



รหัสโครงการ [SUT3-304-50-24-30]

รายงานการวิจัย

**การศึกษาการผลิตแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมัน
สำปะหลังโดยกระบวนการหมัก
Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production from Cassava
by Fermentation process**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รหัสโครงการ [SUT3-304-50-24-30]

รายงานการวิจัย

การศึกษาการผลิตแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมัน
ตำปะหลังโดยกระบวนการหมัก

**Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production from Cassava
by Fermentation process**

คณะวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร กาญจนทวี

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นายอภิชัย สวัสดิ์สิทธิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย จนทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้แล้วเสร็จ สมบูรณ์ด้วยความเรียบร้อย รวมทั้งขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้อนุญาตให้ใช้สถานที่ ตลอดถึงความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัย ท้ายที่สุดขอขอบคุณนายอภิชัย สาวสิทธิ์ (ผู้ช่วยวิจัย) เจ้าหน้าที่และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทุกคนที่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องและให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนทร กาญจนทวี



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การศึกษาการผลิตแอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลัง โดยกระบวนการหมัก

สุนทร กาญจนทวี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ แอซิโตน บิวทานอลและเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 การทดลองได้ทำการศึกษาผลของการควบคุมค่า pH ที่แตกต่างกันในช่วง pH 4.5-6.5 รวมทั้งทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในช่วง 20-80 g/L ตลอดจนศึกษาผลของการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันที่มีต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการทดลองแบบกะที่ไม่มีการควบคุม pH สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด 14.33 g/L ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการผลิตโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด 15.39 g/L นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังก่อนนำไปทำการหมัก ทำให้ได้น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นนั้นไม่ได้มีผลช่วยให้การผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ ขณะที่การย่อยด้วยกรดก่อนนำไปทำการหมัก พบว่าให้ผลผลิตที่น้อยกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ 19.48% ส่วนการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ในช่วงที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) พบว่าที่ pH 5.5 มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด 20.08 g/L นอกจากนี้ยังพบว่า การควบคุมค่า pH ที่สูงกว่า 6.0 ขึ้นไปจะมีการผลิตกรดอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ และมีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และยังพบว่าการควบคุมค่า pH ที่ 5.25 มีการผลิตแอซิโตนสูงสุดถึง 6.78 g/L ทั้งนี้การทดลองที่มีการควบคุม pH ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายอินทรีย์สูงกว่าที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ประมาณ 1.5 เท่า จากผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองในช่วง 20-80 g/L พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 60 g/L มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด คือ 14.33 g/L การใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังที่ต่ำกว่า 30 g/L จะทำให้เกิดการผลิตกรดอินทรีย์มากกว่าการ

ผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ 18.46 g/L ซึ่งใกล้เคียงกันกับการหมักที่ใช้ยีสต์สกัดทางการค้า ซึ่งผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 20.86 g/L

คำสำคัญ: กระบวนการหมักเอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล, น้ำมันปะหลัง, แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*, การผลิตตัวทำละลายอินทรีย์, กระบวนการหมักแบบกะ



Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production from Cassava by Fermentation process

Sunthorn Kanchanatawee

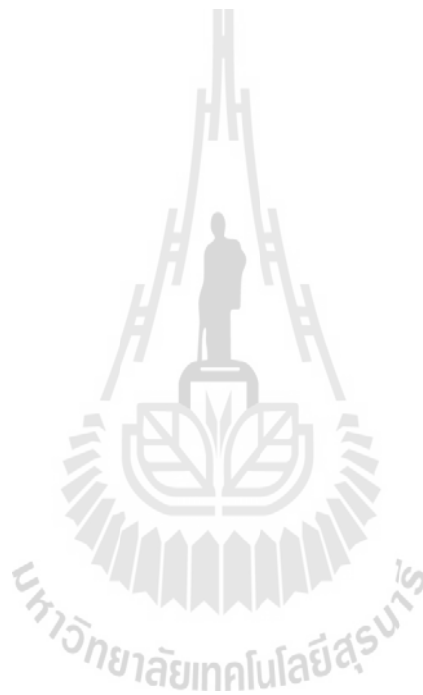
**School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology**

Abstract (ภาษาอังกฤษ)

The main objective of this study was to demonstrate the feasibility of using cassava materials as carbon sources supplemented with spent brewer's yeast extract as a nitrogen source for acetone, butanol and ethanol (ABE) fermentation by *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 in batch culture. The solvents production was performed with different pH controlled strategies (pH 4.5-6.5). The effects of cassava starch concentrations on the solvents production were investigated in the range of 20~80 g/L as well as the effects of different types of carbon sources and nitrogen sources. The results showed that *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 was capable of producing solvents efficiently from cassava materials, comparable to when glucose was used. The batch experiment with uncontrolled pH of cassava starch resulted in 14.33 g/L of total solvents as compared with 15.39 g/L of total solvents when glucose was used. Moreover, it was found that enzymatic pretreatment of the gelatinized cassava starch yielding maltose and glucose prior to the fermentation did not improve solvents production as compared with direct fermentation of the gelatinized starch, while the lower solvents production (19.48%) was observed when cassava materials was hydrolyzed with acid prior to the fermentation. In the experiment with pH controlled during solventogenic phase, the highest total solvents production (20.08 g/L) was obtained with a controlled pH of 5.5. At controlled pH 6.0 or higher, the fermentation produced mainly organic acids with a small amount of solvents. It was also found that the highest acetone production (6.78 g/L) was obtained at controlled pH 5.25. Using the appropriated pH control strategy, the final solvents concentration obtained was almost 1.5 times higher than that obtained under fermentation with uncontrolled pH. Within the range of cassava starch concentration investigated (20-80 g/L), the highest total solvents production (14.33 g/L) was obtained at 60 g/L initial cassava starch concentration. The fermentation performance using initial cassava concentrations lower than 30 g/L

was acidogenic rather than solventogenic. For the effect of various nitrogen sources, it revealed that the fermentation performance using spent brewer's yeast extract as a nitrogen source resulted in 18.46 g/L solvents production, comparable to that obtained in fermentation using commercial yeast extract (20.86 g/L).

Keyword: Acetone-Butanol-Ethanol fermentation, Cassava materials, *Clostridium acetobutylicum*, Solventogenesis, Batch fermentation



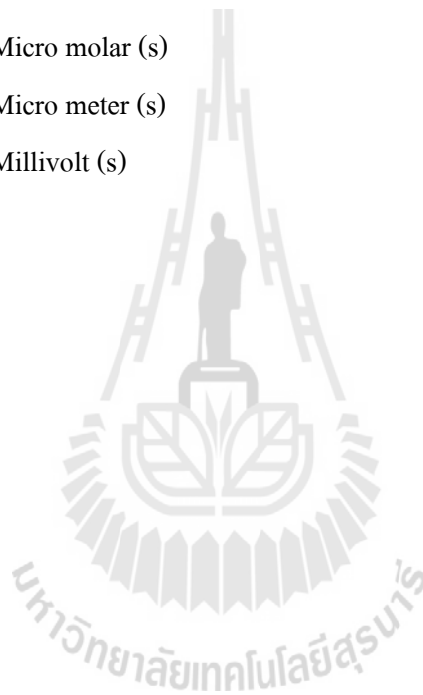


คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

ABE	=	Acetone-Butanol-Ethanol
ATP	=	Adenosine 5'-tri-phosphate
BYE	=	Spent brewer's yeast extract
BTU	=	British thermal unit
CYE	=	Commercial yeast extract
CoA	=	Coenzyme A
°C	=	Degree Celsius
K	=	Degree Kelvin
g	=	Gram (s)
g/L	=	Gram (s) per Liter
g/mL	=	Gram (s) per milliliter
h	=	Hour (s)
L	=	Liter (s)
M	=	Molar
mg	=	Milligram (s)
mg/L	=	Milligram (s) per liter
mg/mL	=	Milligram (s) per milliliter
min	=	Minute (s)
mL	=	Milliliter (s)
mm	=	Millimeter (s)
mmHg	=	<u>Millimeter (s) of mercury</u>
MW	=	Molecular weight
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized form)
NADH	=	Reduced form of Nicotinamide adenine dinucleotide
OD ₆₀₀	=	Optical density at 600 nm
Pa	=	Pascal
rpm	=	Revolutions per minute
RVP	=	Reid vapor pressure
STP	=	Standard Temperature and Pressure

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

μL	=	Micro liter (s)
% (w/v)	=	Percentage weight by volume
% (v/v)	=	Percentage volume by volume
SEM	=	Scanning Electron Microscope
DAPI	=	4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
PI	=	Propidium iodide
nm	=	Nanometer
μM	=	Micro molar (s)
μm	=	Micro meter (s)
mV	=	Millivolt (s)



สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย.....	ฉ
สารบัญเรื่อง	๗
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิด	3
2 การทบทวนวรรณกรรม	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล	4
2.2 บิวทานอลในแง่ของการเป็นสารเชื้อเพลิง	4
2.3 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้	5
2.4 การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี	7
2.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก	8
2.6 กระบวนการผลิตตัวทำละลาย แอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) ด้วยกระบวนการหมัก	9
2.6.1 ประวัติและที่มาของกระบวนการเอบีอี.....	9
2.6.2 จุลลินทรีย์	9
2.6.3 รูปแบบของกระบวนการหมัก.....	11
2.7 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก	12
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก	15
2.8.1 แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น	15

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.8.2 อุณหภูมิ	16
2.8.3 ออกซิเจน	16
2.8.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และผลิตภัณฑ์กรดในขั้นตอนสุดท้าย	16
2.9 การใช้วัตถุดิบประเภทแป้งในกระบวนการหมักแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	17
3 วัสดุที่ใช้ในการวิจัยและวิธีดำเนินการวิจัย	21
3.1 วัสดุที่ใช้ในการวิจัย	21
3.1.1 มันสำปะหลัง	21
3.1.2 สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์	21
3.1.3 แบคทีเรีย	22
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	22
3.1.5 สารเคมีที่ใช้	23
3.1.6 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	24
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	24
3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง	25
3.2.2 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์	25
3.2.2.1 แป้งมัน (Cassava starch) และมันเส้น (Cassava chip)	25
3.2.2.2 กากมัน (Cassava pulp)	25
3.2.3 การเตรียมมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยกรด	25
3.2.4 การเตรียมสปอร์ของแบคทีเรีย Clostridia และการเก็บรักษา	26
3.2.5 การเตรียมกล้าเชื้อ (Inoculum preparation)	27
3.2.6 สภาพของกระบวนการหมัก	28
3.2.6.1 การหมักในขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 250-mL	28
3.2.6.2 การหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L	29
3.3 วิธีการวิเคราะห์ผลการวิจัย	31
3.3.1 การหาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย	31
3.3.2 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	31
3.3.3 การย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI และ PI	32

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก	32
3.3.5 การวิเคราะห์ทางจุลนศาสตร์	33
4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการวิจัย	34
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง	34
4.2 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดเจือจาง.....	35
4.3 ผลของการควบคุมค่า pH ในระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ต่อการสร้างตัวทำละลายเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	36
4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตตัวทำละลาย อินทรีย์	44
4.5 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์	50
4.6 อิทธิพลของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ต่อการผลิต ตัวทำละลายอินทรีย์	51
5 บทสรุป	57
5.1 สรุปผลการวิจัย	57
5.2 ข้อเสนอแนะ	58
5.3 อุปสรรค	59
บรรณานุกรม	60
ภาคผนวก	66
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	68
ประวัติผู้วิจัย	73
ประวัติผู้ร่วมวิจัย	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล6
2.2	สรุปการผลิตสารตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย <i>Clostridium</i> spp. โดยใช้วัตถุดิบ จากแป้งในกระบวนการหมักแบบกะ20
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง.....35
4.2	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugars) ของตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย ด้วยกรดและเอนไซม์.....36
4.3	ประสิทธิภาพของการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L ของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462 ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมค่า pH ที่แตกต่างกัน ในระหว่างการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)41
4.4	ประสิทธิภาพการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 146246
4.5	ประสิทธิภาพการหมักโดยใช้วัตถุดิบมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 146253
4.6	ความสามารถของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> spp. ในการใช้วัตถุดิบ ประเภทต่างๆ เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์56

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	วิธีการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี8
2.2	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน (SEM)10
2.3	วงจรชีวิตของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> sp.11
2.4	วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i>14
3.1	รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า.....27
3.2	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462 ที่ได้จากการ Pour plate ของสารละลายสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการบ่มที่ 35 °C นาน 24 ชั่วโมง27
3.3	การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากสารละลายสปอร์28
3.4	การหมักด้วยขวดทดลองขนาด 250-mL29
3.5	การหมักด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L สำหรับการทดลอง ที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก30
4.1	รูปแบบวิถีกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462; น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ 50 g/L37
4.2	การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในขณะที่หมักด้วยน้ำตาลกลูโคส 50 g/L ที่ย้อมด้วย 1 mg/mL ของ DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) และ PI (Propidium iodide) ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ชนิด Fluorescent microscope ซึ่งเซลล์สีแดงที่เห็นแสดงถึงเซลล์ ที่ตายแล้ว โดยติดสีแดงของ PI และเซลล์สีน้ำเงินแสดงถึงเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งติดสีน้ำเงินของ DAPI38
4.3	วิธีการหมักของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462 ที่ใช้ น้ำตาลกลูโคส 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.4	
การเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิต	
ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i>	
TISTR 1462 ที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักแตกต่างกันในกระบวนการหมัก	
แบบกะ	43
4.5	
วิธีการหมักของแป้งมันสำปะหลัง (Gelatinized cassava starch) ความเข้มข้น	
60 g/L ที่ยังไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462	45
4.6	
การเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิต	
ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i>	
TISTR 1462 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งอาหารหลัก	
ในกระบวนการหมักแบบกะ	50
4.7	
การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์	
ในกระบวนการหมักแบบกะของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462	
ที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5	51
1ข	
ความสัมพันธ์ระหว่าง Optical density (OD) และน้ำหนักเซลล์แห้ง	
(dry cell weight) ของแบคทีเรีย <i>Cl. acetobutylicum</i> TISTR 1462	68
2ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากเครื่อง HPLC	68
3ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากเครื่อง HPLC	69
4ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของกรดบิวทริกที่ได้จากเครื่อง HPLC	69
5ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของกรดอะซิติกที่ได้จากเครื่อง HPLC	70
6ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS	70
7ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของบิวทานอลที่ได้จากเครื่อง GC.....	71
8ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของเอทานอลที่ได้จากเครื่อง GC.....	71
9ข	
กราฟสารละลายมาตรฐานของแอซิโตนที่ได้จากเครื่อง GC.....	72

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในรอบปีที่ผ่านมาราคาน้ำมันดิบพุ่งสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประกอบกับในปัจจุบันผู้คนให้ความสนใจเกี่ยวกับภาวะโลกร้อนมากขึ้น ส่งผลให้เกิดความพยายามที่จะนำไปสู่การผลิตพลังงานชีวภาพจากแหล่งวัตถุดิบเหลือใช้เพิ่มมากขึ้นด้วย (Ezeji *et al.*, 2005; Qureshi *et al.*, 2008) ทั้งนี้เอทานอล ซึ่งเป็นพลังงานชีวภาพดั้งเดิมมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นสูง และมีความหนาแน่นของพลังงานต่ำ (Low density energy) จึงเพิ่มความยุ่งยากในการนำไปใช้ รวมถึงค่าการเก็บรักษาและการขนส่งที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับบิวทานอล บิวทานอลมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นและการระเหยที่ต่ำ รวมทั้งยังมีค่าความหนาแน่นของพลังงาน (Density energy) ที่ใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนด้วย (Lee *et al.*, 2008a) นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกและอุตสาหกรรมผลิตกลีเซอรอลได้อีกด้วย (Campos *et al.*, 2002) ดังนั้นในปัจจุบันนี้นักวิจัยส่วนใหญ่จึงหันมาให้ความสนใจกับการศึกษากระบวนการผลิตบิวทานอลมากขึ้น

บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียในกลุ่ม Clostridia จากกระบวนการเอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งประกอบด้วยแอสिटอน บิวทานอล และเอทานอล ทั้งนี้ Clostridium sp. ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่สามารถสร้างสปอร์ และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยสภาพธรรมชาติแล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้มีวิถีในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (แอสिटอน บิวทานอล และเอทานอล) แบคทีเรีย Clostridium sp. ได้ถูกจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ เป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตบิวทานอล แต่แบคทีเรีย Clostridium acetobutylicum เป็นสายพันธุ์เดียวที่นิยมนำไปใช้ในกระบวนการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Jones and Woods, 1986) ซึ่งบิวทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล (Molasses), สารชีวมวลทางการเกษตร (Agricultural biomass), Wood hydrolysate และวัตถุดิบประเภทที่ให้แป้ง (Starchy material) (ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวไรย์ และมันสำปะหลัง) ของเสียจากอุตสาหกรรมนม (Dairy industry waste) เป็นต้น (Campos *et al.*, 2002) ปัญหาที่มักจะส่งผลกระทบต่อในเชิงเศรษฐศาสตร์ของกระบวนการผลิตบิวทานอล ได้แก่ ต้นทุนของวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิต ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เทคนิคในการเก็บเกี่ยวผลผลิต การเกิดผลผลิตอื่นๆ (By products) ในระหว่างการหมักบิวทานอล ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตได้ และความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย เป็นต้น (Qureshi *et al.*, 2001) ทั้งนี้มีรายงานว่าข้อจำกัดหลักทางด้านเศรษฐศาสตร์ในกระบวนการผลิตแอสिटอน บิวทานอล และเอทานอล คือ ต้นทุนของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ซึ่งคิด

เป็นร้อยละ 60-70 ของต้นทุนทั้งหมด (Madihah *et al.*, 2001a; Madihah *et al.*, 2001b) ดังนั้นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายและราคาถูกจึงเป็นสิ่งจำเป็นในกระบวนการผลิตเพื่อให้สามารถลดต้นทุนการผลิตให้มากที่สุด ทั้งนี้วัตถุดิบที่มีอยู่จำนวนมากและราคาถูกที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิตสารอินทรีย์คือวัตถุดิบประเภทแป้ง ซึ่งในประเทศไทยเอง มันสำปะหลังถือได้ว่าเป็นอีกหนึ่งวัตถุดิบทางเลือกเนื่องจากมีราคาถูกและมีอยู่มากภายในประเทศ นอกจากนี้มันสำปะหลังยังเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจในการที่จะนำไปผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งในด้านเศรษฐศาสตร์และภูมิศาสตร์อีกด้วย กล่าวคือ มันสำปะหลังที่โตเต็มที่จะให้ปริมาณแป้งที่สูงมากเมื่อเทียบกับพืชที่ให้แป้งชนิดอื่นๆ นอกจากนี้มันสำปะหลังยังสามารถเจริญเติบโตในดินที่มีแร่ธาตุอาหารต่ำและแห้งแล้งได้ (Yu and Toa, 2009) ดังนั้นมันสำปะหลังจึงเหมาะที่จะใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ อย่างเช่นบิวทานอล เป็นต้น

ในกระบวนการหมักแอสซิโตน บิวทานอล และเอทานอล แบคทีเรียจำเป็นต้องใช้สารอาหารที่ซับซ้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน มีรายงานว่า แหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย คือแหล่งที่ได้มาจากสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) (Madihah *et al.*, 2001b) อย่างไรก็ตามสารสกัดจากยีสต์เป็นวัตถุดิบที่มีราคาสูง ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่ทำนายในการพัฒนาวิธีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอสซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) เพื่อลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัตถุดิบที่เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูก อย่างเช่น สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast extract) ที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของแบคทีเรียมากมาย มาทดแทนการใช้วัตถุดิบราคาแพงดังกล่าว ฉะนั้นเมื่อพิจารณาความเป็นไปได้แล้ว ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้นั้นเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) ที่มีราคาแพง ในการผลิตแอสซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

คุณสมบัติทางกายภาพและวิธีการสังเคราะห์สารอินทรีย์ของจุลินทรีย์สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ และมีความสัมพันธ์อย่างมากต่อระดับของกรดบิวทีริกที่รูปที่ไม่แตกตัวที่อยู่ในน้ำหมัก (Dissociated butyric acid) และรูปที่แตกแตกตัวได้ (Dissociated butyrate) ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. (Monot *et al.*, 1984) ทั้งนี้การศึกษาวีธีการควบคุมค่า pH เพื่อกระตุ้นการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวด้วย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นไปที่ การใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ที่มีกรควบคุมค่า pH เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ตลอดจนหาส่วนผสมที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทดแทนวัตถุดิบที่มี

ราคาแพง เช่น สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า ด้วยใช้วัตถุดิบที่ต้นทุนต่ำกว่าและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล) ในกระบวนการหมักแบบกะ ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 โดยใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลัง ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน

2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการหมักแบบกะ ที่ใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังแต่ละชนิดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการหมักแบบกะ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษารั้งนี้จะศึกษาการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล) ในขนาดห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) โดยใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังที่เสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในกระบวนการหมักแบบกะ เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลและตัวแปรต่างๆ ตลอดจนนำมาวิเคราะห์และใช้เป็นต้นแบบเพื่อนำไปสู่การคำนวณขยายขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้นระดับโรงงานต้นแบบต่อไป

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิด

มีความเป็นไปได้หากมีการศึกษาการนำเอามันสำปะหลัง มาใช้เป็นแหล่งสารอาหาร (Substrate) ทั้งในรูปของแป้งมัน กากมันและ มันเส้น เมื่อศึกษาพฤติกรรมการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvents) โดยจุลินทรีย์ *Clostridium* sp. เพื่อลดต้นทุนต่อหน่วยของการผลิตบิวทานอล โดยอาจนำการศึกษาควบคู่การเปรียบเทียบการใช้ สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) กับสารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast extract) ก็จะเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมลงได้อีก เท่ากับเป็นการเพิ่มศักยภาพของการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมให้มีความเป็นไปได้มากยิ่งขึ้น

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล

บิวทานอล (1-butanol) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อของ Butyl alcohol, n-butanol หรือ Methylolpropane เป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล C_4H_9OH มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 74.12 g/mol บิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ไร้ไฟ ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัว ซึ่งคล้ายๆ กลิ่นของกล้วย แต่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามบิวทานอลสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอลก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ ทั้งนี้อาจก่อให้เกิดการเสพยาติได้เมื่อสูดดมที่ความเข้มข้นสูงๆ บิวทานอลสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี แต่ละลายในน้ำได้ค่อนข้างต่ำ (Lee *et al.*, 2008; Durre, 2008) นอกจากนี้ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์ เช่นเดียวกับบิวทานอลได้แก่ เมทานอล (1 คาร์บอน) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (Kristin, 2007) ตารางที่ 2.1 สรุปคุณลักษณะของบิวทานอลเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ

2.2 บิวทานอลในแง่ของการเป็นสารเชื้อเพลิง

จุดเด่นหนึ่งของบิวทานอลที่ผลิตได้ทางชีวภาพที่เหนือกว่าเอทานอล คือสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรง ในขณะที่เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Hansen *et al.*, 2005; Niven, 2005) ทั้งนี้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการตัดแปลงใดๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมี รวมทั้งให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอลอย่างมาก (Huber *et al.*, 2006) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างบิวทานอลกับเอทานอล ตามตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าบิวทานอลมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธิ์ ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนต้องใช้ปริมาณมากกว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่เท่ากัน นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนได้ในอัตราส่วนต่างๆ ได้ (Lee *et al.*, 2008b) ในทางตรงกันข้ามเอทานอลสามารถนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้บางส่วนเท่านั้น เช่น ในประเทศบราซิลได้มีการใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนแค่ 23% นอกจากนี้ในแถบทวีปยุโรปบางประเทศ รวมทั้งประเทศสหรัฐอเมริกา จะใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนเพียง 10% เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์โดยไม่ต้องมีการตัดแปลงเครื่องยนต์ และไม่ส่งผลใดๆ ต่อเครื่องยนต์เลย รวมทั้งให้สมรรถนะในการขับเคลื่อนเช่นเดียวกับการใช้แก๊สโซลีนอีกด้วย นอกจากนี้การเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนผสม พบว่าไอเสียที่ออกมาปลอดจากแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์

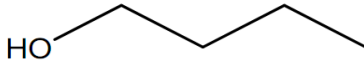
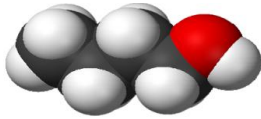
ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไนโตรสออกไซด์ที่เป็นพิษ ซึ่งเป็นมิตรอย่างมากต่อสภาพแวดล้อม เมื่อเทียบกับการใช้เอทานอล

คุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล ได้แก่ บิวทานอลระเหยกลายเป็นไอได้ต่ำกว่า โดยมีค่า Reid value ต่ำกว่าเอทานอลถึง 7 เท่า และบิวทานอลยังมีความสามารถในการกักกร่อนต่ำ จึงทำให้ปลอดภัยต่อการขนส่งลำเลียง ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลมีความดันไอต่ำ มีค่าออกเทนที่สูงจึงสามารถนำไปผสมเข้ากับแก๊สโซลีนและน้ำมันดีเซลได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุดังกล่าวนี้จึงทำให้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงที่มีความปลอดภัยสูง และสามารถส่งลำเลียงด้วยระบบท่อไปยังสถานีจ่ายได้ (Lee *et al.*, 2008a) ในขณะที่เอทานอลไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้ เนื่องจากมีค่าความดันไอสูง นอกจากนี้บิวทานอลยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่สามารถผสมเข้ากับแก๊สโซลีนได้ดีกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามบิวทานอลมีความหนืดเป็น 2 เท่าของเอทานอล และประมาณ 5-7 เท่า ของแก๊สโซลีน (Wackett, 2008) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอล เช่น ความหนาแน่น และความจุความร้อน มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับเอทานอลดังแสดงในตารางที่ 2.1

2.3 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) สารยึดเกาะ (Adhesives) วัสดุสิ่งทอ (Textile) วัสดุเส้นใย (Fiber) และพลาสติก เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น ทั้งนี้บิวทานอลและสารอนุพันธ์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีเยี่ยมในอุตสาหกรรมสีทา อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมการขึ้นรูป รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย นอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้ว บิวทานอลยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมกลีนิรสีได้อีกด้วย (Lee *et al.*, 2008b; Durre, 2008)

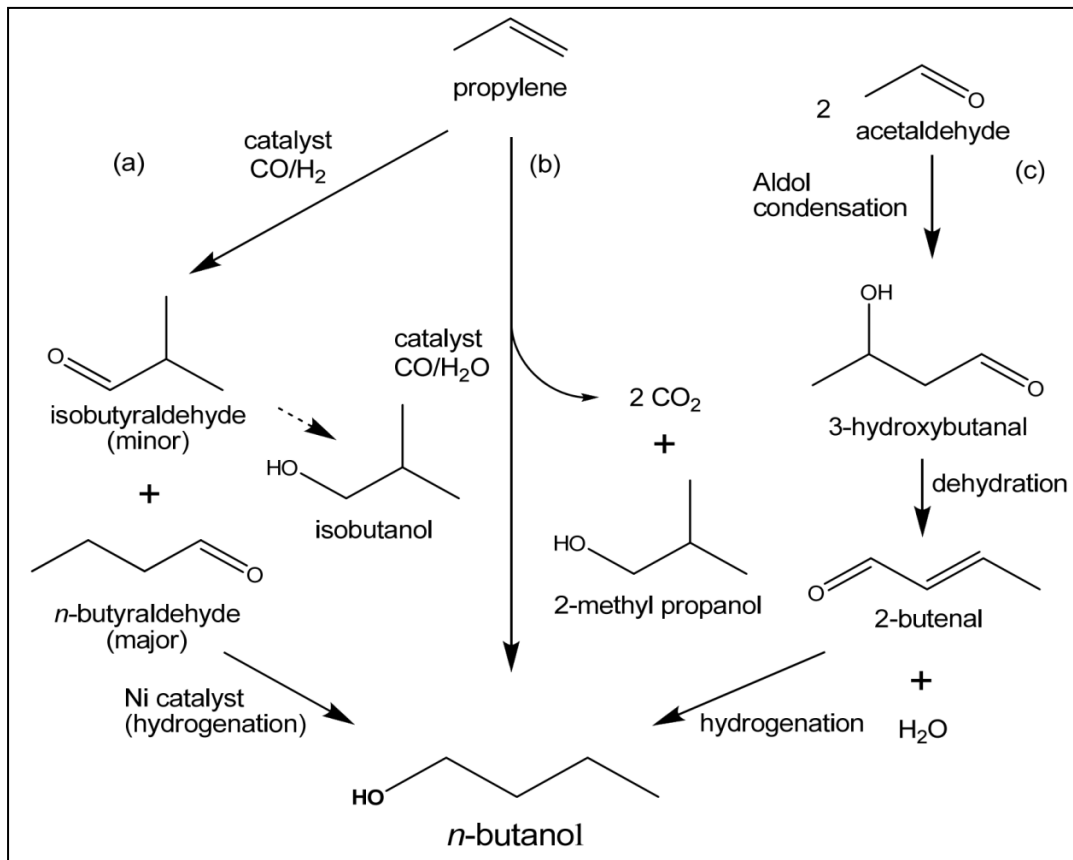
ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล (ดัดแปลงจาก Devis and Morton III, 2008 และ Lee *et al.*, 2008a)

Properties	Butanol	Chemical Structure		
Melting point (°C)	- 89.3	 1-butanol		
Specific gravity	0.810-0.812			
Ignition temperature (°C)	35-37			
Auto-ignition temperature (°C)	343-345			
Flash point (°C)	25-29			
Relative density (water: 1.0)	0.81			
Critical pressure (hPa)	48.4			
Critical temperature (°C)	287			
Explosive limits (vol. % in air)	1.4-11.3			
Water solubility 9.0 mL/100 mL	(7.7 g/100 mL at 20°C)			
Relative vapor density (air: 1.0)	2.6			
Vapor pressure (kPa at 20°C)	0.58			
	Butanol	Gasoline	Ethanol	Methanol
Boiling point (°C)	117-118	27-221	78	64.7
Density at 20°C (g/mL)	0.8098	0.7-0.8	0.7851	0.7866
Solubility in 100 g of water	immiscible	immiscible	miscible	miscible
Energy density (MJ.l ⁻¹)	27-29.2	32	19.6	16
Energy content/value (BTU/gal)	110000	115000	84000	76000
Air-fuel ratio	11.2	14.6	9	6.5
Heat of vaporization (MJ/kg)	0.43	0.36	0.92	1.2
Liquid Heat capacity (Cp) at STP (kJ/k-mol.°K)	178	160-300	112.3	81.14
Research octane number	96	91-99	129	136
Motor octane number	78	81-89	102	104
Octanol/Water Partition Coefficient (as logP _{o/w}) ^a	0.88	3.52±0.62	-0.31	-0.77
Dipole moment (polarity)	1.66	n.a.	1.7	1.6
Viscosity (10 ⁻³ Pa.s)	2.593	0.24-0.32	1.078	0.5445

^aLog P is a measure of hydrophobicity (lipophilicity) and is similar to polarity. These published values were obtained from Hansch *et al.* (1995) for the three alcohols. In gasoline the Log P was roughly estimated as the average weight of main representative components.

2.4 การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี

บิวทานอลที่ถูกผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรมนั้น ส่วนใหญ่จะผลิตจากกระบวนการทางเคมี 3 กระบวนการ ได้แก่ Oxo process, Reppe process และ Crotonaldehyde hydrogenation (ภาพที่ 2.1) ในการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Oxo (Hydroformylation) นั้นต้องมีการเติม Carbon monoxide และ Hydrogen เพื่อเข้าไปแทนที่หมู่ Hydrocarbonyl อย่างต่อเนื่อง โดยมีโลหะจำพวก Co, Rh, หรือ Ru เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง Aldehyde ที่เกิดขึ้นในระยะแรก จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นบิวทานอลในกระบวนการ hydrogenation ต่อไป ทั้งนี้ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความดัน อุณหภูมิ และชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย โดยบิวทานอลที่ได้จากปฏิกิริยานี้จะได้ Isomer ที่แตกต่างกันหลายชนิด ส่วนการสังเคราะห์บิวทานอลผ่านกระบวนการ Reppe จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันของ Propylene, Carbon monoxide และน้ำ ในขณะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมอยู่ด้วย (Bochman *et al.*, 1999) ซึ่งจะทำให้เกิดของผสมของ n-butaraldehyde และ Isobutaraldehyde ต่อมาจะถูกกลรูปให้เปลี่ยนเป็นบิวทานอล (Wackett, 2008) การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Reppe นี้จะทำให้ได้บิวทานอลโดยตรงไม่ผ่านตัวกลาง ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิและความดันต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีนี้ไม่สามารถผลิตได้ในเชิงการค้า เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีที่ทันสมัยซึ่งมีราคาแพง จนกระทั่งเมื่อสิบปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตบิวทานอลจาก Acetaldehyde ผ่านกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation ที่ประกอบไปด้วยขั้นตอน Aldol condensation, Dehydration และ Hydrogenation (Bochman *et al.*, 1999) แม้ว่าจะยังคงมีการใช้วิธีนี้ในการผลิตบิวทานอลไม่มากนัก แต่ในอนาคตอันใกล้นี้ การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation นี้อาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญก็ได้ เนื่องจาก Crotonaldehyde สามารถผลิตได้จากเอทานอล โดยกระบวนการ Dehydrogenation ทั้งนี้ เอทานอลสามารถผลิตได้จากสารชีวมวลโดยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งการผลิตบิวทานอลโดยการสังเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีอื่นๆ ต้องอาศัยวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นที่มาจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม ซึ่งนับวันยิ่งจะหายากและลดน้อยลง เป็นต้น



ภาพที่ 2.1 วิธีการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี (a) Oxo synthesis, (b) Reppe process, และ (c) Crotonaldehyde hydrogenation (ดัดแปลงจาก Lee *et al.*, 2008a และ Wackett, 2008)

2.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า เอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคทีเรียในการผลิตเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากสารชีวมวล ทั้งนี้เอบีอีเป็นกระบวนการที่รู้จักกันดี และเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตเอซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ผลผลิตเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการผลิต โดยเฉพาะ *Cl. acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด รวมทั้งสายพันธุ์ *Cl. beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน

2.6 กระบวนการผลิตตัวทำละลาย แอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) ด้วยกระบวนการหมัก

2.6.1 ประวัติและที่มาของกระบวนการเอบีอี

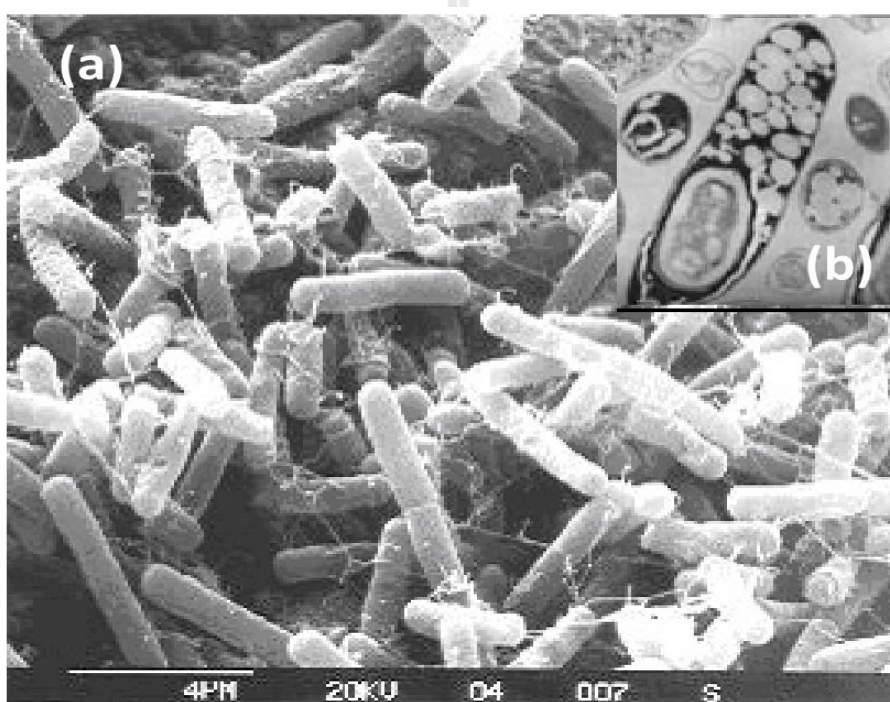
การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดยหลุยส์ พาสเตอร์ (Jones and Woods, 1986) ต่อมา Schardinger ได้ค้นพบแอซิโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์ พาสเตอร์ในปี ค.ศ. 1905 กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อันได้แก่ แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องมาจากปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบีตาไดอิน ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตยางสังเคราะห์ ส่วนแอซิโตนนั้นมีความสำคัญในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตตัวถูกระเบิดในสงครามโลกครั้งที่ 1 ภายหลังจากสงครามยุติ ความต้องการแอซิโตนจึงลดน้อยลง แต่กลับมีความต้องการแอซิโตนมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์และอุตสาหกรรมสีทา (Jones and Woods, 1986)

ความสำคัญของกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าว โดยกระบวนการหมักเริ่มลดลงภายหลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่กลับมาเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นในปี ค.ศ. 1973 และปี ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวก็ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างสูงอยู่เมื่อเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Jones and Woods, 1986)

2.6.2 จุลินทรีย์

แบคทีเรีย Clostridia เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ และเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน และมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ ทั้งนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (Exotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น *Cl. tetanus* sp., *Cl. botulum* sp. เป็นต้น อย่างไรก็ตามในช่วงศตวรรษที่ 20 แบคทีเรีย Clostridia ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Cl. acetobutylicum* sp. และ *Cl. beijerinckii* sp. ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยกระบวนการ ABE fermentation โดยในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและแอซิโตน แต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิต แอซิโตนและเอทานอลเป็นผลผลิตหลัก ต่อมาแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้ ถูกนำไปพัฒนาเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตตัวทำละลายบิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล จากแป้ง และน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (Pentose) ได้ในอัตราส่วน 6:3:1 ตามลำดับ (Qureshi, 2001; Lee et al., 2008a)

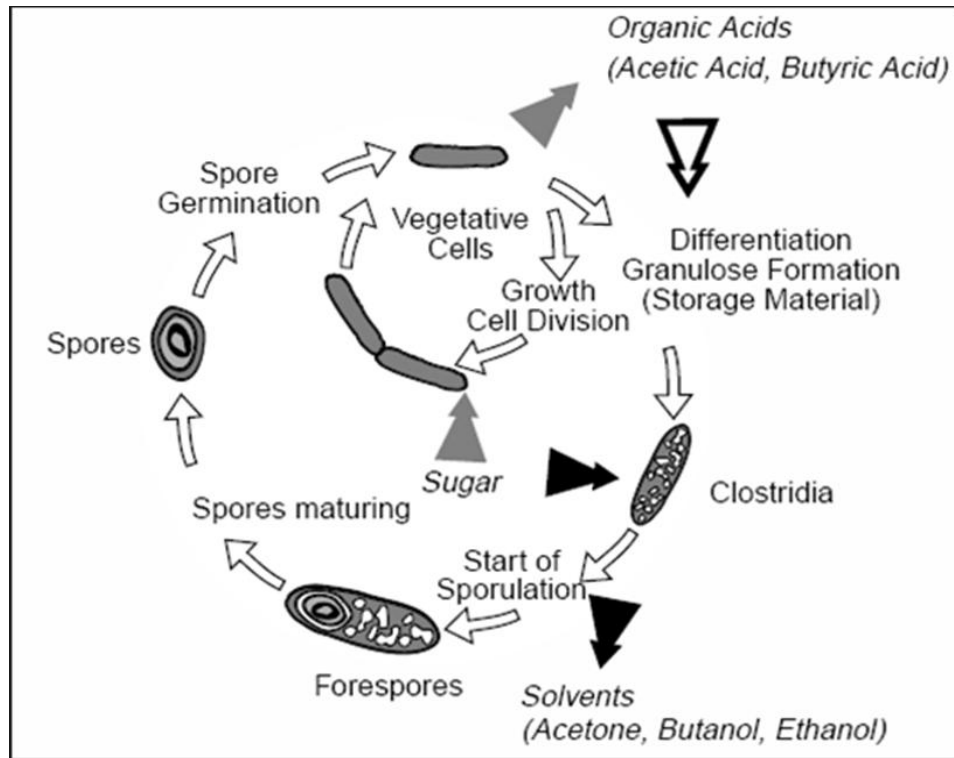
Cl. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Obligate anaerobic bacteria) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rods shape) (ภาพที่ 2.2b) ขนาด $0.6 - 0.9 \times 2.4-4.7 \mu\text{m}$ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบๆ เซลล์ (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งของเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (Subterminal) ดังภาพที่ 2.2b ไม่มีเอกโซสปอเรียม (Exosporium) ไม่มีริยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (Circular) ขอบไม่เรียบ (Irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $3-5 \mu\text{m}$ สีของโคโลนีเป็นสีครีมผิวเป็นมัน และโปร่งแสง



ภาพที่ 2.2 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) a) เซลล์ปกติ (Vegetative cells); b) สปอร์ (Spore formed cells) (ที่มา: Jones *et al.*, 1982)

วงจรชีวิตและการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่ต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังภาพที่ 2.3 ได้แก่ (1) การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rods-shaped) ซึ่งอาจจะพบในลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกันเป็นสายโซ่ยาวก็ได้ (2) รูปร่างแบบคลอสตริเดียม (Clostridia) เซลล์จะมีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ

(Cigar-shape) การเจริญในขั้นนี้เซลล์จะมีการสร้างสารพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการพองขึ้น (3) Forespores จะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้าง Forespores และจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป (4) รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อไปได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Schuster *et al.*, 1998)



ภาพที่ 2.3 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. (ที่มา: Schuster *et al.*, 1998)

2.6.3 รูปแบบของกระบวนการหมัก

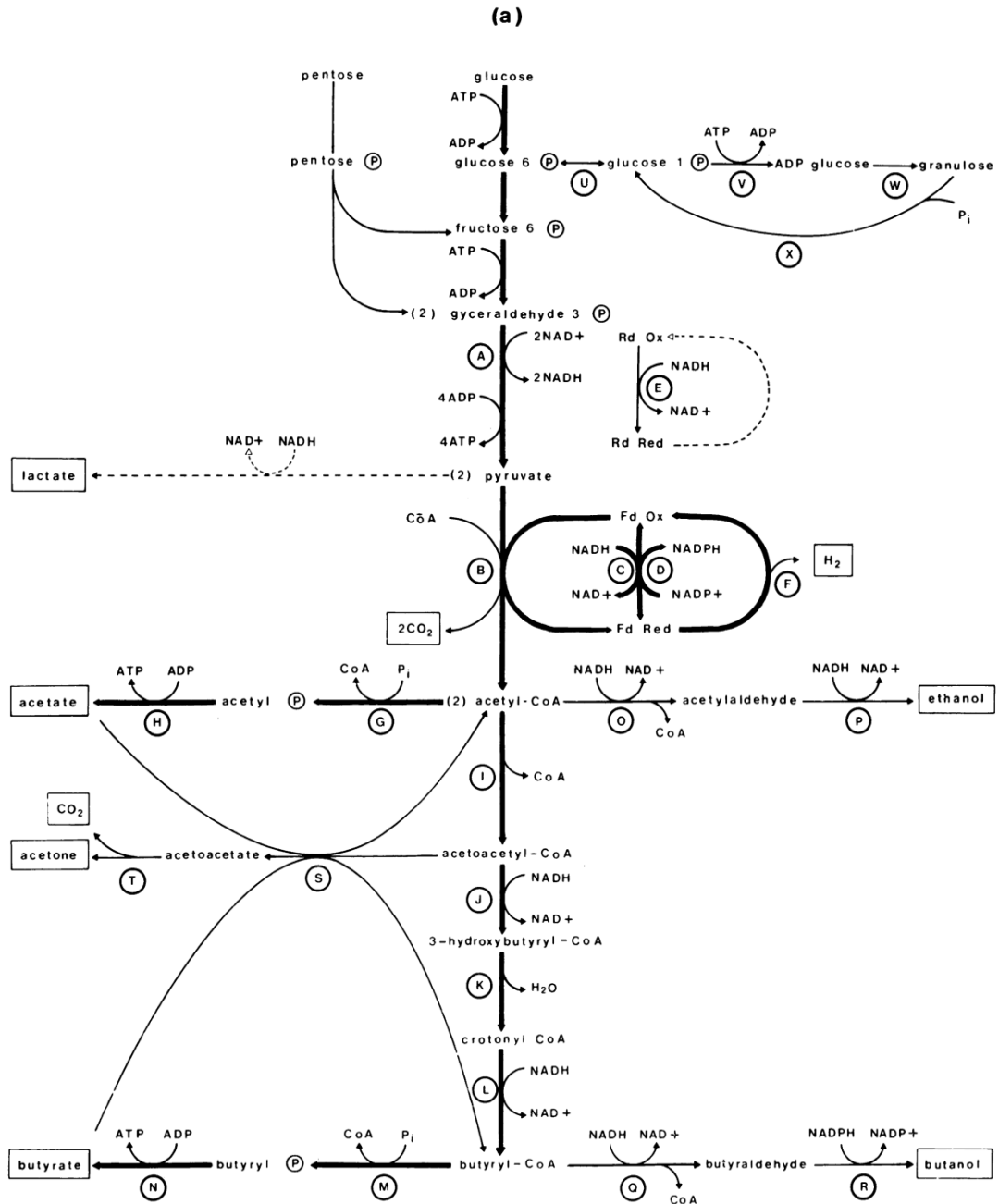
รูปแบบกระบวนการหมักแบบกะโดยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ได้ถูกบันทึกไว้ในหลายๆ ตำรา และเผยแพร่จนเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ระยะที่แตกต่างกัน โดยสอดคล้องกันกับกลไกการสร้างผลิตภัณฑ์ 2 ลักษณะด้วย (Jones and Woods, 1986; Schuster *et al.*, 1998; Badr *et al.*, 2001) กล่าวคือ ในระยะแรก จะมีการผลิตกรดอินทรีย์ อันได้แก่ กรดบิวทิริก และกรดอะซิติกในช่วง 7-18 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นเหตุให้ค่า pH ในน้ำหมักลดลง ช่วงนี้นิยมเรียกว่า ช่วงของการผลิตกรดอินทรีย์ หรือ Acidogenesis หลังจากนั้นระยะที่สอง ซึ่งเป็นช่วงของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อันได้แก่ แอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งปกติจะเกิดขึ้นภายหลังจากเริ่มการ

หมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง ในช่วงนี้ค่า pH ของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจะมีการนำกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในช่วงแรกมาใช้เป็นบางส่วน ระยะที่สองนี้นิยมเรียกว่าระยะของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์หรือ Solventogenesis นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมัก ยังมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ออกมาตลอดกระบวนการด้วย

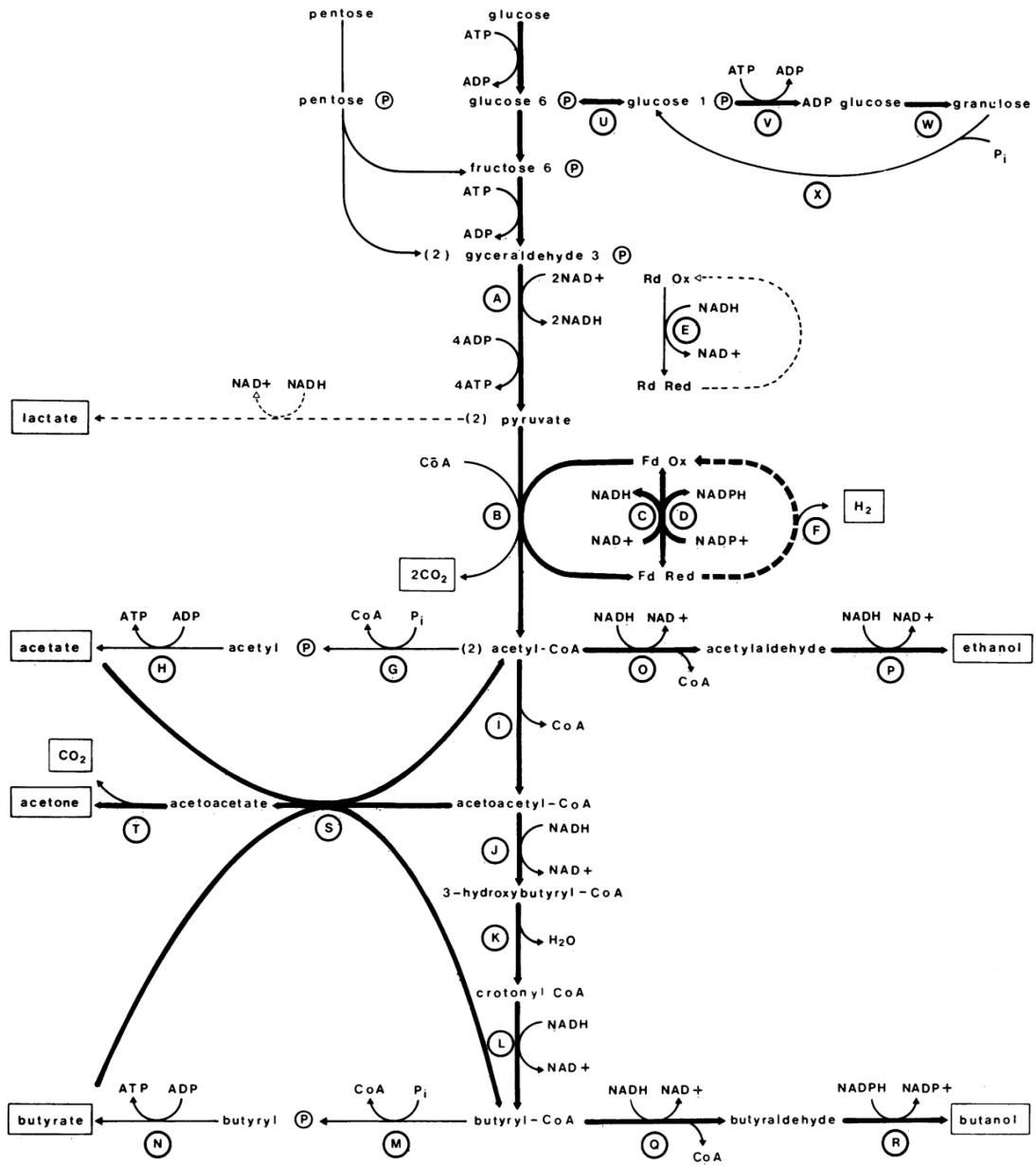
2.7 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)

รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ดังได้กล่าวไปแล้วนั้น วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต ให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วยดังแสดงในภาพที่ 2.4a และ 2.4b ทั้งนี้น้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ $\text{NADH} + \text{H}^+$ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce ferredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นของการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก โดยจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นเอซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่กลับไม่ได้ (Jones and Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตเอซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูก

เปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ $\text{NADH} + \text{H}^+$ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD^+ ด้วย



(b)



ภาพที่ 2.4 วิธีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* (a) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนา เกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) (b) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) (ที่มา; Jones and Woods, 1986)

เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษร: (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH-ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate

acetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (i) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase); (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase.

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพจากการผลิตกรดอินทรีย์ไปเป็นการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ มีความยุ่งยากซับซ้อน ได้มีการทำการศึกษาค้นคว้ามากมายเพื่อที่จะเข้าใจถึงสาเหตุของปัจจัย ที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ทั้งในกระบวนการหมักแบบกะ (Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) โดยมุ่งหวังที่จะค้นหาสาเหตุของปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ และรักษาภาวะดังกล่าวไว้ให้ยาวนานที่สุดเท่าที่จะทำได้ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนระยะดังกล่าวก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Lee *et al.*, 2008b) ถึงแม้ว่าการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวจะนำมาซึ่งข้อมูลใหม่ๆ ที่มีคุณค่า แต่ก็เป็นที่เข้าใจว่าไม่มีปัจจัยเฉพาะปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์

2.8.1. แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น

ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเป็นสิ่งสำคัญในการหมักเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลต่ำ (ต่ำกว่า 20 g/L) การหมักจะมุ่งไปสู่ Acidogenesis phase โดยจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อย (Lee *et al.*, 2008b) อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นสูงๆ (สูงกว่า 60 g/L) กระบวนการจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่า (Madihah *et al.*, 2001a) และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 80 g/L น้ำตาลจะไม่ถูกหมักซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (Product inhibition) ขณะที่ความเข้มข้นสูงถึง 120 g/L กิจกรรมการหมักจะเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อย (Qadeer *et al.*, 1980) ซึ่งอาจเป็นเพราะการยับยั้งของวัตถุดิบ (Substrate inhibition)

กลไกการส่งผ่านน้ำตาลยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน อย่างไรก็ตามเชื่อกันว่าระบบ Phosphotransferase ทำให้เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส (Lee *et al.*, 2008b) และดูเหมือนว่าการใช้วัตถุดิบอย่างอื่นของ *Cl. acetobutylicum* ที่เกิดขึ้นโดย Symport mechanism จะเกิดขึ้นโดยการส่งผ่าน Proton ผ่าน Membrane สำหรับน้ำตาล Disaccharide เช่น น้ำตาลซูโคส และ

น้ำตาลมอลโตส จะถูกย่อยโดย Phosphorylase และ Free glucose ที่ได้สามารถเปลี่ยนไปเป็น Glucose-6-phosphate โดย Hexokinase (Jones and Woods, 1986)

2.8.2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการหมักมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างยิ่ง ซึ่งอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมักโดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบนั้น จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 30°C และ 33°C แต่จะลดลงที่อุณหภูมิ 37°C (Jones and Woods, 1986) ผลที่คล้ายกันนี้ถูกพบในการหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) โดย Mcneil และ Kristiansen (1985) เมื่อทำการทดลอง Mcneil และ Kristiansen พบว่าผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญ และการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในการหมักแบบกะของ *Cl. acetobutylicum* คือผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม (Total solvent yield) มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเพราะการลดลงของการผลิตเอซิโตน และพบว่าบิวทานอลจะไม่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิในรูปของผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม และอัตราการผลิต ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ 35°C

2.8.3. ออกซิเจน

Cl. acetobutylicum ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ (Obligate anaerobe) การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหมักที่มีความต่างศักย์ของ Redox (Redox potential; E_h) ในช่วงระหว่าง -250 mV ถึง -400 mV การสัมผัสกับออกซิเจนในการหมักแบบไร้อากาศไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดขึ้นเพียงระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40-60 μ M) การใช้น้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง การเจริญ การสังเคราะห์ DNA RNA และ โปรตีนจะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) จุลินทรีย์จะมีการผลิต Butylate แต่ไม่ผลิต Acetate หรือมีการผลิตลดลง รวมถึงมีการลดลงของ ATP ในเซลล์ด้วย ซึ่งผลของออกซิเจนคือมีการย้อนกลับของปฏิกิริยาทั้งหมด การเจริญและเมแทบอลิซึม (Metabolism) จะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้อากาศอีก (Jones and Woods, 1986)

2.8.4. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และผลิตภัณฑ์กรดในขั้นตอนสุดท้าย

ในน้ำหมัก pH จะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล มีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่า ถ้ารักษาค่า pH ของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรดอินทรีย์ ในทางตรงกันข้ามถ้ารักษาค่า pH ไว้ที่ค่าต่ำๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามช่วงของ pH ที่จะทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ในช่วงกว้าง

มาก ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมักด้วย ช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์มักอยู่ในช่วง pH 3.8 ถึง 5.5 (Lee *et al.*, 2008b) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมอย่าง *Cl. acetobutylicum* P262 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีในช่วง pH 6.5 (Jones and Woods, 1986)

กรดอินทรีย์อย่างอ่อน (Weak organic acid) เช่น กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product) ของปฏิกิริยา โดยธรรมชาติแล้วจะเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในรูปที่ไม่แตกตัว ที่ความเข้มข้นของกรดสูงๆ ค่า pH ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลงซึ่งเป็นสาเหตุในการยับยั้งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ ภายในตัวเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าจะมีการสะสมของกรดและการลดลงของค่า pH จึงทำให้อัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดชะงักในที่สุด ถึงแม้ว่าการใช้วัตถุดิบและเมแทบอลิซึมของเซลล์ยังดำเนินต่อไป (Zhu and Yang, 2004) ดังนั้นจึงมีข้อเสนอว่าจุดที่เปลี่ยนเป็น Solventogenesis ก็คือกลไก Detoxification ของเซลล์ เพื่อกำจัดผลที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากการยับยั้งเมื่อกรดในขั้นตอนสุดท้ายมาถึงระดับช่วงที่มีพิษ (Hatarnis *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1984) โดยทั่วไปการเริ่มต้นของ Solventogenesis จะเกิดขึ้นร่วมกันขณะที่ pH ของสารอาหารมีค่าต่ำและมีกรดในรูปที่ไม่แตกตัวอยู่ในช่วงวิกฤต (Lee *et al.*, 2008b) ดังนั้นความเข้มข้นของ Butyrate จะต่ำที่ค่า pH ต่ำ (Jones and Woods, 1986) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าผลของ pH เป็นผลจากความเข้มข้นของกรดบิวทิริกที่ไม่แตกตัวและสิ่งนี้เป็นปัจจัยควบคุมการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

2.9 การใช้วัตถุดิบประเภทแป้งในกระบวนการหมักแอสिटอน บิวทานอล และเอทานอล

แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก (Jones and Woods, 1986; Qureshi and Blaschek, 2001; Lee *et al.*, 2008b) โดยวัตถุดิบที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นแบบดั้งเดิมในกระบวนการหมักแอสिटอนบิวทานอล และเอทานอลทางการค้า นั้น ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวไรย์ เป็นต้น ทั้งนี้วัตถุดิบเหล่านั้นมีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวัตถุดิบทางเลือกใหม่ที่มีราคาถูกกว่า อย่างเช่น วัตถุดิบประเภทแป้ง (แป้งสาลี แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง) (Madihah *et al.*, 2001a) ของเสียจากการเกษตร (Jesses *et al.*, 2002) วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร (Ezeji *et al.*, 2007a) และ Dried distiller's grain and soluble (DDGS) (Ezeji *et al.*, 2008) เป็นต้น

แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ เช่น เอนไซม์ Amylase, Pullulanase และ Glucoamylase ส่งผลให้สามารถย่อยแป้งที่ทำให้เกิด เกลบบางส่วนในกระบวนการหมักแอสिटอน บิวทานอล และเอทานอลได้ (Jones and Woods, 1986; Nimcevic *et al.*, 1998; Madihah *et al.*, 2001a) นักวิจัยหลายกลุ่ม ได้ทดลองใช้วัตถุดิบประเภทแป้งชนิดต่างๆ ใน

กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium* sp. ดังสรุปในตารางที่ 2.2 โดย Nimcevic *et al.* (1998) ได้ทดสอบใช้แบคทีเรีย *Cl. beijerinckii* NRRL B592 ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และพบว่าแบคทีเรีย *Cl. beijerinckii* NRRL B592 สามารถใช้มันฝรั่งในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูงถึง 18.9 g/L โดยที่ไม่จำเป็นต้องมีการย่อยแป้งมันฝรั่งด้วยเอนไซม์ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักเลย

ต่อมาในปี 2001 Madihah และคณะได้รายงานว่แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 มีความสามารถในการใช้วัตถุดิบประเภทแป้งได้หลายชนิด ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อาทิเช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งสาเก และแป้งมันฝรั่ง ทั้งนี้พบว่าเมื่อใช้แป้งสาเกเป็นวัตถุดิบในการหมัก จะให้ค่าอัตราการผลิต (Productivity) ตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุดถึง 0.26 g/L/h เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างแป้งชนิดอื่น อย่างไรก็ตามค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้ดังกล่าวพบว่าไม่ได้แตกต่างจากการใช้แป้งข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อใช้แป้งมันฝรั่งมีผลทำให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายลดลงถึง 2 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาเกและแป้งข้าวโพด จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า วัตถุดิบประเภทแป้งสามารถใช้ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับประเภทของแป้งแต่ละชนิด ซึ่งมีสมบัติทางทางเคมี-กายภาพที่ต่างกันด้วย

ต่อจากนั้นในปี 2003 Ezeji และทีมวิจัย ประสบผลสำเร็จในการใช้แบคทีเรีย *Cl. beijerinckii* BA101 ในการทดสอบการหมักด้วย Packing peanut ในอาหาร P2 medium ความเข้มข้น 80 g/L เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยพบว่า สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 18.9 g/L ซึ่งให้ค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) เท่ากับ 32% โดยใช้เวลาในการหมัก 110 ชั่วโมง และให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายเท่ากับ 0.17 g/L/h อย่างไรก็ตามค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา

หลังจากนั้น Madihah และคณะวิจัย ได้ศึกษาการใช้วิธีควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะต่างๆ ของการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 ทั้งระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ซึ่งพบว่า การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์นั้น สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าการควบคุมค่า pH น้ำหมักในระยะของการสร้างกรด นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (27.9 g/L) ได้สูงถึง 2 เท่าของการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH และเพิ่มค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ถึง 1.4 เท่าด้วย

ในปีต่อมา Gu *et al.* (2009) ได้รายงานว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่เสริมด้วย Ammonium acetate ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* EA 2018 ซึ่งพบว่า การใช้

วัตถุประสงค์ดังกล่าวมีผลทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ ทั้งกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ในช่วงแรก ก่อนจะถูกนำไปอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะพบการผลิต บิวทานอลและแอซิโตนเป็นส่วนมาก และมีการผลิตเอทานอลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ล่าสุดเมื่อปี 2010 Thang และผู้ร่วมวิจัย ได้รายงานความสามารถของแบคทีเรีย *Cl. saccharoperbutylacetonicum* N14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยแป้งได้ใน ปริมาณมาก (Hyperamylolytic strain) ในการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้กลุ่มนักวิจัยพบว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย ดังกล่าว ให้ผลเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเลย ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงถึง 20-21 g/L และให้ค่าผลผลิตทั้งหมด 41-46% ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้แป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่งในการศึกษาที่ ผ่านมา (Nimcevic *et al.*, 1998; Ezeji *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าผลผลิตที่ได้ยังสูงกว่าการใช้ แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 อย่างมาก ซึ่งให้ค่าผลผลิตที่ได้เพียง 20-34% เท่านั้น



ตารางที่ 2.2 สรุปการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium* spp. โดยใช้วัตถุดิบจากแป้งในกระบวนการหมักแบบกะ

Substrate	Microorganism	Total solvents (g/L)	Total ABE productivity (g/L/h)	Total ABE yield (g solvent/g glucose)	References
Potato starch	<i>Cl. beijerinckii</i> NRRL B592	18.9	0.42	-	Nimcevic <i>et al.</i> , 1998
Potato starch	<i>Cl. acetobutylicum</i> P262	4.62	0.06	0.14	Madihah <i>et al.</i> , 2001b
Corn starch	<i>Cl. acetobutylicum</i> P262	11.87	0.18	0.36	Madihah <i>et al.</i> , 2001b
Sago starch	<i>Cl. acetobutylicum</i> P262	11.03	0.26	0.33	Madihah <i>et al.</i> , 2001b
Tapioca starch	<i>Cl. acetobutylicum</i> P262	6.74	0.16	0.20	Madihah <i>et al.</i> , 2001b
Starch-based packing peanuts	<i>Cl. beijerinckii</i> BA101	21.7	0.20	0.37	Ezeji <i>et al.</i> , 2002
Degermed corn	<i>Cl. beijerinckii</i> BA101	24.8	0.34	0.42	Campos <i>et al.</i> , 2002
Corn starch	<i>Cl. beijerinckii</i> BA101	20.0	0.28	0.49	Ezeji <i>et al.</i> , 2005
Sago starch	<i>Cl. saccharobutylicum</i> DSM 13864	16.38	0.59	0.35	Liew <i>et al.</i> , 2006
Sago starch	<i>Cl. saccharobutylicum</i> P262	27.9	0.70	0.48	Madihah <i>et al.</i> , 2008
Cassava starch	<i>Cl. acetobutylicum</i> EA 2018	19.4	-	-	Gu <i>et al.</i> , 2009
Cassava starch	<i>Cl. saccharoperbutylacetonicum</i> N14	21.0	0.44	0.41	Thang <i>et al.</i> , 2010

Note: (-): no data

บทที่ 3

วัสดุที่ใช้ในการวิจัยและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 มันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) จัดซื้อจากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมาประเทศไทย ตัวอย่างแป้งที่ได้จะถูกเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

มันเส้น (Cassava chip) จัดซื้อจากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมาประเทศไทย ซึ่งมันเส้นที่ได้จะถูกนำมาลดขนาดด้วยการบด โดยใช้ Cross-Beater mill (Glen Mill Crop., Maywood) ที่มีตะแกรงร่อนขนาด 0.2 mm และมันเส้นที่ผ่านการลดขนาดแล้วจะนำไปเก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

กากมัน (Cassava pulp) รับมาจากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมาประเทศไทย ทั้งนี้กากมันที่ได้มีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 60-70% จึงต้องนำไปอบไล่ความชื้นที่ 55°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.2 mm กากมันที่ผ่านการลดขนาดแล้วจะนำไปเก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

3.1.2 สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

กากยีสต์สดซึ่งปริมาณของแข็งแขวนลอยประมาณ 18-20% ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทขอนแก่นบิวเวอรี่ จำกัด จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย จะถูกเตรียมตามวิธีการของ Saksinchai *et al.* (2001) โคมเริ่มจากนำสารละลายกากยีสต์มาเจือจางด้วยน้ำที่ปลอดเชื้อให้ได้ปริมาณของแข็งแขวนลอยเท่ากับ 15% (w/v) จากนั้นนำไป Autolysate ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบ 20 ชั่วโมง ทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 85°C คงไว้นาน 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เหลืออยู่ทั้งหมดของเอนไซม์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปแยกเซลล์ยีสต์ออกด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 rpm นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum evaporator) (NESLAB Instrument, Inc., USA) ที่ 60°C ความดัน 300 mbar ตอนสุดทำให้น้ำสารละลายไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง Spray dryer (GEA Niro, Denmark) โดยใช้อุณหภูมิก๊าซเข้าที่ 180°C และอุณหภูมิขาออกที่ 90°C ตามลำดับ สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ที่ได้จะนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.3 แบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ได้ใช้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งจัดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยแบคทีเรียที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดการสร้างสปอร์ดังจะได้กล่าวในหัวข้อ 3.2.4 ซึ่งสารละลายสปอร์ที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และจะใช้เป็นกล้าเชื้อตลอดทั้งการทดลอง

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อผลิตตัวทำละลายเอปี้ไอ (แอสิตอน บิวทานอล และเอทานอล) จะใช้อาหาร P2 medium ตามรายงานของ Madihah *et al.* (2001b) ซึ่งมีองค์ประกอบตามตารางข้างล่างนี้

	Chemical	Concentration (g/L)
Buffer:	KH_2PO_4	0.75
	K_2HPO_4	0.75
	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	2.2
Minerals:	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
	NaCl	1.0
Vitamins:	<i>p</i> -aminobenzoic acid	0.001
	Biotin	0.0008
	Yeast extract	5.0

อาหาร P2 medium จะใช้ในทุกการทดลอง ซึ่งจะนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีและตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะเติมวิตามิน (*p*-aminobenzoic acid และ Biotin) ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง (Sterilized membrane Filter) ขนาด 0.2 μm

3.1.5 สารเคมีที่ใช้

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 แสดงดังตารางข้างล่างนี้

Chemical reagents	Company
Agar	VECHAVIT, THAILAND
Ammonium acetate	MERCK, GERMANY
α -Amylase	SIGMA-ALDRICH, THAILAND
Biotin	FLUKA, CHINA
Cooked meat medium	FLUKA, CHINA
Cellulase	SIGMA-ALDRICH, THAILAND
Dipotassium hydrogen phosphate	AJAX, AUSTRALIA
Dinitrosalicylic acid	FLUKA, SWITZERLAND
Ferrous sulphate heptahydrate	AJAX, AUSTRALIA
Glucoamylase	SIGMA-ALDRICH, THAILAND
Glucose	FLUKA, SWITZERLAND
Malachite green oxylate	AJAX, AUSTRALIA
Manganese sulphate, monohydrate	AJAX, AUSTRALIA
Magnesium sulphate heptahydrate	FLUKA, SWITZERLAND
Maltose	FLUKA, CHINA
<i>p</i> -aminobenzoic acid	AJAX, AUSTRALIA
Potassium dihydrogen phosphate	FLUKA, CHINA
Reinforced clostridia agar	AJAX, AUSTRALIA
Sodium chloride	VECHAVIT, THAILAND
Sodium hydroxide	J.K. BAKER, USA
Sulfuric acid	FLUKA, CHINA
Yeast extract	VECHAVIT, THAILAND

3.1.6 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือทั้งหมดที่ใช้เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง โดยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 แสดงดังรายการข้างล่างนี้

Equipment	Company
Analytical balance	PRESICA, USA
Autoclave model ACV-3167	HIRIYAMA, JAPAN
Gas chromatograph	KONIK, SPAIN
High performance liquid chromatography	AGILENT, JAPAN
Hot air oven	MEMMERT, GERMANY
Hot plate	GIBTHAI, THAILAND
Incubator	EN400 NUVE, TURKEY
Laminar air flow cabinet	AUGUSTA, THAILAND
Micropipette 100,1000,5000 μ L	BRAND, GERMANY
pH meter	CONSORT, SWITZERLAND
Rotary evaporator vacuum	NESLAB, U.S.A.
Refrigerated centrifuge super TT21	SORVALL, USA
Spectrophotometer	ANALYTIK JANA, THAILAND
Spray dryer	GEA NIRO, DENMARK
Vortex mixer	VORTEX-2-GENIE, TAIWAN
Hammer miller	CROMTON, USA

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ไขมัน เส้นใย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปริมาณความชื้น) ของตัวอย่างแป้งมัน มันเส้น และกากมันจะวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ทั้งนี้ปริมาณไขมัน เส้นใยและเถ้า จะวิเคราะห์ตามรายงานของ Charles *et al.* (2005) ส่วนปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จะวิเคราะห์ตามรายงานของ Vadivel and Janardhanan, (2001)

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์

3.2.2.1 แป้งมัน (Cassava starch) และมันเส้น (Cassava chip)

ในการย่อยตัวอย่างแป้งมัน และมันเส้นจะใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ α -Amylase (Sigma-Aldrich) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งมี Activity เท่ากับ 12,000 U/mL และเอนไซม์ Glucoamylase (Sigma-Aldrich) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Aspergillus niger* และมี Activity เท่ากับ 6,000 U/mL สำหรับวิธีการย่อยตัวอย่าง จะเริ่มจากละลายตัวอย่างมันสำปะหลัง 90 g ในน้ำ 400 mL จากนั้นเติมเอนไซม์ α -Amylase ปริมาณ 0.3% (v/v) ที่ pH 6.0 แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Glucoamylase ปริมาณ 0.5% (v/v) ที่ pH 4.5 แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58°C นาน 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse *et al.*, 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 3.3.4)

3.2.2.2 กากมัน (Cassava pulp)

สำหรับการย่อยตัวอย่างกากมันโดยใช้เอนไซม์นั้น จะเริ่มละลายกากมัน ในอัตราส่วนกากมัน 1 g ต่อ น้ำ 4 mL แล้วเติมเอนไซม์ Cellulase (Spezyme CP, Genencor, USA, 5000 U/mL) ปริมาณ 1.41 U/mL เพื่อทำการย่อยโครงสร้างของ Cellulose จากนั้นเติมเอนไซม์ α -Amylase ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, 12,000 U/mL ปริมาณ 0.3% (v/v) ที่ pH 6.0 แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Glucoamylase ปริมาณ 0.5% (v/v) ที่ pH 4.5 แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58°C นาน 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse *et al.*, 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 3.3.4)

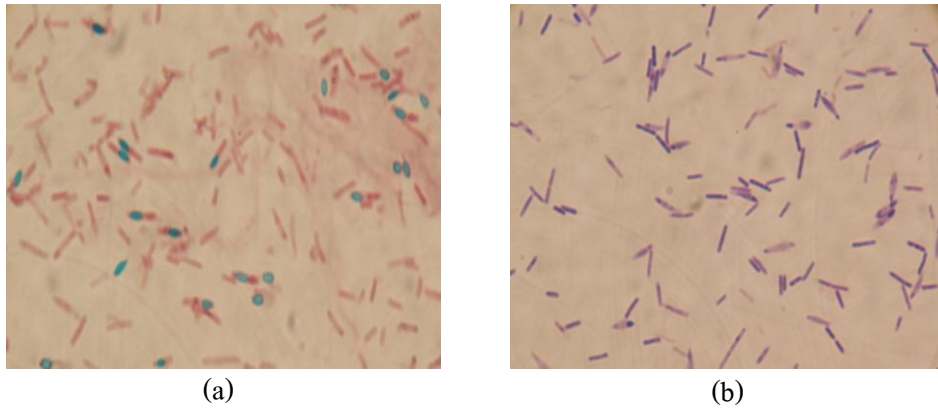
3.2.3 การเตรียมมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยกรด

การเตรียมกากมันโดยการย่อยด้วยกรด จะดัดแปลงการเตรียมตามวิธีของ Thongchul *et al.* (2010) ซึ่งจะใช้กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง 1 mol/L (ตัวอย่างกากมัน 1 g ผสมกับ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 mol/L ปริมาณ 9 mL) โดยจะนำตัวอย่างสารละลายที่เติมกรดแล้วไปให้ความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาทีในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) จากนั้นนำตัวอย่างไปกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH 10 ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงส่วนที่ตกตะกอนออกโดยใช้ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 15 นาที หลังจากนั้นปรับ pH ด้วยกรดให้ได้ pH 6.0 ตามด้วยปั่นเหวี่ยงแยกส่วนที่ตกตะกอนออกอีกครั้ง สุดท้ายนำ

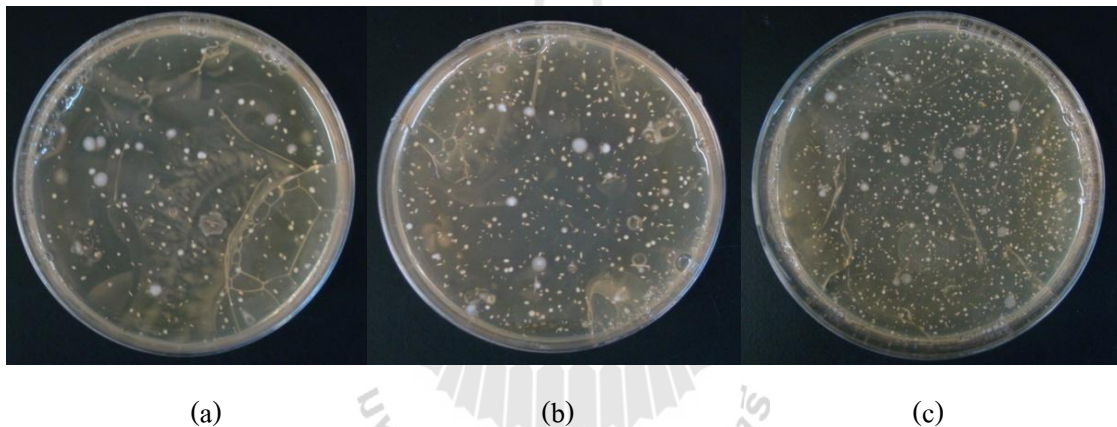
ตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse *et al.*, 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 3.3.4)

3.2.4 การเตรียมสปอร์ของแบคทีเรีย Clostridia และการเก็บรักษา

แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ที่ใช้จะนิยมเก็บรักษาไว้ในรูปสารละลายสปอร์ (Spore suspension) ในน้ำ ดังนั้นจึงต้องทำการเตรียม Stock ของสปอร์เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน โดยมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากนำสารละลายสปอร์ 0.2 mL จาก stock มากระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) ใน 20 mL ของอาหาร Cooked meat (ดูองค์ประกอบในภาคผนวก ก) ที่เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 g/L ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วตามด้วยการกระตุ้นในสารละลายน้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 1.5 นาที จากนั้นจึงนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นการสร้างแก๊สเกิดขึ้นอย่างรุนแรง (Vigorous gassing) จากนั้นใช้ Loop และเชื้อที่ได้จากข้างต้นไป Streak ลงบน Slope ของ Reinforced Clostridial Agar (ดูองค์ประกอบในภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในโถไร้อากาศ (Anaerobic jar) ในตู้บ่มเพาะที่ 35°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 45 วัน หลังจากนั้นใช้น้ำกลั่นเข้าไปละลายสปอร์ของเชื้อที่สร้างขึ้นบน Slant ของ Reinforced Clostridial Agar แล้วบรรจุลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเล็ก หลอดละ 2 mL ทำการนับสปอร์ด้วยเครื่องวัดเซลล์เม็ดเลือดแดง (Haemocytometer) ปริมาณสปอร์ที่ใช้ควรมีจำนวนอยู่ระหว่าง 1.0×10^7 ถึง 1.0×10^8 spores/mL จากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อในกระบวนการหมักต่อไป ทั้งนี้จะตรวจสอบลักษณะของสปอร์โดยการย้อมตามวิธีของ Bartholomev และ Mittwer, (1950) ซึ่งใช้ Malachite green เป็นสีย้อมก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในภาพที่ 3.1 นอกจากนี้ก็นำสารละลายสปอร์ไปใช้เพื่อเป็นก้ำเชื้อนั้น จะทำการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์ก่อนการใช้งานโดยการทำ Pour plate ในอาหาร Cooked Meat Agar (ดูองค์ประกอบในภาคผนวก ก) แล้วบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในถังเพาะไร้อากาศ ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (a) แสดงสีเขียวของเซลล์สปอร์ที่ติดสีของ Malachite green (b) แสดงลักษณะแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (Rod-shaped) จาก Gram's stained

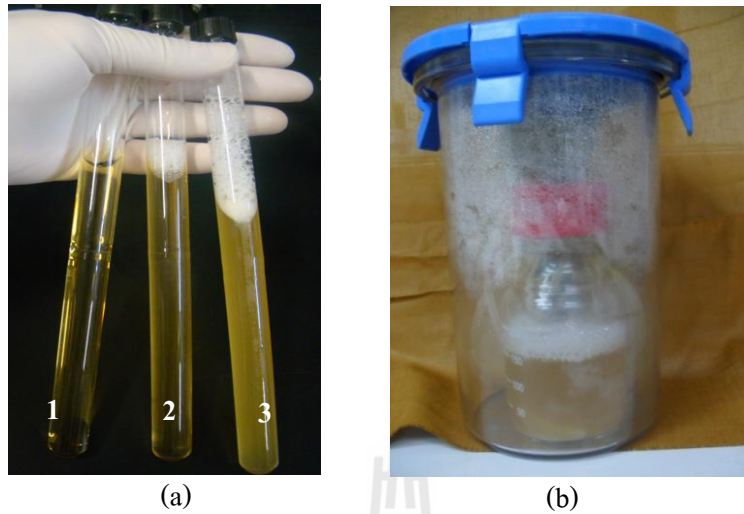


ภาพที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ได้จากการ Pour plate ของสารละลายสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการบ่มที่ 35°C นาน 24 ชั่วโมง (a) ใช้สารละลายสปอร์ปริมาณ 0.2 mL (b) ใช้สารละลายสปอร์ปริมาณ 0.5 mL และ (c) สารละลายสปอร์ปริมาณ 1.0 mL

3.2.5 การเตรียมกล้าเชื้อ

วิธีการเตรียมกล้าเชื้อ จะเริ่มจากนำสารละลายสปอร์ 0.2 mL จาก stock ใส่ลงในอาหาร Cooked meat ปริมาตร 20 mL ที่เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 g/L แล้วนำกระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยการกระตุ้นในสารละลายน้ำแข็งต่ออีก 1.5 นาที จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 17-18 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นการสร้างแก๊สเกิดขึ้นอย่างรุนแรง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 2 mL ลงในขวด 100 mL ที่มีอาหารสำหรับใช้ในกระบวนการหมักขั้นต่อไป ก่อนจะนำไปบ่มเพาะที่ 35°C เป็นเวลาประมาณ 17-18 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อ

หลังจากการบ่มเพาะครั้งที่สองนี้ จะถูกใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักต่อไป โดยจะใช้ที่ปริมาตร 10% (v/v) ดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากสารละลายสปอร์ (a) 20 mL ของอาหาร Cooked meat ก่อนการเติมเชื้อ (หลอดหมายเลข 1) หลังจากเติมเชื้อ (หลอดหมายเลข 2) ขณะเจริญเติบโตเต็มที่ (หลอดหมายเลข 3); (b) อาหารเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองขนาด 100 mL หลังจากการบ่มเพาะที่ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.2.6 สถานะของกระบวนการหมัก

3.2.6.1 การหมักในขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 mL

สำหรับการหมักในขวดนั้นใช้ขวดทดลองขนาด 250 mL ที่มีลักษณะของส่วนที่คล้ายแขนยื่นออกมา ดังภาพที่ 3.4 เพื่อรักษาระบบให้เป็นระบบปิด จะปิดฝาขวดด้วย Butyl rubber ส่วนด้านที่เป็นแขนยื่นออกมาจะปิดด้วย Rubber septum และจะถ่ายเชื้อหรือสุ่มตัวอย่างด้วยเข็มที่ปลอดเชื้อ เพื่อรักษาสถานะไร้ออกซิเจนของขวดไว้ตลอดเวลา ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุลงในขวดดังกล่าว จะถูกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะปล่อยออกซิเจนในขวดออกด้วยแก๊สไนโตรเจน เพื่อให้เกิดสถานะไร้อากาศซึ่งเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ โดยทุกการทดลองในการศึกษานี้จะหมักที่อุณหภูมิ 35°C และจะใช้ความเร็วรอบในการหมุนที่ 100 rpm สำหรับตัวอย่างที่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมัก



(a)

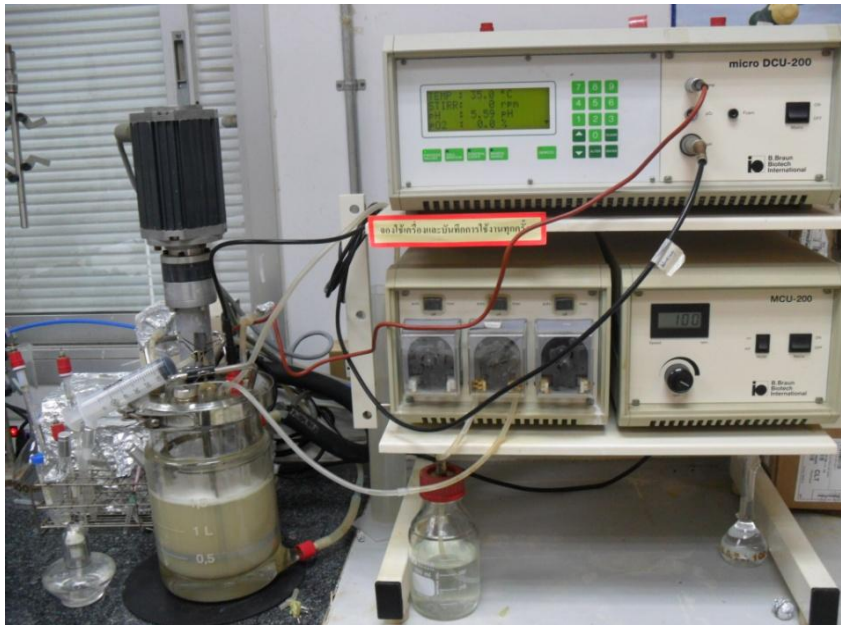


(b)

ภาพที่ 3.4 การหมักด้วยขวดทดลองขนาด 250 mL (a) การหมักที่มีควบคุมค่า pH (b) การหมัก ที่ไม่มีการควบคุมค่า pH

3.2.6.2 การหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L

ในการทดลองนี้ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L ที่เป็นชนิดพื้นฐานทั่วไป ซึ่งเป็นแก้วสองชั้น (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, New Jersey, USA) โดยจะใช้ปริมาตรในการหมัก (Working volume) 1.5-L และสามารถควบคุมค่า pH ของน้ำหมักได้อัตโนมัติ (ภาพที่ 3.5) ทั้งนี้ในการทดลองที่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ของน้ำหมักจะใช้ 3M KOH เพื่อรักษาระดับของ pH ก่อนการเติมกล้าเชื้อทุกครั้งจะทำการไล่อากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้แก๊สไนโตรเจนพ่นใส่ที่ผิวหน้าของอาหาร (Surface flushing) เพื่อให้ได้สถานะไร้ออกซิเจน และหลังจากเติมเชื้อลงในปฏิกรณ์ชีวภาพแล้ว จะทำการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจนอย่างต่อเนื่อง จนกว่าแบคทีเรียจะโตได้ดีและสร้างแก๊สเองได้ จึงจะหยุดการให้แก๊สไนโตรเจน



ภาพที่ 3.5 การหมักด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L สำหรับการทดลองที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก

ในการศึกษานี้จะใช้วัตถุดิบที่ได้จากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลัก เพื่อผลิตตัวทำละลาย บิวทานอล แอซีโตน และเอทานอล ในกระบวนการหมักแบบกะด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งวิธีการทดลองทั้งหมดของการศึกษานี้ จะประกอบด้วย 4 ส่วนหลักๆ ดังนี้

1) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการควบคุมค่า pH ต่างๆ ในระหว่างการหมัก ซึ่งการทดลองนี้จะประยุกต์ใช้การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะเวลาที่มีการสร้างตัวทำละลาย (Solventogenic phase) ตามวิธีการของ Mahihah *et al.* (2008) โดยควบคุมค่า pH ที่ pH 4.5-6.5 (4.5, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0 และ 6.5) (pH เริ่มต้น 6.5) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และใช้ 5 g/L สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าเป็นแหล่งไนโตรเจนด้วย

2) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังชนิดต่างๆ (แป้งมัน กากมัน มันเส้น และตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดและเอนไซม์) โดยใช้ที่ความเข้มข้น 50 g/L ร่วมกับการใช้ 5 g/L สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าเป็นแหล่งไนโตรเจนด้วย

3) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นต่างๆ ของแหล่งอาหารคาร์บอน ซึ่ง Mahihah *et al.* (2008) และ Lee *et al.* (2008) ได้รายงานว่าช่วงความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมกับการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. มากที่สุดจะอยู่ในช่วง 20-80 g/L ดังนั้น การทดลองนี้จะศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 20-80 g/L โดยใช้ 5 g/L สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าเป็นแหล่งไนโตรเจน

4) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการใช้แหล่งไนโตรเจน ระหว่างสารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) และสารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast extract)

ทุกการทดลองจะเติมสารละลายวิตามิน (*p*-aminobenzoic acid 0.001 g/L + Biotin 0.0008 g/L) เมื่ออุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการทำให้ปลอดเชื้ออยู่ในช่วง 34-37°C ในระหว่างการหมัก จะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 35°C และควบคุมความเร็วรอบในการหมุนที่ 100 rpm เพื่อป้องกันการตกตะกอนของอาหาร สำหรับตัวอย่างที่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมัก จะใช้สารละลาย 3M KOH ทั้งนี้ทุกการทดลองใช้กล้ำเชื้อที่ความเข้มข้น 10% (v/v) และในระหว่างการหมักจะสุ่มตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วันเพื่อตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก

3.3 วิธีการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ตัวอย่างที่ได้ในระหว่างการหมักจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียและส่วนใสก่อนจะนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3.1 การหาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย

ความเข้มข้นของเซลล์ (1 g เซลล์แห้งต่อ 1 mL ของน้ำหมัก) ในกรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักสามารถหาได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Assobhei *et al.*, 1998) (ดูสมการความสัมพันธ์ในภาคผนวก ข) ส่วนกรณีที่ใช้วัตถุดิบที่เป็นแป้ง จะหาปริมาณเซลล์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Tang *et al.* (2010) โดยมีวิธีการคือ เติมเอนไซม์ α -amylase (Sigma-Aldrich) ซึ่งมี Activity เท่ากับ 12,000 U/mL ปริมาณ 20 μ L ลงในตัวอย่างน้ำหมัก 1 mL ที่บรรจุอยู่ในหลอด Eppendorf ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วนำไปบ่มที่ 90°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยแป้งที่เหลืออยู่ก่อน จากนั้นนำหลอด Eppendorf ดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำ 1 mL เข้าไปแทน หลังจากนั้นนำหลอด Eppendorf ที่มีเฉพาะเซลล์แบคทีเรียไปอบให้แห้งที่ 105°C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่แท้จริง

3.3.2 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

ทุกตัวอย่างที่ต้องวัดค่า pH ของน้ำหมัก จะวัดโดยใช้เครื่องวัด pH รุ่น E520 (Metrohm A.G., Hersau, Switzerland) ที่ผ่านการ calibrated ด้วยบัฟเฟอร์ pH 4.0 และ pH 7.0 ก่อนใช้งานทุกครั้ง

3.3.3 การย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI และ PI

ในการทดลองนี้จะวัดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของแบคทีเรีย โดยอาศัยความสามารถในการซึมผ่านของสี DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma-Aldrich) และ PI (Propidium iodide) (Sigma-Aldrich) ซึ่งสี DAPI จะมีความสามารถในการจับกับ DNA ของแบคทีเรียทุกชนิดทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในขณะที่สี PI จะใช้บ่งบอกความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของแบคทีเรีย เนื่องจากสี PI ไม่มีความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ในกรณีที่เซลล์แบคทีเรียเป็นปกติ แต่ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายหรือถูกทำลาย สี PI จะเข้าสู่เซลล์และจะไปจับกับกรดนิวคลีอิกได้ (Carneiro *et al.*, 2009; Pablos *et al.*, 2011) ดังนั้นจึงอาศัยความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสีย้อมทั้ง 2 ชนิด เพื่อบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้สารละลาย DAPI จะเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยละลาย DAPI 5 mg ในน้ำปลอดเชื้อ 5 mL ที่มีสารละลาย 2.5% Glutaraldehyde และสารละลาย PI จะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/1mL เช่นกัน โดยละลาย PI 25 mg ในน้ำปลอดเชื้อ 25 mL สำหรับวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างจะเริ่มจากเติมสารละลาย DAPI และ PI จาก Stock ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาณ 80 μ L ลงในตัวอย่างน้ำหมัก 4 mL จากนั้นนำไปปั่นในที่มีดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะนำไปกรองด้วย Polycarbonate membrane ขนาด 0.22 μ m จากนั้นนำกระดาษกรองที่ได้ไปวางลงบนกระจกสไลด์ (Glass slide) และปิดด้วย Cover slip ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (Leica DMI 4000B microscope) ที่ติดตั้งอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดการเรืองแสง (Fluorescence attachment ebq-100 mc-L) และกล้องถ่ายรูป (Canon Power Shot S80) ในการนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียจะสุ่มนับจากจุดที่ต่างกัน 3 จุดในกระดาษกรอง พร้อมทั้งถ่ายรูปความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมด้วยสี DAPI/PI โดยค่าความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อม DAPI จะอยู่ระหว่าง 340-380 nm และจะมีค่า Suppression ของแสงที่ 425 nm ส่วนค่าความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อม PI จะอยู่ระหว่าง 515-560 nm และจะมีค่า Suppression ของแสงที่เหมาะสมที่ 590 nm

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก

การหาปริมาณความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (แอลกอฮอล์ และเอทานอล) ที่ได้จากกระบวนการหมัก จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Madihah *et al.*, (2008) โดยใช้เครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งมี Detector ชนิด FID (Flame ionization detector) ตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกแยกด้วยคอลัมน์ ชนิด Capillary column ความยาว 30 m ขนาด 30 m \times 0.25 mm โดยมีแก๊สไฮโดรเจนเป็นตัวพา (Carrier gas) ด้วยอัตราการไหล 1.5 mL/นาที ทั้งนี้อุณหภูมิของคอลัมน์จะถูกตั้งไว้ที่ 115°C นาน 8 นาที ก่อนที่จะเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไป 170°C ด้วยอัตรา 5°C/นาที และคงอุณหภูมิที่

170°C นาน 10 นาที ส่วนอุณหภูมิของ Detector และ Injector จะถูกตั้งไว้ที่ 270 และ 220 °C ตามลำดับ การฉีดตัวอย่างแต่ละครั้งจะใช้ปริมาณ 2 μ L

ปริมาณน้ำตาล (กลูโคสและมอลโตส) ที่ได้จากการกระบวนการย่อย รวมทั้งกรดอินทรีย์ (บิวทริกและอะซิติก) จะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) (Model 1200 series, Agilent technology, Japan) โดยใช้ Detector ชนิด RI (Refractive index) น้ำตาลและกรดอินทรีย์จะแยกโดยใช้ คอลัมน์ชนิด An ion exclusion (BIO RAD, Aminex, HPX-87H, USA) โดยตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 45°C และใช้ 4 mM H₂SO₄ เป็น Mobile phase ด้วยอัตราการไหล 0.4 mL/นาที

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแป้งในตัวอย่างที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบนั้น จะวิเคราะห์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Tang *et al.* (2010) โดยเติมเอนไซม์ α -Amylase ปริมาณ 20 μ L ลงในตัวอย่างน้ำหมัก 1 mL แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C นาน 3 ชั่วโมง เพื่อย่อยแป้งให้กลายเป็น dextrin ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ หลังจากนั้นเติม 8,880 μ L ของอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ก่อนจะเติมเอนไซม์ Glucoamylase ปริมาณ 100 μ L แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58°C นาน 4 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 mL นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณปริมาณแป้งตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{ปริมาณแป้ง (g/L)} = \text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (g/L)} \times 10^a \times 0.9^b$$

เมื่อ a คือค่าการเจือจางตัวอย่าง และ b คือค่าความสัมพัทธ์ของแป้งที่สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้

3.3.5 การวิเคราะห์ทางจุลนศาสตร์

ค่าอัตราการผลิตสารละลายอินทรีย์ทั้งหมดในกระบวนการหมักแบบกะ (Productivity; g/L/h) จะคำนวณโดยใช้ผลรวมของความเข้มข้นของตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตนและเอทานอลหารด้วยเวลาในการหมักที่ทำให้ได้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield; g product/g sugar consumed) ของตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตนและเอทานอลนั้น จะคำนวณจากปริมาณผลรวมของความเข้มข้นของตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตนและเอทานอล หารด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไปเพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง (แป้งมัน กากมัน และมันเส้น) จะวัดโดยใช้วิธี AOAC (Charles *et al.*, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยปริมาณเส้นใยที่สูงสุดจะพบในกากมัน รองลงมาคือมันเส้นและ แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.08, 2.05 และ 0.17 (% w/w) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแป้ง (Starch content) ในวัตถุดิบมันสำปะหลังแต่ละชนิดนั้น พบว่ากากมันมีปริมาณแป้ง (58.74%, w/w) ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ โดยมันเส้นมีปริมาณแป้งเท่ากับ 85.85% (w/w) และแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งเท่ากับ 99.04% (w/w) แต่กากมันมีปริมาณเส้นใยสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ในวัตถุดิบจากมันสำปะหลังแต่ละชนิด พบว่ามีความแปรปรวนและแตกต่างกันออกไป ซึ่ง Sriroth และคณะ ปี 1999 ได้สรุปไว้ว่า องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสถานที่ที่เพาะปลูก ฤดูกาลในการเพาะปลูก วิธีการเก็บเกี่ยว ตลอดจนวิธีการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีนั้นๆ ด้วย

Ezeji และคณะ ปี 2007 รายงานว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ไม่มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบที่มีปริมาณเส้นใยสูงๆ ได้ เนื่องจากไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ จำพวกเซลลูเลสที่ใช้ย่อยวัตถุดิบที่เป็นเส้นใยได้ จากการศึกษาของ Madihah *et al.* (2008) พบว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยแป้งได้ เช่น Amylase, Glucoamylase และ Pullulanase อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของเอนไซม์ในแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. นั้น จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตลอดจนความสามารถในการทำกิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ด้วย ดังนั้นกากมันและมันเส้นซึ่งมีองค์ประกอบของแป้งอยู่ประมาณ 58 และ 85 (% w/w) ตามลำดับ จึงถูกพิจารณานำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* เพื่อใช้ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามวัตถุดิบดังกล่าวมีองค์ประกอบของเส้นใยในปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งจะรบกวนกระบวนการหมักได้ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถที่จะใช้วัตถุดิบที่เป็นเส้นใยได้ จึงจำเป็นต้องย่อย หรือแปรสภาพวัตถุดิบเหล่านั้นเพื่อให้ได้น้ำตาลซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ (Fermentable sugars) ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง

Samples	Main components (% , w/w)						
	Fat	Protein	Ash	Crude fiber	Moisture content	Carbohydrate	Starch content
Cassava starch	0.21±0.01	1.31±0.01	0.13±0.08	0.17±0.01	5.04±0.17	93.14±0.12	99.04±0.02
Cassava chip	0.52±0.06	1.42±0.03	1.92±0.02	2.05±0.07	8.26±0.13	85.83±0.15	85.85±0.17
Cassava pulp	0.41±0.01	1.77±0.23	1.87±0.03	14.08±0.03	7.56±0.13	74.31±0.24	58.74±0.15

ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดเจือจาง

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugars) ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ได้สรุปในตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาการย่อยตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ พบว่าตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงมากที่สุด 114.87 g/L ซึ่งค่าผลผลิตที่ได้ (Reducing sugars yield) มากกว่า 100% รองลงมาคือตัวอย่างมันเส้น และกากมัน ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง เท่ากับ 104.89 g/L และ 85.88 g/L ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่ได้จะแปรผันตรงกับปริมาณแป้งที่เป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่าง กล่าวคือ ตัวอย่างกากมันมีเส้นใยที่สูง (14.08%) และมีปริมาณแป้งที่เป็นองค์ประกอบต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ (58.74%) (ตารางที่ 4.1) หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์จึงให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ โดยในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ร่วมกัน 3 ชนิดได้แก่ Cellulase, α -Amylase และ Glucoamylase ซึ่งมีรายงานว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ α -Amylase และ Glucoamylase สามารถย่อยองค์ประกอบที่เป็นแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดยแป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.1 g (Liew *et al.*, 2006) ส่วนตัวอย่างกากมันซึ่งมีเส้นใยในปริมาณมาก การใช้เพียงเอนไซม์ Cellulase อาจยังไม่เพียงพอที่จะทำให้การย่อยตัวอย่างสมบูรณ์ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของแป้งมากกว่า อย่างไรก็ตามการย่อยตัวอย่างกากมันด้วยกรดเจือจางให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงสูงกว่าการย่อยตัวอย่างกากมันด้วยเอนไซม์ เนื่องจากกรดสามารถแทรกเข้าไปย่อยพันธะแบบสุ่มอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (Nonspecific random hydrolysis) ภายในโครงสร้างของแป้งและเซลลูโลสได้ทุกพันธะ จึงส่งผลให้ได้น้ำตาลรีดิวซิงในปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Thongchul *et al.* (2010) ที่รายงานว่าสารละลายกรด HCl, H₂SO₄ และ H₃PO₄ ความเข้มข้น 1M สามารถย่อยพันธะในตัวอย่างกากมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยได้ปริมาณ Reducing sugars yield มากกว่า 100%

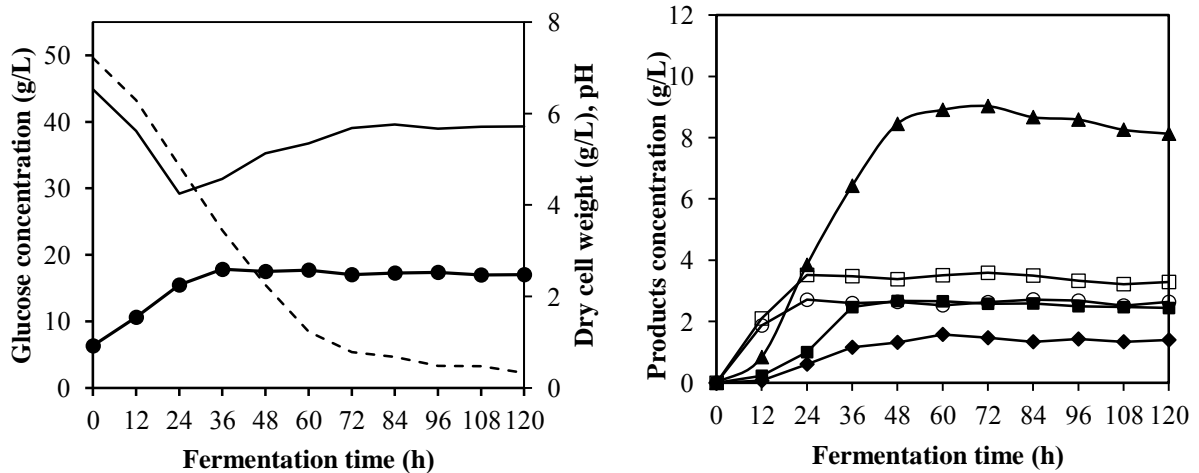
ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugars) ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์

Samples	*Reducing sugar in hydrolysate (g/L)
Enzymatic hydrolysate of cassava starch	114.87±0.23
Enzymatic hydrolysate of cassava chip	104.89±0.11
Enzymatic hydrolysate of cassava pulp	85.88±0.24
Acid hydrolysis of cassava pulp	94.08±0.15

*Reducing sugars คำนวณจากปริมาณตัวอย่างมันสำปะหลังเริ่มต้น 100 g
ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

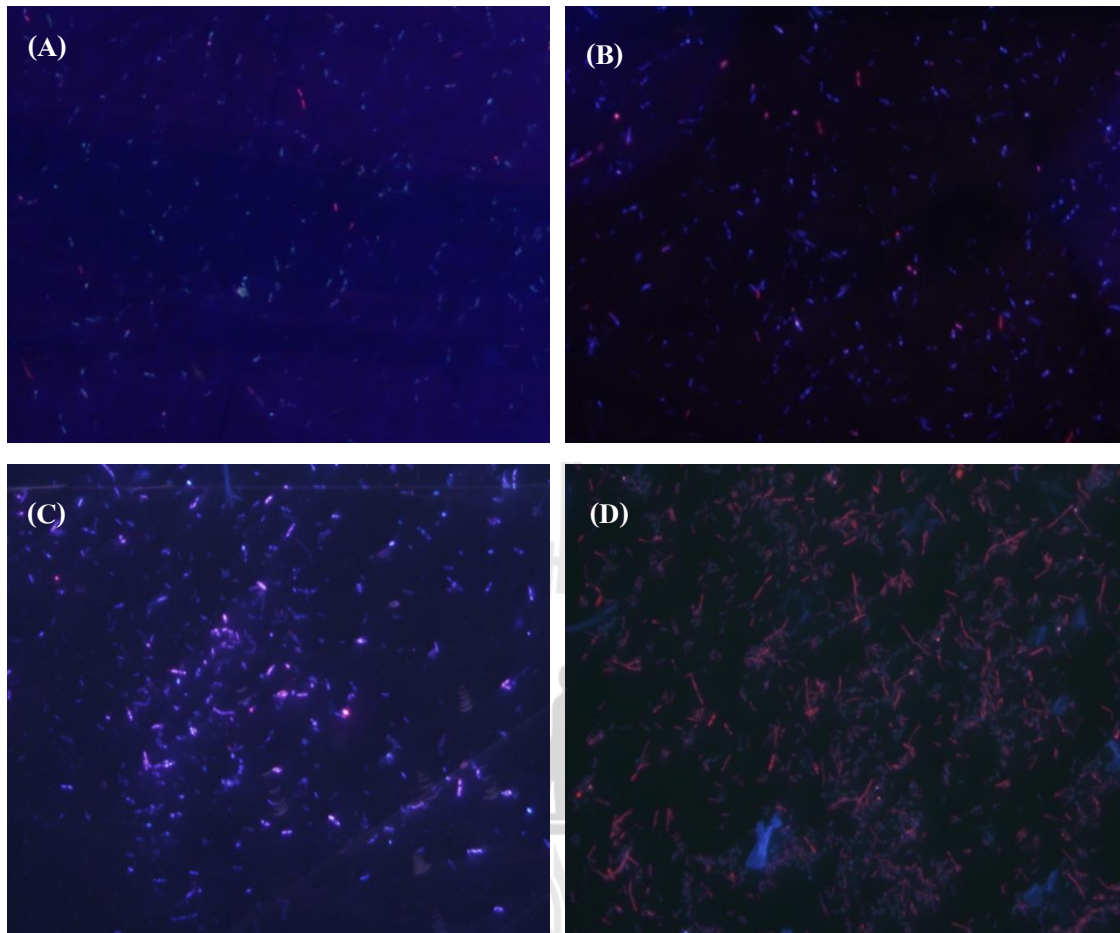
4.3 ผลของการควบคุมค่า pH ในระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ต่อการสร้างตัวทำละลายเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เพื่อศึกษาอิทธิพลของการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) ที่แตกต่างกัน (pH 4.5-6.5) ในระหว่างระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์หรือ Solventogenic phase ต่อกลไกการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้น ได้ทำการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L และใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนตลอดจนใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) ความเข้มข้น 5 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนชุดการทดลองควบคุม (Control experiment) นั้นจะไม่มี การควบคุมค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งรูปแบบการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ไม่ได้มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) ได้แสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าในระหว่างที่มีการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ ไปเป็นระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์อย่างชัดเจน ทั้งนี้ระยะที่มีการสร้างกรดอินทรีย์นั้นจะเกิดขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยจะมีการสร้างกรดอินทรีย์จำพวกกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นเหตุให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก 6.0 เป็น 4.75 และในระยะนี้จะพบการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก การเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้จะเริ่มคงที่และเข้าสู่ระยะ Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้กลไกการเปลี่ยนแปลงจากการสร้างกรดอินทรีย์ไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์นั้น จะส่งผลให้ค่า pH ของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในระยะที่สองต่อไป



ภาพที่ 4.1 รูปแบบวิถีกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462; น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ 50 g/L สัญลักษณ์: (----) glucose, (—) pH, (■) acetone, (▲) butanol, (◆) ethanol, (●) dry cell weight, (□) butyric acid, (○) acetic acid.

สำหรับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่แสดงในภาพที่ 4.2 นั้น เซลล์แบคทีเรียที่ปรากฏให้เห็นเป็นสีน้ำเงิน คือเซลล์ที่ย้อมติดสีของ DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) ส่วนตัวเซลล์ที่เห็นเป็นสีแดง คือเซลล์ที่ย้อมติดสีของ PI (Propidium iodide) ทั้งนี้เซลล์ที่ติดสีน้ำเงินของ DAPI จะบ่งบอกถึงเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ซึ่งผนังเซลล์ถูกทำลายไม่มากนัก ส่วนเซลล์ที่ติดสีแดงของ PI แสดงว่าเซลล์เกิดความเสียหายของผนังเซลล์อย่างรุนแรงหรือเป็นเซลล์ที่ตายแล้วนั่นเอง จากภาพที่ 4.2 พบว่าจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินของ DAPI มีแนวโน้มลดลง ขณะที่เซลล์ที่ติดสีแดงของ PI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) ซึ่งมีค่าสูงสุดที่ 36 ชั่วโมงก่อนที่จะลดลง (ภาพที่ 4.1) นอกจากนี้ยังพบว่าชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก (ภาพที่ 4.2 D) มีปริมาณของเซลล์สีแดงที่ติดสีของ PI มากกว่าที่ชั่วโมงอื่นๆ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณตัวทำลายอินทรีย์ ซึ่งถูกผลิตมากที่สุดที่ชั่วโมงดังกล่าวด้วย โดยสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ติดสีแดงของ PI หรือการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ตายแล้วนั้น อาจเนื่องมาจากการยับยั้งอันเป็นผลมาจากปริมาณผลผลิตที่สร้างขึ้น (Product inhibition) ของแบคทีเรียเองก็เป็นได้ Roos *et al.* (1985) รายงานไว้ว่าบิวทานอลที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย *Clostridium* sp. นั้น มีความเป็นพิษมากที่สุดเมื่อเทียบกับผลผลิตชนิดอื่นๆ ซึ่งบิวทานอลความเข้มข้น 13 ถึง 16 g/L สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่การเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. จะลดลงถึง 50% เมื่อมีการเติมบิวทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7-12 g/L (Moreira *et al.*, 1981)



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในขณะที่หมักด้วยน้ำตาลกลูโคส 50 g/L ที่ย้อมด้วย 1 mg/mL ของ DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) และ PI (Propidium iodide) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Fluorescent microscope ซึ่งเซลล์สีแดงที่เห็นแสดงถึงเซลล์ที่ตายแล้ว โดยสีแดงของ PI และเซลล์สีน้ำเงินแสดงถึงเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ซึ่งติดสีน้ำเงินของ DAPI สัญลักษณ์: A คือ ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก, B คือ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก, C คือ ชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก, D คือ ชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก

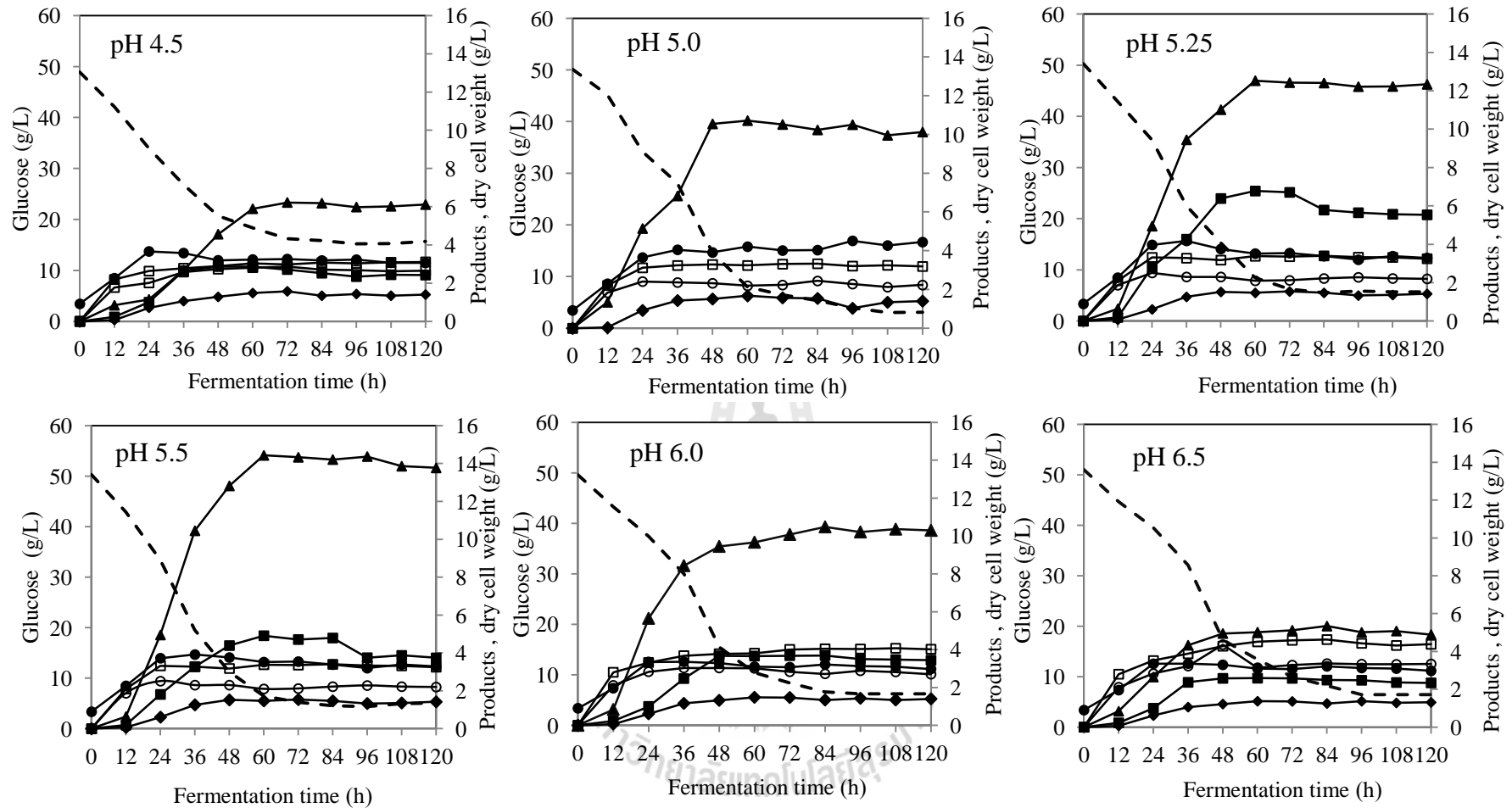
ภาพที่ 4.3 แสดงวิธีการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลัก ในขณะที่ควบคุมค่า pH ระหว่างกระบวนการหมักที่ระดับต่างๆ (pH 4.5-6.5) จากภาพจะเห็นว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (บิวทานอล เอทานอล และแอซิโตน) ได้ทุกการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักตั้งแต่ 4.5-6.5 ซึ่งได้ชี้ให้เห็นว่า ทั้งการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl.*

acetobutylicum TISTR 1462 นั้นจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือ pH ของน้ำหมัก ซึ่งปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด (Total solvents) 20 g/L ถูกผลิตขึ้นเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.5 โดยสัมพันธ์กับปริมาณบิวทานอลและเอทานอล ซึ่งถูกผลิตสูงสุดเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 5.5 ด้วย (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกผลิตมากขึ้นเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) จาก pH 4.5-5.5 โดยการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่มากกว่า 6.0 ขึ้นไป ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักส่วนใหญ่จะเป็นกรดอินทรีย์ และจะพบการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยผลการทดลองที่ได้คล้ายกันกับการศึกษาของ Stephens *et al.* (1985) ที่พบว่าเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.5 แบคทีเรีย *Cl. beijerinckii* NCIMB 8052 มีการเจริญและสร้างตัวทำละลายได้ดีกว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ 5.0 อย่างมาก และยังพบอีกว่าเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 4.0 แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้เลย เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* B18 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจากแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* สายพันธุ์ NRRL B643 ซึ่งพบว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ 5.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะ (Geng and Park, 1993) นอกจากนี้ Madihah *et al.* (2008) ได้ศึกษาอิทธิพลของการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ของแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 และพบว่าการควบคุมค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 5.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมมากที่สุดในการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Monot *et al.* (1984) ได้พบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* DSM 1731 มีความสามารถในการทนกรด และสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 4.5 จากผลการศึกษาในครั้งนี้และข้อมูลของนักวิจัยหลายๆ กลุ่มดังได้กล่าวไปข้างต้นแล้ว จะเห็นว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักมีผลต่อการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมาก ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. นั้นจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และข้อมูลทางพันธุกรรม (Nucleic acid data) ของแบคทีเรียด้วย (Bahl *et al.*, 1982)

สำหรับการผลิตเอซีโตน พบว่ามีการผลิตสูงสุดเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.25 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Madihah *et al.* (2008) ซึ่งได้อธิบายไว้ว่าเอซีโตนที่ถูกผลิตจากแป้งสาคุ (Sago starch) โดยแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 จะสูงที่สุดเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.25 โดยการควบคุมค่า pH ดังกล่าวส่งผลให้เอนไซม์ Thiolase มีความสามารถในการทำกิจกรรม (Specific activity) สูงที่สุด ซึ่งเอนไซม์ Thiolase มีความสำคัญต่อการผลิตเอซีโตนอย่างมาก (Madihah *et al.*, 2008)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการหมักระหว่าง ชุดการทดลองที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมักและการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก พบว่าการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ให้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Total solvents) 20.08 g/L ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการควบคุม pH (15.30 g/L) ประมาณ 1.5 เท่า (ตารางที่ 4.3) ซึ่งปริมาณตัวทำละลายบิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล ที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว คือ 14.43, 4.91 และ 0.74 g/L ตามลำดับ ทั้งนี้ ปริมาณของ บิวทานอลที่สูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นจากการควบคุมค่า pH ที่ 5.5 นั้น เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase และ Butanol dehydrogenase ซึ่งมีความสามารถในการทำกิจกรรม (Activity) สูงที่สุดเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 5.5 ก็เป็นไปได้ ซึ่งจากรายงานของ Madihah *et al.* (2008) ได้กล่าวไว้ว่าเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase มีความเกี่ยวข้อง และเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการเปลี่ยนของการสร้างกรดอินทรีย์ไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 ส่วนเอนไซม์ Butanol dehydrogenase ทำหน้าที่ควบคุมการผลิตบิวทานอลให้เกิดอย่างต่อเนื่อง เป็นต้น





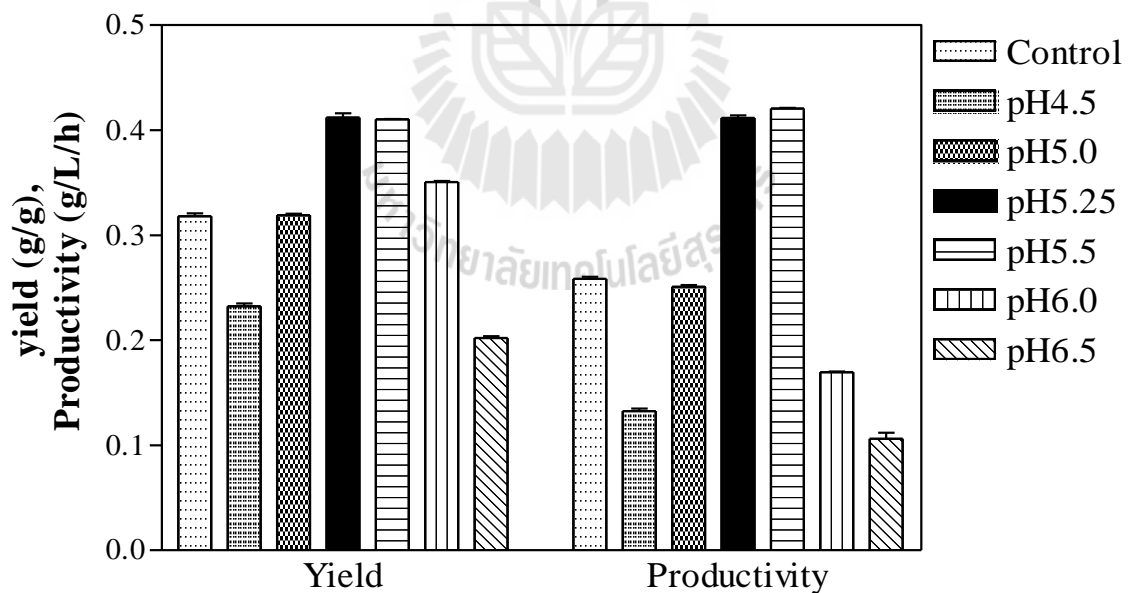
ภาพที่ 4.3 วิธีการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สำคัญลักษณะ; (----) glucose, (■) acetone, (▲) butanol, (◆) ethanol, (●) dry cell weight, (□) butyric acid, (○) acetic acid.

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมค่า pH ที่แตกต่างกันในระหว่างการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

Kinetic parameters	pH						
	Uncontrolled pH	4.50	5.00	5.25	5.50	6.00	6.50
Initial glucose concentration (g/L)	50.20±0.38	51.30±0.45	50.04±0.22	49.96±0.07	50.07±0.33	51.03±0.47	49.86±0.22
Glucose utilized (g/L)	47.98±0.44	40.68±0.28	45.68±0.46	48.97±0.56	48.75±0.17	41.22±0.33	41.38±0.27
Max. dry cell weight (g/L)	1.61±0.12	1.59±0.07	2.31±0.20	2.53±0.09	3.27±0.12	3.01±0.07	3.36±0.14
Maximum butyric acid concentration (g/L)	2.72±0.24	2.98±0.26	3.26±0.40	3.69±0.56	3.38±0.67	3.48±0.28	4.63±0.35
Maximum acetic acid concentration (g/L)	2.50±0.17	1.81±0.24	3.23±0.09	3.24±0.34	3.12±0.08	3.43±0.34	3.54±0.22
Total organic acids concentration (g/L)	5.22±0.24	4.79±0.26	5.54±0.28	6.22±0.28	6.50±0.37	6.44±0.28	8.17±0.19
Maximum butanol concentration (g/L)	11.37±0.26	6.22±0.17	10.72±0.13	12.53±0.40	14.43±0.44	10.48±0.56	5.34±0.33
Maximum acetone concentration (g/L)	3.59±0.02	2.71±0.02	3.54±0.05	6.78±0.11	4.91±0.09	3.68±0.07	2.49±0.15
Maximum ethanol concentration (g/L)	0.34±0.02	0.37±0.01	0.47±0.02	0.53±0.02	0.74±0.02	0.37±0.10	0.25±0.07
Total solvents concentration (g/L)	15.30±0.22	9.30±0.18	14.73±0.04	19.84±0.11	20.08±0.22	14.53±0.17	8.08±0.24
Fermentation time (h)*	60	72	60	60	60	84	84

ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง จะคำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยสมมติให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากภาพที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักแตกต่างกัน พบว่าเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 5.5 ทำให้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 มีค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) สูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมักถึง 21.21% (0.33 กับ 0.26 g/L/h) และให้ค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) สูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมักถึง 28% (0.41 กับ 0.37 g/L/h) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการควบคุมค่า pH ที่ 5.5 และ 5.25 พบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 มีค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด และให้ค่าผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดจะอยู่ช่วง 0.4 g/L/h ส่วนค่าผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วง 40% เมื่อพิจารณาทางเศรษฐศาสตร์ ซึ่งการควบคุมค่า pH ที่ต่ำกว่าต้องใช้ปริมาณเบส (3M KOH) เพื่อปรับรักษาค่า pH ให้คงที่มากกว่า ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่า ฉะนั้นในการศึกษานี้จึงสรุปว่า การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 เหมาะสมที่สุด จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ากลยุทธ์ในการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) มีความสำคัญอย่างมาก ในการพัฒนาและปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462

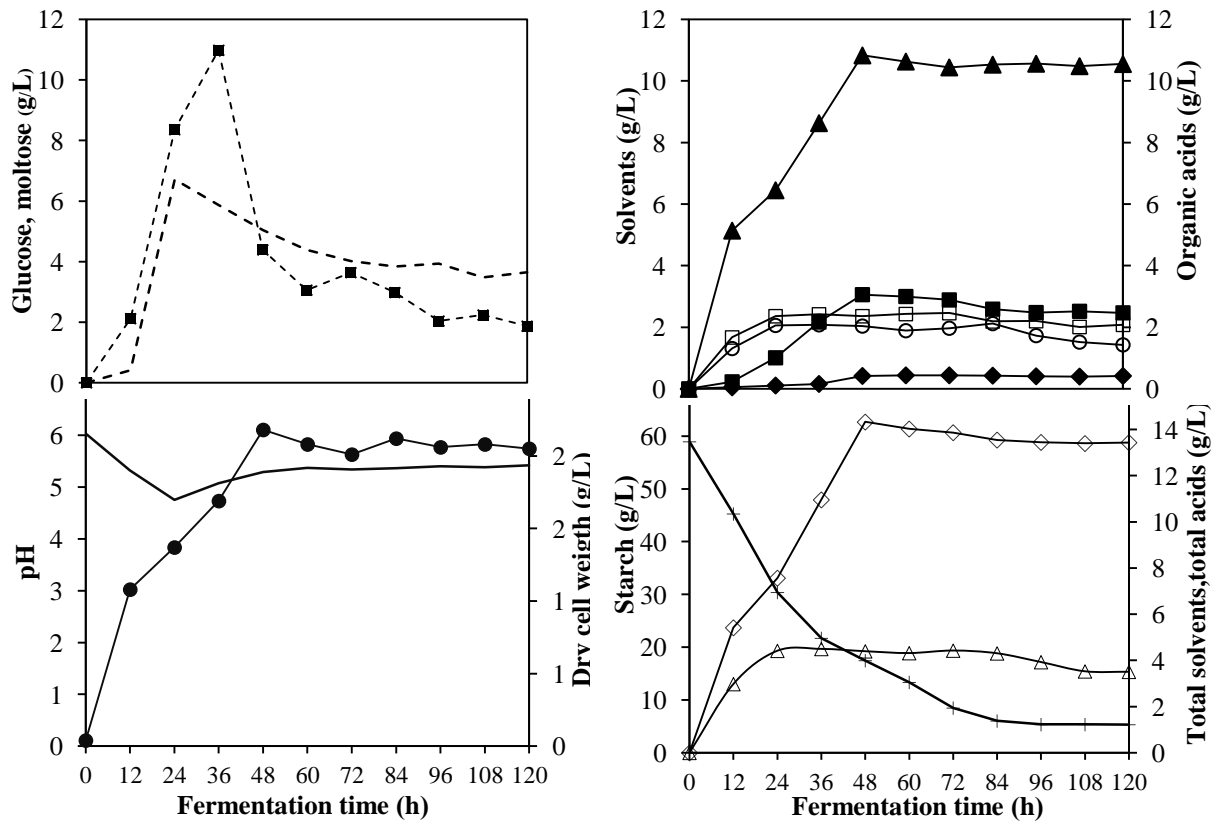


ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักแตกต่างกันในกระบวนการหมักแบบกะ

4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

เพื่อศึกษาคุณลักษณะของการหมัก (Fermentation characteristic) ของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 และจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารในตัวอย่างทดลองควบคุม (Control experiment) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก (Fermentation products) ชีวมวล (Biomass) และการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในระหว่างการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 แสดงในภาพที่ 4.5 จะเห็นว่ารูปแบบวิถีการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 มีลักษณะคล้ายกับรูปแบบวิถีการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสดังแสดงในภาพที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งในระยะแรกของการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Amylolytic enzyme) อาทิเช่น เอนไซม์ α -amylase glucoamylase และ pullulanase จะผลิตเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวออกมา เพื่อย่อยหรือเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคสก่อน ทั้งนี้ประสิทธิภาพและกระบวนการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตออกมาในระหว่างกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียดังกล่าว จะมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตลอดจนความสามารถในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นด้วย ซึ่งความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent-producing strain) และสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยวัตถุดิบประเภทแป้งได้เองนั้น ถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ต่อไป (Madihah *et al.*, 2008)

จากภาพที่ 4.5 จะเห็นว่ารูปแบบกระบวนการหมักของแป้งมันสำปะหลังที่ยังไม่ผ่านการย่อย (Gelatinized cassava starch) ก่อนกระบวนการหมักนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ 1) ระยะที่มีการผลิตกรดอินทรีย์ (กรดบิวทิริกและกรดอะซิติก) ควบคู่กับการผลิตชีวมวล (Cell biomass) ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญของแบคทีเรีย ผลจากการผลิตกรดอินทรีย์ ทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก pH เริ่มต้น 6.0 เป็น pH 4.75 และในระยะนี้จะพบการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ต่อมาระยะที่ 2 เมื่อการเจริญของแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase (หลังจาก 36 ชั่วโมง) ซึ่งในระยะนี้แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยนกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นในระยะแรกให้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (บิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล) ซึ่งส่งผลให้ค่า pH ของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย



ภาพที่ 4.5 วิธีการหมักของแป้งมันสำปะหลัง (Gelatinized cassava starch) ความเข้มข้น 60 g/L ที่ยังไม่ผ่านการย่อยด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สัญลักษณ์: (----) glucose, (--■--) maltose, (—) pH, (■) acetone, (▲) butanol, (◆) ethanol, (●) dry cell weight, (□) butyric acid, (○) acetic acid, (◇) total solvents, (Δ) total organic acids, (+) starch.

เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในการศึกษานี้ ได้ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 20-80 g/L เป็นแหล่งอาหาร จากการทดลองเมื่อให้ความร้อนแก่แป้งมันสำปะหลังจนกระทั่งแป้งเกิดการพองตัวและสุก (Gelatinization) พบว่าแป้งมันสำปะหลังจะแสดงพฤติกรรมแบบ Pseudoplastic behavior และความหนืด (Viscosity) ของแป้งจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นที่ใช้ด้วย (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทั้งนี้ได้ลองทดสอบใช้แป้งมันสำปะหลังในการหมักที่ 90 g/L ด้วยเช่นกัน แต่เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าว แป้งมันสำปะหลังแสดงพฤติกรรมแบบ Pseudoplastic behavior และมีความหนืดสูงมาก ซึ่งทำให้การเตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบค่อนข้างยุ่งยาก ในการวิจัยนี้จึงได้เลือกทำการศึกษาเฉพาะช่วงความเข้มข้นจาก 20-80 g/L เท่านั้น

ประสิทธิภาพในการหมักตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 จากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 60 g/L ทำให้สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Total solvents) ได้สูงที่สุดถึง 14.33 g/L รองลงมาคือการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 50 g/L และ 70 g/L ซึ่งผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดได้เท่ากับ 13.14 และ 11.92 g/L ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (Maximum dry cell weight) จะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่ใช้แป้งมันสำปะหลังจากความเข้มข้น 20 g/L จนถึง 40 g/L ส่วนการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นตั้งแต่ 40 g/L ขึ้นไปจนถึง 80 g/L พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อพิจารณาการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกผลิตเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากการใช้แป้งมันสำปะหลังตั้งแต่ 20 g/L จนถึง 60 g/L แล้วจะค่อยๆ ลดลงเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นมากกว่า 60 g/L ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจาก 40 g/L เป็น 80 g/L พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 10.41 g/L และน้ำตาลมอลโตสจะเพิ่มขึ้นจาก 0.13 เป็น 2.83 g/L ตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ (Residue starch concentration) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (40-80 g/L) พบว่าปริมาณแป้งที่เหลืออยู่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 3.04 เป็น 12.78 g/L ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไปในระหว่างการหมักลดลงจาก 89.87% เป็น 68.8% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกันกับผลการทดลองของ Madihah *et al.* (2000) และ Madihah *et al.* (2001b) ซึ่งใช้แป้งสาเก (Sago starch) เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 โดยกลุ่มนักวิจัยดังกล่าวได้สรุปว่า เมื่อใช้ตัวอย่างแป้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงๆ ในการหมัก จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ลดลง ซึ่งเป็นเพราะความหนืดที่เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่เพิ่มขึ้นนั้น อาจจะมีผลต่อการถ่ายเทมวล (Mass transfer) ในกระบวนการย่อย (Enzymatic hydrolysis) ตลอดจนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ รวมถึงปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ก็เป็นได้

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462

Kinetic parameters	Cassava starch concentrations (g/L)						
	20	30	40	50	60	70	80
Final glucose concentration (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.23±0.11	1.65±0.21	6.86±0.11	10.41±0.06
Final maltose concentration (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.13±0.24	0.51±0.37	1.07±0.07	2.12±0.35	2.83±0.22
Final starch concentration (g/L)	2.02±0.20	3.04±0.38	3.42±0.35	3.03±0.45	5.35±0.12	10.05±0.46	12.78±0.18
Utilized starch (%)	94.90±0.17	89.87±0.22	91.13±0.12	92.54±0.08	86.88±0.08	73.83±0.11	68.82±0.06
Maximum dry cell weight (g/L)	1.09±0.02	1.85±0.12	2.29±0.20	2.20±0.02	2.18±0.06	2.29±0.12	2.34±0.04
Maximum acetic acid concentration (g/L)	2.13±0.24	1.17±0.36	1.45±0.19	2.23±0.13	2.06±0.32	1.56±0.45	1.47±0.53
Maximum butyric acid concentration (g/L)	3.47±0.42	2.38±0.38	2.22±0.44	2.52±0.35	2.56±0.20	2.32±0.08	1.87±0.11
Total organic acids concentration (g/L)	5.60±0.12	3.55±0.16	3.67±0.25	4.75±0.18	4.62±0.16	3.88±0.13	3.34±0.18
Maximum acetone concentration (g/L)	0.79±0.22	2.45±0.25	1.86±0.16	2.81±0.20	3.06±0.25	3.37±0.11	2.72±0.23
Maximum ethanol concentration (g/L)	0.18±0.04	0.22±0.01	0.32±0.04	0.32±0.06	0.34±0.02	0.37±0.01	0.30±0.06
Maximum butanol concentration (g/L)	2.23±0.34	6.88±0.46	9.24±0.26	10.01±0.18	10.93±0.22	8.18±0.45	8.64±0.38
Total solvents concentration (g/L)	3.20±0.12	9.55±0.23	11.42±0.11	13.14±0.08	14.33±0.09	11.92±0.21	11.66±0.11
Fermentation time (h)*	72	60	48	48	48	60	72

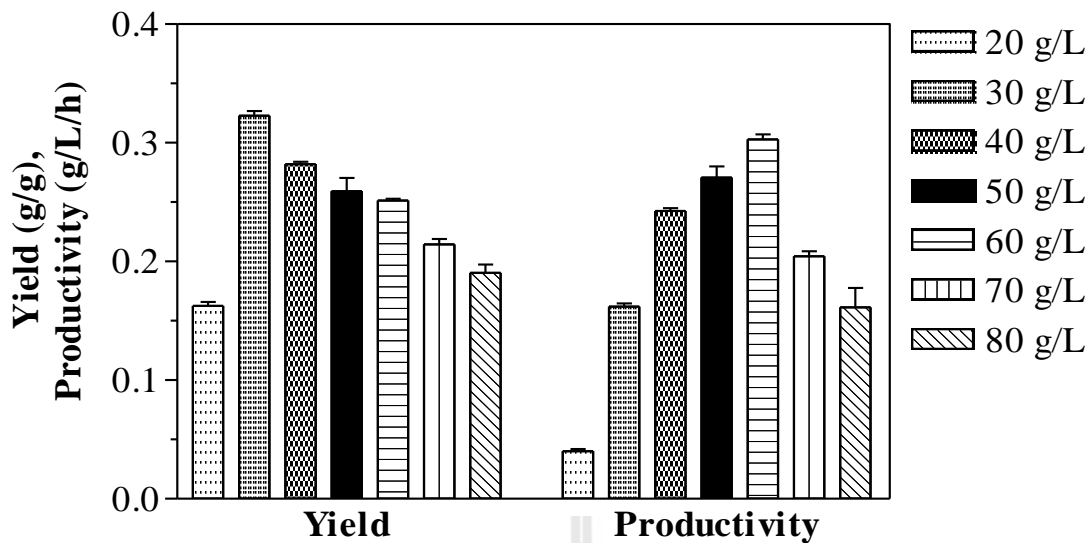
ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง คำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยกำหนดให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ครั้ง

สำหรับการหมักโดยใช้ตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 30 g/L พบว่ามีแป้งที่ยังคงไม่ถูกใช้ไปและเหลืออยู่ประมาณ 3.04 g/L แสดงว่าแป้งมันสำปะหลังจะถูกใช้ไปในระหว่างกระบวนการหมักเท่ากับ 89.87% หรือประมาณ 26.96 g/L (ตารางที่ 4.4) ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นดังกล่าว พบว่าไม่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสเหลืออยู่เลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 30 g/L ในการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์นั้น แบคทีเรียมีความสามารถในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส) ซ้ำกว่าการใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักเพื่อการเจริญและสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ จึงไม่พบปริมาณน้ำตาลหลงเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นอาจจะอนุมานได้ว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 30 g/L ประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะลดลง เนื่องจากปริมาณแหล่งอาหารเริ่มต้นไม่เพียงพอ (Deficient in substrate) ต่อการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย

จากภาพที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งอาหารหลัก ซึ่งพบว่าค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะลดลงจาก 0.32 เป็น 0.19 g/g เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังจาก 30 g/L เป็น 80 g/L นอกจากนี้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ก็ลดลงจาก 0.28 เป็น 0.16 g/L/h เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังจาก 60 g/L เป็น 80 g/L จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูงๆ นั้น อาจจะส่งผลต่ออัตราการถ่ายเทมวล (Mass transfer rate) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความหนืดของน้ำหมัก กล่าวคือเมื่อความหนืดของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นจะไปลดความสามารถในการแพร่ (Diffusion) ของสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการหมักได้ Thang *et al.* (2010) ได้อธิบายไว้ว่า ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยวัตถุดิบประเภทแป้ง (Amylolytic enzyme) ให้กลายเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Fermentable sugars) ของแบคทีเรียระหว่างที่มีการเจริญเต็มที่ (Active growth) จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแป้งที่ใช้ในกระบวนการหมักเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากปริมาณแป้งที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนืดของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งความหนืดที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวจะส่งผลให้การผลิตตัวทำละลายลดลงด้วย

เมื่อพิจารณาปริมาณบิวทานอลที่ถูกผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นค่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ปริมาณบิวทานอลสูงสุดที่ผลิตได้จากทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจะไม่มากกว่า 16 g/L ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Roos *et al.* (1985) ที่รายงานไว้ว่าบิวทานอลความเข้มข้น 13 ถึง 16 g/L สามารถยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่การเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. จะลดลงถึง 50% เมื่อมีการเติมบิวทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7-12 g/L ส่วนความเข้มข้นของกรดบิวทริก ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลนั้น (Monot *et al.*, 1983) พบว่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจาก 40 g/L เป็น 50 g/L โดยลดลงจาก 2.52 เป็น 2.22 g/L อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการผลิตตัวทำละลายไม่ได้มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด (Total organic acids) ที่ถูกผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ดังจะเห็นได้จากการสะสมของกรดอินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 4.75 g/L ในตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 50 g/L ซึ่งสูงกว่าปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด (4.62 g/L) ของตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 60 g/L และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายทั้งหมดที่ถูกผลิตขึ้นจากการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 50 และ 60 g/L พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 50 g/L ซึ่งมีการสะสมของกรดอินทรีย์สูงกว่านั้น มีการผลิตตัวทำละลาย เพียง 13.14 g/L ซึ่งน้อยกว่าตัวอย่างที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 60 g/L ที่ผลิตตัวทำละลายได้ 14.33 g/L ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Madihah *et al.* (2001) ที่พบว่า การสะสมของกรดอินทรีย์ (กรดบิวทริก และ กรดอะซิติก) ในปริมาณมากระหว่างกระบวนการหมักนั้น ไม่ได้มีส่วนกระตุ้นให้มีการผลิตตัวทำละลายได้มากขึ้น แต่การที่จะผลิตตัวทำละลายให้ได้ปริมาณมากนั้น เชื่อว่าปริมาณของกรดบิวทริกในรูปที่ไม่แตกตัว (Undissociated butyric acid) ต้องมีการสะสมในระดับเพียงพอที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Onset of solvent production)

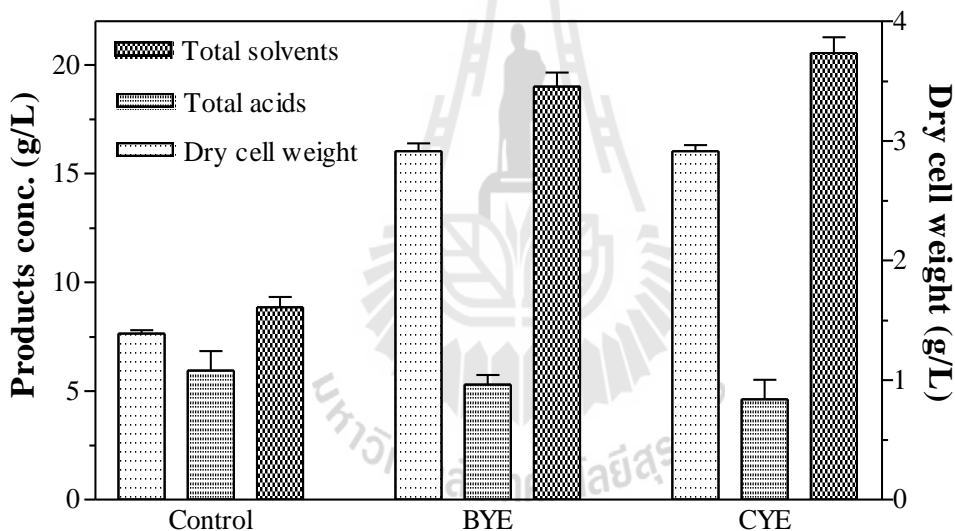


ภาพที่ 4.6 การเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งอาหารหลักในกระบวนการหมักแบบกะ

4.5 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ระหว่างสารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) และสารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast extract) ต่อประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (เอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลัง 60 g/L และควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยสารสกัดจากยีสต์ประเภทต่างๆ ในการทดลองนี้จึงควบคุมความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ให้เท่ากันที่ 5 g/L ส่วนตัวอย่างควบคุม (Control experiment) จะไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่า การใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 20.86 g/L ซึ่งมากกว่าการใช้สารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ที่ผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 18.46 g/L นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า และสารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมาก เมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการใช้สารสกัดจากยีสต์เลยที่ผลิตตัวทำละลายได้เพียง 9.55 g/L ยิ่งไปกว่านั้นปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งที่สูงที่สุดของตัวอย่างควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์นั้น มีค่าน้อยกว่าการทดลองที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า และสารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

เป็นแหล่งไนโตรเจนถึง 2 เท่า ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่าแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์ (Organic nitrogen source) เช่น สารสกัดจากยีสต์ จะเป็นแหล่งของกรดอะมิโนหลายชนิด วิตามิน และแร่ธาตุที่จะกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Madihah *et al.*, 2001) Saksinchai *et al.* (2001) รายงานว่า สารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างง่าย สำหรับการเจริญและการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าซึ่งมีราคาแพงในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า แป้งมันสำปะหลัง เสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นวัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพอย่างยิ่ง ที่จะใช้ในกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (บิวทานอล แอซีโตน และเอทานอล) ซึ่งการค้ำที่ยั่งยืนต่อไป



ภาพที่ 4.7 การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 (สัญลักษณ์: BYE, Spent brewer's yeast extract; CYE, Commercial yeast extract and Control, without yeast extract)

4.6 อิทธิพลของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

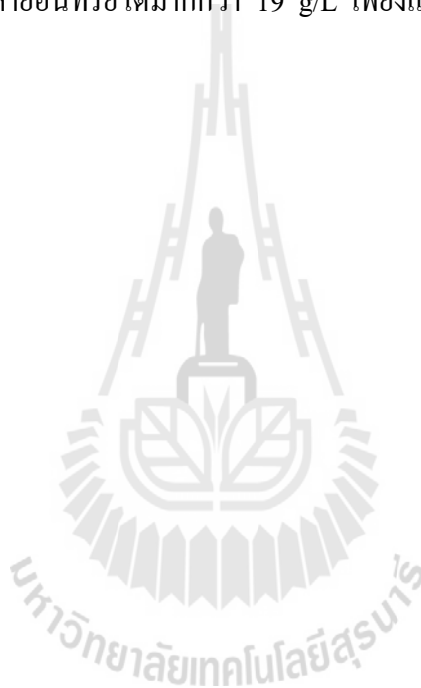
เพื่อศึกษาความสามารถของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ในกระบวนการหมักต่อการผลิตตัวทำละลายเอบีอี (แอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล) ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ได้แก่ แป้งมัน มันเส้น กาก

มัน ตลอดจนมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยทั้งเอนไซม์ หรือกรด ที่ความเข้มข้นประมาณ 70 g/L ทั้งนี้ ในกรณีที่ใช้อาหารที่มีแป้งอยู่ 60 g/L จะกำหนดให้ในตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 66 g/L เนื่องจากแป้ง 1 g ถ้าถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส 1.1 g ในการทดลองนี้ก็ได้ประยุกต์ใช้การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระหว่างการสร้างตัวทำละลายที่ pH 5.5 ด้วย และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารในชุดการทดลองควบคุม ซึ่งผลของการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังประเภทต่างๆ รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ในการผลิตตัวทำละลายได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.5 พบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลัก

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลัง ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการย่อย (Non hydrolyzed treatment) ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก ได้แก่ แป้งมัน มันเส้น และกากมัน พบว่าการใช้แป้งมันให้ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุดถึง 21.20 g/L ตามด้วยการใช้มันเส้น ซึ่งผลิตตัวทำละลายทั้งหมดได้ 19.11 g/L ส่วนตัวอย่างกากมันซึ่งมีองค์ประกอบของเส้นใยที่ค่อนข้างสูงถึง 14.08 g/L (ตารางที่ 4.1) จึงไม่สามารถใช้ในกระบวนการหมักได้โดยตรง เนื่องจากแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Cellulase ที่จะย่อยส่วนประกอบที่เป็นเส้นใยภายในโครงสร้างของ Lignocelluloses ในกากมันได้ จึงจำเป็นต้องย่อยตัวอย่างก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก

สำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลัง ทั้งย่อยด้วยเอนไซม์ กรด และการทำให้เกิดเจลก่อนการหมัก (Gelatinization) โดยพบว่า การย่อยมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และการทำให้เกิดเจลก่อนการหมัก สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ในช่วง 19-21 g/L ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Nimcevic *et al.* (1998) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Cl. beijerinckii* NRRL B592 สามารถใช้มันฝรั่งทั้งหัวที่ไม่ผ่านการเตรียมและย่อยด้วยเอนไซม์ใดๆ เป็นแหล่งอาหารในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อผลิตน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคส ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักนั้น ไม่ได้มีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรียชนิดนี้เลย ส่วนการใช้ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ลดลงประมาณ 19.48% เมื่อเทียบกับปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตได้จากการเตรียมตัวอย่างอื่นๆ (21.20 กับ 17.07 g/L) ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจากในระหว่างการเตรียมตัวอย่างด้วยกรด ซึ่งสามารถย่อยทุกพันธะอย่างไม่จำเพาะเจาะจงใน โมเลกุลของตัวอย่าง จึงอาจทำให้เกิดการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้ปัญหาที่สืบเนื่องมาจากการเตรียมตัวอย่างก่อนการหมักด้วยกรด

นั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าจะทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ เช่น อนุพันธ์ของสาร Furfural ได้แก่ พวก Aliphatic acid และ Phenolic compound ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรีย เป็นต้น (Purwadi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009 และ Thongchul *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามการเตรียมตัวอย่างด้วยกรด เป็นวิธีการที่ค่อนข้างสะดวก รวดเร็ว และประหยัดในการผลิตน้ำตาลโมลกุลเดี่ยวจากอนุพันธ์ของสารที่ซับซ้อน เช่น Polysaccharide เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้นอาจจะอนุมานได้ว่า การเตรียมตัวอย่างกากมันโดยใช้กรด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ และมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าวัตถุดิบมันสำปะหลัง (Cassava materials) สามารถใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่า 19 g/L เพียงแค่เตรียมตัวอย่างเล็กน้อยก่อนน้ำเข้าสู่กระบวนการหมักเท่านั้น



ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพการหมักโดยใช้วัตถุดิบมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462

Kinetic parameters	Glucose	Gelatinized	Enzyme	Gelatinized	Enzyme	Enzyme	Acid
		cassava starch	hydrolysate cassava starch	cassava chip	hydrolysate cassava chip	hydrolysate cassava pulp	hydrolysate cassava pulp
Initial substrate concentration (g/L)	66.02±0.05	60±0.02	65.78±0.09	60±0.01±0.01	65.46±0.06	66.22±0.02	64.72±0.06
Final substrate concentration (g/L)	13.24±0.24	11.21±0.55	11.87±0.34	12.53±0.46	11.75±0.42	12.83±0.33	17.77±0.36
Maximum dry cell weight concentration (g/L)	2.65±0.26	2.78±0.05	2.75±0.06	2.70±0.12	2.72±0.06	2.78±0.16	2.54±0.12
Substrate utilized (%)	79.95±0.03	83.02±0.23	81.96±0.32	81.02±0.34	82.05±0.52	80.63±0.44	72.54±0.44
Final acetic acid concentration (g/L)	0.53±0.08	0.66±0.21	1.04±0.35	1.35±0.24	1.26±0.09	1.45±0.27	1.06±0.12
Final butyric acid concentration (g/L)	0.08±0.05	1.12±0.05	2.22±0.12	2.04±0.15	1.89±0.26	2.34±0.16	2.34±0.23
Maximum acetone concentration (g/L)	5.45±0.32	4.89±0.11	4.38±0.44	4.05±0.23	4.12±0.38	4.22±0.22	3.86±0.34
Maximum butanol concentration (g/L)	15.76±0.54	15.65±0.07	15.14±0.34	14.67±0.34	15.09±0.26	14.92±0.31	12.86±0.27
Max. ethanol concentration (g/L)	0.58±0.02	0.66±0.05	0.34±0.02	0.39±0.02	0.53±0.05	0.52±0.02	0.35±0.02
Total solvents concentration (g/L)	21.79±0.27	21.20±0.32	19.86±0.31	19.11±0.35	19.74±0.32	19.66±0.34	17.07±0.13
Fermentation time (h)*	60	48	48	48	60	60	60
Solvent yield (g solvents/g glucose)	0.41±0.03	0.39±0.02	0.37±0.02	0.36±0.01	0.37±0.03	0.37±0.03	0.36±0.02
Solvent productivity (g solvents/L/h)	0.36±0.01	0.44±0.01	0.41±0.02	0.40±0.02	0.33±0.02	0.33±0.01	0.28±0.01

ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง คำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยกำหนดให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากการเปรียบเทียบวัตถุดิบประเภทแป้ง (Starchy material) ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* sp. ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังในการหมักแบบกะโดยไม่มีการควบคุมค่า pH ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ให้ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์น้อยกว่าการใช้แป้งสาคุ (Sago starch) ในการหมักแบบกะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 (17.99 กับ 14.33 g/L) ในทางตรงกันข้ามเมื่อควบคุมค่า pH ในกระบวนการหมักแป้งมันสำปะหลังที่ pH 5.5 พบว่าสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่าการใช้แป้งสาคุในการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่า pH จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ในระหว่างกระบวนการหมัก มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ได้ ดังนั้นข้อพิสูจน์ในเรื่องการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ในการวิจัยนี้ อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

เมื่อพิจารณาการผลิตเอซิโตน เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลักในกระบวนการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้นสามารถผลิตเอซิโตนได้มากกว่าการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง ทั้งที่ผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามเชื่อว่าปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความแตกต่าง ของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวัตถุดิบต่างๆ ในตารางที่ 4.6 คือเวลาที่ใช้ในการหมัก (Fermentation time) กล่าวคือเมื่อใช้วัตถุดิบทั้งกากมันและมันเส้นในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์นั้น แบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้แป้งข้าวโพดและแป้งสาคุในกระบวนการหมัก แบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์มากที่สุดที่เวลา 66 และ 77 ชั่วโมงตามลำดับ ขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลัก แบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุดที่ 60 ชั่วโมง ทั้งนี้ผลของการใช้เวลาในการหมักที่มากกว่าตัวอย่างอื่นๆ เมื่อใช้แป้งข้าวโพดและแป้งสาคุในกระบวนการหมัก จึงทำให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Productivity) น้อยกว่า เมื่อเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังหรือกากมัน ป्राกฏการณ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าว สามารถอธิบายได้โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกันของแป้งแต่ละชนิด โดยมีการรายงานว่าแป้งข้าวโพดมีขนาดของเม็ดแป้งโดยเฉลี่ยประมาณ 15 μm (Ma *et al.*, 2006) และมีปริมาณ Amylose ประมาณ 28% (Ahmad *et al.*, 1999) ส่วนแป้งสาคุมีขนาดของเม็ดแป้งโดยเฉลี่ยประมาณ 30 μm (Wang *et al.*, 1995) และมีปริมาณ Amylose ประมาณ 24–31% (Ahmad *et al.*, 1999 และ Sandhu and Singh, 2007) ในขณะที่แป้งมันสำปะหลังมีขนาดของเม็ดแป้งโดยเฉลี่ยประมาณ 13-15 μm (Rao and Tattiyakul, 1999) และมีปริมาณ Amylose ประมาณ 18.6-23.6% (Defloor *et al.*, 1998) ทั้งนี้ขนาดของเม็ดแป้งที่เล็กกว่า จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยของเอนไซม์ Amylase ได้ด้วย เนื่องจากขนาดที่เล็กของเม็ดแป้งจะ

ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์และตัวซับสเตรต จึงทำให้เกิดการย่อยได้เร็วและดีขึ้นด้วย (Cone *et al.*, 1990)

ตารางที่ 4.6 ความสามารถของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* spp. ในการใช้วัตถุดิบประเภทต่างๆ เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

Kinetic parameters	Types of substrate					
	Glucose ^a	Cassava starch ^a	Cassava chip ^a	Cassava starch ^b	Corn starch ^c	Sago starch ^d
Initial substrate conc. (g/L)	66.02±0.05	60±0.02	60±0.01	60±0.12	50.00	60.00
Final substrate conc. (g/L)	13.24±0.24	11.21±0.55	12.53±0.46	10.46±0.24	11.46	17.06
Maximum dry cell weight concentration (g/L)	2.65±0.26	2.78±0.05	2.70±0.12	2.48±0.06	2.60	2.08
Substrate utilized (%)	79.95±0.03	83.02±0.23	81.02±0.34	84.24±0.07	78.60	no data
Final acetic acid concentration (g/L)	0.53±0.08	0.66±0.21	1.35±0.24	0.76±0.34	0.60	0.43
Final butyric acid concentration (g/L)	0.08±0.05	1.12±0.05	2.04±0.15	0.66±0.36	0.00	0.54
Maximum acetone concentration (g/L)	5.45±0.32	4.89±0.11	4.05±0.23	3.06±0.33	4.00	1.67
Maximum concentration (g/L)	15.76±0.54	15.65±0.07	14.67±0.34	10.93±0.17	16.20	16.00
Maximum ethanol concentration (g/L)	0.58±0.02	0.66±0.05	0.39±0.02	0.34±0.08	0.50	0.34
Total solvents concentration (g/L)	21.79±0.27	21.20±0.32	19.11±0.35	14.33±0.11	20.70	17.99
Fermentation time (h)*	60	48	48	48	66	77
Solvent yield (g solvents/g glucose)	0.41±0.02	0.39±0.02	0.36±0.01	0.26±0.02	0.48	0.37
Solvent productivity (g solvents/L/h)	0.36±0.01	0.44±0.01	0.40±0.02	0.24±0.01	0.31	0.23

ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง คำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยกำหนดให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากทดลอง 3 ซ้ำ การหมักแบบกะที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ 5.5 ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 (งานวิจัยนี้) ^bการหมักแบบกะที่ไม่มีมีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 (งานวิจัยนี้) ^cการหมักแบบกะที่ไม่มีมีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 (Thang *et al.*, 2010) ^dการหมักแบบกะที่ไม่มีมีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 (Madihah *et al.*, 2001)

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (เอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล) โดยใช้วัตถุดิบจากแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารหลัก เสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม การผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักแบบกะ จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังซึ่งมีอยู่มากในประเทศและราคาถูก ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ผลของการเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักโดยการย่อยด้วยเอนไซม์นั้น ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์แต่อย่างใด เมื่อเปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้ออกมาของตัวอย่างมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อน สำหรับการเตรียมตัวอย่างก่อนการหมักด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง พบว่าทำให้การผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ลดลงจาก 21.20 g/L เหลือ 17.07 g/L หรือคิดเป็น 19.48% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อน ซึ่งเชื่อว่าสาเหตุน่าจะมาจากสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Growth inhibitor substance) ที่เกิดขึ้นในขณะที่เตรียมตัวอย่างก็ว่าได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.5 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ถึง 1.5 เท่า ส่วนผลของการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 18.46 g/L ซึ่งเทียบเท่ากับใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า ที่ผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดได้เท่ากับ 20.86 g/L จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบจากมันสำปะหลังสามารถใช้เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่า 19 g/L โดยมีการย่อยตัวอย่างเพียงบางส่วนก่อนทำการหมักเท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้น กระบวนการหมักวัตถุดิบจากแป้งมันสำปะหลังซึ่งมีราคาถูก และมีอยู่มากตลอดทั้งปีในประเทศไทย โดยการใช้วิธีการการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 ร่วมกับการใช้สกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ถือว่าเป็นวัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพอีกทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถใช้เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมที่ยั่งยืนต่อไปได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่มุ่งเน้นไปที่การผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ในกระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลัง ทั้งแป้งมัน กากมัน และมันเส้น ซึ่งมีอยู่มากภายในประเทศ ที่สำคัญราคาถูกและสามารถหาได้ง่ายตลอดทั้งปีอีกด้วย ซึ่งในการวิจัยนี้จะใช้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายอินทรีย์ที่ต้องการได้ในปริมาณมาก และเป็นแบคทีเรียที่ได้รับความนิยมมากที่สุดสำหรับการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมด้วย นอกจากนี้แบคทีเรียดังกล่าวยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยวัตถุดิบประเภทแป้งอีกด้วย อย่างไรก็ตามในกรณีของการใช้ตัวอย่างกากมันซึ่งมีองค์ประกอบของเส้นใยอยู่ในปริมาณมากนั้น แบคทีเรียจะไม่สามารถใช้วัตถุดิบดังกล่าวในการเจริญและสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ได้โดยตรง เนื่องจากไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ที่มีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของโมเลกุลที่เป็นเส้นใยได้ ดังนั้นจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือกรดก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อเปลี่ยนโมเลกุลที่ซับซ้อนของตัวอย่าง ให้กลายเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ ทั้งนี้จากการทดลองพบว่า การเตรียมตัวอย่างกากมันด้วยกรดนั้น มีผลทำให้ประสิทธิภาพของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรียลดลงประมาณ 19% เมื่อเปรียบเทียบกับ การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ แต่ทั้งนี้การเตรียมตัวอย่างด้วยกรดก่อนการหมักก็มีข้อได้เปรียบในเรื่องของต้นทุนการผลิต ประกอบกับเป็นวิธีการที่ค่อนข้างสะดวก รวดเร็ว และประหยัดในการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากอนุพันธ์ของสารที่ซับซ้อน เช่น Polysaccharide ดังนั้นถ้าจะใช้ตัวอย่างกากมันในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ในการวิจัยนี้จึงขอแนะนำให้เลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนต่ำและมีประสิทธิภาพสูงอีกด้วย

ถ้าจะมีการทดลองครั้งต่อไป ควรที่จะนำโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติ เช่น โปรแกรม Response Surface Methodology (RSM) มาช่วยวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาจุดที่เหมาะสมอย่างแท้จริง ของแต่ละปัจจัยซึ่งมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้ศึกษาไป ไม่ว่าจะเป็นการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวอย่างที่ใช้ ตลอดจนเพิ่มปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ซึ่งเชื่อว่าน่าจะมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียกลุ่มนี้อย่างมาก เพื่อให้สามารถนำข้อมูลที่ได้ออกไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ควรมีการเพิ่มการศึกษาถึงระบบการหมักแบบต่อเนื่อง โดยการเลี้ยงแบบ Chemostat และ Turbidostat ตลอดจนควรมีการศึกษาถึงการเลี้ยงแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 โดยวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized) แบบต่างๆ ด้วย

5.2 อุปสรรค

ในระหว่างการดำเนินการวิจัยพบปัญหาหลัก คือ การเกิดการกลายพันธุ์หรือเสื่อมสภาพ (Strain degeneration) ของแบคทีเรียที่ใช้ ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ลดลง หรือไม่พบการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เลย จะพบเฉพาะการผลิตกรดอินทรีย์เท่านั้น ทั้งนี้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 เป็นแบคทีเรียที่เจริญและสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Strictly anaerobic bacteria) จึงทำให้เกิดความยุ่งยากในการดำเนินการวิจัย ทั้งในเรื่องของการควบคุมสถานะของกระบวนการหมัก การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก ตลอดจนการเก็บรักษาแบคทีเรียที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก ในการนี้ได้แก้ปัญหาโดยทำการควบคุมสถานะในระหว่างทำการหมัก โดยการไล่ออกซิเจนในน้ำหมักก่อนการถ่ายกล้าเชื้อด้วยแก๊สไนโตรเจนทุกครั้งและจะให้แก๊สไนโตรเจนต่อไปอีกเรื่อยๆ จนกระทั่งพบว่าแบคทีเรียเริ่มมีการเจริญและสร้างแก๊สได้เอง (คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน) จึงจะหยุดการให้แก๊สไนโตรเจน สำหรับการเก็บ Stock กล้าเชื่อนั้น จะเก็บในรูปของสปอร์โดยละลายในน้ำกลั่นแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำกล้าเชื่อนั้นไปใช้ เนื่องจากแบคทีเรียในรูปของสปอร์สามารถทนต่อสถานะที่ไม่เหมาะสม หรือมีออกซิเจนอยู่ได้ และที่สำคัญการเก็บกล้าเชื้อในรูปของสารละลายสปอร์นั้น สามารถป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์และเสถียรภาพธรรมชาติของแบคทีเรียได้อีกด้วย



บรรณานุกรม

- Ahmad, F. B., Williams, P. A., Doublier, J.-L., Durand, S., and Buleon, A. (1999). Physico-chemical characterisation of sago starch. Carbohydrate Polymers 38, 361-370.
- Assobhei, O., Kanouni, A. E., Ismaili, M., Loutfi, M., and Petitdemange, H. (1998). Effect of acetic and butyric acids on the stability of solvent and spore formation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during repeated subculturing. Fermentation and Bioengineering 85, 209-212.
- Badr, H. R., Toledo, R., and Hamdy, M. K. (2001). Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. Biomass and Bioenergy 20, 119-132.
- Bahl, H., Andersch, W., and Gottschalk, G. (1982). Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. Applied Microbiology and Biotechnology 15, 201-205.
- Bartholomev, J. W., and Mittwer, T. (1950). A simplified bacterial spore stain. Stain Technology 25, 153-154.
- Biebl, H. (2001). Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. Industrial Microbiology and Biotechnology 27, 18-26.
- Bochman, M. (1999). Advanced Inorganic Chemistry. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Campos, E., Qureshi, N., and Blaschek, H. (2002). Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA101. Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100, 553-561.
- Carneiro, S., Amaral, A. L., Veloso, A. C. A., Dias, T., Peres, A. M., Ferreira, E. C., and Rocha, I. (2009). Assessment of physiological conditions in *E. coli* fermentations by fluorescent microscopy and image analysis. Biotechnology Progress 25, 882-889.
- Charles, A. L., Sriroth, K., and Huang, T. (2005). Proximate composition, mineral contents, hydrogen cyanide and phytic acid of 5 cassava genotypes. Food Chemistry 92, 615-620.
- Chijindu, E. N., Boateng, B. A., Ayertey, J. N., Cudjoe, A. R., and Okonkwo, N. J. (2008). The effect of processing method of cassava chips on the development of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). African Journal of Agricultural Research 3, 537-541.

- Cone, J. W., and Wolters, M. G. E. (1990). Some properties and degradability of isolated starch granules. Starch - Stärke 42, 298-301.
- Davis, S. E., and Morton, S., A. III. (2008). Investigation of ionic liquids for the separation of butanol and water. Separation Science and Technology 43, 2460-2472.
- Defloor, I., Dehing, I., and Delcour, J. A. (1998). Physico-Chemical Properties of Cassava Starch. Starch - Stärke 50, 58-64.
- Dürre, P. (2008). Fermentative butanol production. Annals of the New York Academy of Sciences 1125, 353-362.
- Ezeji, T. C., and Blaschek, H. P. (2008). Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. Bioresource Technology 99, 5232-5242.
- Ezeji, T. C., Groberg, M., Qureshi, N., and Blaschek, H. (2003). Continuous production of butanol from starch-based packing peanuts. Applied Biochemistry and Biotechnology 106, 375-382.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. (2005). Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. Biotechnology 115, 179-187.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Current Opinion in Biotechnology 18, 220-227
- Geng, Q., and Park, C.-H. (1993). Controlled-ph batch butanol-acetone fermentation by low acid producing *Clostridium acetobutylicum* B18. Biotechnology Letters 15, 421-426.
- Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., Yang, S., and Jiang, W. (2009). Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. Microbiology and Biotechnology 36, 1225-1232.
- Hansen, Alan C., Qin Zhang, Peter, W.L. Lyne. (2005). Ethanol diesel fuel blends-a review. Bioresource Technology 96: 277-285.
- Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D., (1995). Exploring QSAR hydrophobic, electronic and steric constants. ACS, Washington, DC.
- Hartmanis, M. G. N., Klason, T., and Gatenbeck, S. (1984). Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. Applied Microbiology and Biotechnology 20, 66-77.

- Huber, G. W., Iborra, S., and Corma, A. (2006). Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. Chemical Reviews 106, 4044-4098.
- Jesse, T. W., Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. (2002). Production of butanol from starch-based waste packing peanuts and agricultural waste. Microbiology and Biotechnology 29, 117-123.
- Jones, D. T., Westhuizen, A. V. D., Long, S., Allcock, E. R., Reid, S. J., and Woods, D. R. (1982). Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology 43, 1434-1439.
- Jones, D. T., and Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological Reviews 50, 484-524.
- Kristin B. (2007). Butanol – an energy alternative? Ethanol Today. March 2011; 36-39. Online sources:<http://www.ethanoltoday.com/>andhttp://www.ethanol.org/pdf/contentmgmt/March_11_ET_secondary.pdf.
- Lee, S.-M., Cho, M. O., Park, C. H., Chung, Y.-C., Kim, J. H., Sang, B.-I., and Um, Y. (2008a). Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate. Energy and Fuels 22, 3459-3464.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., and Jung, K. S. (2008b). Fermentative butanol production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering 101, 209-228.
- Lee, J., Seo, E., Kweon, D. H., Park, K., and Jin, Y. S. (2009). Fermentation of rice bran and defatted rice bran for butanol 5 production using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. Microbiology and Biotechnology 19, 482-490.
- Liew, S. T., Arbakariya, L. S. T., Rosfarizan, M., and Raha, A. R. (2006). Production of solvent (acetone-butanol-ethanol) in continuous fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 using gelatinized sago starch as a carbon source. Malaysian journal of Microbiology 2, 41-50.
- Long, S., Jones, D. T., and Woods, D. R. (1984). Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262. Applied Microbiology and Biotechnology 20, 256-261.
- Ma, Y., Cai, C., Wang, J., and Sun, D.-W. (2006). Enzymatic hydrolysis of corn starch for producing fat mimetic. Food Engineering 73, 297-303.

- Madihah, M. S., Ariff, A. B., Khalil, M. S., Karim, K. I. A., and Suraini, A. A. (2001a). Anaerobic fermentation of gelatinized sago starch-derived sugars to acetone-1-butanol-ethanol solvent by *Clostridium acetobutylicum*. Folia Microbiologica 46, 197-204.
- Madihah, M. S., Ariff, A. B., Khalil, M. S., Suraini, A. A., and Karim, M. I. A. (2000). Partial purification and some properties of alpha-amylase and glucoamylase obtained as by-product from direct fermentation of sago starch to solvent by *Clostridium acetobutylicum*. Pakistan Journal of Biological Sciences 3, 744-749.
- Madihah, M. S., Ariff, A. B., Sahaid, K. M., Suraini, A. A., and Karim, M. I. A. (2001b). Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. Microbiology and Biotechnology 17, 567-576.
- Madihah, M. S., Tsuey, L. S., and Ariff, A. B. (2008). The profile of enzymes relevant to solvent production during direct fermentation of sago starch by *Clostridium saccharobutylicum* P262 utilizing different pH control strategies. Biotechnology and Bioprocess Engineering 13, 33-39.
- McNeil, B., and Kristiansen, B. (1985). Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology Letters 7, 499-502.
- Monot, F., Engasser, J. M., and Petitdemange, H. (1983). Regulation of acetone butanol production in batch and continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology and Bioengineering Symposium 13, 207-216.
- Monot, F., Engasser, J. M., and Petitdemange, H. (1984). Influence of pH and dissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Applied Microbiology and Biotechnology 19, 422.
- Moreira, A. R., Ulmer, D. C., and Linden, J. C. (1981). Butanol toxicity in the butyric fermentation. Biotechnology and Bioengineering Symposium 11, 567-579.
- Nimcevic, D., Schuster, M., and Gapes, J. R. (1998). Solvent production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media. Applied Microbiology and Biotechnology 50, 426-428.
- Niven, R. K. (2005). Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article. Renewable and Sustainable Energy Reviews 9, 535-555.

- Pablos, C., Grieken, R. V., Marugan, J., and Moreno, B. (2011). Photocatalytic inactivation of bacteria in fixed-bed reactor: mechanistic insights by epifluorescence microscopy. Catalysis Today 161, 133-139.
- Purwadi, R., Niklasson, C., and Taherzadeh, M. J. (2004). Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Biotechnology 114, 187-198.
- Qadeer, M. A., Choudhry, F. M., Ahmad, S., Rashid, S., and Akhtar, M. A. (1980). Acetone-butanol fermentation of cane molasses by *Clostridium acetobutylicum*. Scientific Research 32, 157-671.
- Qureshi, N., and Blaschek, H. P. (2001). ABE production from corn: a recent economic evaluation. Industrial Microbiology and Biotechnology 27, 292-297.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Hughes, S. R., and Cotta, M. A. (2008). Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-batch fermentation. Biomass and Bioenergy 32, 168–175.
- Rao, M. A., and Tattiyakul, J. (1999). Granule size and rheological behavior of heated tapioca starch dispersions. Carbohydrate Polymers 38, 123-132.
- Robinson, R. K. (2000): Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier 1-3, 445-450.
- Roos, J. W., McLaughlin, J. K., and Papoutsakis, E. T. (1985). The effect of pH on nitrogen supply, cell lysis, and solvent production in fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology and Bioengineering 27, 681-694.
- Saksinchai, S., Suphantharika, M., and Verduyn, C. (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17, 307-316.
- Sandhu, K. S., and Singh, N. (2007). Some properties of corn starches II: Physicochemical, gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. Food Chemistry 101, 1499-1507.
- Schuster, K. C., van den Heuvel, R., Gutierrez, N. A., and Maddox, I. S. (1998). Development of markers for product formation and cell cycle in batch cultivation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Applied Microbiology and Biotechnology 49, 669-676.
- Sriroth, K., Santisopasri, V., Petchalanuwat, C., Kurotjanawong, K., and Piyachomkwan, K. (1999). Cassava starch granule structure function properties: influence of time and

- conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. Carbohydrate Polymers 38, 161-170.
- Swodenk, W. (1983). Ethanol als Rohstoff für die chemische Industrie. Chemie Ingenieur Technik 55, 683-688.
- Stephens, G. M., Holt, R. A., Gottschal, J. C., and Morris, J. G. (1985). Studies on the stability of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. Applied Microbiology 58, 597-605.
- Thang, V., Kanda, K., and Kobayashi, G. (2010). Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Applied Biochemistry and Biotechnology 161, 157-170.
- Thongchul, N., Navankasattusas, S., and Yang, S.-T. (2010). Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. Bioprocess and Biosystems Engineering 33, 407-416.
- Vadivel, V., and Janardhanan, K. (2001). Diversity in nutritional composition of wild jack bean (*Canavalia ensiformis* L. DC) seed collected from South India. Food Chemistry 74, 507-511.
- Wackett, L.P. (2008). Biomass to fuels via microbial transformations. Current Opinion in Chemical Biology 12, 187-193.
- Wang, W. J., Powell, A. D., and Oates, C. G. (1995). Pattern of enzyme hydrolysis in raw sago starch: effects of processing history. Carbohydrate Polymers 26, 91-97.
- Yu, S., and Tao, J. (2009). Energy efficiency assessment by life cycle simulation of cassava-based fuel ethanol for automotive use in Chinese Guangxi context. Energy 34, 22-31.
- Zhu, Y., and Yang, S.T. (2004). Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. Biotechnology 110, 143-151.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ส่วนผสมของอาหารเลี้ยง

1. Cooked Meat Medium

Beef heart extract	30 g/L
Meat peptone	20 g/L
D (+) glucose	2 g/L
Sodium chloride	5 g/L

2. Cooked Meat Agar

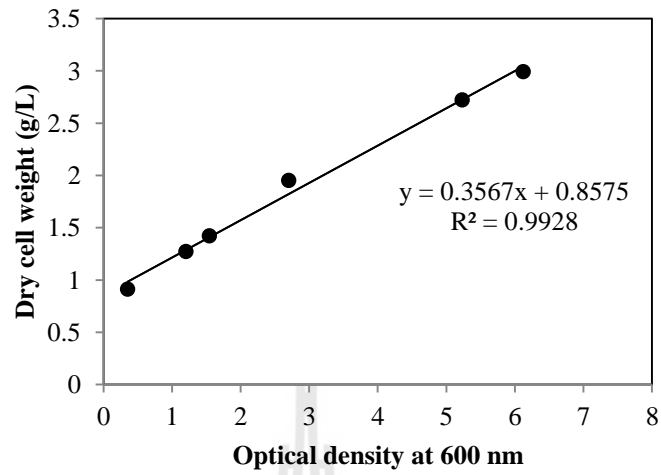
Beef heart extract	30 g/L
Meat peptone	20 g/L
D (+) glucose	2 g/L
Sodium chloride	5 g/L
Agar	15 g/L

3. Reinforced Clostridial Agar

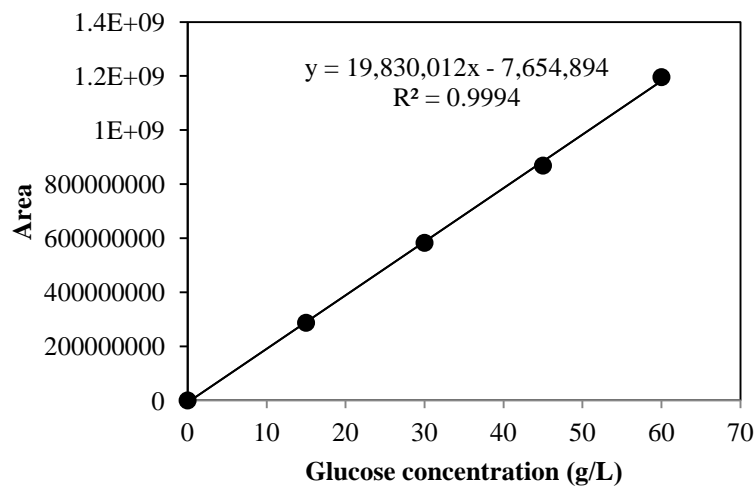
Casein enzymic hydrolysate	10 g/L
Beef extract	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
Dextrose	5 g/L
Sodium chloride	3 g/L
Sodium acetate	1 g/L
Soluble starch	0.5 g/L
L- cystein hydrochloride	0.5 g/L
Agar	15 g/L

ภาคผนวก ข

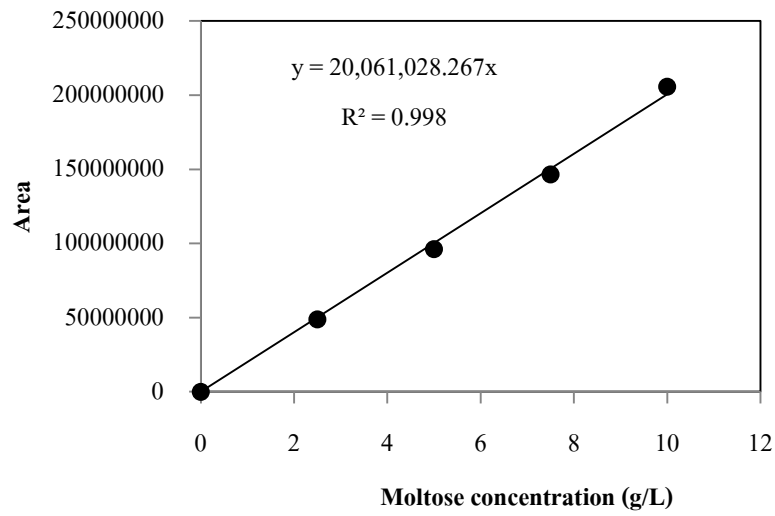
กราฟมาตรฐาน



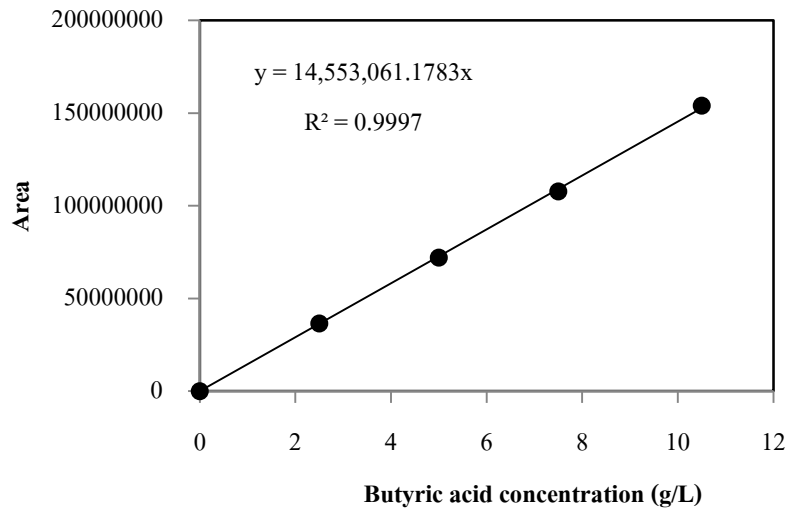
ภาพที่ 1ข ความสัมพันธ์ระหว่าง Optical density (OD) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462



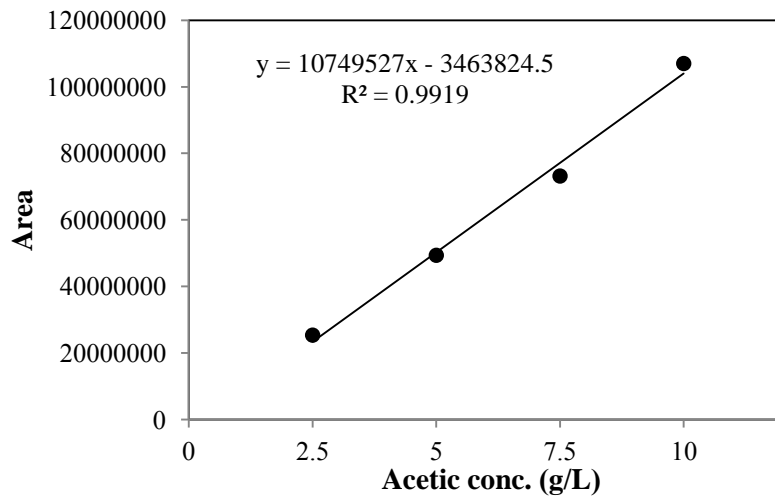
ภาพที่ 2ข กราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากเครื่อง HPLC



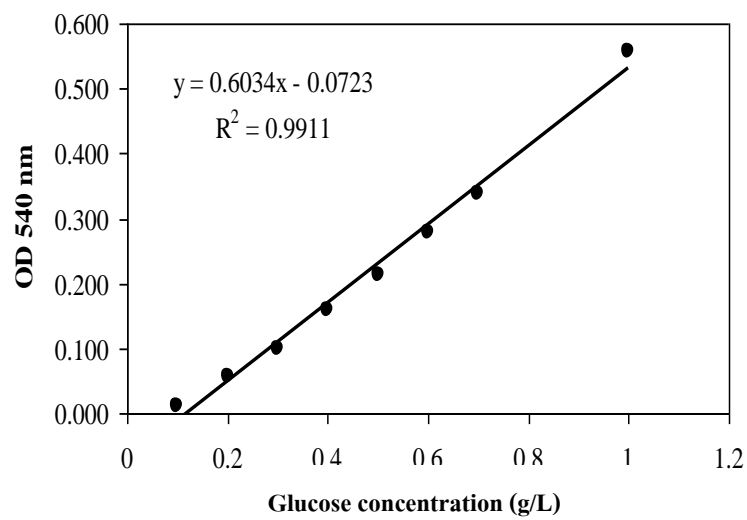
ภาพที่ 3 ข กราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลมอลโตสที่ได้จากเครื่อง HPLC



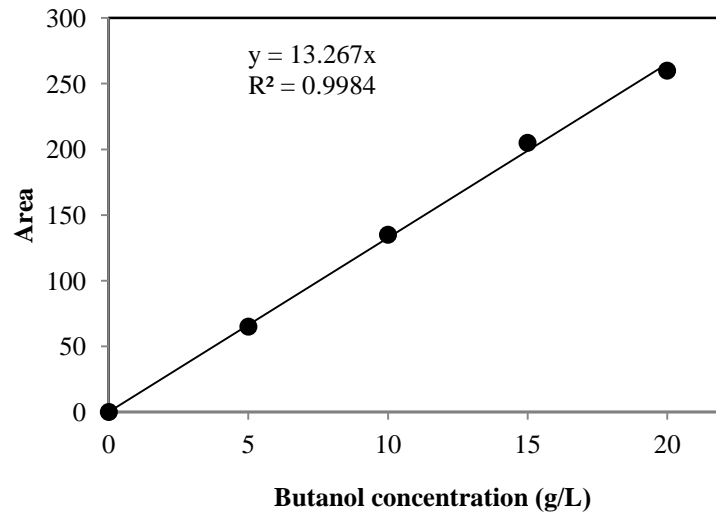
ภาพที่ 4 ข กราฟสารละลายมาตรฐานของกรดบิวทิริกที่ได้จากเครื่อง HPLC



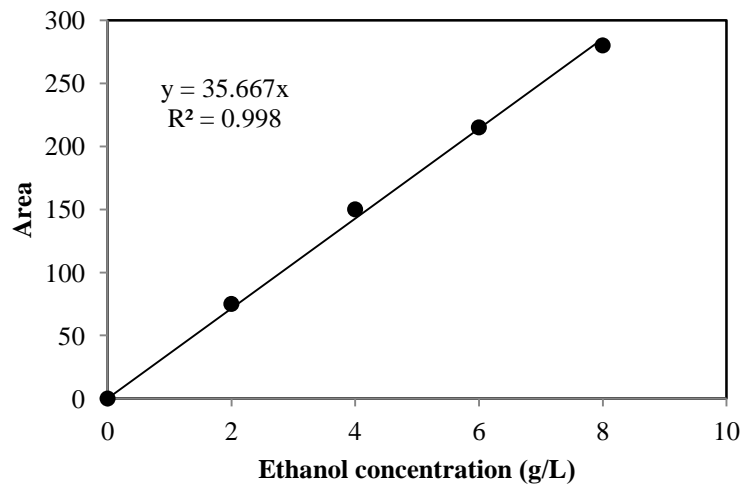
ภาพที่ 5 ข กราฟสารละลายมาตรฐานของกรดอะซิติกที่ได้จากเครื่อง HPLC



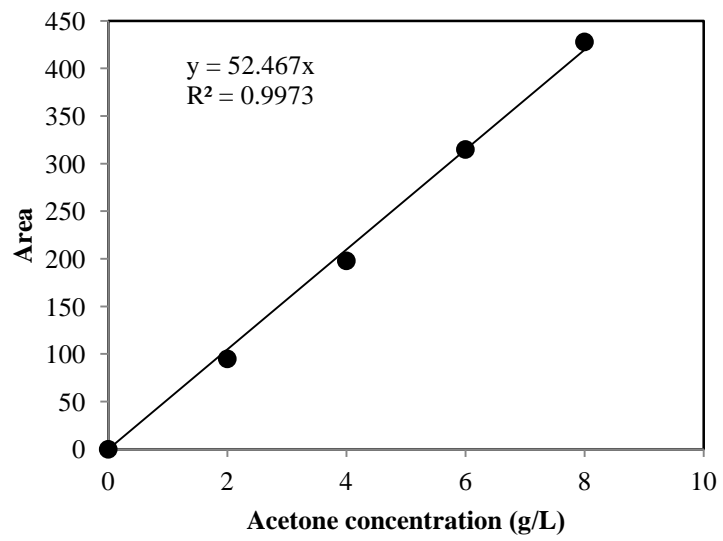
ภาพที่ 6 ข กราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS



ภาพที่ 7ข กราฟสารละลายมาตรฐานของบิวทานอลที่ได้จากเครื่อง GC



ภาพที่ 8ข กราฟสารละลายมาตรฐานของเอทานอลที่ได้จากเครื่อง GC



ภาพที่ 9ข กราฟสารละลายมาตรฐานของแอซิโตนที่ได้จากเครื่อง GC



ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนทร กาญจนทวี ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถนน มหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-224745 โทรสาร 044-224750 (E-mail: sunthorn@sut.ac.th) ประวัติการศึกษาจบปริญญาตรีสาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ปี พ.ศ. 2525 ปริญญาโทสาขาวิชา Agricultural Engineering (Food Process Engineering) จากสถาบัน AIT (Asian Institute of Technology) จังหวัดปทุมธานี ปี พ.ศ. 2528 และปริญญาเอก (Ph.D.) สาขาวิชา Biotechnology (Bioprocessing) จากมหาวิทยาลัย Massey University ประเทศ New Zealand ปี พ.ศ. 2533

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย ปัจจุบันเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย “การคัดเลือกแบคทีเรียกรดซักซินิก และการแยก และการทำให้บริสุทธิ์กรดซักซินิก” และเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การแยกและทำบริสุทธิ์กรดซักซินิกจากน้ำหมักโดยกระบวนการนาโนฟิวเตรชั่น”

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้วเรื่อง “การพัฒนาระบบกำจัดธาตุอาหารทางชีวภาพโดยใช้แหล่งคาร์บอนภายใน” ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 2009 ใน Suranaree Journal of Science and Technology Vol. 16 หน้า 221-233 และ “การแยกและทำบริสุทธิ์กรดอินทรีย์จากน้ำหมักโดยกระบวนการแผ่นเยื่อบาง: นาโนฟิวเตรชั่น” (Separation and Purification of Organic Acid from Fermentation Broth by Membrane Process: Nanofiltration) ตีพิมพ์ปี ค.ศ. 2010 ใน Process Biochemistry Vol. 45, No 11 หน้า 1763-1768 Impact factor (2010) = 2.648 และ “การผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* เสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์” ตีพิมพ์ปี ค.ศ. 2011 ใน Biochemical Engineering Journal Vol. 54, No 3 หน้า 192-199 Impact factor (2010) = 2.692 และ “ลักษณะเฉพาะทางแพนจีโนมของเชื้อแลคโตคอคคัส แลคติส ด้วยเทคนิคความหลากหลายทางจีโนมิกและทรานสคริปโตมิก (Pan-Genome Characteristics of *Lactococcus lactis*: A Genomic and Transcriptomic Diversity Techniques) ตีพิมพ์ปี ค.ศ. 2011 ใน Applied and Environmental Microbiology Vol. 77, No 3 หน้า 739-748 Impact factor (2010) = 3.778

ประวัติผู้วิจัยผู้ร่วมวิจัย

นายอภิชัย สาวิสิต เกิดเมื่อวันที่ 20 พฤษภาคม 2528 บ้านเลขที่ 59 หมู่ 7 ตำบลคงสิงห์ อำเภोजังหวัดร้อยเอ็ด 45270 โทรศัพท์ 044-223333 โทรสาร 044-224750 (E-mail: apichai.sawisit@gmail.com) ประวัติการศึกษา จบปริญญาตรีสาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี ปี พ.ศ. 2550 ปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ปี พ.ศ. 2553 ในระหว่างที่ศึกษาในระดับปริญญาโท ได้รับทุนเพื่อไปทำงานวิจัยที่ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้โครงการ “Internship Program for Asian Young Researchers in the Field of Life Sciences and Bioengineering” โดยหัวข้องานวิจัยในระดับปริญญาโทคือ การผลิตเอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังและกลีเซอรอลด้วยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

ผลงานทางวิชาการ เรื่อง “Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production from Cassava by *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462” ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 2011 ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (The 1st Payap University Research Symposium) มหาวิทยาลัยพายัพ จังหวัดเชียงใหม่ และเรื่อง “Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum*” ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 2011 ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (The 1st International Congress on Natural Products) จังหวัดพังงา และเรื่อง “Validation of Carbon and Nitrogen Sources, pH, and Temperature for Efficient Succinate Production by *Actinobacillus succinogenes*” ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 2012 ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (The 3rd Thai-Japan Bioplastics and Biobased Materials Symposium) กรุงเทพมหานคร และเรื่อง “Validation of fermentative parameters for efficient succinate production in batch operation by *Actinobacillus succinogenes* 130ZT” ตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 2012 ใน Advanced Materials Research Journal, Vol. 550-553. หน้า 1448-1454.

ปัจจุบันเป็นนักศึกษาระดับปริญญาเอกในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถนน มหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000