อภิชัย สาวิสิทธิ์ : การผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังและกลีเซอรอลด้วยเชื้อ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* (ACETONE-BUTANOL-ETHANOL (ABE) PRODUCTION FROM CASSAVA AND GLYCEROL BY *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุนทร กาญจนทวี, 111 หน้า.

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยในครั้งนี้ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้มันสำปะหลังและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับยีสต์ใช้แล้วในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตตัวทำละลาย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ทั้งนี้การทดลองที่ใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ได้ศึกษาผลของการควบคุมค่า pH ที่แตกต่างกันในช่วง pH 4.5-6.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในช่วง 20-80 g/L และศึกษาผลของการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันต่อการผลิตตัวทำละลาย จากผลการทดลองพบว่า *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเทียบเท่ากับการใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการทดลองแบบกะที่ไม่มีการควบคุม pH สามารถผลิตตัวทำละลายทั้งหมด 14.33 g/L ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการผลิตโดยใช้กลูโคสที่ผลิตตัวทำละลายทั้งหมด 15.39 g/L นอกจากนี้ ยังพบว่าการใช้เอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังก่อนนำไปหมัก ซึ่งทำให้ได้มอลโตสและกลูโคสเกิดขึ้นนั้น ไม่ได้มีผลช่วยให้การผลิตตัวทำละลายเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ ขณะที่การย่อยด้วยกรดก่อนนำไปหมัก พบว่าให้ผลผลิตน้อยกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ 19.4% ส่วนการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ในช่วงที่มีการผลิตตัวทำละลาย พบว่าที่ pH 5.5 มีการผลิตตัวทำละลายสูงสุด 20.08 g/L นอกจากนี้ยังพบว่าที่การควบคุมค่า pH ที่สูงกว่า 6.0 ขึ้นไปจะมีการผลิตกรดอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ และมีการผลิตตัวทำละลายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และยังพบว่าการควบคุมค่า pH ที่ 5.25 มีการผลิตอะซิโตนสูงสุดถึง 6.78 g/L ทั้งนี้การทดลองที่มีการควบคุม pH ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายสูงกว่าที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ประมาณ 1.5 เท่า จากผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในการทดลองในช่วง 20-80 g/L พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 60 g/L มีการผลิตตัวทำละลายสูงสุด คือ 14.33 g/L การใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลังที่ต่ำกว่า 30 g/L จะทำให้เกิดการผลิตกรดอินทรีย์มากกว่าการผลิตตัวทำละลาย สำหรับผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันในการผลิตตัวทำละลาย พบว่าการใช้ยีสต์สกัดจากยีสต์ที่ใช้แล้วในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้มีการผลิตตัวทำละลาย 18.46 g/L ซึ่งใกล้เคียงกับได้กับการหมักที่ใช้ยีสต์สกัดทางการค้า ซึ่งผลิตตัวทำละลายได้ 20.86 g/L

กรณีที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก พบว่าเชื้อ *Cl. acetobutylicum* JCM 7289 สามารถผลิตผลผลิตได้หลากหลาย เช่น บิวทานอล เอทานอล และอะซิโตน อย่างไรก็ตามกลีเซอรอลบางส่วนยังสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น 1,3 โพรเพนไดออล, กรดบิวทิริกและ กรดอะซิติก ตามลำดับ โดยพบว่า การใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นมากกว่า 40 g/L มีการผลิตตัวทำละลายเพียง 5.92 g/L ซึ่งน้อยกว่าการใช้กลูโคส (13.85 g/L) ถึง 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจาก วิถีการเกิดกระบวนการสันดาปของกลีเซอรอลที่ทำให้เกิดการสร้างตัวทำละลายตัวอื่น เช่น 1, 3 โพรเพนไดออล เป็นต้น จึงส่งผลให้การผลิตของตัวทำละลาย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลลดลง จากการศึกษาผลของความเข้มข้นพบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตตัวทำละลาย โดยการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงกว่า 40 g/L เชื้อจะไม่สามารถใช้กลีเซอรอลได้หมด ยิ่งไปกว่านั้นการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นสูงๆ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลลดลงอีกด้วย ทั้งนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 60 g/L หรือมากกว่าส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดน้อยลง จากผลการพิจารณากระบวนการหมักที่มีการควบคุม pH สามารถสรุปได้ว่า ที่ pH 5.5 มีการผลิตตัวทำละลายสูงสุด คือ 11.66 g/L และกระบวนการหมักที่มีการควบคุม pH สามารถผลิตตัวทำละลายได้มากกว่ากระบวนการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่า pH สำหรับผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันนั้น สามารถสรุปได้ว่ากระบวนการหมักโดยใช้ยีสต์สกัดจากยีสต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการผลิตตัวทำละลายเท่ากับ 10.34 g/L ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้ยีสต์สกัดทางการค้าที่มีการผลิตตัวทำละลายเท่ากับ 11.66 g/L

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

APICHAI SAWISIT : ACETONE-BUTANOL-ETHANOL (ABE) PRODUCTION FROM CASSAVA AND GLYCEROL BY *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUNTHORN KANCHANATAWEE, Ph.D., 111 PP.

ABE FERMENTATION/*CLOSTRIDIUM ACETOBYTYLICUM*/CASSAVA/ GLYCEROL

The main objective of this study was to demonstrate the feasibility of using cassava materials and glycerol as a carbon source 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 a 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 with a 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 were 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).

When glycerol was used as carbon substrate, *Cl. acetobutylicum* JCM 7289 was able to produce relatively great variety of products including butanol, ethanol acetone; however, a varying fraction of glycerol was also converted to 1,3 propanediol, butyric acid and acetic acid, respectively. More than 40 g/L glycerol was utilized, and only 5.92 g/L total solvents were produced, two times lower in concentration as when glucose was used as substrate (13.85 g/L). It could be due to its metabolic route that favors the formation of other solvents such as 1, 3 propanediol, diminishing the production of ABE. According to the result of glycerol concentrations, it had an effect on cell growth and solvents production. When initial glycerol concentration was higher than 40 g/L, residual glycerol was left at the end of

the fermentation. Moreover, the efficiency of glycerol utilization at high initial glycerol concentration was low. In addition, the initial concentration of glycerol at 60 g/L or higher the cell growth rate was retarded. On the fermentation with controlled pH, the result revealed that the highest total solvents production (11.66 g/L) was obtained with a controlled pH of 5.5. Furthermore, total solvents production with controlled pH was higher than that obtained in fermentation without controlled pH. Considering the effect of various nitrogen sources, it revealed that the fermentation performance using spent brewer's yeast extract as a nitrogen source resulted in 10.81 g/L total solvents production, comparable to that obtained with fermentation using the commercial yeast extract (11.66 g/L).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-Advisor's Signature_____