

การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียม ในกระบวนการหมักแบบกะ

อังคณา สุจริต¹⁾, ชุตติมณีนธ์ สติธิพัฒน์กุล²⁾, จิรกันต์ เมืองนาโพธิ์³⁾, วรกันต์ บุรพาณะ⁴⁾ และเหมือนเดือน พิศาลพงศ์⁵⁾

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ โดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในกระบวนการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.0 เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบผลกับการใช้น้ำตาลกลูโคส พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 45 กรัมต่อลิตร จะได้ตัวทำละลายรวม 16.62 และ 7.98 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส และน้ำอ้อย ตามลำดับ การหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะส่งผลยับยั้งต่อกระบวนการหมักบิวทานอล แต่สำหรับการหมักโดยใช้น้ำอ้อยที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก การเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 80 และ 90 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มอัตราการผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายรวมได้อย่างมาก โดยที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ถึง 24.73 กรัมต่อลิตร ค่าการเปลี่ยนเป็นตัวทำละลาย ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 32.67เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตตัวทำละลายเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยผลิตบิวทานอล อะซิโตนและเอทานอลได้ 15.35, 4.58 และ 4.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: บิวทานอล น้ำอ้อย คลอสตริเดียม กระบวนการหมักแบบกะ

¹⁾ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

อีเมล: as_angkhana@hotmail.com

²⁾ อาจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

อีเมล: chutimon.s@chula.ac.th

³⁾ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

อีเมล: chirakarn.m@chula.ac.th

⁴⁾ นักวิจัย สถาบันวิจัยและเทคโนโลยี ปตท. บริษัท ปตท.จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ 10900

อีเมล: vorakan.b@pttplc.com

⁵⁾ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

อีเมล: muenduen.p@chula.ac.th

* Corresponding Author

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

Angkhana Sutcharit¹⁾, Chutimon Satirapipathkul²⁾, Chirakarn Muangnapoh³⁾, Vorakan Burapatana⁴⁾
and Muenduen Phisalaphong⁵⁾

Abstract

Butanol production from sugarcane juice by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 was studied in batch fermentation at 35 °C and pH 5.0. In a comparative study of fermentation performance between using glucose medium and sugarcane juice medium at the initial reducing sugar concentration of 45 g/L, the total solvent concentrations of 16.62 and 7.89 g/L were obtained from the system using glucose medium and sugarcane juice medium, respectively. The inhibition of butanol fermentation at initial glucose concentrations above 60 g/L was reported. On the other hand, since sugarcane juice is composed predominantly of sucrose, enhancement of butanol formation and total solvent production were achieved by the utilization of sugarcane juice medium with the initial sugar concentration of 80-90 g/L. By utilization of sugarcane juice medium at the optimal sugar concentration (80 g/L), the total solvents of 24.73 g/L (composed of 15.35 g/L butanol, 4.58 g/L acetone and 4.80 g/L ethanol) with the conversion yield ($Y_{p/s}$) of 32.67% and 0.26 g/(L·h) production rate was obtained.

Keywords: Butanol, Sugarcane juice, Clostridium, Batch fermentation

¹⁾ Master Students, Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 1033,
E-mail: as_angkhana@hotmail.com

²⁾ Lecturer, Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,
Email: chutimon.s@chula.ac.th

³⁾ Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,
E-mail: chirakarn.m@chula.ac.th

⁴⁾ Researcher, PTT Researcher and Technology Institute, PTT Public Company Limited (PTT), Bangkok 10900,
E-mail: vorakan.b@pttplc.com

⁵⁾ Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,
E-mail: muenduen.p@chula.ac.th

* Corresponding Author

1. บทนำ

น้ำมันปิโตรเลียมเป็นพลังงานที่มีอยู่ในปริมาณจำกัด แต่ความต้องการใช้มีเพิ่มขึ้นทุกวัน เป็นผลให้เกิดวิกฤตการณ์ราคาน้ำมันในตลาดโลกเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมและการพัฒนาประเทศได้ ดังนั้นจึงทำให้มีการแสวงหาพลังงานทดแทนในรูปแบบอื่นเพื่อใช้ทดแทนหรือลดปริมาณการใช้้ำมันปิโตรเลียมลง

บิวทานอลเป็นพลังงานจากชีวมวลชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ (David and David, 1986) มีความเหมาะสมในการใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ เนื่องจากการสันดาปภายในเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จึงไม่เกิดมลพิษ อีกทั้งยังมีค่าความดันไอและการกัดกร่อนน้อยกว่าเอทานอล ทำให้สามารถขนส่งได้สะดวกและปลอดภัยกว่า สามารถละลายได้ดีในน้ำมันเบนซินและดีเซล ไม่ก่อให้เกิดการแยกชั้น (Durre, 2007) นอกจากนี้ยังนิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมเคมีและการสังเคราะห์ยา

ปัจจุบันการผลิตบิวทานอลส่วนใหญ่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยการนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้มีต้นทุนสูง บิวทานอลยังสามารถผลิตได้โดยกระบวนการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE fermentation) ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มคลอสทริเดียม โดยจุลินทรีย์จะผลิตสารละลายผ่านกระบวนการกลูโคสเมตาโบไลต์ไปเป็นไพรูเวท จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อเนื่องเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอ, อะซิโตนอะเซทิลโคเอ และบิวทาลิลโคเอ ตามลำดับ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือตัวทำละลาย บิวทานอล อะซิโตน และ เอทานอลในสัดส่วน 6:3:1 โดยประมาณ ให้กรดบิวทริก กรดอะซิติก แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (จิรกันต์, เหมือนเดือน และพูลพร, 2544)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการผลิตได้แก่สายพันธุ์จุลินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น อุณหภูมิในการหมัก และการควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง เป็นต้น (Grott and Bahl, 1981) โดยสารตั้งต้นจากวัตถุดิบหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในประเทศที่ใช้ได้ เช่น แป้งมันสำปะหลัง (Hanh et al., 2010) มันสำปะหลังสด (Sutcharit, Satirapipathkul and Muangnapoh,

2009) ผักตบชวา ฟางข้าว แกลบ และเปลือกเมเปิล (Sun and Lui, 2010) เป็นต้น แต่วัตถุดิบที่เป็นที่สนใจ ในปัจจุบัน คือ น้ำอ้อย ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ไม่ต้องผ่านการแปรรูปสามารถนำมาใช้หมักได้เลย โดยไม่มีขั้นตอนยุ่งยาก นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีแหล่งเพาะปลูกอ้อยได้ในปริมาณมากทั้งที่ใช้เป็นอาหารและที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการหมัก ทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องของราคาตลาดวัตถุดิบในการหมัก แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักบิวทานอลโดยใช้น้ำอ้อยที่แน่นอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาและหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตบิวทานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

ในงานวิจัยนี้ใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (จาก American Type Culture Collection 12301 Pask Lawn Drive Rock, Maryland, U.S.A.) ในอาหาร RCM (Reinforced Clostridial Medium) ที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเชื้อโดยนำหัวเชื้อมาทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (Gapes, et al., 2000) จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหาร RCM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายในหม้อนิ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 60 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในขวดเขย่า โดยผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.2 กระบวนการหมักแบบกะ

กระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 1 ลิตร (Biostat Q®, B. Braun Biotech International, Germany) เริ่มจากการเตรียมสารอาหารปริมาตร 600 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.01, Yeast extract 2.0, Tryptone 6.0 และ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 3.0 กรัมต่อลิตร (Tashiro et al., 2004) ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผ่านแก๊สไนโตรเจน เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทกล้าเชื้อว่องไว (active inoculums) ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในถังหมัก และผ่านแก๊สไนโตรเจนอีกเป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างกระบวนการหมัก ทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นที่ 4.0 นอร์มอล และควบคุมอุณหภูมิการหมักที่ 35 องศาเซลเซียส ปรับความเร็วรอบเครื่องกวนที่ 200 รอบต่อนาที ทำการทดลองโดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำอ้อยเป็น 45, 60, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร ส่วนการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลกลูโคส ทำการทดลองที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารเช่นเดียวกัน

2.3 วิธีวิเคราะห์

วัดปริมาณเซลล์ด้วยการหาหน้าหนักแห้งร่วมกับการวัดค่าความขุ่น (Optical density, OD) โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-2450, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจะหาในรูปของค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี DNS analysis และหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส (Glucose Analyser YSI รุ่น 27, U.S.A.) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จะใช้วิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Shimadzu Model Gc 7AG, Japan) กับ recorder integrator (Chromatopac CR1A, Japan) ปริมาณของผลิตภัณฑ์หาได้จากการเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ

3. ผลการทดลอง

จากการศึกษาการใช้น้ำอ้อยเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และการหาความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำอ้อยที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลโดยกระบวนการหมักแบบกะได้ผลดังนี้

3.1 ผลของวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบกะ

ผลการศึกษาการใช้น้ำอ้อยเป็นกลูโคสบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 1 โดยกระบวนการหมักที่ใช้กลูโคส สามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ 16.62 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย บิวทานอล อะซิโตนและเอทานอล 8.38, 4.10 และ 4.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำอ้อย ที่ได้ปริมาณตัวทำละลายรวม 7.98 กรัมต่อลิตร ซึ่งประกอบด้วยบิวทานอล 3.16 กรัมต่อลิตร อะซิโตน 1.24 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 3.58 กรัมต่อลิตร พบว่า การหมักโดยใช้กลูโคสสามารถผลิตตัวทำละลายได้มากกว่าการใช้น้ำอ้อย เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเซลล์สามารถใช้ได้โดยตรง ในขณะที่น้ำอ้อยมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่

Tangney และ Mitchell (2000) ได้รายงานการศึกษาการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 พบว่า สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวได้ โดยน้ำตาลซูโครสจะเข้าสู่วิถีเมตาโบลิซึม โดยนำผ่านเข้าไปในเซลล์ ที่มีการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุคโตส และเข้าสู่วิถีของการสร้างกรดและตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อไป แต่ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียว จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ในการใช้ซูโครส และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีทั้งน้ำตาลกลูโคสและซูโครส โดยเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นในอาหารซูโครสก่อน จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสให้หมดก่อน จึงมีการใช้ซูโครสต่อไป

จากผลการหมักโดยใช้น้ำอ้อย พบว่าในช่วงแรกของกระบวนการหมัก เซลล์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้หมดก่อน จึงจะเริ่มสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรุคโตส ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการหมักยาวนานกว่า เมื่อเทียบกับการหมักด้วยกลูโคส ทั้งนี้พบว่า การหมักโดยใช้น้ำอ้อยจะให้ปริมาณกรดรวมที่สูงกว่า คือ มีกรดบิวทิริก 3.62 กรัมต่อลิตร และมีกรดอะซิติก 4.33 กรัมต่อลิตร เนื่องมาจากในช่วงแรกเซลล์จะผลิตกรดก่อน แล้วจึงเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลาย ซึ่งถ้าสามารถเปลี่ยนกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกที่เหลืออยู่ใน

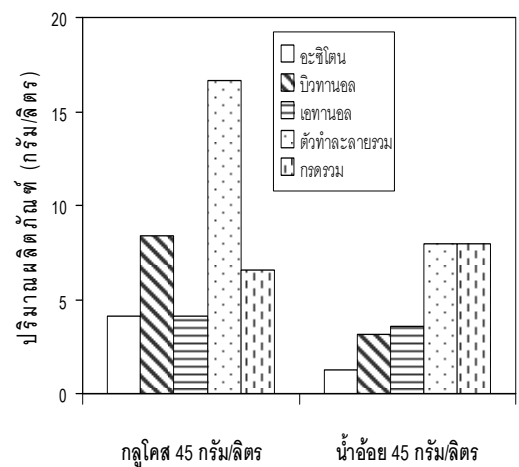
ระบบไปเป็นตัวทำละลายได้หมด จะทำให้ได้ปริมาณตัวทำละลายเพิ่มขึ้น

ในงานวิจัยที่ผ่านมา (Shaheen, Shirley and Jones, 2000) พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักบิวทานอลอยู่ที่ 45-60 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะส่งผลยับยั้งกระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามเนื่องจาก ในน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครสเป็นหลัก และยังมีสารอาหารอื่นๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะศึกษาค่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับกระบวนการหมักโดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ ในการผลิตบิวทานอล

3.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตบิวทานอล

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอ้อยต่อการผลิตบิวทานอลในการหมักแบบกะ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ 60, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) จะได้ค่าการผลิตตัวทำละลายรวมและบิวทานอลในปริมาณค่อนข้างน้อย โดยมีเปอร์เซ็นต์การผลิตตัวทำละลาย 14.67 และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยผลิตตัวทำละลายรวมได้ 7.51 กรัมต่อลิตร ผลิตบิวทานอลได้ 3.81 กรัมต่อลิตร ผลิตอะซิโตนและเอทานอลได้ 1.09 และ 2.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกที่เหลืออยู่ในระบบร่วมกับการใช้น้ำตาล พบว่า มีปริมาณกรดรวมเหลืออยู่เป็นจำนวนมากถึง 11.45 กรัมต่อลิตร ในขณะที่มีการใช้น้ำตาลไปเกือบหมด ดังนั้นการที่ผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลได้ในปริมาณน้อยนั้น อาจเกิดจากปริมาณน้ำตาลในระบบหมักก่อน ที่ขั้นตอนของกระบวนการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายจะได้ถูกดำเนินการ โดยกระบวนการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายจะใช้สารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาล (แหล่งคาร์บอน) ร่วมกับการใช้กรดบิวทิริกและอะซิติกเพื่อเปลี่ยนเป็นตัวทำละลาย แต่เมื่อปริมาณน้ำตาลหมดก่อน

ทำให้การเปลี่ยนเป็นบิวทานอลและอะซิโตนต้องยุติลง ส่งผลต่อปริมาณตัวทำละลายที่ผลิตได้



รูปที่ 1 ผลของวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบกะ โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสเปรียบเทียบกับน้ำอ้อย โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษากระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามตารางที่ 1 พบว่า สามารถผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลได้ในอัตราการผลิตที่สูงขึ้นมาก โดยผลิตตัวทำละลายรวมได้ 24.73 และ 22.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร จะมีค่าผลได้ตัวทำละลายรวม ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 32.67 เปอร์เซ็นต์ และ 0.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงถึง 15.35 กรัมต่อลิตร ผลิตอะซิโตนและเอทานอลได้ 4.58 และ 4.80 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ 12.75 กรัมต่อลิตร ผลิตอะซิโตนและเอทานอลได้ 6.04 และ 3.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมที่ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า ที่ความเข้มข้นน้ำอ้อยเริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตตัวทำละลายได้น้อยลง และได้ปริมาณเซลล์ลดลง แต่ได้ปริมาณอะซิโตนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อธิบายได้ว่าที่ความเข้มข้น

น้ำตาลที่สูงเกินไป อาจส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลายของเซลล์ได้ จากผลการศึกษาการผลิตตัวทำละลายโดยใช้กลูโคส 40-70 กรัมต่อลิตรก่อนหน้านี้นี้ พบว่า ที่กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร มีผลได้ตัวทำละลายเท่ากับ 31.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 70 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ตัวทำละลายลดลงเป็น 19.3 เปอร์เซ็นต์ (Mitchell, 1998)

จะเห็นว่า ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงเกินไป อาจทำให้ผลได้ตัวทำละลายรวมลดลง อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลที่ต่ำเกินไป จะทำให้การผลิตตัวทำละลายได้น้อย

เช่นกัน ทั้งนี้เพราะปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่อาจถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตกรดจนหมด ไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกิจกรรมการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลาย ดังจะเห็นได้จากผลการหมักโดยใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 45-60 กรัมต่อลิตร โดยจะสังเกตได้ว่า การหมักโดยใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80-90 กรัมต่อลิตร จะมีการผลิตกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกมากในช่วง 30 ชั่วโมงแรก จากนั้นเซลล์จะทำปฏิกิริยาเปลี่ยนกรดให้เป็นตัวทำละลายต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาณตัวทำละลายและกรดที่ผลิตได้โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นต่างๆ

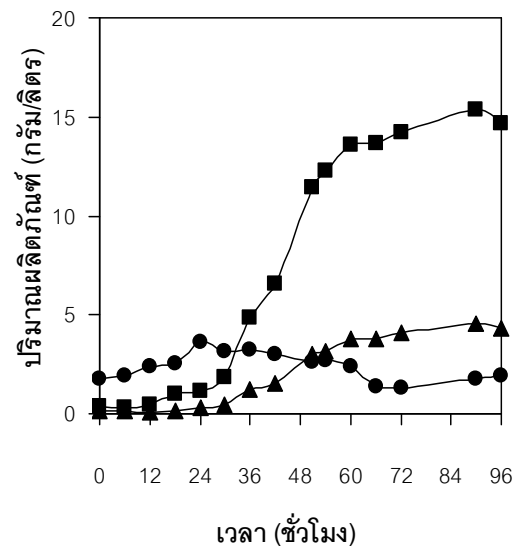
ปริมาณผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)		
	60	80	90
อะซิโตน	1.09	4.58	6.04
บิวทานอล	3.81	15.35	12.75
เอทานอล	2.61	4.80	3.96
ปริมาณตัวทำละลายรวม	7.51	24.73	22.75
กรดบิวทิริก	7.62	1.26	1.48
กรดอะซิติก	3.83	1.79	1.48
ปริมาณกรดรวม	11.45	3.05	2.96
ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น	55.09	76.41	96.31
ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้	51.18	75.7	84.68
ปริมาณเซลล์สูงสุด	2.64	3.55	2.92
ผลได้ตัวทำละลายรวม (%Y _{p/s})	14.67	32.67	26.87
ผลได้กรดรวม (%)	22.37	4.03	5.87
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (g/L-h)	0.08	0.26	0.12
อัตราการผลิตกรด (g/L-h)	0.12	0.03	0.03

หลังการหมักสิ้นสุดปริมาณกรดทั้ง 2 ชนิดที่เหลืออยู่ในระบบมีปริมาณน้อยกว่ามาก เมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้น้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสำหรับการใช้น้ำอ้อยเป็นสารตั้งต้น ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลาย คือ ที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร

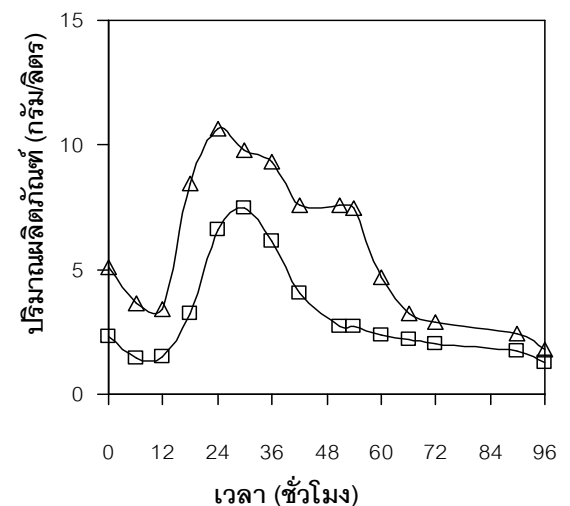
รูปแบบแนวโน้มของการหมักโดยใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 - 90 กรัมต่อลิตร มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยได้แสดงรูปแบบของการหมักที่ใช้น้ำอ้อยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ในรูปที่ 2 สำหรับการผลิตตัวทำละลาย และ ในรูปที่ 3 สำหรับการผลิตกรดที่เวลาต่างๆ พบว่า ในช่วงชั่วโมงแรกๆของการหมักยังไม่มีการผลิตผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเชื้ออยู่ในช่วงการปรับตัว แต่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง เริ่มมีการใช้ปริมาณน้ำตาลจำนวนมากในการเจริญเติบโตของเซลล์ (รูปที่ 4) ในขั้นนี้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดเป็นส่วนใหญ่ ต่อเมื่อมีปริมาณกรดที่มากพอระดับหนึ่ง เซลล์จะมีการใช้น้ำตาลร่วมกับการใช้กรดเพื่อเปลี่ยนกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกไปเป็นตัวทำละลายบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอลมากขึ้น และจะเห็นว่า เมื่อมีบิวทานอลในความเข้มข้นที่มาก ปริมาณเซลล์ในระบบจะลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4 เนื่องจากบิวทานอลและตัวทำละลายที่ความเข้มข้นสูง มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยมีรายงานว่า บิวทานอลที่ความเข้มข้น 13-14 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญและการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* (Gutierrez, et al., 1998)

เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบอื่นๆ เช่น การใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายผักตบชวา ที่สภาวะในการหมักที่เหมือนกัน ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ 6.77 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลิตบิวทานอลได้ 4.43 กรัมต่อลิตร (Satirapipathkul and Muangnapoh, 2009) หรือการใช้น้ำมันสำปะหลังสด ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.28 กรัมต่อลิตร และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 20.16 กรัมต่อลิตร (จิรกานต์, เหมือนเดือน

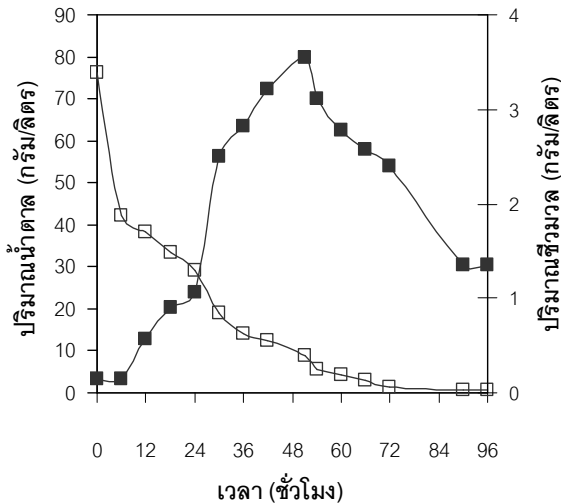
และพลพร, 2544) และการใช้น้ำตาลจากการย่อยสลายเปลือกเมเปิ้ล ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 90 กรัมต่อลิตร ผลิตบิวทานอลได้ 10.89 กรัมต่อลิตร และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 13.82 กรัมต่อลิตร (Sun and Lui, 2010) จะเห็นว่า การใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบสามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงกว่า



รูปที่ 2 ปริมาณตัวทำละลายที่ผลิตได้โดยใช้น้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย ■ คือ บิวทานอล □ คือ อะซิโตน ● คือ เอทานอล



รูปที่ 3 ปริมาณกรดที่ผลิตได้โดยใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัม/ลิตร โดย □ คือ กรดบิวทิริก Δ คือ กรดอะซิติก



รูปที่ 4 ปริมาณเซลล์และปริมาณน้ำตาลระหว่างการหมักบิวทานอลโดยใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย □ คือ ปริมาณน้ำตาล ■ คือ ปริมาณเซลล์

4. สรุปผล

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าการใช้ น้ำอ้อยในกระบวนการหมักแบบกะเพื่อผลิตตัวทำละลายบิวทานอลโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีใช้ในอุตสาหกรรม ทำการควบคุมสภาวะในระหว่างกระบวนการหมัก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างคั้งที่ 5.0 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาจากก่อนหน้านี้ โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร กระบวนการหมักโดยใช้น้ำอ้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ จะผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลได้น้อยกว่า แต่การใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งกระบวนการหมักบิวทานอล จากการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำอ้อยต่อกระบวนการผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายอื่นๆ พบว่า ปัจจัยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นจะมีผลต่อการผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายเป็นอย่างมาก การหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 และ 90 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูง โดยสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงถึง 15.35 และ 12.75 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายเท่ากับ 32.67 และ 26.87 และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.26 และ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการ

เปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรอื่นๆ สรุปได้ว่า น้ำอ้อยเป็นสารตั้งต้นที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ผลิตบิวทานอล

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท ปตท.จำกัด (มหาชน) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

จิรกันต์ เมืองนาโพธิ์ เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และพุลพร แสงบางปลา. 2544. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต n-Butanol จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้ เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน. ทุนอุดหนุนการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2544.

Angkhana Sutcharit, Chutimon Satirapipatkul and Chirakarn Muangnapoh. (2009). Bio- Botanol Production from The Fermentation of Cassava, 19th Thailand Chemical Engineering and Applied Chemistry Conference, Felix River Kwai Resort, Kanjanaburi, Thailand, 26-27 Oct.

Chutimon Satirapipathkul and Chirakarn Muangnapoh. (2009). Bio-Butanol production from Water Hyacinth, The 2nd AUN Regional conference on Natural Resources and Materials, yorkyakata, Indonesia 6-7 Aug.

David, T. J. and David R. W. (1986). Acetone- Butanol Fermentation. Microbiological Reviews, Vol. 50, No. 4, 484-524

Dürre, P. (2007). Biobutanol: An attractive biofuel. J. Biotechnol. Vol.2: 1525–1534. Vol.2, No.1, 115-124.

Gapes, J. R., Swoboda, H., Haslinger, A., Nimcevic, D. (2000). The effect of heat-shocking on batch fermentation by *Clostridium beijerinckii* NRRL

- B592. Appl. Microbiol Biotechnol. Vol.54, 118-120.
- Grott, S, G. and Bahl H. (1981). Feasible improvement of the Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum*, Trends in the Biological of Fermentation for Fuels and Chemical (Hollander, A.ed). Plenum Press New York, 463-471.
- Gutierrez, N.A., Schuster, K.C., Maddox, I.S., Swoboda, H. and Gapes, J.R. (1998). Strain comparison and medium preparation for the acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process using a substrate of potato. Bioresource Technology. Vol.66.No.3, 263-265.
- Hanh Thi My Tran, Benjamas Cheirsilp, Brian Hodgson and Kamontam Umsakul. (2010). Potential use of Bacillus subtilis in a co- culture with Clostridium butylicum for acetone-butanol-ethanol production from cassava starch. Biochemical Engineering Journal. Vol.48, 260-267.
- Mitchell, W.J. (1998). Physiology of carbohydrates to solvent conversion by clostridia. Adv. Microb Physio. Vol.39, 31-130.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., and Yoshino, S. (2004). High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose feeding Method. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol.98.No.4, 263-268.
- Tangney, M. and Mitchell W.J. (2000). Analysis of a Catabolic Operon for Sucrose Transport and Metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J. Mol. Microbial. Biotechnol. Vol.2.No.1, 71-80.
- Shaheen, R., Shirley M., and Jones, T. D. (2000). Comparative Fermentation Studies of Industrial Strains Belonging to Four Species of Solvent-Producing Clostridia. J.Mol.Microbiol.Biotechnol. Vol.2. No.1, 115- 124.
- Sun, Z. and Liu, S. (2010). Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by Clostridia acetobutylicum ATCC 824. Biomass and Bioenergy.