บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. ประวัติการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลโดยการหมัก

การผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในระดับอุตสาหกรรม ได้เริ่มขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1914 ซึ่งเป็นปีที่ Weizmann นักเคมีชาวอิสราเอลได้แยกเชื้อ Clostridium acetobutylicum นำมาหมักกับแป้งข้าวโพด ให้ผลิตภัณฑ์อาซีโตน บิวทานอล และเอธานอล เป็นผลสำเร็จ (6)

เมื่อเริ่มสงครามโลกครั้งที่ 1 ประเทศอังกฤษมีความต้องการอาซีโตน เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการทำวัตถุระเบิด และต้องการบิวทานอลเพื่อนำไปเปลี่ยนเป็น butadien สำหรับเป็นวัตถุดิบผลิตยางสังเคราะห์ อุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยใช้ขบวนการผลิตของ Weizmann ได้เริ่มขึ้นในประเทศอังกฤษ และต่อมาในประเทศคานาดา และสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ (7)

เมื่อยุติสงครามโลกครั้งที่ 1 ความต้องการอาซีโตนลดลง ต่อมาพบว่าบิวทานอลใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับ nitrocellulose lacquers ทำให้อุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลเริ่มขึ้นอีกครั้ง แต่วัตถุดิบคือแป้งจากธัญญพืชมีราคาแพงขึ้น (5,7)

ปี ค.ศ. 1930 ประสบความสำเร็จในการแยกเชื้อที่สามารถใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล และใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกากน้ำตาลราคาถูกกว่าธัญญพืช (8)

ปี ค.ศ. 1945 อุตสาหกรรมการหมักอาซีโตน-บิวทานอล ถูกแข่งขันกับการผลิตบิวทานอลโดยวิธีการสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี (acetaldohyde) ต่อมาอุตสาหกรรมการหมักอาซีโตน-บิวทานอล ได้ยุติลงในปี ค.ศ. 1952 เนื่องจากราคาธัญญพืชและกากน้ำตาลสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีซึ่งราคาถูกกว่า (5)

ปี ค.ศ. 1973 ราคาน้ำมันดิบสูงขึ้น การผลิตบิวทานอลโดยวิธีการสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี มีต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ก่อให้เกิดความสนใจที่จะผลิตอาซีโตน-บิวทานอล โดยกระบวนการหมักอีกครั้ง (5)

2. องค์ประกอบที่ใช้ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

2.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล คือ แบคทีเรีย ซึ่งอยู่ในจีนัสบาซิลัส (Bacillus) เช่น Bacillus tetryl Bacillus butacone และแบคทีเรียในจีนัสคลอสตริเดียม (clostridium) เช่น Clostridium acetobutylicum Clostridium. butylicum เป็นต้น (6, 8)

ในอุตสาหกรรมการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล และในงานวิจัยโดยทั่วไปจะใช้แบคทีเรียจีนัสคลอสตริเดียมเป็นส่วนใหญ่ คลอสตริเดียมที่สำคัญที่ผลิตบิวทานอล มีอยู่ 4 ชนิด (species) (5) ได้แก่ (โดยประมาณ)

1) Clostridium acetobutylicum ให้ผลิตภัณฑ์บิวทานอล อาซีโตน และเอธานอล ในอัตราส่วน 6:3:1 (โดยประมาณ)

2) Clostridium beijerinkii (Cl. butyricum) ให้ผลิตภัณฑ์บิวทานอล ไอโซโปรพานอล และเอธานอล ในอัตราส่วน 6:3:1

3) Clostridium aurantibutyricum ให้ผลิตภัณฑ์บิวทานอล อาซีโตน และไอโซโปรพานอล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4) Clostridium tetanomorphum ให้ผลิตภัณฑ์บิวทานอล และเอธานอล ในอัตราที่เท่ากัน

ชนิดของคลอสตริเดียมที่ใช้สารคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก แสดงไว้ในตารางที่ 2

2.2 วัตถุดิบ

วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ได้แก่ แป้งข้าวโพด (maize) กากน้ำตาล (blackstrap molasses, high-test molasses) (9) วัตถุดิบอื่น ๆ เช่น ข้าวสาลี มันฝรั่ง บีท (beet) (7) เฮมิเซลลูโลส (10) หางนม (whey) (11, 12) น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพด (7) น้ำตาลจากการย่อยเนื้อไม้ (wood hydrolysate) (13) น้ำตาลจากการย่อยมันสำปะหลัง (14)

คลอสตริเดียมที่ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส น้ำตาลเพนโตส เช่น ไซโลส อะราบิโนส เซลโลไบโอส ซูโครส และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แสดงในตารางที่ 2

ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยคลอสตริเดียม ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ได้ เวลาที่ใช้ในการหมัก และ % เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงไว้ในตารางที่ 3

3. ปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

ผลผลิตของบิวทานอล อาซีโตน เอธานอล นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของคลอสตริเดียม วัตถุดิบที่ใช้หมักแล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ดังนี้

ตารางที่ 2 ชนิดของคลอสตริเดียมที่ใช้สารคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (5)

จุลินทรีย์	แหล่งคาร์บอนที่ใช้	ผลิตภัณฑ์ (มิลิโมล/100 โมลของเฮกโซลี								
		กรด			ตัวละทำลาย				แก๊ส	
		อะเซติก	บิวทิริค	อื่นๆ	เอธานอล	บิวทานอล	ไอโซโปรพานอล	อาซีโตน	CO_2	H_2
Cl. acetobutylicum	แป้ง เฮกโซส เพนโตส เซลโลไบโอส	14	4	6	9	56	-	22	221	139
Cl. beijerinckii (syn. Cl. butylicum)	แป้ง เฮกโซส เพนโตส เซลโลไบโอส	3	1	-	12	68	26	-	220	81
Cl. tetanomorphum (strain MGI)	เซลโลไบโอส เฮกโซส เพนโตส	23	5	-	43	17	-	-	ม.	ม.
Cl. aurantibutyricum	แป้ง เฮกโซส เพนโตส ซูโครส เซลโลไบโอส	ม.	ม.	-	ม.	42	10	15	ม.	ม.

หมายเหตุ ม. = ไม่ได้รายงานไว้

(-) = ไม่ผลิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยคลอสตริเดียม ความเข้มข้นของตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการหมัก เปอร์เซนต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

สารอาหาร	จุลินทรีย์	ตัวทำละลายรวม (ก./ล.) (บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล)	ระยะเวลาหมัก (ช.ม.)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
กลูโคส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	20.8 (15, 4.5, 1.3)	96	32	15
ไซโลส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	28.0 (8.9, 3.9, 1.3)	144	28	15
อราบิโนส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	16.5 (10.5, 4.5, 1.5)	99	29	15
กลูโคส	Cl. butylicum NRRL B592	14.1	110	28.2	15
กลูโคส	Cl. acetobutylicum P262	12.7 (9.0, 3.4, E0.3)	58	32	11
แลคโตส	Cl. acetobutylicum P262	9.5 (6.7, 2.6, 0.2)	96	38	11
กาแลคโตส	Cl. acetobutylicum P262	10.0 (7.1, 2.7, 0.2)	42	31	11
whey permeate	Cl. acetobutylicum P262	9.5 (7.0, 2.5, 0.0)	39	42	11
whey permeate hydrolysate	Cl. acetobutylicum P262	7.1 (5.1, 1.8, 0.2)	62	39	11

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารอาหาร	จุลินทรีย์	ตัวทำละลายรวม (ก./ล.) (บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล)	ระยะเวลาหมัก (ช.ม.)	% การเปลี่ยนเป็นผลผลิต	เอกสารอ้างอิง
กากน้ำตาล (molasses)	Cl. acetobutylicum strin selection	16-18	30-36	31-32	9
น้ำตาลจากการย่อยสลาย					10
เซลโลไบโอส	Cl. acetobutylicum ATCC 824	5.74	48	30.7	
แมนโนส		4.28	48	25.3	
อราบิโนส		1.64	48	15.2	
ไซโลส		1.31	48	10.7	
กาแลคโตส		0.56	48	4.8	
น้ำตาลเพนโตสจากการย่อยซังข้าวโพด	Cl. acetobutylicum	13.5	48	-	17
กลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	Cl. butylicum NRRL B592	14.64 (9.51, 4.86, 0.26)	68.5	39.73	14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าไบโอติน (biotin) และกรดอมิโนเบนโซอิค (p-aminobenzoic acid) เป็นปัจจัยการเจริญเติบโตที่จำเป็น

Monot และคณะ (20) พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของไบโอตินและกรดอมิโนเบนโซอิค อยู่ระหว่าง 0.01 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ไบโอตินและกรดอมิโนเบนโซอิค มีอยู่ในยีสต์สกัด สามารถใช้ยีสต์สกัดแทนวิตามินทั้งสองได้ (6)

3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจะมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ผลผลิตของผลิตภัณฑ์และอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล อยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส (8)

McNell และ Kistiaksen (21) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ Clostridium acetobutylicum ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส

Voget และคณะ (12) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเพื่อผลิตด่างทำละลายจากหางนม (whey) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของคลอสตริเดียม

3.3 ความเป็นกรดด่าง (pH)

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์และกระบวนการหมัก (6, 22, 23) การหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-

3.1.3 แร่ธาตุ

แมงกานิส มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมาณของแมงกานีสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.0-20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าใช้ปริมาณของแมงกานีสมากกว่านี้จะมีอิทธิพลต่อผลผลิตของบิวทานอล โดยอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายลดลง (19)

แมกนีเซียม มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมาณแมงกานีสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.05-0.20 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิตของตัวทำละลาย และการใช้น้ำตาลของคลอสตริเดียมดีที่สุด (19)

เหล็ก มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมาณเหล็กที่เหมาะสมคือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่เติมเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การเจริญเติบโตช้าลง น้ำตาลถูกใช้ไปเพียง 40% และเปลี่ยนไปเป็นตัวทำละลาย 25% (19)

โปตัสเซียม มีบทบาทต่อการใช้กลูโคสของคลอสตริเดียม ปริมาณโปตัสเซียมที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 กรัมต่อลิตร (19)

3.1.4 วิตามิน

ชนิดของวิตามินที่จำเป็นต่อคลอสตริเดียมที่ผลิตตัวทำละลายยังไม่ทราบแน่ชัด แต่การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะเติมยีสต์สกัดหรือ Corn Steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนและวิตามิน (21)

McNell และ Kristiaksen (21) รายงานถึงผลการวิจัยของ Oxford และคณะ ศึกษาถึงความต้องการวิตามินของ Clostridium acetobutylicum

ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าไบโอติน (biotin) และกรดอะมิโนเบนโซอิค (p-aminobenzoic acid) เป็นปัจจัยการเจริญเติบโตที่จำเป็น

Monot และคณะ (19) พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของไบโอติน และกรดอะมิโนเบนโซอิคอยู่ระหว่าง 0.01 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ไบโอตินและกรดอะมิโนเบนโซอิค มีอยู่ในยีสต์สกัด สามารถใช้ยีสต์สกัดแทนวิตามินทั้งสองได้ (6)

3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิจะมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ และอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล อยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส (8)

McNell และ Kistiaksen (20) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ Clostridium acetobutylicum ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส

Voget และคณะ (12) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเพื่อผลิตด่างทำละลายจากหางนม (whey) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของคลอสตริเดียม

3.3 ความเป็นกรดด่าง (pH)

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์และกระบวนการหมัก (6, 21, 22) การหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-

บิวทานอลจากแป้งข้าวโพด ความเป็นกรดด่างที่ใช้อยู่ระหว่าง 4.7-8.0 คลอสตริเดียม เจริญเติบโตดี แต่ให้ผลผลิตต่ำ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-7.0 (7)

Monot และคณะ (24) ศึกษาอิทธิพลความเป็นกรดด่างต่อการผลิตตัวทำละลายโดย Clostridium acetobutylicum ในอาหารกลูโคสความเข้มข้น 55 กรัมต่อลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 คลอสตริเดียมจะผลิตกรด (อะซิติกและบิวทิริค) มากกว่าตัวทำละลาย และที่ความเป็นกรด ด่างเริ่มต้นเป็น 4.5 จะให้ตัวทำละลายมากกว่ากรด

3.4 อิทธิพลของการเติมกรดอะซิติกและกรดบิวทิริค

Martin และคณะ (25) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะซิติกและกรดบิวทิริค ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Clostridium acetobutylicum พบว่าเมื่อไม่เติมกรดทั้งสอง ผลผลิต (yield) ของตัวทำละลาย (อาซีโตน บิวทานอล และเอธานอล) เป็น 32% ให้อัตราส่วนของอาซีโตน:บิวทานอล:เอธานอล เป็น 6:1.9:0.6 เมื่อเติมกรดอะซิติกในปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตตัวทำลายเพิ่มขึ้นเป็น 34% อัตราส่วนของอาซีโตน:บิวทานอล:เอธานอล เป็น 6.0:3.0:0.5 ปริมาณอาซีโตนเพิ่มเป็น 31.6% ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด เมื่อเติมกรดบิวทิริคปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตตัวทำละลายเพิ่มเป็น 35% อาซีโตนและบิวทานอลเพิ่มเป็น 26 และ 65% ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด ตามลำดับ เมื่อเติมทั้งกรดบิวทิริคและกรดอะเซติกในปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร จะทำให้ผลผลิตทั้งอาซีโตนและบิวทานอลจะเพิ่มขึ้น โดยให้ผลผลิตตัวทำละลายรวมเป็น 34.7%

3.5 ความเข้มข้นของบิวทานอล

โดยทั่วไป เซลล์ของ Clostridium acetobutylicum สามารถทนต่อความเข้มข้นของบิวทานอลได้ไม่เกิน 13-15 กรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเนื่องจากบิวทานอลเชื่อว่า บิวทานอลจะไปละลายไลโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ (8, 21)

ในอุตสาหกรรมการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ความเข้มข้นของบิวทานอลพบว่าจะอยู่ในช่วง 7-16 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเป็นผลทำให้เซลล์เพิ่มอัตราการย่อยตัวเอง (autolysis) แต่จะไม่มีอิทธิพลต่อมิวแตนท์ที่เกิดจากการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นพวกที่บกพร่องในการย่อยตัวเอง (autolysis-deficient mutant) และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของบิวทานอลสูง (21)

Lin และ Blaschek (26) ศึกษาการเพิ่มความทนทานต่อบิวทานอลโดยการเลี้ยง Clostridium acetobutylicum ในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอลสูงขึ้นเรื่อย ๆ จะได้พวกมิวแตนท์ที่ทนทานต่อความเข้มข้นของบิวทานอลได้ถึง 15 กรัมต่อลิตร และมิวแตนท์ที่ได้นี้ผลิตบิวทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม 5-14%

3.6 การย่อยตัวเอง (Autolysin) และการสร้างแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

เซลล์ของ Clostridium acetobutylicum ในระยะ Stationary phase พบว่าจะเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) และขับสารแบคเทอริโอซินออกมา การขับสารแบคเทอริโอซินจะสัมพันธุ์กับระยะการผลิตตัวทำละลาย กล่าวคือ แบคเทอริโอซินเป็นสาเหตุให้เซลล์ซึ่งมีรูปร่างแบบ Spindle-shaped (รูปร่างของเซลล์ในขณะผลิตตัวทำละลาย) สลายตัว (lysis) (5)

Webster และคณะ (27) พบว่า ในระยะการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Log phase) Clostridium acetobutylicum จะสร้าง Autolysis (Bacteriocin) ตรึงติดอยู่กับผนังเซลล์ เมื่อถึงระยะสุดท้ายของ Log phase เซลล์จะปล่อย Autolysin ออกมา เป็นผลให้เซลล์สลายตัว และผลผลิตตัวทำละลายลดลง

Wethuizen และคณะ (27) พบความสัมพันธ์ว่า เมื่อคลอสตริเดียมผลิตบิวทานอลในความเข้มข้นที่สูงขึ้น การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย

3.7 อิทธิพลของการกวน

Yerushalmi และ Volesley (29) ศึกษาถึงอิทธิพลของการกวนในถังหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะเพิ่มขึ้นตามอัตราการหมุนของใบพัดจาก 190 ถึง 340 รอบต่อนาที อัตราการผลิตจำเพาะสูงสุดของบิวทานอล อาซีโตน และเอธานอล เป็น 5.54, 3.85 และ 0.8 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ตามลำดับ และจะมีค่าลดลงเป็นศูนย์ เมื่อเพิ่มอัตราการหมุนของใบพัดจนถึง 360 รอบต่อนาที

3.8 การทำ heat shock กับคลอสตริเดียม

โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล จะสร้างสปอร์ซึ่งทนต่อความร้อน และเก็บรักษาเชื้อไว้ในรูปของสปอร์ เมื่อถ่ายเชื้อ (ในรูปของสปอร์) ลงในอาหารใหม่ (Subculture) แล้ว จะนำไปทำ heat shock ซึ่งเป็นวิธีทำลายตัวเซลล์ (vegetative cell) และสปอร์ที่อ่อนแอ ทำให้คลอสตริเดียมแข็งแรง (Active) ประสิทธิภาพในการหมักไม่เปลี่ยนแปลง (6, 22)

วิธีการ heat shock ทำโดยนำเชื้อที่อยู่ในรูปของสปอร์ มาจุ่มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 นาที (19) หรือที่อุณหภูมิระหว่าง 65.5-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 นาที (22) หรือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (30) แล้วปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลง

3.9 การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ

ในระหว่างการหมักอาซีโตน-บิวทานอล อาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ปนเปื้อนมา จุลินทรีย์ที่มักปนเปื้อนอยู่เสมอ คือ กลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิและสภาพไร้ออกซิเจนของการหมักอาซีโตน-บิวทานอล และจะสร้างกรดแลคติกออกมา ซึ่งเป็นพิษต่อคลอสตริเดียม

014408

และทำให้ความเป็นกรด-ด่างในอาหารต่ำลง ซึ่งเป็นสภาวะไม่เหมาะสำหรับการหมักอาซีโตน-บิวทานอล แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ Lactobacillus leichmanii L. manitopocum L. gracil. เป็นต้น (6, 7)

นอกจากนี้ ในอุตสาหกรรมการหมักอาซีโตน-บิวทานอล ยังพบว่ามีไวรัสของแบคทีเรีย (bacteriophage) ที่บุกรุก (Infect) เข้าไปในแบคทีเรียที่ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลลดลง (7, 18)

4. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาซีโตน-บิวทานอล

โดยทั่วไปการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นแก๊สประมาณ 70% ตัวทำละลาย (อาซีโตน บิวทานอล และเอธานอล) 30% กรดอินทรีย์ (กรดอะเซติก กรดบิวทิริค) อีกเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีอะเซทิลเมธิลคาร์บินอล (Acetylmethyl-carbinal) เยลโลว์ออยล์ (Yellow oils) และชีวมวลที่ประกอบด้วย วิตามินบี และไรโบฟลาวิน (3, 7, 17)

ผลผลิตที่ได้จากการหมักแป้งข้าวโพด ได้ตัวทำละลายทั้งหมด 30% แก๊ส 70% ซึ่งประกอบไปด้วย คาร์บอนไดออกไซด์ 60% และไฮโดรเจน 40% อัตราส่วนของบิวทานอล:อาซีโตน:เอธานอล เป็น 6:3:1 (7)

ผลผลิตที่ได้จากการหมักกากน้ำตาล ได้ตัวทำละลายทั้งหมด 30% เป็นบิวทานอล 76-81% อาซีโตน 20-25% และเอธานอล 4% ได้แก๊สทั้งหมด 70% (คาร์บอนไดออกไซด์ 67% ไฮโดรเจน 33%) (7)

Robson และ Jones (9) รายงานผลผลิตของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลโดย Clostridium acetobutylicum ไว้ในตารางที่ 4 และตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักกากน้ำตาล และ % น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (9)

ผลิตภัณฑ์	% น้ำตาลที่ถูกใช้ไป
คาร์บอนไดออกไซด์	57
ไฮโดรเจน	2
อาซีโตน บิวทานอล เอธานอล	32
ชีวมวล	6
กรดอะเซติก กรดบิวทิริค	2
อื่น ๆ	1

ตารางที่ 5 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ได้จากการหมักกากน้ำตาล (9)

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Beesch (18) รายงานผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักแป้งธัญญพืชเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ในอุตสาหกรรมจะได้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สมดุลย์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากแป้งธัญญพืช (18)
100 กิโลกรัม

ผลิตภัณฑ์	ปริมาณ (กิโลกรัมต่อแป้ง 100 กิโลกรัม)	เปอร์เซนต์แก๊สที่เกิดขึ้น (โดยปริมาตร)
บิวทานอล	22	—
อาซีโตน	10.5	—
เอธานอล	5.3	—
ไฮโดรเจน	1.7	40
คาร์บอนไดออกไซด์	62.4	60

5. การศึกษาเกี่ยวกับ Clostridium Acetobutylicum

5.1 ลักษณะโดยทั่วไป

Buchann และ Gibbons (30) ได้อธิบายลักษณะโดยทั่วไปของ Clostridium acetobutylicum ไว้ดังนี้ เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.6-0.9 x 2.4-4.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ ตำแหน่งของสปอร์อยู่ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่ง (subterminal) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimtic acid โคโลนีกลม (Circular) ขอบโคโลนีขอบไม่เรียบ (irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร โคโลนีสีครีม ผิวเป็นมัน และโปร่งใส เจริญได้ดีในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ด้วย ความสัมพันธ์กับออกซิเจนเป็นแบบ obligate anaerobe ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กรดอะเซติก กรดบิวทิริค บิวทานอล และอาซีโตน สามารถตรึงไนโตรเจนได้บ้าง เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปในดิน

5.2 การแยกแบคทีเรียที่ผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

ปี ค.ศ. 1861 Louis Pasteur เป็นบุคคลแรกที่พบแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ และเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Butyric Acid-Producing Bacteria (6)

ปี ค.ศ. 1905 Schardinger รายงานว่า อาซีโตน เอธานอล กรดอะเซติก และกรดบิวทิริค ผลิตได้จากการหมักแป้งมันฝรั่งโดย Bacillus maceran (8)

ปี ค.ศ. 1912 Weizmann ได้แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอล อาซีโตน และเอธานอล ได้เป็นผลสำเร็จในอาหารแป้งจากธัญพืช เขาเรียกแบคทีเรียนี้ว่า Bacillus granulo-bacter pectinovorum และต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น Clostridium acetobutylicum (6, 8)

ปี ค.ศ. 1930 มีรายงานว่าสามารถแยก Clostridium saccharobutyricum ซึ่งสามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล (8)

Beesch (19) กล่าวถึงการแยกคลอสตริเดียมจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน กองปุ๋ย รากพืชตระกูลถั่ว ธัญญพืช น้ำเสีย ฯลฯ โดยใช้อาหารกากน้ำตาล และอาหารมันฝรั่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

Calam (29) ได้แยก Clostridium acetobutylicum จากตัวอย่างหลายชนิด เช่น หัวมันฝรั่ง จากพืชตระกูลถั่ว เมล็ดข้าวที่กำลังงอก นำตัวอย่างดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารมันฝรั่ง (Potato medium) และอาหารกากน้ำตาล-รำข้าว (Molasses-rice bran medium) นำมาทำ heat shock ที่ 100 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงที่ 30 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อตรวจสอบผลผลิต พบว่า ให้ปริมาณของอาซีโตน-บิวทานอล สูงถึง 18-20 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนของบิวทานอลต่ออาซีโตนเป็น 3:1

5.3 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ Clostridium acetobutylicum ในระหว่างการหมัก

John และคณะ (28) ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ Clostridium acetobutylicum P262 ในระหว่างการหมักอาซีโตน-บิวทานอลในอุตสาหกรรม พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะของการหมัก เริ่มตั้งแต่ระยะที่มีการสร้างกรด (บิวทิริค อะเซติก) ระหว่างชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 18 และระยะที่มีการสร้างตัวทำละลาย (อะซีโตน-บิวทานอล) ระหว่างชั่วโมงที่ 18 ถึงชั่วโมงที่ 36 ดังแสดงในตารางที่ 6

6. ชีวเคมีของการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลโดยการหมัก

ชีวเคมีการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล มีความซับซ้อน เนื่องจากมีการสร้างผลิตภัณฑ์หลายตัวมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาหลายชนิด (5, 31) แต่จากการที่พบว่าในระหว่างการหมักจะเกิดกรด (กรดอะเซติก และกรดบิวทิริค) เกิดขึ้นก่อนการเกิดตัวทำละลาย (อาซีโตน บิวทานอล และเอธานอล) จึงได้แยกขั้นตอนการหมัก เป็น 2 ขั้นตอน (6, 17)

ขั้นตอนที่ 1 คลอสตริเดียมจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) สร้างกรดอะเซติก และกรดบิวทิริค ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงเรื่อย ๆ จนถึงจุด ๆ หนึ่ง ที่ความเป็นกรด ด่างมีค่าต่ำสุดเรียกว่า จุดหัก (break point) ซึ่งเป็นจุดที่บ่งชี้ว่าการหมักเริ่มขั้นตอนที่ 2 แล้ว ในขั้นตอนที่ 1 มีการสร้างแก๊ส (ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์) ออกมาตลอดเวลา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

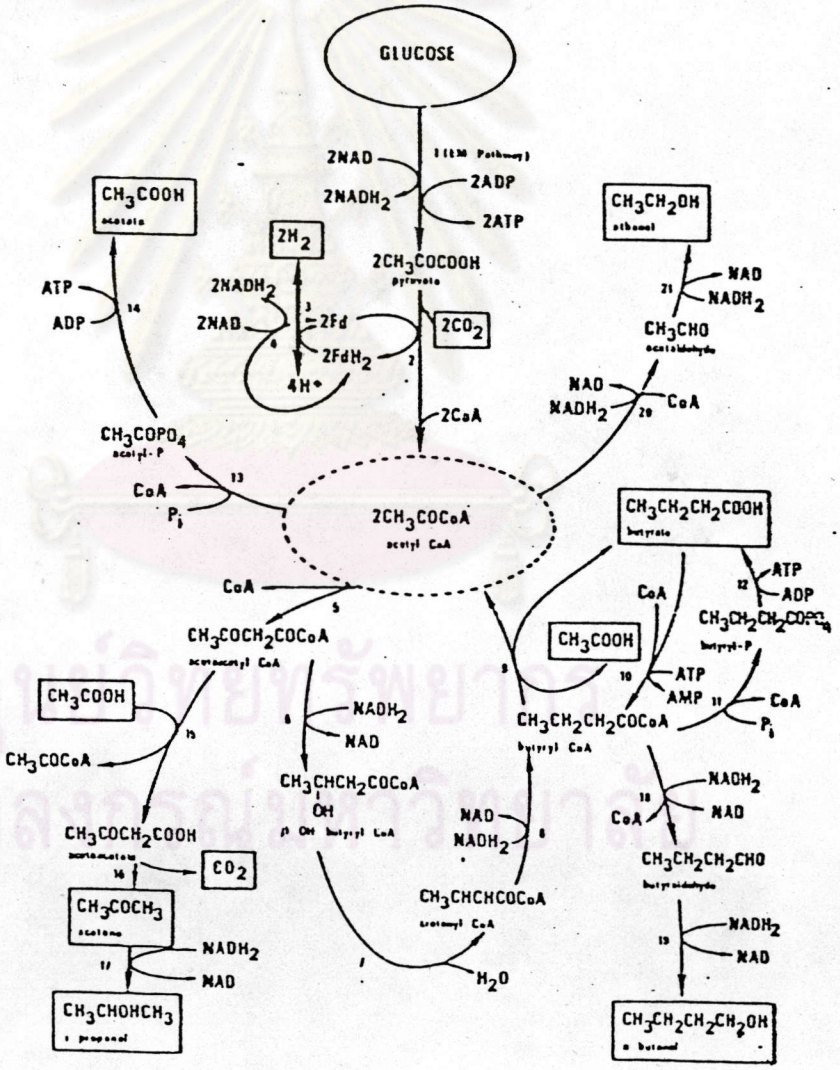
ขั้นตอนที่ 2 การเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมลดลง เนื่องจากถูกยับยั้งโดยกรดที่สร้างขึ้น การสร้างกรดจะลดลง กรดทั้งสองจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในบางส่วนพร้อมกับแหล่งคาร์บอนในอาหาร ทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารสูงขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนที่ 2 ได้แก่ อาซีโตน บิวทานอล และเอธานอล ส่วนแก๊สไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ยังคงสร้างขึ้นมาเรื่อย ๆ (ในปริมาณที่น้อยลง) จนถึงสิ้นสุดการหมัก

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ Clostridium acetobutylicum P262 ตามระยะเวลาการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	สัณฐานวิทยา (morphology)
0-6	เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง อยู่เดี่ยว ๆ หรือมาต่อกันเป็นลูกโซ่ เซลล์เคลื่อนที่ช้า
6-14	เซลล์ที่ต่อกันเป็นลูกโซ่จะแยกออกจากกันเป็นอิสระ เคลื่อนที่เร็ว
14-18	เซลล์เริ่มสร้าง granulose ภายในเซลล์ และในชั่วโมงที่ 18 เซลล์เริ่มหยุดการเจริญเติบโต
18-20	เซลล์เกือบทั้งหมด (90%) จะสร้าง granulose ภายในเซลล์ เซลล์รูปร่างโตขึ้น เซลล์ไม่เคลื่อนที่
20-36	รูปร่างเซลล์จะเป็นแบบ Clostridial form คือ เซลล์จะพองออก (swollen) หรือเรียกรูปร่างแบบ cigar และในบางเซลล์จะมีการสร้างสปอร์
36 ชั่วโมงขึ้นไป	เซลล์ทั้งหมดจะสร้างสปอร์ และในที่สุดเซลล์จะสลายตัวเหลือแต่สปอร์

วิถีเมตาบอลิสมของการสร้างผลิตภัณฑ์จากกลูโคสโดยคลอสตริเดียม

วิถีเมตาบอลิสมของการสร้างผลิตภัณฑ์ เริ่มจากกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (Pyruvate) โดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะเซทิล-โคเอ (acetyl-CoA) ในขั้นตอนนี้จะให้แก๊สไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา จากนั้นอะเซทิล-โคเอ จะเป็นสารตัวกลางที่จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ อาซีโตน บิวทานอล เอธานอล ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 (31)



รูปที่ 1 วิถีเมตาบอลิสมของการสร้างอาซีโตน-บิวทานอล โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทิริค (butyric acid bacteria) (32)

จากรูปที่ 1 เขียนเป็นสมการหลักของปฏิกิริยาที่สำคัญของการสร้างผลิตภัณฑ์ (สมการสมดุลย์เฉพาะคาร์บอน, ATP, $NADH_2$ และ FdH_2) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ตามหมายเลขของปฏิกิริยา ได้ดังนี้

1. การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof Panas (ปฏิกิริยา 1)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[\text{Phosphotransferase system}]{\text{Phosphoenolpyruvate}} 2CH_3COCOOH + 2ATP + 2NADH$$

กลูโคส Phosphotransferase system ไพรูเวท

2. การสร้างอะเซทิล-โคเอ จากไพรูเวท (ปฏิกิริยา 2)

$$CH_3COCOOH \xrightarrow[\text{Pyruvate-ferredoxin Oxidoreductase}]{} CH_3COCoA + FdH_2 + CO_2$$

ไพรูเวท Pyruvate-ferredoxin Oxidoreductase อะเซทิล-โคเอ

3. การสร้างไฮโดรเจนจากเฟอริดอกซินรูปรีดิวซ์ (FdH_2) (ปฏิกิริยา 3)

$$FdH_2 \rightleftharpoons H_2$$

เฟอริดอกซิน Hydrogenase ไฮโดรเจน

4. ปฏิกิริยารีดักชันของ NAD โดยเฟอริดอกซินรูปรีดิวซ์ (ปฏิกิริยา 4)

$$FdH_{12} \rightleftharpoons NADH_2$$

NADH-ferredoxin Oxidoreductase

5. การสร้างกรดอะเซติกจากอะเซทิล-โคเอ (ปฏิกิริยา 13-14)

CH_3COCoA ----------> $CH_3COOH + ATP$

Phosphotransaceylase (ปฏิกิริยาที่ 13)

acetate kinase (ปฏิกิริยาที่ 14)

6. การสร้างบิวทิริล โคเอ จากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 5-8)

$3CH_3COCoA + 2NADH_2$ ----------> $CH_3CH_2CH_2CoA$

อะเซทิล โคเอ บิวทิริล โคเอ

acetyl-CoA-acetyl transferase (ปฏิกิริยา 5)

L(+)-B-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (6)

L-3-hydroxyacyl-CoA hydrolase (ปฏิกิริยา 7)

butyryl-CoA dehydrogenase (ปฏิกิริยา 8)

7. การสร้างกรดบิวทิริคจากบิวทิริลโค โคเอ มี 2 วิถี

7.1 การสร้างกรดบิวทิริคจากบิวทิริลโคเอและกรดอะซิติก (ปฏิกิริยา 9)

$CH_3CH_2CH_2COCoA + CH_3COOH$ ======= $CH_3CH_2CH_2COOH + CH_3COCoA$

COA transferase

บิวทิริล โคเอ อะเซติก บิวทิริค อะเซทิล โคเอ

7.2 การสร้างกรดบิวทิริคจากบิวทิริล โคเอ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์

Phosphotransbutyrylase (ปฏิกิริยา 11) butyrate kinase (ปฏิกิริยา 12)

$CH_3CH_2CH_2CoA$ ----------> $CH_3CH_2CH_2COOH + ATP$

บิวทิริล โคเอ บิวทิริค

8. การสร้างบิวทานอลจากบิวทิริล โคเอ (ปฏิกิริยา 18-19)

$CH_3CH_2CH_2COCoA + 2NADH_2$ ---------> $CH_3CH_2CH_2CH_2OH$

บิวทิริล โคเอ — บิวทานอล

butyraldehyde dehydrogenase (ปฏิกิริยา 18)

butanol dehydrogenase (ปฏิกิริยา 19)

9. การสร้างอาซีโตนจากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 5, 15 และ 16)

$CH_3COCoA + CH_3COOH$ ---------> CH_3COCH_3

อะเซทิล โคเอ — อาซีโตน

acetyl-CoA transferase (ปฏิกิริยา 5)

CoA transferase (ปฏิกิริยา 15)

acetoacetate decarboxylase (ปฏิกิริยา 16)

10. การสร้างเอธานอลจากอะเซทิล โคเอ (ปฏิกิริยา 20-21)

$CH_3COCoA + 2NADH_2$ ----------> CH_3CHOH

อะเซทิล โคเอ — เอธานอล

acetaldehyde dehydrogenase (ปฏิกิริยา 20)

ethanol dehydrogenase (ปฏิกิริยา 21)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย