

การผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง
โดย Clostridium sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

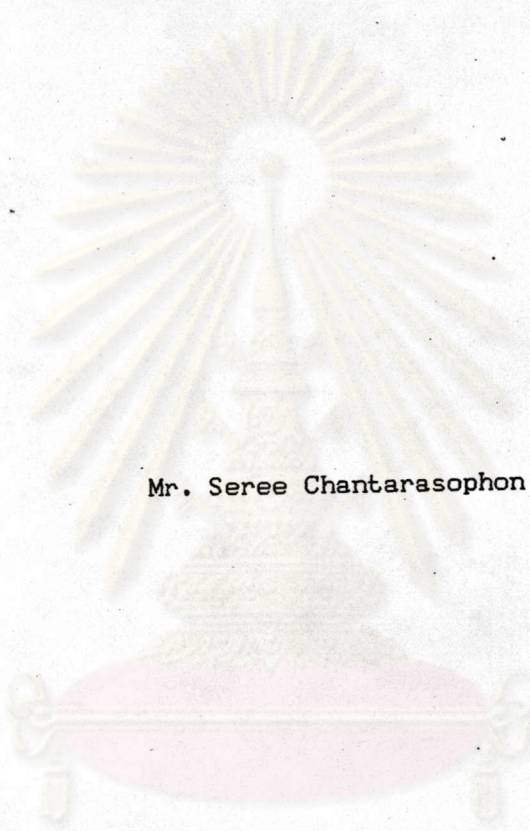
ISBN 974-569-409-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014408

117434233

PRODUCTION OF ACETONE-BUTANOL FROM CASSAVA STARCH
BY CLOSTRIDIUM SP. ISOLATED FROM THAI SOIL



Mr. Seree Chantarasophon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-409-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตอาซิโตน-บิวทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

โดย Clostridium sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

โดย

นายเสวี จันทรโสภา

ภาควิชา

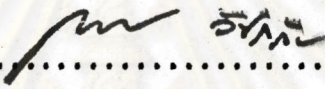
จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

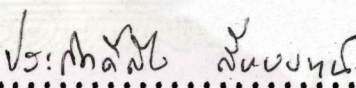
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์

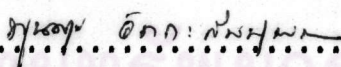
รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ महामนตรี


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

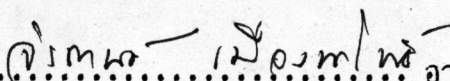
.....  คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วิชาภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....  ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สิน สีहनนท์)

.....  กรรมการ
(นางสาวอนุศุข อัททะสัมปณณะ)

.....  กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์)

.....  อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ महामนตรี)



หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตอาซิโตน-บิวทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

โดย Clostridium sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

ชื่อนิสิต

นายเสรี จันทรโสภณ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์

รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ महามนตรี

ภาควิชา

จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา

2530

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกคลอสตริเดียมที่สามารถผลิตบิวทานอลได้จากดินตัวอย่างในแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย พบว่ามีคลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่ผลิตบิวทานอลได้ปริมาณสูงในอาหารโพเตโต เต็กโตรส บรอก ในจำนวนนี้คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณสูงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง จากการศึกษาการผลิตอาซิโตน-บิวทานอลในถังหมัก (ขนาดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ลิตร) โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 พบว่า ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 5% เหมาะสมต่อการผลิตตัวทำละลาย (บิวทานอล อาซิโตน เอธานอล) การเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.2-0.8% เป็นแหล่งไนโตรเจนจะเพิ่มปริมาณตัวทำละลายตามปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้ การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% และสารสกัดจากยีสต์ 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมจะเพิ่มการผลิตตัวทำละลายเมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว แต่การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ 0.2, 0.4 และ 0.6% จะไม่เพิ่มปริมาณตัวทำละลาย ปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการสร้างตัวทำละลายคือ 0.03%

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวทำละลายในถังหมักเมื่อเลี้ยงคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 5%, สารสกัดจากยีสต์ 0.5%, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.03% คือควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 6.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

25-30 ชั่วโมง จะได้ตัวทำละลายรวมสูงสุดเป็น 14.03 กรัมต่อลิตร เปอร์เซนต์การ
เปลี่ยนแบ่งเป็นผลิตภัณฑ์เป็น 29.22

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะบางประการทางสรีระวิทยาของ
คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 พบว่าจุลินทรีย์แสดงคุณสมบัติที่คล้ายกันกับ Clostridium
butylicum อย่างไรก็ตามชนิดของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

different batch culture did not increased the solvents production at all. The addition of 0.03% magnesium sulphate was found suitable for growth of culture and solvents production.

The optimal condition for solvents production in the fermentor when Clostridium sp. strain 8p-2 was grown in the medium containing 5% of cassva starch, 0.5% of yeast extract, 0.03% of magnesium sulphate were the controlled pH of 6.0, at 35°C, for 25-30 hrs. Under these condition, the maximal solvents production of 14.03 g/l were obtained and the percentage of conversion yield was 29.22.

Studies on morphological and some physiological characteristics of Clostridium sp. strain 8p-2. It was found that this organism show characteristics similar to those of Clostridium butylicum. However, the species of Clostridium sp. 8p-2 could not yet established.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ และ
รองศาสตราจารย์ วิระวุฒิ มหามนตรี ที่ได้กรุณารับเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น
ต่าง ๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณอาจารย์
ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรม-
เคมีทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ท้ายสุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา และญาติพี่น้อง ซึ่งสนับสนุนในด้าน
การเงิน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำย่อ	ด
บทที่	
1 บทนำ	1
2 ตรวจสอบเอกสาร	4
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	26
4 ผลการวิจัย	36
5 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย	75
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก	84
ประวัติผู้เขียน	90

ศูนย์วิจัยทันตแพทย์ กรม
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง


ตารางที่	หน้า	
1	<p>มันสำปะหลัง เนื้อที่ ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ ราคาตามราคาที เกษตรกรขายได้ พ.ศ. 2520-2529</p>	3
2	<p>ชนิดของคลอสตริเดียมที่ใช้สารคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็น แหล่งคาร์บอน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก</p>	7
3	<p>ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยคลอสตริเดียม ความเข้มข้นของตัวทำลาย เวลาที่ใช้ในการหมัก เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์</p>	8
4	<p>ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักกากน้ำตาล และเปอร์เซ็นต์น้ำตาลที่ถูกใช้ไป</p>	17
5	<p>อัตราส่วนของตัวทำลายที่ได้จากการหมักกากน้ำตาล</p>	17
6	<p>สมมูลย์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเพื่อผลิตอาซิโตน-บิวทานอล จากแป้งธัญพืช 100 กิโลกรัม</p>	18
7	<p>การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ <u>Clostridium</u> <u>acetobutylicum</u> P262 ตามระยะเวลาของการหมัก แบบไม่ต่อเนื่อง</p>	21
8	<p>สายพันธุ์ของคลอสตริเดียมที่ผลิตบิวทานอลได้ปริมาณสูง ในอาหารไฟเตโต เด็กโตรส บรอก</p>	37
9	<p>เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น เป็น 6.0 ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2</p>	42
10	<p>เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 5.0, 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ</p>	46

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11	เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 4, 5 และ 7% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 51
12	เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่มีปริมาณสารสกัดจากฮีสต์ 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.8% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 55
13	เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากฮีสต์เป็น 0.2, 0.4, 0.5 และ 0.6% ตามลำดับ ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 61
14	เปรียบเทียบผลที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0.00, 0.02, 0.03 และ 0.04% ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 67
15	การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามระยะเวลาในระหว่างการหมัก 72
16	องค์ประกอบของแก๊สตามระยะเวลาที่ได้จากการหมักเพื่อผลิต อาซิโตน-บิวทานอล โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 72
17	ลักษณะสัณฐานวิทยาของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 73
18	ลักษณะทางสรีระวิทยาของคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
19	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตบิวทานอล อาซิโตน จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง โดยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 กับ <u>Clostridium butylicum</u> NRRL B592	78



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	วิธีเมตาบอลิซึมของการสร้างอาซิโตน-บิวทานอล โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทีริก	20
2	ปริมาณของบิวทานอลที่ผลิตได้ปริมาณสูง ในอาหารมันฝรั่งบด โดยคลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้	38
3	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตบิวทานอลในอาหารมันสำปะหลัง โดยคลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้	39
4	ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตบิวทานอล โดยคลอสตริเดียม 13 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้	40
5	ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	43
6	ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	44
7	ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ควบคุมความเป็นกรดต่าง โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	45
8	ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 5.5 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	47
9	ปริมาณตัวทำละลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างที่ 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
9	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างที่ 6.0 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 48
10	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างที่ 6.5 โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 49
11	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 4% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างที่ 6.0 52
12	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 7% ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างที่ 6.0 53
13	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 56
14	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.4% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 57
15	ปริมาณตัวทำละลายลายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.0 โดยคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 58

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
16	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% ที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ๐.8% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสทริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 59
17	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากยีสต์ ๐.2% และแอมโมเนียมซัลเฟต ๐.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 62
18	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากยีสต์ ๐.4% และแอมโมเนียมซัลเฟต ๐.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 63
19	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากยีสต์ ๐.5% และแอมโมเนียมซัลเฟต ๐.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 64
20	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากยีสต์ ๐.6% และแอมโมเนียมซัลเฟต ๐.2% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 65
21	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากยีสต์ ๐.5 % ที่ไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากซีสต์ ๑.5% ที่เติมแมกนีเซียมซิลิเฟต ๑.๐3% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	69
23	ปริมาณตัวทำละลายสายที่ได้จากการหมักแป้งมันสำปะหลัง 5% สารสกัดจากซีสต์ ๑.5% ที่เติมแมกนีเซียมซิลิเฟต ๑.๐4% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6.๐ โดยคลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2	7๐

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



คำย่อ

ก. = กรัม

ล. = ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย