

การผลิตแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานมันสำปะหลังโดย *Clostridium* sp.

นางสาวชนิกา อ้อพานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACETONE BUTANOL AND ETHANOL PRODUCTION FROM TAPIOCA PLANT
WASTEWATER BY *Clostridium* sp.

Miss Chanika Ouephanit

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตแอสซีโทน บิวทานอล และเอทานอลจากน้ำเสีย โรงงานมันสำปะหลังโดย <i>Clostridium</i> sp.
โดย	นางสาวชนิกา อ้อพานิช
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ชมกฤษ วิชาญานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ชมกฤษ วิชาญานนท์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. วรกันต์ บุรพาธนะ)

ชื่อนิกิต อ้อพานิช : การผลิตแอซีโทน บิวทานอล และเอทานอลจากน้ำเสียโรงงานมัน
 ลำปะหลังโดย *Clostridium* sp. (ACETONE BUTANOL AND ETHANOL
 PRODUCTION FROM TAPIOCA PLANT WASTEWATER BY *Clostridium* sp.)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นฤกุล, อ.ที่ปรึกษา
 วิทยานิพนธ์ร่วม : อ. ดร. ชมภูษ วิจารณ์นท์, 101 หน้า.

ไบโอบิวทานอลเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากความหนาแน่นพลังงานที่
 มากกว่าไบโอเอทานอลและสามารถผลิตได้จากทรัพยากรหมุนเวียน แต่การผลิตไบโอบิวทา
 นอลยังคงไม่คุ้มทุน หนึ่งในปัญหาหลักของการผลิตไบโอบิวทานอล คือ ราคาของวัตถุดิบ ใน
 ประเทศไทย แป้งมันสำปะหลังเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์หลักทางการเกษตรซึ่งประมาณได้ 4 ล้าน
 ตันต่อปี ส่งผลให้เกิดน้ำเสียมากกว่า 10 ล้านตันต่อปี ตามความเป็นจริงว่าน้ำเสียจากโรงงาน
 แป้งยังคงประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่สามารถใช้หมักได้ ดังนั้น น้ำเสียแป้งเหล่านี้อาจมี
 ศักยภาพในการเป็นสารตั้งต้นราคาถูกสำหรับผลิตไบโอบิวทานอลได้ ในงานวิจัยนี้ น้ำเสียจาก
 โรงงานมันสำปะหลังทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยถูกประยุกต์ใช้เป็นสารตั้ง
 ต้นสำหรับการหมัก แอซีโทน บิวทานอล และเอทานอล โดยจุลินทรีย์สกุลโคลอสทริเดียม
 ปริมาณแป้งในน้ำเสียที่เก็บมามีค่าประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์จากการตรวจตามวิธี AOAC การ
 เพิ่มสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ทำละลายเพียงเล็กน้อย แต่ช่วยส่งเสริมการ
 เจริญเติบโตของโคลอสทริเดียม การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นมากที่สุดเกิดขึ้นโดย *C. butyricum*
 ที่ความเป็นกรดต่าง 6.5 โดยไม่มีสารสกัดจากยีสต์หรือสารอาหารเพิ่มเติม ผลการวิจัยแสดง
 ว่าน้ำเสียแป้งมันสำปะหลังมีศักยภาพในการถูกใช้เป็นเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล
 โดยจุลินทรีย์สกุลโคลอสทริเดียมได้

สาขาวิชา :เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อ นิสิต
 ปีการศึกษา : 2552 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5072252023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : ACETONE BUTANOL ETHANOL FERMENTATION / *Clostridium* sp. /
TAPIOCA WASTEWATER / CASSAVA SOLID WASTE

CHANIKA OUEPHANIT : ACETONE BUTANOL AND ETHANOL
PRODUCTION FROM TAPIOCA PLANT WASTEWATER BY *Clostridium* sp.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL,
Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : CHOMPUNUCH VIRUNANON, Ph.D., 101 pp.

Biobutanol is an interesting alternative fuel due to its higher energy density than bioethanol and potential for production from renewable resource, but biobutanol production is still not economical. One of the major problems in biobutanol production is the raw material cost. In Thailand, tapioca starch is one of the major agricultural products with roughly 4 million tons of starch produced annually, which generates over ten million tons of wastewater per year. Due to the fact that waste water from starch factory still contains fermentable carbohydrates, thus this starchy wastewater has a potential to be a low cost substrate for biobutanol production. In this study, wastewater from starch factory in Northeastern Thailand is applied as the substrate for Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation by *Clostridium* sp. The starch content of wastewater collected was around 14% based on AOAC method. Supplementation of yeast extract had very little effect on solvent production, but promoted the growth of *Clostridium* sp. The highest production was produced by *C. butyricum* at pH 6.5 without yeast extract or nutrient supplements. The results show that tapioca starch wastewater has a potential to be used as additional substrate to biobutanol production by *Clostridium* sp.

Field of Study : Biotechnology..... Student's Signature

Academic Year : 2009..... Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ เอาใจใส่ และมอบโอกาสที่ดีเสมอมา

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชมัญญช วิภูณานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ร่วม ที่รักและดูแล เอาใจใส่ ให้คำแนะนำด้วยความปรารถนาดีในทุกๆเรื่อง

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่เอาใจใส่ ตรวจสอบแก้ไข
และกรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และ ดร. วรกันต์ บุรพาธนะ ที่
กรุณาตรวจแก้ไขและเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ผู้ให้
ทุนสนับสนุนการวิจัย รวมทั้งบุคลากร ได้แก่ คุณพิชิต ไพรพนาพงศ์ ดร. กันย์ กังวานสายชล ดร.
สุชาดา บุตรนาค และ ดร. วรกันต์ บุรพาธนะ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ผลักดัน เอ็นดูและสนับสนุน
อุปกรณ์การทำวิจัยอย่างเต็มที่

กราบขอบพระคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้
ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาให้
ความช่วยเหลือ เอาใจใส่ และอำนวยความสะดวกในทุกๆเรื่อง

กราบขอบพระคุณ บริษัท สวอนวงษ์อุตสาหกรรม จำกัด ที่กรุณาให้เก็บตัวอย่าง
น้ำเสียและกากมันสำปะหลังสำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในห้องปฏิบัติการการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเอง
ปฏิกิริยาชีวภาพ และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว รวมทั้งญาติพี่น้อง ที่ให้ความ
ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีที่สุด จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เชื้อเพลิงชีวภาพ.....	4
2.2 ไบโอบิวทานอล.....	6
2.3 การผลิตบิวทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ.....	8
2.3.1 ประวัติการผลิตเอซีโทน-บิวทานอล-เอทานอลโดยการหมัก.....	8
2.3.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเอซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล.....	9
2.3.3 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก.....	10
2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล.....	11
2.3.4.1 จุลินทรีย์.....	11
2.3.4.2 วัตถุดิบ.....	12
2.3.4.3 อุณหภูมิ.....	14
2.3.4.4 ความเป็นกรด-ด่าง.....	15
2.3.4.5 ความเข้มข้นของบิวทานอล.....	15
2.3.4.6 การกระตุ้นด้วยความร้อน.....	15

บทที่	ช หน้า	
2.3.5	ชีวเคมีของการผลิตแอสซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล.....	17
2.3.6	ปัญหาที่พบในการผลิตตัวทำละลายของคลอสทริเดียม.....	18
2.4	การผลิตแอสซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล โดยใช้มันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น...	20
2.4.1	มันสำปะหลัง.....	20
2.4.2	การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง.....	21
2.4.3	อุตสาหกรรมการแปรรูปมันสำปะหลัง.....	24
3.	วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	28
	วัสดุอุปกรณ์.....	28
	เคมีภัณฑ์.....	29
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.1	น้ำเสียที่ใช้ในการวิจัย.....	30
3.2	การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้น.....	30
3.2.1	ค่า Biological Oxygen Demand (BOD) ในน้ำเสีย.....	30
3.2.2	ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ในน้ำเสีย.....	31
3.2.3	ปริมาณของแข็งแขวนลอย Suspended Solids (SS) และ ของแข็งที่ละลายน้ำ Total Dissolved Solids (TDS)	31
3.2.4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	31
3.2.5	ปริมาณแป้งในน้ำเสีย.....	32
3.3	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	32
3.3.1	ชนิดของจุลินทรีย์.....	32
3.3.2	การเก็บรักษาคลอสทริเดียม.....	32
3.3.3	การถ่ายเชื้อคลอสทริเดียมลงสู่อาหารสำหรับการหมัก.....	32
3.3.4	การตรวจวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.....	33
3.3.5	การย้อมสีเซลล์.....	33
3.4	การเตรียมอาหารสำหรับหมักแบบปราศจากออกซิเจน.....	33
3.5	การทดสอบการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM).....	34
3.6	การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของคลอสทริเดียม.....	34
3.6.1	แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม.....	34

บทที่	ณ หน้า
3.6.2 การแปรปริมาณกลูโคสในอาหารหมัก.....	34
3.6.3 การแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมัก.....	34
3.7 การใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร.....	35
3.7.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม.....	35
3.7.2 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตตัวทำละลาย.....	35
3.8 การใช้น้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกันในการผลิตตัวทำละลาย..	35
3.9 การเตรียมตัวอย่างจากการหมักเพื่อวิเคราะห์.....	35
3.10 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น.....	36
4. ผลการวิจัย.....	37
4.1 น้ำเสียที่ใช้ในการวิจัย.....	37
4.2 ผลการวิเคราะห์น้ำเสียเบื้องต้น.....	38
4.3 การเก็บรักษาคลอสทริเดียม.....	38
4.4 การเตรียมอาหารสำหรับหมักแบบปราศจากออกซิเจน.....	39
4.5 การทดสอบการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM).....	40
4.6 การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของคลอสทริเดียม.....	43
4.6.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม.....	43
4.6.2 การแปรปริมาณกลูโคสในอาหารหมัก.....	55
4.6.3 การแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมัก.....	56
4.7 การใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร.....	60
4.7.1 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม.....	60
4.7.2 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตตัวทำละลาย.....	62
4.8 การใช้น้ำเสียจากแต่ละเดือนผลิตตัวทำละลาย.....	64
5. อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	68
6. สรุปผลการวิจัย.....	75
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก.....	88
ภาคผนวก ข.....	90

บทที่	ญ	หน้า
ภาคผนวก ค.....		97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....		101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เปรียบเทียบการใช้บิวทานอลและเอทานอล.....	5
2.2	เปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล แก๊สโซลีน และ เอทานอล.....	6
2.3	คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล.....	7
2.4	ผลการแปรความเข้มข้นข้าวโพดเอกซ์ทรูดที่มีต่ออัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและประสิทธิภาพการเปลี่ยนเป็นบิวทานอลโดย <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 และ SA-1.....	10
2.5	มันสำปะหลัง: เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ของประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ ปี 2548-2550.....	23
2.6	ปริมาณการส่งออกมันสำปะหลังแปรรูปในปี ค.ศ. 2006-2009.....	25
4.1	ผลการวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีของน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจากแต่ละเดือน.....	38
4.2	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	45
4.3	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก <i>C. butyricum</i> ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	47
4.4	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก <i>C. butyricum</i> ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	49
4.5	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก <i>C. acetobutylicum</i> ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	51
4.6	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก <i>C. acetobutylicum</i> ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	53
4.7	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมักคลอสทริเดียม 3 สายพันธุ์ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....	56
4.8	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและกลูโคสที่เหลือ เมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร.....	57

ตารางที่	หน้า	
4.9	ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและกลูโคสที่เหลือ เมื่อหมัก <i>C. butyricum</i> ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร.....	58
4.10	ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและกลูโคสที่เหลือ เมื่อหมัก <i>C. acetobutylicum</i> ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร.....	59
4.11	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำเสียเริ่มต้นสำหรับหมักด้วยคลอสทริเดียมที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5.....	60
4.12	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ด้วยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA.....	61
4.13	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ด้วย <i>C. butyricum</i>	61
4.14	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ด้วย <i>C. acetobutylicum</i>	62
4.15	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ด้วยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA.....	63
4.16	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ด้วย <i>C. butyricum</i>	63
4.17	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ด้วย <i>C. acetobutylicum</i>	64
4.18	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และแป้งในน้ำเสียจากแต่ละเดือน.....	65
4.19	ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียจากแต่ละเดือนหลังจากการหมักด้วยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA.....	65
4.20	ผลิตรภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียจากแต่ละเดือนหลังจากการหมักด้วย <i>C. butyricum</i>	66

ตารางที่	หน้า
4.21	
ผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียจากแต่ละเดือน หลังจากการหมักด้วย <i>C. acetobutylicum</i>	66
4.22	
ค่าซีไอดีก่อนและหลังการหมักน้ำเสียจากแต่ละเดือน ด้วยคลอสทริเดียม 3 สาย พันธุ์.....	67

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของบิวทานอล.....	7
2.2	เซลล์ <i>C. acetobutylicum</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope, SEM).....	12
2.3	สปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ของ <i>C. acetobutylicum</i>	16
2.4	วิถีเมตาบอลิซึมของการผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล ของ <i>C. acetobutylicum</i>	18
2.5	จำลองสารพันธุกรรมแบบวงกลม (circular representation) ของ <i>C. acetobutylicum</i>	19
2.6	มันสำปะหลัง.....	21
2.7	ประโยชน์ของมันสำปะหลัง.....	22
2.8	กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง.....	26
4.1	น้ำเสียจากกระบวนการล้างหัวมันสำปะหลัง.....	37
4.2	<i>C. acetobutylicum</i> เมื่อเลี้ยงในอาหาร RCM เป็นเวลา 14 วัน.....	39
4.3	การเตรียมอาหารสำหรับการหมักแบบปราศจากออกซิเจน ด้วยวิธีผ่านแก๊สไนโตรเจน.....	39
4.4	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM.....	40
4.5	การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM.....	41
4.6	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมัก <i>C. butyricum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM.....	41
4.7	การเจริญเติบโตของ <i>C. butyricum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM.....	42
4.8	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมัก <i>C. acetobutylicum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM.....	42
4.9	การเจริญเติบโตของ <i>C. acetobutylicum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM.....	43

ภาพที่	หน้า
4.10 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	44
4.11 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	46
4.12 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	46
4.13 การเจริญเติบโตของ <i>C. butyricum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	47
4.14 การเจริญเติบโตของ <i>C. butyricum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	48
4.15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจพบตั้งแต่ต้นจนกระทั่ง 96 ชั่วโมงเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ <i>C. butyricum</i>	49
4.16 การเจริญเติบโตของ <i>C. butyricum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	50
4.17 การเจริญเติบโตของ <i>C. acetobutylicum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	51
4.18 การเจริญเติบโตของ <i>C. acetobutylicum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	52
4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจพบตั้งแต่ต้นจนกระทั่ง 96 ชั่วโมงเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ <i>C. acetobutylicum</i>	54
4.20 การเจริญเติบโตของ <i>C. acetobutylicum</i> และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	55
4.21 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร.....	57
4.22 การเจริญเติบโตของ <i>C. butyricum</i> ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร.....	58

ภาพที่		หน้า
4.23	การเจริญเติบโตของ <i>C. acetobutylicum</i> ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร.....	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในยุคปัจจุบันโลกได้มีการพัฒนาก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการใช้พลังงานต่าง ๆ มากมาย สำหรับเชื้อเพลิงที่นำมาใช้กับยานพาหนะ เช่น แก๊สโซลีนและดีเซลได้เพิ่มปริมาณสูงขึ้นทั่วโลก แต่เนื่องจากน้ำมันปิโตรเลียมเป็นทรัพยากรที่มีอยู่จำกัด จึงนำมาซึ่งปัญหาที่สำคัญทั่วโลกในขณะนี้ คือ ปัญหาวิกฤตการณ์น้ำมันแพง ดังนั้น ความพยายามในการพึ่งพาตนเองทางด้านพลังงานจึงเกิดขึ้นทั่วโลก สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรมแต่ความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรทางด้านพลังงานไม่เพียงพอต่อความต้องการของประเทศ การแสวงหาพลังงานทดแทนจึงอยู่ในรูปการนำผลผลิตทางการเกษตรมาแปรรูปและใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเชื้อเพลิงทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ดียังพบว่าปัญหาที่สำคัญจากการนำผลผลิตทางการเกษตรมาใช้ คือ ราคาของต้นทุนและการแก่งแย่งพื้นที่เพาะปลูกอาหาร ดังนั้น วัตถุดิบที่ดีสำหรับการนำมาผลิตพลังงานชีวภาพทางเลือกจึงควรมหาได้ง่ายในพื้นที่ มีปริมาณมาก ราคาถูก และไม่ก่อให้เกิดการแข่งขันทางพื้นที่การเพาะปลูกอาหาร ดังนั้น การนำของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกผลผลิตทางการเกษตรรายใหญ่ของโลก โดยเฉพาะจากอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง และเนื่องจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังต้องใช้น้ำปริมาณมาก ในกระบวนการทำความสะอาดและการผลิตทำให้เกิดน้ำเสียปริมาณมาก (Avancini และคณะ, 2007) โดยปกติน้ำเสียจะถูกบำบัดก่อนปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จากสถิติประเทศไทยมีการส่งออกแป้งมันสำปะหลังมากที่สุดในโลก (Food and Agriculture Organization, 2009) ดังนั้น น้ำเสียจึงเกิดขึ้นในปริมาณมหาศาล และเป็นส่วนทิ้งซึ่งไม่ส่งผลกระทบต่อการแข่งขันกับพื้นที่เพาะปลูกสำหรับการบริโภคของประชากร และเนื่องจากมันสำปะหลังประกอบด้วยแป้งเป็นหลัก จึงสามารถถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับจุลินทรีย์ในการหมักให้เกิดเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี จึงทำให้มีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ซึ่งเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาทำให้เกิดมูลค่า เพื่อลดต้นทุนในการใช้สารตั้งต้นที่มีราคาแพงเป็นวัตถุดิบ

แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติในการนำมาผสมกับเชื้อเพลิงประเภทแก๊สโซลีน เรียกว่า แก๊สโซฮอลล์ (gasohol) และน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอลล์ (desohol) สามารถใช้

เป็นพลังงานทดแทนหรือใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง และใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน (octane improver) แทนสารตะกั่วหรือสาร MTBE (Gonzalez-Olmos และ Iglesias, 2008)

ไบโอแอลกอฮอล์ (bioalcohol) คือ แอลกอฮอล์ที่ได้มาจากกระบวนการทางชีวภาพ ไบโอแอลกอฮอล์ที่ได้รับความสนใจในการพัฒนามาเป็นพลังงานทดแทนในปัจจุบันมี 2 ชนิด ได้แก่ เอทานอลและบิวทานอล เนื่องจากสามารถนำมาดัดแปลงหรือใช้ในเครื่องยนต์ได้โดยตรง โดยเฉพาะบิวทานอล ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ มีความหนาแน่นพลังงาน (energy density) ที่สูงใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนมากกว่าเอทานอล มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนและไม่ต้องเก็บในระบบที่มีความดันสูงเหมือนแก๊สธรรมชาติ เนื่องจากการระเหยต่ำซึ่งต่ำกว่าการระเหยของน้ำมัน รวมตัวกับน้ำมันได้ดี ไม่เกิดการแยกตัว สามารถขนส่งตามท่อและไม่มีปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์เนื่องจากไม่มีการกัดกร่อน (Dürre, 2007 และ Arnold, 2008) จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทางเลือกต่อไปในอนาคต

ไบโอบิวทานอล (biobutanol) เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุล C_4H_9OH สามารถผลิตได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส ซึ่งมีอยู่ในพืชชนิดต่างๆ เพื่อให้จุลินทรีย์บริโภคและผลิตเป็นบิวทานอลได้โดยตรง โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *คลอสทริเดียม* บิวทานอลมักถูกใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด จุดหลอมเหลวต่ำ ในภาวะปกติจะอยู่ในภาวะของเหลวและระเหยได้ง่าย สามารถติดไฟได้ง่ายจึงใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ (Keim, 1983)

คลอสทริเดียม (*Clostridium* sp.) เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตไบโอบิวทานอล โดยไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) ด้วยกระบวนการหมักแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation) ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตเนื่องจากลดต้นทุนในการติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มออกซิเจนในถังหมัก แบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาล แป้ง หรือเซลลูโลส ให้เปลี่ยนเป็นบิวทานอล รวมทั้งตัวทำละลายอื่น คือ แอซีโตนและเอทานอล (Tashiro และคณะ, 2005)

ดังนั้น ในภาวะที่ต้องประสบกับวิกฤตพลังงาน การนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ไม่มีมูลค่าหรือมีมูลค่าต่ำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับ *คลอสทริเดียม* ในกระบวนการหมักแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า จึงมีความเหมาะสมในการพึ่งพาตัวเองทางด้านพลังงานสำหรับประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งและไม่แข่งขันกับการผลิตอาหารมาเพิ่มมูลค่า โดยผ่านกระบวนการและหมักด้วยจุลินทรีย์ในสกุลคลอสทริเดียมซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล เพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิต

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ผลิตแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอลจากคลอสทริเดียมด้วยกระบวนการหมักที่ปราศจากออกซิเจน โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอลจากน้ำเสียซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วยจุลินทรีย์ในสกุลคลอสทริเดียม ในภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างน้ำเสีย
2. วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้น
3. ทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตและการใช้สารอาหารของคลอสทริเดียม
4. ศึกษาการหมักน้ำเสียด้วยคลอสทริเดียม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อเพลิงชีวภาพ

เชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) คือ เชื้อเพลิงที่ได้มาจากชีวมวล (biomass) จัดเป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) ชนิดหนึ่งที่สามารถฟื้นฟูหรือสร้างขึ้นใหม่ได้ เชื้อเพลิงชีวภาพหลักมี 3 รูปแบบ ได้แก่ แก๊สชีวภาพ (biogas) เช่น แก๊สมีเทนและแก๊สไฮโดรเจน (Demirel และคณะ, 2010) เชื้อเพลิงแข็ง (solid biofuel) เช่น ไม้ ชี้เลื่อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย มูลสัตว์ และถ่าน เชื้อเพลิงเหลว (liquid biofuel) เช่น ไบโอดีเซล (biodiesel) และไบโอแอลกอฮอล์ (bioalcohol) (Enguidanos และคณะ, 2002)

ไบโอแอลกอฮอล์ (bioalcohol) ที่ได้รับความสนใจในอุตสาหกรรมยานยนต์มี 2 ชนิด คือ ไบโอเอทานอลและไบโอบิวทานอล (Thomas, 2009) แอลกอฮอล์ทั้ง 2 ชนิดให้ค่าออกเทนที่สูง โดยเฉพาะบิวทานอล ซึ่งมีข้อได้เปรียบ (ตารางที่ 2.1 และ 2.2) คือ มีค่าปริมาณพลังงาน (energy content) ใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซินและมากกว่าเอทานอลถึง 30 เปอร์เซ็นต์ มีโอกาสระเบิดได้น้อยกว่าเนื่องจากการระเหยต่ำ โดยที่บิวทานอลมีค่าความดันไอ (Reid vapor pressure) น้อยกว่าเอทานอลประมาณ 6.7 เท่า (Brekke, 2007) ค่าออกเทน (octane number) ไม่สูงกว่าน้ำมันมากนักทำให้ผสมกับน้ำมันได้มาก (ชัชวาล คำวงศ์ และคณะ, 2550) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีนและไม่ต้องเก็บในระบบที่มีความดันสูงเหมือนแก๊สธรรมชาติ เนื่องจากการระเหยต่ำซึ่งต่ำกว่าการระเหยของน้ำมันจึงรวมตัวกับน้ำมันได้ดีไม่เกิดการแยกตัว เนื่องจากสามารถละลายในน้ำมันได้ดีจึงสามารถผสมกับน้ำมันในอัตราส่วนตามที่ต้องการ ในขณะที่เอทานอลสามารถผสมได้สูงที่สุด 85 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากไม่มีการกัดกร่อนจึงสามารถขนส่งตามท่อและไม่มีปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ (Dürre, 2007 และ Arnold, 2008) ดังนั้นบิวทานอลจึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทางเลือกต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบการใช้บิวทานอลและเอทานอล (Ramey, 2007 และ Arnold, 2008 และ Lee และคณะ, 2008)

คุณสมบัติ	บิวทานอล	เอทานอล
1. ความสามารถในการละลายน้ำ	น้อยมาก จึงง่ายต่อการแยก เมื่อถูกปนเปื้อนจากน้ำ	สามารถละลายในน้ำได้ จึงเกิดปัญหาในการแยก เมื่อถูกปนเปื้อนจากน้ำ
2. การรวมตัวกับน้ำมัน	รวมตัวได้ดีไม่เกิดการแยกชั้น ทำให้สามารถผสมกับแก๊สโซลีนด้วยอัตราส่วนที่ต้องการ	น้อยกว่า ปัจจุบันสามารถผสมกับน้ำมันได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์
3. การกักกรอง	ไม่มีการกักกรอง ทำให้สามารถขนส่งตามท่อได้ และไม่มีปัญหากับเครื่องยนต์	กักกรองสูง ทำให้ไม่สามารถส่งทางท่อได้ และทำให้เครื่องยนต์สึกหรอ
4. มลพิษจากการเผาไหม้	น้อยกว่า	มากกว่า
5. ปริมาณการผลิต	ผลิตได้น้อย เนื่องจากความเป็นพิษของบิวทานอลต่อจุลินทรีย์	ผลิตได้มาก
6. เทคโนโลยีการผลิต	อยู่ในช่วงการวิจัยให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น	มีการพัฒนาจนกระทั่งผลิตได้ง่ายและมีผลผลิตสูง
7. ราคาต้นทุน	สูง เนื่องจากปัญหาในกระบวนการหมักและการแยกผลิตภัณฑ์	ต่ำ เนื่องจากปัญหาในกระบวนการผลิตมีไม่มาก

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล แก๊สโซลีน และเอทานอล (Lee และคณะ, 2008 และ Davis และ Morton, 2008)

คุณสมบัติ	บิวทานอล	แก๊สโซลีน	เอทานอล
ความหนาแน่นพลังงาน (energy density, MJ/L)	29.2	32	19.6
อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันและอากาศ (air-fuel ratio)	11.2	14.6	9
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (heat of vaporization, MJ/kg)	0.43	0.36	0.92
ปริมาณพลังงาน (energy content/value, BTU/gal)	110000	115000	84000
ความสามารถในการละลายน้ำ 100 กรัม (solubility)	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย
research octane number	96	91-99	129
motor octane number	78	81-89	102

ในปี ค.ศ. 2005 David Ramey ได้ขับรถยนต์ข้ามรัฐในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นระยะทาง 10,000 ไมล์ โดยใช้บิวทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ แทนการใช้แก๊สโซลีน พบว่าบิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ได้ประมาณ 10.62 กิโลเมตรต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแก๊สโซลีน คือ 9.35 กิโลเมตรต่อลิตร รวมทั้งปริมาณการปลดปล่อยก๊าซไนโตรเจนออกไซด์และไฮโดรคาร์บอนลดลงถึง 37 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเกิดคาร์บอนมอนอกไซด์เพียง 0.01 เปอร์เซ็นต์ (Ramey, 2007)

2.2 ไบโอบิวทานอล

ไบโอบิวทานอล (biobutanol) เป็นแอลกอฮอล์ที่มีโครงสร้างโมเลกุล C_4H_9OH สามารถผลิตได้จากการหมัก (fermentation) คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส ที่มีอยู่ในพืชชนิดต่างๆ เพื่อให้จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งอาหารและผลิตเป็นบิวทานอลได้โดยตรง ซึ่งถูกจัดเป็นพลังงานชีวภาพในรุ่นถัดไปจากปัจจุบัน (next generation of biofuel) (Dürre, 2008)

2.3 การผลิตบิวทานอลด้วยวิธีทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลและใช้ในอุตสาหกรรม คือ แบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม (*Clostridium* sp.) ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายที่สำคัญในทางอุตสาหกรรมได้ 3 ชนิด คือ แอซีโตน บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเอทานอลในปริมาณเล็กน้อย จึงมักเรียกระบวนการผลิตตัวทำละลายของแบคทีเรียนี้ว่า กระบวนการหมักแอซีโตน-บิวทานอล (Acetone-Butanol (AB) fermentation) หรือกระบวนการหมักแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation) (Zverlov และคณะ, 2006 และ Dürre, 2008)

2.3.1 ประวัติการผลิตแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลโดยการหมัก

ปี ค.ศ. 1861 นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส Louis Pasteur เป็นบุคคลแรกที่พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอลและให้ชื่อว่า "Vibron butyrique" (Finegold, 1993 และ Dürre, 2007)

การผลิตแอซีโตน-บิวทานอล เริ่มขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1912 เมื่อนักเคมีชาวอิสราเอล Chaim Weizmann ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* และหมักโดยใช้แป้งเป็นสารตั้งต้น ให้ผลิตภัณฑ์เป็นแอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล เป็นผลสำเร็จ (Zverlov และคณะ, 2006)

อุตสาหกรรมการหมักแอซีโตน-บิวทานอล เกิดขึ้นที่ประเทศอังกฤษ เมื่อเริ่มสงครามโลกครั้งที่ 1 ในปี ค.ศ. 1914 เนื่องจากประเทศอังกฤษต้องการแอซีโตนเพื่อใช้สำหรับอุตสาหกรรมการทำวัตถุระเบิด และต้องการบิวทานอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นบิวทาไดอิน (butadiene) ใช้สำหรับผลิตยางสังเคราะห์ และเกิดอุตสาหกรรมการหมักแอซีโตน-บิวทานอล ต่อมาที่ประเทศแคนาดา และสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ (Dürre, 2007)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1930 สามารถแยกเชื้อที่สามารถใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นวัตถุดิบในการหมักได้สำเร็จ และใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกกว่าธัญพืช (Jones และ Woods, 1986)

ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 อุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์ขยายตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลต่อความต้องการเหล็กเกอร์ซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากบิวทานอล อุตสาหกรรมผลิตแอซีโตน-บิวทานอลจึงมีความสำคัญมากซึ่งเป็นอันดับที่ 2 รองจากอุตสาหกรรมผลิตเอทานอล (Nimcevic และ Gapes, 2000)

เมื่อสงครามโลกสิ้นสุดลง อุตสาหกรรมการผลิตแอสีโทน-บิวทานอลไม่สามารถแข่งขันกับอุตสาหกรรมน้ำมันปิโตรเลียมได้ เนื่องจากราคาน้ำมันได้ลดลง การพัฒนาที่รวดเร็วของอุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิงปิโตรเลียม รวมทั้งปัญหาและราคาวัตถุดิบในการผลิตบิวทานอลด้วยไบโอเทคโนโลยี (Dürre, 2008)

อย่างไรก็ตามปัญหาทางด้านพลังงานได้กลับมาเป็นปัญหาที่สำคัญของโลกในปัจจุบัน เนื่องจากความขัดแย้งในพื้นที่ประเทศผู้ผลิตน้ำมันและปริมาณที่จำกัดของเชื้อเพลิงฟอสซิล มีผลให้ราคาของเชื้อเพลิงปิโตรเลียมมีราคาสูงขึ้นและไม่คงที่ อุตสาหกรรมการหมักแอสีโทน-บิวทานอลจึงกลับมาเป็นที่สนใจอีกครั้ง

2.3.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล

ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม สามารถแบ่งได้ 3 ประเภทหลัก ประเภทแรก คือ ตัวทำละลาย ได้แก่ แอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล ประเภทที่ 2 คือ กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแอสีติก และกรดบิวทิริก และประเภทสุดท้าย คือ แก๊ส ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน (Datta และ Zeikus, 1985) และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ แก๊สประมาณ 70% และ ตัวทำละลายประมาณ 30% โดยที่อัตราส่วนของตัวทำละลาย แอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ สำหรับ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* มีอัตราส่วนในการผลิต ABE เป็น 3:6:1 (Formanek และคณะ, 1997 และ Qureshi และคณะ, 2006)

ข้าวโพดซึ่งผ่านการใช้ความร้อนและความดันเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของข้าวโพด เพื่อเพิ่มโภชนาการสำหรับเป็นอาหารสัตว์ หรือ ข้าวโพดเอกซ์ทรูด (extruded corn) (Amornthewaphat และคณะ, 2005) ได้ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในงานวิจัยของ Lin และ Blaschek (1983) ซึ่งรายงานอัตราส่วนผลิตภัณฑ์จากการหมักข้าวโพดเอกซ์ทรูดด้วยแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ATCC 824 และ SA-1 ที่ 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลการแปรความเข้มข้นข้าวโพดเอกซ์ทราด์ที่มีต่ออัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และประสิทธิภาพการเปลี่ยนเป็นบิวทานอลโดย *C. acebutylicum* ATCC 824 และ SA-1

% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ข้าวโพดเอกซ์ทราด์	อัตราส่วนการผลิตตัวทำละลาย		ประสิทธิภาพการเปลี่ยน สารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์	
	(บิวทานอล:แอซีโตน:เอทานอล)		824	SA-1
	824	SA-1	824	SA-1
4	54:40:6	68:27:5	0.191	0.213
6	57:37:6	66:28:6	0.185	0.199
8	55:39:6	66:28:6	0.162	0.170
10	55:39:6	65:29:6	0.140	0.160
12	58:38:6	65:28:7	0.127	0.140
14	59:35:6	64:29:7	0.126	0.139
16	61:32:7	65:28:7	0.107	0.115
18	NDC	64:29:7	ND	0.101
20	ND	60:32:8	ND	0.095

2.3.3 การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก

บิวทานอล (butanol) นอกจากประโยชน์ทางด้านพลังงาน และเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมสารเคมีและสิ่งทออย่างกว้างขวางแล้ว บิวทานอลยังถูกใช้เป็นสารระหว่างกลาง (intermediate) ในกระบวนการสังเคราะห์สารเคมีเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและยา (Patnaik, 2007; Lee และคณะ, 2008 และ Dürre, 2008)

แอซีโตน (acetone) ใช้สำหรับเป็นตัวทำละลายทั่วไปในอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมผลิตยา ใช้ผลิตน้ำมันหล่อลื่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) พลาสติก น้ำมันชักเงา และเครื่องสำอาง (กองควบคุมวัตถุเสพติด สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2548)

เอทานอล (ethanol) นอกจากถูกใช้ผลิตอาหารและเครื่องดื่ม รวมทั้งเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม และน้ำยาฆ่าเชื้อแล้ว ยังถูกใช้เป็นพลังงานทดแทนโดยผสมกับแก๊สโซลีน

เรียกว่า แก๊สโซฮอล (gasohol) ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้กับน้ำมันเบนซินทดแทนสาร Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) (Barnard, 1983 และ Gallagher และคณะ, 2000)

กรดบิวทิริก (butyric acid) สามารถใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ใช้ในรูปกรดสำหรับอุตสาหกรรมนม ใช้ในรูปเอสเทอร์เพื่อเพิ่มกลิ่นผลไม้ อนุพันธ์ของกรดบิวทิริกสามารถใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกและสิ่งทอ (Zigová และ Šturdík, 2000)

กรดแอสติก (acetic acid) หรือกรดน้ำส้ม นอกจากใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารแล้วยังสามารถใช้สังเคราะห์แอสติกเอสเทอร์และถูกใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม (Kalaichelvi และคณะ, 2007)

แก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์สามารถใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำอัดลม (Ljunggren และ Karlberg, 1995) ใช้ทำน้ำแข็งแห้ง (Krailas, 1994) หรือใช้สำหรับในการเลี้ยงสาหร่ายเพื่อผลิตน้ำมัน (Ezeji และคณะ, 2007) สำหรับแก๊สไฮโดรเจน สามารถใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้ (Lo และคณะ, 2009)

เซลล์และของแข็งที่เหลือจากกระบวนการหมัก มักถูกใช้เป็นอาหารสัตว์ (Qureshi และ blaschek 2001)

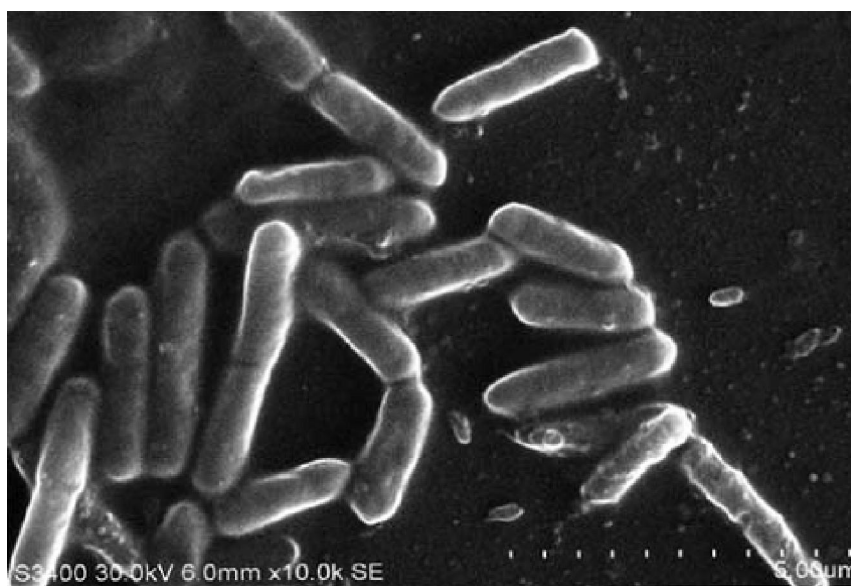
2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักแอสซิโทน-บิวทานอล-เอทานอล

2.3.4.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic organism) ที่สามารถผลิตแอสซิโทน-บิวทานอลได้ คือ แบคทีเรียในสกุลบาซิลลัส (*Bacillus*) เช่น *Bacillus butacone* (Beesch, 1952) และแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียม (*Clostridium*) เช่น *C. acetobutylicum* และ *C. butyricum* เป็นต้น (Zverlov และคณะ, 2006) โดยที่ในระดับอุตสาหกรรมและงานวิจัยนิยมใช้แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมในการผลิตแอสซิโทน บิวทานอล และเอทานอล

คลอสทริเดียม (*Clostridium* sp.) เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ส่วนมากเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (ภาพที่ 2.2) สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) (Dürre, 2005 และ Virunanon และคณะ, 2008) สปอร์ทนความร้อนได้ดีสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 120 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 10 – 15 นาที พบได้ในดิน น้ำเสีย และระบบย่อยของสัตว์ (Zigová และ Šturdík, 2000) สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายประเภทตั้งแต่คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) จนถึงคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่

(polysaccharides) เป็นแหล่งคาร์บอน (Jones และ Woods, 1986) สำหรับแหล่งไนโตรเจนสามารถใช้โมเลกุลของไนโตรเจนในอากาศได้โดยตรงผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน หรือใช้ในรูปแบบอื่น เช่น แอมโมเนียมไอออน และกรดอะมิโน หรือแหล่งไนโตรเจนที่ซับซ้อน เช่น สารสกัดยีสต์ (yeast extract) (Madihah และคณะ, 2001) แต่แหล่งไนโตรเจนที่ไม่ซับซ้อนมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียคลอสทริเดียมมากกว่าแหล่งไนโตรเจนที่ซับซ้อน (Monot และคณะ, 1982) และสามารถผลิตสารละลายได้หลายชนิด เช่น แอซีโทน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งอัตราส่วนในการผลิตจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ สำหรับ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* มีอัตราส่วนในการผลิต ABE เป็น 3:6:1 (Formanek และคณะ, 1997 และ Qureshi และคณะ, 2006)



ภาพที่ 2.2 เซลล์ *C. acetobutylicum* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope, SEM) (Ni และ Sun, 2009)

2.3.4.2 วัตถุดิบ

เนื่องจากคลอสทริเดียมเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่หลากหลาย สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายประเภทตั้งแต่คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) ทั้งน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส จนถึงคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ (polysaccharides) เช่น แป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน (Jones และ Woods, 1986) สำหรับพอลิแซ็กคา

ไรต์ประเภทเซลลูโลส มีคลอสทริเดียมจำนวนไม่มากที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ ซึ่งมักเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ เช่น *C. thermocellum* (Lu และคณะ, 2006) *C. cellulolyticum* (Guedon และคณะ, 2002) และ *C. cellulovorans* (Murashima และคณะ, 2003) แต่คลอสทริเดียมในกลุ่มที่ผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล เช่น *C. acetobutylicum* พบว่าไม่สามารถย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทเซลลูโลสได้ (Kim และคณะ, 1994 และ Perret และคณะ, 2004) การใช้วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสจึงต้องมีการผ่านกระบวนการย่อยก่อนทำการหมัก (Qureshi และคณะ, 2008) งานวิจัยที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทเซลลูโลส จึงนิยมใช้กรดหรือเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสเหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลก่อนแล้วจึงหมักด้วยคลอสทริเดียม หรือใช้คลอสทริเดียมในกลุ่มที่สามารถย่อยเซลลูโลสร่วมกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่น (co-culture) โดยเฉพาะ *C. thermocellum* เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลกลูโคส (Freier และคณะ, 1988) ซึ่งทำให้สามารถหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Demain และคณะ, 2005)

เนื่องจาก 60-70 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนในกระบวนการผลิตไบโอบิวทานอล คือ สารตั้งต้น (Madihah และคณะ, 2001) ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันจึงมีจุดประสงค์เพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ เซลลูโลสหรือแป้ง ดังงานวิจัยต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 1985 Yu และคณะ ศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยวิธีการหมักแบบ co-culture โดยใช้ *C. thermocellum* เปลี่ยนเซลลูโลสผงชนิดที่มีความบริสุทธิ์สูง (Solka Floc®) เป็นน้ำตาล และพบว่า *C. acetobutylicum* สามารถใช้สารตั้งต้นที่ผ่านการย่อยด้วย *C. thermocellum* และผลิตบิวทานอลได้

ในปี ค.ศ. 2000 Nimcevic และ Gapes รายงานว่าประเทศฝรั่งเศสได้ผลิตบิวทานอลในระดับก่อนอุตสาหกรรม (pilot หรือ pre-industrial scale) โดยใช้ฟางของธัญพืช และขังข้าวโพดซึ่งผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จาก *Trichoderma reesei* CL 847 เป็นสารตั้งต้น และหมักด้วย *C. acetobutylicum* ได้ตัวทำละลาย 1 ตัน จากสารตั้งต้น 6-7 ตัน

ในปี ค.ศ. 2002 Jesse และคณะ ศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยการหมัก starch-based waste packing peanuts (โฟมสำหรับป้องกันการแตกของวัสดุระหว่างการขนส่ง ซึ่งผลิตจากแป้ง) พบว่า *C. beijerinckii* BA101 สามารถใช้วัสดุนี้เป็นแหล่งคาร์บอนได้และผลิตตัวทำละลายรวม 21.7 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ 24.7 กรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2007 Qureshi และคณะ ศึกษาการย่อยกากข้าวโพดด้วยกรดและเอนไซม์ สำหรับการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล พบว่าการย่อยด้วยกรดเกิดตัวยับยั้ง (inhibiter) ซึ่งส่งผลให้ *C. beijerinckii* BA101 ผลิตตัวทำละลายรวมมีเพียง 1.7 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรดย่อยด้วยเอนไซม์ที่ได้ตัวทำละลายรวม 8.6 กรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2008 Qureshi และคณะ ศึกษาการใช้ฟางข้าวสาลีซึ่งผ่านการปรับสภาพ (pretreatment) ด้วยกรดก่อนนำมาย่อยและหมักในขั้นตอนเดียว (simultaneous hydrolysis and fermentation) และปั่นกวนด้วยแก๊ส (gas stripping) พบว่า *C. beijerinckii* P260 สามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ 21.42 กรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2010 Geng และคณะ ได้ศึกษาการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยการหมักแบบ co-culture โดยการย่อยเซลลูโลสในรูปของกระดาษกรองด้วย *C. thermocellum* และผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วย *C. thermopalmarium*

2.3.4.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมามีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การผลิตตัวทำละลายรวมและอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้ (Ross, 1961) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของคลอสทริเดียม โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมทั่วไปอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส (Schlegel และคณะ, 1993) สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการหมัก คือ 35 และ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาถึงผลิตภัณฑ์ แอซิโตนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีจุดเดือดประมาณ 56 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิในการหมักไม่ควรสูงกว่า 37-42 องศาเซลเซียส เนื่องจากการหมักที่อุณหภูมิสูงจะเกิดการระเหยและสูญเสียผลิตภัณฑ์ (Krailas, 1994)

Voget และคณะ (1985) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายจากหางนม (whey) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก คือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์ของคลอสทริเดียม

Lai และ Traxle (1994) ได้ทำการหมักแบบต่อเนื่องด้วย *C. acetobutylicum* โดยแบ่งการใช้อุณหภูมิในการหมักเป็น 2 ค่า ตามขั้นตอนการผลิต 2 ช่วง คือ ในช่วงการหมักเพื่อผลิตกรด (acid production) ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในช่วงการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย (solvent production) ใช้อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนการผลิตให้ผลผลิตกรดรวม 8 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายรวม 0.86 กรัมต่อลิตร สำหรับขั้นตอนการผลิตตัวทำละลาย ให้ผลผลิตกรดรวม 4.32 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายรวม 9.11 กรัมต่อลิตร

2.3.4.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมแตกต่างกันตามสายพันธุ์และกระบวนการหมัก เนื่องจากเป็นปัจจัยที่มีผลต่อชีวเคมีของคลอสทริเดียมในการผลิตตัวทำละลายโดยตรง ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมทั่วไปมีค่าอยู่ที่ช่วง 4.5-7.0 (Grube และ Gottschalk, 1992) โดยทั่วไปความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นสำหรับกระบวนการหมัก คือ 6.0-6.5 และ ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายในกระบวนการหมัก คือ 4.2-4.4 (Beesch, 1953)

2.3.4.5 ความเข้มข้นของบิวทานอล

ความเป็นพิษของบิวทานอลเป็นปัญหาที่สำคัญในกระบวนการผลิตเอซีโตนและบิวทานอล เนื่องจากบิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่ละลายในไขมันได้ (lipophilic) จึงละลายฟอสโฟไลปิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของคลอสทริเดียม พบว่าที่ความเข้มข้นของบิวทานอลเพียง 7.4-11.1 กรัมต่อลิตร เป็นสาเหตุให้การเจริญเติบโตและการใช้น้ำตาลของคลอสทริเดียมลดลงไปครึ่งหนึ่ง (Bowles และ Ellefson, 1985) ในขณะที่เอซีโตนและเอทานอลต้องใช้ความเข้มข้นถึง 40 กรัมต่อลิตร จึงสามารถลดการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมลดลงไปครึ่งหนึ่ง (Jones และ Woods, 1986) ในปัจจุบันพบว่าคลอสทริเดียมมีความสามารถในการทนบิวทานอลได้เพียง 2 เปอร์เซ็นต์ หรือ 20 กรัมต่อลิตร (Dürre, 2008)

ในปี ค.ศ. 2000 Liyanage และคณะ ได้ทำการปรับปรุงคลอสทริเดียมสายพันธุ์ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 ด้วยวิธี antisense RNA ยีน *gldA* พบว่าคลอสทริเดียมตอบสนองต่อบิวทานอลลดลง จึงทำให้สามารถทนบิวทานอลได้มากขึ้น

ในปี ค.ศ. 2001 Qureshi และ Blaschek ได้ทำการปรับปรุงคลอสทริเดียมสายพันธุ์ *C. beijerinckii* BA101 ด้วยวิธี random mutagenesis ซึ่งได้คลอสทริเดียมที่สามารถทนต่อบิวทานอลได้มากขึ้น

2.3.4.6 การกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

คลอสทริเดียมสายพันธุ์ที่ผลิตเอซีโตน-บิวทานอล เมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะสร้างสปอร์ (ภาพที่ 2.3) ซึ่งทนต่อความร้อน เพื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ เมื่อถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ในรูปของสปอร์จึงต้องกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) เพื่อกระตุ้น (activate) ให้

เกิดการเปลี่ยนแปลงของสปอร์ให้เป็นเซลล์ที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารใหม่ รวมทั้งเป็นการทำลายเซลล์ (vegetative cell) และสปอร์ที่อ่อนแอ มีผลให้ได้เซลล์คลอสทริเดียมที่แข็งแรง (active) และมีประสิทธิภาพในการหมักไม่เปลี่ยนแปลง (Monot และคณะ, 1982; และ Liu และคณะ, 2008)

วิธีการ heat shock ทำได้โดยการนำเชื้อที่อยู่ในรูปของสปอร์ (spore suspension) มาจุ่มในน้ำร้อน ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้มีความแตกต่างกัน ดังงานวิจัยต่อไปนี้

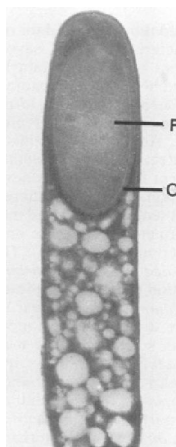
Beesch (1953) ใช้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที

Ounine และคณะ (1983) และ Assobhei และคณะ (1998) ใช้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

Long และคณะ (1983) ใช้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

Formanek และคณะ (1997) ใช้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Qureshi และ Blaschek (2001) ใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตั้งแต่ 2-5 นาที และพบว่า การ heat shock ที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 นาที มีผลให้คลอสทริเดียมสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุด



ภาพที่ 2.3 สปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ของ *C. acetobutylicum* (F (forespore) คือ สปอร์ที่เริ่มสร้าง และ C (spore coat) คือ เปลือกหุ้มสปอร์) (Long และคณะ, 1983)

2.3.5 ชีวเคมีของการผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล

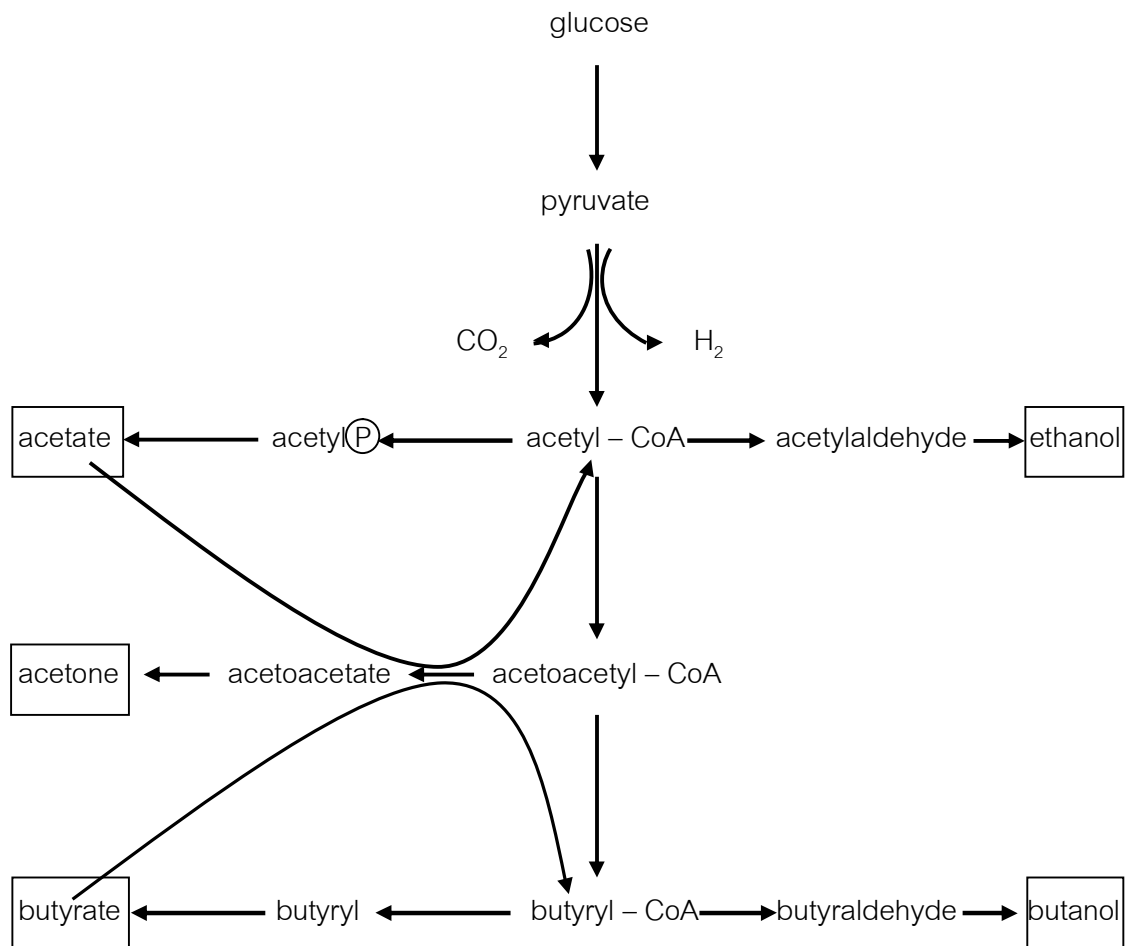
ชีวเคมีของการผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล โดยคลอสทริเดียมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้น (Prescott และ Dunn, 1959; Dürre, 2007; Dürre, 2008; Lee และคณะ, 2008 และ Shinto และคณะ, 2008)

ขั้นการสร้างกรดอินทรีย์ (acidogenesis)

คลอสทริเดียมจะมีช่วงการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) ผลิตกรดแอสีติกและกรดบิวทิริกปล่อยออกมานอกเซลล์ ทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงจุดหนึ่งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดเรียกว่า จุดหัก (break point) จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นที่ 2 ของการหมัก ในการขั้นแรกนี้นอกจากกรดแอสีติกและกรดบิวทิริกแล้ว คลอสทริเดียมยังผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนออกมาเป็นผลิตภัณฑ์หลักด้วย และการที่ความเป็นกรด-ด่างที่ลดต่ำเกินไปหรือต่ำกว่าประมาณ 4.5 เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์เจริญเติบโตช้าลงหรือตายไป เนื่องจากแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนส่วนมากไม่สามารถรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ให้คงที่ได้ โปรตอนจากกรดที่ผลิตขึ้นจะแพร่เข้าสู่ไซโตพลาสซึมทำให้ระดับการเปลี่ยนแปลงโปรตรอน (proton gradient) สูงเกินไป ส่งผลให้เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมสูญเสียและเซลล์ตายในที่สุด

ขั้นการสร้างตัวทำละลาย (solventogenesis)

ขั้นตอนนี้ความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก โดยเริ่มต้นขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นจากปริมาณของกรดแอสีติกและกรดบิวทิริก ส่งผลให้การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมลดลงและเริ่มใช้กรดทั้งสองร่วมกับแหล่งคาร์บอนในอาหาร โดยการเปลี่ยนเป็นตัวทำละลาย ได้แก่ แอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล ทำให้ความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น และยังคงผลิตแก๊สตลอดเวลาแต่ในปริมาณที่น้อยลงจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก โดยคลอสทริเดียมจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตจากความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ผลิต โดยคลอสทริเดียมสามารถทนบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้นประมาณ 20 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายคลอสทริเดียมจะสร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) เก็บรักษาเชื้อไว้ เพื่อป้องกันความเป็นพิษของบิวทานอลที่เกิดขึ้น (วิถีเมตาบอลิซึมของการผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* แสดงในภาพที่ 2.4)



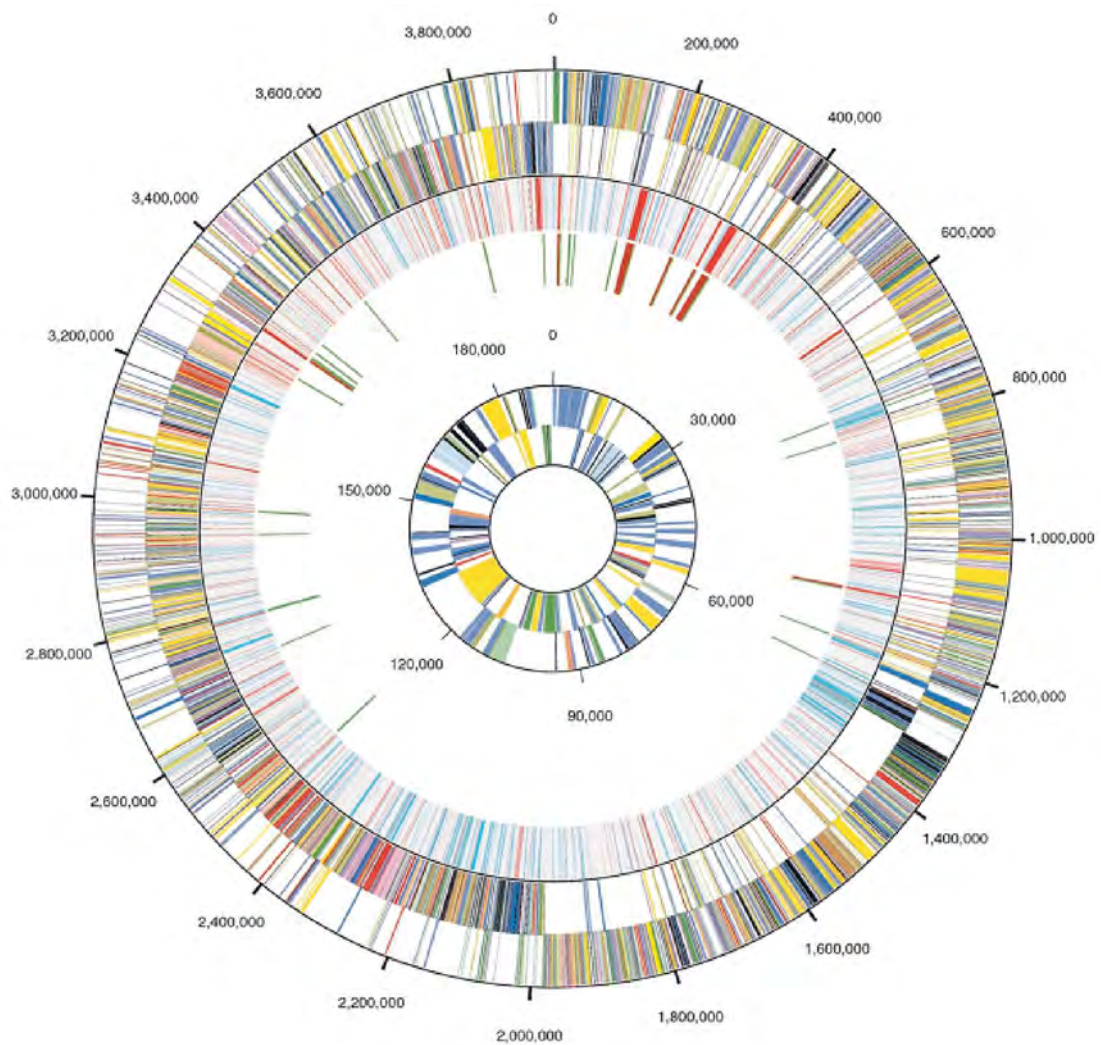
ภาพที่ 2.4 วิธีเมตาบอลิซึมของการผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล ของ *C. acetobutylicum*

2.3.6 ปัญหาที่พบในการผลิตตัวทำละลายของคลอสทริเดียม

นอกจากความเป็นพิษของบิวทานอลแล้ว ปัญหาที่สำคัญซึ่งส่งผลต่อการพัฒนากระบวนการผลิตตัวทำละลายจากคลอสทริเดียม คือ การสูญเสียคุณสมบัติในการผลิตตัวทำละลาย

จากข้อมูลทางพันธุกรรม (genome) โดยทั่วไปในเซลล์แบคทีเรียมีสารพันธุกรรมอยู่ 2 ประเภท คือ สารพันธุกรรมหลัก (chromosomal DNA) และพลาสมิด (plasmid DNA) ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่ยีน สำหรับ *C. acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียในสกุลคลอสทริเดียมที่ได้รับความสนใจในระดับอุตสาหกรรมและงานวิจัย พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมของ *C. acetobutylicum* ประกอบไปด้วยสารพันธุกรรมหลัก ขนาด 3.94 Mbp และพลาสมิด

ขนาด 192 kbp (ภาพที่ 2.5) เรียกว่า pSOL1 และมียีน *Spo0A* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสปอร์และมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตตัวทำละลาย ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์-บิวทานอล – เอทานอล โดยการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) จำเป็นต้องรักษา ระยะของเซลล์ให้อยู่ในช่วง log phase ตลอดเวลา ส่งผลให้ยีน *Spo0A* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสร้างสปอร์ไม่ทำงานจึงส่งผลให้การผลิตตัวทำละลายลดลง (Long และคณะ, 1984; Cornillot และคณะ, 1997; Nolling และคณะ, 2001 และ Harris และคณะ, 2002)



ภาพที่ 2.5 จำลองสารพันธุกรรมแบบวงกลม (circular representation) ของ *C. acetobutylicum* (วงนอก คือ chromosomal DNA วงใน คือ plasmid DNA) (Nolling และคณะ, 2001)

2.4 การผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล โดยใช้มันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น

2.4.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (ภาพที่ 2.6) จัดเป็นพืชหัวชนิดหนึ่งและเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญของโลก จัดเป็นอาหารที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ใหญ่เป็นอันดับที่ 3 ของโลก (Fauquet และ Fargette, 1990) มีชื่อเรียกมากมายตามภาษาต่างๆ เช่น ภาษาอังกฤษ สเปน โปรตุเกส ฝรั่งเศส เรียกว่า cassava, yuca, mandioca, manioc ตามลำดับ เป็นต้น สำหรับชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Manihot esculenta* Crantz สามารถปลูกได้ทั่วไปในแถบเมืองร้อน ปลูกได้ตลอดทั้งปี ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ปลูกง่ายไม่ต้องการน้ำมาก ไม่มีแมลงและโรคพืชรบกวน สะดวกในการดูแลรักษา ให้ผลผลิตสูง จึงเพาะปลูกกันมาก (สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2530)

การจัดหมวดหมู่ของมันสำปะหลัง (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2519)

Subdivision Angiospermae

Class Dicotyledonae

Order Geraniales

Family Euphorbiaceae

Genus Manihot

สำหรับประเทศไทย มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศมากชนิดหนึ่ง พื้นที่เพาะปลูกส่วนมากอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีเนื้อที่เพาะปลูกทั่วประเทศในปี พ.ศ. 2550 ประมาณ 7.3 ล้านไร่ และมีผลผลิตประมาณ 27 ล้านตัน จัดเป็นประเทศผู้ผลิตมันสำปะหลังสูงสุดอันดับที่ 3 ของโลก ดังตารางที่ 2.5 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) ซึ่งผลผลิตส่วนมากจะนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์ สัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท



ภาพที่ 2.6 มันสำปะหลัง

2.4.2 การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง (สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2530)

1) แหล่งพลังงานที่สำคัญของมนุษย์

มันสำปะหลังเป็นพืชที่ให้พลังงานสูง เมื่อเทียบราคาและแคลอรีที่ได้รับจะมีต้นทุนที่ถูกกว่าพืชชนิดอื่นมาก จึงถูกนำไปใช้บริโภคโดยตรง

2) แป้ง

แป้งที่ผลิตจากมันสำปะหลังสามารถนำไปทดแทนแป้งที่ผลิตได้จากพืชหัวชนิดอื่น รวมทั้งแป้งจากข้าวโพด ข้าวฟ่าง และข้าวสาลีได้ แป้งมันสำปะหลังสามารถนำไปใช้ได้ 2 ทางใหญ่ๆ คือ แป้งดิบ (native starch) ใช้ในการประกอบอาหาร ได้แก่ การทำซอส ผงชูรส กากูโคส ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ต่างๆ และแป้งแปรรูป (modified starch) ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเภสัชกรรม อุตสาหกรรมกาว อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมไม้อัด เป็นต้น

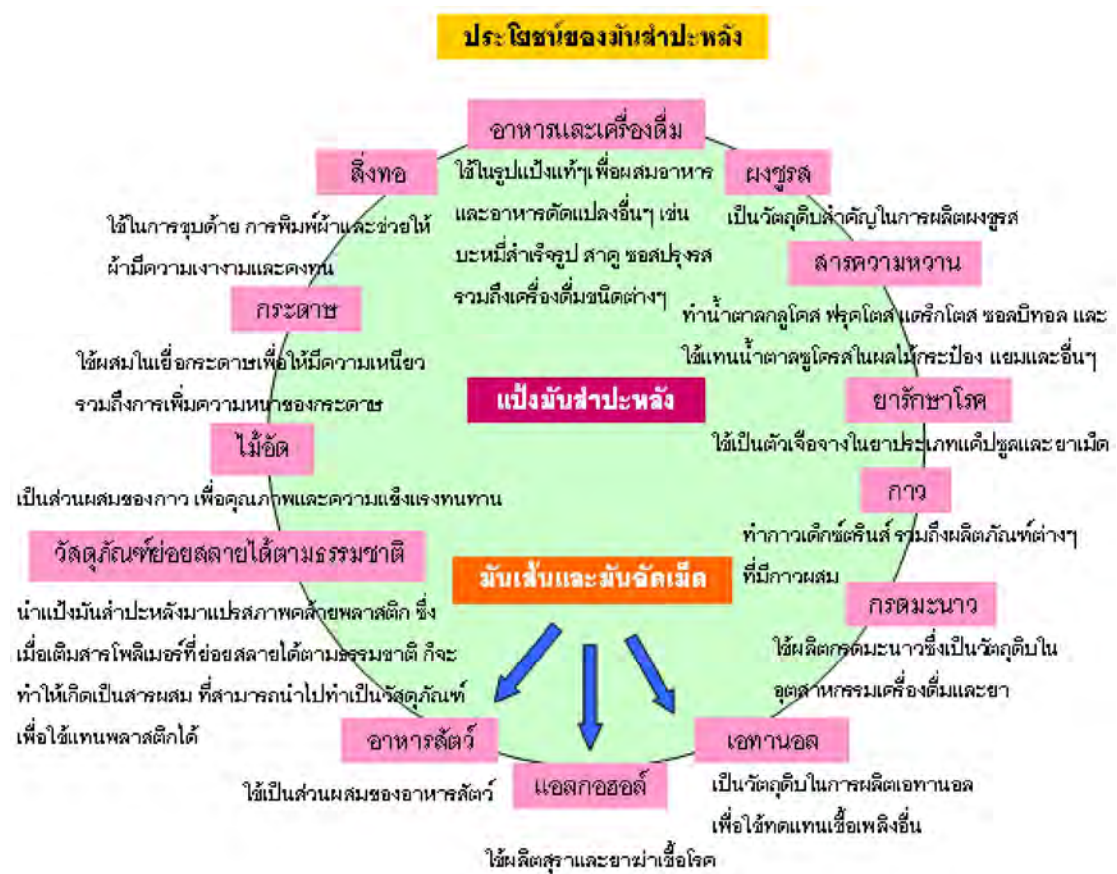
3) อาหารสัตว์

เนื่องจากหัวมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถนำมาเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตราคาถูก เหมาะสำหรับใช้ประกอบอาหารสัตว์

4) อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์

แป้งซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในหัวมันสำปะหลังสามารถถูกใช้เป็นสารตั้งต้นโดยตรงหรือผ่านกระบวนการทางเคมีหรือกระบวนการทางชีวภาพ ให้สลายตัวเป็นน้ำตาลและใช้ผลิตแอลกอฮอล์ได้

ประโยชน์ของมันสำปะหลังในภาพรวมแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 ประโยชน์ของมันสำปะหลัง (กระทรวงพาณิชย์, กรมการค้าต่างประเทศ, กองการค้าสินค้าข้อตกลง, 2546)

ตารางที่ 2.5 มันสำปะหลัง: เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ของประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ
ปี 2548-2550 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

ประเทศ	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (1,000 ไร่)		ผลผลิต (1,000 ตัน)		ผลผลิตต่อไร่ (กก.)	
	harvested area (1,000 rai)		production (1,000 tons)		yield per rai (Kgs.)	
	2549	2550	2549	2550	2549	2550
	2006	2007	2006	2007	2006	2007
รวมทั้งโลก	113,590	115,113	218,240	224,273	1,921	1,948
ไนจีเรีย	23,813	24,063	45,721	45,750	1,920	1,901
บราซิล	11,853	12,155	26,639	27,313	2,247	2,247
ไทย	6,693	7,339	22,584	26,916	3,375	3,668
อินโดนีเซีย	7,643	7,543	19,928	19,610	2,607	2,600
คองโก	11,733	11,563	14,989	15,000	1,278	1,297
กานา	4,938	5,000	9,638	9,650	1,952	1,930
เวียดนาม	2,968	3,500	7,714	8,900	2,599	2,543
อังกฤษ	4,731	4,750	8,810	8,800	1,862	1,853
อื่น ๆ	39,218	39,200	62,217	62,334	1,586	1,590

ถึงแม้มันสำปะหลังจะเป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ แต่เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบต่ออุตสาหกรรมต่อเนื่องที่ใช้มันสำปะหลังหรือแป้งมันสำปะหลัง เช่น อุตสาหกรรมสารความหวาน ผงชูรส สิ่งทอ และกระดาษแล้ว การนำมันสำปะหลังมาผลิตแอลกอฮอล์มากขึ้น จะส่งผลให้ผลผลิตสำหรับอุตสาหกรรมต่อเนื่องลดลง ดังนั้นการใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการแปรรูปมันสำปะหลังเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอลกอฮอล์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหลีกเลี่ยงปัญหาทั้งทางด้านพลังงานและทางด้านอุตสาหกรรม

2.4.3 อุตสาหกรรมการแปรรูปมันสำปะหลัง

หัวมันสำปะหลังสดเมื่อถูกขูดขึ้นจากดินแล้วไม่สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพเดิมไว้ได้นานเหมือนพืชชนิดอื่น ในระยะ 2 วันแรกหัวมันสำปะหลังยังไม่เน่าเสียและเปอร์เซ็นต์แป้งยังไม่ลดลง แต่หากปล่อยทิ้งไว้เกิน 4 วัน หัวมันสำปะหลังจะเน่าเสียมากและเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวจะลดลง (อรุณี วงศ์ราชน, 2549) ดังนั้นผลผลิตหัวมันสำปะหลังสดปริมาณมากจึงจำเป็นต้องมีการแปรสภาพก่อนการเก็บรักษา เพื่อยืดอายุการอุปโภคบริโภคให้นานขึ้น อุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลังหลักในปัจจุบัน คือ อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง อุตสาหกรรมมันสำปะหลังเส้น และอุตสาหกรรมมันสำปะหลังอัดเม็ดโดยมีอัตราการแปรรูป ดังนี้ (กรมวิชาการเกษตร, 2526)

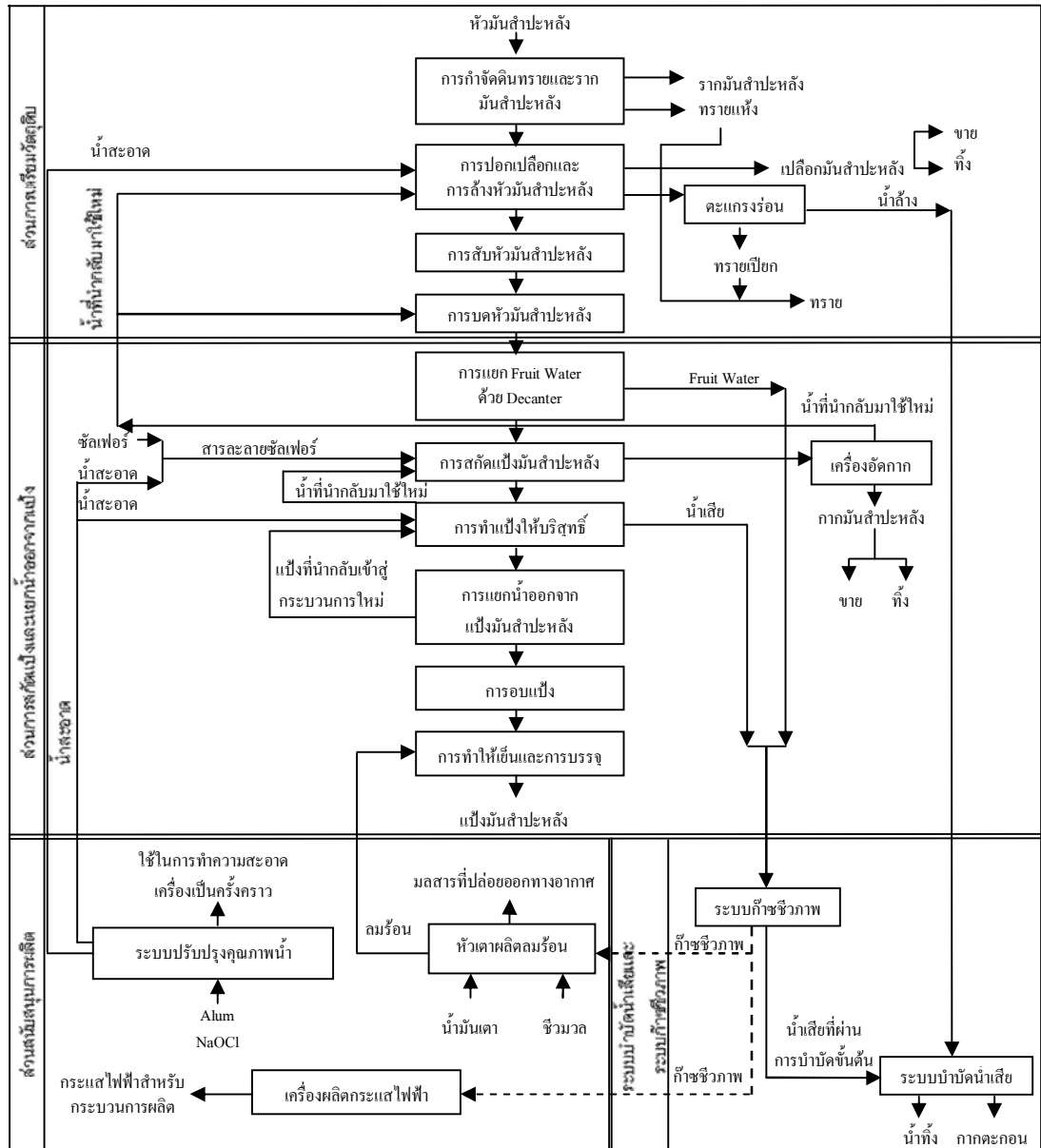
หัวมันสำปะหลังสด 1 กิโลกรัม	ได้แป้งมันสำปะหลัง	เฉลี่ย 0.20 กิโลกรัม
หัวมันสำปะหลังสด 1 กิโลกรัม	ได้มันสำปะหลังเส้น	เฉลี่ย 0.40 กิโลกรัม
หัวมันสำปะหลังสด 1 กิโลกรัม	ได้มันสำปะหลังอัดเม็ด	เฉลี่ย 0.37 กิโลกรัม
มันสำปะหลังเส้น 1 กิโลกรัม	ได้มันสำปะหลังอัดเม็ด	เฉลี่ย 0.93 กิโลกรัม

สำหรับตลาดแป้งมันสำปะหลัง ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ส่งออกมากที่สุดในโลก โดยในปี พ.ศ. 2552 ปริมาณการส่งออกแป้งมันสำปะหลังสูงถึง 4.3 ล้านตัน ดังตารางที่ 2.6 (Food and Agriculture Organization, 2009) ปัจจุบันมีโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังที่เป็นสมาชิกของสมาคมแป้งมันสำปะหลังไทยมีทั้งสิ้น 74 แห่ง (สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย, 2553) ซึ่งการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะเริ่มจากการนำหัวมันสำปะหลังสดมาผ่านเครื่องร่อนดินและทรายออกจากหัวมันและลอกเปลือกออก นำไปผ่านเครื่องล้างหัวมันและเข้าสู่กระบวนการผลิตแป้ง (ภาพที่ 2.8)

ตารางที่ 2.6 ปริมาณการส่งออกมันสำปะหลังแปรรูปในปี ค.ศ. 2006-2009 (Food and Agriculture Organization, 2009)

ประเทศ	ผลผลิต (1,000 ตัน)			
	2006	2007	2008	2009
แป้ง (flour and starch)	4,852	4,686	4,265	4,651
ไทย	4,616	4,416	3,963	4,316
อื่นๆ	236	269	302	335
มันสำปะหลังเส้น และอัดเม็ด (chips and pellets)	5,629	6,506	5,187	7,802
เวียดนาม	1,041	1,317	2,000	4,000
ไทย	4,348	4,824	2,848	3,450
อินโดนีเซีย	132	210	170	160
อื่นๆ	108	156	169	191

จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังต้องใช้น้ำในกระบวนการผลิตถึง 20-30 ลูกบาศก์เมตรต่อการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน (สุรพล สายพานิช, 2529) และเกิดน้ำเสียปริมาณมากถึง 10-30 ลูกบาศก์เมตร (Sriroth และคณะ, 2000) สำหรับองค์ประกอบของน้ำเสียมีความแตกต่างกันตามกระบวนการผลิต จากรายงานการวิจัยพบว่า น้ำเสียมีองค์ประกอบของ Suspended Solid (SS) อยู่ถึง 4,200-7,600 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแป้งหลงเหลืออยู่ถึงอยู่ถึง 3 กิโลกรัม (Chavalparit และ Ongwandee, 2009) ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) มากถึง 11,000-13,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 4.5-5.0 (Mai และคณะ, 2001) น้ำเสียเหล่านี้เป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับแหล่งที่มีการทำอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและชุมชนในระยะยาว จึงจำเป็นต้องบำบัดก่อนถูกปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งต้องใช้พื้นที่มาก ดังนั้น งานวิจัยเพื่อกำจัดความเป็นพิษของน้ำเสียและนำน้ำเสียไปใช้ให้เกิดประโยชน์จึงมีอยู่จำนวนมาก



ภาพที่ 2.8 กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (เดชา พิมพิสุทธิ, 2550)

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับน้ำเสีย

สุรพล สายพานิช (2529) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียและการผลิตแก๊สชีวภาพจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง โดยกระบวนการตะกอนเร่งคอนแทคสแตปีไลเซชันแบบแอนแอโรบิก

ธาดา ฉัตรธานี (2531) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียและการผลิตแก๊สชีวภาพจากโรงงานแปรงมันสำปะหลัง โดยกระบวนการไร้ออกซิเจนอิสระแบบสองขั้นตอน

ในปี ค.ศ. 2003 Damasceno และคณะ ศึกษาการใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตแปรงมันสำปะหลังเพื่อผลิตสารระเหยจาก *Geotrichum fragrans* และเมื่อเพิ่มกลูโคสปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ 0.007 กรัมต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2005 Kobayashi และคณะ ศึกษาการใช้ตะกอนของน้ำเสียเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล ด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* เมื่อเติมกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหารที่ใช้ตะกอนของน้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ 9.3 กรัมต่อลิตร

Razif และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ใช้ยีสต์เพื่อลดปริมาณน้ำเสียของโรงงานผลิตมันสำปะหลังในประเทศอินโดนีเซีย พบว่าสามารถลดค่าบีโอดี ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

Hipolito และคณะ (2008) ศึกษาการหมักแป้งสาคุและน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มสาคุด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* เพื่อผลิตบิวทานอล พบว่าเมื่อใช้น้ำเสียผสมกับแป้งสาคุที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ คลอสทริเดียมสามารถผลิตบิวทานอลได้ถึง 10.4 กรัมต่อลิตร เมื่อไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างในกระบวนการหมัก ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น

Chavalparit และ Ongwandee ในปี ค.ศ. 2009 รายงานว่าในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแปรงมันสำปะหลังของประเทศไทยหลงเหลือแป้งอยู่ถึง 3 กิโลกรัมต่อการผลิตแป้ง 1 ตัน ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจลินทรีย์สำหรับผลิตแก๊สชีวภาพได้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, England)

กระบอกฉีดยา (Nipro, Thailand)

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 (Olympus, Japan)

ขวดยาฉีด ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร (BTI packaging, Thailand)

เข็มฉีดยา (Nipro, Thailand)

คริมเปอร์ (The Finest in Crimping Tool & Accessories, USA)

เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก รุ่น PC-420 (Corning, USA)

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VS-8480SFN (Vision Scientetific, Korea)

เครื่องเขย่าผสมสาร รุ่น KMC-1300V (Vision Scientetific, Korea)

เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C (Precisa, Switzerland)

เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler Toledo, USA)

เครื่องดูดสูญญากาศ รุ่น DOA-V502-BN (GAST, USA)

เครื่องปั่น (Moulinex, France)

เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น BiofugeA (Heraeus, Sepatech, Germany)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น DR/2010 (HACH, USA)

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง รุ่น PP-50 (Sartorius, Germany)

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท รุ่น Zenyth 200 rt (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)

เครื่อง Gas Chromatography รุ่น 7AG (Shimadzu, Japan)

จุกยาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร (Amani, Thailand)

ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น Clean model: BC (Lab Services, Thailand)

ตู้บ่มเชื้อ (EHRET, Germany)

ตู้เพาะเชื้อภาวะไร้ออกซิเจน รุ่น Bactron (SHEL LAB, USA)

ตู้อบลมร้อน (Mettmert, Germany)

ฝาคลุมินีเยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร (Amani, Thailand)
 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (DAIHAN Scientific, Korea)
 อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

เคมีภัณฑ์

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4 : Labscan, Ireland)
 กรดบิวทิริก ($C_4H_8O_2$: BDH, England)
 กรดไฮโดรคลอริก (HCl: Merck, Germany)
 กลาเซียลแอซิดิกแอซิด (CH_3COOH : BDH, England)
 กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$: Fisher scientific, UK)
 คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose: Fluka, Finland)
 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$: Merck, Germany)
 ซาฟรานิน โอ (safranin O: Searle, England)
 ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4 : Merck, Germany)
 โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3 : Merck, Germany)
 เดคะไฮโดรแนพทาลีน ($C_{10}H_{18}$: Carlo Erba, Italy)
 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4 : Scharlau, Spain)
 เทอร์เชียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ ($(CH_3)_3COH$: Carlo Erba, Italy)
 1-บิวทานอล (C_4H_9OH : GReC, Malaysia)
 ไบโอติน (biotin: Fluka, China)
 เปปไทน์ (peptone from casein: Scharlau, Spain)
 แป้งที่ละลายน้ำ (starch soluble: Merck, Germany)
 โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$: Univar, Australia)
 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4 : Univar, Australia)
 โพแทสเซียมพทาเลท ($C_8H_5O_4K$: Fisher Scientific, UK)
 เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$: Univar, Australia)
 มาลาไคท์ กรีน (malachite green: Labchem, Australia)
 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$: Univar, Australia)
 รีซาซูริน (resazurin: Acros, Belgium)

วิตามินพาบา (PABA-Aminobenzoic acid: Fluka, Switzerland)

สารสกัดจากมอลต์ (malt extract: Himedia, India)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract: Himedia, India)

อาหารเลี้ยงเชื้อ cooked meat (Himedia, India)

อาหารเลี้ยงเชื้อ reinforced clostridium (Himedia, India)

เอทานอล 99.9 เปอร์เซนต์ (absolute ethanol: Merck, Germany)

แอสซีโทน (C_3H_6O : Burdick & Jackson, Korea)

แอล-ซิสเตอีน (L-Cysteine: Fluka, Switzerland)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$: Scharlau, Spain)

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีเตรียมสารเคมีและกราฟมาตรฐานของการวิจัยแสดงในภาคผนวก

3.1 น้ำเสียที่ใช้ในการวิจัย

น้ำเสียที่ใช้ในการวิจัยเป็นส่วนที่เก็บจากท่อซึ่งเป็นน้ำทิ้งจากส่วนของการล้างหัวมันสำปะหลังโดยตรงของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันแบบสไลด์แห่งในจังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกัน 3 เดือน ได้แก่ เดือนกรกฎาคม เดือนมีนาคม และเดือนพฤษภาคม ตัวอย่างน้ำเสียจะถูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อวัดค่า Biological Oxygen Demand (BOD) ภายใน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้นอื่นๆ และถูกนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเบื้องต้น

3.2.1 ค่า Biological Oxygen Demand (BOD) ในน้ำเสีย

วิเคราะห์ค่าบีโอดีในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยวิธี Azide Modification: Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA, WEF 21st Edition 2005, Part 5210 B.) โดยบริษัท Environment & Laboratory Co., Ltd. ประเทศไทย

3.2.2 ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ในน้ำเสีย

วิเคราะห์ค่าซีโอดีในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยกระบวนการ close reflux: colorimetric method (Lapara และคณะ, 2000) โดยการบีบอัดน้ำเสียตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วทรงสูงมีฝาปิด เติมสารละลายสำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ (digestion solution) 6 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก-ซิลเวอร์ซัลเฟต 14 มิลลิลิตร ปิดฝา หลอดแก้ว เขย่าให้ผสมเข้าด้วยกัน นำเข้าตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารละลายเย็นลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเทียบหาค่าซีโอดีจากกราฟมาตรฐาน

3.2.3 ปริมาณของแข็งแขวนลอย Suspended Solids (SS) และ ของแข็งที่ละลายน้ำ Total Dissolved Solids (TDS)

อบกระดาษกรองและบีกเกอร์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อระเหย ความชื้นจนกว่าน้ำหนักของกระดาษกรองและบีกเกอร์ไม่เปลี่ยนแปลง (บันทึกเป็นค่า ก และ ข ตามลำดับ) กรองน้ำเสียผ่านกระดาษกรอง และนำส่วนน้ำใสในบีกเกอร์ นำกระดาษกรองและบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยความชื้นจนกว่าน้ำหนักของกระดาษกรองและ บีกเกอร์ไม่เปลี่ยนแปลง (บันทึกเป็นค่า ค และ ง ตามลำดับ) (Murphy, 2008; Vaisala Instruments, 2008 และ Sawyer และ McCarty, 1967)

$$\text{ปริมาณของแข็งแขวนลอย} = \frac{\text{ค่า ค.} - \text{ค่า ก.}}{\text{ปริมาตรของน้ำเสีย}}$$

$$\text{ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ} = \frac{\text{ค่า ง.} - \text{ค่า ข.}}{\text{ปริมาตรของน้ำเสีย}}$$

3.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ด้วยวิธี DNS (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959) โดยบีบอัดตัวอย่างและ สารละลาย DNS ปริมาตรอย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท นำไปบ่มที่ 95 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที บีบอัดมา 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทที่น้ำกลั่นอยู่ 200 ไมโครลิตร

และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐาน

3.2.5 ปริมาณแป้งในน้ำเสีย

ปริมาณแป้งในน้ำเสียถูกส่งตรวจด้วยวิธี T-CM-064 Based on AOAC (2000) 950.55 ในหน่วยกรัมต่อ 100 กรัม โดยสถาบันคั้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

3.3.1 ชนิดของจุลินทรีย์

แบคทีเรียคลอสทริเดียมที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย และได้รายงานถึงผลการผลิตบิวทานอลที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่นที่คัดแยกได้ในคราวเดียวกัน (Virunanon และคณะ, 2008) *C. acetobutylicum* ATCC 824 และ *C. butyricum* TISTR1032 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการศึกษาในงานวิจัยอย่างกว้างขวางถึงคุณสมบัติในการผลิตตัวทำละลาย

3.3.2 การเก็บรักษาคลอสทริเดียม

การเก็บรักษาคลอสทริเดียม (Decom-PA, *C. acetobutylicum* และ *C. butyricum*) โดยการบ่มในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อให้คลอสทริเดียมสร้างสปอร์ และเก็บในรูปแบบของสปอร์ (spore suspension) ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การถ่ายเชื้อคลอสทริเดียมลงสู่อาหารสำหรับการหมัก

ในการหมักจะใช้คลอสทริเดียมในรูปแบบของสปอร์ โดยถ่ายคลอสทริเดียมเข้าสู่อาหารหมักในอัตราส่วน 1:9 (10% inoculum) นำไปกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 10 นาที และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะปราศจากออกซิเจน ตามเวลาที่ต้องการ
เก็บผลวิเคราะห์

3.3.4 การตรวจวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ตรวจวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่
ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Demain and Davies, 1999)

3.3.5 การย้อมสีเซลล์

เกลี่ยเชื้อ (smear) ด้วยลูป (loop) บนแผ่นสไลด์ทิ้งให้แห้งในอากาศ และ
นำไปผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้งอย่างรวดเร็ว เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนแผ่นสไลด์ (heat fix) หยดมาลาไคท์
กรีน 5 เปอร์เซ็นต์ จนท่วมบริเวณ และนำแผ่นสไลด์ไปอังบนอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศา
เซลเซียส ให้น้ำสัมผัสกับแผ่นสไลด์ และคอยเติมมาลาไคท์กรีน อย่าให้แผ่นสไลด์แห้งเป็นเวลา
20 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดซาฟรานินโอ 1 เปอร์เซ็นต์ จนท่วมบริเวณ ทิ้งไว้เป็นเวลา
30 วินาที ล้างสีออกด้วยน้ำ รอจนสไลด์แห้งและส่องแผ่นสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ส่วนที่ติดสี
แดงเป็นเส้น คือ เซลล์ ส่วนที่ติดสีฟ้าเป็นจุดกลม คือ สปอร์ (Wistreich, 2003)

3.4 การเตรียมอาหารสำหรับการหมักแบบปราศจากออกซิเจน

นำอาหารสำหรับหมักที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดแอสติกและ
แอมโมเนีย ตวงใส่ขวดยาฉีด (serum bottle) และนำมาผ่านแก๊สไนโตรเจน 99.995 เปอร์เซ็นต์
เป็นเวลา 15 นาที (สำหรับอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร) จากนั้นปิดจุกยางและฝาอลูมิเนียมด้วย
ครีมเปอร์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น
เวลา 15 นาที (Demain and Davies, 1999)

3.5 การทดสอบการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM)

หมักอาหาร RCM ด้วยคลอสทริเดียมเป็นเวลา 216 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ เพื่อตรวจวัดการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.6 การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของคลอสทริเดียม

3.6.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการวิจัย 3 ประเภท คือ กลูโคส แป้ง และคาร์บอกซีเมททิวเซลลูโลส (carboxymethylcellulose, CMC) ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic Medium) ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก โดยใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.6.2 การแปรปริมาณกลูโคสในอาหารหมัก

เตรียมอาหารสังเคราะห์ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร หมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.6.3 การแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมัก

เตรียมอาหารสังเคราะห์ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เติมสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนด้วยความเข้มข้น 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร หมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.7 การใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร

3.7.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

ปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำเสียเป็น 4.5 และ 6.5 และใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับคลอสทริเดียมโดยตรงไม่เติมสารอาหารใดเพิ่มเติม และไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก ใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.7.2 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตตัวทำละลาย

ปรับน้ำเสียให้มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมดังข้อ 3.7.1 เติมสารสกัดยีสต์ปริมาณ 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่คลอสทริเดียม หมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

3.8 การใช้น้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกันในการผลิตตัวทำละลาย

ปรับน้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจากแต่ละเดือนให้มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมดังข้อ 3.7.1 และหมักด้วยคลอสทริเดียมเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น และค่าซีไอดี

3.9 การเตรียมตัวอย่างจากการหมักเพื่อวิเคราะห์

ตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงเวลาจะถูกนำมาทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ดูดส่วนน้ำเพื่อวิเคราะห์ สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ปั่นเหวี่ยง 1 ครั้ง สำหรับการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง และหยดกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล 1 หยด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการตรวจวิเคราะห์

3.10 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography ในปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยใช้แก๊สไนโตรเจนอัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที พาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ Porapax Q ยาว 2 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.3 มิลลิเมตร อุณหภูมิขณะฉีด (injection) 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในคอลัมน์ 170 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขณะตรวจวัดด้วย FID 240 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ผลจากโครมาโทแกรม สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

4.1 น้ำเสียที่ใช้ในการวิจัย

โรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง บริษัท สงวนวงษ์อุตสาหกรรม จำกัด จังหวัดนครราชสีมา เป็นโรงงานผู้ผลิตแป้งมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของประเทศไทย น้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังมีอยู่ 2 ส่วน คือ น้ำเสียจากกระบวนการล้างหัวมันสำปะหลังและน้ำเสียรวมจากทั้งโรงงาน ซึ่งรวมถึงน้ำที่เกิดจากกิจกรรมต่างๆ ภายในโรงงาน เช่น การล้างห้องน้ำและสิ่งปฏิกูล จึงแบ่งน้ำเสียแบ่งได้สองประเภท ได้แก่ น้ำเสียที่มีศักยภาพที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้ และน้ำเสียที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ในการวิจัยนี้จึงเลือกเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากส่วนที่มีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ คือ น้ำเสียที่เกิดจากการล้างหัวมันสำปะหลัง การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเสียสามารถทำได้สองแบบ แบบแรกคือ จ้วงตักจากบ่อพักน้ำเสีย แบบที่สอง คือ เก็บแบบรองเก็บจากท่อปล่อยน้ำทิ้งจากกระบวนการล้างหัวมันสำปะหลังโดยตรง น้ำเสียจากกระบวนการล้างมันสำปะหลังจากท่อต่อที่มีการไหลอย่างต่อเนื่องมีลักษณะเป็นคราบขุ่นข้นสีขาว และไม่มีกลิ่นบูดเน่า ไม่เกิดกระบวนการหมักเนื่องมาจากน้ำถูกถ่ายเทไปยังบ่อพักรวมตลอดเวลา ผู้วิจัยเลือกการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเสียโดยใช้น้ำจากการเก็บแบบท่อ (ภาพที่ 4.1) เนื่องจากมีผลกระทบจากการตกตะกอนและการหมักในบ่อพักน้อยกว่า น้ำเสียที่เก็บได้มีความสดใหม่มากกว่า



ภาพที่ 4.1 น้ำเสียจากกระบวนการล้างหัวมันสำปะหลัง

4.2 ผลการวิเคราะห์น้ำเสียเบื้องต้น

จากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียทั้ง 3 เดือน ได้แก่ เดือนกรกฎาคม มีนาคม และ พฤษภาคม พบว่าคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีในแต่ละเดือนมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1) คือ เดือนกรกฎาคมมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนใกล้เคียงกับเดือนพฤษภาคม คือ 14.01 และ 14.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเดือนมีนาคมมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ค่าบีโอดี และซีโอดีต่ำกว่าเดือนอื่น โดยมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน 10.06 เปอร์เซ็นต์

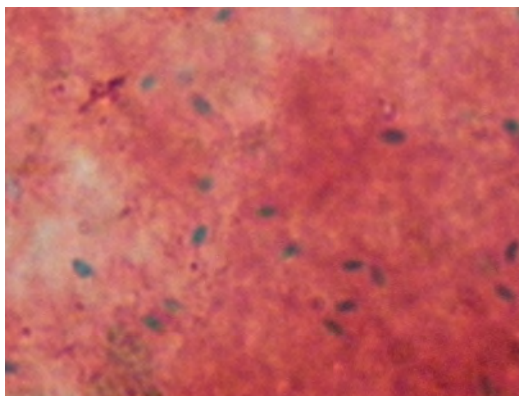
ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีของน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในแต่ละเดือน

พารามิเตอร์	ผลการวิเคราะห์		
	กรกฎาคม	มีนาคม	พฤษภาคม
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.56 (ที่ 27.2 °C)	5.13 (ที่ 28.4 °C)	6.21 (ที่ 27.2 °C)
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total Dissolved Solids, กรัม/ลิตร)	5.32	8.23	13.52
ปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids, กรัม/ลิตร)	14.00	1.07	1.91
Chemical Oxygen Demand (COD, มิลลิกรัม/ลิตร)	17,133.33	9,866.667	20,433.33
Biological Oxygen Demand (BOD, มิลลิกรัม/ลิตร)	ND	3,000	9,750
แอมโมเนียไนโตรเจน (กรัม/100 กรัม)	14.01	10.06	14.98
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	7.83	2.900	6.073

4.3 การเก็บรักษาคลอสทริเดียม

บ่มคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ (Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum*) ในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

14 วัน เพื่อให้คลอสทริเดียมสร้างสปอร์ โดยตรวจสอบด้วยการย้อมสีเชลล์ (ภาพที่ 4.2) และเก็บรักษาคลอสทริเดียมในรูปของสปอร์ (spore suspension) ที่ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.2 *C. acetobutylicum* เมื่อเลี้ยงในอาหาร RCM เป็นเวลา 14 วัน จุดสีเขี้ยว คือ สปอร์

4.4 การเตรียมอาหารสำหรับการหมักแบบปราศจากออกซิเจน

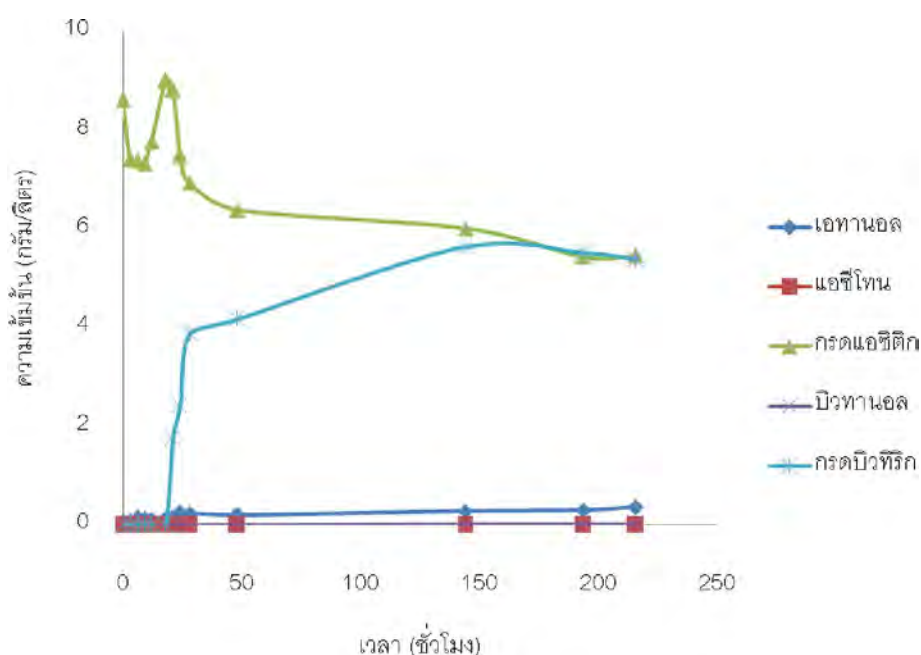
อาหารสำหรับหมักที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดแอสติกและแอมโมเนีย ซึ่งถูกตวงใส่ขวดยาฉีด (serum bottle) จะถูกนำมาผ่านแก๊สไนโตรเจน 99.995 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.3) เมื่อครบเวลา 15 นาที (สำหรับอาหารปริมาตร 30 มิลลิลิตร) ขวดอาหารจะมีอุณหภูมิลดลงและมีไอน้ำเกาะด้านนอกขวด เนื่องจากแก๊สไนโตรเจนซึ่งเป็นแก๊สอุณหภูมิต่ำเข้าแทนที่แก๊สออกซิเจนภายในอาหาร



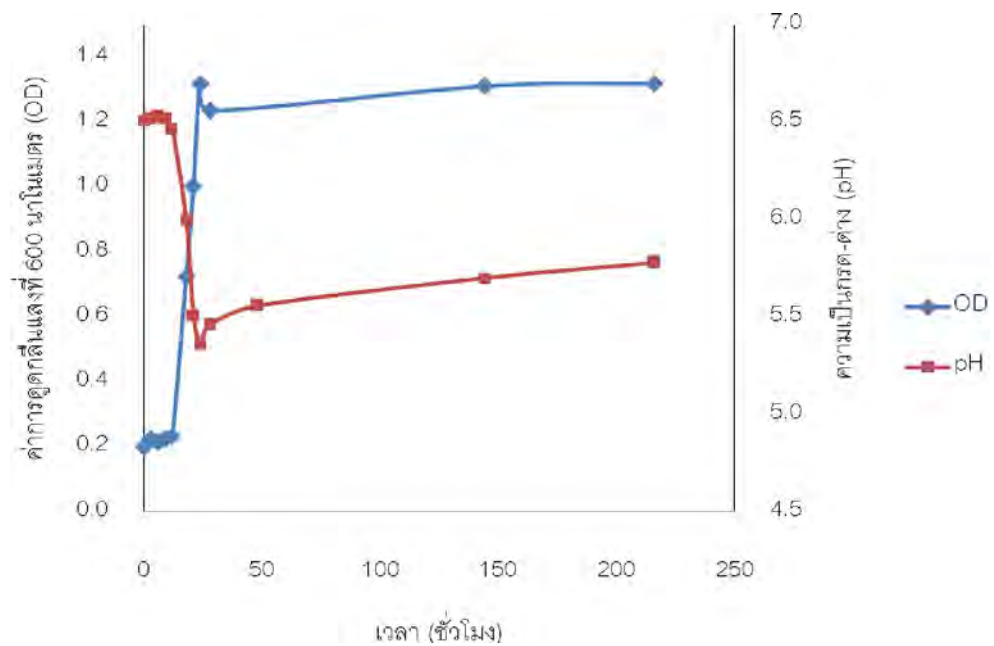
ภาพที่ 4.3 การเตรียมอาหารสำหรับการหมักแบบปราศจากออกซิเจน ด้วยวิธีผ่านแก๊สไนโตรเจน

4.5 การทดสอบการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM)

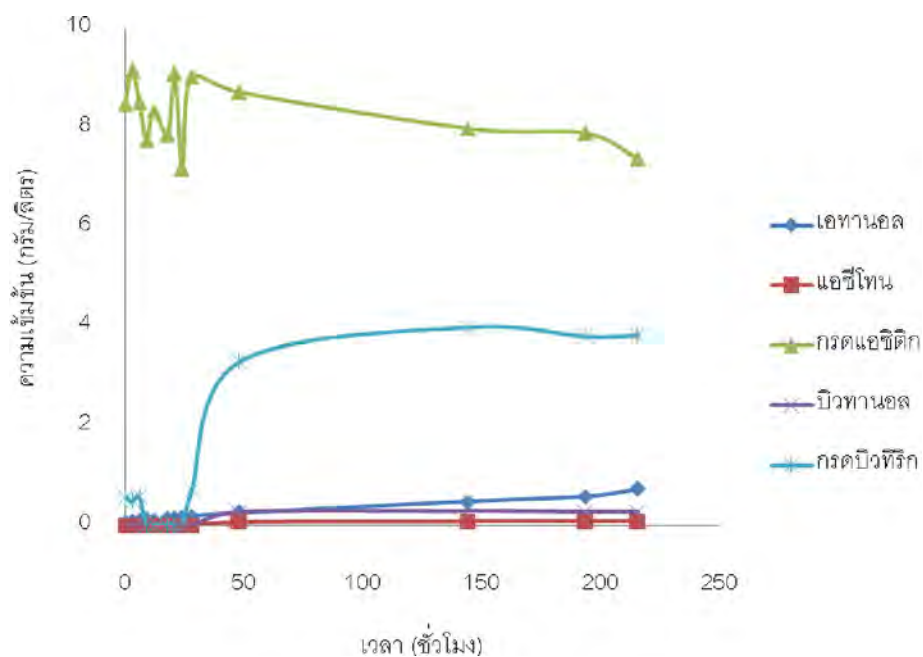
Reinforced Clostridial Media (RCM) ถูกใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนและเก็บจุลินทรีย์ในรูปของสปอร์ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อของการทดลองแต่ละครั้ง จึงได้ทดสอบการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงสูตร RCM โดยทำการบ่มไว้เป็นเวลา 216 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจน โดยเก็บตัวอย่างที่ช่วงเวลาต่างๆ เพื่อตรวจวัดการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งแสดงดังภาพที่ 4.4-4.9



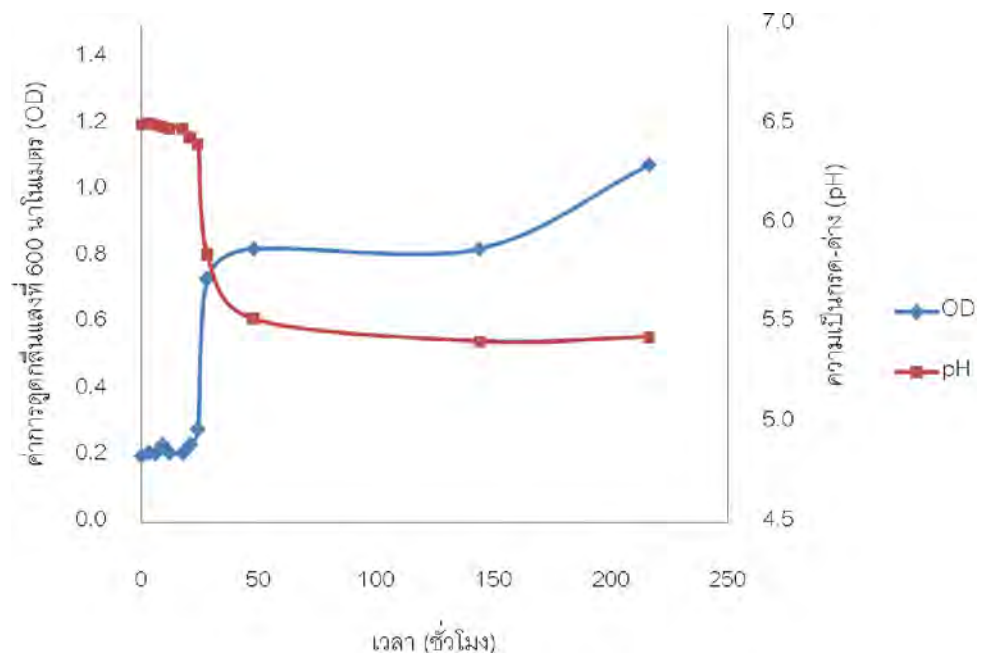
ภาพที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง



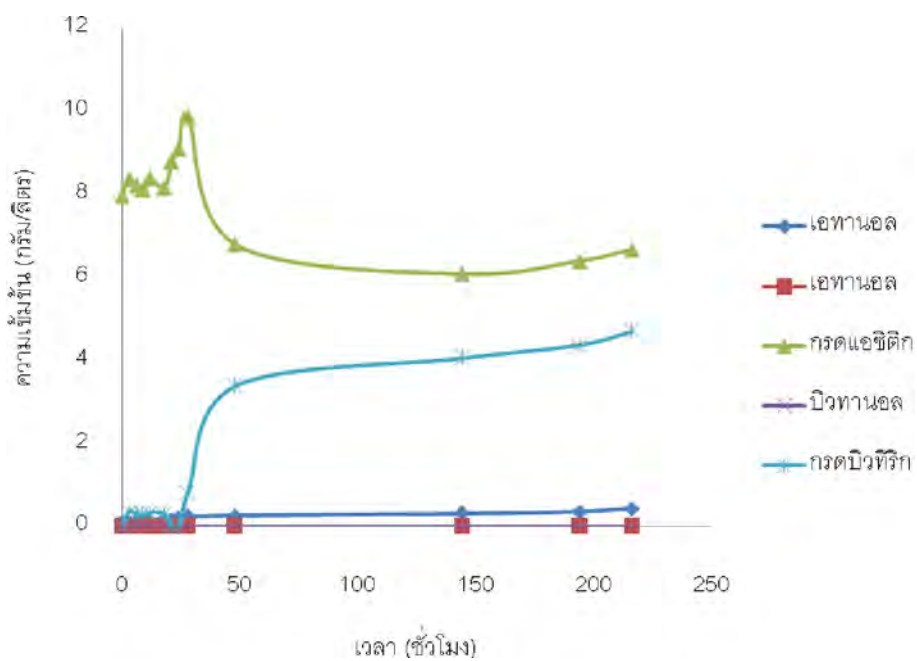
ภาพที่ 4.5 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง



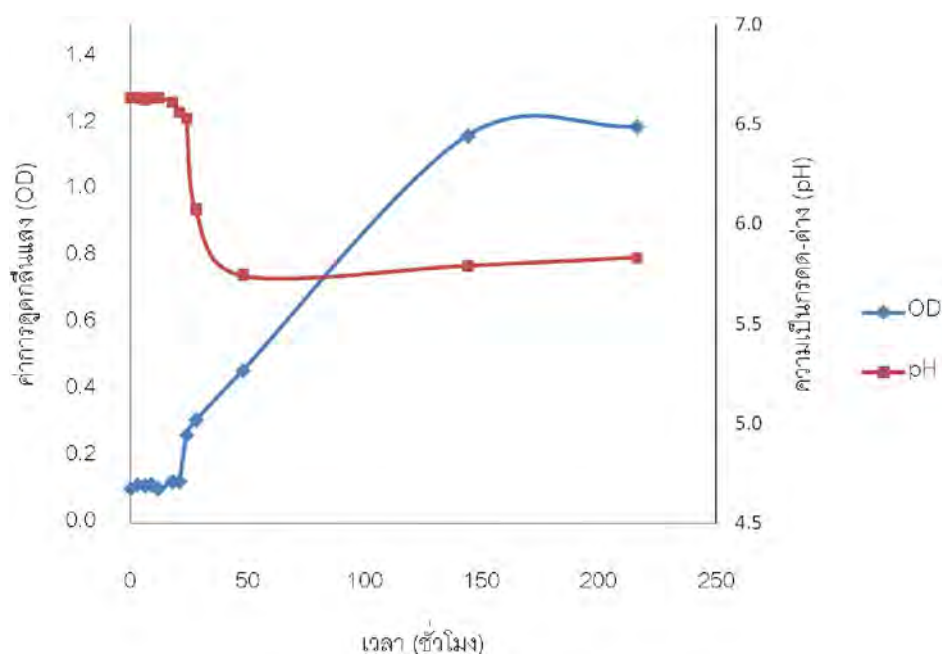
ภาพที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมัก *C. butyricum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.7 การเจริญเติบโตของ *C. butyricum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมัก *C. acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.9 การเจริญเติบโตของ *C. acetobutylicum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง

จากผลการทดลองคลอสทริเดียมทุกสายพันธุ์มีผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดแอซีติก และกรดบิวทิริก โดยที่ Decom-PA ใช้เวลาในการแบ่งตัวและเจริญเติบโต 28 ชั่วโมง สำหรับ *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* ใช้เวลา 48 ชั่วโมง

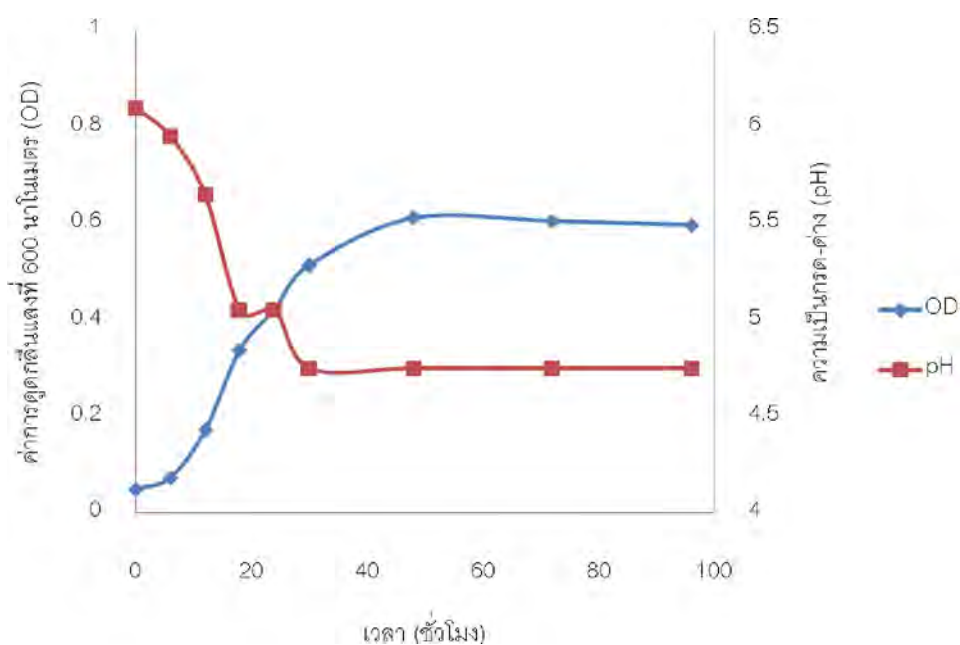
4.6 การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของคลอสทริเดียม

4.6.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

การใช้กลูโคส แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose, CMC) ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic Medium) ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับคลอสทริเดียมในกลุ่มผลิตตัวทำละลายทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* ในการเจริญเติบโตและผลิตตัวทำละลาย เพื่อศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับคลอสทริเดียมแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะที่

ปราศจากออกซิเจน ตรวจวัดการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

สำหรับคลอสทริเดียมสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย (Decom-PA) สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ภาพที่ 4.10) เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 96 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดบิวทิริกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก คือ 2.696 กรัมต่อลิตร และบริโภคน้ำตาลประมาณ 6.55 กรัมต่อลิตร โดยไม่พบการผลิตบิวทานอล (ตารางที่ 4.2)

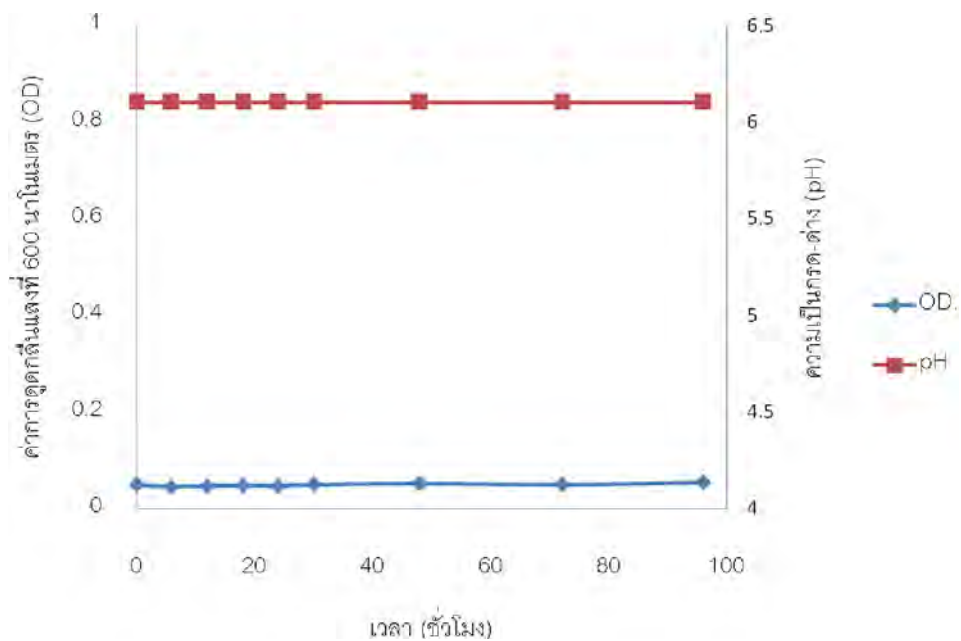


ภาพที่ 4.10 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

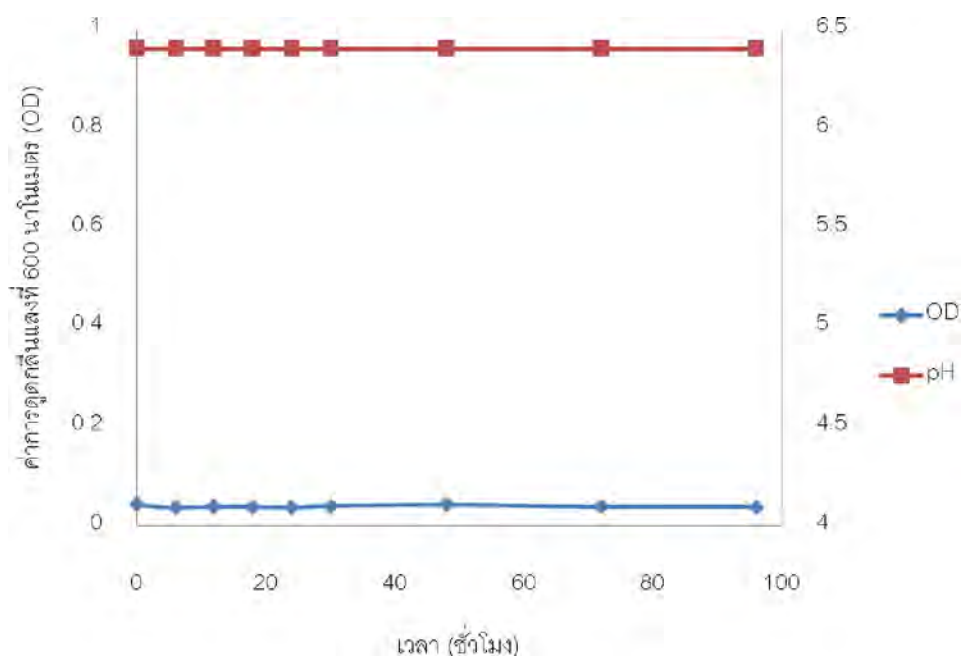
ตารางที่ 4.2 ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)			
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทีริก
0	0.015	0.006	0.000	0.208
24	0.020	0.000	0.000	2.147
48	0.019	0.000	0.000	2.298
72	0.022	0.000	0.000	2.638
96	0.022	0.011	0.000	2.696

เมื่อใช้แป้งและเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน คลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ไม่สามารถตรวจพบการเจริญเติบโตจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.11-4.12) และตรวจไม่พบตัวทำละลายที่ผลิตขึ้น จากการเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารหมักซึ่งแสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมเบื้องต้น โดยการสังเกตจากฟองแก๊ส พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนอาหารหมักเกิดฟองแก๊สมากที่สุด โดยเริ่มเกิดฟองแก๊สในชั่วโมงที่ 12

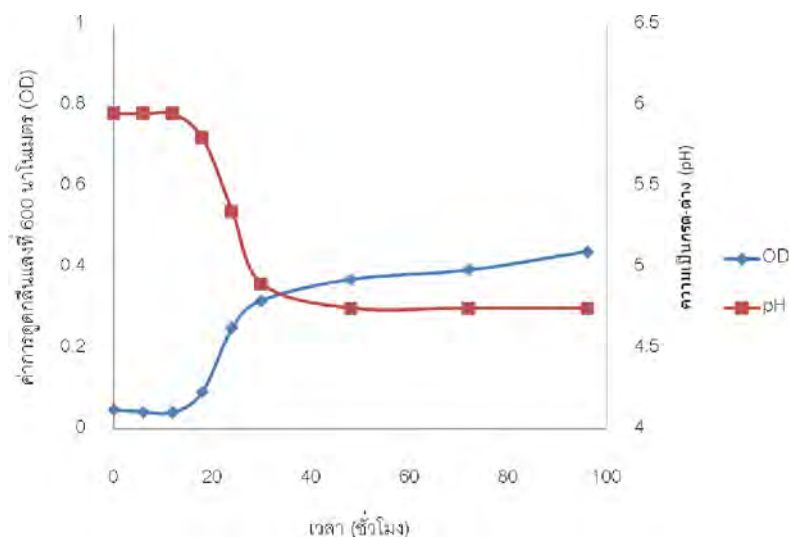


ภาพที่ 4.11 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.12 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สำหรับ *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดกลูโคส (ภาพที่ 4.13) และแป้ง โดยไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเซลลูโลส จากตารางที่ 4.3 *C. butyricum* สามารถผลิตแอสีโทนและบิวทานอลได้สูงที่สุด 0.989 และ 1.753 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และบรีโคโนน้ำตาล 11.783 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดบิวทิริก

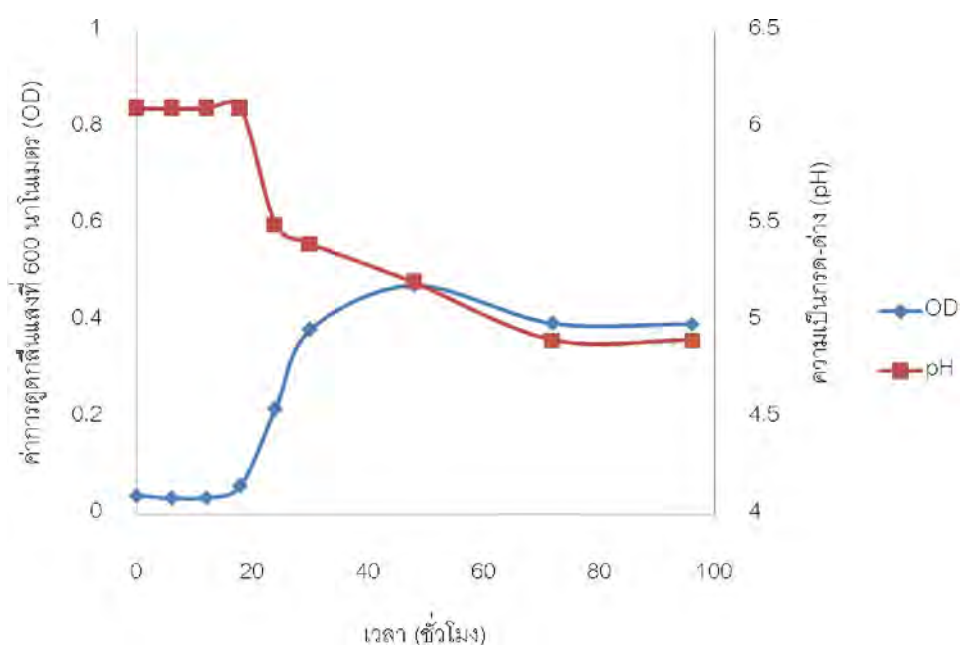


ภาพที่ 4.13 การเจริญเติบโตของ *C. butyricum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก *C. butyricum* ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)			
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก
0	0.012	0.007	0.000	0.175
24	0.020	0.450	0.508	0.730
48	0.050	0.859	1.383	1.820
72	0.057	0.989	1.753	2.514
96	0.048	0.823	1.413	2.132

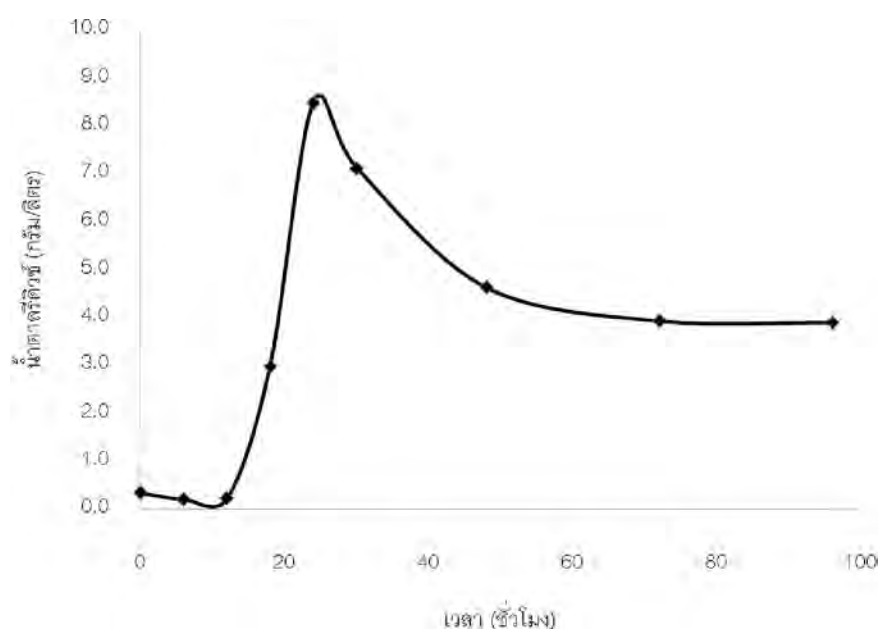
สำหรับการทดสอบการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *C. butyricum* พบว่า *C. butyricum* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 4.14) โดยในชั่วโมงที่ 48 *C. butyricum* สามารถผลิตแอสีโทนและบิวทานอลได้สูงที่สุดถึง 0.973 และ 1.075 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่ผลิตกรดบิวทริกได้มากที่สุด 3.787 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.4 และเป็นเวลาที่มีการเจริญสูงที่สุด ก่อนลดลงในชั่วโมงที่ 48 พร้อมกับปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจพบมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 คือ 8.473 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นเวลาที่เริ่มเกิดแก๊ส และเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้าย คือ 3.907 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.14 การเจริญเติบโตของ *C. butyricum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

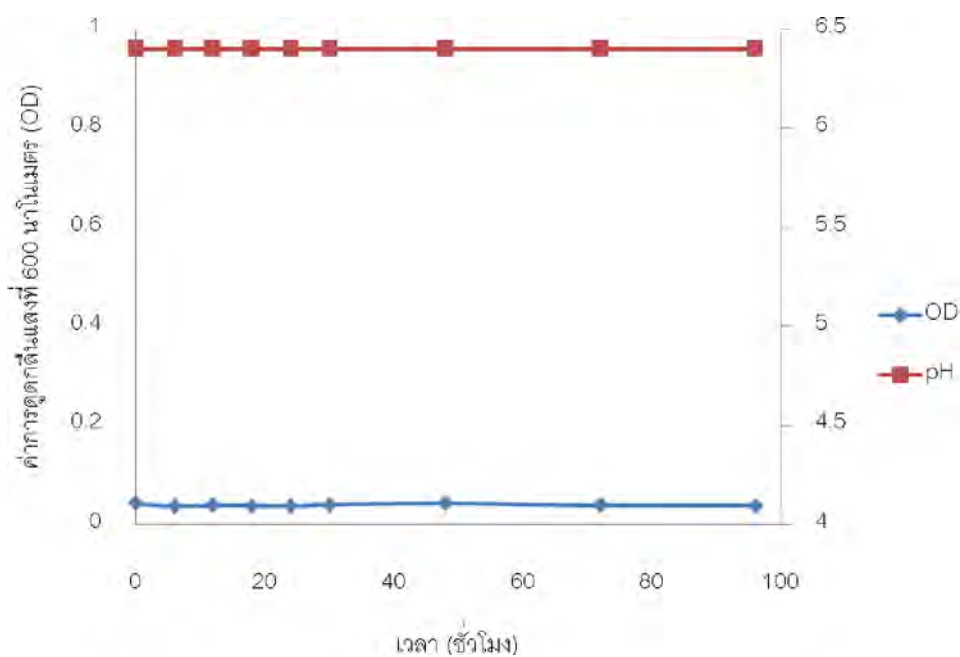
ตารางที่ 4.4 ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก *C. butyricum* ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้ง 20 กรัม ต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็น เวลา 96 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)			
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทีริก
0	0.028	0.016	0.014	0.222
6	0.018	0.005	0.000	0.454
12	0.022	0.003	0.004	0.247
18	0.026	0.003	0.000	0.009
24	0.039	0.128	0.103	0.836
30	0.042	0.423	0.369	1.066
48	0.073	0.973	1.075	3.787
72	0.045	0.556	0.668	2.428
96	0.050	0.617	0.724	2.723



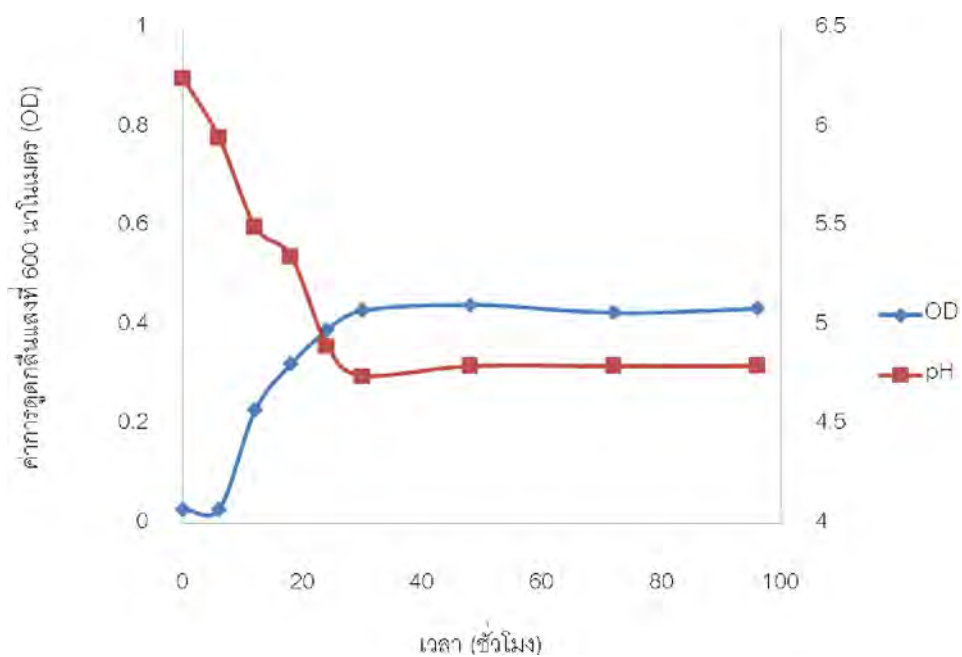
ภาพที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาบิวทีริกที่ตรวจพบตั้งแต่ต้นจนกระทั่ง 96 ชั่วโมงเมื่อใช้แป้ง 20 กรัมต่อ ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *C. butyricum* ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด- ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สำหรับการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *C. butyricum* ไม่สามารถถูกตรวจพบเจริญเติบโต (ภาพที่ 4.16) และไม่ผลิตตัวทำละลาย จากการเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารหมักซึ่งแสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมเบื้องต้นโดยการสังเกตจากฟองแก๊ส พบว่าฟองแก๊สที่เกิดขึ้นเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน พบว่าฟองแก๊สเกิดมากที่สุดเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารหมัก และตรวจพบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นระหว่างการหมัก โดยมีมากที่สุดในช่วงเวลาที่ 24 คือ 8.473 กรัมต่อลิตร และค่อยๆลดลง สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งวัดการเจริญของคลอสทริเดียมหลังช่วงเวลาที่ 24 และค่อยๆลดลง สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งวัดการเจริญของคลอสทริเดียมหลังช่วงเวลาที่ 24 (ภาพที่ 4.15 และ 4.16)



ภาพที่ 4.16 การเจริญเติบโตของ *C. butyricum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสังเคราะห์สำหรับหมัก *C. acetobutylicum* พบว่า *C. acetobutylicum* สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 4.17) สำหรับผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น คือ กรดบิวทิริก (ตารางที่ 4.5) และบริโภคน้ำตาล 6.172 กรัมต่อลิตร

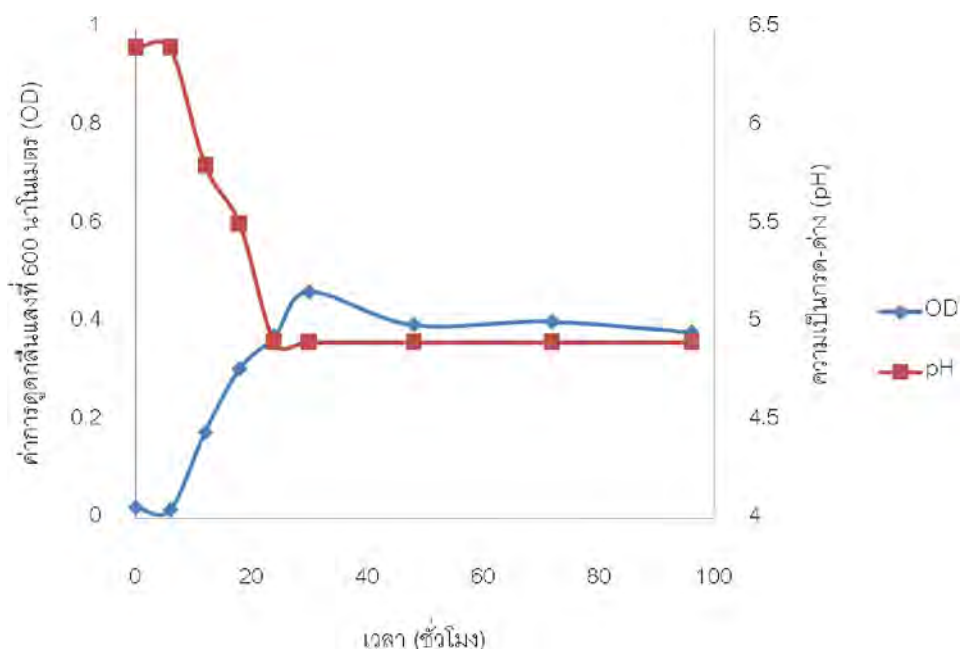


ภาพที่ 4.17 การเจริญเติบโตของ *C. acetobutylicum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.5 ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก *C. acetobutylicum* ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)			
	เอทานอล	แอสีโตน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก
0	0.051	0.003	0.000	0.180
24	0.028	0.044	0.044	1.465
48	0.030	0.060	0.131	2.733
72	0.030	0.058	0.153	2.770
96	0.032	0.052	0.149	2.662

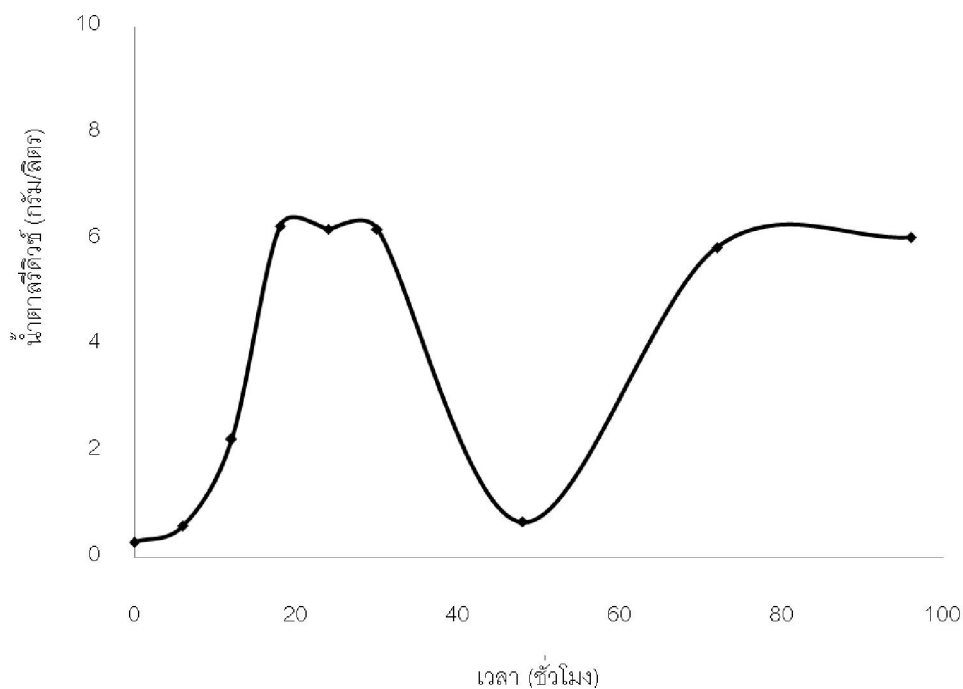
สำหรับการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *C. acetobutylicum* พบว่า *C. acetobutylicum* สามารถเจริญเติบโตได้ (ภาพที่ 4.18) โดยผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดบิวทิริกดังตารางที่ 4.6 สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง คือ 6.240 กรัมต่อลิตร และลดลงจนกระทั่งเวลา 48 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลเพียง 0.667 กรัมต่อลิตร และเริ่มสูงขึ้นอีกครั้งจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักที่ 96 ชั่วโมง พบน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 6.027 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.18 การเจริญเติบโตของ *C. acetobutylicum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

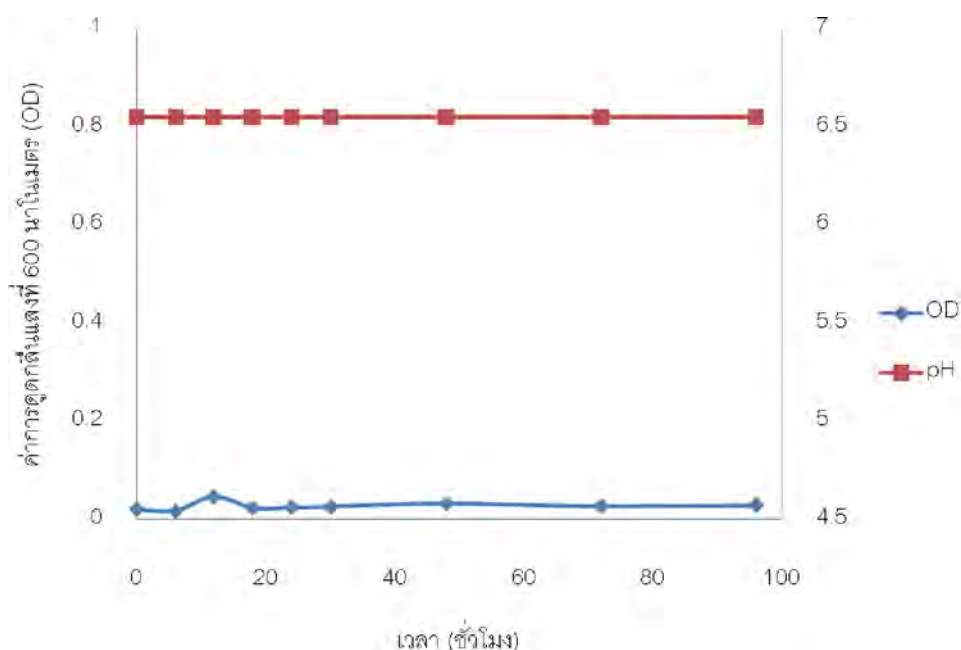
ตารางที่ 4.6 ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น เมื่อหมัก *C. acetobutylicum* ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)			
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทีริก
0	0.089	0.024	0.000	0.161
6	0.052	0.013	0.000	0.157
12	0.055	0.004	0.000	0.489
18	0.065	0.028	0.030	1.467
24	0.075	0.043	0.071	2.023
30	0.134	0.076	0.103	3.050
48	0.101	0.050	0.076	2.366
72	0.107	0.064	0.098	3.096
96	0.091	0.057	0.089	2.689



ภาพที่ 4.19 ปริมาณน้ำตาลรีดีวซ์ที่ตรวจพบตั้งแต่ต้นจนกระทั่ง 96 ชั่วโมงเมื่อใช้แป้ง 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *C. acetobutylicum* ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สำหรับการใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *C. acetobutylicum* ไม่สามารถตรวจพบการเจริญเติบโต (ภาพที่ 4.20) และไม่สามารถตรวจพบการผลิตตัวทำละลายจากการเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอาหารหมักซึ่งแสดงความสามารถในการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมเบื้องต้นโดยการสังเกตจากฟองแก๊ส พบว่าฟองแก๊สที่เกิดขึ้นเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนประเภทกลูโคสและแป้ง



ภาพที่ 4.20 การเจริญเติบโตของ *C. acetobutylicum* และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างเมื่อหมักในอาหารสังเคราะห์โดยใช้เซลลูโลส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4.6.2 การแปรปริมาณกลูโคสในอาหารหมัก

การแปรปริมาณกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสังเคราะห์ โดยเพิ่มปริมาณกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก และใช้เป็นอาหารสำหรับหมักคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* โดยใช้เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะปราศจากออกซิเจน ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

สำหรับคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถในใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูง 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 96 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์หลักของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และ *C. acetobutylicum* คือ กรดบิวทิริก ซึ่งสามารถผลิตได้ 2.748 และ 2.697 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และบริโภคน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 11.07 และ 9.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *C. butyricum* ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอล 2.102 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.7 และบริโภคน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 13.61 กรัมต่อลิตร

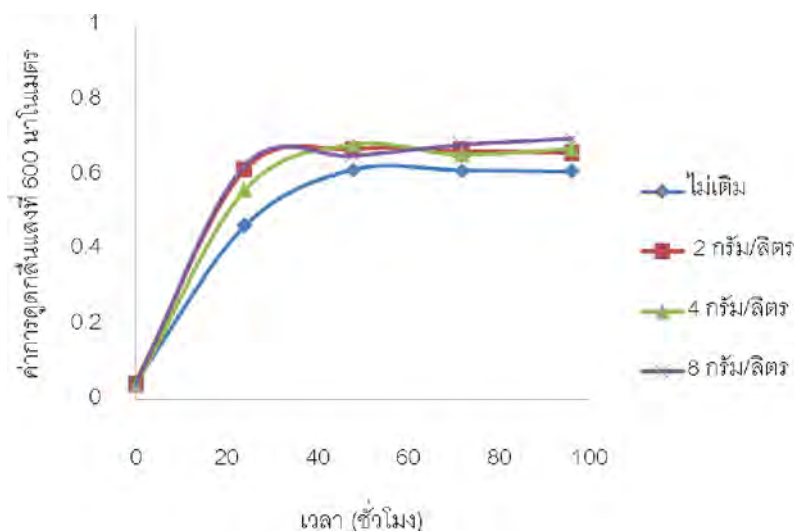
ตารางที่ 4.7 ผลผลิตที่เกิดขึ้น เมื่อหมักคลอสทริเดียม 3 สายพันธุ์ ในอาหารสังเคราะห์โดยใช้ กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ 37 องศาเซลเซียส ความ เป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สายพันธุ์	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				กลูโคส (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
Decom-PA	0.028	0.004	0.000	2.748	48.933
<i>C. butyricum</i>	0.049	0.880	2.102	1.890	46.387
<i>C. acetobutylicum</i>	0.034	0.065	0.105	2.697	50.280

4.6.3 การแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมัก

การแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ในอาหารหมักโดยเติม สารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอนปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 ไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ระหว่างการหมัก หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในภาวะปราศจาก ออกซิเจน และเปรียบเทียบผลผลิตที่เกิดขึ้นเมื่อไม่เติมสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

สำหรับคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA เมื่อหมักอาหารที่ความเข้มข้น ของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม (ภาพที่ 4.21) และการบริโภค กลูโคสสูงขึ้นตามปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เติมในอาหารหมัก โดยที่ผลผลิตหลัก คือกรด บิวทิริก และการเพิ่มสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณใดๆ ไม่ส่งผลต่อการผลิตแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล ของคลอสทริเดียมสายพันธุ์นี้มากนัก (ตารางที่ 4.8) ซึ่งขณะการหมักเกิดฟองแก๊ส จำนวนมาก

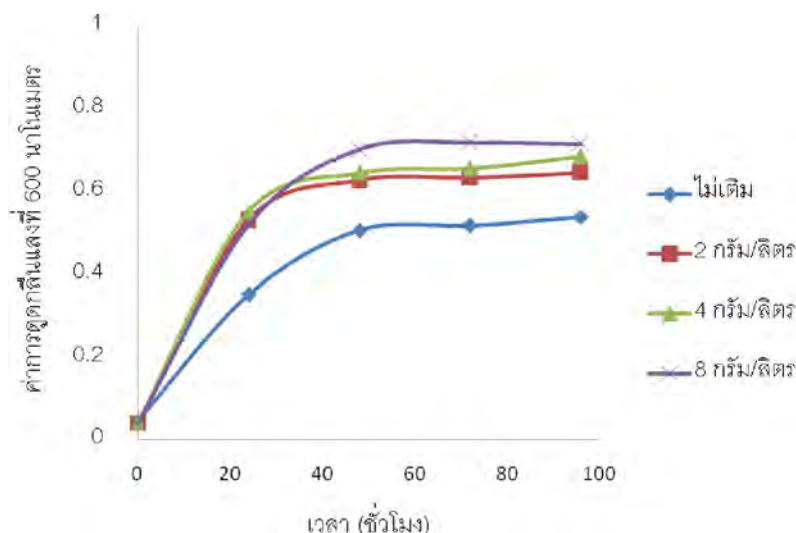


ภาพที่ 4.21 การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.8 ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและกลูโคสที่เหลือ เมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				กลูโคส (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสซีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
0	0.022	0.011	0.000	2.696	13.45
2	0.038	0.017	0.000	3.177	11.189
4	0.047	0.005	0.000	3.314	10.450
8	0.041	0.005	0.017	2.799	8.739

สำหรับ *C. butyricum* ในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสูงขึ้นตามปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เติมในอาหารหมัก (ภาพที่ 4.22) และการบริโภคกลูโคสเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อมีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตแอสซีโทนและบิวทานอลเกิดมากที่สุดเมื่อไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ คือ 0.989 และ 1.753 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.9) ซึ่งฟองแก๊สจำนวนมากเกิดขึ้นระหว่างการหมัก

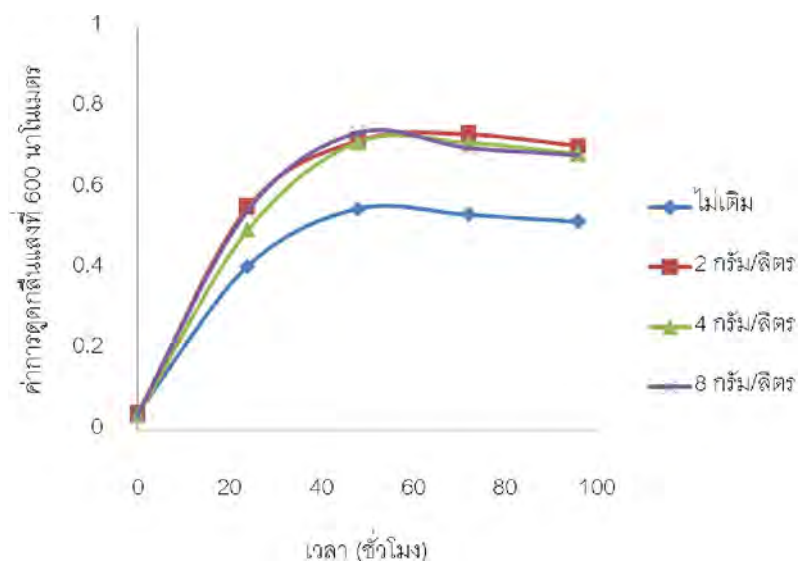


ภาพที่ 4.22 การเจริญเติบโตของ *C. butyricum* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.9 ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและกลูโคสที่เหลือ เมื่อหมัก *C. butyricum* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				กลูโคส (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทริก	
0	0.057	0.989	1.753	2.514	8.217
2	0.056	0.252	0.685	2.195	9.694
4	0.050	0.132	0.491	2.359	9.156
8	0.065	0.202	0.728	2.551	7.383

สำหรับการหมัก *C. acetobutylicum* ในอาหารที่มีความเข้มข้นกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ส่งผลให้การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมสูงขึ้นและใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.23) และพบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การบริโภคกลูโคส รวมถึงการสร้างกรดบิวทริกของคลอสทริเดียมเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.10) และเกิดฟองแก๊สขึ้นในปริมาณมากในขณะหมัก



ภาพที่ 4.23 การเจริญเติบโตของ *C. acetobutylicum* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.10 ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและกลูโคสที่เหลือ เมื่อหมัก *C. acetobutylicum* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				กลูโคส (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
0	0.032	0.060	0.153	2.770	13.828
2	0.042	0.027	0.236	3.685	9.728
4	0.050	0.028	0.267	3.831	9.044
8	0.060	0.028	0.292	4.135	7.861

4.7 การใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร

4.7.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม

ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของน้ำเสียที่ใช้ในการทดลองมี 2 ค่า คือ 4.5 และ 6.5 การเลือกความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม ถูกพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลที่คลอสทริเดียมบริโภาคและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้มากกว่า โดยหมักด้วยคลอสทริเดียมในกลุ่มผลิตภัณฑ์ทำละลายทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเสียจากเดือนพฤษภาคมเป็นสารตั้งต้น และไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก สำหรับปริมาณกรดแอสिटิกและน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำเสียแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำเสียเริ่มต้นสำหรับหมักด้วยคลอสทริเดียมที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ความเป็นกรด-ด่าง	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)					น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสिटอน	กรดแอสिटิก	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
4.5	0.032	0.038	3.144	0.000	0.000	9.133
6.5	0.087	0.070	0.504	0.005	0.000	7.687

สำหรับคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA พบว่าผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดบิวทิริก โดยที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 คลอสทริเดียมสามารถผลิตเอทานอลและแอสिटอนได้มากกว่า และพบว่าที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 คลอสทริเดียมสามารถบริโภาคน้ำตาลได้มากกว่า (ตารางที่ 4.12) และไม่พบฟองแก๊สในอาหารหมักที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5

ตารางที่ 4.12 ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ด้วยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ความเป็นกรด-ด่าง	ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)					น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	กรดแอสีติก	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
4.5	0.036	0.020	2.979	0.000	0.364	6.720
6.5	0.076	0.074	2.548	0.010	5.189	1.520

สำหรับ *C. butyricum* ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 คลอสทริเดียมไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ ในขณะที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 สามารถผลิตบิวทานอลได้ถึง 1.608 กรัมต่อลิตร รวมทั้งแอสีโทน เอทานอลและการบริโภคน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นมากกว่าที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 (ตารางที่ 4.13) สำหรับฟองแก๊สในอาหารระหว่างการหมัก ไม่พบในน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5

ตารางที่ 4.13 ผลิตรภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ด้วย *C. butyricum* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ความเป็นกรด-ด่าง	ผลิตรภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)					น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	กรดแอสีติก	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
4.5	0.041	0.039	1.867	0.000	0.413	6.567
6.5	0.115	0.236	0.902	1.608	1.893	0.547

จากการหมัก *C. acetobutylicum* ด้วยน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 คลอสทริเดียมสามารถผลิตแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอลได้มากกว่าที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 รวมทั้งมีการบริโภคน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่า (ตารางที่ 4.14) เมื่อพิจารณาการเจริญของคลอสทริเดียมเบื้องต้นจากฟองแก๊สในอาหารหมักพบว่าที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 ไม่เกิดฟองแก๊ส

ตารางที่ 4.14 ผลผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 และ 6.5 ด้วย *C. acetobutylicum* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ความเป็นกรด-ด่าง	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)					น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	กรดแอสีติก	บิวทานอล	กรดบิวทริก	
4.5	0.040	0.030	2.170	0.011	0.636	6.833
6.5	0.149	0.097	1.555	0.055	5.100	2.185

4.7.2 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตตัวทำละลาย

น้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 ถูกใช้ในการทดสอบการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ เพื่อเลือกปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวทำละลาย โดยการเปรียบเทียบปริมาณของผลิตภัณฑ์และการบริโภคกลูโคสของคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* หลังจากการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะปราศจากออกซิเจน โดยแปรปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.5 เมื่อไม่เติมสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

สำหรับคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA การเติมสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณใดๆ ไม่มีผลต่อการผลิตแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล แต่ส่งผลให้การบริโภคกลูโคสของคลอสทริเดียมสูงขึ้น ดังตารางที่ 4.15 หากพิจารณาจากฟองแก๊สที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักพบว่าฟองแก๊สที่เกิดขึ้นในขวดอาหารที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์ มีปริมาณน้อยกว่าขวดอาหารที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์

ตารางที่ 4.15 ผลผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ด้วยคลอสทริเดียม สายพันธุ์ Decom-PA ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
0	0.076	0.074	0.010	5.189	1.520
2	0.053	0.040	0.000	2.607	0.318
4	0.051	0.046	0.000	2.532	0.347
8	0.056	0.035	0.000	3.009	0.386

สำหรับ *C. butyricum* การเติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณใดๆ ส่งผลให้การผลิตบิวทานอลลดลง โดยที่แอสีโทน บิวทานอล และเอทานอลมีปริมาณสูงสุดเมื่อไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ และการบริโภคกลูโคสของคลอสทริเดียมเมื่อไม่มีสารสกัดจากยีสต์ใกล้เคียงกันกับเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ปริมาณใดๆ (ตารางที่ 4.16) และฟองแก๊สที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักมีปริมาณไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.16 ผลผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. butyricum* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
0	0.115	0.236	1.608	1.893	0.547
2	0.064	0.058	0.513	1.926	0.315
4	0.069	0.068	0.415	2.335	0.338
8	0.075	0.062	0.509	2.406	0.407

สำหรับ *C. acetobutylicum* เมื่อไม่มีสารสกัดจากยีสต์พบว่าสามารถสร้าง แอซีโตน บิวทานอลและเอทานอลได้สูงที่สุด 0.039, 0.115 และ 0.056 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่มีการบริโภคกลูโคสต่ำที่สุด (ตารางที่ 4.17) และจากฟองแก๊สที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักพบว่า ใน น้ำเสียที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์เกิดฟองแก๊สน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.17 ผลผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 และสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. acetobutylicum* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอซีโตน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
0	0.149	0.097	0.055	5.100	2.185
2	0.061	0.035	0.021	2.792	0.303
4	0.056	0.038	0.018	2.536	0.320
8	0.057	0.033	0.022	2.804	0.403

4.8 ผลการใช้ น้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกันในการผลิตตัวทำละลาย

จากการทดลองความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม และการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์เพื่อการผลิตแอซีโตน บิวทานอล และเอทานอลจากน้ำเสียด้วยคลอสทริเดียม ทำให้ได้ ภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำเสียเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตแอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล คือ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ สำหรับการใช้น้ำเสียที่เก็บตัวอย่าง จากเดือนที่แตกต่างกัน คือ กรกฎาคม มีนาคม และพฤษภาคม นอกจากการพิจารณาผลผลิตภัณฑ์ที่ เกิดขึ้น และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมงแล้ว ได้เพิ่มการวิเคราะห์ค่าซีไอดี หลังจากการหมัก สำหรับเป็นแนวทางในการบำบัดน้ำเสียต่อไป

ปริมาณแป้งและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจพบในน้ำเสียทั้ง 3 เดือน ก่อนการหมักด้วย คลอสทริเดียมแสดงในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และแป้งในน้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจากเดือนกรกฎาคม มีนาคม และพฤษภาคม

สารอาหาร	กรกฎาคม	มีนาคม	พฤษภาคม
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	7.830	2.900	6.073
แป้ง (กรัม/100 กรัม)	14.01	10.06	14.98

สำหรับคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA เมื่อหมักน้ำเสียทั้ง 3 เดือน พบว่าผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดบิวทิริก ดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 ผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียจากเดือนกรกฎาคม มีนาคม และพฤษภาคม หลังจากการหมักด้วยคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
กรกฎาคม	0.137	0.297	0.011	5.371	2.150
มีนาคม	0.081	0.074	0.000	4.021	0.420
พฤษภาคม	0.076	0.074	0.010	5.189	1.520

สำหรับน้ำเสียจากเดือนกรกฎาคมสามารถผลิตแอสีโทนได้มากที่สุด คือ 0.297 กรัมต่อลิตร โดยผลิตเอทานอลและบิวทานอล 0.137 และ 0.011 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำเสียจากเดือนมีนาคมเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์เกิดน้อยที่สุด จากเดือนพฤษภาคมบิวทานอลถูกผลิตใกล้เคียงกันเดือนกรกฎาคม คือ 0.010 กรัมต่อลิตร โดยที่ผลิตภัณฑ์หลักของคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในน้ำเสียทุกเดือน คือ กรดบิวทิริก

สำหรับ *C. butyricum* เมื่อหมักน้ำเสียทั้ง 3 เดือน พบว่าผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดบิวทิริกและรองลงมา คือ บิวทานอล ดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 ผลผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียจากเดือนกรกฎาคม มีนาคม และพฤษภาคม หลังจากการหมักด้วย *C. butyricum* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
กรกฎาคม	0.081	0.193	1.123	3.969	0.621
มีนาคม	0.084	0.137	0.866	4.257	0.272
พฤษภาคม	0.115	0.236	1.608	1.893	0.547

จากเดือนพฤษภาคม *C. butyricum* สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด 1.586 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ เดือนกรกฎาคม 1.123 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตแอสีโทนได้ 0.307 กรัมต่อลิตร โดยเดือนมีนาคมสามารถผลิตกรดบิวทิริกได้มากที่สุด 3 เดือน คือ 4.257 กรัมต่อลิตร

สำหรับการหมักน้ำเสียจาก 3 เดือนด้วย *C. acetobutylicum* ผลผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดบิวทิริก และรองลงมา คือ เอทานอล ดังตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 ผลผลิตภัณฑ์และน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียจากเดือนกรกฎาคม มีนาคม และพฤษภาคม หลังจากการหมักด้วย *C. acetobutylicum* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
	เอทานอล	แอสีโทน	บิวทานอล	กรดบิวทิริก	
กรกฎาคม	0.174	0.137	0.099	7.622	1.217
มีนาคม	0.131	0.068	0.054	4.489	0.407
พฤษภาคม	0.149	0.097	0.055	5.100	2.185

น้ำเสียจากเดือนกรกฎาคม ผลผลิตภัณฑ์ทุกชนิดที่เกิดจากการหมักด้วย *C. acetobutylicum* มีปริมาณมากกว่าเดือนมีนาคมและพฤษภาคม

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าซีไอดีหลังจากการหมักน้ำเสียทั้ง 3 เดือนด้วยคลอสทริเดียม 3 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.22 ค่าซีไอดีก่อนและหลังการหมักน้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจาก 3 เดือน ด้วยคลอสทริเดียม 3 สายพันธุ์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เดือนที่เก็บ ตัวอย่าง	ค่าซีไอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)			
	ก่อนการหมัก	หลังการหมัก		
		Decom-PA	<i>C. butyricum</i>	<i>C. acetobutylicum</i>
กรกฎาคม	17,133.33	16,666.67	15,933.33	16,600.00
มีนาคม	9,866.667	10,900.00	10,666.67	10,966.67
พฤษภาคม	20,433.33	18,933.33	17,700.00	19,100.00

สำหรับค่าซีไอดีหลังจากการหมักน้ำเสียด้วยคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าค่าซีไอดียังทั้งก่อนและหลังการหมักมีค่าใกล้เคียงกัน

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ผลการวิเคราะห์น้ำเสียเบื้องต้น

จากผลการวิเคราะห์เบื้องต้นแสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่ผสมอยู่ในน้ำเสียเป็นจำนวนมาก และเป็นแป้งซึ่งสูญเสียไปในน้ำเสียจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังไม่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเสียทั้ง 3 เดือน ซึ่งการวิเคราะห์โดยใช้ค่าซีโอดีเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทราบได้ว่าสารอินทรีย์ที่ปะปนอยู่เป็นประเภทใด จำเป็นต้องมีการวิเคราะห์บีโอดีร่วมด้วย เนื่องจากสารอินทรีย์สามารถจัดได้เป็นสองประเภท คือ ประเภทที่หนึ่ง สารที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางชีววิทยาสามารถตรวจสอบได้จากค่าบีโอดี และแบบที่สอง คือ สารอินทรีย์ที่ไม่สามารถย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีววิทยาสามารถตรวจสอบได้จากค่าซีโอดี การตรวจซีโอดีร่วมกับบีโอดีจึงสามารถทำให้ทราบว่าสารอินทรีย์ที่เจือปนอยู่ในน้ำเสียสามารถนำไปใช้ได้หรือสารถูกนำไปใช้แล้วด้วยจุลินทรีย์โดยตรงหรือไม่ ซึ่งส่วนต่างของซีโอดีและบีโอดีในน้ำเสียแสดงถึงปริมาณสารอินทรีย์เหลืออยู่นอกเหนือจากการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่า น้ำเสียจากการล้างมันอาจจะมีสารที่ยากแก่การนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ทั่วไปเจือปนอยู่มากอีกด้วย สำหรับปริมาณแป้งในน้ำเสียมีความสัมพันธ์กับค่าซีโอดีและบีโอดี คือ น้ำเสียจากเดือนมีนาคมซึ่งมีปริมาณแป้งต่ำกว่าเดือนอื่น ส่งผลให้ค่าซีโอดีและบีโอดีต่ำกว่าเดือนอื่น เช่นเดียวกับเดือนพฤษภาคม มีปริมาณแป้งสูงสุด จึงส่งผลให้ค่าซีโอดีและค่าบีโอดีสูงที่สุดเช่นกัน แสดงว่าฤดูกาลส่งผลต่อปริมาณตลอดจนองค์ประกอบของสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ในการนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์จึงจำเป็นต้องประเมินช่วงเวลาที่ให้นำมาใช้ หรือปรับเปลี่ยนกระบวนการนำมาใช้ให้เหมาะสมกับช่วงฤดูกาล โดยปกติน้ำเสียเหล่านี้จะถูกนำไปบำบัดหรือใช้ผลิตไบโอแก๊สเพื่อใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าภายในโรงงานด้วยกระบวนการแบบปราศจากออกซิเจน (anaerobic process) ซึ่งใช้พื้นที่ในการสร้างบ่อบำบัดเป็นจำนวนมาก ทั้งยังส่งกลิ่นเหม็นไปสู่ชุมชนเกิดเป็นมลภาวะ

จากผลการวิเคราะห์เบื้องต้น พบว่ามีแป้งเป็นองค์ประกอบเจือปนในน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง งานวิจัยนี้จึงมีสมมติฐานว่า น้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังมีศักยภาพที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอซีโทน บิวทานอล และเอทานอลได้ ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์จากมันสำปะหลังที่สำคัญของโลก (Food and Agriculture Organization, 2009) จึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาของเสีย

จากโรงงานแปรรูปมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งสำหรับผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพและผลิตภัณฑ์อื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ประเภทแอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยจุลินทรีย์สกุล *คลอสทริเดียม* ภายใต้กระบวนการแบบปราศจากออกซิเจน

การทดสอบการเจริญเติบโตของ *คลอสทริเดียม* ในอาหาร Reinforce Clostridial Media (RCM)

Reinforced Clostridial Media (RCM) เป็นอาหารซึ่งมีกลูโคสปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของ *คลอสทริเดียม* และแบคทีเรียแอนแอโรบส์อื่นๆ จึงถูกใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนและเก็บจุลินทรีย์ในรูปของสปอร์ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อของการทดลองแต่ละครั้ง

ผลการทดลองแสดงความสอดคล้องกันในแต่ละสายพันธุ์ของ *คลอสทริเดียม* กล่าวคือ เมื่อเวลาผ่านไป *คลอสทริเดียม* ผลิตกรดในรูปของกรดแอซีติกและกรดบิวทิริก จึงส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลง จากนั้นค่าความเป็นกรดต่างค่อนข้างคงที่ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของกรดที่พบในอาหารเลี้ยง เมื่อพิจารณาจากกราฟ ที่เวลาขณะ *คลอสทริเดียม* มีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เป็นเวลาเดียวกันที่ความเป็นกรดต่างลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากผลิตภัณฑ์ประเภทกรดที่เซลล์ผลิตขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตช่วง exponential phase (Alsaker และ Papoutsakis, 2005) จนถึงช่วงเวลาที่เซลล์มีอัตราการเจริญและการตายที่ใกล้เคียงกัน (stationary phase) ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างคงที่ โดยที่ *คลอสทริเดียม* แต่ละสายพันธุ์ใช้เวลาในการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป คือ Decom-PA ใช้เวลาในการแบ่งตัวและเจริญเติบโตเร็วที่สุด คือ 28 ชั่วโมง สำหรับ *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* ใช้เวลานานกว่า คือ 48 ชั่วโมง โดยที่ผลิตภัณฑ์ในรูปของตัวทำละลายที่ต้องการมีปริมาณน้อย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ กลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจึงมีปริมาณน้อย โดยถูกใช้สำหรับการเจริญเติบโตและผลิตกรดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เชื้อสร้างขึ้นก่อน จึงไม่มีแหล่งคาร์บอนเพียงพอสำหรับการผลิตตัวทำละลายซึ่งเกิดภายหลังและจำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอนมากเพียงพอ สุดท้ายเมื่อสารอาหารหมดจุลินทรีย์จึงสร้างสปอร์ขึ้นเพื่อดำรงชีพในภาวะที่ไม่เหมาะสมจนกระทั่งภาวะแวดล้อมเหมาะสมจึงเกิดการเจริญเติบโตอีกครั้ง

การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของคลอสทริเดียม

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Decom-PA, *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* โดยใช้แหล่งคาร์บอน 3 ประเภทหลักที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ คือ น้ำตาล (กลูโคส) แป้ง และเซลลูโลส รวมทั้งผลของการแปรปริมาณกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร และผลของสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมักที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารหมักที่แตกต่างกันส่งผลให้ความสามารถในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์มีความแตกต่างกันไป ดังนี้

คลอสทริเดียมสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากประเทศไทย (Decom-PA) ผลิตภัณฑ์หลักของ Decom-PA ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ กรดบิวทิริก จากการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่า Decom-PA เริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกับค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 30 ชั่วโมง เมื่อแปรปริมาณกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่า Decom-PA สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงขึ้นได้ แต่สามารถบริโภคกลูโคสได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และสร้างผลิตภัณฑ์ได้ลดลง จึงเป็นไปได้ว่ากลูโคสที่มีความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ของ Decom-PA สำหรับสารสกัดจากยีสต์ส่งผลให้อัตราเร็วในการเจริญเติบโตของ Decom-PA สูงขึ้นตามปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เติมในอาหารหมักในช่วงแรก โดยที่การเพิ่มสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณใดๆ ไม่ส่งผลต่อการผลิตแอสีโตน บิวทานอล และเอทานอล ของ Decom-PA

สำหรับ *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดกลูโคสและแป้ง สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุดในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตภัณฑ์หลักยังคงเป็นกรดบิวทิริก และไม่สามารถตรวจพบการเจริญเติบโตในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเซลลูโลส เมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจพบมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นเวลาที่เริ่มเกิดแก๊ส และเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก แสดงถึงกระบวนการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจุลินทรีย์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนในช่วงแรก จากนั้นจึงใช้น้ำตาลที่ย่อยได้ในการผลิตกรดและตัวทำละลาย ทำให้ตรวจวัดการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงต่อมา เมื่อแปรปริมาณกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่า *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตได้และสร้างบิวทานอลได้สูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร 1.2 เท่า สำหรับสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของ *C. butyricum* เห็นได้ชัดเจนกว่า Decom-PA โดยสูงขึ้นตามปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เติมในอาหารหมัก และการบริโภค

กลูโคสเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อมีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตแอสีโทนและบิวทานอลเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อไม่เติมสารสกัดจากยีสต์

สำหรับ *C. acetobutylicum* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดกลูโคสและแป้ง สามารถผลิตแอสีโทนได้สูงสุดในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตภัณฑ์หลักยังคงเป็นกรดบิวทริก และไม่สามารถตรวจพบการเจริญเติบโตของ *C. butyricum* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเซลลูโลส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ ในปี 1994 และ Perret และคณะ ในปี 2004 เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *C. acetobutylicum* นำแป้งไปใช้โดยการย่อยเป็นน้ำตาลก่อนและนำน้ำตาลนั้นไปใช้ โดยการย่อยแป้งเพื่อใช้น้ำตาลของ *C. acetobutylicum* แตกต่างจาก *C. butyricum* คือ *C. acetobutylicum* จะสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยแป้งจนได้ปริมาณน้ำตาลเพียงพอในปริมาณหนึ่งและบริโภคน้ำตาลนั้นจนกระทั่งเหลือน้อยลงแล้วจึงปล่อยเอนไซม์ทำการย่อยแป้งอีกครั้ง การแปรปริมาณกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร สำหรับ *C. acetobutylicum* พบว่าไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอลและแอสีโทน แต่ส่งผลให้ผลิตบิวทานอลลดลง 31.37 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารหมัก สำหรับสารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของ *C. acetobutylicum* และกรดบิวทริกสูงขึ้นอย่างชัดเจน ตามปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เติมในอาหารหมัก และการบริโภคกลูโคสเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อมีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร

การใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร

จากการวิจัยความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหาร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตหมัก สำหรับคลอสทริเดียมในกลุ่มผลิตตัวทำละลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ใช้ในมี 2 ค่า คือ 4.5 และ 6.5 โดยใช้กรดแอสีติกและแอมโมเนียในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เนื่องจากที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5 เป็นจุดที่คลอสทริเดียมเริ่มผลิตตัวทำละลาย และที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นค่าที่ในสูตรอาหารและงานวิจัยต่างๆ ใช้เป็นค่าเริ่มต้นในการหมัก พบว่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากปริมาณของผลิตภัณฑ์ การบริโภคกลูโคส และการเจริญเติบโตเบื้องต้นจากการเกิดแก๊สในอาหารระหว่างการผลิตหมัก คือ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 6.5 เนื่องจากคลอสทริเดียมมีการเจริญเติบโต การสร้างผลิตภัณฑ์ทั้งแอสีโทน บิวทานอล และเอทานอล รวมทั้งการบริโภคน้ำตาลมากกว่าน้ำเสียที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 4.5

สำหรับผลของสารสกัดจากยีสต์โดยการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในน้ำเสียที่ความเข้มข้นต่างกันเริ่มต้น 6.5 พบว่าสารสกัดจากยีสต์ไม่มีผลต่อคลอสทริเดียมในการผลิตแอสซีโทน บิวทานอลและเอทานอลที่สูงขึ้น แต่สำหรับคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA และ *C. acetobutylicum* เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ปริมาณใดๆ ส่งผลให้การบริโภคกลูโคสสูงขึ้น และเกิดฟองแก๊สซึ่งแสดงถึงการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมในเบื้องต้นในน้ำเสียมากกว่าการหมักด้วยน้ำเสียที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์ โดยน้ำเสียที่ไม่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นอาหารหมักที่คลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ทั้งแอสซีโทน บิวทานอล และเอทานอล โดยเฉพาะ *C. butyricum* สามารถผลิตบิวทานอลได้ 1.608 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับบิวทานอลที่ผลิตได้จากอาหารหมักที่มีกลูโคส 20, 60 กรัมต่อลิตร และอาหารที่มีแป้ง 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 1.753, 2.102 และ 1.075 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เนื่องจากแป้งซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในน้ำเสียอาจอยู่ในรูปที่จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้ *Geotrichum fragrans* ผลิตสารระเหยจากน้ำเสียโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังเช่นกันแต่ได้ปริมาณของผลิตภัณฑ์รวม 0.167 กรัมต่อลิตร และเป็นบิวทานอลเพียง 0.007 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ต้องเพิ่มกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (Damasceno และคณะ, 2003) ดังนั้น จุลินทรีย์สกุลคลอสทริเดียมสามารถใช้ในการเปลี่ยนน้ำเสียให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าในปริมาณที่มากกว่าด้วยต้นทุนที่ต่ำกว่าเนื่องจากไม่ต้องใส่แหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม

เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการทดลองการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสังเคราะห์เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจากยีสต์ไม่ส่งผลต่อการผลิตตัวทำละลายโดยตรง แต่ส่งผลให้การเจริญเติบโตของคลอสทริเดียมเพิ่มขึ้น ดังนั้น การเติมสารสกัดจากยีสต์จึงไม่มีความจำเป็นในการผลิตแอสซีโทน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Monot และคณะ ในปี 1982 และ Madihah และคณะ ในปี 2001 ซึ่งพบว่าสารสกัดจากยีสต์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม โดยที่ปริมาณของไนโตรเจนที่จำกัดในอาหารหมักส่งผลให้คลอสทริเดียมสามารถผลิตตัวทำละลายได้มากขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของน้ำเสียที่เกิดขึ้นประมาณ 10-30 ลูกบาศก์เมตร จากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน (Siroth และคณะ, 2000) พบว่าจุลินทรีย์ *C. butyricum* สามารถผลิตบิวทานอลได้ 20-60 ลิตร โดยการอนุมาณจากการทดลอง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำ *C. butyricum* มาใช้เปลี่ยนน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังให้เป็นบิวทานอลซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีค่าทั้งทางด้านอุตสาหกรรมและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางพลังงาน

การใช้น้ำเสียที่เก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกันในการผลิตตัวทำละลาย

จากการวิจัยความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม และการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ เพื่อการผลิตแอสซีโทน บิวทานอล และเอทานอลจากน้ำเสียด้วยคลอสทริเดียม ภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำเสียเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตแอสซีโทน บิวทานอล และเอทานอล คือ ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ทั้งนี้ได้ทำการทดลองการใช้น้ำเสียซึ่งเก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกัน คือ เดือนกรกฎาคม มีนาคมและพฤษภาคม เพื่อศึกษาความคงที่ของน้ำเสียเพื่อเป็นสารอาหารตั้งต้นสำหรับการผลิตแอสซีโทน บิวทานอล และเอทานอลด้วยคลอสทริเดียม

ปริมาณของแบ่งที่พบในน้ำเสียแต่ละเดือนแตกต่างกันโดยพบมากที่สุดในเดือน พฤษภาคม ซึ่งใกล้เคียงกับเดือนกรกฎาคม และพบน้อยที่สุดในเดือนมีนาคม จากผลของการหมักคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ ในน้ำเสีย 3 เดือน พบว่าน้ำเสียจากเดือนที่แตกต่างกันส่งผลให้คลอสทริเดียมสร้างผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยน้ำเสียจากเดือนมีนาคมคลอสทริเดียมสามารถผลิตตัวทำละลายได้น้อยที่สุดเนื่องจากมีปริมาณแบ่งอยู่ในน้ำเสียน้อยที่สุด แต่ลำดับของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างคงที่ในแต่ละสายพันธุ์ในทุกเดือน โดยที่ผลิตภัณฑ์หลักของทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ กรดบิวทริก เนื่องจากคุณภาพของหัวมันสำปะหลังในแต่ละเดือนไม่เท่ากัน ส่งผลให้น้ำเสียในแต่ละเดือนแตกต่างกัน จากข้อมูลของงานวิจัยนี้สามารถระบุได้เพียงปริมาณสารตั้งต้นในน้ำเสีย ได้แก่ แบ่งและน้ำตาลที่ไม่เท่ากันในแต่ละเดือนเป็นสาเหตุของความไม่คงที่ของการผลิต และมีน้อยที่สุดในเดือนมีนาคม โดยปกติยังมีปัจจัยอื่นอีกที่อาจเป็นสาเหตุ ได้แก่ การปรับปรุงกระบวนการผลิตซึ่งกระทำการทดสอบเป็นครั้งคราวของโรงงานอีกด้วย

สำหรับค่าซีไอดีหลังจากการหมักน้ำเสียด้วยคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ เนื่องจากจุลินทรีย์ได้เปลี่ยนแบ่งและน้ำตาลไปเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งยังคงปะปนอยู่ในน้ำหมัก ตัวทำละลายเหล่านี้ส่งผลต่อค่าซีไอดี จึงพบว่าค่าซีไอดียังทั้งก่อนและหลังการหมักมีค่าใกล้เคียงกัน

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยทั้งหมดผลิตภัณฑ์หลักของคลอสทริเดียม คือ กรดบิวทิริก บิวทานอล และเอทานอล พบว่าน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังมีศักยภาพในการนำมาผลิตพลังงานทางเลือกโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ได้ และอาจตรวจหาค่า total organic carbon (TOC) ในน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมัน หรือแป้งหมี่เพิ่มเติมเพื่อการประเมินความเหมาะสมของการนำไปใช้ โดยเฉพาะคลอสทริเดียม ซึ่งสามารถใช้สารอินทรีย์ที่ยากแก่การย่อยสลายด้วยกระบวนการทางชีวะในน้ำเสียจากการล้างมัน และหากพิจารณาจากวิถีเมแทบอลิซึมของการผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* เป็นต้นแบบ พบว่ากรดบิวทิริกสามารถเปลี่ยนเป็นบิวทานอล ดังนั้น การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเปลี่ยนกรดบิวทิริกเป็นบิวทานอลด้วยแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมจึงเป็นที่น่าสนใจ โดยที่ปัจจุบันได้มีการทำพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มคุณสมบัติบางประการ เช่น สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน (Perret และคณะ, 2004) แก้ไขปัญหา เช่น ลดการตอบสนองต่อความเป็นพิษของบิวทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ต้องการจากคลอสทริเดียม (Liyanage และคณะ, 2000 และ Qureshi และ Blaschek, 2001) และส่งเสริมวิถีเมแทบอลิซึมในจุดที่ต้องการของคลอสทริเดียม เช่น ควบคุมให้ผลิตบิวทานอลในปริมาณสูง (Harris และคณะ, 2001) ควบคุมไปกับการคัดแยกคลอสทริเดียมสายพันธุ์ใหม่จากธรรมชาติ (Virunanon และคณะ, 2008) เนื่องจากสายพันธุ์จากธรรมชาติเหล่านี้มีข้อดีบางประการซึ่งไม่สามารถสร้างด้วยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม ดังนั้น หากประสบความสำเร็จในการพัฒนาหรือค้นพบคลอสทริเดียมสายพันธุ์ใหม่ และกระบวนการหมักคลอสทริเดียมเพื่อผลิตแอสีโทน-บิวทานอล-เอทานอล โดยใช้ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลังและอุตสาหกรรมการเกษตรอื่นๆ ได้รับการศึกษาพัฒนาในระดับอุตสาหกรรม กระบวนการนี้จะเป็นทางออกหนึ่งในการพึ่งพาตนเองทางด้านพลังงานของประเทศไทย

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการนำน้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งและไม่แข่งขันกับการผลิตอาหารมาเพิ่มมูลค่า โดยผ่านกระบวนการและหมักด้วยจุลินทรีย์ในสกุลคลอสทริเดียมซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นแอซีโทน บิวทานอล และเอทานอล เพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิต

คลอสทริเดียมที่ใช้ผลิตตัวทำละลายในงานวิจัยทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ คลอสทริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย *Clostridium* sp. สายพันธุ์ Decom-PA รวมทั้ง *C. butyricum* TISTR1032 และ *C. acetobutylicum* ATCC 824 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน (กลูโคส แป้ง และเซลลูโลส) โดยที่แหล่งคาร์บอนประเภทกลูโคสสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของคลอสทริเดียมทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่แป้งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* เท่านั้น สำหรับเซลลูโลสไม่สามารถตรวจพบการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อแปรความเข้มข้นกลูโคสจาก 20 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงขึ้นส่งผลต่อคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์แตกต่างกันไปโดยคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์ยังคงเจริญเติบโตและสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ แต่สำหรับ Decom-PA ความสามารถในการผลิตตัวทำละลายลดลง สำหรับ *C. butyricum* สามารถสร้างบิวทานอลได้เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า และ *C. acetobutylicum* ผลิตบิวทานอลลดลง 31.37 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นกลูโคสสูงขึ้น 3 เท่า แต่ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถบริโภคกลูโคสได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยที่สารสกัดจากยีสต์ในอาหารหมักที่มีกลูโคสเป็นแหล่งมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม แต่ไม่มีผลส่งเสริมการสร้างผลิตภัณฑ์ คลอสทริเดียมสายพันธุ์ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด คือ *C. butyricum* สามารถผลิตบิวทานอลในอาหารหมักที่มีกลูโคส 20, 60 กรัมต่อลิตร และอาหารที่มีแป้ง 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 1.753, 2.102 และ 1.075 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหารของคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสม โดยเฉพาะ *C. butyricum* สามารถผลิตบิวทานอลได้ถึง 1.608 กรัมต่อลิตร โดยไม่ต้องเติมสารอาหารใดๆเพิ่มเติม น้ำเสียซึ่งเก็บตัวอย่างจากเดือนที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่คลอสทริเดียมผลิตได้ในทุกสายพันธุ์ โดยที่น้ำเสียในทุกเดือนมีปริมาณแป้งหลงเหลืออยู่มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และมากที่สุดในเดือนพฤษภาคมซึ่งใกล้เคียงกับ

เดือนกรกฎาคม คือ 14.98 และ 14.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้คลอสทริเดียมสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุดใต้น้ำเสียจากเดือนพฤษภาคม และน้อยที่สุดในน้ำเสียจากเดือนมีนาคม สำหรับค่าซีไอดีหลังจากการหมักน้ำเสียด้วยคลอสทริเดียมทั้ง 3 สายพันธุ์เนื่องจากจุลินทรีย์ได้เปลี่ยนแป้งและน้ำตาลไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังคงปะปนอยู่ในน้ำหมัก จึงพบว่าค่าซีไอดียังทั้งก่อนและหลังการหมักมีค่าใกล้เคียงกัน

จากผลการวิจัยทั้งหมด น้ำเสียที่เกิดจากระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังซึ่งไม่มีมูลค่าและต้องผ่านการบำบัดก่อนถูกปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ยังคงประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ได้แก่ แป้งและน้ำตาล ซึ่งสามารถถูกใช้สำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์โดยจุลินทรีย์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. butyricum* สามารถใช้น้ำเสียเป็นแหล่งอาหารและเปลี่ยนเป็นบิวทานอลที่มีมูลค่าได้ ซึ่งนอกจากเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำเสียแล้วยังเป็นการลดต้นทุนซึ่งเป็นปัญหาหลักในการผลิตบิวทานอลด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. สถิติการเกษตรประเทศไทย-พืชอาหาร: มันสำปะหลังโรงงาน ปี 2550. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.oae.go.th/oae_report/stat_agri/report_result_content.php?](http://www.oae.go.th/oae_report/stat_agri/report_result_content.php) [19 พฤษภาคม 2551]
- คณะกรรมการอาหารและยา, สำนักงาน. กองควบคุมวัตถุเสพติด. 2548. อะเซโตน (Acetone). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.fda.moph.go.th/fdanet/html/product/addict/precursor/acetone.html> [13 มีนาคม 2553]
- เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2519. มันสำปะหลัง. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัชวาล คำวงศ์, ณัฐวิทย์ พงศ์พันธุ์, นฤมลกิจ ฑูณภาศ, วิลาวัลย์ บันอิน และ วิไลวรรณ ลีนะกุล. 2550. แอลกอฮอล์. โครงการ จัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf [13 พฤษภาคม 2551]
- เดชา พิมพ์สุทธิ. 2550. การประยุกต์ใช้ระบบสารสนเทศเพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพเชิงเศรษฐกิจนิเวศน์: อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaitapioca starch.org/article05_th.asp [20 มิถุนายน 2551]
- ธาดา ฉัตรธานี. 2531. การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง โดยกระบวนการไร้ออกซิเจนอิสระแบบสองขั้นตอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมสุขาภิบาล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พาณิชย์, กระทรวง. กรมการค้าต่างประเทศ, กองการค้าสินค้าส่งออก. 2546. ประโยชน์ของมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.dft.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/\\$8/level4/tapioca2.html&level4=1020](http://www.dft.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/$8/level4/tapioca2.html&level4=1020) [22 กรกฎาคม 2551]
- วิชาการเกษตร, กรม. 2526. มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ เล่มที่ 7. กรุงเทพมหานคร: งานทะเบียนและประมวลสถิติ กองแผนงานและวิชาการ.
- สมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทย. 2530. อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังของไทย. กรุงเทพมหานคร: หอสมุดการพิมพ์.

- สมาคมแป้งมันสำปะหลังไทย. 2553. สมาชิกสามัญ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaitapiocastarch.org/member_dir.asp [13 มีนาคม 2553]
- สุรพล สายพานิช. 2529. การบำบัดน้ำเสียและการผลิตก๊าซชีวภาพจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการตะกอนเร่งคอนแทกสเตปีไลเซชันแบบแอนแอโรบิค. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรุณี วงศ์ราชน. 2549. วงจรมันสำปะหลังและการดำเนินธุรกิจมันสำปะหลังผ่านระบบสหกรณ์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.evaluate.cad.go.th/download/วงจรมันสำปะหลัง.doc> [13 พฤษภาคม 2551]

ภาษาอังกฤษ

- Alsaker, K. V. and Papoutsakis, E. T. 2005. Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. Journal of Bacteriology. 187(20): 7103-7118.
- Amornthewaphat, N., Lerdsuwant, S. and Attamangkunet, S. 2005. Effect of extrusion of corn and feed form on feed quality and growth performance of poultry in a tropical environment. Poultry Science. 84(10): 1640-1647.
- Arnold, F. H. 2008. The race for new biofuels. Engineering and Science. 71(2): 12-19.
- Assobhei, O., Kanouni, A. E., Ismaili, M., Louffi, 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. Journal of Fermentation and Bioengineering. 85(2): 209-212.
- Avancini, S. R. P., Faccin, G. L., Vieira, M. A., Rovaris, A. A., Podest, R., Tramonte, R., de Souza, N. M. A., and Amante, E. R. 2007. Cassava starch fermentation wastewater: Characterization and preliminary toxicological studies. Food and Chemical Toxicology. 45(11): 2273-2278.
- Barnard, J. 1983. Gasohol/ethanol: a review of national and regional policy and feasibility issues. Regional Science Perspectives. 13: 3-14.
- Beesch, S. C. 1952. Acetone-butanol fermentation of sugars. Industrial and Engineering Chemistry Research. 44(7): 1677-1682.

- Beesch, S. C. 1953. Acetone-butanol fermentation of starches. Applied and Environmental Microbiology. 1(2): 85-95.
- Bowles, L. K. and Ellefson, W. L. 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology. 50(5): 1165–1170.
- Brekke, K. 2007. Butanol – an energy alternative? Ethanol Today. March 2007: 36-39.
- Chavalparit, O. and Ongwandee, M. 2009. Clean technology for the tapioca starch industry in Thailand. Journal of Cleaner Production. 17(2): 105-110.
- Cornillot, E., Nair, R. V., Papoutsakis, E. T. and Soucaille, P. 1997. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. Journal of Bacteriology. 179(17): 5442–5447.
- Damasceno, S., Cereda, M. P., Pastore, G. M. and Oliveira, J. G. 2003. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. Process Biochemistry. 39(4): 411-414.
- Datta, R. and Zeikus, J. G. 1985. Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids. Applied and Environmental Microbiology. 49(3): 522-529.
- Davis, S. E. and Morton, S. A. 2008. Investigation of ionic liquids for the separation of butanol and water. Separation Science and Technology. 43(9&10): 2460-2472.
- Demain, A. L. and Davies, J. E. 1999. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington, D.C.: ASM Press.
- Demain, A. L., Newcomb, M. and Wu, J. H. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69(1): 124-54.
- Demirel, B., Scherer, P., Yenigun, O. and Onay, T. T. 2010. Production of methane and hydrogen from biomass through conventional and high-rate anaerobic digestion processes. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 40(2): 116 – 146.
- Dürre, P. 2005. Handbook on Clostridia. Volume 1. New York: CRC Press.
- Dürre, P. 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. Biotechnology Journal. 2(12): 1525–1534.

- Dürre, P. 2008. Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel. Annals of the New York Academy of Sciences. 1125(1): 353-362.
- Enguídanos, M., Soria, A., Kavalov, B. and Jensen, P. 2002. Techno-economic analysis of bio-alcohol production in the EU: a short summary for decision-makers. [Online]. Available from: http://www.senternovem.nl/mmfiles/26432_tcm24-279847.pdf [2010, March 9]
- Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P. 2007. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Energy Biotechnology. 18(3): 220-227.
- Fauquet, C. and Fargette, D. 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology, and Control. Plant Disease. 74(6): 404-11.
- Finegold, S. M. 1993. A century of anaerobes: a look backward and a call to arms. Clinical Infectious Diseases. 16(supplement 4): S453-S457.
- Food and Agriculture Organization. 2009. Food outlook-global market analysis: cassava. [Online]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/012/ak341e/ak341e06.htm> [2010, February 25]
- Formanek, J., Mackie, R. and Blaschek, H. P. 1997. Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. Applied and Environmental Microbiology. 63(6): 2306-2310.
- Freier, D., Mothershed, C. P. and Wiegel, J. 1988. Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. Applied and Environmental Microbiology. 54(1): 204-211.
- Gallagher, P. W., Otto, D. M. and Dikeman, M. 2000. Effects of an oxygen requirement for fuel in midwest ethanol markets and local economies. Review of Agricultural Economics. 22(2): 292-311.
- Geng, A., He Y., Qian, C., Yan, X. and Zhou, Z. 2010. Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*. Bioresource Technology. 101(11): 4029-4033.
- Gonzalez-Olmos, R. and Iglesias, M. 2008. Study of fuel oxygenates solubility in aqueous media as a function of temperature and *tert*-butyl alcohol concentration. Chemosphere. 71(11): 2098-2105.

- Grupe, H. and Gottschalk, G. 1992. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift Induction. Applied and Environmental Microbiology. 58(12): 3896–3902.
- Guedon, E., Desvaux, M. and Petitdemange, H. 2002. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. Applied and Environmental Microbiology. 68(1): 53–58.
- Harris, L. M., Welker, N. E. and Papoutsakis, E. T. 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Journal of Bacteriology. 184(13): 3586–3597.
- Harris, L. M., Blank, L., Desai, R. P., Welker, N. E. and Papoutsakis, E. T. 2001. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated *solR* gene. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 27(5): 322-328.
- Hipolito, C. N., et al. 2008. Bioconversion of industrial wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). Journal of Cleaner Production. 16(5): 632-638.
- 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. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 29(3): 117–123.
- Jones, D. T. and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiology Review. 50(4): 484-524.
- Kalaichelvi. P., Perumalsamy, M., Arunagiri, A. and Sofiya, K. 2007. Synergistic extraction of acetic acid from its aqueous solution. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 42(3): 291-294.
- Keim, C. R. 1983. Technology and economics of fermentation alcohol-an update. Enzyme and Microbial Technology. 5(2): 103-114.

- Kim, A.Y., Attwood, G.T., Holt, S. C., White, B. A. and Blaschek, H. P. 1994. Heterologous expression of endo-b-1,4-glucanase from *Clostridium cellulovorans* in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 following transformation of the *engB* gene. Applied and Environmental Microbiology. 60(1): 337–340.
- Kobayashi, G., Eto, K., Tashiro, Y., Okubo, K., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2005. Utilization of excess sludge by acetone–butanol–ethanol fermentation employing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). Journal of Bioscience and Bioengineering. 99(5): 517-519.
- Krailas, S. 1994. Solvent productivity improvement in acetone-butanol-fermentation by two-stage continuous system. Master's Degree Thesis, Department of Chemical Engineering, Graduate School, Chulalongkorn University.
- Lai, M. C. and Traxler, R. W. 1994. A coupled two-stage continuous fermentation for solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Enzyme and Microbial Technology. 16(12): 1021-1025.
- Lapara, T. M., Alleman, J. E. and Pope, P. G. 2000. Miniaturized closed reflux, colorimetric method for the determination of chemical oxygen demand. Waste Management. 20(4): 295-298.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. and Jung, K. S. 2008. Fermentative butanol production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering. 101(2):209-28.
- Lin, Y. L. and Blaschek, H. P. 1983. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. Applied and Environmental Microbiology. 45(3): 966-973.
- Liu, S. C., Ahn, G. O., Kioi, M., Dorie, M. J., Patterson, A. V. and Brown, J. M. 2008. Optimized clostridium-directed enzyme prodrug therapy improves the antitumor activity of the novel DNA cross-linking agent PR-104. Cancer Research. 68(19): 7995-8003.
- Liyanage, H., Young, M. and Kashket, E. R. 2000. Butanol tolerance of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 associated with down-regulation of *gldA* by antisense RNA. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2(1): 87–93.

- Ljunggren, E. and Karlberg, B. 1995. Determination of total carbon dioxide in beer and soft drinks by gas diffusion and flow injection analysis. Journal of Automatic Chemistry. 17(3): 105–108.
- Lo, Y. C., Huang, C. Y., Fu, T. N., Chen, C. Y. and Chan, J. S. 2009. Fermentative hydrogen production from hydrolyzed cellulosic feedstock prepared with a thermophilic anaerobic bacterial isolate. International Journal of Hydrogen Energy. 34(15): 6189–6200.
- Long, S., Jones, D. T. and Woods, D. R. 1983. Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a defined medium. Applied and Environmental Microbiology. 45(4): 1389-1393.
- Long, S., Jones, D. T. and Woods, D. R. 1984. The relationship between sporulation and solvent production in *Clostridium acetobutylicum* P262. Biotechnology Letters. 6(8): 529-534.
- Lu, Y., Zhang, Y. H. P. and Lynd, L. R. 2006. Enzyme–microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. The National Academy of Sciences of the USA. 103(44): 16165-16169.
- Madiah, M. S., Ariff, A. B., Khalil, M. S., Suraini, A. A. and Karim, M. I. 2001. Anaerobic fermentation of gelatinized sago starch-derived sugars to acetone-1-butanol-ethanol solvent by *Clostridium acetobutylicum*. Folia Microbiologica (Praha). 46(3):197-204.
- Madiah, M. S., Ariff, A. B., Sahaid, K. M., Suraini, A. A. and Karim, M. I. A. 2001. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17(6): 567-576.
- Mai, H. N. P., Thai, L. N., Viet, N. T. and Lettinga, G. 2001. Effect of organic loading rate on treatment efficiency for tapioca processing wastewater using UASB. Proceedings of International Conference on Industry and Environment in Viet Nam. 20-21 April 2001. Ho Chi Minh City. Viet Nam. p. 224-233.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determining of reducing sugars. Analytical Chemistry. 31(3): 426-428.

- Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H. and Gay, R. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. Applied and Environmental Microbiology. 44(6):1318–1324.
- Murashima, K., Kosugi, A. and Doi, R. H. 2003. Synergistic Effects of Cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. Journal of Bacteriology. 185(5): 1518–1524.
- Murphy, S. 2008. General Information on Solids. [Online]. Available from: <http://bcn.boulder.co.us/basin/data/BACT/info/TSS.html> [2008, July 14]
- Ni, Y. and Sun, Z. 2009. Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. Applied Microbiology Biotechnology. 83(3): 415-423.
- Nimcevic, D. and Gapes, J. R. 2000. The acetone-butanol fermentation in pilot plant and pre-industrial scale. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2(1): 15-20.
- Nolling, J., *et al.* 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. Journal of Bacteriology. 183(16): 4823–4838.
- Ounine, K., Petitdemange H., Raval, G. and Gay, R. 1983. Acetone-butanol production from pentoses by *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology Letters. 5(9): 605-610.
- Patnaik, P. 2007. A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances. Third edition. United States of America: John Wiley and Sons, Inc.
- Perret, S., Casalot, L., Fierobe, H. P., Tardif, C., Sabathe, F., Belaich, J. P. and Belaich, A. 2004. Production of heterologous and chimeric scaffoldins by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Journal of Bacteriology. 186(1): 253-7.
- Prescott, S. C. and Dunn, C. G. 1959. Industrial Microbiology. Third Edition. New York: McGraw-Hill.
- Qureshi, N. and Blaschek, H. P. 2001. Evaluation of recent advances in butanol fermentation, upstream, and downstream processing. Bioprocess Biosystems Engineering. 24(4): 219-226.

- Qureshi, N. and Blaschek, H. P. 2001. Recent advances in ABE fermentation: hyperbutanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 27(5): 287–291.
- Qureshi, N., Li, X. L., Hughes, S., Saha, B. C. and Cotta, M. A. 2006. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology Progress. 22(3): 673-680.
- Qureshi, N., Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A. and Blaschek, H. P. 2007. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed cornfiber. Bioresource Technology. 99(13): 5915–5922.
- 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(2): 168-175.
- Ramey, D. E. 2007. Butanol: the other alternative fuel. Proceedings of Conference Headquarters SDSU Student Union. 22-24 May 2007. South Dakota State University. Brookings. United States. p. 137-147.
- Razif, M., Budiarti, V. E. and Mangkoedihardjo, S. 2006. Appropriate fermentation process for tapioca's wastewater in Indonesia. Journal of Applied Sciences. 6(13): 2846-2848.
- Ross, D. 1961. The acetone-butanol fermentation. Program in Industrial Microbiology. 3:73-85.
- Sawyer, C. N., and McCarty, P. L. 1967. Series in Sanitary Science and Water Resources Engineering. Second edition. New York: McGraw-Hill.
- Schlegel, H. G., Zaborosch, C. and Kogut, M. 1993. General microbiology. Seventh edition. New York: Cambridge University Press.
- Shinto, H., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M. and Sonomoto, K. 2008. Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation. Process Biochemistry. 43(12): 1452-1461.

- Sriroth, K., Piyachomkwan, K., Wanlapatit, S. and Oates, C. G. 2000. Cassava starch technology: the Thai experience. Starch/Starke. 52(12): 439-449.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. 2005. High production of acetone–butanol–ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. Journal of Biotechnology. 120(2): 197-206.
- Thomas, E. W. 2009. Fluoroelastomer compatibility with bioalcohol fuels. [Online]. Available from: <http://saefuel.saejournals.org/content/2/1/462>. [2010, March 9]
- Vaisala Instruments. 2008. Total dissolved solid. [Online]. Available from: http://www.engineeringtoolbox.com/total-dissolved-solids-d_1062.html [2008, July 14]
- Virunanon, C., Chantaropamai, S., Denduangbaripant, J. and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. Anaerobe. 14(2): 109-117.
- Voget, C. E., Mignone, C. F. and Ertola, R. J. 1985. Influence of temperature on solvents production from whey. Biotechnology Letters. 7(8): 607-610.
- Wistreich, G. A. 2003. Microbiology laboratory: fundamentals and applications. Second edition. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall.
- Yu, E. K. C., Chan, M. K. H. and Saddler, J. N. 1985. Butanol production from cellulosic substrates by sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *C. acetobutylicum*. Biotechnology Letters. 7(7): 509-514.
- Zigová, J. and Šturdík, E. 2000. Advances in biotechnological production of butyric acid. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 24(3): 153-160.
- Zverlov, V. V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. A. and Schwarz, W. H. 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. Applied Microbiology and Biotechnology. 71(5): 587–597.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Synthetic media สูตร 1 ลิตร (Virunanon และคณะ, 2008)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.220	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.550	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.550	กรัม
เพอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.011	กรัม

เติมน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมด

รีซาชูริน (1 กรัมต่อลิตร)	1.0	มิลลิลิตร
กรดแอสติคเข้มข้น	2.3	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ 6.5 (± 0.2) ด้วยแอมโมเนีย

วิตามินพาบา (1.6 กรัมต่อลิตร)	5.0	มิลลิลิตร
ไบโอติน (0.02 กรัมต่อลิตร)	4.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปต้มจนเดือด ตวงอาหารเหลวที่ได้ลงในขวดแก้วเลี้ยงเชื้อขวดละ 26 มิลลิลิตร โดยแต่ละขวดใส่

แหล่งอาหารคาร์บอนด์	0.60	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.05	กรัม

ทำให้อยู่ในภาวะปราศจากออกซิเจนโดยผ่านแก๊สไนโตรเจน 15 นาที ปิดฝาแต่ละขวดด้วยจุกยางแล้วครอบฝาโลหะ ล็อคฝาด้วยคริมเปอร์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (สีของ media ที่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารคาร์บอนด์) ก่อนลงเชื้อ 1 วัน เติม cysteine (15 กรัมต่อลิตร) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร ต่อขวดอาหารที่ใช้ปริมาตรการหมัก 30 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมีและกราฟมาตรฐาน

1. สารละลายสำหรับการวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD, mg/l) ในน้ำเสีย ด้วย
กระบวนการ Close reflux: Colorimetric method (Lapara, Alleman, and Pope, 2000)

1.1 สารละลายสำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ (ก)

โพแทสเซียมไดโครเมต	10.2	กรัม
(อบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง)		
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	167	มิลลิลิตร
เมอร์คิวรีซัลเฟต	33.3	กรัม

ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ปล่อยให้เย็นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลายกรดซัลฟูริก-ซิลเวอร์ซัลเฟต (ข)

ซิลเวอร์ซัลเฟต	22.0	กรัม
กรดซัลฟูริกเข้มข้น	2.5	ลิตร

ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ให้ซิลเวอร์ซัลเฟตละลาย

1.3 สารละลายมาตรฐานซีไอดี (ค)

โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต	0.85	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

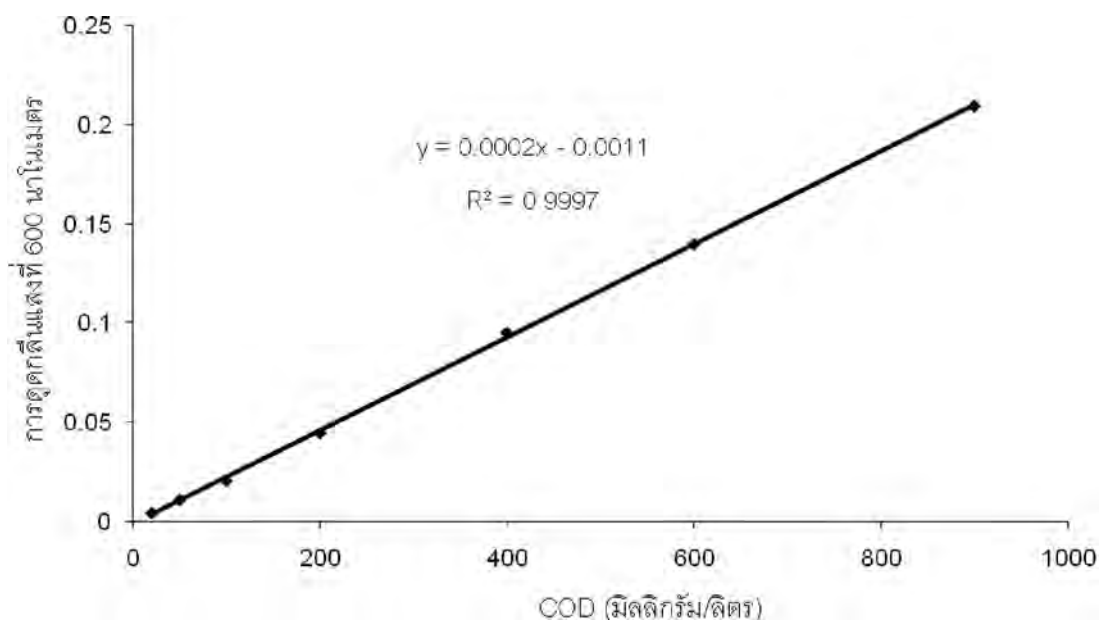
ตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมกราฟมาตรฐานซีไอดี

ปิเปตสารละลาย ค. ปริมาตรต่างๆดังตาราง และปรับปริมาตรในแต่ละความเข้มข้น เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ซีไอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรสารละลาย ค. (มิลลิลิตร)
20	1.0
50	2.5
100	5.0
200	10.0
400	20.0
600	30.0
900	45.0

ปิเปตสารละลายมาตรฐานซีไอดีแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วทรงสูงมีฝาปิด ปิเปตสารละลาย ก. ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย ข. ปริมาตร 14.0 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดแก้วและเขย่าให้ผสมเข้าด้วยกัน นำเข้าตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอให้สารละลายเย็นลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าซีไอดีของสารละลายมาตรฐาน



กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานซีไอดี

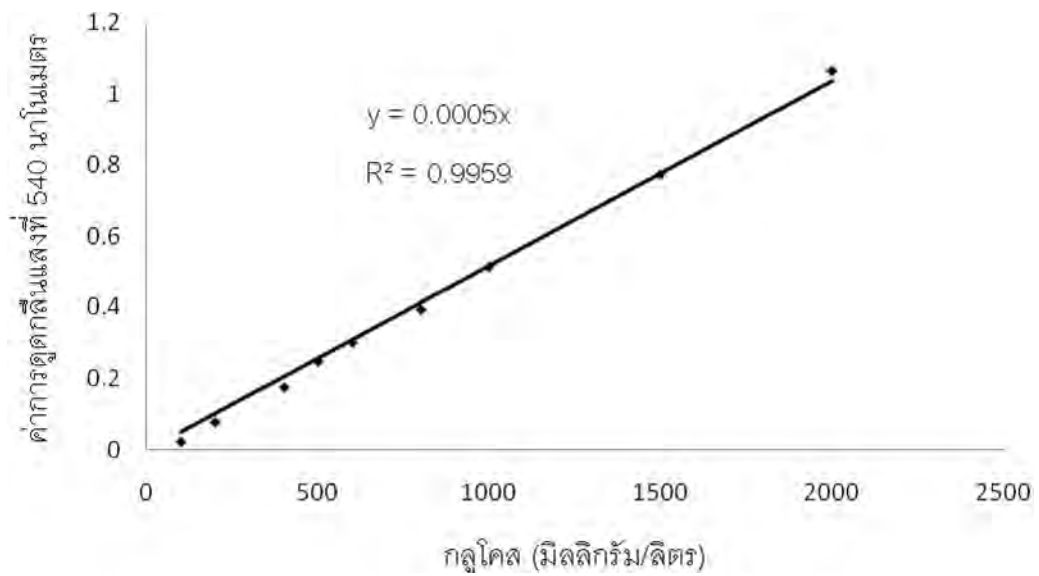
2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959)

DNS solution

3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด	10.0	กรัม
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต	300.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	16.0	กรัม

ปรับปริมาณเป็น 1 ลิตร รวจนละลาย

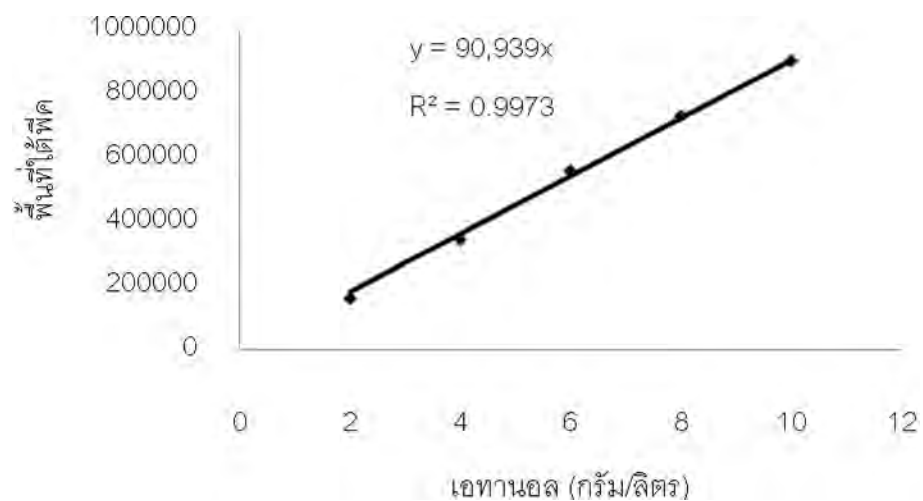
สารละลายมาตรฐานกลูโคส ใช้ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500, 2000 มิลลิกรัมต่อกรัม



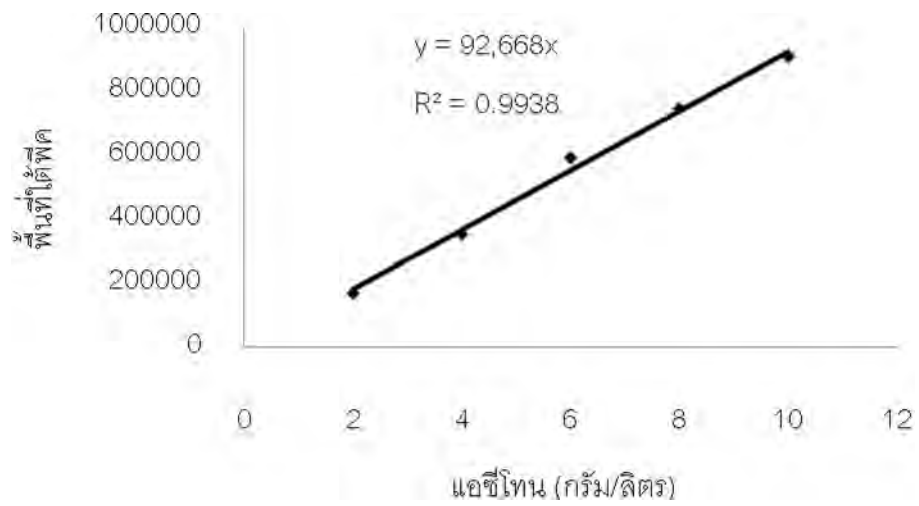
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4 สารมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

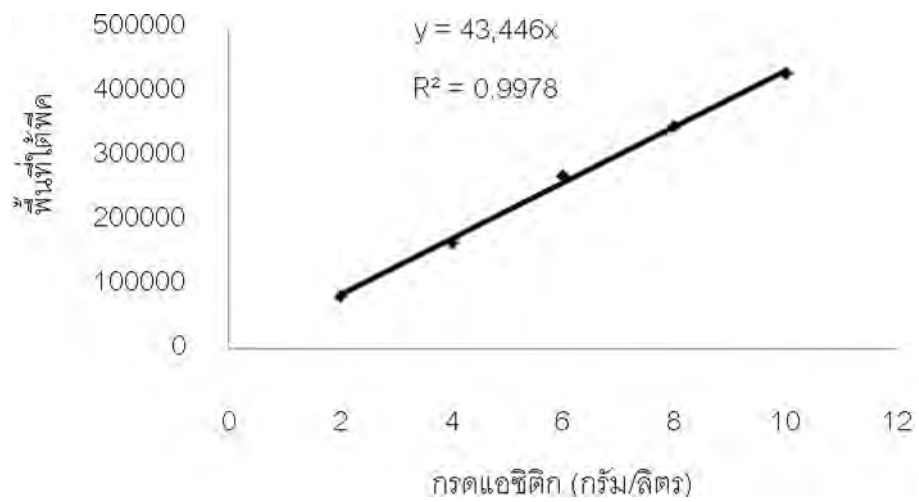
สารละลายมาตรฐานแอสีโทน บิวทานอล เอทานอล กรดแอสีติก และกรดบิวทริก ใช้ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 กรัมต่อลิตร



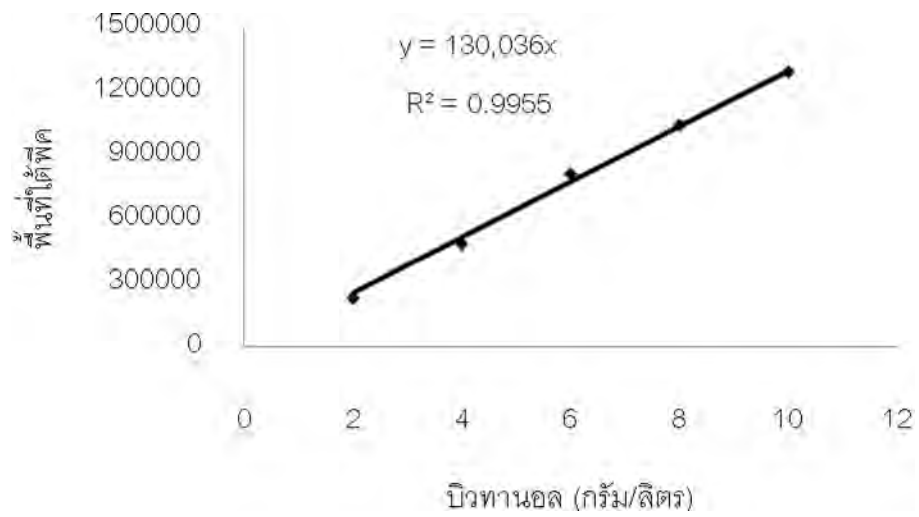
กราฟมาตรฐานของเอทานอล



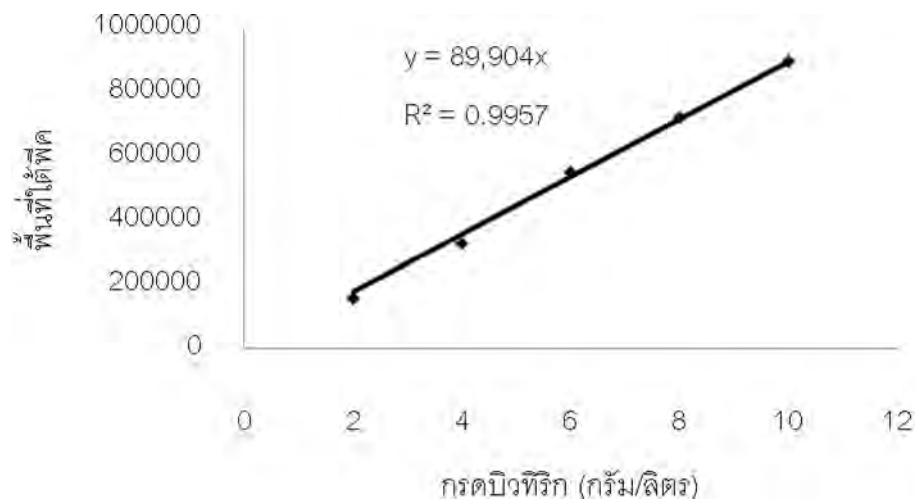
กราฟมาตรฐานของแอซีไทน์



กราฟมาตรฐานของกรดแอซีติก



กราฟมาตรฐานของบิวทานอล



กราฟมาตรฐานของกรดบิวทริก

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมักคลอสทริเดียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมักคลอสทริเดียมสายพันธุ์ Decom-PA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				
	เอทานอล	แอสีโตน	กรดแอสีติก	บิวทานอล	กรดบิวทีริก
0	0.057	0	8.605	0	0
3	0.091	0	7.408	0	0
6	0.139	0	7.385	0	0
9	0.123	0	7.325	0	0
12	0.116	0	7.765	0	0
18	0.138	0	8.999	0	0
21	0.157	0	8.813	0	1.739
24	0.253	0	7.489	0	2.399
28	0.237	0	6.930	0	3.853
48	0.208	0	6.375	0	4.167
144	0.279	0	5.999	0.020	5.628
194	0.299	0	5.435	0.022	5.512
216	0.356	0	5.453	0.022	5.385

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมัก *C. butyricum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				
	เอทานอล	แอสีโทน	กรดแอสีติก	บิวทานอล	กรดบิวทีริก
0	0.050	0	8.472	0	0.556
3	0.068	0	9.153	0	0.488
6	0.0901	0	8.504	0	0.567
9	0.112	0	7.750	0	0
12	0.096	0	8.332	0	0
18	0.142	0	7.858	0	0
21	0.138	0	9.082	0	0
24	0.163	0	7.167	0	0
28	0.191	0	9.032	0	0.692
48	0.254	0.073	8.714	0.269	3.293
144	0.477	0.080	7.977	0.284	3.965
194	0.577	0.082	7.884	0.265	3.793
216	0.729	0.080	7.374	0.270	3.817

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมัก *C. acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RCM ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 216 ชั่วโมง

ชั่วโมงที่	ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก (กรัม/ลิตร)				
	เอทานอล	แอสีโตน	กรดแอสีติก	บิวทานอล	กรดบิวทีริก
0	0.107	0	7.965	0	0
3	0.110	0	8.358	0	0.3560
6	0.135	0	8.207	0	0.313
9	0.139	0	8.125	0	0.295
12	0.128	0	8.384	0	0.341
18	0.168	0	8.150	0	0.307
21	0.154	0	8.782	0	0
24	0.203	0	9.095	0	0
28	0.245	0	9.867	0	0.826
48	0.264	0	6.792	0	3.388
144	0.322	0	6.088	0	4.059
194	0.356	0	6.390	0	4.368
216	0.435	0	6.668	0	4.704

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชนิกา อื้อพานิช เกิดวันที่ 28 ธันวาคม 2527 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับที่ 2 สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549 และ เข้าศึกษาต่อในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2552 โดยงานวิจัยนี้ถูกเผยแพร่ผลงานวิจัย บางส่วนในการประชุมวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 17 ประจำปี 2552 เรื่อง Cellulosic ethanol and butanol production from *Clostridium* sp. ระหว่างวันที่ 12-13 มีนาคม พ.ศ. 2552 การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ แก้วกฤตพลังงานชาติ ครั้งที่ 16 ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม พ.ศ. 2552 ณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี เรื่อง การผลิตบิวทานอลและเอทานอลจากน้ำเสียกระบวนการผลิตแป้งมันด้วยสายพันธุ์โคลอสทริเดียมในประเทศไทย และในการประชุมวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 18 ประจำปี 2553 เรื่อง Cellulosic ethanol and butanol from *Clostridium* sp. bacteria ระหว่างวันที่ 11-12 มีนาคม พ.ศ. 2553 รวมทั้งได้ยื่นจดสิทธิบัตร 1 เรื่อง ชื่อ การผลิตบิวทานอลและเอทานอลด้วยเชื้อโคลอสทริเดียม โดยใช้ของเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง หมายเลขอ้างอิง 0801005960