

การผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียของโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลและโรงงาน
น้ำตาลโดยใช้ *Clostridium beijerinckii*

นางสาวจันทร์สม โคมเวียน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bioalcohol production from wastewater of cellulosic ethanol pilot plant and sugar factory
using *Clostridium beijerinckii*

Miss Jantarush Comwien



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

จันทร์สม์ โคมเวียน : การผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียของโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลและโรงงานน้ำตาลโดยใช้ *Clostridium beijerinckii* (Bioalcohol production from wastewater of cellulosic ethanol pilot plant and sugar factory using *Clostridium beijerinckii*) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชมภูษ กสิ่นวงษ์ , 81 หน้า.

ไบโอแอลกอฮอล์เป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับ ความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันไบโอแอลกอฮอล์สามารถนำมาทดแทนเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมได้เพียงบางส่วนเพราะสารตั้งต้นมีราคาแพงทำให้ไม่มีความคุ้มค่าในการผลิต เป้าหมายสำคัญของการศึกษานี้ คือ การประยุกต์ใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลและโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอล การศึกษาในส่วนแรกเป็นการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. beijerinckii* CG1 พบว่ามีความสามารถในการผลิตบิวทานอลสูงสุดในน้ำตาลแมนโนสเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น และมีความสามารถเจริญได้ในน้ำตาลแมนโนส, กลูโคส, อะราบิโนส, ฟรุกโทส, ซูโครส, แล็กโทส และไซโลส ตามลำดับ การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าได้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุดที่ 12.6-2.8 กรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้น 2.5 เท่าก่อนการหาภาวะที่เหมาะสม จากนั้นในการศึกษานี้ได้นำภาวะที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้กับน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลและน้ำเสียโรงงานน้ำตาลในถังหมักขนาด 2 และ 5 ลิตร พบว่า ในน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอล เชื้อใช้เวลาในการผลิตสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงสุด ที่ 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกับถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยได้ความเข้มข้นบิวทานอล 5.3 กรัมต่อลิตร(ผลได้ของการผลิตบิวทานอล 0.76 กรัมต่อกรัม น้ำตาลรวมที่ถูกใช้ และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เอทานอล 2.4 กรัมต่อลิตร ค่าซีไอดีหลังการหมักนั้นลดลงถึง 1.9 เท่าของค่าซีไอดีก่อนการหมัก ในขณะที่ผลของการนำน้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลมาเป็นสารตั้งต้นโดยไม่มีการเติมสารอาหารอื่น ๆ สำหรับ *C. beijerinckii* CG1 ในการผลิตบิวทานอล ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเอทานอล 0.34 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 0.97 กรัมต่อลิตร (ผลได้ของการผลิตบิวทานอล 0.33 กรัมต่อกรัม น้ำตาลรวมที่ถูกใช้ และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.004 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และสามารถลดค่าซีไอดีหลังการหมักนั้นลดลงถึง 4 เท่า

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5687106220 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS: CLOSTRIDIUM SP. / WASTEWATER / BUTANOL / ETHANOL

JANTARUSH COMWIEN: Bioalcohol production from wastewater of cellulosic ethanol pilot plant and sugar factory using *Clostridium beijerinckii*. ADVISOR: ASST. PROF. CHOMPUNUCH GLINWONG, 81 pp.

Bioalcohol is an alternative energy that has been very interested in the present. It is environmentally friendly. Currently, bioalcohol can partially substitute be for petroleum-based fuels because the substrate price is expensive. The goal of this study is to adapt wastewater production from sugar cane factory and cellulose ethanol pilot plant for bioalcohol production. The first section in this study is to test the ability to use sugar of *C. beijerinckii* CG1. This strain produces highest butanol in mannose sugar. The growth can be investigated mannose, arabinose, glucose fructose, lactose, sucrose, and xylose respectively. Butanol production was determined in the optimal condition for producing butanol in 2L fermenter. The optimum condition can activation maximum butanol concentration 12.6-12.8 g/L. This is 2.5 fold higher than the previous study. The optimum conditions are applied to use in cellulosic pilot plant wastewater and sugar cane factory wastewater experiments. In cellulosic ethanol pilot plant wastewater, *C. beijerinckii* CG1 produce butanol concentration with highest at 48 hours as same as 2 L bioreactor. Butanol concentration is 5.3 g/L (butanol yield 0.76 g/g of total sugar consumed and productivity 0.11 g/L/h), ethanol concentration is 2.4 g/L. COD after fermentation is reduced about 1.9 folds compared to before fermentation. Bioalcohol yield from sugar cane factory wastewater can be used in the production butanol without supplementary nutrient for *C. beijerinckii* CG1. The total products show ethanol 0.34 g/L and butanol 0.97 g/L (butanol yield 0.33 g/g of total sugar consumed and productivity 0.004 g/L/h) and COD could reduce after fermentation about 4 times.

Field of Study: Environmental Science

Student's Signature

Academic Year: 2015

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนทุนจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุน
รัชดาภิเษกสมโภช”

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยสำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคล
หลายท่าน ซึ่งไม่อาจจะนำมากล่าวได้ทั้งหมด ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่ขอกราบพระคุณคือ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมภูนุช กลิ่นวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ
ข้อคิดเห็น ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ตรวจสอบ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจ
ใส่ทุกขั้นตอน ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ออกมาสมบูรณ์ ซึ่งขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้
 ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ อิ่มยิ้ม ที่กรุณามาเป็นประธาน
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณทัย ภิญญาคง
รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล และ ดร.ณษพัฒน์ บุญวิทยา ที่กรุณาเป็น
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์พร้อมทั้งชี้แนะข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงเล่ม
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร.ณษพัฒน์ บุญวิทยา นายปริญญา, มาตรวิริยะกุล และ สถาบันวิจัย
และเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัดมหาชน สำหรับเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย ความ
ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและข้อมูลของน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์โลสิคเอทานอล
และขอขอบคุณ โรงงานน้ำตาลสิงห์บุรี (เครือ มิตรผล) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง
น้ำเสีย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่
ความอนุเคราะห์ในเรื่องสถานที่ อุปกรณ์เครื่อง สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณสมาชิกหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ
ทุกท่าน ทั้งพี่เก้ พี่เอี่ยม พี่ต่าย แอม ปิ๊ก มิ่ง ที่ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษาและกำลังใจตลอด
การทำงานวิจัยนี้

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณครอบครัว คุณอา ที่ให้ความรักความห่วงใย และการ
สนับสนุนตลอดจนงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

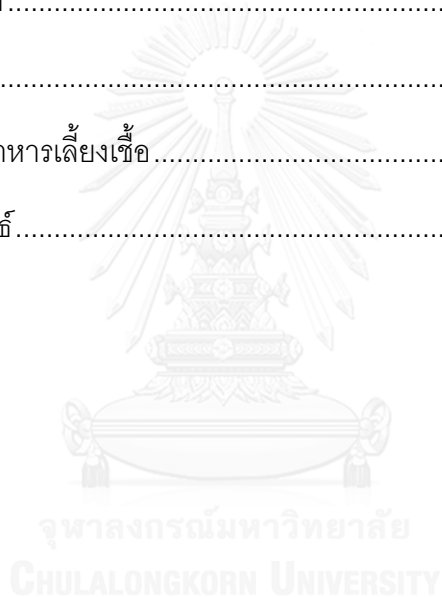
หน้า

| | |
|---|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฎ |
| สารบัญรูป..... | ฏ |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 2 |
| 1.3 ขอบเขตการวิจัย | 3 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| 1.5 วิธีดำเนินการวิจัย | 3 |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| 2.1 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง | 4 |
| 2.1.1 แนวโน้มด้านพลังงาน | 4 |
| 2.1.2 แนวโน้มการใช้ไบโอดีเซลกอสอลเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเบนซิน | 8 |
| 2.1.3 ไบโอดีเซลกอสอลกับสิ่งแวดล้อม | 9 |
| 2.1.4 ไบโอดีเซล..... | 10 |
| 2.1.4.1 ไบโอเอทานอล..... | 11 |
| 2.1.4.2 ไบโอบิวทานอล..... | 13 |
| 2.1.5 แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม | 13 |
| 2.1.5.1 วิธีขึ้นสังเคราะห์ของคลอสทริเดียม | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.1.5.2 คลอสทริเดียมกับการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ | 20 |
| 2.1.5.3 <i>C. beijerinckii</i> CG1 | 22 |
| 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 23 |
| 2.2.1 สารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการหมัก | 23 |
| 2.2.1.1 น้ำตาลซูโครสและแป้ง | 23 |
| 2.2.1.2 มวลชีวภาพจำพวกลิกโนเซลลูโลส | 25 |
| บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย | 30 |
| วัสดุอุปกรณ์ | 30 |
| สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง | 31 |
| วิธีการดำเนินการวิจัย | 32 |
| 3.1 ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการผลิตไบโอบิวทานอลของ <i>Clostridium beijerinckii</i> CG1 ที่คัดเลือกได้จากหน่วยวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วย ตัวเร่งชีวภาพ | 32 |
| 3.2 หากภาวะที่เหมาะสมของการใช้ <i>C. beijerinckii</i> CG1 ในการผลิตบิวทานอลให้ได้ ความเข้มข้นที่สูงในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง | 32 |
| 3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลใน ถังหมักขนาด 2 ลิตร | 33 |
| 3.2.2 ศึกษาความเร็วใบพัดที่เหมาะสมในการการผลิตบิวทานอลในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร | 33 |
| 3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล ในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 33 |
| 3.2.4 ศึกษาปริมาตรใช้งานที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 33 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.5 | ศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 34 |
| 3.2.6 | ศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 34 |
| 3.2.7 | นำภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1-3.2.6 มาใช้กับอาหารที่เป็นน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล และ โรงงานน้ำตาลในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 34 |
| 3.3 | เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียโรงงานน้ำตาล และโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลในถังหมัก 5 ลิตรโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2..... | 34 |
| 3.4 | เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสีย | 36 |
| บทที่ 4 | ผลการศึกษาและอภิปรายผลการทดลอง | 37 |
| 4.1 | ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการผลิตไบโอบิวทานอลของ <i>C. beijerinckii</i> CG1 | 37 |
| 4.2 | ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการใช้ <i>C. beijerinckii</i> CG1 ในการผลิตบิวทานอลให้มีความเข้มข้นที่สูงในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 43 |
| 4.2.1 | ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล | 43 |
| 4.2.2 | ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล | 44 |
| 4.2.3 | ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล | 46 |
| 4.2.4 | ผลการศึกษาความเร็วใบพัดที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล | 47 |
| 4.2.5 | ผลการศึกษาปริมาตรใช้งานที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล | 48 |
| 4.2.6 | ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล | 49 |
| 4.3 | ผลการนำภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 มาใช้กับอาหารที่เป็นน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล และ โรงงานน้ำตาล | 53 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 คุณสมบัติน้ำเสียที่ใช้ในการศึกษา | 53 |
| 4.3.2 ผลการผลิตเอทานอลและบิวทานอลโดยใช้น้ำเสียในถังหมักขนาด 2 ลิตร | 56 |
| 4.4 ผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... | 57 |
| 4.4.1 ผลการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร | 57 |
| 4.4.2 ผลการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียโรงงานน้ำตาลในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... | 61 |
| บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา | 65 |
| รายการอ้างอิง..... | 67 |
| ภาคผนวก ก วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ | 80 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 81 |



สารบัญตาราง

| | |
|--|--|
| ตารางที่ 2.1 แสดงสัดส่วนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณผลผลิต ทางการเกษตรเป็นชีวมวลใน ปี พ.ศ. 2552 (ดัดแปลงข้อมูลจาก: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553) 6 | |
| ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณชีวมวลชนิดต่าง ๆ (ยกเว้นไม้พืน) ที่ผลิตได้ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2552 7 | |
| ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบการใช้บิวทานอล และเอทานอล 12 | |
| ตารางที่ 2.4 ตารางแสดงสารตั้งต้นที่คลอสทริเดียมแต่ละกลุ่มสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นได้ 16 | |
| ตารางที่ 2.5 แสดงความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักจากสารตั้งต้น ประเภทน้ำตาลและแป้ง 28 | |
| ตารางที่ 2.6 แสดงความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักจากสารตั้งต้น ประเภทมวลชีวภาพ (ลิกโนเซลลูโลสิก) 29 | |
| ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงเปรียบเทียบการผลิตเอซีโตน, บิวทานอลและเอทานอล เมื่อใช้ น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 53 | |
| ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติของน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล 54 | |
| ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติน้ำเสียโรงงานน้ำตาล 55 | |

สารบัญรูป

| | |
|---|----|
| รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเอทานอล | 11 |
| รูปที่ 2.2 แสดงผลิตภัณฑ์และกลุ่มของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมที่สามารถผลิตได้จากวิถีชีวสังเคราะห์ผ่านกระบวนการหมัก | 18 |
| รูปที่ 2.3 ภาพแสดงวิถีชีวสังเคราะห์ของแบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม | 19 |
| รูปที่ 2. 4 ภาพลักษณะโคโลนีของ <i>C. beijerinckii</i> CG1 | 23 |
| รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C.beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลอะราบิโนส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน | 39 |
| รูปที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C. beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลฟรุกโทส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... | 39 |
| รูปที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C.beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... | 40 |
| รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C.beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลแล็กโทส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... | 40 |
| รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C.beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลแมนโนส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... | 41 |
| รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C.beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... | 41 |
| รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย <i>C. beijerinckii</i> CG1 โดยใช้น้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน..... | 42 |
| รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ แอซีโตน เอทานอล และบิวทานอล ที่เวลา 120 ชั่วโมง จากการหมักด้วย <i>C. beijerinckii</i> CG1 ในน้ำตาลต่างๆ | 42 |
| รูปที่ 4. 9 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ | 44 |
| รูปที่ 4.10 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล ... | 45 |

รูปที่ 4.11 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิต
 บิวทานอล 47

รูปที่ 4.12 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาความเร็วใบพัดที่เหมาะสมในการผลิตบิวทา
 นอล 48

รูปที่ 4.13 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาปริมาตรใช้งานที่เหมาะสมในการผลิตบิวทา
 นอล 49

รูปที่ 4.14 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการ
 ผลิตบิวทานอล..... 50

รูปที่ 4.15 แสดงวิถีชีวสังเคราะห์และเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารต่างๆของแบคทีเรียสกุล
 คลอสทริเดียมโดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลกลูโคส..... 51

รูปที่ 4.16 แสดงค่าผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์รวมของในแต่ละปัจจัย 52

รูปที่ 4.17 แสดงค่าผลได้ของการผลิตบิวทานอลของในแต่ละปัจจัย 52

รูปที่ 4.18 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแอสซิโทน บิวทานอล และ เอทานอลที่ได้จากการ
 หมักด้วย *C. beijerinckii* CG1 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง 57

รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะน้ำเสียที่อยู่ในถังหมัก 5 ลิตร โดย..... 60

รูปที่ 4.20 แผนภาพแสดงวิถีชีวสังเคราะห์ของเอนไซม์ที่ใช้ในน้ำตาลแต่ละชนิดของ *C.*
beijerinckii..... 60

รูปที่ 4.21 กราฟแสดงการเจริญของ *C. beijerinckii* CG1 และความเข้มข้นของน้ำตาลชนิด
 ต่าง ๆ ที่ลดลง จากการหมักด้วยน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล 61

รูปที่ 4.22 กราฟแสดงการเจริญของ *C. beijerinckii* CG1และความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่
 ลดลง จากการหมักด้วยน้ำเสียโรงงานน้ำตาล 63

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในอดีตมนุษย์ได้นำเอาพลังงานจากใต้พื้นพิภพมาใช้ โดยเฉพาะน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจ และในชีวิตประจำวันของมนุษย์ จึงทำให้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมนั้นมีความสำคัญและมีความจำเป็นอย่างมากในทุกภาคส่วน แต่การนำเชื้อเพลิงปิโตรเลียมมาใช้นั้นก็ยังมีปัญหาหนึ่ง คือ เชื้อเพลิงปิโตรเลียมเป็นทรัพยากรที่มีอย่างจำกัด ทำให้ทั่วโลกตระหนักถึงปัญหาสำคัญนี้และพยายามค้นคว้าวิจัยหาแหล่งพลังงานใหม่ที่จะมาทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่จะหมดลงในอนาคต นอกจากนี้ปัญหาในเรื่องของเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่มีอย่างจำกัดแล้ว การขุดนำเอาพลังงานจากน้ำมันปิโตรเลียมมาใช้ นั้น เมื่อนำมาเผาไหม้จะทำให้เกิดแก๊สหลายชนิด เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide: CO₂), แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbon monoxide: CO) และ สารประกอบไนโตรเจนออกไซด์ (Oxides of Nitrogen: NOx) เป็นต้น ซึ่งสูงขึ้นบรรยากาศซึ่งแก๊สนี้จัดเป็นแก๊สเรือนกระจกที่เป็นหนึ่งในปัจจัยของการทำให้เกิดภาวะโลกร้อน (Wistreich, 2003) ดังนั้น นอกจากการหาแหล่งพลังงานทดแทนแหล่งใหม่แล้ว แหล่งพลังงานใหม่ที่ได้จึงต้องเป็นพลังงานที่สะอาด มีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าน้ำมันปิโตรเลียม เป็นเหตุให้แนวโน้มของพลังงานทดแทนด้านน้ำมันเชื้อเพลิงนั้นจะมุ่งไปที่ไบโอแอลกอฮอล์ (Balat และคณะ, 2008)

ประเทศไทยมีวัตถุดิบหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวมวลได้ ซึ่งสามารถหาได้จากพืชและสัตว์ รวมไปถึงของเสียจากโรงงานแปรรูปทางการเกษตรและขยะ โดยจากการศึกษาร่วมกันระหว่าง Danish Cooperation for Environment and Development (DANCE) ประเทศเดนมาร์ก และสำนักงานนโยบายและแผนพลังงานพบว่า ประเทศไทยมีปริมาณเชื้อเพลิงชีวมวลที่ยังไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์มีถึง 5-7 ล้านตัน โดยพืชที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบของชีวมวลทางการเกษตรหลักของประเทศไทยนั้นมี 3 ชนิด คือ ข้าวเปลือก อ้อย และทะลายปาล์ม โดยเมื่อเปรียบเทียบพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ในปี พ.ศ. 2552 นั้นประเทศไทยปลูกอ้อยได้มากที่สุด คิดเป็นผลผลิต 66 ล้านตัน ซึ่งมากกว่าข้าวเปลือกประมาณ 2 เท่า โดยมีปริมาณชีวมวลที่เหลือไม่ถูกนำไปใช้ประมาณ 17 ล้านตัน โดยชีวมวลที่ได้จากอ้อยนั้น จะได้ผลผลิตพลอยได้เป็นชานอ้อย และ

กากน้ำตาล โดยกากน้ำตาลที่ได้จากโรงงานนั้นมาใช้ในการผลิตไบโอดีเอสแอลเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลที่สูงซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส 27 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 21 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุอาหารอื่น ๆ 2 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำมาผลิตไบโอดีเอสแอลในกระบวนการหมัก กากน้ำตาลในปัจจุบันนั้นถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้เป็นองค์ประกอบของปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมีส่วนของเสียที่เหลือทิ้งอีกส่วนหนึ่ง คือ น้ำเสียจากกระบวนการผลิต ซึ่งน้ำเสียส่วนนี้ได้ก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม เพราะน้ำเสียจากกระบวนการผลิตกากน้ำตาลในกระบวนการล่างนั้นมีสีดำน้ำตาล อุณหภูมิสูง (Nandy และคณะ, 2002; Patil และคณะ, 2003; Yeoh, 1997) อีกทั้งยังมีสารอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ หากไม่ได้นำไปดัดแปลงใช้ประโยชน์ก็จะก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมจำเป็นต้องผ่านกระบวนการบำบัดก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งกระบวนการนี้ใช้พื้นที่เป็นบริเวณกว้างและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการนำน้ำเสียในกระบวนการนี้มาทดสอบใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเอสแอลจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

นอกจากน้ำเสียโรงงานน้ำตาลแล้ว น้ำเสียที่ได้จากการปรับสภาพวัตถุดิบที่เป็นวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสก็เช่นกันก็เป็นอีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษา และน้ำเสียที่ได้จากกระบวนการนี้ น่าจะมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบสูงอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเอสแอลจาก *Clostridium* sp. โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลและโรงงานน้ำตาล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 หาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไบโอดีเอสแอลด้วย *Clostridium* sp. โดยใช้ น้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลและโรงงานน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต

1.2.2 ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลและโรงงานน้ำตาลของ *Clostridium* sp. ที่ได้จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติของน้ำเสียและเปรียบเทียบความเข้มข้นของไบโอแอลกอฮอล์ ที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำเสียโรงงานน้ำตาลน้ำตาลสิงห์บุรี และโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล สถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด(มหาชน) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานน้ำตาลและโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล

1.4.2 ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จาก *C. beijerinckii* CG1

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

1.5.1 ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ชนิดต่าง ๆ ในการผลิตไบโอเอทานอล

1.5.2 หาภาวะที่เหมาะสมของการใช้ *Clostridium beijerinckii* CG1. ในการผลิตเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่สูงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.5.3 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลและโรงงานน้ำตาล

1.5.4 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์น้ำเสียโรงงานน้ำตาลและโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลถึงหมัก 5 ลิตร โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.5.2

1.5.5 สรุปและอภิปรายผล

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 แนวโน้มด้านพลังงาน

ในอดีตมนุษย์ได้นำเอาพลังงานจากใต้ผืนพิภพที่โลกได้สะสมสร้างไว้นับล้าน ๆ ปี อย่างน้ำมันเชื้อเพลิง แก๊สธรรมชาติ และถ่านหินขึ้นมาใช้ โดยเฉพาะน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนเศรษฐกิจ และในชีวิตประจำวันของมนุษย์เป็นเหตุให้ความต้องการในการใช้พลังงานมีมากขึ้นทุก ๆ วัน อย่างไม่มีที่สิ้นสุด ความสะดวกสบายต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน ล้วนมาจากพลังงานที่ได้จากเชื้อเพลิงที่เราขุดขึ้นมา จึงทำให้เชื้อเพลิงปิโตรเลียมนั้นมีความสำคัญ และมีความจำเป็นอย่างมากในทุกภาคส่วน แต่การนำเชื้อเพลิงปิโตรเลียมมาใช้นั้นก็ยังมีปัญหาหนึ่ง คือ เชื้อเพลิงปิโตรเลียมเป็นทรัพยากรที่มีอย่างจำกัด ทำให้ทั่วโลกกำลังตระหนักถึงปัญหาสำคัญนี้ และพยายามค้นคว้าวิจัยหาพลังงานแหล่งใหม่ที่จะมาทดแทนพลังงานจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่จะหมดลงในอนาคตอันใกล้ ส่งผลให้การผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากชีวมวล (biomass) นั้นเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของพลังงานทดแทนที่ทั่วโลกให้ความสนใจและมีการศึกษาวิจัยกันอย่างมาก (Pazo และคณะ, 2010)

เมื่อวันที่ 10 ธันวาคม ค.ศ. 1997 นานาชาติได้ยอมรับข้อตกลงร่วมกัน เรียกว่า พิธีสารเกียวโต (Kyoto protocol) เพื่อดำเนินงานในช่วง ค.ศ. 1997 – 2008 ต่อมาในการประชุมภาคีสมาชิกของยูเอ็นเอพีซีครั้งที่ 21 ณ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส เมื่อวันที่ 12 ธันวาคม ค.ศ. 2015 ได้ตกลงรับตราสารที่เรียกว่า "ข้อแก้ไขเพิ่มเติมโดฮา" (Doha Amendment) เพื่อแก้ไขและเพิ่มเติมพิธีสารเกียวโตให้ขยายการดำเนินงานออกไปจนถึง พ.ศ. 2563 (BBC News, 2015) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันอีกอย่างว่าเป็นสนธิสัญญาเกี่ยวกับภูมิอากาศของโลก คือ บันทึกข้อตกลงระหว่างประเทศฉบับเดียวของโลกที่มีเป้าหมายผูกพัน คือ การลดการปล่อยแก๊สเรือนกระจก และให้ทุกประเทศลดการปลดปล่อยแก๊สที่เป็นอันตรายต่อชั้นบรรยากาศ เช่น ลดการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากโรงงาน เป็นต้น ดังนั้นกระบวนการผลิตสารเคมีและเชื้อเพลิงเหลวด้วยกระบวนการการหมักจากมวลชีวภาพด้วยเชื้อจุลินทรีย์จึงนับเป็นแนวทางสำคัญหนึ่งในการสนับสนุนกับข้อตกลงนี้ เนื่องจากไบโอแอลกอฮอล์เมื่อนำไปผสมกับน้ำมันแล้วพบว่ามีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ และคาร์บอนไดออกไซด์น้อยลง (Wistreich, 2003) แต่ยังมี

ปัญหาอยู่ในเรื่องของกระบวนการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการหมักในปัจจุบันนั้นที่ยังไม่มีการรายงานหรือพิสูจน์ว่าสามารถลดการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้

การผลิตไบโอแอลกอฮอล์ในยุคแรกจากน้ำตาลและแป้งนั้น พบปัญหาเป็นอย่างมากในกระบวนการแปรรูปเป็นไบโอเอทานอล ได้แก่ มลภาวะ การใช้น้ำ การใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลในการผลิต ดินถูกทำลาย และการขัดแย้งในการใช้พื้นที่ในการเพาะปลูก และยังมีผลกระทบถึงปัญหาพื้นที่การเพาะปลูกพืชอาหารและพื้นที่เพาะปลูกพืชพลังงาน ซึ่งเป็นที่ประจักษ์ว่าอาจจะมีประเด็นในการนำอาหารมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงในภาคการขนส่ง (Weber และคณะ, 2010) ตามที่องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ได้เคยกล่าวไว้ว่า ปัญหาในปัจจุบันดูเหมือนว่าไม่น่าจะขาดแคลนความสามารถในการผลิตอาหาร แต่จะเป็นปัญหาทางการเมืองเชิงเศรษฐกิจศาสตร์ คือการกีดกันทางการค้า (Fernandez Gutierrez และคณะ, 2005; Ren และคณะ, 2012; Ren และคณะ, 2013; Xie และคณะ, 2007)

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าไบโอแอลกอฮอล์เป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับ ความสนใจเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันพลังงานทางเลือกนี้ยังไม่สามารถนำมาทดแทนเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากยังมีปัญหาในเรื่องของความไม่คุ้มทุนในการผลิตจึงยังมีการผลิตเพื่อทดแทนเชื้อเพลิงปิโตรเลียมเป็นบางส่วน วัตถุประสงค์ที่นำมาผลิตนั้นมีปัญหาในเรื่องของ การแย่งพื้นที่ของอาหาร เป็นเหตุให้ในตอนนี้อย่างทั่วโลกกำลังมองหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ที่มีราคาถูก ไม่เป็นที่ต้องการของมนุษย์ และมีจำนวนมาก ซึ่งสารตั้งต้นที่มีในประเทศไทยที่ตรงกับเงื่อนไขคุณสมบัติเหล่านี้ คือ พลังงานชีวมวล เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นแหล่ง พลังงานชีวมวลได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถหาได้จากพืชและสัตว์ รวมไปถึงของเสียจากโรงงานแปรรูปทางการเกษตรและขยะ โดยจากการศึกษาร่วมกันระหว่าง Danish Cooperation for Environment and Development (DANCE) ประเทศเดนมาร์ก และ สำนักงานพลังงานแห่งชาติ ประเทศไทย ในปี 2552 พบว่า ประเทศไทยมีปริมาณเชื้อเพลิงชีวมวลที่ยังไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์มี ถึง 60 ล้านตัน โดยพืชที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบของชีวมวลทางการเกษตรหลักของประเทศไทยนั้นมี 3 ชนิด คือ ข้าวเปลือก อ้อย และทะลายปาล์ม โดยเมื่อเปรียบเทียบพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ในปี พ.ศ. 2552 นั้นประเทศไทยปลูกอ้อยได้มากที่สุด คิดเป็นผลผลิต 66 ล้านตัน ซึ่งมากกว่าข้าวเปลือกประมาณ 2 เท่า โดยมีปริมาณชีวมวลที่เหลือไม่ถูกนำไปใช้ประมาณ 17 ล้านตัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2 โดยชีวมวลที่ได้จากอ้อยนั้น จะได้ผลผลิตพลอยได้เป็นขานอ้อย และกากน้ำตาล โดย กากน้ำตาลที่ได้จากโรงงานนั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์เนื่องจากมีปริมาณ น้ำตาลที่สูงซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และไม่จำเป็นต้องผ่าน

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำมาผลิตไบโอแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมัก กากน้ำตาลในปัจจุบันนั้นถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้เป็นองค์ประกอบของปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังมีส่วนของเสียที่เหลือทิ้งอีกส่วนหนึ่ง คือ น้ำเสียจากกระบวนการผลิต ซึ่งน้ำเสียส่วนนี้ได้ก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม ทั้งในเรื่องของสี กลิ่น คุณภาพของน้ำเสียก่อนทิ้งลงแหล่งน้ำ น้ำเสียจึงเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ เช่น น้ำเสียโรงงานน้ำตาลนั้นจะมีสารประกอบอินทรีย์จำนวนมาก ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมสูง โดยทั่วไปจะมีค่าดัชนีคุณภาพน้ำก่อนการบำบัดน้ำเสีย ดังนี้บีโอดี 4,000-7,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี มากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ในน้ำเสียยังมีน้ำตาล สารประกอบอินทรีย์ที่มาจากพืชที่ถูกหีบ สารเคมีที่ใช้กำจัดศัตรูพืช แมลงศัตรูพืชและเชื้อโรคที่อยู่ในน้ำเสีย (Environmental Health and Safety Guidelines for Sugar Manufacturing, 2007) ซึ่งจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำเสียก่อนที่จะปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำ

ตารางที่ 2.1 แสดงสัดส่วนของการเปลี่ยนแปลงปริมาณผลผลิต ทางการเกษตรเป็นชีวมวลในปี พ.ศ. 2552 (ดัดแปลงข้อมูลจาก: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553)

| ชนิด | ผลผลิต | ปริมาณผลผลิตต่อ วัตถุดิบที่เหลือ | ค่าความร้อน (เมกาจูลต่อกิโลกรัม) |
|-------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| อ้อย | ชานอ้อย | 0.06 | 14.40 |
| | แกลบ | 0.2 | 14.27 |
| ข้าว | ฟางข้าว | 0.11 | 10.24 |
| | ถั่วเหลือง | ต้น/เปลือก/ใบ | 0.81 |
| ข้าวโพด | ชัง | 0.6 | 18.04 |
| | ทะลาย | 0.13 | 17.86 |
| | ใย | 0.13 | 17.62 |
| | กะลา | 0.02 | 18.46 |
| ปาล์มน้ำมัน | ก้าน | 0.27 | 9.83 |
| | มันสำปะหลัง | ลำต้น | 0.08 |
| มะพร้าว | เหง้า | 0.06 | 18.42 |
| | ก้าน | 0.46 | 15.40 |
| | กาบ | 0.33 | 16.23 |
| ไม้ยางพารา | กะลา | 0.09 | 17.93 |
| | กิ่ง/ก้าน | 0.10 | 14.98 |

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณชีวมวลชนิดต่าง ๆ (ยกเว้นไม้พืน) ที่ผลิตได้ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2552 (ดัดแปลงข้อมูลจาก: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2553)

| ชนิด | ผลผลิต (ล้าน ตัน) | ชีวมวล | ปริมาณชีวมวล (ล้าน ตัน) | ศักยภาพพลังงาน | |
|-------------|-------------------------|-------------------|----------------------------|----------------|---------------|
| | | | | (พีโค จูล) | (เมกะ ตัน) |
| อ้อย | 66.82 | ชานอ้อย | 4.19 | 60.35 | 1.43 |
| | | ยอดและใบ | 13.44 | 233.72 | 5.53 |
| ข้าว | 31.51 | แกลบ | 3.51 | 50.10 | 1.19 |
| | | ฟางข้าว | 25.65 | 262.62 | 6.22 |
| ถั่วเหลือง | 0.19 | ต้น/เปลือก/ ใบ | 0.17 | 3.31 | 0.08 |
| ข้าวโพด | 4.61 | ชัง | 0.58 | 10.55 | 0.25 |
| | | ลำต้น | 2.76 | 49.77 | 1.18 |
| ปาล์มน้ำมัน | 8.16 | ทะลายเปล่า | 1.02 | 18.30 | 0.43 |
| | | ใบ | 0.16 | 2.87 | 0.07 |
| | | กะลา | 0.04 | 0.72 | 0.02 |
| | | ก้าน | 2.20 | 21.82 | 0.52 |
| มัน | 30.09 | ลำต้น | 2.44 | 44.93 | 1.06 |
| ลำปะหลัง | | เหง้า | 1.83 | 33.79 | 0.80 |
| มะพร้าว | 1.38 | ก้าน | 0.63 | 9.69 | 0.23 |
| | | กาบ | 0.46 | 7.53 | 0.18 |
| | | กะลา | 0.13 | 2.31 | 0.05 |
| ไม้ยางพารา | 3.09 | กิ่ง/ก้าน | 0.31 | 4.68 | 0.11 |
| รวม | 145.85 | | 59.54 | 504.34 | 11.94 |

2.1.2 แนวโน้มการใช้ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเบนซิน

ด้วยปัญหาการใช้พลังงานจากปิโตรเลียมที่มีอยู่อย่างจำกัดและปัญหาเรื่องสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ และ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศ เป็นเหตุให้เกิดมลพิษในบริเวณเขตเมือง ทำให้หลายประเทศได้มีนโยบายในการลดการใช้ น้ำมันเบนซินลง โดยให้มีการเติมเอทานอลและสารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์ (Methy Tertiary Buthyl Ether: MTBE) ซึ่งเป็นสารออกซิเจน (oxygenate) ใช้ผสมเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำมันเบนซิน ทำให้การเผาไหม้สมบูรณ์และสะอาดมากขึ้น เพราะเมื่อเพิ่มแก๊สออกซิเจนในน้ำมันเบนซินมีผลทำให้เครื่องยนต์มีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ น้อยลง ซึ่งสามารถใช้ทดแทนสารตะกั่วได้ และสารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์นี้ยังมีความสามารถในการเพิ่มค่าออกเทนได้อีกด้วย (ACE, 2005) ดังนั้นความเป็นไปได้ของการใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินโดยตรงนั้นมีความเป็นไปได้น้อยมากในสมัยนั้น เนื่องจากการผลิตเอทานอลจากกระบวนการทางชีวภาพมีราคาแพง โดยเฉพาะแถบตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการนำข้าวโพดมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตนั้นมีต้นทุนในการผลิตที่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเชื้อเพลิงจากปิโตรเคมีจึงจำเป็นต้องเติมสารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์นี้เพื่อลดต้นทุนลง ต่อมา ในปี พ. ศ. 2542 รัฐแคลิฟอร์เนียและรัฐใกล้เคียงในสหรัฐอเมริกา ได้ประกาศห้ามใช้สารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์ อย่างเด็ดขาด เนื่องจากพบการปนเปื้อนสารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์ในแหล่งน้ำใต้ดินและน้ำที่ใช้ในการอุปโภคบริโภค โดยสารที่รั่วไหลลงสู่แหล่งน้ำนี้เกิดจากการรั่วของถังเก็บน้ำมันเบนซินใต้ดิน (Stephenson, 2002) รัฐบาลจึงประกาศห้ามใช้สารนี้อย่างเด็ดขาดและมีนโยบายให้ใช้เอทานอลทดแทนสารนี้ และต่อมาในหลายประเทศก็ได้ยกเลิกการใช้สารนี้เนื่องจากสารนี้มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมสูง จึงเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้ตลาดโลกมีความต้องการเอทานอลเพิ่มมากขึ้นและมีการศึกษาวิจัยเพื่อผลิตเอทานอลให้ได้ในปริมาณที่สูงและมีราคาถูกในปัจจุบัน

สำหรับในประเทศไทยนั้น รัฐบาลไทยได้มีนโยบายในการยกเลิกใช้สารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์ ตั้งแต่ปี พ. ศ. 2550 ซึ่งไม่สามารถทำได้ในปีนี้เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ประเทศไทยสามารถผลิตได้นั้นไม่สามารถทดแทนปริมาณสารเมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์ที่ใช้ในการเติมในน้ำมันเบนซินได้ จึงยังไม่สามารถยกเลิกการใช้สารนี้ได้อย่างทันที โดยนโยบายนี้สำเร็จในช่วงปี 2557 นอกจากต้นทุนการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพมีราคาสูงแล้ว วัตถุดิบที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง มีราคาแพงและขาดแคลน จึงเป็นเหตุให้ต้นทุนการผลิตแก๊สโซฮอล์ที่คาดว่าจะนำมาใช้ทดแทนน้ำมันเบนซิน 95 มีราคาสูงขึ้น แต่ทาง

ภาครัฐได้มีนโยบายสนับสนุนการใช้แก๊สโซฮอล์ในประเทศไทย เช่น การตรึงราคาแก๊สโซฮอล์ให้มีราคาถูกลงกว่าน้ำมันเบนซิน และการสนับสนุนให้ปลูกพืชพลังงาน เป็นต้น

2.1.3 ไบโอดีเซลกับสิ่งแวดล้อม

มนุษย์มีความต้องการในการใช้พลังงานมากขึ้นเพื่อสนองต่ออุตสาหกรรมและกิจกรรมของมนุษย์ที่มีอย่างไม่จำกัด แต่พลังงานที่มนุษย์นำมาใช้นี้มาจากน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งมีอย่างจำกัด นอกจากนี้ การที่มนุษย์นำพลังงานจากฟอสซิลมาใช้มากขึ้นนั้นทำให้เกิดปัญหาการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกขึ้นสู่ชั้นบรรยากาศ จากการเผาไหม้เชื้อเพลิง เป็นส่วนหนึ่งของการเกิดภาวะโลกร้อน (global warming) และคาดว่าจะเกิดปัญหาภาวะการขาดแคลนพลังงานในอนาคต (Mohan และคณะ, 2008)

จำนวนการใช้รถยนต์เป็นตัวบ่งชี้ถึงปัญหามลภาวะในเมืองที่มากขึ้นควบคู่ไปกับการพัฒนา จากการรายงานของ Goldemberg (2008) พบว่า จากจำนวนของการใช้รถยนต์ของโลกนั้น มีการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbonmonoxide: CO) มากกว่า 70% และปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide: CO₂) มากกว่า 19% โดย แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปลดปล่อยจาก 1 แกลลอนของแก๊สโซลีน คิดเป็นปริมาณประมาณ 8 กิโลกรัม ตามการคำนวณ

CO₂ ที่ถูกปลดปล่อยจาก 1 แกลลอนของเลขออกเทน

$$= 3.78 \text{ ลิตร} \times 0.699 \text{ กิโลกรัมต่อลิตร} \times (96/114) \times (44/12) = 8.16 \text{ กิโลกรัม}$$

(Mohan และคณะ, 2008)

รถยนต์ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่บนท้องถนนในโลก ปัจจุบันมีจำนวนประมาณ 700 ล้านคันบนท้องถนนทั่วโลก ซึ่งคาดว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยคาดการณ์ว่าจะมีถึง 1.3 พันล้านคัน ในปี ค.ศ. 2030 และมากกว่า 2 พันล้านคันในปี ค.ศ. 2050 โดยการเพิ่มขึ้นของจำนวนรถนั้นจะสอดคล้องไปกับการพัฒนาเมือง การเติบโตของเมืองจึงมีผลกระทบต่อระบบนิเวศ (ecosystem) และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิโลก และปริมาณการใช้น้ำมัน

แหล่งพลังงานฟอสซิลที่มนุษย์นำมาใช้มีอยู่หลายรูปแบบ ได้แก่ น้ำมันปิโตรเลียม แก๊สธรรมชาติ ถ่านหิน ซึ่งแหล่งพลังงานเหล่านี้ถูกเก็บสะสมไว้เป็นเวลานานใต้ผืนพิภพภายใต้ความร้อนและความดันสูง โดยเรียงจากปริมาณได้ดังนี้ 168.6 พันล้านตัน, 177.4 พันล้านตัน, และ 847.5 พันล้านตัน ตามลำดับจากการสำรวจในปี ค.ศ. 2007 (British petroleum company,

2008) ซึ่งปี 2007 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำมันถึง 3.9 พันล้านตัน ได้ถูกลดการผลิตลง 0.2% ของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเมื่อปี 2006

จากการบันทึกของ Accord to International Energy Agency Statistic พบว่า ในส่วนของภาคการขนส่งนั้นใช้น้ำมันประมาณ 60% ของน้ำมันที่ใช้ในโลก จึงทำให้ความสนใจของการหาแหล่งพลังงานทดแทนที่เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงของโลกมีแนวโน้มในการศึกษาเพิ่มขึ้นด้วยสาเหตุปัญหาหลักคือ น้ำมันเชื้อเพลิงมีอยู่อย่างจำกัด ภาวะโลกร้อนที่เกิดจากการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจก การโปรโมทภาพลักษณ์ที่ดีขององค์กรในการรักษาสิ่งแวดล้อมเพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ

เชื้อเพลิงชีวภาพเป็นอีกหนึ่งแหล่งพลังงานทดแทนที่น่าสนใจเพราะสามารถใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงได้โดยตรง และการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพยังเป็นการช่วยลดการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจก เพราะเชื้อเพลิงชีวภาพมีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าเชื้อเพลิงปิโตรเลียม เป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืน และยังเพิ่มรายได้ให้กับภาคเกษตรกรรม ทำให้ในปัจจุบันเชื้อเพลิงชีวภาพถูกผลิตจากมวลชีวภาพด้วยเหตุผล 3 ประการ คือ

1. เป็นแหล่งพลังงานที่ได้จากสารตั้งต้นที่ถูกนำกลับมาใช้ใหม่ (renewable sources) จึงเป็นแหล่งพลังงานที่ยั่งยืนต่อการพัฒนาในอนาคต
2. เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกในปริมาณที่ต่ำ
3. มีความคุ้มค่าด้านเศรษฐศาสตร์ในอนาคต เนื่องจากราคาน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมมีราคาสูงขึ้นทุกปี

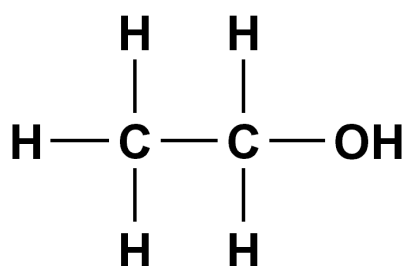
2.1.4 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ อดีเซลที่ถูกสร้างหรือผลิตขึ้นจากกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งมีแอลกอฮอล์หลายชนิด โดยที่ผลิตได้มากที่สุดคือ เอทานอล (ethanol) รองลงมาคือ โพรพานอล (propanol) และบิวทานอล (butanol) ซึ่งแอลกอฮอล์ที่ได้เหล่านี้ถูกผลิตโดยจุลินทรีย์จากกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาล (ได้มาจากข้าวสาลี ข้าวโพด น้ำตาลหัวบีต อ้อย กากน้ำตาล) หรือแป้ง หรือเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ซึ่งในปัจจุบันนั้นแอลกอฮอล์ที่ได้รับความนิยม คือ เอทานอล และบิวทานอลเพราะสามารถนำมาดัดแปลงเพื่อใช้กับเครื่องยนต์แทนน้ำมันเบนซินได้ (ตารางที่ 2.3) โดยเฉพาะบิวทานอลนั้นกำลังเป็นที่ได้รับความนิยมเนื่องจากบิวทานอลนั้นสามารถนำมาใช้โดยตรงกับเครื่องยนต์เบนซินได้ จึงสามารถมาใช้แทนที่น้ำมันเบนซินได้ แต่ใน

ปัจจุบันบิวทานอลยังมีปัญหาในเรื่องของควมไม่คุ้มทุนในการผลิต จึงยังไม่สามารถแข่งขันราคา กับเอทานอลได้ในปัจจุบัน (Linoj และคณะ, 2006)

2.1.4.1 ไบโอะเอทานอล

เอทานอลเป็นสารที่สะอาด ไม่มีสี ติดไฟง่าย ประกอบด้วยธาตุออกซิเจนใน โมเลกุล สูตรโมเลกุลอย่างง่าย คือ C_2H_5OH (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเอทานอล

ไบโอะเอทานอล เป็นเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ โดย ไบโอะเอทานอลมีการผลิตขึ้นครั้งแรกโดยบังเอิญจากการหมักน้ำตาล ต่อมาจึงนำมาใช้เป็นแหล่ง พลังงานและเครื่องดื่มน้ำแอลกอฮอล์ โดยเอทานอลที่ผลิตในปัจจุบันยังคงได้มาจากการหมัก ซึ่งเป็น ที่รู้จักกันในชื่อไบโอะเอทานอล (Demain และคณะ, 2005) โดย 60 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิต ได้ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยเอทานอล ถูกนำมาผสมกับแก๊สโซลีนได้ในอัตราส่วนมาก ที่สุดถึง 85% ด้วยคุณสมบัติที่ว่าเอทานอลเป็นสารที่มีความหนาแน่นพลังงาน (Energy Density) ต่ำกว่าแก๊สโซลีน ดังนั้นจึงมีเลขออกเทนที่สูงทำให้มีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าแก๊สโซลีน

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบการใช้บิวทานอล และเอทานอล (Arnold, 2008; Lee และคณะ, 2008; Ramey และคณะ, 2007)

| คุณสมบัติ | บิวทานอล | เอทานอล | แก๊สโซลีน |
|---|---|--|--|
| 1. ความสามารถในการละลายน้ำ | น้อยมาก | สามารถละลายในน้ำได้ | น้อยมาก |
| 2. การรวมตัวกับน้ำมัน | รวมตัวได้ดีไม่เกิดการแยกชั้น | รวมตัวกับน้ำมันได้น้อยกว่าบิวทานอล | - |
| 3. การกัดกร่อน | ไม่มีการกัดกร่อน | กัดกร่อนสูง | ไม่มีการกัดกร่อน |
| 4. มลพิษจากการเผาไหม้ (อ้างอิงจากเลขออกเทน) | ต่ำ | เผาไหม้สมบูรณ์แต่เมื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงต้องมีการผสมกับแก๊สโซลีนทำให้เกิดมลพิษสูงกว่าบิวทานอล | สูง |
| 5. ปริมาณการผลิตทางชีวภาพ | ผลิตได้น้อย เนื่องจากความเป็นพิษของบิวทานอลต่อแบคทีเรีย | ผลิตได้มาก | วิธีการทางปิโตรเคมี |
| 6. เทคโนโลยีการผลิต | อยู่ในช่วงการวิจัยให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น | มีการพัฒนาจนกระทั่งผลิตได้ง่ายและมีผลผลิตสูง | วิธีการทางปิโตรเคมีผลิตได้ง่ายและมีผลผลิตสูง |
| 7. ราคาต้นทุน | สูง เนื่องจากปัญหาในกระบวนการหมักและการแยกผลิตภัณฑ์ | สูงกว่าแก๊สโซลีน แต่ต่ำกว่าบิวทานอล | ต่ำ |

แหล่งผลิตเอทานอลหลักของโลก คือ ประเทศบราซิลและสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีกำลังการผลิตรวมกันได้ถึง 65 เพอร์เซ็นต์ของเอทานอลที่ผลิตได้ทั่วโลก ส่วนยุโรปผลิตได้ 13 เพอร์เซ็นต์ เอทานอลที่ผลิตในประเทศบราซิลนิยมใช้วัตถุดิบจากอ้อย ส่วนสหรัฐอเมริกาวัตถุดิบที่นิยมใช้ คือ ข้าวโพด ในปี ค.ศ. 2001 บราซิลและสหรัฐอเมริกาสามารถผลิตเอทานอลได้ 11.9 และ 7.6 ล้านลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ (Blanch และคณะ, 2011; Brown และคณะ, 2013; Nigam และคณะ, 2011)

ในสหรัฐอเมริกา การใช้เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีโดยเฉพาะใน แอสซาชูเซตส์ วิสคอนซิน โอเรกอน และชิคาโก สาเหตุที่ไบโอเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่น่าสนใจเนื่องจากเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตได้สม่ำเสมอ ควบคุมได้ที่ยังมีพืชเป็นแหล่งวัตถุดิบ และการใช้ไบโอเอทานอลในรถยนต์สามารถลดการปล่อยแก๊สเรือนกระจกได้

2.1.4.2 ไบโอบิวทานอล

บิวทานอลเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม และเป็นสารที่มีความสามารถใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้ โดยบิวทานอลนั้นมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน จึงสามารถใช้แทนแก๊สโซลีนได้ เป็นเหตุให้มีการวิจัยมากมายศึกษาถึงกระบวนการผลิตบิวทานอล ไม่ว่าจะเป็นการหาสารตั้งต้นในการผลิตที่มีความยั่งยืนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ รวมถึงมีการพัฒนาในด้านของกระบวนการทางวิศวกรรมในเรื่องของระบบการหมักเพื่อจะเปลี่ยนมวลชีวภาพเป็นบิวทานอล (Dürre, 2007; Lee และคณะ, 2008; Papoutsakis, 2008) อุตสาหกรรมการผลิตบิวทานอลจึงมีแนวโน้มที่จะผลิตมาจากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียไร้อากาศสกุลคลอสทริเดียมโดยใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งสิ่งที่แตกต่างกันคือ ชนิดของ *Clostridium* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ที่มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นและความเข้มข้นของบิวทานอลที่แตกต่างกัน (Jones และคณะ, 1986b)

2.1.5 แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม

คลอสทริเดียมเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในภาวะไร้ออกซิเจน แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน และมีสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Firmicute ชั้น (class) Clostridia ซึ่งแบคทีเรียสกุลนี้ได้ถูกวิเคราะห์ว่าน่าจะเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการมาอย่างยาวนาน ก่อนยุคเกรทออกซิเดชัน (Great oxidation) นั่นคือ แบคทีเรียสกุลนี้มีชีวิตอยู่ในช่วง 2,800-3,300 ล้านปีมาแล้ว ในยุคที่ชั้นบรรยากาศของโลกไม่มีแก๊สออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้แบคทีเรียสกุลนี้ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนและตัวเซลล์ของมันจะถูกทำลายเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน แต่อย่างไรก็ตาม คลอสทริเดียมโดยทั่วไปมีความสามารถในการทนออกซิเจน (aerotolerant) ได้โดยการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ทำให้ตัวเซลล์มีชีวิตรอดอยู่ในภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนอยู่ในชั้นบรรยากาศ (Paredes และคณะ, 2005)

นอกจากนี้แบคทีเรียสกุลนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญกับสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศเป็นอย่างมาก คือ

1. คลอสทริเดียมบางชนิดเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคมียผลต่อสุขภาพของคนและสัตว์
2. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลอย่างง่ายรวมถึงคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เช่น มวลชีวภาพ
3. คลอสทริเดียมเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในบทบาทของการเป็นผู้ย่อยสลายชนิดในการรักษาสมดุลของวัฏจักรคาร์บอน

นอกจากความสำคัญในเรื่องของระบบนิเวศและสิ่งมีชีวิตอื่นแล้ว คลอสทริเดียมยังมีความสามารถในการผลิตสารในการย่อยสลายโมเลกุลสารประกอบในดินให้มีโครงสร้างที่ง่ายและสิ่งมีชีวิตอื่นสามารถนำไปใช้ได้ (Bhowmik และคณะ, 2009; Bowman และคณะ, 2010; Bowman และคณะ, 2009; Carmona และคณะ, 2009; Esteve-Núñez และคณะ, 2001; Francis และคณะ, 2008; Kulkarni และคณะ, 2007; Martins และคณะ, 2010) ซึ่งสารที่คลอสทริเดียมผลิตได้นั้นมีความหลากหลายมากขึ้นอยู่กับชนิดของคลอสทริเดียม เช่น กลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสารเคมีที่อยู่ในสิ่งมีชีวิต (เช่น เซลลูโลส, ไชแลน, โปรตีน และไขมัน เป็นต้น), สารละลายจำพวกกรด, แอนติไบโอติก และแอลกอฮอล์จึงทำให้แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมถูกศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพคลอสทริเดียมยังมีวิถีชีวสังเคราะห์ (Biosynthetic pathway) ในการผลิตสารละลายได้หลายชนิดที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรม เป็นเหตุให้งานวิจัยมากมายมุ่งทำการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียตัวนี้ ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดในลำดับต่อไป

2.1.5.1 วิถีชีวสังเคราะห์ของคลอสทริเดียม

คลอสทริเดียมเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสารหรือเอนไซม์ปล่อยออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายให้เป็นสารโมเลกุลเล็กแล้วนำเข้าสู่เซลล์ได้ และมีที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย (ดิน, น้ำ, ลำไส้ของสัตว์ เป็นต้น) ดังนั้นคลอสทริเดียมจึงมีการการสร้างเอนไซม์ที่มีความหลากหลายมากเพื่อที่จะใช้สารตั้งต้นได้หลายประเภทโดยเฉพาะสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ซึ่งได้สรุปสารตั้งต้นโดยทั่วไปที่คลอสทริเดียมแต่ละกลุ่มสามารถใช้ได้ไว้ในตารางที่ 2.4 แต่อย่างไรก็ตามสารละลายหรือเอนไซม์บางชนิดที่คลอสทริเดียมปล่อยออกมานั้นก็ป็นพิษต่อเซลล์มันด้วยเช่นกัน จึงทำให้แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียมมีวิถีชีวสังเคราะห์ในการผลิตสารละลายต่างๆที่แตกต่างกัน

ในแต่ละชนิดของคลอสทริเดียมโดยผ่านกระบวนการหมัก (ตารางที่ 2.4) ซึ่งสามารถจัดประเภทได้ ดังนี้ (Tracy และคณะ, 2012)

1. Solventogenic Clostridia

เป็นคลอสทริเดียมกลุ่มที่มีความสามารถในการผลิตสารละลายอินทรีย์ จำพวก แอซีเตต, เอทานอล, บิวทานอล, เอทานอล, บิวทีเรต, แอซีโตน, 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) และ สารละลายอื่นๆ ได้โดยกล่าวสรุปไว้ในตารางที่ 2.4 คลอสทริเดียมกลุ่มนี้มักถูกใช้ในอุตสาหกรรม การหมัก ABE และการผลิตกรดบิวทีเรต ได้แก่ *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* และ *C. butyricum* เป็นต้น

2. Cellulolytic Clostridia

เป็นกลุ่มคลอสทริเดียมที่มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่เป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ในกระบวนการหมักได้ เช่น ของเสียจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ฟางข้าว ชานอ้อย), เพกติน, เซลลูโลส เป็นต้น โดยจุดเด่นของคลอสทริเดียมในกลุ่มนี้คือมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่ม เซลลูเลสสูง และ มีความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นได้หลายชนิด ตัวอย่างชนิดของ คลอสทริเดียมในกลุ่มนี้ ได้แก่ *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum*, และ *C. phytofermentans*

3. Acetogen Clostridia

เป็นคลอสทริเดียมกลุ่มที่มีความสามารถในการใช้แก๊สสังเคราะห์ (syngas) เป็นสารตั้งต้นได้ โดยผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ที่เรียกว่า Wood-Ljungdahl Pathway ปัจจุบันแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่ม ของคลอสทริเดียมที่มีผู้สนใจศึกษาเป็นอย่างมาก เนื่องจากแก๊สเป็นสารตั้งต้นที่มีราคาถูก แต่ใน ปัจจุบันคลอสทริเดียมกลุ่มนี้ยังไม่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพราะปัญหาในเรื่องของผลิตภัณฑ์ที่ ผลิตได้จากแก๊สมีความเข้มข้นต่ำ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *C. ljungdahlii*, *C. thermoaceticum*, และ *C. carboxidivorans*

ตารางที่ 2.4 ตารางแสดงสารตั้งต้นที่คลอสทริเดียมแต่ละกลุ่มสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นได้

| สารตั้งต้น | น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่เป็นองค์ประกอบ | กลุ่มของ คลอสทริเดียม | เอกสารอ้างอิง |
|---|--|---|---|
| น้ำตาล ข้อย, หัวบีท | กลูโคส ฟรุคโทส | Solventogenic | (Jiang และคณะ, 2009a; Jones และคณะ, 1986a; Wang และคณะ, 2009) |
| แป้ง ข้าวโพด, มันสำปะหลัง | กลูโคส | Solventogenic, Cellulolytic บางชนิด | (Jiang และคณะ, 2009a; Jones และคณะ, 1986a; Leschine, 2005; Wang และ คณะ, 2009) |
| เซลลูโลส | กลูโคส | Cellulolytic, Solventogenic บางชนิด | (Bramono และคณะ, 2011; Leschine, 2005) |
| เฮมิเซลลูโลส ข้าวไร้ด (Oat spelt) ไม้ลาร์ช (Larchwood) ไม้เบิร์ช (Birchwood) ไม้บีช (Beechwood) | กลูโคส ไซโลส แมนโนส กาแลกโทส แรมโนส อะราบิโนส | Cellulolytic, Solventogenic | (Berezina และคณะ, 2009; Leschine, 2005) |
| เพกทิน | กรดกาแลกทูโรนิก (Galacturonic acid), แรมโนส (Rhamnose) | Cellulolytic, Solventogenic | (Leschine, 2005) |
| กลีเซอรอล | - | Solventogenic | (Chatzifragkou และคณะ, 2011; Gungormusler และ คณะ, 2011) |
| ชีสเวย์ (Cheese whey) | แลคโทส | Solventogenic | (Bahl และคณะ, 1986; |
| กรดสายสั้น กรดแอสติค, กรดบิวทริก, กรดแลคติก | | Solventogenic | (Baba และคณะ, 2012; Oshiro และคณะ, 2010; Tashiro และคณะ, 2004) |
| Waste sludge | unknown | Solventogenic, Acetogen | (Kim และคณะ, 2011; Shin และคณะ, 2010) |





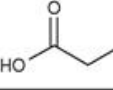
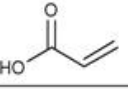


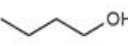
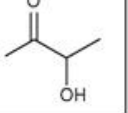
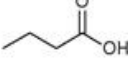
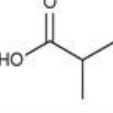
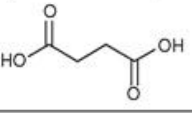
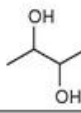
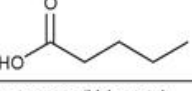
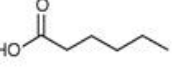
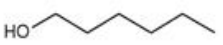
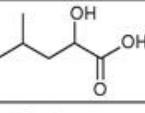
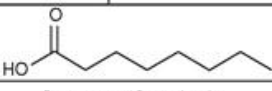
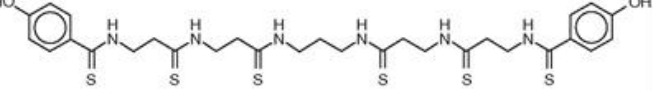
ในวิถีชีวสังเคราะห์ของคลอสทริเดียมมีด้วยกันหลากหลายเส้นทางโดยขอสรุปไว้ในรูปที่ 2.3 ซึ่งจะเห็นว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่คลอสทริเดียมได้ คือ บิวทีเรต, แอซีเตต, แล็กเตต, บิวทานอล, แอซีโตน, แอซีโทอิน, เอทานอล, และสารอื่นๆ ซึ่งขอสรุปไว้ในรูปที่ 2.2 (Akedo และคณะ, 1983; Dabrock และคณะ, 1992; Dorn และคณะ, 1978; Forsberg, 1987; George และคณะ, 1983; Köpke และคณะ, 2011; Kridelbaugh และคณะ, 2009; Seedorf และคณะ, 2008)

สารกลุ่มแรกที่คลอสทริเดียมสร้างเป็นสารกลุ่มที่มีกลิ่นเหม็นเรียกสารจำพวกนี้ว่า “Malodorous compounds” ได้แก่ p-cresol (Elsden และคณะ, 1976; Kridelbaugh และคณะ, 2009) ถูกสร้างระหว่างการหมัก โดยจะผลิตได้มากกว่าสารตั้งต้นจำพวกกรดอะมิโน และกรดไขมันเป็นสารตั้งต้น โดยเมื่อคลอสทริเดียมเจริญในสารตั้งต้นที่เป็นกรดอะมิโน จะผลิตสาร i-butyrate, indole, indole acids, phenyl acetate, valerate (pentanoate), i-valerate, and caproate ได้สูง นอกจากนี้ในการศึกษาเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ของคลอสทริเดียม พบว่า คลอสทริเดียมสามารถผลิตสารแอนติไบโอติกได้ตัวแรกจาก *C. cellulolyticum* (Lincke และคณะ, 2010)

สารในกลุ่มต่อมาคือ สารจำพวกแอลกอฮอล์ โดยแอลกอฮอล์สามารถผลิตได้สองทางคือ เข้าสู่วิถีการสร้าง Acetyl CoA และ วิถีการสร้างกรดไพรูวิก โดยวิถีการสร้าง Acetyl CoA คลอสทริเดียมโดยทั่วไปจะสามารถผลิตแอลกอฮอล์หลักได้ 2 ชนิด คือ เอทานอล และ บิวทานอล แต่บางชนิดไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ ซึ่งถ้าดูจากวิถีชีวสังเคราะห์ในรูปที่ 2.3 จะเห็นได้ว่า เอทานอลสามารถผลิตได้โดยตรงจาก Acetyl CoA และอีกทางคือจากกรดแอซีเตต เช่นเดียวกับบิวทานอลที่สามารถผลิตได้โดยตรงจาก Acetyl CoA และอีกทางคือ กรดบิวทีเรต ซึ่งจากวิธีนี้พบว่าคลอสทริเดียมในระยะการเจริญช่วง log phase คลอสทริเดียมจะเข้าสู่วิถีการสร้างกรด ทำให้มีการผลิตกรดบิวทีริกและกรดแอซีเตตในช่วงแรกของการเจริญ และเมื่อเชื้อเข้าสู่การเจริญในระยะ stationary phase เชื้อจะเริ่มมีการสร้างแอลกอฮอล์ โดยสร้างได้สองทางคือ วิธีของ Acetyl CoA อีกเส้นทางคือ กรดบิวทีริกและกรดแอซีติกโดยผ่านเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ นอกจากสารกลุ่มเหล่านี้แล้วคลอสทริเดียมบางชนิดยังมีความสามารถในการสร้างสารอื่นๆได้ โดยขอสรุปไว้ในตารางที่ 2.2

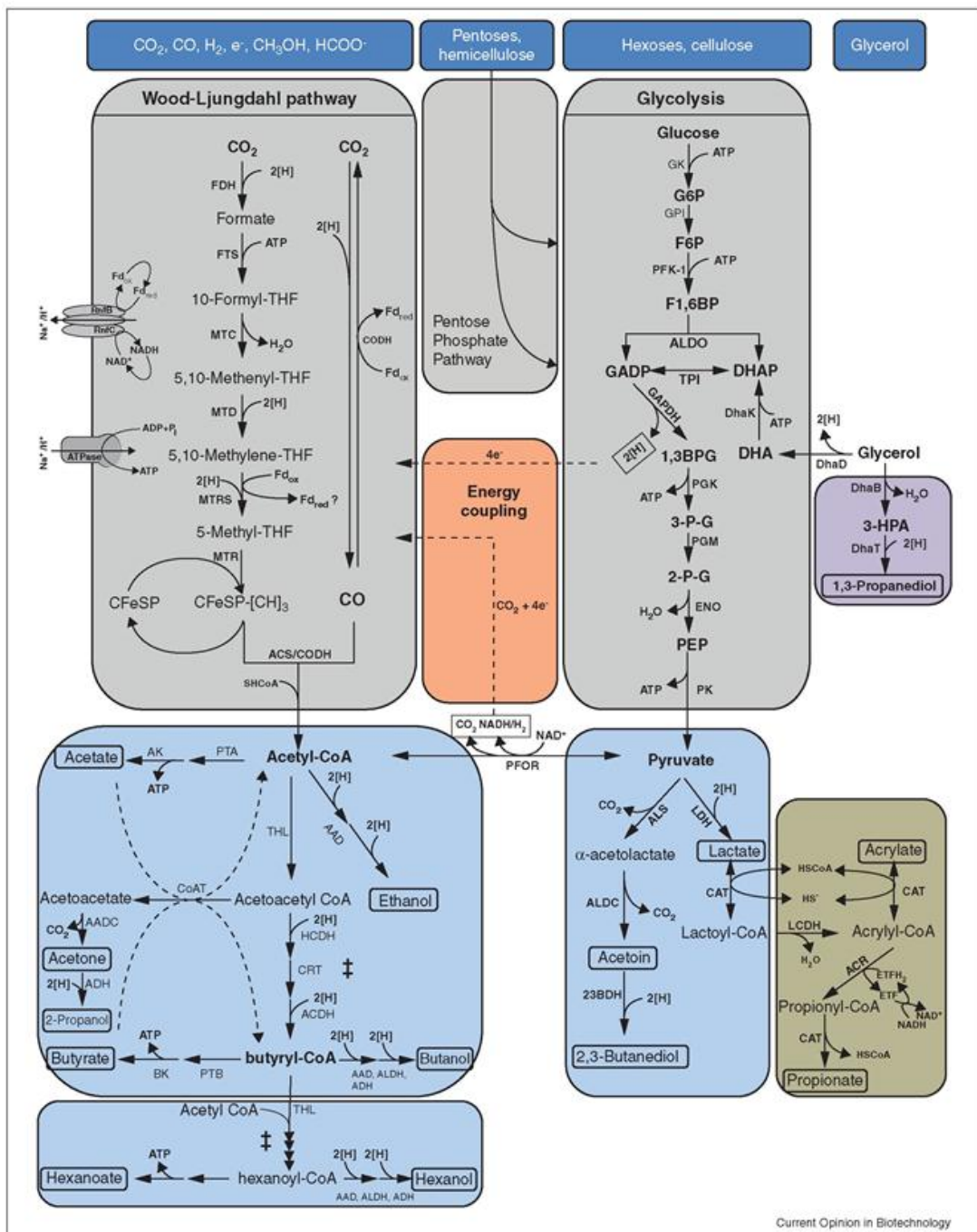
จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิถีชีวสังเคราะห์ของคลอสทริเดียมนั้นมีความหลากหลายและยังมีความเป็นเอกลักษณ์ที่แตกต่างจากยีสต์และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ทั้ง

ในเรื่องการผลิตสารละลายและในเรื่องการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้โคลอสทริเดียมเป็นที่น่าสนใจและถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการหมักเอซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดในหัวข้อถัดไป

| | Products | | | Organisms |
|------------------------|--|---|--|--|
| 2-C and H ₂ |  |  | H ₂ | Acetogens Butyric/Solvent Cellulolytic |
| | Ethanol | Acetate | Hydrogen | |
| 3-C |  |  |  | Butyric/Solvent Propionic Others [28-32] |
| | Acetone | 1,3-propanediol | Propionate | |
| |  |  |  | |
| | Acrylate | i-Propanol | Lactate | |
| 4-C |  |  |  | Butyric/Solvent Acetogens Others [25-27] |
| | Butanol | Acetoin | Butyrate | |
| |  | | | |
| | |  |  | |
| | | Succinate | 2,3-butanediol | |
| 5-C |  | | | <i>C. scatologenes</i> [27] <i>C. kluyveri</i> and related [24] Others [36] |
| | Pentanoate (Valeroate) | | | |
| 6-C |  |  |  | <i>C. scatologenes</i> [27] <i>C. butyricum</i> [33] <i>C. kluyveri</i> and related [24] |
| | Hexanoate (Caproate) | Hexanol | 2-hydroxy-4-methylpentanoate | |
| 8-C |  | | | <i>C. kluyveri</i> and related [89] |
| | Octanoate (Caprylate) | | | |
| Other |  | | | <i>C. cellulolyticum</i> [37] |
| | Closthioamide (antibiotic) | | | |

Current Opinion in Biotechnology

รูปที่ 2.2 แสดงผลิตภัณฑ์และกลุ่มของแบคทีเรียสกุลโคลอสทริเดียมที่สามารถผลิตได้จากวิถีชีวสังเคราะห์ผ่านกระบวนการหมัก (Tracy และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.3 ภาพแสดงวิถีชีวสังเคราะห์ของแบคทีเรียสกุลคอลลอสทริเดียม (Tracy และคณะ, 2012)

2.1.5.2 คลอสทริเดียมกับการผลิตไบโอแอลกอฮอล์

Clostridium sp. มีจุดเด่นในเรื่องของความทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมได้สูง เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) จึงมีความสามารถในการทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าแบคทีเรียสกุลอื่น จึงมีความเหมาะสมในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากเอทานอลและบิวทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง โดยเฉพาะบิวทานอลจึงอาจกล่าวได้ว่าไม่มีแบคทีเรียในสกุลใดในกลุ่ม Archea และ Eucarya จะมีประสิทธิภาพตามธรรมชาติเพียงพอในการผลิตบิวทานอลได้ในระดับอุตสาหกรรมเท่า *Clostridium* sp. ได้เลย (Qureshi และคณะ, 2008a) นอกจากนี้แบคทีเรียสกุลนี้ยังเป็นสกุลแบคทีเรียที่รู้จักกันแพร่หลายและมีศึกษากันมาอย่างยาวนาน โดยมีการศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1912 เมื่อนักเคมีชาวอิสราเอล Chaim Weizmann ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* และหมักโดยใช้แป้งเป็นสารตั้งต้น พบว่าแบคทีเรียสกุลนี้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นแอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนาและนำมาใช้เป็นอุตสาหกรรมหมักแอซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE Fermentation) กันอย่างแพร่หลายในยุโรป (Thang และคณะ, 2010) โดยผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้ 3 ประเภทหลัก ประเภทแรก คือ ตัวทำละลาย ได้แก่ แอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ประเภทที่ 2 คือ กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแอซีติก และกรดบิวทิริก และประเภทสุดท้าย คือ แก๊ส ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ แก๊สประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และตัวทำละลายประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยที่อัตราส่วนของตัวทำละลาย แอซีโตน บิวทานอล และเอทานอล จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ สำหรับ *C. acetobutylicum* มีอัตราส่วนในการผลิต ABE เป็น 3:6:1 (Shapovalov และคณะ, 2008)

อุตสาหกรรมหมักแอซีโตน-บิวทานอล เกิดขึ้นที่ประเทศอังกฤษ เมื่อเริ่มสงครามโลกครั้งที่ 1 ในปี ค.ศ. 1914 เนื่องจากต้องการแอซีโตนเพื่อใช้สำหรับอุตสาหกรรมการทำวัตถุระเบิด และต้องการบิวทานอล มาใช้ในการผลิตยางสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนไปเป็นบิวทาไดอีน (butadiene) และเกิดอุตสาหกรรมหมักแอซีโตน-บิวทานอล ต่อมาที่ประเทศแคนาดา และสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ ต่อมาในปี ค.ศ. 1930 สามารถแยกเชื้อที่สามารถใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นวัตถุดิบในการหมักได้สำเร็จ และใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกกว่าธัญพืช ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 อุตสาหกรรมผลิตรถยนต์ขยายตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลต่อความต้องการแล็กเกอร์ซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากบิวทานอล อุตสาหกรรมผลิตแอซีโตน-บิวทานอลจึงมีความสำคัญมากเป็นอันดับ

ที่ 2 รองจากอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล เมื่อสงครามโลกสิ้นสุดลง อุตสาหกรรมการผลิตแอสซีโทน-บิวทานอลได้ลดบทบาทลงจนไม่สามารถแข่งขันสู้กับอุตสาหกรรมน้ำมันปิโตรเลียมได้ เนื่องจากราคาน้ำมันได้ลดลง การพัฒนาที่รวดเร็วของอุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิงปิโตรเลียม เพราะปัญหาในเรื่องของราคาต้นทุนการผลิตที่สูงกว่า ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน และปัญหาของราคาวัตถุดิบในการผลิตตัวบิวทานอลด้วยเทคโนโลยีทางชีวภาพ (Li และคณะ, 2014; Qureshi และคณะ, 2001)

อย่างไรก็ตามปัญหาทางด้านพลังงานได้กลับมาเป็นปัญหาที่สำคัญของโลกในปัจจุบัน เนื่องจากความขัดแย้งของประเทศผู้ผลิตน้ำมันและปริมาณเชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีอย่างจำกัด ส่งผลให้ราคาของเชื้อเพลิงปิโตรเลียมมีราคาสูงขึ้นและไม่คงที่ อุตสาหกรรมการหมักแอสซีโทน-บิวทานอลจึงกลับมาเป็นที่สนใจอีกครั้งโดยการหาแหล่งคาร์บอนใหม่ที่มีศักยภาพเพียงพอต่อการนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล และเอทานอล โดยชีวมวลนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทั่วโลกได้ให้ความสนใจ แต่การนำชีวมวลมาใช้นั้นจำเป็นต้องมีกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนจึงสามารถนำมาใช้ได้

ในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบในการแปรสภาพของมวลชีวภาพโดยการสกัดน้ำตาลออกมาเพื่อใช้ในการหมักนั้น น้ำตาลที่ได้ออกมาจะเป็นน้ำตาลที่มีองค์ประกอบของ น้ำตาลเฮกโซส (hexose sugar) น้ำตาลเพนโทส (pentose sugar) และ น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ซึ่ง *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลผสมได้ทั้ง น้ำตาลเพนโทส และ น้ำตาลเฮกโซส รวมถึงใน *Clostridium* sp. บางชนิดมีความสามารถในการใช้แก๊สสังเคราะห์ได้ (Jang และคณะ, 2012; Köpke และคณะ, 2010; Munasinghe และคณะ, 2010; Tracy และคณะ, 2012) ด้วยเหตุนี้ จึงมีการประยุกต์ใช้ *Clostridium* sp. ในการผลิตบิวทานอลโดยใช้น้ำตาลที่ถูกสกัดมาจากมวลชีวภาพจำพวกเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัสดุที่มีราคาถูก ไม่เป็นที่ต้องการของมนุษย์ จึงจัดเป็นวัสดุที่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ในการนำมาผลิตบิวทานอล (Jones และคณะ, 1986b; Lee และคณะ, 2008; Zverlov และคณะ, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม การค้นหาสารตั้งต้นที่มีราคาถูก ไม่เป็นที่ต้องการของมนุษย์ และเป็นวัสดุที่ถูกนำกลับมาใช้ประโยชน์แหล่งอื่นได้ ก็ยังเป็นหัวข้อวิจัยที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายเพื่อให้ได้อนาคตที่มีความยั่งยืนในด้านของพลังงาน

แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของกระบวนการหมักบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium* sp. ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของราคาสารตั้งต้นที่มีราคาสูง สารตั้งต้นบางชนิดเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ต่ำ การเจริญเติบโตของเชื้อที่ต่ำทำให้ผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักได้ความเข้มข้นที่ต่ำ จากปัญหาที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นจะเห็นว่า ปัญหาสำคัญคือ

ความทนต่อบิวทานอลของคลอสทริเดียม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและคัดเลือกชนิดของ *Clostridium* sp. ให้มีความทนต่อบิวทานอลได้สูง เพื่อที่จะเพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอลจากกระบวนการหมัก (Green, 2011; Jang และคณะ, 2012; Jiang และคณะ, 2009b; Lee, 2009b) การทำพันธุวิศวกรรมกับ *Clostridium* sp. เพื่อให้มีความทนต่อบิวทานอลได้เพิ่มมากขึ้นซึ่งมีการทำการศึกษาในหลายงานวิจัย (Ezeji และคณะ, 2003; Li และคณะ, 2011; Lu และคณะ, 2012; Mariano และคณะ, 2011; Nielsen และคณะ, 2009; Roffler และคณะ, 1988; Xue และคณะ, 2012) อีกทางเลือกหนึ่งนอกจากการทำพันธุวิศวกรรม คือ การคัดเลือกเชื้อคลอสทริเดียมที่มีความทนต่อบิวทานอลได้สูงจากธรรมชาติก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้ และการศึกษาวิธีเมแทบอลิซึมเพื่อให้ *Clostridium* sp. ผลิตบิวทานอลได้สูงขึ้น (Jang และคณะ, 2012; Jones และคณะ, 1986b; Lütke-Eversloh และคณะ, 2011; Tracy และคณะ, 2012; Yu และคณะ, 2011) การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ในการหมักเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้ (Ezeji และคณะ, 2003; Tashiro และคณะ, 2005)

เมื่อได้ *Clostridium* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตและทนบิวทานอลได้สูงแล้ว การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลของคลอสทริเดียมชนิดนั้นก็จะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการช่วยลดต้นทุนของการผลิตบิวทานอลลงได้

2.1.5.3 *C. beijerinckii* CG1

C. beijerinckii CG1 เป็นเชื้อที่ได้จากการคัดแยกมูลวัวในฟาร์มของเกษตรกรจังหวัดปทุมธานี เมื่อในปี พ.ศ. 2554 โดยพรพรรณธิภา ส่งเสริมพานิช ได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพชีวภาพต่าง ๆ พบว่า เป็นเชื้อไม่ก่อโรค โคโลนีมีรูปร่างแบบ irregular ขอบไม่เรียบ ลักษณะโคโลนีเป็นสีครีม ดังรูปที่ 2.4 รูปร่างของเชื้อเมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นลักษณะ rod shape มีสปอร์อยู่ภายในเซลล์ และมีแกรมบวก ต่อมาได้ทำการทดสอบความทนต่อบิวทานอลของเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของบิวทานอลที่แตกต่างกันพบว่า *C. beijerinckii* CG1 มีความทนต่อความเข้มข้นบิวทานอลได้สูงสุดที่ 15 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำเชื่อนี้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS สูตรดัดแปลง (Virunanon และคณะ, 2008) ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร *C. beijerinckii* CG1 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ค่าแอสีโทน เอทานอล บิวทานอลที่เชื้อสร้างได้ พบว่าได้อัตราส่วนการผลิตแอสีโทน: บิวทานอล: เอทานอล = 0:8:2

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่า *C. beijerinckii* CG1 นั้นมีจุดเด่นอยู่ 3 ประการ คือ

1. เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค และถูกคัดแยกได้จากธรรมชาติ ไม่ได้ผ่านการกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งจากจุดนี้เองทำให้เชื้อตัวนี้ได้เปรียบมากกว่าเชื้อที่ผ่านกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมด้วยในเรื่องข้อจำกัดของความปลอดภัยทางชีวภาพในประเทศไทย

2. *C. beijerinckii* CG1 มีการผลิตแอสีโทนได้ต่ำมาก จากข้อดีนี้เองทำให้ง่ายต่อกระบวนการกลั่นแอลกอฮอล์และมั่นใจได้ว่าไม่มีแอสีโทนปนมากับผลิตภัณฑ์หลังจากการกลั่น

3. เชื้อนี้มีความทนต่อบิวทานอลสูง ทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องความเป็นพิษของบิวทานอลที่มีต่อเซลล์



รูปที่ 2. 4 ภาพลักษณะโคโลนีของ *C. beijerinckii* CG1

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 สารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการหมัก

2.2.1.1 น้ำตาลซูโครสและแป้ง

บิวทานอลที่ผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพนั้นจะได้จากกระบวนการหมัก ABE fermentation โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ได้จาก ข้าวโพด น้ำตาล หัวบีต อ้อย มันฝรั่ง มันลำปะหลัง และข้าวฟ่าง (Jones และคณะ, 1986b; Qureshi และคณะ, 2008a). โดยแหล่ง

คาร์บอนเหล่านี้จะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสที่สร้างจาก *Clostridium* sp. ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสารประกอบจำพวกแป้งโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส ในแอฟริกาใต้การผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยนั้นประสบความสำเร็จเป็นอย่างมากในระดับอุตสาหกรรม จนในปี ค.ศ. 1980 (Jones และคณะ, 1986b) ได้ประเมินการใช้กากอ้อยเหลืองเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *C. beijerinckii* BA101 พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นผลได้ของการผลิต (yield) 0.1 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ อัตราการผลิตบิวทานอล 0.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากกากน้ำตาลที่ใช้ 80 กรัมต่อลิตร (Qureshi และคณะ, 2001)

จากงานวิจัยส่วนหนึ่งของประเทศฝรั่งเศสได้ประเมินการผลิตบิวทานอลจากมวลชีวภาพ โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแก่นตะวัน (*Jerusalem artichoke* หรือ *sunchoke*) และใช้ *C. acetobutylicum* ซึ่งเป็นชนิดที่คัดแยกได้จากหัวของแก่นตะวัน พบว่าเมื่อหมักในภาวะที่เหมาะสม แบคทีเรียสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้น 14.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของการผลิต 0.23 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ โดยใช้เวลาในการหมัก 33 ชั่วโมง ซึ่งในกระบวนการนี้ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส และไม่มีการเติมสารอาหารเสริมอื่น ๆ โดยต่อมากกระบวนการของงานวิจัยนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในถังหมักที่มีสเกลขนาดใหญ่ขึ้น (Marchal และคณะ, 1985)

พลาสติกชีวภาพที่ถูกขึ้นรูปโดยใช้แป้งจากถั่วลิสง (*packing peanut*) ได้ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลเนื่องจากพลาสติกชนิดนี้เป็นขยะที่มีจำนวนมากในแถบยุโรป เมื่อผ่านกระบวนการหมักด้วย *C. beijerinckii* BA101 พบว่า ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลถึง 18.9 กรัมต่อลิตร โดยใช้พลาสติกชีวภาพถึง 80 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น และใช้เวลาในการหมัก 110 ชั่วโมง (Ezeji และคณะ, 2003)

จากการรายงานของ Madihah และคณะ. (2001) ได้มีการประยุกต์ใช้แป้งของจากวุ้นสาकुเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบิวทานอล โดยการหมักด้วย *C. acetobutylicum* พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้น 16 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของการผลิต 0.24 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ อัตราการผลิตบิวทานอล 0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากแป้งวุ้นสาकुกับแป้งจากมันฝรั่ง แป้งสาลี และแป้งข้าวโพดแล้วพบว่ามีความเข้มข้นของบิวทานอลที่ใกล้เคียงกัน (Madihah และคณะ, 2001) และความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากสารตั้งต้นเหล่านี้มีค่าใกล้เคียงกันกับการใช้สารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาล จากการหมักด้วย *C. beijerinckii* BA101 (Ezeji และคณะ, 2007)

ปัจจุบันแป้งมันสำปะหลัง ได้ถูกใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอลโดย ตัวอย่างการศึกษาหนึ่งที่ใช้ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม ให้มีการแสดงออกของ ไฮเปอร์อะไมโลไลติกแอคทิวิตี (hyper amylolytic activity) ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง พบว่า สามารถผลิตบิวทานอลได้ด้วยความเข้มข้น 16.4-16.9 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของการผลิต 0.26-0.35 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.35-0.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Thang และคณะ, 2010)

แม้ว่า น้ำตาลและแป้งจะเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดสำหรับการหมักในการผลิตบิวทานอลซึ่งได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.5 แต่สารตั้งต้นทั้งสองนี้เป็นสารตั้งต้นที่มีความต้องการทางตลาดอาหารที่สูง เมื่อนำมาใช้ในการผลิตเป็นเชื้อเพลิง ทำให้เกิดการแข่งขันราคากับอาหาร มีผลให้ราคาของน้ำตาลและแป้งสูงขึ้น ดังนั้นการมองหาแหล่งวัตถุดิบที่จะใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงจึงต้องหาแหล่งวัตถุดิบที่ไม่มีผลต่อราคาอาหารและไม่เป็นที่ต้องการของมนุษย์ มวลชีวภาพ (biomass) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวเลือกที่นักวิจัยได้ให้ความสนใจต่อไป

2.2.1.2 มวลชีวภาพจำพวกลิกโนเซลลูโลส

มวลชีวภาพเป็นสารตั้งต้นหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ของคำตอบสำหรับการหาแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตไบโอแอลกอฮอล์โดยที่สารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนเหล่านั้นไม่มีผลต่อราคาอาหารของมนุษย์ โดยมวลชีวภาพนั้นเป็นวัสดุที่มีเป็นจำนวนมากในโลก และมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกทิน ล้วนแต่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) โดยแหล่งที่มาซึ่งได้มาจากภาคการเกษตร อุตสาหกรรม ป่าของเสียที่มีไม้เป็นองค์ประกอบจากบ้านเรือน (Buschke และคณะ, 2011) ซึ่งสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ เหล่านี้มีราคาถูก และไม่เป็นที่ต้องการ เป็นการนำของเหลือทิ้งกลับมาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่า นอกจากนี้เชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากวัสดุที่เป็นลิกโนเซลลูโลสนั้นยังมีข้อดีกว่าในเรื่องของจำนวนแก๊สเรือนกระจกที่ถูกปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากข้าวโพด (Buschke และคณะ, 2011) แต่อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการนำมาผลิตเชื้อเพลิงคือ ความยากในการสกัดน้ำตาลออกจากโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส (Blanch และคณะ, 2011) ซึ่งต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบทางกายภาพ เคมี หรือวิธีการทางชีวภาพเพื่อปรับสภาพวัตถุดิบก่อนที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้ และการปรับสภาพวัตถุดิบนั้นจะใช้กระบวนการไฮโดรลิซิส ทำให้ได้น้ำตาลหลายชนิดผสมกัน ทั้งน้ำตาลเชิงเดี่ยวและน้ำตาลเชิงกลุ่ม แต่อย่างไรก็ตาม ก็ไม่เป็นปัญหากับการผลิตไบโอแอลกอฮอล์โดยใช้ *Clostridium* sp. เพราะแบคทีเรียสกุลนี้มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะแหล่ง

คาร์โบไฮเดรตที่หลากหลาย ทั้งน้ำตาลเพนโทส และ น้ำตาลเฮกโซส (Tracy และคณะ, 2012) ดังนั้นแนวทางในการศึกษาวิจัยในเรื่องของการนำวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จึงให้ความสำคัญไปที่การศึกษากระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ โดยเฉพาะในกระบวนการไฮโดรลิซิส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลที่สูง (Al-Shorgani และคณะ, 2012; Ezeji และคณะ, 2008; Ezeji และคณะ, 2007; Lu และคณะ, 2012; Qureshi และคณะ, 2008a; Qureshi และคณะ, 2007; Qureshi และคณะ, 2010a; Qureshi และคณะ, 2010b)

- วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

มวลชีวภาพที่มีองค์ประกอบของวัสดุที่เป็นลิกโนเซลลูโลสนั้นมีความหลากหลาย วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นอีกหนึ่งสารตั้งต้นที่มีความน่าสนใจที่จะนำมาผลิตไบโอแอลกอฮอล์ (López-Contreras และคณะ, 2000; Qureshi และคณะ, 2008a; Qureshi และคณะ, 2007; Qureshi และคณะ, 2010a) ตัวอย่างหนึ่งในการศึกษาน้ำตาลที่ได้จากขยะอินทรีย์ (domestic organic waste; DOW) ภายในประเทศ โดยนำขยะอินทรีย์เหล่านี้มาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล โดยใช้ *C. acetobutylicum* ATCC824 เมื่อนำขยะสดและขยะแห้งมาผ่านการปรับสภาพแล้วได้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 27.7-39.3% (W/W) โดยมีกลูโคสในขยะสด 18.4% ของวัตถุดิบ และ ในขยะแห้ง 25.1% ของวัตถุดิบ เมื่อผ่านกระบวนการหมักด้วย *C. acetobutylicum* ATCC824 โดยไม่มีการเติมสารอาหารอื่นเพิ่มเติม ใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ 10% (WV) เมื่อผ่านกระบวนการหมัก พบว่าได้ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ 3 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตบิวทานอล 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากขยะอินทรีย์ 100 กรัม แต่เมื่อนำขยะอินทรีย์เหล่านี้มาผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส โดยการเติมเอนไซม์เซลลูเลส (cellulases) และ บีตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidases) พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น เป็น 4.2 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตบิวทานอล 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (López-Contreras และคณะ, 2000)

ในการศึกษาการไฮโดรลิซิสจากฟางข้าวสาลีเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักด้วย *C. beijerinckii* P260 เมื่อผ่านการไฮโดรลิซิสฟางข้าวสาลี 86 กรัมต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นน้ำตาลที่ 60.2 กรัมต่อลิตรเมื่อผ่านกระบวนการหมักพบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้ 12 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของการผลิต 0.20 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Qureshi และคณะ, 2007)

นอกจากนี้ยังมีการนำวัสดุอื่น ๆ ที่เป็นวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในการผลิตบิวทานอล ได้แก่ กากวัดฤดูบที่เหลือใช้จากกระบวนการผลิตเอทานอล (dried distiller's grains and soluble: DDGS) (Ezeji และคณะ, 2008) รำข้าว (rice bran) (Lee, 2009a) ช้างข้าวโพด (Qureshi และคณะ, 2008a) แป้งมันสำปะหลัง และ ชานอ้อย (Lu และคณะ, 2012) ซึ่งได้มีการประเมินถึงประสิทธิภาพการนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ โดยกล่าวสรุปในตารางที่ 2.6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการการนำฟางข้าวบาร์เลย์ (Qureshi และคณะ, 2010a) ช้างข้าวโพด (Qureshi และคณะ, 2010a) และ หญ้าสวิสต์ (Qureshi และคณะ, 2010a) ที่ประสบความสำเร็จในการนำมาหมักด้วย *C. beijerinckii* P260 (ตารางที่ 2.6). เช่นเดียวกับการใช้รำข้าวสาลีที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการม่ข้าวสาลี โดยนำรำข้าวสาลีมาหมักด้วย *C. beijerinckii* ATCC 55025 (Liu และคณะ, 2010) โดยรำข้าวสาลีที่ผ่านการไฮโดรลิซิส 53.1 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ 3 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 21.3 กรัมต่อลิตร น้ำตาลไซโลส 17.4 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลอะราบิโนส 10.6 กรัมต่อลิตร เมื่อผ่านกระบวนการหมัก พบว่าได้ความเข้มข้นบิวทานอลถึง 8.8 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง (Liu และคณะ, 2010) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ รำข้าวและน้ำมันรำข้าวได้ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล โดยใช้ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 พบว่าได้บิวทานอลที่ความเข้มข้น 7.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของการผลิต 0.27 กรัมต่อกรัมวัสดุ และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Al-Shorgani และคณะ, 2012)

ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้นนั้นจะเห็นได้ว่ามวลชีวภาพที่มีวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบนั้นมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตบิวทานอลได้ แต่ก็ยังมีปัญหาในเรื่องของความหลากหลายของสารประกอบที่ได้มาหลังจากกระบวนการไฮโดรลิซิส ได้แก่ เกลือ (salts), เฟอร์ฟูรัล (furfural), ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (hydroxymethylfurfural), กรดอะซิติก (acetic acid), เฟอร์รูลิก (ferulic), กลูคูโรนิก (glucuronic), กรดแกมาริก (p-coumaric acids) และ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) (Ezeji และคณะ, 2007) โดยสารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งกระบวนการหมักบิวทานอลได้ ทำให้ยังคงต้องมีการพัฒนาศึกษาปรับปรุงแก้ไขวิธีในการไฮโดรลิซิสเพื่อให้ความเข้มข้นของบิวทานอลให้สูงขึ้น รวมถึงการศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตทางชีวภาพในขั้นตอนเดียวเพื่อลดขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อนในการผลิตบิวทานอลเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสในอนาคต

ตารางที่ 2. 5 แสดงความเข้มข้นของชีวทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักจากสารตั้งต้นประเภทน้ำตาล

| แหล่ง คาร์บอน | จุลินทรีย์ | ชนิด | เวลา (ชม.) | สารตั้งต้น | ชีวทานอล (g/L) | ABE (g/L) | ผลได้ของ การผลิต (g/g) | อัตราการ ผลิต (g/L/h) | ที่มา |
|------------------|---|--------|---------------|---|-------------------|--------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| น้ำตาล | <i>C. beijerinckii</i> | BA101 | 96 | กากถั่วเหลือง 80 กรัมต่อลิตร (น้ำตาล 34.7 กรัมต่อลิตร) | 8 | 10.7 | 0.23 | 0.08 | (Qureshi, Lolias, และคณะ, 2001) |
| แป้ง | <i>C. acetobutylicum</i> | IFP904 | 33 | กากข้าว (น้ำตาล 65 กรัมต่อลิตร) | 14.8 | 22.1 | 0.23 | 0.45 | (Marchal และคณะ, 1985) |
| | <i>C. beijerinckii</i> | BA101 | 110 | พลาสมาที่ชีวภาพ 80 กรัมต่อลิตร | - | 18.9 | - | - | (Marchal และคณะ, 1985) |
| | <i>C. acetobutylicum</i> | P262 | 75 | แป้งสาลี 60 กรัมต่อลิตร | 16.0 | 18.0 | 0.24 | 0.21 | (Ezeji และคณะ, 2003) |
| | <i>C. beijerinckii</i> | BA101 | 120 | แป้งข้าวโพด (กลูโคส 44.9 กรัมต่อ ลิตร) | 13.4 | 18.4 | 0.30 | 0.11 | (Madhah และคณะ, 2001) |
| | <i>C. beijerinckii</i> | BA101 | 78 | น้ำตาลแป้งข้าวโพด (กลูโคส 45.7 กรัมต่อลิตร) | 13.4 | 18.2 | 0.29 | 0.17 | (Ezeji และคณะ, 2007) |
| | <i>C. saccharoperbutyl acetonicum</i> | N1-4 | 36 | แป้งมันสำปะหลัง 62.6 กรัมต่อลิตร | 16.4 | 23.1 | 0.25 | 0.46 | (Ezeji และคณะ, 2007) |
| | <i>C. saccharoperbutyl acetonicum</i> | N1-4 | 48 | แป้งมันสำปะหลัง 48.5 กรัมต่อลิตร | 16.9 | 21.0 | 0.33 | 0.35 | (Thang และคณะ, 2010) |

ตารางที่ 2.6 แสดงความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักจากสารตั้งต้นประเภทผลซีวภาพ (ลิกโนเซลลูโลสิก)

| แหล่ง คาร์บอน | จุลินทรีย์ | ชนิด | เวลา (ชม.) | สารตั้งต้น | บิวทานอล (g/L) | ABE (g/L) | ผลได้ของ การผลิต (g/g) | อัตราการ ผลิต (g/L/h) | ที่มา |
|------------------|--------------------------|-------|---------------|---|-------------------|--------------|------------------------------|-----------------------------|--|
| น้ำตาล | <i>C. beijerinckii</i> | P260 | 42 | ฟางข้าวสาลี 86 กรัมต่อลิตร (น้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร) | 12.0 | 25.0 | 0.20 | 0.29 | (Qureshi และคณะ, 2007) |
| ซีวภาพ | <i>C. beijerinckii</i> | BA101 | 88 | เต้าน้ำข้าวโพด (น้ำตาล 23.6 กรัมต่อลิตร) | 6.4 | 9.3 | 0.27 | 0.07 | (Qureshi, Saha, และคณะ, 2008) |
| เซลลู โลสิก) | <i>C. acetobutylicum</i> | JB200 | 40 | มันสำปะหลัง ซานออย (กลูโคส 4.8 กรัม ต่อลิตร) | 9.71 | 15.4 | 0.22 | 0.24 | (Lu และคณะ, 2012) |
| | <i>C. beijerinckii</i> | P260 | 68 | ฟางข้าวบาร์เลย์ (น้ำตาล 63.4 กรัมต่อลิตร) | 18.0 | 26.6 | 0.29 | 0.26 | (Qureshi, Saha, Dien, และ คณะ, 2010b) |
| | <i>C. beijerinckii</i> | P260 | 96 | ซังข้าวโพด (น้ำตาล 37.3 กรัมต่อลิตร) | 10.4 | 16.0 | 0.28 | 0.11 | (Qureshi, Saha, Dien, และ คณะ, 2010b) |
| | <i>C. beijerinckii</i> | P260 | 85 | หญ้าสุวิสต์ | 14.5 | 26.3 | – | 0.17 | (Qureshi, Saha, Dien, และ คณะ, 2010b) |

และคณะ, 2010b)

(Qureshi, Saha, Hector,

คณะ, 2010b)

(Qureshi, Saha, Dien, และ

คณะ, 2010b)

(Qureshi, Saha, Dien, และ

คณะ, 2010b)

(Lu และคณะ, 2012)

2008)

(Qureshi, Saha, และคณะ,

2008)

(Qureshi, Saha, และคณะ,

2007)

(Qureshi, Saha, และคณะ,

2008)

(Qureshi, Saha, และคณะ,

2008)

(Qureshi, Saha, และคณะ,

2008)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

| | |
|---|--|
| Anaerobic chamber | ขวดแก้ว จุกยาง และคลิมเปอร์ |
| Anaerobic jar | จานเลี้ยงเชื้อ |
| Hot plate | ชั้นตัดกสาร |
| Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร | ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส |
| pH meter | ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส |
| Slide and cover glass | ตู้เชื้อแบบ Laminar flow |
| spectrophotometer | ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส |
| Tip พร้อมกล่อง | ตู้ดูดควัน |
| เข็มฉีดยา | ตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส |
| เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) | ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave) |
| เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) | ตะเกียงแอลกอฮอล์ |
| แท่งแก้วคน, glass spreader | ถุงมือยาง |
| ไมโครปิเปตต์ (P ₂ , P ₂₀ , P ₂₀₀ , และ P ₁₀₀₀) | ปีกเกอร์ |
| กระดาษชำระ | ปิเปตต์ ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร |
| กระบอบกตวง | ลูป (loop) |
| กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) | เข็มเย็บ (needle) |
| ถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 2 ลิตร | สำลี |
| ขวดเก็บตัวอย่าง | หลอดหยดสาร |
| ตู้ Laminar flow | หลอด Falcon ขนาด 15 มิลลิลิตร |
| Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) | อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) |
| Column Chromatography (Agilent, USA) | อลูมิเนียมฟอยล์ |
| ขวด Pyrex | Spectrophotometer (Biotek, USA) |

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

| | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Acetic acid | Magnesium sulfate |
| Agar | PABA (4-aminobenzoic acid) |
| Ammonia | Peptone from casein |
| Biotin | Peptone from meat |
| Calcium carbonate | Potassium dihydrogen phosphate |
| Cysteine | Potassium hydrogen phosphate |
| D(+)-glucose | Resazurin |
| Ferric (III) ammonium citrate | Sodium acetate |
| Ferrous sulfate | Sodium chloride |
| L-Cystenium chloride | Sodium sulfite x 7H ₂ O |
| Meat extract | Starch |
| D-glucose | Yeast extract |
| D-fructose | D-xylose |
| D-arabinose | D-mannose |
| Sucrose | |

- สารเคมีในขั้นตอนอื่น ๆ

| | |
|------------------------|-------------------------|
| 3% Potassium hydroxide | 99.99% Ethanol |
| 5% Malachite green | Butanol |
| 70% Ethanol | Acetone |
| 95% Ethanol | Butyric acid |
| 6 N Hydrochloric acid | Dinitrosalicylic acid |
| Acetic acid | Sodium sulfite |
| Sodium hydroxide | Sulfuric silver sulfate |

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการผลิตไบโอบิวทานอลของ *Clostridium beijerinckii* CG1 ที่คัดเลือกได้จากหน่วยวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ

3.1.1 เลี้ยงแบคทีเรียในภาวะไร้อากาศ และเพิ่มจำนวนแบคทีเรียด้วยอาหาร MS media สูตรดัดแปลง (Virunanon และคณะ, 2008) ในขวด serum bottle ขนาด 50 มิลลิลิตร ในน้ำตาลเฮกไซส 3 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุคโทส แมนโนส น้ำตาลเพนโทส 2 ชนิดคือ อะราบิโนส ซิโลส และในน้ำตาลโมเลกุลคู่ 2 ชนิด คือ ซูโครสและแลคโทสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

3.1.2 เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมงที่เวลา 0 24 48 72 96 120 และ 144 ชั่วโมงของการหมักเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของ acetone, butanol, ethanol, acetic acid และ butyric acid ที่เกิดขึ้นจากการหมัก ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) และ วัดค่าการเจริญเติบโตที่ภายใต้ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร และตรวจปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic method เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิด (ภาคผนวก ข.)

3.2 หาภาวะที่เหมาะสมของการใช้ *C. beijerinckii* CG1 ในการผลิตบิวทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่สูงในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำหลังลงเชื้อ คือ เต็มแก๊สไนโตรเจน 99.995% จนค่า Dissolved oxygen เป็น 0 แล้วเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงที่เวลา 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมงของการหมักในทุกปัจจัย แล้วนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักด้วย เครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) และ วัดค่าการเจริญเติบโตที่ภายใต้ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร และตรวจปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic method โดยทำเหมือนกันในทุกปัจจัย

3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหาร MS media สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในแต่ละถังหมัก โดยใช้ ความเร็วใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 อุณหภูมิในการหมักที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก และลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% ของปริมาตรใช้งาน (พรพนธิภา ส่งเสริมพานิช, 2554)

3.2.2 ศึกษาความเร็วใบพัดที่เหมาะสมในการการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหาร MS media สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นที่สามารถผลิตไบโอแอลกอฮอล์ได้ความเข้มข้นสูงสุด (ข้อ 3.2.1) โดยใช้ ความเร็วใบพัดที่ 100 120 140 160 และ 180 รอบต่อนาทีตามลำดับ ในแต่ละถังหมัก ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 อุณหภูมิในการหมักที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก และลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% ของปริมาตรใช้งาน

3.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหาร MS media สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นที่สามารถผลิตไบโอแอลกอฮอล์ได้ความเข้มข้นสูงสุด (ข้อ 3.2.1) โดยใช้ ความเร็วใบพัดที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.2) ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 อุณหภูมิในการหมักที่ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับในแต่ละถังหมัก ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก และลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% ของปริมาตรใช้งาน

3.2.4 ศึกษาปริมาตรใช้งานที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหาร MS media สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นที่สามารถผลิตไบโอแอลกอฮอล์ได้ความเข้มข้นสูงสุด (ข้อ 3.2.1) โดยใช้ ความเร็วใบพัดที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.2) ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 อุณหภูมิในการหมักที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.3) ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 30 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรถังหมักตามลำดับในแต่ละถังหมัก โดยลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% ของปริมาตรใช้งาน

3.2.5 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหาร MS media สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นที่สามารถผลิตไบโอแอลกอฮอล์ได้ความเข้มข้นสูงที่สุด (ข้อ 3.2.1) โดยใช้ ความเร็วใบพัดที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.2) ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 อุณหภูมิในการหมักที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.3) ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.4) โดยลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 5 10 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรใช้งานตามลำดับในแต่ละถังหมัก

3.2.6 ศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหาร MS media สูตรดัดแปลง โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นที่สามารถผลิตไบโอแอลกอฮอล์ได้ความเข้มข้นสูงที่สุด (ข้อ 3.2.1) โดยใช้ ความเร็วใบพัดที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.2) ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 5.5 6 6.5 และ 7 ตามลำดับในแต่ละถังหมัก อุณหภูมิในการหมักที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.3) ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.4) โดยลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.5)

3.2.7 นำภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1-3.2.6 มาใช้กับอาหารที่เป็นน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล และ โรงงานน้ำตาลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.3 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียโรงงานน้ำตาลและโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลในถังหมัก 5 ลิตรโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2

3.3.1 เก็บตัวอย่างน้ำเสียโรงงานน้ำตาลและโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล

เก็บน้ำเสียด้วยวิธีจุ่มตัก โดยน้ำเสียโรงงานน้ำตาลจะเก็บที่น้ำเสียบ่อรวมก่อนที่จะนำไปบำบัด และน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอลจะเก็บน้ำส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบที่เครื่อง decanter โดยน้ำเสียทั้ง 2 ชนิดถูกบรรจุในแกลลอนที่บิวทานอล 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1.1 วิเคราะห์ค่าไบโอเคมีคอล ออกซิเจน ดีมานด์: บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand: BOD) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

ด้วยวิธี Azide Modification: Standard Methods for The Examination of water and waste water (APHA, AWWA, WEF 21st Edition 2005, Part5210B.) โดยบริษัท Environment & Laboratory Co.,Ltd. ประเทศไทย

3.3.1.2 วิเคราะห์ค่า เคมีคอล ออกซิเจน ดีมาน: ซีไอดี (Chemical Oxygen Demand: COD)

นำน้ำเสียมาส่งวิเคราะห์ค่าซีไอดี ในหน่วยกรัมต่อลิตรด้วยกระบวนการ close reflux colorimetric method โดยบีเปิดตัวอย่างน้ำเสียมา 10 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วที่มีฝาปิด เติมสารละลายย่อยสลายสารอินทรีย์ 6 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกซิลเวอร์ซัลเฟต 14 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วรอให้สารละลายอุณหภูมิลดลงที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมกับเทียบค่าหาค่า ซีไอดีจากกราฟมาตรฐาน (LaPara และคณะ, 2000)

3.3.1.3 วิเคราะห์ค่าปริมาณของแข็งแขวนลอย (Suspended Solids: SS) และของแข็งที่ละลายน้ำ Total Dissolved Solid (TDS)

อบกระดาษกรองและภาชนะกรองน้ำเสียจนน้ำระเหยออกหมดแล้วชั่งน้ำหนักจุดบันทึกค่า จากนั้นกรองน้ำเสียผ่านกระดาษกรองและภาชนะกรองน้ำเสียที่ผ่านการอบแล้ว นำกระดาษกรองที่กรองน้ำเสียและภาชนะกรองไปอบเพื่อระเหยน้ำแล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจุดบันทึกค่า (instrument, 2008; Murphy, 2008; Sawyer, 1967)

ปริมาณของแข็งแขวนลอย = $\frac{\text{น้ำหนักกระดาษหลังกรอง} - \text{น้ำหนักกระดาษก่อนกรอง}}{\text{ปริมาตรน้ำเสีย}}$
(มิลลิกรัมต่อลิตร)

ปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ = $\frac{\text{น้ำหนักภาชนะหลังกรอง} - \text{น้ำหนักภาชนะก่อนกรอง}}{\text{ปริมาตรน้ำเสีย}}$
(มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.3.1.4 วัดค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิของน้ำเสีย

3.3.1.5 วัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS (Dinitrosalicylic Acid Method) (ดัดแปลงจาก (Miller, 1959)) และ วัดปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (Shimadzu, Japan)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ด้วยวิธี DNS โดยปิเปตตัวอย่างน้ำเสียมา 50 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลาย DNS มา 450 ไมโครลิตร ไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในหน่วยกรัมต่อลิตรจากกราฟมาตรฐาน

วัดปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง(High-performance liquid chromatography: HPLC) (Shimadzu LC-20A, Japan) โดยใช้ mobile phase สาร A เป็นแอสีโทไนไตรท์ (acetonitrile) สาร B เป็นน้ำกลั่น HPLC grade อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยผ่านคอลัมน์ Inertsil NH₂ (5 µm, 250x4.6 mm) และใช้ตัวตรวจจับเป็น ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) ข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จะคำนวณออกมาเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสีย

3.4.1 เตรียมหัวเชื้อในการลงถังหมัก 5 ลิตรในขวดเก็บมีเดีย (Duran bottle) ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1-1.2

3.4.2 นำหัวเชื้อที่ได้มาหมักโดยใช้ภาวะไร้อากาศในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ น้ำเสีย โรงงานน้ำตาลและโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูโลสจากเอทานอลเป็นสารตั้งต้นแล้วนำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากโรงงานทั้งสองแห่ง ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง รวมเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยใช้ภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการผลิตไบโอบิวทานอลของ *C. beijerinckii* CG1

การทดสอบความสามารถการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เป็นแหล่งในคาร์บอนในการผลิตบิวทานอล และเอทานอลนั้น ได้ทำการทดสอบในน้ำตาล 2 กลุ่ม คือ

1. น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide):

- คาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส และ น้ำตาลแมนโนส
- คาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลไซโลส และ น้ำตาลอะราบิโนส

2. น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide)

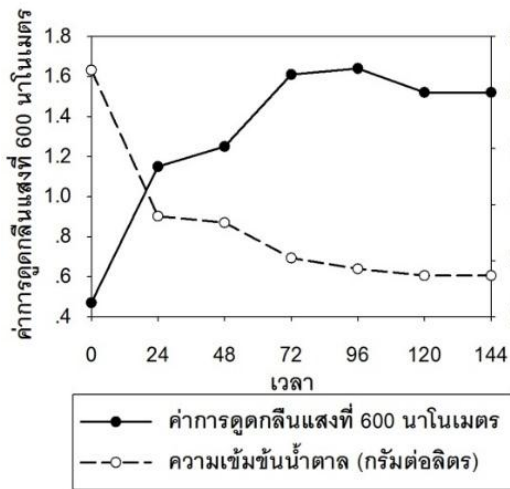
- คาร์บอน 12 อะตอม ได้แก่ น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแลกโทส

ผลการทดสอบในน้ำตาลทั้งหมด 7 ชนิด พบว่า เชื้อ *C. beijerinckii* CG1 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ทั้งหมด 7 ชนิดที่ทดสอบ โดยน้ำตาลที่เชื้อมีความสามารถใช้ในการผลิตเอทานอลและบิวทานอลได้มากที่สุด คือ น้ำตาลแมนโนส (บิวทานอล 3.5 กรัมต่อลิตร, เอทานอล 1.69 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม น้ำตาลที่ให้ผลผลิตการหมักเอทานอลและบิวทานอลรองลงมาได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโทส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลไซโลส และ น้ำตาลแลกโทส ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าน้ำตาล 3 อันดับแรกที่เขื่อนำไปใช้แล้วผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดและน้ำตาลถูกใช้ไปเกิน 95% นั้น เป็นกลุ่มน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (รูปที่ 4.1 - 4.7)

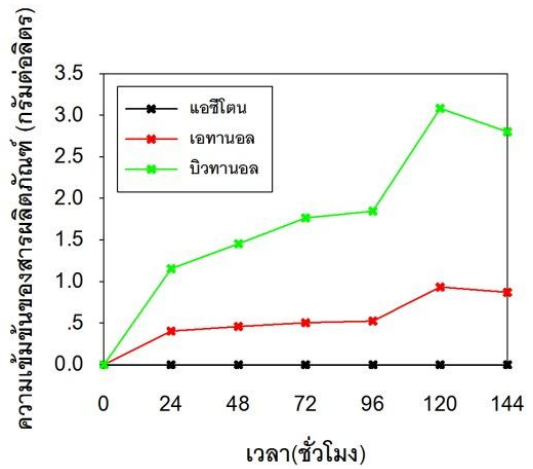
จากผลการทดสอบ จะเห็นได้ว่า *C. beijerinckii* CG1 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย โดยจากผลการศึกษาพบว่าสามารถใช้แหล่งน้ำตาลได้ทั้ง น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 5 และ 6 อะตอมเป็นองค์ประกอบได้รวมถึงน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารละลายเอทานอลและบิวทานอลได้ ซึ่งสรุปเปรียบเทียบไว้ในรูปที่ 4.8 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้เชื้อจะใช้น้ำตาลได้ทุกชนิดแต่ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลและบิวทานอลแตกต่างกัน โดยเชื้อตัวนี้มีความสามารถใช้น้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 6 อะตอมในการผลิตบิวทานอลได้ดีที่สุด คือ แมนโนสผลิตบิวทานอลได้ 3.50 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ กลูโคสผลิตบิวทานอลได้ 3.20 กรัมต่อ

ลิตร และ ฟรุกโทสผลิตบิวทานอลได้ 3.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่น้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 5 อะตอมและ 12 อะตอม เพื่อมีความสามารถในการนำเอาไปผลิตบิวทานอลได้ต่ำกว่าน้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 6 อะตอม โดยได้ความเข้มข้นของบิวทานอล ดังนี้ อะราบิโนสผลิตบิวทานอลได้ 3.08 กรัมต่อลิตร ซูโครสผลิตบิวทานอลได้ 2.00 กรัมต่อลิตร แลกโทสผลิตบิวทานอลได้ 1.62 กรัมต่อลิตร และ ไฮโลสผลิตบิวทานอลได้ 1.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นว่า เชื้อ *C. beijerinckii* CG1 ใช้น้ำตาลกลุ่มคาร์บอน 6 อะตอมได้ดีที่สุด โดยเฉพาะน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบแหล่งที่พบน้ำตาลทั้งสองในธรรมชาติแล้วพบว่า น้ำตาลแมนโนสนั้นเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในผักผลไม้จำพวกตระกูลเบอร์รี่และมะพร้าว ในปัจจุบันราคากลางในประเทศไทยของผลไม้กลุ่มนี้มีราคาแพง นอกจากนี้น้ำตาลแมนโนสที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปแบบของน้ำตาลโมเลกุลคู่ ไม่ใช่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคแมนแนน (glucomannan) กาแลกโทแมนแนน (galactomannan) ขณะที่น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสนั้นมีอยู่ทั่วไปในผลไม้ชนิดต่าง ๆ และยังคงอยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ในเรื่องของแหล่งที่พบน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแมนโนสในธรรมชาติแล้ว จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลและเอทานอลจะหาได้ง่ายกว่าในธรรมชาติและเมื่อเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของบิวทานอลและเอทานอลจากการใช้น้ำตาลกลูโคสและแมนโนสยังได้ผลผลิตใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเลือกใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลและเอทานอลจึงน่าจะมีความเหมาะสมกว่า นอกจากนี้ จากผลของกลุ่มน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม จะเห็นได้ว่าน้ำตาลอะราบิโนสได้ผลการผลิตบิวทานอลและเอทานอลใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส ซึ่งคุณสมบัตินี้นั้นเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีว่า *C. beijerinckii* CG1 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมได้ดี ซึ่งทั้งอะราบิโนสและไฮโลสนั้นเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในวัสดุคูลิกโนเซลลูโลสิกเช่นกัน อีกทั้งการที่เชื้อตัวนี้มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายนั้นทำให้ง่ายต่อการนำมาประยุกต์ใช้กับของเสียและน้ำเสียประเภทต่าง ๆ ได้หลากหลายยิ่งขึ้นเพื่อช่วยเพิ่มมูลค่ากับน้ำเสีย และยังเป็นการช่วยลดสารอาหารในน้ำเสียเบื้องต้นได้ขั้นตอนหนึ่ง

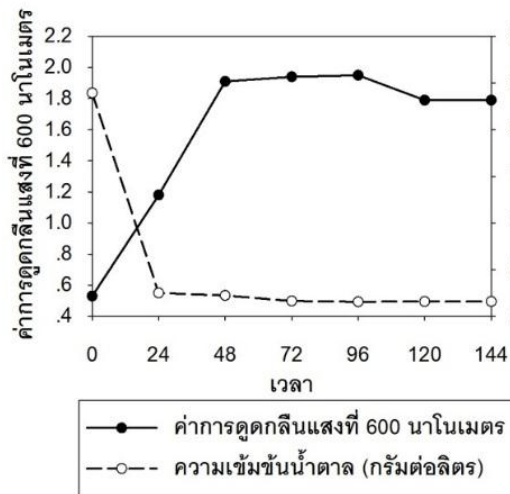


(ก.)

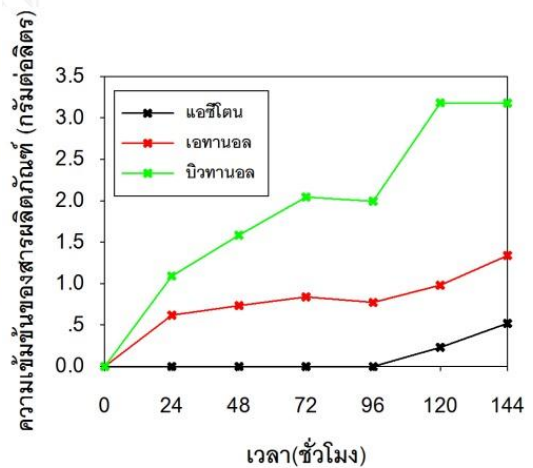


(ข.)

รูปที่ 4.1 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย *C.beijerinckii* CG1 โดยใช้น้ำตาลอะราบิโนส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

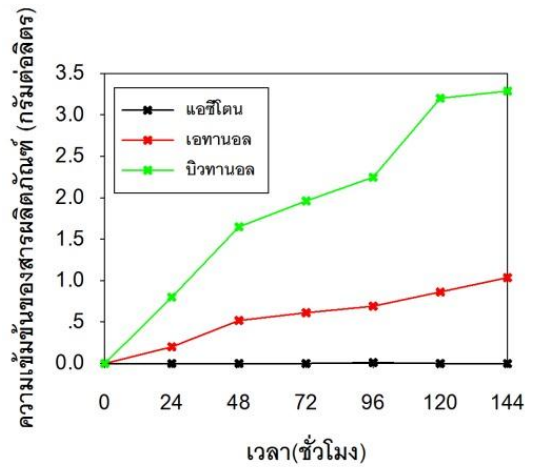
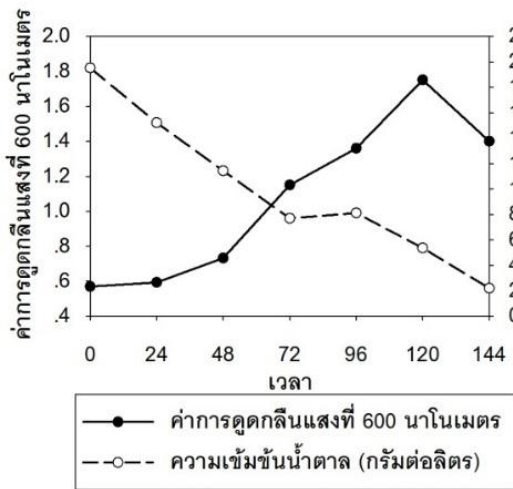


(ก.)



(ข.)

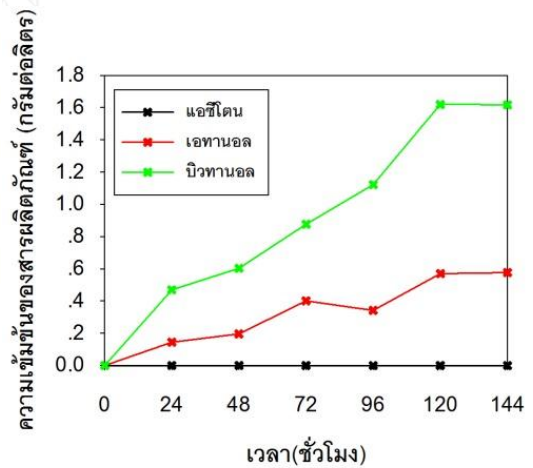
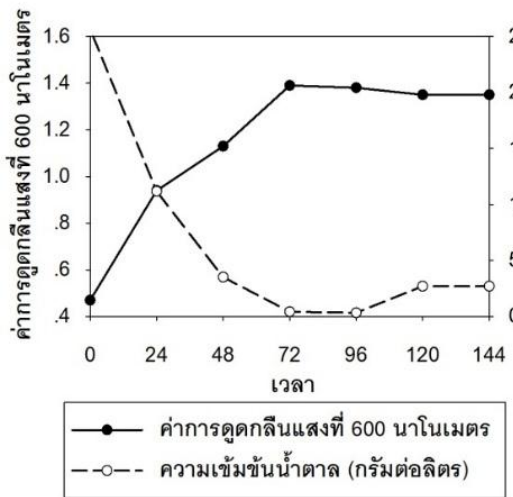
รูปที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย *C. beijerinckii* CG1 โดยใช้น้ำตาลฟรุกโทส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



(ก.)

(ข.)

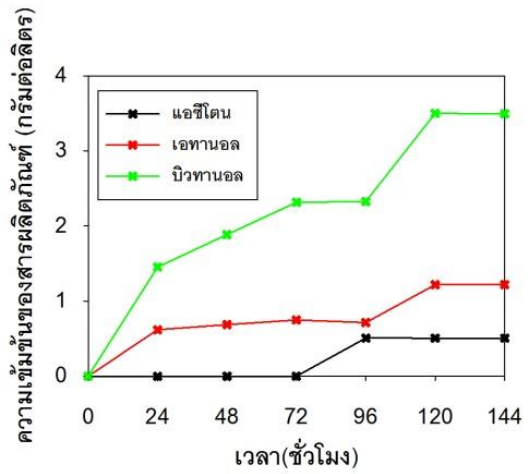
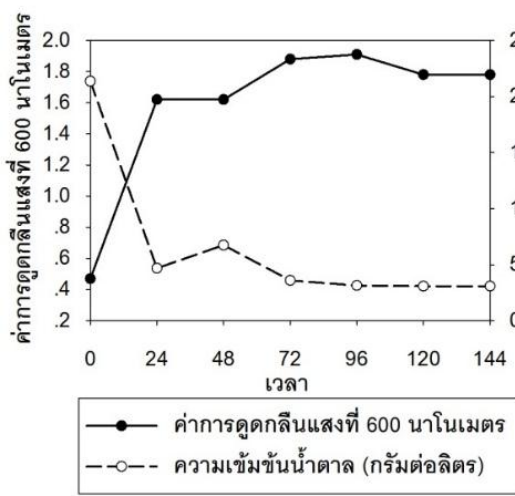
รูปที่ 4.3 ผลลัพธ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย C.beijerinckii CG1 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



(ก.)

(ข.)

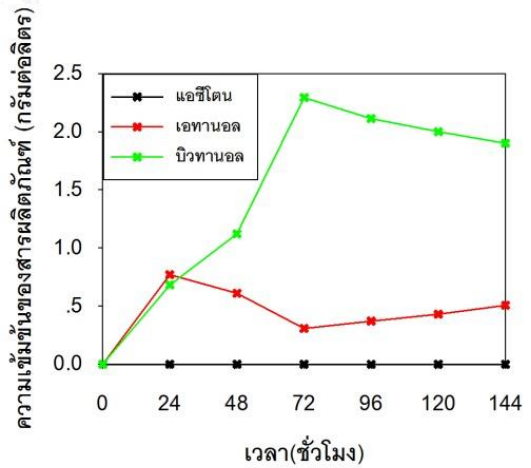
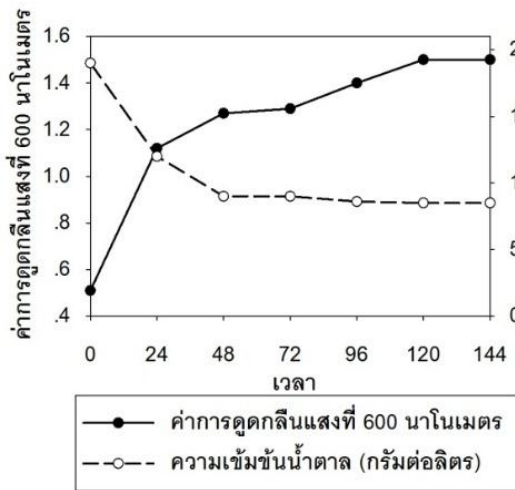
รูปที่ 4.4 ผลลัพธ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย C.beijerinckii CG1 โดยใช้น้ำตาลแลกโทส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



(ก.)

(ข.)

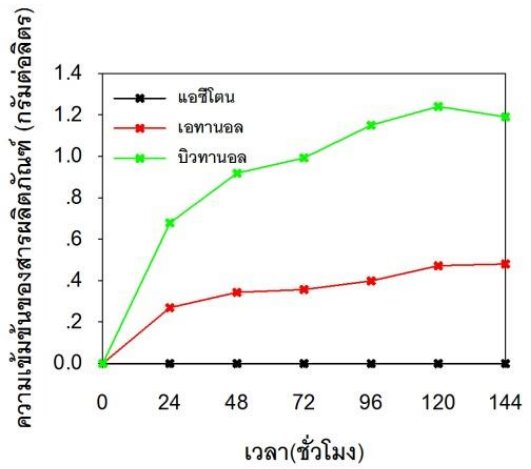
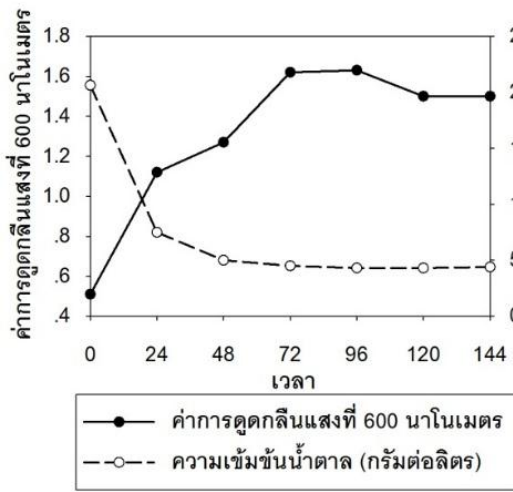
รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย *C.beijerinckii* CG1 โดยใช้น้ำตาลแมนโนส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



(ก.)

(ข.)

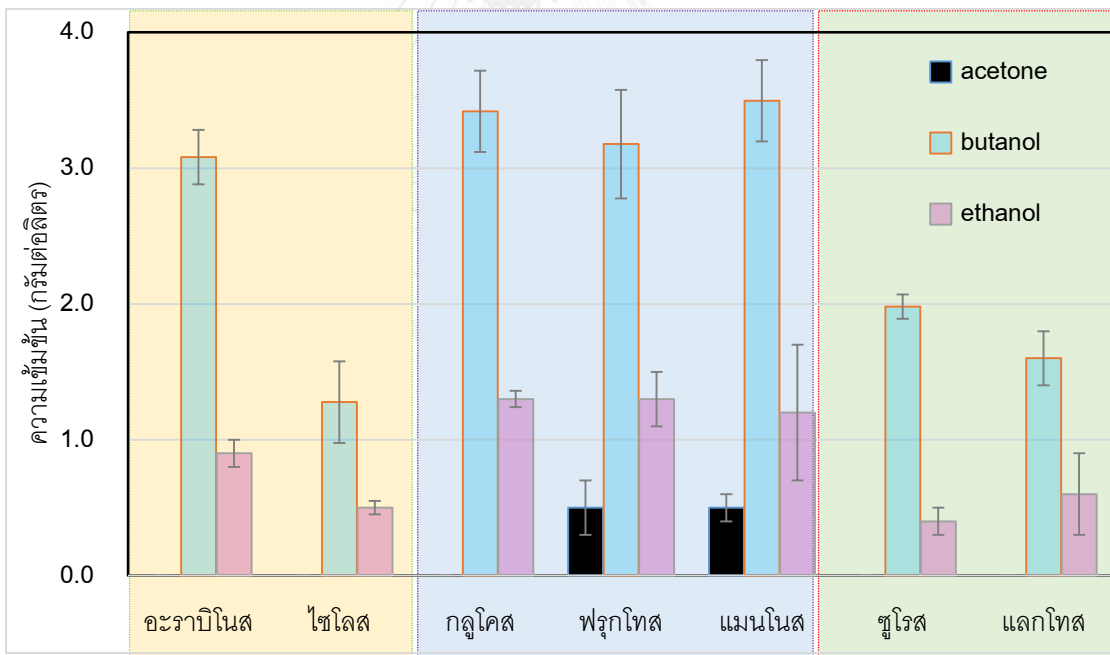
รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย *C.beijerinckii* CG1 โดยใช้น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



(ก.)

(ข.)

รูปที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ ABE ที่ได้จากการหมักด้วย *C. beijerinckii* CG1 โดยใช้น้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ แอซีโตน เอทานอล และบิวทานอล ที่เวลา 120 ชั่วโมง จากการหมักด้วย *C. beijerinckii* CG1 ในน้ำตาลต่างๆ

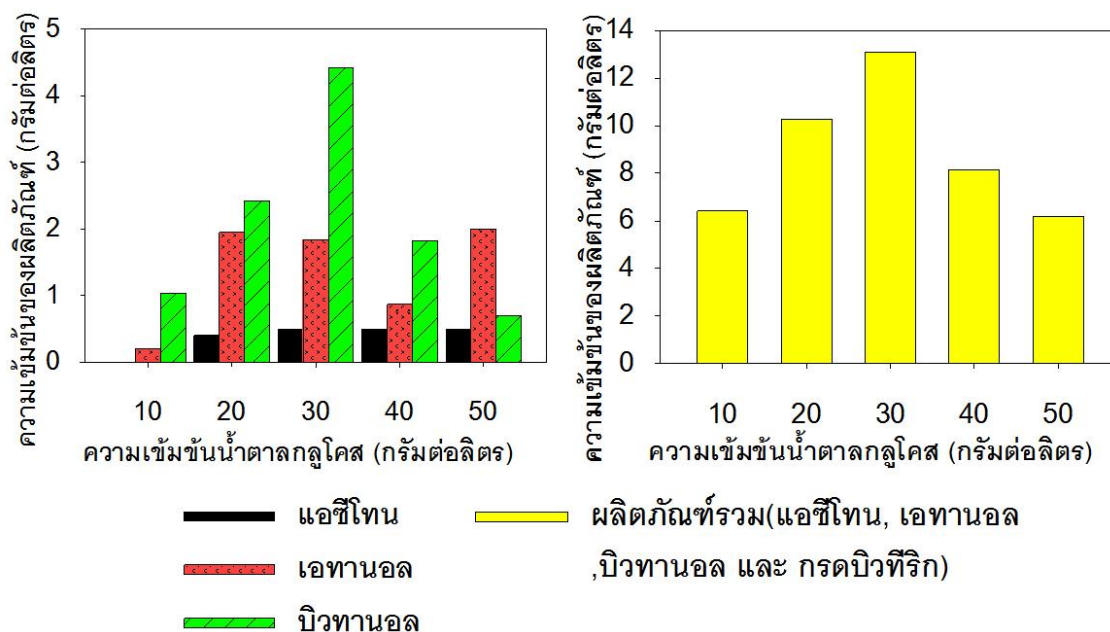
4.2 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการใช้ *C. beijerinckii* CG1 ในการผลิตบิวทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่สูงในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ในการหาภาวะที่เหมาะสมของการใช้ *C. beijerinckii* CG1 ในการผลิตบิวทานอลนั้น ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 6 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล อุณหภูมิ ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย ความเร็วใบพัด ปริมาตรใช้งาน และ ค่าความเป็นกรดต่าง โดยในการศึกษาจะใช้ผลที่ดีที่สุดของการศึกษาในปัจจัยที่ศึกษาก่อนหน้า ไปเรื่อย ๆ จนจบทั้ง 6 ปัจจัย แล้วบันทึกผลทั้ง 6 ปัจจัยมาวิเคราะห์วิจารณ์ผลการศึกษา

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

ในการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมนั้น ได้ทำการศึกษาในความเข้มข้นน้ำตาล 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ ปัจจัยอื่นใช้ ความเร็วใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 อุณหภูมิในการหมักที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก และลดปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ 10% ของปริมาตรใช้งาน ผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุด คือ 4.42 กรัมต่อลิตร และผลิตภัณฑ์รวม 13.09 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อคำนวณค่าผลได้ของการผลิต 0.14 กรัมต่อกรัมวัตถุดิบ (รูปที่ 4.9)

จากผลการทดลองของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ 40 และ 50 กรัมต่อลิตรนั้นได้ปริมาณของผลิตภัณฑ์รวมที่น้อยกว่าการใช้น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น ซึ่งเมื่อดูการใช้ น้ำตาลของเชื้อขณะทดลองแล้ว พบว่าเชื้อใช้น้ำตาลได้เพียง 35.0 -35.3 กรัมต่อลิตรเท่านั้น และช่วงเวลาที่อัตราความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงลดลงมากที่สุดคือช่วงเวลา 48 – 72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ พรรณธิภา (2551) ได้ใช้เชื้อ *C. beijerinckii* CG1 ในการผลิตเอทานอลและบิวทานอล โดยใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น พบว่าเชื้อใช้น้ำตาลไปเพียง 32 กรัมต่อลิตรเท่านั้น นอกจากนี้ จากการรายงานของ Galadimaa และคณะ (2012) พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเชื้อคลอสทริเดียมแต่ละชนิดมาก หากความเข้มข้นน้ำตาลต่ำเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ แต่หากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไป จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเช่นกัน และเมื่อเชื้อถูกการยับยั้งการเจริญก็จะมีผลต่อการผลิตเอทานอลและบิวทานอลได้ต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้



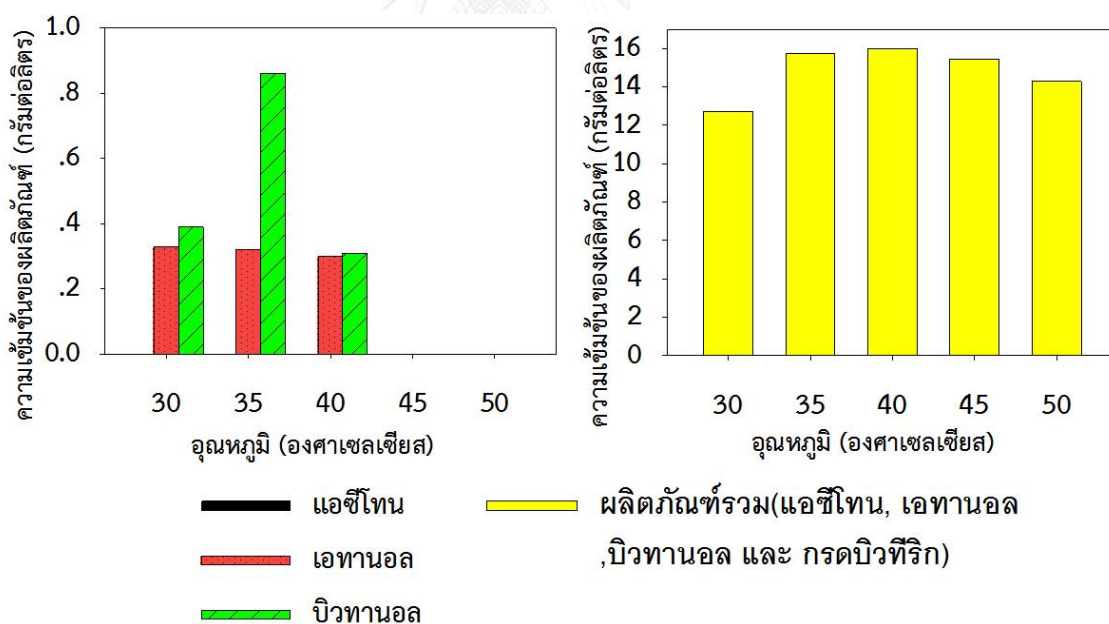
รูปที่ 4. 9 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น ได้ทำการศึกษาที่ได้จากข้อ 4.2.1 อุณหภูมิ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส และได้ใช้ความเข้มข้นน้ำตาล ที่ 30 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปัจจัยอื่นใช้ความเร็วใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 ใสอาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก และลงปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% ของปริมาตรใช้งาน พบว่าจากการศึกษา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลิตภัณฑ์รวมสูงที่สุด คือ 16.01 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ ถัดลงมา คือ 35 45 50 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสมีค่าผลิตภัณฑ์รวม ต่างกันเพียง 0.35 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์บิวทานอลที่เกิดขึ้นแล้วพบว่า ในอุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของบิวทานอลเป็น 0.86 และ 0.31 ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) ซึ่งจะเห็นว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของบิวทานอลที่สูงกว่า ดังนั้นผลการการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล คือ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากผลการทดลองที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียสจะเห็นว่าเชื้อไม่มีการสร้างเอทานอลและบิวทานอล แต่เข้าสู่วิถีการสร้างกรด โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เชื้อมีการสร้างเอทานอลและบิวทานอล แต่ที่อุณหภูมิ 45-50 เชื้อนั้นไม่มี

การสร้างแอลกอฮอล์ โดยเชื้อจะเข้าสู่วิธีการสร้างกรด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Madi และคณะ (1987) ได้กล่าวไว้ว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการสร้างผลิตภัณฑ์ของคลอสทริเดียม โดยพบว่าเชื้อคลอสทริเดียมส่วนใหญ่จะสร้างไบโอแอลกอฮอล์ได้ดีในช่วงอุณหภูมิใกล้เคียงกับ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการใช้เชื้อ *C. beijerinckii* CG1 นั้นสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ นอกจากนี้จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อมีความสามารถในการเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการประยุกต์ใช้เชื้อในระบบอุตสาหกรรม เนื่องจากน้ำในระบบอุตสาหกรรมนั้นมักจะมีอุณหภูมิที่สูง ตัวอย่างเช่น การใช้ฮีตปั๊มในสถานประกอบการขนาดกลาง น้ำที่ออกจากระบบจะมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส แต่ในระบบอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ดังเช่นอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและอุตสาหกรรมการผลิตเอโนไซม์จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 60-90 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับขนาดแท่งค้ำ โดยอุณหภูมิของน้ำในระบบจะลดลงระหว่างขนส่งทางท่อ เมื่อเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย อุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 45-65 องศาเซลเซียส (Oliveira และคณะ, 2007; Pandey และคณะ, 1999) ซึ่งจุดนี้ถือเป็นข้อได้เปรียบในการประยุกต์การใช้งานของเชื้อ

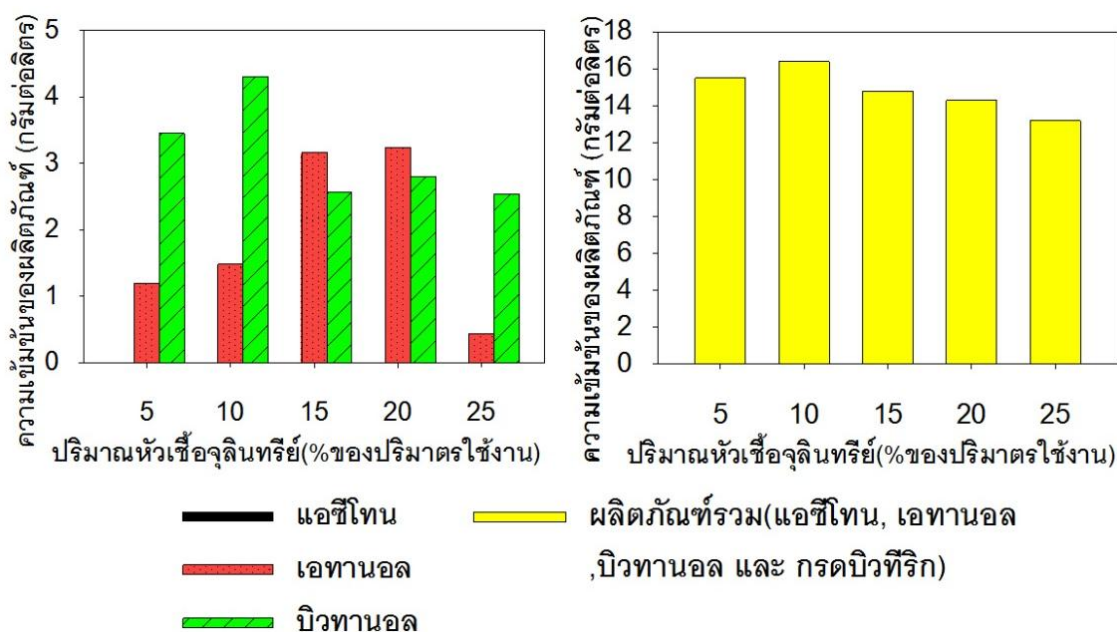


รูปที่ 4.10 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

4.2.3 ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

การศึกษ ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมได้ทำการศึกษา ที่ปริมาณหัวเชื้อ 5% 10% 15% 20% และ 25% ของปริมาตรใช้งาน ซึ่งใช้ความเข้มข้นน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นผลที่ได้จากข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ปัจจัยอื่นที่ใช้ ความเร็วใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 ใส่อาหารและเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก พบว่า ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รวมที่มากที่สุด คือ ถังที่ใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตรซึ่งได้ผลสอดคล้องกับความเข้มข้นของบิวทานอลซึ่งมีความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตร เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองเมื่อสังเกตผลิตภัณฑ์เอทานอล เมื่อใส่ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่ 15 % และ 20 % ของปริมาตรใช้งาน จะเห็นได้ว่าเชื้อมีการสร้างเอทานอลมากกว่าบิวทานอล ในขณะที่เมื่อใส่ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่ 25 % กลับได้อัตราส่วนของเอทานอลต่ำกว่าบิวทานอล โดยเมื่อเปรียบเทียบผลจากทดลองในข้อ 4.2.1-4.2.2 จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของบิวทานอลจะสูงกว่าเอทานอล (รูปที่ 4.11) และเมื่อเปรียบเทียบจากการรายงานการศึกษานอื่น มักจะใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10-15% โดยปริมาตร จะได้อัตราส่วนของบิวทานอลที่สูงกว่าเอทานอลทั้งสิ้น (Green, 2011; Jang และคณะ, 2012; Lee และคณะ, 2008; Liu และคณะ, 2010; Madihah และคณะ, 2001; Qureshi และคณะ, 2008b) จึงอาจสรุปจากการศึกษาครั้งนี้ได้ว่า ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลต่อการสร้างเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นได้

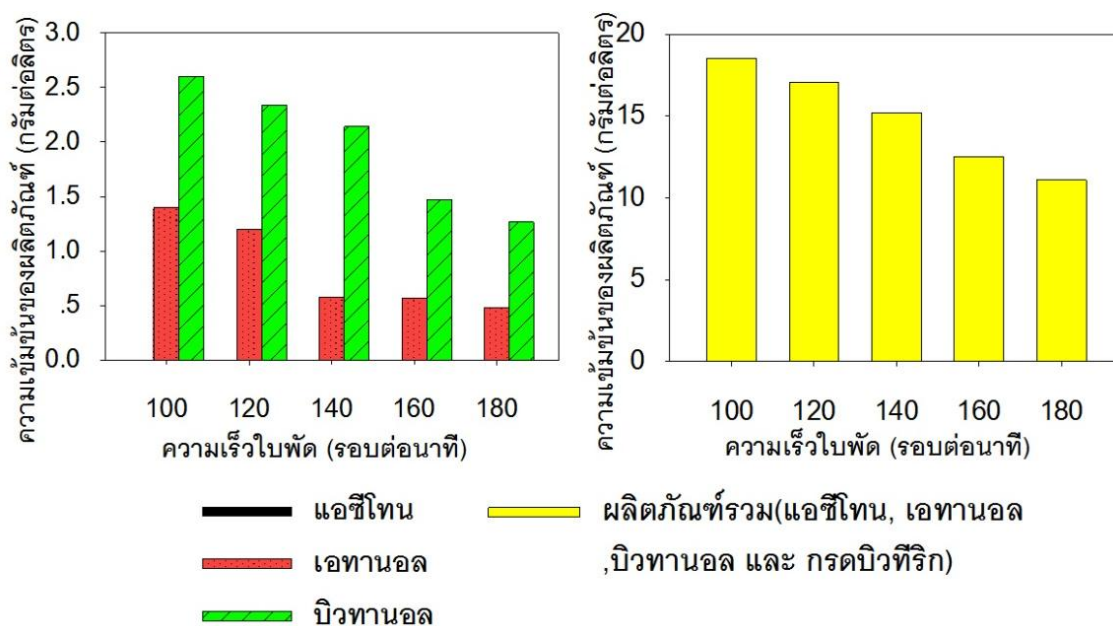


รูปที่ 4.11 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

4.2.4 ผลการศึกษาความเร็วใบพัดที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

ความเร็วใบพัดที่ใช้ในการศึกษา คือ 100 120 140 160 และ 180 รอบต่อนาที โดยได้ใช้ผลการศึกษาจากข้อ 4.2.1 - 4.2.3 คือ ความเข้มข้นน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตร ส่วนปัจจัยอื่นที่ยังไม่ได้ศึกษา ยังคงใช้ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6 และ เลี้ยงเชื้อในปริมาตร 50% ของถังหมัก จากผลการศึกษาพบว่า ที่ความเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาทีมีความเข้มข้นของบิวทานอล และผลิตภัณฑ์รวมสูงสุด คือ 2.6 และ 18.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ(รูปที่ 4.12)

ความเร็วใบพัดนั้นมีส่วนช่วยในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผสมอาหารและเชื้อให้เป็นอย่างดี ไม่ทำให้อาหารหรือเชื้อตกตะกอนที่ด้านล่างของถังหมักแต่ถ้าใช้ความเร็วใบพัดที่สูงเกินไปนั้นจะมีผลต่อการทำลายเซลล์ของเชื้อ และเป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน (Wang และคณะ, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ โดยจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ความเร็วใบพัดมากขึ้นความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จะต่ำลง โดยคาดว่าความเร็วใบพัดนั้นได้ทำลายเซลล์ของเชื้อ และความเร็วใบพัดที่สูงขึ้นนั้น ยังเป็นช่วยในการเพิ่มการละลายของออกซิเจนที่อยู่ในอาหารอีกด้วยซึ่งไม่เป็นผลดีต่อเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการใช้ความเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาทีจึงมีความเหมาะสมที่สุดต่อเชื้อ *C. beijerinckii* CG1

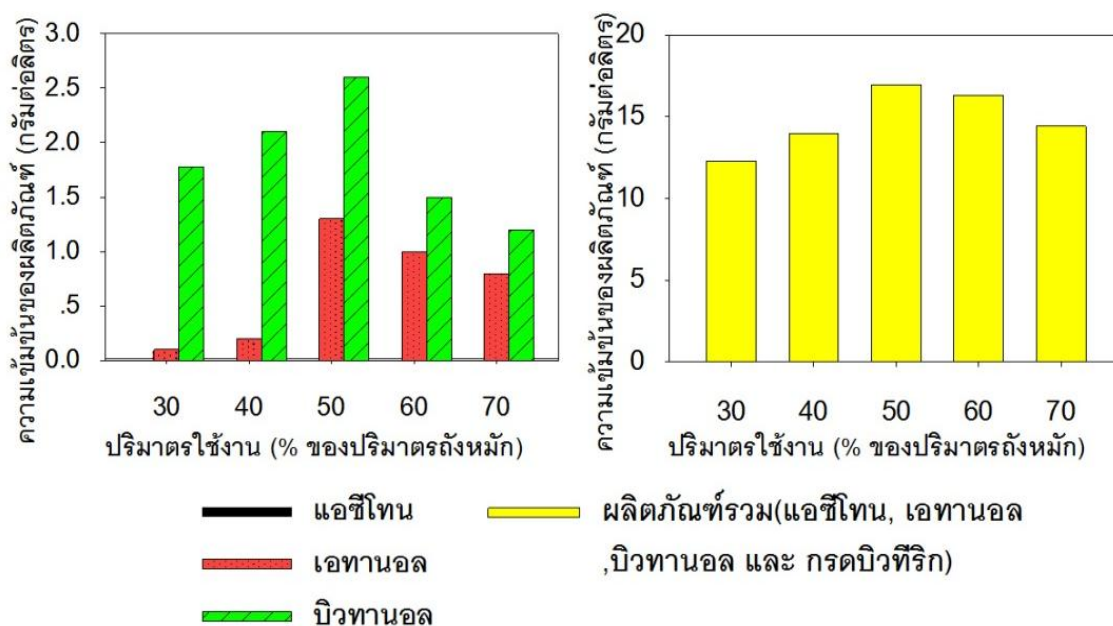


รูปที่ 4.12 แสดงผลิตภัณ์ที่ได้จากการศึกษาความเร็วใบพัดที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

4.2.5 ผลการศึกษาปริมาตรใช้งานที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

ในการศึกษาปริมาตรใช้งานที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล ได้ทำใน ปริมาตร 30% 40% 50% 60% และ 70% ของถังหมัก และได้ใช้ภาวะเหมาะสมที่ศึกษาได้ในข้อ 4.2.1-4.2.4 คือ ความเข้มข้นน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตร ที่ความเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาที ส่วนปัจจัยอื่นที่ยังไม่ได้ศึกษา ยังคงใช้ค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.0 จากการศึกษาพบว่า ถังหมักที่ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงที่สุดและผลิตภัณ์รวมสูงสุด คือถังที่ใช้ปริมาตรใช้งาน 50% ของถังหมัก โดยมีความเข้มข้น 2.6 และ 16.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.13)

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าปริมาตรใช้งานมีผลต่อการผลิตผลิตภัณ์ของเชื้อเช่นกัน เนื่องจากยิ่งปริมาตรใช้งานที่สูงจะทำให้แรงดันในถังหมักสูง และเมื่อเชื้อมีการเจริญจะปล่อยแก๊สเข้ามาในระบบจึงทำให้แรงดันยิ่งสูงขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรใช้งานที่ 60-70% ของปริมาตรถังหมัก กับ 30-40% ของปริมาตรถังหมัก แล้วจะพบว่าที่ปริมาตรใช้งานที่ 60-70% ของปริมาตรถังหมักจะมีการสร้างกรดและเอทานอลสูงกว่าการสร้างบิวทานอล แต่ในขณะที่ปริมาตรใช้งานที่ 30-40% ของปริมาตรถังหมัก จะมีการสร้างบิวทานอลสูงกว่าซึ่งจากผลการทดลองนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาใด ๆ อธิบายถึงเหตุผลนี้ เนื่องจากการใช้ปริมาตรใช้งานที่สูงมากในถังหมักนั้นจะมีการปั๊มของแก๊สและสารออกนอกกระบวนทำให้ปริมาตรและความเข้มข้นของสารในถังหมักลดลง (Nuanpeng และคณะ, 2011)



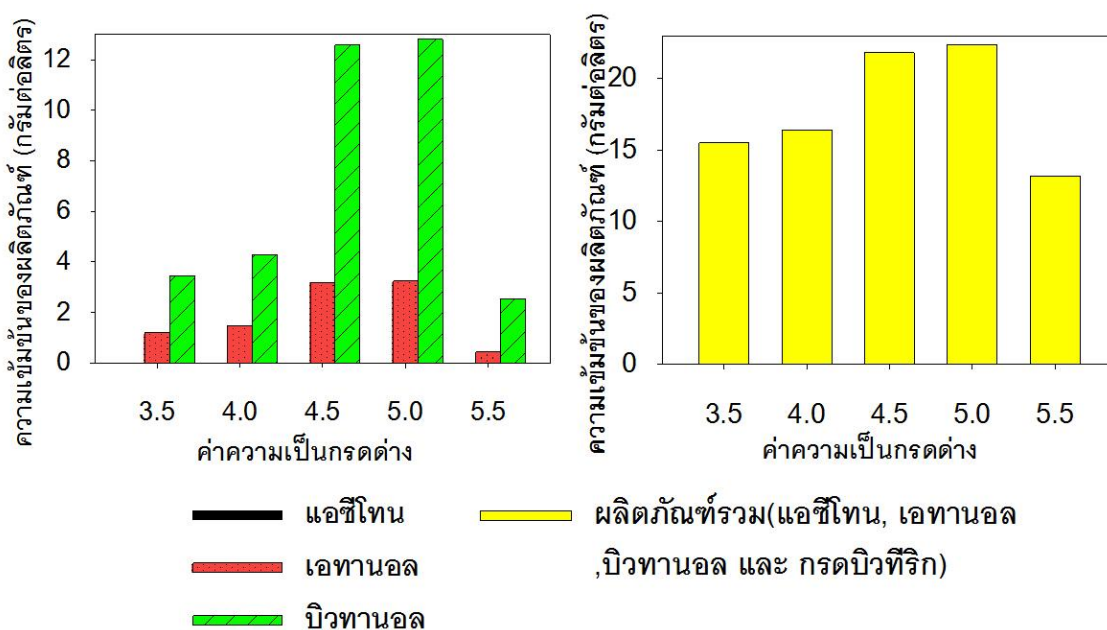
รูปที่ 4.13 แสดงผลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาปริมาณน้ำที่ใช้ที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

4.2.6 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง ได้ศึกษาในค่าความเป็นกรดต่างที่ 3.5 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 โดยใช้ภาวะเหมาะสมที่ศึกษาได้ในข้อ 4.2.1-4.2.5 คือ ความเข้มข้นน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตร ที่ความเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำที่ใช้ 50% ของถังหมัก ผลการศึกษาพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 4.5 และ 5.0 ได้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รวม 21.8 และ 22.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของบิวทานอล 12.6 และ 12.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับซึ่งจะเห็นว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างทั้งสองค่านี้ ทำให้ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูง ดังนั้นค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการศึกษานี้ คือ 4.5 - 5.0 (รูปที่ 4.14)

จากผลการทดลองนี้นั้นแสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดต่างมีผลต่อการผลิตเอทานอลและบิวทานอลเป็นอย่างมาก โดยเชื้อจะสามารถผลิตเอทานอลและบิวทานอลได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างที่ 4.5-5 อาจเนื่องมาจากในวิถีเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียคลอสทริเดียม นั้น จะมีอยู่สองเส้นทางคือ วิถีในการสร้างกรด และวิถีในการสร้างแอลกอฮอล์ กรดที่ *C. beijerinckii* CG1 สร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลักคือ กรดบิวทีริก นั้นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์สารคือ phosphotransbutyrylase (PTB) และ NAD-independent lactate dehydrogenase (iLDH) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้จะทำงานได้ดีในภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.3 ซึ่งตรงข้ามกับในวิถีการสร้าง

แอลกอฮอล์ เอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นบิวทานอล คือ Butanol dehydrogenase I (BDHA) และ Butanol dehydrogenase II (BDHB) ทำงานได้ดีที่สุดที่ภาวะค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 โดยได้แสดงวิถีชีวิตสังเคราะห์ในการผลิตสารต่างๆไว้ในรูปที่ 4.14 ซึ่งจากผลการศึกษาได้สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่ได้ค่าเป็นค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม คือ 4.5-5 โดยหลังจากการหาภาวะที่เหมาะสมทั้ง 6 ปัจจัยแล้ว งานวิจัยนี้สามารถเพิ่มผลได้ของการผลิตภัณฑ์รวมเพิ่มขึ้นถึง 2.5 เท่าของผลิตภัณฑ์รวมก่อนการศึกษา (รูปที่ 4.16)

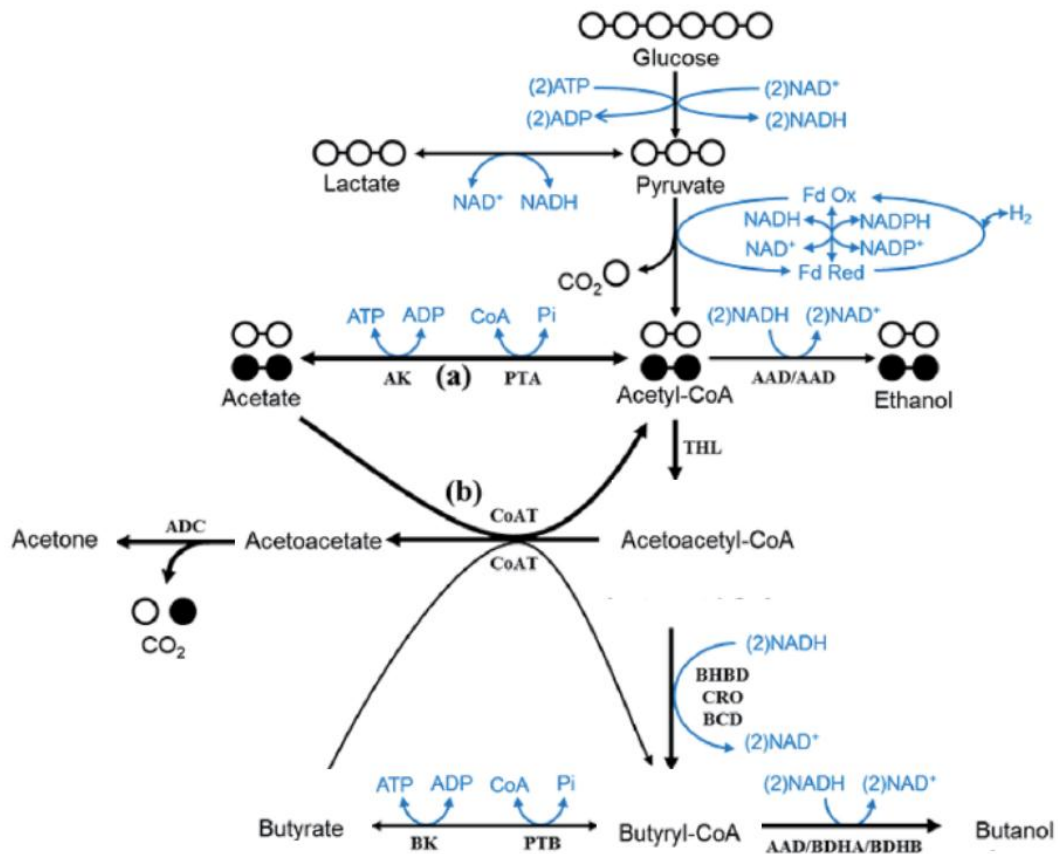


รูปที่ 4.14 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

จากผลการศึกษาข้อ 4.2.1 - 4.2.6 ได้นำมาวิเคราะห์ผลเป็นค่าผลได้ของการผลิตของในแต่ละปัจจัยได้ดังรูปที่ 4.16 จะเห็นได้ว่า ทุกปัจจัยนั้นมีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทั้งสิ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างนั้นมีผลต่อความเข้มข้นของการผลิตผลิตภัณฑ์รวมมากที่สุด โดยทำให้ผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์รวมเป็น 0.75 กรัมต่อกรัม ปัจจัยอื่นที่มีผล รองลงมา คือ อุณหภูมิ ปริมาณหัวเชื้อ ความเร็วใบพัด และ เปอร์เซ็นต์ปริมาณใช้งาน ตามลำดับ

ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์ผลเป็นค่าผลได้ของการผลิตบิวทานอลในแต่ละปัจจัยได้ดังรูปที่ 4.17 จะเห็นว่าปัจจัยของค่าความเป็นกรดต่างมีความสำคัญมากที่สุดในการผลิตบิวทานอล เช่นเดียวกับผลผลิตผลิตภัณฑ์รวม โดยทำให้ผลได้ของการผลิตบิวทานอลรวมเป็น 0.45 กรัมต่อกรัม ปัจจัยที่มีผลรองลงมา คือ อุณหภูมิ และ เปอร์เซ็นต์ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ ตามลำดับในผลของ

เปอร์เซ็นต์ปริมาตรใช้งาน และความเร็วใบพัดนั้น พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตบิวทานอลของเชื้อแต่มีผลต่อการผลิตกรดบิวทีริก



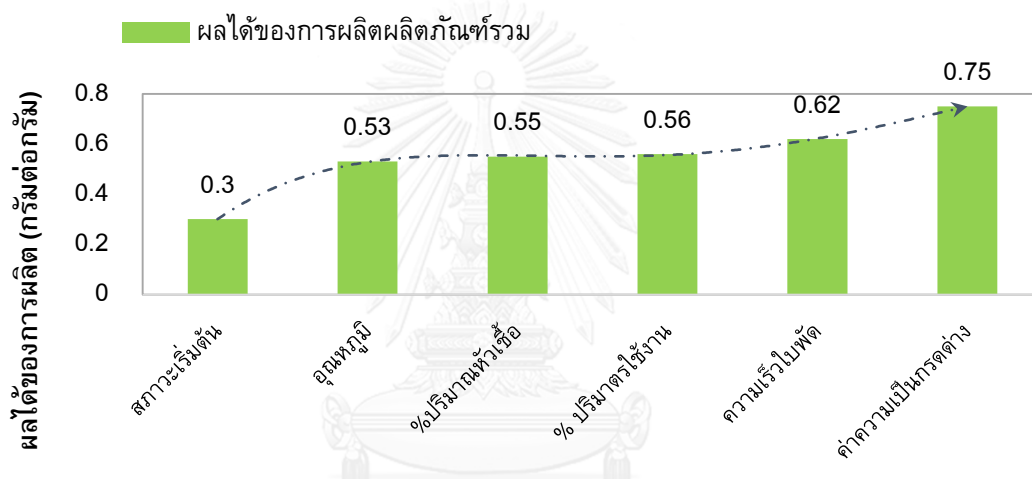
รูปที่ 4.15 แสดงวิถีชีวสังเคราะห์และเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตสารต่างๆของแบคทีเรียสกุล *Clostridium* โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลกลูโคส

- โดยชื่อย่อเอนไซม์ต่างๆมีดังนี้

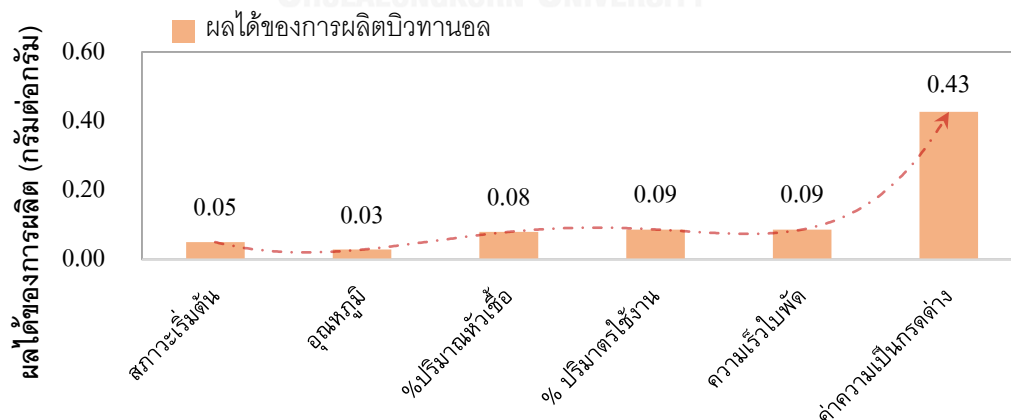
phosphotransacetylase (PTA); acetate kinase (AK); thiolase (THL); b-hydroxybutyryl dehydrogenase (BHBD); crotonase (CRO); butyryl-CoA dehydrogenase (BCD); CoA transferase (CoAT); acetoacetate decarboxylase (ADC); butyrate kinase (BK); phosphotransbutyrylase (PTB); aldehyde/alcohol dehydrogenase (AAD); butanol dehydrogenase I (BDHA); butanol dehydrogenase II (BDHB)

เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของบิวทานอลในภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วย *C. beijerinckii* CG1 ของการศึกษานี้มีความเข้มข้นที่สูงกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น

ของน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรเท่ากัน (ตารางที่ 4.1) ดังเช่นในการศึกษาของ Bramono และคณะ (2011) ใช้แบคทีเรีย *C. butyricum* strain BOH3 ในการหมักด้วยน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอสซีโทน 2.67 กรัมต่อลิตร บิวทานอล 4.36 กรัมต่อลิตร และ เอทานอล 0.36 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมงเช่นกัน แต่เมื่อเราเปรียบเทียบกับผลการศึกษาที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น เช่น จากการศึกษาของ Ezeji และคณะ (2007) เมื่อหมักด้วย *C. beijerinckii* BA101 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอสซีโทน 4.4 กรัมต่อลิตร บิวทานอล 13.7 กรัมต่อลิตร และ เอทานอล 4.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกับการศึกษาที่ใช้ น้ำตาลเพียง 30 กรัมต่อลิตร ดังในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.16 แสดงค่าผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์รวมของในแต่ละปัจจัย



รูปที่ 4.17 แสดงค่าผลได้ของการผลิตบิวทานอลของแต่ละปัจจัย

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงเปรียบเทียบการผลิตเอซีโตน, บิวทานอลและเอทานอล เมื่อใช้น้ำตาล กลูโคสเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

| แบคทีเรียที่ใช้ | สารตั้งต้น | condition | | | | solvent production | | | อ้างอิง |
|--|--------------------------|-----------|------------------|--------|---------|--------------------|-------|------|----------------------------|
| | | เวลา | T ^o c | %เชื้อ | pH | A | B | E | |
| <i>C. beijerinckii</i> 10132 | กลูโคส 20 กรัม ต่อลิตร | 84 | 37 | 2% | 6.5 | - | 3.2 | - | (Isar และคณะ, 2012) |
| <i>C. saccharoperbuty lacetonicum</i> N1-4 | กลูโคส 20 กรัม ต่อลิตร | 72 | 30 | 10% | 6.5 | 0.9 | 2.11 | 0.02 | (Al-Shorgani และคณะ, 2011) |
| <i>C. acetobutylicum</i> Strain YM1 | กลูโคส 20 กรัม ต่อลิตร | 72 | 30 | 10% | 6.5 | 1.35 | 3.71 | 0.17 | (Al-Shorgani และคณะ, 2016) |
| <i>C. beijerinckii</i> CG1 | กลูโคส 30 กรัม ต่อลิตร | 120 | 35 | 10% | 4.5-5.0 | 0 | 12.8 | 3.2 | งานที่ศึกษา |
| <i>C. butyricum</i> strain BOH3 | กลูโคส 30 กรัม ต่อลิตร | 120 | 35 | 10% | 5-5.5 | 2.65 | 4.67 | 0.36 | (Bramono และคณะ, 2011) |
| <i>C. acetobutylicum</i> Strain YM1 | กลูโคส 30 กรัม ต่อลิตร | 96 | 30 | 10% | 6.5 | 2.66 | 6.2 | 0.07 | (Al-Shorgani และคณะ, 2016) |
| <i>C. beijerinckii</i> BA101 | กลูโคส 60 กรัม ต่อลิตร | 68 | 35 | 5% | 6.5 | 4.4 | 13.7 | 0.5 | (Ezeji และคณะ, 2007) |
| <i>C. acetobutylicum</i> ABE 1201 | กลูโคส 60 กรัม ต่อลิตร | 88 | 37 | 10% | 6.5 | 5.21 | 11.92 | 2.08 | (Chang และคณะ, 2014) |
| <i>C. beijerinckii</i> P260 | กลูโคส 62.5 กรัม ต่อลิตร | 70 | 35 | 6% | 6.5 | 7.7 | 13.89 | 1.66 | (Qureshi และคณะ, 2014) |

4.3 ผลการนำภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 มาใช้กับอาหารที่เป็นน้ำเสียจากโรงงาน ต้นแบบการผลิตเซลล์ulosสิกเอทานอล และ โรงงานน้ำตาล

4.3.1 คุณสมบัติ น้ำเสียที่ใช้ในการศึกษา

4.3.1.1 น้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ulosสิกเอทานอล

มีลักษณะเป็นสีดำน้ำตาลใส และมีตะกอนขุ่นอยู่ ค่าความเป็นกรดต่าง อยู่ที่ 5.5 อุณหภูมิ น้ำขณะเก็บ 56 องศาเซลเซียส โดยน้ำเสียนี้ได้จากหลังกระบวนการปรับสภาพ วัตถุประสงค์ปวงข้าวเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลของโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ulosสิกเอทานอล เป็น น้ำส่วนที่เชื้อจุลินทรีย์ของโรงงานไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้ โดยทางโรงงานต้อง

เสียค่ากำจัดน้ำเสียส่วนนี้ โดยเมื่อตรวจสอบดัชนีคุณภาพน้ำ 4 ค่า คือ ค่าบีโอดี ได้ 6,300 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี ได้ 31,158 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 263 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าของแข็งที่ละลายน้ำ 14,106 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทั้ง 4 ค่านี้นี้มีค่าเกินค่ามาตรฐานน้ำเสียโรงงานทั้งสิ้น รายละเอียดคุณสมบัติอื่น ๆ นั้นสรุปอยู่ในตารางที่ 4.2 จากค่าดัชนีคุณภาพน้ำ เมื่อเปรียบเทียบค่าของบีโอดีและค่าซีโอดี จะเห็นได้ว่า ค่าซีโอดีมีค่ามากกว่าค่าบีโอดีประมาณ 5 เท่า โดยจากสองค่านี้นี้บ่งชี้เบื้องต้นได้ว่าน้ำเสียจากโรงงานนี้ มีสารอินทรีย์ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้โดยไม่ต้องอาศัยการดูดซึมทางชีวเคมี หรือน้ำเสียอาจมีสารอินทรีย์ที่ไม่สามารถถูกออกซิไดส์ได้ทางกระบวนการทางชีวเคมีอยู่ ซึ่งเมื่อดูจากสารตั้งต้นจากในกระบวนการผลิตของโรงงานที่ใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในกระบวนการผลิตจึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีสารจำพวก เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสอยู่ในน้ำเสียนี้เป็นเหตุให้ค่า ซีโอดีสูงกว่าค่าบีโอดี

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติของน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอล

| ดัชนีคุณภาพน้ำ | ค่าที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | *ค่ามาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร) | วิธีการตรวจสอบ |
|-------------------------|--|-----------------------------------|----------------------|
| บีโอดี | 6300 | น้อยกว่า 20 | Azide Modification |
| ซีโอดี | 31,158 | น้อยกว่า 120 | Close Reflux |
| ปริมาณของแข็งแขวนลอย | 263 | น้อยกว่า 50 | อบแห้งที่ 103-105 °C |
| ของแข็งที่ละลายน้ำ | 14,106 | น้อยกว่า 3,000 | อบแห้งที่ 103-105 °C |
| แหล่งคาร์บอน | ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) | | |
| กลูโคส | 2.74 | | |
| ฟรุกโทส | 1.51 | | |
| อะราบิโนส | 2.84 | | |
| อื่น ๆ | | | |
| ค่าความเป็นกรดต่าง | 5.5 | | |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 56 | | |

* ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2536)

4.3.1.2 น้ำเสียโรงงานน้ำตาล

มีลักษณะสีเหลืองใส มีตะกอนสีน้ำตาลขุ่นอยู่เล็กน้อย ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 5.5-6 อุณหภูมิน้ำขณะเก็บ 41 องศาเซลเซียส น้ำเสียที่ได้มาจาก บ่อรวมของโรงงาน ซึ่งน้ำในบ่อรวมนั้นจะเป็นน้ำที่ยังไม่ผ่านการบำบัดน้ำเสีย โดยน้ำในบ่อรวมนี้เป็นน้ำที่ได้จาก น้ำล้างท่อส่ง อ้อยน้ำตาล้างเครื่องหีบอ้อยของโรงงาน บ่อดูดอุณหภูมิ และเครื่องจักรอื่น ๆ ในโรงงาน รวมแล้ว ปริมาณน้ำเสียโดยประมาณของโรงงาน คือ 1,130 ตันต่อวัน ที่ต้องผ่านระบบบำบัดน้ำเสีย เมื่อตรวจสอบดัชนีคุณภาพน้ำ 4 ค่า คือ ค่าบีโอดี ได้ 22.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดี ได้ 12,517 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณของแข็งแขวนลอย 98.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าของแข็งที่ละลายน้ำ 11,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งทั้ง 4 ค่านี้มีค่าเกินค่ามาตรฐานน้ำเสียโรงงานทั้งสิ้น รายละเอียดคุณสมบัติอื่น ๆ นั้นสรุปอยู่ในตารางที่ 4.3 โดยจากค่าดัชนีคุณภาพน้ำจะเห็นได้ว่า น้ำเสียโรงงานน้ำตาลมีค่าซีโอดี สูงกว่าค่าบีโอดีประมาณ 549 เท่า ซึ่งสูงกว่าค่าโดยทั่วไปของน้ำเสียมากที่มักจะมีค่าซีโอดี สูงกว่า ค่าบีโอดีประมาณ 60 เท่า จากค่าที่ได้นี้นั้นอาจบ่งชี้ให้เห็นว่าน้ำเสียชนิดนี้อาจมีสารอินทรีย์ที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้โดยไม่ต้องอาศัยการดูดซึมทางชีวเคมี เป็นเหตุให้ค่า บีโอดีมีค่าต่ำจนเกือบจะอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของน้ำทิ้งโรงงาน

ตารางที่ 4.3 คุณสมบัติน้ำเสียโรงงานน้ำตาล

| ดัชนีคุณภาพน้ำ | ค่าที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | *ค่ามาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร) | วิธีการตรวจสอบ |
|-------------------------|--|-----------------------------------|----------------------|
| บีโอดี | 22.8 | น้อยกว่า 20 | Azide Modification |
| ซีโอดี | 12,517 | น้อยกว่า 120 | Close Reflux |
| ปริมาณของแข็งแขวนลอย | 98.5 | น้อยกว่า 50 | อบแห้งที่ 103-105 °C |
| ของแข็งที่ละลายน้ำ | 11,000 | น้อยกว่า 3,000 | อบแห้งที่ 103-105 °C |
| แหล่งคาร์บอน | ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร) | | |
| ซูโครส | 2.74 | | |
| อื่น ๆ | | | |
| ความเป็นกรดต่าง | 5.5-6 | | |
| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | 41 | | |

* ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 2 (พ.ศ. 2536)

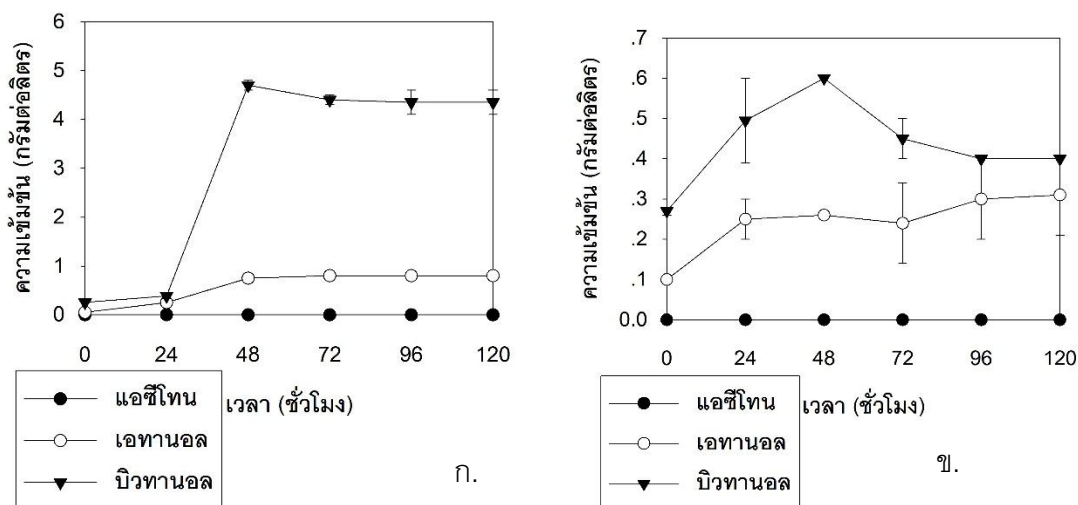
4.3.2 ผลการผลิตเอทานอลและบิวทานอลโดยใช้น้ำเสียในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เมื่อนำน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอล และ โรงงานน้ำตาลมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักด้วย *C. beijerinckii* CG1 ภายใต้ภาวะที่ได้จากการศึกษาในข้อ 4.2.2-4.2.6 คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 35 องศาเซลเซียส, ใช้ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตร, ที่ความเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาที, ปริมาตรใช้งาน 50% ของถังหมัก, ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.0

จากการศึกษาพบว่าน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลมีความสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลได้ เนื่องจากมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล กลูโคส 2.74 กรัมต่อลิตร ฟรุกโทส 1.51 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลอะราบินอส 2.84 กรัมต่อลิตรจากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งผลการหมักน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอลได้ความเข้มข้นเฉลี่ยสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเอทานอลที่ 0.45 กรัมต่อลิตร บิวทานอลที่ 4.7 กรัมต่อลิตร และไม่มีการผลิตแอสีโทน ดังรูปที่ 4.18 ก

ผลการนำน้ำเสียโรงงานน้ำตาลมาหมักโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมด้วย *C. beijerinckii* CG1 พบว่า น้ำเสียโรงงานน้ำตาลมีความสามารถในการเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตสารละลายบิวทานอลและเอทานอลได้ น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลมีน้ำตาลซูโครส 2.74 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยที่เวลา 48 ชั่วโมงของการหมักได้ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลายสูงสุดเอทานอล 0.5 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 0.6 กรัมต่อลิตร และไม่มีการผลิตแอสีโทน ดังรูปที่ 4.18 ข

ข



รูปที่ 4.18 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแอสซีโตน บิวทานอล และ เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วย *C. beijerinckii* CG1 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ก. ใช้น้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูโลสจากเอทานอลเป็นสารตั้งต้น

ข. ใช้น้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลเป็นสารตั้งต้น

4.4 ผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียในถังหมักขนาด 5 ลิตร

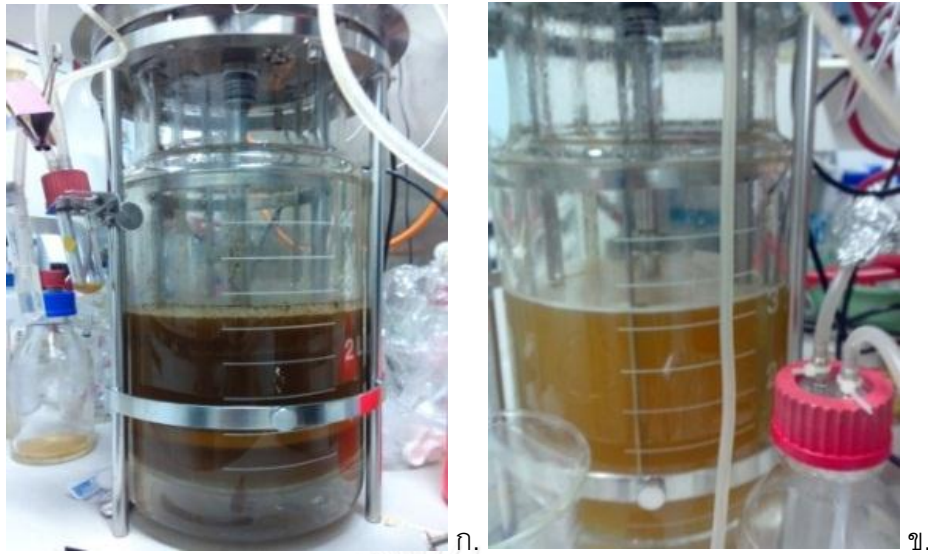
4.4.1 ผลการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูโลสจากเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูโลสจากเอทานอลมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ โดยใช้ภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 4.2 พบว่า การขยายขนาดจากถังหมักขนาด 2 ลิตรเป็นถังหมักขนาด 5 ลิตรไม่มีผลต่อความสามารถในการเจริญเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละชั่วโมง และ ใช้เวลาในการผลิตสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงสุด ที่ 48 ชั่วโมงเช่นเดียวกับถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยได้ความเข้มข้นบิวทานอล 5.3 กรัมต่อลิตร เอทานอล 2.4 กรัมต่อลิตร และไม่พบแอสซีโตนคิดเป็นผลได้ของการผลิตบิวทานอล 0.76 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจะเห็นว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น มีความเข้มข้นไม่แตกต่างจากผลของถังหมักขนาด 2 ลิตร และเมื่อตรวจวัดค่าบีโอดีและค่าซีโอดี หลังการหมักที่ 120 ชั่วโมงพบว่า ได้ค่าบีโอดี 10,606 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดี 16,400 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งค่าซีโอดีหลังการหมักนั้นลดลงไปครึ่งหนึ่งของค่า

ซีไอดีก่อนการหมักคือ 31,158 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าบีไอดีเพิ่มขึ้น จาก 6,300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 10,606 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจากค่าดัชนีชี้คุณภาพน้ำทั้งสองค่านี้ ในการวัดค่าบีไอดีและซีไอดีหลังการหมักได้ทำการวัดโดยไม่ได้นำเซลล์ของแบคทีเรียออกก่อน ด้วยเหตุผลนี้เองจึงคาดว่าค่าบีไอดีที่สูงขึ้นน่าจะมาจากผนังเซลล์และองค์ประกอบอื่น ๆ ของเซลล์คลอสทริเดียม ที่มีองค์ประกอบจำพวกน้ำตาลและโปรตีน จึงมีผลทำให้ค่าบีไอดีสูงขึ้นมาก และยังมีความเป็นไปได้อีกว่าน้ำเสียหลังการหมักที่มีองค์ประกอบของตัวทำละลายอยู่ เช่น เอทานอล บิวทานอล กรดบิวทริก กรดแอซิติค มีผลทำให้ค่าบีไอดีหลังการหมักสูงขึ้น 4,306 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.7 เท่าของค่าบีไอดีก่อนการหมัก ขณะเดียวกันก็มีสารบางส่วนที่เชื้อใช้เพื่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ เช่น น้ำตาล แล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำเสียเป็นเหตุให้ค่าซีไอดีลดลง 14,758 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.9 เท่าของค่าซีไอดีก่อนการหมัก

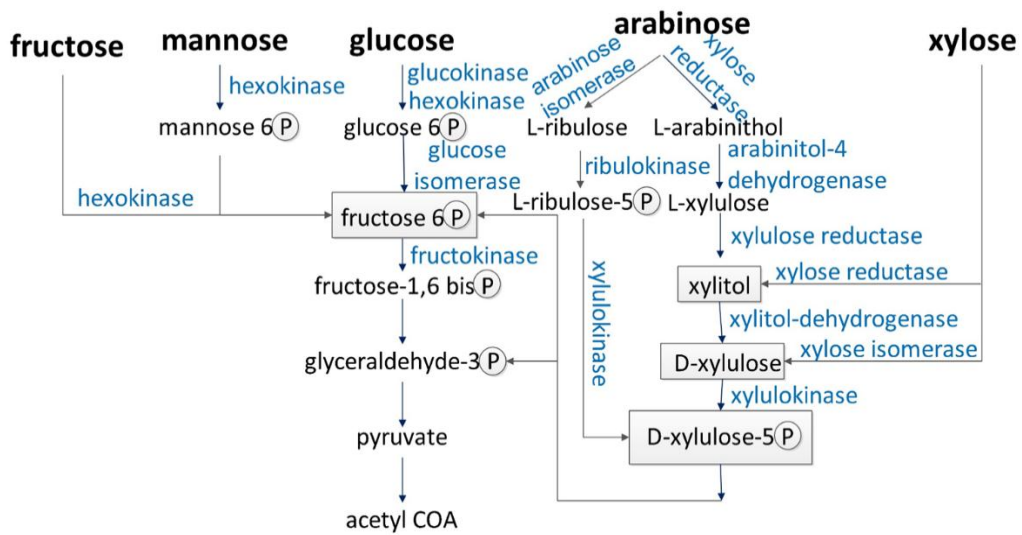
จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเมื่อนำภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ข้อ 4.2.2-4.2.6 มาใช้กับน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูไลติกเอทานอลในถังหมัก 2 และ 5 ลิตรนั้นพบว่า ได้ความเข้มข้นของบิวทานอลใกล้เคียงกัน คือ 4.7 และ 5.3 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยจากการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำเสียชนิดนี้นั้นพบว่า แล่งคาร์บอนส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำเสียประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 2.74 กรัมต่อลิตร น้ำตาลฟรุกโทส 1.51 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลอะราบิโนส 2.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมงแล้วปริมาณน้ำตาลที่คงเหลืออยู่คือ น้ำตาลอะราบิโนส 2.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากรูปที่ 4.18 จะเห็นว่าเชื้อนั้นเลือกใช้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมมากกว่าน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม นอกจากนี้เมื่อดูผลความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ลดลงจากรูปที่ 4.20 จะเห็นได้ว่า เชื้อใช้น้ำตาลฟรุกโตสหมดในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจึงค่อยๆลดลงในชั่วโมงต่อมา จนกระทั่งหมดลงในชั่วโมงที่ 36-48 ซึ่งเป็นชั่วโมงเดียวกับช่วงน้ำตาลอะราบิโนสค่อยๆลดลงเพียงแต่น้ำตาลอะราบิโนสนั้นเชื้อไม่สามารถใช้ได้หมด จากผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Andresen (1973) เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อ *C. thermoaceticum* โดยทำการหมักในน้ำตาลผสมคือกลูโคสและฟรุกโทส พบว่าเชื้อนั้นจะไม่ใช้น้ำตาลกลูโคสถ้าน้ำตาลฟรุกโทสยังไม่หมด เช่นเดียวกันโดย Andresen ให้ความเห็นเพียงว่า เอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงน้ำตาลฟรุกโทสเข้าสู่เซลล์นั้นไปกีดการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ด้วยเหตุนี้เมื่อได้วิเคราะห์วิถีชีวสังเคราะห์ในฐานข้อมูลออนไลน์ (KEGG, Japan) ของ *C. beijerinckii* ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในวิถีของน้ำตาลแต่ละชนิดซึ่งได้เขียนสรุปไว้ในรูปที่ 4.19 พบว่า ในกลุ่มน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม คือ แมนโนส กลูโคส และฟรุกโตส เมื่อถูกนำเข้าสู่เซลล์จะมีเอนไซม์

hexokinase มาเติมหมู่ฟอสเฟสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 เช่นเดียวกัน มีเพียงน้ำตาลกลูโคสที่มี เอนไซม์ช่วยกัน 2 ชนิดในการเติมหมู่ฟอสเฟต คือ hexokinase และ glucokinase ซึ่งจากแผนภาพ นี้่อาจวิเคราะห์ได้ว่า ในน้ำเลี้ยงของโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสอยู่ในอาหาร ในช่วง 0-24 ชั่วโมงนั้น เอนไซม์ hexokinase ได้เข้ามาเติมหมู่ฟอสเฟตที่น้ำตาลฟรุกโตสก่อน และเอนไซม์นี้อาจมีผลในการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ glucokinase ทำให้ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไม่ลดลง มาลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่น้ำตาลฟรุกโตสหมด จึงทำให้เอนไซม์ hexokinase เข้าไปเติมหมู่ฟอสเฟตที่น้ำตาลกลูโคสได้ เป็นอีกหนึ่งเหตุผลที่ลักษณะการใช้น้ำตาลของเชื้อเป็นดังรูปที่ 4.20 นอกจากนี้เมื่อเราดูวิถีสังเคราะห์ของน้ำตาลอะราบิโนส จะเห็นได้ว่า มีเอนไซม์ที่เข้าไปทำปฏิกิริยากับอะราบิโนส 2 ตัว คือ arabinose isomerase และ xylose reductase โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำให้วิถีสังเคราะห์แยกเป็น 2 ทาง และจะเห็นว่า การใช้น้ำตาลอะราบิโนสของเชื่อนั้นมีความซับซ้อนกว่าการใช้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมเป็นอย่างมากดังแสดงในรูปที่ 4.19 ทำให้น้ำตาลอะราบิโนสเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งช้ากว่าน้ำตาลฟรุกโตส และเมื่อน้ำตาลอะราบิโนสถูกเชื้อนำไปใช้ในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อคลอสทริเดียมมีการสร้างกรดแลคติกและกรดบิวทริกขึ้นมีผลทำให้น้ำเลี้ยงความเป็นกรดมากขึ้น ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการเปลี่ยนรูปน้ำตาลอะราบิโนส ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆในวิถีสังเคราะห์ของอะราบิโนส จึงอาจเป็นสาเหตุให้เชื้อมีการใช้น้ำตาลไปได้เพียงเล็กน้อยหลังจากชั่วโมงที่ 48 หรือ เอนไซม์ที่ใช้ตรึงน้ำตาลอะราบิโนสนั้นอาจถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์บางชนิด หรือ สารที่ใช้ในการปรับสภาพฟางข้าวของโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน

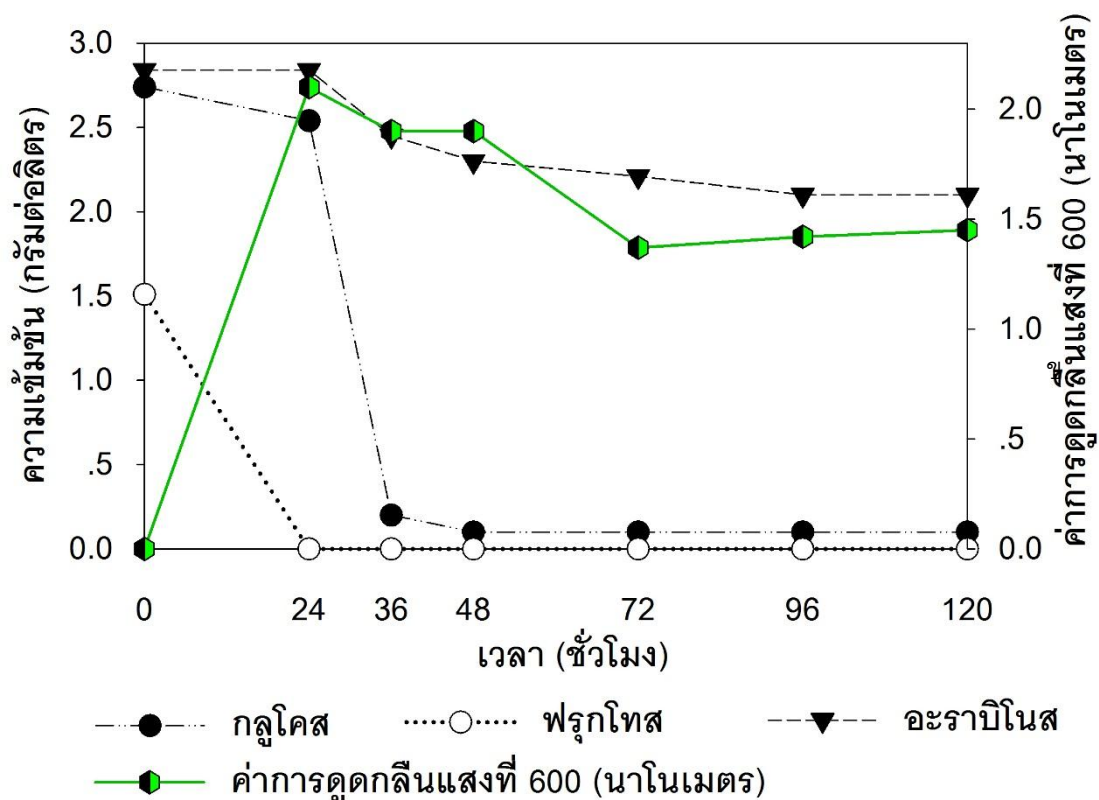


รูปที่ 4.19 แสดงลักษณะน้ำเสียที่อยู่ในถังหมัก 5 ลิตร โดย

- ก. แสดงลักษณะน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสจากเอทานอล
- ข. แสดงลักษณะน้ำเสียโรงงานน้ำตาล



รูปที่ 4.20 แผนภาพแสดงวิถีชีวสังเคราะห์ของเอนไซม์ที่ใช้ในน้ำตาลแต่ละชนิดของ *C. beijerinckii*



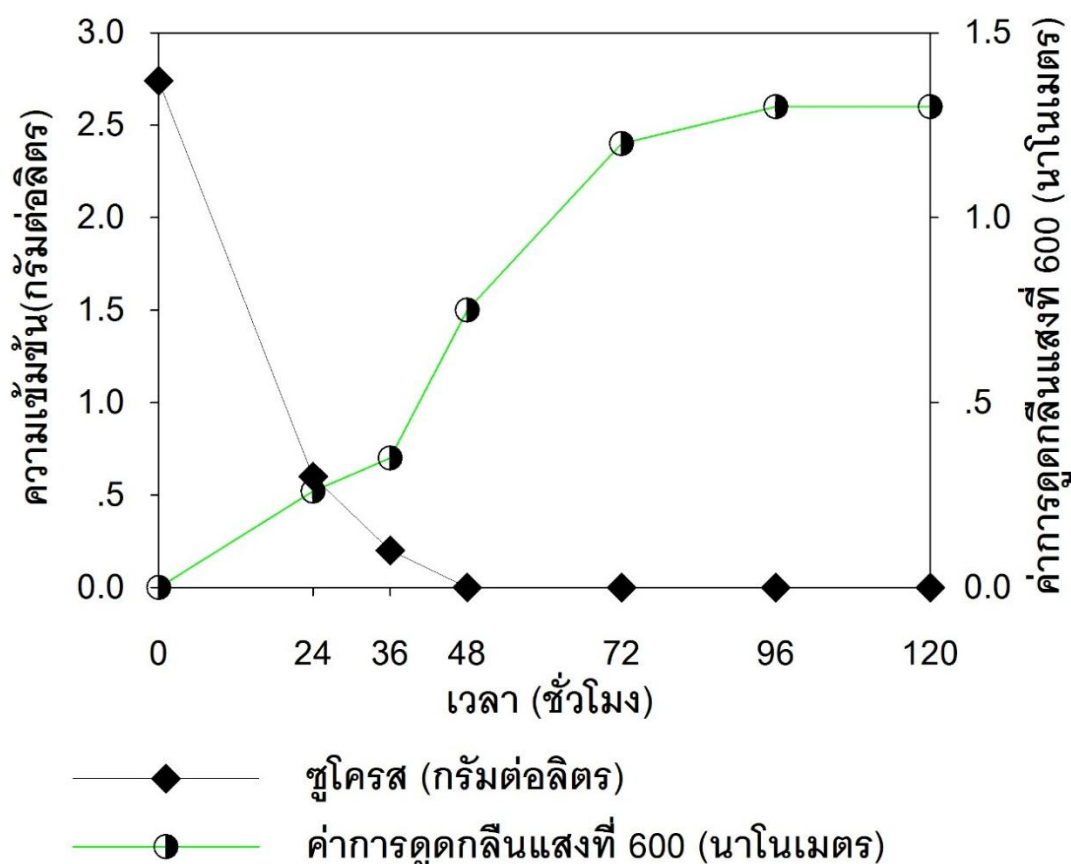
รูปที่ 4.21 กราฟแสดงการเจริญของ *C. beijerinckii* CG1 และความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ลดลง จากการหมักด้วยน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสิกเอทานอล

4.4.2 ผลการผลิตไบโอแอลกอฮอล์จากน้ำเสียโรงงานน้ำตาลในถังหมักขนาด 5 ลิตร

น้ำเสียโรงงานน้ำตาลมีลักษณะสีเหลืองขุ่นเล็กน้อย มีตะกอนสีน้ำตาลและมีกลิ่นอ้อยอยู่ เจือจาง มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.5 หลังจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีองค์ประกอบของน้ำตาลเพียงชนิดเดียว คือ น้ำตาลซูโครส 2.84 กรัมต่อลิตร และนำน้ำเสียนี้มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์พบว่าน้ำเสียมีความสามารถนำมาใช้ผลิต บิวทานอลและเอทานอลได้ โดยเวลาที่มีใช้ในการผลิตสารละลายได้มีความเข้มข้นสูงสุด คือ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเอทานอล 0.34 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 0.97 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของการผลิตบิวทานอล 0.34 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตบิวทานอล 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อตรวจวัดค่าบีโอดีและซีโอดีหลังการหมักที่ 120 ชั่วโมงพบว่า ได้ค่าบีโอดี 2,151 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดี 3,140 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่าค่าซีโอดีหลังการหมักนั้นลดลง 9,377 มิลลิกรัมต่อลิตร ลดลงไป 4 เท่าของค่าซีโอดีก่อนการหมัก ขณะที่ค่าบีโอดีเพิ่มขึ้น 2,128 มิลลิกรัม

ต่อลิตร โดยค่าซีไอดีที่ลดลงและค่าบีไอดีที่เพิ่มขึ้นนี้ได้สอดคล้องกับผลของค่าบีไอดีและค่าซีไอดีของน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูโลสิกเอทานอล เช่นเดียวกันที่ค่าบีไอดีหลังการหมักเพิ่มและค่าซีไอดีหลังการหมักลดลง ซึ่งจากผลการทดลองนี้น่าจะมีเหตุผลเช่นเดียวกัน คือ ค่าบีไอดีที่เพิ่มขึ้นนั้นมาจากองค์ประกอบเซลล์ของคลอสทริเดียมและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก ขณะที่ค่าซีไอดีที่ลดลงนั้นเป็นผลมาจากการที่เชื้อมีการเจริญในน้ำเสียแล้วนำน้ำตาลจากน้ำเสียเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์คาร์บอนบางส่วนได้ถูกเปลี่ยนให้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการสร้างเอทานอลและบิวทานอล จึงเป็นเหตุให้ค่าซีไอดีลดลง

ผลการทดลองใช้น้ำเสียโรงงานน้ำตาลในถังหมัก 2 และ 5 ลิตรนั้นได้ความเข้มข้นบิวทานอล ที่ 0.6 และ 0.97 กรัมต่อลิตร โดยเวลาที่ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุดจะอยู่ 72 ชั่วโมง แหล่งคาร์บอนของน้ำเสียนี้มีเพียงน้ำตาลซูโครส 2.74 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.21 ซึ่งจากผลของการผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำเสียชนิดนี้นั้นมีความเข้มข้นต่ำกว่าน้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ลูโลสิกเอทานอลมาก อาจเนื่องมาจากน้ำเสียโรงงานน้ำตาลนั้นมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในน้ำเสีย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง ในข้อ 4.1 ในส่วนของการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นในการหมักนั้น จะได้ความเข้มข้นของบิวทานอลและเอทานอลที่ต่ำกว่าน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมมาก โดยผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Al-Shorgani และคณะ (2016) ได้รายงานว่า การหมักในน้ำตาลซูโครสนั้น เชื้อคลอสทริเดียมจะผลิตแก๊สไฮโดรเจนสูงกว่าใช้น้ำตาลกลูโคส เนื่องจากเชื้อจะเข้าสู่วิถีการสร้างกรดมากกว่าวิถีการสร้างแอลกอฮอล์ (Al-Shorgani และคณะ, 2016)



รูปที่ 4.22 กราฟแสดงการเจริญของ *C. beijerinckii* CG1 และความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่ลดลงจากการหมักด้วยน้ำเสียโรงงานน้ำตาล

จากการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่า น้ำเสียทั้งสองชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ที่น่าสนใจ เนื่องจาก น้ำเสียเป็นของเสียที่ไม่มีมูลค่าการนำน้ำเสียมาใช้ประโยชน์นั้นเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำเสียอีกทางหนึ่ง ก่อนการบำบัดน้ำเสีย และ ในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ไบโอแอลกอฮอล์ที่ได้ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถนำมาใช้ได้เลย ซึ่งจะเห็นได้ว่าในการศึกษานี้ได้ตอบโจทย์ในเรื่องของการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก และได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์ด้วย *C. beijerinckii* CG1 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีทั้งในเรื่องของการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูงผลิตเอซีโทนต่ำ มีความทนต่อชีวทานอลได้สูง และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย ซึ่ง

จุดเด่นเหล่านี้ทำให้เชื้อตัวนี้มีความน่าสนใจในการประยุกต์ใช้กับน้ำเสียในอุตสาหกรรมต่าง ๆ
ได้อีกหลากหลายซึ่งน่าศึกษากันต่อไปในอนาคต



บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วน คือ การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. beijerinckii* CG1, การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมัก 2 ลิตร และ การประยุกต์ใช้น้ำเสียโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ulosสิกเอทานอลเป็นสารตั้งต้นการผลิตบิวทานอลและโรงงานน้ำตาลในถังหมัก 2-5 ลิตร

ผลการศึกษาในส่วนแรกพบว่า เชื้อ *C. beijerinckii* CG1 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นได้หลากหลายทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม รวมถึงน้ำตาลโมเลกุลคู่ ที่มี 12 คาร์บอน แต่เชื้อมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้ในความเข้มข้นที่ไม่เท่ากัน กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบในน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเชื้อมีความสามารถใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ได้ดีกว่าน้ำตาลคาร์บอน 5 โดยน้ำตาลแมนโนสมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลสูงสุด รองลงมาคือ กลูโคส อะราบิโนส ฟรุคโทส ซูโครส แล็กโทส และไซโลส ตามลำดับ แต่เนื่องจากแหล่งน้ำตาลแมนโนสในธรรมชาตินั้นมักพบในรูปของกลูโคแมนแนนอีกทั้งยังมีราคาแพง ขณะที่น้ำตาลกลูโคสนั้นพบได้อยู่ทั่วไปในธรรมชาติ หาได้ง่าย มีราคาถูก เช่น ผลไม้ต่าง ๆ เป็นต้น ดังนั้น การผลิตโดยใช้น้ำตาลกลูโคสจึงดูคุ้มค่ากว่าน้ำตาลประเภทอื่นเมื่อดูจากผลผลิตบิวทานอลและเอทานอลที่ได้จากการศึกษา

การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลในถังหมัก 2 ลิตร ได้ภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ ความเข้มข้นน้ำตาลที่ 30 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณหัวเชื้อแบคทีเรีย 10% โดยปริมาตร ความเร็วใบพัด 100 รอบต่อนาที ปริมาตรใช้งาน 50% ของถังหมัก และค่าความเป็นกรดต่างที่ 4.5 - 5.0 ได้ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รวม 21.8 - 22.4 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของบิวทานอล 12.6 - 12.8 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตของผลิตภัณฑ์รวมที่ได้ก่อนการหาภาวะที่เหมาะสมการศึกษานี้ได้ผลได้ของการผลิตผลิตภัณฑ์รวมเพิ่มขึ้นจาก 0.3 เป็น 0.75 กรัมต่อกรัมน้ำตาลรวมที่ถูกใช้ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอลมากที่สุด คือ ค่าความเป็นกรดต่าง แต่ในขณะเดียวกันปัจจัยอื่น ๆ ก็มีผลต่อการผลิตสารละลายเช่นเดียวกัน

เมื่อนำภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ไปใช้กับสารตั้งต้นที่เป็นน้ำเสียกับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า ในน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลล์ulosสิกเอทานอลได้ความเข้มข้นเฉลี่ยสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเอทานอลที่ 0.45 กรัมต่อลิตร บิวทานอลที่ 4.7 กรัมต่อลิตร และไม่มีการ

ผลิตแอสีโทน ขณะที่เมื่อหมักด้วยน้ำเสียโรงงานน้ำตาลได้ความความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลายเอทานอล 0.5 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 0.6 กรัมต่อลิตร และไม่มีการผลิตแอสีโทนเช่นกัน

จากนั้นได้ทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า ในน้ำเสียจากโรงงานต้นแบบการผลิตเซลลูโลสเอทานอล ใช้เวลาในการผลิตสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด ที่ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกับถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยได้ความเข้มข้นบิวทานอล 5.3 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นเอทานอล 2.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักไม่แตกต่างจากผลของถังหมักขนาด 2 ลิตรมากนัก ในขณะที่ค่าบีโอดี และ ซีโอดี หลังการหมักที่ 120 ชั่วโมงพบว่า ได้ค่าบีโอดี 10,606 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดี 16,400 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่า ค่า ซีโอดี หลังการหมักนั้นลดลงถึง 1.9 เท่าของค่าซีโอดีก่อนเริ่มหมัก ในขณะที่ผลของการนำน้ำเสียจากโรงงานน้ำตาลมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเอทานอล 0.34 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 0.97 กรัมต่อลิตร และเมื่อตรวจวัดค่า บีโอดี และ ซีโอดี หลังการหมักที่ 120 ชั่วโมงพบว่า ได้ค่าบีโอดี 2,151 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าซีโอดี 3,140 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่า ค่าซีโอดีหลังการหมักนั้นลดลงถึง 4 เท่าของค่าซีโอดีก่อนการหมัก

รายการอ้างอิง

- ACE. (2005). *E10: 10% ethanol; 90% unleaded gasoline*. in American Coalition for Ethanol. [online]. Available from: <http://www.ethanol.org/e10.html>. .
- Akedo, M., Cooney, C. L., and Sinskey, A. J. 1983. Direct Demonstration of Lactate–Acrylate Interconversion in *Clostridium Propionicum*. *Nature Biotechnology*. 1(9): 791-794.
- Al-Shorgani, N. K., Kalil, M. S., and Yusoff, W. M. 2012. Biobutanol production from rice bran and de-oiled rice bran by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Bioprocess and biosystems engineering*. 35(5): 817-826.
- Al-Shorgani, N. K. N., Isa, M. H. M., Yusoff, W. M. W., Kalil, M. S., and Hamid, A. A. 2016. Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes. *Renewable Energy*. 86: 459-465.
- Arnold, F. H. 2008. The race for new biofuels. *Engineering and Science*. 71(2): 12-19.
- Baba, S.-i., Tashiro, Y., Shinto, H., and Sonomoto, K. 2012. Development of high-speed and highly efficient butanol production systems from butyric acid with high density of living cells of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Journal of biotechnology*. 157(4): 605-612.
- Bahl, H., Gottwald, M., Kuhn, A., Rale, V., Andersch, W., and Gottschalk, G. 1986. Nutritional factors affecting the ratio of solvents produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*. 52(1): 169-172.
- Balat, M., Balat, H., and Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 34(5): 551-573.
- BBC News. (2015). UN climate talks extend Kyoto Protocol, promise compensation *BBC News*.
- Berezina, O. V., Brandt, A., Yarotsky, S., Schwarz, W. H., and Zverlov, V. V. 2009. Isolation of a new butanol-producing *Clostridium* strain: high level of hemicellulosic activity and structure of solventogenesis genes of a new

- Clostridium saccharobutylicum* isolate. *Systematic and applied microbiology*. 32(7): 449-459.
- Bhowmik, A., Asahino, A., Shiraki, T., Nakamura, K., and Takamizawa, K. 2009. In situ study of tetrachloroethylene bioremediation with different microbial community shifting. *Environmental technology*. 30(14): 1607-1614.
- Blanch, H. W., Simmons, B. A., and Klein-Marcuschamer, D. 2011. Biomass deconstruction to sugars. *Biotechnology Journal*. 6(9): 1086-1102.
- Bowman, K. S., Dupré, R. E., Rainey, F. A., and Moe, W. M. 2010. *Clostridium hydrogeniformans* sp. nov. and *Clostridium cavendishii* sp. nov., hydrogen-producing bacteria from chlorinated solvent-contaminated groundwater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 60(2): 358-363.
- Bowman, K. S., Rainey, F. A., and Moe, W. M. 2009. Production of hydrogen by *Clostridium* species in the presence of chlorinated solvents. *FEMS microbiology letters*. 290(2): 188-194.
- Bramono, S. E., Lam, Y. S., Ong, S. L., and He, J. 2011. A mesophilic *Clostridium* species that produces butanol from monosaccharides and hydrogen from polysaccharides. *Bioresource Technology*. 102(20): 9558-9563.
- Brown, R. C., and Brown, T. R. (2013). *Biorenewable resources: engineering new products from agriculture*. John Wiley & Sons.
- Buschke, N., Schröder, H., and Wittmann, C. 2011. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of 1,5-diaminopentane from hemicellulose. *Biotechnology Journal*. 6(3): 306-317.
- Carmona, M., Zamarro, M. T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J. F., Valderrama, J. A., Barragán, M. J., García, J. L., and Díaz, E. 2009. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73(1): 71-133.
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G.-J. E., and Zeng, A.-P. 2011. Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum*

- growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*. 91(1): 101-112.
- Dabrock, B., Bahl, H., and Gottschalk, G. 1992. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and environmental microbiology*. 58(4): 1233-1239.
- Demain, A. L., Newcomb, M., and Wu, J. D. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69(1): 124-154.
- Dorn, M., Andreesen, J., and Gottschalk, G. 1978. Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *Journal of bacteriology*. 133(1): 26-32.
- Dürre, P. 2007. Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnology Journal*. 2(12): 1525-1534.
- Elsden, S. R., Hilton, M. G., and Waller, J. M. 1976. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by Clostridia. *Archives of Microbiology*. 107(3): 283-288.
- Environmental Health and Safety Guidelines for Sugar Manufacturing. (2007). World Bank Group Environmental Health and Safety Guidelines. Washington, DC: The World Bank Group.
- Esteve-Núñez, A., Caballero, A., and Ramos, J. L. 2001. Biological degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(3): 335-352.
- Ezeji, T., and Blaschek, H. P. 2008. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic *Clostridia*. *Bioresource Technology*. 99(12): 5232-5242.
- Ezeji, T. C., Groberg, M., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2003. Continuous production of butanol from starch-based packing peanuts. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. 106(1-3): 375-382.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2007. Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii*

- coupled with product recovery by gas stripping. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(12): 771-777.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G.-H., Hintz, W., and Almadidy, A. 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*. 120(4): 402-409.
- Fernandez Gutierrez, M. J., Baxter, D., Hunter, C., and Svoboda, K. 2005. Nitrous oxide (N₂O) emissions from waste and biomass to energy plants. *Waste Management and Research*. 23(2): 133-147.
- Forsberg, C. W. 1987. Production of 1, 3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(4): 639-643.
- Francis, A., and Dodge, C. 2008. Bioreduction of uranium (VI) complexed with citric acid by Clostridia affects its structure and solubility. *Environmental science & technology*. 42(22): 8277-8282.
- George, H., Johnson, J., Moore, W., Holdeman, L., and Chen, J. 1983. Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Applied and environmental microbiology*. 45(3): 1160-1163.
- Goldemberg, J. (2008, March 10; 2008). *Environmental and ecological dimensions of biofuels*. Paper presented at the Proceedings of the conference on the ecological dimensions of biofuels, Washington, DC.
- Green, E. M. 2011. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(3): 337-343.
- Gungormusler, M., Gonen, C., and Azbar, N. 2011. Continuous production of 1, 3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. *Bioprocess and biosystems engineering*. 34(6): 727-733.
- instrument, V. (2008). *Totak dissolve solid*. [online]. Available from: http://www.engineeringtoolbox.com/totak_dissolve_solid. [2014, June 7]

- Jang, Y. S., Lee, J., Malaviya, A., Seung, D. Y., Cho, J. H., and Lee, S. Y. 2012. Butanol production from renewable biomass: Rediscovery of metabolic pathways and metabolic engineering. *Biotechnology Journal*. 7(2): 186-198.
- Jiang, L., Wang, J., Liang, S., Wang, X., Cen, P., and Xu, Z. 2009a. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresource Technology*. 100(13): 3403-3409.
- Jiang, Y., Xu, C., Dong, F., Yang, Y., Jiang, W., and Yang, S. 2009b. Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. *Metabolic Engineering*. 11(4-5): 284-291.
- Jones, D. T., and Woods, D. R. 1986a. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews*. 50(4): 484.
- Jones, D. T., and Woods, D. R. 1986b. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*. 50(4): 484-524.
- Kim, J., Shin, S. G., Han, G., O'Flaherty, V., Lee, C., and Hwang, S. 2011. Common key acidogen populations in anaerobic reactors treating different wastewaters: molecular identification and quantitative monitoring. *water research*. 45(8): 2539-2549.
- Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., and Dürre, P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(29): 13087-13092.
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., and Simpson, S. D. 2011. 2, 3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and environmental microbiology*. 77(15): 5467-5475.

- Kridelbaugh, D., and Doerner, K. 2009. Development of a defined medium for *Clostridium scatologenes* ATCC 25775. *Letters in applied microbiology*. 48(4): 426-432.
- Kulkarni, M., and Chaudhari, A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *Journal of Environmental Management*. 85(2): 496-512.
- 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, J. 2009a. Identification of multiple cracks in a beam using natural frequencies. *Journal of Sound and Vibration*. 320(3): 482-490.
- Lee, J. Y., Jang, Y.-S., Lee, J., Papoutsakis, E.T., Lee, S.Y. 2009b. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. *Biotechnology Journal*. 4(10): 9.
- 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): 209-228.
- Leschine, S. 2005. Degradation of polymers: cellulose, xylan, pectin, starch. *Handbook on Clostridia*. Taylor & Francis/CRC, Boca Raton: 101-131.
- Li, S. Y., Srivastava, R., and Parnas, R. S. 2011. Study of in situ 1-butanol pervaporation from A-B-E fermentation using a PDMS composite membrane: Validity of solution-diffusion model for pervaporative A-B-E fermentation. *Biotechnology Progress*. 27(1): 111-120.
- Li, X., Shi, Z., and Li, Z. 2014. Increasing butanol/acetone ratio and solvent productivity in ABE fermentation by consecutively feeding butyrate to weaken metabolic strength of butyrate loop. *Bioprocess Biosyst Eng*. 37(8): 1609-1616.
- Lincke, T., Behnken, S., Ishida, K., Roth, M., and Hertweck, C. 2010. Closthioamide: an unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Angewandte Chemie*. 122(11): 2055-2057.

- Linoj, K., Dhavala, P., Goswami, A., Maithel, S., and Raju, K. 2006. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. *Asian Biotechnology and Development Review*. 8(2): 31-49.
- Liu, Z., Ying, Y., Li, F., Ma, C., and Xu, P. 2010. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37(5): 495-501.
- López-Contreras, A. M., Claassen, P. A. M., Mooibroek, H., and De Vos, W. M. 2000. Utilisation of saccharides in extruded domestic organic waste by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for production of acetone, butanol and ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*. 54(2): 162-167.
- Lu, C., Zhao, J., Yang, S. T., and Wei, D. 2012. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. *Bioresource Technology*. 104: 380-387.
- Lütke-Eversloh, T., and Bahl, H. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: Recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(5): 634-647.
- 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.
- Marchal, R., Blanchet, D., and Vandecasteele, J. P. 1985. Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of *Jerusalem artichokes*. *Applied microbiology and biotechnology*. 23(2): 92-98.
- Mariano, A. P., Qureshi, N., Filho, R. M., and Ezeji, T. C. 2011. Bioproduction of butanol in bioreactors: New insights from simultaneous in situ butanol recovery to eliminate product toxicity. *Biotechnology and Bioengineering*. 108(8): 1757-1765.
- Martins, M., Faleiro, M. L., Chaves, S., Tenreiro, R., Santos, E., and Costa, M. C. 2010. Anaerobic bio-removal of uranium (VI) and chromium (VI): comparison of

- microbial community structure. *Journal of hazardous materials*. 176(1): 1065-1072.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.
- Mohan, H., Carolus, M., and Biglarbigi, K. 2008. The potential for additional carbon dioxide flooding projects in the United States. *Society of Petroleum Engineers, SPE*. 113975: 9.
- Munasinghe, P. C., and Khanal, S. K. 2010. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*. 101(13): 5013-5022.
- Murphy, S. (2008). *General information on Solids*. [online]. Available from: <http://bcn.boulder.co.us/basin/data/BACT/info/TSS.html>. [2014, August 25]
- Nandy, T., Shastry, S., and Kaul, S. 2002. Wastewater management in a cane molasses distillery involving bioresource recovery. *Journal of environmental management*. 65(1): 25-38.
- Nielsen, D. R., and Prather, K. J. 2009. In situ product recovery of n-butanol using polymeric resins. *Biotechnology and Bioengineering*. 102(3): 811-821.
- Nigam, P. S., and Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. 37(1): 52-68.
- Nuanpeng, S., Laopaiboon, L., Srinophakun, P., Klanrit, P., Jaisil, P., and Laopaiboon, P. 2011. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 14(1): 4-5.
- Oliveira, C., Silva, C. M., and Milanez, A. F. 2007. Application of ultrafiltration in the pulp and paper industry: metals removal and whitewater reuse. *Water Science & Technology*. 55(6): 117-123.
- Oshiro, M., Hanada, K., Tashiro, Y., and Sonomoto, K. 2010. Efficient conversion of lactic acid to butanol with pH-stat continuous lactic acid and glucose feeding

- method by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Applied microbiology and biotechnology*. 87(3): 1177-1185.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*. 77(1): 149-162.
- Papoutsakis, E. T. 2008. Engineering solventogenic *Clostridia*. *Current Opinion in Biotechnology*. 19(5): 420-429.
- Paredes, C. J., Alsaker, K. V., and Papoutsakis, E. T. 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 3(12): 969-978.
- Patil, P., Kapadnis, B., and Dhamankar, V. 2003. Decolorisation of synthetic melanoidin and biogas effluent by immobilised fungal isolate of *Aspergillus niger* UM2. *International Sugar Journal*. 105(1249): 8, 10-13.
- Pazo, J. A., Granada, E., Saavedra, A., Eguia, P., and Collazo, J. 2010. Uncertainty determination methodology, sampling maps generation and trend studies with biomass thermogravimetric analysis. *International journal of molecular sciences*. 11(10): 3660-3674.
- Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2001. Recent advances in ABE fermentation: hyperbutanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 27(5): 287-291.
- Qureshi, N., Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A., and Blaschek, H. P. 2008a. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*. 99(13): 5915-5922.
- Qureshi, N., Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2007. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess and biosystems engineering*. 30(6): 419-427.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Dien, B., Hector, R. E., and Cotta, M. A. 2010a. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I - Use of barley straw hydrolysate. *Biomass and Bioenergy*. 34(4): 559-565.

- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Dien, B., Hughes, S., Liu, S., Iten, L., Bowman, M. J., Sarath, G., and Cotta, M. A. 2010b. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*. 34(4): 566-571.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Hughes, S. R., and Cotta, M. A. 2008b. 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., Eaglesham, A., and Hardy, R. 2007. Butanol: the other alternative fuel. *NABC Report*(19): 137-147.
- Ren, Q., and Zhao, C. 2012. NO_x and N₂O precursors from biomass pyrolysis: nitrogen transformation from amino acid. *Environmental science & technology*. 46(7): 4236-4240.
- Ren, Q., and Zhao, C. 2013. NO_x and N₂O precursors from biomass pyrolysis: role of cellulose, hemicellulose and lignin. *Environmental science & technology*. 47(15): 8955-8961.
- Roffler, S. R., Blanch, H. W., and Wilke, C. R. 1988. In situ extractive fermentation of acetone and butanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 31(2): 135-143.
- Sawyer, C. N., and McCarty, P.L. (1967). *Series in Sanitary Science and water Resources Engineering*. New york: McGraw-Hill.
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., and Li, F. 2008. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(6): 2128-2133.
- Shapovalov, O., and Ashkinazi, L. 2008. Biobutanol: Biofuel of second generation. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 81(12): 2232-2236.
- Shin, S. G., Lee, S., Lee, C., Hwang, K., and Hwang, S. 2010. Qualitative and quantitative assessment of microbial community in batch anaerobic digestion of secondary sludge. *Bioresource technology*. 101(24): 9461-9470.

- Stephenson, J. (2002). Environmental Protection: MTBE Contamination From Underground Storage Tanks: DTIC Document.
- 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.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., and Yoshino, S. 2004. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method. *Journal of bioscience and bioengineering*. 98(4): 263-268.
- Thang, V. H., Kanda, K., and Kobayashi, G. 2010. Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Appl Biochem Biotechnol*. 161(1-8): 157-170.
- Tracy, B. P., Jones, S. W., Fast, A. G., Indurthi, D. C., and Papoutsakis, E. T. 2012. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Current opinion in biotechnology*. 23(3): 364-381.
- Wang, X., and Jin, B. 2009. Process optimization of biological hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. *Journal of bioscience and bioengineering*. 107(2): 138-144.
- Wang, Y., and Blaschek, H. P. 2011. Optimization of butanol production from tropical maize stalk juice by fermentation with *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Bioresource Technology*. 102(21): 9985-9990.
- Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T., and Boles, E. 2010. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Applied microbiology and biotechnology*. 87(4): 1303-1315.
- Wistreich, G. A. (2003). *Microbiology laboratory*. Prentice Hall.

- Xie, J. J., Yang, X. M., Zhang, L., Ding, T. L., Song, W. L., and Lin, W. G. 2007. Emissions of SO₂, NO and N₂O in a circulating fluidized bed combustor during co-firing coal and biomass. *Journal of environmental sciences*. 19(1): 109-116.
- Xue, C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S. T., Bai, F., and Tang, I. C. 2012. High-titer n-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. *Biotechnol Bioeng*. 109(11): 2746-2756.
- Yeoh, B. 1997. Two-phase anaerobic treatment of cane-molasses alcohol stillage. *Water Science and Technology*. 36(6): 441-448.
- Yu, M., Zhang, Y., Tang, I. C., and Yang, S. T. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. *Metab Eng*. 13(4): 373-382.
- 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.
- พัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. กรม. (2553). รายงานฉบับสมบูรณ์การใช้เชื้อเพลิงชีวมวลในภาคอุตสาหกรรมต่างๆ. [online]. Available from: http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/final%20report_3.pdf.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

1.1 ชั่งสารดังนี้

| | |
|----------------------------------|------------|
| - Magnesium sulfate | 0.220 กรัม |
| - Potassium dihydrogen phosphate | 0.550 กรัม |
| - Potassium hydrogen phosphate | 0.550 กรัม |
| - Ferrous sulfate | 0.011 กรัม |
| - D (+) glucose | 30 กรัม |

เติมน้ำกลั่น แล้วละลายส่วนผสมทั้งหมด

1.2 เติมสาร

| | |
|-----------------------|---------------|
| - Resazurin (1 g/L) | 1.0 มิลลิลิตร |
| - Acetic acid (Conc.) | 2.3 มิลลิลิตร |

1.3 ปรับความเป็นกรดต่างให้ได้ pH 6.5 (± 0.2) ด้วยแอมโมเนีย

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปต้มจนเดือด ตวงอาหารเหลวที่ได้ลงในขวดแก้วเลี้ยงเชื้อขวดละ 26 มิลลิลิตร

ทำให้อยู่ในภาวะไร้ออกซิเจนโดยผ่านแก๊สไนโตรเจน 15 นาที ปิดฝาแต่ละขวดด้วยจุกยาง แล้วครอบฝาโลหะ ปิดฝาด้วยคริมเปอร์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจันทร์สม โคมเวียน เกิดเมื่อวันที่ 19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา พ.ศ. 2554 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา พ.ศ. 2558 และได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน 2015 International Conference on Alternative Energy in Developing Countries and Emerging Economies เมื่อวันที่ 28-29 พฤษภาคม พ.ศ. 2558 ณ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งจัดโดยมหาวิทยาลัยทักษิณร่วมกับ University of Moncton ประเทศแคนาดา ในหัวข้อ Direct production of butanol-ethanol from cane sugar factory wastewater (CSFW) and cellulosic ethanol pilot plant wastewater (CEPW) by *Clostridium beijerinckii* CG1 และได้ยื่นจดสิทธิบัตร 1 เรื่อง ชื่อกระบวนการผลิตบิวทานอลและเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อคลอสทริเดียม ซีจี1