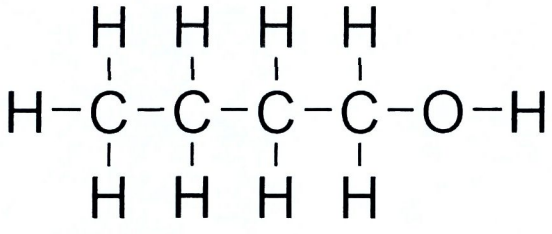
บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล (Butanol)

บิวทานอล หรือบิวทิล แอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่ประกอบด้วยคาร์บอน 4 ตัว และหมู่ไฮดรอกซิล (OH-) ที่มีโครงสร้างโมเลกุล C_4H_9OH ตามแบบในรูปที่ 2.1 ซึ่งเป็นสารมีขั้วอ่อนๆ ซึ่งมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด และจุดหลอมเหลวต่ำ ในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะของเหลว และระเหยได้ง่าย บิวทานอลสามารถติดไฟได้ง่าย จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล

ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Butanol_flat_structure.png (01/04/2554)

2.1.1 ประวัติของบิวทานอล

บิวทานอลถูกค้นพบครั้งแรกครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดย Pasteur โดยใช้จุลินทรีย์เป็นครั้งแรก ต่อมาในปี ค.ศ. 1905 Sehardinger ได้ค้นพบผลิตภัณฑ์ที่เกิดร่วมกับบิวทานอลในการหมักคือ อะ-ซีโตน ต่อมากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องจากเกิดปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของบิวทาไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตยางสังเคราะห์ (Jones และ Woods, 1986)

ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 อุตสาหกรรมมีความต้องการอะซีโตนมากขึ้น เนื่องจากมีความสำคัญในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตระเบิด ต่อมาภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยการหมัก ได้รับความสนใจน้อยลงเพราะความสนใจน้อยลงเพราะการเจริญของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เมื่อปี ค.ศ. 1973 และ ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา (สุนทร, 2537)

2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล

ในปัจจุบันบิวทานอลถูกใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์ อีกทั้งยังใช้บิวทานอลในการเป็นตัวทำละลายที่ต้องการระเหยช้า เนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล

นอกจากนี้บิวทานอลยังใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำหอม และในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงมากขึ้น ซึ่งบิวทานอลสามารถใช้เชื้อเพลิงได้โดยตรง โดยไม่เป็นอันตรายต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณบิวทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูงปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ดัดแปลงเครื่องยนต์ บิวทานอลมีความร้อนมากกว่าเอทานอลและมีความร้อนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน

2.1.3 คุณสมบัติของบิวทานอล

2.1.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

บิวทานอลมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังแสดงตามตารางที่ 2.1

2.1.3.2 คุณสมบัติทางเคมี

บิวทานอลมีชื่อเรียกทั่วไปและทางเคมี ดังแสดงตามตารางที่ 2.2

2.1.3.3 คุณสมบัติทางด้านพลังงาน

การเปลี่ยนรูปพลังงานที่ได้จากบิวทานอลจะเหมือนกับแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ กล่าวคือ

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. นำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน (Gasohol)
3. นำไปผสมกับน้ำมันดีเซล (Desohol)
4. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน เนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูง
5. ค่าออกเทน จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเอทานอลที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน
6. ใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าจาก fuel cell แต่อยู่ในขั้นการวิจัย แต่มีแนวโน้มได้ได้ผลดีกว่าการใช้ แอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวใส
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น-รส	คล้ายเอทานอล
น้ำหนักโมเลกุล	74.12
จุดเดือด	117 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	-89.5 องศาเซลเซียส
ความดันไอ	7.3 มิลลิปรอท ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	0. 810 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น(กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.809 - 0.812 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่นของไอ	2.6
ความสามารถในการละลายน้ำ	7.7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส
อัตราการระเหย	0.5
ความเป็นกรดด่าง (pH)	ไม่มีข้อมูล

ที่มา: http://www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf (01/04/2554)

ตารางที่ 2.2 ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล

ชื่อ IUPAC	1-บิวทานอล (1-Butanol)
ชื่อทั่วไป	เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) เอ็นบีเอ (NBA) , บิวทิว แอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol)
ชื่อพ้องอื่นๆ	บิวทาน-1-ออล (Butan-1-ol)
สูตรโมเลกุล	C_4H_9OH

ที่มา: http://www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf (01/04/2554)

คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

บิวทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน

ก) คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

บิวทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน

ข) ค่าออกเทน (octane rating)

ค่าออกเทน (octane rating) ของบิวทานอลมีค่าประมาณ 100 เมื่อผสมน้ำมันกับบิวทานอล ค่าออกเทนของน้ำมันเบนซินเพิ่มขึ้นในอัตราที่น่าสนใจ กล่าวคือ ค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้น 2.5 เท่าต่อการเติมบิวทานอลทุกร้อยละ 10 โดยปริมาตรของบิวทานอลที่ผสม ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 2.2 ทั้งนี้อัตราเพิ่มของค่าออกเทนจะลดลงเล็กน้อย เมื่อส่วนผสมเพิ่มมากกว่าร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่าบิวทานอลสามารถใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทน (octane improver) แทนที่สารตะกั่วหรือสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) เป็นสารเคมีที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ผลิตขึ้นได้จากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง Methanol และ Isobutaneได้ ซึ่งในอัตราส่วนร้อยละ 20 โดยปริมาตร จะทำให้น้ำมันเบนซินธรรมดาในท้องตลาดประเทศไทยมีค่าออกเทนประมาณ 91 ซึ่งเพียงพอกับเครื่องยนต์ส่วนใหญ่ที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทย

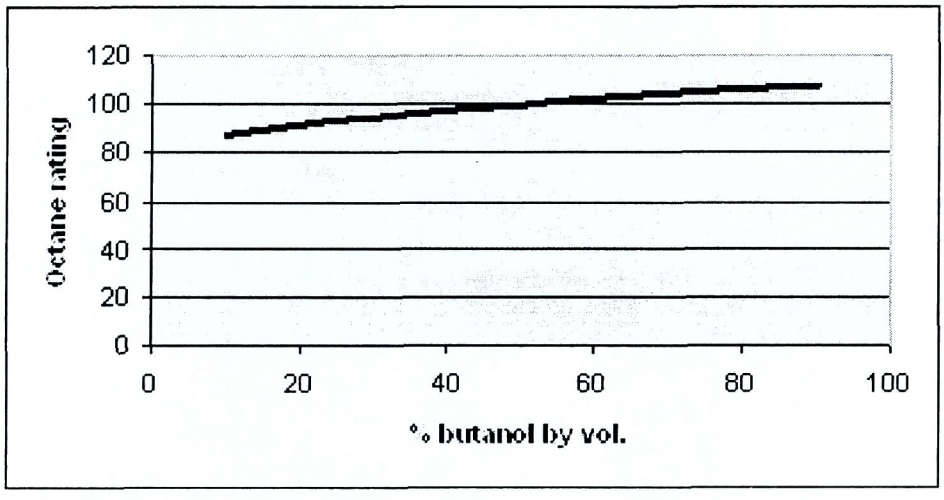
ค) ค่าซีเทน (cetane rating)

ส่วนค่าซีเทน (cetane rating) ซึ่งใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันดีเซล พบว่าบิวทานอลมีค่าซีเทนประมาณ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีเทนของน้ำมันดีเซล ซึ่งมีค่าประมาณ 48.8 จะเห็นว่าค่าซีเทนของบิวทานอลต่ำกว่ามาก จนมีความจำเป็นต้องเติมสารเพิ่มค่าซีเทน (cetane improver) เช่น ไอโซบิวทิวไนเตรต (isobutyl nitrate) พบว่า หากผสมน้ำมันดีเซลร้อยละ 75 เปอร์เซ็นต์ บิวทานอลร้อยละ 23.75 และไอโซบิวทิวไนเตรตร้อยละ 1.25 จะได้ค่าซีเทน 45.4 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าซีเทนของน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (high speed diesel fuel) ซึ่งมีค่าซีเทน 48.8 ส่วนคุณสมบัติอื่นๆสามารถดูได้ในตารางเปรียบเทียบข้างล่าง

การใช้พลังงานจากบิวทานอลในอนาคต

บิวทานอลจัดว่าเป็นแอลกอฮอล์ที่มีอนาคตไกลมากที่สุดเนื่องด้วยเหตุผลหลายประการ คือ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่บริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีนและไม่ต้องเก็บในระบบที่มีความดันสูงเหมือนแก๊สธรรมชาติเนื่องจากการระเหยต่ำ ซึ่งต่ำกว่าการระเหยของน้ำมันสามารถรวมตัวกับน้ำมันได้ดีไม่เกิดการแยกตัว สามารถขนส่งตามท่อเนื่องจากไม่มีการกัดกร่อน

เหมือนแอลกอฮอล์ตัวอื่น ดังจะเห็นได้จากค่าคุณสมบัติทางพลังงานที่ใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีนมากกว่าแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ ตามที่แสดงในตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.2 ค่า Octane rating ของน้ำมันเบนซินธรรมดาเมื่อผสมบิวทานอลลงไปในอัตราส่วนต่างกัน
ที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (25/04/2554)

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล

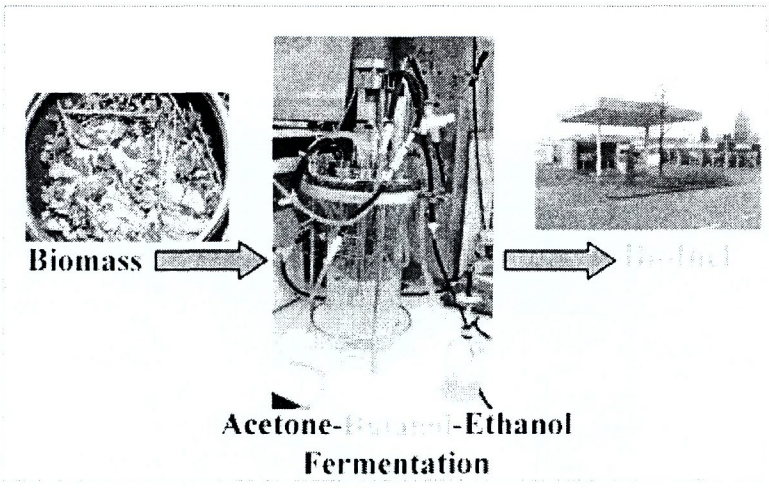
คุณสมบัติทางพลังงาน ของน้ำมันรถ บิวทานอล เอทานอล เมทานอล	Energy density (MJ/L)	Air-fuel ratio	Specific energy (MJ/kg air)	Heat of vaporization (MJ/kg)	RON	MON
น้ำมันแก๊สโซลีน	32	14.6	2.9	0.36	91–99	81–89
บิวทานอล	29.2	11.2	3.2	0.43	96-110	78-90
เอทานอล	19.6	9.0	3.0	0.92	129	102
เมทานอล	16	6.5	3.1	1.2	136	104

ที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (25/04/2554)

2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล

บิวทานอลสามารถได้มาจากหลายวิธีคือกระบวนการทางเคมีที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน กระบวนการหมักจากมวลชีวภาพบางชนิด และ กระบวนการขั้นสูง โดยมีสารตั้งต้นจากหลากหลายชนิด แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันที่ทำกันมาคือ กระบวนการหมัก โดยใช้แบคทีเรียที่เหมาะสม ซึ่ งในการหมัก มักจะเรียกว่ากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation) โดยแบคทีเรียที่ใช้มักจะเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Clostridium* เช่น *Clostridium butyricum* และ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งเดิมทีนั้นแบคทีเรียในตระกูลนี้ใช้เพื่อ ผลิตอะซีโตน จากสารจำพวกแป้ง ซึ่งตอนนั้นบิวทานอลและเอทานอลเป็นผลพลอยได้ที่ได้ออกมาจากการหมัก ซึ่งบิวทานอลที่ได้นั้นมากพอสมควร

ในปัจจุบัน กระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล มีกระบวนการดังนี้คือ เมื่อสารตั้งต้น เช่น น้ำตาล ถูกหมักโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* นั้นจะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นบิวทานอล ซึ่งในกระบวนการนี้ แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ที่เปลี่ยนสารอาหารให้เป็นบิวทานอลจะตายไป ตามแผนภาพที่แสดงในรูป 2.3 เมื่อความเข้มข้นของบิวทานอลประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความพยายามที่จะค้นคว้าให้แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ซึ่งใช้ในการหมักสามารถทนทานต่อบิวทานอลให้ได้มากขึ้น เพื่อให้ผลผลิตของบิวทานอลมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการศึกษาพบว่า บิวทานอลให้พลังงานได้สูงกว่าเอทานอลตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้พวกของเหลือจากการผลิตเอทานอลยังสามารถนำมาผลิตบิวทานอลต่อได้อีกด้วย (โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถานบันวิจัยและพัฒนาพลังงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2552)



รูปที่ 2.3 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

ที่มา: www.bpe.wur.nl/UK/Research/Projects/Maximal+butanol+yield+by+directed+engineering (25/03/2554)

2.2 กลูโคส (Glucose)

กลูโคส เป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยกัน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และสารเผาผลาญขั้นกลาง (metabolic intermediate) กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) โครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของมัน (D-glucose) จะอยู่ในรูปที่เรียกว่า เดกซ์โตรส (dextrose) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร (http://th.wikipedia/กลูโคส, 01/04/2554)

2.2.1 แหล่งที่มา

จากธรรมชาติ

1. ในพืชและสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรแคริโอต จากการสังเคราะห์แสง

2. ในสัตว์และเชื้อรา จากการแยกสลายไกลโคเจน โดยกระบวนการที่รู้จักกันในชื่อ การสลายไกลโคเจน (Glycogenolysis) ในพืชจะเป็นการแยกสลาย ซับสเตรต คือ แป้ง

3. ในสัตว์ กลูโคสจะถูกสังเคราะห์ในตับและไต จากสารขั้นกลาง (intermediates) ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (non-carbohydrate) เช่น ไพรูเวต (pyruvate) และ กลีเซอรอล (glycerol) โดยกระบวนการที่เรียกว่า กลูโคนีโอเจนีสิส (gluconeogenesis)

ผลิตทางการค้า

กลูโคสสามารถผลิตเป็นการค้าได้โดยการ ไฮโดรไลซิสแป้ง ที่มี เอ็นไซม์ ช่วยเร่งปฏิกิริยา พืชผักมากมายสามารถใช้เป็นแหล่งของแป้งได้เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันเทศ มันสำปะหลัง (cassava) ต้นไม้เท้ายายม่อม (arrowroot) และ สาคู การใช้แป้งจากพืชจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆของโลก ในสหรัฐอเมริกาแป้งส่วนใหญ่จะเป็นแป้งข้าวโพด (จากต้นข้าวโพด) ในประเทศแถบเอเชียอย่างประเทศไทย จะใช้ข้าวทำแป้งเช่น แป้งข้าวจ้าวและแป้งข้าวเหนียว

กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ช่วยจะมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนแรกใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 100 °C เอนไซม์เหล่านี้จะ ไฮโดรไลซ์แป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เล็กลง โดยจะมีโมเลกุลของกลูโคส 5-10 หน่วย ความผิดเพี้ยนของกระบวนการจะอยู่ที่การต้มส่วนผสมของแป้งที่อุณหภูมิ 130 °C หรือร้อนกว่านี้ หนึ่งครั้งหรือมากกว่า การใช้ความร้อนระดับนี้เพื่อช่วยการละลายของแป้งในน้ำแต่มันก็จะทำลายฤทธิ์เอนไซม์ ซึ่งจะต้องเติมเอนไซม์เข้าไปใหม่ในการต้มแต่ละครั้ง

2. ขั้นตอนที่สองเรียกว่า แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ขั้นตอนนี้จะไฮโดรไลซ์แป้งบางส่วนและไฮโดรไลซ์กลูโคสอย่างสมบูรณ์โดยใช้เอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จาก เชื้อรา *Aspergillus niger* สภาวะของปฏิกิริยาจะต้องควบคุมให้อยู่ที่ pH 4.0-4.5 อุณหภูมิ 60 °C และความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจะต้องอยู่ที่ 30-35% โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวการณ์เหล่านี้แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสประมาณ 96% หลังจากใช้เวลา 1-4 วัน ถ้าจะให้ผลผลิตสูงกว่านี้สามารถทำได้โดยการทำให้สารละลายจางลง แต่จะต้องใช้หม้อต้มที่ใหญ่กว่าและต้องการน้ำมากกว่าซึ่งสรุปแล้วไม่ประหยัดกว่า สารละลายกลูโคสที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกรอง และเคี่ยวให้งวดในเครื่องระเหยเอนกประสงค์ (multiple-effect evaporator) ดี-กลูโคสที่เป็นของแข็งจะทำได้โดย การตกผลึก (crystallization)

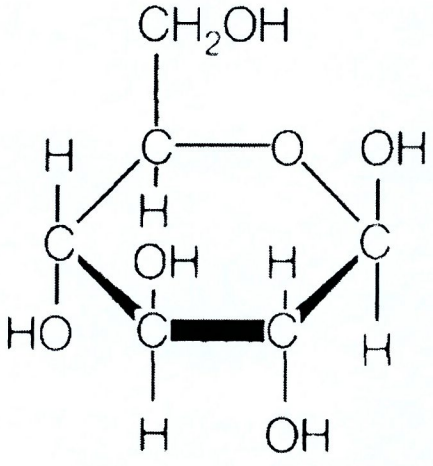
2.2.2 คุณสมบัติของกลูโคส

กลูโคสมีชื่อเรียกทางเคมีและคุณสมบัติตามตารางที่ 2.4 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูป 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางเคมีของกลูโคส

ชื่อ IUPAC	6-(hydroxymethyl)oxane -2,3,4,5-tetrol หรือ (2R,3R,4S,5R,6R) -6 -(hydroxymethyl) tetrahydro -2H-pyran-2,3,4,5-tetraol
ชื่ออื่น	เด็กซ์โตส(Dextrose)
สูตรเคมี	$C_6H_{12}O_6$
น้ำหนักโมเลกุล	180.156 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.54 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	α-D-glucose:146 °C β-D-glucose: 150 °C

ที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%81%E0%B8%A5%E0%B8%B9%E0%B9%82%E0%B8%84%E0%B8%AA (22/03/2554)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลูโคส

ที่มา: http://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap1/chapter1_2.html (22/03/2554)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 28 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250373
เลขเรียกหนังสือ

2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิตบิวทานอล

Monot และคณะ (1982) ได้รายงานว่าในการหมักอะซีโตน บิวทานอลของ *C. acetobutylicum* ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารตั้งต้น พบว่ากลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำ (5-10 กรัมต่อลิตร) จะทำให้การหมักเกิดขึ้นเพียงครั้งเดียว คือขั้นตอนการสร้างกรดอินทรีย์เท่านั้น จะไม่มีการสร้างตัวทำละลาย กลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 20-40 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อเจริญได้ดีที่สุด และกลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร จะทำให้ *Clostridium* สร้างบิวทานอลได้สูงสุด

Monot และ Engasser (1983) กล่าวว่า ในกรณีที่แหล่งคาร์บอน (กลูโคส) ต่ำมาก การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียม) จะเพิ่มผลผลิตตัวทำละลาย แต่การเติมแอมโมเนียมมากเกินไป จะทำให้การหมักได้กรดมากกว่าตัวทำละลาย หรือกล่าวว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียม ก็จะต้องจำกัดปริมาณกลูโคสด้วย จึงเป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมในการสนับสนุนให้มีการสร้างตัวทำละลาย หรือกล่าวว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนียมที่จะเปลี่ยนเป็นบิวทานอล ก็คือระดับความเข้มข้นของสับสเตรตที่จะเปลี่ยนเป็นระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์นั่นเอง

Pimpa และ Goma (1984) กล่าวว่า ในวิถีเมตาบอลิซึมของการสร้างบิวทานอลจากกลูโคสโดยไม่ผ่านกรดบิวทิริคนั้น จะวิเคราะห์ได้ว่า ในบางครั้ง *Clostridium* สามารถสร้างบิวทานอลจากกลูโคสได้โดยตรง โดยไม่ผ่านกรดบิวทิริค ซึ่งมีข้อเสียคือ นอกจากไม่มีการกำจัดกรดอะซีติกแล้วยังต้องใช้ $NADH+H^+$ มากขึ้นอีกด้วย

มณีนาฎ (2527) ได้ใช้เทคนิคสำหรับการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนโดยการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น โดยทำการศึกษาการเจริญของ *Clostridium* (ใช้กลูโคสเป็นอาหาร) เปรียบเทียบระหว่างการวัดความขุ่นของเซลล์ (โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์) และการวัดปริมาตรของก๊าซ (โดยการแทนที่ของน้ำ) ซึ่งปรากฏว่าตัวแปรทั้งสองสอดคล้องกัน

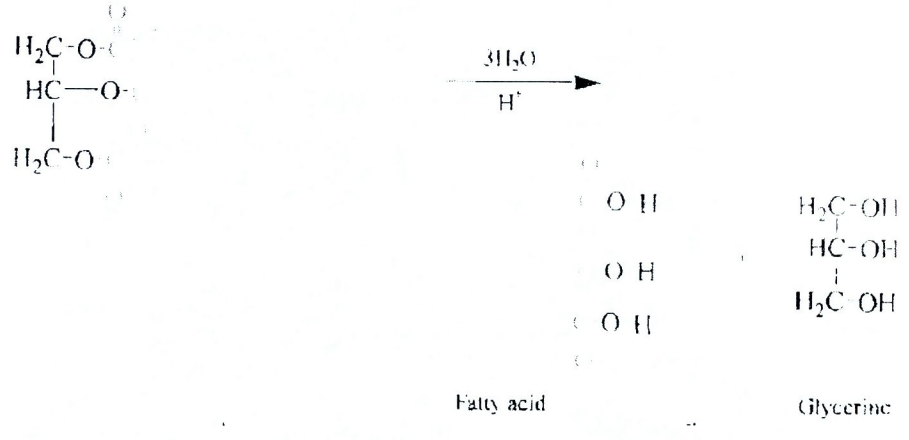
2.3 กลีเซอรอล (Glycerol)

2.3.1 ประวัติของกลีเซอรอล

สารกลีเซอรอถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W. Scheele จากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (sponification) ของน้ำมันมะกอก มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีรสหวาน ต่อมาพบว่ากลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบหลักในไขมันและน้ำมันเกือบทุกชนิดโดยไขมันและน้ำมันประกอบด้วยกลีเซอรอลที่มีหมู่เอสเทอร์มาเกาะกัน 3 หมู่ หรือที่

เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เมื่อนำไขมันหรือน้ำมันมาแยกสลายด้วยน้ำในสภาวะกรดจะได้กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

ในช่วงแรก ได้นำกลีเซอรอลไปใช้ในการผลิตกาว ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้กาวมีความเหนียวมากขึ้น ในเวลาต่อมาได้นำไปใช้ในการทำสีย้อมน้ำหมึกและอื่นๆ จนกระทั่งในปี คศ.1867 นักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Alfred Nobel ได้คิดค้นวิธีการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (dynamite) โดยใช้กลีเซอรอลที่ทำอยู่ในรูปไนโตรกลีเซอรีน (nitroglycerine) เมื่อนำมาผสมกับซิลิกา (silica) ณ จุดนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการนำกลีเซอรอลไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม (อมร อุดเสน และคณะ, 2550)



รูปที่ 2.5 สมการแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด
ที่มา : อมร และคณะ (2550)

2.3.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1,2,3 propanetriol เป็นแอลกอฮอล์อย่างง่าย (simple alcohol) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการใช้ประโยชน์มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สี เครื่องจักร เครื่องยนต์ อาหาร ยาสูบ เภสัชกรรม เยื่อกระดาษ เครื่องหนัง และสิ่งทอ แสดงดังตารางที่ 2.5 นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้น (feedstock) สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น ใช้ ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanedial) ได้อีกด้วย (Biebl และคณะ, 1998; 1999)

2.3.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล

2.3.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีคุณสมบัติทางกายภาพตามตารางที่ 2.6

2.3.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีชื่อเรียกทางเคมีตามตารางที่ 2.7 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล

ด้านที่นำไปใช้ประโยชน์	การนำไปใช้ (ร้อยละ)			
	สหรัฐฯ (160,000 ตันต่อปี)	ยุโรป (190,000 ตันต่อปี)	ญี่ปุ่น (50,000 ตันต่อปี)	จีน[a] (80,000 ตันต่อปี)
ยา	39.5	23.1	34.0	5.2
ยาสูบ	15.8	2.5	5.3	7.3
กลีเซอรินไตรอะซีเตท (glycerintriacetate)	ND[b]	14.4	ND	ND
อาหาร	14.5	5.6	ND	ND
โพลีอีเทอร์แอลกอฮอลล์ (polyether acohol)	10.5	13.1	11.6	5.2
สี	9.2	13.1	19.5	49.0
เซลโลเฟน (cellophane)	2.0	4.4	3.8	1.5
ระเบิด (dynamite)	0.6	3.1	1.9	3.1
ยาสีฟัน	ND	ND	ND	16.0
เครื่องสำอาง	ND	ND	ND	6.3
อื่นๆ	7.9	20.6	23.9	7.2

หมายเหตุ [a] ข้อมูลส่วนใหญ่นำมาจากรายงานของศูนย์ข้อมูลวิศวกรรมเคมีแห่งประเทศจีน (Chinese Chemical Engineering Information Center)

[b] ND ย่อมาจาก no data (ไม่มีข้อมูล)

ที่มา : Wang และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

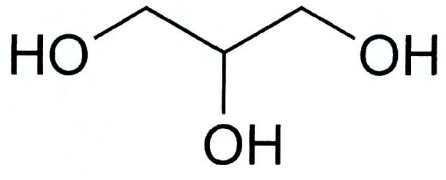
คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวหนืด
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น-รส	ไม่มีกลิ่น แต่มีรสหวาน
น้ำหนักโมเลกุล	92.10 กรัมต่อโมล
ความหนืด	1,400 มิลลิปาสคาล วินาที
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ ไดออกเซน และไม่ละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน
คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5 ที่ 20 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	290 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	17.8 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันไอ	0.0025 มิลลิปรอท ที่ 50 องศาเซลเซียส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mallinckrodt Chemicals และ The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed. Copyright © 2007, Columbia University Press

ตารางที่ 2.7 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

ชื่อ IUPAC	1,2,3-Propanetriol หรือ 1,2,3-Trihydroxypropane
ชื่อทั่วไป	Glycerol ; Glycerin
ชื่อพ้องอื่นๆ	D-glycerol, L-glycerol, Glyceritol, Glycyl alcohol, Trihydroxypropane, Glycerin mist, Polyhydric alcohols, Propanetriol
สูตรโมเลกุล	$C_3H_5(OH)_3$

ที่มา: http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568 (25/04/2554)



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา: Richard, Rusty และ Myers (2007)

2.3.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

2.3.4.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by-product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ที่เกิดจากกระบวนการการผลิตไบโอดีเซลซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ แต่กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ นั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่ หรือแม้กระทั่งใช้ในการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธีที่จะทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล โดยกระบวนการและวิธีที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ได้แก่ การปรับสภาพคุณสมบัติให้เป็นกรดเพื่อแยกชั้นของกลีเซอรอลกับไขมัน โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อแยกตะกอนของเกลือออก จากการทดลองเมื่อทำให้

กลีเซอรอลมีความเป็นกรดอยู่ที่ pH 2–4 จะทำให้มีชั้นของกลีเซอรอลแยกออกมาร้อยละ 38–40 โดยน้ำหนัก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบตามมาตรฐาน BS 5711 จะพบว่ากลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์อยู่ที่ร้อยละ 80–85 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ และสามารถเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลได้ และมาตรฐานของกลีเซอรอลที่แบ่งตามอุตสาหกรรมมีตามตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้

คุณลักษณะ	อุตสาหกรรม					มาตรฐานที่ใช้ทดสอบ
	เคมี	ไดนาไมต์	ยา	อาหาร	สบู่	
กลิ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	-	BS 5711 :Part 19
กลีเซอรอล ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	99	99	95	99	80	BS 5711 :Part 3
น้ำ ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	-	-	-	10	ISO 2097 - 1972
เถ้า ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	-	-	-	10	ISO 2098 - 1972
เถ้าซัลเฟต ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน	0.01	0.01	0.01	0.01	-	ISO 1616 - 1976
สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	-	-	-	2.5	ISO 2464 - 1973
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 20° C 20° C ที่อุณหภูมิ 25° C 25° C	1.261ถึง 1.264	1.261ถึง 1.264	- 1.249	1.261ถึง 1.264	-	ISO 2099 - 1972
ความเป็นด่างหรือความเป็นกรด มิลลิอีคลีวิเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.064	0.32	-	0.32	-	BS 5711 :Part 5
สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	2	-	1.5	-	2	BS 5711 :Part 10
ตะกั่ว มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	1	-	-	-	-	BS 2621 – 5
คลอไรด์ ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	0.01	0.01	0.01	-	BS 5711 :Part 12
สะพอนิฟิเคชันอีควิวาเลนต์ มิลลิอีควิวาเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.64	0.64	-	-	-	BS 5711 :Part 21

หมายเหตุ มาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิงคุณลักษณะของกลีเซอรอล คือ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.337-2538)[13] และ British Standards Institution (BS 2621-5 : 1979)

ที่มา : มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์, มอก 377-2538

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องแยกกลีเซอรอลออกจากไบโอดีเซลให้หมด มิฉะนั้นกลีเซอรอลจะไปอุดหัวฉีดและยังก่อให้เกิดปริมาณอัลดีไฮด์ในท่อไอเสียเครื่องยนต์ขณะเผาไหม้สูงกว่าปกติอีกด้วย โดยปกติการผลิตไบโอดีเซลแต่ละครั้งจะได้กลีเซอรอลประมาณร้อยละ 10-15 โดยปริมาตร ซึ่งจะทำการอยกออกได้ด้วยการทำให้แยกชั้นออกจากไบโอดีเซลด้วยความแตกต่างของความหนาแน่น ไบโอดีเซลมีความหนาแน่น 0.86 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่กลีเซอรอลมีความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มี ผลทำให้กลีเซอรอลแยกตัวอยู่ชั้นล่างและไบโอดีเซลอยู่ชั้นบน ในส่วนของชั้นกลีเซอรอลยังคงมีสิ่งเจือปนอื่นได้แก่ ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทานอล หรือแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่และน้ำ เป็นต้น เป็นผลทำให้กลีเซอรอลที่แยกได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

Yong และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่า มีปริมาณของสารดังนี้ กลีเซอรอล ร้อยละ 20.2 เถ้าร้อยละ 64.3 น้ำร้อยละ 3.0 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 12.4 และพีเอช (pH) 12.8 และเมื่อแยกสิ่งเจือปนโดยใช้กรดซัลฟิวริกแล้ว พบว่ากลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น กล่าวคือ ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 33.9 กรดไขมันดิบ (crude fatty acid) ร้อยละ 10.5 และเกลือ (salt) ร้อยละ 65.2 และยังพบว่า pH มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล จากการปรับเปลี่ยนพีเอช (pH) ของสารละลายกลีเซอรอลจากพีเอช (pH) 1-7 พบว่าที่พีเอช (pH) 1-2 ให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์สูงสุด กล่าวคือ มีกลีเซอรอลร้อยละ 54 เถ้าร้อยละ 7.4 น้ำร้อยละ 7.5 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 31.1 หลังจากนำกลีเซอรอลดังกล่าวไปกลั่นแบบสุญญากาศอย่างง่าย (simple vacuum distillation) ที่ความดัน 4×10^{-1} ถึง 4×10^{-2} มิลลิบาร์ และ pH ต่ำกว่า 5 (เพื่อป้องกันการเกิดฟองจากสบู่ที่เกิดขึ้น) ได้กลีเซอรอลกลั่นตัวออกมาที่อุณหภูมิ 120-126 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ พบกลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 96.6 เถ้าร้อยละ 0.03 น้ำร้อยละ 2.4 และสารอินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 2.4 และมีพีเอช (pH) เท่ากับ 3.5

2.3.4.2 กระบวนการทางเคมี (Myers และ Myers, 2007)

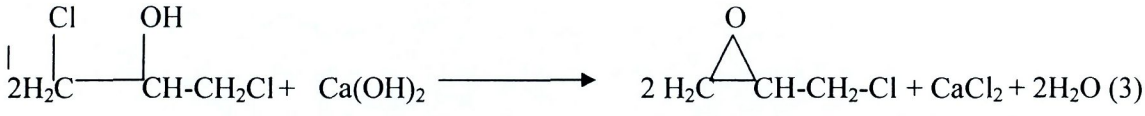
ในปี ค.ศ. 1940 มีความต้องการกลีเซอรอลจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เพื่อใช้ในการผลิตสบู่และเทียน ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 เริ่มมีการผลิตกลีเซอรอลโดยวิธีการหมักจากน้ำตาลเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีผลิตจากกระบวนการทางเคมีซึ่งสังเคราะห์มาจากโพรไพลีน (propylene) โดยการสังเคราะห์จากโพรไพลีนมีขึ้นครั้งแรกก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 และการผลิตในเชิงการค้าเริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 1943 โดยประเทศเยอรมนี

การสังเคราะห์กลีเซอรอลทางเคมีนั้นเริ่มจากการที่คลอรีนเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของโพรไพลีน ได้เป็นสารอัลลิลคลอไรด์ (allyl chloride) ตามสมการที่ 1 จากนั้นทำปฏิกิริยากับกรดไฮโปคลอรัสจะได้เป็น 1,3 ไดคลอโรไฮดริน (1,3 dichlorohydrin) ดังสมการที่ 2

$$H_2C{=}CH{-}CH_3 + Cl_2 \longrightarrow H_2C{=}CH{-}CH_2Cl + HCL \quad (1)$$

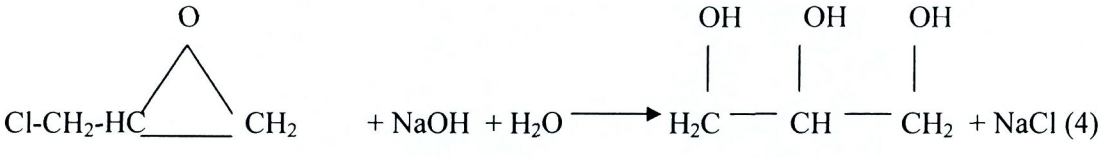
$$H_2C{=}CH{-}CH_2Cl + HOCl \longrightarrow H_2C(Cl){-}CH(OH){-}CH_2Cl \quad (2)$$

จากนั้นเติมสารละลายโซเดียม หรือแคลเซียมไฮโดรออกไซด์ลงใน 1, 3 ไดคลอโรไฮดริน จะได้ อีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) ดังสมการที่ 3



$$2H_2C(Cl){-}CH(OH){-}CH_2Cl + Ca(OH)_2 \longrightarrow 2\,H_2C(O){-}CH{-}CH_2{-}Cl + CaCl_2 + 2H_2O \quad (3)$$

ปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายนั้นอีพิคลอโรไฮดรินจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น กลีเซอรอลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต ดังสมการที่ (4)



$$Cl{-}CH_2{-}HC(O){-}CH_2 + NaOH + H_2O \longrightarrow H_2C(OH){-}CH(OH){-}CH_2(OH) + NaCl \quad (4)$$

การสังเคราะห์อีกทางหนึ่ง คือ อัลลิลคลอไรด์ถูกไฮโดรไลส์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ ($H_2C{=}CH{-}CH_2{-}OH$) จากนั้นเติมคลอรีนจะได้โมโนคลอโรไฮดริน (Monochlorohycrin) และไดคลอโรไฮดริน (Dichlorohydrin) ซึ่งทั้งสองจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตให้กลีเซอรอล

2.3.4.3 กระบวนการทางชีวภาพ

da Silva และคณะ (2009) กล่าวถึงปิโตรเลียมเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดในโลก แต่มีลักษณะที่ต้องใช้อย่างจำกัด จึงทำให้ต้องหาแหล่งพลังงานที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งเป็นที่สนใจกันอย่างมาก อย่างเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) เช่น เอทานอล และไบโอดีเซล ซึ่งเต็มไปด้วยแหล่งต่างๆ เพื่อไปแทนที่ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ไบโอดีเซลสามารถแทนที่ปิโตรเลียมดีเซล (petroleum diesel) ผลิตจากไขมันสัตว์และน้ำมันพืช ซึ่งสร้างกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ (by product) ประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนเกินของกลีเซอรอลที่ถูกสร้างขึ้นอาจจะกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งกลีเซอรอลไม่สามารถถูกจัดการให้หมดไปในสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ที่จะมีการนำกลีเซอรอลไปใช้ โดยอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และ/หรือแหล่งพลังงานจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เพื่อผลิตเป็นสารเคมีโดยใช้กระบวนทางชีวภาพให้มีมูลค่าสูงขึ้น เช่น 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) ไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) เอทานอล (ethanol) ซัคซิเนท (saccinate) เป็นต้น

เพราะฉะนั้น จึงมีการศึกษาการผลิตสารกลีเซอรอลโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ เพื่อลดการใช้ปิโตรเลียม ดังนี้ Benito และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเพคเบด (packed bed) โดยใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตเป็น 36.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง (pH) 6.9 และมีอัตราการเจือจาง (dilution rate) เป็น 1.22 ต่อชั่วโมง

Bisping และ Rehm (1986) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกตรึงอยู่ในซินเตอร์กลาส (sintered glass) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-100 ไมโครเมตร พบว่าซินเตอร์กลาส (sintered glass) มีความสามารถในการกักเก็บเซลล์ได้ดี ซึ่งเมื่อทำการผลิตกลีเซอรอลในสภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) 8 รอบ จะสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ 26.2 ถึง 29.5 กรัมต่อลิตร

Guo และคณะ (2006) ศึกษาผลกระทบของสารควบคุมแรงดันออสโมติกชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกลีเซอรอลของยีสต์ *Candida krusei* ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพลีเอทิลีนไกลคอล 4000 (PEG 4000) และกลีเซอรอล (glycerol) พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 179 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารควบคุมแรงดันออสโมติกเป็นกลีเซอรอล ได้ความเข้มข้นเพียง 80 กรัมต่อลิตร และในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารควบคุมแรงดันออสโมติกสามารถผลิตกลีเซอรอลได้เพียง 41 กรัมต่อลิตร

Zhuge และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดย *Candida glycerinogenes* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมติกสูง (osmotolerance yeast) ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างกลีเซอรอลคือ ที่อุณหภูมิ 29-33 องศาเซลเซียส และพีเอช (pH) 4-6 โดยอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตกลีเซอรอล ประกอบไปด้วยกลูโคส 230-250 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) 5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีฟอสเฟตประกอบ 55-65 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีผลได้ของกลีเซอรอลสูงสุดเป็นร้อยละ 64.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงสุดเป็น 137 กรัมต่อลิตร

Yalcin1 และ Ozbas (2008) ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อที่มีต่อการเจริญเติบโต และจลนพลศาสตร์ของการผลิตกลีเซอรอลแบบกะของเชื้อยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik1 และ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 โดยทำการศึกษาปริมาณหัวเชื้อตั้งแต่ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 2.5 สำหรับสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik1 จะทำให้สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 8.6 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 2.5-7.5 จะสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 7.6 กรัมต่อลิตร

Spencer และคณะ (1956) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Aerobacter aerogenes* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 3.2-4.8 และเมื่อทำการศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Torulopsis magnoliae* พบว่ากลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์เดียวที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก และผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 17

Liu และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าของเชื้อ *Candida krusei* พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 40 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกลีเซอรอลจาก 16.5 เป็น 47.7 กรัมต่อลิตร

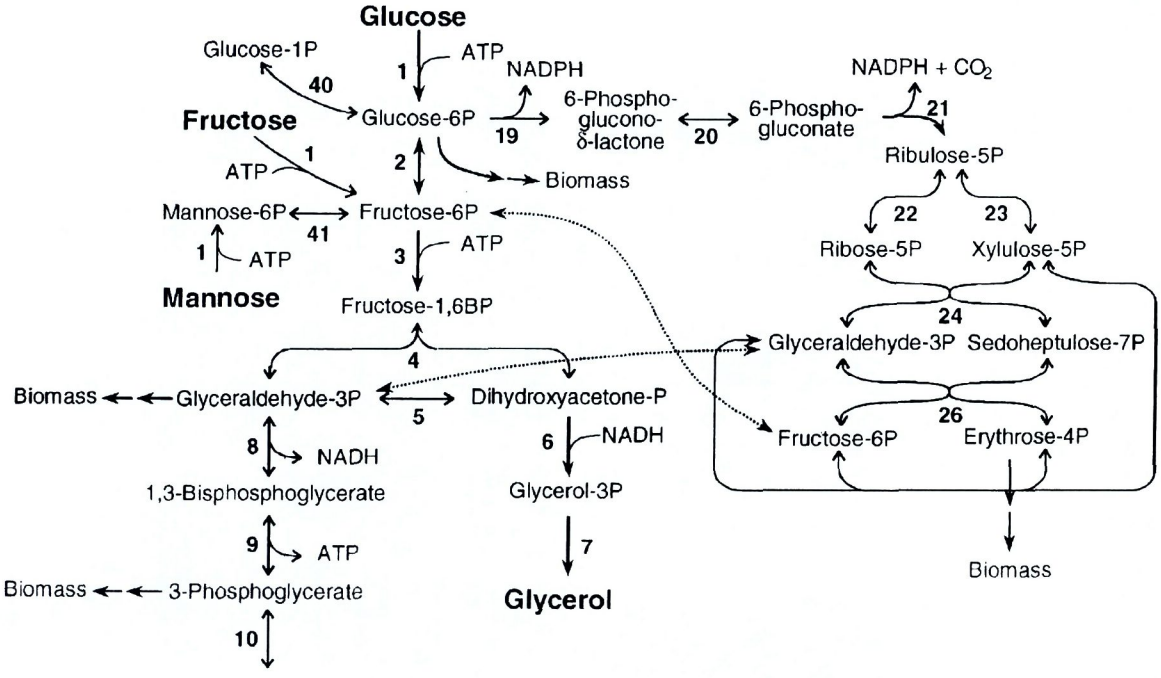
ทั้งนี้ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอลสรุปอยู่ในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล

สายพันธุ์	สารตั้งต้น	กระบวนการ/ระดับการผลิต	ความเข้มข้นกลีเซอรอลในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิต (ร้อยละของการใช้น้ำตาล)	อัตราการผลิตเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	เอกสารอ้างอิง
ยีสต์						
S. cerevisiae	กากน้ำตาล	Batch sulfite/ 12 ลิตร	55	25	11.5	Cocking และ Liliy, 1919
	กลูโคส	Batch insoluble sulfite/ 2.5 ลิตร	35	23	11.6	Underkofler, 1954
	กลูโคส	Continuous sulfite/pilot plant	50	28	33	Freeman และ Donald, 1957a
	กากน้ำตาล	Fed batch sulfite/vacuum, CO_2 sparing	80	25	30	Kalle และคณะ, 1985
	กลูโคส	Batch alkali steered/ 12 ลิตร	45	23	9	Shade และ Farber, 1947
C. magnoliae I B[a]	กลูโคส	Aerobic batch process/ shake flask	79[b]	43	20	Spencer และ Shu, 1957
	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 60 ลิตร	170	ND[c]	17	Peterson และคณะ, 1958
P. farinose	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 1ลิตร	300	ND	75	Vijaikishore และ Karanth, 1986a
C. glycerinogens	กลูโคส	Aerobic batch process/ จาก shake flask ถึง 50,000 ลิตร	110-130	52-63	28-32	Zhung และ Fang, 1995
แบคทีเรีย						
B. subtilis	กลูโคส	Batch/shake flask	14.7	29	2	Neish และคณะ, 1945
สาหร่าย						
D. tertiolecta	CO_2	Batch	0.12	ND	0.066	Ben-Amotz และ Avron, 1981

ที่มา : Wang และคณะ (2001)

2.3.5 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล



1 Glucokinase (GLK) and Hexokinase (HXK)
2 Phosphoglucose isomerase (PGI)
3 Phosphofructokinase (PFK)
4 Aldolase (ALD)
5 Triosephosphate isomerase (TPI)
6 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD)
7 Glycerol-3-phosphatase (GPP)

รูปที่ 2.7 เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล

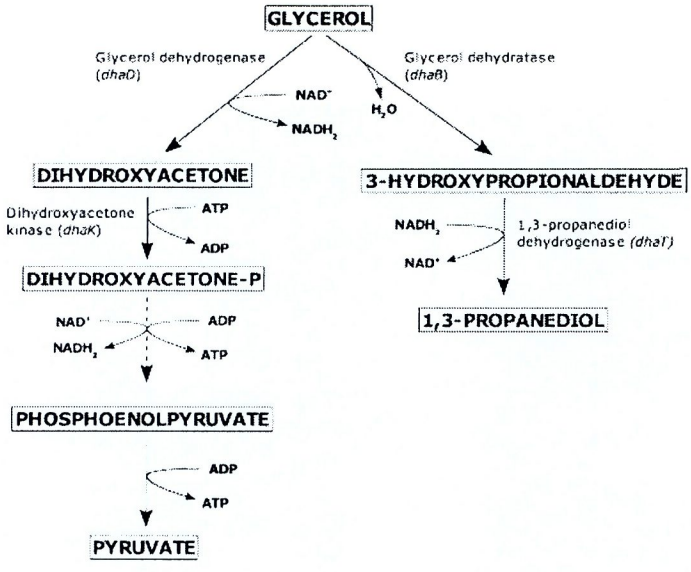
ที่มา : Mostafa (1995)

รูปที่ 2.7 เป็นเมทาบอริซึมของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ เช่น ยีสต์ และแบคทีเรียอย่าง *Lactobacillus lycopersici* กับ *Bacillus subtilis* ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะไม่มีอากาศกับกลีเซอรอลซึ่งมีบทบาทเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีมากมายหลายชนิด เช่น *Citrobacter freundii* (Homann และคณะ, 1990; Daniel และคณะ 1995; Seifert และคณะ, 2001) *Klebsiella pneumoniae* (Forage และ Foster, 1992; Tong และคณะ, 1991; Menzel และคณะ, 1997b; Biebl และคณะ, 1998; Németh และคณะ, 1998; Biebl, 2001) *Clostridium pasteurianum* (Luers และคณะ, 1997; Macis และคณะ, 1998; Biebl, 2001) *Clostridium butyricum* (Abbad-Andaloussi และคณะ, 1995; Biebl, 1991; Biebl และคณะ, 1992; Himmi และคณะ, 1999; Malaoui และ Marczak, 2001; Colin และคณะ, 2001) *Enterobacter agglomerans* (Barbirato และ

คณะ, 1996; Bories, 1997; Barbirato และคณะ, 1997a) *Enterobacter aerogenes* (Ito และคณะ, 2005) และ *Lactobacillus reuteri* (Talarica และคณะ, 1988, 1990)

ในรูปที่ 2.8 *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* และ *Enterobacter* กลีเซอรอลถูกใช้ในเมทาบอลิ-ซึมของจุลินทรีย์เหล่านี้ ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน(oxidation) และรีดักชัน (reduction) (Zhu และคณะ, 2002) ใน oxidative pathway จะมี NAD^+ ไม่อิสระ เอนไซม์ glyceroldehydrogenase (EC 1.1.1.6) กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอลไปเป็น dihydroxyacetone และถัดมาเอนไซม์ dehydroxyacetone kinase (EC 2.7.1.29) เร่งปฏิกิริยาการผลิต phosphorylates (Daniel และคณะ, 1995; Luers และคณะ, 1997; Macis และคณะ, 1998) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) ส่วน reducing pathway จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ glycerol dehydratase (EC 4.2.1.30) ที่ต้องการโคเอนไซม์เป็นวิตามินบี 12 (coenzyme B_{12}-dependent) และเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ diol dehydratases (EC 4.2.1.28) (Toraya และคณะ, 1978; Forage และ Foster, 1982; Knietsch และคณะ , 2003) กลีเซอรอลถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxy propionaldehyde (Toraya และคณะ, 1980; Tong และคณะ, 1991; Seifert และคณะ, 2001) และเอนไซม์ 1,3-propanediol dehydrogenase (1,3-propanediol-oxydoreductase, EC 1.1.1.202) ที่ต้องการ $NADH+H^+$ ($NADH+H^+$ dependent) จะทำการรีดิวซ์ 3-hydroxypropionaldehyde ไปเป็น 1,3-propanediol และสร้าง NAD^+ ขึ้นใหม่ (Macis และคณะ, 1998; Skraly และคณะ, 1998; Ahrens และคณะ, 1998; Veigo da Chuha และ Foster, 1992; Németh และคณะ, 2003) ดังรูปที่ 2.10 ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ 1,3-propanediol (1,3-PDO) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการหมักกลีเซอรอล (Homann และคณะ, 1990; Deckwer, 1995)

ใน *K. pneumoniae* (Forage และ Lin, 1982) และ *C. freundii* ลำดับการเรียงตัวของยีนสุดท้ายทำหน้าที่เชื่อมโยงและกระตุ้นเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB*), 1,3-PDO dehydrogenase (*dhaT*), glycerol dehydrogenase (*dhaD*), และ dihydroxyacetone kinase (*dhaK*) ซึ่งถูกล้อมรอบโดย *dha* regulon (Zhu และคณะ, 2002) ดังรูป 2.4 สำหรับกลุ่มยีน 1,3-PDO ของ *C. butyricum* จะประกอบด้วย 3 ยีนที่แตกต่างกัน คือเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB1*), เป็นตัวกระตุ้นโปรตีน (*dhaB2*) และ *dhaT* (Raynaud และคณะ, 2003) ในแบคทีเรียนี้ เอนไซม์ glycerol dehydrogenase มีความว่องไวต่อออกซิเจนอย่างรุนแรง ซึ่งจะร่วมกับผนังเซลล์ของวิตามินบีสิบสองอิสระ (vitamin-B_{12} independent) (Saint-Amans และคณะ, 2001; Raynaud และคณะ, 2003; Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004, 2005a,b, 2006)



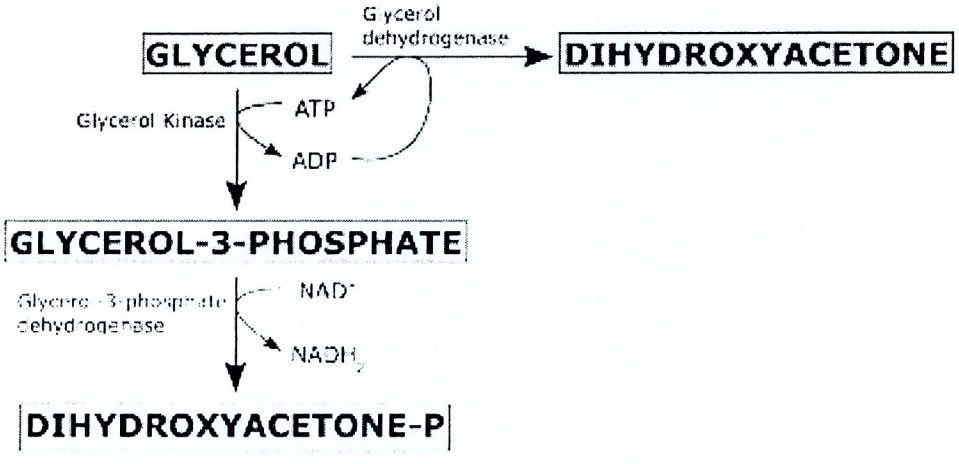
รูปที่ 2.8 ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-PDO

ที่มา : Bouvet และคณะ (1995); Barbirato และคณะ (1997b); Menzel และคณะ (1997a); Biebl (2001)

ใน *S. cerevisiae* และจุลินทรีย์อื่นๆ กลีเซอรอลจะถูกแยกเป็น dihydroxyacetone หรือ glycerol-3-phosphate ตามรูปที่ 2.9 (Wang และคณะ, 2001) จากสารหลังนั้น กลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น glycerol-3-phosphate ผ่านเอนไซม์ glycerol kinase (EC 2.7.1.30) ขณะที่สามารถใช้อันใดอันหนึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไขมันหรือการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dihydroxyacetone phosphate และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอนไซม์ triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) ในปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือสามารถนำมาให้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เมทาบอลิซึมอื่นๆ (Wang และคณะ, 2001) เหมือนวิถีสำหรับ glycerol oxidation (*glp* regulon) ถูกแสดงใน *K. pneumoniae* (Ruch และคณะ, 1974; Forage และ Lin, 1982) *Gluconobacter oxydans* (Bories และคณะ, 1991; Claret และคณะ, 1994) และ *C. acetobutylicum* (Gonzalez- Pajuelo และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.5 ตามด้วย Ruch และคณะ (1974) ซึ่งวิถี glycerol-3-phosphate เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะที่มีอากาศของกลีเซอรอลใน *K. pneumoniae* (เปลี่ยนชื่อมาจาก *K. aerogenes*) ขณะที่วิถี dihydroxyacetone เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะไม่มีอากาศของสารตั้งต้นนี้

การหมักจากกลีเซอรอลไปเป็นเอทานอลหรือบิวทานอลโดย *C. pasteurinum* ไม่ขึ้นอยู่กับการสร้างเป็นผลพลอยได้ (by-product) (Biebl, 2001) จนกระทั่งตัวพาไฮโดรเจนจะสมบูรณ์เมื่อถูกสร้างขึ้นใหม่ในวิถี (Biebl และคณะ, 1998) อีกตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการ redox-balanced เป็น

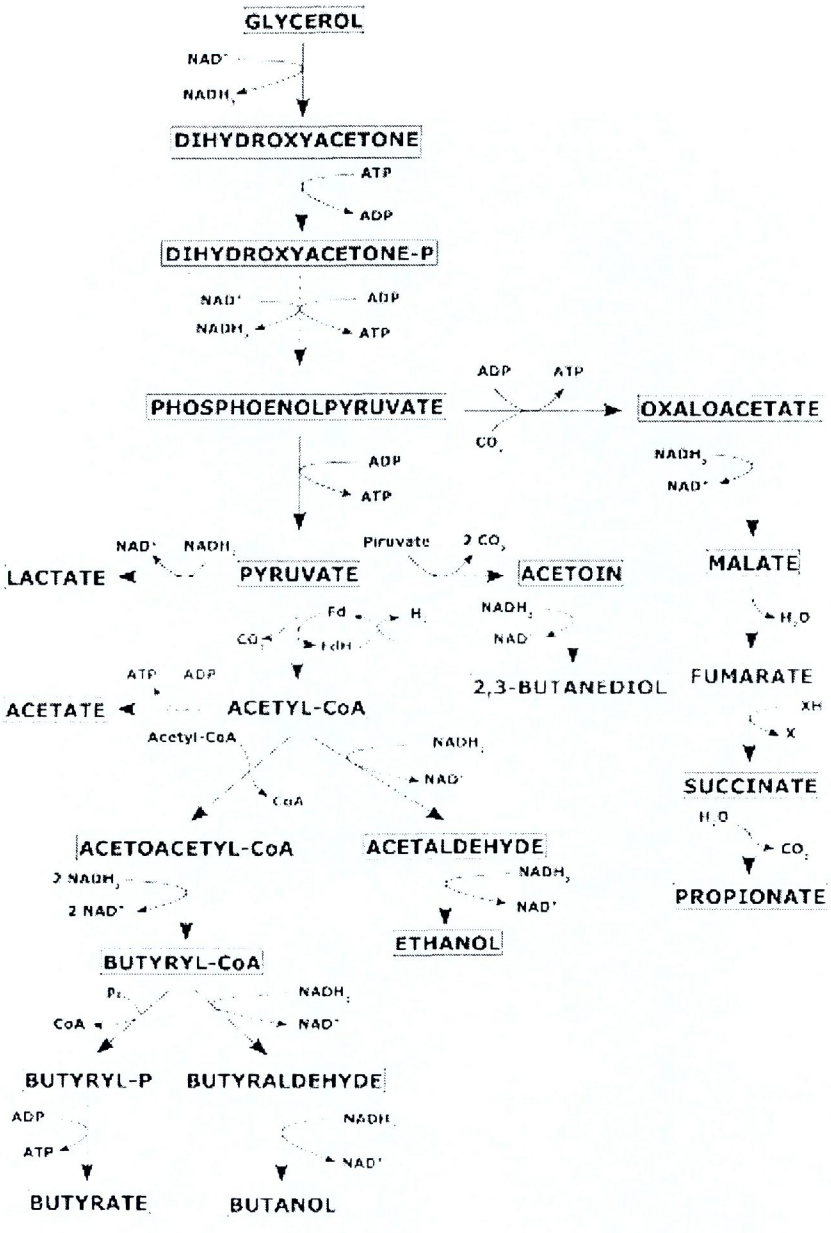
การเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น succinic acid แม้ว่าวิถีสำหรับเอทานอลและ saccinate มีค่าเท่ากับ redox-balanced ที่เกี่ยวโยงกันทั้งหมด ซึ่งมีการใช้พลังงานของวิถี ethanologenic สูงมาก คือ 1ATP เป็นผลผลิตต่อแต่ละโมเลกุลของกลีเซอรอล ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ขณะที่การผลิตพลังงานในวิถี saccinate จะถูกจำกัดไปเป็นความสามารถในการสร้าง proton motive force โดย fumarate reductase (Dharmadi และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.9 วิถีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย *C. oxydans* ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตนอกเซลล์ของ DHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate

ที่มา : Bories และคณะ (1991) และ Claret และคณะ (1994)

กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีแอลกอฮอล์ น้ำมัน มอนอกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ สบู่ และสิ่งสกปรกอื่นๆ ปนกันอยู่ การทำกลีเซอรีนบริสุทธิ์ทำได้โดยนำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยากับกรด เพื่อให้กลายเป็นกรดไขมันและเกลือ พร้อมทั้งเติมสารละลายเฮกเซนเพื่อละลายสิ่งเจือปนต่างๆ ให้แยกออกจากชั้นกลีเซอรีน จากนั้นนำกลีเซอรีนไปเติมผงถ่านและกรองออก จะได้กลีเซอรีนที่ใสสะอาด เมื่อกลั่นเอาแอลกอฮอล์ออก ก็จะได้กลีเซอรีนบริสุทธิ์ในที่สุด



รูปที่ 2.10 ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล

ที่มา : da Silva และคณะ (2009)

การผลิตไบโอดีเซลจึงยังเป็นกระบวนการที่ไม่คุ้มค่าการลงทุน ดังนั้นในการที่จะขยายกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไปสู่ระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นจะต้องมีการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้ โดยในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันนั้นจะเกิดกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ดังนั้น

แนวคิดในเชิงเศรษฐศาสตร์แนวหนึ่ง คือ การทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลนั้นต่อไป กลีเซอรอลที่บริสุทธิ์จะมีราคาสูงกว่าเมทิลเอสเตอร์

กลีเซอรอลเป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของการหมักเอทานอลจากกลูโคสหรือเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการที่มีขั้นตอนเริ่มต้นจากไขมันพืช และไขมันสัตว์ มีแบคทีเรียจำนวนมากหมักกลีเซอรอลไปสู่สารเคมี เช่น บิวทานอล เอทานอล อะซีโตน กรดอะซิติก และกรดแลคติค ตามรูปที่ 2.10 อีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลคือ การแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารมูลค่าเพิ่ม โดยการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นบิวทานอล ซึ่งเป็นตัวเด่นที่สุด

2.4 กระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

บิวทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนหมักแบบไม่ใช้อากาศโดยแบคทีเรียไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* และ *C saccharoperbutylacetonicum* เป็นต้น โดยทั่วไปแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* สามารถหมักแป้ง น้ำตาลเฮกโซส หรือเพนโตส เป็นอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ได้โดยผลิตในอัตราส่วน 6:3:1 (Spivey, 1978)

แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ลักษณะตามตัวอย่างแบคทีเรียในจีนัสตามรูปที่ 2.11 เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิลิตร เป็นพวกแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (obligate anaerobes) หรือมีบางพวกเป็นแบคทีเรียที่ทนอากาศ (aerotolerant) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว มีความสามารถในสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย ตามรูปที่ 2.12 การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถทนทานอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น การขาดสารอาหาร เป็นต้น สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์มีความทนทานต่อความร้อน ความแห้ง และสารเคมีได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) สามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ เมทาบอริซึมของแบคทีเรียจะหยุดชะงัก จนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงงอกใหม่เป็นเซลล์ปกติ (จริยา, 2541)

รูปที่ 2.11 ลักษณะของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า

ที่มา : Spivey (1978)

รูปที่ 2.12 ลักษณะสปอร์ของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า

ที่มา : Spivey (1978)

การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือด (blood agar) และ อาหารแข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดง (egg yolk agar) ในสภาพไม่มีอากาศเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โคโลนีจากอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือด สามารถนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดง สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์เลซิทิเนส (lecithinase) โดยดูจากลักษณะตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากความเป็นเงา (iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

การแยกเชื้อ *Clostridium* ออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ (Primary isolation) ทำได้โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียสนาน 10-15 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ และบ่มไว้ 37

องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงต่อ (subculture) ในอาหาร หรือนำตัวอย่าง ใส่ในอาหาร thioglycolate broth ที่มีกลูโคส บ่มไว้ 24-48 ชั่วโมง เชื้อ *Clostridium* จะเปลี่ยนกลูโคสได้เป็นกรดที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้

เชื้อ *Clostridium* เป็นพวกที่ไม่มีระบบไซโตรโครม และกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพื่อสร้างสารพลังงาน ATP ดังนั้นการได้มาซึ่ง ATP จึงต้องผ่านกระบวนการ ซับสเตรท-เลเวล-ฟอสโฟ-รีเลชั่น (substrate- level-phosphorylation) การจัดจำพวกในระดับจีนัสออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ จะใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้สารชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *C. cellodioparum* และ *C. thermocellum* สามารถหมักเซลลูโลสแล้วให้ผลเป็นกรดอะซีติก (acetic acid) กรดซัคซินิค (succunic acid) เอทานอล (ethanol) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2) ส่วน *C .butyricum C. pasteurianum C .perfringens* และ *C .acetobutylicum* หมักน้ำตาล แป้ง และแพคติน ให้ผลลัพธ์เป็นอะซีโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) กรดบิวทิริค (butyric acid) กรดอะซีติก (acetic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2)

2.4.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก

ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วง ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นเรียกช่วงนี้ว่า อะซิโดจีนิซิสเฟส (Acidogenesis phase) โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซี-ติลโคเอ (acetyl CoA) และอะซีติลโคเอ จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซีติก (acetic acid) และบิวไทริลโคเอ (butyryl CoA) ก่อนเปลี่ยนเป็นกรดบิวทิริก (butyric acid) ในช่วงนี้ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง จากนั้นแบคทีเรียจะเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวทำละลายต่างๆ โดยกรดอะซีติกจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีโตน ส่วนกรดบิวทิริกจะถูกเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และอะซิติลโคเอเปลี่ยนเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (acetyldehyde) ซึ่งอะซิทัลดีไฮด์จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล เรียกช่วงนี้ว่า โซลเวนโทจีนิซิสเฟส (Solventogenesis phase) ในขั้นตอนนี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นและจะมีการนำกรดอินทรีย์มาใช้เป็นบางส่วน ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ อะซิโดจีนิซิสเฟสเปลี่ยนเป็น โซลเวนโทจีนิซิสเฟส เรียกว่า จุดเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่าง (pH transition point) หรือ จุดยุติค่าความเป็นกรดด่าง (pH break – point) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่ากรดอินทรีย์ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักยังมีแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นด้วย วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล แสดงดังรูป 2.5

2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดและได้ปริมาณบิวทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักบิวทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยสำคัญและองค์ประกอบด้านสภาพแวดล้อมอื่นๆ

2.4.3.1 สารตั้งต้น

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Clostridium* วัสดุที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลและสารคาร์โบไฮเดรตในรูปต่างๆ ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและโพลิเมอร์ ซึ่งอาจจำแนกได้ดังนี้ ประเภทที่หนึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวจ้าว ข้าวเหนียว ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันเทศ เป็นต้น ประเภทที่สอง เป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ กากน้ำตาล หางนม เป็นต้น และประเภทที่สาม เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าวและซังข้าวโพด เป็นต้น

Robinson (1922) ศึกษากระบวนการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส แลคโตส แป้ง และเดกตรินเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ส่วนกาแลคโตส ไซโลส อะราบิโนส ราฟฟิโนส เมเลซิโตส อินนูลิน แมนนิทอลถูกใช้ไปเพียงบางส่วน และน้ำตาลทรีฮาโลส แรมโนส เมลิไบโอส กลีเซอรอล ไม่ถูกใช้ในการหมัก

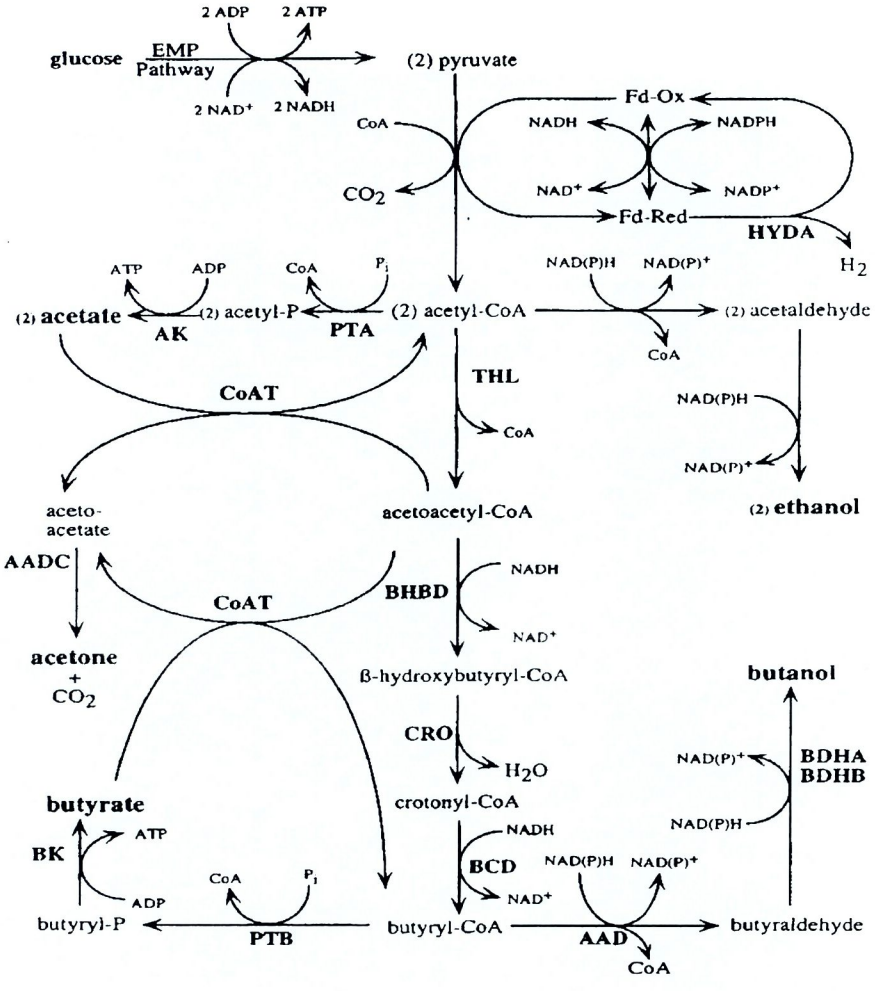
หากใช้น้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียชนิดนี้จะมีวิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ตามรูปที่ 2.13

2.2.3.2 ความเข้มข้นของสารอาหาร

ในการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล มีรายงานว่า การกำจัดปริมาณคาร์บอนเป็นอันตรายต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ภายใต้การจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณกรดในขั้นตอนสุดท้ายที่เกิดขึ้นจะไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้

2.2.3.3 อุณหภูมิ

McCutchan และ Hickey (1954) ทำการศึกษาอุณหภูมิในการหมักที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อัตราผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมัก มีรายงานว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ผลอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30 องศาเซลเซียสและ 33 องศาเซลเซียส แต่การผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลองคล้ายกับการทดลองการหมักในอาหารสังเคราะห์ (synthesis medium)



รูปที่ 2.13 วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส (phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase) CoAT แทนอะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต- บิวทิเรต:โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-COA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซิเตท ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส(butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/ alcohol dehydrogenase) BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)

ที่มา: Ruchir และคณะ (1999)

2.2.3.4 ออกซิเจน

O' Brien และ Morris (1971) ศึกษา *C. acetobutylicum* ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไม่มีอากาศ การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหนักที่มีความต่างศักย์รีดอกซ์ ในช่วงระหว่าง -250 ถึง -400 มิลลิโวล์ท การสัมผัสกับออกซิเจนในน้ำหมักแบบไร้อากาศไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดในระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าน้ำหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40-60 ไมโครโมลาร์) การใช้กลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง อัตราการเจริญ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนจะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ จุลินทรีย์จะมีพลังงานน้อยลง และมีการผลิตบิวทาเรทแต่ไม่มีการผลิตอะซีเตท และจะหยุดการผลิตทำให้ปริมาณ ATP ในเซลล์ลดลง การเจริญและเมทาบอลิซึมจะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้อากาศอีก

2.2.3.5 ระดับความเป็นกรดด่าง (pH)

ในน้ำหมักความเป็นกรดด่างจะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล หากรักษาระดับความเป็นกรดด่างของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรด ในทางตรงข้ามถ้ารักษาค่าความเป็นความเป็นกรดด่างไว้ที่ค่าต่ำๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์อย่างไรก็ตามช่วงของความเป็นกรดด่างที่จะทำให้มีการผลิตสารละลายอยู่ในช่วงกว้าง ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสภาวะในการหมัก (Jones และWoods, 1986) ช่วงความเป็น กรดด่างที่มีการสร้างสารละลายมักอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.8-5.5 (Bahl และคณะ, 1982)

2.2.3.6 วิตามิน

ไบโอติน (biotin) และกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างอะซีโตน-บิวทานอล ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีอยู่ในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือวัตถุดิบที่ประกอบไปด้วยวิตามินที่จำเป็น (essential vitamin) (นวลจันทร์และสุวิญชา, 2548)

2.2.3.7 Clostridial degeneration

กลไกการเกิดความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์บ่งชี้ได้จาก (1) การสร้างกรดที่มากเกินพอระหว่างการเจริญในช่วง การเติบโตแบบทวีการ(exponential phase) ซึ่ง Eva และคณะ (1995) ได้รายงานว่า *C. beijerinckii* NCIMV 8052 มีการใช้กลูโคสในการหมักซึ่งจะได้กรดอะซีติกและกรดบิวทาริก ในอัตราที่มากกว่าการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ความเป็นกรดด่างลดลงและเซลล์ไม่สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในช่วงของการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenesis phase) ได้และมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น (2) Hugh และ Chen ในปี 1995 ได้คัดแยกสายพันธุ์กลายของ *C. beijerinckii* NCIMV 8052 ซึ่งมีความทนทานต่อความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัว

ทำละลายอินทรีย์ (3) มีการคาดคะเนว่ายีนควบคุมของ *C. beijerinckii* ที่มีการสูญเสียสภาพแล้วไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ในการเพาะเลี้ยงแบบ คีโมสแตท(chemostat) และ (4) เซลล์ที่เสียสภาพจะแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องในการหมักแบบต่อเนื่องขณะที่เซลล์ที่ไม่เสียสภาพจะหยุดแบ่งตัวแล้วเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอนโดสปอร์

2.5 สัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Firmicutes
Class	:	Clostridia
Order	:	Clostridiales
Family	:	Clostridiaceae
Genus	:	*Clostridium*

Clostridium เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิเมตร เป็นพวก Obligate anaerobes หรือมีบางพวกเป็น Aerotolerant ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์ทนความร้อนได้ดีสามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงใน Blood agar และ Egg yolk agar ในสภาพไม่มีอากาศเป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง โคโลนีจาก Blood agar สามาถนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญใน Egg yolk agar สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lecithinase โดยดูจากลักษณะตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lipase โดยดูจากความเป็นเงา (Iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

การแยกเชื้อ *Clostridium* ออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ (Primary isolation) ทำได้โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 10 - 15 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ และบ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงต่อ (Subculture) ในอาหาร หรือนำตัวอย่าง ใส่ในอาหาร Thioglycolate broth ที่มีกลูโคส บ่มไว้ 24 - 48 ชั่วโมง เชื้อ *Clostridium* จะเปลี่ยนกลูโคสได้เป็นกรดที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำตัวอย่างใส่ใน Chopped meat medium ปิดฝาสนิทด้วย Pertrolatum หลังจากบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึง Subculture ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น

ลักษณะสำคัญของ *Clostridium* แต่ละสปีชีส์ คือ ความสามารถในการ Ferment น้ำตาลต่างชนิดกันได้ นอกจากนี้ *Clostridium* บางชนิดยังสามารถให้ก๊าซมากพอ ที่จะนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อได้ *Clostridium* sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน ตามพืชผักต่างๆ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และมีเพียง 2-3 สปีชีส์ ในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Clostridium botulinum* เป็นสาเหตุสำคัญของโบทูลิซึม (Botulism) *Clostridium tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก (Tetanus) และ *Clostridium perfringens* ทำให้เกิดก๊าซแกงกรีน (Gas Gangrene)

โรคที่เกิดจาก *Clostridium*

Clostridium botulinum Clostridium perfringens และ *Clostridium tetani* มี Exotoxin ที่รุนแรงสามารถที่จะทำให้เกิดโรคที่ร้ายแรงได้ คือ โรคอาหารเป็นพิษ Botulism gas gangrene และบาดทะยัก

2.5.1 *Clostridium acetobutylicum*

รูปที่ 2.14 ภาพของ *Clostridium acetobutylicum*

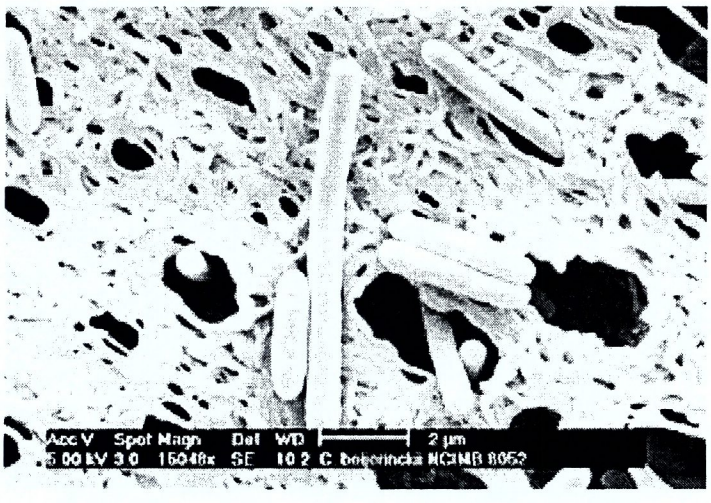
ที่มา : www.scribemedia.org/2007/09/18/nanologix-clostridia/ (25/04/2554)

Clostridium acetobutylicum รูปร่างเป็นแท่งตรง ตามที่แสดงในรูปที่ 2.14 เคลื่อนที่โดยใช้ pertrichous flagella สปอร์เป็นรูปไข่ อยู่ค่อนไปทางปลายเซลล์ ติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีไม่สม่ำเสมอ สีขาวเทา โปร่งแสงเป็นมัน เจริญได้เล็กน้อยในอาหาร NB แต่ถ้ามีคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อมักจะเจริญได้ดี หมักผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมีกรดอะซิติก บิวทิวริก บิวทานอล และสร้างอะซีโตน สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจน พบทั่วไปในดิน

Clostridium acetobutylicum อยู่ในจีนัส *Clostridium* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญเชิงการค้าอย่างมาก บางครั้งสามารถเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า "Wiezmann Organism" ซึ่งเป็นชื่อที่ตั้งตาม Chiam Weizmann ที่ผู้ค้นพบแบคทีเรียชนิดนี้ในปี 1916 เขายังค้นพบอีกว่า

Clostridium acetobutylicum นั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล จากแป้งโดยใช้กระบวนการ ABE (Acetone Butanol Ethanol process) ในงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตดินปืน และดินระเบิด กระบวนการ ABE กลายมาเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมจนกระทั่งปลายปี 1940 เมื่อน้ำมันมีราคาลดลงทำให้มีผลกระทบอย่างมากต่อกระบวนการพื้นฐานของการแยกไฮโดรคาร์บอน และเทคนิคการกลั่นปิโตรเลียม *Clostridium acetobutylicum* ยังสามารถผลิตกรดอะซีติก กรดบิวทีริก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน

2.5.2 *Clostridium beijerinckii*



รูปที่ 2.15 ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน
ที่มา : http://genome.jgi-psf.org/clobe/clobe.home.html (11/03/2554)

Clostridium beijerinckii เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ดังแสดงในรูปที่ 2.15 สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำการแยกได้จากอุจจาระและในดิน จะมีการสร้างสปอร์เป็นรูปท่อนปล้องมีลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ไก่ ในระดับอุตสาหกรรมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น บิวทานอล อะซีโตน และไอโซโพรพานอล ณ สภาวะไร้ออกซิเจนที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 °C จะมีการใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีความหลากหลาย(ไม่จำกัดจำนวน) ซึ่งรวมถึง เพนโตส เฮกโซส และแป้ง ข้อดีของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ มีความสามารถในการเติบโตที่ง่าย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาไม่แพงในการเพาะเลี้ยง มีความเสถียรของสายพันธุ์ที่ทนต่อการเสื่อมสภาพ มีการปรับตัวดีในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง และตัวทำละลายจะทำงานได้ดีในระยะ Log phase เป็นต้น *Clostridium beijerinckii* สามารถหมักแป้งได้เป็นบิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ และ ได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย นอกจากนี้*Clostridium beijerinckii* บางสายพันธุ์จะผลิตไอโซโพรพานอลออกมาด้วยนอกเหนือจากอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตนี้สามารถกำหนดสภาวะให้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการได้ รวมทั้งยังศึกษาความเป็นไปได้ที่จะมีประยุกต์ใช้เศษวัตถุดิบเหลือใช้มาประยุกต์ใช้เพื่อทำการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่างๆ เพื่อเป็นการลดต้นทุนด้านวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโดยทดแทนสารตั้งต้นสังเคราะห์สำเร็จรูปที่มีราคาแพง รวมไปถึงช่วยลดปัญหามลภาวะที่มาจากเศษวัตถุดิบ เหลือใช้จากทางการเกษตร

จิรกานต์และคณะ (2544) ศึกษาพัฒนา เทคโนโลยีการผลิต n-butanol จากวัสดุทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน การศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล โดยใช้เชื้อ *Clostridium butylicum* NRRL B592 และ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบ มันสำปะหลังสด มันสำปะหลังหลังย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งมันสำปะหลัง และผักตบชวาหลังย่อยด้วยกรด ผลจากการทดลองพบว่าการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสดที่ค่าน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ให้บิวทานอลสูงสุด (11.1-11.3 กรัมต่อลิตร) การเพิ่มผลผลิตสามารถทำโดยการพัฒนากระบวนการผลิต จากการทดลองหมักอะซีโตน บิวทานอลแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนกลับของเซลล์สามารถทำให้อัตราการผลิตเป็น 20 เท่าของแบบครั้งคราว และ 4.6 เท่าของแบบต่อเนื่อง พบว่าภาวะที่เหมาะสมคือที่ความเข้มข้นน้ำตาล 52 กรัมต่อลิตร

Gheshlaghi และคณะ (2009) เป็นบทความที่กล่าวถึงเมทาบอลิซึมของ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย (heterofermentative) สร้างสปอร์ได้ (Girbal และ Soucaille, 1994) การหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) แบบแบช (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอริซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตตและบิวทาเลต กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่า pH ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

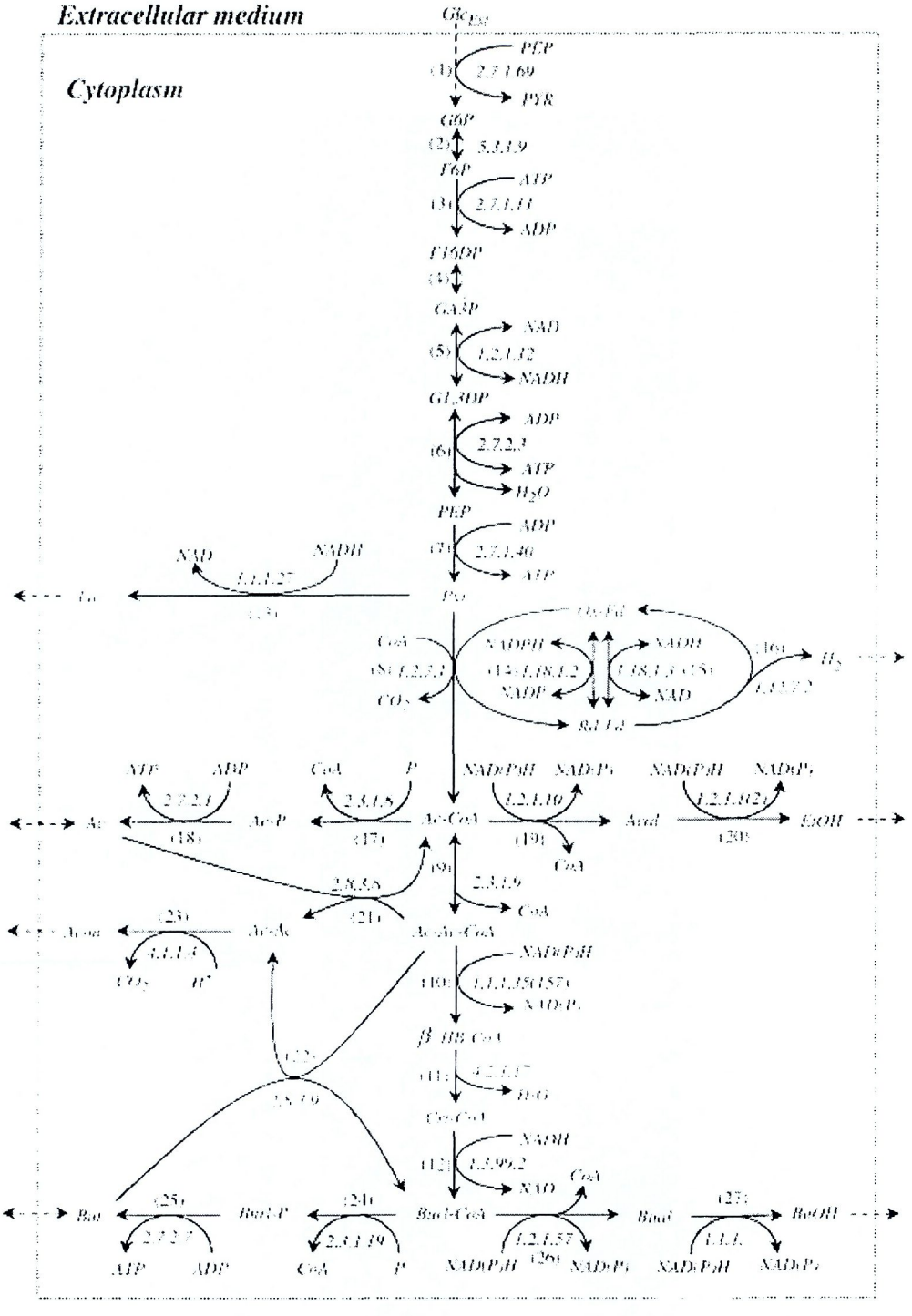
ในกระบวนการหมักขั้นที่สอง (BalLongue และคณะ, 1985) กรดที่เกิดขึ้นมาก่อนหน้านี้จะกลับเข้าไปยังเซลล์ และทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrates) สำหรับการผลิตสารละลายที่เป็นกลาง (Fond และคณะ, 1985; Kell และคณะ, 1973) เมื่อมาถึงในขั้นตอนนี้ กระบวนการผลิตกรดจะสิ้นสุดลงพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะสิ้นสุดลงเช่นกัน และค่า pH ของอาหาร

จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดถูกดูดกลืนเข้าไปในเซลล์ (Terracciano และ Kashket, 1986; Spivey, 1978) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนไปของกระบวนการผลิตสารละลายนั้น คือการที่เซลล์ปรับตัวเพื่อตอบสนองต่ออาหารที่มีค่า pH ต่ำ อันเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตกรด ผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายที่ได้จากการหมักนี้คือบิวทานอล โดยมีอะซีโตน และเอทานอล เป็นผลิตภัณฑ์รองลงมา แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของคาร์โบไฮเดรต และสภาวะการเพาะเลี้ยง ขอบเขตของการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวทำละลายนี้มีความไม่แน่นอน นอกจากนี้ คาร์บอนและอิเล็กตรอนเป็นตัวกำหนดรูปแบบของตัวทำละลายเหล่านี้ ในท้ายที่สุดของกระบวนการหมักตัวทำละลายอาจจะมีระดับความเข้มข้นจนถึงระดับของการยับยั้ง และทำให้กระบวนการผลิตสิ้นสุดลง (Bowles และ Ellefson, 1985) ตัวทำละลายที่สะสมน่าจะมีผลต่อเซลล์ของ *C. acetobutylicum* โดยการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของเซลล์ (Moreira และคณะ, 1981) และของเหลวในเซลล์ (Vollherbst-Scheneck และคณะ, 1984)

วิถีทางชีวเคมีที่หลากหลายในกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ถูกศึกษาในหลายรายงาน (Andreesen และคณะ, 1989; Ljungdahl และคณะ, 1989; Jones และ Woods, 1986; Rogers, 1986) และวิถีที่เป็นที่นิยมโดยทั่วไปได้แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.14

Kotze (1969) ได้พบว่าเอนไซม์เฮกโซฮิเนส (hexohinase, HK, EC 2.7.1.2) เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (glucose-6-phosphate phosphate isomerase, G6PI, EC 5.3.1.9) และเอนไซม์ไพรูเวตไคเนส (pyruvate kinase, PK, EC 2.7.1.40) มีกิจกรรมที่แตกต่างกันไปในกลุ่มของ clostridia (ตัวอย่างเช่น กลุ่มที่ย่อยน้ำตาลได้ (saccharolytic) กลุ่มที่ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic) กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสได้ (cellulolytic) หรือกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ (nitrogen fixing) ซึ่งทั้งหมดนี้มีความสามารถในการสลายคาร์โบไฮเดรต

จากวิถีของเชื้อ *C. acetobutylicum* ในรูปที่ 2.16 เฮกโซส 1 โมล จะให้ไพรูเวต 2 โมล ได้ ATP 2 โมล และ NADH 2 โมล กระบวนการผลิตตัวทำละลายจาก clostridia ยังสามารถใช้น้ำตาลเพนโตสโดยวัฏจักรของเพนโตสฟอสเฟต (Ounine และคณะ, 1983; Cynkin และ Delwiche, 1958) ผลที่ได้ระหว่างการเติมหมู่ฟอสเฟต คือการเปลี่ยนจากเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส (transaldolase) และเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส (transketolase) ให้ได้ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceraldehydes-3-phosphate) ซึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรไกลโคไลซิส กระบวนการสลายเพนโตส 3 โมล ไปเป็นไพรูเวต จะให้ ATP 5 โมล และ NADH 5 โมล (Rogers, 1986)



รูปที่ 2.16 วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ *Clostridium acetobutylicum* เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์ และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับ จำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC ชื่อเต็มของเอนไซม์ และชื่อย่อสารเคมี จะแสดงในส่วนคำย่อและสัญลักษณ์

ที่มา: Gheshlaghi และคณะ (2009)

โดยทั่วไป เชื้อจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* DG1 เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว แต่สายพันธุ์ผสมจะสามารถเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนนี้ ซึ่งจะใช้เอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส (glycerol kinase) และเอนไซม์กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) สำหรับการออกซิไดซ์กลีเซอรอล โดยที่กลีเซอรอล 1 โมลที่ถูกใช้ไปจะให้ ATP 1 โมลและNADH 2 โมล *C. acetobutylicum* ได้แสดงให้เห็นถึงการมียีนหลาย ๆ ตัวที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส (Nolling และคณะ, 2001) แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Mitchell, 1998) clostridia กลุ่มที่ย่อยน้ำตาลได้จะสามารถเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นแลกเตตได้ โดยเอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) อย่างไรก็ตาม ไพรูเวตส่วนใหญ่จะใช้ไปในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไพรูเวตเฟอเรอออกซินดอกซิโดรีดักเทส (pyruvate-ferredoxin oxidoreductase) ไปเป็นอะเซตทิวโคเอ (acetyl-CoA) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กับการลดลงของเฟอเรดอกซิน (ferredoxin) ไปพร้อม ๆ กัน

Turkish (2008) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum*ที่กลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต การกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) และ ethyl methane sulphonate (EMS) โดยมีการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักในถังหมักขนาด 14 ลิตร โดยมี pH เริ่มต้นที่ 6.2 และไม่ควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดกระบวนการหมัก เติมก๊าซไฮโดรเจนในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะปลอดออกซิเจน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงจะพบว่าการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต และการใช้สารN-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตบิวทานอลแต่การเติมสาร ethyl methane sulphonate (EMS) นั้นมีความสามารถในการเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ร้อยละ 20

Qureshi และคณะ(2008a) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการหมักที่มาจากฟางของต้นข้าวสาลีที่ผ่านการใส่อัลคาไลน์เพอร์รอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ : การผลิตบิวทานอลจากฟางต้นข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยโดยใช้ *Clostridium beijerinckii* ในถังหมักแบบกะ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักในในขวดฝาเกลียวปิดขนาด 125 มิลลิลิตรทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ เป็นการเปรียบกันระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคสในการหมักและกลุ่มที่ใช้ฟางข้าวสาลีที่ถูกย่อยและกำจัดเกลือ จะพบว่าสามารถผลิต อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้ 21.37 และ 22.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Qureshi และคณะ (2008b) ศึกษาการผลิตบิวทานอล จากกระบวนการย่อยฟางข้าวสาลีโดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ด้วยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวสาลีให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและการหมักให้ได้บิวทานอลไปพร้อมๆกันได้ผล

100% ในการเพิ่มฟางข้าวสาลีโดยการป้อนลงในถังหมักร่วมกับสารละลายน้ำตาล ทำให้อัตราผลผลิต (productivity) ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เพิ่มขึ้น 16% เมื่อเทียบกับการการทดลองการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและการหมักให้ได้บิวทานอลไปพร้อมๆ กัน ซึ่งได้อัตราผลผลิต (productivity) 0.36 $gL^{-1}h^{-1}$ และ ณ เวลาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ถูกกระตุ้นสูงสุดจะได้อัตราผลผลิต (productivity) 0.77 $gL^{-1}h^{-1}$ การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องใช้เวลาในทั้งสิ้น 533 ชั่วโมง

Qureshi และคณะ (2010) ศึกษากระบวนการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดและการย่อยหญ้า switchgrass โดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลของการทดลองจะได้ว่า การทดลองควบคุมจะใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น ผลลัพธ์ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลทั้งหมดเท่ากับ 21.06 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิว-ทานอล เอทานอลคือ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดโดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะไม่แสดงการเจริญเติบโต และไม่เกิดการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำและเจือจางด้วยการหมักการย่อยฟางข้าวสาลี (อัตราส่วน 1:1) ผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลจะมีค่าความเข้มข้นเป็น 16.00 และ 18.04 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ผลลัพธ์ของอัตราผลผลิต (productivity) มีค่าระหว่าง 0.17-0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการปรับสภาพด้วยการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพด ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] (เรียกว่ากระบวนการ Overliming) จุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลได้ 26.67 กรัมต่อลิตร การย่อยหญ้า switchgrass โดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะทำให้ผลของการหมักต่ำ และจุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลมากกว่า 1.48 กรัมต่อลิตร หรือมากเกิน 14.61 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การปรับสภาพสารชีวมวลไม่สามารถที่จะหยุดการสร้างสารยับยั้งที่มาจากการทดลองได้ หรืออีกประการหนึ่ง เชื้อจุลินทรีย์ทนต่อสารยับยั้งและสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งอาจใช้สำหรับเป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการหมักอื่นๆให้ดีขึ้น

Turkish (2008) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum* ที่กลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต การกลายพันธุ์โดยใช้สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) และ ethyl methane sulphonate (EMS) โดยมีการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักในถังหมักขนาด 14 ลิตร โดยมี pH เริ่มต้นที่ 6.2 และไม่ควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดกระบวนการหมัก เติมก๊าซไฮโดรเจนในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะปลอดออกซิเจน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงจะพบว่าการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต และการใช้สาร N-methyl-N-

nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตบิวทานอลแต่การเติมสาร ethyl methane sulphonate (EMS) นั้นมีความสามารถในการเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ร้อยละ 20

Qureshi และคณะ (2008) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการหมักที่มาจากฟางของต้นข้าวสาลีที่ผ่านการใส่อัลคาไลน์เพอร์รอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้ *Clostridium beijerinckii* มาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตบิวทานอลในถังหมักแบบกะ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักในในขวดฝาเกลียวปิดขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เป็นการเปรียบกันระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคสในการหมักและกลุ่มที่ใช้ฟางข้าวสาลีที่ถูกย่อยและกำจัดเกลือ จะพบว่าสามารถผลิต อะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้ 21.37 และ 22.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Gheshlaghi และคณะ (2009) เป็นบทความที่กล่าวถึงเมทาบอลิซึมของ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย (heterofermentative) สร้างสปอร์ได้ (Girbal และ Soucaille, 1994) การหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) แบบแบช (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอริซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตตและบิวทาเลต กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่า pH ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการ ชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 1997 Fermanek และคณะ พบว่าระดับของบิวทานอลและอะซีโตนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้ผลของบิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย โดย *C. beijerinckii* BA101 และ NCIMB 8052 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ P2 กึ่งแข็ง ที่ประกอบไปด้วยมอลโตเดร็กส์ติน (maltodextrin) ร้อยละ 6 หรือกลูโคสในกระบวนการหมักแบบกะ 20 ลิตร *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 19 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการผลิตบิวทานอลระหว่างสายพันธุ์ BA101กับ NCIMB 8052 พบว่าสายพันธุ์ BA101 ผลิตบิวทานอลในอัตราที่รวดเร็วกว่าสายพันธุ์ NCIMB 8052 และสายพันธุ์ BA101 ยังสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้อย่างสมบูรณ์มากกว่าสายพันธุ์ NCIMB 8052

ต่อมา ในปี ค.ศ. 2004 Tashiro และคณะ ศึกษาการผลิตบิวทานอลด้วยการหมักแบบกึ่งกะที่ควบคุมความเป็นกรดด่างให้คงที่ด้วยการเติมกรดบิวทิริค และกลูโคส จากการทดลองพบว่าการเติมกรดบิวทิริคลงไปในอาหาร สามารถเพิ่มอัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ การผลิตอะซีโตนบิวทานอล และผลได้ของตัวทำละลายด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ได้โดยกระบวนการเติมกรดบิวทิริคและกลูโคส สามารถควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารให้อยู่

ในระดับต่ำได้อย่างสม่ำเสมอ และได้ผลได้ของบิวทานอลสูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 1.5 เท่า นอกจากนี้ยังได้อัตราผลผลิตบิวทานอลจำเพาะ (specific butanol product rate) มากกว่า 0.10 กรัมต่อกรัมต่อลิตรที่เวลา 39 ชั่วโมงของการหมัก เมื่ออัตราการส่วนระหว่างกรดบิวทิริคและกลูโคสเท่ากับ 1.6 และพบว่าการเติมกรดบิวทิริค และการควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 5.5) จะไม่พบการผลิตเอทานอล ในขณะที่การเติมกรดอะซีติกลงไปในอาหารจะเพิ่มการผลิตอะซีโตนเท่านั้น

ในปี ค.ศ. 1982 Bahl และคณะรายงานว่าการเติมกรดอะซีติก และบิวทิริค ลงในการหมักแบบกึ่งกะที่ใช้ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ทำให้ผลได้ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 Monot และคณะ ได้รายงานว่ากรดบิวทิริคที่ถูกเติมลงในอาหารหมัก เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตบิวทานอล โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 จากผลการทดลองยังพบว่า ความเป็นกรดด่างของอาหารมีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ และตัวทำละลาย ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างสูง การหมักจะได้กรดอินทรีย์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่การหมักในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างต่ำจะได้ตัวทำละลายเป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งการผลิตตัวทำละลายโดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 จะเพิ่มขึ้นที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 ซึ่งให้ผลคล้ายการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลด้วย *Clostridium* ชนิดอื่น

ในปี ค.ศ. 1997 Formanek และคณะ พบว่าในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องใน อาหารเลี้ยงเชื้อP2กึ่งแข็ง ที่ประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 6 พบว่าสายพันธุ์ BA101 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ NCIMB 8052 คือ ได้ผลได้และอัตราผลผลิตของตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับ 0.78 และ 1.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงสำหรับสายพันธุ์ BA101 และ 0.34 และ 1.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงสำหรับสายพันธุ์ NCIMB 8052 ที่อัตราเจือจาง 0.05 และ 0.20 ต่อชั่วโมงตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2005 Ezeji และคณะ พบว่าความเป็นไปได้ในการใช้แป้งข้าวโพดในการผลิตอะซี-โตน บิวทานอล เอทานอล โดยใช้ *C. beijerinckii* BA101 ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง โดยเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และหมักแบบต่อเนื่อง *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตอะซีโตน ได้ 5.4 กรัมต่อลิตร บิวทานอลได้ 14.3 กรัมต่อลิตร และเอทานอลได้ 0.3 กรัมต่อลิตร

ปี ค.ศ. 2005 Tashiro และคณะศึกษาการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงด้วยการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ และการดึงเซลล์ออก จากการทดลองพบว่า การหมักอย่างต่อเนื่องที่ไม่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราการเจือจางวิกฤติ (critical dilution rate) เท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมง และให้อัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทา-นอล รวมกันเท่ากับ 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.20 ต่อชั่วโมง สำหรับการหมักอย่างต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอ

ทานอลสูงสุดเท่ากับ 11.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.85 ต่อชั่วโมง ซึ่งการหมักในระบบนี้สามารถปรับปรุงอัตราการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเชิงปริมาตรได้เมื่อหมักอย่างต่อเนื่องที่อัตราเจือจางสูง (มากกว่า 0.52 ต่อชั่วโมง) ในขณะที่การหมักอย่างต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่และการดึงเซลล์ออกจากถังหมัก มีอัตราการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 7.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และหมักได้นานถึง 200 ชั่วโมง

ปี ค.ศ. 2010 Qureshi และคณะ การย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลในการผลิต คือ ได้ อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เป็นปริมาณ 7.09 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทา-นอล เท่ากับ 0.33 และอัตราผลผลิต (productivity) ได้เป็น 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ระดับอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลนี้จะมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการควบคุมการหมัก (21.06 กรัมต่อลิตร) เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้น ในการควบคุมการหมัก ผลได้ ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเท่ากับ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) ได้เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การเปรียบเทียบนี้จะชี้ให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางเป็นพิษต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อลดผลของความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นนี้ ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางจะได้รับการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] ตามด้วยการหมัก การปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางจะทำให้การหมักประสบผลสำเร็จ และความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ได้เท่ากับ 26.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้ดีกว่าการควบคุมการหมักและการหมักฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางและไม่ผ่านการปรับสภาพ (ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร) ในการหมักผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เท่ากับ 0.43 และได้อัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (390% ของการหมักที่ไม่ผ่านการปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง และการใช้ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางโดยไม่เจือจางน้ำตาล) ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง ทำให้ได้อัตราผลผลิตเฉพาะ (specific productivity) เท่ากับ 0.55 ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับ 0.12 ต่อชั่วโมงของการควบคุมการหมักที่มีการควบคุมการกระตุ้นของคาร์บอนที่มากขึ้น ซึ่งมาจากผลิตภัณฑ์การหมักโดยตรง