บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล

บิวทานอล (1-butanol) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อของ Butyl alcohol, n-butanol หรือ Methylolpropane เป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล C_4H_9OH มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 74.12 g/mol บิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ไวไฟ ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัว ซึ่งคล้ายๆ กลิ่นของกล้วย แต่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามบิวทานอลสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอลก่อให้เกิดการระเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ ทั้งนี้อาจก่อให้เกิดการเสพย์ติดได้เมื่อสูดดมที่ความเข้มข้นสูงๆ บิวทานอลสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆได้ดี แต่ละลายในน้ำได้ค่อนข้างต่ำ (Lee *et al.*, 2008; Durre, 2008) นอกจากนี้ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับบิวทานอลได้แก่ เมทานอล (1 คาร์บอน) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (Kristin, 2007) ตารางที่ 2.1 สรุปคุณลักษณะของบิวทานอลเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ

2.2 บิวทานอลในแง่ของการเป็นสารเชื้อเพลิง

จุดเด่นหนึ่งของบิวทานอลที่ผลิตได้ทางชีวภาพที่เหนือกว่าเอทานอล คือสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรง ในขณะที่เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Hansen *et al.*, 2005; Niven, 2005) ทั้งนี้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการดัดแปลงใดๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมี รวมทั้งให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอลอย่างมาก (Huber *et al.*, 2006) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างบิวทานอลกับเอทานอล ตามตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าบิวทานอลมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธ์ ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนต้องใช้ปริมาณมากว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่เท่ากัน นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนได้ในอัตราส่วนต่างๆ ได้ (Lee *et al.*, 2008b) ในทางตรงกันข้ามเอทานอลสามารถนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้บางส่วนเท่านั้น เช่น ในประเทศบราซิลได้มีการใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนแค่ 23% นอกจากนี้ในแถบทวีปยุโรปบางประเทศ รวมทั้งประเทศสหรัฐอเมริกา จะใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนเพียง 10% เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ และไม่ส่งผลใดๆ ต่อเครื่องยนต์เลย รวมทั้งให้สมรรถนะในการขับเคลื่อนเช่นเดียวกับการใช้แก๊สโซลีนอีกด้วย นอกจากนี้การเผาไหม้ของ

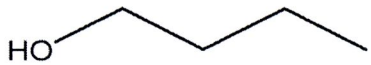
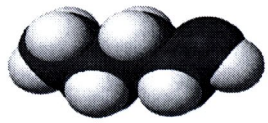
เครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนผสม พบว่าไอเสียที่ออกมาปลอดจากแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไนตรัสออกไซด์ที่เป็นพิษ ซึ่งเป็นมิตรอย่างมากต่อสภาพแวดล้อม เมื่อเทียบกับการใช้เอทานอล

คุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล ได้แก่ บิวทานอลระเหยกลายเป็นไอได้ต่ำกว่า โดยมีค่า Reid value ต่ำกว่าเอทานอลถึง 7 เท่า และบิวทานอลยังมีความสามารถในการกัดกร่อนต่ำ จึงทำให้ปลอดภัยต่อการขนส่งลำเลียง ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลมีความดันไอต่ำ มีค่าอ๊อกเทนที่สูงจึงสามารถนำไปผสมเข้ากับแก๊สโซลีนและน้ำมันดีเซลได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุดังกล่าวนี้จึงทำให้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงที่มีความปลอดภัยสูง และสามารถส่งลำเลียงด้วยระบบท่อไปยังสถานีจ่ายได้ (Lee *et al.*, 2008a) ในขณะที่เอทานอลไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้ เนื่องจากมีค่าความดันไอสูง นอกจากนี้บิวทานอลยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่สามารถผสมเข้ากับแก๊สโซลีนได้ดีกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามบิวทานอลมีความหนืดเป็น 2 เท่าของเอทานอล และประมาณ 5-7 เท่า ของแก๊สโซลีน (Wackett, 2008) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอล เช่น ความหนาแน่น และความจุความร้อน มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับเอทานอลดังแสดงในตารางที่ 2.1

2.3 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) สารยึดเกาะ (Adhesives) วัสดุสิ่งทอ (Textile) วัสดุเส้นใย (Fiber) และพลาสติก เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น ทั้งนี้บิวทานอลและสารอนุพันธ์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีเยี่ยมในอุตสาหกรรมสีทา อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมการขึ้นรูป รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย นอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้ว บิวทานอลยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่นอุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมกลิ่นรสได้อีกด้วย (Lee *et al.*, 2008b; Durre, 2008)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล (ดัดแปลงจาก Devis and Morton III, 2008 และ Lee *et al.*, 2008a)

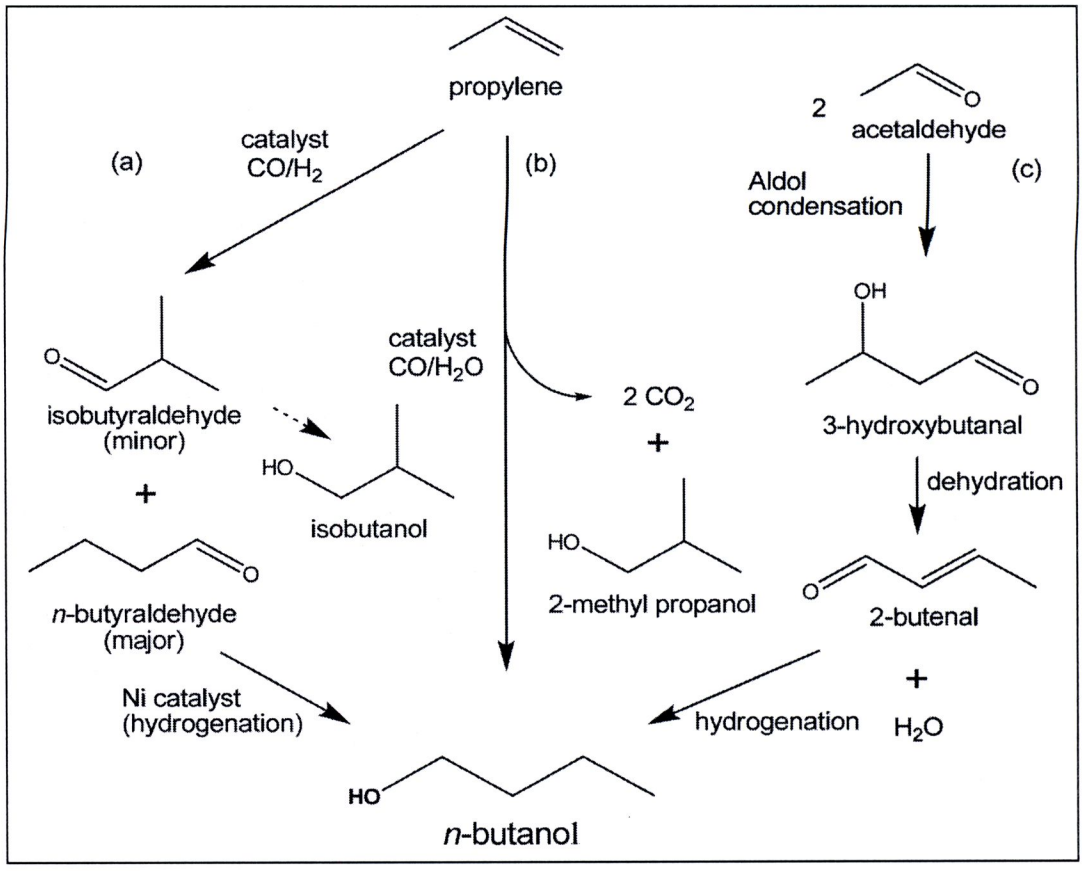
Properties	**Butanol**	**Chemical Structure**
Melting point (°C)	- 89.3	
Specific gravity	0.810-0.812	1-butanol
Ignition temperature (°C)	35-37	
Auto-ignition temperature (°C)	343-345	
Flash point (°C)	25-29	
Relative density (water: 1.0)	0.81	
Critical pressure (hPa)	48.4	
Critical temperature (°C)	287	
Explosive limits (vol. % in air)	1.4-11.3	
Water solubility 9.0 mL/100 mL	(7.7 g/100 mL at 20°C)	
Relative vapor density (air: 1.0)	2.6	
Vapor pressure (kPa at 20°C)	0.58	

	Butanol	**Gasoline**	**Ethanol**	**Methanol**
Boiling point (°C)	117-118	27-221	78	64.7
Density at 20°C (g/mL)	0.8098	0.7-0.8	0.7851	0.7866
Solubility in 100 g of water	immiscible	immiscible	miscible	miscible
Energy density ($MJ.1^{-1}$)	27-29.2	32	19.6	16
Energy content/value (BTU/gal)	110000	115000	84000	76000
Air-fuel ratio	11.2	14.6	9	6.5
Heat of vaporization (MJ/kg)	0.43	0.36	0.92	1.2
Liquid Heat capacity (Cp) at STP (kJ/k-mol.°K)	178	160–300	112.3	81.14
Research octane number	96	91-99	129	136
Motor octane number	78	81-89	102	104
Octanol/Water Partition Coefficient (as $logP_{o/w}$)[a]	0.88	3.52±0.62	-0.31	-0.77
Dipole moment (polarity)	1.66	n.a.	1.7	1.6
Viscosity (10^{-3} Pa.s)	2.593	0.24-0.32	1.078	0.5445

[a]Log P is a measure of hydrophobicity (lipophilicity) and is similar to polarity. These published values were obtained from Hansch *et al.* (1995) for the three alcohols. In gasoline the Log P was roughly estimated as the average weight of main representative components.

2.4 การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี

บิวทานอลที่ถูกผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรมนั้น ส่วนใหญ่จะผลิตจากกระบวนการทางเคมี 3 กระบวนการ ได้แก่ Oxo process, Reppe process และ Crotonaldehyde hydrogenation (ภาพที่ 2.1) ในการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Oxo (Hydroformylation) นั้นต้องมีการเติม Carbon monoxide และ Hydrogen เพื่อเข้าไปแทนที่หมู่ Hydrocarbonyl อย่างต่อเนื่อง โดยมีโลหะจำพวก Co, Rh, หรือ Ru เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง Aldehyde ที่เกิดขึ้นในระยะแรก จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นบิวทานอลในกระบวนการ hydrogenation ต่อไป ทั้งนี้ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความดัน อุณหภูมิ และชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย โดยบิวทานอลที่ได้จากปฏิกิริยานี้จะได้ Isomer ที่แตกต่างกันหลายชนิด ส่วนการสังเคราะห์บิวทานอลผ่านกระบวนการ Reppe จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันของ Propylene, Carbon monoxide และน้ำ ในขณะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมอยู่ด้วย (Bochman *et al.*, 1999) ซึ่งจะทำให้เกิดของผสมของ n-butaraldehyde และ Isobutaraldehyde ต่อมาจะถูกลดรูปให้เปลี่ยนเป็นบิวทานอล (Wackett, 2008) การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Reppe นี้จะทำให้ได้บิวทานอลโดยตรงไม่ผ่านตัวกลาง ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิและความดันต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีนี้ไม่สามารถผลิตได้ในเชิงการค้า เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีที่ทันสมัยซึ่งมีราคาแพง จนกระทั่งเมื่อสิบปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตบิวทานอลจาก Acetaldehyde ผ่านกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation ที่ประกอบไปด้วยขั้นตอน Aldol condensation, Dehydration และ Hydrogenation (Bochman *et al.*, 1999) แม้ว่าจะยังคงมีการใช้วิธีนี้ในการผลิตบิวทานอลไม่มากนัก แต่ในอนาคตอันใกล้นี้ การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation นี้อาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญก็ได้ เนื่องจาก Crotonaldehyde สามารถผลิตได้จากเอทานอล โดยกระบวนการ Dehydrogenation ทั้งนี้ เอทานอลสามารถผลิตได้จากสารชีวมวลโดยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งการผลิตบิวทานอลโดยการสังเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีอื่นๆ ต้องอาศัยวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นที่มาจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม ซึ่งนับวันยิ่งจะหายากและลดน้อยลง เป็นต้น



ภาพที่ 2.1 วิธีการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี (a) Oxo synthesis, (b) Reppe process, และ (c) Crotonaldehyde hydrogenation (ดัดแปลงจาก Lee *et al.*, 2008a และ Wackett, 2008)

2.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า เอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคทีเรียในการผลิตแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากสารชีวมวล ทั้งนี้เอบีอีเป็นกระบวนการที่รู้จักกันดี และเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตแอซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ผลผลิตแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการผลิต โดยเฉพาะ *Cl. acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด รวมทั้งสายพันธุ์ *Cl. beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน

2.6 กระบวนการผลิตตัวทำละลาย แอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) ด้วยกระบวนการหมัก

2.6.1 ประวัติและที่มาของกระบวนการเอบีอี

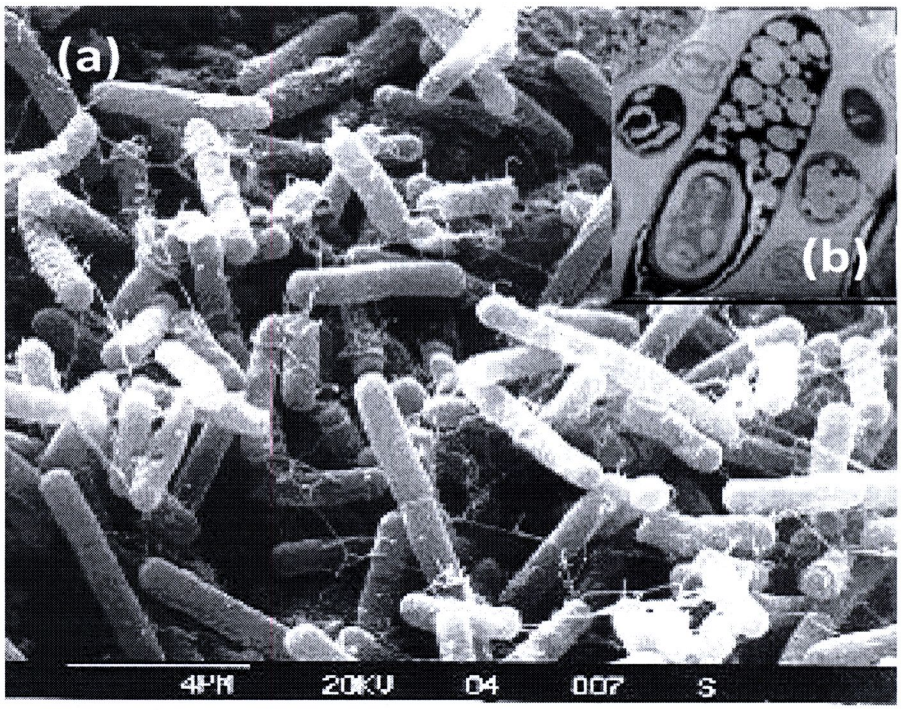
การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดยหลุยส์ พาสเตอร์ (Jones and Woods, 1986) ต่อมา Schardinger ได้ค้นพบแอซิโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์ พาสเตอร์ในปี ค.ศ. 1905 กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อันได้แก่ แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องมาจากปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบีตาไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตยางสังเคราะห์ ส่วนแอซิโตนนั้นมีความสำคัญในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตวัตถุระเบิดในสงครามโลกครั้งที่ 1 ภายหลังสงครามยุติ ความต้องการแอซิโตนจึงลดน้อยลง แต่กลับมีความต้องการแอซิโตนมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตรถยนต์และอุตสาหกรรมสีทา (Jones and Woods, 1986)

ความสำคัญของกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าว โดยกระบวนการหมักเริ่มลดลงภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่กลับมาเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นในปี ค.ศ. 1973 และปี ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวก็ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างสูงอยู่เมื่อเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Jones and Woods, 1986)

2.6.2 จุลลินทรีย์

แบคทีเรีย Clostridia เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ และเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน และมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ ทั้งนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (Exotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น *Cl. tetanus* sp., *Cl. botulum* sp. เป็นต้น อย่างไรก็ในช่วงศตวรรษที่ 20 แบคทีเรีย Clostridia ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Cl. acetobutylicum* sp. และ *Cl. beijerinckii* sp. ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยกระบวนการ ABE fermentation โดยในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและแอซิโตน แต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิต แอซิโตนและเอทานอลเป็นผลผลิตหลัก ต่อมาแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้ ถูกนำไปพัฒนาเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตตัวทำละลายบิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล จากแป้ง และน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (Pentose) ได้ในอัตราส่วน 6:3:1 ตามลำดับ (Qureshi, 2001; Lee *et al.*, 2008a)

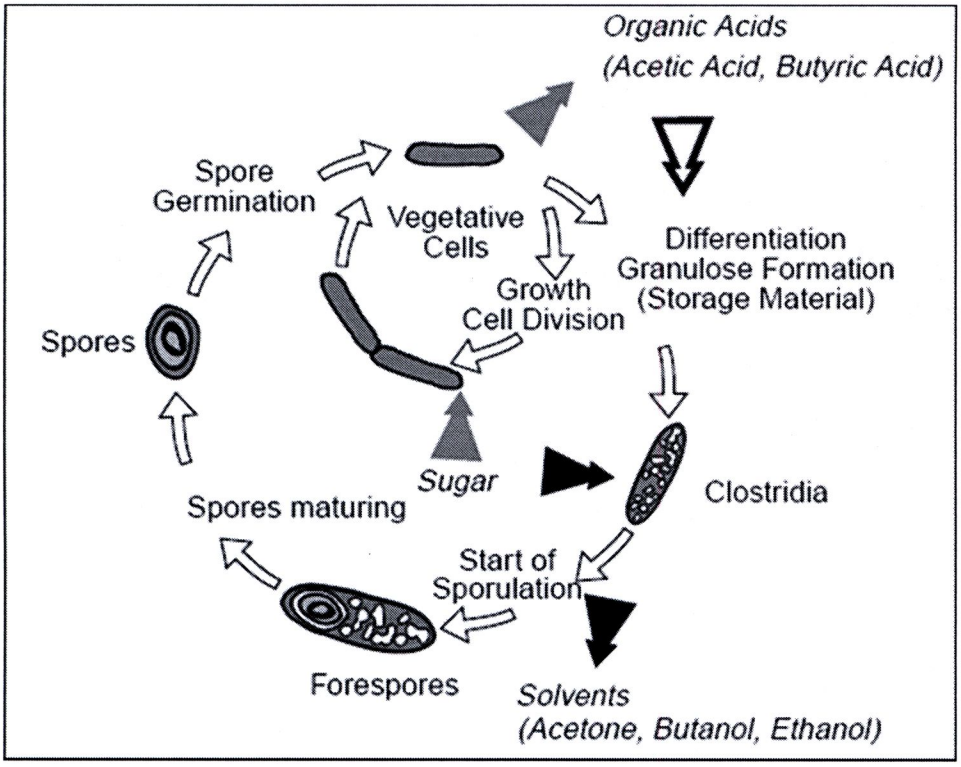
Cl. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Obligate anaerobic bacteria) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rods shape) (ภาพที่ 2.2b) ขนาด 0.6 – 0.9 x 2.4-4.7 μm เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบๆ เซลล์ (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งของเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (Subterminal) ดังภาพที่ 2.2b ไม่มีเอกโซสปอเรียม (Exosporium) ไม่มีรยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (Circular) ขอบไม่เรียบ (Irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 μm สีของโคโลนีเป็นสีครีมผิวเป็นมันและโปร่งแสง



ภาพที่ 2.2 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) a) เซลล์ปกติ (Vegetative cells); b) สปอร์ (Spore formed cells) (ที่มา: Jones *et al.*, 1982)

วงจรชีวิตและการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังภาพที่ 2.3 ได้แก่ (1) การเจริญในสภาวะปรกติ (Vegetative cell) จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rods-shaped) ซึ่งอาจจะพบในลักษณะที่เป็นเซลล์เดียว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกันเป็นสายโซ่ยาวก็ได้ (2) รูปร่างแบบคลอสติเดีย (Clostridia) เซลล์จะมีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ

(Cigar-shape) การเจริญในขั้นนี้เซลล์จะมีการสร้างสารพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการพองขึ้น (3) Forespores จะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้าง Forespores และจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป (4) รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Schuster *et al.*, 1998)



ภาพที่ 2.3 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. (ที่มา: Schuster *et al.*, 1998)

2.6.3 รูปแบบของกระบวนการหมัก

รูปแบบกระบวนการหมักแบบกะโดยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ได้ถูกบันทึกไว้ในหลายๆ ตำรา และเผยแพร่จนเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ระยะที่แตกต่างกัน โดยสอดคล้องกันกับกลไกการสร้างผลิตภัณฑ์ 2 ลักษณะด้วย (Jones and Woods, 1986; Schuster *et al.*, 1998; Badr *et al.*, 2001) กล่าวคือ ในระยะแรก จะมีการผลิตกรดอินทรีย์ อันได้แก่ กรดบิวทิริค และกรดอะซิติกในช่วง 7-18 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นเหตุให้ค่า pH ในน้ำหมักลดลง ช่วงนี้นิยมเรียกว่าช่วงของการผลิตกรดอินทีย์ หรือ Acidogenesis หลังจากนั้นระยะที่สอง ซึ่งเป็นช่วงของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อันได้แก่ แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งปกติจะเกิดขึ้นภายหลังจากเริ่มการ

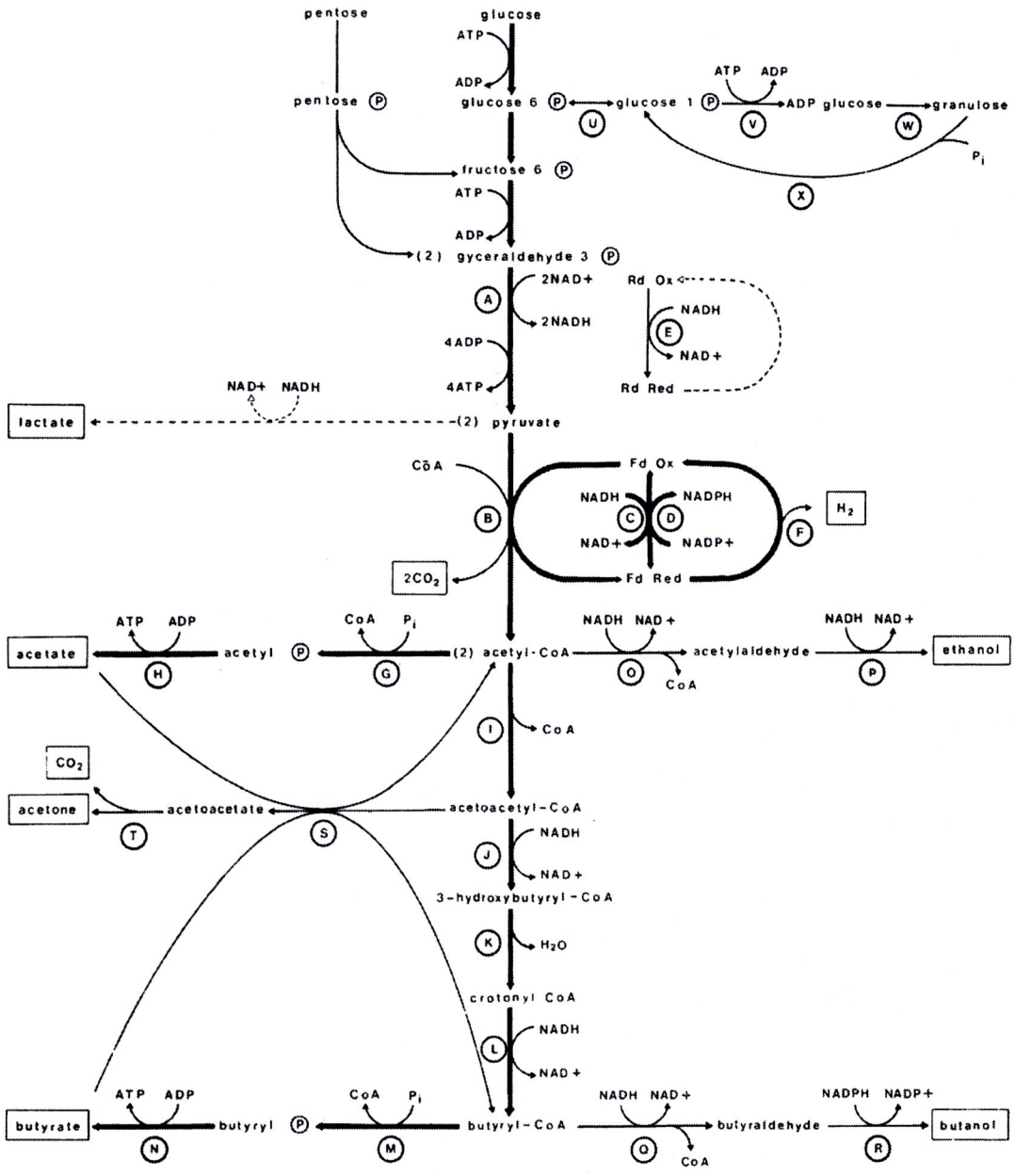
หมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง ในช่วงนี้ค่า pH ของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจะมีการนำกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในช่วงแรกมาใช้เป็นบางส่วน ระยะที่สองนี้นิยมเรียกว่าระยะของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์หรือ Solventogenesis นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมัก ยังมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ออกมาตลอดกระบวนการด้วย

2.7 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)

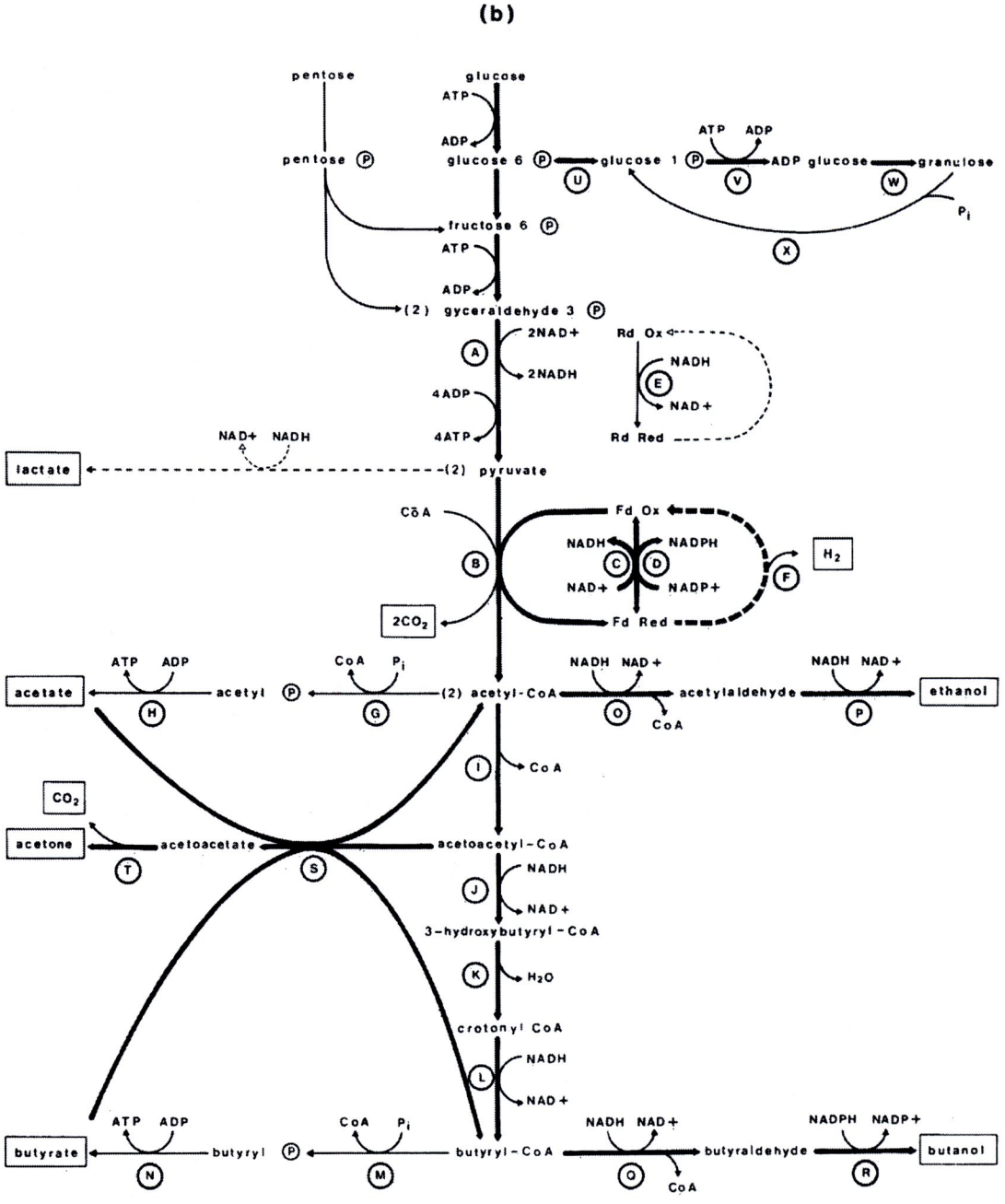
รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ดังได้กล่าวไปแล้วนั้น วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต ให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วยดังแสดงในภาพที่ 2.4a และ 2.4b ทั้งนี้น้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไฟรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไฟรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ $NADH + H^+$ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไฟรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก โดยจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นแอซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ในระบบAcetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่กลับไม่ได้ (Jone and Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตแอซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูก

เปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH + H^+ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD^+ ด้วย

(a)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 7 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 190918
เลขเรียกหนังสือ



ภาพที่ 2.4 วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* (a) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) (b) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)
(ที่มา; Jones and Woods, 1986)

เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษร: (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH-

ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (i) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase); (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase.

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพจากการผลิตกรดอินทรีย์ไปเป็นการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ มีความยุ่งยากซับซ้อน ได้มีการทำการศึกษาค้นคว้ามากมายเพื่อที่จะเข้าใจถึงสาเหตุของปัจจัย ที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ทั้งในกระบวนการหมักแบบกะ (Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) โดยมุ่งหวังที่จะค้นหาสาเหตุของปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ และรักษาสภาวะดังกล่าวไว้ให้ยาวนานที่สุดเท่าที่จะทำได้ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนระยะดังกล่าวก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Lee *et al.*, 2008b) ถึงแม้ว่าการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวจะนำมาซึ่งข้อมูลใหม่ๆ ที่มีคุณค่า แต่ก็เป็นที่เข้าใจว่าไม่มีปัจจัยเฉพาะปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์

2.8.1. แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น

ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเป็นสิ่งที่สำคัญในการหมักแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลต่ำ (ต่ำกว่า 20 g/L) การหมักจะมุ่งไปสู่ Acidogenesis phase โดยจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อย (Lee *et al.*, 2008b) อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นสูงๆ (สูงกว่า 60 g/L) กระบวนการจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่า (Madihah *et al.*, 2001a) และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 80 g/L น้ำตาลจะไม่ถูกหมักซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (Product inhibition) ขณะที่ความเข้มข้นสูงถึง 120 g/L กิจกรรมการหมักจะเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อย (Qadeer *et al.*, 1980) ซึ่งอาจเป็นเพราะการยับยั้งของวัตถุดิบ (Substrate inhibition)

กลไกการส่งผ่านน้ำตาลยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน อย่างไรก็ตามเชื่อกันว่าระบบ Phosphotransferase ทำให้เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส (Lee *et al.*, 2008b) และดูเหมือนว่าการใช้วัตถุดิบอย่างอื่นของ *Cl. acetobutylicum* ที่เกิดขึ้นโดย Symport mechanism จะเกิดขึ้นโดยการส่งผ่าน Proton ผ่าน Membrane สำหรับน้ำตาล Disaccharide เช่น น้ำตาลซูโคส และ

น้ำตาลมอลโตส จะถูกย่อยโดย Phosphorylase และ Free glucose ที่ได้สามารถเปลี่ยนไปเป็น Glucose-6-phosphate โดย Hexokinase (Jones and Woods, 1986)

2.8.2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการหมักมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างยิ่ง ซึ่งอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมักโดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบนั้น จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 30°C และ 33°C แต่จะลดลงที่อุณหภูมิ 37°C (Jones and Woods, 1986) ผลที่คล้ายกันนี้ถูกพบในการหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) โดย Mcneil และ Kristiansen (1985) เมื่อทำการทดลอง Mcneil และ Kristiansen พบว่าผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญ และการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในการหมักแบบกะของ *Cl. acetobutylicum* คือผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม (Total solvent yield) มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเพราะการลดลงของการผลิตแอซิโตน และพบว่าบิวทานอลจะไม่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิในรูปของผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม และอัตราการผลิต ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ 35°C

2.8.3. ออกซิเจน

Cl. acetobutylicum ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ (Obligate anaerobe) การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหมักที่มีความต่างศักย์ของ Redox (Redox potential; E_h) ในช่วงระหว่าง -250 mV ถึง -400 mV การสัมผัสกับออกซิเจนในการหมักแบบไร้อากาศไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดขึ้นเพียงระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าน้ำหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40-60 μM) การใช้น้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง การเจริญ การสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีนจะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) จุลินทรีย์จะมีการผลิต Butylate แต่ไม่ผลิต Acetate หรือมีการผลิตลดลง รวมถึงมีการลดลงของ ATP ในเซลล์ด้วย ซึ่งผลของออกซิเจนคือมีการย้อนกลับของปฏิกิริยาทั้งหมด การเจริญและเมแทบอลิซึม (Metabolism) จะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้อากาศอีก (Jones and Woods, 1986)

2.8.4. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และผลิตภัณฑ์กรดในขั้นตอนสุดท้าย

ในน้ำหมัก pH จะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล มีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่า ถ้ารักษาค่า pH ของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรดอินทรีย์ ในทางตรงกันข้ามถ้ารักษาค่า pH ไว้ที่ค่าต่ำๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามช่วงของ pH ที่จะทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ในช่วงกว้าง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

มาก ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมักด้วย ช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์มักอยู่ในช่วง pH 3.8 ถึง 5.5 (Lee *et al.*, 2008b) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมอย่าง *Cl. acetobutylicum* P262 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีในช่วง pH 6.5 (Jones and Woods, 1986)

กรดอินทรีย์อย่างอ่อน (Weak organic acid) เช่น กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product) ของปฏิกิริยา โดยธรรมชาติแล้วจะเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในรูปที่ไม่แตกตัว ที่ความเข้มข้นของกรดสูงๆ ค่า pH ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลงซึ่งเป็นสาเหตุในการยับยั้งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ ภายในตัวเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าจะมีการสะสมของกรดและการลดลงของค่า pH จึงทำให้อัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดชะงักในที่สุด ถึงแม้ว่าการใช้วัตถุดิบและเมแทบอลิซึมของเซลล์ยังดำเนินต่อไป (Zhu and Yang, 2004) ดังนั้นจึงมีข้อเสนอว่าจุดที่เปลี่ยนเป็น Solventogenesis ก็คือกลไก Detoxification ของเซลล์ เพื่อกำจัดผลที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากการยับยั้งเมื่อกรดในขั้นตอนสุดท้ายมาถึงระดับช่วงที่มีพิษ (Hatarnis *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1984) โดยทั่วๆ ไปการเริ่มต้นของ Solventogenesis จะเกิดขึ้นร่วมกันขณะที่ pH ของสารอาหารมีค่าต่ำและมีกรดในรูปที่ไม่แตกตัวอยู่ในช่วงวิกฤต (Lee *et al.*, 2008b) ดังนั้นความเข้มข้นของ Butylate จะต่ำที่ค่า pH ต่ำ (Jones and Woods, 1986) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าผลของ pH เป็นผลจากความเข้มข้นของกรดบิวทิริกที่ไม่แตกตัวและสิ่งนี้เป็นปัจจัยควบคุมการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

2.9 การใช้วัตถุดิบประเภทแป้งในกระบวนการหมักแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก (Jones and Woods, 1986; Qureshi and Blaschek, 2001; Lee *et al.*, 2008b) โดยวัตถุดิบที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นแบบดั้งเดิมในกระบวนการหมักแอซิโตนบิวทานอล และเอทานอลทางการค้านั้น ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวไรย์ เป็นต้น ทั้งนี้วัตถุดิบเหล่านั้นมีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวัตถุดิบทางเลือกใหม่ที่มีราคาถูกกว่า อย่างเช่น วัตถุดิบประเภทแป้ง (แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง) (Madihah *et al.*, 2001a) ของเสียจากการเกษตร (Jesses *et al.*, 2002) วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร (Ezeji *et al.*, 2007a) และ Dried distiller's grain and soluble (DDGS) (Ezeji *et al.*, 2008) เป็นต้น

แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ เช่น เอนไซม์ Amylase, Pullulanase และ Glucoamylase ส่งผลให้สามารถย่อยแป้งที่ทำให้เกิด เจลบางส่วนในกระบวนการหมักแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ (Jones and Woods, 1986; Nimcevic *et al.*, 1998; Madihah *et al.*, 2001a) นักวิจัยหลายกลุ่ม ได้ทดลองใช้วัตถุดิบประเภทแป้งชนิดต่างๆ ใน

กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium* sp. ดังสรุปในตารางที่ 2.2 โดย Nimcevic *et al.* (1998) ได้ทดสอบใช้แบคทีเรีย *Cl. bejerinckii* NRRL B592 ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และพบว่าแบคทีเรีย *Cl. bejerinckii* NRRL B592 สามารถใช้มันฝรั่งในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูงถึง 18.9 g/L โดยที่ไม่จำเป็นต้องมีการย่อยแป้งมันฝรั่งด้วยเอนไซม์ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักเลย

ต่อมาในปี 2001 Madihah และคณะได้รายงานว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 มีความสามารถในการใช้วัตถุดิบประเภทแป้งได้หลายชนิด ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อาทิเช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด แป้งสาคู และแป้งมันฝรั่ง ทั้งนี้พบว่าเมื่อใช้แป้งสาคูเป็นวัตถุดิบในการหมัก จะให้ค่าอัตราการผลิต (Productivity) ตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุดถึง 0.26 g/L/h เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างแป้งชนิดอื่น อย่างไรก็ตามค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้ดังกล่าวพบว่าไม่ได้แตกต่างจากการใช้แป้งข้าวโพดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อใช้แป้งมันฝรั่งมีผลทำให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายลดลงถึง 2 เท่าเมื่อเทียบกับการใช้แป้งสาคูและแป้งข้าวโพด จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า วัตถุดิบประเภทแป้งสามารถใช้ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้เป็นอย่างดี แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับประเภทของแป้งแต่ละชนิด ซึ่งมีสมบัติทางทางเคมี-กายภาพที่ต่างกันด้วย

ต่อจากนั้นในปี 2003 Ezeji และทีมวิจัย ประสบผลสำเร็จในการใช้แบคทีเรีย *Cl. bejerinckii* BA101 ในการทดสอบการหมักด้วย Packing peanut ในอาหาร P2 medium ความเข้มข้น 80 g/L เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยพบว่า สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 18.9 g/L ซึ่งให้ค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) เท่ากับ 32% โดยใช้เวลาในการหมัก 110 ชั่วโมง และให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายเท่ากับ 0.17 g/L/h อย่างไรก็ตามค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา

หลังจากนั้น Madihah และคณะวิจัย ได้ศึกษาการใช้วิธีควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะต่างๆ ของการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 ทั้งระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ซึ่งพบว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหนักในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์นั้น สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าการควบคุมค่า pH น้ำหนักในระยะของการสร้างกรด นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (27.9 g/L) ได้สูงถึง 2 เท่าของการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH และเพิ่มค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ถึง 1.4 เท่าด้วย

ในปีต่อมา Gu *et al.* (2009) ได้รายงานว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่เสริมด้วย Ammonium acetate ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* EA 2018 ซึ่งพบว่า การใช้

วัตถุดิบดังกล่าวมีผลทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ ทั้งกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก ในช่วงแรก ก่อนจะถูกใช้ไปอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะพบการผลิตบิวทานอลและแอซิโตนเป็นส่วนมาก และมีการผลิตเอาทานอลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ล่าสุดเมื่อปี 2010 Thang และผู้ร่วมวิจัย ได้รายงานความสามารถของแบคทีเรีย *Cl. saccharoperbutylacetonicum* N14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยแป้งได้ในปริมาณมาก (Hyperamylolytic strain) ในการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้กลุ่มนักวิจัยพบว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียดังกล่าว ให้ผลเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเลย ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงถึง 20-21 g/L และให้ค่าผลผลิตทั้งหมด 41-46% ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้แป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่งในการศึกษาที่ผ่านมา (Nimcevic *et al.*, 1998; Ezeji *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าผลผลิตที่ได้ยังสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 อย่างมาก ซึ่งให้ค่าผลผลิตที่ได้เพียง 20-34% เท่านั้น

ตารางที่ 2.2 สรุปการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium* spp. โดยใช้วัตถุดิบจากแป้งในกระบวนการหม

Substrate	Microorganism	Total solvents (g/L)	Total ABE productivity (g/L/h)	Total AB (g solv gluc
Potato starch	*Cl. beijerinckii* NRRL B592	18.9	0.42	-
Potato starch	*Cl. acetobutylicum* P262	4.62	0.06	0.1
Corn starch	*Cl. acetobutylicum* P262	11.87	0.18	0.3
Sago starch	*Cl. acetobutylicum* P262	11.03	0.26	0.3
Tapioca starch	*Cl. acetobutylicum* P262	6.74	0.16	0.2
Starch-based packing peanuts	*Cl. beijerinckii* BA101	21.7	0.20	0.3
Degermed corn	*Cl. beijerinckii* BA101	24.8	0.34	0.4
Corn starch	*Cl. beijerinckii* BA101	20.0	0.28	0.4
Sago starch	*Cl. saccharobutylicum* DSM 13864	16.38	0.59	0.3
Sago starch	*Cl. saccharobutylicum* P262	27.9	0.70	0.4
Cassava starch	*Cl. acetobutylicum* EA 2018	19.4	-	-
Cassava starch	*Cl. saccharoperbutylacetonicum* N14	21.0	0.44	0.4

Note: (-): no data