บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง (แป้งมัน กากมัน และมันเส้น) จะวัดโดยใช้วิธี AOAC (Charles *et al.*, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยปริมาณเส้นใยที่สูงสุดจะพบในกากมัน รองลงมาคือมันเส้นและ แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.08, 2.05 และ 0.17 (%, w/w) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแป้ง (Starch content) ในวัตถุดิบมันสำปะหลังแต่ละชนิดนั้น พบว่ากากมันมีปริมาณแป้ง (58.74%, w/w) ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ โดยมันเส้นมีปริมาณแป้งเท่ากับ 85.85% (w/w) และแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณแป้งเท่ากับ 99.04% (w/w) แต่กากมันมีปริมาณเส้นใยสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น นอกจากนี้เมื่อพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ในวัตถุดิบจากมันสำปะหลังแต่ละชนิด พบว่ามีความแปรปรวนและแตกต่างกันออกไป ซึ่ง Sriroth และคณะ ปี 1999 ได้สรุปไว้ว่า องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสถานที่ที่เพาะปลูก ฤดูกาลในการเพาะปลูก วิธีการเก็บเกี่ยว ตลอดจนวิธีการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีนั้นๆ ด้วย

Ezeji และคณะ ปี 2007 รายงานว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* ไม่มีความสามารถในการย่อยวัตถุดิบที่มีปริมาณเส้นใยสูงๆได้ เนื่องจากไม่มีความสามารถในสร้างเอนไซม์ จำพวกเซลลูเลสที่ใช้ย่อยวัตถุดิบที่เป็นเส้นใยได้ จากการศึกษาของ Madihah *et al.* (2008) พบว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยแป้งได้ เช่น Amylase, Glucoamylase และ Pullulanase อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของเอนไซม์ในแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. นั้น จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตลอดจนความสามารถในการทำกิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ด้วย ดังนั้นกากมันและมันเส้นซึ่งมีองค์ประกอบของแป้งอยู่ประมาณ 58 และ 85 (%, w/w) ตามลำดับ จึงถูกพิจารณานำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* เพื่อใช้ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามวัตถุดิบดังกล่าวมีองค์ประกอบของเส้นใยในปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งจะรบกวนกระบวนการหมักได้ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถที่จะใช้วัตถุดิบที่เป็นเส้นใยได้ จึงจำเป็นต้องย่อย หรือแปรสภาพวัตถุดิบเหล่านั้นเพื่อให้ได้น้ำตาลซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ (Fermentable sugars) ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบจากมันสำปะหลัง

Samples	Main components (%, w/w)						
	Fat	Protein	Ash	Crude fiber	Moisture content	Carbohydrate	Starch content
Cassava starch	0.21±0.01	1.31±0.01	0.13±0.08	0.17±0.01	5.04±0.17	93.14±0.12	99.04±0.02
Cassava chip	0.52±0.06	1.42±0.03	1.92±0.02	2.05±0.07	8.26±0.13	85.83±0.15	85.85±0.17
Cassava pulp	0.41±0.01	1.77±0.23	1.87±0.03	14.08±0.03	7.56±0.13	74.31±0.24	58.74±0.15

ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดเจือจาง

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugars) ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ได้สรุปในตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาการย่อยตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ พบว่าตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงมากที่สุด 114.87 g/L ซึ่งค่าผลผลิตที่ได้ (Reducing sugars yield) มากกว่า 100% รองลงมาคือตัวอย่างมันเส้น และกากมัน ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง เท่ากับ 104.89 g/L และ 85.88 g/L ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่ได้จะแปรผันตรงกับปริมาณแป้งที่เป็นองค์ประกอบหลักของตัวอย่าง กล่าวคือ ตัวอย่างกากมันมีเส้นใยที่สูง (14.08%) และมีปริมาณแป้งที่เป็นองค์ประกอบต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ (58.74%) (ตารางที่ 4.1) หลังจากการย่อมด้วยเอนไซม์จึงให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ โดยในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ร่วมกัน 3 ชนิดได้แก่ Cellulase, α-Amylase และ Glucoamylase ซึ่งมีรายงานว่าการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ α-Amylase และ Glucoamylase สามารถย่อยองค์ประกอบที่เป็นแป้งให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดยแป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.1 g (Liew *et al.*, 2006) ส่วนตัวอย่างกากมันซึ่งมีเส้นใยในปริมาณมาก การใช้เพียงเอนไซม์ Cellulase อาจยังไม่เพียงพอที่จะทำให้การย่อยตัวอย่างสมบรูณ์ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงในปริมาณต่ำเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของแป้งมากกว่า อย่างไรก็ตามการย่อยตัวอย่างกากมันด้วยกรดเจือจางให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงสูงกว่าการย่อยตัวอย่างกากมันด้วยเอนไซม์ เนื่องจากกรดสามารถแทรกเข้าไปย่อยพันธะแบบสุ่มอย่างไม่จำเพาะเจาะจง (Nonspecific random hydrolysis) ภายในโครงสร้างของแป้งและเซลลูโลสได้ทุกพันธะ จึงส่งผลให้ได้น้ำตาลรีดิวซิงในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Thongchul et al. (2010) ที่รายงานว่าสารละลายกรด HCl, H_2SO_4 และ H_3PO_4 ความเข้มข้น 1M สามารถย่อยพันธะในตัวอย่างกากมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยได้ปริมาณ Reducing sugars yield มากกว่า 100%

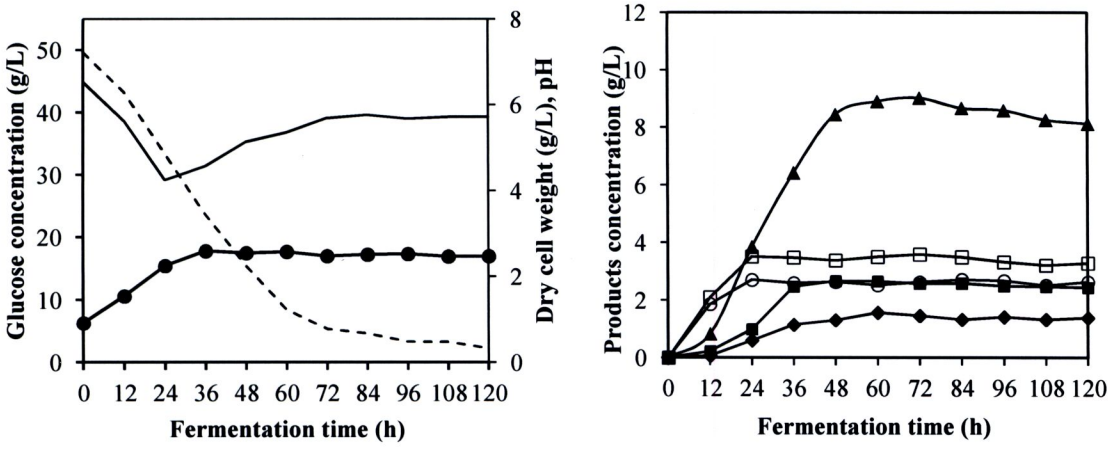
ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing sugars) ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์

Samples	*Reducing sugar in hydrolysate (g/L)
Enzymatic hydrolysate of cassava starch	114.87±0.23
Enzymatic hydrolysate of cassava chip	104.89±0.11
Enzymatic hydrolysate of cassava pulp	85.88±0.24
Acid hydrolysis of cassava pulp	94.08±0.15

*Reducing sugars คำนวณจากปริมาณตัวอย่างมันสำปะหลังเริ่มต้น 100 g
ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

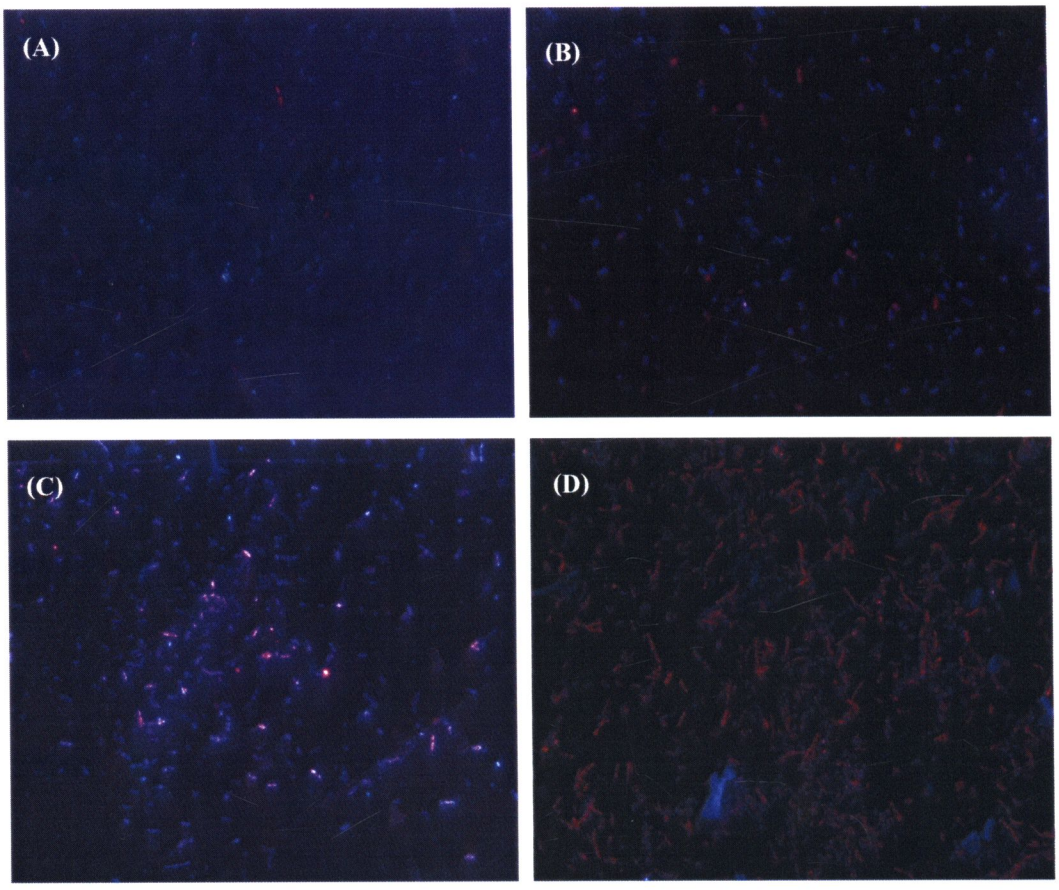
4.3 ผลของการควบคุมค่า pH ในระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ต่อการสร้างตัวทำละลายแอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เพื่อศึกษาอิทธิพลของการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH value) ที่แตกต่างกัน (pH 4.5-6.5) ในระหว่างระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์หรือ Solventogenic phase ต่อกลไกการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้น ได้ทำการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L และใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนตลอดจนใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) ความเข้มข้น 5 g/L เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนชุดการทดลองควบคุม (Control experiment) นั้นจะไม่มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งรูปแบบการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ไม่ได้มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมักภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) ได้แสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าในระหว่างที่มีการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงของระยะการสร้างกรดอินทรีย์ ไปเป็นระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์อย่างชัดเจน ทั้งนี้ระยะที่มีการสร้างกรดอินทรีย์นั้นจะเกิดขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยจะมีการสร้างกรดอินทรีย์จำพวกกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นเหตุให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก 6.0 เป็น 4.75 และในระยะนี้จะพบการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก การเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้จะเริ่มคงที่และเข้าสู่ระยะ Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้กลไกการเปลี่ยนแปลงจากการสร้างกรดอินทรีย์ไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์นั้น จะส่งผลให้ค่า pH ของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในระยะที่สองต่อไป



ภาพที่ 4.1 รูปแบบวิถีกระบวนการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462; น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ 50 g/L สัญลักษณ์: (----) glucose, (—) pH, (■) acetone, (▲) butanol, (♦) ethanol, (●) dry cell weight, (□) butyric acid, (○) acetic acid.

สำหรับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่แสดงในภาพที่ 4.2 นั้น เซลล์แบคทีเรียที่ปรากฏให้เห็นเป็นสีน้ำเงิน คือเซลล์ที่ย้อมติดสีของ DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) ส่วนตัวเซลล์ที่เห็นเป็นสีแดง คือเซลล์ที่ย้อมติดสีของ PI (Propidium idodide) ทั้งนี้เซลล์ที่ติดสีน้ำเงินของ DAPI จะบ่งบอกถึงเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ซึ่งผนังเซลล์ถูกทำลายไม่มากนัก ส่วนเซลล์ที่ติดสีแดงของ PI แสดงว่าเซลล์เกิดความเสียหายของผนังเซลล์อย่างรุนแรงหรือเป็นเซลล์ที่ตายแล้วนั่นเอง จากภาพที่ 4.2 พบว่าจำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินของ DAPI มีแนวโน้มลดลง ขณะที่เซลล์ที่ติดสีแดงของ PI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight) ซึ่งมีค่าสูงสุดที่ 36 ชั่วโมงก่อนที่จะลดลง (ภาพที่ 4.1) นอกจากนี้ยังพบว่าชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก (ภาพที่ 4.2 D) มีปริมาณของเซลล์สีแดงที่ติดสีของ PI มากกว่าที่ชั่วโมงอื่นๆ ซึ่งสัมพันธ์กันกับปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งถูกผลิตมากที่สุดที่ชั่วโมงดังกล่าวด้วย โดยสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ติดสีแดงของ PI หรือการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่ตายแล้วนั้น อาจเนื่องมาจากการยับยั้งอันเป็นผลมาจากปริมาณผลผลิตที่สร้างขึ้น (Product inhibition) ของแบคทีเรียเองก็เป็นได้ Roos *et al.* (1985) รายงานไว้ว่าบิวทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย *Clostridium* sp. นั้น มีความเป็นพิษมากที่สุดเมื่อเทียบกับผลผลิตชนิดอื่นๆ ซึ่งบิวทานอลความเข้มข้น 13 ถึง 16 g/L สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้อย่างสมบรูณ์ ขณะที่การเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. จะลดลงถึง 50% เมื่อมีการเติมบิวทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7-12 g/L (Moreira *et al.*, 1981)



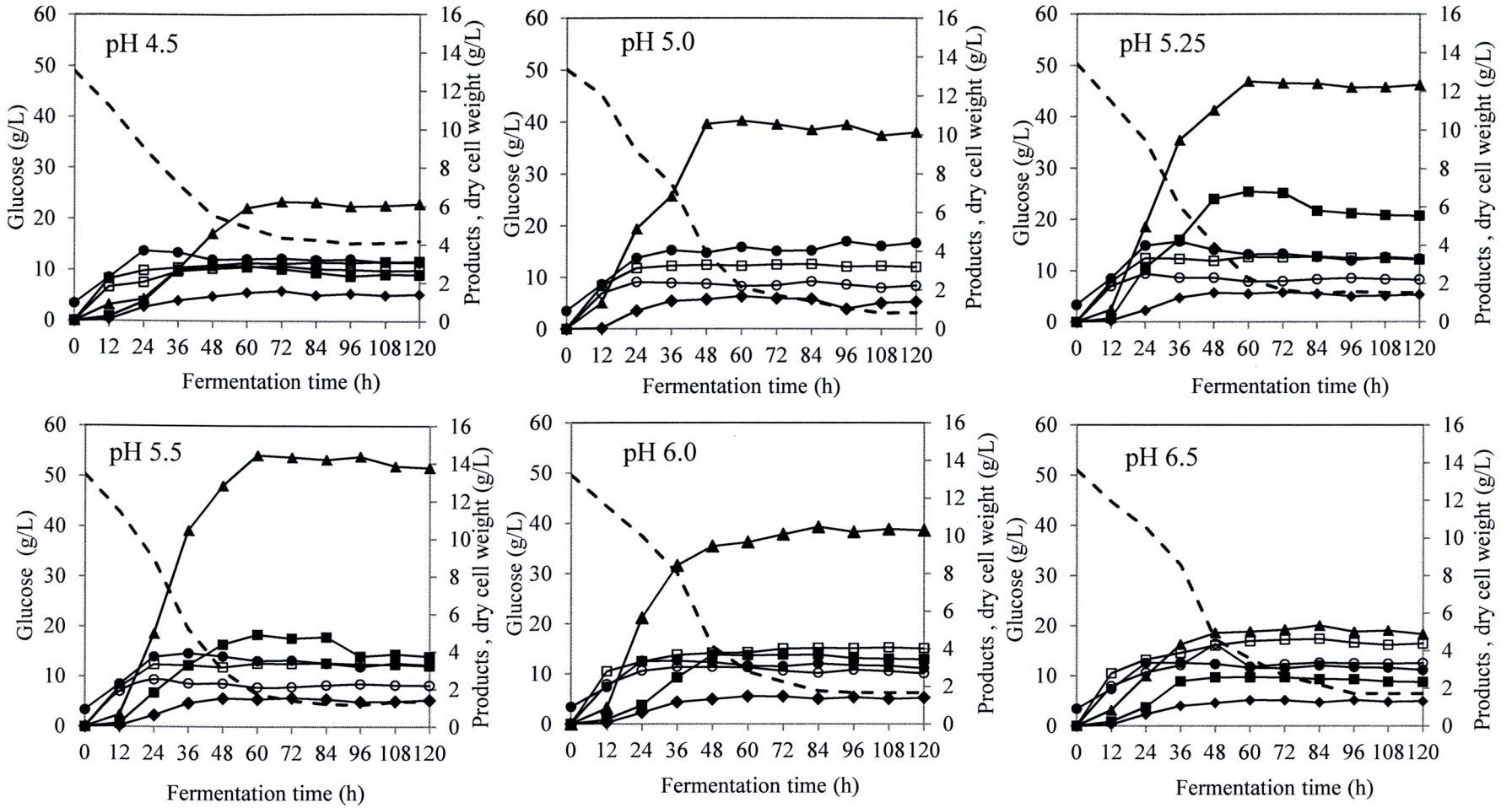
ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในขณะที่หมักด้วยน้ำตาลกลูโคส 50 g/L ที่ย้อมด้วย 1 mg/mL ของ DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) และ PI (Propidium idodide) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Fluorescent microscope ซึ่งเซลล์สีแดงที่เห็นแสดงถึงเซลล์ที่ตายแล้ว โดยติดสีแดงของ PI และเซลล์สีน้ำเงินแสดงถึงเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ซึ่งติดสีน้ำเงินของ DAPI สัญลักษณ์: A คือ ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก, B คือ ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก, C คือ ชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก, D คือ ชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก

ภาพที่ 4.3 แสดงวิถีการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลัก ในขณะที่ควบคุมค่า pH ระหว่างกระบวนการหมักที่ระดับต่างๆ (pH 4.5-6.5) จากภาพจะเห็นว่าแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (บิวทานอล เอทานอล และแอซิโตน) ได้ทุกการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักตั้งแต่ 4.5-6.5 ซึ่งได้ชี้ให้เห็นว่า ทั้งการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl.*

acetobutylicum TISTR 1462 นั้นจะขึ้นอยู่กับการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือ pH ของน้ำหมัก ซึ่งปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด (Total solvents) 20 g/L ถูกผลิตขึ้นเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.5 โดยสัมพันธ์กับปริมาณบิวทานอลและเอทานอล ซึ่งถูกผลิตสูงที่สุดเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 5.5 ด้วย (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกผลิตมากขึ้นเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) จาก pH 4.5-5.5 โดยการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่มากกว่า 6.0 ขึ้นไป ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักส่วนใหญ่จะเป็นกรดอินทรีย์ และจะพบการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยผลการทดลองที่ได้คล้ายกันกับการศึกษาของ Stephens *et al.* (1985) ที่พบว่าเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.5 แบคทีเรีย *Cl. bejerinckii* NCIMB 8052 มีการเจริญและสร้างตัวทำละลายได้ดีกว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ 5.0 อย่างมาก และยังพบอีกว่าเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 4.0 แบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถเจริญได้เลย เช่นเดียวกันกับแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* B18 ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมจากแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* สายพันธุ์ NRRL B643 ซึ่งพบว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ 5.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะ (Geng and Park, 1993) นอกจากนี้ Madihah *et al.* (2008) ได้ศึกษาอธิพลของการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ของแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 และพบว่าการควบคุมค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 5.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมมากที่สุดในการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Monot *et al.* (1984) ได้พบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* DSM 1731 มีความสามารถในการทนกรด และสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 4.5 จากผลการศึกษาในครั้งนี้และข้อมูลของนักวิจัยหลายๆ กลุ่มดังได้กล่าวไปข้างต้นแล้ว จะเห็นว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักมีผลต่อการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมาก ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. นั้นจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และข้อมูลทางพันธุกรรม (Nucleic acid data) ของแบคทีเรียด้วย (Bahl *et al.*, 1982)

สำหรับการผลิตแอซิโตน พบว่ามีการผลิตสูงสุดเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ให้คงที่ที่ pH 5.25 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Madihah *et al.* (2008) ซึ่งได้อธิบายไว้ว่าแอซิโตนที่ถูกผลิตจากแป้งสาคู (Sago starch) โดยแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 จะสูงที่สุดเมื่อควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ที่ pH 5.25 โดยการควบคุมค่า pH ดังกล่าวส่งผลให้เอนไซม์ Thiolase มีความสามารถในการทำกิจกรรม (Specific activity) สูงที่สุด ซึ่งเอนไซม์ Thiolase มีความสำคัญต่อการผลิตแอซิโตนอย่างมาก (Madihah *et al.*, 2008)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการหมักระหว่าง ชุดการทดลองที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมักและการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก พบว่าการทดลองที่มีการควบคุมค่า pH ให้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Total solvents) 20.08 g/L ซึ่งสูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการควบคุม pH (15.30 g/L) ประมาณ 1.5 เท่า (ตารางที่ 4.3) ซึ่งปริมาณตัวทำละลายบิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล ที่ผลิตได้ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว คือ 14.43, 4.91 และ 0.74 g/L ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณของ บิวทานอลที่สูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นจากการควบคุมค่า pH ที่ 5.5 นั้น เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase และ Butanol dehydrogenase ซึ่งมีความสามารถในการทำกิจกรรม (Activity) สูงที่สุดเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 5.5 ก็เป็นได้ ซึ่งจากรายงานของ Madihah *et al.* (2008) ได้กล่าวไว้ว่าเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase มีความเกี่ยวข้อง และเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการเปลี่ยนของการสร้างกรดอินทรีย์ไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 ส่วนเอนไซม์ Butanol dehydrogenase ทำหน้าที่ควบคุมการผลิตบิวทานอลให้เกิดอย่างต่อเนื่อง เป็นต้น



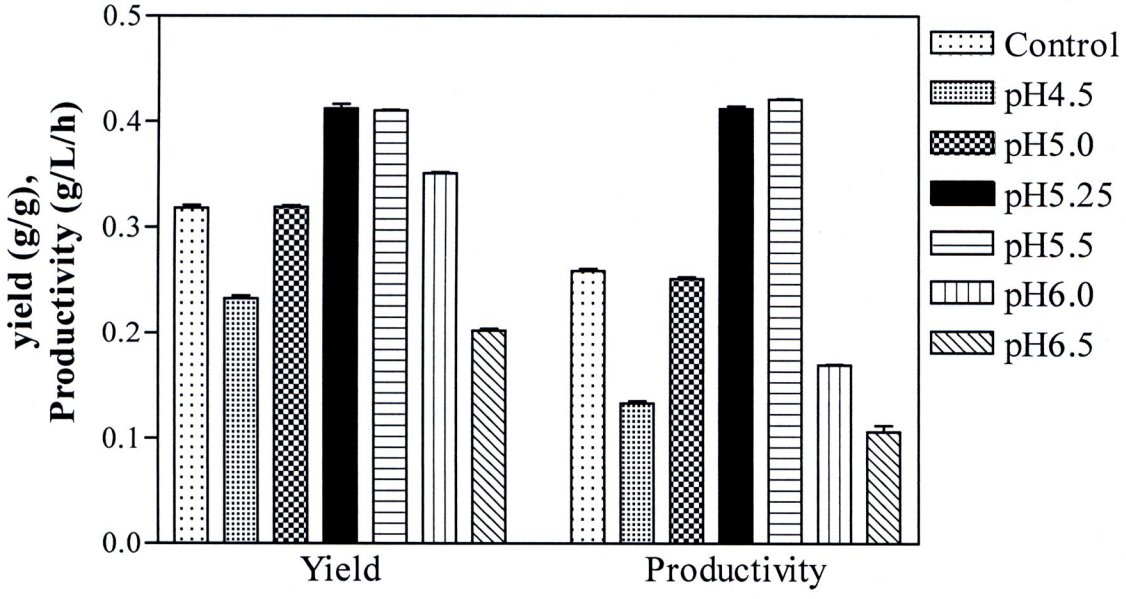
ภาพที่ 4.3 วิถีการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ สัญลักษณ์; (----) glucose, (■) acetone, (▲) butanol, (♦) ethanol, (●) dry cell weight, (□) butyric acid, (○) acetic acid.

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพของการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมค่า pH ที่ แตกต่างกันในระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

Kinetic parameters	pH						
	Uncontrolled pH	4.50	5.00	5.25	5.50	6.00	6.50
Initial glucose concentration (g/L)	50.20±0.38	51.30±0.45	50.04±0.22	49.96±0.07	50.07±0.33	51.03±0.47	49.86±0.22
Glucose utilized (g/L)	47.98±0.44	40.68±0.28	45.68±0.46	48.97±0.56	48.75±0.17	41.22±0.33	41.38±0.27
Max. dry cell weight (g/L)	1.61±0.12	1.59±0.07	2.31±0.20	2.53±0.09	3.27±0.12	3.01±0.07	3.36±0.14
Maximum butyric acid concentration (g/L)	2.72±0.24	2.98±0.26	3.26±0.40	3.69±0.56	3.38±0.67	3.48±0.28	4.63±0.35
Maximum acetic acid concentration (g/L)	2.50±0.17	1.81±0.24	3.23±0.09	3.24±0.34	3.12±0.08	3.43±0.34	3.54±0.22
Total organic acids concentration (g/L)	5.22±0.24	4.79±0.26	5.54±0.28	6.22±0.28	6.50±0.37	6.44±0.28	8.17±0.19
Maximum butanol concentration (g/L)	11.37±0.26	6.22±0.17	10.72±0.13	12.53±0.40	14.43±0.44	10.48±0.56	5.34±0.33
Maximum acetone concentration (g/L)	3.59±0.02	2.71±0.02	3.54±0.05	6.78±0.11	4.91±0.09	3.68±0.07	2.49±0.15
Maximum ethanol concentration (g/L)	0.34±0.02	0.37±0.01	0.47±0.02	0.53±0.02	0.74±0.02	0.37±0.10	0.25±0.07
Total solvents concentration (g/L)	15.30±0.22	9.30±0.18	14.73±0.04	19.84±0.11	20.08±0.22	14.53±0.17	8.08±0.24
Fermentation time (h)*	60	72	60	60	60	84	84

ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง จะคำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยสมมุติให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากภาพที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักแตกต่างกัน พบว่าเมื่อควบคุมค่า pH ที่ 5.5 ทำให้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 มีค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) สูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมักถึง 21.21% (0.33 กับ0.26 g/L/h) และให้ค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) สูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมักถึง 28% (0.41 กับ 0.37 g/L/h) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการควบคุมค่า pH ที่ 5.5 และ 5.25 พบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 มีค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด และให้ค่าผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดจะอยู่ช่วง 0.4 g/L/h ส่วนค่าค่าผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วง 40% เมื่อพิจารณาทางเศรษฐศาสตร์ ซึ่งการควบคุมค่า pH ที่ต่ำกว่าต้องใช้ปริมาณเบส (3M KOH) เพื่อปรับรักษาค่า pH ให้คงที่มากกว่า ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่า ฉะนั้นในการศึกษานี้จึงสรุปว่า การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 เหมาะสมที่สุด จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ากลยุทธ์ในการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) มีความสำคัญอย่างมาก ในการพัฒนาและปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462

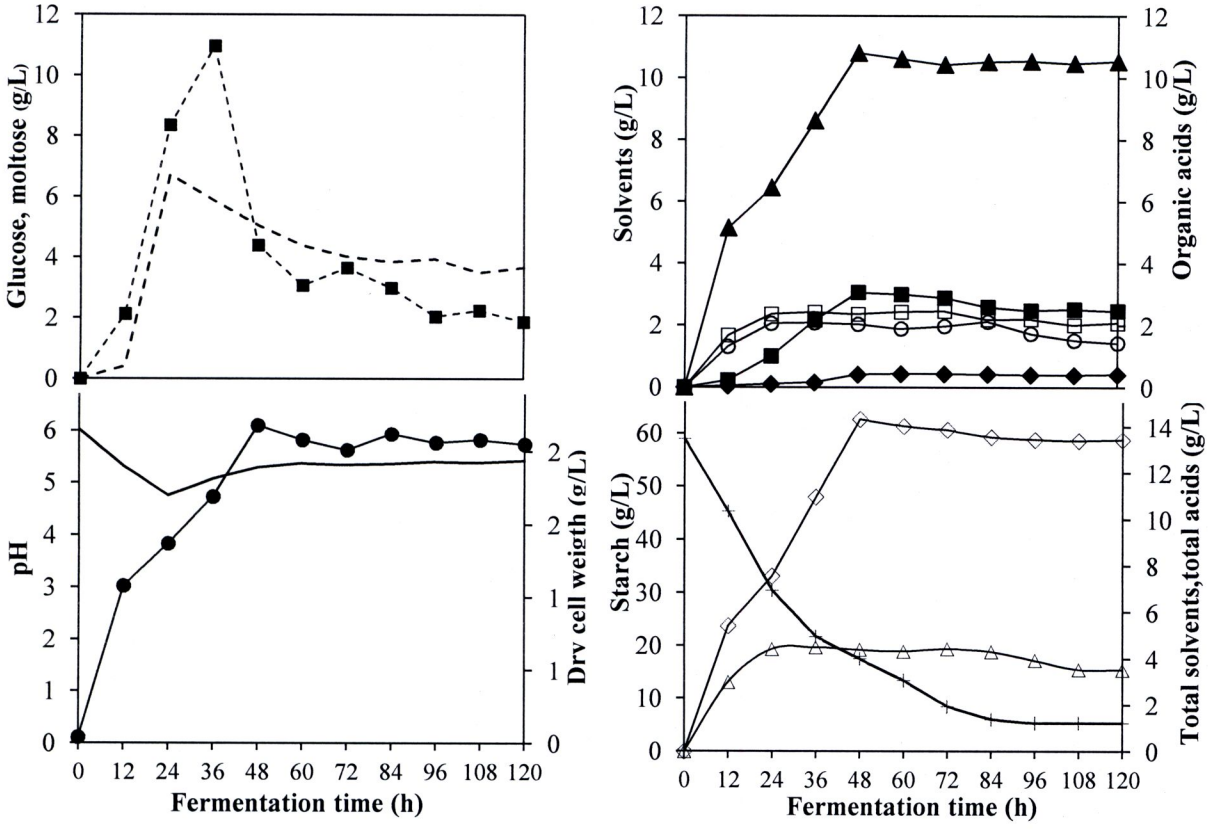


ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักแตกต่างกันในกระบวนการหมักแบบกะ

4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

เพื่อศึกษาคุณลักษณะของการหมัก (Fermentation characteristic) ของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 และจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารในตัวอย่างทดลองควบคุม (Control experiment) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก (Fermentation products) ชีวมวล (Biomass) และการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ในระหว่างการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 แสดงในภาพที่ 4.5 จะเห็นว่ารูปแบบวิถีการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 มีลักษณะคล้ายกันกับรูปแบบวิถีการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสดังแสดงในภาพที่ 4.1 และ 4.2 ซึ่งในระยะแรกของการเจริญของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (Amyloytic enzyme) อาทิเช่น เอนไซม์ α-amylase glucoamylase และ pullulanase จะผลิตเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวออกมา เพื่อย่อยหรือเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคสก่อน ทั้งนี้ประสิทธิภาพและกระบวนการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล ด้วยเอนไซม์ที่ผลิตออกมาในระหว่างกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียนั้น จะมีความแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตลอดจนความสามารถในการทำกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นด้วย ซึ่งความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent-producing strain) และสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยวัตถุดิบประเภทแป้งได้เองนั้น ถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการปรับปรุงและพัฒนากระบวนผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ต่อไป (Madihah *et al.*, 2008)

จากภาพที่ 4.5 จะเห็นว่ารูปแบบกระบวนการหมักของแป้งมันสำปะหลังที่ยังไม่ผ่านการย่อย (Gelatinized cassava starch) ก่อนกระบวนการหมักนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ 1) ระยะที่มีการผลิตกรดอินทีย์ (กรดบิวทิริกและกรดอะซิติก) ควบคู่กับการผลิตชีวมวล (Cell biomass) ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญของแบคทีเรีย ผลจากการผลิตกรดอินทรีย์ ทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก pH เริ่มต้น 6.0 เป็น pH 4.75 และในระยะนี้จะพบการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ต่อมาระยะที่ 2 เมื่อการเจริญของแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase (หลังจาก 36 ชั่วโมง) ซึ่งในระยะนี้แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยนกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นในระยะแรกให้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (บิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล) ซึ่งส่งผลให้ค่า pH ของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย



ภาพที่ 4.5 วิถีการหมักของแป้งมันสำปะหลัง (Gelatinized cassava starch) ความเข้มข้น 60 g/L ที่ยังไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สัญลักษณ์: (----) glucose, (--■--) maltose, (—) pH, (■) acetone, (▲) butanol, (♦) ethanol, (●) dry cell weight, (□) butyric acid, (○) acetic acid, (◊) total solvents, (Δ) total organic acids, (+) starch.

เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในการศึกษานี้ได้ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 20-80 g/L เป็นแหล่งอาหาร จากการทดลองเมื่อให้ความร้อนแก่แป้งมันสำปะหลังจนกระทั่งแป้งเกิดการพองตัวและสุก (Gelatinization) พบว่าแป้งมันสำปะหลังจะแสดงพฤติกรรมแบบ Pseudoplastic behavior และความหนืด (Viscosity) ของแป้งจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นที่ใช้ด้วย (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ทั้งนี้ได้ลองทดสอบใช้แป้งมันสำปะหลังในการหมักที่ 90 g/L ด้วยเช่นกัน แต่เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าว แป้งมันสำปะหลังแสดงพฤติกรรมแบบ Pseudoplastic behavior และมีความหนืดสูงมาก ซึ่งทำให้การเตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบค่อนข้างยุ่งยาก ในการวิจัยนี้จึงได้เลือกทำการศึกษาเฉพาะช่วงความเข้มข้นจาก 20-80 g/L เท่านั้น

ประสิทธิภาพในการหมักตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 จากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 60 g/L ทำให้สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Total solvents) ได้สูงที่สุดถึง 14.33 g/L รองลงมาคือการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 50 g/L และ 70 g/L ซึ่งผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดได้เท่ากับ 13.14 และ 11.92 g/L ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (Maximum dry cell weight) จะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่ใช้แป้งมันสำปะหลังจากความเข้มข้น 20 g/L จนถึง 40 g/L ส่วนการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นตั้งแต่ 40 g/L ขึ้นไปจนถึง 80 g/L พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อพิจารณาการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกผลิตเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากการใช้แป้งมันสำปะหลังตั้งแต่ 20 g/L จนถึง 60 g/L แล้วจะค่อยๆ ลดลงเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นมากกว่า 60 g/L ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจาก 40 g/L เป็น 80 g/L พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 10.41 g/L และน้ำตาลมอลโตสจะเพิ่มขึ้นจาก 0.13 เป็น 2.83 g/L ตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ (Residue starch concentration) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (40-80 g/L) พบว่าปริมาณแป้งที่เหลืออยู่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 3.04 เป็น 12.78 g/L ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปริมาณแป้งที่ถูกใช้ไปในระหว่างการหมักลดลงจาก 89.87% เป็น 68.8% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกันกับผลการทดลองของ Madihah *et al.* (2000) และ Madihah *et al.* (2001b) ซึ่งใช้แป้งสาคู (Sago starch) เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 โดยกลุ่มนักวิจัยดังกล่าวได้สรุปว่า เมื่อใช้ตัวอย่างแป้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงๆ ในการหมัก จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ลดลง ซึ่งเป็นเพราะความหนืดที่เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่เพิ่มขึ้นนั้น อาจจะมีผลต่อการถ่ายเทมวล (Mass transfer) ในกระบวนการย่อย (Enzymatic hydrolysis) ตลอดจนยับยั้งทำงานของเอนไซม์ รวมถึงปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ก็เป็นได้

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462

Kinetic parameters	Cassava starch concentrations (g/L)						
	20	30	40	50	60	70	80
Final glucose concentration (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.23±0.11	1.65±0.21	6.86±0.11	10.41±0.06
Final maltose concentration (g/L)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.13±0.24	0.51±0.37	1.07±0.07	2.12±0.35	2.83±0.22
Final starch concentration (g/L)	2.02±0.20	3.04±0.38	3.42±0.35	3.03±0.45	5.35±0.12	10.05±0.46	12.78±0.18
Utilized starch (%)	94.90±0.17	89.87±0.22	91.13±0.12	92.54±0.08	86.88±0.08	73.83±0.11	68.82±0.06
Maximum dry cell weight (g/L)	1.09±0.02	1.85±0.12	2.29±0.20	2.20±0.02	2.18±0.06	2.29±0.12	2.34±0.04
Maximum acetic acid concentration (g/L)	2.13±0.24	1.17±0.36	1.45±0.19	2.23±0.13	2.06±0.32	1.56±0.45	1.47±0.53
Maximum butyric acid concentration (g/L)	3.47±0.42	2.38±0.38	2.22±0.44	2.52±0.35	2.56±0.20	2.32±0.08	1.87±0.11
Total organic acids concentration (g/L)	5.60±0.12	3.55±0.16	3.67±0.25	4.75±0.18	4.62±0.16	3.88±0.13	3.34±0.18
Maximum acetone concentration (g/L)	0.79±0.22	2.45±0.25	1.86±0.16	2.81±0.20	3.06±0.25	3.37±0.11	2.72±0.23
Maximum ethanol concentration (g/L)	0.18±0.04	0.22±0.01	0.32±0.04	0.32±0.06	0.34±0.02	0.37±0.01	0.30±0.06
Maximum butanol concentration (g/L)	2.23±0.34	6.88±0.46	9.24±0.26	10.01±0.18	10.93±0.22	8.18±0.45	8.64±0.38
Total solvents concentration (g/L)	3.20±0.12	9.55±0.23	11.42±0.11	13.14±0.08	14.33±0.09	11.92±0.21	11.66±0.11
Fermentation time (h)*	72	60	48	48	48	60	72

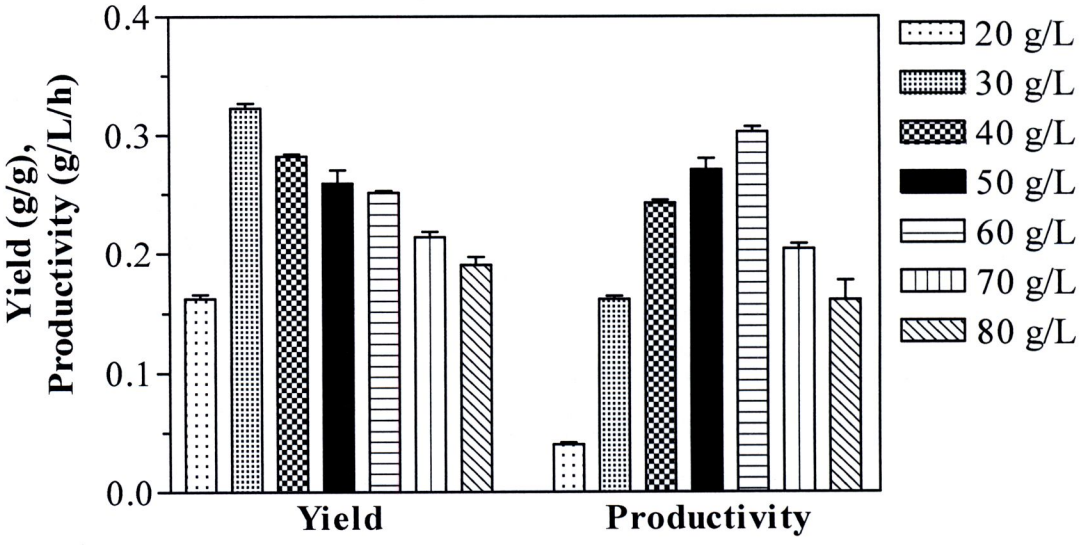
ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง คำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยกำหนดให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

สำหรับการหมักโดยใช้ตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 30 g/L พบว่ามีแป้งที่ยังคงไม่ถูกใช้ไปและเหลืออยู่ประมาณ 3.04 g/L แสดงว่าแป้งมันสำปะหลังจะถูกใช้ไปในระหว่างกระบวนการหมักเท่ากับ 89.87% หรือประมาณ 26.96 g/L (ตารางที่ 4.4) ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นดังกล่าว พบว่าไม่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตสเหลืออยู่เลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 30 g/L ในการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์นั้น แบคทีเรียมีความสามารถในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส) ช้ากว่าการใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักเพื่อการเจริญและสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ จึงไม่พบปริมาณน้ำตาลหลงเหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากข้อมูลดังได้กล่าวไปข้างต้นอาจจะอนุมานได้ว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 30 g/L ประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะลดลง เนื่องจากปริมาณแหล่งอาหารเริ่มต้นไม่เพียงพอ (Deficient in substrate) ต่อการเจริญและการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย

จากภาพที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งอาหารหลัก ซึ่งพบว่าค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะลดลงจาก 0.32 เป็น 0.19 g/g เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังจาก 30 g/L เป็น 80 g/L นอกจากนี้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ก็ลดลงจาก 0.28 เป็น 0.16 g/L/h เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังจาก 60 g/L เป็น 80 g/L จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูงๆ นั้น อาจจะส่งผลต่ออัตราการถ่ายเทมวล (Mass transfer rate) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความหนืดของน้ำหมัก กล่าวคือเมื่อความหนืดของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นจะไปลดความสามารถในการแพร่ (Diffusion) ของสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการหมักได้ Thang *et al.* (2010) ได้อธิบายไว้ว่า ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยวัตถุดิบประเภทแป้ง (Amylolytic enzyme) ให้กลายเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Fermentable sugars) ของแบคทีเรียระหว่างที่มีการเจริญเต็มที่ (Active growth) จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแป้งที่ใช้ในกระบวนการหมักเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากปริมาณแป้งที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนืดของน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งความหนืดที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวจะส่งผลให้การผลิตตัวทำละลายลดลงด้วย

เมื่อพิจารณาปริมาณบิวทานอลที่ถูกผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นค่าต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ปริมาณบิวทานอลสูงสุดที่ผลิตได้จากทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจะไม่มากกว่า 16 g/L ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Roos *et al.* (1985) ที่รายงานไว้ว่าบิวทานอลความเข้มข้น 13 ถึง 16 g/L สามารถยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่การเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. จะลดลงถึง 50% เมื่อมีการเติมบิวทานอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 7-12 g/L ส่วนความเข้มข้นของกรดบิวทิริก ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลนั้น (Monot *et al.*, 1983) พบว่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจาก 40 g/L เป็น 50 g/L โดยลดลงจาก 2.52 เป็น 2.22 g/L อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการผลิตตัวทำละลายไม่ได้มีความสัมพันธ์กันกับปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด (Total organic acids) ที่ถูกผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ดังจะเห็นได้จากมีการสะสมของกรดอินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 4.75 g/L ในตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 50 g/L ซึ่งสูงกว่าปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมด (4.62 g/L) ของตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 60 g/L และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณตัวทำละลายทั้งหมดที่ถูกผลิตขึ้นจากการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 50 และ 60 g/L พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 50 g/L ซึ่งมีการสะสมของกรดอินทรีย์สูงกว่านั้น มีการผลิตตัวทำละลาย เพียง 13.14 g/L ซึ่งน้อยกว่าตัวอย่างที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 60 g/L ที่ผลิตตัวทำละลายได้ 14.33 g/L ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Madihah *et al.* (2001) ที่พบว่า การสะสมของกรดอินทรีย์ (กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก) ในปริมาณมากระหว่างกระบวนการหมักนั้น ไม่ได้มีส่วนกระตุ้นให้มีการผลิตตัวทำละลายได้มากขึ้น แต่การที่จะผลิตตัวทำละลายให้ได้ปริมาณมากนั้น เชื่อว่าปริมาณของกรดบิวทิริกในรูปที่ไม่แตกตัว (Undissociated butyric acid) ต้องมีการสะสมในระดับเพียงพอที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Onset of solvent production)

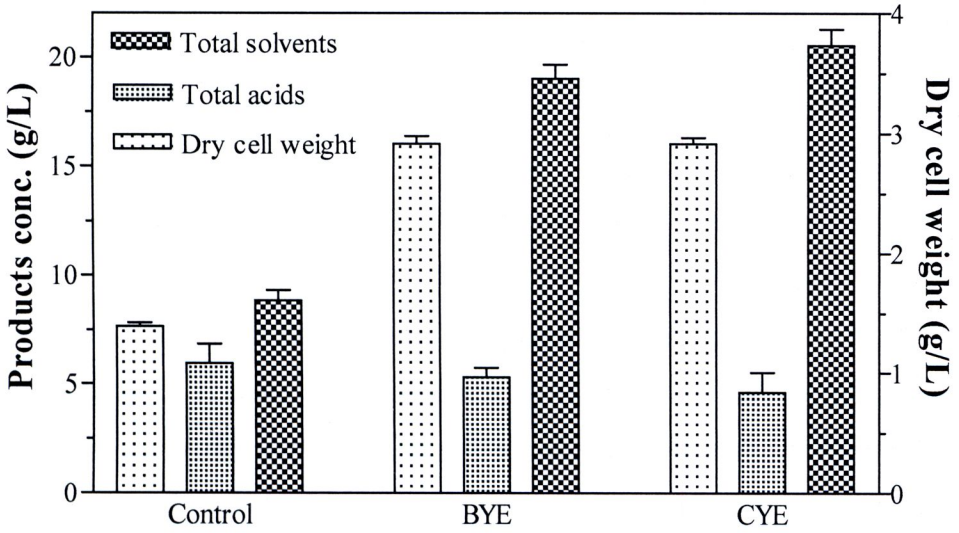


ภาพที่ 4.6 การเปรียบเทียบระหว่างค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) และค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด (Productivity) ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งอาหารหลักในกระบวนการหมักแบบกะ

4.5 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ระหว่างสารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) และสารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast extract) ต่อประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งมันสำปะหลัง 60 g/L และควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยสารสกัดจากยีสต์ประเภทต่างๆ ในการทดลองนี้จึงควบคุมความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ให้เท่ากันที่ 5 g/L ส่วนตัวอย่างควบคุม (Control experiment) จะไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่า การใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 20.86 g/L ซึ่งมากกว่าการใช้สารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ที่ผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 18.46 g/L นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า และสารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมาก เมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการใช้สารสกัดจากยีสต์เลยที่ผลิตตัวทำละลายได้เพียง 9.55 g/L ยิ่งไปกว่านั้นปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดของตัวอย่างควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์นั้น มีค่าน้อยกว่าการทดลองที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า และสารสกัดยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

เป็นแหล่งไนโตรเจนถึง 2 เท่า ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่าแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารอินทรีย์ (Organic nitrogen source) เช่น สารสัดจากยีสต์ จะเป็นแหล่งของกรดอะมิโนหลายชนิด วิตามิน และแร่ธาตุที่จะกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญของจุลลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Madihah *et al.*, 2001) Saksinchai *et al.* (2001) รายงานว่า สารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างง่าย สำหรับการเจริญและการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าซึ่งมีราคาแพงในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า แป้งมันสำปะหลัง เสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ เป็นวัตถุดิบที่มีประสิทธิภาพอย่างยิ่ง ที่จะใช้ในกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (บิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล) เชิงการค้าที่ยั่งยืนต่อไป



ภาพที่ 4.7 การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ pH 5.5 (สัญลักษณ์: BYE, Spent brewer's yeast extract; CYE, Commercial yeast extract and Control, without yeast extract)

4.6 อิทธิพลของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

เพื่อศึกษาความสามารถของวัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ในกระบวนการหมัก ต่อการผลิตตัวทำละลายเอบีอี (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ในการศึกษานี้ได้ใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ได้แก่ แป้งมัน มันเส้น กาก

มัน ตลอดจนมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยทั้งเอนไซม์ หรือกรด ที่ความเข้มข้นประมาณ 70 g/L ทั้งนี้ ในกรณีที่ใช้อาหารที่มีแป้งอยู่ 60 g/L จะกำหนดให้ในตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 66 g/L เนื่องจากแป้ง 1 g ถ้าถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส 1.1 g ในการทดลองนี้ก็ได้ประยุกต์ใช้การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะการสร้างตัวทำละลายที่ pH 5.5 ด้วย และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารในชุดการทดลองควบคุม ซึ่งผลของการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลังประเภทต่างๆ รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ในการผลิตตัวทำละลายได้สรุปไว้ในตารางที่ 4.5 พบว่า แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังประเภทต่างๆ เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลัก

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลัง ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการย่อย (Non hydrolyzed treatment) ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก ได้แก่ แป้งมัน มันเส้น และกากมัน พบว่าการใช้แป้งมันให้ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงที่สุดถึง 21.20 g/L ตามด้วยการใช้มันเส้น ซึ่งผลิตตัวทำละลายทั้งหมดได้ 19.11 g/L ส่วนตัวอย่างกากมันซึ่งมีองค์ประกอบของเส้นใยที่ค่อนข้างสูงถึง 14.08 g/L (ตารางที่ 4.1) จึงไม่สามารถใช้ในกระบวนการหมักได้โดยตรง เนื่องจากแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Cellulase ที่จะย่อยส่วนประกอบที่เป็นเส้นใยภายในโครงสร้างของ Lignocelluloses ในกากมันได้ จึงจำเป็นต้องย่อยตัวอย่างก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก

สำหรับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลัง ทั้งย่อยด้วยเอนไซม์ กรด และการทำให้เกิดเจลก่อนการหมัก (Gelatinization) โดยพบว่า การย่อยมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และการทำให้เกิดเจลก่อนการหมัก สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ในช่วง 19-21 g/L ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Nimcevic *et al.* (1998) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Cl. beijerinckii* NRRL B592 สามารถใช้มันฝรั่งทั้งหัวที่ไม่ผ่านการเตรียมและย่อยด้วยเอนไซม์ใดๆ เป็นแหล่งอาหารในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อผลิตน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคส ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักนั้น ไม่ได้มีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรียชนิดนี้เลย ส่วนการใช้ตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอลิกเจือจางในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ลดลงประมาณ 19.48% เมื่อเทียบกับปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตได้จากการเตรียมตัวอย่างอื่นๆ (21.20 กับ 17.07 g/L) ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจากในระหว่างการเตรียมตัวอย่างด้วยกรด ซึ่งสามารถย่อยทุกพันธะอย่างไม่จำเพาะเจาะจงในโมเลกุลของตัวอย่าง จึงอาจทำให้เกิดการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้ปัญหาที่สืบเนื่องมาจากการเตรียมตัวอย่างก่อนการหมักด้วยกรด

นั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าจะทำให้เกิดการสร้างสารประกอบ เช่น อนุพันธ์ของสาร Fufural ได้แก่ พวก Aliphatic acid และ Phenolic compound ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรีย เป็นต้น (Purwadi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009 และ Thongchul *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามการเตรียมตัวอย่างด้วยกรด เป็นวิธีการที่ค่อนข้างสะดวก รวดเร็ว และประหยัดในการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากอนุพันธ์ของสารที่ซับซ้อน เช่น Polysaccharide เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้นอาจจะอนุมานได้ว่า การเตรียมตัวอย่างกากมันโดยใช้กรด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ และมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าวัตถุดิบมันสำปะหลัง (Cassava materials) สามารถใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกในการผลิตตัวละลายอินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่า 19 g/L เพียงแค่เตรียมตัวอย่างเล็กน้อยก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมักเท่านั้น

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพการหมักโดยใช้วัตถุดิบมันสำปะหลังประเภทต่างๆ ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462

Kinetic parameters	Glucose	Gelatinized cassava starch	Enzyme hydrolysate cassava starch	Gelatinized cassava chip	Enzyme hydrolysate cassava chip	Enzyme hydrolysate cassava pulp	Acid hydrolysate cassava pulp
Initial substrate concentration (g/L)	66.02±0.05	60±0.02	65.78±0.09	60±0.01±0.01	65.46±0.06	66.22±0.02	64.72±0.06
Final substrate concentration (g/L)	13.24±0.24	11.21±0.55	11.87±0.34	12.53±0.46	11.75±0.42	12.83±0.33	17.77±0.36
Maximum dry cell weight concentration (g/L)	2.65±0.26	2.78±0.05	2.75±0.06	2.70±0.12	2.72±0.06	2.78±0.16	2.54±0.12
Substrate utilized (%)	79.95±0.03	83.02±0.23	81.96±0.32	81.02±0.34	82.05±0.52	80.63±0.44	72.54±0.44
Final acetic acid concentration (g/L)	0.53±0.08	0.66±0.21	1.04±0.35	1.35±0.24	1.26±0.09	1.45±0.27	1.06±0.12
Final butyric acid concentration (g/L)	0.08±0.05	1.12±0.05	2.22±0.12	2.04±0.15	1.89±0.26	2.34±0.16	2.34±0.23
Maximum acetone concentration (g/L)	5.45±0.32	4.89±0.11	4.38±0.44	4.05±0.23	4.12±0.38	4.22±0.22	3.86±0.34
Maximum butanol concentration (g/L)	15.76±0.54	15.65±0.07	15.14±0.34	14.67±0.34	15.09±0.26	14.92±0.31	12.86±0.27
Max. ethanol concentration (g/L)	0.58±0.02	0.66±0.05	0.34±0.02	0.39±0.02	0.53±0.05	0.52±0.02	0.35±0.02
Total solvents concentration (g/L)	21.79±0.27	21.20±0.32	19.86±0.31	19.11±0.35	19.74±0.32	19.66±0.34	17.07±0.13
Fermentation time (h)*	60	48	48	48	60	60	60
Solvent yield (g solvents/g glucose)	0.41±0.03	0.39±0.02	0.37±0.02	0.36±0.01	0.37±0.03	0.37±0.03	0.36±0.02
Solvent productivity (g solvents/L/h)	0.36±0.01	0.44±0.01	0.41±0.02	0.40±0.02	0.33±0.02	0.33±0.01	0.28±0.01

ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง คำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยกำหนดให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ

จากการเปรียบเทียบวัตถุดิบประเภทแป้ง (Starchy material) ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* sp. ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังในการหมักแบบกะโดยไม่มีการควบคุมค่า pH ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ให้ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์น้อยกว่าการใช้แป้งสาคู (Sago starch) ในการหมักแบบกะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 (17.99 กับ 14.33 g/L) ในทางตรงกันข้ามเมื่อควบคุมค่า pH ในกระบวนการหมักแป้งมันสำปะหลังที่ pH 5.5 พบว่าสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่าการใช้แป้งสาคูในการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่า pH จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ในระหว่างกระบวนการหมัก มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ได้ ดังนั้นข้อพิสูจน์ในเรื่องการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักให้คงที่ในการวิจัยนี้ อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

เมื่อพิจารณาการผลิตแอซิโตน เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลักในกระบวนการหมักของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 นั้นสามารถผลิตแอซิโตนได้มากกว่าการใช้วัตถุดิบแป้งมันสำปะหลัง ทั้งที่ผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามเชื่อว่าปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความแตกต่าง ของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวัตถุดิบต่างๆ ในตารางที่ 4.6 คือเวลาที่ใช้ในการหมัก (Fermentation time) กล่าวคือเมื่อใช้วัตถุดิบทั้งกากมันและมันเส้นในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์นั้น แบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้แป้งข้าวโพดและแป้งสาคูในกระบวนการหมัก แบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์มากที่สุดที่เวลา 66 และ 77 ชั่วโมงตามลำดับ ขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารหลัก แบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุดที่ 60 ชั่วโมง ทั้งนี้ผลของการใช้เวลาในการหมักที่มากกว่าตัวอย่างอื่นๆ เมื่อใช้แป้งข้าวโพดและแป้งสาคูในกระบวนการหมัก จึงทำให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Productivity) น้อยกว่า เมื่อเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังหรือกากมัน ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าว สามารถอธิบายได้โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกันของแป้งแต่ละชนิด โดยมีการรายงานว่าแป้งข้าวโพดมีขนาดของเม็ดแป้งโดยเฉลี่ยประมาณ 15 μm (Ma *et al.*, 2006) และมีปริมาณ Amylose ประมาณ 28% (Ahmad *et al.*, 1999) ส่วนแป้งสาคูมีขนาดของเม็ดแป้งโดยเฉลี่ยประมาณ 30 μm (Wang *et al.*, 1995) และมีปริมาณ Amylose ประมาณ 24–31% (Ahmad *et al.*, 1999 และ Sandhu and Singh, 2007) ในขณะที่แป้งมันสำปะหลังมีขนาดของเม็ดแป้งโดยเฉลี่ยประมาณ 13-15 μm (Rao and Tattiyakul, 1999) และมีปริมาณ Amylose ประมาณ 18.6-23.6% (Defloor *et al.*, 1998) ทั้งนี้ขนาดของเม็ดแป้งที่เล็กกว่า จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยของเอนไซม์ Amylase ได้ด้วย เนื่องจากขนาดที่เล็กของเม็ดแป้งจะ

ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์และตัวซับสเตรต จึงทำให้เกิดการย่อยได้เร็วและดีขึ้นด้วย (Cone *et al.*, 1990)

ตารางที่ 4.6 ความสามารถของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* spp. ในการใช้วัตถุดิบประเภทต่างๆ เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

Kinetic parameters	Types of substrate					
	Glucose[a]	Cassava starch[a]	Cassava chip[a]	Cassava starch[b]	Corn starch[c]	Sago starch[d]
Initial substrate conc. (g/L)	66.02±0.05	60±0.02	60±0.01	60±0.12	50.00	60.00
Final substrate conc. (g/L)	13.24±0.24	11.21±0.55	12.53±0.46	10.46±0.24	11.46	17.06
Maximum dry cell weight concentration (g/L)	2.65±0.26	2.78±0.05	2.70±0.12	2.48±0.06	2.60	2.08
Substrate utilized (%)	79.95±0.03	83.02±0.23	81.02±0.34	84.24±0.07	78.60	no data
Final acetic acid concentration (g/L)	0.53±0.08	0.66±0.21	1.35±0.24	0.76±0.34	0.60	0.43
Final butyric acid concentration (g/L)	0.08±0.05	1.12±0.05	2.04±0.15	0.66±0.36	0.00	0.54
Maximum acetone concentration (g/L)	5.45±0.32	4.89±0.11	4.05±0.23	3.06±0.33	4.00	1.67
Maximum concentration (g/L)	15.76±0.54	15.65±0.07	14.67±0.34	10.93±0.17	16.20	16.00
Maximum ethanol concentration (g/L)	0.58±0.02	0.66±0.05	0.39±0.02	0.34±0.08	0.50	0.34
Total solvents concentration (g/L)	21.79±0.27	21.20±0.32	19.11±0.35	14.33±0.11	20.70	17.99
Fermentation time (h)*	60	48	48	48	66	77
Solvent yield (g solvents/g glucose)	0.41±0.02	0.39±0.02	0.36±0.01	0.26±0.02	0.48	0.37
Solvent productivity (g solvents/L/h)	0.36±0.01	0.44±0.01	0.40±0.02	0.24±0.01	0.31	0.23

ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดอินทรีย์ น้ำตาล และแป้ง คำนวณ ณ จุดที่มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield) จะคำนวณตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร โดยกำหนดให้ แป้ง 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้ 1.1 g และน้ำตาลมอลโตส 1 g สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ 1.053 g (Liew *et al.*, 2006) *Fermentation time คือ เวลาที่ใช้การหมักที่ทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด ตัวเลข ± คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ [a]การหมักแบบกะที่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมักที่ 5.5 ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 (งานวิจัยนี้) [b]การหมักแบบกะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 (งานวิจัยนี้) [c]การหมักแบบกะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Cl. saccharobutylicum* P262 (Thang *et al.*, 2010) [d]การหมักแบบกะที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก ด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* P262 (Madihah *et al.*, 2001)