

การประเมินจำนวนเซลล์มีชีวิตของ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461
ระหว่างการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี
Clostridium beijerinckii TISTR 1461 Viability Determination
during Butanol Production from Sugarcane Molasses by Flow Cytometry

กัณทิมา ศิริสันติเมธาคม, กิติพงษ์ เวชกามา และลิขิต ศิริสันติเมธาคม*

Kantima Sirisantimethakom, Kitipong Wechgama and Likit Sirisantimethakom*

คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์

Faculty of Agro Industrial Technology, Kalasin University

*Corresponding Author: likit@ksu.ac.th

บทคัดย่อ

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (เอบีอี) ในกระบวนการหมักแบบกะโดยทั่วไปสามารถแบ่งได้ 2 ระยะ คือ ระยะการสร้างกรดและการสร้างตัวทำละลาย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ ประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 สำหรับการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลในระบบการหมักแบบกะด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี จากผลการทดลอง พบว่า การผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลสามารถผลิตบิวทานอลและเอบีอีมีค่าเท่ากับ 7.39 ± 0.14 และ 11.96 ± 0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก และในระยะของการสร้างกรด (ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกากน้ำตาล คือ $71.75 \pm 2.76\%$ และมีปริมาณบิวทานอลเท่ากับ 2.69 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 (ระยะการสร้างตัวทำละลาย) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกากน้ำตาล คือ $4.90 \pm 1.56\%$ ในช่วงเวลานี้มีปริมาณบิวทานอลเท่ากับ 7.33 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ในระหว่างช่วงระยะการสร้างตัวทำละลาย จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 มีจำนวนลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของบิวทานอลมีค่าเพิ่มขึ้น ดังนั้น พบว่าเทคโนโลยีของโฟลไซโทเมทรีมีศักยภาพในการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการผลิตบิวทานอลและความเข้มข้นของบิวทานอลมีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461

คำสำคัญ: การหมักแบบกะ, บิวทานอล, กากน้ำตาล, โฟลไซโทเมทรี

Abstract

Butanol can be produced by Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation. In batch mode, the fermentation process typically proceeds in two phases, namely the acidogenic and solventogenic phase. The aim of this study was to determine physiological population of *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 for butanol production from sugarcane molasses in batch fermentation by flow cytometer analysis. The results show that the butanol production from sugarcane molasses gave the butanol and ABE concentration with the values of 7.39 ± 0.14 and 11.96 ± 0.29 g/L, respectively at 60 h of fermentation time. During acidogenic phase (24 h of fermentation time), the viable cells of

C. beijerinckii TISTR 1461 in sugarcane molasses were $71.75 \pm 2.76\%$ and the butanol concentration was 2.69 ± 0.01 g/L. At 72 h (solventogenic phase), the viable cells of *C. beijerinckii* TISTR 1461 in sugarcane molasses were 4.90 ± 1.56 %. At this point, the butanol concentration was 7.33 ± 0.07 g/L. During solventogenic phase, the viable cells of *C. beijerinckii* TISTR 1461 were reduced, however, the concentrations of butanol were increased. Therefore, we found that flow cytometry technique has the potential to viability determination of *C. beijerinckii* TISTR 1461 in butanol production and butanol concentration affects viable cells of *C. beijerinckii* TISTR 1461.

Keywords: batch fermentation, butanol, sugarcane molasses, flow cytometry



บทนำ

เนื่องจากปัญหาราคาน้ำมันที่ผันผวนตามภาวะเศรษฐกิจโลก ประกอบกับแหล่งพลังงานฟอสซิลเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่ในปัจจุบันมีปริมาณจำกัดและอัตราการใช้พลังงานมีแนวโน้มสูงขึ้น ในอนาคตอาจทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนพลังงานอย่างรุนแรง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมและการพัฒนาของประเทศ จากปัญหาดังกล่าว การหาแหล่งพลังงานทดแทนในรูปอื่น ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วน เพื่อนำมาใช้ทดแทนหรือลดปริมาณการใช้น้ำมันปิโตรเลียม

ในปัจจุบัน พลังงานทดแทนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ เอทานอล ซึ่งมีข้อเสียหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับบิวทานอล โดยบิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ สามารถใช้เป็นตัวทำละลาย ตัวสกัด หรือสารเติมแต่งในอุตสาหกรรมเรซิน สารทำความสะอาด เป็นต้น (Wei, Tai-Shung & Takeshi, 2004) และสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมอาหาร และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้ (Qureshi & Ezeji, 2008) บิวทานอลมีจำนวนคาร์บอนอะตอมสูงกว่าเอทานอล ทำให้สามารถละลายในน้ำมันดีเซลได้ดีกว่าเอทานอลแม้ที่อุณหภูมิต่ำ ทั้งยังไม่ก่อให้เกิดปัญหาการแยกชั้นแบบที่พบในเชื้อเพลิงผสมเอทานอล การใช้บิวทานอลมีความสะดวกในการเก็บและการขนส่ง เพราะสามารถขนส่งบิวทานอลได้ทางท่อโดยตรง นอกจากนี้บิวทานอลมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ทำให้มีฤทธิ์กัดกร่อนน้อย (Shen & Liao, 2008)

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักที่เรียกว่า กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol--ABE) หรือการหมักตัวทำละลาย โดยทั่วไปอัตราส่วนการผลิต ABE เป็น 3:6:1 โดยได้บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนนี้อาจเปลี่ยนไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ความเป็นกรด-ด่าง สารอาหาร แร่ธาตุ การขนส่งอาหาร (nutrient transport) การขนส่งไอออน (ion transport) ส่วนประกอบของเซลล์ เมมเบรนและสถานะในการเลี้ยง (Maddox, Qureshi & Roberts-Thomson, 1995) กระบวนการหมักบิวทานอลเกิดขึ้นโดย Clostridia ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ไม่ใช้อากาศ (obligate anaerobic) สามารถสร้างสปอร์ได้ (Maddox, Qureshi & Roberts-Thomson, 1995; Lee, et al., 2008; Patakova, et al., 2013)

การผลิตบิวทานอลจากจุลินทรีย์ สามารถใช้วัสดุจากการเกษตร หรือของเสียจากอุตสาหกรรมทางชีวภาพเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น น้ำข้าว ฟางหวาน น้ำตาล และกากน้ำตาล เป็นต้น ซึ่งอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ ปลูกมากในภาคตะวันออก เฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้หลักของโรงงานผลิตน้ำตาล โดยสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล (Office of the Cane and Sugar Board, Ministry of Industry, 2017) ได้รายงานการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศ ประจำปีการผลิต 2559/60 ในประเทศไทยว่าจากผลผลิตอ้อยที่ถูกส่งเข้าโรงงานน้ำตาลทั่วประเทศอยู่ที่ 92,950,815.09 ตัน จะเหลือเป็นกากน้ำตาลเท่ากับ 3,894,356.247 ตัน

หรือเฉลี่ย 41.90 กิโลกรัมต่ออ้อย 1 ตัน ซึ่งในปัจจุบันกากน้ำตาลถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลของประเทศไทย

การเปลี่ยนแปลงทางสรีระของจุลินทรีย์ที่อยู่ในถังปฏิกรณ์มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิตชีวทานอลอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นปริมาณจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จำนวนเซลล์ที่ตาย จำนวนเซลล์ที่สร้างสปอร์ หรือขนาดของเซลล์ ซึ่งวิธีการเดิมในการตรวจวัดปัจจัยเหล่านี้ คือ การย้อมสีเฉพาะและนำไปตรวจนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ แต่มีความยุ่งยากและใช้เวลานาน เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ผลิตชีวทานอลสามารถเคลื่อนที่ได้รวดเร็ว ทำให้ข้อมูลที่ได้อาจคลาดเคลื่อน หรือวิธีการอีกอย่างคือ การเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วทำการนับปริมาณจำนวน โดยต้องใช้เทคนิค spread plate technique หรือ pour-plate technique แต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานาน และข้อมูลที่ได้อาจคลาดเคลื่อน เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ปัจจุบันมีเทคโนโลยีใหม่ที่เรียกว่า โฟลไซโทเมทรี (flow cytometry) โดยหลักการของเครื่อง คือ การทำให้เซลล์ไหลผ่านระบบการตรวจวัดที่ละเซลล์ โดยทำการตรวจวัดการกระจายของแสงทั้งทางด้านตรง (forward scatter) และแสงจากด้านข้าง (side scatter) หรืออาจใช้การเรืองแสงจากสารฟลูออเรสเซนต์ร่วมด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโมเลกุลที่ติดสารฟลูออเรสเซนต์ว่าจำเพาะกับเซลล์ชนิดใด โดยอาศัยหลักการทางฟิสิกส์ชีวเคมี และคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้ในการคัดแยกเซลล์ออกมาศึกษา จากหลักการดังกล่าว จึงมีการนำเครื่องโฟลไซโทเมทรีมาใช้กันอย่างแพร่หลายทางวงการแพทย์ เพราะสามารถวัดเซลล์ได้ทีละเซลล์และวัดได้ปริมาณมาก มีความจำเพาะ รวดเร็วและที่สำคัญเซลล์นั้นยังมีชีวิต โดยนิยมวัดปริมาณของเซลล์ ขนาด รูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวัดปริมาณ DNA content, Metabolic activity, Surface receptors, Membrane permeability และ Calcium flux ได้ (Linhová, et al., 2010; Linhová, et al., 2012)

โดยในการหมักเพื่อผลิตชีวทานอลนั้น เริ่มมีการพัฒนาและประยุกต์เครื่องโฟลไซโทเมทรีมาใช้ในการวัดปริมาณเซลล์มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย โดยทดสอบใน

C. acetobutylicum ATCC824 (Tracy, Gaida & Papoutsakis, 2008) *C. pasteurianum* NRRL B-598 และ *C. beijerinckii* CCM 6218 (Linhová, et al., 2012) ซึ่งอยู่ในช่วงการประยุกต์และพัฒนาเทคนิค และส่วนสายพันธุ์อื่นยังไม่มีการศึกษา

วัตถุประสงค์การวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายหลักคือ การประยุกต์การใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ระหว่างการผลิตชีวทานอลจากกากน้ำตาล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมกากน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตชีวทานอล

กากน้ำตาลที่นำมาทำการทดลองในครั้งนี้คือ กากน้ำตาลยี่ห้อ M molasses จากโรงงานน้ำตาลมิตรผล หลังจากเก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างกากน้ำตาลแบ่งในถุง ถุงละ 1 กิโลกรัม แช่ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric method (Mecozzi, 2005) ความเป็นกรด-ด่าง โดย pH meter ปริมาณโลหะหรือธาตุต่าง ๆ (trace elements) โดยใช้ Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (AOAC, 1995)

3. การเตรียมจุลินทรีย์และกระบวนการหมัก

นำสารละลายสปอร์จุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาจุ่มลงในน้ำเย็นจัด 0°C นาน 1 นาที (Sirisantimethakom, et al., 2016) จากนั้นถ่ายกลัเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ที่ผ่านการกระตุ้นลงใน CMM (Cooked Meat Medium) 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 13-15 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเชื้อที่เจริญจะสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว จากนั้นถ่ายสารละลายเซลล์จำนวน 5% โดยปริมาตร ลงในอาหาร TGY (Tryptone Glucose Yeast Extract Medium) 20 มิลลิลิตร แล้ว

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จนสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งจะได้กล้าเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการหมักต่อไป

เตรียมน้ำหมัก 37.5 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อในขวดขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้กากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 60 กรัมต่อลิตร

จากนั้นนำน้ำหมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C นาน 30 นาที (Wechgama, Laopaiboon & Laopaiboon, 2017) พันด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ผ่านชุดกรองอากาศขนาด 0.2 ไมครอนเมตร เพื่อไล่ออกซิเจน และทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายกล้าเชื้อลงในขวด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย โดยใช้เทคนิคโฟลไซโทเมทรี (Linhová, et al., 2010; Linhová, et al., 2012) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก (Sirisantimethakom, et al., 2016)

4. การย้อมเซลล์เพื่อศึกษาสัดส่วนของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

นำน้ำหมักตัวอย่างเดิมพรอพิเดียมไอโอไดด์ (Propidium Iodide--PI) ในสารละลายให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนเพื่อหาเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายด้วยวิธีโฟลไซโทเมทรีโดยใช้เซลล์ในระยะแบ่งตัวเพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มเซลล์มีชีวิต (กลุ่มควบคุม) และใช้เซลล์มีชีวิตที่ผ่านการบ่มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที เป็นตัวแทนของกลุ่มเซลล์ตาย โดยเซลล์ทั้งสองกลุ่มจะทำการทดลองเพื่อทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคโฟลไซโทเมทรีในการหาสัดส่วนของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย

5. การตรวจวัดด้วยเทคนิคโฟลไซโทเมทรี

เซลล์ที่ผ่านการย้อมสี จะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ รุ่น Cytomics FC500 MPL ที่ใช้โปรแกรม MXP ของบริษัท Beckman Coulter ในการดำเนินการ

ทดสอบ ซึ่งมีอาร์กอนเป็นแหล่งกำเนิดแสงเลเซอร์ มีความยาวคลื่นเท่ากับ 488 นาโนเมตร โดยปรับสัญญาณของการเอียงทำมุมเล็กน้อย (Forward Scatter--FSC) และการสะท้อนของแสงที่ทำมุมตั้งฉาก (Side Scatter--SSC) และช่องฟลูออเรสเซนซ์ที่ให้สีเขียว (FL1) มีความยาวคลื่น 515-565 นาโนเมตร ส่วนช่องฟลูออเรสเซนซ์ที่ให้สีแดง (FL3) มีความยาวคลื่นมากกว่า 605 นาโนเมตร และตั้งค่าโวลต์ของตัวตรวจจับของ FSC, SSC, FL1 และ FL3 เป็น 32, 149, 660 และ 640 โวลต์ตามลำดับ และให้จำนวนเซลล์ที่เข้ามาในระบบการทดสอบแต่ละการทดลองอย่างน้อย 1,000 เซลล์ จากนั้นทำการทดสอบหาจุดตัดที่สามารถแยกเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย โดยการใช้กลุ่มควบคุม (เซลล์มีชีวิตมากกว่า 95%) และเซลล์มีชีวิตที่ผ่านการบ่มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที เป็นตัวแทนของกลุ่มเซลล์ตาย (เซลล์มีชีวิตน้อยกว่า 5%) ซึ่งทำการทดสอบทีละกลุ่มตัวอย่าง โดยปรับค่าโวลต์ของ FL3 โดยให้กลุ่มควบคุมที่เป็นเซลล์มีชีวิต ควรเป็นกลุ่มประชากรส่วนใหญ่มีค่าความเข้มแสงสีแดงของพรอพิเดียมไอโอไดด์ในปริมาณต่ำ และกลุ่มเซลล์ตายควรเป็นกลุ่มประชากรส่วนใหญ่มีค่าความเข้มแสงสีแดงของพรอพิเดียมไอโอไดด์ในปริมาณสูง จากนั้นนำทั้งสองกลุ่มผสมกัน โดยปรับค่าโวลต์ของ FL3 ให้สามารถหาจุดตัดที่สามารถแยกเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายได้อย่างชัดเจน เมื่อปรับค่าสภาวะที่เหมาะสมในเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ได้แล้ว ทำการทดสอบตามกลุ่มการทดลองต่าง ๆ โดยรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบในกลุ่มประชากรทั้งหมดด้วยโปรแกรม CXP analysis ของบริษัท Beckman Coulter

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลองแบบสามซ้ำ ข้อมูลรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD)

ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

ผลการวิเคราะห์แร่ธาตุ และโลหะหนักในกากน้ำตาลแสดงดังตาราง 1 โดยผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของตัวอย่างกากน้ำตาลพบว่า มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 56.19 กรัมต่อตัวอย่างกากน้ำตาล 100 กรัม และ

มีปริมาณธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 0.88% โดยน้ำหนักกากน้ำตาล อีกทั้งยังพบว่ามีแร่ธาตุสำคัญอื่น ๆ (ตาราง 1)

ดังนั้น กากน้ำตาลสามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตบิวทานอลได้

ตาราง 1

องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล

Composition	Concentration
Chloride	1.47 % w/w
Organic Carbon (OC)	36.27 % w/w
Total Nitrogen (as N)	0.88 % w/w
Total Phosphate (as P ₂ O ₅)	0.05 % w/w
Sulfur (S)	1.03 % w/w
Protein	5.10 g/100 g
Total sugar	56.19 g/100g
Aluminium (Al)	306.60 mg/kg
Potassium (K)	18,590.00 mg/kg
Sodium (Na)	841.90 mg/kg
Calcium (Ca)	4,750.00 mg/kg
Magnesium (Mg)	3,236.00 mg/kg
Iron (Fe)	58.12 mg/kg
Manganese (Mn)	2.37 mg/kg
Copper (Cu)	2.43 mg/kg
Molybdenum (Mo)	0.15 mg/kg
Nickel (Ni)	11.82 mg/kg
Boron (B)	330.40 mg/kg
Cobalt (Co)	0.51 mg/kg

2. การประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ระหว่างการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลด้วยเทคนิคโฟลโซโทเมทรี

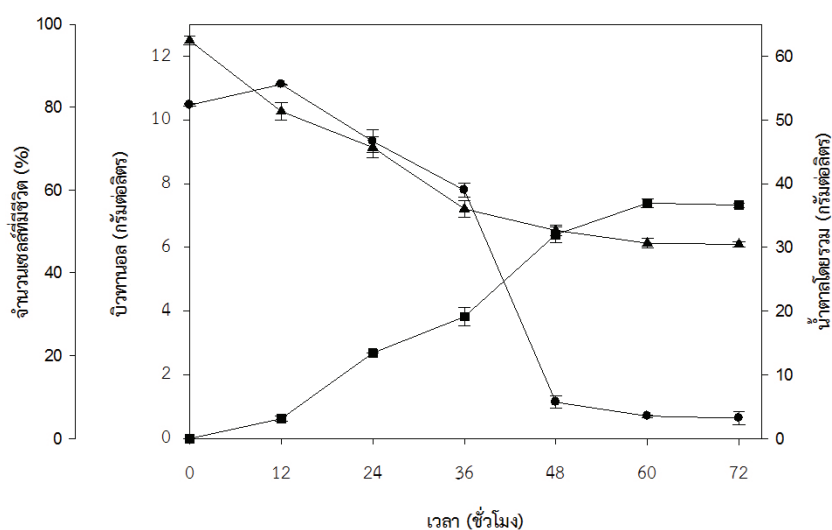
จากการประเมินจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ระหว่างการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลด้วยเครื่องโฟลโซโทเมทรี พบว่าในช่วงเริ่มต้น

(ชั่วโมงที่ 0-12) ของการหมัก *C. beijerinckii* TISTR 1461 มีเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเป็น $85.5 \pm 0.14\%$ หลังจากชั่วโมงที่ 12 เซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยจะมีอัตราการลดลงเร็วที่สุดระหว่างชั่วโมงการหมักที่ 36-48 หลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อย (ภาพ 1) ในสภาวะดังกล่าวเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะมีเซลล์ที่มีชีวิต $4.90 \pm 1.56\%$

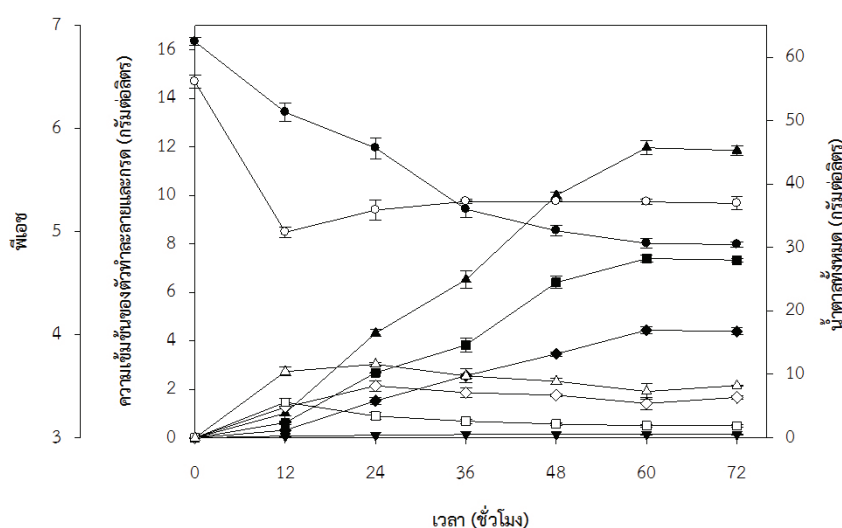
3. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 จากกากน้ำตาล

การศึกษาการผลิตบิวทานอลในกากน้ำตาล โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461 ผลการทดลองและรูปแบบการผลิตผลิตภัณฑ์แสดงดังภาพ 1 จากผลการทดลองที่ได้พบว่า *C. beijerinckii* TISTR 1461 มีการใช้น้ำตาลไปจนถึง 60 ชั่วโมงของการหมัก (31.80 กรัมต่อลิตร) และหลังจากชั่วโมงที่ 60 จะเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมักซึ่งเป็นช่วงของการผลิตกรด พืเอชจะลดลงจาก

6.5 เป็น 5.0 (ภาพ 2) โดยความเข้มข้นของกรดอะซิติกและบิวทริกในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 1.42 และ 0.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 5.29 และผลิตตัวทำละลาย (solvents) ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และเอบีอี มีความเข้มข้นเท่ากับ 4.44, 7.39, 0.13 และ 11.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในสภาวะนี้ให้ผลได้และอัตราการผลิตบิวทานอลเท่ากับ 0.23 และ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพ 2 และตาราง 2)



ภาพ 1 การผลิตบิวทานอล การใช้น้ำตาล และเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ระหว่างการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาล: บิวทานอล (■) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (▲) และเซลล์ที่มีชีวิต (●)



ภาพ 2 รูปแบบการผลิตผลิตภัณฑ์ในการหมักแบบกะจากกากน้ำตาล: อะซิโตน (◆) บิวทานอล (■) เอทานอล (▼) เอบีอี (▲) กรดอะซิติก (◇) กรดบิวทริก (□) กรดโดยรวม (△) น้ำตาลทั้งหมด (●) และ พีเอช (○)

ตาราง 2

การผลิตบิวทานอลในกากน้ำตาลด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดย *C. beijerinckii* TISTR 1461

พารามิเตอร์การหมัก*	กากน้ำตาล
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	4.44 ± 0.16
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	7.39 ± 0.14
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.13 ± 0.01
เอปีอี (กรัมต่อลิตร)	11.96 ± 0.29
กรดอะซีติก (กรัมต่อลิตร)	1.42 ± 0.26
กรดบิวไทริก (กรัมต่อลิตร)	0.50 ± 0.05
กรดโดยรวม (กรัมต่อลิตร)	1.91 ± 0.31
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	62.46 ± 0.64
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	31.80 ± 1.40
พีเอช	5.29 ± 0.03
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	60
ผลได้ของบิวทานอล	0.23 ± 0.01
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.12 ± 0.00

*การทดสอบ ทำจำนวน 3 ซ้ำ ค่าที่แสดง คือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

จากการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า ความเข้มข้นของบิวทานอล มีผลโดยตรงต่อการมีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 จาก Jiang, et al. (2014) รายงานว่าปัญหาที่สำคัญในการผลิตบิวทานอลที่ส่งผลให้ได้ผลผลิต ผลได้ และอัตราการผลิตน้อย ก็คือผลของความเข้มข้นที่สูงขึ้นของบิวทานอลที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ Al-Shorgani, et al. (2012) รายงานว่าความเข้มข้นของบิวทานอลที่ 5 กรัมต่อลิตร จะเริ่มส่งผลกระทบต่อผลการเจริญเติบโตของ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 และจะยับยั้งการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของบิวทานอล 15 กรัมต่อลิตร Qureshi and Ezaji (2008) รายงานว่าความเข้มข้นของบิวทานอลที่ 5-10 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตบิวทานอล ขณะที่ Soni, Das and Ghose (1987) และ Qunine, et al. (1985) รายงานว่าความเข้มข้นของบิวทานอลที่

13 และ 14 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27022 และ *C. acetobutylicum* ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ

การใช้เทคนิคโพลีไซโทเมทรีมาใช้ในการพิจารณาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ในระหว่างกระบวนการผลิตบิวทานอลจากกากน้ำตาลนั้น ทำให้ทราบช่วงระยะเวลาที่เซลล์เริ่มเกิดการตาย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอล จากข้อมูลดังกล่าวซึ่งถือว่าเป็นจุดที่สำคัญในการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอล ซึ่งอาจศึกษาเพิ่มเติมในส่วนปัจจัยที่ทำให้เชื้อตายในช่วงระยะเวลาดังกล่าวหรืออาจมีการเติมสารเพื่อช่วยให้ *C. beijerinckii* TISTR 1461 สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานยิ่งขึ้น จะทำให้การผลิตบิวทานอลได้ปริมาณมากยิ่งขึ้น

การอภิปรายผล

การทดลองที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตบิวทานอลด้วย *C. beijerinckii* TISTR 1461 พบว่า สามารถผลิตบิวทานอล และเอปีไธด์ 7.39 ± 0.14 และ 11.96 ± 0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใต้สภาวะนี้มีค่าผลได้และอัตราการผลิตของบิวทานอลเท่ากับ 0.23 และ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกันกับงานวิจัยของ Wechgama, Laopaiboon and Laopaiboon (2017) งานวิจัยของ Areesirisuk, et al (2010) งานวิจัยของ Lee, et al (2011) และงานวิจัยของ Al-Shorgani, Kalil and Yusoff (2011) ที่ผลิตบิวทานอลได้ 7.45 7.56 8.20 และ 8.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *C. beijerinckii* TISTR 1461 และกากน้ำตาลที่ไม่มีการเติมสารอาหารอื่นเพิ่มเติมสามารถผลิตบิวทานอลได้ และเมื่อพิจารณาเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 ระหว่างการผลิตบิวทานอล พบว่าเมื่อเข้าสู่ระยะการผลิตตัวทำละลาย ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตบิวทานอล จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461 จะลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ความเข้มข้นของบิวทานอลจะเพิ่มขึ้น โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกากน้ำตาล ในช่วงที่ 24 เท่ากับ $71.75 \pm 2.76\%$ ช่วงดังกล่าวมีปริมาณบิวทานอลเท่ากับ 2.69

± 0.01 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นในระหว่างการหมักจะมีการผลิตบิวทานอลขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในช่วงที่ 72 พบว่า มีปริมาณเท่ากับ $4.90 \pm 1.56\%$ และมีปริมาณบิวทานอลเท่ากับ 7.33 ± 0.07 กรัมต่อลิตร จากการทดลองสรุปได้ว่าความเข้มข้นของบิวทานอลมีผลโดยตรงต่อการมีชีวิตของ *C. beijerinckii* TISTR 1461

ข้อเสนอแนะการวิจัย

เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตบิวทานอล ควรศึกษาถึงสารที่สามารถเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับเซลล์ *C. beijerinckii* ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการผลิตบิวทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือกเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ขอขอบพระคุณศูนย์ปฏิบัติการวิจัยโรคเขตร้อน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องโพลไซโทมิเตอร์ในการดำเนินงานวิจัย



References

- Al-Shorgani, N. K. N., Kalil, M. S., & Yusoff, W. M. W. (2011). The effect of different carbon sources on biobutanol production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Biotechnology*, 10(3), 280-285.
- Al-Shorgani, N. K. N., Ali, E., Kalil, M. S., & Yusoff, W. M. W. (2012). Bioconversion of butyric acid to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) in a limited nutrient medium. *Bioenergy Research*, 5(2), 287-293.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis of AOAC international*. Virginia: Arlington.
- Areesirisuk, A., Laopaiboon, L. Khongsay, N., & Laopaiboon, P. (2010). Improvement of gas chromatographic analysis for organic acids and solvents in acetone-butanol-ethanol fermentation from sweet sorghum juice. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6422-6429.
- Jiang, M., Chen, J. N., He, A. Y., Wu, H., Kong, K. P., Liu, J. L., . . . Chen, P. (2014). Enhanced acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. *Process Biochemistry*, 49(8), 1238-1244.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209-227.
- Lee, J., Jang, Y. S., Choi, S. J., Im, J. A., Song, H., Cho, J. H., . . . Lee, S. Y. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol-butanol-ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1416-1423.
- Linhová, M., Branská, B., Patáková, P., Lipovský, J., Fribert, P., Rychtera, M., & Melzoch, K. (2012). Rapid flow cytometric method for viability determination of solventogenic clostridia. *Folia Microbiologica*, 57(4), 307-311.
- Linhová, M., Patáková, P., Lipovský, J., Fribert, P., Paulová, L., Rychtera, M., & Melzoch, K. (2010). Development of flow cytometry technique for detection of thinning of Peptidoglycan layer as a result of solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Folia Microbiologica*, 55(4), 340-344.
- Maddox, I. S., Qureshi, N., & Roberts-Thomson, K. (1995). Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrate using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*, 30(3), 209-215.
- Mecozzi, M. (2005). Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid methods assisted by multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 79(1-2), 84-90.
- Office of the Cane and Sugar Board, Ministry of Industry. (2017). *Annual report*. Retrieved from <http://www.ocsb.go.th/upload/production/fileupload/142-7802.pdf> (in Thai)

- Patakova, P., Linhova, M., Rychtera, M., Paulova, L., & Melzoch, K. (2013). Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnology Advances*, 31(1), 58-67.
- Qunine, K., Petitdemange, H., Raval, G., & Gay, R. (1985). Reculation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in Clostridium acetobutylicum. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(4), 874-878.
- Qureshi, N., & Ezeji, C. T. (2008). Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): Recent progress in technology. *Biofuel, Bioproducts and Biorefining*, 2(4), 319-330.
- Shen, C. R., & Liao, J. C. (2008). Metabolic engineering of Escherichia coli for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metabolic Engineering*, 10(6), 312-320.
- Sirisantimethakom, L., Laopaiboon, L., Sanchanda, P., Chatleudmongkol, J., & Laopaiboon, P. (2016). Improvement of butanol production from sweet sorghum juice by Clostridium beijerinckii using an orthogonal array design. *Industrial Crops and Products*, 79(2016), 287-294.
- Soni, B. K., Das, K., & Ghose, T. K. (1987). Inhibitory factors involved in acetone-butanol fermentation by Clostridium saccharoperbutylacetonicum. *Current Microbiology*, 16(2), 61-67.
- Tracy, B. P., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2008). Development and application of flow-cytometric techniques for analyzing and sorting endospore-forming clostridia. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7497-7506.
- Wechgama, K., Laopaiboon, L., & Laopaiboon, P. (2017). Enhancement of batch butanol production from sugarcane molasses using nitrogen supplementation integrated with gas stripping for product recovery. *Industrial Crops and Products*, 95(2017), 216-226.
- Wei, F. G., Tai-Shung, C., & Takeshi, M. (2004). Pervaporation study on the dehydration of aqueous butanol solutions: A comparison of flux vs. permeance, separation factor vs selectivity. *Journal of Membrane Science*, 245(1-2), 199-210.

