

ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตสาร ละลายอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะด้วย *Clostridium Acetobutylicum* จากกากน้ำตาลอ้อย

พัฒนา เหล่าไพบุลย์

ลักขณา ชนะวงศ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาพความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิต ABE (acetone-butanol-ethanol) ของ *Clostridium acetobutylicum* P262 โดยการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่งใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นวัตถุดิบ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.27×10^7 สปอร์ต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 34°C โดยปรับ pH เริ่มต้นของสารอาหารให้มีค่า 4.50, 5.00, 5.40 และ 7.00 พบว่าที่ pH เริ่มต้น 7.00 จุลินทรีย์สามารถผลิต butanol และ ethanol ได้สูงสุด รองลงมาคือที่ pH เริ่มต้น 5.40, 5.00 และ 4.50 ตามลำดับ ที่ pH เริ่มต้น 7.00 นี้จุลินทรีย์จะผลิต acetone, butanol และ ethanol ได้ในปริมาณ 2.92, 3.87 และ 0.97 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 60, 96 และ 60 ตามลำดับ โดยปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นที่ pH เริ่มต้น 7.00 จะมีค่าสูงกว่าที่ pH เริ่มต้นอื่นๆ มาก ที่ pH เริ่มต้น 4.50 จุลินทรีย์จะผลิต acetone ได้เพียงอย่างเดียว ส่วนที่ pH เริ่มต้น 5.00 จุลินทรีย์ผลิตเฉพาะ acetone และ butanol

Effect of pH upon Solvent Production in Batch Cultures of *Clostridium* *Acetobutylicum* in Cane Molasses

Pattana Laopaiboon

Lakkana Chanawongse

Biotechnology Department

Faculty of Technology Khon Kaen University

Abstract

Experiments have been performed in batch fermentation, using cane molasses, to investigate the effect of pH on solvent production of *Clostridium acetobutylicum* P262. Initial pH of medium was adjusted at 4.50, 5.00, 5.40 and 7.00. Inoculum size of *Clostridium* used in this study was 2.27×10^7 spores/ml. The cultures were incubated anaerobically at 34 °C. The result shows that butanol and ethanol production increased with increasing pH. At initial pH 7.00, maximum production of acetone, butanol and ethanol were 2.92, 3.97 and 0.97 g/l at 60, 90 and 60 h after incubation, respectively. Only acetone was produced at initial pH 4.50. And at initial pH 5.00, acetone and butanol were produced.

บทนำ

ปัจจุบันพลังงานจากแหล่งปิโตรเลียมจากธรรมชาติมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากถูกนำมาใช้ในทางด้านอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น การผลิต ABE (acetone-butanol-ethanol) จากกากน้ำตาลอ้อยจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อพัฒนาการผลิตสารละลายอินทรีย์ให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่สูงที่สุด

ประวัติของกระบวนการหมัก ABE มีมานานแล้ว[1,2,3] โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่ม *Clostridium* ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารละลายอินทรีย์ได้หลายชนิดเช่น acetone, butanol, ethanol และ isopropanol เป็นต้น ตัวอย่างของจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Clostridium* ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. aurantibutylicum*, *C. tetanomorphum* และ *C. pasteurianum*[4,5,6,7,8] จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ถูกนำมาศึกษาในกระบวนการหมักแบบต่างๆ เช่น แบบกะ (batch) แบบต่อเนื่อง (continuous) โดยแบบต่อเนื่องจะมีการศึกษาทั้งแบบ chemostat และ turbidostat [9,10,11] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในรูปการตรึงเซลล์ (immobilized cell) แบบต่างๆ ด้วย [12,13]

วิธีดำเนินงานวิจัย

จุลินทรีย์

Clostridium acetobutylicum P262 จาก ผศ.ดร.สุนทร กาญจนทวี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Reinforced clostridial agar (RCA) (Oxoid Ltd., England); cooked meat medium (Unipath Ltd., England); D-glucose (anhydrous) (Fluka Biochemica, Switzerland); yeast extract (Becton Dickinson Microbiology System Cockeysvil, USA); กากน้ำตาลอ้อยจากโรงงานสุรากรมสรรพสามิต จังหวัดขอนแก่น

สารเคมี

สารเคมีระดับ analytical grade มี ammonium sulfate (Fluka-Garantic, Switzerland); hydrochloric acid, sodium hydroxide, ethanol, orthophosphoric acid และ acetone (Merck, Germany); D-glucose, sucrose, n-butanol, butyric acid และ sec-butanol (Fluka chemica, Switzerland); palladium catalyst และ gas pack (BBL Microbiology Systems)

การเตรียมสปอร์ของจุลินทรีย์

ละลาย RCA 52.5 g ในน้ำกลั่น 1 litre นำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที หลังจากนั้นทำ slant agar และใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เชื้อเชื้อลงในหลอด slant agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 เดือน

การเก็บรักษาสปอร์ของจุลินทรีย์

เชื้อสปอร์ของเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ml ลงไป 1 loop แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อไว้ใช้ต่อไป

การเลี้ยงจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ถูกนำมาทำ heat shock ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 °C นาน 2 นาที และทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 0 °C ประมาณ 1.5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงใน cooked meat medium ที่มี glucose ที่อุณหภูมิ 34 °C ในสภาพไร้อากาศ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตและมีการเคลื่อนที่ได้เร็ว นำมาเลี้ยงใน preculture medium ที่มีส่วนประกอบดังนี้คือ กากน้ำตาลร้อยละเจ็ดเจ็ดด้วยน้ำกลั่น 12-13% Brix 1 l, yeast extract 2.22 g, ammonium sulfate 4.45 g, glucose 22.21 g ปรับ pH ให้ได้ 5.4 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.27×10^7 สปอร์/ลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 34 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar เมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโต นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเหมือน preculture medium โดยปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4.50, 5.00, 5.40 และ 7.00 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 34 °C เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์

การวิเคราะห์

ตัวอย่างที่เก็บมาวิเคราะห์ถูกนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องตกตะกอนที่ 10,000 rpm 10 นาที ส่วนใส่นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วย HPLC[14] ปริมาณกรดและสารละลายอินทรีย์ด้วย GC[15] และตะกอนนำมาหาค่าหนักแห้ง[16] ที่ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 และ 120

ตารางที่ 1

น้ำหนักเซลล์แห้ง, pH, ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ, ปริมาณกรด และปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่เวลาต่างๆ ในกระบวนการหมัก ABE โดย *C. acetobutylicum* P262 ในกากน้ำตาลอ้อยที่ pH เริ่มต้น 4.50

ชั่วโมงที่	น้ำหนัก เซลล์แห้ง 10(g/l)	pH	ปริมาณน้ำตาลที่ เหลือ		ปริมาณกรด(g/l)		ปริมาณสารละลาย (g/l)		
			sucrose	glucose	acetic acid	butyric acid	acetone	butanol	ethanol
			(g/l)	(g/l)					
0	0	4.50	24.26	26.43	0	0	0	0	0
6	0.2	4.62	24.20	25.32	0.14	0.66	0	0	0
12	1.1	4.68	24.00	24.64	0.15	0.72	0	0	0
24	2.3	4.53	23.19	24.38	0.22	0.95	0	0	0
36	2.7	4.53	22.36	24.08	0.22	0.98	0	0	0
48	2.9	4.70	22.10	22.50	0.21	1.116	0	0	0
60	3.4	4.69	21.73	21.75	0.20	1.11	0.06	0	0
72	3.6	4.68	17.50	18.14	0.24	1.02	0.16	0	0
96	3.6	4.60	18.06	18.07	0.25	0.98	0.39	0	0
120	4.2	4.59	16.32	17.14	0.23	0.85	0.23	0	0

ผลการทดลอง

ผลการผลิตสารละลายอินทรีย์โดยวิธีการหมักแบบกะในกากน้ำตาลอ้อยที่ pH เริ่มต้น 4.50, 5.00, 5.40 และ 7.00 โดย *Clostridium acetobutylicum* P262 ที่เวลาต่างๆ กัน แสดงดังตารางที่ 1 ถึง 4 และรูปที่ 1

ตารางที่ 2

น้ำหนักเซลล์แห้ง, pH, ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ, ปริมาณกรด และปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่เวลาต่างๆ ในกระบวนการหมัก ABE โดย *C.acetobutylicum* P262 ในกากน้ำตาลอ้อยที่ pH เริ่มต้น 5.00

ชั่วโมงที่	น้ำหนัก เซลล์แห้ง 10(g/l)	pH	ปริมาณน้ำตาลที่ เหลือ		ปริมาณกรด(g/l)		ปริมาณสารละลาย (g/l)		
			sucrose	glucose	acetic acid	butyric acid	acetone	butanol	ethanol
			(g/l)	(g/l)					
0	0	5.00	25.96	21.79	0	0	0	0	0
6	0.20	4.90	25.56	22.48	0.19	0.65	0	0	0
12	0.50	4.96	25.61	22.14	0.26	0.72	0	0	0
24	1.00	4.78	25.09	22.13	0.30	0.90	0	0	0
36	1.09	4.85	24.67	18.79	0.46	1.39	0	0	0
48	1.30	5.02	22.81	19.64	0.48	1.17	0	0.10	0
60	2.20	5.00	21.82	18.75	0.60	1.10	0.33	0.14	0
72	2.30	4.92	19.55	16.48	0.66	1.09	0.55	0.17	0
96	3.80	4.90	17.27	15.81	0.69	1.04	0.58	0.19	0
120	4.40	4.85	15.06	14.82	0.67	1.00	0.58	0.26	0

ตารางที่ 3

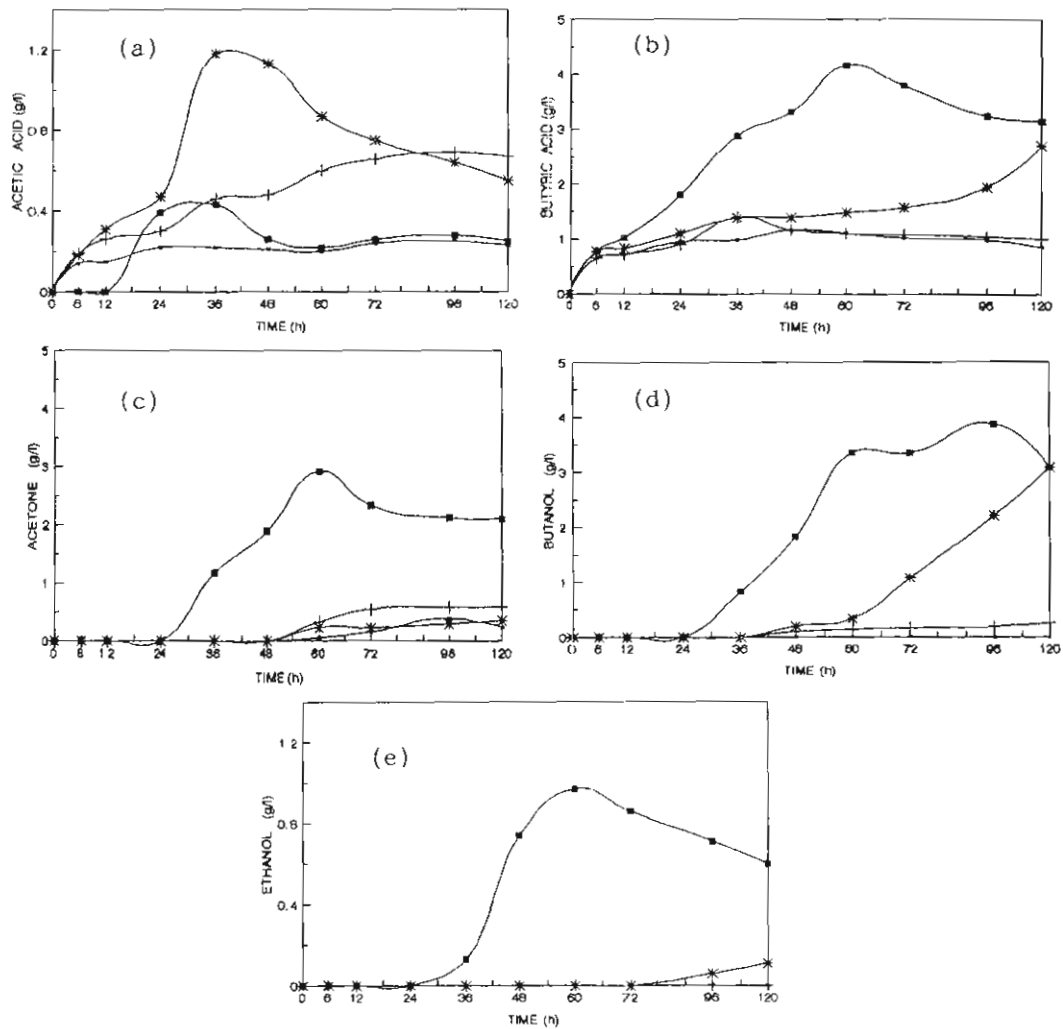
น้ำหนักเซลล์แห้ง, pH, ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ, ปริมาณกรด และปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่
เวลาต่างๆ ในกระบวนการหมัก ABE โดย *C.acetobutylicum* P262 ในกากน้ำตาลอ้อยที่
pH เริ่มต้น 5.40

ชั่วโมงที่	น้ำหนัก เซลล์แห้ง 10(g/l)	pH	ปริมาณน้ำตาลที่ เหลือ		ปริมาณกรด(g/l)		ปริมาณสารละลาย (g/l)		
			sucrose	glucose	acetic acid	butyric acid	acetone	butanol	ethanol
			(g/l)	(g/l)					
0	0	5.40	25.96	21.79	0	0	0	0	0
6	0.20	5.05	25.44	21.65	0.18	0.77	0	0	0
12	0.50	5.07	25.33	21.03	0.31	0.83	0	0	0
24	2.10	4.90	24.92	20.86	0.47	1.10	0	0	0
36	2.60	4.85	23.24	20.61	1.18	1.38	0	0	0
48	2.60	4.93	22.96	19.25	1.13	1.39	0	0.20	0
60	3.30	4.94	22.18	18.92	0.87	1.48	0.23	0.34	0
72	3.50	5.02	19.20	18.57	0.75	1.57	0.23	1.08	0
96	4.40	5.05	18.40	15.32	0.64	1.94	0.30	2.21	0.06
120	4.80	5.04	14.76	14.70	0.55	2.69	0.35	3.09	00.11

ตารางที่ 4

น้ำหนักเซลล์แห้ง, pH, ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ, ปริมาณกรด และปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่เวลาต่างๆ ในกระบวนการหมัก ABE โดย *C.acetobutylicum* P262 ในกากน้ำตาลอ้อยที่ pH เริ่มต้น 7.00

ชั่วโมงที่	น้ำหนัก เซลล์แห้ง 10(g/l)	pH	ปริมาณน้ำตาลที่ เหลือ		ปริมาณกรด(g/l)		ปริมาณสารละลาย (g/l)		
			sucrose	glucose	acetic acid	butyric acid	acetone	butanol	ethanol
			(g/l)	(g/l)					
0	0	7.00	28.07	21.89	0	0	0	0	0
6	0.20	5.52	27.26	21.21	0	0.79	0	0	0
12	0.90	5.40	26.82	21.07	0	1.02	0	0	0
24	1.80	4.89	25.45	19.42	0.39	1.80	0	0	0
36	2.00	4.90	25.29	18.82	0.43	2.87	1.17	0.83	0.13
48	3.00	4.99	24.56	14.64	0.26	3.31	1.89	1.83	0.74
60	4.60	5.25	23.64	13.59	0.22	4.16	2.92	3.35	0.97
72	4.80	5.27	20.55	12.79	0.26	3.80	2.34	3.35	0.86
96	4.90	5.26	14.77	8.60	0.28	3.24	2.12	3.87	0.71
120	5.00	5.32	13.79	9.84	0.25	3.14	2.10	3.08	0.60



รูปที่ 1 ปริมาณ (a) acetic acid, (b) butyric acid, (c) acetone, (d) butanol และ (e) ethanol ที่ผลิตขึ้นที่เวลาต่างๆ ในระหว่างการหมัก ABE โดย *C. acetobutylicum* P262 ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหารต่างๆ กัน:

pH 7.00, pH 5.40, pH 5.00 และ pH 4.50

จากตารางที่ 1 ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 4.50 ของกระบวนการหมัก ABE ปริมาณน้ำตาลค่อยๆ ลดลง ในขณะที่เดียวกันน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นโดยมีอัตราเจริญสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 0-24 ค่า pH ในระหว่างการทดลองไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก จุลินทรีย์ผลิต acetic acid ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า butyric acid โดยเริ่มผลิตหลังชั่วโมงที่ 0 ปริมาณ acetic acid หลังชั่วโมงที่ 24 ค่อนข้างคงที่ คือ มีค่าประมาณ 0.22 g/l (รูปที่ 1a) ในขณะที่ปริมาณของ butyric acid จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้นและมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.16 g/l ที่ชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้น ปริมาณ butyric acid จะค่อยๆ ลดลง (รูปที่ 1b) นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการผลิตสารละลายอินทรีย์ในชั่วโมงที่ 0-48 หลังจากชั่วโมงที่ 48 จุลินทรีย์จะมีการผลิต acetone โดยมีปริมาณ acetone สูงสุดเท่ากับ 0.39 g/l ที่ชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 1c) จากตารางที่ 2 ที่ค่า pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.00 ของกระบวนการหมัก ABE pH จะค่อยๆ ลดลงจาก 5.00 เป็น 4.78 ที่ชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้น pH จะเพิ่มขึ้นโดยมี pH อยู่ระหว่าง 4.85-5.02 เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจุลินทรีย์จะผลิต acetic acid เพิ่มขึ้น ปริมาณ acetic acid สูงสุดเท่ากับ 0.69 g/l ที่ชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 1a) ในขณะที่ปริมาณ butyric acid สูงสุดเท่ากับ 1.39 g/l ที่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นปริมาณ butyric acid จะลดลง (รูปที่ 1b) ที่ pH เริ่มต้น 5.00 นี้จุลินทรีย์ผลิตสารละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ acetone และ butanol โดยจุลินทรีย์จะผลิต acetone หลังชั่วโมงที่ 48 ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 0.58 g/l ที่ชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 1c) หลังจากนั้นปริมาณ acetone ค่อนข้างคงที่ ส่วน butanol นั้น จุลินทรีย์ผลิตหลังชั่วโมงที่ 36 เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณ butanol จะเพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงสุด 0.26 g/l เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 120 (รูปที่ 1d)

จากตารางที่ 3 ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.40 ของกระบวนการหมัก ABE pH จะลดลงจาก 5.40 เป็น 4.85 ที่ชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้น pH จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น pH หลังจากชั่วโมงที่ 48 จะอยู่ในช่วง 4.93-5.05 ปริมาณ acetic acid สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.18 g/l หลังจากนั้นปริมาณ acetic acid จะลดลง (รูปที่ 1a) ในขณะที่ปริมาณ butyric acid สูงสุดเท่ากับ 2.69 g/l ที่ชั่วโมงที่ 120 (รูปที่ 1b) ที่ pH เริ่มต้น 5.40 นี้ จุลินทรีย์ผลิตสารละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ acetone, butanol และ ethanol โดยจุลินทรีย์จะผลิต acetone, butanol และ ethanol หลังชั่วโมงที่ 48, 36 และ 72 ตามลำดับ ปริมาณ acetone, butanol และ ethanol สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 โดยมีค่าเท่ากับ 0.35, 3.09 และ 0.11 g/l ตามลำดับ (รูปที่ 1c,d,e)

จากตารางที่ 4 ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 7.00 ของกระบวนการหมัก ABE ค่า pH จะลดลงจาก 7.00 เป็น 4.90 ที่ชั่วโมงที่ 24-36 หลังจากนั้น pH จะค่อยๆเพิ่มขึ้น pH จากชั่วโมงที่ 60-120 ก่อนข้างคองที่ค้อยอยู่ในช่วง 5.25-5.32 จุลินทรีย์ผลิต acetic acid หลังจากชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ acetic acid สูงสุด 0.43 g/l ที่ชั่วโมงที่ 36 ปริมาณ acetic acid ก่อนข้างคองที่ชั่วโมงที่ 48-120 คือ มีค่าประมาณ 0.26 g/l (รูปที่ 1a) ในขณะที่ปริมาณ butyric acid สูงสุดเท่ากับ 4.16 g/l ที่ชั่วโมงที่ 60 (รูปที่ 1b) จุลินทรีย์ผลิตกรดอินทรีย์ 3 ชนิดเช่นเดียวกับที่ pH เริ่มต้น 5.40 โดยจุลินทรีย์ผลิต acetone, butanol และ ethanol หลังจากชั่วโมงที่ 24 (รูปที่ 1c,d,e) และมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60, 96 และ 60 ตามลำดับ โดยมีปริมาณ acetone, butanol และ ethanol สูงสุดเท่ากับ 2.92, 3.87 และ 0.97 g/l ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหา pH เริ่มต้นของสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิต ABE (acetone-butanol-ethanol) ซึ่งใช้ *Clostridium acetobutylicum* P262 ในการผลิต โดยใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นวัตถุดิบในการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.27×10^7 สปอร์/ลิตร ศึกษาความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารอาหารที่ทำการศึกษาคือ pH 4.50, 5.00, 5.40 และ 7.00 ที่อุณหภูมิ 34 °C จากการทดลองพบว่า ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 4.50 และ 5.00 pH ในระหว่างการทดลองไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แม้ว่าจุลินทรีย์จะมีการผลิต acetic acid และ butyric acid เนื่องจาก acetic acid และ butyric acid เป็นกรดอ่อน และผลิตในปริมาณที่ไม่มาก ส่วนที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.40 และ 7.00 จะมีการเปลี่ยนแปลงของ pH ชัดเจนกว่า pH จะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 36 เนื่องจากจุลินทรีย์มีการผลิตกรดในปริมาณที่สูง และหลังจากนั้น acetic acid และ butyric acid บางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็น acetone และ butanol จึงทำให้ pH เพิ่มขึ้น

ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.40 จุลินทรีย์จะผลิต acetic acid สูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 1.18 g/l ที่ชั่วโมงที่ 36 รองลงมาคือ ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.00, 7.00 และ 4.50 ตามลำดับ ในขณะที่จุลินทรีย์ผลิต butyric acid สูงสุดที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 7.00 โดยมีค่าเท่ากับ 4.16 g/l รองลงมาคือ ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.40, 5.00 และ 4.50 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงสารละลายอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นพบว่า จุลินทรีย์สามารถผลิตสารละลายอินทรีย์ได้ 3 ชนิดคือ acetone, butanol และ ethanol โดยจุลินทรีย์จะผลิต butanol ได้สูงที่สุด รองลงมาคือ acetone และ ethanol ตามลำดับ ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหารที่สูงกว่า จุลินทรีย์จะผลิตสารละลายอินทรีย์ได้ในปริมาณที่มากกว่า จากการทดลองพบว่า ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 7.00 จุลินทรีย์จะผลิต butanol และ ethanol ได้สูงสุด รองลงมาคือที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.40, 5.00 และ 4.50 ตามลำดับ โดยปริมาณสารละลายอินทรีย์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 7.00 จะมีค่าสูงกว่าที่ pH อื่นๆ มาก ที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 4.50 จุลินทรีย์จะผลิต acetone ได้เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ pH เริ่มต้นของสารอาหาร 5.00 จุลินทรีย์จะผลิตเฉพาะ acetone และ butanol

เมื่อพิจารณากระบวนการผลิต ABE โดย *C. acetobutylicum* P262 นี้จะเห็นได้ชัดเจนว่าการผลิต ABE จะมีกลไก 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ที่เรียกว่า acidogenic phase ซึ่งจะเกิดในช่วงต้นๆ ของการผลิต โดยกรดที่ผลิตขึ้นคือ acetic acid และ butyric acid และขั้นตอนที่ 2 คือ ขั้นตอนการผลิตสารละลายอินทรีย์ที่เรียกว่า solventogenic phase ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์

บรรณานุกรม

1. Jones, D.T., and D.R. Woods. **Acetone-butanol fermentation revisited** *Microbiol. Rev.* 50: 484-524., 1986
2. Compere, A.L., and W.L. Griffith. **Evaluation of substrates for butanol production.** *Dev. Ind. Microbiol.* 20: 509-517, 1979.
3. Walton, M.T., and J.L. Martin. **Production of butanol-acetone by fermentation,** pp 187-209. In H.L. Peppler and D. Perlman (ed.), *Microbial technology*, 2nd ed., vol. 1. Academic Press, Inc., New York. 1979.

4. Cunnins, C.S., and J.L. Johnson. ***Taxonomy of the Clostridia: Cell wall composition and DNA homologues in Clostridium butylicum and other butyric acid-producing Clostridia***. J.Gen.Microbiol. 67: 33-46, 1971.
5. Chen, J.S., and L.E. Mortenson. ***Purification and properties of hydrogenase from Clostridium pasteurianum W5***. Biochim. Biophys. Acta. 371: 283-398, 1974.
6. George, H.A., and J.S. Chen. ***Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by Clostridium beijerinckii (synonym, C. butylicum)***. Appl. Environ. Microbial. 46: 321-327, 1983.
7. Nakamura, S., I. Okado, T. Abe, and S. Nishida. ***Taxonomy of Clostridium telani and related species***. J.Gen.Microbiol.113:29-35, 1979.
8. Maddox, I.S. ***Production of n-butanol from whey filtrate using Clostridium acetobutylicum NCIB2951***. Biotechnol.Lett. 2: 493-498, 1980.
9. McNeil, B., and B. Kristiansen.. ***The effect of medium composition on the acetone-butanol fermentation in continuous culture***. Biotechnol. Bioeng. 29: 383-387, 1987
10. Gottschal, J.C., and J.G. Morris. ***Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum growing in turbidostat culture***. Biotechnol. Lett. 4: 477-482, 1982.
11. McNeil, B., and B. Kristiansen.. ***Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch culture of Clostridium acetobutylicum***. Biotechnol. Lett. 7: 499-502, 1985
12. Krouwel, P.G., W.F.M. Van Der Laan, and N.W.F. Kossen. ***Continuous production of n-butanol and isopropanol by immobilized growing Clostridium butylicum cells***. Biotechnol Lett. 2: 253-258, 1980.
13. Park, C.-H., M.R. Okos, and P.C. Wankat. ***Characterization of an immobilized cell, trickle bed reactor during long term Butanol (ABE) fermentation***. Biotechnol.Bioeng. 36: 207-217, 1990.

14. Ennis, B.M., and I.S. Maddox. *Use of Closteidium acetobutylicum P262 for production of solvents from whey permeate*. Biotechnol.Lett. 7: 601-606, 1985.
15. Qureshi, N., and I.S. Maddox. *Continuous solvent production from whey permeate using cells of Clostridium acetibutylicum immobilized by adsorption on to bone char*. Enz.Microbial Technol. 9: 668-671, 1987.
16. พัฒนา เหล่าไพบุลย์ และ อลิศรา ศรีวัฒนา. *การวิเคราะห์โดยทั่วไปสำหรับงานปฏิบัติการในกระบวนวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, วิธีวิเคราะห์สำหรับงานปฏิบัติการในกระบวนวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, หน้า 2-2 ถึง 2-3, 2536.*