

การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล
โดย *Clostridium butyricum* DSM 5431 และการลดค่าใช้จ่ายในการผลิต
โดยการปรับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นางสาวจิรวรรณ แก้วรัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)



เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL FROM BIODIESEL-BASED GLYCEROL
BY *Clostridium butyricum* DSM 5431 AND REDUCTION OF PRODUCTION EXPENSE
BY MODIFYING THE COMPOSITION OF CULTURE MEDIUM

Miss Chirawan Kaewrat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสาร 1,3-โพรเพนได้ออกจากกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดย <i>Clostridium butyricum</i> DSM 5431 และการลดค่าใช้จ่ายในการผลิตโดยการปรับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ
โดย	นางสาวจิรวรรณ แก้วรัตน์
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิติศ หนูทอง

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์นาฏ สมหวังธนโรจน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิติศ หนูทอง)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชุตินันท์ สิริพิพัฒน์กุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.มะลิวัลย์ คุตะ โค)

จิรวรรณ แก้วรัตน์ : การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดย *Clostridium butyricum* DSM 5431 และการลดค่าใช้จ่ายในการผลิต โดยการปรับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ.(PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL FROM BIODIESEL-BASED GLYCEROL BY *Clostridium butyricum* DSM 5431 AND REDUCTION OF PRODUCTION EXPENSE BY MODIFYING THE COMPOSITION OF CULTURE MEDIUM)
 อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศศ.ดร.กษิธิศ หนูทอง, 126 หน้า.

1,3-โพรเพนไดออลเป็นสารที่มีมูลค่าสูงและนิยมใช้เป็นโมโนเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้และในอีกหลายอุตสาหกรรม การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยวิธีทางชีวภาพอาศัยการหมักกลีเซอรอลกับจุลินทรีย์ในสภาวะไร้อากาศ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางการพัฒนากระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากการหมักกลีเซอรอลรวมถึงแนวทางการลดต้นทุนในการผลิต ในส่วนแรกของงานวิจัยได้ทำการศึกษาการผลิตสาร 1,3 โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเคลื่อนที่โดยการตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 บนวัสดุตรึง BCN-009 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุดเท่ากับ 35.86 ± 0.19 และ 31.65 ± 0.44 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 10.76 ± 0.06 และ 9.49 ± 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.76 และ 0.70 จากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลตามลำดับ เมื่อคงความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าที่ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม^{-1} ในส่วนที่สองของงานวิจัยได้ศึกษาแนวทางการลดต้นทุนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยการเจือจางความเข้มข้นของสูตรอาหารลดลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ปรับความบริสุทธิ์ของอาหารโดยเปลี่ยนมาใช้สารเคมีเกรดโรงงาน ปรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเปลี่ยนจากสารสกัดยีสต์เป็นยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต และปรับสัดส่วนของสารอินทรีย์ไนโตรเจนต่อสารอินทรีย์ไนโตรเจนในสูตรอาหารเดิมโดยคงจำนวนไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารให้คงที่ ผลการทดลองหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล ที่สภาวะคงตัวมีค่าเท่ากับ 19.81 ± 0.13 , 11.32 ± 0.26 , 5.28 ± 0.11 , 13.88 ± 0.05 , 15.80 ± 0.15 , 10.79 ± 0.21 , 9.68 ± 0.08 , 12.79 ± 0.21 , 7.03 ± 0.42 , 10.15 ± 0.09 และ 5.67 ± 0.62 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารเจือจาง 5 และ 10 เท่า สูตรอาหารเกรดโรงงาน ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน กากผงชูรส สัดส่วนสารสกัดยีสต์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11, 1:16 และ 1:34 ตามลำดับ โดยรวมแล้วงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเคลื่อนที่ที่มีความเป็นไปได้ และสามารถควบคุมสภาวะความเป็นกรด-ด่างได้ดีกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคงที่ นอกจากนี้ชนิดและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลมีผลต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ดังนั้นจึงควรกำจัดสิ่งเจือปนในกลีเซอรอลก่อนดำเนินการหมัก และผลการศึกษากิจการเจือจางจากสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิมและการปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงานพบว่าให้ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล ลดลง ซึ่งคล้ายคลึงกับการปรับแหล่งไนโตรเจนและการปรับสัดส่วนปริมาณสารอินทรีย์ต่อสารอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การปรับมาใช้งานอาหารเลี้ยงเชื้อจากสารเคมีเกรดโรงงานจะมีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่าการใช้สูตรอาหารปกติและการใช้สารเคมีเกรดการวิเคราะห์มาก ซึ่งทำให้มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเพื่อใช้งานจริงในระดับอุตสาหกรรม

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา 2554

5370408621 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORDS: BIODIESEL / FERMENTATION / CLOSTRIDIUM / GLYCEROL / 1,3-PROPANEDIOL

CHIRAWAN KAEWRAT : PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL FROM BIODIESEL-BASED GLYCEROL BY *Clostridium butyricum* DSM 5431 AND REDUCTION OF PRODUCTION EXPENSE BY MODIFYING THE COMPOSITION OF CULTURE MEDIUM. ADVISOR : ASST. PROF. KASIDIT NOOTONG, Ph.D., 126 pp.

1,3-propanediol (PD) is a highly valued chemical, which is commonly used as a monomer for biodegradable plastics as well as in other industrial applications. PD production can be accomplished by glycerol fermentation with various bacteria strains under anaerobic condition. Therefore, this research aimed to study the improvement of PD production process and examined the feasibility of reducing the expense associated with the production. In the first part, the research examined the PD production by *C. butyricum* DSM 5431 with BCN-009 as cell carriers using pure and biodiesel based glycerol as the sole substrate. The highest PD concentrations were 35.86±0.19 g/L and 31.65±0.44 g/L with the yield of 0.76 and 0.7 for pure and biodiesel based glycerol, respectively when the bioreactor was maintained with inlet glycerol of 60 g/L and dilution rate of 0.3 hr⁻¹. The steady state result also suggested the possibility of using biodiesel based glycerol as the substrate for this process but still recommended removing the purity before being used. In the second part, the research explored several options for reducing the PD production expense including dilution of media to 5 and 10 folds of the original formula, lowering the purity of media reagent to industrial grade, changing the nitrogen source from yeast extract to urea, L-lysine, ami-ami, and ammonium sulfate, and finally changing the mass ratio of inorganic to organic nitrogen in the original media formula to 1:11, 1:16, and 1:34, while maintaining the constant total nitrogen. The result indicated that, for the initial glycerol concentration of 40 g/L, the steady state PD concentrations were 19.81±0.13 g/L, 11.32±0.26 g/L, 5.28±0.11 g/L, 13.88±0.05 g/L, 15.80±0.15 g/L, 10.79±0.21 g/L, 9.68±0.08 g/L, 12.79±0.21 g/L, 7.03±0.42 g/L, 10.15±0.09 g/L, and 5.67±0.62 g/L for original media formula, 5-times dilution, 10-times-dilution, industrial grade reagents, urea, ammonium sulfate, L-lysine, ami-ami, 1:11 inorganic/organic nitrogen ratio, 1:16 inorganic/organic nitrogen ratio, and finally 1:34 inorganic/organic nitrogen ratio, respectively. The result also pointed out that dilution and lowering the purity of the reagents led to decreasing PD concentrations, a trend that is similar to those when changing the nitrogen source and changing the mass ratio of inorganic to organic nitrogen. In addition, using industrial grade reagents significantly reduced production cost in comparison to employing the original media formula or selecting analytical reagents, thereby suggesting the possibility of application in an actual industrial scale production.

Department: Chemical Engineering

Student's Signature.....

Field of Study: Chemical Engineering

Advisor's Signature.....

Academic Year: ..2011.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์จากกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดย *Clostridium butyricum* DSM 5431 และการลดค่าใช้จ่ายในการผลิต โดยการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณต่อผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กษิธิศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำทาง หลักการในการดำเนินงานวิจัย และแก้ไขในสิ่งที่บกพร่องมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนงค์นาฏ สมหวังชน โรจน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ชุตินิพนธ์ สติธิพิพัฒนกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.มะลิวัลย์ กุตะโค กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาชี้แนะ แก้ไขวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน พี่และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาของมูลนิธิธินิสิตเก่าจุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนวิจัยจากโครงการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รหัสโครงการ FW0670B) ที่ได้สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย ที่จำเป็นทำให้การทดลองต่างๆของวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	6
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 ไบโอดีเซล (Biodiesel)	8
2.2 กลีเซอรอล (Glycerol)	9
2.2.1 สมบัติของกลีเซอรอล.....	9
2.3 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-Propanediol).....	10
2.3.1 กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางเคมี.....	11
2.3.2 กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางชีวภาพ.....	11
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และการดำเนินงานวิจัย.....	29
3.1 อุปกรณ์.....	29
3.2 เคมีภัณฑ์.....	30
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก.....	31
3.4 วิธีการทดลอง	31
3.4.1 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์.....	31
3.4.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดเคลื่อนที่.....	33

3.4.3 การตรึงเชื้อจุลินทรีย์บนวัสดุตรึง.....	34
3.4.4 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	35
3.4.5 การศึกษาผลของการเจือจางสูตรอาหารต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล.....	35
3.4.6 การศึกษาผลของการปรับความบริสุทธิ์ของสารเคมีต่อการผลิต สาร 1,3-โพรเพนไดออล.....	35
3.4.7 การศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล	36
3.4.8 วิเคราะห์.....	39
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	42
4.1 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์และ กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่	42
4.1.1 การตรึงเชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 และการเริ่มต้นกระบวนการหมัก ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่	42
4.1.2 กระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิต ไบโอดีเซลโดยระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่.....	44
4.2 ผลของการเจือจางสูตรอาหารต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลและผลของการปรับ ความบริสุทธิ์ของสารเคมีต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยระบบแบบกะ	50
4.3 ผลของการศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล	57
4.3.1 ผลของการเปลี่ยนประเภทของแหล่งไนโตรเจน	57
4.3.2 ผลของการปรับสัดส่วนของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็น สารอินทรีย์และไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์	59
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	72
5.1 สรุปผลการทดลอง	72
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	74
รายการอ้างอิง	75

ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	89
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง.....	124
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	126

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	ค่าใช้จ่ายของสูตรอาหารในการผลิตต่อ 1 กิโลกรัมของ 1,3-โพรเพนไดออล.....3
2.1	จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล12
3.1	พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษาในการทดลอง39
4.1	ความเข้มข้นของ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 เมื่อเสร็จสิ้นจากการหมัก กลีเซอรอลบริสุทธิ์ในระบบแบบต่อเนื่อง46
4.2	ความเข้มข้นของ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 เมื่อเสร็จสิ้นจากการหมัก กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในระบบแบบต่อเนื่อง46
4.3	สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ใน สถานะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุครึ่ง BCN-009.....47
4.4	สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการ ผลิตไบโอดีเซลในสถานะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุครึ่ง BCN-009.....48
4.5	สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลซึ่งเปรียบเทียบระหว่างงานวิจัยปัจจุบัน และงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งทำการตรึงเซลล์และชนิดของการหมักด้วยวิธี ที่แตกต่างกัน49
4.6	สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลใน สถานะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้ระบบแบบกะ โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน56
4.7	สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลใน สถานะไร้ออกซิเจน โดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้ระบบแบบกะ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน68
4.8	สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลใน สถานะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้ระบบแบบกะโดยใช้สัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับ แอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกัน.....69
4.9	การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสถานะไร้ออกซิเจน โดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่71

ตารางที่	หน้า
ก.1 สารอาหารที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	84
ก.2 สารอาหารที่ใช้ในการเจือจางสูตรอาหารต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล	85
ก.3 สารอาหารที่ใช้ในการปรับความบริสุทธิ์ของสารเคมีต่อการผลิต สาร 1,3-โพรเพนไดออล	86
ก.4 สารอาหารที่ใช้ในการศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิต สาร 1,3-โพรเพนไดออล	87
ก.5 สารอาหารที่ใช้ในการปรับสัดส่วนของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็น สารอินทรีย์และไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในการผลิต สาร 1,3-โพรเพนไดออล	88
ค.1.1 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.3 ชม. ⁻¹	92
ค.1.2 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.4 ชม. ⁻¹	93
ค.1.3 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.5 ชม. ⁻¹	94
ค.1.4 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง เท่ากับ 0.6 ชม. ⁻¹	95
ค.1.5 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม. ⁻¹	96
ค.1.6 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ชม. ⁻¹	97

ตารางที่	หน้า
ค.1.7 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม. ⁻¹	98
ค.1.8 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม. ⁻¹	99
ค.1.9 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้สารอาหารปกติ เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ	100
ค.1.10 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยการเจือจางสารอาหารปกติ 5 เท่า เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ	101
ค.1.11 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยการเจือจางสารอาหารปกติ 10 เท่า เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ	102
ค.1.12 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้สารอาหารปกติที่ทำจาก สารเคมีเกรด Analytical Reagent เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบกะ.....	103
ค.1.13 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ สารอาหารปกติที่ทำจาก สารเคมีเกรด Commercial Reagent เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมัก ในระบบแบบกะ.....	104
ค.1.14 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้ยูเรียแทนสารสกัดยีสต์ เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ	105
ค.1.15 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้แอลไลซีนแทนสารสกัดยีสต์ เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ	106
ค.1.16 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้กากผงชูรสแทนสารสกัดยีสต์เพื่อ ผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ	107
ค.1.17 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แทนสารสกัดยีสต์เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ	108
ค.1.18 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมัก ในระบบแบบกะ.....	109

ตารางที่	หน้า
ค.1.19 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบกะ.....	110
ค.1.20 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:16 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบกะ.....	111
ค.1.21 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:34 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมัก ในระบบแบบกะ.....	112

สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 (ก), (ข), (ค), (ง), (จ) เเปอร์เซ็นต์ราคาสารเคมีแต่ละชนิด ที่ใช้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	6
2.1 ปฏิบัติการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	8
2.2 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	9
2.3 โครงสร้างโมเลกุลของ 1,3-โพรเพนไดออล	10
2.4 วัฏจักรการหมักแบบไร้อากาศของกลีเซอรอลโดย <i>Clostridium butyricum</i>	14
2.5 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ (a) การยัดเกาะบนพื้นผิว (b) การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมตริกซ์ (c) การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้น (d) การรวมตัวของเซลล์	16
3.1 วัสดุตรึง BCN-009	30
3.2 การเพาะเชื้อ <i>Clostridium butyricum</i> DSM 5431	32
3.3 ถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่	33
3.4 ถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่แบบสามมิติ	34
3.5 สรุปการดำเนินงานวิจัยทั้งหมด	38
4.1 พื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 (ซ้าย) และพื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่มีการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ในกระบวนการหมัก	43
4.2 พื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 (ซ้าย) และพื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่มีการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 โดยใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในกระบวนการหมัก	43
4.3 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน	52
4.4 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน	52

รูปที่	หน้า
4.5 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน53	53
4.6 ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน53	53
4.7 ความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน54	54
4.8 ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน54	54
4.9 อัตราการผลิตของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน55	55
4.10 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน61	61
4.11 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน61	61

รูปที่	หน้า
4.12 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน	62
4.13 ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน	62
4.14 ความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน	63
4.15 ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน	63
4.16 อัตราการผลิตของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน	64
4.17 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน	64
4.18 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน	65

รูปที่	หน้า
4.19 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน	65
4.20 ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน	66
4.21 ความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน	66
4.22 ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	67
4.23 อัตราการผลิตของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	67
ค.2.1 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ เข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน	113
ค.2.2 ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อความเข้มข้นของ กลีเซอรอลบริสุทธิ์เข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน.....	113
ค.2.3 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอล จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน	114
ค.2.4 ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อความเข้มข้นของ กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน	114

รูปที่	หน้า
ค.3.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ 1,3-โพเพนไดออล	115
ค.3.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกลีเซอรอล	115
ค.3.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดอะซีติก.....	116
ค.3.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดบิวทริก.....	116
ค.3.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้สารอาหารปกติ.....	117
ค.3.6 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่เจือจางสารอาหารปกติ 5 เท่า.....	117
ค.3.7 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่เจือจางสารอาหารปกติ 10 เท่า.....	118
ค.3.8 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้สารอาหารปกติที่ทำจากสารเคมี เกรด Analytical Reagent.....	118
ค.3.9 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้สารอาหารปกติที่ทำจากสารเคมี เกรด Commercial Reagent	119
ค.3.10 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ยูเรีย	119
ค.3.11 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้แอล ไลซีน	120
ค.3.12 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้กาผงชูรส	120
ค.3.13 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้แอม โมเนียมซัลเฟต	121
ค.3.14 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอม โมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8.....	121
ค.3.15 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอม โมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11.....	122
ค.3.16 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอม โมเนียมซัลเฟตเป็น 1:16.....	122
ค.3.17 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ กับแอม โมเนียมซัลเฟตเป็น 1:34.....	123

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

1,3-โพรเพนไดออลเป็นสารที่มีมูลค่าสูงและนิยมใช้เป็นโมโนเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ นอกจากนี้สาร 1,3-โพรเพนไดออล สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของสารอื่นๆ เช่น ใช้เป็นสารรักษาความคงตัวในสารประเภทซักล้าง ใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวจากการแช่เยือกแข็ง และใช้เป็นสารผสมในน้ำมันหล่อลื่นเพื่อช่วยเพิ่มความทนทานต่อน้ำและความดันสูง เป็นต้น กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลสามารถทำได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ โดยกระบวนการผลิตทางเคมีจะใช้เอทิลีนหรือโพรพิลีนเป็นสารตั้งต้น และดำเนินการผลิตภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการผลิตทางชีวภาพที่ทำการหมักกลีเซอรอลโดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ชนิดต่างๆ เช่น *Citrobacter freundii* *Klebsiella pneumoniae* และ *Clostridium butyricum* ทั้งนี้จุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ได้ปริมาณมากที่สุดและมีอัตราการผลิตที่สูงที่สุด

สำหรับแนวคิดในการปรับปรุงการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการทางชีวภาพนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แนวทางคือ (1) การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (2) การปรับปรุงกระบวนการผลิตให้สามารถสร้างสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และ (3) การลดต้นทุนที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิต สำหรับในงานวิจัยนี้เนื่องจากส่วนใหญ่จะเน้นในแนวทางที่ (2) และ (3) กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักกลีเซอรอลพบว่านิยมทำในระบบเซลล์แขวนลอยมากกว่าระบบที่มีการตรึงเซลล์ ถึงแม้ว่าระบบตรึงเซลล์โดยทั่วไปจะมีข้อดีคือ (1) มีความหนาแน่นของเซลล์สูง (2) มีปริมาณเซลล์ที่ถูกชะออกจากระบบน้อยในสภาวะที่มีอัตราการเจือจางสูง (3) สามารถป้องกันเซลล์จากแรงเฉือนได้ดี (4) สามารถทนต่อสภาวะที่เกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นและการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ได้ดี และ (5) สามารถแยกเซลล์จากของเหลวและนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย ทั้งนี้งานวิจัยในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลด้วยระบบตรึงเซลล์ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการกักเซลล์ไว้ในเจลเมทริกซ์หรือใช้กระบวนการดูดซับไว้บนพื้นผิวของวัสดุตรึง เช่น โพลียูรีเทน โพลีสไตรีน หรือใยบวบ จากการศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยตรึงเซลล์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 บนพลาสติก BCN-009 ซึ่งทำจากโพลีเอทิลีนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด

เคลื่อนที่ (Moving-Bed Bioreactor) พบว่าสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ในระดับความเข้มข้นเป็นที่น่าพอใจ (35.86 กรัมต่อลิตร) และมีอัตราการผลิต (10.76 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) สูงกว่าการใช้ระบบแบบแขวนลอยหรือเทคนิคการตรึงเซลล์แบบอื่น (ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ, 2552) นอกจากการใช้งานถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ยังสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิให้อยู่ในสภาวะเหมาะสมได้ดี จากการค้นคว้าพบว่าในปัจจุบันยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับการใช้งานถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่เพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ จากการหมักกลีเซอรอลที่มาจากระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยตรง

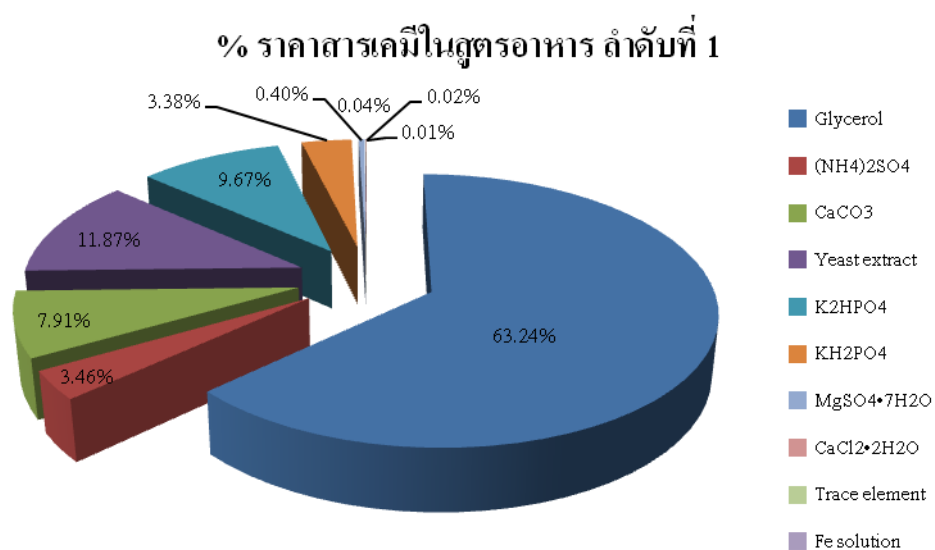
นอกจากการปรับปรุงกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การวิเคราะห์ค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานพบว่าสารเคมีที่ใช้ในการทดลองที่ผ่านมาเป็นเกรดการวิเคราะห์ (Analytical Grade Reagent) ซึ่งมีราคาสูง และอาจทำให้ไม่คุ้มค่าต่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ในระดับอุตสาหกรรม จากตารางที่ 1.1 จะเห็นได้ว่าค่าใช้จ่ายในส่วนของสูตรอาหารเพื่อผลิตต่อกิโลกรัมของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ มีช่วงระหว่าง 1,000 – 2,700 บาท ซึ่งสูงกว่าราคาจำหน่ายของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มีค่าเท่ากับ 905.10 บาทต่อกิโลกรัม (1 มกราคม 2555) ซึ่งหากนำไปผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรม จะทำให้ไม่คุ้มค่าในการผลิต ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงมีความสนใจเพิ่มเติมในการศึกษาความเป็นไปได้ของการปรับสูตรอาหารที่จะใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อลดต้นทุนการผลิต ซึ่งอาจทำได้โดยปรับระดับความเข้มข้นหรือปรับไปใช้งานสารเคมีที่มีราคาถูกลง และจากรูปที่ 1.1 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ราคาของกลีเซอรอล (Glycerol) ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาสูงที่สุด ซึ่งกลีเซอรอลจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากการนำกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ทดแทนกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ก็อาจช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนของสารเคมีซึ่งจะส่งผลคุ้มค่าต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ นอกจากนี้สารสกัดยีสต์ (Yeast extracts) ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีราคาสูงเช่นกัน สารสกัดยีสต์จะถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้แหล่งไนโตรเจนประเภทอื่นทดแทนสารสกัดยีสต์หรือการปรับสัดส่วนของปริมาณสารอินทรีย์ในโตรเจนต่อสารอนินทรีย์ในโตรเจนในสูตรอาหาร ก็อาจจะทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนของสารเคมีเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 1.1 ค่าใช้จ่ายของสูตรอาหารในการผลิตต่อ 1 กิโลกรัมของ 1,3-โพรเพนไดออล

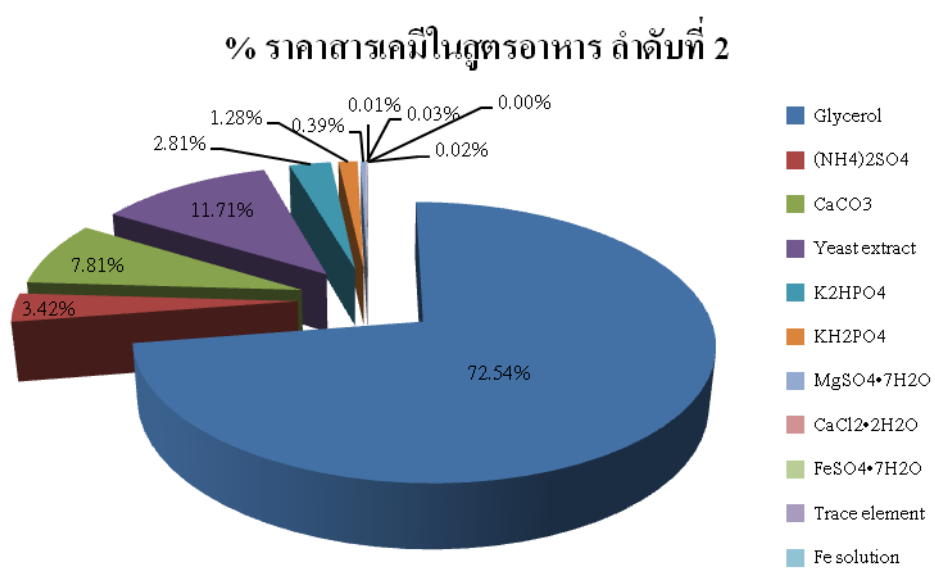
ลำดับที่	สูตรอาหาร Medium เกรด AR (กรัมต่อลิตร)											คิดเป็นเงิน (บาท)	อ้างอิง
	Glycerol	(NH ₄) ₂ SO ₄	CaCO ₃	Yeast extract	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ •7H ₂ O	CaCl ₂ •2H ₂ O	FeSO ₄ •7H ₂ O	Trace element	Fe solution		
1	43	2	2	1	3.4	1.3	0.2	0.02	-	1 ml	2 ml	1,811.60	Gunzel et al. (1991)
2	50	2	2	1	1	0.5	0.2	0.015	0.005	2 ml	-	2,634.12	Petitdemange et al. (1995)
3	80	2	2	1	1	0.5	0.2	0.015	0.005	2 ml	-	1,136.97	Pullsisrisombat (2007)
4	50	2	2	1	3.4	1.3	0.2	0.02	0.005	2 ml	-	1,372.30	Asad-ur-Rehman et. al (2008)
5	80	5	-	1	1	0.5	0.2	0.02	-	1 ml	1 ml	1,032.20	Laosirilurchakai (2008)

* ราคาของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ขายได้เท่ากับ 905.10 บาทต่อกิโลกรัม (บริษัท คูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด)

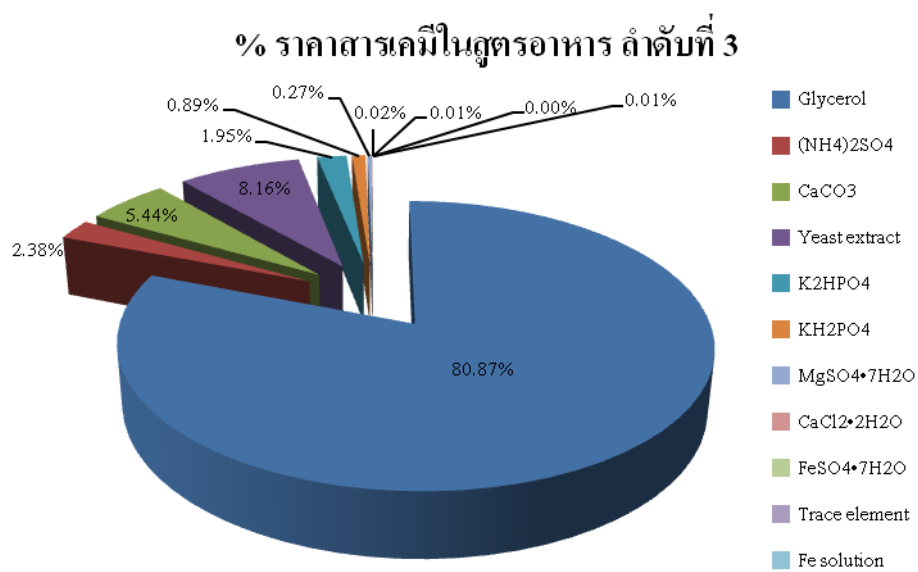
** ราคาของสารเคมีที่ใช้ในสูตรอาหาร จากบริษัทยูแอนดีวี โฮลดิ้ง (ประเทศไทย) จำกัด



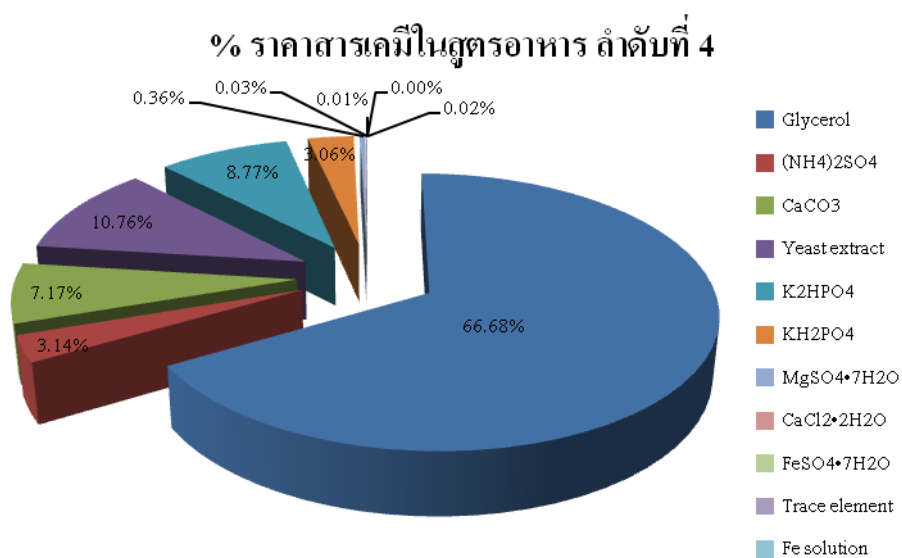
(ก)



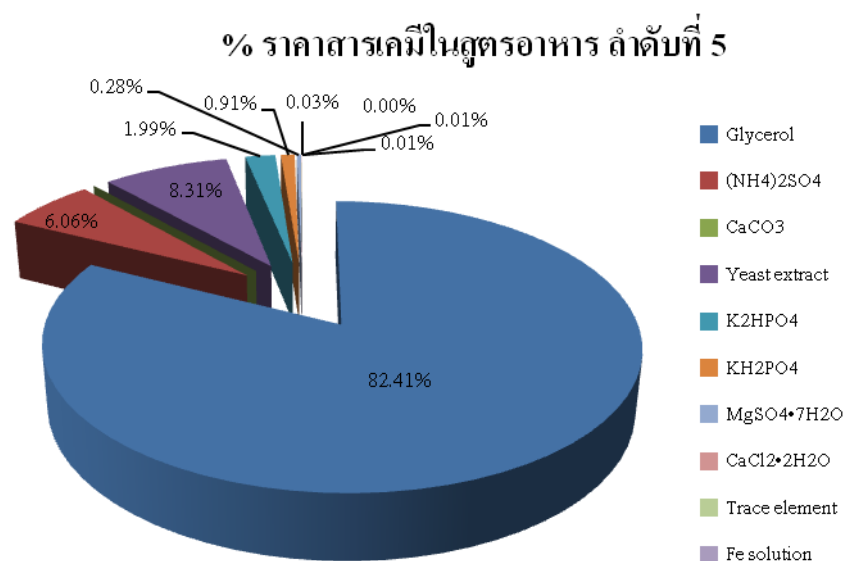
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

รูปที่ 1.1 (ก), (ข), (ค), (ง), (จ) เปอร์เซนต์ราคาสารเคมีแต่ละชนิด ที่ใช้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 เพื่อลดต้นทุนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยการเจือจางสูตรอาหาร การปรับความบริสุทธิ์ของสารเคมี และการปรับประเภทและสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จะทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดูดซับ BCN-009

3. ศึกษาความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลแบบต่อเนื่องจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ (99.5%) และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (ความบริสุทธิ์ 81.33%) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยควบคุมสภาวะเหมาะสมสำหรับเชื้อจุลินทรีย์

4. ศึกษาแนวทางการลดต้นทุนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล โดยเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 โดยจะทำการทดลองภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยควบคุมสภาวะการเติบโตให้เหมาะสมสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ ในการทดลองมีแนวทางดังนี้

- (1) เจือจางความเข้มข้นของสูตรอาหารลดลง 5 และ 10 เท่า ของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม
- (2) ปรับความบริสุทธิ์ของสูตรอาหาร โดยเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารเคมีระดับวิเคราะห์ (Analytical Grade Reagent) ไปใช้สารเคมีระดับอุตสาหกรรม (Industrial Grade Reagent)
- (3) ปรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเปลี่ยนจากสารสกัดยีสต์ เป็นยูเรีย ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) แอลไลซีน ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{HCl}$) กากผงชูรส (อามิ-อามิ) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- (4) ปรับสัดส่วนของสารอินทรีย์ในโตรเจนต่อสารอินทรีย์ในโตรเจนในสูตรอาหารเดิม โดยคงจำนวนไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารให้คงที่

5. วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของระบบ ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอล กรดบิวทริก กรดอะซิติก และกลีเซอรอล ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ตรงและเซลล์แขวนลอย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รับข้อมูลในการใช้งานและแนวทางในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่และได้รับข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการขยายกำลังการผลิต

2. ได้รับแนวทางและข้อมูลเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล จากการหมักกลีเซอรอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431

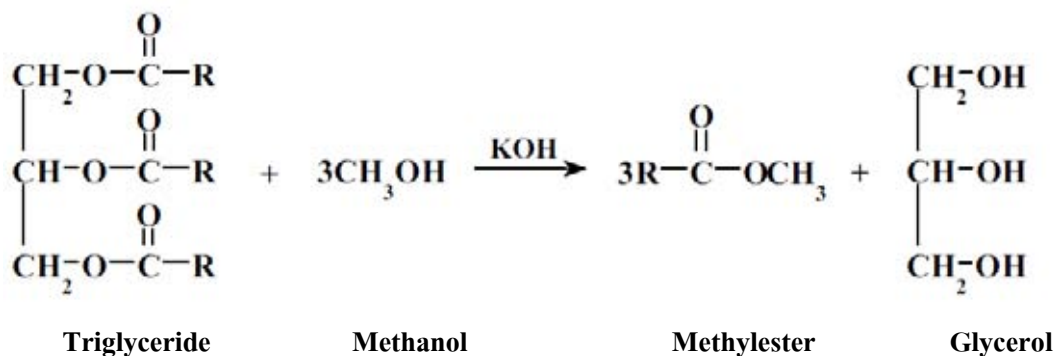
3. ลดปริมาณของเสียจากการผลิตไบโอดีเซลและสามารถเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล (Biodiesel)

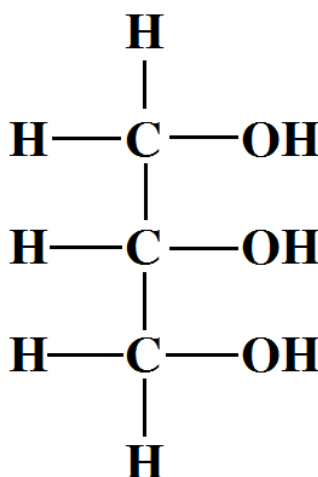
ไบโอดีเซล เป็นชื่อเรียกเชื้อเพลิงที่เป็นสารเอสเทอร์ (Ester) และเป็นเชื้อเพลิงที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบัน ซึ่งผลิตได้จากการนำน้ำมันพืชชนิดต่างๆหรือน้ำมันที่ใช้ปรุงอาหารแล้วมาทำปฏิกิริยาทางเคมีกับแอลกอฮอล์ (เมทานอลหรือเอทานอล) ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ของไขมันสัตว์หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์โดยมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ เมทิลเอสเทอร์ (Methylester) หรือไบโอดีเซล และได้กลีเซอรอล เป็นผลพลอยได้ ซึ่งปริมาณของกลีเซอรอลมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันมักต้องการตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ และเนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันสามารถดำเนินการแบบย้อนกลับได้การใช้แอลกอฮอล์มากเกินไปจะช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น ไบโอดีเซลถูกค้นพบและนำมาทดลองใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซล โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Rudolf Diesel เมื่อปี ค.ศ.1893 แต่ไม่แพร่หลายเนื่องจากเชื้อเพลิงฟอสซิล (Fossil fuel) มีราคาถูกกว่ามาก



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (Ma and Hanna, 1999)

2.2 กlycerol (Glycerol)

กlycerol หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กlycerine หมายถึงสารจำพวกโพลีไฮดริคแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) ที่มีสูตรเคมี $C_3H_5(OH)_3$ มีชื่อทางเคมีว่า 1,2,3-โพรเพนไตรออล (1,2,3-Propanetriol) (กิตติยา, 2545 และมอก.337, 2545) มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.2 กlycerol ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ K.W. Scheele ในขณะที่ทำการสกัดน้ำเชื่อมจากน้ำมันมะกอกที่มีสังกะสีผสมอยู่ สารที่ค้นพบนี้มีรสหวาน เลยให้ชื่อว่ากlycerol ซึ่งมาจากภาษากรีกว่า Glykys มีความหมายว่าหวาน ต่อมามีการค้นพบว่าสารดังกล่าว สามารถสกัดได้จากไขมันและน้ำมัน ในรูปของเอสเทอร์ (Ester) ที่เรียกกันทั่วไปว่า กlycerไรด์ (David and Henry, 1996)



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกlycerol (Jungermann and Sonntag, 1991)

2.2.1 สมบัติของกlycerol (วิภา สุโรจนะเมธากุล, 2546)

- กlycerol เป็นของเหลวข้น ไม่มีสี
- กlycerol มีจุดเดือด 290 °C
- กlycerol ไม่สามารถถูกออกซิไดส์ (Oxidize) จึงมีความคงตัวสูง (High stability)
- ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และรส เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน
- ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท

- มีความหนืด จึงสามารถนำไปใช้เป็นตัวเพิ่มความหนืด (Thickening agent) หรือ สารเพิ่มเนื้อสัมผัสสำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวและผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็น เจล
- มีความดันไอต่ำ และไม่ระเหยที่อุณหภูมิปกติ เป็นสารไม่มีพิษต่อระบบการย่อยอาหาร ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนๆ

2.3 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-Propanediol)

สาร 1,3-โพรเพนไดออล เป็นสารโมโนเมอร์มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_3H_8O_2$ ใช้ในการผลิต โพลีเอสเตอร์ (Polyester) โพลีอีเทอร์ (Polyether) และโพลียูรีเทน (Polyurethane) ในกระบวนการโพลีคอนเดนเซชัน (Polycondensation) นอกจากนี้สาร 1,3-โพรเพนไดออล ยังถูก ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการทำพรมเป็นหลัก (Besson et al., 2003; Kurosaka et al., 2008) ส่วน การใช้งานในด้านอื่นๆ เช่น เป็นตัวทำละลายและเป็นสารที่เติมลงไปในการผลิตสารหล่อ ลื่น (Gunzel et al., 1991; Biebl et al., 1999) ทั้งนี้การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล สามารถทำได้ ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ สำหรับกระบวนการผลิตทางเคมีจะใช้ แอโครลีน (Acrolein) เป็นสารตั้งต้นในการผลิต ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูงซึ่งจะให้ สมบัติการคัดเลือกต่ำ (Low selectivity) และสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ได้ปริมาณน้อย ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูง (Zeng et al., 1996; Biebl et al., 1999) ในทางกลับกัน กระบวนการผลิตทางชีวภาพสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการหมัก กลิเซอรอลโดยใช้จุลินทรีย์ซึ่งใช้อุณหภูมิและความดันปกติ ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก กลิเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล มีหลายชนิดเช่น *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Clostridium butyricum* (Gunzel et al., 1991; Pflugmacher et al., 1994; Zhao et al., 2006) ดังนั้น 1,3-โพรเพนไดออล จึงได้เข้ามามีบทบาทสำคัญ ต่ออุตสาหกรรมผลิตพลาสติกในปัจจุบัน และคาดว่าจะมีการนำ 1,3-โพรเพนไดออล ไปใช้ ประโยชน์ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของสารอื่นๆ อย่างแพร่หลายต่อไปในอนาคต



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของ 1,3-โพรเพนไดออล (Kinneging, 1992)

2.3.1 กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางเคมี

การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางเคมีเป็นกระบวนการผลิตที่ยากและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นน้อย (Zeng et al., 2000; Besson et al., 2003) โดยกระบวนการผลิตมี 2 แบบ สำหรับแบบแรกเป็นกระบวนการผลิตของเดกัสสา (Degussa) เป็นแบบที่มีการผลิตทั่วไป โดยสารตั้งต้นในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล คือ แอโครลีน (Acrolein) ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยอิเล็กตรอนของโพรพิลีน (Propylene) โดยแอโครลีน (Acrolein) จะรับน้ำที่อุณหภูมิและความดันปานกลาง จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนัลดีไฮด์ (3-Hydroxypropionaldehyde) ในปฏิกิริยาขั้นที่สอง 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนัลดีไฮด์ (3-Hydroxypropionaldehyde) รับไฮโดรเจนเพื่อเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยมีรูบิเดียม (Rubidium) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้ความดันสูง (90 บาร์) (Brossmer et al., 2000) สำหรับกระบวนการผลิตในแบบที่ 2 ของเชลล์ (Shell) สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตคือ เอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของเอทิลีน (Ethylene) โดยเอทิลีนออกไซด์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ 3-ไฮดรอกซีโพรพานอล (3-Hydroxypropanal) ด้วยก๊าซสังเคราะห์ในกระบวนการไฮโดรฟอมีลชัน (Hydroformylation) ภายใต้ความดันสูงมาก (150 บาร์) แอลดีไฮด์ถูกสกัดจากสารอินทรีย์ด้วยน้ำ และเกิดปฏิกิริยาจับไฮโดรเจน (Hydrogenation) โดยมีนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้ความดันเดียวกัน ทั้งนี้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิตแบบแรกและแบบที่สองเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากเอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide) มีราคาต่ำกว่าแอโครลีน (Acrolein) ดังนั้นกระบวนการผลิตของเชลล์ (Shell) จึงได้รับความนิยมมากกว่ากระบวนการผลิตของเดกัสสา (Degussa)

2.3.2 กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตทางชีวภาพสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยใช้จุลินทรีย์ซึ่งใช้อุณหภูมิและความดันปกติ ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักมีหลายชนิดเช่น *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, และ *Clostridium butyricum* (Gunzel et al., 1991; Pflugmacher et al., 1994; Zhao et al., 2006) โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ *C. butyricum* จะสามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้มากที่สุด ดังตารางที่ 2.3

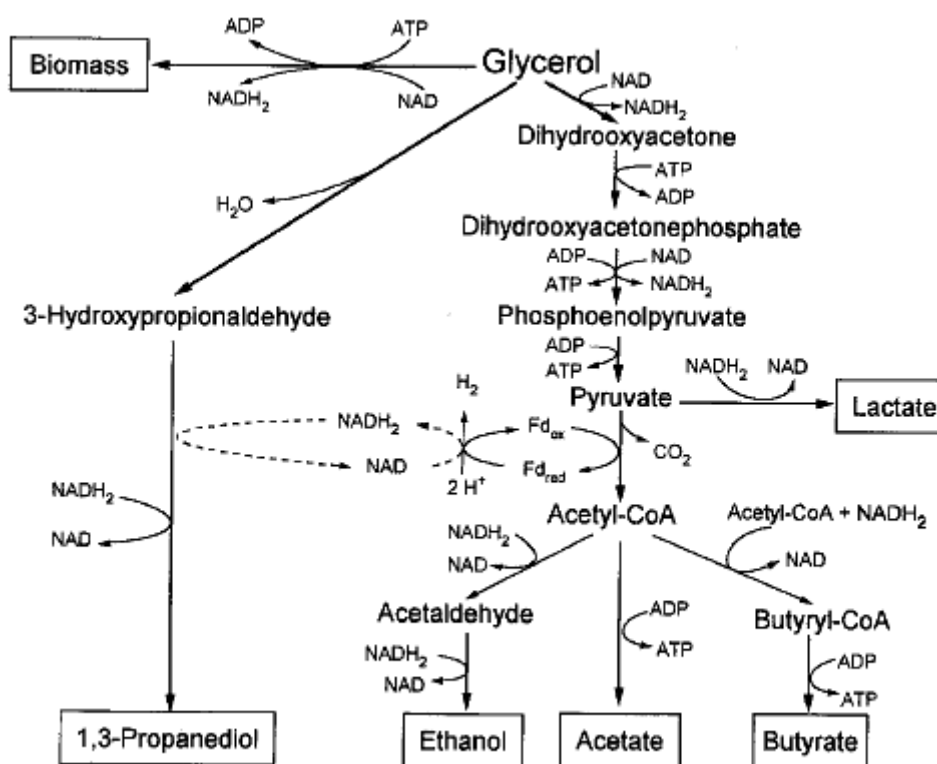
ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล (ดัดแปลงจากใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ, 2552)

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นเริ่มต้น กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ ผลิตภัณฑ์	อัตราการผลิต ผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ชนิดของกรหมัก	อ้างอิง
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	43	25.0	0.70	2.20	แบบกะ	Gunzel et al. (1991)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	50	24.9	0.62	-	แบบกะ	Petitdemange et al. (1995)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	80	41.4	0.76	1.30	แบบกะ	Pullsisrisombat (2007)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	50	26.0	0.52	1.85	แบบกะ	Asad-ur-Rehman et. al (2008)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	80	44.8	0.77	-	แบบกะ	Laosirilurchakai (2008)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	97	50.0	0.61	2.70	แบบกึ่งกะ	Gunzel et al. (1991)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	110	56.0	0.61	2.20	แบบกึ่งกะ	Deckwer (1995)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	22	13	0.69	-	แบบกึ่งกะ	Biebl et al (1998)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	56	26.5	0.58	13.30	แบบต่อเนื่อง	Reimann et al. (1998)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	60	33.6	0.58	-	แบบต่อเนื่อง	Papanikolaou et al. (2004)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	60	32.3	0.54	10.3	แบบต่อเนื่อง	Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	60	29.08	0.75	6.11	แบบต่อเนื่อง	Suratago (2009)
<i>C. butyricum</i> F2b	90	47.1	0.53	3.58	แบบกะ	Papanikolaou et. al (2007)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล (ต่อ)

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นเริ่มต้น กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ ผลิตภัณฑ์	อัตราการผลิต ผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ชนิดของการหมัก	อ้างอิง
<i>C. butyricum</i> F2b	90	43.5	0.49	1.74	แบบต่อเนื่อง	Papanikolaou et. al (2007)
<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	70	37	0.64	1.89	แบบกะ	Barbirato et al. (1998)
<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	129	67	0.63	-	แบบกะ	Himmi et al. (1999)
<i>C. butyricum</i> CNCM 1211	120	63.7	0.64	-	แบบกะ	Colin (2000)
<i>C. freundii</i> DSM 30040	34.5	19	0.57	8.2	แบบต่อเนื่อง	Pflugmacher et al. (1994)
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	20	22.3	0.53	1.68	แบบกะ	Homann et al. (1990)
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	125	56.0	0.45	2.30	แบบกึ่งกะ	Deckwer (1995)
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	60	31	0.62	-	แบบกึ่งกะ	Biebl et al (1998)
<i>K. pneumoniae</i> DSM2026	40	18	0.57	1.62	แบบกึ่งกะ	Chen et al. (2003)

2.3.2.1 วัฏจักรการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพจากกระบวนการหมักกลีเซอรอล



รูปที่ 2.4 วัฏจักรการหมักแบบไร้อากาศของกลีเซอรอลโดย *Clostridium butyricum* (Zeng, 1996)

วัฏจักรการหมักของกลีเซอรอลโดย *C. butyricum* เพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ภายใต้สภาวะไร้อากาศ กระบวนการหมักจะเริ่มขึ้นเมื่อกลีเซอรอลแพร่เข้าสู่เซลล์ โดยกลีเซอรอลส่วนแรกจะถูกกำจัดไฮโดรเจน (Dehydrogenated) เป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตน (Dihydroxyacetone) และเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (Pyruvate) ในวัฏจักรไกลโคไลซิส (Glycolysis) จากนั้นไพรูเวท (Pyruvate) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) โดยเอนไซม์ไพรูเวทเฟอริดอกซินออกซิโดเรดักเตส (Ferredoxin oxidoreductase) และจากแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) จะรับอิเล็กตรอนเกิดเป็นเอทานอลโดยมีอะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นสารมัธยันต์ (Intermediate) ส่วนบิวทาเรทจะเกิดจากการรับอิเล็กตรอนของบิวทิวริลโคเอนไซม์เอ (Butyryl-CoA) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ จากนั้นจะปล่อยพลังงาน อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) และเกิดเป็นบิวทาเรท ส่วนอะซีเตตจะเกิดจากการปลดปล่อยพลังงาน อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ของแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) ซึ่งพลังงานอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) เหล่านี้จะใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้ กลีเซอรอลส่วนที่เหลือจะต้องทำการเอาน้ำออกโดยใช้วิตามินบี 12 เพื่อเปลี่ยนเป็น 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนัลดีไฮด์ (3-Hydroxypropionaldehyde) จากนั้น

จะรับอิเล็กตรอนเกิดเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มากที่สุดจะเกิดขึ้นเมื่อมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนและกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเท่านั้น (Deckwer, 1995; Zeng, 1996; Biebl, 1999) ทั้งนี้เมื่อปริมาณกลีเซอรอลจำกัดจะส่งผลให้จำนวนเซลล์เกิดขึ้นอย่างเหมาะสมและเกิดเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง และถ้าปริมาณกลีเซอรอลปานกลางจะส่งผลให้ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มีค่ามากที่สุดและปริมาณเอทานอลมากขึ้นซึ่งอาจนำมาสู่การเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียง นอกจากนี้พบว่าเมื่อปริมาณกลีเซอรอลมากเกินไปจะเกิดกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (Biebl, 1999)

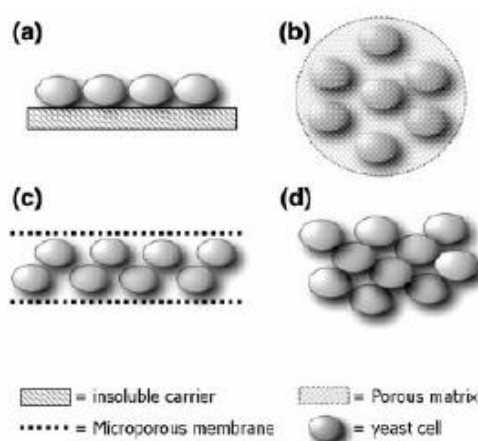
2.3.2.2 กระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ในระบบเซลล์แขวนลอย

Gonzalez-Pajuelo et al. (2005) ได้ศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์เพื่อเพิ่มอัตราส่วนของผลได้และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูง โดยใช้จุลินทรีย์ *C. butyricum* VPI 3266 ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดยทำการศึกษาปัจจัยของอัตราการเจือจาง (D) ที่เท่ากับ 0.05-0.5 ชม.⁻¹ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ป้อนเข้าสู่กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้ถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร มีปริมาตรใช้งานเท่ากับ 1250 มิลลิลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และความเร็วยกเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้ได้เปลี่ยนแปลงอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.05-0.5 ชม.⁻¹ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจนเท่ากับ 0.3 ชม.⁻¹ จะมีปริมาณกลีเซอรอลเหลือจากการหมักเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และที่อัตราเจือจางที่สูงกว่า 0.3 ชม.⁻¹ จะมีปริมาณกลีเซอรอลเหลือจากการหมักเท่ากับ 12.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนต่อพื้นที่มีความสำคัญต่อปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไป ดังนั้นอัตราการเจือจางที่เหมาะสมทำให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 0.3 ชม.⁻¹ ทั้งนี้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มากที่สุดและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และ 10.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.03 ชม.⁻¹ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษารวมการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มากที่สุดโดยการหมักกลีเซอรอล เมื่อใช้ *C. butyricum* โดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed batch) ซึ่งการทำงานของระบบกึ่งกะจะทำงานโดยการควบคุมการป้อนสารตั้งต้น เนื่องจากระบบกึ่งกะ จะสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นได้ ทำให้สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ในปริมาณมาก ในปี 1994 Saint-Amans และคณะ ได้ทำการศึกษารวมหมักในระบบแบบกึ่งกะและแบบกะ สำหรับระบบกึ่งกะสามารถผลิต 1,3-โพรเพน-

ไดออกไซด์เท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.57 ส่วนการหมักแบบกะสามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์เท่ากับ 35 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.54

2.3.2.3 กระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ในระบบตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์เป็นการจำกัดขอบเขตที่อยู่ของเซลล์เพื่อให้รักษาให้กิจกรรมการเร่งของเซลล์ยังคงอยู่ การตรึงเซลล์ด้วยกลไกทางกายภาพแบ่งออกเป็น 4 วิธี (Pullsirisombat, 2007) (1.) การยึดเกาะบนพื้นผิว (Attachment/Adsorption to a surface) (2.) การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมทริกซ์ (Entrapment within a porous matrix) (3.) การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้น (Containment behind a barrier) (4.) การรวมตัวของเซลล์ (Self-aggregation)



รูปที่ 2.5 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ คือ (a) การยึดเกาะบนพื้นผิว (b) การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมทริกซ์ (c) การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้น (d) การรวมตัวของเซลล์ (Verbelen et al., 2006)

1. การยึดเกาะบนพื้นผิว (Attachment/Adsorption to a surface)

การตรึงเซลล์โดยการดูดซับเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและมีความสะดวก รวดเร็ว (Pullsirisombat, 2007) การรวมตัวของเซลล์และวัสดุตรึงจะยึดกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ การสัมผัสกันโดยตรงระหว่างสารอาหารและวัสดุตรึงนับว่าเป็นข้อดีของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ (Budiraharjo, 2006) ทั้งนี้ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับช่องว่างภายในวัสดุตรึง ในกรณีที่ช่องว่างภายในตัวกลางน้อย การแพร่ของสารอาหารเพื่อเข้าสู่เซลล์จะถูกจำกัด ในขณะที่ช่องว่างภายในวัสดุตรึงที่มาก จะส่งผลในเรื่องของพื้นที่ผิวจำเพาะต่อหน่วยปริมาตรของวัสดุตรึง ดังนั้นวัสดุตรึงควรมีขนาดของช่องว่างให้เหมาะสม

2. การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมทริกซ์ (Entrapment within a porous matrix)

การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมทริกซ์เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางอีกวิธีหนึ่ง (Shuler et al., 2001) ซึ่งเมทริกซ์ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น โพลีเมอร์ที่มีรูพรุน (วุ้น อัลจิเนต โคลโคซาน เจลลาติน เซลลูโลส และคอลลาเจน) โพลียูรีเทน ซิลิกาเจล โพลีสไตรีน เป็นต้น (Liu et al., 1998; Ogbonna et al., 1994; Fujii et al., 1999; Sakurai et al., 2000; Bekers et al., 1999; Shinonaga et al., 1992) โดยวัสดุจริงจะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของบีท (Bead) ซึ่งภายในเม็ดบีท (Bead) จะมีจุลินทรีย์บรรจุอยู่ จากนั้นจะเกิดกระบวนการการเกิดเจล (Gelation) หรือกระบวนการโพลิเมไรเซชัน (Polymerization) เพื่อผลิตเจลโพลีเมอร์บรรจุเซลล์ไว้อีกชั้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการแพร่ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้

3. การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้น (Containment behind a barrier)

การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้นเป็นการตรึงเซลล์ในอุดมคติ ซึ่งใช้ในหลากหลายระบบ เมื่อต้องการแยกปริมาณเซลล์ทั้งหมดหรือต้องการแยกผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะเจาะจงออกจากสารขาออก โดยตัวขวางกั้นอาจมีอยู่แล้วภายในระบบ (Hollow fibred และ Flat membrane reactors) หรือถูกสร้างขึ้นมาเพื่อทำการตรึงเซลล์ (ไมโครแคปซูลและการกักเซลล์สองเฟส) ทั้งนี้เยื่อเลือกผ่านสังเคราะห์โดยปกติคือโพลิเมอร์ไมโครฟิวเดชัน (Polymeric microfiltration) หรืออัลตราฟิวเดชันเมมเบรน (Ultra-filtration membranes) ถึงแม้ว่าเยื่อเลือกผ่านที่ใช้มีหลากหลายชนิด เช่น เซรามิก ยางซิลิโคน เป็นต้น การถ่ายเทมวลสารผ่านเยื่อเลือกผ่านไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของรูพรุนและโครงสร้างแต่ขึ้นอยู่กับความชอบน้ำ (Hydrophobicity) ความไม่ชอบน้ำ (Hydrophilicity) และประจุอีกด้วย (Pullsirisombat, 2007)

4. การรวมตัวของเซลล์ (Self-aggregation)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็น การรวมตัวกันของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติ (Pullsirisombat, 2007) ในอุตสาหกรรมจำนวนมากมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นในเมทาบอลิซึมขั้นแรกและเมทาบอลิซึมขั้นที่สอง เช่น กรดอะซิติก แอนติไบโอติก เซลลูโลติกเอนไซม์ เป็นต้น ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนการรวมตัวกันของจุลินทรีย์จะถูกใช้เป็นตัวเร่งการย่อยสลายของกระบวนการเมทาโนจิโนสิส (Methanogenesis) และประสบความสำเร็จในกระบวนการบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมมันฝรั่งและผลไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในกระบวนการหมักไวน์และเบียร์อีกด้วย

ข้อดีของการตรึงเซลล์

- การตรึงเซลล์ทำให้เซลล์มีจำนวนมากขึ้น เมื่อจำนวนเซลล์มีมากขึ้นส่งผลให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงขึ้น
- วัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงเซลล์จะสามารถป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ ค่าความเป็นกรด-ด่างและโลหะหนัก
- เซลล์ที่ถูตรึงจะเสถียรและมีกิจกรรมที่ยาวนานมากขึ้น
- สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้
- เพิ่มความคงทนให้กับเซลล์ เมื่อเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นและการยับยั้งของผลิตภัณฑ์
- ลดปัญหาเซลล์ถูกชะล้าง (Wash out) ออกจากระบบ เมื่อดำเนินการด้วยอัตราการเจือจางสูง
- ป้องกันเซลล์จากแรงเฉือน

ทั้งนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาระบบการหมักกลีเซอรอลโดยการตรึงเซลล์ Zhao (2006) ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* โดยการกักเซลล์ด้วย NaCS/PDMDAAC (Sodium cellulose sulfate/Poly-dimethyl-diallyl-ammonium chloride) เมื่อทำการทดลองแบบกะจะได้รับความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 63.1 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.65 และเมื่อทำการทดลองแบบกึ่งกะ จะได้รับความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 51.86 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองแบบต่อเนื่องจะได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 4.49 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 13.6 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.43 ที่อัตราเจือจางเท่ากับ 0.33 ชม.⁻¹ นอกจากนี้ยังพบว่า การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ทำให้เกิดปัญหาในเรื่องของการถ่ายเทมวลสาร ส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นภายในแคปซูล ซึ่งทำให้ 1,3-โพรเพนไดออลที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังส่งผลให้กลีเซอรอลถ่ายเทเข้าไปภายในแคปซูลได้ปริมาณน้อย ทำให้เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยสารตั้งต้น เช่นเดียวกับ Pullsirisombat (2007) ทำการตรึงเซลล์ลงบน γ -อะลูมินาในเจลอัลจินท จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล ที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าในระบบเซลล์แขวนลอย เนื่องจากบริเวณพื้นที่ผิวของ γ -อะลูมินา มีความหนาแน่นของประจุบวกสูงส่งผลให้รบกวนกิจกรรมของเซลล์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย

นอกจากการตรึงเซลล์ด้วยการกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมทริกซ์ (Entrapment within a porous matrix) แล้วยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีดูดซับ (Adsorption) บนวัสดุ

ตรึง ในปี 1994 Pflugmacher และคณะ ได้ทำการศึกษาการตรึง *Citrobacter freundii* เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล ซึ่งทำการตรึงเซลล์ลงบนโพลียูรีเทนที่ได้มีการดัดแปลง โดยใช้กลีเซอรอลเป็น แหล่งคาร์บอนซึ่งมีการป้อนกลีเซอรอลอย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศใน เครื่องปฏิกรณ์แบบเบดนิ่งขนาด 500 มิลลิลิตร ทั้งนี้ระบบนี้มีการเวียนกลับในขาออกที่อัตราการเงื้อง่าเท่ากับ 3 ซม.⁻¹ เพื่อให้ระบบเกิดการผสมกันอย่างสมบูรณ์ จากนั้นมีทำการบ่มเชื้อในถังหมักเป็นเวลา 24 วัน อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอัตราการเงื้อง่าของการป้อนสารอาหารเท่ากับ 0.3 ซม.⁻¹ และความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 400 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้ปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ อัตราการเงื้อง่าที่เท่ากับ 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ซม.⁻¹ และความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 400, 500, 550, 600, 650, 700, 750 และ 800 มิลลิโมลาร์ จากการทำการทดลองเริ่มต้นทำการศึกษาปัจจัยในเรื่องของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล โดยทำการควบคุมอัตราการเงื้อง่าที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.3 ซม.⁻¹ จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลต่ำ จะได้ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพน-ไดคอลสูง ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงขึ้นไม่ได้ส่งผลให้ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลสูงขึ้น เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 400 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้ในการศึกษาปัจจัยในส่วนของการเงื้อง่า จากการทดลองพบว่า ที่อัตราการเงื้อง่าในช่วง 0.3-0.5 ซม.⁻¹ จะทำให้ได้ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลสูงขึ้นตามลำดับ และจะได้ผลได้ต่ำลงเมื่ออัตราการเงื้อง่าเท่ากับ 0.6 ซม.⁻¹ ดังนั้นจึงเลือกอัตราการเงื้อง่าเท่ากับ 0.5 ซม.⁻¹ ซึ่งได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 8.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และในปี 2009 Suratago ได้ศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล โดยการตรึงเซลล์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 โดยใช้ยวบเป็นวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่ง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล พิจารณาจากความเข้มข้นของสารตั้งต้น โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร และอัตราการเงื้อง่าเท่ากับ 0.13, 0.17, 0.21 และ 0.25 ซม.⁻¹ ผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 60 กรัมต่อลิตรและอัตราการเงื้อง่าเท่ากับ 0.21 ซม.⁻¹ จะให้อัตราการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล ได้สูงสุดที่ 6.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลและผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่ 29.08 กรัมต่อลิตร และ 0.75 ตามลำดับ และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่สูงกว่า 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเงื้อง่าที่สูงกว่า 0.21 ซม.⁻¹ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นและอัตราการเงื้อง่าที่สูง ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางหลุดออกมาบางส่วน ทั้งนี้การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลถูกยับยั้งเมื่อสภาวะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความเป็นกรดต่ำกว่า 6.5 ทั้งนี้การตรึงเซลล์ทำให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้น

2.3.2.4 กระบวนการหมักกลีเซอรอลจากการผลิตไบโอดีเซลเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล

งานวิจัยที่ทำการศึกษากการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยการเปรียบเทียบกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการที่แตกต่างกันและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ โดย Asad-ur-Rehman และคณะ (2008) ทำการศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งทำการเปรียบเทียบกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการที่แตกต่างกันและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก (Magnetically stirred bioreactor) ขนาด 1.5 ลิตร ทั้งนี้การทดลองได้ทำเปรียบเทียบความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 20 และ 50 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จะผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10.3-10.7 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นสาร 1,3-โพรเพนไดออลในช่วง 25-26 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล ที่ผลิตได้จะใกล้เคียงกัน เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และในปี 2006 Ying Mu และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดย *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 จากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85 เปอร์เซ็นต์ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้ได้ทำการทดลองในระบบแบบกะ จากการทดลองในระบบแบบกะ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่เกิดขึ้นเท่ากับ 9.4, 7.3, 8.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85 เปอร์เซ็นต์ จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งตามลำดับ และในปี 1995 Petitdemange และคณะ ได้ทำการศึกษากการหมักกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดย *C. butyricum* E5 ซึ่งทำการหมักแบบกึ่งกะเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 109 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เท่ากับ 58 กรัมต่อลิตร ถัดมาในปี 2000 Papanikolaou และคณะ ได้ศึกษากการหมักกลีเซอรอลที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* F2b ซึ่งทำการหมักแบบต่อเนื่อง 1 ช่วง และ 2 ช่วง โดยการหมักแบบต่อเนื่องแบบ 1 ช่วงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02 ถึง 0.29 ชม⁻¹ ภายในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลเท่ากับ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ความเข้มข้นของ

1,3-โพรเพนไดคอล เพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลที่มากที่สุดเท่ากับ 35-48 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02-0.12 ซม.⁻¹ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลลดลง และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในขาออกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง 2 ช่วง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร โดยในช่วงแรกจะใช้อัตราการเจือจางที่สูงเท่ากับ 0.08-0.3 ซม.⁻¹ เพื่อให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูง ส่วนในช่วงที่สองจะใช้อัตราการเจือจางต่ำเท่ากับ 0.03-0.12 ซม.⁻¹ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลสูง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลที่มากที่สุดที่ผลิตได้เท่ากับ 41-46 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุดเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้นความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลลดลง และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากอัตราการเจือจางสูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการไหลของกลีเซอรอลที่เหลือเพิ่มสูงขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ได้รับกลีเซอรอลไม่สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้อย่างเพียงพอ จึงสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลได้ปริมาณน้อย และในปี 2004 Papanikolaou และคณะได้ทำการศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลแบบต่อเนื่อง โดยใช้จุลินทรีย์ *C. butyricum* F2b ซึ่งทำการศึกษาในเรื่องของความเข้มข้นของกลีเซอรอล ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลที่ผลิตได้ โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลจาก 20 – 90 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการหมักแบบต่อเนื่องที่สภาวะคงที่ ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.04 ซม.⁻¹ ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 44 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร ในปีถัดมา Papanikolaou และคณะ (2008) ได้ทำการทดลองทั้งในแบบกะและแบบต่อเนื่อง สำหรับการทดลองแบบกะ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 39 และ 90 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราการใช้สารตั้งต้น เท่ากับ 2.3 และ 3.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร จะได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอล เท่ากับ 47.1 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้การทดลองแบบต่อเนื่องได้ทำการทดลองแบบ 2 ชั้น เนื่องจากในขั้นแรกจะใช้อัตราการเจือจางที่สูงที่สุดเพื่อให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด ส่วนขั้นที่สองจะใช้อัตราการเจือจางต่ำสุดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลมากที่สุด ซึ่งทั้งสองขั้นทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร และอัตราการไหลเท่ากับ 55 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยในขั้นแรกอัตราการเจือจางจะเท่ากับ 0.11 ซม.⁻¹ และปริมาตรที่ใช้เท่ากับ 0.5 ลิตร ส่วนในขั้นที่สองจะมีอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.04 ซม.⁻¹ และปริมาตรที่ใช้เท่ากับ 1.3 ลิตร

จากการทดลองพบว่าในขั้นแรกได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 2.2 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์เท่ากับ 32.5 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 3.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนในขั้นที่สองจะได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1.4 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์เท่ากับ 43.5 กรัมต่อลิตรและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ในส่วนของขั้นที่สองจะพบว่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อสารตั้งต้น อัตราการใช้สารตั้งต้นและความเข้มข้นของเซลล์จะมีค่าต่ำกว่าขั้นแรก ซึ่งอาจมีผลมาจากปฏิกิริยาการจ่ายอิเล็กตรอนของ 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์ (3-HPA) ที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (Intermediate) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสารอาหารที่เซลล์ใช้ในการเจริญเติบโต

2.3.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์

ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และเป็นสภาวะที่ต้องมีการควบคุมเพื่อให้เซลล์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณมาก Gunzel et al. (1991) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-8.0 จากการทดลองพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจาก 6-7 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นและเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 7 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลง ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7 และในปี 2007 Pullsirirombat ได้ทำการหมักกลีเซอรอล พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเท่ากับ 6 แต่ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มีค่าคงที่ ทั้งนี้ความเข้มข้นเซลล์ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในระหว่างกระบวนการหมัก ส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงจาก 7 เป็น 4 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7 เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างมีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก เช่น อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น

วิตามินและแร่ธาตุ (Monot et al., 1982)

1. วิตามินที่ให้แก่คลอสตริเดียมในกระบวนการผลิตตัวทำละลายยังไม่แน่ชัด วิตามินที่จำเป็น ได้แก่ ไบโอติน (Biotin) และพาราอะมิโนเบนโซอิก (para-aminobenzoic acid) โดยปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.01 กรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวิตามินทั้งสองมีอยู่ในยีสต์สกัด ดังนั้นสามารถใช้ยีสต์สกัดแทนวิตามินทั้งสองได้

2. แมงกานีส มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคลอสทริเดียม โดยปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะมีอิทธิพลต่อการผลิต โดยอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายลดลง

3. แมกนีเซียม มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.05-0.2 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิตตัวทำละลาย และการใช้น้ำตาลของคลอสทริเดียมดีที่สุด

4. เหล็ก มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสทริเดียม ปริมาณเหล็กที่เหมาะสมคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่เติมเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การเจริญเติบโตช้าลง น้ำถูกใช้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายเพียง 25 เปอร์เซ็นต์

5. โปแตสเซียม มีบทบาทต่อการใช้กลูโคสของเชื้อคลอสทริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะทำให้ผลิตรวมมากขึ้น และผลิตตัวทำละลายน้อยลง

6. แอมโมเนียมอะซิเตต มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลาย ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 1.1-2.2 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะทำให้ผลิตรวมมากขึ้น และผลิตตัวทำละลายน้อยลง

อุณหภูมิ

การเจริญเติบโตของเซลล์มีความจำเป็นในการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม เพื่อให้เซลล์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณมาก โดยในปี 1991 Gunzel และคณะได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการหมักสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเท่ากับ 30 – 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่ออุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล มีค่าเพิ่มสูงขึ้น และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลลดลงอย่างมาก ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 0.61

ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์

ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญของกระบวนการหมักกลีเซอรอล เนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่สูง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทั้งนี้ Colin (2000) ได้ทำการศึกษาการเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ *C. butyricum* ที่เกิดจากสารตั้งต้นในกระบวนการหมักกลีเซอรอล เมื่อความเข้มข้น กลีเซอรอลเริ่มต้น

เท่ากับ 20-160 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่มากที่สุดเท่ากับ 63.7 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร และไม่เกิด 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 160 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักสูงกว่า 65 กรัมต่อลิตร จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของ จุลินทรีย์ลดลงเรื่อยๆ และในปี 2007 Pullsirisombat ได้ศึกษาปัจจัยในเรื่องของการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. butyricum* ของสารตั้งต้นเช่นกัน โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40-130 กรัมต่อลิตรซึ่งทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่มากที่สุดเท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 100 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเซลล์จะลดลงและมีระยะปรับตัว (Lag phase) ที่ช้ากว่าปกติ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น ต่อมาในปี 2009 Laosirilurchakai ทำการศึกษาโดยความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 60 – 120 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ กลีเซอรอลที่เหมาะสมคือ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.77 และผลได้ของเซลล์เท่ากับ 0.042 และเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลมากกว่า 80 กรัมต่อลิตรจะเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Klebsiella pneumoniae* โดย Menzel et al. (1997) ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 200-1900 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล อะซีเตต เอทานอลและแลคเตต มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 200 – 1100 มิลลิโมลต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงกว่า 1100 มิลลิโมลต่อลิตร ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ต่างๆมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น

นอกจากนี้ Gonzalez-Pajuelo (2004) ได้ศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระบบแบบกะ โดยใช้จุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* VPI 3266 ซึ่งทำการหมักกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลซึ่งมีความบริสุทธิ์ 65 เปอร์เซ็นต์ 92 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลทางการค้าซึ่งมีความบริสุทธิ์ 87 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ได้ศึกษาการเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น โดยความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 20 – 100 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ถูกยับยั้ง เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 92 เปอร์เซ็นต์ และ 87 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตของเซลล์จะใกล้เคียงกัน ส่วนกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65 เปอร์เซ็นต์ เซลล์จะเจริญเติบโตน้อยกว่าใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 92 เปอร์เซ็นต์ และ 87 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65 เปอร์เซ็นต์มีสิ่งเจือปนมากทำให้เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต ไม่เพียงแต่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เท่านั้น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่มากเกินไปก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโต

ของเซลล์เช่นเดียวกัน ในปี 1991 Biebl ได้ทำการศึกษาปัจจัยในเรื่องของการเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งเกิดจากการสะสมของผลิตภัณฑ์ ในกระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล จากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือ กรดอะซิติก กรดบิวทิริกเท่ากับ 27 และ 19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงกว่า 80 กรัมต่อลิตร เซลล์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเนื่องจากการยับยั้งของสารตั้งต้นอีกด้วย

แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

1. แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (Inorganic nitrogen)

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท เป็นต้น

แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแบบก๊าซ หรือสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ การใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องระมัดระวังในเรื่องการเก็บรักษา เนื่องจากแอมโมเนียระเหยง่าย จึงต้องเก็บในภาชนะบรรจุที่ป้องกันการระเหย และทนต่อการกัดกร่อนได้

เกลือแอมโมเนียม ที่มีราคาถูกที่สุดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งตามปกติจะทำให้เกิดสถานะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะเกิด SO_4^{2-} ขึ้น ในทางตรงข้ามก๊าซแอมโมเนียและไนเตรทเมื่อถูกเมแทบอลิซึม ตามปกติจะทำให้เกิดสถานะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในกรณีที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท ตามปกติในระยะแรก NH_4^+ จะถูกใช้ไปก่อน ทำให้เกิดสถานะที่เป็นกรด จนกระทั่ง NH_4^+ หหมด จุลินทรีย์จึงสังเคราะห์เอนไซม์ Nitrate reductase และใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น ยกเว้นใน *Gibberella fujikuroi* ที่ไนเตรทจะยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลาย NH_4^+ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.8-3.0 ดังนั้นไนเตรทจึงถูกใช้ไปก่อน จนกระทั่งค่าความเป็นกรด-ด่างสูงมากพอ จึงจะมีการเมแทบอลิซึม NH_4^+ ได้ (สมใจ ศิริโชค, 2550)

2. แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (Organic nitrogen)

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย ก็ได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน จุลินทรีย์บางชนิด โดยเฉพาะพวกมิวแคนท์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน (สนใจ ศิริ โภค, 2550)

วัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ฟาร์มามีเดีย และสารสกัดยีสต์ เป็นต้น

Mohd และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* NCIMB 13357 เมื่อใช้ สารสกัดยีสต์ เปปโทน และทริปโทน ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากันในสารอาหาร พบว่าสารสกัดยีสต์สามารถทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าการใช้เปปโทน และทริปโทน เมื่อใช้เกลือของแอมโมเนียม ซึ่งเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน มาแทนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ช้าลง และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำ เมื่อเทียบกับแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

Khare และคณะ (1995) รายงานว่า สามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้ในเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Aspergillus niger* เพื่อให้เกิดการหมัก และสร้างกรดซิตริก เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.3 จะสามารถผลิตกรดได้ 5 – 10 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

Wijitra และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งสารอาหารต่อการเจริญเติบโต และการผลิตอะซิเตด โดยเชื้อ *C. thermoaceticum* ATCC 49707 พบว่าในน้ำนมข้าวโพดมีแหล่งไนโตรเจนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งครึ่งหนึ่งของไนโตรเจนทั้งหมดจะเป็นกรดอะมิโนอิสระ การหมักด้วยน้ำนมข้าวโพดนั้น จุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารสกัดยีสต์ แต่จะผลิตอะซิเตดลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีความเข้มข้นของสารอาหารน้อยกว่าสารสกัดยีสต์ โดยสารสกัดยีสต์ (Bacto yeast extract จาก difco) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย และมีรายงานว่าช่วยส่งเสริมให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี แต่ยังไม่มียางานแน่ชัดว่าในสารสกัดยีสต์นั้นมีองค์ประกอบใดเป็นสำคัญ แต่ Lundie และ Drake ในปี 1984 ได้รายงานว่าสารสกัดยีสต์นั้นมีวิตามินมากมายที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งประกอบไปด้วยกรดนิโคตินิก (nicotinic) ซึ่งเป็นวิตามินที่สำคัญสำหรับเชื้อจุลินทรีย์

Welsh และคณะ (1986) ได้ศึกษาผลของแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน และแหล่งอนินทรีย์ในโตรเจนต่อกระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 พบว่าการใช้แหล่งอินทรีย์ในโตรเจนร่วมกับแหล่งอนินทรีย์ในโตรเจน ในกระบวนการหมักแบบกะจะส่งผลให้เจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตตัวทำละลายเพิ่มสูงขึ้น

Lay และคณะ (2001) รายงานว่าการใช้แหล่งอินทรีย์ในโตรเจน คือ สารสกัดยีสต์ ทรีปโทน และเปปโทน ในกระบวนการหมักโดยเชื้อ *C. acetobutylicum* NCIMB 13357 จะทำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น และเซลล์จะมีการใช้น้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นได้เกือบสมบูรณ์ โดยที่สารสกัดยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ที่สามารถทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดี พร้อมทั้งยังส่งเสริมให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้น

Mongi และคณะ (2005) รายงานว่าแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีองค์ประกอบซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยสเปกตรัมของเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ ในระหว่างการหมักด้วยเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 องค์ประกอบเหล่านี้จะถูกใช้จากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเซลล์ และรวมเข้าไปในโปรตีนโดยตรง หรือเปลี่ยนไปเป็นองค์ประกอบไนโตรเจนอื่นๆ แต่ในทางตรงกันข้ามนั้นเซลล์จะใช้พลังงาน และเวลาในการสังเคราะห์กรดอะมิโนสำหรับโปรตีนที่สังเคราะห์จากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เป็นจำนวนมาก ซึ่งในหมูของแหล่งไนโตรเจนนั้นจะมีความแตกต่างของโปรตีน และกรดอะมิโน ซึ่งอาจมีส่วนที่แตกต่างกันต่ออัตราการผลิต และผลได้ของกระบวนการหมัก

Xiaoyi และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเชื้อ *C. butylicum* W5 พบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยการใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่หลากหลายทั้งวัตถุดิบที่สดใหม่ และของเสีย โดยที่สารสกัดยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดสำหรับเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ดี อีกทั้งยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จากแอมโมเนียมไนเตรท

มัลลิกา บุญมี (2548) ได้ศึกษาการนำกากยีสต์จากโรงงานผลิตเบียร์มาใช้แทนสารสกัดยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำย่อยเมล็ดข้าวฟ่างหวาน จากการทดสอบพบว่าการใช้สารสกัดยีสต์เพียง 3 กรัมต่อลิตร เพียงพอต่อการเสริมการเจริญและผลิตเอทานอลของเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ ยีสต์ *Saccharomyces*

cerevisiae TISTR 5339 และแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* TISTR 548 ดังนั้นจึงใช้กากยีสต์ที่มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับสารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดสอบการล้างและไม่ล้างกากยีสต์ก่อน ซึ่งพบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถเจริญได้ทั้ง 2 สภาวะ แสดงว่ากากยีสต์แห้งไม่มีสารที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอทานอลแต่อย่างใด นอกจากนี้การเติมกากยีสต์ยังช่วยเพิ่มการผลิตเอทานอลเช่นเดียวกับการเติมสารสกัดยีสต์ อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มการปลดปล่อยโปรตีนในกากยีสต์จึงนำมาผ่านกระบวนการ homogenization ก่อนนำไปย่อยซึ่งพบว่าไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนมากนัก เมื่อเทียบกับการย่อยเพียงอย่างเดียว โดยในการย่อยจะมี 2 วิธีคือ ออโตไลเซส และ ไฮโดรไลเซส ซึ่งการย่อยวิธีไฮโดรไลเซส โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ให้ปริมาณโปรตีนประมาณ 17 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าวิธีออโตไลเซส คือเฉลี่ยประมาณ 11 กรัมต่อลิตร เมื่อนำกากยีสต์ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดมาเติมในน้ำย่อยเมล็ดข้าวฟ่างหวานเพื่อผลิตเอทานอลในระดับขวดเขย่า พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอทานอลได้ดีเช่นเดียวกับการเติมสารสกัดยีสต์ โดยการเติมกากยีสต์ที่ไม่ได้ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ สามารถผลิตเอทานอลได้ 46-47 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเติมส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์กากยีสต์ คือ 42-44 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มขนาดการผลิตเอทานอลในระดับถึงปฏิกรณ์ชีวภาพโดยเติมกากยีสต์ที่ไม่ได้ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ในน้ำย่อยเมล็ดข้าวฟ่างหวาน พบว่า *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ 31 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการหมัก 35 ชั่วโมง ส่วน *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้ 41 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการหมัก 27 ชั่วโมง ซึ่งเร็วกว่า *S. cerevisiae* ประมาณ 8 ชั่วโมง

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- 3.1.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โโรค (Autoclave) SS-325, TOMY, Japan
- 3.1.2 Vertical Laminar flow (VS-124, ISSCO , U.S.A.)
- 3.1.3 Vortex mixer (G-560E, Scientific Industries, Inc., U.S.A.)
- 3.1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled Environment Incubator Shaker) New Brunswick Scientific Co., U.S.A.
- 3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) Kubota 5100 apan, Kubota Corporation, Japan
- 3.1.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) UV-2450, Shimadzu, Japan
- 3.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) MP220, Mettler Toledo, Switzerland
- 3.1.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (Modified Moving Bed Bioreactor)
ขนาด 6 ลิตร
- 3.1.9 ถังหมัก (Fermentor) Biostat Q® , B Braun Biotech International, Germany
ขนาด 1 ลิตร
- 3.1.10 ตู้อบ (Hot Air Oven) ULM 500, Memmert, Germany
- 3.1.11 เครื่องกวน (stirrer) รุ่น RW 20 ZM.n. ของบริษัท Ika laborotechnik, Germany
- 3.1.12 เครื่องและอุปกรณ์วัดโปรตีนด้วยวิธี Kjeldah method
Distillation Unit Nitrogen analyzer รุ่น BUCHI 339
Digestion Unit รุ่น BUCHI K 435
Control Unit รุ่น BUCHI B 436
Scrubber Unit รุ่น BUCHI B 414
- 3.1.13 วัสดุครึ่ง BCN-009 ทำจากโพลีเอทิลีนที่มีค่าความหนาแน่นสูง (HDPE) มีพื้นที่
ผิวจำเพาะเท่ากับ 834 ตร.ม./ลบ.ม.



รูปที่ 3.1 วัสดุรูขี้ผึ้ง BCN-009

3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (APS Finechem, Australia^{1,3})
- 3.2.2 แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) (Ajax Finechem, Australia^{1,3})
- 3.2.3 โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (APS Ajax Finechem, Australia¹)
- 3.2.4 คอปเปอร์คลอไรด์ ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem, Australia¹)
- 3.2.5 เฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (APS, Australia²)
- 3.2.6 กรดบอริก (H_3BO_3) (Merck, Germany^{1,3})
- 3.2.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Ajax Finechem, New Zealand^{1,3})
- 3.2.8 ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Ajax Finechem, Australia^{1,3})
- 3.2.9 โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia^{1,3})
- 3.2.10 แมงกานีสคลอไรด์เตรตะไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Ajax laboratory chemicals, Australia¹)
- 3.2.11 แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (APS, Australia^{1,3})
- 3.2.12 โซเดียมโมลิบเดต ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (APS Ajax Finechem, Australia¹)
- 3.2.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Ajax Finechem, Australia^{1,3})
- 3.2.14 แอมโมเนียมซัลเฟต ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (APS, Australia^{1,3})
- 3.2.15 ยูเรีย $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (Ajax Finechem, Australia¹)
- 3.2.16 นิกเกิลคลอไรด์ ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem, Australia¹)
- 3.2.17 ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2) (APS, Australia^{1,3})
- 3.2.18 เอทานอล (Ethanol) (VWR, CE¹)
- 3.2.19 กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (Glycerol) (Fisher Scientific UK Limited, UK¹)

- 3.2.20 กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Crude Glycerol) (จากบริษัท บางจากไบโอฟูเอล จำกัด³)
- 3.2.21 กรดบิวทีริก (Butyric acid) (Merck, Germany¹)
- 3.2.22 กรดอะซิติก (Acetic acid) (May & Baker, British^{1,3})
- 3.2.23 สารสกัดยีสต์ (Yeast extracts) (Himedia, India²)
- 3.2.24 แอลไลซีน (C₆H₁₄N₂O₂HCl) (จากบริษัท อายิโนะโมะไต้ะ (ประเทศไทย) จำกัด³)
- 3.2.25 กากผงชูรส (อามิ-อามิ) (จากบริษัท อายิโนะโมะไต้ะ (ประเทศไทย) จำกัด³)
- 3.2.26 1,3-propanediol (Acros Organics, U.S.A.²)
- 3.2.27 Antifoam (Ajax Finechem, Australia²)
- 3.2.28 Reinforced Clostridial Medium (Himedia, India²)

Remark: ¹ Analytical reagent
 ² Laboratory reagent
 ³ Commercial reagent

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

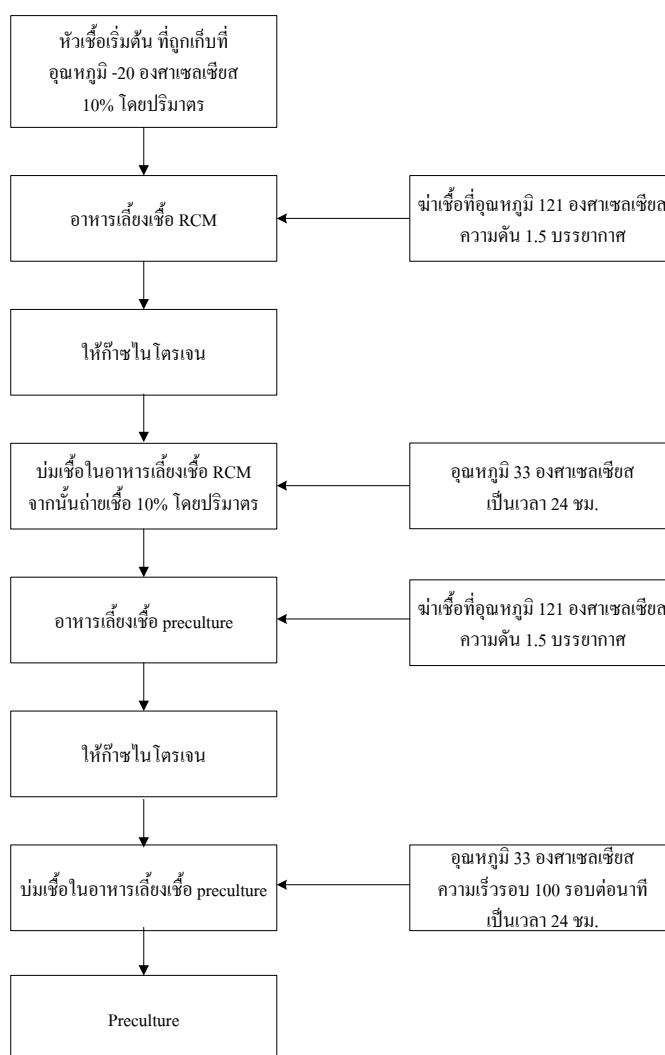
จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 จาก American Type Culture Collection (ATCC) BAA-557TM

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์

การเพาะเชื้อ *Clostridium butyricum* DSM 5431 ดำเนินการดังรูปที่ 3.2 เชื้อ *C. butyricum* อยู่ในสารผสมระหว่าง Reinforced Clostridial Medium (RCM) กับกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ซึ่งเก็บภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเตรียมถ่ายเชื้อ เริ่มต้นทำการเตรียมอาหาร RCM ลงในหลอดแก้ว จากนั้นอาหารที่เตรียมไว้จะถูกนำไปฆ่าเชื้อที่ ภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะถูกกำจัดออกซิเจนโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนที่อัตรา 0.1 vvm เป็นเวลา 6 นาที แล้วจึงทำการถ่ายเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรลงอาหาร RCM ในหลอดแก้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

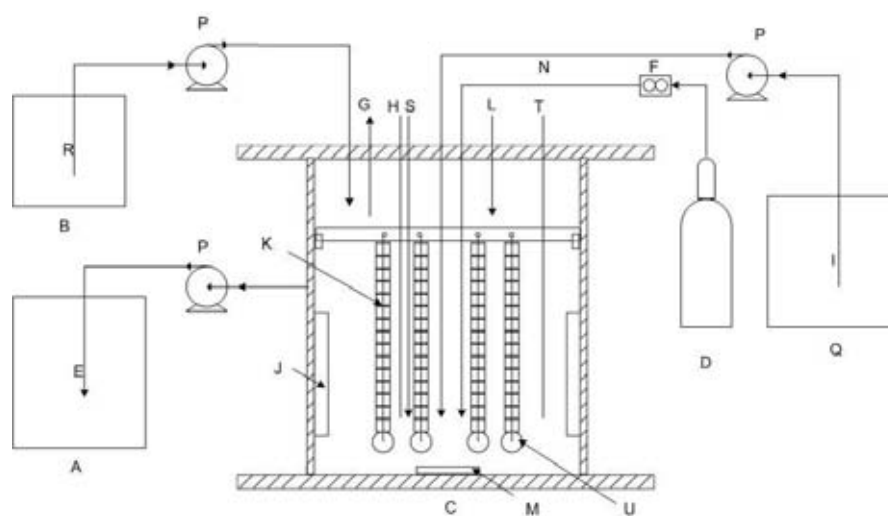
ต่อมาทำการขยายจำนวนเชื้อโดยเตรียมอาหารของ กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร $CaCO_3$ 2 กรัมต่อลิตร และสาร สังกะสี 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นอาหารที่เตรียมไว้จะถูกนำไปฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นอาหารที่ผ่านการฆ่า เชื้อแล้วจะนำไปกำจัดออกซิเจนโดยใช้ไนโตรเจนที่อัตรา 0.1 vvm เป็นเวลา 6 นาที แล้วจึงถ่ายเชื้อ *C. butyricum* ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหาร RCM 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ลงในอาหาร Preculture จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสและเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 การเพาะเชื้อ *Clostridium butyricum* DSM 5431 (Jaitip, 2009)

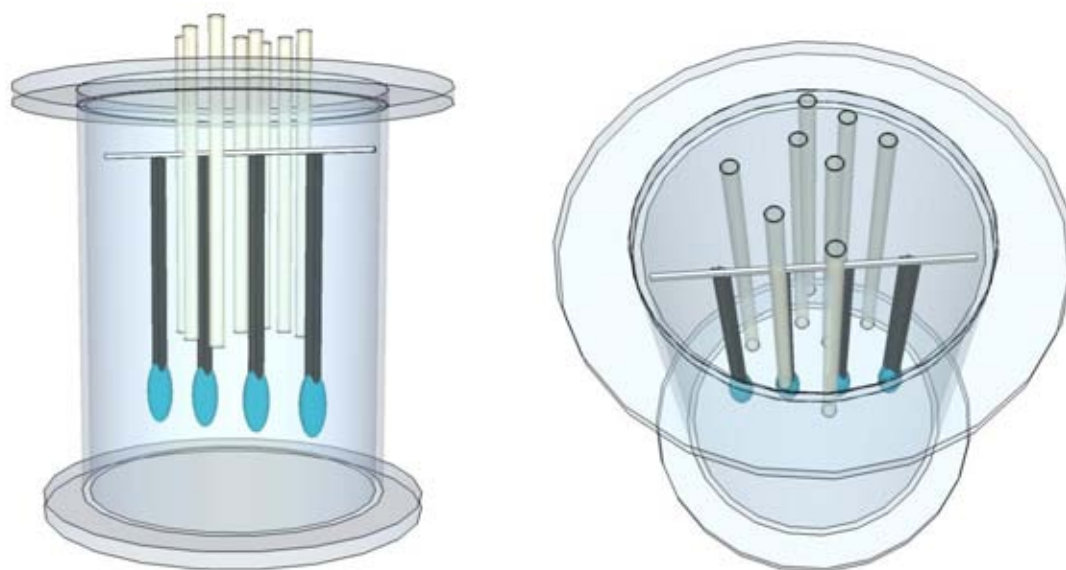
3.4.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (รูปที่ 3.3 และ รูปที่ 3.4) ทำจากอะครีลิก โดยมีขนาด 6 ลิตร ความสูง 25 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 19 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกเท่ากับ 20 เซนติเมตร ภายในมีแผ่นกั้น (Baffle) 4 อัน ขนาด 1x9 เซนติเมตร ด้านบนมีแท่นแขวนวัสดุตรึงที่เจาะช่อง 3 มิลลิเมตร จำนวน 8 ช่อง เพื่อแขวนวัสดุตรึง BCN-009 ที่ร้อยเป็นเส้นและถ่วงน้ำหนักด้วยลูกแก้ว



รูปที่ 3.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ, 2552)

เมื่อ	A ถังเก็บผลิตภัณฑ์ (1,3-PDO)	B ขวด NaOH
	C ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่	D ถังก๊าซไนโตรเจน
	E สารขาออก	F เครื่องวัดอัตราการไหล
	G ก๊าซขาออก	H เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH probe)
	I สารตั้งต้น	J แผ่นกั้น (Baffle)
	K ตัวกลาง BCN-009 ที่ร้อยเข้าด้วยกัน	L สารป้องกันฟอง (Antifoam)
	M แท่งแม่เหล็กกวนสาร	N ก๊าซไนโตรเจน
	P เพอร์ิสตอลติกปั๊ม (Peristaltic pump)	Q ถังเก็บสารอาหาร
	R โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	S ท่อเก็บสารตัวอย่าง
	T เทอร์โมมิเตอร์	U ลูกแก้ว



รูปที่ 3.4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่แบบสามมิติ

3.4.3 การตรึงเชื้อจุลินทรีย์บนวัสดุตรึง

วัสดุตรึงเซลล์จุลินทรีย์ BCN-009 จำนวนทั้งหมด 480 ชิ้น จะถูกร้อยเป็นเส้น เส้นละ 15 ชิ้น แต่ละเส้นจะถูกถ่วงน้ำหนักด้วยลูกแก้ว เพื่อป้องกันการลอยตัวและอัดแน่นของวัสดุตรึงเซลล์บริเวณผิวของของเหลว การแขวนวัสดุตรึงเซลล์ในลักษณะดังกล่าวยังเปิดโอกาสให้วัสดุตรึงเซลล์เคลื่อนที่ได้จากอิสระตามการไหลวนของของเหลว วัสดุตรึงเซลล์ที่ร้อยเป็นเส้นจะถูกฆ่าเชื้อโดยล้างด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และแช่เอทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำอีกครั้ง

กระบวนการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีวัสดุตรึงบรรจุอยู่ ดำเนินการโดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากหัวข้อ 3.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3200 มิลลิลิตร (โดยมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 4 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร Fe solution 1 มิลลิลิตร Trace element 0.1 มิลลิลิตร $CaCO_3$ 2 กรัมต่อลิตร และสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร) ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อได้มีการให้ก๊าซไนโตรเจนในอัตรา 0.1 vvm เพื่อกำจัดออกซิเจนเป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นทำการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โดยมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วย ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ระบุในข้างต้น จนกระทั่งพบไบโอฟิล์มเกิดขึ้นบริเวณผิวของวัสดุตรึง

3.4.4 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

การทดลองในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับการใช้งานถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากกลีเซอรอลจากการผลิตไบโอดีเซลโดยตรง การทดลองจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 โดยจะหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ ดังนี้ (1) กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์ และ (2) กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เริ่มต้นกระบวนการหมักโดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรึงบนวัสดุตั้งจากหัวข้อ 3.4.3 มาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อและนำอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าสู่ระบบ ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ได้ผ่านการกำจัดออกซิเจนโดยใช้ไนโตรเจนเป็นเวลา 15 นาที ภายในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ที่มีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างโดยชุดควบคุมอัตโนมัติเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที และควบคุมอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 - 0.6 ชม.⁻¹ โดยกำหนดความเข้มข้นของกลีเซอรอลเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ในแต่ละสภาวะจะทำการเก็บตัวอย่างของเหลวภายในถึงปฏิกรณ์เป็นประจำทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล กลีเซอรอล กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก เพื่อนำมาวิเคราะห์หาข้อมูลที่สภาวะคงตัวของการทดลองในแต่ละชุด

3.4.5 การศึกษาผลของการเจือจางสูตรอาหารต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

การทดลองในส่วนนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตโดยลดความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการเจือจางลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิม ในการทดลองใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลในทุกชุดความเจือจาง เท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์จากหัวข้อ 3.4.1 และทำการทดลองแบบกะภายในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเป็นประจำทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล กลีเซอรอล กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก

3.4.6 การศึกษาผลของการปรับความบริสุทธิ์ของสารเคมีต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

การทดลองในส่วนนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตโดยปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีที่ใช้ในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน

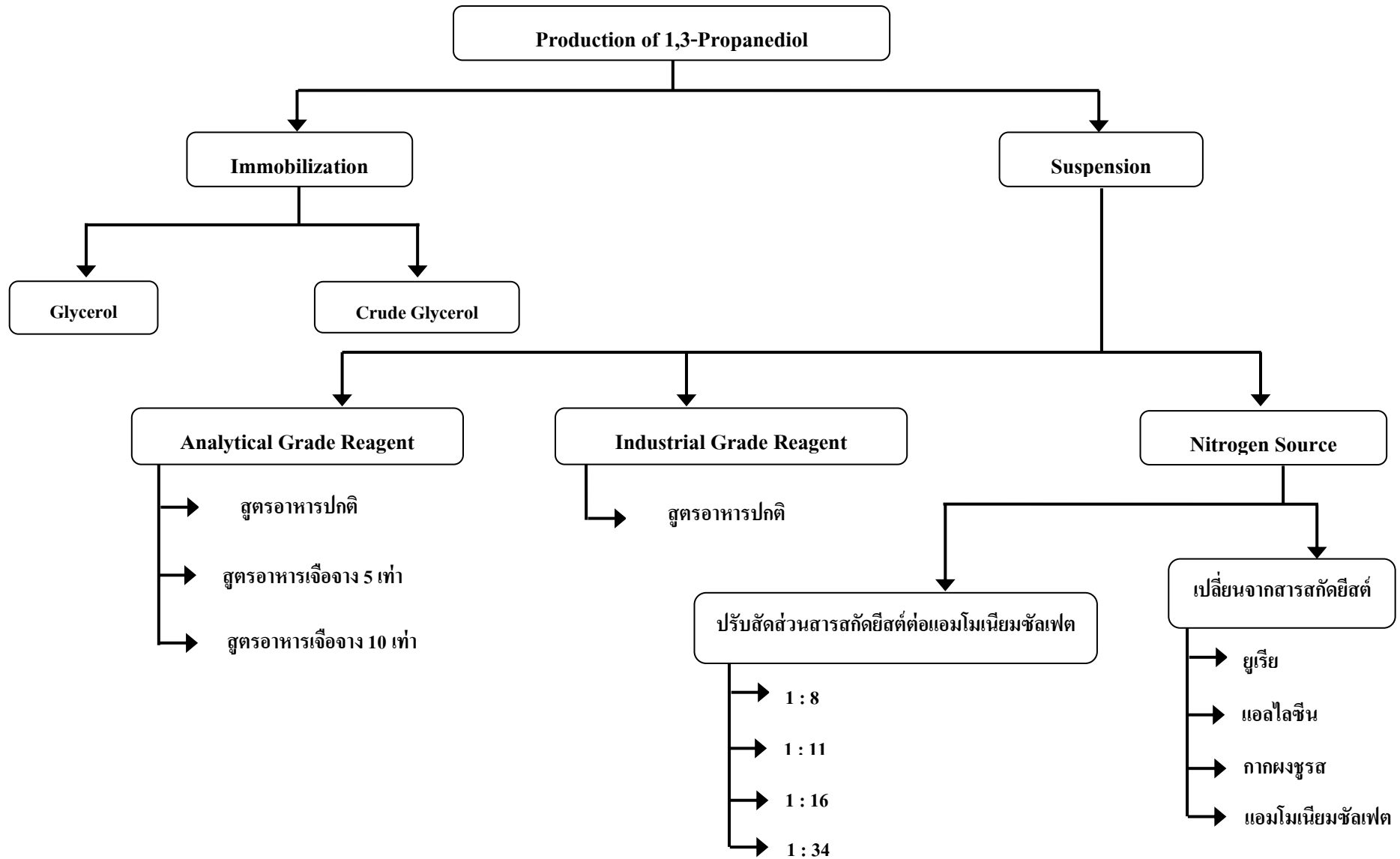
คือ (1) สูตรอาหารที่ทำจากสารเคมีเกรด Analytical Reagent (2) สูตรอาหารที่ทำจากสารเคมีเกรด Industrial Reagent ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์จากหัวข้อ 3.4.1 และทำการทดลองแบบกะภายในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเป็นประจำทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล กลีเซอรอล กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก

3.4.7 การศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

การทดลองในส่วนนี้ศึกษาแนวทางการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนในการผลิตโดยจะเน้นไปที่แหล่งไนโตรเจน

- (1) ทำการเปลี่ยนประเภทของแหล่งไนโตรเจนจากเดิมซึ่งใช้สารสกัดยีสต์เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร (0.1097 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) ไปเป็นชนิดอื่น ได้แก่ ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต ในการทดลองจะควบคุมปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นให้คงที่ และจะใช้ซึ่งคิดเป็นปริมาณยูเรียเท่ากับ 0.235 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอลไลซีนเท่ากับ 0.715 กรัมต่อลิตร ปริมาณกากผงชูรสเท่ากับ 2.11 กรัมต่อลิตร และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 4.517 กรัมต่อลิตร การทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์จากหัวข้อ 3.4.1 และทำการทดลองแบบกะภายในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเป็นประจำทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล กลีเซอรอล กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก
- (2) ทำการปรับสัดส่วนของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ และไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ จากเดิมใช้สารสกัดยีสต์ 0.1097 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.8485 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งมีค่าสัดส่วนของไนโตรเจนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 ทำการปรับสัดส่วนใหม่ไปเป็น 1:11 1:16 และ 1:34 ตามลำดับ โดยจะควบคุมปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.9582 กรัม-ไนโตรเจน ในการทดลองจะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล

เท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์จากหัวข้อ 3.4.1 และทำการทดลองแบบกะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเป็นประจำทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ เซอร์โรล กรดบิวทีริก และกรดอะซิติก



รูปที่ 3.5 สรุปการดำเนินงานวิจัยทั้งหมด

3.4.8 วิธีวิเคราะห์

ตารางที่ 3.1 พารามิเตอร์และวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษาในการทดลอง

พารามิเตอร์ที่วิเคราะห์	วิธีวิเคราะห์
ความเข้มข้นของกลีเซอรอล	ใช้เครื่อง HPLC ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล	ใช้เครื่อง HPLC ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ความเข้มข้นของกรดบิวทิริก	ใช้เครื่อง HPLC ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ความเข้มข้นของกรดอะซิติก	ใช้เครื่อง HPLC ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ความเข้มข้นของเซลล์	ใช้เครื่อง Spectrophotometer ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
การตรึงจุลินทรีย์บนผิววัสดุตรึง	ใช้เทคนิค SEM ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน	ใช้วิธี Kjeldah ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.8.1 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

ใช้หลอดฉีดยาดูดน้ำหมักที่ต้องการวัดประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็ก นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยอัตราการหมุน 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมาประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็กที่มีฝาปิด นำไปวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.8.2 ความเข้มข้นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์

ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1,3-โพรเพนไดออล กรดบิวทริกและกรดอะซิติกใช้การวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วย refractive index detector (RI) โดยคอลัมน์ (Lichrocart C18) ยาว 250 มม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกเท่ากับ 4 มม. สารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่คือ H_3PO_4 20 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส สารตัวอย่างถูกฉีดด้วยปริมาตร 50 ไมโครลิตร การวิเคราะห์ HPLC ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.8.3 การหาความเข้มข้นของเซลล์

วิเคราะห์ความเข้มข้นเซลล์ด้วยการหาน้ำหนักแห้งร่วมกับการวัดค่าความขุ่น (Optical density, OD) การวัดค่าความขุ่นทำโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-2450, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ส่วนการหาน้ำหนักแห้งทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำหมัก 20 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวส่วนใสที่อยู่ด้านบนออกทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน ล้างด้วย HCl 0.1 โมลาร์ และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสออก แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำซ้ำในลักษณะเดียวกันอีกครั้ง เทลงในอะลูมิเนียมฟอยล์ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักอะลูมิเนียมฟอยล์ก่อนการเท นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.8.4 การตรึงจุลินทรีย์

การตรึงจุลินทรีย์บนผิววัสดุตรึง BCN-009 สามารถตรวจสอบโดยใช้เทคนิค SEM (JSM-5410LV, JEOL, Japan) SEM ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.8.5 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Kjeldah โดยใช้เครื่องและอุปกรณ์วิเคราะห์ไนโตรเจน(Distillation Unit Nitrogen analyzer รุ่น BUCHI 339, Digestion Unit รุ่น BUCHI K 435, Control Unit รุ่น BUCHI B 436 และ Scrubber Unit รุ่น BUCHI B 414)

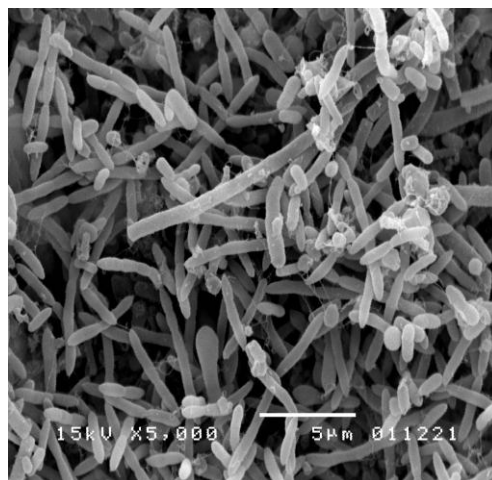
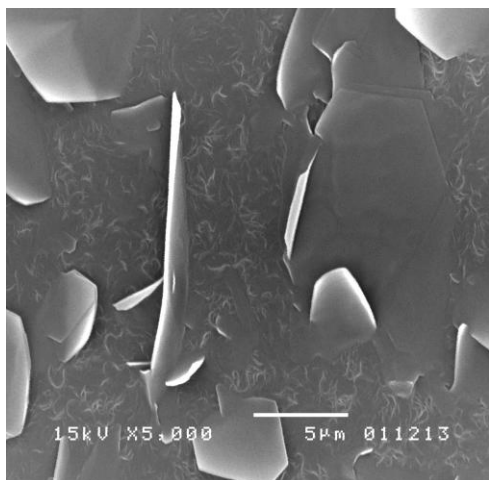
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

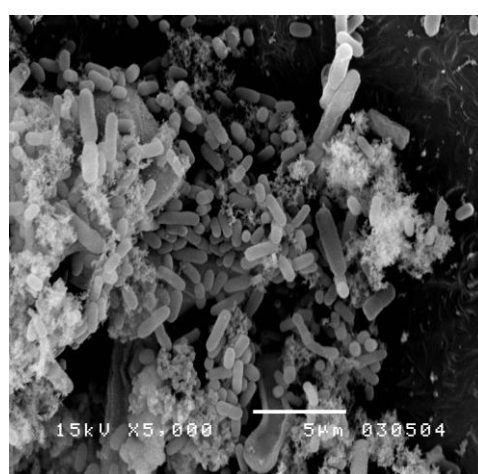
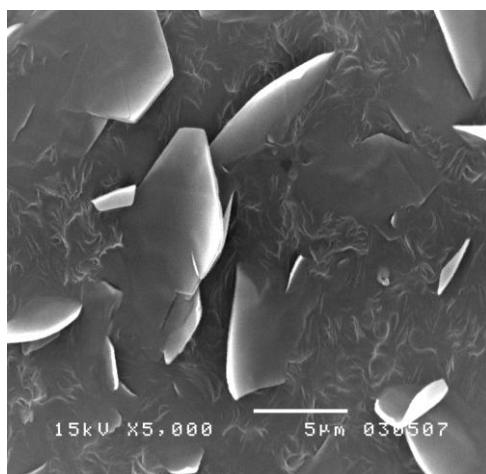
4.1 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

4.1.1 การตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 และการเริ่มต้นกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

ในกระบวนการตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 สังเกตพบการเกิดขึ้นของไบโอฟิล์มที่ผิวของวัสดุตรึง BCN-009 หลังจากเริ่มต้นตรึงเชื้อได้ 144 ชั่วโมง ในช่วงเวลาดังกล่าวพบการเพิ่มขึ้นของไบโอฟิล์มและฟองก๊าซซึ่งคาดว่าเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณผิวของวัสดุตรึง BCN-009 นอกจากนี้ยังได้กลิ่นของกรดบิวทิริกเกิดขึ้น จากการเปรียบเทียบวัสดุตรึงโดยใช้ SEM พบว่าวัสดุตรึง BCN-009 ที่ไม่ผ่านการตรึงมีผิวขรุขระเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างจากวัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเชื้อซึ่งพบจุลินทรีย์กระจายตัวบนผิวเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.1 และ รูปที่ 4.2) โดยลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์มีรูปร่างเป็นแท่งต่อกันเป็นสายยาวและเจริญเติบโตเป็นชั้นๆ ลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลการทดลองงานวิจัยของ Suratago (2009) กับ Wuttisarnsukit (2009) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในการตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์จะมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวบนผิวของวัสดุตรึงหนาแน่นกว่าการใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และจากตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ 4.2 พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์จะมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึง และความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยมากกว่าการใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเช่นกัน จึงส่งผลให้สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้มากกว่า จากนั้นทำการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.^{-1} ในระบบแบบต่อเนื่อง จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอลและสาร 1,3-โพรเพนไดออล พบว่าระบบเข้าสู่สภาวะคงตัวเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชม. ทั้งกรณีของกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล



รูปที่ 4.1 ผิวของวัสดุtring BCN-009 ที่ไม่ผ่านการtringเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 (ซ้าย) และผิวของวัสดุtring BCN-009 ที่มีการtringเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ในกระบวนการหมัก



รูปที่ 4.2 ผิวของวัสดุtring BCN-009 ที่ไม่ผ่านการtringเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 (ซ้าย) และผิวของวัสดุtring BCN-009 ที่มีการtringเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 โดยใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในกระบวนการหมัก

4.1.2 กระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยระบบแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักกลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 บนวัสดุตรึง BCN-009 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ในระบบแบบต่อเนื่อง ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าที่ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ชม⁻¹ เนื่องจากงานวิจัยของ Wuttisarnsukit (2009) ได้ศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าในช่วง 20-60 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เนื่องมาจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นได้ และเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้สูงสุด ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Suratago et al., 2009 Gunzel et al., 1991; Pullsirisombat, 2007) ได้ทำการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 80-100 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่งผลต่อเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 33 องศาเซลเซียส และสามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในสภาวะเหมาะสมที่ 6.97 – 7.0 ตลอดการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่งซึ่งพบการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 6.5 บริเวณส่วนกลางและบนของคอลัมน์ ซึ่งทำให้อัตราการใช้กลีเซอรอลของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ลดลง (Suratago, 2009) จากงานวิจัยของ Gunzel et al. (1991) พบว่าในกระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จำเป็นต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 7.0 และในปี 2008 Mongkolkajit et al. ได้ทำการหมักกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่งที่ไม่มีระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และตรึงเซลล์จุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ไว้ใน Alumina Alginate Gel โดยพบว่าการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จะถูกยับยั้งเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.5 สำหรับในวิทยานิพนธ์นี้ซึ่งใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ที่มีกลไกในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำให้สามารถควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ตลอดการทดลองและมีระบบในการปั่นกวทำให้สามารถกระจายสารละลายบัฟเฟอร์ให้ทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ (เช่น กรดบิวทิริกและ กรดอะซิติก) ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลได้อย่างทั่วถึง

ตารางที่ 4.3 สรุปผลการดำเนินการหมักกลีเซอรอลบริสุทธ์แบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยใช้กลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่มากที่สุดเท่ากับ 35.86 ± 0.19 , 33.36 ± 0.26 , 31.15 ± 0.2 และ 27.95 ± 0.17 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ 12.85 ± 0.33 , 14.81 ± 0.22 , 16.00 ± 0.35 และ

17.10±0.25 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ซม.⁻¹ ตามลำดับ ดังนั้นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ซม.⁻¹ สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ปริมาณมากที่สุด ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Papanikolaou et al. (2008) ซึ่งทำการศึกษากิจกรรมหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์โดยใช้แบคทีเรีย *C. butyricum* F2b ในระบบแบบต่อเนื่อง โดยผลที่ได้รับในงานวิจัยนี้สามารถอธิบายได้ดังนี้ อัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการไหลของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ไหลออกอย่างรวดเร็ว ทำให้แบคทีเรียที่ถูกต้องไม่สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้อย่างเพียงพอ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ปริมาณน้อย ในส่วนของอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์และผลได้ของผลิตภัณฑ์ พบว่ามีค่าสูงสุดที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ซม.⁻¹ เช่นกัน

ตารางที่ 4.4 ได้สรุปผลการดำเนินการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ ที่มีความเข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่สถานะคงตัวพบว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มากที่สุดเท่ากับ 31.65±0.44, 28.02±0.70, 25.09±0.44 และ 20.37±0.56 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ 15.09±0.40, 17.91±0.46, 21.15±0.69 และ 25.54±1.12 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ซม.⁻¹ ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ซม.⁻¹ สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ความเข้มข้นสูงสุด และมีอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์และผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าสูงสุดเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองเมื่อทำการหมักโดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จะเห็นว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ กรดอะซิติกและกรดบิวทริกมีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.3 และ ตารางที่ 4.4) สามารถอธิบายได้จากการที่กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีสิ่งเจือปนที่ติดอยู่ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้ความสามารถในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลงด้วย ทั้งนี้การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จากการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gonzalez-Pajuelo et al. (2004) ที่ได้ศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65%, 87% และ 92% เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ในระบบแบบกะ โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* VPI 3266 พบว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 92% และ 87% จะมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกัน ส่วนกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65% จุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ในปี 2006 Ying Mu et al. ได้ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบการผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์โดยแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* จากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99% กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70% จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85% จาก

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่า กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99% ให้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลลดลง โดยคาดว่าเป็นผลจากสิ่งเจือปนที่อยู่ในกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เช่น เมทานอล เป็นต้น และยังคงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wuttisarnsukit (2009) ได้ศึกษาชนิดและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลมีผลต่อความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 จากผลการทดลองสรุปว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมและกลีเซอรอลที่มีเมทานอลปนเปื้อนซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8, 2, 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นของเมทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้น้อยลง

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของ *C. butyricum* DSM 5431 เมื่อเสร็จสิ้นจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในระบบแบบต่อเนื่อง

	ความเข้มข้นของเซลล์
เซลล์ที่ถูกตรึง (กรัมต่อลิตร)	19
เซลล์แขวนลอย (กรัมต่อลิตร)	1

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของ *C. butyricum* DSM 5431 เมื่อเสร็จสิ้นจากการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในระบบแบบต่อเนื่อง

	ความเข้มข้นของเซลล์
เซลล์ที่ถูกตรึง (กรัมต่อลิตร)	15
เซลล์แขวนลอย (กรัมต่อลิตร)	0.90

ตารางที่ 4.3 สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลโดยทำการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุตั้ง BCN-009

ตัวแปร	อัตราการเจือจาง (ชม. ⁻¹)			
	0.3	0.4	0.5	0.6
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	60	60	60	60
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	12.85±0.33	14.81±0.22	16.00±0.35	17.10±0.25
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร)	35.86±0.19	33.36±0.26	31.15±0.2	27.95±0.17
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	1.26±0.05	1.17±0.15	1±0.01	0.98±0.01
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	7.93±0.18	7.5±0.18	7.01±0.03	6.93±0.02
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	10.76±0.06	13.34±0.10	15.58±0.10	16.77±0.1
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอล	0.76	0.74	0.71	0.65

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลโดยทำการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดูดซับ BCN-009

ตัวแปร	อัตราการเจือจาง (ชม. ⁻¹)			
	0.3	0.4	0.5	0.6
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	60	60	60	60
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	15.09±0.40	17.91±0.46	21.15±0.69	25.54±1.12
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร)	31.65±0.44	28.02±0.70	25.09±0.44	20.37±0.56
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	1.08±0.04	0.95±0.05	0.89±0.01	0.81±0.05
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	6.10±0.61	5.58±0.53	5.60±0.72	5.11±0.64
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	9.49±0.13	11.21±0.28	12.54±0.22	12.22±0.34
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอล	0.70	0.67	0.65	0.59

ตารางที่ 4.5 สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพน ไดออลซึ่งเปรียบเทียบระหว่างงานวิจัยปัจจุบันและงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งทำการตรึงเซลล์และชนิดของการหมักด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

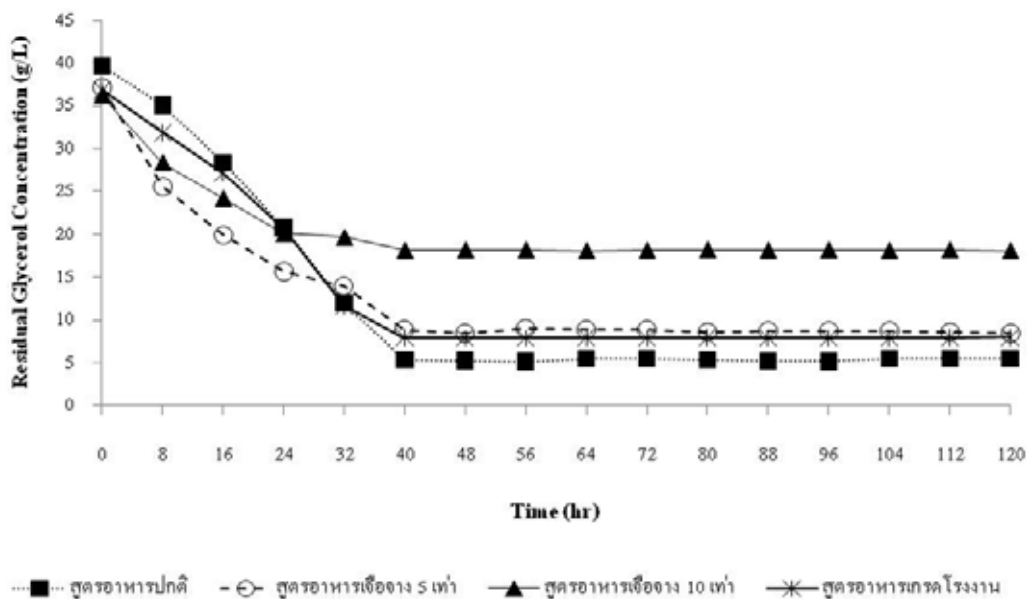
รายการอ้างอิง	จุลินทรีย์	ความเข้มข้น		อัตราการผลิต ผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง) / ผลได้ของผลิตภัณฑ์	วัสดุที่ใช้ในการ ตรึง	ชนิดของการ หมัก
		กลีเซอรอล เข้า / กลีเซอรอล ที่เหลือ (กรัมต่อ ลิตร)	1,3-โพรเพน ไดออล (กรัม ต่อลิตร)			
Current work	<i>C. butyricum</i>	60/12.82	35.95	10.76/ 0.76	BCN-009	Continues fermentation
	DSM5431	60/ 15.09	31.65	9.49/ 0.70	BCN-009	
Suratago, 2009	<i>C. butyricum</i>	60/21.23	29.08	6.11/ 0.75	ไยบวบ	Continues
	DSM5431	60/20.75	22.68	4.76/ 0.58	BCN-009	fermentation
Pullsirisombat, 2007	<i>C. butyricum</i>	80/47.71	15.5	0.48	Υ-อะลูมินา	Continues
	DSM5431				(Υ-Al ₂ O ₃) เจล	fermentation
Zhao et al., 2006	<i>K. pneumoniae</i>	40/38.3	13.6	4.49/ 0.43	NaCS/ PDMDAAC	Continues fermentation
Pflugmacher and Gottschalk, 1994	<i>C. freundii</i>	36.8/2.3	16.34	8.2/ 0.57	โพลียูรีเทน คัดแปลง	Continues fermentation

4.2 ผลของการเจือจางสูตรอาหารต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกอลและผลของการปรับความบริสุทธิ์ของสารเคมีต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกอล โดยระบบแบบกะ

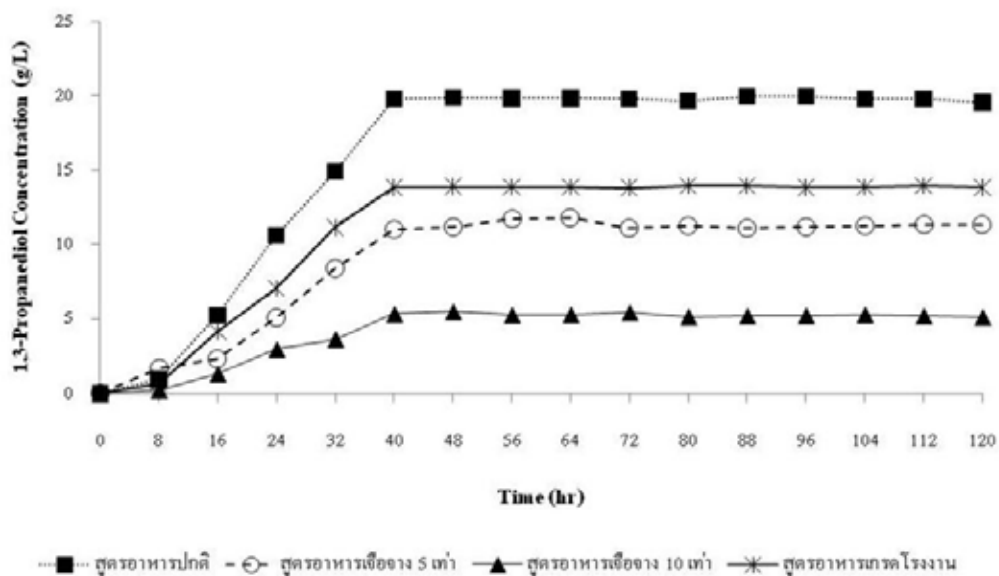
การทดลองในส่วนนี้ศึกษาความเป็นไปได้ในการลดต้นทุนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกอล โดยลดความเข้มข้นของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเจือจางจากสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิมและการปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน (Industrial Reagent) ในการทำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองจะควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-40 ชม. และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. ทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 4.3) สำหรับผลการทดลองในส่วนของความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก (รูปที่ 4.4 ถึง รูปที่ 4.6) พบว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกอลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0-40 ชม. และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. ทุกชุดการทดลอง ทั้งนี้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกอลทุกชุดการทดลองเช่นกัน โดยความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกอลเท่ากับ 19.81 ± 0.13 , 11.32 ± 0.26 , 5.28 ± 0.11 และ 13.88 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ 5.36 ± 0.14 , 8.72 ± 0.15 , 18.12 ± 0.05 และ 7.93 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเท่ากับ 0.82 ± 0.02 , 0.67 ± 0.01 , 0.54 ± 0.02 และ 0.72 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกเท่ากับ 4.78 ± 0.13 , 3.87 ± 0.04 , 1.87 ± 0.04 และ 4.16 ± 0.03 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรปกติ โดยทำการเจือจางสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิมและโดยการปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน ตามลำดับ จากรูปที่ 4.7 พบว่ามีการลดลงของเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีของสูตรอาหารปกติเมื่อเวลามากกว่า 56 ชม. ซึ่งคล้ายกับกรณีของความเข้มข้นของเซลล์จากการปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีที่มีการเจือจางสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิม โดยความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 4.6, 2.24, 0.77 และ 3.22 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรปกติ โดยทำการเจือจางสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิมและโดยการปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน ตามลำดับ จากตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกอล ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ลดลงเมื่อทำการเจือจางจากสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิม และเมื่อปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารอาหารมีไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในกรณีที่มีการเจือจาง และความบริสุทธิ์ของสารอาหารที่ใช้สารเคมี

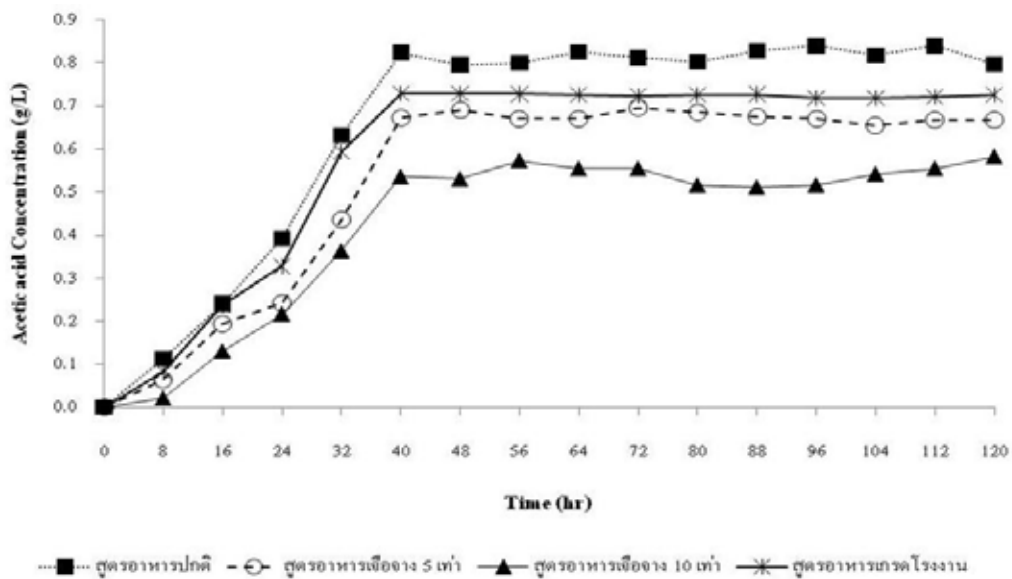
กรดโรงงาน ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ และผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Monot et al.(1982) ได้รายงานว่าวิตามินและแร่ธาตุ มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นจึงควรจะได้รับวิตามินและแร่ธาตุในปริมาณที่เหมาะสม หากได้รับมากหรือน้อยเกินไปจะทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ และการผลิตผลิตภัณฑ์หลัก



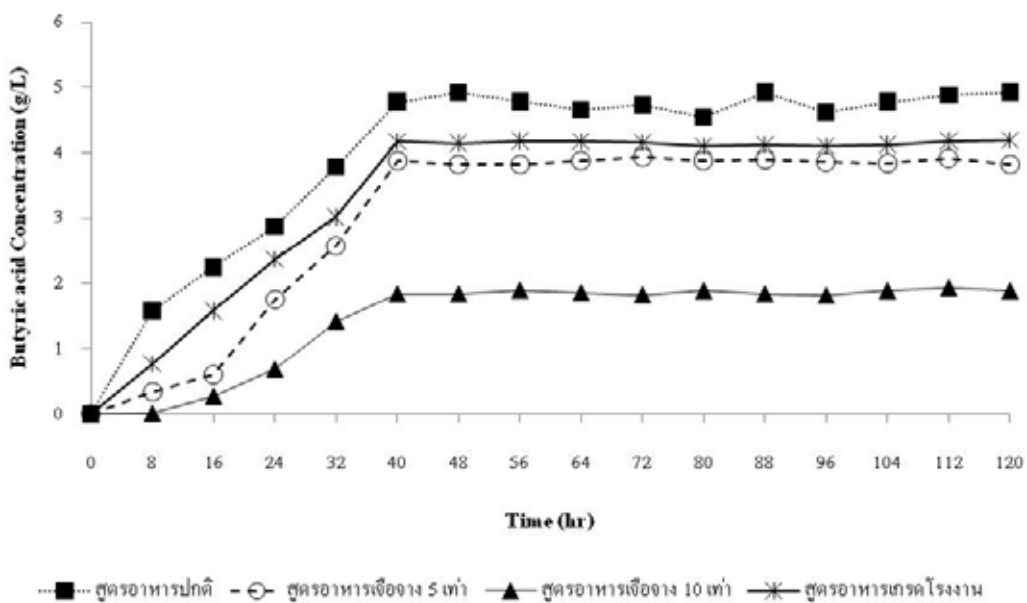
รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน



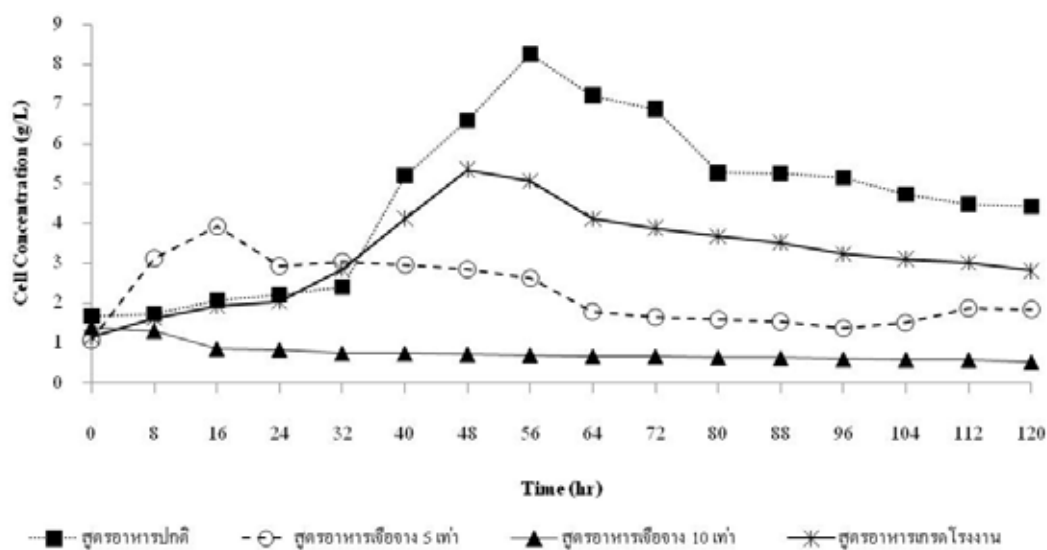
รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน



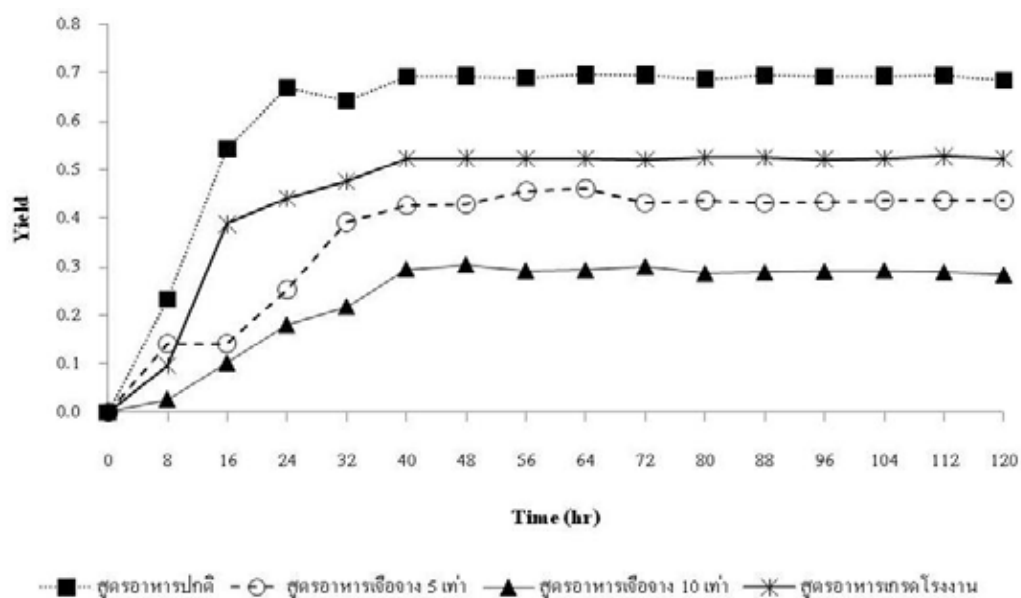
รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน



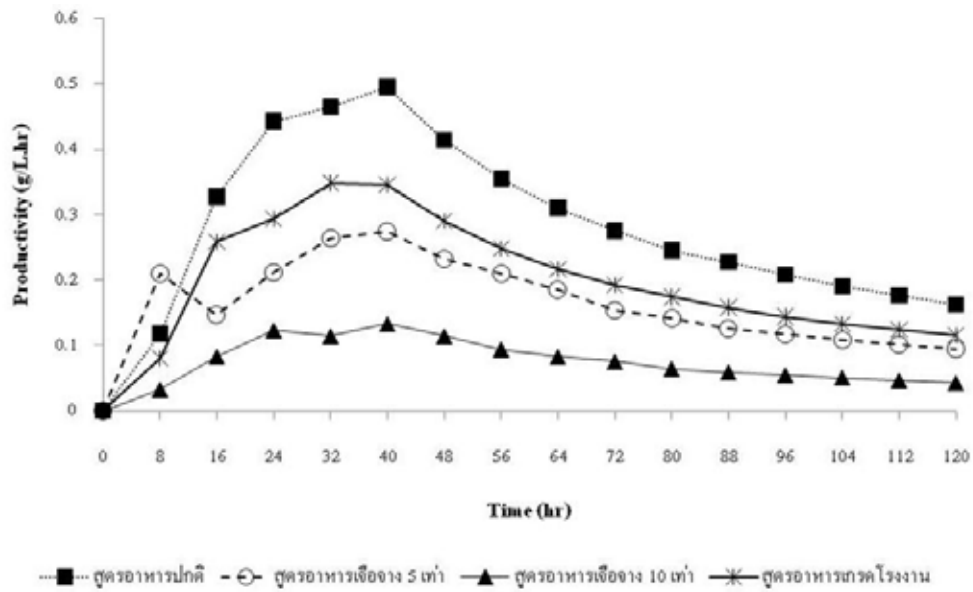
รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน



รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน



รูปที่ 4.8 ผลได้ของสาร 1,3-โพเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารเกรดโรงงาน



รูปที่ 4.9 อัตราการผลิตของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารปกติ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า และสูตรอาหารกรดโรงงาน

ตารางที่ 4.6 สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้ระบบแบบกะ โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน

ตัวแปร	สูตรอาหาร			
		เจือจาง	เจือจาง	เกรด
	ปกติ	5 เท่า	10 เท่า	โรงงาน
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	40	40	40	40
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	5.36±0.14	8.72±0.15	18.12±0.05	7.93±0.03
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร)	19.81±0.13	11.32±0.26	5.28±0.11	13.88±0.05
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.82±0.02	0.67±0.01	0.54±0.02	0.72±0.01
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	4.78±0.13	3.87±0.04	1.87±0.04	4.16±0.03
ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	4.60	2.24	0.77	3.22
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.29±0.12	0.17±0.06	0.08±0.03	0.21±0.09
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอล	0.69	0.44	0.29	0.52

4.3 ผลของการศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสาร1,3-โพรเพนไดออล

การทดลองในส่วนนี้ศึกษาแนวทางการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนในการผลิต โดยจะเน้นไปที่แหล่งไนโตรเจน เนื่องจากสารสกัดยีสต์ซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีราคาสูง ดังนั้นการใช้แหล่งไนโตรเจนประเภทอื่นทดแทนสารสกัดยีสต์หรือการปรับสัดส่วนของปริมาณสารอินทรีย์ในโตรเจนต่อสารอนินทรีย์ในโตรเจนในสูตรอาหาร ก็อาจจะทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนของสารเคมีได้

4.3.1 ผลของการเปลี่ยนประเภทของแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาการเปลี่ยนประเภทของแหล่งไนโตรเจนทำได้โดยการเปลี่ยนประเภทของแหล่งไนโตรเจน จากเดิมซึ่งใช้สารสกัดยีสต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร (0.1097 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) ไปเป็นชนิดอื่น ได้แก่ ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต ในการทดลองจะควบคุมปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นให้คงที่ และจะใช้ยูเรียเท่ากับ 0.235 กรัมต่อลิตร ใช้แอลไลซีน เท่ากับ 0.715 กรัมต่อลิตร ใช้กากผงชูรสเท่ากับ 2.11 กรัมต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 4.517 กรัมต่อลิตร ซึ่งสารดังกล่าวทุกชนิดจะมีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1097 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตรเท่าเดิม การทดลองทั้งสี่ส่วนจะใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 0-40 ชม. และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. (รูปที่ 4.10) สำหรับผลการทดลองในส่วนของความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล กรดอะซิติก และกรดบิวทริก (รูปที่ 4.11 ถึง รูปที่ 4.13) พบว่า ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 0-40 ชม. และคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. ทั้งนี้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดบิวทริกมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล โดยความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 19.81 ± 0.13 , 12.79 ± 0.21 , 7.03 ± 0.42 , 10.15 ± 0.09 และ 5.67 ± 0.62 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ 5.36 ± 0.14 , 9.16 ± 0.53 , 11.39 ± 0.56 , 10.45 ± 0.40 และ 15.23 ± 0.41 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเท่ากับ 0.82 ± 0.02 , 0.70 ± 0.03 , 0.55 ± 0.02 , 0.66 ± 0.03 และ 0.50 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวทริกเท่ากับ 4.78 ± 0.14 , 3.96 ± 0.07 , 2.94 ± 0.009 , 3.69 ± 0.14 และ 2.46 ± 0.12 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ จากรูปที่ 4.14 พบว่ามีการลดลงของเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีของการใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อเวลามากกว่า 56 ชม. ซึ่งคล้ายกับกรณีของการใช้ยูเรียและแอลไลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีที่ใช้

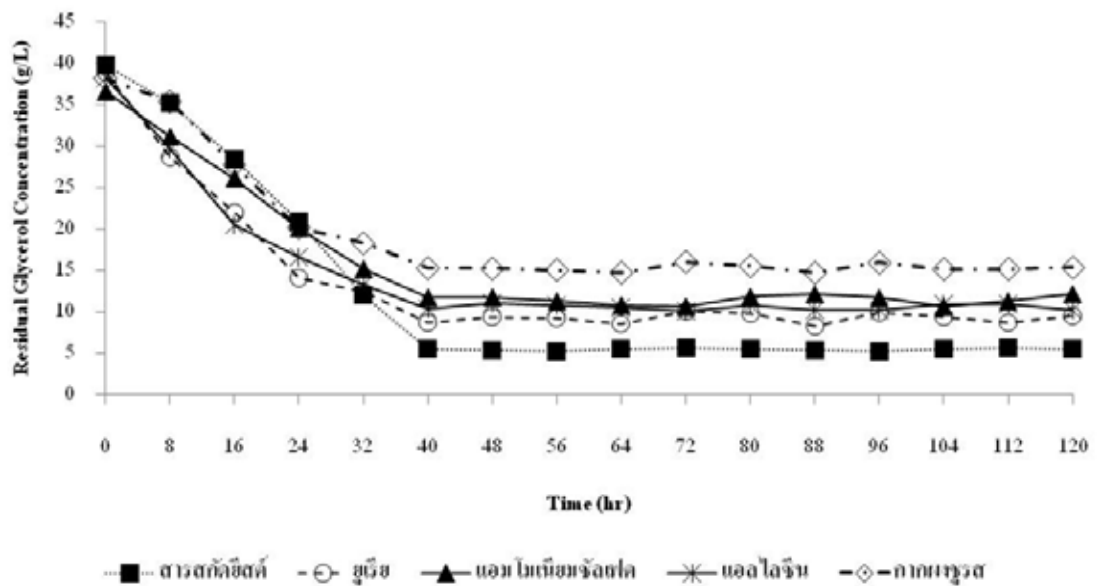
แอมโมเนียมซัลเฟตและกากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 4.6, 3.14, 1.59, 2.70 และ 1.48 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ จากตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลงเมื่อใช้ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนสารสกัดยีสต์ อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ไม่สามารถที่จะนำสารอาหารที่จำเป็นมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ หรืออาจกล่าวได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมีสารอาหารและวิตามินไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้แหล่งไนโตรเจนไม่เหมาะสมและเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากสารสกัดยีสต์มีส่วนประกอบของวิตามิน ได้แก่ ไบโอติน (Biotin) และพาราอะมิโนเบนโซอิก (para-aminobenzoic acid) ซึ่งเป็นวิตามินที่เชื้อจุลินทรีย์มีความจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโต (สมใจ ศิริโชค, 2550) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xiaoyi et al. (2008) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนจากอาหารที่แตกต่างกันในการผลิตไฮโดรเจน โดยเชื้อ *C. butylicum* W5 พบว่าสามารถผลิตไฮโดรเจนได้โดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากอาหารที่มาจากทั้งวัตถุดิบที่สดใหม่และกากของเสีย โดยที่สารสกัดยีสต์สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดสำหรับเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดี อีกทั้งยังสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรท นอกจากนี้ในปี 2001 Lay และคณะ รายงานว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนคือ สารสกัดยีสต์ ทรีปโทน และเปปโทน ในกระบวนการหมักโดยเชื้อ *C. acetobutylicum* NCIMB 13357 ในการผลิตไฮโดรเจน จะทำให้สามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงขึ้น โดยที่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ที่สามารถทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดี พร้อมทั้งยังส่งเสริมให้อัตราการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน

4.3.2 ผลของการปรับสัดส่วนของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารอินทรีย์และไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์

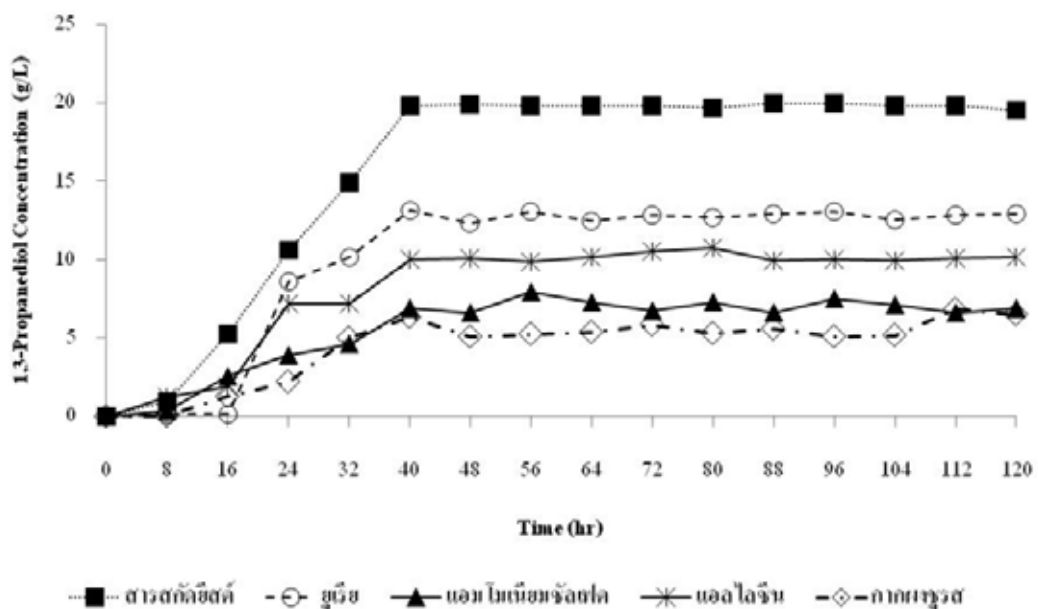
จากเดิมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้สารสกัดยีสต์ 0.1097 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.8485 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นค่าสัดส่วนไนโตรเจนระหว่างสารสกัดยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 ในการทดลองส่วนนี้จะทำการปรับสัดส่วนใหม่ไปเป็น 1:11 (0.0823 : 0.8759 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) 1:16 (0.0549 : 0.9033 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) และ 1:34 (0.0274 : 0.9308 กรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) ตามลำดับ โดยจะควบคุมปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.9582 กรัม-ไนโตรเจน ทั้งนี้เหตุผลในการปรับปริมาณสารสกัดยีสต์เป็นเพราะสารสกัดยีสต์มีราคาสูงกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 0-40 ชม. และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. (รูปที่ 4.17) สำหรับผลการทดลองในส่วนของความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก (รูปที่ 4.18 ถึง รูปที่ 4.20) พบว่า ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 0-40 ชม. และคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. ทั้งนี้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดบิวทิริก มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล โดยความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 19.81 ± 0.13 , 15.80 ± 0.15 , 10.79 ± 0.21 และ 9.68 ± 0.08 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ 5.36 ± 0.14 , 7.95 ± 0.14 , 9.03 ± 0.63 และ 10.30 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเท่ากับ 0.82 ± 0.02 , 0.74 ± 0.03 , 0.65 ± 0.02 และ 0.64 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกเท่ากับ 4.78 ± 0.13 , 4.09 ± 0.06 , 3.85 ± 0.11 และ 3.26 ± 0.08 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8, 1:11, 1:16, และ 1:34 ตามลำดับ จากรูปที่ 4.21 พบว่ามีการลดลงของเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีของการใช้ค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 เมื่อเวลามากกว่า 56 ชม. ซึ่งคล้ายกับกรณีของการใช้ค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11 และไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ในกรณีที่ใช้ค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:16 และ 1:34 โดยความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 4.60, 3.36, 1.87 และ 1.48 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8, 1:11, 1:16, และ 1:34 ตามลำดับ จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลลดลงเมื่อค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้น อาจเนื่องจากเมื่อค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้นส่งผลให้สารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนมีค่าน้อยลง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลลดลง ในปี 2550 สมใจ ศิริโชค ได้กล่าวไว้ว่าแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็น

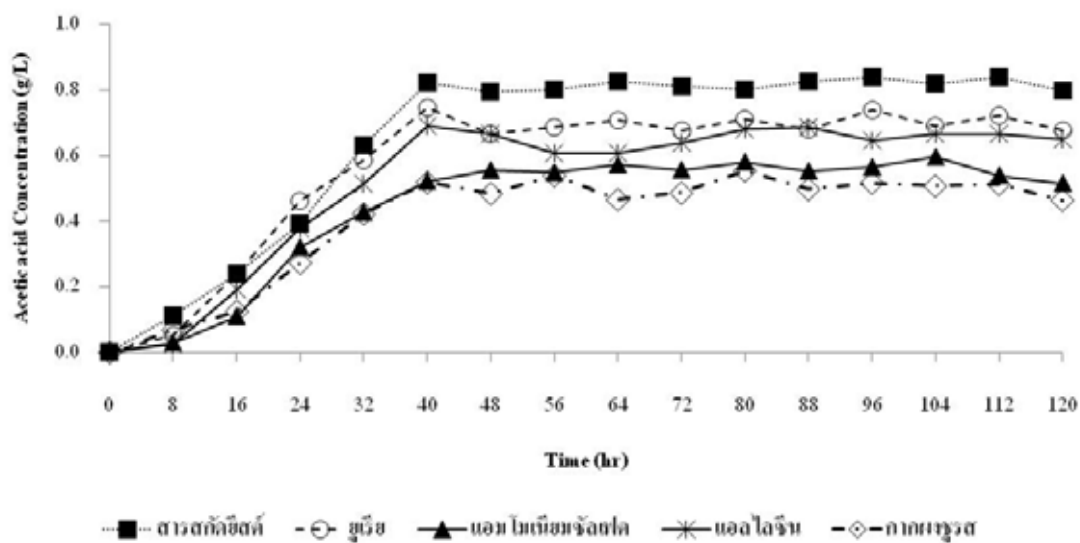
สารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ในระดับหนึ่ง แต่ไม่ดีเพียงพอที่จะสามารถสนับสนุนกระบวนการสร้างผลิตภัณฑ์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งอินทรีย์ในโตรเจนจะพบว่าจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า และสามารถที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า เนื่องจากแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนเป็นอะตอมที่มีทั้งไนโตรเจน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งโปรตีนเป็นโมเลกุลที่ประกอบเป็นโครงสร้างของเซลล์หรือเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของเซลล์ และกรดนิวคลีอิกเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohd et al. (2008) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไฮโดรเจน โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* NCIMB 13357 เมื่อใช้ สารสกัดยีสต์ เปปโทน และทริปโทน ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากันในสารอาหาร พบว่าสารสกัดยีสต์สามารถทำให้เซลล์จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงกว่าการใช้เปปโทน และทริปโทน แต่เมื่อใช้เกลือของแอมโมเนียม ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน มาแทนแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน ทำให้เซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ช้าลง และสามารถผลิตไฮโดรเจนได้ต่ำ เมื่อเทียบกับแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน แต่ในงานวิจัยของ Himmi et al. (1999) พบว่าการใช้สารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในโตรเจนในอาหารเลี้ยง สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ในปริมาณที่สูง (61.15 กรัมต่อลิตร) และมีผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออลสูง (0.66) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดยีสต์ และแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกันจะทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และงานวิจัยของ Welsh et al. (1986) ได้ศึกษาผลของแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน และแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนต่อกระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 พบว่าการใช้แหล่งอินทรีย์ในโตรเจนร่วมกับแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน ในกระบวนการหมักแบบกะจะส่งผลให้เจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ และการผลิตตัวทำละลายเพิ่มสูงขึ้น แต่สารสกัดยีสต์ที่นำมาใช้นั้นมีราคาแพง ดังนั้นจึงควรศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ได้จากวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาทดแทนในสูตรอาหารร่วมกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในการทดลองต่อไป



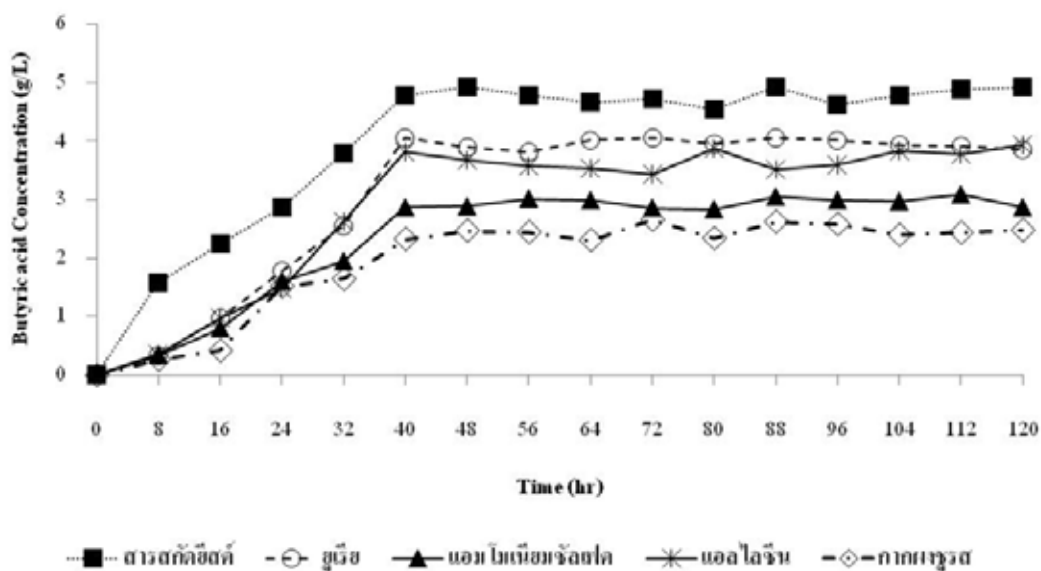
รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลอิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



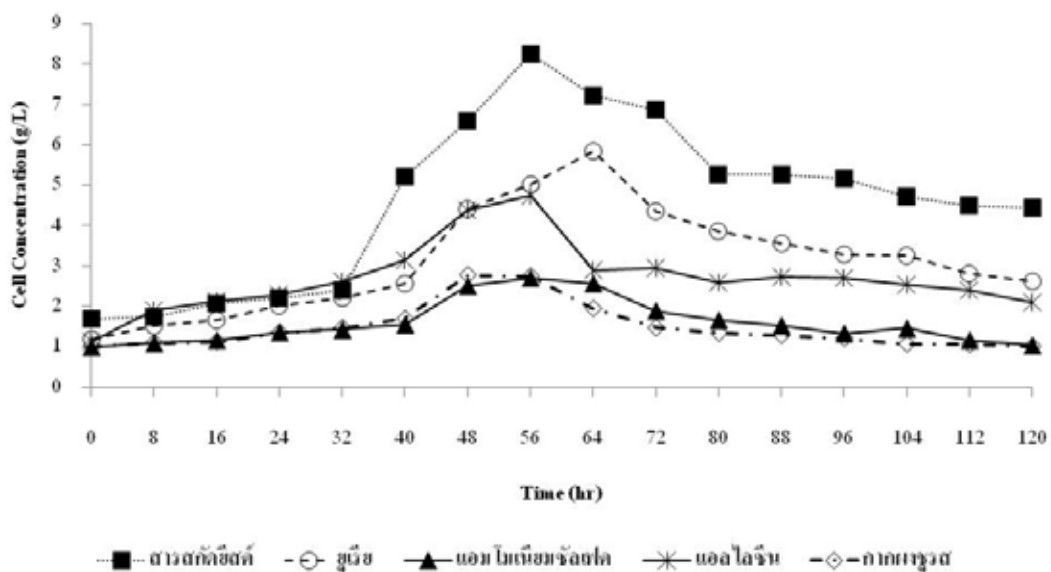
รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลอิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



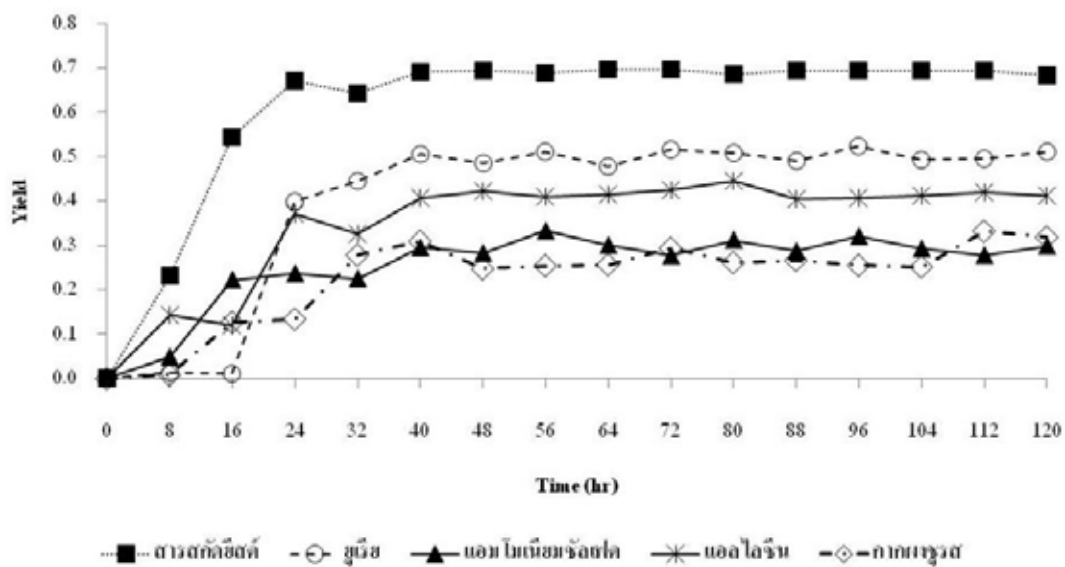
รูปที่ 4.12 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลจิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



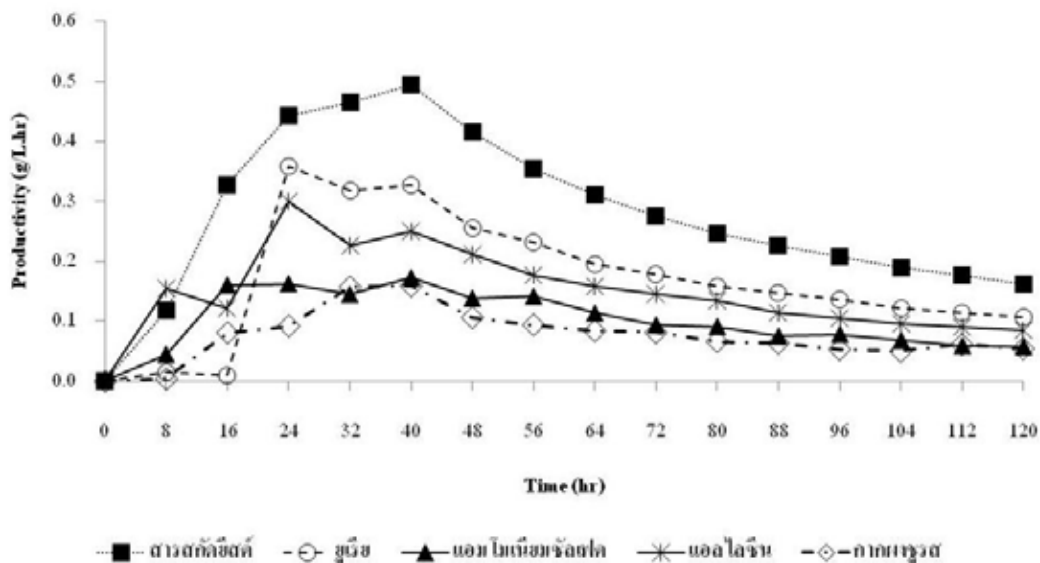
รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นของกรดบิวทีริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลจิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



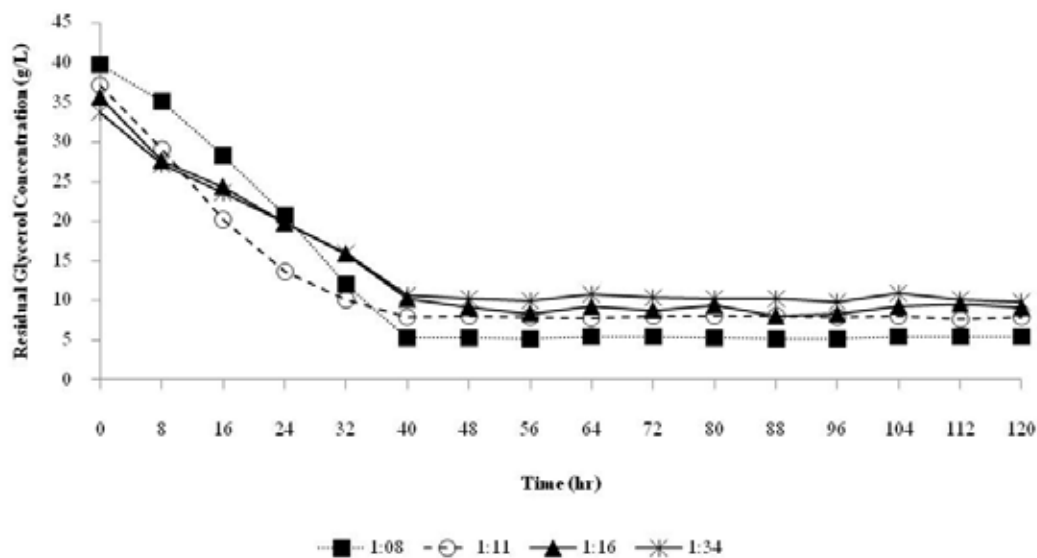
รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลอิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



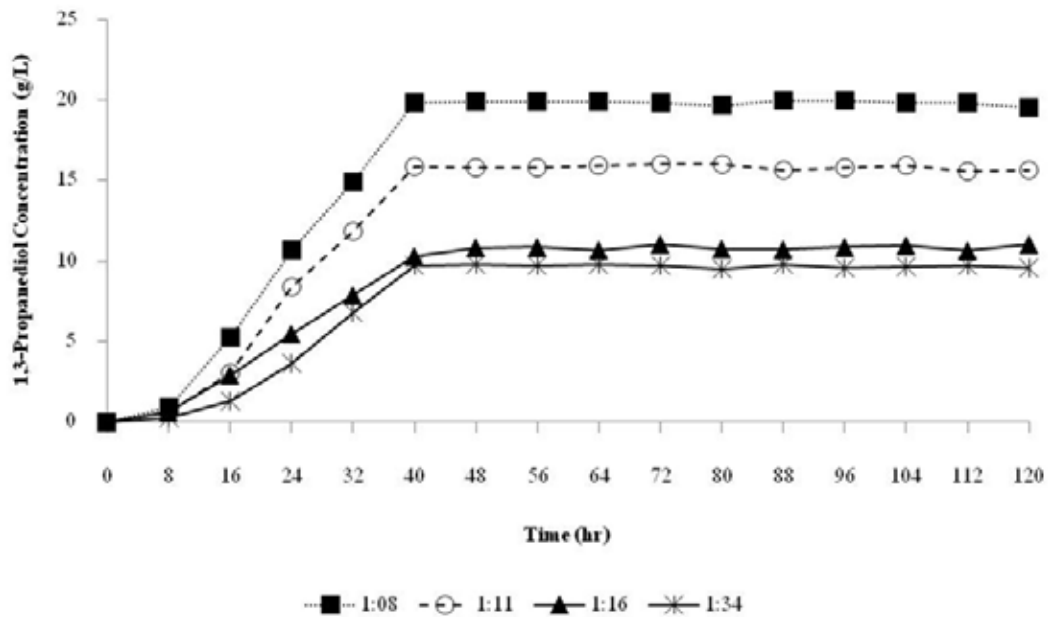
รูปที่ 4.15 ผลได้ของสาร 1,3-โพเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลอิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



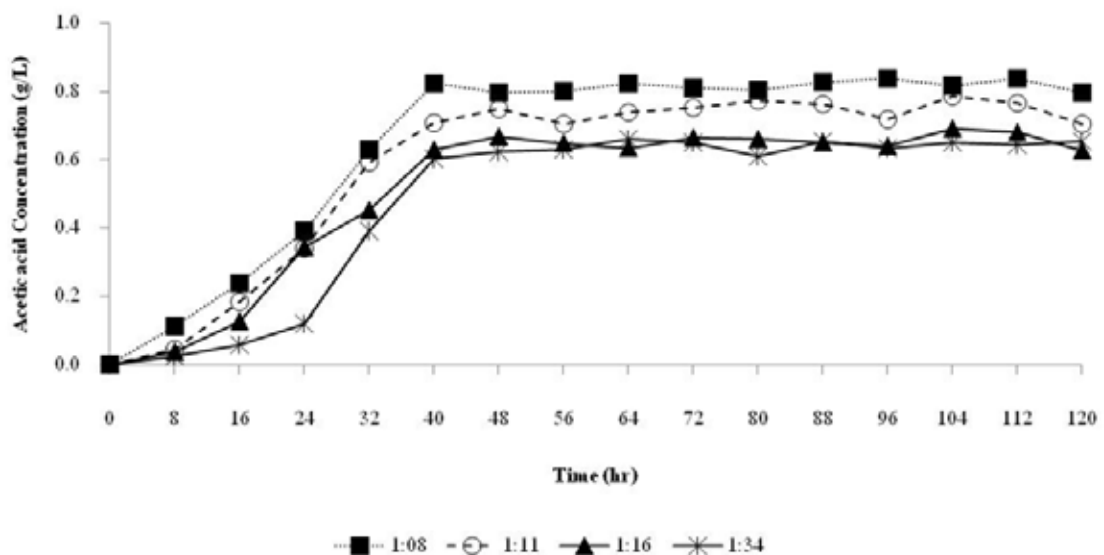
รูปที่ 4.16 อัตราการผลิตของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต แอลโลไซซิน และกากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน



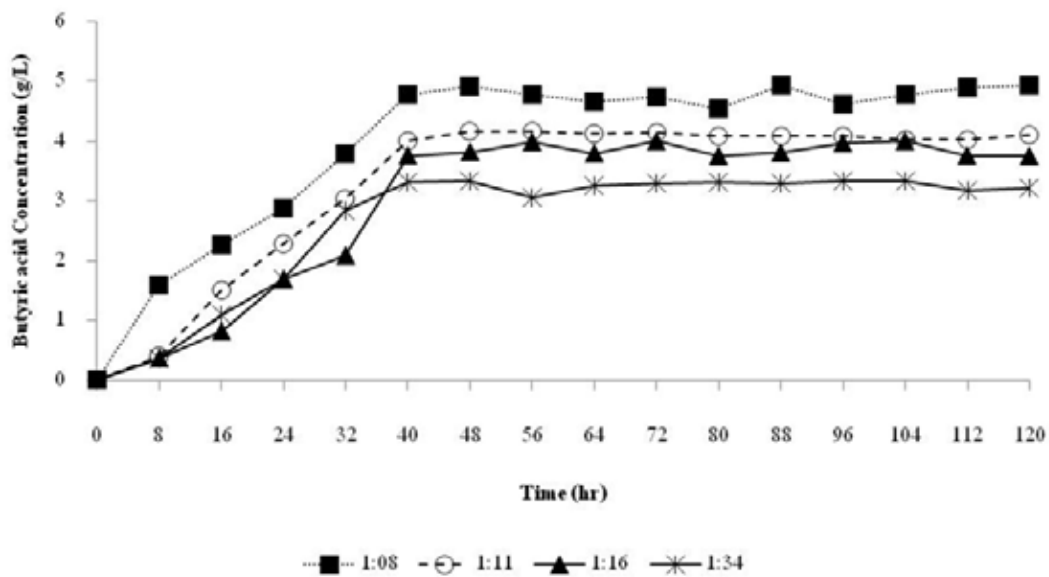
รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน



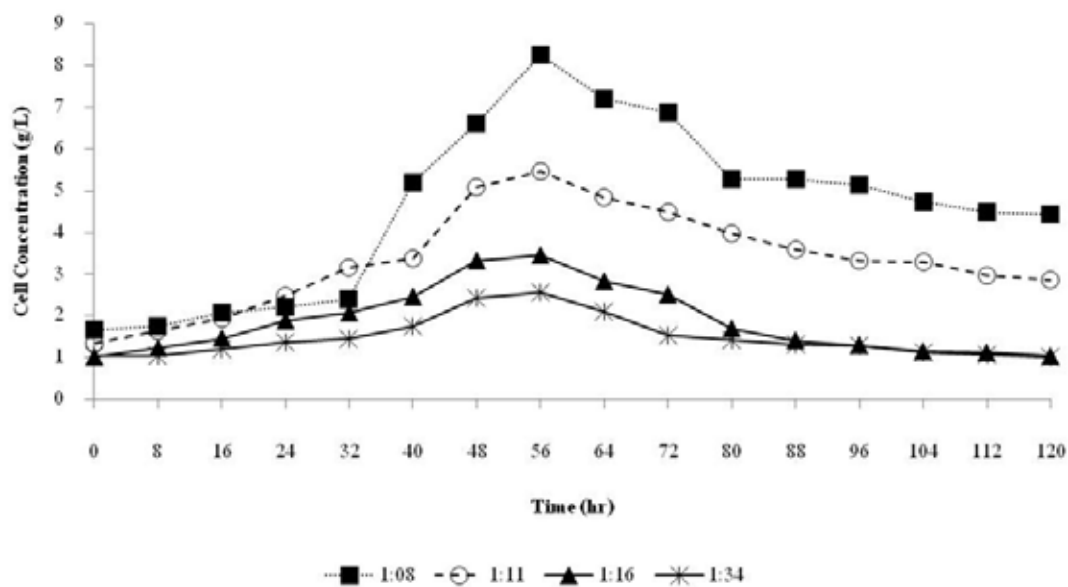
รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน



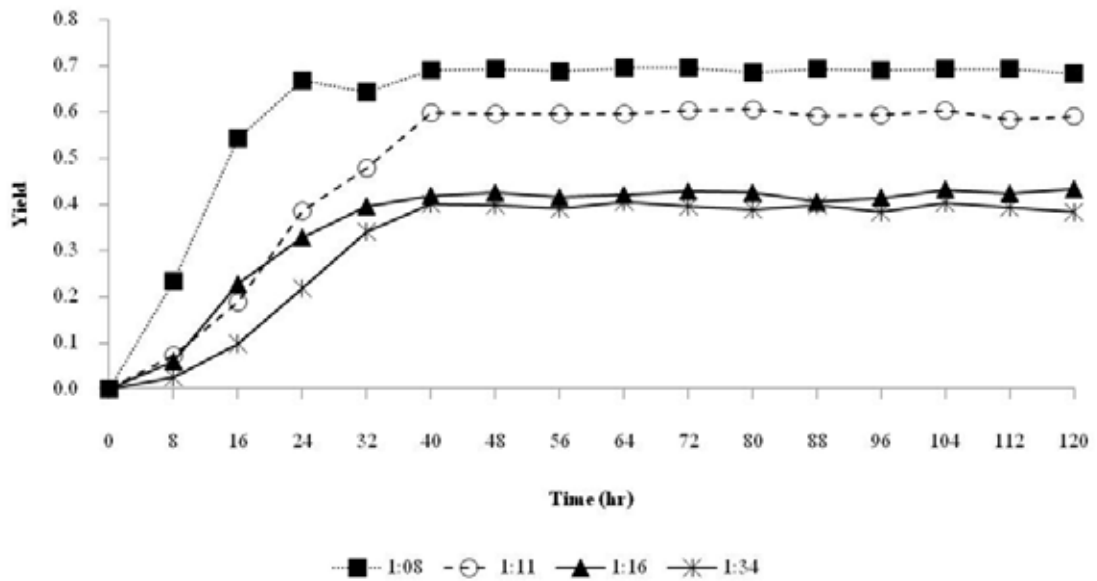
รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน



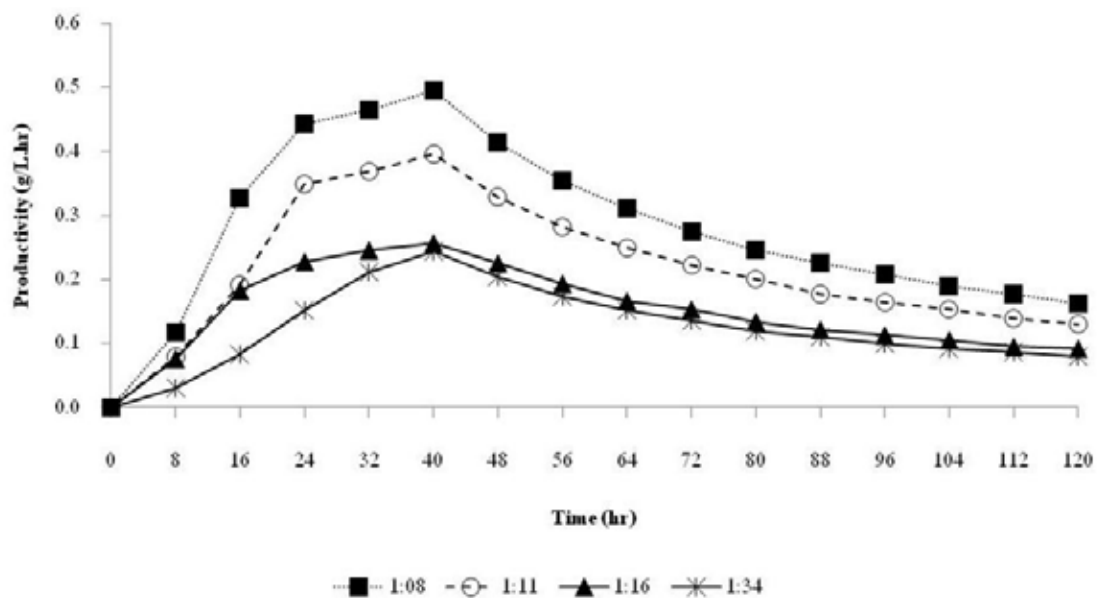
รูปที่ 4.20 ความเข้มข้นของกรดบิวทีริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.22 ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.23 อัตราการผลิตของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 1:11 1:16 1:34 เป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 4.7 สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้ระบบแบบกะ โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน

ตัวแปร	แหล่งไนโตรเจน				
	สารสกัด		แอมโมเนียม		
	ยีสต์	ยูเรีย	ซัลเฟต	แอลไลซีน	กากผงชูรส
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	40	40	40	40	40
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	5.36±0.14	9.16±0.53	11.39±0.56	10.45±0.40	15.23±0.41
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร)	19.81±0.13	12.79±0.21	7.03±0.42	10.15±0.09	5.67±0.62
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.82±0.02	0.70±0.03	0.55±0.02	0.66±0.03	0.50±0.03
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	4.78±0.14	3.96±0.07	2.94±0.009	3.69±0.14	2.46±0.12
ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	4.60	3.14	1.59	2.70	1.48
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.31±0.11	0.19±0.10	0.11±0.04	0.16±0.07	0.08±0.04
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอล	0.69	0.50	0.30	0.42	0.28

ตารางที่ 4.8 สรุปผลการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้ระบบแบบกะโดยใช้สัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตที่แตกต่างกัน

ตัวแปร	ค่าสัดส่วนสารสกัดยีสต์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟต			
	1:8	1:11	1:16	1:34
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	40	40	40	40
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	5.36±0.14	7.95±0.14	9.03±0.63	10.30±0.52
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร)	19.81±0.13	15.80±0.15	10.79±0.21	9.68±0.08
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.82±0.02	0.74±0.03	0.65±0.02	0.64±0.02
ความเข้มข้นกรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	4.78±0.13	4.09±0.06	3.85±0.11	3.26±0.08
ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	4.60	3.36	1.87	1.48
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.29±0.12	0.23±0.10	0.16±0.06	0.14±0.05
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอล	0.69	0.60	0.42	0.39

จากตารางที่ 4.9 สรุปผลการทดลองที่สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่ดีที่สุด คือการใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ การใช้สูตรอาหารปกติมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1:11 และการใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน เมื่อนำการปรับสูตรอาหารทั้งสามแบบมาคำนวณต้นทุนในการผลิตพบว่า เท่ากับ 1,472 บาทต่อกิโลกรัม เมื่อใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ 635 บาทต่อกิโลกรัม เมื่อใช้สูตรอาหารปกติที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1:11 และ 392 บาทต่อกิโลกรัม เมื่อใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน จะเห็นได้ว่าการใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์มีต้นทุนสูงที่สุดในกระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ ถึงแม้ว่าจะสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ปริมาณสูงที่สุด หากเราปรับสูตรอาหารมาใช้สารเคมีเป็นเกรดโรงงาน และปรับสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1:11 นั้น สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ปริมาณน้อยก็จริง แต่เมื่อนำมาคิดความคุ้มค่าของต้นทุนในการผลิตจริงและราคาขายของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์แล้วการปรับสูตรอาหารมาใช้สารเคมีเป็นเกรดโรงงานจะได้กำไรถึง 513 บาทต่อกิโลกรัม และการปรับสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1:11 ก็ได้กำไร 267 บาทต่อกิโลกรัมเช่นเดียวกัน ในขณะที่การใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ขาดทุน 567 บาทต่อกิโลกรัม ดังนั้นผลการทดลองที่วิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อลดต้นทุนในการผลิต แต่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกระบวนการผลิตที่มีขนาดใหญ่ต่อไป

ตารางที่ 4.9 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

ตัวแปร	การลดค่าใช้จ่ายในการผลิต		
	สูตรอาหารปกติ	สูตรอาหารปกติ	สูตรอาหารปกติ
	เกรดวิเคราะห์	(1:11)	เกรดโรงงาน
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	40	40	40
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	5.36±0.14	7.95±0.14	7.93±0.03
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	19.81±0.13	15.80±0.15	13.88±0.05
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.82±0.02	0.74±0.03	0.72±0.01
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	4.78±0.13	4.09±0.06	4.16±0.03
ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	4.60	3.36	3.22
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.29±0.12	0.23±0.10	0.21±0.09
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	0.69	0.60	0.52
ต้นทุนการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (บาทต่อกิโลกรัม)	1,471.98	635.44	391.93
สรุป: เมื่อขาย 1,3-โพรเพนไดออล 905.10 บาทต่อกิโลกรัม*	- 566.88	+ 269.66	+ 513.17

* บริษัท คูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด (วันที่ 1 มกราคม 2555)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่สามารถควบคุมสภาวะความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่ง ซึ่งพบการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างเข้าสู่ช่วงที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2. ความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลมีผลต่อความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยใช้แบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 จากการทดลองในระบบแบบต่อเนื่องโดยใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล พบว่ามีความเป็นไปได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ โดยความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เท่ากับ 35.86 ± 0.19 และ 31.65 ± 0.44 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลตามลำดับ ซึ่งสารปนเปื้อนในกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอาจส่งผลกระทบต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้น้อยลง

3. ผลการศึกษาการเจือจางจากสูตรอาหารปกติลง 5 และ 10 เท่าของสูตรอาหารเดิม และการปรับเปลี่ยนความบริสุทธิ์ของสารเคมีโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ลดลงเมื่อทำการเจือจางสูตรอาหารหรือเปลี่ยนมาใช้อาหารจากสารเคมีเกรดโรงงาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารอาหารมีไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และความบริสุทธิ์ของสารอาหารที่ใช้

4. ผลการศึกษาการเปลี่ยนประเภทของแหล่งไนโตรเจนจากเดิมซึ่งใช้สารสกัดยีสต์เป็นสารชนิดอื่นๆ ได้แก่ ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ลดลง เมื่อใช้ยูเรีย แอลไลซีน กากผงชูรส และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนสารสกัดยีสต์ ซึ่งเป็นเพราะในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นมีสารอาหารและวิตามินไม่

เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้แหล่งไนโตรเจนไม่เหมาะสมและเพียงพอ สำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์

5. การใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในอัตราส่วนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 เพิ่มขึ้น และจะทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์สูงมากยิ่งขึ้น จากการทดลองในระบบแบบกะเพื่อศึกษาผลของการปรับสัดส่วนของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ และไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ พบว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ลดลงเมื่อค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้น อาจเนื่องจากค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้นส่งผลให้สารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนมีค่าน้อยลง เนื่องจากแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นอะตอมที่มีทั้งไนโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งโปรตีนเป็นโมเลกุลที่ประกอบเป็นโครงสร้างของเซลล์หรือเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตะบอลิซึมของเซลล์ และกรดนิวคลีอิกเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนจะพบว่าแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนนั้นจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่า และสามารถที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า

6. ในการทดลองนี้พบว่าการใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ การใช้สูตรอาหารปกติที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1:11 และการใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดโรงงาน สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ และเมื่อนำการปรับสูตรอาหารทั้งสามแบบมาคิดความคุ้มค่าของต้นทุนในการผลิตและเปรียบเทียบกับราคาขายของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ พบว่าการปรับสูตรอาหารมาใช้สารเคมีเป็นเกรดโรงงานจะได้กำไร 513 บาทต่อกิโลกรัม และการปรับสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1:11 จะได้กำไร 267 บาทต่อกิโลกรัม ในขณะที่การใช้สูตรอาหารปกติโดยใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์จะขาดทุน 567 บาทต่อกิโลกรัม

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การนำกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลมีความเป็นไปได้ แต่ควรศึกษาถึงแนวทางการกำจัดสิ่งเจือปนที่ติดมากับกลีเซอรอล เพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

2. เนื่องจากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1,3-โพรเพนไดออล กรดอะซิติก และกรดบิวทริก ไม่สามารถทำได้ทันที จึงควรศึกษาพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หรือเครื่องมือเครื่องใช้ที่สามารถวิเคราะห์หาความเข้มข้นของพารามิเตอร์ต่างๆ ได้ทันที

3. ควรศึกษาหาความเร็วรอบที่ใช้ในการกวนผสมที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ให้มีปริมาณสูงขึ้น เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวล และสามารถใช้พลังงานได้เหมาะสม

4. ควรศึกษาเพิ่มเติม โดยการนำกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาทดลองในระบบเซลล์แขวนลอยในระบบแบบกะ เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองโดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์

5. ควรศึกษาเพิ่มเติม โดยนำผลการทดลองที่ดีที่สุดในแต่ละสภาวะในชุดการทดลองในระบบแบบกะ มาใช้ทำการทดลองร่วมกันในระบบแบบต่อเนื่อง เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กิตติยา อัลภาชน์. 2545. กลีเซอรินบริสุทธิ์. สมอ. สาร 28(326):9.
- ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ. การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลโดย *Clostridium butyricum* DSM 5431 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไร้อากาศชนิดเบดเคลื่อนที่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.
- มัลลิกา บุญมี. 2548. การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างหวานโดย *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* และการใช้กากยีสต์จากโรงงานเบียร์เป็นแหล่งอาหารเสริม. ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2548 – 2549.
- วิภา สุโรจนะเมธากุล. 2546. คุณสมบัติและประโยชน์ของกลีเซอรอล. อาหาร 33(2):87-89.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2545a. กระทรวงอุตสาหกรรม มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กลีเซอรินบริสุทธิ์. มอก.337-2545.
- สมใจ ศิริโชค. 2550. แหล่งไนโตรเจน. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ 2(2550): 87-89.

ภาษาอังกฤษ

- Agarwal, A.K. 2006. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. Progress in Energy and Combustion Science. (Unpublished manuscript).
- Asad-ur-Rehman, Wijesekara R.G, S., Nomura, N., Satol, S., Matsumura, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* Journal of Chemical Technology and Biotechnology 83 (2008):1072–1080.
- A. Sakurai, Y. Nishida, H. Saito, M. Sakakibara, Ethanol production by repeated batch culture using yeast cells immobilized within porous cellulose carriers. Journal of Bioscience and Bioengineering 90 (2000): 526-529.

- Barbirato, F., Himmi, E.H., Conte, T., Bories, A. 1,3-Propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. Industrial Crops and Products 7(1998): 281-289.
- Besson, M., Gallezot, P., Pigamo, A., Reifsnnyder, S. Development of an improved continuous hydrogenation process for the production of 1,3-propanediol using titania supported ruthenium catalysts. Applied Catalysis A: General 250 (2003) 117–124.
- Berovic M, Pivec A, Kosmerl T, Wondra M & Celan S. 2007. Influence of Heat Shock on Glycerol production in Alcohol Fermentation. Bioscience and Bioengineering 103(2):135-139.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., Deckwer, W.-D. Microbial production of 1,3-propanediol. Applied Microbiology and Biotechnology 52 (1999): 289-297.
- Biebl, H. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. Applied Microbiology and Biotechnology 35(1991): 701-705.
- Budiraharjo, R. Loofa reinforced gel carriers for yeast immobilization in ethanol fermentation. Master's Thesis, Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering, Chulalongkorn University, 2006.
- Chen, X., Xiu, Z., Wang, J., Zhang, D., Xu, P. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro aerobic conditions. Enzyme and Microbial Technology 33(2003): 386-394.
- Colin, T., Bories, A., Moulin, G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 54(2000): 201-205.
- David AM & Henry SG. . 1996. Glycerol: A Jack of all trade. York University: Chemistry Hall of Frame.
- Dasaria AM, Kiatsimkula P-P, Sutterlinb RW & Suppesa JG. 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. Applied Catalysis A 281:225-231.
- Deckwer, W.-D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. FEMS Microbiology Reviews 16(1995): 143-149.

- Demirbas, A. 2002. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. Energy Convers Manage 43:2349-2356.
- Eddy D. 2005. Chemistry 122: Synthesis of Soap. Southern Arkansas University.
- Fujii, N., Sakurai, A., Onjoh, K., Sakakibara, M. Influence of surface characteristics of cellulose carriers on ethanol production by immobilized yeast cells. Process Biochemistry 34 (1999): 147-152.
- Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering 92:405-416.
- Jab C & Frantisek P. 1996. Production and treatment of rapeseed oil methyl esters as alternative fuels for diesel engines. Bioresource technology 55:145-152.
- Jitputti, J., B. Kitiyanan, P. Rangsunvigit, K. Bunyakiat, L. Attanatho and P. Jenvanitpanjakul. 2005. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. Chemical Engineering Journal 116: 61-66.
- Griffiths, M.S., Bosley, J.A. Assessment of macroporous polystyrene-based polymers for the immobilization of *Citrobacter freundii*. Enzyme and Microbial Technology 15(1993): 109-113.
- Godfrey MT. 1953. method of production. Glycerol. Reinhold publishing corporation.
- Gonzalez-Pajuelo, M., Andrade, J.C., Vasconcelos, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 31(2004): 442-446.
- Gonzalez-Pajuelo, M., Andrade, J.C., Vasconcelos, Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. Journal Industrial Microbiol Biotechnol (2005) 32: 391-396.
- Gunzel, B., Yonsel, S., Deckwer, W.-D. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. Applied Microbiology and Biotechnology 36(1991): 36289-294.
- Himmi, E.H., Bories, A., Barbirato, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Bioresource Technology 67(1999): 123-128.

- Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W.-D., Schink, B., Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. Applied Microbiology and Biotechnology 33(1990): 121-126.
- Jungermann E, Sonntag OVS. 1991. Glycerine a key cosmetic ingredient.
- Kandpal, J.B. and M. Madan. 1994. *Jatropha curcas*: a renewable source of energy for meeting future energy needs. Technical Note 6: 159-160.
- Khan, A.K. 2002. Research into Biodiesel Kinetics & Catalyst Development. Available Source: www.cheque.uq.edu.au/ugrad/chee4001/CHEE400102/Adam_khan_Thesis.pdf, January 1, 2007.
- Khare, S.K., Krishna, J. and Gandhi, A.P. 1995. Citric Acid Production from Okara (soy residue) by Solid-state Fermentation. *Bioresource Technol.* 54:323-325.
- Kurosaka, T., Maruyama, H., Naribayashi, I., Sasaki Y. Production of 1,3-propanediol by hydrogenolysis of glycerol catalyzed by Pt/WO₃/ZrO₂. Catalysis Communications 9 (2008): 1360–1363.
- K. Witjitra, M. M. Shah, and M. Cheryan. 1996. Effect of nutrient sources on growth and acetate production by *Clostridium thermoaceticum*. Enzyme and Microbial Technology. 19:322-327.
- Laosirilurchakaj, N. Kinetic model for 1,3-propandiol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum* DSM 5431 in fed-batch fermenter. Master's Thesis. Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering Chulalongkorn University, 2009.
- Lay, J.J. 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. Biotechnol. Bioeng. 74: 280-287.
- Liu, Y.K., Seki, M., Tanaka, H., Furusaki, S. Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. Journal of Fermentation and Bioengineering 85 (1998): 416-421.
- Lundie, L. L. and Drake, H. L. 1984. Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. J. Bacterial. 159,700.
- Ma F & Hanna AM. 1999. Biodiesel production:a review. Bioresource Technology 70:1-15.

- Ma, F., L.D. Clements and M.A. Hanna. 1998. The effect of catalyst, free fatty acids, and water on transesterification of beef tallow. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 41(5):1261-1264.
- Ma, F., L.D. Clements and M.A. Hanna. 1999. The effect of mixing on transesterification of beef tallow. Bioresource Technology 69:289-293.
- Madras, G., C. Kolluru and R. Kumar. 2004. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. Fuel 83:2029-2033.
- Marchetti, J.M., V.U. Miguel and A.F. Errazu. 2005. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews 20:280-288.
- Meher, L.C., D. Sagar and S.N. Naik. 2004. Technical aspects of biodiesel production by Transesterification-a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 10:1-21.
- M. Bekers, E. Ventina, A. Karsakevich, et al., Attachment of yeast to modified stainless steel wire spheres, growth of cells and ethanol production, Process Biochemistry 35 (1999): 523-530.
- Menzel, K., Zeng, A.-P., Deckwer, W.D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumonia*. Enzyme and Microbial Technology 20(1997): 82-86.
- Miner SC & Dalton NN. 1953. Glycerol. Reinhold publishing corporation.
- Mohd Sahaid Kalil, Hisham Salem Alshiyab, and Wan Mohtar Wan Yusoff. 2008. Effect of Nitrogen Source and Carbon to Nitrogen Ratio on Hydrogen Production using *C. acetobutylicum*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (4): 393-401.
- Mongi, F., C. Edward, H. William, G. Gwanghoon and A. Almadidy. 2005. Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. World J. Microbiol. Biotechnol. 21:855-862.
- Monot, F., Martin, J.R., Petitdemange, H. and Gay, R.1982. Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. Applied and Environmental Microbiology. 44, 6:1318-1324.
- Mu, Y., Teng, H., Zhang, D., Wang, W., Xiu, Z. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. Biotechnol Lett 28 (2006): 1755–1759.

- Ogbonna, J.C., Liu, Y.C., Liu, Y.K., Tanaka, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. Journal of Fermentation and Bioengineering 78 (1994): 437-442.
- Papanikolaou, S., Ruiz-Sanchez, P., Pariset, B., Blanchard, F., Fick, M., High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. Journal of Biotechnology 77(2000): 191–208.
- Papanikolaou, S., Fick, M., Aggelis, G. The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 79(2004): 1189–1196.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marca, I., Aggelis, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and Bioenergy 32(2008): 60 – 71.
- Petitdemange, E., Dürr, C., Abbad Andaloussi, S., Raval, G. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. Journal of industrial Microbiology 15(1995): 498-502.
- Pflugmacher, U., Gottschalk, G. Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. Applied Microbiology and Biotechnology 41(1994): 313-316.
- Pinki Anand and Rajendra Kumar Saxena, 2012. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. New Biotechnology. Volume 29: 199-205.
- Pullirisombat, J. γ-Alumina doped alginate gel for cell immobilization in fermentation processes. Master's Thesis. Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering Chulalongkorn University, 2007
- Ramadas, A.S., S. Jayaraj and C. Muraleecharan. 2005. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. Fuel 84: 335-340.
- Rehman, A., Wijesekara R.G, S., Nomura, N., Satol, S., Matsumura, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol

- production by *Clostridium butyricum*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 83 (2008) 1072–1080.
- Reimann, A., Biebl, H., Deckwer, W.-D. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. Applied Microbiology and Biotechnology 49(1998): 359-363.
- Rymowicz W, Rywinska A & Zarowska B. 2007. Biosynthesis of citric acid from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* in repeated-batch cultivations. Biotechnology 131: 133-187.
- Saint-Amans, S., Perlot, P., Goma, G., Soucaille P. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simple controlled fed batch system. Biotechnology letters 16 (1994): 831 -836.
- Segur JB. 1953. Uses of Glycerine. Glycerol. Reinhold publishing corporation.
- Shinonaga, M.A., Kawamura, Y., Yamane, T. Immobilization of yeast cells with cross-linked chitosan beads. Journal of Fermentation and Bioengineering 74 (1992): 90-94.
- Silvia Casali^a, Mine Gungormusler^b, Lorenzo Bertin^a, Fabio Fava^a, Nuri Azbar^b. Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol. Biochemical Engineering Journal (2011).
- Srivastava, A. and R. Prasad. 1999. Triglycerides based diesel fuels. Renewable and Sustainable Energy Review 4: 111-133.
- Suratago, T. Immobilization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 on loofa sponges in fixed bed bioreactors for the production of 1,3-propanediol. Master's Thesis. Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering Chulalongkorn University, 2009.
- Verbelen, P.J., De schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. Biotechnol Letter 28 (2006): 1515-1525.
- Villegas GC, Santos EV, Zazo M, Garcia LJ & Ochoa G-F. 2007. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition. Biotechnology 131:98-121.
- Waste Management and Research Center. 2006. Small Scale Biodiesel Production. Available Source: www.wmrc.com/. November 17, 2006.
- Welsh FW, Williams RE, Veliky IA. 1986. A note on the effect of nitrogen source on growth of and solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. J Appl Bacteriol 61:413-419.

- Xiaoyi Wang, Bo Jin and Dennis Mulcahy. 2008. Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. international journal of hydrogen energy. 33: 4998 – 5005.
- Ying Mu, Zhi-Long Xiu*, Dai-Jia Zhang, 2008. combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumonia*. Biochemical Engineering Journal 40 (2008) 537–541.
- Zeng, A., Biebl, H. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends. Biotechnology 74 (2002) 239-259.
- Zeng, A.-P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. Bioprocess Engineering 14(1996): 169-175.
- Zhao,Y., Chen,G., Yao, S. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Biochemical Engineering 32 (2006): 93–99.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรสารอาหารในการหมัก

ตารางที่ ก.1 สารอาหารที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)	
	สูตร 1	สูตร 2
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	60	-
กลีเซอรอลจากกระบวนการ ผลิตไบโอดีเซล	-	60
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	4
CaCO ₃	2	2
Yeast extract	1	1
K ₂ HPO ₄	1	1
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	0.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	0.02
Fe solution (ml/L)	1	1
Trace element (ml/L)	0.1	0.1

ตารางที่ ก.2 สารอาหารที่ใช้ในการเจือจางสูตรสารอาหารต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)		
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	40	8	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	0.8	0.4
CaCO ₃	2	0.4	0.2
Yeast extract	1	0.2	0.1
K ₂ HPO ₄	1	0.2	0.1
KH ₂ PO ₄	0.5	0.1	0.05
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	0.04	0.02
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	0.004	0.002
Fe solution (ml/L)	1	0.2	0.1
Trace element (ml/L)	0.1	0.02	0.01

หมายเหตุ สูตร 1 คือ สูตรอาหารปกติ
 สูตร 2 คือ สูตรอาหารปกติเจือจาง 5 เท่า
 สูตร 3 คือ สูตรอาหารปกติเจือจาง 10 เท่า

ตารางที่ ก.3 สารอาหารที่ใช้ในการปรับความบริสุทธิ์ของสารเคมีต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพน-ไดออล

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)	
	สูตร 1	สูตร 2
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	40	-
กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	-	40
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	4
CaCO_3	2	2
Yeast extract	1	1
K_2HPO_4	1	1
KH_2PO_4	0.5	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.02
Fe solution (ml/L)	1	1
Trace element (ml/L)	0.1	0.1

หมายเหตุ สูตร 1 คือ สูตรอาหารที่ทำจากสารเคมีเกรด Analytical Reagent
 สูตร 2 คือ สูตรอาหารที่ทำจากสารเคมีเกรด Commercial Reagent

ตารางที่ ก.4 สารอาหารที่ใช้ในการศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสาร 1,3-โพรเพน-ไดออล

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)				
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	40	40	40	40	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	4	4.52	4	4
CaCO ₃	2	2	2	2	2
Yeast extract	1	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	1	1	1	1	1
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Fe solution (ml/L)	1	1	1	1	1
Trace element (ml/L)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ยูเรีย	-	0.24	-	-	-
แอลไลซีน	-	-	-	0.72	-
กากผงชูรส	-	-	-	-	2.11

ตารางที่ ก.5 สารอาหารที่ใช้ในการปรับสัดส่วนของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารอินทรีย์และไนโตรเจนจากสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)			
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
กลีเซอรอลบริสุทธิ์	40	40	40	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	4.13	4.26	4.39
CaCO ₃	2	2	2	2
Yeast extract	1	0.75	0.5	0.25
K ₂ HPO ₄	1	1	1	1
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02	0.02	0.02	0.02
Fe solution (ml/L)	1	1	1	1
Trace element (ml/L)	0.1	0.1	0.1	0.1

หมายเหตุ สูตร 1 คือ สูตรอาหารมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8

สูตร 2 คือ สูตรอาหารมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11

สูตร 3 คือ สูตรอาหารมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:16

สูตร 4 คือ สูตรอาหารมีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:34

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

ข.1 ความหนาแน่นของเซลล์

การวัดความหนาแน่นของเซลล์ใช้วิธีการ Optical density (OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ทำการหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดย centrifuge ตัวอย่างปริมาตร 20 มล. ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทของเหลวส่วนใสที่อยู่ด้านบนออก แล้วล้างส่วนที่ตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นและ centrifuge อีกครั้ง ตัวอย่างที่ได้จะถูกนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

ข.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

1. ทำการแยกเซลล์ออกจากสารอาหารโดยการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
2. กำจัดส่วนที่ลอยด้านบนออก
3. เติม HCl 0.1 โมลาร์ ลงในเซลล์ ข้อ 2. ที่ผ่านการกำจัดส่วนที่ลอยออก
4. จากนั้นทำการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
5. กำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออกอีกครั้ง
6. จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น
7. ทำซ้ำตามข้อที่ 4-6
8. เทเซลล์แขวนลอยลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่ผ่านการชั่งน้ำหนักแล้ว
9. จากนั้นทำให้เซลล์แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.
10. จากนั้นชั่งน้ำหนักเซลล์

ข.3 การหาความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอย

เซลล์แขวนลอยที่ทราบความเข้มข้นถูกนำมาใช้เพื่อเป็นค่ามาตรฐาน โดยตัวอย่างที่ได้จากการหมักซึ่งนำมาวิเคราะห์เทียบกับค่ามาตรฐาน

1. ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น
2. ทำการแยกเซลล์แขวนลอยโดยการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3. กำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนจากข้อ 2.
4. เติม HCl 0.1 โมลาร์ ลงในเซลล์ ข้อ 3. ที่ผ่านการกำจัดส่วนที่ลอยออก
5. จากนั้นทำการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
6. กำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออกอีกครั้ง
7. จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น
8. ทำซ้ำข้อ 5-7
9. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 650 นาโนเมตร

ข.4 การหาความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึง

1. ตัดวัสดุตรึงที่มีเซลล์เกาะอยู่ให้มีขนาดเล็กกลง
2. ละลายวัสดุตรึงที่ได้จากข้อ 1. ในน้ำกลั่น 100 มล.
3. กวนวัสดุตรึงจากข้อ 2. ภายในบีกเกอร์ซึ่งจนเซลล์ที่ติดอยู่บนวัสดุตรึงหลุดออกหมด
4. ตีวัสดุตรึงที่เซลล์หลุดออกหมดจากสารแขวนลอย
5. ทำการแยกเซลล์ออกจากสารอาหารโดยการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 15 นาที
6. กำจัดส่วนที่ลอยด้านบนออก
7. เติม HCl 0.1 โมลาร์ ลงในเซลล์ ข้อ 2. ที่ผ่านการกำจัดส่วนที่ลอยออก
8. จากนั้นทำการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
9. กำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออกอีกครั้ง
10. จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น
11. ทำซ้ำตามข้อที่ 4-6
12. เทเซลล์แขวนลอยลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่ผ่านการชั่งน้ำหนักแล้ว
13. จากนั้นทำให้เซลล์แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชม.
14. จากนั้นชั่งน้ำหนักเซลล์

ข.5 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldah

ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อยโปรตีน แล้วใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (Selenium reagent mixture) ลงไปประมาณ 1 ช้อน จากนั้นเทกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อยโปรตีน แล้วนำหลอดย่อยโปรตีนที่ใส่สารทั้งหมดครบ ประกอบให้ครบชุดการย่อยโปรตีนแล้วนำไปใส่ช่องสำหรับให้ความร้อนของเครื่องย่อยโปรตีนซึ่งให้ความร้อน 200-360 องศาเซลเซียส

โดยในชุดเครื่องย่อยโปรตีนจะประกอบไปด้วยเครื่องให้ความร้อนเพื่อย่อยโปรตีน, อุปกรณ์สกรับกรด, เครื่องให้ความเย็น เราจะทิ้งให้เกิดการย่อยโปรตีนจนสมบูรณ์จะสังเกตได้จากสีของสารละลายในหลอดย่อยโปรตีนจะเป็นสารละลายไม่มีสีหรือสารละลายใส (เวลาในการย่อยประมาณ 60 นาที) หลังจากย่อยโปรตีนเสร็จให้ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปใส่ในเครื่องกลั่น ซึ่งเครื่องกลั่นนี้จะทำการไต่เตรท และหาปริมาณกรดที่จะใช้ในการไต่เตรท ปริมาณกรดนี้เราจะใช้ในการคำนวณหาร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งในขั้นตอนการกลั่นจะทำการใส่น้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงไปเพื่อเจือจางสภาพความเป็นกรด เครื่องจะทำการกลั่นสารละลายทั้งหมดที่ป้อนเข้าไปจนได้ส่วนที่ถูกกลั่น ซึ่งส่วนที่ถูกกลั่นออกมาจะถูกใส่สารละลายกรดบอริก 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 มิลลิลิตร ในส่วนนี้สารละลายจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้มพร้อมกับการให้ความร้อนแก่สารละลายทั้งหมด และจะมีการไต่เตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.098 นอร์มัล โดยจุดยุติของการไต่เตรทจะอยู่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.65 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างของกรดบอริก

การคำนวณ

$$\% \text{Total nitrogen} = (1.4007 \times N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times V_{\text{H}_2\text{SO}_4}) / V_{\text{Sample}}$$

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = ความเข้มข้นนอร์มัลลิตีของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไต่เตรท

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไต่เตรท

V_{Sample} = ปริมาตรของสารตัวอย่าง

ภาคผนวก ก

ข้อมูลผลการทดลองและกราฟมาตรฐาน

ก.1 ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ก.1.1 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.⁻¹

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	13.23	34.72			0.74	10.41
32	12.47	36.05			0.76	10.82
40	12.46	36.35	1.21	7.72	0.76	10.91
48	12.46	36.17			0.76	10.85
56	12.8	35.73			0.76	10.72
64	12.89	35.89			0.76	10.77
72	13.17	35.72	1.28	8.03	0.76	10.71
80	12.52	36			0.76	10.8
88	12.53	36.06			0.76	10.82
96	12.86	35.98			0.76	10.79
104	13.17	35.89			0.77	10.77
112	13.22	35.87			0.77	10.76
120	13.33	35.72	1.3	8.04	0.77	10.72
AVERAGE	12.85	35.86	1.26	7.93	0.76	10.76

ตารางที่ ค.1.2 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ชม.⁻¹

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	14.91	33.05			0.73	13.22
32	15	33.41	1.16	7.36	0.74	13.36
40	14.76	33.68			0.74	13.47
48	14.45	33.72			0.74	13.49
56	14.8	33.42			0.74	13.37
64	15.01	33.35	1.19	7.7	0.74	13.34
72	15.01	33.22			0.74	13.29
80	14.73	33.72			0.74	13.49
88	14.4	33.55			0.74	13.42
96	14.7	33.32			0.74	13.33
104	15.2	33.05			0.74	13.22
112	14.73	33.25	1.16	7.43	0.73	13.3
120	14.8	32.93			0.73	13.17
AVERAGE	14.81	33.36	1.17	7.50	0.74	13.34

ตารางที่ ค.1.3 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม.⁻¹

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	15.31	30.96	1.01	7	0.69	15.48
32	15.93	30.93			0.7	15.47
40	15.28	31.33			0.7	15.66
48	16	31.12			0.71	15.56
56	15.91	31.08			0.7	15.54
64	16.09	31.03			0.71	15.52
72	15.98	31.62			0.72	15.81
80	16.37	31.13	1	6.98	0.71	15.57
88	16.09	31.38			0.71	15.69
96	15.98	31.34			0.71	15.67
104	16.3	31.04			0.71	15.52
112	16.34	31			0.71	15.5
120	16.34	31	1.01	7.05	0.71	15.5
AVERAGE	16	31.15	1.01	7.01	0.71	15.58

ตารางที่ ค.1.4 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.⁻¹

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	17.12	27.85			0.65	16.71
32	16.78	27.75	0.98	6.94	0.64	16.65
40	16.65	28.06			0.65	16.83
48	17.3	27.78			0.65	16.67
56	17.12	28.05			0.65	16.83
64	17.17	27.98			0.65	16.79
72	17.16	28.23	1	6.95	0.66	16.94
80	17.02	27.81			0.65	16.69
88	17.01	28			0.65	16.8
96	16.82	28.28			0.65	16.97
104	17.4	27.99			0.66	16.79
112	17.17	27.82			0.65	16.69
120	17.53	27.8	0.97	6.91	0.65	16.68
AVERAGE	17.1	27.95	0.98	6.93	0.65	16.77

ตารางที่ ค.1.5 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตรเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.^{-1}

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	14.76	32.14			0.71	9.64
32	15.23	32.08			0.72	9.62
40	15.67	31.14	1.04	5.54	0.70	9.34
48	14.53	31.43			0.69	9.43
56	15.16	31.86			0.71	9.56
64	14.77	31.45			0.70	9.43
72	15.80	31.50	1.07	6.01	0.71	9.45
80	15.42	32.13			0.72	9.64
88	14.93	32.22			0.72	9.67
96	15.05	31.36			0.70	9.41
104	14.56	31.05			0.68	9.31
112	15.31	32.02			0.72	9.61
120	14.93	31.03	1.11	6.74	0.69	9.31
AVERAGE	15.09	31.65	1.08	6.10	0.70	9.49

ตารางที่ ค.1.6 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตรเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ชม.⁻¹

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	17.87	28.94			0.69	11.58
32	17.07	27.22	0.91	5.61	0.63	10.89
40	17.48	27.49			0.65	11.00
48	18.29	28.68			0.69	11.47
56	18.67	28.92			0.70	11.57
64	17.83	28.29	0.96	5.48	0.67	11.31
72	18.13	27.19			0.65	10.88
80	18.32	28.37			0.68	11.35
88	17.91	28.86			0.69	11.54
96	17.66	27.71			0.65	11.08
104	17.26	27.42			0.64	10.97
112	18.39	28.07	1.00	6.46	0.67	11.23
120	17.99	27.09			0.64	10.84
AVERAGE	17.91	28.02	0.95	5.85	0.67	11.21

ตารางที่ ค.1.7 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตรเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม.⁻¹

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	20.03	25.58	0.88	4.93	0.64	12.79
32	20.88	25.52			0.65	12.76
40	21.32	24.58			0.64	12.29
48	20.56	24.87			0.63	12.43
56	21.56	25.30			0.66	12.65
64	21.18	24.89			0.64	12.44
72	22.21	24.94			0.66	12.47
80	21.83	25.57	0.88	5.50	0.67	12.78
88	20.97	25.66			0.66	12.83
96	21.46	24.80			0.64	12.40
104	20.21	24.49			0.62	12.24
112	22.10	25.46			0.67	12.73
120	20.59	24.47	0.90	6.36	0.62	12.23
AVERAGE	21.15	25.09	0.89	5.60	0.65	12.54

ตารางที่ ค.1.8 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตรเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.^{-1}

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)
24	25.41	19.76			0.57	11.85
32	26.87	20.33		4.43	0.61	12.20
40	24.26	20.60			0.58	12.36
48	27.71	20.81			0.64	12.49
56	26.59	20.39			0.61	12.23
64	26.12	19.76			0.58	11.85
72	26.04	20.31		5.18	0.60	12.18
80	25.86	21.81			0.64	13.09
88	25.45	20.00			0.58	12.00
96	24.44	20.17			0.57	12.10
104	24.42	19.88			0.56	11.93
112	24.42	20.20			0.57	12.12
120	24.40	20.86	0.86	5.71	0.59	12.52
AVERAGE	25.54	20.37	0.81	5.11	0.59	12.22

ตารางที่ ค.1.9 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้สารอาหารปกติ เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	39.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.68
8	35.08	0.94	0.11	1.58	0.23	0.12	1.74
16	28.34	5.24	0.24	2.25	0.54	0.33	2.07
24	20.80	10.63	0.39	2.87	0.67	0.44	2.22
32	11.99	14.89	0.63	3.79	0.64	0.47	2.41
40	5.36	19.81	0.82	4.78	0.69	0.50	5.21
48	5.26	19.90	0.80	4.92	0.69	0.41	6.60
56	5.13	19.85	0.80	4.78	0.69	0.35	8.26
64	5.49	19.85	0.83	4.66	0.70	0.31	7.21
72	5.50	19.83	0.81	4.73	0.70	0.28	6.88
80	5.36	19.65	0.80	4.55	0.69	0.25	5.28
88	19.96	0.83	4.93	0.69	0.23	5.27	5.24
96	19.95	0.84	4.62	0.69	0.21	5.15	5.16
104	19.79	0.82	4.78	0.69	0.19	4.73	5.45
112	19.80	0.84	4.89	0.69	0.18	4.49	5.50
120	19.53	0.80	4.93	0.68	0.16	4.44	5.46
AVERAGE	19.81	0.82	4.78	0.69	0.29	4.60	5.36

ตารางที่ ค.1.10 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยการเจือจางสารอาหารปกติ 5 เท่า เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	37.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.06
8	25.57	1.68	0.06	0.34	0.14	0.21	3.14
16	19.89	2.34	0.19	0.60	0.14	0.15	3.92
24	15.66	5.09	0.24	1.75	0.25	0.21	2.93
32	14.01	8.43	0.43	2.58	0.39	0.26	3.05
40	8.82	11.01	0.67	3.87	0.43	0.28	2.95
48	8.52	11.19	0.69	3.83	0.43	0.23	2.86
56	8.99	11.70	0.67	3.82	0.46	0.21	2.64
64	8.86	11.85	0.67	3.88	0.46	0.19	1.79
72	8.87	11.08	0.69	3.93	0.43	0.15	1.67
80	8.65	11.30	0.68	3.88	0.44	0.14	1.60
88	8.69	11.14	0.68	3.91	0.43	5.27	1.54
96	8.71	11.21	0.67	3.86	0.43	5.15	1.37
104	8.68	11.30	0.65	3.84	0.44	4.73	1.51
112	8.63	11.34	0.67	3.92	0.44	4.49	1.88
120	8.48	11.37	0.67	3.82	0.44	4.44	1.85
AVERAGE	8.72	11.32	0.67	3.87	0.44	4.60	2.24

ตารางที่ ค.1.11 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยการเจือจางสารอาหารปกติ 10 เท่า เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	36.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.40
8	28.36	0.26	0.02	0.02	0.03	0.03	1.31
16	24.17	1.33	0.13	0.29	0.10	0.08	0.87
24	20.05	2.97	0.22	0.69	0.18	0.12	0.84
32	19.64	3.67	0.36	1.42	0.22	0.11	0.76
40	18.08	5.34	0.54	1.85	0.29	0.13	0.75
48	18.16	5.49	0.53	1.85	0.30	0.11	0.73
56	18.15	5.27	0.57	1.90	0.29	0.09	0.71
64	18.07	5.31	0.55	1.87	0.29	0.08	0.68
72	18.10	5.44	0.55	1.83	0.30	0.08	0.68
80	18.19	5.16	0.52	1.90	0.29	0.06	0.65
88	18.11	5.21	0.51	1.85	0.29	0.06	0.64
96	18.15	5.24	0.52	1.82	0.29	0.05	0.61
104	18.09	5.30	0.54	1.89	0.29	0.05	0.60
112	18.17	5.21	0.55	1.94	0.29	0.05	0.59
120	18.05	5.13	0.58	1.89	0.28	0.04	0.54
AVERAGE	18.12	5.28	0.54	1.87	0.29	0.08	0.77

ตารางที่ ค.1.12 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้สารอาหารปกติที่ทำจากสารเคมีเกรด Analytical Reagent เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	39.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.68
8	35.08	0.94	0.11	1.58	0.23	0.12	1.74
16	28.34	5.24	0.24	2.25	0.54	0.33	2.07
24	20.80	10.63	0.39	2.87	0.67	0.44	2.22
32	11.99	14.89	0.63	3.79	0.64	0.47	2.41
40	5.36	19.81	0.82	4.78	0.69	0.50	5.21
48	5.26	19.90	0.80	4.92	0.69	0.41	6.60
56	5.13	19.85	0.80	4.78	0.69	0.35	8.26
64	5.49	19.85	0.83	4.66	0.70	0.31	7.21
72	5.50	19.83	0.81	4.73	0.70	0.28	6.88
80	5.36	19.65	0.80	4.55	0.69	0.25	5.28
88	5.24	19.96	0.83	4.93	0.69	0.23	5.27
96	5.16	19.95	0.84	4.62	0.69	0.21	5.15
104	5.45	19.79	0.82	4.78	0.69	0.19	4.73
112	5.50	19.80	0.84	4.89	0.69	0.18	4.49
120	5.46	19.53	0.80	4.93	0.68	0.16	4.44
AVERAGE	5.36	19.81	0.82	4.78	0.69	0.29	4.60

ตารางที่ ค.1.13 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยการใช้สารอาหารปกติที่ทำจากสารเคมีเกรด Commercial Reagent เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield (g/L)	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	36.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.16
8	31.86	0.65	0.08	0.77	0.10	0.08	1.62
16	27.09	4.14	0.24	1.58	0.39	0.26	1.95
24	20.67	7.06	0.33	2.37	0.44	0.29	2.04
32	11.65	11.16	0.59	3.02	0.48	0.35	2.85
40	7.96	13.84	0.73	4.18	0.52	0.35	4.14
48	7.92	13.90	0.73	4.15	0.52	0.29	5.36
56	7.90	13.89	0.73	4.19	0.52	0.25	5.06
64	7.95	13.86	0.73	4.18	0.52	0.22	4.12
72	7.91	13.83	0.72	4.16	0.52	0.19	3.89
80	7.95	13.94	0.73	4.11	0.53	0.17	3.68
88	7.91	13.93	0.73	4.12	0.53	0.16	3.53
96	7.92	13.84	0.72	4.11	0.52	0.14	3.23
104	7.90	13.88	0.72	4.13	0.52	0.13	3.11
112	7.96	13.96	0.72	4.19	0.53	0.12	3.03
120	7.99	13.84	0.73	4.19	0.52	0.12	2.81
AVERAGE	7.93	13.88	0.72	4.16	0.52	0.21	3.22

ตารางที่ ค.1.14 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยการใช้ยีส่ยีส่แทนสารสกัดยีสต์เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	38.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.18
8	28.56	0.12	0.05	0.33	0.01	0.01	1.53
16	21.88	0.16	0.24	0.98	0.01	0.01	1.66
24	13.97	8.59	0.46	1.79	0.40	0.36	2.01
32	12.41	10.16	0.59	2.55	0.45	0.32	2.21
40	8.57	13.12	0.75	4.07	0.51	0.33	2.57
48	9.31	12.29	0.67	3.90	0.48	0.26	4.41
56	9.20	13.03	0.69	3.81	0.51	0.23	5.03
64	8.44	12.49	0.71	4.01	0.48	0.20	5.85
72	9.98	12.83	0.68	4.05	0.52	0.18	4.37
80	9.74	12.69	0.71	3.96	0.51	0.16	3.86
88	8.18	12.90	0.68	4.05	0.49	0.15	3.56
96	9.91	13.03	0.74	4.02	0.52	0.14	3.29
104	9.25	12.54	0.69	3.95	0.49	0.12	3.26
112	8.65	12.82	0.72	3.93	0.50	0.11	2.81
120	9.50	12.90	0.68	3.86	0.51	0.11	2.63
AVERAGE	9.16	12.79	0.70	3.96	0.50	0.19	3.14

ตารางที่ ค.1.15 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้แอลกอฮอล์แทนสารสกัดยีสต์เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	38.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.15
8	29.58	1.23	0.03	0.36	0.14	0.15	1.91
16	20.47	1.94	0.19	0.98	0.12	0.12	2.13
24	16.51	7.18	0.38	1.49	0.37	0.30	2.29
32	13.26	7.22	0.51	2.64	0.33	0.23	2.61
40	10.25	10.01	0.69	3.82	0.41	0.25	3.15
48	10.99	10.12	0.67	3.67	0.42	0.21	4.38
56	10.68	9.89	0.61	3.58	0.41	0.18	4.75
64	10.43	10.13	0.61	3.54	0.41	0.16	2.89
72	10.04	10.51	0.64	3.44	0.42	0.15	2.94
80	10.67	10.76	0.68	3.88	0.44	0.13	2.59
88	10.13	9.98	0.69	3.52	0.40	0.11	2.74
96	10.12	10.03	0.64	3.60	0.41	0.10	2.71
104	10.79	9.96	0.67	3.84	0.41	0.10	2.54
112	10.81	10.12	0.67	3.79	0.42	0.09	2.39
120	10.09	10.15	0.65	3.93	0.41	0.08	2.08
AVERAGE	10.45	10.15	0.66	3.69	0.42	0.16	2.70

ตารางที่ ค.1.16 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้กากผงชูรสแทนสารสกัดยีสต์เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	38.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.02
8	35.38	0.03	0.07	0.27	0.01	0.00	1.10
16	27.73	1.29	0.13	0.42	0.13	0.08	1.13
24	20.12	2.21	0.27	1.52	0.13	0.09	1.35
32	18.22	5.01	0.42	1.64	0.28	0.16	1.46
40	15.21	6.33	0.52	2.32	0.31	0.16	1.69
48	15.15	5.08	0.48	2.47	0.25	0.11	2.78
56	15.00	5.25	0.54	2.44	0.25	0.09	2.76
64	14.68	5.37	0.47	2.30	0.26	0.08	1.95
72	15.97	5.84	0.49	2.65	0.29	0.08	1.47
80	15.48	5.29	0.55	2.34	0.26	0.07	1.34
88	14.67	5.58	0.50	2.62	0.27	0.06	1.28
96	15.86	5.09	0.52	2.58	0.26	0.05	1.21
104	15.10	5.18	0.51	2.39	0.25	0.05	1.06
112	15.12	6.83	0.51	2.43	0.33	0.06	1.05
120	15.29	6.51	0.46	2.47	0.32	0.05	1.01
AVERAGE	15.23	5.67	0.50	2.46	0.28	0.08	1.48

ตารางที่ ค.1.17 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต
แทนสารสกัดยีสต์เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	36.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01
8	31.05	0.36	0.03	0.34	0.05	0.04	1.09
16	26.04	2.56	0.11	0.80	0.22	0.16	1.17
24	20.07	3.89	0.32	1.60	0.24	0.16	1.36
32	15.11	4.62	0.43	1.95	0.22	0.14	1.42
40	11.68	6.88	0.52	2.86	0.29	0.17	1.55
48	11.72	6.60	0.56	2.88	0.28	0.14	2.50
56	11.22	7.90	0.55	3.01	0.33	0.14	2.69
64	10.75	7.25	0.57	2.98	0.30	0.11	2.56
72	10.59	6.72	0.56	2.86	0.28	0.09	1.89
80	11.76	7.27	0.58	2.83	0.31	0.09	1.66
88	12.10	6.61	0.55	3.05	0.29	0.08	1.53
96	11.63	7.49	0.57	2.99	0.32	0.08	1.33
104	10.58	7.10	0.60	2.97	0.29	0.07	1.46
112	11.22	6.59	0.54	3.08	0.28	0.06	1.17
120	12.11	6.87	0.52	2.87	0.30	0.06	1.04
AVERAGE	11.39	7.03	0.55	2.94	0.30	0.11	1.59

ตารางที่ ค.1.18 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	39.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.68
8	35.08	0.94	0.11	1.58	0.23	0.12	1.74
16	28.34	5.24	0.24	2.25	0.54	0.33	2.07
24	20.80	10.63	0.39	2.87	0.67	0.44	2.22
32	11.99	14.89	0.63	3.79	0.64	0.47	2.41
40	5.36	19.81	0.82	4.78	0.69	0.50	5.21
48	5.26	19.90	0.80	4.92	0.69	0.41	6.60
56	5.13	19.85	0.80	4.78	0.69	0.35	8.26
64	5.49	19.85	0.83	4.66	0.70	0.31	7.21
72	5.50	19.83	0.81	4.73	0.70	0.28	6.88
80	5.36	19.65	0.80	4.55	0.69	0.25	5.28
88	5.24	19.96	0.83	4.93	0.69	0.23	5.27
96	5.16	19.95	0.84	4.62	0.69	0.21	5.15
104	5.45	19.79	0.82	4.78	0.69	0.19	4.73
112	5.50	19.80	0.84	4.89	0.69	0.18	4.49
120	5.46	19.53	0.80	4.93	0.68	0.16	4.44
AVERAGE	5.36	19.81	0.82	4.78	0.69	0.29	4.60

ตารางที่ ค.1.19 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	37.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33
8	29.18	0.64	0.04	0.40	0.07	0.08	1.63
16	20.16	3.08	0.18	1.51	0.19	0.19	1.93
24	13.73	8.38	0.34	2.28	0.39	0.35	2.48
32	10.12	11.81	0.59	3.03	0.48	0.37	3.17
40	7.93	15.88	0.71	4.00	0.60	0.40	3.37
48	8.01	15.76	0.75	4.17	0.60	0.33	5.08
56	7.99	15.77	0.71	4.17	0.60	0.28	5.47
64	7.72	15.93	0.74	4.13	0.60	0.25	4.83
72	7.99	15.97	0.75	4.14	0.60	0.22	4.49
80	8.09	16.00	0.77	4.09	0.61	0.20	3.97
88	8.02	15.63	0.76	4.09	0.59	0.18	3.58
96	7.89	15.79	0.72	4.09	0.60	0.16	3.33
104	8.12	15.90	0.79	4.02	0.60	0.15	3.28
112	7.68	15.57	0.77	4.02	0.58	0.14	2.98
120	7.98	15.64	0.71	4.10	0.59	0.13	2.87
AVERAGE	7.95	15.80	0.74	4.09	0.60	0.23	3.36

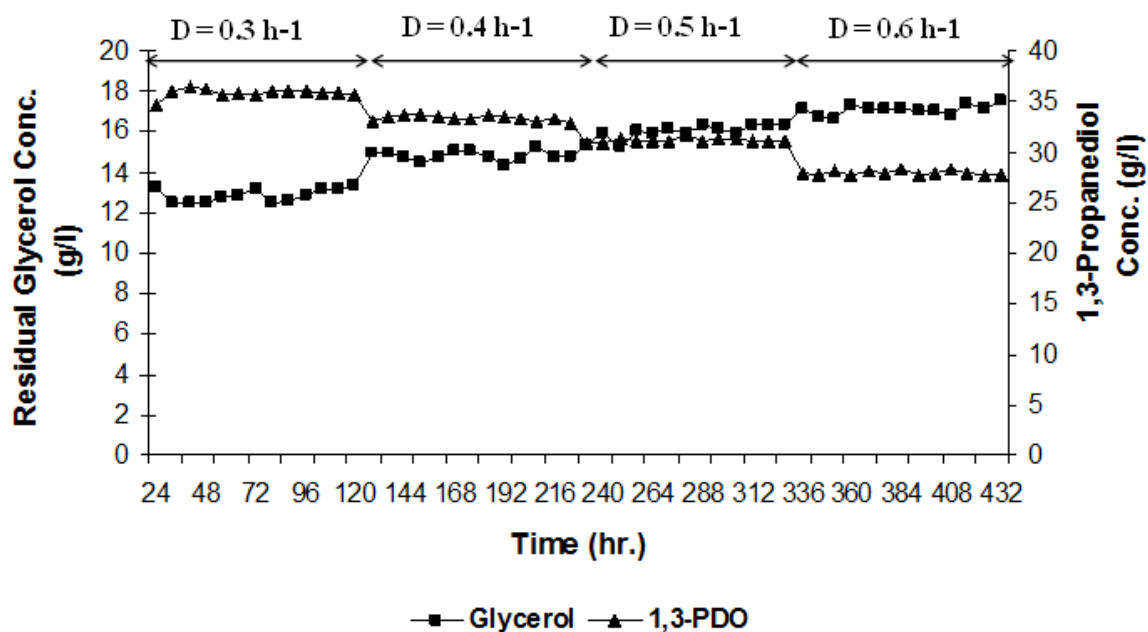
ตารางที่ ค.1.20 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:16 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	35.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01
8	27.65	0.61	0.04	0.37	0.06	0.08	1.22
16	24.38	2.93	0.13	0.82	0.23	0.18	1.46
24	19.76	5.48	0.35	1.69	0.33	0.23	1.89
32	15.91	7.88	0.45	2.09	0.40	0.25	2.07
40	10.19	10.30	0.63	3.76	0.42	0.26	2.46
48	9.14	10.84	0.67	3.82	0.43	0.23	3.33
56	8.36	10.85	0.65	3.98	0.42	0.19	3.46
64	9.22	10.68	0.64	3.79	0.42	0.17	2.83
72	8.75	11.05	0.67	4.00	0.43	0.15	2.51
80	9.41	10.75	0.66	3.75	0.43	0.13	1.69
88	8.02	10.71	0.65	3.80	0.41	0.12	1.41
96	8.27	10.87	0.64	3.97	0.41	0.11	1.30
104	9.25	10.98	0.69	4.00	0.43	0.11	1.15
112	9.57	10.65	0.68	3.75	0.42	0.10	1.12
120	9.11	11.05	0.63	3.75	0.43	0.09	1.03
AVERAGE	9.03	10.79	0.65	3.85	0.42	0.16	1.87

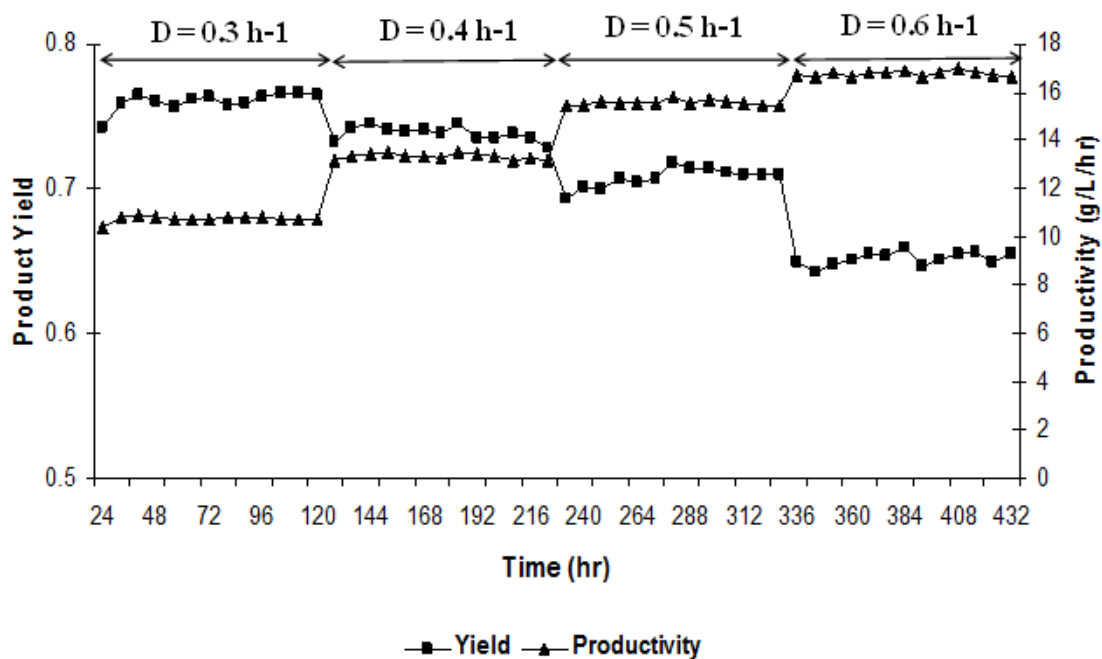
ตารางที่ ค.1.21 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:34 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.)	Glycerol (g/L)	1,3-Propanediol (g/L)	Acetic acid (g/L)	Butyric acid (g/L)	Yield	Productivity (g/L.hr)	Cell Conc. (g/l)
0	33.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.03
8	27.26	0.25	0.02	0.36	0.02	0.03	1.05
16	23.66	1.32	0.06	1.09	0.10	0.08	1.20
24	19.84	3.62	0.12	1.68	0.22	0.15	1.37
32	15.96	6.77	0.39	2.84	0.34	0.21	1.44
40	10.68	9.73	0.60	3.31	0.40	0.24	1.74
48	10.23	9.77	0.62	3.33	0.40	0.20	2.44
56	9.91	9.70	0.63	3.05	0.39	0.17	2.57
64	10.84	9.76	0.66	3.25	0.41	0.15	2.10
72	10.35	9.73	0.65	3.29	0.40	0.14	1.53
80	10.27	9.53	0.61	3.31	0.39	0.12	1.42
88	10.27	9.76	0.65	3.29	0.40	0.11	1.33
96	9.84	9.58	0.63	3.33	0.38	0.10	1.29
104	10.93	9.67	0.65	3.34	0.40	0.09	1.13
112	10.15	9.70	0.64	3.17	0.39	0.09	1.08
120	9.82	9.53	0.65	3.22	0.38	0.08	1.01
AVERAGE	10.30	9.68	0.64	3.26	0.39	0.14	1.48

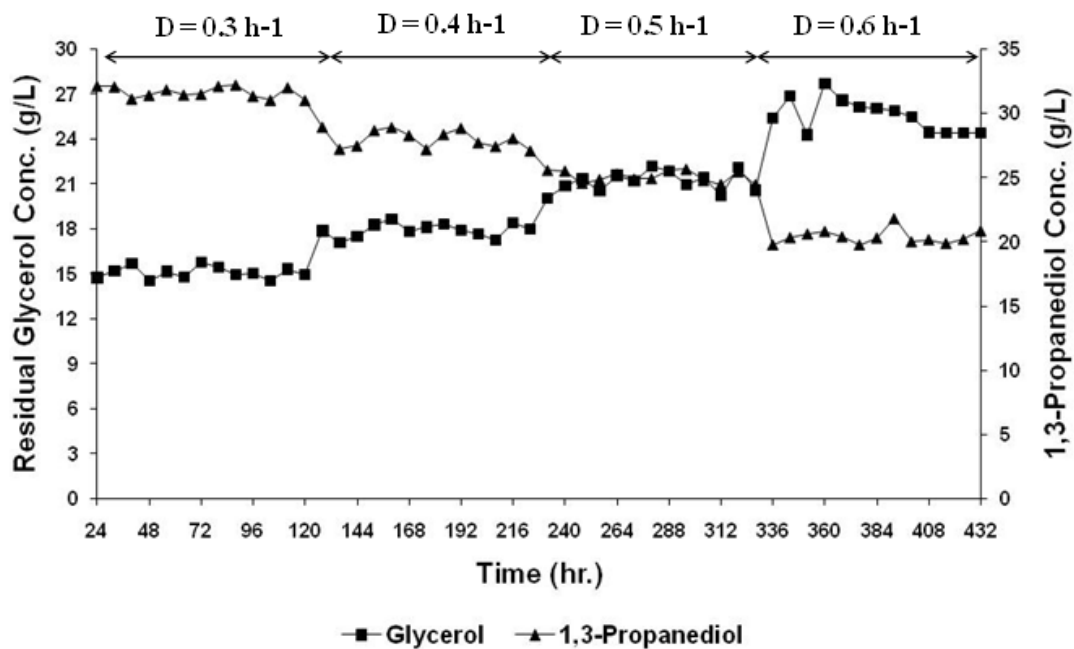
ค.2 กราฟที่ได้จากการทดลอง



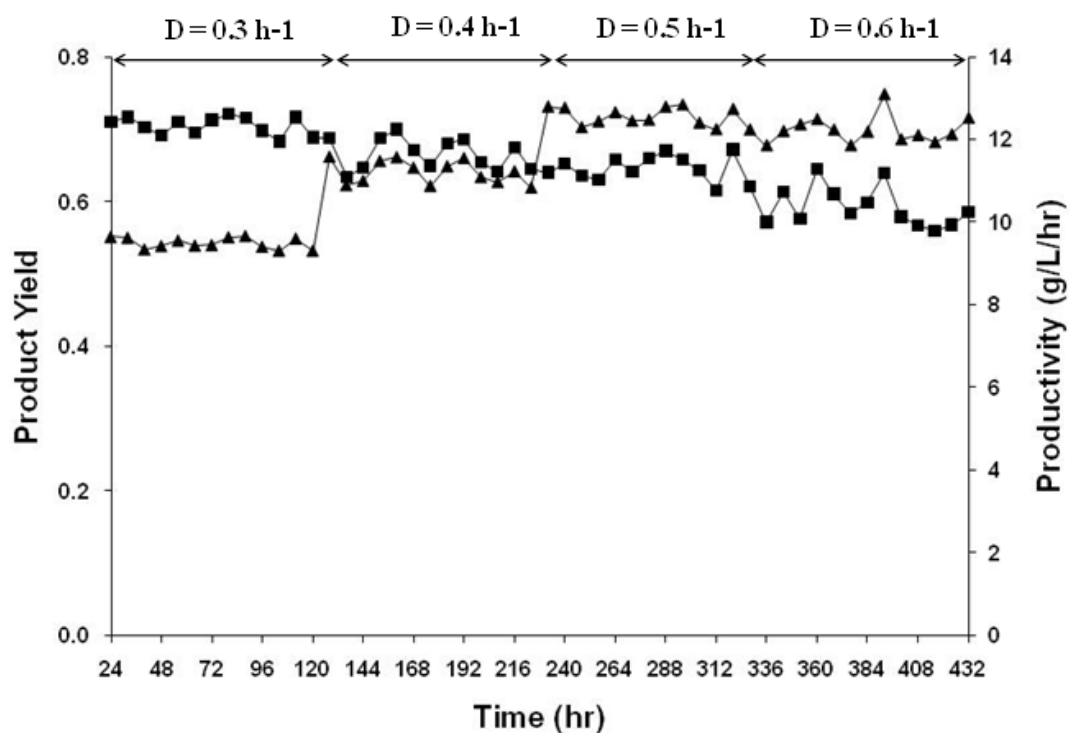
รูปที่ ค.2.1 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่เข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน



รูปที่ ค.2.2 ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่เข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

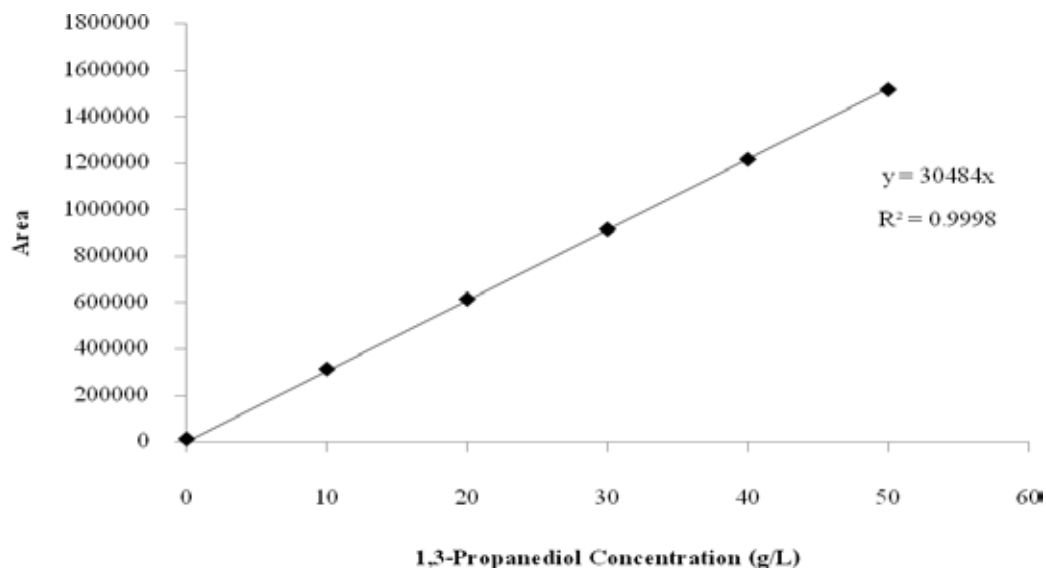


รูปที่ ค.2.3 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

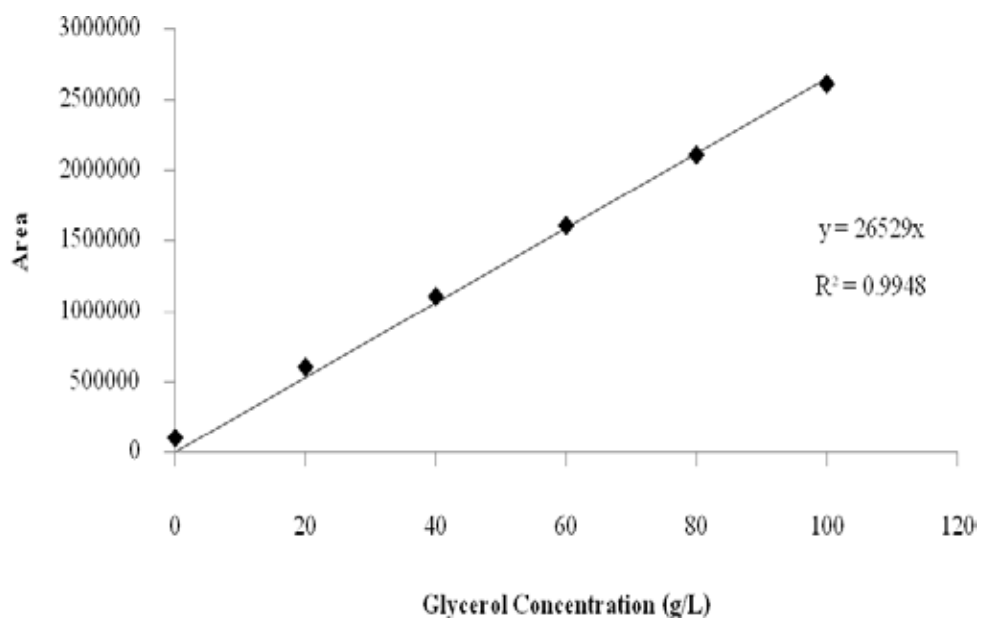


รูปที่ ค.2.4 ผลได้ของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

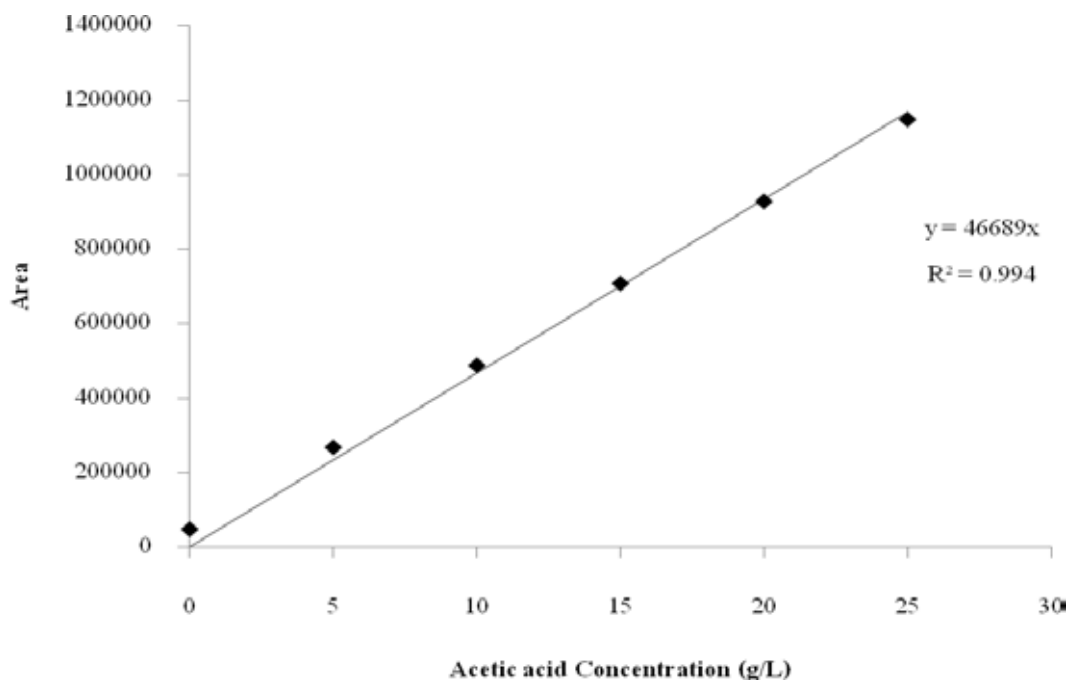
ค.3 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง



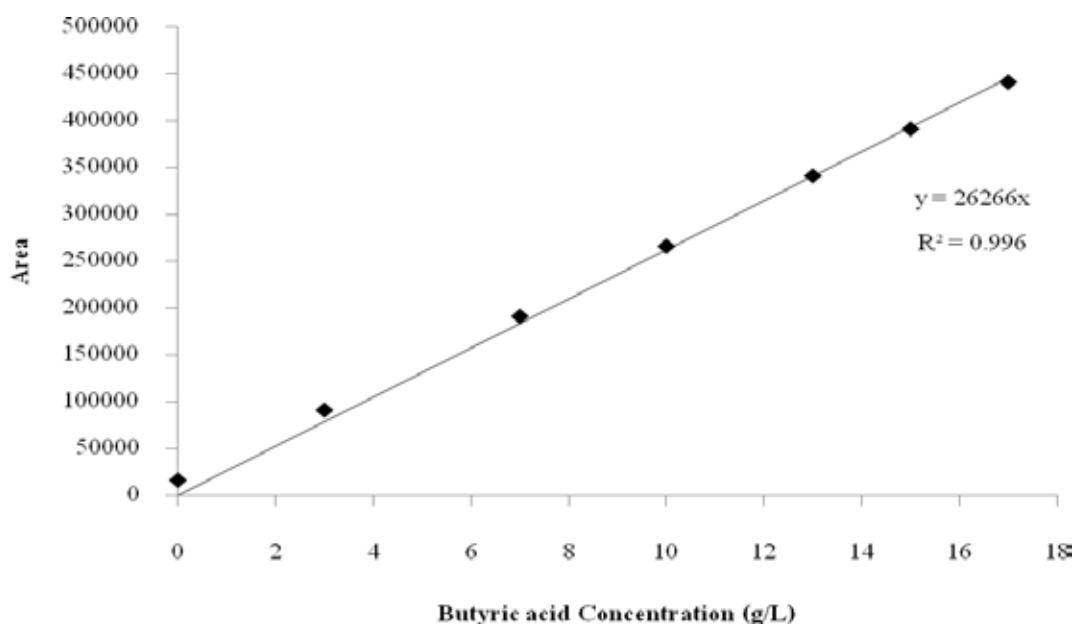
รูปที่ ค.3.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล



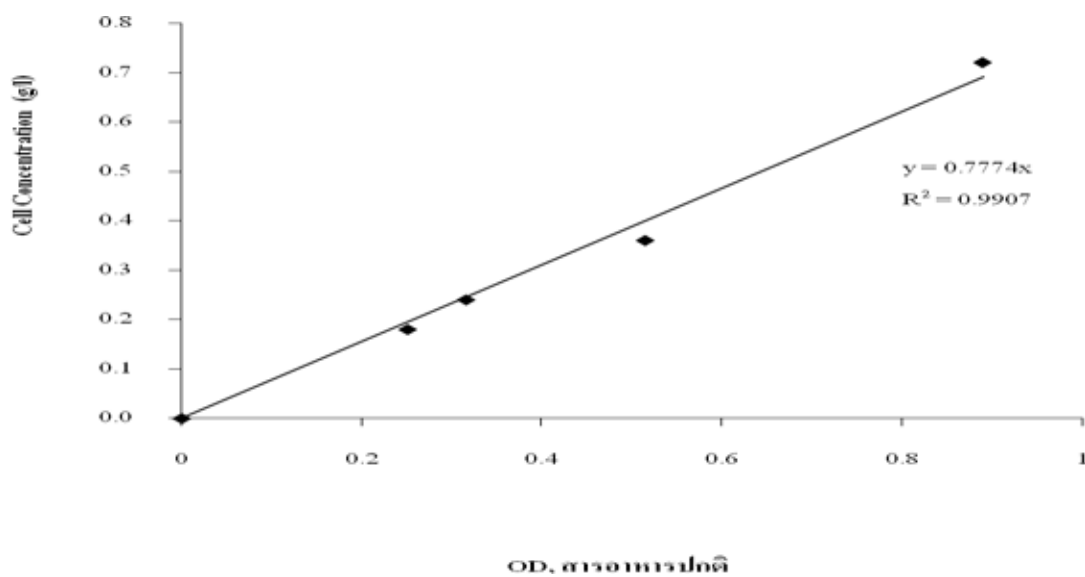
รูปที่ ค.3.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกลีเซอรอล



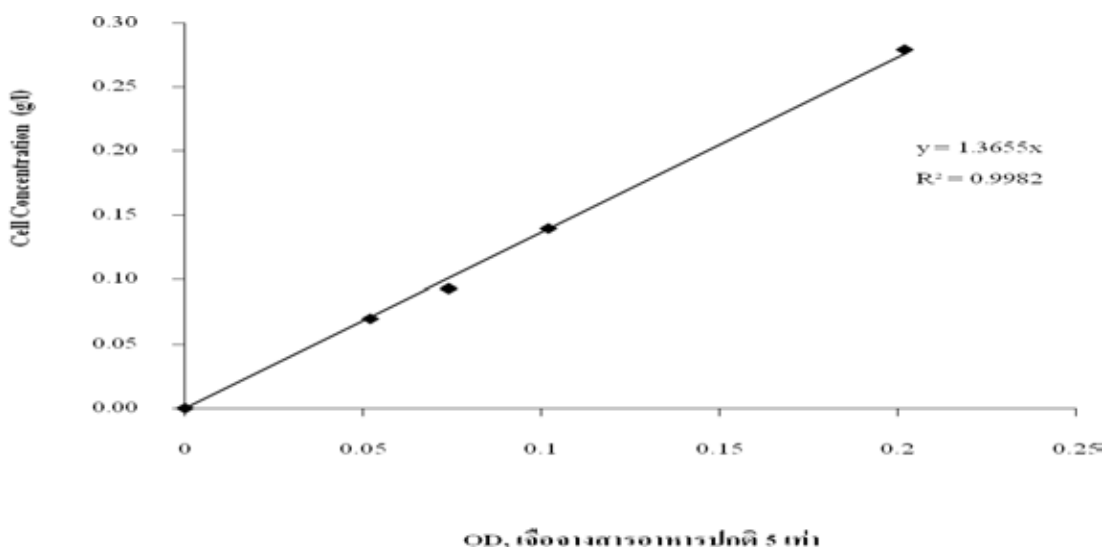
รูปที่ ค.3.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดอะซีติก



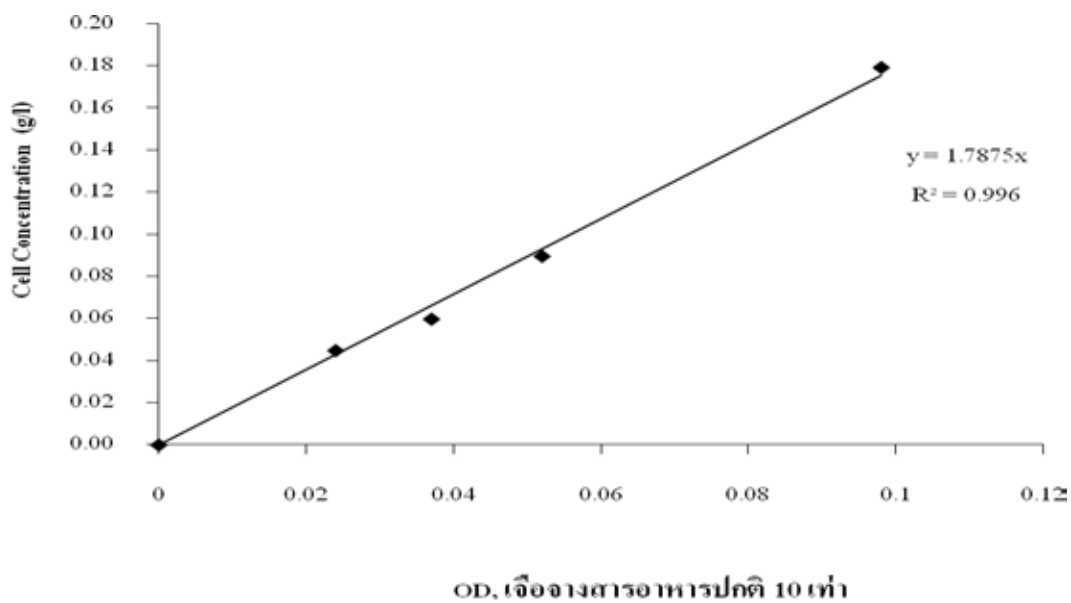
รูปที่ ค.3.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดบิวทิริก



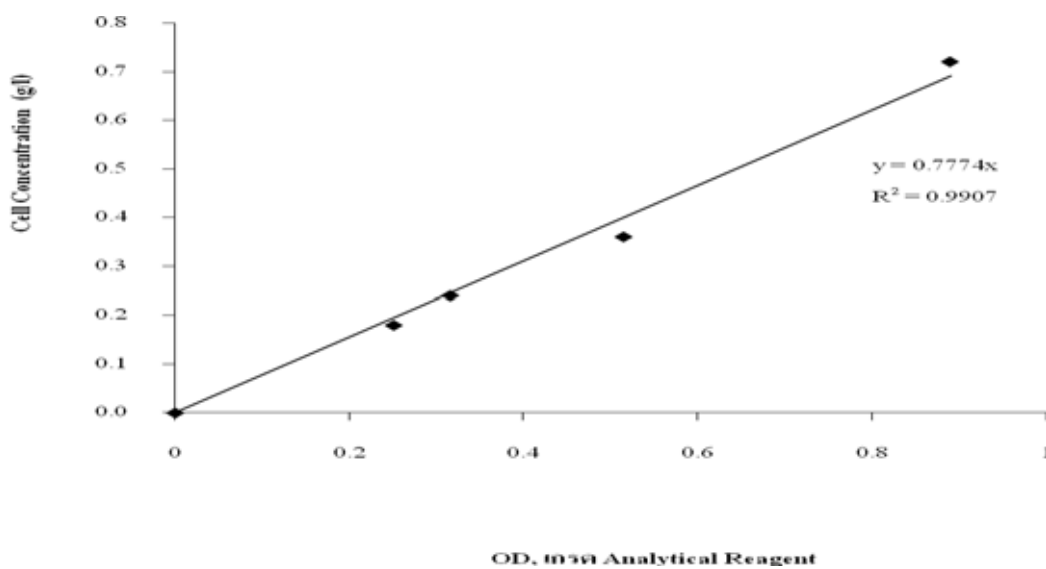
รูปที่ ค.3.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้สารอาหารปกติ



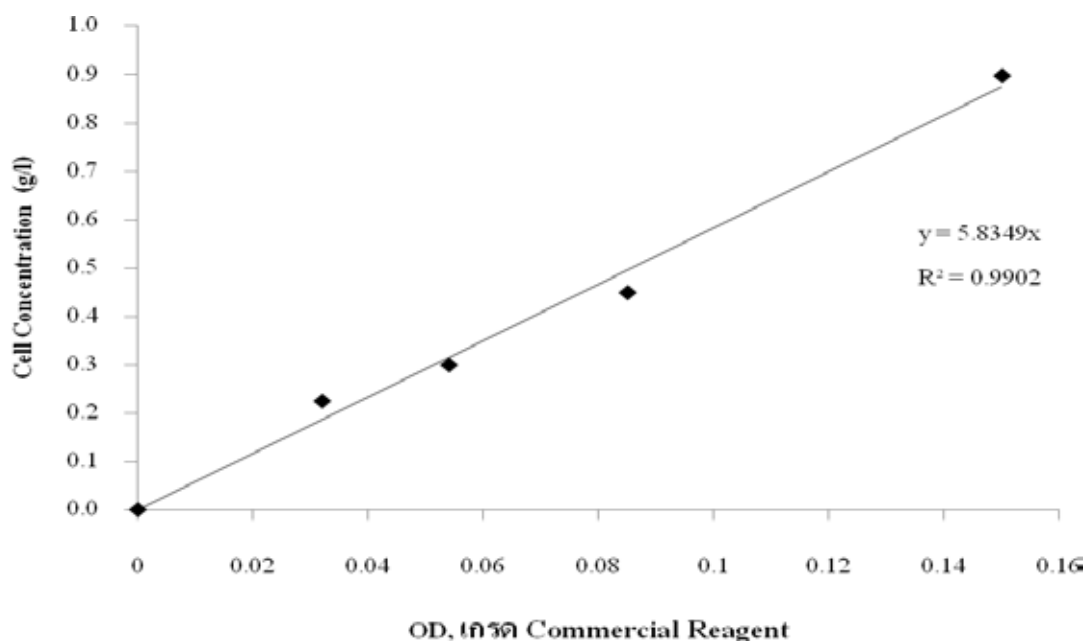
รูปที่ ค.3.6 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่เจือจางสารอาหารปกติ 5 เท่า



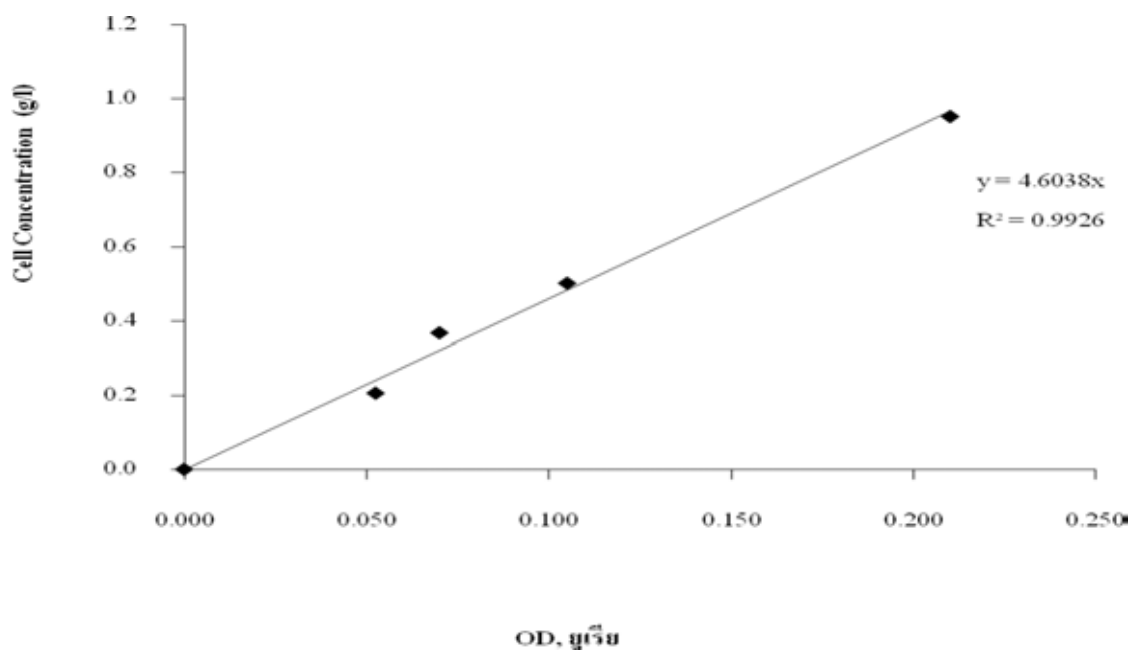
รูปที่ ค.3.7 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่เจือจางสารอาหารปกติ 10 เท่า



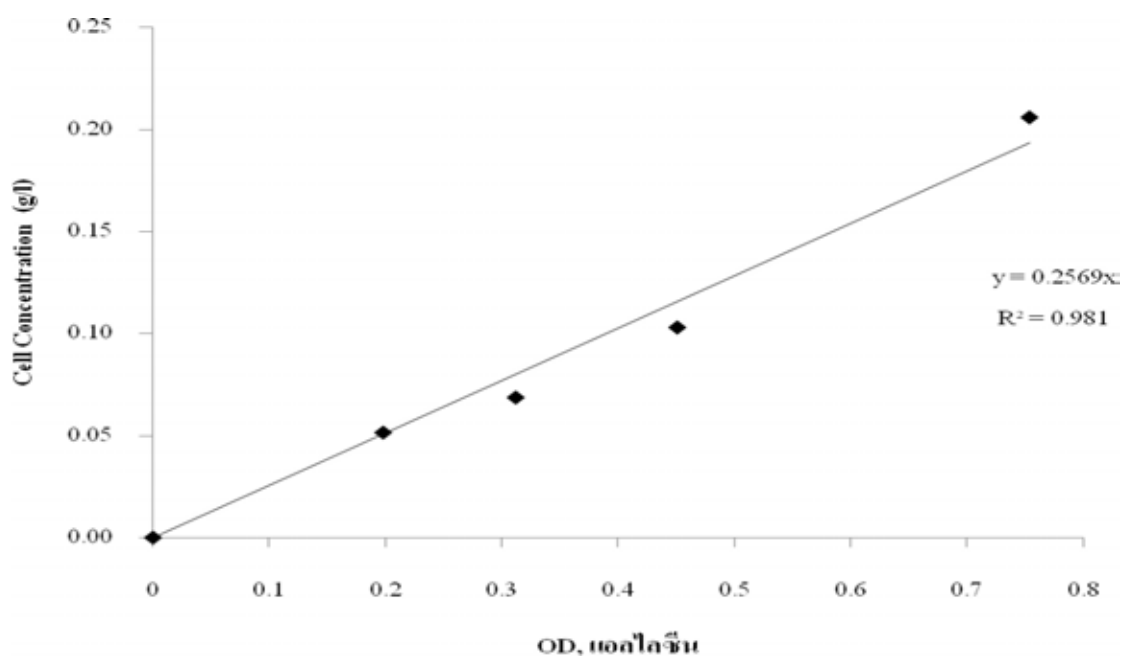
รูปที่ ค.3.8 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้สารอาหารปกติที่ทำจากสารเคมีเกรด Analytical Reagent



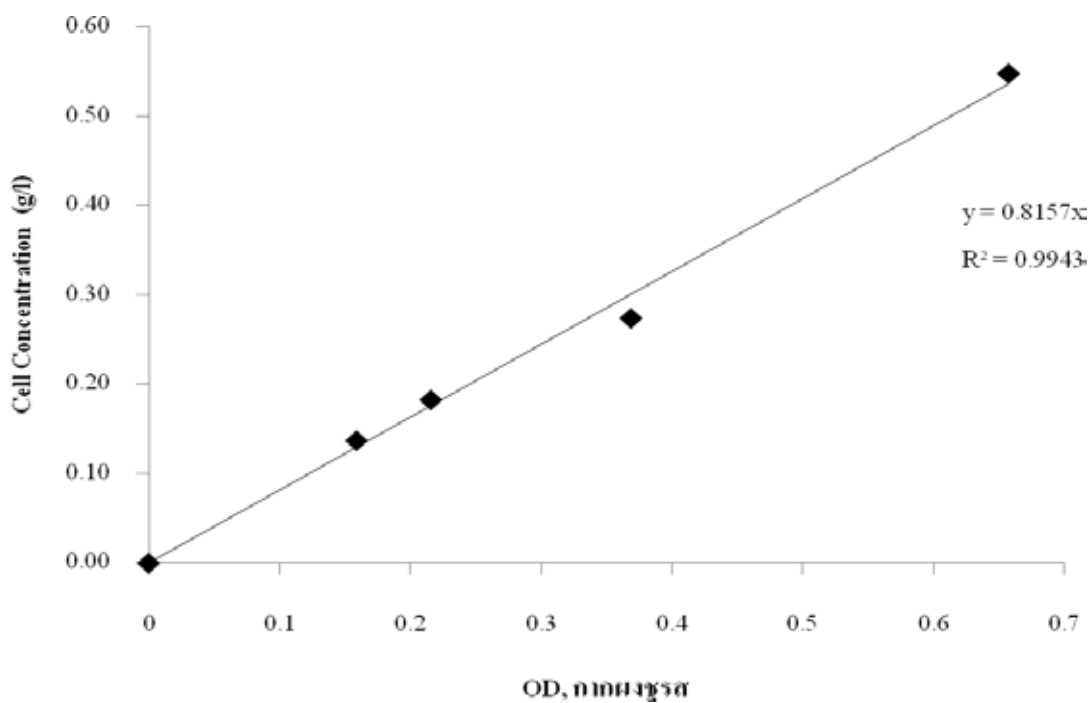
รูปที่ ค.3.9 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้สารอาหารปกติที่ทำจากสารเคมี
เกรด Commercial Reagent



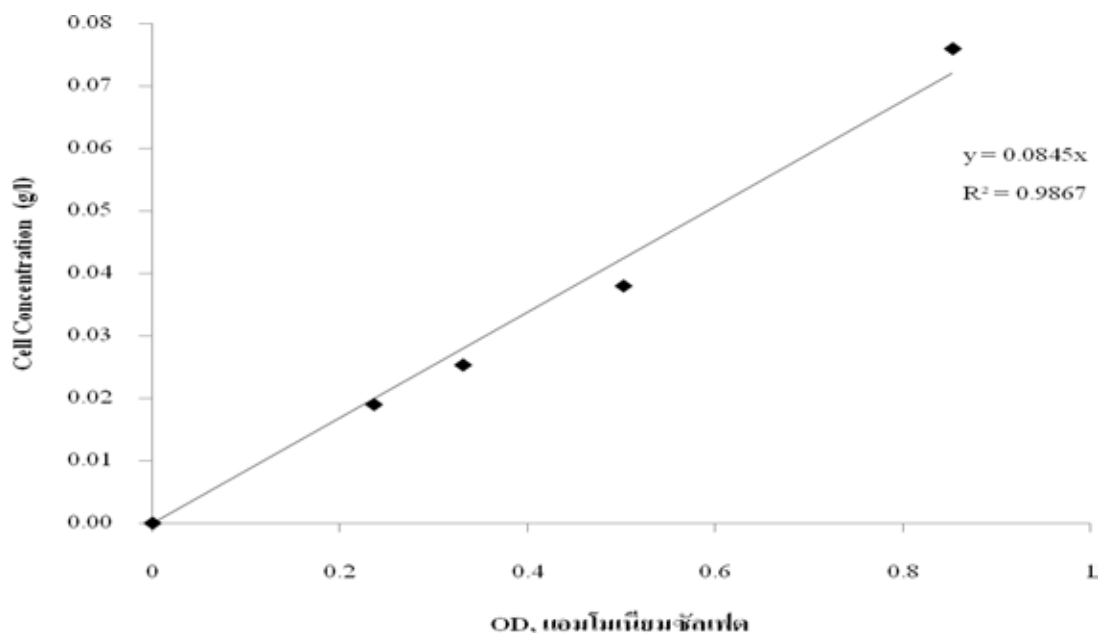
รูปที่ ค.3.10 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ยูเรีย



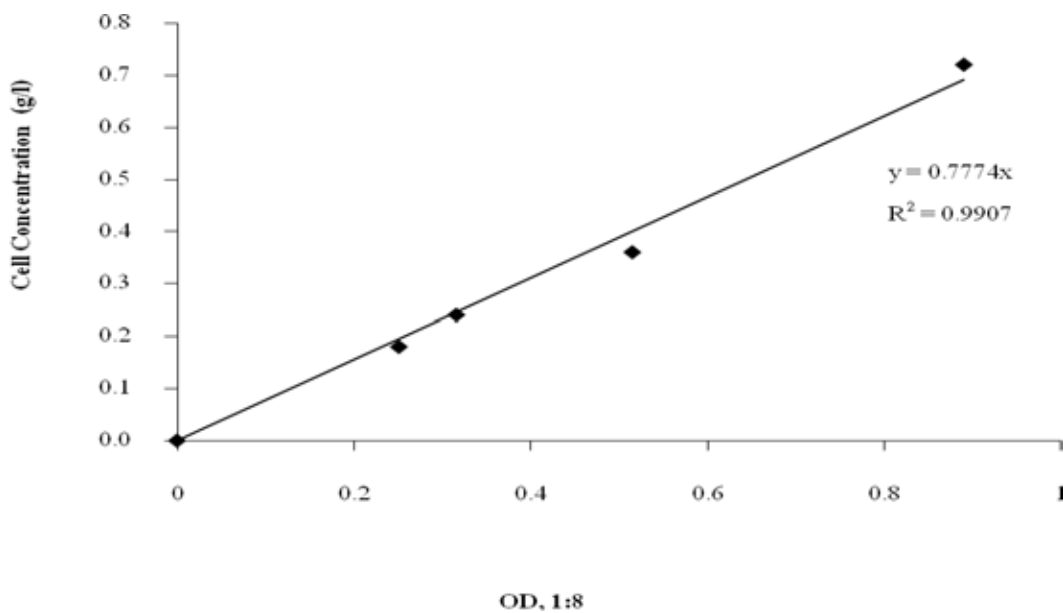
รูปที่ ค.4.11 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้แอลโลซิน



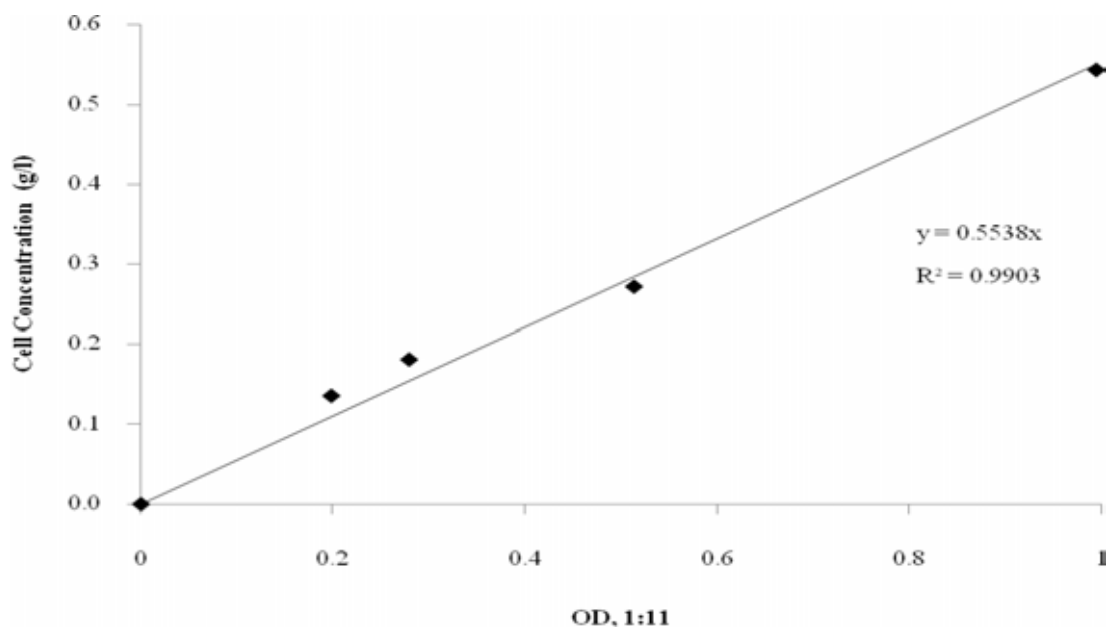
รูปที่ ค.3.12 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้กากผงชูรส



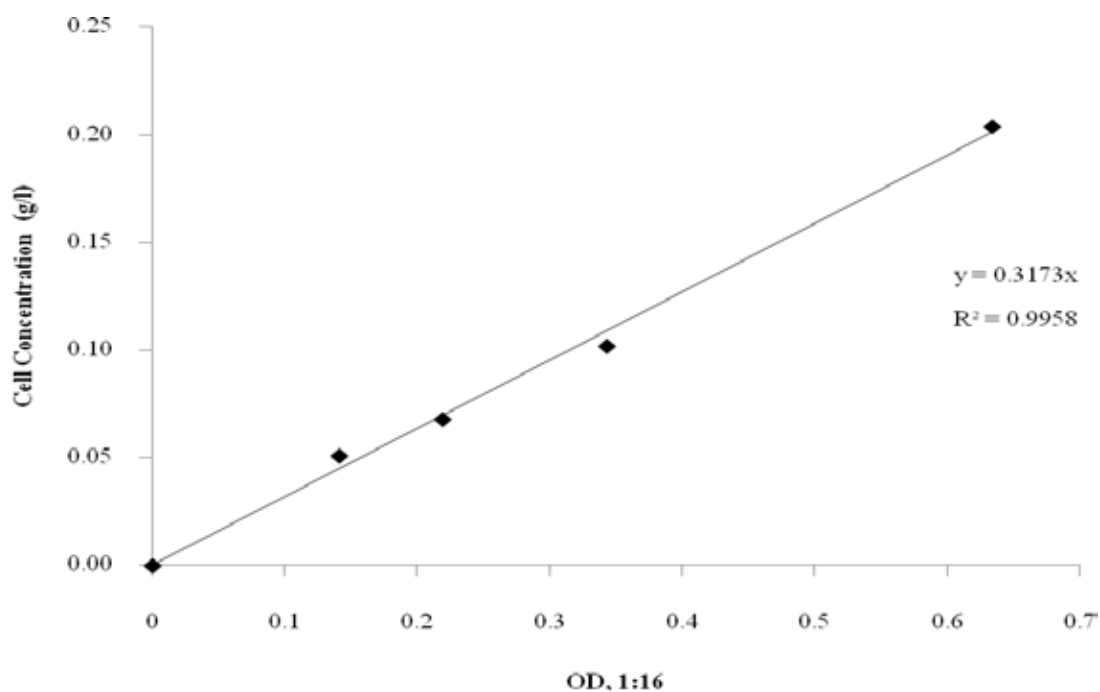
รูปที่ ค.3.13 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้แอม โมเนียมซัลเฟต



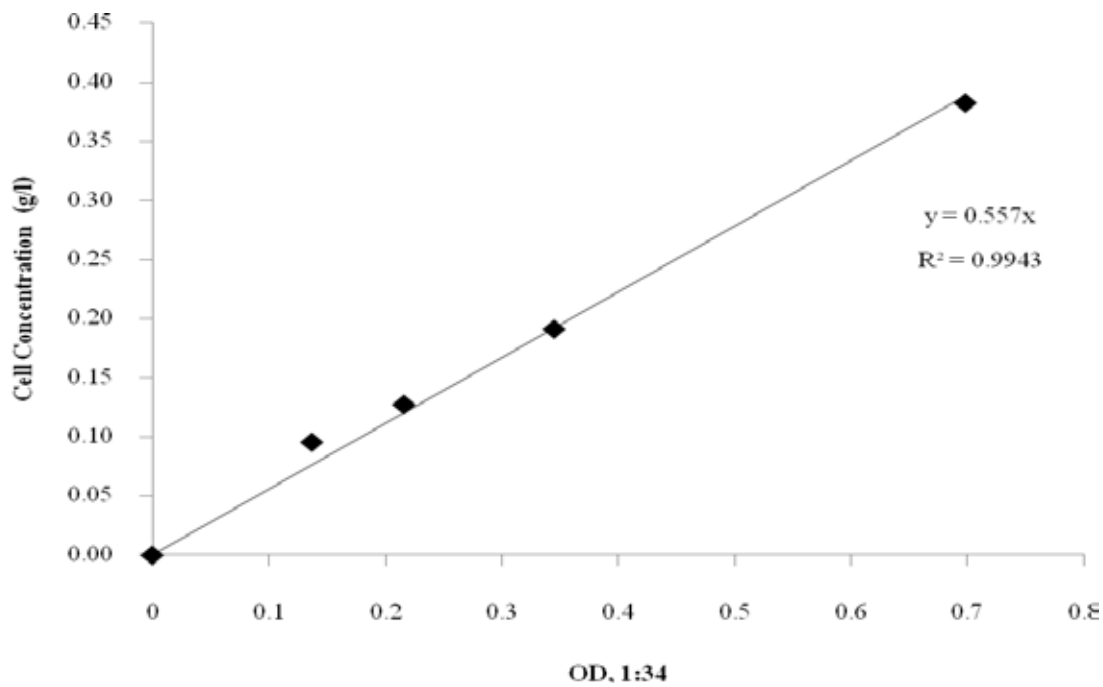
รูปที่ ค.3.14 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์
กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:8



รูปที่ ค.3.15 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:11



รูปที่ ค.3.16 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:16



รูปที่ ๓.๑๗ กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเซลล์ที่มีค่าสัดส่วนระหว่างสารสกัดยีสต์กับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1:34

ภาคผนวก ง

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

Chirawan Kaewrat, Kasidit Nootong. Comparison Between Fixed-bed and Moving-bed Bioreactor in The Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum*. The 37th Congress on Science and Technology of Thailand (STT37). วันที่ 10-11 ตุลาคม 2554 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และ บางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย



The Celebration on the Auspicious Occasion of
His Majesty the King's 7th Cycle Birthday Anniversary
5 December 2011

37TH CONGRESS ON SCIENCE
AND TECHNOLOGY
OF THAILAND

Abstracts

The 37th Congress on
Science and Technology
of Thailand (STT 37)

การประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
ครั้งที่ 37 (วทท 37)

Creative Sciences for Creating the Future
วิทยาศาสตร์สร้างสรรค์ เพื่อสร้างสรรค์อนาคต



10-12 October 2011

Venue : Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, Thailand
10-12 ตุลาคม 2554 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และ บางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ

www.scisoc.or.th/stt37 : www.sc.mahidol.ac.th/stt37

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจิรวรรณ แก้วรัตน์ เกิดวันที่ 29 เดือน กันยายน พ.ศ. 2530 ที่โรงพยาบาลมหाराชา จ.นครศรีธรรมราช ปัจจุบันอายุ 24 ปี จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาปลายจากโรงเรียน จุฬารัตนราชวิทยาลัยนครศรีธรรมราช จ.นครศรีธรรมราช เมื่อปีการศึกษา 2548 และสำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อใน หลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553