

การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลโดย *Clostridium butyricum* DSM 5431  
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไร้อากาศชนิดเบดเคลื่อนที่



นางสาว ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL FROM A FERMENTATION OF  
GLYCEROL BY *Clostridium butyricum* DSM 5431 IN AN ANAEROBIC  
MOVING-BED BIOREACTOR



Miss Jaitip Wuttisarnsukit

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์จากการหมักกลีเซอรอลโดย  
*Clostridium butyricum* DSM 5431 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ  
ไร้อากาศชนิดเบดเคลื่อนที่

โดย

นางสาว ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ

สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.กษิตศ หนูทอง

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรี วงศ์ศรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.กษิตศ หนูทอง)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ชุตินันท์ สติรพิพัฒน์กุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรณารต จงเลิศจรรยา)

ศูนย์วิทยานิพนธ์มหาวิทยาลัย  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยุ วุฒิสารสุกิจ : การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลโดย *Clostridium butyricum* DSM 5431 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไร้อากาศชนิดเบดเคลื่อนที่ (PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL FROM A FERMENTATION OF GLYCEROL BY *Clostridium butyricum* DSM 5431 IN AN ANAEROBIC MOVING-BED BIOREACTOR) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. กษิธิศ หนูทอง, 73 หน้า.

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกที่ได้รับความนิยมเนื่องจากปัญหาความผันผวนของราคาน้ำมันและสภาวะโลกร้อน ส่งผลให้กำลังการผลิตไบโอดีเซลสูงขึ้นและมีกลีเซอรอลเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าแก่กลีเซอรอลคือการหมักกลีเซอรอลโดยแบคทีเรีย *Clostridium butyricum* DSM 5431 เพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล งานวิจัยนี้ศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยการตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 บนวัสดุคูดรีง BCN-009 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยศึกษาปัจจัยของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลจาก 20-60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางจาก 0.3-0.6 ชม.<sup>-1</sup> ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุดเท่ากับ 35.86±0.19 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 10.76±0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.76 เมื่อทำการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup> งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากการหมักกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ต่างกัน ผลการทดลองหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่ได้รับมีค่าเท่ากับ 22.94±0.16 21.18±0.54 17.58±0.14 16.87±0.03 14.53±0.01 และ 9.70±0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม และกลีเซอรอลที่มีเมทานอลผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยรวมแล้วงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ที่มีความเป็นไปได้อย่างดีและสามารถควบคุมสภาวะความเป็นกรดต่างได้ดีกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดคิ่ง นอกจากนี้ชนิดและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลมีผลต่อแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ดังนั้นจึงควรกำจัดสิ่งเจือปนในกลีเซอรอลก่อนดำเนินการหมัก

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....*ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ*  
 สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา.....2552.....

# # 5170554321: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : *Clostridium butyricum* DSM 5431/ 1,3-PROPANEDIOL/  
GLYCEROL/MOVING-BED BIOREACTORS

JAITIP WUTTISARN SUKIT: PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL  
FROM A FERMENTATION OF GLYCEROL BY *Clostridium butyricum*  
DSM 5431 IN AN ANAEROBIC MOVING-BED BIOREACTOR .

THESIS ADVISOR: KASIDIT NOOTONG, Ph.D., 73 pp.

Biodiesel is an alternative energy that becomes favorable due to variation in petroleum prices and concerns about global warming. During biodiesel production, the transesterification of plant oils or animal fats generates glycerol. As the demand for biodiesel increases, a large quantity of glycerol are produced, thereby driving glycerol price down rapidly. One of promising options for glycerol utilization is the synthesis of 1,3-propanediol (1,3-PDO) using *Clostridium butyricum* DSM 5431. Therefore, this research focuses on the production of 1,3-PDO by *C. butyricum* DSM 5431 in a moving-bed bioreactor, with influent glycerol concentrations (i.e., 20-60 g/L) and dilution rate (i.e., 0.3-0.6 hr<sup>-1</sup>) as main experimental variables. The maximum concentration of 1,3-PDO was determined at 35.86±0.19 g/L when the bioreactor was operated at inlet glycerol and dilution rate of 60 g/L and 0.3 hr<sup>-1</sup>, respectively. The corresponding 1,3-PDO productivity and yield for this operating condition are determined at 10.76±0.06 g/L/hr and 0.76, respectively. In addition, the research compares the ability of *C. butyricum* DSM 5431 in producing 1,3-PDO when it was supplied with glycerol having different purities. The experimental result indicated that, with an initial glycerol concentration at 40 g/L, the 1,3-PDO concentrations were measured at 22.94±0.16, 21.18±0.54, 17.58±0.14, 16.87±0.03, 14.53±0.01, and 9.70±0.01 g/L when using pure glycerol, industrial-grade glycerol, and glycerol containing methanol at the following concentrations: 0.8, 2, 3.2 and 4.4 g/L. Overall, this research demonstrates that (1) the 1,3-PDO production in the moving-bed bioreactor was feasible; (2) the moving-bed bioreactor was more effective in controlling suitable pH range in comparison to the fixed-bed column; and (3) the 1,3-PDO production using *C. butyricum* DSM 5431 may require pre-treatment to remove impurities from glycerol.

Department:..... Chemical Engineering.....Student's Signature *Jaitip Wuttisarnsukit*  
Field of study:...Chemical Engineering.....Advisor's Signature *Kasidit Nootong*  
Academic Year:.....2009.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความช่วยเหลือของ อ.ดร. กษิติศ หนูทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.มนตรี วงศ์ศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อ.ดร.ชุตินิพนธ์ สติรพิพัฒน์กุล และ ผศ.ดร. วรนารถ จงเลิศจรรยา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่านที่ได้สละเวลาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	19
3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี.....	19
3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	19
3.1.2 สารเคมี.....	19
3.2 จุลินทรีย์.....	20
3.3 วิธีการทดลอง.....	20
3.3.1 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์.....	20
3.3.2 ถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่.....	22
3.3.3 การตรึงเชื้อจุลินทรีย์บนวัสดุตรึง.....	22
3.3.4 การเริ่มต้นกระบวนการหมักและกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องภายใน ถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่.....	23
3.3.5 ความสามารถของจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากการหมักกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน.....	23
3.3.6 วิธีวิเคราะห์.....	24
3.3.6.2 ความเข้มข้นสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์.....	24
3.3.6.3 การตรึงจุลินทรีย์.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	25
4.1 กระบวนการหมักภายในถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่.....	25
4.1.1 การเริ่มต้นกระบวนการหมักภายในถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่.....	25
4.1.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในถึงปฏิบัติการชีวภาพแบบ เบดเคลื่อนที่.....	26
4.2 ความสามารถของจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากการหมักกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน.....	28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	36
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	36
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	36



รายการอ้างอิง.....	37
ภาคผนวก.....	42
ภาคผนวก ก วิธีการทดลอง.....	43
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลองและกราฟมาตรฐาน.....	45
ภาคผนวก ค บทความที่ได้รับการตีพิมพ์.....	70
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	73



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล..... 6
ตารางที่ 4.1	การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุตรึง BCN-009..... 32
ตารางที่ 4.2	ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1,3-โพรเพนไดออล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก จากการหมักกลีเซอรอลชนิดต่างๆ..... 34
ตารางที่ 4.3	อัตราการใช้กลีเซอรอลและอัตราการเกิดสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลชนิดต่างๆโดยความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร..... 34
ตารางที่ 4.4	การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลซึ่งทำการเปรียบเทียบระหว่างงานวิจัยปัจจุบันและงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งทำการตรึงเซลล์ด้วยวิธีที่ต่างกัน..... 35

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงวัฏจักรการหมักแบบไร้อากาศของกลีเซอรอลโดย <i>Clostridium butyricum</i> .....	3
รูปที่ 2.2 แสดงการตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ.....	11
รูปที่ 3.1 วัสดุตรึง BCN-009.....	18
รูปที่ 3.2 การเพาะเชื้อ <i>Clostridium butyricum</i> DSM 5431.....	20
รูปที่ 3.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่.....	21
รูปที่ 4.1 พื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431 (ซ้าย) และพื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่มีการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ <i>C. butyricum</i> DSM 5431.....	25
รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร.....	30
รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของสาร 1,3- โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอล จากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร.....	31
รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร.....	31
รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร.....	32

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญของปัญหา

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนที่สามารถบรรเทาภาวะโลกร้อน นอกจากนี้ราคาน้ำมันในตลาดโลกที่มีความผันผวนได้ทำให้ไบโอดีเซลได้รับความนิยมมากขึ้น ส่งผลต่อกำหนดการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณมากขึ้น กระบวนการผลิตไบโอดีเซลใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเตอริฟิเคชันซึ่งให้กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง จากการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณมากขึ้นทำให้เกิดกลีเซอรอลขึ้นเป็นจำนวนมากซึ่งส่งผลให้ราคากลีเซอรอลในตลาดตกต่ำลง หนึ่งในทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มมูลค่าแก่กลีเซอรอลคือการหมักกลีเซอรอลจากเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล ทั้งนี้สาร 1,3-โพรเพนไดออลเป็นโมโนเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลสามารถทำได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ กระบวนการผลิตทางเคมีจะใช้เอทิลีนหรือโพรพิลีนเป็นสารตั้งต้น และดำเนินการผลิตภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูงซึ่งแตกต่างจากกระบวนการผลิตทางชีวภาพที่ทำการหมักกลีเซอรอลโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Clostridium butyricum* ทั้งนี้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ได้ปริมาณมากที่สุด

การหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยใช้แบคทีเรีย *C. butyricum* นิยมทำในระบบเซลล์แขวนลอยมากกว่าระบบที่มีการตรึงเซลล์ ถึงแม้ว่าระบบตรึงเซลล์จะมีข้อดีคือ (1) สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้ในความเข้มข้นสูง (2) มีปริมาณเซลล์มาก (3) มีปริมาณเซลล์ที่ถูกชะออกจากระบบน้อยลงในสภาวะที่มีอัตราการเจือจางสูง (4) สามารถป้องกันเซลล์จากแรงเฉือนได้ดี (5) สามารถทนต่อสภาวะที่เกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นและการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (6) สามารถแยกเซลล์จากของเหลวและนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย ทั้งนี้งานวิจัยส่วนใหญ่นิยมตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการกักเซลล์ไว้ในเจลเมทริกซ์หรือใช้กระบวนการดูดซับไว้บนพื้นผิวของวัสดุตรึง เช่น โพลียูรีเทน โพลีสไตรีน หรือไยบอบ ในปี 2009 Suratago และคณะได้ทำการศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยตรึงเซลล์ *C. butyricum* DSM 5431 บนไยบอบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่ง (fixed-bed bioreactor) ผลจากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจาง 0.21 ชม.<sup>-1</sup> จะให้อัตราการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ได้สูงสุดที่ 6.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลและ

ผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่ 29.08 กรัมต่อลิตร และ 0.75 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปัญหาหลักจากการทดลองนี้คือการควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง โดยเฉพาะบริเวณตำแหน่งบนและกลางของคอลัมน์ของเครื่องปฏิกรณ์ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างในบริเวณดังกล่าวต่ำกว่า 6.5 ทำให้จุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลลดลง ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (Moving-bed Bioreactor) เป็นทางเลือกในการปรับปรุงกระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น หลักการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้ใช้การตรึงแบคทีเรียไว้บนพื้นผิวของวัสดุตรึง ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ในของเหลวได้อย่างอิสระและมีการผสมผสานเป็นเนื้อเดียวของของเหลว เนื่องจากการกวน ดังนั้นจึงคาดว่าในถังปฏิกรณ์ประเภทนี้จะสามารถควบคุมค่าความเป็นกรดต่างได้ดีขึ้น และสามารถเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลสารบริเวณผิวนอกของฟิล์มชีวภาพ (Biofilm) ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุตรึง ซึ่งจะส่งผลให้ความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลสูงขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จะศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลโดยเชื้อ *C. butyricum* ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ และศึกษาความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลของ *C. butyricum* โดยกระบวนการตรึงเซลล์จากการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตและปรับปรุงกระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลโดยเชื้อแบคทีเรีย *C. butyricum* ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ ซึ่งประกอบด้วยความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล และผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือ กรดบิวทีริก กรดอะซิติก อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์และผลได้ของผลิตภัณฑ์
3. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลของ *C. butyricum* โดยกระบวนการตรึงเซลล์จากการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม
4. ศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย *C. butyricum* ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการตรึงเซลล์จากกลีเซอรอลที่มีเมทานอลผสมอยู่ในระดับต่างๆ

### 1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจะทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 โดยใช้วัสดุตั้ง BCN-009 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุตั้ง BCN-009
2. ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล (20, 40, 60 กรัมต่อลิตร) และอัตราการเจือจาง (0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ชม.<sup>-1</sup>) ที่มีต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลแบบต่อเนื่องจาก *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ผลการศึกษาจะพิจารณาจากความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ และความเข้มข้นของกรดบิวทิริก กรดอะซิติกผลิตภัณฑ์ข้างเคียง อัตราการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์
3. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ (99.5%) กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม (ความบริสุทธิ์ 95%) โดยความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร กระบวนการหมักทำในระบบแบบกะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยมี BCN-009 เป็นวัสดุตั้ง โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที
4. ศึกษาความสามารถของแบคทีเรีย *C. butyricum* ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการตั้งเซลล์จากกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเมทานอลผสมเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำการหมักในระบบแบบกะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยมี BCN-009 เป็นวัสดุตั้ง โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิเท่ากับ 33 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลในการใช้งานและแนวทางในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่และได้รับข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการขยายกำลังการผลิต
2. สามารถใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

สาร 1,3-โพรเพนไดออล คือ สารเคมีที่ใช้เป็น โมโนเมอร์ในการผลิตโพลีเอสเตอร์ (polyester) และ โพลียูรีเทน (polyurethane) ในกระบวนการโพลีคอนเดนเซชัน (Polycondensation) นอกจากนี้ สาร 1,3-โพรเพนไดออล ยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการทำพรมเป็นหลัก (Besson et al., 2003; Kurosaka et al., 2008) ส่วนการใช้งานในด้านอื่นๆ เช่น เป็นตัวทำละลายและเป็นสารที่เติมลงไป ในกระบวนการผลิตสารหล่อลื่น (Gunzel et. al., 1991; Biebl et. al 1999) ทั้งนี้การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล สามารถทำได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ สำหรับกระบวนการผลิตทางเคมีจะใช้แอโครลีน (acrolein) เป็นสารตั้งต้นในการผลิต ภายใต้สภาวะที่มี อุณหภูมิและความดันสูงซึ่งจะให้ low selectivity และสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้ ปริมาณน้อย ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูง (Zeng et al., 1996; Biebl et. al 1999) ในทางกลับกัน กระบวนการผลิตทางชีวภาพสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการหมัก กลีเซอรอลโดยใช้แบคทีเรียซึ่งใช้อุณหภูมิและความดันปกติ ทั้งนี้แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 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) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาในเรื่องของราคาของกลีเซอรอลที่เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการหมักและราคาของสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นราคาที่รวมต้นทุนในการผลิต ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้ (Deckwer, 1995) ราคาของ 1,3-โพรเพนไดออล (\$) = 1+2× (ราคาของกลีเซอรอล)

#### 2.1 กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางเคมี

การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางเคมีเป็นกระบวนการผลิตที่ยากและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นน้อย (Zeng et al., 2000; Besson et al., 2003) โดยกระบวนการผลิตมี 2 แบบ สำหรับแบบแรกเป็นกระบวนการผลิตของเดกัสซา (Degussa) เป็นแบบที่มีการผลิตทั่วไป โดยสารตั้งต้นในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล คือ แอโครลีน (acrolein) ที่ได้จากปฏิกิริยาการจ่ายอิเล็กตรอนของ โพรพิลีน (propylene) โดยแอโครลีน (acrolein) จะรับน้ำที่อุณหภูมิและความดันปานกลาง จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนัลดีไฮด์ (3-hydroxypropionaldehyde) ในปฏิกิริยาขั้นที่สอง 3-ไฮดรอกซีโพรพิโอนัลดีไฮด์ (3-hydroxypropionaldehyde) รับไฮโดรเจนเพื่อเป็นสาร 1,3-โพรเพน-

ไดออกไซด์ โดยมิรูบีเดียม (rubidium) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้ความดันสูง (90 บาร์) (Brossmer et al., 2000) สำหรับกระบวนการผลิตในแบบที่ 2 ของเชลล์ (Shell) สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตคือ เอทีลีนออกไซด์ (ethylene oxide) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาการรับอิเล็กตรอนของเอทีลีน (ethylene) โดยเอทีลีนออกไซด์จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ 3-ไฮดรอกซีโพรพานอล (3-hydroxypropanal) ด้วยก๊าซสังเคราะห์ในกระบวนการ ไฮโดรฟอมีลเลชัน (hydroformylation) ภายใต้ความดันสูงมาก (150 บาร์) แอลดีไฮด์ถูกสกัดจากสารอินทรีย์ด้วยน้ำและ เกิดปฏิกิริยารับไฮโดรเจน (hydrogenation) โดยมีนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้ความดันเดียวกัน ทั้งนี้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิตแบบแรกและแบบที่สองเท่ากับ 65% และ 80% ตามลำดับ เนื่องจากเอทีลีนออกไซด์ (ethylene oxide) มีราคาต่ำกว่าแอโครลีน (acrolein) ดังนั้นกระบวนการผลิตของเชลล์ (Shell) จึงได้รับความนิยมมากกว่ากระบวนการผลิตของเดกัสซา (Degussa)

## 2.2 กระบวนการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลทางชีวภาพ

กระบวนการผลิตทางชีวภาพสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยกระบวนการหมักกลีเซอรอลโดยใช้แบคทีเรียซึ่งใช้อุณหภูมิและความดันปกติ ทั้งนี้แบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการหมักมีหลายชนิดเช่น *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, และ *Clostridium butyricum* (Gunzel et al., 1991; Pflugmacher et al., 1994; Zhao et al., 2006) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium butyricum* จะสามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้มากที่สุด ดังตารางที่ 2.1



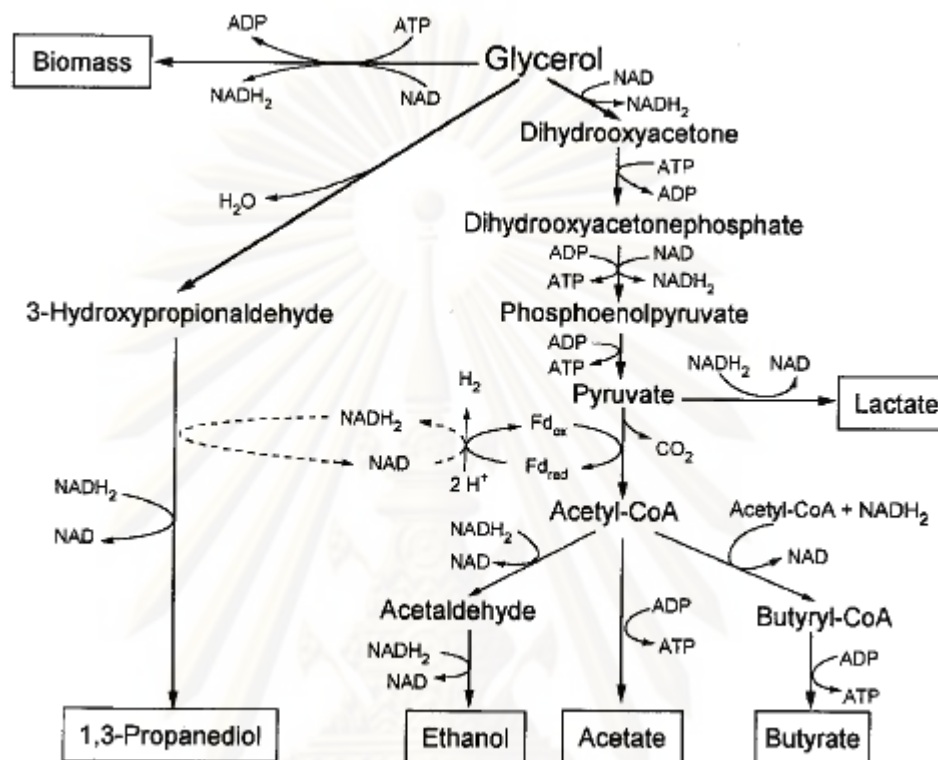
ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นเริ่มต้น กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ ผลิตภัณฑ์	อัตราการผลิต ผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง)	ชนิดของการหมัก	อ้างอิง
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	50	26	0.52	1.85	แบบกะ	Asad-ur-Rehman et. al (2008)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	80	41.4	0.76	1.30	แบบกะ	Pullisirisombat (2007)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	80	44.75	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	56	26.5	0.58	13.30	แบบต่อเนื่อง	Reimann et al. (1998)
<i>C. butyricum</i> DSM 5431	60	29.08	0.75	6.11	แบบต่อเนื่อง	Suratago (2009)
<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	33.6	0.58	-	แบบต่อเนื่อง	Papanikolaou et al. (2004)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอล (ต่อ)

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นเริ่มต้น กลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ ผลิตภัณฑ์	อัตราการผลิต ผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง)	ชนิดของการหมัก	อ้างอิง
<i>C. butyricum</i> F2b	90	47.1	0.53	3.58	แบบกะ	Papanikolaou et. al (2007)
<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. 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	40	18	0.57	1.62	แบบกึ่งกะ	Chen et al. (2003)

## 2.2.1 วัฏจักรการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพจากกระบวนการหมักกลีเซอรอล



รูปที่ 2.1 วัฏจักรการหมักแบบไร้อากาศของกลีเซอรอลโดย *Clostridium butyricum* (Zeng, 1996)

วัฏจักรการหมักของกลีเซอรอลโดย *C. butyricum* เพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ภายใต้สภาวะไร้อากาศ กระบวนการหมักจะเริ่มขึ้นเมื่อกลีเซอรอลแพร่เข้าสู่เซลล์ โดยกลีเซอรอลส่วนแรกจะถูกกำจัดไฮโดรเจน (dehydrogenated) เป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone) และเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) ในวัฏจักรไกลโคไลซิส (glycolysis) จากนั้นไพรูเวต (pyruvate) จะถูกเปลี่ยนเป็นแอซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) โดยเอนไซม์ไพรูเวตเฟอร์เรดอกซินออกซิเดอเรดักเตส (ferredoxin oxidoreductase) และจากแอซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) จะรับอิเล็กตรอนเกิดเป็นเอทานอล โดยมีอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ส่วนบิวทาเรทจะเกิดจากการรับอิเล็กตรอนของบิวทิวริลโคเอนไซม์เอ (butyryl-CoA) ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ จากนั้นจะปล่อยพลังงานอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) และเกิดเป็นบิวทาเรท ส่วนอะซีเตตจะเกิดจากการปลดปล่อยพลังงานอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ของแอซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl-CoA) ซึ่งพลังงานอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) เหล่านี้จะใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งนี้

กลีเซอรอลส่วนที่เหลือจะต้องทำการเอาน้ำออกโดยใช้วิตามินบี<sub>12</sub> เพื่อเปลี่ยนเป็น 3-ไฮดรอกซีโพร-ไพโอนัลดีไฮด์ (3-hydroxypropionaldehyde) จากนั้นจะรับอิเล็กตรอนเกิดเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล

ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล ที่มากที่สุดจะเกิดขึ้นเมื่อมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไฮโดรเจนและกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเท่านั้น (Deckwer, 1995; Zeng, 1996; Biebl, 1999) ทั้งนี้เมื่อปริมาณกลีเซอรอลจำกัดจะส่งผลให้จำนวนเซลล์เกิดขึ้นอย่างเหมาะสมและเกิดเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง และถ้าปริมาณกลีเซอรอลปานกลางจะส่งผลให้ ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออลมีค่ามากที่สุดและปริมาณเอทานอลมากขึ้นซึ่งอาจนำมาสู่การเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่องจากผลิตภัณฑ์ข้างเคียง นอกจากนี้พบว่าเมื่อปริมาณกลีเซอรอลมากเกินไปจะเกิดกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (Biebl, 1999)

## 2.2.2 กระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

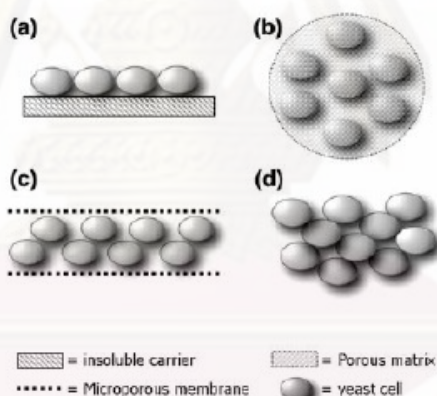
### 2.2.2.1 กระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระบบเซลล์ แขนวลอย

Gonzalez-Pajuelo et al. (2005) ได้ศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล เพื่อเพิ่มอัตราส่วนของผลได้และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูง โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* VPI 3266 ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดยทำการศึกษาปัจจัยของอัตราการเจือจาง (D) ที่เท่ากับ 0.05-0.5 ชม.<sup>-1</sup> และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ป้อนเข้าสู่กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 30 และ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้ถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร มีปริมาตรใช้งานเท่ากับ 1250 มล. โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และความเร็รรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้ได้เปลี่ยนแปลงอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.05-0.5 ชม.<sup>-1</sup> เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจนเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup> จะมีปริมาณกลีเซอรอลเหลือจากการหมักเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการเจือจางที่สูงกว่า 0.3 ชม.<sup>-1</sup> จะมีปริมาณกลีเซอรอลเหลือจากการหมักเท่ากับ 12.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณคาร์บอนต่อพื้นที่มีความสำคัญต่อปริมาณกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไป ดังนั้นอัตราการเจือจางที่เหมาะสมทำให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup> ทั้งนี้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่มากที่สุดและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และ 10.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.03 ชม.<sup>-1</sup> เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ที่มากที่สุดโดยการหมักกลีเซอรอล เมื่อใช้ *C. butyricum* โดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed batch) ซึ่งการทำงานของระบบกึ่งกะจะทำงานโดยการควบคุมการป้อนสารตั้งต้น เนื่องจากระบบกึ่งกะ (fed

batch) จะสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นได้ ทำให้สามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้ในปริมาณมาก ในปี 1994 Saint-Amans และคณะ ได้ทำการศึกษาการหมักในระบบแบบกึ่งกะและแบบกะ สำหรับระบบกึ่งกะสามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 65 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.57 ส่วนการหมักแบบกะสามารถผลิต 1,3-โพรเพน-ไดออลเท่ากับ 35 กรัมต่อลิตรและผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.54

### 2.2.2.2 กระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระบบตรึงเซลล์

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 2.2** การตรึงเซลล์ด้วยวิธีต่างๆ (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

ในขณะที่ช่องว่างภายในวัสดุตั้งที่มาก จะส่งผลในเรื่องของพื้นที่ผิวจำเพาะต่อหน่วยปริมาตรของวัสดุตั้ง ดังนั้นวัสดุตั้งควรมีขนาดของช่องว่างให้เหมาะสม

## 2. การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมตริกซ์ (entrapment within a porous matrix)

การกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมตริกซ์เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางอีกวิธีหนึ่ง Shuler et.al (2001) ซึ่งเมตริกซ์ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น โพลีเมอร์ที่มีรูพรุน (วุ้น อัลจินเต ไคโตซาน เจลลาติน เซลลูโลส และคอลลอยด์) 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) โดยวัสดุตั้งจะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของบีด (bead) ซึ่งภายในเม็ดบีด (bead) จะมีจุลินทรีย์บรรจุอยู่ จากนั้นจะเกิดกระบวนการการเกิดเจล หรือกระบวนการโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) เพื่อผลิตเจลโพลิเมอร์บรรจุเซลล์ไว้กักขัง การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดในเรื่องการแพร่ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้

## 3. การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้น (containment behind a barrier)

การบรรจุเซลล์ข้างหลังตัวขวางกั้นเป็นการตรึงเซลล์ในอุดมคติ ซึ่งใช้ในหลากหลายระบบเมื่อต้องการแยกปริมาณเซลล์ทั้งหมดหรือต้องการแยกผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะเจาะจงออกจากสารขาออก โดยตัวขวางกั้นอาจมีอยู่แล้วภายในระบบ (hollow fibred และ flat membrane reactors) หรือถูกสร้างขึ้นมาเพื่อทำการตรึงเซลล์ (ไมโครแคปซูลและการกักเซลล์สองเฟส) ทั้งนี้เยื่อเลือกผ่านสังเคราะห์โดยปกติคือ โพลีเมอร์ไมโครฟิวเดชัน (polymeric microfiltration) หรืออัลตราฟิวเดชันเมมเบรน (ultra-filtration membranes) ถึงแม้ว่าเยื่อเลือกผ่านที่ใช้มีหลากหลายชนิด เช่น เซรามิก ยางซิลิโคน เป็นต้น การถ่านเทมวอลสารผ่านเยื่อเลือกผ่านไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของรูพรุนและโครงสร้างแต่ขึ้นอยู่กับความชอบน้ำ (hydrophobicity) ความไม่ชอบน้ำ (hydrophilicity) และประจุอีกด้วย Pullsirisombat (2007)

## 4. การรวมตัวของเซลล์ (self-aggregation)

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นารรวมตัวกันของเซลล์ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติ Pullsirisombat (2007) ในอุตสาหกรรมจำนวนมากมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นในเมทาบอลิซึมขั้นแรกและเมทาบอลิซึมขั้นที่สอง เช่น กรดอะซิติก แอนติไบโอติก เซลลูโลสไดคเอนไซม์ เป็นต้น ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศการรวมตัวกันของจุลินทรีย์จะถูกใช้เป็นตัวเร่งการย่อยสลายของกระบวนการเมทาโนจิโนลิซิส (methanogenesis)

### ข้อดีของการตรึงเซลล์

1. การตรึงเซลล์ทำให้เซลล์มีจำนวนมากขึ้น เมื่อจำนวนเซลล์มีมากขึ้นส่งผลให้อัตราการผลิผลิตภัณฑ์สูงขึ้น
2. วัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงเซลล์จะสามารถป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และโลหะหนัก
3. เซลล์ที่ถูกตรึงจะเสถียรและมีกิจกรรมที่ยาวนานมากขึ้น
4. สามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้
5. เพิ่มความคงทนให้กับเซลล์ เมื่อเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้นและการยับยั้งของผลิตภัณฑ์
6. ลดปัญหาเซลล์ถูกชะล้าง (wash out) ออกจากระบบ เมื่อดำเนินการด้วยอัตราการผลิตที่สูง
7. ป้องกันเซลล์จากแรงเฉือน

ทั้งนี้ ได้มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาระบบการหมักกลีเซอรอลโดยการตรึงเซลล์ Zhao (2006) ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ *Klebsiella pneumoniae* โดยการกักเซลล์ด้วย NaCS/PDMAAC (sodium cellulose sulfate/poly-dimethyl-diallyl-ammonium chloride) เมื่อทำการทดลองแบบกะจะ ได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 63.1 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.65 และเมื่อทำการทดลองแบบกึ่งกะ (fed batch) จะ ได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 51.86 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองแบบต่อเนื่องจะได้ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 4.49 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 13.6 กรัมต่อลิตร และผลได้ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.43 ที่อัตราเจือจางเท่ากับ 0.33 ชม.<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังพบว่า การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ทำให้เกิดปัญหาในเรื่องของการถ่ายเทมวลสาร ส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นภายในแคปซูล ซึ่งทำให้ 1,3-โพรเพนไดออลที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังส่งผลให้กลีเซอรอลถ่ายเทเข้าไปภายในแคปซูลได้ปริมาณน้อย ทำให้เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยสารตั้งต้น เช่นเดียวกับ Pullsirisombat (2007) ทำการตรึงเซลล์ลงบน  $\gamma$ -อะลูมินาในเจลอัลจินา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล ที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าในระบบเซลล์แขวนลอย เนื่องจากบริเวณพื้นที่ผิวของ  $\gamma$ -อะลูมินา มีความหนาแน่นของประจุบวกสูงส่งผลให้รบกวนกิจกรรมของเซลล์และค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย

นอกจากการตรึงเซลล์ด้วยการกักเซลล์ภายในรูพรุนของเมทริกซ์ (entrapment within a porous matrix) แล้ว ยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีดูดซับ (adsorption) บน

วัสดุครึ่ง ในปี 1994 Pflugmacher และคณะได้ทำการศึกษาการตรึง *Citrobacter freundii* เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ ซึ่งทำการตรึงเซลล์ลงบนโพลียูรีเทนที่ได้มีการดัดแปลง โดยใช้กลีเซอรอลเป็น แหล่งคาร์บอนซึ่งมีการป้อนกลีเซอรอลอย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้ในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ ในเครื่องปฏิกรณ์แบบเบดนิ่งขนาด 500 มล. ทั้งนี้ระบบนี้มีการเวียนกลับในขาออกที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 3 ชม.<sup>-1</sup> เพื่อให้ระบบเกิดการผสมกันอย่างสมบูรณ์ จากนั้นมีทำการบ่มเชื้อในถังหมัก เป็นเวลา 24 วัน อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอัตราการเจือจางของการป้อนสารอาหารเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup> และความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 400 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้ปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ อัตราการเจือจางที่เท่ากับ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 ชม.<sup>-1</sup> และความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 400 500 550 600 650 700 750 และ 800 มิลลิโมลาร์ จากการทำการทดลองเริ่มต้นทำการศึกษา ปัจจัยในเรื่องของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอล โดยทำการควบคุมอัตราการเจือจางที่ต่ำที่สุด เท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup> จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลต่ำ จะได้ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์สูง ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงขึ้นไม่ได้ส่งผลให้ผล ได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์สูงขึ้น เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น ดังนั้นจึงเลือกความ เข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 400 มิลลิ-โมลาร์ เพื่อใช้ในการศึกษาปัจจัยในส่วนของการ อัตราการเจือจาง จากการทดลองพบว่า ที่อัตราการเจือจางในช่วง 0.3-0.5 ชม.<sup>-1</sup> จะทำให้ได้ผลได้ของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์สูงขึ้นไปตามลำดับ และจะได้ผลได้ต่ำลงเมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.<sup>-1</sup> ดังนั้นจึงเลือกอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม.<sup>-1</sup> ซึ่งได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 8.2 กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง และในปี 2009 Suratago ได้ศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพน-ไดออกไซด์ โดยการตรึง เซลล์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 โดยใช้ยิบบวเป็นวัสดุครึ่งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ เบดนิ่ง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ พิจารณา จากความเข้มข้นของสารตั้งต้น โดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 60 80 และ 100 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.13 0.17 0.21 และ 0.25 ชม.<sup>-1</sup> ผลการทดลอง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 60 กรัมต่อลิตรและอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.21 ชม.<sup>-1</sup> จะให้อัตราการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์สูงสุดที่ 6.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์และผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่ 29.08 กรัมต่อลิตร และ 0.75 ตามลำดับ และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่สูงกว่า 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการ เจือจางที่สูงกว่า 0.21 ชม.<sup>-1</sup> ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการยับยั้ง ของสารตั้งต้นและอัตราการเจือจางที่สูง ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่บนตัวกลางหลุดออกมา บางส่วน ทั้งนี้การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ถูกยับยั้งเมื่อสภาวะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความ เป็นกรดต่ำกว่า 6.5 ทั้งนี้การตรึงเซลล์ทำให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้น



### 2.2.2.3 กระบวนการหมักกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล

งานวิจัยที่ทำการศึกษากการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยการเปรียบเทียบกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการที่แตกต่างกันและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ โดย Asad-ur-Rehman et al. (2008) ทำการศึกษากการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งทำการเปรียบเทียบกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการที่แตกต่างกันและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 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 เมื่อใช้กลีเซอรอล บริสุทธิ์และกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และในปี 2006 Ying Mu และคณะได้ทำการศึกษากโดยเปรียบเทียบการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดย *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99% กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันพืชเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้ได้ทำการทดลองในระบบแบบกะ จากการทดลองในระบบแบบกะ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่เกิดขึ้นเท่ากับ 9.4 7.3 8.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99% กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันพืชเป็นตัวเร่งตามลำดับ และในปี 1995 Petitedmange และคณะได้ทำการศึกษากการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดย *C. butyricum* E5 ซึ่งทำการหมักแบบกึ่งกะเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 109 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เท่ากับ 58 กรัมต่อลิตร ถัดมาในปี 2000 Papanikolaou et. al ศึกษาการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยเชื้อ *Clostridium butyricum* F2b ซึ่งทำการหมักแบบต่อเนื่อง 1 ช่วงและ 2 ช่วง โดยการหมักแบบต่อเนื่องแบบ 1 ช่วง ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02 ถึง 0.29 ชม<sup>-1</sup> ภายในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลเท่ากับ 30 60 และ 90 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น

ส่งผลให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มากที่สุดเท่ากับ 35-48 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02-0.12 ชม<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลง และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในขาออกเพิ่มสูงขึ้น สำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง 2 ช่วง ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร โดยในช่วงแรกจะใช้อัตราการเจือจางที่สูงเท่ากับ 0.08-0.3 ชม<sup>-1</sup> เพื่อให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูง ส่วนในช่วงที่สองจะใช้อัตราการเจือจางต่ำเท่ากับ 0.03-0.12 ชม<sup>-1</sup> เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์สูง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มากที่สุดที่ผลิตได้เท่ากับ 41-46 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุดเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้น ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลง และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากอัตราการเจือจางสูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการไหลของกลีเซอรอลที่เหลือเพิ่มสูงขึ้น ทำให้แบคทีเรียได้รับกลีเซอรอลไม่สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้อย่างเพียงพอ จึงสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ได้ปริมาณน้อย และในปี 2004 Papanikolaou และคณะได้ทำการศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์แบบต่อเนื่อง โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* F2b ซึ่งทำการศึกษาในเรื่องของความเข้มข้นของกลีเซอรอล ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่ผลิตได้ โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลจาก 20 – 90 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อทำการหมักแบบต่อเนื่องที่สภาวะคงที่ ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.04 ชม<sup>-1</sup> ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 44 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร ในปีถัดมา Papanikolaou et al. (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-โพรเพนไดออกไซด์เท่ากับ 47.1 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้การทดลองแบบต่อเนื่องได้ทำการทดลองแบบ 2 ชั้น เนื่องจากในขั้นแรกจะใช้อัตราการเจือจางที่สูงที่สุดเพื่อให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุด ส่วนขั้นที่สองจะใช้อัตราการเจือจางต่ำสุดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มากที่สุด ซึ่งทั้งสองขั้นทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร และความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร และอัตราการไหลเท่ากับ 55 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยในขั้นแรกอัตราการ

เจือจางจะเท่ากับ 0.11 ซม.<sup>-1</sup> และปริมาตรที่ใช้เท่ากับ 0.5 ลิตร ส่วนในขั้นที่สองจะมีอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.04 ซม.<sup>-1</sup> 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 ซึ่งอาจมีผลมาจากปฏิกิริยาการย่อยสลายของ 3-ไฮดรอกซีโพรไพโอนอลดีไฮด์ (3-HPA) ที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสารอาหารที่เซลล์ใช้ในการเจริญเติบโต

## 2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์

### 2.2.3.1 ความเป็นกรดต่าง

ความเป็นกรด ต่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และเป็นสภาวะที่ต้องมีการควบคุมเพื่อให้เซลล์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณมาก Gunzel et al. (1991) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0-8.0 จากการทดลองพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นจาก 6 -7 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มีค่าเพิ่มสูงขึ้นและเมื่อค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 7 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลง ดังนั้นค่าความเป็นกรด ต่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7 และในปี 2007 Pullsirisombat ได้ทำการหมักกลีเซอรอล พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชม. ค่าความเป็นกรดต่างลดลงเท่ากับ 6 แต่ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่มีค่าคงที่ ทั้งนี้ความเข้มข้นเซลล์ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในระหว่างกระบวนการหมัก ส่งผลทำให้ค่าความเป็นกรด ต่างมีค่าลดลงจาก 7 เป็น 4 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด ต่างให้เท่ากับ 7 เนื่องจากความเป็นกรดต่างมีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก เช่น อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น

### 2.2.3.2 อุณหภูมิ

การเจริญเติบโตของเซลล์มีความจำเป็นในการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม เพื่อให้เซลล์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณมาก โดยในปี 1991 Gunzel และคณะได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อกระบวนการหมักสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเท่ากับ 30 – 37

องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่ออุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มีค่าเพิ่มสูงขึ้น และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลงอย่างมาก ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยผลได้ของผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 0.61

### 2.2.3.3 ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์

ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญของกระบวนการหมักกลีเซอรอล เนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่สูง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทั้งนี้ Colin (2000) ได้ศึกษาการศึกษาการเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ *Clostridium butyricum* ที่เกิดจากสารตั้งต้นในกระบวนการหมักกลีเซอรอล เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 20-160 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มากที่สุดเท่ากับ 63.7 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร และไม่เกิด 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 160 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักสูงกว่า 65 กรัมต่อลิตร จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดของ จุลินทรีย์ลดลงเรื่อยๆ และในปี 2007 Pullsirirombat ได้ศึกษาปัจจัยในเรื่องของการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium butyricum* ของสารตั้งต้นเช่นกัน โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40-130 กรัมต่อลิตรซึ่งทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. 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-โพรเพนไดออกไซด์ อะซีเตต เอทานอลและแลคเตต มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 200 – 1100 มิลลิโมลต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูง

กว่า 1100 มิลลิโมลต่อลิตร ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ต่างๆมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น

นอกจากนี้ Gonzalez-Pajuelo (2004) ศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระบบแบบกะ โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* VPI 3266 ซึ่งทำการหมักกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลซึ่งมีความบริสุทธิ์ 65% 92% และกลีเซอรอลทางการค้าซึ่งมีความบริสุทธิ์ 87% ทั้งนี้ได้ศึกษาการเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น โดยความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 20 – 100 กรัมต่อลิตร พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ถูกยับยั้ง เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 92% และ 87% การเจริญเติบโตของเซลล์จะใกล้เคียงกัน ส่วนกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65% เซลล์จะเจริญเติบโตน้อยกว่าใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 92% และ 87% เนื่องจากกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65% มีสิ่งเจือปนมากทำให้เซลล์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต ไม่เพียงแต่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เท่านั้น ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่มากเกินไปก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เช่นเดียวกัน ในปี 1991 Biebl ได้ทำการศึกษาปัจจัยในเรื่องของการเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งเกิดจากการสะสมของผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล จากการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือ กรดอะซิติก กรดบิวทริกเท่ากับ 27 และ 19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงกว่า 80 กรัมต่อลิตร เซลล์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตเนื่องจากการยับยั้งของสารตั้งต้นอีกด้วย

## 2.3 ประโยชน์ของสาร 1,3-โพรเพนไดออล

สาร 1,3-โพรเพนไดออลนำไปใช้งานในด้านโพลีเมอร์ (Zeng et al., 2002; Besson et al., 2003; Kurosaka et al., 2008) โดยคุณสมบัติของสาร 1,3-โพรเพนไดออล คือ มีน้ำหนักเบา มีความยืดหยุ่น และสามารถย่อยสลายได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวสาร 1,3-โพรเพนไดออล จึงถูกนำมาใช้เป็นโมโนเมอร์ในการผลิตโพลีเอสเทอร์ คือ โพลีไตรเมทิลีน เทอเรพทาเลท (Polytrimethylene terephthalate) ซึ่งมีคุณสมบัติหลากหลายกว่า โพลีเอทิลีน เทอเรพทาเลท (Polyethylene terephthalate) นอกจากนี้สาร 1,3-โพรเพนไดออลสามารถนำไปใช้งานในด้านต่างๆ เช่น ปรับปรุงคุณสมบัติของตัวทำละลาย (เพิ่มความยืดหยุ่นในกระบวนการผสมเอสเทอร์และสารเติมแต่งอื่นๆ) ใช้เป็นสารยึดเกาะ (adhesives) สารลดแรงตึงผิว อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอ

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

Vertical Laminar flow (VS-124, ISSCO , U.S.A.)

Centrifuger (Kubota 5100 apan, Kubota Corporation, Japan)

Vortex mixer (G-560E, Scientific Industries, Inc., U.S.A.)

Spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Japan)

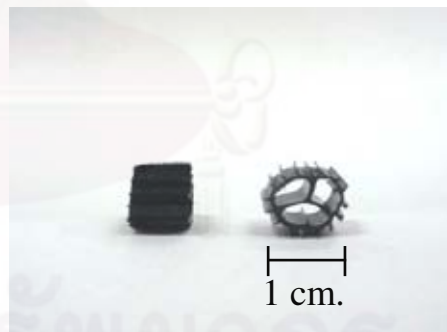
Autoclave (SS-325, TOMY, Japan)

Hot Air Oven (ULM 500, Memmert, Germany)

pH Meter (MP220, Mettler Toledo, Switzerland)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (Modified Moving Bed Bioreactor)

วัสดุตรึง BCN-009 ทำจาก โพลีเอทิลีนที่มีค่าความหนาแน่นสูง (HDPE) มีพื้นที่ผิวจำเพาะเท่ากับ 834 ตร.ม./ลบ.ม.



รูปที่ 3.1 วัสดุตรึง BCN-009

##### 3.1.2 สารเคมี

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (APS Finechem, Australia<sup>1</sup>)

$\text{CaCO}_3$  (Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)

$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (APS Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (APS, Australia<sup>2</sup>)  
 $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck, Germany<sup>1</sup>)  
 HCl (Ajax Finechem, New Zealand)  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Ajax laboratory chemicals, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (APS, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (APS Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)  
 NaOH (Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (APS, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Ajax Finechem, Australia<sup>1</sup>)  
 $\text{ZnCl}_2$  (APS, Australia<sup>1</sup>)  
 Antifoam (Ajax Finechem, Australia)  
 Ethanol (VWR, CE<sup>1</sup>)  
 Glycerol (Fisher Scientific UK Limited, UK<sup>1</sup>)  
 1,3-propanediol (Acros Organics, U.S.A.<sup>2</sup>)  
 Reinforced Clostridial Medium (Himedia, India<sup>2</sup>)  
 Yeast extracts (Himedia, India<sup>2</sup>)  
 Remark: <sup>1</sup>Analytical reagent  
           <sup>2</sup>Laboratory reagent

## 3.2 จุลินทรีย์

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 จาก American Type Culture Collection (ATCC) BAA-557<sup>TM</sup>

## 3.3 วิธีการทดลอง

### 3.3.1 การเพาะเชื้อจุลินทรีย์

การเพาะเชื้อ *Clostridium butyricum* DSM 5431 ดำเนินการดังรูปที่ 3.2 เชื้อ *C. butyricum* อยู่ในสารผสมระหว่าง Reinforced Clostridial Medium (RCM) กับกลีเซอรอล 10% ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ซึ่งเก็บภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเตรียมถ่ายเชื้อเริ่มต้นทำการ

เตรียมอาหาร RCM ลงในหลอดแก้ว จากนั้นอาหารที่เตรียมไว้จะถูกนำไปฆ่าเชื้อที่ภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 บรรยากาศ อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะถูกกำจัดออกซิเจนโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนที่อัตรา 0.1 vvm เป็นเวลา 6 นาที แล้วจึงทำการถ่ายเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 10% 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 และ yeast extract 1 กรัมต่อลิตร จากนั้นอาหารที่เตรียมไว้จะถูกนำไปฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 บรรยากาศ จากนั้นอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะนำไปกำจัดออกซิเจนโดยใช้ไนโตรเจนที่อัตรา 0.1 vvm เป็นเวลา 6 นาที แล้วจึงถ่ายเชื้อ *C. butyricum* ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหาร RCM 10% โดยปริมาตร ลงในอาหาร preculture จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสและเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

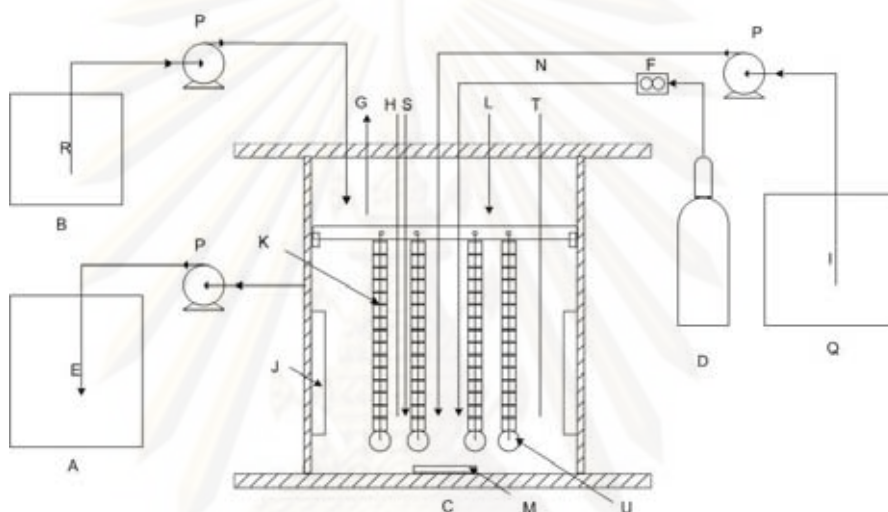


รูปที่ 3.2 การเพาะเชื้อ *Clostridium butyricum* DSM 5431



### 3.3.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดเคลื่อนที่

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (รูปที่ 3.3) ทำจากอะคริลิก โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีขนาด 6.5 ลิตร ความสูง 25.1 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 19 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอกเท่ากับ 20 ซม. ภายในมีแผ่นกั้น (Baffle) 4 อัน ขนาด 1x9 ซม. ด้านบนมีแท่นแขวนวัสดุตรึงที่เจาะช่อง 3 มม. จำนวน 8 ช่อง เพื่อแขวนวัสดุตรึง BCN-009 ที่ร้อยเป็นเส้นและถ่วงน้ำหนักด้วยลูกแก้ว



**รูปที่ 3.3** ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ : A ถังเก็บผลิตภัณฑ์ (1,3-PDO); B ขวด NaOH; C ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่; D ถังก๊าซไนโตรเจน; E สารขาออก; F เครื่องวัดอัตราการไหล; G ก๊าซขาออก; H เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH probe); I สารตั้งต้น; J แผ่นกั้น (Baffle); K ตัวกลาง BCN-009 ที่ร้อยเข้าด้วยกัน; L สารป้องกันฟอง (Antifoam); M แท่งแม่เหล็กกวนสาร; N ก๊าซไนโตรเจน; P เพอริสตาติกปั๊ม (peristaltic pump); Q ถังเก็บสารอาหาร; R NaOH; S ท่อเก็บสารตัวอย่าง; T เทอร์โมมิเตอร์; U ลูกแก้ว

### 3.3.3 การตรึงเชื้อจุลินทรีย์บนวัสดุตรึง

วัสดุตรึงเซลล์จุลินทรีย์ BCN-009 จะถูกร้อยเป็นเส้น เส้นละ 15 ชิ้น เป็นจำนวน 480 ชิ้น แต่ละเส้นจะถูกถ่วงน้ำหนักด้วยลูกแก้ว เพื่อป้องกันการลอยตัวและอัดแน่นบริเวณผิวของของเหลวของวัสดุตรึงเซลล์ การแขวนวัสดุตรึงเซลล์ในลักษณะดังกล่าวยังเปิดโอกาสให้วัสดุตรึงเซลล์เคลื่อนที่ได้จากอิสระตามการไหลวนของของเหลว วัสดุตรึงเซลล์ที่ร้อยเป็นเส้นจะถูกฆ่าเชื้อโดยล้างด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และแช่เอทานอลเป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำอีกครั้ง

กระบวนการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีวัสดุตรึงบรรจุอยู่ ดำเนินการโดยถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 800 มล. จากหัวข้อ 3.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3200 มล. โดยมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อได้มีการให้ก๊าซไนโตรเจนในอัตรา 0.1 vvm เพื่อกำจัดออกซิเจนเป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นทำการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส โดยมีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 ด้วย NaOH 2 โมลาร์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 48 ชม. ภายใต้สภาวะที่ระบุในข้างต้น จนกระทั่งพบไบโอฟิล์มเกิดขึ้นบริเวณผิวของวัสดุตรึง

### 3.3.4 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

การเริ่มต้นกระบวนการหมักดำเนินการโดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรึงบนวัสดุตรึงจากหัวข้อ 3.3.3 มาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อและนำอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าสู่ระบบ ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ได้ผ่านการกำจัดออกซิเจนโดยใช้ไนโตรเจนเป็นเวลา 15 นาที ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างโดยชุดควบคุมอัตโนมัติเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าและอัตราการเจือจางเป็นตัวแปรหลักในการทดลอง โดยกำหนดความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ในแต่ละความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าจะเพิ่มอัตราการเจือจางจาก 0.3 – 0.6 ชม<sup>-1</sup> ในแต่ละสภาวะจะทำการเก็บตัวอย่างของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ทุกๆ 8 ชม. เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล กลีเซอรอล กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก เพื่อนำมาวิเคราะห์หาข้อมูลที่สภาวะคงตัวของการทดลองในแต่ละชุด

### 3.3.5 ความสามารถของจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จาก การหมักกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน

การทดลองในส่วนนี้เปรียบเทียบความสามารถของจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ ดังนี้ (1) กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99.5% (2) กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม และ (3) และกลีเซอรอลที่มีเมทานอลปนเปื้อนความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตรปนเปื้อน ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ทำการทดสอบใช้เซลล์จากหัวข้อ 3.3.3 และทำการทดลองภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่โดยควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 8 ชม. เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออล กลีเซอรอล กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก

### 3.3.6 วิธีวิเคราะห์

#### 3.3.6.1 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  $\text{H}_3\text{PO}_4$  20 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหลเท่ากับ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส สารตัวอย่างถูกฉีดด้วยปริมาตร 50 ไมโครลิตร การวิเคราะห์ HPLC ดำเนินการที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 3.3.6.2 การตรึงจุลินทรีย์

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

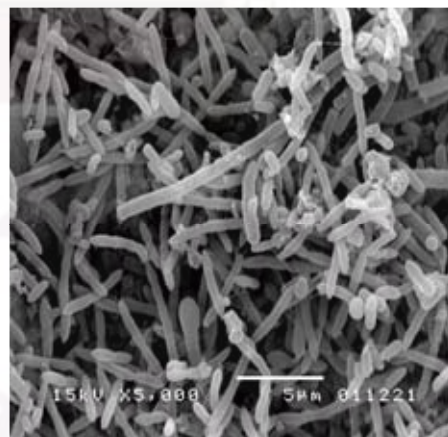
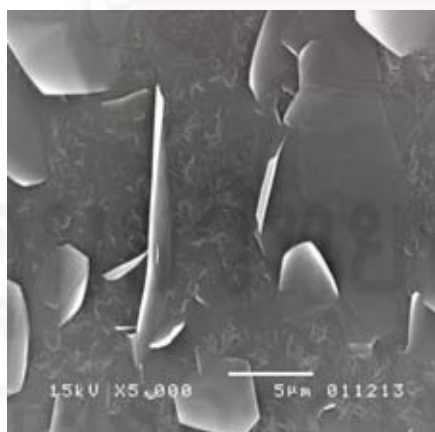
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 กระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

##### 4.1.1 การตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 และการเริ่มต้นกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

การตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 สังเกตพบว่าการเกิดขึ้นของไบโอฟิล์มที่ผิวของวัสดุตรึง BCN-009 หลังจากเริ่มต้นตรึงเชื้อได้ 144 ชม. จากนั้นทำการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม<sup>-1</sup> ในแบบต่อเนื่อง ในระหว่างการเริ่มต้นระบบพบการเพิ่มขึ้นของไบโอฟิล์มและฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณผิวของวัสดุตรึง BCN-009 นอกจากนี้ยังได้กลิ่นของกรดบิวทิริกเกิดขึ้น จากการเปรียบเทียบวัสดุตรึงโดยใช้ SEM พบว่าวัสดุตรึง BCN-009 ที่ไม่ผ่านการตรึงมีผิวขรุขระเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างจากวัสดุตรึงที่ผ่านการตรึงเชื้อซึ่งพบจุลินทรีย์กระจายตัวบนผิวเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 4.1) ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์มีรูปร่างเป็นแท่งและสายยาวและเจริญเติบโตเป็นชั้นๆ ลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลของ Suratago et al. (2009) จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอลและสาร 1,3-โพรเพนไดออล พบว่าระบบเข้าสู่สภาวะคงตัวเมื่อผ่านไป 96 ชม. โดยมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลและสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่ 2.4 กรัมต่อลิตร และ 11.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 พื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่ไม่ผ่านการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 (ซ้าย) และพื้นผิวของวัสดุตรึง BCN-009 ที่มีการตรึงเชื้อจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431

#### 4.1.2 กระบวนการหมักกลีเซอรอลแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่

การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยตรงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 บนวัสดุตรึง BCN-009 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่แบบต่อเนื่อง ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าที่ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 ชม.<sup>-1</sup> สภาวะภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ที่มีความเสถียรสูง โดยสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 33 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ  $7.0 \pm 0.68$  ตลอดจนการทดลอง ความสามารถในการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างให้อยู่ในสภาวะเหมาะสม (pH = 6.97 – 7.0) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่แตกต่างจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่งซึ่งพบการลดลงของค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 6.5 บริเวณส่วนกลางและบนของคอลัมน์ ซึ่งทำให้อัตราการใช้กลีเซอรอลของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ลดลง (Suratago et al. 2009) ในงานวิจัยนี้การเคลื่อนที่ของวัสดุตรึง BCN-009 การปั่นกวและแผ่นกั้น สามารถกระจายสารละลายบัพเฟอร์ให้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ (เช่น กรดบิวทริกและกรดอะซิติก) ได้อย่างทั่วถึง

ตารางที่ 4.1 สรุปผลการดำเนินการหมักกลีเซอรอลแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ จากการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุดเท่ากับ  $12.32 \pm 0.17$   $10.24 \pm 0.10$   $8.63 \pm 0.06$  และ  $7.38 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ  $1.78 \pm 0.14$   $4.30 \pm 0.11$   $6.50 \pm 0.05$  และ  $7.97 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 ชม.<sup>-1</sup> ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลลดลง เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจาก 0.3-0.6 ชม.<sup>-1</sup> ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือซึ่งเพิ่มสูงขึ้น เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มเพิ่มขึ้นจาก 0.3-0.6 ชม.<sup>-1</sup> อัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการไหลของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ไหลออกอย่างรวดเร็ว ทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงไม่สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้อย่างเพียงพอ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามอัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงขึ้น โดยอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุดเท่ากับ  $4.43 \pm 0.03$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.<sup>-1</sup>

จากการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่มากที่สุดเท่ากับ  $19.67 \pm 1.31$   $23.31 \pm 1.21$   $19.6 \pm 0.72$  และ  $17.62 \pm 0.77$  กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ  $9.01 \pm 0.61$   $7.37 \pm 0.66$   $9.1 \pm 0.47$  และ  $10.72 \pm 0.37$  กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 ชม.<sup>-1</sup> ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลลดลง เมื่ออัตราการเจือจางสูงกว่า 0.4 ชม.<sup>-1</sup> ซึ่ง

สอดคล้องกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่ออัตราการเจือจางสูงกว่า 0.4 ซม.<sup>-1</sup> เนื่องจากอัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการไหลของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ไหลออกอย่างรวดเร็ว ทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงไม่สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้อย่างเพียงพอ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ปริมาณน้อย ทั้งนี้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ซม.<sup>-1</sup> มีค่าน้อยกว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ซม.<sup>-1</sup> เนื่องจากการดำเนินการที่ยังไม่เข้าสู่สภาวะคงที่เท่าที่ควร ส่งผลให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลและกลีเซอรอลที่เหลือมีแนวโน้มแตกต่างจากการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 20 และ 60 กรัมต่อลิตร สำหรับอัตราการเจือจางที่ส่งผลต่ออัตราการผลิตผลิตภัณฑ์พบว่า อัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูงขึ้น เมื่ออัตราการเจือจางต่ำจะให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลมากที่สุดและที่อัตราการเจือจางสูงจะให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูง โดยอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงที่สุดเท่ากับ  $10.57 \pm 0.46$  กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ซม.<sup>-1</sup>

จากการหมักกลีเซอรอลความที่เข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่มากที่สุดเท่ากับ  $35.86 \pm 0.19$   $33.36 \pm 0.26$   $31.15 \pm 0.2$  และ  $27.95 \pm 0.17$  กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ  $12.85 \pm 0.33$   $14.81 \pm 0.22$   $16.00 \pm 0.35$  และ  $17.10 \pm 0.25$  กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 ซม.<sup>-1</sup> ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลลดลง เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจาก 0.3-0.6 ซม.<sup>-1</sup> ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือซึ่งเพิ่มสูงขึ้น เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจาก 0.3-0.6 ซม.<sup>-1</sup> เนื่องจากอัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้อัตราการไหลของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ไหลออกอย่างรวดเร็ว ทำให้แบคทีเรียที่ถูกตรึงไม่สามารถนำกลีเซอรอลมาใช้ได้อย่างเพียงพอ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ปริมาณน้อย ในเรื่องของอัตราการเจือจางที่ส่งผลต่ออัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ แสดงให้เห็นว่า เมื่ออัตราการเจือจางต่ำจะให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลมากที่สุดและที่อัตราการเจือจางสูงจะให้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Papanikolaou et al. (2008) ซึ่งทำการศึกษาการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* F2b ในระบบแบบต่อเนื่อง โดยทำการทดลองแบบ 2 ชั้น ในขั้นแรกจะใช้อัตราการเจือจางจะเท่ากับ 0.11 ซม.<sup>-1</sup> ให้ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 32.5 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 3.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนในขั้นที่สองจะใช้อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.04 ซม.<sup>-1</sup> จะให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 43.5 กรัมต่อลิตรและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตรต่อ

ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญที่ส่งผลให้ได้อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์สูง ส่วนอัตราการเจริญต่ำจะทำให้ได้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลสูง

ทั้งนี้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าส่งผลต่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าที่เท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ทำให้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลมากที่สุดเท่ากับ  $35.86 \pm 0.19$  กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจริญเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>1</sup> ซึ่งงานวิจัยของ Suratago et al. (2009) ได้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 29.08 และ 22.68 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักโดยการตรึงเซลล์บนวัสดุตรึงคือ ไยบวบและ BCN-009 ตามลำดับ โดยความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า 60 กรัมต่อลิตรเช่นเดียวกัน (ดังตารางที่ 4.4) ทั้งนี้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่า เนื่องจากกระบวนการหมักสามารถควบคุมค่าความเป็นกรดค้างได้ในสภาวะที่เหมาะสม ( $\text{pH} = 6.97 - 7.0$ ) ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้สูงขึ้น นอกจากนี้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าในช่วง 20-60 กรัมต่อลิตร สามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เนื่องมาจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นได้ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Suratago et al., 2009 Gunzel et al., 1991; Pullsirisombat, 2007) ได้ทำการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้าเท่ากับ 80-100 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่งผลต่อเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารตั้งต้น

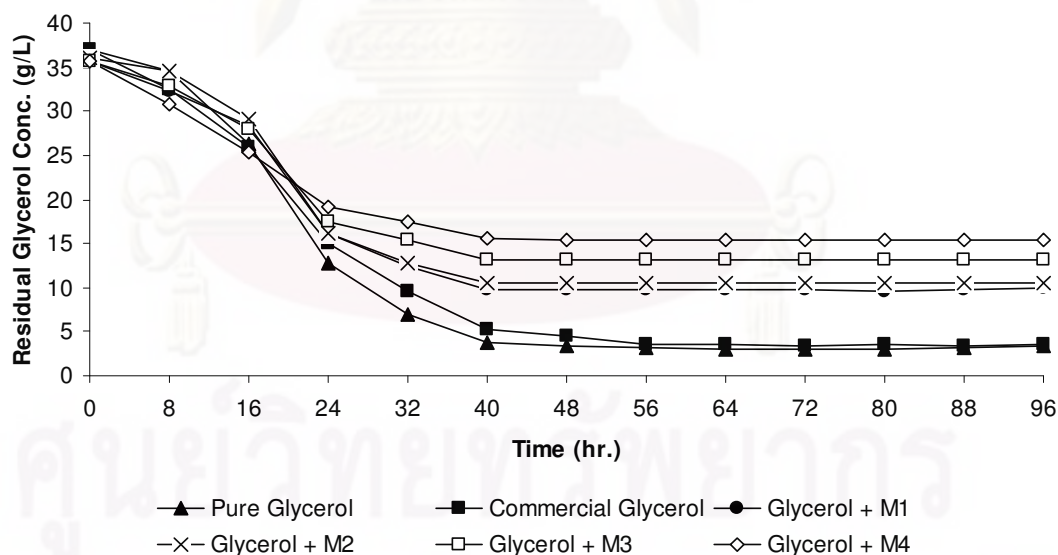
#### 4.2 ความสามารถของจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล จากการหมักกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน

การทดลองในส่วนนี้เปรียบเทียบความสามารถของจุลินทรีย์ *C. butyricum* DSM 5431 ในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆดังนี้ (1) กลีเซอรอล บริสุทธิ์ 99.5% (2) กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรม (3) กลีเซอรอลที่มีเมทานอลปนเปื้อนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลทุกชนิดเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือลดลงเพียงเล็กน้อยที่เวลา 0-8 ชม. จากนั้นความเข้มข้นของกลีเซอรอลลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 8-40 ชม. และคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. (ดังรูปที่ 4.2 โดย M1 M2 M3 M4 คือ ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) สำหรับผลการทดลองในส่วนของความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก (ดังรูปที่ 4.3-4.5) พบว่า ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่เวลา 0-8 ชม. และความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลา 8-40 ชม. และคงที่เมื่อเวลา 48 ชม. ทั้งนี้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมีแนวโน้มในทิศทาง

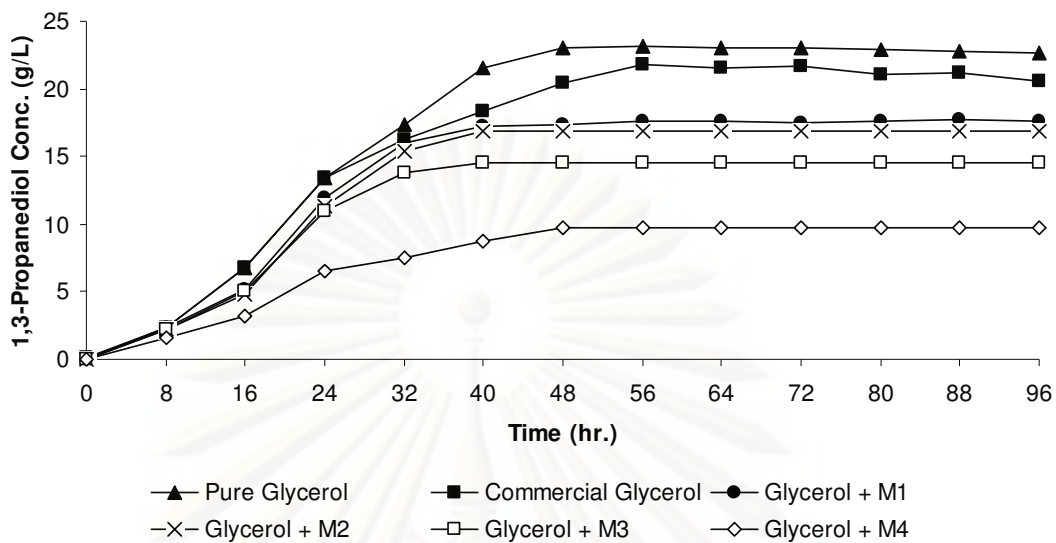
เดียวกับความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ โดยความเข้มข้นของความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์เท่ากับ  $22.94 \pm 0.16$   $21.18 \pm 0.54$   $17.58 \pm 0.14$   $16.87 \pm 0.03$   $14.53 \pm 0.01$  และ  $9.70 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือเท่ากับ  $3.11 \pm 0.14$   $3.67 \pm 0.37$   $9.74 \pm 0.09$   $10.55 \pm 0.05$   $13.16 \pm 0.02$  และ  $15.45 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดอะซิติกเท่ากับ  $0.86 \pm 0.07$   $0.85 \pm 0.02$   $0.81 \pm 0.02$   $0.84 \pm 0.01$   $0.79 \pm 0.01$  และ  $0.68 \pm 0.01$  กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดบิวทิริกเท่ากับ  $3.94 \pm 0.37$   $3.21 \pm 0.19$   $2.8 \pm 0.01$   $2.68 \pm 0.02$   $2.28 \pm 0.01$  และ  $1.85 \pm 0.01$  เมื่อทำการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมและกลีเซอรอลที่มีเมทานอลปนเปื้อนซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญและความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือมีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญเช่นกัน (ดังตารางที่ 4.2) ทั้งนี้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่แตกต่างกัน เมื่อใช้กลีเซอรอลที่ใช้ในอุตสาหกรรมและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในการหมัก เนื่องจากสิ่งเจือปนที่ติดอยู่ในกลีเซอรอลที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้ความสามารถในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลง เช่นเดียวกับความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ที่แตกต่างกัน เมื่อทำการหมักกลีเซอรอลสังเคราะห์ที่มีเมทานอลปนเปื้อนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์มีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้นของเมทานอลที่ปนเปื้อนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการเกิด 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลงตามลำดับ เมื่อทำการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมและและ กลีเซอรอลที่มีเมทานอลปนเปื้อนซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร (ดังตารางที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเมทานอลที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้อัตราการเกิดสาร 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการใช้กลีเซอรอลเมื่อจุลินทรีย์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัตราการใช้กลีเซอรอลลดลงตามลำดับเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gonzalez-Pajuelo et al. (2004) ได้ศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลผลิต 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ในระบบแบบกะ โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium butyricum* VPI 3266 ซึ่งกลีเซอรอลที่นำมาใช้ในการหมักเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลซึ่งมีความบริสุทธิ์ 65% 92% และกลีเซอรอลทางการค้าซึ่งมีความบริสุทธิ์ 87% พบว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 92% และ 87% การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะใกล้เคียงกัน ส่วนกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65% จุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 92%



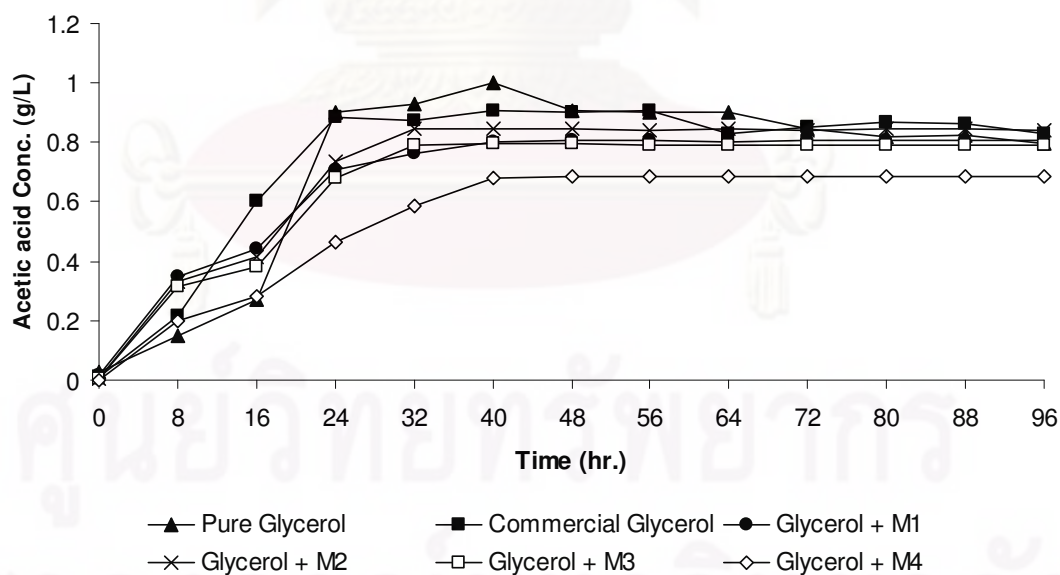
และ 87% เนื่องจากกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ 65% มีสิ่งเจือปนมากทำให้จุลินทรีย์ถูกยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนี้ในปี 2006 Ying Mu et al. ได้ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลโดย *Klebsiella pneumoniae* จากการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99% กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70% ที่ได้จากการผลิต ไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70% มีความเข้มข้นของเมทานอลสูงกว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85% ทั้งนี้ได้ทำการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลที่ผลิตได้เท่ากับ 9.4 7.3 8.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99% กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 70% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 85% ที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งตามลำดับ จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเมทานอลที่สูงขึ้นในกลีเซอรอลส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดคอลที่ผลิตขึ้น



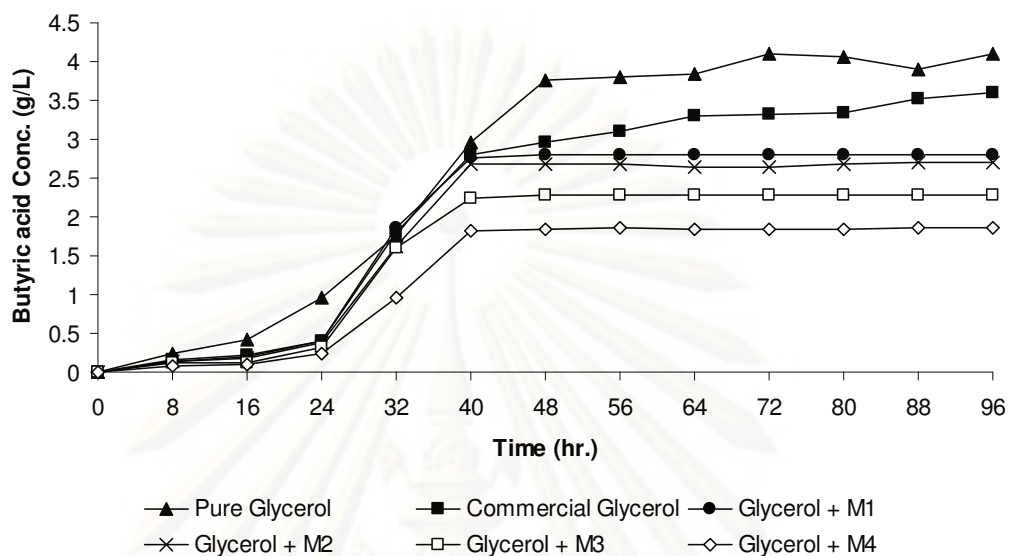
รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดย M1 M2 M3 M4 คือ ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดย M1 M2 M3 M4 คือ ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดย M1 M2 M3 M4 คือ ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลจากแหล่งต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดย M1 M2 M3 M4 คือ ความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 4.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุตรึง BCN-009

ตัวแปร	อัตราการเจือจาง (ชม. <sup>-1</sup> )			
	0.3	0.4	0.5	0.6
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	20	20	20	20
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	1.78±0.14	4.30±0.11	6.50±0.05	7.97±0.05
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	12.32±0.17	10.24±0.10	8.63±0.06	7.38±0.05
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.68±0.01	0.44±0.01	0.30±0.02	0.13±0.01
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	3.70±0.06	2.44±0.04	1.35±0.02	1.70±0.02
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	3.56±0.05	4.10±0.04	4.31±0.03	4.43±0.03
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	0.68	0.65	0.63	0.61

ตารางที่ 4.1 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดคอลโดยทำการหมักกลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยใช้เชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยใช้วัสดุตรึง BCN-009 (ต่อ)

ตัวแปร	อัตราการเงื้องาง (ชม. <sup>-1</sup> )			
	0.3	0.4	0.5	0.6
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	40	40	40	40
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	9.01±0.61	7.37±0.66	9.1±0.47	10.72±0.37
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร)	19.67±1.31	23.31±1.21	19.6±0.72	17.62±0.77
อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	5.9±0.39	9.32±0.48	9.65±0.36	10.57±0.46
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอล	0.63	0.71	0.62	0.6

ตัวแปร	อัตราการเงื้องาง (ชม. <sup>-1</sup> )			
	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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1,3-โพรเพนไดออล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก จากการหมักกลีเซอรอลชนิดต่างๆ

ตัวแปร	ชนิดของกลีเซอรอล					
	กลีเซอรอลบริสุทธิ์	กลีเซอรอลที่ใช้ในอุตสาหกรรม	กลีเซอรอลและเมทานอล 0.8 กรัมต่อลิตร	กลีเซอรอลและเมทานอล 2.0 กรัมต่อลิตร	กลีเซอรอลและเมทานอล 3.2 กรัมต่อลิตร	กลีเซอรอลและเมทานอล 4.4 กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้า (กรัมต่อลิตร)	40	40	40	40	40	40
ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	3.11±0.14	3.67±0.37	9.74±0.09	10.55±0.05	13.16±0.02	15.45±0.01
ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	22.94±0.16	21.18±0.54	17.58±0.14	16.87±0.03	14.53±0.01	9.70±0.01
ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.86±0.07	0.85±0.02	0.81±0.02	0.84±0.01	0.79±0.01	0.68±0.01
ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	3.94±0.37	3.21±0.19	2.8±0.01	2.68±0.02	2.28±0.01	1.85±0.01
ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	0.62	0.58	0.58	0.57	0.54	0.39

ตารางที่ 4.3 อัตราการใช้กลีเซอรอลและอัตราการเกิดสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากการหมักกลีเซอรอลชนิดต่างๆ โดยความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร

อัตรา (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ชนิดของกลีเซอรอล					
	กลีเซอรอลบริสุทธิ์	กลีเซอรอลที่ใช้ในอุตสาหกรรม	กลีเซอรอลและเมทานอล 0.8 กรัมต่อลิตร	กลีเซอรอลและเมทานอล 2.0 กรัมต่อลิตร	กลีเซอรอลและเมทานอล 3.2 กรัมต่อลิตร	กลีเซอรอลและเมทานอล 4.4 กรัมต่อลิตร
กลีเซอรอล	4.69±0.03	4.52±0.03	3.60±0.04	3.54±0.01	3.14±0.01	2.80±0.01
1,3-โพรเพนไดออล	0.80±0.01	0.71±0.01	0.60±0.02	0.58±0.01	0.50±0.01	0.34±0.01

ตารางที่ 4.4 การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลซึ่งทำการเปรียบเทียบระหว่างงานวิจัยปัจจุบันและงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งทำการตรึงเซลล์ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

รายการอ้างอิง	จุลินทรีย์	ความเข้มข้นกลีเซอรอล ขาเข้า / กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพน ไดออล(กรัมต่อ ลิตร)	อัตราการผลิต ผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อ ลิตรต่อชั่วโมง) / ผลได้ของผลิตภัณฑ์	ข้อคิดเห็น
Current work	<i>C. butyricum</i> DSM5431	60/12.82	35.95	10.79/0.76	BCN-009; อัตราการ เจือจาง 0.3 ชม <sup>-1</sup> .
		60/21.23	29.08	6.11/0.75	ไยบบบ ; อัตราการ เจือจาง 0.21 ชม <sup>-1</sup> .
Suratago 2009	<i>C. butyricum</i> DSM5431	60/20.75	22.68	4.76/0.58	BCN-009; อัตราการ เจือจาง 0.21 ชม <sup>-1</sup> .
		80/47.71	15.5	0.48	$\gamma$ -อะลูมินา ( $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) เจล
Pullsisrisombat 2007 Pflugmacher and Gottschalk, 1994	<i>C. freundii</i>	36.8/2.3	16.34	8.2/0.57	โพลียูรีเทนคัดแปลง; อัตราการเจือจาง 0.5 ชม <sup>-1</sup> .
Zhao et al., 2006	<i>K. pneumoniae</i>	40/38.3	13.6	4.49/0.43	NaCS/PDMAAC; อัตราการเจือจาง 0.33 ชม <sup>-1</sup>

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. กระบวนการหมักกลีเซอรอลเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการตรึงเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่มีความเป็นไปได้อาศัยการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในเรื่องของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและอัตราการเจือจาง จากการทดลองความเข้มข้นสูงสุดของสาร 1,3-โพรเพนไดออลเท่ากับ 35.86 กรัมต่อลิตร เมื่อคงความเข้มข้นของกลีเซอรอลขาเข้าและอัตราการเจือจางไว้ที่ 60 กรัมต่อลิตร และ 0.3 ชม<sup>-1</sup> ตามลำดับ อัตราการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลที่สภาวะดังกล่าวอยู่ที่ 10.79±0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่างานวิจัยในอดีต

2. การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่สามารถควบคุมสภาวะความเป็นกรดต่างให้อยู่ในสภาวะเหมาะสมของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

3. ชนิดและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลมีผลต่อความสามารถในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 จากการทดลองความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมและกลีเซอรอลที่มีเมทานอลปนเปื้อนซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 2 3.2 และ 4.4 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นของเมทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้น้อยลง

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

การนำกลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในการหมักเพื่อผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ควรกำจัดสิ่งเจือปนที่ติดมากับกลีเซอรอล เพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *C. butyricum* DSM 5431 ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล

## รายการอ้างอิง

- 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.
- 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.
- Deckwer, W.-D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. FEMS Microbiology Reviews 16(1995): 143-149.
- 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.
- 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.
- 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, I. 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 m<sup>3</sup>. 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.

- Kurosaka, T., Maruyama, H., Naribayashi, I., Sasaki Y. Production of 1,3-propanediol by hydrogenolysis of glycerol catalyzed by Pt/WO<sub>3</sub>/ZrO<sub>2</sub>. Catalysis Communications 9 (2008) 1360–1363.
- Laosirilurchakai, N. Kinetic model for 1,3-propanediol 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pullisrisombat, J.  $\gamma$ -Alumina doped alginate gel for cell immobilization in fermentation processes. Master's Thesis. Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering Chulalongkorn University, 2007
- Rehman, A., Wijesekara R.G, S., Nomura, N., Satoh, 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.
- 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.
- 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.
- 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. Pahtway 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก วิธีการทดลอง

### ก.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.

### ก.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

1. ทำการแยกเซลล์ออกจากสารอาหาร โดยการ 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 12 ชม.
10. จากนั้นชั่งน้ำหนักเซลล์

### ก.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

#### ก.4 การหาความเข้มข้นของเซลล์ที่ถูกตรึง

1. ตัดวัสดุตรึงที่มีเซลล์เกาะอยู่ให้มีขนาดเล็กลง
2. ละลายวัสดุตรึงที่ได้จากข้อ 1. ในน้ำกลั่น 100 มล.
3. กวนวัสดุตรึงจากข้อ 2. ภายในบีกเกอร์ซึ่งจนเซลล์ที่ติดอยู่บนวัสดุตรึงหลุดออกหมด
4. ตีวัสดุตรึงที่เซลล์หลุดออกหมดจากสารแขวนลอย จากนั้นทำตามขั้นตอนที่ 2.1

## ภาคผนวก ข

## ข้อมูลผลการทดลองและกราฟมาตรฐาน

## ข. 1 ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ข1.1 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 20 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพน ไดออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อ ลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อ ลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพน ไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพน ไดออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
24	2.4	11.61			0.66	3.48
32	1.92	11.96			0.66	3.59
40	2.05	12.2	0.53	3.5	0.68	3.66
48	1.78	12.26			0.67	3.68
56	1.64	12.3			0.67	3.69
64	1.8	12.48			0.69	3.74
72	1.64	12.45	0.54	3.61	0.68	3.74
80	1.6	12.48			0.68	3.74
88	1.642	12.49			0.68	3.75
96	1.56	12.5			0.68	3.75
104	1.69	12.5			0.68	3.75
112	1.73	12.51			0.68	3.75
120	1.66	12.46	0.55	3.57	0.67	3.74
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>1.78</b>	<b>12.32</b>	<b>0.68</b>	<b>3.7</b>	<b>0.54</b>	<b>3.56</b>



ตารางที่ ข1.2 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 20 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
24	4.17	10.29			0.65	4.12
32	4.11	10.28	0.46	2.47	0.65	4.11
40	4.25	10.27			0.65	4.11
48	4.29	10.34			0.66	4.14
56	4.27	10.39			0.66	4.16
64	4.41	10.14	0.44	2.44	0.65	4.06
72	4.37	10.16			0.65	4.06
80	4.47	10.09			0.65	4.04
88	4.36	10.3			0.66	4.12
96	4.44	10.11			0.65	4.04
104	4.26	10.31			0.65	4.12
112	4.27	10.16	0.43	2.39	0.65	4.06
120	4.17	10.26			0.65	4.11
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>4.3</b>	<b>10.24</b>	<b>0.44</b>	<b>2.44</b>	<b>0.65</b>	<b>4.1</b>

ตารางที่ ข1.3 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 20 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
24	6.54	8.52	0.32	1.37	0.63	4.26
32	6.52	8.55			0.63	4.27
40	6.53	8.64			0.64	4.32
48	6.4	8.73			0.64	4.37
56	6.52	8.59			0.64	4.29
64	6.55	8.63			0.64	4.32
72	6.38	8.71			0.64	4.36
80	6.51	8.56	0.28	1.32	0.63	4.28
88	6.51	8.63			0.64	4.32
96	6.51	8.61			0.64	4.3
104	6.47	8.66			0.64	4.33
112	6.51	8.66			0.64	4.33
120	6.51	8.63	0.28	1.35	0.64	4.31
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>6.5</b>	<b>8.62</b>	<b>0.3</b>	<b>1.35</b>	<b>0.64</b>	<b>4.31</b>

ตารางที่ ข1.4 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 20 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพน ได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพน ได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
24	7.93	7.48			0.62	4.49
32	7.91	7.42	0.14	1.68	0.61	4.45
40	7.96	7.42			0.62	4.45
48	7.88	7.44			0.61	4.47
56	7.9	7.42			0.61	4.45
64	7.95	7.4			0.61	4.44
72	8.02	7.36	0.14	1.72	0.61	4.41
80	8.01	7.35			0.61	4.41
88	8.03	7.33			0.61	4.4
96	8.01	7.34			0.61	4.4
104	7.96	7.32			0.61	4.39
112	8.03	7.33			0.61	4.4
120	8	7.33	0.12	1.69	0.61	4.4
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>7.97</b>	<b>7.38</b>	<b>0.13</b>	<b>1.7</b>	<b>0.61</b>	<b>4.43</b>

ตารางที่ ข1.5 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 40 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
24	13.63	11.71	0.44	3.51
32	8.42	18.27	0.58	5.48
40	8.97	18.4	0.59	5.52
48	7.67	19.37	0.6	5.81
56	7.57	19.4	0.6	5.82
64	8.32	19.8	0.62	5.94
72	8.22	20.5	0.65	6.15
80	8.97	20.07	0.65	6.01
88	8.52	21.14	0.67	6.34
96	9.22	21.74	0.71	6.52
104	9.16	21.81	0.71	6.54
112	9.18	21.8	0.71	6.53
120	9.34	21.7	0.71	6.51
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>9.01</b>	<b>19.67</b>	<b>0.63</b>	<b>5.9</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.6 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 40 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
24	8.62	20.5	0.65	8.2
32	7.82	22.8	0.71	9.12
40	8.12	22.2	0.7	8.88
48	7.39	22.63	0.69	9.05
56	7.67	22.87	0.71	9.15
64	7.46	22.97	0.71	9.19
72	7.66	23.57	0.73	9.43
80	6.64	25.3	0.76	10.12
88	7.6	23.5	0.73	9.4
96	6.64	24.27	0.73	9.71
104	7.2	23.6	0.72	9.44
112	6.4	24.3	0.72	9.72
120	6.58	24.5	0.73	9.8
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>7.37</b>	<b>23.31</b>	<b>0.71</b>	<b>9.32</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.7 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 40 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
24	9.6	20.77	0.68	10.38
32	9.32	19.9	0.65	9.95
40	9.17	19.8	0.64	9.9
48	9.42	19.95	0.65	9.97
56	8.62	19.2	0.61	9.6
64	9.17	19.07	0.62	9.53
72	9.15	18.5	0.6	9.25
80	8.22	19.4	0.61	9.7
88	8.88	18.57	0.6	9.28
96	8.62	19	0.61	9.5
104	8.81	19.57	0.63	9.79
112	9.32	19.11	0.63	9.55
120	10.01	18.05	0.6	9.03
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>9.10</b>	<b>19.3</b>	<b>0.63</b>	<b>9.65</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.8 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 40 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม.)	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง)
24	10.05	18.04	0.6	10.82
32	10.24	18.43	0.62	11.06
40	10.28	18.75	0.63	11.25
48	10.61	18.7	0.64	11.22
56	10.65	18.27	0.62	10.96
64	10.88	17.2	0.59	10.32
72	10.66	17.73	0.6	10.64
80	10.71	17.2	0.59	10.32
88	10.99	17.5	0.6	10.5
96	10.77	17.3	0.59	10.38
104	11.11	16.8	0.58	10.08
112	11	16.3	0.56	9.78
120	11.4	16.9	0.59	10.14
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>10.72</b>	<b>17.62</b>	<b>0.6</b>	<b>10.57</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.9 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.3 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
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
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>12.85</b>	<b>35.86</b>	<b>1.26</b>	<b>7.93</b>	<b>0.76</b>	<b>10.76</b>



ตารางที่ ข1.10 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
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
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>14.81</b>	<b>33.36</b>	<b>1.17</b>	<b>7.50</b>	<b>0.74</b>	<b>13.34</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.11 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.5 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
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
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>16</b>	<b>31.15</b>	<b>1.01</b>	<b>7.01</b>	<b>0.71</b>	<b>15.58</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.12 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นขาเข้า 60 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.6 ชม.<sup>-1</sup>

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทีริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
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
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>17.1</b>	<b>27.95</b>	<b>0.98</b>	<b>6.93</b>	<b>0.65</b>	<b>16.77</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.13 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นขาเข้า 40 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม. <sup>1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0	37.06	0	0.03	0	0	0
8	34.6	2.4	0.15	0.24	0.44	0.3
16	26.22	6.8	0.27	0.42	0.49	0.42
24	12.82	13.4	0.9	0.96	0.49	0.56
32	7	17.4	0.93	1.76	0.53	0.54
40	3.7	21.6	1	2.96	0.6	0.54
48	3.3	23	0.91	3.77	0.63	0.48
56	3.1	23.1	0.9	3.81	0.63	0.41
64	3	23.06	0.9	3.84	0.62	0.36
72	3.03	23	0.84	4.1	0.62	0.32
80	2.97	22.97	0.82	4.06	0.62	0.29
88	3.1	22.77	0.82	3.9	0.62	0.26
96	3.3	22.67	0.8	4.1	0.62	0.24
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>3.11</b>	<b>22.94</b>	<b>0.86</b>	<b>3.94</b>	<b>0.62</b>	<b>0.34</b>

ตารางที่ ข1.14 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม. <sup>1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0	37.06	0.07	0.01	0	0.02	0
8	32.5	2.4	0.21	0.16	0.32	0.29
16	26	6.8	0.6	0.22	0.49	0.42
24	15	13.4	0.88	0.4	0.54	0.56
32	9.6	16.3	0.88	1.8	0.54	0.51
40	5.3	18.4	0.86	2.8	0.53	0.46
48	4.5	20.5	0.88	2.96	0.58	0.43
56	3.6	21.8	0.86	3.1	0.6	0.39
64	3.6	21.6	0.83	3.22	0.59	0.34
72	3.4	21.71	0.83	3.24	0.59	0.3
80	3.6	21	0.87	3.3	0.58	0.26
88	3.4	21.13	0.86	3.32	0.58	0.24
96	3.6	20.51	0.83	3.32	0.56	0.21
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>3.67</b>	<b>21.18</b>	<b>0.85</b>	<b>3.21</b>	<b>0.58</b>	<b>0.31</b>

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข1.15 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม.¹)	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพนได ออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพนได ออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0	35.66	0.03	0.02	0	0.01	0
8	32.35	2.29	0.35	0.14	0.3	0.28
16	28.39	5.11	0.44	0.2	0.44	0.32
24	16.24	11.96	0.71	0.4	0.5	0.5
32	12.39	16	0.76	1.86	0.58	0.5
40	9.7	17.29	0.8	2.77	0.57	0.43
48	9.74	17.32	0.81	2.8	0.57	0.36
56	9.68	17.62	0.81	2.8	0.58	0.31
64	9.69	17.58	0.8	2.81	0.58	0.27
72	9.86	17.54	0.8	2.8	0.58	0.24
80	9.66	17.6	0.81	2.8	0.58	0.22
88	9.7	17.78	0.81	2.8	0.59	0.2
96	9.87	17.64	0.81	2.8	0.59	0.18
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>9.74</b>	<b>17.58</b>	<b>0.81</b>	<b>2.8</b>	<b>0.58</b>	<b>0.25</b>

ตารางที่ ข1.16 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม. <sup>1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพน ไดคอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพน ไดคอล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพน ไดคอล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0	36.13	0.03	0.01	0	0.01	0
8	34.46	2.22	0.33	0.14	0.4	0.27
16	29.11	4.84	0.41	0.18	0.45	0.3
24	16.05	11.36	0.74	0.37	0.47	0.47
32	12.80	15.41	0.85	1.62	0.57	0.48
40	10.57	16.84	0.85	2.68	0.57	0.42
48	10.60	16.90	0.85	2.68	0.57	0.35
56	10.55	16.83	0.84	2.68	0.57	0.3
64	10.56	16.91	0.85	2.64	0.57	0.26
72	10.54	16.85	0.84	2.64	0.57	0.23
80	10.56	16.85	0.85	2.68	0.57	0.21
88	10.58	16.84	0.85	2.71	0.57	0.19
96	10.45	16.88	0.84	2.7	0.57	0.18
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>10.55</b>	<b>16.87</b>	<b>0.84</b>	<b>2.68</b>	<b>0.57</b>	<b>0.25</b>

ตารางที่ ข1.17 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 3.2 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพน ไดออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพน ไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพน ไดออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0	35.76	0.02	0.01	0	0.01	0
8	32.82	2.16	0.32	0.11	0.29	0.27
16	27.94	5.02	0.38	0.12	0.42	0.31
24	17.38	10.91	0.68	0.31	0.48	0.45
32	15.34	13.79	0.79	1.59	0.56	0.43
40	13.14	14.49	0.79	2.25	0.54	0.36
48	13.18	14.53	0.79	2.29	0.54	0.3
56	13.15	14.52	0.79	2.28	0.54	0.26
64	13.16	14.54	0.79	2.28	0.54	0.23
72	13.18	14.53	0.79	2.27	0.54	0.2
80	13.15	14.55	0.79	2.27	0.54	0.18
88	13.18	14.52	0.79	2.28	0.54	0.16
96	13.14	14.55	0.79	2.28	0.54	0.15
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>13.16</b>	<b>14.53</b>	<b>0.79</b>	<b>2.28</b>	<b>0.54</b>	<b>0.21</b>



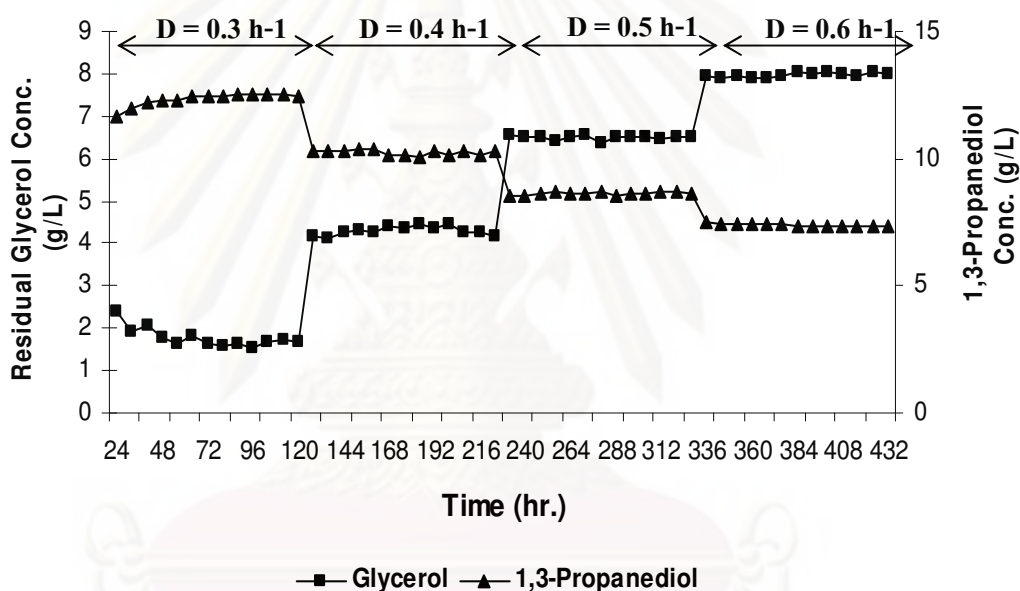
ตารางที่ ข1.18 ข้อมูลของกระบวนการหมักกลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยการหมักในระบบแบบกะ

เวลา (ชม. <sup>-1</sup> )	ความเข้มข้น กลีเซอรอลที่ เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น 1,3-โพรเพน ไดออล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น กรดบิวทริก (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ 1,3-โพรเพน ไดออล	อัตราการผลิต 1,3-โพรเพน ไดออล (กรัมต่อลิตร ต่อชั่วโมง)
0	35.6	0.01	0.01	0	0.01	0
8	30.89	1.58	0.2	0.07	0.17	0.2
16	25.44	3.18	0.28	0.09	0.22	0.2
24	19.21	6.51	0.46	0.24	0.31	0.27
32	17.44	7.51	0.59	0.97	0.33	0.23
40	15.61	8.79	0.68	1.81	0.36	0.22
48	15.43	9.67	0.68	1.83	0.39	0.2
56	15.43	9.71	0.69	1.87	0.4	0.17
64	15.45	9.71	0.68	1.85	0.4	0.15
72	15.46	9.69	0.68	1.85	0.39	0.13
80	15.45	9.69	0.68	1.84	0.39	0.12
88	15.45	9.71	0.68	1.85	0.4	0.11
96	15.45	9.71	0.69	1.87	0.4	0.1
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>15.45</b>	<b>9.70</b>	<b>0.68</b>	<b>1.85</b>	<b>0.40</b>	<b>0.14</b>

ตารางที่ ข1.19 ความเข้มข้นของ *C. butyricum* DSM 5431 เมื่อเสร็จสิ้นจากการหมักแบบต่อเนื่อง

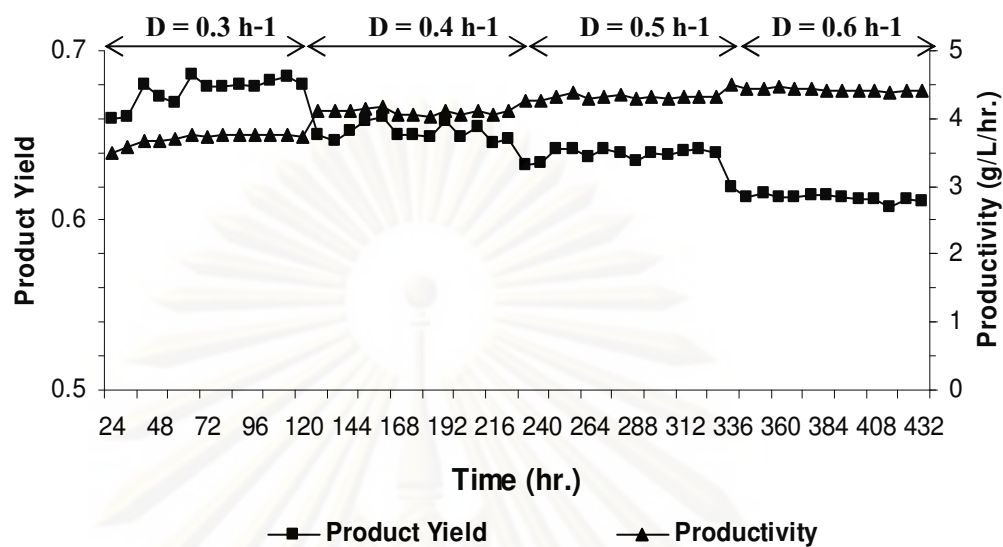
ความเข้มข้นของเซลล์	
เซลล์ที่ถูกตรึง (กรัมต่อลิตร)	19
เซลล์แขวนลอย (กรัมต่อลิตร)	1

ข.2 กราฟที่ได้จากการทดลอง

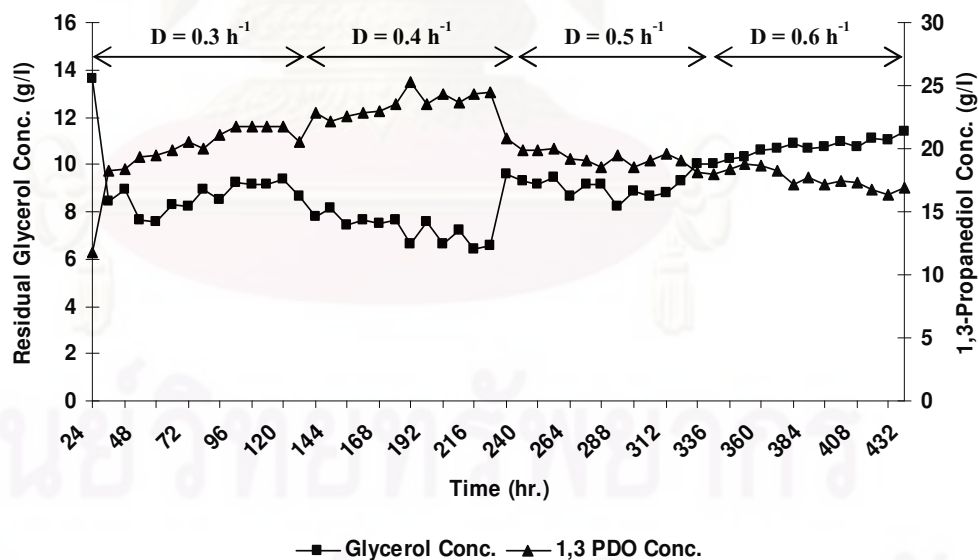


รูปที่ ข2.1 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลเข้าเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

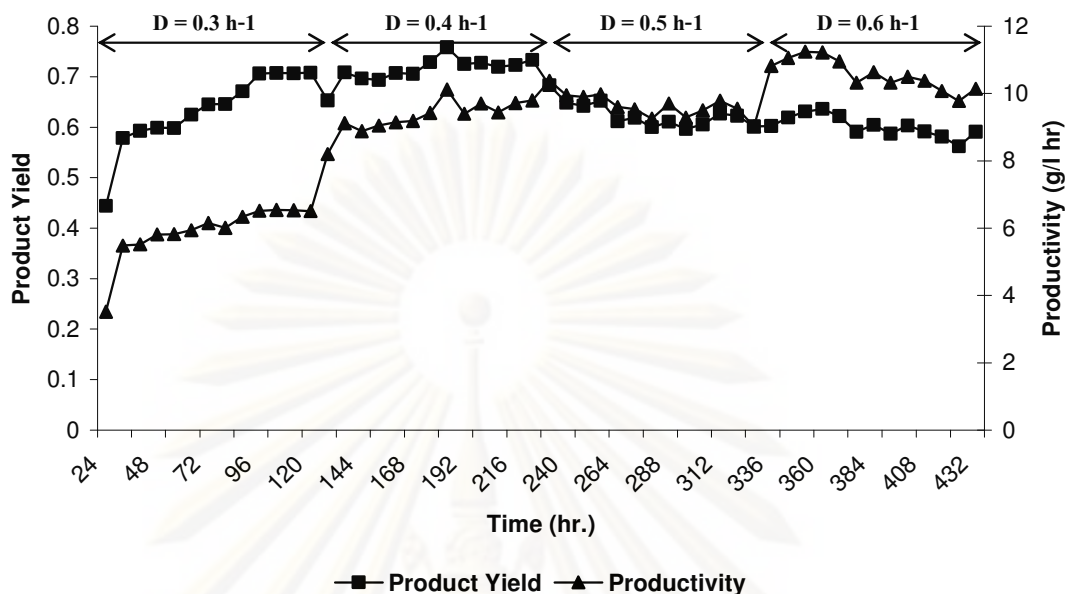
ศูนย์วิทยาศาสตร์การ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



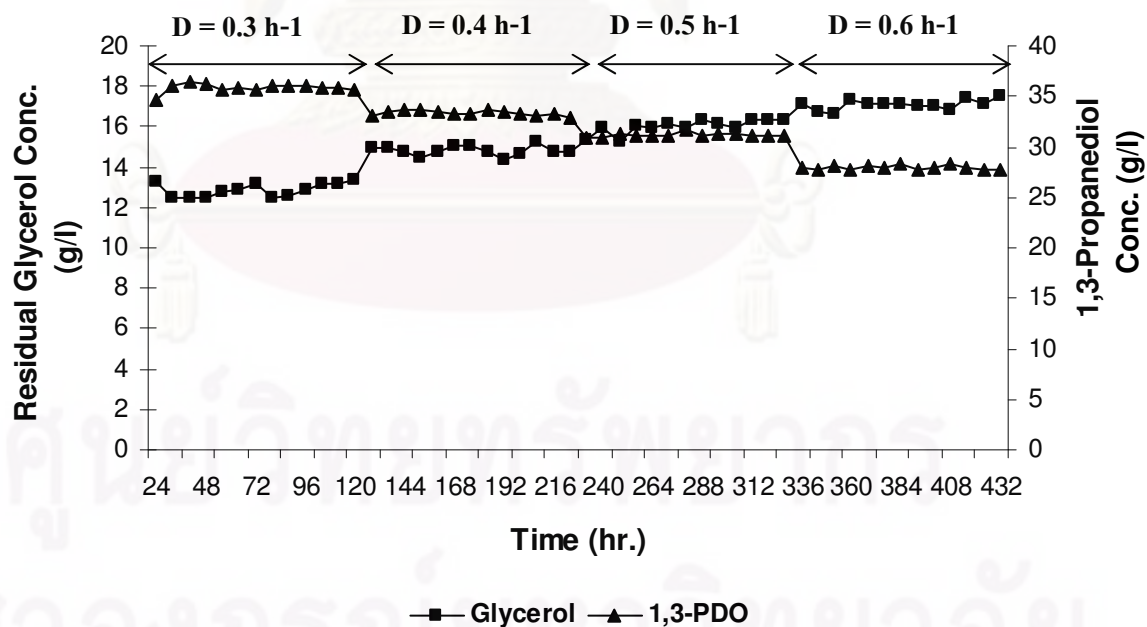
รูปที่ ข2.2 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน



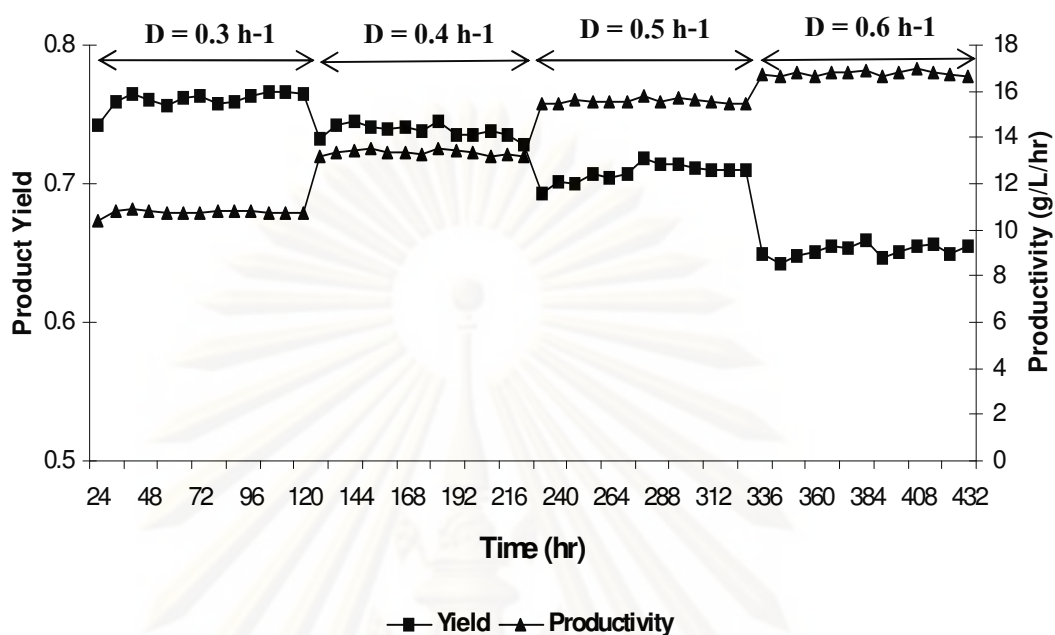
รูปที่ ข2.3 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดโอดที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน



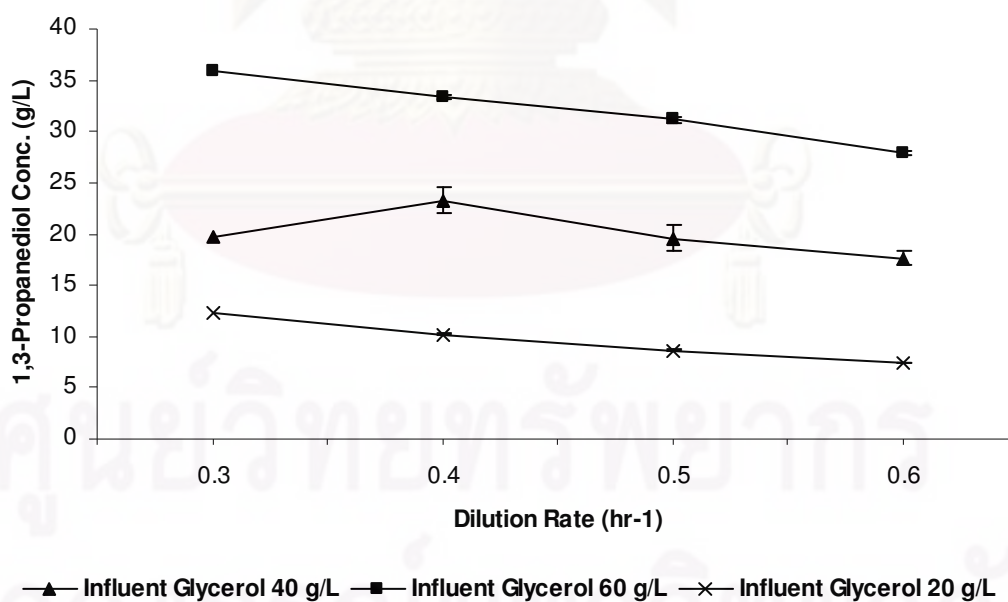
รูปที่ ข2.4 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน



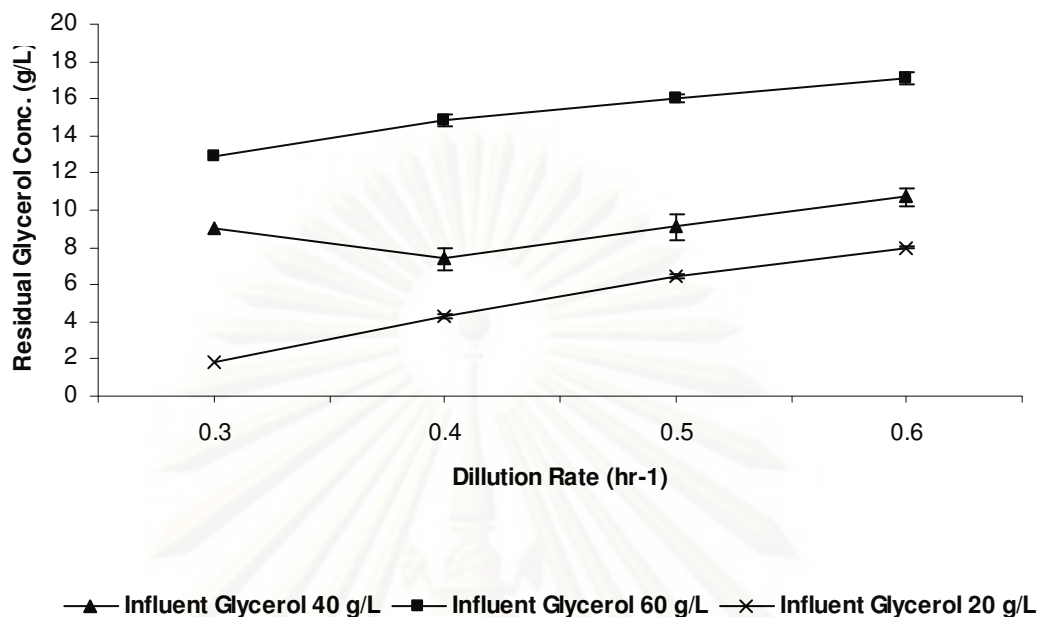
รูปที่ ข2.5 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน



รูปที่ ๒.๖ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

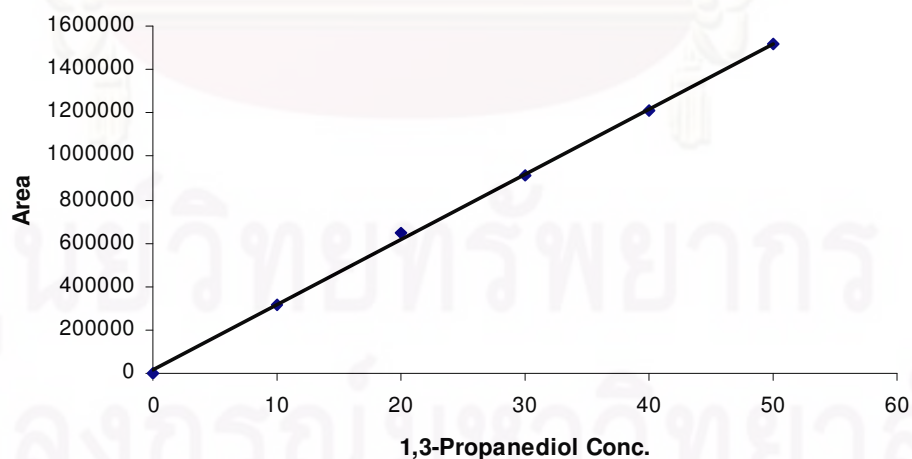


รูปที่ ๒.๗ ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดโอดที่ผลิตได้ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และ อัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

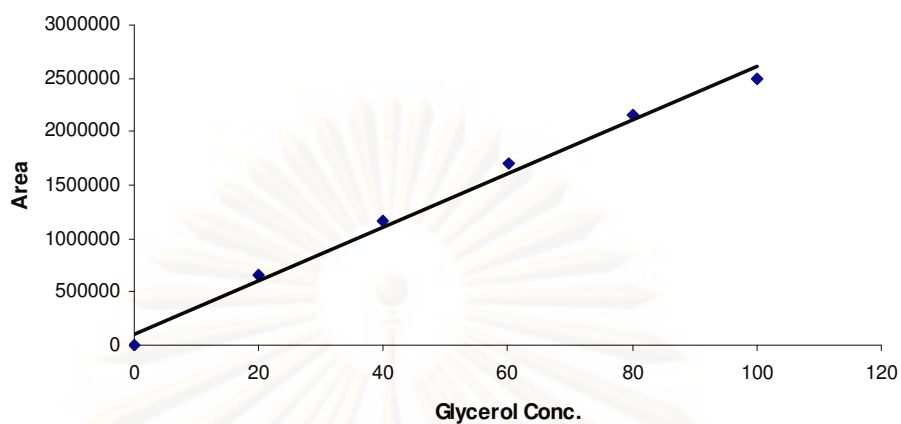


รูปที่ ข2.8 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหลือ เมื่อความเข้มข้นกลีเซอรอลขาเข้าเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และ อัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน

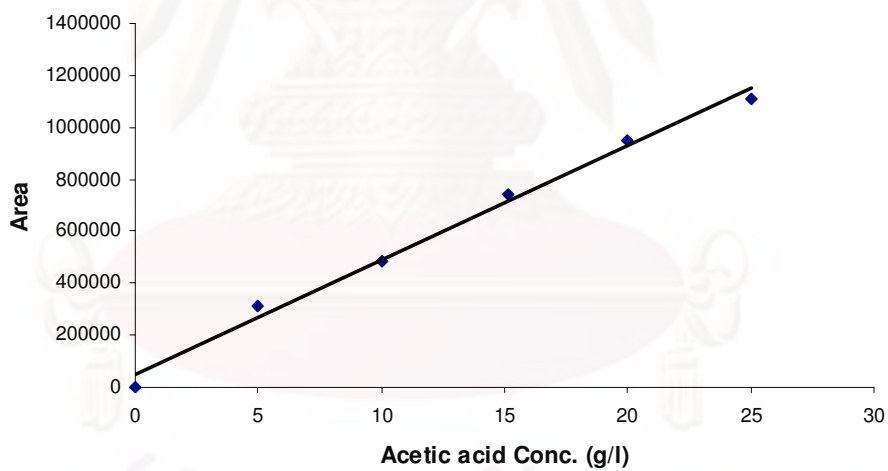
ข.3 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล

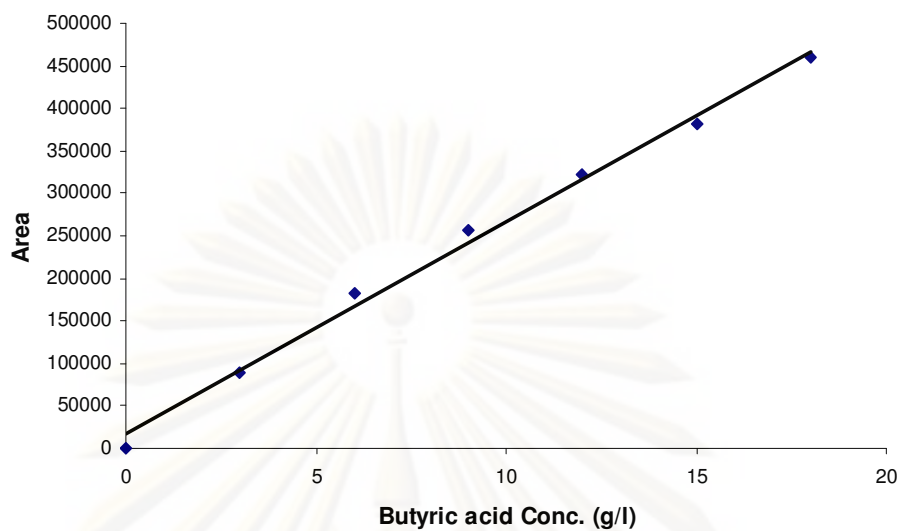


รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกลีเซอรอล



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดอะซิติก

ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดบิวทีริก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค  
บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

**International conference**

Jaitip Wuttisarnsukit and Kasidit Nootong, “Production of 1,3-propanediol from a biological fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 in an anaerobic moving-bed bioreactor”, Proceedings to the Pure and Applied Chemistry International conference 2010, Challenges in Chemistry for Sustainable Development, Ubon Ratchathani, Thailand, 21-23 January 2010



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Oral Presentation Schedule

Chairperson: Thawatchai Tuntulani		
15.20-15.35	INC-INV-3	<b>Khamphée Phomphrai</b> , Steric and electronic effects of bis(amidinate) tin(II) complexes in the polymerization of $\epsilon$ -caprolactone
15.35-15.50	INC-OR-5	<b>Ahmad M. Al-Ajlouni</b> , Kinetic studies on phenylphosphopolyperoxotungstates catalyzed epoxidation of olefins with hydrogen peroxide
15.50-16.05	INC-OR-6	<b>Wichchirini Urat</b> , Solvent extraction of lanthanum from mix rare earth via mixer settler using D2EHPA in kerosene
16.05-16.20	INC-OR-7	<b>Kun Sri Budiasih</b> , Immobilization of Cr(VI) in rice husk ash based geopolymer
16.20-16.35	INC-OR-8	<b>Duangrat Thongkum</b> , Design and synthesis of pseudocyclic crown ethers as efficient fluorescence sensors for fluoride
16.35-16.50	INC-OR-9	<b>Pongthipun Phuengphai</b> , Anion exchange and catalytic properties of a series of coordination networks: cyanosilylation of aldehydes catalyzed by Zn(II)-4,4'-bpy-carboxylate complexes
16.50-17.05	INC-OR-10	<b>Phimphaka Harding</b> , Redox couple-spin crossover in $[\text{Co}(\beta\text{-diketonate})_2(\text{N-N})]^{6+}$ complexes
<b>January 22<sup>nd</sup>, 2010</b> <span style="float: right;">CK B3 room</span>		
Chairperson: Bhuvo Panijpan		
10.35-11.00	CHE-INV-1	<b>Stephen Weiminger</b> , Path-breaking books that changed the course of chemistry
11.00-11.15	CHE-OR-1	<b>Abdulaziz A. Almajjar</b> , Role of language and multiple intelligence skills in communicating chemistry
11.15-11.30	CHE-OR-2	<b>Saksri Supasorn</b> , Implementation of inquiry-based experiments to enhance student conceptual understanding and mental models of organic acid-base extraction and purification
11.30-11.45	CHE-OR-3	<b>Lianna Aisyah</b> , Integrating value education into chemistry education: Indonesia's experience
11.45-12.00	CHE-OR-4	<b>Kulthida Nugultham</b> , Experimental kit: soft drink's secret
12.00-13.00		<b>Lunch</b>
Chairperson: Saksri Supasorn		
13.40-14.05	CHE-INV-2	<b>Bhuvo Panijpan</b> , Research and publishing in chemical education
14.05-14.20	CHE-OR-5	<b>Skonchai Chanuanan</b> , The impact of hands-on professional training program on high school science teachers' conceptual understandings of fundamental nanoscience and nanotechnology
14.20-14.35	CHE-OR-6	<b>Southi Phonchaiya</b> , The element rhythm
14.35-14.50	CHE-OR-7	<b>Surasak Laloknam</b> , Learning retention in undergraduate biology using a hands-on practical "enzyme detection from vegetables and fruits"
14.50-15.05	CHE-OR-8	<b>Sumpun Wongnawa</b> , Solving absorption peaks overlap with Excel
<b>BBC: Biological / Biophysical Chemistry and Chemical Biology</b>		
<b>January 22<sup>nd</sup>, 2010</b> <span style="float: right;">CK B4 room</span>		
Chairperson: Supa Hannongbua		
10.35-11.00	BBC-INV-1	<b>Pimchai Chaiven</b> , Transient kinetics of pyranose 2-oxidase: implications for mechanisms and applications
11.00-11.15	BBC-OR-1	<b>Farshid Nourbakhsh</b> , A kinetic approach to evaluate the biodegradation of 3, 3'-diaminobenzidine in the soil environment
11.15-11.30	BBC-OR-2	<b>Retno Arianingrum</b> , Anticancer properties of vaticanol B from stem bark of dipterocarpaceae toward human cancer cell lines
11.30-11.45	BBC-OR-3	<b>Nurfiina Aznam</b> , Anticancer activity of amelopsin H from stem bark of <i>Hopea odorata</i>
11.45-12.00	BBC-OR-4	<b>Tayakorn Suwannarat</b> , Development of closed recirculating system integrating nitrifying biofilters for rearing tilapia larviculture
12.00-13.00		<b>Coffee break</b>
Chairperson: Pimchai Chaiven		
13.40-14.05	BBC-OR-5	<b>Chanudom Muangchim</b> , Immobilization of lipase on CaCO <sub>3</sub> and entrapment in Calcium alginate bead for biodiesel production
14.05-14.20	BBC-OR-6	<b>Chokchai Puttharungs</b> , Development of surface plasmon resonance imaging for detection of <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> ( <i>Aac</i> ) by using monoclonal antibody 11E5
14.20-14.35	BBC-OR-7	<b>Raweevan Thiramana</b> , Biofunctionalization of acrylic acid-modified colored nanoparticles: method comparison and their agglutination reaction
14.35-14.50	BBC-OR-8	<b>Jaitip Wuttisarnsukit</b> , Production of 1,3-propanediol from a biological fermentation of glycerol by <i>Clostridium butyricum</i> DSM 5431 in an anaerobic modified moving-bed bioreactor
14.50-15.05	BBC-OR-9	<b>Thunyaporn Viriyayingiri</b> , Optimal nutrient requirement of <i>Entomoneis</i> sp. cultivated under batch and continuous conditions
Chairperson: Apinya Buranaprapuk		
15.20-15.35	BBC-OR-10	<b>Sri Wahyuni Budiarti</b> , Isolation, purification, and characterization of $\beta$ -1,3-glucanase from the antagonistic fungus <i>Trichoderma reesei</i>
15.35-15.50	BBC-OR-11	<b>Thidarat Wangkam</b> , Food allergy detection on array sensors by surface plasmon resonance imaging
15.50-16.05	BBC-OR-12	<b>Methinee Prongjit</b> , Kinetic and mechanistic studies of pyranose 2-oxidase from <i>Trametes multicolor</i>
16.05-16.20	BBC-OR-13	<b>Warintra Pitsawong</b> , A conserved active-site threonine is important for both half-reactions of pyranose 2-oxidase
16.20-16.35	BBC-OR-14	<b>Sombat Kongvithaya</b> , Characterization of ammonium sulfate precipitant peroxidase from Ivy gourd

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ใจทิพย์ วุฒิสารสุกิจ เกิดวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529 กรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่ โรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย รังสิต และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดย สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 จากนั้นเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย