



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี

สาขา

วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา

เรื่อง ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนจากกลีเซอรอลดิบ
ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

Potential of L-phenylalanine Production from Raw Glycerol of Biodiesel Process

นามผู้วิจัย นายสุกชัช ฤกษ์เกษม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุสิทธิ์ ธนะพิมพ์เมธา, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ผ่องผาย พรรณวดี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนจากกลีเซอรอลดิบ
ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

Potential of L-phenylalanine Production from Raw Glycerol of Biodiesel Process

โดย

นายศุภชัย ฤกษ์เกษม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภชัย ฤกษ์เกษม 2553: ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิล
อะลานีนจากกลีเซอรอลดิบในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปริญญาวิศวกรรมศาสตร
มหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุสิทธิ์ ธนะพิมพ์เมธา, D.Eng. 131 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้กลีเซอรอลดิบที่ได้จากโรงงานใน
กระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม RBD สำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง
แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อใช้ในการผลิตกรด
อะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน โดยกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีปริมาณ
กลีเซอรอล 76 เปอร์เซ็นต์ สบู่ 7.9 เปอร์เซ็นต์ และ เถ้า 3.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ
กลีเซอรอลดิบได้ถูกนำมาปรับปรุงคุณภาพให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น โดย
ปรับพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงจาก 12 เป็น 6 5 4 3 และ 2 ตามลำดับ พบว่าเมื่อเติมกรด
ซัลฟิวริกเข้มข้นลงในกลีเซอรอลดิบ ทำให้กลีเซอรอลดิบเกิดการแยกชั้นเป็นสามชั้น ชั้นบนคือ
ชั้นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลางคือชั้นกลีเซอรอล และชั้นล่างคือชั้นเกลือซัลเฟต เมื่อทำการวิเคราะห์
หาองค์ประกอบชั้นกลีเซอรอลที่แยกออกมาได้ พบว่ากลีเซอรอลดิบที่ถูกปรับค่าพีเอชให้ต่ำลงจะ
มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 มีความบริสุทธิ์สูงสุดเป็น 91
เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณเถ้าเท่ากับ 2.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และไม่พบว่ามีสบู่
หลงเหลืออยู่ในชั้นกลีเซอรอลเลย อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการใช้กลีเซอรอลดิบ กลีเซอรอล
ดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และกลีเซอรอลเกรดยูเอสพี (ที่มีความบริสุทธิ์ 99.5
เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ความเข้มข้น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยง *E. coli*
BL21 (DE3) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในกลีเซอรอลดิบ
อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย
และความเข้มข้นของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนสูงที่สุดเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร และ
55.2 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ากลีเซอรอลดิบจากกระบวนการ
ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม RBD เป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการเพาะเลี้ยง
E. coli BL21 (DE3)

Supachai Reakasame 2010: Potential of L-phenylalanine Production from Raw Glycerol of Biodiesel Process. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Anusith Thanapimmetha, D.Eng. 131 pages.

The possibility of using raw glycerol from RBD palm oil biodiesel process for bacteria growth and L-phenylalanine production using recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) was investigated. Raw glycerol from the biodiesel industry with 76% (w/w) glycerol content was pretreated with concentrated sulfuric acid to reduce the amount of impurities which were 7.9% (w/w) of soap and 3.9% (w/w) of ash. The acid was added into raw glycerol until the pH of raw glycerol decreased from 12 to 6, 5, 4, 3 and 2, respectively. After that, raw glycerol was separated into 3 phases: free fatty acid (top phase), glycerol (middle phase) and sulfate salt (bottom phase). The recovered glycerol phase was analyzed to determine the glycerol composition. The results showed that glycerol content in the recovered glycerol phase increased when the pH of acid-pretreated glycerol decreased. The pH 3 acid-pretreated glycerol contained 91% (w/w) glycerol, 2.59% (w/w) ash and non-detectable level of soap. Then raw glycerol, acid-pretreated glycerol and USP grade glycerol (99.5% w/w) at the concentration of 5, 10, 30 and 50 g/L were used as a carbon source in culturing *E. coli* BL21 (DE3). The results showed that the cells were able to use raw glycerol efficiently for their growth. The cell dry weight and L-phenylalanine concentration obtained after 36 h of cultivation from raw glycerol were much higher than that from the other kinds of glycerol. The highest cell dry weight (3.47 g/L) and L-phenylalanine concentration (55.2 mg/L) were obtained from the medium containing 30 g/L of raw glycerol. The results indicated that raw glycerol from RBD palm oil biodiesel is an interesting carbon source for *E. coli* BL21 (DE3) cultivation.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุสิทธิ์ ฐนะพิมพ์เมธา ประธานกรรมการ ที่ปรึกษาที่คอยดูแล ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตลอดการ ศึกษาวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วย ศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง ที่ให้ความอนุเคราะห์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย และ ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ผลการวิจัย อีกทั้งขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล คงคาอุยหลาย ที่กรุณาสละเวลาเพื่อเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำแนะนำ และแนวคิดที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้จัดทำ

ขอขอบคุณ บริษัทน้ำมันพืชปทุม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กลีเซอรอลดิบมาเพื่อใช้ในการ วิจัย

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวกระบวนการ และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่เอื้อเพื่อ สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ และ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชา วิศวกรรมเคมี รวมถึง เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ให้การสนับสนุนในการทำ วิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนในด้านทุนวิจัยและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจเสมอมา จนสำเร็จ การศึกษา

ศุภชัย ฤกษ์เกษม
กุมภาพันธ์ 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	50
อุปกรณ์	50
วิธีการ	53
ผลและวิจารณ์	58
สรุปและข้อเสนอแนะ	78
สรุป	78
ข้อเสนอแนะ	79
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	80
ภาคผนวก	87
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอล	88
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน	93
ภาคผนวก ค การคำนวณปริมาณสบู่	97
ภาคผนวก ง โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน	99
ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์ต่าง ๆ	124
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	131

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	6
2	งานวิจัยที่ใช้กลีเซอรอลดิบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์	23
3	ปริมาณกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันปาล์มดิบ	27
4	รายชื่อ และสูตรโมเลกุล ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ	32
5	ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นสำหรับผู้ใหญ่ และ เด็กควรได้รับในแต่ละวัน	35
6	ลักษณะของกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น	60
7	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลีเซอรอล และชั้นเกลือ ที่แยกได้หลังการปั่นเหวี่ยงกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก	63
ตารางผนวกที่		
ก1	ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล	91
ก2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์กลีเซอรอล	91
ข1	ค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	96
จ1	ค่าการวิเคราะห์ปริมาณสบู่ในชั้นกลีเซอรอล	125
จ2	ค่าการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในชั้นกลีเซอรอล	125
จ3	ค่าการวิเคราะห์ค่าความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล	126
จ4	น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>Escherichia coli</i> BI21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน	127
จ5	ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>Escherichia coli</i> BI21 (DE3) ในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน	129

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
จ6 น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) ที่ได้จากเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่ทำการแยกสบู่ออกเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้แยกสบู่ออก	130
จ7 น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) ที่ได้จากเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่มีโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ	130

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	5
2 ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชันระหว่าง ไตรกลีเซอไรด์ กับ ด่าง	10
3 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์กลีเซอรอลด้วยวิธีทางเคมี	12
4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันระหว่าง ไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์	15
5 ขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน	16
6 ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระ กับตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทต่าง	17
7 กระบวนการผลิตไบโอดีเซลในอุตสาหกรรม	21
8 ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันที่ติดอยู่กับทะเล	24
9 ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันผ่าซีก	25
10 แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม	30
11 โครงสร้างของกรดอะมิโน	31
12 การเรียงตัวในสามมิติของกรดอะมิโน	34
13 สูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนชนิด ฟีนิลอะลานีน	43
14 แบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	43
15 ปฏิกิริยาการกำจัดเอาหมูอะมิโนออกจากกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน	45
16 ขั้นตอนการเติมกรดเพื่อปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบ	54
17 กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล	60
18 ปฏิกิริยาระหว่างสบู่ในกลีเซอรอลดิบกับกรดซัลฟิวริก	60
19 ปริมาณสบู่ในกลีเซอรอลดิบ และกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก	64
20 ปริมาณเถ้าในกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก	66
21 ปริมาณกลีเซอรอลในกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วงเวลาที่ 36	69
23	ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วงเวลาที่ 36	74
24	น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ	75
25	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการผสมกลีเซอรอลดิบเข้ากับสารอาหารอื่น ๆ ในน้ำกลั่น	76
26	น้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ทำการแยกชั้นของเหลวสีขาวออกเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้แยกชั้นของเหลวสีขาวออก	77
ภาพผนวกที่		
ก1	กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล	92
ข1	กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	96
ง1	โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	100
ง2	โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	100
ง3	โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง4 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	101
ง5 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	102
ง6 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	102
ง7 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 1)	103
ง8 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 2)	103
ง9 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 3)	104
ง10 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 1)	104
ง11 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	105

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง12 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิเกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	105
ง13 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	106
ง14 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	106
ง15 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	107
ง16 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	107
ง17 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	108
ง18 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	108
ง19 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	109

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง20 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	109
ง21 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	110
ง22 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	110
ง23 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	111
ง24 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	111
ง25 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	112
ง26 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	112
ง27 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	113

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง28 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	113
ง29 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	114
ง30 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	114
ง31 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	115
ง32 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	115
ง33 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	116
ง34 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	116
ง35 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	117

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง36 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	117
ง37 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	118
ง38 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	118
ง39 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	119
ง40 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	119
ง41 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	120
ง42 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	120
ง43 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	121

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง44 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	121
ง45 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	122
ง46 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)	122
ง47 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)	123
ง48 โคโรนาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำ เลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็น แหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)	123

ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนจากกลีเซอรอลดิบ ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

Potential of L-phenylalanine Production from Raw Glycerol of Biodiesel Process

คำนำ

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานชีวภาพที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซล และระบบทำความร้อนได้ เป็นสารประเภทอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันสายยาวที่ผลิตได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์ (Ito *et al.*, 2005) ไบโอดีเซลเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีปริมาณสารพิษเช่น ซัลเฟอร์ และสารอะโรมาติกในปริมาณน้อย จึงกล่าวได้ว่าไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกที่มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Dharmadi *et al.*, 2006)

เนื่องจากน้ำมันปิโตรเลียมเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างจำกัด และกำลังมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับความตื่นตัวเกี่ยวกับปัญหาสภาวะโลกร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศของโลกอันเนื่องมาจากก๊าซไอเสียที่เกิดจากการเผาไหม้น้ำมันปิโตรเลียม ทำให้ในปัจจุบันมีการผลิตไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนกันมากขึ้น

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน นอกจากได้ไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์หลักแล้ว ยังเกิดกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้หลักอีกด้วย โดยปริมาณกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของไบโอดีเซลที่ทำการผลิต (Celik *et al.*, 2008)

กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นสารที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารและยา เป็นต้น อย่างไรก็ตามกลีเซอรอลที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นกลีเซอรอลดิบที่มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากมีสารเคมีชนิดอื่นที่ถูกใช้หรือเกิดขึ้นในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เช่น แอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยา และสบู่ เป็นต้น ปนเปื้อนอยู่ด้วยจำนวนมาก จึงทำให้ไม่สามารถนำกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังกล่าวได้โดยตรง (Chitra *et al.*, 2005)

จากการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นทั่วโลก ทำให้ในปัจจุบันเกิดภาวะกลีเซอรอลดิบล้นตลาด (Yazdani and Gonzalez, 2007) ดังนั้นการหาแนวทางใหม่ ๆ ในการใช้ประโยชน์กลีเซอรอลดิบจึงเป็นทางออกสำคัญที่จะสามารถช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ นอกจากนี้การเพิ่มมูลค่าให้กับกลีเซอรอลดิบยังช่วยทำให้ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลลดลงได้อีกด้วย

กลีเซอรอลสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น 1, 3-โพรเพนไดออล เอทานอล และ บิวทานอล เป็นต้น (Asad-ur-Rehman *et al.*, 2008) ถึงแม้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีปริมาณมาก และมีราคาถูกกว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์ แต่ยังคงมีรายงานการศึกษาการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในจำนวนไม่มากนัก โดยมีรายงานว่าสิ่งเจือปนที่อยู่ในกลีเซอรอลดิบ เช่น สบู่ และเกลืออนินทรีย์ มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด (Asad-ur-Rehman *et al.*, 2008; Gonzalez-Pajuelo *et al.*, 2004) ในขณะเดียวกันก็มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Clostridium butyricum* บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Gonzalez-Pajuelo *et al.*, 2004; Petitdemange *et al.*, 1995)

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ทั้งในระดับการทดลองและระดับอุตสาหกรรม (Aon *et al.*, 2008) มีรายงานว่า *E. coli* สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยในการใช้กลีเซอรอลภายใต้สภาวะไร้อากาศของจุลินทรีย์ชนิดนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น เอทานอล กรดแลกติก กรดอะซิติก และไฮโดรเจน เป็นต้น (Dharmadi *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ด้วยกลีเซอรอลเพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนอีกด้วย (Khamduang *et al.*, 2009a) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีงานวิจัยใดที่ทำการศึกษถึงการนำกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* มาก่อน

กรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนเป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อภาวะโภชนาการของมนุษย์ สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตแอสปาร์แตมซึ่งเป็นสารให้ความหวานที่ให้ค่าพลังงานต่ำ (Hermann, 2003) จากการเติบโตของตลาดผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ทำให้มีความต้องการใช้กรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนเพื่อผลิตแอสปาร์แตมในปริมาณมากขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาและการพัฒนาการผลิตกรดอะมิโนชนิดนี้กันอย่างกว้างขวางมากขึ้น (Chaoa *et al.*, 2000)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น และศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL 21 (DE3) ที่มียีนแอล-ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Acinetobacter lwoffii* เพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน



วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการทำกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
2. ศึกษาผลของกลีเซอรอลดิบ กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และ กลีเซอรอลเกรดยูเอสพี (99.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ต่อการเจริญ และการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่มียีนแอล-ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Acinetobacter lwoffii*

ขอบเขตงานวิจัย

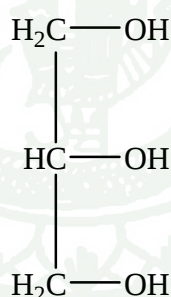
การศึกษากความเป็นไปได้ในการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนจากกลีเซอรอลดิบในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งจะทำการศึกษาการทำให้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีความบริสุทธิ์ขึ้นโดยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเพื่อปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงเป็น 6 5 4 3 และ 2 เพื่อลดปริมาณสิ่งเจือปนในกลีเซอรอลดิบ ในส่วนที่สองจะทำการศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของกลีเซอรอล ต่อการเจริญและการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนของแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) ที่มียีนแอล-ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Acinetobacter lwoffii* โดยเปรียบเทียบระหว่างกลีเซอรอลดิบ กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และ กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

การตรวจเอกสาร

กลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1, 2, 3-โพรเพนไตรออล (Glycerol or 1, 2, 3-propanetriol) เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีลักษณะหนืด ไม่มีกลิ่น มีรสหวาน มีสูตรโมเลกุลคือ $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$ และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในภาพที่ 1

กลีเซอรอลถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W Scheele จากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันมะกอก กับ เลดออกไซด์ (PbO) คำว่ากลีเซอรอลมีที่มาจากคำในภาษากรีกว่า “glykys” ซึ่งมีความหมายว่า “หวาน” กลีเซอริน (Glycerin หรือ Glycerine) หมายถึงสารละลายที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยมักพบว่าการสลับใช้คำว่ากลีเซอริน และ กลีเซอรอล แทนกันอยู่บ่อยครั้งในบทความทางวิชาการต่าง ๆ กลีเซอรอลดิบที่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 70 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์มักถูกทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 95.5 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์เพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ (Pagliaro and Rossi, 2008)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

1. สมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลสามารถละลายได้ดีในน้ำ และ แอลกอฮอล์ ละลายได้เล็กน้อยใน อีเทอร์ (Ether) เอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate) และ ไดออกเซน (Dioxane) ไม่สามารถละลายได้ในสารประเภทไฮโดรคาร์บอน (Kirk and Othmer, 1979) โดยคุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอลได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

คุณสมบัติ	ค่าประจำคุณสมบัติ
มวลโมเลกุล (Molecular weight)	92.09 กรัมต่อโมล
จุดหลอมเหลว (Melting point)	18.0 องศาเซลเซียส
จุดเดือด (Boiling point) (ที่ความดัน 101.3 กิโลพาสคาล)	290 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น (Density) (ที่ 20 °ซ)	1.261 กรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร
ดัชนีหักเห (Refractive index) n_D^{20}	1.4740
ความหนืด (Dynamic viscosity) (ที่ 20 °ซ)	1.410 พาสคาล·วินาที
ความสามารถในการบีบอัด (Compressibility) (ที่ 28.5 °ซ)	21×10^{-4} เมกะพาสคาล ⁻¹
ความตึงผิว (Surface tension) (ที่ 20 °ซ)	63.4 มิลลินิวตันต่อเมตร
ความร้อนจากการเกิด (Heat of formation)	669 กิโลจูลต่อโมล
ความร้อนจากการเผาไหม้ (Heat of combustion)	1,662 กิโลจูลต่อโมล
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (Heat of vaporization)	
(ที่ 55 °ซ)	88.2 กิโลจูลต่อโมล
(ที่ 195 °ซ)	76.1 กิโลจูลต่อโมล
ความร้อนแฝงของการหลอมเหลว (Heat of fusion) (ที่ 18 °ซ)	18.3 กิโลจูลต่อโมล
ความจุความร้อน (Heat Capacity) (ที่ 26 °ซ)	2.41 กิโลจูล กิโลกรัม ⁻¹ เคลวิน ⁻¹
(ที่ -80 °ซ)	1.91 กิโลจูล กิโลกรัม ⁻¹ เคลวิน ⁻¹
(ที่ -108 °ซ)	0.91 กิโลจูล กิโลกรัม ⁻¹ เคลวิน ⁻¹
สภาพนำความร้อน (Thermal conductivity)	0.29 วัตต์ เมตร ⁻¹ เคลวิน ⁻¹
ค่าคงที่ของการแพร่ของน้ำในกลีเซอรอล (ที่ 20° ซ)	1.33×10^{-11} ตารางเมตรต่อวินาที
จุดวาบไฟ (Flash point)	177 องศาเซลเซียส
จุดติดไฟ (Fire point)	204 องศาเซลเซียส
ความดันไอ (Vapor pressure) (ที่ 20 °ซ)	< 0.0001 กิโลพาสคาล
(ที่ 100 °ซ)	0.03 กิโลพาสคาล
(ที่ 175 °ซ)	2.00 กิโลพาสคาล
(ที่ 290 °ซ)	101.3 กิโลพาสคาล

ที่มา: Jakobson *et al.* (1999)

2. สมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่อยู่ในโมเลกุล กลีเซอรอลสามารถทำปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่น โดยหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ด้านนอกของโมเลกุลมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยามากกว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ตำแหน่งกลางโมเลกุล (Jakobson *et al.*, 1999) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลีเซอรอลทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับสภาวะในการทำปฏิกิริยา ในกรณีที่ใช้ตัวออกซิไดส์ที่มีความแรงไม่มาก จะทำให้เกิดการออกซิไดส์หมู่ไฮดรอกซิลเพียงหมู่เดียว ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอล-ดีไฮด์ (Glyceroldehyde) และไดไฮดรอกซีอะซิโตน (Dihydroxyacetone) (Kirk and Othmer, 1979)

3. การใช้ประโยชน์กลีเซอรอล

กลีเซอรอลถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งในรูปแบบของการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์โดยตรง และการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารชนิดอื่น เช่น ไตรไนโตรกลีเซอรีน (Trinitroglycerine) และ โพลียูรีเทน (Polyurethanes) เป็นต้น ส่วนใหญ่กลีเซอรอลจะถูกใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อช่วยรักษาความชุ่มชื้น และความนุ่มให้กับผลิตภัณฑ์ เนื่องจากกลีเซอรอลมีความสามารถในการดูดซับความชื้นจากสิ่งแวดล้อมได้ดี และสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้กลีเซอรอลถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางคือ กลีเซอรอลเป็นสารที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษกับสิ่งมีชีวิต (Pagliaro and Rossi, 2008) โดยการใช้ประโยชน์กลีเซอรอลในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีรายละเอียดดังนี้

3.1 อุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารที่ไม่มีพิษ มีรสชาติหวาน และให้พลังงานน้อย จึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหาร และขนมหวาน โดยกลีเซอรอลปริมาณ 1 ช้อนชาให้พลังงานประมาณ 27 แคลอรี และให้ความหวานคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครส แต่ไม่มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของผู้บริโภคสูงขึ้น และไม่ทำให้แบคทีเรียในช่องปากเกิดการก่อตัวเป็นคราบพลัค กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารอบเพื่อช่วยลดการสูญเสียจากผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เกิดการแห้งหรือแข็งระหว่างการเก็บรักษา (Pagliaro and Rossi, 2008) กลีเซอรอลถูกใช้เป็นตัวทำละลาย สารให้ความชื้น และส่วนผสมของน้ำเชื่อม ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตลูกกวาด และ ลูกอม เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้

น้ำตาลเกิดการตกผลึก นอกจากนี้กลีเซอรอลยังถูกใช้เป็นส่วนหล่อลื่นเครื่องจักร และใช้เป็นสารตัวกลางในการแลกเปลี่ยนความร้อนในอุตสาหกรรมอาหารอีกด้วย (Kirk and Othmer, 1979)

3.2 อุตสาหกรรมยา กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนผสมในตำหรับยาเพื่อให้ความชุ่มชื้น ความลื่น และความนุ่มนวลกับตัวยา นอกจากนี้ยังช่วยรักษาเนื้อสัมผัสของยาอีกด้วย (Pagliaro and Rossi, 2008)

3.3 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนให้ความชุ่มชื้น ตัวทำละลาย สารหล่อลื่น ในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ยาสีฟัน ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ครีมโกนหนวด ผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม และสบู่ เป็นต้น (Pagliaro and Rossi, 2008)

3.4 อุตสาหกรรมบุหรี กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนผสมในสารละลายที่ใช้ฉีดพ่นลงบนใบยาสูบก่อนทำการย่อยใบยาสูบให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และทำการบรรจุต่อไป นอกจากนี้กลีเซอรอลยังถูกผสมเข้ากับสารเติมแต่งต่าง ๆ ในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของบุหรี เพื่อป้องกันไม่ให้ยาสูบเกิดการลุกติดไฟในระหว่างกระบวนการผลิตบุหรี เนื่องจากกลีเซอรอลสามารถช่วยรักษาความชื้นให้กับบุหรีได้ (Kirk and Othmer, 1979)

3.5 อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ และหีบห่อ กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตกระดาษชนิดพิเศษเช่น กระดาษกันไขมัน เป็นต้น (Kirk and Othmer, 1979)

3.6 อุตสาหกรรมการผลิตยูรีเทน กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการผลิตโพลียูรีเทน (Kirk and Othmer, 1979)

3.7 การใช้เป็นส่วนหล่อลื่นในอุตสาหกรรม กลีเซอรอลมีคุณสมบัติที่ดีในการใช้เป็นส่วนหล่อลื่น เนื่องจากมีความหนืดสูง และสามารถคงสภาพเป็นของเหลวอยู่ได้ในอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นกลีเซอรอลจึงมักถูกนำมาใช้เป็นส่วนหล่อลื่นในกรณีที่สารหล่อลื่นประเภทน้ำมันไม่มีความเหมาะสมในการใช้งาน กลีเซอรอลถูกใช้เป็นส่วนหล่อลื่นในกระบวนการผลิตอาหาร ยา และ

เครื่องสำอาง ที่ผลิตภัณฑ์มีการสัมผัสกับสารหล่อลื่นโดยตรง กลีเซอรอลถูกใช้เป็นสารหล่อลื่นในปีที่มีการสัมผัสกับน้ำมันเบนซิน เนื่องจากน้ำมันเบนซินสามารถละลายสารหล่อลื่นประเภทน้ำมันได้ (Kirk and Othmer, 1979)

ในแต่ละปี กลีเซอรอลที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีปริมาณประมาณ 160,000 ตัน โดย 28 เปอร์เซ็นต์ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา ยาสีฟัน และเครื่องสำอาง 15 เปอร์เซ็นต์ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมบุหรี 13 เปอร์เซ็นต์ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และอีก 11 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยูรีเทน ส่วนที่เหลือถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำยาซักเงา กาว หมึก พลาสติกสังเคราะห์ การผลิตระเบิด และการใช้เบ็ดเตล็ดอื่น ๆ ในอุตสาหกรรม (Pagliaro and Rossi, 2008)

กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีขายทั่วไปในท้องตลาด ส่วนมากเป็นกลีเซอรอลเกรดยูเอสพี (USP Grade) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไปตามข้อกำหนดของ เดอะ ยูไนเต็ลสเตท ฟามาโคเปีย หรือ ยูเอสพี (The United States Pharmacopeia, USP) ว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร ยาโรค และเครื่องสำอางได้ โดยมีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความถ่วงจำเพาะที่ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.249 อย่างไรก็ตามในท้องตลาดยังคงมีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีคุณภาพระดับต่าง ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามลักษณะงานที่จะนำไปประยุกต์ใช้ของผู้ซื้อเช่น กลีเซอรอลเกรดไคโนไมด์ เป็นต้น (Kirk and Othmer, 1979)

4. การผลิตกลีเซอรอล

การผลิตกลีเซอรอลสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการผลิตจากไขมันและน้ำมันธรรมชาติ การผลิตด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และการผลิตด้วยวิธีอื่น ๆ ที่ไม่มีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรม เช่น การหมักด้วยจุลินทรีย์ และการเติมไฮโดรเจนให้กับสารประเภทไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น

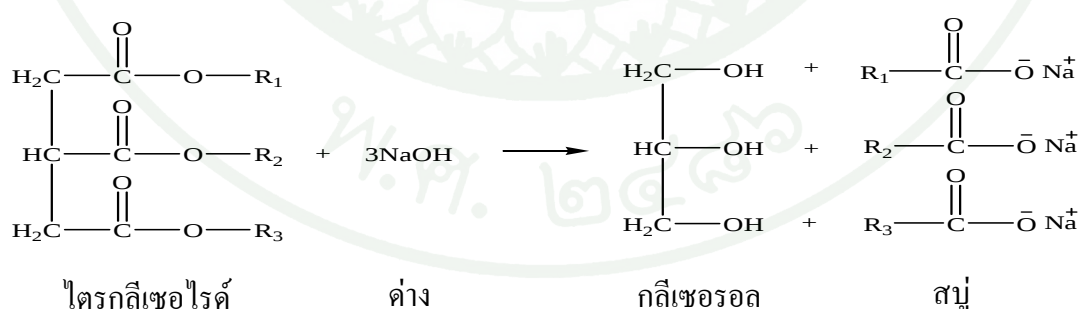
4.1 การผลิตกลีเซอรอลจากไขมันและน้ำมัน โดยทั่วไปกลีเซอรอลที่พบในธรรมชาติจะไม่อยู่รูปของกลีเซอรอลอิสระ แต่จะพบอยู่ในรูปเอสเทอร์ของกรดไขมัน ซึ่งคือกลีเซอไรด์ (Glycerides) ในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ ดังนั้นในการผลิตกลีเซอรอลจากไขมันหรือน้ำมันต้องมี

การทำให้ไขมันหรือน้ำมันเกิดการแตกตัว ซึ่งวิธีที่ใช้ในการทำให้ไขมันเกิดการแตกตัวมีหลายวิธีดังนี้ (Jakobson *et al.*, 1999)

4.1.1 การแตกตัวด้วยความดันสูง (High Pressure Splitting) การแตกตัวของไขมันด้วยวิธีนี้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1845 ปัจจุบันมีการดำเนินการดังกล่าวในถึงปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง โดยในกระบวนการมีการป้อนน้ำ และไขมันเข้าสู่คอลัมน์ในทิศทางตรงกันข้าม ภายใต้ความดัน 5 ถึง 6 เมกะพาสคาล อุณหภูมิ 250 ถึง 260 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารละลายนี้เรียกว่าสวิตวอเตอร์ (Sweet Water) กลีเซอรอลที่ผลิตได้จากกระบวนการนี้เป็น กลีเซอรอลที่มีปริมาณเถ้าต่ำ คือมีปริมาณเกลืออนินทรีย์น้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Trasesterification) กลีเซอรอลดิบเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้หลักที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเมทิลเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) จากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ด้วยปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยรายละเอียดของวิธีนี้จะได้กล่าวต่อไปในหัวข้อการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.1.3 ปฏิกริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ปฏิกริยาสะพอนิฟิเคชัน หรือปฏิกริยาการผลิตสบู่ เป็นปฏิกริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ในไขมันหรือน้ำมันกับด่าง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น สบู่ และกลีเซอรอล ดังแสดงในภาพที่ 2 การผลิตกลีเซอรอลด้วยวิธีนี้ถือเป็นวิธีดั้งเดิมที่สุด



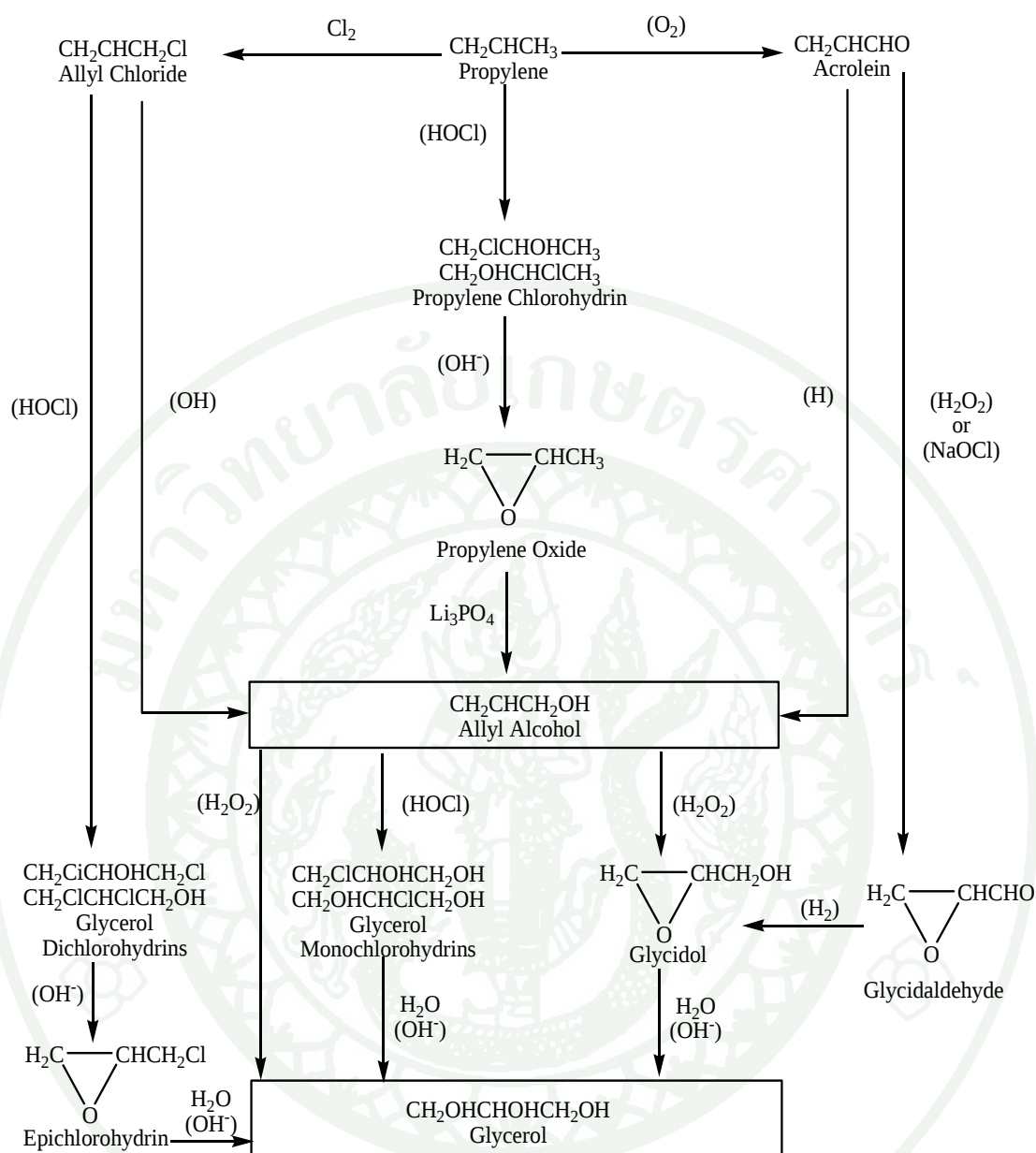
ภาพที่ 2 ปฏิกริยาสะพอนิฟิเคชันระหว่าง ไตรกลีเซอไรด์ กับ ด่าง

4.2 การผลิตกลีเซอรอลด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตไนโตรกลีเซอริน (Nitroglycerine) ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (Dynamite) และอาวุธรบอีกหลายชนิด ทำให้ในช่วงสงครามโลก มีความต้องการใช้กลีเซอรอลในปริมาณมากกว่าที่สามารถผลิตได้จากกระบวนการแตกตัวของไขมันและน้ำมัน จึงทำให้มีการคิดค้นวิธีการผลิตกลีเซอรอลขึ้นใหม่ด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้โพรพิลีน (Propylene) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียมเป็นสารตั้งต้นในการผลิต (Pagliaro and Rossi, 2008) วิธีการสังเคราะห์กลีเซอรอลจากโพรพิลีนได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างมากในช่วง ค.ศ. 1945 ถึง 1965 โดยกระบวนการที่ใช้ในการสังเคราะห์กลีเซอรอลในช่วงแรกเป็นกระบวนการที่ต้องใช้คลอรีนในการผลิต โดยทำการแทนที่ไฮโดรเจนในโมเลกุลของโพรพิลีนด้วยคลอไรด์ (Chlorination) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลลิลคลอไรด์ (Allyl Chloride) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลได้ด้วยหลายวิธีทางดังแสดงในภาพที่ 3 ต่อมาได้มีการค้นพบว่ากลีเซอรอลสามารถถูกออกซิไดซ์อย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะโครลีน (Acrolein) จากการค้นพบดังกล่าว ได้นำไปสู่การผลิตกลีเซอรอลจากโพรพิลีนโดยไม่ต้องใช้คลอรีนในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีกระบวนการผลิตกลีเซอรอลจากโพรพิลีนออกไซด์ (Propylene Oxide) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ (Allyl Alcohol) ได้โดยใช้ไตรลิเทียมฟอสเฟต (Trilithium Phosphate) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 200 ถึง 250 องศาเซลเซียส ซึ่งอัลลิลแอลกอฮอล์สามารถถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลีเซอรอลได้ ดังแสดงในภาพที่ 3 (Kirk and Othmer, 1979)

4.3 การผลิตกลีเซอรอลด้วยกระบวนการอื่น ๆ (Jakobson *et al.*, 1999)

4.3.1 การหมัก ในปี ค.ศ. 1858 ได้มีการค้นพบว่ากลีเซอรอลสามารถเกิดขึ้นในกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ดีตาม การผลิตกลีเซอรอลด้วยวิธีการนี้มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมน้อยมาก

4.3.2 การเติมไฮโดรเจนให้กับสารประเภทไฮโดรคาร์บอน การเติมไฮโดรเจนให้กับสารประเภทโพลีแอลกอฮอล์ (Polyalcohols) เช่น เซลลูโลส แป้ง และน้ำตาล ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายของกลีเซอรอล และไกลคอล (Glycols) ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่ใช้อุณหภูมิสูง โดยตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ได้แก่ นิกเกิล ทองแดง โคบอลต์ โครเมียม และ ทังสเตน



ภาพที่ 3 ปฏิกริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์กลีเซอรอลด้วยวิธีทางเคมี

ที่มา: Kirk and Othmer (1979)

ในปัจจุบันพบว่ากลีเซอรอลมีแนวโน้มทางการตลาดที่เปลี่ยนแปลงไปจากสมัยก่อน เนื่องจากมีกลีเซอรอลปริมาณมหาศาลเกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ก่อให้เกิดภาวะกลีเซอรอลล้นตลาด ทำให้ทั้งนักวิจัย โรงงานอุตสาหกรรม และอีกหลายฝ่ายที่เกี่ยวข้อง พยายามคิดค้นหาแนวทางใหม่ ๆ ในการใช้กลีเซอรอลเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิต

ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อทดแทนสารเคมีจากปิโตรเลียมกันมากขึ้น ส่งผลให้งานวิจัยในประเด็นศึกษาดังกล่าวมีความก้าวหน้าขึ้นอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา อย่างไรก็ตาม แนวทางการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลที่ถูกพัฒนาขึ้นยังคงสามารถรองรับปริมาณกลีเซอรอลได้เพียง 0.05 ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกลีเซอรอลทั้งหมดที่มีอยู่ในท้องตลาด ซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับการหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลจึงยังคงเป็นประเด็นศึกษาที่น่าสนใจ และยังคงต้องมีการพัฒนาให้มีความหลากหลาย และมีประสิทธิภาพมากขึ้นต่อไป (Pagliaro and Rossi, 2008)

ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลหมายถึง พลังงานชีวภาพที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซล เพื่อทดแทนน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมได้

ในทางเคมี ไบโอดีเซลหมายถึง สารประเภทโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (Monoalkyl Ester) ของกรดไขมันสายยาว ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ระหว่างไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ กับแอลกอฮอล์ (Demirbas, 2008)

เนื่องจากในปัจจุบันน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างจำกัด กำลังมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับความตื่นตัวในปัญหาสภาวะโลกร้อน และปัญหาสังแวดล้อมอันเกิดจากการเผาไหม้น้ำมันปิโตรเลียม ทำให้หลายฝ่ายหันมาให้ความสนใจในการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับแหล่งพลังงานทดแทนกันอย่างกว้างขวางมากขึ้น พลังงานทดแทนจากมวลชีวภาพเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลแล้ว ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทางเลือกที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากไบโอดีเซลเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันปิโตรเลียม เนื่องจากไบโอดีเซลสามารถถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (Marchetti *et al.*, 2007) มีปริมาณซัลเฟอร์และสารอะโรมาติกในปริมาณที่น้อยกว่าน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม ทำให้ก๊าซไอเสียที่เกิดขึ้นจากการเผาไหม้น้ำมันไบโอดีเซลมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตน้อยกว่าก๊าซไอเสียจากการเผาไหม้น้ำมันปิโตรเลียม (Dharmadi *et al.*, 2006) เมื่อมีการใช้ไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม พบว่าสามารถลดปริมาณสุทธิของการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงได้มากถึง 78 เปอร์เซ็นต์ จึงนับว่าการใช้ไบโอดีเซลเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่สามารถช่วยลดปัญหาสภาวะโลกร้อนได้ (Helwani *et al.*, 2009)

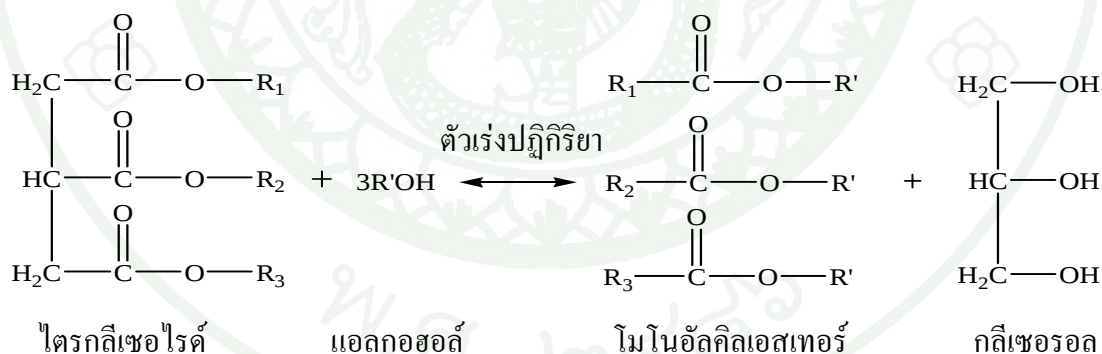
1. การใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งพลังงานในเครื่องยนต์ดีเซล

การใช้น้ำมันพืชเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในเครื่องยนต์ดีเซลโดยตรงนั้น สามารถทำได้โดยการผสมน้ำมันพืชเข้ากับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนที่เหมาะสม แต่วิธีดังกล่าวนี้ไม่เหมาะสำหรับการใช้งานในระยะยาวในเครื่องยนต์ดีเซล เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูง นอกจากนี้กรดไขมันอิสระในน้ำมันพืชยังทำให้เกิดยางเหนียวจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) และพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวจะทำให้เครื่องยนต์เกิดความเสียหายได้ ดังนั้นก่อนการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งพลังงานในเครื่องยนต์ดีเซลนั้น น้ำมันพืชจะต้องผ่านกระบวนการในการลดความหนืดเสียก่อนโดยวิธีการที่ใช้ในการลดความหนืดของน้ำมันพืชมีหลายวิธีดังนี้ (Ranganathan *et al.*, 2008)

1.1 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน หรือ การไพโรไลซิส (Thermalcracking or Pyrolysis) เป็นการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยการให้ความร้อนภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศหรือออกซิเจน ทำให้พันธะเคมีในโมเลกุลของสารตั้งต้นเกิดการสลายตัวไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง โดยในกระบวนการนี้อาจมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมกับการให้ความร้อนได้เช่นกัน วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการแตกสลายด้วยความร้อนได้แก่น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ กรดไขมันธรรมชาติ และเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เมื่อน้ำมันพืชผ่านกระบวนการแตกสลายด้วยความร้อนแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความหนืดลดลง ส่งผลให้มีความสามารถในการไหลได้ดีขึ้น แต่ข้อเสียของกระบวนการนี้คือ อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการมีราคาค่อนข้างสูง (Ma and Hanna, 1999)

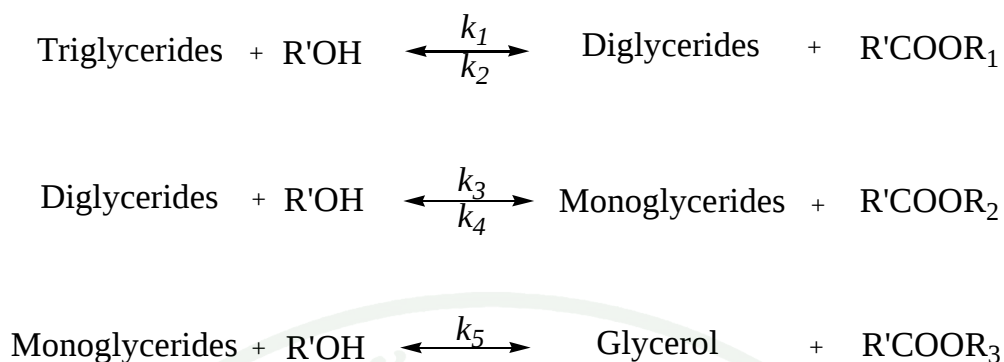
1.2 ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สามารถใช้ในการลดความหนืดของน้ำมันพืชได้ โดยในกระบวนการนี้มีการใช้แอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เอทานอล หรือโพรพานอล เป็นสารเติมแต่งเพื่อลดความหนืดของน้ำมันพืช ใช้แอลกอฮอล์โมเลกุลใหญ่เป็นสารลดแรงตึงผิว และใช้อัลคิลไนเตรท (Alkyl Nitrate) ในการเพิ่มค่าซีเทน (Cetane Number) ให้กับน้ำมัน โดยสารผสมระหว่างแอลกอฮอล์กับน้ำมันพืชจะผสมกันอยู่ในรูปของคอลลอยด์ที่มีกระจายตัวในสถานะสมดุลโดยอนุภาคในคอลลอยด์นั้นส่วนมากมีขนาดอยู่ในช่วง 1 ถึง 150 นาโนเมตร (Ma and Hanna, 1999) ถึงแม้กระบวนการนี้จะสามารถช่วยลดความหนืด และ เพิ่มค่าซีเทนของน้ำมันพืชได้แต่อย่างไรก็ตาม หากมีการใช้งานในระยะยาวจะทำให้เข้มนิดเกิดการอุดตัน และเกิดการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ขึ้นตามมา (Ranganathan *et al.*, 2008)

1.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Ma and Hanna, 1999) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด เป็นปฏิกิริยาระหว่าง ไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืช หรือ ไขมันสัตว์ กับ แอลกอฮอล์ ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็น อัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (ไบโอดีเซล) และ กลีเซอรอล ดังแสดงในภาพที่ 4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันประกอบด้วย 3 ปฏิกิริยาย่อยที่เกิดขึ้น โดยไตรกลีเซอไรด์จะถูกเปลี่ยนเป็น ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และ กลีเซอรอล ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะเกิดอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันขึ้น 1 โมเลกุล ดังแสดงในภาพที่ 5 (Marchetti *et al.*, 2007) ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมักมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา และค่าผลได้ (Yield) ในการผลิตไบโอดีเซลให้สูงขึ้น ในทางทฤษฎีแล้ว อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อไตรกลีเซอไรด์ที่ต้องใช้ในการทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ คือ 3:1 แต่เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ดังนั้นจึงมักมีการใส่แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากเกินไป เพื่อให้สมดุลของปฏิกิริยาผันไปสู่ด้านที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นไบโอดีเซลมากขึ้น แอลกอฮอล์ที่สามารถใช้ในการทำปฏิกิริยาได้มีหลายชนิด เช่น เมทานอล (Methanol) เอทานอล (Ethanol) โพรพานอล (Propanol) และ บิวทานอล (Butanol) เป็นต้น แต่ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ เมทานอล เนื่องจากมีราคาถูก และมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่เหมาะสม คือ มีโมเลกุลขนาดเล็ก และมีความเป็นขั้วสูง จึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ ไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างรวดเร็ว (Ma and Hanna, 1999)



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์

ที่มา: Marchetti *et al.* (2007)



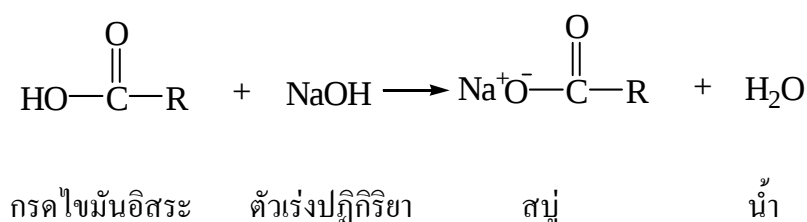
ภาพที่ 5 ขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา: Marchetti *et al.* (2007)

2. การผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

การผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทกรด ตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทด่าง ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ และการใช้เอนกอสอลในสภาวะวิกฤติ เป็นต้น

2.1 การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทด่าง (Alkali Catalyst) การใช้ด่างในการเร่งปฏิกิริยาเป็นวิธีดั้งเดิม และเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยตัวเร่งประเภทด่างที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทด่างนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง มีฤทธิ์ในการกัดกร่อนน้อย และมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูง แม้จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเพียง 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม หากน้ำมันวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยตัวเร่งประเภทด่าง จะเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงซึ่งทำให้เกิดสบู่ที่เรียกว่า ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (Ranganathan *et al.*, 2008) ดังแสดงในภาพที่ 6 การเกิดสบู่ขึ้นนี้จะส่งผลให้ตัวเร่งปฏิกิริยาบางส่วนถูกใช้ไปในปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน ทำให้ประสิทธิภาพของตัวเร่งในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมีลดลง และ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไบโอดีเซลน้อยลง (Demirbas, 2008)



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระ กับตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทต่าง

ที่มา: Gerpen (2005)

2.2 การใช้ตัวเร่งประเภทกรด (Acid Catalyst) การใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเป็นวิธีดั้งเดิมอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยกรดที่นิยมใช้เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาก็คือ กรดซัลฟิวริก (Sulfuric Acid) ตัวเร่งประเภทกรดนี้จะทำให้ค่าผลได้ในการผลิตไบโอดีเซลสูงมาก แต่มีอัตราในการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างต่ำ โดยส่วนมากมักใช้เวลาเป็นวัน เพื่อให้ปฏิกิริยาเสร็จสิ้น (Marchetti *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการใช้ตัวเร่งประเภทกรดมีประโยชน์มากในกรณีการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันวัตถุดิบที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง เนื่องจากไม่มีปัญหาในเรื่องของการเกิดสบู่เหมือนในกรณีของตัวเร่งประเภทด่าง (Gerpen, 2005)

2.3 การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (Enzyme catalyst) เอนไซม์ไลเปส (Lipase Enzyme) เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิด เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) และเอซิโดไลซิส (Acidolysis) อย่างไรก็ตาม ได้มีการค้นพบว่า เอนไซม์ไลเปสสามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน และ เอสเทอร์ิฟิเคชันได้ ด้วยเช่นกัน ข้อดีของการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาคือ มีความปลอดภัย และไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสยังคงมีราคาที่สูง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาจึงยังไม่เป็นที่นิยมมากนักในการผลิตไบโอดีเซล (Marchetti *et al.*, 2007)

2.4 การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ (Heterogeneous or Solid Catalyst) เป็นการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (Heterogeneous) กับน้ำมันและแอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ที่ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ สารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ สารในกลุ่มไฮดรอกไซด์ของโลหะ และ สารในกลุ่มออกไซด์ของโลหะ เช่น แคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และ เซอร์โคเนียมออกไซด์ เป็นต้น ตัวเร่งปฏิกิริยาเหล่านี้ไม่ทำให้เกิดสบู่ในระหว่างการทำปฏิกิริยา

และสามารถแยกออกจากไบโอดีเซลได้ง่าย ทำให้ไบโอดีเซลที่ได้มีการปนเปื้อนของตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณน้อย ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ ลดการใช้กรดและน้ำในการล้างไบโอดีเซล ทำให้มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธุ์คือ มีอัตราในการเกิดปฏิกิริยาก่อนข้างต่ำ เนื่องจากตัวเร่งปฏิกิริยาไม่ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกับสารตั้งต้น (Zabeti *et al.*, 2009)

2.5 การใช้แอลกอฮอล์ในสภาวะวิกฤติ แอลกอฮอล์ในสภาวะวิกฤติมีความสามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ดี ทำให้น้ำมันและแอลกอฮอล์เข้าทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้อย่างสมบูรณ์ในเวลาอันรวดเร็ว โดยข้อดีของการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีนี้เทียบกับการผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา คือ ผลผลิตกันที่ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า และมีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่า อย่างไรก็ตามการผลิตโดยวิธีนี้ต้องทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง (Demirbas, 2008)

แม้ว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะสามารถถูกเร่งได้ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาหลายประเภทดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้เพียงตัวเร่งประเภทด่างเท่านั้นในการผลิตไบโอดีเซล (Ranganathan *et al.*, 2008)

3. แหล่งของน้ำมันชีวภาพที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากน้ำมันชีวภาพหลายชนิด ได้แก่

3.1 น้ำมันพืชบริสุทธิ์ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดเรพ น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันจากสาหร่าย เป็นต้น

3.2 น้ำมันพืชที่ผ่านการใช้งานแล้ว

3.3 ไขมันจากสัตว์

3.4 น้ำมันจากพืชที่ไม่ใช่อาหาร เช่น น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ เป็นต้น

ในแต่ละภูมิภาคของโลกมีความนิยมใช้แหล่งของน้ำมันชีวภาพที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชน้ำมันที่สามารถเพาะปลูกและให้ผลผลิตได้ดีในภูมิภาคนั้น ๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกาใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นหลัก ขณะที่ประเทศในทวีปยุโรปนิยมน้ำมันจากเมล็ดเรพ ส่วนในประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทยนิยมน้ำมันปาล์มเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไบโอดีเซล (Demirbas, 2008)

กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันเป็นการผลิตด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่ใช้ตัวเร่งประเภทด่างในการเร่งปฏิกิริยาโดยมีขั้นตอนในการผลิตดังแสดงในภาพที่ 7 เริ่มจากการผสมเมทานอล และตัวเร่งปฏิกิริยาเข้าด้วยกัน จากนั้นป้อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์พร้อมกับน้ำมันวัตถุดิบ ทำการกวนผสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง สำหรับโรงงานที่มีขนาดเล็กมักทำการผลิตด้วยระบบการผลิตแบบกะ ส่วนโรงงานขนาดใหญ่ที่มีกำลังผลิตสูงมักทำการผลิตด้วยระบบการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชนิดกวนผสมแบบต่อเนื่อง (Continuous Stirred-tank Reactor) หรือถังปฏิกรณ์แบบท่อไหล (Plug Flow Reactor) เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำปฏิกิริยาแล้ว สารผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นของผสมที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอลจะถูกนำไปพักในถังตกตะกอน (Settling Tank) หรือนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อทำการแยกชั้นเมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอลออกจากกัน เมทิลเอสเทอร์ที่แยกได้จากขั้นตอนนี้ยังคงมีเมทานอล สบู่ กลีเซอรอล และตัวเร่งปฏิกิริยาบางส่วนปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นจึงต้องนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นต่อไป โดยทำการระเหยเมทานอลที่หลงเหลืออยู่ออก ทำการปรับสภาพให้เป็นกลางด้วยการเติมกรด และทำการล้างด้วยน้ำ เพื่อกำจัดตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่ เกลือ และ กลีเซอรอลที่หลงเหลืออยู่ออก จากนั้นทำการระเหยน้ำที่หลงเหลือจากขั้นตอนการล้างออก ทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์ที่พร้อมนำไปใช้เป็นไบโอดีเซลต่อไป และเนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ดังนั้นในการผลิตไบโอดีเซล ผู้ผลิตส่วนใหญ่มักใช้อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเท่ากับ 6 ต่อ 1 ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าปริมาณที่จำเป็นในทางทฤษฎีถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพื่อให้สมดุลของปฏิกิริยาผันไปสู่ด้านที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นไบโอดีเซลมากขึ้น โดยแอลกอฮอล์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะเข้าไปรวมอยู่ในชั้นกลีเซอรอล นอกจากนี้สบู่ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต และตัวเร่งปฏิกิริยาส่วนใหญ่ จะเข้าไปรวมอยู่ในชั้นกลีเซอรอลด้วยเช่นกัน ดังนั้นกลีเซอรอลที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นกลีเซอรอลที่มีมูลค่าต่ำเนื่องจากมีสิ่งเจือปนผสมอยู่ด้วยจำนวนมาก การนำกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไป

ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหาร และยานั้น สามารถทำได้โดยนำกลีเซอรอลดังกล่าวไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น แต่ในทางปฏิบัติแล้ว การทำกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้เป็นกลีเซอรอล บริสุทธิ์จะสามารถทำได้หรือไม่ นั้น ต้องพิจารณาถึงความพร้อมทางด้านอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อกระบวนการทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ประกอบกับ ความคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์ของการดำเนินงาน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดการผลิตของผู้ผลิตไบโอดีเซลเอง ในกรณีของผู้ผลิตไบโอดีเซลรายใหญ่นั้น สามารถทำให้กลีเซอรอลดิบมีความบริสุทธิ์มากขึ้นได้อย่างมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ แต่สำหรับกรณีของผู้ผลิตไบโอดีเซลขนาดกลางและขนาดเล็ก การทำกลีเซอรอลดิบให้บริสุทธิ์ขึ้นจะมีค่าใช้จ่ายสูงเกินกว่าที่จะทำให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ได้ โดยส่วนใหญ่ของผู้ผลิตไบโอดีเซลที่ไม่สามารถทำให้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลบริสุทธิ์ขึ้นได้ จะทำการระเหยเมทานอลออกจากกลีเซอรอลดิบเพื่อนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป สำหรับผู้ผลิตไบโอดีเซลรายใหญ่ที่มีความพร้อมในการทำให้กลีเซอรอลดิบมีความบริสุทธิ์ขึ้นได้ จะนำกลีเซอรอลดิบไปผ่านกระบวนการต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 7 ในขั้นตอนแรกจะมีการเติมกรดลงไปในกลีเซอรอลดิบเพื่อให้เกิดการแตกตัวเป็นเกลือและกรดไขมันอิสระ โดยกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจะลอยตัวแยกชั้นออกจากกลีเซอรอล เนื่องจากกรดไขมันอิสระไม่สามารถละลายในกลีเซอรอลได้ เกลือที่เกิดขึ้นบางส่วนยังคงละลายอยู่ในกลีเซอรอล ในขณะที่บางส่วนอาจตกตะกอนออกไปจากกลีเซอรอล ส่วนเมทานอลที่ผสมอยู่กับกลีเซอรอลดิบจะถูกระเหยเพื่อนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป จากนั้นกลีเซอรอลจะถูกนำไปผ่านกระบวนการกลั่นภายใต้ภาวะสุญญากาศ (Vacuum Distillation) หรือกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange) อีกขั้นหนึ่ง เพื่อให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์เป็น 99.5 ถึง 99.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความบริสุทธิ์ที่เพียงพอสำหรับนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง อาหาร และยาได้ (Gerpen, 2005)

การใช้ประโยชน์กลีเซอรอลดิบ

เนื่องจากในปัจจุบันมีกลีเซอรอลดิบเกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในปริมาณมาก ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์กลีเซอรอลดิบในแนวทางต่าง ๆ ดังนี้

1. **การใช้เป็นเชื้อเพลิง** มีรายงานว่ากลีเซอรอลดิบสามารถนำไปเผาเพื่อให้ความร้อนได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่เหมาะกับโรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดใหญ่เนื่องจากให้ผลประโยชน์ในทางเศรษฐศาสตร์ค่อนข้างต่ำ (Johnson and Taconi, 2007)
2. **การใช้เป็นอาหารสัตว์** Lammers *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการเติมกลีเซอรอลดิบลงในอาหารสำหรับเลี้ยงหมู จากการทดลองพบว่าหมูสามารถย่อยกลีเซอรอลและนำพลังงานไปใช้ได้ในส่วนที่เทียบเท่ากับการใช้น้ำมันถั่วเหลืองและข้าวโพดเป็นอาหาร ทำให้สรุปได้ว่า กลีเซอรอลดิบสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานในอาหารเลี้ยงหมูได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามควรมีความระมัดระวังในเรื่องของผลกระทบที่อาจเกิดจากสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบด้วย เนื่องจากยังมีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าวอยู่น้อยมาก
3. **การใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีทางเคมี** มีการศึกษาว่ากลีเซอรอลดิบสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีได้หลายชนิด เช่น โพรพิลีนไกลคอล (Propylene Glycol) (Alhanash *et al.*, 2008) และ อะซิโตนอล (Acetol) (Chiu *et al.*, 2006) เป็นต้น
4. **การใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์** มีรายงานว่ากลีเซอรอลดิบสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยได้ทำการสรุปตัวอย่างของงานวิจัยที่ทำการศึกษากับเรื่องดังกล่าวไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 งานวิจัยที่ใช้กลีเซอรอลดิบในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ผู้ทำการทดลอง	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	ผลิตภัณฑ์ที่ได้
Asad-ur-Rhemen <i>et al.</i> , 2008	<i>Clostridium butyricum</i> DSM5431	1,3-โพรเพนไดออล
Imandi <i>et al.</i> , 2007	<i>Yorrowia lypolytica</i> NCIM 3589	กรดซิตริก
Chi <i>et al.</i> , 2007	<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	ดีเอชเอ (DHA)
Mu <i>et al.</i> , 2006	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,3-โพรเพนไดออล
Ito <i>et al.</i> , 2005	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	ไฮโดรเจนและเอทานอล
Gonzalez-Pajuelo <i>et al.</i> , 2004	<i>Clostridium butyricum</i> VPI3266	1,3-โพรเพนไดออล

ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันสำหรับการอุปโภคและบริโภคที่สำคัญ สามารถให้ปริมาณน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น สำหรับประเทศไทย ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีรายงานปริมาณผลผลิตในแต่ละปีสูงที่สุด (คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

1. อนุกรมวิธานของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันจัดอยู่ในพืชตระกูลปาล์ม อยู่ในวงศ์ (Family) Palmae ตระกูลย่อย (Sub-family) Cocoineae สกุล (Genus) *Elaeis* ซึ่งมีอยู่สามชนิด (Species) ได้แก่

Corogo oleifera (American Oil Palm) มีถิ่นกำเนิดทางอเมริกากลาง ปานามา โคลัมเบีย และแถบลุ่มแม่น้ำอเมซอน

Elaeis odora ปาล์มน้ำมันชนิดนี้ไม่มีรายงานความสำคัญทางเศรษฐกิจ

Elaeis guineensis jacq. (African Oil Palm) หรือ *Alfonsia quineensis*. H.B.K เป็นปาล์มน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบัน (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541)

2. ขั้นตอนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ทะลายปาล์มน้ำมันประกอบด้วยผลปาล์มน้ำมันจำนวนมากติดอยู่กับก้านทะลาย โดยมีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 8 ผลปาล์มน้ำมันประกอบด้วย 2 ส่วนที่สามารถหีบน้ำมันได้ คือ เปลือกนอกของผลปาล์ม (Mesocarp) และ เนื้อของเมล็ดในปาล์ม (Kernel) ดังแสดงในภาพที่ 9 น้ำมันที่สกัดได้จากเปลือกนอกของผลปาล์มเรียกว่า น้ำมันปาล์มดิบ (Crude Palm Oil) และน้ำมันที่สกัดได้จากเนื้อของเมล็ดในปาล์ม เรียกว่า น้ำมันเมล็ดในปาล์ม (Palm Kernel Oil) น้ำมัน 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติทางเคมีและองค์ประกอบกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยน้ำมันปาล์มดิบจะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูงกว่าน้ำมันเมล็ดในปาล์ม (คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)



ภาพที่ 8 ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันที่ติดอยู่กับทะลาย

ที่มา: ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี (2552)

เปลือกนอกของผลปาล์ม

เนื้อของเมล็ดในปาล์ม



ภาพที่ 9 ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันผ่าซีก

ที่มา: โครงการพัฒนาระบบฐานข้อมูลด้านการเกษตรและสหกรณ์ของจังหวัด (2552)

หลังจากทะลายปาล์มถูกเก็บเกี่ยวโดยการตัด แทะ หรือ เกี่ยว ออกจากต้นปาล์มน้ำมันแล้ว จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการสกัดหรือหีบน้ำมันออกมาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป กระบวนการสกัดน้ำมันเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก เพราะเป็นการเอาน้ำมันออกจากผลปาล์มน้ำมัน และเป็นการทำให้ได้น้ำมันดิบที่มีคุณภาพสูงที่สุดเพื่อใช้ในการแปรรูปต่อไป กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มเป็นงานของโรงงานที่เรียกว่าโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (พรชัย, 2549) โดยโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ โรงงานขนาดเล็ก ทำการผลิตโดยสกัดน้ำมันจากผลปาล์มด้วยเครื่องสกัดแบบเกลียวอัด ชนิดเดียวกับที่ใช้ผลิตน้ำมันมะพร้าว การสกัดด้วยวิธีนี้จะได้น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์มปะปนกัน และโรงงานขนาดใหญ่ เป็นโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐาน ทำการผลิตโดยสกัดน้ำมันจากผลปาล์มด้วยเครื่องสกัดแบบเกลียวอัดชนิดเกลียวคู่ ทำให้สามารถแยกน้ำมันปาล์ม และน้ำมันเมล็ดในปาล์มออกจากกันได้ ซึ่งวิธีการสกัดแบบมาตรฐานนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป (คณะกรรมการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545) จึงขอกล่าวรายละเอียดของการสกัดด้วยวิธีมาตรฐานดังต่อไปนี้

ทะลายสดปาล์มน้ำมันที่ผลิตได้จากสวนจะถูกส่งเข้าสู่โรงงานสกัดน้ำมัน โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

2.1 การอบไอน้ำความดัน เป็นกระบวนการที่นำทะเลยสดของปาล์มน้ำมันเข้าไปอบด้วยความร้อนและความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำเท่ากับ 2.4 ถึง 3.4 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 60 ถึง 70 นาที เพื่อยับยั้งกระบวนการที่จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในผลปาล์มน้ำมัน และทำให้ผลปาล์มน้ำมันหลุดร่วงออกจากทะเลยได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ชั้นเปลือกนุ่มเพื่อความสะดวกในการหีบน้ำมัน และเป็นการลดปริมาณน้ำในผลปาล์มน้ำมันอีกด้วย (พรชัย, 2549)

2.2 การแยกผลปาล์มออกจากทะเลย ในกระบวนการนี้ทะเลยปาล์มจะถูกนำเข้าเครื่องนวด เพื่อแยกผลปาล์มน้ำมันออกจากทะเลย เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนนี้จะทำให้ได้ผลปาล์มน้ำมันและทะเลยเปล่าแยกจากกัน ส่วนของผลปาล์มน้ำมันจะถูกส่งต่อไปยังขั้นตอนการย่อยผล และส่วนของทะเลยปาล์มน้ำมันจะถูกนำไปเผาหรือใช้ในการคลุมโคนต้นปาล์มในสวนต่อไป (พรชัย, 2549)

2.3 การย่อยผลปาล์มน้ำมัน ผลปาล์มที่แยกออกจากทะเลยแล้วจะถูกส่งมาตีย่อยเพื่อให้มีความนุ่ม และพร้อมต่อการสกัดน้ำมันออกในขั้นต่อไป (คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

2.4 การสกัดน้ำมันปาล์ม ผลปาล์มที่ผ่านการน็อกย่อยแล้ว จะถูกส่งเข้าสู่เครื่องสกัดเกลียวอัดชนิดเกลียวคู่ เพื่อสกัดน้ำมันออกจากเปลือกนอกของผลปาล์ม ในการสกัดนี้เครื่องสกัดเกลียวอัดจะถูกปรับระยะห่างของเกลียวให้เหมาะสม เพื่อให้สามารถสกัดน้ำมันออกได้มากที่สุด โดยให้กะลาของเมล็ดในปาล์มแตกน้อยที่สุด ทั้งนี้เพื่อให้ได้น้ำมันปาล์มที่มีคุณภาพตามมาตรฐาน ในส่วนที่เป็นกากพืชน้ำมัน ประกอบด้วยเส้นใย และเมล็ดปาล์ม จะถูกเป่าด้วยลมร้อนให้แห้ง และแยกออกจากกันด้วยไซโคลอน เมล็ดปาล์มถูกส่งเข้าเครื่องกะเทาะเพื่อแยกกะลาและเมล็ดในปาล์ม สำหรับเส้นใยและกะลาที่ถูกแยกออกจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อไอน้ำ ส่วนเมล็ดในจะถูกส่งไปยังโรงงานสกัดน้ำมันจากเนื้อในต่อไป (คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

2.5 การกรองน้ำมัน น้ำมันดิบที่ได้จากการหีบจะถูกกรองเพื่อแยกกากน้ำมันออก โดยเครื่องกรองน้ำมันซึ่งเป็นแบบที่มีแผ่นกรองหลายชั้น เมื่อเสร็จสิ้นการกรองจะได้น้ำมันที่สะอาดปราศจากกากน้ำมัน (พรชัย, 2549)

2.6 การเหวี่ยง เป็นการใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงในการแยกน้ำและสิ่งเจือปนออกจากน้ำมันดิบ เนื่องจากน้ำมันที่ได้จากกระบวนการกรองยังคงมีน้ำและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ปนเปื้อนอยู่ การ

เหวี่ยงนี้อาศัยความเร็วสูง และความร้อนเข้าช่วยในการแยกเอาน้ำและสิ่งเจือปนออกจากน้ำมันดิบได้ (พรชัย, 2549)

2.7 การสกัดความชื้น น้ำมันดิบที่เข้าเครื่องเหวี่ยงเรียบร้อยแล้วจะยังคงมีความชื้นอยู่ จึงต้องทำการสกัดความชื้นออกก่อนนำไปบรรจุถังเพื่อส่งต่อไปยังโรงงานแปรรูปต่อไป (พรชัย, 2549)

น้ำมันที่ได้จากกระบวนการสกัดนี้เป็นน้ำมันปาล์มดิบที่มีปริมาณกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตามปริมาณของกรดไขมันเหล่านี้ไม่ค่อยแน่นอน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน สภาพดินฟ้าอากาศ และภูมิอากาศที่ปลูก

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันปาล์มดิบ

ชนิดของกรดไขมัน	ร้อยละโดยน้ำหนักของกรดไขมัน
กรดไขมันอิ่มตัว	
กรดลอริก (Lauric Acid) C12	เล็กน้อย
กรดไมริสติก (Myristic Acid) C12	2
กรดปาล์มติก (Palmitic Acid) C16	43
กรดสเตียริก (Stearic Acid) C18	7
กรดอาราซิก (Aracidic Acid) C20	เล็กน้อย
รวม	52
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	
กรดโอเลอิก (Oleic Acid) C18:1	39
กรดลิโนเลอิก (Linoleic Acid) C18:2	9
กรดลิโนเลนอิก (Linolenic Acid) C18:3	เล็กน้อย
รวม	48

ที่มา: ศักดิ์ศิลป์ และคณะ (2541)

3. การกลั่นน้ำมันบริสุทธิ์

น้ำมันที่ได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จะเป็นผลผลิตออกมาในรูปแบบของน้ำมันดิบ ซึ่งส่วนใหญ่แล้วยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง จึงต้องมีการนำมากลั่นให้บริสุทธิ์ (Refine) หลังจากผ่านกระบวนการกลั่นบริสุทธิ์แล้วจะทำให้ได้น้ำมันบริสุทธิ์ (Refine Oil) ซึ่งจะสามารถนำไปแปรรูปต่าง ๆ ได้ต่อไป

กระบวนการกลั่นน้ำมันให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนการกำจัดสิ่งเจือปนต่าง ๆ ที่ไม่ต้องการออกไปจากน้ำมันดิบ สารต่าง ๆ ที่ถูกสกัดออกไปได้แก่ สารในกลุ่มไฮโดรเลติก คือ สารพวกกลีเซอไรด์ เอนไซม์ กรดไขมันอิสระ สิ่งสกปรก และความชื้น สารในกลุ่มออกซิเดทีฟ คือ สารพวกโลหะหนัก เม็ดสี สารโทโคฟีรอล (Tocopherol) และ สารฟอสฟาไทด์ (Phosphatide) และสารที่เป็นตัวเร่งให้เกิดสารพิษ ได้แก่ กำมะถัน ฮาโลเจน และไนโตรเจน (พรชัย, 2549) โดยกระบวนการกลั่นน้ำมันให้บริสุทธิ์มี 2 แบบคือ

3.1 การกลั่นน้ำมันบริสุทธิ์โดยกระบวนการทางกายภาพ เป็นกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบโดยการกำจัดสารพวกฟอสฟาไทด์ และสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ ออก โดยมีขั้นตอนที่สำคัญ คือ การนำน้ำมันดิบมาผสมกับกรดฟอสฟอริก เพื่อให้สิ่งสกปรกเกิดการรวมตัวกันเป็นยางเหนียว (Gum) และแยกออกจากน้ำมันปาล์มดิบ จากนั้นนำเข้าสู่ขั้นตอนการฟอกสี (Bleaching) ด้วยดินฟอกสี เข้าเครื่องกรอง (Filter) เพื่อแยกเอาดินฟอกสีออก แล้วบรรจุลงถังพัก ในขั้นตอนนี้จะทำให้แยกตะกอนดินและสิ่งเจือปนออกไปได้ จากนั้นนำไปทำการกำจัดกลิ่น และกรดไขมันอิสระออก โดยใช้วิธีการพ่นไอน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 240 ถึง 260 องศาเซลเซียส ในสภาพสุญญากาศ เป็นเวลาประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้จะทำให้ได้น้ำมันที่เรียกว่าน้ำมัน “อาร์บีดี” (RBD) โดยคำว่าอาร์บีดีนี้ย่อมาจาก “Refining Bleaching Deodorising” ซึ่งมีความหมายว่า น้ำมันได้ผ่านการกลั่น ฟอกสี และกำจัดกลิ่นเรียบร้อยแล้ว น้ำมันอาร์บีดีที่ได้จากกระบวนการกลั่นทางกายภาพเป็นน้ำมันที่มีความบริสุทธิ์ระดับหนึ่ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ทำมาการีน น้ำมันพืช น้ำมันทอดกรอบ ไอศกรีม และเนยขาว การกลั่นด้วยวิธีทางกายภาพนี้มีข้อดีคือ มีต้นทุนในการดำเนินการต่ำ มีการสูญเสียน้ำมันในระหว่างกระบวนการกลั่นน้อย และไม่ทำให้เกิดน้ำเสียออกจากโรงงานอีกด้วย

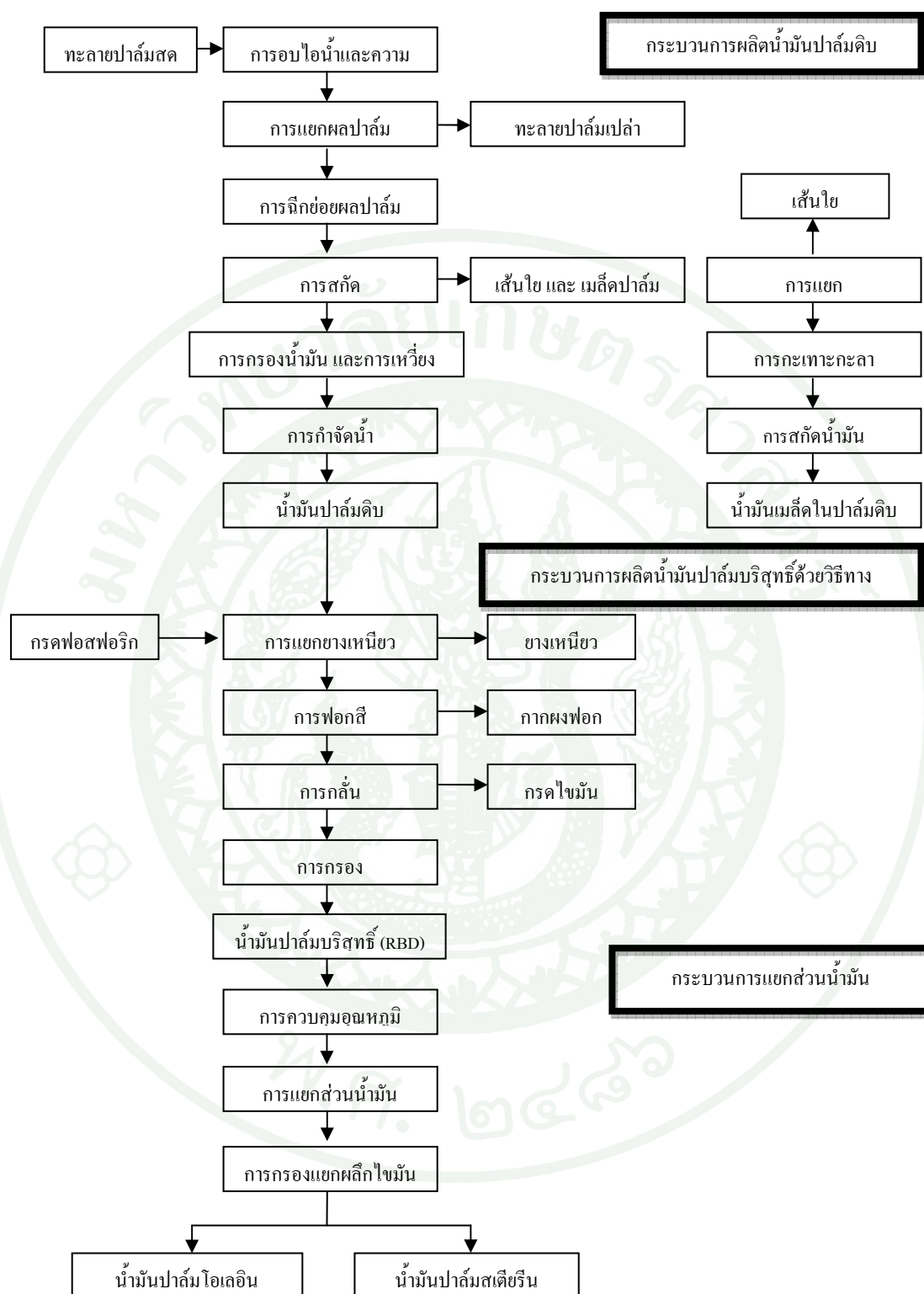
3.2 การกลั่นน้ำมันบริสุทธิ์โดยกระบวนการทางเคมี เป็นกระบวนการกลั่นโดยใช้สารเคมี มาทำปฏิกิริยาในเกือบทุกขั้นตอน ดังนั้นจึงมีต้นทุนในการผลิตต่อหน่วยค่อนข้างสูง เริ่มจากการนำ น้ำมันดิบมาผ่านกระบวนการแยกสารฟอสฟอไรต์ หรือ ยางเหนียวออกโดยการใส่กรดฟอสฟอริก เช่นเดียวกับกระบวนการทางกายภาพ จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการกำจัดกรดไขมันอิสระโดยการใช้ โซดาไฟ ทำการไล่น้ำหรือความชื้นออก ฟอกสีด้วยดินฟอกสี กรองดินฟอกสีออก กำจัดกลิ่นด้วยไอน้ำ ทำให้อัลบูมิน (Polishing) และทำให้เย็นลง จะได้น้ำมันอาร์บีดี เช่นกัน

4. กระบวนการแยกส่วนน้ำมัน

น้ำมันอาร์บีดีที่ผ่านกระบวนการกลั่นบริสุทธิ์แล้วนั้น จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่าง กว้างขวาง โดยที่โรงงานกลั่นน้ำมันบริสุทธิ์ จะขายหรือส่งต่อไปยังโรงงานแปรรูปขั้นสุดท้ายเพื่อ ผลิตให้แก่ผู้บริโภคได้

น้ำมันบริสุทธิ์ที่เป็นน้ำมันปาล์มอาร์บีดี (RBD Palm Oil) เมื่อปล่อยให้เย็นตัวลงที่ อุณหภูมิห้อง จะตกผลึกเป็นไขมันปนอยู่กับน้ำมัน ทำให้ไม่เหมาะกับการบรรจุขวดเพื่อจำหน่าย เป็นน้ำมันบริโภค ดังนั้นจึงต้องนำไปผ่านกระบวนการแยกน้ำมันเหลวพวกโอเลอิน (Olein) ออก จากส่วนไขมันสเตียรีน (Stearin) ที่เป็นของแข็ง (คณะกรรมการพลังงาน สาธารณชน, 2545)

ส่วนของน้ำมันเหลวที่แยกได้นั้นเป็นน้ำมันอาร์บีดีของโอเลอิน เรียกว่า อาร์บีดีปาล์ม โอเลอิน (RBD Palm Olein) เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนที่อุณหภูมิห้อง สามารถนำไปใช้เป็นน้ำมัน สำหรับปรุงอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมขนมขบเคี้ยว อาหารสำเร็จพร้อมบริโภค และใช้เป็นวัตถุดิบ ในการทำมาการีน ตลอดจนใช้เป็นน้ำมันทอดกรอบได้ ในขณะที่ส่วนของไขมันแข็งที่แยกได้ เรียกว่าน้ำมันบริสุทธิ์อาร์บีดีปาล์มสเตียรีน (RBD Palm Stearin) เป็นของแข็งสีขาวที่อุณหภูมิห้อง แต่เมื่อถูกความร้อนจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน น้ำมันอาร์บีดีสเตียรีนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ใน การทำมาการีน และใช้ในอุตสาหกรรมทำสบู่ และเทียนไขได้ (พรชัย, 2549) โดยแผนผังแสดง ขั้นตอนในการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางกายภาพ และ กระบวนการแยกส่วนน้ำมันของน้ำมันปาล์มโดยสรุป ได้แสดงไว้ในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม

ที่มา: คณะกรรมการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร (2545)

5. ผลกระทบต่อน้ำมันปาล์ม

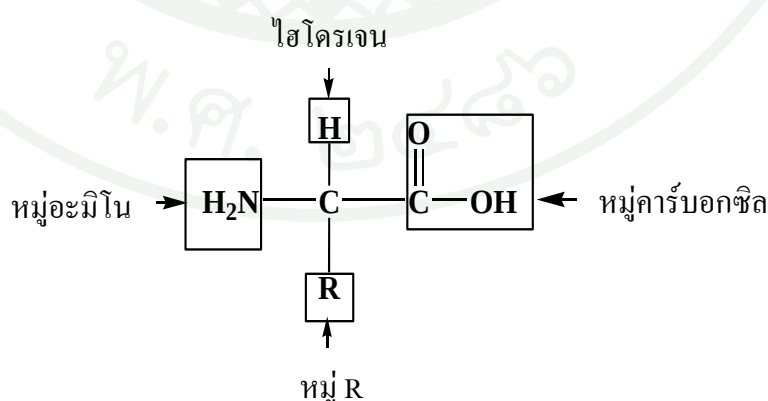
น้ำมันปาล์มสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่างเช่น ใช้เป็นน้ำมันปรุงอาหาร น้ำมันสำหรับทอดในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในผลิตภัณฑ์นม เนยขาว น้ำมันปาล์มเติมไฮโดรเจน นมข้นหวาน ไอศกรีม ครีมเทียม นมเทียม สบู่ และใช้ในอุตสาหกรรมโพลิโอเคมีคอล อาหารสัตว์ ตลอดจนใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน (ศักดิ์ศิลป์ และคณะ, 2541)

กรดอะมิโน

กรดอะมิโนเป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมกลาง (C) ล้อมรอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน 4 หมู่ ได้แก่ ไฮโดรเจน (-H) หมู่อะมิโน ($-NH_2$) หมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) และแขนงข้าง (-R) ดังแสดงในภาพที่ 11 กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนที่เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide Bond) อย่างไรก็ตาม มีกรดอะมิโนบางส่วนที่ถูกพบในรูปของอะมิโนอิสระ (Ajinomoto Co., Inc., 2003)

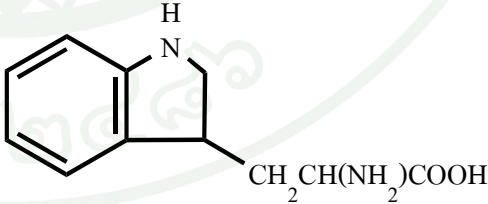
1. ชนิดของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ถูกค้นพบในธรรมชาติมีทั้งหมด 20 ชนิด แต่ละชนิดมีหมู่แขนงข้าง และมีสูตรโมเลกุลที่แตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 11 โครงสร้างของกรดอะมิโน

ตารางที่ 4 รายชื่อ และสูตรโมเลกุล ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ

ชนิดของกรดอะมิโน	สูตรโมเลกุล
ไกลซีน (Glycine)	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$
อะลานีน (Alanine)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
เซอรีน (Serine)	$\text{CH}_2\text{OHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
วาลีน (Valine)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ทรีโอนีน (Threonine)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ซิสเทอีน (Cysteine)	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ลิวซีน (Leucine)	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ไอโซลิวซีน (Isoleucine)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
เมทไธโอนีน (Methionine)	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ไทโรซีน (Tyrosine)	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ทริปโตเฟน (Tryptophan)	
กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid)	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
กรดกลูตามิก (Glutamic acid)	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
แอสพาราจีน (Asparagine)	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

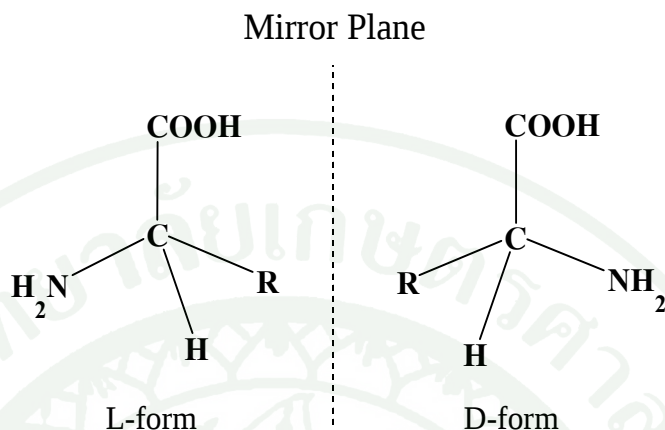
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิดของกรดอะมิโน	สูตรโมเลกุล
กลูตามีน (Glutamine)	$\text{H}_2\text{NCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
ไลซีน (Lysine)	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
อาร์จินีน (Arginine)	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{array}$
โพรลีน (Proline)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C} \end{array}$
ฮิสทีดีน (Histidine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{NH} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{CCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \quad \parallel \\ \text{HC} \quad \text{C} \end{array}$

ที่มา : Kirk and Othmer (1979)

เมื่อพิจารณาการเรียงตัวในสามมิติของหมู่ฟังก์ชันทั้ง 4 หมู่ที่อยู่ล้อมรอบคาร์บอนอะตอมกลาง จะทำให้สามารถแบ่งกรดอะมิโนได้เป็น 2 ชนิดคือ กรดอะมิโนในรูแบบแอล (L-form Amino Acid) และกรดอะมิโนในรูแบบดี (D-form Amino Acid) ดังแสดงในภาพที่ 12 กรดอะมิโนทั้งชนิดดี และชนิดแอล มีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์เหมือนกันทุกประการ ยกเว้นคุณสมบัติในการหักเหระนาบของแสงโพลาไรซ์ โดยกรดอะมิโนทั้งสองชนิดจะหักเหระนาบของแสง

โพลาร์ไรซ์ไปในทิศทางตรงกันข้าม ทั้งนี้กรดอะมิโนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น และใช้ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเกือบทั้งหมดเป็นกรดอะมิโนในรูปแบบแอล (Ajinomoto Co., Inc., 2003)



ภาพที่ 12 การเรียงตัวในสามมิติของกรดอะมิโน

ที่มา: Ajinomoto Co., Inc. (2003)

กรดอะมิโนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญอย่างมาก ต่อการเจริญเติบโต การทำงานของระบบสืบพันธุ์ และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่สึกหรอของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ทำให้สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีความต้องการกรดอะมิโนในปริมาณที่เพียงพอทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ โดยกรดอะมิโนที่ร่างกายได้รับอาจมาจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในระบบทางเดินอาหาร หรือ การรับประทานกรดอะมิโนเข้าไปโดยตรง สิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ มีความจำเป็นที่จะต้องได้รับกรดอะมิโนในปริมาณที่เหมาะสมแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิด และลักษณะทางกายภาพ เช่น อายุ และลักษณะกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ หากมีการได้รับกรดอะมิโนในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไป จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการเสียสมดุลและเกิดความผิดปกติขึ้นได้ ร่างกายของมนุษย์เราสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิดขึ้นได้เองจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล ไขมัน และกรดอะมิโนชนิดอื่น ดังนั้นกรดอะมิโนที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองนี้จึงจัดเป็นกรดอะมิโนชนิดที่ไม่มีความจำเป็นต่อภาวะโภชนาการ (Non Essential Amino Acid) ในขณะที่กรดอะมิโนบางชนิด ร่างกายของเราไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เลย หรือสังเคราะห์ได้ในปริมาณที่น้อยมาก จึงทำให้กรดอะมิโนเหล่านี้ถูกจัดเป็นกรดอะมิโนชนิดที่มีความจำเป็นต่อภาวะโภชนาการ (Essential Amino Acid) ซึ่งมนุษย์ต้องรับกรดอะมิโนกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่ร่างกายผ่านการบริโภค กรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อภาวะโภชนาการของมนุษย์มีอยู่ด้วยกัน 8 ชนิด ได้แก่ ทริปโตเฟน

ฟีนิลอะลานีน ไลซีน ทรีโอนีน วาลีน เมทไธโอนีน ลิวซีน และ ไอโซลิวซีน (Kirk and Othmer, 1979) โดยปริมาณที่เหมาะสมที่เด็กและผู้ใหญ่ควรได้รับในแต่ละวันได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นสำหรับผู้ใหญ่ และ เด็กควรได้รับในแต่ละวัน

ชนิดของอะมิโนจำเป็น	ปริมาณที่ต้องการต่อวัน (มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)	
	ผู้ใหญ่	เด็ก
ทรีปโตเฟน	7.2	30
ฟีนิลอะลานีน	31	196
ไลซีน	23	170
ทรีโอนีน	14	87
วาลีน	23	161
เมทไธโอนีน	31	85
ลิวซีน	31	425
ไอโซลิวซีน	20	90

ที่มา: Kirk and Othmer (1979)

2. ประโยชน์ของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1806 โดยกรดอะมิโนชนิดแรกที่ถูกค้นพบคือ แอสพาราจีน ที่พบอยู่ในสารสกัดจากหน่อไม้ฝรั่ง จากนั้นได้มีการค้นพบกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งปี ค.ศ. 1935 ได้มีการค้นพบกรดอะมิโนชนิด ทรีโอนีน เป็นชนิดสุดท้าย (Ajinomoto Co., Inc., 2003)

เนื่องจากกรดอะมิโนเป็นสารที่มีคุณสมบัติที่หลากหลาย ทั้งในเรื่องของรสชาติ คุณค่าทางโภชนาการ การออกฤทธิ์ทางยา และคุณสมบัติทางเคมี จึงทำให้มีการนำกรดอะมิโนไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นสารปรุงแต่งรสอาหาร ใช้เป็นส่วนผสมในยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ และ สารเคมีที่ใช้ในทางการเกษตร เป็นต้น (Ikeda, 2003)

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำกรดอะมิโนไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ อย่างมากมาย เช่น การใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นผงชูรส การใช้อะลานีน และ โกลซีนเป็นสารให้ความหวานในน้ำผลไม้ การใช้ซิสเทอีนปรับปรุงคุณภาพในการอบของขนมปัง การใช้ทริปโตเฟน และฮิสทิดีนเป็นสารป้องกันการหืนในนมผง และเนื่องจากในธัญพืชซึ่งเป็นอาหารหลักของมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไปมีกรดอะมิโนจำเป็นบางชนิดเช่น โกลซีน ทรีโอนีน และทริปโตเฟน ในปริมาณต่ำ ทำให้ในปัจจุบันมีการเติมกรดอะมิโนจำเป็นลงไปในการอาหารมนุษย์ และ อาหารสัตว์กันอย่างกว้างขวาง มีการเติมโกลซีนลงในขนมปังและผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากธัญพืชชนิดต่าง ๆ ในบางประเทศมีการเติมเมทไธโอนีนในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลือง เนื่องจากในถั่วเหลืองมีปริมาณเมทไธโอนีนต่ำสำหรับอาหารสัตว์โดยทั่วไปจะมีการเติมโกลซีนและทรีโอนีนในปริมาณ 3.8 และ 1.8 กิโลกรัมต่อตัน ตามลำดับ

ในทางการแพทย์ มีการใช้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนผสมในอาหารแบบชง (Infusion) สำหรับคนไขในระยะพักฟื้น และใช้เป็นยารักษาโรคบางชนิด เช่น โรคตับ และ โรคแผลพุพอง เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดอะมิโนเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารชนิดต่าง ๆ เช่น การผลิตโพลีอะลานีนไฟเบอร์ (Polyalanine Fiber) และโกลซีนไอโซไซยานาเทเรซิน (Lysine Isocyanate Resin) การใช้โกลซีนเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตไกลโฟเสท (Glyphosate) และการใช้ทรีโอนีนเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตแอซทรีโอนาม (Azthreonam) เพื่อใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช (สมใจ, 2544)

3. การผลิตกรดอะมิโน

การผลิตกรดอะมิโนมีขึ้นครั้งแรกภายหลังจากการค้นพบว่ากรดกลูตามิกเป็นสารที่ทำให้เกิดรสชาติในสาหร่ายทะเล โดย Ikeda ในปี ค.ศ. 1908 ต่อมาในปี ค.ศ. 1909 บริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด ได้เริ่มทำการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมต โดยการใช้กรดย่อยสลายโปรตีนที่ได้จากข้าวสาลี (กลูเตน) และโปรตีนจากถั่วเหลือง (สมใจ, 2544)

เนื่องจากความต้องการกรดอะมิโนในท้องตลาดมีเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้องค์กรต่าง ๆ ทั้งบริษัทเอกชนและสถาบันการศึกษา ได้หันมาให้ความสนใจเกี่ยวกับการศึกษาวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนกันมากขึ้น ซึ่งผลจากการศึกษาพัฒนาดังกล่าวทำให้สามารถ

ผลิตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ได้ด้วยวิธีที่หลากหลาย และมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Ikeda, 2003) ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโนมีอยู่ทั้งหมด 4 วิธีดังนี้

3.1 การสกัดแยกกรดอะมิโนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสโปรตีน (Extraction Method) เมื่อโปรตีนถูกไฮโดรไลซิสด้วยกรดอินทรีย์เช่น กรดไฮโดรคลอริก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารผสมของกรดอะมิโนรูปแบบแอลหลายชนิดอยู่รวมกัน กระบวนการสกัดจะทำให้สามารถแยกกรดอะมิโนแต่ละชนิดออกจากกันและนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นต่อไป โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างต่างกันของกรดอะมิโนแต่ละชนิด การผลิตกรดอะมิโนด้วยวิธีการสกัดนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในยุคเริ่มต้นของการผลิตกรดอะมิโน แต่ในปัจจุบันการผลิตด้วยวิธีนี้ได้ถูกแทนที่โดยกระบวนการผลิตอื่น ๆ ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาใหม่ เช่น กระบวนการหมัก เป็นต้น อย่างไรก็ตามการผลิตด้วยวิธีนี้ยังคงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกรดอะมิโนที่สามารถผลิตได้ยากด้วยวิธีอื่น และเมื่อโปรตีนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการไฮโดรไลซิสมีราคาไม่แพง และมีกรดอะมิโนชนิดที่ต้องการเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก

3.2 การสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ (Enzymatic Method) การผลิตกรดอะมิโนด้วยวิธีนี้เป็น การเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับกรดอะมิโนที่ต้องการ ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดที่ต้องการ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ข้อดีของการผลิตกรดอะมิโนด้วยวิธีนี้คือ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่น ๆ เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยมาก จึงกล่าวได้ว่าการผลิตกรดอะมิโนด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงมาก อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการผลิตด้วยวิธีนี้คือ ต้องใช้วัตถุดิบเริ่มต้นที่มีความจำเพาะสูง ดังนั้นต้นทุนในการผลิตด้วยวิธีนี้จึงขึ้นอยู่กับราคาของสารตั้งต้นเป็นสำคัญ

3.3 การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) การผลิตกรดอะมิโนด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีนี้เหมาะสำหรับการผลิตกรดอะมิโนในปริมาณมาก วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตมีราคาถูก และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาไม่นาน แต่มีข้อเสียคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผสมระหว่างกรดอะมิโนในรูปแบบแอล และรูปแบบดี ดังนั้นจึงต้องมีการอาศัยเทคนิคออปติคัลเรโซลูชัน (Optical Resolution) ในการแยกเอากรดอะมิโนรูปแบบแอลออก

มา ซึ่งในขั้นตอนดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ดังนั้นเมื่อมีการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมักและการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์เกิดขึ้น การผลิตกรดอะมิโนด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีจึงมีความสำคัญลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ

3.4 กระบวนการหมัก (Fermentation Method) ในการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมักนี้จะมีการใช้กากน้ำตาลจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย หรือน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนที่ผลิตได้ เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่อง ในการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนเช่น น้ำตาลกลูโคส ไปเป็นกรดอะมิโน กระบวนการหมักเป็นกระบวนการในการผลิตกรดอะมิโนที่มีข้อดีมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตด้วยวิธีอื่น ๆ กล่าวคือ กรดอะมิโนที่ได้จากการหมักทั้งหมดจะเป็นกรดอะมิโนในรูปแบบแอล ในขณะที่การผลิตด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนทั้งชนิดดี และชนิดแอลผสมกันอยู่ และเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตด้วยกระบวนการสกัด พบว่ากรดอะมิโนที่ได้จากการหมักสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า (Ajinomoto Co., Inc., 2003)

4. การผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมัก

การผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมักถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกเพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-กลูตามิก (L-glutamic) โดย Kinoshita และคณะ ในช่วงปลายทศวรรษที่ 1950 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเป็นแบคทีเรียในกลุ่มโครีฟอรัม (Coryneform Bacteria) โดยทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารที่มีส่วนประกอบหลักคือ น้ำตาลกลูโคส และไนโตรเจนที่มาจากสารอินทรีย์ และเนื่องจากความก้าวหน้าในด้านการพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถผลิตกรดอะมิโนได้อีกหลายชนิดด้วยกระบวนการหมัก ปัจจัยสำคัญที่สุดในกระบวนการหมักคือ จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ต้องมีความสามารถในการผลิตกรดอะมิโนชนิดที่ต้องการได้ในปริมาณมาก ในปัจจุบันองค์ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมีความก้าวหน้าไปมาก ทำให้สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการตัดต่อยีนเป้าหมายที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เข้าสู่จุลินทรีย์ เพื่อให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมายในระดับสูง ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตเป็นกรดอะมิโนชนิดที่ต้องการในปริมาณมาก โดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตกรดอะมิโนได้แก่ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* (Ajinomoto Co., Inc., 2003)

4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมัก

4.1.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การผลิตกรดอะมิโนแต่ละชนิดต้องเลือกใช้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ซึ่งให้ผลผลิตกรดอะมิโนชนิดที่ต้องการได้สูง และเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแปลงพันธุกรรม ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้สายพันธุ์ที่มีความคงตัวดีด้วย โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอะมิโนได้ มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอคติโนมัยซิต แต่ที่นิยมใช้ในการผลิตกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรมมากที่สุด ได้แก่ แบคทีเรีย เนื่องจากสามารถผลิต และปลดปล่อยกรดอะมิโนออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ กรดอะมิโนที่พบว่ามีการผลิตได้ปริมาณสูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดกลูตามิก อะลานีน และวาเลีน โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากธรรมชาติที่ประสบความสำเร็จในการนำมาผลิตกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรมแล้ว ได้แก่ *Corynebacterium glutamicum* และ *Brevibacterium flavum* ซึ่งใช้ในการผลิตกรดกลูตามิก และ *Pseudomonas* NO. 483 ซึ่งใช้ในการผลิตอะลานีน อย่างไรก็ตามการคัดเลือกแบคทีเรียจากธรรมชาติเพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ พบว่าสามารถผลิตกรดอะมิโนได้ปริมาณน้อย เนื่องจากมีกลไกการควบคุมแบบย้อนกลับ (Feedback Control) ดังนั้นการผลิตกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จึงนิยมใช้จุลินทรีย์ที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างกรดกลูตามิกได้สูง หรือใช้ *Escherichia coli* และ *Serratia marcescens* ที่ผ่านการคัดแปลงพันธุกรรม

4.1.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

แหล่งคาร์บอน โดยทั่วไปจะใช้กลูโคส หรือซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 10 ถึง 20 โดยในอุตสาหกรรมนิยมใช้ในรูปแบบของกากน้ำตาล หรือ แป้งไฮโดรไลซิส การใช้กากน้ำตาลตามปกติจะเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดอะมิโนทั่ว ๆ ไป เนื่องจากมีวิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการผลิตกรดอะมิโนอยู่ด้วย แต่ไม่เหมาะสำหรับการผลิตกรดกลูตามิก ซึ่งต้องการไบโอตินปริมาณจำกัด เพราะในกากน้ำตาลมีไบโอตินสูง (กากน้ำตาลย่อย และกากน้ำตาลบีทมีไบโอติน 0.4-1.2 และ 0.02-0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าสามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตกรดกลูตามิกได้ แต่ต้องมีการเติมเพนนิซิลิน หรืออนุพันธ์ของกรดไขมันเช่น ทวิน 60 (Tween 60) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

แหล่งไนโตรเจน โดยทั่วไปนิยมใช้แก๊สแอมโมเนีย และ เกลือแอมโมเนีย เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) หรือ ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ในกรณีที่จุลินทรีย์สามารถเมตาบอลิซึมยูเรียได้และอาจมีการเติมสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนเป็น แหล่งไนโตรเจนด้วย เช่น สารสกัดยีสต์ สารสกัดเนื้อ และเปปโตน เป็นต้น

แร่ธาตุ โดยทั่วไปนิยมเติม KH_2PO_4 K_2HPO_4 MgSO_4 FeSO_4 และ MnSO_4 ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้อาจมีการเติมแร่ธาตุชนิดอื่น ๆ อีกเช่น KCl MgCl_2 MnCl_2 CaCl_2 H_3BO_3 CuSO_4 NaH_2PO_4 และ CoCl_2 เป็นต้น

วิตามิน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโนอาจมีการเติมวิตามินบาง ชนิด เช่น ๆ ไบโอติน ไทอะมิน นิโคตินาไมด์ แคลเซียมแพนโทธีเนท ไรโบฟลาวิน และวิตามินบี 12 แต่วิตามินที่สำคัญมากที่สุดคือ ไบโอติน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตกรดกลูตามิก ซึ่ง ตามปกติต้องจำกัดความเข้มข้นไม่ให้เกิน 5 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจากมีผลต่อการสังเคราะห์ ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการผลิตกรด กลูตามิก

กรดอะมิโน เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโนส่วนใหญ่เป็นออก โซโทรป ซึ่งต้องการกรดอะมิโนบางอย่าง ดังนั้นจึงต้องเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของ ออกโซโทรปลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เพียงพอต่อการเจริญ แต่ไม่มากพอที่จะทำให้เกิ ดการยับยั้งแบบย้อนกลับได้

4.1.3 สภาพแวดล้อมในการหมัก

อุณหภูมิ โดยทั่วไปจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28-38 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดอะมิโนอาจแตกต่างกันไปบ้างตามชนิดของ จุลินทรีย์ และกรดอะมิโนที่ต้องการผลิต เช่น การผลิตกรดกลูตามิกจาก *C. glutamicum* จะควบคุม อุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32-38 องศาเซลเซียส และการผลิตไลซีนจาก *B. flavum* จะควบคุมอุณหภูมิ ให้อยู่ในช่วง 28-33 องศาเซลเซียส เป็นต้น

สภาพความเป็นกรดด่าง โดยทั่วไปจะควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-8.0 เช่น การผลิตกรดกลูตามิกจะควบคุมค่าพีเอช ให้อยู่ในช่วง 7-8 (เชื้อจะผลิตกรดกลูตามิกได้ดีที่สุดที่ พีเอช 7.8) และการผลิตไลซีนจะควบคุมค่าพีเอช ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.5 เป็นต้น

การให้อากาศ การสังเคราะห์กรดอะมิโนเป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจน ดังนั้นการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมาก การผลิตกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะต้องการออกซิเจนปริมาณแตกต่างกัน ในปี ค.ศ. 1980 Hirose และ Shibai รายงานว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวจะมีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ (สนใจ, 2544)

5. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมัก

วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นับเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งในการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมัก เนื่องจากราคาของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนถือเป็นต้นทุนส่วนใหญ่ในกระบวนการหมัก ดังนั้นการเลือกใช้วัตถุดิบที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมักที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ กากน้ำตาลจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแป้งข้าวโพดหรือแป้งมันสำปะหลัง ในแต่ละประเทศจะนิยมใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชท้องถิ่นที่มีมากในประเทศนั้น ๆ เช่นในประเทศสหรัฐอเมริกาใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแป้งข้าวโพด ประเทศในทวีปยุโรป และอเมริกาใต้นิยมใช้กากน้ำตาลสำหรับประเทศไทยและประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ส่วนใหญ่ใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซิสแป้งมันสำปะหลัง และเนื่องจากราคาของน้ำตาลและแป้งมีความผันผวนมาก ทำให้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อต้นทุนในการผลิตกรดอะมิโนเป็นอย่างมาก ดังนั้นการแสวงหาแหล่งคาร์บอนชนิดใหม่ที่มีปริมาณมาก และมีราคาถูก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการลดต้นทุนและเพิ่มความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ให้กับกระบวนการผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมัก (Ikeda, 2003)

6. กระบวนการผลิตกรดอะมิโน

การผลิตกรดอะมิโนด้วยกระบวนการหมักส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีการหมักแบบกะ โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต และชนิดของกรดอะมิโนที่ต้องการผลิต ในสภาวะที่มีการให้อากาศและการกวนผสมอย่างเพียงพอ การหมักเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อนิยมใช้วิธีการสเตอริไลส์แบบต่อเนื่อง อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ สับสเตรท และชนิดของกรดอะมิโนที่ต้องการผลิต ในระหว่างกระบวนการหมักจะมีความร้อนเกิดขึ้นสูงมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญและย่อยสลายน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงต้องมีระบบทำความเย็น ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28 ถึง 38

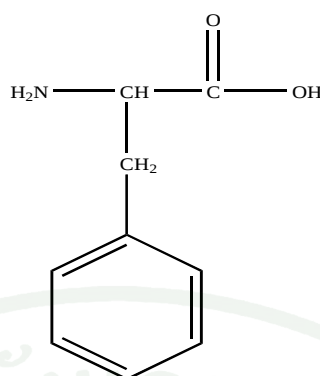
องศาเซลเซียส การควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8 ถึง 8.0 นิยมใช้แก๊สแอมโมเนียซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ด้วย ระยะเวลาในการหมักโดยทั่วไปประมาณ 2 ถึง 4 วัน

ในการผลิตกรดอะมิโนบางชนิด เช่น กรดกลูตามิก จำเป็นต้องมีการควบคุมสภาพแวดล้อมในการหมักอย่างเคร่งครัด โดยเฉพาะอัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และปริมาณสารกำจัดฟองที่ใช้ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาระบบควบคุมแบบอัตโนมัติขึ้น และในบางแห่งมีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์ช่วยในการควบคุมด้วย

การเก็บเกี่ยวผลผลิตหลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลง ทำได้โดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำส่วนอาหารเหลวที่ได้ไปปรับค่าพีเอชให้เป็นกรด เพื่อให้กรดอะมิโนตกตะกอนที่ไอโซอิเล็กทริกพอยท์ (Isoelectric Point) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของกรดอะมิโน หลังจากนั้นจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange Chromatography) หรือโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม (สมใจ, 2544)

กรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

กรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน เป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่แขนงข้างเป็นสารประเภทอะโรมาติก มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในภาพที่ 13 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสขมเล็กน้อย จัดเป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อภาวะโภชนาการของมนุษย์ ในปัจจุบันนิยมทำการผลิตด้วยกระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามกรดอะมิโนชนิดนี้สามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เบนซอลดีไฮด์ (Benzaldehyde) เป็นสารตั้งต้น แอล-ฟีนิลอะลานีนถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น อาหารเสริมสำหรับนักกีฬา อาหารแบบซองสำหรับผู้ป่วยในระยะพักฟื้น อาหารและเครื่องดื่มน้ำเพื่อสุขภาพ เป็นต้น (Ajinomoto Co., Inc., 2003) นอกจากนี้ แอล-ฟีนิลอะลานีนยังเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่ใช้ในการผลิตแอสปาร์แตม (Aspartame) ซึ่งเป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรีต่ำ (Low-calorific Sweetener) จากการขยายตัวของตลาดอาหารและเครื่องดื่มที่มีแคลอรีต่ำ ทำให้มีความต้องการใช้แอล-ฟีนิลอะลานีนในการผลิตแอสปาร์แตมในปริมาณมากขึ้นด้วยเช่นกัน จากข้อมูลทางการค้าในปี ค.ศ. 2002 พบว่ามีการใช้แอล-ฟีนิลอะลานีน ปริมาณมากถึง 14,000 ตัน ทำให้หลายฝ่ายหันมาให้ความสนใจในการพัฒนาการผลิตกรดอะมิโนชนิดนี้กันมากขึ้น (Hermann, 2003)

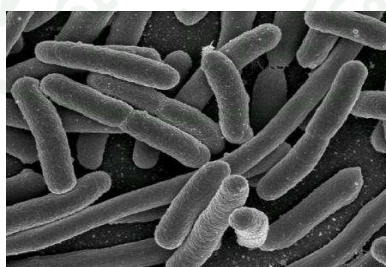


ภาพที่ 13 สูตรโครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

แบคทีเรีย *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง มีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 14 ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1885 โดยนักแบคทีเรียวิทยาและกุมารแพทย์ชาวเยอรมันชื่อ Theodor Escherich

E. coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบได้มากที่สุดในการอุจจาระ จึงได้ถูกนำมาใช้เป็นดัชนีสุขาภิบาลสำหรับบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในสิ่งแวดล้อม อาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง และเวชภัณฑ์ต่าง ๆ *E. coli* มีทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค สำหรับสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค ในขณะที่บางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ระบบเลือด และระบบประสาทส่วนกลางได้



ภาพที่ 14 แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ที่มา: Crowe (2009)

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้รวดเร็ว มีระบบพันธุกรรมที่ไม่ซับซ้อนและสามารถดัดแปรพันธุกรรมได้ง่าย ดังนั้น *E. coli* จึงนับเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาของเซลล์ โพรคาริโอต (Prokaryotic Cell) และถูกนำไปใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวาง (Lederberg, 1992)

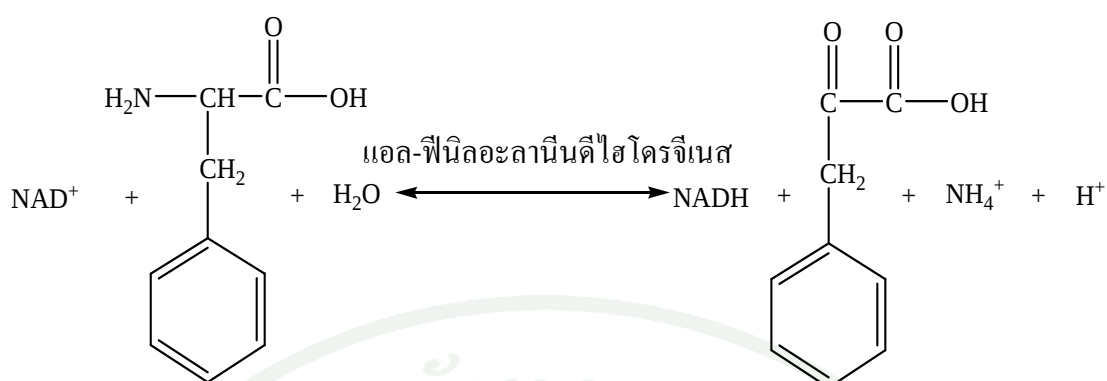
***Escherichia coli* BL21 (DE3)**

E. coli B เป็น *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค ถูกตั้งชื่อขึ้นโดย Delbruck และ Luria ในปี ค.ศ. 1942 สำหรับประวัติความเป็นมาของ *E. coli* สายพันธุ์ B นี้ได้มีการกล่าวถึงและรวบรวมไว้น้อยมาก อย่างไรก็ตาม *E. coli* B ถือเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยมากที่สุดสายพันธุ์หนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ BL21 ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตโปรตีน เอทานอล และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ อย่างกว้างขวาง เนื่องจาก *E. coli* สายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพหลายประการ ได้แก่ เเพาะเลี้ยงได้ง่าย สามารถเจริญได้รวดเร็ว สามารถทำการตัดต่อพันธุกรรมได้ง่าย ให้ค่าผลได้ในการผลิตโปรตีนสูง สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในภาวะที่มีปริมาณเซลล์เข้มข้นสูงโดยมีการผลิตอะซิเตทในปริมาณต่ำ

E. coli BL21 (DE3) เป็นสายพันธุ์ที่ถูกพัฒนามาจาก *E. coli* B โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีน T7 RNA Polymerase จากแบคทีริโอเฟจ (Bacteriophage) เข้าสู่จีโนมของ *E. coli* B เพื่อใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Lee, 2009)

เอนไซม์ แอล-ฟีนิลอะลานีน ดีไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสถูกค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรียกลุ่ม *Brevibacterium* sp. และถูกพบต่อมาในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ อีกหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Nocardia*, *Thermoactinomyces* และ *Rhodococcus* sp. ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนส (EC 1.4.1.20) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductase) ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดอะมิโนออกจากกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอมโมเนีย ฟีนิลไพรูเวต และ NADH โดยมีไพริดีนนิวคลีโอไทด์ (NAD⁺) เป็นโคเอนไซม์ ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ (Brunhuber et al., 1994) ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ปฏิกริยาการกำจัดเอามูอะมิโนออกจากกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานิน

ที่มา: Sitthai (2004)

ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจีเนสไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมเพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานิน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อภาวะโภชนาการของมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์ฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจีเนสไปใช้ในการแพทย์เพื่อตรวจวัดระดับของฟีนิลอะลานิน และฟีนิลไพรูเวต ในเลือดเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคฟีนิลอะลานินไฮเพอร์ฟีนิลคีโตนีเมีย และโรคฟีนิลคีโตนูเรีย อีกด้วย (Ohshima and Soda, 1989)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฐานิสร์ (2545) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยง *E. coli* JM109 ที่มีเอนไซม์แอล-ฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจีเนสจาก *Bacillus badius* BC1 เพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานินในระดับขวดเขย่า โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกันและเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่ผลิตได้ พบว่า *E. coli* JM109 สามารถผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานินได้มากที่สุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลีเซอรอล (เกรดอาหาร) 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 4 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เฟอร์รัสซัลเฟต 0.0002 เปอร์เซ็นต์ ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ แมงกานีสซัลเฟต 0.0002 เปอร์เซ็นต์ แอมพิซิลิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.4 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร มีปริมาณแอล-ฟีนิลอะลานินในน้ำเลี้ยงเชื้อรวม 608.27 มิลลิกรัม

มยุรา (2545) ได้ทำการศึกษา *E. coli* JM109 ที่มียีนแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* เพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-อะลานีนในระดับขวดเขย่า โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่ผลิตได้ พบว่า *E. coli* JM109 สามารถผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-อะลานีนได้มากที่สุดเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลีเซอรอล (เกรดอาหาร) 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เฟอร์รัสซัลเฟต 0.0002 เปอร์เซ็นต์ ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ แมงกานีสซัลเฟต 0.0002 เปอร์เซ็นต์ แอมพิซิลิน 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.8 ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

Asad-ur-Rehman *et al.* (2008) ใช้กรดฟอสฟอริก (Phosphoric Acid) ในการปรับปรุงคุณภาพของกลีเซอรอลดิบที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ได้เป็นกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพเกรดต่าง ๆ โดยแต่ละเกรดจะมีค่าพีเอชแตกต่างกันไปดังนี้ เกรด A (พีเอช 4) เกรด B (พีเอช 5) เกรด C (พีเอช 6) และ เกรด D (พีเอช 7) โดยพบว่า กลีเซอรอลเกรดที่มีค่าพีเอชต่ำจะมีความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลมากกว่ากลีเซอรอลเกรดที่มีค่าพีเอชสูง และเมื่อทำการศึกษาถึงผลของกลีเซอรอลเกรดต่าง ๆ ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* DSM 5431 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตร กลีเซอรอลเกรด A เกรด B และกลีเซอรอลบริสุทธิ์ จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ใกล้เคียงกันโดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 18.5 ถึง 20.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 40 ถึง 100 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตร พบว่ากลีเซอรอลดิบทุกเกรดจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ตั้งแต่ 85.25 ถึง 112.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำกลีเซอรอลเกรด A ไปทำการชะด้วย n-Hexanol 2 ครั้ง จะทำให้ได้กลีเซอรอลเกรด A-2 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลงเป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 40 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษาการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลเกรด A เกรด A-2 และกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ด้วย *Clostridium butyricum* DSM 5431 ในระบบการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20 และ 50 กรัม กลีเซอรอลต่อลิตรจากผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกัน กลีเซอรอลเกรด A-2 และ กลีเซอรอล บริสุทธิ์จะให้ผลผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ใกล้เคียงกันและมากกว่ากลีเซอรอลเกรด A แต่เมื่อเปรียบเทียบการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลของกลีเซอรอลเกรดเดียวกัน ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20 และ 50 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตร จะพบว่าที่ความ

เข้มข้น 50 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตรจะสามารถเปลี่ยนไปเป็น 1,3-โพรเพนไดคอลได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 20 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตร เช่น เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเกรด A-2 เพิ่มขึ้นจาก 20 เป็น 50 กรัมกลีเซอรอลต่อลิตร จะทำให้ค่าความสามารถในการผลิต (Productivity) ของ 1,3-โพรเพนไดคอล เพิ่มขึ้นจาก 1.33 เป็น 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเป็นต้น

Zhang *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลจากกลีเซอรอลได้ โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ในมณฑลซินเจียง ประเทศจีน จากผลการศึกษาพบว่า สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้อากาศทั้งหมด 39 สายพันธุ์ แต่มีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลได้ โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ XJ-Li สามารถผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลได้ในปริมาณสูงที่สุด และหลังจากได้ทำการบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์สายพันธุ์ XJ-Li ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ประกอบกับลำดับของสารพันธุกรรมใน 16S rDNA แล้วพบว่า จุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดคอล คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 8.0 ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) เท่ากับ 6.0 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร โดยในการหมักแบบกะ (Batch Fermentation) จะได้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลเท่ากับ 12.2 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้ (Yield) ของ 1,3-โพรเพนไดคอลเท่ากับ 0.75 โมลต่อโมลกลีเซอรอล และในการหมักแบบกึ่งกะ (Fed Batch Fermentation) จะได้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลเท่ากับ 38.1 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดคอลเท่ากับ 0.70 โมลต่อโมลกลีเซอรอล

Mu *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการผลิต 1,3-โพรเพนไดคอลด้วยแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ภายใต้สภาวะไร้อากาศ จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลดิบที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เบสในการเร่งปฏิกิริยา และ ใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา จากผลการศึกษาในระบบการหมักแบบกึ่งกะ พบว่าความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลที่ได้จากกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งประเภทด่างและใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 51.3 และ 53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยค่าความสามารถในการผลิตของ 1,3-โพรเพนไดคอล ที่ได้จากกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 1.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความสามารถในการผลิตที่ได้จากกลีเซอรอลบริสุทธิ์อย่างมาก โดยกลีเซอรอลบริสุทธิ์จะทำให้ได้ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดคอลเท่ากับ 61.9 กรัมต่อลิตร และมีค่าการผลิตเท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งจากผล

การศึกษาสามารถสรุปได้ว่ากลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้

Ito *et al.* (2005) ได้ศึกษาการผลิต ไฮโดรเจน (H_2) และ เอทานอล (Ethanol) จากกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้แบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* HU-101 โดยทำการเจือจางกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยอาหารสังเคราะห์ (Synthetic Medium) เพื่อเพิ่มอัตราการใช้กลีเซอรอลของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมสารสกัดยีสต์ (Yeast Extract) และทริปโตเน (Tryptone) ลงในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเจือจางกลีเซอรอลดังกล่าว สามารถช่วยเพิ่มการผลิต ไฮโดรเจน และ เอทานอล ให้มากขึ้นได้ โดยค่าผลได้ของไฮโดรเจน และ เอทานอล ที่ได้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นทั้งในกรณีของกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ จากนั้นเมื่อเปรียบเทียบการผลิตไฮโดรเจนและเอทานอลจากกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลกับกลีเซอรอล บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่า อัตราการผลิตไฮโดรเจน และ เอทานอลจากกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีค่าต่ำกว่าในกรณีของกลีเซอรอลบริสุทธิ์มาก ทั้งนี้เนื่องจากกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีเกลือเป็นองค์ประกอบอยู่สูง และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในระบบแบบต่อเนื่อง (Continuous Culture) ในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (Packed-bed Reactor) ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเท่ากับ 110 มิลลิโมลาร์ โดยไม่ใช้วัสดุในการตรึงเซลล์ (Support Material) พบว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์จะมีอัตราการสร้างไฮโดรเจนสูงสุดเท่ากับ 80 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้เอทานอล เท่ากับ 0.8 ขณะที่ในกรณีที่ใช้กลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จะมีอัตราการสร้างไฮโดรเจนเพียง 30 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง แต่เมื่อมีการใช้วัสดุในการตรึงเซลล์ที่ทำจากเชรามิกในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าอัตราการสร้างไฮโดรเจนจาก กลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีค่าสูงขึ้นเป็น 63 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง และมีค่าผลได้เอทานอล เท่ากับ 0.85

Gonzalez-Pajuelo *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของกลีเซอรอลเกรดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* VPI 3266 โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลีเซอรอลเกรดการค้าที่มีปริมาณกลีเซอรอล 87 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร กับกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณกลีเซอรอล 92 และ 65 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่า ที่ความเข้มข้นเดียวกัน กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณกลีเซอรอล 92 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium butyricum* VPI 3266 ไม่ต่างกับกลีเซอรอลเกรดการค้า โดยที่ความ

เข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จะไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เลย แต่เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นจะทำให้มีผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร กลีเซอรอลทั้งสองเกรดดังกล่าวจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์คิดเป็น 62 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณกลีเซอรอลคิดเป็น 65 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่ากลีเซอรอลอีกสองเกรดอย่างเห็นได้ชัด เช่นที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อคิดเป็น 86 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจาก กลีเซอรอลทั้ง 3 ชนิด ด้วย *Clostridium butyricum* VPI 3266 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในอาหารสังเคราะห์ ทั้งในระบบการเลี้ยงแบบกะ และแบบต่อเนื่อง จากผลการศึกษาพบว่าในการเลี้ยงแบบกะ กลีเซอรอลทั้ง 3 ชนิดจะมีค่าผลได้ ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันคือ 0.51 ถึง 0.58 โมลต่อโมล กลีเซอรอล และในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง กลีเซอรอลทั้ง 3 ชนิดให้ค่าผลได้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันคือ 0.57-0.62 โมลต่อโมลกลีเซอรอล

Ooi *et al.* (2001) ได้ทำการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเมทิลเอสเทอร์ จากน้ำมันปาล์ม ด้วยวิธีทางเคมี (การเติมกรดซัลฟิวริก) และกายภาพ (การแยกชั้นการระเหยน้ำออก) หลังจากทำการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลที่เหลือทิ้งแล้วจะทำให้สามารถแยกผลิตภัณฑ์ได้เป็นสามส่วน โดยแต่ละส่วนจะมีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักดังนี้ กลีเซอรอลดิบ 33.9 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมัน 10.5 เปอร์เซ็นต์ และเกลือ 65.2 เปอร์เซ็นต์ และส่วนประกอบในกลีเซอรอลดิบประกอบด้วย กลีเซอรอล 51.4 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 13.8 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 8.9 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล (Matter Organic Non-glycerol) 25.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่ากลีเซอรอลดิบที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพที่มีค่าฟิเอชต่ำ จะทำให้กลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่มียีนแอล-ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Acinetobacter lwoffii* เป็นแบคทีเรียที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยกลุ่มวิจัยภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ทำการโคลนยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนส จาก *A. lwoffii* เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) โดยใช้ Expression Vector (pET-17b) ซึ่งยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสเป็นยีนที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ กรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

2. กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล “กลีเซอรอลดิบ” ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทน้ำมันพืชปทุมจำกัด เป็นกลีเซอรอลที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยา ทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์ม RBD กับเมทานอล โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีการระเหยเมทานอลออกจากกลีเซอรอลดิบเพื่อนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอีกครั้ง กลีเซอรอลดิบที่ได้มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง มีค่าพีเอชเท่ากับ 12

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและวิเคราะห์

- 3.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Anthekie Advanced, Secomam, France
- 3.2 เครื่องเขย่า (Shaking Incubator): SI2, China
- 3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge): PLC-012, Gemmy, Taiwan
- 3.4 เครื่องชั่งแบบละเอียด (เทคนิค 4 ตำแหน่ง): BL2105, Sartorius, Germany
- 3.5 เครื่องชั่งแบบหยาบ (เทคนิค 2 ตำแหน่ง): PM6100, Mettler Toledo, Switzerland
- 3.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ: TAI CHANG medical instrument factory, Thailand
- 3.7 ตู้บ่มร้อน: 500, Memmert, Germany

- 3.8 เครื่องวัดพีเอช: 420A, Orion, U.S.A.
- 3.9 หลอดทดลอง
- 3.10 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Thermo, U.S.A.
- 3.11 คอลัมน์ HPLC: ACE, C18, U.K.
- 3.12 Syringe Filter: ขนาดรูพรุน 0.2 μm , Whatman, U.S.A.
- 3.13 Eppendroff ขนาด 1.5 mL
- 3.14 เครื่องผสม (Vortex Mixer): KMC-1300V, VISION, Korea
- 3.15 ชุดกรอง Mobile Phase: Supelco, U.S.A.
- 3.16 เตาไฟฟ้า: H51, TL
- 3.17 โถดูดความชื้น
- 3.18 นาฬิกาจับเวลา: HS20, Casio, Japan
- 3.19 ออโต้ปีเปิด: Boeco, Germany
- 3.20 ถ้วยแก้ว
- 3.21 เตาเผาอุณหภูมิสูง
- 3.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.23 ฟลาสก์
- 3.24 แท่งแก้ว
- 3.25 ลวดเย็บเยื่อ
- 3.26 เพลทเย็บเยื่อ
- 3.27 ลำโพง และกระดาดฟรอยด์
- 3.28 ขวดปรับปริมาตร
- 3.29 ปีเปิดแก้ว
- 3.30 กระบอกตวง
- 3.31 ซ้อนดักสาร
- 3.32 ปืนสูญญากาศ
- 3.33 ขวด Vial
- 3.34 อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- 3.35 กรวยแยก
- 3.36 บิวเรต
- 3.37 ตู้เย็บเยื่อ

4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 4.1 กรดซัลฟิวริก (เกรดAR, Merck, Germany)
- 4.2 2-โพรพานอล (เกรดAR, J.T Baker, USA)
- 4.3 เอทานอล (เกรดAR, Merck, Germany)
- 4.4 อะซิติกอะซีโตน (เกรดAR, Fluka, Switzerland)
- 4.5 กรดไฮโดรคลอริก (เกรดAR, J.T Baker, USA)
- 4.6 โซเดียมเพอร์ไอโอดेट (เกรดAR, Fluka, Switzerland)
- 4.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (เกรดAR, Ajax finechem, Australia)
- 4.8 ฟีนอล์ฟทาลิน (เกรดAR, Ajax finechem, Australia)
- 4.9 กรดแอสติก (เกรดAR, Merck, Germany)
- 4.10 แอมโมเนียมอะซิเตต (เกรดAR, Ajax Finechem, Australia)
- 4.11 โบรโมฟีนอลบลู (เกรดAR, Ajax Finechem, Australia)
- 4.12 กลีเซอรอล (เกรด USP ความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
- 4.13 แมกนีเซียมคลอไรด์ (เกรดการค้า)
- 4.14 แอมโมเนียมซัลเฟต (เกรดการค้า)
- 4.15 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (เกรดการค้า)
- 4.16 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (เกรดการค้า)
- 4.17 สารสกัดยีสต์ (Biomark Laboratory, India)
- 4.18 ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (เกรดการค้า)
- 4.19 เฟอร์รัสซัลเฟต (เกรดการค้า)
- 4.20 แมงกานีสซัลเฟต (เกรดการค้า)
- 4.21 แคลเซียมคลอไรด์ (เกรดการค้า)
- 4.22 ซิงค์ซัลเฟต (เกรดการค้า)
- 4.23 แดปซิลคลอไรด์ (Supelco, U.S.A.)
- 4.24 อะซีโตน (ยี่ห้อ Merck เกรด HPLC)
- 4.25 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (ยี่ห้อ Merck เกรด AR)
- 4.26 อะซีโตนไนไตร (เกรด HPLC, Merck, Germany)
- 4.27 แอมพิซิลิน (เกรด AR, Sigma, U.S.A.)
- 4.28 ทรีปโตน (Biomark Laboratory, India)
- 4.29 โซเดียมคลอไรด์ (เกรด AR, Univar, Australia)

4.30 โซเดียมซัลเฟต (เกรด AR, Univar, Australia)

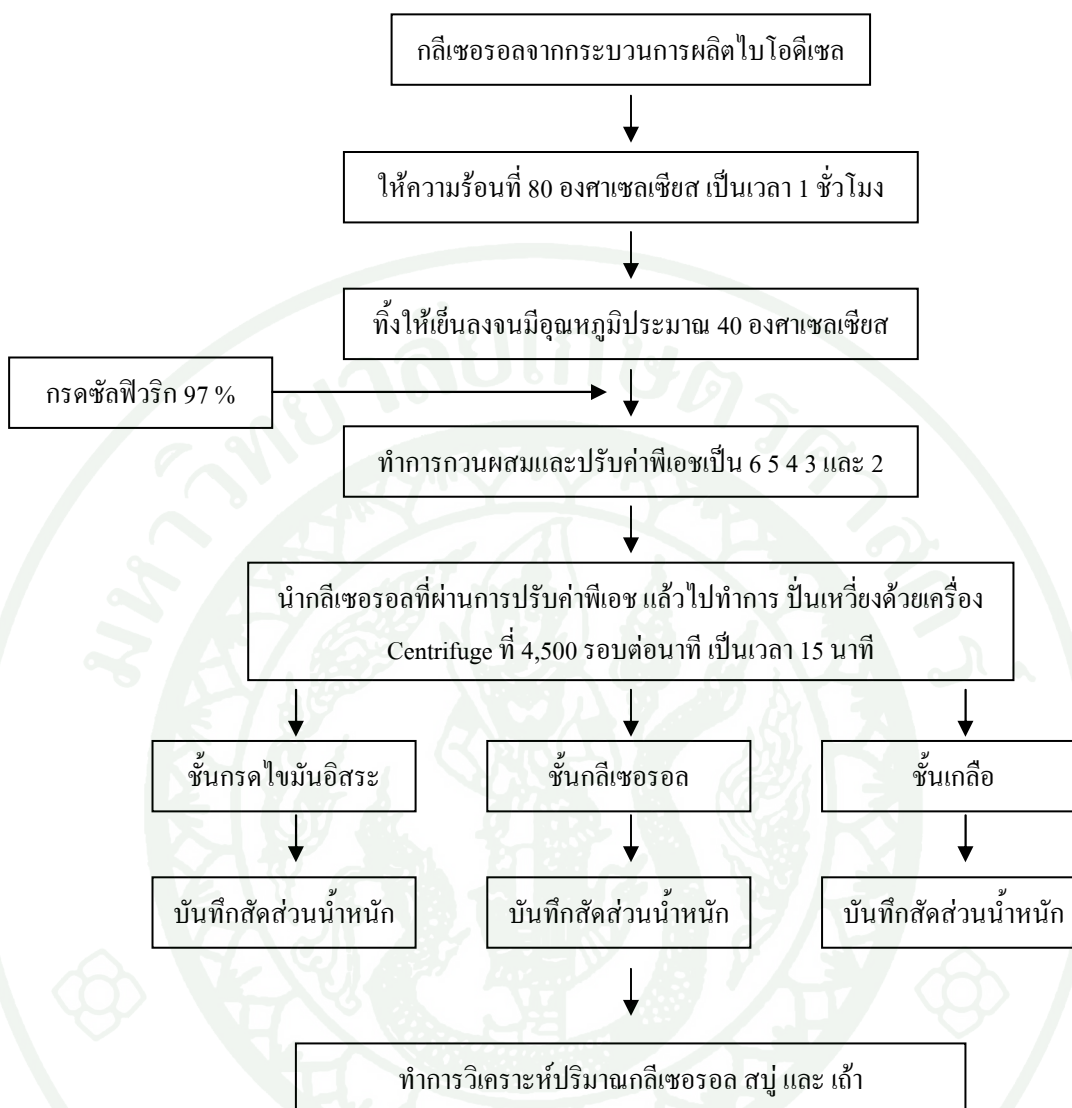
วิธีการ

1. การปรับปรุงคุณภาพของกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

ให้ความร้อนกับกลีเซอรอลดิบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยเมทานอลที่หลงเหลืออยู่ในกลีเซอรอลดิบออก จากนั้นทิ้งให้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการให้ความร้อนดังกล่าวเย็นลง จนมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรลงในกลีเซอรอลดิบ เพื่อทำการปรับพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงจาก 12 เป็น 6 5 4 3 และ 2 ตามลำดับ นำกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็นพีเอชต่าง ๆ แล้วดังกล่าวไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกชั้นกลีเซอรอล ออกจากชั้นของกรดไขมันอิสระ และชั้นของเกลือซัลเฟตที่เกิดขึ้น ทำการบันทึกสัดส่วนโดยน้ำหนักของสารในแต่ละชั้นที่แยกได้ นำชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบ และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป โดยขั้นตอนในการทำการทดลองได้แสดงไว้ในภาพที่ 16

2. การเตรียมต้นเชื้อ *Escherichia coli* BL21 (DE3) เพื่อใช้ในการทดลอง

ทำการถ่ายโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21 (DE3) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (พีเอช 7.4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียว นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (พีเอช 7.4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากขั้นตอนนี้เป็นต้นเชื้อในการทดลองต่อไป โดยอาหาร LB ประกอบด้วย ยีสต์ สกัด 5 กรัมต่อลิตร NaCl 10 กรัมต่อลิตร และทริปโตเนน 10 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 16 ขั้นตอนการเติมกรดเพื่อปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบ

3. การเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL21 (DE3) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ในการทดลองนี้ ประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 กรัมต่อลิตร MgCl_2 0.81 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 2.43 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 2.43 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 0.85 กรัมต่อลิตร Thiamine-HCl 0.085 กรัมต่อลิตร FeSO_4 0.002 กรัมต่อลิตร MnSO_4 0.002 กรัมต่อลิตร CaCl_2 0.05 กรัมต่อลิตร ZnSO_4 0.01 กรัมต่อลิตร และ แอมพิซิลิน 0.05 กรัมต่อลิตร (Khamduang *et al.*, 2009a) โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี (ความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และกลีเซอรอลดิบที่

ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3 โมลาร์ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ Thiamine-HCl แอมพิซิลิน และ $MgCl_2$ จะถูกเตรียมแยกจากส่วนประกอบอื่น ๆ โดยส่วนประกอบทั้งหมดจะถูกนำมาผสมรวมกันในภายหลัง Thiamine-HCl จะถูกกำจัดเชื้อโดยใช้วิธีการกรองผ่าน Filter ที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 2 ไมโครเมตร (National Scientific, USA) ส่วน $MgCl_2$ และองค์ประกอบอื่น ๆ จะถูกฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที การเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) จะทำในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที และใช้ปริมาณต้นเชื้อในการทดลองเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาหน้าหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย และปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนที่แบคทีเรียผลิตขึ้น

4. การวิเคราะห์ตัวแปรต่าง ๆ

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลด้วยวิธีของ Bondoli and Bella (2005) โดยใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุพันธ์ของกลีเซอรอล ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ สาร อนุพันธ์ดังกล่าวคือ 3, 5-ไดอะซีทิล-1, 4-ไดไฮโดรลิวติดีน (3, 5-diacetyl-1, 4-dihydrolutidine) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลีเซอรอล โซเดียมเพอร์รีโอเดต และอะซีติลอะซิโตน ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรได้ดี ขั้นตอนในการวิเคราะห์ การทำกราฟมาตรฐาน และการคำนวณหาปริมาณกลีเซอรอล ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสปู

ชั่งน้ำหนักกลีเซอรอลตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรหยดฟีนอล์ฟทาไลน์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 หยด หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงว่า กลีเซอรอลตัวอย่างยังมีตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทค่างหลงเหลืออยู่ ให้เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงไปในการละลายเพื่อสะเทินตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหลืออยู่

ดังกล่าว เมื่อตัวเร่งปฏิกิริยาถูกสะเทินหมดสารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสารละลายใส จากนั้นหยดโบรมีนฟีนอลบลูความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 3 ถึง 4 หยด (ได้สารละลายสีน้ำเงิน) ทำการไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ไทเทรตจนสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง ณ จุดนี้ถือเป็นจุดยุติ (Courtesy of CCCC Biofuels Program, 2010) บันทึกปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตให้สารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสบู่ โดยวิธีการคำนวณได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าตามมาตรฐาน ISO 2098-1972 นำถ้วยเถ้าไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งและจดบันทึกน้ำหนักของถ้วยเถ้าเปล่า ซึ่งตัวอย่างกลีเซอรอลให้น้ำหนักแน่นอนใส่ลงในถ้วยเถ้า จากนั้นให้ความร้อนแก่กลีเซอรอลในถ้วยเถ้าด้วยตะเกียงเบนเสนจนควันที่เกิดขึ้นจางหายไป นำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 750 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำออกจากเตาเผา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งและจดบันทึกน้ำหนัก นำน้ำหนักที่ชั่งได้ครั้งหลังไปลบด้วยน้ำหนักของถ้วยเถ้าเปล่า ค่าที่ได้คือน้ำหนักของเถ้าในกลีเซอรอลตัวอย่าง

4.4 การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำหลอดเหวี่ยงพลาสติกไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งและจดบันทึกน้ำหนักของหลอดเหวี่ยงพลาสติกเปล่า คือดตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งปริมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเหวี่ยงพลาสติก นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที รินน้ำส่วนในออก จากนั้นนำหลอดเหวี่ยงพลาสติกที่มีกากตะกอนของเซลล์อยู่ไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนัก นำน้ำหนักที่ชั่งได้ครั้งหลังไปลบด้วยน้ำหนักของหลอดเหวี่ยงพลาสติกเปล่า ค่าที่ได้คือน้ำหนักเซลล์แห้งในน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร

4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิด แอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำส่วนใสของตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำปฏิกิริยากับ แดปซิลคลอไรด์ (Dabsyl-Cl) เพื่อให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโน กับแดปซิลคลอไรด์ โดยประยุกต์จากวิธีของ Khamduang *et al.* (2009a) ซึ่งขั้นตอนในการทำสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนได้แสดงไว้ในภาคผนวก ข จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ACE C18 (150×4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) เติมนระบบโดยใช้สารวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดเอ (Mobile Phase A) เป็นสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.55 และ ชนิดบี (Mobile Phase B) เป็นสารละลายของอะซิโตนไนไตร กับ 2-โพรพานอล ในอัตราส่วน 75 ต่อ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราส่วนของสารวัฏภาคเคลื่อนที่ชนิดเอ ต่อชนิดบี ที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 50 ต่อ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการตรวจวัดปริมาณสารที่ผ่านออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบยูวี (UV Detector) ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟจากโครมาโตแกรมที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน ในภาคผนวก ข และทำการคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ข

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาดังความเป็นไปได้ในการนำกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL 21 (DE3) ที่มีซินแอล-ฟีนอลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Acinetobacter lwoffii* เพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนอลอะลานีน จากการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษากการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยเปรียบเทียบกับการใช้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า พบว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีในกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ในขณะที่กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์ต่ำมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่า (Asad-ur-Rehman *et al.*, 2008; Gonzalea-Pajuelo *et al.*, 2004) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้มีความบริสุทธิ์ขึ้น ก่อนการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป โดยสันนิษฐานว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจะสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL 21 (DE3) ได้ดีกว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ

สำหรับวิธีการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้กับกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือการเติมกรดเพื่อปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลง ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สามารถทำให้กลีเซอรอลดิบบริสุทธิ์ขึ้นได้ในเบื้องต้น โดยทำให้สบู่และประจุโซเดียมในกลีเซอรอลดิบ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณลดลงได้ นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการไม่สูงมากนัก ซึ่งจะทำให้ผลการวิจัยนี้มีความเป็นไปได้ในการนำไปปฏิบัติจริง และสามารถดำเนินการโดยมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ได้ กรดที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือกรดซัลฟิวริก ซึ่งเป็นกรดแก่ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมโดยทั่วไป และมีราคาไม่สูงมากนัก นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กรดดังกล่าวในการทำให้กลีเซอรอลดิบบริสุทธิ์ขึ้นด้วย (Ooi *et al.*, 2001)

1. การปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทน้ำมันพืชปทุม จำกัด ซึ่งบริษัทดังกล่าวดำเนินการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้

น้ำมันปาล์มอาร์บีดี ทำปฏิกิริยากับเมทานอล และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในกระบวนการผลิตมีการระเหยเมทานอลออกจากกลีเซอรอลดิบเพื่อนำกลับไปในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป ทำให้กลีเซอรอลดิบที่ได้มีปริมาณเมทานอลเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย (ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) มีลักษณะเป็นของแข็งแข็ง มีสีน้ำตาลดำ (ดังแสดงในภาพที่ 17) และมีค่าพีเอชเท่ากับ 12

1.1 การเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเพื่อทำการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบ และ การแยกชั้นกลีเซอรอลออกจาก ชั้นกรดไขมันอิสระ และชั้นเกลือ

ก่อนทำการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น กลีเซอรอลดิบได้ถูกนำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยเมทานอลที่หลงเหลืออยู่ในกลีเซอรอลดิบออก นอกจากนี้ความร้อนที่ให้กับกลีเซอรอลดิบดังกล่าวยังทำให้กลีเซอรอลดิบซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็ง เกิดการหลอมละลายกลายเป็นของเหลว ทำให้สามารถกวนผสมกรดที่เติมลงไปให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกับกลีเซอรอลดิบได้ดีขึ้นอีกด้วย เมื่อเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงในกลีเซอรอลดิบเพื่อทำการปรับค่าพีเอชให้มีค่าลดลงจาก 12 เป็น 6 5 4 3 และ 2 แล้ว พบว่ากลีเซอรอลดิบเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะปรากฏของกลีเซอรอลแต่ละพีเอชดังแสดงในตารางที่ 6 กล่าวคือเมื่อตั้งกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริกทิ้งไว้ จะสังเกตเห็นกลีเซอรอลดังกล่าวเกิดการแยกชั้นออกเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นบนเป็นชั้นของกรดไขมันอิสระ มีลักษณะเป็นของแข็ง สีเหลืองนวล และมีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว ชั้นกลางเป็นชั้นของกลีเซอรอล เป็นของเหลวใส สีน้ำตาล ก่อนข้างหนืด มีลักษณะคล้ายน้ำผึ้ง และชั้นล่างเป็นชั้นของเกลือซัลเฟต มีลักษณะเป็นของแข็ง เป็นผงละเอียด มีสีเหลืองอ่อน การแยกชั้นออกเป็น 3 ชั้น ของกลีเซอรอลดิบหลังการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นนี้ เกิดจากกรดซัลฟิวริกที่เติมลงไปได้เข้าทำปฏิกิริยากับสบู่ในกลีเซอรอลดิบ ทำให้สบู่เกิดการแตกตัวเป็นกรดไขมันอิสระ และเกลือซัลเฟต ดังแสดงในภาพที่ 18 โดยกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นสามารถละลายในกลีเซอรอลได้ต่ำ จึงเกิดการลอยตัวแยกชั้นออกจากชั้นกลีเซอรอล ในขณะที่เดียวกันเกลือที่เกิดขึ้นบางส่วนก็เกิดการตกผลึกออกจากชั้นกลีเซอรอลเช่นกัน (Gerpen, 2005)



ภาพที่ 17 กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล



ภาพที่ 18 ปฏิกริยาระหว่างสบู่ในกลีเซอรอลดิบและกรดซัลฟิวริก

ตารางที่ 6 ลักษณะของกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

พีเอชของกลีเซอรอล	ลักษณะของกลีเซอรอลหลังปรับพีเอช
พีเอช 6	
พีเอช 5	

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ฟิเอชของกลีเซอรอล	ลักษณะของกลีเซอรอลหลังปรับฟิเอช
ฟิเอช 4	
ฟิเอช 3	
ฟิเอช 2	

เพื่อให้สามารถแยกชั้นกลีเซอรอล ออกจากชั้นกรดไขมันอิสระ และชั้นเกลียวที่เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น จึงได้นำกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าฟิเอชด้วยการเติมกรดแล้วดังกล่าว ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และจัดบันทึกสัดส่วนโดยน้ำหนักของแต่ละชั้นที่สามารถแยกได้จากกลีเซอรอลฟิเอชต่าง ๆ โดยมีผลดังแสดงในตารางที่ 7 จากข้อมูลในตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่า เมื่อกลีเซอรอลมีค่าฟิเอชต่ำลง ทำให้เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นเกลียวที่แยกได้มีค่าเพิ่มสูงขึ้น โดยสัดส่วนของชั้นเกลียวที่แยกได้จากกลีเซอรอลฟิเอช 6 มีค่าเท่ากับ 6.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อกลีเซอรอลมีค่าฟิเอชลดลงเป็น 5 4 3 และ 2 ทำให้สัดส่วนของชั้นเกลียวที่แยกได้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 7.1 7.4 8.2 และ 8.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะกลีเซอรอลที่มีค่าฟิเอชต่ำลง สบู่ในกลีเซอรอลดิบจึงถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไขมันอิสระและเกลียวโซเดียมซัลเฟตในปริมาณที่มากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อค่าฟิเอชต่ำลง จึงมีปริมาณเกลียวซัลเฟตตกผลึกออกจากชั้นกลีเซอรอลมากขึ้นตามลำดับ จากเหตุผลดังกล่าวทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่า

สัดส่วนของชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้ควรมีปริมาณมากขึ้นเมื่อกลีเซอรอลมีค่าพีเอชต่ำลงเช่นกัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองกลับเป็นไปในทางตรงกันข้าม กล่าวคือเมื่อค่าพีเอชของกลีเซอรอลต่ำลง เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้กลับมีค่าน้อยลง โดยสัดส่วนของชั้นกรดไขมันที่แยกได้จากกลีเซอรอลพีเอช 6 มีค่าเท่ากับ 24.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อกลีเซอรอลมีค่า พีเอชลดลงเป็น 5 4 3 และ 2 แล้ว ทำให้สัดส่วนของชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้มีค่าลดลงเป็น 22.2 19.0 13.0 และ 12.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงนั้น ไม่ได้เป็นชั้นที่มีแค่กรดไขมันอิสระเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีกลีเซอรอลผสมอยู่ในชั้นดังกล่าวด้วยบางส่วน เนื่องจากชั้นของกรดไขมันอิสระมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ จึงทำให้กลีเซอรอลสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในชั้นของกรดไขมันอิสระได้ จากการสังเกตลักษณะของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้พบว่ากลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชสูงจะมีความหนืดมากกว่ากลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชต่ำ ซึ่งความหนืดดังกล่าวทำให้การแยกชั้นกลีเซอรอลออกจากชั้นกรดไขมันอิสระอย่างสมบูรณ์เป็นไปได้ยาก ความสมบูรณ์ในการแยกชั้นกลีเซอรอลและชั้นกรดไขมันอิสระออกจากกันจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลอย่างมากต่อสัดส่วนของชั้นกลีเซอรอลและชั้นกรดไขมันที่แยกได้ ในกรณีของกลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชสูง เมื่อถูกปั่นเหวี่ยง กลีเซอรอลซึ่งมีความหนืดมากจะสามารถแยกออกจากชั้นกรดไขมันอิสระได้ไม่ดี ทำให้ชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้ยังคงมีกลีเซอรอลผสมอยู่มาก เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้จึงมีค่ามาก ในขณะที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้มีค่าน้อย ในกรณีของกลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชต่ำลง เมื่อถูกปั่นเหวี่ยง กลีเซอรอลซึ่งมีความหนืดน้อยลง จะสามารถแยกชั้นออกจากกรดไขมันได้ดีขึ้น ทำให้ชั้นกรดไขมันที่แยกได้มีกลีเซอรอลผสมอยู่น้อยลง เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้จึงมีค่าลดลง ในขณะที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้มีค่าเพิ่มขึ้น โดยสัดส่วนของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้จากกลีเซอรอลพีเอช 6 มีค่าเท่ากับ 68.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อค่าพีเอชของกลีเซอรอลลดลงเป็น 5 4 3 และ 2 ทำให้สัดส่วนของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 70.7 73.6 78.8 และ 79.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลีเซอรอล และชั้นเกลือ ที่แยกได้
หลังการปั่นเหวี่ยงกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก

พีเอชของ กลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นต่าง ๆ ที่แยกได้หลังการปั่นเหวี่ยง		
	ชั้นกรดไขมันอิสระ	ชั้นกลีเซอรอล	ชั้นเกลือ
2	12.6±0.2	79.0±0.2	8.4±0.1
3	13.0±0.5	78.8±0.5	8.2±0.3
4	19.0±1.1	73.6±1.1	7.4±0.2
5	22.2±0.5	70.7±0.5	7.1±0.1
6	24.7±1.5	68.5±1.7	6.8±0.3

กรดไขมันอิสระที่อยู่ในรูปสบู่มีความสามารถในการละลายในกลีเซอรอลได้ดี เมื่อกรดไขมันอิสระซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่มีความหนืดสูงในรูปของสบู่ลงไปละลายอยู่ในชั้นของกลีเซอรอลมากขึ้น ทำให้กลีเซอรอลมีความหนืดมากขึ้นตามมา จึงกล่าวได้ว่าความหนืดของกลีเซอรอลเป็นสิ่งที่สามารถบ่งชี้ถึงปริมาณสบู่ที่ละลายอยู่ในกลีเซอรอลนั้น ๆ ได้ (Thompson and He, 2006) ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ ทำให้สามารถตั้งสมมติฐานได้ว่าปริมาณสบู่ที่เหลืออยู่ในชั้นกลีเซอรอลควรมีปริมาณลดลงเมื่อกลีเซอรอลมีค่าพีเอชต่ำลง

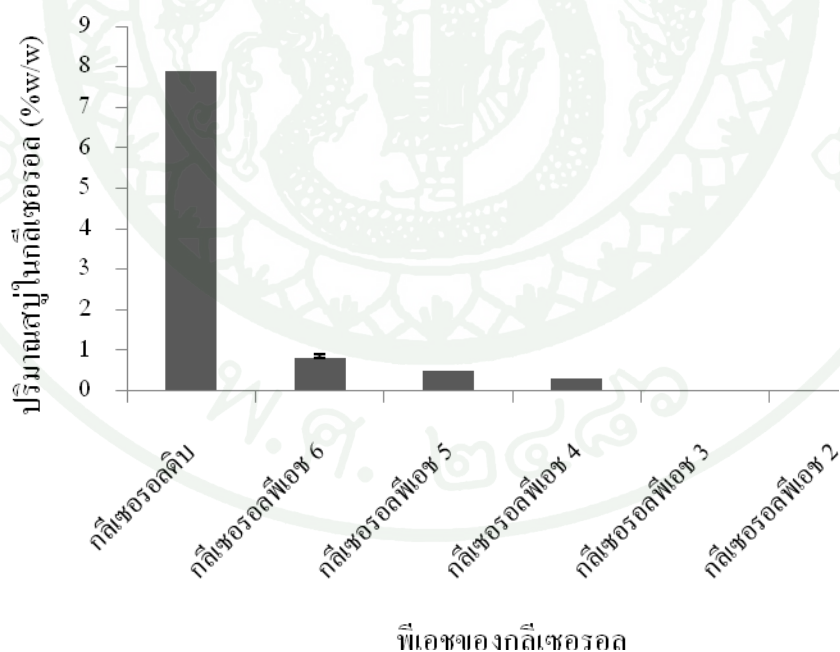
1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของชั้นกลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด

กลีเซอรอลดิบ และกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติมกรดได้ถูกนำมาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบ โดยทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลแต่ละชนิด และตรวจวัดปริมาณสิ่งเจือปนที่อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) เช่น ปริมาณสบู่ และ เถ้า จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของชั้นกลีเซอรอล ได้ผลดังนี้

1.2.1 ปริมาณสบู่ในชั้นกลีเซอรอล สบู่ที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบเป็นสบู่ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยาสะaponification ระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทด่างซึ่งในที่นี้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กับกรดไขมันอิสระในน้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล (Gerpen, 2005) โดยสบู่ที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จะละลายเข้าไปผสมอยู่ในชั้นกลีเซอรอลดิบ เนื่องจากสบู่เป็นสารที่มีความเป็นขั้วสูง เช่นเดียวกับกลีเซอรอล จากการศึกษาของ Asad-ur-Rehman *et al.* (2008) พบว่าสบู่ในกลีเซอรอล

ดิบเป็นปัจจัยหลักที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Clostridium butyricum* DSM 5431 เช่นเดียวกับ Chi *et al.* (2007) ที่รายงานว่ากลีเซอรอลดิบที่ยังคงมีสปอร์อยู่ในปริมาณมากมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Schizochytrium limacinum*

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสปอร์ที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยการเติมกรดพบว่า กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณสปอร์อยู่เท่ากับ 7.90 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อทำการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงด้วยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นพบว่า ปริมาณสปอร์ที่หลงเหลือในชั้นกลีเซอรอลมีปริมาณลดลง เมื่อกลีเซอรอลมีค่าพีเอชต่ำลงดังแสดงในภาพที่ 19 โดยกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 6 5 และ 4 มีปริมาณสปอร์เหลืออยู่ในชั้นกลีเซอรอลเท่ากับ 0.8 0.5 และ 0.3 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และพบว่าไม่มีสปอร์หลงเหลืออยู่เลยในกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 2 และ 3 การลดลงของปริมาณสปอร์ในกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชดังกล่าวเกิดจาก กรดซัลฟิวริกที่เติมลงไปได้เข้าทำปฏิกิริยากับสปอร์ในกลีเซอรอลดิบ ทำให้สปอร์เกิดการแตกตัวเป็นกรดไขมันอิสระ และเกลือซัลเฟต ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในส่วนของการทดลองตอนที่ 1.1 เมื่อเติมกรดลงไปในกลีเซอรอลดิบมากขึ้น สปอร์จึงเกิดการแตกตัวมากขึ้น ดังนั้นกลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชต่ำจึงมีปริมาณสปอร์ลดลง



ภาพที่ 19 ปริมาณสปอร์ในกลีเซอรอลดิบ และกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก

ผลการทดลองดังกล่าวมีแนวโน้มที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Asad-ur-Rehman *et al.* (2008) ที่ได้ทำการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ไขมันเมล็ดดอกทานตะวันเป็นวัตถุดิบ โดยใช้กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงจาก 12.5 เป็น 7 6 5 และ 4 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อกลีเซอรอลดิบที่มีปริมาณสบู่อยู่ที่เท่ากับ 13 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ผ่านการปรับค่าพีเอชให้ลดลงเป็น 7 6 และ 5 แล้วทำให้ชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้มีปริมาณสบู่ลดลงเป็น 9.3 3.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ ไม่พบว่ามีปริมาณสบู่หลงเหลืออยู่ในกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 4

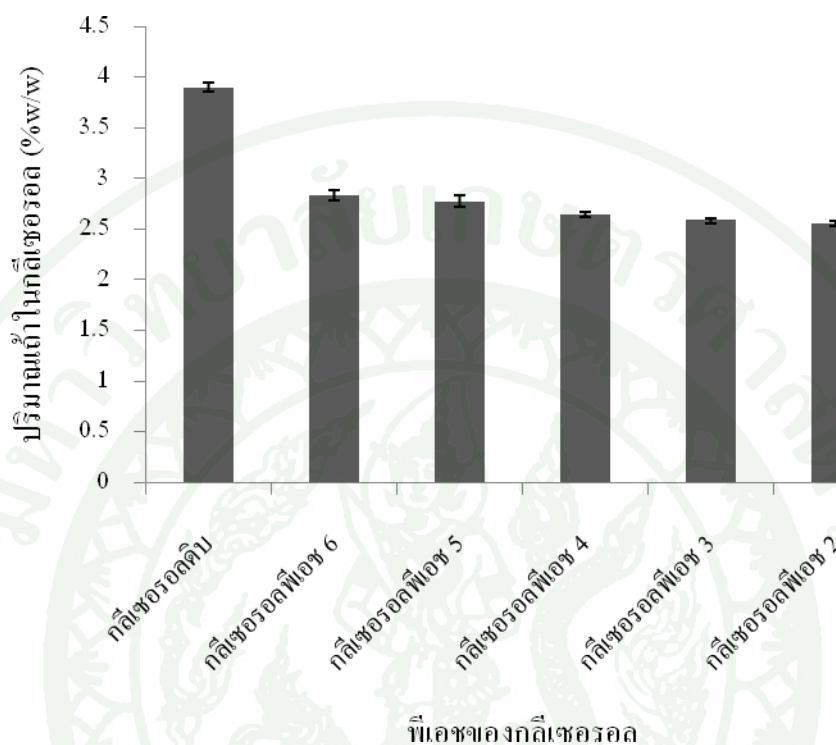
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสบู่ที่ได้จากการทดลองในส่วนนี้มีความสอดคล้องกับสมมุติฐานที่ตั้งไว้ผลการทดลองตอนที่ 1.1 ว่ากลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชสูงซึ่งมีความหนืดมากมีปริมาณสบู่หลงเหลืออยู่ในชั้นกลีเซอรอลมากกว่ากลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชต่ำซึ่งมีความหนืดน้อยกว่า

1.2.2 ปริมาณเถ้าในชั้นกลีเซอรอล

ปริมาณเถ้าที่วิเคราะห์ได้ เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงปริมาณโซเดียมที่มีอยู่ในกลีเซอรอลตัวอย่าง โดยโซเดียมส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบมาจากสบู่ซึ่งเป็นเกลือโซเดียมของกรดไขมันอิสระ Gonzalea-Pajuelo *et al.* (2004) รายงานว่าเกลือโซเดียมในกลีเซอรอลดิบมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Clostridium butyricum* VPI3266 โดยทำให้แบคทีเรียชนิดดังกล่าวมีการแบ่งตัวที่ผิดปกติไป

จากผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณเถ้าที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบมีค่าเท่ากับ 3.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยปริมาณเถ้าในกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยการเติมกรดจะมีน้อยลง เมื่อกลีเซอรอลมีค่าพีเอชต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 20 โดยกลีเซอรอลพีเอช 6 5 4 3 และ 2 มีปริมาณเถ้าอยู่ที่เท่ากับ 2.83 2.77 2.65 2.59 และ 2.55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในชั้นกลีเซอรอลที่ได้นี้ มีความสอดคล้องกับผลของปริมาณชั้นเกลือที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดในการทดลองตอนที่ 1.1 ซึ่งจากผลในตอนนี้ดังกล่าวพบว่าเมื่อกลีเซอรอลมีค่าพีเอชต่ำลง ทำให้เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นเกลือที่แยกได้มีค่าเพิ่มขึ้น การตกผลึกของเกลือออกจากชั้นกลีเซอรอลนั้น เกิดจากการที่โซเดียมไอออนจากสบู่จับตัวกับประจุลึงเฟดจากกรดซัลฟิวริกที่เติมลงไป ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเกลือโซเดียมซัลเฟต ซึ่งเกลือที่เกิดขึ้นดังกล่าวบางส่วนได้ตกผลึกออกไปจากกลีเซอรอล เมื่อเกลือตกผลึกออกไปจากชั้น

กลีเซอรอลมากขึ้น ทำให้ปริมาณโซเดียมที่มีในชั้นกลีเซอรอลมีปริมาณลดลง และเมื่อปริมาณโซเดียมลดลง ทำให้ปริมาณเถ้าที่วิเคราะห์ได้มีค่าลดลงตามไปด้วยเช่นกัน

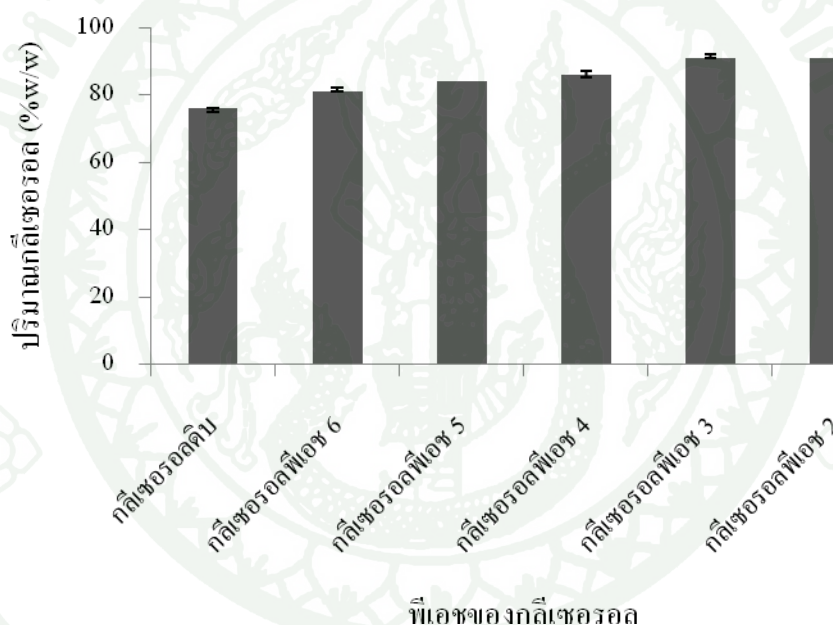


ภาพที่ 20 ปริมาณเถ้าในกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก

ผลการทดลองข้างต้นมีแนวโน้มสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Ooi *et al.* (2001) ที่ได้ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบจากกันหอกถั่ว ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการกลั่นบริสุทธิ์กลีเซอรอล ของโรงงานผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ไขมันปาล์มเมล็ดในเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงจาก 12.8 มาอยู่ในช่วงพีเอช 5 ถึง 7 และช่วงพีเอช 1 ถึง 2 จากผลการทดลองพบว่า กลีเซอรอลดิบจากกันหอกถั่วมีปริมาณเถ้าเท่ากับ 58.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อทำการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้ลดลงมาอยู่ในช่วงพีเอช 5 ถึง 7 และช่วงพีเอช 1 ถึง 2 แล้วพบว่ากลีเซอรอลทั้งสองช่วงพีเอชดังกล่าวมีปริมาณเถ้าลดลงเป็น 17.6 และ 7.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ โดยคณะผู้วิจัยได้อธิบายเหตุผลเกี่ยวกับปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า ที่พีเอชสูง ๆ จะทำให้เกลือโซเดียมสามารถละลายในกลีเซอรอลได้ปริมาณมากกว่าที่พีเอชต่ำ ๆ ดังนั้นเมื่อกลีเซอรอลมีค่าพีเอชต่ำลงจึงทำให้มีปริมาณเถ้าในกลีเซอรอลลดลง

1.2.3 ความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการนำกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ดังนั้นความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลจึงถือเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ต้องทำการวิเคราะห์ในการทดลองนี้ เมื่อกลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น จะทำให้ปริมาณเนื้อกลีเซอรอลต่อ 1 หน่วยน้ำหนักของกลีเซอรอลตัวอย่างที่นำไปใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้น จากข้อมูลงานวิจัยส่วนใหญ่ได้ชี้ให้เห็นว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นจะสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ



ภาพที่ 21 ปริมาณกลีเซอรอลในกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริก

จากการวิเคราะห์พบว่ากลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ในการทดลองความบริสุทธิ์เท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อเติมกรดเพื่อปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลให้ต่ำลง ทำให้กลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 21 โดยกลีเซอรอลพีเอช 6 5 4 และ 3 มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 81 84 86 และ 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ และเมื่อทำการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลให้ลดลงเป็น 2 แล้วพบว่ากลีเซอรอลยังคงมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเช่นเดียวกับกลีเซอรอลพีเอช 3 จึงกล่าวได้ว่าการทำ

ให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นนี้สามารถทำให้กลีเซอรอลดิบตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีความบริสุทธิ์สูงสุดได้เท่ากับ 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความบริสุทธิ์เริ่มต้นของกลีเซอรอลดิบ การเพิ่มขึ้นของความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลหลังการเติมกรดเพื่อปรับค่าพีเอชนี้ เกิดจากกรดที่เติมลงไปช่วยทำให้ปริมาณสิ่งเจือปนต่าง ๆ ในกลีเซอรอลดิบเช่น สบู่ และเกลือโซเดียม มีปริมาณลดลง ดังนั้นกลีเซอรอลที่มีค่าพีเอชต่ำลงจึงมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามการทำให้กลีเซอรอลดิบมีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีนี้สามารถช่วยทำให้กลีเซอรอลดิบมีความบริสุทธิ์ขึ้นได้ในเบื้องต้นเท่านั้น ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองว่าเมื่อปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลให้มีค่าต่ำลงต่ำกว่าพีเอช 3 ก็ไม่มีผลทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอีกแต่อย่างใด

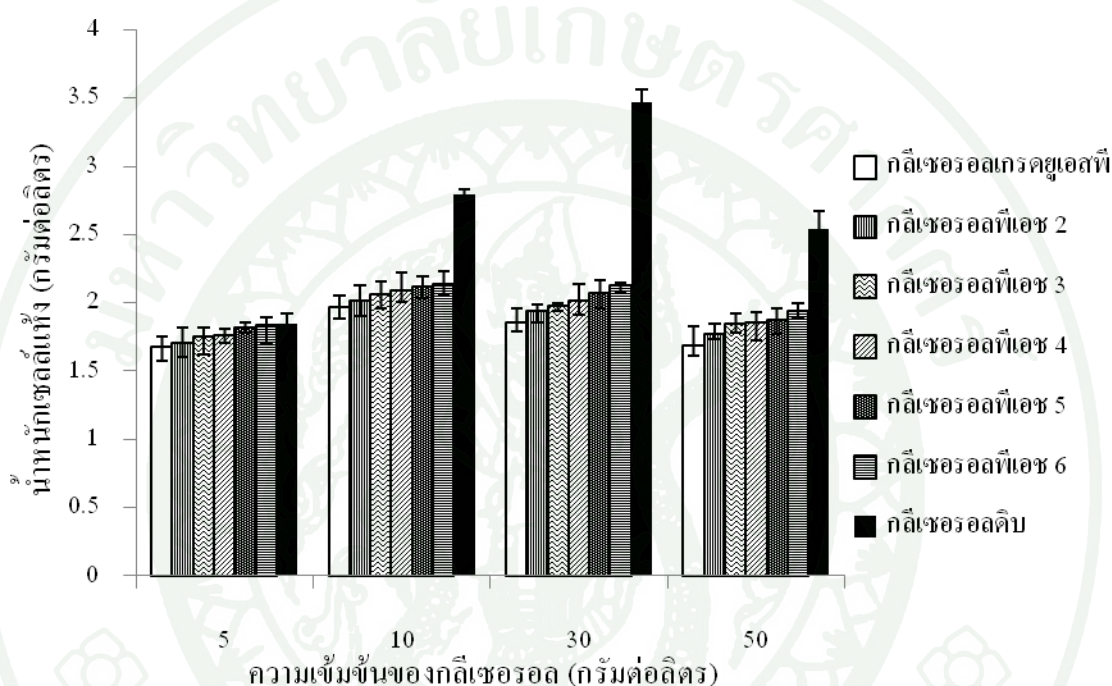
2. การเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL21 (DE3) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

2.1 ผลของกลีเซอรอลต่อการเจริญของ *Escherichia coli* BL21 (DE3)

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และกลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ที่ความเข้มข้น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) โดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 36 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 22 จากผลการทดลองที่ได้ เมื่อพิจารณาเฉพาะในกรณีที่ใช้กลีเซอรอล บริสุทธิ์เกรดยูเอสพีเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตรทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.68 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.97 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าลดลงเป็น 1.86 และ 1.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งในกรณีการหมักแบบใช้อากาศ และไม่ใช้อากาศ (Khamduang *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2007)

Khamduang *et al.* (2009b) ได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติในการออกแบบสูตรอาหารและหาระดับความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) ภายใต้สภาวะการหมักแบบใช้อากาศ ในการศึกษาได้ทำการแบ่งระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 3

ระดับคือ 10 55 และ 100 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเข้า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 32 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่ได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้น โดยระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) มากที่สุดคือ 10 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 22 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ในชั่วโมงที่ 36

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการทดลองเกี่ยวกับผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไว้ในกรณีการหมักแบบไม่ใช้ออกาศด้วยเช่นกัน โดย Zhang *et al.* (2007) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Klebsiella pneumoniae* XJ-Li ที่คัดแยกได้จากดินในมณฑลซินเจียง ประเทศจีน โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิต 1, 3-โพเพนไดออล ด้วยกระบวนการหมักภายใต้ภาวะไร้อากาศ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีที่สุด โดยวัดค่าการกระเจิงแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.356 เมื่อกลีเซอรอลมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้น้อยลง โดยค่า

การกระเจิงแสงที่วัดได้มีค่าลดลงเป็น 1.325 0.931 และ 0.762 เมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวทางคณะผู้วิจัยได้อธิบายเหตุผลที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเมื่อกลีเซอรอลมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮเดรทาส (Glycerol Dehydratase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น 1, 3-โพรเพนไดออล ภายใต้สภาวะไร้อากาศ จึงทำให้แบคทีเรียดังกล่าวเจริญได้น้อยลงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเข้มข้นมากขึ้น

สำหรับการย่อยสลายกลีเซอรอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศ ของ *E. coli* และจุลินทรีย์อีกหลายชนิด ดำเนินไปตามวิถีเมตาบอลิกที่เรียกว่า วิถีกลีเซอรอลไคเนส (Glycerol Kinase Pathway) ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวมีเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีความสำคัญต่อการนำกลีเซอรอลไปใช้ประโยชน์ คือ เอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส (Glycerol Kinase) และเอนไซม์กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase; G3PDH) (Lin, 1976) จากการศึกษาของ Pasteris and Strasser de Sadd (2005) ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงวิถีเมตาบอลิกในการย่อยสลายกลีเซอรอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ไวน์ จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ชนิดนี้ทำการย่อยสลายกลีเซอรอลผ่านวิถีกลีเซอรอลไคเนสเช่นกัน โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *P. pentosaceus* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเข้มข้น 5.7 มิลลิโมลาร์ ทำให้เอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และ เอนไซม์กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส มีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นจากในกรณีที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น 5.5 มิลลิโมลาร์ ถึง 9 และ 9.6 เท่า ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และ เอนไซม์กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญอย่างมากในการย่อยสลายกลีเซอรอลของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศผ่านวิถีกลีเซอรอลไคเนส และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *P. pentosaceus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ และทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าว พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่ากิจกรรมลดลงในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และ เอนไซม์กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส จะถูกยับยั้งการทำงานเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีค่าสูงเกินไป

จากข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับวิถีเมตาบอลิกของกลีเซอรอลใน *E. coli* ประกอบกับผลการทดลองของ Pasteris and Strasser de Sadd (2005) ว่าเอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และ เอนไซม์กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสมีค่ากิจกรรมลดลงเมื่อกลีเซอรอลมีความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่าการที่ *E. coli* BL21 (DE3) เจริญได้น้อยลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอล

มากขึ้นเกิดจากกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และ เอนไซม์กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส

จากภาพที่ 22 เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติมกรด (พีเอชต่าง ๆ) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ มีค่า และแนวโน้มใกล้เคียงกับที่ได้จากกรณีที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพีเป็นแหล่งคาร์บอน กล่าวคือได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าอยู่ในช่วง 2.01 ถึง 2.13 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร จะทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าลดลงมาอยู่ในช่วง 1.94 ถึง 2.12 และ 1.77 ถึง 1.94 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาในกรณีที่ใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตรทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* BL21 (DE3) เท่ากับ 1.85 และ 2.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเพิ่มขึ้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าลดลงเป็น 2.54 กรัมต่อลิตร

และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่ได้จากอาหารที่ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าสูงกว่าที่ได้จากกลีเซอรอลชนิดอื่นอย่างเห็นได้ชัดที่ทุกความเข้มข้น โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นเดียวกันเท่ากับ 10 41 87 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ผลการทดลองดังกล่าวมีแนวโน้มที่แตกต่างไปจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่รายงานว่ากลีเซอรอลดิบมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า

จากการศึกษาของ Gonzalez-Pajuelo *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของ กลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของ *Clostridium butyricum* VPI 3266 โดยทำการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กลีเซอรอลเกรดการค้าที่มีความบริสุทธิ์ 87 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจาก น้ำมันเมล็ดเรพ ที่มีความบริสุทธิ์ 65 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และกลีเซอรอลจาก กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์สูงเท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ที่ความเข้มข้น 20 40 65 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่ากลีเซอรอลเกรดการค้า และกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์ 92 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *C. butyricum* VPI 3266 เท่ากันที่ทุกความเข้มข้น คือที่ความเข้มข้นของ กลีเซอรอลทั้งสองชนิดนี้เท่ากับ 20 40 65 และ 100 กรัมต่อลิตร กลีเซอรอลทั้งสองชนิดดังกล่าวมี ผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับ 0 21 41 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์ 65 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่ากลีเซอรอลอีกสองชนิดอย่างเห็นได้ชัด โดยที่ความเข้มข้นของ กลีเซอรอลชนิดดังกล่าวเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูง ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จากปรากฏการณ์ดังกล่าว ผู้วิจัยได้ให้เหตุผลว่าสิ่งเจือปนที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลีเซอรีน มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ เจริญได้น้อยลง

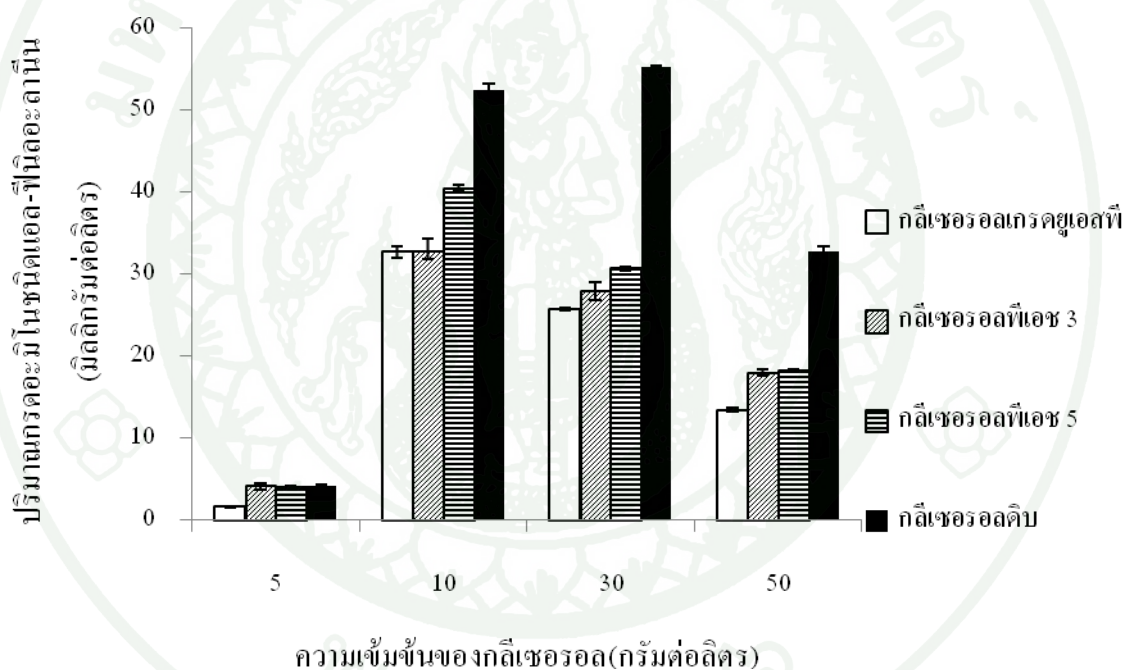
จากการศึกษาของ Asad-ur-Rehman *et al.* (2008) ได้ทำการเพาะเลี้ยง *C. butyricum* DSM 5431 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยกลีเซอรอลที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการเติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้นเพื่อ ปรับค่าพีเอชเป็น 7 6 5 และ 4 ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ เข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตรพบว่า กลีเซอรอลบริสุทธิ์ กลีเซอรอลพีเอช 4 และกลีเซอรอลพีเอช 5 มีค่าการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 18.5-20.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากกลีเซอรอลพีเอช 4 และกลีเซอรอลพีเอช 5 มีปริมาณสบู่หลงเหลืออยู่ใน ปริมาณน้อยโดยมีค่าเท่ากับ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลพีเอช 6 และ 7 ซึ่งมีปริมาณสบู่อยู่ในปริมาณมากเท่ากับ 3.8 และ 9.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ พบว่ากลีเซอรอลทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวให้ค่าการยับยั้ง การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยมีค่าเท่ากับ 62 และ 105 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยผู้วิจัยได้อธิบายถึงสาเหตุของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่เพิ่มขึ้นในกรณีของกลีเซอรอลสองชนิด ดังกล่าวว่ามีสาเหตุมาจากสบู่ในกลีเซอรอลดิบมีผลในการทำลายเซลล์ของแบคทีเรีย

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองของงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า *E. coli* BL21 (DE3) สามารถใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยนอกจากกลีเซอรอลดิบจะไม่ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้แล้ว ยังกลับเอื้อประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้อีกด้วย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสิ่งเจือปนบางอย่างในกลีเซอรอลดิบ เช่น สบู่ และเกลือโซเดียม อาจมีผลดีต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้ ซึ่งข้อสมมติฐานดังกล่าวได้ถูกสนับสนุนโดยงานวิจัยของ *Chi et al.* (2007) ซึ่งได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Schizochytrium limacinum* เพื่อผลิตดีเอชเอ (DHA) ซึ่งเป็นกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 โดยผู้วิจัยได้ทำการพิสูจน์ว่า สบู่ซึ่งมีอยู่มาก (ผู้วิจัยไม่ได้รายงานปริมาณเป็นตัวเลขแน่ชัด) ในกลีเซอรอลดิบ เป็นปัจจัยที่ส่งผลในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ คณะผู้ทำการวิจัยจึงได้นำกลีเซอรอลดิบดังกล่าวไปทำการปรับปรุงคุณภาพด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก เพื่อปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 เพื่อลดปริมาณสบู่ในกลีเซอรอลดิบ จากนั้นจึงได้นำกลีเซอรอลดิบที่แยกได้หลังจากการเติมกรดไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *S. limacinum* ที่ความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบกับการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน ผลการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติมกรดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 5 วัน น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ที่ได้จากอาหารที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชด้วยการเติมกรดเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 18 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ที่ได้จากอาหารที่ใช้กลูโคส และกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนมีค่าเท่ากับ 12 และ 13 กรัมตามลำดับ เนื่องจากผลการทดลองออกมาในรูปแบบดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาปัจจัยที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีในกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นดังกล่าว จากการตรวจสอบพบว่า สบู่ที่หลงเหลืออยู่เล็กน้อย (น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์) ในกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการเติมกรด เป็นปริมาณที่เหมาะสม และส่งผลดีต่อการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่ได้กล่าวถึงรายละเอียด และขั้นตอนในการพิสูจน์ดังกล่าวแต่อย่างใด

2.2 อิทธิพลของกลีเซอรอลต่อการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนของ *Escherichia coli* BL21 (DE3)

นํ้าเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบ กลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด (พีเอช 3 และ 5) และกลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิล

อะลานีน ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงตามวิธีในภาคผนวก ข จากผลที่แสดงในภาพที่ 23 แสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดอะมิโนที่ได้มีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกับผลของน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนสูงที่สุดเท่ากับ 55.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่กลีเซอรอลชนิดอื่นให้ปริมาณกรดอะมิโนสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าอยู่ในช่วง 32.7 ถึง 40.4 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงกล่าวได้ว่า *E. coli* BL21 (DE3) สามารถใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดอะมิโนชนิด แอล-ฟีนิลอะลานีนได้ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่ทำให้มีปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญ และการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนได้ดีที่สุด

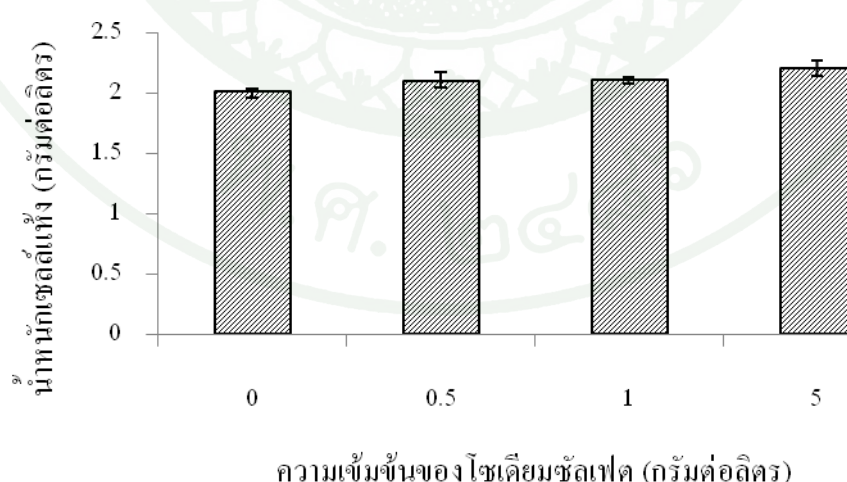


ภาพที่ 23 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL21 (DE3) ในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วงเวลาที่ 36

2.3 อิทธิพลของสิ่งเจือปนในกลีเซอรอลดิบต่อการเจริญของ *Escherichia coli* BL21 (DE3)

จากผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มไปในทางตรงกันข้ามกับข้อสมมุติฐานที่ตั้งไว้ในตอนแรก กล่าวคือ *E. coli* BL21 (DE3) สามารถใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลีเซอรอลชนิดอื่นที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า จากผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวทำให้สามารถตั้งข้อสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่า สารบางอย่างที่เจือปนอยู่ในกลีเซอรอลดิบเป็นปัจจัยที่ส่งผลดีต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของข้อสันนิษฐานดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมขึ้นอีกดังนี้

เนื่องจากถั่วซึ่งถือเป็นตัวแทนของปริมาณเกลือโซเดียมที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบมีปริมาณมากถึง 3.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของกลีเซอรอลดิบ ดังนั้นเกลือโซเดียมจึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ *E. coli* BL21 (DE3) เจริญได้ดีในกลีเซอรอลดิบ เพื่อศึกษาถึงผลของเกลือโซเดียมต่อการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) ผู้วิจัยจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมซัลเฟตเข้มข้น 0 0.5 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองในภาพที่ 24 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหารที่มีเกลือโซเดียมซัลเฟตปริมาณต่าง ๆ มีค่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเกลือโซเดียมในกลีเซอรอลดิบไม่มีผลต่อการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3)

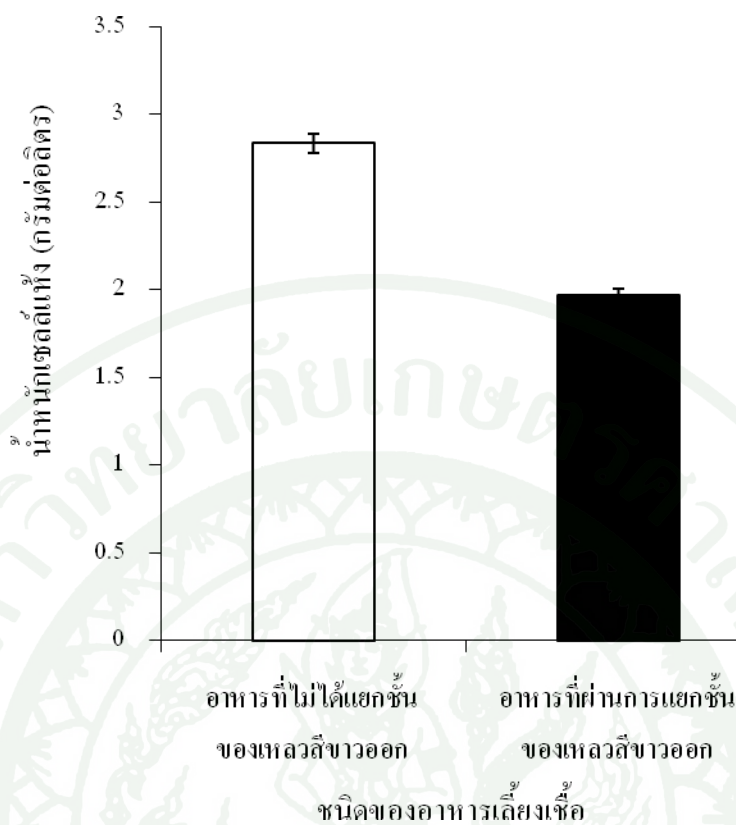


ภาพที่ 24 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ

ในขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการผสมกลีเซอรอลดิบเข้ากับสารอาหารอื่น ๆ ในน้ำกลั่น สามารถสังเกตได้ว่า จะปรากฏชั้นของเหลวมีลักษณะสีขาวขุ่นลอยแยกตัวขึ้นสู่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 25 เมื่อทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผสมกลีเซอรอลดิบในปริมาณเดียวกับที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เข้ากับสารอาหารชนิดอื่นในน้ำกลั่น ตั้งพักไว้ในกรวยแยกเป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น โดยเฉพาะส่วนใสด้านล่างไปใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่ได้ทำการแยกชั้นของเหลวสีขาวออกไป จากผลการทดลองในภาพที่ 26 พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของจุลินทรีย์ที่ได้จากอาหารที่ถูกแยกชั้นของเหลวสีขาวออก มีค่าลดลงจากกรณีที่ไม่ได้แยกชั้นของเหลวสีขาวออกถึง 30.6 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าชั้นของเหลวสีขาวดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) โดยคาดว่าชั้นของเหลวสีขาวดังกล่าวเป็นสารในกลุ่มกรดไขมันซึ่ง *E. coli* BL21 (DE3) มีความสามารถในการใช้กรดไขมันดังกล่าวเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 25 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการผสมกลีเซอรอลดิบเข้ากับสารอาหารอื่น ๆ ในน้ำกลั่น



ภาพที่ 26 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากเพาะเลี้ยงในอาหารที่ทำ การแยกชั้นของเหลวสีขาวออกเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้แยกชั้นของเหลวสีขาว ออก

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้ได้ทำการปรับปรุงคุณภาพของกลีเซอรอลดิบให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น และนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิด แอล-ฟีนิลอะลานีน เพื่อเป็นการหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยกลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการศึกษาเป็นกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันปาล์มอาร์บีดีเป็นวัตถุดิบ และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1. การปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

เมื่อทำการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงในกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ทำให้กลีเซอรอลเกิดการแยกชั้นเป็น 3 ชั้น โดยชั้นบนเป็นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลางเป็นกลีเซอรอล และชั้นล่างเป็นเกลือซัลเฟต ชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของกลีเซอรอลดิบมีค่าลดลง โดยกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณเถ้า 2.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และไม่พบว่ามีสารเหลืออยู่ในกลีเซอรอลนี้

2. การเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL21 (DE3) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อศึกษาใช้กลีเซอรอลดิบ เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) เปรียบเทียบกับ กลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และ กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี (บริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) พบว่า *E. coli* BL21 (DE3) สามารถเจริญในกลีเซอรอลดิบได้ดีที่สุด โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้มีค่าเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนที่ได้จากอาหารดังกล่าวอาหารดังกล่าวยังมีปริมาณปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 55.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีแนวโน้มที่แตกต่างไปจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่มักพบว่ากลีเซอรอลดิบมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่ากลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า จึงกล่าวได้ว่านอกจาก

กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) แล้วยังเอื้อประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ดียิ่งด้วย โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่ทำให้มีปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ในระดับที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญ และการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนได้ดีที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองพบว่ากลีเซอรอลดิบมีผลดีต่อการเจริญ และการผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนของ *E. coli* BL21 (DE3) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดอะมิโนที่ผลิตได้ยังคงมีค่าค่อนข้างต่ำ จึงควรนำข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการทดลองนี้ไปทำการพัฒนาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วยให้สามารถผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนจากกลีเซอรอลดิบได้มากขึ้น
2. *E. coli* BL21 (DE3) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพได้หลากหลายดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ *E. coli* BL21 (DE3) ในการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นที่มีความหลากหลายมากขึ้น
3. จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าชั้นของเหลวสีขาวที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อในกรณีที่ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นเป็นสารที่ส่งผลดีต่อการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) ทำให้มีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาต่อไปเพื่อบ่งชี้ว่าสารดังกล่าวเป็นสารประเภทใด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คณะกรรมการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทนเอทานอลและไบโอดีเซล. สำนักพิมพ์แปลน พรินต์, กรุงเทพฯ.
- โครงการพัฒนาระบบฐานข้อมูลด้านการเกษตรและสหกรณ์ของจังหวัด. 2552. เทคโนโลยีและภูมิปัญญาชาวบ้าน. แหล่งที่มา: http://www.moac-info.net/modules/news/news_view.php?News_id=66706&action=edit, 15 ธันวาคม 2552.
- ฐานิศร์ สมรรถวิทยา. 2545. การหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Escharichia coli* JM109 ที่มียีนแอล-ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Bacillus badius* BC1 เพื่อการผลิตแอล-ฟีนิลอะลานีน. โครงการงานปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2549. คัมภีร์ปาล์มน้ำมัน พืชเศรษฐกิจเพื่อบริโภคและอุปโภค. มติชน, กรุงเทพฯ.
- มยุรา ทองช่วง. 2545. ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Escharichia coli* JM109 ที่มียีนแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila* เพื่อการผลิตแอล-อะลานีน. โครงการงานปริญญาตรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศักดิ์ศิลป์ โชติสกุล, วินาภรณ์ กุญรัตน์ และ กิจารักษ์ วงษ์กุลละ. 2541. เอกสารวิชาการเรื่องปาล์มน้ำมัน. กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี. 2552. รู้จักปาล์มน้ำมัน. แหล่งที่มา: <http://it.doa.go.th/palm/linkTechnical/oilpalm.html>, 15 ธันวาคม 2552.
- สมใจ ศิริโชค. 2544. ชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ, กรุงเทพฯ.

- Ajinomoto Co., Inc. 2003. **Ajinomoto's Amino Acid Handbook**. Ajinomoto Co.,Inc. Amino Acid Department, Tokyo.
- Alhanash, A., E.F. Kozhevnikova and I.V. Kozhevnikov. 2008. Hydrogenolysis of glycerol to propanediol over Ru: Polyoxometalate bifunctional catalyst. **Cat. Lett.** 120: 307-311.
- Aon, J.C., R.J. Caimi, A.H. Taylor, Q. Lu and F. Oluboyede. 2008. Suppressing posttranslational gluconoylation of heterologous proteins by metabolic engineering of *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 74: 950-958.
- Asad-ur-Rehman, R.G.S. Wijesekara, N. Nomura, S. Sato and M. Matsumura. 2008. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1, 3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 83: 1072-1080.
- Bondioli, P. and L.D. Bella. 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.** 107: 153-157.
- Brunhuber, N.M.W., Banerjee A., Jacobs W.R. and S.B. John. 1994. Cloning, sequencing, and expression of *Rhodococcus* L-phenylalanine dehydrogenase. **J. Bio. Chem.** 269: 16203-16211.
- Celik, E., N. Ozbay, N. Oktar and P. Calik. 2008. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Ind. Eng. Chem. Res.** 47: 2985-2990.
- Chaoa, Y.P., T.E. Lob and N.S. Luo. 2000. Selective production of L-aspartic acid and L-phenylalanine by coupling reactions of aspartase and aminotransferase in *Escherichia coli*. **Enz. Microb. Technol.** 27: 19-25.

- Chi, Z., D. Pyle, Z. Wen, C. Frear and S. Chen. 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process. Biochem.** 42: 1537-1545.
- Chitra, P., P. Venkatachalam and A. Sampathrajan. 2005. Characterisation and purification of crude glycerol recovered from transesterification of *Jatropha curcus* oil. **Madras Agric J.** 92: 241-243.
- Chiu, C. M.A. Dasari, G.J. Suppes, and W.R. Sutterlin. 2006. Dehydration of glycerol to acetol via catalytic reactive distillation. **AIChE Journal.** 52: 3543- 3548.
- Courtesy of CCCC BioFuels Program. 2010. **Residual catalyst and soap titration.** Available Source: www.collectivebiodiesel.org/Presentations_files/Biodiesel%20101.pdf, February 17, 2010.
- Crowe, A. 2009. ***E. coli*: A permanent resident of our beaches.** Available Source: <http://lakehuron.ca/index.php?page=e-coli>, December 15, 2009.
- Demirbas, A. 2008. **Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines.** Springer-Verlag, London.
- Dharmadi, Y., A. Murarka, and R. Gonzalez. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. **Biotech. Bioeng.** 94: 821-829.
- Gerpen, J.V. 2005. Biodiesel processing and production. **Fuel. Process. Technol.** 86: 1097-1107.

- Gonzalez-Pajuelo, M., J.C. Andrade and I. Vasconcelos. 2004. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31: 442-446.
- Helwani, Z., M.R. Othman, N. Aziz, W.J.N. Fernando and J. Kim. 2009. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel. Process. Technol.** 90: 1502–1514.
- Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. **J. Biotechnol.** 104: 155-172.
- Ikeda, M. 2003. Amino acid production processes. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 79: 1-35.
- Imandi, S.B., V.V.R. Bandaru, S.R. Somalanka, H.R. Garapati. 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from by product glycerol using Doehlert experimental design. **Enz. Microb. Technol.** 40: 1367–1372.
- Ito, T., Y. Nakashimada, K. Senba, T. Matsui and N. Nishio. 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J Biosci. Bioeng.** 100:260-265.
- Jakobson, G., F.W. Kathagen and M. Klatt. 1999. **Industrial organic chemicals: starting material and intermediates.** Wiley-VCH, Weinheim.
- Johnson D.T. and K.A. Taconi. 2007. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environ. Progress.** 26: 338-348.
- Khamduang, M., K. Packdibamrung, J. Chutmanop, Y. Chisti and P. Srinophakun. 2009a. Production of L-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36: 1267-1274.

- Khamduang, M., K. Packdibamrung, J. Chutmanop and P. Srinophakun. 2009b. Optimization of medium composition for L-phenylalanine production from glycerol using response surface methodology. **Natur. Sci.** 43: 727-734.
- Kirk, R.E. and D.F. Othmer. 1979. **Encyclopedia of chemical technology**. Wiley, New York.
- Lammers, P.J., B.J. Kerr, T.E. Weber, W.A. Dozier, M.T. Kidd, K. Bregendahl and M.S. Honeyman. 2008. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **J. Animal. Sci.** 86: 602-608.
- Lederberg, J. 1992. **Encyclopedia of microbiology**. Academic Press, San Diego.
- Lee, S.Y. 2009. **Systems Biology and Biotechnology of *Escherichia coli***. Springer Science and Business Media, Daejeon.
- Lin, E.C.C. 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.** 30: 535-578.
- Ma, F. and M.A. Hanna. 1999. Biodiesel production: A review. **Bioresour. Technol.** 70: 1-15.
- Marchetti, J.M., V.U. Miguel and A.F. Errazu. 2007. Possible methods for biodiesel production. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 11: 1300-1311.
- Mu, Y., H. Teng, D.J. Zhang, W. Wang and Z.L. Xiu. 2006. Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnol. Lett.** 28: 1755-1759.
- Ohshima, T. and K. Soda. 1989. Thermostable amino acid dehydrogenases: Applications and gene cloning Trends. **Biotechnol.** 7: 210-214.

- Ooi, T.L., K.C. Yong, K. Dzulkefly, W.M.Z. Wanyunus and A.H. Hazimah. 2001. Crude glycerine recovery from glycerol residue waste from a palm kernel oil methyl ester plant. **J. Oil. Palm. Res.** 13: 16-22.
- Pagliari, M. and M. Rossi. 2008. **The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material.** RSC Publishing, Cambridge.
- Pasteris, S.E. and A.M. Strasser de Saad. 2005. Aerobic glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine. **Food. Microb.** 22: 399–407.
- Petitdemange, E., C. Durr, S. Abbad Andaloussi and G. Raval. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1, 3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. **J. Ind. Microbiol.** 15: 498-502.
- Ranganathan, S.V., S.L. Narasimhan and K. Muthukumar. 2008. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresour. Technol.** 99: 3975–3981.
- Sitthai P. 2004. **Cloning and expression of phenylalanine dehydrogenase gene from *Acinetobacter lwoffii* and the possibility for amino acid production.** Master Thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Thompson, J.C. and B.B. He. 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl. Eng. Agric.** 22: 261-265.
- Yazdani, S.S. and R. Gonzalez. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels Industry. **Curr. Opin. Biotechnol.** 18: 213-219.
- Zabeti, M., W.M.A.W. Daud and M. K. Aroua. 2009. Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. **Fuel. Process. Technol.** 90: 770–777.

Zhang, G.L., B.B. Ma, X.L. Xu, C. Li and L. Wang. 2007. Fast conversion of glycerol to 1, 3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. Eng J.** 37: 256-260.







ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอล

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายกรดอะซิติก (Acetic Acid Stock Solution) เตรียมโดย ชั่งน้ำหนักกรดอะซิติกเข้มข้น 9.6 กรัม ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
2. สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท (Ammonium Acetate Stock Solution) เตรียมโดย ชั่งสารแอมโมเนียมอะซิเตท 30.8 กรัม ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. สารละลายอะซิติลอะซิโตน (Acetylacetone Solution) เตรียมโดย คูอะซิติลอะซิโตน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายกรดอะซิติก และสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตท อย่างละ 5 มิลลิลิตร
4. สารละลายโซเดียมเพอร์ริโอเดท (Sodium Periodate Solution) เตรียมโดย ทำการละลายสารโซเดียมเพอร์ริโอเดท 21 มิลลิกรัม ในสารละลายกรดอะซิติก 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียม อะซิเตทลงไป 5 มิลลิลิตร
5. สารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล

1. ทำการเจือจางกลีเซอรอลตัวอย่างด้วยสารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวปริมาตร 1 มิลลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายโซเดียมเพอร์ริโอเดทปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร

4. ทำการเขย่าผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที
5. เติมสารละลายอะซิโตนปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร
5. ให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียสในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 1 นาที
6. นำไปแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส ทันที
7. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ ก1) เพื่อคำนวณหาปริมาณกลีเซอรอล

ขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล

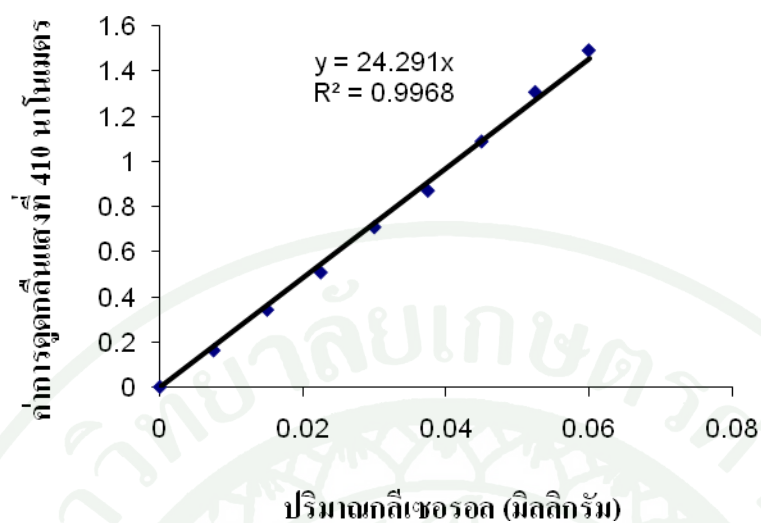
1. เตรียมสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐาน โดยละลายกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 0.003 กรัม ในสารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. ใส่สารละลายกลีเซอรอลมาตรฐาน และสารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลองตามอัตราส่วนที่แสดงในตารางภาคผนวกที่ ก1
3. ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารวิเคราะห์ตัวอย่างตั้งแต่ขั้นตอนที่ 3 ถึง ขั้นตอน ที่ 7
4. นำปริมาณกลีเซอรอล และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แสดงในตารางผนวกที่ ก2 ไปวาดกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน x คือปริมาณของกลีเซอรอล และ แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล

หลอดที่	ปริมาณสารละลาย กลีเซอรอลมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลาย เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (มิลลิกรัม)
1	0.00	2.00	0.0000
2	0.25	1.75	0.0075
3	0.50	1.50	0.0150
4	0.75	1.25	0.0225
5	1.00	1.00	0.0300
6	1.25	0.75	0.0375
7	1.50	0.50	0.0450
8	1.75	0.25	0.0525
9	2.00	0.00	0.0600

ตารางผนวกที่ ก2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐานที่ใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์กลีเซอรอล

ปริมาณกลีเซอรอล (มิลลิกรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร
0.0000	0
0.0075	0.162
0.0150	0.342
0.0225	0.508
0.0300	0.708
0.0375	0.870
0.0450	1.088
0.0525	1.307
0.0600	1.492



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

การคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 (Abs_{410}) ของตัวอย่างแทนค่าลงในสูตรคำนวณด้านล่าง

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)} = \frac{Abs_{410} \times \text{จำนวนเท่าในการเจือจางตัวอย่าง} \times 100}{24.291 \times \text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$



ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

การเตรียมสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ก) สารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ทำการปรับค่าพีเอชเป็น

9

ข) สารละลายแคบซิลคลอไรด์ 0.0218 กรัม ในอะซิโตน 10 มิลลิลิตร

ค) สารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์

2. การเตรียมสารอนุพันธ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

ก) นำเลี้ยงเชื้อตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอย่างไว้ใช้ในการทำอนุพันธ์ของกรดอะมิโนต่อไป

ข) เติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแคบซิลคลอไรด์ในอะซิโตน ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในเอฟเพนดรอฟ (Eppendorf) แล้วทำการเขย่าผสมให้เข้ากัน

ค) เติมส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไป แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมวอร์เท็กซ์

ง) นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (จากขั้นตอนนี้ได้สารละลายใสสีส้ม)

จ) นำไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (จากขั้นตอนนี้ได้ผลึกสีส้ม)

ฉ) เติมสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมด้วยเครื่องผสม เพื่อละลายผลึกของสารตัวอย่าง

ช) กรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร บรรจุลงขวด Vial เพื่อทำการฉีควิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ก) ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดอะมิโนชนิด แอล-ฟีนิลอะลานีน ที่ความเข้มข้น 0.025 0.050 0.075 และ 0.100 กรัมต่อลิตร

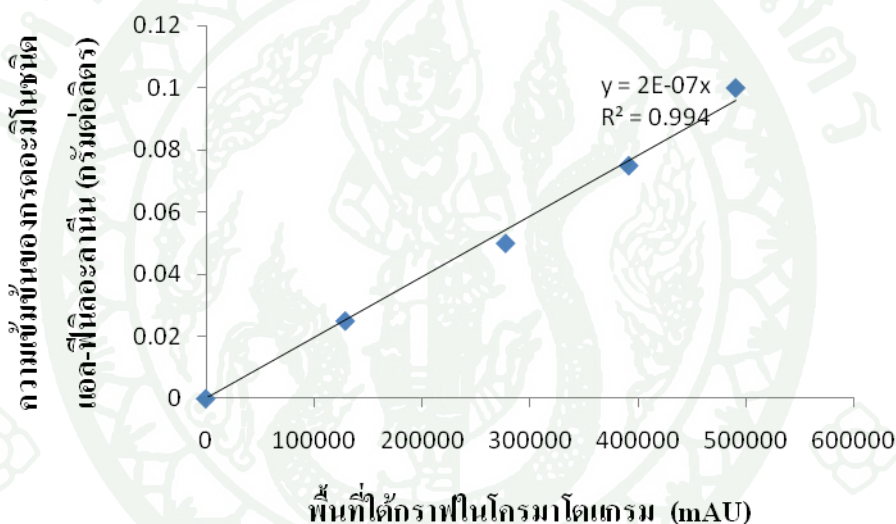
ข) นำสารละลายมาตรฐานของกรดอะมิโนชนิด แอล-ฟีนิลอะลานีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปผ่านกระบวนการเตรียมสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนเช่นเดียวกับที่ทำกับน้ำเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง

ค) นำสารอนุพันธ์ของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน แต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้ไปทำการฉีควิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ง) จัดบันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น และนำไปพล็อตกราฟมาตรฐานสัมพันธ์กับความเข้มข้น

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ความเข้มข้นของกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟในโครมาโตแกรม (mAU)
0.025	129,191
0.050	277,845
0.075	391,927
0.100	490,939



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

วิธีการคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน

นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างมาแทนในสูตรด้านล่าง

ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) = พื้นที่ใต้กราฟ $\times 2 \times 10^{-4}$



ภาคผนวก ค
การคำนวณปริมาณสนุ่

ภาคผนวก ค

การคำนวณปริมาณสบู์

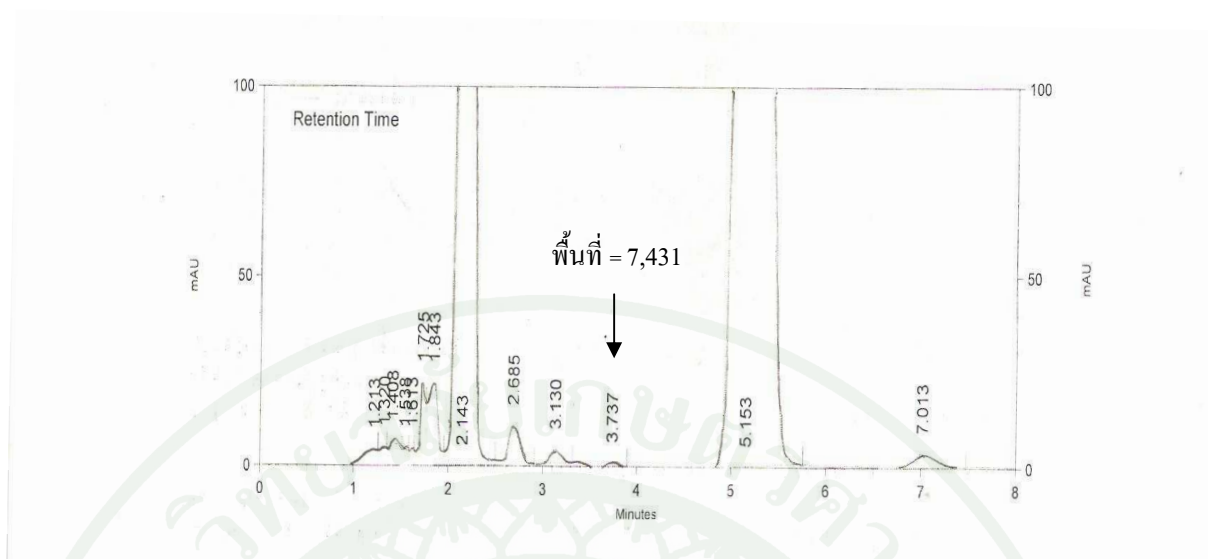
นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตแทนลงในสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์สบู์โดยน้ำหนัก} = \frac{0.1 \times \text{ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times 30.44}{\text{น้ำหนักกลีเซอรอล (กรัม)}}$$

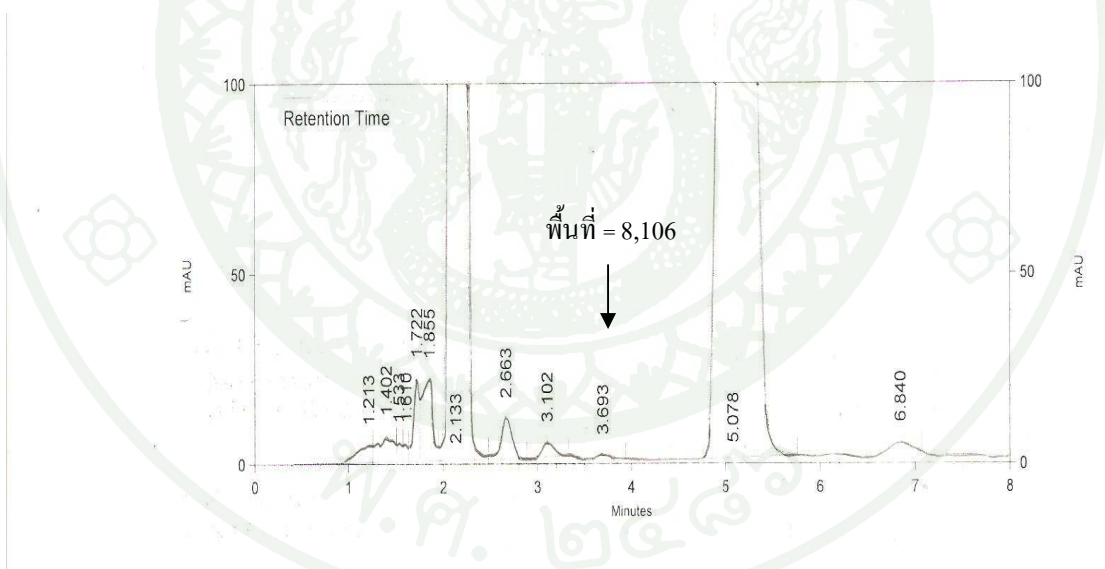


ภาคผนวก ง

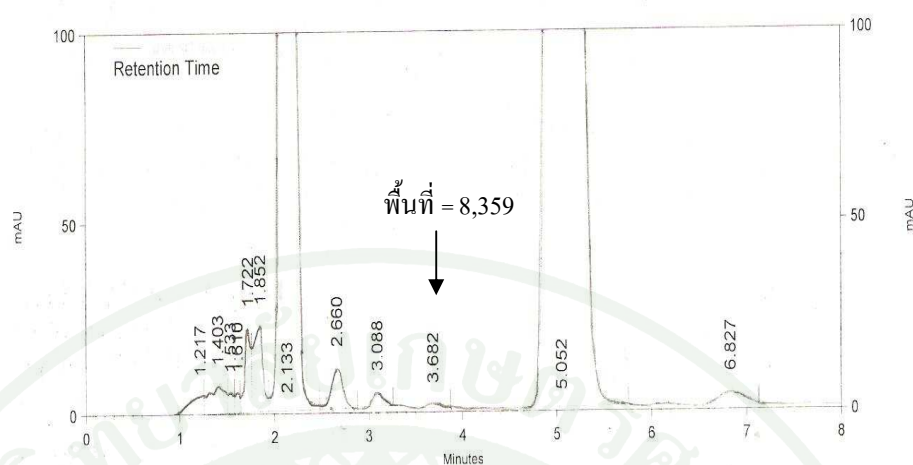
ลักษณะโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนด้วยเครื่อง
โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง



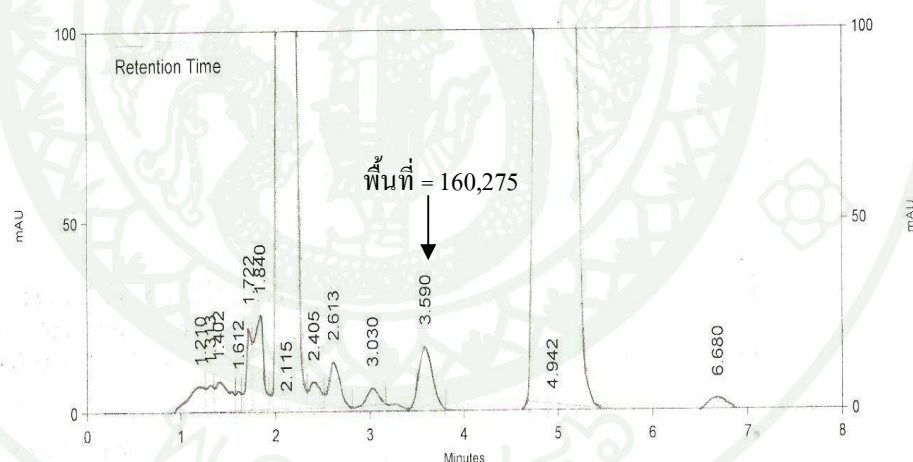
ภาพผนวกที่ ง1 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



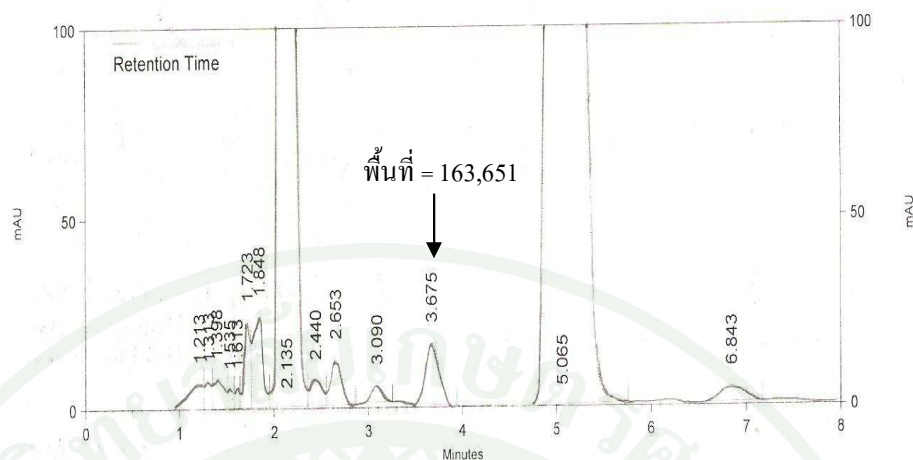
ภาพผนวกที่ ง2 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



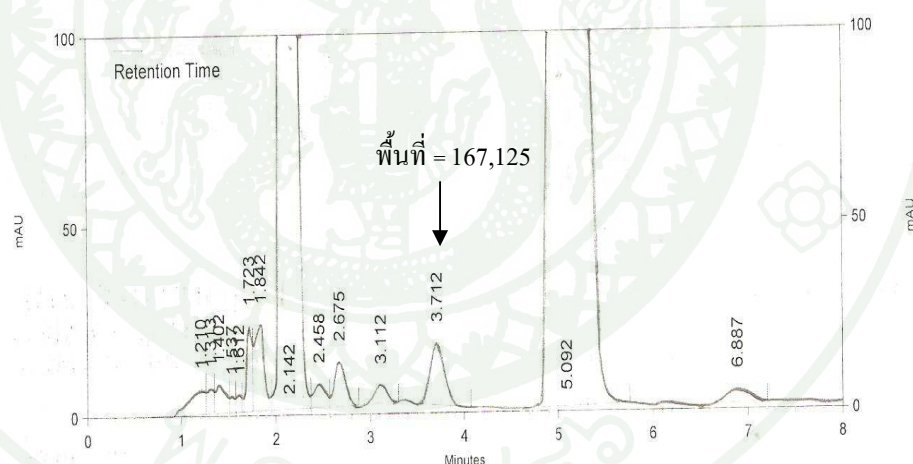
ภาพผนวกที่ ๓3 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



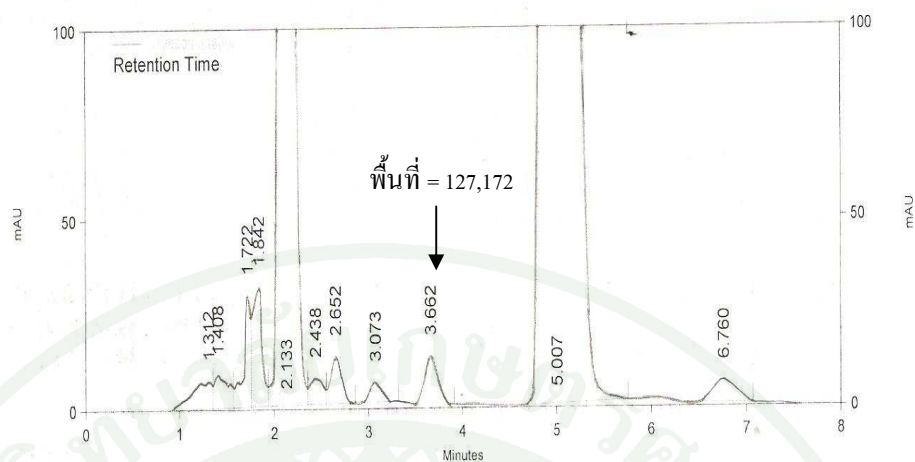
ภาพผนวกที่ ๓4 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



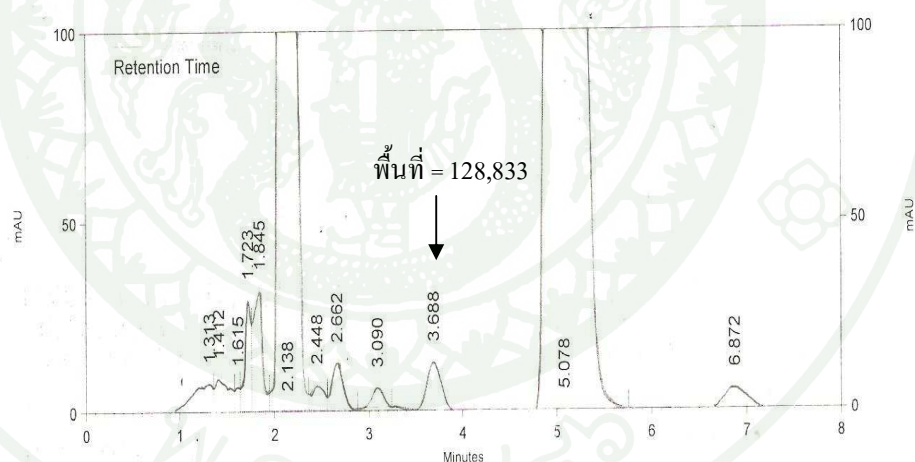
ภาพผนวกที่ ๖5 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



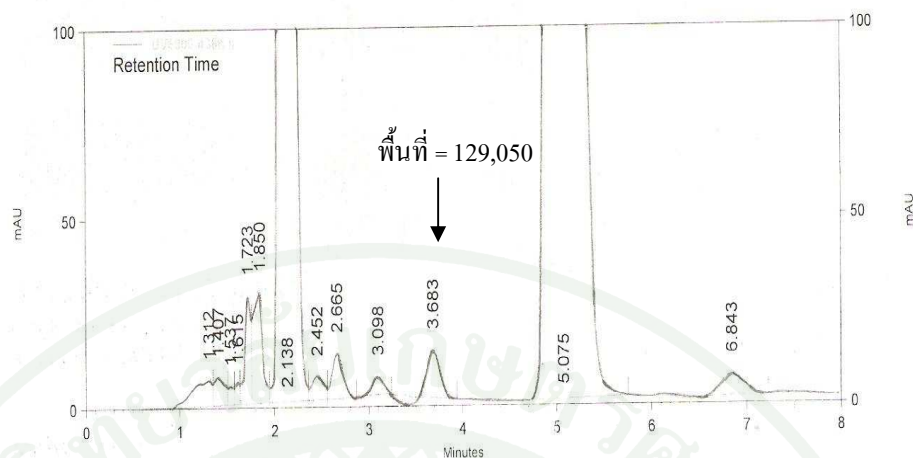
ภาพผนวกที่ ๖6 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



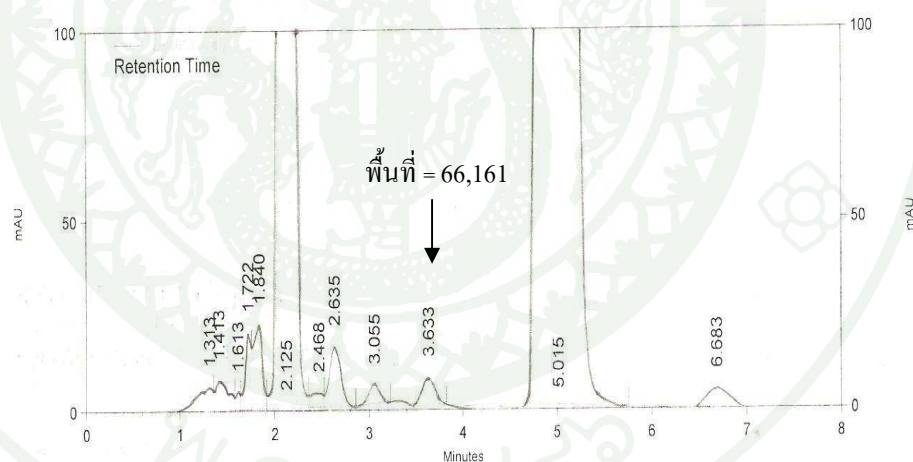
ภาพผนวกที่ ง7 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 1)



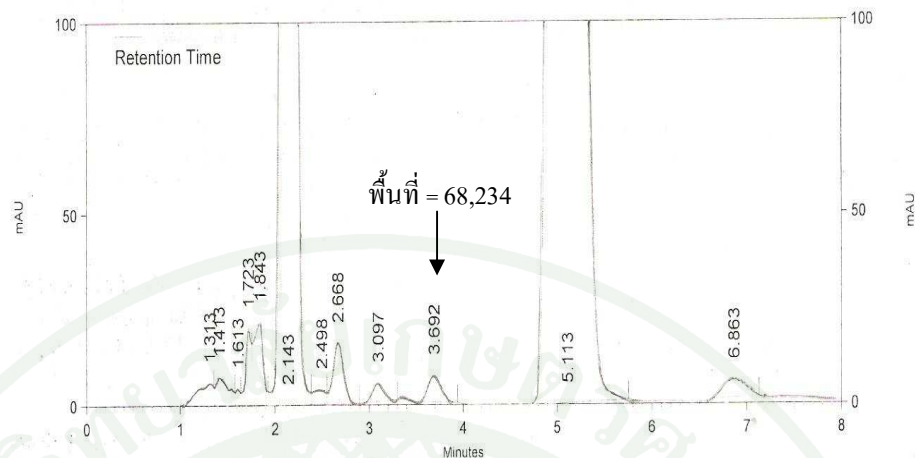
ภาพผนวกที่ ง8 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 2)



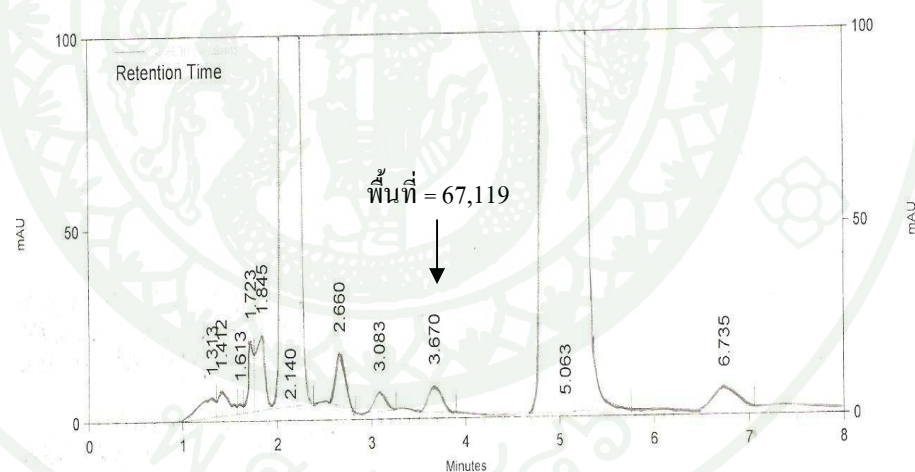
ภาพผนวกที่ 9 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนอละลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 3)



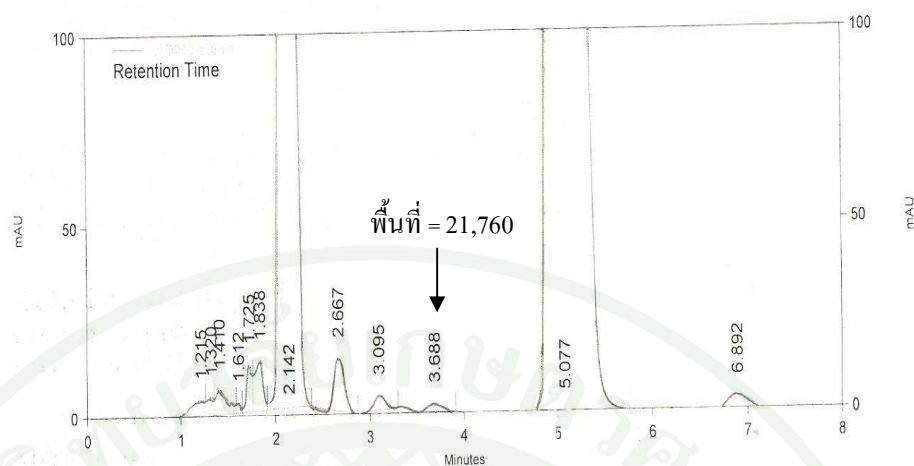
ภาพผนวกที่ 10 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนอละลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน(การทดลองซ้ำที่ 1)



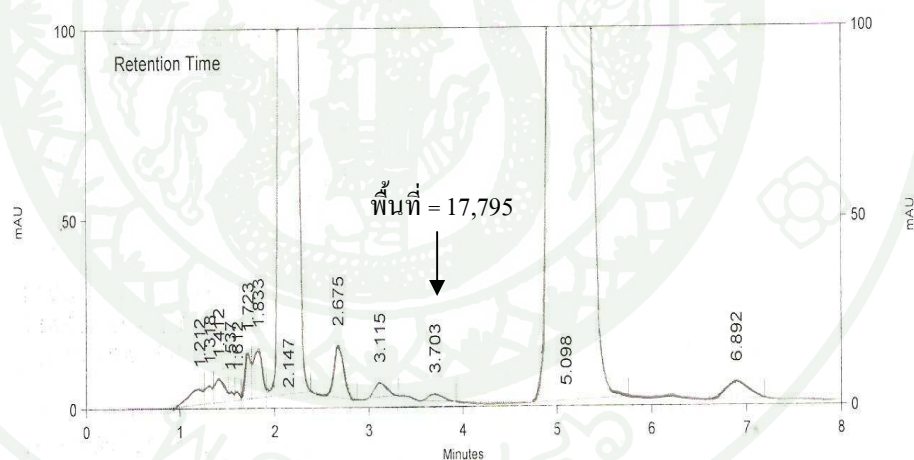
ภาพผนวกที่ 11 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



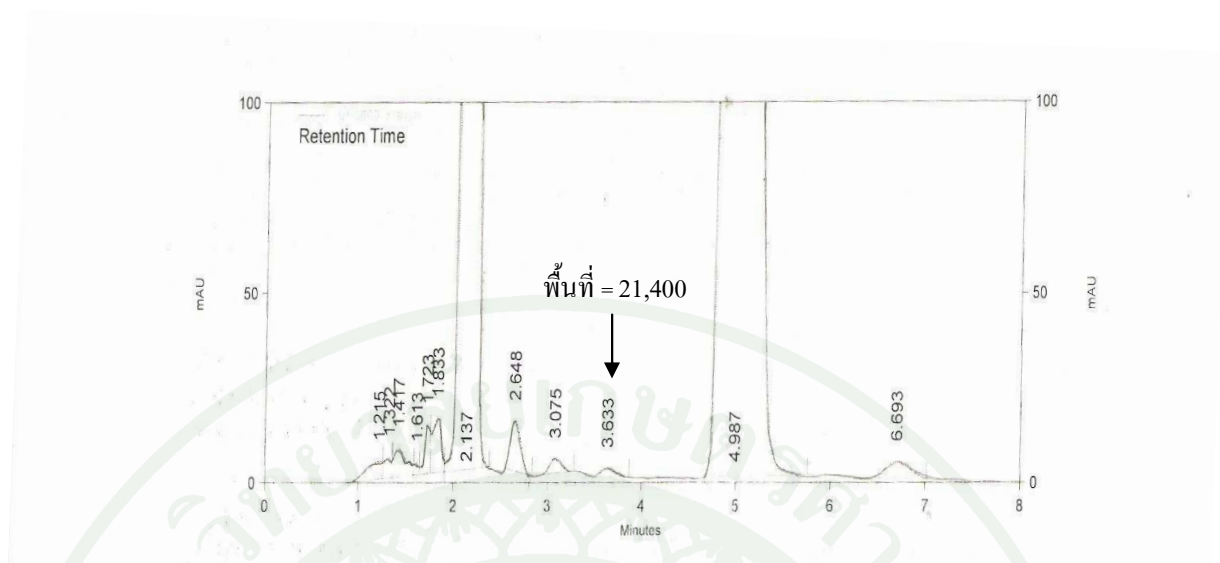
ภาพผนวกที่ 12 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์เกรดยูเอสพี ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



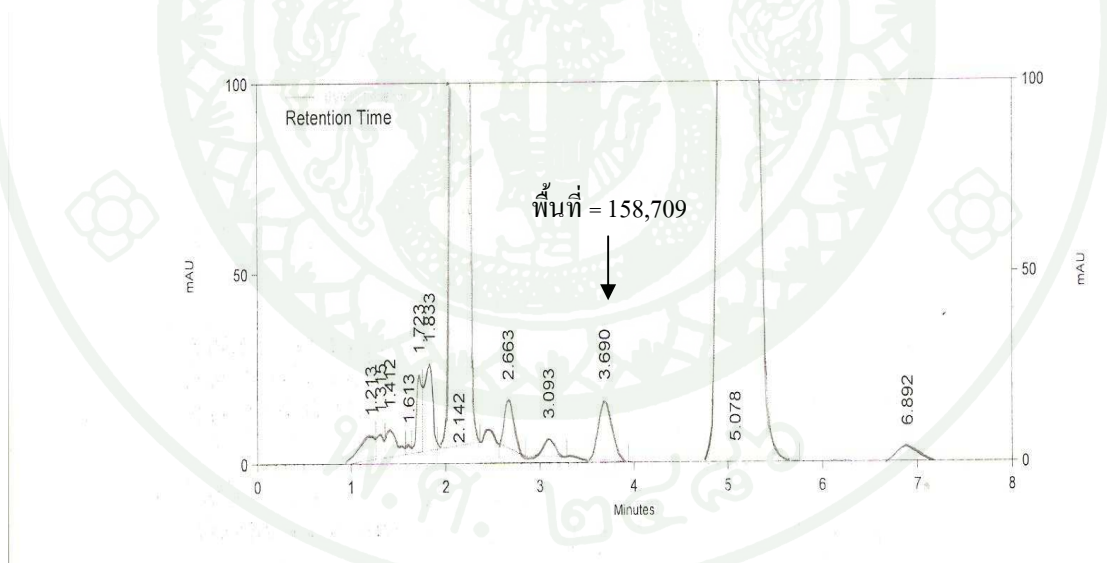
ภาพผนวกที่ 13 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



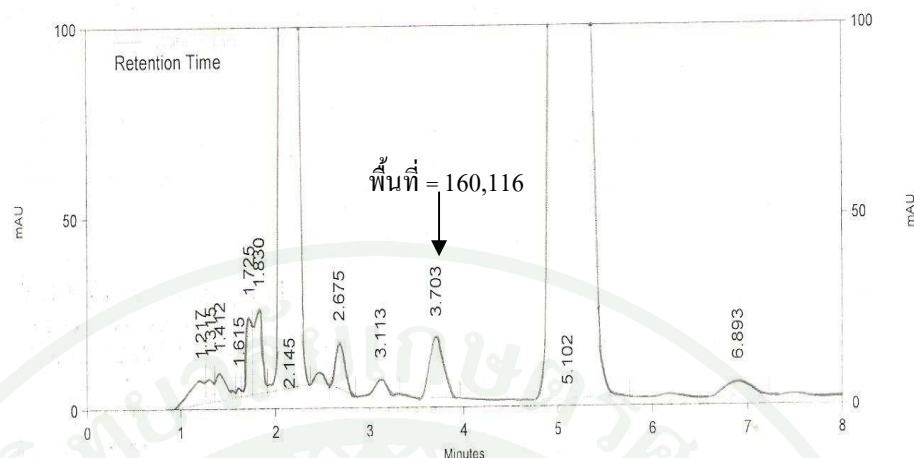
ภาพผนวกที่ 14 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



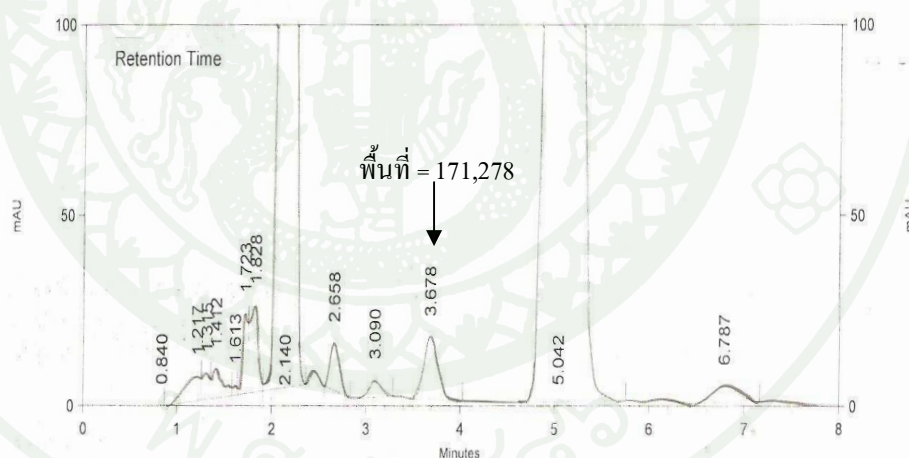
ภาพผนวกที่ 15 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



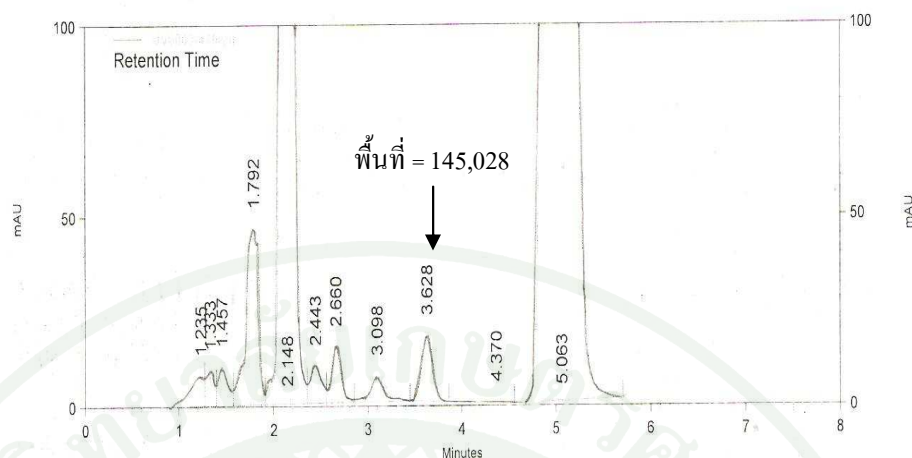
ภาพผนวกที่ 16 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



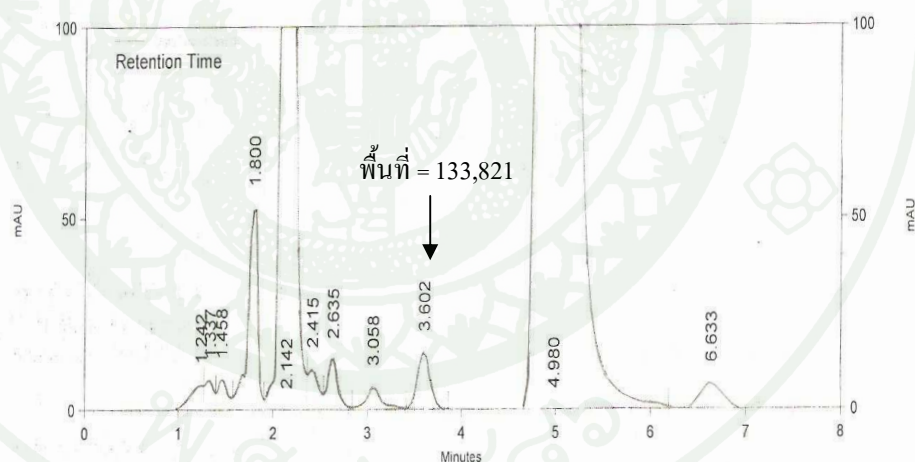
ภาพผนวกที่ 17 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



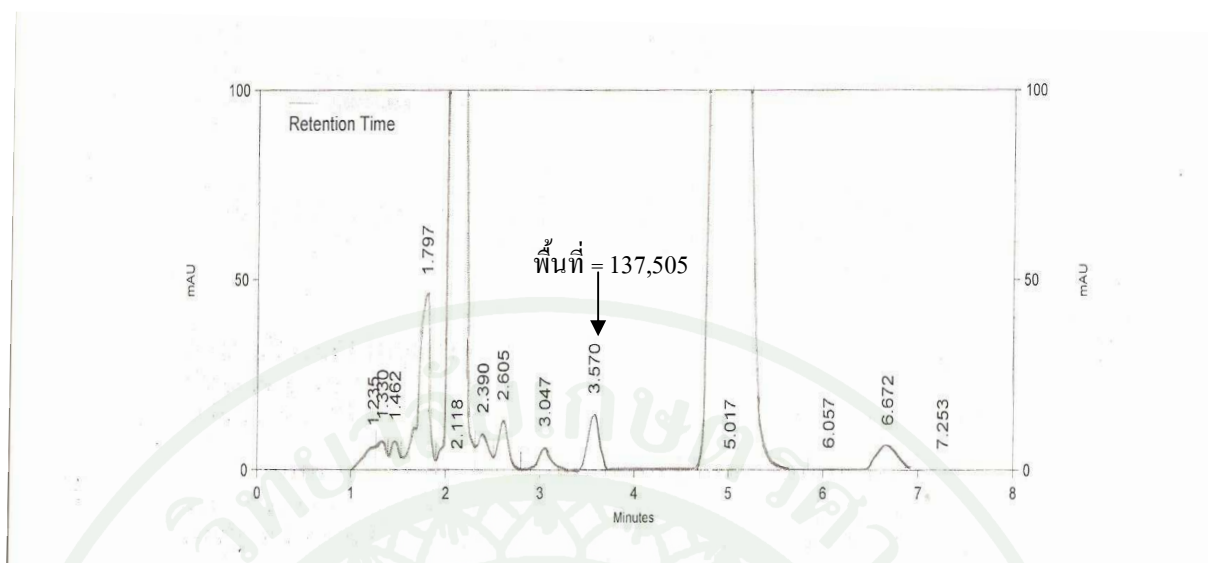
ภาพผนวกที่ 18 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



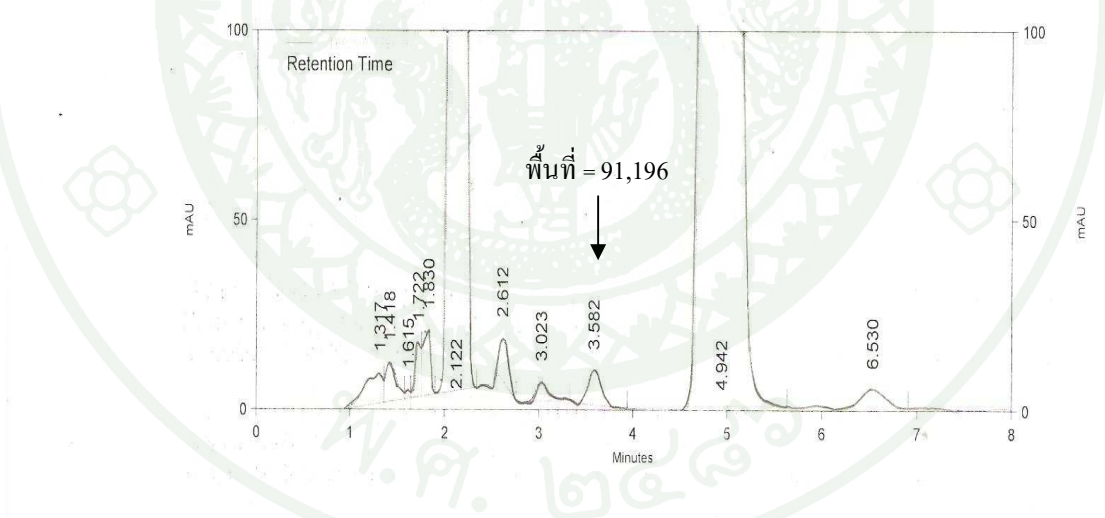
ภาพผนวกที่ 19 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



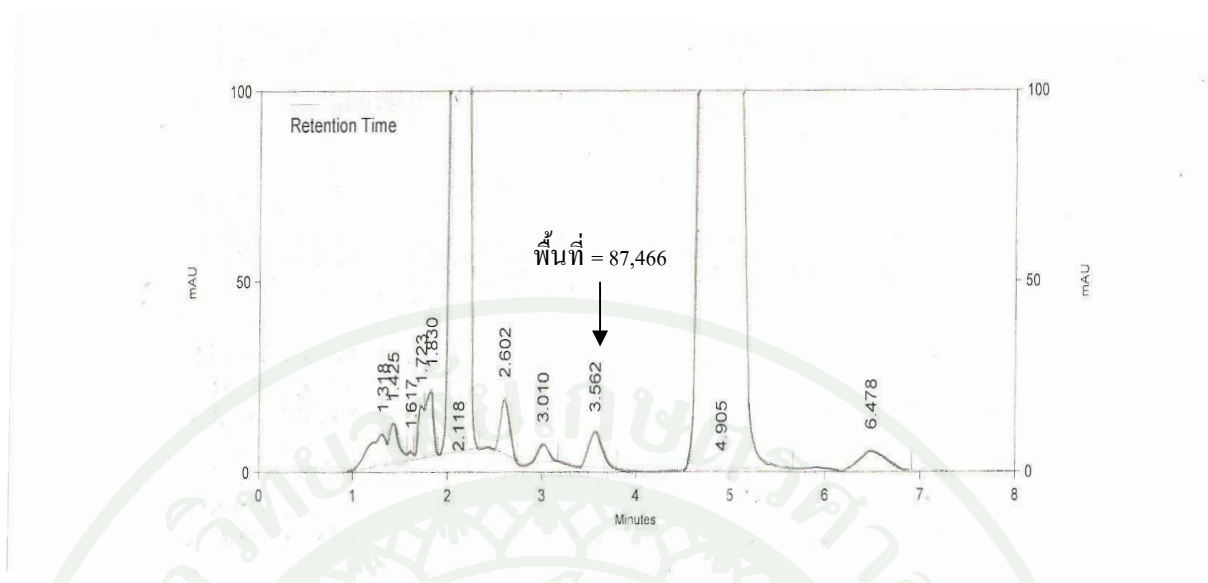
ภาพผนวกที่ 20 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



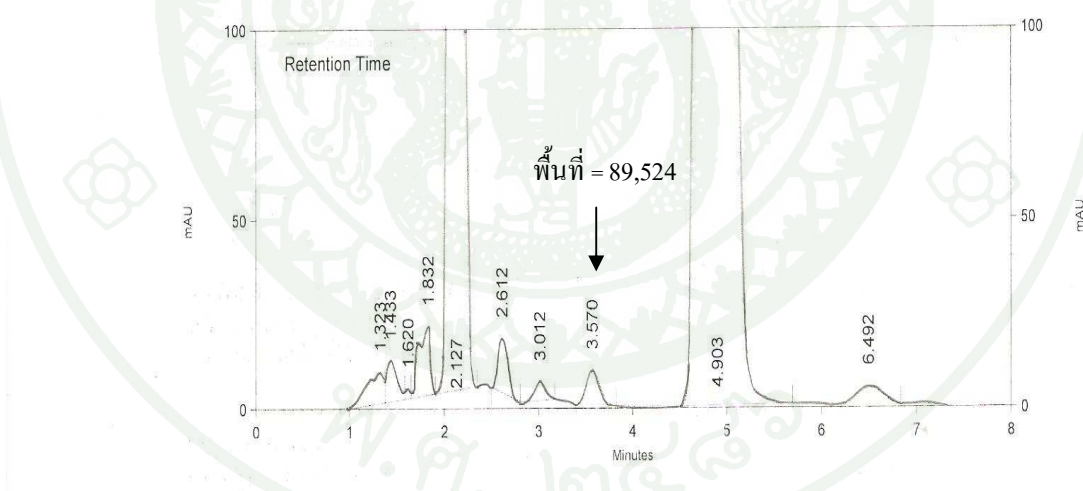
ภาพผนวกที่ ง21 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนใน น้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



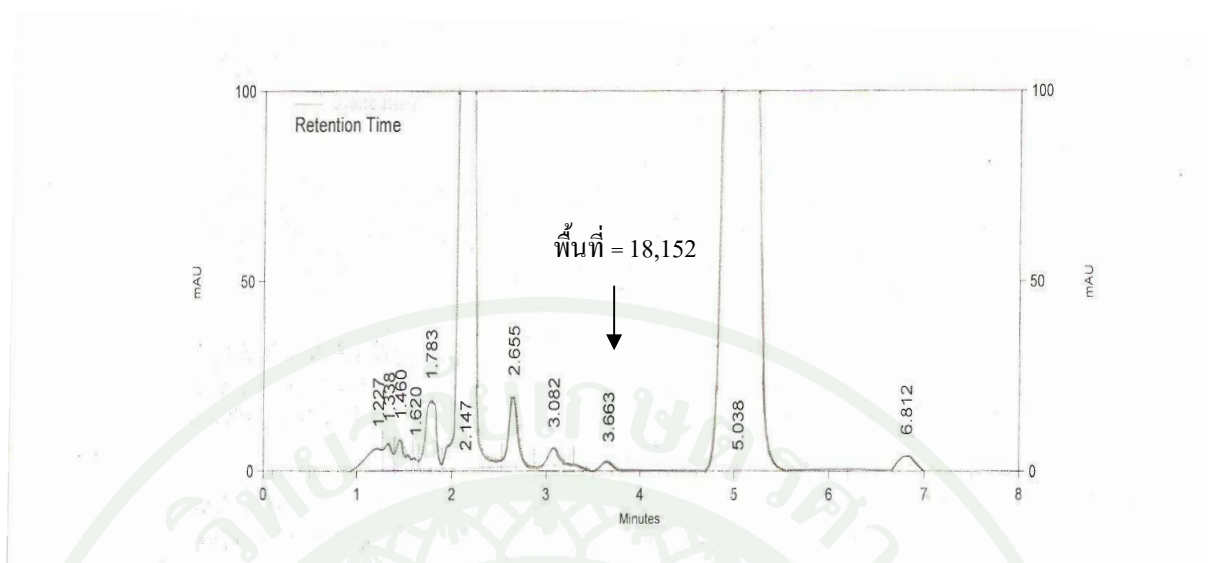
ภาพผนวกที่ ง22 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนใน น้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



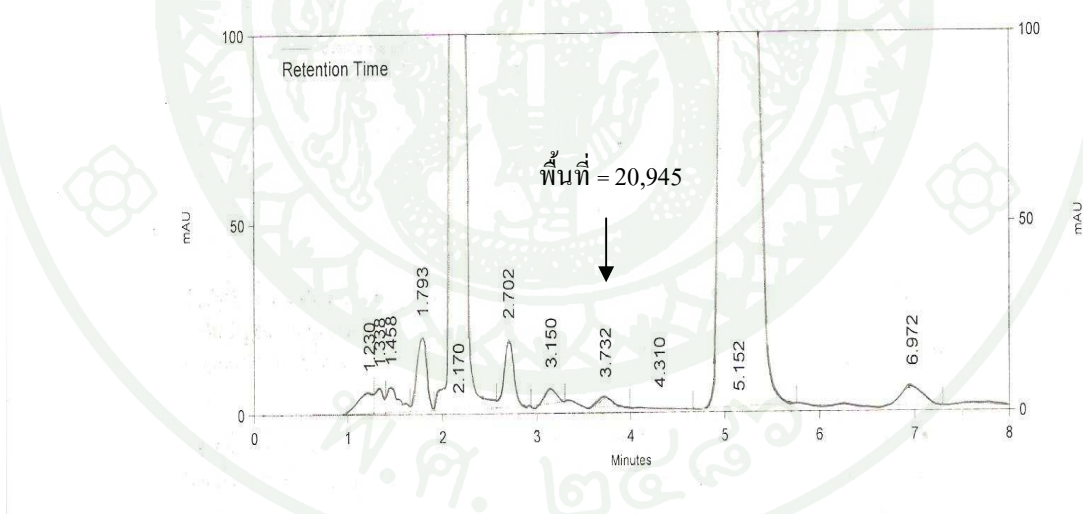
ภาพผนวกที่ ง23 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



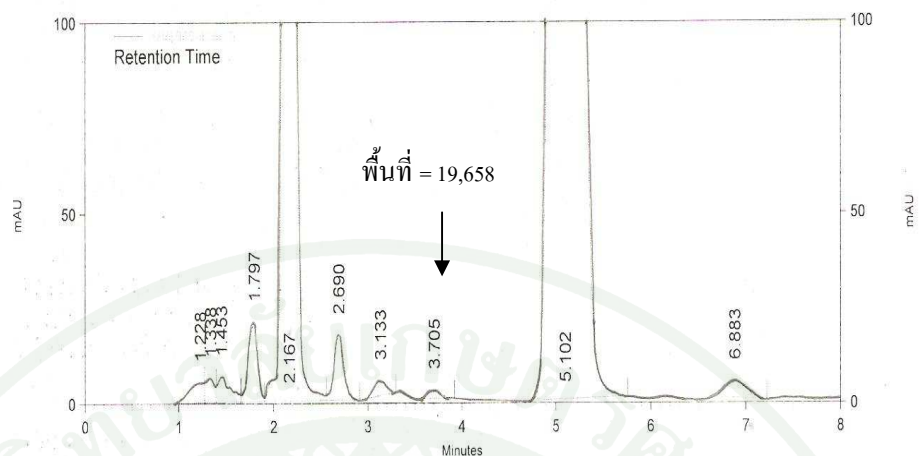
ภาพผนวกที่ ง24 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



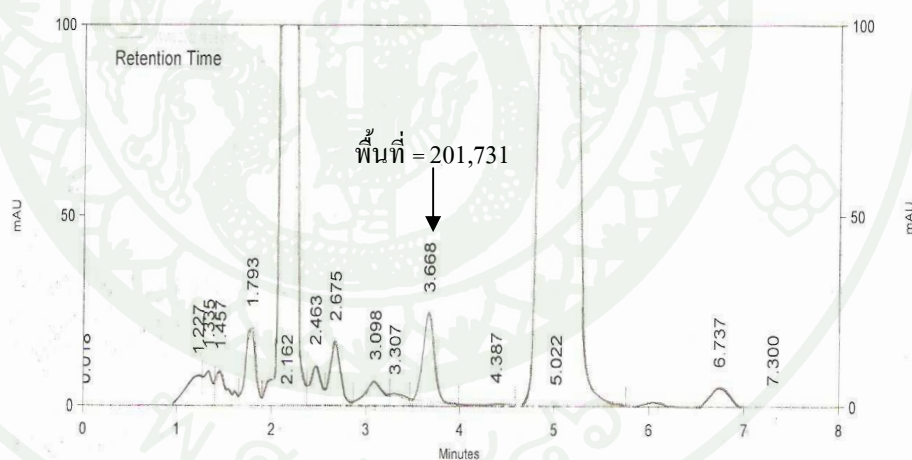
ภาพผนวกที่ 25 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



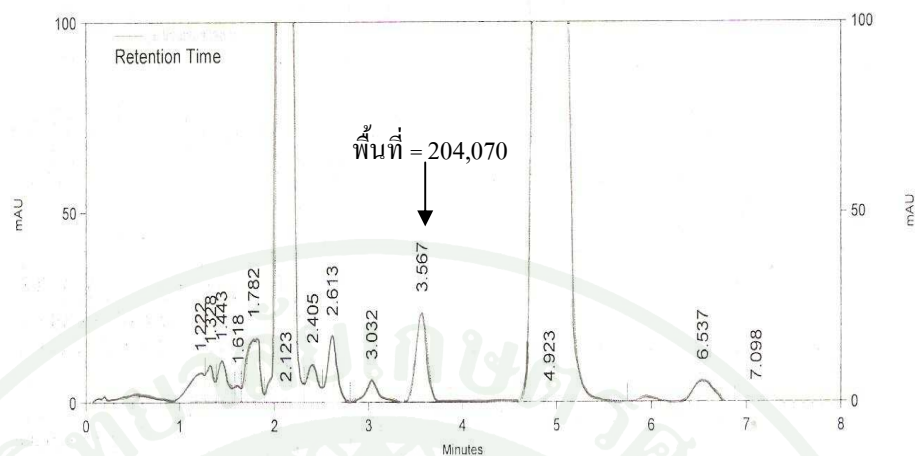
ภาพผนวกที่ 26 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



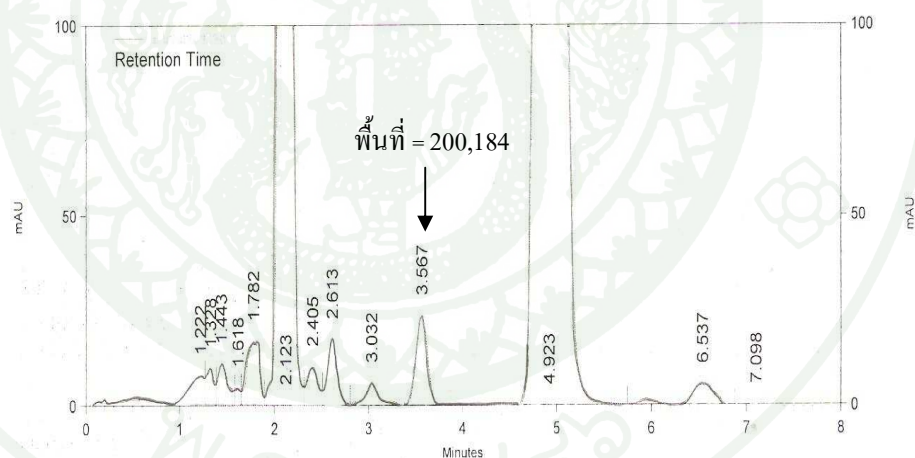
ภาพผนวกที่ 27 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



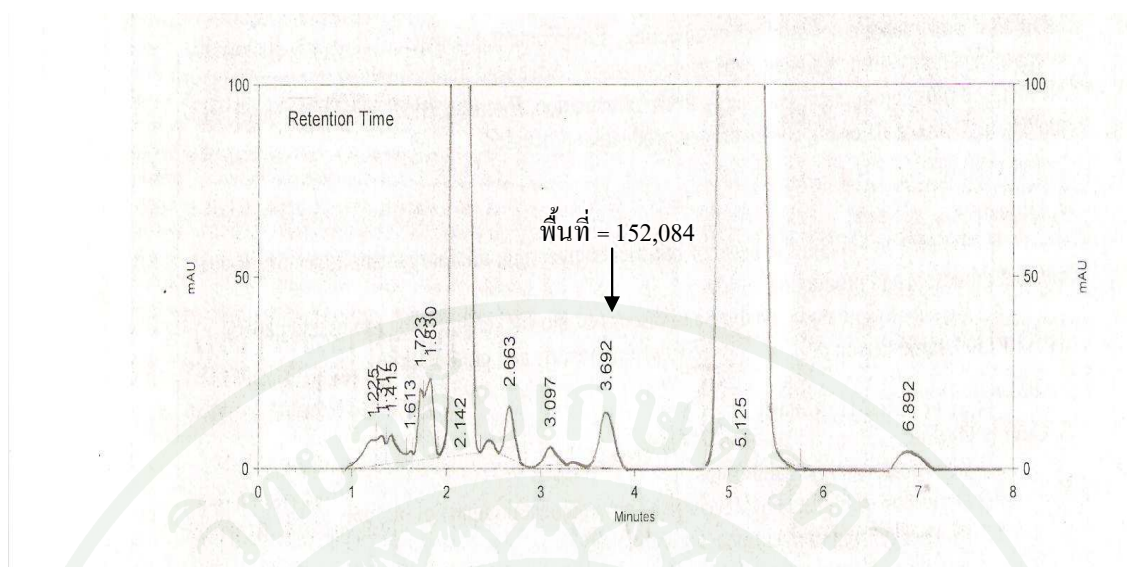
ภาพผนวกที่ 28 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



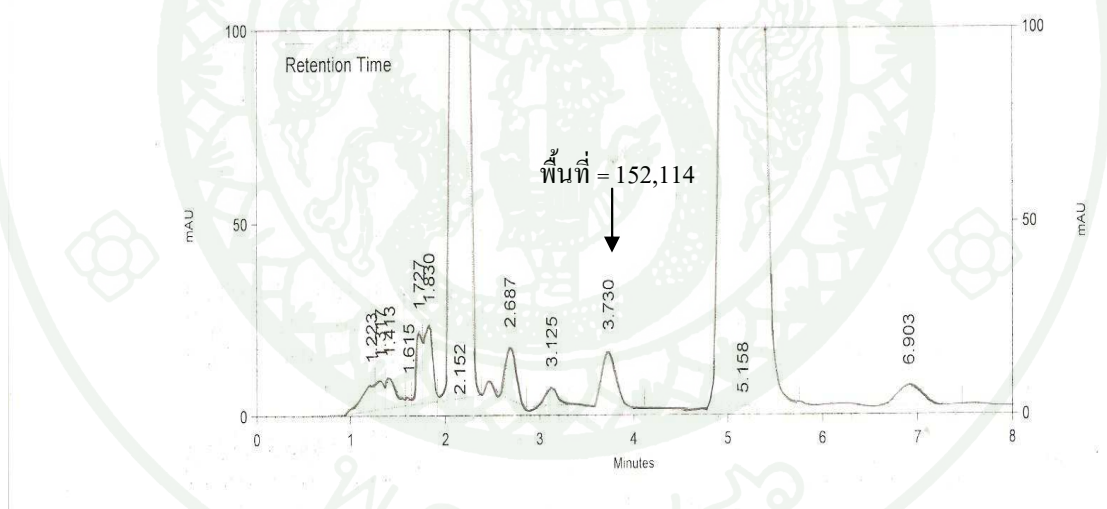
ภาพผนวกที่ 29 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



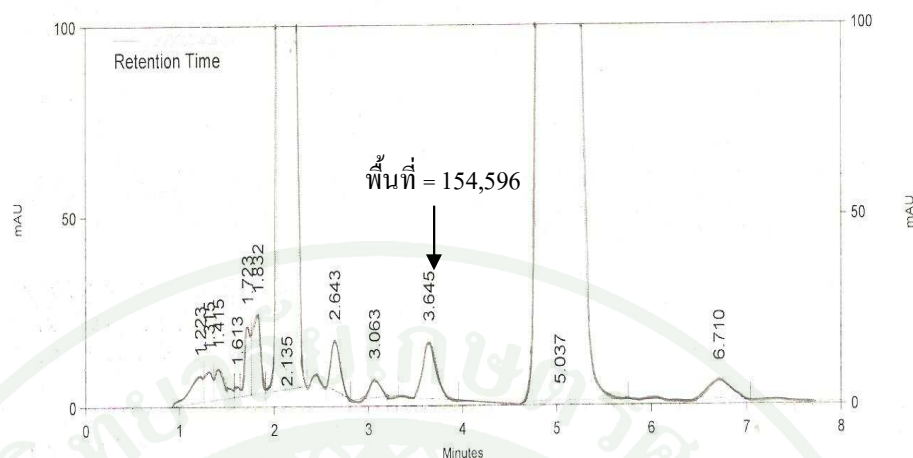
ภาพผนวกที่ 30 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



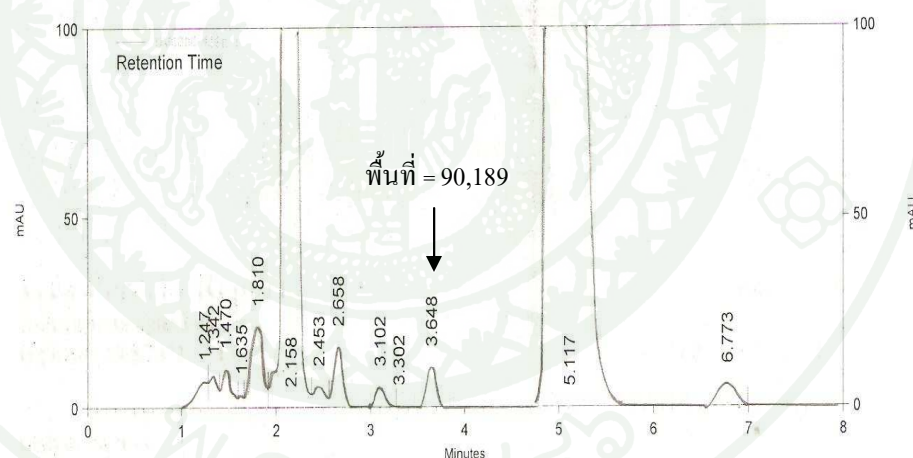
ภาพผนวกที่ 31 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



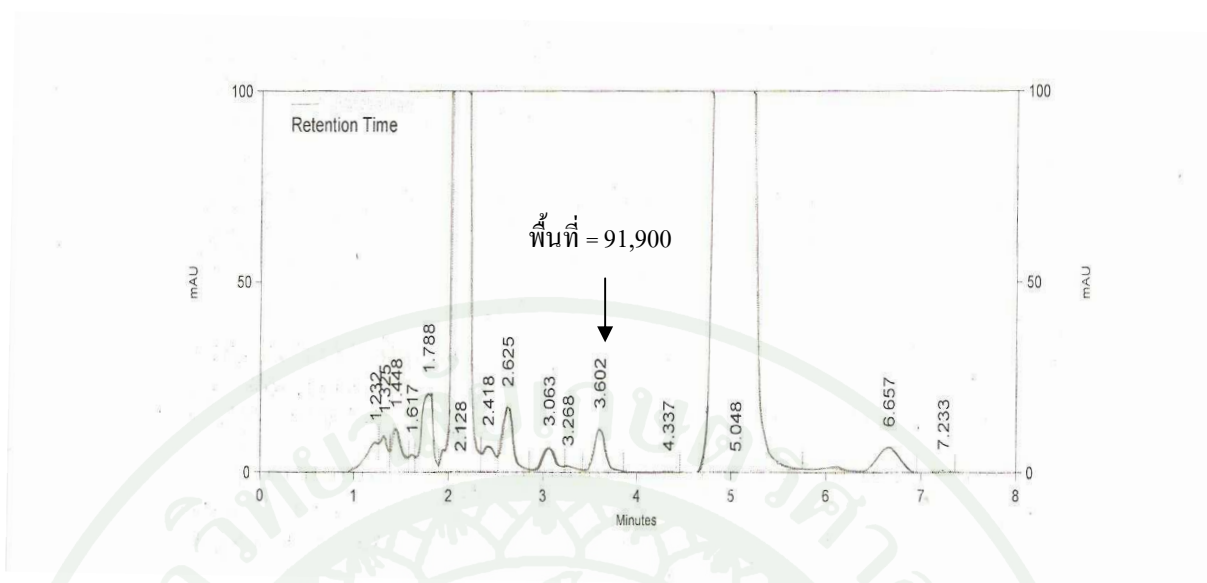
ภาพผนวกที่ 32 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



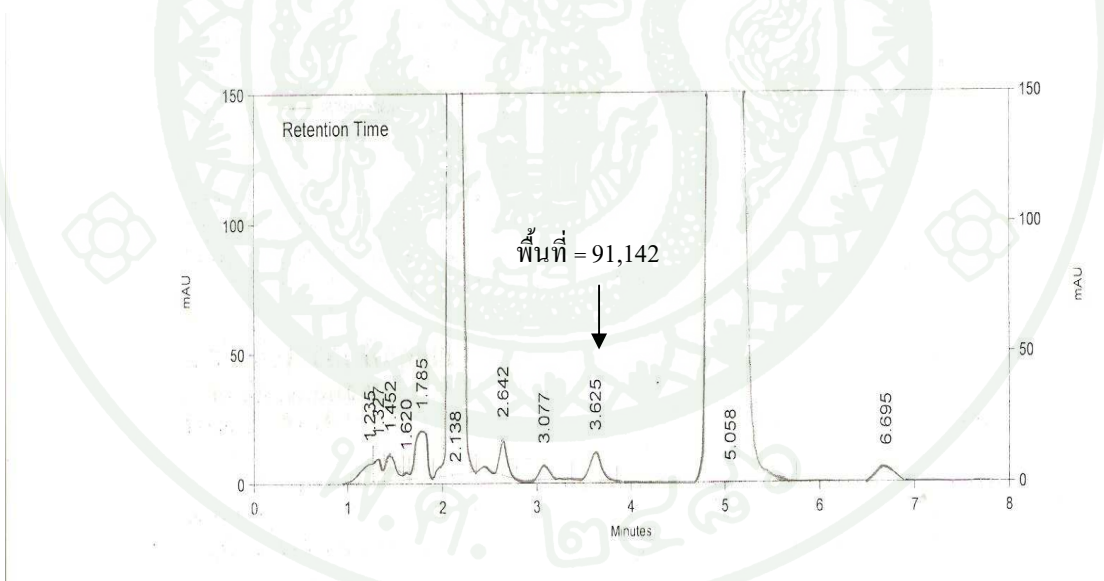
ภาพผนวกที่ ง33 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



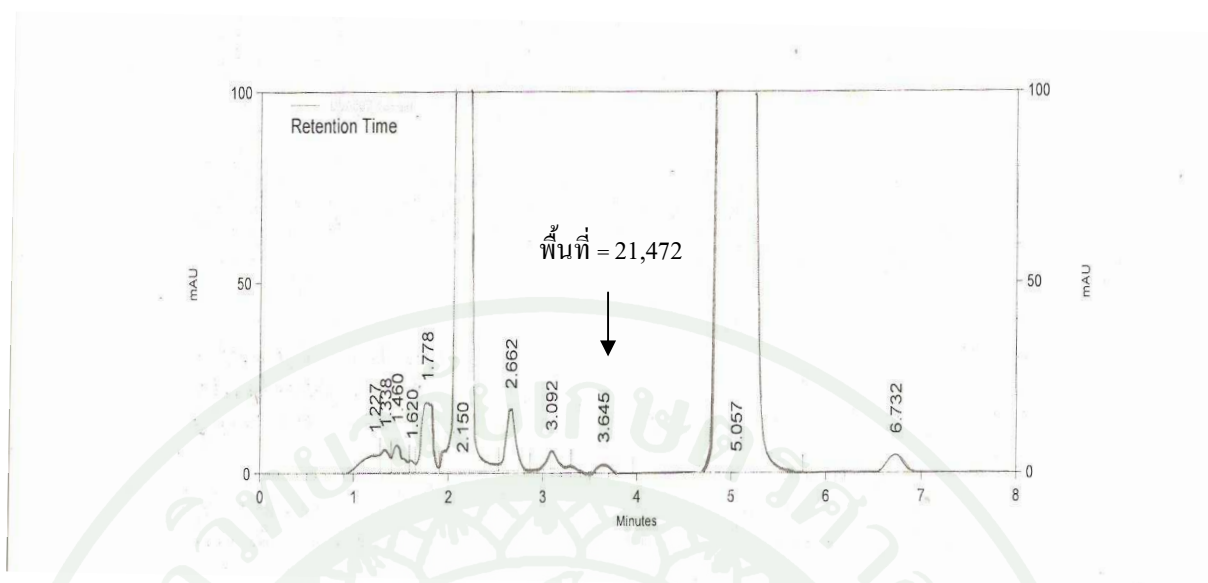
ภาพผนวกที่ ง34 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



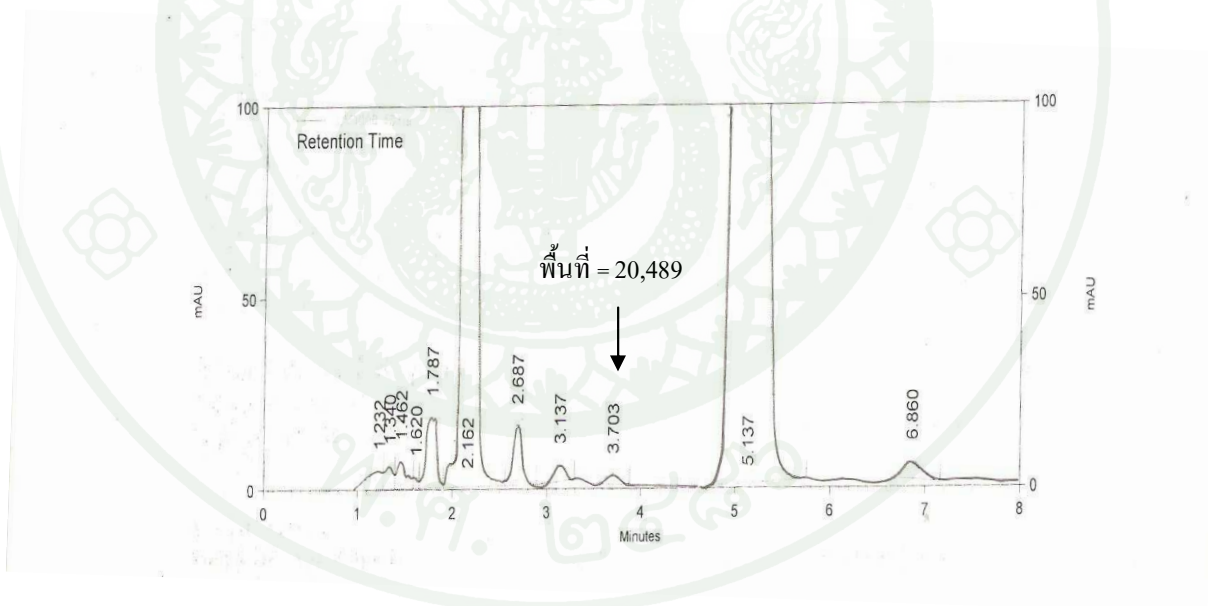
ภาพผนวกที่ ง35 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



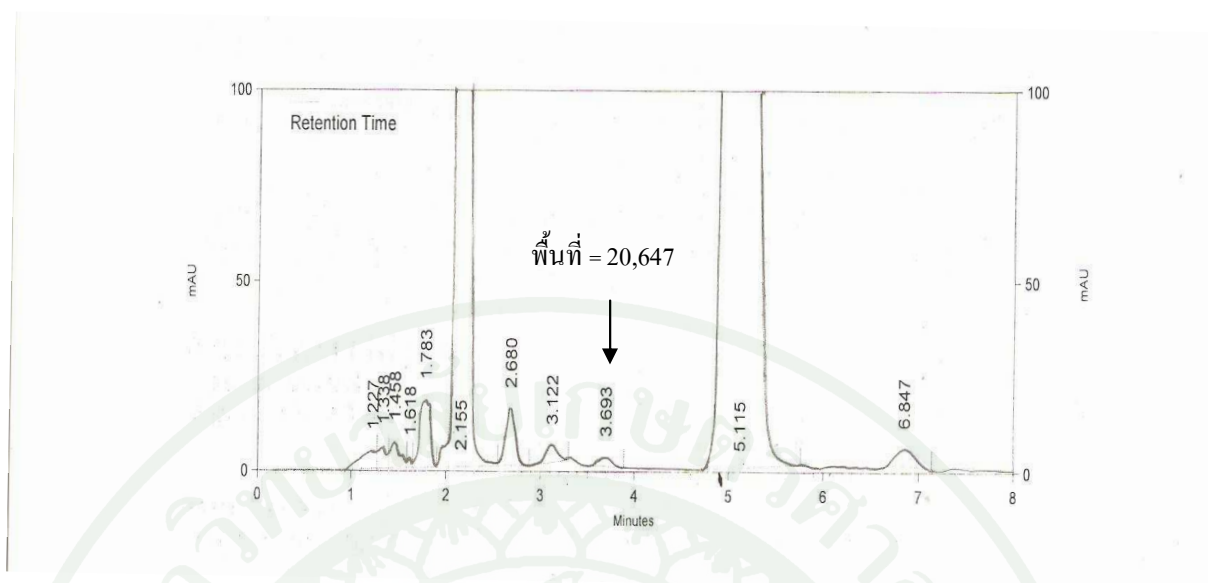
ภาพผนวกที่ ง36 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



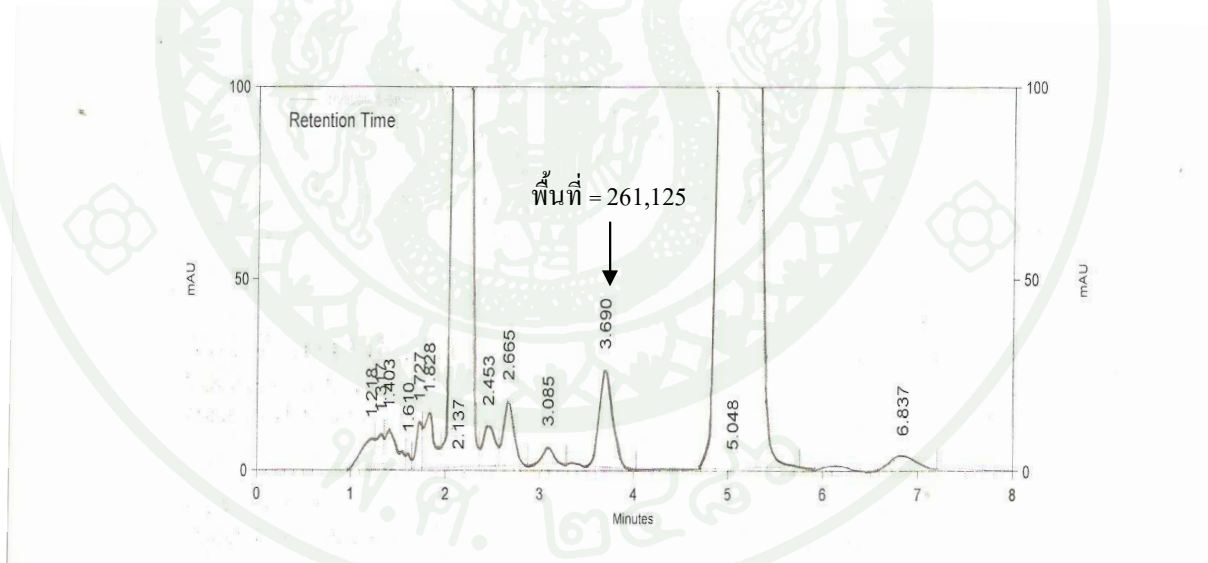
ภาพผนวกที่ 37 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซาลิไซลิกในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



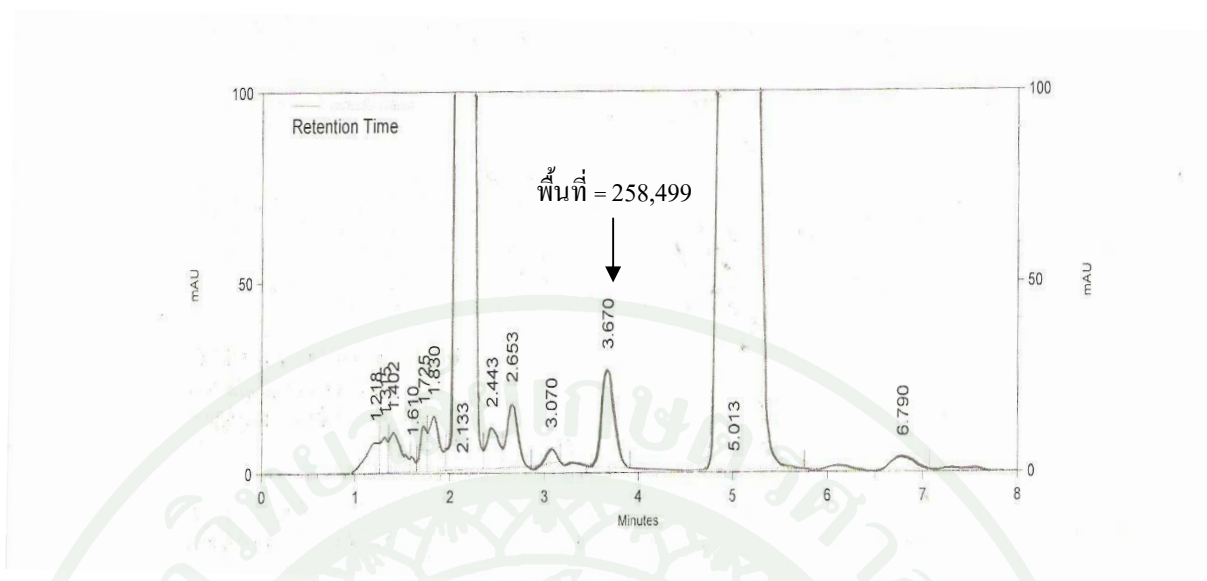
ภาพผนวกที่ 38 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซาลิไซลิกในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



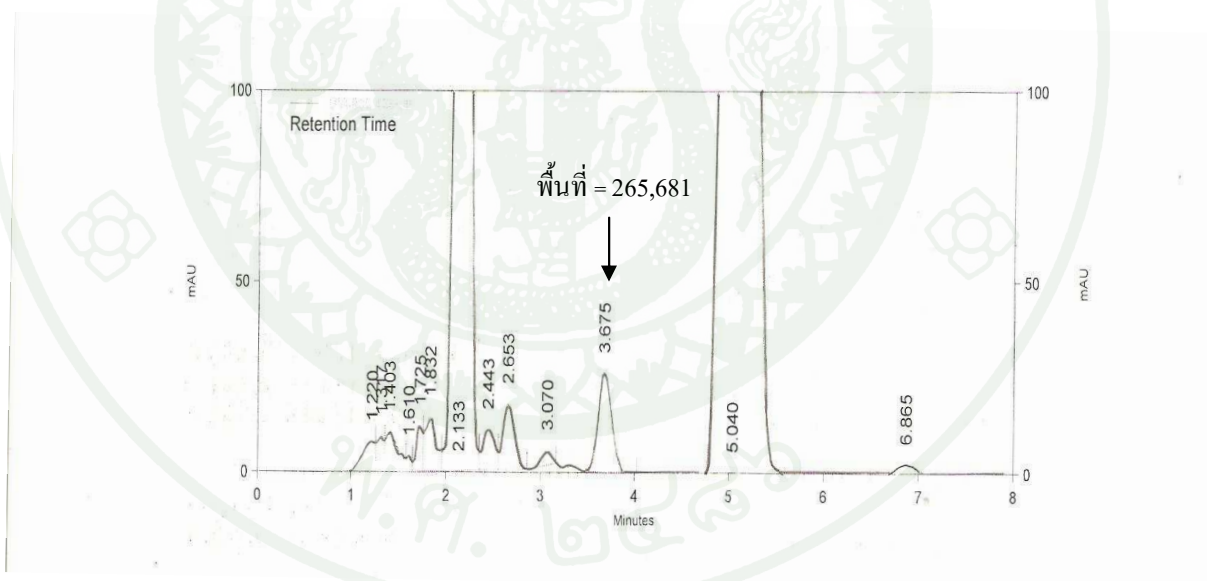
ภาพผนวกที่ 39 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



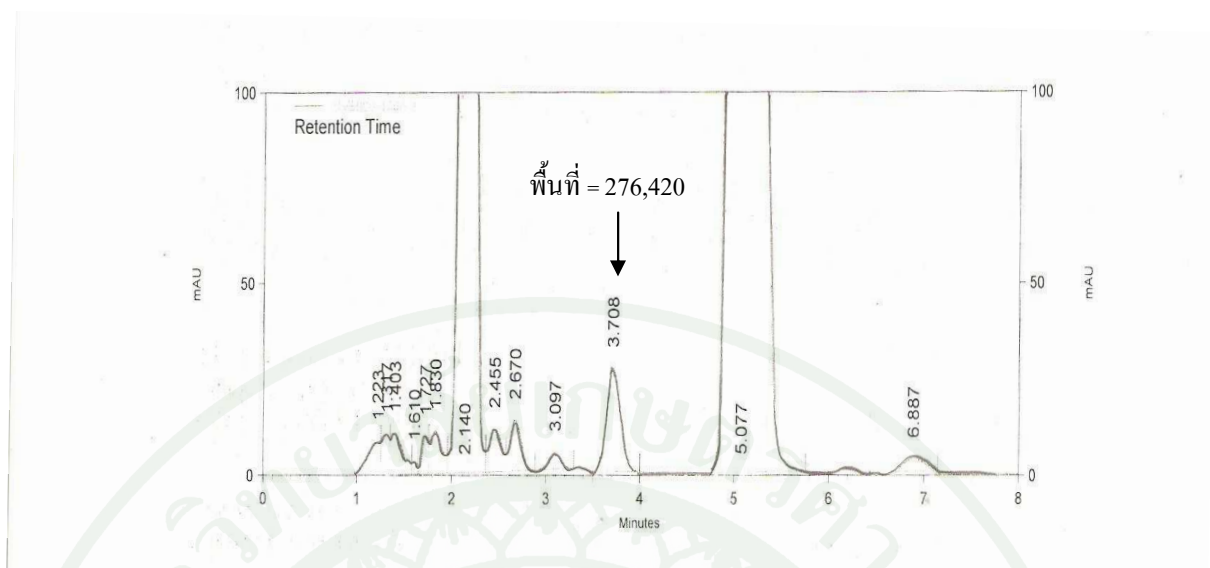
ภาพผนวกที่ 40 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



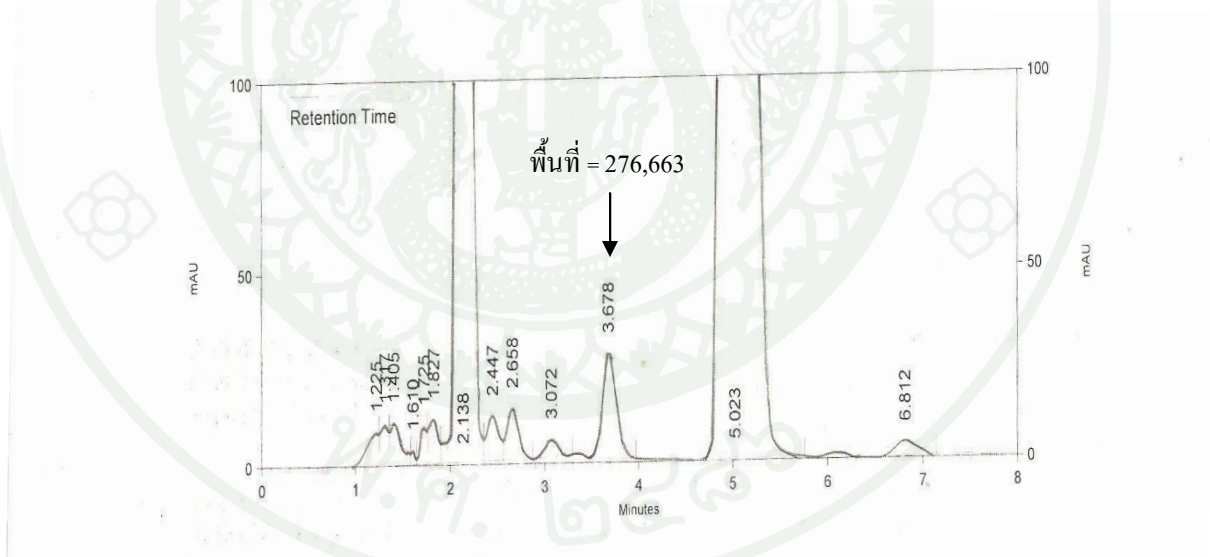
ภาพผนวกที่ ๔41 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



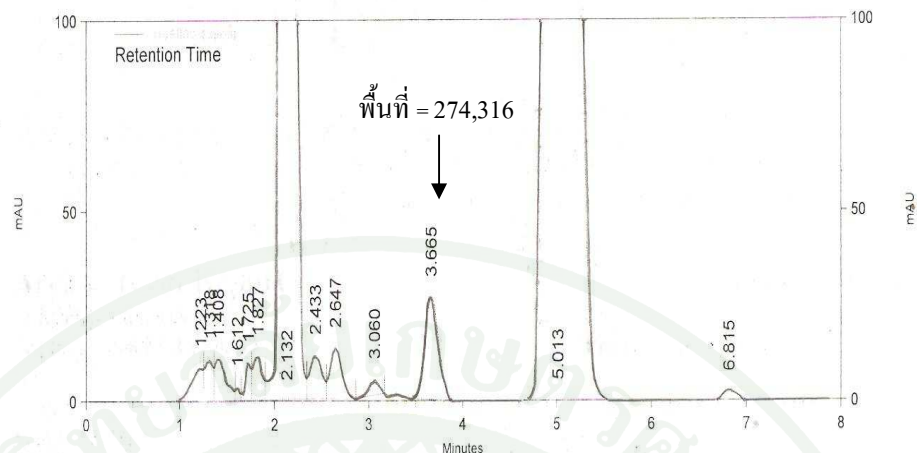
ภาพผนวกที่ ๔42 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



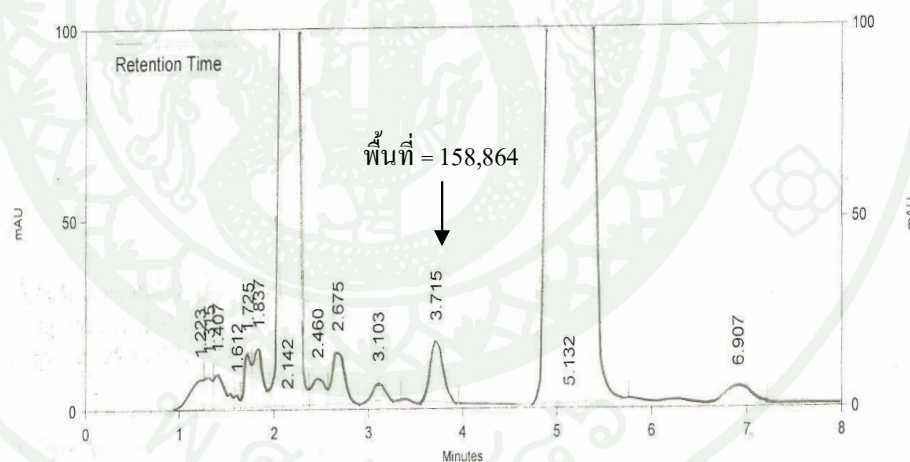
ภาพผนวกที่ 43 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



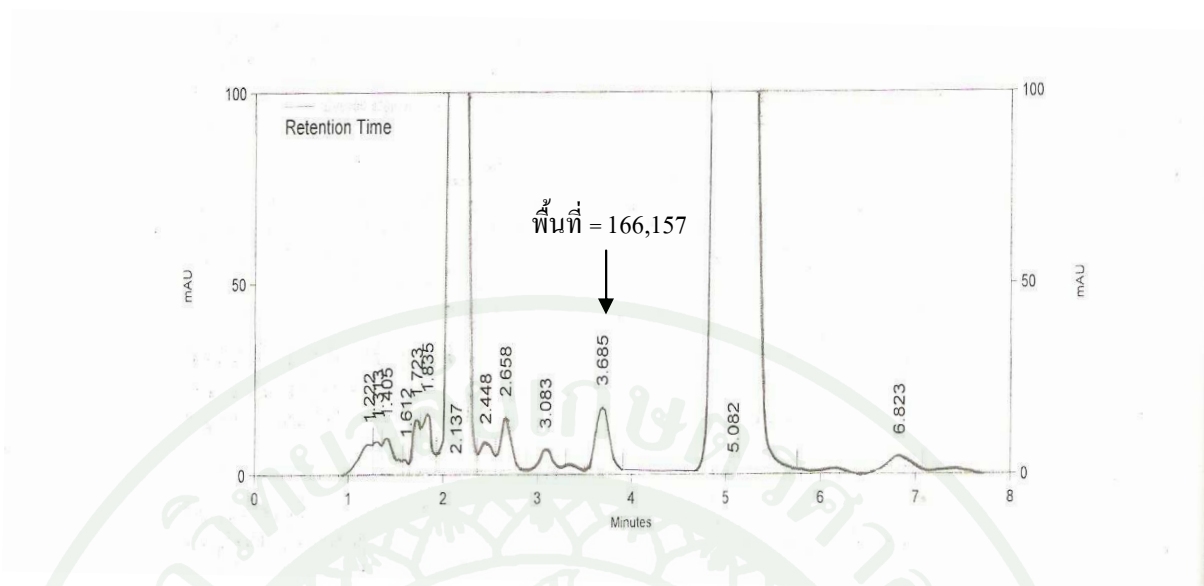
ภาพผนวกที่ 44 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



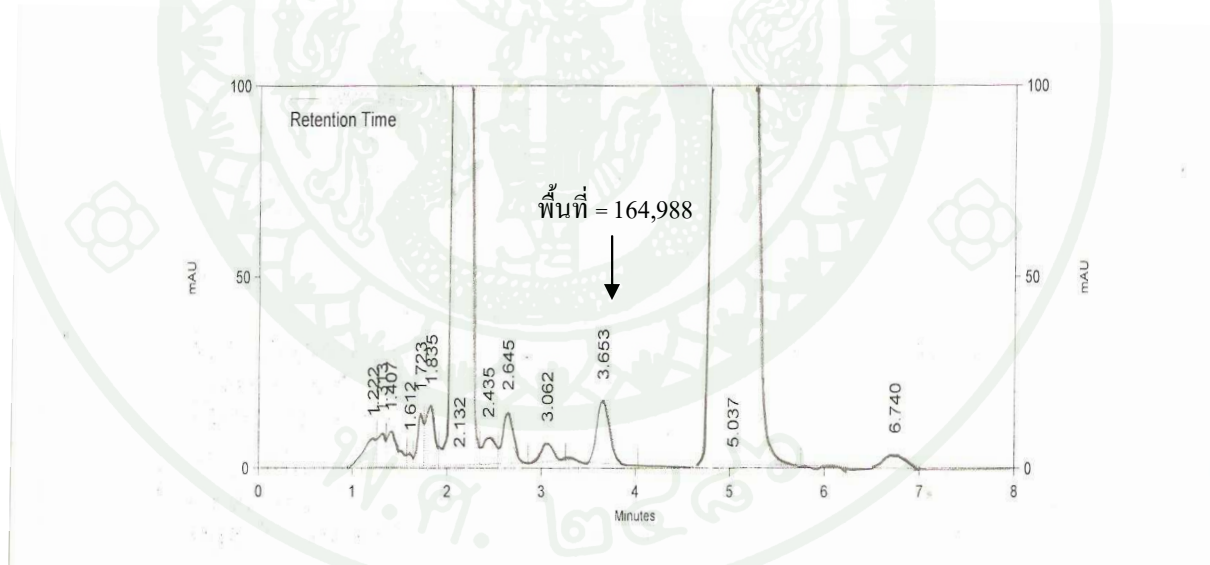
ภาพผนวกที่ 45 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



ภาพผนวกที่ 46 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 1)



ภาพผนวกที่ 47 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 2)



ภาพผนวกที่ 48 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนในน้ำเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ใช้กลีเซอรอลดิบ ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (การทดลองซ้ำที่ 3)



ตารางผนวกที่ จ1 ค่าการวิเคราะห์ปริมาณสบู่ในชั้นกลีเซอรอล

ค่าพีเอชของกลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์ปริมาณสบู่ในชั้นกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ค่าเฉลี่ย
พีเอช2	-	-	-	-
พีเอช3	-	-	-	-
พีเอช 4	0.3	0.3	0.3	0.3
พีเอช5	0.5	0.5	0.5	0.5
พีเอช6	0.9	0.8	0.8	0.8
กลีเซอรอลดิบ(พีเอช 12)	7.9	7.9	7.9	7.9

ตารางผนวกที่ จ2 ค่าการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าในชั้นกลีเซอรอล

ค่าพีเอชของกลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์ปริมาณเถ้าในชั้นกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ค่าเฉลี่ย
พีเอช2	2.54	2.53	2.58	2.55
พีเอช3	2.60	2.60	2.56	2.59
พีเอช 4	2.62	2.65	2.67	2.65
พีเอช5	2.72	2.83	2.77	2.77
พีเอช6	2.84	2.88	2.78	92.2
กลีเซอรอลดิบ(พีเอช 12)	3.86	3.94	3.91	3.90

ตารางผนวกที่ ๖3 ค่าการวิเคราะห์ค่าความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล

ค่าพีเอชของกลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์ปริมาณสบู่ในชั้นกลีเซอรอล (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			
	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	ซ้ำที่3	ค่าเฉลี่ย
พีเอช 2	91	91	91	91
พีเอช 3	91	92	91	91
พีเอช 4	86	85	87	86
พีเอช 5	84	84	84	84
พีเอช 6	82	81	81	81
กลีเซอรอลดิบ(พีเอช 12)	76	76	75	76

ตารางผนวกที่ จ4 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *E.coli* BI21 (DE3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี
กลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดของกลีเซอรอล (ความเข้มข้น กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	การทดลองครั้งที่1	การทดลองครั้งที่2	การทดลองครั้งที่3	เฉลี่ย
กลีเซอรอลบริสุทธิ์				
5	1.57	1.72	1.75	1.68
10	1.99	2.05	1.88	1.97
30	1.84	1.79	1.96	1.86
50	1.64	1.61	1.83	1.69
กลีเซอรอลฟิเชช 2				
5	1.67	1.82	1.60	1.70
10	1.90	2.13	1.99	2.01
30	1.96	1.99	1.86	1.94
50	1.74	1.73	1.85	1.77
กลีเซอรอลฟิเชช 3				
5	1.62	1.80	1.82	1.75
10	2.05	2.16	1.96	2.06
30	1.97	2.00	1.94	1.97
50	1.78	1.82	1.92	1.84
กลีเซอรอลฟิเชช 4				
5	1.71	1.81	1.77	1.76
10	2.04	2.01	2.22	2.09
30	1.91	1.99	2.14	2.01
50	1.72	1.91	1.93	1.85
กลีเซอรอลฟิเชช 5				
5	1.80	1.86	1.78	1.81
10	2.03	2.11	2.19	2.11
30	1.96	2.07	2.17	2.07
50	1.77	1.96	1.87	1.87

ตารางผนวกที่ ๔ (ต่อ)

ชนิดของกลีเซอรอล (ความเข้มข้น กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	การทดลองครั้งที่1	การทดลองครั้งที่2	การทดลองครั้งที่3	เฉลี่ย
กลีเซอรอลพีเอช 6				
5	1.89	1.88	1.71	1.83
10	2.05	2.11	2.23	2.13
30	2.07	2.15	2.15	1.12
50	1.88	2.00	1.94	1.94
กลีเซอรอลดิบ				
5	1.83	1.79	1.92	1.85
10	2.75	2.83	2.80	2.79
30	3.47	3.37	3.56	3.47
50	2.43	2.51	2.67	2.54

ตารางผนวกที่ ๑5 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน ที่ได้จาก การเพาะเลี้ยง *E.coli* B121 (DE3) ในอาหารที่มีกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

ชนิดของกลีเซอรอล	ปริมาณกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีน (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	(ความเข้มข้น กรัมต่อลิตร)	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3 เฉลี่ย
กลีเซอรอลบริสุทธิ์				
5		1.50	1.60	1.70
10		32.10	32.70	33.40
30		25.40	25.80	25.80
50		13.20	13.60	13.40
กลีเซอรอลพีเอช 3				
5		4.40	3.60	4.30
10		31.70	32.00	34.30
30		29.00	26.80	27.50
50		18.20	17.50	17.90
กลีเซอรอลพีเอช 5				
5		3.60	4.20	3.90
10		40.30	40.80	40.00
30		30.40	30.40	30.90
50		18.00	18.40	18.20
กลีเซอรอลดิบ				
5		4.30	4.10	4.10
10		52.20	51.70	53.10
30		55.30	55.30	54.90
50		31.80	33.20	33.00

ตารางผนวกที่ ๖6 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากเพาะเลี้ยงในอาหารที่ทำการแยกสบู่ออกเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้แยกสบู่ออก

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	การทดลองครั้งที่1	การทดลองครั้งที่2	การทดลองครั้งที่3	เฉลี่ย
อาหารที่มีสบู่ออก	2.78	2.89	2.85	2.84
อาหารที่ไม่ได้แยกสบู่ออก	1.99	1.92	2.01	1.97

ตารางผนวกที่ ๖7 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	การทดลองครั้งที่1	การทดลองครั้งที่2	การทดลองครั้งที่3	เฉลี่ย
0	2.03	1.96	2.03	2.01
0.5	2.04	2.09	2.17	2.10
1	2.12	2.13	2.08	2.11
5	2.14	2.19	2.26	2.20

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	ศุภชัย ฤกษ์เกษม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	21 เดือนเมษายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนเทพศิรินทร์ร่วมเกล้า ระดับอุดมศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2549
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์