บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ในปัจจุบันหลายๆ ประเทศได้มีการผลิตพลังงานทดแทนเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ สำหรับประเทศไทยนั้นรัฐบาลได้ตระหนักถึงความสำคัญของไบโอดีเซลเป็นอย่างดี โดยเมื่อวันที่ 18 มกราคม 2548 คณะรัฐมนตรีได้มีมติเห็นชอบยุทธศาสตร์การพัฒนาและส่งเสริมการใช้ไบโอดีเซลจากปาล์ม และเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2548 มีมติเห็นชอบแผนปฏิบัติการพัฒนาและส่งเสริมการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันดีเซลร้อยละ 10 ปี 2555 หรือ 805 ล้านลิตร/วัน ส่งเสริมการใช้วัตถุดิบทั้งน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชใช้แล้วรวมถึงน้ำมันสบู่ดำ และส่งเสริมการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลผสมน้ำมันดีเซล สัดส่วน 5% (B5) ในบางพื้นที่ตั้งแต่ปี 2548 (กระทรวงพลังงาน, 2550)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่นิยมใช้กันอยู่ปัจจุบันคือ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยด่าง โดยเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์โดยมีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (ไบโอดีเซล) และกลีเซอรอล ในการผลิตไบโอดีเซล 100 กิโลกรัม จะมีกลีเซอรอลเกิดขึ้นเสมอประมาณ 10 กิโลกรัม (The National Biodiesel Board, 2007) การขายกลีเซอรอลที่ทำให้มีความบริสุทธิ์ 80% ช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลลดลงถึง 6% (Hass et al. 2006) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับราคาที่ขายด้วย หากต้องการขายราคาสูงขึ้นจะต้องทำให้บริสุทธิ์ถึง 99% ซึ่งก็ทำให้ต้นทุนในการแยกให้ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์นั้นสูงขึ้นตามไปด้วย ยิ่งถ้าเป็นโรงงานผลิตไบโอดีเซลขนาดเล็กแล้วโอกาสที่จะทำให้ได้กลีเซอรอล บริสุทธิ์นั้นแทบจะไม่คุ้มทุน ประกอบกับการเติบโตอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลทำให้มีการผลิตกลีเซอรอลออกมาจำนวนมาก ส่งผลให้ราคาขายของกลีเซอรอลลดลงประมาณ 10 เท่าในรอบ 2 ปีที่ผ่านมา (Yazdani and Gonzalez, 2007) แม้จะเป็นโรงงานขนาดใหญ่ที่มีศักยภาพในการแยกกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์ ก็ประสบปัญหาด้านราคาของกลีเซอรอลที่ต่ำมาก จนอาจจะเรียกได้ว่าเป็นของเสีย (waste) ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล หากจะทิ้งเป็นของเสียก็เป็นมลภาวะกับสิ่งแวดล้อม ถ้าจะกำจัดก็ต้องมีค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัด ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นเร่งด่วนในพัฒนากระบวนการเพื่อ "เพิ่มมูลค่า" ให้กับผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนี้ ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดหรือการทำให้บริสุทธิ์ และหากเทคโนโลยีดังกล่าวสามารถรวมเข้ากับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ก็จะยิ่งช่วยให้ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลลดลงอีกด้วย ซึ่งพบว่ากลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำมาใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) โดยอาศัย

เชื้อจุลินทรีย์ (Santa Anna et al. 2002) ผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลนอกจากมีกลีเซอรอลแล้ว ยังมีกรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันปนอยู่ด้วย ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อการเติบโตและการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เช่น Rhamnolipids จาก *Psuedomonas aeruginosa* Surfactin จาก *Bacillus subtilis* และ Sophorolipids จาก *Candida bombicola* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีข้อดีเหนือกว่าสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยาเคมี คือ มีความเสถียรแม้อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นเกลือสูงหรือต่ำมากๆ ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากศักยภาพในการใช้งานได้หลากหลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร (Nitschke and Costa, 2007) การแพทย์ (Rodrigues et al. 2006; Singh and Cameotra, 2004) และอุตสาหกรรมน้ำมัน (Mulligan, 2005) ทำให้การผลิตเชิงอุตสาหกรรมได้รับความสนใจมากขึ้น แต่ข้อจำกัดอย่างหนึ่งที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังไม่สามารถผลิตขึ้นมาแข่งขันกับสารลดแรงตึงผิวที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีได้ เนื่องจากผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำและต้นทุนการผลิตยังสูงอยู่ ซึ่งเกิดจากราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาแพง ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้คือ การเลือกใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้มีผลได้ (yield) และอัตราการผลิต (productivity) สูงขึ้น (Mukherjee et al. 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ผลพลอยได้ราคาถูกจากการผลิตไบโอดีเซลมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการที่เหมาะสมเพื่อให้มีผลได้และผลผลิตสูงขึ้น รวมทั้งเป็นการจัดการกลีเซอรอลอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดย *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781
2. ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) และแบบครั้งคราว (fed-batch culture) ด้วยแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*
3. ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ
4. ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol)

ขอบเขตของงานวิจัย

แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ ผลพลอยได้ของการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม แล้วผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเป็นกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol) ทำการศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ในระดับห้องปฏิบัติการด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้สภาวะที่มีอากาศ การเพาะเลี้ยงแบบกะนั้นจะศึกษาในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนด้วยเพื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวทำโดยการเติมอาหารแบบเป็นระยะๆ และแบบต่อเนื่องด้วยอัตราคงที่เท่านั้น การนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วศึกษาผลของพีเอช อุณหภูมิ เกลือที่มีผลต่อการเกิดอิมัลชั่นและ critical micelle concentration (CMC)

สมมติฐานของการวิจัย

โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะนำกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์โดยวิธี facilitated diffusion แล้วถูกเปลี่ยนไปเป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) โดยที่ DHAP ยังสามารถเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็น glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) ได้ ซึ่งทั้ง DHAP และ G3P สามารถถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้โดย gluconeogenesis pathway นอกจากนี้แล้ว G3P ยังสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น pyruvate และเปลี่ยนต่อไปเป็น Acetyl-CoA ตามลำดับ โดยที่ Acetyl-CoA นี้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญมากในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันของจุลินทรีย์

แรมโนลิปิด (Rhamnolipid) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุดชนิดหนึ่งอยู่ในกลุ่มของ glycolipid ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลแรมโนส 1 หรือ 2 โมเลกุล เชื่อมต่ออยู่กับ β-hydroxydecanoic acid 1 หรือ 2โมเลกุล ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น RL1 (L-rhamnosyl-Lrhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate; Rha2C10C10) RL2 (L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoate; RhaC10C10) RL3 (L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoate; Rha2C10) และ RL4 (L-rhamnosyl-β-hydroxydecanoate RhaC10) แบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุดในการผลิตแรมโนลิปิด คือ *Pseudomonas spp.* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *P. aeruginosa* สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มีสัดส่วนของแรมโนลิปิดแต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งอาหารคาร์บอน สารอาหารและสภาวะของการเพาะเลี้ยง (Benincasa et al. 2004; Nitschke et al. 2005) ส่งผลให้คุณสมบัติต่างๆ เช่น surface tension, emulsification index, critical micelle concentration ของสารลดแรงตึงผิวที่ได้มีความแตกต่างกันด้วย

โมเลกุลของ Rhamnolipid นั้นประกอบด้วยน้ำตาล rhamnose เชื่อมต่ออยู่กับ 3(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoate (HAA) ดังนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ rhamnolipid ของ *Pseudomonas aeruginosa* จึงมีขั้นตอนที่สำคัญคือการสังเคราะห์ dTDP-L-rhamnose จาก glucose-6-phosphate การสังเคราะห์ HAA ใน fatty acid biosynthesis pathway และสุดท้ายเป็นการทำงานของเอนไซม์ rhamnosyltransferase ที่เชื่อมต่อโมเลกุลของ dTDP-L-rhamnose กับ HAA ได้เป็น rhamnolipid (Chávez et al. 2005)

เมื่อเพาะเลี้ยง *P. aeruginosa* ในอาหารเพาะเชื้อที่มีแหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลเพียงชนิดเดียว ทำให้กลีเซอรอลถูกใช้ไปเพื่อการเติบโตเป็นหลัก กรดไขมันที่สร้างขึ้นมาก็ถูกนำมาเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) จึงทำให้ไม่มีปริมาณกรดไขมันในเซลล์เหลือมากพอที่จะนำมาสังเคราะห์ rhamnolipid ให้ได้ปริมาณมากๆ ซึ่งวิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตได้คือการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยสับสเทรตที่ไม่ละลายในน้ำ (water-insuloble substrate) เช่น alkane และ fatty acid (Hommel and Ratedge, 1993) ผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลนอกจากกลีเซอรอลแล้วยังมีกรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอยู่ประมาณ 34 % (Ashby et al., 2005) ซึ่งเมื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับเลี้ยง *P. aeruginosa* แล้ว กลีเซอรอลก็สามารถถูกใช้ไปเพื่อการเติบโต ในขณะที่กรดไขมันก็สามารถถูกนำไปสังเคราะห์เป็น rhamnolipid ได้มากขึ้น หากต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นก็ต้องใช้สับสเทรตที่มากขึ้น แต่การเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ซึ่งมีการเติมอาหารลงไปครั้งเดียวตอนเริ่มต้น ไม่สามารถใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของสับสเทรตสูงๆได้ เนื่องจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูงจะไปยับยั้งการเติบโตและส่งผลให้การผลิต rhamnolipid ลดลงได้ (Santa Anna et al. 2002) ดังนั้นการใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture) ซึ่งค่อยๆ เติมสับสเทรตลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นระยะๆ จะช่วยลดภาวะการยับยั้งจากสับสเทรตความเข้มข้นสูงได้ ส่งผลให้สามารถผลิต rhamnolipid ได้ในปริมาณมากขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดการเกิดฟองในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย (Kim et al. 2006)