รายงานการวิจัย

การศึกษาการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น 1, 3-โพรเพนไดออลโดยเชื้อจุลินทรีย์

Microbiological conversion of glycerol to 1,3-propanediol

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2552
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น 1, 3-โพรเพนไดออลโดยเชื้อจุลินทรีย์" ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อรายงานผลการวิจัยแก่คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้กรุณาให้เงินทุนอุดหนุนการวิจัย ในประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2552 ทำให้เกิดทีมงานวิจัยอันประกอบด้วยคณาจารย์และนักศึกษาในสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสามารถดำเนินงานวิจัยลุล่วงไปได้ อนึ่งหากมีข้อผิดพลาดประการใดในรายงานฉบับนี้ ทางคณะผู้วิจัยต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

RCH
TP
973
.2387
ฉ.1

สจหม่.....
เลขทะเบียน.115574
วัน,เดือน,ปี.21 มี.ค. 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b.12312393
i.....

ชื่อโครงงาน การศึกษาการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็น 1, 3-โพรเพนไดออลโดยเชื้อจุลินทรีย์

Research title Microbiological conversion of glycerol to 1,3-propanediol

แหล่งเงิน เงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2552 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โทร. 087-698-5528 email: vorapats@hotmail.com

คำสำคัญ 1,3-โพรเพนไดออล, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutyricum*, *Enterobacter agglomerns*, การหมักในสภาวะไร้อากาศ

บทคัดย่อ

จากวิกฤติการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมที่มีราคาผันผวนอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้พลังงานทดแทนมีความสำคัญเป็นอย่างมาก กับโดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไบโอดีเซลในรูปเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้กระบวนการทางเคมีทรานส์เอสเตอร์ริฟิเคชัน (Transesterification) ผลพลอยได้คือ กลีเซอรอลร้อยละ10 ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามกำลังการผลิตไบโอดีเซลที่เพิ่มขึ้น หากมีการแปรรูปวัสดุเศษเหลือให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้จะช่วยให้ผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้นและลดต้นทุนในการกำจัด จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างผลิตภัณฑ์จากกลีเซอรอล พบว่าการผลิตให้ได้สาร 1,3-โพรเพนไดออล ด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นให้จุลินทรีย์ก็คือ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 และ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 กับ *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 และ BCC 19559 เพื่อผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ซึ่งเป็นสารโมโนเมอร์ที่ใช้ในการผลิตโพลิเมอร์หรือพลาสติก เช่น โพลีเอสเทอร์ โพลีอีเทอร์ และโพลียูริเทน

การศึกษานี้จึงได้ทำการทดลองหาเวลาและสภาวะที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลระดับขวดลูกชมพู่ พบว่า ผลของความเร็วรอบ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และเวลาที่มีผลต่อเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 ที่ความเร็วรอบ 100 กลีเซอรอล 30% และที่เวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ให้ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และให้ผลของการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutyricum* TISTR 1462 ที่ความเร็วรอบ 100 กลีเซอรอล 30% และที่เวลาการเพาะเลี้ยง 15 ชั่วโมง ให้ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และให้ผลของการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้ดีที่สุด

สำหรับระยะเวลาที่เชื้อ *Enterobacter agglomerans* ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 12 ชั่วโมง ในการศึกษาผลของความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตพบว่าสายพันธุ์ BCC19558 เจริญได้ดีในค่าความเป็นด่าง 6 และสายพันธุ์ BCC19559 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 จากการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์คือ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร ทั้งสองสายพันธุ์และสุดท้ายศึกษาความเร็วรอบเครื่องเขย่าที่เหมาะสม ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ เจริญได้ดีใน 200 รอบต่อนาที แต่ทั้งนี้ไม่พบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในตัวอย่างที่วิเคราะห์เครื่อง HPLC ของ *Enterobacter agglomerans* ทั้งสองสายพันธุ์ แต่พบสารอื่น ซึ่งไม่พบสารมาตรฐานใดที่ตรงกับ retention time ของสารนี้ที่ออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research title Microbiological conversion of glycerol to 1,3-propanediol

Scholarships Faculty of Sciences Internal Research Funding

Fiscal Year 2009 **Research budget** 50,000 Baht

Research period One year from 1st October 2009 to 30th September 2010

Researcher Dr. Vorapat Sanguanchaipaiwong

Office Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Tel. 087-698-5528 Email: vorapats@hotmail.com

Keywords 1,3-propanediol, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutyricum*, *Enterobacter agglomerns*, anaerobic cultivation

ABSTRACT

According to the crisis of the petroleum's current price, the importance of the renewable energy has been increasing, especially the production of biodiesel in form of methylester produced by using chemical transesterification processes. One of these processes' by-products was 10% glycerol, which has been increased with the growing trend of biodiesel production. However, by-product, such as glycerol, could be transformed to higher valued products and reduced the cost of by-product elimination. There have been several reports to use glycerol as a substrate for the production of 1,3-propanediol by biotechnology process. Hence, this study was interested to cultivate *Clostridium butyricum* TISTR 1032, *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462, *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 and *Enterobacter agglomerans* BCC 19559 for the production of 1,3-propanediol, which has been a monomer to materialize polymer product or plastics, such as, polyester, polyether and polyurethane.

This research has focused on the utilization of glycerol for the cultivation and 1,3-propanediol production and the optimization of those conditions for four anaerobic bacteria in flasks. From the experiment, the suitable conditions of the agitation speed, glycerol of concentration and fermentation time for the cultivation of *Clostridium butyricum* TISTR 1032 were 100 rpm, 30% glycerol and 24 hour given the maximum growth and 1,3-propanediol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

production. For *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462, the appropriate conditions were 100 rpm, 30% glycerol and 15 hour, respectively.

The maximum growth of *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 has been found when cultivated at 12 hours, pH 6, 200 rpm and with addition of 20 mL/L glycerol. While the maximum growth of *Enterobacter agglomerans* BCC 19559 was obtained from similar conditions, except at pH of 6.5. However, from the HPLC analytical results of both *Enterobacter agglomerans*, there was no 1,3-propanediol. Another chemical substance was found, but it did not match with the standard chemicals utilized for the HPLC analysis.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญ	7
สารบัญตาราง	11
สารบัญรูป	13
บทที่ 1 บทนำ	16
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย	16
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	17
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	18
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	18
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	19
2.1 กลีเซอรอล	19
2.1.1 ประวัติของกลีเซอรอล	19
2.1.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล	20
2.1.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล	20
2.1.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	20
2.1.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล	20
2.1.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล	23
2.1.4.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by-product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน	23
2.1.4.2 กระบวนการทางเคมี	25
2.1.4.3 กระบวนการทางชีวภาพ	27
2.1.5 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล	30
2.2 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol, 1,3-PD)	35
2.2.1 คุณสมบัติของ 1,3-โพรเพนไดออล	37
2.2.2 ประวัติความเป็นมา	37
2.2.3 เมทาบอลิซึมของ 1,3-โพรเพนไดออล	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล	38
2.2.5 ความสำคัญของ 1,3-โพรเพนไดออล และการนำไปใช้ประโยชน์ของ 1,3-โพรเพนไดออล	47
2.3 สัญฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	47
2.3.1 *Clostridium butyricum*	47
2.3.1.1 อนุกรมวิธาน	48
2.3.2 *Clostridium acetobutylicum*	48
2.3.2.1 อนุกรมวิธาน	49
2.3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Clostridium*	49
2.3.4 เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*	49
2.3.4.1 อนุกรมวิธาน	50
2.3.4.2 ลักษณะของเชื้อ	51
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	54
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	54
3.1.1 *Clostridium butyricum*	54
3.1.2 *Clostridium acetobutylicum*	54
3.1.3 *Enterobacter agglomerans*	54
3.2 สารเคมี	54
3.3 อุปกรณ์	55
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	55
3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium butylicum*	55
3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*	56
3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans*	57
3.5 การเพาะเลี้ยง	58
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium*	58
3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Enterobacter*	58
3.5.3 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium*เพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* 2 สายพันธุ์ เพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม 59

3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 60

3.6.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ 60

3.6.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลและ1,3-โพรเพนไดออล 60

3.6.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ 60

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 61

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น 61

4.1.1 *Clostridium butylicum* TISTR 1032 61

4.1.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 62

4.1.3 *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 63

4.1.4 *Enterobacter agglomerans* BCC 19559 66

4.2 ผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อเชื้อจุลินทรีย์ 66

4.2.1 *Clostridium butylicum* TISTR 1032 67

4.2.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 71

4.3 ผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอล ต่อการใช้กลีเซอรอล 75

4.3.1 *Clostridium butylicum* TISTR 1032 75

4.3.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 79

4.4 ผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอล ต่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลของเชื้อจุลินทรีย์ 82

4.4.1 *Clostridium butylicum* TISTR 1032 82

4.4.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 85

4.5 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* 89

4.5.1 *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 89

4.5.2 *Enterobacter agglomerans* BCC 19559 91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*	92
4.6.1 *Enterobacter agglomerans* BCC 19558	93
4.6.2 *Enterobacter agglomerans* BCC 19559	94
4.7 ผลของความเร็วรอบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*	96
4.7.1 *Enterobacter agglomerans* BCC 19558	96
4.6.2 *Enterobacter agglomerans* BCC 19559	98
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	100
เอกสารอ้างอิง	104
ภาคผนวก ก	112
ภาคผนวก ข	115
ภาคผนวก ค	117

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล	20
ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	21
ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล	22
ตารางที่ 2.4 มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้	23
ตารางที่ 2.5 รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล	28
ตารางที่ 2.6 ลักษณะของสาร 1,3-โพรเพนไดออล	36
ตารางที่ 2.7 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol, 1,3-PD) ผลได้ (Y_{PD}) และปริมาณอัตราการผลิต (Q_{PD}) ของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและกลายพันธุ์ในถังหมักเพาะเลี้ยงแบบbatch (*B*) และ fed-batch (*Fb*)	42
ตารางที่ 2.8 ลักษณะทางชีวเคมีของสกุล *Enterobacter*	50
ตารางที่ 4.1 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่างตามช่วงเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19558	64
ตารางที่ 4.2 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่างตามช่วงเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19559	64
ตารางที่ 4.3 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล สาร 1,3-โพรเพนไดออลและค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19558	88
ตารางที่ 4.4 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล สาร 1,3-โพรเพนไดออลและค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19559	90
ตารางที่ 4.5 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล สาร 1,3-โพรเพนไดออลและค่าความเป็นกรดด่างเมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19558	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.6 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล สาร 1,3-โพรเพนไดออลและค่าความเป็นกรดด่างเมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19559 93

ตารางที่ 4.7 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล สาร 1,3-โพรเพนไดออล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเร็วรอบเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19558 96

ตารางที่ 4.8 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล สาร 1,3-โพรเพนไดออล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเร็วรอบเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19559 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	สมการแยกสารละลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด	19
รูปที่ 2.2	สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	22
รูปที่ 2.3	เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล	29
รูปที่ 2.4	ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล	30
รูปที่ 2.5	วิถีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย *C. oxydans* ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตนอกเซลล์ของDHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate	32
รูปที่ 2.6	ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล	33
รูปที่ 2.7	โครงสร้างโมเลกุล 1,3-โพรเพนไดออล	36
รูปที่ 2.8	การหมักกลีเซอรอลเพื่อการสร้าง 1,3-PD	37
รูปที่ 2.9	วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในตอนท้ายของปฏิกิริยา	39
รูปที่ 2.10	รูปแบบปัจจุบันสำหรับการเปลี่ยนแปลงกระบวนการหมัก 1,3-PDO dependent จากกลีเซอรอลในสปีชีย์ของแฟมิลี่ Enterobacteriaceae เช่น จีนัส *Klebsiella* และ *Citrobacter* (สิ่งที่ย่อ คือ DHA, dihydroxyacetone; DHAK, DHA kinase; DHAP, DHA phosphate; GLYC, glycerol; GlyD, glycerol dehydratase; glyDH-I, glycerol dehydrogenase type I; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; 1,3-PDO, 1,3-propanediol; 1,3-PDOH, 1,3-PDO dehydrogenase; 3HPA, 3-hydroxypropionaldehyde	44
รูปที่ 2.11	ภาพของ *Clostridium butyricum* ที่มีสปอร์และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก	46
รูปที่ 2.12	ภาพของ *Clostridium acetobutylicum*	47
รูปที่ 2.13	ลักษณะรูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*	49
รูปที่ 4.1	การเจริญเติบโตวัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 และ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 4.2	การเจริญเติบโตวัดจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร ตามช่วงเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยง (ก) เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 และ (ข) เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC 19559	63
รูปที่ 4.3	ผลของความเร็วรอบ (ตั้งนิ่ง และ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงต่างๆ (ก) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 (ข) ความเข้มข้นของกลีเซอ-รอลเริ่มต้นร้อยละ 20 (ค) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 (ง) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40	66
รูปที่ 4.4	ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 เมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที	69
รูปที่ 4.5	ผลของความเร็วรอบ (ตั้งนิ่ง และ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงต่างๆ (ก) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 (ข) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 (ค) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 (ง) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40	70
รูปที่ 4.6	ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที	73
รูปที่ 4.7	ความเข้มข้นของกลีเซอรอลแสดงเป็นความเข้มข้นร้อยละที่ใช้ไปโดยเชื้อ *Clostridium butylicum* TISTR 1032 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40	75
รูปที่ 4.8	ความเข้มข้นของกลีเซอรอลแสดงเป็นความเข้มข้นร้อยละที่ใช้ไปโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40	78
รูปที่ 4.9	ความเข้มข้นของ 1, 3-โพรเพนไดออลแสดงเป็นความเข้มข้นกรัมต่อลิตรที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 4.11	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเข้มข้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร pH 7.0และความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีสารที่ไม่ทราบอยู่	98
รูปที่ ข.1	กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC	114
รูปที่ ข.2	กราฟมาตรฐานของ 1,3-โพรเพนไดออลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC	115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ทางเคมีที่มีความสำคัญ ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, สีทาบ้าน, ยาสูบ, อาหาร และยา ซึ่งกลีเซอรอลมีวิธีการผลิตหลักคือ การสังเคราะห์ทางเคมีจากวัสดุทางปิโตรเลียมและกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ยังเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล และจากอุตสาหกรรมการผลิตสบู่ แต่เนื่องจากมีการใช้สารลดแรงตึงผิวแทนสบู่และเกิดวิกฤตการเกี่ยวกับปิโตรเลียม ทำให้ทั่วโลกหันมาใช้วิธีการผลิตกลีเซอรอลโดยวิธีการหมักมากขึ้น (Zhuge และ Fang, 1994; Zhou, 1996; Fan, 1996; Vijaikishore และคณะ, 1984; Wang และคณะ, 2001)

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะมีกำลังการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น จึงน่าที่จะมีกลีเซอรอลเพิ่มปริมาณมากขึ้นตาม หากมีการแปรรูปผลพลอยได้ให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม จะช่วยให้โรงงานผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้นและลดต้นทุนในการกำจัด กระบวนการการผลิตไบโอดีเซลในรูปของเมทิลเอสเทอร์จะใช้น้ำมัน เช่น น้ำมันพืช น้ำมันจากสัตว์ และน้ำมันที่ปรุงอาหารที่ใช้แล้ว โดยวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด จะผลิตโดยใช้กระบวนการทางเคมี คือ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ริฟิเคชันของน้ำมัน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบสกรด หรือเอนไซม์ แต่กรดและเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำปฏิกิริยาได้ช้าและมีราคาแพง จึงนิยมใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้มาก เพราะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่รวดเร็วและราคาไม่แพง (Fukuda และคณะ, 2001) แต่ไม่ว่าจะใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาตัวใดก็ตามในปฏิกิริยาเอสเตอร์ริฟิเคชันที่เกิดขึ้นจะมีกลีเซอรอลเกิดขึ้นเป็นผลพลอยได้ ดังนั้นสิ่งที่ตามมาก็คือ ต้องกำจัดกลีเซอรอลดิบที่มีประมาณร้อยละ10 ถ้าไม่มีการนำไปใช้และการจัดการที่ดีอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคตจึงต้องหาแนวทางการเปลี่ยนรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารเคมีต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าของสาร

ดังนั้น จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างผลิตภัณฑ์จากสารกลีเซอรอล พบว่าการผลิตให้ได้ 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-Propanediol) เป็นสารที่ทำให้มีมูลค่าเพิ่มเนื่องจากสารนี้เป็นสารโมโนเมอร์ (monomer) ที่ใช้ในการผลิตพลาสติก เช่น โพลีเอสเทอร์ โพลีอีเทอร์ และโพลียูเรเทน (พูนสุข และคณะ, 2550) การผลิต 1,3-โพรเพนไดออลแต่ดั้งเดิมใช้วิธีผลิตจากสารปิโตรเคมี ต่อมาได้มีการคิดค้นโดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไปเป็น 1,3-โพร-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เพนไดออล (1,3-Propanediol) (Zeng และคณะ, 1994; Menzel และคณะ, 1996; Menzel และคณะ, 1997; Hartlep และคณะ, 2002) โดยกระบวนการหมักกลีเซอรอล

Biebl และคณะ (1999) ได้ศึกษาการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลจากสารกลีเซอรอล พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น 1,3-โพรเพนไดออลได้มีมากมาย ซึ่งจุลินทรีย์พวกนั้นประกอบด้วยแบคทีเรีย *Enterobacteria* ของจีนัส *Klebsiella* (*K. pneumonia*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*) *Citrobactor* (*C. freundii*), *Lactobacilli* (*L. brevis* และ *L. buchneri*) และแบคทีเรีย *Clostridia* (*C. butyricum* และ *C. pasteurianum*) (Nakas และคณะ, 1983; Radler, 1984; Forsberg, 1987; Homann และคณะ, 1990; Biebl และคณะ, 1992; Dabrock และคณะ, 1992; และ Barbirato และคณะ, 1995)

สำหรับการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ด้วยวิธีทางชีวภาพนั้น บริษัท Dupont ได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตโดยนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในด้านการตัดต่อยีนให้จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็น 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-Propanediol) โดยตรงและมีผลให้ 1,3-โพรเพนไดออล ซึ่งเป็นโมโนเมอร์มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกในปัจจุบัน (McCoy, 1998; Potera, 1997; Balthuis และคณะ, 1998; Gatenby และคณะ, 1998)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 และ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 กับ *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 และ BCC 19559
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกให้ได้ปริมาณสาร 1,3-โพรเพนไดออลมากที่สุด
3. ศึกษาการนำกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้น สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ โดยใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ
4. เป็นการพัฒนานักวิจัยและเทคโนโลยีเพื่อให้รองรับกับการเติบโตของอุตสาหกรรมด้านพลังงานไบโอดีเซลของประเทศในอนาคต

115574

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปให้เป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยใช้เชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 และ *Clostridium butyricum* TISTR 1462 ที่ซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Enterobacter agglomeran* BCC19558 และ BCC19559 ที่ซื้อจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ จากนั้น ทำการมาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจากกลีเซอรอลในห้องปฏิบัติการทั่วไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้ปริมาณมากจากการใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบ
2. เป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยเรื่องนี้ในขั้นตอนต่อไป คือ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการขยายขนาดสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป
3. เป็นการพัฒนานักวิจัยและเทคโนโลยีเพื่อให้รองรับกับการเติบโตของอุตสาหกรรมด้านพลังงานไบโอดีเซลของประเทศในอนาคต
4. เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างรายได้ และลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 กลีเซอรอล (Glycerol)

กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีแอลกอฮอล์ น้ำมัน มอนอกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ สบู่ และสิ่งสกปรกอื่นๆ ปนกันอยู่ การทำกลีเซอรีนบริสุทธิ์ทำได้โดยนำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยากับกรด เพื่อให้กลายเป็นกรดไขมันและเกลือ พร้อมทั้งเติมสารละลายเฮกเซนเพื่อละลายสิ่งเจือปนต่างๆ ให้แยกออกจากชั้นกลีเซอรีน จากนั้นนำกลีเซอรีนไปเติมผงถ่านและกรองออก จะได้กลีเซอรีนที่ใสสะอาด เมื่อกลั่นเอาแอลกอฮอล์ออก ก็จะได้กลีเซอรีนบริสุทธิ์ในที่สุด

การผลิตไบโอดีเซลจึงยังเป็นกระบวนการที่ไม่คุ้มค่าการลงทุน ดังนั้นในการที่จะขยายกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไปสู่ระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นจะต้องมีการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้ โดยในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันนั้นจะเกิดกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ดังนั้น แนวคิดในเชิงเศรษฐศาสตร์แนวหนึ่ง คือ การทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลนั้นต่อไป กลีเซอรอลที่บริสุทธิ์จะมีราคาสูงกว่าเมทิลเอสเตอร์

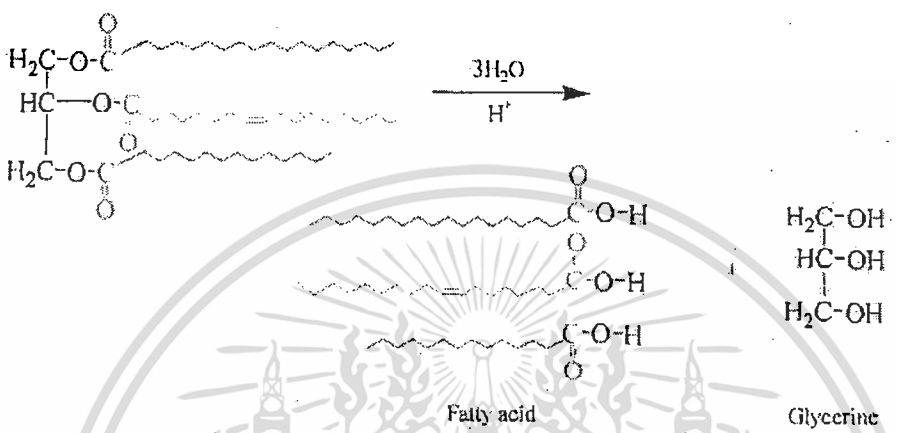
กลีเซอรอลเป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของการหมักเอทานอลจากกลูโคสหรือเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการที่มีขั้นตอนเริ่มต้นจากไขมันพืช และไขมันสัตว์ มีแบคทีเรียจำนวนมากหมักกลีเซอรอลไปสู่สารเคมี เช่น 1,3-โพรเพนไดออล 2,3-บิวเทนไดออล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดแลคติค อีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลคือ การแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารมูลค่าเพิ่ม เช่น กรดซิตริค ไฮโดรเจนและเอทานอล โดยการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล ซึ่งเป็นตัวเด่นที่สุด

2.1.1 ประวัติของกลีเซอรอล

สารกลีเซอรอถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W. Scheele จากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (sponification) ของน้ำมันมะกอก มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีรสหวาน ต่อมาพบว่ากลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบหลักในไขมันและน้ำมันเกือบทุกชนิดโดยไขมันและน้ำมันประกอบด้วยกลีเซอรอลที่มีหมู่เอสเทอร์มาเกาะกัน 3 หมู่ หรือที่เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เมื่อนำไขมันหรือน้ำมันมาแยกสลายด้วยน้ำในสภาวะกรดจะได้กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงแรก ได้นำกลีเซอรอลไปใช้ในการผลิตกาว ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้กาวมีความเหนียวมากขึ้น ในเวลาต่อมาได้นำไปใช้ในการทำสีย้อมน้ำหมึกและอื่นๆ จนกระทั่งในปี คศ.1867 นักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Alfred Nobel ได้คิดค้นวิธีการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (dynamite) โดยใช้กลีเซอรอลที่ทำอยู่ในรูปไนโตรกลีเซอรีน (nitroglycerine) เมื่อนำมาผสมกับซิลิกา (silica) ณ จุดนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการนำกลีเซอรอลไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม (อมร อุดเสน และคณะ, 2550)



รูปที่ 2.1 สมการแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด
ที่มา : อมร อุดเสน และคณะ, 2550

2.1.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1,2,3 propanetriol เป็นแอลกอฮอล์อย่างง่าย (simple alcohol) ชนิดหนึ่งซึ่งมีการใช้ประโยชน์มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สี เครื่องจักร เครื่องยนต์ อาหาร ยาสูบ เภสัชกรรม เยื่อกระดาษ เครื่องหนัง และสิ่งทอ แสดงดังตารางที่ 2.1 นอกจากนี้กลีเซอรอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้น (feedstock) สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanedial) ได้อีกด้วย (Biebl และคณะ, 1998; 1999)

2.1.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล

2.1.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีคุณสมบัติทางกายภาพตามตารางที่ 2.2

2.1.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีชื่อเรียกทางเคมีตามตารางที่ 2.3 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล

ด้านที่นำไปใช้ประโยชน์	การนำไปใช้ (ร้อยละ)			
	สหรัฐฯ (160,000 ตันต่อปี)	ยุโรป (190,000 ตันต่อปี)	ญี่ปุ่น (50,000 ตันต่อปี)	จีน[a] (80,000 ตันต่อปี)
ยา	39.5	23.1	34.0	5.2
ยาสูบ	15.8	2.5	5.3	7.3
กลีเซอรินไตรอะซีเตท (glycerintriacetate)	ND[b]	14.4	ND	ND
อาหาร	14.5	5.6	ND	ND
โพลีอีเทอร์แอลกอฮอลล์ (polyether acohol)	10.5	13.1	11.6	5.2
สี	9.2	13.1	19.5	49.0
เซลโลเฟน (cellophane)	2.0	4.4	3.8	1.5
ระเบิด (dynamite)	0.6	3.1	1.9	3.1
ยาสีฟัน	ND	ND	ND	16.0
เครื่องสำอาง	ND	ND	ND	6.3
อื่นๆ	7.9	20.6	23.9	7.2

หมายเหตุ [a] ข้อมูลส่วนใหญ่นำมาจากรายงานของศูนย์ข้อมูลวิศวกรรมเคมีแห่งประเทศจีน (Chinese Chemical Engineering Information Center)

[b] ND ย่อมาจาก no data (ไม่มีข้อมูล)

ที่มา : Zheng-Xiang Wang และคณะ, 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวหนืด
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น-รส	ไม่มีกลิ่น แต่มีรสหวาน
น้ำหนักโมเลกุล	92.10 กรัมต่อโมล
ความหนืด	1,400 มิลลิปาสคาล วินาที
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ ไดออกเซน และไม่ละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน
คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5 ที่ 20 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	290 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	17.8 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันไอ	0.0025 มิลลิปรอท ที่ 50 องศาเซลเซียส

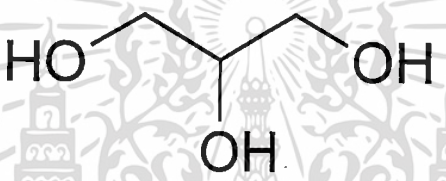
ที่มา : ดัดแปลงจาก Mallinckrodt Chemicals และ The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed. Copyright © 2007, Columbia University Press

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

ชื่อ IUPAC	1,2,3-Propanetriol หรือ 1,2,3-Trihydroxypropane
ชื่อทั่วไป	Glycerol ; Glycerin
ชื่อพ้องอื่นๆ	D-glycerol, L-glycerol, Glyceritol, Glycyl alcohol, Trihydroxypropane, Glycerin mist, Polyhydric alcohols, Propanetriol
สูตรโมเลกุล	$C_3H_5(OH)_3$

ที่มา : http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา: Richard, Rusty และ Myers, 2007

2.1.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

2.1.4.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by-product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ที่เกิดจากกระบวนการการผลิตไบโอดีเซลซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ แต่กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ นั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่ หรือแม้กระทั่งใช้ในการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธีที่จะทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล โดยกระบวนการและวิธีที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ได้แก่ การปรับสภาพคุณสมบัติให้เป็นกรดเพื่อแยกชั้นของกลีเซอรอลกับไขมัน โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อแยกตะกอนของเกลือออก จากการทดลองเมื่อทำให้กลีเซอรอลมีความเป็นกรดอยู่ที่ pH 2–4 จะทำให้มีชั้นของกลีเซอรอลแยกออกมาร้อยละ 38–40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยน้ำหนัก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบตามมาตรฐาน BS 5711 จะพบว่ากลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์อยู่ที่ร้อยละ 80–85 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ และสามารถเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลได้ และมาตรฐานของกลีเซอรอลที่แบ่งตามอุตสาหกรรมมีตามตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้

คุณลักษณะ	อุตสาหกรรม					มาตรฐานที่ใช้ทดสอบ
	เคมี	ไดนาไมต์	ยา	อาหาร	สบู่	
กลิ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	-	BS 5711 :Part 19
กลีเซอรอล ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	99	99	95	99	80	BS 5711 :Part 3
น้ำ ร้อยละโดยน้ำหนักไม่เกิน	-	-	-	-	10	ISO 2097 - 1972
เถ้า ร้อยละโดยน้ำหนักไม่เกิน	-	-	-	-	10	ISO 2098 - 1972
เถ้าซัลเฟต ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	0.01	0.01	0.01	0.01	-	ISO 1616 - 1976
สารอื่นทรีย์ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล ร้อยละโดยน้ำหนักไม่เกิน	-	-	-	-	2.5	ISO 2464 - 1973
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 20°C/20 °C ที่อุณหภูมิ 25°C/25 °C	1.261ถึง 1.264	1.261ถึง 1.264	- 1.249	1.261ถึง 1.264	-	ISO 2099 - 1972
ความเป็นด่างหรือความเป็นกรด มิลลิอิคคิวิเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.064	0.32	-	0.32	-	BS 5711 :Part 5
สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	2	-	1.5	-	2	BS 5711 :Part 10
ตะกั่ว มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	1	-	-	-	-	BS 2621 – 5
คลอไรด์ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	0.01	0.01	0.01	-	BS 5711 :Part 12
สะพอนิฟิเคชันอิควิเวเลนต์ มิลลิอิควิเวเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.64	0.64	-	-	-	BS 5711 :Part 21

หมายเหตุ มาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิงคุณลักษณะของกลีเซอรอล คือ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.337-2538)[13] และ British Standards Institution (BS 2621-5 : 1979)

ที่มา : มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์, มอก 377-2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องแยกกลีเซอรอลออกจากไบโอดีเซลให้หมด มิฉะนั้นกลีเซอรอลจะไปอุดหัวฉีดและยังก่อให้เกิดปริมาณอัลดีไฮด์ในท่อไอเสียเครื่องยนต์ขณะเผาไหม้สูงกว่าปกติอีกด้วย โดยปกติการผลิตไบโอดีเซลแต่ละครั้งจะได้กลีเซอรอลประมาณร้อยละ 10-15 โดยปริมาตร ซึ่งจะทำการอยกออกได้ด้วยการทำให้แยกชั้นออกจากไบโอดีเซลด้วยความแตกต่างของความหนาแน่น ไบโอดีเซลมีความหนาแน่น 0.86 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่กลีเซอรอลมีความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีผลทำให้กลีเซอรอลแยกตัวอยู่ชั้นล่างและไบโอดีเซลอยู่ชั้นบน ในส่วนของชั้นกลีเซอรอลยังคงมีสิ่งเจือปนอื่นได้แก่ ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทานอล หรือแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่และน้ำ เป็นต้น เป็นผลทำให้กลีเซอรอลที่แยกได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

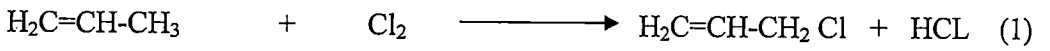
Yong และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่า มีปริมาณของสารดังนี้ กลีเซอรอล ร้อยละ 20.2 เถ้าร้อยละ 64.3 น้ำร้อยละ 3.0 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 12.4 และพีเอช (pH) 12.8 และเมื่อแยกสิ่งเจือปนโดยใช้กรดซัลฟิวริกแล้ว พบว่ากลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น กล่าวคือ ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 33.9 กรดไขมันดิบ (crude fatty acid) ร้อยละ 10.5 และเกลือ (salt) ร้อยละ 65.2 และยังพบว่า pH มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล จากการปรับเปลี่ยนพีเอช (pH) ของสารละลายกลีเซอรอลจากพีเอช (pH) 1-7 พบว่าที่พีเอช (pH) 1-2 ให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์สูงสุด กล่าวคือ มีกลีเซอรอลร้อยละ 54 เถ้าร้อยละ 7.4 น้ำร้อยละ 7.5 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 31.1 หลังจากนำกลีเซอรอลดังกล่าวไปกลั่นแบบสุญญากาศอย่างง่าย (simple vacuum distillation) ที่ความดัน 4×10^{-1} ถึง 4×10^{-2} มิลลิบาร์ และ pH ต่ำกว่า 5 (เพื่อป้องกันการเกิดฟองจากสบู่ที่เกิดขึ้น) ได้กลีเซอรอลกลั่นตัวออกมาที่อุณหภูมิ 120-126 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ พบกลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 96.6 เถ้าร้อยละ 0.03 น้ำร้อยละ 2.4 และสารอินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 2.4 และมีพีเอช (pH) เท่ากับ 3.5

2.1.4.2 กระบวนการทางเคมี (Myers และ Myers, 2007)

ในปี ค.ศ. 1940 มีความต้องการกลีเซอรอลจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เพื่อใช้ในการผลิตสบู่และเทียน ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 เริ่มมีการผลิตกลีเซอรอลโดยวิธีการหมักจากน้ำตาลเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีผลิตจากกระบวนการทางเคมีซึ่งสังเคราะห์มาจากโพรไพลีน (propylene) โดยการสังเคราะห์จากโพรไพลีนมีขึ้นครั้งแรกก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 และการผลิตในเชิงการค้าเริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 1943 โดยประเทศเยอรมนี

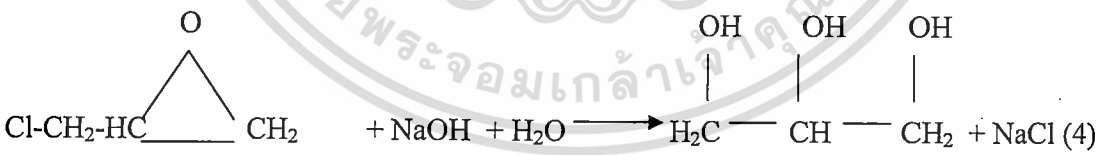
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์กลีเซอรอลทางเคมีนั้นเริ่มจากการที่คลอรีนเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของโพรไพลีน ได้เป็นสารอัลลิลคลอไรด์ (allyl chloride) ตามสมการที่ 1 จากนั้นทำปฏิกิริยากับกรดไฮโปคลอรัสจะได้เป็น 1,3 ไดคลอโรไฮดริน (1,3 dichlorohydrin) ดังสมการที่ 2



จากนั้นเติมสารละลายโซเดียม หรือแคลเซียมไฮโดรออกไซด์ลงใน 1, 3 ไดคลอโรไฮดริน จะได้ อีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) ดังสมการที่ 3

ปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายนั้นอีพิคลอโรไฮดรินจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น กลีเซอรอลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต ดังสมการที่ (4)



การสังเคราะห์อีกทางหนึ่ง คือ อัลลิลคลอไรด์ถูกไฮโดรไลส์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ ($H_2C=CH-CH_2-OH$) จากนั้นเติมคลอรีนจะได้โมโนคลอโรไฮดริน (Monochlorohycrin) และไดคลอโรไฮดริน (Dichlorohydrin) ซึ่งทั้งสองจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตให้กลีเซอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.3 กระบวนการทางชีวภาพ

da Silva และคณะ (2009) กล่าวถึงปิโตรเลียมเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดในโลก แต่มีลักษณะที่ต้องใช้อย่างจำกัด จึงทำให้ต้องหาแหล่งพลังงานที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งเป็นที่สนใจกันอย่างมาก อย่างเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) เช่น เอทานอล และไบโอดีเซล ซึ่งเต็มไปด้วยแหล่งต่างๆ เพื่อไปแทนที่ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ไบโอดีเซลสามารถแทนที่ปิโตรเลียมดีเซล (petroleum diesel) ผลิตจากไขมันสัตว์และน้ำมันพืช ซึ่งสร้างกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ (by product) ประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนเกินของกลีเซอรอลที่ถูกสร้างขึ้นอาจจะกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งกลีเซอรอลไม่สามารถถูกจัดการให้หมดไปในสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ที่จะมีการนำกลีเซอรอลไปใช้ โดยอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และ/หรือแหล่งพลังงานจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เพื่อผลิตเป็นสารเคมีโดยใช้กระบวนทางชีวภาพให้มีมูลค่าสูงขึ้น เช่น 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) ไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) เอทานอล (ethanol) ซัคซิเนท (saccinate) เป็นต้น

เพราะฉะนั้น จึงมีการศึกษาการผลิตสารกลีเซอรอลโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ เพื่อลดการใช้ปิโตรเลียม ดังนี้ Benito และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเพคเบด (packed bed) โดยใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตเป็น 36.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง (pH) 6.9 และมีอัตราการเจือจาง (dilution rate) เป็น 1.22 ต่อชั่วโมง

Bisping และ Rehm (1986) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกตรึงอยู่ในซินเตอร์กลาส (sintered glass) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-100 ไมโครเมตร พบว่าซินเตอร์กลาส (sintered glass) มีความสามารถในการกักเก็บเซลล์ได้ดี ซึ่งเมื่อทำการผลิตกลีเซอรอลในสภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) 8 รอบ จะสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ 26.2 ถึง 29.5 กรัมต่อลิตร

Guo และคณะ (2006) ศึกษาผลกระทบของสารควบคุมแรงดันออสโมติกชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกลีเซอรอลของยีสต์ *Candida krusei* ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพลีเอทิลีนไกล-คอล 4000 (PEG 4000) และกลีเซอรอล (glycerol) พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 179 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารควบคุมแรงดันออสโมติกเป็นกลีเซอรอล ได้ความเข้มข้นเพียง 80 กรัมต่อลิตร และในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารควบคุมแรงดันออสโมติกสามารถผลิตกลีเซอรอลได้เพียง 41 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhuge และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดย *Candida glycerinogenes* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมติกสูง (osmotolerance yeast) ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างกลีเซอรอลคือ ที่อุณหภูมิ 29-33 องศาเซลเซียส และพีเอช (pH) 4-6 โดยอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตกลีเซอรอล ประกอบไปด้วยกลูโคส 230-250 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) 5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีฟอสเฟตประกอบ 55-65 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีผลได้ของกลีเซอรอลสูงสุดเป็นร้อยละ 64.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงสุดเป็น 137 กรัมต่อลิตร

Yalcin1 และ Ozbas (2008) ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อที่มีต่อการเจริญเติบโต และจลนพลศาสตร์ของการผลิตกลีเซอรอลแบบกะของเชื้อยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik1 และ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 โดยทำการศึกษาปริมาณหัวเชื้อตั้งแต่ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 2.5 สำหรับสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik1 จะทำให้สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 8.6 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 2.5-7.5 จะสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 7.6 กรัมต่อลิตร

Spencer และคณะ (1956) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Aerobacter aerogenes* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 3.2-4.8 และเมื่อทำการศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Torulopsis magnoliae* พบว่ากลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์เดียวที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก และผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 17

Liu และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าของเชื้อ *Candida krusei* พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 40 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกลีเซอรอลจาก 16.5 เป็น 47.7 กรัมต่อลิตร

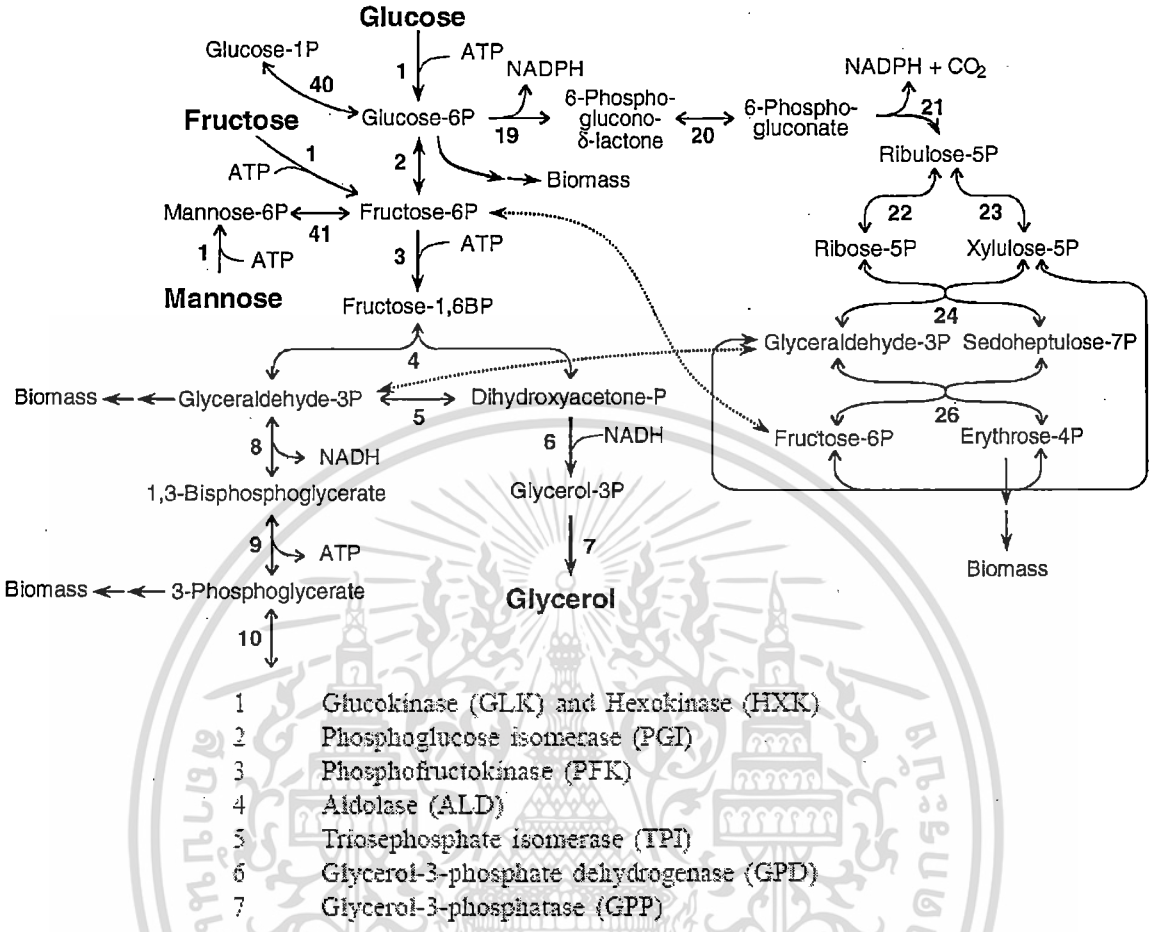
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล

สายพันธุ์	สารตั้งต้น	กระบวนการ/ระดับการผลิต	ความเข้มข้นกลีเซอรอลในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิต (ร้อยละของการใช้น้ำตาล)	อัตราการผลิตเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	เอกสารอ้างอิง
ยีสต์						
S. cerevisiae	กากน้ำตาล	Batch sulfite/ 12 ลิตร	55	25	11.5	Cocking และ Liliy, 1919
	กลูโคส	Batch insoluble sulfite/ 2.5 ลิตร	35	23	11.6	Underkofler, 1954
	กลูโคส	Continuous sulfite/pilot plant	50	28	33	Freeman และ Donald, 1957a
	กากน้ำตาล	Fed batch sulfite/vacuum, CO_2 sparing	80	25	30	Kalle และคณะ, 1985
	กลูโคส	Batch alkali steered/ 12 ลิตร	45	23	9	Shade และ Farber, 1947
C. magnoliae IFO[a]	กลูโคส	Aerobic batch process/ shake flask	79[b]	43	20	Spencer และ Shu, 1957
	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 60 ลิตร	170	ND[c]	17	Peterson และคณะ, 1958
P. farinose	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 1ลิตร	300	ND	75	Vijaikishore และ Karanth, 1986a
C. glycerinogens	กลูโคส	Aerobic batch process/ จาก shake flask ถึง 50,000 ลิตร	110-130	52-63	28-32	Zhung และ Fang, 1995
แบคทีเรีย						
B. subtilis	กลูโคส	Batch/shake flask	14.7	29	2	Neish และคณะ, 1945
สาหร่าย						
D. tertiolecta	CO_2	Batch	0.12	ND	0.066	Ben-Amotz และ Avron, 1981

ที่มา : Zheng-Xiang Wang และคณะ, 20

2.1.5 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล



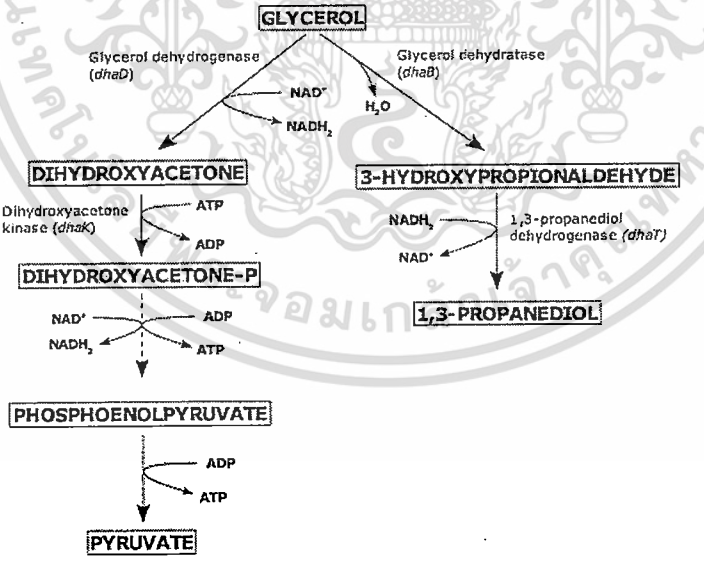
รูปที่ 2.3 เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล

ที่มา : Mostafa, 1995

จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะไม่มีอากาศกับกลีเซอรอลซึ่งมีบทบาทเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีมากมายหลายชนิด เช่น *Citrobacter freundii* (Homann และคณะ, 1990; Daniel และคณะ 1995; Seifert และคณะ, 2001) *Klebsiella pneumoniae* (Forage และ Foster, 1992; Tong และคณะ, 1991; Menzel และคณะ, 1997b; Biebl และคณะ, 1998; Németh และคณะ, 1998; Biebl, 2001) *Clostridium pasteurianum* (Luers และคณะ, 1997; Macis และคณะ, 1998; Biebl, 2001) *Clostridium butyricum* (Abbad-Andaloussi และคณะ, 1995; Biebl, 1991; Biebl และคณะ, 1992; Himmi และคณะ, 1999; Malaoui และ Marczak, 2001; Colin และคณะ, 2001) *Enterobacter agglomerans* (Barbirato และคณะ, 1996; Bories, 1997; Barbirato และคณะ, 1997a) *Enterobacter aerogenes* (Ito และคณะ, 2005) และ *Lactobacillus reuteri* (Talarica และคณะ, 1988, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* และ *Enterobacter* กลีเซอรอลถูกใช้ในเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์เหล่านี้ ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน(oxidation) และรีดักชัน (reduction) (Zhu และคณะ, 2002) ใน oxidative pathway จะมี NAD^+ ไม่อิสระ เอนไซม์ glyceroldehydrogenase (EC 1.1.1.6) กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอลไปเป็น dihydroxyacetone และถัดมาเอนไซม์ dehydroxyacetone kinase (EC 2.7.1.29) เร่งปฏิกิริยาการผลิต phosphorylates (Daniel และคณะ, 1995; Luers และคณะ, 1997; Macis และคณะ, 1998) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) ส่วน reducing pathway จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ glycerol dehydratase (EC 4.2.1.30) ที่ต้องการโคเอนไซม์เป็นวิตามินบี 12 (coenzyme B_{12}-dependent) และเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ diol dehydratases (EC 4.2.1.28) (Toraya และคณะ, 1978; Forage และ Foster, 1982; Knietsch และคณะ, 2003) กลีเซอรอลถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxy propionaldehyde (Toraya และคณะ, 1980; Tong และคณะ, 1991; Seifert และคณะ, 2001) และเอนไซม์ 1,3-propanediol dehydrogenase (1,3-propanediol-oxydoreductase, EC 1.1.1.202) ที่ต้องการ $NADH+H^+$ ($NADH+H^+$ dependent) จะทำการรีดิวซ์ 3-hydroxypropionaldehyde ไปเป็น 1,3-propanediol และสร้าง NAD^+ ขึ้นใหม่ (Macis และคณะ, 1998; Skraly และคณะ, 1998; Ahrens และคณะ, 1998; Veigo da Chuha และ Foster, 1992; Németh และคณะ, 2003) ดังรูปที่ 2.4 ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ 1,3-propanediol (1,3-PDO) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการหมักกลีเซอรอล (Homann และคณะ, 1990; Deckwer, 1995)



รูปที่ 2.4 ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-PDO

ที่มา : Bouvet และคณะ, 1995; Barbirato และคณะ, 1997b; Menzel และคณะ, 1997a; Biebl, 2001

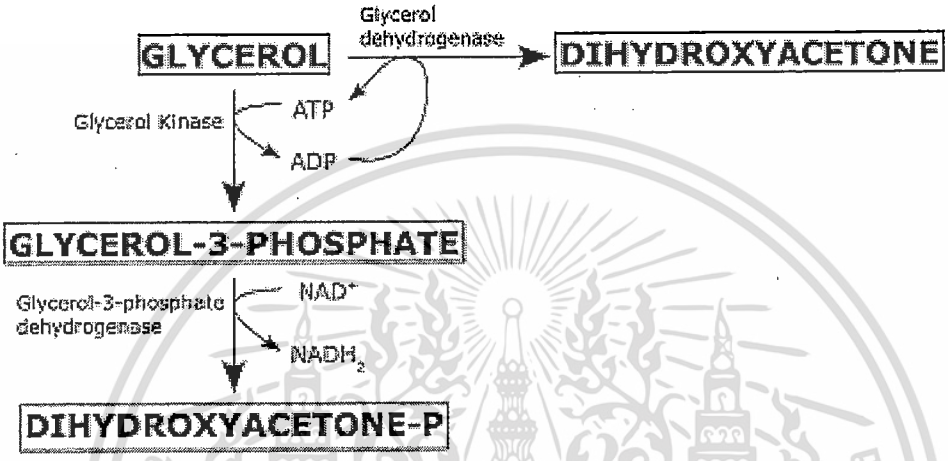
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน *K. pneumoniae* (Forage และ Lin, 1982) และ *C. freundii* ลำดับการเรียงตัวของยีนสุดท้ายทำหน้าที่เชื่อมโยงและกระตุ้นเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB*), 1,3-PDO dehydrogenase (*dhaT*), glycerol dehydrogenase (*dhaD*), และ dihydroxyacetone kinase (*dhaK*) ซึ่งถูกล้อมรอบโดย *dha* regulon (Zhu และคณะ, 2002) ดังรูป 2.4 สำหรับกลุ่มยีน 1,3-PDO ของ *C. butyricum* จะประกอบด้วย 3 ยีนที่แตกต่างกัน คือเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB1*), เป็นตัวกระตุ้นโปรตีน (*dhaB2*) และ *dhaT* (Raynaud และคณะ, 2003) ในแบคทีเรียนี้ เอนไซม์ glycerol dehydrogenase มีความว่องไวต่อออกซิเจนอย่างรุนแรง ซึ่งจะร่วมกับผนังเซลล์ของวิตามินบีสิบสองอิสระ (vitamin-B_{12} independent) (Saint-Amans และคณะ, 2001; Raynaud และคณะ, 2003; Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004, 2005a,b, 2006)

ใน *S. cerevisiae* และจุลินทรีย์อื่นๆ กลีเซอรอลจะถูกแยกเป็น dihydroxyacetone หรือ glycerol-3-phosphate (Wang และคณะ, 2001) จากสารหลังนั้น กลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น glycerol-3-phosphate ผ่านเอนไซม์ glycerol kinase (EC 2.7.1.30) ขณะที่สามารถใช้อันใดอันหนึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไขมันหรือการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dihydroxyacetone phosphate และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอนไซม์ triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) ในปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือสามารถนำมาให้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เมทาบอลิซึมอื่นๆ (Wang และคณะ, 2001) เหมือนวิถีสำหรับ glycerol oxidation (*glp* regulon) ถูกแสดงใน *K. pneumoniae* (Ruch และคณะ, 1974; Forage และ Lin, 1982) *Gluconobacter oxydans* (Bories และคณะ, 1991; Claret และคณะ, 1994) และ *C. acetobutylicum* (Gonzalez- Pajuelo และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.5 ตามด้วย Ruch และคณะ (1974) ซึ่งวิถี glycerol-3-phosphate เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะที่มีอากาศของกลีเซอรอลใน *K. pneumoniae* (เปลี่ยนชื่อมาจาก *K. aerogenes*) ขณะที่วิถี dihydroxyacetone เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะไม่มีอากาศของสารตั้งต้นนี้

การหมักจากกลีเซอรอลไปเป็นเอทานอลหรือบิวทานอลโดย *C. pasteurinum* ไม่ขึ้นอยู่กับการสร้างเป็นผลพลอยได้ (by-product) (Biebl, 2001) จนกระทั่งตัวพาไฮโดรเจนจะสมบูรณ์เมื่อถูกสร้างขึ้นใหม่ในวิถี (Biebl และคณะ, 1998) อีกตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการ redox-balanced เป็นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น succinic acid แม้ว่าวิถีสำหรับเอทานอลและ saccinate มีค่าเท่ากับ redox-balanced ที่เกี่ยวโยงกันทั้งหมด ซึ่งมีการใช้พลังงานของวิถี ethanologenic สูงมาก คือ 1ATP เป็นผลผลิตต่อแต่ละโมเลกุลของกลีเซอรอล ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ขณะที่การผลิตพลังงานในวิถี saccinate จะถูกจำกัดไปเป็นความสามารถในการสร้าง proton motive force โดย fumarate reductase (Dharmadi และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.6

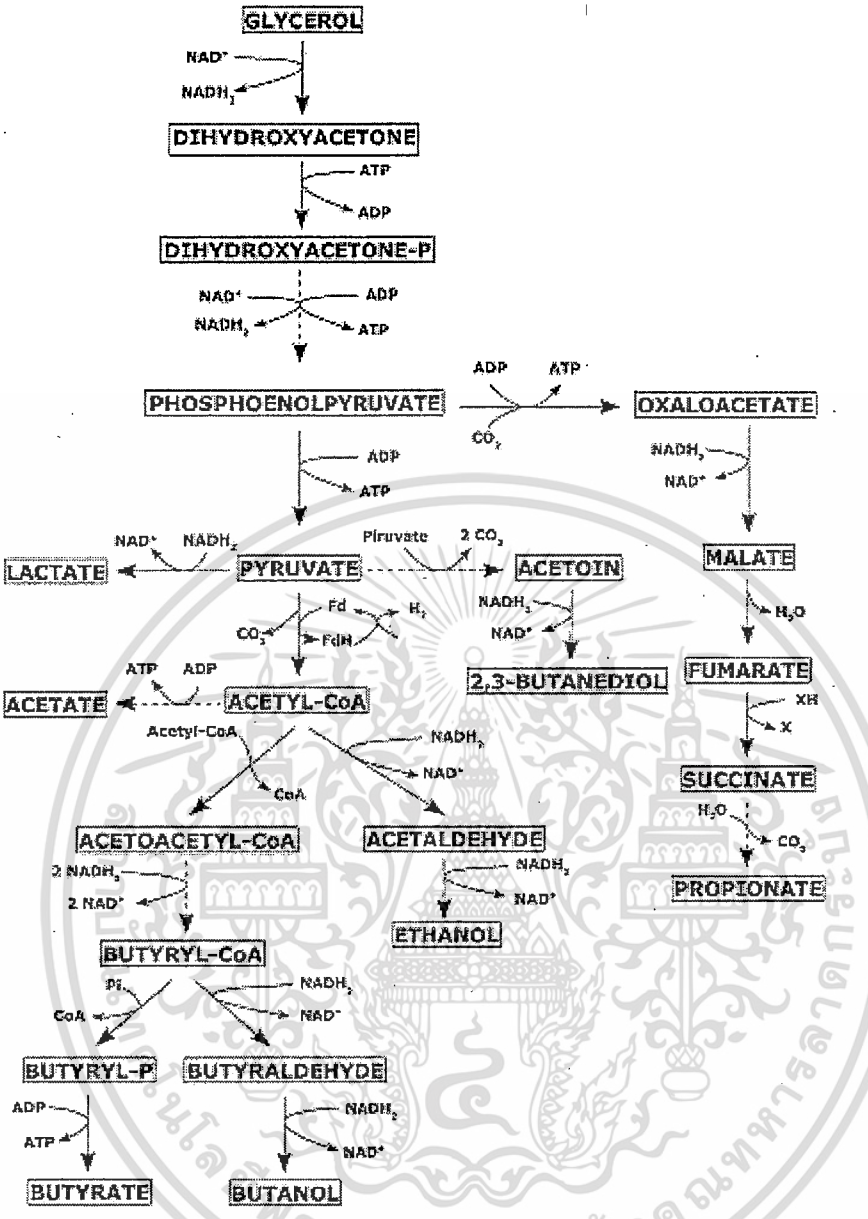
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วิถีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย *C. oxydans* ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตนอกเซลล์ของ DHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate

ที่มา : จาก Bories และคณะ, 1991; Claret และคณะ, 1994

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล

ที่มา : G.P. da Silva และคณะ, 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-Propanediol, 1,3-PD)

ไดไกลคอล 1,3-โพรเพนไดออล (diglycol 1,3-propanediol คือ trimethylene glycole และ propylene glycol) เป็นผลผลิตที่สำคัญที่ได้รับผ่านการหมักกลีเซอรอล 1,3-PD ถูกพบครั้งแรกเป็นการผลิตของการหมักกลีเซอรอลในปี 1881 (Werkman และ Gillen, 1932) 1,3-PD เป็นหนึ่งของผลผลิตการหมักในวิถีจุลินทรีย์ที่มีความรู้ตั้งแต่ในช่วงศตวรรษ แต่ได้รับความสนใจเพียงเล็กน้อย (Biebl และคณะ, 1999) 1,3-PD มีความน่าสนใจ เพราะมีความหลากหลาย สามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ได้หลายอย่าง (Tong และคณะ, 1991; Deckwer, 1995; Colin และคณะ, 2000; Cheng และคณะ, 2004; Lin และคณะ, 2005) ยกตัวอย่างเช่น 1,3-PD สามารถใช้เป็นโมโนเมอร์ (monomer) สำหรับนำไปทำ polycondensations เพื่อนำไปสู่การผลิตพลาสติกที่มีคุณสมบัติที่พิเศษ เช่น โพลีเอสเทอร์ (polyester) โพลีอีเทอร์ (polyethers) และโพลียูริเทน (polyurethanes) (Deckwer, 1995; Colin และคณะ, 2001; Wilke, 1999; Himmi และคณะ, 1999; Yang และคณะ, 2007; Du และคณะ, 2006) หรือเป็นโมโนเมอร์ (monomer) สำหรับเป็นน้ำมันหล่อลื่นชนิดโพลีไกลคอล (polyglycol) และอาจจะเป็นตัวละลายที่ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย (Papaniko laou และคณะ, 2000)

1,3-PD เป็นสารเคมีที่ปรากฏเห็นในของใช้หรือสินค้าที่ใช้ในชีวิตประจำวัน (Cameron และคณะ, 1993) และมีความสนใจที่จะทำการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเกิดขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ (Abbed-Andaloussi และคณะ, 1995; Zhang และคณะ, 2006b) การพัฒนาโพลีเอสเทอร์ใหม่ คือ โพลีโพรไพลีนเทเรพทาเลท (polypropylene terephthalate, PPT หรือ polytrimethylene terephthalate, PTT) จาก 1,3-PD ซึ่งมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นในการนำไปใช้ทางเคมี (Raynaud และคณะ, 2003; González-Pajuelo และคณะ, 2005b, 2006) PPT คือโพลีเอสเทอร์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายให้หมดไป ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพรมและอุตสาหกรรมผลิตสิ่งทอและมีความเกี่ยวข้องกับโพลีเอทิวลีนเทเรพทาเลท (polyethylene terephthalate, PET) และโพลีบิวทิวลีนเทเรพทาเลท (polybutylene terephthalate, PBT) (Hao และคณะ, 20006) สำหรับบริษัท Shell และบริษัท DuPont ได้จดสิทธิบัตรซึ่งเกี่ยวข้องกับโพลิเมอร์ PPT นี้ โดยสำหรับบริษัท Shell ได้พัฒนาเป็น Corterra® และบริษัท DuPont ได้พัฒนาเป็น Sorona® และ Hytrel®

PPT ถูกพัฒนาและจดสิทธิบัตรในปี 1941 แต่การใช้มีไม่มาก เป็นเพราะสารตั้งต้น 1,3-PD มีราคาแพง ดังนั้นบริษัทจำนวนมากพยายามพัฒนาให้การผลิต 1,3-PD มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในกระบวนการใหม่ของบริษัท Shell ซึ่ง 1,3-PD เป็นสารเคมีที่ได้ จากปฏิกิริยาของเอทิวลีนออกไซด์ (ethylene oxide) กับคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) และไฮโดรเจน (hydrogen) ส่วนกระบวนการของบริษัท DuPont ได้พัฒนาการผลิต 1,3-PD โดยทำให้เป็นเป็นผลิตภัณฑ์การหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกลูโคสโดยการเชื่อมต่อของยีนจุลินทรีย์ (Biebl และคณะ, 1999; Chotani และคณะ, 2000; Nakamura และ Whited, 2003) Nakamura และ Whited (2003) ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลูโคสและกลีเซอรอล พบว่าเป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตาม จำนวนของกลีเซอรอลที่เหลือจากการผลิตไบโอดีเซลยังมีไม่มาก แต่กลูโคสปัจจุบันนี้บางทีมีราคาแพง และใช้ในการประยุกต์อื่นๆ เช่น การหมักแอลกอฮอล์

1,3-PD ถูกผลิตขึ้น 10^5 ตันของทุกปี ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Németh และคณะ, 2003; Zhang และคณะ, 2006a) 1,3-PD เป็นการผลิตทางเคมีผ่าน 2 เส้นทางที่แตกต่างกันคือ ปฏิกิริยา hydration ของ acrolein และปฏิกิริยา hydroformylation ของ ethylene oxide (Cemeron และคณะ, 1998; Hao และคณะ, 2006; Yang และคณะ, 2007) การสังเคราะห์ทางเคมีต้องการอุณหภูมิสูง ความดันสูง และตัวเร่งปฏิกิริยา (Lin และคณะ, 2005) และยังผลิตสารตัวกลางที่เป็นพิษ (Raynaud และคณะ, 2003; González Pajuelo และคณะ, 2004, 2005a) ดังนั้น การสังเคราะห์ทางเคมีมีต้นทุนที่แพงและเป็นพิษ นอกจากนี้ 1,3-PD ยังคงมีปริมาณการตลาดที่ต่ำ (Deckwer, 1995) การสังเคราะห์ทางเทคโนโลยีชีวภาพของ 1,3-PD จึงเป็นทางเลือกใหม่ เพราะได้รับประโยชน์ทางสิ่งแวดล้อมและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ในการทดลอง (Hao และคณะ, 2006)

Biebl และคณะ (1999) ศึกษาการผลิต 1,3-PD โดยการหมักกลีเซอรอล ซึ่งบรรยายมาแล้วตั้งแต่ปีค.ศ. 1881 แต่การใช้จุลินทรีย์ในช่วง 100 ปีได้รับความสนใจเพียงเล็กน้อย จึงได้มีการเผยแพร่เมื่อไม่นานมานี้ กลีเซอรอลถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น 1,3-PD โดย *Clostridia* ซึ่งเหมือนกับ *Enterobacteriaceae* ส่วนสารตัวกลางหลักของวิถี oxidative คือ ไพรูเวท (pyruvate) ซึ่งมีผลพลอยได้ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มเติม คือ CO_2, H_2, acetate, butyrate, ethanol, butanol และ 2,3-butanediol ในการเพิ่ม lactate และ saccinate ถูกสร้างพลังงานในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง สำหรับผลได้ของ 1,3-PD ต่อกลีเซอรอลถูกกำหนดโดย $NADH_2$ ซึ่ง $NADH_2$ ส่วนใหญ่มีผลโดยการกระจายของผลิตภัณฑ์ในวิถี oxidative และขึ้นอยู่กับการใช้จุลินทรีย์ นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับสภาวะของกระบวนการ เช่น ชนิดของการหมัก สารตั้งต้นที่มากเกินพอ การยับยั้งที่หลากหลาย เป็นต้น

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา การค้นคว้าการผลิต 1,3-PD จากจุลินทรีย์ได้ถูกบรรยายเป็นสารไดออลซึ่งสามารถใช้สำหรับ polycondensates ที่หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โพลีเอสเทอร์ (polyester) กับคุณสมบัติที่สามารถนำมาผลิตได้ สำหรับการทดลองที่เหมาะสมโดยเฉพาะการใช้สารตั้งต้นที่เลือกไว้เท่านั้น เช่น กลูโคส แทนที่จะใช้กลีเซอรอล ดังนั้นความพยายามอย่างมากจนกระทั่งนำไปสู่การรวมกันของวิถีจากกลูโคสไปเป็นกลีเซอรอลประสบความสำเร็จกับแบคทีเรียจากการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ดังนั้น 1,3-PD อาจจะกลายเป็นผลผลิตทางเคมีที่สำคัญครั้งแรกโดยพันธุวิศวกรรมจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 คุณสมบัติของ 1,3-โพรเพนไดออล

เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีC3 อะตอมยึดติดกันด้วยพันธะเดี่ยว ในสภาวะปกติจะมีสถานะเป็นแก๊ส โพรเพนเป็นสารประกอบที่ได้มาจากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.7

รูปที่ 2.7 โครงสร้างโมเลกุล 1,3-โพรเพนไดออล
ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/1,3-propanediol

ตารางที่ 2.6 ลักษณะของสาร 1,3-โพรเพนไดออล

ชื่อเรียก	: โพรเพน-1,3-ไดออล
ชื่อทั่วไป	: ไตรเมตทาลีน กลีเซอรอล , 1,3-ไดไฮดรอกซี่โพเพน
สูตรโมเลกุล	: $C_3H_8O_2$
จำนวนโมล	: 76.09 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	: 1.0597 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	: -28 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	: 210-212 องศาเซลเซียส

ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/1,3-propanediol

2.2.2 ประวัติความเป็นมา

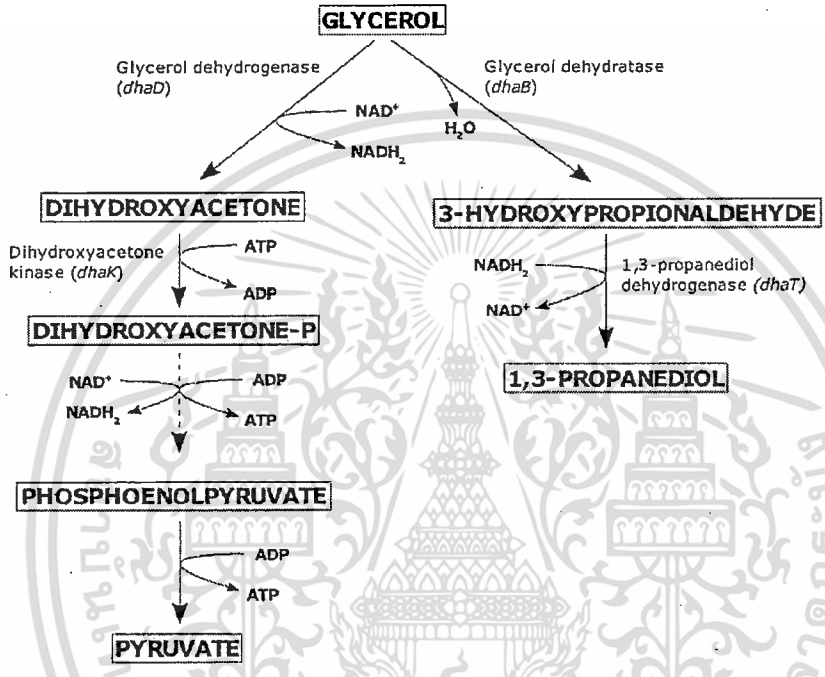
Biebl และคณะ (1999) ศึกษา 1,3-Propanediol (1,3-PD) เป็นหนึ่งของผลผลผลิตการหมักที่ทำการศึกษามานาน 1,3-PD เป็นที่รู้จักกันมาก่อนในปี 1881 โดย August Freund ซึ่ง *Clostridium pasteurianum* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำการเพาะเลี้ยงการหมักจากกลีเซอรอลอย่างเห็นได้ชัดเจน (Freund, 1881)

ต่อมา ในปี 1914 Voisenet ได้บรรยายถึงของเสียจากไวน์ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับแบคทีเรียนั้น แต่จนบัดนี้ไม่มีสายพันธุ์ที่ถูกแยกได้ ซึ่งการวิเคราะห์เกี่ยวกับปริมาณการหมักของ *Enterobacteria* ที่ผลิต 1,3-PD ที่แตกต่างกัน (trimethylene glycol, propylene glycol) เริ่มต้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาจุลินทรีย์ของ Delft (Braak, 1928) และต่อมาประสบความสำเร็จที่เมือง Ames มลรัฐ Iowa ประเทศสหรัฐอเมริกา (Mickelson, Mickelson และ Werkman, 1940)

ในช่วงยุค 1960 ความสนใจถูกย้ายไปสู่เอนไซม์ที่ใช้กับกลีเซอรอล โดยเฉพาะกลีเซอรอล และ diol dehydratase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นลักษณะพิเศษที่ต้องการโคเอนไซม์วิตามินบีสิบสอง (coenzyme B_{12}) เปลี่ยน 1,3-PD จาก *Clostridia* ซึ่งถูกบรรยายครั้งแรกในปี 1983 เป็นส่วนของกระบวนการไปสู่การได้มาของผลผลิตที่พิเศษจากสาหร่ายที่หลั่งของเสียกลีเซอรอลออกมา



รูปที่ 2.8 การหมักกลีเซอรอลเพื่อการสร้าง 1,3-PD

ที่มา : Bouvet และคณะ, 1995; Barbirato และคณะ, 1997b; Menzel และคณะ, 1997a; Biebl, 2001

2.2.3 เมทาบอลิซึมของ 1,3-โพรเพนไดออล

เป็นไปตามรูปที่ 2.8 ซึ่งแสดงถึงเมทาบอริซึมเพื่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล

2.2.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล

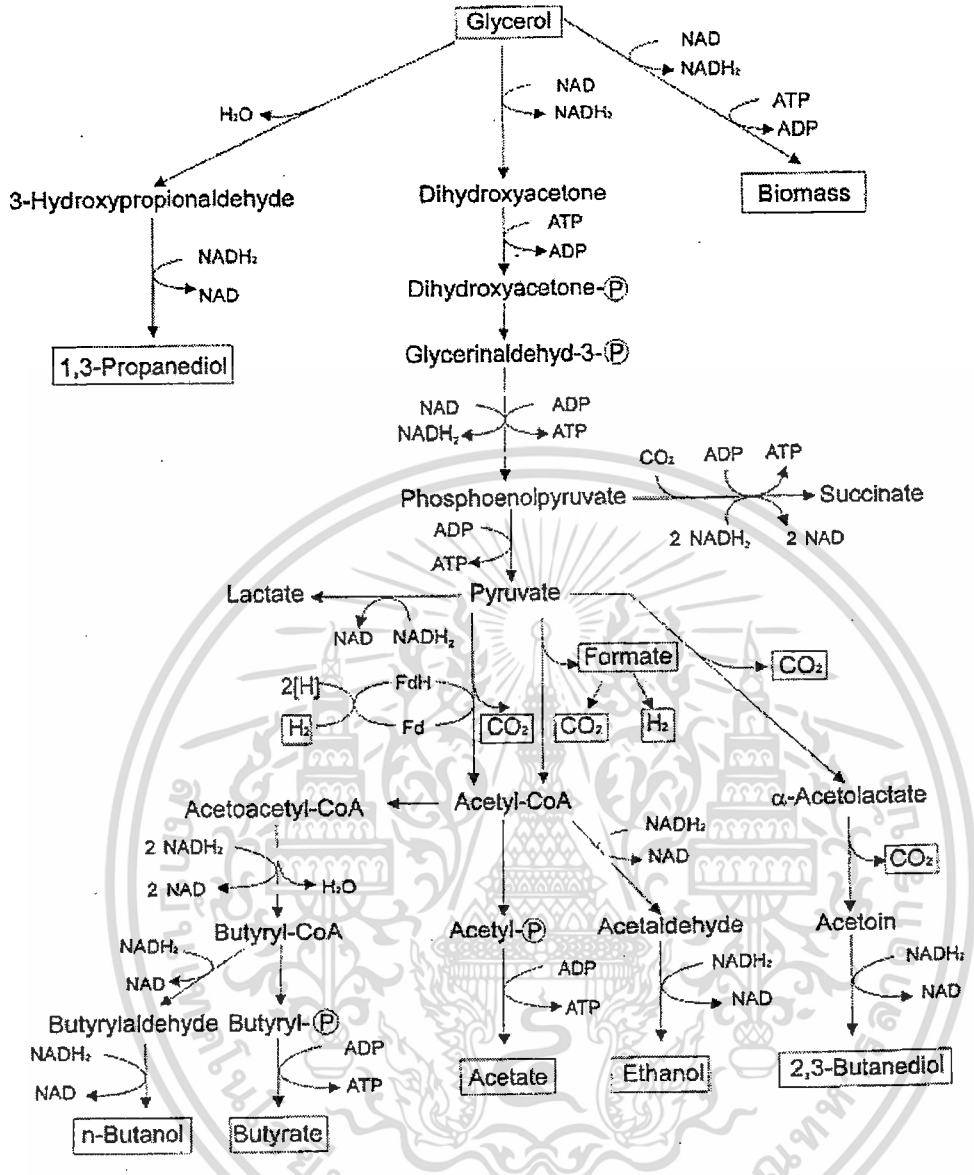
Biebl และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol, 1,3-PD) ซึ่งเป็นแบบอย่างผลผลิตของการหมักกลีเซอรอล แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนไปเป็น 1,3-PD ได้ ซึ่งจุลินทรีย์พวกนั้นประกอบด้วย *Enterobacteria* ของจีนัส *Klebsiella* (*K. pneumonia*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*) *Citrobactor* (*C. freundii*), *Lactobacilli* (*L. brevis* และ *L. buchneri*) และ *Clostridia* (*C. butyricum* และ *C. pasteurianum*) (Nakas และคณะ, 1983; Radler, 1984; Forsberg,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1987; Homann และคณะ, 1990; Biebl และคณะ, 1992; Dabrock และคณะ, 1992; และ Barbirato และคณะ, 1995) วิธีการหมักผลผลิตได้แสดงในส่วนของการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งได้การหมักจากน้ำตาล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะให้พลังงานที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต แต่สำหรับผลิตภัณฑ์หลายๆ ตัวถูกลดความเท่าเทียมกันซึ่งปรากฏให้เห็นในการ oxidized กลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ใน *Lactobacilli* เท่านั้น มีการเปลี่ยนแปลงลดลงและจะต้องมีการเพิ่มสารตั้งต้นของการหมักเพื่อการเจริญเติบโตและทำให้เกิดการลดลงค่าเท่ากัน (da Chaha และ Foster, 1992)

da Silva และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพของ 1,3-PD จากกลีเซอรอล ซึ่งมีแบคทีเรียที่หลากหลายชนิด เช่น *Lactobacillus brevis*, *L. bucherii*, *Bacillus welchii*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *C. pasteurianum*, *C. butyricum* และ *E. agglomerans* (Nakas และคณะ , 1983; Forsberg, 1987; Homann และคณะ, 1990; Veiga da Cunha และ Foster, 1992; Biebl, 1991; Biebl และคณะ, 1992; Biebl และ Morten, 1995; Daniel และคณะ, 1995; Macis และคณะ, 1998; Deckwer, 1995; González-Pajuelo และคณะ, 2006; Cheng และคณะ, 2004; Yang และคณะ, 2007) ผลการหมักโดยจุลินทรีย์ Enterobacteriaceae ในการสะสมของ 2 ผลิตภัณฑ์หลักคือ 1,3-PD และ lactate ในขณะที่ส่วนผลิตภัณฑ์ที่สอง คือ เลคเทท (lactate) ฟอร์เมท (formate) ซัคซิเนท (succinate) และเอทานอล (ethanol) ซึ่งเป็นผลผลิตที่ขึ้นอยู่กับสภาวะการเพาะเลี้ยง (Homann และคณะ, 1990; Barbirato และคณะ, 1998) กับ *C. butyricum* สำหรับ 1,3-PD เป็นผลิตภัณฑ์หลักกับกรดบิวทิวริก (butyric acid) และกรดอะซิติก (acetic acid) เป็นผลผลิตสุดท้ายก่อนนำไปสู่คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน (Barbirato และคณะ, 1998) *C. pasteurianum* เจริญบนกลีเซอรอล ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น n-บิวทานอล (n-butanol) 1,3-PD เอทานอล (ethanol) กรดอะซิติค (acetic acid) กรดบิวทิวริก (butyric acid) และกรดแลคติก (lactic acid) (Biebl, 2001) ดังรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในตอนท้ายของปฏิกิริยา

ที่มา : Biebl และคณะ, 1999

ตามที่ได้กล่าวจาก Biebl (1991) ความเข้มข้นสูงนั้นจะยับยั้งการใช้กลีเซอรอลของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อ *C. butyricum* เป็น 60 กรัมต่อลิตร สำหรับผลิต 1,3-PD สำหรับอะซิเตท (acetate) 27 กรัมต่อลิตร และบิวทิวเลทมีค่าเป็น 19 กรัมต่อลิตร และกลีเซอรอลถูกเสริมจนกระทั่งมีความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร Barbirato และคณะ (1998) ได้รายงานในการหมักแบบ batch ซึ่งใช้ *C. butyricum* ได้รับกลีเซอรีนหรือกลีเซอรอลจากอุตสาหกรรมความเข้มข้น 112 กรัมต่อลิตร ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของ 1,3-PD สุดท้าย เป็น 63.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลได้เป็น 0.69 โมลต่อโมล และอัตราการผลิตของ 1,3-PD สูงสุดเป็น 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กับบิวทิวเลต (butyrate) มีความเข้มข้นเป็น 7.5 กรัมต่อลิตร และได้สารอะซิเตต (acetate) เป็น 8.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by-product)

Papanikolaou และคณะ (2002) ได้ค้นคว้าการผลิต 1,3-PD โดยการแยกสายพันธุ์ *C. butyricum* ได้ความเข้มข้นสูงสุดของ 1,3-PD ซึ่งได้รับในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องมีค่าความเข้มข้นเป็น 31.48 กรัมต่อลิตร และมีผลได้เป็น 0.55 กรัมของ 1,3-PD ต่อกรัมของกลีเซอรอล เมื่อใช้กลยุทธ์ 2 ขั้นตอน ได้รับ 1,3-PD สูงสุดเป็น 41-46 กรัมต่อลิตร กับอัตราการผลิตสูงสุดเป็น 3.4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Mu และคณะ (2006) ใช้ *K. pneumoniae* ไปใช้ในการหมักกลีเซอรอลดิบ ได้ค่าความเข้มข้นของ 1,3-PD เป็น 51.3-53 กรัมต่อลิตร กับอัตราการผลิตเป็น 1.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งใช้กลีเซอรอลดิบกับกระบวนการซึ่งทำให้ง่ายลงและลดมูลค่าในการทำงาน ในการหมักแบบ fed-batch กับซูโครสซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นร่วม Yang และคณะ (2007) ได้สาร 1,3-PD มากขึ้นไปเป็น 83.56 กรัมต่อลิตร กับผลได้เป็น 0.62 โมลต่อโมลกลีเซอรอล และอัตราการผลิตเป็น 1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *K. oxytoca* M5a1 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดกลายพันธุ์ให้เกิดการบกพร่องในการสังเคราะห์กรดแลคติค (lactic acid) ในการรายงานครั้งแรก การผลิตของ 1,3-PD ในระดับการผลิตขนาด pilot scale ซึ่งใช้เชื้อ *K. pneumoniae* M5a1 สำหรับ Cheng และคณะ (2007) ได้สาร 1,3-PD ความเข้มข้นเป็น 58.8 กรัมต่อลิตร ผลได้ของสาร 1,3-PD เป็น 0.53 โมลต่อโมลกลีเซอรอล และมีอัตราการผลิตเป็น 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ลำดับปฏิกิริยาชีวเคมีสามารถควบคุมได้จากวิถีที่สารเปลี่ยนในเมทาบอริซึม ดังนั้นการสร้างของผลพลอยได้ (by-product) จะลดลงหรือแม้แต่ถูกตัดออก (Cheng และคณะ, 2005; 2006) การควบคุมพันธุกรรมของจุลินทรีย์สามารถตัดวิถีออก ซึ่งเป็นการแข่งขันกับความต้องการผลผลิตหรือยกระดับการผลิตของเมทาบอลิซึมที่ต้องการ การผลิตทางชีวภาพของทั้งกลีเซอรอลและ 1,3-PD ถูกศึกษา แต่ไม่สามารถแสดงกระบวนการที่สามารถทำให้สำเร็จได้ (Chotani และคณะ, 2000) ดังนั้น จึงไม่มีจุลินทรีย์ทางธรรมชาติโดยตรงสามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็น 1,3-PD (Hartlep และคณะ, 2002) ยิ่งไปกว่านั้น สายพันธุ์ *E. coli* ปกติไม่หมักกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD (Cameron และคณะ, 1998) การศึกษาได้พัฒนาการเชื่อมต่อของยีนจุลินทรีย์สำหรับการผลิต 1,3-PD จากกลูโคสได้สำเร็จ

Hartlep และคณะ (2002) ได้เสนอกลยุทธ์ 2 ขั้นตอนสำหรับการเปลี่ยนแปลงของกลูโคสไปเป็น 1,3-PD ซึ่งขั้นตอนแรกทำการเชื่อมต่อยีนของ *E. coli* ให้ผลิตกลีเซอรอลจากกลูโคส จากนั้น เมื่อกลีเซอรอลถูกเปลี่ยนแปลงเป็น 1,3-PD โดย *K. pneumoniae* กระบวนการทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จะทำให้ได้ 1,3-PD สูงถึง 60-70 กรัมต่อลิตร ในส่วนของบริษัท DuPont ได้จดสิทธิบัตร Genencor ® (Chotani และคณะ, 2002) ซึ่งได้บรรยายถึงการใช้กระบวนการเชื่อมต่อยีน *E. coli* ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับยีนจาก *S. cerevisiae* สำหรับการผลิตกลีเซอรอล และยีนจาก *K. pneumoniae* สำหรับการผลิต 1,3-PD (U.S. Patent 5599689, 1997) การเชื่อมต่อยีนจุลินทรีย์นี้ทำให้ได้ 1,3-PD ถึง 135 กรัมต่อลิตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น อัตราการผลิตเป็น 3.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นเป็นร้อยละ 51 (Sanford และคณะ, 2004) ความต้องการเพิ่มปริมาณ 1,3-PD ถูกจำกัดและถูกกีดกันจากความต้องการวิตามินบีสิบสองในกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ (Yang และคณะ, 2007)

สายพันธุ์ของ *E. coli* นั้นสามารถนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD มีการสร้างโดยยีนที่แสดงออกมากเกินไปของ *dha* regulon จาก *K. pneumoniae* หรือ *C. freundii* อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลจะลดลง ซึ่งเหตุผลหลักสำหรับการลดลงของผลิตภัณฑ์ เป็นผลมาจากผลผลิตสุดท้ายที่เป็นพิษ เช่น glycerol-3-phosphate (Zhu และคณะ, 2002) ต่อมา González-Pajuelo และคณะ (2005b) ได้พัฒนาการเชื่อมต่อของยีน *C. acetobutylicum* DG1 โดยนำพลาสมิด (pSPD5) เข้ามาทำให้ได้วิถี 1,3-PDO จาก *C. butyricum* ซึ่งแบคทีเรียนี้ถือได้ว่าเป็นผู้ผลิตทางธรรมชาติในช่วงของทั้งผลพลอยได้และ titer ของ 1,3-PD การเชื่อมต่อของยีน *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) สามารถใช้สำหรับอุตสาหกรรมต่อเนื่องของการผลิต 1,3-PD พร้อมกับได้ผลผลิตที่สูง ส่วน titer และอัตราการผลิตขากวัตถุดิบกลีเซอรอลจากไบโอดีเซล (González-Pajuelo และคณะ, 2005a, 2006b, 2006) ซึ่ง Zhang และคณะ (2006a) ได้สร้างการเชื่อมต่อของยีนสายพันธุ์ *E. coli* JM 109 (pHsh-*dhaB-yqhD*) ได้รับยีน *yqhD* (รหัสสำหรับเอนไซม์ 1,3-PD oxidoreductase จาก *E. coli* ปกติ) และยีน *dhaB* จาก *C. freundii* ในการควบคุมอุณหภูมิ การแสดงออกของพลาสมิดเวกเตอร์ pHsh ซึ่งการเชื่อมต่อของยีนสายพันธุ์นี้ ทำให้เกิดการผลิต 1,3-PD มากขึ้นถึง 41.1 กรัมต่อลิตร จากอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ซึ่งมีกลีเซอรอล 61.8 กรัมต่อลิตร Cameron และคณะ (1998) ได้บรรยายวิศวกรรมเมทาบอริซึม (metabolic engineering) ที่หลากหลาย ซึ่งได้เข้าใกล้สำหรับการผลิต 1,3-PD และ 1,2-PD

Zeng และคณะ (1994) ได้ศึกษากระบวนการสำหรับพัฒนาและการทำให้มีประสิทธิภาพทั้ง *Enterobacteria* และ *Clostridia* ถูกปรากฏให้เห็นถึงความเหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิต 1,3-PD จากเชื้อ *K. pneumoniae* และ *C. freundii* ซึ่งเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (facultative anaerobes) ทำให้ง่ายต่อการควบคุม แต่โดยเหตุที่สายพันธุ์เหล่านี้จะมีโอกาสก่อให้เกิดโรคจึงได้มีการป้องกันความปลอดภัยซึ่งได้ทำการแบ่งประเภทไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol, 1,3-PD) ผลได้ (Y_{PD}) และปริมาณอัตราการผลิต (Q_{PD}) ของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและกลายพันธุ์ในถังหมักเพาะเลี้ยงแบบ batch (*B*) และ fed-batch (*Fb*)

สายพันธุ์		การเพาะเลี้ยง	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	1,3-PD (กรัมต่อลิตร)	Y_{PD} (โมลต่อโมล)	Q_{PD} (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เอกสารอ้างอิง
K. pueumoniae	ATCC 15380	B	1	57.7	0.56	2.4	Tag, 1990
	ATCC 25955	Fb	6	58.1	0.44	1.0	Held, 1996
	ATCC 25955	Fb	21	73.3	0.48	1.5	Held, 1996
C. butyricum	DSM 5431	B	1	56.0	0.62	1.9	Biebl และคณะ, 1992
	DSM 5431	Fb	1	58.0	0.68	2.7	Günzel และคณะ, 1991
	DSM 5431	Fb	1	57.0	0.64	2.8	Reiman และ Biebl, 1996
	DSM 5431	Fb	1	70.3	0.68	1.5	Abbab-Andaloussiและคณะ, 1995
	mutant 2/2	Fb	1	70.5	0.66	0.9	Reiman และ Biebl, 1996
	VPI 3266	B	0	35.0	0.65	0.6	Saint-Amans และคณะ, 1994
	VPI 3266	Fb	0	65.0	0.69	1.0	Saint-Amans และคณะ, 1994
	E5	Fb	1	65.6	0.65	1.2	Petitdemange และคณะ, 1965

ที่มา : Biebl และคณะ, 1999

ในตารางที่ 2.9 แสดงความเข้มข้นของ 1,3-PD ที่ได้ จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ batch และ fed-batch จากแบคทีเรีย 2 ชนิดซึ่งมีผลผลิตอยู่ที่ร้อยละ 5.5–7.3 พบว่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแอลกอฮอล์ซึ่งสูงถึงร้อยละ 15 แต่สูงกว่า ถ้าเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตอะซิโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) ซึ่งได้ร้อยละ 2.5 ระยะเวลาในการหมักถูกแสดงค่าด้วยอัตราการผลิตเฉลี่ย (*Q*) คือ เป็นช่วงเวลาพอๆ กันทั้งแบคทีเรีย 2 กลุ่ม แต่ผลได้สาร 1,3-PD ต่อสารตั้งต้นที่ได้จากเชื้อ *Klebsiella* จะต่ำกว่า เนื่องจากการสร้างผลพลอยได้ (by-product) ของ *Clostridium butyricum* มีเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีการสร้างในปฏิกิริยาที่เร็วเท่ากับ 1,3-PD เช่น เลคเทต (lactate) และเอทานอล (ethanol) ขณะที่ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Klebsiella* ATCC 15380 มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงมาก (Homann และคณะ, 1990) ส่วน *Clostridia* DSM 5431 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วนความเข้มข้นของ 1,3-PD ที่ได้สูงสุดถึง70.5 กรัมต่อลิตร โดยสายพันธุ์ *Clostridium* อื่นๆ มีผลสำเร็จอย่างมากโดยลดเวลาในการหมักให้สั้นลง (Saint-Amains และคณะ, 1994; Petitidemange และคณะ, 1995)

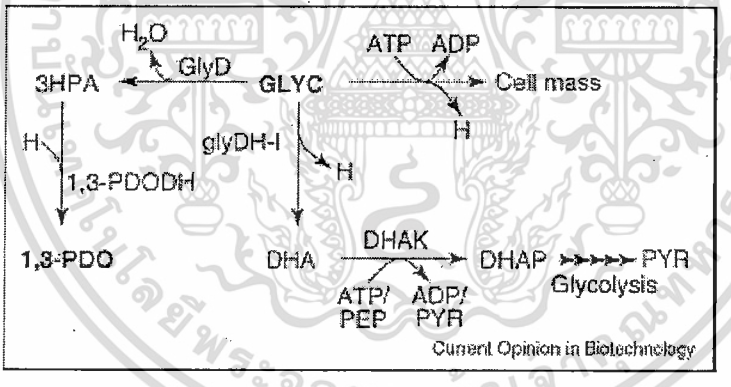
Günzel และคณะ (1991) ได้ศึกษาการผลิต 1,3-PD จากเชื้อ *C. butyricum* DSM 5431 ใน stirred-tank และ airlift reactor ซึ่งมีปริมาตรต่างๆ 1.2 และ 2 ลูกบาศก์เมตร ก๊าซที่ปล่อยออกมาเป็นก๊าซเฉื่อย นั่นก็คือ ก๊าซไนโตรเจน (N_2) และแปรผันความเร็วของเครื่องกวน (stirrer) พบว่า ไม่มีผลกระทบแม้กระทั่งชนิดของ reactor และปริมาตรก็ไม่มีผลกระทบเช่นเดียวกัน สำหรับการยับยั้งด้วยความเข้มข้นของสารตั้งต้น ทดลองในการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งมีผลการทดลองของสายพันธุ์ *C. butyricum* DSM 5431 แสดงในตารางที่ 2.8 ในส่วนของข้อมูลของ Günzel และคณะ (1991) สรุปได้ว่าปริมาณที่สูงขึ้นของการผลิต 1,3-PD จากจุลินทรีย์มีผลมาจากขนาดของถังทางอุตสาหกรรม ซึ่งไม่ก่อให้เกิดปัญหาใดๆ เนื่องจาก airlift reactor มีราคาไม่แพง เป็นการลดการลงทุนซึ่งถูกกว่าต้นทุนในการทดลอง การเก็บเกี่ยวสาร 1,3-PD จากการหมักและการทำให้บริสุทธิ์อยู่บนพื้นฐานของการปฏิบัติทางเครื่องมือและการใช้ความร้อน ซึ่งกระบวนการเก็บเกี่ยวทั้งหมดมีผลต่อต้นทุนอย่างมากโดยความเข้มข้นของ 1,3-PD สามารถได้มาในการหมัก ได้ถูกรายงานโดย Deckwer, (1995)

Boenigk และคณะ (1993) ได้ศึกษาการใช้การเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (continuous) 2 ขั้นตอนของเชื้อ *C. freundii* ที่มีอัตราการเจือจางเป็น 0.05 ต่อชั่วโมงในทั้ง 2 ขั้นตอน พบว่าผลการทดลองได้ความเข้มข้นของ 1,3-PD เป็น 42 กรัมต่อลิตร และผลได้เป็นร้อยละ 62 และมีกลีเซอรอลที่เหลือ 17 กรัมต่อลิตร แต่มีอัตราการผลิตเป็น 2.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการผลิต 4.8 หรือ 3.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงของเชื้อ *K. pneumoniae* ก็ยังมีค่าน้อยกว่าสำหรับ *Clostridia* ไม่พบข้อมูลการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (continuous) ถ้าข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch ของ Reimann ในปีค.ศ. 1977 ได้สาร 1,3-PD มีค่าเป็น 23 กรัมต่อลิตร และได้ผลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 68 โดยใช้อัตราการเจือจางเป็น 0.27 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตเป็น 6.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ต่อมา Yazdani และ Gonzalez (2007) ได้ทำการศึกษาการหมักกลีเซอรอลแบบไม่มีอากาศ ซึ่งเป็นแหล่งเชื้อเพลิงและเคมีในสายพันธุ์ของ *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* และ *Clostridium*

ได้มีความพยายามในการวิจัยที่หลากหลาย เพื่อนำไปสู่ความสำเร็จของการผลิตสารเคมีที่มีประสิทธิภาพ และจุลินทรีย์ทำการหมักกลีเซอรอล ทำให้ได้เป็น1,3-PD-dependent manner ส่วนใหญ่เป็นจุดของการทำงานที่มีประสิทธิภาพของการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมักกลีเซอรอล การปรับปรุงสายพันธุ์พื้นฐาน ประกอบด้วยยีน aldehyde dehydrogenase ที่ไม่ถูกกระตุ้น (Zhang และคณะ, 2006) และการแสดงออกของยีนที่มากเกินพอของ *dha* regulon (Zhang และคณะ, 2006) ซึ่งรหัส *dha* regulon เป็นเอนไซม์ในวิถีของ 1,3-propanediol ดังรูปที่ 2.10 กระบวนการปรับปรุงพื้นฐานอีกทางหนึ่ง ประกอบด้วย micro-encapsulation ของการผลิตสายพันธุ์ (Zhao และคณะ, 2006) สารตั้งต้นดิบจาก electrodialysis (Cheng และคณะ, 2006) อาหารที่ใช้เพิ่มเติม (Lin และคณะ, 2005) การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโต (Cheng และคณะ, 2005) และปัจจัยการเพาะเลี้ยง (González-Pajuelo และคณะ, 2004, 2005)



รูปที่ 2.10 รูปแบบปัจจุบันสำหรับการเปลี่ยนแปลงกระบวนการหมัก 1,3-PDO-dependent จากกลีเซอรอลในสปีชีย์ของแฟมิลี่ Enterobacteriaceae เช่น จีนัส *Klebsiella* และ *Citrobacter* (สิ่งที่ย่อ คือ DHA, dihydroxyacetone; DHAK, DHA kinase; DHAP, DHA phosphate; GLYC, glycerol; GlyD, glycerol dehydratase; glyDH-I, glycerol dehydrogenase type I; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; 1,3-PDO, 1,3-propanediol; 1,3-PDOH, 1,3-PDO dehydrogenase; 3HPA, 3-hydroxypropionaldehyde

ที่มา : Yazdani และ Gonzales (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาดังกล่าวข้างต้นทำให้เกิดผลประโยชน์ทั้งทางด้านพันธุกรรมและกระบวนการทางชีวภาพ ทำให้เกิดผลของระดับความเข้มข้นของ 1,3-PD ขึ้นไปอยู่ที่อยู่ที่ 100 กรัมต่อลิตร (Hirchmann และคณะ, 2005; Yang และคณะ, 2007) สำหรับการวิจัยเหล่านี้ทำให้มีทางเลือกในการวิศวกรรมสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่เป็นตามธรรมชาติ ในการหมักกลีเซอรอลโดยวิถีที่ถูกปรับปรุงจากธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตทำการหมักกลีเซอรอล ยกตัวอย่างเช่น วิถี 1,3-PD จากเชื้อ *Clostridium butyricum* ซึ่งเป็นตัวนำไปสู่ผลที่มีประสิทธิภาพของการหมักกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ของเชื้อ *Clostridium aceobutylicum* (González-Pajuelo และคณะ, 2005)

การสร้างผลิตภัณฑ์อื่นซึ่งไม่ใช่ 1,3-PD ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักกลีเซอรอลได้ถูกรายงาน ตัวอย่างเช่น บิวทานอล (butanol) เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่พบในการหมักกลีเซอรอลโดยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แน่นอน (Biebl และคณะ, 2001) ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอลเป็น 17 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นพิษระหว่างการผลิตอย่างเห็นได้ชัดเจน

ในรายงานอื่นๆ เอทานอล (ethanol) และฟอร์เมต (formate) เป็นผลผลิตหลักของการหมักกลีเซอรอลโดยเชื้อ *Klebsiella planticola* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากกระเพาะของกวางแดง (Javis และคณะ, 1997) ผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นมามีโมล่าร์พอๆ กัน และมีปริมาณความเข้มข้นสูงถึง 2 กรัมต่อลิตร แต่การหมักที่ยาวนานนำไปสู่ความสำเร็จที่สำคัญของการหมักกลีเซอรอล ส่วนการผลิตร่วมของเอทานอล (ethanol) และไฮโดรเจน (hydrogen) จากของเสียที่มีกลีเซอรอลประกอบอยู่โดยเชื้อ *Enterobacter aerogenase* ที่กลายพันธุ์ ได้ถูกรายงานด้วยเหมือนกัน (Ito, 2005)

Chen และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิต 1,3-PD โดยเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ภายใต้สภาวะ micro-aerobic ได้ทำการวิจัยการหมักในถังหมักแบบ batch ได้แสดงความเข้มข้นสุดท้ายและผลได้ของ 1,3-propanediol ในกลีเซอรอลภายใต้สภาวะ micro-aerobic ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ อย่างไรก็ตามเอทานอล (ethanol) ที่มีปริมาณเล็กน้อยถูกผลิตภายใต้สภาวะ micro-aerobic มากกว่าสภาวะที่ไม่มีอากาศที่การหมักช่วงสุดท้าย การหมักในถังหมักที่มีสภาวะ micro-aerobic ใช้เวลาน้อยกว่าการหมักแบบไม่มีอากาศ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มอัตราการผลิต 1,3-PD โดยความเข้มข้น ผลได้ และอัตราการผลิตของสาร 1,3-PD ในถังหมักที่ทำการหมักที่มีสภาวะ micro-aerobic โดยเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 มีค่าเป็น 17.65 กรัมต่อลิตร ร้อยละ 56.13 และ 2.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ระยะเวลาการหมักอยู่ที่ 6 ชั่วโมง และมีความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลเป็น 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ DSM 2026 กับ *Klebsiella pneumoniae* AS1-1736 ซึ่งเจริญเติบโต โดยได้ความเข้มข้นของ 1,3-PD อยู่ภายใต้สภาวะอย่างช้าเช่นเดียวกัน ยิ่งกว่านั้นการเจริญของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบ feb-batch โดย *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 ภายใต้สภาวะ micro-aerobic จะมีระยะการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เร็วกว่าสภาวะที่ไม่มีอากาศ สำหรับความเข้มข้นของ 1,3-PD มีค่าเป็น 59.50 กรัมต่อลิตร ผลได้มีค่าเป็นร้อยละ 51.75 ส่วนค่าอัตราการผลิตของ 1,3-PD ทั้ง 2 การหมักมีค่าเป็น 1.57 และ 0.80 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

2.2.5 ความสำคัญของ 1,3-โพรเพนไดออล และการนำไปใช้ประโยชน์ของ 1,3-โพรเพนไดออล

Biebl และคณะ (1999) Xiu และคณะ (1999) และ Zeng และคณะ (2002) ได้ศึกษาความสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น 1,3-PD ซึ่ง 1,3-PD เป็นหนึ่งในสารเคมีที่ดี มีราคาแพง และมีคุณสมบัติเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ที่มีศักยภาพในการผลิตโพลียูรีเทน (polyurethanes) เป็นส่วนโพลีเอสเทอร์ (polyester) ตัวใหม่ คือ โพลีไตรเมททิวไทลีนเทเรพทาเลต (polytrimethylene terephthalate, PTT) สำหรับ PTT นี้เป็นไฟเบอร์ที่โดดเด่นในการนำไปใช้ทางเคมี ซึ่งเทียบได้กับโพลีเอทิวลีนเทเรพทาเลต (polyethylene terephthalate, PET) และโพลีบิวทิวเลตเทเรพทาเรต (polybutyrate terephthalate, PBT)

2.3 สัญฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

2.3.1 *Clostridium butyricum*

รูปที่ 2.11 ภาพของ *Clostridium butyricum* ที่มีสปอร์และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก
ที่มา : www.miyarisan.com/english_main.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

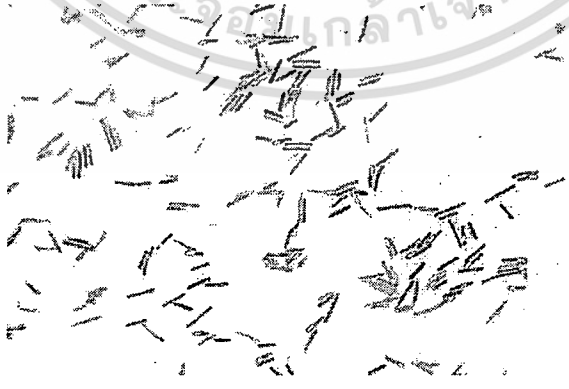
2.3.1.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Firmicutes
Class	:	Clostridia
Order	:	Clostridiales
Family	:	Clostridiaceae
Genus	:	*Clostridium*

Clostridium butyricum มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อยปลายมน อาจอยู่เซลล์เดี่ยว หรืออยู่เป็นคู่ อยู่เป็นลูกโซ่ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ pertrichous flagella สปอร์มีรูปร่างเป็นลูกโซ่ หรือเป็นเสี้ยว อยู่ค่อนไปทางปลายเซลล์ ติดสีแกรมบวก แต่ถ้าเชื้อมีอายุมากจะติดสีแกรมลบ ไม่เจริญหรือเจริญได้เล็กน้อยบนอาหาร NA แต่เจริญได้ดีบนอาหาร glucose agar ไม่ย่อยเคซีนและเจลาติน พบในดิน มูลสัตว์ เนยแข็ง นมที่เปรี้ยวตามธรรมชาติ

เชื้อแบคทีเรียนี้ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotroph บางชนิดเป็นพวกที่ย่อยแป้ง บางชนิดย่อยโปรตีน หรือบางชนิดอาจเป็นทั้งสองอย่างหรือไม่เป็นเลย สามารถหมักน้ำตาลต่างๆ โพลีแอลกอฮอล์ กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ พิวรีน และสารอินทรีย์อื่นๆ บางชนิดตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ ไม่รีดิวซ์ (reduce) ซัลเฟต ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนอย่างรุนแรง (strictly anaerobic) ปกติไม่สร้างเอนไซม์ catalase พบทั่วไปในดินตะกอนน้ำจืด และน้ำทะเล และในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ค่า G+C content ของ DNA 23-43 โมลเปอร์เซ็นต์ Type species *Clostridium butyricum*

2.3.2 *Clostridium acetobutylicum*



รูปที่ 2.12 ภาพของ *Clostridium acetobutylicum*

ที่มา : www.scribemedia.org/2007/09/18/nanologix-clostridia/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Firmicutes
Class	:	Clostridia
Order	:	Clostridiales
Family	:	Clostridiaceae
Genus	:	*Clostridium*

Clostridium acetobutylicum มีรูปร่างเป็นแท่งตรง เคลื่อนที่โดยใช้ pertrichous flagella สปอร์เป็นรูปไข่ อยู่ค่อนไปทางปลายเซลล์ ติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีไม่สม่ำเสมอ มีสีขาวเทาโปร่งแสงเป็นมัน เจริญได้เล็กน้อยในอาหาร NB แต่ถ้ามีคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อใช้ได้ มักจะเจริญได้ดี สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักดังนี้ กรดแอซิติก (acetic acid) กรดบิวทิวริก (butyric) บิวทานอล (butanol) และแอซีโตน (acetone) สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจน พบได้ทั่วไปในดิน

2.3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Clostridium*

เป็นพวกที่ไม่มีระบบไซโตรโครม และกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพื่อสร้างสารพลังงาน ATP ดังนั้นการได้มาซึ่ง ATP จึงต้องผ่านกระบวนการ substrate-level-phosphorylation การจัดจำพวกในระดับจีนัสออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ จะใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้สารชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *C. cellodioparum* และ *C. thermocellum* สามารถเฟอร์เมนเซลลูโลสแล้วให้ผลเป็นกรดอะซีติก (acetic acid) กรดซัคซินิค (succinic acid) เอทานอล (ethanol) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2) ส่วน *C. butyrium*, *C. pasteurianum*, *C. perfringens* และ *C. acetobutylicum* หมักน้ำตาล แป้ง และเพคติน ให้ผลลัพธ์เป็นอะซิโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) กรดบิวทิวริค (butyric acid) กรดอะซีติค (acetic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2)

2.3.4 *Enterobacter agglomerans*

Enterobacter เดิมมีชื่อว่า *Aerobacter* ประกอบด้วย 8 สปีชีย์ที่อาศัยอยู่ในดินและน้ำ และมีบางที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ แต่มี 2 สปีชีย์ คือ *Enterobacter amnigenua* และ *Enterobacter intermedium* ที่เป็นเชื้อในสิ่งแวดล้อมที่พบในดินและน้ำ และไม่ทราบว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.13 ลักษณะรูปร่างของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*
ที่มา: filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/Enterobacter.html

2.3.4.1 อนุกรมวิธาน

มี *Enterobacter* 6 สปีชีย์ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในคน คือ *E. cloacae, E. aerogenes, E. agglomerans, E. gergoviae, E. sakazakil* และ *E.taylorea*

เอนเทอโรแบคทีเรียเอซีเป็นตระกูลที่ใหญ่ที่สุดที่รวมแบคทีเรียที่สำคัญทางการแพทย์ ปัจจุบันมีสมาชิกอย่างน้อย 27 จีนัส 102 สปีชีย์ การจัดจำแนกจีนัสอาศัยหลักความคล้ายคลึงกันของ DNA (DNA homology) สมบัติทางชีวเคมี ปฏิกิริยาทางซีโรโลยี ความไวต่อโอเฟจและความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมของจีนัสต่างๆแบคทีเรียในตระกูลเอนเทอโรแบคทีรีเอซีมีสมาชิกจำนวนมากที่พบได้ทั่วโลกทั้งในดิน น้ำ สิ่งเน่าเปื่อย และเชื้อประจำถิ่น ในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ จึงเรียกว่าแบคทีเรียในลำไส้หรือ เอนเทอริกแบคทีเรีย สมาชิกบางตัวมักเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค เช่น สมาชิกบางตัวเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อาจฉวยโอกาสทำให้เกิดโรค การติดเชื้ออาจเริ่มมาจากแหล่งเก็บเชื้อ ในสัตว์ จากคนที่เป็นพาหะ หรือเกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อในร่างกายเอง

แบคทีเรียสกุล *Enterobacter* หรือมีชื่อเดิมคือ *Aerobacter* โดยมีโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร ลักษณะไม่เป็นเมือกดังรูปที่ 2.13 ซึ่งคุณลักษณะทางชีวเคมีของ *Enterobacter* แสดงในตารางที่ 2.10

แบคทีเรียในสกุล *Enterobacter* ประกอบด้วย 9 ชนิด คือ *E.cloacae*, *E.intermedium*, *E.taylorae*, *E.amnigenes* biogroup 1, *E.amnigenes* biogroup 2, *E.aerogenes*, *E.agglomerans*, *E.sakazakii* และ *E.gergoviae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.8 ลักษณะทางชีวเคมีของสกุล *Enterobacter*

การทดสอบทางชีวเคมี	*E.aerogenes*	*E.agglomerans*	*E.cloacae*	*E.gergoviae*	*E.intermedium*	*E.sakazakii*
Oxidase test	-	-	-	-	-	-
KIA TSI,gas	A/A +	A/A +	A/A +	A/A +	A/A +	A/A +
H_2S production	-	-	-	-	-	-
Indole production test	-	[-]	-	-	-	[-]
Methyl red test	-	d	-	-	+	-
Voges-Proskauer test	+	d	+	+	+	+
Citrate utilization test	+	d	+	+	d	+
Urease test	-	[-]	d	+	-	-
Motility test	+	[+]	+	+	[+]	+
Malonate utilization test	+	d	d	+	+	[-]
Lysine decarboxylase test	+	-	-	+	-	-
Ornithine decarboxylase test	+	-	+	+	[+]	+

หมายเหตุ + 90-100% สายพันธุ์ให้ผลบวก , - 0 – 10% สายพันธุ์ให้ผลบวก

[+] 76-89% สายพันธุ์ให้ผลบวก , d 26-75% สายพันธุ์ให้ผลบวก

[-] 11-25% สายพันธุ์ให้ผลบวก

แถบสีขาวทั้งแถบ หมายถึง ปฏิกิริยาที่เหมือนกันทั้งสกุล *Enterobacter*

แถบสีบางช่อง หมายถึง ปฏิกิริยาที่สามารถจำแนกสกุล *Enterobacter* ออกเป็น 2 กลุ่ม

2.3.4.2 ลักษณะของเชื้อ

เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่สร้างสปอร์ มีทั้งพวกที่สามารถเคลื่อนที่ได้และไม่ได้ พวกที่เคลื่อนที่ได้ส่วนใหญ่จะใช้ Peritrichous flagella (flagella ที่อยู่รอบๆเซลล์ในการเคลื่อนที่ หมักกลูโคสให้กรดและแก๊ส ในกระบวนการหมักหรือให้กรดเพียงอย่างเดียว ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (Reduce) ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enterobacter เป็นเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ และเจริญได้ดีในอาหารที่แยกได้จากลำไส้ ทุกสปีชีย์เกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันกับออร์นิทีน ยกเว้น *E. agglomerans* การติดเชื้อปกติ *Enterobacter* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ และอาจพบในดิน น้ำ น้ำเสีย และพืชผักต่างๆ บางครั้งพบในอุจจาระและทางเดินหายใจปกติไม่เป็นเชื้อก่อโรคตัวแรกยกเว้นการติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะในโรงพยาบาล และเป็นเชื้อฉวยโอกาส เช่นการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะเมื่อได้มีการสอดใส่เครื่องมือทางแพทย์

การรักษา

Enterobacter ไวต่อยาอะมิโนกลูโคไซค์ คลอแรมฟินิคอล เตรตระไซคลิน ไตรมิโซพริม ซัลฟาเมทอกซาโซล กรดนาลิดีซิก และไนโทรฟีราโทอิก ซึ่ง 3 ตัวหลักเป็นการรักษาในทางเดินปัสสาวะ

ความสำคัญทางการแพทย์

แบคทีเรียใน family นี้ส่วนใหญ่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์โดยไม่ก่อให้เกิดโรคจึงเรียกว่า entericbacteria เชื้อบางตัวเป็นเชื้อก่อโรคเช่น *Shigella, Salmonella, Yersinia pestis* บางตัวก็แป็น Normalflora ที่อาจเป็นเชื้อฉวยโอกาสได้ทำให้เกิดโรคได้ (opportunistic pathogent) เช่น *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis*

การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Enrichment media เช่น blood agar, Chocolate agar พบว่า Enterobacteriaceae สามารถเจริญได้ดีมักจะให้โคโลนีขนาดใหญ่ บางชนิด เช่น *Kle bseilla* spp. ให้โคโลนี่มันเยิ้มเพราะสามารถสร้าง Capsule ได้ บางชนิดสามารถสลายเม็ดเลือดแดงบน blood agar ได้ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae นี้ได้

2. Selective media การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือของกรดน้ำดีและสีอะนีลีน ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรม positive เช่น MacConkey agar สามารถช่วยแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่

2.1 Lactose fermenter แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถ ferment lactose ได้ทำให้เกิดกรด lactic acid ซึ่งเปลี่ยนสีของ indicater ทำให้โคโลนีมีสีแดงหรือสีชมพู Lactose fermenter ได้แก่ *E. coli, Klebseilla, Enterobacter* เป็นต้น

2.2 Non lactose fermenter แบคทีเรียกลุ่มนี้ให้โคโลนีที่ไม่มีสี ได้แก่ *Shigella, Salmonella, Edwardsiella* และ *Proteus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถ ferment lactose ได้แต่ช้า (delayed fermenter) คือภายใน 3-7 วัน ได้แก่ *Citrobacter*, *Arizona*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Clostridium butyricum*

Clostridium butyricum TISTR 1032 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บในอาหาร reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และมีการจัดเก็บใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.1.2 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum TISTR 1462 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บในอาหาร reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และมีการจัดเก็บใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.1.3 *Enterobactor agglomerans*

Enterobacter agglomerans BCC 19558 และ BCC 19559 มาจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยเก็บในอาหาร NA (Nutrient agar) ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และมีการจัดเก็บใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมี

กลีเซอรอล

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($[NH_4]_2SO_4$)

แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)

แคลเซียมคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($CaCl_2 . 2H_2O$)

โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$)

สารสกัดจากยีสต์

แบคโตเปปโตน

สารสกัดจากเนื้อ

อีดีทีเอ (EDTA)

เฟอร์รัสซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($FeSO_4 . 7H_2O$)

แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต ($MnCl_2 . 4H_2O$)

คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 . 2H_2O$)

บอริคแอซิด (H_3BO_3)

โซเดียมโมลิปเดต-2-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิกเกิลคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($NiCl_2 . 2H_2O$)	ซิงซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($ZnSO_4 . 7H_2O$)
กรดอะซิติก	กลูโคส
แอมโมเนียมซัลเฟต	ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต
แคลเซียมคลอไรด์	แคลเซียมคาร์บอเนต
กรดไฮโดรคลอริก	โซเดียมโมลิปเดต

3.3 อุปกรณ์

ฟลาก์ส	บีกเกอร์	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
ขวดเก็บอาหาร (Duran ®)	หลอดทดลอง	Anaerobic jar
แท่งแก้วคน	กระบอกตวง	ตะเกียงแอลกอฮอล์
เข็มเขี่ยเชื้อ	หลอดหยด	ปิเปต
จุกยางดูดสาร	จุกสำลี	จุกยางปิดฟลาก์ส
หลอดปั่นเหวี่ยง	ขวดเก็บตัวอย่าง	ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
เครื่องเขย่า	เครื่องปั่นเหวี่ยง	ขวดลูกชมพู่

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium butyricum*

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. butyricum* มีส่วนประกอบดังนี้

Glycerol	20.0	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	15.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	5.0	มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CaCo_3$	2.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	1.0	กรัมต่อลิตร
Trace element solution SL7	2.0	มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบ

ไปด้วย ดังนี้

$Zncl_2$	70.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$MnCl_2.4H_2O$	100.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
H_3BO_3	60.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CoCl_2.2H_2O$	200.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$CuCl_2.2H_2O$	20.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$NiCl_2.6H_2O$	25.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4.2H_2O$	35.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
HCl 37%	0.9	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับพีเอช (pH) ให้ได้ 7.0 โดยเติมสารละลาย 5 M NaOH หรือ 5 M H_2SO_4 โดยพีเอช (pH) เริ่มต้นจะมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-8.0 ช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลอยู่ระหว่าง 10-100 กรัมต่อลิตร

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ ***Clostridium acetobutylicum***

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutyricum* มีส่วนประกอบดังนี้

Glucose	15.0	กรัมต่อลิตร
Glycerol	15.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
Acetic acid	2.2	กรัมต่อลิตร
Biotin	0.04	กรัมต่อลิตร
Þ-aminobenzoic acid	8.0	มิลลิกรัมกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับพีเอช (pH) ให้ได้ 6.3 โดยเติมสารละลาย 5 M NaOH หรือ 5 M H_2SO_4 โดยพีเอช (pH) เริ่มต้นจะมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-8.0 ช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลอยู่ระหว่าง 10-100 กรัมต่อลิตร

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans*

อาหารเลี้ยงเชื้อ *E. agglomerans* มีส่วนประกอบดังนี้

Glycerol	20	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร
$CaCo_3$	4.0	มิลลิกรัมต่อลิตร
Yeast extract	2.0	กรัมต่อลิตร
Bactopeptone	0.5	กรัมต่อลิตร
Bacteriological meat extract	0.3	กรัมต่อลิตร
Mineral solution containing	1.0	มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบไปด้วย ดังนี้
EDTA	5.0	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4$ $7H_2O$	2.0	กรัมต่อลิตร
$MnCl_2$ $4H_2O$	1.0	กรัมต่อลิตร
$CuCl_2$ $2H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
H_3BO_3	0.2	กรัมต่อลิตร
Na_2MoO_4 $2H_2O$	30	มิลลิกรัมต่อลิตร
$Nicl_2$ $2H_2O$	30	มิลลิกรัมต่อลิตร
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0.1	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอช (pH) ให้ได้ 7.0 โดยเติมสารละลาย 5 โมลาร์ NaOH หรือ 5 โมลาร์ H_2SO_4 โดยพีเอช (pH) เริ่มต้นจะมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-8.0 ช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลอยู่ระหว่าง 10-100 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium*

ทั้งเชื้อ *Clostridium bytyricum* TISTR 1032 และ *Clostridium acetobytylicum* TISTR 1462 มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงแต่ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยความแตกต่างของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้กล่าวถึงแล้วในหัวข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 เริ่มการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ จากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อ *Clostridium* ดังกล่าวมาแล้ว และอาหารนี้มีความเข้มข้นกลีเซอรอลร้อยละ 20 ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว จากนั้นเติมไนโตรเจนแล้วนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากนั้นทำการเตรียมหัวเชื้อที่จะใช้กับการทดลอง โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อ *Clostridium* ดังกล่าวมาแล้ว และอาหารนี้มีความเข้มข้นกลีเซอรอลร้อยละ 20 ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วทำการดูดหัวเชื้อ *Clostridium* เริ่มต้น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมไว้จากนั้นเติมไนโตรเจนแล้วนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Enterobacter*

นำเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 และ BCC 19559 ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อเหมือนกัน โดยส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้กล่าวถึงแล้วในหัวข้อ 3.4.3 โดยเริ่มการเตรียมเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ จากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อ *Enterobacter agglomerans* 2 สายพันธุ์ที่กล่าวมาแล้วและอาหารนี้มีความเข้มข้นของกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตรทั้งหมด 5 มิลลิลิตรที่อยู่ในหลอดฝาเกรียว แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ที่ 121 อาศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เลี้ยงไว้ในอาหาร glycerol stock ที่เป็นอาหารแข็ง จำนวน 1 ลูป แล้วเลี้ยงในแอนด์แอโรบิกจาที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

จากนั้นเตรียมหัวเชื้อที่ใช้กับการทดลอง โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อ *Enterobacter* ดังกล่าวมาแล้วและอาหารที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ที่ 121 อาศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วทำการดูดเชื้อ *Enterobacter* เริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่เตรียมไว้ในฟลาก์กขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไนโตรเจนแล้วนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.5.3 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* เพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่แตกต่างกัน (ร้อยละ 10, 20, 30 และ 40) ในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมในหัวข้อ 3.5.1 เป็นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นเติมไนโตรเจนแล้วนำไปเลี้ยงที่ความเร็วรอบแต่ละระดับ (0, 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 0, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Clostridium butyricum* และที่ระยะเวลา 0, 12, 15 และ 18 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* จากนั้น แยกตัวอย่างไปวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ด้วยการเจือจางแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ตัวอย่างที่เหลือ นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที 15 นาที ทำการแยกส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอล และ 1,3-โพรเพนไดออล

3.5.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* 2 สายพันธุ์ เพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่แตกต่างกัน (10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตรต่อลิตร) ที่มีค่าระดับ pH ที่ต่างกัน (5.5, 6, 6.5, 7, 7.5) โดยใส่ในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) ที่ 121 อาศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที แล้วทำการดูดหัวเชื้อที่จะใช้กับการทดลอง 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมไว้จากนั้นเติมไนโตรเจนแล้วนำไปเลี้ยงที่ความเร็วรอบแต่ละระดับ (0, 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 0, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 และ 36 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Enterobacter agglomerans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จากนั้นแยกตัวอย่างไปวิเคราะห์จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตด้วยการเจือจางแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ตัวอย่างที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลและสาร 1,3-โพรเพนไดออล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.6.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์

ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ เริ่มด้วยการเจือจางเป็นชุด (series dilution) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) เริ่มจากหลอมอาหารเพาะเชื้อให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมตัวอย่างอาหารให้เจือจางได้ความเข้มข้นช่วงที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากสารละลายเชื้อที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 จาน โดยเรียงจานทั้ง 3 ซ้อนกัน ดูดอาหารใส่จานล่างสุดก่อน แล้วไล่ขึ้นมาจนถึงใบบนสุด เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากจานใบล่างสุด เช่นเดียวกัน เขย่าจานที่ซ้อนอยู่ทั้ง 3 ใบพร้อมกันโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วันโดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร)

3.6.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลและ 1, 3-โพรเพนไดออล

ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และ 1,3-โพรเพนไดออล ด้วยเครื่อง HPLC ทำโดยใช้คอลัมน Aminex® HPX-87H Ion Exclusion และ 9 μm particle size เส้น ผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมล่าร์ ที่มีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง ใช้ run time 20 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานกลีเซอรอล และ 1,3-โพรเพนไดออลที่ใช้มี retention time (นาที) ดังต่อไปนี้ กลีเซอรอล (10.15-10.55) และ 1,3-โพรเพนไดออล (13.30-13.80)

3.6.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

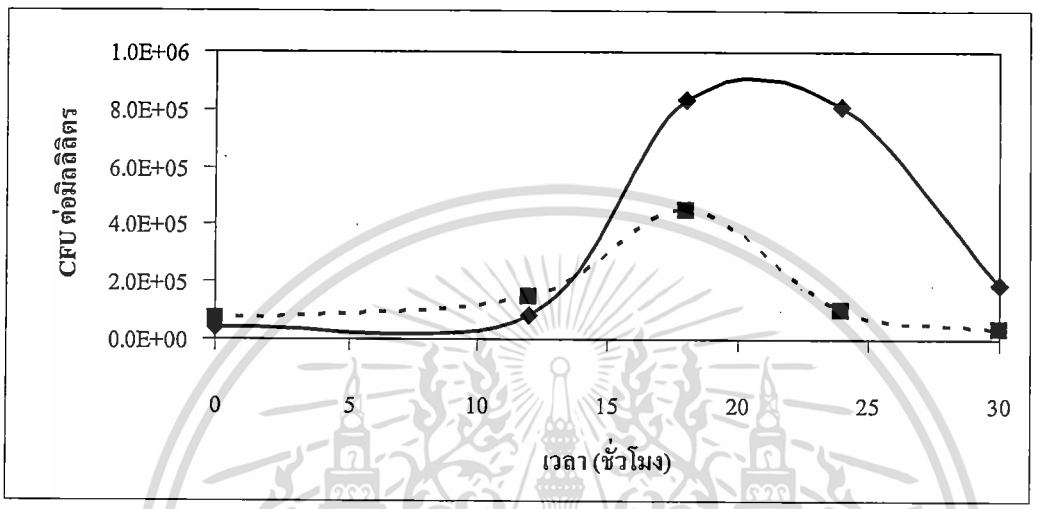
นำค่าที่ได้จากความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ ที่นำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตวัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเชื้อ (CFU ต่อมิลลิลิตร) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 (——◆——) และ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 (- - ■ - -)

4.1.1 *Clostridium butyricum* TISTR 1032

เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 จากโคโลนีเดี่ยว เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} และ 10^{-4} โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อแต่ละความเจือจาง เริ่มจากตัวอย่างที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าจานอาหาร โดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.1 พบว่าเชื้อ *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 18 ชั่วโมง นับได้ 8.32 $\times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร และรองลงมาที่ 24 ชั่วโมง นับได้ 8.12 $\times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่ง พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงเล็กน้อย ดังนั้นจึงได้นำช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงซึ่งเชื้อ *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตเฉลี่ยได้สูงสุดมาทำการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ส่วนที่ระยะเวลาเริ่มต้น นับเชื้อ *C. butyricum* ได้ 4.05 $\times 10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร ที่การเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เป็น 8.23 $\times 10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น เชื้อนี้จะเริ่มอยู่ในช่วงระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) จนถึง 18 ชั่วโมง

4.1.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462

สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1032 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นี้เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น เริ่มจากการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} และ 10^{-4} โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อแต่ละความเจือจาง เริ่มจากตัวอย่างที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ แล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะลี้ยงเชื้อ โดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วันโดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร)

จากรูปที่ 4.1 เมื่อทำการนับโคโลนีและคำนวณแล้ว พบว่าที่ระยะเริ่มต้น สามารถนับเชื้อ *C. acetobutylicum* ได้ 7.05 $\times 10^4$ CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น ที่ 12 ชั่วโมง เชื้อ *C. acetobutylicum* สามารถเจริญเติบโตได้ 1.49 $\times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร และเจริญเติบโตสูงสุดเฉลี่ยที่ 18 ชั่วโมง นับได้ 4.52 $\times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น โคโลนีที่นับได้ของเชื้อ *C. acetobutylicum* มีจำนวนลดลงเรื่อยๆ ดังนั้นจึงได้นำช่วงเวลาที่ 18 ชั่วโมงซึ่งเชื้อสามารถเจริญเติบโตเฉลี่ยได้สูงสุดมาทำการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เป็นที่น่าสังเกตว่า ที่การเจริญเติบโตสูงสุด คือ 18 ชั่วโมง เชื้อ *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตได้สูงกว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* คิดเป็น 1.8 เท่า เกือบ 2 เท่าทีเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

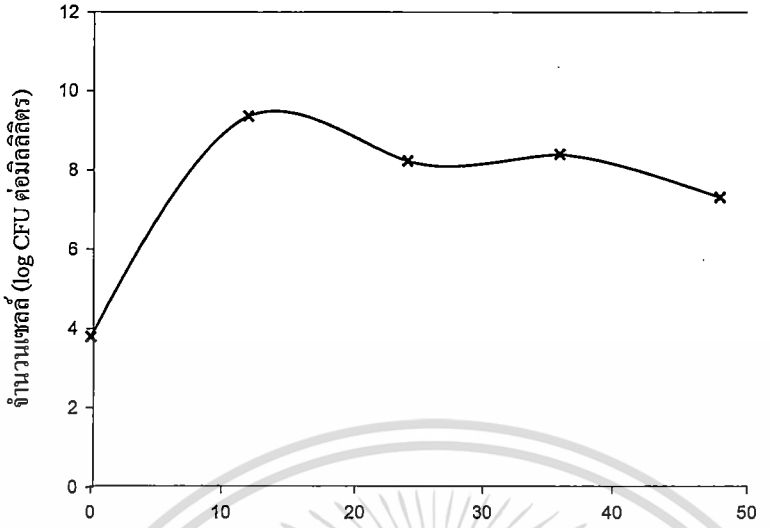
4.1.3 *Enterobacter agglomerans* BCC 19558

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 และ BCC19559 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อการสร้างสาร 1,3-โพรเพนไดออล เริ่มจากการใช้เชื้อโคโลนีเดี่ยว มาเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร (Barbirato และ Bories, 1997) คิดเป็นความเข้มข้นกลีเซอรอล 25.22 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศโดยทำการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน และใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้น ทำการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยใช้วิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3},10^{-5}และ10^{-7} ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเป็น CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ผลตามรูปที่ 4.2 ตารางที่ 4.1 และ 4.2

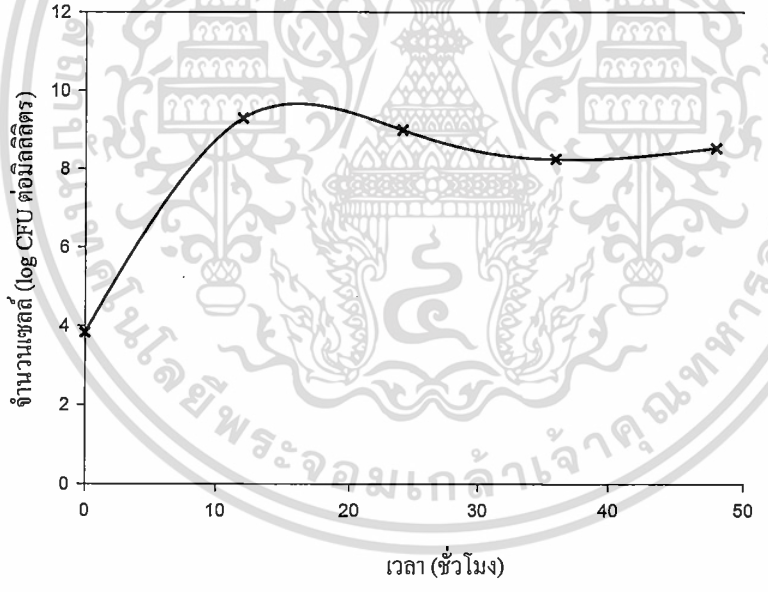
จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.2 พบว่าเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง นับได้ 9.36 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับช่วงเวลาอื่นที่ทำการเก็บตัวอย่าง และช่วงเวลาที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์รองลงมา คือที่ 36 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อได้ 8.40 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นมีการเจริญเติบโตลดลง ที่ 48 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่เพียง 7.33 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนที่สุด ดังนั้นจึงพบว่าเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ที่เจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 12 ชั่วโมง ส่วนที่ระยะเวลาเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงนับได้ 3.79 log CFU ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 จึงได้ใช้ช่วงเวลานี้มาเป็นเวลาที่เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น และเก็บตัวอย่างเชื้อเมื่อทำการทดลองหาสภาวการณ์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

พบว่าเมื่อผ่านไปตามช่วงเวลาเริ่มต้นตั้งแต่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25.22 กรัมต่อลิตร มีการนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อ จาก 25.22 กรัมต่อลิตร แต่ในระยะเริ่มต้นของการเจริญเติบโตพบค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 20.55 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 12 จุดถัดมาของการเก็บตัวอย่าง ค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลลดลงเหลือ 17.81 กรัมต่อลิตร จากนั้น พบว่ากลีเซอรอลมีค่าเป็น 18.00 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 และมีค่าคงที่ประมาณ 18.00 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ที่เจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตวัดจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในหน่วย log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามช่วงเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยง (ก) เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 และ (ข) เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่างตามช่วงเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่ 12 ชม.
0	3.79^{d}±0.10	20.55	6.8
12	9.36^{a}±0.16	17.81	6.9
24	8.23^{b}±0.45	18.00	6.8
36	8.40^{b}±0.36	18.00	6.8
48	7.33^{c}±0.07	nd	6.8

หมายเหตุ a, b, c, d ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด

ตารางที่ 4.2 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่างตามช่วงเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่ 12 ชม.
0	3.83^{d}±0.22	17.12	6.8
12	9.30^{a}±0.11	24.81	6.9
24	8.99^{b}±0.21	18.76	6.8
36	8.25^{c}±0.08	14.67	6.8
48	8.53^{c}±0.16	16.54	6.8

หมายเหตุ a, b, c, d ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 *Enterobacter agglomerans* BCC 19559

จากรูปที่ 4.2 (ข) และตารางที่ 4.2 เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอล 25.22 กรัมต่อลิตร ทำการนับเซลล์และคำนวณแล้ว พบว่าที่ระยะเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตได้ 3.83 log CFU ต่อมิลลิลิตร และพบการเจริญเติบโตสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 นับได้ 9.30 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับช่วงเวลาอื่นที่ทำการเก็บตัวอย่าง และช่วงเวลาที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์รองลงมา คือที่ 36 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อได้ 8.25 log CFU ต่อมิลลิลิตรจากนั้น มีการเจริญเติบโตลดลง ที่ 48 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่เพียง 8.53 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนที่สุด

นอกจากนี้ พบว่าเมื่อผ่านไปตามช่วงเวลาเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอล 25.22 กรัมต่อลิตร มีการนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลในชั่วโมงที่ 24 ลดลงเหลือ 18.76 กรัมต่อลิตร จากนั้นกลีเซอรอลมีค่าลดลงอีกเป็น 14.67 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 36 และมีค่าคงที่ที่ชั่วโมงที่ 48 เป็น 14.67 กรัมต่อลิตร

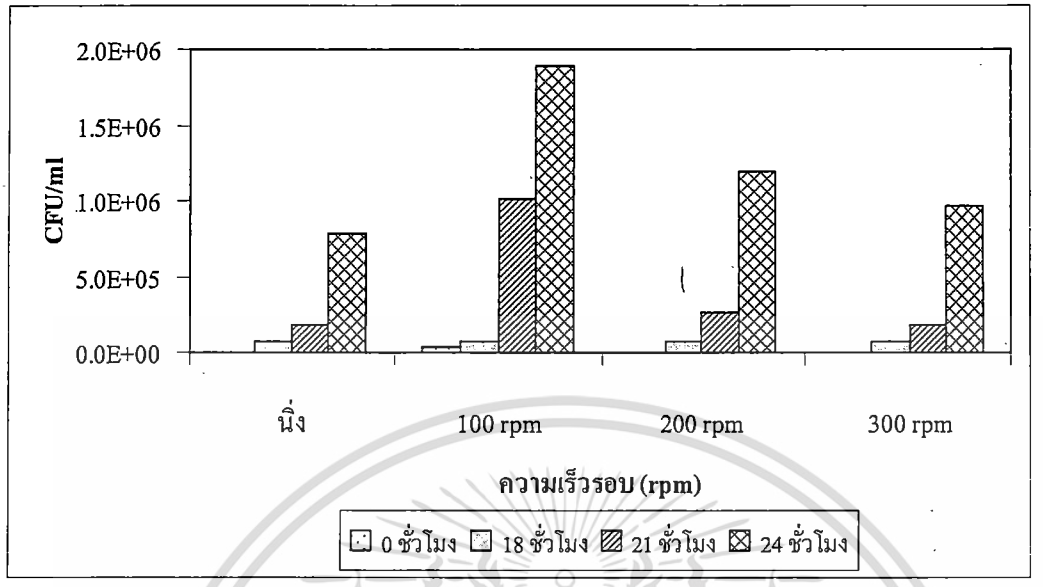
ดังนั้น จึงพบว่าเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ที่เจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 12 ชั่วโมง ส่วนที่ระยะเวลาเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงนับได้ 3.83 log CFU ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 จึงได้ใช้ช่วงเวลานี้มาเป็นเวลาที่เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น และเก็บตัวอย่างเชื้อเมื่อทำการทดลองหา สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเป็นที่สังเกตว่าที่การเจริญเติบโตสูงสุดเฉลี่ยที่ 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 เจริญได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น คิดเป็น 1.2 เท่า ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก

4.2 ผลของความเร็วรอบกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

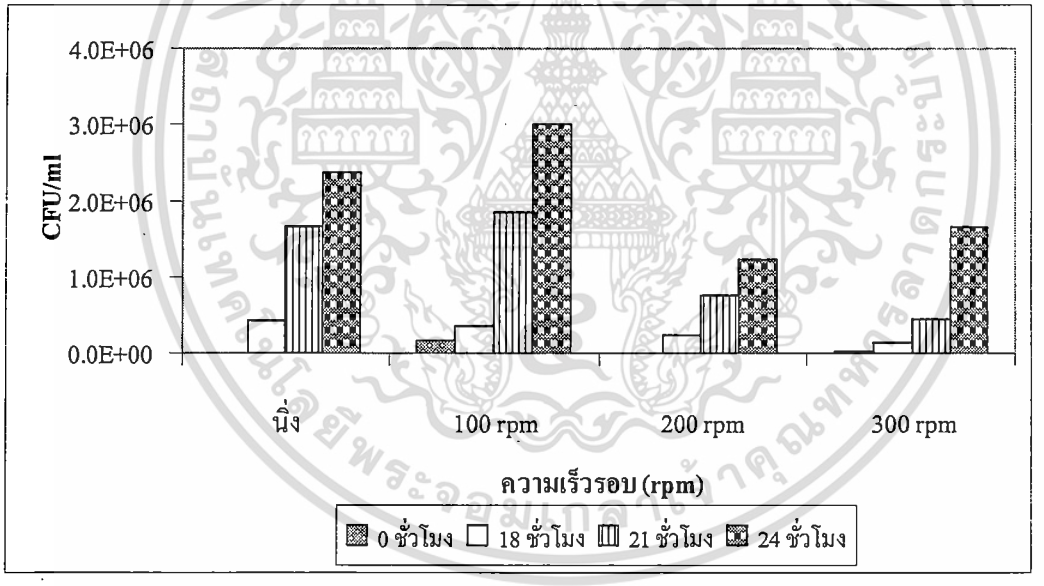
สำหรับเชื้อจีนัส *Clostridium* จะทำการทดลองหาผลของความเร็วรอบกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ภายใน 1 การทดลอง ในขณะที่เชื้อจีนัส *Enterobacter* จะทำการทดลองส่วนนี้แยกจากกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 *Clostridium butyricum* TISTR 1032



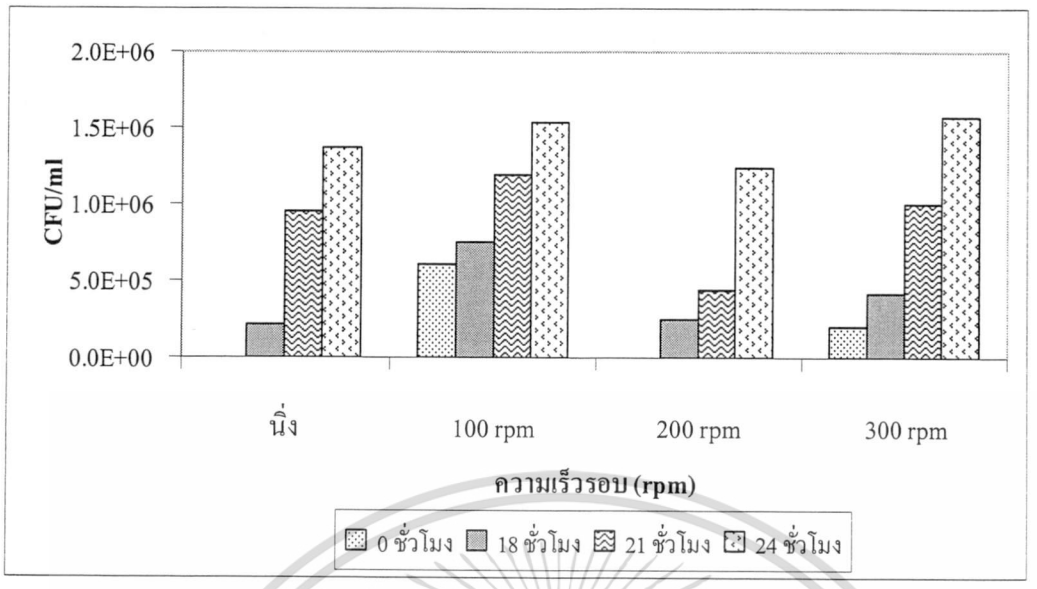
(ก)



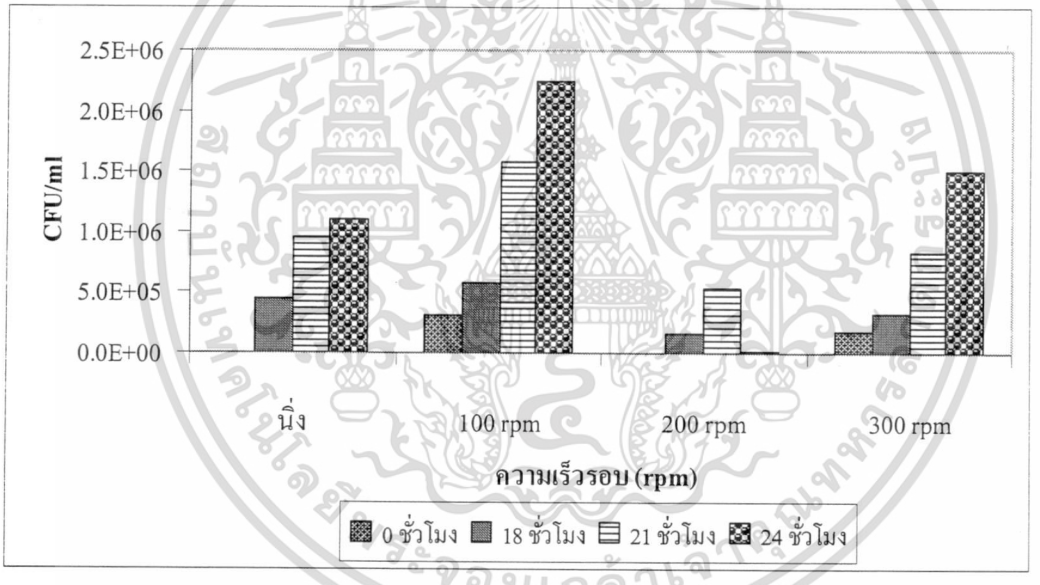
(ข)

รูปที่ 4.3 ผลของความเร็วรอบ (ตั้งนิ่ง และ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงต่างๆ (ก) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 (ข) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 (ค) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 (ง) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.3 (ต่อ) ผลของความเร็วรอบ (ตั้งนิ่ง และ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงต่างๆ (ก) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 (ข) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 (ค) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 (ง) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการศึกษาผลของความเร็วรอบกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลร่วมกันต่อเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} โดยใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากตัวอย่างที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ และเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าจานให้เข้ากัน แล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3

ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลร้อยละ 10 ในการทดลองเพาะเลี้ยง พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ที่ 24 ชั่วโมง โดยที่สภาวะนิ่ง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 7.88×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นับโคโลนีเฉลี่ยสูงสุดได้ 1.89×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดเท่ากับ 1.20×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่หากใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จำนวนเชื้อ *C. butyricum* สูงสุดลดลง 9.63×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าถ้าเติมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 100 รอบต่อนาที และใช้เวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ทำให้ทราบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดยังคงอยู่ที่ 24 ชั่วโมง พิจารณาที่สภาวะนิ่ง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 2.38×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นับโคโลนีเฉลี่ยสูงสุดได้ 3.01×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดลดลงเหลือ 1.24×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่หากใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จำนวนเชื้อ *C. butyricum* สูงสุดเป็น 1.66×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังนั้น ถ้าเติมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 20 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 100 รอบต่อนาที และใช้เวลา 24 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับการเติมกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10

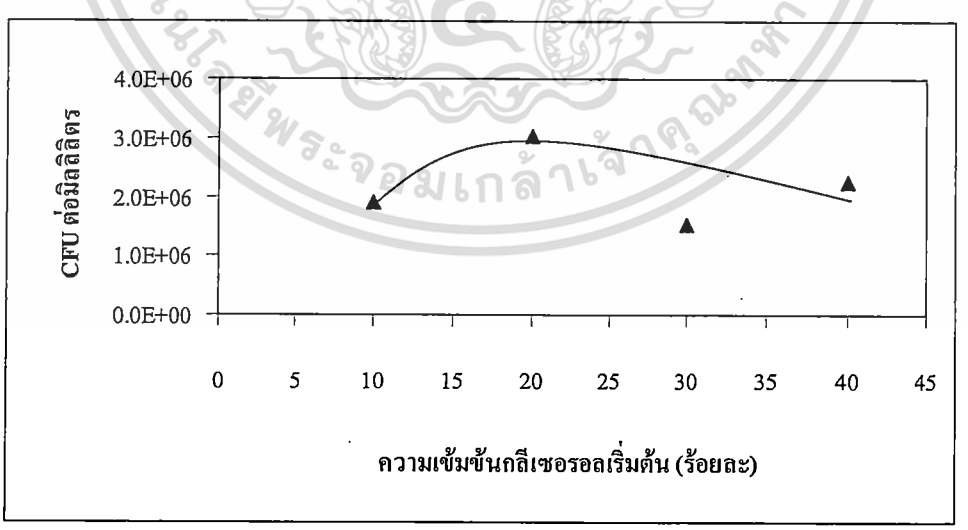
ส่วนการทดลองความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 24 ชั่วโมง โดยที่สภาวะนิ่ง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 1.37×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นับโคโลนีเฉลี่ยสูงสุดได้ 1.54×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดลดลงเป็น 1.24×10^6 CFU ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ในขณะที่หากใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จำนวนเชื้อ *C. butyricum* สูงสุดเท่ากับ 1.58×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ไม่ต่างจากการเพาะเลี้ยงด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่าถ้าเติมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 30 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 300 และ 100 รอบต่อนาที และใช้เวลา 24 ชั่วโมง

ในขณะที่ใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 ในการทดลอง พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 24 ชั่วโมง ยกเว้นเมื่อทำการทดลองที่ 200 รอบต่อนาที เจริญเติบโตสูงสุดที่ 21 ชั่วโมง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง นับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้สูงสุด 1.10×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดเป็น 2.25×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร หากใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบจำนวนเชื้อ *C. butyricum* สูงสุด 5.30×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 21 ชั่วโมง และถ้าใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที มีจำนวนเชื้อสูงสุด 1.50×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เพราะฉะนั้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 ต่อเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบสภาวะความเร็วรอบของเครื่องเขย่าแล้ว เชื้อ *C. butyricum* สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และเวลา 24 ชั่วโมง และเหมือนกับการทดลองช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นอื่นๆ

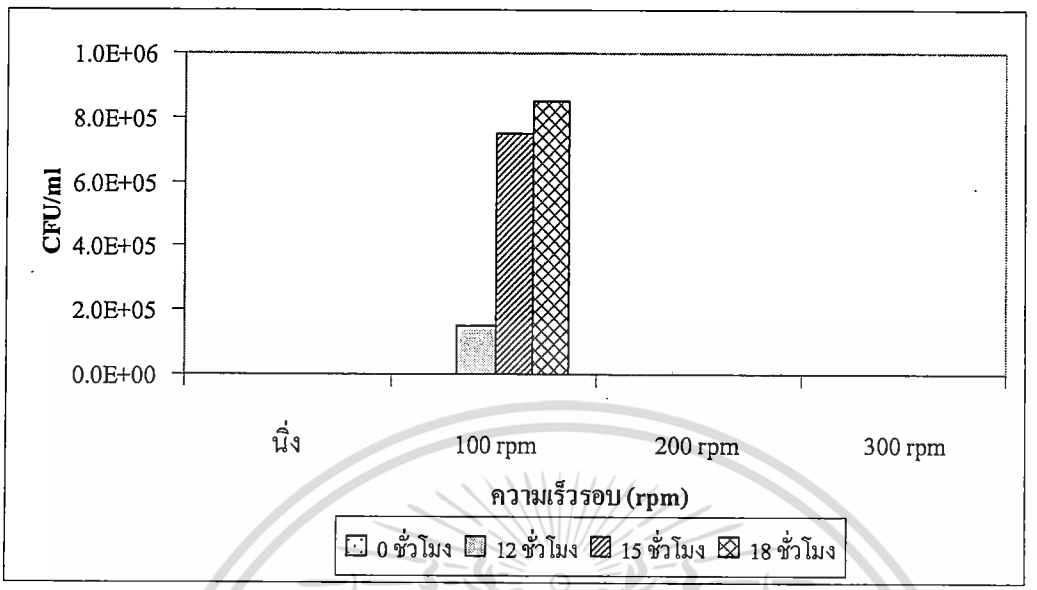
ถ้าหากพิจารณาเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 ตามรูปที่ 4.4 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที พบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 20



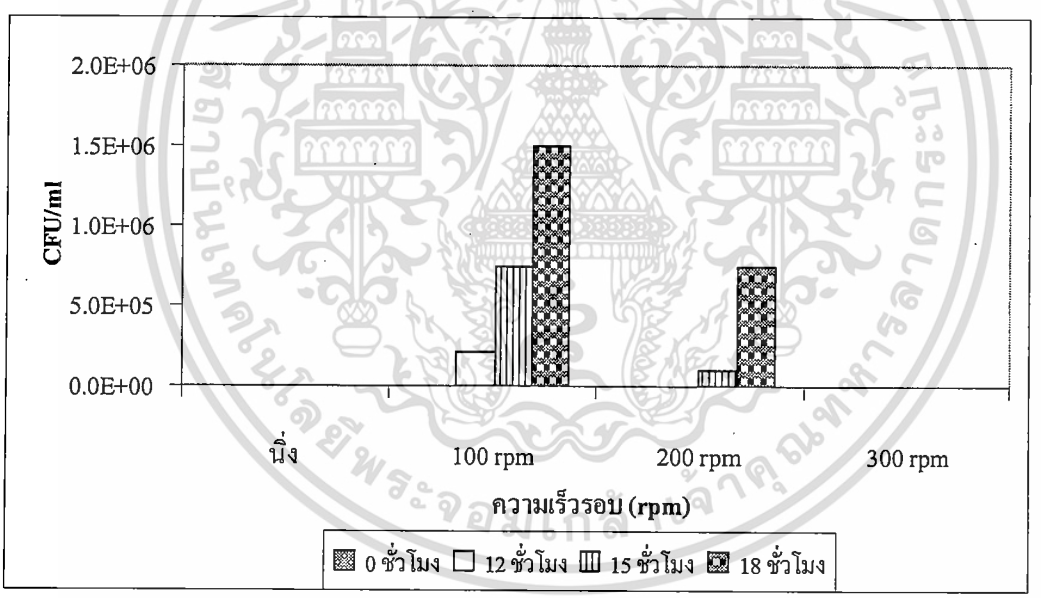
รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 เมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462



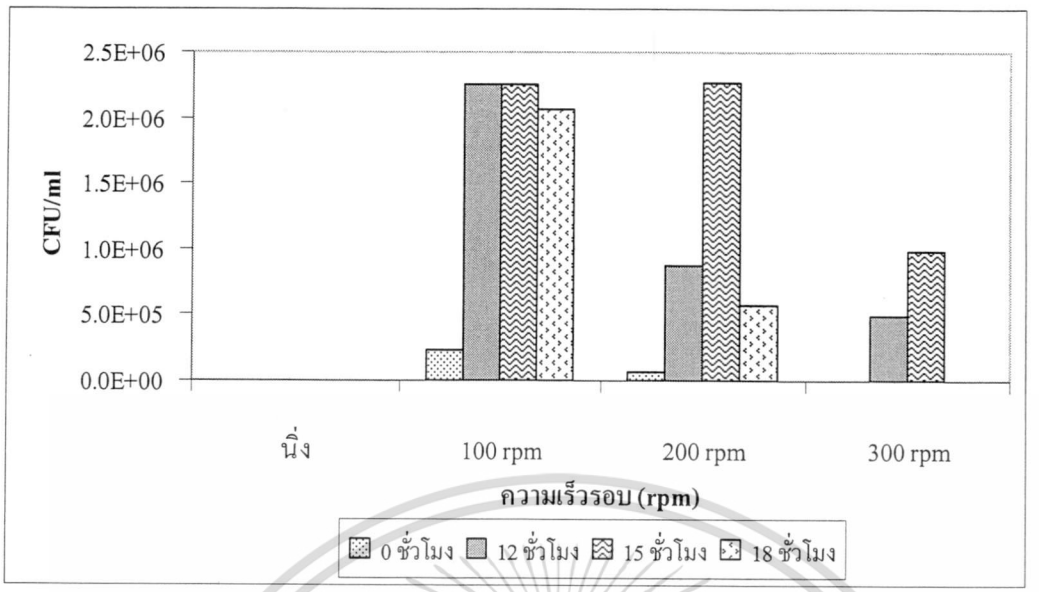
(ก)



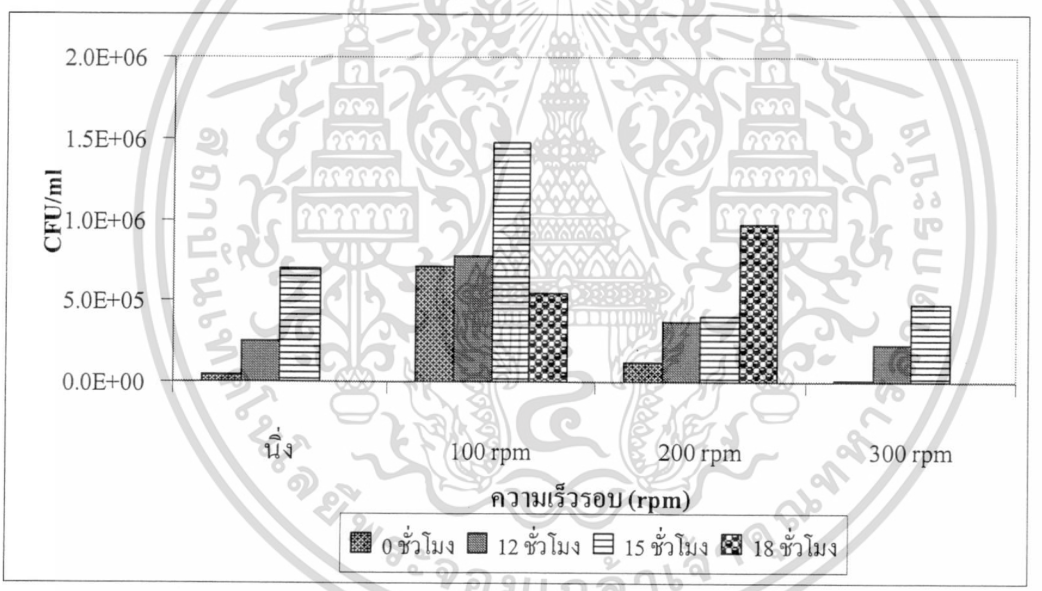
(ข)

รูปที่ 4.5 ผลของความเร็วรอบ (ตั้งนิ่ง และ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงต่างๆ (ก) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 (ข) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 (ค) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 (ง) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.5 (ต่อ) ผลของความเร็วรอบ (ตั้งนิ่ง และ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่การเพาะเลี้ยงชั่วโมงต่างๆ (ก) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 (ข) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 (ค) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 (ง) ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการศึกษาผลของความเร็วรอบกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลร่วมกันต่อเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 15 และ 18 ชั่วโมง ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3},10^{-4},10^{-5} และ 10^{-6} โดยใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากตัวอย่างที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ และเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าจานให้เข้ากัน แล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) ดังผลแสดงในรูปที่ 4.5

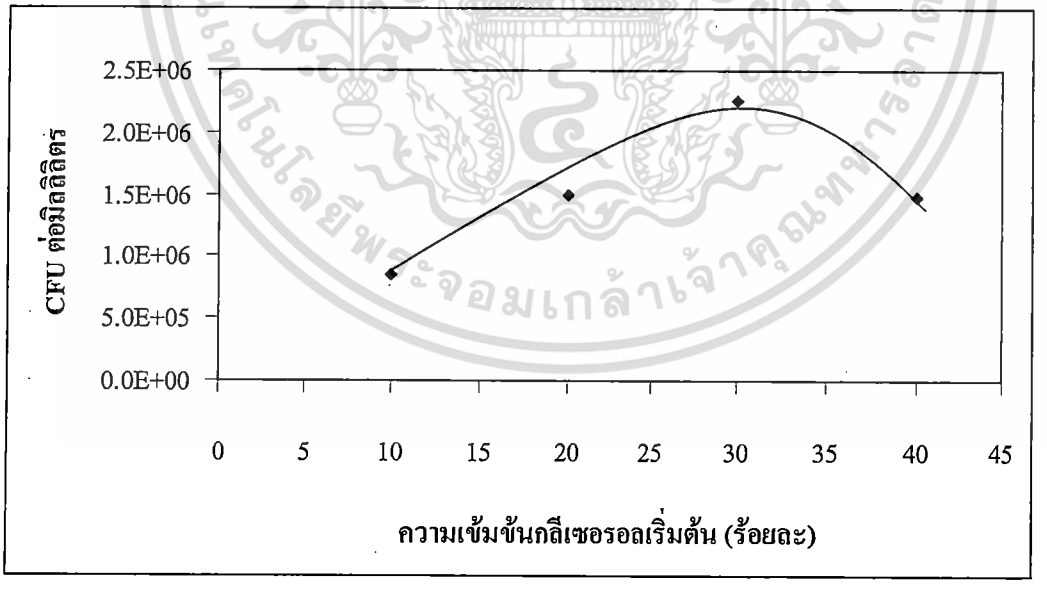
เมื่อใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลร้อยละ 10 ในการทดลองเพาะเลี้ยง พบว่ามีการเจริญเติบโตเมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และนับจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สูงสุดได้ 8.50×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยที่สภาวะนิ่ง ที่ความเร็วเครื่องเขย่า 200 และ 300 รอบต่อนาที ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงที่ทำการเจือจาง ต่อมา ที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ทำให้ทราบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดยังคงอยู่ที่ 18 ชั่วโมง แต่ที่การเพาะเลี้ยงสภาวะนิ่งและความเร็วเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงที่ทำการทดลอง ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ 100 รอบต่อนาที มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 1.50×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดลดลงเหลือ 7.50×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นถ้าเติมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 20 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 100 รอบต่อนาที และใช้เวลาเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับการเติมกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10

ในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 15 ชั่วโมง แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 และ 20 โดยในการทดลองนี้ ที่สภาวะนิ่งก็ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acetobutylicum* ส่วนที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที นับโคโลนีเฉลี่ยสูงสุดได้ 2.26×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดพอๆกับความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที คือ 2.26×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่หากใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จำนวนเชื้อ *C. acetobutylicum* สูงสุดลดลงเหลือ 9.78×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าถ้าเติมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 30 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมคือ 100 และ 200 รอบต่อนาที และใช้เวลา 15 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนในการทดลองใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 ในการทดลอง พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 15 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 ยกเว้นการเพาะเลี้ยงด้วยความเร็วเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะนิ่ง ก็สามารถนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้สูงสุดได้ 6.99 $\times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดเป็น 1.48 $\times$ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร หากใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบจำนวนเชื้อ *C. acetobutylicum* สูงสุด 9.73 $\times$ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง และถ้าใช้ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที มีจำนวนเชื้อสูงสุด 4.78 $\times$ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เพราะฉะนั้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 ต่อเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบสภาวะความเร็วรอบของเครื่องเขย่าแล้ว เชื้อ *C. acetobutylicum* สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และเวลา 15 ชั่วโมง

เห็นได้ว่าโดยส่วนมากแล้ว เมื่อพิจารณาช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใส่ไปในการเพาะเลี้ยงเวลาเริ่มต้นแล้ว ความเร็วของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมที่สุด คือ 100 รอบต่อนาที แต่จะใช้เวลา 15 หรือ 18 ชั่วโมง ก็แล้วแต่ว่าจะเป็นความเข้มข้นใด และถ้าเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1032 ตามรูปที่ 4.6 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที พบว่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 30



รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่อจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตสูงสุดระหว่างเชื้อ *Clostridium butyricum* และ *Clostridium acetobutylicum* แล้ว *C. butyricum* มีการเจริญเติบโตสูงกว่า *C. acetobutylicum* โดยเชื้อ *C. butyricum* มีจำนวนเซลล์ 3.01 $\times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 และความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที ในขณะที่สามารถนับเชื้อ *C. acetobutylicum* ได้ 2.26 $\times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 และความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที ซึ่งมากกว่ากันเพียง 1.3 เท่าเท่านั้น

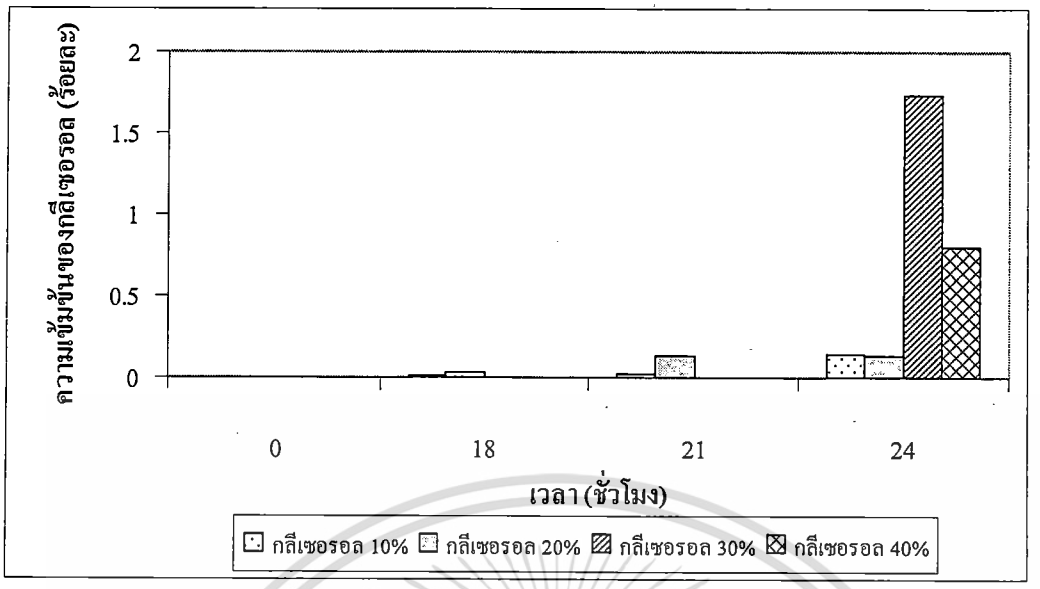
4.3 ผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการใช้กลีเซอรอลของเชื้อจุลินทรีย์

4.3.1 *Clostridium butyricum* TISTR 1032

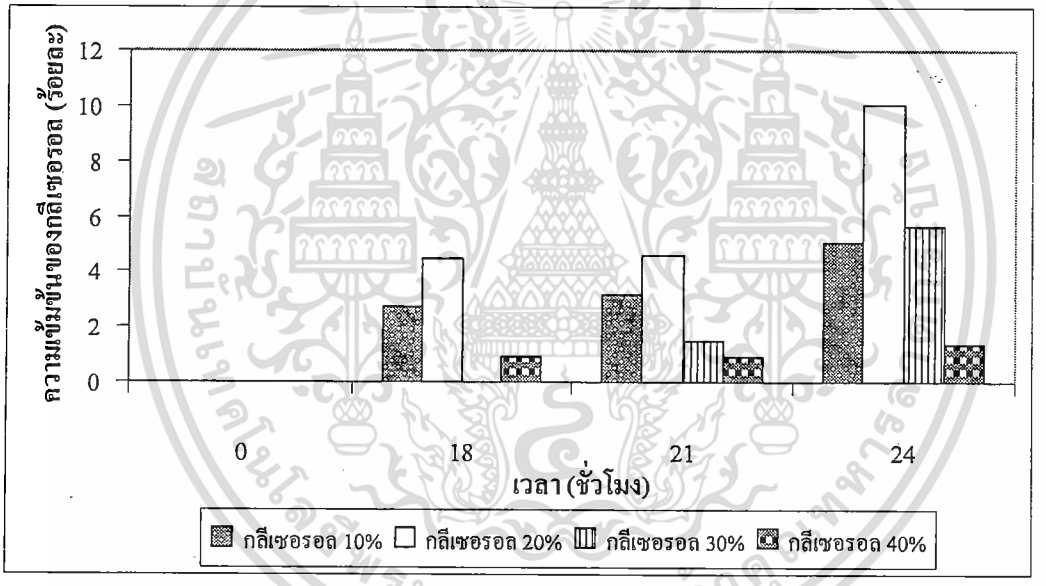
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium butyricum* ได้ผลการใช้กลีเซอรอลซึ่งเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นแหล่งอาหาร และแหล่งพลังงานของเชื้อจุลินทรีย์ ผลการใช้กลีเซอรอลของจุลินทรีย์นี้คำนวณมาจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่วัดได้จากเครื่อง HPLC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเริ่มต้น หรือชั่วโมงที่ 0 มาลบออกด้วยความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่วัดด้วยวิธีเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงช่วงต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 4.7 พิจารณารูป 4.7 (ก) ที่สภาวะตั้งนิ่งเชื้อ *C. butyricum* มีการใช้กลีเซอรอลไปน้อยมาก จนเมื่อการเพาะเลี้ยงถึงช่วง 24 ชั่วโมง เมื่อใช้กลีเซอรอลมากกว่าร้อยละ 30 เชื้อจึงมีการใช้กลีเซอรอลไปอย่างมาก โดยเมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไป 17.34 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 1.73 และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40 มีการใช้กลีเซอรอลไป 8.06 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.81

เมื่อเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ได้ผลการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *C. butyricum* ตามรูปที่ 4.7 (ข) พบว่ามีการใช้กลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ผ่านไป จนถึงมากที่สุดช่วง 24 ชั่วโมง และเมื่อเติมกลีเซอรอลลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 20 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปปริมาณมากที่สุด โดยใช้ไป 100.38 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 10.038 ที่ 24 ชั่วโมง ส่วนการใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 10 เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลไป 50.80 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 5.08 ในขณะที่ถ้าใช้กลีเซอรอลปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 30 *C. butyricum* มีการใช้กลีเซอรอลไป 56.16 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 5.61 และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40 มีการใช้กลีเซอรอลไป 13.68 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 1.368 ซึ่งผลการใช้กลีเซอรอลของสภาวะนี้สอดคล้องกับผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. butyricum* นั่นคือ พบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด และการใช้กลีเซอรอลเป็นปริมาณสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



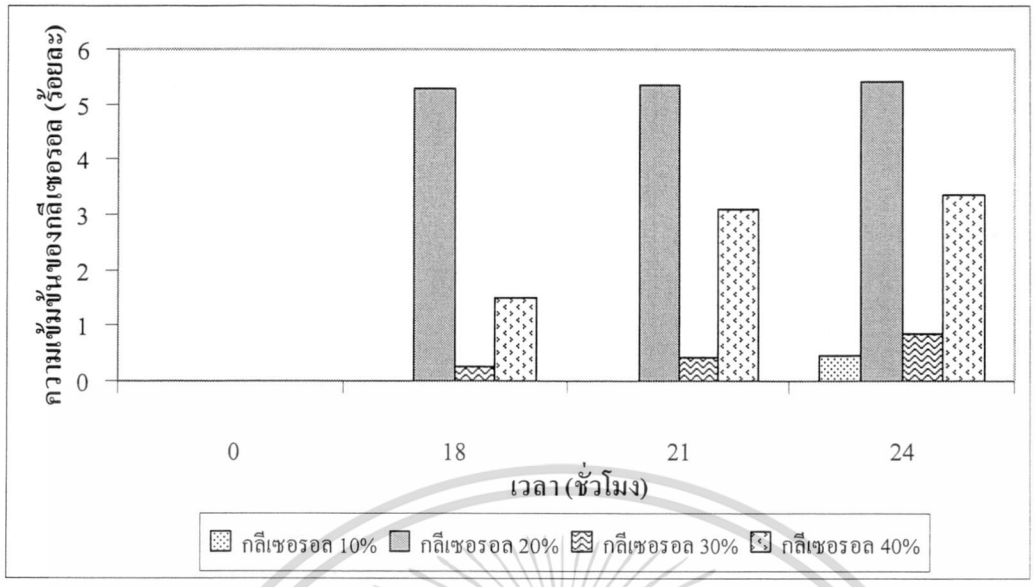
(ก)



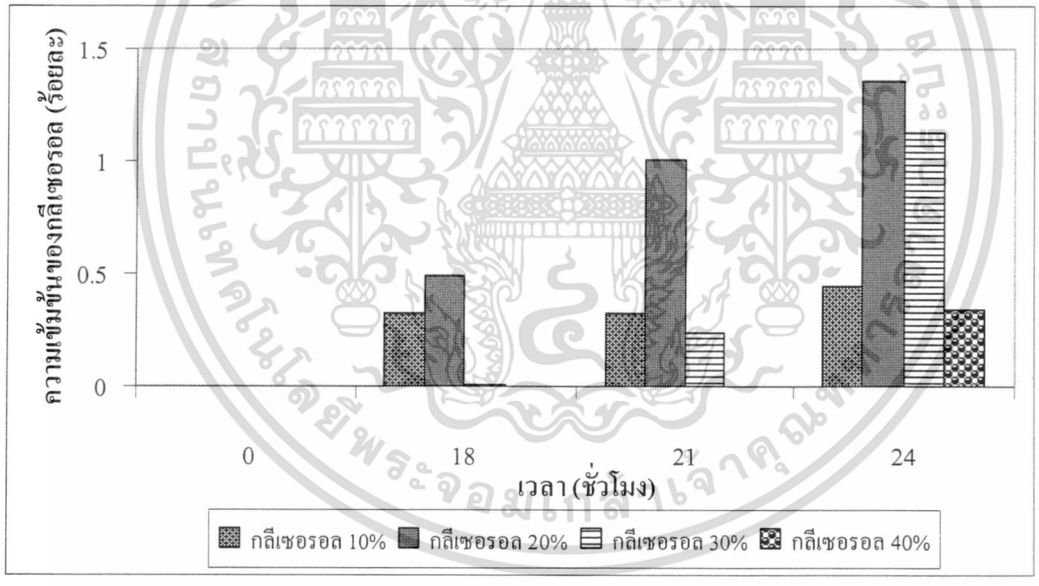
(ข)

รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลแสดงเป็นความเข้มข้นร้อยละที่ใช้ไปโดยเชื้อ *Clostridium butylicum* TISTR 1032 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.7 (ต่อ) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลแสดงเป็นความเข้มข้นร้อยละที่ใช้ไปโดยเชื้อ *Clostridium butylicum* TISTR 1032 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20

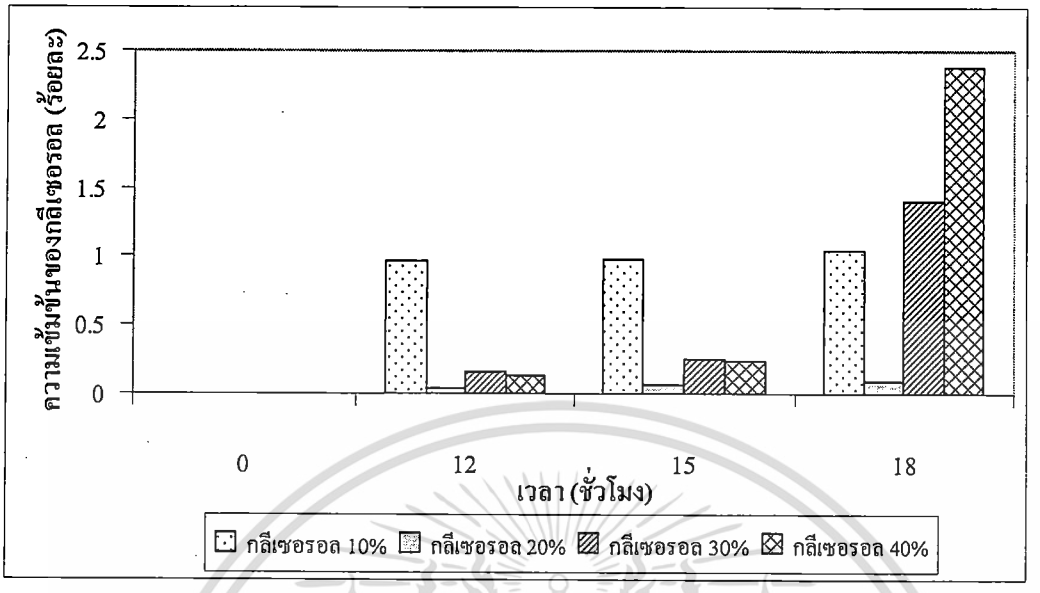
จากรูป 4.7 (ค) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เชื้อ *C. butyricum* มีการใช้กลีเซอรอลเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป จนถึง 24 ชั่วโมง เฉพาะเมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 แต่หากใช้ปริมาณกลีเซอรอลความเข้มข้นอื่นๆ (ต่ำกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30) เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลไปพอๆ กัน ไม่แตกต่างกันตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปมากที่สุด เท่ากับ 54.14 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 5.414 ถ้าหากใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 10 พบการใช้กลีเซอรอลไป 4.47 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.447 ส่วนเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 30 มีการใช้กลีเซอรอลไป 8.40 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.84 และในขณะที่ใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40 มีการใช้กลีเซอรอลไป 33.61 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 3.36

ในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่ด้วยความเร็วเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที ได้ผลการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *C. butyricum* ตามรูปที่ 4.7 (ง) สังเกตได้ว่ามีการใช้กลีเซอรอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ยกเว้นเมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปในปริมาณไม่แตกต่างกันตามช่วงเวลาที่ผ่านไป โดยเมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปมากที่สุด คือ 13.54 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 1.35 ในขณะที่ใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 10 มีการใช้กลีเซอรอลไปเพียง 4.41 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.44 หากปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 พบการใช้กลีเซอรอลไป 11.30 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 1.130 และถ้าใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40 มีการใช้กลีเซอรอลไป 3.42 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.34

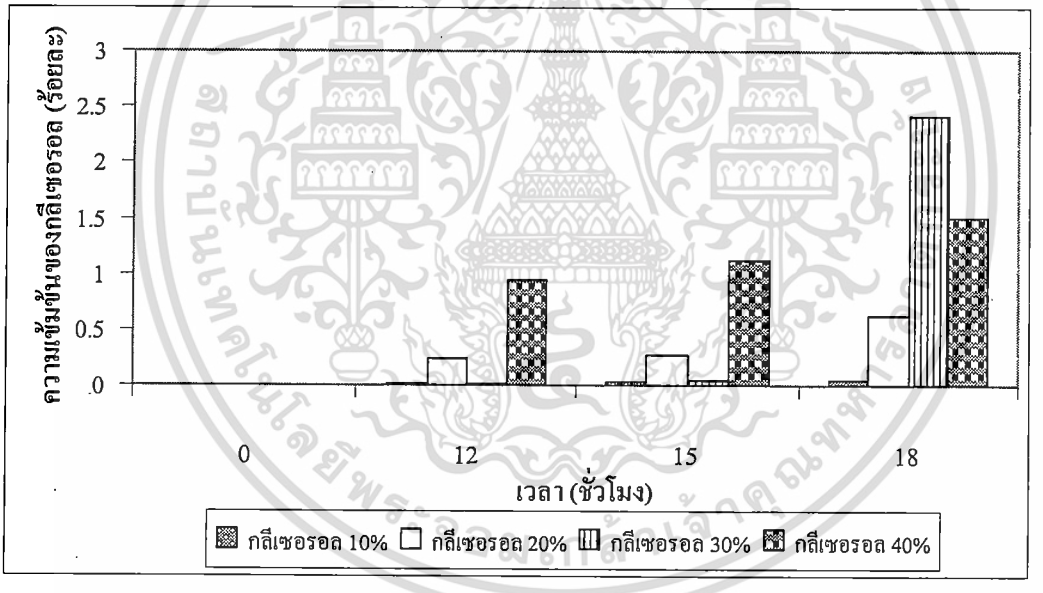
จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Clostridium butyricum* มีการใช้กลีเซอรอลไปน้อยมาก เพียงประมาณร้อยละ 50 เมื่อเทียบปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ กับถ้าใช้ปริมาณกลีเซอรอลที่ใช้ไปมากที่สุด ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462



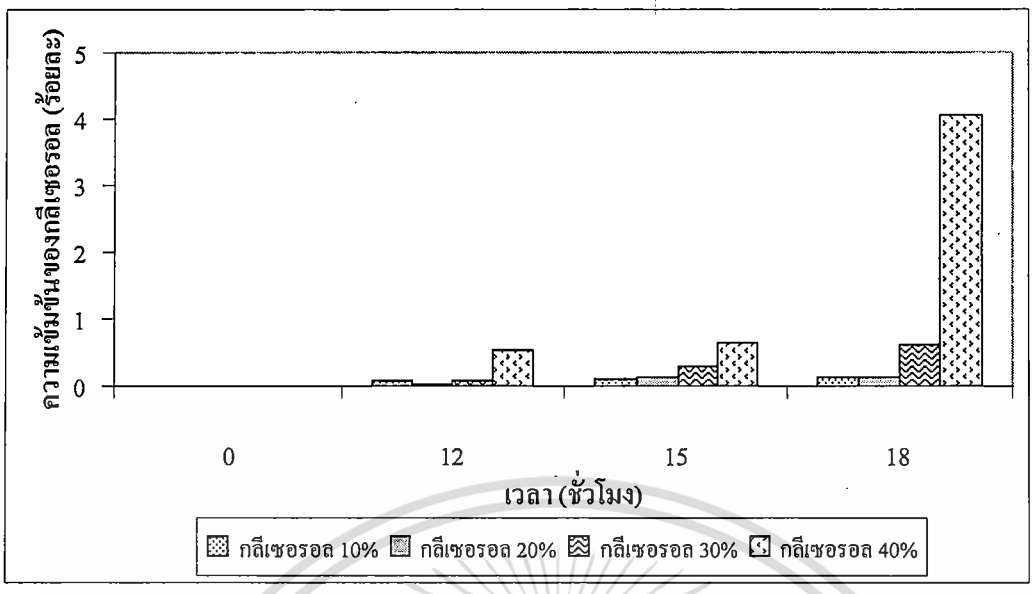
(ก)



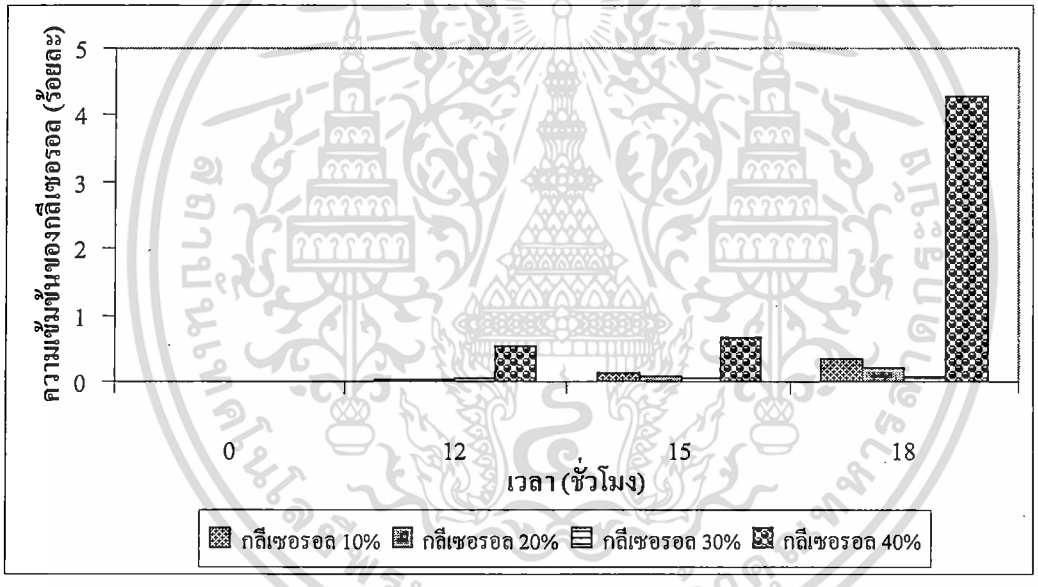
(ข)

รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลแสดงเป็นความเข้มข้นร้อยละที่ใช้ไปโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.8 (ต่อ) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลแสดงเป็นความเข้มข้นร้อยละที่ใช้ไปโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ได้ผลการใช้กลีเซอรอลของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นแหล่งอาหาร และแหล่งพลังงานของเชื้อจุลินทรีย์ ผลการใช้ กลีเซอรอลของจุลินทรีย์นี้คำนวณมาจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่วัดได้จากเครื่อง HPLC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเริ่มต้น หรือชั่วโมงที่ 0 มาลบออกด้วยความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่วัดได้ด้วยวิธีเดียวกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงช่วงต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 4.8

จากรูป 4.8 (ก) ที่สภาวะตั้งนิ่งและปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 เชื้อ *C. acetobutylicum* มีการใช้กลีเซอรอลไปน้อยมาก แต่ก็เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อจนถึงช่วง 18 ชั่วโมง ใช้กลีเซอรอลไปทั้งหมด 1.42 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.14 ซึ่งเป็นปริมาณที่คล้ายคลึงกับการเติมปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ที่มีการใช้กลีเซอรอลทั้งหมด 1.35 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.14 และถ้าใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 30 พบว่ามีการใช้กลีเซอรอลไป 14.02 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 1.402 ซึ่งมากกว่าการเติมกลีเซอรอลเริ่มต้นในปริมาณที่น้อยกว่าถึง 10 เท่า และมากขึ้นไปอีกเมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลไป 23.80 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 2.38

ต่อมา เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* ในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ได้ผลการใช้กลีเซอรอล ตามรูปที่ 4.8 (ข) พบว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* มีการใช้กลีเซอรอลในปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง จนถึงช่วง 18 ชั่วโมง โดยเมื่อใช้กลีเซอรอลร้อยละ 10 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปน้อยมาก 0.41 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.04 และเมื่อเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 เชื้อจุลินทรีย์ใช้กลีเซอรอลไป 6.32 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.63 ในขณะที่ใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปถึง 24.21 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 2.42 และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40 มีการใช้กลีเซอรอลไป 15.04 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 1.50

เมื่อนำเชื้อ *C. acetobutylicum* ไปเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที มีการใช้กลีเซอรอลไปตามรูป 4.8 (ค) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลไปไม่มาก ยกเว้นการใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 แต่การใช้กลีเซอรอลของเชื้อยังแปรผันตามเวลาของการเพาะเลี้ยง ซึ่งใช้เวลาทั้งหมด 18 ชั่วโมง เมื่อทำการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไป 1.41 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.14 และเมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 เชื้อ *C. acetobutylicum* ได้ใช้กลีเซอรอลทั้งหมดพอๆกัน คือ 1.42 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.14 จากนั้น เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นเป็นร้อยละ 30 พบการใช้กลีเซอรอลไปมากขึ้น 6.23 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.623 และเพิ่มการใช้กลีเซอรอลสูงสุด เมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 40 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไป 40.59 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 4.059

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที และหยุดการทดลองเมื่อการเพาะเลี้ยงถึง 18 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* มีการใช้กลีเซอรอลไปน้อยมาก เมื่อใช้กลีเซอรอลน้อยกว่าร้อยละ 40 ที่เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปต่ำกว่า 3.39 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 0.34 ส่วนถ้าใช้ปริมาณของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 40 เชื้อมีการใช้กลีเซอรอลไปมากที่สุด โดยใช้กลีเซอรอลไป 42.77 กรัมต่อลิตร หรือร้อยละ 4.277 ซึ่งเป็นปริมาณการใช้กลีเซอรอลสูงสุด

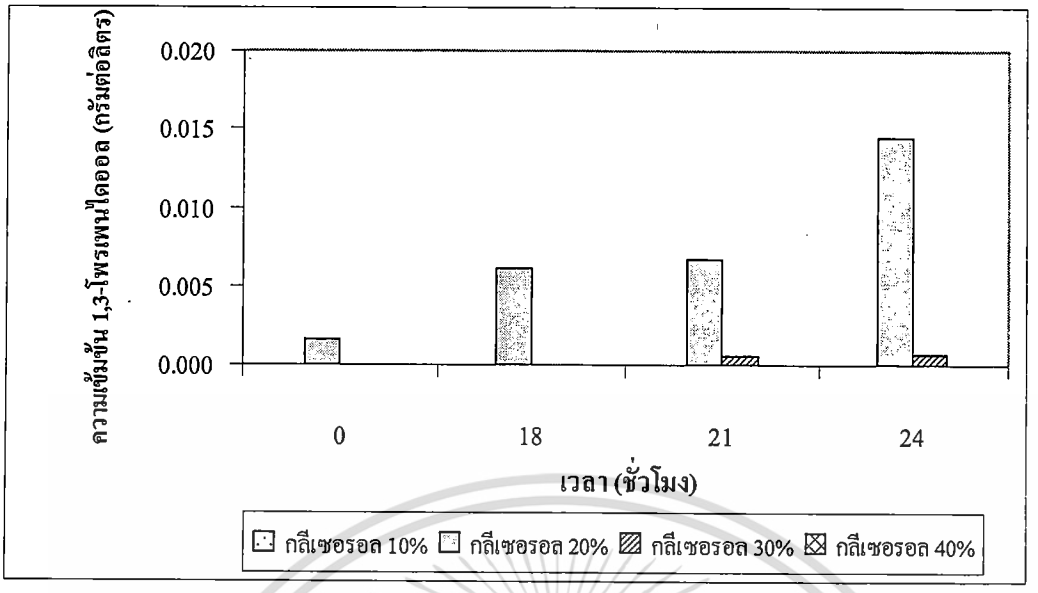
สังเกตได้ว่าปริมาณการใช้กลีเซอรอลในลำดับรองลงมาของเชื้อ *C. acetobutylicum* อยู่ที่สภาวะความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับสภาวะที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ด้วย อย่างไรก็ตาม เชื้อ *C. acetobutylicum* นี้ มีการใช้กลีเซอรอลไปในการเจริญเติบโตและการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลต่ำมาก

4.4 ผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลของเชื้อจุลินทรีย์

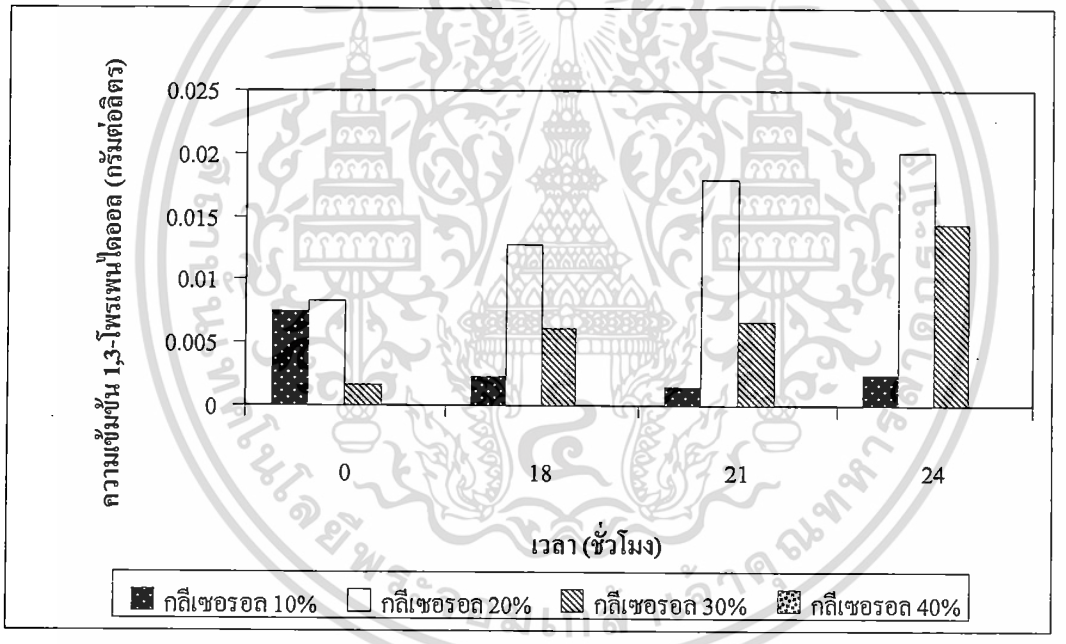
4.4.1 *Clostridium butyricum* TISTR 1032

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium butyricum* TIRTS 1032 ด้วยกลีเซอรอลเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ซึ่งวัดได้จากเครื่อง HPLC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงช่วงต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 4.9 เมื่อพิจารณารูป 4.9 (ก และ ข) ที่สภาวะตั้งนิ่ง และที่ความเร็วรอบ 100 rpm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมาก เมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 พบสาร 1,3-โพรเพนไดออลสูงมากในระยะเริ่มต้น คือ 0.0201 กรัมต่อลิตร แล้วค่อยๆลดลงตามระยะเวลาการเจริญเติบโต จนเมื่อการเพาะเลี้ยงถึงช่วง 24 ชั่วโมง มี 1,3-โพรเพนไดออลเหลือเพียง 0.0083 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมกลีเซอรอลมากกว่าร้อยละ 20 เชื้อจึงมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลมากขึ้นตามระยะการเจริญเติบโต และมีค่าสูงที่สุดที่ระยะการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง โดยเมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 เชื้อมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 0.0151 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 30 มีการสร้าง 1,3-โพร-เพนไดออลสูงสุด 0.0144 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าไม่ต่างจากการใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 มากนัก แต่ถ้าใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 40 จะไม่พบการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



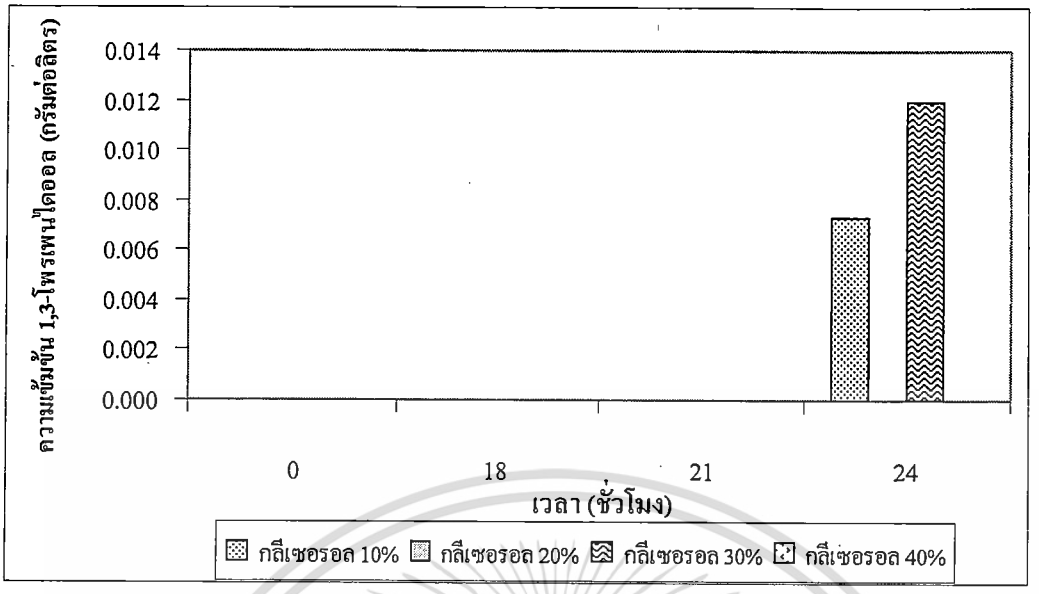
(ก)



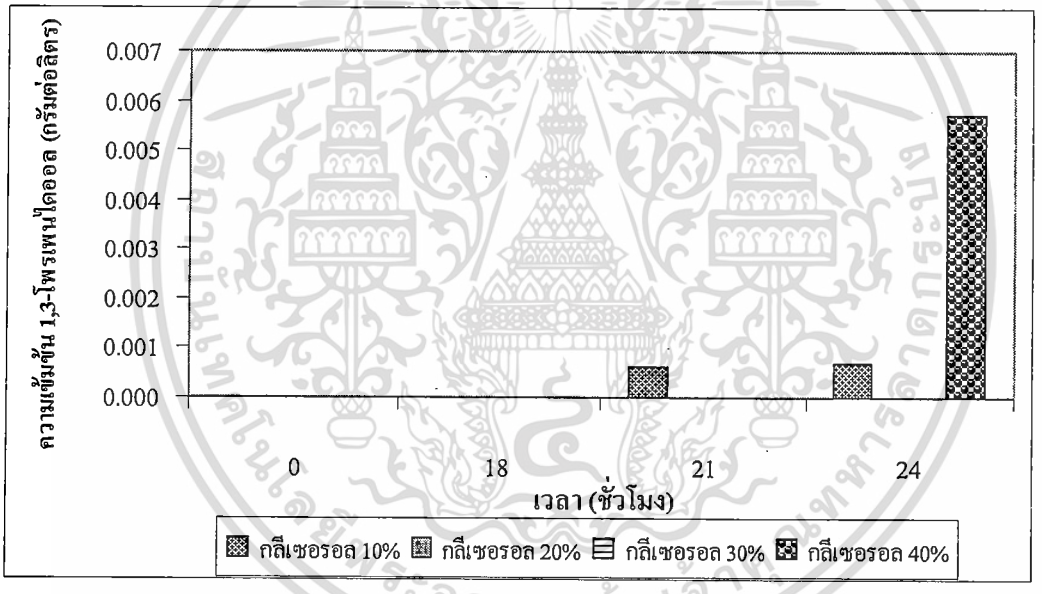
(ข)

รูปที่ 4.9 ปริมาณของ 1, 3-โพรเพนไดออลแสดงเป็นความเข้มข้นกรัมต่อลิตร ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.9 (ต่อ) ปริมาณของ 1, 3-โพรเพนไดออลแสดงเป็นความเข้มข้นกรัมต่อลิตร ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

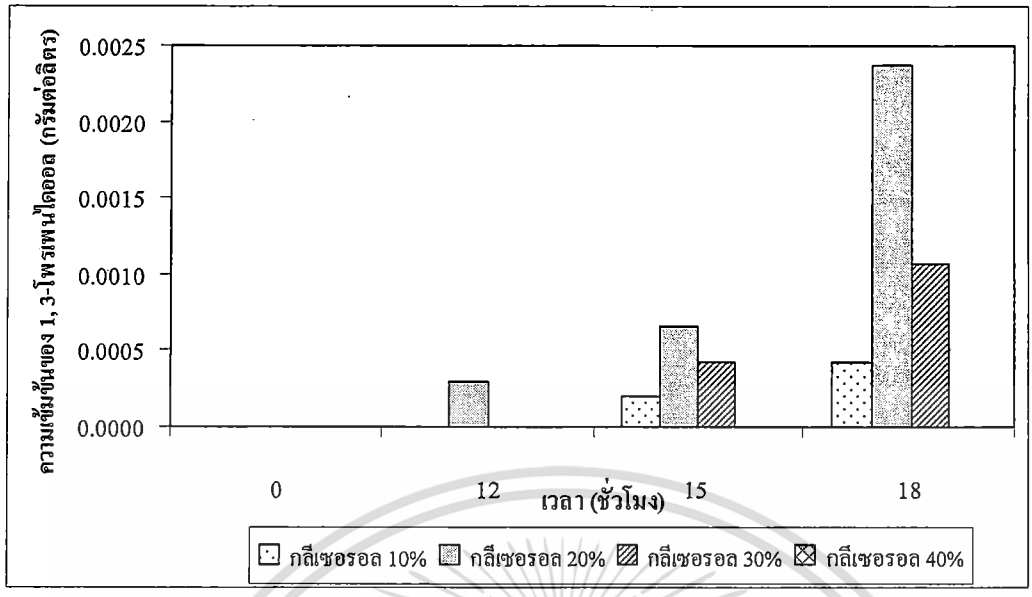
จากการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. butyricum* ในสภาวะความเร็วเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ได้ผลการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ค) พบว่าเชื้อสามารถสร้างสาร 1,3-โพรเพนไดออลในช่วง 24 ชั่วโมงเท่านั้น และเป็นเฉพาะเมื่อทำการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 และร้อยละ 30 โดยการเติมกลีเซอรอลร้อยละ 10 จะได้ 1,3-โพรเพนไดออล 0.0073 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 30 มีการสร้าง 1,3-โพรเพน-ไดออลสูงสุด 0.0119 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 จะไม่พบสาร 1,3-โพรเพนไดออล

ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ได้ผลตามรูปที่ 4.9 (ง) ในระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 พบสาร 1,3-โพรเพนไดออล 0.0007 กรัมต่อลิตร ส่วนเมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 40 เชื้อมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 0.0057 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ไม่พบสาร 1,3-โพรเพนไดออล เมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 20 และ 30

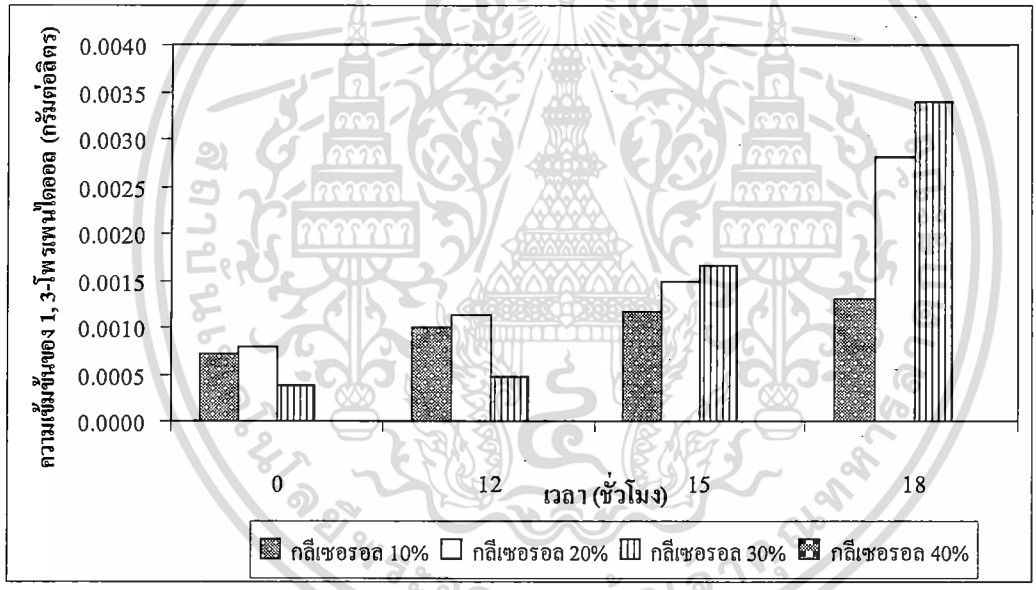
4.4.2 *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462

เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TIRTS 1462 ด้วยกลีเซอรอล ซึ่งสาร 1,3-โพรเพนไดออลวัดได้จากเครื่อง HPLC ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงช่วงต่างๆ ได้ผลดังรูปที่ 4.10 เมื่อพิจารณารูป 4.10 (ก) ที่สภาวะตั้งนิ่ง เมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 20 พบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง และในช่วงเวลา 15 ชั่วโมง โดยพบเป็นปริมาณ 0.0002 กรัมต่อลิตร และ 0.0006 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเจริญเติบโต จนเมื่อการเพาะเลี้ยงถึงช่วง 18 ชั่วโมง มี 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด คือ 0.0023 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมกลีเซอรอลร้อยละ 30 เชื้อมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเช่นกัน คือ 0.0011 กรัมต่อลิตร แต่ยังมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลน้อยกว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลร้อยละ 20 สำหรับการใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 40 จะไม่พบการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



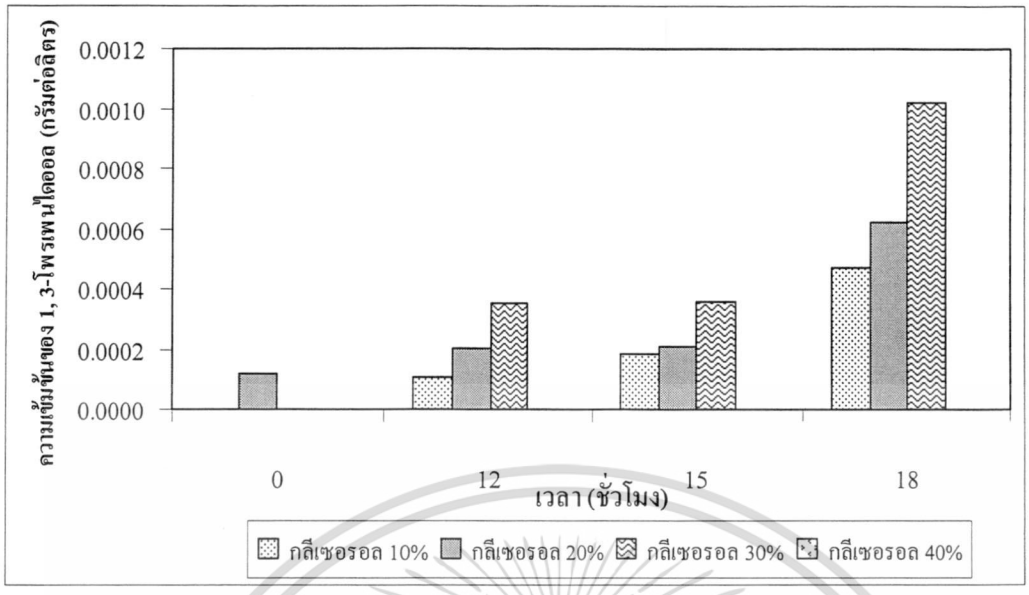
(ก)



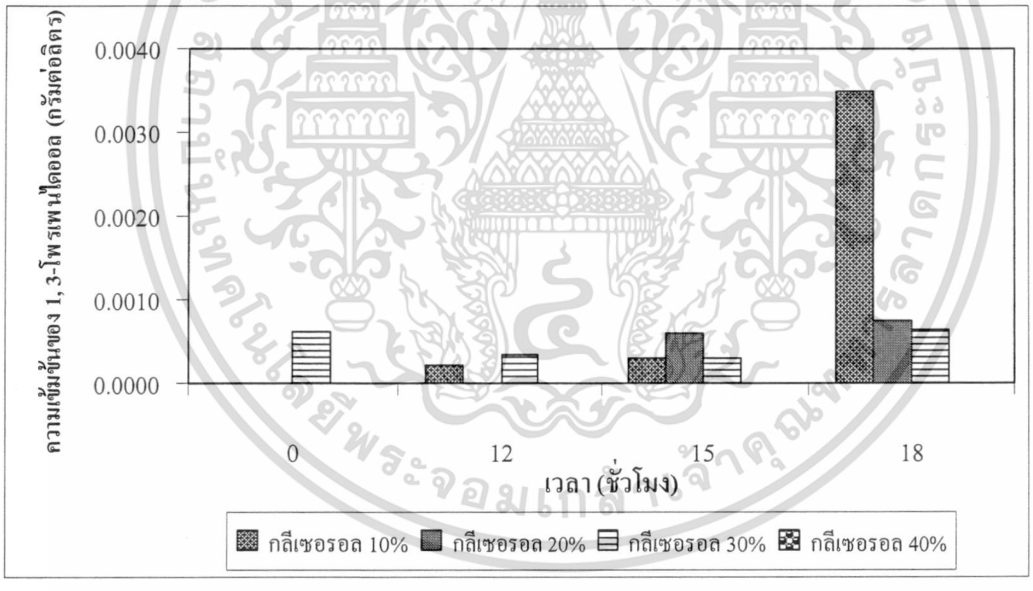
(ข)

รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของ 1, 3-โพรเพนไดออลแสดงเป็นความเข้มข้นกรัมต่อลิตร ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.10 (ต่อ) ความเข้มข้นของ 1, 3-โพรเพนไดออลแสดงเป็นความเข้มข้นกรัมต่อลิตร ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 แยกตามความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ที่ (ก) สภาวะนิ่ง (ข) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (ค) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที (ง) ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเชื้อ *C. acetobutylicum* มาเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ได้ผลการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลตามรูปที่ 4.10 (ข) เมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 พบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในระยะเริ่มต้น คือ 0.0007 กรัมต่อลิตร แล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเจริญเติบโต จนเมื่อการเพาะเลี้ยงถึงช่วง 18 ชั่วโมง มี 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด คือ 0.0013 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 เชื้อมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 0.0028 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 30 มีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 0.0034 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าไม่ต่างจากการใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 มากนัก แต่ถ้าใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 40 จะไม่พบการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล

จากรูปที่ 4.10 (ค) เป็นผลการทดลองจากการเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 10 พบสาร 1, 3-โพรเพนไดออลสูงสุดเท่ากับ 0.0004 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 20 พบการสร้าง 1, 3-โพรเพนไดออลสูงสุด 0.0006 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 30 มีการสร้าง 1, 3-โพรเพนไดออลสูงสุด 0.001 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 40 จะไม่พบการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่และนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ได้ผลดังรูปที่ 4.10 (ง) เมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 30 พบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในช่วงระยะเริ่มต้น ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง และในช่วงเวลา 15 ชั่วโมง ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.0005 กรัมต่อลิตร 0.0004 กรัมต่อลิตร และ 0.0003 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จนเมื่อการเพาะเลี้ยงถึงช่วง 18 ชั่วโมง มี 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด คือ 0.0006 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 10 เชื้อมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด คือ 0.0034 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมกลีเซอรอลร้อยละ 20 เชื้อมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล คือ 0.0007 กรัมต่อลิตร แต่ยังมีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลน้อยกว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลร้อยละ 10 สำหรับการใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 40 จะไม่พบการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล

เช่นเดียวกับผลการทดลองการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *C. acetobutylicum* การเจริญเติบโตสูงสุด การใช้กลีเซอรอลมากเป็นลำดับที่สอง และการสร้างสาร 1,3-โพรเพนไดออลสูงที่สุด เกิดขึ้นภายใต้การใช้สภาวะเดียวกัน คือ การเพาะเลี้ยงด้วยความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และใช้ปริมาณของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*

เป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 และ BCC19559เพื่อหาสภาวะความเป็นกรดด่างที่หมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 25.22 กรัมต่อลิตร ที่มีระดับ pH แตกต่างกัน (5.5, 6, 6.5, 7 และ 7.5) ทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศโดยทำการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน และใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 12 ชั่วโมง (จากหัวข้อ 4.1) นำมาตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3},10^{-5},10^{-7}และ10^{-9} ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต log CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ผลตามตารางที่ 4.3 และ 4.4

4.5.1 *Enterobacter agglomerans* BCC19558

ตารางที่ 4.3 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558

pH เริ่มต้น	จำนวนเซลล์ (log CFU/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่ 12 ช.ม.
5.5	7.12^{b}±0.35	17.63	5.81
6.0	9.14^{a}±0.01	25.28	6.15
6.5	7.02^{b}±0.39	14.31	6.42
7.0	7.24^{b}±0.89	18.07	6.90
7.5	7.69^{ab}±1.68	10.94	5.69

หมายเหตุ a, b ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร ปรากฏว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6 สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 9.14 log CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นอื่นที่ทำการเก็บตัวอย่าง รองลงมาคือที่ระดับความเป็นกรดด่าง 7 พบว่าในการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 7.24 log CFUต่อมิลลิลิตร ถัดไปคือที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.5 พบจำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ 7.69 log CFUต่อมิลลิลิตร ถัดไปคือที่ระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 มีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ 7.02 log CFUต่อมิลลิลิตร สุดท้ายที่มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดคือที่ระดับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นับได้เท่ากับ 7.12 log CFU ต่อมิลลิลิตร

พบว่าเมื่อผ่านไปจนถึง 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร มีการนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต จาก ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 5.5 ได้ลดลงจนมีปริมาณเท่ากับความเข้มข้นกลีเซอรอล 17.12 กรัมต่อลิตร ถัดมาคือ 25.28 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6 ต่อมาคือ 14.31 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 ถัดมาคือ 18.07 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 7 และ 10.94 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 7.5 ซึ่งลดลงจากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้น จากการทดลองพบว่าว่าที่ระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 มีค่าpHเท่ากับ 6 และมีการเจริญเติบโตที่สูงสุด โดยดูจากจำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง นับได้ 9.14 log CFUต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 *Enterobacter agglomerans* BCC19559

ตารางที่ 4.4 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559

pH เริ่มต้น	จำนวนเซลล์ (log CFU/มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่12 ช.ม.
5.5	10.00^{a}±0.51	24.16	5.97
6.0	9.79^{a}±0.61	22.80	6.12
6.5	10.09^{a}±1.33	25.35	6.31
7.0	7.09^{b}±0.53	15.60	6.97
7.5	9.95^{a}±0.10	23.49	6.36

หมายเหตุ a, b ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นกลี-เซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร ปรากฏว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 10.09 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นอื่นที่ทำการเก็บตัวอย่าง รองลงมาคือที่ระดับความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่าในการเพาะเลี้ยง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด 10.00 log CFU ต่อมิลลิลิตร ถัดไปคือที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.5 พบจำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ 9.95 log CFU ต่อมิลลิลิตร ถัดไปคือที่ระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 มีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ 9.79 CFU ต่อมิลลิลิตร สุดท้ายที่มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดคือที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7 พบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นับได้เท่ากับ 2.65×10^{7} CFU ต่อ มิลลิลิตร

พบว่าเมื่อผ่านไปจนถึง 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างกัน โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร มีการนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 5.5 ได้ลดลงจนมีปริมาณเท่ากับความเข้มข้นกลีเซอรอล 24.16 กรัมต่อลิตร ถัดมาคือ 22.80 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6 ซึ่งเป็นค่าที่น่าจะเกิดการผิดพลาดจากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC เพราะทำการเจือจางตัวอย่างมากเกินไป (100 เท่า) ต่อมาคือ 25.35 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 ถัดมาคือ 15.60 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 7 และ 23.49 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 7.5 ซึ่งลดลงจากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้น จากการทดลองพบว่าว่าที่ระดับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 มีค่าเท่ากับ 6.5 และมีการเจริญเติบโตที่สูงสุด โดยดูจากจำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง นับได้ 10.09 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 ที่มีสภาวะความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 6

4.6 ผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*

เป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 และ BCC19559เพื่อหาสภาวะความเข้มข้นกลีเซอรอลที่หมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* โดยใช้อาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างกันสำหรับแต่ละสายพันธุ์ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 ใช้ระดับความเป็นกรดด่างที่ pH 6 ส่วนอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 ใช้ระดับความเป็นกรดด่างที่ pH 6.5 ทำการเติม กลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตรต่อลิตร (คำนวณเป็น 12.61, 25.22, 37.83 และ 50.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน และใส่ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 12 ชั่วโมง (จากหัวข้อ 4.1) นำมาตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3},10^{-5},10^{-7}และ10^{-9} ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต log CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ผลตามตารางที่ 4.5 และ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.1 *Enterobacter agglomerans* BCC19558

จากตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่างกัน คือ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตรต่อลิตร (คำนวณแล้วได้เป็น 12.61, 25.22, 37.83 และ 50.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยใช้ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อมีค่าความกลีเซอรอลเริ่มต้นเป็น 30 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 7.62 log CFU ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ระดับความความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าในการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ 7.58 log CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นลำดับถัดไป คือ 10 มิลลิลิตรต่อลิตร มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 7.53 log CFU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหาร 10 กับ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร และ 20 กับ 30 มิลลิลิตรต่อลิตร นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สุดท้ายที่มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดคือที่ระดับความความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 40 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นับได้เท่ากับ 7.00 log CFU ต่อมิลลิลิตร

พบว่าเมื่อผ่านไปจนถึง 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ pH 6 โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร (12.61 กรัมต่อลิตร) ค่ากลีเซอรอลที่พบเมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมงคือ 13.73 กรัมต่อลิตร ถัดมาเมื่อเติมกลีเซอรอล 20 มิลลิลิตรต่อลิตร (25.22 กรัมต่อลิตร) จะพบกลีเซอรอลที่เหลืออยู่เข้มข้น 25.17 กรัมต่อลิตร ต่อมา เมื่อเติมกลีเซอรอล 30 มิลลิลิตรต่อลิตร (37.83 กรัมต่อลิตร) พบกลีเซอรอลเหลือเพียง 35.33 กรัมต่อลิตร และสุดท้าย จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 40 มิลลิลิตรต่อลิตร (50.44 กรัมต่อลิตร) พบกลีเซอรอลเหลือ 47.15 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น จากการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 มีค่าเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร เพราะมีการเจริญเติบโตของเชื้อไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นของกลีเซอรอล 30 มิลลิลิตรต่อลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ pH 6 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้จำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดเท่ากับ 7.58 log CFU ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่างเมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558

ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น (มล.ต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (log CFUต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่ 12 ช.ม.
10	7.53^{a}±0.03	13.73	6.17
20	7.58^{a}±0.05	25.17	6.18
30	7.62^{a}±0.04	35.33	6.48
40	7.00^{b}±0.07	47.15	6.17

หมายเหตุ a, b ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.6.2 *Enterobacter agglomerans* BCC19559

ตารางที่ 4.6 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559

ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น (มล.ต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ (log CFUต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่12 ช.ม.
10	6.46^{c}±0.15	15.31	6.35
20	7.69^{a}±0.11	27.34	6.38
30	7.44^{b}±0.00	34.68	6.85
40	7.43^{b}±0.04	47.19	6.48

หมายเหตุ a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นต่างกัน คือ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตรต่อลิตร (คำนวณได้เป็น 12.61, 25.22, 37.83 และ 50.44 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)โดยใช้ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 และทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 12 ชั่วโมง ปรากฏว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อมีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 7.69 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นอื่นที่ทำการเก็บตัวอย่าง รองลงมาคือที่ระดับความความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ 30 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าในการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์นับได้ 7.44 log CFU ต่อมิลลิลิตร ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ 40 มิลลิลิตรต่อลิตร นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ได้ 7.43 log CFU ต่อมิลลิลิตร สุดท้ายที่มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดคือที่ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นับได้เท่ากับ 6.46 log CFU ต่อมิลลิลิตร

พบว่าเมื่อผ่านไปจนถึง 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ pH 6.5 โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตสาร1,3-โพรเพนไดออล จากความเข้มข้น กลีเซอรอลเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร (12.61 กรัมต่อลิตร) พบปริมาณกลีเซอรอลเท่ากับ 15.31 กรัมต่อลิตร ถัดมาคือ เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 มิลลิลิตรต่อลิตร (25.22 กรัมต่อลิตร) พบกลีเซอรอลเข้มข้น 27.34 กรัมต่อลิตร ต่อมา จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อลิตร (37.83 กรัมต่อลิตร) จะพบความเข้มข้นกลีเซอรอลเหลืออยู่ 34.68 กรัมต่อลิตร และสุดท้าย จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อลิตร (50.44 กรัมต่อลิตร) เหลือปริมาณกลีเซอรอลหลังการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 47.19 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 มีค่าเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร เช่นเดียวกับเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 และใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ pH 6.5 โดยพบจำนวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดนับได้ 7.69 log CFU ต่อมิลลิลิตรที่ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง

Toraya และคณะ (2003) จากรายงานความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สามารถผลิตสาร 1,3–โพรเพนไดออล จากเชื้อสายพันธุ์ที่ใช้เจริญได้ดีเมื่อมีการสลายกลีเซอรอลเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโต จากรายงานกระบวนการหมักนั้นพบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร 1,3–โพรเพนไดออลเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นเป็นผลยับยั้งการเจริญและผลิตสาร 1,3–โพรเพนไดออลของเชื้อ พอกลีเซอรอลถูกเปลี่ยนเป็นเคต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะเลต จะทำให้เกิดสาร 1,3–โพรเพนไดออล ในขณะที่กลีเซอรอลที่มีมากไปก็จะไปยับยั้งการผลิตสาร 1,3–โพรเพนไดออล เนื่องจากเชื้อไม่ได้ใช้กลีเซอรอลเพียงตัวเดียวในการผลิตสาร 1,3–โพรเพนไดออล

4.7 ผลของความเร็วรอบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans*

เป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 และ BCC19559เพื่อหาสภาวะความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* โดยใช้อาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างกันใช้ระดับ pH 6 สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 และใช้อาหารเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ระดับ pH 6.5 สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร เช่นเดียวกันทั้ง 2 สายพันธุ์ และใช้สภาวะความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่แตกต่างกัน คือ ที่ระดับตั้งนิ่ง 100 รอบต่อนาที และ 200 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 12 ชั่วโมง (จากหัวข้อ 4.1) นำมาตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3},10^{-5},10^{-7}และ10^{-9} ทำการบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ผลตามตารางที่ 4.7 และ 4.8

4.7.1 *Enterobacter agglomerans* BCC19558

พบว่าเมื่อผ่านไปจนถึง 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ pH 6 โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 25.22 กรัมต่อลิตร เท่ากัน แต่มีความเร็วรอบเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จากสภาวะตั้งนิ่ง ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 25.22 กรัมต่อลิตร ได้ลดลงจนมีปริมาณเท่ากับ 19.09 กรัมต่อลิตร ถัดมาคือ ที่ความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที พบกลีเซอรอลเหลือเพียง 14.99 กรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 25.22 กรัมต่อลิตร และจากความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที จากความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 25.22 กรัมต่อลิตร เป็น 25.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเร็วรอบเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	จำนวนเซลล์ (log CFUต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	pHที่ 12 ช.ม.
0	6.51^{c}±0.23	19.09	6.39
100	7.17^{b}±0.04	14.99	6.21
200	7.76^{a}±0.05	25.17	6.18

หมายเหตุ a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

ดังนั้น จากการทดลองพบว่าที่ระดับความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที และอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 ทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุด โดยมีจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเท่ากับ 7.76 log CFU ต่อมิลลิลิตร

เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เจริญเติบโตได้ดีกว่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที คิดเป็น 35.41 เท่า ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการถ่ายเทมวลสารที่ดีกว่า เช่น สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 ถูกถ่ายเทมายังเชื้อจุลินทรีย์ได้เร็วกว่า

Kirkpatrick และคณะ (2001) และ Chen และคณะ (2003) มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากสารกลีเซอรอล พบว่าที่สภาวะมีอากาศออกซิเจนมาก เชื้อจุลินทรีย์พวก enterobacteria จะมีเมทาบอริซึมไปในส่วนของกระบวนการ TCA cycle และกระบวนการถ่ายเทอิเล็คตรอน ซึ่งได้พลังงานมากกว่า แต่จะไม่ทำให้เกิดสาร 1,3-โพรเพนไดออล เนื่องจากเป็นผลของเมทาบอริซึ่มที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นถ้าต้องการปริมาณของสาร 1,3-โพรเพนไดออล จะต้องเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.2 *Enterobacter agglomerans* BCC19559

ตารางที่ 4.8 ค่าการเจริญเติบโต ความเข้มข้นกลีเซอรอล และค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ตามสภาวะความเร็วรอบเริ่มต้นที่ต่างกันของเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	จำนวนเซลล์ (log CFUต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นกลีเซอรอล ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	pH ที่ 12 ช.ม.
0	6.68^{c}±0.23	21.12	6.5
100	7.15^{b}±0.07	21.17	6.43
200	7.71^{a}±0.10	27.34	6.38

<u>หมายเหตุ</u> a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าที่เบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 25.22 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 ที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าหลายระดับ คือตั้งนิ่ง 100 รอบต่อนาที และ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่าความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที และสามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 7.71 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าความเร็วรอบอื่นที่ทำการเก็บตัวอย่าง รองลงมาคือที่ระดับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที พบว่าในการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์นับได้ 7.15 log CFU ต่อมิลลิลิตร และสุดท้ายที่มีระดับการเจริญเติบโตต่ำที่สุด คือการเพาะเลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่ง พบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นับได้เท่ากับ 6.68 log CFU ต่อมิลลิลิตร

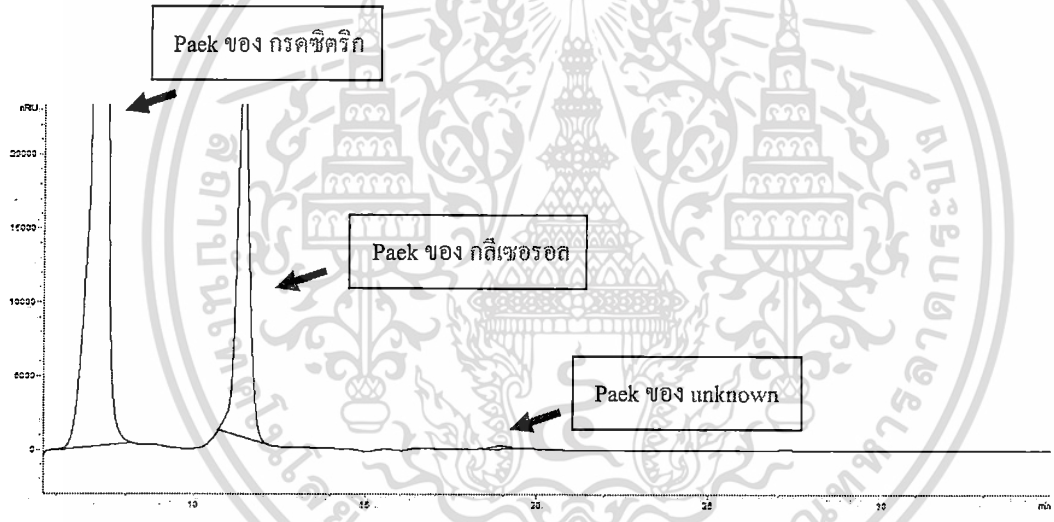
พบว่าเมื่อผ่านไปจนถึง 12 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์เชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ pH 6.5 โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ 25.22 กรัมต่อลิตรเท่ากัน แต่มีความเร็วรอบเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโต จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่ง ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 25.22 กรัมต่อลิตร ได้ลดลงจนมีปริมาณเท่ากับ 21.12 กรัมต่อลิตร ถัดมาคือเหลือกลีเซอรอลเพียง 21.17 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 รอบต่อนาที และใช้ค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นเท่ากับ 25.22 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 200 รอบต่อนาที จะพบค่าความเข้มข้นกลีเซอรอล 27.34 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ จากการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 และสายพันธุ์ BCC19559 มีระดับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน คือ 200 รอบต่อนาที มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง นับได้ 7.76 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 7.71 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันเพียง 1.12 เท่า

ทั้งนี้ จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบสาร 1,3-โพรเพนไดออล เป็นผลิตภัณฑ์ แต่พบว่าเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 และ BCC19559 สร้างสารตัวอื่นขึ้นมา ดังตัวอย่างโครมาโตแกรม HPLC ที่แสดงในรูปที่ 4.11 และเนื่องจากไม่สามารถเปรียบเทียบ retention time ของสารดังกล่าวกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้ จึงไม่ทราบว่าสารดังกล่าวคืออะไร



รูปที่ 4.11 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเข้มข้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร pH 7.0 และความเร็วรอบเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีสารที่ไม่ทราบอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ในการศึกษานี้ คือเชื้อ *Clostridium butyricum* TISTR 1032 เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC 19558 และ *Enterobacter agglomerans* BCC 19559 โดยแยกทดลองศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นกลีเซอรอล ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า และเวลาที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโต การผลิต 1,3-โพรเพนไดออล และการนำกลีเซอรอลไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์จีนัส *Clostridium* และศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจีนัส *Enterobacter* ตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ของเชื้อ ผลกระทบของความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นกลีเซอรอล และความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการเจริญเติบโต การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล และการนำกลีเซอรอลไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์

5.1.1 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium*

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที และความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 10 พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุด คือ 18 ชั่วโมง สามารถนับเชื้อ *C. butyricum* ได้ 8.32×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเจริญเติบโตได้สูงกว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* ที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 4.52×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 1.8 เท่า

ในขณะที่ผลของความเร็วรอบกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตสูงสุดระหว่างเชื้อ *C. butyricum* และ *C. acetobutylicum* แล้ว เชื้อ *C. butyricum* มีการเจริญเติบโตสูงกว่า *C. acetobutylicum* โดยเชื้อ *C. butyricum* มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เท่ากับ 3.01×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 และความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ในขณะที่สามารถนับเชื้อ *C. acetobutylicum* ได้ 2.26×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 และความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที ซึ่งมากกว่ากันเพียง 1.3 เท่า

ส่วนผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการใช้กลีเซอรอลของเชื้อจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่าเชื้อ *C. butyricum* เมื่อการเพาะเลี้ยงในสภาวะความเร็วเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที และปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ผ่านไปได้ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้กลีเซอรอลปริมาณมากที่สุด คือ ร้อยละ 10.04 แต่เมื่อเทียบปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเห็นได้ว่ามีการใช้กลีเซอรอลไปน้อยมาก เพียงประมาณร้อยละ 50 ในขณะที่ปริมาณการใช้กลีเซอรอลในลำดับรองลงมาของเชื้อ *C. acetobutylicum* อยู่ที่สภาวะความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 30 ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับสภาวะที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ด้วย โดยใช้กลีเซอรอลไปร้อยละ 2.42 อย่างไรก็ตาม เชื้อ *C. acetobutylicum* นี้มีการใช้กลีเซอรอลไปในการเจริญเติบโตและการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออลต่ำมาก คิดเป็นเพียงร้อยละ 8.07 เท่านั้น

สุดท้ายเป็นผลของความเร็วรอบและความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลของเชื้อจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่า *C. butyricum* มีการผลิต 1,3-โพรเพนไดออลได้สูงที่สุด เมื่อใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นร้อยละ 20 ได้ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล 0.0151 กรัมต่อลิตร สำหรับ *C. acetobutylicum* มีการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลได้สูงที่สุดที่ปริมาณ 0.0034 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะการเพาะเลี้ยง ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และปริมาณกลีเซอรอลร้อยละ 30 ซึ่งผลการสร้างสาร 1,3-โพรเพนไดออล สอดคล้องกันดีกับผลของการเจริญเติบโต และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งอาหารของเชื้อทั้งสองชนิดนี้

5.1.2 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Enterobacter*

ส่วนเชื้อ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC 19558 และ *Enterobacter agglomerans* BCC 19559 มีการศึกษาเปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล โดยทดลองศึกษาผลการเจริญเติบโตตามช่วงเวลาที่เหมาะสมที่ของเชื้อ ผลกระทบของความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นกลีเซอรอล และความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการเจริญเติบโต การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล และการนำกลีเซอรอลไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์

จากผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที และความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร (25.22 กรัมต่อลิตร) พบว่าการเจริญเติบโตสูงสุด คือ 12 ชั่วโมง สามารถนับเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 นับได้ 9.36 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หา กลีเซอรอล พบค่าความเข้มข้นสุดท้าย 20.55 กรัมต่อลิตร เท่ากับใช้ไปประมาณ 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเจริญเติบโตได้สูงกว่า *Enterobacter agglomerans* BCC19559 ที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 9.30 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หากลีเซอรอล พบค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 24.81 กรัมต่อลิตรเชื้อจุลินทรีย์ใช้ไปเพียง 0.41 กรัมต่อลิตร

ในขณะที่ผลของความเป็นกรดด่างต่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตสูงสุดระหว่างเชื้อ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6 สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 9.14 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 เมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 10.09 log CFU ต่อมิลลิลิตร

จากผลการวิเคราะห์สภาวะต่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อความเป็นกรดด่างมีผลกระทบต่อจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19559 โดยใช้ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 และทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 12 ชั่วโมง ปรากฏว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อมีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 7.69 log CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าเจริญได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* BCC19558 ที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ pH 6 โดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร นับได้ 7.58 log CFU ต่อมิลลิลิตร

ส่วนผลของความเร็วรอบต่อความเป็นกรดด่างและต่อการใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลของเชื้อจุลินทรีย์เห็นว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19558 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร และความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6 โดยผลปรากฏว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่าความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที สามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตจากการเพาะเลี้ยงได้ 7.76 log CFU ต่อมิลลิลิตร และมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าของเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter agglomerans* สายพันธุ์ BCC19559 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 20 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยใช้ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ pH 6.5 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้ค่าความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที และสามารถนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 7.71 log CFU ต่อมิลลิลิตร

จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในตัวอย่างที่วิเคราะห์ แต่พบสารอื่น ซึ่งยังไม่พบสารมาตรฐานใดที่มี retention time ตรงกับของสารตัวอย่างที่ออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในอนาคตจะมีการศึกษาการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ดังต่อไปนี้

1. สามารถเปลี่ยนจากกลูโคสไปเป็น 1,3-โพรเพนไดออล ได้จากการหมัก 2 ขั้นตอนโดยกลีเซอรอล จะผลิตได้จากกลูโคสจากจุลินทรีย์ และทำการหมักให้ไปเป็น 1,3-โพรเพนไดออล จากเชื้อจุลินทรีย์
2. นำกลีเซอรอลซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้จะช่วยให้ผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้นและลดต้นทุนในการกำจัด
3. ควรเพิ่มระดับการทดลองลงในถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะที่ดีขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธีรวัจน์ สุราตะโก. 2551. การตรึง *Clostridium butyricum* DSM 5431 บนใยบวบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดนิ่งเพื่อการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออล บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 76 หน้า.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ. 2549-2550. การแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิต 1,3-โพรเพน-ไดออลจากกลี-เซอรอลที่เหลือจากการผลิตไบโอดีเซล. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2552. การจำแนกแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน วงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอี. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 144 หน้า.

Abbad-Andalous, S., C. Manginot-Dürr, J. Amine, E. Petitdemange and H. Petitdemange. 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered productionof acids. *Appl Env Microbiol.* 61: 4413-4417.

Ahrens, K., K. Menzel, A.P. Zeng and W.D. Deckwer. 1998. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzyme and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. *Biotechnol Bioeng.* 59: 544-552.

Barbirato, F. and A. Bories. 1997. Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Res. Microbiol.* 148: 475-484.

Barbirato, F., C. Camarasca-Claret, A. Bories and J.-P. Grivet. 1995. Description of the glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol producing microorganism *Enterobacter agglomerans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43: 786-793.

Barbirato, F., D. Chedaille and A. Bories. 1997. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47: 441-446.

Barbirato, F., E.H. Himmi, T. Conte and A. Bories. 1998. 1,3-Propanediol production by fermentation : an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind Crops Prod.* 7: 281-289.

Barbirato, F., P. Soucaliie and A. Bories. 1996. Physiologic mechanisms involved in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. *Appl Env Microbiol.* 62: 4405-4409.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Barbirato, F., A. Suzette, P. Soucaille, C. Camarasa, J.M. Salmon and A. Bories. 1997. Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: Limitations and regulations. *Microbiology*. 143: 2423-2432.

Bauer, R., N. Katsikis, S. Varga and D. Hekmat. 2005. Student of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess Biosyst Eng*. 5: 37-43.

Biebl, H. 1991. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotech*. 35: 701-705.

Biebl, H. 2001. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* - batch and continuous culture studies. *J Ind Microbiol Biotech*. 27: 18-26.

Biebl, H. and S. Marten. 1995. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol : use of cosubstrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 44: 9-15.

Biebl, H., S. Marten, H. Hippe and W.D. Deckwer. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated Clostridia. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 36: 592-597.

Biebl, H., K. Menzel, A.P. Zeng and W.D. Deckwer. 1998. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 50: 24-29.

Biebl, H., K. Menzel, A.P. Zeng and W.D. Deckwer. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 52: 289-297.

Boenigk, R., S. Bowien and G. Gottschalk. 1993. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 38: 453-457.

Bories, A., C. Claret and P. Soucaille. 1991. Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem*. 26: 243-248.

Bouvet, O.M.M., P. Lenormand, E. Ageron and P.A.D. Grimont. 1995. Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae. *Rea Microbiol*. 146: 279-290.

Cameron, D.C., N.E. Altaras, M.L. Hoffman and A.J. Shaw. 1998. Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog*. 14: 116-25.

Chang, J., K.-S. Leeb and P.-J. Linb. 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27: 1167-1174.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chen, X., D.J. Zhang, W.T. Qi, S.J. Gao, Z.L. Xiu and P. Xu. 2003. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic condition. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 143-146.

Cheng, K.K., D.H. Liu and W.B Liu. 2005. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. *Biotechnol Lett.* 27: 19-22.

Cheng, K.K., D.H. Liu, Y. Sun and W.B. Liu. 2004. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnol Lett.* 26: 911-915.

Cheng, K.K., J. A. Zhang, D.H. Liu, Y. Sun, M.D. Yang and H.J. Liu. 2007. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae. Process Biochem.* 42: 740-744.

Cheng, K.K., J.A. Zhang, D.H. LIU, Y. Sun, M.D. Yang and J.M. Xu. 2006. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. *Biotechnol Lett.* 28: 1817-1821.

Chotani, G., T. Dodge, A. Hsu, M. Kumar, R. Laduca, D. Trimbur, W. Weyler and K. Sanford. 2000. The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim .Biophys. Acta* 1543: 434-455.

Claret, C., J.M. Salmon, C. Romieu and A. Bories. 1994. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl Environ Microbiol.* 41: 359-365.

Colin, T., A. Bories and G. Moulin. 2000. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54: 201-205.

Colin, T., A. Bories, C. Lavigne and G. Moulin. 2001. Effect of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum. Curr Microbiol.* 43: 238-243.

Dabrock, B., H. Bahl and G. Gottschalk. 1992. Parameters a solvent production by *Clostridium pasteurianum. Appl Environ Microbiol.* 58: 1233-1239.

Daniel, R., K. Stuertz and G. Gottschalk. 1995. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii. J Bacteriol.* 177: 4392-4401.

Deckwer, W.-D. 1995. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbial Rev.* 16: 143-149.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dharmadi, Y., A. Murarka and R. Gonzalez. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng.* 94: 821-829.

Du, C., H. Yan, Y. Zhang and Y. Li. 2006. Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae. App l Microbiol Biotechnol.* 69: 554-563.

Forage, C.W. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Env Microbiol.* 53: 639-643.

Forage, R.G. and C.C. Lin. 1982. Dha System mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J Bacteriol.* 151: 591-599.

Forsberg, C. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *App Environ Microbiol.* 53: 639-643.

Fukuda, H., K. Akiniko and N. Hideo. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *J. Bioscience and Bioengineering.* 92(52): 405-416.

Gervasio, P.S., M. Matthias and C. Jonas. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances.* 27: 30-39.

González-Pajuelo, M., J.C. Andrade and I. Vasconcelos. 2004. Production of 1,3-production by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J Ind Microbiol Biotech.* 31: 442-446.

González-Pajuelo, M., J.C. Andrade and I. Vasconcelos. 2005. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32: 391-396

González-Pajuelo, M., I. Meynial-Salles, F. Mendes, J.C. Andrade, I. Vasconcelos and P. Soucaille. 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab Eng.* 7: 329-336.

González-Pajuelo, M., I. Meynial-Salles, F. Mendes, P. Soucaille and I. Vasconcelos. 2006. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol : physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266 and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1 (psPD5). *Appl Env Microbiol.* 72: 96-101.

Gunzel, B., S. Yonsel and W.D. Deckwer. 1991. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m^3. *Appl Microbiol Biotechnol.* 36: 289-295.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hao, J., F. Xu, H. Liu and D. Liu. 2006. Downstream processing of 1,3-propanediol fermentation broth. *J Chem Technol.* 60: 60-66.

Himmi, E.H., A. Bories and F. Barbirato F. 1999. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum. Bioresour Technol.* 67: 123-128.

Homann, T., C. Tag, H. Biebl, W.D. Deckwer and B. Schink. 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbioil Biotechnol.* 33: 121-126.

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.

Jarvis, G.N., E.R.B. Moore and J.H. Thiele. 1997. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J Appl Microbiol.* 83 : 166-174.

Knietsch, A., S. Bowien, G. Whited, G. Gottschalk and R. Daniel. 2003. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl Env Microbiol.* 69: 3048-3060.

Lin, E.C.C. 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 30: 535-578.

Lin, R., H. Liu, J. Hao, K. Cheng and D. Liu. 2005. Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. *Biotechnol Lett.* 27 : 1755-1759.

Luers, F., M. Seyfried, R. Daniel and G. Gottschalk. 1997. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett.* 154: 337-345.

Macis, I., R. Daniel and G. Gottschalk. 1998. Properties and sequence of the coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum. FEMS microbiol Lett.* 164: 21-28.

Malaoui, H. and R. Marczak. 2001. Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. *J Appl Microbiol.* 90: 1001-1014.

McCoy, M. 1998. Chemical makers try biotech paths. *Chem Eng News.* 22(June): 13-19.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Menzel, K., A.P. Zeng and W.D. Deckwer. 1997. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae. Enzyme Microb. Technol.* 20: 82-86.

Mu, Y., Z.-L. Xiu and D.-J. Zhang. 2008. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumonia. Biochemical Engineering Journal.* 40: 537-541.

Nakamura, C.E. and G.M. Whited. 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol.* 14: 454-459.

Nakas, J.P., M. Schaedle, C.M. Parkinson, C.E. Coonley and S.W. Tanenbaum. 1983. System development for linked-fermentation products of solvents from algal biomass. *Appl Environ Microbiol.* 46: 1017-1023.

Németh, A., B. Kupcsulik and B. Sevella. 2003. 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026. *World J Microbiol Biotechnol.* 19: 659-663.

Papanikolaou, S., P. Ruiz-Sanchez, B. Pariset, F. Blanchard and M. Fick. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol.* 77: 191-208.

Petitdemange, E., C. Dürr, S. Abbad and G. Raval. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum. Ind Microbiol.* 15: 498-502.

Raynaud, C., P. Sarcabal, I. Meynial-Salles, C. Croux and P. Soucaille. 2003. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum. Proc Natl Acad Sci.* 100: 5010-5015.

Reimann, A., H. Biebl and W.D. Deckwer. 1998. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49: 359-363.

Saint-Amans, S., I. Girbal, J. Andrade, K. Ahrens and P. Soucaille. 2001. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J Bacteriol.* 183: 1748-1754.

Saint-Amans, S., P. Perlot, G. Goma and P. Soucaille. 1994. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium bu butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotechnol Lett.* 16: 832-836.

Schutz, H. and F. Radler. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri. Syst Appl Microbiol.* 5: 169-178.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stevenson, D.E., R.A. Stanley and R.H. Furneaux. 1994. Near-quantitative production of fatty acid alkyl ester by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 478-484.

Toraya, T., S. Honda, S. Kuno and S. Fukui. 1978. Coenzyme B12-dependent diol dehydratase: regulation of apoenzyme synthesis in *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 8724. *J Bacteriol.* 135: 726-729.

Wang, Z.X., J. Zhuge, H. Fang and B.A. Prior. 2001. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv.* 19: 201-223.

Xiu, Z.L. 1999. The analysis of microbial production of 1,3-propanediol. *Chem Ind.* 19: 33-35.

Yang, G., J.S. Tian and J.L. Li. 2007. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 1017-1024.

Yazdani, S.S. and R. Gonzalez. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology.* 18: 213-219.

Ying, M., Z.L. Xiu and D.J. Zhang. 2008. A combined bioprocess of biodiesel productive by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Engineering.* 40: 537-541.

Zeng, A.P. and H. Biebl. 2002. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Ads Biochem Eng and Biotechnol.* 74: 239-259.

Zeng, A.P., H. Biebl and H. Schlieker. 1993. Pathway analysis of glycerol fermentation by *K. pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microbiol.Technol.* 15: 770–779.

Zeng, A.P., A. Ross, H. Biebl, C. Tag, B. Gunzel and W.D. Deckwer. 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 44: 902-911.

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*. *Biochemical Engineering Journal.* 37: 256–260.

Zhao, Y.N., G. Chen and S.J. Yao. 2006. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Eng J.* 32: 93-99.

[Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/1,3-propanediol (11/10/52)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online]. Available: http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/Enterobacter.html (11/10/52)

[Online]. Available: http://www.miyarisan.com/english_main.htm (14/02/54)

[Online]. Available: http://www.scribemedia.org/2007/09/18/nanologix-clostridia/ (14/02/54)

[Online]. Available: http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568 (16/02/54)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ (preculture) ของ clostridia

อาหาร reinforced clostridial (ต่อลิตร)

Yeast extract	3.0	กรัม
ผง Lab-L emco	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
แป้ง	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
โซเดียมอะซีเตต	3.0	กรัม
ซีสเตอีน ไฮดรอคลอไรด์	0.5	กรัม
วุ้น	0.5	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ± 0.2 โดยเติมสารละลาย 5 M NaOH หรือ 5 M H_2SO_4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง เก็บในตู้เย็น 8 °C ทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Fermentation medium)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Clostridium butyricum* (ต่อลิตร) (H. Malaoui, 2000)

Glycerol	20.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	15.0	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	5.0	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$CaCo_3$	2.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Trace element solution SL7	2.0	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบของ Trace element solution SL7 (ต่อลิตร) มีดังนี้

$Zncl_2$	70.0	มิลลิกรัม
$MnCl_2.4H_2O$	100.0	มิลลิกรัม
H_3BO_3	60.0	มิลลิกรัม
$CoCl_2.2H_2O$	200.0	มิลลิกรัม
$CuCl_2.2H_2O$	20.0	มิลลิกรัม
$NiCl_2.6H_2O$	25.0	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	35.0	มิลลิกรัม
HCl 37%	0.9	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยเติมสารละลาย 5 M NaOH หรือ 5 M H_2SO_4 โดยช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลอยู่ระหว่างร้อยละ 10-40

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Clostridium acetobutylicum* (ต่อลิตร) (Andrade และ Vasconcelos, 2003)

Glucose	15.0	กรัม
Glycerol	15.0	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Acetic acid	2.2	กรัม
Biotin	0.04	กรัม
Þ-aminobenzoic acid	8.0	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

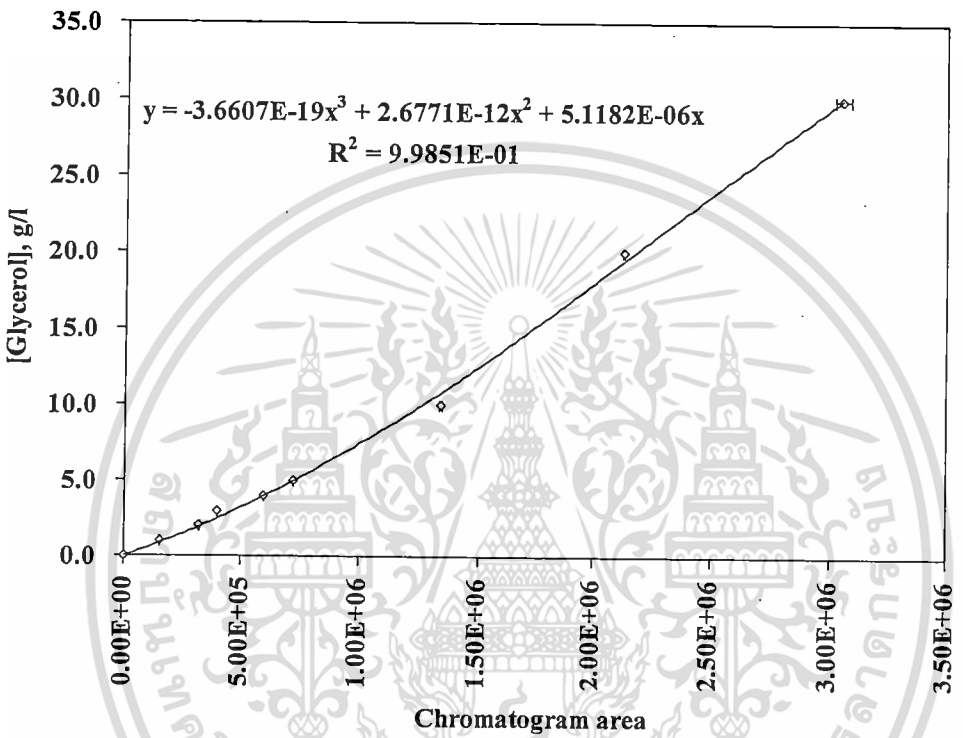
ปรับ pH ให้ได้ 6.3 โดยเติมสารละลาย 5 M NaOH หรือ 5 M H_2SO_4 โดยช่วงความเข้มข้นของกลีเซอรอลอยู่ระหว่างร้อยละ 10-40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

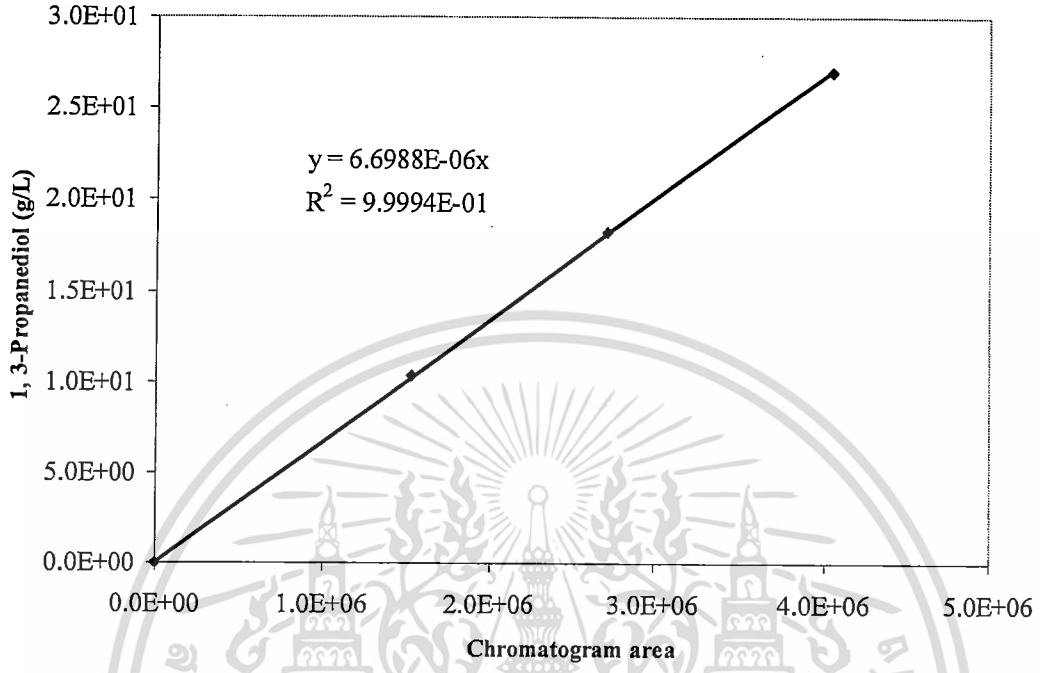
1. กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล (glycerol standard)



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลที่วัดได้จากเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟมาตรฐานของ 1, 3-โพรเพนไดออล (1, 3-propanediol standard)



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของ 1,3-โพรเพนไดออลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้