การเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* BL 21 (DE3) ด้วยกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

Escherichia coli BL 21 (DE3) Cultivation Using Raw Glycerol from Biodiesel Production Process

ศุภชัย ฤกษ์เกษม[1,2] เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ[1,2] และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา[1,2]

Supachai Reakasame [1,2], Penjit Srinophakun[1,2] and Anusith Thanapimmetha[1,2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม RBD เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) โดยกลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการศึกษา มีปริมาณกลีเซอรอล 76 เปอร์เซ็นต์ สบู่ 13.3 เปอร์เซ็นต์ และ เถ้า 3.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เนื่องจากสบู่และโซเดียมอิออนในกลีเซอรอลดิบอาจมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย กลีเซอรอลดิบจึงถูกนำมาปรับปรุงคุณภาพให้บริสุทธิ์ขึ้น ด้วยการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น โดยปรับพีเอชของกลีเซอรอลดิบให้มีค่าลดลงจาก 12 เป็น 6 5 4 3 และ2 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงในกลีเซอรอลดิบ ทำให้กลีเซอรอลดิบเกิดการแยกชั้นเป็นสามชั้น โดยชั้นบนคือชั้นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลางคือชั้นกลีเซอรอล และชั้นล่างคือชั้นเกลือซัลเฟต เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของชั้นกลีเซอรอลที่แยกออกมาได้ พบว่ากลีเซอรอลดิบที่ถูกปรับค่าพีเอชให้ต่ำลงจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 มีความบริสุทธิ์เป็น 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณเถ้าเท่ากับ 2.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และไม่พบว่ามีสบู่หลงเหลืออยู่ในชั้นกลีเซอรอลเลย อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการใช้กลีเซอรอลดิบกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และกลีเซอรอลเกรดการค้าที่มีความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในกลีเซอรอลดิบ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม RBD เป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3)

คำสำคัญ : กลีเซอรอลดิบ การปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบ ไบโอดีเซล *Escherichia coli* BL21 (DE3)

ABSTRACT

The possibility of using raw glycerol from RBD palm oil biodiesel as a sole carbon source in culturing *Escherichia coli* BL21 (DE3) was investigated. Raw glycerol from biodiesel industry with 76 % (w/w) glycerol content was pretreated with concentrated sulfuric acid to reduce the amount of

[1] ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Chemical Engineering Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง กรุงเทพฯ 10330

Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Bangkok 10330

impurities which were 13.3% (w/w) of soap and 3.9% (w/w) of ash. These impurities may be toxic to the microbial cell. The acid was added into raw glycerol until the pH of raw glycerol decreased from 12 to 6, 5, 4, 3 and 2, respectively. After that, raw glycerol was separated into 3 phases: free fatty acid (top phase), glycerol (middle phase) and sulfate salt (bottom phase). The recovered glycerol phase was analyzed to determine the glycerol composition. The results showed that glycerol content in the recovered glycerol phase increased when the pH of acid-pretreated glycerol decreased. The pH 3 acid-pretreated glycerol contained 91% (w/w) glycerol, 2.59% (w/w) ash and non-detectable level of soap. Raw glycerol, acid-pretreated glycerol and commercial grade glycerol (99.5% w/w) at the concentration of 5, 10, 30 and 50 g/L were used as a carbon source in culturing *E. coli* BL21 (DE3). The results showed that the cells were able to use raw glycerol efficiently for their growth. The cell dry weight obtained after 36 h of cultivation from raw glycerol were much higher than that from the other kinds of glycerol. The highest cell dry weight (3.47 g/L) was obtained from the medium containing 30 g/L of raw glycerol. The results indicated that raw glycerol from RBD palm oil biodiesel is an interesting carbon source for *E. coli* BL21 (DE3) cultivation.

Keywords : raw glycerol, raw glycerol pretreatment, biodiesel, *Escherichia coli* BL21 (DE3)

E-mail : **g5065332@ku.ac.th**

คำนำ

เนื่องจากน้ำมันปิโตรเลียมเป็นทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัด และมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับความตื่นตัวเกี่ยวกับปัญหาสภาวะโลกร้อน อันมีสาเหตุหลักมาจากก๊าซไอเสียที่เกิดจากการเผาไหม้น้ำมันปิโตรเลียม ทำให้ไบโอดีเซลได้รับความสนใจมากขึ้นอย่างต่อเนื่องในฐานะพลังงานทดแทนสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม การผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันจะทำการผลิตด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ระหว่างไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์กับเมทานอล โดยใช้เบส เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนอกจากจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไบโอดีเซลแล้ว ยังเกิดกลีเซอรอลขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้หลักอีกด้วย (Dharmadi และคณะ, 2006)

กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นสารที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารและยา เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามกลีเซอรอลที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นกลีเซอรอลดิบที่มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากมีสารเคมีชนิดอื่นที่ถูกใช้หรือเกิดขึ้นในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เช่น แอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่ และกรดไขมันอิสระปนเปื้อนอยู่ด้วยจำนวนมาก จึงทำให้ไม่สามารถนำกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังกล่าวได้โดยตรง (Chitra และคณะ, 2005)

กลีเซอรอลสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้หลากหลายเช่น 1, 3-propanediol เอทานอล และ บิวทานอล เป็นต้น (Asad-ur-Rehman และคณะ, 2008) ถึงแม้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีปริมาณมาก และมีราคาถูกกว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์ แต่

ยังคงมีรายงานการศึกษาการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในจำนวนที่ไม่มากนัก โดยมีรายงานว่าสิ่งเจือปนที่อยู่ในกลีเซอรอลดิบ เช่นสบู่ และ เกลืออนินทรีย์ มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด (Asad-ur-Rehman และคณะ, 2008; Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004) ในขณะเดียวกันก็มีรายงานว่าแบคทีเรีย *Clostridium butyricum* บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004; Petitdemange และคณะ, 1995)

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งในระดับการทดลองและระดับอุตสาหกรรม (Aon และคณะ, 2008) มีรายงานว่า *E. Coli* สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยในการใช้กลีเซอรอลภายใต้สภาวะไร้อากาศของจุลินทรีย์ชนิดนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น เอทานอล กรดแลคติก กรดอะซิติก และไฮโดรเจน เป็นต้น (Dharmadi และคณะ, 2006) รวมถึงยังมีการรายงานการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ด้วยกลีเซอรอลเพื่อผลิตกรดอะมิโนชนิดแอล-ฟีนิลอะลานีนอีกด้วย (Khamduang และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีงานวิจัยใดที่ทำการศึกษาถึงการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* มาก่อน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL 21 (DE3)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การเตรียมต้นเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดลอง ทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (pH 7.4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยอาหาร LB ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร NaCl 10 กรัมต่อลิตร และทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร

2. กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบดีเซลที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทน้ำมันพืชปทุมจำกัด เป็นกลีเซอรอลที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างน้ำมันปาล์ม RBD (Refined Bleached Deodorized Palm Oil) กับเมทานอล โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในกระบวนการผลิตจะมีการระเหยเมทานอลออกจากกลีเซอรอลดิบเพื่อนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอีกครั้ง กลีเซอรอลดิบที่ได้มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็ง มีพีเอชเท่ากับ 12 และมีความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล 76 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณสบู่ 13.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีปริมาณเถ้า 3.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3. การปรับปรุงคุณภาพของกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

ให้ความร้อนกับกลีเซอรอลดิบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยเมทานอลที่หลงเหลืออยู่ในกลีเซอรอลดิบออก จากนั้นทิ้งให้กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการให้ความร้อนดังกล่าวเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วทำการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงไปในกลีเซอรอลดิบ เพื่อทำการปรับพีเอชของกลีเซออรอลดิบให้มีค่าลดลงจาก 12 เป็น 6 5 4 3 และ 2 ตามลำดับ เมื่อเติมกรดซัลฟิวริกลงไปในกลีเซอรอลดิบแล้วจะทำให้เกิดเกลือซัลเฟต และกรดไขมันอิสระขึ้น จากนั้นนำกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับพีเอชแล้วดังกล่าวไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกชั้นกลีเซอรอล ออกจากชั้นของกรดไขมันอิสระ และชั้นของเกลือซัลเฟต ทำการบันทึกสัดส่วนโดยน้ำหนักของสารในแต่ละชั้นที่แยกได้ นำชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป

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

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ในการทดลองนี้ ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 50 กรัมต่อลิตร $MgCl_2$ 0.81 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 2.43 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 2.43 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 0.85 กรัมต่อลิตร Thiamine–HCl 0.085 กรัมต่อลิตร $FeSO_4$ 0.002 กรัมต่อลิตร $MnSO_4$ 0.002 กรัมต่อลิตร $CaCl_2$ 0.05 กรัมต่อลิตร และ $ZnSO_4$ 0.01 กรัมต่อลิตร (Khamduang และคณะ, 2009) โดยใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลเกรดการค้าที่มีความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 3 โมลาร์ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ Thiamine-HCl และ $MgCl_2$ จะถูกเตรียมแยกจากส่วนประกอบอื่น ๆ โดยส่วนประกอบทั้งหมดจะถูกนำมาผสมรวมกันในภายหลัง Thiamine-HCl จะถูกกำจัดเชื้อโดยใช้วิธีการกรองผ่าน Filter ที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 2 ไมโครเมตร (National Scientific, USA) ส่วน $MgCl_2$ และองค์ประกอบอื่น ๆ จะถูกฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที การเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) จะทำในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที และใช้ต้นเชื้อในการทดลองเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเก็บตัวอย่างของน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่ได้

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลีเซอรอล

ทำการวิเคราะห์กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และกลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด เพื่อหาองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

ก) ปริมาณกลีเซอรอลวิเคราะห์ด้วยวิธี Spectophotometry ของ Bondioli และคณะ (2005)

ข) ปริมาณสบู่วิเคราะห์ด้วยการไตเตรท ด้วย HCl 0.1 โมลาร์ และใช้โบรโมฟีนอลบลูเป็น Indicator (Asad-ur-Rehman และคณะ, 2008)

ค) ปริมาณเถ้าทำการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ISO 2098-1972

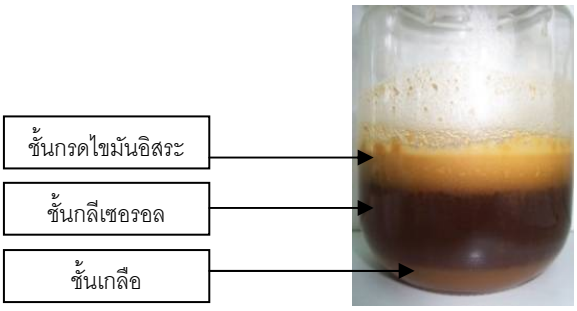
6. การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Escherichia coli* BL21 (DE3)

การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งทำโดยการนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การปรับปรุงคุณภาพของกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่ใช้น้ำมันปาล์ม RBD เป็นวัตถุดิบในการผลิต และใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในกลีเซอรอลดิบนี้มีปริมาณกลีเซอรอล 76 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีสบู่ 13.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีเถ้า 3.9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ขั้นตอนการปรับปรุงคุณภาพกลีเซอรอลดิบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์และลดปริมาณของสิ่งเจือปนในกลีเซอรอลดิบ เนื่องจากมีรายงานว่าสบู่และโซเดียมอิออนในกลีเซอรอลดิบมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด (Asad-ur-Rehman และคณะ, 2008) ผลการทดลองพบว่าหลังจากเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปในกลีเซอรอลดิบเพื่อทำการปรับค่าพีเอชให้มีค่าลดลงจาก 12 เป็น 6 5 4 3 และ 2 แล้ว ทำให้กลีเซอรอลดิบเกิดการแยกชั้นเป็น 3 ชั้น (ดังแสดงในภาพที่1) โดยชั้นบนเป็นชั้นของกรดไขมันอิสระ ชั้นกลางเป็นชั้นของกลีเซอรอล และชั้นล่างเป็นชั้นของเกลือซัลเฟต และหลังจากทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นต่าง ๆ ออกจากกัน พบว่าเมื่อพีเอชของกลีเซอรอลมีค่าต่ำลง ทำให้เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกลีเซอรอลและชั้นเกลือที่แยกได้มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระที่แยกได้มีค่าลดลง ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้ โดยค่าองค์ประกอบของกลีเซอรอลแต่ละพีเอชที่วิเคราะห์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมกรดซัลฟิวริกลงไปในกลีเซอรอลดิบจะทำให้ปริมาณสบู่ที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบมีปริมาณลดลง ทั้งนี้เนื่องจากกรดที่เติมลงไปเข้าทำปฏิกิริยากับสบู่ในกลีเซอรอลดิบ ทำให้เกิดการแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและเกลือซัลเฟต (Gerpen และคณะ, 2005) ซึ่งได้ถูกแยกออกจากชั้นกลีเซอรอลโดยการปั่นเหวี่ยงดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น จากการที่ปริมาณสบู่ที่มีอยู่ในกลีเซอรอลดิบมีปริมาณลดลงส่งผลให้กลีเซอรอลที่ผ่านการปรับค่าพีเอชให้ลดลง มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยกลีเซอรอลที่ผ่านการปรับพีเอชเป็น 3 มีความบริสุทธิ์มากกว่ากลีเซอรอลดิบ 1.2 เท่า โดยมีปริมาณกลีเซอรอลเท่ากับ 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ไม่พบว่ามีสบู่เหลืออยู่ในชั้นกลีเซอรอลเลย เกลือซัลเฟตที่เกิดขึ้นจากการแตกตัวของสบู่และการสะเทินของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีในกลีเซอรอลดิบกับกรดซัลฟิวริก มีความสามารถในการละลายได้ในกลีเซอรอลต่ำ ทำให้เกลือซัลเฟตที่เกิดขึ้นบางส่วนตกผลึกออกจากกลีเซอรอล ทำให้ปริมาณเถ้าซึ่งถือเป็นตัวแทนของโซเดียมอิออนในกลีเซอรอล มีปริมาณลดลงเมื่อพีเอชของกลีเซอรอลมีค่าลดลง ส่วนองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์นั้นคาดว่าน่าจะเป็นความชื้นเป็นส่วนใหญ่



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะกลีเซอรอลหลังจากทำการปรับพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลีเซอรอล และชั้นเกลือ ที่แยกได้หลังการปั่นเหวี่ยงกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับพีเอชด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

pH ของกลีเซอรอล	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของชั้นต่าง ๆ ที่แยกได้หลังการปั่นเหวี่ยง (% โดยน้ำหนัก)		
	ชั้นกรดไขมันอิสระ	**ชั้นกลีเซอรอล**	**ชั้นเกลือ**
2	12.6	79.0	8.4
3	13.0	78.8	8.2
4	19.0	73.6	7.4
5	22.2	70.7	7.1
6	24.7	68.5	6.8

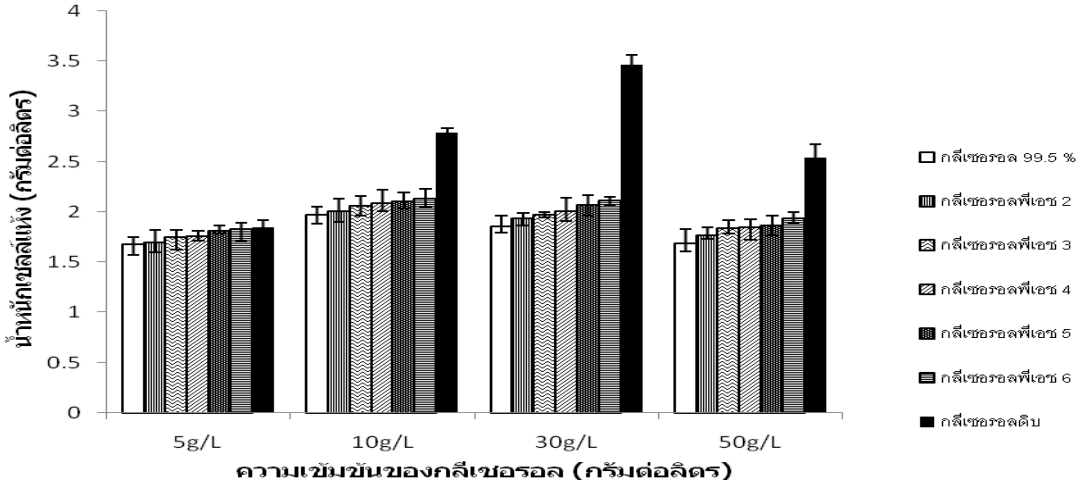
ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้หลังการปรับค่าพีเอชของกลีเซอรอลดิบด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

pHของกลีเซอรอล	กลีเซอรอล (% โดยน้ำหนัก)	สบู่ (% โดยน้ำหนัก)	เถ้า (% โดยน้ำหนัก)	อื่น ๆ (% โดยน้ำหนัก)
2	91	ไม่พบ	2.55	6.45
3	91	ไม่พบ	2.59	6.41
4	86	0.3	2.65	11.05
5	84	0.5	2.77	12.73
6	81	0.8	2.83	15.37
12 (กลีเซอรอลดิบ)	76	13.3	3.90	6.80

2. อิทธิพลของกลีเซอรอลต่อการเจริญของ *Escherichia coli* BL21 (DE3)

ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาการใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และกลีเซอรอลเกรดการค้าที่มีความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้นเป็น 5 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) โดย

วัดน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 36 ดังแสดงในภาพที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลเกรดการค้า และกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด มีแนวโน้มและค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน โดยที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ของกลีเซอรอลเหล่านี้ จะทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.97 ถึง 2.13 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลเหล่านี้เพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงว่ากลีเซอรอลเหล่านี้จะมีผลในการยังยั้งการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันของกลีเซอรอลเหล่านี้ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จะลดลงตามความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามจากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลดิบจะให้ค่าการเจริญสูงกว่ากลีเซอรอลชนิดอื่นที่ทุกความเข้มข้น โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่เพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในชั่วโมงที่ 36

น้ำหนักเซลล์แห้งของ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากกลีเซอรอลดิบ มีค่าสูงกว่าที่ได้จากกลีเซอรอลชนิดอื่น ชี้ให้เห็นว่า *E. coli* BL21 (DE3) สามารถใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ มากกว่าการใช้กลีเซอรอลชนิดอื่น ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นผลการทดลองที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากในงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มักพบว่ากลีเซอรอลดิบมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีรายงานว่ากลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Clostridium butyricum* VPI3266 (Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004) และ *Klebsiella pneumonia* (Mu และคณะ, 2006) มากกว่ากลีเซอรอลบริสุทธิ์ นอกจากนี้ Asad-ur-Rehman และคณะ (2008) ยังรายงานว่าสบู่ในกลีเซอรอลดิบมีผลในการยังยั้งการเจริญของ *C. butyricum* DSM5431 อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้พบว่ากลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีปริมาณสิ่งเจือปนมากส่งผลดีต่อการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้สิ่งเจือปนในกลีเซอรอลดิบ เช่น สบู่ เป็นแหล่งอาหารในการเจริญได้ดี โดยที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้มีปริมาณสารอาหารเหมาะสมกับการเจริญของ *E. coli* BL21 (DE3) มากที่สุด

สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงในกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ทำให้กลีเซอรอลเกิดการแยกชั้นเป็น 3 ชั้น โดยชั้นบนเป็นกรดไขมันอิสระ ชั้นกลางเป็นกลีเซอรอล และชั้นล่างเป็นเกลือซัลเฟต ชั้นกลีเซอรอลที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของกลีเซอรอลดิบมีค่าลดลง โดยกลีเซอรอลดิบที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 3 จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 91 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีปริมาณเถ้า 2.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และไม่พบว่ามีสบู่เหลืออยู่ในกลีเซอรอลนี้ และเมื่อศึกษาใช้กลีเซอรอลดิบ เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) เปรียบเทียบกับ กลีเซอรอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยกรด และกลีเซอรอลเกรดการค้าที่มีความบริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่า *E. coli* BL21 (DE3) สามารถเจริญในกลีเซอรอลดิบได้ดีที่สุด โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้เท่ากับ 3.47 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่มีกลีเซอรอลดิบเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความสนับสนุนจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และโครงการเคยู-ไบโอดีเซล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Aon JC, Caimi RJ, Taylor AH, Lu Q and Oluboyede F. 2008. Suppressing posttranslational gluconoylation of heterologous proteins by metabolic engineering of *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol** (74):950–958

Asad-ur-Rehman, Wijesekara RGS, Nomura N, Sato S, and Matsumura M. 2008. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1, 3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **J Chem Technol Biotechnol** (83):1072-1080

Bondioli P and Bella L D. 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **Eur J Lipid Sci Technol** (107):153–157

Chitra P, Venkatachalam P and Sampathrajan A. 2005. Characterisation and purification of crude glycerol recovered from transesterification of *Jatropha curcus* oil. **Madras Agric J** (92):241-243

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

Gerpen JV. 2005. Biodiesel processing and production. **Fuel Process Tech** (86):1097-1107

Gonzalez-Pajuelo M, Andrade JC and Vasconcelos I. 2004. Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **J Ind Microbiol Biotechnol** (31):442-446

Khamduang M, Packdibamrung K, Chutmanop J, Chisti Y and Srinophakun P. 2009. Production of L-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli*. **J Ind Microbiol Biotechnol** (36):1267-1274

Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W and Xiu ZL. 2006. Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnol Lett** (28):1755-1759

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