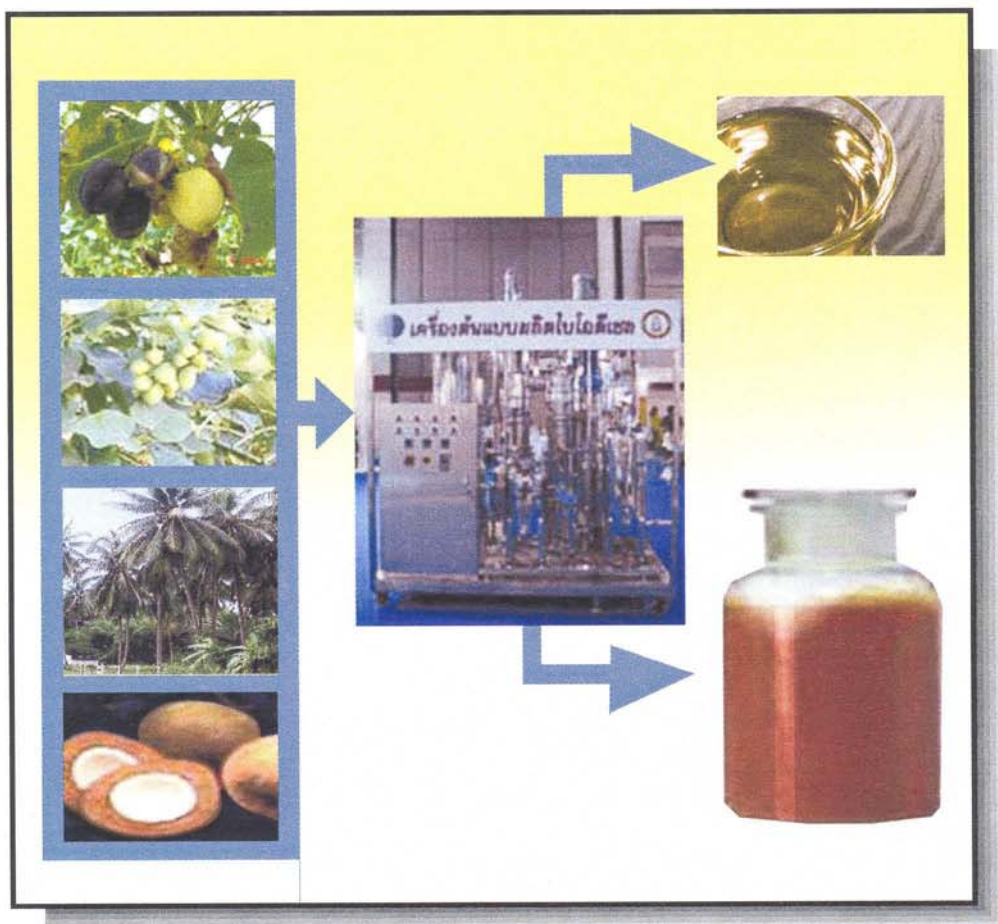




จ.จ.

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-18 / ย. 2 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การพัฒนาสารประกอบมูลค่าเพิ่ม จากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 49-18

การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซลอย่างครบวงจร

โครงการย่อยที่ 2

การพัฒนาสารประกอบมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

รายงานฉบับที่ 1 (รายงานฉบับสมบูรณ์)

การพัฒนาสารประกอบมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้

ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

โดย

อัญชญา พัฒนสุพงษ์

ปารมี เพ็งปรีชา สมใจ เพ็งปรีชา

รมณีย์ หวังดีธรรม โศรดา วัลภา

นิตยาพร สมภักดิ์ มยุรี ใจใส

ดารณี เจริญสุข พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล

บรรณาธิการ

ลิขิต หาญจางสิทธิ์

บุญเรียม น้อยชุมแพ

พิสุทธิ์ พลัสสวาท

วว., กรุงเทพฯ 2555

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



(นายยงวุฒิ เสาวพฤกษ์
ผู้ว่าการ

สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| สารบัญตาราง | ก |
| สารบัญรูป | ง |
| คำนำ | จ |
| ABSTRACT | 1 |
| บทคัดย่อ | 2 |
| 1. บทนำ | 3 |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ | 13 |
| 3. ผลการทดลองและวิจารณ์ | 25 |
| 4. สรุปผลการทดลอง | 42 |
| 5. ข้อเสนอแนะ | 43 |
| 6. เอกสารอ้างอิง | 44 |
| 7. ภาคผนวก | 46 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1 ชนิดของ primers ที่ใช้ในงานวิจัย | 16 |
| ตารางที่ 2 ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิในกลีเซอรอลดิบเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องในระยะเวลา 5 เดือน | 26 |
| ตารางที่ 3 ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่เลี้ยงเชื้อกลุ่ม A โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า | 28 |
| ตารางที่ 4 ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่เลี้ยงเชื้อกลุ่ม B โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า | 29 |
| ตารางที่ 5 ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่เลี้ยงเชื้อกลุ่ม C โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า | 30 |
| ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์กลีเซอรอลบริสุทธิคงเหลือในกลุ่มทดลอง | 31 |
| ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์ของ 1,3-propanediol (1,3-PD) ที่แต่ละกลุ่มเชื้อผลิตได้ ที่เวลา 3 และ 5 วัน | 31 |
| ตารางที่ 8 เปอร์เซนต์ของ 1,3-PD ที่กลุ่มเชื้อ B สามารถผลิตได้จากกลีเซอรอล ภายในเวลาการทดสอบ 5 วัน | 32 |
| ตารางที่ 9 ลักษณะของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกลุ่มเชื้อ B | 33 |
| ตารางที่ 10 เปอร์เซนต์ของสารมูลค่าเพิ่มที่แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตได้ จากการใช้กลีเซอรอลดิบภายในเวลาการทดสอบ 7 วัน | 37 |

สารบัญรูป

| | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 1 แหล่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการคัดแยกกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลคิบเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต | 13 |
| รูปที่ 2 การติดตั้งเครื่องมืออุปกรณ์สำหรับขั้นตอนการทำ Esterification และ Polycondensation | 25 |
| รูปที่ 3 ประสิทธิภาพในการผลิตสาร 1,3-propanediol ของสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ในอาหารทดสอบ 3 ชนิด | 34 |
| รูปที่ 4 ประสิทธิภาพในการผลิตสาร succinic acids ของสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ในอาหารทดสอบ 3 ชนิด | 34 |
| รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงขณะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10 % โดยน้ำหนักเป็นเวลา 5 วัน | 35 |
| รูปที่ 6 ปริมาณกลีเซอรอลคงเหลือในอาหารทดสอบ 3 ชนิด คือ (1) ENT, (2) TM, และ (3) TY ที่เวลา 0, 1, 3, และ 7 วันของการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ | 36 |
| รูปที่ 7 ร้อยละของปริมาณสารมูลค่าเพิ่ม (1,3-propanediol และ succinic acids) และการลดลงของปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ใน 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 | 38 |
| รูปที่ 8 ร้อยละของปริมาณสารมูลค่าเพิ่ม (1,3-propanediol และ succinic acids) และการลดลงของปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ในอาหารทดสอบ ENT ที่มี CG 1, 5, 10, 20 และ 50 % โดยน้ำหนัก | 39 |
| รูปที่ 9 ขั้นตอนการสังเคราะห์ Poly (propylene succinate) | 40 |
| รูปที่ 10 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจาก Poly (propylene succinate) ที่สังเคราะห์ได้ | 41 |

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ เพื่อรองรับความต้องการใช้ภายในประเทศที่เพิ่มขึ้นทุกๆ ปี, โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลมีสัดส่วนการใช้ประมาณร้อยละ 44 ของปริมาณการใช้น้ำมันสำเร็จรูป โดยส่วนใหญ่อยู่ในภาคเกษตรกรรมและภาคการขนส่ง. ไบโอดีเซลจัดเป็นพลังงานที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถทดแทนน้ำมันดีเซลนำเข้ที่ได้จากปิโตรเลียม. โดยทั่วไป การผลิตไบโอดีเซล คือการใช้น้ำมันพืชทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) กับเมทานอล โดยใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นไบโอดีเซลหรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester), ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยมีกลีเซอรอลและสบู่เป็นผลพลอยได้. โดยทั่วไปกลีเซอรอลแบ่งเป็นสองประเภท คือ กลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ (กระทรวงอุตสาหกรรม, มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 336-2538 และ มอก. 337-2538). โดยกลีเซอรอลดิบ แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ กลีเซอรอลดิบจากการแยกสลายไขมัน (hydrolyser crude glycerol) และกลีเซอรอลจากอุตสาหกรรมสบู่ (soap lye crude glycerol) และผ่านกรรมวิธีขจัดไขมันและสบู่ออกแล้ว. ส่วนกลีเซอรอลบริสุทธิ์ หมายถึง กลีเซอรอลที่ผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์สูงมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมยา, อาหาร, บุหรี่ และวัตถุระเบิด. การผลิตไบโอดีเซลจะได้กลีเซอรอลดิบประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ทั้งหมด. โดยทั่วไปองค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชันจะมีกลีเซอรินอยู่ร้อยละ 75-90 โดยน้ำหนัก ขึ้นอยู่กับเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. กระบวนการแยกกลีเซอรอลบริสุทธิ์จัดเป็นวิธีการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้และลดต้นทุนในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้ต้นทุนสูงมาก. อีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล คือ การแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารประกอบมูลค่าเพิ่มเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ซึ่งมีรายงานการศึกษาวิจัยดังนี้ คือ.

การสังเคราะห์สารเติมแต่งในน้ำมันดีเซลโดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้เป็นสารประกอบเมทิลเอสเทอร์ และเมื่อนำมาผสมกับน้ำมันดีเซลพื้นฐานโดยใช้สารประกอบเมทิลเอสเทอร์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถเพิ่มค่าการหล่อลื่นในน้ำมันดีเซลพื้นฐานได้ (Dmytryshyn *et al.* 2004).

การสังเคราะห์สารเติมแต่งในน้ำมันดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง จะได้เมทิลโอเลโทไคโนเทรต ที่สามารถเพิ่มค่าซีเทนและเพิ่มสมบัติการหล่อลื่นของน้ำมัน โดยนำกรดโอเลอิกนำมาทำ

ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอล. หลังจากนั้น ปฏิกิริยาอีพอกซิเดชันที่พันธะคู่ของกรดโอเลอิกและนำมาทำการไฮโดรไลซิส จะได้สารประกอบไดออล. จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาในเทอร์ชันด้วยกรดไนตริกและแอสติคแอนไฮไดรด์ สารประกอบไนเตรตที่สังเคราะห์ได้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มค่าซีเทนและมีการระเหยที่ต่ำกว่า 2-เอทิลเฮกซิลไนเตรต (Suppes *et al.* 2001)

การผลิตสาร 1,3-propanediol โดยกระบวนการหมักและมีการใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และ/หรือกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ ซึ่งสาร 1,3-Propanediol จัดเป็นสารตั้งต้นชนิดหนึ่งในกระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเหล่านี้ อาทิเช่น *Klebsiella pneumoniae* (Biebl *et al.* 1999), *Enterobacter agglomerans* (Barbirato *et al.* 1996), และ *Clostridium butyricum* (Gonzalez-Pajuelo *et al.* 2004)

รายงานฉบับนี้ เป็นแนวทางการศึกษาเบื้องต้นในการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารประกอบมูลค่าเพิ่ม รวมถึงการพัฒนาในรูปแบบเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในอุตสาหกรรมต่างๆเพื่อลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซล. สอดคล้องกับนโยบายของประเทศในการสนับสนุนการเพิ่มมูลค่าให้แก่สินค้าเกษตร โดยส่งเสริมด้านการวิจัย, ให้ความสำคัญในการสร้างความมั่นคงทางด้านอาหาร และนำผลผลิตเกษตรไปผลิตเป็นพลังงานทดแทน เช่น ปาล์ม, สร้างความมั่นคงด้านพลังงานในภูมิภาค และเพิ่มมูลค่าในประเทศโดยการพัฒนาอุตสาหกรรมปิโตรเคมี, อุตสาหกรรมต่อเนื่อง และอุตสาหกรรมผลิตพลังงานชีวภาพ, ตลอดจนการเพิ่มมูลค่าผลผลิตบนฐานความรู้ด้านวิทยาศาสตร์, เทคโนโลยีและนวัตกรรม.

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางการศึกษาเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การผลิต 1, 3-Propanediol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้โดยผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์และการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน.

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อให้ได้กระบวนการแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารประกอบมูลค่าเพิ่มและการพัฒนา รูปแบบเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในอุตสาหกรรม.

ขอบเขตของโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาพัฒนาการผลิตสารประกอบมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.

ศึกษาคุณสมบัติสารประกอบมูลค่าเพิ่มที่ผลิตได้และทำให้บริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการ.

การศึกษาเบื้องต้นในการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์จากสารประกอบมูลค่าเพิ่มที่ได้ เพื่อเป็นกระบวนการต้นแบบในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.

การผลิตสารประกอบมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยผ่านกิจกรรมของจุลินทรีย์.

กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมี.

PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL USING RAW GLYCEROL FOR ENERGY SOURCE OF MICROORGANISM

Anchana Pattanasupong, Paramee Pengprecha, Rommanie Wungdheethum, Sorada Wanllapa, Nittayaporn Sompakdee, Mayuree Jaisai, Daranee Charaensuk, Somchai Pengprecha and Peesamai Jenvanitpanjakul

ABSTRACT

A bacteria consortium being efficient of using raw glycerol, by-product of biodiesel production process as an energy source and capable of converting it into more value-added substance, 1,3-propanediol (PDO), was isolated from waste water of biodiesel production process carried out by Environment, Ecology and Energy Department at TISTR. The optimal conditions for cultivation of this bacterial consortium were investigated with two culture media, Enterobacterium (ENT) and T-medium (TM), both containing raw glycerol (CG) of 0, 1, 5, 10 and 20% by wt. concentrations. The results revealed that the best conditions for growing the bacterial consortium were in ENT media with 10 and 20% by wt. of CG additions. Therefore, 8 bacterial strains were isolated from the consortium. The most effective bacterial strains producing 1,3-PDO were identified using 16S rDNA Sequencing method as *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter radicincitans*, which both were capable of using CG as energy source to produce 1,3-PDO in culture media within 1 day under facultative culture conditions. In addition, the synthesis process of polyester from 1,3-PDO was preliminarily studied in this research project.

การผลิต 1,3-Propanediol โดยใช้กลีเซอรอลดิบ เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์

อัษฎนา พัฒนสุพงษ์¹, ปารมี เพ็งปรีชา², รมณีย์ หวังดีธรรม³, โศรดา วัลภา⁴,
นิตยาพร สมภักดิ์¹, มยุรี ใจใส¹, ดารณี เจริญสุข⁵, สมใจ เพ็งปรีชา⁶
และพิศมัย เจนวนิชปัญจกุล⁵

บทคัดย่อ

กลุ่มแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลดิบ ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงาน และสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารมูลค่าเพิ่ม คือ 1,3-Propanediol (PDO) คัดแยกได้จากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลของฝ่ายสิ่งแวดล้อมนิเวศวิทยาและพลังงาน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร คือ Enterobacterium (ENT) และ T- medium (TM) ที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลดิบ (Crude glycerol, CG) ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 และ 20% โดยน้ำหนัก. พบว่า กลุ่มแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ENT ที่มี CG ความเข้มข้น 10% และ 20% โดยน้ำหนักได้ดีที่สุด. ทำการคัดแยกสายพันธุ์ของกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์. จากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิต 1,3-PDO ด้วยวิธีการ 16S rDNA Sequencing พบว่า เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Klebsilla pneumoniae* และสายพันธุ์ *Enterobacter radicincitans*. จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 จินัสนี้มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ CG เป็นแหล่งพลังงานและผลิตสาร 1,3-PDO ขึ้นในอาหารทดสอบภายใน 1 วันของการบ่มเลี้ยงแบบ facultative. นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษากระบวนการเบื้องต้นในการสังเคราะห์สารพอลิเอสเตอร์จาก 1,3-propanediol.

¹ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

² ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา, วว.

³ ฝ่ายเทคโนโลยีพลังงาน, วว.

⁴ ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร, วว.

⁵ รองผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยและพัฒนา ด้านพัฒนาอย่างยั่งยืน, วว.

⁶ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ เพื่อรองรับความต้องการใช้ภายในประเทศที่เพิ่มขึ้นทุกๆ ปี, โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลมีสัดส่วนการใช้ประมาณร้อยละ 44 ของปริมาณการใช้น้ำมันสำเร็จรูป โดยส่วนใหญ่อยู่ในภาคเกษตรกรรมและภาคการขนส่ง. ไบโอดีเซลจัดเป็นพลังงานที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่สามารถทดแทนน้ำมันดีเซลนำเข้าที่ได้จากปิโตรเลียม. โดยทั่วไป การผลิตไบโอดีเซล คือการใช้น้ำมันพืชทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) กับเมทานอลและใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะได้เอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid methyl ester), เป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยมีกลีเซอรอลและสบู่เป็นผลพลอยได้. โดยทั่วไป กลีเซอรอลแบ่งเป็นสองประเภทคือ กลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลบริสุทธิ์ (กระทรวงอุตสาหกรรม, มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 336-2538 และ มอก. 337-2538). กลีเซอรอลดิบ แบ่งออกเป็นสองประเภท คือ กลีเซอรอลดิบจากการแยกสลายไขมัน (hydrolyser crude glycerol) และกลีเซอรอลจากอุตสาหกรรมสบู่ (soap lye crude glycerol) และผ่านกรรมวิธีขจัดไขมันและสบู่ออกแล้ว. ส่วนกลีเซอรอลบริสุทธิ์ หมายถึง กลีเซอรอลที่ผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์สูง, มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมยา, อาหาร, บุหรี่ และวัตถุระเบิด. การผลิตไบโอดีเซลจะได้กลีเซอรอลดิบประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ทั้งหมด. โดยทั่วไป องค์ประกอบของกลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชันจะมีกลีเซอรินอยู่ร้อยละ 75-90 โดยน้ำหนัก, ขึ้นอยู่กับเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. กระบวนการแยกกลีเซอรอลบริสุทธิ์จัดเป็นวิธีการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้และลดต้นทุนในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้ต้นทุนสูงมาก.

อีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล คือ การแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารประกอบมูลค่าเพิ่มเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ. 1,3-Propanediol (PDO) เป็นสารมูลค่าเพิ่มที่น่าสนใจตัวหนึ่ง ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นสารพอลิเมอร์เพื่อใช้ผลิตเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic). นักวิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาการผลิตสาร PDO โดยผ่านกระบวนการหมัก โดยใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และ/หรือกลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์. สาร PDO จัดเป็นสารตั้งต้นชนิดหนึ่งในกระบวนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเหล่านี้ อาทิเช่น *Klebsiella pneumoniae* (Biebl et al. 1999),

Enterobacter agglomerans (Barbirato *et al.* 1996), *Clostridium butyricum* (Gonzalez-Pajuelo *et al.* 2004). สามารถสรุปรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสาร PDO โดยการทำงานของจุลินทรีย์ได้ ดังนี้ :

Barbirato *et al.* (1996) ทำการหมักกลีเซอรอลร่วมกับ *Enterobacter agglomerans* โดยใช้กลีเซอรอลประมาณ 430 มิลลิโมล พบว่า มีการเจริญของแบคทีเรียควบคู่กับการผลิต PDO. นอกจากนี้ยังพบการผลิตสารอีกชนิดหนึ่งคือ 3-Hydroxypropionaldehyde. การบ่งชี้สารชนิดนี้จะใช้ proton nuclear magnetic resonance และผลจาก Bacteriostatic effect, โดยสารชนิดนี้จะส่งให้การผลิต PDO ลดลง. การสะสมของสารชนิดนี้พบทั้งในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacterial, Klebsiella และ Citrobacter.

Barbirato *et al.* (1998) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้กลีเซอรอลโดย batch fermentation ของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ คือ *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* และ *Clostridium butyricum*. ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ คือ 20 และ 70 กรัมต่อลิตร ซึ่งเกิดการสะสม inhibitory compound คือ 3-hydroxypropionaldehyde (intermediate in 1,3-propanediol metabolic pathway), ทำให้ biological activity ลดลง. *C. butyricum* ถูกเลือกไปใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของ bioconversion ของน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนของ glycerol / glycerin จากการผลิตเอสเทอร์ และจาก wine stillage, เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น PDO สูง. PDO ที่ผลิตได้สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี liquid / liquid extraction โดยมี recovery yield 100%.

Biebl *et al.* (1999) กล่าวว่า เป็นเวลากว่า 100 ปีมาแล้ว ที่มีรายงานการหมักกลีเซอรอลโดยจุลินทรีย์แล้วจะได้ PDO แต่ยังไม่เป็นที่ได้รับความสนใจในวงกว้าง. โดยพบว่า แบคทีเรียกลุ่ม Clostridia มีการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็น PDO ได้ดีกว่า Enterobacteriaceae. ตัวกลางหลักที่ใช้ในการผลิตคือ pyruvate ซึ่งเป็นตัวกลางในวิถีการถ่ายทอดพลังงานโดยใช้ออกซิเจน (Oxidative pathway). นอกจากนี้ ยังมีการใช้สารตัวอื่นร่วมด้วยคือ CO₂, H₂, acetate, butyrate, ethanol, butanol และ 2,3-buthanediol ซึ่งจะทำให้เกิด lactate และ succinate ขึ้นอีกด้วย. ประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยมากขึ้นที่นำ PDO ที่ได้จากการผลิตของจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ เนื่องจาก PDO

ที่ได้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิเอสเตอร์ ซึ่งเป็น Green-Polyester และในการผลิต PDO ยังสามารถใช้ซับสเตรตทางเลือกที่ไม่ใช่กลูโคส นั่นคือ การใช้กลีเซอรอล.

Chen *et al.* (2003) ศึกษาการผลิต PDO ด้วยแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ภายใต้สภาวะ micro-aerobic และพบว่า การหมักแบบรุ่นผลิต (Batch) โดยใช้กลีเซอรอล ในสภาวะ micro-aerobic จะมีค่าความเข้มข้นและผลได้ของ 1,3-PD ใกล้เคียงกับการหมักในสภาวะไม่ใช้อากาศ แต่จะมีปริมาณของเอทานอลน้อยกว่า, ใช้เวลาสั้นกว่า, มีผลให้ประสิทธิภาพในการผลิต PDO เพิ่มขึ้น. การหมักแบบรุ่นผลิตในสภาวะ micro-aerobic โดย *K. pneumoniae* DSM 2026 จะได้ความเข้มข้น 1,3-PD ที่ 17.65 กรัมต่อลิตร, ผลผลิตได้ 56.13 % และกำลังการผลิต 2.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, โดยใช้เวลาในการผลิต 6 ชั่วโมง ใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร. แต่เมื่อเทียบการเจริญของ *K. pneumoniae* DSM 2026 กับ *K. pneumoniae* AS1.1736 ในสภาวะนี้ จะเห็นว่า *K. pneumoniae* DSM 2026 จะมีการเจริญต่ำกว่าและให้ความเข้มข้นของ PDO น้อยกว่า. อย่างไรก็ตาม *K. pneumoniae* DSM 2026 จะเจริญในสภาวะ micro-aerobic ได้ดีกว่าในสภาวะไม่ใช้อากาศ และในการหมักแบบกึ่งรุ่นผลิต (Fed-batch) ภายใต้สภาวะ micro-aerobic ได้ PDO ความเข้มข้น 59.50 กรัมต่อลิตร และกำลังการผลิต 1.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง.

Cheng *et al.* (2004) ทำการผลิต PDO โดยใช้ *K. pneumoniae* เป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้ N_2 และการให้อากาศ 4 ระบบ ผลผลิตกัณฑ์พลอยได้จะแปรผันตามการเปลี่ยนแปลงการให้อากาศ. การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งรุ่นผลิต โดยใช้สภาวะการไม่ใช้อากาศร่วมกับการให้อากาศ จะทำให้ได้ผลผลิตกัณฑ์ คือ PDO 70 กรัมต่อลิตร, 2,3-Butanediol 16 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลได้ diol ทั้งหมด 0.6 ต่อโมลกลีเซอรอล.

González-Pajuelo *et al.* (2004) ทำการทดลองพบว่า การมี lower grade raw glycerol (65% w/v) 100 กรัมต่อลิตร (raw glycerol ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium butyricum* VPI 3266 ได้ร้อยละ 39 ผลผลิตกัณฑ์ที่ได้จากการใช้ glycerol (65% และ 92% w/v) คือ 1,3-propanediol ซึ่งมีปริมาณประมาณ 0.6 mol/mol glycerol consumed.

Lee *et al.* (2000) พบว่า *Anaerobiospirillum succiniciproducens* สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิต Succinic acid ได้. เมื่อเซลล์เจริญในสภาวะขาดอากาศในอาหารที่มี

6.5 กรัมต่อลิตรของกลีเซอรอลได้ผลผลิตของ succinic acid สูงร้อยละ 133 และหลีกเลี่ยงการเกิดกรดแอซีติก อัตราส่วน(ในหน่วยกรัม)ของ succinic acid ต่อกรดแอซีติก เป็น 25.8:1 ซึ่งสูงกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 6.5 เท่า.

Tong *et al.* (1991) พบว่า dha regulon เป็นกลุ่มยีนที่สามารถผลิต PDO จากกลีเซอรอลได้. dha regulon นี้ถูกแทรกเข้าไปใน cosmid PTC1 โดยที่มี *Escherichia coli* AG1 เป็น host ทำให้ *Escherichia coli* AG1 สามารถเจริญใน complex medium ที่มีกลีเซอรอลอยู่ได้ และสามารถผลิต PDO ได้ 4.6 โมลต่อโมล.

Zhu *et al.* (2002) กล่าวว่า การผลิต PDO โดยใช้ *E. coli* สามารถถูกปรับปรุงการผลิตได้ดีขึ้น โดยการลดการสะสมของ methylglyoxal. ในการทดลองนี้จึงมุ่งไปที่ metabolic pathway ที่ยังไม่ค่อยเป็นที่รู้จักที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PDO โดยใช้ glycerol-3-phosphate (G3P). เมื่อให้ *E. coli* เจริญในสภาวะขาดอากาศในกลีเซอรอล โดยปราศจาก exogenous acceptor พบว่า ระดับ G3P ภายในเซลล์สูงกว่าใน *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งเป็นยีนที่ผลิต PDO โดยธรรมชาติอยู่แล้ว. ระดับ G3P ใน *E. coli* สามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในขณะที่ระดับ G3P ของ *K. pneumoniae* คงที่ แม้ว่า จะเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอล.

การผลิตพอลิเอสเตอร์จาก PDO

PTT (polytrimethylene terephthalate) เป็นพอลิเมอร์สายยาวของพอลิเอสเตอร์อะโรมาติก, ผลิตจากการรวมกันของโมโนเมอร์ 2 ชนิด คือ 1,3-propanediol (trimethylene glycol, PDO) กับ terephthalic acid บริสุทธิ์ หรือ dimethyl terephthalate (DMT) อย่างใดอย่างหนึ่ง. โมโนเมอร์ที่เป็น diacid และ diol ตามปกติแล้วจะได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่บริษัท DuPont, Tate & Lyle และ Genecor ได้ประสบความสำเร็จในการผลิต PDO โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์, โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบเติมอากาศและใช้น้ำตาลกลูโคสจากแป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ, ทำให้ช่องทางการผลิตโมโนเมอร์จากธรรมชาติมีมากขึ้นกว่าเดิม. นอกจาก PTT แล้ว ยังมี PTMT (polytrimethylene terephthalate) และ PPT (polypropylene terephthalate) (Wolf and Crank 2005).

PTT จัดเป็น thermoplastic ที่มีคุณสมบัติโดดเด่นหลายอย่าง โดยได้รวมเอาคุณสมบัติโดดเด่นของ PET (polyethylene terephthalate) ในด้านความแข็ง, ความแข็งแรง และความทนทานต่อ

ความร้อน กับ PBT (polybutylene terephthate) ที่ดำเนินกระบวนการผลิตได้ง่าย. การใช้ประโยชน์จาก PTT ได้แก่ การผลิตเป็นเส้นใยที่ใช้ทำพรมหรือเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมทอผ้า เนื่องจากมีความยืดหยุ่นดี และสวมใส่ได้สบาย เหมือนเส้นใยไนลอน, อีกทั้งสามารถย้อมติดสีได้, ทนทานต่อแรงดึงและสารเคมีเหมือนกับ PET. เมื่อนำมาผสมกับเรซินอื่นจึงให้ความแข็งแรง, ยืดหยุ่นและสมบัติด้านความทนทานในกระบวนการขึ้นรูปและบีบอัดขึ้น (Wolf and Crank 2005).

PTT เกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1941, ในช่วงปลาย 1960 บริษัท เชลล์ได้พยายามจะจำหน่าย PTT แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากต้นทุนในด้านวัตถุดิบ PDO เริ่มต้นที่สูง, ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกับน้ำของ acrolein. จนกระทั่งช่วงทศวรรษ 1990 บริษัทเชลล์ได้หาวิธีการผลิตที่มีต้นทุนที่เหมาะสมมากขึ้น โดยใช้วิธีการรวมตัวกับน้ำของ ethylene oxide อย่างต่อเนื่อง โดยคะตะลิสต์ตัวที่ผลิตขึ้นใหม่ และจำหน่ายในชื่อทางการค้าว่า Corterra. ในปี ค.ศ. 1999 บริษัทเชลล์ได้จับมือร่วมทุนกับ SGF Chemie JV ในการสร้างโรงงานผลิต PTT ขึ้นครั้งแรกของโลก ที่เมือง Montreal ประเทศแคนาดาในปี ค.ศ. 2004, โดยมีกำลังการผลิต 86,000 ตันต่อปี และเงินทุน 40 ล้านดอลลาร์. ในขณะที่บริษัทเชลล์ ได้ใช้ความพยายามในการผลิตและจำหน่าย PTT นั้น บริษัทคูปองต์ ได้สร้างผลิตภัณฑ์ PTT ของตนที่รู้จักกันในนาม 3GT หรือ Sorona. Corterra ของบริษัทเชลล์มุ่งเน้นในอุตสาหกรรมเส้นใยและพลาสติกขึ้นรูป แต่ Sorona มีกลุ่มเป้าหมายเป็นตลาดเครื่องนุ่งห่มที่มีมูลค่าสูง. การผลิต PTT ของบริษัทคูปองต์ใช้เทคโนโลยีการรวมตัวกับน้ำของ acrolein เช่นกัน แต่บริษัทได้วางแผนอย่างแน่นอนในการเปลี่ยนกระบวนการผลิตมาสู่การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตภายในปี ค.ศ. 2005, ในขณะที่บริษัทเชลล์ไม่สนใจเทคโนโลยีชีวภาพแต่อย่างใด. บริษัทคูปองต์จึงได้ทำวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยร่วมมือกับ Genecor ในด้านการศึกษา metabolic engineering ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต PDO จากกลูโคสที่ให้ปริมาณผลผลิตและอัตราการผลิตในระดับที่ยอมรับได้. ต้นปี ค.ศ. 2003 บริษัทคูปองต์ได้ประกาศว่า ได้กระบวนการผลิต PTT โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในเชิงพาณิชย์ และจะใช้กระบวนการนี้เป็นหลักในการผลิต PTT ต่อไป. นอกจากนี้ บริษัทคูปองต์ได้รับรางวัลจาก U.S. Environmental Protection Agency's Presidential Green Chemistry ในช่วงต้นปี ค.ศ. 2003.

การผลิต PDO จากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ :

- (1) ใช้ยีสต์ในการหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกลีเซอรอล,

(2) ใช้แบคทีเรียในการหมักกลีเซอรอลให้เป็น PDO.

บริษัทผู้ปลูกใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากแป้งข้าวโพด เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรม เพื่อเปลี่ยนให้เป็น PDO. จากนั้นแยก PDO ออกโดยการกรอง, ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออก และทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น, และ PDO จะถูกนำเข้าไปโรงงานเพื่อผลิตเป็น PTT.

ในการผลิต PTT สามารถทำได้ทั้งจากปฏิกิริยา transesterification ของ dimethyl terephthalate (DMT) กับ PDO การเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันสามารถทำได้ด้วยกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับการผลิต PET ในช่วงต้นของการทำพอลิเมอร์ไรเซชัน.

สำหรับขั้นตอนแรกของการพอลิเมอร์ไรเซชัน จะเป็นการสร้างสารพอลิเอสเทอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยใช้ PDO ปริมาณที่มากเกินไปพร้อมกับน้ำโดยอาศัยปฏิกิริยา transesterification (ในกรณีที่ทำปฏิกิริยากับ PTA) หรือกับเมทานอล (ในกรณีของ DMT).

ขั้นตอนที่สองเป็นการเพิ่มความยาวของสายพอลิเอสเทอร์ โดยการกำจัด PDO, น้ำ และ/หรือเมทานอลที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก. เมื่อปฏิกิริยายังคงดำเนินต่อไปจะทำให้การแยก PDO ออกยากขึ้นเรื่อยๆ. ในการผลิตจริงจึงจำเป็นต้องอาศัยการติดตั้งชุดถังปฏิกรณ์เป็นขั้นตอนเพื่อให้สามารถใช้ระดับอุณหภูมิที่สูงขึ้นและความดันในระดับที่ต่ำลงเรื่อยๆ. ส่วนขั้นตอนสุดท้ายเป็นการนำพอลิเมอร์ซึ่งมีความหนืดสูงและยังคงหลอมอยู่ผสมกับสารเติมแต่งด้วยเครื่อง static mixer, จากนั้น จึงเปลี่ยนสภาพของพอลิเมอร์ให้อยู่รูปของเม็ดพลาสติก.

การผลิต PTT สามารถดัดแปลงใช้เครื่องจักรและระบบที่ใช้ในการผลิต PTT ได้ เนื่องจากกระบวนการผลิตไม่แตกต่างกันมากนัก, ยกเว้นในส่วนของการผลิตสารตั้งต้นคือ PDO ซึ่งจำเป็นต้องแยกออกไปต่างหาก. ต้นทุนที่ต้องใช้ในการเปลี่ยนสายการผลิต PET ให้เป็น PTT นั้นคือ 10-20% ของต้นทุนที่ต้องใช้ในการสร้างโรงงานใหม่. ผู้ผลิตรายใหญ่อย่างบริษัทผู้ปลูกอาศัยการปรับปรุงสายการผลิต PTT มาใช้ ในขณะที่บริษัทเซลล์สร้างโรงงานขึ้นมาใหม่ในการผลิต PTT.

สมบัติของ PTT

PTT มีสมบัติทางกายภาพคล้ายกับ PET คือ มีความแข็งแรง, เหนียว และทนทานต่อความร้อน, สามารถผ่านกระบวนการต่างๆ ได้ง่ายเหมือนกับ PBT เช่น การที่มีจุดหลอมเหลวและอุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปต่ำ, ตกผลึกได้ง่าย, ใช้เวลาน้อยกว่าการผลิต PET. มีสมบัติเหมือนกับ polyamide และ PP ตรงที่สามารถใช้ผลิตเส้นใยเพื่อใช้ในการผลิตสิ่งทอหลากหลายชนิด และเหมือน polycarbonate ตรงที่ขึ้นรูปด้วยแม่พิมพ์ได้อย่างหลากหลาย, มีสมบัติและความสามารถในการแปรรูปได้ทั้งเป็นเส้นใยและฟิล์ม, ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติอยู่ระหว่าง PLA และ cellophane.

สมบัติทางเคมีและกายภาพ

โดยทั่วไปแล้ว PTT มีน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัวของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ไม่แตกต่างจากพอลิเอสเทอร์อื่นๆ. โครงสร้างหลักของพอลิเมอร์อิมิตัวและไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี มีความเป็นผลึก, แข็ง, แข็งแรงและเหนียวมาก, ความหนาแน่นต่ำกว่า PET และใกล้เคียงกับ PBT.

สมบัติเชิงกลและความร้อน

ความทนทานต่อแรงดึง (tensile strength) และ flexular modulus ลดลงตามลำดับดังนี้ PET, PTT, PBT. ระยะทางในการยืดตัวของเส้นใยก่อนขาดของเส้นใย PTT มากกว่าทั้ง PET และ ไนลอน. PTT มีค่า modulus เริ่มต้นน้อยกว่า PET และ ไนลอน หมายความว่ามีความแข็งน้อยกว่าหรือมีความนิ่มมากกว่า, มีจุดหลอมเหลวต่ำ (37 องศาเซลเซียส) และมีอุณหภูมิ glass transition ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่า PET จึงใช้ความร้อนในการผลิตต่ำกว่า.

สมบัติอื่นๆ

ฟิล์มจาก PTT สามารถป้องกันการซึมผ่านไอน้ำได้ดี, สามารถย้อมติดสีได้ง่ายเนื่องจาก PTT มีค่าอุณหภูมิ glass transition ปานกลาง, สีกระจายตัวได้อย่างทั่วถึงไม่จำเป็นต้องใช้ตัวพา, การกระจายตัวของสีสม่ำเสมอ, ติดสีได้ทนทานมากกว่าไนลอน, ทนทานต่อรังสียูวีได้อย่างดีเยี่ยม, ไม่สร้างไฟฟ้าสถิตย์ จึงเหมาะสำหรับทำพรม. เส้นใยจาก PTT ได้นำมาทดสอบในด้านการสัมผัสจากคน พบว่าให้ความรู้สึกนุ่มมากกว่าเส้นใยจาก polyamide และ PET จึงเหมาะที่จะนำมาทำเครื่องนุ่งห่ม.

การปรับปรุงคุณภาพและการผสม

การวิจัยและพัฒนา PTT ที่ผ่านมามุ่งเน้นในการทำให้เป็นเส้นใย PTT สามารถปั่นให้เป็นเส้นด้ายและดึงด้วยความเร็วสูงได้, สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างหลากหลาย เช่น ผลิตเป็นชุดกีฬา, ชุดที่เน้นความคล่องตัว และเครื่องนุ่งห่มอื่นๆ. การผลิตสามารถใช้เครื่องจักรที่ใช้ในการผลิต PET ได้ แต่จำเป็นต้องรักษาความชื้นให้ต่ำกว่า 30 ppm และปรับอุณหภูมิให้ต่ำกว่าการผลิต PET. จากสมบัติในด้านความคงรูปด้วยความร้อนจึงทำให้ PTT สามารถทำเป็นผ้าที่ไม่ต้องผ่านการทอ. การใช้ประโยชน์จาก PTT จะขยายไปสู่พลาสติกได้ต่อเมื่อมีเรซินมาตรฐานออกสู่ตลาดได้แล้ว. PTT สามารถใช้ในการแทนที่พอลิเมอร์ชนิดอื่นๆได้ โดยเฉพาะ PLA. บริษัท Cargill Dow ได้เติม PTT ทดแทน PLA บางส่วนเพื่อใช้ในการผลิตเส้นใย, ทางทฤษฎีแล้ว PTT สามารถทดแทน PLA ได้ 100% แต่ในการทางปฏิบัติยังคงมีข้อจำกัดในด้านราคาของ PTT เอง.

การใช้ประโยชน์ในอนาคต

การใช้ PTT ที่ผ่านมามีส่วนใหญ่เป็นการใช้ในการผลิตเส้นใย เพื่อแปรรูปเป็นสิ่งทอชนิดต่างๆ พรหม, เสื้อผ้า และฟิล์มเพื่อใช้ในการผลิตภาชนะบรรจุ. PTT สามารถเข้ามาแทนที่ PET ได้บางส่วน ทั้งในการผลิตภาชนะบรรจุ, เส้นใย หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ฟิล์ม x-ray, เทปแม่เหล็ก (ในวีดีโอ, เทปคาสเซต หรือคอมพิวเตอร์), ใช้ประโยชน์อื่นๆ เช่น Solenium ใช้ในการทำพื้นในสำนักงานและโรงพยาบาล เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น, ทนทาน และข้อมเป็นสีต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว.

เมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์อื่นๆ แล้ว PTT ยังนับว่า เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เพิ่งออกสู่ตลาด. เมื่อพิจารณาจากผู้ผลิต PTT ยักษ์ใหญ่ 2 ราย จะพบว่า บริษัทเชลล์ มีกลุ่มตลาดหลักเป็นเครื่องใช้ภายในบ้าน โดยใช้แบรนด์ Corterra และคาดว่าแนวโน้มผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาต่อไปน่าจะเป็นการใช้ประโยชน์ในเชิงวิศวกรรม เช่น การทำเป็นแม่พิมพ์เพื่อการผลิตเครื่องใช้ภายในบ้านและอิเล็กทรอนิกส์ ในขณะที่บริษัทดูปองต์ซึ่งมุ่งเน้นในการใช้ PTT เพื่อการผลิตเส้นใยเพื่อใช้ในการผลิตเสื้อผ้าเครื่องนุ่งห่มภายใต้แบรนด์ Sorma. ดังนั้น จึงคาดว่า การใช้ประโยชน์ PTT ใหม่ๆ คงเกิดจาก 2 บริษัทนี้เป็นหลัก.

ผู้ผลิตเดิมและผู้ผลิตที่กำลังเกิดใหม่

ปัจจุบันบริษัทดูปองต์ถือว่าเป็นผู้ผลิต PDO ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพเป็นรายแรก โดยโรงงานต้นแบบที่ใช้ในการผลิต PDO ตั้งอยู่ที่รัฐอิลลินอยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา. เป็นสถานที่ที่

บริษัทร่วมทุนอย่าง Tate & Lyle PLC ใช้ในการผลิตแป้งข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิต PDO นั้นเอง. โรงงานต้นแบบดังกล่าวถูกใช้ในการผลิต PDO อย่างต่อเนื่อง. บริษัทมีแผนที่จะสร้างโรงงานผลิต PDO ในเชิงพาณิชย์แห่งแรกที่ Tennessee ในปี ค.ศ. 2006. โรงงานที่ใช้ในการสร้างพอลิเอสเตอร์จะตั้งอยู่ที่ Kinston, NC, โดยถูกสร้างขึ้นครั้งแรกเพื่อรองรับกำลังการผลิต 9,800 ตันต่อปี คาดว่าจะขยายกำลังการผลิตให้ถึง 40,800 ตันต่อปี. โรงงานที่ Kinston นี้มีความสามารถในการเปลี่ยนการผลิต PTT จากปิโตรเลียมมาสู่ PTT จากจุลินทรีย์ได้ทันที. ในปี ค.ศ. 2003 บริษัทถูกปองต์ได้ร่วมทำวิจัยกับ U.S. Department of Energy's National Renewable Energy Laboratory (NREL) ด้วยเงินลงทุน 7.7 ล้านดอลลาร์เพื่อพัฒนา, สร้าง และทดสอบกระบวนการต้นแบบเพื่อผลิตเคมีภัณฑ์มูลค่าเพิ่มต่างๆ ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (รวมทั้ง PDO) จากเมล็ดพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ เช่น กระแสไฟฟ้า และเอทานอลเกรดเชื้อเพลิงจากเปลือกข้าวโพด. โครงการดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของความร่วมมือที่เรียกว่า Integrated Corn-Based Bioproducts Refinery ซึ่งมีจำนวนเงินลงทุนทั้งหมด 38 ล้านดอลลาร์.

ราคาขาย

ราคาตลาดของ PTT ยังคงไม่มี จากข้อมูลของผู้แทนจำหน่ายของคูปองต์ พบว่า ราคาของ Sorona จะอยู่ในระดับเดียวกับ Nylon 6 คือในช่วง 1.3-1.6 ยูโร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเทศและสภาวะทางการตลาด ณ เวลานั้น.

โครงสร้างราคา

ต้นทุนในการผลิต PDO โดยใช้กระบวนการหมักจากกลีเซอรอลจะอยู่ที่ประมาณกิโลกรัมละ 1.77 ยูโร โดยประเมินจากกำลังการผลิตของโรงงานที่ 75,000 ตันต่อปี, ในขณะที่ต้นทุนค่า PTA และ DMT อยู่ที่กิโลกรัมละ 0.6 และ 0.62 ยูโร. จะเห็นได้ว่า ราคาของ PDO สูงกว่า PTA และ DMT ถึงสองเท่า. อย่างไรก็ตาม ในการผลิตจะใช้ PDO น้อยกว่า PTA. เมื่อผลิตเป็น PTT แล้วพบว่า ราคาของ PDO จะเท่ากับ 60% ของต้นทุนในด้านวัตถุดิบ โดยต้นทุนวัตถุดิบอยู่ที่ 1.14 ยูโรต่อกิโลกรัม PTT .

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตสารมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยการผ่านกระบวนการทำงานของจุลินทรีย์.

1.3 ขอบเขตการศึกษาวิจัย

1.3.1 การคัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต และผลิตสารมูลค่าเพิ่ม.

1.3.2 การคัดแยกและการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ.

1.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก.

1.3.4 การทดลองออกแบบอุปกรณ์และวิธีการสังเคราะห์สารพอลิเอสเทอร์จาก PDO.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

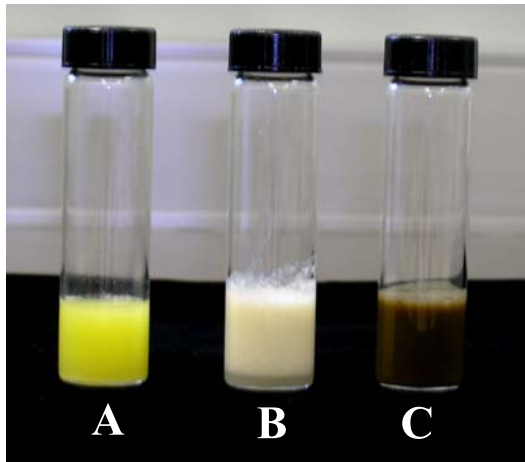
1.4.1 เพื่อได้สายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร PDO.

1.4.2 ได้กระบวนการเบื้องต้นในการพัฒนาสารมูลค่าเพิ่มที่ได้จากกระบวนการผลิตทางชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ.

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 2.1.1 น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ของฝ่ายพลังงาน, วว. ครั้งที่ 1 (เชื้อกลุ่ม A).
- 2.1.2 น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ของฝ่ายพลังงาน, วว. ครั้งที่ 2 (เชื้อกลุ่ม B).
- 2.1.3 น้ำทิ้งจากการผลิตน้ำมันปาล์มจากโรงงานชุมชนพรอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม (เชื้อกลุ่ม C).



รูปที่ 1. แหล่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการคัดแยกกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต.

2.2 อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.2.1 งานวิจัยทางจุลชีววิทยา

อุปกรณ์

- 2.2.1.1 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml.
- 2.2.1.2 Micropipette ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 20 μ l - 1000 μ l
- 2.2.1.3 Vortex mixer (Vision) รุ่น KMC-1300V
- 2.2.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius) รุ่น BA 310S
- 2.2.1.5 ห้องบ่มเชื้อ (ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส)

- 2.2.1.6 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Yamato) รุ่น SP 300
- 2.2.1.7 เครื่องเขย่า (Lab line) รุ่น LED orbit shaker
- 2.2.1.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Faster) รุ่น Bio48
- 2.2.1.9 Stereomicroscope (Olympus) รุ่น SZ30
- 2.2.1.10 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus) รุ่น BX60
- 2.2.1.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Secomam) รุ่น UVIKON 2
- 2.2.1.12 เครื่องเหวี่ยงแยกควบคุมอุณหภูมิ (Tomy) รุ่น MRX-150
- 2.2.1.13 pH meter (Cyberscan) รุ่น 10
- 2.2.1.14 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น เครื่องแก้วต่างๆ (Duran bottles, test tubes, beaker, cylinder เป็นต้น), เข็มเขี่ยเชื้อ, anaerobic jar ฯลฯ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 2.2.1.15 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Nutrient Agar ; NA (Merck)
- 2.2.1.16 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Nutrient Broth ; NB (Difco)
- 2.2.1.17 อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Yeast Malt Agar ; YM
- 2.2.1.18 อาหารทดสอบสูตร T-medium; TM
- 2.2.1.19 อาหารทดสอบสูตร Enterobacterium ;ENT
- 2.2.1.20 กลีเซอรอลดิบ ; CG
- 2.2.1.21 กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 99.99% ; PG (Ajax Finechem)
- 2.2.1.22 ลีซียมแกรม (Merck)

2.2.2 งานวิจัยทางพันธุวิศวกรรม

อุปกรณ์

- 2.2.2.1 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml.
- 2.2.2.2 Thin wall PCR tube ขนาด 0.2 ml
- 2.2.2.3 Micropipette ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 2 μ l – 1000 μ l
- 2.2.2.4 Vortex mixer (Vortex-genic2) รุ่น G-560E
- 2.2.2.5 Heating block (Boekel) รุ่น 02051
- 2.2.2.6 Water bath (Yamato) รุ่น BT100

- 2.2.2.7 ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ
- 2.2.2.8 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius) รุ่น BA 310S
- 2.2.2.9 เต้าไมโครเวฟ (Hitachi) รุ่น MR-6400
- 2.2.2.10 ชุดทำ electrophoresis ของ DNA ซึ่งประกอบด้วย gel chamber

และ power supply

- 2.2.2.11 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)
- 2.2.2.12 High speed refrigerated microcentrifuge
- 2.2.2.13 ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- 2.2.2.14 Gel documentation

สารเคมีที่ใช้

- 2.2.2.15 เอนไซม์ lysozyme (Pharmacia Biotech, USA.)
- 2.2.2.16 เอนไซม์ proteinase K (SIGMA, USA.)
- 2.2.2.17 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)
- 2.2.2.18 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 2.2.2.19 สารละลาย phenol, saturated pH 8
- 2.2.2.20 chloroform- isoamylalcohol (อัตราส่วน 24:1)
- 2.2.2.21 0.5 M sodium chloride (Merck)
- 2.2.2.22 absolute ethanol (Merck)
- 2.2.2.23 deionized water
- 2.2.2.24 agarose (Promega, USA)
- 2.2.2.25 gel star (Promega., USA)
- 2.2.2.26 6x loading dye (0.25% bromphenol blue, 40% sucrose: SIGMA, USA.)
- 2.2.2.27 standard marker: 1 DNA ที่ตัดด้วย HindIII และ Eco RI (Qiagen, USA)
- 2.2.2.28 Takara Ex Taq kit (Takara, Japan) ประกอบด้วย 10x Takara Ex Taq buffer,

2.5 mM dNTPs mix และ Takara Ex Taq polymerase

- 2.2.2.29 ABI Prism 1Big Dye[®] Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit
- 2.2.2.30 3 M sodium acetate pH 4.6
- 2.2.2.31 95% ethanol (Merck)

2.2.2.32 70% ethanol (Merck)

2.2.2.33 Template Suppression Reagent (TSR; Applied Biosystems)

2.2.2.34 Performance Optimized Polymer 6 (POP-6; Applied Biosystems)

2.2.2.35 Primers ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA และการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียมี 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. ชนิดของ primers ที่ใช้ในงานวิจัย

| Primers | ตำแหน่งบน 16S rDNA* | ลำดับเบส |
|-----------------|---------------------|----------------------------|
| BF ₁ | 9-26 | 5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3' |
| BR ₁ | 1510-1491 | 5'-CGTTACCTTGTTAGCGACTT-3' |

* เทียบจาก 16S rDNA ของ *Escherichia coli* (ภาคผนวก ก.)

2.2.3 งานวิเคราะห์ทางเคมี

2.2.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์

อุปกรณ์

- 1) pH meter (Cyberscan) รุ่น 10
- 2) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius) รุ่น A 200S
- 3) Micropipette ขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 20 μ l - 1000 μ l
- 4) อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ สำหรับการไทเทรต

สารเคมีที่ใช้

- 1) สารละลายเอทิลีน ไกลคอล (Ethylene glycol)
- 2) สารละลายกรดซัลฟิวริก
- 3) สารละลายโซเดียมฟอร์มเมต (Sodium formate, NaCHO₂)
- 4) สารละลายโซเดียมเพอร์ไอโอเดต (Sodium metaperiodate, NaIO₄)
- 5) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)

2.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารมูลค่าเพิ่มที่แบคทีเรียผลิตขึ้น

อุปกรณ์

- 1) High Performance Liquid Chromatography; HPLC (Shimadzu) รุ่น LC-10 AD series
- 2) Aminex[®] HPX-87H ขนาด 7.8x300 มิลลิเมตร
- 3) เครื่อง Ultrasonic (Crest) รุ่น 575DAE
- 4) ชุคกรอง (Sartorius) รุ่น 16309

สารเคมีที่ใช้

- 1) Sulphuric acid (Merck)
- 2) Methanol (HPLC grade)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในกลีเซอรอลดิบ

กลีเซอรอลดิบที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดได้รับจากฝ่ายสิ่งแวดล้อมนิเวศน์วิทยาและพลังงาน, วว. นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด). จากนั้น ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ เดือนละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน, โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์กลีเซอรอลในระดับอุตสาหกรรม International Standard ISO 2879. Glycerine for industrial use – Determination of glycerol content – Titrimetric method ดังนี้ :

1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างกลีเซอริน 0.5000 ± 0.0001 กรัม โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร.

2) ปรับค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.05 นอร์แมล ให้มีค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.9 ± 0.1 ด้วยเครื่อง pH-meter.

3) เติมสารละลายโซเดียมเพอร์ไอโอดีต (N_2IO_4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม สารละลายเอทิลีนไกลคอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที.

4) เติมสารละลายโซเดียมฟอร์มเมต ($NaCHO_2$) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรต กับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.125 นอร์แมล จนได้ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) 7.9 ± 0.2 บันทึกปริมาตรที่ใช้.

5) สำหรับตัวเปรียบเทียบ (blank) ไม่ต้องชั่งสารตัวอย่าง ให้ทำตามขั้นตอนเดียวกัน.

6) คำนวณปริมาณกลีเซอรอลในหน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก ตามสูตรดังนี้ คือ :

$$v_1 - v_2 \times 0.125 \times 0.0921 \times \frac{100}{m} = 1.151 \times \frac{v_1 - v_2}{m} \quad \text{โดย}$$

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.125 นอร์แมล ที่ใช้ไทเทรตกับสารตัวอย่าง (มิลลิลิตร),

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.125 นอร์แมล ที่ใช้ไทเทรตกับตัวเปรียบเทียบ (มิลลิลิตร),

m คือ น้ำหนักของสารตัวอย่าง (กรัม).

2.3.2 การคัดเลือกเชื้อกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต

นำกลุ่มเชื้อ A, B, และ C มาบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร TM และ ENT ที่มี PG และ CG ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยน้ำหนัก. ทำการทดลองในหลอดทดลองขนาด 4 แครม โดยมีปริมาณอาหารสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงที่สภาวะแบบ Facultative ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 14 วัน. โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 แผนการทดลอง, สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ด้วยตาเปล่า และวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่เหลือด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.3 การทดสอบความสามารถของกลุ่มเชื้อในการผลิตสารมูลค่าเพิ่มจากกลีเซอรอลดิบ

นำกลุ่มเชื้อ A, B, และ C มาบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร TM และ ENT ที่มี CG 10 และ 20% โดยน้ำหนัก. ทำการทดลองในหลอดทดลองขนาด 4 แครม โดยมีปริมาณอาหารสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงที่สภาวะแบบ Facultative ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 5 วัน, โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 แผนการทดลอง. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ 1,3-propanediol (1,3-PD) ที่แต่ละกลุ่มเชื้อผลิตได้ที่เวลาการทดสอบ 3 และ 5 วัน ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเชื้อคัดเลือกในการผลิตสาร 1,3-PD จากกลีเซอรอลดิบ ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50%

คัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสาร 1,3-PD มาบ่มเลี้ยงบนอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 1% โดยน้ำหนัก. จากนั้น นำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิต 1,3-PD ในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยน้ำหนัก. ทำการทดลองในหลอด

ขนาด 8 แครม โดยมีปริมาตรอาหารสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงที่สภาวะแบบ Facultative ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 5 วัน, โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 แผนการทดลอง. จากนั้น ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ 1,3-PD ที่กลุ่มเชื้อคัดเลือกผลิตได้ที่เวลาการทดสอบ 1, 2, 3 และ 5 วัน ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.5 การคัดแยกสายพันธุ์จากกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพ

นำกลุ่มเชื้อคัดเลือกมาบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10% โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 1 คืน ก่อนที่จะนำมาคัดแยกสายพันธุ์บนอาหาร NA ด้วยวิธีการ Spread plate เมื่อคัดแยกได้สายพันธุ์บริสุทธิ์แล้ว ทำการศึกษาลักษณะและตรวจสอบการติดสีแกรม จากนั้น นำสายพันธุ์แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดเก็บรักษาไว้ในอาหารสำเร็จรูปสูตร NA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.

2.3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

2.3.6.1 การผลิตสารมูลค่าเพิ่มของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารทดสอบ 3 ชนิด

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารมูลค่าเพิ่มในอาหารทดสอบ 3 ชนิด คือ ENT, TM, TY ที่มี CG 10 % โดยน้ำหนัก ในหลอดทดลองขนาด 8 แครม, โดยมีปริมาตรอาหารสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงในสภาวะ Facultative ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน, โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 แผนการทดลอง. จากนั้น ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารมูลค่าเพิ่ม (ได้แก่ 1,3-PD และ succinic acid) ที่แต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ทั้งหมด ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.6.2 การผลิตสารมูลค่าเพิ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก ในระดับการผลิตที่สูงขึ้น

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารมูลค่าเพิ่ม มาศึกษาประสิทธิภาพในระดับการผลิตที่สูงขึ้น โดยทำการบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10% โดยน้ำหนัก, ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร, โดยมีปริมาตรอาหารสุดท้ายเป็น 45 มิลลิลิตร, ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 แผนการทดลอง, บ่มเลี้ยงใน 3 สภาวะทดสอบ คือ Aerobe, Anaerobe และ Facultative, ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน. ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารมูลค่าเพิ่มที่ได้ และปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ทั้งหมดทุก 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.6.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตสารมูลค่าเพิ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารมูลค่าเพิ่ม มาศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม โดยทำการบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10% โดยน้ำหนัก, ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร, โดยมีปริมาตรอาหารสุดท้ายเป็น 45 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงใน 3 สภาวะทดสอบ คือ Aerobe, Anaerobe และ Facultative ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน, ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 แผนการทดลอง. วิเคราะห์ปริมาณสารมูลค่าเพิ่มที่ได้ และปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิคั่งเหลือทุก 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.6.4 การผลิตสารมูลค่าเพิ่มจากกลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารมูลค่าเพิ่ม มาบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยน้ำหนัก, ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร, โดยมีปริมาตรอาหารสุดท้ายเป็น 45 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงในสภาวะ Aerobe ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน, ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อ 1 แผนการทดลอง. วิเคราะห์ปริมาณสารมูลค่าเพิ่มที่ได้ และปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิคั่งเหลือทุก 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องวิเคราะห์ HPLC.

2.3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

2.3.7.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมาเลี้ยงบน Lauria-Bertanii (LB) agar (Difco) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 24 ชั่วโมง.

2.3.7.2 การแยกโครโมโซมของแบคทีเรีย

(1) ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ เชี่ยโคโลนิของเชื้ออายุ 16 - 24 ชั่วโมง ใต้งใน Eppendorf tube ที่มีสารละลาย lysis buffer (TE buffer, 8 mg/ml lysozyme) อยู่ 400 ไมโครลิตร, ปั่นด้วย vortex mixer 30 - 60 วินาที. จากนั้นนำ Eppendorf tube ไปบ่มใน heating block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 60 นาที.

(2) เมื่อครบเวลาบ่มจึงเติม 10% SDS ปริมาณ 64.8 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Proteinase K (ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 21.7 ไมโครลิตร ลงใน Eppendorf tube, ปิดฝาให้

สนิทแล้วพลิกหลอด Eppendorf tube กลับไปมาเบาๆ 4 - 5 ครั้ง. จากนั้นนำไปบ่มต่อใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ระหว่างนั้นให้พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ 4 - 5 ครั้งทุก ๆ 10 นาที, จะสังเกตเห็นสารละลายมีลักษณะใส.

(3) สกัดโปรตีนออกโดยเติมฟีนอล ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ลงใน Eppendorf tube พลิกกลับไปมาเบาๆ. แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน (supernatant) ใสใน Eppendorf tube หลอดใหม่แล้วสกัดซ้ำด้วยฟีนอลอีกครั้ง.

(4) สกัดซ้ำด้วยสารละลาย chloroform-isoamylalcohol แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบน ใสใน Eppendorf tube หลอดใหม่.

(5) ตกตะกอนโครโมโซม โดยเติม 5 M NaCl ปริมาณ 5 ไมโครลิตรต่อสารละลายส่วนใส 100 ไมโครลิตร และเติม absolute ethanol ซึ่งแช่เย็นไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใสที่มีอยู่, พลิก Eppendorf tube กลับไปมาเบาๆ แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 16 - 18 ชั่วโมง.

(6) ตกตะกอนโครโมโซม โดยการปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 45 นาที, จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้ง.

(7) ล้างตะกอนโครโมโซมด้วย 70% ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที, เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วนำ Eppendorf tube ไปบ่มใน heating block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาทีหรือจนตะกอนโครโมโซมแห้ง.

(8) ละลายโครโมโซมใน deionized water ที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 20-35 ไมโครลิตร, นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเร่งการละลายของตะกอนโครโมโซมให้สมบูรณ์เร็วขึ้น. จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของโครโมโซมที่สกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ข.) เก็บสารละลายโครโมโซมที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน.

2.3.7.3 การเพิ่มจำนวน 16S rDNA โดยใช้เทคนิค PCR

(1) เตรียม PCR reaction/tube ดังต่อไปนี้

| | | |
|----------------------------|---|----|
| - 10x Takara Ex Taq buffer | 5 | μl |
| - 0.25 mM dNTPs mix | 4 | μl |

| | | |
|--------------------------------|-------|----|
| - Primer 1 (20 mM) | 1 | μl |
| - Primer 2 (20 mM) | 1 | μl |
| - deionized water | 28.75 | μl |
| - Takara Ex Taq DNA polymerase | 0.25 | μl |
| ปริมาตรสุทธิ | 40 | μl |

(2) จากนั้นเติม DNA template ลงในแต่ละ PCR tube หลอดละ 1 - 10 ไมโครลิตร แล้วแต่ความเข้มข้นของสารละลายโครโมโซมตัวอย่าง. นำ PCR tubes ที่มีส่วนประกอบดังกล่าวไปเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณ 16S rDNA โดยตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ :-

- (a) Initial Denaturation step 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที.
- (b) 30 cycles ของ
 - Denaturation step 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที.
 - Annealing step 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที.
 - Elongation step 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที.
 - Final elongation 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที.

(3) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ นำ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.

2.3.7.4 การทำ PCR products ให้บริสุทธิ์ (PCR purification)

นำ PCR products มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR purification kit (Qiagen) เพื่อให้ได้ PCR products ที่มีความบริสุทธิ์เหมาะแก่การใช้เป็น template ในการหาลำดับเบส. จากนั้น elute PCR products ออกจาก column ด้วย deionized water ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 20 - 30 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ PCR products.

2.3.7.5 การหาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ

- (1) การเตรียม reaction mixture สำหรับ Cycle sequencing ในแต่ละ reaction ประกอบด้วย

| | | |
|-------------------------------|-------|------------|
| Terminator Ready Reaction mix | 8 | ไมโครลิตร. |
| DNA template (PCR Product) | 1-100 | นาโนกรัม. |

primer (3.2 pmol) 1 ไมโครลิตร.

ปรับปริมาตรสุทธิด้วย deionized water เป็น 20 ไมโครลิตร.

(2) โปรแกรมที่ใช้ในการทำ Cycle sequencing ประกอบด้วย 25 cycles ของ

- Denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที.

- Annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที.

- Extension 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที.

(3) กำจัด Dye ส่วนเกินออกโดยดูด PCR product ใส่ลงใน eppendorf tube ใหม่ จากนั้นเติม ethanol/sodium acetate ลงไป 80 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที, ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที.

(4) เติสสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 70 % ethanol ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ปั่นด้วย vortex mixer 30 - 60 วินาที ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที. เติสสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วทำให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ใน heating block เป็นเวลา 1 นาที.

(5) เติม TSR 12-25 มิลลิลิตร ลงใน Eppendorf tube แล้วปั่นด้วย vortex mixer. จากนั้นถ่ายสารละลายลงหลอด septa ขนาด 0.5 มิลลิลิตร, นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นปั่นด้วย vortex mixer แล้วนำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 - 10 วินาที, ใส่หลอด septa เข้าในเครื่อง ABI Prism® 310 Genetic Analyzer เพื่อทำการหาลำดับเบส.

2.3.7.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำลำดับเบสที่ได้ของแต่ละเชื้อมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อที่ทราบชนิดแล้ว ในฐานข้อมูลต่างๆ ที่มีอยู่, โดยใช้ Nucleotide-nucleotide BLAST ของ NCBI ผ่าน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

2.3.8 สถานะการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมูลค่าเพิ่ม (ได้แก่ PDO และ succinic acid) และ ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ทั้งหมด

- Mobile phase: 0.01 N Sulfuric acid ใน Mille-Q.

- อัตราการไหล: 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที และปริมาณที่ฉีด : 10 ไมโครลิตร ที่ RI detector.

2.3.9 การออกแบบอุปกรณ์และวิธีการสังเคราะห์สารพอลิเอสเทอร์จาก PDO

2.3.9.1 ขั้นตอนที่ 1 การทำ Esterification

(1) ชั่ง 1,3 – Propanediol , Succinic acid และ Titanium (IV)n – butoxide ปริมาณ 85.4 , 118.7 และ 0.1031 กรัม ตามลำดับใน Beaker ขนาด 250 มล.

(2) บรรจุสารเคมีข้อ (1) ลงในขวดก้นกลมขนาด 1000 มล.

(3) ติดตั้งเครื่องมืออุปกรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.

(4) กวนของผสมในขวดข้อ (2) ด้วยชุดเครื่องกวนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที พร้อมกับผ่านแก๊สอาร์กอนเข้าไปตลอดระยะเวลาของการทดลองเพื่อไล่แก๊สออกซิเจนออก.

(5) ให้ความร้อนแก่ของผสมในขวดข้อ (4) อย่างช้าๆ จนอุณหภูมิขึ้นสูงถึง 190 °ซ.

(6) ปล่อยให้ของผสมในขวดข้อ (5) ทำปฏิกิริยา ที่อัตราการกวนของของผสม และอุณหภูมิคงที่ที่ 500 รอบต่อนาที และ 190 °ซ. ตามลำดับ จนกระทั่งไอน้ำที่เกิดจากปฏิกิริยา เกิดการควบแน่นผ่าน condenser กลายเป็นหยดน้ำจนหมด.

2.3.9.2 ขั้นตอนที่ 2 การทำ Polycondensation

(1) Valve เพื่อหยุดการจ่ายแก๊สอาร์กอน ในขวดข้อ (6) ในขั้นตอนที่ 1.

(2) เติม Polyphosphoric acid ปริมาณ 0.0866 กรัม ลงในขวด.

(3) ดูดแก๊สภายในขวดออกด้วย Vacuum pump อย่างช้าๆ.

(4) เพิ่มความเร็วการกวนให้เป็น 720 รอบ / นาที ที่อุณหภูมิ 230 °ซ. เป็นเวลา 60 นาที.

(5) สังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเมทานอล และแยกสารออกโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง.

(6) บด และสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ที่ได้ด้วยเมทานอล แล้วแยกออกด้วยการกรองอีกครั้งหนึ่ง.

(7) ผึ่งพอลิเอสเทอร์ ที่สังเคราะห์ได้ ให้แห้งบนกระดาษฟิวส์.

(8) เก็บตัวอย่างพอลิเอสเทอร์ที่ผึ่งแห้งไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงได้สนิท เพื่อการใช้งานขั้นต่อไป.



รูปที่ 2. การติดตั้งเครื่องมืออุปกรณ์สำหรับขั้นตอนการทำ Esterification และ Polycondensation

3. ผลการทดลอง และวิจารณ์

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในกลีเซอรอลดิบ

จากการทดลองเก็บรักษากลีเซอรอลดิบชุดที่นำมาใช้ในการทดลองทั้งหมดที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) เป็นเวลา 6 เดือนนั้น พบว่า สามารถที่จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน. โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในกลีเซอรอลดิบ (โดยวิธีการไทเทรต) ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ในกลีเซอรอลดิบเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องในระยะเวลา 5 เดือน

| ระยะเวลาการเก็บ (เดือน) | % กลีเซอรอลบริสุทธิ์ ในตัวอย่างกลีเซอรอลดิบ | |
|-------------------------|---|--------------------------|
| | เก็บรักษาที่ 4°C. | เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง |
| 0 | 45.58 | 45.80 |
| 1 | 44.31 | 45.92 |
| 2 | 39.23 | 46.38 |
| 3 | 41.32 | 43.28 |
| 4 | 46.03 | 43.84 |
| 5 | 47.89 | 45.82 |
| 6 | 46.15 | 43.17 |

3.2 การคัดเลือกเชื้อกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของกลุ่มเชื้อ A, B, C ในอาหารทดสอบสูตร TM และ ENT ที่มี PG และ CG ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยน้ำหนัก พบว่า เชื้อทั้ง 3 กลุ่ม สามารถใช้ทั้งกลีเซอรอลดิบและกลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตได้. การเปลี่ยนแปลงที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังแสดงในตารางที่ 3-5. ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์คงเหลือในแต่ละกลุ่มทดลองดังแสดงในตารางที่

6. นอกจากนี้ ผลการตรวจนับโคโลนีภายหลัง 14 วันของการบ่มเลี้ยง พบว่า ในทุกหน่วยทดลองมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น.

3.3 การทดสอบความสามารถของกลุ่มเชื้อในการผลิตสารมูลค่าเพิ่มจากกลีเซอรอลดิบ

เมื่อนำกลุ่มเชื้อ A, B, และ C มาบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร TM และ ENT ที่มี CG 10 และ 20% โดยน้ำหนัก ที่สภาวะการบ่มเลี้ยงแบบ Facultative ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 5 วันนั้น พบว่า มีกลุ่มเชื้อ B เท่านั้นที่สามารถผลิตสาร 1,3-propanediol (1,3-PD) ได้ตั้งแต่ 3 วันของการเพาะเลี้ยง ทั้งในอาหารทดสอบที่มีแหล่งคาร์บอนอื่นเป็นองค์ประกอบ (อาหารพื้นฐานสูตร ENT) และในอาหารทดสอบที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นเป็นองค์ประกอบ (อาหารพื้นฐานสูตร TM). ปริมาณสาร PDO ที่วิเคราะห์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 7.

ตารางที่ 3. ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่เลี้ยงเชื้อกลุ่ม A โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

| อาหาร | ชนิด กลีเซอรอล | สัปดาห์ | การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 6 ความเข้มข้น | | | | | การถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 6 ความเข้มข้น | | | | | | |
|-------|-------------------|---------|--|----------|----------|----------|----------|--|--------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | 0% | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% | 0% | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% |
| TM | CG | 1 | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 3,**,y,+ | 3,**,y,+ | 3,**,y,+ | ** ,y,- | 1,* ,+ | 3,**,x,+ | 3,**,y,+ | 3,**,y,+ | 4,**,y,+ | ** ,y,- |
| | | 2 | 1,* ,+ | 3,**,x,+ | 3,**,y,+ | 4,**,y,+ | 4,**,y,+ | ** ,y,- | 1,* ,+ | 3,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,y,+ | ** ,Y,- |
| | | 3 | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,y,- | 1,* ,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- |
| | | 4 | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,* ,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- |
| | PG | 1 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,x,+ | 1,**,x,+ | 1,**,x,+ | 1,**,x,- | 1,* ,+ | 1,**,X,+ | 1,**,x,+ | 1,**,x,+ | 1,**,x,+ | 1,* ,X,- |
| | | 2 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,x,- | 1,* ,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,- |
| | | 3 | 1,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,- | 1,* ,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,- |
| | | 4 | 1,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,- | 1,* ,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,* ,X,- |
| ENT | CG | 1 | 1,* ,+ | 1,* ,x,+ | 2,**,x,+ | 2,**,Y,+ | 2,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,* ,+ | 2,**,x,+ | 3,* ,Y,+ | 3,**,y,+ | 3,**,y,+ | ** ,y,- |
| | | 2 | 1,* ,+ | 2,* ,x,+ | 3,**,x,+ | 4,**,y,+ | 4,**,y,+ | ** ,y,- | 1,* ,+ | 2,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- |
| | | 3 | 1,* ,+ | 2,* ,x,+ | 3,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,* ,+ | 2,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | | 4 | 1,* ,+ | 3,* ,x,+ | 4,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,* ,+ | 2,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | PG | 1 | 1,* ,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,x,- | 1,* ,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- | 1,* ,x,- |
| | | 2 | 1,* ,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,x,- | 1,* ,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- |
| | | 3 | 1,* ,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- |
| | | 4 | 1,* ,+ | 2,**,X,+ | 2,* ,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- |

หมายเหตุ ตัวเลข 1-5 แสดงระดับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกลีเซอรอล

(X คือ กลีเซอรอลละลายในอาหาร, x คือ ไม่ละลาย, y คือ กลีเซอรอลเหลว, Y คือ กลีเซอรอลแข็ง, - คือ ไม่มีตะกอน, + คือ มีตะกอน, * คือ สีอาหารไม่เปลี่ยนแปลงจากสีอาหารเดิม, ** คือ สีอาหารเปลี่ยนแปลง)

ตารางที่ 4. ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่เลี้ยงเชื้อกลุ่ม B โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

| อาหาร | ชนิด กลีเซอรอล | สัปดาห์ | การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 6 ความเข้มข้น | | | | | | การถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 6 ความเข้มข้น | | | | | | |
|-------|-------------------|---------|--|----------|----------|----------|----------|----------|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | 0% | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% | 0% | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% | |
| TM | CG | 1 | 1,**,+ | 2,**,x,+ | 2,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,*,+ | 2,**,x,+ | 3,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,y,- | |
| | | 2 | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 4,**,x,+ | 4,* ,Y,+ | 4,* ,Y,+ | * ,Y,- | 1,*,+ | 2,**,x,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | | 3 | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 4,**,x,+ | 4,* ,Y,+ | 4,* ,Y,+ | * ,Y,+ | 1,*,+ | 3,**,x,+ | 4,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | | 4 | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 4,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | * ,Y,+ | 1,*,+ | 5,**,x,+ | 5,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | PG | 1 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,*,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,x,- |
| | | 2 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,x,+ |
| | | 3 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ |
| | | 4 | 2,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,* ,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,* ,X,+ |
| ENT | CG | 1 | 1,*,+ | 3,* ,x,+ | 3,* ,x,+ | 3,* ,B,+ | 3,* ,B,+ | ** ,y,- | 1,**,+ | 2,**,x,+ | 2,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | | 2 | 1,*,+ | 4,* ,x,+ | 4,* ,x,+ | 4,* ,B,+ | 4,* ,B,+ | * ,Y,- | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 3,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | | 3 | 1,*,+ | 4,* ,x,+ | 5,* ,x,+ | 4,* ,B,+ | 4,* ,B,+ | * ,Y,- | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | | 4 | 2,*,+ | 4,* ,x,+ | 5,* ,x,+ | 5,* ,B,+ | 5,* ,B,+ | * ,Y,- | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 5,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | |
| | PG | 1 | 1,*,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,- | |
| | | 2 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,- | |
| | | 3 | 2,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,* ,X,+ |
| | | 4 | 2,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,* ,X,+ |

หมายเหตุ ตัวเลข 1-5 แสดงระดับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกลีเซอรอล

(X คือ กลีเซอรอลละลายในอาหาร, x คือ ไม่ละลาย, y คือ กลีเซอรอลเหลว, Y คือ กลีเซอรอลแข็ง, - คือ ไม่มีตะกอน, + คือ มีตะกอน, * คือ สีอาหารไม่เปลี่ยนแปลงจากสีอาหารเดิม, ** คือ สีอาหารเปลี่ยนแปลง)

ตารางที่ 5. ผลการเปลี่ยนแปลงของอาหารที่เลี้ยงเชื้อกลุ่ม C โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

| อาหาร | ชนิด กลีเซอรอล | สัปดาห์ | การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 6 ความเข้มข้น | | | | | | การถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ในอาหารที่มีกลีเซอรอล 6 ความเข้มข้น | | | | | |
|-------|-------------------|---------|--|----------|----------|----------|----------|----------|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | 0% | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% | 0% | 1% | 5% | 10% | 20% | 50% |
| TM | CG | 1 | 1,**,+ | 2,**,x,+ | 2,**,Y,+ | 2,**,Y,+ | 2,**,Y,+ | ** ,y,+ | 1,*,+ | 2,**,x,+ | 2,**,Y,+ | 2,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,y,+ |
| | | 2 | 1,**,+ | 2,**,x,+ | 2,**,Y,+ | 2,**,Y,+ | 2,**,Y,+ | ** ,Y,+ | 1,*,+ | 3,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | | 3 | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,Y,+ | 1,*,+ | 3,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | | 4 | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | ** ,Y,+ | 1,*,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | PG | 1 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,x,+ | 1,*,- | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- |
| | | 2 | 1,**,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,x,+ | 1,*,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- |
| | | 3 | 1,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,*,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,- |
| | | 4 | 1,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,**,X,+ | 1,*,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,- |
| ENT | CG | 1 | 1,* ,+ | 2,* ,x,+ | 2,* ,y,+ | 3,* ,Y,+ | 3,* ,Y,+ | ** ,Y,- | 1,* ,+ | 2,* ,x,+ | 3,* ,x,+ | 3,* ,Y,+ | 3,* ,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | | 2 | 1,* ,+ | 3,* ,x,+ | 2,* ,Y,+ | 3,* ,Y,+ | 3,* ,Y,+ | ** ,Y,- | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 3,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | | 3 | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 3,**,Y,+ | 4,**,Y,+ | 3,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | | 4 | 1,**,+ | 4,**,x,+ | 4,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,- | 1,**,+ | 3,**,x,+ | 4,**,x,+ | 5,**,Y,+ | 5,**,Y,+ | ** ,Y,+ |
| | PG | 1 | 1,**,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,x,- | 1,* ,x,- | 1,**,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- | 1,* ,X,- | 1,* ,x,- |
| | | 2 | 1,**,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,x,- | 1,**,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- | 1,* ,x,- |
| | | 3 | 1,**,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- | 1,**,+ | 2,* ,X,+ | 2,* ,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- |
| | | 4 | 2,**,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 2,**,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,**,+ | 2,* ,X,+ | 2,* ,X,+ | 2,* ,X,+ | 1,* ,X,+ | 1,* ,X,- |

หมายเหตุ ตัวเลข 1-5 แสดงระดับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกลีเซอรอล

(X คือ กลีเซอรอลละลายในอาหาร, x คือ ไม่ละลาย, y คือ กลีเซอรอลเหลว, Y คือ กลีเซอรอลแข็ง, - คือ ไม่มีตะกอน, + คือ มีตะกอน, * คือ สื่ออาหารไม่เปลี่ยนแปลงจากสื่ออาหารเดิม, ** คือ สื่ออาหารเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 6. เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลบริสุทธิ์คงเหลือในกลุ่มทดลอง

| กลุ่มทดลอง | % PG คงเหลือ | TM -1% | TM -5% | TM -10% | TM -20% | ENT-1% | ENT-5% | ENT-10% | ENT-20% |
|--------------|--------------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|
| เชือกกลุ่ม A | PG | 33 | 81 | 81 | 68 | 87 | 26 | 81 | 86 |
| | CG | 36 | 25 | 17 | 19 | 28 | 61 | 65 | 30 |
| เชือกกลุ่ม B | PG | 81 | 73 | 69 | 92 | 32 | 78 | 68 | 81 |
| | CG | 36 | 10 | 11 | 6 | 65 | 20 | 31 | 7 |
| เชือกกลุ่ม C | PG | 100 | 56 | 75 | 82 | 17 | 93 | 92 | 84 |
| | CG | 36 | 3 | 9 | 3 | 100 | 1 | 23 | 25 |

ตารางที่ 7. เปอร์เซ็นต์ของ 1,3-propanediol (1,3-PD) ที่แต่ละกลุ่มเชื้อผลิตได้ที่เวลาการทดสอบ 3 และ 5 วัน

| กลุ่มทดลอง | % PG เริ่มต้น | TM-T3 | TM-T5 | ENT- T3 | ENT- T5 |
|--------------|---------------|-------|-------|---------|---------|
| เชือกกลุ่ม A | 10 | * | 0 | * | * |
| | 20 | * | * | * | * |
| เชือกกลุ่ม B | 10 | 0.789 | 1.127 | 1.108 | 1.134 |
| | 20 | * | * | 1.791 | 2.120 |
| เชือกกลุ่ม C | 10 | * | 0 | * | * |
| | 20 | * | * | * | * |

หมายเหตุ * หมายถึง ตัวอย่างทดสอบมีลักษณะข้นหนืด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลได้

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเชื้อคัดเลือกในการผลิตสาร 1,3-PD จาก กลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50%

จากหัวข้อก่อนหน้านี พบว่า กลุ่มเชื้อ B มีความสามารถในการผลิตสาร PDO ได้ในอาหารทดสอบทั้งสูตร ENT และ TM. อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่า กลุ่มเชื้อ B สามารถผลิตสาร PDO ในอาหารทดสอบสูตร ENT ได้สูงกว่า ในอาหารสูตร TM. ดังนั้น ในการทดลองนี้ จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเชื้อ B ในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยนำหนัก พบว่า กลุ่มเชื้อ B สามารถใช้กลีเซอรอลดิบได้ถึง 20% เพื่อการผลิตสาร PDO ได้หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน เป็นต้นไป (ตารางที่ 8).

ตารางที่ 8. เปอร์เซนต์ของ 1,3-PD ที่กลุ่มเชื้อ B สามารถผลิตได้จากกลีเซอรอลดิบภายในเวลา การทดสอบ 5 วัน

| ปริมาณเริ่มต้น (T0) | | ปริมาณ 1,3-PD ที่วิเคราะห์ได้ (%) | | | |
|---------------------|--------|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| % CG | % PG | T1 | T2 | T3 | T5 |
| 1 | 0.460 | 0.145 | 0.146 | 0.129 | 0.127 |
| 5 | 2.300 | 0.488 | 0.521 | 0.537 | 0.570 |
| 10 | 4.600 | 0.789 | 0.839 | 0.784 | 0.830 |
| 20 | 9.200 | 1.446 | 1.435 | 1.579 | 1.581 |
| 50 | 23.000 | * | * | * | * |

หมายเหตุ * หมายถึง ตัวอย่างทดสอบมีลักษณะขุ่นหนืด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลได้

3.5 การคัดแยกสายพันธุ์จากกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพ

ทำการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวในกลุ่มเชื้อ B โดยทำการคัดแยกบนอาหารสำเร็จรูป สูตร NA ด้วยวิธีการ Spread plate, สามารถคัดแยกได้ 8 สายพันธุ์ ให้ชื่อเป็น unknown (UNK) 1-8. จากนั้นทำการศึกษาลักษณะและตรวจสอบการดีเอ็นเอของสายพันธุ์ทั้งหมด ได้ผลดังตารางที่ 9.

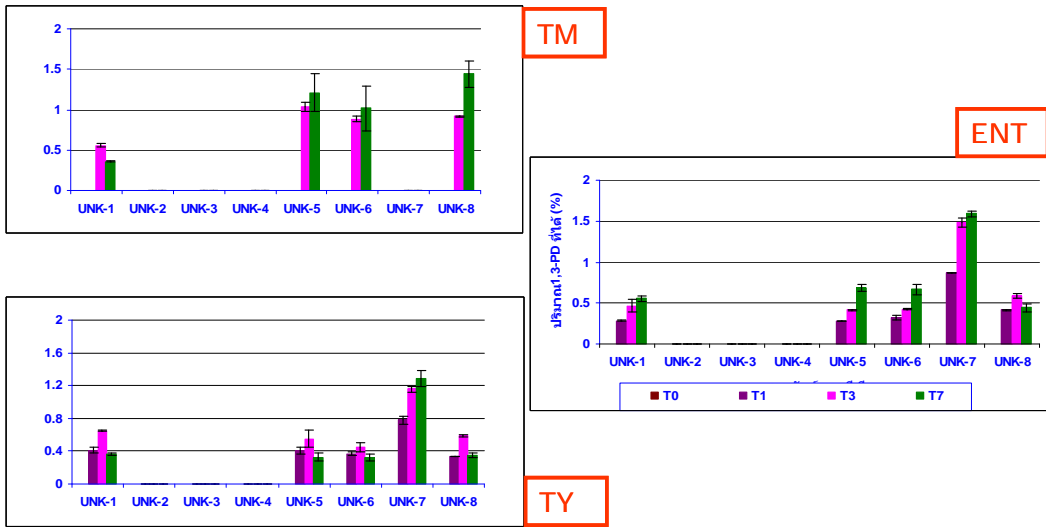
ตารางที่ 9. ลักษณะของสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากกลุ่มเชื้อ B

| สายพันธุ์ | ลักษณะโคโลนี | | ลักษณะเซลล์ | |
|-----------|---------------|---|-------------|------|
| | ขนาด (ซม.) | สี/รูปร่าง/มันวาว/ผิว,ขอบ/ความทึบแสง | รูปร่าง | แกรม |
| UNK-1 | 0.3 | ขาวออกเหลือง/กลม/มันวาว/เรียบ/โปร่งแสง | แท่งสั้น | + |
| UNK-2 | 0.1 | เหลือง/กลม/มันวาว/เรียบ/ใส | แท่ง | - |
| UNK-3 | 0.05 | เหลืองออกขาว/กลม/มัน/เรียบ/ทึบแสงเล็กน้อย | แท่งสั้น | + |
| UNK-4 | 0.1 | เหลือง/กลม/มันวาว/เรียบ/ใส | แท่ง | - |
| UNK-5 | 0.3 | ขาวออกเหลือง/กลม/มันวาว/เรียบ/โปร่งแสง | แท่งสั้น | + |
| UNK-6 | 0.3 | ขาวออกเหลือง/กลม/มันวาว/เรียบ/โปร่งแสง | แท่งสั้น | + |
| UNK-7 | 0.3 | เหลือง/กลม/มันวาว/ขรุขระ/ใส | แท่ง | - |
| UNK-8 | 0.3 | ขาวออกเหลือง/กลม/มันวาว/เรียบ/โปร่งแสง | แท่งสั้น | + |

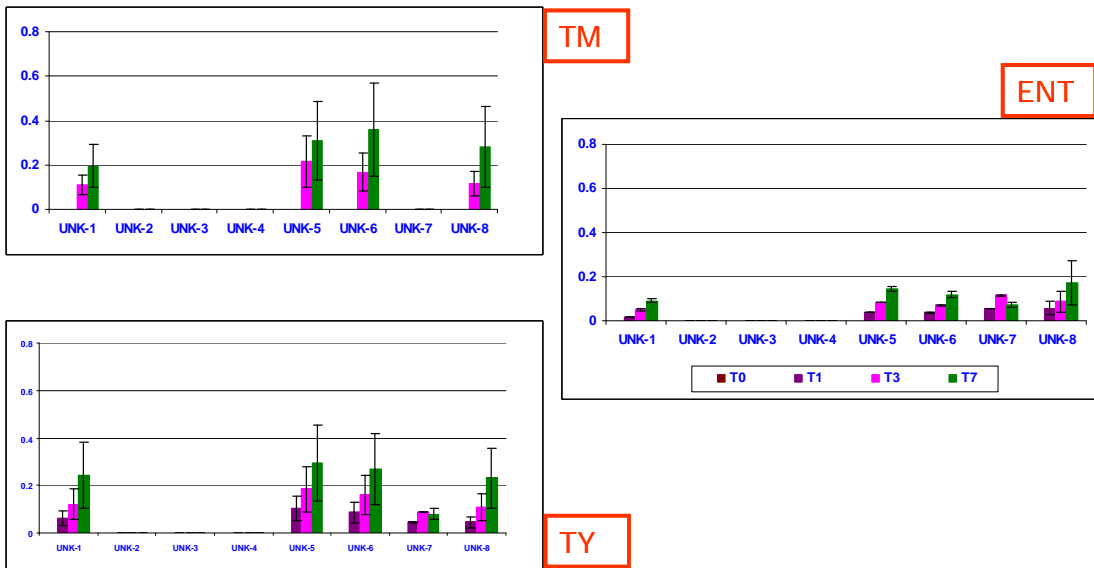
3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้

3.6.1 การผลิตสารมูลค่าเพิ่มของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหารทดสอบ 3 ชนิด

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารมูลค่าเพิ่มโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารทดสอบ 3 ชนิด คือ ENT, TM, TY ที่มี CG 10 % โดยน้ำหนัก. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบมูลค่าเพิ่ม (ได้แก่ 1,3-propanediol และ succinic acid) ที่แต่ละสายพันธุ์ผลิตได้ และปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ซึ่งเหลือในแต่ละชนิดของอาหารทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 3-6. ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตสาร 1,3-PD ได้สูงที่สุดในอาหารทดสอบสูตร ENT และ TY ในเวลาเพียง 1 วันของการบ่มเลี้ยง แต่ไม่สามารถผลิตได้เลยในอาหารทดสอบที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นอยู่ (อาหารทดสอบสูตร TM). ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-1, UNK-5, UNK-6, UNK-7 และ UNK-8 สามารถผลิตสาร succinic acid ได้ในปริมาณใกล้เคียงกันในอาหารทดสอบสูตร ENT และ TY. ในขณะที่ในอาหารทดสอบสูตร TM มีเพียงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ที่ไม่สามารถผลิตสาร succinic acid ได้เลย เมื่อเทียบกับอีก 4 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม เมื่อดูจากปริมาณการผลิตสาร 1,3-PD ได้สูงที่สุดและการใช้กลีเซอรอลได้ดีที่สุด จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 และอาหารทดสอบสูตร ENT ในการทดลองในหัวข้อต่อไป.



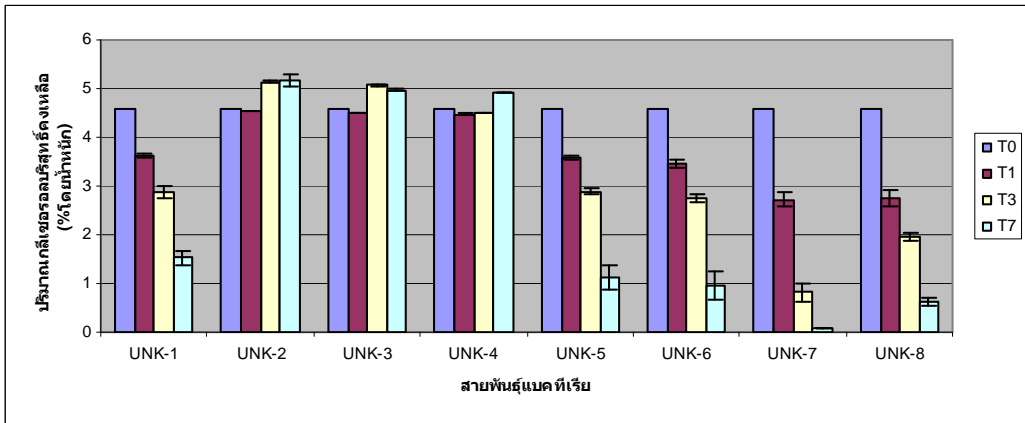
รูปที่ 3. ประสิทธิภาพในการผลิตสาร 1,3-propanediol ของสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ในอาหารทดสอบ 3 ชนิด.



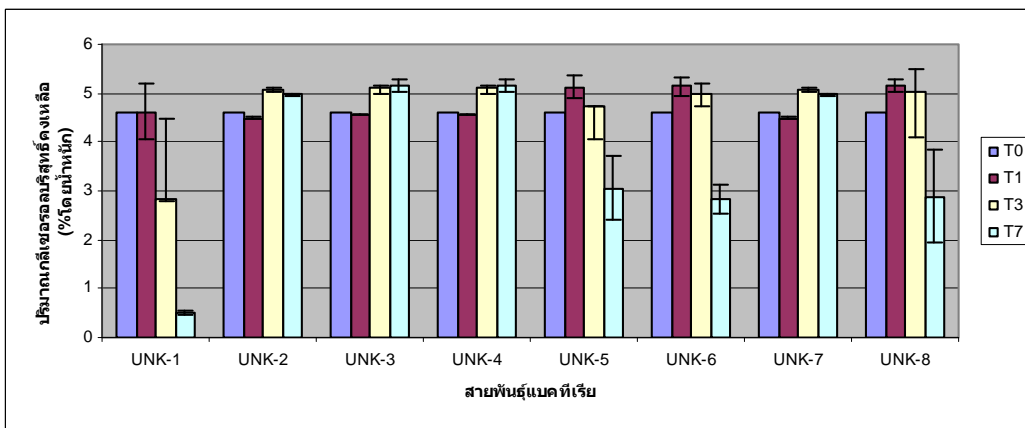
รูปที่ 4. ประสิทธิภาพในการผลิตสาร succinic acids ของสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์ในอาหารทดสอบ 3 ชนิด.



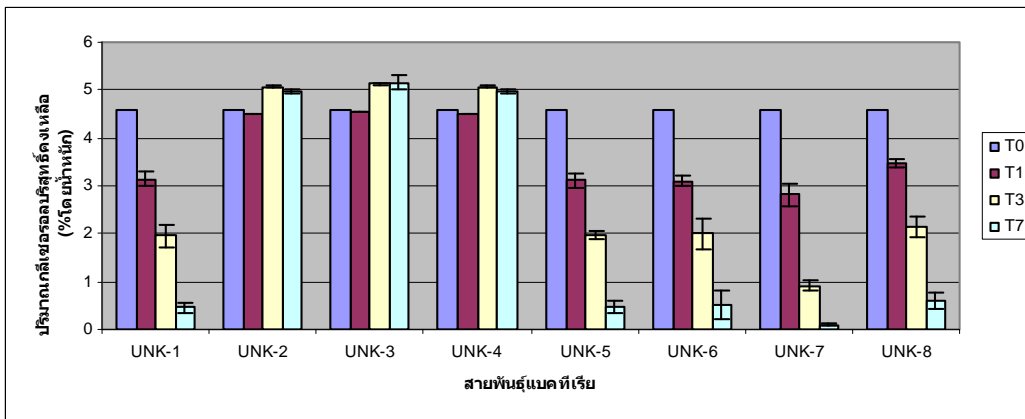
รูปที่ 5. การเปลี่ยนแปลงขณะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10 % โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 วัน.



(1)



(2)



(3)

รูปที่ 6. ปริมาณกลีเซอรอลคองเหลื่อในอาหารทดสอบ 3 ชนิด คือ (1) ENT, (2) TM และ (3) TY ที่เวลา 0, 1, 3, และ 7 วันของการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์แบคทีเรียจำนวน 8 สายพันธุ์.

3.6.2 การผลิตสารมูลค่าเพิ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก ในระดับการผลิตที่สูงขึ้น

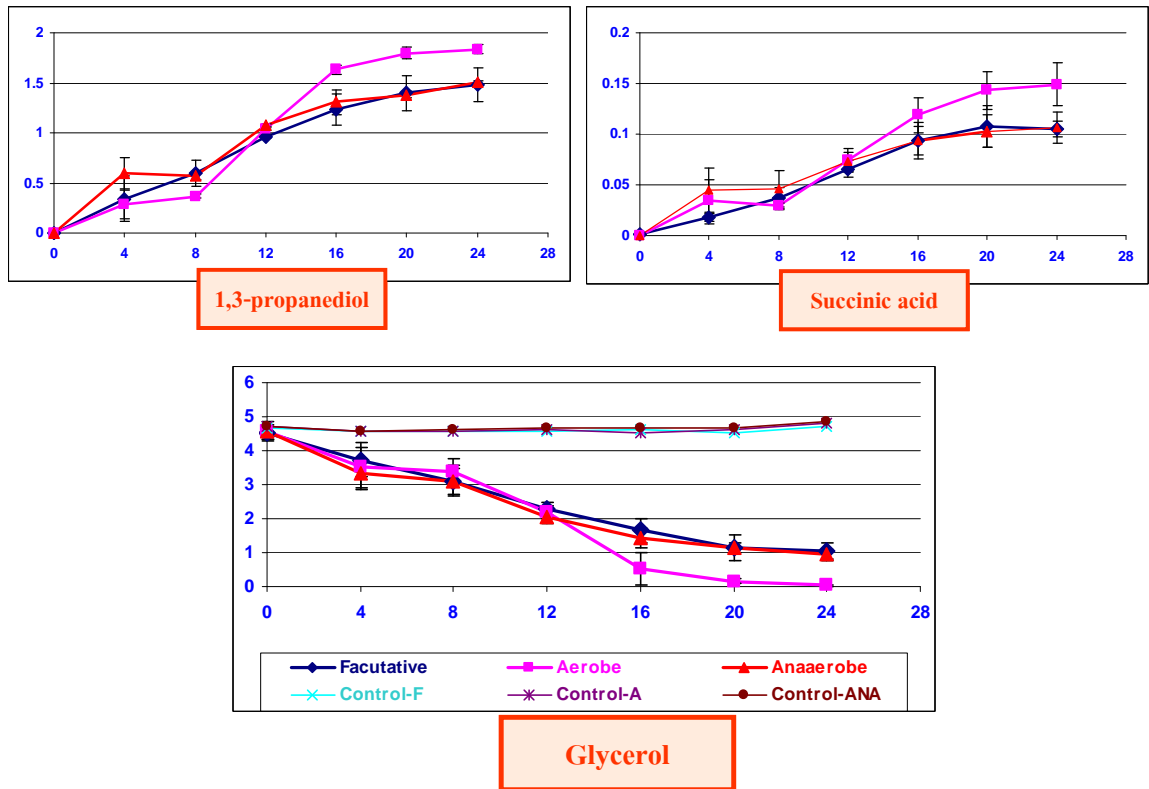
แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ได้ถูกคัดเลือกมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารมูลค่าเพิ่มในระดับการผลิตที่สูงขึ้น โดยทำการบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10% โดยน้ำหนัก ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร, ที่มีปริมาตรอาหารสุดท้ายเป็น 45 มิลลิลิตร ใน 3 สภาวะการทดสอบ คือ Aerobic, Anaerobic และ Facultative พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตสาร 1,3-PD และ succinic acid ได้ที่ทุกสภาวะการเพาะเลี้ยงภายในเวลา 1 วัน (ตารางที่ 10).

ตารางที่ 10. เปอร์เซนต์ของสารมูลค่าเพิ่มที่แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตได้จากการใช้ กลีเซอรอลดิบภายในเวลาการทดสอบ 7 วัน

| สารมูลค่าเพิ่มที่ได้ (%) | สภาวะการบ่มเลี้ยง | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
|--------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1,3-propanediol | Anaerobic | 1.66 | 1.69 | 1.67 | 1.65 | 1.67 | 1.68 | 1.68 |
| | Facultative | 1.43 | 1.72 | 1.70 | 1.66 | 1.67 | 1.66 | 1.72 |
| | Aerobic | 1.52 | 1.69 | 1.62 | 1.58 | 1.54 | 1.57 | 1.60 |
| Succinic acid | Anaerobic | 0.17 | 0.12 | 0.08 | 0.38 | 0.27 | 0.13 | 0.10 |
| | Facultative | 0.10 | 0.13 | 0.13 | 0.39 | 0.23 | 0.07 | 0.05 |
| | Aerobic | 0.13 | 0.04 | 0.00 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.03 |

3.6.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตสารมูลค่าเพิ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก

จากผลการทดลองข้างต้น แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตสาร 1,3-PD และ succinic acid ได้ที่ทุกสภาวะการเพาะเลี้ยงภายในเวลา 1 วัน. ในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพในรายละเอียดมากขึ้น โดยทำการบ่มเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 10% โดยน้ำหนักในปริมาตรอาหารสุดท้าย 45 มิลลิลิตร, บ่มเลี้ยงใน 3 สภาวะทดสอบ คือ Aerobic, Anaerobic และ Facultative เป็นเวลา 1 วัน, เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารมูลค่าเพิ่มที่ได้ และวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์คงเหลือ ทุก 4 ชั่วโมง. ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตสาร 1,3-PD และ succinic acid ได้ตั้งแต่ 4 ชั่วโมงของการบ่มเลี้ยง และผลิตได้สูงสุดในช่วง 16-24 ชั่วโมงของการบ่มเลี้ยงในสภาวะ Aerobic.

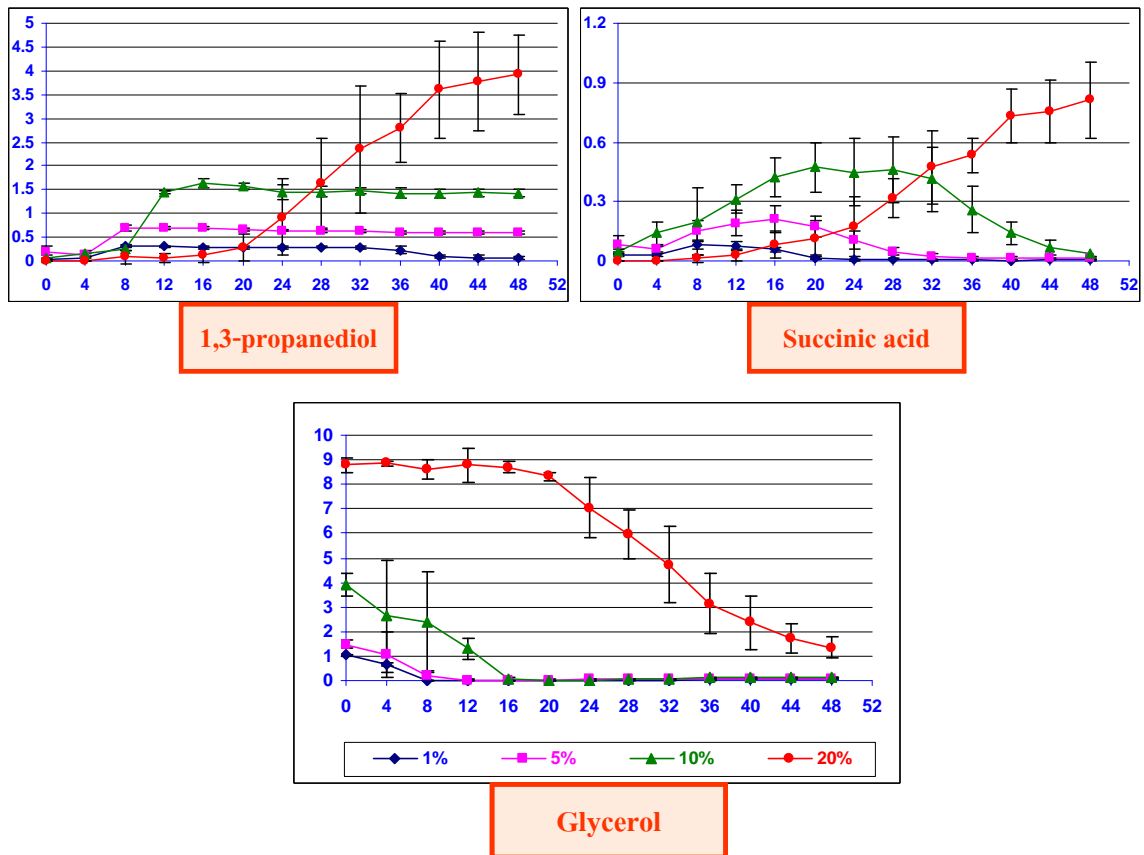


รูปที่ 7. ร้อยละของปริมาณสารมูลค่าเพิ่ม (1,3-propanediol และ succinic acid) และการลดลงของปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ ใน 3 สถานะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7

3.6.4 การผลิตสารมูลค่าเพิ่มจากกลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 50 % โดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก

ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตสารมูลค่าเพิ่มของแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 1, 5, 10, 20 และ 50 % โดยนำหนักในสถานะการบ่มเลี้ยงแบบ Aerobe เป็นเวลา 2 วัน โดยเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารมูลค่าเพิ่มที่ได้และปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิทิ้งเหลือ ทุก 4 ชั่วโมง. ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่า ในอาหารทดสอบสูตร ENT ที่มี CG 1, 5, และ 10% โดยนำหนัก แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตสาร 1,3-PD และ succinic acid ได้ตั้งแต่ 4 ชั่วโมงของการบ่มเลี้ยง และปริมาณสารทั้ง 2 ชนิดที่ผลิตได้สูงสุดในช่วง 12-24 ชั่วโมงของการบ่มเลี้ยง. หลังจากนั้น จะค่อนข้างคงที่ และค่อยๆ ลดลง ตามปริมาณ

กลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ถูกใช้ไป. ในขณะที่ในอาหารทดสอบที่มี CG 20% โดยน้ำหนัก แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 สามารถผลิตสาร ทั้ง 2 ชนิดได้ตั้งแต่ 12-16 ชั่วโมงของการบ่มเลี้ยง หลังจากนั้น ปริมาณการผลิตสารทั้ง 2 ชนิด จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มคงที่ในช่วง 40-48 ชั่วโมง ซึ่ง สัมพันธ์ปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ลดลง.



รูปที่ 8. ร้อยละของปริมาณสารมูลค่าเพิ่ม (1,3-propanediol และ succinic acid) และการลดลงของปริมาณกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 ในอาหารทดสอบ ENT ที่มี CG 1, 5, 10, 20 และ 50% โดยน้ำหนัก

3.7 การจัดจำแนกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสารมูลค่าเพิ่ม (1,3-PD และ succinic acid) ด้วยวิธีการ 16S rDNA Sequencing สรุปได้ดังนี้ คือ :

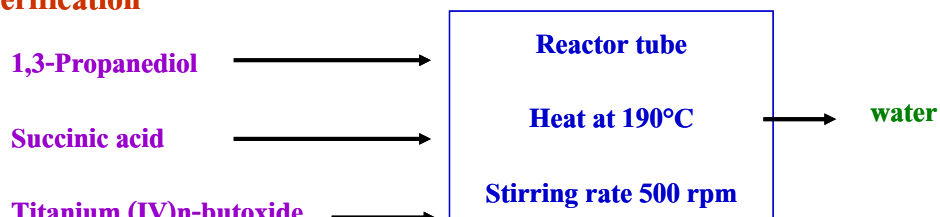
- แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-1, UNK-5, UNK-6 และ UNK-8 คือ *Klebsilla pneumoniae*.

- แบคทีเรียสายพันธุ์ UNK-7 คือ *Enterobacter radicincitans*.

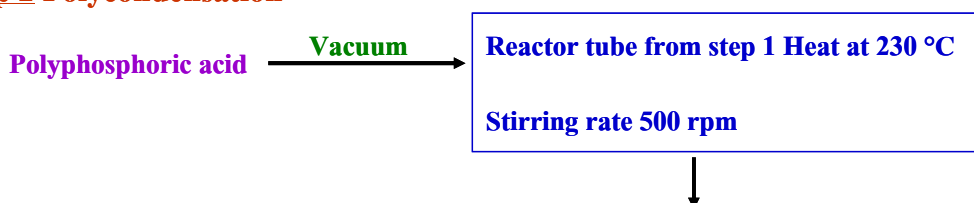
3.8 การออกแบบอุปกรณ์และวิธีการสังเคราะห์สารพอลิเอสเทอร์จาก 1,3-propanediol

การทดลองออกแบบวิธีการสังเคราะห์สารพอลิเอสเทอร์จาก 1,3-PD หรือที่เรียกว่า Poly (propylene succinate) กระทำโดยผ่าน 2 ขั้นตอนการทดลอง ดังสรุปได้ในรูปที่ 9 ดังนี้.

Step 1 Esterification



Step 2 Polycondensation



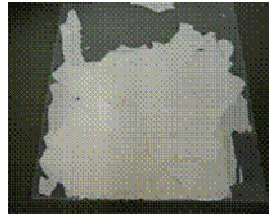
Poly (propylene succinate)

รูปที่ 9. ขั้นตอนการสังเคราะห์ Poly (propylene succinate)

โดยปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในขั้นตอน Esterification ให้สาร Oligomers ลักษณะเป็นของเหลวใส, ความหนืดต่ำ, สีเหลืองอ่อน และมีน้ำเกิดขึ้นในรูปของไอน้ำ, สามารถแยกออกโดยให้ไอน้ำ ผ่านชุดอุปกรณ์ควบแน่นที่มีน้ำหล่อเย็น. จากนั้นในขั้นตอน Polycondensation เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน ภายใต้อุณหภูมิและความเร็วรอบการกวนสูง ให้สารพอลิเมอร์ลักษณะเป็นของเหลวที่มีความหนืดสูง, สีเหลืองอ่อนน้ำตาล, สามารถทำการแยกได้โดยการเติมเมทานอลลงในของเหลว. หลังการบดและล้างด้วยเมทานอล ได้สาร Poly (propylene succinate) ที่เป็นของแข็ง, สีเหลืองอ่อน และนุ่ม, ละลายได้ดีในเอซีโตน ทดลองเบื้องต้นในการทำเป็นผลิตภัณฑ์ดังแสดงในรูปที่ 10.



**Poly(propylene succinate)
ที่สังเคราะห์ได้**



**Poly(propylene succinate)
ที่ cast เป็นแผ่น film**



**ทดลองทำ Bacterial Support จาก
Poly(propylene succinate) ที่
สังเคราะห์ได้ และเยื่อจากต้นสนุดำ**



เยื่อจากต้นสนุดำ

รูปที่ 10. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำมาจาก Poly (propylene succinate) ที่สังเคราะห์ได้

4. สรุปผลการทดลอง

1. ได้แบคทีเรีย *Enterobacter radicincitans* (1 สายพันธุ์) และ *Klebsiella pneumoniae* (4 สายพันธุ์) ที่สามารถผลิตสารมูลค่าเพิ่ม คือ PDO และ succinic acid ได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยง ทั้งแบบ Aerobic, Anaerobic และ Facultative.
2. ได้กระบวนการเบื้องต้นในการสังเคราะห์สารพอลิเอสเทอร์จาก PDO.

5. ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (อาทิเช่น อุณหภูมิขณะบ่มเลี้ยง, ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารทดสอบ และเวลาที่ใช้ในการบ่มเลี้ยง เป็นต้น) ที่ในปริมาณสารมูลค่าเพิ่มสูงสุด.
2. ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยว/สายพันธุ์ผสม และ/หรือสายพันธุ์ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม ในการใช้กลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารมูลค่าเพิ่ม, เพื่อนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาสารประกอบให้สามารถใช้ประโยชน์ได้จริง ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากวัตถุดิบทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุด.
3. ศึกษาวิธีการทำสารมูลค่าเพิ่มที่ได้จากกระบวนการผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือกให้บริสุทธิ์ (purification).
4. ศึกษากระบวนการสังเคราะห์สารพอลิเอสเทอร์จาก PDO ที่ได้จากกระบวนการผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์คัดเลือก.

6. เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2544. ไบโอดีเซล. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://www.nsm.or.th/modules.php?name=News&file=article&sid=167> [เข้าถึงเมื่อ 11 พฤษภาคม 2549].
- กลุ่มส่งเสริมการเกษตร สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร. ไบโอดีเซลน้ำมันเชื้อเพลิงจากพืช. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://agritech.doae.go.th/agri-media/other/bio-diesel.pdf> [เข้าถึงเมื่อ 8 พฤษภาคม 2549].
- มิตรอุปถัมภ์ ชิตชนกและคณะ. 2549. พัฒนาการของกระบวนการเป่าขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์ PET. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://industrial.seed.com/itr118/itr118_121.asp [เข้าถึงเมื่อ 8 พฤษภาคม 2549].
- ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. ไบโอดีเซล. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://www.navy.mi.th/dockyard/biodiesel.html> [เข้าถึงเมื่อ 9 พฤษภาคม 2549].
- KMUTT Digital Library. 2549. คู่มือที่ใช้ข้าวโพดผลิตเส้นใยสิ่งทอชีวภาพ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://digital.lib.kmutt.ac.th/news_content.php?n_id=158#top, [เข้าถึงเมื่อ 8 พฤษภาคม 2549].
- Barbirato, F., Grivet, J. P., Soucaille, P. and Bories, A. 1996. 3-hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Enterobacterium* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, pp. 1448-1451.
- Barbirato, F., Himmi, E. H., Conte, T. and Borries, A. 1998. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries, *Industrial Crops and Production*, **7**, pp. 281-289.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.-P. and Deckwer, W., D. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, pp.289-297.
- Chen, X., Zhang, D.-J., Qi, W.-T., Gao, S.-J., Xiu, Z.-L and Xu, P. 2003. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic condition, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, pp. 143-146.

- Cheng, K.-K., Liu, D.-H., Sun, Y. and Liu, W.-B. 2004. 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies, *Biotechnol. Lett.* **26**, pp. 911-915.
- González-Pajuelo, M., Andrade, J.C. and Vascoceles, I., 2004. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol, *J. Ind Microbiol. Biotechnol.*, **31**, pp. 442-446.
- Lee, P.C., Lee, W.G., Lee, S.Y. and Chang, H.N. 2000. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source, *Biotechnol. Bioeng.* **72**, pp. 41-48.
- National Standard Iso 2879. Glycerine for industrial Use - Determination of glycerol content – TiTrimetric method.
- Tong, J., Liao, H. and Cameron, D.C., 1991. 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, pp. 3541-3546.
- Wolf, O. and Crank, M., 2005. Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe. European Communication, Spain. 256 pp.
- Zhu, M.M., Lawman, P.D. and Cameron, D.C., 2002. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate, *Biotechnol. Prog.* **18**, pp. 694-699.

7. ภาคผนวก

7.1 แสดงลำดับเบสของ E. coli 16S rDNA และตำแหน่ง primers ที่ใช้

1 ^{BF1}
aaattgaa**ga gtttgatcat ggctcaga**att gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa
61 gtcgaacggg aacaggaaga agcttgctct ttgctgacga gtggcggacg ggtgagtaat
121 gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata actactggaa acggtagcta ataccgcata
181 acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttgc catcggatgt gcccagatgg
241 gattagctag taggtggggg aacggctcac ctaggcgacg atccctagct ggtctgagag
301 gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg
361 gaatattgca caatgggagc aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt
421 cgggttgtaa agtactttca gcggggagga agggagtaaa gttaatacct ttgctcattg
481 acgttaccgg cagaagaagc accggctaac tccgtg**ccag cagccg**cggt aatacggagg
541 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggagc aaagcgcacg caggcgggtt gttaagttag
601 atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac tgcactgatg actggcaagc ttgagtctcg
661 tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctgg aggaataaccg
721 gtggcgaagg cggccccctg gacgaagact gacgctcagg tgcgaaagcg tggggagcaa
781 acaggattag atacctggg agtccacgcc gtaaaccgatg tcgacttgga ggtttgtgcc
841 ttgagggcgt gcttccggag ctaacgcggt aagtcgaccg cctggggagt acggccgcaa
901 ggttaaaact caaatgaatt gacggggggc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt
961 cgatgcaacg cgaagaacct tacctgggtc tgacatccac ggaagttttc agagatgaga
1021 atgtgccttc gggaaaccgtg agacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgttgtaaa
1081 atgttggggt aagtcccgca acgagcgcaa cccttatact ttgttgccag cggccgggcc
1141 gggaaactca aggagactgc cagtgataaa ctggaggaag gtggggatga cgtcaagtca
1201 tcatggccct tacgaccagg gctacacacg tgctacaatg gcgcatacaa agagaagcga
1261 cctcgcgaga gcaagcggac ctcataaagt gcgtcgtagt ccggattgga gtctgcaact
1321 cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat cgtggatcag aatgccacgg tgaatacgtt

BR 1

46

BR 1



1381 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg gggtgcaaaa gaagtaggta
 1441 gcttaacctt cgggagggcg cttaccactt tgtgattcat gactggggtg aagtcgtaac
 1501 aaggtaaccg taggggaacc tgcgggttga tcacctcctt a

7.2 การวิเคราะห์ Genomic DNA ที่โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

1. เตรียม 0.8% agarose gel โดยชั่ง agarose 0.8 กรัม ใส่ลงใน 1XTAE buffer (Tris-HCl, glacial acetic acid, EDTA pH 8.0) 100 มิลลิลิตร นำไปต้มในไมโครเวฟจนกระทั่ง agarose ละลาย เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส

2. เท agarose gel ลงใน tray ที่มี comb วางไว้เรียบร้อยแล้ว ปล่อยให้ agarose gel แข็งตัว หลังจากนั้นดึง comb ออก ก็จะได้ well สำหรับใส่ตัวอย่าง DNA วาง tray ลงใน gel chamber จากนั้นจึงเติม 1 x TAE buffer ลงใน gel chamber ให้ท่วมผิว agarose gel

3. ผสม Standard marker 1 DNA หรือ ตัวอย่าง DNA ปริมาณ 5 มิลลิลิตร กับ 6X loading dye ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ Gel star ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงดูดตัวอย่างใส่ลงใน well

4. ต่อวงจรไฟฟ้ากระแสตรงเข้ากับ chamber โดยให้ด้านที่มี well อยู่ทางด้านขั้วลบ ใช้ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 volts - 100 volts ขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบแถบ ของ DNA โดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet แล้วบันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วย

Gel documentation

7.3 อาหารทดสอบ

7.3.1 สูตร TM

องค์ประกอบ

| | | |
|--|-----|-----------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.0 | กรัม |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.0 | มิลลิลิตร |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 | มิลลิลิตร |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 | กรัม |
| KH_2PO_4 | 1.5 | กรัม |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 1.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1.0 | ลิตร |

วิธีการ

- ผสมสารเคมีให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7.00 ± 0.02 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ใส่ขวดเตรียมสาร
- ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

7.3.2 สูตร ENT

องค์ประกอบ

| | | |
|------------------------|--------|------|
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 5 | กรัม |
| KH_2PO_4 | 3 | กรัม |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 | กรัม |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.1 | กรัม |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.0004 | กรัม |
| Yeast extract | 2 | กรัม |
| Bacto peptone | 0.5 | กรัม |
| Meat extract | 0.3 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

วิธีการ

- ละลายสารเคมีแต่ละตัวก่อน จึงนำมาผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดเตรียมสาร
- ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7.3.3 สูตร TY

องค์ประกอบ

| | | |
|----------------------|-----|-----------|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2.0 | กรัม |
| $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ | 1.0 | มิลลิลิตร |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 | มิลลิลิตร |

| | | |
|--|-----|------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 | กรัม |
| KH ₂ PO ₄ | 1.5 | กรัม |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 1.5 | กรัม |
| Yeast extract | 0.2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1.0 | ลิตร |

วิธีการ

- ผสมสารเคมีให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7.00 ± 0.02 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ใส่ขวดเตรียมสาร.

- ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

7.3.4 อาหารสำเร็จรูป NA

องค์ประกอบ

| | | |
|-------------------|----|------|
| อาหารสำเร็จรูป NA | 20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

วิธีการ

- ละลายอาหารสำเร็จรูป NA ในน้ำกลั่น ใส่ขวดเตรียมสาร

- ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที.

รายงานฉบับที่ 2 (ฉบับสมบูรณ์)
การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน

เรื่อง
การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน

โดย
อัญชญา พัฒนสุพงษ์
ปารมี เพ็งปรีชา สมใจ เพ็งปรีชา
รมณีย์ หวังดีธรรม โสรดา วัลภา
นิตยาพร สมภักดิ์ มยุรี ใจใส
ดารณี เจริญสุข พิศมัย เจนวนิชปัญญากุล

บรรณาธิการ
ลิขิต หาญจางสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
พิสุทธิ พลับสวาท

วว., กรุงเทพฯ 2555
สงวนลิขสิทธิ์

กิตติกรรมประกาศ

คณะทำงานขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและสำนักงานประมาณ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตลอดโครงการจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี.

สารบัญ

| | หน้า |
|---------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| สารบัญตาราง | ก |
| สารบัญรูป | ง |
| ABSTRACT | 1 |
| บทคัดย่อ | 2 |
| 1. บทนำ | 3 |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 19 |
| 3. ผลการทดลองและวิจารณ์ | 25 |
| 4. สรุปผลการทดลอง | 47 |
| 5. ข้อเสนอแนะ | 48 |
| 6. เอกสารอ้างอิง | 49 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|--|------|
| ตารางที่ 1.1 การเปรียบเทียบปัจจัยของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลระหว่างใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา | 11 |
| ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันปาล์ม ถั่วเหลืองและเมล็ดเรพเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานมันดีเซลตามประกาศของกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2547 | 13 |
| ตารางที่ 3.1 ผลการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่ | 25 |
| ตารางที่ 3.2 Absorption assignments ของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 27 |
| ตารางที่ 3.3 Assignments ¹ H-NMR สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 29 |
| ตารางที่ 3.4 Assignments ¹³ C-NMR สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 31 |
| ตารางที่ 3.5 Absorption assignments ของเมทิลเอสเทอร์จากกลีเซอรินเปรียบเทียบกับสารประกอบอีพอกไซด์จากกลีเซอริน | 33 |
| ตารางที่ 3.6 Assignments ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 35 |
| ตารางที่ 3.7 Assignments ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 36 |
| ตารางที่ 3.8 Absorption assignments ของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 38 |
| ตารางที่ 3.9 Assignments ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 40 |
| ตารางที่ 3.10 Assignments ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 41 |
| ตารางที่ 3.11 ผลการทดลองแปรผันปริมาณเมทานอลในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ | 42 |
| ตารางที่ 3.12 ผลการทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ | 44 |
| ตารางที่ 3.13 ผลการทดลองแปรผันเวลา ในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ | 45 |

สารบัญรูป

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1.1 แนวโน้มการบริโภคน้ำมันชนิดต่างๆ ในปี 1990-2000 | 3 |
| รูปที่ 1.2 อัตราส่วนน้ำมันดีเซลและผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมชนิดอื่นๆ ที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ | 5 |
| รูปที่ 1.3 สมการทั่วไปของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน | 7 |
| รูปที่ 1.4 สมการทั่วไปของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ | 8 |
| รูปที่ 1.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ | 9 |
| รูปที่ 1.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเบส | 9 |
| รูปที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยากรด | 10 |
| รูปที่ 1.8 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่ | 16 |
| รูปที่ 3.1 IR สเปกตรัมของกลีเซอริน (NaCl) | 26 |
| รูปที่ 3.2 IR สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (NaCl) | 27 |
| รูปที่ 3.3 ¹ H-NMR สเปกตรัมของกลีเซอริน (CDCl ₃) | 28 |
| รูปที่ 3.4 ¹ H-NMR สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl ₃) | 28 |
| รูปที่ 3.5 ¹³ C-NMR สเปกตรัมของกลีเซอริน (CDCl ₃) | 30 |
| รูปที่ 3.6 ¹³ C-NMR สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl ₃) | 30 |
| รูปที่ 3.7 สูตรโครงสร้างที่แสดง Assignments ¹ H-NMR สเปกตรัมเมทิลเอสเทอร์ ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 32 |
| รูปที่ 3.8 IR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (NaCl) | 32 |
| รูปที่ 3.9 ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ จากกลีเซอริน (CDCl ₃) | 34 |
| รูปที่ 3.10 ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ จากกลีเซอริน (CDCl ₃) | 35 |
| รูปที่ 3.11 สูตรโครงสร้างที่แสดง Assignments ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบ อีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 36 |
| รูปที่ 3.12 IR สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรตที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (NaCl) | 37 |
| รูปที่ 3.13 ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรตที่สังเคราะห์ได้ | 39 |

จากกลีเซอริน (CDCl₃)

สารบัญรูป

| | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 3.14 ¹³ C-NMR สเปกตรัมของสารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้ จากกลีเซอริน (CDCl ₃) | 40 |
| รูปที่ 3.15 สูตรโครงสร้างที่แสดง Assignments ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารประกอบ ในเทรตที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน | 41 |
| รูปที่ 3.16 ผลการทดลองแปรผันปริมาณเมทานอลในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ | 43 |
| รูปที่ 3.17 ผลการทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ในการสังเคราะห์ เมทิลเอสเทอร์ | 44 |
| รูปที่ 3.18 ผลการทดลองแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ เมทิลเอสเทอร์ | 46 |

MULTIFUNCTIONAL BIODIESEL FROM GLYCERINE

Paramee Pengpreecha, Daranee Charaensuk and Somchai Pengpreecha

ABSTRACT

Multifunctional biodiesels were synthesized from glycerine which was a by-product of biodiesel production. Firstly, methyl ester of crude glycerine was prepared by reacting with methanol in the presence of sulfuric acid to yield 45%. Secondly, the epoxidation process was carried out giving yield 86% and finally, the nitration reaction was achieved giving yield 68%. Their structures were characterized by FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, and $^{13}\text{C-NMR}$. The addition of nitrate group into methyl ester structure would increase the cetane number of biodiesels. This could have a benefit to the ignition of the engine.

การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน

ปารมี เพ็งปรีชา¹, ดารณี เจริญสุข² และสมใจ เพ็งปรีชา²

บทคัดย่อ

สังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยทำการเตรียมเมทิลเอสเทอร์ของกลีเซอรินได้จากการทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยมีกรดซัลฟิวริก สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ คิดเทียบกับกลีเซอรินดิบที่ยังไม่ได้แยกเอากลิเซอรอลออกจากการผลิตไบโอดีเซล. จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการทำให้เป็นอีพอกไซด์ได้ผลผลิตประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ และสุดท้ายนำมาทำปฏิกิริยาในเทอร์ชัน, สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 68 เปอร์เซ็นต์. ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, โพรตอนและคาร์บอน, แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี. นำไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่ที่สังเคราะห์มาทำการตรวจสอบยืนยันทางเอกลักษณ์ว่าได้เป็นสารประกอบที่มีในเทอร์ตเป็นองค์ประกอบ การเพิ่มหมู่ในเทอร์ตเข้าไปในโครงสร้างของไบโอดีเซล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพซีเทน นัมเบอร์ของไบโอดีเซล ซึ่งคาดว่าจะทำให้เกิดการจุดระเบิดในเครื่องยนต์ดีเซล.

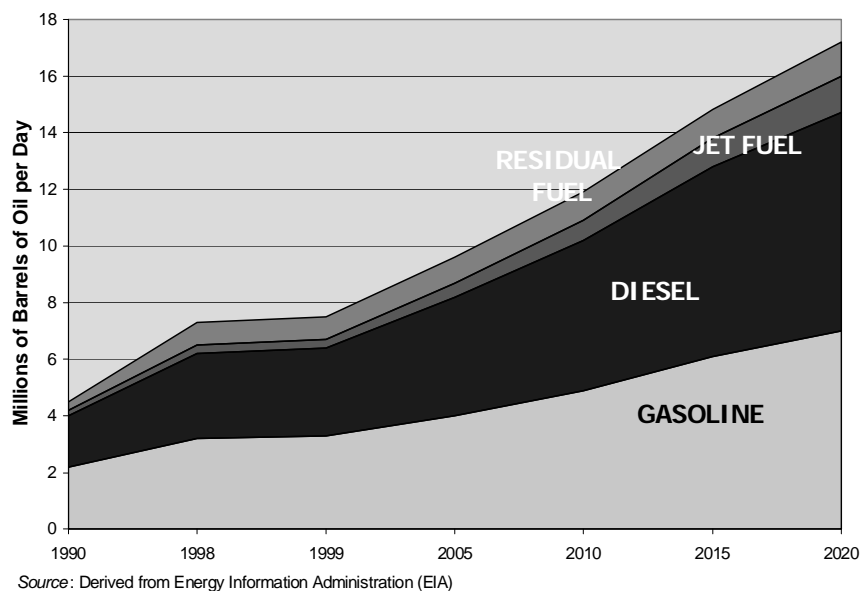
¹ ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

² ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปี ค.ศ. 1882 ดร.รูคอล์ฟ ดีเซล (Rudolph Diesel) วิศวกรชาวเยอรมัน เป็นผู้คิดค้นเครื่องยนต์ดีเซลได้สำเร็จ, โดยใช้น้ำมันจากถั่วลิสงเป็นเชื้อเพลิงให้กับเครื่องยนต์สันดาปภายในที่ทำงานโดยการอัดอากาศให้เกิดความร้อนสูง, เมื่อน้ำมันเชื้อเพลิงเข้าไปจะเกิดการลุกไหม้ขึ้น ทำให้แก๊สร้อนมีการขยายตัว, ดันลูกสูบให้เคลื่อนที่ส่งกำลังงานออกมา. ผลงานการประดิษฐ์นี้ได้นำออกแสดงในงานเอกซ์โปที่จัดขึ้น ณ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส ในปี ค.ศ. 1900 ซึ่งเป็นต้นแบบของเครื่องยนต์ดีเซลจนถึงปัจจุบัน. แต่การใช้น้ำมันจากพืชไม่ได้รับความสนใจมากนัก เนื่องจากน้ำมันพืชส่วนใหญ่จะมีกรดไขมันอิสระ, ฟอสโฟไลปิด, สเตอรอยด์, น้ำ และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ เป็นส่วนประกอบทำให้ไม่สามารถใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงโดยตรงได้และราคาน้ำมันดีเซลจากฟอสซิลในขณะนั้นยังมีราคาถูก ปัจจุบันเครื่องยนต์ดีเซลจัดว่าเป็นเครื่องยนต์ที่มีความสำคัญที่สุดเนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางกว่าเครื่องยนต์ชนิดอื่น, ใช้ขับเคลื่อนเครื่องยนต์ขนาดเล็ก, เครื่องจักรอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ไปจนถึงเรือขนส่งสินค้า (Hobson 1984). ความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงดีเซลจึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แนวโน้มการบริโภคโลกน้ำมันชนิดต่างๆ ในปี 1990-2000

เมื่อมีเหตุการณ์ขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในช่วงทศวรรษที่ 70 และอีกครั้งตั้งแต่ปี ค.ศ. 1991 เป็นต้นมาได้มีสงครามเกิดขึ้นหลายครั้งในกลุ่มประเทศผู้ผลิตน้ำมันโลก เช่น สงครามอ่าวเปอร์เซีย, สงครามคูเวต และสงครามในประเทศอิรัก, อีกทั้งปัญหาต่างๆ เช่น การประกาศเตือนจาก International Energy Agency ถึงปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมที่กำลังจะหมดลงในอนาคตอันใกล้ ส่งผลให้ราคาน้ำมันฟอสซิลเพิ่มสูงขึ้น (Korbitz 1999). มาตรการประหยัดพลังงาน, การเพิ่มประสิทธิภาพเครื่องยนต์, การเสาะแสวงหาพลังงานทางเลือก และกระแสความตื่นตัวในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม จึงถูกหยิบยกมาเป็นประเด็น ทำให้แต่ละประเทศเร่งค้นหาพลังงานจากแหล่งอื่นๆ และเร่งพัฒนาเชื้อเพลิงชนิดใหม่.

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่จะทวีความสำคัญในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากเป็นพลังงานหมุนเวียน ที่มีอยู่ไม่จำกัดตราบใดที่โลกยังสามารถผลิตพืช, เป็นพลังงานสีเขียว, ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม, เมื่อเผาผลาญจะให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbomonoxide, CO) น้อยกว่าน้ำมันดีเซลทั่วไป และไม่ปล่อยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulferdioxide, SO₂) ช่วยลดผลกระทบจากปรากฏการณ์เรือนกระจก (Greenhouse effect). จากการที่ไบโอดีเซลผลิตได้จากผลผลิตทางการเกษตร จึงสามารถถูกจุลินทรีย์ในธรรมชาติย่อยสลายได้, คาร์บอนที่ย่อยสลายจะหมุนเวียนเป็นวัฏจักรโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช, จึงไม่เพิ่มภาวะเรือนกระจกเหมือนการใช้ น้ำมันดีเซล.

ไบโอดีเซลเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาความยั่งยืนของระบบพลังงานและการเกษตร, ลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ, สร้างงานและกระจายรายได้สู่ท้องถิ่น, ลดปัญหาแรงงานอพยพเข้าเมือง, นำไปสู่การพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนที่ยั่งยืน.

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ประเทศไทยมีความต้องการใช้น้ำมันดีเซลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว. จากความต้องการใช้ในปริมาณสูงเช่นนี้ ทำให้ต้องมีการนำเข้าน้ำมันดิบถึงวันละ 674,978 บาร์เรลต่อวัน เป็นมูลค่านำเข้าถึง 285,286 ล้านบาท. ทำให้หน่วยงานหลายแห่งได้ทำการวิจัยและพัฒนานำวัตถุดิบภายในประเทศมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ซึ่งสามารถใช้แทนน้ำมันดีเซลหรือเติมเป็นส่วนผสมในน้ำมันดีเซล เพื่อใช้กับเครื่องยนต์โดยไม่ต้องมีการปรับแต่งเครื่องยนต์ และมีคุณสมบัติที่ดีกว่าน้ำมันดีเซล คือการเผาไหม้ได้ดีกว่า, สามารถลดปริมาณของไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่หมด คาร์บอนมอนอกไซด์และฝุ่นละอองลงได้, รวมถึงมีคุณสมบัติในการหล่อลื่นดีกว่า น้ำมันดีเซล ทำให้ช่วยยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์.

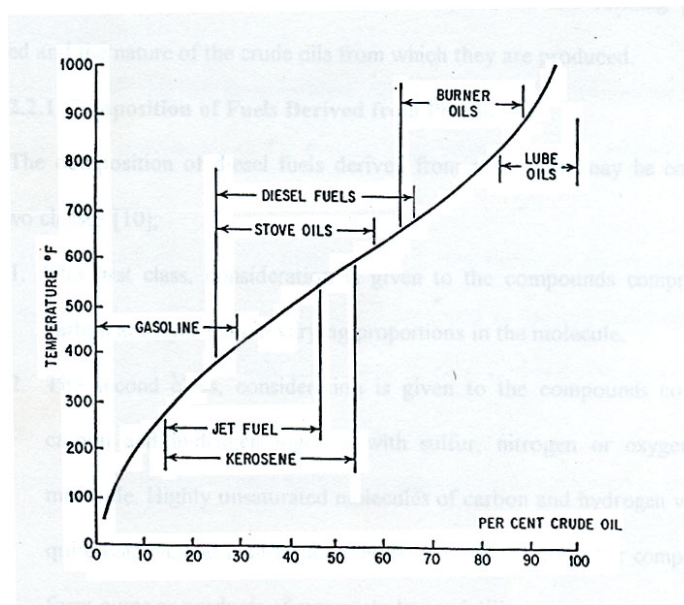
1.2 เครื่องยนต์และน้ำมันดีเซล

1.2.1 เครื่องยนต์ดีเซล (Diesel engine)

เครื่องยนต์ดีเซลเป็นเครื่องยนต์ที่ใช้ความร้อนที่เกิดจากการอัดอากาศภายในกระบอกสูบ (Compression ignition engine) แล้วฉีดเชื้อเพลิงเข้าไปเพื่อการเผาไหม้. ดังนั้น ต้องทำให้น้ำมันแตกตัวเป็นละอองน้ำมันเพื่อฉีดเข้าไปในกระบอกสูบ. เครื่องยนต์ดีเซลเป็นเครื่องยนต์แรงอัดสูง, จุดระเบิดเอง (high compression, self ignition engine) ซึ่งต่างจากเครื่องยนต์เบนซินที่ใช้หัวเทียนเป็นตัวจุดระเบิด.

1.2.2 น้ำมันดีเซล (Diesel fuel)

น้ำมันดีเซลเป็นเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ที่ได้จากการกลั่นลำดับส่วนจากน้ำมันดิบ ซึ่งเป็นส่วนผสมของไฮโดรคาร์บอนหนักและเบา เช่น เบนซีน, เพนเทน, เฮกเซน, เฮปเทน, โทลูอิน, โพรเพนและบิวเทน. จุดเดือดของน้ำมันดีเซลอยู่ในช่วง 160-330 องศาเซลเซียส โดยประมาณ ซึ่งสูงกว่าน้ำมันเบนซินดังรูปที่ 1.2. น้ำมันดีเซลใช้ในเครื่องยนต์อัตราระเบิด หรือเครื่องยนต์ที่ใช้ในเครื่องยนต์สำหรับพาหนะที่ทนต่อการสึกหรอ อาศัยการเผาไหม้ที่อุณหภูมิสูง เช่น รถบรรทุก, รถโดยสารและหัวรถจักร.



รูปที่ 1.2 อัตราส่วนน้ำมันดีเซลและผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมชนิดอื่นๆ
ที่ได้จากกระบวนการกลั่นน้ำมันดิบ

องค์ประกอบของน้ำมันดีเซล เป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงเป็นหลักหลายตัวปะปนกันไป. การบอกชนิดของน้ำมันจะดูที่อุณหภูมิการกลั่นของน้ำมันเป็นหลัก คือน้ำมันที่กลั่นได้จากน้ำมันดิบในช่วง 160-330 องศาเซลเซียส. น้ำมันดีเซลที่ใช้โดยทั่วไปจะมีส่วนผสมของ Light gas oil คือส่วนที่ระเหยง่าย, Heavy gas oil คือส่วนที่ระเหยยาก และสารเพิ่มคุณสมบัติ (Additive) เช่น สารทำความสะอาด (Detergent), สารต้านทานการเติมออกซิเจน(Antioxidant), สารป้องกันสนิมและการกัดกร่อน, สารป้องกันการเกิดฟอง และสารเพิ่มค่าซีเทน Ignition quality improver (Cetane improver) เพื่อให้เครื่องยนต์ติดง่ายลดควันขาว เป็นต้น.

1.3 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตเช่น น้ำมันพืช, น้ำมันที่ผ่านการปรุงอาหาร, ไขมันจากสัตว์, ล้วนแต่สามารถนำไปทำเป็นน้ำมันแล้วนำไปผสมกับน้ำมันที่ได้จากการกลั่นปิโตรเลียม เพื่อนำไปใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งและกระบวนการทางอุตสาหกรรม เพื่อชดเชยความต้องการพลังงานที่เพิ่มสูงขึ้น. สามารถแบ่งไบโอดีเซลได้ตามประเภทของน้ำมันได้ 3 ประเภท ดังนี้คือ :

1.3.1 น้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์

ไบโอดีเซลประเภทนี้คือน้ำมันพืชแท้ ๆ (เช่น น้ำมันมะพร้าว, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันถั่วลิสง, น้ำมันถั่วเหลือง) หรือน้ำมันจากไขมันสัตว์ (เช่น น้ำมันหมู) ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้เลยกับเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องผสม.

1.3.2. ไบโอดีเซลผสม

เป็นการผสมระหว่างน้ำมันพืช (หรือสัตว์) กับน้ำมันก๊าด, น้ำมันดีเซล หรือน้ำมันชนิดอื่น เพื่อให้ไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลให้มากที่สุด อย่างเช่น โคโคดีเซล (Coco-diesel) ที่อาเภอทับสะแก ประจวบคีรีขันธ์, ซึ่งเป็นการผสมกันระหว่างน้ำมันมะพร้าวกับน้ำมันก๊าด หรือปาล์มดีเซล (Palm-diesel) เป็นการผสมระหว่างน้ำมันปาล์มกับน้ำมันดีเซล.

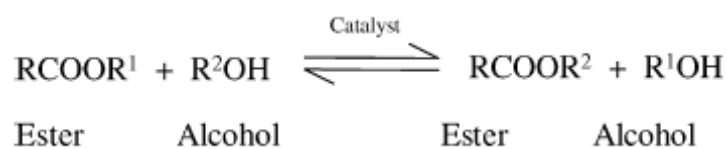
1.3.3. ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์

ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ มาผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification). โดยกรดไขมันในน้ำมันจะทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ และใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์, เรียกชนิดของไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์ ตามชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา. ไบโอดีเซลชนิดเอสเทอร์นี้ มีคุณสมบัติที่เหมือนกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด เป็นไบโอดีเซลตามความหมายที่ต่างประเทศใช้กันทั่วไป อาทิ ในเยอรมนี, สหรัฐอเมริกา หรือแม้แต่มาเลเซีย. ดังนั้น คำว่า “ไบโอดีเซล” ในความหมายของสากลจึงหมายถึง ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์.

จากการที่ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์ มีคุณสมบัติเหมือนกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด, สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ได้โดยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์ และเชื่อว่าสามารถใช้เป็นสารหล่อลื่นได้ในตัว. ดังนั้น ถ้ามีการนำไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์มาเพิ่มหมักในเทอร์ต จะทำให้เพิ่มค่าซีเทนได้ ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการจุดระเบิด รวมถึงช่วยลดมลพิษจากการเผาไหม้ของเครื่องยนต์.

1.3.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

กระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือการนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากสัตว์ มาทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน กับแอลกอฮอล์โดยใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น เมทิลเอสเทอร์, กลีเซอริน และกรดไขมันอิสระ แสดงดังในรูปที่ 1.3.



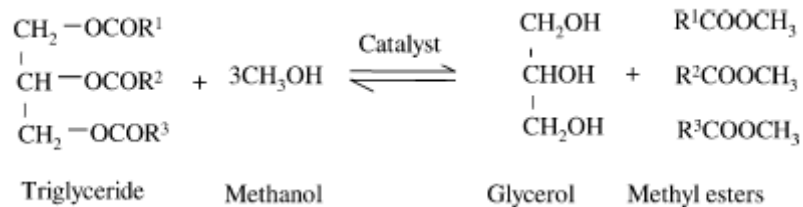
รูปที่ 1.3 สมการทั่วไปของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน.

การที่มีสิ่งเจือปนเหล่านี้ มีผลทำให้เกิด "กัม" (gum) หรือ "ยาง" ในส่วนของหัวฉีดบริเวณเครื่องยนต์ดีเซล โดยเป็นตัวทำให้เกิดการอุดตันในเครื่องยนต์. ดังนั้น ในกระบวนการผลิตจึงต้องควบคุมให้มีสิ่งเจือปนน้อยที่สุด โดยเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้อยู่ในรูปของสบู่แล้วล้างออกด้วยน้ำ

หรือทำกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันก่อนที่จะผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน, การล้างเอากลิเซอรินออกด้วยน้ำ และควบคุมสภาวะการผลิตให้เหมาะสม.

1.3.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ ปฏิกิริยาที่เปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืชจากโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายยาวสามสาย ซึ่งถูกเชื่อมด้วยพันธะเอสเทอร์เข้ากับโมเลกุลกลีเซอรอล 1 โมเลกุล. โดยชนิดของกรดไขมันนี้แตกต่างกันเนื่องมาจากความยาวของสายโซ่คาร์บอนและตำแหน่งของพันธะคู่ในสายโซ่. น้ำมันพืชจะถูกเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีไปเป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันสายยาว โดยการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทิลแอลกอฮอล์ (Srivastava and Prasad 2000) ดังแสดงในรูปที่ 1.4.



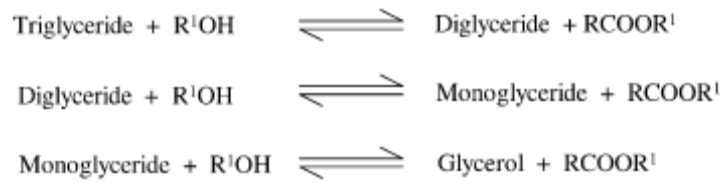
รูปที่ 1.4 สมการทั่วไปของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์.

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันหรือแอลกอฮอล์ไลซิส เป็นการแลกเปลี่ยนของแอลกอฮอล์ในเอสเทอร์โดยใช้วิธีคล้ายกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส, แต่ต่างกันตรงที่ใช้แอลกอฮอล์แทนน้ำ เป็นปฏิกิริยาที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อลดความหนืดของไตรกลีเซอไรด์. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ แต่เร่งปฏิกิริยาให้ไปข้างหน้าได้เร็วขึ้นโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา.

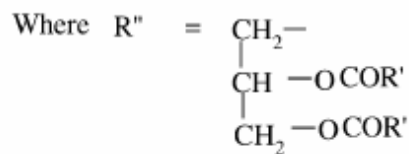
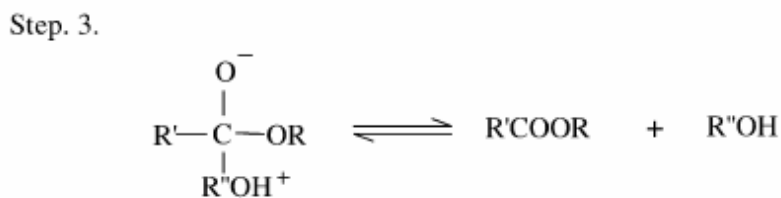
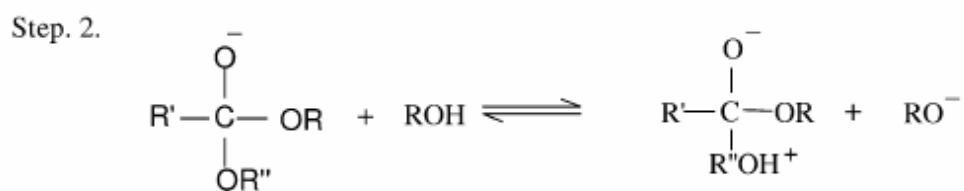
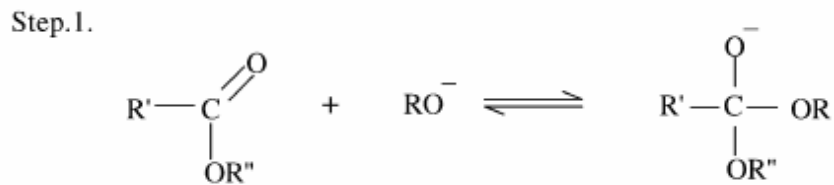
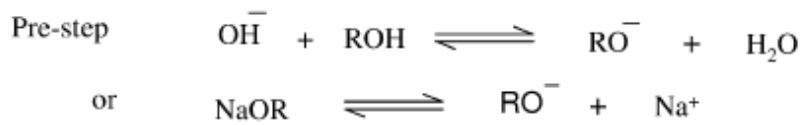
ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้ :

1.3.2.1. วิธีใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ ที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบส จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล, โดยกลีเซอรอลจะแยกชั้นอยู่ที่บริเวณด้านล่าง. กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะเกิดโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์เป็นสารอินเทอร์มีเดียต (Intermediate) (Freedman *et al.* 1986) ดังแสดงในรูปที่ 1.5.



รูปที่ 1.5 กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์



$\text{R}' =$ Carbon chain of fatty acid

$\text{R} =$ Alkyl group of alcohol

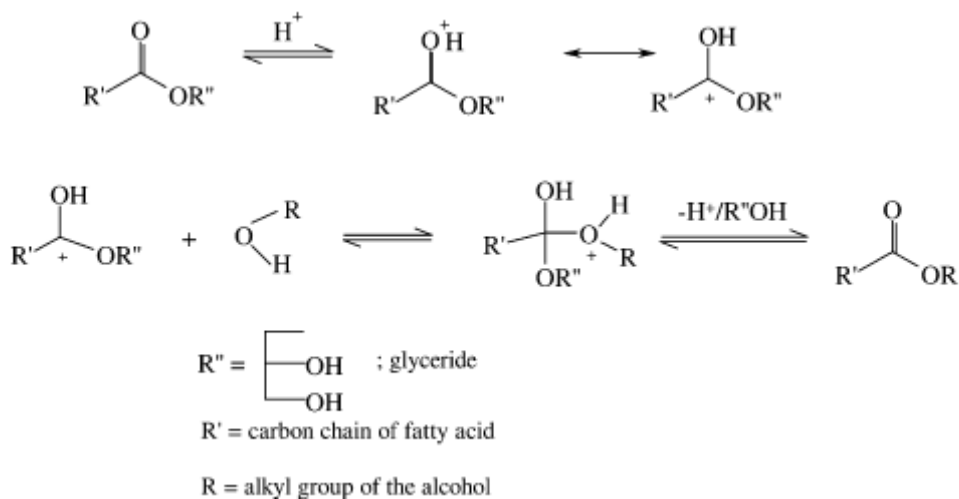
รูปที่ 1.6 กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเบส

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันสามารถผันกลับได้ ดังนั้นการใช้แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากกว่าหนึ่งสมมูลจะทำให้ปฏิกิริยาผันไปด้านหน้าทำให้เกิดเอสเทอร์. กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเริ่มจาก, ชั้นแรกแอลกอฮอล์ไอออน จะเข้าชนที่ตำแหน่งคาร์บอนิลคาร์บอนของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งทำให้เกิดสารอินเทอร์มีเดียตลักษณะเป็นเตตระฮีดรอล, ชั้นที่สองเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารอินเทอร์มีเดียตกับแอลกอฮอล์ทำให้เกิดแอลกอฮอล์ไอออนและขั้นสุดท้ายเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของสารอินเทอร์มีเดียต เกิดเป็นเอสเทอร์และไตรกลีเซอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 1.6.

1.3.2.2 วิธีใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ด้วยกรด Brownsted เช่น กรดซัลโฟนิก, กรดซัลฟิวริก. การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ค่อนข้างสูง แต่เกิดปฏิกิริยาช้ามาก, โดยต้องทำในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 °ซ. เวลามากกว่า 3 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ (Schuchardt *et al.* 1998).

กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้กรด Brownsted เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เริ่มจากโปรตอนไปโปรโตเนตที่หมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ทำให้เกิดคาร์โบแคทไอออน. หลังจากนั้น จึงเกิดการชนด้วยนิวคลีโอไฟล์ของแอลกอฮอล์เกิด tetrahedral intermediate. โดย intermediate นี้จะปล่อยกลีเซอรอลออกมาทำให้เกิดเอสเทอร์ใหม่และตัวเร่งปฏิกิริยาใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 1.7.



รูปที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยากรด

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดและเบสจะให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ที่สูงโดยใช้เวลาที่สั้น แต่ปฏิกิริยานี้มีข้อเสียคือ สิ้นเปลืองพลังงานในการเกิดปฏิกิริยามาก, การนำกลีเซอรอลกลับมาใช้ใหม่ทำได้ยาก, จำเป็นต้องกำจัดตัวเร่งปฏิกิริยากรดและเบสออกจากผลิตภัณฑ์, น้ำเสียที่มีเบสต้องผ่านการบำบัดก่อนปล่อยทิ้ง, กรดไขมันและน้ำจะรบกวนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (Dmytryshyn *et al.* 2004).

1.3.2.3 วิธีใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเอนไซม์ไลเปส

ทั้ง Extracellular และ Intracellular lipases สามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ที่มีประสิทธิภาพได้ทั้งในระบบ Aqueous และ Nonaqueous Dmytryshyn *et al.* (2004) ได้เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียกับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยากับการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 1.1.

ตารางที่ 1.1 การเปรียบเทียบปัจจัยของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลระหว่างใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

| ปัจจัยของกระบวนการผลิต | กระบวนการผลิต | |
|--------------------------------------|------------------|---------------------|
| ตัวเร่งปฏิกิริยา | เบส | เอนไซม์ไลเปส |
| อุณหภูมิของปฏิกิริยา | 60-70 °ซ. | 30-40 °ซ. |
| กรดไขมันอิสระในวัตถุดิบ | ผลิตภัณฑ์สูง | เมทิลเอสเทอร์ |
| น้ำในวัตถุดิบ | รบกวนปฏิกิริยา | ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา |
| % Yield ของเมทิลเอสเทอร์ | ปกติ | มากกว่า |
| ปริมาณกลีเซอรอลที่สามารถนำกลับมาได้ | ยาก | ง่าย |
| กระบวนการทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์ | ล้างหลาย ๆ ครั้ง | ไม่ต้องมี |
| ราคาตัวเร่งปฏิกิริยา | ถูก | แพงกว่า |

เห็นได้ว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถแก้ปัญหาต่างที่กล่าวมาข้างต้นได้ และนอกจากนั้น ยังสามารถกล่าวได้อีกว่ากลีเซอรอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้กระบวนการที่ซับซ้อนและกรดไขมันอิสระซึ่งมีอยู่ในน้ำมันของเสียและไขมันสามารถเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ทั้งหมด แต่ในทางกลับกันกระบวนการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.

1.3.2.4. วิธีใช้ Supercritical Fluids

วิธีใช้ Supercritical Fluids มีเป้าหมายที่จะพัฒนากระบวนการเมทาโนไลซิสโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา. Kusdiana and Saka (2001) ได้ศึกษากระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ Supercritical Methanol ที่ 350 °ซ. ความดัน 45 เมกะพาสคัล ทำให้น้ำมันเมล็ดเรพเปลี่ยนไปเป็นเมทิลเอสเทอร์. Supercritical Fluids เป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ง่ายมากขึ้นและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น, เมื่อเทียบกับวิธีที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบสซึ่งต้องกำจัดตัวเร่งปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์สบู่ที่เกิดขึ้นทั้งหมดที่อยู่ในไบโอดีเซลที่ได้. อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ควรต้องทำการศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องและพัฒนาการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม.

1.3.3 ผลกระทบของไบโอดีเซลที่มีต่อเครื่องยนต์

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ กับข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันดีเซลหมุนช้าและหมุนเร็ว ตามประกาศของกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2547 พบว่า ไบโอดีเซลมีค่าความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล. จุดวาบไฟของไบโอดีเซลมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง. ค่าซีเทนที่เป็นดัชนีบอกถึงคุณภาพการติดไฟของไบโอดีเซลยังมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล (เจนวนิชปัญญากุล 2549) แสดงดังตารางที่ 1.2.

ตารางที่ 1.2. คุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันปาล์ม ถั่วเหลืองและเมล็ดเรพ
เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานมันดีเซลตามประกาศของกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2547

| คุณสมบัติ | ไบโอดีเซล | | | น้ำมันดีเซล*** | |
|--------------------------------|------------|------------------|------------|----------------|---------|
| | ปาล์ม * | ถั่ว เหลือง** | เมล็ดเรพ** | หมุนเร็ว | หมุนช้า |
| ค่าซีเทน | 62-65 | 51-53 | 58 | >47 | >45 |
| จุดวาบไฟ (° ซ.) | 167 | - | >170 | >52 | >52 |
| ความถ่วงจำเพาะ ที่ 15.6 °ซ. | 0.887 | - | 0.883 | 0.81-0.87 | >0.92 |
| ค่าความร้อน (กิโลจูล/กิโลกรัม) | 39,300 | - | 37,100 | 46,800 | |

ที่มา : * เจนวนิชปัญจกุลและคณะ (2525)

** <http://www.biodiesel.de>

*** ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน (2547)

เนื่องจากน้ำมันไบโอดีเซลตามมาตรฐานสากลนั้นมีคุณสมบัติเทียบเคียงได้กับน้ำมันดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปิโตรเลียม. ดังนั้น ผลกระทบต่อเครื่องยนต์ถือได้ว่าไม่มีผลทางด้านลบ หรือในกรณีของเครื่องยนต์เก่า อาจมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนซีลยางบางส่วนเท่านั้น.

1.4 ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่

ไบโอดีเซล คือ เอสเทอร์ของกรดไขมันซึ่งสามารถใช้แทนน้ำมันดีเซล นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของสารประกอบออกซิเจนภายในโมเลกุล จึงมีความน่าสนใจในการปรับปรุงคุณสมบัติบางประการ ที่มีผลทำให้เผาไหม้ให้ดีขึ้นและให้มีความหล่อลื่นมากขึ้น เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องยนต์ดีเซล. เนื่องจากไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืช จึงสามารถสลายตัวได้ในสิ่งแวดล้อมและมีต้นทุนการผลิตต่ำ.

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของไบโอดีเซลกับน้ำมันดีเซลแล้ว โมเลกุลของไบโอดีเซลจะมีออกซิเจนอยู่ประมาณ 11 % จึงช่วยให้การเผาไหม้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น, ทำให้ลดมลพิษต่างๆ ลงได้ เช่น ลด Carbonmonoxide 15%, Hydrocarbons 40%, Particles 60%, แต่ NOx เพิ่มเล็กน้อย. นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังมีค่า Cetane Index สูง ทำให้เครื่องยนต์สตาร์ทติดง่ายและเดินเรียบ, มีปริมาณกำมะถันน้อยมาก, ไม่มีสารอะโรมาติก และในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ ไบโอดีเซลสลายในดินได้

99%, ส่วนน้ำมันดีเซลได้ 70%. เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซลแล้ว ไบโอดีเซลมีค่าซีเทนสูงกว่า, การปลดปล่อยอนุภาคขนาดเล็กเช่นฝุ่นละอองต่ำกว่าและลดการปล่อยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่เป็นพิษและย่อยสลายได้ในสิ่งแวดล้อม.

1.4.1 คุณสมบัติด้านการเพิ่มค่าซีเทน

ไบโอดีเซลบริสุทธิ์ (Neat biodiesel) มีค่าซีเทนสูงกว่าน้ำมันดีเซล. ความแตกต่างของไบโอดีเซลที่สำคัญคือ เป็นสารไม่ไวไฟและไม่ระเบิด, มีจุดวาบไฟสูงถึง 120 °ซ. ในขณะที่น้ำมันดีเซลทั่วไปมีจุดวาบไฟที่ 64 °ซ. ช่วยให้ประสิทธิภาพการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ดีขึ้น เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารออกซิเจนอัด (Oxygenate) ปริมาณสูง, ช่วยให้การเผาไหม้ในกระบอกสูบมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น, การจุดระเบิดดี, การสันดาปสมบูรณ์. นอกจากนี้ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงในเครื่องยนต์ดีเซลรอบต่ำแล้ว ยังนำมาผสมกับน้ำมันดีเซลในสัดส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถใช้งานกับเครื่องยนต์ดีเซลรอบสูงได้โดยไม่มีปัญหาในการใช้งานทั้งระยะสั้นและระยะยาว.

1.4.2 คุณสมบัติด้านการหล่อลื่น

ไบโอดีเซลประสบความสำเร็จในด้านการปรับปรุงคุณภาพ โดยเฉพาะคุณสมบัติเพิ่มความหล่อลื่น เนื่องจากไบโอดีเซลเป็นไฮโดรคาร์บอนที่เป็นโซ่ยาว มีส่วนผสมของกรดไขมัน, เมทิลเอสเทอร์ส่งผลต่อความหล่อลื่นที่ดี ช่วยให้ชิ้นส่วนในระบบน้ำมันเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ เช่น ปัมป์ลูกสูบ (Plunger pump) และแหวนลูกสูบ (Piston ring) มีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น.

1.4.3 คุณสมบัติด้านการลดการปลดปล่อยซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ไบโอดีเซลจัดเป็นเชื้อเพลิงสะอาด การที่ไบโอดีเซลไม่มีส่วนผสมของกำมะถันอะโรมาติกเหมือนน้ำมันที่ได้มาจากฟอสซิล จึงไม่มีปัญหาเรื่องปริมาณซัลเฟอร์ในไบโอดีเซล ซึ่งเป็นการช่วยลดการปลดปล่อยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ออกสู่ชั้นบรรยากาศ.

1.4.4 คุณสมบัติด้านการลดการปลดปล่อยฝุ่นละออง

เครื่องยนต์ที่ใช้ไบโอดีเซลสามารถลดการเกิดอนุภาคขนาดเล็ก เช่น พอลิไซคลิกอะโรมาติก, ไฮโดรคาร์บอน, ฝุ่นละออง และปรับปรุงประสิทธิภาพการเผาไหม้ให้ดีขึ้น.

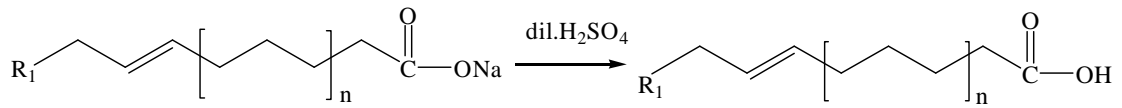
1.5 กลีเซอริน (Glycerine)

กลีเซอริน (Glycerine) เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ประกอบด้วยกลีเซอรอล (Glycerol), กลีเซอรอลของกรดไขมันอิสระ, น้ำ, เอซิลกลีเซอไรด์ (Acylglycerides), และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglyceride). กลีเซอรินที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้, โดยนำมาผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งปนเปื้อนและเปลี่ยนกลีเซอรอลของกรดไขมันอิสระให้เป็นกรด, แล้วจึงสังเคราะห์ให้เป็นเมทิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.

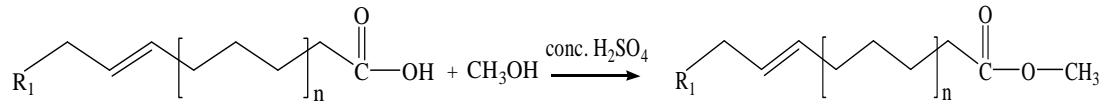
1.6 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่

การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอยู่ในรูปของกลีเซอรอล โดยนำมาทำให้เป็นกรด ด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง, แล้วนำมาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอล โดยมีกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา, จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์. จากนั้น นำมาทำปฏิกิริยาอีพอกซิเดชันและไฮโดรไลซิสจะได้เป็นสารประกอบไดออล, แล้วนำมาทำปฏิกิริยาไนเตรชันด้วยกรดผสมระหว่างกรดไนตริกเข้มข้นกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะได้สารประกอบไนเตรต. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นไปดังสมการดังรูปที่ 1.8

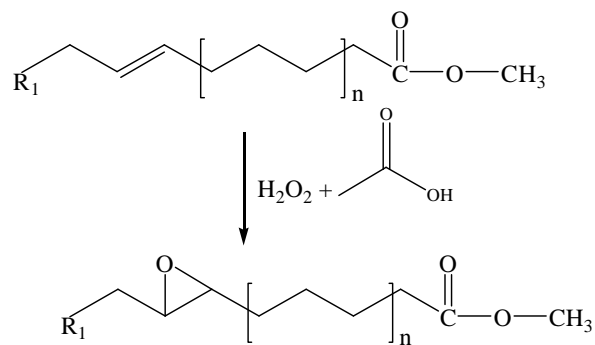
Hydrolysis



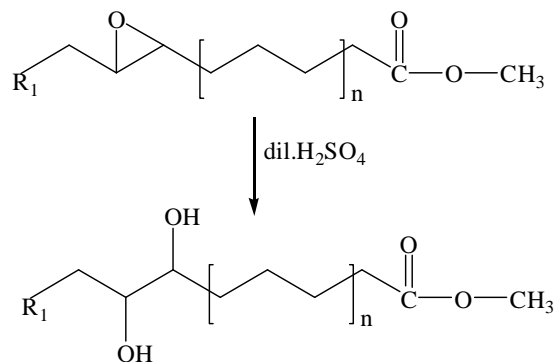
Esterification



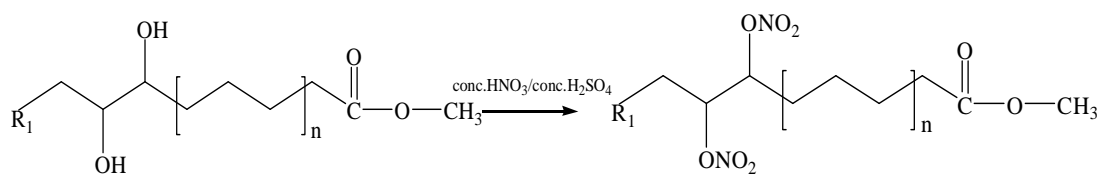
Epoxidation



Hydrolysis



Nitration



รูปที่ 1.8 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไฮโปดีเซลแบบหลายหน้าที่

1.7 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Dmytryshyn *et al.* (2004) สังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันพืช 4 ชนิด คือ น้ำมันคาโนลา, น้ำมันจากเมล็ดคาโนลา, ไขมันที่เป็นของเสียจากการทอดที่ผ่านการบำบัด และไขมันที่เป็นของเสียจากการทอด, โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งมีตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เมื่อนำเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่สังเคราะห์ได้เพียง 1% มาผสมกับน้ำมันดีเซลจะช่วยเพิ่มคุณสมบัติหล่อลื่น.

Hass *et al.* (2001) ศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากสต็อกสบู่ของน้ำมันถั่วเหลือง โดยกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากสต็อกสบู่ของน้ำมันถั่วเหลืองมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันถั่วเหลือง. เมื่อนำมาไบโอดีเซลที่สังเคราะห์ได้ผสมกับน้ำมันดีเซล 20%, จะสามารถลดเขม่าได้ 19.7 %, และก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ได้ 2.4%, ซึ่งสามารถลดมลพิษของสิ่งแวดล้อม.

Felizardo *et al.* (2005) สังเคราะห์ไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มของเสียที่ผ่านการทอดแล้ว โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอลชนิดโครมาโทกราฟีเกรด โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีผลผลิตถึง 92 %.

Suppes *et al.* (2001) สังเคราะห์สารเพิ่มค่าซีเทนประเภท Fatty acid glycol nitrate ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดอินทรีย์ ที่มีจำนวนคาร์บอน 6-18 อะตอม โดยใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยากับเอทิลีนไกลคอล ตามด้วยปฏิกิริยาไนเตรชัน. สารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จะทำให้ช่วงเวลาในการจุดระเบิดสั้นลง ค่าซีเทนสูงขึ้นแต่ประสิทธิภาพไม่ดีเท่า 2-เอทิลเฮกซิลไนเตรด.

Suppes *et al.* (2003) สังเคราะห์สารเพิ่มค่าซีเทนประเภทอัลคิลไนเตรดจากไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันพืช อาทิเช่น น้ำมันละหุ่ง, น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอก โดยวิธีไนเตรชันด้วยกรดไนตริกและแอสซิดิกแอนไฮไดรด์. สารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้ประสิทธิภาพไม่ดีเท่ากับ 2-เอทิลเฮกซิลไนเตรด.

1.8 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

1.8.1 วัตถุประสงค์

1. สังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน.
2. ศึกษาสมบัติของไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่ที่สังเคราะห์ได้.
3. ศึกษาหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากกลีเซอริน.

1.8.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาและค้นคว้ารวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย.
2. จัดเตรียมอุปกรณ์และสารเคมี.
3. สังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน โดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน, ปฏิกิริยาอีพอกซิเดชัน และปฏิกิริยาไนเตรชัน.
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่ ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี คือ FT-IR และ FT-NMR.
5. ทดลองหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากกลีเซอริน.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอรินที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีวัสดุ, อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 3 ขั้นตอน, ดังนี้ :

2.1 การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน

2.1.1 การสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ (Glycerine methyl ester)

2.1.1.1 วัสดุอุปกรณ์

- 2.1.1.1.1 ชุดอุปกรณ์การกลั่น (Reflux)
- 2.1.1.1.2 ขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2.1.1.1.3 กรวยแยก (Separating funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2.1.1.1.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Filtrate paper)
- 2.1.1.1.5 กระดาษวัด pH
- 2.1.1.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าตลับ 4 ตำแหน่ง : Model AB204-S Mettler Toedo
- 2.1.1.1.7 Hotplate/stirrer : CORNING
- 2.1.1.1.8 Rotary evaporator : Model R-200; BÜCHI

2.1.1.2 สารเคมี

- 2.1.1.2.1 Methanol (AR grade)
- 2.1.1.2.2 Conc. Sulfuric acid (96%) (AR grade)
- 2.1.1.2.3 Sodium hydrogen carbonate (AR grade)
- 2.1.1.2.4 Sodium chloride (AR grade)
- 2.1.1.2.5 Sodium sulfate anhydrous (AR grade)
- 2.1.1.2.6 Dichloromethane (AR grade)
- 2.1.1.2.7 น้ำกลั่น

2.1.1.3 วิธีการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

ซึ่งกลีเซอรินที่เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล 25 กรัม ลงในขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร. เติมเมทานอล 93.75 กรัม, ไคคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาณ 3.125 มิลลิลิตร. ต่อขวดก้นกลมเข้ากับอุปกรณ์กลั่น ได้แก่ Reflux condenser, Thermometer และMagnetic stirrer. กลั่น (Reflux) ส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และคนตลอดเวลาเป็นเวลา 10 ชั่วโมง. หลังจากเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ส่วนผสมที่ได้จะแยกชั้นออกมา. จากนั้น ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยก และแยกชั้นน้ำออกไป. ชั้นที่เป็นสารอินทรีย์ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของชั้นสารอินทรีย์จะเป็นกลาง (pH=7), ตามด้วยสารละลาย 5% โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ปริมาณ 37.5 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 25 มิลลิลิตร, ตามลำดับ. หลังจากแยกส่วนที่เป็นชั้นน้ำออกไป กำจัดน้ำในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous) แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง. นำส่วนที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ด้วยเครื่อง Rotary evaporator พบว่า จะได้เมทิลเอสเทอร์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง, ซึ่งน้ำหนักเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้.

2.1.2 การสังเคราะห์สารประกอบอีพอกไซด์ (Glycerine poxide)

2.1.2.1 วัสดุอุปกรณ์

- 2.1.2.1.1 ชุดอุปกรณ์การกลั่น (Reflux)
- 2.1.2.1.2 ขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2.1.2.1.3 กรวยแยก (Separating funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 2.1.2.1.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Filtrate paper)
- 2.1.2.1.5 กระดาษวัด pH
- 2.1.2.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง : Model AB204-S Mettler Toedo
- 2.1.2.1.7 Hot plate/stirrer : CORNING
- 2.1.2.1.8 Rotary evaporator : Model R-200; BÜCHI

2.1.2.2 สารเคมี

- 2.1.2.2.1 Methanol (AR grade)
- 2.1.2.2.2 Hexane (AR grade)
- 2.1.2.2.3 Glacial acetic acid (AR grade)

2.1.2.2.4 Conc. Sulfuric acid (96%) (AR grade)

2.1.2.2.5 50% Hydrogen peroxide (AR grade)

2.1.2.2.6 Sodium hydrogen carbonate (AR grade)

2.1.2.2.7 Sodium chloride (AR grade)

2.1.2.2.8 Sodium sulfate anhydrous (AR grade)

2.1.2.2.9 น้ำกลั่น

2.1.2.3 วิธีการสังเคราะห์สารประกอบอีพอกไซด์

ซึ่งเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลองที่ 2.1.1 ปริมาณ 18 กรัม ผสมด้วยเฮกเซน 17.8 กรัม และใส่ magnetic stirrer ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร, คนส่วนผสมทั้งหมดเป็นเวลา 30 นาที. เตรียมกรดเปอร์แอซีติก (peracetic acid) จากกรดแอซีติก 7.9 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาณ 0.2 กรัม ในขวดก้นกลมอีกใบขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มี magnetic stirrer. จากนั้น เติมน้ำ 50% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 13.49 กรัม อย่างช้าๆ ไม่ต่ำกว่า 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง. หลังจากนั้น เทกรดเปอร์แอซีติกลงในส่วนผสมอย่างช้าๆ และคนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง, หลังจากปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ส่วนผสมที่ได้จะแยกตัว. จากนั้น ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยก, ไซส่วนที่เป็นชั้นน้ำออกไป, แล้วล้างส่วนที่เป็นชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของชั้นสารอินทรีย์จะเป็นกลาง, ตามด้วยสารละลาย 5% โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตปริมาณ 100 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 100 มิลลิลิตร, ตามลำดับ. หลังจากแยกส่วนที่เป็นชั้นน้ำออกไป กำจัดน้ำในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ด้วยการเติม โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous), แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง. นำส่วนที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ด้วยเครื่อง Rotary evaporator พบว่า จะได้สารประกอบอีพอกไซด์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน, ซึ่งนำหน้าสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้.

2.1.3 การสังเคราะห์สารประกอบไนเตรต (Glycerine nitrate)

2.1.3.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.3.1.1 ชุดอุปกรณ์การกลั่น (Reflux)

2.1.3.1.2 ขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.1.3.1.3 กรวยแยก (Separating funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร

2.1.3.1.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Filtrate paper)

2.1.3.1.5 กระดาษวัด pH

2.1.3.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง : Model AB204-S Mettler Toedo

2.1.3.1.7 Hotplate/stirrer : CORNING

2.1.3.1.8 Rotary evaporator : Model R-200 ; BÜCHI

2.1.3.2 สารเคมี

2.1.3.2.1 Conc. Nitric acid (65%) (AR grade)

2.1.3.2.2 Conc. Sulfuric acid (96%) (AR grade)

2.1.3.2.3 Dichloromethane (AR grade)

2.1.3.2.4 Glacial acetic acid (AR grade)

2.1.3.2.5 Sodium hydrogen carbonate (AR grade)

2.1.3.2.6 Sodium chloride (AR grade)

2.1.3.2.7 Sodium sulfate anhydrous (AR grade)

2.1.3.2.8 น้ำกลั่น

2.1.3.3 วิธีการสังเคราะห์สารประกอบไนเตรด

เทส่วนผสมของกรดไนตริกเข้มข้น 65% ปริมาณ 32 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาณ 67.57 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร, คนส่วนผสมในอ่างน้ำแข็งและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 0 ± 2 องศาเซลเซียส. ซังสารประกอบอ็อกไซด์ที่ได้จากการทดลองที่ 2.1.2 ปริมาณ 15.50 กรัม ละลายในไดคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร, ค่อยๆ หยดลงในขวดก้นกลม, คนให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยรักษาระดับอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 0 ± 2 องศาเซลเซียส, หลังจากปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ ส่วนผสมที่ได้จะแยกตัว. จากนั้น ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยกไขส่วนที่เป็นชั้นน้ำออกไปแล้วล้างส่วนที่เป็นชั้นสารอินทรีย์ด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของชั้นสารอินทรีย์จะเป็นกลาง, ตามด้วยสารละลาย 5 % โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตปริมาณ 100 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร, และโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ. หลังจากแยกส่วนที่เป็นชั้นน้ำออกไป กำจัดน้ำในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate anhydrous), แล้วนำไปกรอง ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ด้วยเครื่อง Rotary evaporator พบว่า จะได้สารประกอบไนเตรดที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล, ชั่งน้ำหนักสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้.

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

พิสูจน์เอกลักษณ์ของเมทิลเอสเทอร์, สารประกอบอีพอกไซด์ และสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอรินที่เป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยเครื่องมือวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ :

- Fourier-Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR).
- Fourier-Transform NMR Spectrometer (FT-NMR).

2.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

2.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

2.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

2.3 การทดลองหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

เป็นการปรับสภาวะการสังเคราะห์โดยการแปรผันปริมาณเมทานอลให้อยู่ในช่วง 5-40 มิลลิลิตร, ปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ให้อยู่ในช่วง 2-10 มิลลิลิตร และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วง 5-360 นาที, เพื่อให้ได้เมทิลเอสเทอร์ในปริมาณสูงที่สุด.

2.3.1 การทดลองแปรผันปริมาณเมทานอล

ชั่งกลีเซอริน 50 กรัม ในขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร, เติมเมทานอล 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 มิลลิลิตร, ไคคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาณ 8 มิลลิลิตร. ต่อขวดก้นกลมเข้ากับอุปกรณ์กลั่น ได้แก่ Reflux condenser, Thermometer และ Magnetic stirrer. กลั่น (Reflux) ส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และคนตลอดเวลาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง. หลังจากเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ส่วนผสมที่ได้จะแยกชั้นออกมา. จากนั้น ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยกและแยกชั้นน้ำออกไป. ชั้นที่เป็นสารอินทรีย์ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของชั้นสารอินทรีย์จะเป็นกลาง. ชั่งน้ำหนักชั้นสารอินทรีย์ที่แยกได้, เลือกปริมาตรเมทานอลที่ให้ % Yield สูงที่สุด ใช้ในการทดลองที่ 2.3.2 ต่อไป.

2.3.2 การทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96%

ซังกลีเซอริน 50 กรัม ในขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร, เดิมเมทานอล 12 มิลลิลิตร, ไคคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96 % ปริมาณ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 10 มิลลิลิตร. ต่อขวดก้นกลมเข้ากับอุปกรณ์กลั่นได้แก่ Reflux condenser, Thermometer และ Magnetic stirrer. กลั่น (Reflux) ส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและคนตลอดเวลาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง. หลังจากเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ส่วนผสมที่ได้จะแยกชั้นออกมา. จากนั้น ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยกและแยกชั้นน้ำออกไป. ชั้นที่เป็นสารอินทรีย์ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของชั้นสารอินทรีย์จะเป็นกลาง. ชั่งน้ำหนักชั้นสารอินทรีย์ที่แยกได้, เลือกปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ที่ให้ % Yield สูงที่สุด ใช้ในการทดลองที่ 2.3.3 ต่อไป.

2.3.3 การทดลองแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ซังกลีเซอริน 50 กรัม ในขวดก้นกลมสองคอ (Two-neck round bottom flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร, เดิมเมทานอล 12 มิลลิลิตร, ไคคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96 % ปริมาณ 6 มิลลิลิตร. ต่อขวดก้นกลมเข้ากับอุปกรณ์กลั่นได้แก่ Reflux condenser, Thermometer และ Magnetic stirrer. กลั่น (Reflux) ส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และคนตลอดเวลาเป็นเวลา 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 และ 360 นาที. หลังจากเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์, ส่วนผสมที่ได้จะแยกชั้นออกมา. จากนั้น ถ่ายส่วนผสมทั้งหมดลงในกรวยแยกและแยกชั้นน้ำออกไป. ชั้นที่เป็นสารอินทรีย์ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่า pH ของชั้นสารอินทรีย์จะเป็นกลาง. ชั่งน้ำหนักชั้นสารอินทรีย์ที่แยกได้ เลือกเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแล้วให้ % Yield สูงที่สุด.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน

ไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ ที่ผลิตได้จากกลีเซอรินซึ่งเป็นของเหลือทิ้งหรือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล สามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเกลือของกรดไขมันอิสระที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ในกลีเซอรินกับเมทานอล โดยมีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า สามารถสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ได้เท่ากับ 44.96 เปอร์เซ็นต์. เมื่อนำเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยาอีพอกซิเดชันและไฮโดรไลซิส จะได้เป็นสารประกอบไดออกไซด์เอสเทอร์ เท่ากับ 86.11 เปอร์เซ็นต์. หลังจากนั้น นำมาทำปฏิกิริยาในทรานซ์ด้วยกรดผสมระหว่างกรดไนตริก เข้มข้นกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจะได้สารประกอบไนเตรต ที่มีคุณสมบัติเป็นสารหล่อลื่นเท่ากับ 68.19 เปอร์เซ็นต์. ผลการสังเคราะห์ที่ได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 3.1.

ตารางที่ 3.1 ผลการสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่

| การสังเคราะห์ | น้ำหนัก (g) | | Yield (%) | ลักษณะ |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------|-------------------|
| | ก่อนทำปฏิกิริยา | หลังทำปฏิกิริยา | | |
| เมทิลเอสเทอร์ | 25 | 11.2 | 45.0* | ของเหลวสีเหลืองใส |
| สารประกอบอีพอกไซด์ | 18 | 15.5 | 86.1** | ของเหลวสีเหลืองใส |
| สารประกอบไนเตรต | 15.5 | 10.6 | 68.2*** | ของเหลวสีน้ำตาลใส |

หมายเหตุ : * ผลผลิตที่คิดเทียบกับของเสียจากกระบวนการผลิตที่ยังไม่ได้แยกเอากลีเซอรอลออก

** ผลผลิตที่คิดเทียบกับ*

***ผลผลิตที่คิดเทียบกับ**

3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

พิสูจน์เอกลักษณ์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่สังเคราะห์ได้ 3 ชนิด ดังนี้ :

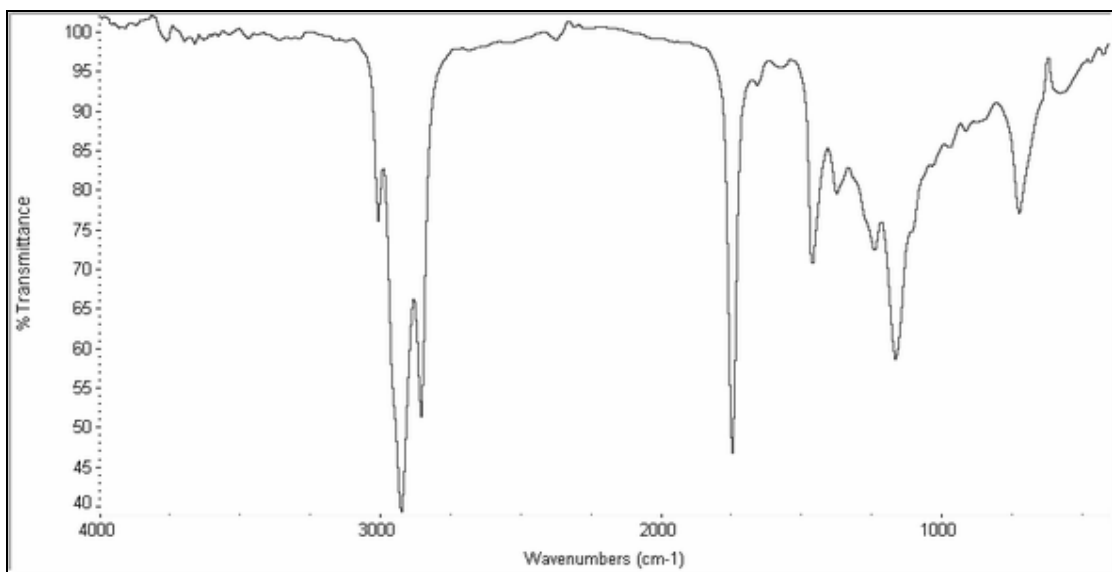
- เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (Glycerine methyl ester).
- สารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (Glycerine epoxide).
- สารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (Glycerine nitrate).

3.2.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ จากกลีเซอริน

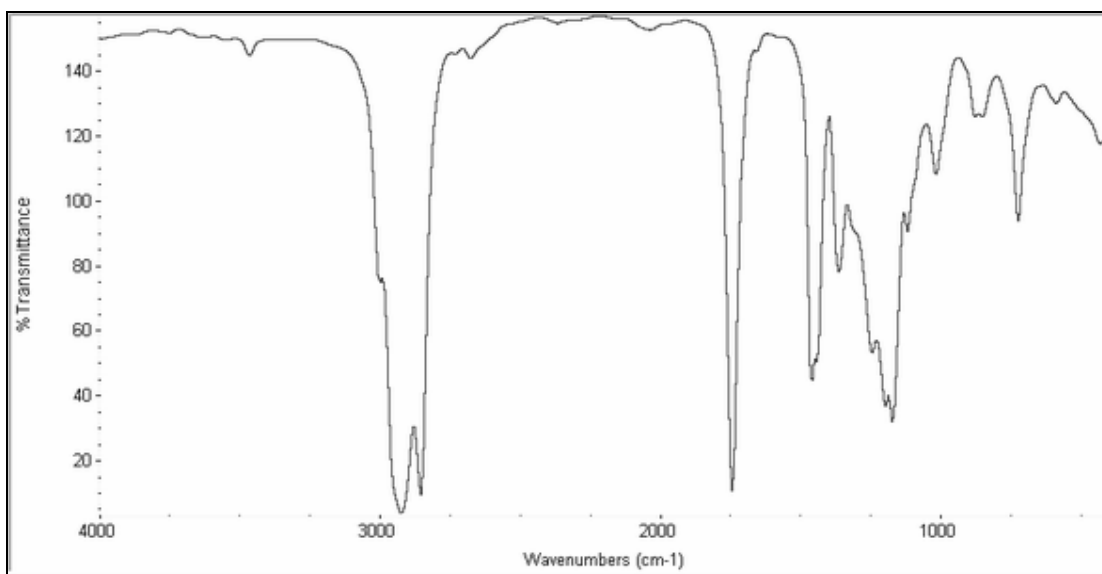
พิสูจน์เอกลักษณ์เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค IR และ NMR.

ผลการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ ด้วย Fourier-Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR).

IR สเปกตรัมของ กลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ.



รูปที่ 3.1 IR สเปกตรัมของกลีเซอริน (NaCl)



รูปที่ 3.2 IR สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (NaCl)

ช่วงการดูดกลืนแสงที่สำคัญของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน แสดงดังตารางที่ 3.2.

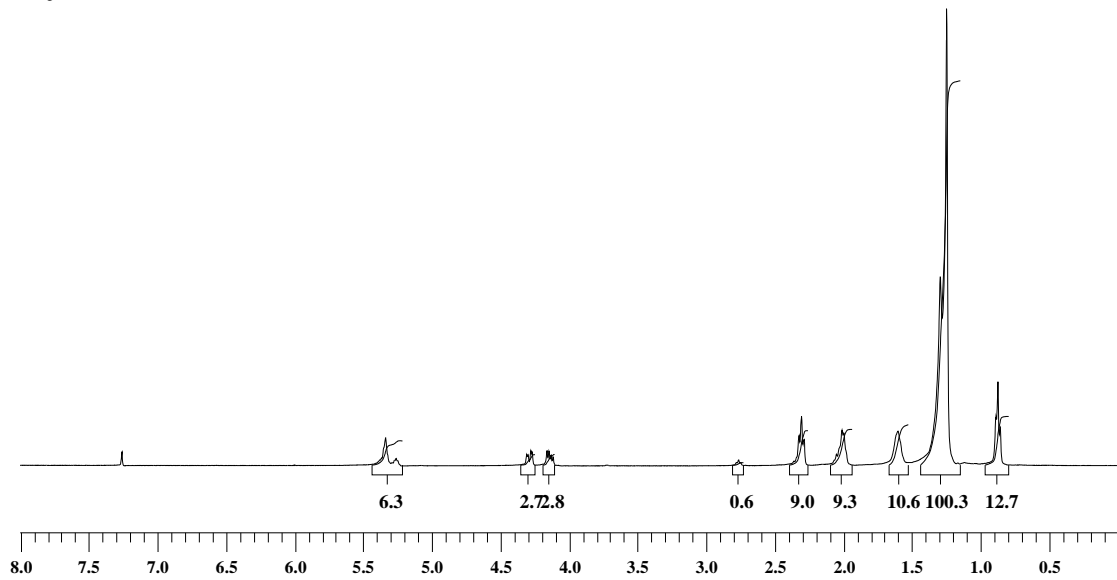
ตารางที่ 3.2 Absorption assignments ของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

| Wave number (cm-1) | | Assignments |
|--------------------|------------------------|---------------------------|
| Glycerine | Glycerine methyl ester | |
| 3005 | 3005 | =C-H Stretching |
| 2851 | 2849 | C-H Stretching, Aliphatic |
| 1740 | 1742 | C=O Stretching |
| 1654 | 1654 | C=C Stretching |
| 1461 | 1461 | C-H Bending, Aliphatic |
| 1162 | 1167 | C-O Stretching |

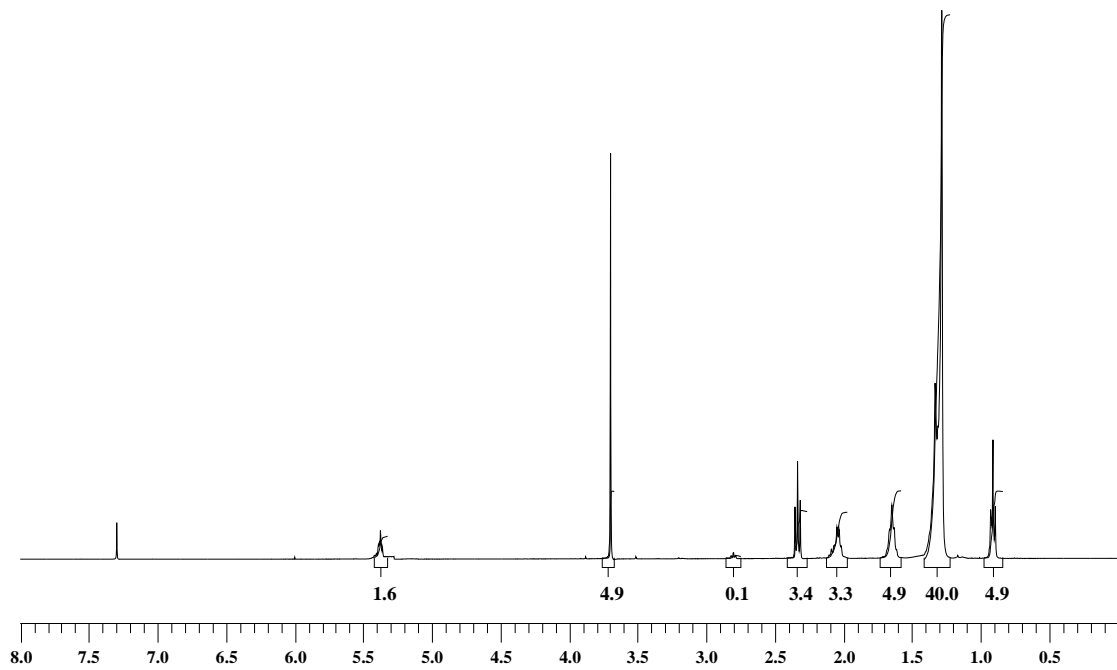
IR สเปกตรัมของกลีเซอรินดังรูปที่ 3.1 และเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอรินดังรูปที่ 3.2 ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่า สารทั้งสองอย่างมีความแตกต่างของโครงสร้างหมู่ฟังก์ชันอย่างไร, ดังนั้น จึงนำสารทั้งสองชนิดมายืนยันด้วยเครื่อง FT-NMR.

ผลการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ ด้วย Fourier-Transform NMR Spectrometer (FT-NMR)

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน แสดงดังรูปที่ 3.3 และ 3.4.



รูปที่ 3.3 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของกลีเซอริน (CDCl_3)



รูปที่ 3.4 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl_3)

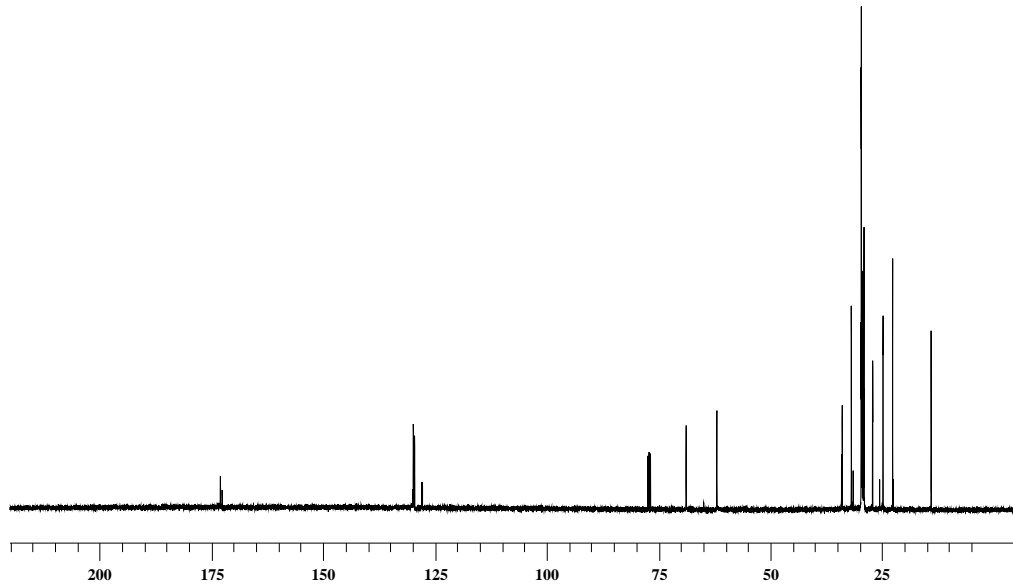
สัญญาณสำคัญที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน แสดงดังตารางที่ 3.3.

ตารางที่ 3.3 Assignments $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

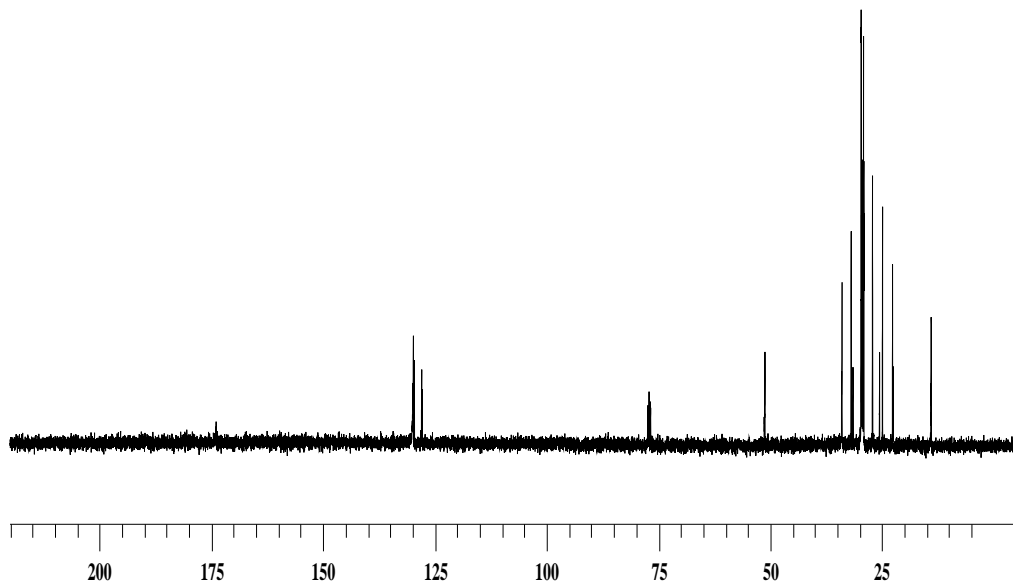
| Position of Proton | Multiplicity | Chemical Shift (δ ,ppm) | |
|---------------------------|--------------|---------------------------------|------------------------|
| | | Glycerine | Glycerine methyl ester |
| a | m | 0.77-0.83 | 0.74-0.81 |
| b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p | m | 1.15-1.95 | 1.12-1.92 |
| q | t | 2.19-2.26 | 2.15-2.22 |
| s | s | - | 3.54 |
| t,u,v | m | 4.01-4.27 | - |
| i,j | m | 5.19-5.28 | 5.20-5.25 |

เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน ดังรูปที่ 3.4 กับกลีเซอรินดังรูปที่ 3.3 สังเกตได้ว่าสัญญาณที่ค่า Chemical shift δ_{H} 3.54 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนของหมู่ methoxy ของเมทิลเอสเทอร์.

^{13}C -NMR สเปกตรัมของกลีเซอริน และเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน แสดง
ได้ดังรูปที่ 3.5 และ 3.6.



รูปที่ 3.5 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของกลีเซอริน (CDCl_3)



รูปที่ 3.6 ^{13}C -NMR สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl_3)

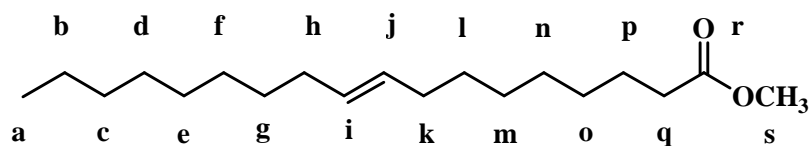
สัญญาณสำคัญที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน แสดงดังตารางที่ 3.4.

ตารางที่ 3.4 Assignments $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของกลีเซอรินและเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

| Position of Carbon | Chemical Shift (δ ,ppm) | |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------|
| | Glycerine | Glycerine methyl ester |
| a | 14.05 | 14.00 |
| b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p | 22.55-33.94 | 22.61-31.86 |
| q | 34.09 | 33.90 |
| s | - | 51.12 |
| t,v | 62.00 | - |
| u | 68.86 | - |
| i,j | 127.83-130.01 | 127.79-129.93 |
| r | 172.60-173.01 | 173.90 |

เมื่อเปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้ รูปที่ 3.9 กับ สเปกตรัมของกลีเซอรินดังรูปที่ 3.8 เห็นได้ชัดว่า สัญญาณที่ค่า Chemical shift δ_{C} 62 ppm and δ_{C} 68 ppm, ซึ่งเป็นของคาร์บอนส่วนของกลีเซอรอลของไตรกลีเซอไรด์ได้หายไป เนื่องมาจากการเกิดเมทิลเอสเทอร์และสัญญาณที่ค่า Chemical shift δ_{C} 51 ppm เป็นของคาร์บอนของหมู่เมทอกซีของเมทิลเอสเทอร์จะเกิดขึ้นแทนที่.

จากผลของข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน คือ เมทิลเอสเทอร์และมีสูตร โครงสร้างเป็นดังนี้ :



Glycerine methyl ester

รูปที่ 3.7 สูตรโครงสร้างที่แสดง Assignments $^1\text{H-NMR}$ สเตปครัมเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

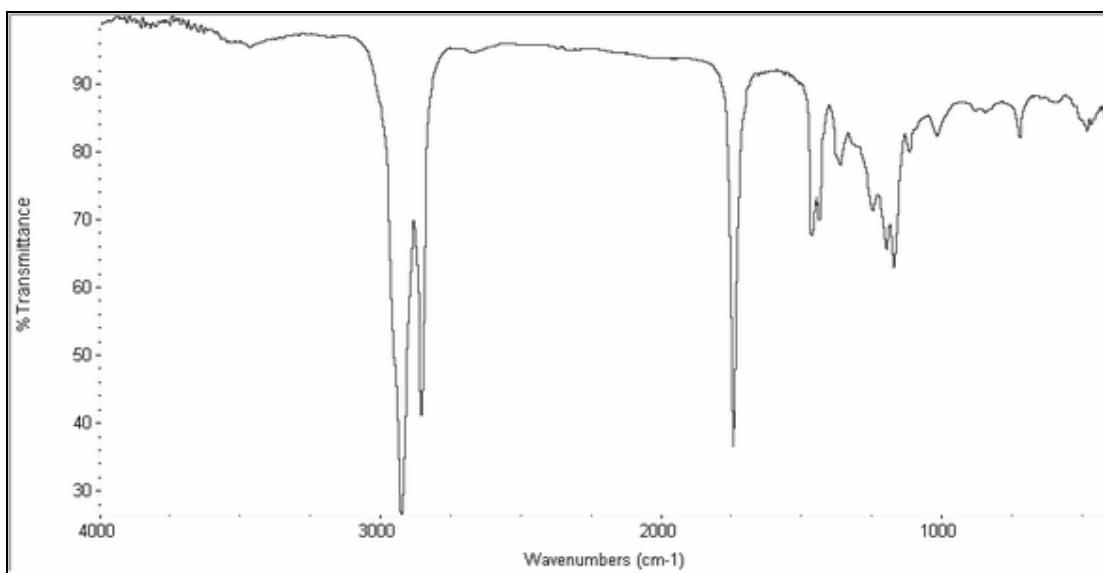
3.2.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบอียพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

พิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบอียพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค IR และ NMR.

ผลการวิเคราะห์สารประกอบอียพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ ด้วย Fourier-Transform

Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

IR สเตปครัมของสารประกอบอียพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากกลีเซอริน แสดงได้ดังรูปที่ 3.8.



รูปที่ 3.8 IR สเตปครัมของสารประกอบอียพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (NaCl)

ช่วงการดูดกลืนแสงที่สำคัญของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังตารางที่ 3.5.

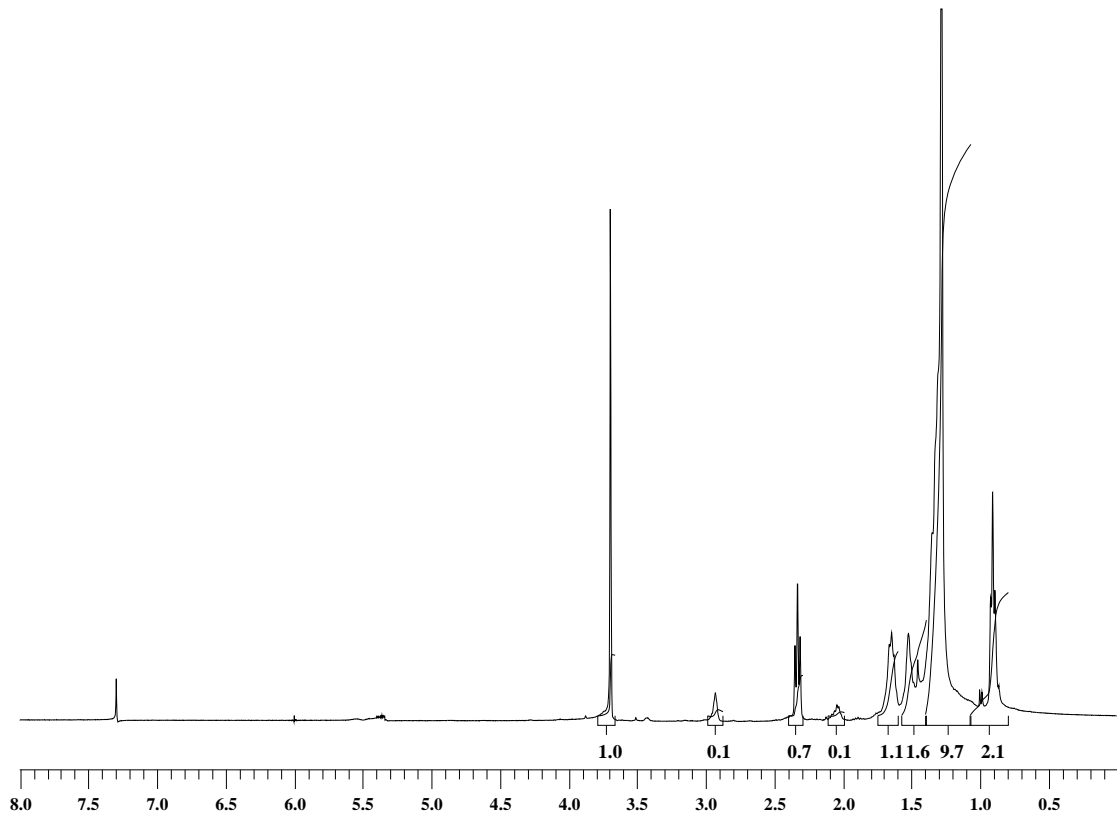
ตารางที่ 3.5 Absorption assignments ของเมทิลเอสเทอร์จากกลีเซอรินเปรียบเทียบกับ สารประกอบอีพอกไซด์จากกลีเซอริน

| Wave number (cm ⁻¹) | | Assignments |
|---------------------------------|-------------------|---------------------------|
| Glycerine methyl ester | Glycerine epoxide | |
| - | 3467 | O-H Stretching |
| 3005 | - | =C-H Stretching |
| 2849 | 2849 | C-H Stretching, Aliphatic |
| 1742 | 1741 | C=O Stretching |
| 1654 | - | C=C Stretching |
| 1461 | 1461 | C-H Bending, Aliphatic |
| 1167 | 1162 | C-O Stretching |

จากการเปรียบเทียบกราฟ IR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ แสดงดังรูปที่ 3.8 กับ เมทิลเอสเทอร์ ดังรูปที่ 3.2 พบว่า สามารถสังเกตการดูดกลืนแสงที่ 3005 cm⁻¹ และ 1654 cm⁻¹ จากสเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์ เนื่องจากการมีอยู่ของพันธะคู่ในโซ่ของกรดไขมัน ในขณะที่ไม่สามารถสังเกตเห็นได้จากสเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์.

ผลการวิเคราะห์สารประกอบอียพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ ด้วย Fourier-Transform NMR Spectrometer (FT-NMR)

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอียพอกไซด์ ที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังรูปที่ 3.9.



รูปที่ 3.9 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอียพอกไซด์ ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl_3)

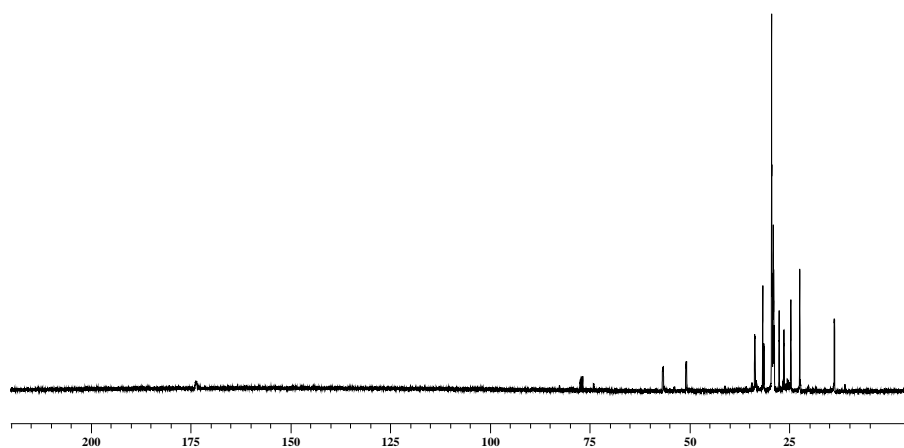
สัญญาณสำคัญที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ แสดงได้ดังตารางที่ 3.6.

ตารางที่ 3.6 Assignments $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

| Position of Proton | Multiplicity | Chemical Shift (δ ,ppm) |
|---------------------------|--------------|---------------------------------|
| a | m | 0.71-0.77 |
| b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p | m | 1.09-1.51 |
| q | t | 2.11-2.19 |
| i,j | m | 2.68-2.76 |
| s | s | 3.54 |

เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ดังรูปที่ 3.9 กับเมทิลเอสเทอร์ดังรูปที่ 3.4 จะสามารถเห็นได้ว่า สัญญาณระหว่าง δH 5.20 ppm ถึง δH 5.25 เป็นสัญญาณของโปรตอนจากส่วนที่เป็นแอลเคนในโซ่กรดไขมันหายไป เนื่องจากการฟอร์มตัวของสารประกอบอีพอกไซด์. ดังนั้น สัญญาณที่ δH 2.68 ถึง 2.76 ppm จึงมาจากโปรตอนในหมู่อีพอกไซด์.

$^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังในรูปที่ 3.10.



รูปที่ 3.10 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl_3)

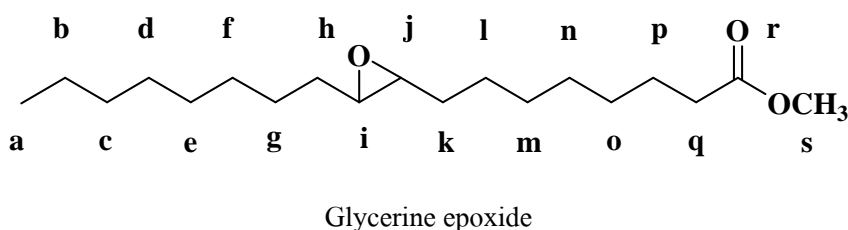
สัญญาณสำคัญที่ได้จาก ^{13}C -NMR สเปกตรัม ของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้
 ดังแสดงในตารางที่ 3.7.

ตารางที่ 3.7 Assignments ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้
 จากกลีเซอริน

| Position of Carbon | Chemical Shift (δ ,ppm) |
|---------------------------|---------------------------------|
| a | 14.02 |
| b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p | 22.62-31.86 |
| q | 34.00 |
| s | 51.32 |
| ij | 57.13-57.17 |
| r | 174.23 |

เมื่อเปรียบเทียบ ^{13}C -NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ดังรูปที่ 3.10 กับ ^{13}C -
 NMR สเปกตรัมของเมทิลเอสเทอร์รูปที่ 3.6 พบว่า สัญญาณของ olefinic carbon ($-\text{C}=\text{C}-$) ที่ δC
 127.79 ถึง 129.93 ppm หายไป เนื่องจากการฟอร์มตัวของเมทิลเอสเทอร์กลายเป็นสารประกอบ
 อีพอกไซด์ ดังนั้น สัญญาณที่ δC 57.13 ถึง 57.17 ppm จึงมาจากคาร์บอนในหมู่อีพอกไซด์.

จากผลข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากเมทิลเอส
 เทอร์คือ สารประกอบอีพอกไซด์ และมีสูตร โครงสร้างเป็นดังนี้ :



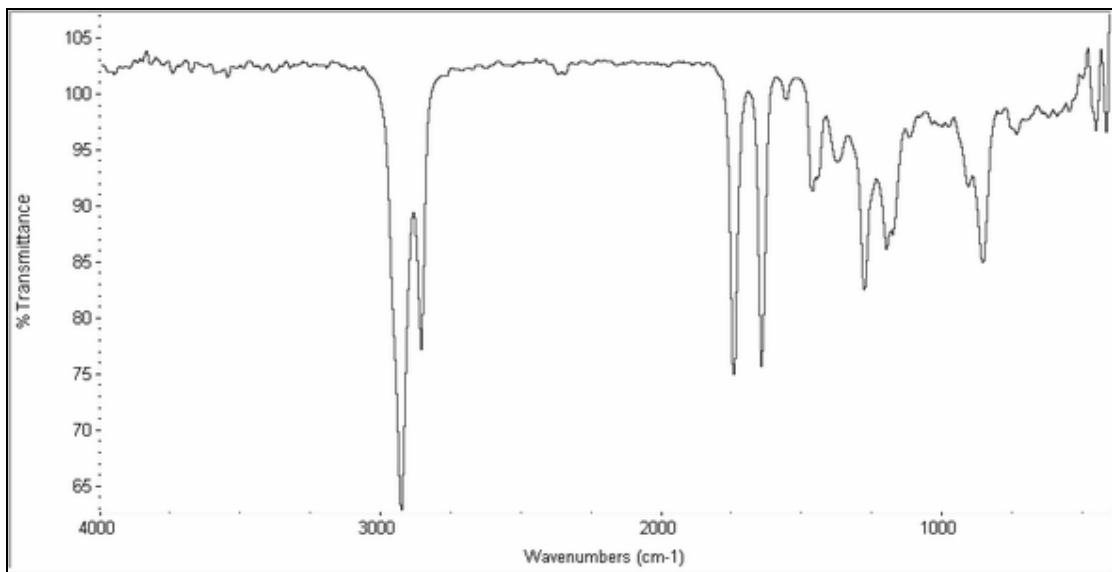
รูปที่ 3.11 สูตรโครงสร้างที่แสดง Assignments ^1H -NMR สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์
 ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน.

3.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

พิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค IR และ NMR.

ผลการวิเคราะห์สารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้ ด้วย Fourier-Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

IR สเปกตรัมของสารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้สารประกอบอีพอกไซด์ที่ได้จากเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากกลีเซอริน แสดงได้ดังรูปที่ 3.12.



รูปที่ 3.12 IR สเปกตรัมของสารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (NaCl)

ช่วงการดูดกลืนแสงที่สำคัญของสารประกอบไนเตรตที่สังเคราะห์ได้แสดงดัง ตารางที่ 3.8.

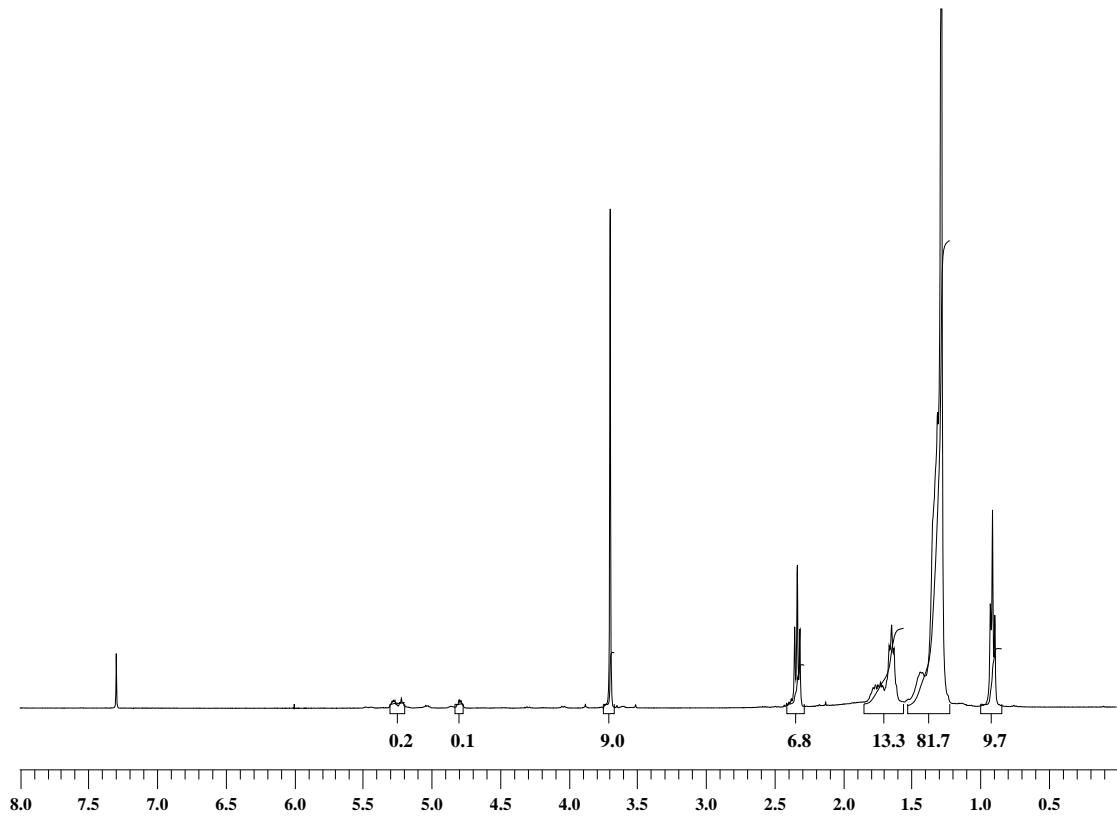
ตารางที่ 3.8 Absorption assignments ของสารประกอบไนเตรตที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

| Wave number (cm-1) | | Assignments |
|--------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Glycerine epoxide | Glycerine nitrate | |
| 3467 | - | O-H Stretching |
| 2849 | 2863 | C-H Stretching, Aliphatic |
| 1741 | 1742 | C=O Stretching |
| - | 1632 | NO ₂ Asymmetric Stretching |
| 1461 | 1461 | C-H Bending, Aliphatic |
| - | 1271 | NO ₂ Symmetric Stretching |
| 1162 | 1167 | C-O Stretching |
| | 853 | N-O Stretching Vibration |

เมื่อเปรียบเทียบกราฟ IR สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรต แสดงดังในรูปที่ 3.12 กับสารประกอบอีพอกไซด์ ดังรูปที่ 3.8 พบว่า ไม่มีการดูดกลืนแสงในช่วง OH stretching ที่ 3467 cm^{-1} แต่กลับพบการดูดกลืนแสงในช่วงของ NO₂ (asymmetric and symmetric) stretching and NO stretching ที่ 1632 , 1271 and 853 cm^{-1} ตามลำดับ ยืนยันผลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง FT-NMR ต่อไป.

ผลการวิเคราะห์สารประกอบในเทรตที่สังเคราะห์ได้ ด้วย Fourier-Transform NMR Spectrometer (FT-NMR)

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบในเทรต ที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังรูปที่ 3.13.



รูปที่ 3.13 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบในเทรต ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl_3)

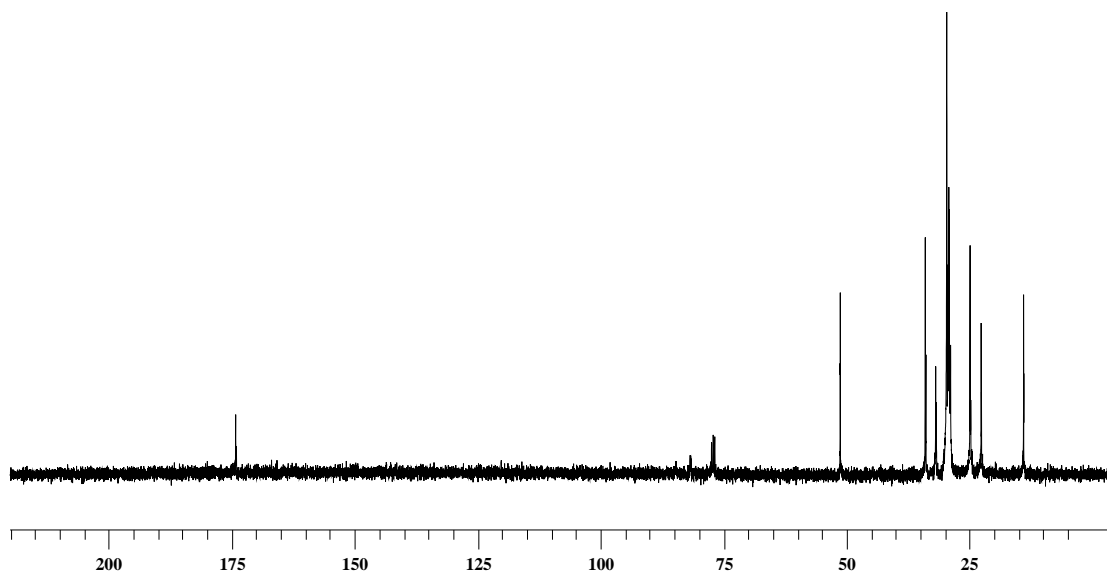
สัญญาณสำคัญที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบในเทรต แสดงได้ดัง ตารางที่ 3.9.

ตารางที่ 3.9 Assignments $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จาก กลีเซอริน

| Position of Proton | Multiplicity | Chemical Shift (δ ,ppm) |
|---------------------------|--------------|---------------------------------|
| a | m | 0.75-0.81 |
| b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p | m | 1.12-1.59 |
| q | t | 2.26-2.24 |
| s | s | 3.56 |
| i,j | m | 5.06-5.16 |

เมื่อเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังรูปที่ 3.13 กับสเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์ และดังรูปที่ 3.9 จะสังเกตเห็นได้ว่า สัญญาณระหว่าง δ_{H} 3.18 ถึง 3.26 ppm เป็นสัญญาณจากโปรตอนของคาร์บอนที่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลหายไปเนื่องจากการฟอร์มตัวของสารประกอบไนเตรด, ดังนั้น สัญญาณที่ δ_{H} 5.06 ppm ถึง δ_{H} 5.16 ppm จึงมาจากโปรตอนของคาร์บอนในหมู่ไนเตรด.

$^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังรูปที่ 3.14.



รูปที่ 3.14 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน (CDCl_3)

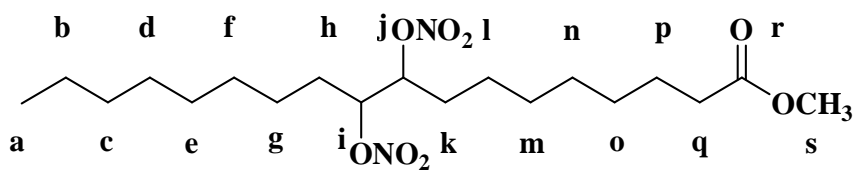
สัญญาณสำคัญที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัม ของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้ แสดงดังตารางที่ 3.10.

ตารางที่ 3.10 Assignments $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

| Position of Carbon | Chemical Shift (δ ,ppm) |
|---------------------------|---------------------------------|
| a | 13.79 |
| b,c,d,e,f,g,h,k,l,m,n,o,p | 22.34-31.84 |
| q | 33.92 |
| s | 51.19 |
| ij | 81.62-81.67 |
| r | 174.06 |

เมื่อเปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดดังรูปที่ 3.14 กับ $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบอีพอกไซด์รูปที่ 3.10 สังเกตพบว่า สัญญาณของคาร์บอนที่ δ_c 81.62 to 81.67 ppm เป็นของคาร์บอนที่ต่ออยู่กับหมู่ไนเตรด.

จากผลข้อมูลสเปกตรัมทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จากสารประกอบอีพอกไซด์คือ สารประกอบไนเตรด และมีสูตรโครงสร้างเป็นดังนี้ :



Glycerine nitrate

รูปที่ 3.15 สูตรโครงสร้างที่แสดง Assignments $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสารประกอบไนเตรดที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

3.3 ผลการทดลองหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

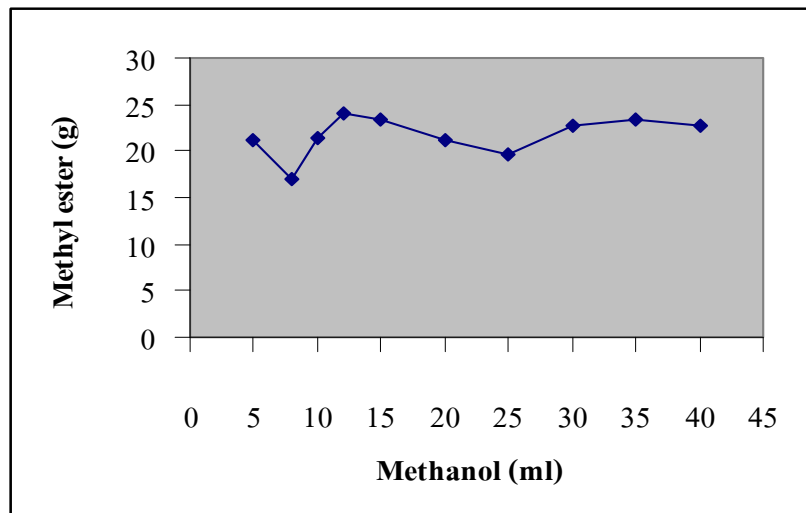
การปรับสภาวะการสังเคราะห์โดยการแปรผันปริมาณเมทานอล ปริมาณกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 96 % และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา, เพื่อหาสภาวะที่ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด ผลการทดลองเป็น ดังนี้ :

3.3.1 ผลการทดลองแปรผันปริมาณเมทานอล

เมื่อทดลองแปรผันปริมาณเมทานอล 10 ปริมาตรคือ 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 มิลลิลิตร โดยใช้กลีเซอริน 50 กรัม, ไดคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาณ 8 มิลลิลิตร, Reflux ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, แล้วชั่งปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้. ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 3.11 และรูปที่ 3.16.

ตารางที่ 3.11 ผลการทดลองแปรผันปริมาณเมทานอลในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

| No. | Glycerine (g) | Methanol (ml) | H ₂ SO ₄ (ml) | Time (hr.) | Methyl ester (g) | Yield (%) |
|-----|---------------|---------------|-------------------------------------|------------|------------------|-----------|
| 1 | 50 | 5 | 8 | 3 | 21.2 | 42.4 |
| 2 | 50 | 8 | 8 | 3 | 17.1 | 34.1 |
| 3 | 50 | 10 | 8 | 3 | 21.4 | 42.9 |
| 4 | 50 | 12 | 8 | 3 | 23.9 | 47.9 |
| 5 | 50 | 15 | 8 | 3 | 23.4 | 46.9 |
| 6 | 50 | 20 | 8 | 3 | 21.1 | 42.2 |
| 7 | 50 | 25 | 8 | 3 | 19.7 | 39.4 |
| 8 | 50 | 30 | 8 | 3 | 22.7 | 45.5 |
| 9 | 50 | 35 | 8 | 3 | 23.4 | 46.9 |
| 10 | 50 | 40 | 8 | 3 | 22.7 | 45.5 |



รูปที่ 3.16 ผลการทดลองแปรผันปริมาณเมทานอลในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

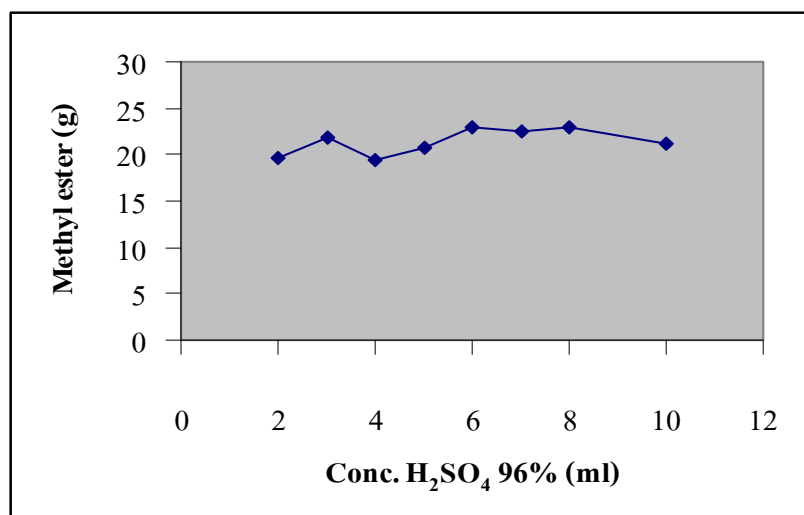
จากการทดลองแปรผันปริมาณเมทานอลในช่วง 5-40 มิลลิลิตร พบว่า การใช้เมทานอล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร เป็นปริมาตรที่ให้เมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดคือ 47.88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองหาปริมาณกรดซัลฟิวริกในการทดลองที่ 2.3.2 ต่อไป.

3.3.2 ผลการทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96%

เมื่อทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% จำนวน 8 ปริมาตรคือ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 10 มิลลิลิตร โดยใช้กลีเซอริน 50 กรัม, ไคคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร และเมทานอล 8 มิลลิลิตร, Reflux ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง, แล้วชั่งปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้. สังเคราะห์ได้ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 3.12 และรูปที่ 3.17.

ตารางที่ 3.12 ผลการทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

| No. | Glycerine (g) | Methanol (ml) | H ₂ SO ₄ (ml) | Time (hr.) | Methyl ester (g) | %Yield |
|-----|---------------|---------------|-------------------------------------|------------|------------------|--------|
| 1 | 50 | 12 | 2 | 3 | 19.5 | 39.1 |
| 2 | 50 | 12 | 3 | 3 | 21.7 | 43.5 |
| 3 | 50 | 12 | 4 | 3 | 19.3 | 38.7 |
| 4 | 50 | 12 | 5 | 3 | 20.8 | 41.6 |
| 5 | 50 | 12 | 6 | 3 | 23.0 | 45.9 |
| 6 | 50 | 12 | 7 | 3 | 22.4 | 44.9 |
| 7 | 50 | 12 | 8 | 3 | 22.9 | 45.8 |
| 8 | 50 | 12 | 10 | 3 | 21.2 | 42.3 |



รูปที่ 3.17 ผลการทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

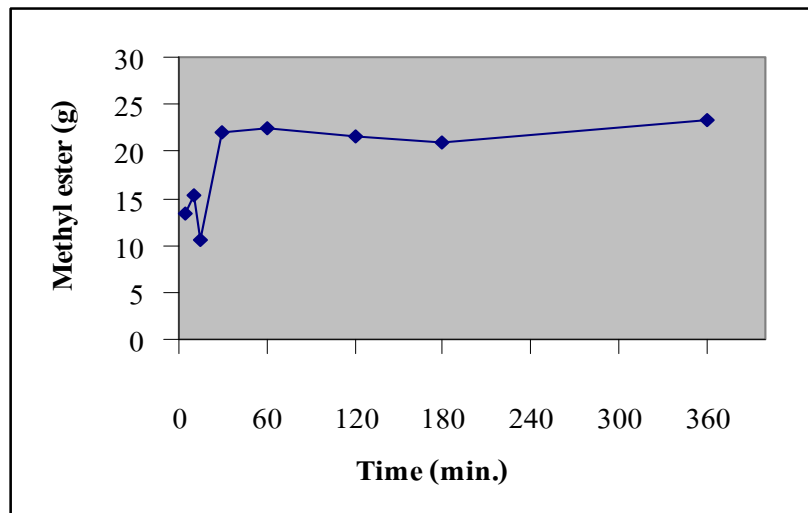
จากการทดลองแปรผันปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ในช่วง 2-10 มิลลิลิตร พบว่า การใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เป็นปริมาตรที่ให้เมทิลเอสเทอร์สูงสุดคือ 45.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองหาระยะเวลาในการทดลองที่ 2.3.3 ต่อไป.

3.3.3 ผลการทดลองแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

เมื่อใช้กลีเซอริน 50 กรัม เมทานอล 12 มิลลิลิตร ไดคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96 % ปริมาตร 6 มิลลิลิตร, แล้วกลั่น (Reflux) ส่วนผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 8 ครั้ง และเป็นเวลา 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 และ 360 นาที. ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 3.13 และรูปที่ 3.18.

ตารางที่ 3.13 ผลการทดลองแปรผันเวลาในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

| No. | Glycerine (g) | Methanol (ml) | H ₂ SO ₄ (ml) | Time (hr.) | Methyl ester (g) | Yield (%) |
|-----|------------------|------------------|--|---------------|---------------------|--------------|
| 1 | 50 | 12 | 6 | 5 | 13.5 | 27.0 |
| 2 | 50 | 12 | 6 | 10 | 15.3 | 30.6 |
| 3 | 50 | 12 | 6 | 15 | 10.5 | 21.1 |
| 4 | 50 | 12 | 6 | 30 | 21.9 | 43.8 |
| 5 | 50 | 12 | 6 | 60 | 22.4 | 44.8 |
| 6 | 50 | 12 | 6 | 120 | 21.6 | 43.1 |
| 7 | 50 | 12 | 6 | 180 | 21.0 | 41.9 |
| 8 | 50 | 12 | 6 | 360 | 23.2 | 46.5 |



รูปที่ 3.18 ผลการทดลองแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

จากการทดลองแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วง 5-360 นาที พบว่า การ Reflux นาน 360 นาที เป็นระยะเวลาที่ทำให้ เมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดคือ 46.46 เปอร์เซ็นต์.

สรุปได้ว่า สภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ให้ได้ปริมาณสูงที่สุดคือการใช้ เมทานอล 12 มิลลิลิตร, กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% ปริมาณ 6 มิลลิลิตร และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 360 นาที หรือ 6 ชั่วโมง.

4. สรุปผลการทดลอง

1. การสังเคราะห์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่จากกลีเซอริน

1.1 การสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ (Glycerine methyl ester) โดยใช้ผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ยังไม่ผ่านการแยกกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระออกสามารถเตรียมผลิตภัณฑ์ได้ 45 เปอร์เซ็นต์.

1.2 การสังเคราะห์สารประกอบอีพอกไซด์ (Glycerine epoxide) สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์ได้ 86 เปอร์เซ็นต์เมื่อคิดเทียบกับเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากข้อ 4.1.1.

1.3 การสังเคราะห์สารประกอบไนเตรต (Glycerine nitrate) สามารถเตรียมผลิตภัณฑ์ได้ 68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคิดเทียบกับเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากข้อ 4.1.2.

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

2.1 Fourier-Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

2.2 Fourier-Transform NMR Spectrometer (FT-NMR)

สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โปรตอนและคาร์บอน แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี.

2.2.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์เมทิลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

2.2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบอีพอกไซด์ที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

2.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบไนเตรตที่สังเคราะห์ได้จากกลีเซอริน

3. การทดลองหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

การทดลองแปรผันปริมาณเมทานอล ปริมาณกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา พบว่า สภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ให้ได้ปริมาณสูงที่สุดคือการใช้:

| | |
|-----------------------------------|----------------|
| เมทานอล | 12 มิลลิลิตร |
| กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96% | 6 มิลลิลิตร |
| ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ | 6 ชั่วโมง |
| สามารถสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้ | 46 เปอร์เซ็นต์ |

5. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาคุณสมบัติความสามารถในการเป็นไบโอดีเซลหลายหน้าที่ โดยมุ่งเน้นการเพิ่มค่าซีเทนของไบโอดีเซล, ทำให้การจุดระเบิดของเครื่องยนต์ดีขึ้น. นอกจากนี้ ควรมีศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารหล่อลื่นที่ดีของไบโอดีเซลแบบหลายหน้าที่ที่สังเคราะห์ขึ้น. ศึกษาการเพิ่มผลผลิตในขั้นตอนการทำไบโอดีเซล.

ควรมีการพัฒนาสารหล่อลื่นไบโอดีเซลสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อส่งเสริมระบบการผลิตที่ปลอดภัย และเป็นการเพิ่มมูลค่าและพัฒนาารูปแบบของการใช้ไบโอดีเซลในอุตสาหกรรมอาหาร. โดยควรมีศึกษาด้านความคงสภาพของสารหล่อลื่นไบโอดีเซล, ความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ของสารหล่อลื่นไบโอดีเซล, คุณสมบัติทางเคมีเรื่องสารตกค้างและสารปนเปื้อนของสารหล่อลื่นไบโอดีเซล.

6. เอกสารอ้างอิง

- เจนวนิชปัญจกุล, พิสมัย; ศรีวิจิตร, เดโช; ศรีกำไลทอง, สุมาลัย และศรารุช วรสุมนต์. 2525. การใช้น้ำมันพืชแทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ดีเซล. การประชุมวิชาการครั้งที่ 20, กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เจนวนิชปัญจกุล, พิสมัย. 2549. ไบโอดีเซล พลังงานทางเลือก, [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://www.tistr.or.th> [เข้าถึงเมื่อ 24 กันยายน 2549].
- ศรีรอด, กล้าณรงค์. 2546. การศึกษาสถานภาพวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- Anastopoulos, G.; Lois, E. ; Serdari, A., Zanikos, F. ; Stournas, S. and Kalligerus, S. 2001. Lubrication properties of low-sulfur diesel fuels in the presence of specific types of fatty acid derivative. *Energy & Fuels*, **15**, pp. 106-112.
- Anastopoulos, G.;Lois, E.;Zanikos, F. and Kalligeros,S, 2001. A Preliminary evaluation of esters of monocarboxylic fatty acid on the lubrication properties of diesel fuel. *Ind.Eng.Chem.Res*, **40**, pp. 452-456.
- Barnwal, B.K. and Sharma, M.P., 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **9**, : pp. 363-378.
- Boonlaksiri, C., 2003. Synthesis of diol nitrate compounds from fatty acid wastes as cetane improver. Master's Thesis, Program of Petrochemistry and Polymer Science, Graduate School, Bangkok : Chulalongkorn University.
- Dmytryshyn, S.L.; Dalai, A.K.; Chaudhari, S.T. ; Mishra, H.K. and Reaney M. J., 2004. Synthesis and characterization of vegetable derived ester : evaluation for their diesel additive properties. *Bioresource Technology*., **92** : pp. 55-64.
- Drown, D.C.; Harper, K. and Frame, E., 2001. Screening vegetable oil alcohol esters as fuel lubricity enhancers. *J. Am. Oil. Chem. Soc*, **78**, pp. 579-584.
- Eiamsupasawat, K., 1999. Synthesis of lubricating base oil from rice bran oil. Master's Thesis, Program of Petrochemistry and Polymer Science, Graduate School, Bangkok : Chulalongkorn University.
- Felizardo, P. ; Correia, J. N. M.; Raposo, I. ; Mendes, J. F. ; Berkemeier, R. and Bordado, J. M., 2005. Production of biodiesel from waste frying oils. *A Waste Management*.

- Fermo, M.W.; Jungermann, E. and Norris, F.A. 1979. Bailey's Industrial Oil and Fat Product. 4th ed. New York : John Wiley&Sons, pp. 335-434.
- Filly, J., 2004. New lubricants from vegetable oil : cyclic acetals of methyl 9, 10-dihydroxy stearate. *Bioresource Technology*.
- Freedman, B., Butterfield, R. O. and Pryde, E. H. 1986. Transesterification kinetics of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc*, **63** (10), pp. 1375–80.
- Fukuda, H. ; Hondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *J. of Bioscien. and Bioeng*, **92**, pp. 405-416.
- Geller, P. and Goodrum, W., 2004. Effects of specific fatty acid methyl esters on diesel fuel lubricity. *Fuel*, **83**, pp. 2351-2356.
- Hass, M. J; Scott. K.M.; Alleman, T.L. and McCornick, R.L., 2001. Engine Performance of biodiesel fuel prepared from soybean soapstock : A High Quality Renewable Fuel Production from a Waste Feedstock. *Energy & Fuel*, **15**, pp. 1207-1212.
- Hobson, G.D., 1984. Modern Petroleum Technology Part 2. 5th ed. New York : John Wiley & Sons, 821-823.
- Khankasikram, T., 2001. Synthesis of cycloalkyl nitrate compounds from cycloaliphatic monoalcohol as cetane improvers. Master's Thesis, Program of Petrochemistry and Polymer Science, Graduate School, Chulalongkorn University.
- Kobitz, W., 1999. Biodiesel development status worldwide. *In Proceeding of the 1998 PORIM International Biodiesel and Lubicant Conference*. PORIM, Malaysia. pp. 3-22.
- Kusdiana, D. and Saka, S. 2001. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. *Fuel*, **80**, pp. 693-698.
- Loudon, G.M., 1995. Organic Chemistry. 3rd ed. Red Wood: Benjamin/Cummings.
- Ma, F. and Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, **70**, pp. 1-5.
- Meher, L.C.; Sagar, V. D. and Naik N. S., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*., **10**, pp.248–268.
- Nikanjam, M., 1995. *Low Emission Diesel fuel*, **5**(389), pp. 111.

- Pongthanomsak, C., 2003. Synthesis of nitrates compound from vegetable oils as cetane improver. Master's Thesis, Program of Petrochemistry and Polymer Science, Graduate School, Bangkok : Chulalongkorn University.
- Rodinger, W., 1994. Neue Daten zur Umweltverträglichkeit von RME im Vergleich zu Diesel kraftstoff. Bundesanstalt für Wassergüte, Vienna, Austria.
- Schobert, H.H., 1991. The Chemistry of Hydrocarbon Fuels. 2nd ed. London : Butterworth-Heinemann, pp. 197-202.
- Schuchardt, U. ; Sercheli, R. and Vargas, R. M., 1998. Transesterification of vegetable oils : a review. *J. Braz Chem Soc*, **9**, pp. 199–210.
- Shay, E. G. 1993. Diesel fuel from vegetable oil : status and opportunities. *Biomass Bioenergy*, **4**, pp. 227–42.
- Song, C.; Hsu, C.S. and Mochida, I., 2000. Chemistry of Diesel Fuels. New York : Taylor & Francis, **43**, pp. 32-35, 199-212.
- Sroisopee, W., 2003. Lubricity additives for diesel by amidation of vegetable oils. Bangkok : Master's Thesis, Program of Petrochemistry and Polymer Science, Graduate School. Bangkok : Chulalongkorn University.
- Srivastava, A. and Prasad, R., 2000. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew Sustain Energy Rev*, **4**, pp. 111–33.
- Suppes, G.J.; Goff, M.; Burkhart L. and Bockwinkel, K. 2001. Multifunctional diesel fuel additives from triglycerides. *Energy & Fuels*, **15**, pp.151-157.
- Tomasevic, A.V. and Siler-Marinkovic, S.S., 2003. Methanolysis of used frying oil Fuel. *Processing Technology*, **81**, pp.1 – 6.
- Virgil, B.G. 1960. Petroleum Products Handbook. 1st ed. New York : McGraw-Hill, **6** (2) Bangkok : pp. 6-11.
- Wongchanta, W. 1997. Synthesis of diesels as diesel fuel maker from palm oil. Master's Thesis. Program of Chemistry, Graduate School, Bangkok : Chulalongkorn University.