

รายงานการวิจัย

การแยกและการคัดเลือกเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุง
คุณภาพน้ำมันสบู่ดำ

Isolation and screening lipase producing fungi for quality improvement of Jatropha oil



RCH
QP
609
.L5
06587
ด.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

115493
15 ส.ค. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12311959
i.

การแยกและการคัดเลือกยีสต์ราเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันสบู่ดำ

Isolation and screening lipase producing fungi for quality improvement of Jatropha oil

แหล่งเงิน

ประจำปีงบประมาณ 2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2552 ถึง กันยายน 2553

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานสังกัดและอีเมล

รศ. อารี ฤทธิบุรณ์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำสำคัญ Screening, fungi, lipase, Jathopha oil

บทคัดย่อ

ทำการเก็บตัวอย่างและคัดเลือกเชื้อราในวัสดุและเศษเหลือในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันประเภทต่างๆ ได้เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสในอาหาร Tributylin agar ได้จำนวน 200 สายพันธุ์ และเมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์จากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ทำการคัดแยกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สายพันธุ์ LPP/45-21 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเท่ากับ 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ LPP/45-21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* sp.

เมื่อนำเชื้อราชนิดนี้มาทำการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเล็ต และอัตราการรอดของเชื้อไม่เกินร้อยละ 10 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมากขึ้น พบว่าเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต 3.6 นาที จะให้อัตราการรอดร้อยละ 10

Abstract

Selection and screening of fungi from materials and waste in oil industrial production and the isolated fungi have the ability to produce lipases in Tributylin agar was included 200 species and determined on the activities of lipase in liquid substrate fermentation with jatropha oil as a carbon source was C LP/45-21 strain can produce a maximum lipase was 0.03 units per ml. When study of the morphological characteristics of the LPP/45-21 strain under a microscope. It was found that a fungal strain was *Aspergillus* sp.

When the fungus was induced mutation by ultraviolet light and the survival rate of mutant strains were not more than 10 percent in order to select mutants that have the potential to produce more lipase. It was found that ultraviolet radiation at the 3.6 minutes of survival rates 10 percent.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี 2553 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และศักยภาพของการทำงานวิจัยที่ได้รับจากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทั้งด้านสาธารณูปโภค เครื่องมือ และอุปกรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ดิฉันขอขอบพระคุณผู้ช่วยวิจัย นางสาวสุนิษา ปั่นสุข ที่อุทิศกำลังกาย กำลังใจ และเวลาในการทำงานวิจัยให้ประสบความสำเร็จ

รศ. อารี ฤทธิบูรณ์



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	I
กิตติกรรมประกาศ.....	II
สารบัญ.....	III
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญรูป.....	VI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของ โครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง.....	2
2.1 ลักษณะสบู่ดำ	4
2.2 ประโยชน์ของสบู่ดำ	4
2.3 คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำ.....	5
2.4 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	4
2.5 การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส.....	8
2.6 คุณสมบัติของน้ำมันพืช และไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล.....	9
2.7 การใช้น้ำมันสบู่ดำผลิตไบโอดีเซล.....	10
2.8 เอนไซม์ไลเปส.....	11
2.9 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์.....	13
2.10 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส.....	13
2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส.....	14
2.12 แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography)	16
2.13 การประยุกต์ใช้งานแก๊สโครมาโตกราฟี.....	17
2.14 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1 วัตถุประสงค์.....	19
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	19
3.3 สารเคมี.....	19
3.4 อุปกรณ์.....	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ.....	20
3.5.1 เตรียมตัวอย่าง (ตัวอย่างจากดิน)	20
3.5.2 คัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างวงใสในอาหารแข็ง tributyrin agar.....	20
3.5.3 คัดเลือกเชื้อที่สามารถใช้ในสบู่อัดเป็นแหล่งคาร์บอน.....	21
3.5.4 การกลายพันธุ์เชื้อราที่คัดเลือกแล้ว.....	21
3.5.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	23
4.1 เลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานผลิตน้ำมันแหล่งต่างๆ.....	23
4.2 ศึกษาอัตราการอยู่รอดเชื้อราหลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างๆ.....	26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	27
บรรณานุกรม.....	28
ภาคผนวก ก	30
ภาคผนวก ข	32



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันจากสบู่ดำ.....	5
2 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	8
3 คุณสมบัติของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ.....	9
4 คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำและไบโอดีเซล.....	10
4.1 แสดงตัวอย่างที่นำมาคัดเลือดเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ไลเปสและหมายเลขเชื้อ.....	23
4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา 20 โคลนนี้จากการคัดเลือดซ้ำ.....	24
ก1 แสดงจำนวนมิลลิลิตรระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ที่ความเป็นกรดต่างๆ.....	30
ข1 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95.....	33



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ปฏิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจากไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์.....	6
2 ปฏิริยาสaponification จากกรดไขมันอิสระโดยความร้อน.....	7
3 ปฏิริยาสaponification จากเอสเทอร์ในปฏิริยาที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ.....	7
4 ปฏิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดจากกรดไขมันอิสระ.....	7
5 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบส (ก) และไลเปส (ข) เป็นตัวเร่งปฏิริยา.....	9
6 การแบ่งอนุไซม์ไลเปสตามความจำเพาะ.....	12
7 ปฏิริยาการทำงานของอนุไซม์ไลเปส.....	13
8 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง gas chromatography.....	16
9 แสดงลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องบันทึกข้อมูลของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี.....	16
4.1 ลักษณะของเชื้อราที่คัดเลือกได้จากกล้องจุลทรรศน์.....	25
4.2 กราฟแสดงอัตราการย่อยและการอยู่รอดของเชื้อราที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ...	26
ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายในโครมาโตแกรมที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดการดูดแสงที่ 410 นาโนเมตร.....	32

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงที่สูงมากในปัจจุบันส่งผลให้พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่ได้จากฟอสซิล (Fossil Fuel) ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และมีแนวโน้มที่จะหมดลงในไม่ช้านี้ จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยน้ำมันที่สามารถช่วยลดปัญหาเหล่านี้

ไบโอดีเซล (Biodiesel) จึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่ง ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงสำรองได้ในภาคครัวเรือน เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นพืชน้ำมันที่มีปลูกอยู่เกือบทุกภาคของประเทศไทย อาทิเช่น มะพร้าว ปาล์ม ทานตะวัน ถั่วเหลือง และสบู่ดำพืชที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงในขณะนี้รวมไปถึงไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหารตรงจุดนี้เองที่ทำให้ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่เชื้อเพลิงที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมากและยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันที่ได้จากฟอสซิล (ศศิธร, 2544)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เป็นวิธีการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันวิธีหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมในการสังเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซล เนื่องจากทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ กระบวนการไม่ยุ่งยาก เป็นกระบวนการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีทั้งใช้กรด เบส และเอนไซม์ไลเปสเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ แอลคิลเอสเทอร์ โดยทั่วไปการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นที่นิยมเนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานั้น แต่การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดอยู่หลายประการคือ มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากผลิตภัณฑ์มากใช้ ต้องใช้พลังงานสูงในการเกิด ปฏิกิริยา (ปวีณา, 2547)

ดังนั้นการใช้เอนไซม์ไลเปสจึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งการใช้เอนไซม์นั้น มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ช่วยลดความหนืดน้ำมันจะได้ผลผลิตต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันนี้ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปส ที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก ควบคุมได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มี คุณสมบัติต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการผลิต แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสยังมีข้อจำกัดในด้านราคา สายพันธุ์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ และความคงตัวของไลเปสในบางสายพันธุ์ (ปวีณา, 2547) ซึ่งการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะนำมาสังเคราะห์เอนไซม์ก่อนที่จะนำเอนไซม์ไปทำปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นแนวทางที่จะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ลงได้ ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา เพื่อหาสายพันธุ์ที่ดีมีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสและการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์สังเคราะห์จากเชื้อราเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ในปัจจุบันการเกษตรไทยมีการปลูกสับดูดำ และการสกัดน้ำมันกรองและนำมาใช้กับเครื่องยนต์ ความเร็วรอบต่ำ เช่น รถไถนาขนาดเล็ก แต่ไม่สามารถนำมาใช้กับรถยนต์ประเภทที่ใช้ น้ำมันดีเซลได้ เนื่องจากสับดูดำยังมีความหนืดสูงมาก จึงต้องมีการนำน้ำมันจากสับดูดำ มาปรับปรุงคุณภาพ เป็น ไบโอดีเซล ซึ่งสามารถทดแทนน้ำมันที่ได้จากฟอสซิลได้ ซึ่งวิธีการผลิตน้ำมัน ไบโอดีเซลที่ใช้วิธีการเอสเทอร์ฟิเคชัน จำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งอาจจะเป็นกรด เบส หรือเอนไซม์ การแยก การคัดเลือก และการทำการกลายพันธุ์เชื้อจากดิน และ โรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันจึง เป็นแนวทางการใช้สารทางชีวภาพในการเร่งปฏิกิริยานี้ เพื่อการใช้ผลิตไบโอดีเซลเป็นทางการค้าในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อราจากตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำมันพืชที่มีความสามารถในการผลิต เอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันจากสับดูดำ
- 1.2.2 ทำการคัดเลือกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูง
- 1.2.3 เมื่อทำการกลายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส และคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ กลาย (mutant) ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type)
- 1.2.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และการผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจาก การใช้เอนไซม์ไลเปสจากการกลายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการแยกและคัดเลือกเชื้อราจากตัวอย่างดิน และตัวอย่างพืชน้ำมันชนิดต่างๆที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และสามารถย่อยน้ำมันจากสับดูดำได้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูง และคัดเลือกสายพันธุ์ดั้งเดิมเหล่านี้มาทำการกลายพันธุ์เชื้อ โดยวิธีใช้สารเคมีใช้รังสีอัลตราไวโอเลตหรือรังสีชนิดอื่นๆ และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยการเปรียบเทียบเชิงปริมาณและคุณภาพ จากนั้นนำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มาผลิตเอนไซม์ไลเปส และนำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันน้ำมันจากสับดูดำ ในรูปเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ที่สกัดออกมาหรือเลี้ยงเซลล์ในน้ำมัน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่ขายในทางการค้า โดยวิธีการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเครื่อง Gas chromatography

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน(ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล (Biomass) สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับยานพาหนะได้ โดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไบโอดีเซล (diesel) จึงสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ อีกทั้งยังช่วยรักษาสภาพเครื่องยนต์อีกด้วย เนื่องจากออกซิเจนในไบโอดีเซลให้การสันดาปที่ดีกว่าดีเซลปกติ ทำให้มีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงช่วยลดการอุดตันของระบบไอเสีย นอกจากนี้ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงสะอาด กล่าวคือไม่มีแก๊สซัลเฟอร์ (sulfur) จากการเผาไหม้และไม่

ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ การใช้ไบโอดีเซลสามารถลดปรากฏการณ์ฝนกรด ปรากฏการณ์เรือนกระจก ลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ (CO) กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ (NO) กลุ่มซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO) และสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่สมบูรณ์ลงได้ (Fukuda, และคณะ, 2006) ทำให้ไบโอดีเซลได้รับความสนใจมาดในปัจจุบัน

อย่างไรก็ดีสารชีวมวลที่ได้จากพืช หรือน้ำมันจากสัตว์ชนิดต่างๆไม่สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยตรง เนื่องจากน้ำมันเหล่านี้มีค่าความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลประมาณ 10-20 เท่า มีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันอิสระที่อยู่ในน้ำมัน และยางเหนียว (gum) เนื่องจากปฏิกิริยาการรวมตัวกับออกซิเจน (oxidation) การตกตะกอนของคาร์บอน และปฏิกิริยาเกิดเป็นโพลิเมอร์ (polymerization) ในขั้นตอนการเก็บ และการเผาไหม้ (combustion) มีน้ำเป็นองค์ประกอบเป็นต้น จึงมีผู้ที่ดัดแปลงคุณภาพของน้ำมันต่างๆ ให้ใกล้เคียงกับคุณสมบัติของน้ำมันดีเซล โดยทำได้หลายวิธีคือ การเจือจาง (dilution) ไมโครอิมัลชัน (microemulsification) ไพโรไลซิส (pyrolysis) และ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transterification)



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ

2. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง น้ำมันที่ได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่เกษตรกรใช้ได้โดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค ใช้ปลูกเป็นแนวรั้วเพื่อป้องกันสัตว์เลื้อยเข้าไปทำลายผลผลิต เนื่องจากมีสารพิษ Hydrocyanic มีกลิ่นเหม็นเขียว สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในสถานะที่ราคาน้ำมันดีเซลมีราคาสูงอย่างปัจจุบัน สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas Linn.* อยู่ในวงศ์ไม้ยางพารา ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกส นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย ในช่วงสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อนำมาบีบสำหรับทำสบู่ ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วประเทศ ประเทศไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคเหนือเรียกว่ามะหุ้งฮั่ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามะเยาหรือสีหลอด ภาคใต้เรียกว่ามาเคาะ (<http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.html>)

2.1 ลักษณะสบู่ดำ

ต้นสบู่ดำ เป็น ไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง ความสูง 2-7 เมตร ลำต้นและดอกคล้ายละหุ่ง แต่ไม่มีขน ลำต้นเกลี้ยงเกล่าใช้มือหักได้ง่ายเพราะเนื้อไม้ไม่มีแก่น ใบหยักคล้ายใบละหุ่งแต่หยักตื้นกว่ามี 4 หยัก

ดอกสบู่ดำ ดอกสบู่ดำเป็นช่อกระจุกที่ข้อสวนปลาย ขนาดเล็ก มีกลิ่นหอมอ่อนๆ มีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมียในช่อเดียวกัน

ผลสบู่ดำ ผลมีลักษณะเป็นพู่ โดยส่วนมากมี 3 พู่ สีเขียวอ่อน เวลาสุกแก่จัดจะมีสีเหลือง อายุของผลสบู่ดำตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ ประมาณ 60-90 วัน

เมล็ดสบู่ดำ เมล็ดมีสีดำ ขนาดเล็กกว่าเมล็ดละหุ่งพันธุ์สายขาวดำเล็กน้อย สีตรงปลายเมล็ดมีจุดสีขาวเล็กๆติดอยู่ ความยาวประมาณ 1.7-1.9 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.8-0.9 เซนติเมตร น้ำหนัก 100 เมล็ดประมาณ 69.8 กรัม (<http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.html>)

2.2 ประโยชน์ของสบู่ดำ

2.2.1 ยางจากก้านใบ ใช้ป่ายรักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาว โดยผสมกับน้ำมันมารดาป้ายลิ้น

2.2.2 ลำต้น ตัดเป็นท่อนต้มน้ำให้เด็กกินแก้ซางตาลขโมย ตัดเป็นท่อนแช่น้ำอาบแก้โรคพุพอง ใช้เป็น แนวกันรั้วป้องกันสัตว์เลื้อย เช่น โค กระบือ ม้า แพะ เข้าทำลายผลผลิต

2.2.3 เมล็ดหีบเป็นน้ำมัน ใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล ใช้บำรุงรากผม ใช้เป็นนุ้ยอินทรี โดยใช้กากที่เหลือจากการหีบน้ำมัน ซึ่งมีธาตุอาหารหลัก มากกว่านุ้ยหมักและมูลสัตว์หลายชนิด ยกเว้นมูลไก่ที่มีฟอสฟอรัส และ โปรแตสเซียมมากกว่า และยังมีสารพิษ curcin มีฤทธิ์เหมือนสลอด เมื่อกินเข้าไปแล้วจะทำให้ท้องเดิน (<http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.html>)

2.3 คุณสมบัติของน้ำมันสุญต์

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันจากสบู่แสดงดังตารางที่ 1
 ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันจากสบู่

ค่าความถ่วงจำเพาะ	0.915
ดัชนีหักเห	1.4634
ค่าของกรด (AV), มิลลิกรัม KOH/กรัมไขมัน	0.99
ปริมาณกรดไขมันอิสระ, %	n/a
ค่าไอโอดีนแบบวิจส์, เซนติกรัม ไอโอดีน/กรัมไขมัน	101.40
ค่าความร้อน, กิโลแคลอรี/กรัม	145.20
ปริมาณน้ำและสิ่งที่ยระเหยได้, % น้ำหนัก	0.14
ค่าความหนืดที่ 40 องศาเซลเซียส, เซนติโตรก	40.29
ค่าสะปอนนิฟิเคชัน, มิลลิกรัม KOH/กรัมไขมัน	9,328

As laurin acid, %FFA (As lauric acid) = $AV/2.81$, n/a ไม่มีข้อมูล

ที่มา : วิศวกรรมสาร (2548)

2.4 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการต่างๆ ที่ปัจจุบันใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมีดังนี้ ทั้งที่เป็นแบบยากและง่าย แบบง่ายจะได้มาจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน และการผสมโดยตรง ตัวอย่างการผลิตดังต่อไปนี้ (Ma and Hanna, 1999)

2.4.1 การใช้โดยตรง (direct us and blending)

2.4.2 ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)

2.4.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermalcracking or pyrolysis)

2.4.4 กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งประกอบไปด้วยวิธีย่อยๆ คือ

2.4.4.1 สปอนนิฟิเคชัน (sponification)

2.4.4.2 เอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification)

2.4.1 การใช้โดยตรง (direct us and blending)

การใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรือผสมลงในน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ เพื่อต้องการลดความหนืดของน้ำมันพืช เมื่อนำมาใช้จะก่อปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถทำงานได้ดีกับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม แต่ก็มีปัญหาตามมาเกิดขึ้นตามมา เช่น มียางเหนียว เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระในระหว่างการเก็บรักษา หรือปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันจากขั้นตอนการเผาไหม้ ซึ่งลักษณะการเผาผลาญพลังงานระหว่างน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันดีเซลพบว่าเป็นไปในแบบเดียวกัน และมีการรายงานว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของน้ำมันพืชต่อน้ำดีเซล ในอัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

2.4.2 ไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่อยู่ในสถานะสมดุลของระบบสองวัฏภาค ระหว่างน้ำและน้ำมัน ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 1-5 นาโนเมตร ต้องมีสารช่วยลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดมีประจุและไม่ มีประจุเพื่อทำให้เกิดความคงสภาพ วิธีการทำไมโครอิมัลชันช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืด โดยใช้ สารละลาย เช่น แอลกอฮอล์ คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายกับน้ำมันไบโอดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

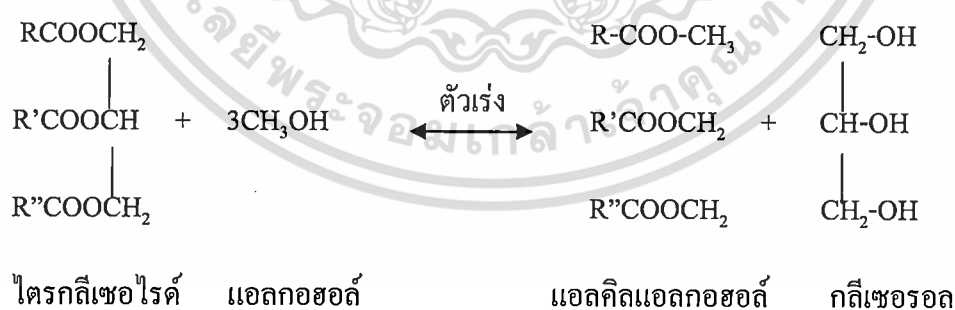
2.4.3 กระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่นโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 450-850 องศาเซลเซียส ไบโอดีเซลสามารถถูกไพโรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กกลงได้ แสดงดังรูปที่ 1 แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูก กำจัดออกไป ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้กระบวนการนี้มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มี คุณสมบัติเหมือนน้ำ มันเบนซินมากกว่าเกิดไบโอดีเซล

2.4.4 การบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไบโอดีเซลหรือน้ำมันพืช กับแอลกอฮอล์ เพื่อเปลี่ยนสารประกอบเป็นสารประกอบเอสเทอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาเป็นไปดังรูปที่ 1 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับและเติมแอลกอฮอล์มากเกินไปเพื่อเป็นการบังคับ ปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สัดส่วนโดย โมลของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันคือ 3:1 ซึ่งตัวเร่งที่ใช้ในสารละลายนี้มีทั้งสารละลายกรด สารละลายเบส และเอนไซม์ไลเปส

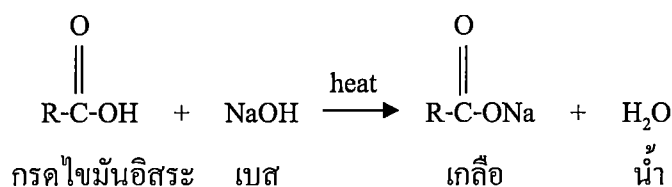
ในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้น ที่สุดและเป็นของเหลวที่มีขี้ผึ้ง ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้มากที่สุด



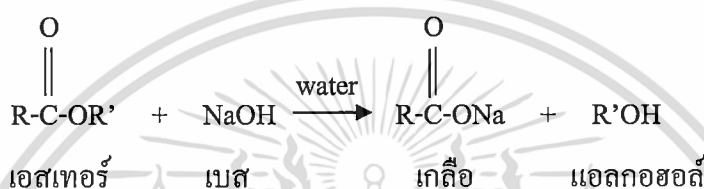
รูปที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจากไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์

2.4.4.1 สaponification

ปฏิกิริยาสaponification เป็นปฏิกิริยาการทำสบู่ สามารถเกิดได้จากสารตั้งต้นคือ กรดไขมันอิสระกับสารละลายเบสโดยมีน้ำร่วมอยู่ในปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2 และ 3



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาสaponification จากกรดไขมันอิสระ โดยความร้อน



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาสaponification จากเอสเทอร์ในปฏิกิริยาที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยาดังกล่าวคือ ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้เป็นแอลคิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลได้ แต่กลับทำให้กรดไขมันอิสระและแอลคิลเอสเทอร์เป็นสบู่ซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการ และทำให้ต้องกำจัดสบู่เหล่านั้นออกอีกด้วย

2.4.4.2 เอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดจากสารตั้งต้นหรือกรดไขมันอิสระ และแอลกอฮอล์ ได้สามผลิตภัณฑ์ คือ เอสเทอร์ ดังรูปที่ 4 ปฏิกิริยานี้เกิดได้โดยใช้เอนไซม์ไลเปส หรือใช้กรดแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดจากกรดไขมันอิสระ

2.5 การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

การผลิตแอลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเพิ่มอัตราเร็วโดยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด เบส กรด และเอนไซม์

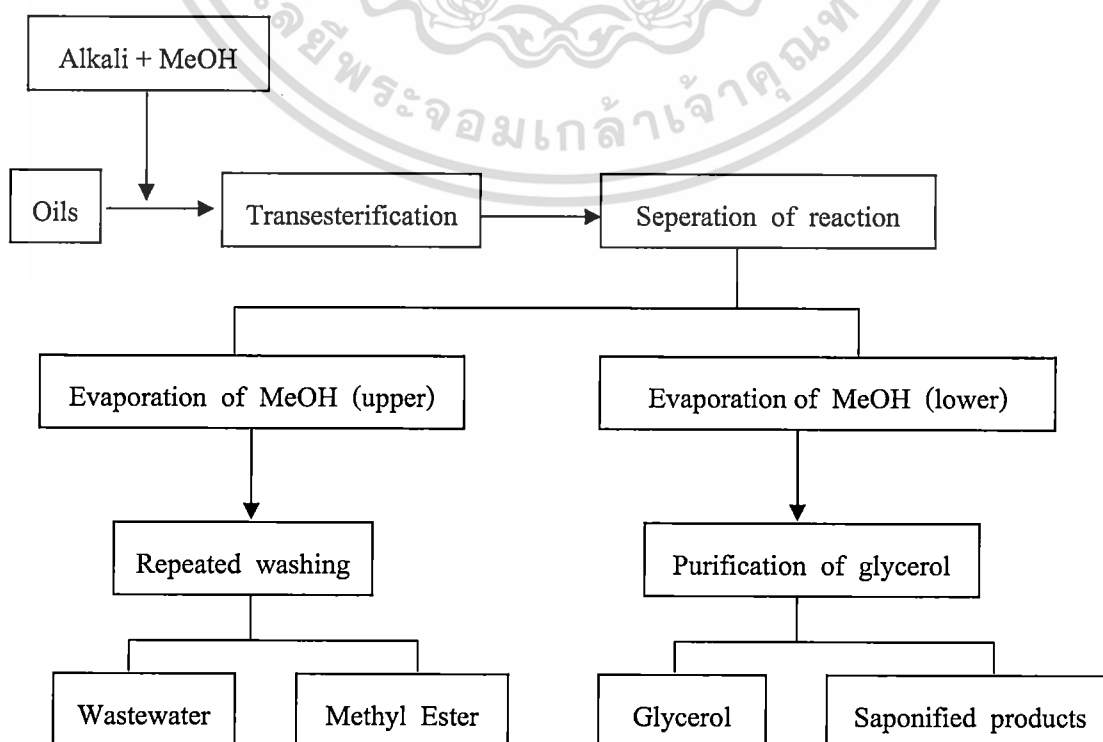
การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีข้อจำกัดดังนี้คือ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาโดยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ง่ายต่อการแยกกลีเซอรอล ไม่มีกระบวนการล้างที่ยุ่งยาก แต่การผลิตโดยใช้เอนไซม์ต้องใช้ต้นทุนสูง ดังตารางที่ 2 แผนภูมิการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้เบส และเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังแสดงใน รูปที่ 5

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

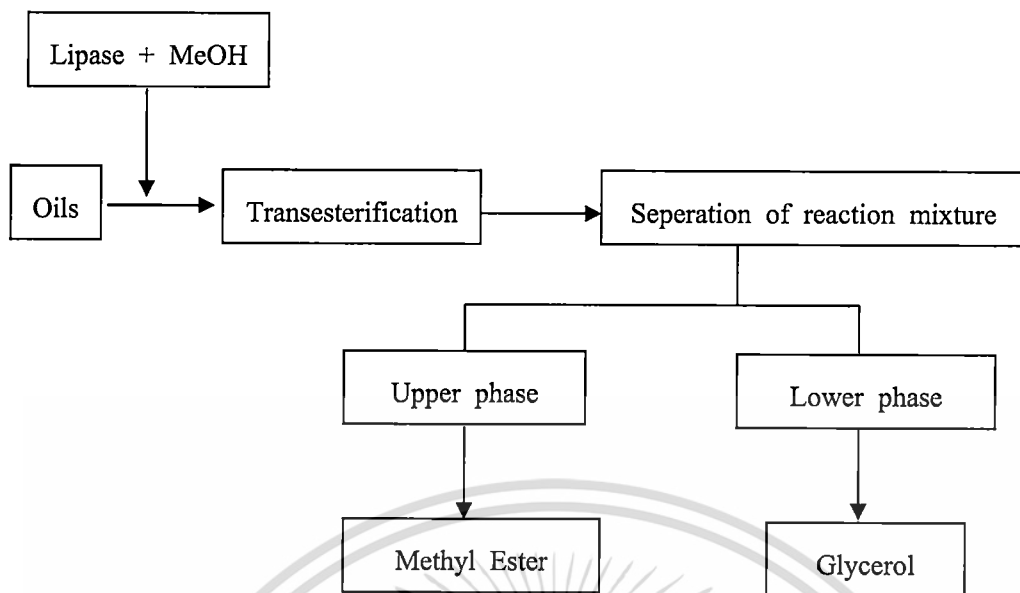
	Alkali-catalysis process	Lipase-catalysis process
Reaction Temperature	60-70 °C	30-40 °C
Free fatty acid in raw material	Saponified product	Methyl esters
Water in raw material	Interference with the reaction	No influence
Yield of methyl esters	Normal	Higher
Recovery of glycerol	Difficult	Easy
Purification of methyl ester	Repeated washing	None
Production cost of catalyst	Cheap	Relatively expensive

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

(ก)



(ข)



รูปที่ 5 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบส (ก) และไลเปส (ข) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

2.6 คุณสมบัติของน้ำมันพืช และไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล

น้ำมันพืชได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่มีพิษ และสามารถทดแทน น้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดี (Nouredini และคณะ, 2005) น้ำมันพืชส่วนใหญ่มีความหนืดสูง น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 600-900 ซึ่งสูงกว่าน้ำมันดีเซลถึง 20 จุดควมไฟ (flash point) ประมาณ 20 องศาเซลเซียส cetane member ประมาณ 32-40 ค่าความร้อนน้อยกว่าน้ำมันดีเซลประมาณร้อยละ 10 (Barnwal และ Sharma, 2004) ซึ่งคุณสมบัติของน้ำมันพืชชนิดต่างๆที่นิยมใช้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Vegetable oil methyl ester	Kinematic viscosity (mm ² /s)	Cetane number	Lower heating value (MJ/l)	Cloud point (°C)	Flash point (°C)	Density (g/l)	Sulfur, (wt%)
Peanut ^a	4.9 (37.8°C)	54	33.6	5	176	0.883	—
Soybean ^a	4.5 (37.8°C)	45	33.5	1	178	0.885	—
Soybean ^b	4.0 (40°C)	45.7-56	32.7	—	—	0.880 (15°C)	—
Babassu ^a	3.6 (37.8°C)	63	31.8	4	127	0.879	—
Palm ^a	5.7 (37.8°C)	62	33.5	13	164	0.880	—
Palm ^b	4.3-4.5 (40°C)	64.3-70	32.4	—	—	0.872-0.877 (15°C)	—
Sunflower ^a	4.6 (37.8°C)	49	33.5	1	183	0.860	—
Tallow ^a	—	—	—	12	96	—	—
Rapeseed ^b	4.2 (40°C)	51-59.7	32.8	—	—	0.882 (15°C)	—
Used rapeseed ^b	9.48 (30°C)	53	36.7	—	192	0.895	0.002
Used corn oil ^a	6.23 (30°C)	63.9	42.3	—	166	0.884	0.0013
Diesel fuel ^b	12-3.5 (40°C)	51	33.5	—	—	0.830-0.840 (15°C)	—
JIS-2D ^a (Gas oil)	2.8 (30°C)	58	42.7	—	59	0.833	0.05

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

น้ำมันพืชเป็นสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) มีโครงสร้างเป็น C_3H_5 ซึ่งเชื่อมต่อกับกรดไขมัน มีคาร์บอนตั้งแต่ 10-30 ตัว น้ำมันพืชและสัตว์มีกรดไขมันชนิดต่างๆกันเป็น 94-96 ของน้ำหนักโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ทำให้คุณสมบัติของน้ำมันแต่ละชนิดทั้งทางเคมี และกายภาพ แตกต่างกันไปตามคุณสมบัติของกรดไขมันนั้นๆ โดยทั่วไปน้ำมันพืชสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยตรงเนื่องจากมีค่าความร้อนสูง แต่ก็มีข้อจำกัดในทางกายภาพบางประการ เช่น มีความหนืดสูง ค่าการระเหยตัวต่ำ ทำให้การเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ และเกิดปัญหาการอุดตันในเครื่องยนต์ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาคุณภาพน้ำมัน พืชให้ มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลด้วยกระบวนการ transesterification ซึ่งการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืช หรือน้ำมันสัตว์ด้วยกระบวนการนี้เมื่อน้ำมันพืชถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์แล้วขนาดโมเลกุลจะลดลงเหลือ 1 ใน 3 เป็นผลทำให้ความหนืดของน้ำมันลดลงอย่างมากใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล

2.7 การใช้น้ำมันสบู่ดำผลิตไบโอดีเซล

น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสบู่ดำส่วนใหญ่ใช้ในเครื่องยนต์ทางการเกษตรซึ่งจากคุณสมบัติที่มีความหนืดสูงของน้ำมันทำให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องยนต์ที่มีความเร็วรอบสูงได้ น้ำมันพืช โดยเฉพาะน้ำมัน สบู่ดำมีจำนวนอะตอมคาร์บอนค่อนข้างสูง การเผาไหม้จึงเกิดไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดควันปริมาณมาก แต่เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำมีจุดวาบไฟที่สูงกว่าน้ำมันดีเซล จึงมีความปลอดภัยมากกว่า (Reddy และ Ramesh, 2006) คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำและไบโอดีเซลแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำและไบโอดีเซล

Poperti	Diesel	Jatropha. Curcas oil
Density (gm/cc), 30°C	0.836 - 0.850	0.93292
Kinematic viscosity (cSt), 30°C	4 - 8	52.76
Cetane No.	40 - 55	38.00
Flash point, °C	45 - 60	210.00
Calorific value, MJ/kg	42 - 46	38.20
Saponification value	-	198.00
Iodine No.	-	94.00

ที่มา : Pramanik (2003)

นอกจากปัญหาข้างต้นแล้วการใช้น้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ ที่ไม่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพอาจก่อให้เกิดปัญหาเครื่องยนต์ได้ เช่น การติดเครื่องยนต์ในขณะที่เครื่องยนต์เย็นจะสตาร์ทติดยากกว่าปกติแต่เมื่อเครื่องติดแล้วเครื่องจะเดินต่อเนื่องเป็นปกติไม่มีอาการดับ กรองน้ำมันเชื้อเพลิงเกิดการอุดตันเร็วกว่าปกติหากไม่มีระบบกรองน้ำมันที่ดีก่อนนำไปใช้ หากหยุดใช้เครื่องยนต์เป็นเวลานานๆจะเกิดยางเหนียวเกาะที่ปั๊มเชื้อเพลิงและหัวฉีดการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันอาจทำได้ โดยการผสมน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันดีเซลใน

อัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของน้ำมันสบู่มากกว่าร้อยละ 30 จะทำให้ไบโอดีเซลมีความหนืดสูงเมื่อเปรียบเทียบกับดีเซลธรรมดา (Ptamanik, 2003)

2.8 เอนไซม์ไลเปส

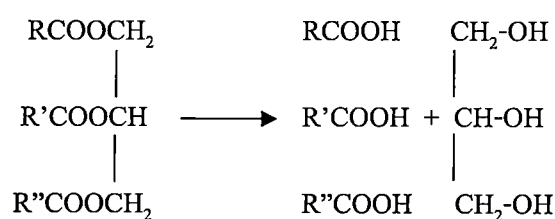
ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) มีชื่อตามระบบว่า systematic name ว่า *tryacylglycerol acylhydrolase* และมีชื่อเรียกตามรหัส หรือตามตัวเลข (Code or Mumber System) คือ E.C. 3.1.1.3 ไลเปสสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไลเปสได้รับความสนใจในการศึกษาคุณสมบัติทั้งด้านสรีรวิทยา และการนำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยมีน้ำเข้าร่วมทำปฏิกิริยา (hydrolysis) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจะช่วยย่อยสลายไขมันที่มีโครงสร้างทางเคมีจำเพาะเจาะจงแล้ว (reio-and enantiomeraselective hydrolysis) เอนไซม์ไลเปสยังสามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับความต่างกันของสารตั้งต้น (ปวีณา, 2547)

แหล่งเอนไซม์พบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกตามธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งอาจจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายใน และที่ปลดปล่อยออกมาจากภายนอกเซลล์ ไลเปสที่ได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์พบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูง และสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย (ปวีณา, 2547)

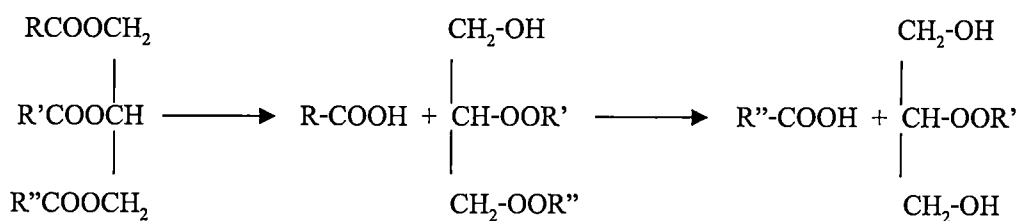
กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์และได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์ และ 2- โมโนกลีเซอไรด์ แต่ (1,2) (2,3)-โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้ามีการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Aspergillus niger*, *Mucoro javanicus* และในพวก *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์

กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวกความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลหรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง ดังรูปที่ 6

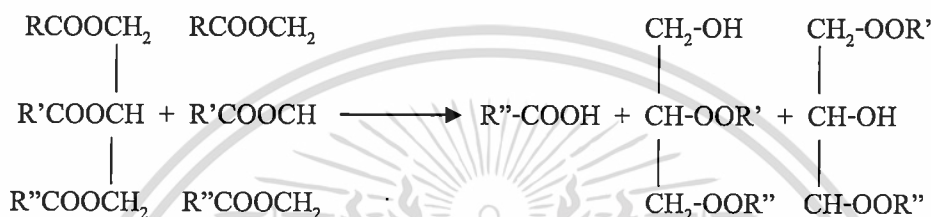
- (1) เอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



(2) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



(3) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบน โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

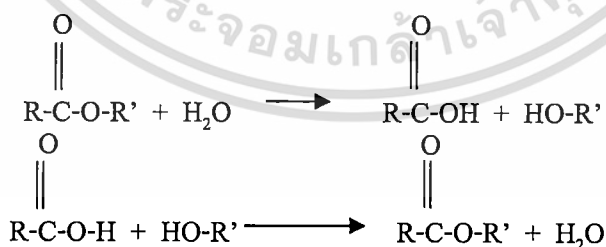


รูปที่ 6 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะ

ที่มา : Macrae (1983)

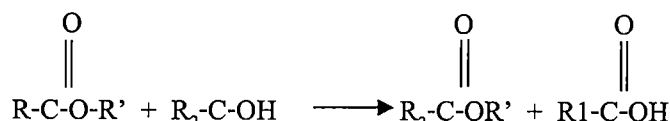
เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ การย่อยสลาย (hydrolysis) การสังเคราะห์เอสเทอร์ (ester) และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification) ดังรูปที่ 7

- (1) ปฏิกิริยาสลายเอสเทอร์ (hydrolysis of ester)
- (2) ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of ester)

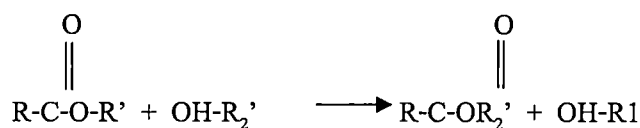


- (3) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification reaction)

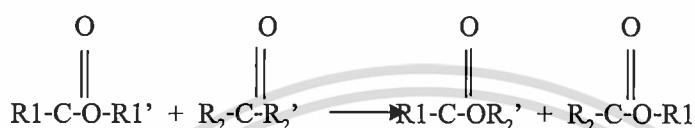
(3.2) ปฏิกิริยาแอซิดโกลิซิส (acidolysis)



(3.3) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis)



(3.4) ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification)



รูปที่ 7 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Yamane (1987)

2.9 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้ในแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Mahadik และคณะ, 2002) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เชื้อราเป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุด และถูกนำมาใช้อย่างมากในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร (Mahadik และคณะ, 2002) เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* และ *Rhizomucor* เป็นต้น (Caedenas และคณะ, 2001 ; Tan และคณะ, 2003) ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Candida* และ *Yarrowia lipolytica* (Tan และคณะ, 2003 ; Frickers และคณะ, 2006) เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Staphylococcus* เป็นต้น (Jaeger และคณะ, 2000)

2.10 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส

เนื่องจากไลเปสสามารถคะตะไลซ์ (catalyse) กระบวนการ transesterification หรือ interesterification ทำให้เกิดการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเอสเทอร์ได้มากมาย จากคุณสมบัติพื้นฐานของไลเปสจึงมีการนำเอาไลเปสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิตยาและการบำบัด กระบวนการผลิตอาหารทางอุตสาหกรรมการผลิตสารเพิ่มกลิ่นรส ในการบำบัดน้ำเสีย การผลิตเครื่องสำอาง การผลิตสารซักฟอกและการผลิตไบโอดีเซล (Ficker และคณะ, 2005 ; Jaeger และคณะ, 2000 ; Corzo และคณะ, 1999) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการปรับปรุงกลิ่น สี ความนุ่มและโครงสร้างของขนมปัง ใช้ในการกำจัดไขมันในน้ำเสียและกำจัดขยะ และลดการใช้สารเคมีในการผลิตและทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีข้อดีมากกว่าการใช้วิธีทางเคมี คือ ไม่ต้องใช้ความดันสูงหรือผ่านหลายขั้นตอนและไม่ทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมตามมา ผลผลิตที่ได้สะอาด เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อสับสเตรท

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสมีข้อเสีย คือ เป็นต้นเหตุทำให้เกิดการหืนในน้ำมันและผลิตภัณฑ์นม กลิ่นหืนที่เกิดขึ้นเป็นกลิ่นของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย เช่น กรดบิวทิริก การไฮโมจิในเซชันน้ำมันจะช่วยให้ เอนไซม์ไลเปสไฮโดรไลซ์ไขมันนมได้เร็วขึ้น เกิดกลิ่นหืนได้ถึงแม้จะทำภายในระยะเวลาสั้นก็ตาม เพราะการไฮโมจิในเซชัน การกวน หรือการเขย่าช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้การให้น้ำมัน เย็น ลงถึง 4 องศาเซลเซียส แล้วทำให้ร้อนขึ้นถึง 30 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงถึง 5 องศาเซลเซียส อีกครั้งหนึ่ง จะช่วยทำให้เอนไลเปสเข้าไปย่อย fat globule ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เพราะเป็นการช่วยให้ เอนไซม์ถูกดูดซับอยู่บน fat globule ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้ทดสอบว่าไลเปสเป็นตัวทำให้เกิดการหืนในเนยด้วย

2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีหลายประการ

2.11.1 ปริมาณเมทานอล

ศึกษาผลการเติมเมทานอลต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิส โดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลอัตราส่วนโดยโมลคือ 1:1 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่าเมื่อเติมเมทานอลครั้งละ 1 โมล อีกสองครั้งหลังจากเติมสารตั้งต้นเริ่มต้น สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้น และปริมาตรกรดไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาค่อยๆ ลดลง (Kaieda และคณะ, 1999)

ศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าว โดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วนโดยโมล 1:2, 1:3, 1:4, และ 1:6 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp.* และใช้ปริมาณน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารตั้งต้นพบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมง เมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วน โดยโมล 1:4 สามารถผลิตเมทานอลได้สูงถึง 79.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอลอัตราส่วนโดยโมลเป็น 1:6 จะผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ต่ำ เนื่องจากปริมาณเมทานอลสูงเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (Kamini, และ Lefuli., 2001)

ได้ทดลองเพื่อศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันผสมเมทานอล สูงเกินไปทำให้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งจาก crude lipase และ Immobilized lipase พบว่าในปฏิกิริยาที่มีสารละลายอินทรีย์ (เฮกเซนและปิโตรเลียมอีเทอร์) ให้ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 80 จาก *Pseudomonas. Fluoresens* ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ไม่มีสารละลายอินทรีย์พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดถึง 90 ที่สัดส่วนของน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1 ต่อ 4.5 จาก *P.fluoresens* เช่นกัน เนื่องจากอัตราส่วนเมทานอลสูงกว่านี้อาจทำให้เสียสภาพการทำงาน และได้ทำการทดลองเพื่อลดผลเมทานอลต่อการเสียสภาพเอนไซม์ โดยวิธีการเติมเป็นขั้นทั้งหมด 3 ขั้น พบว่าสามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์ได้ (Soumanou and Bornscheued, 2003)

2.11.2 อุณหภูมิ

ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามะทาโนไลซิสของน้ำมันพืชโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida Antarctica* ศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 30,40,50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากปฏิกิริยาดำเนินไป

6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิค่าร้อยละของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้นและเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าร้อยละของผลผลิตที่มากที่สุดเท่ากับ 29.9 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง (Shimada และคณะ, 1999)

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยามาเทนอลิซิสของน้ำมันรำข้าว โดยเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และที่เวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดร้อยละ 62.3 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง (Kamini, และ Lefujij., 2001)

2.11.3 ปริมาณน้ำ

น้ำเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก ในด้านการทำงานของเอนไซม์ทั้งในด้านการรักษาธรรมชาติของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างสามมิติของไลเปสบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์จะมีสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ทำหน้าที่เป็นฝาปิดตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้ จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้ โดยสายพอลิเปปไทด์นี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่และขดตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (α -helical lid) โดยฝาดังนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะเข้าร่วมทั้งโดยตรงและโดยอ้อมกับพันธะต่างๆของเอนไซม์ เช่น ไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waal interaction) การกำจัดน้ำออกโดยสิ้นเชิงจะทำให้เกิดการบิดทำลายโครงสร้างของเอนไซม์อย่างรุนแรง อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (denature) และไม่สามารถทำงานได้ (Klibanov, 1986) อีกทั้งน้ำยังทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายสารอินทรีย์ สัมผัสกับเอนไซม์โดยตรง ทำให้ได้ผลการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์

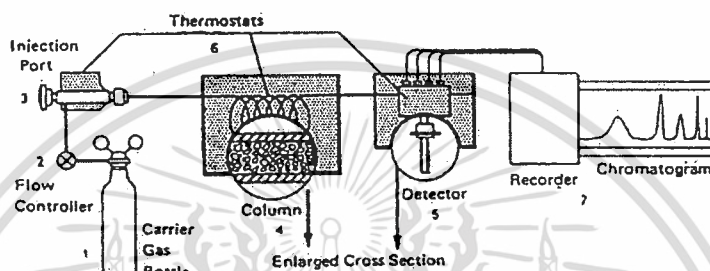
ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยามาเทนอลิซิส โดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสม ระหว่าง น้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล อัตราส่วนโดยมวล 1:1 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* 210 ยูนิต เติมน้ำให้ได้สารละลายเอนไซม์ 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4, 3.0, 6.0 และ 90 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเวลาที่ใช้เอนไซม์ 1.2-9.0 มิลลิลิตร (ประมาณน้ำร้อยละ 4-30 ของสารตั้งต้น) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 80-90 (Kaieda และคณะ, 1999)

ศึกษาผลของปฏิกิริยามาเทนอลิซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปจาก *Candida Antarctica* 0.4 กรัม ทำปฏิกิริยามาเทนอลิซิสโดยใช้สารตั้งต้น 10 กรัม เติมน้ำในปริมาณร้อยละ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเติมน้ำปริมาณมากขึ้นค่าร้อยละของผลผลิตลดลง (Shimada และคณะ, 1999)

ศึกษาผลของปฏิกิริยามาเทนอลิซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp.* ใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลคือ 1:4 และใช้ปริมาณน้ำร้อยละ 20-200 โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มน้ำร้อยละ 80-100 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 62.6-66.4 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณมากกว่าร้อยละ 100 ค่าเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ลดลง (kimini, และ Lefujij, 2001)

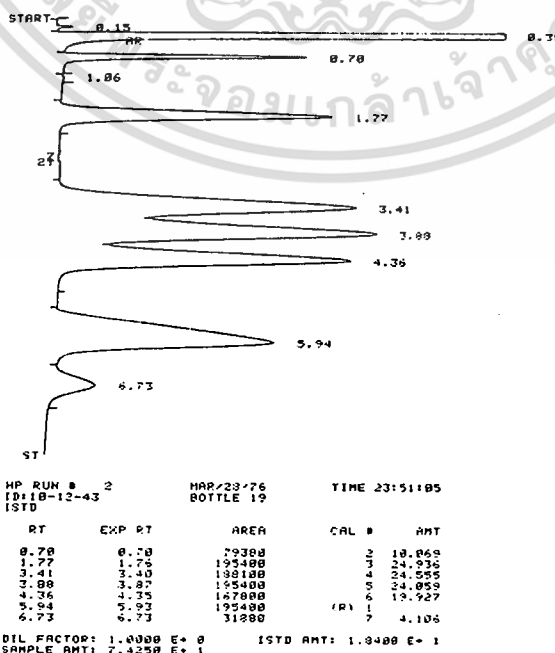
2.12 แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography)

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคสำหรับแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย (volatile compounds) โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่งแล้วให้ไหลของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือแก๊สตัวพา (carrier gas) องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวอย่างผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่ต่างกัน โดยองค์ประกอบในเครื่อง gas chromatography แสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง gas chromatography
ที่มา : อมร และคณะ (2539)

ในการวิเคราะห์ สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ sample injection port สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในเครื่องคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกัน เมื่อเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากเครื่องตรวจวัดจะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปของ โครมาโตแกรม (chromatogram) ดังรูปที่9



รูปที่9 แสดงลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องบันทึกข้อมูลของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : อมร และคณะ (2539)

แก๊สโครมาโตกราฟีแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

1. แก๊ส-ของแข็งโครมาโตกราฟี (gas-solid chromatography หรือ GSC) วิธีนี้ทำให้เฟสคงที่เป็นของแข็งที่ดูดซับ (adsorption) สารที่เป็นแก๊สซึ่งต้องการแยกได้ และไม่มีสารอื่นใดเคลือบอยู่ ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ค่อนข้างจะแคบ เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็กๆ เท่านั้น ดังนั้น คอลัมน์ที่ใช้มักจะบรรจุด้วย activated solid

2. แก๊ส-ของเหลวโครมาโตกราฟี (gas-liquid chromatography) สารที่เป็นแก๊สหรือไอของสารที่ผสมกันอยู่เมื่อผ่านคอลัมน์จะสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยการกระจายตัวที่แตกต่างกันของแก๊สหรือไอระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่มีของเหลว (liquid phase) ฉาบอยู่บนของแข็งหรือมีค่า partition coefficient ต่างกัน วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกสารที่เป็นแก๊ส หรือสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นไอ หรือแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิที่กำหนด

2.13 การประยุกต์ใช้งานแก๊สโครมาโตกราฟี

2.13.1 การวิเคราะห์มลพิษทางอากาศ เช่น lead alkyls, hydrocarbon, PAN, CO, aldehyde, keton, SO₂, H₂S และออกไซด์บางชนิด

2.13.2 การวิเคราะห์ทางด้านคลินิก โดยทั่วไปงานทางด้านคลินิกมักเป็นงานที่มีปริมาณหรือจำนวนตัวอย่างมาก การวิเคราะห์และแยกโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟีนั้นสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ตัวอย่างของสารที่แยกและวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี ได้แก่ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน กรดไขมัน สารอนุพันธ์ ไตรกลีเซอไรด์ สเตอรอยด์ บาร์บิทูเรต และวิตามินซี

2.13.3 การวิเคราะห์วัสดุสารเคลือบ เช่น ยาง เรซินสังเคราะห์ เป็นต้นที่สามารถนำมาวิเคราะห์และแยกได้โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี

2.13.4 การวิเคราะห์สารพวกน้ำมันหอมระเหย การวิเคราะห์สารประเภทนี้สามารถทำได้หลายเทคนิคแต่แก๊สโครมาโตกราฟีให้ผลที่ดี สะดวกและรวดเร็ว ตัวอย่างของสารที่วิเคราะห์ได้โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี ได้แก่ น้ำมันจากสระระเห่น้ำมันจากมะนาว น้ำมันมะกอก เป็นต้น

2.13.5 การวิเคราะห์อาหาร โดยปกติแล้วในการวิเคราะห์อาหารมักจะใช้ TLC ร่วมกับแก๊สโครมาโตกราฟีเสมอ โดยเฉพาะการวิเคราะห์สารจำพวกสารต้านอนุมูลอิสระและสาร preservative นอกจากนี้ยังใช้ในการวิเคราะห์สารปนเปื้อน การสลายตัวของสาร ในอาหารและเครื่องดื่ม

2.13.6 การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง นิยมใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีเพราะให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี มีความถูกต้องสูง โดยเฉพาะยาฆ่าแมลงที่มีสารประกอบพวก halogenated, chlorinated และ organophosphate เป็นส่วนประกอบ

2.13.7 การวิเคราะห์สารปิโตรเลียม ใช้แยกและวิเคราะห์ปริมาณส่วนผสมของแก๊สธรรมชาติที่ใช้กันอย่างกว้างขวางผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ พวกรีดคาร์บอน น้ำมันดิบ พอลิไซคลิกโครมาติก เป็นต้น

2.13.8 การวิเคราะห์ยา ปัจจุบันมีการใช้แก๊สโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์สารประกอบต่างๆ ทางด้านการผลิตยาเนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบพวก alkaloids ชนิดต่าง ๆ

2.14 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร

เป็นการศึกษาแนวทางและความเป็นไปได้ในการใช้น้ำมันสบู่ดำมาใช้ทดแทนพลังงานน้ำมันเชื้อเพลิง ซึ่งมีราคาแพงและมีการนำเข้า เพื่อลดการนำเข้ามันเชื้อเพลิงและเป็นการพัฒนาวิธีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อใช้งานได้กว้างขวางมากขึ้นจากแหล่งวัตถุดิบในประเทศ ซึ่งหน่วยงานที่นำมาผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ก็คือประชาชนผู้สนใจการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร เกษตรกรผู้ปลูกสบู่ดำ มหาวิทยาลัยเกษตรกำแพงแสน และบริษัทเอกชนที่จะมีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ ซึ่งเป็นหนทางหนึ่งของการพึ่งตนเองได้เมื่อเกิดวิกฤตการณ์การขาดแคลนน้ำมัน หรือน้ำมันมีราคาแพงมากๆ และงานวิจัยนี้จะได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ทั้งในระดับชาติ และระดับนานาชาติอีกด้วย



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

- กากสับุดำ ดินบริเวณผลิต โรงงานสับุดำคลอง 3 ปทุมธานี
- กะลาปาล์ม ปาล์มย่อยแล้ว ผลปาล์ม เส้นใยปาล์ม ทะลายปาล์มหลังบีบ น้ำทิ้งจากการผลิตปาล์ม จากเมล็ด น้ำมันปาล์มจากเปลือก บริษัท สุขสมบูรณ์ จำกัด
- กากปาล์มสกัดแล้ว ตะกอนปาล์ม กากปาล์ม เนื้อมะพร้าวบีบแล้ว กากมะพร้าวคั้นกะทิแล้ว
- กากถั่วเหลือง น้ำมันถั่วเหลือง บริษัท อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร potato dextrose agar (PDA)
2. อาหาร Tributyrin agar
3. อาหารสูตร CD medium
4. อาหารเหลวที่มีสับุดำเป็นแหล่งคาร์บอน

3.3 สารเคมี

1. น้ำมันสับุดำ
2. โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)
3. ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
4. แคลเซียมคาร์บอเนต (NaCO_3)
5. ทวีน-80
6. พาราฟิน
7. กลีเซอรอล
8. ยีสต์สกัด
9. เบคโตเปปโตน
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
11. โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)
12. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
13. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
14. ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
15. พาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตรท
16. 2 – โพรพานอล

17. ไตรตรอน เอ็ก – 100
18. กัมอาราบิก
19. สีวิกติเรียบลู (Victoria blue)
20. พงวุ้น

3.4 อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (autoclave)
2. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
3. เครื่องบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
4. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge)
6. กล้องจุลทรรศน์
7. เครื่องกวนสาร
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
9. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร)
10. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
11. เครื่องผสมสาร (votex)
12. ไมโครปิเปต (micropipet)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
15. เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง
16. เครื่องแก้วต่างๆ

3.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ

3.5.1 เตรียมตัวอย่าง (ตัวอย่างจากดิน)

เตรียมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตรในขวดคูแรน เติมหิวิน 0.01% แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (autoclave) หลังจากนั้นละลายตัวอย่างจำนวน 10 กรัม และเจือจางตัวอย่างจนถึง 10^{-5}

3.5.2 คัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างวงใสในอาหารแข็ง tributyrin agar

3.5.2.1 นำตัวอย่างมาวางบนหน้าอาหารแข็ง tributyrin agar โดยวางเป็นชั้นๆ ให้ทั่วหน้าอาหาร โดยเว้นระยะห่างของตัวอย่างไม่ให้ติดกันมากเกินไป ตัวอย่างที่เป็นดินจะเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมา spread ลงบนหน้าอาหารแข็ง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส

3.5.2.2 แยกโคโลนีที่ทำให้อาหารแข็ง tributyrin agar เกิดวงใส วงในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ทำการแยกโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA ไปเรื่อยๆจนกว่าจะได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.5.2.3 เก็บเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหารแข็งเอียง PDA เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3 คัดเลือกเชื้อที่สามารถใช้ในสบูดำเป็นแหล่งคาร์บอน (Frenken และคณะ, 1992)

3.5.3.1 เตรียมอาหารเหลวที่มีสบูดำเป็นแหล่งคาร์บอน 25 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ นำเชื้อราที่คัดเลือกแล้วย้ายลงอาหารใหม่ (PDA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน แล้วย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว โดยตัดชิ้นวุ้นให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น หลังจากนั้นนำเชื้อไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

3.5.3.2 เก็บส่วนที่เป็นอาหารมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที

3.5.3.3 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Hoshiro และคณะ, 1992)

นำสารละลายเอนไซม์ไลเปส 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D (เตรียมจากสารละลาย A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 90 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล

กำหนดยูนิตของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพาราไนโตรฟินอลปามีเตต ให้เป็นพาราไนโตรฟินอล 1 ไมโครโมล

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ไมโครกรัมของพาราไนโตรฟินอล} \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักรวมของพาราไนโตรฟินอล} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาณสารละลายเอนไซม์}}$$

3.5.3.4 นำเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด 50 โคโลนีมาคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งตามข้อ

3.5.3

3.3.4 การกลายพันธุ์เชื้อราที่คัดเลือกแล้ว

3.3.4.1 เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกแล้ว ในอาหารแข็งเอียง (PDA) เป็นเวลา 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.3.4.2 นับจำนวนและเตรียมสารละลายสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)

3.3.4.3 นำสารละลายสปอร์เข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อเพื่อนำมาฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต และไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ชุดควบคุม) อย่างละ 1 ชุด

3.3.4.4 เตรียมอุปกรณ์ฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ โดยกำหนดให้จานเพาะเลี้ยงบรรจุสารละลายสปอร์ห่างจากหลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต 15 เซนติเมตร

3.3.4.5 วางจานเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของเชื้อที่ต้องการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์บนเครื่องกวนสาร ใส่แท่งกวนสารแม่เหล็กที่ฆ่าเชื้อแล้วในจานเลี้ยงเชื้อ ปรับความเร็วการหมุนแท่งแม่เหล็กอย่างช้าๆ

3.3.4.6 ฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตสารละลายสปอร์ในจานเลี้ยงเชื้อ โดยจับเวลาและเก็บสารละลายสปอร์แต่ละช่วงเวลาตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 นาทีตามลำดับที่เวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต นำสารละลายสปอร์ 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหุ้มฟอยล์และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.3.4.7 ทำการเจือจางสารละลายสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} จากนั้นนำสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร มานับจำนวนด้วยวิธี spread plate โดยใช้อาหาร PDA (Demzin, 1986) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีและหาร้อยละของการอยู่รอด โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3

3.3.4.8 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและร้อยละการอยู่รอด เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายต่อไปโดยเลือกระยะเวลาที่เหมาะสม สำหรับการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต จะใช้เวลาที่ทำให้เซลล์เริ่มต้นตายร้อยละ 90 หรือมีการอยู่รอดร้อยละ 10 (ชวณพิศ คือนกนามกุล. 2536)

$$\text{ร้อยละการอยู่รอด} = 100(S)/X$$

X = จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (ตัวควบคุม) ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S = จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตในแต่ละเวลาและความเจือจาง

3.4.5 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแบบ Duncan' New multiple-Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 เลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานผลิตน้ำมันแหล่งต่างๆ

จากการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดเลือกตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรงงานหีบสบู่ดำ โรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม และโรงงานผลิต น้ำมันมะพร้าว และโรงงานน้ำมันถั่วเหลือง การเก็บตัวอย่างจะ เก็บจากสายการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงกระบวนการสุดท้ายรวม ทั้งนำทิ้งจากการผลิต และรอบบริเวณสายการผลิต ตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาคัดเลือกเชื้อราโดยนำมาวางบนอาหารแข็ง tributyrin agar และนำไปบ่มที่ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นย้ายโคโลนีเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็ง tributyrin agar ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA และนำไปบ่มที่ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เช่นเดิม และแยกเชื้อจนกว่าจะได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ซึ่งจากการคัดเลือกได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ทั้งหมด 200 โคโลนี หลังจากนั้นนำเชื้อราทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 6 วัน หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และคัดเลือกซ้ำอีกครั้ง โดยการเลือกเชื้อที่มีกิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุด 50 โคโลนี ซึ่งจากการทดลองได้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุดคือ เชื้อหมายเลข LP/45-21 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากตัวอย่างดินบริเวณการผลิตน้ำมันสบู่ดำ และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.0308 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทดลองเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุด มาจากตัวอย่างดินบริเวณการผลิตน้ำมันสบู่ดำ อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ เชื้อราที่สามารถเจริญเติบโตในแหล่งที่มีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่แล้ว จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ดีกว่าเชื้อราที่เจริญอยู่ได้ในแหล่งที่มีน้ำมันชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 4.1 แสดงตัวอย่างที่นำมาคัดเลือกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ไลเปสและหมายเลขเชื้อ

ตัวอย่าง	หมายเลขเชื้อ (บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส)	หมายเลขเชื้อ (บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส)
กากสบู่ดำ	LP/30-1 - LP/30-9	LP/45-1 - LP/45-2
ดินบริเวณผลิตน้ำมันสบู่ดำ	LP/30-10 - LP/30-22	LP/45-2 - LP/45-25
ทะลายปาล์มอบแล้ว	LPP/30-1 - LPP/30-5	LPP/45-1 - LPP/45-5
กะลาปาล์ม	LPP/30-6 - LPP/30-9	LPP/45-6 - LPP/45-7
เมล็ดปาล์มหลังบีบ	LPP/30-10 - LPP/30-13	LPP/45-8 - LPP/45-14
ผลปาล์มสด	LPP/30-14 - LPP/30-16	LPP/45-15 - LPP/45-18
กากปาล์มย่อยแล้ว	LPP/30-17 - LPP/30-20	LPP/45-19 - LPP/45-22
เศษปาล์มบริเวณผลิต	LPP/30-21 - LPP/30-26	LPP/45-23 - LPP/45-29
ดินบริเวณผลิตน้ำมันปาล์ม	LPP/30-27 - LPP/30-34	LPP/45-30 - LPP/45-44
น้ำทิ้งจากการผลิตน้ำมันปาล์ม	LPP/30-35	-

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงตัวอย่างที่นำมาคัดเลือกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ไลเปสและหมายเลขเชื้อ

ตัวอย่าง	หมายเลขเชื้อ (บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส)	หมายเลขเชื้อ (บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส)
น้ำมันจากเมล็ดปาล์ม	LPP/30-36	-
ตะกอนปาล์ม	LPP2/30-1 - LPP2/30-4	LPP2/45-1 - LPP2/45-4
กากปาล์มละเอียด	LPP2/30-5	-
กากปาล์ม(1)	LPP2/30-6 - LPP2/30-11	LPP2/45-5 - LPP2/45-11
กากปาล์มสกัดน้ำมันแล้ว	LPP2/30-12 - LPP2/30-14	LPP2/45-12
กากปาล์ม(2)	LPP2/30-15 - LPP2/30-23	LPP2/45-15 - LPP2/45-16
กากมะพร้าวคั้นกะทิแล้ว	LPC/30-1 - LPC/30-4	LPC/45-1 - LPC/45-4
เนื้อมะพร้าวหีบแล้ว	LPC/30-5 - LPC/30-15	LPP2/45-5 - LPP2/45-7
กากถั่วเหลือง	LPS/30-1 - LPS/30-9	LPS/45-1 - LPS/45-5
น้ำมันถั่วเหลือง	LPS/30-10	LPP2/45-6 - LPP2/45-7

ตารางที่ 4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา 20 โคลนนี้จากการคัดเลือกซ้ำ

หมายเลขเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
LPP/45-21	0.0308 ^a
LPP2/30-1	0.0257 ^b
LPC/30-6	0.0246 ^c
LPP/45-30	0.0215 ^{cd}
LPP2/45-8	0.0196 ^d
LPP2/30-10	0.0186 ^{de}
LPP2/45-6	0.0184 ^{de}
LPP/30-35	0.0182 ^{de}
LPP/30-1	0.0178 ^{ef}
LP/45-24	0.0164 ^{fg}
LPP/45-34	0.0155 ^{fg}
LP/30-2	0.0148 ^{hi}
LP/30-5	0.0138 ^{hi}

^{abc} ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

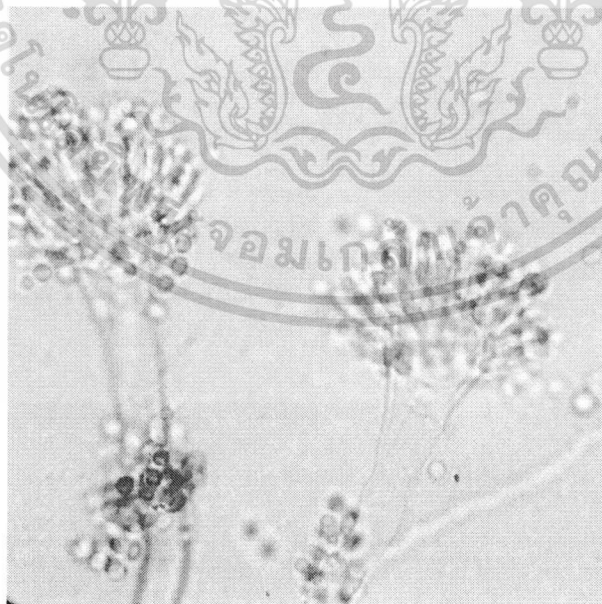
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา 20 โคลนจากการคัดเลือดซ้ำ

หมายเลขเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
LPP/45-32	0.0137 ^{hi}
LP/45-1	0.0137 ^{hi}
LPP/45-42	0.0135 ^{ijk}
LPP/45-33	0.0117 ^N
LPP/45-33	0.0117 ^N
LPP/45-44	0.0116 ^N
LP/45-19	0.0114 ^N

^{abc} ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^N ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

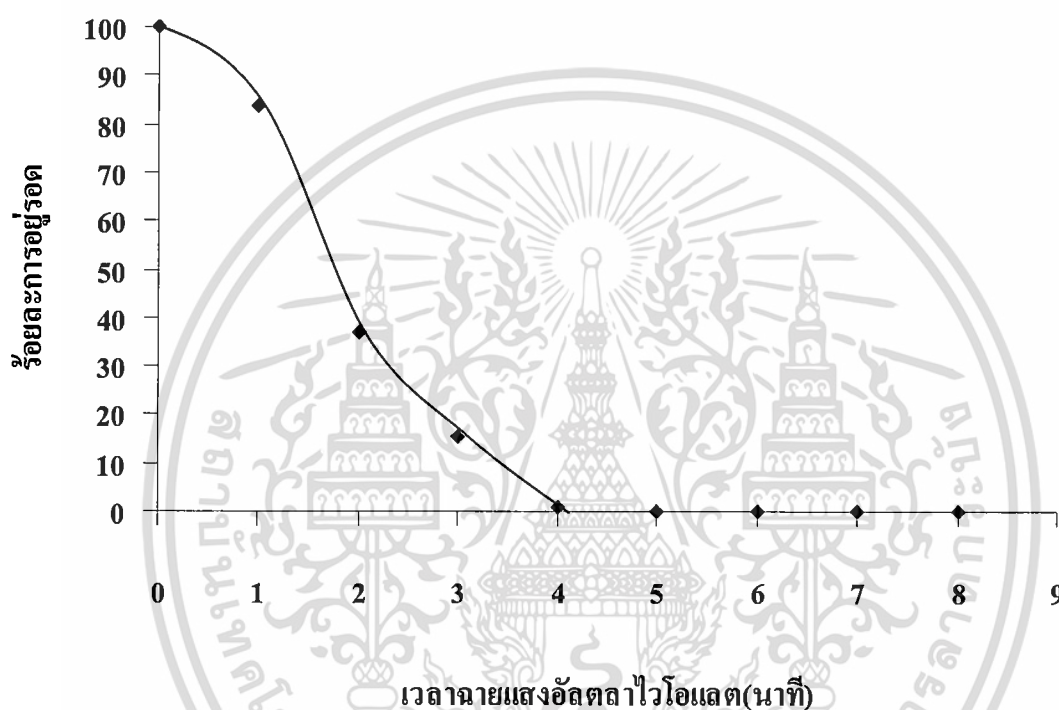
เมื่อนำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาคู่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* แสดงดังรูปที่ 4.1 มีงานวิจัยพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus sp.* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี (Miura และ Yamane, 1997)



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อราที่คัดเลือกได้จากกล้องจุลทรรศน์

4.2 ศึกษาอัตราการอยู่รอดเชื้อราหลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเชื้อราที่คัดเลือกจากข้อ 4.1 โดยใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ให้กับสปอร์ของเชื้อในระยะเวลาต่างๆ และนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA (ชุดทดลอง) เทียบกับจำนวนโคโลนีเชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสง (ชุดควบคุมโดยมาค่านวณร้อยละการอยู่รอดพบว่าที่เวลา 3 นาที จะมีการอยู่รอดร้อยละ 15.5 เมื่อพลอตกราฟระหว่างร้อยละของการอยู่รอดกับระยะที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต ดังรูปที่ 4.2 จะมีร้อยละการอยู่รอดของเชื้อหลังจากแสงอัลตราไวโอเล็ตเท่ากับร้อยละ 10 ที่เวลาประมาณ 3.6 นาที



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงอัตราร้อยละของการอยู่รอดของเชื้อราที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดเลือกตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรม ผลิตน้ำมันพืชชนิดต่างๆพบว่า เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุดเป็นเชื้อที่ได้จากตัวอย่างดิน บริเวณการผลิตน้ำมันสบู่ดำ และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ 0.0308 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากการดู ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นลักษณะของเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus sp.* การศึกษาอัตราการอยู่รอดเชื้อรา หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างๆพบว่า ร้อยละการอยู่รอดของเชื้อหลังจากแสงอัลตราไวโอเล็ตเท่ากับร้อยละ 10 ที่เวลาประมาณ 3.6 นาที



บรรณานุกรม

- ชวนพิศ ตีเอโกนามกุล. 2536. “การทำให้เกิดการกลายพันธุ์”. เล่มที่ 1. น.20-33 ในคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. วัฒนา วิทยาลัยปทุมธานี และสรวงอุดมวรภัณฑ์ (บรรณาธิการ). สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- วิศวกรรมสาร. 2548 เทคโนโลยีเชื้อเพลิง. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าพระนครเหนือ
- ศศิธร จารุสมบัติ. 2544. เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาฟิสิกส์น้ำมัน. ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- อารี ฤทธิบุรณ์. เทคโนโลยีเอนไซม์. โครงการตำรา ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.
- อมร, แม้น, เพชรสม และอมรสิทธิ์. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- Barnwal, B.K. and Sharma, M.P. 2004. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India, Indian Institute of Technology. Roorkee 247667. Uttaranchal, India.
- Cardenas, F., De Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W., Alvarez, E. 2001. Novel inicrobial lipase : catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* 28 : 145 – 154.
- Fickers, P., Fudalej, F., Nicand, J.M., Destain, J. and Thonart, P. 2005. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 115 : 379 – 386.
- Fickers, P., Desain, J., Ongena, N., Weekers, F. and Thonart. P. 2006. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb. Technol.* 38 : 756 – 759.
- Frenken LG., Egmond MR., Batenburg AM., Bos JW., Visser C. a Verrips CT. 1992. Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl Environ Microbiol.* 58 : 3787–3791.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92 : 405 – 416.
- Fukuda, H., 2006. Process for producing fatty acid lower alcohol ester. United States Patent. Usb. 982-115 B1.
- Hoshino T., Sasaki T., Watanabe, Yuichi W., Nagasawa T. and Yamane T. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 : 660-664.

- Ma, F. Clements, L.D. and Hanna, M.A. 1998. The effect of catalyst, ferr fatty acids and water on transesterification of beef tallow. American Society of Agricultural Engineers. 41 : 1261 – 1265.
- Macrae, R.A., Wisdom, P. Dunnill, A and Lilly, M.D. 1993. Enzymic interesterification of fats : Factors influencing the choice of support for immobilized lipase. Enzyme Microb. Technol. 6(10) : 443 – 446.
- Mahadik, N.D., Puntambeker, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., Gokhale, D.V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochem. 38 : 175 – 721.
- Miura, T. and Yamane, T. 1997. Screening for fungi that have high lipolytic and acidolytic activities in biomass support particles. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61 : 1252-1257.
- Pramanik, K. 2003. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. Renewable Energy. 28 : 239 – 248.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C. and Deng, L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation, Process Biochem. 39 : 459 – 465.
- Stoll V.S. and Blanchard J.S. 1990. Buffers: Principles and practice. Methods Enzymology 182: 22-38.
- <http://aopdm01.doae.go.th/data/physinut21.htm>

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Stoll and Blanchard, 1990)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยเจือจางให้ความเข้มข้นที่ต้องการนำมาผสมกันให้ได้ค่ากรดต่างที่ต้องการ

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำสารละลาย KHPO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำสารละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (X) ผสมสารละลาย ข (Y) เจือจางด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร (อารี, 2548)

ตารางผนวกที่ ก1 แสดงจำนวนมิลลิลิตรระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ที่ความเป็นกรดต่างต่างๆ

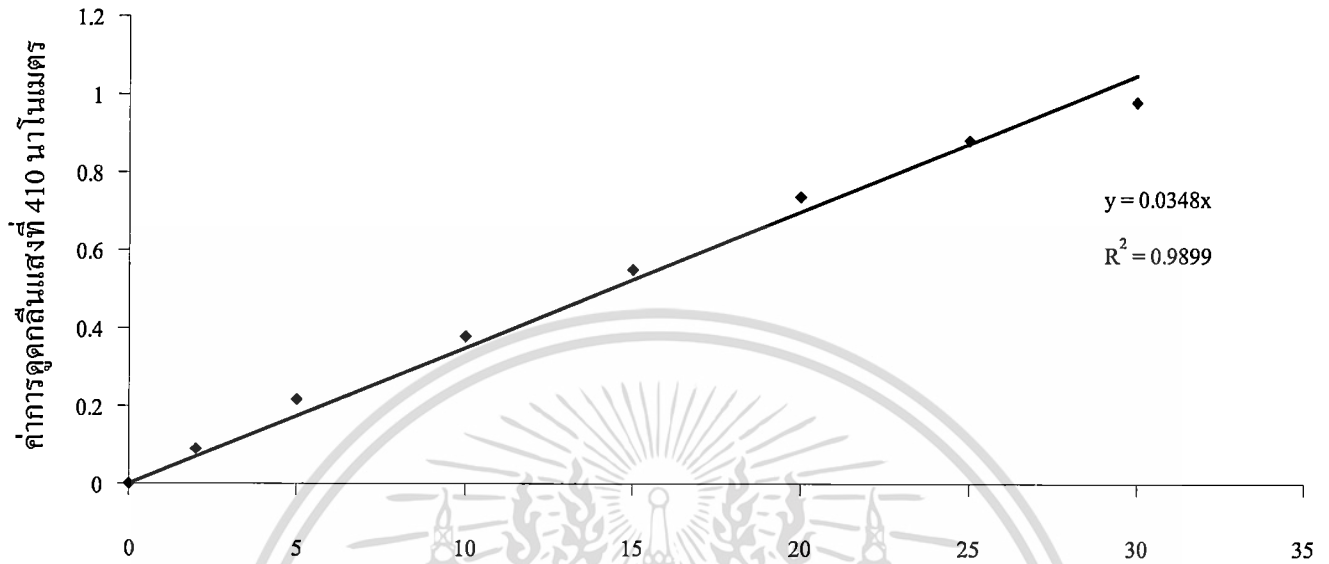
X	Y	ค่ากรดต่าง	X	Y	ค่ากรดต่าง
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.5	6.8	5.3	94.7	8.0

2. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Hoshiro และคณะ, 1992)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย A : ละลายพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตรท 30 มิลลิกรัม ใน 2 โพรพานอล ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข



ปริมาณไนโตรฟินอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนโตรฟินอลที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดการดูดแสงที่ 410 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่
ระดับความเชื่อมั่น 95

sample	N	Subset										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LP/45-19	3	.011672	.011672	.011672	.011672							
LPP/45-44	3	.011764	.011764	.011764	.011764							
LPP/45-33	3		.011901	.011901	.011901							
LP/45-16	3		.011947	.011947	.011947							
LPP/45-42	3			.013594	.013594	.013594						
LP/45-1	3				.013732	.013732						
LPP/45-32	3				.013777	.013777						
LP/30-5	3				.013869	.013869						
LP/30-2	3					.014876	.014876					
LPP/45-34	3					.015563	.015563					
LP/45-24	3						.016455	.016455				
LPP/30-1	3							.017851	.017851			
LPP/30-35	3							.018217	.018217			
LPP2/45-6	3							.018446	.018446			
LPP2/30-10	3								.018675			
LPP2/45-8	3								.019682	.019682		
LPP/45-30	3									.021513		
LPC/30-6	3										.024626	
LPP2/30-1	3										.025770	
LPP/45-21	3											.030851
Sig.		.061	.063	.052	.053	.077	.126	.061	.094	.061	.239	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b Alpha = .05.