รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม

รศ.อารี ฤทธิบูรณ์

รศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

RCH
TA 654 ก
2555

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 137308
รับ เดือน ปี 22 มิ.ย. 2558

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b.1261998x

i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	9
2.2 คุณสมบัติของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	10
3.1 แสดงระดับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง	28
4.1 แสดงตัวอย่างและจำนวนเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างปาล์มบริเวณต่างๆ และหมายเลขเชื้อ	30
4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ 7 สายพันธุ์เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	31
4.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ 12 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	33
4.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ 6 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	35
4.5 เวลาการฉายรังสีแกมมาของตัวอย่างเชื้อยีสต์	37
4.6 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ 10 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	38
4.7 แสดงผลของร้อยละของแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ จากการทดลองพื้นที่ตอบสนอง	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากไตรกลีเซอร์ไรด์และแอลกอฮอล์	7
2.2 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระโดยความร้อน	7
2.3 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันจากเอสเทอร์ในปฏิกิริยาที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ	7
2.4 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเกิดจากกรดไขมันอิสระ	8
2.5 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบส (ก) และไลเปส (ข) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	10
2.6 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะ	13
2.7 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	14
2. 8 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง Gas Chromatography	18
2.9 แสดงลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องบันทึกข้อมูลของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	19
4.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์รหัส SLP27 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	32
4.2 กราฟแสดงร้อยละอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่เวลา 20, 40, 60 และ 80 วินาที	32
4.3 กราฟแสดงร้อยละอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย EMS ที่ เวลา 20, 40, 60 และ 80 นาที	34
4.4 กราฟแสดงร้อยละอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของปริมาณรังสีที่ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์	37
4.5 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ (กรัม/น้ำหนัก น้ำมัน) กับร้อยละแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	41
4.6 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา (ชั่วโมง) ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ (กรัม/น้ำหนักน้ำมัน) กับร้อยละแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	42
4.7 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ (กรัม/น้ำหนัก น้ำมัน) กับร้อยละแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	
สารบัญตาราง	
สารบัญภาพ	
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (ถ้ามี)	3
1.6 คำสำคัญของการวิจัย (ถ้ามี)	3
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**22**
3.1 วัตถุดิบ	**22**
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	22
3.3 สารเคมี	22
3.4 อุปกรณ์	23
3.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ	24
บทที่ 4 ผลการวิจัย	**29**
4.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานผลิตน้ำมันแหล่งต่างๆ	29
4.2 การคัดเลือกชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด	29
4.3 การกลายพันธุ์เชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	**31**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) **การกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม**

แหล่งเงิน ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 230,000- บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

รศ. อารี ฤทธิบูรณ์ หัวหน้าโครงการ และรศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ผู้ร่วมวิจัย สาขาวิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างดินและวัสดุชนิดต่างๆ ในพื้นที่ของโรงงานอุสาหกรรมน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อสายพันธุ์ SLP27 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.28 ยูนิต/มล. จากนั้นทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลาย โดยการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 38 วินาที จากนั้นทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลฟอเนต เป็นเวลา 58 นาที และการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ ได้เชื้อสายพันธุ์ UV79, EM107 และ GAM47 และให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.30, 0.36 และ 0.70 ยูนิต/มล. ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย GAM47 เพื่อการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาเพื่อการผลิตไบโอดีเซลได้ และผลการจำแนกชนิดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับสปีชีส์ด้วยวิธี D1/D2 domain of 26S ribosomal RNA sequence ซึ่งสามารถระบุชนิดของยีสต์ชนิดนี้ได้คือ *Candida orthopsilosis* และได้ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อ *Candida orthopsilosis* สายพันธุ์กลายในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวและกากน้ำตาล โดยศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล ปริมาณความชื้นและเวลาที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แล้วนำหัวเชื้อมาใช้ในการหาสภาวะของปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยวิธีการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง โดยศึกษาช่วงเวลา อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อ น้ำมันปาล์มดิบ และปริมาณหัวเชื้อ พบว่า ที่ปริมาณความชื้นร้อยละ 40 และความเข้มข้นของกากน้ำตาล ร้อยละ 10 (ปริมาตร/น้ำหนักของรำข้าว) ที่เวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ยีสต์มากที่สุดคือ 6.43×10^9 เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักหัวเชื้อ และสภาวะของปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์ คือ ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันปาล์มดิบ 8:1 ปริมาณหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อร้อยละ 10 (น้ำหนัก/น้ำหนักของ น้ำมัน) และอุณหภูมิ 40°C จะทำให้ได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 70.4

คำสำคัญ : การกลายพันธุ์ การคัดเลือก เชื้อยีสต์ ไลเปส น้ำมันปาล์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Mutation and mutant screening of lipase producing yeast for enchancing biodiesel production from plam oil

Researcher: Mrs. Aree Rittiboon

Faculty: Science Department: Biology

ABSTRACT

The research was about the isolation and selection of isolates of yeast from soil and other material in the area of oil palm industry. It was found that the strain isolated from palm kernel after compression (SLP27) could produce the highest lipase (0.28 unit/ml). The SLP27 was mutated with UV (ultraviolet) for 38 seconds, strain UV79 was mutated with ethyl methane sulfonate for 58 minutes, and strain EM107 was mutated with gamma rays at 2 kGy; strain GAM47. The gave maximum lipase activities of 0.30, 0.36 and 0.70 unit/ml, respectively. When transesterification was tested using lipase from GAM47 catalyst, the biodiesel production, it was found that it could catalyst the biodiesel production. The selected yeast strain was identified in species level by D1/D2 domain of 26S ribosomal RNA sequence; and the result was "*Candida orthopsilosis*" and the research was studied about starter prepraratio of mutants *Candida orthopsilosis* by solid state fermentation with rice bran and molasses. The concentration of molasses and the optimal moisture content and time were studied to increase amount of yeast cells. Then, the yeast cells were carried out to investigate the optimal conditions of ethyl esters production from crude palm oil by response surface methodology, the relationships of reaction time, ethanol to crude palm oil molar ratio and starter content. It was found that 40% moisture content and 10% (v/w, g of rice bran) molasses concentration at 60 h could produce the highest yeast 6.43×10^{9} CFU/g of starter. Furthermore, the highest ethyl ester yield 70.4% was obtained at reaction time 72 h in 8:1 ethanol to crude palm oil molar ratio, 10% (w/w, crude palm oil) starter content and temperature of transesterification was 40 °C condition.

Keywords : Mutation, Selection, Yeast, Lipase, Palm Oil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนักศึกษาปริญญาโทที่เป็นผู้ช่วยวิจัย (นส. วรรณิสา ปั้นสุข) นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง และสาขาวิชาที่สนับสนุนอุปกรณ์และครุภัณฑ์ในการวิจัย และการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน งบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

รศ. อารี ฤทธิบูรณ์

รศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงที่สูงมากในปัจจุบันส่งผลให้พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่ได้จากฟอสซิล (Fossil Fuel) ไม่เพียงพอต่อความต้องการและมีแนวโน้มที่จะหมดลงในไม่ช้านี้ จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยน้ำมันที่สามารถช่วยลดปัญหาเหล่านี้ ไบโอดีเซล (Biodiesel) จึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่ง ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงสำรองได้ในภายภาคหน้า เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นพืชน้ำมันที่มีปลูกอยู่เกือบทุกภาคของประเทศไทย อาทิเช่น มะพร้าว ปาล์ม ทานตะวัน ถั่วเหลือง และสบู่ดำพืชที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงในขณะนี้รวมไปถึงไบโอดีเซลที่ได้จากน้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหาร ตรงจุดนี้ที่เองที่ทำให้ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่เชื้อเพลิงที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมากและยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันที่ได้จากฟอสซิล (ศศิธร, 2544) และในปัจจุบันจะเปิดการค้าเสรี

ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นวิธีการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันวิธีหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมในการสังเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซล เนื่องจากทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ กระบวนการไม่ยุ่งยาก เป็นกระบวนการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีทั้งใช้กรด เบส และเอนไซน์ไลเปสเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ แอลคิลเอสเทอร์ โดยทั่วไปการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นที่นิยมเนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสั้น แต่การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดอยู่หลายประการคือ มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากผลิตภัณฑ์มากใช้ ต้องใช้พลังงานสูงในการเกิดปฏิกิริยา (ปวีณา, 2547) รวมทั้งจะเกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากการใช้กรดหรือด่างซึ่งเป็นสารเคมีปริมาณมาก และปฏิกิริยาจะเกิดที่อุณหภูมิสูง จึงจำเป็นต้องใช้พลังงานสูง (Savitha, และคณะ, 2007)

การใช้เอนไซน์ไลเปสจึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งการใช้เอนไซม นั้น มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ประหยัดพลังงานในการผลิต ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ช่วยลดความหนืดในน้ำมันจะได้ผลผลิต ต่ำเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถผลิตเอนไซน์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซน์ไลเปสที่มีคุณสมบัติต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการผลิต แต่การใช้เอนไซน์ไลเปสยังมีข้อจำกัดในด้านราคา สายพันธุ์ที่สังเคราะห์เอนไซน์ และความคงตัวของไลเปสในบางสายพันธุ์ (ปวีณา, 2547) ซึ่งการทำการกลายพันธุ์เชื้อที่แยกได้จากสภาพธรรมชาติและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาสังเคราะห์เอนไซน์ได้สูงขึ้นและเป็นสายพันธุ์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คงตัว ก่อนที่จะนำเอนไซม์ไปใช้ทำปฏิกิริยาในกระบวนการ ผลิตไบโอดีเซลนั้น และนำเชื้อเป็นแนวทางที่จะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ลงได้ ดังนั้น จึงมีแนวคิดที่จะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา เพื่อหาสายพันธ์ที่ดีมีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส รวมทั้งการทำการกลายพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปสในลักษณะ Over-Production เพื่อที่จะพัฒนาสายพันธุ์ที่เป็นไปได้ในเชิงการค้า และศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยใช้เอนไซน์ที่สังเคราะห์จากเชื้อยีสต์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 ทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากธรรมชาติ และคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย (Mutant) โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild Type)

2 ทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถและมีความคงตัวในการผลิตไลเปสเพื่อการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

3 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกเพื่อเร่งปฏิกิริยา-ทรานส์เอสเทอริพิเคชันจากน้ำมันปาล์มโดยวิธีการ Response Surface Methodology และวิเคราะห์ปริมาณไบโอดีเซลที่ได้

4 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกและจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์ โดยวิธีการใช้สารเคมี รังสีอัลตราไวโอเลต และรังสีแกมม่า และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและมากขึ้นกว่าเดิมเรื่อยๆ โดยการเปรียบเทียบทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ รวมทั้งการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์กลายของยีสต์ที่มีความสามารถและมีความคงตัวในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล โดยการใช้เทคนิกธิน เลเยอร์ โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography) ในการทดสอบ จากนั้นนำสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริพิ-เคชันน้ำมันปาล์ม เพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ และทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเครื่อง Gas Chromatography รวมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

ทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากวัสดุเศษเหลือจากโรงงานผลิตน้ำมันประเภทต่างๆ มาทำการกลายพันธุ์ด้วยการใช้สารเคมี รังสีอัลตราไวโอเลต หรือรังสีแกมม่า และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเรื่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีความคงตัวมากกว่าสายพันธุ์กลาย และนำเชื้อที่คัดเลือกมาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชันน้ำมันปาล์มโดยวิธี Surface metrodology เพื่อผลิตไบโอดีเซล รวมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อที่คัดเลือกเพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

1.6 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล (Biomass) สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับยานพาหนะได้ โดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซล (diesel) จึงสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยไม่จำเป็นต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ อีกทั้งยังช่วยรักษาสภาพเครื่องยนต์ให้ใช้งานได้นานอีกด้วย เนื่องจากออกซิเจนในไบโอดีเซลให้การสันดาปที่ดีกว่าดีเซลปกติ ทำให้มีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงช่วยลดการอุดตันของระบบไอเสีย นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังเป็นเชื้อเพลิงสะอาด กล่าวคือไม่มีก๊าซซัลเฟอร์(Sulfur)จากการเผาไหม้และไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ การใช้ไบโอดีเซลสามารถลดปรากฏการณ์ฝนกรด ปรากฏการณ์เรือนกระจก ลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ (NO) กลุ่มซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO) และสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่สมบูรณ์ลงได้ (Fukuda, และคณะ, 2006) ทำให้ไบโอดีเซลได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน

อย่างไรก็ดีสารชีวมวลที่ได้จากพืช หรือน้ำมันจากสัตว์ชนิดต่างๆไม่สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยตรง เนื่องจากน้ำมันเหล่านี้ มีค่าความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลประมาณ10- 20 เท่า มีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันอิสระที่อยู่ในน้ำมัน และยางเหนียว (Gum) เนื่องจากปฏิกิริยาการรวมตัวกับออกซิเจน (oxidation)การตกตะกอนของคาร์บอน และปฏิกิริยาการเกิดเป็นโพลิเมอร์ (polymerization) ในขั้นตอนการเก็บและการเผาไหม้ (combustion) มีน้ำเป็นองค์ประกอบเป็นต้น จึงได้มีผู้ที่จะดัดแปลงคุณภาพของน้ำมันต่างๆ ให้ใกล้เคียงกับคุณสมบัติของน้ำมันดีเซลโดยทำได้หลายวิธีคือ การเจือจาง (dilution) ไมโครอิมัลซิฟิเคชั่น (microemulsification) ไพโรไลซิส (pyrolysis) และ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (tanesterification)

1.7 คำสำคัญของการวิจัย

การกลายพันธุ์ การคัดเลือก เชื้อยีสต์ ไลเปส น้ำมันปาล์ม

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นการศึกษาแนวทางและความเป็นไปได้ในการใช้น้ำมันปาล์มมาใช้ทดแทนพลังงานน้ำมันเชื้อเพลิง ซึ่งมีราคาแพงและมีการนำเข้า เพื่อลดการนำเข้ามันเชื้อเพลิงและเป็นการพัฒนาวิธีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อใช้งานได้กว้างขวางมากขึ้นจากแหล่งวัตถุดิบในประเทศ และการผลิตโดยการใช้ตัวเร่งทางชีวภาพนับเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งหน่วยงานที่นำมาผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ก็คือประชาชนผู้สนใจการผลิตน้ำมันโบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร เกษตรกรผู้ปลูกปาล์ม และบริษัทเอกชนที่จะมีการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นหนทางหนึ่งของการพึ่งตนเองได้เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดวิกฤตการณ์การขาดแคลนน้ำมัน หรือน้ำมันมีราคาแพงมากๆ และงานวิจัยนี้จะได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ทั้งในระดับชาติและระดับนานาชาติอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำมันปาล์ม

น้ำมันปาล์ม ประกอบด้วย กรดไขมัน ที่เกิดพันธะเอสเทอร์กับกลีเซอรอล มีกรดไขมันอิ่มตัวสูง มีกรดไขมันอิ่มตัวที่มีคาร์บอน 16 ตัว คือ กรดปาล์มิติก และกรดโอลีอิก ประเภทโมโนอันแซททูเรทเทต (monounsaturates) น้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะมีสารโทโคไตรอีนอล (tototrienol) ซึ่งเป็นส่วนของวิตามินอีตามธรรมชาติปริมาณมาก

ส่วนประกอบของกรมไขมันในน้ำมันปาล์ม มีดังนี้ คือ

- กรดปาลมิติก (C16) 44.3%
- สเตียริก (กรดไขมันอิ่มตัว ; C18) 4.6%
- ไมริสติก (กรดไขมันอิ่มตัว ; C14) 1%
- โอลีอิก (กรดไขมันอิ่มตัวพันธุคู่ 1 พันธะ ; C18) 38.7%
- ลิโนลีอิก (กรดไขมันอิ่มตัวพันธุคู่มากกว่า 1 พันธะ ; C18) 10.5%
- อื่นๆ 38.7%

2.2 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการทั่วๆ ไปที่ปัจจุบันใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมีดังนี้ ทั้งที่เป็นแบบยากและง่าย แบบง่ายจะได้มาจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น และการผสมโดยตรง ตัวอย่างการผลิตดังต่อไปนี้ (Ma and Hanna, 1999)

- การใช้โดยตรง (direct use and blending)
- ไมโครอิมัลชั่น (microemultion)
- กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermalcracking or pyrolysis)
- กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งประกอบไปด้วยวิธีการย่อยๆ ก็คือ
  - สปอนิฟิเคชั่น (sponification)
  - เอสเทอริฟิเคชั่น (esterification)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การใช้โดยตรง (direct use and blending)

การใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรือผสมลงในน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ เพื่อต้องการลดความหนืดของน้ำมันพืช เมื่อนำมาใช้จะก่อปัญหากับเครื่องยนต์ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถทำงานได้ดีกับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม แต่ก็มีปัญหามากมายเกิดขึ้นตามมา เช่น มียางเหนียวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไขมันอิสระในระหว่างการเก็บรักษา หรือปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่น จากขั้นตอนการเผาไหม้ ซึ่งลักษณะการเผาผลาญพลังงานระหว่างน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันดีเซลพบว่าเป็นไปในแบบเดียวกัน และมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของ น้ำมันพืชต่อน้ำมันดีเซล ในอัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

2.2.2 ไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่อยู่ในสภาวะสมดุลของระบบสองวัตภาคระหว่างน้ำและน้ำมัน ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 1-150 นาโนเมตร ต้องมีสารช่วยลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดมีประจุและไม่มีประจุเพื่อทำให้เกิดความคงสภาพ วิธีการทำไมโครอิมัลชั่นนี้ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืด โดยการใช้สารละลาย เช่น แอลกอฮอล์ คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

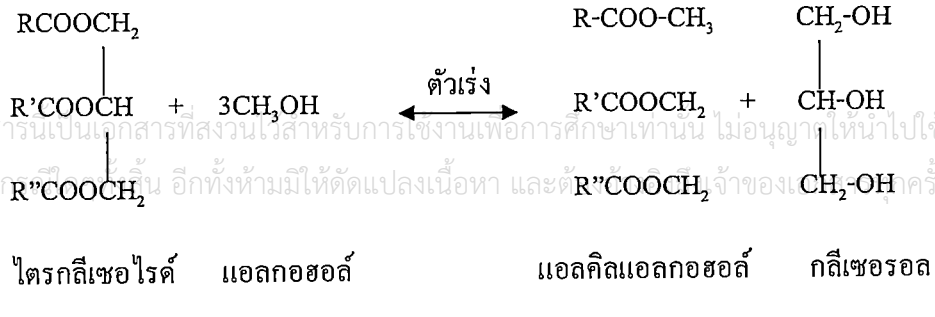
2.2.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน

ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่นโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 450-850 องศาเซลเซียส ไขมันสามารถถูกไพโรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลงได้ดังแสดงในรูปที่ 1 แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกกำจัดออกไป ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้กระบวนการนี้ มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนน้ำมันเบนซินมากกว่าเกิดไบโอดีเซล

2.2.4 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไขมันสัตว์ หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ เพื่อเปลี่ยนรูปสารประกอบเป็นสารประกอบเอสเทอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาเป็นไปดังรูปที่ 2 ซึ่งปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับและการเติมแอลกอฮอล์มากเกินมักจะใช้เพื่อเป็นการบังคับปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สัดส่วนโดยโมล ของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน คือ 3:1 ซึ่งตัวเร่งที่ใช้ในนี้มีทั้งสารละลายกรด สารละลายเบส และเอนไซม์ไลเปส

ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นที่สุดและเป็นของเหลวที่มีขั้วสูง ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้มากที่สุด

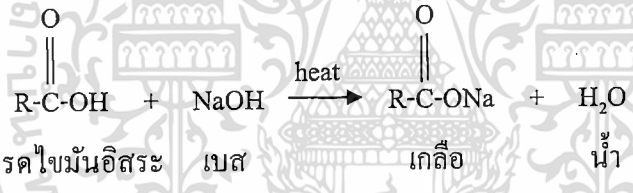


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

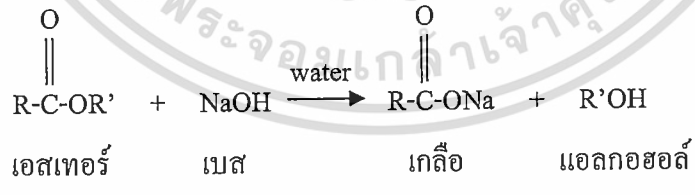
รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากไตรกลีเซอร์ไรด์และแอลกอฮอล์

2.4.4.1 สปอนิฟิเคชัน (sponification)

ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาการทำสบู่ สามารถเกิดได้จากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระกับสารละลายเบสโดยมีความร้อนในปฏิกิริยาหรือเอสเทอร์กับสารละลายเบสโดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2 และ 3



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระโดยความร้อน



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันจากเอสเทอร์ในปฏิกิริยาที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

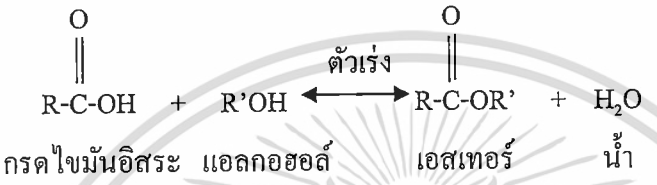
จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยา กล่าวคือ ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้เป็นแอลคิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลได้แต่กลับทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันอิสระและแอลคิลเอสเทอร์เปลี่ยนเป็นสบู่ซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการ และทำให้ต้องกำจัดสบู่เหล่านั้นออกอีกด้วย

2.4.4.2 เอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเกิดจากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระ และแอลกอฮอล์ ได้สารผลิตภัณฑ์ คือ เอสเทอร์ ดังรูปที่ 4 ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้โดยใช้เอนไซม์ไลเปส หรือใช้กรดแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเกิดจากกรดไขมันอิสระ

2.3 การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

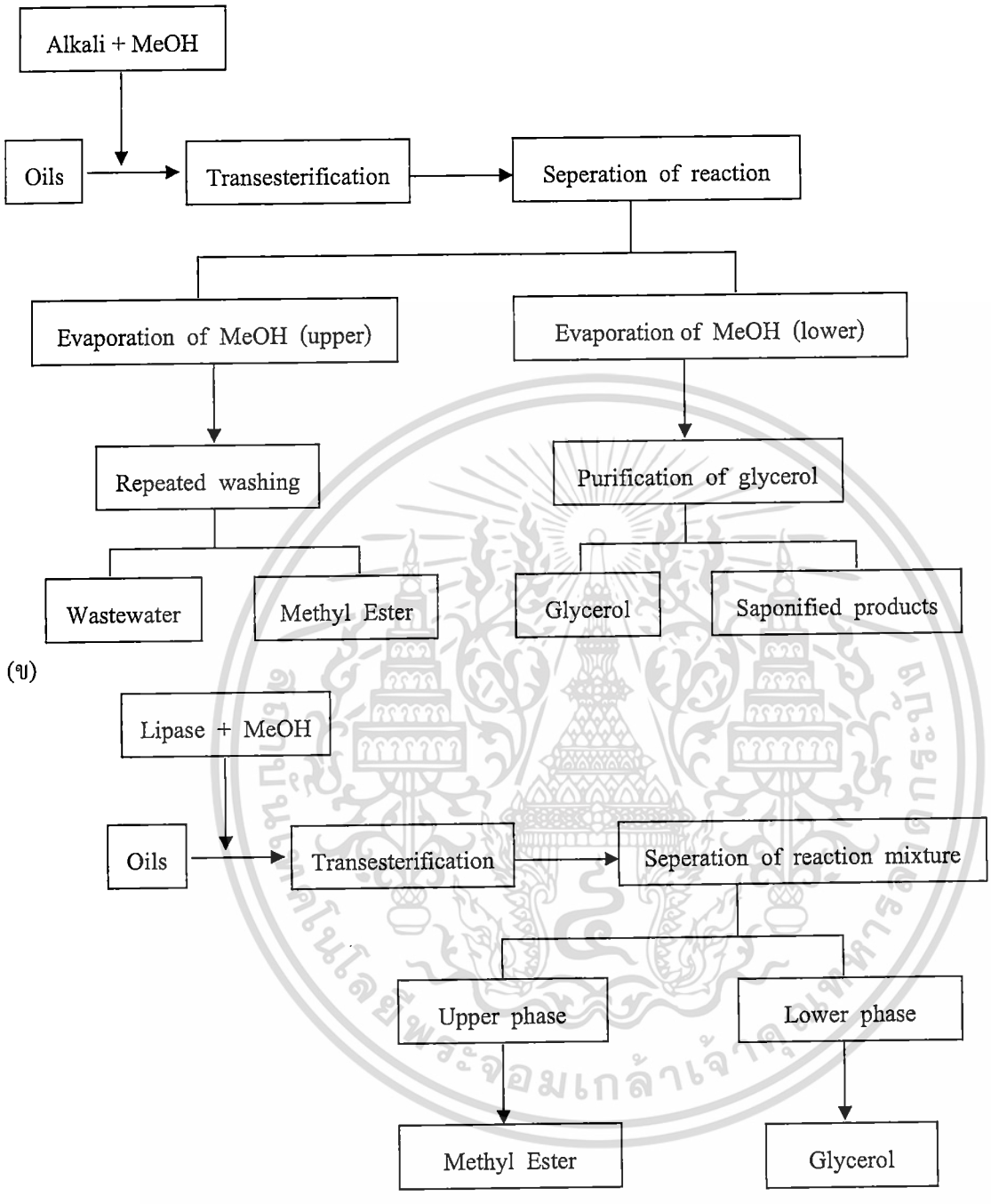
การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด คือเบส กรด และเอนไซม์

การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีข้อจำกัด ดังนี้ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ง่ายต่อการแยกกลีเซอรอลไม่มีกระบวนการล้างที่ยุ่งยาก แต่การผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสต้องใช้ต้นทุนสูง ดังตารางที่ 2 แผนภูมิการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้เบส และเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 5

2.4 คุณสมบัติของน้ำมันพืช และไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล

น้ำมันพืชได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่มีพิษ และสามารถทดแทนน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดี (Noureddini และคณะ, 2005) น้ำมันพืชส่วนใหญ่มีความหนืดสูง น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 600 - 900 ซึ่งสูงกว่าน้ำมันดีเซลถึง 20 เท่า จุดวาบไฟ (flash point) ประมาณ 200 องศาเซลเซียส cetane number ประมาณ 32-40 ค่าความร้อนน้อยกว่าน้ำมันดีเซลประมาณร้อยละ 10 (Barnwal และ Sharma, 2004) ซึ่งคุณสมบัติของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้แสดงในตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบส (ก) และไลเปส (ข) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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[c]	9.48 (30°C)	53	36.7	—	192	0.895	0.002
Used corn oil[c]	6.23 (30°C)	63.9	42.3	—	166	0.884	0.0013
Diesel fuel[b]	12–3.5 (40°C)	51	35.5	—	—	0.830–0.840 (15°C)	—
JIS-2D[c] (Gas oil)	2.8 (30°C)	58	42.7	—	59	0.833	0.05

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งอาจจะผลิตเอมไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายใน และที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ไลเปสที่ได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรั่ม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูง และสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย (ปวีณา, 2547)

ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่าย และคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วย โดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugora* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคมีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphycoccus* (ปวีณา, 2547)

2.6 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon และคณะ 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชทีเหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ปริมาณเกลือและชนิดของอิมัลซิฟายเออร์(emulsify)ที่ใช้ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Malcata *et al.*, 1992) ในส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีช่วงพีเอชเป็นกรด พบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.9-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gibert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสารตั้งต้น เป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata และคณะ 1992)

2.7 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

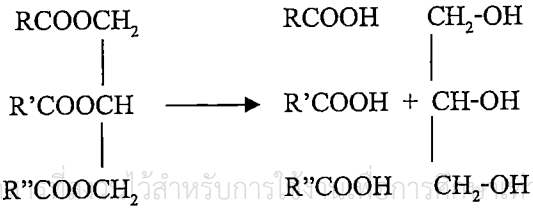
Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่ง บนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอลเอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอรอลได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอร์ไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นอินเตอร์มีเดียตในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea, Corynebacterium acnes, Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens*

กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไดกลีเซอร์ไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ (1,2) (2,3) – โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้ามีการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอร์ไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์ *Aspergillus niger, Mucoro javanicus* และในพวก *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์

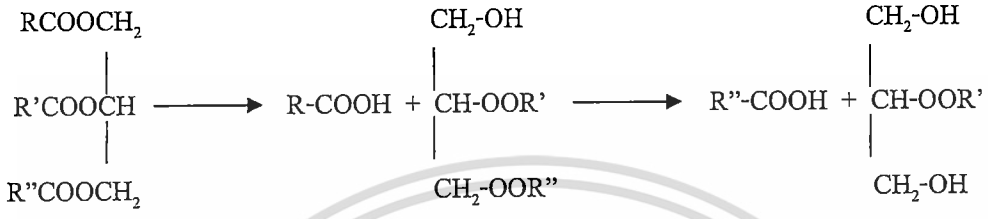
กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไปมีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวกความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลแต่ถ้ามีเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรเอซิล- กลีเซอรอลความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง ดังรูปที่ 6

(1) เอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

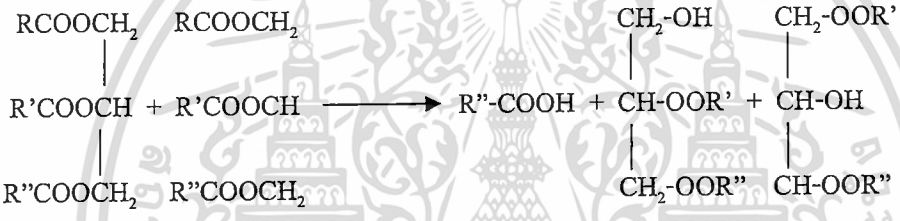


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



(3) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



รูปที่ 2.6 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะ

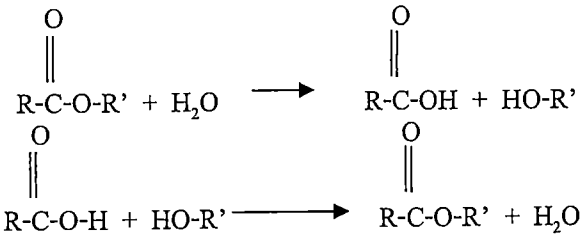
ที่มา : Macrae (1983)

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

(1) ปฏิกิริยาสลายเอสเทอร์ (hydrolysis of ester)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of ester)

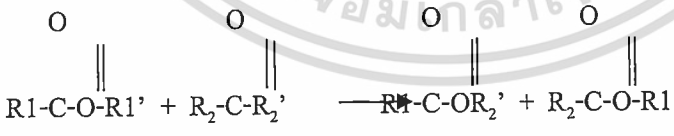


(3) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟีเคชัน (transesterification reaction)

(3.1) ปฏิกิริยาแอซิโดไลซิส (acidolysis)

(3.2) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis)

(3.3) ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟีเคชัน (interesterification)



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Yamane (1987)

2.8 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้ในแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา (Mahadik และคณะ, 2002) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เชื้อราเป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุด และถูกนำมาใช้อย่างมากในทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร (Mahadik และคณะ, 2002) เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Geotrichum, Penicillium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus* และ *Rhizomucor* เป็นต้น (Cardenas และคณะ, 2001 ; Tan และคณะ, 2003) ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Candida* และ *Yarrowia lipolytica* (Tan และคณะ, 2003 ; Fickers และคณะ, 2006) เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Pseudomonas, Bacillus* และ *Staphylococcus* เป็นต้น (Jaeger และคณะ, 2000)

2.9 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส

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

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสมีข้อเสีย คือ เป็นต้นเหตุทำให้เกิดการหืนในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม กลิ่นหืนที่เกิดขึ้นเป็นกลิ่นของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย เช่น กรดบิวทิริค การโฮโมจีไนเซชั่นน้ำนมจะช่วยทำให้เอนไซม์ไลเปสไฮโดรไลซ์ไขมันนมได้เร็วขึ้น เกิดกลิ่นหืนได้ถึงแม้จะทำภายในระยะเวลาสั้นก็ตาม เพราะการโฮโมจีไนเซชั่น การกวน หรือการเขย่าช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนั้นการทำให้น้ำนมเย็นลงถึง 4 องศาเซลเซียส แล้วทำให้ร้อนขึ้นถึง 30 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงถึง 5 องศาเซลเซียส อีกครั้งหนึ่ง จะช่วยทำให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปย่อย fat globule ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เพราะเป็นการช่วยให้เอนไซม์ถูกดูดซับอยู่บน fat globule ได้ดีขึ้น นอกจากนั้นยังมีผู้ทดสอบพบว่าไลเปสเป็นตัวทำให้เกิดการหืนในเนยด้วย

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีหลายประการคือ

2.10.1 ปริมาณเมทานอล

ศึกษาผลของการเติมเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลอัตราส่วนโดยโมลคือ 1:1 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเมื่อเติมเอทานอลครั้งละ 1 โมล อีกสองครั้งหลังจากการเติมสารตั้งต้นเริ่มต้น สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้นและปริมาณกรดไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายลดลง (Kaieda และคณะ, 1999)

ศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าวโดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันระข้าวและเมทานอล อัตราส่วนโดยโมล 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp.* และใช้ปริมาณน้ำ 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารตั้งต้น พบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมงเมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วนโดยโมล 1:4 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 79.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอล อัตราส่วนโดยโมลเป็น 1:6 จะผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ต่ำ เนื่องจากปริมาณเมทานอลสูงเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (Kamini, และ Lefuji., 2001)

ได้ทดลองเพื่อศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันผสมเมทานอล โดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยได้ศึกษาเลือกเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งจาก Crude lipase และ Immobilized lipase พบว่าในปฏิกิริยาที่มีสารละลายอินทรีย์ (เฮกเซนและปิโตรเลียมอีเทอร์) ให้ผลิตภัณฑ์ได้สูงถึงร้อยละ80 จาก *Pseudomonas. fluoresens* ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่มีสารละลายอินทรีย์พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดถึงมากกว่า ร้อยละ 90 ที่สัดส่วนของน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1 ต่อ 4.5 จาก *P. fluoresens* เช่นกัน เนื่องจากถ้าอัตราส่วนเมทานอลสูงกว่านี้จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน และได้ทำการทดลองเพื่อลดผลของเมทานอลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ โดยวิธีการเติมเป็นขั้นทั้งหมด 3 ขั้น พบว่าสามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์ได้ (Soumanou and Bornscheued, 2003)

2.10.2 อุณหภูมิ

ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันพืชโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida Antarctica* ศึกษาที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากปฏิกิริยาดำเนินไป 6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิค่าร้อยละของผลผลิตจะเพิ่มขึ้นและเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าร้อยละของผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 29.9 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง (Shimada และคณะ, 1999)

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าวโดยเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และที่เวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 62.3 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง (Kamini, และ Lefuji., 2001)

2.10.3 ปริมาณน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

น้ำเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมาก ในด้านการทำงานของเอนไซม์ทั้งในด้านการรักษารูปธรรมชาติของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างสามมิติของไลเปสบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์จะมีสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ทำหน้าที่เป็นฝาปิดตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้ โดยสายพอลิเปปไทด์นี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่และขดตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (α-helical lid) โดยฝาปิดนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ อีกทั้งน้ำจะเข้าร่วมทั้งโดยตรงและโดยอ้อมกับพันธะต่าง ๆ ของเอนไซม์ เช่น ไฮโดโฟบิกอินเตอร์แอคชัน (hydrophobic interactin) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงแวนเดอร์วาลล์ (van der Waal interaction) การกำจัดน้ำออกจากระบบโดยสิ้นเชิงจะทำให้เกิดการบิดทำลายโครงรูปของเอนไซม์อย่างรุนแรง อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) และไม่สามารถทำงานได้ (Klibanov, 1986) อีกทั้งน้ำยังทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายอินทรีย์สัมผัสกับเอนไซม์โดยตรง ทำให้ลดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์

ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่าง น้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล อัตราส่วนโดยโมล คือ 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 9.0 มิลลิเมตร พบว่าเมื่อเวลาที่ใช้เอนไซม์ 1.2-9.0 มิลลิเมตร (ประมาณน้ำ ร้อยละ 4-30 ของสารตั้งต้น) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มสูงขึ้งถึงร้อยละ 80-90 (Kaieda และคณะ, 1999)

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

ศึกษาผลของปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Cryptococcus spp.* ใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันรำข้าวและเมทานอลอัตราส่วนโดยโมลคือ 1:4 และใช้ปริมาณน้ำร้อยละ 20-200 โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มน้ำเป็นร้อยละ 80-100 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 62.6-66.4 แต่เมื่อเพิ่มปริมาณมากกว่าร้อยละ 100 ค่าเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ลดลง (Kamini, และ Lefuji., 2001)

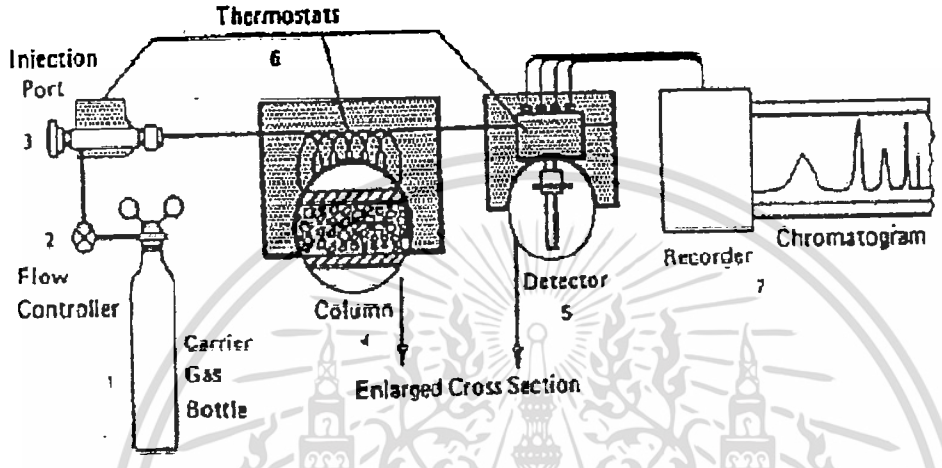
2.11 แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography)

แก๊สโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคสำหรับแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย (volatile compounds) โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่งแล้วให้ไอของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

137308

เหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่(stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือแก๊สตัวพา (carrier gas) องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่ต่างกัน โดยองค์ประกอบภายในเครื่อง Gas Chromatography แสดงในรูปที่ 8

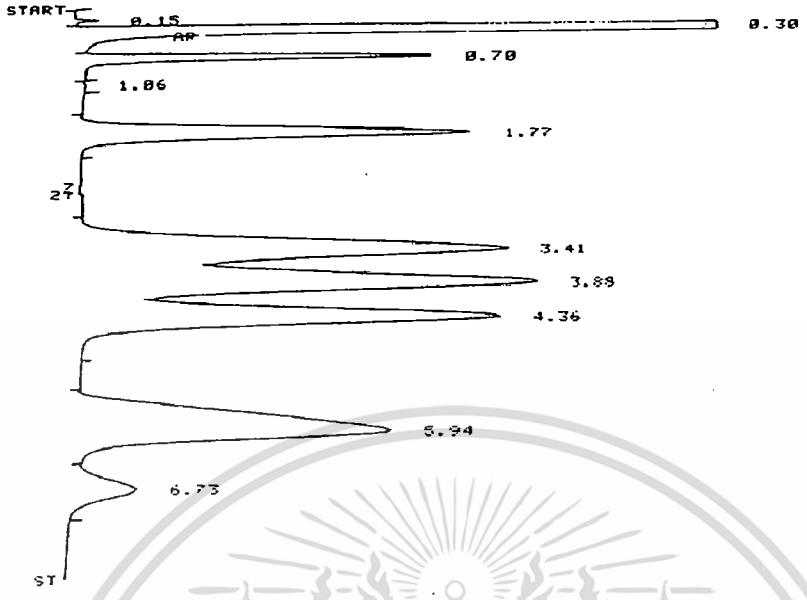


รูปที่ 2. 8 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง Gas Chromatography

ที่มา : อมร และคณะ (2539)

ในการวิเคราะห์ สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ sample injection port สารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนผ่านคอลัมน์และถูกตรวจวัดโดยเครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากเครื่องตรวจวัดจะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปของโครมาโตแกรม (chromatogram) ดังรูปที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



HP RUN # 2 MAR/28/76 TIME 23:51:05
ID:10-12-43 BOTTLE 19
ISTD

RT	EXP RT	AREA	CAL #	AMT
0.70	0.70	79380	2	10.869
1.77	1.75	195400	3	24.936
3.41	3.40	188100	4	24.555
3.88	3.87	195400	5	24.059
4.36	4.35	167800	6	19.927
5.94	5.93	195400	(R) 1	
6.73	6.73	31880	7	4.136

DIL FACTOR: 1.0000 E+ 0 ISTD AMT: 1.3400 E+ 1
SAMPLE AMT: 7.4250 E+ 1

รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องบันทึกข้อมูลของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี
ที่มา : อมร และคณะ (2539)

แก๊สโครมาโตกราฟีแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

(1) แก๊ส-ของแข็งโครมาโตกราฟี (gas-solid chromatography หรือ GSC) วิธีนี้ให้เฟสคงที่เป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (adsorption) สารที่เป็นแก๊สซึ่งต้องการแยกได้ และไม่มีสารอื่นใดเคลือบอยู่ ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ค่อนข้องจะแคบ เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เท่านั้น ดังนั้น คอลัมน์ที่ใช้มักจะบรรจุด้วย activated solid

(2) แก๊ส-ของเหลวโครมาโตกราฟี (gas-liquid chromatography) สารที่เป็นแก๊สหรือไอของสารที่ผสมกันอยู่เมื่อผ่านคอลัมน์จะสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยการกระจายตัวที่แตกต่างกันของแก๊สหรือไอระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่ที่มีของเหลว (liquid phase) ฉาบอยู่บนของ แข็ง หรือมีค่า partition coeffecient ต่างกัน วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นไอหรือแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1 การประยุกต์ใช้งานแก๊สโครมาโตกราฟี

(1) การวิเคราะห์มลพิษทางอากาศ เช่น lead alkyls, hydrocarbon, PAN, CO, aldehyde, keton, SO_2, H_2S และออกไซด์บางชนิด

(2) การวิเคราะห์ทางด้านคลินิก โดยทั่วไปงานทางด้านคลินิกมักเป็นงานที่มีปริมาณหรือจำนวนตัวอย่างมาก การวิเคราะห์และแยกโดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟีนั้นสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ตัวอย่างของสารที่แยกและวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี ได้แก่ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน กรดไขมัน สารอนุพันธ์ ไตรกลีเซอไรด์เสตอรอยด์ บาร์บิทูเรต และวิตามินซี

(3) การวิเคราะห์วัสดุสารเคลือบ เช่น ยาง เรซินสังเคราะห์ เป็นต้นที่สามารถนำมาวิเคราะห์และแยกได้โดยใชแก๊สโครมาโตกราฟี

(4) การวิเคราะห์สารพวกน้ำมันหอมระเหย การวิเคราะห์สารประเภทนี้สามารถทำได้หลายเทคนิคแต่แก๊สโครมาโตกราฟีให้ผลที่ดี สะดวกและรวดเร็ว ตัวอย่างของสารที่วิเคราะห์ได้โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟี ได้แก่ น้ำมันจากสะระแหน่น้ำมันจากมะนาว น้ำมันมะกอก เป็นต้น

(5) การวิเคราะห์อาหาร โดยปกติแล้วในการวิเคราะห์อาหารมักจะใช้ TLC ร่วมกับแก๊สโครมาโตกราฟีเสมอ โดยเฉพาะการวิเคราะห์สารจำพวกสารต้านอนุมูลอิสระและสาร preservative นอกจากนี้ยังใช้ในการวิเคราะห์สารปนเปื้อน การสลายตัวของสาร ในอาหารและเครื่องดื่ม

(6) การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลง นิยมใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีเพราะให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี มีความถูกต้องสูงโดยเฉพาะยาฆ่าแมลงที่มีสารประกอบพวก halogenated, chlorinated และ organophosphate เป็นส่วนประกอบ

(7) การวิเคราะห์สารปิโตรเลียม ใช้แยกและวิเคราะห์ปริมาณส่วนผสมของแก๊สธรรมชาติที่ใช้กันอย่างกว้างขวางผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมที่ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ พวกไฮโดรคาร์บอน น้ำมันดิบ พอลิไซคลิก โครมาติก เป็นต้น

(8) การวิเคราะห์ยา ปัจจุบันมีการใช้แก๊สโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์สารประกอบต่างๆ ทางด้านการผลิตยาเนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบพวก alkoloids ชนิดต่าง ๆ

2.12 การวิเคราะห์ไบโอดีเซล

Samukawa และคณะ, 2000 ทำการวิเคราะห์โครมาโตกราฟีแบบธินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี(Thin Layer Chromatography) โดยการใช้แผ่นเจลซิลิกา 60 F254 ขนาด 20 x 20 ซม. (Merck) โดยการใช้ตัวอย่างน้ำมัน 1 ไมโครลิตร จุดบน TLC plate สารละลายที่แช่แผ่น TLC ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะซิติก เท่ากับ 90 : 10 : 2 (ปริมาตร/ปริมาตร และใช้สารละลายของกรมซัลฟุริก : เมทานอล 1 : 1 (ต่อน้ำหนัก) ฉีดพ่นแผ่นเจลซิลิกาและจะสังเกตเห็นจุดหลังจากการอบที่ 110° ซ. เป็นเวลา 30 นาที

Yang และคณะ, 2009 ทำการวิเคราะห์ไบโอดีเซลโดยการใช้ แก๊สโครมาโทกราฟี โดยการใช้ GC Hewlett Packard 5890 Series ทำการวิเคราะห์ Fatty acid methyl ester โดยการใช้คอลัมภ์ HP 5 (crosslinked PHME Siloxane ร้อยละ 5 ขนาด 0.32 มม.X 30 ม. และใช้ FID detector อุณหภูมิของคอลัมภ์เพิ่มขึ้นจาก 70 ° ซ. เป็น 300 ° ซ. ในอัตรา 10 ° ซ./ นาที และคงไว้ที่ 300 ° ซ. เป็นเวลา 3 นาที ทำการเปรียบเทียบ retention time และ peak area กับ peak มาตรฐานของ Fatty acid methyl ester ทำการคำนวณปริมาณทั้งหมด (ในรูปโมล) ของ Fatty acid methyl ester หรือไบโอดีเซลในสารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อยีสต์จากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมัน

โดยเป็นโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มคือ บริษัท สุขสมบูรณ์จำกัด 97 หมู่ 4 ตำบล ห้างสูง อำเภอหนองใหญ่ จังหวัด ชลบุรี 20190 โดยเก็บตัวอย่างตามบริเวณต่างๆ ในโรงงาน ดังนี้

1.น้ำทิ้งจากบริเวณการผลิต
2. ทะลายปาล์มหลังบีบ
3. เส้นใยปาล์ม
4. กากปาล์มหลังบีบ
5. กะลาปาล์ม
6. ผลปาล์ม
7. เศษปาล์มบริเวณผลิต
8. ดินบริเวณการผลิต
9. ผลปาล์มหลังอบ
10. เส้นใยปาล์มหลังอบ
11. เมล็ดปาล์มหลังบีบ
12. ปาล์มย่อยแล้ว
13. ตัวอย่างปาล์มมะพร้าว

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร yeast malt agar (YM agar)
2. อาหาร Tributyrin agar
3. อาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1

3.3 สารเคมี

1. น้ำมันปาล์ม
2. สารสกัดจากยีสต์
3. สารสกัดจากมอลต์
4. น้ำตาลเดกโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ไดโพแทสเซียสไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
6. ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.7H_2O$)
7. โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$)
8. ทวีน-80
9. พาราฟิน
10. กลีเซอรอล
11. เบคโตเปปโตน
12. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)
13. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)
14. ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
15. พาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตรท
16. 2-โพรพานอล
17. ไตรตรอน เอ็ก-100
18. กัมอาราบิก
19. นิสเตติน (Nystatin)
20. สเตร็ปโตมัยซิน (Streptomycin)
21. น้ำกลั่น
22. สีย้อมเมทิลีนบลู
23. เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate)

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (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
17. เครื่องฉายรังสีแกมมา

3.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ

3.5.1 การคัดเลือกและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Tian wei และคณะ, 2003)

นำตัวอย่างที่เก็บมาจากโรงงานน้ำมันมาทำการตรวจสอบหาจุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ ไลเปส โดยการนำตัวอย่างมา spread plate ในอาหาร tributyrin agar เติมสารสเตร็ปโตมัยซิน 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดได้ บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.1.1 คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีวงใสรอบโคโลนี (clear zone) มาทำการแยกเชื้อ โดยวิธี streak plateในอาหาร YM ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.1.2 เลือกโคโลนีที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว มาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นเชื้อยีสต์เพื่อดูลักษณะของเซลล์ให้แน่ชัดว่าเป็นเซลล์ยีสต์ และมีความบริสุทธิ์

3.5.1.3 หากเซลล์ยีสต์ที่ได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์ ให้ทำการแยกซ้ำด้วยการ streak plate ในอาหาร YM แล้วทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง จนกระทั่งได้เซลล์ยีสต์ที่มีความบริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บในอาหารเอียง YM เพื่อเก็บไว้เป็น stock culture เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป
โดยคัดเลือกทั้งหมด 200 สายพันธุ์

3.5.2 วิธีการเก็บ stock culture YM slants (Tian wei และคณะ, 2003)

3.5.2.1 เตรียมอาหาร YM ใส่หลอดทดลอง 5 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วย จุกสำลี ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเอียงหลอดทดลองให้ได้วุ้นอยู่ในลักษณะเอียง (slant) รอจนวุ้นแข็งตัวเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 เขี่ยเชื้อยีสต์ที่ได้จากการแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว และทำการทดสอบแล้วว่าบริสุทธิ์ ถ่ายลงในอาหารเอียง โดยเทคนิคปลอดเชื้อและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 1 เดือน

3.5.2.3 เชื้อยีสต์อีกชุดเก็บในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 คืน จากนั้นย้ายไปเก็บในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.5.3 คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถใช้ในน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (Frenken และคณะ1992)

3.5.3.1 เตรียมอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มแป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ย้ายลงอาหารใหม่ (YM) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเหลว โดยใส่เชื้อจำนวน 1 ลูป หลังจากนั้นนำเชื้อไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

3.5.3.2 เก็บส่วนที่เป็นอาหารมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 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 คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล

3.5.3.4 นำเชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดที่คัดลือกได้ 7 สายพันธุ์มาคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งตามข้อ 3.5.3.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 1 สายพันธุ์ นำมาทำการทดลองขั้นต่อไป

3.5.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัตราไวโอเลต

3.5.4.1 เลี้ยงเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ดีที่สุดจากการคัดเลือกข้อ 3.5.3.4 มาย้ายเชื้อลงในอาหาร YM บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงทำให้เป็นสารละลายของเซลล์ โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแล้วใส่ลงในน้ำกลั่นที่มีทวีน 80 ร้อยละ 0.01 ลงไป นับจำนวนเซลล์ให้ได้ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนับเซลล์โดยใช้ฮีมาไซโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 นำสารละลายเซลล์ที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่าน การฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปฉายรังสีอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยกวนสาร ละลายอยู่ตลอดเวลาบนเครื่องคนสาร เก็บตัวอย่างสารละลายที่เวลา 20, 40, 60 และ 80 วินาที โดยที่ 0 วินาทีเป็นชุดควบคุม ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาทำการเจือจางสารละลายเซลล์ที่ 10^{-1}-10^{-4} และทำการ spread plate ลงในอาหาร YM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.4.3 การหาร้อยละการอยู่รอด นำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}-10^{-4} ที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มานับจำนวนโคโลนีทั้งหมดโดยวิธี total plate count และคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัตราไวโอเลต ให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10

3.5.4.4 หลังจากได้ช่วงเวลาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 นำเชื้อมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัตราไวโอเลตอีกครั้งตามข้อ 3.5.4.2 โดยเลือกเฉพาะช่วงเวลาที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 เท่านั้น แล้วนำมา spread plate ลงในอาหาร Tributyrin Agar ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตติน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหาร Tributyrin Agar เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยดูจากการสร้างวงใส จำนวน 150 สายพันธุ์ และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามข้อ 3.5.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

3.5.4.5 นำเชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดที่คัดเลือกได้ 12 สายพันธุ์มาคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งตามข้อ 3.5.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 1 สายพันธุ์นำมาทำการทดลองขั้นต่อไป

3.5.5 การกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS)

3.5.5.1 เลี้ยงเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.5.4.4 ในอาหารเอียง (YM) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5.5.2 นับจำนวนและเตรียมสารละลายของเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)

3.5.5.3 นำสารละลายเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารเคมี EMS จำนวน 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จับเวลา 20, 40, 60 และ 80 นาที ตามลำดับ และที่ 0 วินาทีเป็นชุดควบคุม เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วย 5% โซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-4}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร มา spread plate โดยใช้อาหาร YM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

นับจำนวนโคโลนีโดยวิธี total plate count และหาอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10

3.5.5.4 หลังจากได้ช่วงเวลาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 นำเชื้อมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์อีกครั้งด้วยสารเคมี EMS ตามข้อ 3.5.5.3 โดยเลือกเฉพาะช่วงเวลาที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 เท่านั้น แล้วนำมา spread plate ลงในอาหาร Tributyrin Agar ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตติน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหาร Tributyrin Agar เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยดูจากการสร้างวงใส จำนวน 300 สายพันธุ์ และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามข้อ 3.5.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

3.5.5.5 นำเชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดที่คัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์มาคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งตามข้อ 3.5.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 1 สายพันธุ์นำมาทำการทดลองขั้นต่อไป

3.5.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา

3.5.6.1 เลี้ยงเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.5.4.4 ในอาหารเอียง (YM) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5.6.2 นับจำนวนและเตรียมสารละลายของเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)

3.5.6.3 นำสารละลายเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิตร ฉายด้วยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์ โดยความเข้มข้น 0 กิโลเกรย์ เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำมาทำการเจือจางสารละลายเซลล์ที่ 10^{-1}-10^{-4} และทำการ spread plate ลงในอาหาร YM ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.6.4 การหาร้อยละการอยู่รอด นำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงรังสีแกมมาที่ระดับการเจือจาง10^{-1}-10^{-4} ที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มานับจำนวนโคโลนีทั้งหมดโดยวิธี total plate count และคำนวณหาร้อยละการอยู่รอดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคัดเลือกเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ให้มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10

3.5.6.5 หลังจากได้ช่วงความเข้มข้นของรังสีแกมมา ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 แล้วนำมา spread plate ลงในอาหาร Tributyrin Agar ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตติน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ให้วงใสในอาหาร Tributyrin Agar เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยดูจากการสร้างวงใส จำนวน 300 สายพันธุ์ และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามข้อ 3.5.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

3.5.6.6 นำเชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดที่คัดเลือกได้ 10 สายพันธุ์มาคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งตามข้อ 3.5.3 หลังจากนั้นคัดเลือกสารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 1 สายพันธุ์นำมาทำการทดลองขั้นต่อไป

3.5.7 การเตรียมหัวเชื้อที่จะใช้เป็นตัวเร่งในการผลิตไบโอดีเซล

3.5.7.1 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตหัวเชื้อ โดยใช้ปริมาณกากน้ำตาลร้อยละ4, 6, 8 และ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักของรำข้าว (Sevgi and Gonul, 2010) ที่ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, และ 84 ชั่วโมง ทำการวัดพีเอช หาปริมาณความชื้น นับจำนวนเซลล์ และหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.5.7.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตหัวเชื้อ โดยใช้ปริมาณกากน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนักของรำข้าว ที่ปริมาณความชื้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 (Liu *et.al.*, 2013) เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, และ 84 ชั่วโมง ทำการวัดพีเอช หาปริมาณความชื้น นับจำนวนเซลล์ และหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.5.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้หัวเชื้อเร่งปฏิกิริยา

การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยทำการศึกษา 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ คืออัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน ร้อยละของปริมาณหัวเชื้อ และเวลา และใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) แสดงดังตารางที่ 4 และเมื่อทำการพลอตกราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างเวลากับอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน เวลากับร้อยละของปริมาณหัวเชื้อเร่งปฏิกิริยาและอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันกับร้อยละของปริมาณหัวเชื้อ

ตารางที่ 3.1 แสดงระดับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	หน่วย	ระดับ				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
เวลา	ชั่วโมง	31.6	48	72	96	112.3
อัตราส่วนโดยโมลแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน	ml/ml	4.64:1	6:1	8:1	10:1	11.36:1
ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ	กรัม/น้ำหนักน้ำมัน	1.59	5	10	15	18.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานผลิตน้ำมันแหล่งต่างๆ

จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดเลือกตัวอย่างจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรงงานผลิตน้ำมันสบู่ดำ โรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม โรงงานผลิตน้ำมันมะพร้าว และโรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง

การเก็บตัวอย่างจะเก็บจากสายการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงกระบวนการสุดท้าย รวมทั้งน้ำ ทิ้ง จากการผลิต และบริเวณสายการผลิต ตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาคัดเลือกเชื้อยีสต์โดยนำมาเลี้ยง บนอาหารแข็ง tributyrin agar และนำไปบ่มที่ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายโคโลนีเชื้อยีสต์ที่สามารถทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็ง tributyrin agar ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง YM และนำไปบ่มที่ 30 และ 45 องศาเซลเซียสเช่นเดิม และแยกเชื้อจนกว่าจะได้เชื้อที่บริสุทธิ์ ซึ่งจากการคัดเลือกได้เชื้อยีสต์ที่บริสุทธิ์ทั้งหมด 200 โคโลนี (ตามตารางที่ 5) หลังจากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และคัดเลือกซ้ำอีกครั้งโดยการเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสดีที่สุดทั้งหมด 7 สายพันธุ์

จากการทดลองได้เชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุดคือ เชื้อหมายเลข SLP27 ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากตัวอย่างจากเมล็ดปาล์มหลังบีบ และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทดลองเชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุด มาจากตัวอย่างเมล็ดปาล์มหลังบีบ อาจเนื่องมาจากการทดลองนี้ใช้น้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอนในการ เลี้ยงเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตในแหล่งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนอยู่แล้ว จะมีกิจกรรม ของ เอนไซม์ดีกว่าเชื้อที่เจริญอยู่ได้ในแหล่งที่มีน้ำมันชนิดอื่นๆ

4.2 การคัดเลือกชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด

จากการทดลองนำเชื้อที่ได้จากบริเวณการผลิต 7 สายพันธุ์ คือ FLP7, SLP27, FLP23, FLP22, LPS20, FLP26, DLP50 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของไลเปสที่ดีที่สุดและทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 พบว่าสายพันธุ์ SLP 27 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสายพันธุ์อื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงตัวอย่างและจำนวนเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากการคัดเลือดเชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างปาล์มบริเวณต่างๆ และหมายเลขเชื้อ

แหล่งตัวอย่างหรือบริเวณ	จำนวนเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้	หมายเลขเชื้อยีสต์ที่แยกได้
1. น้ำทิ้งจากบริเวณการผลิต	21	LPS1-LPS21
2. ทะลายปาล์มหลังบีบ	20	PLP1-PLP20
3. เส้นใยปาล์ม	32	FLP1-FLP32
4. กากปาล์มหลังบีบ	12	PPLP1-PPLP12
5. กะลาปาล์ม	3	KPS1-KPS3
6. ผลปาล์ม	23	PALP1-PALP23
7. เศษปาล์มบริเวณผลิต	15	PLP1-PLP15
8. ดินบริเวณการผลิต	11	SOLP1-SOLP11
9. ผลปาล์มหลังอบ	20	PFLP1-PFLP20
10. เส้นใยปาล์มหลังอบ	27	SLP1-SLP27
11. เมล็ดปาล์มหลังบีบ	50	DLP1-DLP50
12. ปาล์มย่อยแล้ว	25	PLP1-PLP25
13. ตัวอย่างปาล์มมะพร้าว	33	PPL1-PPL33

เมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกมาย้อมสีเมทิลีนบลู และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเป็นลักษณะของเชื้อยีสต์ ซึ่งมีงานวิจัยพบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนี่ยวนำได้ดี และจากการเปรียบเทียบเอนไซม์ไลเปสจากรา และแบคทีเรียในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล พบว่าไลเปสจาก *Candida rugosa* จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด (ปกรณ์ วินะยานุวัติ, 2011)

เมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกมาย้อมสีเมทิลีนบลู และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเป็นลักษณะของเชื้อยีสต์ ซึ่งมีงานวิจัยพบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนี่ยวนำได้ดี และจากการเปรียบเทียบเอนไซม์ไลเปสจากรา และแบคทีเรียในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล พบว่าไลเปสจาก *Candida rugosa* จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด (ปกรณ์ วินะยานุวัติ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ 7 สายพันธุ์เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

หมายเลขเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
SLP27	0.28[a]
LPS20	0.21[b]
FLP23	0.21[bc]
FLP7	0.20[bc]
FLP22	0.20[bc]
FLP26	0.20[c]
DLP50	0.18[d]

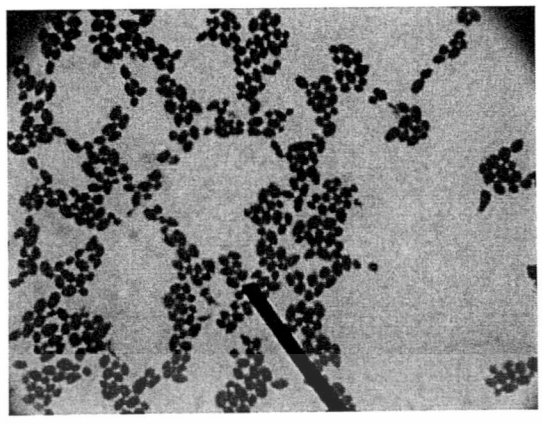
[abc] ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 การกลายพันธุ์เชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

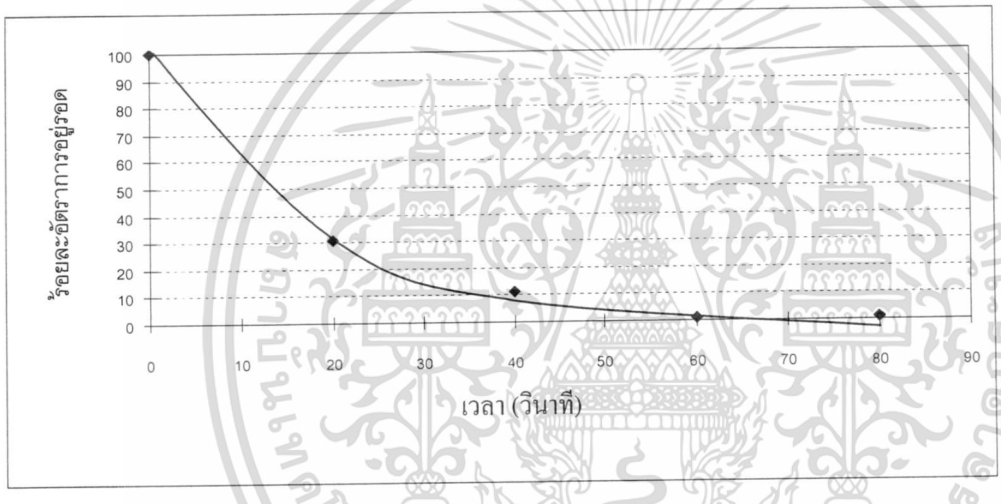
4.3.1 ผลอัตราการอยู่รอดเชื้อยีสต์หลังจากทำการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากข้อ 4.2 โดยใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กับเชื้อยีสต์ในระยะเวลา 20, 40, 60 และ 80 วินาที และนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง YM (ชุดทดลอง) เทียบกับจำนวนโคโลนีเชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสง (ชุดควบคุม) โดยมาคำนวณอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 เมื่อพลอตกราฟระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดกับระยะเวลาที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตพบว่าที่เวลา 38 วินาที จะมีการอยู่ประมาณรอดร้อยละ 10 ดังรูปที่ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์รหัส SLP27 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงร้อยละอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรที่เวลา 20, 40, 60 และ 80 วินาที

4.3.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์กลายพันธุ์จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด

จากการทดลองฉายแสงอัลตราไวโอเลตเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากข้อ 4.2 โดยใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กับเชื้อยีสต์ในระยะเวลา 20, 40, 60 และ 80 วินาที เวลาที่ทำให้เชื้ออยู่รอดร้อยละ 5-10 คือ 38 วินาที และนำมานำมา spread ลงบนหน้าอาหารแข็ง tributyrin agar ที่มีนิสเตติน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกโคโลนีที่ทำให้อาหารเกิดวงใสได้ 150 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้หมายเลขเชื้อเป็น UV1 ถึง UV150 หลังจากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 โดยบ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ทำให้ได้เชื้อยีสต์สารพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมจำนวน 12 สายพันธุ์ และนำเชื้อทั้ง 12 สายพันธุ์มาคัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 เชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุดคือเชื้อหมายเลข UV79 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์อื่นๆ ยกเว้น SLP27 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 4.3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ 12 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

หมายเลขเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UV79	0.30^{a}
SLP27	0.28^{ab}
UV113	0.27^{bc}
UV32	0.27^{bc}
UV131	0.26^{bc}
UV34	0.26^{bc}
UV38	0.25^{bcd}
UV149	0.25^{bcd}
UV61	0.25^{cd}
UV51	0.25^{cd}
UV101	0.25^{cd}
UV97	0.24^{cd}
UV23	0.23^{d}

^{abc} ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รังสีอัตราไวโอเล็ตเป็นรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน(non ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้ต่ำ มักจะทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) หรือไซโทซีนไดเมอร์(cytosine dymer) (Atherly, Girton and McDonald 1999)

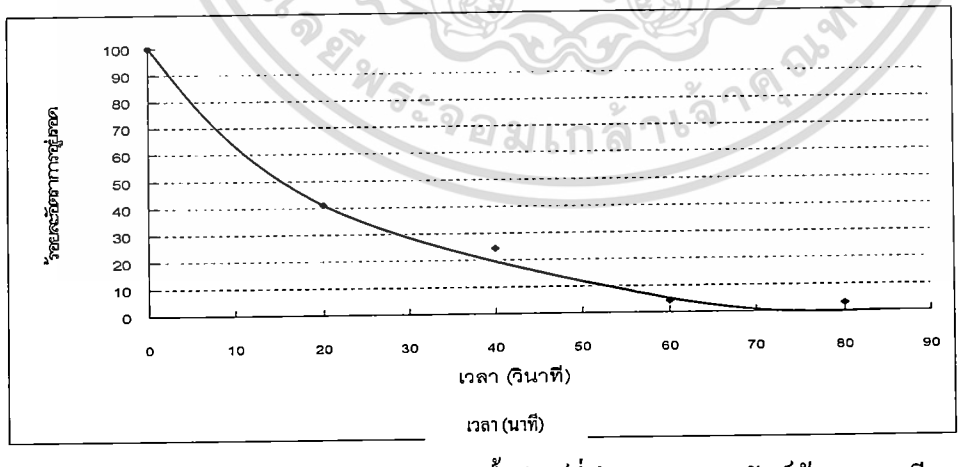
จากงานวิจัยของ Thein และคณะ (2010) ได้พบว่าเชื้อ *Xanthomonas oryzae* ที่ผลิตสาร bacteriocin ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัตราไวโอเล็ต ซึ่งทำให้เชื้อสามารถผลิต bacteriocin ได้ในปริมาณที่มากขึ้น

และจากงานวิจัยของ Watanabe และคณะ (2011) ได้ทำการผลิตเอทานอลจากน้ำตาล ไซโลสจากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *Pichia stipitis* NBRC1687 ที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเล็ต พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ PXF58 สามารถผลิตเอทานอลได้ 4.3% เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้ 3.1% ซึ่งสายพันธุ์กลายผลิตได้มากกว่า 1.4 เท่า

4.4 การศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate EMS) ที่ระยะเวลาต่างๆ

4.4.1 ผลอัตราการอยู่รอดเชื้อยีสต์หลังจากทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate EMS) ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการทดลองกลายพันธุ์ด้วยการเติมสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) กับเชื้อยีสต์ จากข้อ 4.3 ในระยะเวลา 20, 40, 60 และ 80 นาที และนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง YM (ชุดทดลอง) เทียบกับจำนวนโคโลนีเชื้อที่ไม่เติมสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) (ชุดควบคุม) โดยนำมาคำนวณอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 เมื่อพลอตกราฟระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดกับระยะเวลาที่ได้รับสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ดังรูปที่ 13 พบว่าที่เวลา 58 นาที จะมีการอยู่รอดประมาณร้อยละ 6



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงร้อยละอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS ที่ เวลา 20, 40, 60 และ 80 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate EMS) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด

จากการทดลองกลายพันธุ์ด้วยการเติมสารเคมี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) กับเชื้อยีสต์จากข้อ 4.3 ในระยะเวลา 20, 40, 60 และ 80 นาที โดยใช้เวลาที่ทำให้เชื้อยีสต์อยู่รอดร้อยละ 5-10 คือ 58 นาที และนำมา spread ลงบนหน้าอาหารแข็ง tributyrin agar ที่มีนิสเตติน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกโคโลนีที่ทำให้อาหารเกิดวงใสได้ 300 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้หมายเลขเชื้อเป็น EM1 ถึง EM300 และหลังจากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมัน ปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และคัดเลือกซ้ำอีกครั้ง โดยการเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุด 6 สายพันธุ์ เชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุดคือเชื้อหมายเลข EM107 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และแตกต่างจากสายพันธุ์กลายสายพันธุ์อื่น รวมทั้งสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัตราไวโอเล็ต (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 4.4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ 6 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

หมายเลขเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
EM107	0.36[a]
EM213	0.23[b]
EM214	0.19[c]
EM100	0.15[d]
EM121	0.15[d]
EM141	0.14[d]
UV79	0.14[d]

[abc] ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปวิณ ภิรมย์ และคณะ (2004) ได้อธิบายว่า เอธิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นสารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส ซึ่งมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสเช่นเดียวกัน ทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป

จากงานวิจัย Srinorakutara และคณะ (2007) ได้ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ ซึ่งได้เลือกใช้รังสีอัตราไวโอเล็ตและสารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS) ซึ่งยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 45 องศาเซลเซียส และทนต่อการยับยั้งของเอทานอลได้ถึง 15% (w/v) ซึ่งสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้นจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียสและทนความเข้มข้นของเอทานอลได้ระหว่าง 4.7 และ 7.8% (w / v) และจากงานวิจัยของ Dehkordi และคณะ (2011) เช่นเดียวกัน ได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยสารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS) เพื่อให้เชื้อมีความทนทานและสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อทางการค้า และพบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายนั้นสามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้น อีกทั้งยังสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

4.5 การศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่มีความเข้มข้นของปริมาณรังสีต่างๆกัน

4.5.1 ผลอัตราการอยู่รอดเชื้อยีสต์หลังจากทำการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของปริมาณรังสีต่างๆกัน

จากการทดลองฉายรังสีแกมมากับเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากข้อ 4.4 โดยใช้ความเข้มข้นของปริมาณรังสีแกมมากับเชื้อยีสต์แตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์ โดยใช้เวลาแตกต่างกันตามตารางที่ 9 และนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง YM (ชุดทดลอง) เทียบกับจำนวนโคโลนีเชื้อที่ไม่ผ่านการฉายแสง (ชุดควบคุม)โดยมาคำนวณอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 พบว่าที่ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ จะมีอัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 6 เมื่อพลอตกราฟระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดกับความเข้มข้นของรังสีแกมมาดังรูปที่ 14 ซึ่งรังสีแกมมาเป็นรังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้สูง ซึ่งมักจะทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (Atherly, Girton and McDonald 1999)

4.5.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของปริมาณรังสีต่างๆกันที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด

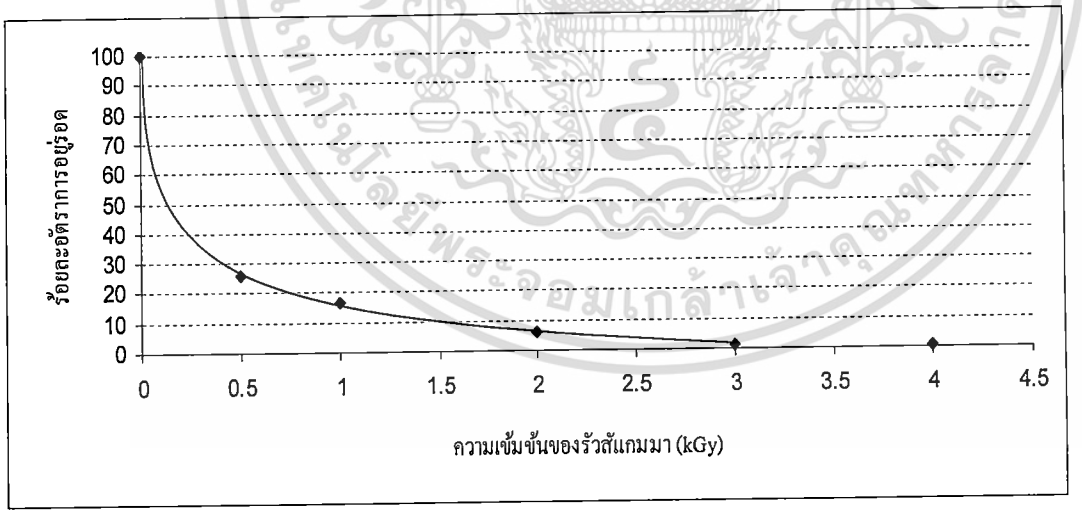
จากการทดลองกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของปริมาณรังสีต่างๆกันกับเชื้อยีสต์จากข้อ 4.4 ปริมาณรังสีแกมมากับเชื้อยีสต์แตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์ โดยความเข้มข้นของรังสีแกมมาที่ทำให้เชื้อยีสต์อยู่รอดร้อยละ 5-10 คือ 2 กิโลเกรย์ และนำมา spread ลงบนหน้าอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

tributyrin agar ที่มีนิสเตติน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคัดเลือกโคโลนีที่ทำให้อาหารเกิดวงใส ได้ 300 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้หมายเลขเชื้อเป็น GAM1 ถึง GAM300 หลังจากนั้นนำเชื้อยีสต์ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่ง คาร์บอนร้อยละ 1 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และคัดเลือกซ้ำอีก ครั้งโดยการเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุด 10 สายพันธุ์ เชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุดคือเชื้อหมายเลข GAM47 วัด กิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 4.5 เวลาการฉายรังสีแกมมาของตัวอย่างเชื้อยีสต์

ตัวอย่างเชื้อยีสต์	เวลา (นาที)	ความเข้มข้นรังสีแกมมา (กิโลเกรย์)
ตัวควบคุม	0	0
1	4.5	0.5
2	9.1	1
3	18.2	2
4	27.2	3
5	36.3	4



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงร้อยละอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของปริมาณรังสีที่ 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์กลายพันธุ์ 10 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

หมายเลขเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
GAM47	0.70^{a}
GAM153	0.58^{ab}
GAM40	0.57^{ab}
GAM26	0.48^{b}
GAM68	0.44^{bc}
GAM41	0.30^{cd}
GAM42	0.30^{cd}
GAM107	0.30^{cd}
GAM112	0.25^{de}
GAM130	0.21^{de}
EM107	0.11^{e}

^{abc} ตัวอักษรกำกับในแนวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากงานวิจัยของ Sun และคณะ (2004) ได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Phaffia rhodozyma* ด้วยรังสีแกมมา ที่ความเข้มข้นของรังสีน้อยกว่า 10 กิโลเกรย์ โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 0, 1,2, 3, 3,5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, and 7 กิโลเกรย์ โดยคัดเลือกจากอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5 ซึ่งทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์ยีสต์ มากกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการกลายพันธุ์ถึง 50% และงานวิจัย Akacha และคณะ (2008) ได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยรังสีแกมมา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ alcohol-dehydrogenase โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 เกรย์ ซึ่งที่ความเข้มข้นรังสี 10 เกรย์ เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น 1.5 เท่า คือ 27 U/mg เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้ 15 U/mg และยังมีผลต่อการตรึงเซลล์ โดยเซลล์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้นรังสี 20 เกรย์จะมีความคงตัวสูงกว่า สามารถนำมาใช้ซ้ำได้มากกว่า 8 ครั้ง และได้ผลผลิตที่สูงคือร้อยละ 79และมีกิจกรรมร้อยละ 88

4.6 ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.1. อัตราส่วนของหัวเชื้อรำข้าวและกากน้ำตาล โดยใช้ปริมาณกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ที่ปริมาณกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อยีสต์มากที่สุดคือ 5.03×10^9 เซลล์ต่อกรัมของหัวเชื้อ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสภาวะกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 72 ชั่วโมง และกากน้ำตาลร้อยละ 6 ที่เวลา 60 ชั่วโมง และที่ปริมาณกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 60 ชั่วโมง จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยการผลิตหัวเชื้อจะมีปริมาณความชื้นลดลง และมีค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น ตามจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น

4.6.2. ปริมาณความชื้นของหัวเชื้อรำข้าวและกากน้ำตาล โดยใช้ปริมาณความชื้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ปริมาณกากน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ที่ปริมาณความชื้นร้อยละ 40 ที่เวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อยีสต์มากที่สุดคือ 6.43×10^9 เซลล์ต่อกรัมของหัวเชื้อ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสภาวะความชื้นร้อยละ 40 ที่เวลา 72 ชั่วโมง และความชื้นร้อยละ 40 ที่เวลา 84 ชั่วโมง และที่ความชื้นร้อยละ 40 ที่เวลา 60 ชั่วโมง จะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยการผลิตหัวเชื้อจะมีปริมาณความชื้นลดลง และมีค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น ตามจำนวนชั่วโมงที่เพิ่มขึ้น

4.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ

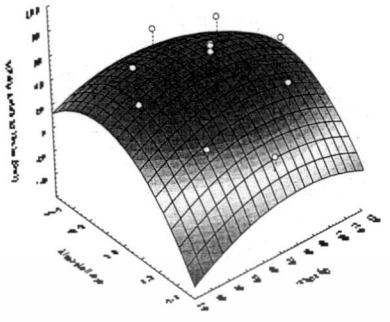
การใช้หัวเชื้อเร่งปฏิกิริยาโดยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เกิดการสร้างแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด คือ อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน เท่ากับ 8:1 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ เท่ากับร้อยละ 73.19 แสดงดังตารางที่ 11 และเมื่อทำการพลอตกราฟพื้นที่ตอบสนอง แสดงดังรูปที่ 15, 16 และ 17

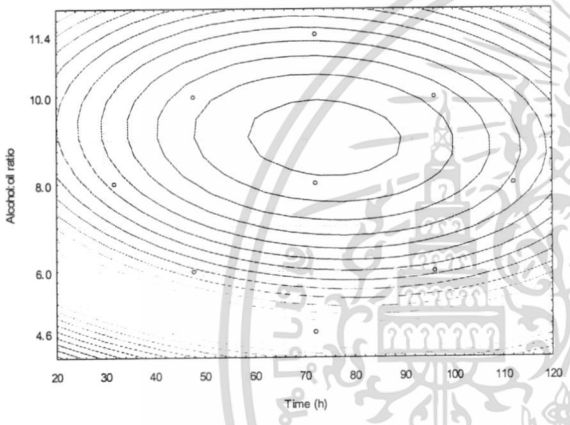
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงผลของร้อยละของแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ จากการทดลองพื้นที่ตอบสนอง

ทดลองครั้งที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			%Fatty Acid Ethyl Ester	
	เวลา	อัตราส่วนโดยโมล	ปริมาณหัวเชื้อ	เวลา	อัตราส่วนโดยโมล	ปริมาณหัวเชื้อ	การวัด	การคาดคะเน
1	48	6:1	5	-1	-1	-1	8.09	11.11
2	96	6:1	5	+1	-1	-1	44.82	46.65
3	48	10:1	5	-1	+1	-1	31.74	36.11
4	96	10:1	5	+1	+1	-1	62.87	65.00
5	48	6:1	15	-1	-1	+1	21.55	21.72
6	96	6:1	15	+1	-1	+1	0.31	-1.76
7	48	10:1	15	-1	+1	+1	50.63	51.10
8	96	10:1	15	+1	+!	+1	21.67	20.97
9	31.6	8:1	10	-1.682	0	0	49.95	49.66
10	112.3	8:1	10	+1.682	0	0	53.75	54.20
11	72	4.64:1	10	0	-1.682	0	12.39	11.86
12	72	11.36:1	10	0	+1.682	0	54.49	51.95
13	72	8:1	1.59	0	0	-1.682	36.77	31.25
14	72	8:1	18.41	0	0	+1.682	0.67	3.18
15	72	8:1	10	0	0	0	73.19	70.54
16	72	8:1	10	0	0	0	71.69	70.54
17	72	8:1	10	0	0	0	71.68	70.54
18	72	8:1	10	0	0	0	71.55	70.54
19	72	8:1	10	0	0	0	67.44	70.54
20	72	8:1	10	0	0	0	67.12	70.54

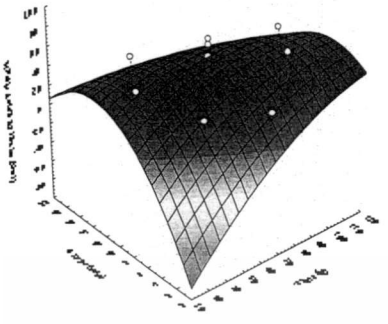
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

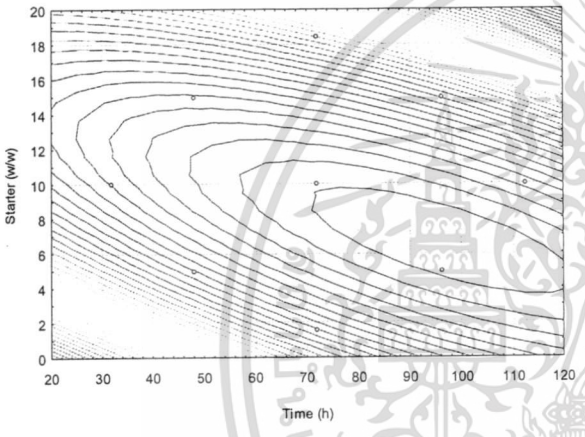




รูปที่ 4.5 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ (กรัม/น้ำหนัก น้ำมัน) กับร้อยละแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

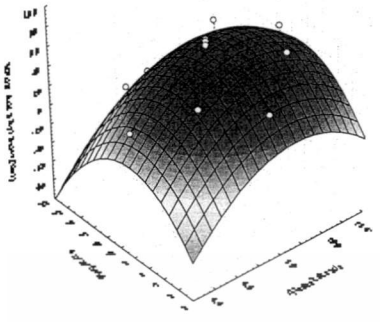
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

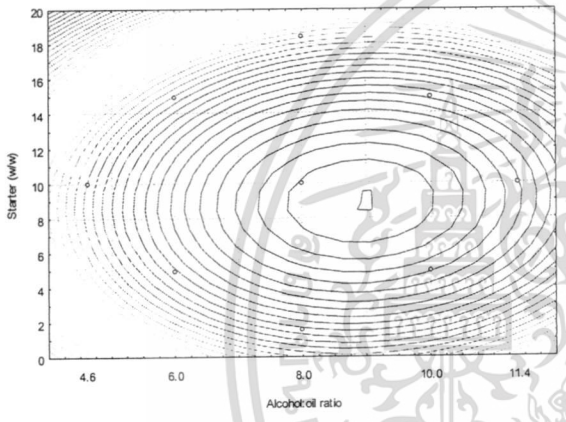




รูปที่ 4.6 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา (ชั่วโมง) ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ (กรัม/น้ำหนักน้ำมัน) กับร้อยละแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่ 4.7 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน ร้อยละปริมาณหัวเชื้อ (กรัม/น้ำหนัก น้ำมัน) กับร้อยละแฟททิแอซิดเอทิลเอสเทอร์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างดินและวัสดุชนิดต่างๆในพื้นที่ของโรงงานอุสาหกรรมน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อสายพันธุ์ SLP27 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุด โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.28 ยูนิต/มล. จากนั้นทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลาย โดยการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 38 วินาที จากนั้นทำการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลฟอเนต เป็นเวลา 58 นาที และการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ ได้เชื้อสายพันธุ์ UV79, EM107 และ GAM47 และให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.30, 0.36 และ 0.70 ยูนิต/มล. ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟีเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อสายพันธุ์กลาย GAM47 เพื่อการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาเพื่อการผลิตไบโอดีเซลได้ และผลการจำแนกชนิดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับสปีชีส์ด้วยวิธี D1/D2 domain of 26S ribosomal RNA sequence ซึ่งสามารถระบุชนิดของยีสต์ชนิดนี้ได้คือ *Candida orthopsilosis* และได้ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อ *Candida orthopsilosis* สายพันธุ์กลายในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวและกากน้ำตาล โดยศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล ปริมาณความชื้นและเวลาที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แล้วนำหัวเชื้อมาใช้ในการหาสภาวะของปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยวิธีการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง โดยศึกษาช่วงเวลา อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อ น้ำมันปาล์มดิบ และปริมาณหัวเชื้อ พบว่า ที่ปริมาณความชื้นร้อยละ 40 และความเข้มข้นของกากน้ำตาล ร้อยละ 10 (ปริมาตร/น้ำหนักของรำข้าว) ที่เวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ยีสต์มากที่สุดคือ 6.43 x 10^9 เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนักหัวเชื้อ และสภาวะของปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์ คือ ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันปาล์มดิบ 8:1 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 (น้ำหนัก/น้ำหนักของ น้ำมัน) และอุณหภูมิ 40°C จะทำให้ได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 70.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมทรัพยาธรณี. 2547. น้ำมันไบโอดีเซล. โลกพลังงาน. 78(22):42-45.

กัลยาณี เต็งพงศธร. 2554. เอกสารประกอบการสอนวิชาการวางแผนการทดลองทางอุตสาหกรรมเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิศวกรรมสาร. 2548 เทคโนโลยีเชื้อเพลิง. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าพระนครเหนือ

ศิริวรรณ น้ำสมบุญ. 2551. การผลิตแอลกอฮอล์จากกากตะกอนน้ำเสียร่วมกับวัสดุเหลือทิ้งทาง การเกษตร. ค้นวันที่ 29 พฤษภาคม 2556 จาก http://www.research.rdi.ku.ac.th/world/ cache/ 47/SiriwanNUMAll.pdf

ศิริวัลภา เกษศิลป์. 2547. การผลิตและสมบัติของแป้งคาร์บอกซีเมทิลจากแป้งมันสำปะหลัง. ค้นวันที่ 29 พฤษภาคม 2556 จาก http://www.research.rdi.ku.ac.th/world/cache/d4/ SiriwanlaphaKETAll.pdf

ศศิธร จารุสมบัติ. 2544. เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาพืชน้ำมัน. ภาควิชาครุศาสตรเกษตร คณะครุ-ศาสตรอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปวิณ ภิรมย์และคณะ. 2009. พันธุศาสตร์. ค้นวันที่ 31 มีนาคม 2556 จาก http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/27/contents/genetics-8816.html

อมร, แม้น, เพชรสม และอมรสิทธิ์. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. โรงพิมพ์ ชวนพิมพ์. กรุงเทพฯ.

Agarwal, A.K. 2006. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. Progress in Energy and Combustion Sciene. 33(3):233-271.

Akacha, N.B., Zehlila, A., Mejri, S., Jerbi, T. and Gargouri, M. 2008. Effect of gamma-ray on activity and stability of alcohol-dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Engineering Journal. 40:184–188.

Atherly, A.G., Girton, J.R. and McDonald, J.F. 1999. The Science of genetics. Philadelphia : Saunders College Publishing.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dehkordi, M.M., Nahvi, I., Esfahani, H.Z., Ghaedi, K., Tavassoli, M. and Akada, R. 2011. Characterization of an interesting novel mutant strain of commercial *Saccharomyces cerevisiae*. Iranian journal of Biotechnology. 9(2):109-114.

Dizge, N. and Keskinler, B. 2008. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. Biomass and Bioenergy. 32:1274-1278.

Fedosov, SN., Brask, J. and Xu, X. 2011. Analysis of biodiesel conversion using thin layer chromatography and nonlinear calibration curves. Journal of Chromatography A. 1218:2785–2792.

Fickers, P., Fudalej, F., Nicand, J.M., Destain, J. and Thonart, P. 2005. Selection of new over – producing derivertives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yest *Yarrowia lipolytica*. J. Biotechnol. 115 : 379 – 386.

Fickers, P., Desain, J., Ongena, N., Weekers, F. and Thonart. P. 2006. Production and downstream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Enzyme Microb. Technol. 38 : 756 – 759.

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 alchol ester. United States Patent. Usb. 982-115 B1.

Gandhi NN. 1997. Applications of lipase. Journal of American Oil Chemists' Society. 74: 621–634.

Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T.,Numata, T., Tamalampuri, S., Kondo, A., Noda, H. and Fukuda, H. 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Biochemical Engineering Journal. 34:273-278.

Hoshino,T.; Sasaki, T.; Watanabe, Y.; Nagasawa, T. and Yamane, T. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 56(4):660-64.

Huang, D., Han, S., Han, Z. and Lin Y. 2012. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in an isooctane system. Biochemical Engineering Journal. 63:10– 14.

Jaeger KE. and Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. 13(4):390–397.

Jitputti, J; Kitiyanan, B.; Rangsunvigit, P.; Bunyakiat, K.; Attanatho, L. and Jenvanitpanjakul, P.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2006. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. Chemical Engineering Journal.116 (1):61-66.

Kaieda M., Samukawa T., Matsumoto T., Ban K., Kondo A., Shimada Y., Noda H., Nomoto F., Ohtsuka K., Izumoto E. and Fukuda H. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. Journal of Bioscience and Bioengineering. 88(6):627–631.

Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T. and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process Biochemistry. 36:317–324.

Karatay, S. and Donmez, G. 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. Bioresource Technology. 101:7988–7990.

Liu, Y., Li, C., Meng, X. and Yan, Y. 2013. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. Fuel Processing Technology. 106:303–309.

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. Dunnil, A and Lilly, M.D. 19983. Enzymic interesterification of fats : Factors influencing the choice of support for immobilized lipase. Enzyme Micrb. 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.

Pramanik, K. 2003. Properties and use of Jatropha curcas oil and diesel fuel bilends in compression ignition engine. Renewable Energy. 28 : 239 – 248.

Marchetti J.M., Miguel V.U. and Errazu A.F. 2007. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 11:1300–1311

Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. and Kondo, A. 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. Applied Microbiology and Biotechnology. 57:515–520.

Meher L.C., Vidya Sagar D. and Naik S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 10: 3: 248-268.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mitchell, D. A., B. K. Lonsane, A. Durand, R. Renaud, S. Almanza, J. Maratray and G. W. Malaney. 1992. Solid substrate cultivation. Elsevier science publishers. London.

Olkku, J. and Hagqvist, A. 1983. Steady state modeling of extrusion cooking employing response surface methodology. Journal of Food Engineering, 2:105–128.

Omar, W.N.N.W., Amin, N.A.S. 2011. Optimization of heterogeneous biodiesel production from waste cooking palm oil via response surface methodology. Biomass and Bioenergy. 35:1329-1338.

Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kando, Al, Shimada, Y., Noda, H. and Fukuda, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida Antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. J. Biosci and Bioeng. 90 : 180-183.

Sevgi, E.K. and Gonul, D. 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molass. Bioresource Technology. 101:291-299

Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17:133-142.

Soumanou, M.M. and Bornscheuer, U.T. 2003. Improvement in Lipase-catalysed synthesis of fatty acid methey esters from sunflower oil. Enzyme and Microbial Technology. 33:97-103.

Srimhan, P., Kongnum, K., Taweerodjanakarn, S. and Hongpattarakere, T. 2011. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. Enzyme and Microbial Technology. 48:293-298.

Srinorakutara, T., Chumkhunthod, P., Suttikul, S., Yindeeyoungyeon, W., Wattanasiritham, L., Mouthung, B. and Wangpila, M. 2007. Strain Improvement of Ethanol Fermenting Yeast Using Random Mutagenesis Technique.

Subramaniyam, R. and Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fementation for the production of bioactive substances: A comparative study. International Journal of Security and Networks. 3(3): 480-486.

Sun, N., Lee, S. and Song, K.B. 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. International Journal of Food Microbiology. 94:263– 267.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Thein, A., Prathuangwong, S. 2010. Novel Strains of Xanthomonas oryzae pv. oryzae UV Mutated Induce Systemic Resistance in Rice against Bacterial Leaf Blight Disease. Kasetsart Journal : Natural Science.44(6):1026-1043.

Tomasevic, A.V. and Marinkovic, S.S. 2003. Methanolysis of used frying oil. Fuel Processing Technology. 81:1-6.

Veras, I.C., Silva, F.A.L., Ferrao-Gonzales, A.D. and Moreau, V.H. 2011. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from-acidity waste feedstocks in solvent-free media. Bioresource Technology. 102:9653-9658.

Watanabe, T., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A. and Nakamura, T. 2011. A UV-induced mutant of Pichia stipitis with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. Bioresource Technology 102: 1844–1848.

Yang, K. S., Sohn, Jung- Hoon and Kim, H. K. 2009. Catalysis properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. J. Biosci. Bioeng. 107(6):599-604.

Yücel, Y. 2012. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. Fuel Processing Technology. 99:97–102.

http://aopdm01.doae.go.th/data/physinut21.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคภนวก ก

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Stoll and Blanchard, 1990)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยเจือจางให้ความเข้มข้นที่ต้องการนำมาผสมกันให้ได้ค่ากรดด่างที่ต้องการ

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (ทำสารละลาย $KHPO_4$ 27.8 กรัม ในน้ำ กลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายไดเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (ทำสารละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 แสดงจำนวนมิลลิลิตรระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ

X	Y	ค่ากรด-ด่าง	X	Y	ค่ากรด-ด่าง
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

สารละลาย B : ละลายไตรตรอนเอ็กซ์-100 400 มิลลิกรัม และกรัมอาราบิค 100 มิลลิกรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

สารละลาย C : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ที่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ผสมสารละลาย A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 90 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล

3. การตรวจนับเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 เตรียมตัวอย่างที่ตรวจนับโดยละลายตัวอย่างที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 1:10)

3.2 ปิเปตตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในฮีมาโตไซโตมิเตอร์ที่ปิดด้วยกระจกสไลด์ (cover slip) โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด

3.3 ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (เลนส์ใกล้วัตถุ 40X) นับจำนวนในแต่ละช่องเล็ก หรือนับในช่องใหญ่แล้วมาหาค่าเฉลี่ย โดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับและนำไปคูณด้วย 2.5×10^5 จะได้เป็นปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร

4. วิธีการคำนวณหาปริมาณเซลล์ยีสต์

พื้นที่ 1 ช่องกลางในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ $= 0.2 \times 0.2 = 0.04$ ตร.ซม.

ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง $= 0.1$ มม.

ดังนั้นปริมารต 1 ช่องกลาง $= 0.04 \times 0.1 = 0.004$ มม.^{3}

ปริมาตร 0.004 มม.^{3} มีจุลินทรีย์ $=$ Z เซลล์

ปริมาตร 1000 ลบ.ซม. มีจุลินทรีย์ $= \frac{Z \times 1000}{0.004} = Z \times 250 \times 10^3$

$= Z \times 2.5 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5. วิธีการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ (จำนวนจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตร)

จำนวนจุลินทรีย์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x ระดับความเจือจาง

6. การคำนวณหาร้อยละอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังจากทำการกลายพันธุ์

$$\text{ร้อยละการอยู่รอด} = \frac{100 \times S}{X}$$

X = จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (ตัวควบคุม) ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S = จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS แต่ละเวลาและความเจือจาง

7. วิธีการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

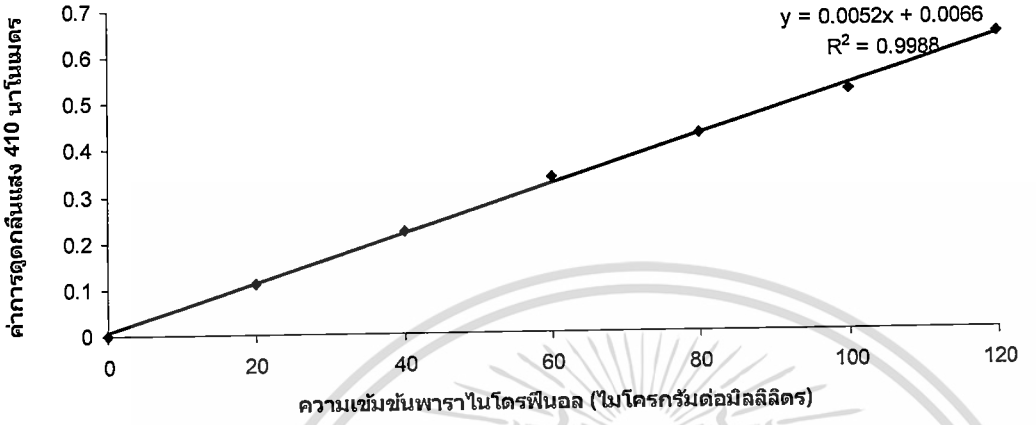
$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ไมโครกรัมของพาราไนโตรฟีนอล x จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักของพาราไนโตรฟีนอล x ระยะเวลาการบ่ม x ปริมาณสารละลายเอนไซม์}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดยูนิตของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลปามิเตต ให้เป็นพาราไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



รูปผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดการดูดแสงที่ 410 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

Sample	N	Subset			
		1	2	3	4
DLP50	3	.1844			
FLP26	3		.1984		
FLP22	3		.2022	.2022	
FLP7	3		.2025	.2025	
FLP23	3		.2094	.2094	
LPS20	3			.2134	
SLP27	3				.2847
Sig.		1.000	.074	.071	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข2 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ระดับความเชื่อมั่น 95

Sample	N	Subset			
		1	2	3	4
uv23	3	.2270			
uv97	3	.2420	.2420		
uv101	3	.2455	.2455		
uv51	3	.2479	.2479		
uv61	3	.2534	.2534	.2534	
uv149	3	.2544	.2544	.2544	
uv38	3	.2549	.2549	.2549	
uv34	3	.2557	.2557	.2557	
uv131	3		.2638	.2638	
uv32	3		.2673	.2673	
uv113	3		.2734	.2734	
SLP27	3			.2847	.2847
uv79	3				.3030
Sig.		.072	.053	.051	.182

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข3 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

Sample	N	Subset			
		1	2	3	4
UV79	3	.1438			
EM114	3	.1441			
EM121	3	.1475			
EM100	3	.1527			
EM214	3		.1892		
EM213	3			.2295	
EM107	3				.3575
Sig.		.086	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ข4 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

		Subset				
sample	N	1	2	3	4	5
EM107	3	.1124				
GAM130	3	.2092	.2092			
GAM112	3	.2476	.2476			
GAM107	3		.2888	.2888		
GAM42	3		.2891	.2891		
GAM41	3		.2965	.2965		
GAM68	3			.4378	.4378	
GAM26	3				.4795	
GAM40	3				.5702	.5702
GAM153	3				.5822	.5822
GAM47	3					.7029
Sig.		.072	.262	.055	.062	.077

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย (ปรับได้ตามความเหมาะสม)

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล รศ. อารี ฤทธิบูรณ์

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และประกาศ-นียบัตร)	อักษรย่อ ปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2530	ปริญญาตรี	วท.บ วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2)	เกษตรศาสตร์	พืชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่)	ไทย
2536	ปริญญาโท	วท.ม วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	-	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่)	ไทย

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) เทคโนโลยีของเอนไซม์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ -

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2529	**ทุนการศึกษาระดับปริญญาโท: STDB**	**STDB**

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ

- Prasertsan, P., H-kihikul, A., Kunghae, A., Maneesri, J. and Oi, S. 1997. Optimization for

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- xylanase and cellulase production form Aspergillus niger ATCC 6275. in palm oil mill wastes and its application. World J. Microbiol. Biotechnol. 13 : 555-559. สถานภาพในการวิจัย คือ นักศึกษาปริญญาโท
- อารี ฤทธิบูรณ์. 2541. การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส. ว.เทคโนโลยีสุรนารี. 5 : 138 – 146. สถานภาพในการวิจัย คือหัวหน้าโครงการวิจัย
- อารี ฤทธิบูรณ์. 2541. การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อ Sporotrichum pulverulentum ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว. ว.วิทยาศาสตร์ มข. 26(4) : 273 – 280. สถานภาพในการวิจัย คือ หัวหน้าโครงการวิจัย
- อารี ฤทธิบูรณ์. 2542. การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากฟางข้าวโดยเชื้อราในสภาวะอาหารแข็ง. ว. วิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 9 : 58 – 65. สถานภาพในการวิจัย คือหัวหน้าโครงการวิจัย
- Rittiboon, A and Katemai, W. 2003. Production of Starch-Digesting Glucoamylase from Fungi in Liquid and Solid Cultures. The 2nd International Conference. Enzymes in the Environment : Activity, Ecology & Applications. Praha, Czech Republic, July 14 – 17, 2003. สถานภาพในการวิจัย คือ หัวหน้าโครงการวิจัย
- Rittiboon, A. and Katemai, W. 2004. Production of Starch – Digesting Glucoamylase from Aspergillus niger ATCC 10864. KMITL Science Journal. 4(1) : 108 – 118.
- มาลินี ตันติยาภรณ์, อารี ฤทธิบูรณ์ และพรทิพย์ ภูแกดำ. 2548. การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มเส้นใยของเห็ดตีนแรดโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์. ว. วิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 14(1) : 51 – 74.
- อารี ฤทธิบูรณ์ และสุนันทา มีชนะ. 2548. การชักนำการกลายพันธุ์ การแยก และการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อราสายพันธุ์กลาย. ว.วิทยาศาสตร์ขอนแก่น. 33(1) ซ 41 – 52.
- Rittiboon, A. and Reavadee, P. 2006. Isolation, selection and optimization for xylanase production from Aspergillus niger isolated from soil in Thailand. Loas Journal on Applied Science. 1(1) : 266 – 275.
- Chalit Nopparat, Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon. 2008. Screening for phosphate solubilizing bacteria and optimum of bacterial cultivation by response surface methodology. KMITL Sci. J. 8(2):60-72.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-

การเสนอผลงานวิชาการ

- อารี ฤทธิบูรณ์ และสุนันทา มีชนะ. 2549. การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ไซลาเนสโดยเชื้อ Aspergillus niger ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต. รวมบทความ (Proceeding) การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตแห่งชาติ ครั้งที่ 6 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างวันที่ 13 – 14 ตุลาคม 2549 ในรูป PDF – file ที่ 306. 11 หน้า
- Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon. 2007. Characteristics and Composition of Jatropha curcas seed oil in Thailand. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. November 1-3, 2007. Khon Kaen Univeristy, Nong Khai Campus, NongKhai, Thailand.
- Piroonporn Srimongkol, Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon, 2007. Isolation and selection of soil fungi as compost starter from Kanchanaburi. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. November 1-3, 2007. Khon Kaen Univerisy, NongKhai Campus, NongKhai, Thailand.
- Malinee Tantiyaporn, Aree Rittiboon, Porntip Poomkaedum, and Natthaporn, Veanngam. 2007. Genetic variations of Tricholoma crassum in some areas of Thailand by isozyme electrophoresis and PCR-RFLP method. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. November 1-3, 2007. Khon Kaen University, Nong Khai Campus, NongKhai, Thailand.
- Chalit Nopparat, Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon. 2009. Optimization of Aspergillus japonicus SA22P3406 on Rough Rice Bran Cultivation. The Proceeding of 47th Kasetsart University Annual Conference : Vol. 8, Subject : Agro-Industry. 17-20 March 2009.
- Jatupornpipat, M., Rittiboon, A., Nopparat, C. 2010. Screening for asymbiotic N2 fixing of actinomycetes from soils by Acetylene Reduction Assay. In Proceedings 37th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering. May 24-28, 2010. Tatranske Matliare, Slovakia. pp. 1023-1037.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ) -

อื่นๆ -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้ช่วยวิจัย

ชื่อ-สกุล รศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขา ชีววิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒสงขลา
ประเทศไทย ปีที่จบ 2532 คะแนนเฉลี่ยสะสม 2.97
แหล่งทุนที่ได้รับ ทุนสิรินทร , ทุนธนาคารกรุงเทพ

ปริญญาโท สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเทศ ไทย ปีที่จบ 2537 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.16
แหล่งทุนที่ได้รับ ทุนผู้ช่วยวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ทุนสโมสรราชกรีฑา

ปริญญาเอก สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประเทศ ไทย ปีที่จบ 2548 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.77
แหล่งทุนที่ได้รับ ทุน UDC

ปริญญาโท บริหารธุรกิจมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการธุรกิจขนาดกลางและขนาดย่อม
มหาวิทยาลัยรามคำแหง ประเทศ ไทย
ปีที่จบ 2552 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.72

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม, เทคโนโลยีการอาหาร, จุลชีววิทยาของสิ่งแวดล้อม

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ -

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rittiboon, A. and Reavadee, P. 2006. Isolation, selection and optimization for xylanase production from Aspergillus niger isolated from soil in Thailand. Loas Journal on Applied Science. 1(1) : 266 – 275.
- Chalit Nopparat, Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon. 2008. Screening for phosphate solubilizing bacteria and optimum of bacterial cultivation by response surface methodology. KMITL Sci. J. 8(2):60-72.
-

การเสนอผลงานวิชาการ

- Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon. 2007. Characteristics and Composition of Jatropha curcas seed oil in Thailand. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. November 1-3, 2007. Khon Kaen Univeristy, Nong Khai Campus, NongKhai, Thailand.
- Piroonporn Srimongkol, Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon, 2007. Isolation and selection of soil fungi as compost starter from Kanchanaburi. The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. November 1-3, 2007. Khon Kaen Univerisy, NongKhai Campus, NongKhai, Thailand.
- Chalit Nopparat, Marisa Jatupornpipat and Aree Rittiboon. 2009. Optimization of Aspergillus japonicus SA22P3406 on Rough Rice Bran Cultivation. The Proceeding of 47th Kasetsart University Annual Conference : Vol. 8, Subject : Agro-Industry. 17-20 March 2009.
- Jatupornpipat, M., Rittiboon, A., Nopparat, C. 2010. Screening for asymbiotic N2 fixing of actinomycetes from soils by Acetylene Reduction Assay. In Proceedings 37th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering. May 24-28, 2010. Tatranske Matliare, Slovakia. pp. 1023-1037.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ) -

อื่นๆ -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้