สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเหนี่ยวนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์ม

Induction and selection mutants of yeasts for enhanced lipase production for biodiesel production from palm oil

T117247

นางสาวอนงค์ บุญเรืองอนันต์

นายอภิสิทธิ์ ปิ่นทอง

นางสาวอมรรัตน์ มงคลอำนวย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
สำนักหอสมุดกลาง
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 117247
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b 12338916
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Induction and selection mutants of yeasts for enhanced lipase production for biodiesel production from palm oil

Miss Anong Boonruenganan

Miss Amonrat Mongkonamnuay

Mr. Apisit Pinthong

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การเหนี่ยวนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์ม
Induction and selection mutants of yeasts for enhanced lipase production for biodiesel production from palm oil

ชื่อนักศึกษา นางสาวอนงค์ บุญเรืองอนันต์
นายอภิสิทธิ์ ปิ่นทอง
นางสาวอมรรัตน์ มงคลอำนวย

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ	.....
กรรมการ ผศ.ดร.มาริสา จตุพรพิพัฒน์	.....
กรรมการ รศ. อารี ฤทธิบูรณ์	.....

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การเหนี่ยวนำและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อยีสต์เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์ม
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอนงค์ บุญเรืองอนันต์
	นายอภิสิทธิ์ ปิ่นทอง
	นางสาวอมรรัตน์ มงคลอำนวย
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณมาก โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 0.2-2.5 กิโลเกรย์ พบว่าการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายที่ปริมาณรังสี 1.0 กิโลเกรย์ เชื้อยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 6.04 ซึ่งสามารถคัดเลือกได้ 40 สายพันธุ์ และมี 24 สายพันธุ์เท่านั้นที่สร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยวัดจากอัตราส่วนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และเมื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ พบว่าสายพันธุ์กลาย M25 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด โดยวัดขนาดของวงใสได้ 1.85 เซนติเมตรและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1.0456 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีขนาดวงใส 1.18 เซนติเมตรและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.7218 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงใช้สายพันธุ์กลาย M25 ในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนโดยมวลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็น 1 ต่อ 4 เมื่อวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบทินเลเยอร์พบว่าไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์ในตัวอย่าง

คำสำคัญ : การกลายพันธุ์ รังสีแกมมา ไบโอดีเซล น้ำมันปาล์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Induction and selection mutants of yeasts for enhanced lipase production for biodiesel production from palm oil
Students	Miss Anong Boonruenganan
	Miss Amonrat Mongkonamnuay
	Mr. Apisit Pinthong
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2010
Advisor	Asst. Prof. Aree Rittiboon

ABSTRACT

This project aims to study selection of mutanted yeast that could produce high lipase which was induced by gamma irradiation at dosage of 0.2-2.5 kGy. The results showed that gamma irradiation at a dosage of 1.0 kGy gave 6.04% survival rate and 40 mutants. But only 24 mutants could produce high lipase more than wild type strain, measured from ratio of diameter of clear zone/diameter of colony. When measured lipase activity in quantitative and quanlitative process, the results showed that the mutant number 25 (M25) had the highest efficiency which created clear zone size of 1.85 cm and enzyme activity of 1.0456 unit/ml, that was more than wild type strain which had enzyme activity of 0.7218 unit/ml and clear zone site 1.18 cm. Therefore, mutant number 25 was used for biodiesel production with palm oil as carbon source by 1:4 ratio of palm oil and methanol. Thin layer chromatography was used for analyzed methylester in sample and the results showed that there was no methylester.

Keywords : mutation, gamma irradiation, biodiesel, palm oil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายบุคคล

ขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ และผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำ แนวทางที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของโครงงานพิเศษ และเป็นผู้ให้การสนับสนุน ให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ซึ่งนอกจากจะเป็นเนื้อหาวิชาการแล้วยังสอนให้รู้จักหน้าที่และความรับผิดชอบต่องานที่ทำ

ขอบคุณ คุณอารักษ์ วิชิตจิรนันท์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน สำหรับความอนุเคราะห์ในการฉายรังสีแกมมาที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้การเอื้อเฟื้อ จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลองครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอบคุณครอบครัวและเพื่อนๆที่คอยให้กำลังใจ ช่วยเหลือและดูแลกันอย่างดีมาตลอดโดยเฉพาะในช่วงเวลาที่ยากลำบากและมีปัญหา

อนงค์ บุญเรืองอนันต์
อภิสิทธิ์ ปิ่นทอง
อมรรัตน์ มงคลอำนวย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ลิพิด	3
2.2 ไขมัน น้ำมัน และไข	3
2.3 สมบัติ โครงสร้าง และปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมัน	3
2.4 ชนิดของกรดไขมัน	5
2.4.1 กรดไขมันอิ่มตัว	5
2.4.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว	5
2.5 ไบโอดีเซล	7
2.6 เทคนิคการผลิตไบโอดีเซล	8
2.6.1 การใช้โดยตรงและการผสม	8
2.6.2 ไมโครอิมัลชัน	8
2.6.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.6.4 การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต	9
2.6.5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	10
2.6.5.1 ชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	11
2.6.5.2 แอลกอฮอล์ที่ใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	12
2.6.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	13
2.7 เอนไซม์ไลเปส	15
2.7.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	16
2.7.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์	16
2.7.3 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเอนไซม์ไลเปส	17
2.7.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสารตั้งต้น	18
2.7.4.1 ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	18
2.7.4.2 ความจำเพาะต่อกรดไขมัน	19
2.7.4.3 อิแนนทิโอซีแลกทิวิตี	19
2.7.5 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส	20
2.7.6 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส	20
2.8 การผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปส	21
2.9 การกลายพันธุ์	22
2.9.1 การเกิดการกลายพันธุ์	22
2.9.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ	23
2.9.3 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี	23
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	27
3.2 วัตถุดิบและสารเคมี	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.3 วิธีการทดลอง	28
3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ	28
3.3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอย	28
3.3.3 การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	29
3.3.4 การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย	29
3.3.5 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลาย	29
3.3.6 การผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน	30
3.3.7 การศึกษาองค์ประกอบของไบโอดีเซลด้วยโครมาโตกราฟีทินเลเยอร์	31
3.3.8 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	33
4.1 ผลการหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	33
4.1.1 การชักนำให้เกดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา	33
4.1.2 ผลอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา	34
4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเกิดวงใสบนอาหาร Tributyrin agar ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตติน	36
4.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	38
4.3.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพ	39
4.3.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณ	40
4.4 การผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลาย	42
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	45
5.1 สรุปผลการทดลอง	45
5.2 ข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก ก	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด 6

2.2 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอนไซม์ 15

4.1 เวลาในการฉายรังสีตัวอย่างเชื้อยีสต์ที่เซลล์เริ่มต้น 1.8×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร 34

4.2 อัตราการอยู่รอดของเชื้อบนอาหาร YM agar ภายหลังจากการฉายรังสีแกมมา 34

4.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสบนอาหารวุ้น Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 36

4.4 ขนาดของวงใสบนอาหารวุ้น Tributyrin ของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม 39

4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน 40

ตารางภาคผนวกที่

ข-1 มิลลิลิตรของสารละลาย ก (x) ผสมกับมิลลิลิตรของสารละลาย ข (y) 55

ข-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของสาร *p*-nitrophenol 55

ค-3 ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพดีที่สุดโดยเปรียบเทียบขนาดของวงใสบนอาหาร Tributyrin 57

ค-4 ค่าความแตกต่างทางสถิติในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณของสายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 2.5 เป็นแหล่งคาร์บอน 57

ค-5 ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสและขนาดของโคโลนีบนอาหารTributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และไตรกลีเซอไรด์	4
2.2	ปฏิกิริยาการเกิดไตรกลีเซอไรด์	4
2.3	ไตรกลีเซอไรด์อย่างง่ายและไตรกลีเซอไรด์ผสม	4
2.4	ปฏิกิริยาการเกิดไขมันไตรสเตียริน	5
2.5	กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน	9
2.6	กลไกของปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชัน	10
2.7	ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชันที่ย่อยสลายจนได้กลีเซอรอล	11
2.8	ปฏิกิริยาเคมีในการเตรียมสารอัลคอกซี	11
2.9	ปฏิกิริยาการเกิดสบู่	13
2.10	ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	13
2.11	โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ไม่จำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์	18
2.12	โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ตำแหน่ง 1,3	19
4.1	เครื่อง Gamma cell-220 ณ สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ	33
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการอยู่รอดและปริมาณรังสี	35
4.3	การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์บนเพลทซิลิกาเจล	44

รูปภาคผนวกที่

ข-1	กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบกับปัญหาราคาน้ำมันสูงขึ้น เนื่องจากพลังงานปิโตรเลียมที่กำลังจะหมดไป ส่งผลให้ต้องหาแหล่งพลังงานทดแทน ไบโอดีเซลจึงเป็นพลังงานทดแทนทางเลือกหนึ่งและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมซึ่งสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น กรด เบสและเอนไซม์ ซึ่งเบสที่นิยมใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ แต่มีข้อเสียคือ จะเกิดสบู่และน้ำ รวมทั้งต้องใช้อุณหภูมิสูงส่วนการใช้กรดนั้นปฏิกิริยาจะเกิดได้ช้า ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรงและเก็บเกี่ยวกลีเซอรอลออกได้ง่ายแต่มีข้อเสียคือ เอนไซม์มีราคาแพงจึงนำวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้โดยเลือกใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งสามารถย่อยน้ำมันได้มาใช้ประโยชน์ ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซลได้ แต่การผลิตเอนไซม์ในจุลินทรีย์นั้นอาจไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ จึงต้องทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาในปริมาณที่มากเกินพอ

ดังนั้นโครงงานนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ซึ่งคัดแยกได้จากธรรมชาติ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดกลายพันธุ์ด้วยกัมมันตภาพรังสีแล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ โดยการใช้รังสีแกมมา
2. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม
3. เพื่อศึกษาและประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลายในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการเหนี่ยวนำให้เชื้อยีสต์เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้กัมมันตภาพรังสี
2. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน
3. นำเอนไซม์ไลเปสที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบทินเลเยอร์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซล
2. เป็นการเพิ่มแนวทางในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำมันปาล์มมากขึ้น
3. เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิพิด

ลิพิด (lipid) เป็นสารอินทรีย์ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจนและอาจมีธาตุอื่นอีกคือ ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส โดยทั่วไปจะไม่ละลายในน้ำแต่ละลายได้ในสารอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่น พวกไฮโดรคาร์บอนหรืออีเทอร์ ลิพิดมีอยู่หลายประเภททั้งที่เป็นเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite)

2.2 ไขมัน น้ำมัน และไข

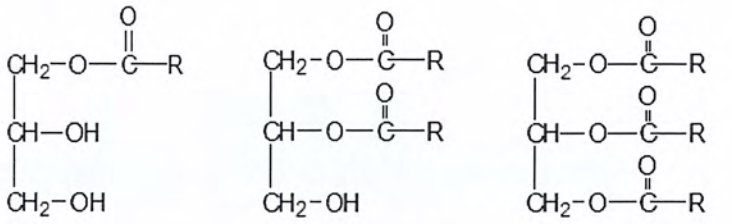
ไขมันและน้ำมันเป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์ที่ชื่อ กลีเซอรอล 1 โมเลกุลกับกรดไขมันอิสระ 1-3 โมเลกุล ไขมันจะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ส่วนใหญ่จะเป็นไขมันจากสัตว์แต่น้ำมันจะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องซึ่งมักจะได้จากพืช ส่วนไขเป็นของผสมของเอสเทอร์ที่เป็นของแข็งเกิดจากกรดไขมันและแอลกอฮอล์ที่มีโซ่ยาว หน้าที่สำคัญของไขมันคือเป็นโครงสร้างหลักของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นแหล่งพลังงานของสิ่งมีชีวิต การเผาผลาญไขมันอย่างสมบูรณ์จะให้พลังงานประมาณ 9 กิโลแคลอรีต่อกรัม ลิพิดพบในอาหารที่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบ เช่น เนย น้ำกะทิหรืออาหารที่ทอดด้วยน้ำมัน

2.3 สมบัติ โครงสร้าง และปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมัน

ในการจำแนกไขมันและน้ำมันจะพิจารณาจากส่วนที่เกิดจากกรดไขมันในเอสเทอร์นั้น ถ้ามี 1 โมเลกุล จัดเป็นโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ถ้ามี 2 โมเลกุลจัดเป็นไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และถ้ามี 3 โมเลกุลจัดเป็นไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) แสดงดังรูปที่ 2.1

ปฏิกิริยาการเกิดไขมันเป็นปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์(esterification) เช่น ปฏิกิริยาการเกิดไตรกลีเซอไรด์จากกลีเซอรอล 1 โมเลกุลรวมกับกรดไขมัน 3 โมเลกุลจะได้ไตรกลีเซอไรด์ (หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล) 1 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.2

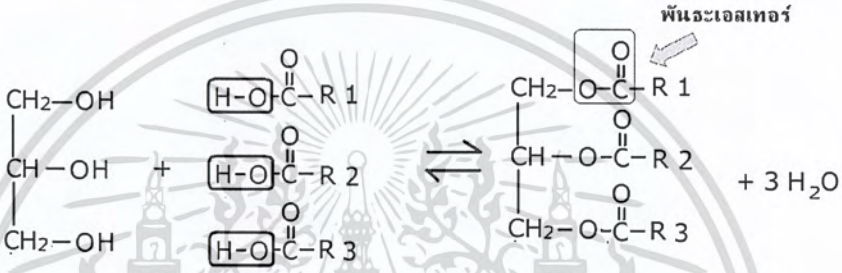
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Monoglyceride (Monoacylglycerol) Diglyceride (Diiacylglycerol) Triglyceride (Triacylglycerol)

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/fat_formation.htm (30 กรกฎาคม 2553)



กลีเซอรอล กรดไขมัน 3 โมเลกุล ไตรกลีเซอไรด์ น้ำ 3 โมเลกุล

รูปที่ 2.2 บฏกรยาการเกด เตรกลเซอ เรด

ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/uploaded/triglyceride.JPG (30 กรกฎาคม 2553)

ไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ที่มีหมู่ R1, R2, R3 เหมือนกันเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์อย่างง่าย (simple triglyceride) แต่ถ้า 2 หรือ 3 หมู่ต่างกันก็จะเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ผสม (mix triglyceride) ไขมันและน้ำมันในธรรมชาติจะเป็นไตรกลีเซอไรด์ผสมเป็นส่วนใหญ่ แสดงดังรูปที่ 2.3

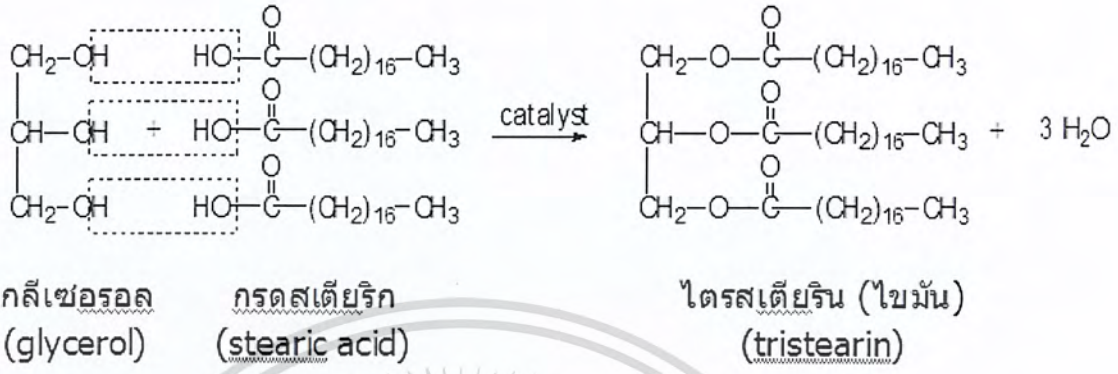
ไตรกลีเซอไรด์ผสม ไตรกลีเซอไรด์อย่างง่าย

รูปที่2.3 ไตรกลีเซอไรด์อย่างง่าย และไตรกลีเซอไรด์ผสม

ที่มา: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/fat_formation.htm (30 กรกฎาคม 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างปฏิกิริยาการเกิดไขมันไตรสเตียรินจากปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอรอล 1 โมเลกุลกับกรดสเตียริก 3 โมเลกุล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาจัดเป็นปฏิกิริยาขจัดน้ำ (dehydration reaction) จะได้ไขมันไตรสเตียริน 1 โมเลกุล และน้ำ 3 โมเลกุล แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเกิดไขมันไตรสเตียริน

ที่มา: http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/fat_formation.htm (30 กรกฎาคม 2553)

2.4 ชนิดของกรดไขมัน

กรดไขมันอิสระที่ได้จากการนำไตรกลีเซอไรด์มาไฮโดรไลซ์จะเป็นโซ่ตรงและมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่อยู่ระหว่าง 12–24 อะตอม กรดไขมันที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีประมาณ 40 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็นประเภทได้ดังนี้

2.4.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid)

เป็นกรดไขมันที่พันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนกับคาร์บอนยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด มีสูตรทั่วไปเป็น $C_nH_{2n}O_2$ หรือ C_nH_{2n}+1COOH หรือ $CH_3(CH_2)_nCOOH$ เช่น กรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 18 อะตอม จะมีสูตรทั่วไปเป็น $C_{18}H_{36}O_2$ ซึ่งเขียนสูตรได้ดังนี้ $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ กรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุด ได้แก่ กรดปาล์มิติก (palmitic acid) และกรดสเตียริก (stearic acid)

2.4.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid)

เป็นกรดไขมันที่พันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนกับคาร์บอนยึดเหนี่ยวด้วยพันธะคู่อย่างน้อย 1 พันธะ ซึ่งมีจำนวนอะตอมคาร์บอนน้อยกว่ากรดไขมันอิ่มตัว 2 อะตอม มีสูตรทั่วไปเป็น C_nH_{2n}–$2O_2$ หรือ C_nH_{2n}–1COOH หรือเขียนสูตรได้เป็น $CH_3(CH_2)_yCH{=}CH(CH_2)_xCOOH$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่ง 9–10 จะมีสูตรทั่วไปเป็น $C_{18}H_{34}O_2$ ซึ่งเขียนสูตรดังนี้ $CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$

กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากที่สุด ได้แก่ กรดโอเลอิก(oleic acid) และกรดไลโนเลอิก (linoleic acid) ไขมันและน้ำมันที่ได้จากสัตว์และพืชประกอบด้วยของผสมของกรดไขมันหลายชนิด ของผสมที่มีร้อยละของกรดไขมันอิ่มตัวสูงจะเป็นของแข็งแต่ถ้ามีร้อยละของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงก็จะเป็นน้ำมัน เช่น น้ำมันพืช สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด

ชื่อ	จำนวนคาร์บอน	โครงสร้าง	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)
กรดไขมันอิ่มตัว			
Luaric acid	12	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	44
Myristic acid	14	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	54
Palmitic acid	16	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	53
Stearic acid	18	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	70
Arachidic acid	20	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	75
กรดไขมันไม่อิ่มตัว			
Palmitoleic acid	16	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	32
Oleic acid	18	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	13
Linoleic acid	18	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$*(cis)*	–5
Linoleic acid	18	$CH_3(CH_2CH=CH)_3(CH_2)_7COOH$*(cis , cis)*	–11
Arachidonic acid	20	$CH_3(CH_2CH=CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$*(all cis)*	

ที่มา : www.planenergy.co.th (30 กรกฎาคม 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล เป็นชื่อเรียกเชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่ผ่านกระบวนการเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างไขมัน เนื่องจากกลีเซอไรด์ในธรรมชาติที่มีไขมันไม่อิ่มตัวสูง ความหนืดจึงสูง มีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ส่วนไขมันอิ่มตัวจะมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องซึ่งไม่สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้ถ้าอยู่ในโครงสร้างปกติ เนื่องจากจะทำให้เกิดการสะสมของคาร์บอนในเครื่องยนต์เกิดการปนเปื้อนในน้ำมันหล่อลื่น (Ma และคณะ, 1999)

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเครื่องยนต์ ไบโอดีเซลเป็นสารเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาเคมีระหว่างน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์หรือไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์ การเรียกชื่อสารเอสเทอร์ที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น เมื่อใช้เมทานอลจะเรียกสารที่ได้ว่า เมทิลเอสเทอร์ แต่ถ้าใช้เอทานอลจะเรียกสารที่ได้ว่า เอทิลเอสเทอร์ อย่างไรก็ตาม ไบโอดีเซลเป็นคำรวมที่ใช้เรียกสารเอสเทอร์เหล่านี้ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนจากพืช ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงล้วนๆที่ไม่ทำการผสมกับน้ำมันดีเซลเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้ โดยที่อัตราการผสมสามารถใช้ผสมได้ตั้งแต่อัตราส่วนไบโอดีเซลร้อยละ 5 ขึ้นไป โดยทั่วไปแล้วไบโอดีเซลล้วนๆที่ไม่ทำการผสมกับน้ำมันดีเซลมีชื่อเรียกว่า B100 สำหรับไบโอดีเซลที่ผสมกับน้ำมันดีเซลจะเรียกชื่อตามอัตราส่วนโดยปริมาตรของการผสม เช่น เชื้อเพลิงที่มีไบโอดีเซลร้อยละ 20 ผสมกับน้ำมันดีเซลร้อยละ 80 โดยปริมาตร เรียกว่า B20 เป็นต้น

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์นี้เป็นเชื้อเพลิงสะอาด ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม สามารถเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์และไอเสียมีมลพิษต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ดีเซล

วัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ น้ำมันพืชและน้ำมันพืชใช้แล้วและไขมันสัตว์ อาทิ น้ำมันปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ละหุ่ง งาและทานตะวัน แต่ยังมีพืชน้ำมันอีกชนิดหนึ่งที่มีการส่งเสริมให้นำมาใช้ผลิตเป็นไบโอดีเซลมากขึ้นได้แก่ สบู่ดำ เนื่องจากในเมล็ดของสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันสูงถึงร้อยละ 52.8 ของน้ำหนักเนื้อใน และในน้ำมันสบู่ดำมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูงกล่าวคือ มีปริมาณกรดโอเลอิกร้อยละ 44.8 และกรดลิโนเลอิกร้อยละ 34.0 ซึ่งส่งผลให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีความหนืดที่เหมาะสมและมีคุณภาพดี นอกจากนี้การนำสบู่ดำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลยังไม่เป็นการแย่งตลาดของน้ำมันที่ใช้บริโภค เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำไม่สามารถนำมาบริโภคได้ (Kandpal และ Madan, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะเดียวกันปาล์มน้ำมันก็เป็นพืชน้ำมันที่น่าสนใจนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ทั้งนี้เพราะปาล์มเป็นพืชที่ปลูกกันมากอยู่แล้ว แต่ละปีประเทศไทยมีผลผลิตของปาล์มจำนวนมาก น้ำมันปาล์มมีทั้งกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบหลักกล่าวคือ มีกรดปาล์มมิติกร้อยละ 42.6 และกรดโอเลอิกร้อยละ 40.5 (Demirbas, 2002) การที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากจะช่วยให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอัลคิลเอสเทอร์ไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีและมีความหนืดไม่สูงเกินมาตรฐานสากล

2.6 เทคนิคการผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลสามารถผลิตได้หลายวิธีคือ การใช้โดยตรงและการผสม ไมโครอิมัลชัน กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน(pyrolysis) กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน กระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยการทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต นอกจากนั้นยังมีการผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทรานสเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ในการผลิตไบโอดีเซลด้วย (heterogeneous catalyst) วิธีการผลิตไบโอดีเซลดังกล่าวข้างต้นแสดงรายละเอียดดังนี้

2.6.1. การใช้โดยตรงและการผสม

การใช้โดยตรงคือ น้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชแท้ๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้เลยกับเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องผสมหรือผสมสารเคมีอื่นหรือไม่ต้องนำมาเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำมัน ส่วนแบบผสมคือเป็นการผสมระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซลหรือสารอื่นๆ เพื่อให้ไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลให้มากที่สุด เช่น โคโคดีเซลที่ประจวบคีรีขันธ์ซึ่งเป็นการผสมระหว่างน้ำมันมะพร้าวกับน้ำมันก๊าด (กองบรรณาธิการ, 2548)

2.6.2. ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)

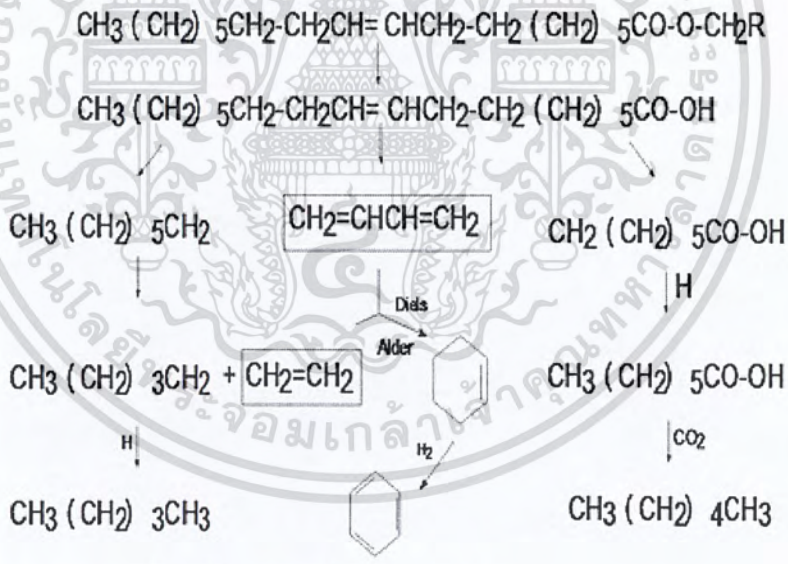
ไมโครอิมัลชัน คือคอลลอยด์ที่กระจายตัวในสภาวะสมดุล ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาค่าความหนืดสูงในน้ำมันพืชให้มีค่าความหนืดลดลง โดยใช้ควบคู่กับตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทานอลและบิวทานอล (Srivasyava และ Prasad, 1999) ไมโครอิมัลชั่นที่เกิดจากเมทานอลกับน้ำมันพืชจะได้น้ำมันที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเครื่องยนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่ามีการสะสมตัวของคราบซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนเกาะรอบๆ หัวฉีดและวาล์วของเครื่องยนต์ซึ่งเป็นข้อเสียของน้ำมันที่ผลิตโดยวิธีนี้ (Ma และคณะ, 1999)

2.6.3. กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis)

เป็นกระบวนการเปลี่ยนจากสารประกอบหนึ่งชนิดไปเป็นสารประกอบอื่นๆมากกว่าหนึ่งชนิด โดยใช้ความร้อนหรือใช้ความร้อนร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้จะต้องจำกัดปริมาณอากาศหรือออกซิเจนที่ใช้ในกระบวนการด้วยเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการประมาณ 450 ถึง 600 องศาเซลเซียส สารประกอบที่ผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งกระบวนการนี้ยากที่จะกำหนดหรือควบคุมให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ เนื่องด้วยความหลากหลายทางปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการไพโรไลซิสได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ กรดไขมันธรรมชาติ (natural Fatty Acid) และเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Ma และคณะ, 1999) กลไกของกระบวนการแตกสลายทางความร้อนแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis)

ที่มา: http://www.skoolbuz.com/library/content/3351 (19 มีนาคม 2554)

2.6.4. การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต

เป็นกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งวิธีนี้เป็นการนำเอาน้ำมันมาทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย พร้อมทั้งเป็นมิตรกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

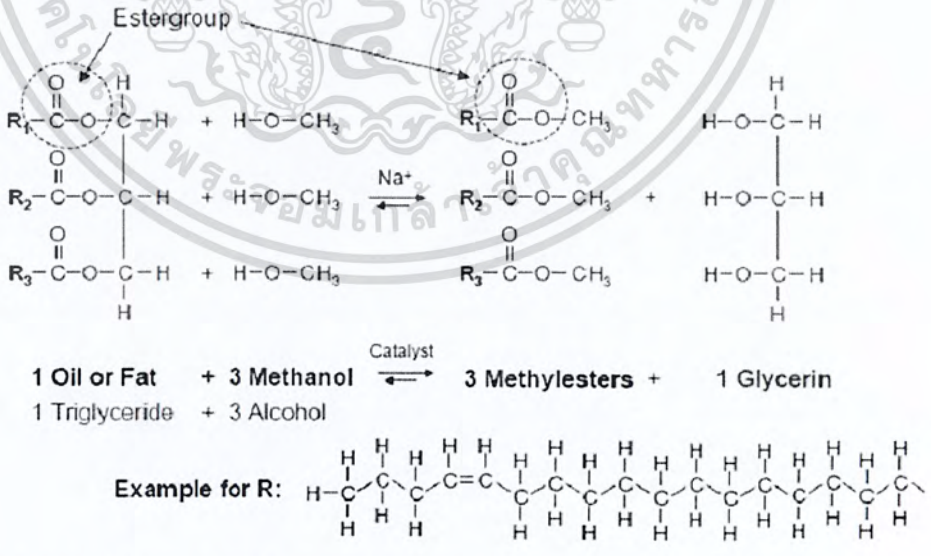
สิ่งแวดล้อมกล่าวคือ ไม่มีของเสียจากกระบวนการ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะต้องใช้อุณหภูมิและความดันในระดับที่ค่อนข้างสูงประมาณ 512.2 เคลวิน และ 8.1 เมกะปาสคาล ตามลำดับ เพื่อให้เมทานอลอยู่ในสภาวะเหนือวิกฤต (Demirbas, 2002)

2.6.5. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือเรียกอีกอย่างว่า แอลกอฮอไลซิส (alcoholysis) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไขมันหรือน้ำมัน (triglyceride) กับแอลกอฮอล์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2.6

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยแบบผันกลับได้ 3 ขั้นตอน

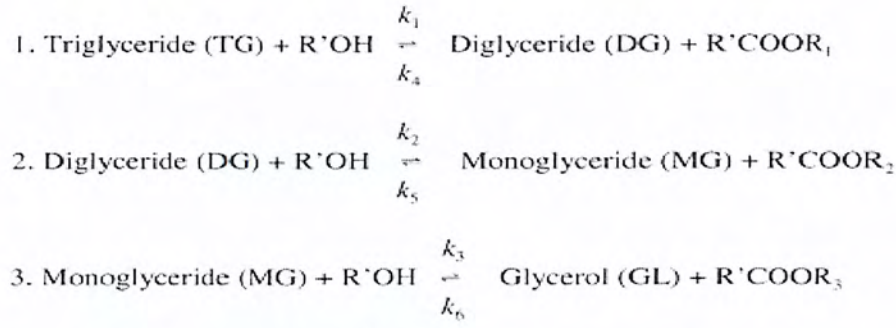
1. น้ำมันพืช หรือไตรกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยากับเมทานอลเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลกับไดกลีเซอไรด์
2. ไดกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยาต่อกับเมทานอลเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์กับโมโนกลีเซอไรด์
3. โมโนกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยากับเมทานอลเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์กับกลีเซอรอล ดังรูปที่ 2.7 ฉะนั้นการผลิตไบโอดีเซล เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอย่างสมบูรณ์จะสามารถควบคุมปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ ไม่ให้หลงเหลือในไบโอดีเซลเกินที่มาตรฐานกำหนด



รูปที่ 2.6 กลไกของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ที่มา: http://www.vcharkarn.com/venergy/pic/A409p2x3.gif (6 กรกฎาคม 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ย่อยสลายจนได้กลีเซอรอล

ที่มา: Ma และคณะ (1999)

2.6.5.1 ชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การนำตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะช่วยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์เกิดได้ดีขึ้น โดยชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถแบ่งได้ดังนี้ (Marchetti และคณะ, 2005)

1. ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (base Catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ซึ่งควรใช้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือเอทานอล โดยน้ำมันที่ใช้จะเป็นชนิดใดก็ได้ เช่น น้ำมันดิบ หรือน้ำมันที่ใช้แล้ว ก่อนทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันควรเปลี่ยนจากรูปเบสไปเป็นในรูปของสารประกอบอัลคอกซี (alcoxy) ก่อนโดยการเตรียมสารประกอบอัลคอกซีเป็นไปดังปฏิกิริยาเคมีในรูปที่ 2.8

รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาเคมีในการเตรียมสารอัลคอกซี

ที่มา: Marchetti และคณะ (2005)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อีกทั้งยังทำให้ได้ไบโอดีเซลปริมาณสูง (Ma และคณะ, 1999) ส่วนข้อจำกัดตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสคือ น้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันดิบ ถ้ามีน้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบของการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณมากจะทำให้มีสบู่เกิดขึ้นแทนที่จะได้น้ำมันไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ (Agarwal, 2006)

2. ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด (acid Catalyst)

กรดที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะทำให้ได้ผลผลิตคือน้ำมันไบโอดีเซลในปริมาณมากแต่ปฏิกิริยาจะเกิดช้ามาก อาจใช้เวลามากกว่า 1 วันกว่าปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ใช้ได้ดีกับกลีเซอไรด์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและน้ำในปริมาณสูงได้ เช่น น้ำมันที่ใช้แล้ว (Fukuda และคณะ, 2001)

3. เอนไซม์ (enzyme catalyst)

เอนไซม์ที่ใช้คือเอนไซม์ไลเปส มีข้อดีคือ เป็นปฏิกิริยาที่สามารถควบคุมได้ เกิดในสภาวะไม่รุนแรง ไม่มีสารพิษในของเสียจากปฏิกิริยา สามารถจำกัดกลีเซอรอลออกได้ง่าย และถ้าเป็นเอนไซม์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่ข้อเสียคือราคาค่อนข้างแพง

4. ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ (heterogeneous catalyst)

เป็นการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวในระบบ เช่น ZrO_2 ZnO KNO_3/ZrO_2 KNO_3/KL ซีโอไลต์ ซึ่งการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะช่วยแก้ปัญหาการเกิดสบู่ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเมื่อใช้เบสเป็นตัวเร่งในระบบที่มีน้ำ (Jitputti และคณะ, 2005)

2.6.5.2 แอลกอฮอล์ที่ใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

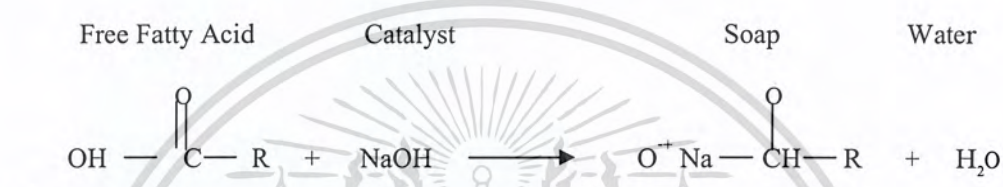
แอลกอฮอล์ที่นำมาใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันคือ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล และบิวทานอล โดยเฉพาะเมทานอลถูกใช้มากที่สุดเพราะมีราคาถูกอีกทั้งยังมีข้อดีในส่วนของคุณสมบัติทางกายภาพและด้านเคมี คือ เป็นโมกุลขนาดเล็กมีขั้ว ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวของเมทานอลสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกลีเซอไรด์ได้รวดเร็วและสามารถละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ดี ตามสัดส่วนของปฏิกิริยาเคมีพบว่าเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ต้องใช้อัตราส่วนโดยโมลแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเป็น 3:1 แต่ในทางปฏิบัติต้องใช้อัตราส่วนที่มากกว่านั้น หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของผสมระหว่างเอสเทอร์ กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ เพราะฉะนั้นการทำให้ไบโอดีเซลบริสุทธิ์จึงเป็นเรื่องที่ค่อนข้างยาก เพราะถ้าไบโอดีเซลมีส่วนผสมของโมโนกลีเซอไรด์จะทำให้ไบโอดีเซลเกิดการแข็งตัวง่าย ทั้งนี้ถ้ามีสิ่งเจือปนอยู่ในไบโอดีเซลก็จะทำให้จุดหมอกควัน (cloud Point) และจุดไหลเท (pour Point) มีค่าสูงขึ้นด้วย (Ma และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

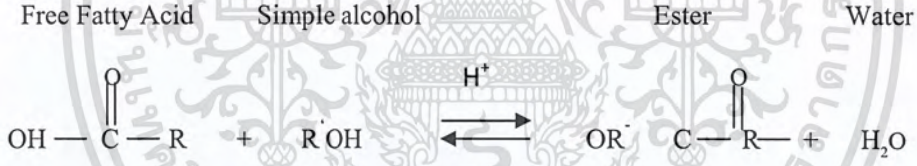
1. ผลของความชื้นและกรดไขมันอิสระ

สำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ที่ใช้จะต้องไม่มีน้ำเป็นส่วนผสมเพราะน้ำเป็นสาเหตุทำให้เกิดสบู่ขึ้นในระหว่างการทำปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 2.9 สบู่ที่เกิดขึ้นจะไปลดประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาลง นอกจากนั้นยังส่งผลต่อคุณสมบัติของน้ำมันไบโอดีเซลคือทำให้ค่าความหนืดสูงขึ้น ทำให้น้ำมันมีลักษณะเป็นเจล และยากต่อการแยกไบโอดีเซลออกจากกลีเซอรอลด้วย



รูปที่2.9 ปฏิกิริยาการเกิดสบู่ (Saponification)

ที่มา: http://mybiofuels.us/Pubs/Khan_Thesis_2002_Kinetics_Catalysts.pdf. (19 มีนาคม 2554)



รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่ใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา: http://mybiofuels.us/Pubs/Khan_Thesis_2002_Kinetics_Catalysts.pdf. (19 มีนาคม 2554)

จากรูปจะเห็นว่าปัจจัยที่ทำให้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเกิดสบู่ได้นอกจากน้ำแล้วยังมีกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันวัตถุดิบ ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำมันวัตถุดิบควรมีค่าความเป็นกรด (acid value) ไม่เกิน 4 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม เพราะการมีกรดไขมันอิสระในน้ำมันวัตถุดิบที่มากเกินไปจะทำให้ได้ไบโอดีเซลน้อยลง แต่สำหรับน้ำมันวัตถุดิบที่ค่าความเป็นกรดสูง (มากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อกรัม) จะต้องนำน้ำมันมาทำการลดค่าความเป็นกรดลง โดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันซึ่งใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 2.10 แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อ (Ramadhas และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับ เพราะฉะนั้นแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องใช้ในปริมาณที่มากเกินพอเพื่อที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางขวามากขึ้นซึ่งก็จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นเช่นกัน โดยสัดส่วนที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ แอลกอฮอล์ 3 โมลต่อไตรกลีเซอไรด์ 1 โมล ดังนั้นยิ่งใช้อัตราส่วนมากเท่าไหร่ก็จะทำให้ได้เอสเทอร์มากขึ้นเท่านั้นและภายในเวลาที่สั้นลงด้วย โดยอัตราส่วน 6:1 เป็นค่าที่ถูกใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม พบว่าได้เมทิลเอสเทอร์มากกว่าร้อยละ 98 (Fukuda และคณะ, 2001)

3. ผลของตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งสามารถแบ่งได้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กรดหรือเอนไซม์ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วกว่าปฏิกิริยาที่ใช้กรดเป็นตัวเร่ง อย่างไรก็ตามกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันมันอิสระในปริมาณมากและมีน้ำผสมอยู่ด้วยการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะสมกว่า (Ma และคณะ, 1999) เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเบสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 - 1 โดยน้ำหนักจะให้ผลได้ร้อยละ 94 – 99 การเพิ่มปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาเบสไม่ได้เป็นการช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดมากขึ้น แต่กลับเพิ่มค่าใช้จ่ายในขั้นตอนของการล้างเอาตัวเร่งปฏิกิริยาเบสออกจากผลิตภัณฑ์ (Agarwal, 2006) โดยในตารางที่ 2.2 เป็นการเปรียบเทียบข้อแตกต่างของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กรดและเอนไซม์

4. ผลของเวลาและอุณหภูมิการทำปฏิกิริยา

อัตราการเกิดไบโอดีเซลจะแปรผันโดยตรงกับเวลา นั่นคือถ้าเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณเอสเทอร์มากขึ้นเช่นกัน (Meher และคณะ, 2004) อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอย่างมาก อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาให้เพียงพอ ปฏิกิริยาก็จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใต้อุณหภูมิห้อง แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับจุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้เช่น ถ้าใช้เมทานอลอุณหภูมิที่ใช้คือ 60-70 องศาเซลเซียสที่ความดันบรรยากาศ (โดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา) (Agarwal, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ผลของอัตราการกวนผสม

การกวนผสมนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากสำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพราะน้ำมันหรือไขมันที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลนั้นไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับแอลกอฮอล์และตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงต้องมีการกวนผสมให้เนื้อสารสัมผัสกันปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจึงจะเกิดและได้เป็นไบโอดีเซล (Meher และคณะ, 2006)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรดและเอนไซม์

ตัวแปร	ตัวเร่งชนิดเบส	ตัวเร่งชนิดกรด	เอนไซม์ไลเปส
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	60-70	55-80	30-40
กรดไขมันอิสระในน้ำมัน	เกิดสบู่	เกิดเอสเทอร์	เกิดเอสเทอร์
น้ำในน้ำมัน	มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยา	มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยา	ไม่มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยา
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง
กระบวนการเก็บเกี่ยวกลีเซอรอล	ยาก	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ทำการล้างซ้ำ	ทำการล้างซ้ำ	ไม่ต้องล้าง

ที่มา: Marchetti และคณะ (2005)

2.7 เอนไซม์ไลเปส (lipase)

ชื่อสามัญคือไลเปส (lipase) ชื่อตามระบบคือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glyceral esterhydrolase) และชื่อตามรหัสคือ E.C. 3.1.1.3 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ

เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำแต่อยู่ในน้ำโดยไม่รวมตัวกับน้ำ ดังนั้นปฏิกิริยาจึงเกิดขึ้นระหว่างชั้นของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำ(insoluble substrate) กับเอเควียสเฟส(aqeous phase) ลักษณะปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสมี 2 ลักษณะใหญ่ๆคือ ทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะต่อพันธะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอสเทอร์ (non-specific lipase) และทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง 1,3 (1,3-specific lipase)

2.7.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งผลิตที่สำคัญได้แก่ พืช สัตว์ จุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตและจำหน่ายทางค้าส่วนใหญ่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ เนื่องจากมีกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยากและสามารถควบคุมการผลิตได้ง่าย (Macrae และคณะ, 1985) ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางเช่น การเติมในผงซักฟอกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการซักล้าง เพื่อเพิ่มรสชาติในอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ เพราะมีข้อดีหลายประการคือ เอนไซม์มีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมีทั้งยีสต์ รา แบคทีเรีย ซึ่งแบ่งได้ 2 ลักษณะคือ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตแล้วสะสมไว้ในเซลล์(intracellular lipase) และที่ผลิตจากยีสต์และแบคทีเรียส่วนใหญ่จะขับออกนอกเซลล์(extracellular enzyme) จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่าย ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida deformans*, *Candida rugosa*, *Pesudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) และ *P.fragi* CRDA323 เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดสะสมเอนไซม์ไลเปสไว้ในเซลล์ก่อนแล้วขับออกมานอกเซลล์เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม เช่น *Yarrowai lipolytica* (*Candida lipolytica*) โดยจะขับออกมานอกเซลล์เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของคาร์บอนสูงถึงระดับหนึ่ง (Pereira-Meirelles และคณะ, 2000)

2.7.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

จากการศึกษาพบว่า การผลิตแบบอาหารเหลวจะเกิดการยับยั้งการสร้างเมื่อมีกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์หรือกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีการเติมไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ แหล่งไนโตรเจนส่วนมากใช้ถั่วเหลืองบด เปปโตน ยีสต์สกัด ไฮโดรไลเสตจากเคซีน และน้ำแช่ข้าวโพด ตัวอย่างเชื้อที่ทำการผลิตคือ *Geotrichum candidum, Rhizopus japonicus, Candida paralipolytica* จุลินทรีย์บางชนิดสร้างเอนไซม์ไลเปสและปล่อยออกมานอกเซลล์ แต่บางครั้งเอนไซม์จะยึดติดอยู่กับผนังเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีเอนไซม์อยู่น้อย จึงต้องใช้เทคนิคบางอย่างเพื่อให้เอนไซม์ที่ติดอยู่กับผนังเซลล์หลุดออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่น การเติม Mg^{2+} หรือเลซิติน (อารี, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.7.3 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเอนไซม์ไลเปส

ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8.0-9.0) แต่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ปริมาณเกลือและชนิดของอิมัลซิฟาย-เออร์ที่ใช้ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ ส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีในช่วงของความเป็นกรดจะพบมากในไลโซโซมของเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.9-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงที่พีเอชเป็นกลาง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 30-40 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้ที่ได้จากพืชและสัตว์ ซึ่งความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่รวมกับสารตั้งต้นซึ่งเป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นจะทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้

จากที่มีการค้นพบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเปสพบว่า บริเวณเร่งปฏิกริยา (active site) ของเอนไซม์จะมีสายโพลิเปปไดท์ ทำหน้าที่เป็นฝาปิด (lid) ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้ จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้ โดยโพลิเปปไทด์จะประกอบไปด้วย กรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่และขดตัวเป็นเกลียวนวา โดยฝาปิดนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำและตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากจะมีกรดอะมิโนเซอรีนแล้ว ยังพบอีก 2 ชนิด ได้แก่ ฮีสทีดีนและกรดแอสพาร์ติกที่เป็นตัวช่วยการทำงานของกรดอะมิโนเซอรีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

มีรายงานว่า *Photobacterium lipolyticum* M37 เป็นเอนไซม์ชนิดไซโครฟิลิก (psychrophilic enzyme) ซึ่งต้องการพลังงานกระตุ้นต่ำ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเอนไซม์คือ 25 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาโครงสร้างสามมิติพบว่ามีขนาด 2.2 อังสตอม และบริเวณล่างของฝาปิดประกอบด้วยหลุมที่มีความสำคัญ ซึ่งถูกคลุมอยู่ในฝาปิดเกลียว(lid helix) บนบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น(substrate binding) นอกจากนี้บริเวณออกซีแอนไอออน(oxyanion hole) ยังกว้างกว่าในเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น ลักษณะโครงสร้างทั้งสองเกี่ยวข้องกับการต้องการพลังงานกระตุ้นต่ำและการมีกิจกรรมสูงภายใต้อุณหภูมิต่ำ

2.7.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสารตั้งต้น

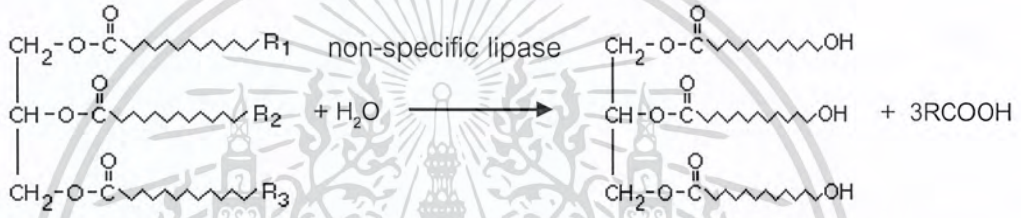
เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์(position specificity) ความจำเพาะต่อกรดไขมัน(fatty acid specificity) และอิแนนทิโอซีแลกทิวิตี(enantioselectivity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117247

2.7.4.1 ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (position specificity)

แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. ไลเปสที่ไม่จำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์(non-specific lipase) ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถตัดพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ทั้ง 3 ตำแหน่ง โดยไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมัน เมื่อมีการย่อยอย่างสมบูรณ์จะได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida rugosa, Pseudomonas* sp., *Chromobacterium viscosum, Corynebacterium acnes* ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ไม่จำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ ที่มา: http://library.med.utah.edu/NetBiochem/mml/fa_triacyg.gif (6 กรกฎาคม 2553)

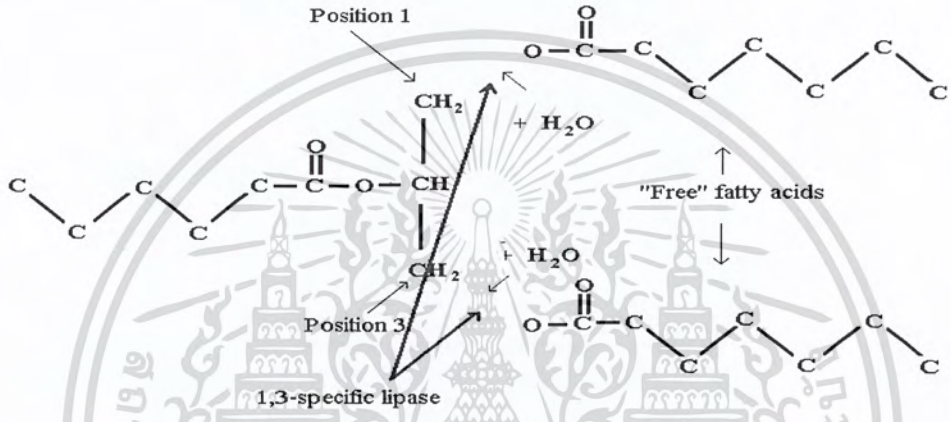
2. ไลเปสที่จำเพาะต่อโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่ง 1,3 (1,3-specific lipase) ไลเปสในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันเฉพาะตำแหน่งที่อยู่ด้านนอกของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันอิสระ 1,2 (2,3)-ไดกลีเซอไรด์และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ไม่คงตัว ถ้าปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาต่อไปจะเกิดการย้ายกรดไขมัน(acyl migration) จากตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์และ 1-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อน *Bacillus subtilis* 168, *Mucor javanicus*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger, Rhizopus javanicus* ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้แสดงในรูปที่ 2.12

2.7.4.2 ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (fatty acid specificity)

ไลเปสในแหล่งต่างๆจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันโดยสามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายกรดไขมันชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยอัตราเร็วสูงซึ่งบางชนิดมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายสั้น (ต่ำกว่า C8) เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* ซึ่งสามารถย่อยน้ำมันมะกอกได้ดี เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลเปสจาก *Bacillus* sp. เป็นไลเปสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายยาวกว่า C12 ได้ต่ำ ไลเปสจาก *Geotrichium candidum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายยาวที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (cis-9 double bond) ไลเปสจาก *Aspergillus niger* ย่อยสลายไตรโอเลอิน (triolein) ซึ่งมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่ 1 ตำแหน่งได้ดีกว่าไตรสเตียรินที่มีกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดสเตียริก ไลเปสจาก *Aspergillus* sp. (ไลเปส 8901) สามารถย่อยน้ำมันมะกอกและน้ำมันถั่วเหลืองได้อย่างรวดเร็ว



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ตำแหน่ง1,3
ที่มา: www.nutriology.com/TGbreakdown1.gif (6 กรกฎาคม 2553)

2.7.4.3 อิแนนทิโอซีแลกทิวิตี (enantioselectivity)

อิแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) เป็นโมเลกุลของสารประกอบที่เป็นภาพในกระจกเงาซึ่งกันและกัน แต่ไม่สามารถวางทับภาพในกระจกเงาได้สนิท อิแนนทิโอเมอร์จะมีเป็นคู่ๆและมีคุณสมบัติหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้ แต่อิแนนทิโอเมอร์ที่เป็นสเตอริโอไอโซเมอร์(สูตรโครงสร้างเหมือนกันอะตอมต่างๆต่อกันในลักษณะเดียวกัน แต่แตกต่างกันในวิธีการจัดเรียงตัวของอะตอมแบบ 3 มิติ)ซึ่งกันและกันจะมีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนกัน ยกเว้นการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ซึ่งองศาจะเท่ากันแต่หมุนทิศทางตรงข้ามกัน มีการค้นพบเอนไซม์ไลเปส u3648 ซึ่งมีความจำเพาะต่ออิแนนทิโอเมอร์ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.5 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิดคือ

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำในการทำปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน

2. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสคือการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำน้อยๆและผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้เป็นไตรกลีเซอไรด์

3. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) เป็นปฏิกิริยาการสับเปลี่ยนหมู่จากสารชนิดไปยังสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสารเคมีประเภทเดียวกัน เช่น การแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างโมโนเอสเทอร์หรือโพลีเอสเทอร์ การแลกเปลี่ยนหมู่ของแอลกอออล์ในกรดไขมันเอสเทอร์

2.7.6 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส

1. ความเป็นกรดด่าง

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีทั้งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะต่างๆกัน เช่น เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส (Lesuisse และคณะ, 1992) ส่วนความเป็นกรดด่างของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้น พบว่า มีความคงตัวในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้าง

2. อุณหภูมิ

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติในการทำงานและมีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์จาก *Aspergillus nidulands* จะทำงานได้ดีในอุณหภูมิช่วง 0-20 องศาเซลเซียส (Mayordomo และคณะ, 2000)โดยเฉพาะจาก *Pseudomonas* sp. สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 100 องศาเซลเซียส และความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อรวมอยู่กับสารที่ทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียจะมีความคงตัวสูงในสภาวะที่รุนแรง โดยเอนไซม์ไลเปสหลายชนิดที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลางมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงและเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูงนอกจากจะมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงแล้ว ยังมีความคงตัวต่อตัวทำละลายหลายชนิดด้วย (Schmidt-Dannert และคณะ, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตัวทำละลายอินทรีย์

นอกจากเอนไซม์ไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของกรดไขมันและน้ำมันในสภาวะที่มีน้ำแล้วเอนไซม์ไลเปสยังสามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ การย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ การย้ายหมู่เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ (Mitsuhashi และคณะ, 1999) เพราะสามารถสังเคราะห์โมเลกุลชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพตามที่ต้องการได้โดยการทำปฏิกิริยาที่มีการควบคุมปริมาณน้ำนั้นจะมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ (Klibanov, 2001)โดยตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น เมทานอลจะทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 (Chartrain และคณะ, 1993) และ *Pseudomonas fluorescens* Strain 2D และ *Rhiropus oryzae* มีความคงตัวลดลง นอกจากตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้เอนไซม์ไลเปสมีความคงตัวลดลงแล้ว แต่บางชนิดสามารถเพิ่มความคงตัวได้ เช่น ไอโซออกเทนจะช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor hiemalis, f. hiemalis* และ *Rhizopus oryzae* (Hiol และคณะ, 2000) แต่ไอโซออกเทนจะลดความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK

4. ไอออนของโลหะและสารเคมี

ไอออนของโลหะบางชนิดอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น Ca^{2+} Na^{+} (Gilbert และคณะ, 1991) Ba^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} และ Sr^{2+} จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่ Ca^{2+} มักเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยไอออนของ Ca^{2+} จะช่วยการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานดีขึ้น โดยเพิ่มการดูดซึมไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน(oil-water interface) และยังช่วยขจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน

2.8 การผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปส

การผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสนับเป็นหนึ่งในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ นอกจากจะทำให้ได้ผลผลิตที่ถือว่ามีความสะอาดปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้ว ระดับมลพิษที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการผลิตยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับการผลิตทางเคมีแบบดั้งเดิม โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลได้จากกระบวนการทางเคมีซึ่งให้ผลผลิตในอัตราสูงและนิยมใช้กันมากในการผลิตระดับอุตสาหกรรมแต่การผลิตด้วยวิธีการนี้ยังมีปัญหาบางประการเช่น ความยุ่งยากในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิต เกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตไบโอดีเซลจากการเร่งของเอนไซม์ไลเปส นอกจากจะได้ผลผลิตที่เป็นประโยชน์แล้วยังมีความสะอาดปลอดภัยต่อผู้บริโภค ไม่ต้องมีการบำบัดน้ำเสียและกระบวนการแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลผลิตอีกชนิดหนึ่งทำได้สะดวกและง่าย เป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศในปัจจุบันที่ราคาน้ำมันขยับตัวสูงขึ้น จะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไบโอดีเซลได้ภายในประเทศและนับเป็นส่วนหนึ่งในการยกระดับมาตรฐานการวิจัยให้ก้าวหน้า

2.9 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์(mutation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรมและลักษณะที่เปลี่ยนแปลงสามารถจะถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งได้ แบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ

1. มิวเทชันระดับโครโมโซม(chromosome mutation) คือการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม อาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมหรือการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

2. มิวเทชันระดับยีน(gene mutation หรือ point mutation) คือการเปลี่ยนแปลงจากยีนหนึ่งไปเป็นอีกยีนหนึ่งซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.9.1 การเกิดการกลายพันธุ์

แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

2.9.1.1 การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutstion) อาจเกิดขึ้นเนื่องจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิในธรรมชาติ ซึ่งสิ่งต่างๆเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนตำแหน่งไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลของเบส(tautomeric shift) หรือการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลของเบส (ionization) ทำให้การจับคู่ของเบสผิดไปจากเดิมมีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบแทรนซิชันหรือทรานส์เวอร์ชันทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนไป แต่อัตราการเกิดมิวเทชันชนิดนี้จะต่ำมากเช่น เกิดในอัตรา 10^{-6} หรือ 10^{-5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1.2 การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้น

2.9.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen)

ได้แก่ อุณหภูมิ รังสีต่างๆ รังสีสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.9.2.1 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้สูงซึ่งมักจะทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมรังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีแอลฟา เบตา แกมมา นิวตรอนซ์หรือรังสีเอ็กซ์

2.9.2.2 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้ต่ำมักจะทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์หรือไซโทซีนไดเมอร์ รังสีประเภทนี้ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)

2.9.3 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen)

ได้แก่ สารเคมีต่างๆซึ่งมีหลายชนิด

2.9.3.1 สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆ ของดีเอ็นเอ(base analogues) ซึ่งสารเคมีประเภทนี้สามารถเข้าแทนที่เบสเหล่านั้นได้ระหว่างที่เกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสและรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างสารเคมี ได้แก่ 5-โบรโมยูราซิล และ 2-อะมิโนพิวรีน 5-โบรโมยูราซิลมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับไทมีนเมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะสามารถเข้าไปแทนที่ไทมีนได้และสามารถเกิดทอทโทเมอริก (tautomeric) หรือไอออนไนเซชัน(ionization)ได้ซึ่งเมื่อเกิดแล้วแทนที่จะจับคู่กับอะดินีนก็จะไปจับคู่กับกัวนีน เมื่อมีการจำลองโมเลกุลต่อไปอีกจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสขึ้นได้

2.9.3.2 สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส

สารเคมีประเภทนี้มีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสเช่นเดียวกันทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ กรดไนตรัส ไฮดรอกซิลลามีน ไนโตรเจนมัสตาด เอธิลมีเทนซัลโฟเนต กรดไนตรัส จะทำหน้าที่ดึงหมู่อะมิโนออกจากโมเลกุลของเบสอะดินีน ไซโทซีนและกัวนีน ทำให้เบสอะดีนีนเปลี่ยนเป็นไฮโปแซนทีนซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโทซีนได้ เบสไซโทซีนเปลี่ยนเป็นยูราซิลซึ่งสามารถจับคู่กับเบสอะดีนีนได้และเบสกัวนีนเปลี่ยนเป็นแซนทีนซึ่งสามารถจับคู่กับเบสไซโทซีนได้ ดังนั้นเมื่อเกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสแบบแทรนซิชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทรกโดยอะคริดีนออเรนจ์หรือโพรฟาวีนหลุดออกมา เมื่อมีการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอจะได้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์และการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ยีนที่เปลี่ยนแปลงไปนี้อาจจะกลายเป็นยีนเด่นหรือยีนด้อยก็ได้หรืออาจทำให้เกิดการตายขึ้นได้ (lethal gene)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.10.1 ลักษณะของยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์มาก ซึ่งคัดเลือกได้จากการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณต่ำ

การคัดเลือก *Phaffia rhodozyma* ที่ผลิตแคโรทีนอยด์มากกว่าปกติโดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ปริมาณต่ำกว่า 10 กิโลเกรย์ ซึ่งมีโคบอลต์ 60 เป็นแหล่งกำเนิดรังสี โดยใช้ปริมาณรังสี 0, 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 และ 7 กิโลเกรย์ ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ 3A4-8 ที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์ 3.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของยีสต์ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ปกติร้อยละ 50 โดยสายพันธุ์ปกติจะไม่พบการอยู่รอดที่ปริมาณรังสีมากกว่า 4.5 กิโลเกรย์ ในขณะที่สายพันธุ์กลายสามารถอยู่รอดได้แม้จะได้รับปริมาณรังสี 6 กิโลเกรย์ แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมานี้จะมีเฉพาะสายพันธุ์กลายที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในปริมาณมากเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดหลังจากผ่านการฉายรังสี (Sun และคณะ, 2004)

2.10.2 การคัดเลือก *Candida* sp. ที่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสปริมาณมากและการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยกระบวนการหมัก

การกลายพันธุ์ *Candida* sp. 99-125 เพื่อให้มีกิจกรรมของไลเปสสูงขึ้นโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมีเอ็นทีจี (NTG) และนิวตรอน พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสในยีสต์สายพันธุ์กลายเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยกระบวนการหมักโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์กลายนี้มีสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ ถั่วเหลืองบดร้อยละ 4 น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 2.5 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 แอมโมเนียมไดซัลเฟตร้อยละ0.1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนสภาวะเขย่าที่ 500 รอบต่อนาที และเมื่อทดสอบความคงตัวในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการย้ายยีสต์ไปบนอาหารใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง 5 ครั้ง แล้วนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 5 ครั้งใกล้เคียงกัน แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์กลายนี้มีความคงตัวในการสร้างเอนไซม์ (Tan และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.3 การใช้ *Rhizopus oryzae* ที่ตรึงบนตัวพยุงเพื่อใช้เป็นตังเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

การใช้ *Rhizopus oryzae* IFO4697 ที่ตรึงบนตัวพยุงเพื่อศึกษาปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าหากมีการใช้น้ำมันถั่วเหลืองร่วมกับน้ำมันมะกอกหรือกรดโอเลอิกจะช่วยให้การผลิตไบโอดีเซลมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยปริมาณน้ำมันมะกอกที่เหมาะสมคือ 30 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูง ถ้าใช้ปริมาณมากกว่านี้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การทดสอบผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเซลล์ พบว่าหลังจากที่บ่มตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับเซลล์ที่อยู่บนตัวพยุงไอโซโพรพิลและอะซิโตนจะไม่ลดปริมาณเมทิลเอสเทอร์ หลังจากที่บ่มเป็นเวลา 30 นาที แต่เอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลจะทำให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรให้มีปริมาณเมทานอลในสารละลายต่ำเพื่อลดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณน้ำในการทำปฏิกิริยาจะได้จากบัฟเฟอร์ โดยพบว่าถ้ามีปริมาณน้ำร้อยละ 4.0 ถึง 30 โดยน้ำหนักของสารตั้งต้นจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 80 ถึง 90 (Ban และคณะ, 2001)

2.10.4 การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ฟังไจเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในของเหลวที่มีอิออน

ปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสในน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อสร้างเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันอิสระโดยเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากฟังไจซึ่งตรึงอยู่บนตัวพยุงชีวภาพ เซลล์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะอยู่ในของเหลวที่มีอิออนโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา 4 ชนิด ดังนี้ *Rhizopus oryzae* สายพันธุ์ดั้งเดิมซึ่งสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลไลเปส (w-ROL) รีคอมบิแนนท์ *Aspergillus oryzae* ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสของ *Fusarium heterosporum* (r-FHL) เอนไซม์ไลเปสบีของ *Candida antarctica* (r-CALB) พบว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดโมโนกลีเซอไรด์ไลเปสและไดกลีเซอไรด์ไลเปส (r-mdlB) w-ROL ให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงในของเหลวที่มีอิออนชนิด[Emim][BF_4] หรือ [Bmim][BF_4] ในระบบที่มีสารละลายแยกชั้นกันโดยให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะปกติเอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งอย่างรุนแรง ถ้ามีปริมาณเมทานอลมากเกินไป ปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสจะสมบูรณ์เมื่อมีอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4 ในระบบที่ของเหลวแยกชั้นกัน ของเหลวที่มีอิออนจะเป็นแหล่งเก็บเมทานอลเพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ โดยที่ w-ROL เท่านั้นที่สามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสเมื่อใช้จะไม่ได้โมโนกลีเซอไรด์เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสของ *R.oryzae* จะจำเพาะกับตำแหน่ง 1,3 ของไตรกลีเซอไรด์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่สูงจึงได้จากการใช้ตัวเร่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยา 2 ชนิดร่วมกันคือ w-ROL และ r-mdlB ในการทดสอบความคงตัว พบว่ากิจกรรมของ w-ROL ลดลง1 ใน 3 เท่าจากค่าเดิม หลังจากบ่มใน [Bmim][BF_4] เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยความคงตัวของ w-ROL ใน [Bmim][BF_4] จะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื่อมไขว้กับกลูตารอลดีไฮด์ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าของเหลวที่มีอิออนเหมาะสมต่อการใช้เป็นตัวทำละลายที่ 2 ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้เซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Arai และคณะ, 2010)

2.10.5 การใช้โมโนและไดซิลกลีเซอไรด์ไลเปส (mono-and diacylglyceride lipase) ที่ได้จากการตรึงเซลล์ฟังไจเพื่อเปลี่ยนกลีเซอไรด์บางส่วนที่เหลืออยู่ให้เป็นเมทิลเอสเทอร์

กลีเซอไรด์บางส่วนที่เหลืออยู่ เช่น โมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์ เป็นหนึ่งในข้อจำกัดของ *Rhizopus oryzae* ที่สร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลไลเปสเพื่อเปลี่ยนกลีเซอไรด์ส่วนที่เหลืออยู่ให้เป็นเมทิลเอสเทอร์จึงต้องใช้เอนไซม์โมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์ไลเปส (mdlB) ที่ได้จาก *Aspergillus oryzae* แล้วตรึงตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งสองบนตัวพยุง mdlB มีผลจำเพาะต่อโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์เมื่อใช้ในกระบวนการเมทาโนไลซิสในสภาวะที่มีน้ำร้อยละ 5 พบว่า mdlB มีประสิทธิภาพสูงสุดเนื่องจากเหลือโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์น้อยกว่าร้อยละ0.1 และเมื่อทำซ้ำทั้ง *R. oryzae* และ mdlB สามารถคงปริมาณเมทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 90 ด้วยโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์ร้อยละ0.08-0.69 และ 0.22-1.45 ตามลำดับ (Hama และคณะ, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ปิเปต
2. ตู้บ่มเชื้อ
3. เครื่องเขย่า
4. จานเพาะเชื้อ
5. หลอดทดลอง
6. แท่งแก้วงอ
7. ตู้ปลอดเชื้อ
8. ตู้อบลมร้อน
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง
11. ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ
12. ช้อนตักสาร
13. เครื่องชั่งสาร
14. เครื่องวัดพีเอช
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์
16. เครื่องอัลตราโซนิเคต
17. เครื่อง Gamma-cell 220
18. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์
19. ฮีมาไซโตมิเตอร์
20. กล้องจุลทรรศน์
21. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
22. เพลทซิลิกาเจล
23. ตู้ส่องUV ที่ 254 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วัตถุดิบและสารเคมี

1. น้ำมันปาล์ม
2. เมทานอล
3. อาหารวุ้น YM
4. อาหารวุ้น Tributyrin
5. ทวีน 20
6. กลีเซอรอลไตรบิวไทเรต
7. โซเดียมคาร์บอเนต
8. พารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเทต (*p*-nitrophenyl palmitate)
9. Triton X 100
10. กัมอาราบิก
11. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8
12. น้ำกลั่น
13. 2- โพรพานอล

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการเตรียมอาหารวุ้น YM นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้น เทอาหารใส่ในหลอดทดลองเพื่อเตรียมอาหารวุ้นเอียง แล้วทำการเขี่ยเชื้อยีสต์อายุ 48 ชั่วโมง ใส่ในอาหารแต่ละหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อไว้ในตู้เย็น และทำการถ่ายเชื้อก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป

3.3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension)

ทำการเตรียมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองและเติมทวีน 20 ลงไปร้อยละ 0.02 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำเชื้อยีสต์มาทำการเจือจางให้ได้เซลล์แขวนลอยที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 6 หลอดโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และนำมา spread บนจานอาหารวุ้น YM เพื่อหาจำนวนเซลล์เริ่มต้น

3.3.3 การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

นำเซลล์แขวนลอยมาฉายรังสีด้วยเครื่อง Gamma cell-220 ที่ปริมาณรังสี 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 กิโลเกรย์ (Sun และคณะ, 2004) จากนั้นนำมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}- 10^{-6} แล้ว spread บนจานอาหารวุ้น YM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงร้อยละ 5-10 (Singh และคณะ, 1995) มาทำการทดลองต่อไป

3.3.4 การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย

เลือกปริมาณรังสีที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงร้อยละ 5-10 มาใช้ในการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยนำเซลล์แขวนลอยมาฉายรังสีด้วยเครื่อง Gamma cell-220 จากนั้น นำมาเจือจางที่ความเข้ม 10^{-1}- 10^{-6} แล้ว spread บนจานอาหารวุ้น Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตโคโลนีที่สามารถเจริญและสร้างวงใสรอบๆ โคโลนีโดยวัดอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสต่อขนาดของโคโลนีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการสร้างวงใสได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ถ่ายเชื้อเก็บไว้ในหลอดอาหารวุ้นเอียง YM เพื่อนำไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3.5 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลาย

นำเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือก มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ประกอบด้วยเปปโตนร้อยละ 4, น้ำมันปาล์มร้อยละ 0.7, K_2HPO ร้อยละ 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ 0.1 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.175 (Tan และคณะ, 2003) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และแยกเก็บส่วนใสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณ

ทำการเตรียมอาหารวุ้น Tributyrin ที่เจาะรูอาหารด้วยคอร์กบอยเลอร์เป็นวงกลม จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาหยดลงในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และวัดขนาดของวงใสเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยสายพันธุ์กลายที่มีขนาดของวงใสขนาดใหญ่แสดงว่า มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสในปริมาณสูง โดยการคำนวณหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3.5.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพ(Hoshino และคณะ, 1992)

นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังนี้

สารละลาย ก : ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate 30 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอล ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : ละลาย triton X -100 ปริมาตร 400 มิลลิกรัม และกัมอาราบิก 100 มิลลิกรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

สารละลาย ค : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตรนำสารละลาย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมในสารละลาย ง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมจากการผสมสารละลาย ก 10 มิลลิลิตรกับสารละลาย ข 90 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย ค 2.9 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenyl แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดโดยทำการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate ให้ *p* - nitrophenyl ปริมาตร 1 ไมโครโมล

3.3.6 การผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมาผลิตไบโอดีเซลโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็น 1 ต่อ 4 (วิธีการคำนวณแสดงภาคผนวก ก.) ปริมาตรสุดท้ายของเมทานอลเท่ากับ 5.71 มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร และน้ำมันปาล์ม 20 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร โดยแบ่งการเติมเมาทานอลออกเป็น 3 ช่วงของการเกิดปฏิกิริยา (Yung และคณะ, 2009) คือ
ก) เติมเมาทานอลชั่วโมงที่ 0, 12 และ 24 ของการเกิดปฏิกิริยา โดยแบ่งเติมครั้งละ 1.9 มิลลิลิตร
ข) เติมเมาทานอลชั่วโมงที่ 0 และ 12 ของการเกิดปฏิกิริยา โดยแบ่งเติมครั้งละ 2.86 มิลลิลิตร
ค) เติมเมาทานอลชั่วโมงที่ 0 ของการเกิดปฏิกิริยา โดยเติมครั้งเดียว 5.71 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และแยกเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อนำไปวิเคราะห์

3.3.7 การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันไบโอดีเซลด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบทินเลเยอร์บนเพลทซิลิกาเจล

น้ำมันหรือไขมันที่พบในพืชเป็นองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำ จะประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) เป็นองค์ประกอบหลัก ประมาณร้อยละ 80 – 90 มีไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) อยู่เพียงเล็กน้อย มีกรดไขมันอิสระร้อยละ 1-5 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ฟอสฟาไทด์ (phosphatides) และน้ำอีกจำนวนเล็กน้อย การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคทางเคมีที่สำคัญที่ช่วยจำแนกส่วนประกอบของสารตัวอย่าง โดยใช้หลักการคือ สารประกอบต่างชนิดที่อยู่ในน้ำมันมีความสามารถที่แตกต่างกันในสารละลายในตัวทำละลายชนิดหนึ่งๆ

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบทินเลเยอร์เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพในเบื้องต้น เพื่อให้ทราบว่า เมทิลเอสเทอร์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด และมีน้ำมันปาล์มที่ไม่ได้ถูกทำปฏิกิริยาเหลืออยู่มากน้อยเท่าใด โดยใช้ซิลิกาซึ่งเคลือบอยู่บนแผ่นกระจกเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary Phase) และใช้นอร์มัลเฮกเซนผสมกับไดเอทิลอีเทอร์และกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 80 : 20 : 1 โดยปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile Phase) เทเฟสเคลื่อนที่ใส่โหลแก้วสี่เหลี่ยมให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาแล้วทิ้งไว้ให้อิ่มตัวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

หยดตัวอย่างของน้ำมันปาล์ม กรดไขมัน และ เมทิลเอสเทอร์ ให้เป็นจุดเล็กๆ บนแผ่นกระจกที่เคลือบอยู่บนซิลิกาเจล แล้วจุ่มแผ่นซิลิกาเจลลงในโหลแก้วที่มีเฟสเคลื่อนที่อยู่ ทิ้งไว้ให้อิ่มตัว ซึ่งสารตัวอย่างจะเกิดการแยกจากกันตาม retention time จากนั้นเป่าแผ่นซิลิกาเจลให้แห้ง และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.8 วิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) และนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 17 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

4.1.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา

จากการทดลองนำตัวอย่างเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากดิน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเตรียมเซลล์แขวนลอย โดยทำการเจือจางเชื้อยีสต์ด้วยน้ำกลั่นที่มีทวีน 20 เข้มข้นร้อยละ 0.02 ได้ระดับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ 1.8×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำเซลล์แขวนลอยมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสีแกมมาด้วยเครื่อง Gamma cell-220 ที่มีความแรงของรังสี Co-60 เท่ากับ 23859 Ci หรือ 882.8 TBq

รูปที่ 4.1 เครื่อง Gamma cell-220 ณ สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ

ปริมาณรังสี 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 กิโลเกรย์ โดยเวลาในการฉายรังสี แสดงดังตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า เมื่อเวลาในการฉายรังสีเพิ่มขึ้น ปริมาณรังสีจะเพิ่มขึ้น ตามลำดับ ซึ่งรังสีแกมมาจัดเป็นรังสีที่ก่อให้เกิดไอออน รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้สูง ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (ปวิณ, 2552) หรือเกิดการสลับเปลี่ยนเบสจาก AT ไปเป็น CG (Xie และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เวลาในการฉายรังสีตัวอย่างเชื้อยีสต์ที่เซลล์เริ่มต้น 1.8×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

หลอดทดลอง	ปริมาณรังสี(กิโลเกรย์)	เวลา (นาที)
ตัวควบคุม	0	0
1	0.2	1.7
2	0.5	4.2
3	1.0	8.3
4	1.5	12.5
5	2.0	16.6
6	2.5	20.8

4.1.2 ผลอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา

เมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการฉายรังสีแกมมามาเจือจางที่ระดับ 10^{-3} – 10^{-6} จากนั้น spread บนจานอาหารวุ้น YM และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร และคำนวณหาอัตราการอยู่รอด พบว่า มีการเจริญของเชื้อยีสต์ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 อัตราการอยู่รอดของเชื้อบนอาหาร YM agar ภายหลังจากการฉายรังสีแกมมา

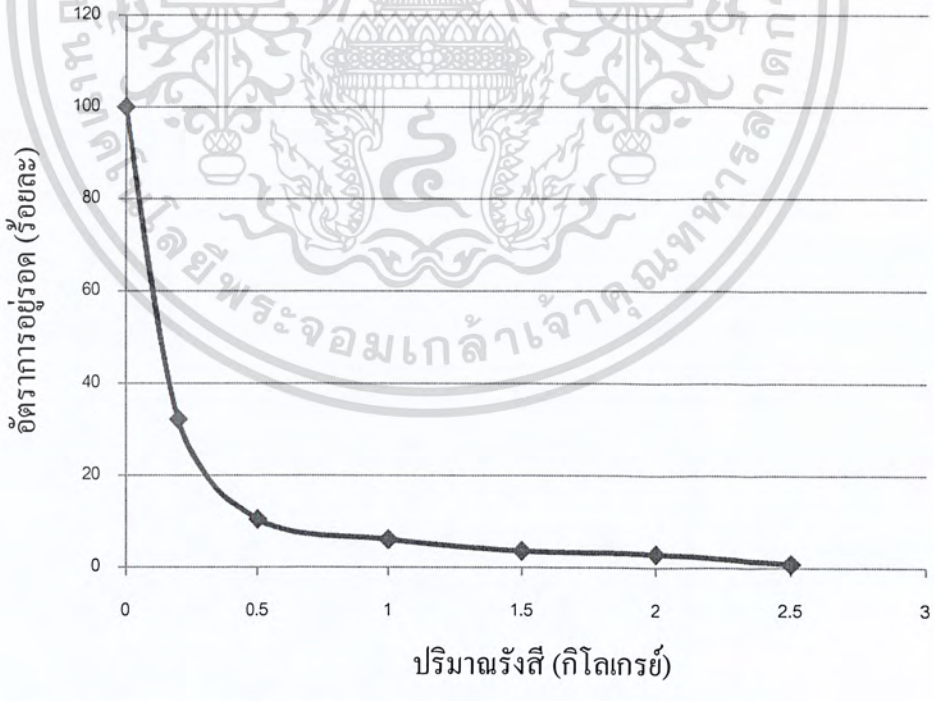
ปริมาณรังสี (กิโลเกรย์)	จำนวนโคโลนี บนอาหาร YM agar	ระดับการเจือจาง (เท่า)	อัตราการอยู่รอด (ร้อยละ)
ตัวควบคุม	23	10^{-6}	100
0.2	74	10^{-5}	32.17
0.5	24	10^{-5}	10.43
1.00	139	10^{-4}	6.04
1.5	82	10^{-4}	3.57
2.0	67	10^{-4}	2.91
2.5	19	10^{-4}	0.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางพบว่าอัตราการอยู่รอดของเชื้อสายพันธุ์กลายจะมีค่าลดลง เมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มมากขึ้น ตามลำดับ เชื้อยีสต์ที่ได้รับปริมาณรังสีที่ 1.0 กิโลเกรย์ จะมีอัตราการอยู่รอดเท่ากับร้อยละ 6.04 ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 5 -10

Singh และคณะ, 1995 ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์เชื้อ *Fusarium oxysporum* โดยคัดเลือกที่อัตราการรอดชีวิตร้อยละ 5 พบว่า สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสและ β-ไซโลซิเดสได้เป็นสามเท่าจากเดิม

Khaliq และคณะ, 2009 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces fradiae* NRRL-2702 โดยการฉายรังสีแกมมาและรังสีอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ พบว่า การฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 100 และ 120 วินาที มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 8 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งที่อัตราการอยู่รอดร้อยละ 5 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไปจากเดิม 3 ลักษณะ (UV2, UV4 และ UV5) โดยคัดเลือกเชื้อ UV2 เนื่องจากมีโคโลนีขนาดใหญ่ที่สุดมาฉายรังสีแกมมา ^{60}CO พบว่า ที่ปริมาณรังสี 25 กิโลเกรย์ อัตราการอยู่รอดร้อยละ 10 มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม(γ-1) ซึ่งมีโคโลนีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการอยู่รอดและปริมาณรังสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเกิดวงใสบนอาหาร Tributyrin agar ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตติน

จากผลการทดลองข้อ 4.1.2 พบว่า เชื้อยีสต์ที่ได้รับปริมาณรังสี 1.0 กิโลเกรย์เป็นช่วงที่มีการกลายพันธุ์ดีที่สุด ดังนั้น จึงเลือกที่ปริมาณรังสี 1.0 กิโลเกรย์ ชักนำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ แล้วนำเซลล์แขวนลอยมา spread บนจานอาหารวุ้น Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จะเห็นว่าระยะเวลาในการเจริญของเชื้อจะยาวนานมากขึ้น เนื่องจากเชื้อได้รับบาดเจ็บจากการฉายรังสี ทำให้ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวเพื่อเข้าสู่สภาวะแวดล้อมของอาหาร เมื่อเชื้อมีการเจริญจะสังเกตพบโคโลนีของเชื้อมีสีครีม ขุ่นและเกิดวงใสรอบๆโคโลนี ซึ่งคล้ายกับสายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถแยกได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.3 เชื้อที่สามารถเจริญและสร้างวงใสรอบๆโคโลนี แสดงว่าเชื้อมีประสิทธิในการสร้างเอนไซม์ไลเปสมาย่อยกลีเซอรอลไตรบิวไทเรตซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร และเชื้อเกิดการกลายพันธุ์ทำให้มีความสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้

ตารางที่ 4.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสบนอาหารวุ้น Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสและขนาดโคโลนี
สายพันธุ์ดั้งเดิม	2.49	4.16	1.6703
M1	3.3	3.8	1.1515
M2	2.07	3.67	1.7729*
M3	2.36	3.89	1.6483
M4	1.97	3.75	1.9036*
M5	2.29	5.08	2.2183*
M6	1.92	3.13	1.6302
M7	2.00	3.54	1.7700*
M8	1.80	3.65	2.0278*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสบนอาหาร Tributyrin agar ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสและขนาดโคโลนี
M9	2.91	4.80	1.6495
M10	2.35	4.44	1.8894 *
M11	2.26	3.98	1.7611 *
M12	2.46	4.89	1.9878 *
M13	4.01	5.80	1.4464
M14	2.74	3.94	1.4380
M15	2.22	4.21	1.8964 *
M16	3.21	5.48	1.7072 *
M17	2.33	4.72	2.0258 *
M18	1.37	3.40	2.4818 *
M19	2.70	4.75	1.7593 *
M20	3.30	4.90	1.4848
M21	3.17	5.40	1.7035 *
M22	2.53	4.18	1.6522
M23	2.50	3.66	1.4640
M24	3.10	4.91	1.5839
M25	1.65	3.67	2.2242 *
M26	2.17	3.27	1.5069
M27	2.65	4.68	1.7660 *
M28	3.29	5.84	1.7751 *
M29	3.63	5.34	1.4711
M30	3.13	5.93	1.8946 *
M31	2.08	5.16	2.4808 *
M32	3.53	4.74	1.3428

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสบนอาหารวุ้น Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)	อัตราส่วนระหว่างขนาดวงใสและขนาดโคโลนี
M33	3.37	5.91	1.7537 *
M34	3.06	5.39	1.7614 *
M35	2.97	5.60	1.8855 *
M36	3.14	4.58	1.4586
M37	2.47	4.40	1.7814 *
M38	3.04	4.12	1.3553
M39	3.02	5.39	1.7848 *
M40	3.23	4.36	1.3498

หมายเหตุ * หมายถึง สายพันธุ์กลายที่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

จากตารางที่ 4.3 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยการชักนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีแกมมาทั้งหมด 40 สายพันธุ์ โดยวัดอัตราส่วนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดวงใสต่อขนาดของโคโลนีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า สายพันธุ์กลายบางตัวจะมีอัตราส่วนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของขนาดวงใสต่อขนาดของโคโลนีน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่มี 24 สายพันธุ์ที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงทำการถ่ายเชื้อเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง YM เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลาย

เมื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีอัตราส่วนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของขนาดวงใสต่อขนาดของโคโลนีมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ จึงนำมาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีน้ำมันปาล์มร้อยละ 2.5 เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารไปปั่นเหวี่ยงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้นำไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป

4.3.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพ

นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนหลุมอาหารวุ้น Tributyrin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 4.4 ซึ่งสายพันธุ์ M18, M25 และ M31 มีขนาดของวงใสสูงสุดเท่ากับ 1.92, 1.85 และ 1.80 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ M5, M17 และ M8 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.4 ขนาดของวงใสบนอาหารวุ้น Tributyrin ของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม

สายพันธุ์	ขนาดของวงใส (เซนติเมตร)	สายพันธุ์	ขนาดของวงใส (เซนติเมตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	1.18^{cdef}	M19	0.96^{fg}
M2	1.07^{efg}	M21	0.63^{h}
M4	1.45^{bc}	M25	1.85^{a}
M5	1.68^{ab}	M27	1.03^{efg}
M7	1.05^{efg}	M28	1.05^{efg}
M8	1.66^{ab}	M30	1.42^{bcd}
M10	1.35^{cd}	M31	1.80^{a}
M11	1.19^{cdef}	M33	0.85^{gh}
M12	1.45^{bc}	M34	1.02^{efg}
M15	1.43^{bcd}	M35	1.30^{cde}
M16	0.82^{gh}	M37	1.15^{def}
M17	1.67^{ab}	M39	0.97^{fg}
M18	1.92^{a}		

หมายเหตุ ตัวอักษรหลังตัวเลขในแถวสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณ

นำส่วนใสที่ได้มาทำปฏิกิริยาดังวิธีการข้อ 3.3.5.2 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ 4.5 พบว่า M25 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 1.0456 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ M30, M8 และ M17 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายตัวอื่นจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสง	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	0.166	0.7218^{de}
M2	0.109	0.4734^{h}
M4	0.101	0.4415^{h}
M5	0.075	0.3282^{i}
M7	0.075	0.3253^{i}
M8	0.216	0.9425^{b}
M10	0.076	0.3297^{i}
M11	0.577	0.2469^{i}
M12	0.189	0.8249^{c}
M15	0.123	0.5344^{gh}
M16	0.054	0.2353^{i}
M17	0.214	0.9338^{b}
M18	0.165	0.7189^{def}
M19	0.106	0.4618^{h}
M21	0.010	0.4342^{h}
M25	0.240	1.0456^{a}
M27	0.159	0.6913^{ef}
M28	0.164	0.7200^{def}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

สายพันธุ์	ค่าการดูดกลืนแสง	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
M30	0.234	1.0195^{ab}
M31	0.188	0.8191^{cd}
M33	0.058	0.2527^{i}
M34	0.032	0.1394^{j}
M35	0.028	0.1205^{j}
M37	0.141	0.6143^{fg}
M39	0.058	0.2512^{i}

หมายเหตุ ตัวอักษรหลังตัวเลขในแถวสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ พบว่าสายพันธุ์กลาย M25 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 2.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีรายงานว่าน้ำตาลฟรุคโตสและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* และพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตรให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรุคโตสถึง 12 เท่า (Papaparaskevas และคณะ, 1992) นอกจากนี้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย M25 ยังมีความสามารถในการใช้น้ำมันปาล์มโดยการสร้างเอนไซม์ไลเปสมาย่อยน้ำมันปาล์มที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร เช่นเดียวกับ Markossian และคณะ, 2002 ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 sp. nov. จากน้ำพุร้อนที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 และสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ 300 ยูนิตต่อลิตรซึ่งสามารถใช้ไขมันต่างๆ เช่น palmitic acid, stearic acid, lanolin, น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดยไม่ต้องเติม growth factors อื่นๆ รวมทั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* T1 ที่แยกได้จากน้ำพุร้อนซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงใน mineral salt medium ที่ประกอบด้วยน้ำมันสลัดที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

triacylglycerol ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าสามารถย่อยสลายไขมันและน้ำมัน รวมทั้งของเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันได้โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (Hasanuzzaman และคณะ, 2004)

4.4 การผลิตไบโอดีเซลจากเอนไซม์ไลเปสของเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์กลาย M25 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 4 โดยแบ่งระยะเวลาการเติมเมทานอลออกเป็น 3 ช่วง คือ 0, 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นรอให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ในเชิงคุณภาพโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบทินเลเยอร์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 และ 4.3 จากรูปจะเห็นว่า สารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์และน้ำมันปาล์มมีการเคลื่อนที่ของสารเกิดขึ้น ส่วนตัวอย่างไม่พบการเคลื่อนที่ของสารอาจเกิดจากเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานลดลง เพราะมีน้ำเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hama และคณะ, 2009 ที่พบว่า ปริมาณน้ำร้อยละ 5 ทำให้โมโนและไดกลีเซอไรด์ไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นปริมาณน้ำในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลควรเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรอาหาร ซึ่งปริมาณน้ำในการทำปฏิกิริยาจะได้จากบัฟเฟอร์ โดยพบว่าถ้ามีปริมาณน้ำร้อยละ 4.0 ถึง 30 โดยน้ำหนักของสารตั้งต้นจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ประมาณร้อยละ 80 ถึง 90 (Ban และคณะ, 2001) หรือเนื่องจากปฏิกิริยาอาจเกิดไม่สมบูรณ์ เพราะอัตราส่วนของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลไม่ได้เป็นสัดส่วนที่พอเหมาะต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งมีรายงานว่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับ เพราะฉะนั้นแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องใช้ในปริมาณที่มากเกินพอ เพื่อที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางขวามากขึ้นซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นเช่นกัน (Agarwal, 2006) และตามสัดส่วนของปฏิกิริยาเคมี พบว่าเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ต้องใช้อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเป็น 3 ต่อ 1 แต่ในทางปฏิบัติต้องใช้อัตราส่วนที่มากกว่านั้น หลังปฏิกิริยาสิ้นสุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นของผสมระหว่างเอสเทอร์ กลีเซอรอล แอลกอฮอล์ ตัวเร่งปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เพราะฉะนั้นการทำให้ไบโอดีเซลบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงเป็นเรื่องที่ค่อนข้างยาก (Ma และคณะ, 1999) ซึ่งการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบทินเลเยอร์เป็นการวิเคราะห์ในเบื้องต้น ถ้าหากผลิตภัณฑ์ไม่มีความบริสุทธิ์อาจทำให้การแยกของสารเกิดได้ยาก

Fukuda และคณะ, 2001 รายงานว่า การใช้อัตราส่วนระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันมากก็จะทำให้ได้เอสเทอร์มากขึ้นเท่านั้นและภายในเวลาที่สั้นลง โดยอัตราส่วน 6:1 เป็นค่าที่ถูกใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม ซึ่งพบว่า ได้เมทิลเอสเทอร์มากกว่าร้อยละ 98

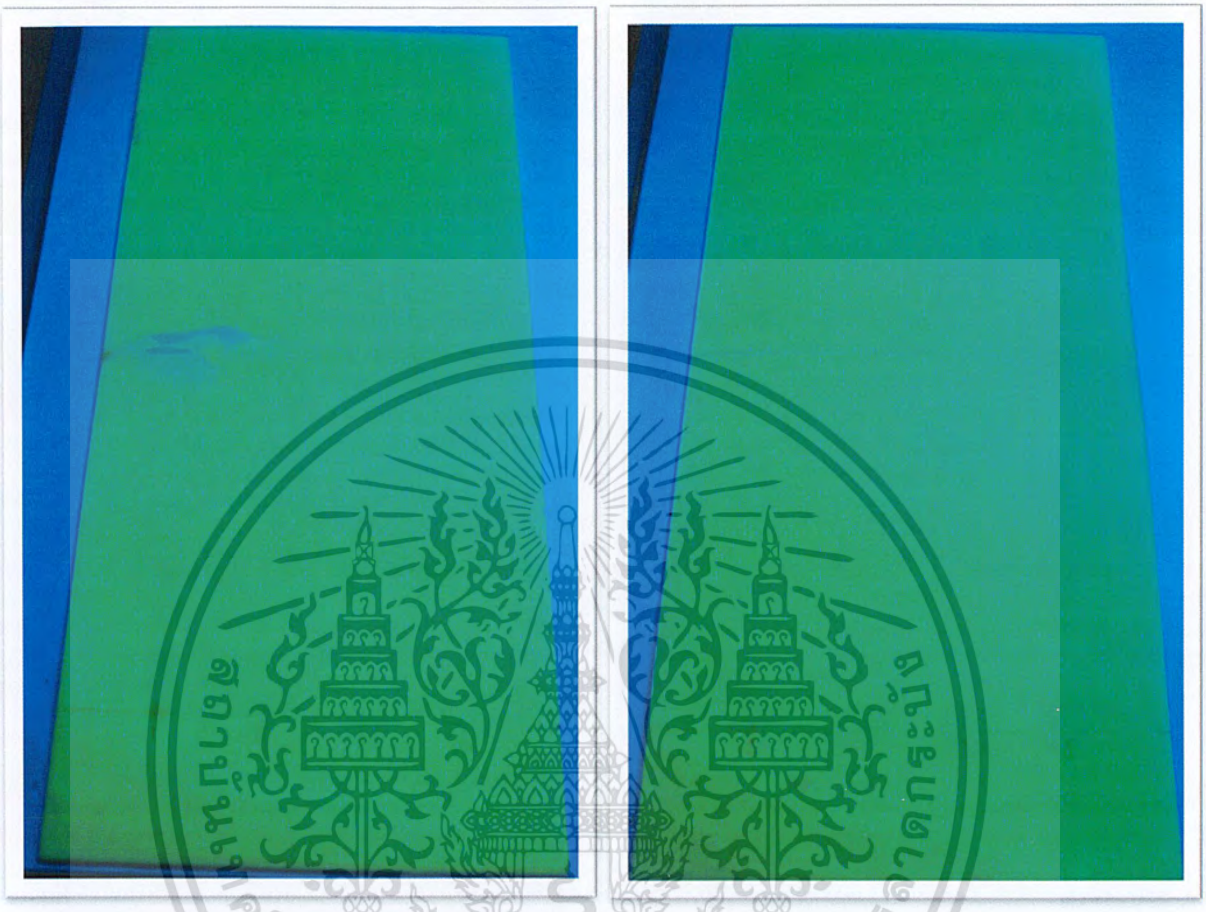
แต่หากเติมเมทานอลในปริมาณมากเกินไป จะทำให้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงาน และความคงตัวของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ (Klibanov, 2001) โดยตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น เมทานอลจะทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 (Chartrain และคณะ,1993) และ *Pseudomonas fluorescens* Strain 2D (Makhzoum และคณะ,1996) และ *Rhiropus oryzae* (Hiol และคณะ, 2000) มีความคงตัวลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ที่มีผลต่อเอนไซม์ไลเปส M37 จากเชื้อ *Photobacterium lipolyticum* พบว่าเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ อะซิโตไนไตรและเอทิลอะซิเตตเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเรื่อยๆ แต่สำหรับเมทานอลและเอทานอล พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงแรกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลและเอทานอลสูงถึงร้อยละ 30 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง (Yang และคณะ, 2009)

Ban และคณะ, 2001 ทำการทดสอบผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเซลล์ พบว่า หลังจากที่บ่มตัวทำละลายอินทรีย์รวมกับเซลล์ที่อยู่บนตัวพยุงไอโซโพรพิลและอะซิโตนจะไม่ลดปริมาณเมทิลเอสเทอร์หลังจากที่บ่มเป็นเวลา 30 นาที แต่เอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลจะทำให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรให้มีปริมาณเมทานอลในสารละลายต่ำเพื่อลดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

ในการทดลองปริมาณเมทานอลที่เติมลงไปนั้นไม่เพียงแต่มีผลต่อเอนไซม์แต่ยังมีผลต่อเซลล์ และมีผลต่อผลได้ของเมทิลเอสเทอร์ด้วย ดังนั้น จึงควรมีการเติมสารบางชนิดที่ช่วยให้เซลล์ทนต่อเมทานอลและสามารถเจริญได้ ซึ่ง Arai และคณะ, 2010 พบว่า การเติมของเหลวที่มีไอออน เช่น 1-เอทธิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม, เตทตระฟลูออโรโบเรต, 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม หรือ ไตรฟลูออโรเมทิล-ซัลโฟเนต โดยของเหลวที่มีไอออนนี้จะช่วยลดการไม่ทำงานของเซลล์ได้หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรมีการตรึงเซลล์ก่อนนำเซลล์ไปผลิตไบโอดีเซลเพื่อไม่ให้เซลล์สัมผัสกับเมทานอลโดยตรงและสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ (Ban และคณะ, 2002)



รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์บนเพลทซิลิกาเจล

หมายเลข 1 สารมาตรฐาน Fatty Acid Methyl Esters ระยะทางที่สารเคลื่อนที่เท่ากับ 7.6 เซนติเมตร

หมายเลข 2 น้ำมันปาล์ม ระยะทางที่สารเคลื่อนที่เท่ากับ 6.5 เซนติเมตร

หมายเลข 3 ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์กลายเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทานอลที่ 0 ชั่วโมง

หมายเลข 4 ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทานอลที่ 0 ชั่วโมง

หมายเลข 5 ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์กลายเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทานอลที่ 0 และ 12 ชั่วโมง

หมายเลข 6 ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทานอลที่ 0 และ 12 ชั่วโมง

หมายเลข 7 ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์กลายเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทานอลที่ 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

หมายเลข 8 ตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมเพาะเลี้ยงโดยเติมเมทานอลที่ 0, 12 และ 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาหาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ โดยให้อัตราการอยู่รอดอยู่ในช่วงร้อยละ 5-10 โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 กิโลเกรย์ พบว่า ที่ปริมาณรังสี 1.0 กิโลเกรย์ ทำให้เชื้อยีสต์มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 6.04 และเมื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการวัดขนาดวงใสบนอาหารแข็ง Tributyrin และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สายพันธุ์กลายหมายเลข 25 (M25) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 1.0456 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.7218 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงเลือกสายพันธุ์กลายหมายเลข 25 มาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะแบ่งการเติมเมทานอลออกเป็น 3 ช่วงคือ การเติมเมทานอลที่ 0, 12 และ 24 ชั่วโมง ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 5.71 มิลลิลิตร และเมื่อเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์โครมาโตกราฟฟีแบบทินเลเยอร์พบว่าไม่เกิดการสร้างเมทิลเอสเทอร์

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแกิดปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อสายพันธุ์กลายที่แยกได้ก่อน เนื่องจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ให้มากขึ้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด
2. ควรมีการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายนี้ในน้ำมันชนิดอื่น เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและน้ำมันสบู่ดำ
3. อาจมีการนำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายนี้ไปทำการตรึงเซลล์ เพื่อให้สามารนำกลับมาใช้ซ้ำได้ และมีความสามารถทนต่อเมทานอลได้มากขึ้นซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองบรรณาธิการเทคนิค เครื่องกลไฟฟ้า อุตสาหกรรม. 2548. ไบโอดีเซลพลังงานทดแทนช่วยชาติ. 22(256), 154-163.

ปวิณ ภิรมย์, พลกฤต ขำวิชา, ชินนพร ซุ่นอื้อ, & พัชรา พงศ์มานะวุฒิ. (2552). พันธุศาสตร์ศาสตร์แห่งชีวิต โครงการประกวดสื่อดิจิทัลเพื่อการเรียนรู้ (Digital Learning Contest) ครั้งที่ 2 ดำเนินการโดย ไทยกู๊ดวิวดอทคอม. ค้นเมื่อวันที่ 23 เมษายน 2554, จาก http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/27/index.html.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2550. เทคโนโลยีของเอนไซม์. โครงการตำราภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 130 หน้า

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

Arai, S., Nakashima, K., Tanino, T., Oginoa, C., Kondo, A. and Fukuda, H. 2010. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. Enzyme and Microbial Technology. 46, 51–55.

Ban, K., Kaieda, K., Matsumoto, T., Kondo, A. and Fukuda, H. 2001. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Journal of Biochemical Engineering. 8, 39-43.

Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thien, M., Smith, S., Fisher, E., Goklen, K., Salmon, P., Brix, T., Price, K. and Greasham, R. 1993. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB5001. Enzyme and Microbial Technology. 15, 80–575.

Demirbas, A. 2002. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. Energy Conversion and Management. 43, 2349-2356.

Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92, 405–416.

Gilbert, E.J., Drozd, J.W. and Jones, C.W. 1991. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. General Microbiology. 137, 21-2215.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hama, S., Numata, T., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Noda, H., Kondo, A. and Fukuda, H. 2009. Use of mono- and diacylglycerol lipase as immobilized fungal whole cells to convert residual partial glycerides enzymatically into fatty acid methyl esters. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 58, 93–97.

Hasanuzzaman, M., Umadhay-Briones, K.M., Zsiros, S.M., Morita, N., Nodasaka, Y., Yumoto, I. and Okuyama, H. 2004. Isolation, identification and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. Current Microbiology. 49, 108-114.

Hiol, A., Jonzo M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. and Comeau, L. C. 2000. Purification and characterization of an extra cellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. Enzyme and Microbial Technology. 26, 421 – 430.

Hoshino, T., Sasaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T. and Ymane, T. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 56, 660-664.

Jitputti, J., Kitiyanan, B., Rangsunvigit, P., Bunyakiat, K., Attanatho, L. and Jenvanitpanjakul, P. 2005. Transesterification of crude palm kernel oil and crude coconut oil by different solid catalysts. Chemical Engineering Journal. 116, 61-66.

Kandpal, J.B. and Madan, M. 1994. *Jatropha curcas*: a renewable source of energy for meeting future energy needs. Technical Note. 6, 159-160.

Khaliq, S., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Iqbal, R., Khalid, A.M. and Muddassar, M. 2009. Change in colony morphology and kinetics of tylosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702. Microbiological Research. 164, 469-477.

Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature. 6817, 6-241.

Lesuisse, E., Schanck, K., and Colson, C. 1992. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168 an extremely basic pH-tolerant enzyme. European Journal of Biochemistry. 216, 60-155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ma, F., Clements, L.D. and Hanna, M.A. 1999. The effect of mixing on transesterification of beef tallow. Bioresource Technology. 69, 289-293.

Ma, F. and Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. 70, 1-15.

Macrae, A.R., and Hammond, A.R. (1985). Present and future applications of lipases. Biotechnology and Genetic Engineering. 3, 193-217.

Madras, G., Kolluru, C. and Kumar, R. 2004. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. Fuel. 83, 2029-2033.

Marchetti, J.M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2005. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 20, 280-28.

Markossian, S., Becker, P., Markl, H. and Antranikian, G. 2000. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Icelandic hot spring. Extremophiles. 4, 365-371.

Mayordomo, I., Randez-Gil, F. and Prieto, J.A. 2000. Isolation, Purification and Characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. Agricultural and Food Chemistry. 48, 105-109.

Meher, L.C., Sagar, D. and Naik, S.N. 2004. Technical aspects of biodiesel production by Transesterification a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 10, 1-21.

Meher, L.C., Vidya, S.D., and Naik, S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by Transesterification (review). Bioresourse Technology. 10, 248–268.

Mitsuhashi, K., Yamashita, M., HwaY.n, Y.S., Ihara, F., Nihira, T. and Yamada, Y. 1999. Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter* nov. sp. Strain KM109. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 63, 64-1959.

Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotechnology Letters. 14, 397-402.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leao, M.H.M. and Sa Jr, G.L. 2000. Lipase location in *Yerrowia lipolytica* cells. Biotechnology Letters. 22, 71-75.

Ramadhas, A.S., Jayaraj, S. and Muraleeharan, C. 2005. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. Fuel. 84, 335-340.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U. and Schmid, R.D. 1996. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. Biochimica et biophysica acta, L. Lipids and lipid metabolism. 1214, 43-53.

Singh, A., Kuhad, R.C. and Kumer, M. 1995. Xylanase production by a hyperxylanolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Enzyme and Microbial Technology. 17, 551-553.

Srivastava, A. and Prasad, R. 1999. Triglycerides based diesel fuels. Renewable and Sustainable Energy Review. 4, 111-133.

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

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 Biochemistry. 39, 459-465.

Xie, C.X.,An, X., Li, J.W., Jian, M.Y., Jian, Y. and Zeng, L.Y. 2004. Comparison of base substitutions in response to nitrogen ion implantation and ^{60}Co-gamma ray irradiation in *E. coli*. Genetics and Molecular Biology. 27, 90-284.

Yang, K.S., Sohn, J.H. and Kim, H.K. 2009. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. Bioscience and Bioengineering. 107(6), 599-604.

[Online].Available : http://www.foodnetworksolution.com/uploaded/triglyceride.JPG (30 กรกฎาคม 2553)

[Online].Available : http://library.med.utah.edu/NetBiochem/mml/fa_triacyg.gif (6 กรกฎาคม 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : http://mybiofuels.us/Pubs/Khan_Thesis_2002_Kinetics_Catalysts.pdf. (19 มีนาคม 2554)

[Online].Available : www.nutriology.com/TGbreakdown1.gif (6 กรกฎาคม 2553)

[Online].Available : www.planenergy.co.th. (30 กรกฎาคม 2553)

[Online].Available : http://www.promma.ac.th/main/chemistry/boonrawd_site/fat_formation.htm. (30 กรกฎาคม 2553)

[Online].Available : http://www.skoolbuz.com/library/content/3351. (19 มีนาคม 2554)

[Online].Available : http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/27/contents/genetics-8816.html. (12 ตุลาคม 2553)

[Online].Available : http://www.vcharkarn.com/venergy/pic/A409p2x3.gif. (6 กรกฎาคม 2553)

[Online].Available : http://203.185.68.133/nstkc/content/view/525/29/1/1/. (12 ตุลาคม 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

สูตรที่ 1

อาหาร YM ประกอบด้วย

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15	กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2

อาหารแข็ง Tributyrin ชนิดสำเร็จรูปประกอบด้วยเปปโตน ยีสต์สกัด เคซีน วุ้น และกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต

การเตรียมอาหารปริมาตร 1 ลิตร เตรียมโดยการชั่งอาหาร 20 กรัม เติมน้ำ 990 มิลลิลิตร และเติมกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารให้อยู่ในช่วง 7.5±0.2 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 3

อาหารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ประกอบด้วย เปปโตนร้อยละ 4 , K_2HPO_4 ร้อยล 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ 0.1, น้ำมันปาล์ม ร้อยละ 2.5 และปรับพีเอชให้ได้ 7.0

สูตรที่ 4

อาหารเหลว สำหรับขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซล ประกอบด้วย

กลูโคส	2	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4$	0.1	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
น้ำมันปาล์ม	20	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียมอิมัลชั่น

เติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับน้ำมันปาล์มที่ใช้ เติมทวีน 80 ร้อยละ 0.1 แล้วนำไปโฮโมจีไนซ์เป็นเวลา 5 นาที โดยตั้งค่าให้โฮโมจีไนซ์ 5 วินาที แล้วหยุด 1 วินาที

การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

เตรียมตัวอย่างเพื่อทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการก่อน เช่น ตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร(จะได้ความเจือจางเป็น 10^{-1}) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีสปอร์จำนวนมาก เช่น เจือจางที่ระดับ 10^{-2} หรือ 10^{-3} เป็นต้น

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงบนแผ่นสไลด์ฮีมาไซโตมิเตอร์ที่ปิดด้วย cover slip โดยใช้หลอดหยดที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดตัวอย่างมาประมาณ 1-2 มิลลิลิตร หยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip จากนั้นทำการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็กและนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับ คูณด้วย 4×10^6 จะได้ปริมาณสปอร์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร

การคำนวณหาจำนวนสปอร์

พื้นที่ 1 ช่องเล็กในช่องใหญ่มีค่า	0.0025	ตารางมิลลิลิตร
ความลึกระหว่าง cover slip และช่อง	0.1	มิลลิเมตร
ดังนั้น ปริมาตร 1 ช่องเล็ก จะมีค่า	0.0025 x 0.1 = 0.00025	ลูกบาศก์เซนติเมตร
ปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีจุลินทรีย์	Z	สปอร์
ปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะมีจุลินทรีย์	Z x 1000 /0.00025	สปอร์
หรือ	$Z \times 4 \times 10^6$	สปอร์

การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล

ร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโดยทั่วไป (Dermirbas, 2002)

Lauric acid	0.1	Oleic acid	40.5
Myristic acid	1.0	Linoleic acid	10.1
Plamitic acid	42.8	Linolenic acid	0.2
Stearic acid	4.5		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดให้ น้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มเท่ากับ 256 (องค์ประกอบส่วนใหญ่คือกรดปาล์มิติก) และมีความหนาแน่นเท่ากับ 0.904 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

น้ำมันปาล์ม 1 โมล น้ำหนักเท่ากับ 256 กรัม

น้ำมันปาล์ม 256 กรัม มีปริมาตร 256/0.904 = 283.2 มิลลิลิตร

ดังนั้น น้ำมันปริมาตร 283.2 มิลลิลิตร เท่ากับ 1 โมล

จากสูตรอาหาร น้ำมันปริมาตร 10 มิลลิลิตร เท่ากับ 0.0353 โมล

ต้องการเติมน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1 ต่อ 4

ดังนั้น น้ำมันปาล์ม 0.0353 โมล คิดเป็น 1 ส่วน

ต้องเติม เมทานอล 0.0353 x 4 = 0.1412 โมล คิดเป็น 4 ส่วน

กำหนดให้ เมทานอลมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.04 และมีความหนาแน่นเท่ากับ 0.792 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

เมทานอล 1 โมล มีปริมาตรเท่ากับ 32.04/0.792 = 40.45 มิลลิลิตร

เมทานอล 0.1412 โมล มีปริมาตรเท่ากับ 40.45 x 0.1412 = 5.71 มิลลิลิตร

สรุป ต้องเติมน้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตรต่อเมทานอล 5.71 มิลลิลิตร

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

จากสูตร กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ไมโครกรัมของพาราไนโตรฟีนอล} \times \text{ค่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของพาราไนโตรฟีนอล} \times \text{ระยะเวลาบ่ม(นาที)} \times \text{ปริมาณเอนไซม์(มิลลิลิตร)}}$$

กำหนดให้ น้ำหนักโมเลกุลของพาราไนโตรฟีนอล เท่ากับ 139.11 กรัมต่อโมล ระยะเวลาการบ่ม เท่ากับ 15 นาที และปริมาณเอนไซม์ เท่ากับ 0.1 มิลลิลิตร

ตัวอย่างการคำนวณของเชื้อสายพันธุ์กลาย M25

จากกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol สมการเส้นตรงที่ได้ คือ y = 0.0011x เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เท่ากับ 0.240

ไมโครกรัมของพาราไนโตรฟีนอล(x) = 0.240/0.0011 = 218.18 ไมโครกรัม

กิจกรรมของเอนไซม์ $= \frac{218.18 \times 1}{139.11 \times 15 \times 0.1}$ = 1.0456 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Hoshiro และคณะ, 1992)

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณ เตรียมสารละลาย ดังนี้

สารละลาย ก : ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate 30 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอล ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : ละลาย triton X -100 ปริมาตร 400 มิลลิกรัม และกัมอาราบิก 100 มิลลิกรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

สารละลาย ค : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลาย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมในสารละลาย ง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมจากการผสมสารละลาย ก 10 มิลลิลิตรกับสารละลาย ข 90 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

จากนั้นนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย ค 2.9 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenyl

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate ให้ *p*-nitrophenyl ปริมาตร 1 ไมโครโมล

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Stoll และ Blanchard, 1990)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้

สารละลาย ก. : สารละลายของโมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ทำการละลาย $NaH_2PO_4.7H_2O$ 27.8 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข. : สารละลายของไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ทำการละลาย $NaH_2PO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $NaH_2PO_4.12H_2O$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (x) ผสมกับจำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ข (y) และทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย ก (x) ผสมกับมิลลิลิตรของสารละลาย ข (y)

x	y	พีเอช	x	y	พีเอช
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	49.0	9.8	5.3	94.7	8.0

ที่มา : Stoll และ Blanchard, 1990 อ้างโดย อารี ฤทธิบูรณ์, 2552

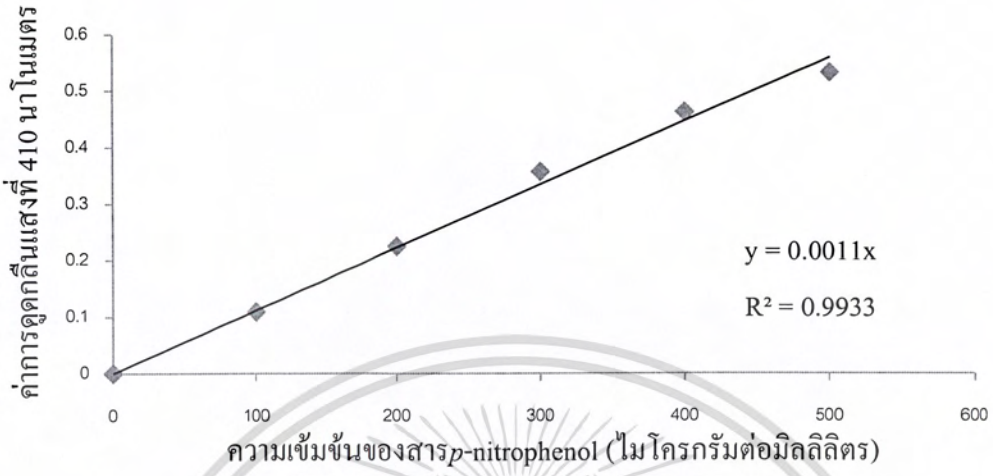
การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol เพื่อทำกราฟสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสาร *p*-nitrophenol ร้อยละ 95 ปริมาณ 0.10526 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ดังตารางภาคผนวกที่ 2

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของสาร *p*-nitrophenol

ความเข้มข้น *p*-nitrophenol (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
100	0.109	0.107	0.110	0.109
200	0.227	0.220	0.227	0.225
300	0.352	0.360	0.359	0.357
400	0.465	0.463	0.459	0.462
500	0.530	0.537	0.530	0.532

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพดีที่สุดโดยเปรียบเทียบขนาดของวงใสบนอาหาร Tributyrin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.688	24	.362	15.791	.000
Within Groups	1.146	50	.023		
Total	9.834	74			

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าความแตกต่างทางสถิติในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณของสายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 2.5 เป็นแหล่งคาร์บอน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.701	24	.238	68.864	.000
Within Groups	.172	50	.003		
Total	5.874	74			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3(ต่อ) ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพดีที่สุดโดยเปรียบเทียบขนาดของวงใสบนอาหาร Tributyrin

Duncan[a]

SAMP	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
21	3	.6333							
16	3	.8167	.8167						
33	3	.8500	.8500						
19	3		.9583	.9583					
39	3		.9667	.9667					
34	3		1.0167	1.0167	1.0167				
27	3		1.0333	1.0333	1.0333				
7	3		1.0500	1.0500	1.0500				
28	3		1.0500	1.0500	1.0500				
2	3		1.0667	1.0667	1.0667				
37	3			1.1500	1.1500	1.1500			
สายพันธุ์ดั้งเดิม	3			1.1833	1.1833	1.1833	1.1833		
11	3			1.1917	1.1917	1.1917	1.1917		
35	3				1.3000	1.3000	1.3000		
10	3					1.3500	1.3500		
30	3					1.4167	1.4167	1.4167	
15	3					1.4333	1.4333	1.4333	
4	3						1.4500	1.4500	
12	3						1.4500	1.4500	
8	3							1.6583	1.6583
17	3							1.6667	1.6667
5	3							1.6833	1.6833
31	3								1.8000
25	3								1.8500
18	3								1.9167
Sig.		.103	.091	.118	.055	.051	.069	.066	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4(ต่อ) ค่าความแตกต่างทางสถิติในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณของสายพันธุ์กลายเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 2.5 เป็นแหล่งคาร์บอน

Duncan[a]

sample	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
35	3	.120533									
34	3	.139400									
11	3		.246867								
39	3		.251267								
33	3		.252667								
16	3		.293333								
7	3		.325333								
5	3		.328200								
10	3		.329667								
21	3			.434200							
4	3			.441467							
19	3			.461800							
2	3			.473467							
15	3			.534433	.534433						
37	3				.614333	.614333					
27	3					.691267	.691267				
28	3					.715933	.715933	.715933			
18	3					.718867	.718867	.718867			
สายพันธุ์ดั้งเดิม	3						.721767	.721767			
31	3							.819067	.819067		
12	3								.824867		
17	3									.933767	
8	3									.942500	
30	3									1.019467	1.019467
25	3										1.045600
Sig.		.696	.142	.066	.102	.050	.569	.053	.904	.097	.588

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสและขนาดของโคโลนีบนอาหาร Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Duncan[a]

SAMP	N	Subset for alpha = 0.05																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	3	1.151500																		
32	3		1.342800																	
40	3		1.349800																	
38	3		1.355300																	
14	3			1.438000																
13	3			1.446400	1.446400															
36	3			1.458600	1.458600	1.458600														
23	3				1.464000	1.464000	1.464000													
29	3					1.471100	1.471100													
20	3						1.484800													
26	3							1.506900												
24	3								1.583900											
6	3									1.630200										
3	3									1.648300	1.648300									
9	3									1.649500	1.649500									
22	3									1.652200	1.652200									
สายพันธุ์ดั้งเดิม	3										1.670267									
21	3											1.703500								

ตารางภาคผนวกที่ 5(ต่อ) ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสและขนาดของโคโลนีบนอาหาร Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

SAMP	N	Subset for alpha = 0.05																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
16	3											1.707200								
33	3												1.753700							
19	3												1.759300	1.759300						
11	3												1.761100	1.761100	1.761100					
34	3												1.761400	1.761400	1.761400					
27	3												1.766000	1.766000	1.766000					
7	3												1.770000	1.770000	1.770000					
2	3												1.772900	1.772900	1.772900					
28	3												1.775100	1.775100	1.775100					
37	3													1.781400	1.781400					
39	3														1.784800					
35	3															1.885500				
10	3															1.889400				
30	3															1.894600				
15	3															1.896400				
4	3															1.903600				
12	3																1.987800			

ตารางภาคผนวกที่ 5(ต่อ) ค่าความแตกต่างทางสถิติในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างขนาดของวงใสและขนาดของโคโลนีบนอาหาร Tributyrin ที่มียาปฏิชีวนะนิสเตตินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

SAMP	N	Subset for alpha = 0.05																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
17	3																	2.025800		
8	3																	2.027800		
5	3																		2.218300	
25	3																		2.224200	
31	3																			2.480800
18	3																			2.481800
Sig.		1.000	.263	.064	.114	.263	.061	1.000	1.000	.056	.056	.723	.082	.073	.053	.126	1.000	.848	.572	.924

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.938	40	.248	1527.908	.000
Within Groups	.013	82	.000		
Total	9.952	122			