

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์เชื้อยีสต์เพื่อการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่
เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง

THE YEAST SELECTION AND STRAIN IMPROVEMENT FOR OPTIMIZING
BIODIESEL PRODUCTION WITH RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



วพ.
ก 269 ก
2558

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 141280
วัน.เดือน.ปี - 8 ส.ค. 2559

b. 18751649
i.....

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับก... KMITL-2015-SC-M-020-026... ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE YEAST SELECTION AND STRAIN IMPROVEMENT FOR OPTIMIZING
BIODIESEL PRODUCTION WITH RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-SC-M-020-026

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2015

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และผู้จัดทำหน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ “การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์เชื้อยีสต์เพื่อการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง”
“THE YEAST SELECTION AND STRAIN IMPROVEMENT FOR OPTIMIZING BIODIESEL PRODUCTION WITH RESPONSE SURFACE METHODOLOGY”

ชื่อนักศึกษา นางสาววรรณิสา บันสุข
รหัสประจำตัว 54651605
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรัศมิ์ ประธานกรรมการ รศ.สุใจ ชูจันทร์ อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ผศ.ดร.เหมือนหมาย อภินันทพงษ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 27 พฤษภาคม พ.ศ.2558 เวลา 10.00-12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 อาคารจุฬารามณ์วิทยาลัยลักษณะ 1 ชั้น 4

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร. ดุชนัน ธีระขีริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่...../.....เดือน...../..... พ.ศ.....58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์เชื้อยีสต์เพื่อการผลิตไบโอดีเซล ในสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง
นักศึกษา	นางสาววรรณิสา ปั่นสุข
รหัสประจำตัว	54651605
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. อารี ฤทธิบุรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำทิ้ง ดิน และส่วนต่างๆ ของป่าล้มในพื้นที่ของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์มบริษัท สุขสมบูรณ์ จำกัด สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่สร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งไตรบิวทรีนได้จำนวน 267 สายพันธุ์ เมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ SLP27 ให้การผลิตสูงสุด 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงนำไปผ่านการปรับปรุงพันธุ์ 3 ขั้นตอนอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ ริงส์อัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 38 วินาที สารเอทิลเมเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที และริงส์แกมมา ที่ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 205, 326 และ 170 สายพันธุ์ ตามลำดับ และได้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79, EM107 และ GAM47 ซึ่งให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 0.30, 0.36 และ 0.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเพิ่มขึ้น 1.07, 1.29 และ 2.50 เท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (SLP27) ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับสปีชีส์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequence พบว่าเป็นเชื้อยีสต์ *Candida orthopsilosis* และเมื่อทดสอบการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันได้ เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวละเอียดผสมกากน้ำตาล พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) และปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) ที่เวลา 60 ชั่วโมง จะมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงสุด 6.43×10^9 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 1.60 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง คือ ที่เวลา 72.6 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันปาล์มดิบ 9.05:1 และปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 8.42 (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 74.79 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

คำสำคัญ : เอนไซม์ไลเปส การกลายพันธุ์ ไบโอดีเซล พื้นที่การตอบสนอง และ *Candida orthopsilosis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	The yeast selection and strain improvement for optimizing biodiesel production with response surface methodology
Student Name	Wannisa Pansuk
Student ID	54651605
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2015
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Marisa Jatupornpiput

ABSTRACT

The selection of lipase-producing yeast isolated from waste water, soil and other parts of palm in Suksomboon palm oil manufacture. The total 267 isolated yeasts were found to produce clear zone in tributyrin medium agar and the strain SLP27 gave the maximum lipase activity of 0.28 unit/ml in liquid medium containing 1% (w/v) crude palm oil as a carbon source. This strain was selected and subjected to strain improvement by three steps of mutagenesis including ultraviolet (UV) radiation for 38 sec, ethyl methane sulfonate (EMS) for 58 min and gamma ray at 2 kGy, respectively. The 205 UV mutants, 326 UV+EMS mutant, and 170 UV+EMS+gamma mutants were obtained. The strain UV79, EM107 and GAM47 showed maximum lipase activities of 0.30, 0.36 and 0.70 unit/ml which were higher than wild type (SLP27) 1.07, 1.29 and 2.50 times, respectively. This strain was identified as *Candida orthopsilosis* using D1/D2 domain of 26S ribosomal DNA sequence analysis. The strain GAM47 was selected and examined the ability as a biocatalysis in biodiesel production. The GAM47's lipase property was examined as a transesterification. The optimal conditions for biocatalyst production under solid state fermentation using rice bran and molasses as substrate were obtained at 10% molasses (v/w), 40% initial moisture content (v/w) and 60 h of incubation with maximum viable cells of 6.43×10^9 CFU/g-DSW and lipase activity of 1.60 unit/g-DSW. A statistical method response surface methodology (RSM) was selected to determine the optimal conditions for producing of fatty acid ethyl ester (biodiesel) using crude palm oil as a substrate. The optimal conditions were 72.6 h of reaction time, 9.05:1 of ethanol to crude palm oil molar ratio and 8.42% (w/w) of biocatalyst with the maximum fatty acid ethyl ester yield of 74.79% (w/w).

Keywords : lipase, mutation, biodiesel, response surface methodology and *Candida orthopsilosis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาของรองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย และช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน อีกทั้งยังให้กำลังใจเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์ กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไข ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยแก่นักศึกษา ระดับอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2553 กองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน และทุนของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555

ขอขอบคุณบริษัท สุขสมบูรณ์ จำกัด (ชลบุรี) ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันปาล์มดิบมาเพื่อใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักงานปริมาณเพื่อสัตว์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในการฉายรังสีแกมมาเพื่อการทำวิจัย

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุนยกเว้นค่าหน่วยกิตและทุนการทำวิจัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือบริการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวก รวมทั้งขอขอบคุณ ดร. อมรรัตน์ สุวรรณโพธิ์ศรี ที่กรุณาสอนและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการใช้โปรแกรมการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง และงานด้านต่างๆ ขอขอบคุณนางสาวภริตา ทองสุขนอก และนางสาววิศรา ลัทธวิงศกร มิตรสหายที่คอยเป็นกำลังใจ และช่วยเหลือในทุกๆ ด้านด้วยความจริงใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนญาติพี่น้อง ที่ได้ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือทั้งร่างกาย แรงใจ ในการปฏิบัติงานและการแก้ไขปัญหาต่างๆ ให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

นางสาววรรณิสา ปั้นสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	2
1.3 ขอบเขตของวิทยานิพนธ์.....	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของวิทยานิพนธ์.....	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ปาล์มน้ำมัน.....	4
2.2 เอนไซม์ไลเปส.....	4
2.3 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์.....	8
2.4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส.....	9
2.5 การกลายพันธุ์.....	9
2.5.1 สิ่งก่อการกลายทางกายภาพ.....	10
2.5.1.1 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน.....	10
2.5.1.2 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน.....	11
2.5.2 สิ่งก่อการกลายทางเคมี.....	12
2.5.2.1 สารคล้ายเบส.....	12
2.5.2.2 สารเคมีที่เปลี่ยนโครงสร้างและการเข้าสู่ของเบส.....	12
2.5.2.3 สารอินเตอร์คาเลตติ้ง.....	13
2.6 การจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์ยีสต์.....	13
2.7 ไบโอดีเซล.....	16
2.7.1 คุณสมบัติ และคุณภาพของไบโอดีเซล.....	16
2.7.2 เทคนิคการผลิตไบโอดีเซล.....	18
2.7.2.1 การใช้โดยตรง และการผสม.....	18
2.7.2.2 ไมโครอิมัลชัน.....	19
2.7.2.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน.....	19
2.7.2.4 การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต.....	19
2.7.2.5 ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์.....	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	20
2.7.3.1 ผลของปริมาณน้ำ.....	20
2.7.3.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน.....	21
2.7.3.3 ผลของตัวเร่งปฏิกิริยา.....	21
2.7.3.4 ผลของเวลา และอุณหภูมิการทำปฏิกิริยา.....	22
2.8 โครมาโตกราฟี.....	23
2.8.1 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี.....	23
2.8.2 ก๊าซโครมาโตกราฟี.....	25
2.8.2.1 ก๊าซของแข็งโครมาโตกราฟี.....	26
2.8.2.2 ก๊าซของเหลวโครมาโตกราฟี.....	26
2.9 กระบวนการเลี้ยงเชื้อ.....	26
2.9.1 การหมักแบบอาหารแข็งหรือการหมักแบบแห้ง.....	26
2.9.1.1 ลักษณะของการกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง.....	26
2.9.1.2 ปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักแบบอาหารแข็ง.....	27
2.9.1.3 ข้อดีและข้อเสียของการหมักแบบอาหารแข็ง.....	27
2.9.2 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมัก.....	28
2.9.2.1 ราข้าว.....	28
2.9.2.2 กากน้ำตาล.....	30
2.10 การออกแบบการทดลองทางสถิติ.....	32
2.10.1 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง.....	32
2.10.2 แบบจำลองสมการถดถอย.....	32
2.10.3 การออกแบบการทดลองแบบสุ่มประสมกลาง.....	33
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	36
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	39
3.1 วัตถุประสงค์.....	39
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี.....	39
3.3 อุปกรณ์.....	40
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินการ.....	41
3.4.1 การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารแข็ง.....	41
3.4.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารเหลว.....	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา ซึ่งไม่อนุญาตให้ผู้อื่นใช้ประโยชน์จากการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.3 การชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัตราไวโอเล็ต ที่ระยะเวลาต่างๆ	42
3.4.4 การชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่ระยะเวลาต่างๆ	43
3.4.5 การชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา ⁶⁰ Co ที่มีความเข้มข้นของรังสีแตกต่างกัน	43
3.4.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือก	44
3.4.7 การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย ที่คัดเลือก	44
3.4.8 การแยกยางเหนียวจากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้สารละลายกรด	46
3.4.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพโดยเลี้ยงเชื้อ บนรำข้าวละเอียดผสมกากน้ำตาลด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง	46
3.4.10 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง	47
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	50
4.1 ผลการแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอโนไซม์ไลเปสจาก ตัวอย่างชนิดต่างๆ ในพื้นที่ของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม	50
4.2 ผลการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัตราไวโอเล็ต ที่ระยะเวลาต่างๆ	52
4.3 ผลการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่ระยะเวลาต่างๆ	55
4.4 ผลการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา ⁶⁰ Co ที่มี ความเข้มข้นของรังสีแตกต่างกัน	57
4.5 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือก	60
4.5.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	60
4.5.2 ผลการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม	60
4.6 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย ที่คัดเลือก	62
4.6.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	62
4.6.2 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน	63
4.6.3 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดโอเลอิก	64
4.7 ผลการแยกยางเหนียวจากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้สารละลายกรด	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.8 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าว ละเอียดผสมกากน้ำตาลด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง	66
4.8.1 ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อปริมาณตัวเร่งชีวภาพต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส การเปลี่ยนแปลงความชื้น และพีเอช	66
4.8.2 ผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อปริมาณตัวเร่งชีวภาพต่อกิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปส การเปลี่ยนแปลงความชื้น และพีเอช	69
4.9 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ ด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง	72
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	80
5.1 สรุปผลการทดลอง	80
5.2 ข้อเสนอแนะ	81
บรรณานุกรม	82
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	97
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารละลายและวิธีการวิเคราะห์	99
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ	112
ประวัติผู้เขียน	134

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม	5
2.2 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์.....	6
2.3 ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พ.ศ. 2548 ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน.....	17
2.4 ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์การเกษตร (ไบโอดีเซลชุมชน) พ.ศ. 2549 ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน	18
2.5 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด กรด เบส และเอนไซม์.....	22
2.6 องค์ประกอบทางเคมีในรำข้าว	29
2.7 วิตามินและแร่ธาตุในรำข้าว.....	29
2.8 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลจากอ้อย.....	30
2.9 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลจากอ้อย.....	31
2.10 รหัสของระดับปัจจัยที่ออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง.....	35
3.1 ปริมาณความเข้มข้นของรังสีแกมมา ⁶⁰ Co ในการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์.....	44
3.2 รหัสและระดับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์ จากน้ำมันปาล์มดิบโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง.....	48
3.3 สิ่งทดลองทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จาก น้ำมันปาล์มดิบโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง.....	49
4.1 แหล่งตัวอย่างและจำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มในสภาวะ อาหารเชิงไตรบิวทิลีน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	51
4.2 ร้อยละปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันปาล์มดิบจากสภาวะที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 40 และร้อยละ 50 บมที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์	63
4.3 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสม กากน้ำตาล โดยแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ความชื้น เริ่มต้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....	67
4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าว ผสมกากน้ำตาล โดยแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....	67
4.5 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสม กากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ กากน้ำตาลร้อยละ 10 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....	70
4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าว ผสมกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ กากน้ำตาลร้อยละ 10 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....	70
4.7 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์และค่าสถิติของร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์.....	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8 ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ เมื่อทดลองตามปัจจัยต่างๆ จากการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง	74
4.9 การทดสอบความแปรปรวนและความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์.....	77
4.10 การคาดคะเนร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากปัจจัยต่างๆ ที่ได้จากการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง	78



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ชนิดและความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส.....	8
2.2 ปฏิกริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไลเปส.....	9
2.3 ปฏิกริยาการเปลี่ยนเบสกวีนีนเป็น O ⁶ -ethylguanine.....	13
2.4 rRNAs; 18S rRNA, 5.8S rRNA, 26S rRNA, ETS (external teanscribed spacer) และ ITS (internal teanscribed spacer).....	14
2.5 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมทานอล.....	20
2.6 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี.....	24
2.7 วิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอดีเซลด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี.....	25
2.8 องค์ประกอบของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี.....	25
2.9 แบบจำลองและจุดของจำนวนสิ่งทดลอง เมื่อออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง 3 ปัจจัย.....	34
4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ 7 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน.....	51
4.2 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 วินาที.....	54
4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต ที่เวลา 38 วินาที เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน.....	54
4.4 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที.....	56
4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน.....	56
4.6 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา ⁶⁰ Co ที่ความเข้มข้นของรังสี 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์.....	59
4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ⁶⁰ Co ที่ความเข้มข้นของรังสี 2 กิโลเกรย์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน.....	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8	ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง YM ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27, UV79, EM107 และ GAM47 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า และรูปร่างของเซลล์ยีสต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 400 เท่า.....
4.9	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มดิบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
4.10	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มดิบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
4.11	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
4.12	การแยกชั้นของผลผลิตหลังปฏิกิริยาการขจัดยางเหนียวของน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้สารละลายกรดฟอสฟอริกร่วมกับน้ำ.....
4.13	ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ค่าพีเอช และปริมาณความชื้นของสายพันธุ์กล้วย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....
4.14	ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ค่าพีเอช และปริมาณความชื้นของสายพันธุ์กล้วย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นกากน้ำตาลร้อยละ 10 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....
4.15	ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ค่าพีเอช และปริมาณความชื้นของสายพันธุ์กล้วย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีการแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....
4.16	ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ค่าพีเอช และปริมาณความชื้นของสายพันธุ์กล้วย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง.....
4.17	พื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ
4.18	พื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.19	พื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน ร้อยละ ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ..... 76
4.20	ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ ร้อยละปริมาณผลได้ของไบโอดีเซล พีเอช ปริมาณ เชื้อยีสต์ก่อนและหลังการเติมเอทานอลของสายพันธุ์กลาย GAM47 จากการผลิต ไบโอดีเซลโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน 9.05:1 ปริมาณตัวเร่ง ชีวภาพร้อยละ 8.42 เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 73 และ 84 ชั่วโมง..... 79



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันความต้องการใช้พลังงานเชื้อเพลิงมีเพิ่มมากขึ้น โดยน้ำมันปิโตรเลียมเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้กันมากในแต่ละวัน แต่มีข้อจำกัด คือ เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ใช้แล้วหมดไป ซึ่งมีแนวโน้มที่จะหมดไปในอีกไม่กี่ปีข้างหน้า ทำให้ในปัจจุบันน้ำมันปิโตรเลียมมีราคาที่สูง ด้วยข้อจำกัดนี้ทั่วโลกจึงกำลังประสบปัญหาด้านการขาดแคลนพลังงาน ดังนั้นปัญหานี้จึงทำให้มนุษย์เริ่มที่จะมองหาพลังงานทางเลือก นอกเหนือจากแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงที่ผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นพลังงานอีกทางเลือกหนึ่ง สามารถนำมาใช้แทนน้ำมันดีเซลปกติได้ โดยเมื่อนำมาใช้กับเครื่องยนต์แล้วมีคุณสมบัติในการเผาไหม้ได้ดีเทียบเท่ากับน้ำมันดีเซล (พินิจ, 2551) และยังมีข้อดีคือ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเผาไหม้ในเครื่องยนต์ได้ดีขึ้น เนื่องจากไบโอดีเซลมีออกซิเจนผสมอยู่ประมาณร้อยละ 10 ซึ่งทำให้เกิดการกระจายตัวระหว่างอากาศและน้ำมันอย่างสม่ำเสมอ (ศิระพงษ์, 2550) ทำให้มีการเผาไหม้ที่สะอาดกว่า เอโอเสียมีคุณภาพที่ดีกว่า มีปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้อย และเนื่องจากไม่มีกำมะถันในไบโอดีเซล จึงไม่มีปัญหาซัลเฟต อีกทั้งยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย ทำให้ไม่เกิดการอุดตันของระบบเอโอเสียม (พินิจ, 2551) แต่ก็อาจมีข้อเสียบางประการ คือ เพิ่มการปลดปล่อยก๊าซไนโตรเจนออกไซด์ แต่สามารถแก้ไขได้โดยใช้ระบบหมุนเวียนก๊าซเสีย (exhaust gas recirculation) และสารเคมีตกค้างที่เหลือจากปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (อนชญา และชัยชาญ, 2550)

ไบโอดีเซลเป็นสารเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างน้ำมันหรือไขมันกับแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้น โดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ใช้เวลาน้อยลง และได้ผลผลิตสูงขึ้น เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันจากไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ให้เป็นอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid alkyl ester) (รัชนนท์, 2554) การเรียกชื่อสารเอสเทอร์ที่ได้ จะขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น เมื่อใช้เมทานอลในการทำปฏิกิริยา จะเรียกสารที่ได้ว่าเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) และเมื่อใช้เอทานอลในการทำปฏิกิริยา จะเรียกสารที่ได้ว่าเอทิลเอสเทอร์ (ethyl ester) ในปัจจุบันพบว่าพืชน้ำมัน ไขมันสัตว์หรือน้ำมันที่เหลือทิ้งจากครัวเรือนสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ (พิสมัย และลลิตา, 2549)

ในประเทศไทยมีพืชน้ำมันหลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซลได้ เช่น มะพร้าว ปาล์ม น้ำมัน ทานตะวัน ถั่วเหลือง และสบู่ดำ เป็นต้น ซึ่งปาล์มน้ำมันมีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล โดยปาล์มน้ำมันนั้นมีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ ทั้งด้านการผลิตและการตลาด เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำ ได้ผลผลิตต่อพื้นที่สูง สามารถผลิตได้ปริมาณมาก และมีราคาซื้อขายในตลาดไม่สูงมากนัก อีกทั้งยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดความเสียหายจากภัยธรรมชาติน้อยเมื่อเทียบกับพืชอายุสั้นชนิดอื่นๆ (พินิจ, 2551)

การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นแนวทางเลือกหนึ่งในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งการใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นมีข้อดีหลายประการ คือ ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ช่วยลดความหนืดของน้ำมัน ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ต้องมีการบำบัดของเสีย การแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้ทำได้ง่าย และยังสามารถผลิตไบโอดีเซลได้จากทั้งไตรกลีเซอไรด์ และเอกซสาร์เป็นเอกซสาร์ที่สังวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันอิสระ (Wang และคณะ, 2010) ดังนั้นจึงสามารถใช้กับสารตั้งต้นที่มีคุณภาพด้อยกว่าน้ำมันบริสุทธิ์ได้ ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ใช้เวลาสั้น ประหยัดพื้นที่ในการผลิต ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิต เอนไซม์ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด และมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ (Gupta และคณะ, 2004) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ และมีความคงตัวในช่วงพีเอชที่กว้าง จุลินทรีย์ที่ยีสต์ รา และแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถแยกได้จากธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันมีความนิยมในการนำเชื้อยีสต์มาผลิตเอนไซม์ไลเปสในทางการค้า เนื่องจากมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น และสามารถขยายขนาดในการเพาะเลี้ยงได้ง่าย (ชนกฤต, 2556) ซึ่งเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี เช่น *Candida rugosa* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากการใช้กรดไขมันโอเลอิกเป็นแหล่งคาร์บอน (Gordillo และคณะ, 1995) แต่โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่แยกได้จากธรรมชาติอาจมีข้อจำกัดบางประการ คือ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในบางสายพันธุ์ยังไม่สูงมากนัก ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์เป็นวิธีการที่ช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้น เพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตไบโอดีเซลได้ ซึ่งสามารถทำได้โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีและสารเคมีในปริมาณที่เหมาะสม (Tan และคณะ, 2003) ซึ่งสามารถชักนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่มากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีแนวคิดในการทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ประเภทเชื้อยีสต์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส และเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยการกลายพันธุ์ด้วยรังสีและสารเคมี จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด เพื่อนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันปาล์มดิบ

1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

1.2.1 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.2.2 ทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล

1.2.3 ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพโดยใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.2.4 ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ โดยการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือก โดยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (response surface methodology, RSM)

1.3 ขอบเขตของวิทยานิพนธ์

การวิจัยนี้เป็นการแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างน้ำทิ้ง ดิน และส่วนต่างๆ ของปาล์ม ในโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์มที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และสามารถย่อยน้ำมันจากปาล์มได้ โดยทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากนั้นนำสายพันธุ์ดั้งเดิมเหล่านี้มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการแข่งขันเพื่อชิงรางวัลชิงดีชิงเด่น มีอยู่ภายใต้เงื่อนไขข้อบังคับในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และรังสีแกมมา และทำการคัดเลือกสายพันธุ์กล้วยที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยการเปรียบเทียบเชิงปริมาณและคุณภาพ นำสายพันธุ์กล้วยที่คัดเลือกได้มาผลิตตัวเร่งทางชีวภาพ เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลจากตัวเร่งชีวภาพที่ผลิตได้ โดยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของวิทยานิพนธ์

เอนไซม์ไลเปสสามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่าการใช้สารเคมีแบบดั้งเดิม เช่น กรด เบส เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และได้ผลพลอยได้ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเชื้อยีสต์มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส แต่มีข้อจำกัด คือ อาจผลิตได้ปริมาณน้อย ทำให้มีราคาแพง ซึ่งการกลายพันธุ์นั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อยีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้นและมีความคงตัวสูงขึ้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตและนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในระดับที่มากขึ้นต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปาล์มน้ำมัน

ประเทศมาเลเซียเป็นประเทศที่มีการปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุดในโลก โดยมีพื้นที่การเพาะปลูกประมาณ 23 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 68 ล้านตัน ส่วนประเทศไทยมีพื้นที่การเพาะปลูกปาล์มที่ให้ผลเก็บเกี่ยวประมาณ 1.94 ล้านไร่ ให้ผลผลิตทะลายปาล์มสด 5.2 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2547 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทางภาคใต้ของประเทศในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ ตรัง สงขลา และสตูล ซึ่งในประเทศไทยจะให้ผลผลิตปาล์มสดเฉลี่ย 2.7 ตันต่อไร่ (พิสมัย และลลิตา, 2549)

ทะลายปาล์มสดประกอบด้วยผลปาล์มจำนวนมากเกาะติดบนก้านทะลาย และน้ำมันปาล์มเป็นส่วนที่ได้จากผลปาล์ม ซึ่งผลปาล์มน้ำมันจะให้ไขมัน 2 ชนิด คือ น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม น้ำมันปาล์มดิบเป็นส่วนที่สกัดได้จากส่วนเปลือกนอกของผลปาล์ม ขณะที่น้ำมันเมล็ดในปาล์ม สกัดได้จากเมล็ดในของผลปาล์ม โดยทั่วไปแล้วทะลายปาล์มสดมีน้ำมันปาล์มอยู่ประมาณร้อยละ 20-21 จากทะลายปาล์มสด แต่ในการผลิตในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มของประเทศโดยเฉลี่ยแล้ว สามารถสกัดน้ำมันได้เพียงร้อยละ 17 จากทะลายปาล์มสด สำหรับน้ำมันเมล็ดในปาล์มมีอยู่ประมาณร้อยละ 5 จากทะลายปาล์มสด น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันอย่างมาก โดยน้ำมันปาล์มดิบมีกรดไขมันคาร์บอน 16 ตัว เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่น้ำมันเมล็ดในปาล์มมีกรดไขมันคาร์บอน 12 ตัว เป็นองค์ประกอบหลัก (พิสมัย และลลิตา, 2549) ในน้ำมันปาล์มดิบจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่ น้ำมันเมล็ดในปาล์มจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณมาก (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี, 2556) ดังที่แสดงในตารางที่ 2.1

น้ำมันปาล์มดิบมีลักษณะเป็นของเหลวปะปนอยู่กับของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาบรรจุขวดเพื่อจำหน่ายจะต้องทำให้ไขมันปาล์มบริสุทธิ์ โดยการกำจัดกรด ยางเหนียว สี และกลิ่นก่อน จากนั้นจึงทำการแยกของแข็งและของเหลวออกจากกัน ส่วนที่เป็นของเหลวเรียกว่าน้ำมันปาล์มโอลีน และส่วนที่เป็นของแข็งเรียกว่าปาล์มสเตียรีนหรือไซสเตียรีน (พิสมัย และลลิตา, 2549)

การผลิตไบโอดีเซลสามารถใช้ไขมันทุกส่วนที่ได้มาจากปาล์มน้ำมันมาเป็นวัตถุดิบ เช่น น้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันปาล์มโอลีน ไซสเตียรีน กรดไขมันปาล์มกลั่น และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม แต่ในการผลิตเชิงพาณิชย์จำเป็นต้องพิจารณาความคุ้มค่าด้านเศรษฐศาสตร์ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำน้ำมันที่มีราคาสูงมาใช้ เช่น น้ำมันปาล์มโอลีน เนื่องจากเป็นส่วนที่ใช้ในการบริโภค และน้ำมันเมล็ดในปาล์มที่ใช้ในการผลิตสารเคมีและเครื่องสำอางอยู่แล้ว (พิสมัย และลลิตา, 2549)

2.2 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อเรียกว่า triacylglycerol acylhydrolase และมีชื่อเรียกตามรหัสหรือตามตัวเลข (code or number system) คือ E.C. 3.1.1.3 ไลเปสสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไลเปสได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยมีน้ำเข้าร่วมทำปฏิกิริยา นอกจากนี้ไลเปสจะช่วยย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไขมันที่มีโครงสร้างทางเคมีอย่างจำเพาะเจาะจงแล้ว ไลเปสยังสามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น (ปราณี, 2547)

แหล่งของเอนไซม์พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกตามธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะผลิตไลเปสทั้งที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular lipase) และที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular lipase) ไลเปสที่ได้จากพืช ได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดกะหล่ำ เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์พบได้ในเนื้อเยื่อวัยต่างๆ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง และกล้ามเนื้อ (ปราณี, 2547) ส่วนไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์นั้น ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตไลเปสได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าในพืช และสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตโดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (Mahadik และคณะ, 2002) โดยในทางการค้าจะนิยมใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสที่ได้รับความสนใจ แสดงดังตารางที่ 2.2 อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแหล่งต่างๆ จะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน จึงต้องเลือกไลเปสให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ (Sharma และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม

กรดไขมัน	น้ำมันปาล์มดิบ	น้ำมันเมล็ดในปาล์ม
กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid)	ร้อยละ 50.2	ร้อยละ 82
กรดคาโปรอิก (Caproic acid, C6:0)	-	0.1 - 0.5
กรดคาพริลิก (Caprylic acid, C8:0)	-	3.4 - 5.9
กรดคาพริก (Capric acid, C10:0)	-	3.3 - 4.4
กรดลอริก (Lauric acid, C12:0)	0.1 - 0.4	46.3 - 51.1
กรดไมริสติก (Myristic acid, C14:0)	1.0 - 1.4	14.3 - 16.8
กรดพาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0)	40.9 - 47.5	6.5 - 8.9
กรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0)	3.8 - 4.8	1.6 - 2.6
กรดอะราคิติก (Arachidic acid, C20:0)	0 - 0.8	-
กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)	ร้อยละ 50	ร้อยละ 18
กรดพาล์มิทอเลอิก (Palmitoleic acid, C16:1)	0 - 0.6	-
กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1)	36.4 - 41.2	13.2 - 16.4
กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2)	9.2 - 11.6	2.2 - 3.4
กรดลิโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3)	0 - 0.5	-

ที่มา : ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี (2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	สกุล	สายพันธุ์	อ้างอิง
แบคทีเรีย แกรมบวก	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	Godtfredsen, 1990
		<i>B. cereus</i>	El-Shafei และ Rezkallah, 1997
		<i>B. subtilis</i>	Kennedy และ Rennarz, 1979
		<i>B. acidocaldarius</i>	Manco และคณะ, 1998
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. canosus</i>	Tahoun และคณะ, 1985
		<i>S. aureus</i>	Lee และ Yandolo, 1986
		<i>S. epidermidis</i>	Farrell และคณะ, 1993
		<i>S. warneri</i>	Talon และคณะ, 1995
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbrueckii</i>	El-Sawah และคณะ, 1995
		<i>Lactobacillus sp.</i>	Meyers และคณะ, 1996
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i>	Sztajer และคณะ, 1988
	<i>Micrococcus</i>	<i>M. freudenreichii</i>	Hou, 1994
		<i>M. luteus</i>	Hou, 1994
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acne</i>	Sztajer และคณะ, 1988	
	<i>P. granulosum</i>	Sztajer และคณะ, 1988	
แบคทีเรีย แกรมลบ	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	Yeo และคณะ, 1998
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Ito และคณะ, 2001
		<i>P. mendocina</i>	Jaeger และ Reetz, 1998
		<i>P. glumae</i>	Frenken และคณะ, 1993
		<i>P. pseudoalcaligenes</i>	Lin และคณะ, 1995
		F-111	
		<i>P. cepacia</i>	Pencreach และ Baratti, 1996
	<i>Chromobacterium</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Yang และคณะ, 2000
		KWI56	
		<i>C. viscosum</i>	Rees และ Robinson, 1995
		Helisto และ Korpela, 1998	
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. pseudoalcaligenes</i>	Jaeger และ Reetz, 1998	
	<i>A. radioresistens</i>	Diogo และคณะ, 1999	
<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>	Sztajer และคณะ, 1988	
	<i>A. sorbia</i> LP004	Chen และคณะ, 1999	
รา	<i>Rhizopus</i>	<i>R. delemar</i>	Anguita และคณะ, 1993
		<i>R. oryzae</i>	Lotrakul และ Dharmsthiti, 1997
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Klein และคณะ, 1997
			Salleh และคณะ, 1993
			Long และคณะ, 1996, 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	สกุล	สายพันธุ์	อ้างอิง
		<i>A. niger</i>	Chen และคณะ, 1995
		<i>A. oryzae</i>	Ohnishi และคณะ, 1994
	<i>Penicillium</i>	<i>P. cyclopium</i>	Chahinian และคณะ, 2000
		<i>P. citrinum</i>	Sztajer และ Maliszewska, 1989
		<i>P. wortmanii</i>	Costa และ Peralta, 1999
	<i>Mucor</i>	<i>M. miehei</i>	Rantakyla และคณะ, 1996
		<i>M. javanicus</i>	Ishihara และคณะ, 1975
ยีสต์	<i>Ashbya</i>	<i>A. gossypii</i>	Stahmann และคณะ, 1997
	<i>Acremonium</i>	<i>A. strictum</i>	Okeke และ Okolo, 1990
	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>	Wang และคณะ, 1995
		<i>C. tropicalis</i>	Takahashi และคณะ, 1998
		<i>C. antarctica</i>	Weber และคณะ, 1999
		<i>C. cylindracea</i>	Kamiya และ Gotto, 1998
		<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe และคณะ, 1996
		<i>C. deformans</i>	Lacointe และคณะ, 1996
		<i>C. curvata</i>	Ghosh และคณะ, 1996
		<i>C. valida</i>	Ghosh และคณะ, 1996
	<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Merek และ Bednasski, 1996
	<i>Rhodotorula</i>	<i>R. glutinis</i>	Papaparaskevas และคณะ, 1992
		<i>R. pilimornae</i>	Tahoun และคณะ, 1985
	<i>Pichia</i>	<i>P. bispora</i>	Hou, 1994
		<i>P. maxicana</i>	Hou, 1994
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. lipolytica</i>	Tahoun และคณะ, 1985
		<i>S. crataegenesis</i>	Hou, 1994
	<i>Torulospora</i>	<i>T. globora</i>	Hou, 1994
แอคติโนมัยซีต	<i>Trichosporon</i>	<i>T. asteroides</i>	Dharmsthiti และ Ammaranond, 1997
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. fradiae</i> NCIB 8233	Sztajer และคณะ, 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. PCB27	Sztajer และคณะ, 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. CCM 33	Sztajer และคณะ, 1988
		<i>S. coelicolor</i>	Hou, 1994
		<i>S. cinnamomeus</i>	Sommer และคณะ, 1997

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sharma และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

Macrae (1983) ได้สรุปชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยความจำเพาะต่อตำแหน่งของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ดังนี้

กลุ่มที่หนึ่ง เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (non-specific lipases) สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้ทุกตำแหน่ง จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน ซึ่งในระหว่างปฏิกิริยาอาจมีไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เกิดขึ้นได้ ดังภาพที่ 2.1-ก โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. glumae*, *B. cepacia*, *C. rugosa*, *C. cylindracea*, *P. glumae* และ *P. cepacia* เป็นต้น

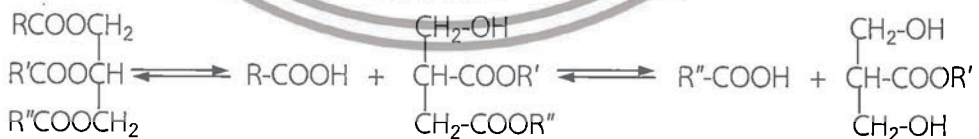
กลุ่มที่สอง เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipases) สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลปฐมภูมิ (primary hydroxyl group) โดยความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ ดังภาพที่ 2.1-ข ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1,2-ไตรกลีเซอไรด์, 2,3-ไตรกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ *A. niger*, *B. thermocatenuatus*, *M. javanicusa*, *P. camembertii*, กลุ่มจำพวก *Rhizopus* หลายชนิด และ *Y. lipolytica* เป็นต้น

กลุ่มที่สาม เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (fatty acid specific lipases) ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีพันธะคู่ (double bond) ในตำแหน่งที่ 9 (C9:0) และตำแหน่งที่ 10 (C10:0) ของกรดไขมัน ดังภาพที่ 2.1-ค ไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นไลเปสจากจุลินทรีย์ เช่น *P. cyclopium* และ *Geotrichum candidum* เป็นต้น

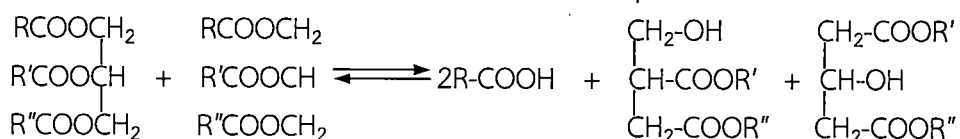
ก. เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



ข. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



ค. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



ภาพที่ 2.1 ชนิดและความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Macrae (1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสแบ่งได้เป็นปฏิกิริยาหลัก 3 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมัน (hydrolysis) ซึ่งต้องอาศัยน้ำเข้าร่วมในปฏิกิริยา ดังภาพที่ 2.2-ก ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) ซึ่งมักเกิดในสภาวะที่มีน้ำน้อยเนื่องจากมีน้ำเป็นผลผลิตจากการเกิดปฏิกิริยา ดังภาพที่ 2.2-ข และปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ (transesterification) ซึ่งจำแนกออกเป็น 3 ปฏิกิริยาตามชนิดของสารตั้งต้น ได้แก่ ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (interesterification) เป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารเอสเทอร์ด้วยกัน ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) เป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ที่มีแอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้น ซึ่งการผลิตไบโอดีเซลจัดอยู่ในปฏิกิริยาชนิดนี้ และปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส (acidolysis) เป็นการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ที่มีกรดอินทรีย์เป็นสารตั้งต้น (Gandhi, 1997) ดังภาพที่ 2.2-ค

ก. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



ข. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน



ค. ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์

ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน



ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส



ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไลเปส
ที่มา : Gandhi (1997)

2.5 การกลายพันธุ์ (mutation)

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาตินั้นสามารถเกิดขึ้นได้ แต่มีโอกาสนในการเกิดขึ้นน้อยมาก การเพิ่มการกลายพันธุ์จึงต้องอาศัยสิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้อัตราการเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน และเชื้อสายพันธุ์ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติด้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ซึ่งจะมีประมาณร้อยละ 1 ที่มีคุณสมบัติดีขึ้นหรือให้ผลผลิตมากขึ้นกว่าเดิม (กำเนิด, 2534) การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ (induce mutation) นั้นเกิดเพราะมีสิ่งก่อการกลายหลายอย่างที่มีผลต่อดีเอ็นเอ โดยอาจทำให้เกิดทอโทเมอร์ไรเซชัน (tautomerization) ของเบสมากขึ้น หรือ

เอกลี เป็นหนึ่งในบริการที่ส่งเสริมให้เกษตรกรและผู้ประกอบการรายย่อยสามารถเข้าถึงบริการด้านเทคโนโลยีสารสนเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มค่า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการยอมให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสผิดในระหว่างการถ่ายแบบ (replication DNA) สิ่งก่อการกลายบางชนิดทำปฏิกิริยาทางเคมีเปลี่ยนโครงสร้างเบสในดีเอ็นเอ ซึ่งส่งเสริมการถ่ายแบบที่ผิดพลาด เช่น ดีอะมีเนชัน (deamination) และอัลคิเลชัน (alkylation) สิ่งก่อการกลายอาจเป็นรังสีที่เรียกว่า สิ่งก่อการทางกายภาพ (physical mutagen) และเป็นสารเคมีเรียกว่า สิ่งก่อการกลายทางเคมี (chemical mutagen) (สาวิตรี, 2549)

2.5.1 สิ่งก่อการกลายทางกายภาพ

สิ่งก่อการกลายทางกายภาพ ได้แก่ รังสีต่างๆ มีผลในการทำลายดีเอ็นเอโดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน (gene) ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของรังสีออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.5.1.1 รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) รังสีอินฟราเรด (infrared) และแสงสว่าง (visible light) ซึ่งเป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำ เมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใดๆ จะไม่สามารถทำให้ตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน เนื่องจากมีพลังงานไม่มากพอที่จะผลักอิเล็กตรอนให้หลุดออกจากอะตอมได้ (พีรณช, 2556)

รังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอและโมเลกุลอื่นๆ ในเซลล์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มที่เรียกว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดในระดับโมเลกุลหรือยีน (point mutation) โดยรังสีอัลตราไวโอเล็ตถูกดูดซับด้วยเบสในดีเอ็นเอ ปกติรังสีอัลตราไวโอเล็ตจัดจำแนกตามความยาวคลื่นเป็น UV-C ที่มีความยาวคลื่น 180-290 นาโนเมตร ซึ่งมีพลังงานมาก และมีผลในการฆ่าเซลล์แต่ไม่พบ UV-C ในแสงอาทิตย์ เพราะถูกดูดซับด้วยชั้นโอโซน ชนิดที่ 2 คือ UV-B มีความยาวคลื่น 290-320 นาโนเมตร เป็นส่วนประกอบของแสงอาทิตย์มีผลสำคัญต่อเซลล์ คือ ทำให้ตายและกลายพันธุ์ ชนิดสุดท้าย คือ UV-A มีความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร นอกจากนั้นอาจแบ่งคร่าวๆ เป็นรังสีอัลตราไวโอเล็ตคลื่นสั้น ซึ่งมีความยาวคลื่นที่มีประสิทธิภาพสำหรับทำให้เกิดกลายพันธุ์ คือ 200-300 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการกลายพันธุ์ คือ 255 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่ ดีเอ็นเอดูดกลืนสูงสุด ผลที่สำคัญจากการทำงานของรังสีอัลตราไวโอเล็ต คือ ไพริมิดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimer) ซึ่งอาจเกิดได้ 3 แบบ คือ ระหว่างเบสไทมีน (thymine) กับเบสไทมีน เบสไทมีนกับเบสไซโทซีน (cytosine) และเบสไซโทซีนกับเบสไซโทซีน ไพริมิดีนไดเมอร์เหล่านี้ อาจเกิดระหว่างไพริมิดีนที่อยู่ติดกันบนดีเอ็นเอสายเดียวกันหรือคนละสาย ทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายแบบดีเอ็นเอ รังสีอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่นสั้นนี้อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดการทรานซิชัน (transition) ของเบสกวานีน (guanine) กับเบสไซโตซีน ไปเป็นเบสอะดีนีน (adenine) กับเบสไทมีน นอกจากไพริมิดีนไดเมอร์แล้วรังสีอัลตราไวโอเล็ตอาจทำให้เกิดผลอื่นๆบนดีเอ็นเอ เช่น การเติมน้ำที่พันธะคูในเบสไพริมิดีน ซึ่งทำให้มีความผิดพลาดในระหว่างการถ่ายแบบดีเอ็นเอ และการสร้างไดเมอร์ของกรดอะมิโนซิสทีอีน ส่วนรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดคลื่นยาว ซึ่งมีความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร มีผลต่อการตายและทำให้เกิดการกลายพันธุ์น้อยกว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดความยาวคลื่นสั้น (สาวิตรี, 2549) รังสีอัลตราไวโอเล็ตนิยมใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีสต์เพราะใช้ง่าย การวัดปริมาณกำหนด (dose) ทำได้ง่าย และการสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ตไม่เป็นอันตรายมากนัก ทำให้การปฏิบัติไม่ต้องระมัดระวังมาก สายพันธุ์กลายที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตนั้น ประมาณร้อยละ 10 อาจเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่เปลี่ยนกลับหรือสามารถเปลี่ยนกลับที่ความถี่ต่ำมาก (Jacobson, 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ (X-rays) รังสีแกมมา (gamma rays) อนุภาคแอลฟา (alpha particle) อนุภาคบีตา (beta particle) ซึ่งเป็นรังสีที่มีพลังงานสูง มีอำนาจทะลุทะลวงสูง (penetration) เมื่อรังสีชนิดนี้ผ่านเข้าไปในตัวกลางใดๆ จะทำให้อะตอมของตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน โดยที่พลังงานจากรังสีสามารถผลักให้อิเล็กตรอนในอะตอมของตัวกลางหลุดออกจากอะตอม เกิดเป็นคู่อิออน (ion pair) ซึ่งประกอบด้วยอิเล็กตรอนอิสระ (free electron) ที่มีไอออนลบ (negative ion) และไอออนบวก (positive ion) (พีรณูช, 2556)

รังสีแกมมาเป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ไม่มีมวล ไม่มีประจุ มีอำนาจทะลุทะลวงสูง เกิดจากการปล่อยพลังงานของนิวไคลด์กัมมันตรังสี (radionuclide หรือ radioactive nuclide) ที่สลายตัวให้รังสีชนิดอื่นแล้ว แต่ยังมีพลังงานเหลืออยู่ จึงปล่อยพลังงานออกมาในรูปของรังสีแกมมา ตัวอย่างของนิวไคลด์กัมมันตรังสี คือ โคบอลต์-60 (cobalt-60, ^{60}Co) และซีเซียม-137 (cesium-137, ^{137}Cs) (พีรณูช, 2556) รังสีแกมมาทำให้เกิดรอยแผลจำนวนมากมีทั้งการแตกหักของดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded break) และการหักของดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded break) ทำให้มีผลต่อยีนเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มที่เรียกว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) ยังทำให้เกิดการแตกหักของพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่เข้าคู่กัน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส การเชื่อมข้ามภายในสาย (intra-strand cross-linkage) การเชื่อมระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีน และการเชื่อมระหว่างดีเอ็นเอกับโมเลกุล (สาวิตรี, 2549)

ทิพนयरธิน และเชรชัวร์ชัร (2539) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Candida sp.* ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 1.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้ 0.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

สมศักดิ์ (2546) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต เพื่อเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย P176 มีการเจริญและสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณ 98.14 ไมโครกรัมต่อกรัมของเซลล์ยีสต์ ซึ่งสายพันธุ์ดั้งเดิมผลิตแคโรทีนอยด์ได้ปริมาณน้อยกว่า คือ 96.76 ไมโครกรัมต่อกรัมของเซลล์ยีสต์

Tan และคณะ (2003) ทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Candida sp.* ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต สารไนโตรโซควานิดีน (nitrosoguanidine, NTG) และการอาบนิวตรอน (neutron mutation) เพื่อเพิ่มกิจกรรมไลเปสให้สูงขึ้น พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสในเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 112 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยสายพันธุ์กลาย *Candida sp.* 90-123 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต สายพันธุ์กลาย *Candida sp.* 90-49 ที่ผ่านกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และสายพันธุ์กลาย *Candida sp.* 90-125 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยการอาบนิวตรอน มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 230, 590 และ 1,108 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสายพันธุ์กลาย *Candida sp.* 90-125 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 10 เท่า

Thein และ Prathuangwong (2010) ทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายมีความสามารถในการผลิตสารแบคทีริโอซินได้ในปริมาณที่มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Watanabe และคณะ (2011) ทำการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสจากกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อยีสต์ *P. stipitis* NBRC 1687 ที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเล็ต พบว่าเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ PXF58 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 4.3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้ร้อยละ 3.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งสายพันธุ์กลายผลิตได้มากกว่า 1.4 เท่า

Sun และคณะ (2004) ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *P. rhodozyma* ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้นจากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของรังสี 0, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, และ 7.0 กิโลเกรย์ โดยคัดเลือกจากอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5 ซึ่งทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์ยีสต์ มากกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการกลายพันธุ์ถึงร้อยละ 50

Akacha และคณะ (2008) ทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยรังสีแกมมา เพื่อเพิ่มความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในการผลิตแอลดีไฮด์จากเอทานอล โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 เกรย์ พบว่าที่ความเข้มข้นรังสี 10 เกรย์ เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น 1.5 เท่า คือ 27 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้ 15 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และยังมีผลต่อการตรึงเซลล์ โดยเซลล์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้นรังสี 20 เกรย์ จะมีความคงตัวสูงกว่า สามารถนำมาใช้ซ้ำได้มากกว่า 8 ครั้ง และยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสถึงร้อยละ 88 และได้ผลผลิตแอลดีไฮด์ที่สูงถึงร้อยละ 79 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.5.2 สิ่งก่อการกลายทางเคมี

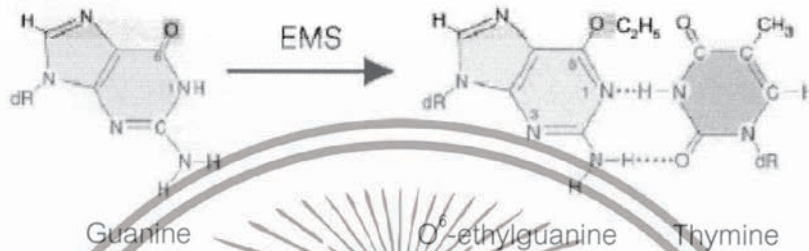
สิ่งก่อการกลายทางเคมีบางชนิดอาจมีผลต่อดีเอ็นเอที่กำลังถ่ายแบบ ส่วนบางชนิดมีผลต่อดีเอ็นเอที่ไม่ได้กำลังถ่ายแบบ ในขณะที่บางชนิดมีผลต่อดีเอ็นเอที่กำลังซ่อมแซม สิ่งก่อการกลายทางเคมีเหล่านี้สามารถแยกกันได้โดยอาศัยกลไกการทำงาน บางชนิดทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้กลไกเดียวกันกับที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเอง สิ่งก่อการกลายเคมี ได้แก่ สารคล้ายเบส (base analog) สารเคมีที่เปลี่ยนโครงสร้างและการเข้าคู่ของเบส และสารอินเตอร์คาลเลตติ้ง (intercalating agent) (Montelon, 1998)

2.5.2.1 สารคล้ายเบส สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบสพิวรีนหรือเบสไพริมิดีนเหล่านี้สามารถรวมเข้าไปในดีเอ็นเอในตำแหน่งของเบสปกติในระหว่งถ่ายแบบดีเอ็นเอ (สาวิตรี, 2549)

2.5.2.2 สารเคมีที่เปลี่ยนโครงสร้างและการเข้าคู่ของเบส มีสารหลายอย่างที่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างและสมบัติการเข้าคู่ของเบส สารที่เข้มข้นที่สุด คือ สารที่ทำให้เกิดดีอะมิเนชันซึ่งแยกเอาหมู่เอมิโนออก นอกจากนั้นการเติมสารบางอย่างเข้าไปที่เบส เช่น เติมหิวไฮดรอกซีเอมิโน และหมู่อัลคิลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นกัน (สาวิตรี, 2549)

สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีโครงสร้างทางเคมี คือ $C_3H_8O_3S$ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มในระดับโมเลกุลหรือยีน โดยการเติมหมู่อัลคิล คือ หมู่เอทิลที่เบสกวานีน ส่งผลให้เบสกวานีนเปลี่ยนเป็น O^6 -ethylguanine (Lodish และคณะ, 2007) ดังภาพที่ 2.3 เมื่อเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ จะทำให้เกิดการจับคู่ของเบสที่ผิดไป คือ เกิดการจับกันระหว่างเบสกวานีนกับเบสไทมีน แทนที่จะเป็นการจับกับเบสไซโตซีน เมื่อเป็นเช่นนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจับคู่ของเบสกวานีนกับเบสไซโตซีนเป็นเบสอะดีนีนกับเบสไทมีน เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่เรียกว่า การทรานซิชัน ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (หทัยรัตน์ และคณะ, 2553) สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตใช้มากสำหรับการเอกซาร์เนเป็นเอกซาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในยีสต์ เนื่องจากเป็นสิ่งก่อการกลายที่มีประสิทธิภาพ โดยพบว่าเหนี่ยวนำการสร้างสายพันธุ์กลายที่ขาดความสามารถในการสร้างสารอาหารบางอย่างที่เรียกว่า ออกโซโทรฟ (auxotroph) ได้ถึงร้อยละ 5 ของสายพันธุ์โพรโทโทรฟ (prototroph) ในสภาวะที่เหมาะสม นอกจากนั้นยังไม่เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์และมิกลืนแรง เวลาใช้เอทิลมีเทนซัลโฟเนตจึงสามารถหลีกเลี่ยงการสัมผัสได้ง่าย ดังนั้นจึงถือว่าสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตมีอันตรายน้อยที่สุดในห้องปฏิบัติการ (Borstel, 1990)



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนเบสกวีนีนเป็น O⁶-ethylguanine
ที่มา : Lodish และคณะ (2007)

2.5.2.3 สารอินเตอร์คาเลตัง ได้แก่ สารพวกอะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) โพรฟลาวิน (proflavin) และเอทิดีนโบรไมด์ (ethidine bromide) มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหลายวงแหวนที่ทำปฏิกิริยากับเบส และแทรกตัวเข้าไประหว่างเบสของดีเอ็นเอเกลียวคู่ ผลของการแทรกนี้เป็นสาเหตุให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่มีการบิดงอไม่เสถียร เมื่อได้ติดตามที่ดีเอ็นเอมีสารอินเตอร์คาเลตังอยู่ระหว่างเบสในระหว่างที่มีการฉายแบบดีเอ็นเอจะมีการเพิ่มและการขจัดหายไปของคู่เบส 1 หรือ 2-3 คู่ เป็นผลให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนไปเกิดการอ่านรหัสที่เคลื่อนไป (สาวตรี, 2549)

Mobini-Dehkordi และคณะ (2008) ทำการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เพื่อให้เชื้อมีความทนทานและสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ทางการค้า พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายนั้นสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าร้อยละ 17.3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และยังสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยสายพันธุ์กลายสามารถทนความเข้มข้นของเอทานอลได้ร้อยละ 13 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และสายพันธุ์ดั้งเดิมทนความเข้มข้นของเอทานอลได้ร้อยละ 12 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

Darvishi และคณะ (2011) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* DSM 3286 ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย C2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 86.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2.5 เท่า โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 34.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.6 การจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์ยีสต์

การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger printing) คือ วิธีการสำหรับการทำให้เกิดรูปแบบที่เป็นเอกลักษณ์ของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต วิธีการเหล่านี้ช่วยในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต (สาวตรี, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกประเภทแบบใดก็ตามที่มีจุดมุ่งหมายในการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตตามบรรพบุรุษซึ่งหมายถึง จัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ คือ การจำแนกประเภทไฟโลเจติกหรือการจำแนกไฟลิติก (Singleton และ Sainsbury, 1988) ปัจจุบันเชื่อว่าการจำแนกประเภทที่เชื่อถือได้ต้องอาศัยพื้นฐานของวิวัฒนาการ และควรพิจารณาความเหมือนหรือต่างของพันธุกรรมด้วย การหาลำดับเบสในดีเอ็นเอสามารถใช้แสดงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการในทุกระดับอนุกรมวิธาน (Kurtzman, 1992)

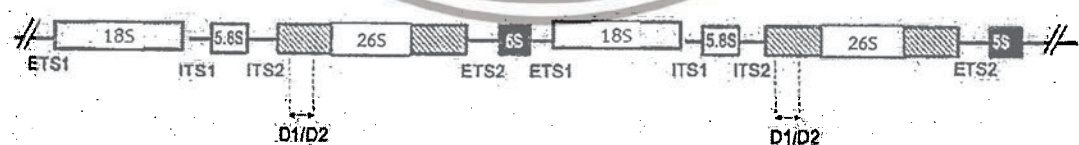
สิ่งที่สำคัญในการใช้ลำดับเบสสำหรับจำแนกประเภทและจัดจำแนกยีสต์ คือ การเลือกที่จะนำบริเวณใดของยีนอมมาหาลำดับเบส เนื่องจากยีนอมของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยส่วนที่มีวิวัฒนาการด้วยอัตราที่ต่างกันมีผลทำให้ความสามารถในการแยกแตกต่างกัน การเปรียบเทียบสำหรับเบสของอาร์เอ็นเอไรโบโซมหรือดีเอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA/ribosomal DNA หรือ rRNA/rDNA) มาใช้สำหรับการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดย Kurtzman และ Sugiyama (2001) ได้ให้เหตุผลที่ใช้ rRNA/rDNA ไว้ ดังนี้

1 ไรโบโซมปรากฏในเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน

2 ไรโบโซมมีหลายชุดในแต่ละเซลล์ โดยทุกชุดมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน

3 ลำดับเบสใน rRNA/rDNA มีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อยที่เรียกว่า บริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่า บริเวณผันแปร (variable region) หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย (less conserved region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณที่ผันแปรได้

สำหรับ rRNA ที่พบในยูคาริโอตมีหลายขนาด คือ 25S-28S rRNA, 18S rRNA และ 5.8S rRNA ทั้งนี้ rRNA ทั้ง 3 ชนิด กำหนดการสร้างโดย rDNA 3 ชนิด ซึ่งเรียงต่อกันซ้ำๆ กัน ดังภาพที่ 2.4 และถอดรหัสเป็นโมเลกุล pre-rRNA 1 โมเลกุล โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase จากนั้นผ่านกระบวนการต่อไปจนได้ mature rDNAs คือ 18S rRNA, 5.8S rRNA และ 25S = (25S-26S) rRNA แยกจากกัน โดยการแยกเอา internal transcribed spacer (ITS) คือ ITS1 และ ITS2 ออกและแยกเอา external transcribed spacer (ETS) ออกจากทั้ง 2 บล็อก นอกจากนั้นยังมียื่นของ 5S rRNA ซึ่งมีการถอดแยกจาก rDNA ของ rRNA 3 โมเลกุลดังกล่าว ส่วนเทคนิคสำหรับการหาลำดับของ rRNA ของทั้งหน่วยย่อยขนาดใหญ่ และหน่วยย่อยขนาดเล็กมักอาศัยวิธีดีดีออกซี (dideoxy) ของ Sanger และคณะ (1977) (อ้างโดย สาวิตรี, 2549)



ภาพที่ 2.4 rRNAs; 18S rRNA, 5.8S rRNA, 26S rRNA, ETS (external transcribed spacer) และ ITS (internal transcribed spacer)

ที่มา : สาวิตรี (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lane และคณะ (1985) ได้อธิบายการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ และ เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส (reverse transcriptase) และการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerrase chain reaction, PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอและหาลำดับเบส โดยลำดับเบสที่ได้จาก PCR มักจะมีความชัดเจนกว่าการใช้เอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทส แต่ Kurtzman (1992) ได้กล่าวว่าการใช้ PCR อาจจะไม่สามารถตรวจความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งจำเพาะได้เท่ากับวิธีรีเวิร์สทรานสคริปเทส เนื่องจาก PCR อาจเพิ่มเฉพาะยีนบางยีนที่กำหนดการสร้าง rRNA เท่านั้น

บริเวณ rRNA ของยีสต์ที่มีการนำมาหาลำดับเบสประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ คือ 5S rRNA มีขนาดเล็กโดยในยีสต์มีขนาดเพียง 120 นิวคลีโอไทด์ ทำให้การหาลำดับเบสง่าย เดิมใช้สำหรับการประเมินความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการกว้างๆ เช่น วิเคราะห์ไฟโลจีนีในระดับอาณาจักร 18S rRNA ของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมของยีสต์มีขนาด 1,800 นิวคลีโอไทด์ และของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซม คือ 26S rRNA มีขนาด 3,200 นิวคลีโอไทด์ จึงสามารถแสดงความแตกต่างมากกว่า 5.8S rRNA และ 5S rRNA โดย 18S rRNA นั้นมีขนาดใหญ่พอที่จะใช้เพื่อแยกยีสต์ทั้งชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดและที่มีความสัมพันธ์ห่างกัน เนื่องจากมีบริเวณต่างๆ ที่มีระดับการอนุรักษ์ที่แตกต่างกัน (สวัตตีรี, 2549) การหาลำดับเบสของ 25S-28S rRNA เริ่มพร้อมๆ กับ 18S rRNA มีหลายบริเวณที่ใช้ เช่น บริเวณ 25S-635 (ที่รู้จักในชื่อ D2, V3, B หรือ 25S-นิวคลีโอไทด์ 4932-622) บริเวณ 25S-1841 (ซึ่งชื่ออื่น คือ 25S-นิวคลีโอไทด์ 1611-1835) และบริเวณ D1/D2 เนื่องจากเป็นบริเวณที่รู้ว่ามี การผันแปร สำหรับบริเวณ 25S-1841 นั้นภายหลังพิสูจน์ได้ว่ามีประโยชน์น้อยสำหรับการแยกสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากๆ ยกเว้นว่าจะใช้ร่วมกับบริเวณอื่น อย่างไรก็ตามยังมีผู้ใช้เพื่อวิเคราะห์สกุลของยีสต์ ส่วนบริเวณ 25S-635 หรือ D2 มีขนาด 300 นิวคลีโอไทด์ สามารถใช้แยกสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมากๆ และในบรรดาสายพันธุ์สปีชีส์เดียวกัน มักมีการเติมนิวคลีโอไทด์บริเวณ D2 ไม่เกินร้อยละ 1 โดยถ้าสายพันธุ์มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์มากกว่านี้จะเป็นสมาชิกของต่างสปีชีส์ (Peterson และ Kurtzman, 1991) ส่วนบริเวณ D1/D2 26S rDNA ที่มีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ 26S rDNA ซึ่งใน *S. cerevisiae* คือ นิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 ของยีนของ rRNA เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับเบสของ 26S rDNA ความแตกต่างในบริเวณนี้เพียงพอที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ (Kurtzman และ Robnett, 1998)

Kurtzman และ Robnett (1998) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ที่สร้างแอสโคสเปอร์ 500 สปีชีส์ รวมทั้ง *Candida* และสกุลที่มีเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำบริเวณ D1/D2 มาเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG) และ NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G) โดยทำ PCR 36 รอบที่ 52 องศาเซลเซียส สำหรับ annealing และการขยายยาวใช้ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และการทำให้เสียสภาพใช้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gene clean II หาลำดับเบสทั้งสองสายของ rDNA โดย ABI Tag Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยาการหาลำดับของเบส 4 ปฏิกิริยา โดยไพรเมอร์ของปฏิกิริยาเหล่านี้ประกอบด้วยไพรเมอร์ด้านนอก (external primer) คือ NL-1 และ NL-4 กับไพรเมอร์ด้านใน 2 ชนิด คือ NL-2A (5'-CTT GTT GGC TAT CGG TCT C) และ NL-3A (5'-GAG ACC GAT AGC GAA CAA G) จากผลการวิเคราะห์ พบว่าสายพันธุ์ในสปีชีส์ส่วนใหญ่มีการผันแปร 0- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตามมีสายพันธุ์ของ 3 สปีชีส์ ที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ ส่วนสายพันธุ์ที่มีเมติงไทป์ของ *Metschnikowia agaves* แตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ สำหรับ *Wiliopsis californica* ที่ตรวจสอบพบ 17 สายพันธุ์ มีความแตกต่าง 0-6 นิวคลีโอไทด์ ส่วน 3 สายพันธุ์ ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 5-6 นิวคลีโอไทด์ นั้นเป็นการหายไปของเบสที่ติดกัน (base contiguous deletion) มากกว่าการแทนที่เบส (base substitution) นอกจากนี้ยังได้ทำการหาความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส พบว่าคู่สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสต่ำกว่าร้อยละ 30 มักจะมีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ และจัดว่าเป็นคนละสปีชีส์ การผันแปรที่เห็นได้จากการเปรียบเทียบข้างต้นใช้ทำนายว่า ถ้าสายพันธุ์มีการแทนที่เบสมากกว่าร้อยละ 1 ใน 600 นิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ D1/D2 คือ เบสต่างกัน 6 เบส สายพันธุ์นั้นจะถูกจัดเป็นคนละสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ จัดเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก

2.7 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่ได้จากสารชีวมวล เช่น น้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ รวมถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วนำมาแปรรูป โดยผ่านกระบวนการที่ทำให้โมเลกุลมีขนาดเล็กลงเพื่อลดความหนืดของไตรกลีเซอไรด์ และสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงกับยานพาหนะได้ โดยทั่วไปมีองค์ประกอบที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล (Gerpen, 2005) ซึ่งไบโอดีเซลเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์จากพืชหรือสัตว์กับแอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้น โดยต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งส่วนมากแอลกอฮอล์ที่นำมาใช้จะเป็นแอลกอฮอล์สายที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้น ได้แก่ เมทานอลหรือเอทานอล จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ตามสารตั้งต้นที่ใช้ ซึ่งเรียกโดยรวมว่า ไบโอดีเซล (พิสมัย และลลิตา, 2549)

2.7.1 คุณสมบัติ และคุณภาพของไบโอดีเซล

น้ำมันไบโอดีเซลบริสุทธิ์ (B100) ที่จะนำไปใช้โดยตรงในเครื่องยนต์ที่มีการดัดแปลงหรือใช้ผสมกับน้ำมันดีเซลที่อัตราส่วนต่างๆ นั้น จะต้องมีคุณสมบัติเป็นไปตามมาตรฐานไบโอดีเซลที่กำหนดไว้ เช่น มาตรฐานไบโอดีเซล ASTM D 6751-03 ของสหรัฐอเมริกา และมาตรฐาน EN 14214 : 2003 ของยุโรป เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของไบโอดีเซลและไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อเครื่องยนต์ (พิสมัย และลลิตา, 2549) สำหรับประเทศไทย กรมธุรกิจพลังงานได้มีประกาศกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ในปี พ.ศ. 2548 ดังตารางที่ 2.3 เพื่อประโยชน์ในการกำกับดูแลคุณภาพของไบโอดีเซลสำหรับนำมาใช้ผสมน้ำมันดีเซล และสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค และกรมธุรกิจพลังงานได้กำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลสำหรับการเกษตร (ไบโอดีเซลชุมชน) ในปี พ.ศ. 2549 ดังตารางที่ 2.4 เพื่อเป็นการส่งเสริมและสนับสนุนให้ชุมชนได้มีการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์การเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน
พ.ศ. 2548 ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน

รายการข้อกำหนด	หน่วยที่วัด	อัตราสูงต่ำ	วิธีทดสอบ
1. เมทิลเอสเทอร์	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≥96.5	EN 14103
2. ความหนาแน่น ณ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส	กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร	860-900	ASTM D 1298
3. ความหนืด ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	เซนติสโตกส์	3.5-5.0	ASTM D 445
4. จุดวาบไฟ	องศาเซลเซียส	≥120	ASTM D 93
5. กำมะถัน	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.0010	ASTM D 2622
6. คากถ่าน	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.30	ASTM D 4530
7. จำนวนซีเทน	-	≥51	ASTM D 613
8. เถ้าซัลเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.02	ASTM D 874
9. น้ำ	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.05	ASTM D 2709
10. สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.0024	ASTM D 5452
11. การกัดกร่อนแผ่นทองแดง	-	≤1	ASTM D 130
12. การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ณ 110 องศาเซลเซียส	ชั่วโมง	≥6	EN 14112
13. ค่ากรด	มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อกรัม	≤0.5	ASTM D 664
14. ค่าไอโอดีน	กรัมไอโอดีนต่อ 100 กรัม	≤120	EN 14111
15. กรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเทอร์	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤12.0	EN 14103
16. เมทานอล	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.2	EN 14110
17. โมโนกลีเซอไรด์	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.8	EN 14105
18. ไดกลีเซอไรด์	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.2	EN 14105
19. ไตรกลีเซอไรด์	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.2	EN 14105
20. กลีเซอรินอิสระ	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.02	EN 14105
21. กลีเซอรินทั้งหมด	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.25	EN 14105
22. โลหะกลุ่ม 1 (โซเดียม และโพแทสเซียม)	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	≤5.0	EN 14108 และ EN 14109
โลหะกลุ่ม 2 (แคลเซียม และแมกนีเซียม)	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	≤5.0	prEN 14538
23. ฟอสฟอรัส	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.001	ASTM D 4951
24. สารเติมแต่ง (ถ้ามี)	เป็นไปตามความเห็นชอบจากอธิบดีกรมธุรกิจพลังงาน		

ที่มา : กรมธุรกิจพลังงาน (2548)

ตารางที่ 2.4 ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์การเกษตร
(ไบโอดีเซลชุมชน) พ.ศ. 2549 ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน

รายการข้อกำหนด	หน่วยที่วัด	อัตราสูงต่ำ	วิธีทดสอบ
1. ความหนาแน่น ณ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส	กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร	860-900	ASTM D 1298
2. ความหนืด ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	เซนติสโตกส์	1.9-8.0	ASTM D 445
3. จุดวาบไฟ	องศาเซลเซียส	≥120	ASTM D 93
4. กำมะถัน	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.0015	ASTM D 2622
5. จำนวนซีเทน	-	≥47	ASTM D 613
6. เถ้าซิลเฟต	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.02	ASTM D 874
7. น้ำและตะกอน	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.2	ASTM D 2709
8. การกัดกร่อนแผ่นทองแดง	-	≤3	ASTM D 130
9. ค่ากรด	มิลลิกรัมโพแทสเซียมต่อกรัม	≤0.8	ASTM D 664
10. กลีเซอรินอิสระ	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.02	ASTM D 6584
11. กลีเซอรินทั้งหมด	ร้อยละโดยน้ำหนัก	≤0.25	ASTM D 6584
12. สี	ม่วง		ตรวจพิจารณาด้วยสายตา
13. สารเติมแต่ง (ถ้ามี)	เป็นไปตามความเห็นชอบจากอธิบดีกรมธุรกิจพลังงาน		

ที่มา : กรมธุรกิจพลังงาน (2549)

2.7.2 เทคนิคการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการผลิตไบโอดีเซลโดยทั่วไปที่ใช้ในปัจจุบันมีทั้งที่เป็นแบบที่ง่ายและยาก โดยแบบง่ายที่ใช้ เช่น การผสมโดยตรง และจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน และแบบยากที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบัน คือ การทำปฏิกิริยากับเมทานอลที่สภาวะเหนือวิกฤต โดยกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถแบ่งได้ ดังนี้ (Ma และ Hanna, 1999; Demirbas, 2002)

2.7.2.1 การใช้โดยตรง และการผสม (direct use and blending)

การใช้โดยตรง คือ น้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชแท้ๆ เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันหมู ซึ่งสามารถนำเอามาใช้ได้เลยกับเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ต้องผสมสารเคมีอื่น หรือไม่ต้องนำมาเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำมัน (Ma และ Hanna, 1999) การใช้แบบผสม คือ เป็นการผสมระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล หรืออื่นๆ เพื่อให้ไบโอดีเซลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด เช่น โคโคดีเซลที่ประจวบคีรีขันธ์ซึ่งเป็นการผสมระหว่างน้ำมันมะพร้าวกับน้ำมันก๊าดหรือที่เรียกว่า ปาล์มดีเซล (กองบรรณาธิการเทคนิคเครื่องกลไฟฟ้าอุตสาหกรรม, 2548) แต่มีข้อเสีย คือ อาจเกิดปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว แม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถใช้งานได้กับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูง มีปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและพอลิเมอไรเซชันในระหว่างการเก็บรักษา และยางเหนียว ทำให้เกิดการอุดตันในระบบหัวฉีดของเครื่องยนต์ได้ (Fukuda และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2.2 ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)

ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่กระจายตัวในสภาวะสมดุลโดยมีอนุภาคในคอลลอยด์ส่วนมากอยู่ในช่วงขนาด 1-150 นาโนเมตร ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาค่าความหนืดสูงในน้ำมันพืช ให้มีค่าความหนืดลดลง โดยใช้ควบคู่กับตัวทำละลาย เช่น เมทานอล เอทานอล และ 1-บิวทานอล (Srivastava และ Prasad, 2000) ไมโครอิมัลชันที่เกิดจากเมทานอลกับน้ำมันพืชจะได้ น้ำมันที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล แต่มีข้อเสีย คือ เมื่อนำมาทดสอบกับเครื่องยนต์ พบว่าการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เกิดการสะสมตัวของคราบ ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอนเกาะรอบๆ หัวฉีดและวาล์วของเครื่องยนต์ (Ma และ Hanna, 1999)

2.7.2.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis)

กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน เป็นกระบวนการเปลี่ยนจากสารประกอบหนึ่งชนิดไปเป็นสารประกอบอื่นๆ มากกว่าหนึ่งชนิด โดยใช้ความร้อนหรือใช้ความร้อนร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้จะต้องจำกัดปริมาณอากาศหรือออกซิเจนที่ใช้ในกระบวนการด้วย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการประมาณ 450-600 องศาเซลเซียส สารประกอบที่ผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะถูกทำให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งข้อเสียของกระบวนการนี้ คือ การกำหนดหรือควบคุมให้ผลผลิตตามที่ต้องการนั้นทำได้ยาก เนื่องด้วยความหลากหลายทางปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ นอกจากนี้กระบวนการนี้มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนแก๊สซิแลนมากกว่าไบโอดีเซล (Ma และ Hanna, 1999)

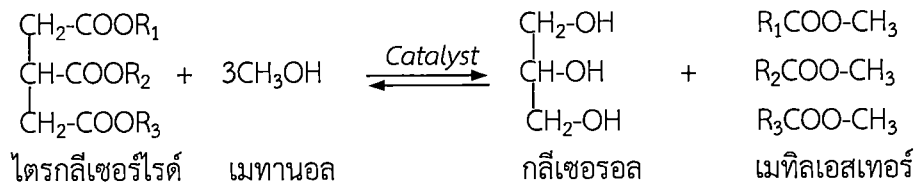
2.7.2.4 การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต (supercritical methanol)

การทำปฏิกิริยากับเมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤต เป็นกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา จะเกิดขึ้นโดยเมทานอลและน้ำมันวัตถุดิบจะผสมกันจนเป็นเนื้อเดียวกัน (single homogeneous phase) แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง (อมรรรัตน์ และ สมใจ, 2556) โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย พร้อมทั้งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม กล่าวคือ ไม่มีของเสียจากกระบวนการ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะต้องใช้อุณหภูมิและความดันในระดับที่ค่อนข้างสูงประมาณ 512.2 เคลวิน และ 8.1 เมกะปาสกาล ตามลำดับ เพื่อต้องทำให้เมทานอลอยู่ในสภาวะเหนือจุดวิกฤต (Demirbas, 2002) คือ สภาวะที่มีสมบัติร่วมกันระหว่างของเหลวและก๊าซ มีความหนาแน่นคล้ายของเหลว จึงมีความสามารถในการละลายสารต่างๆ ได้ และมีสมบัติการไหลเหมือนก๊าซ จึงทำให้ซึมผ่านสารต่างๆ ได้ดี

2.7.2.5 ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ (transesterification หรือ methanolysis)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้เร็วขึ้น (Agarwal, 2006) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยแบบผันกลับได้ 3 ขั้นตอน คือ เริ่มจากไตรกลีเซอไรด์เปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ ตามลำดับ สุดท้ายได้เป็นเอสเทอร์กับกลีเซอรอล จากกลไกพบว่าแต่ละขั้นตอนย่อยจะได้ 1 โมลของเอสเทอร์ การเติมแอลกอฮอล์มากเกินไปจะยิ่งเป็นการบังคับปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ สัดส่วนโดยโมลของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน คือ 3:1 หรืออาจมากกว่าเพื่อให้สมดุลเปลี่ยนไปในทางให้ผลผลิตของเอสเทอร์มากที่สุด (Meher และคณะ, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2006) ดังภาพที่ 2.5 ซึ่งตัวเร่งที่ใช้ในปฏิกิริยามีทั้งกรด เบส และเอนไซม์ไลเปส ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นที่สุด และเป็นของเหลวที่มีขี้สูง เช่น เมทานอลและเอทานอล ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้มากที่สุด (Ma และ Hanna, 1999)



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมทานอล
ที่มา : Meher และคณะ (2006)

2.7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.7.3.1 ผลของปริมาณน้ำ

น้ำมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งในด้านการรักษาธรรมชาติของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างสามมิติบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ไลเปสจะมีสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ทำหน้าที่เป็นฝาปิดทรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้ซึ่งทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้ โดยสายพอลิเปปไทด์นี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขี้ (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่ และขดตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (α -helical lid) โดยฝาปิดนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ อีกทั้งน้ำจะเข้าร่วมทั้งโดยตรงและโดยอ้อมกับพันธะต่างๆ ของเอนไซม์ เช่น ไฮโดรฟอบิกอินเตอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der waal interaction) การกำจัดน้ำออกจากระบบโดยสิ้นเชิงจะทำให้เกิดการบิดทำลายโครงสร้างของเอนไซม์อย่างรุนแรง อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) และไม่สามารถทำงานได้ (Klibanov, 1986)

Kaieda และคณะ (1999) ทำการศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สารตั้งต้นระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล ในอัตราส่วนโดยโมล 1:1 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *R. oryzae* 210 ยูนิต เติมน้ำให้ได้สารละลายเอนไซม์ 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.4, 3.0, 6.0 และ 9.0 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ 1.2-9.0 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำร้อยละ 4-30 ของสารตั้งต้น) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 80-90 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

Shimada และคณะ (2002) ทำการศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองกับเมล็ดเรปและเอทานอล และใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปจากเชื้อยีสต์ *C. antarctica* 0.4 กรัม ทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้สารตั้งต้น 10 กรัม เติมน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเติมน้ำปริมาณมากขึ้นค่าร้อยละผลผลิตจะลดลง

Kamini และ Lefuji (2001) ทำการศึกษาผลของปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *Cryptococcus* spp. ใช้สารตั้งต้นระหว่างเมทานอลและน้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วนโดยโมล เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4:1 และใช้ปริมาณน้ำร้อยละ 20-200 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มน้ำร้อยละ 80-100 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 62.6-66.4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากกว่าร้อยละ 100 ค่าเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จะลดลง

2.7.3.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับ ดังนั้น แอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องใช้ในปริมาณที่มากเกินไปเพื่อที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางขวามากขึ้น ซึ่งก็จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นเช่นกัน สัดส่วนที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 3 โมล ของแอลกอฮอล์ ต่อ 1 โมล ของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นยิ่งใช้อัตราส่วนมากเท่าไรก็จะทำให้ได้เอสเทอร์มากขึ้นเท่านั้น และภายในเวลาที่สั้นลงด้วย (Agarwal, 2006) อัตราส่วนโดยโมล 6:1 เป็นที่นิยมใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม พบว่าได้เมทิลเอสเทอร์มากกว่าร้อยละ 98 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) (Fukuda และคณะ, 2001) แต่ทั้งนี้ถ้าเมทานอลมีปริมาณมากเกินไป อาจจะไปทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ จึงต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม

Kamini และ Lefuji (2001) ทำการศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันรำข้าว โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1, 3:1, 4:1 และ 6:1 และใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *Cryptococcus* spp. ปริมาณน้ำร้อยละ 80 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) พบว่าที่เวลา 120 ชั่วโมง เมื่อใช้สารตั้งต้นระหว่างเมทานอลและน้ำมันรำข้าว อัตราส่วนโดยโมล 4:1 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึงร้อยละ 79.7 และเมื่อใช้สารตั้งต้นระหว่างเมทานอลและน้ำมันรำข้าว อัตราส่วนโดยโมลเป็น 6:1 จะผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ต่ำ เนื่องจากปริมาณเมทานอลสูงเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

Kose และคณะ (2002) ทำการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อยีสต์ *C. antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยศึกษาอัตราส่วนโดยโมล 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 พบว่าอัตราส่วนโดยโมล 4:1 จะทำให้ได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 87.4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และอัตราส่วนโดยโมล 1:1 จะได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์น้อยที่สุดร้อยละ 29.9 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

Soumanou และ Bornscheuer (2003) ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของเมทานอลและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยได้ศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งจากเอนไซม์ไลเปสสกัดหยาบ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* พบว่าได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงสุดมากกว่าร้อยละ 90 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ที่อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4.5:1 ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง แต่ถ้าอัตราส่วนเมทานอลสูงกว่านี้จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน จึงได้ทำการทดลองเพื่อลดผลของเมทานอลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ โดยวิธีการเติมเป็นขั้นทั้งหมด 3 ขั้น พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้

2.7.3.3 ผลของตัวเร่งปฏิกิริยา

การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด คือ กรด เบส และเอนไซม์ การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัด คือ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ ปฏิกิริยาที่เกิดไม่รุนแรง สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำ ไม่มีของเสียออกมา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการดำเนินงานไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกระบวนการ แต่การผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสต้องใช้ต้นทุนสูง (Marchetti และคณะ, 2007) โดยตารางที่ 2.5 แสดงการเปรียบเทียบข้อแตกต่างของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กรด และเอนไซม์

ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารตั้งต้น โดยในปฏิกิริยาจะต้องมีมากพอที่จะสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ให้ได้มากที่สุด และไม่เกินความจำเป็น ทั้งนี้หากมีสัดส่วนของปริมาณเอนไซม์และสารตั้งต้นที่ไม่เหมาะสม ปริมาณสารตั้งต้นที่มากกว่าจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์บางส่วนเสียสภาพ และถ้ามีปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปก็อาจทำให้ระบบมีความหนืดสูง ทำให้ได้ผลผลิตลดลง (เอ็ม, 2555)

Noureddini และคณะ (2005) ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลของน้ำมันถั่วเหลืองผสมเมทานอลและเอทานอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า Lipase PS จากเชื้อแบคทีเรีย *P. cepacia* ซึ่งใช้เป็นเอนไซม์ไลเปสอิสระปริมาณ 0-700 มิลลิกรัม และเอนไซม์ไลเปสตรังรูปปริมาณ 0-35 กรัม พบว่าปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ในปริมาณที่มากขึ้น แต่เมื่อถึงจุดที่มีปริมาณเอนไซม์สูงมากพอลกลับพบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์มีผลต่อร้อยละของผลผลิตค่อนข้างคงที่โดยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันทั้งการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรังรูป

ตารางที่ 2.5 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด กรด เบส และเอนไซม์

ตัวแปร	ตัวเร่งชนิดกรด	ตัวเร่งชนิดเบส	เอนไซม์ไลเปส
1. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	55-80	60-70	30-40
2. กรดไขมันอิสระ	เกิดเอสเทอร์	เกิดสบู่	เกิดเอสเทอร์
3. น้ำในน้ำมัน	มีผลกระทบต่อการศึกษา เกิดปฏิกิริยา	มีผลกระทบต่อการศึกษา เกิดปฏิกิริยา	ไม่มีผลกระทบต่อการศึกษา เกิดปฏิกิริยา
4. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง
5. การ recovery กลีเซอรอล	ยาก	ยาก	ง่าย
6. การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ทำการชะล้าง	ทำการชะล้าง	ไม่ต้องล้าง
7. ราคา	ถูก	ถูก	ค่อนข้างแพง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Marchetti และคณะ (2007)

2.7.3.4 ผลของเวลา และอุณหภูมิการทำปฏิกิริยา

อัตราการเกิดไบโอดีเซลจะแปรผันโดยตรงกับเวลา คือ ถ้าเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณเอสเทอร์มากขึ้นเช่นกัน (Meher และคณะ, 2006) แต่ทั้งนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นในระยะแรกของปฏิกิริยา และจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากจะเกิดปฏิกิริยาการผันกลับทำให้เกิดผลิตภัณฑ์น้อยลง ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมจึงจำเป็นในการผลิตไบโอดีเซล

อุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่างๆ จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมিরะหว่าง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส (Nie และคณะ, 2006) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นถูกกำหนดโดยการรักษาสมดุลระหว่างเสถียรภาพของเอนไซม์และอัตราเร็วของปฏิกิริยา แต่หากมองในเชิงพาณิชย์แล้วกระบวนการที่ดีที่สุดในการผลิตต้องใช้เอนไซม์ที่ต่ำที่สุดแต่สามารถทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดภายในเวลาสั้นที่สุด

Shimada และคณะ (2002) ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันถั่วเหลืองและเมล็ดเรป โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C. antarctica* ใช้อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน 1:1 ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ร้อยละของการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดหลังทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Nouredini และคณะ (2005) ทำการศึกษาการทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *P. cepacia* ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจะอยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส และการผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส

Salis และคณะ (2005) ทำการศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไตรโอเลอิน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดร้อยละ 100 ที่เวลา 4 ชั่วโมง และผลผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.8 โครมาโตกราฟี (chromatography)

โครมาโตกราฟีเป็นวิธีแยกสารที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในเฟสคงที่ (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน สารต่างชนิดกันจึงเดินทางผ่านเฟสคงที่ออกมาถึงเฟสเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกัน จึงเกิดการแยกขึ้น (วารินทร์, 2549)

2.8.1 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) (วารินทร์, 2549)

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคการวิเคราะห์คุณภาพเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม สามารถทำได้โดยใช้เฟสคงที่ คือ ซิลิกาหรืออะลูมินา ยึดเหนี่ยวกับซัพพอร์ต เช่น แก้ว อะลูมิเนียม พลาสติกพอลิ เป็นต้น กับเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งโดยทั่วไปสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ จะนิยมใช้กับอะลูมินา และสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน จะนิยมใช้กับซิลิกาเจล เป็นต้น

หลักการของ TLC คือ นำสารตัวอย่างที่ต้องการแยกองค์ประกอบ จุดลงที่ตำแหน่งเหนือขอบด้านหนึ่งของแผ่นเล็กน้อยโดยใช้หลอดแคปิลลารี สามารถจุดสารได้มากกว่า 1 จุด หรืออาจจุดสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบสารตัวอย่างในแผ่นเดียวกันได้ จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปจุ่มลงในภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ ในระดับต่ำกว่าตำแหน่งของสารตัวอย่างที่จุดบนแผ่น เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ ก็จะทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปบนเพลตด้วย และเนื่องจากองค์ประกอบแต่ละชนิดในสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วไม่เท่ากัน จึงทำให้สามารถแยกองค์ประกอบเหล่านั้นจากกันได้ ได้เป็นโครมาโตแกรม (chromatogram) ของสารที่เกิดการแยก ดังภาพที่ 2.6 ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันเป็นเฟสเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟสเคลื่อนที่ แต่ถูกดูดซับด้วยเฟสคงที่ได้น้อยจึงเคลื่อนที่ไปได้ดีด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้น้อย แต่ดูดซับบนเฟสคงที่ได้ดี เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยกเทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบ ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี รวมถึงการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย

ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพ โครมาโตแกรมที่ได้จะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละองค์ประกอบ ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานได้ โดยการคำนวณหาค่า retardation factor (R_f factor) โดยจะมีค่าไม่เกิน 1 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับระยะทางของเฟสเคลื่อนที่ที่เคลื่อนที่บนแผ่นกระดาษหรือเพลต TLC สัมพันธ์กับระยะทางขององค์ประกอบที่เคลื่อนที่ไป ดังสมการที่ 2.1

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}} \quad (2.1)$$



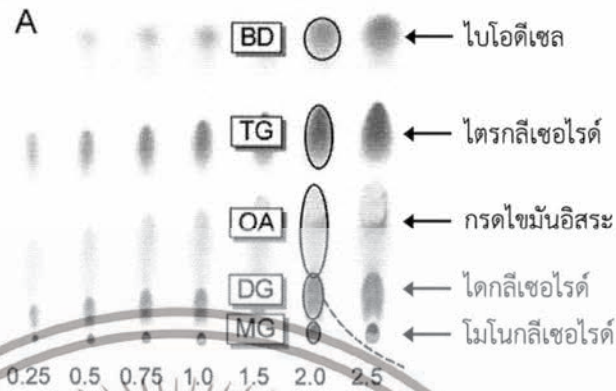
ภาพที่ 2.6 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
ที่มา : วารินทร์ (2549)

Samukawa และคณะ (2000) ทำการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์โดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยการใช้แผ่นเจลซิลิกา 60 F254 ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ใช้ตัวอย่างน้ำมัน 1 ไมโครลิตร จุดบนแผ่น TLC สารละลายที่แช่แผ่น TLC ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก เท่ากับ 90 : 10 : 2 ปริมาตรต่อปริมาตร และใช้สารละลายของกรดซัลฟิวริก : เมทานอล 1:1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก สังเกตเห็นจุดหลังจากการอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Tomasevic และ Marinkovic (2003) ทำการศึกษาการเกิดเมทาโนไลซิสของน้ำมันที่ใช้แล้ว โดยการใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีกับแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลสำหรับการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตจากน้ำมันดอกทานตะวัน ตัวทำละลายที่นำมาใช้ คือ บิโตรเลียมอีเทอร์ ไดเอทิลอีเทอร์ และกรดอะซิติก ใช้ไอโอดีนทำให้เกิดภาพโครมาโตแกรม

Fedosov และคณะ (2011) ทำการวิเคราะห์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเรพซิดและเอทานอล ที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีเพื่อตรวจสอบการเกิดเมทาโนไลซิสของไบโอดีเซลที่ผลิตขึ้น เมื่อผู้ผลิตเห็นประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

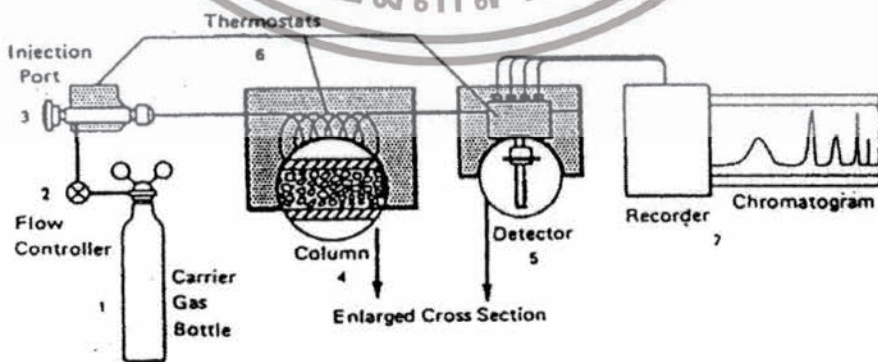
โครมาโตกราฟี ในน้ำมันมีไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ โดย การเกิดแถบของโครมาโตแกรมประกอบไปด้วยแถบแต่ละชั้น คือ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไตรกลีเซอไรด์ และไบโอดีเซล ตามลำดับ ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 วิเคราะห์องค์ประกอบของไบโอดีเซลด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography ที่มา : Fedosov และคณะ (2011)

2.8.2 ก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) (แม้น และอมร, 2539)

ก๊าซโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคสำหรับแยกและวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหย กลายเป็นไอได้ง่าย (volatile compounds) โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้อไอ ของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่หรือ แก๊สตัวพา (carrier gas) องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ และการกระจาย ตัวอย่างผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาที่ต่างกัน ในการวิเคราะห์สารผสม ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ sample injection port สารผสมจะมีการให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูก พาเข้าไปในเครื่องคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนที่ ผ่านคอลัมน์ และถูกตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จากเครื่อง ตรวจวัดจะถูกบันทึก และแสดงออกมาในรูปของโครมาโตแกรม ดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 องค์ประกอบของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ที่มา : แม้น และอมร (2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มัน และอมร (2539) ได้แยกประเภทของก๊าซโครมาโตกราฟีจากเฟสคงที่ได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.8.2.1 ก๊าซของแข็งโครมาโตกราฟี (gas-solid chromatography) วิธีนี้ให้เฟสคงที่เป็นของแข็งที่ดูดซับ (adsorption) และไม่มีสารอื่นเคลือบอยู่ สารที่ต้องการแยกเป็นแก๊ส ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ค่อนข้างแคบ เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็กๆ เท่านั้น ดังนั้นคอลัมน์ที่ใช้มักจะบรรจุด้วย activated solid

2.8.2.2 ก๊าซของเหลวโครมาโตกราฟี (gas-liquid chromatography) สารที่เป็นก๊าซหรือไอของสารที่ผสมกันอยู่ เมื่อผ่านคอลัมน์จะสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยการกระจายตัวที่แตกต่างกันของก๊าซหรือไอระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่มีของเหลว (liquid phase) ฉาบอยู่บนของแข็งหรือมีค่า partition coefficient ต่างกัน วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกสารที่เป็นก๊าซหรือสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นไอหรือก๊าซได้ที่อุณหภูมิที่กำหนด

Yang และคณะ (2009) ทำการวิเคราะห์ที่ไบโอดีเซลโดยใช้เทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีด้วยเครื่อง GC Hewlett Packard 5890 Series ทำการวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ โดยการใช้คอลัมน์ HP 5 (crosslinked PHME Siloxane) ขนาด 0.32 มิลลิเมตร x 30 เมตร และใช้ FID detector อุณหภูมิของคอลัมน์เพิ่มขึ้นจาก 70 องศาเซลเซียส เป็น 300 องศาเซลเซียส ทำการเปรียบเทียบ retention time และพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์ ทำการคำนวณปริมาณทั้งหมดของเมทิลเอสเทอร์

2.9 กระบวนการเลี้ยงเชื้อ

การหมัก คือ กระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมี ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ (สมใจ, 2537) การหมักในอุตสาหกรรมจะมีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์หรือมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้การหมักอาจเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจนเต็มที่หรือเพียงเล็กน้อยหรือปราศจากอากาศ

2.9.1 การหมักแบบอาหารแข็งหรือการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation, SSF)

การหมักแบบอาหารแข็งเป็นกระบวนการหมักบนวัสดุที่เป็นของแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ (Mitchell และคณะ, 1992) เพราะฉะนั้นน้ำที่อยู่ในกระบวนการหมักนี้จึงอยู่ในสภาพของความชื้นที่อยู่ในวัสดุหมัก ส่วนใหญ่เหมาะสำหรับราที่สร้างเส้นใย รวมทั้งยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด (วรารุณี, 2529) โดยถ้าความชื้นในกระบวนการนี้ต่ำกว่าร้อยละ 12 แล้ว จุลินทรีย์จะหยุดการเจริญ (ดุชนิ, 2537) การหมักแบบแข็งนี้วัตถุดิบส่วนใหญ่ ได้แก่ เมล็ดธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง) ไร่ข้าวสาลี วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส (เช่น ไม้ ฟางข้าว) รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร (Smith, 1985; Mudgett, 1986) วัตถุดิบจำพวกนี้ส่วนใหญ่โมเลกุลจะใหญ่จึงไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย และเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่าย มีปริมาณมาก ราคาถูก และมีสารอาหารในปริมาณมาก ในปัจจุบันการหมักแบบนี้ได้มีการประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักต่างๆ เช่น การผลิตเนยแข็ง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ปุ๋ยหมักชีวภาพ รวมถึงการผลิตเอนไซม์ เป็นต้น (ศิริวรรณ, 2551)

2.9.1.1 ลักษณะของการกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

Hesseltine (1977) ได้แบ่งลักษณะโดยทั่วไปของการหมักแบบอาหารแข็งไว้ ดังนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งมักนิยมเป็นพวกวัตถุประสงค์ทางการเกษตร เช่น ธัญพืช ถั่ว ซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง

2 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ต้องมีขนาดเหมาะสมเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างอนุภาคของวัตถุประสงค์เพียงพอให้อากาศถ่ายเทดี

3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ ได้แก่ น้ำ นอกจากนี้จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจนหรือเกลือแร่ เป็นต้น

4 การปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เนื่องจากความชื้นต่ำไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย

5 จำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินไป เพราะจะทำให้จุลินทรีย์ตายได้ เนื่องมาจากความร้อนสะสมอยู่มากในการกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง และอาจต้องควบคุมปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

2.9.1.2 ปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักแบบอาหารแข็ง Martin และคณะ (1993) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการหมักแบบอาหารแข็งไว้ ดังนี้

1 ความชื้นต้องมีปริมาณเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตเมแทบอลิท์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

2 อุณหภูมิระหว่างการหมักจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ หากมีความร้อนสะสมเนื่องจากขาดการระบายความร้อนที่ดีพอ จะทำให้เกิดการระเหยของน้ำ และอาจทำให้จุลินทรีย์ตายได้ โดยทั่วไปการหมักแบบอาหารแข็งมักจะรักษาระดับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 25-32 องศาเซลเซียส

3 ค่าความเป็นกรด ด่าง เป็นปัจจัยที่ควบคุมและติดตามได้ยาก

4 การถ่ายเทอากาศ เพื่อรักษาระดับปริมาณออกซิเจนและลดระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ยังเป็นการรักษาระดับอุณหภูมิ และรักษาระดับความชื้นอีกด้วย

5 การกวนผสม เพื่อกระจายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ให้ผสมกับอาหารได้อย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังเป็นการให้อากาศอีกด้วย

2.9.1.3 ข้อดีและข้อเสียของการหมักแบบอาหารแข็ง Cannel และ Moo-Young (1980) ได้สรุปข้อดีและข้อเสียของการหมักแบบอาหารแข็งไว้ ดังนี้

ข้อดีของการหมักแบบอาหารแข็ง

1 อาหารเลี้ยงเชื้อมีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากน้อยกว่าอาหารเหลว

2 ต้องการพื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มาก

3 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยากและไม่แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

4 อาหารที่ใช้ในกระบวนการมีปริมาณความชื้นต่ำ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้โดยเฉพาะแบคทีเรีย

5 สภาพการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น รา มีลักษณะคล้ายกับที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้เชื่อต้องการระยะเวลาในการปรับตัว (lag phase) สั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6 อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอนุภาคอาหารและอนุภาคจุลินทรีย์ได้อย่างสะดวก

7 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสามารถนำมาสกัดออกจากวัสดุหมักได้ทันที โดยการเติมสารละลายลงไป หรืออาจนำมาเก็บแช่แข็งไว้ก่อนที่จะนำมาสกัด

ข้อเสียของการหมักแบบอาหารแข็ง

1 มีความจำกัดต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ซึ่งจุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำ ทำให้กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ในระบบการหมักแบบอาหารแข็งนี้อยู่ในช่วงที่แคบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรา นอกจากนี้ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และสเตรปโตมัยซิสบางสายพันธุ์เท่านั้น

2 ปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายเทความร้อนหรือมีความร้อนสะสมเกิดขึ้นในขณะทำการหมัก โดยเฉพาะในระบบที่มีขนาดใหญ่

3 เนื่องจากระบบการหมักนี้เป็นการหมักแบบอาหารแข็ง จึงเป็นปัญหาในการวัดค่าตัวแปรของระบบ ดังนั้นการควบคุมและการติดตามผลการผลิต เช่น พีเอช ความชื้น และความเข้มข้นของวัสดุหมักสามารถทำได้ยาก

4 วัตถุประสงค์ทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจต้องนำมาผ่านกระบวนการเพื่อเตรียมสภาพให้เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อน เช่น การทำให้มีขนาดเล็กลงหรือการนำวัตถุดิบไปนึ่งก่อนแทนที่จะใช้วัตถุดิบนั้นในสภาพปกติ

5 ปริมาณเริ่มต้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ อาจต้องมีปริมาณมากจึงจะได้ผลที่ดี ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

2.9.2 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมัก

2.9.2.1 ไร่ข้าว

ไร่ข้าวเป็นผลพลอยได้จากฝักรวงนอกของข้าวกล้องหรือเปลือกของเมล็ดข้าวจากกระบวนการขัดสีข้าวให้ได้ข้าวขาวหรือข้าวสาร โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ไร่ข้าวกล้องหรือไร่หยาบ ซึ่งมีปริมาณน้ำมันน้อยใช้สำหรับการเลี้ยงสัตว์ และไร่ข้าวขาวหรือไร่ละเอียด ซึ่งมีปริมาณน้ำมันประมาณร้อยละ 17.0-22.9 จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมัน (Salunkhe และคณะ, 1992) โดยปกติไร่หยาบที่ได้จะมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 8-9 สำหรับไร่ละเอียดมีปริมาณร้อยละ 2-3 จากปริมาณข้าวเปลือกทั้งหมด ดังนั้นไร่หยาบและไร่ละเอียดมีปริมาณรวมร้อยละ 10 ถือเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากการขัดสีข้าว (Grist, 1959)

Salunkhe และคณะ (1992) ได้กล่าวถึงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของไร่ข้าวไว้ดังนี้

1 คาร์โบไฮเดรต ที่พบมากในไร่ข้าว ได้แก่ แป้ง มีประมาณร้อยละ 16.1 และน้ำตาลอิสระ มีประมาณร้อยละ 6.0-6.5 ดังตารางที่ 2.6 พบมากที่สุด คือ ซูโครส ส่วนกลูโคส และฟรุคโตส พบในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพนโทแซน และลิกนิน อีกด้วย

2 โปรตีน ปริมาณโปรตีนในไร่ข้าวมีประมาณร้อยละ 13.2-17.3 ดังตารางที่ 2.6 ซึ่งประกอบด้วยอัลบูมินร้อยละ 5 โกลบูลินร้อยละ 10 โปรลามินร้อยละ 5 และกลูตินร้อยละ 80

3 ไขมัน พบประมาณร้อยละ 17.0-22.9 ดังตารางที่ 2.6 ไขมันที่พบได้ส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์ พบฟอสโฟลิพิด โกลโคลิพิด และไขมันส่วนน้อย กรดไขมันที่พบมาก ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอเลอิก ลิกโนเลอิก และพาล์มิติก พบประมาณร้อยละ 75-95 และที่พบเล็กน้อย คือ ลิโนเลนิก ประมาณร้อยละ 1-2 สเตียริกร้อยละ 1-2 ไมริสติกร้อยละ 0.1-1 และอะราคิติกร้อยละ 0-1

4 วิตามินที่สำคัญ คือ แอลฟา-โทโคเฟอรอล ซึ่งเป็นสารป้องกันการหมื่นทึน ในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของวิตามินอื่นๆ ดังตารางที่ 2.7

5 แร่ธาตุ พบมากที่สุด คือ ฟอสฟอรัส มีอยู่ประมาณร้อยละ 90 ซึ่งอยู่ในรูปของไฟติน ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบทางเคมีในรำข้าว

องค์ประกอบ	ปริมาณร้อยละ (โดยน้ำหนัก)
โปรตีน	13.2-17.3
ไขมัน	17.0-22.9
เส้นใย	9.5-13.2
แป้ง	16.1
น้ำตาลอิสระ	6.0-6.5
เถ้า	9.2-11.5
คาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่าย	39.6-60.8

ที่มา : Salunkhe และคณะ (1992)

ตารางที่ 2.7 วิตามินและแร่ธาตุในรำข้าว

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
วิตามิน	
ไทอะมีน (Thiamin)	10.1-26.9
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	1.17-3.4
ไนอะซิน (Niacin)	241-590
ไพริดอกซิน (Pyridoxin)	10.3-32.1
ไบโอติน (Biotin)	0.16-0.47
วิตามินเอ (Vitamin A)	4.2
วิตามินอี (Vitamin E)	149.2
แร่ธาตุ	
แคลเซียม (Calcium)	140-1310
ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	14,800-28,680
เหล็ก (Iron)	130-530
แมกนีเซียม (Magnesium)	8650-12,300
โพแทสเซียม (Potassium)	13,650-22,700

ที่มา : Salunkhe และคณะ (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 กากน้ำตาล

กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย สามารถจัดจำแนกเป็น 3 ชนิด ดังนี้ (Paturau, 1982)

1 Blackstrap molasses หรือ Final molasses เป็นผลพลอยได้จากระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 มีลักษณะเป็นของเหลวข้น มีความหนืด และมีสีน้ำตาลเข้ม ได้จากการตกผลึกน้ำตาลครั้งสุดท้ายแล้วนำไปปั่นแยกเอาผลึกซูโครสออก ของเหลวที่เหลือ คือ กากน้ำตาล โดยมีองค์ประกอบหลักดังตารางที่ 2.8 และยังมีองค์ประกอบอย่างหนึ่งที่สำคัญ คือ วิตามิน เช่น ไบโอดีน ไนอะซิน กรดแพนโทธีนิก และไรโบฟลาวิน ดังตารางที่ 2.9 มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์

2 Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 48

3 Highest molasses หรือ Invert molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการนำน้ำอ้อยมาย่อยด้วยกรดแล้วระเหยให้เข้มข้นเป็นน้ำเชื่อม มีปริมาณน้ำตาลประมาณร้อยละ 77 การใช้ highest molasses ค่อนข้างกว้างขวางเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลสูงและมีสารปนเปื้อนต่ำสามารถใช้ทดแทน blackstrap molasses ได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลจากอ้อย

องค์ประกอบ	ร้อยละค่าปกติ (โดยน้ำหนัก)	ร้อยละค่าเฉลี่ย (โดยน้ำหนัก)
น้ำ	17-25	20
น้ำตาลซูโครส	30-40	35
น้ำตาลกลูโคส	4-9	7
น้ำตาลฟรุกโตส	5-12	9
น้ำตาลรีดิซอื่นๆ	1-5	3
คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ	2-5	4
เถ้า	7-15	12
สารประกอบไนโตรเจน	2-6	4.5
กรดที่ไม่ใช่พวกไนโตรเจน	2-8	5
ไซ สเตอร์อล และฟอสโฟลิพิด	0.1-1	0.4
วิตามิน	ปริมาณที่เหลืออื่นๆ	

ที่มา : Paturau (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 วิตามินที่พบในกากน้ำตาลจากอ้อย

วิตามิน	ปริมาณ (ไมโครกรัมต่อกรัม)
ไบโอติน (Biotin)	1-3
โคลีน (Choline)	880
กรดโฟลิก (Folic acid)	0.3-0.4
ไนอะซิน (Niacin)	17-30
กรดแพนโทธีนิก (pantothenic acid)	20-60
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	2-3
ไพริดอกซิน (Pyridoxin)	1-7
ไทอะมีน (Thiamin)	0.6-1.0

ที่มา : Paturau (1982)

มนัสนันท์ (2547) ทำการศึกษาสภาวะการผลิตแคโรทีนอยด์และเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *R. glutinis* DM28 จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าว ที่สภาวะความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 พีเอช 6.2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์และเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในวันที่ 6 โดยมีน้ำหนักเซลล์ 54 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 1.65 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว และมีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.97 ยูนิตต่อกรัมรำข้าว และจะลดลงหลังวันที่ 6 เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ลดลง โดยความชื้น อุณหภูมิ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหาร และค่าพีเอช มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแคโรทีนอยด์ คือ ความชื้นร้อยละ 70 พีเอช 5 อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารเท่ากับ 4 ซึ่งเชื้อยีสต์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากขึ้น 2.12 ไมโครกรัมต่อกรัมรำข้าว และมีน้ำหนักเซลล์ 88.2 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว

ธราธร (2549) ทำการศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา *R. oligosporus* ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวสาลี ทำการเปรียบเทียบความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50, 55 และ 60 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ ร้อยละ 55 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 7.83 ยูนิตต่อน้ำหนักของวัสดุหมักแห้ง ที่เวลา 96 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกวัสดุหมักชนิดต่างๆ ได้แก่ เมล็ดทานตะวัน รำข้าวสาลี ถั่วเหลือง งา ถั่วลิสง รำละเอียด และวัสดุผสมระหว่างรำข้าวสาลีกับงาร้อยละ 75:25 รำข้าวสาลีกับถั่วเหลืองร้อยละ 75:25 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 55 พบว่าวัสดุผสมระหว่างรำข้าวสาลีกับถั่วเหลืองให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 5.42 ยูนิตต่อน้ำหนักของวัสดุหมักแห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบการเติมยูเรียและกลูโคสอัตราส่วน 1.5:8 เป็นเวลา 4 วัน พบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้นไปอีกเท่ากับ 11.24 ยูนิตต่อน้ำหนักของวัสดุหมักแห้ง ที่เวลา 72 ชั่วโมง

Liu และคณะ (2013) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cenocepacia* โดยวิธีการหมักแบบอาหารแข็งโดยเลี้ยงเชื้อบนขานอ้อยและเมล็ดทานตะวัน เพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองในสภาวะที่มีตัวทำละลายเทอร์เทอริบิวทานอล (tert-butanol) ผลผลิตไบโอดีเซลสูงสุดที่ได้ คือ ร้อยละ 86 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ที่เวลา 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ปริมาณ tert-butanol ร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) และปริมาณน้ำร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 การออกแบบการทดลองทางสถิติ

2.10.1 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (ไพโรจน์, 2544)

ปัจจุบันมีความสนใจในการออกแบบเพื่อหาความสอดคล้องกับพื้นที่ของการตอบสนองและประเมินความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง การออกแบบที่เรียกว่า response surface design (RSD) โดยอาศัยแผนภาพคอนทัวร์ (contour plot) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ หลายปัจจัยที่นักวิจัยสนใจซึ่งสามารถหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) และความสัมพันธ์ของปัจจัยได้เมื่อพิจารณาปัจจัยเหล่านั้นพร้อมๆ กัน โดยอาศัยความรู้พื้นฐาน คือ การวางแผนการทดลอง (experimental design) การวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และความรู้ด้านคอมพิวเตอร์และโปรแกรมสำหรับสร้างแผนภาพคอนทัวร์ ซึ่งส่งผลให้สามารถค้นหาการตอบสนองที่เหมาะสมที่สุดได้ การตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตอบสนองที่มากที่สุด (maximum) และการตอบสนองที่ต่ำสุด (minimum) ขึ้นอยู่กับลักษณะของการทดลอง

ในการศึกษาต้องอาศัยการวางแผนการทดลองให้เหมาะสมกับปัจจัยในการศึกษาที่แตกต่างกัน คือ การวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial) การทดลองแบบแฟกทอเรียลบางส่วน (fractional factorial) การทดลองแบบหมุน (rotatable design) การทดลองแบบส่วนประสมกลาง (central composite design, CCD) ทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design) และการทดลองแบบผสม (mixture design) ซึ่งการเลือกใช้การทดลองแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับข้อจำกัดต่างๆ ชนิดของแบบจำลองที่เลือกใช้ และชนิดของตัวแปรต่างๆ ที่ศึกษาในแต่ละการทดลอง การออกแบบพื้นที่การตอบสนองเป็นการแสดงที่เป็นตัวแทนทางเรขาคณิตที่ได้เมื่อผลตอบสนองของตัวแปร (response) ถูกสร้างเป็นฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านั้น ซึ่งใช้แผนภาพคอนทัวร์ในการอธิบายและตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรหรือปัจจัยที่เราศึกษา ซึ่งสามารถหาสูตรหรือสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองได้ ในการทดลองโดยใช้การออกแบบพื้นที่การตอบสนองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการศึกษาใดๆ นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการวางแผนที่ดีตั้งแต่เริ่มต้น คือ การเลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้างแผนภาพคอนทัวร์ สร้างสมการเชิงเส้นที่ดีที่สุด และสามารถนำสมการนั้นไปสร้างเป็นแผนภาพคอนทัวร์ อีกทั้งยังตรวจสอบหาจุดหรือพื้นที่การตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด และสามารถพิสูจน์แบบจำลอง (validation) โดยการทดลองใหม่จากจุดที่เหมาะสมภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว แล้วเปรียบเทียบค่าจากการทดลองและค่าที่ได้จากการคาดคะเนจากสมการได้

2.10.2 แบบจำลองสมการถดถอย (regression model) (ไพโรจน์, 2544)

ความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression relationship) แสดงดังสมการที่ 2.2 ซึ่งเป็นสมการที่เป็นรูปแบบหรือสมการลำดับที่หนึ่ง (first-order model or equation) ส่วนรูปแบบลำดับที่สอง (second-order model) เป็นความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) แสดงดังสมการที่ 2.3 และโดยทั่วไปสัมประสิทธิ์ของสมการที่ 2.2 และ 2.3 จะยังไม่ทราบจึงต้องทำการประมาณการจากผลการทดลอง

นิพจน์ของความคลาดเคลื่อนโดยปกติจะกำหนดให้มีการกระจายตัวเทียบกับค่าเฉลี่ยเป็นศูนย์ และมีค่าความแปรปรวนเป็น σ^2 ความแปรปรวนในเชิงปริมาณของการกระจายตัวของค่าตอบสนองเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างระหว่างจุดต่างๆ ที่ออกแบบกับความคลาดเคลื่อนในการทดลองที่ไม่สามารถควบคุมได้ ความแปรปรวนเนื่องจากความแตกต่างระหว่างจุดต่างๆ ที่ออกแบบสามารถอธิบายโดยฟังก์ชันของการตอบสนองถ้าเกิดทราบความแปรปรวนดังกล่าว แต่โดยปกติฟังก์ชันของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตอบสนองที่เป็นจริงไม่ค่อยทราบมาก่อน ดังนั้นจึงจะต้องประมาณการของค่าดังกล่าว เป็นผลให้การกระจายตัวของความแปรปรวนเกิดความคลาดเคลื่อน แต่เกิดเนื่องจากการทดลองเพียงอย่างเดียว และความสอดคล้องของรูปแบบสมการที่ประมาณการขึ้นมาหรือที่เรียกว่า lack of fit of estimated model ถ้ารูปแบบสมการที่ประมาณขึ้นมา มีความสอดคล้องในการตอบสนองที่กำลังคาดคะเนแล้ว ค่าผลรวมกำลังสอง (sum of square) ของความคลาดเคลื่อน จะเกิดเนื่องจากการคลาดเคลื่อนในการทดลองเท่านั้น เพื่อประเมินความเหมาะสมของรูปแบบสมการที่ประมาณผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนจึงถูกแบ่งเป็น ผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนในการทดลอง และผลรวมกำลังสองอันเนื่องมาจากการขาดความสอดคล้องของรูปแบบสมการ หลักการทางสถิติของกำลังสองน้อยที่สุด (least squares) มีการนำมาใช้ในการประมาณพารามิเตอร์ของฟังก์ชันการตอบสนองของสมการถดถอยที่ตั้งสมมติฐานขึ้น เมื่อสัมประสิทธิ์ของฟังก์ชันการตอบสนองถูกแทนด้วยค่าประมาณผลลัพธ์ของฟังก์ชันการตอบสนองจะสอดคล้องขึ้น ดังสมการที่ 2.4 และ 2.5 ซึ่งเป็นฟังก์ชันการตอบสนองเส้นตรง และเส้นโค้งที่สามารถนำไปใช้ในการคาดคะเนการตอบสนองสำหรับค่าที่ต้องการของตัวแปรอิสระ เมื่อนำฟังก์ชันการตอบสนองมาสร้างกราฟในลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและผลการตอบสนองหรือตัวแปรตามจะได้กราฟพื้นที่ตอบสนอง

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n \quad (2.2)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n + \beta_{11} X_1^2 + \dots + \beta_{nn} X_n^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{n-1, n} X_{n-1} X_n \quad (2.3)$$

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_n X_n \quad (2.4)$$

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_n X_n + b_{11} X_1^2 + \dots + b_{nn} X_n^2 + b_{12} X_1 X_2 + \dots + b_{n-1, n} X_{n-1} X_n \quad (2.5)$$

กำหนดให้

Y คือ ค่าตอบสนองที่สังเกตได้หรือตัวแปรตาม

β_0 คือ จุดตัด (intercept) หรือ grand mean การประมาณการใช้สัญลักษณ์เป็น b_0

β_i คือ ผลเชิงเส้นตรง (linear effect) ของ X_i การประมาณการใช้สัญลักษณ์เป็น b_i

β_{ii} คือ ผลเชิงเส้นโค้ง (quadratic effect) ของ X_i การประมาณการใช้สัญลักษณ์เป็น b_{ii}

β_{ij} คือ ผลของปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction effect) ของ X_i และ X_j การประมาณการใช้สัญลักษณ์เป็น b_{ij} แทน

เมื่อ $i < j$ และ $i = 1, \dots, n-1$ ส่วน $j = 1, \dots, n$

2.10.3 การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่มากกว่า 3 ระดับ การใช้การออกแบบ 3^k แฟกทอเรียล จะ

ให้จำนวนสิ่งทดลองค่อนข้างมาก ซึ่ง Box และ Wilson (1951) ได้คิดค้นการออกแบบการทดลองเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบ CCD ซึ่งช่วยลดปริมาณสิ่งทดลองและข้อเสียจากการออกแบบ 3^k แฟกทอเรียล การออกแบบการทดลองแบบ CCD เริ่มจากการออกแบบการทดลอง 2^k แฟกทอเรียล แต่มีการเพิ่มเติมจุดของการออกแบบการทดลองจำนวน $2k+1$ เพื่อสร้างรูปแบบสมการลำดับที่สองได้ ในการหาจุดที่มีการตอบสนองที่เหมาะสม และการออกแบบการทดลองแบบ CCD ยังสามารถแสดงขั้นตอนการออกแบบ 2^k แฟกทอเรียล และสร้างรูปแบบสมการลำดับที่ 1 ถ้ามีจำนวนปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย จะทำให้มีสิ่งทดลองเท่ากับการออกแบบการทดลองแบบ 2^k แฟกทอเรียล รวมกับจุดเพิ่มเติมทั้งหมด 15 สิ่งทดลอง ตามสมการที่ 2.6 โดยจุดที่ประกอบเป็นทรงลูกบาศก์ ดังภาพที่ 2.9 เป็นการออกแบบการทดลอง 2^k แฟกทอเรียล (factorial point) ส่วนจุดเพิ่มเติมจำนวน $2k+1$ ประกอบด้วยจุดกึ่งกลาง (center point) และจุดที่เหลือนจำนวน $2k$ เป็นจุดที่มีระยะห่าง α จากจุดกึ่งกลาง (axial point) เป็นลักษณะการกระจายตัวเท่าๆ กัน (ไพโรจน์, 2544) และค่า α สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.7 (Mason และคณะ, 2003)

$$N = 2^k + 2k + r \tag{2.6}$$

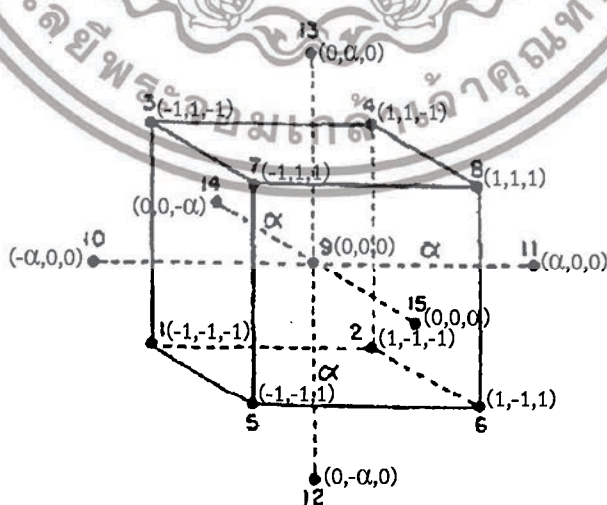
กำหนดให้

- N คือ จำนวนสิ่งทดลอง
- K คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา
- r คือ จำนวนการทดลองซ้ำ

$$\alpha = F^{1/4} \tag{2.7}$$

กำหนดให้

- α คือ ระยะห่างจากจุดศูนย์กลาง
- F คือ จำนวนจุดของการออกแบบการทดลองแบบ 2^k แฟกทอเรียล
- N คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา



ภาพที่ 2.9 แบบจำลองและจุดของจำนวนสิ่งทดลอง เมื่อออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง 3 ปัจจัย

ที่มา : ดัดแปลงจากไพโรจน์ (2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการออกแบบทดลองแบบส่วนประสมกลางที่มีจำนวน 3 ปัจจัย และระดับปัจจัย 3 ระดับ สามารถกำหนดระดับปัจจัยสูงให้มีรหัสเป็น +1 ส่วนปัจจัยที่อยู่ในระดับต่ำให้มีรหัสเป็น -1 และปัจจัยระดับกลางให้มีรหัสเป็น 0 โดยมีค่าเท่ากับจุดกึ่งกลางของผลต่างระหว่างระดับปัจจัยสูงและระดับปัจจัยต่ำ ดังตารางที่ 2.10 (Mason และคณะ, 2003)

Li และคณะ (2007) ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้การตรึงเซลล์จากเชื้อรา *R. oryzae* IFO4697 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในระบบที่มีตัวทำละลาย tert-butanol ด้วยวิธีพื้นที่การตอบสนอง โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD ทำการศึกษา 4 ปัจจัย คือ อัตราส่วน tert-butanol ต่อน้ำมัน ปริมาณเมทานอล ปริมาณน้ำ และปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ พบว่าปริมาณ tert-butanol ต่อน้ำมัน 1:1.6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 5.2:1 ปริมาณน้ำร้อยละ 3.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพร้อยละ 12 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ได้เมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 72 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

Yücel (2012) ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไบโอดีเซลจากกากน้ำมันโดยใช้เชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ที่ตรึงเซลล์บนโพลีกลูตารัลดีไฮด์ (polyglutaraldehyde) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD ทำการศึกษา 4 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ อัตราส่วนโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ และเวลาการเกิดปฏิกิริยา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 5.3:1 ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาร้อยละ 5.8 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเวลาการปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ได้เมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 91.81 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 93.73 เมื่อเติมปริมาณน้ำร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ตารางที่ 2.10 รหัสของระดับปัจจัยที่ออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

สิ่งทดลอง	รหัสของระดับปัจจัย			ชื่อของจุด
	ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่ 2	ปัจจัยที่ 3	
1	-1	-1	-1	factorial point
2	-1	-1	+1	factorial point
3	-1	+1	-1	factorial point
4	-1	+1	+1	factorial point
5	+1	-1	-1	factorial point
6	+1	-1	+1	factorial point
7	+1	+1	-1	factorial point
8	+1	+1	+1	factorial point
9	-1.682	0	0	axial point
10	+1.682	0	0	axial point
11	0	-1.682	0	axial point
12	0	+1.682	0	axial point
13	0	0	-1.682	axial point
14	0	0	+1.682	axial point
15	0	0	0	central point

ที่มา : Mason และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชุตินา (2550) ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริเฟเคชันเพื่อการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มและเมทานอล ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *S. warneri* เชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และเชื้อรา *Fusarium salani* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.124, 0.33, 0.78 และ 0.102 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 21.59, 32.21, 59.46 และ 23.98 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์กลาย สามารถเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลได้ดีที่สุด และได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า

ธนภฤต (2556) ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน และน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน โดยการใช้อาหารแข็งไตรบิวทิรินในการคัดเลือก และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมของไลเปสสูง 3 สายพันธุ์ คือ KKU-PH2-15, KKU-PH1-18 และ KKU-SC22 โดยยีสต์สายพันธุ์ KKU-PH2-15 มีกิจกรรมของไลเปสสูงสุด คือ 1.028 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่มีเอทานอลปริมาณสูง ซึ่งเป็นผลดีเหมาะสมในการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริเฟเคชันสำหรับการผลิตไบโอดีเซล และเมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA ของยีสต์สายพันธุ์ KKU-PH 2-15 เทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าเป็นเชื้อยีสต์ในสกุล *Candida* sp. และการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ *Candida* sp. KKU-PH2-15 พบว่าเชื้อยีสต์มีการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำมันปาล์มเป็นตัวกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่พีเอชเริ่มต้น 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 18.17 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของไลเปส 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะ 0.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

Dalmau และคณะ (2000) ทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ *C. rugosa* พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนทั้งประเภทคาร์โบไฮเดรต และแหล่งคาร์บอนประเภทกรดไขมัน จะส่งผลให้เชื้อยีสต์มีอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่าการมีแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งเท่านั้น

Kamini และคณะ (2000) ทำการทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ของเชื้อ: *Cryptococcus* sp. ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมและการเก็บรักษาเอนไซม์ โดยใช้อาหารแข็งไตรบิวทิรินในการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี แล้วนำมาทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน น้ำแซซซัวโพต และกรดคาซามิโน ซึ่งจากการทดลอง พบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุด คือ 26.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ มีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไลเปส และเมื่อทดสอบการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ น้ำตาลแลคโตส กลูโคส และกาแลคโตส พบว่าการเอกลำกรีนเป็นเอกลำกรีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมน้ำตาลแลคโตสร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะช่วยเพิ่มการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้เป็น 40.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบการเติมน้ำมันเพื่อเป็นตัวเหนียวการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ น้ำมันชาร์ดิน น้ำมันถั่วเหลือง และไตรโอสีน พบว่า น้ำมันชาร์ดินสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ 50.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Matsumoto และคณะ (2001) ทำการศึกษาการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* MT8-1 ที่ผ่านการทำแห้งในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยยีสต์ดังกล่าวได้รับการดัดต่อยีนส์เพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสแบบมากเกินพอ (overproducing) จากเชื้อรา *R. oryzae* และเป็นเอนไซม์ไลเปสชนิดที่สร้างและเก็บไว้ในเซลล์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000g ล้างด้วยน้ำกลั่น และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยอากาศที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทำการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส แล้วปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ นำเซลล์ยีสต์ (0.4 กรัม น้ำหนักเปียก) มาละลายในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส นำสารละลายเซลล์ที่ได้เติมลงในส่วนผสมของน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลที่ผสมกันอยู่ในอัตราส่วนโดยโมล 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ที่สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับร้อยละ 71 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ที่เวลา 165 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 474.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Dizge และ Keskinler (2008) ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อรา *J. lanuginosus* ด้วยการตรึงบนโพลียูรีเทนโฟม (polyurethane foams) โดยใช้ไขมันคาโนลา เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ไขมันคาโนลาบริสุทธิ์ 20 กรัม ปริมาณเอนไซม์ไลเปส 430 ไมโครกรัม อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 6:1 ปริมาณน้ำ 0.1 กรัม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์มากที่สุดร้อยละ 90 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และพบว่าเอนไซม์ที่เหลือยังมีความคงตัว สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้อีก 10 ครั้ง เมื่อมีการเติม tert-butanol เพื่อกำจัดกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ

Karatay และ Donmez (2010) ทำการศึกษาการปรับปรุงคุณสมบัติของเชื้อยีสต์เพื่อการผลิตไบโอดีเซล โดยการใช้เชื้อยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง คือ *C. lipolytica*, *C. tropicalis* และ *R. mucilaginosa* ศึกษาการใช้ความเข้มข้นต่างๆ ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร และกาน้ำตาลที่ความเข้มข้นร้อยละ 6, 8 และ 10 และค่าพีเอชต่างๆ คือ 4-7 มีการทดสอบเพื่อหาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่ากาน้ำตาลที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร และพีเอช 5 หลังจากบ่มไว้ 4 วัน เชื้อยีสต์ *C. lipolytica*, *C. tropicalis* และ *R. mucilaginosa* จะให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 84.9, 93.2 และ 92.3 ตามลำดับ

Veras และคณะ (2011) ทำการหาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธีการไทเทรต โดยใช้ตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเอทานอล 15 มิลลิลิตร และหยดฟีนอล์ฟทาลินความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 6 หยด ไทเทรตด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ที่ผ่านการหาความเข้มข้นมาตรฐานจนกระทั่งฟีนอล์ฟทาลินเปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Srimhan และคณะ (2011) ทำการแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างน้ำเสีย ดิน และกากใยปาล์มจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มดิบในภาคใต้ของประเทศไทย โดยการใช้อาหารแข็ง Yeast Malt agar ที่เติมน้ำมันปาล์ม และ Rhodamine B เชื้อยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสจะมีโคโลนีสีชมพูแดงและมีวงใสรอบโคโลนีและจะเรืองแสงสีส้มเมื่อส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างไอออนบวกของ Rhodamine B และไอออนลบของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันโดยเอนไซม์ไลเปส เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน urany-fatty acid ion (MacKezie และคณะ, 1967) โดยพบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ *R. mucilaginosus* P11189 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 51.26 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อยีสต์จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม
ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อยีสต์จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม บริษัท สุขสมบูรณ์
จำกัด 97 หมู่ 4 ตำบลห้างสูง อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่าง ดังนี้

3.1.1.1 น้ำทิ้งจากบริเวณการผลิต

3.1.1.2 ทะลายปาล์ม

3.1.1.3 เส้นใยปาล์ม

3.1.1.4 กากปาล์มหลังบีบน้ำมัน

3.1.1.5 กะลาปาล์ม

3.1.1.6 ผลปาล์ม

3.1.1.7 เศษปาล์มบริเวณการผลิต

3.1.1.8 ดินบริเวณการผลิต

3.1.1.9 ผลปาล์มหลังอบ

3.1.1.10 เส้นใยปาล์มหลังอบ

3.1.1.11 เมล็ดปาล์มหลังบีบน้ำมัน

3.1.1.12 ปาล์มที่ย่อยแล้ว

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

3.2.1 อาหารแข็ง Yeast Malt agar (YM) agar (ภาคผนวก ก) (Himedia Laboratories Pvt., Ltd., India)

3.2.2 อาหารแข็งไตรบิวทีริน (tributirin) (ภาคผนวก ก) (Himedia Laboratories Pvt., Ltd., India)

3.2.3 อาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก)

3.2.4 น้ำมันปาล์มดิบ (บริษัท สุขสมบูรณ์ จำกัด)

3.2.5 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract powder) (Himedia Laboratories Pvt., Ltd., India)

3.2.6 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) (Himedia Laboratories Pvt., Ltd., India)

3.2.7 น้ำตาลเด็กโตส (dextose) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)

3.2.8 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Carlo Erba Reagents Co., Ltd., France)

3.2.9 ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4) (Merck Co., Ltd., Germany)

3.2.10 โซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)

3.2.11 ทวิน-80 (tween 80) (Merck Co., Ltd., Germany)

3.2.12 กลีเซอรอล (glycerol) (Merck Co., Ltd., Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.13 เบคโตเปปโตน (bacto peptone) (Merck Co., Ltd., Germany)
- 3.2.14 โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) (Merck Co., Ltd., Germany)
- 3.2.15 แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.16 ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (Merck Co., Ltd., Germany)
- 3.2.17 พาราไนโตรฟีนิลพาล์มิเตต (*p*-nitrophenyl palmitate) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.18 2-โพรพานอล (2-propanol) (Merck Co., Ltd., Germany)
- 3.2.19 ไตรตรอน เอ็ก-100 (triton X-100) (Fisher Scientific Co., Ltd., USA)
- 3.2.20 กัม อาราบิก (gum arabic) (Merck Co., Ltd., Germany)
- 3.2.21 นิสเตติน (nystatin) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.22 สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.23 เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.24 กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) (Analar Standards Co., Ltd., England)
- 3.2.25 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) (Mallinckrodt Baker Co., Ltd., USA)
- 3.2.26 ฟีนอล (phenol) (Merck Co., Ltd., Germany)
- 3.2.27 กลูโคส (glucose) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.28 เอทิลอะซิเตต ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$) (Carlo Erba Reagents Co., Ltd., France)
- 3.2.29 กรดอะซิติก ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (Carlo Erba Reagents Co., Ltd., France)
- 3.2.30 ไดเอทิลอีเทอร์ ($\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (Carlo Erba Reagents Co., Ltd., France)
- 3.2.31 เฮกเซน (hexane) (J.T. Baker Chemical Co., Ltd., USA)
- 3.2.32 กรดโอเลอิก (oleic acid) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.33 สารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., USA)
- 3.2.34 สีย้อมเมทิลีนบลู (methylene blue)
- 3.2.35 น้ำกลั่น
- 3.2.36 น้ำปราศจากไอออน

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (autoclave) (Tomy Digital Biology Co., Ltd., Japan)
- 3.3.2 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Contherm Scientific Co., Ltd., New Zealand)
- 3.3.3 เครื่องบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) (Unitron Co., Ltd., Switzerland)
- 3.3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) (Boss Tech Co., Ltd., USA)
- 3.3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) (Hermle Co., Ltd., Germany)
- 3.3.6 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) (Olympus Co., Ltd., Japan)
- 3.3.7 เครื่องกวนสารให้ความร้อน (hot plate) (LabTech Co., Ltd., USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Thermo Scientific Co., Ltd., USA)
- 3.3.9 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
- 3.3.10 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Shel Lab Co., Ltd., USA)
- 3.3.11 เครื่องผสมสาร (vortex) (Scientific Industries Co., Ltd., USA)
- 3.3.12 ไมโครปิเปต (micropipet) (Gilson Co., Ltd., France)
- 3.3.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert Co., Ltd., Germany)
- 3.3.14 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Thermo Scientific Co., Ltd., USA)
- 3.3.15 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) (Sartorius Co., Ltd., Germany)
- 3.3.16 เครื่องอัลตราซาวด์ (ultrasonic vibration) (Vibra Cell Co., Ltd., USA)
- 3.3.17 เครื่องฉายรังสีแกมมา ⁶⁰Co (MDS Nordion Co., Ltd., Canada)
- 3.3.18 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) (GenTech Co., Ltd., USA)
- 3.3.19 เครื่องดูดควัน (protector laboratory hood) (Science Tech Co., Ltd., USA)
- 3.3.20 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemocytometer)
- 3.3.21 เครื่องแก้วต่างๆ

3.4 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.4.1 การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารแข็ง (ดัดแปลงจากวิธีของทรัพย์ทวี, 2544)

3.4.1.1 ทำการตรวจสอบหาจุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการเจือจางตัวอย่างจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่เติมทวิน 80 ร้อยละ 0.01 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4.1.2 ตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาทำเทคนิคการเกลี่ยเชื้อให้กระจาย (spread plate) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งไตรบิวทรีน ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะสเตربتอมัยซิน ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Tezuka และคณะ, 1975) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4.1.3 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนี (clear zone) และทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคการขีดเชื้อแบบไขว้ (cross streak) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง YM จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาเก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียง (slant) YM เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (stock culture) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการย้ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.4.1.4 ทำการเก็บเชื้อสำรองด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง โดยเก็บในสารละลายกลีเซอรอลปราศจากเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารเหลวโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอน (Bussamara และคณะ, 2010)

3.4.2.1 ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์จากเชื้อตั้งต้น ในอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติมทวิน 80 ร้อยละ 0.01 นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในบรรจุอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน (วรรณิตา, 2555)

3.4.2.2 ทำการเก็บตัวอย่างโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1960g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสด้านบนไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hoshino และคณะ (1992) (ภาคผนวก ข)

3.4.2.3 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงประมาณ 10 สายพันธุ์แรก จากเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่ทำการศึกษาได้ มาคัดเลือกในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนอีกครั้งตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น และเลือกสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมา 1 สายพันธุ์ ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.3 การชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างๆ (Tan และคณะ, 2003)

3.4.3.1 ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 1 สายพันธุ์ จากการคัดเลือกข้อ 3.4.2.3 ในอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเซลล์ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติมทวิน 80 ร้อยละ 0.01 โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข)

3.4.3.2 ทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ โดยกวนสารละลายเซลล์ในจานเพาะเชื้อตลอดเวลาบนเครื่องคนสาร เก็บตัวอย่างสารละลายเซลล์ที่เวลา 0 (ชุดควบคุม), 20, 40, 60 และ 80 วินาที แล้วทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (สาวิตรี, 2549) ทำการเสาะหาสารละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติมทวิน 80 ร้อยละ 0.01 ที่ระดับ 10^1 - 10^4 แล้วทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง YM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาร้อยละอัตราการอยู่รอด (ภาคผนวก ข) เพื่อหาระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 (ดัดแปลงจากสาวิตรี, 2549)

3.4.3.3 เมื่อทราบระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 แล้ว นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.2.3 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตเช่นเดิม ตามวิธีการในข้อ 3.4.3.2 โดยเลือกเฉพาะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 แล้วทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายลงบนผิวหน้าอาหารแข็งไตรบิวทรีนที่เติมยาปฏิชีวนะนิสเตติน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Nga และคณะ, 1989) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนี แล้วเก็บเชื้อลงในอาหารแข็ง YM เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในสภาวะอาหารเหลวโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนตามข้อ 3.4.2

3.4.3.4 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงประมาณ 10 สายพันธุ์แรก จากเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่ทำการคัดเลือกได้ มาคัดเลือกในสภาวะอาหารเหลวอีกครั้งตามข้อ 3.4.2 และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดและสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมา 1 สายพันธุ์ ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.4 การชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่ระยะเวลาต่างๆ (ดัดแปลงจากวิธีของ Mobini-Dehkordi และคณะ, 2008)

3.4.4.1 ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 1 สายพันธุ์ จากการคัดเลือกข้อ 3.4.3.4 และเตรียมสารละลายเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.3.1

3.4.4.2 สารละลายเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร นำมาใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวปลอดเชื้อ เติมสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 20, 40, 60 และ 80 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วยการเติมโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการเจือจางสารละลายเซลล์และเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.4.3.2 เพื่อหาระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดร้อยละ 5-10

3.4.4.3 เมื่อทราบระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดร้อยละ 5-10 แล้ว นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้จากข้อ 3.4.3.4 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตเช่นเดิม ตามวิธีการในข้อ 3.4.4.2 โดยเลือกเฉพาะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดร้อยละ 5-10 และทำการเลี้ยงเชื้อและคัดเลือกเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.4.3.3 จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในสภาวะอาหารเหลวโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนตามข้อ 3.4.2

3.4.4.4 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงประมาณ 10 สายพันธุ์แรก จากเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่ทำการคัดเลือกได้ มาคัดเลือกในสภาวะอาหารเหลวอีกครั้งตามข้อ 3.4.2 และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดและสูงกว่าสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัตราไวโอเลตมา 1 สายพันธุ์ ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.5 การชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา ^{60}Co ที่มีความเข้มข้นของรังสีแตกต่างกัน (ดัดแปลงจากวิธีของ Sun และคณะ, 2004)

3.4.5.1 ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 1 สายพันธุ์ จากการคัดเลือกข้อ 3.4.4.4 และเตรียมสารละลายเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.3.1

3.4.5.2 สารละลายเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวปลอดเชื้อ แล้วนำไปฉายรังสีแกมมา ^{60}Co ที่ห้องปฏิบัติการด้านรังสีแกมมา สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 0 (ชุดควบคุม), 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 กิโลเกรย์ (kGy) โดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณรังสีทุกๆ 1 กิโลเกรย์ จะใช้เวลาประมาณ 9.1 นาที ดังตารางที่ 3.1 ทำการเจือจางสารละลายเซลล์และเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.4.3.2 เพื่อหาความเข้มข้นของรังสีแกมมาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการรอดร้อยละ 5-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.3 เมื่อทราบระยะเวลาที่ทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5-10 แล้ว นำเชื้อที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาจากข้อ 3.4.5.2 มาทำการเลี้ยงเชื้อและคัดเลือกเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.4.3.3 จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในสภาวะอาหารเหลวโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนตามข้อ 3.4.2

3.4.5.4 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงประมาณ 10 สายพันธุ์แรก จากเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่ทำการคัดเลือกได้ มาคัดเลือกในสภาวะอาหารเหลวอีกครั้งตามข้อ 3.4.2 และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดและสูงกว่าสายพันธุ์กลายที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตมา 1 สายพันธุ์ ไปทำการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 ปริมาณความเข้มข้นของรังสีแกมมา ^{60}Co ในการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์

หลอดทดลองที่	เวลา (นาทีก)	ความเข้มข้นรังสีแกมมา (กิโลเกรย์)
1	0	0
2	4.5	0.5
3	9.1	1.0
4	18.2	2.0
5	27.2	3.0
6	36.3	4.0

3.4.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือก

3.4.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นสังเกตลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง โดยสังเกตลักษณะของโคโลนี ได้แก่ ขนาด (size) รูปร่าง (form) ลักษณะขอบ (margin) พื้นผิว (surface texture) การยกตัว (elevation) ความหนืด (consistency) ความขุ่น (optical features) และการสร้างสี (pigmentation) ของโคโลนี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า และสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยการย้อมสีเมทิลีนบลู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 400 เท่า

3.4.6.2 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธี D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequence (ภาคผนวก ข) 500-600 คู่เบส โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

3.4.7 การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือก

3.4.7.1 การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (ดัดแปลงจากวิธีของ ปุริมปรัชญ์, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ทำการชั่งน้ำมันปาล์มดิบ 5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว จำนวน 6 หลอด แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2 ทำการเติมแอลกอฮอล์ในแต่ละหลอด โดยใช้แอลกอฮอล์ต่างชนิดกัน ได้แก่ เมทานอล เอทานอลบริสุทธิ์ และเอทานอลร้อยละ 95 ชนิดละ 2 หลอด โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 4:1 (0.95, 1.37 และ 1.34 กรัม ตามลำดับ) (ภาคผนวก ข) แล้วใส่เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่คัดเลือกจากข้อ 3.4.5.4 จำนวน 3 ลูบ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

3 ทำการเก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7840g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสด้านบนมาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีตามวิธีการวิเคราะห์ของ Wang และคณะ (2010) (ภาคผนวก ข)

3.4.7.2 การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (ดัดแปลงจากวิธีของทิพรรัตน์ และเบญจมาศ, 2551)

ก. การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

1 ทำการชั่งน้ำมันปาล์มดิบ 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ชุด แล้วผสมน้ำร้อยละ 40 และ 50 (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) และทำการผสมสารระหว่างน้ำกับน้ำมันให้รวมกันเป็นเนื้อเดียวกันหรือการทำให้เกิดอิมัลชัน โดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่มีความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ (kHz) ระดับแอมพลิจูดร้อยละ 40 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งเวลาการทำงาน 5 วินาที และหยุด 1 วินาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วใส่เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5.4 จำนวน 3 ลูบ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 สัปดาห์

2 ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 สัปดาห์ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7840g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำมันมาทำการไทเทรตเพื่อหาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยวิธีการวิเคราะห์ของ Veras และคณะ (2011) (ภาคผนวก ข)

3 เมื่อครบ 6 สัปดาห์แล้ว ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดตามวิธีการในข้อ 3.4.7.1 ข้อ 3 และเก็บส่วนที่เป็นน้ำมันไปทดสอบปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป

ข. การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

1 ทำการชั่งส่วนน้ำมันที่เก็บได้จากขั้นตอนการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวหลอดเชื้อ จำนวน 12 หลอด แบ่งเป็นส่วนที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสปริมาณน้ำร้อยละ 40 จำนวน 6 หลอด และส่วนที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสปริมาณน้ำร้อยละ 50 จำนวน 6 หลอด

2 ทำการเติมแอลกอฮอล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.7.1 ข้อ 2 โดยเติมแอลกอฮอล์ชนิดละ 2 หลอด และทดสอบระหว่างเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายจากข้อ 3.4.5.4 โดยใช้เชื้อจำนวน 3 ลูบ และไม่เติมเชื้อยีสต์ แล้วนำมาบ่มอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 ทำการเก็บตัวอย่างตามวิธีการในข้อ 3.4.7.1 ข้อ 3 แล้วนำส่วนใสด้านบนมาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

3.4.7.3 การทดสอบการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดโอเลอิก (ดัดแปลงจากวิธีของปรีมปรัชญ์, 2552)

1 ชั่งกรดโอเลอิก 5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว จำนวน 3 หลอด แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2 ทำการเติมแอลกอฮอล์ตามวิธีการในข้อ 3.4.7.1 ข้อ 2 แล้วใส่เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ให้อากาศกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5.4 จำนวน 3 ลูก แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3 ทำการเก็บตัวอย่างตามวิธีการในข้อ 3.4.7.1 ข้อ 3 แล้วนำส่วนใสด้านบนมาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

3.4.8 การแยกยางเหนียวจากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้สารละลายกรด (ดัดแปลงจากวิธีของสินินาฎ และคณะ, 2553) (ภาคผนวก ข)

3.4.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวละเอียดผสมกากน้ำตาลด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง

3.4.9.1 ทำการชั่งรำข้าวปริมาณ 50 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกใสขนาด 10 x 15 เซนติเมตร

3.4.9.2 ทำการเตรียมกากน้ำตาล โดยทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข) และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

3.4.9.3 ทำการหว่านปริมาณความชื้น โดยผสมรำข้าวและน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปหาปริมาณความชื้น (ภาคผนวก ข)

3.4.9.4 ทำการผสมกากน้ำตาลที่เจือจางแล้วลงในรำข้าว โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) (ดัดแปลงจากวิธีของ Karatay และ Donmez, 2010) โดยเติมกากน้ำตาลที่เจือจางแล้ว ปริมาณ 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตรตามลำดับ แล้วผสมให้เข้ากัน ปิดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปหาปริมาณความชื้น

3.4.9.5 ทำการเตรียมสารละลายของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์กลายจากข้อ 3.4.5.4 ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติมทวิน 80 ร้อยละ 0.01 โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายเซลล์ลงในรำข้าวที่ผสมกับกากน้ำตาล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วคำนวณความชื้นที่ได้เปรียบเทียบกับค่าความชื้นจากข้อ 3.4.9.3 เพื่อปรับให้มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ± 2 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.4.9.6 ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, และ 84 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่เติมทวิน 80 ร้อยละ 0.01 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ระดับ 10^{-1} - 10^{-8} จากนั้นนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายลงบนผิวเอกซารีนเป็นเอกซารีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าอาหารแข็ง YM แล้วนับจำนวนโคโลนี วัดค่าพีเอช หาปริมาณความชื้น และหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยเลือกความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ทำให้มีปริมาณเชื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.9.7 เมื่อได้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ± 2 , 50 ± 2 , 60 ± 2 และ 70 ± 2 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) (ดัดแปลงจากวิธีของ Liu และคณะ, 2013) และเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.4.9.4-3.4.9.5 ทำการเก็บตัวอย่างและทดลองตามวิธีการในข้อ 3.4.9.6 โดยเลือกปริมาณความชื้นเริ่มต้นและเวลาที่ให้มีปริมาณเชื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.10 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง

3.4.10.1 การเตรียมตัวเร่งชีวภาพ

ทำการเตรียมตัวเร่งชีวภาพในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4.9

3.4.10.2 การเลี้ยงเชื้อและปัจจัยที่ต้องการศึกษา

ทำการชั่งน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านการแยกยางเหนียวจากข้อ 3.4.8 ปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สภาวะการเลี้ยงเชื้อทำการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ซึ่งสามารถกำหนดปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาหรือตัวแปรอิสระในการทดลองได้ตามตารางที่ 3.2 (ภาคผนวก ข) โดยแบ่งการทดลองออกเป็นสี่ทดลองทั้งหมด 20 สิ่งทดลอง ตามตารางที่ 3.3 (ภาคผนวก ข) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (Yücel, 2012) และทำการเติมเอทานอลเพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชันก่อนครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง

1 ปัจจัยเวลา (X_1) กำหนดระดับปัจจัยต่ำสุด (-1.682) เท่ากับ 31.6 ระดับปัจจัยต่ำ (-1) เท่ากับ 48 ระดับปัจจัยกลาง (0) เท่ากับ 72 (Li และคณะ, 2007) ระดับปัจจัยสูง (+1) เท่ากับ 96 และระดับปัจจัยสูงสุด (+1.682) เท่ากับ 112.4

2 ปัจจัยอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน (X_2) กำหนดระดับปัจจัยต่ำสุด (-1.682) เท่ากับ 4.64:1 ระดับปัจจัยต่ำ (-1) เท่ากับ 6:1 ระดับปัจจัยกลาง (0) เท่ากับ 8:1 (Salis และคณะ, 2008) ระดับปัจจัยสูง (+1) เท่ากับ 10:1 และระดับปัจจัยสูงสุด (+1.682) เท่ากับ 11.36:1

3 ปัจจัยร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (X_3) กำหนดระดับปัจจัยต่ำสุด (-1.682) เท่ากับ 1.59 ระดับปัจจัยต่ำ (-1) เท่ากับ 5 ระดับปัจจัยกลาง (0) เท่ากับ 10 (Li และคณะ, 2007) ระดับปัจจัยสูง (+1) เท่ากับ 15 และระดับปัจจัยสูงสุด (+1.682) เท่ากับ 18.41

3.4.10.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์

1 ทำการเก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7840g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2 ส่วนใสด้านบนนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี และคำนวณร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.10.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง และระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาตามตารางที่ 3.3 นำมาสร้างกราฟ 3 มิติของพื้นที่การตอบสนองด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 8 และนำมาวิเคราะห์สมการถดถอยด้วยโปรแกรม SPSS statistics เวอร์ชัน 17 เพื่อสรุปเป็นสมการที่ 3.1

3.4.10.5 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการคาดคะเนด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง

ทำการทดสอบสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากการคาดคะเน โดยสถานะการเลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสถานะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง นำมาวัดพีเอช หาปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ปริมาณร้อยละผลได้ (yield) ของไบโอดีเซล (ภาคผนวก ข) และนับจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งก่อนและหลังการเติมเอทานอลตามชั่วโมงที่กำหนด

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (3.1)$$

กำหนดให้

Y คือ ปัจจัยตามที่ต้องการศึกษา (ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์)

X_1, X_2 และ X_3 คือ ตัวแปรอิสระที่ต้องการศึกษาปัจจัยที่ 1, 2 และ 3

X_1X_2 คือ นิพจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 1 และ 2

X_1X_3 คือ นิพจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 1 และ 3

X_2X_3 คือ นิพจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 2 และ 3

X_1^2, X_2^2 และ X_3^2 คือ นิพจน์กำลังสองของปัจจัยที่ 1, 2 และ 3

b_0 คือ ค่าคงที่ของสมการ

b_1, b_2 และ b_3 คือ สัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่ 1, 2 และ 3

b_{12} คือ สัมประสิทธิ์ของนิพจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 1 และ 2

b_{13} คือ สัมประสิทธิ์ของนิพจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 1 และ 3

b_{23} คือ สัมประสิทธิ์ของนิพจน์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 2 และ 3

b_{11}, b_{22} และ b_{33} คือ สัมประสิทธิ์ของนิพจน์กำลังสองของปัจจัยที่ 1, 2 และ 3

ตารางที่ 3.2 รหัสและระดับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มดิบโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

ปัจจัย	รหัส	ระดับ				
		-1.682 (- α)	-1	0	+1	+1.682 (+ α)
1. เวลา (ชั่วโมง)	X_1	31.6	48	72	96	112.4
2. อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล)	X_2	4.64:1	6:1	8:1	10:1	11.36:1
3. ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน)	X_3	1.59	5	10	15	18.41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปยังประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 สิ่งทดลองทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มดิบโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

สิ่งทดลองที่	รหัสของปัจจัย			ระดับของปัจจัย		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	48	6:1	5	-1	-1	-1
2	96	6:1	5	+1	-1	-1
3	48	10:1	5	-1	+1	-1
4	96	10:1	5	+1	+1	-1
5	48	6:1	15	-1	-1	+1
6	96	6:1	15	+1	-1	+1
7	48	10:1	15	-1	+1	+1
8	96	10:1	15	+1	+1	+1
9	31.6	8:1	10	-1.682	0	0
10	112.4	8:1	10	+1.682	0	0
11	72	4.64:1	10	0	-1.682	0
12	72	11.36:1	10	0	+1.682	0
13	72	8:1	1.59	0	0	-1.682
14	72	8:1	18.41	0	0	+1.682
15	72	8:1	10	0	0	0
16	72	8:1	10	0	0	0
17	72	8:1	10	0	0	0
18	72	8:1	10	0	0	0
19	72	8:1	10	0	0	0
20	72	8:1	10	0	0	0

กำหนดให้ X_1 คือ เวลา X_2 คือ อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และ X_3 คือ ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

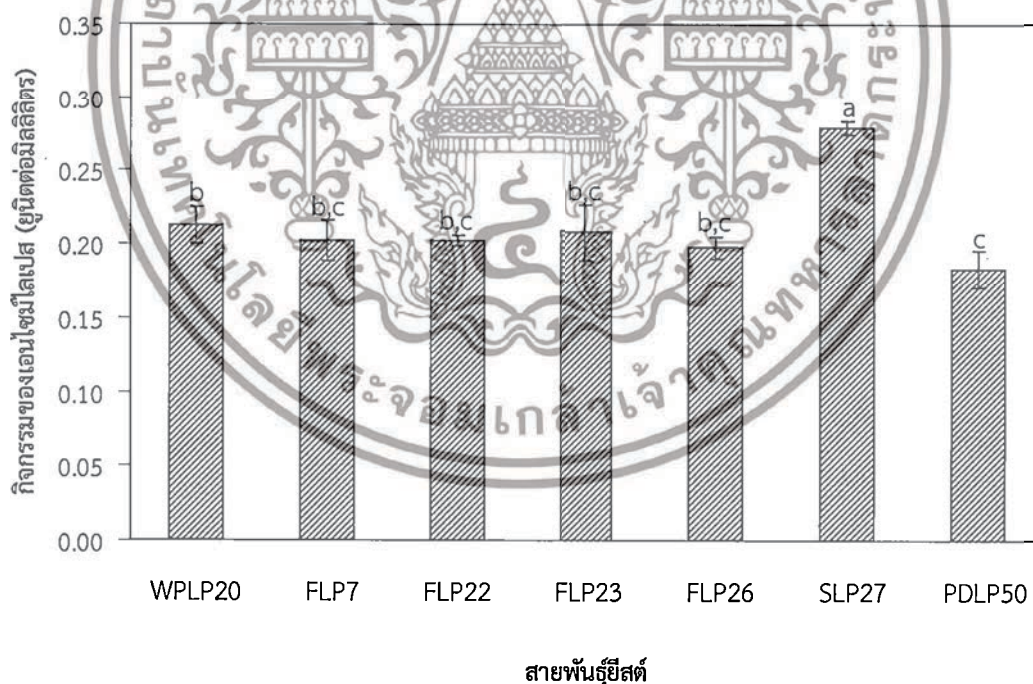
4.1 ผลการแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างชนิดต่างๆ ในพื้นที่ของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม

จากการแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส จากตัวอย่างน้ำทิ้ง ดิน และส่วนต่างๆ ของปาล์มในบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม โดยสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งไตรบิวทิริน พบว่าสามารถแยกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา และมีเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งหมดจำนวน 267 สายพันธุ์ โดยแหล่งที่สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุด คือ ปาล์มที่ย่อยแล้วคิดเป็นร้อยละ 18.73 ของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด และกะลาปาล์มเป็นแหล่งที่พบเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวนน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 1.12 ของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยกำหนดหมายเลขเชื้อยีสต์ตามบริเวณที่ทำการแยกเชื้อได้ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งการสร้างวงใสรอบโคโลนีเป็นการยืนยันได้ว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เนื่องจากสามารถใช้ไตรบิวทิรินเป็นสารตั้งต้นได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของเกรียงไกร (2545) ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากบ่อบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง โดยใช้อาหารแข็งไตรบิวทิริน พบว่าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ได้ทั้งเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย จากการสังเกตการสร้างวงใสรอบโคโลนี เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ไลเปสมาย่อยสารตั้งต้น และจากการเติมยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งสเตรปโตมัยซินจะเข้าไปรวมกับ 30S ไรโบโซม ทำให้ขัดขวางการจับของ aminoacyl-tRNA และสามารถรวมกับ 70S ไรโบโซม ทำให้ไรโบโซมไม่สามารถแยกออกเป็นหน่วยย่อย 30S และ 50S ได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554) จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่แยกได้มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้มาทำการคัดเลือกการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อยีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปส (Bussamara และคณะ, 2010) ซึ่งพบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง ได้แก่ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ WPLP20, FLP7, FLP22, FLP23, FLP26, SLP27 และ PDLP50 และเมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์ มาคัดเลือกซ้ำอีกครั้งในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเมล็ดปาล์มหลังบีบน้ำมัน ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสูงกว่าสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังภาพที่ 4.1 สอดคล้องกับงานวิจัยของธนภุต (2556) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ *Candida* sp. ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดินและน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นตัวกระตุ้น พบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ สายพันธุ์ KKU-SC22, KKU-PH1-6 และ KKU-PH2-15 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.249, 0.230 และ 0.278 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้สามารถใช้น้ำมันปาล์มดิบเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเซลล์ และใช้สำหรับการกระตุ้นให้มีการสร้างและขับเอนไซม์ไลเปสออกนอกเซลล์ได้ (ธนภุต, 2556) และจากผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด จึงนำไปใช้ในการกลายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แหล่งตัวอย่างและจำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มในสถานะอาหารแข็งไตรบิวทีรีน ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แหล่งตัวอย่างหรือบริเวณ	หมายเลขเชื้อยีสต์ที่แยกได้	จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้	ร้อยละ
1. น้ำทิ้งจากบริเวณการผลิต	WPLP1-WPLP21	21	7.87
2. ทะลายปาล์ม	PEBLP1-PEBLP20	20	7.49
3. เส้นใยปาล์ม	FLP1-FLP32	32	11.99
4. กากปาล์มหลังบีบน้ำมัน	PMLP1-PMLP12	12	4.49
5. กะลาปาล์ม	PSLP1-PSLP3	3	1.12
6. ผลปาล์ม	PFLP1-PFLP23	23	8.61
7. เศษปาล์มบริเวณการผลิต	PWLP1-PWLP15	15	5.62
8. ดินบริเวณการผลิต	SOLP1-SOLP11	11	4.12
9. ผลปาล์มหลังอบ	PFDLP1-PFDLP33	33	12.36
10. เส้นใยปาล์มหลังอบ	FDLP1-FDLP20	20	7.49
11. เมล็ดปาล์มหลังบีบน้ำมัน	SLP1-SLP27	27	10.11
12. ปาล์มย่อยแล้ว	PDLP1-PDLP50	50	18.73
รวม		267	100



ภาพที่ 4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ 7 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในสถานะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสถานะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน และกำหนดให้ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

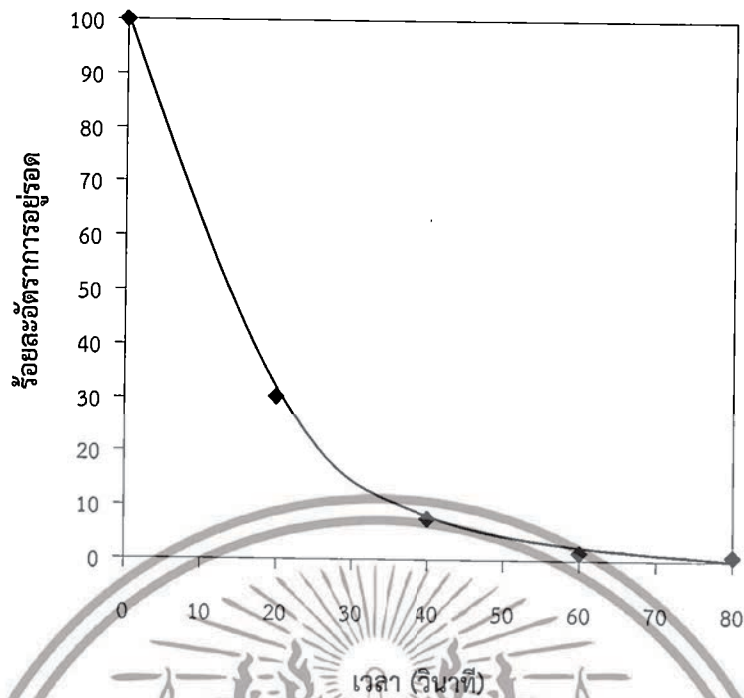
4.2 ผลการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการทดลองการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 วินาที เมื่อเขียนกราฟระหว่างร้อยละของอัตราการอยู่รอดกับระยะเวลาที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าที่เวลา 38 วินาที จะมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 10 ดังภาพที่ 4.2 ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีประสิทธิภาพที่สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในช่วงความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร มักจะทำให้เกิดไพริมิดีนไดเมอร์ คือ ไทมีนไดเมอร์หรือไซโตซีนไดเมอร์ นอกจากนั้นยังเหนี่ยวนำให้เกิดการทรานซิชันของเบสกับเบสไซโตซีน เป็นเบสอะดีนีนกับเบสไทมีน ซึ่งทำให้มีความผิดพลาดในระหว่างการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ทำให้การอ่านรหัสพันธุกรรม 3 เบส ในเอ็มอาร์เอ็นเอเปลี่ยนไป มีผลให้กรดอะมิโนผิดไปจากเดิม จึงอาจทำให้ได้โปรตีนที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ปกติหรือไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นมาได้ เซลล์ก็จะตายลง และเมื่อเซลล์สัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นระยะเวลานานขึ้น ก็จะทำให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้นด้วย (สาวิตรี, 2549) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Siripong และคณะ (2012) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพื่อเพิ่มการผลิตเซลลูโลส พบว่าเซลล์จะมีอัตราการตายสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 20, 40 และ 60 นาที โดยมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 8.53, 5.80 และ 1.27 ตามลำดับ จากการทดลองได้คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่อัตราการอยู่รอดร้อยละ 10 ซึ่งอัตราการอยู่รอดเป็นสิ่งที่ช่วยตัดสินใจในการใช้ตัวเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ที่ปริมาณหรือที่ระยะเวลาสั้นเท่าไร เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายจำนวนมาก เนื่องจากปกติตัวเหนี่ยวนำนอกจากจะทำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์แล้วยังทำให้เซลล์ตาย โดยปกติมักเลือกสายพันธุ์กลายจากเซลล์รอดชีวิตจำนวนไม่มากหลังสัมผัสกับตัวเหนี่ยวนำ เนื่องจากเป็นไปได้มากที่แต่ละเซลล์จะมีดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลง 1 หรือมากกว่า 1 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่สูงอย่างเดียวไม่ได้บ่งบอกว่าจะมีการกลายพันธุ์ของยีนจำเพาะสูง ซึ่งโดยทั่วไปมักจะเลือกใช้เวลาที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดร้อยละ 10 (Brock, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jacobson (1981) ที่ได้แนะนำการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่อัตราการอยู่รอดประมาณร้อยละ 10 ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่เปลี่ยนกลับหรือสามารถเปลี่ยนกลับที่ความถี่ต่ำมาก แต่การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตนั้น เชื้อยีสต์มีกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอโดยการใช้แสงที่มองเห็นได้ที่มีความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร ซึ่งจะสลายพันธะโควาเลนต์ไพริมิดีนไดเมอร์ที่เกิดขึ้นในสายดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์โฟโตไลเอส (photolyase) (Brock, 1984) ซึ่งหลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วจะต้องนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อปล่อยให้เกิดการแบ่งเซลล์ 1 ช่วง เพื่อเป็นการตรึงการกลายพันธุ์ (สาวิตรี, 2549) จากการทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 38 วินาที พบว่าทำการคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานยาปฏิชีวนะนิสเตตินและสร้างวงใสบนอาหารแข็งไตรบิวทรีนได้จำนวน 205 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้หมายเลขเชื้อเป็น UV1 ถึง UV205 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ต้านทานยาปฏิชีวนะโดยนำมาเลี้ยงบนอาหารที่มีนิสเตติน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อเชื้อยีสต์และรา โดยมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554) ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ดั้งเดิมในขณะที่ไม่ยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์กลาย โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ คือ นิสเตตินจะเข้าไปจับกับเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตอรอลที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์ (Walker, 1988) ส่งผลทำให้สมบัติการยอมให้สารผ่านเข้าออกเซลล์เพิ่มขึ้น เกิดการรั่วไหลของโพแทสเซียม

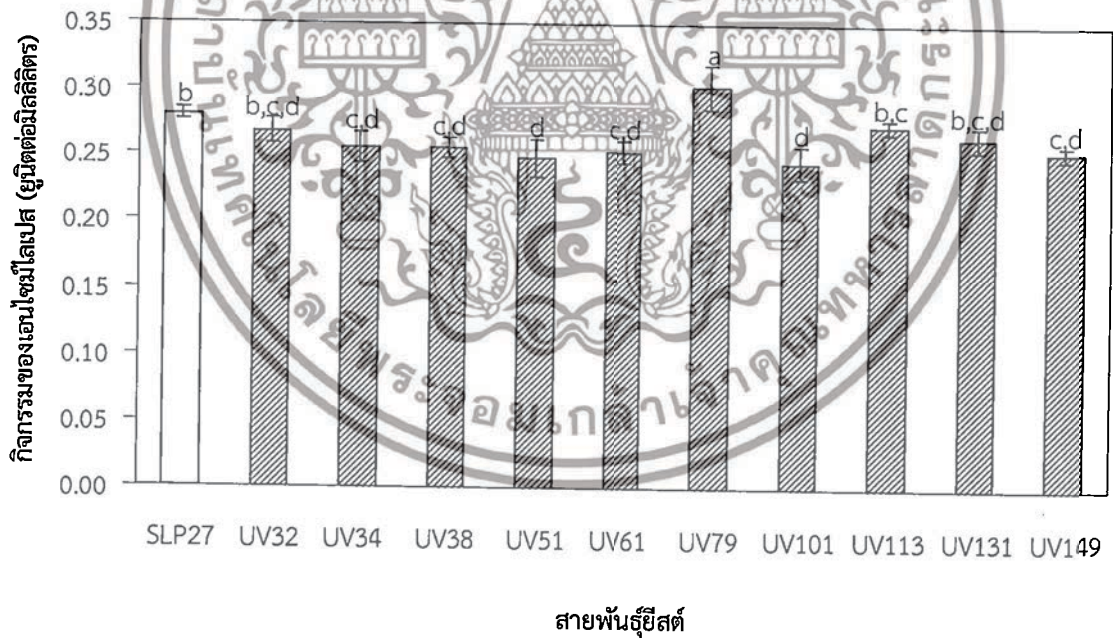
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอออน น้ำตาล และเมแทบอลิท์ ทำให้เซลล์ตาย แต่สายพันธุ์กลายอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการการสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอล ทำให้ไม่มีการสร้างเออร์โกสเตอรอลขึ้น ดังนั้นนิสเตดินจึงไม่สามารถจับได้ ทำให้ไม่มีผลต่อเชื้อหุ้มเซลล์ และไม่เกิดการยับยั้งการเจริญ สายพันธุ์กลายจึงมีความต้านทานต่อนิสเตดิน (Yu และคณะ, 1999) และจากการทดลองการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายทั้งหมดในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงมี 10 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ UV32, UV34, UV38, UV51, UV61, UV79, UV101, UV113, UV131 และ UV149 และเมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาคัดเลือกซ้ำอีกครั้งในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 0.30 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังภาพที่ 4.3 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้สูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 คิดเป็น 1.07 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชุดิมา (2550) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์เชื้อยีสต์ *C. rogusa* ด้วยการฉายรังสีอัตราไวโอเล็ตเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 0.78 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ 0.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันได้สูงกว่า โดยได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 59.46 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ร้อยละ 32.21 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์กลายสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tan และคณะ (2003) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Candida* sp. 90-17 ด้วยรังสีอัตราไวโอเล็ต พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสในเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายให้กิจกรรมของเอนไซม์ 230 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้ 112 หน่วยต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Darvishi และคณะ (2011) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* DSM 3286 ด้วยรังสีอัตราไวโอเล็ตเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย U6 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 80.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ดั้งเดิมให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 34.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2.3 เท่า งานวิจัยของทิพนยวรรณ และเศรษฐวัชร (2539) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Candida* sp. ด้วยรังสีอัตราไวโอเล็ตเพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 1.47 หน่วยต่อมิลลิลิตร มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้ 0.86 หน่วยต่อมิลลิลิตร และจากผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด จึงนำไปใช้ในการกลายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 วินาที



ภาพที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 38 วินาที เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน และกำหนดให้ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

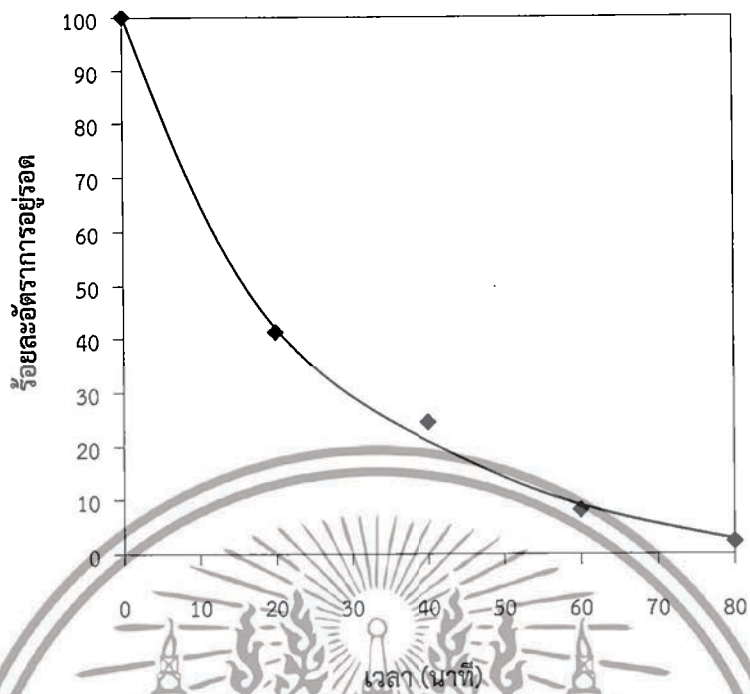
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่ระยะเวลาต่างๆ

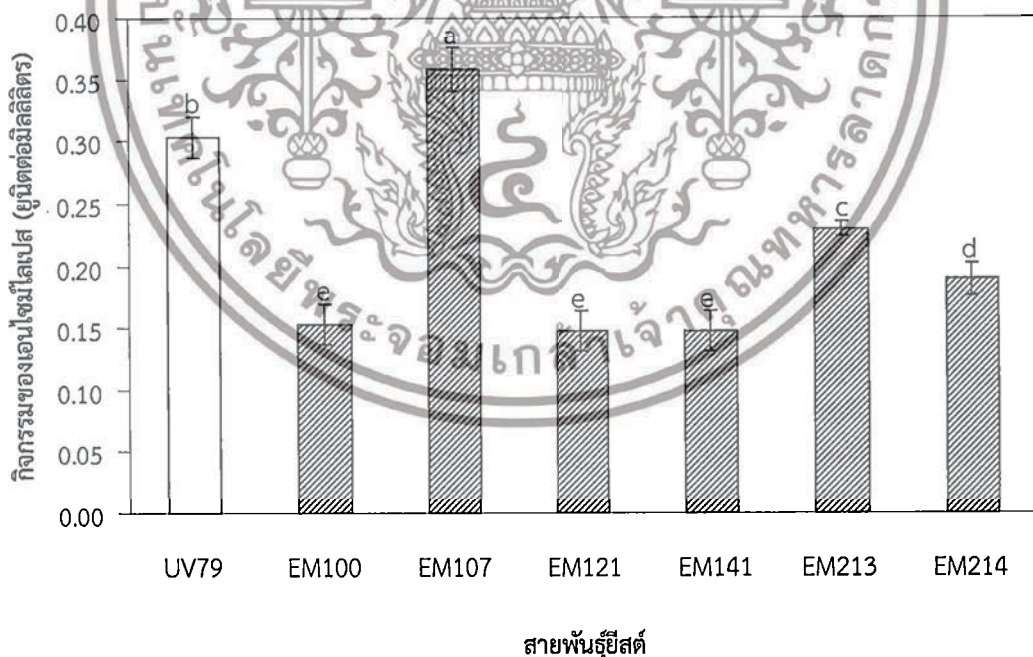
จากการทดลองการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที เมื่อเขียนกราฟระหว่างร้อยละของอัตราการรอดชีวิตกับระยะเวลาที่ได้รับสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต พบว่าที่เวลา 58 นาที จะมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 10 ดังภาพที่ 4.4 ซึ่งสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่ใช้โดยทั่วไปในการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์จะใช้ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 3 (สาวิตรี, 2549) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส โดยการเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันกับเบสพิวรีน ซึ่งมีผลรุนแรงกับเบสกวีนีนโดยการเติมหมู่เอทิลที่อะตอมออกซิเจนที่จับกับคาร์บอนอะตอมในตำแหน่งที่ 6 เกิดเป็น O⁶-ethylguanine ทำให้เกิดการเข้าคู่กับเบสไทมีนแทนที่จะเป็นเบสไซโตซีน เกิดการแทนที่คู่เบสแบบทรานซิชัน (Lodish และคณะ, 2007) ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จากการทดลองการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที พบว่าสามารถคัดเลือกโคโลนีที่ต้านทานนิสเตดินและสร้างวงใสบนอาหารแข็งไตรบิวทิรีนได้จำนวน 326 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้หมายเลขเชื้อเป็น EM1 ถึง EM326 และจากการทดลองการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ทั้งหมดในสถานะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงมี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ EM100, EM107, EM121, EM141, EM213 และ EM214 และเมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้งหมดมาคัดเลือกซ้ำอีกครั้งในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังภาพที่ 4.5 โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้สูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 และเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 คิดเป็น 1.29 และ 1.20 เท่า ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Darvishi และคณะ (2011) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* DSM 3286 ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย C2 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 86.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2.5 เท่า โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 34.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Ranadive และคณะ (2011) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตและสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เพื่อเพิ่มการผลิตโคเอนไซม์ควิเทน พบว่าสายพันธุ์กลาย EA22 มีการผลิตโคเอนไซม์ควิเทนสูงขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากการปรับปรุงคุณสมบัติในการเพิ่มการผลิตแล้ว ยังสามารถปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติด้านอื่นๆ ดีขึ้นด้วย เช่นงานวิจัยของ Mobini-Dehkordi และคณะ (2008) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เพื่อให้เชื้อมีความทนทานและสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ทางการค้า พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายนั้นสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าร้อยละ 17.3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และยังสามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และจากงานวิจัยของ Srinorakutara และคณะ (2008) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ในการหมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต พบว่าเชื้อยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้นจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 25 และ 30 องศาเซลเซียส และจากผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลเปสสูงที่สุด จึงนำไปใช้ในการกลายพันธุ์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.4 ร้อยละของอัตราการอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย UV79 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที



ภาพที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 6 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน และกำหนดให้^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

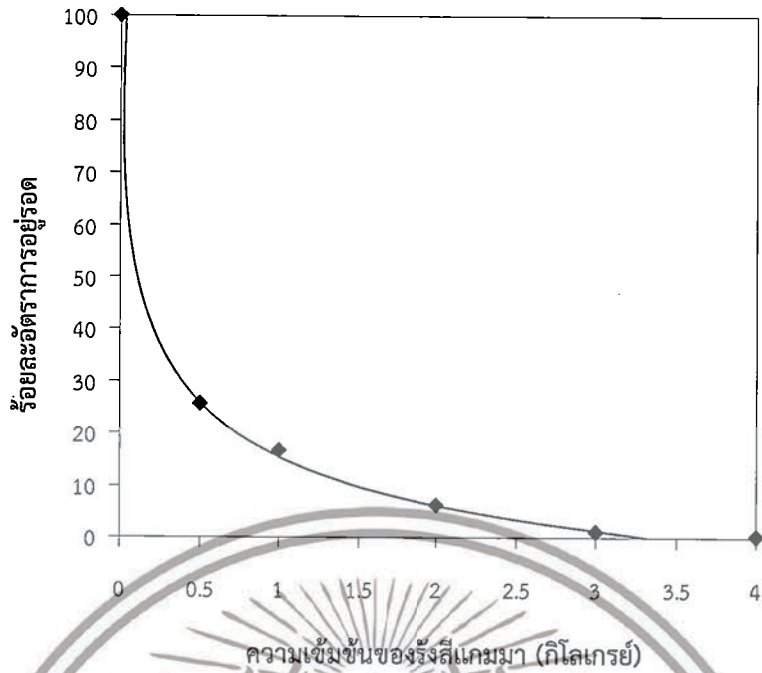
4.4 ผลการชักนำเชื้อยีสต์ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา ^{60}Co ที่มีความเข้มข้นของรังสีแตกต่างกัน

จากการทดลองการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 ด้วยการฉายรังสีแกมมา โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 กิโลเกรย์ เมื่อเขียนกราฟระหว่างร้อยละของอัตราการอยู่รอดกับความเข้มข้นของรังสีแกมมา พบว่าที่ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ จะมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 6 ดังภาพที่ 4.6 ซึ่งรังสีแกมมามักจะทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอทั้งสายเดี่ยวและสายคู่ หรือการแตกหักของพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสที่เข้าคู่กัน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเบส และการเชื่อมข้ามภายในสายดีเอ็นเอ (สาวิตรี, 2549) จากการทดลองการกลายพันธุ์เชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 ด้วยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นของรังสีที่ 2 กิโลเกรย์ สามารถคัดเลือกโคลนที่ต้านทานนิสเตดินและสร้างวงใสบนอาหารแข็งไตรบิวทรีนได้จำนวน 170 สายพันธุ์ โดยกำหนดให้หมายเลขเชื้อเป็น GAM1 ถึง GAM170 และจากการทดลองการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ทั้งหมดในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง ได้แก่ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ GAM26, GAM40, GAM41, GAM42, GAM47, GAM68, GAM107, GAM112, GAM130 และ GAM153 และเมื่อนำเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ มาคัดเลือกซ้ำอีกครั้งในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 0.70 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังภาพที่ 4.7 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้สูงกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 สายพันธุ์กลาย UV79 และ EM107 คิดเป็น 2.50, 2.33 และ 1.94 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Iftikhar และคณะ (2010a) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *R. oligosporus* ด้วยรังสีแกมมา เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 20, 40, 60, 80, 100, 120 และ 140 กิโลเรด (kRad) ซึ่งที่ความเข้มข้นรังสี 120 กิโลเรด (1.2 กิโลเกรย์) พบว่าสายพันธุ์กลาย JIB-63-Y-8 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 6.88 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 3.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 2.15 เท่า และงานวิจัยของ Iftikhar และคณะ (2010b) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *A. niger*, *R. microsporus* และ *P. atrovenetum* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปสในภาคอุตสาหกรรมด้วยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 และ 160 เกรย์ (Gy) พบว่าความเข้มข้นของรังสี 140 เกรย์ (0.14 กิโลเกรย์) *A. niger* สายพันธุ์กลาย MBL-5 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 13.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 2.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 6.14 เท่า ส่วน *R. microsporus* สายพันธุ์กลาย MBL-1 ที่ความเข้มข้น 60 เกรย์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 14.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 2.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 6.48 เท่า และ *P. atrovenetum* สายพันธุ์กลาย MBL-1 ที่ความเข้มข้น 60 เกรย์ ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 6.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 3.56 เท่า งานวิจัยของ Akacha และคณะ (2008) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยรังสีแกมมา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความคงตัวของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในการผลิตแอลกอฮอล์จากเอทานอล โดยใช้ความเข้มข้นของรังสีที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 เกรย์ พบว่าที่ความเข้มข้นรังสี 10 เกรย์ เชื้อสายพันธุ์กลายมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น 1.5 เท่า คือ 27 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้ 15 หน่วยต่อ

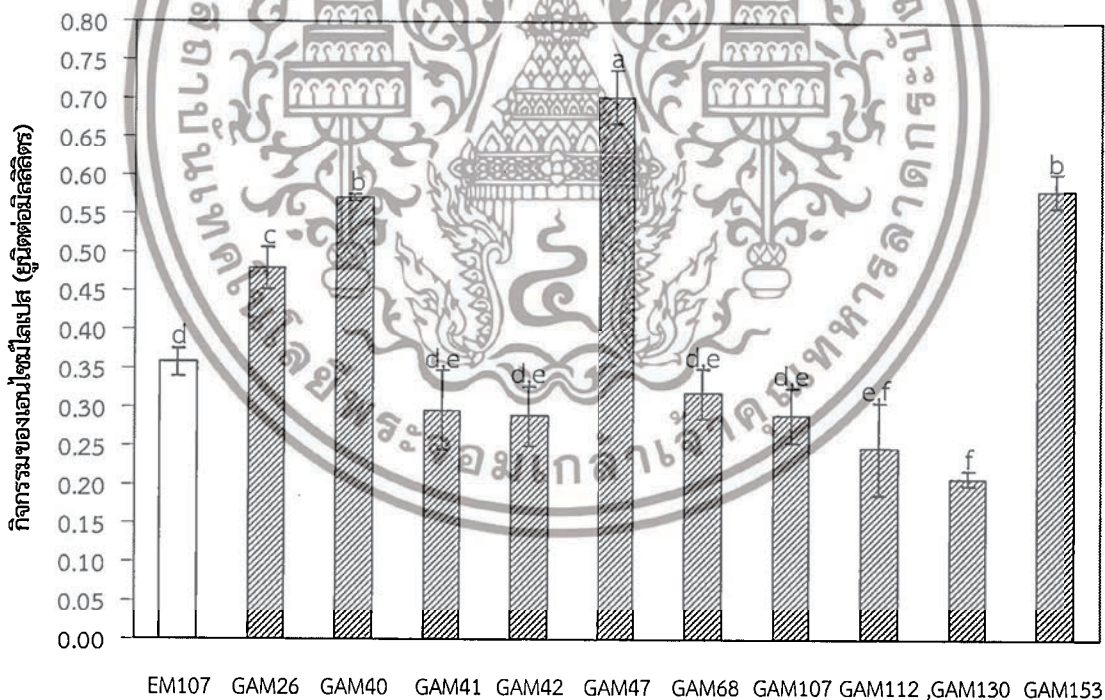
มิลลิกรัม และยังมีผลต่อความคงตัวของเซลล์ โดยเซลล์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้นรังสี 20 เกรย์ จะมีความคงตัวสูงกว่า สามารถนำมาใช้ซ้ำได้มากกว่า 8 ครั้ง และได้ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่สูงถึงร้อยละ 79 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ถึงร้อยละ 88 และงานวิจัยของ Sun และคณะ (2004) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *P. rhodozyma* ด้วยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 กิโลเกรย์ โดยคัดเลือกจากอัตราการอยู่รอดร้อยละ 5 ซึ่งทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ 3.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์ยีสต์ ซึ่งมากกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการกลายพันธุ์ถึงร้อยละ 50 และจากผลการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด จึงนำไปใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

สิ่งก่อกการกลายพันธุ์ทั้งรังสีและสารเคมีต่างเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสภายในโมเลกุลของสายโพลีนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม (random mutagenesis) เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เมื่อเกิดการถ่ายแบบขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ถ้าการเปลี่ยนแปลงนั้นอยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่ต้องการจะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยอาจทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้นหรือน้อยลงก็ได้ (สาวิตร์, 2549) และการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีอัตราการอยู่รอดจำนวนน้อยหลังจากการใช้สิ่งก่อกการกลายพันธุ์ในแต่ละครั้ง แล้วนำสายพันธุ์ที่ดีที่สุดซึ่งอาจมีผลผลิตที่ต้องการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยมาทำการกลายพันธุ์ซ้ำอย่างต่อเนื่อง โดยใช้สิ่งก่อกการกลายพันธุ์ที่ต่างไปจากเดิมจะได้สายพันธุ์ที่มีผลผลิตเพิ่มขึ้นทีละน้อย แต่จะมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์มากกว่าการทำการทดสอบกับเซลล์รอดชีวิตจำนวนมากในการกลายพันธุ์ไม่กี่ครั้ง ทั้งนี้เนื่องมาจากโดยทั่วไปสายพันธุ์กลายที่มีผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมากจากสายพันธุ์เดิมนั้นหายากกว่าสายพันธุ์ที่มีผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (Brock, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tan และคณะ (2003) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Candida* sp. 90-17 ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 112 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ด้วยการใช้รังสีอัตราไวโอเลต สารไนโตรโซแกมมิดีน (nitrosoguanidine, NTG) และการอาบด้วยนิวตรอน พบว่าสายพันธุ์กลาย *Candida* sp. 90-123 ที่ผ่านกรกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัตราไวโอเลต สายพันธุ์กลาย *Candida* sp. 90-49 ที่ผ่านกลายพันธุ์ด้วยสาร NTG และสายพันธุ์กลาย *Candida* sp. 90-125 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยการอาบนิวตรอน ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นเป็น 230, 590 และ 1,108 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์กลาย *Candida* sp. 90-125 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 10 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ร้อยละของอัตราการรอดอยู่รอดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย EM107 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยการฉายรังสีแกมมา ^{60}Co ที่ความเข้มข้นของรังสี 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กิโลเกรย์



สายพันธุ์ยีสต์

ภาพที่ 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ไคเปสของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย 10 สายพันธุ์ ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ^{60}Co ที่ความเข้มข้นของรังสี 2 กิโลเกรย์ เมื่อนำมาเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน และกำหนดให้ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือก

4.5.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

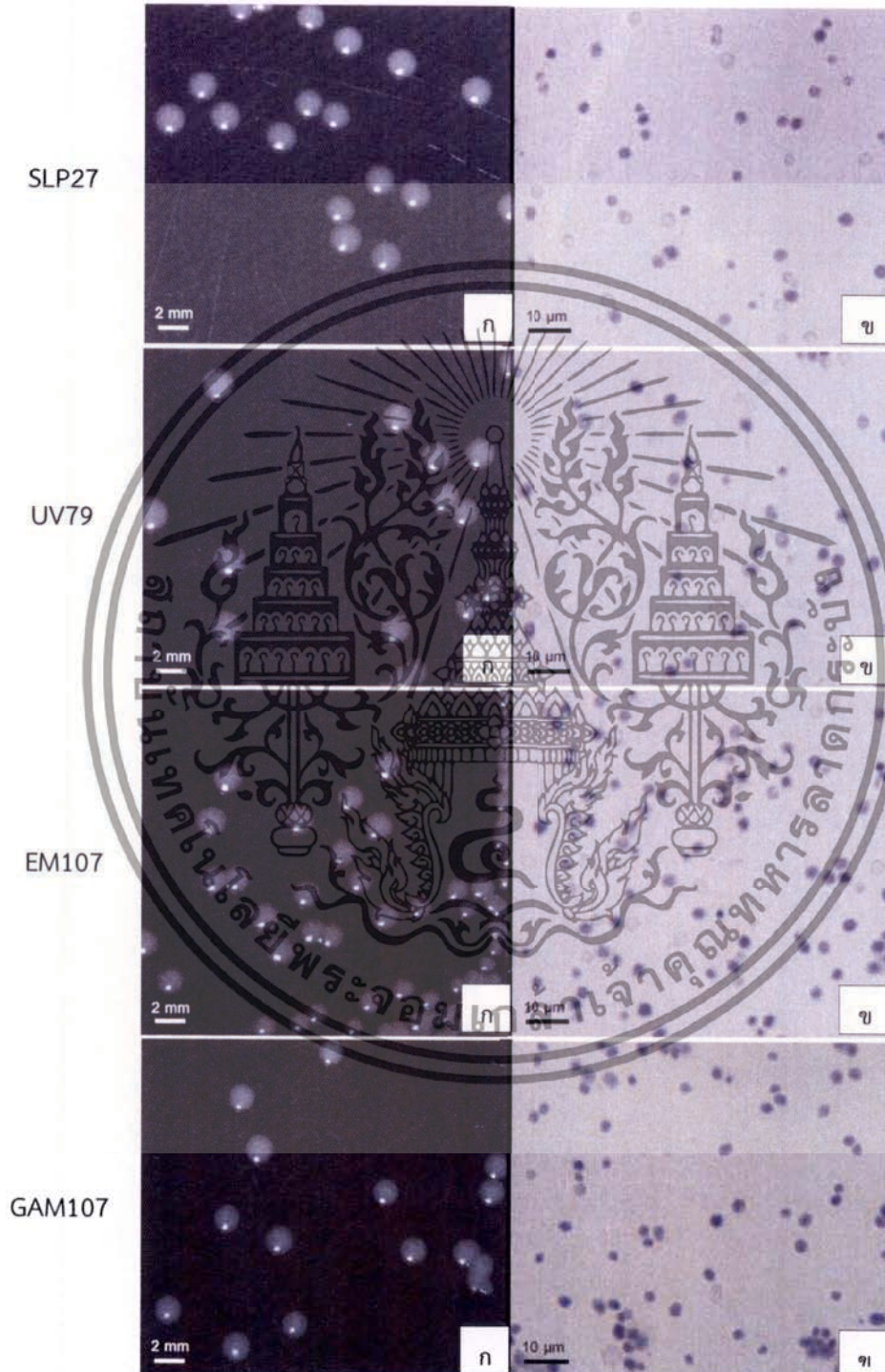
เมื่อนำเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม SLP27 และสายพันธุ์กลาย UV79, EM107 และ GAM47 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาสังเกตลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีลักษณะการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน โดยโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร รูปร่างโคโลนีมีรูปแบบกลม (circular) ลักษณะขอบโคโลนีเป็นแบบขอบเรียบไม่มีรอยหยัก (entire) พื้นผิวของโคโลนีเรียบ (smooth) การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบโค้งนูนจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย (convex) โคโลนีมีความหนืด (consistency) คล้ายเนยเหลว (butyrous) และมีความชุ่ม (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554) สีของโคโลนีจะมีสีขาวในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และจะมีสีเหลืองอ่อนเมื่อมีระยะเวลาการเจริญมากกว่า 24 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.8-ก จากนั้นทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ยีสต์ โดยนำโคโลนีของเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มาย้อมสีเมทิลีนบลู และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเซลล์ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีลักษณะของเซลล์ที่ไม่แตกต่างกัน โดยมีรูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) ไม่มีการจัดเรียงตัวของเซลล์ และมีขนาดเซลล์ประมาณ 5 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 4.8-ข

4.5.2 ผลการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม

เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม SLP27 และสายพันธุ์กลาย UV79, EM107 และ GAM47 ในระดับสปีชีส์ด้วยวิธี D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequence โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI พบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันร้อยละ 100 สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จำนวน 576 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบส 5'-AAACCAACAGGGATTGCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGC AAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAAACAGAACGTACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATG AGATGTCCCAGACCTATGTAAGTTCCTTCGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAG TGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGA TGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTTGTTGAAAGGGAAGG GCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGG GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCCTCGGTAGTGTGTT ATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCAT AATGATCTTAAGTCGCCGTCT-3' ซึ่งพบว่าเชื้อยีสต์ที่ทำการคัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความเหมือนกับเชื้อยีสต์ *Candida orthopsilosis* CBS 10906 (นิวคลีโอไทด์ที่ 34-608) ร้อยละ 99.83 โดยมีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง คือ นิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 176 ในเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นเบสไทมีน แตกต่างจากในเชื้อยีสต์ *Candida orthopsilosis* CBS 10906 ซึ่งเป็นเบสอะดีนีน (นิวคลีโอไทด์ที่ 208) และมี gap 1 ตำแหน่ง ระหว่างนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 67 และ 68 ในเชื้อยีสต์ *Candida orthopsilosis* CBS 10906 นอกจากนี้ยังเหมือนกับ *Candida orthopsilosis* สายพันธุ์อื่นๆ ร้อยละ 100 จึงจำแนกเชื้อยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นเชื้อยีสต์ *Candida orthopsilosis* ซึ่งบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA เป็นบริเวณที่มีการวิวัฒนาการเร็ว จึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาก ซึ่งความแตกต่างในบริเวณนี้เพียงพอที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ (Kurtzman และ Robnett, 1998) โดยเชื้อยีสต์ *Candida orthopsilosis* จัดอยู่ในกลุ่มแอสโคไมยซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeasts) (รัฐตา และคณะ, 2555) และจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ที่อยู่ในวงศ์ Candidaceae โดยสกุล *Candida* เป็นสกุลที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (สาวิตรี, 2540)



ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง YM ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27, UV79, EM107 และ GAM47 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 40 เท่า (ก) และรูปร่างของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 400 เท่า (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่คัดเลือก

4.6.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชัน

จากการทดลองการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 โดยใช้น้ำมันปาล์มดิบ พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชันโดยใช้แอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิดได้ คือ เมทานอล เอทานอลบริสุทธิ์ และเอทานอลร้อยละ 95 ทั้งที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง โดยพบแถบของโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไตรกลีเซอไรด์ และเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.9 เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชันเป็นปฏิกิริยาการสลายพันธะของเอสเทอร์ด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกไตรกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เกิดเป็นเอสเทอร์และไดกลีเซอไรด์ จากนั้นไดกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยาต่อกับแอลกอฮอล์ เกิดเป็นเอสเทอร์และโมโนกลีเซอไรด์ ในขั้นตอนสุดท้ายโมโนกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยาต่อกับแอลกอฮอล์ เกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์และกลีเซอรอล (อัจฉรา และอภิพงศ์, 2557) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fedosov และคณะ (2011) ได้ทำการวิเคราะห์การผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชันของน้ำมันเรพชิดและเอทานอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ซึ่งจะได้แถบของโมโนกลีเซอไรด์ เป็นลำดับแรก จากนั้นเป็นไดกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไตรกลีเซอไรด์ และเอทิลเอสเทอร์ เป็นลำดับสุดท้าย



ภาพที่ 4.9 โครมาโตแกรมภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชันของน้ำมันปาล์มดิบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ทดสอบโดยใช้เมทานอล เอทานอลบริสุทธิ์ และเอทานอลร้อยละ 95 ตามลำดับ โดยแถวที่ 1 เป็นสารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ แถวที่ 2, 3, 4 เป็นการทดสอบที่เวลา 12 ชั่วโมง และแถวที่ 5, 6, 7 ทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

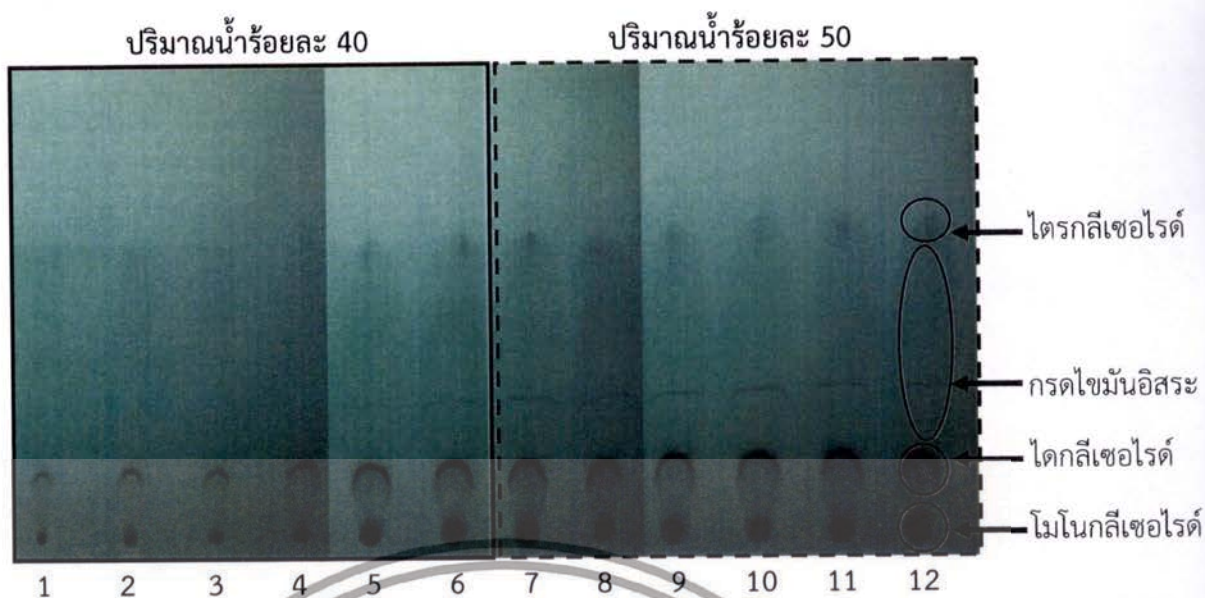
จากการทดลองการเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 โดยใช้ไขมันปาล์มดิบ พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสได้ โดยมีกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นทั้งในสภาวะที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 40 และ 50 (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) โดยที่เวลา 6 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 40 จะมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงสุดร้อยละ 18.3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับที่เวลา 6 สัปดาห์ ในสภาวะที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 50 จะมีปริมาณกรดไขมันอิสระรองลงมาร้อยละ 15.9 ดังตารางที่ 4.2 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับน้ำ โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายที่พันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอล และกรดอินทรีย์ ซึ่งก็คือ กรดไขมันอิสระ (Gandhi, 1997) และเมื่อนำน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านขั้นตอนการทำปฏิกริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งจะมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง มาทำการทดลองการเร่งปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยแบ่งเป็นการเติมเชื้อยีสต์และไม่เติมเชื้อยีสต์ เพื่อเป็นการทดสอบเอนไซม์ไลเปสที่ปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ซึ่งมีอยู่ในน้ำมันหลังจากผ่านขั้นตอนการทำปฏิกริยาไฮโดรไลซิส และทดสอบปฏิกริยาโดยใช้แอลกอฮอล์ 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทานอลบริสุทธิ์ และเอทานอลร้อยละ 95 พบว่าเอนไซม์ไลเปสไม่สามารถเร่งปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ โดยไม่พบแถบของเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ ดังภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์นั้นอาจมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่เป็นไตรกลีเซอไรด์มากกว่ากรดไขมันอิสระ โดยปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจะเกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นกรดไขมันอิสระทำปฏิกริยากับแอลกอฮอล์เกิดเป็นเอสเทอร์ (เกษรฯ, 2553) และจากการพบแถบของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ได้แก่ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่เร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นการย่อยสลายน้ำมันจึงเป็นไปในแบบสุ่ม ทำให้มีองค์ประกอบที่เหลือในน้ำมันเป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ ดังภาพที่ 4.10 สอดคล้องงานวิจัยของ Macrae (1983) ได้ทำการสรุปชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยเชื้อยีสต์สกุล *Candida* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มที่ไม่มีมีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ สามารถเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้ทุกตำแหน่ง จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ซึ่งในระหว่างปฏิกริยาอาจมีไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เกิดขึ้นได้

ตารางที่ 4.2 ร้อยละปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันปาล์มดิบจากสภาวะที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 40 และร้อยละ 50 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์

เวลา (สัปดาห์)	ร้อยละปริมาณกรดไขมันอิสระ	
	ปริมาณน้ำร้อยละ 40	ปริมาณน้ำร้อยละ 50
2	7.8 ± 0.14 ^d	7.7 ± 0.04 ^d
4	11.1 ± 0.97 ^c	10.5 ± 0.56 ^c
6	18.3 ± 0.19 ^a	15.9 ± 0.16 ^b

กำหนดให้ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



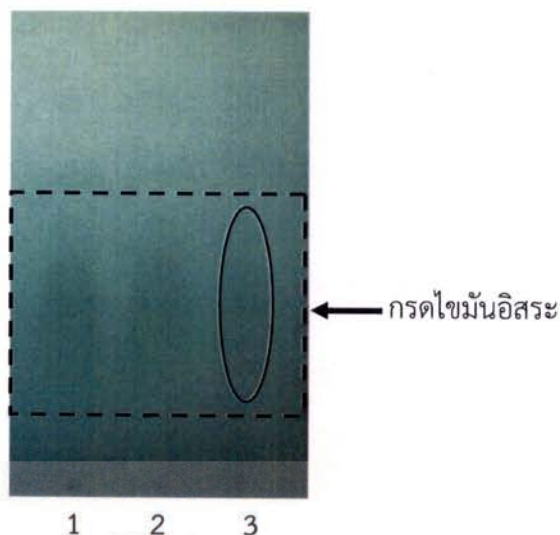
ภาพที่ 4.10 โครมาโตแกรมภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มดิบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ทดสอบโดยใช้เมทานอล เอทานอลบริสุทธิ์ และเอทานอลร้อยละ 95 ตามลำดับ ปริมาณน้ำร้อยละ 40 แถวที่ 1, 2, 3 เติมเชื้อยีสต์ และแถวที่ 4, 5, 6 ไม่เติมเชื้อยีสต์ และปริมาณน้ำร้อยละ 50 แถวที่ 7, 8, 9 เติมเชื้อยีสต์ และแถวที่ 10, 11, 12 ไม่เติมเชื้อยีสต์ โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.6.3 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิก

จากการทดลองการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 โดยใช้กรดโอเลอิก พบว่าเอนไซม์ไลเปสไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อการผลิตไบโอดีเซลของกรดโอเลอิกและแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิดได้ คือ เมทานอล เอทานอลบริสุทธิ์ และเอทานอลร้อยละ 95 โดยพบเฉพาะแถบของกรดไขมันอิสระ แต่ไม่พบแถบของเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ ดังภาพที่ 4.11 อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ไม่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่เป็นกรดไขมันอิสระ จึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่มีสารตั้งต้นเป็นกรดไขมันอิสระได้

จากผลการทดลองการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลตามข้างต้นที่ได้กล่าวมาแล้ว อาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่เป็นไตรกลีเซอไรด์หรือน้ำมันได้ดีกว่าสารตั้งต้นที่เป็นกรดไขมันอิสระ หรือมีความสามารถในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ดีกว่าการสร้างพันธะเอสเทอร์ (เกษรา, 2553) จึงทำให้สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและไฮโดรไลซิสได้ แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสามารถนำน้ำมันปาล์มดิบไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งชีวภาพจากเชื้อสายพันธุ์กลาย GAM47 ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นจากไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นกรดไขมันอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

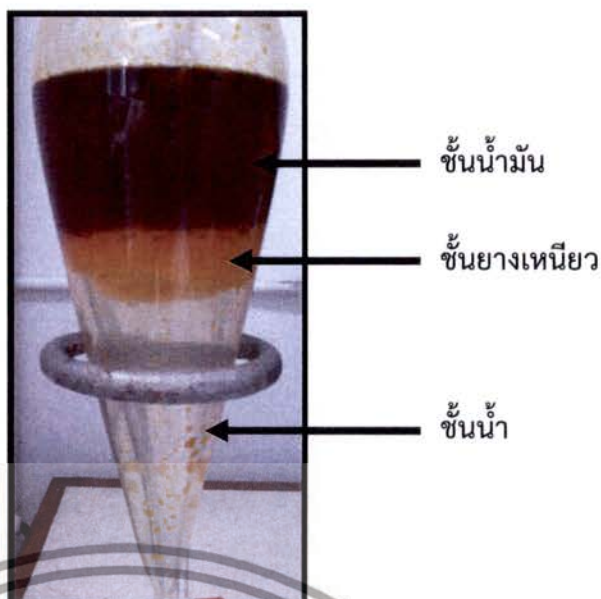


ภาพที่ 4.11 โครมาโตแกรมภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดโอเลอิกด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดย แถวที่ 1 ทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้เมทานอล แถวที่ 2 เอทานอลบริสุทธิ์ และแถวที่ 3 เอทานอลร้อยละ 95 โดยทำการป่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.7 ผลการแยกยางเหนียวจากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้สารละลายกรด

จากการทำการแยกยางเหนียวจากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้กรดฟอสฟอริกผสมกับน้ำ พบว่าเกิดการแยกชั้นออกเป็น 3 ชั้น จากชั้นบนลงล่าง คือ ชั้นน้ำมันปาล์มดิบ ชั้นยางเหนียว และชั้นน้ำตามลำดับ ดังภาพที่ 4.12 ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำมันปาล์มดิบหลังจากทำการแยกยางเหนียวแล้วประมาณ 146.2 กรัม จากน้ำมันปาล์มดิบเริ่มต้น 200 กรัม คิดเป็นร้อยละ 73.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และน้ำมันปาล์มดิบจะมีลักษณะหนืดน้อยลง โดยทั่วไปแล้วในน้ำมันปาล์มดิบนั้นจะมีส่วนประกอบหลักเป็นพวงกลีเซอไรด์ และส่วนประกอบอื่นๆ เล็กน้อย เช่น ฟอสฟาไทด์ที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวทำให้้ำมันมีลักษณะเหนียวข้น ซึ่งหากเกิดการตกค้างในน้ำมันไบโอดีเซล จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพ เนื่องจากยางเหนียวจะไม่เกิดการเผาไหม้ และทำให้เกิดการอุดตันในเครื่องยนต์ได้ (กิตติศักดิ์, 2549) อีกทั้งยังขัดขวางการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นระหว่างไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่ดี ส่งผลให้การเกิดผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ลดน้อยลงอีกด้วย ซึ่งการใช้สารละลายกรดจะเป็นตัวช่วยในการเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพของฟอสฟาไทด์ให้อยู่ในลักษณะที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น และการใช้น้ำจะเป็นตัวช่วยในการชะยางเหนียวออกจากชั้นของน้ำมันได้ง่ายขึ้น (สินินาฏ และคณะ, 2553) ดังนั้นน้ำมันปาล์มดิบที่ผ่านกระบวนการแยกยางเหนียวแล้ว เมื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล จะส่งผลให้ได้ไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีขึ้น (กิตติศักดิ์, 2549) โดยจากผลการทดลองจะนำส่วนที่เป็นน้ำมันที่เก็บได้จากชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การแยกชั้นของผลผลิตหลังปฏิบัติการกำจัดยางเหนียวของน้ำมันปาล์มดิบ โดยการใช้สารละลายกรดฟอสฟอริกร่วมกับน้ำ

4.8 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวละเอียดผสมกากน้ำตาลด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง

4.8.1 ผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อปริมาณตัวเร่งชีวภาพต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส การเปลี่ยนแปลงความชื้น และพีเอช

เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อปริมาณตัวเร่งชีวภาพและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ *C. orthopositis* สายพันธุ์กลาย GAM47 พบว่าที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 (ปริมาณต่อน้ำหนักรำข้าว) ที่เวลา 60 ชั่วโมง ที่ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 มีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 5.03×10^7 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพรองลงมาเท่ากับ 4.87×10^7 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ดังตารางที่ 4.3 และที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6 และ 12 จะมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพน้อยที่สุด ดังภาพที่ 4.13-ก ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณน้ำตาลที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 มีไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่เชื้อยีสต์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่ายที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 12 อาจมากเกินไปส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ อาจเนื่องมาจากในกากน้ำตาลมีสารที่เป็นพิษต่อเซลล์บนเบื่อนอยู่ (Karatay และ Donmez, 2010) เมื่อใช้ในปริมาณมากก็จะเกิดการเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ซึ่งจากการทดลองการใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 10 มีความเหมาะสมในเจริญเติบโตมากที่สุด ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงสุด ที่เวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งมีผลทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 1.43 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ส่วนที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสรองลงมาเท่ากับ 1.40 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ดังภาพที่ 4.13-ข ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.4 ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้สูงสุดจะอยู่ในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงที่เริ่มขาดแคลนสารอาหาร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์จึงถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ (Suzuki และคณะ, 1988) ทั้งนี้เชื้อยีสต์จะใช้สารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่เป็นน้ำตาลอิสระจากกากน้ำตาลก่อน ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์นำมาใช้ได้ง่ายที่สุด จึงทำให้ระยะเวลาในช่วงแรกมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ปริมาณน้อย และเมื่อเวลาผ่านไปสารอาหารเริ่มหมดลง เชื้อยีสต์จะใช้ไขมันที่มีอยู่ในรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนแทน (มนัสนันท์, 2547) โดยการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมามากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นในช่วงการเจริญสูงสุด ดังภาพที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อ (growth associated product) (อรัญ, 2555) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมนัสนันท์ (2547) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *R. glutinis* DM28 จากการหมักแบบแข็งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าว พบว่ากิจกรรมไลเปสมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 โดยมีค่าเท่ากับ 0.97 ยูนิตต่อกรัมรำข้าว และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด คือ 54 มิลลิกรัมต่อกรัมรำข้าว และจะลดลงหลังวันที่ 6 เนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ลดลง และงานวิจัยของชุตินา (2550) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ *C. rogersii* พบว่าเชื้อยีสต์จะเริ่มผลิตเอนไซม์ไลเปสในช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ และจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด 0.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง ในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ

ตารางที่ 4.3 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50±2 บมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

ปริมาณ กากน้ำตาล (ร้อยละ)	จำนวนเซลล์ × 10 ⁷ (โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง)						
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	84 ชั่วโมง
6	0.79±0.08 ⁿ	1.88±0.11 ⁱ	2.49±0.22 ^{jj}	3.22±0.17 ^h	3.96±0.08 ^{ef}	4.02±0.11 ^{ef}	3.55±0.21 ^s
8	0.49±0.03 ^o	1.52±0.14 ^m	2.29±0.17 ^{jk}	3.85±0.29 ^{ef}	4.76±0.10 ^{bc}	4.56±0.12 ^{cd}	4.45±0.20 ^d
10	0.90±0.46 ⁿ	2.16±0.18 ^k	3.46±0.15 ^{gh}	4.34±0.10 ^d	5.03±0.13 ^a	4.87±0.15 ^{ab}	4.44±0.10 ^d
12	0.94±0.01 ⁿ	2.67±0.12 ⁱ	3.29±0.26 ^h	4.01±0.17 ^{ef}	4.07±0.09 ^e	3.98±0.18 ^{ef}	3.81±0.19 ^f

กำหนดให้^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

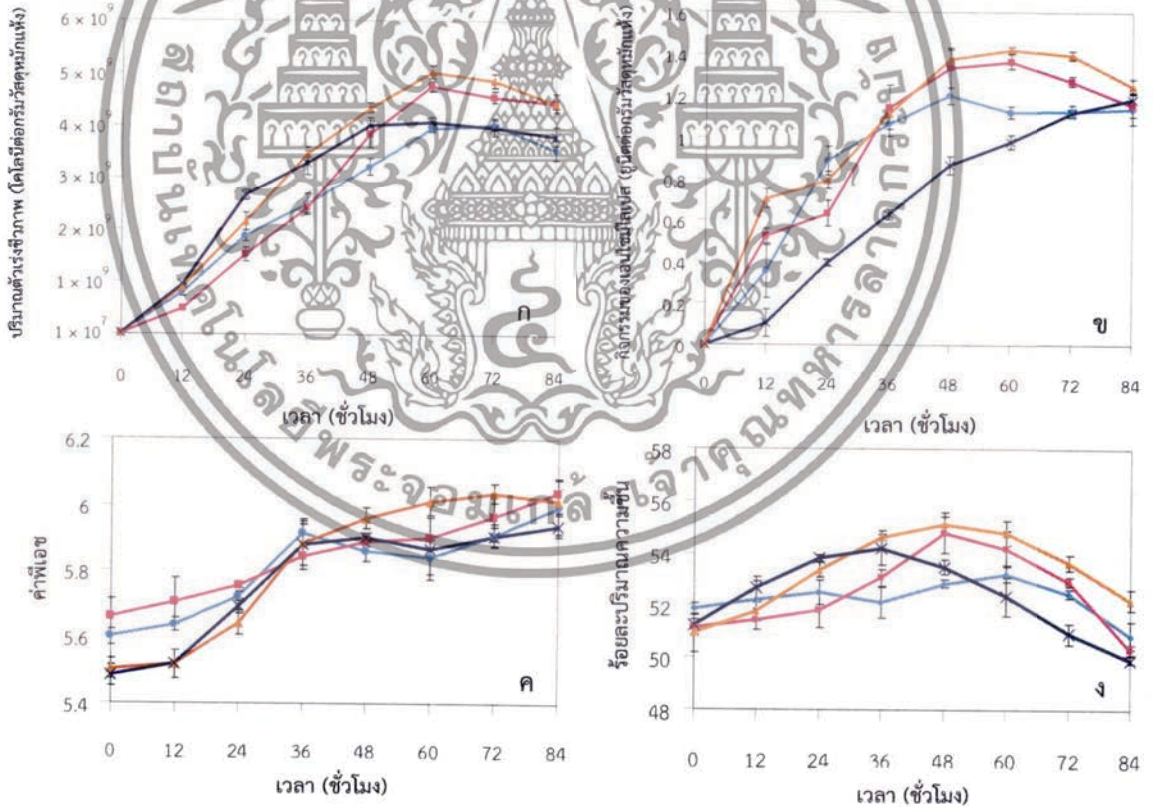
ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50±2 บมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

ปริมาณ กากน้ำตาล (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง)						
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	84 ชั่วโมง
6	0.35±0.14 ^o	0.89±0.08 ^k	1.07±0.07 ^{hi}	1.29±0.04 ^{bcde}	1.20±0.04 ^{efg}	1.27±0.03 ^{de}	1.14±0.08 ^{gh}
8	0.53±0.04 ⁿ	0.64±0.07 ^m	1.15±0.12 ^{sh}	1.12±0.03 ^{sh}	1.37±0.04 ^{abcd}	1.13±0.03 ^{gh}	1.16±0.06 ^{fg}
10	0.71±0.05 ^{lm}	0.80±0.05 ^{kl}	1.12±0.04 ^{sh}	1.38±0.05 ^{abc}	1.43±0.01 ^a	1.40±0.02 ^{ab}	1.25±0.03 ^{ef}
12	0.03±0.03 ^q	0.12±0.02 ^q	0.23±0.03 ^p	0.47±0.05 ⁿ	0.98±0.04 ^{ij}	1.12±0.02 ^{gh}	1.29±0.05 ^{cde}

กำหนดให้^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

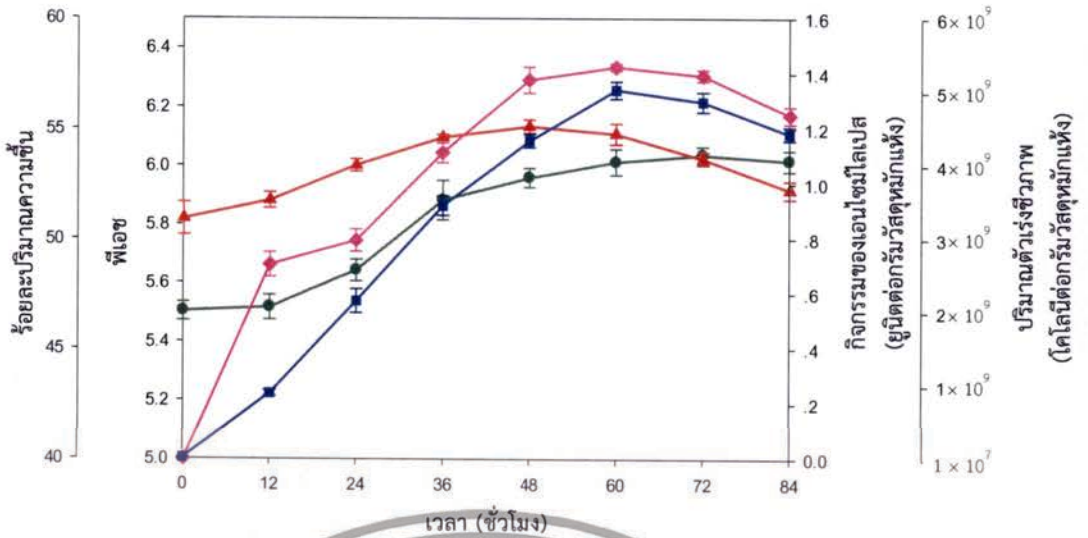
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่แจ้งขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่าพีเอชระหว่างการหมักที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 จะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันทุกการทดลอง โดยจะมีค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงระหว่าง 5.5-6.04 ดังภาพที่ 4.13-ค โดยปกติเชื้อยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชเริ่มต้นในช่วง 4.5-6.5 แต่มีเชื้อยีสต์บางชนิดที่สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชกว้าง คือ 3-8 แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเจริญได้ไม่ดีในพีเอชที่เป็นค่า (Walker, 1998) และค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักจะบ่งบอกถึงผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่สร้างผลิตภัณฑ์ประเภทกรดออกมาทำให้ค่าพีเอชลดลง แต่ถ้ามีค่าพีเอชเพิ่มขึ้น แสดงว่าจุลินทรีย์สร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นแอมโมเนียออกมาจากการย่อยสารประกอบไนโตรเจน ส่งผลทำให้มีค่าพีเอชสูงขึ้น (Gombert, 1999) และผลของการเปลี่ยนแปลงความชื้น พบว่าความชื้นที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรก และจะค่อยๆ ลดลงตามลำดับ ดังภาพที่ 4.13-ง โดยทุกการทดลองจะมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของความชื้นอาจเนื่องมาจากเมื่อเชื้อยีสต์เจริญจะมีการใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสที่ได้จากกากน้ำตาล ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงาน (Walker, 1998) ส่วนการลดลงของความชื้นในช่วงหลังจากการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์อาจเกิดจากเชื้อมีการเจริญลดลง ทำให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมน้อยลงตามไปด้วย ร่วมกับเกิดการระเหยของน้ำออกไปตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (Martin และคณะ, 1993) ส่งผลให้ความชื้นลดลง



ภาพที่ 4.13 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (ก) กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ (ข) ค่าพีเอช (ค) และปริมาณความชื้น (ง) ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีการแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6 (●), 8 (■), 10 (▲) และ 12 (x) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ± 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (■) กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (◆) ค่าพีเอช (●) และปริมาณความชื้น (▲) ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ± 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

4.8.2 ผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อปริมาณตัวเร่งชีวภาพต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส การเปลี่ยนแปลงความชื้น และพีเอช

เมื่อทำการศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นต่อปริมาณตัวเร่งชีวภาพ พบว่าที่ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) ที่เวลา 60 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 มีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงที่สุดเท่ากับ 6.43×10^9 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับที่ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพรองลงมาเท่ากับ 6.40×10^9 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ดังตารางที่ 4.5 และปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 และ 70 จะมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพน้อยที่สุดดังภาพที่ 4.15-ก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักที่สูง จะทำให้เชื้อยีสต์เจริญเติบโตได้ไม่ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อมีความชื้นสูงจะทำให้รำข้าวจับตัวกันมีลักษณะเป็นก้อน ทำให้เกิดการถ่ายเทอากาศได้ไม่ดี และเกิดความชื้นสะสม (Rathbun และ Shuler, 1983) แต่เมื่อวัสดุหมักมีความชื้นน้อยลง รำข้าวจะมีลักษณะร่วนมากกว่า เกิดการถ่ายเทอากาศได้ดีกว่า ซึ่งปริมาณเชื้อที่มากจะส่งผลให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง พบว่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ที่เวลา 60 ชั่วโมง ที่มีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงสุด จะมีค่ากิจกรรมของไลเปสสูงที่สุด คือ 1.60 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ดังภาพที่ 4.16 ส่วนที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของไลเปสรองลงมาเท่ากับ 1.44 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ดังภาพที่ 4.15-ข ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 4.6 ทั้งนี้เนื่องจากความชื้นที่สูงจะส่งผลต่อการจับตัวเป็นก้อนของวัสดุหมักดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง และเมื่อการเจริญเติบโตลดลง การผลิตเอนไซม์ก็จะลดลงตามไปด้วยเช่นกัน (Carrizales และคณะ, 1981) โดยงานวิจัยของธรร (2549) ได้ทำการศึกษาปริมาณความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา *R. oligosporus* ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแห้งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวสาลีผสมกากถั่วเหลือง ศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50, 55 และ 60 พบว่าความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ ร้อยละ 55 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 7.83 ยูนิตต่อน้ำหนักของวัสดุหมักแห้ง ที่เวลา 96 ชั่วโมง และพบว่าที่ความชื้นสูงกว่าร้อยละ 55 จะทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลง เนื่องจากเกิดการจับตัวกันแน่นของวัสดุหมัก ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยลงตามไปด้วย

ตารางที่ 4.5 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยง เชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40±2, 50±2, 60±2 และ 70±2 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	จำนวนเซลล์ × 10 ⁹ (โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง)						
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	84 ชั่วโมง
40	1.51±0.40 ^j	3.45±0.26 ^s	4.01±0.13 ^{ef}	5.25±0.15 ^c	6.43±0.17 ^a	6.40±0.30 ^a	6.26±0.52 ^a
50	1.35±0.38 ^l	2.98±0.20 ^h	4.41±0.14 ^{de}	5.68±0.15 ^b	5.73±0.53 ^b	4.66±0.21 ^d	3.90±0.06 ^f
60	0.80±0.16 ^k	2.03±0.18 ⁱ	2.92±0.23 ^h	2.82±0.11 ^h	2.84±0.18 ^h	3.06±0.32 ^{gh}	3.04±0.34 ^{gh}
70	0.59±0.11 ^k	1.56±0.26 ^j	2.70±0.34 ^h	2.23±0.11 ⁱ	2.05±0.22 ⁱ	2.18±0.12 ⁱ	2.15±0.13 ⁱ

กำหนดให้ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

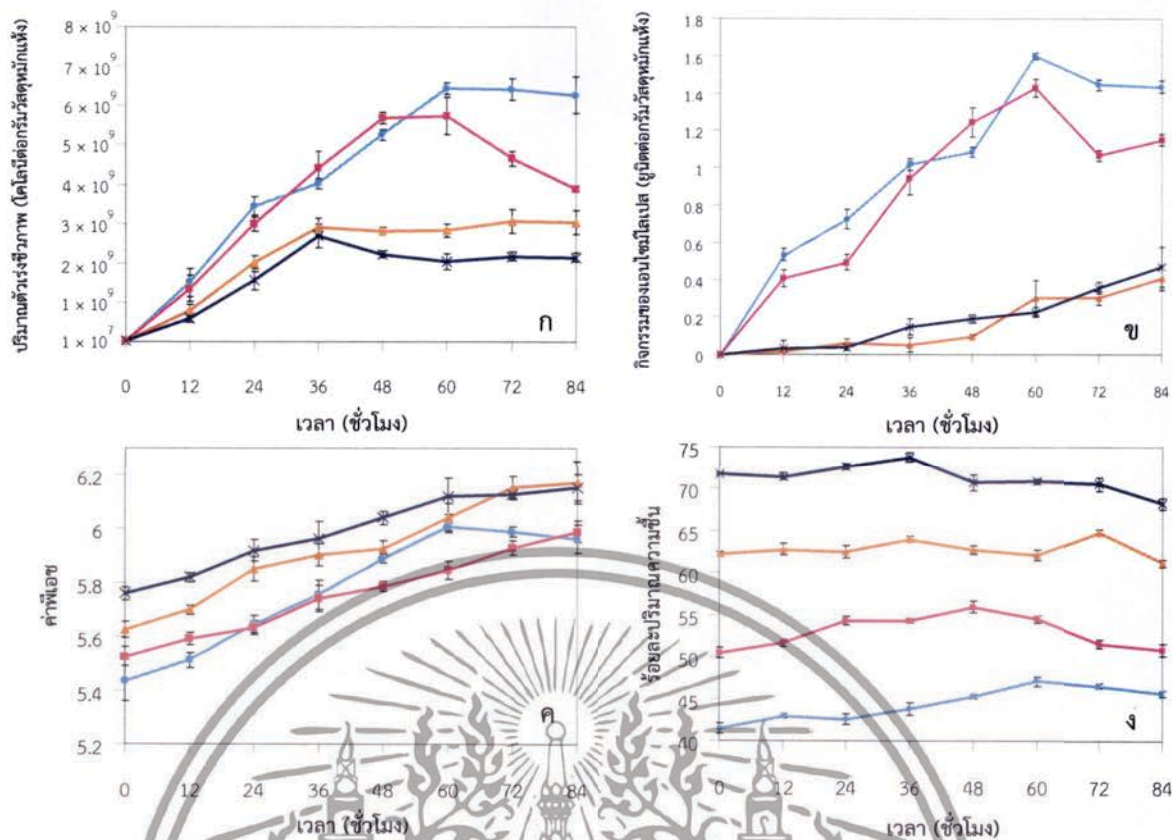
ตารางที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40±2, 50±2, 60±2 และ 70±2 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ปมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง)						
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	60 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	84 ชั่วโมง
40	0.14±0.04 ^{klmn}	0.72±0.16 ^d	1.02±0.03 ^c	1.08±0.03 ^c	1.60±0.02 ^a	1.44±0.03 ^b	1.43±0.04 ^b
50	0.11±0.01 ^{klmn}	0.18±0.02 ^{ijklm}	0.43±0.21 ^{figh}	0.56±0.04 ^{ef}	1.43±0.05 ^b	0.67±0.10 ^{de}	0.63±0.16 ^{de}
60	0.02±0.01 ⁿ	0.06±0.02 ^{lmn}	0.10±0.04 ^{lm}	0.10±0.01 ^{klmn}	0.30±0.11 ^{hij}	0.30±0.04 ^{hij}	0.41±0.08 ^{gh}
70	0.04±0.04 ⁿ	0.04±0.02 ^{mn}	0.15±0.05 ^{klmn}	0.19±0.02 ^{kl}	0.23±0.03 ^{ijk}	0.36±0.03 ^{ghi}	0.47±0.12 ^{fg}

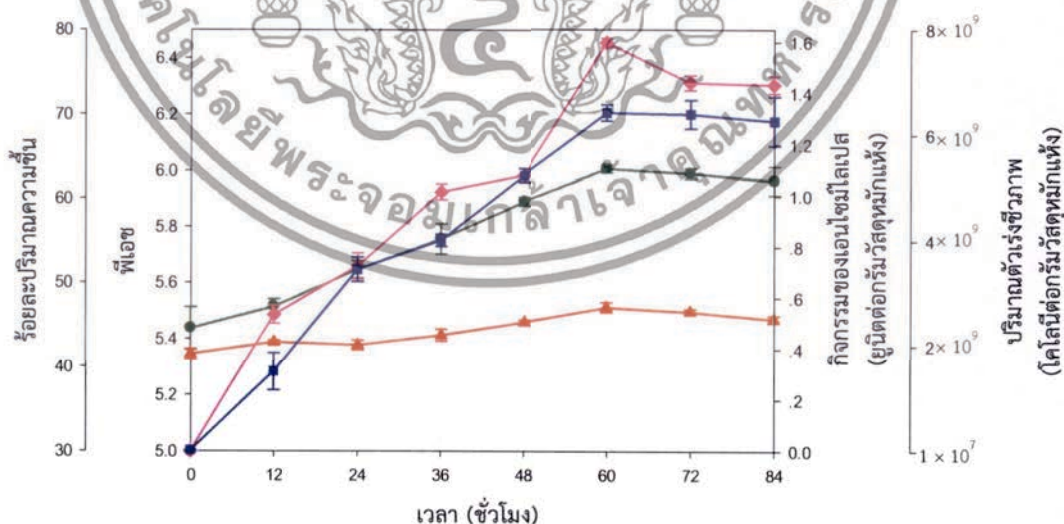
กำหนดให้ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อทำการศึกษผลของการเปลี่ยนแปลงพีเอช พบว่าพีเอชระหว่างการหมักที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 จะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 4.15-ค เช่นเดียวกับผลการทดลองจากข้อ 4.8.1 โดยจะมีช่วงพีเอชระหว่าง 5.4-6.17 และผลของการเปลี่ยนแปลงความชื้น พบว่าความชื้นของทุกการทดลองที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงแรก และจะลดลงในช่วงหลังตามลำดับ ดังภาพที่ 4.15-ง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.8.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (ก) กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ข) ค่าพีเอช (ค) และปริมาณความชื้น (ง) ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย-GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีการแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 10±2 (●), 30±2 (■), 50±2 (▲) และ 70±2 (×) ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.16 ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (■) กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (◆) ค่าพีเอช (●) และปริมาณความชื้น (▲) ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 ที่เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลที่มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40±2 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 โดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาลด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวเร่งชีวภาพ คือ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ที่เวลา 60 ชั่วโมง สามารถผลิตปริมาณตัวเร่งชีวภาพได้สูงสุด 6.43×10^9 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 1.60 ยูนิตต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ซึ่งกลูโคสจากกากน้ำตาลนั้นเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเชื้อยีสต์สามารถนำไปใช้เป็นสารอาหารในกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ง่าย และเมื่อสารอาหารเริ่มขาดแคลน เชื้อยีสต์จะใช้ไขมันที่มีอยู่ในรำข้าว ซึ่งโดยส่วนใหญ่ไขมันที่พบเป็นไตรกลีเซอไรด์ (Salunkhe และคณะ, 1992) เป็นแหล่งคาร์บอนแทน โดยไขมันสามารถเหนียวนำไปให้เชื้อยีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยไตรกลีเซอไรด์เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dalmau และคณะ (2000) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ *C. rugosa* พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนทั้งประเภทคาร์โบไฮเดรตและไขมัน จะส่งผลให้เชื้อยีสต์มีอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่าการมีแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น

4.9 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนองจากปัจจัยอิสระที่ต้องการศึกษาประกอบด้วยเวลา (ชั่วโมง) อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล) และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) โดยปัจจัยอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพมีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่เวลาไม่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อพิจารณาผลเชิงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเวลากับร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพมีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ผลเชิงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเวลากับอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันกับร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพไม่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังตารางที่ 4.7

จากการทดลองระดับปัจจัยที่ต้องการศึกษาตามตารางที่ 4.8 สามารถสร้างกราฟ 3 มิติ ของพื้นที่การตอบสนองได้จำนวน 3 กราฟ ประกอบด้วยภาพที่ 4.17 แสดงพื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ ภาพที่ 4.18 แสดงพื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ และภาพที่ 4.19 แสดงพื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์

ผลการทดลองแสดงพื้นที่การตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างเวลาและอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน ดังภาพที่ 4.17 พบว่าเวลาเริ่มต้นและอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันที่ต่ำ จะมีปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์ต่ำ แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันสูงขึ้น จะทำให้มีปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์มากขึ้น เนื่องจากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณตัวเร่งชีวภาพเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์มากขึ้นตามไปด้วย และอัตราส่วนโดย

โมลของเอทานอลต่อน้ำมันที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยามากขึ้นอีกด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Srimhan และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์ม โดยใช้เชื้อยีสต์ *R. mucilagenosa* P11189 เป็นตัวเร่งชีวภาพพบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะสูงขึ้น เมื่อเวลาและอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันสูงขึ้น โดยจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 83.29 ที่เวลา 72 ชั่วโมง และอัตราส่วนเมทานอลต่อ น้ำมัน 6:1 ซึ่งจากภาพที่ 4.17 จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 58.16 ที่เวลา 72.6 ชั่วโมง และอัตราส่วนโมลของเอทานอลต่อ น้ำมัน 9.05:1 แต่ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์จะลดลง เมื่อเพิ่มเวลามากกว่า 72 ชั่วโมง และอัตราส่วนโดยโมลต่อของเอทานอลต่อ น้ำมันสูงกว่า 9.05:1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการยับยั้งเอนไซม์โดยความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้น และถ้าใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานเกินไปจะส่งผลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ลดลงเช่นกัน เนื่องจากจะเกิดปฏิกิริยาการผันกลับ (Meher และคณะ, 2006)

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์และค่าสถิติของร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์

Term	Coefficient	t-value	p-value
Constant	70.538	-36.969	0.000 ^a
X_1	1.352	1.068	0.291 ^b
X_2	11.932	9.426	0.000 ^a
X_3	-8.352	-6.598	0.000 ^a
X_1X_2	-1.663	-1.005	0.320 ^b
X_1X_3	-14.755	-8.921	0.000 ^a
X_2X_3	1.095	0.662	0.511 ^b
X_1^2	-6.594	-5.351	0.000 ^a
X_2^2	-13.688	-11.110	0.000 ^a
X_3^2	-18.893	-15.334	0.000 ^a

กำหนดให้ ^a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ ^b ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

X_1 คือ เวลา X_2 คือ อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อ น้ำมัน และ X_3 คือ ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ

ผลการทดลองแสดงพื้นที่การตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างเวลาและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ ดังภาพที่ 4.18 พบว่าช่วงเวลาเริ่มต้นและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพที่น้อย จะมีปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์ต่ำ แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพมากขึ้น จะมีผลทำให้ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นทำให้มีการเจริญของตัวเร่งชีวภาพมากขึ้นนั่นเอง และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพที่มากขึ้นก็ส่งผลให้ผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้นด้วยเช่นกัน จึงทำให้มีตัวเร่งปฏิกิริยาในการเกิดเอทิลเอสเทอร์สูงขึ้น ซึ่งจากภาพที่ 4.18 จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 63.08 ที่เวลา 98.9 ชั่วโมง และปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 6.31 แต่ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์จะลดลง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพมากขึ้น ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะเมื่อเวลาผ่านไป จะมีปริมาณเชื้อและเอนไซม์ที่มากขึ้น ซึ่งทำให้น้ำมันมีลักษณะขุ่นเหนียว เกิดการขัดขวางการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้น ทำให้การสัมผัสกันของสารตั้งต้นน้อยลง ส่งผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิ์ในเนื้อหาและข้อมูลทั้งหมดและเป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ผ่านการอนุญาตจากทางมหาวิทยาลัยฯ ถือว่าผิดกฎหมายและต้องแจ้งถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เกิดผลิตภัณฑ์ลดลงตามไปด้วย โดยทั่วไปแล้วการเพิ่มปริมาณตัวเร่งชีวภาพจะส่งผลให้อัตราการเร่งของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นด้วย แต่ถ้ามีปริมาณที่มากเกินไปกว่าระดับที่พอดีกับสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้น อีกทั้งส่งผลทำให้สารละลายในปฏิกิริยามีความหนืดสูง (เอ็ม, 2555) สอดคล้องกับงานวิจัย Nouredini และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลและเอทานอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า Lipase PS จากเชื้อแบคทีเรีย *P. cepacia* ในรูปของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะทำให้ได้ผลผลิตเอสเทอร์มากขึ้น แต่เมื่อถึงจุดที่มีปริมาณเอนไซม์มากเกินไปกลับพบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์มากขึ้นแต่อย่างใด ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันทั้งการใช้เอนไซม์อิสระและตรึงรูป

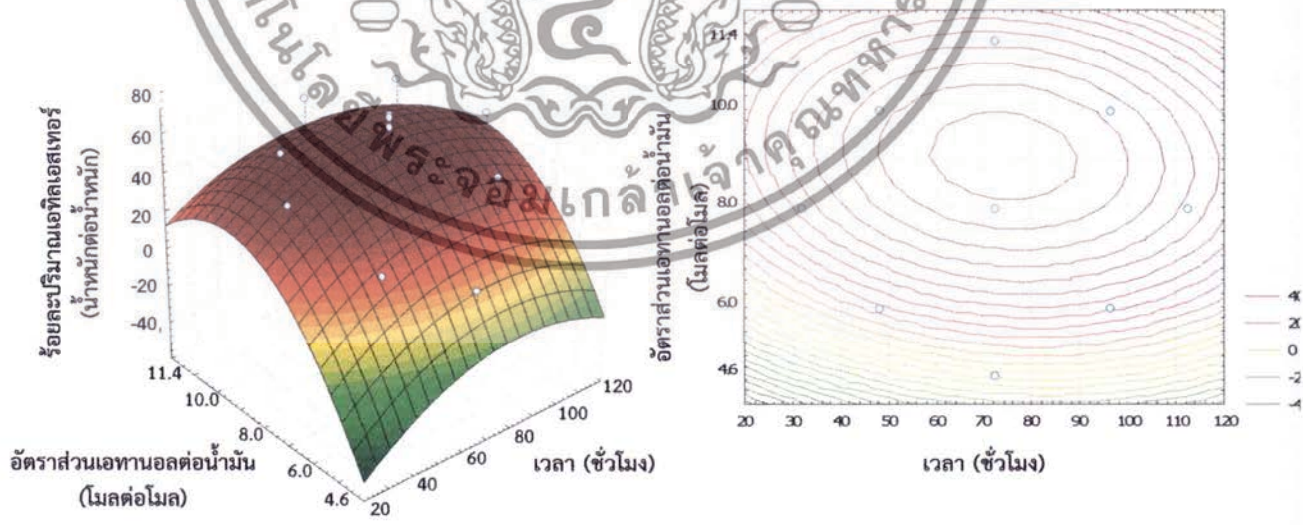
ตารางที่ 4.8 ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ เมื่อทดลองตามปัจจัยต่างๆ จากการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

สิ่งทดลอง	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์	
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	การวัด	การคาดคะเน
1	48	6:1	5	-1	-1	-1	8.09	11.11
2	96	6:1	5	+1	-1	-1	44.82	46.65
3	48	10:1	5	-1	+1	-1	31.74	36.11
4	96	10:1	5	+1	+1	-1	62.87	65.00
5	48	6:1	15	-1	-1	+1	21.55	21.72
6	96	6:1	15	+1	-1	+1	0.31	0
7	48	10:1	15	-1	+1	+1	50.63	51.10
8	96	10:1	15	+1	+1	+1	21.67	20.97
9	31.6	8:1	10	-1.682	0	0	49.95	49.66
10	112.4	8:1	10	+1.682	0	0	53.75	54.20
11	72	4.64:1	10	0	-1.682	0	12.39	11.86
12	72	11.36:1	10	0	+1.682	0	54.49	51.95
13	72	8:1	1.59	0	0	-1.682	36.77	31.25
14	72	8:1	18.41	0	0	+1.682	0.67	3.18
15	72	8:1	10	0	0	0	73.19	70.54
16	72	8:1	10	0	0	0	71.69	70.54
17	72	8:1	10	0	0	0	71.68	70.54
18	72	8:1	10	0	0	0	71.55	70.54
19	72	8:1	10	0	0	0	67.44	70.54
20	72	8:1	10	0	0	0	67.12	70.54

กำหนดให้ X_1 คือ เวลา X_2 คือ อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และ X_3 คือ ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ

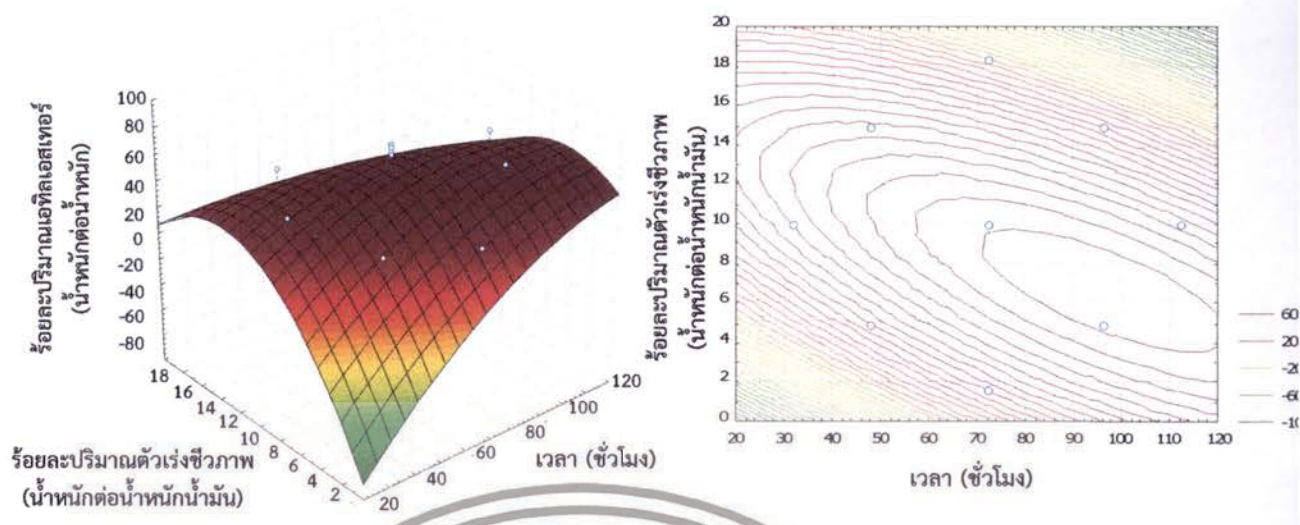
ผลการทดลองแสดงพื้นที่การตอบสนองของอิทธิพลร่วมระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ ดังภาพที่ 4.19 พบว่าอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันที่ต่ำและปริมาณตัวเร่งชีวภาพที่น้อย จะมีปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์ต่ำ อาจเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องมาจากมีปริมาณเอทานอลที่เป็นสารตั้งต้นไม่เพียงพอที่จะทำให้ปฏิกิริยาดำเนินไปข้างหน้า และ เอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยายังน้อยเกินไป แต่เมื่ออัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันและ ปริมาณตัวเร่งชีวภาพเพิ่มขึ้น พบว่าจะได้ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์สูงขึ้น ซึ่งจากภาพที่ 4.19 จะ ได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดร้อยละ 68.08 ที่อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน 9.05:1 และ ปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 8.42 แต่ปริมาณร้อยละเอทิลเอสเทอร์จะเริ่มลดลง เมื่อมีอัตราส่วนโดย โมลของเอทานอลต่อน้ำมันมากกว่า 9.05:1 และปริมาณตัวเร่งชีวภาพมากกว่าร้อยละ 8.42 ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจากเกิดการยับยั้งเอนไซม์เมื่อมีอัตราส่วนของเอทานอลที่สูง ซึ่งอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง แอลกอฮอล์ต่อน้ำมันมีผลอย่างมากในการเกิดปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล โดยจากทฤษฎีนั้น ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะต้องมีอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันอย่างน้อย 3:1 แต่ในทางปฏิบัติที่ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ จึงต้องมีการเติม แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากเกินไปเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้มากที่สุด (Agarwal, 2006) แต่ทั้งนี้ถ้าเติม แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากเกินไปก็อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ แต่ถ้าเติมน้อยเกินไปก็ ไม่เพียงพอในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยลงตามไปด้วย ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอัตราส่วนโดย โมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 4:1 ที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์หรือตัวเซลล์เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาจะสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ดี (เอี่ยม, 2555) แต่จากผลการทดลองสามารถเกิดปฏิกิริยา ได้ดีโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันประมาณ 9:1 แสดงว่าเอนไซม์สามารถทนต่อ เอทานอลในปริมาณที่สูงกว่าปกติได้ แต่ถ้ามากกว่า 9:1 ก็จะทำให้เกิดการยับยั้งขึ้น ซึ่งมีงานวิจัยของ เอี่ยม (2555) ได้ทำการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลและน้ำมันปาล์ม เพื่อการผลิตเมทิล เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *R. mucilagenosa* พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถทนต่อ เมทานอลในอัตราส่วนที่สูงถึง 12:1 ได้ และยังคงสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดี ส่วนปริมาณตัวเร่งชีวภาพที่มากเกินไปจะทำให้ระบบเกิดความหนืดสูง ทำให้การสัมผัสกันของสารตั้ง ต้นน้อยลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงลดลง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยลงตามไปด้วย



ภาพที่ 4.17 พื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา (ชั่วโมง) อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล) และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เพื่อศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 พื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยเวลา (ชั่วโมง) ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (น้ำหนักร้อยละต่อ น้ำหนักน้ำมัน) และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (น้ำหนักต่อ น้ำหนัก) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ



ภาพที่ 4.19 พื้นที่การตอบสนองระหว่างปัจจัยอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อ น้ำมัน (โมลต่อโมล) ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (น้ำหนักร้อยละต่อ น้ำหนักน้ำมัน) และร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (น้ำหนักต่อ น้ำหนัก) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบ

จากการทดลองระดับปัจจัยที่ต้องการศึกษาตามตารางที่ 4.8 สามารถสร้างสมการถดถอยตามสมการที่ 4.1 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.917 หรือร้อยละ 91.7 และค่าปรับปรุงสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (adjusted R^2) เท่ากับ 0.902 หรือร้อยละ 90.2 แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม เมื่อได้รับอิทธิพลจากตัวแปรอิสระร้อยละ 90.2 โดยหากมีค่าใกล้เคียงร้อยละ 100 จะทำให้สมการถดถอยมีค่ามากยิ่งขึ้น ซึ่งควรมีค่ามากกว่าร้อยละ 75 และจากค่า R^2 และ adjusted R^2 ที่สูงและใกล้เคียงกัน แสดงถึงความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออยู่ใต้เงื่อนไขลิขสิทธิ์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสมการในการอธิบายความแปรปรวนที่มีผลต่อการตอบสนอง ซึ่งสมการที่ 4.1 นำไปใช้ในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองต่อร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (จุฑามาศ, 2553) สำหรับความคลาดเคลื่อนของแบบจำลองกับผลการทดลอง (lack of fit) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.875 ดังตารางที่ 4.9 แสดงว่าการทดลองมีความเหมาะสมกับรูปแบบสมการกำลังสอง (quadratic model) ที่ใช้ในการทดสอบและร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากการทดลองและจากการคาดคะเนไม่แตกต่างกันมากนัก (จุฑามาศ, 2553) และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์หน้าปัจจัยในสมการถดถอยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบว่ามีค่าคงที่ของสัมประสิทธิ์ผลเชิงเส้นตรงของอัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ สัมประสิทธิ์ผลเชิงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเวลาและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ สัมประสิทธิ์ผลเชิงเส้นโค้งของเวลา อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ ซึ่งแม้บางปัจจัยจะมีค่าสัมประสิทธิ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ไม่สามารถตัดปัจจัยดังกล่าวไปได้ เนื่องจากผลกระทบร่วมระหว่างปัจจัยยังคงมีอยู่ ดังนั้นสมการถดถอยจึงมีความสามารถในการคาดคะเนผลกระทบของปัจจัยต่างๆ ต่อร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้

$$Y = 70.538 + 1.352X_1 + 11.932X_2 - 8.352X_3 - 1.663X_1X_2 - 14.755X_1X_3 + 1.095X_2X_3 - 6.594X_1^2 - 13.688X_2^2 - 18.893X_3^2 \quad (4.1)$$

กำหนดให้

Y คือ ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

X_1 คือ เวลา (ชั่วโมง)

X_2 คือ อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล)

X_3 คือ ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน)

ตารางที่ 4.9 การทดสอบความแปรปรวนและความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	p-value
Regression	36203.172	9	4022.575	61.266	0.000 ^a
Residual	3282.859	50	65.657		
Lack of fit	1.649	1	1.649	0.25	0.875 ^b
Pure error	2984.660	45	66.326		
$R^2 = 0.917$					
adjusted $R^2 = 0.902$					

กำหนดให้^a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ^b ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมการถดถอยที่ 4.1 เมื่อแทนค่าปัจจัยต่างๆ ที่ได้จากค่าสูงสุดของกราฟตามภาพที่ 4.17-4.19 จะได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบ คือ เวลา 72.6 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน 9.05:1 โมลต่อโมล และปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 8.42 (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) ซึ่งสามารถคาดคะเนได้ว่าจะสามารถผลิตปริมาณเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 73.73 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ดังตารางที่ 4.10

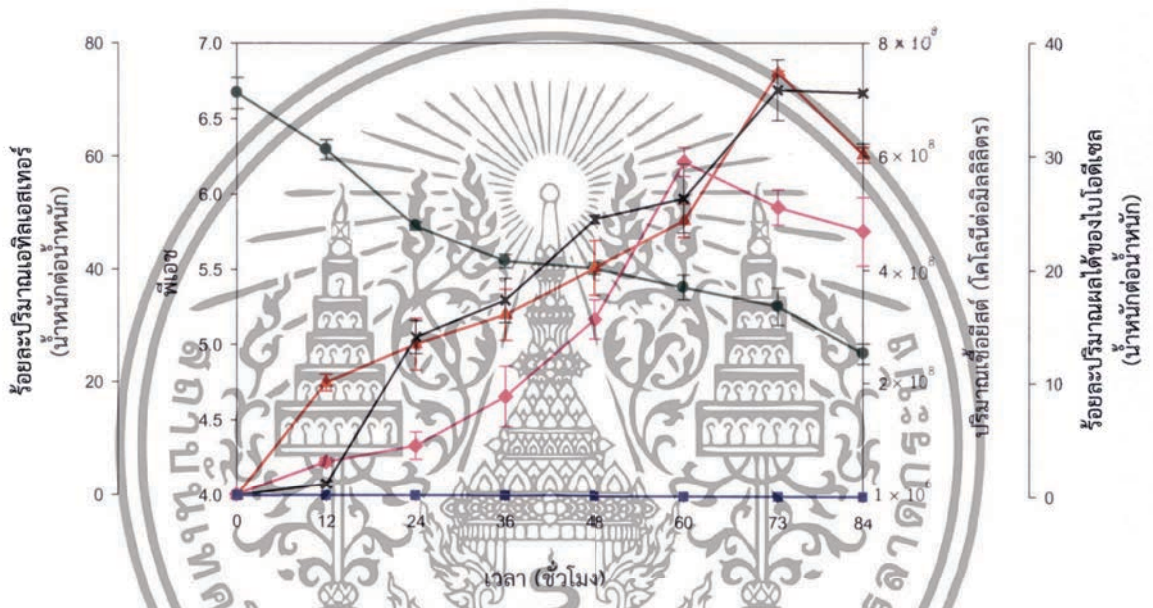
ตารางที่ 4.10 การคาดคะเนร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากปัจจัยต่างๆ ที่ได้จากการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง

สิ่ง ทดลองที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			ร้อยละปริมาณ เอทิลเอสเทอร์ จากการคาดคะเน
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	
1	72.6	9.05:1	6.32	0.025	0.525	-0.736	68.80
2	72.6	9.05:1	8.42	0.025	0.525	-0.316	73.73
3	98.9	9.05:1	6.32	1.121	0.525	-0.736	72.94
4	98.9	9.05:1	8.42	1.121	0.525	-0.316	71.08

กำหนดให้ X_1 คือ เวลา X_2 คือ อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน และ X_3 คือ ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ

จากการทดลองการพิสูจน์การคาดคะเนร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้จากการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบที่คาดคะเนได้ คือ เวลา 72.6 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน 9.05:1 โมลต่อโมล และปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 8.42 (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) พบว่าได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 74.79 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คาดคะเน คือ ร้อยละ 73.73 แสดงว่าแบบจำลองนี้มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมในการใช้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 และได้ปริมาณผลได้ (yield) ของไบโอดีเซลสูงสุดร้อยละ 35.83 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และจากการวัดปริมาณเชื้อยีสต์ทั้งก่อนและหลังการเติมเอทานอล พบว่าปริมาณเชื้อยีสต์สูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อยีสต์ 5.91×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณเชื้อยีสต์จะลดลงอย่างมากหลังการเติมเอทานอล ทั้งนี้อาจเนื่องจากการยับยั้งโดยเอทานอล แต่ปฏิกิริยายังสามารถดำเนินต่อไปได้ อาจเป็นเพราะเอนไซม์ไลเปสที่ขับออกมาออกเซลล์ยังสามารถทนต่อเอทานอลและเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันได้ และจากการวัดค่าพีเอชพบว่าพีเอชจะลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากมีปริมาณกรดไขมันอิสระมากขึ้นในวัตถุดิบน้ำมัน เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากน้ำที่ปนอยู่ในน้ำมัน ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระรวมอยู่กับน้ำมันไบโอดีเซล (พิสมัย และลลิตา, 2549) ดังภาพที่ 4.20 อย่างไรก็ตามการผลิตเอทิลเอสเทอร์ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจากเชื้อยีสต์ *C. orthopsilosis* สายพันธุ์กลาย GAM47 ได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 74.79 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แต่ในเชิงพาณิชย์มีข้อบ่งชี้ว่าจะต้องมีปริมาณร้อยละเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ไม่ต่ำกว่า 96.5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) (กรมธุรกิจพลังงาน, 2548) ซึ่งบ่งบอกถึงผลผลิตไบโอดีเซลยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ โดยอาจมีปริมาณโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ หรือไตรกลีเซอไรด์สูงกว่าที่กำหนด ทำให้ไบโอดีเซลมีค่าความหนืดสูง และส่งผลให้เกิดการอุดตันในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวฉีดหรือกระบอกสูบเครื่องยนต์ได้ และจากกรดไขมันอิสระที่ปะปนอยู่ จะทำให้น้ำมันไบโอดีเซลมีความเป็นกรดสูงขึ้น ซึ่งมีผลต่อการกัดกร่อนในเครื่องยนต์ได้ เมื่อใช้เป็นระยะเวลาานาน (พิสมัย และ ลลิตา, 2549) เพราะฉะนั้นโดยภาพรวมคุณภาพของไบโอดีเซลจึงยังไม่ผ่านข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลในเชิงพาณิชย์ โดยยังต้องมีการปรับปรุงแก้ไขและพัฒนาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลต่อไป แต่อาจสามารถนำไปใช้กับเครื่องจักรกลทางการเกษตรได้ หลังจากนำผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้ไปทำการตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ ตามข้อกำหนดแล้ว เนื่องจากข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของน้ำมันไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์การเกษตร (ไบโอดีเซลชุมชน) ไม่ได้ระบุข้อบังคับขั้นต่ำของร้อยละปริมาณเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ โดยอาจนำไปใช้ผสมกับน้ำมันดีเซล เป็นไบโอดีเซลลูกผสม เพื่อใช้สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลทางการเกษตรได้ (กรมธุรกิจพลังงาน, 2549)



ภาพที่ 4.20 ร้อยละปริมาณเอทิลเอสเทอร์ (▲) ร้อยละปริมาณผลได้ของไบโอดีเซล (x) พีเอช (●) ปริมาณเชื้อยีสต์ก่อนเติมเอทานอล (◆) และปริมาณเชื้อยีสต์หลังการเติมเอทานอล (■) ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลาย GAM47 จากการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมัน 9.05:1 โมลต่อโมล ปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 8.42 (น้ำหนักร่อน้ำหนักน้ำมัน) เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60, 73 และ 84 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำทิ้ง ดิน และ ส่วนต่างๆ ของปาล์มในพื้นที่ของโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์มบริษัท สุขสมบุรณ์ จำกัด โดยใช้อาหารแข็งไตรบิวทรีนที่เติมยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน พบว่ามีเชื้อยีสต์ที่สร้างวงใสรอบโคโลนี จำนวน 267 สายพันธุ์ และศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์ม ดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง ได้แก่ WPLP20, FLP7, FLP22, FLP23, FLP26, SLP27 และ PDLP50 และพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ SLP27 ที่แยกได้จากเมล็ดปาล์มหลังปีน้ำมัน ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 0.28 หน่วยต่อ มิลลิลิตร

จากการทดลองการคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายโดยใช้อาหารแข็งไตรบิวทรีนที่เติมยาปฏิชีวนะนิสเตดิน และอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการกลายพันธุ์สายพันธุ์ SLP27 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 38 วินาที เชื้อยีสต์จะมีอัตราการอยู่รอด ร้อยละ 10 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 205 สายพันธุ์ โดยพบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้ค่า กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงมี 10 สายพันธุ์ ได้แก่ UV32, UV34, UV38, UV51, UV61, UV79, UV101, UV113, UV131 และ UV149 และพบว่าสายพันธุ์กลาย UV79 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสสูงสุด 0.30 หน่วยต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม SLP27 1.07 เท่า จากนั้นทำการ กลายพันธุ์สายพันธุ์กลาย UV79 ด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นเวลา 58 นาที เชื้อยีสต์จะมีอัตรา การอยู่รอดร้อยละ 10 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 326 สายพันธุ์ โดยพบว่าเชื้อยีสต์ที่ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงมี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ EM100, EM107, EM121, EM141, EM213 และ EM214 และพบว่าสายพันธุ์กลาย EM107 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 0.36 หน่วยต่อ มิลลิลิตร เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม SLP27 และสายพันธุ์กลาย UV79 1.29 และ 1.20 เท่า ตามลำดับ และทำการกลายพันธุ์สายพันธุ์กลาย EM107 ด้วยรังสีแกมมา ที่ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ เชื้อยีสต์จะมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 6 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 170 สายพันธุ์ โดย พบว่ามีเชื้อยีสต์จำนวน 10 สายพันธุ์ ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง ได้แก่ GAM26, GAM40, GAM41, GAM42, GAM47, GAM68, GAM107, GAM112, GAM130 และ GAM153 และพบว่า สายพันธุ์กลาย GAM107 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 0.70 หน่วยต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นจาก สายพันธุ์ดั้งเดิม SLP27 สายพันธุ์กลาย UV79 และ EM107 2.50, 2.33 และ 1.94 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเชื้อที่กลายพันธุ์แล้วมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้น

จากการทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequence ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ ดั้งเดิม SLP27 สายพันธุ์กลาย UV79, EM107 และ GAM47 พบว่าเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ คือ *Candida orthopsilosis* และจากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เชื้อสายพันธุ์กลาย GAM47 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันปาล์มดิบ พบว่าเชื้อยีสต์สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและไฮโดรไลซิสได้ แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ ซึ่งสายพันธุ์กลาย GAM47 สามารถนำไปใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพ เพื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มดิบได้

จากการทำการทดลองการผลิตตัวเร่งชีวภาพด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวละเอียดผสมกับกากน้ำตาลจากสายพันธุ์กลาย GAM47 โดยศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อน้ำหนักรำข้าว) พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 60 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงสุด 5.03×10^9 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 1.43 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง จากนั้นศึกษาปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 พบว่าปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40 ที่เวลา 60 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงสุด 6.43×10^9 โคโลนีต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และมีค่ากิจกรรมของไลเปสสูงที่สุด 1.60 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง

จากการทดลองการนำตัวเร่งชีวภาพที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเอทิลเอสเตอร์จากน้ำมันปาล์มดิบด้วยวิธีการออกแบบพื้นที่การตอบสนอง โดยศึกษาปัจจัยเวลา อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันปาล์มดิบ และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ จากการคาดคะเนผลจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ เวลา 72.6 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันปาล์มดิบ 9.05:1 โมลต่อโมล และปริมาณตัวเร่งชีวภาพร้อยละ 8.42 (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะได้ผลผลิตเอทิลเอสเตอร์สูงสุตร้อยละ 73.73 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และจากการทดสอบสภาวะที่ได้จากการคาดคะเนพบว่าสามารถผลิตปริมาณเอทิลเอสเตอร์ได้ร้อยละ 74.79 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะทำให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซลในปริมาณที่สูง ซึ่งอาจนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์โดยวิธีการอื่นๆ ที่แตกต่างกัน เพื่อให้เชื้อยีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้นกว่าเดิม และเชื้อยีสต์สามารถทนต่อแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงได้

5.2.2 ศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซล เช่น อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา ปริมาณน้ำ อัตราเร็วในการกวนผสม ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น เพื่อให้ได้น้ำมันไบโอดีเซลที่มีคุณภาพและผลผลิตที่สูงขึ้น

5.2.3 ทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ของน้ำมันไบโอดีเซล เพื่อให้ทราบคุณภาพที่แน่นอนแล้วนำไปใช้ประโยชน์ เช่น นำไปใช้ในรูปแบบน้ำมันไบโอดีเซลประเภทถูกผสมที่มีการผสมน้ำมันดีเซลเพื่อช่วยลดปัญหาความหนืดและความเป็นกรดลงได้

บรรณานุกรม

- กรมธุรกิจพลังงาน. 2548. ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 12. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สำนักงานเลขาธิการคณะรัฐมนตรี.
- กรมธุรกิจพลังงาน. 2549. ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลสำหรับเครื่องยนต์การเกษตร (ไบโอดีเซลชุมชน) ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 123. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สำนักงานเลขาธิการคณะรัฐมนตรี.
- กรมธุรกิจพลังงาน. ม.ป.ป. มาตรฐานไบโอดีเซล. [Online]. Available : <http://www.doeb.go.th/v3/kmv2/report/biodiesel1.pdf>. สืบค้นวันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2557.
- กองบรรณาธิการเทคนิคเครื่องกลไฟฟ้าอุตสาหกรรม. 2548. “ไบโอดีเซล พลังงานทดแทนช่วยชาติ.” วารสารเทคนิค เครื่องกล ไฟฟ้า อุตสาหกรรม. 22(256) : 154-163.
- กิตติศักดิ์ ศรีโสภณ. 2549. “การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มที่บรวมน โดยใช้กระบวนการผลิตแบบ Esterification และ Tranesterification.” วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกรียงไกร พัทธยากร. 2545. “การใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการบำบัดน้ำเสียจากครัวที่ปนเปื้อนไขมัน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกษรา ทองบริบูรณ์. 2553. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วโดยเอนไซม์ไลเปสตรังรูปในระบบกะ และระบบต่อเนื่อง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กำเนิด สุภณวงษ์. 2534. จุลชีวอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- คณินท์ เอี่ยมจิตต์. 2551. “ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำเพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาวิธพันธุ.” วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จุฑามาศ รธา. 2553. “การผลิตเอนโดกลูคาเนสโดยเชื้อราที่แยกจากดิน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- จันทรนาถ พลขำนิ. 2548. “ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยไลเปสจากแบคทีเรีย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชุตินา แก้วพิบูลย์. 2550. “การผลิตไบโอดีเซลที่เร่งปฏิกิริยาโดยไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดุชนัน ธนบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ทรัพย์ทวี ฝูงทอง. 2544. “การผลิตจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ทิพนยวรรณ นพคุณ และเศรษฐวัชร ฉำศาสตร. 2539. “การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Candida* sp. เพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 4(1) : 37-43.
- ทิพรัตน์ หงษ์ทรี และเบณจมาส เขียรศิลป์. 2551. “การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส และการประยุกต์ใช้ยีสต์ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม.” รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ชนกฤต บุญไชยดั่ง. 2556. “การคัดเลือกยีสต์ และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ธรรธ พ่วงพลับ. 2549. “การผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oligosporus* วิธีการหมักแบบแห้ง.” วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นงลักษณ์ สุวรรณวินิจฉัย และปรีชา สุวรรณวินิจฉัย. 2554. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. พิมพ์ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปราณี อานเปลื้อง. 2547. *เอนไซม์ทางอาหาร*. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุริมปรัชญ ศรีหมาน. 2552. “การคัดเลือกยีสต์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล และสลิตา อัดนโถ. 2549. *รอบรู้เรื่องราวไบโอดีเซล*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ : พิมพ์พิณ.
- พินิจ จันทร. 2551. *ชี้ทางรวยด้วยพืชพลังงานทดแทน ไบโอดีเซล*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : นาคา อินเตอร์มีเดีย.
- พีรนุช จอมพุก. 2556. *การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ (mutation breeding)*. กรุงเทพฯ : สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน).
- พุดพัฒนา เบญจปรีชาพัฒน์. 2555. “การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังบนมอลต์มอร์ลโลไนต์.” วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ไพโรจน์ วิริยจारी. 2544. *การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง*. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- มนัสนันท์ โรจนกมลสันต์. 2547. “การผลิตแคโรทีนอยล์และเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Rhodotorula glutinis* DM28 บนรำข้าว.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์.
- รัชนนท์ สิทธิกัน. 2554. “การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาประเภทถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่มีพอลิเมอร์เป็นตัวรองรับ.” วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- รัฐดา จันท์กลั่น, ประภาพรณ กุ้งแก้ว, สมจิตร อ่าอินทร์, และศศิธร จินตามรกฏ. 2555. “ความหลากหลายของยีสต์บริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*. 1(3) : 155-168.
- วรรณิศา ลีลาจร. 2555. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ *Jatopha curcas* L. เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ *Aureobasidium pullurans* var. *melanogenum*.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรารุณี ครูสง. 2529. *เทคโนโลยีชีวภาพ*. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- วารินทร์ พิมพ์. 2549. *หลักการวิเคราะห์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ เทคนิคทางโครมาโตกราฟี*.
 พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ศิวะพงษ์ เพ็ชรสงค์. 2550. *ไบโอดีเซล พลังงานทางเลือก*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มิตรภาพ การพิมพ์ และสตูดิโอ.
- ศิริวรรณ น้าสมบุญ. 2551. การผลิตแอลกอฮอล์จากกากตะกอนน้ำเสียร่วมกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร. [Online]. Available : <http://www.research.rdi.ku.ac.th/world/cache/47/SiriwanNUMAU.pdf>. สืบค้นวันที่ 29 พฤษภาคม 2556.
- ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี. 2556. การแปรรูปน้ำมันปาล์ม. [Online]. Available : <http://www.doa.go.th/palm/linkTechnical/oil%20palm%20processing.html>. สืบค้นวันที่ 31 พฤษภาคม 2557.
- สมศักดิ์ แก้วนก. 2546. “การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* เพื่อเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยล์ โดยวิธีกลายพันธุ์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. *เทคโนโลยีการหมัก*. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- สาวตรี ล้อมทอง. 2549. *ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สินินาฏ จงคง, ชاکริต ทองอโร และอิสรินทร์ มะหมัด. 2553. “การแยกยางเหนียวในน้ำมันปาล์มดิบด้วยสารละลายกรดอย่างต่อเนื่อง.” รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- หทัยรัตน์ ธาตุไชย, พรเทพ ถนนแก้ว และสุดารัตน์ ถนนแก้ว. 2553. “การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต.” *วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 18(1) : 37-41.
- อนุชา พรหมวังขวา และชัยชาญ ฤทธิกริกโกร. 2550. “ไขประตูลู่ความรู้เรื่องไบโอดีเซล (1).” *วารสารโลกพลังงาน*. 10(35) : 49-56.
- อมรรัตน์ สำเนียง และสมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. 2556. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เมทานอลสภาวะเหนือจุดวิกฤต.” *วิศวกรรมสารมหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 40(3) : 427-435.
- อริญ หันพงศ์กิตติกุล. 2555. *เทคโนโลยีเอนไซม์*. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อัจฉรา พุฒคำ และ อภิพงษ์ พุฒคำ. 2557. “การสังเคราะห์และคุณลักษณะของแคลเซียมออกไซด์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล.” *วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร*. 22(3) : 29-46.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เอ็ม น้อยเลิศ. 2555. “การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Rhodotulorula mucilagenosa* และการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Agarwal, A.K. 2006. “Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines.” *Progress in Energy and Combustion Science*. 33(3) : 233-271.
- Akacha, N.B., Zehlila, A., Mejri, S., Jerbi, T. and Gargouri, M. 2008. “Effect of gamma-ray on activity and stability of alcohol-dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biochemical Engineering Journal*. 40(1) : 184-188.
- A.O.A.C. 1984. *Official Method of Analysis of Association of Analytical Chemists*. 14th ed. USA : Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Anguita, J., Rodriguez-Aparicio, L.B. and Naharro, G. 1993. “Purification, gene cloning, amino acid sequencing analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate.” *Applied and Environmental Microbiology*. 59(8) : 2411-2417.
- Borstel, R.C. and Hennig, U.G.G. 1990. “Mutagenicity testing of pharmaceutical compounds : Mutagen-contaminated anthelmintic drugs.” 345-361. in *Proceeding of a Symposium on Genetic Monitoring for Protection of Human Health and the Environment*.
- Box, G.E.P. and Wilson, K.B. 1951. “On the experimental attainment of optimum condition.” *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 13(1) : 1-45.
- Brock, T.D. 1984. *Biotechnology. A Textbook of Industrial Microbiology*. Madison : Science Technology.
- Bussamara, R., Fuentesfria, A. M., Oliveira, E. S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2010. “Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation.” *Bioresource Technology*. 101(1) : 268-275.
- Carrizales, V., Rodrigues, H. and Sardina, I. 1981. “Determination of specific growth rate of molds as semi solid cultures.” *Biotechnology and Bioengineering*. 23(2) : 321-333.
- Cannel, E. and Moo-Young, M. 1980. “Solid-state fermentation systems.” *Process Biochemistry*. 15(5) : 2-7.
- Chahinian, H., Vanot, G., Ibrik, A., Rugani, N., Sarda, L. and Comeau, L.C. 2000. “Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclospium* purification and characterization of partial acylglycerol lipase.” *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 64(2) : 215-222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chen, H.P., Hsiao, K.F., Wu, S.H. and Wang, K.T. 1995. "Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*." *Biotechnology Letters*. 17(3) : 305-308.
- Chen, J.Y., Wen, C.M. and Chen, T.L. 1999. "Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radoresistens*." *Biotechnology and Bioengineering*. 62(3) : 311-316.
- Costa, M.A. and Peralta, R.M. 1999. "Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*)." *Journal of Basic Microbiology*. 39(1) : 11-15.
- Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M. and Casas C. 2000. "Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*." *Enzyme and Microbial Technology*. 26(9-10) : 657-663.
- Darvishi, F., Destain, J., Nahvi, I., Thonart, P. and Zarkesh-Esfahani, H. 2011. "High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate." *New Biotechnology*. 28(6) : 756-760.
- Demirbas, A. 2002. "Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol." *Energy Conversion and Management*. 43(17) : 2349-2356.
- Dharmsthiti, S. and Ammaranond, P. 1997. "Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*)." *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 26(2) : 111-116.
- Diogo, M.M., Silva, M.M., Cabral, J.M. and Queiroz, J.A. 1999. "Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilized on sepharose." *Journal of Chromatography A*. 849(2) : 413-419.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugar and related substances." *Journal of Analytical Chemistry*. 28(3) : 350-356.
- Dizge, N. and Keskinler, B. 2008. "Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase." *Biomass and Bioenergy*. 32(12) : 1274-1278.
- El-Sawah, M.M.A., Sherief, A.A. and Bayoumy, S.M. 1995. "Enzymatic properties of lipase and characteristic production by *Lactobacillus delbrueckii* sub species bulgaricus." *Antonie van Leeuwenhoek*. 67(4) : 356-362.
- El-Shafei, H.A. and Rezkallah, L.A. 1997. "Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase." *Microbiological Research*. 152(2) : 199-208.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Farrell, A.M., Foster, T.J and Holland, K.T. 1993. "Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*." *Journal of general microbiology*. 139(2) : 267-277.
- Fedosov, S.N., Brask, J. and Xu, X. 2011. "Analysis of biodiesel conversion using thin layer chromatography and nonlinear calibration curves." *Journal of Chromatography A*. 1218(19) : 2785-2792.
- Frenken, L.G.J., Egmond, M.R., Batenburg, A.M. and Verrips, C.T. 1993. "Pseudomonas glumae lipase: increased proteolytic stability by protein engineering." *Protein engineering*. 6(6) : 637-642.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. "Biodiesel fuel production by transesterification of oils." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5) : 405-416.
- Gandhi, N.N. 1997. "Applications of lipase." *Journal of American Oil Chemists' Society*. 74(6) : 621-634.
- Gerpen, J.V. 2005. "Biodiesel processing and production." *Fuel Processing Technology*. 86(10) : 1097-1107.
- Ghosh, P.K., Saxena, T.K., Gupta, R., Yadav, R.P. and Davidson, S. 1996. "Microbial lipases: production and applications." *Science Progress*. 79(2) : 119-157.
- Godtfredsen, S.E. 1990. *Microbial lipases*. 2nd ed. Amsterdam : Elsevier Publishing Company.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R. and Freire, D.M.G. 1999. "Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate." *Process Biochemistry*. 35(1-2) : 85-90.
- Gordillo, M.A., Obradors, N., Montesinos, J.L., Valero, F., Lafuente, J. and Sola, C. 1995. "Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa* lipase." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43(1) : 38-41.
- Grist, D.H. 1959. *Rice*. 3rd ed. London : Longman Green and Company.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. 2004. "Bacterial lipase: an overview of production, purification and biochemical properties." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64(6) : 763-781.
- Helisto, P. and Korpela, T. 1998. "Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkonate esters method." *Enzyme and Microbial Technology*. 23(1-2) : 113-117.
- Hesseltine, C.W. 1977. "Solid-state fermentation part 2." *Process Biochemistry*. 12(11) : 29-32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hoshino, T., Sasaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T. and Yamane, T. 1992. "Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lini." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 56(4) : 660-664.
- Hou, C.T. 1994. "pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 13(4) : 242-248.
- Iftikhar, T., Niaz, M., Abbas, Q.S., Anjum, Z.M., Ashraf, I., Lee, K, J. and Haq, U. I. 2010a. "Mutation induced enhanced biosynthesis of lipases by *Rhizopus oligosporus* var. microsporus." *Pakistan Journal of Botany*. 42(2) : 1235-1249.
- Iftikhar, T., Niaz, M., Hussain, Y., Abbas, S.Q., Ashraf, I. and Zia, M.A. 2010b. "Improvement of selection strains through gamma irradiation for enhanced lipolytic potential." *Pakistan Journal of Botany*. 42(4) : 2257-2267.
- Ishihara, H., Okumura, H., Ikezawa, H. and Tejima, S. 1975. "Studies on lipase from *Mucor javanicus* : I. Purification and properties." *Biochimica et Biophysica Acta*. 388(3) : 413-417.
- Ito, T., Kikuta, H., Nagamori, E., Honda, H., Ogino, H., Ishikawa, H. and Kobayashi, T. 2001. "Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91(3) : 245-250.
- Jacobson, G.K. 1981. *Mutation*. Weinheim : Verlag Chemie.
- Jaeger, K.E. and Reetz, T.M. 1998. "Microbial lipases from versatile tools for biotechnology." *Trends in Biotechnology*. 16(9) : 396-403.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E. and Fukuda, H. 1999. "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88(6) : 627-631.
- Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T. and Lefuji, H. 2000. "Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2." *Process Biochemistry*. 36(4) : 317-324.
- Kamini, N.R. and Lefuji, H. 2001. "Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2." *Process Biochemistry*. 37(4) : 405-410.
- Kamiya, N. and Gotto, M. 1998. "Preparation of surfactant coated lipases utilizing the molecular imprinting technique." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85(2) : 237-239.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Karatay, S.E. and Donmez, G. 2010. "Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses." *Bioresource Technology*. 101(20) : 7988-7990.
- Kennedy, M.B. and Rennarz, W.J. 1979. "Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* and its relationship to a membrane bound lipase found in a mutant strain." *Journal of Biological Chemistry*. 254(4) : 1080-1089.
- Klein, R.R., King, G., Moreau, R.A and Haas, M.J. 1997. "Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling." *Lipids*. 32(2) : 123-130.
- Klibanov, A.M. 1986. "Enzymes that work in organic solvents." *Chemical Technology*. 16 : 354-359.
- Kose, O., Tuter, M. and Aksoy, H.A. 2002. "Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent- medium." *Bioresource Technology*. 83(2) : 125-129.
- Kurtzman, C.P. 1992. "rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts." *International Journal of Systemic Bacteriology*. 42(1) : 1-6.
- Kurtzman, C.P. and Sugiyama, J. 2001. *Ascomycetous yeasts and yeastlike taxa*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. 1998. "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences." *Antonie van Leeuwenhoek*. 73(1) : 331-371.
- Lacointe, C., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1996. "Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases." *Biotechnology Letters*. 18(8) : 869-874.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R. 1985. "Rapid determination of 26S rRNA sequences for phylogenetic analyses." 6955-6959. in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Lee, C.Y. and Yandolo, J.J. 1986. "Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a into the lipase structural gene." *Journal of Bacteriology*. 166(2) : 385-391.
- Li, W., Du, W. and Liu, D. 2007. "Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 45(3-4) : 122-127.
- Lin, S.F., Chiou, C.M. and Tsai, Y.C. 1995. "Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111." *Biotechnology Letters*. 17(4) : 959-962.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Liu, Y., Li, C., Meng, X. and Yan, Y. 2013. "Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation." *Fuel Processing Technology*. 106 : 303-309.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P. 2007. *Molecular Cell Biology*. 6th ed. New York : W.H. Freeman and Company.
- Long, K., Ghazal, H.M., Ariff, A., Man, Y.C. and Bucke, C. 1998. "Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* link." *Biotechnology Letters*. 20(4) : 369-372.
- Lotrakul, P. and Dharmsthiti, S. 1997. "Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13(2) : 163-166.
- Ma, F. and Hanna, MA. 1999. "Biodiesel production: a review." *Bioresource Technology*. 70(1) : 1-15.
- Mackenzie, R. D., Blohm, T. R., Auxier, E.M. and Luther, A. C. 1967. "Rapid colorimetric micromethod for fatty acids." *Journal of Lipid Research*. 8(6) : 589-597.
- Macrae, A.R. 1983. "Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 60(2) : 291-294.
- Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M. and Gokhale, D.V. 2002. "Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation." *Process Biochemistry*. 38(5) : 715-721.
- Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F.M., Ottolina, G., Carrea, G. and Rossi, M. 1998. "Overexpression and properties of a new thermophilic and the thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily." *Biochemical Journal*. 15(1) : 203-212.
- Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2007. "Possible methods for biodiesel production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 11(6) : 1300-1311.
- Mason, R.L., Gunst, R.F. and Hess, J.L. 2003. **Statistical design and analysis of experiments with application to engineering and science**. 2nd ed. Hoboken : Willey-Interscience.
- Matin, A.M., Lu, C. and Paral, T.R. 1993. "Growth parameters for the yeasts *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 76(4) : 321-325.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. and Kondo, A. 2001. "Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(4) : 515-520.
- Meher, L.C., Vidya, S.D. and Naik, S.N. 2006. "Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10(3) : 248-268.
- Merek, A. and Bednasski, W. 1996. "Some factors affecting lipase production by yeast and filamentous fungi." *Biotechnology Letters*. 18(10) : 1155-1160.
- Meyers, S.A., Cuppett, S.L. and Hutkins, R.W. 1996. "Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil." *Food Microbiology*. 13(5) : 383-389.
- Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry*. 31(3) : 426-428.
- Mitchell, D.A., Lonsane, B.K., Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J. and Malaney, G.W. 1992. *Solid substrate cultivation*. London : Elsevier science publishers.
- Mobini-Dehkordi, M., Nahvi, J. and Zarkesh-Esfahani, H. 2008. "Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 105(4) : 403-408.
- Montelon, B.A. 1998. Mutation, mutagens and DNA repair. Originally written as a supplement to BIOL400, Human Genetic. [Online]. Available : <http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html>. สืบค้นวันที่ 5 มีนาคม 2557.
- Mudgett, R.E. 1986. *Solid-state fermentation*. Washington D.C. : American Society for Microbiology.
- Nga, B.H., Gaillardin, C.X., Fournier, P. and Heslot, H. 1989. "Genetic analysis of lipase low-producing mutants of *Yarrowia lipolytica*." *Journal of General Microbiology*. 135 : 2439-2443.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T. 2006. "Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 43(1-4) : 142-147.
- Noureddini, H., Gao, X. and Philkana, R.S. 2005. "Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil." *Bioresource Technology*. 96(7) : 769-777.
- Ohnishi, K., Yoshida, Y. and Sekiguchi, J. 1994. "Lipase production of *Aspergillus oryzae*." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 77(5) : 490-495.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Okeke, C.N. and Okolo, B.N. 1990. "The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*." *Biotechnology Letters*. 12(10) : 747-750.
- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J. 1992. "Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*." *Biotechnology Letters*. 14(5) : 397-402.
- Paturau, J.M. 1982. **By products of the cane sugar industry**. Amsterdam : Elsevier Publishing Company.
- Pencreach, G. and Baratti, J.C. 1996. "Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media." *Enzyme and Microbial Technology*. 18(1) : 417-422.
- Peterson, S.W. and Kurtzman, C.P. 1991. "Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 14(2) : 124-129.
- Ranadive, P., Mehta, A. and George, S. 2011. "Rational selection and screening of mutant strains of *Sporidiobolus johnsonii* ATCC 20490 for improved production of coenzyme Q10." 141-145. in *Proceeding of the International Conference on Life Science and Technology*.
- Rantakyä, M., Alkio, M. and Paltonen, O. 1996. "Stereospecific hydrolysis of 3-(4-methoxyphenyl) glycosidic ester in supercritical carbon dioxide by immobilized lipase." *Biotechnology Letters*. 18 : 1089-1094.
- Rees, G.D. and Robinson, B.H. 1995. "Esterification reactions catalysed by *Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsion system." *Biotechnology and Bioengineering*. 45(4) : 344-345.
- Rathbun, B.L. and Shuler, M.L. 1983. "Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: design of fermentation chambers." *Biotechnology and Bioengineering*. 25(4) : 929-938.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M and Solinas, V. 2005. "Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis." *Journal of Biotechnology*. 199(3) : 291-299.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M and Solinas, V. 2008. "Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 54(1-2) : 19-26.
- Salleh, A.B., Musani, R. and Razak, C.N.A. 1993. "Extra and Intracellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production." *Canadian Journal of Microbiology*. 39(10) : 978-981.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Adsule, R.N. and Kadam, S.S. 1992. "Rice", in *World Oilseeds Chemistry Technology and Utilization*. New York : Van Nostrand Reinhold.
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kando, A., Shimada, Y., Noda, H. and Fukuda, H. 2000. "Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90(2) : 180-183.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1997. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitor." 5463-5467. in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2001. "Production, purification, characterization and applications of lipases." *Biotechnology Advances*. 19(8) : 627-662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y. 2002. "Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 17(3-5) : 133-142.
- Singleton, P. and Sainsbury, D. 1988. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 2nd ed. Singapore : John Wiley and Sons.
- Siripong, P., Chuleekorn, S. and Duangporn, P. 2012. "Enhanced cellulose production By ultraviolet (UV) irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis of an *Acetobacter* species isolate." *African Journal of Biotechnology*. 11 : 1433-1442.
- Smith, J.E. 1985. *Biotechnology Principles*. Washington D.C. : American society for Microbiology.
- Sommer, P., Bormann, C. and Gotz, F. 1997. "Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*." *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9) : 3553-3560.
- Soumanou, M.M. and Bornscheuer, U.T. 2003. "Improvement in Lipase-catalysed synthesis of fatty acid methylesters from sunflower oil." *Enzyme and Microbial Technology*. 33(1) : 97-103.
- Srimhan, P., Kongnum, K., Taweerodjanakarn, S. and Hongpattarakere, T. 2011. "Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm oil transesterification." *Enzyme and Microbial Technology*. 48(3) : 293-298.
- Srinorakutara, T., Chumkhunthod, P., Suttikul, S., Yindeeyoungyeon, W., Wattanasiritham, L., Mouthung, B. and Wangpila, M. 2008. "Strain improvement of ethanol fermenting yeast using random mutagenesis technique." *Thai Journal of Biotechnology*. 8(1) : 120-123.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Srivastava, A. and Prasad, R. 2000. "Triglycerides-based diesel fuels." *Renewable and Sustainable Energy Review*. 4(2) : 111-133.
- Stahmann, K.P., Boddecker, T. and Sahm, H. 1997. "Regulation and properties of a fungal lipase showing interfacial inactivation by gas bubbles or droplets of lipid or fatty acid." *European Journal of Biochemistry*. 244(1) : 220-225.
- Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. "Buffers: principles and practice." *Methods in Enzymology*. 182 : 24-38.
- Sun, N., Lee, S. and Song, K.B. 2004. "Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation." *International Journal of Food Microbiology*. 94(3) : 263-267.
- Suzuki, T., Mushiga, Y., T. And Shimizu, S. 1988. "Mass production of lipases by fed batch culture of *Pseudomonas fluorescens*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 27 : 417-422.
- Sztajer, H. and Maliszewska, I. 1989. "The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*." *Biotechnology Letters*. 11(12) : 895-898.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. and Wiczorek, J. 1988. "Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes." *Enzyme and Microbial Technology*. 10(8) : 492-497.
- Tahoun, M.K., E-Kady, I. and Wahba, A. 1985. "Production of lipases from microorganisms." *FEMS Microbiology Letters*. 28 : 133-139.
- Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H.D., Borncheuer, U.T., Schmid, R.D. and Tanka, A. 1998. "Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86(2) : 164-168.
- Talon, R., Dublet, N., Montel, M.C. and Cantonnet, M. 1995. "Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase." *Current Microbiology*. 30 : 11-16.
- 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(4) : 459-465.
- Tezuka, H., Nakahara, T., Minoda, Y. and Yamada, K. 1975. "Production of yeast cell from methanol." *Agricultural and Biological Chemistry*. 39 : 285-286.
- Thein, A., and Prathuangwong, S. 2010. "Novel Strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* UV mutated induce systemic resistance in rice against bacterial leaf blight disease." *Kasetsart Journal : Natural Science*. 44(6) : 1026-1043.
- Tomasevic, A.V. and Marinkovic, S.S. 2003. "Methanolysis of used frying oil." *Fuel Processing Technology*. 81(1) : 1-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Veras, I.C., Silva, F.A.L., Ferrao-Gonzales, A.D. and Moreau, V.H. 2011. "One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from-acidity waste feedstocks in solvent-free media." *Bioresource Technology*. 102(20) : 9653-9658.
- Walker, G.M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester : John Wiley and Sons.
- Wang, Y., Shen, X., Li, Z., Li, X., Wang, F., Nie, X. and Jiang, J. 2010. "Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system." *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic*. 67(1-2) : 45-51.
- Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J. and Wang, H.Y. 1995. "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841)." *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79(5) : 433-438.
- Watanabe, T., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A. and Nakamura, T. 2011. "A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance." *Bioresource Technology*. 102(2) : 1844-1848.
- Weber, N., Klein, E. and Mukerjee, K.D. 1999. "Long chain acyl thioesters prepared by solvent free thioesterification and transesterification catalyzed by microbial lipases." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51(3) : 401-404.
- Yang, J., Kobayashi, K., Iwasaki, Y., Nakano, H. and Yamane, T. 2000. "In vitro analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI 56 lipase." *Journal of Bacteriology*. 182(2) : 295-302.
- Yang, K.S., Sohn, J.H. and Kim, H.K. 2009. "Catalysis properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107(6) : 599-604.
- Yeo, S.H., Nihira, T. and Yamada, Y. 1998. "Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp. YY62 which hydrolyzes t-butyl esters effectively." *Journal of General and Applied Microbiology*. 44(2) : 147-52.
- Yu, V.L., Merican, T.C. and Barriere, S.L. 1999. **Antimicrobial therapy and vaccines**. Maryland : William and Wilkins.
- Yücel, Y. 2012. "Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology." *Fuel Processing Technology*. 99 : 97-102.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารแข็ง Yeast Malt agar

สารสกัดจากยีสต์	3	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	20	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารแข็งไตรบิวทีรีน

เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	3	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	15	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 990 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรอลไตรบิวทีเรต (glycerol tributyrate) 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน (Bussamara และคณะ, 2010)

กลูโคส	2	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัมต่อลิตร
สารละลายน้ำมันปาล์มดิบ*	20	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*หมายเหตุ ทำการผสมน้ำมันปาล์มดิบและน้ำกลั่นให้รวมกันเป็นเนื้อเดียวกันหรืออิมัลชัน ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ ระดับแอมพลิจูดร้อยละ 40 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งเวลาการทำงาน 5 วินาที และหยุด 1 วินาที เป็นเวลา 5 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารละลายและวิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ (Stoll และ Blanchard, 1990)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นนำมาผสมกันให้ได้ค่ากรดต่างตามที่ต้องการ ดังตารางภาคผนวกที่ ข1

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (เตรียมโดยทำการละลาย NaH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ทำสารละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ตารางผนวกที่ ข1 จำนวนมิลลิลิตรระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ที่ความเป็นกรดต่าง

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

2. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจากวิธีของ Hoshiro และคณะ, 1992)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย A : ละลายพาราไนโตรฟินิลพาล์มิเตต 30 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอล ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลายไตรตรอนเอ็กซ์-100 400 มิลลิกรัม และกรัมอาราบิก 100 มิลลิกรัม ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าพีเอช 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย C : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ที่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ผสมสารละลาย A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 90 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟินอล (ภาพภาคผนวกที่ ข1) และคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดังสมการที่ 1

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ไมโครกรัมของพาราไนโตรฟินอล} \times \text{จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักของพาราไนโตรฟินอล} \times \text{ระยะเวลาการบ่ม} \times \text{ปริมาณสารละลายเอนไซม์}} \quad (1)$$

1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพาราไนโตรฟินอลให้กลายเป็นพาราไนโตรฟินอล 1 ไมโครโมลต่อนาที



ภาพภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนโตรฟินอลที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3. การตรวจนับเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

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

3.2 บีบตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

4. วิธีการคำนวณหาปริมาณเซลล์ยีสต์

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ 1 ช่องกลางในตารางใหญ่มีค่าเท่ากับ} &= 0.2 \times 0.2 = 0.04 \text{ ตร.ซม.} \\ \text{ความลึกระหว่าง cover slip และตาราง} &= 0.1 \text{ มม.} \\ \text{ดังนั้นปริมาตร 1 ช่องกลาง} &= 0.04 \times 0.1 = 0.004 \text{ มม.}^3 \\ \text{ปริมาตร 0.004 มม.}^3 \text{ มีจุลินทรีย์} &= Z \text{ เซลล์} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตร 1000 ลบ.ซม. มีจุลินทรีย์} &= \frac{Z \times 1000}{0.004} = Z \times 250 \times 10^3 \\ &= Z \times 2.5 \times 10^5 \text{ เซลล์ต่อมิลลิลิตร} \end{aligned}$$

5. การคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

ทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละระดับความเจือจาง แล้วคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ได้ดังสมการ 2

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times \text{ระดับความเจือจางของตัวอย่าง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่นำมาเกลี่ยเช็บบนอาหารแข็ง}} \quad (2)$$

6. การคำนวณหาร้อยละอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์หลังจากทำการกลายพันธุ์

ทำการนับจำนวนโคโลนีในแต่ละเวลาและระดับความเจือจาง แล้วคำนวณหาร้อยละอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ได้ดังสมการ 3

$$\text{ร้อยละอัตราการอยู่รอด} = \frac{100 \times S}{S_0} \quad (3)$$

กำหนดให้

X คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการกลายพันธุ์ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

S คือ จำนวนจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ในแต่ละเวลาและความเจือจาง

7. การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธี D1/D2 domain of 26S ribosomal DNA sequence

7.1 การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีของ Maniatis และคณะ, 1982)

ทำการถ่ายเชื้อ 1 ลูกปลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมไลซิสบัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้ม เป็นเวลา 15 นาที เมื่อต้มเสร็จแล้วเติม โปแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12073.6g เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดส่วนใสมาสกัด 2 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้ง ด้วยคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 13860g เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ตามลำดับ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำ Milli Q ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่

7.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ NL-(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และ NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (Kurtzman และ Robnett, 1998) แล้วนำดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม มาผสมกับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 2.5 ยูนิต ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ไพรเมอร์ NL-1 ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ไพรเมอร์ NL-4 ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ดังภาพภาคผนวกที่ ข2 นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit จากนั้นตรวจสอบด้วยการแยกทางไฟฟ้าโดยใช้เจล (Gel Electrophoresis)



ภาพภาคผนวกที่ ข2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 26S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่

7.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ตามวิธีของ Kurtzman และ Robnett (1998) ด้วยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และรีเวิร์ดไพรเมอร์ (reverse primer) NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')

7.4 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST

ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequence กับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn Homology Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. การเตรียมสารละลายและวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยวิธีการไทเทรต (Veras และคณะ, 2011)

8.1 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล นอร์มอล คือ การใช้กรัมสมมูลในการคำนวณหาความเข้มข้นแทนกรัมสูตร (มวลโมเลกุล) เนื่องจากกรัมสมมูลของ KOH คือ 56.11 กรัม เท่ากับมวลโมเลกุลของ KOH ดังนั้น KOH 0.05 โมลาร์ = 0.05 นอร์มอล เตรียมโดยการชั่ง KOH 2.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วทึบแสง

8.2 การหาความเข้มข้นมาตรฐานสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 0.05 นอร์มอล เตรียมโดยการชั่งโพแทสเซียมไฮดรเจนพทาเลต ทำการอบ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วนำมาชั่ง 0.3 กรัม เติมน้ำ DI 90-100 มิลลิลิตร เติมหินอล์ฟทาลีน 3 หยด ทำการไทเทรตด้วย KOH 0.05 นอร์มอล แล้วคำนวณหาความเข้มข้นมาตรฐานดังสมการ 4

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (นอร์มอล)} = \frac{\text{COOHC}_6\text{H}_4\text{COO (กรัม)} \times 1000}{\text{KOH (มิลลิลิตร)} \times 204.229} \quad (4)$$

8.3 การเตรียมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ทำการชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 0.1 กรัม แล้วละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ทำการปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดแก้วทึบแสง

8.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ นำตัวอย่างจากการทดลองมาปั่นเหวี่ยงที่ 7840g เป็นเวลา 15 นาที มาทำการไทเทรตหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรที่นำไปชั่งน้ำหนักแล้ว เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้เป็น 15 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 6 หยด แล้วไทเทรตด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล ที่ผ่านการหาความเข้มข้นมาตรฐานแล้ว ไทเทรตจนกระทั่งฟีนอล์ฟทาลีนเปลี่ยนสี ส่วนแบลงค์ใช้เอทานอล เพื่อวัดความเป็นกรดของแอลกอฮอล์ ทำการคำนวณหาปริมาณร้อยละของกรดไขมันอิสระดังสมการที่ 5

$$\text{ร้อยละกรดไขมันอิสระ} = \frac{\text{KOH (มิลลิลิตร)} \times \text{KOH (นอร์มอล)} \times 25.6}{\text{oil (กรัม)}} \quad (5)$$

9. การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (Dubois และคณะ, 1956)

9.1 การเตรียมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5

ทำการชั่งฟีนอล 2.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก

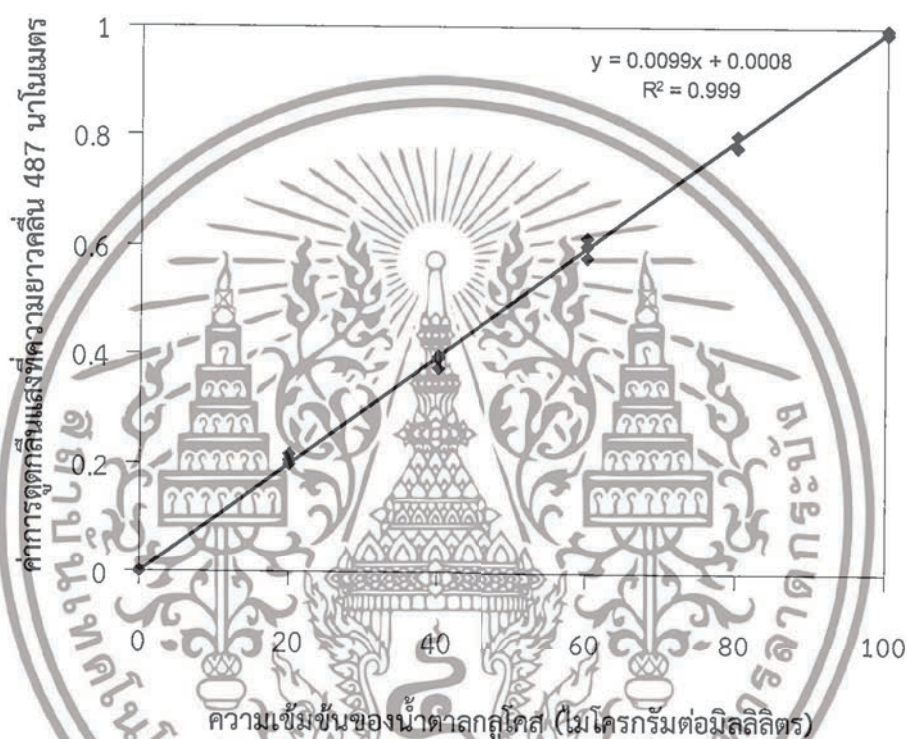
ทำการเจือจางกากน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายกากน้ำตาลที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 487

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้เข้าเว็บไซต์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ หรือเว็บไซต์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ ไม่ว่าความผิดใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปทำการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยทำการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

9.3 การสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก

นำน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายน้ำให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟินอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 487 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาพภาคผนวกที่ ข3)



ภาพภาคผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 487 นาโนเมตร

10. การเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

10.1 การเตรียมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid)

เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆเติม DNS 10 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมเทอร์เทรต 200 กรัม เติมฟินอล 0.2 กรัม และ Na_2SO_3 0.5 กรัม โดยค่อยๆละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

10.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลโดยวิธีการกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก

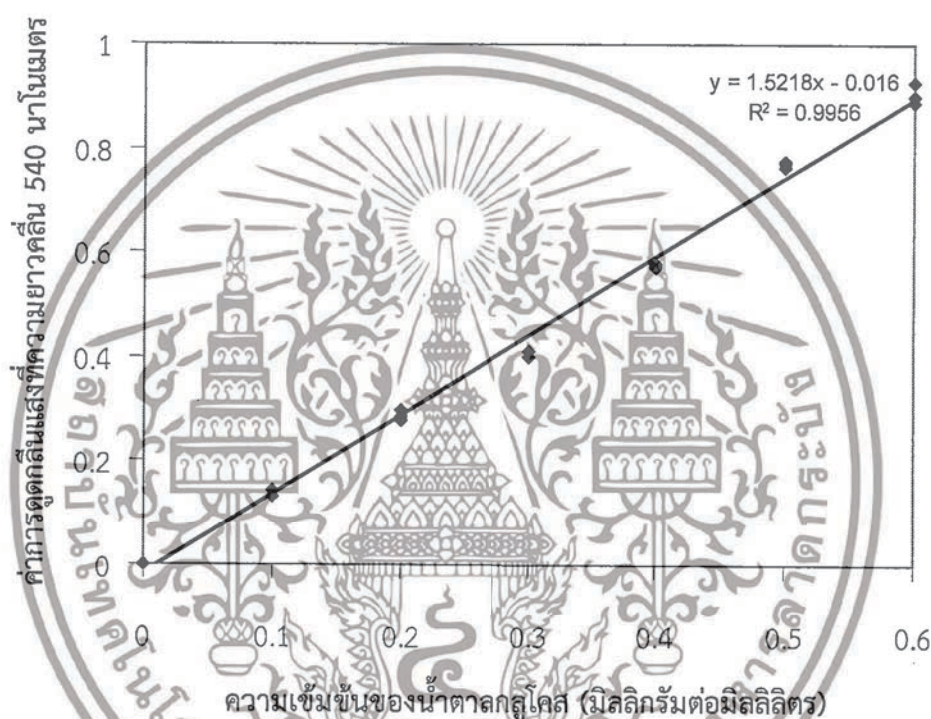
ทำการเจือจางกากน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายกากน้ำตาลที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นใบใช้ประโยชน์ที่มีการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานสารละลายกลูโคส

10.3 การสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก

นำน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม มาละลายน้ำให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิกปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาพภาคผนวกที่ ข4)



ภาพภาคผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

11. การหาปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1984)

ทำการชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในภาชนะที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ โดยผ่านการชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำมาชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสมการที่ 6

$$\text{ร้อยละปริมาณความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}} \quad (6)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. การเตรียมสารเคมีและวิธีการแยกยางเหนียวจากน้ำมันปาล์มดิบโดยใช้สารละลายกรด (ดัดแปลงจากวิธีของสินินาฏ และคณะ, 2553)

12.1 การเตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 8.5

ทำการเจือจางสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 85 ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:9

12.2 วิธีการแยกยางเหนียว

ทำการชั่งน้ำมันปาล์มดิบ 200 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอุ่นให้ร้อนด้วยเครื่องกวนสารให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทำการชั่งสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 8.5 ปริมาณ 3 กรัม (ร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักของน้ำมันที่เตรียมไว้) ผสมลงในน้ำมันแล้วกวนผสมเป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วทำการล้างด้วยน้ำกลั่น โดยชั่งน้ำกลั่น 200 กรัม เติมน้ำลงไปน้ำมัน แล้วกวนผสมต่อไปอีก 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดแล้วนำมากเทใส่ลงในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเป็นเวลา 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วทำการล้างน้ำมันด้วยน้ำกลั่นซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำน้ำมันไปต้มด้วยเครื่องกวนสารให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการไล่ความชื้น แล้วนำน้ำมันที่ได้ไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

13. การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม (จันทรนาถ, 2548)

มวลโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ คำนวณจากสมการที่ 7 และ 8

$$R_{\text{aver}} = \frac{\sum (\%FA_n \times MW_n)}{100} \quad (7)$$

$$MW_{TG} = 3R_{\text{aver}} + 173 \quad (8)$$

กำหนดให้

R_{aver} คือ มวลโมเลกุลของกรดไขมันทั้ง 3 ตำแหน่งที่มา esterified กับกลีเซอรอล ซึ่งหักมวลโมเลกุลของ $-COOH$ ออกแล้ว (ลบออกด้วย 45)

$\%FA_n$ คือ ร้อยละของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน

MW_n คือ มวลโมเลกุลของกรดไขมันที่ลบออกด้วยมวลโมเลกุลของ $-COOH$ ออกแล้ว

MW_{TG} คือ มวลโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์หรือมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม

คำนวณมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มดิบ แทนค่าในสมการที่ 7

$$\begin{aligned} R_{\text{aver}} &= (0.0035 \times 155.32) + (0.0092 \times 183.38) + (0.4411 \times 211.43) + (0.0436 \times \\ &239.49) + (0.0009 \times 267.54) + (0.3897 \times 237.49) + (0.1121 \times 235.49) \\ &= 227.14 \end{aligned}$$

นำค่า R_{aver} ที่ได้ แทนค่าในสมการที่ 8

$$\begin{aligned} MW_{TG} &= (3 \times 227.14) + 173 \\ &= 854.42 \text{ กรัมต่อโมล} \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรมธุรกิจพลังงาน (ม.ป.ป.) ได้วิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบน้ำมันปาล์มดิบในประเทศไทย ไว้ดังตารางภาคผนวกที่ ข2

ตารางภาคผนวกที่ ข2 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปาล์มดิบ

กรดไขมัน	ร้อยละ
กรดลอริก	0.35
กรดไมริสติก	0.92
กรดพาล์มิติก	44.11
กรดสเตียริก	4.36
กรดอะราคิก	0.09
กรดโอเลอิก	38.97
กรดลิโนเลอิก	11.21

14. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันปาล์มดิบ (พุดิพัฒน์, 2555)

เมื่อทราบมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มดิบแล้ว สามารถคำนวณน้ำหนักและปริมาณของเมทานอลหรือเอทานอลที่จะต้องเติมลงในแต่ละการทดลองได้ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันปาล์มดิบเป็น 4:1 โดยใช้ น้ำมันปาล์มดิบ 5 กรัม คิดเป็น 5 หารด้วยมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มดิบ (854.42) = 5.85×10^{-3} โมล

เมทานอลมีมวลโมเลกุล 32.04 กรัมต่อโมล และมีความหนาแน่น 0.793 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ $4 \times 5.85 \times 10^{-3}$ โมล คิดเป็น $4 \times 5.85 \times 10^{-3} \times 32.04 = 0.750$ กรัม

หรือคิดเป็น $0.750 \div 0.793 = 0.946$ มิลลิลิตร

เอทานอลบริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมล และมีความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ $4 \times 5.85 \times 10^{-3}$ โมล คิดเป็น $4 \times 5.85 \times 10^{-3} \times 46.07 = 1.078$ กรัม

หรือคิดเป็น $1.078 \div 0.789 = 1.366$ มิลลิลิตร

เอทานอลร้อยละ 95 มีมวลโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมล และมีความหนาแน่น 0.807 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้ $4 \times 5.85 \times 10^{-3}$ โมล คิดเป็น $4 \times 5.85 \times 10^{-3} \times 46.07 = 1.078$ กรัม

หรือคิดเป็น $1.078 \div 0.807 = 1.336$ มิลลิลิตร

15. การเตรียมสารละลายและวิธีวิเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Wang และคณะ, 2010)

15.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

ทำการผสม n-hexane, diethyl ether และ acetic acid ในอัตราส่วน 90:10:1 ทำการเทใส่ TLC Developing Tank สูง 1 เซนติเมตร ปิดฝาทิ้งให้อิ่มตัวที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

15.2 วิธีการวิเคราะห์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

ทำการหยดตัวอย่างที่ได้จากการทดลองที่ผ่านการปั่นเหวี่ยง ลงบนแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วจุ่มแผ่นกระดาษลงใน TLC Developing Tank ที่มีเฟสเคลื่อนที่อยู่ ปิดฝาทิ้งไว้ให้อิ่มตัว สารตัวอย่างจะมีการแยกกันตามค่า retention time แล้วนำแผ่นกระดาษออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วทำการส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่เผยแพร่โดยไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. การเตรียมสารละลายและวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี (คณินทร์, 2551)

หลังจากผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแล้ว นำเอทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี โดยมีขั้นตอนและการเตรียมการดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างเอทิลเอสเทอร์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7840g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน
2. ชั่งเอทิลเอสเทอร์ที่ได้ปริมาณ 50 มิลลิกรัมบรรจุลงในขวดเก็บสารปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเฮปตะดีคานอเอทความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนอร์มอลเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. เขย่าสารตัวอย่างที่เตรียมได้อย่างรุนแรงเพื่อให้เกิดการผสมเข้ากันอย่างดี
5. นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ไปฉีดกับเครื่องวิเคราะห์ GC-MS โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร
6. นำพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์มาคำนวณหาปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากสมการที่ 9

$$C = \frac{(\sum A - A_{Et}) \times (C_{Et} \times V_{Et}) \times 100}{A_{Et} \times m} \quad (9)$$

กำหนดให้

C คือ ร้อยละของเอทิลเอสเทอร์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$\sum A$ คือ พื้นที่พีค (Peak) รวมของเอทิลเอสเทอร์ตั้งแต่ C₁₂ ถึง C₂₀

A_{Et} คือ พื้นที่พีคที่ตรงกันกับของเมทิลเฮปตะดีคานอเอท

C_{Et} คือ ความเข้มข้นหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายเมทิลเฮปตะดีคานอเอท

V_{Et} คือ ปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของสารละลายเมทิลเฮปตะดีคานอเอท

m คือ มวลในหน่วยมิลลิกรัมของสารตัวอย่าง

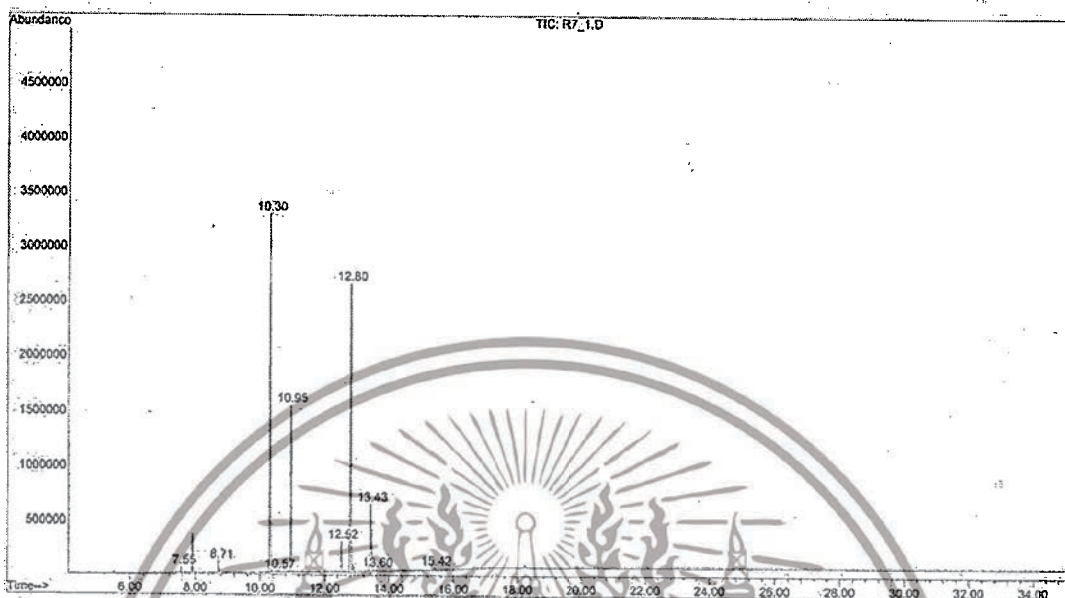
สภาวะที่ใช้วิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟี

1. GC Column : DB-WAX length : 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm
2. Injection mode : split 100:1 Injector Volume : 1 μl
3. Flow rate of mobile phase : helium 1 ml/min
4. Inlet Temperature : 250°C
5. GC temperature program : 50°C, 1 min, 25°C/min to 200°C, 3°C/min to 230°C, 18 min
6. Solvent Delay : 4 min
7. Scan parameter Low Mass : 50 High Mass : 500

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละโดยน้ำหนักปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากโครมาโตแกรมเอทิลเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (ภาพภาคผนวกที่ ข5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

File : D:\57_053\R7_1.D
 Operator :
 Acquired : 9 Sep 2014 16:30 using AcqMethod 57_053
 Instrument : Instrumen
 Sample Name : R 7-1
 Misc Info :
 Vial Number : 1



ภาพภาคผนวกที่ ข5 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์เอทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์

Peak#	Retention time (min)	Peak height	Area	% of total	Name
1	7.547	56100	58005	0.322	Lauric acid ethyl ester
2	8.713	110103	146044	0.812	Myristic acid ethyl ester
3	10.304	3279572	6299897	35.022	Palmitic acid ethyl ester
4	10.568	17358	35186	0.196	Palmitoleic acid ethyl ester
5	10.946	1531717	3751541	20.855	Heptadecanoic acid methyl ester
6	12.522	283331	646493	3.594	Stearic acid ethyl ester
7	12.796	2633297	5289343	29.404	Oleic acid ethyl ester
8	13.429	619199	1604201	8.918	Linoleic acid ethyl ester
9	13.605	20775	77040	0.428	Linolenic acid ethyl ester
10	15.418	20045	80630	0.448	Arachidic acid ethyl ester
Total		8571497	17988380		

จากสมการที่ 9 สามารถคำนวณหาปริมาณเอทิลเอสเทอร์ได้ ดังนี้

$$\begin{aligned} \Sigma A &= 58005 + 146044 + 6299897 + 35186 + 3751541 + 646493 + 5289343 + \\ &1604201 + 77040 + 80630 \\ &= 17988380 \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$A_{E1} = 3751541$$

$$C_{E1} = 10 \text{ มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร}$$

$$V_{E1} = 1 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$m = 51 \text{ มิลลิลิตร}$$

แทนค่าทั้งหมดลงในสมการที่ 9

$$C = \frac{(17988380 - 3751541) \times (10 \times 1) \times 100}{3751541 \times 51}$$

$$= 3.7949 \times 0.1961 \times 100$$

$$= 74.42$$

ดังนั้นมีปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 74.42 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

17. การคำนวณร้อยละผลผลิตของไบโอดีเซล (yield) (คณินทร์, 2551)

การคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้ คือ ผลลัพธ์ที่ได้เก็บได้จากชั้นบน (ไบโอดีเซล) หลังจากการแยกกลีเซอรอลซึ่งอยู่ชั้นล่างออกไป สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 10

$$\text{ร้อยละผลผลิตของไบโอดีเซล} = \frac{\text{น้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่ได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของน้ำมันเริ่มต้น (กรัม)}} \quad (10)$$

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละผลผลิตไบโอดีเซล

น้ำหนักของน้ำมันปาล์มเริ่มต้นเท่ากับ	10	กรัม
น้ำหนักของไบโอดีเซลที่ได้เท่ากับ	3.52	กรัม

แทนค่าลงในสมการที่ 10

$$\text{ร้อยละผลผลิตของไบโอดีเซล} = \frac{3.52 \times 100}{10} = 35.2$$

ดังนั้นมีผลผลิตของไบโอดีเซลร้อยละ 35.2 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

18. การคำนวณจำนวนสิ่งทดลองและระดับปัจจัยที่ใช้เป็นตัวแปรอิสระในการทดลองด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

จำนวนสิ่งทดลองสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 11 (ไพโรจน์, 2544)

$$N = 2^k + 2k + r \quad (11)$$

กำหนดให้

N คือ จำนวนสิ่งทดลอง

k คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

r คือ จำนวนการทดลองซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างคำนวณจำนวนสิ่งทดลอง แทนค่าในสมการที่ 10

$$\begin{aligned} N &= 2^3 + 2(3) + 6 \\ &= 8 + 6 + 6 \\ &= 20 \end{aligned}$$

ระดับปัจจัยสามารถคำนวณได้จากค่า α ซึ่งเป็นระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง (0) จากสมการที่ 12 (Mason และคณะ, 2003)

$$\alpha = F^{1/4} \quad (12)$$

กำหนดให้

α คือ ระยะห่างจากจุดศูนย์กลาง

F คือ จำนวนจุดของการออกแบบการทดลองแบบ 2^k แฟคทอเรียล

k คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

คำนวณค่า α แทนค่าในสมการที่ 12

$$\begin{aligned} \alpha &= (2^3)^{1/4} \\ &= 8^{1/4} \\ &= 1.682 \end{aligned}$$

ตัวอย่างการคำนวณของระดับปัจจัยเวลา

กำหนดระดับปัจจัยกลาง (0) เท่ากับ 72 ชั่วโมง ระดับปัจจัยสูง (+1) เท่ากับ 96 ชั่วโมง ระดับปัจจัยต่ำ (-1) เท่ากับ 48 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง 0 ถึง +1 และ -1 มีระยะห่างเท่ากับ 24 ชั่วโมง

ดังนั้น ที่ระยะห่าง 1 จะมีค่าเท่ากับ 24

$$\text{ที่ระยะห่าง } 1.682 \text{ จะมีค่าเท่ากับ } \frac{24 \times 1.682}{1} = 40.368$$

ดังนั้น ระดับปัจจัยสูงสุด (+1.682) จะเท่ากับ $72 + 40.368 = 112.368$ ชั่วโมง

และ ระดับปัจจัยต่ำสุด (-1.682) จะเท่ากับ $72 - 40.368 = 31.632$ ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	Mean	Std. Deviation	N
PDLP50	.1843	.01376	3
FLP22	.2021	.00384	3
FLP23	.2092	.02108	3
FLP26	.1988	.00856	3
FLP7	.2024	.01521	3
WPLP20	.2132	.01417	3
SLP27	.2802	.00513	3
Total	.2129	.03139	21

ตารางภาคผนวกที่ ค2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.017 ^a	16	.003	17.145	.000
Intercept	.952	1	.952	5645.922	.000
sample	.017	6	.003	17.145	.000
Error	.002	14	.000		
Total	.971	21			
Corrected Total	.020	20			

a. R Squared = .880 (Adjusted R Squared = .829)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค3 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	N	Subset		
		1	2	3
PDLP50	3	.1843		
FLP26	3	.1988	.1988	
FLP22	3	.2021	.2021	
FLP7	3	.2024	.2024	
FLP23	3	.2092	.2092	
WPLP20	3		.2132	
SLP27	3			.2802
Sig.		.051	.236	1.000

ตารางภาคผนวกที่ ค4 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคลอกกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้รังสีคอสมิกที่เวลา 38 วินาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	Mean	Std. Deviation	N
SLP27	.2802	.00513	3
UV101	.2458	.01383	3
UV113	.2734	.00614	3
UV131	.2639	.01011	3
UV149	.2544	.00576	3
UV32	.2673	.01039	3
UV34	.2556	.01227	3
UV38	.2550	.00856	3
UV51	.2479	.01575	3
UV61	.2534	.00879	3
UV79	.3032	.01850	3
Total	.2636	.01880	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่
กลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัตร้าไอโอเลต ที่เวลา 38 วินาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว
ที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.009 ^a	10	.001	6.752	.000
Intercept	2.294	1	2.294	18149.409	.000
sample	.009	10	.001	6.752	.000
Error	.003	22	.000		
Total	2.305	33			
Corrected Total	.011	32			

a. R Squared = .754 (Adjusted R Squared = .643)

ตารางภาคผนวกที่ ค6 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของ
ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัตร้าไอโอเลต ที่เวลา 38 วินาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ
1 เป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200
รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	N	Subset			
		1	2	3	4
UV101	3	.2458			
UV51	3	.2479			
UV61	3	.2534	.2534		
UV149	3	.2544	.2544		
UV38	3	.2550	.2550		
UV34	3	.2556	.2556		
UV131	3	.2639	.2639	.2639	
UV32	3	.2673	.2673	.2673	
UV113	3		.2734	.2734	
SLP27	3			.2802	
UV79	3				.3032
Sig.		.053	.069	.117	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค7 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	Mean	Std. Deviation	N
EM100	.1527	.01871	3
EM107	.3576	.01996	3
EM121	.1475	.01815	3
EM141	.1441	.01710	3
EM213	.2295	.00696	3
EM214	.1892	.01446	3
UV79	.3032	.01850	3
Total	.2177	.08099	21

ตารางภาคผนวกที่ ค8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.127 ^a	6	.021	75.328	.000
Intercept	.995	1	.995	3534.713	.000
sample	.127	6	.021	75.328	.000
Error	.004	14	.000		
Total	1.126	21			
Corrected Total	.131	20			

a. R Squared = .970 (Adjusted R Squared = .957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค9 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต ที่เวลา 58 นาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	N	Subset				
		1	2	3	4	5
EM141	3	.1441				
EM121	3	.1475				
EM100	3	.1527				
EM214	3		.1892			
EM213	3			.2295		
UV79	3				.3032	
EM107	3					.3576
Sig.		.561	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกที่ ค10 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	Mean	Std. Deviation	N
EM107	.3576	.01996	3
GAM107	.2888	.03937	3
GAM112	.2476	.06650	3
GAM130	.2092	.01039	3
GAM153	.5822	.02467	3
GAM26	.4795	.03064	3
GAM40	.5702	.00508	3
GAM41	.2965	.05671	3
GAM42	.2891	.04354	3
GAM47	.7029	.03851	3
GAM68	.3180	.03673	3
Total	.3947	.16030	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ ที่กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.790 ^a	10	.079	54.349	.000
Intercept	5.140	1	5.140	3534.876	.000
sample	.790	10	.079	54.349	.000
Error	.032	22	.001		
Total	5.963	33			
Corrected Total	.822	32			

a. R Squared = .961 (Adjusted R Squared = .943)

ตารางภาคผนวกที่ ค12 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อยีสต์ที่กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา ความเข้มข้น 2 กิโลเกรย์ เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มดิบร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

sample	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
GAM130	3	.2092					
GAM112	3	.2476	.2476				
GAM107	3		.2888	.2888			
GAM42	3		.2891	.2891			
GAM41	3		.2965	.2965			
GAM68	3		.3180	.3180			
EM107	3			.3576			
GAM26	3				.4795		
GAM40	3					.5702	
GAM153	3					.5822	
GAM47	3						.7029
Sig.		.230	.053	.058	1.000	.704	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค13 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	Mean	Std. Deviation	N
6%-0	.014467	.0016197	3
6%-12	.785333	.0794628	3
6%-24	1.879667	.1143081	3
6%-36	2.491000	.2199727	3
6%-48	3.219000	.1715547	3
6%-60	3.957000	.0846109	3
6%-72	4.023333	.1145833	3
6%-84	3.553000	.2116530	3
8%-0	.014467	.0015144	3
8%-12	.492333	.0317228	3
8%-24	1.524000	.1425061	3
8%-36	2.288667	.1729894	3
8%-48	3.850000	.2861818	3
8%-60	4.761667	.1010462	3
8%-72	4.560000	.1212436	3
8%-84	4.446667	.1973153	3
10%-0	.014667	.0015695	3
10%-12	.898333	.0466083	3
10%-24	2.156667	.1823001	3
10%-36	3.458000	.1473092	3
10%-48	4.343333	.1011599	3
10%-60	5.031667	.1325079	3
10%-72	4.870667	.1504704	3
10%-84	4.436667	.1002464	3
12%-0	.014533	.0008737	3
12%-12	.945000	.0111355	3
12%-24	2.667000	.1152345	3
12%-36	3.290667	.2606172	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค13 (ต่อ) แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการ
การตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้น
ของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50
ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	Mean	Std. Deviation	N
12%-48	4.011000	.1661355	3
12%-60	4.085333	.0888669	3
12%-72	3.983667	.1799176	3
12%-84	3.812333	.1937068	3
Total	2.808754	1.6485857	96

ตารางภาคผนวกที่ ค14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการตัวเร่งโดย
เลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล
ร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24,
36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	256.867 ^a	31	8.286	399.580	.000
Intercept	757.354	1	757.354	36522.080	.000
sample	256.867	31	8.286	399.580	.000
Error	1.327	64	.021		
Total	1015.548	96			
Corrected Total	258.194	95			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค15 (ต่อ) แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	N	Subset																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
6%-84	3									3.553000	3.812333							
12%-84	3										3.850000	3.850000						
8%-48	3										3.957000	3.957000						
6%-60	3										3.983667	3.983667						
12%-72	3										4.011000	4.011000						
12%-48	3										4.023333	4.023333						
6%-72	3										4.085333	4.085333						
12%-60	3											4.343333	4.343333					
10%-48	3											4.436667	4.436667					
10%-84	3											4.446667	4.446667					
8%-84	3											4.560000	4.560000					
8%-72	3											4.761667	4.761667	4.761667	4.761667			
8%-60	3												4.870667	4.870667	4.870667	4.870667		
10%-72	3																	5.031667
10%-60	3																	
Sig.		.999	1.000	.206	1.000	1.000	.266	.090	.139	.058	.422	.121	.083	.097	.091	.357	.176	

ตารางภาคผนวกที่ ค16 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก การผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้น ของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่ เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	Mean	Std. Deviation	N
6%-12	.353284	.1431712	3
6%-24	.887817	.0783820	3
6%-36	1.065995	.0666709	3
6%-48	1.293326	.0435536	3
6%-60	1.201165	.0435536	3
6%-72	1.271821	.0276483	3
6%-84	1.139724	.0826028	3
8%-12	.525318	.0401720	3
8%-24	.635911	.0695800	3
8%-36	1.145868	.1199274	3
8%-48	1.124364	.0332291	3
8%-60	1.370126	.0435536	3
8%-72	1.127436	.0323659	3
8%-84	1.158156	.0613638	3
10%-12	.706567	.0507583	3
10%-24	.795656	.0454619	3
10%-36	1.115148	.0401720	3
10%-48	1.379343	.0524049	3
10%-60	1.425423	.0140778	3
10%-72	1.394703	.0231933	3
10%-84	1.250317	.0348916	3
12%-12	.033792	.0281556	3
12%-24	.116737	.0191848	3
12%-36	.230402	.0276483	3
12%-48	.466949	.0507583	3
12%-60	.979978	.0372464	3
12%-72	1.118220	.0231933	3
12%-84	1.287182	.0524049	3
Total	.950026	.4073267	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	13.588 ^a	27	.503	154.430	.000
Intercept	75.814	1	75.814	23263.506	.000
sample	13.588	27	.503	154.430	.000
Error	.183	56	.003		
Total	89.585	84			
Corrected Total	13.771	83			

a. R Squared = .987 (Adjusted R Squared = .980)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางภาคผนวกที่ ค18 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์แลปเตสจากการผลิตหัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบน
 รำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72
 และ 84 ชั่วโมง**

sample N	Subset																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
12%-12 3	.033792																	
12%-24 3	.116737																	
12%-36 3		.230402																
6%-12 3			.353284															
12%-48 3				.466949														
8%-12 3				.525318														
8%-24 3					.635911													
10%-12 3						.706567												
10%-24 3							.795656											
6%-24 3								.887817										
12%-60 3								.979978										
6%-36 3									1.065995									
10%-36 3										1.115148								
12%-72 3											1.118220							
8%-48 3												1.124364						
8%-72 3													1.127436					

ตารางภาคผนวกที่ ค18 (ต่อ) แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 6, 8, 10 และ 12 ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
6%-84	3										1.139724	1.139724							
8%-36	3										1.145868	1.145868							
8%-84	3										1.158156	1.158156	1.158156						
6%-60	3										1.201165	1.201165	1.201165	1.201165					
10%-84	3										1.250317	1.250317	1.250317	1.250317					
6%-72	3										1.271821	1.271821	1.271821	1.271821	1.271821				
12%-84	3										1.287182	1.287182	1.287182	1.287182	1.287182	1.287182			
6%-48	3										1.293326	1.293326	1.293326	1.293326	1.293326	1.293326	1.293326		
8%-60	3										1.370126	1.370126	1.370126	1.370126	1.370126	1.370126	1.370126	1.370126	
10%-48	3										1.379343	1.379343	1.379343	1.379343	1.379343	1.379343	1.379343	1.379343	
10%-72	3										1.394703	1.394703	1.394703	1.394703	1.394703	1.394703	1.394703	1.394703	
10%-60	3										1.425423	1.425423	1.425423	1.425423	1.425423	1.425423	1.425423	1.425423	
sig		.081	1.000	1.000	.216	.135	.061	.053	.053	.096	.120	.066	.082	.058	.075	.050	.050	.287	

ตารางภาคผนวกที่ ค19 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ปริมาณความชื้นร้อยละเริ่มต้น 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	Mean	Std. Deviation	N
40%-0	.015133	.0011240	3
40%-12	1.510000	.3994997	3
40%-24	3.450000	.2645751	3
40%-36	4.012333	.1300628	3
40%-48	5.250000	.1500000	3
40%-60	6.430000	.1732051	3
40%-72	6.400000	.3041381	3
40%-84	6.265000	.5222308	3
50%-0	.014833	.0007024	3
50%-12	1.350000	.3774917	3
50%-24	2.985000	.2025463	3
50%-36	4.410000	.4616276	3
50%-48	5.682333	.1549720	3
50%-60	5.731000	.5258260	3
50%-72	4.660000	.2088061	3
50%-84	3.900000	.0624500	3
60%-0	.014600	.0020809	3
60%-12	.795667	.1565769	3
60%-24	2.030000	.1757840	3
60%-36	2.925000	.2324328	3
60%-48	2.823333	.1106044	3
60%-60	2.835000	.1850000	3
60%-72	3.065000	.3273759	3
60%-84	3.045000	.3363406	3
70%-0	.014733	.0007234	3
70%-12	.587333	.1060204	3
70%-24	1.560000	.2645751	3
70%-36	2.700000	.3385100	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เฉพาะในวงจำกัดเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค19 (ต่อ) แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	Mean	Std. Deviation	N
70%-48	2.230000	.1099136	3
70%-60	2.051667	.2183079	3
70%-72	2.180000	.1190126	3
70%-84	2.150000	.1322876	3
Total	2.908530	1.9379231	96

ตารางภาคผนวกที่ ค20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	352.632 ^a	31	11.375	175.653	.000
Intercept	812.117	1	812.117	12540.437	.000
sample	352.632	31	11.375	175.653	.000
Error	4.145	64	.065		
Total	1168.893	96			
Corrected Total	356.777	95			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค21 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสม
 ภาคน้ำตาล ที่ปริมาณความเข้มข้นของกาบน้ำตาลร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกาบน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	N	Subset																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
8%-0	3	.014467																
6%-0	3	.014467																
12%-0	3	.014533																
10%-0	3	.014667																
8%-12	3	.492333																
6%-12	3	.785333																
10%-12	3	.898333																
12%-12	3	.945000																
8%-24	3	1.524000																
6%-24	3	1.879667																
10%-24	3	2.156667																
8%-36	3	2.288667																
6%-36	3	2.491000																
12%-24	3	2.491000																
6%-48	3	3.219000																
12%-36	3	3.290667																
10%-36	3	3.458000																

ตารางภาคผนวกที่ ค21 (ต่อ) แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมภักคนาดาล โดยให้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	N	Subset																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
6%-84	3									3.553000	3.812333							
12%-84	3										2.850000	3.850000						
8%-48	3										3.957000	3.957000						
6%-60	3										3.983667	3.983667						
12%-72	3										4.011000	4.011000						
12%-48	3										4.023333	4.023333						
6%-72	3										4.085333	4.085333						
12%-60	3											4.343333	4.343333					
10%-48	3											4.436667	4.436667					
10%-84	3											4.446667	4.446667					
8%-84	3											4.560000	4.560000					
8%-72	3											4.761667	4.761667	4.560000				
8%-60	3											4.761667	4.761667	4.761667	4.761667			
10%-72	3														4.870667	4.870667	4.870667	
10%-60	3															5.031667	5.031667	
Sig.		.999	1.000	.206	1.000	1.000	.266	.090	.139	.058	.422	.121	.083	.097	.091	.357	.176	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สละลิขสิทธิ์ภายใต้การคุ้มครองของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง การค้า
 ไม่ว่าการฉ้อโกงทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค22 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ปริมาณ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล ร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	Mean	Std. Deviation	N
40%-12	.135169	.0383697	3
40%-24	.725000	.1567640	3
40%-36	1.016843	.0348916	3
40%-48	1.084427	.0281556	3
40%-60	1.600529	.0191848	3
40%-72	1.443855	.0323659	3
40%-84	1.434639	.0383697	3
50%-12	.113665	.0053209	3
50%-24	.181250	.0191848	3
50%-36	.430085	.2130361	3
50%-48	.556038	.0383697	3
50%-60	1.428495	.0513131	3
50%-72	.669703	.0968056	3
50%-84	.626695	.1596275	3
60%-12	.018432	.0092161	3
60%-24	.061441	.0231933	3
60%-36	.052225	.0435536	3
60%-48	.095233	.0140778	3
60%-60	.304131	.1062852	3
60%-72	.304131	.0401720	3
60%-84	.411652	.0750608	3
70%-12	.036864	.0401720	3
70%-24	.039936	.0191848	3
70%-36	.147458	.0478882	3
70%-48	.193538	.0243835	3
70%-60	.227330	.0281556	3
70%-72	.359428	.0332291	3
70%-84	.470021	.1219175	3
Total	.506008	.4903040	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	19.636 ^a	27	.727	128.412	.000
Intercept	21.508	1	21.508	3797.633	.000
sample	19.636	27	.727	128.412	.000
Error	.317	56	.006		
Total	41.461	84			
Corrected Total	19.953	83			

a. R Squared = .984 (Adjusted R Squared = .976)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค24 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบน
 ... ไร่ข้าวผสมกาน้ำตาล โดยให้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกาน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36,
 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	N	Subset																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
60%-12	3	.018432																
70%-12	3	.036864																
70%-24	3	.039936	.039936															
60%-36	3	.052225	.052225	.052225														
60%-24	3	.061441	.061441	.061441	.061441													
60%-48	3	.095233	.095233	.095233	.095233	.095233												
50%-12	3	.113665	.113665	.113665	.113665	.113665	.113665											
40%-12	3	.135169	.135169	.135169	.135169	.135169	.135169	.135169										
70%-36	3	.147458	.147458	.147458	.147458	.147458	.147458	.147458										
50%-24	3	.181250	.181250	.181250	.181250	.181250	.181250	.181250	.181250									
70%-48	3	.193538	.193538	.193538	.193538	.193538	.193538	.193538	.193538	.193538								
70%-60	3	.227330	.227330	.227330	.227330	.227330	.227330	.227330	.227330	.227330	.227330							
60%-60	3	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131						
60%-72	3	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131	.304131					
70%-72	3	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428	.359428				
60%-84	3	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652	.411652			

ตารางภาคผนวกที่ ค24 (ต่อ) แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งโดยเลี้ยงเชื้อบนรำข้าวผสมกากน้ำตาล โดยให้ปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 10 ที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72 และ 84 ชั่วโมง

sample	N	subset														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
50%-36	3							.430085	.430085	.430085						
70%-84	3							.470021	.470021							
50%-48	3							.556038	.556038	.556038						
50%-84	3							.626695	.626695	.626695	.626695					
50%-72	3							.669703	.669703	.669703	.669703	.669703				
40%-24	3							.725000	.725000	.725000	.725000	.725000				
40%-36	3							1.016843	1.016843	1.016843	1.016843	1.016843	1.016843			
40%-48	3							1.084427	1.084427	1.084427	1.084427	1.084427	1.084427	1.428495		
50%-60	3													1.434639		
40%-84	3													1.443855		
40%-72	3															
40%-60	3															
Sig.		.079	.052	.052	.067	.079	.105	.057	.085	.136	.276	.816	1.600529			

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววรรณิสา บั้นสุข
วัน เดือน ปีเกิด	27 กันยายน 2529
ที่อยู่ปัจจุบัน	210/88 หมู่บ้านเทพารักษ์ 4 หมู่ 1 ถนนปานวิถี ตำบลบางเพ็ญ อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ 10560
ประวัติการศึกษา	2550 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ เกรตเฉลี่ย 3.32 มหาวิทยาลัยนเรศวร
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่นักศึกษา ระดับอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2553 กองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน 2. ทุนของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2555 3. ทุนยกเว้นค่าหน่วยกิตระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. เรื่อง การแยกเชื้อและคัดเลือกลำไส้ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการผลิต เอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล (Isolation and selection of mutant yeasts to produce lipase for catalysis of biodiesel production) การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (The 52 nd Kasetsart University Annual Conference) ระหว่างวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2557 ได้รับรางวัลผลงาน วิจัยระดับดี 2. เรื่อง Optimization of biodiesel production by mutant catalytic cells of <i>Candida orthopsilosis</i> from crude palm oil using response surface methodology การประชุมวิชาการระดับ นานาชาติ The International Bioscience Conference and the 5 th International PSU-UNS Bioscience Conference 2014 (IBSC 2014) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ Novi Sad University ระหว่างวันที่ 29-30 กันยายน 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้