

การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนตเพื่อผลิตไบโอดีเซล

IMMOBILIZED LIPASE WITH ALGINATE FOR BIODIESEL
PRODUCTION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2561
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IMMOBILIZED LIPASE WITH ALGINATE FOR BIODIESEL PRODUCTION



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าเอกสารจะเสียหายจากการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดลอกข้อมูลของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

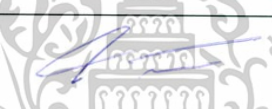


ACADEMIC YEAR 2018

หัวข้อโครงการพิเศษ การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนตเพื่อผลิตไบโอดีเซล
 Immobilized Lipase with Alginate for Biodiesel Production

ชื่อนักศึกษา นางสาวกาญจนา สิงห์หาญ รหัสนักศึกษา 58050862
 นางสาวศุภดา รัตน์ะ รหัสนักศึกษา 58050987
 นางสาวสุกัญญา ภาระศรี รหัสนักศึกษา 58050993

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2561
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
 อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
 (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาธิยะ กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาที่อาคารเรียนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เอามาใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรึงรูปร่างเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนตเพื่อผลิตไบโอดีเซล Immobilized Lipase with Alginate for Biodiesel Production		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกาญจนา	สิงห์หาญ	รหัสนักศึกษา 58050862
	นางสาวศุภดา	รัตน์ะ	รหัสนักศึกษา 58050987
	นางสาวสุกัญญา	ภาระศรี	รหัสนักศึกษา 58050993
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		
ปีการศึกษา	2561		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต	วรณันทกิจ	

บทคัดย่อ

ไบโอดีเซลเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผลิตได้จากกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยอาศัยกรด ต่าง หรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา งานวิจัยทำการศึกษการตรึงรูปร่างเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 โดยทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วแยกเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส ตรึงรูปร่างเอนไซม์ด้วยอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเท่ากับ 2:1 นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ได้ไปใช้เร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4:1 ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 ทำปฏิกิริยาที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง แล้วคำนวณหาปริมาณร้อยละไบโอดีเซลที่ผลิตได้ ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 SS1003 SN2006 และ KS2002 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 164.87 ± 1.91 156.23 ± 4.46 3.51 ± 0.02 3.24 ± 0.01 0.68 ± 0.02 และ 0.66 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแบคทีเรียรหัส BG2018 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ และให้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงที่สุด หลังจากการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ครั้ง มีปริมาณไบโอดีเซลร้อยละ 73.40 37.89 และ 4.21 ตามลำดับ จากผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตกลับมาใช้ซ้ำในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลได้ ช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสอีกด้วย

เอกสาร**คำสำคัญ**: ไบโอดีเซล ไลเปส การตรึงรูปร่าง *Burkholderia* sp. *Pseudomonas* sp.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Immobilized Lipase with Alginate for Biodiesel Production
Student	Miss Kanjana Singharn Student ID 58050862 Miss Suphada Rattana Student ID 58050987 Miss Sugunya Parasri Student ID 58050993
Degree	Bachelor for Science (Industrial microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology ladkrabang (KMITL)
Academic year	2018
Advisor	Asst.Prof.Dr.Worakrit Worananthakij

Abstact

Biodiesel is one of the alternative energy sources that similar to diesel fuel and environment friendly. This production is used the process of transesterification reaction require acid alkaline or lipase as the catalyst. This study aims to study immobilized lipase from bacteria *Burkholderia* sp. strains BG2015 and BG2018, and bacteria *Pseudomonas* sp. strains KS2002 KS3005 SN2006 and SS1003. Enzyme lipase was purification by ammonium sulfate precipitation and dialysis. Immobilized lipase with alginate concentration of 2 percent, enzyme lipase to sodium alginate solution ratio is 2:1. Immobilized enzymes are used as catalysts in the production of biodiesel. The optimum condition was at temperature 45°C, methanol to oil molar ratio is 4:1, dosage enzyme 50 percent, 200 rpm, 72 hours. The chemical compositions analyzed by using of thin layer chromatography, and analyzed amount of biodiesel contents. The enzyme activity value from bacteria strains BG2018 BG2015 KS3005 SS1003 SN2006 and KS2002 were 164.87±1.91 156.23±4.46 3.51±0.02 3.24±0.01 0.68±0.02 and 0.66±0.02 units/ml, respectively. Bacteria strain BG2018 has the highest enzyme activity and biodiesel yield was used as catalyst repeated 3 times with amount of biodiesel 73.40 37.89 and 4.21 percent, respectively. Immobilized lipase with alginate could be reused as a catalyst for biodiesel production. This study provides the reduces of cost and duration of bacteria culture for lipase production.

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากคณะผู้จัดทำได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณดังนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรภุต วรรณนทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา และชี้แนวทางอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือแนะแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องในการทำเล่มโครงการพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นด้วยความเอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ และ ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการในการสอบที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำเพื่อให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีเนื้อหาที่สมบูรณ์ครบถ้วนมากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้วิชาการ ซึ่งผู้ดำเนินโครงการได้นำความรู้มาใช้เป็นพื้นฐานในการทำโครงการพิเศษ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารและสถานที่ ตลอดจนแม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยา อาคารจุฬารัตน์วลัยลักษณ์ 1 และเจ้าหน้าที่ประจำคณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษาตลอดจนเลี้ยงดู อบรม สั่งสอน เป็นกำลังใจและเป็นแรงผลักดันในการทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และบุคคลอื่นๆ ทุกคนที่ไม่ได้กล่าวมาที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการทำโครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้เกี่ยวข้องในการนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ดังกล่าวข้างต้นต่อไป หากมีข้อผิดพลาดประการใดในเนื้อหาทางคณะผู้จัดทำขออภัยอย่างสูงมา ณ ที่นี้

กาญจนา สิงห์หาญ

ศุภดา รัตนะ

สุกัญญา ภาระศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ไบโอดีเซล.....	3
2.1.1 ไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์โดยตรง.....	3
2.1.2 ไบโอดีเซลแบบลูกผสม.....	3
2.1.3 ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์.....	4
2.2 ปัจจัยสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล.....	4
2.2.1 ผลของอัตราส่วนโมลของแอลกอฮอล์.....	4
2.2.2 ความชื้นและกรดไขมันอิสระ.....	5
2.2.3 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา.....	5
2.2.4 อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา.....	5
2.2.5 การกวนผสม.....	5
2.2.6 ชนิดและปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา.....	6
2.3 เอนไซม์ไลเปส.....	7
2.3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส.....	7
2.3.2 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์.....	8
2.4 การผลิตเอนไซม์ตรึงรูป.....	9
2.4.1 การตรึงรูปด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง.....	9
2.4.2 การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้.....	9
2.4.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้.....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุที่เปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป.....	10
2.5.1 ชนิดตัวพอง.....	10
2.5.2 กรดต่าง.....	10
2.5.3 อุณหภูมิ.....	11
2.5.4 ตัวทำลายอินทรีย์.....	11
2.5.5 แคลเซียมไอออน.....	11
2.6 การเก็บเกี่ยว.....	12
2.7 การวิเคราะห์ผลผลิตไบโอดีเซล.....	12
2.7.1 โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง.....	12
2.7.2 แก๊สโครมาโทกราฟี.....	13
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.8.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	14
2.8.2 การตรึงเอนไซม์.....	14
2.8.3 การผลิตไบโอดีเซล.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	18
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	18
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.3 สารเคมี.....	18
3.4 อุปกรณ์.....	19
3.5 เครื่องมือ.....	19
3.6 วิธีการดำเนินงาน.....	20
3.6.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.....	20
3.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric.....	20
3.6.3 การทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์.....	21
3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี.....	22
3.6.5 การทดสอบความเข้มข้นและอัตราส่วนของอัลจินต.....	22
3.6.6 การตรึงเซลล์เอนไซม์ไลเปสในเม็ดแคลเซียมอัลจินต.....	22
3.6.7 การผลิตไบโอดีเซล.....	23
3.6.8 การทำไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์โดยวิธีการชะล้างแบบเปียก.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ชนด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.6.9 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไบโอดีเซล ที่ได้จากการทดลองโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง.....	23
3.6.10 การตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีโดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	25
4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์.....	25
4.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นและอัตราส่วนของอัลจินต.....	25
4.3 ผลการศึกษาการตรึงรูปร่างเอนไซม์ไลเปสด้วยแคลเซียมอัลจินต.....	27
4.4 ผลการศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปร่างด้วยแคลเซียมอัลจินตกลับมาใช้ใหม่.....	27
4.5 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง.....	32
4.6 ผลการตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วย เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีโดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103.....	33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	38
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	38
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	39
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	46
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	47
ภาคผนวก ข สารเคมี.....	49
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	50
ภาคผนวก ง ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์การอิมตัว) ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน.....	52
ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์.....	53
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร.....	54
ภาคผนวก ช ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	60
ภาคผนวก ซ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	66
ภาคผนวก ฌ ผลผลิตไบโอดีเซล.....	92
ภาคผนวก ฎ ขนาดเม็ดของแคลเซียมอัลจินต.....	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	8
4.1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด...	29
4.2 ปริมาณร้อยละไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต.....	34
ค.1 การเจือจาง p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	50
ค.2 การเจือจาง Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	51
ง.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน ที่เปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวต่างๆ ที่ 0 องศาเซลเซียส.....	52
จ.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003.....	53
ฉ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต.....	54
ช.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต.....	60
ซ.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.....	66
ซ.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.....	78
ซ.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีไดอะไลซิสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.....	80
ซ.4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีไดอะไลซิสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.....	82
ซ.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.....	84
ซ.6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp. ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตหลังการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซ้ำ 1 ครั้ง.....	86
ซ.7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp. ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตหลังการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซ้ำ 2 ครั้ง.....	88
ซ.8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp. ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตหลังการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซ้ำ 3 ครั้ง.....	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูอาจารย์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 สมการปฏิกิริยาของกระบวนการ Transesterification.....	4
2.2 ตัวอย่างลักษณะโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้ จากเครื่องบันทึกข้อมูลเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	13
4.1 เอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต.....	26
4.2 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง.....	32
4.3 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง.....	33
4.4 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	34
4.5 โครมาโทแกรมของการผลิตไบโอดีเซลครั้งที่ 1.....	35
4.6 โครมาโทแกรมของการผลิตไบโอดีเซลครั้งที่ 2.....	36
4.7 โครมาโทแกรมของการผลิตไบโอดีเซลครั้งที่ 3.....	37
ค.1 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร.....	50
ค.2 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	51
ณ.1 ผลผลิตไบโอดีเซล.....	92
ญ.1 ผลขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต.....	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมีความต้องการน้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มมากขึ้น จึงนำมาสู่การค้นหาแหล่งพลังงานทางเลือกอื่น เชื้อเพลิงชีวภาพคือพลังงานที่น่าสนใจ เป็นเชื้อเพลิงเหลวหรือก๊าซที่ผลิตจากชีวมวลเป็นส่วนใหญ่ เพราะสามารถลดก๊าซเรือนกระจกได้และให้ความมั่นคงทางด้านพลังงาน หนึ่งในเชื้อเพลิงชีวภาพเหล่านี้คือไบโอดีเซลซึ่งเป็นพลังงานชีวภาพที่สะอาดได้จากพลังงานหมุนเวียน โดยสามารถผลิตได้จากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ คุณสมบัติของไบโอดีเซลค่อนข้างคล้ายกับน้ำมันดีเซลจึงได้กลายเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจในปัจจุบัน (Abbaszadeh *et al.*, 2014)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) สามารถผลิตได้จากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ ส่วนประกอบหลักของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์คือไตรกลีเซอไรด์ ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล ได้ผลิตผลเป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (mono-alkyl ester) และกลีเซอรอล (Glycerol) กระบวนการผลิตไบโอดีเซลถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (Transesterification) ที่มีกรดต่าง หรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) (Lam *et al.*, 2010; Abbaszadeh *et al.*, 2014)

ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol Acylhydrolases, EC 3.1.1.3) ได้กลายเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลมากกว่าการใช้กรดหรือต่าง โดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ในสภาวะปกติจึงใช้พลังงานน้อย ยังสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับวัตถุดิบน้ำมันที่มีคุณภาพแตกต่างกันรวมถึงน้ำมันคุณภาพต่ำหรือน้ำมันเหลือใช้จากการปรุงอาหาร ซึ่งมีความเป็นกรดค่อนข้างสูง จึงมีการนำเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งการใช้ตัวเร่งชีวภาพนี้จะไม่มีการใช้กรดหรือต่างในปฏิกิริยาจึงไม่ทำให้เกิดน้ำเสียจากการผลิต (ปกรณ, 2554) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั้งในสัตว์ พืช หรือผลิตได้จากจุลินทรีย์ โดยสามารถลดระยะเวลาในการผลิตได้โดยการตรึงรูปเอนไซม์ (Fukuda *et al.*, 2001)

เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) เป็นการนำเอาเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดไว้ สามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้ง จนกว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลง ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ และสามารถใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระดั้งเดิมได้ ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวกลางที่ใช้จับยึดกับวิธีการตรึงรูป ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระที่จะต้องใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่จุดหนึ่งที่เหมาะสมเท่านั้น (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2552)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสเพื่อลดต้นทุน และลดเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า สำหรับใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยแคลเซียมอัลจินตเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล

1.2.2 ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจินตที่ใช้แล้วนำกลับมาใช้ใหม่

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท รหัส BG2015 และ BG2018 จากการคัดแยกของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 จากการคัดแยกของ โชตินันท์ และคณะ (2557) โดยวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยอัลจินต เพื่อนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล และศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินตกลับมาใช้ซ้ำในปฏิกิริยา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถลดระยะเวลาในขั้นตอนการผลิต และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้

1.4.2 สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นสารประกอบเอสเทอร์ที่สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์ ซึ่งการเรียกชื่อสารประกอบเอสเทอร์ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น เมื่อใช้เมทานอลในการทำปฏิกิริยาเรียกว่า เมทิลเอสเทอร์ หรือ เมื่อใช้เอทานอลในการทำปฏิกิริยาจะเรียกว่า เอทิลเอสเทอร์ ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นที่นิยมใช้ทั่วไปเนื่องจากให้ผลลัพธ์การแปลงไตรกลีเซอไรด์ที่สูงและใช้ระยะเวลาอันสั้น นอกจากนี้มีการใช้สารเร่งปฏิกิริยาชนิดอื่น เช่น กรด เบส และเอนไซม์ เพื่อลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาและให้อัตราการแปลงที่สูงขึ้น (Lam *et al.*, 2010)

ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและมีข้อดีกว่าหลายอย่างคือไบโอดีเซลที่ได้เป็นเชื้อเพลิงสะอาดไม่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้ไอเสียจากเครื่องยนต์ที่ปล่อยออกมาไม่ก่อให้เกิดฝนกรด และมีจุดวาบไฟสูงกว่าจึงมีค่าการจุดระเบิดในเครื่องยนต์ที่ต่ำกว่า น้ำมันดีเซล นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ดี ช่วยลดการสึกหรอของเครื่องยนต์ (Zhang *et al.*, 2003) โดยเทคนิคการผลิตไบโอดีเซลมีหลายวิธี ดังนี้ (อาภาณี, 2549; อรณิข, 2560)

2.1.1 ไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์โดยตรง

ไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์โดยตรง (Straight Vegetable Oil) คือ การนำน้ำมันจากพืชหรือน้ำมันจากไขมันสัตว์ใส่ลงในเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ผสมหรือเติมสารเคมีอื่น สิ่งสำคัญในการใช้น้ำมันพืชโดยตรงคือการให้ความร้อนน้ำมันในทุกจุดที่มีน้ำมันไหลผ่านเพื่อหลอมเหลวไขแข็งและลดความหนืดของน้ำมัน ซึ่งต้องให้อุณหภูมิอย่างน้อย 70 องศาเซลเซียส น้ำมันพืชที่มีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลการนำมาใช้จะทำให้หัวฉีดน้ำมันฉีดน้ำมันเป็นฝอยได้ยาก เป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิงเข้าสู่ห้องเผาไหม้ทำให้เกิดการสันดาปที่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ น้ำมันพืชยังมีคุณสมบัติที่ระเหยตัวกลายเป็นไอได้ช้า ยิ่งทำให้เครื่องยนต์ติดยากและหลงเหลือคราบเขม่าเกาะที่หัวฉีด ผนังลูกสูบ แหวน และวาล์ว จากคุณสมบัติน้ำมันพืชที่มีความหนืดสูงและระเหยตัวได้ต่ำกว่าน้ำมันดีเซลนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากเมื่อนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรงในเครื่องยนต์

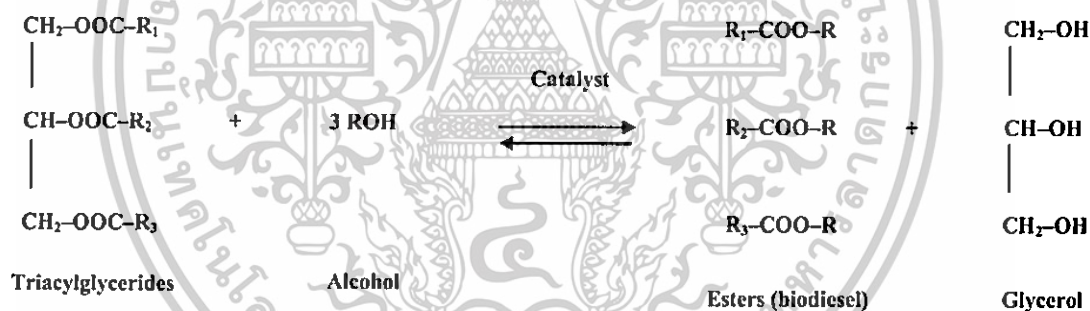
2.1.2 ไบโอดีเซลแบบลูกผสม

ไบโอดีเซลแบบลูกผสม (Veggie/Kero Mix) คือ การผสมน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากไขมันสัตว์กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล เพื่อลดความหนืดของน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากไขมันสัตว์ลง น้ำมันที่ได้จากวิธีการดังกล่าวเหมาะกับกรณีจำเป็นที่ต้องการใช้น้ำมันอย่างเร่งด่วน และใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้งานหนัก ตลอดจนถึงใช้ในภูมิภาคเขตร้อน ซึ่งอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมอยู่ที่น้ำมันก๊าดร้อยละ 20 น้ำมันพืชร้อยละ 80 ปัจจุบันมีการนำวิธีดังกล่าวไปใช้งาน แต่เนื่องจากราคาไม่ถาวรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของน้ำมันก๊าดค่อนข้างสูงทำให้ใช้ปริมาณของน้ำมันก๊าดน้อยเกินไป จึงเกิดผลกระทบต่อเครื่องยนต์ จากปัญหาการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้เพื่อใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลที่ไม่มีการดัดแปลงเครื่องยนต์ จึงต้องเลือกชนิดน้ำมันพืช ชนิดของตัวทำละลาย และสัดส่วนผสมที่เหมาะสมกับพื้นที่ และฤดูกาลที่ใช้ เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้งานและไม่เกิดปัญหาตามมา เช่น การเกิดไขในท่อส่งน้ำมัน และ ทำให้เกิดการอุดตัน เป็นต้น

2.1.3 ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์

ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์ได้จากปฏิกิริยาเคมีที่เรียกว่า ทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (Transesterification process) ซึ่งเป็นการนำแอลกอฮอล์มาทำปฏิกิริยากับน้ำมันจากพืชหรือไขมันสัตว์ ได้ผลผลิตเป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์เป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด สามารถนำไปเติมในเครื่องยนต์ดีเซลได้ทุกชนิด ทั้งเติมโดยตรงและผสมลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ เช่น B5 หมายถึงการผสมไบโอดีเซลต่อ น้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 5:95 หรือ B100 ซึ่งเป็นน้ำมันไบโอดีเซลร้อยละ 100 เป็นต้น แต่ปัญหาคือ ต้นทุนในการผลิตสูงเมื่อเทียบกับไบโอดีเซลแบบอื่น ปัจจุบันราคาน้ำมันไบโอดีเซลยังสูงกว่าน้ำมันดีเซล 1 ถึง 2 เท่า การนำมาใช้กับเครื่องยนต์จึงมักจะนำน้ำมันดีเซลมาผสมด้วย ซึ่งในปัจจุบันได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในระบบขนส่งมวลชน เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีราคาไม่ต่างจากน้ำมันดีเซล



รูปที่ 2.1 สมการปฏิกิริยาของกระบวนการทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน
ที่มา : Lin and Tsai (2015)

2.2 ปัจจัยสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล

ปัจจัยต่างๆ ในการผลิตไบโอดีเซล มีผลต่อลักษณะและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ โดยอาจส่งผลต่อความหนืดของน้ำมัน หรืออุณหภูมิของจุดวาบไฟ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลมีดังนี้ (Mathiyazhagan and Ganapathi, 2011)

2.2.1 ผลของอัตราส่วนโมลของแอลกอฮอล์

อัตราส่วนของแอลกอฮอล์มีบทบาทสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล โดยปกติในปฏิกิริยาจะต้องใช้แอลกอฮอล์ 3 โมลต่อไตรกลีเซอไรด์ 1 โมล เพื่อให้ได้เอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมลและกลีเซอรอล 1 โมล ปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากเกินไปจะเพิ่มประสิทธิภาพการเปลี่ยนไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไตรกลีเซอไรด์ไปเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันได้ภายในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นผลผลิตไบโอดีเซล จะเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จนถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่การเพิ่มขึ้นของ ปริมาณแอลกอฮอล์นั้นยังเพิ่มต้นทุนในการใช้แอลกอฮอล์อีกด้วย

2.2.2 ความชื้นและกรดไขมันอิสระ

ความชื้นและกรดไขมันอิสระ (FFA) เป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา เช่น ในปฏิกิริยาการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสจะต้องใช้น้ำอิสระและปริมาณกรดที่ต่ำ (น้อยกว่า 1) เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล หากตัวอย่างน้ำมันมีปริมาณ FFA สูง (มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์) ปฏิกิริยานี้จะต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสเพื่อทำให้ FFA เป็นกลาง ซึ่งน้ำจะมีผลเสียมากกว่า FFA เพราะน้ำอาจก่อให้เกิดสบู่และพองจากปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ซึ่งอาจทำให้เกิด ความหนืดเพิ่มขึ้น เกิดการก่อตัวของเจลและโพลีเมอร์เป็นอุปสรรคต่อการแยกกลีเซอรอลจากไบโอดีเซล นอกจากนี้ FFA และน้ำยังส่งผลทำให้เกิดสบู่และนำไปสู่การลดเอสเทอร์ของกรดไขมันอีกด้วย

2.2.3 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

อัตราการแปลงกรดไขมันเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มเวลาของปฏิกิริยา ปฏิกิริยาจะช้าเมื่อเริ่มต้นเพราะในขั้นตอนการผสมมีการกระจายตัวของแอลกอฮอล์และน้ำมัน หลังจากนั้นปฏิกิริยาจะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการแปลงเอสเทอร์สูงสุดนั้นทำได้ภายใน 90 นาที การเพิ่มขึ้นของเวลาในการทำปฏิกิริยานั้นไม่ได้เพิ่มผลผลิต เช่น อัลคิลเอสเทอร์ นอกจากนี้ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่นานอาจทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาย้อนกลับของ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียเอสเทอร์และการเกิดสบู่

2.2.4 อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา

อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อผลผลิตไบโอดีเซล เช่น อุณหภูมิปฏิกิริยาที่สูงขึ้นจะเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและลดระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาลง เนื่องจาก ความหนืดของน้ำมันลดลง อย่างไรก็ตามอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเกินกว่าระดับที่เหมาะสม จะทำให้ผลผลิตไบโอดีเซลลดลง เนื่องจากอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่สูงขึ้นนั้นจะเร่งการสลายตัวของ ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาควรอยู่ต่ำกว่าจุดเดือดของแอลกอฮอล์เพื่อป้องกันการ ระเหยของแอลกอฮอล์ ช่วงอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่ดีที่สุดอาจแตกต่างกันตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับประเภทน้ำมันหรือไขมันที่ใช้

2.2.5 การกวนผสม

ความเร็วกวนมีบทบาทสำคัญในการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากช่วยกวนผสม น้ำมันและตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งจะช่วยเพิ่มความเร็วของปฏิกิริยา เช่น ความเร็วกวน คือ 200 400 600 และ 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ในขณะที่พารามิเตอร์อื่นมีค่าคงที่ ที่ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที การแปลงของผลิตภัณฑ์ที่ได้รับจะสูงขึ้น เนื่องจากความเร็วของเครื่องปั่นทำให้เกิด การสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต่ำลง แต่ในทางกลับกันความเร็วรอบในการกวนสูงนั้นจะทำให้การสูญเสีย เพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 ชนิดและปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันถูกนำมาใช้เพื่อช่วยเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลผลิต ทำให้ปฏิกิริยาเกิดสมดุลโดยการย้ายหมู่เอสเทอร์ของน้ำมัน ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด เบส และเอนไซม์ไลเปส ทำหน้าที่สำคัญในการปรับปฏิกิริยาให้อยู่ในจุดสมดุลเร็วขึ้น โดยประเภทของตัวเร่งปฏิกิริยาจำแนกได้ดังนี้

2.2.6.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด (Acid Catalyst)

กรดที่ใช้กันทั่วไปในปฏิกิริยา ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดซัลโฟนิค กรดไฮโดรคลอริก กรดอินทรีย์ซัลโฟนิค เพอร์ริกซัลเฟต และอื่นๆ (Atadashi *et al.*, 2013) การใช้กรดจะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ต่ำและใช้อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 55 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล (Marchetti *et al.*, 2007) กลไกการเร่งปฏิกิริยาด้วยกรดสามารถเกิดกรดคาร์บอกซิลิกขึ้นได้ง่ายจากการไฮโดรไลซิสของคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาควรใช้ในกรณีที่ไม่มีน้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการก่อตัวของกรดคาร์บอกซิลิกที่จะทำให้ผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์ลดลง (Narasimharao *et al.*, 2007)

2.2.6.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (Base Catalyst)

เบสมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาในอัตราเร็วกว่าเกือบ 4,000 เท่า และการก่อก้อนที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดในปริมาณเดียวกัน (Atadashi *et al.*, 2013) เบสทั่วไปที่ใช้ในปฏิกิริยา ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ร่วมกับเมทานอลหรือเอทานอล สามารถใช้ร่วมกับน้ำมันชนิดใดก็ได้ เช่น น้ำมันปรุงแต่ง น้ำมันดิบ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วจากการทอด ซึ่งในการทำปฏิกิริยาควรเปลี่ยนเบสให้อยู่ในรูปของสารประกอบอัลคอกซี (Alcoxy) ก่อน โดยอัตราส่วนน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมคือ 1:6 เป็นอัตราส่วนที่ให้การแปลงสูงสุดสำหรับการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Marchetti *et al.*, 2007)

2.2.6.3 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องใช้โคเอนไซม์ มีความเสถียร ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ มีความจำเพาะ ให้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ที่สูง และเหมาะกับวัตถุดิบที่มีปริมาณกรดไขมันและน้ำปนเปื้อน ถึงแม้ว่ายังไม่มีการนำกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาพัฒนาในเชิงการค้า แต่มีบทความและงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาสถานะที่เหมาะสม (สารละลาย อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส ชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ เป็นต้น) เพื่อปรับใช้ในอุตสาหกรรม (Marchetti *et al.*, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส (triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล พบว่าบริเวณที่เร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์มีสายโพลีเปปไทด์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับสารตั้งต้นให้เกิดการเข้าคู่ที่เหมาะสมกัน สายโพลีเปปไทด์ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่ โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยาจะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีกรดอะมิโนซีรีนทำหน้าที่เป็นเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ นอกจากกรดอะมิโนซีรีนแล้วยังพบกรดอะมิโนอีก 2 ชนิด ได้แก่ ฮีสทีดีนและกรดแอสพาทิก เป็นตัวช่วยการทำงานของกรดอะมิโนซีรีนที่บริเวณตัวเร่งเอนไซม์ การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีประโยชน์มากสำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลของสารอินทรีย์ ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก ซึ่งแหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบได้ในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เป็นที่สนใจมากกว่าไลเปสจากสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ (Rohit *et al.*, 2001)

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ในปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์กำลังได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่นิยมมาใช้ในการค้า ได้แก่ *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ผลิตจากรา เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ คือ *Candida cylindracea* ส่วนเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย คือ *Pseudomonas* (Treichel *et al.*, 2010)

2.3.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์

เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อนซึ่งเป็นชนิดแรกที่พบทำหน้าที่ย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม กระเพาะอาหาร ลำไส้ หัวใจ ไต กล้ามเนื้อ และสมอง นอกจากนี้ยังพบไลเปสในน้ำนมสัตว์ ซึ่งไลเปสจากตับอ่อนมี 2 แบบคือ ไลเปส-เอ และไลเปส-บี และยังสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย

2.3.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

เอนไซม์ไลเปสจากพืชพบได้ทั้งใน เนื้อเยื่อพืช ผัก และในเมล็ดพืช ไลเปสที่พบจากพืชจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง มักพบจากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโอ๊ต เมล็ดปาล์ม เมล็ดยางพารา ถั่วเหลือง เป็นต้น

2.3.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวสูงและสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ ไม่มีความซับซ้อนในการสกัดจึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยโดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การค้าหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีไม่ต่ำกว่าร้อยละ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลที่ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต จึงมีข้อดีมากกว่า เอนไซม์จากสัตว์และพืช (ปวีณา, 2548)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

Microorganism	Source	Microorganism	Source
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Fungi	<i>Candida rugosa</i>	Yeast
<i>Rhizopus chinensis</i>	Fungi	<i>Candida cylindracea</i>	Yeast
<i>Aspergillus</i> sp.	Fungi	<i>Candida</i> sp.	Yeast
<i>Penicillium cirinum</i>	Fungi	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Yeast
<i>Penicillium resrictum</i>	Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yeast
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Fungi	<i>Williopsis californica</i>	Yeast
<i>Penicillium verrucosum</i>	Fungi	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Bacteria
<i>Geotrichum</i> sp.	Fungi	<i>Pseudomonas</i> sp	Bacteria
<i>Geotrichum candidum</i>	Fungi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria
<i>Aspergillus carneus</i>	Fungi	<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	Bacteria
<i>Rhizopus</i> sp.	Fungi	'Biopetro-4'	Bacteria
<i>Aspergillus niger</i>	Fungi	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bacteria
<i>Rhizopus oryzae</i>	Yeast	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria
<i>Colletorichum gloesporioïdes</i>	Yeast	<i>Burkholderia multivorans</i>	Bacteria
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	Yeast	<i>Serratia rubidaea</i>	Bacteria
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.	Bacteria
<i>Candida utilis</i>	Yeast	<i>Bacillus coagulans</i>	Bacteria
<i>Trichosporon asahii</i>	Yeast	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteria

ที่มา: (Treichel *et al.*, 2010)

2.3.2 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

ชนิดเอนไซม์ไลเปสได้ถูกแบ่งจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (Macrae *et al.*, 1983)

2.3.2.1 กลุ่มเปปเปอร์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งอื่นของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ โดยเอนไซม์ไลเปสพวกนี้จะสามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจะได้เอสเทอร์และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้คือ *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

2.3.2.2 กลุ่มไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3)-ไตรกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่โมเลกุลทั้งสองชนิดนี้ไม่คงตัว ถ้าทำการบ่มเป็นเวลานานพอจะมีการเกิดไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acyl migration ทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมนอกลิเซอไรด์ ซึ่งจะถูกละลายได้อย่างสมบูรณ์ได้เอสเทอร์และกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้จะได้จากจุลินทรีย์จำพวก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rhizopus sp.*

2.3.2.3 กลุ่มที่ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของกรดไขมันบนกลุ่มไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์บางพวก เช่น *Geotrichum candidum* ที่ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีพันธะคู่นิวรูปซิส (cis form) ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

นอกจากนี้ยังมีการแบ่งเอนไซม์ไลเปสอีกแบบโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนไตรกลีเซอไรด์ และพวกที่ไม่มีมีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้จะถูกแบ่งออกจากกัน (Yamane *et al.*, 1987) แต่ก็ยังมีนักวิจัยท่านอื่นศึกษาแยกเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเอนไซม์ไลเปสพวกที่มีความจำเพาะจะมีการ reverse hydrolysis ระหว่างที่มีการไฮโดรไลซ์ ขณะที่เอนไซม์ไลเปสชนิดที่ไม่มีมีความจำเพาะจะไม่มี reverse hydrolysis ทำให้มีการไฮโดรไลซ์ได้ดีกว่า เพราะเหตุนี้ทำให้ไลเปสพวกที่ไม่มีมีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ (Okumura *et al.*, 1983)

2.4 การผลิตเอนไซม์ตรีงรูป

การผลิตเอนไซม์ไลเปสตรีงรูปเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ละลายน้ำ โดยนำเอาเอนไซม์มาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดหรือจับยึดไว้กับสารตัวกลางซึ่งมี 3 วิธีหลัก ดังนี้ (Zhao *et al.*, 2015)

2.4.1 การตรีงรูปด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับสารตัวกลาง

การตรีงรูปด้วยสารตัวกลางหรือตัวพุง (carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำ การดูดซับของเอนไซม์อยู่บนผิวภายนอกของตัวพุง วิธีนี้จะไม่ทำให้โครงสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนไป แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย เนื่องจากแรงดึงดูดที่ค่อนข้างน้อยระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ และแรงไฮโดรโฟบิก เป็นต้น ซึ่งความสามารถในการดูดซับจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่าง ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย และอุณหภูมิ ตัวพุงที่นิยมใช้ ได้แก่ อลูมินา คาร์บอนกัมมันต์ และโพลีเมอร์ธรรมชาติ เป็นต้น

ในกรณีที่ตัวพุงเป็นโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ การเชื่อมกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงจะใช้พันธะไอออนิกในการยึดเกาะ เนื่องจากเอนไซม์เมื่ออยู่ในรูปสารละลายจะมีประจุจากการแตกตัวของกรดอะมิโน ซึ่งชนิดของประจุและจำนวนประจุของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดต่างของสารละลาย ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ตัวพุงที่มีประจุตรงกันข้ามกับเอนไซม์ให้สามารถยึดเกาะกันได้

2.4.2 การตรีงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนการตรีงรูปด้วยวิธีนี้จะอาศัยการสร้างพันธะเคมีโดยต้องใช้ตัวพุง เอนไซม์จะถูกตรีงเข้า
ไม่ว่าอยู่ได้โดยการสร้างพันธะแบบไขว้เชื่อมกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเคมีที่มีกลุ่มฟังก์ชัน

หลายหมู่ (multifunctional reagent) หรือเรียกว่า cross-linkers เป็นตัวเชื่อมทำให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และละลายน้ำได้น้อย สารที่ใช้ในการเชื่อม ได้แก่ เฮกซะเมทิลลิ้น และกลูทาร์ลดีไฮด์ เป็นต้น การเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสารเชื่อมแบบไขว้เมื่อเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงจะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้การเลือกสถานะในการตรึงรูปนั้นยาก เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดของสารเชื่อมไขว้ ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา เป็นต้น

2.4.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้

วิธีห่อหุ้มเป็นวิธีตรึงรูปแบบรวมเอนไซม์อิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายโพลีเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.4.3.1 เอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลขนาดเล็ก

เอนไซม์สามารถถูกตรึงโดยใช้แคปซูลขนาดเล็กจากสารโพลีเมอร์ โดยโพลีเมอร์จะล้อมรอบด้วยเอนไซม์โดยที่ปล่อยให้ซับสเตรทและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านได้ การเตรียมด้วยวิธีนี้จะต้องควบคุมสถานะที่ใช้ทำปฏิกิริยา เนื่องจากผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้สำหรับกรณีที่ซับสเตรทมีมวลโมเลกุลสูง เนื่องจากเอนไซม์อาจจะเข้าไปฝังอยู่ในผนังโพลีเมอร์ได้

2.4.3.2 เอนไซม์ที่ถูกกักหรือห่อหุ้มไว้ในตาข่ายของสารโพลีเมอร์

การตรึงด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมเอนไซม์เข้ากับสารห่อหุ้มที่มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มด้วยตาข่ายของสารโพลีเมอร์ ซึ่งจะต้องเลือกชนิดของสารโพลีเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ สารบางชนิดอาจทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียหายได้ ตัวอย่างโพลีเมอร์ที่ใช้ ได้แก่ ไคติน คาราจีแนน และอัลจิเนต เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้ม พบว่าสามารถดูดซับและกักเก็บเอนไซม์ไลเปสไว้ในปริมาณที่สูง และหลังจากการใช้ในปฏิกิริยายังสามารถกักเก็บเอนไซม์ไว้ได้ประมาณร้อยละ 34

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

2.5.1 ชนิดตัวพุง

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปอยู่ในพื้นที่จำกัดได้คือชนิดของตัวพุง ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป จำพวกค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ หรือการเคลื่อนที่ของซับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เป็นต้น สารที่ใช้ควรปลอดจากสารพิษและควรมีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ คุณลักษณะที่ดีของตัวพุงจะต้องมีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึด การซึมผ่านของสารได้ดี ไม่ละลายน้ำ มีความเสถียร มีรูปร่างและขนาดที่พอดี เป็นต้น ซึ่งสารที่นิยมใช้กันส่วนมาก คือสารพวกโพลีเมอร์ธรรมชาติและอนุภาคอินทรีย์ (Zhang *et al.*, 2013)

2.5.2 กรดต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนโดยทั่วไปค่าความเป็นกรดต่างจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ค่าเอนไซม์เนื่องจากมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียหาย เอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่าง

ที่เหมาะสม (optimum pH) ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยนไป มีผลมาจากประจุของโมเลกุลเอนไซม์และประจุของตัวพยุง เมื่อเอนไซม์ถูกตรึงรูปด้วยตัวพยุงที่มีประจุจะทำให้คุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้ผลมาจากแรงสัมผัสของประจุบนตัวพยุง ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าแตกต่างจากเอนไซม์อิสระ (Kojiima *et al.*, 1994)

2.5.3 อุณหภูมิ

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ ซึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกับการเร่งปฏิกิริยาทางเคมี โดยส่วนใหญ่จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สำหรับอุณหภูมิปฏิกิริยาที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูป (optimum temperature) ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นจากการจับกันของเอนไซม์กับซับสเตรทที่บริเวณการเร่งของตัวเร่งปฏิกิริยา การเพิ่มอุณหภูมิมากเกินไปจะทำให้โครงสร้างเอนไซม์ตรึงรูปเสียหาย มีผลให้สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา (Kojiima *et al.*, 1994)

2.5.4 ตัวทำละลายอินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของน้ำมันและไขมันได้ สามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์และการย้ายหมู่เอสเทอร์ที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา การทำปฏิกิริยาในสถานะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำจะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้อง ซึ่งส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักลดความคงตัวของโมเลกุลของเอนไซม์ และทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ เช่น เมทานอล ทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 มีความคงตัวลดลง นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดสามารถเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น ไอโซออกเทนจะช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* แต่กลับลดความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK เป็นต้น (ชินนภัทร, 2560)

2.5.5 แคลเซียมไอออน

แคลเซียมไอออนสามารถช่วยให้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทำงานได้ดีมากขึ้น ในกรณีที่สารตั้งต้นเป็นไตรกลีเซอไรด์พวกกรดไขมันต่ำ พบว่าแคลเซียมไอออนเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แทนการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน สรุปได้ว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้นในบางกรณีเท่านั้น ซึ่งไม่ได้ขึ้นกับการคงตัวของเอนไซม์ และยังไม่ได้ขึ้นกับการขจัดกรดไขมันออกจากระบบปฏิกิริยา รวมทั้งไม่ได้ขึ้นกับการเปลี่ยนรูปเป็นเกลือแคลเซียม แต่จะขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอิมัลชันของปฏิกิริยาผสม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มาจากการทำงานของเกลือแคลเซียมที่ถูกระตุ้นของกรดไขมัน (Sharma *et al.*, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การเก็บเกี่ยว

การล้างใบโอดีเซลด้วยน้ำเป็นวิธีแบบดั้งเดิมที่ถูกใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนส่วนเกินที่เหลืออกจากผลผลิตใบโอดีเซล เช่น คราบไขสบู่ กลีเซอรินส่วนที่ยังแยกไม่หมด ตะกอน และแอลกอฮอล์ที่หลงเหลืออยู่ เป็นต้น ดังนั้นควรกำจัดสิ่งเหล่านี้โดยการใช้น้ำหนึ่งในสามของผลิตภัณฑ์ใบโอดีเซล ให้ความร้อนน้ำจนถึง 85 องศาเซลเซียส และให้ความร้อนผลิตภัณฑ์จนถึง 60 องศาเซลเซียส ผสมสารเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น หลังจากนั้นทำการแยกชั้นใบโอดีเซลออกมาทำการล้างซ้ำ 3 ครั้งจนกว่าน้ำจะสะอาด การล้างด้วยน้ำยังสามารถกำจัดส่วนที่เหลือของเมทานอลได้ เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับเมทานอล แต่การเติมน้ำเข้าไปต้องทำให้ความร้อนใบโอดีเซลจนถึง 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เพื่อให้ปริมาณน้ำและส่วนที่เหลือของเมทานอลจะถูกกำจัดออก (Mohammed *et al.*, 2017)

2.7 การวิเคราะห์ผลผลิตใบโอดีเซล

ปัจจุบันการวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณร้อยละใบโอดีเซลสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (วุฒิชัย และคณะ, 2557)

2.7.1 โครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นวิธีการที่เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวระหว่างเฟสคงที่ของสาร (stationary phase) ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็ง และตัวทำละลายซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ผ่านตัวดูดซับบน TLC จัดเป็น solid-liquid adsorption chromatography แต่เดิม TLC ใช้วิเคราะห์ทางเชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณไม่มาก เพื่อหาปริมาณสารที่อยู่ในสารผสมโดยเปรียบเทียบ R_f ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน TLC (วิมลมาศ, 2555)

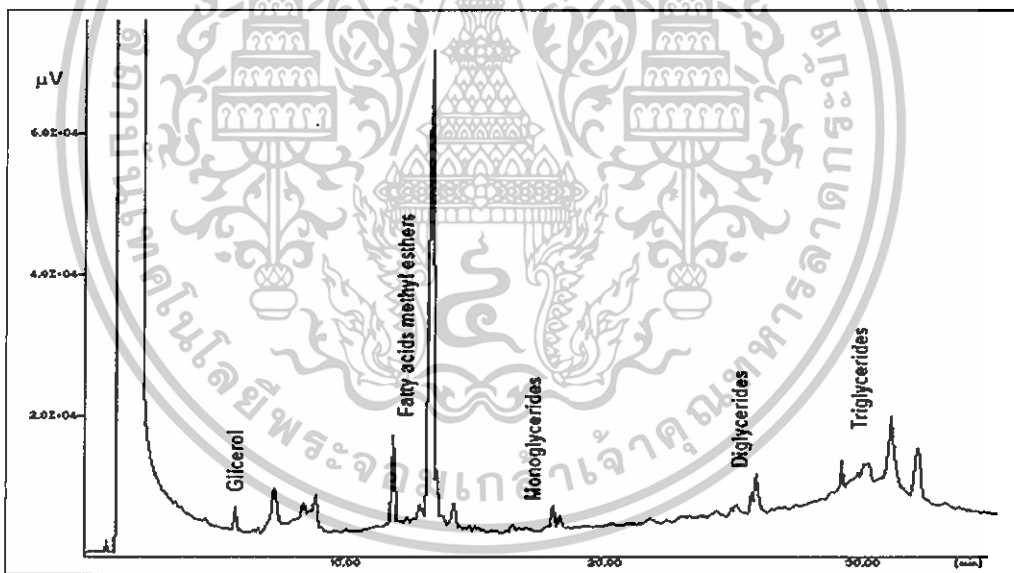
TLC เป็นแผ่นแก้วหรือพลาสติกแข็งขนาด 5x10 หรือ 5x20 เซนติเมตร เคลือบด้วยตัวดูดซับหนาขนาด 0.25 ถึง 0.3 มิลลิเมตร ตัวดูดซับที่ใช้กับ TLC ได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา และคิเซลกาัวร์ เป็นต้น ตัวดูดซับเหล่านี้มีวิธีตรวจสอบตำแหน่งของสารได้หลายวิธี เช่น มองภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) หรือระเหยด้วยเกรดไฮโอดีน เป็นต้น ในส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในการเคลื่อนที่ อาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสม ทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยจุดสารตัวอย่างที่เป็นสารผสมลงบน TLC โดยเลือกตัวทำละลายหลายระบบ เช่น บิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน อีเทอร์ และเมทานอล ตามลำดับ (ตัวทำละลายเรียงลำดับจากสภาพขั้วต่ำไปยังสภาพขั้วสูง) แล้ววางแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างลงในตัวทำละลายแต่ละชนิด หาค่า R_f ของแต่ละแผ่นในตัวทำละลายที่ต่างกันโดยเลือกตัวทำละลายที่สามารถให้ผลการแยกที่ชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)

Gas Chromatography (GC) ใช้สำหรับแยกสารผสมโดยมีแก๊สเป็นเฟสเคลื่อนที่ เช่น ฮีเลียมจะทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier) สารผสม ส่วนเฟสอยู่กับที่อาจจะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เมื่อตัวพาและสารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ส่วนของเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์จะดึงดูดด้วยแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตตามความเป็นขั้วของสารกับโมเลกุลในสารผสม ทำให้องค์ประกอบในสารผสมถูกพาไปด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน GC สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเนื่องจากมีความไวสูง ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยกองค์ประกอบของส่วนผสมแก๊สโครมาโทกราฟี

การวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี สามารถวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยในเชิงคุณภาพสามารถหาชนิดของสารได้จากการเปรียบเทียบกับค่า Retention time คือเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์นับจากเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์ถึงตำแหน่งสูงสุดของพีคที่ได้จากโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ส่วนในเชิงปริมาณสามารถคำนวณหาปริมาณของสารได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่หรือความสูงของพีคตัวอย่างกับพีคของสารละลายมาตรฐาน (Madon *et al.*, 2018)



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างลักษณะโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ได้

จากเครื่องบันทึกข้อมูลเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : https://www.researchgate.net/figure/On-column-injection-of-1-m-L-waste-oil-biodiesel-derivatized-with_fig3_279514655

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปส

Park *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสที่ทำกรแบ่งกลุ่มย่อยตามลำดับกรดอะมิโน เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Pseudomonas* และ *Burkholderia* มักถูกใช้ในอุตสาหกรรมครัวเรือน ผงซักฟอก และอุตสาหกรรมเคมี ทำการวัดค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์โดยใช้ pNP-caproate เป็นตัววิเคราะห์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดสอบคือ 37 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5 ถึง 11

Liu *et al.* (2011) จากการศึกษาพบว่า *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) หรือที่รู้จักกันในชื่อทางการค้าว่า lipase PS มีการใช้อย่างกว้างขวางในการนำมาเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ เช่น ปฏิกริยาการขนส่งหมู่เอคิล การผลิตโมโนกลีเซอไรด์ และการสังเคราะห์เชื้อเพลิงชีวภาพ BCL ได้ถูกตรึงลงบน NKA เพื่อสร้างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงและใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลในระบบไอโซออกเทน และตัวทำละลายอิสระให้มีการเร่งและความสามารถในการเข้าคู่ได้ดี การแปลงสภาพไบโอดีเซลเพื่อการผลิตไบโอดีเซลใน RTIL ก็เช่นกัน โดยนำเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Candida Antarctica* มาทำการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งได้ร้อยละ 98 ถึง 99 ของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

Aboalfazl *et al.* (2014) ได้ศึกษาอุตสาหกรรมน้ำมันที่มีปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสารมลพิษต่างๆ ที่เกิดขึ้น ซึ่งตามแหล่งน้ำเสียได้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อยู่ด้วย ในวิธีการทางชีวภาพจุลินทรีย์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สามารถที่จะลดความมันลง โดยเอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลายไขมันเป็นกลีเซอรินและกรดไขมันได้ ซึ่งมีจุลินทรีย์จำนวนมาก รวมถึงเชื้อราและยีสต์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาจำพวก *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Geotrichum*, *Bacillus*, *Acinetobacter* และ *Serratia*

2.8.2 การตรึงเอนไซม์

ดุษฎี และเพ็ญจิตร (2549) จากการศึกษาผลของขนาดเม็ดอัลจิเนตที่มีต่อการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส โดยใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลจิเนตต่อเอนไซม์ไลเปสคือ 2:1 พบว่าเมื่อขนาดเม็ดอัลจิเนตเพิ่มขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน และมีค่าสูงสุดเมื่อขนาดเม็ดอัลจิเนตเท่ากับ 2.00 มิลลิเมตร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 485 หน่วยต่อกรัม โดยทั่วไปหากขนาดเม็ดอัลจิเนตเพิ่มขึ้นค่ากิจกรรมควรจะลดลง อาจเนื่องมาจากขนาดของเม็ดอัลจิเนตที่เล็กเกิดการรวมตัวเป็นก้อน ทำให้พื้นที่ในการแลกเปลี่ยนมวลสารลดลง และเมื่อขนาดเม็ดอัลจิเนตเพิ่มขึ้นเป็น 2.50 มิลลิเมตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าลดลง ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีเมื่อเอนไซม์ที่ถูกตรึงในปริมาณเท่ากัน เม็ดอัลจิเนตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น พื้นผิวสัมผัสในการแลกเปลี่ยนมวลสารจะลดลง ค่ากิจกรรมจึงลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการเรียนการสอนเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวิทย์ และคณะ (2549) จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูป เอนไซม์ไลเปสโดยวิธีแบบห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต สรุปได้ว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ร้อยละ 2 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และขนาดของเข็มที่ 24 G เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสแบบห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต โดยจะทำให้ได้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปขนาด 2 มิลลิเมตร ค่าประสิทธิภาพการยัดเกาะร้อยละ 95.2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป 8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยัดเกาะร้อยละ 22.2

พุทธชาติ (2553) งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม บริสุทธิ์และกรดไขมันจากปาล์มโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทาง(ชีวภาพ)เอนไซม์ไลเปสอิสระและตรึงรูป ทำการศึกษาการตรึงไลเปส 2 วิธี ได้แก่ 1) ไลเปสตรึงรูปบนโอบวบ (CRLA) 2) ไลเปสตรึงรูปบน โอบวบและห่อหุ้มด้วยโครงข่ายแคลเซียมอัลจิเนต (CRLAE) ซึ่งเตรียมได้โดยการใช้ไลเปส 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและ โซเดียมอัลจิเนตร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สภาวะที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยา คือที่ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที และทำการห่อหุ้ม ด้วยโครงข่ายแคลเซียมอัลจิเนต 3 ชั้น สำหรับการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้เอทานอลเป็นสารตั้งต้นคือที่ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 99.9 สารละลายบัฟเฟอร์ ฟอสเฟต 0.001 โมลต่อลิตร และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 36 ชั่วโมง โดยผลได้เอทิลเอสเทอร์จากการใช้ไลเปสอิสระและ CRLAE มีค่าเท่ากับร้อยละ 78.87 และ 96.18 ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้เมทานอลเป็นสารตั้งต้นคือที่ความเข้มข้นของเมทานอลร้อยละ 99.9 สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.001 โมลต่อลิตร และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง โดยผลได้ เมทิลเอสเทอร์จากเอนไซม์ไลเปสอิสระและจากตรึงไลเปสตรึงรูปใน CRLAE ที่ร้อยละ 96.97 และ 97.92 ตามลำดับ ส่วนผลจากการนำไลเปสตรึงรูปมาใช้ใหม่ พบว่าร้อยละของเอทิลเอสเทอร์ลดลง อย่างมีนัยสำคัญจากการใช้ครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 2 และครั้งที่ 1 ถึงครั้งที่ 5 สำหรับเมทิลเอสเทอร์ใน ขณะที่เมื่อใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ผสมกรดไขมันจากปาล์มในอัตราส่วนเริ่มต้น 70:30 โดยน้ำหนัก พบว่าภายใต้การเติมกรดไขมันปาล์มแบบกึ่งต่อเนื่องสามารถนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำได้ ถึง 5 ครั้งโดยผลได้เอทิลเอสเทอร์ไม่ลดลง

Zorica *et al.* (2002) ได้ศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ที่ถูกตรึง ในเม็ดอัลจิเนต เป็นวิธีการที่ทำให้สูญเสียไลเปสน้อยลง (ประสิทธิภาพการตรึงร้อยละ 98.2 ถึง 99.2) สภาวะที่เหมาะสมคือสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 เม็ดอัลจิเนตที่กักเก็บเอนไซม์ ไลเปสมีขนาด 0.65 มิลลิเมตร ส่งผลให้มีค่าผลผลิตเอนไซม์สูงถึงร้อยละ 75 ซึ่งมากกว่าผลของ เอนไซม์ไลเปสอิสระ

Bhushan *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Arthrobacter* sp. (ABL) ที่ถูกตรึงในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต เซลล์ที่อยู่ในรูปโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ สามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ ถูกตั้งข้อสังเกตว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิ เนตส่งผลต่อผลผลิตของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีความเสถียรภาพมากขึ้นในช่วงกว้างของอุณหภูมิ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรด-ต่าง และเวลาการเก็บรักษา เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินเตตนี้ถูกนำมาใช้ซ้ำ 10 รอบ เพื่อย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไม่สูญเสียผลผลิตใดๆ ในกิจกรรมไลเปสที่ถูกกักเก็บไว้

Dimitrijevic *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการสร้าง Exopolysaccharide (EPS) ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ extremophylic ของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินเตต เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยสายพันธุ์เดียวกันถูกเก็บในเม็ดแคลเซียมอัลจินเตต EPS ที่เกิดจากการหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ การตรึงรูปมีผลต่อประสิทธิภาพผลผลิตและศักยภาพสำหรับการนำมาใช้ การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินเตตเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย ประหยัดเวลาสามารถนำมาใช้ซ้ำ และประยุกต์ใช้การตรึงเอนไซม์ไลเปสในการวิจัยในอนาคตได้

Rahmath and Pogaku (2013) จากการศึกษาเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia cepacia* โดยตรึงรูปเอนไซม์ด้วยอัลจินเตตและเค-คาราจีแนนในสัดส่วนที่เท่ากัน จากนั้นนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันสบู่ดำ ในสภาวะที่เหมาะสม คือ น้ำมันสบู่ดำ 10 กรัม อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:10 น้ำ 1 กรัม เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 5.25 กรัม และหมุนเหียงนาน 24 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันได้ร้อยละ 100 ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปยังคงมีความเสถียรและคงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไว้ได้ร้อยละ 73 หลังจากการใช้ซ้ำ แสดงให้เห็นว่าไลเปสที่ตรึงรูปด้วยอัลจินเตตและเค-คาราจีแนนนั้นเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีศักยภาพสำหรับใช้อุตสาหกรรมไบโอดีเซล

2.8.3 การผลิตไบโอดีเซล

นภาพิพย์ และคณะ (2561) ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้และน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้ว โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล คือ 1:5 และมีการเติมเป็นช่วง (น้ำมันปาล์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:1) ที่เวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง มีการเติมสารลดแรงตึงผิว Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 และมีเอกเซนเป็นตัวทำละลาย (1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 7 (1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสัมผัส 24 ชั่วโมง จะส่งผลให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ โดยพบการมีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานบน TLC chromatography และเมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ในสภาวะเดียวกัน พบว่าไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์เนื่องจากไม่พบการมีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์

Noureddini *et al.* (2005) จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับเมทานอลคือ 7.5:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที เช่น การผลิตไบโอดีเซลต่อครั้งใช้น้ำมันถั่วเหลือง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 กรัม ต่อเมทานอล 3 กรัม น้ำ 0.5 กรัม และเอนไซม์ไลเปสตรังรูป 3 กรัม ส่งผลให้ค่าผลผลิตน้ำมันไบโอดีเซล และปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 67 โดยโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง

Sawangpanya et al. (2010) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida* sp. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลอยู่ที่อัตราส่วนของเอทานอลน้ำมันปาล์ม 9:1 เอนไซม์ไลเปสร้อยละ 5 หรือขึ้นอยู่กับน้ำหนักของน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที และหลังจาก 48 ชั่วโมง ได้ค่าผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ตัวเร่งเป็นเอนไซม์ไลเปสเท่ากับร้อยละ 83

Sirajunnisa et al. (2016) ศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันจากน้ำมันที่ใช้แล้ว โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรังรูปจากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลคือ เอนไซม์ปริมาณ 2 กรัม อัตราส่วนระหว่างน้ำมันกับเมทิลอะซิเตรท 1:12 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งผลผลิตไบโอดีเซลสูงสุดที่ได้รับคือร้อยละ 93.61



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 แบคทีเรีย *Burkholderia* sp.

3.1.1.1 รหัส BG2015

3.1.1.2 รหัส BG2018

3.1.2 แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

3.1.2.1 รหัส KS2002

3.1.2.2 รหัส KS3005

3.1.2.3 รหัส SN2006

3.1.2.4 รหัส SS1003

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Basal medium

3.2.2 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.2.3 Tryptic Soy Agar (TSA)

3.3 สารเคมี

3.3.1 Ammonium sulphate

3.3.2 Bovine serum albumin

3.3.3 Gum Arabic

3.3.4 Iodine crystal

3.3.5 Isopropyl alcohol

3.3.6 p-Nitrophenol

3.3.7 p-Nitrophenyl palmitate

3.3.8 Triton X-100

3.3.9 Sodium Alginate

3.3.10 Calcium chloride

3.3.11 Acetic acid

3.3.12 Ethyl acetate

3.3.13 Folin-ciocalteu reagent

3.3.14 Hexane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.15 Propanol
- 3.3.16 Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.6)
- 3.3.17 Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8)
- 3.3.18 น้ำมันปาล์ม
- 3.3.19 น้ำมันไบโอดีเซลมาตรฐานจากน้ำมันพืชปทุม
- 3.3.20 แอลกอฮอล์ร้อยละ 70
- 3.3.21 แอลกอฮอล์ร้อยละ 95

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 จานเพาะเชื้อ
- 3.4.2 หลอดทดลอง
- 3.4.3 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 3.4.4 บีกเกอร์ขนาด 50 250 600 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.5 กระบองตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.6 ขวดปรับปริมาตรขนาด 5 10 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.7 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.4.8 ขวดดูแรนขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.9 ปีเปตแก้วขนาด 0.1 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.4.10 ไมโครปีเปตขนาด 2-20 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.4.11 ปีเปตทีปขนาด 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.4.12 ขวดเก็บสาร ขนาด 1.5 ลิตร
- 3.4.13 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- 3.4.14 96 -well Microplate
- 3.4.15 ขวดสีชา
- 3.4.16 จุกยาง

3.5 เครื่องมือ

- 3.5.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น High-pressure sterilizer ES-315
- 3.5.2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น HICLAVE HVE-50
- 3.5.3 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น V4-T
- 3.5.4 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น 120-BS
- 3.5.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อ รุ่น UN100
- 3.5.6 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า รุ่น 4230
- 3.5.7 ตู้บลัมรอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ หากมีการเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.5.8 เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น PG-803
- 3.5.9 เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TE2145
- 3.5.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Z326K
- 3.5.11 เครื่องเขย่าสารละลาย รุ่น Votex-Genie 2
- 3.5.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1601
- 3.5.13 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครไทเทอร์เพลท รุ่น FLUOstar Omega
- 3.5.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง
- 3.5.15 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น GC-2014

3.6 วิธีการดำเนินงาน

3.6.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยนำเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. จากการคัดแยกของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส BG2018 และ BG2015 และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จากการคัดแยกของ โชตินันท์ และคณะ (2557) จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ถ่ายลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับหัวเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 โดยใช้ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหาร Basal medium โดยอัตราส่วนระหว่างอาหาร Basal medium และหัวเชื้อเท่ากับ 90:10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เก็บสารละลายส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ (Sonia and Shilpa, 2013)

3.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric method

เตรียมสารละลาย A โดยซั่ง p-Nitrophenyl palmitate ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ละลายใน Isopopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย B โดยซั่ง Gum Arabic ปริมาณ 100 มิลลิกรัม และ Triton X-100 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl Buffer (pH 8.0) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 10:90 เข้าด้วยกัน ได้เป็น Substrate solution แล้วจึงผสมตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ Substrate solution ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน หยดสารละลายลงใน Micro plate well ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

(Mobarak *et al.*, 2011) จากนั้นนำมาคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ดังสมการ (Chakraborty *et al.*, 2014)

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{p-NP (ไมโครโมล) จากกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ระยะเวลาป่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรม}}$$

กำหนดให้ 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ของเอนไซม์ไลเปส คือ ปริมาตรเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็น p-Nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.6.3 การทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

3.6.3.1 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 0-30 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บสารละลายส่วนใสและส่วนตะกอน นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตต่อที่ความเข้มข้นร้อยละ 30-80 จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บส่วนตะกอน โดยนำส่วนตะกอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-30 และร้อยละ 30-80 ละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl bufer (pH 7. 6) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร (Vishwe and Chowdhary, 2014) ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารละลายที่ได้

3.6.3.2 การแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส

นำถุงไดอะไลซิสที่มีความยาว 12 เซนติเมตรแช่น้ำเพื่อให้ถุงไดอะไลซิสแยกออกจากกันและใช้เส้นด้ายมัดปิดปากถุงแล้วนำสารละลายที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตใส่ลงในถุงไดอะไลซิสแล้วมัดปากถุงด้วยเส้นด้าย นำไปแช่ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl bufer (pH 7.6) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl bufer (pH 7.6) ในชั่วโมงที่ 4 เมื่อครบ 8 ชั่วโมง ทำการเก็บสารละลายเอนไซม์แล้วทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีน (Harcum, 2008) จากนั้นนำมาคำนวณหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดดังสมการ (Iheme *et al.*, 2017)

$$\text{ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)} = \frac{\text{กิจกรรมจำเพาะของแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์บริสุทธิ์}}{\text{กิจกรรมจำเพาะของ Crude enzyme}}$$

กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต) = กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) X ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน มีการเตรียมสารละลาย A โดยผสมสารโซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย B โดยผสมสารคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ร้อยละ 0.5 และสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 50:1 ทำการเจือจางสารละลาย Folin-ciocalteu reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ผสมตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่เจือจางอย่างเหมาะสม 200 ไมโครลิตรและสารละลาย C ปริมาตร 1000 ไมโครลิตรให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ที่เจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (Schaich, 2016) จากนั้นนำมาคำนวณหากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ดังสมการ (Iheme *et al.*, 2017)

$$\text{กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{ยูนิตต่อมิลลิตรกิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)}}$$

3.6.5 การทดสอบความเข้มข้นและอัตราส่วนของอัลจินต

นำเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากข้อ 3.6.3 มาทดสอบหาความเข้มข้นและอัตราส่วนของอัลจินตที่เหมาะสมต่อการตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้นอัลจินตที่ร้อยละ 1 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ผสมโซเดียมอัลจินตกับน้ำกลั่นโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส ทำการคนด้วยแท่งแก้วจนโซเดียมอัลจินตละลายนาน 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็น 20 นาที เพื่อไม่ให้ความร้อนทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ แล้วผสมกับเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ ที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินตเท่ากับ 1:1 1:2 และ 2:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ หยดผ่านกระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อให้เม็ดอัลจินตเกิดขึ้น จากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีความคงตัว (ประวิทย์ และคณะ, 2549)

3.6.6 การตรึงเซลล์เอนไซม์ไลเปสในเม็ดแคลเซียมอัลจินต

จากการทดสอบหาความเข้มข้นและอัตราส่วนของอัลจินต ใช้ความเข้มข้นของอัลจินตเท่ากับร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ความร้อนจนโซเดียมอัลจินตละลาย แล้วผสมกับเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ ที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินตเท่ากับ 2:1 โดยปริมาตร ให้เข้ากัน หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นพักทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ก่อนนำเม็ดเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยอัลจินตมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล (Bhushan *et al.*, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.7 การผลิตไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลมีการนำเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ที่ตรึงรูปด้วย แคลเซียมอัลจินเตมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สำหรับศึกษาความสามารถในการ ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซล โดยทำปฏิกิริยาระหว่าง เมทานอลและน้ำมันปาล์ม โดยสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ ร้อยละ 50 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4:1 โดยปฏิกิริยาดำเนินไปที่ความเร็ว รอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ซินนัททร และคณะ 2560) หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการ แยกเม็ดแคลเซียมอัลจินเตมาชะล้างด้วยแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ก่อนนำเม็ด แคลเซียมอัลจินเตไปใช้ในปฏิกิริยาครั้งต่อไป (Bhushan *et al.*, 2008)

3.6.8 การทำไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์โดยวิธีการชะล้างแบบเปียก

ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่ถูกผสมเป็นเนื้อเดียวกันโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ถูกตั้งทิ้งไว้ 6 ถึง 8 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเกิดการแยกชั้นทางกายภาพ ซึ่งกลีเซอรินจะตกตะกอนลง ด้านล่างของภาชนะเนื่องจากมีความหนาแน่นสูง หลังจากนั้นทำการแยกชั้นไบโอดีเซลออกมาทำ การล้างด้วยน้ำ โดยใช้ น้ำ 1 ใน 3 ของผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ให้ความร้อนน้ำจนถึง 85 องศาเซลเซียส และให้ความร้อนไบโอดีเซลจนถึง 60 องศาเซลเซียส ผสมสารเบาๆ ไม่เกิน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เกิดการ แยกชั้น แล้วทำการแยกชั้นไบโอดีเซลออกมาชะล้างด้วยน้ำซ้ำอีก 3 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำที่ทำการชะ ล้างไม่มีตะกอนของกลีเซอริน หลังจากนั้นนำไบโอดีเซลที่ได้ไปตรวจสอบหาองค์ประกอบทางเคมีด้วย เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Mohammed *et al.*, 2016)

3.6.9 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองโดย ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer Chromatography, TLC) (Yoo *et al.*, 2011)

3.6.9.1 เตรียมสารละลายตัวทำละลาย (mobile phase) โดยนำ เฮกเซน: เอทิลอะซิเตท: กรดอะซิติก ผสมกันในอัตราส่วน 90:10:1 เทใส่ลงใน Tank Thin Layer Chromatography โดยให้ความสูงตัวทำละลายประมาณ 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นทิ้งไว้จนตัวทำละลายอิมตัว

3.6.9.2 เตรียมแผ่น TLC ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร โดยใช้ ดินสอลากเส้นจากขอบด้านล่างขึ้นมา 1 เซนติเมตร (Bansal *et al.*, 2008) และจุด solvent front จากขอบด้านบนลงมา 0.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการจุดผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง และไบโอดีเซลมาตรฐานเพื่อใช้เป็นสารเปรียบเทียบกับคุณภาพ

3.6.9.3 ใส่แผ่น TLC ลงใน Tank TLC ที่เตรียมไว้ จากนั้นปล่อยให้ตัวทำละลายให้ เคลื่อนที่จนถึงเส้น solvent front แล้วนำออกมาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำแผ่น TLC ออกมาอ่านผลโดยการนำ TLC ที่แห้งสนิทด้วยเกล็ดไอโอดีนรอจนเกิดสีเหลืองของสารที่เคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.10 ขั้นตอนการตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีโดยตัดแปลงมาจากวิธี EN14103

วิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยผสมตัวอย่างไบโอดีเซลและสารละลายไพโรฟานอลในอัตราส่วน 1:1 ตั้งค่าสภาวะระบบโดยใช้คอลัมน์แบบ DB-Wax ขนาด 30 m x 0.25 mm ปริมาตรการฉีดตัวอย่าง (Injector volume) 1 ไมโครลิตร เครื่องตรวจวัด (Detector) แบบ Flame Ionization Detector (FID) อุณหภูมิเข้าทางท่อ (Inlet temperature) 250 องศาเซลเซียส Split ratio เท่ากับ 100 ใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็นแก๊สตัวพา (Carrier gas) ความดันของหัวป้อน (Head pressure) 53 กิโลปาสกาล อุณหภูมิของเครื่องตรวจจับ (Detector temperature) 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตู้อบ (Oven temperature) เริ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส คงที่ที่อุณหภูมินี้เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิครั้งสุดท้ายเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่อุณหภูมินี้เป็นระยะเวลา 18 นาที เครื่องตรวจวัดแก๊ส (Detector gases) ควบคุมโดยใช้อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจนเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 450 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สฮีเลียมเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อนาที (Westberg, 2013) จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณร้อยละไบโอดีเซลดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละไบโอดีเซล} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของน้ำมันปาล์ม}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของไบโอดีเซลมาตรฐาน} - \text{พื้นที่ใต้กราฟของน้ำมันปาล์ม}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

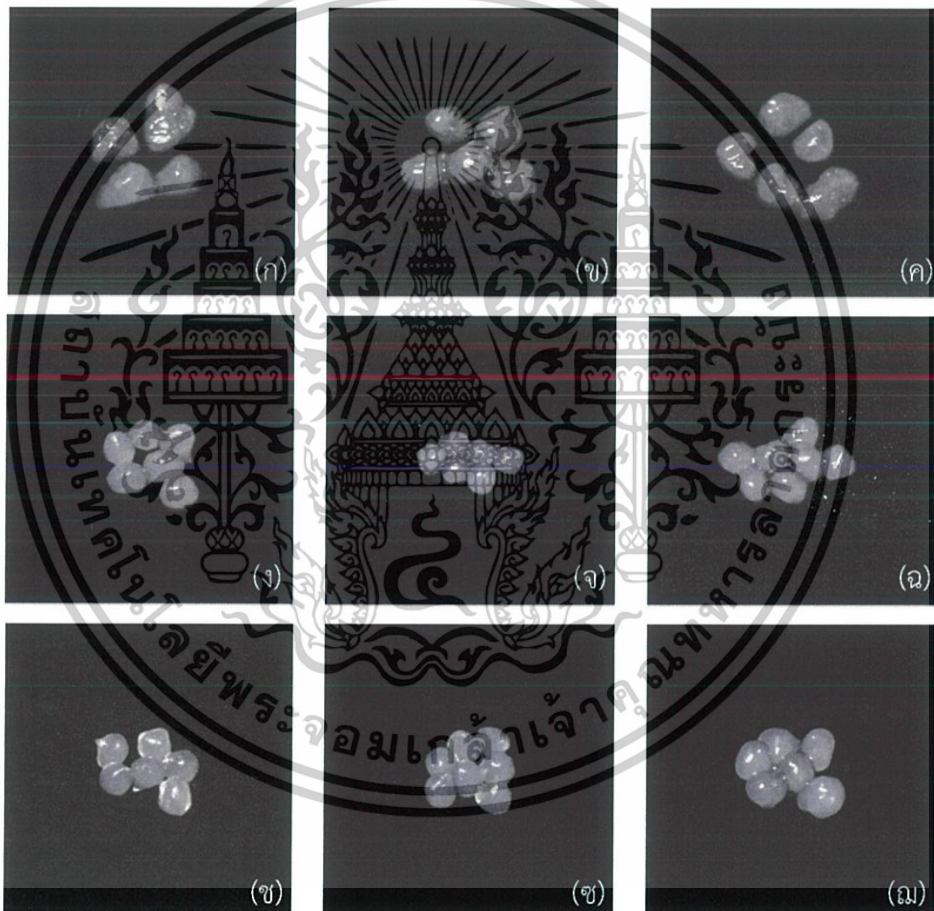
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ในอาหาร Basal medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตกตะกอนเพื่อเอาส่วนใสมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 61.12 ± 1.04 83.35 ± 3.09 0.35 ± 0.02 0.53 ± 0.01 และ 2.49 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงตารางที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พัทธ์พิมล (2552) และ Priyanka *et al.* (2018) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. EQ3 และ *Pseudomonas reinekei* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหาร Basal medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สามารถวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้ 1.77 และ 0.91 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากนั้นทำการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ได้ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 30-80 และทำการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส พบว่าเมื่อนำแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 156.23 ± 4.46 164.87 ± 1.91 0.66 ± 0.02 3.51 ± 0.02 0.68 ± 0.02 และ 3.24 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงตารางที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Anderson และ Vijayakumar (2011) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนไซม์ไลเปส *Pseudomonas aeruginosa* และทำการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 30-80 และทำการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 14.72 เป็น 40.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.2 ผลการทดสอบความเข้มข้นและอัตราส่วนของอัลจินต

จากการทดสอบหาความเข้มข้นของอัลจินตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินตที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อรูปร่างและความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของพบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจินตและอัตราส่วนของสารละลายโซเดียมอัลจินตเพิ่มขึ้น เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะมีลักษณะเป็นทรงกลมและมีความหนาแน่นมาก เช่นเดียวกับเมื่ออัตราส่วนของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นทำให้เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีลักษณะนิ่มและเปราะ ไม่คงตัว อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของอัลจินตที่มากกว่าร้อยละ 2 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีความแข็งแรงตัวมากเกินไป ดังแสดงในรูปที่ 4.1 เอนไซม์ตรึงรูปที่มีความแข็งแรงตัวมากเกินไป จะทำให้ซบสเตรท

เข้าไปทำปฏิกิริยาภายในเอนไซม์ตรึงรูปได้ยาก ส่วนเอนไซม์ตรึงรูปที่มีลักษณะนิ่มไม่เป็นทรงกลม เวลานำมาใช้ในปฏิกิริยาจะเกิดความไม่เสถียร (ประวิทย์ และคณะ, 2549) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zorica *et al.* (2002) ที่ได้ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินต พบว่าการใช้ความเข้มข้นของอัลจินตน้อยเกินไปจะทำให้รูพรุนของเอนไซม์ตรึงรูปมีขนาดใหญ่ ส่งผลให้มีความคงตัวน้อยและทำให้เอนไซม์รั่วไหลออกมาได้ง่าย หากเพิ่มความเข้มข้นของอัลจินตมากขึ้นจะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีรูพรุนน้อย ซึ่งขนาดรูพรุนส่งผลต่อการไหลเข้าออกของสารนำไปสู่ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปขณะทำปฏิกิริยา ดังนั้นความเข้มข้นของอัลจินตที่ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินตเท่ากับ 2:1 มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์มากที่สุด



รูปที่ 4.1 เอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจินต (ความเข้มข้นของอัลจินต, อัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินต) (ก) 1, 1:1 (ข) 1, 1:2 (ค) 1, 2:1 (ง) 2, 1:1 (จ) 2, 1:2 (ฉ) 2, 2:1 (ช) 1, 1:1 (ซ) 1, 1:2 และ (ฅ) 1, 2:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

จากการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. โดยวิธีการตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอิสระเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสอิสระมีค่าเท่ากับ 285.85 ± 11.05 438.08 ± 3.87 1.78 ± 0.07 8.47 ± 0.23 2.19 ± 0.03 และ 9.35 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ หลังจากการตรึงรูปเอนไซม์มีค่าลดลงเหลือ 261.79 ± 1.39 424.50 ± 2.86 1.56 ± 0.01 8.00 ± 0.49 2.09 ± 0.06 และ 1.77 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ลดลงหลังจากการตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ganapati *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida* และ *Pseudomonas* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยเอนไซม์ไลเปสอิสระหลังจากผ่านการตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตแล้วจะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลง เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida* หลังจากผ่านการตรึงรูปแล้วจะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลงจาก 362 เป็น 304 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ซึ่งลดลงถึง 58 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เนื่องจากเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงรูปจะมีความสามารถในการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสไว้ได้เพียงร้อยละ 60 และการตรึงรูปเอนไซม์จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย ทำให้การจับคู่บริเวณ active site กับกรดอะมิโนเกิดการผิดรูป ส่งผลให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลง (Ye *et al.*, 2005)

4.4 ผลการศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตกลับมาใช้ใหม่

จากการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากจากแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วคัดแยกเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตนำกลับมาใช้ใหม่ พบว่าจากการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในปฏิกิริยาคั้งที่ 1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 206.90 ± 11.66 287.82 ± 1.02 1.30 ± 0.03 4.44 ± 0.11 0.46 ± 0.01 และ 0.36 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ หลังจากการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในปฏิกิริยาซ้ำเป็นครั้งที่ 2 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลงเท่ากับ 107.07 ± 4.99 197.50 ± 3.45 0.61 ± 0.01 3.32 ± 0.19 0.22 ± 0.00 และ 0.23 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และสุดท้ายหลังจากการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในปฏิกิริยาซ้ำเป็นครั้งที่ 3 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS2002 และ KS3005 ลดลงเท่ากับ 85.81 ± 1.30 99.81 ± 1.94 0.21 ± 0.01 และ 2.51 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งแบคทีเรียรหัส SN2006 และ SS1003 ไม่สามารถวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในการใช้ซ้ำครั้งที่ 3 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ganapati *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida* และ *Pseudomonas* ด้วยวิธีการตรึงรูปในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งหลังจากการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมาใช้ซ้ำ 3 ครั้ง ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ลดลง เช่น เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของเชื้อ *Candida* มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ในรอบที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 162.5 124.3 และ 89 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลงตามลำดับ เนื่องจากเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตเล็กส่งผลต่อการแพร่ของเอนไซม์ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Du *et al.* (2004) ศึกษาแนวโน้มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงรูปบน acrylic resin เพื่อทำการผลิตไบโอดีเซล สภาวะที่ใช้คืออัตราส่วนน้ำมันกับเมทานอลเท่ากับ 4:1 ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส จากการผลิตพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเมื่อมีการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมาผลิตซ้ำในรอบที่ 3 เนื่องจากการลดลงของพื้นที่ผิวตัวพุง และอุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างการผลิต



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
BG2015	Crude Enzyme	61.12±1.04 ^a	1.23±0.05	49.78±2.67	3055.96±51.81	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	114.44±0.52 ^b	1.09±0.02	104.85±2.03	5721.82±25.90	2.11
	Dialysis	156.23±4.46 ^c	0.55±0.01	285.85±11.05	7811.28±222.91	5.74
	Immobilization lipase	128.85±0.78 ^d	0.49±0.00	261.79±1.39	6442.32±38.97	5.26
	1 cycle	82.94±0.41 ^e	0.40±0.03	206.90±11.66	4147.01±20.59	4.16
	2 cycle	63.38±2.88 ^f	0.59±0.01	107.07±4.99	3169.18±144.10	2.15
	3 cycle	42.59±0.86 ^g	0.50±0.01	85.81±1.30	2129.60±42.86	1.72
BG2018	Crude Enzyme	83.35±3.09 ^a	1.16±0.03	71.62±0.91	4167.59±154.51	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	137.70±1.15 ^b	0.96±0.01	144.06±0.82	6884.92±57.31	2.01
	Dialysis	164.87±1.91 ^c	0.38±0.01	438.08±3.87	8243.58±95.64	6.12
	Immobilization lipase	158.28±1.26 ^d	0.37±0.01	424.50±2.86	7914.20±62.89	5.93
	1 cycle	116.91±0.41 ^e	0.41±0.01	287.82±1.02	5845.33±20.59	4.02
	2 cycle	73.26±0.66 ^f	0.37±0.06	197.50±3.45	3663.24±33.09	2.76
	3 cycle	39.09±2.39 ^g	0.39±0.05	99.81±1.94	1954.62±119.30	1.39

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
KS2002	Crude Enzyme	0.35±0.02 ^a	0.45±0.02	0.78±0.04	17.66±0.88	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.62±0.00 ^b	0.46±0.02	1.36±0.02	31.20±0.13	1.74
	Dialysis	0.66±0.02 ^c	0.37±0.03	1.78±0.07	32.93±0.90	2.27
	Immobilization lipase	0.56±0.00 ^d	0.36±0.01	1.56±0.01	28.20±0.19	2.00
	1 cycle	0.45±0.01 ^e	0.35±0.01	1.30±0.03	22.60±0.61	1.65
	2 cycles	0.28±0.01 ^f	0.45±0.01	0.61±0.01	13.79±0.54	0.78
	3 cycles	0.07±0.01 ^g	0.31±0.03	0.21±0.01	3.29±0.34	0.27
KS3005	Crude Enzyme	2.65±0.05 ^a	0.63±0.01	4.22±0.07	132.35±2.69	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.94±0.08 ^b	0.56±0.01	5.22±0.15	147.17±3.76	1.24
	Dialysis	3.51±0.02 ^c	0.41±0.02	8.47±0.23	175.58±0.94	2.01
	Immobilization lipase	2.98±0.13 ^d	0.37±0.02	8.00±0.49	149.23±6.49	1.90
	1 cycle	2.09±0.07 ^e	0.47±0.00	4.44±0.11	104.35±3.64	1.05
	2 cycle	1.28±0.10 ^f	0.38±0.01	3.32±0.19	63.80±5.10	0.79
	3 cycle	1.35±0.12 ^g	0.54±0.03	2.51±0.09	67.29±6.19	0.59

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
SN2006	Crude Enzyme	0.53±0.01 ^a	0.35±0.02	1.51±0.05	26.59±0.35	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.62±0.01 ^b	0.37±0.05	1.70±0.08	31.20±0.27	1.13
	Dialysis	0.68±0.02 ^c	0.31±0.02	2.19±0.03	33.88±1.25	1.45
	Immobilization lipase	0.59±0.02 ^d	0.28±0.02	2.09±0.06	29.56±0.89	1.39
	1 cycle	0.13±0.01 ^e	0.29±0.01	0.46±0.01	6.53±0.33	0.30
	2 cycle	0.06±0.00 ^f	0.26±0.03	0.22±0.00	2.88±0.12	0.15
SS1003	Crude Enzyme	2.49±0.02 ^a	0.40±0.02	6.29±0.06	124.32±0.84	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3.02±0.03 ^b	0.40±0.02	7.64±0.07	151.08±1.37	1.21
	Dialysis	3.24±0.01 ^c	0.35±0.02	9.35±0.03	161.78±0.51	1.49
	Immobilization lipase	0.57±0.04 ^d	0.32±0.01	1.77±0.06	28.49±1.77	1.40
	1 cycle	0.11±0.00 ^e	0.30±0.03	0.36±0.01	5.30±0.24	0.28
	2 cycle	0.06±0.00 ^f	0.27±0.03	0.23±0.00	3.09±0.14	0.18

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

4.5 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (Thin layer chromatography, TLC)

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินเต โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวนางจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการทำปฏิกิริยา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4:1 ปริมาตรเอนไซม์ร้อยละ 50 และความเข้มข้นของอัลจินเตร้อยละ 2 พบว่าผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองประกอบไปด้วย ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน ไคกลีเซอไรด์ และโมนอกลิเซอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah *et al.* (2003) พบว่าการนำเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวนางมาวิเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซลที่ได้จากสบู่ดำ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป สามารถแสดงข้อมูลเชิงคุณภาพของไบโอดีเซลที่ผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยสามารถตรวจสอบการเกิด ไตรกลีเซอไรด์ ไคกลีเซอไรด์ โมนอกลิเซอไรด์ และกรดไขมันได้

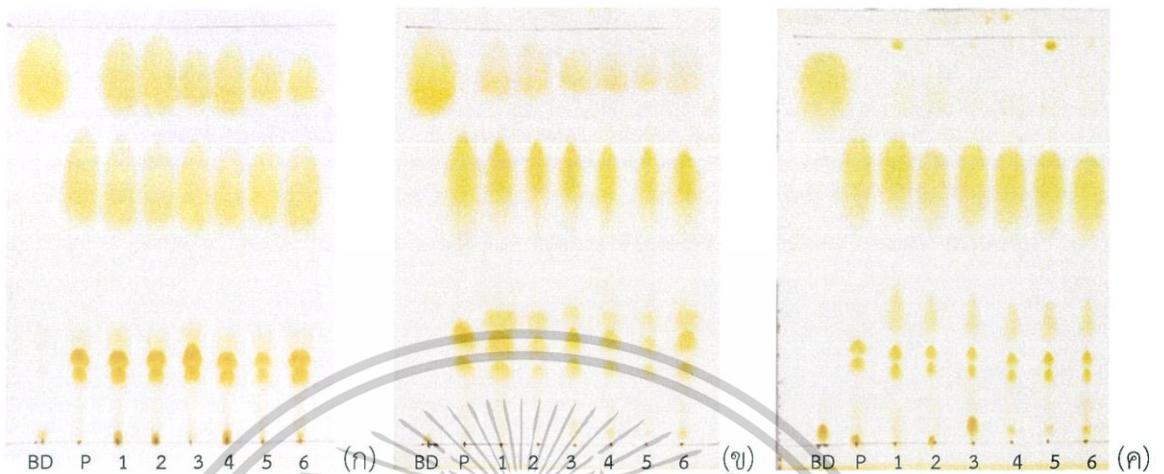


รูปที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวนางของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐาน น้ำมันพืชปทุม (P) น้ำมันปาล์ม (1) ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจินเตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าแถบของผลผลิตไบโอดีเซลของแบคทีเรียรหัส BG2015 และ BG2018 มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียรหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 และ BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 261.79 ± 1.39 424.50 ± 2.86 1.56 ± 0.01 8.00 ± 0.49 2.09 ± 0.06 และ 1.77 ± 0.06 ยูนิต์ต่อ มิลลิกรัม ตามลำดับ

หลังจากการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ จะเห็นได้ว่าผลผลิตไบโอดีเซลในครั้งที่ 2 ลดน้อยลงจากผลผลิตไบโอดีเซลในครั้งที่ 1 เห็นได้จากแถบของผลผลิตไบโอดีเซล ดังแสดงในรูปที่ 4.3 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ซึ่งสอดคล้องกับคู่มือกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 และไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัส BG2018 ในครั้งที่ 2 ลดลงน้อยลงจากครั้งที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เช่นเดียวกันกับ ผลผลิตไบโอดีเซลในครั้งที่ 3 ลดน้อยลงจากผลผลิตไบโอดีเซลในครั้งที่ 2 จึงนำผลผลิตไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากการทดลองไปตรวจหาปริมาณของไบโอดีเซลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี



รูปที่ 4.3 องค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบางของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานจากน้ำมันพืชปทุม (P) น้ำมันปาล์ม และผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสที่สังเคราะห์ด้วยอัลจินเตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส (1) BG2015 (2) BG2018 และ *Pseudomonas* sp. รหัส (3) KS2002 (4) KS3005 (5) SN2006 (6) SS1003 ในการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง (ก) การผลิตไบโอดีเซลครั้งที่ 1 (ข) การผลิตไบโอดีเซลครั้งที่ 2 (ค) การผลิตไบโอดีเซลครั้งที่ 3

4.6 การตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี โดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103

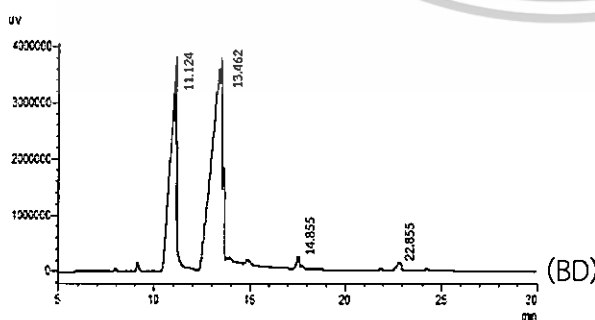
จากผลการตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ผลิตด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี ดังแสดงในรูปที่ 4.3-4.6 พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการทำปฏิกิริยา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4:1 ปริมาตรเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายอัลจินเตเท่ากับ 2:1 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่สังเคราะห์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตจากแบคทีเรีย BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ทั้งหมด 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันให้ผลผลิตไบโอดีเซลร้อยละ 64.47 73.40 45.33 62.45 40.73 และ 33.21 ตามลำดับ แล้วนำเอนไซม์ไลเปสที่สังเคราะห์มาใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 2 ในสภาวะเดียวกัน ให้ผลผลิตไบโอดีเซลลดลงเท่ากับร้อยละ 34.38 37.89 16.10 32.44 14.68 และ 15.75 ตามลำดับ และนำเอนไซม์ไลเปสที่สังเคราะห์ด้วยอัลจินเตมาใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 3 ให้ผลผลิตไบโอดีเซลลดลงเท่ากับร้อยละ 3.90 4.21 1.94 2.07 1.56 และ 1.48 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ค่า

เอกสารอ้างอิงกับงานวิจัยของ Neveha *et al.* (2008) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อ

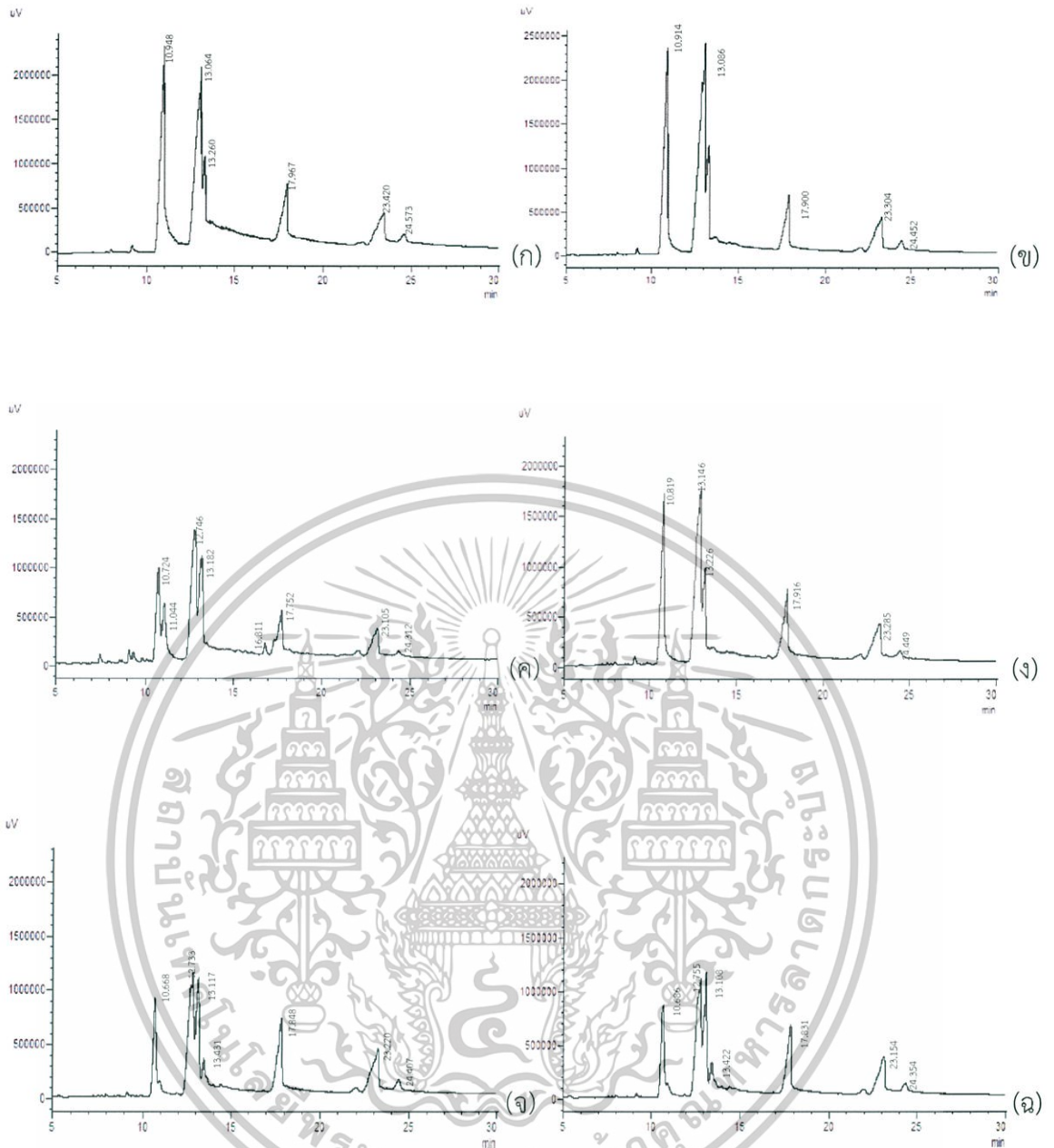
ผลิตไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida Antarctica* ที่ตรึงรูปบน acrylic resin เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตไบโอดีเซลรอบแรกและรอบที่สองให้ค่าผลผลิตร้อยละ 99.6 และ 94.6 ลดลงตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงรูปมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลลดลงหากนำมาใช้ซ้ำหลายครั้ง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2010) ได้ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* มาตรึงรูปบนตัวพุง เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลที่อัตราส่วนเมทานอลกับน้ำมันเท่ากับ 4:1 สามารถผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปซ้ำได้ทั้ง 3 รอบให้ค่าผลผลิตเท่ากับร้อยละ 58.1 52.3 และ 38.0 ตามลำดับ พบว่าความสามารถของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงรูปมีความสามารถในการผลิตลดลง เนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาการผลิต และประสิทธิภาพของตัวพุง

ตารางที่ 4.2 ปริมาณร้อยละไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจินตของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แบคทีเรีย	ปริมาณไบโอดีเซล (ร้อยละ)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
BG2015	64.47	34.38	3.90
BG2018	73.40	37.89	4.21
KS2002	45.33	16.10	1.94
KS3005	62.45	32.44	2.07
SN2006	40.73	14.68	1.56
SS1003	33.21	15.75	1.48

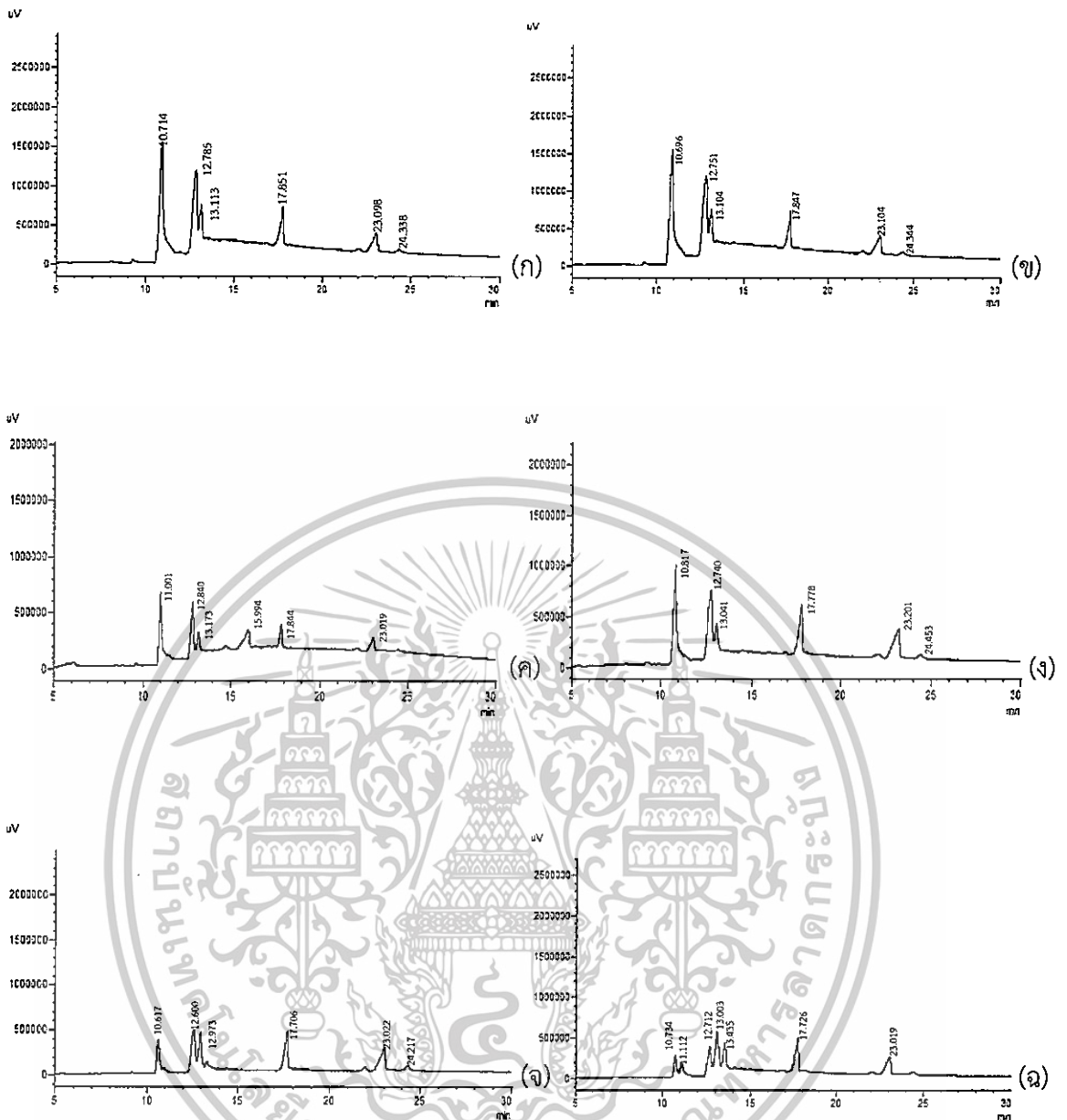


รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐาน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า หรือนำน้ำมันพืชปทุม และ (P) น้ำมันปาล์ม ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



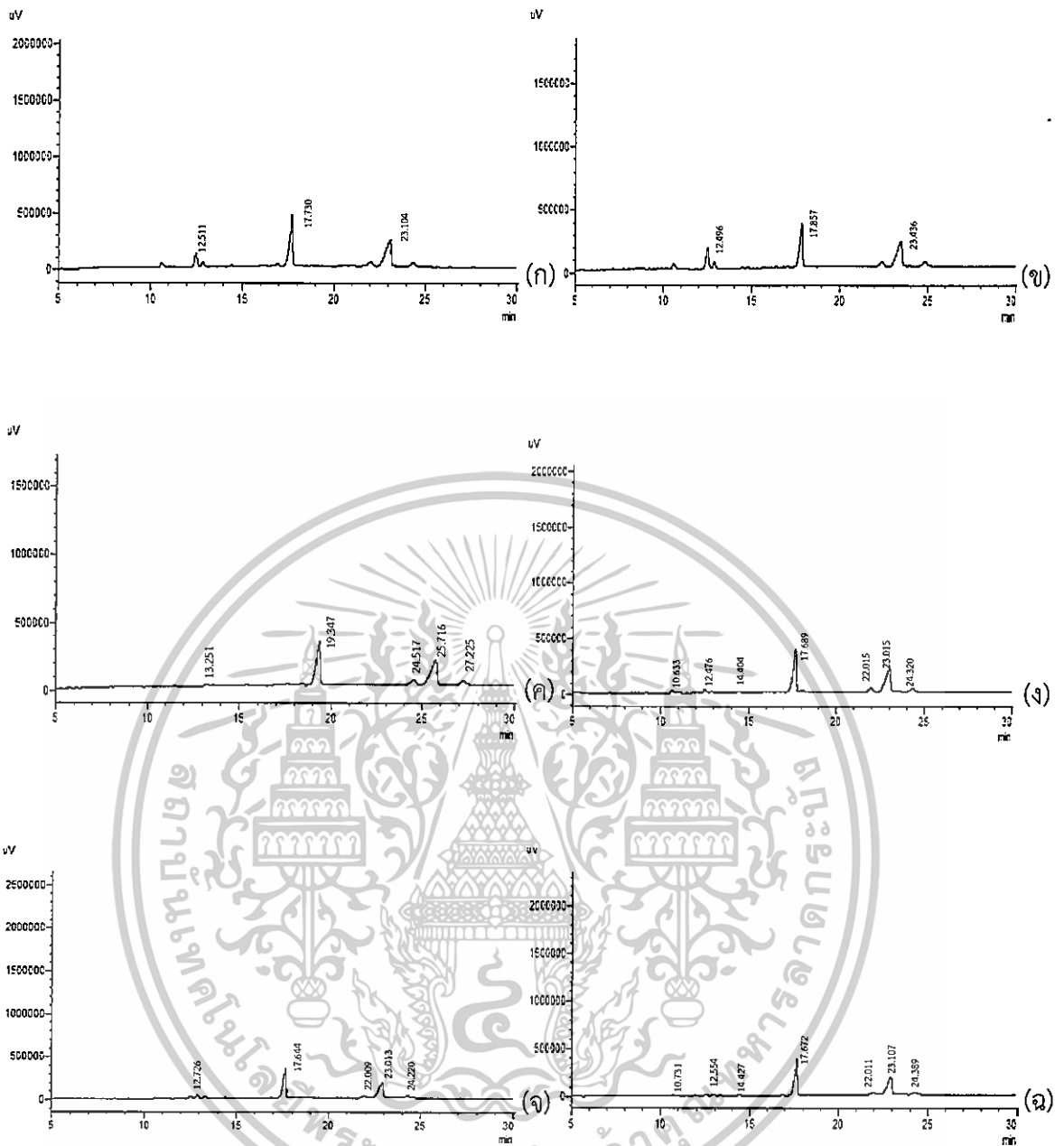
รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมของไปโอติเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ตรีงรูปด้วยแคลเซียมอัลจินेट ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในการผลิตไปโอติเซลรอบที่ 1 (ก) รหัส BG2015 (ข) รหัส BG2018 (ค) รหัส KS2002 (ง) รหัส KS3005 (จ) รหัส SN2006 และ (ฉ) รหัส SS1003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของไบโอทีเซลล์ที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ตรีงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในการผลิตไบโอทีเซลล์รอบที่ 2 (ก) รหัส BG2015 (ข) รหัส BG2018 (ค) รหัส KS2002 (ง) รหัส KS3005 (จ) รหัส SN2006 และ (ฉ) รหัส SS1003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในการผลิตไบโอดีเซลรอบที่ 3 (ก) รหัส BG2015 (ข) รหัส BG2018 (ค) รหัส KS2002 (ง) รหัส KS3005 (จ) รหัส SN2006 และ(ฉ) รหัส SS1003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. จากการคัดแยกของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส BG2015 และ BG2018 และ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จากการคัดแยกของ โชตินันท์ และคณะ (2557) จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 พบว่าหลังจากการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 และ 30-80 ตามลำดับ และแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนโดยวิธีการไดอะไลซิส พบว่าเมื่อนำมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 156.23 ± 4.46 164.87 ± 1.91 0.66 ± 0.02 3.51 ± 0.02 0.68 ± 0.02 และ 3.24 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการทดสอบหาความเข้มข้นของอัลจินเตที่ร้อยละ 1 2 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ และศึกษาอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินเตที่อัตราส่วน 1:1 1:2 และ 2:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยสังเกตลักษณะทางกายภาพพบว่าที่ความเข้มข้นของอัลจินเตร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจินเตเท่ากับ 2:1 มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์มากที่สุด

จากการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยแคลเซียมของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่าหลังจากการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และวิธีการไดอะไลซิส เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 KS20020 KS3005 SN2006 และ SS1003 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 285.85 ± 11.05 438.08 ± 3.87 1.78 ± 0.07 8.47 ± 0.23 2.09 ± 0.06 และ 9.35 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วจึงนำเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มาตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจินเต ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เป็น 261.79 ± 1.39 24.50 ± 2.86 1.56 ± 0.01 8.00 ± 0.49 2.09 ± 0.06 และ 1.77 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษารูปทรงของแบคทีเรียของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบางในการตรวจสอบหาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองประกอบไปด้วย ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจะให้ปริมาณไบโอดีเซลที่สูงในครั้งแรก และเมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำในครั้งที่ 2 และ 3 พบว่าปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ลดลงตามลำดับ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตรวจสอบหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี โดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103 พบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปด้วย แคลเซียมอัลจินเตของแบคทีเรียรหัส BG2018 มีปริมาณไบโอดีเซลสูงสุดเท่ากับร้อยละ 73.40 ในครั้งที่ 1 และเมื่อนำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปนํากลับมาใช้ซ้ำในครั้งที่ 2 ยังสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ โดย ปริมาณไบโอดีเซลในครั้งที่ 2 เท่ากับร้อยละ 37.89

การศึกษาครั้งนี้สามารถลดระยะเวลาในขั้นตอนการผลิตและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ และสามารถแยกเอนไซม์ไลเปสตรังรูปกลับมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ในครั้งที่ 2 เป็นการให้ ผลผลิตไบโอดีเซลที่เพิ่มขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาสภาพที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปด้วยอัลจินเตเป็นตัวเร่ง ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เช่น อุณหภูมิ ความเร็วรอบ และระยะเวลา เป็นต้น

5.2.2 ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อน้ำมันชนิดอื่น เช่น บริเวณเร่งปฏิกิริยา และการเข้า คู่ของซบสเตรทกับกรดอะมิโน เป็นต้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชินนภัทร ศรีศาสนา, เทพินทร์ ยายี และ ภานุชนาท ตำราเรียง. 2560. “การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

โชตินันท์ จันประดิษฐ์, ภัสราภรณ์ ฐูปเพ็ง และ รัชดา ช่างไชย. 2557. “การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดุขฎี รัตนพระ และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2549. “การผลิตไบโอดีเซลจากสบู่ดำด้วยกระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน.” ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

นภาพิทย ปรางทอง, สภาพร บุญสาน, ตริตาภรณ์ กาญจนากร, สุรีย์ หอมวิเศษวงศา และ ปิยาภรณ์ สุภักดีดำรงกุล. 2561. “การผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป.” สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

ปกรณ วิษยานุวัตติคุณ. 2554. “เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล.” วารสารวิจัยพลังงาน. 2 : 61-75.

ประวิทย์ เจียมจวนขาว, อรัญ หันพงษ์กิตติกุล และ เบญจมาศ เขียรศิลป์. 2549. “สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินตเพื่ออยู่น้ำมันปาล์มโอเลอิน.” วารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2 : 261-267.

ปวีณา อร่ามรัตน์. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันดิบโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2548.

พัคตร์พิมล อิงเจริญวิวัฒน์. 2552. “การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา. 2552. “เอนไซม์ตรึงรูป” ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร, บริษัท ฟู้ด เน็ดเวิร์ก โซลูชัน จำกัด.

พุทธชาติ จันท์เมือง. 2553. “การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพองอัลจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารเสริมใบบัณฑิต” วิทยานิพนธ์สาขาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ระเบียบดำเนินการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิมลมาศ โพธิ์ศรีศมี. 2555. “การวิเคราะห์หมึกสีดำจากปากกาลูกลื่นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี” และการวิเคราะห์ภาพ.” ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

วุฒิชัย รสชาติ, เทิดเกียรติ แก้วพวง, บุญญาวินัย อยู่สุข และวินิช พรหมอาร์ักษ์. 2557. “การวิเคราะห์ไบโอดีเซลอย่างง่ายด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC).” งานวิจัยสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

อากานี เหลืองนฤมิตชัย. 2549. “ไบโอดีเซล.” บทความเทคโนโลยีและนวัตกรรม. วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรณิข เผือกคง. 2560. “ไบโอดีเซล (Biodiesel)” คลังความรู้ SciMath. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, กระทรวงศึกษาธิการ.

Abbaszadeh, A., Ghobadian, B., Najafi, G. and Yusaf, T. 2014. “An experimental investigation of the effective parameters on wet washing of biodiesel purification.” *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering*. 9 : 1525-1537.

Aboofazl, A., Bagher, M. and Gholamreza, M. 2014. “Oily wastewaters treatment using *Pseudomonas* sp. isolated from the compost fertilizer.” *Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 12 : 1-6.

Anderson, A. and Vijayakumar, S. 2011. “Purification and Optimization of Uricase Enzyme Produced by *Pseudomonas aeruginosa*.” *Journal of Experimental Sciences*. 2(11) : 05-08.

Atadashi, I.-M., Aroua, M.-K., Abdul Aziz, A.-R. and Sulaiman, N.-M.-N. 2013. “The effects of catalysts in biodiesel production : A review.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 19(1) : 14–26.

Bhushan, I., parshad, R., and Qaz, N.G. 2008. “Immobilization of lipase by entrapment in Ca-alginate beads.” *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 23 : 552-562.

Chakraborty, A. and Mahajan, A. 2014. “Cellulose Activity Enhancement of bacteria Isolated From Oil-Pump Soil Using Substrate and Medium Optimization” *American Journal of Microbiological Research*. 2(2) : 52-56.

Dimitrijevic, A., Velickovic, D., Rikalovic, M.G. and Avramovic, N.S. 2011. “Simultaneous production of exopolysaccharide and lipase from extremophilic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pseudomonas aeruginosa* san-ai strain: A novel approach for lipase immobilization and purification.” *Carbohydrate Polymers*. 83(3) : 1397-1401.
- Du, W., Xu, Y., Liu, D. and Zeng, J. 2004. “Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymati*. 30 : 125-129.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. “Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils.” *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5) : 405-416.
- Ganapati, D., Sachin, Y. and Jadhav, R. 2005. “Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate:Transesterification in non-aqueous medium.” *Microporous and Mesoporous Materials*. 86 : 215–222.
- Harcum, S. 2008. “Purification of protein solutions” *Woodhead Publishing Series in Textiles*. 26-43.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M.A., Luccio, M.D. and Oliveira, J.V. 2010. “A Review on Microbial Lipases Production”. *Food Bioprocess Technol*. 3: 182–196.
- Iheme, C.I., Ukaio, D.I., Ibegbulem, C.O., Okorom, O.O. and Chibundu, K. 2017. “Analysis of Enzyme Activity on Domestic Waste Dump Sites.” *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 8 : 4.
- Kojima, Y., Yokoe, M. and Mase, T. 1994. “Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102”. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 58(9) : 1564-1568.
- Lam, M.-K., Lee, K.-T. and Mohamed, A.-R. 2010. “Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review.” *Biotechnology Advances*. 28(4) : 500–518
- Lin, C.W. and Tsai, S.W. 2015. “Production of biodiesel from chicken wastes by various alcohol-catalyst combinations.” *Journal of Energy in Southern Africa*. 26(1) : 36-45.
- Liu, Y., Chen, D., Yan, Y.J., Peng, C. and Xu, L. 2011. “Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents.” *Bioresource Technology*. 102(22) : 414-418.

Macrae, A.R., In William, M., Fogsrtly. 1973. “Extracellular Microbial Lipase” *Microbial enzyme and biotechnology*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Madon, R.H., Fawzi, M., Osman, S.A., Alimin, A.J., Razali, M.A., Ilman Sarwani, M.-K. and Abeden, Z.-Z. 2018. "Gas Chromatography Analysis of a C1-C5 Hydrocarbon Column" *International Journal of Integrated Engineering*. 10(1) : 85-91.
- 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.
- Mathiyazhagan, M. and Ganapathi, A. 2011. "Factors Affecting Biodiesel Production." *Research in Plant Biology*. 1(2) : 01-05.
- Mobarak, Q.E., Kasra, K.R., and Moosavi, N.Z. 2011. "Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KM110." *Iranian Journal of Microbiology*. 3(2) : 92-98.
- Mohammed, B.G., Badiea, A.M. and Moad, S.Q. 2016. "Production of Biodiesel Fuel From Cooking Oil Waste." *International Research Journal of Engineering and Technology*. 3(5) : 582-588.
- Narasimharao, K., Lee, A. and Wilson, K. 2007. "Catalysts in Production of Biodiesel: A Review." *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 1(1) : 1-12.
- Nevena, D.O., Svetlana V.S., Dejan I.B. and Zorica, D.K. 2008. "Lipase-catalyzed biodiesel synthesis with different acyl acceptors." *Acta Periodica Technologica*. 39 : 1-212.
- Noureddini, H., Gao, X. and Philkana, R.S. 2005. "Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil." *Bioresource Technology*. 96 : 769–777.
- Park, D.S., Oh, H.W., Jeong, W.J., Kim, W., Park, H.Y. and Bae, K.S. 2007. "A Culture-Based Study of the Bacterial Communities within the Guts of Nine Longicorn Beetle Species and their Exo-enzyme Producing Properties for Degrading Xylan and Pectin." *The Journal of Microbiology*. 45(5) : 394-401.
- Priyanka, P., Tan, Y., Kinsella, G., Henehan, G.T. and Ryan, B.J. 2018. "Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*." *Dublin Institute of Technology*. 1-22.
- Rahmath, A. and Pogaku, R. 2013. "Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix." *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 44 : 545-551.
- Rohit, S., Yusuf, C. and Uttam, C.B. 2001. "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnology Advances* 19: 627 –662.

- Sawangpanya, N., Muangchim, C. and Phisalaphong, M. 2010 "Immobilization of Lipase on CaCO₃ and Entrapment in Calcium Alginate Bead for Biodiesel Production." *Science Journal UBU.*, 1(2) : 46-51 .
- Schaich, K.M. 2016. "Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods" *Department of Food Science, Rutgers University, New Brunswick, NJ, USA.* 1-131.
- Sharma, A.K., Sharma, V. and Saxena, J. 2016. "A Review Paper on Properties of Fungal Lipases". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 5(12): 123-130.
- Sirajunnisa, A.R., Surendhiran, D. 2015. "Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme." *Waste Management.* 2015.
- Dhiman, S. and Chapadgaonkar, S.S. 2013. "Optimization of lipase production medium for a bacterial isolate." *International Journal of ChemTech Research.* 5(6) : 2837-2843.
- Susumu, O., Mieko, I. and Yoshio T. 1981. "The Effect of Reverse Action on Triglyceride Hydrolysis by Lipase". *Agricultural and Biological Chemistry.* 45(1): 185-189.
- Wang, Y-d., Shen, X-Y., Z-L Li., Li, X., Wang, F., Nie, X-A. and Jiang, J-C. 2010. "Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 67 : 45-51.
- Westberg, E. 2012. "Qualitative and Quantitative Analysis of Biodiesel Deposits Formed on a Hot Metal Surface" *Department of Physics, Chemistry and Biology Master's Thesis.* 1-53.
- Vishwe, V. and Chowdhary, A. 2013. "Production and Immobilization of extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." *International Journal of Science and Research.* 4(10) : 1479-1482.
- Yamane, T. 1987. "Enzyme Technology ofr The Lipids Industry: An Engineering Overview". *Journal of the American Oil chemists' Society.* 64(12): 1657-1662.
- Ye, P., Xu, Z.-K., Wang, Z.-G., Wu, J., Deng H.-T., and Seta, P. 2005. "Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 32 : 115-121.

- Yoo, H.Y., Simkhada, J.R., Cho, S.-S., Park, D.H., Kim, S.W., Seong, C.N. and Yoo, J.C. 2011. "A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production." *Bioresource Technology*. 102(2) : 6104–6111.
- Zhang, D.-H., Yuwen, L.-X. and Peng, L.-J. 2013. "Review Article Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme." *Journal of Chemistry*. 1-7.
- Zhang, Y., Dube, M.A., McLean, D.D. and Kates, M. 2003. "Biodiesel production from waste cooking oil : 1. Process design and technological assessment." *Bioresource Technology*. 89(1) : 1–16.
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W. and Liu, D. 2015. "Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 44 : 182–197.
- Zorica, K., Svetlana, B., Aleksandra, M., Bojana, O., Ljiljana, M. and Branko, B. 2002. "Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system." *Process Biochemistry*. 38.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Tryptone	17.0
Soytone	3.0
Glucosse	2.5
Sodium Chloride	5.0
Dipotassium Hydrogen Posphate	2.5
Final pH (25 C)	7.3±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 30 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Tryptone	15.0
Soytone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	15.0
Final pH (25 C)	7.3±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 30 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal medium)

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Tryptone	0.3 % (v/v)
Yeast extract	1.0
Dipotassium phosphate	2.0
Potassium dihydrogen phosphate	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Ammonium sulphate	1.0
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2
Calcium chloride	0.15
Olive oil	1 % (v/v)

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลาย Tris-HCl Buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

สารละลาย Tris-Base ปริมาณ 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ตามที่ต้องการด้วยกรดไฮโดรคลอริก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

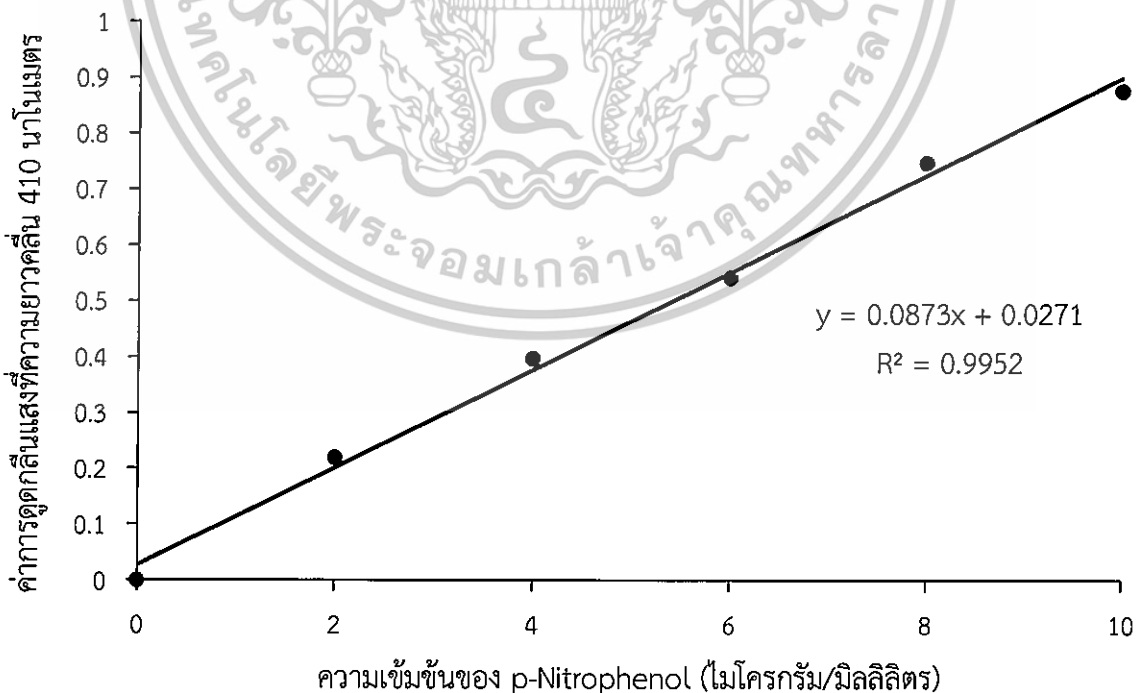
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol

เตรียมสารละลาย p-Nitrophenol (p-NP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสารปริมาณ 0.014 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ ด้วย Tris-HCl (pH 8.0) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ดังตารางที่ ค.1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

ตารางที่ ค.1 การเจือจาง p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1mM p-NP (ไมโครลิตร)	50 mM Phosphate Buffer (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย p-NP (ไมโครลิตร)
0	2000	0
20	1960	0.02
40	1920	0.04
60	1880	0.06
80	1840	0.08
100	1800	0.10



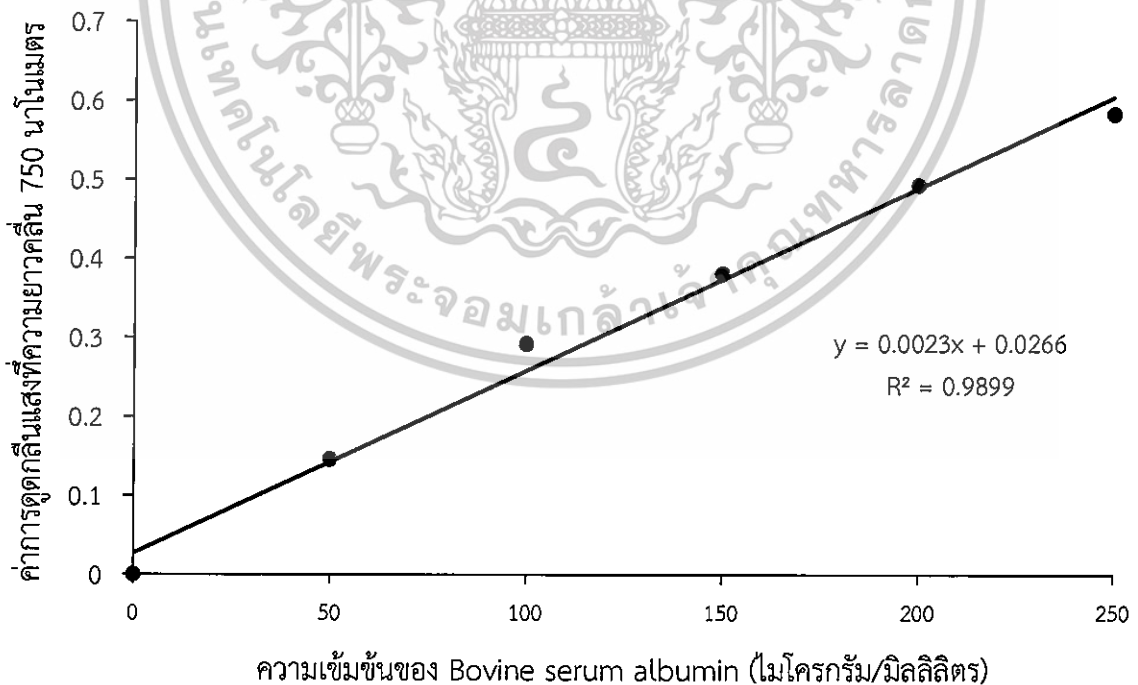
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ **รูปที่ ค.1** กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังตารางที่ ค.2 จากนั้นปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วจึงเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

ตารางที่ ค.2 การเจือจาง Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Stock BSA	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย BSA (ไมโครลิตร)
0	2000	0
100	1900	50
200	1800	100
300	1700	150
400	1600	200
500	1500	250



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์การอิมิตัว) ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตารางที่ ง.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่เปอร์เซ็นต์การอิมิตัวต่างๆ ที่ 0 องศาเซลเซียส

ร้อยละ	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75
0	56	84	144	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516
5		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449
10			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415
15				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382
20					30	49	61	93	125	138	193	230	267	307	348
25						19	30	62	94	127	162	198	235	273	315
30							12	43	74	107	142	177	214	252	292
35								31	63	94	129	164	200	238	278
40									31	63	97	132	168	205	245
45										33	65	99	134	171	210
50											33	66	101	137	176
55												33	67	103	141
60													34	69	105
65														34	70
70															35

ที่มา : Biovision (2004)

ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ตารางที่ จ.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และ *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003

แบคทีเรีย	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
BG2015	5000 เท่า	0.319	0.325	0.329	61.12±1.04
BG2018	5000 เท่า	0.449	0.423	0.423	83.35±3.09
KS2002	10 เท่า	0.472	0.465	0.432	2.65±0.05
KS3005	10 เท่า	0.684	0.669	0.658	0.53±0.01
SN2006	10 เท่า	0.682	0.665	0.671	0.53±0.01
SS1003	10 เท่า	0.624	0.611	0.657	2.49±0.02

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ตารางที่ ฉ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
BG2015	เอนไซม์หยาบ	5000 เท่า	0.319	0.325	0.329	0.324±0.005 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	5000 เท่า	0.586	0.581	0.583	0.583±0.003 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	5000 เท่า	0.761	0.798	0.799	0.786±0.022 ^c
	ไดอะไลซิส	5000 เท่า	0.657	0.650	0.651	0.653±0.004 ^d
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	5000 เท่า	0.430	0.428	0.432	0.430±0.002 ^e
	ทำซ้ำรอบที่ 1	500 เท่า	0.319	0.341	0.345	0.335±0.014 ^f
	ทำซ้ำรอบที่ 2	500 เท่า	0.233	0.239	0.231	0.234±0.004 ^g
	ทำซ้ำรอบที่ 3	500 เท่า				

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
BG2018	เอนไซม์หยาบ	5000 เท่า	0.449	0.423	0.423	0.432±0.015 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	5000 เท่า	0.702	0.695	0.691	0.696±0.006 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต					
	ไดอะไลซิส	5000 เท่า	0.839	0.822	0.824	0.828±0.009 ^c
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	5000 เท่า	0.803	0.791	0.795	0.796±0.006 ^d
	ทำซ้ำรอบที่ 1	5000 เท่า	0.595	0.593	0.597	0.595±0.002 ^e
	ทำซ้ำรอบที่ 2	500 เท่า	0.387	0.381	0.382	0.383±0.003 ^f
	ทำซ้ำรอบที่ 3	500 เท่า	0.204	0.223	0.225	0.217±0.012 ^g

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
KS2002	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.472	0.465	0.432	0.456±0.021 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	10 เท่า	0.789	0.784	0.783	0.785±0.003 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	10 เท่า	0.803	0.846	0.832	0.827±0.022 ^c
	ไดอะไลซิส	10 เท่า	0.712	0.717	0.708	0.712±0.005 ^d
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	10 เท่า	0.563	0.592	0.572	0.576±0.015 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	10 เท่า	0.372	0.366	0.347	0.362±0.013 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	10 เท่า	0.313	0.379	0.348	0.347±0.033 ^g
	ทำซ้ำครั้งที่ 3	5 เท่า				

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ จ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจินต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
KS3005	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.684	0.669	0.658	0.670±0.013 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	10 เท่า	0.721	0.754	0.751	0.742±0.018 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	100 เท่า	0.879	0.876	0.885	0.880±0.005 ^c
	ไดอะไลซิส	100 เท่า	0.724	0.786	0.745	0.752±0.032 ^d
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	100 เท่า	0.514	0.543	0.546	0.534±0.018 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	10 เท่า	0.365	0.328	0.318	0.337±0.025 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	10 เท่า	0.388	0.341	0.332	0.354±0.030 ^g
	ทำซ้ำครั้งที่ 3	10 เท่า				

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
SN2006	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.682	0.665	0.671	0.673±0.009 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	10 เท่า	0.791	0.787	0.778	0.785±0.007 ^b
	ไดอะไลซิส	10 เท่า	0.883	0.845	0.823	0.850±0.030 ^c
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	10 เท่า	0.753	0.721	0.762	0.745±0.022 ^d
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	5 เท่า	0.625	0.678	0.683	0.662±0.032 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	5 เท่า	0.297	0.319	0.304	0.307±0.11 ^f

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
SS1003	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.624	0.611	0.657	0.631±0.020 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	10 เท่า	0.723	0.786	0.773	0.761±0.033 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	10 เท่า	0.799	0.823	0.817	0.813±0.012 ^c
	ไดอะไลซิส	10 เท่า	0.727	0.758	0.673	0.719±0.043 ^d
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	10 เท่า	0.524	0.568	0.533	0.542±0.023 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	5 เท่า	0.342	0.322	0.317	0.327±0.013 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	5 เท่า				

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
BG2015	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.322	0.303	0.303	0.309±0.011 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	6 เท่า	0.442	0.453	0.441	0.445±0.007 ^b
	ไดอะไลซิส	5 เท่า	0.281	0.276	0.277	0.278±0.003 ^c
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	5 เท่า	0.254	0.253	0.251	0.253±0.002 ^d
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	5 เท่า	0.207	0.202	0.224	0.211±0.012 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	4 เท่า	0.372	0.363	0.365	0.367±0.005 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 3	4 เท่า	0.314	0.312	0.309	0.312±0.003 ^g

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* และ *Pseudomonas sp.* ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
BG2018	เอนไซม์หยาบ	9 เท่า	0.332	0.320	0.319	0.324±0.007 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	6 เท่า	0.396	0.389	0.393	0.393±0.004 ^b
	ไดอะไลซิส	4 เท่า	0.241	0.243	0.245	0.243±0.002 ^c
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	4 เท่า	0.239	0.242	0.241	0.241±0.002 ^d
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	3 เท่า	0.340	0.338	0.335	0.338±0.003 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	3 เท่า	0.319	0.321	0.294	0.311±0.015 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 3	2 เท่า	0.491	0.470	0.469	0.477±0.012 ^g

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
KS2002	เอนไซม์หยาบ	5 เท่า	0.242	0.228	0.231	0.234±0.007 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วย เกลียวแอมโมเนียมซัลเฟต	3 เท่า	0.388	0.371	0.374	0.378±0.009 ^b
	ไดอะไลซิส	3 เท่า	0.311	0.298	0.324	0.311±0.013 ^c
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	3 เท่า	0.302	0.308	0.299	0.303±0.005 ^d
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	3 เท่า	0.297	0.293	0.291	0.294±0.003 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	3 เท่า	0.379	0.370	0.369	0.373±0.006 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 3	2 เท่า	0.373	0.374	0.396	0.381±0.013 ^g

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
KS3005	เอนไซม์หยาบ	5 เท่า	0.322	0.309	0.314	0.315±0.007 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	4 เท่า	0.352	0.344	0.357	0.351±0.007 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	4 เท่า	0.274	0.259	0.261	0.265±0.008 ^c
	ไดอะไลซิส	4 เท่า	0.251	0.237	0.234	0.241±0.009 ^d
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	4 เท่า	0.285	0.286	0.289	0.387±0.002 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	3 เท่า	0.317	0.322	0.325	0.321±0.004 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	3 เท่า	0.453	0.432	0.429	0.438±0.013 ^g
	ทำซ้ำครั้งที่ 3	3 เท่า				

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
SN2006	เอนไซม์หยาบ	4 เท่า	0.241	0.225	0.221	0.229±0.011 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วย เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	3 เท่า	0.335	0.288	0.301	0.308±0.024 ^b
	ไดอะไลซิส	3 เท่า	0.283	0.267	0.271	0.264±0.008 ^c
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	3 เท่า	0.252	0.239	0.237	0.243±0.008 ^d
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	2 เท่า	0.355	0.355	0.359	0.356±0.002 ^f
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	2 เท่า	0.334	0.338	0.311	0.328±0.015 ^e

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงด้วยอัลจิเนต

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
SS1003	เอนไซม์หยาบ	4 เท่า	0.261	0.255	0.246	0.254±0.008 ^a
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	3 เท่า	0.341	0.331	0.319	0.330±0.011 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต					
	ไดอะไลซิส	3 เท่า	0.281	0.302	0.292	0.292±0.011 ^d
	ตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส	3 เท่า	0.278	0.272	0.271	0.274±0.004 ^c
	ทำซ้ำครั้งที่ 1	2 เท่า	0.352	0.375	0.378	0.368±0.014 ^e
	ทำซ้ำครั้งที่ 2	2 เท่า	0.346	0.324	0.341	0.337±0.012 ^f

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันของแบคทีเรียแต่ละรหัส คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ภาคผนวก ข
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตรึงรูปเอนไซม์ และการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

BG2015

Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3.000	61.190	1.037	0.599	58.614	63.766	60.090	62.150
Protein precipitation	3.000	114.503	0.518	0.299	113.217	115.790	114.020	115.050
Dialysis	3.000	156.227	4.458	2.574	145.152	167.302	151.080	158.900
Immobilization	3.000	128.777	0.780	0.450	126.839	130.715	128.230	129.670
1 cycle	3.000	82.940	0.410	0.237	81.922	83.958	82.530	83.350
2 cycle	3.000	63.383	2.881	1.664	56.225	70.541	60.090	65.440
3 cycle	3.000	42.660	0.857	0.495	40.530	44.790	41.970	43.620
Total	21.000	92.811	39.277	8.571	74.933	110.690	41.970	158.900

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	30792.204	6.000	5132.034	1157.557	0.000		
Within Groups	62.069	14.000	4.434				
Total	30854.273	20.000					
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets							
Duncan ^a							
Subset for alpha = 0.05							
Method	N	1	2	3	4	5	6
Crude enzyme	3.000	42.660					
Protein precipitation	3.000		61.190				
Dialysis	3.000		63.383				
Immobilization	3.000			82.940			
1 cycle	3.000				114.503		
2 cycle	3.000					128.777	
3 cycle	3.000						156.227
Sig.		1.000	0.223	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ซ.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตรึงรูปเอนไซม์ และการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* และ *Pseudomonas sp.*

Descriptives									
BG2018									
Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Crude enzyme	3.000	83.283	3.089	1.783	75.610	90.956	81.500	86.850	
Protein precipitation	3.000	137.697	1.144	0.661	134.855	140.539	136.670	138.930	
Dialysis	3.000	164.943	1.913	1.105	160.190	169.696	163.640	167.140	
Immobilization	3.000	158.353	1.262	0.729	155.217	161.489	157.250	159.730	
1 cycle	3.000	116.907	0.415	0.240	115.876	117.938	116.490	117.320	
2 cycle	3.000	73.333	0.664	0.383	71.685	74.982	72.850	74.090	
3 cycle	3.000	39.163	2.385	1.377	33.240	45.087	36.420	40.740	
Total	21.000	110.526	44.599	9.732	90.224	130.827	36.420	167.140	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.			
Between Groups	39737.237	6.000	6622.873	2069.321	0.000			
Within Groups	44.807	14.000	3.201					
Total	39782.044	20.000						
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets								
Duncan ^a								
		Subset for alpha = 0.05						
Method	N	1	2	3	4	5	6	7
Crude enzyme	3.000	39.163						
Protein precipitation	3.000		73.333					
Dialysis	3.000			83.283				
Immobilization	3.000				116.907			
1 cycle	3.000					137.697		
2 cycle	3.000						158.353	
3 cycle	3.000							164.943
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ซ.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตรึงรูปเอนไซม์ และการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives									
KS2002									
Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Crude enzyme	3.000	0.353	0.021	0.012	0.302	0.405	0.330	0.370	
Protein precipitation	3.000	0.623	0.006	0.003	0.609	0.638	0.620	0.630	
Dialysis	3.000	0.657	0.015	0.009	0.619	0.695	0.640	0.670	
Immobilization	3.000	0.563	0.006	0.003	0.549	0.578	0.560	0.570	
1 cycle	3.000	0.453	0.015	0.009	0.415	0.491	0.440	0.470	
2 cycle	3.000	0.273	0.012	0.007	0.245	0.302	0.260	0.280	
3 cycle	3.000	0.067	0.006	0.003	0.052	0.081	0.060	0.070	
Total	21.000	0.427	0.201	0.044	0.336	0.519	0.060	0.670	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.			
Between Groups	0.808	6.000	0.135	832.137	0.000			
Within Groups	0.002	14.000	0.000					
Total	0.811	20.000						
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets								
Duncan ^a								
		Subset for alpha = 0.05						
Method	N	1	2	3	4	5	6	7
Crude enzyme	3.000	0.067						
Protein precipitation	3.000		0.273					
Dialysis	3.000			0.353				
Immobilization	3.000				0.453			
1 cycle	3.000					0.563		
2 cycle	3.000						0.623	
3 cycle	3.000							0.657
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ซ.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตรึงรูปเอนไซม์ และการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives									
KS3005									
Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
BG2015	3.000	2.647	0.050	0.029	2.522	2.772	2.600	2.700	
BG2018	3.000	2.943	0.072	0.042	2.764	3.123	2.860	2.990	
KS2002	3.000	3.513	0.015	0.009	3.475	3.551	3.500	3.530	
KS3005	3.000	2.983	0.127	0.073	2.669	3.298	2.870	3.120	
SN2006	3.000	2.087	0.076	0.044	1.899	2.275	2.000	2.140	
SS1003	3.000	1.277	0.100	0.058	1.028	1.525	1.200	1.390	
Total	18.000	1.347	0.125	0.072	1.036	1.657	1.260	1.490	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	13.216	6.000	2.203	278.153	0.000	
Within Groups	0.111	14.000	0.008			
Total	13.327	20.000				
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets						
Duncan ^a						
Method	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Crude enzyme	3.000	1.277				
Protein precipitation	3.000	1.347				
Dialysis	3.000		2.087			
Immobilization	3.000			2.647		
1 cycle	3.000				2.943	
2 cycle	3.000				2.983	
3 cycle	3.000					3.513
Sig.		0.352	1.000	1.000	0.591	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ซ.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตรึงรูปเอนไซม์ และการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives								
SN2006								
Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3.000	0.533	0.006	0.003	0.519	0.548	0.530	0.540
Protien precipitation	3.000	0.627	0.006	0.003	0.612	0.641	0.620	0.630
Dialysis	3.000	0.677	0.021	0.012	0.625	0.728	0.660	0.700
Immobilization	3.000	0.593	0.021	0.012	0.542	0.645	0.570	0.610
1 cycle	3.000	0.130	0.010	0.006	0.105	0.155	0.120	0.140
2 cycle	3.000	0.060	0.000	0.000	0.060	0.060	0.060	0.060
3 cycle	3.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Total	21.000	0.374	0.281	0.061	0.246	0.502	0.000	0.700

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.			
Between Groups	6.000	0.263	1784.828	0.000	6.000			
Within Groups	14.000	0.000			14.000			
Total	20.000				20.000			
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets								
Duncan ^a								
		Subset for alpha = 0.05						
Method	N	1	2	3	4	5	6	7
Crude enzyme	3.000	0.000						
Protein precipitation	3.000		0.060					
Dialysis	3.000			0.130				
Immobilization	3.000				0.533			
1 cycle	3.000					0.593		
2 cycle	3.000						0.627	
3 cycle	3.000							0.677
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ซ.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ การตรึงรูปเอนไซม์ และการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives									
SS1003									
Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Crude enzyme	3.000	0.510	0.017	0.010	0.467	0.553	0.490	0.520	
Protien precipitation	3.000	0.600	0.026	0.015	0.534	0.666	0.570	0.620	
Dialysis	3.000	0.650	0.010	0.006	0.625	0.675	0.640	0.660	
Immobilization	3.000	0.570	0.036	0.021	0.480	0.660	0.530	0.600	
1 cycle	3.000	0.103	0.006	0.003	0.089	0.118	0.100	0.110	
2 cycle	3.000	0.060	0.000	0.000	0.060	0.060	0.060	0.060	
3 cycle	3.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Total	21.000	0.35619	0.272571	0.059480	0.23212	0.48026	0.000	0.660	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	1.481	6.000	0.247	710.082	0.000		
Within Groups	0.005	14.000	0.000				
Total	1.486	20.000					
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets							
Duncan ^a							
		Subset for alpha = 0.05					
Method	N	1	2	3	4	5	6
Crude enzyme	3.000	0.000					
Protien precipitation	3.000		0.060				
Dialysis	3.000			0.103			
Immobilization	3.000				0.510		
1 cycle	3.000					0.570	
2 cycle	3.000					0.600	
3 cycle	3.000						0.650
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	0.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ซ.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BG2015	3.000	61.190	1.037	0.599	58.614	63.766	60.090	62.150
BG2018	3.000	83.283	3.089	1.783	75.610	90.956	81.500	86.850
KS2002	3.000	0.353	0.021	0.012	0.302	0.405	0.330	0.370
KS3005	3.000	2.647	0.050	0.029	2.522	2.772	2.600	2.700
SN2006	3.000	0.533	0.006	0.003	0.519	0.548	0.530	0.540
SS1003	3.000	0.510	0.017	0.010	0.467	0.553	0.490	0.520
Total	18.000	24.753	35.194	8.295	7.251	42.254	0.330	86.850

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21035.412	5.000	4207.082	2376.942	0.000
Within Groups	21.239	12.000	1.770		
Total	21056.651	17.000			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets					
Duncan ^a					
Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
KS2002	3.000	0.353			
SS1003	3.000	0.510			
SN2006	3.000	0.533			
KS3005	3.000	2.647			
BG2015	3.000		61.190		
BG2018	3.000				83.283
Sig.		0.073	1.000		1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๗.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives									
Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
BG2015	3.000	114.503	0.518	0.299	113.217	115.790	114.020	115.050	
BG2018	3.000	137.697	1.144	0.661	134.855	140.539	136.670	138.930	
KS2002	3.000	0.623	0.006	0.003	0.609	0.638	0.620	0.630	
KS3005	3.000	2.943	0.072	0.042	2.764	3.123	2.860	2.990	
SN2006	3.000	0.627	0.006	0.003	0.612	0.641	0.620	0.630	
SS1003	3.000	0.600	0.026	0.015	0.534	0.666	0.570	0.620	
Total	18.000	42.832	60.984	14.374	12.506	73.159	0.570	138.930	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63220.783	5.000	12644.157	47919.743	0.000
Within Groups	3.166	12.000	0.264		
Total	63223.949	17.000			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets					
Duncan ^a					
Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
SN2006	3.000	0.600			
SS1003	3.000	0.623			
KS2002	3.000	0.627			
KS3005	3.000		2.943		
BG2015	3.000			114.503	
BG2018	3.000				137.697
Sig.		0.953	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๔.4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดอะไลซิสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					BG2015	3.000		
BG2018	3.000	164.943	1.913	1.105	160.190	169.696	163.640	167.140
KS2002	3.000	0.657	0.015	0.009	0.619	0.695	0.640	0.670
KS3005	3.000	3.513	0.015	0.009	3.475	3.551	3.500	3.530
SN2006	3.000	0.677	0.021	0.012	0.625	0.728	0.660	0.700
SS1003	3.000	0.650	0.010	0.006	0.625	0.675	0.640	0.660
Total	18.000	54.444	77.297	18.219	16.006	92.883	0.640	167.140

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	101524.634	5.000	20304.927	5175.830	0.000
Within Groups	47.076	12.000	3.923		
Total	101571.710	17.000			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SS1003	3.000	0.650		
KS2002	3.000	0.657		
SN2006	3.000	0.677		
KS3005	3.000	3.513		
BG2015	3.000		156.227	
BG2018	3.000			164.943
Sig.		0.126	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ข.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					BG2015	3.000		
BG2018	3.000	158.353	1.262	0.729	155.217	161.489	157.250	159.730
KS2002	3.000	0.563	0.006	0.003	0.549	0.578	0.560	0.570
KS3005	3.000	2.983	0.127	0.073	2.669	3.298	2.870	3.120
SN2006	3.000	0.593	0.021	0.012	0.542	0.645	0.570	0.610
SS1003	3.000	0.570	0.036	0.021	0.480	0.660	0.530	0.600
Total	18.000	48.640	69.632	16.412	14.013	83.267	0.530	159.730

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82422.015	5.000	16484.403	44553.110	0.000
Within Groups	4.440	12.000	0.370		
Total	82426.455	17.000			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
KS2002	3.000	0.563			
SS1003	3.000	0.570			
SN2006	3.000	0.593			
KS3005	3.000		2.983		
BG2015	3.000			128.777	
BG2018	3.000				158.353
Sig.		0.955	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ๗.6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงรูปด้วยอัลจินตหลังการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซ้ำ 1 ครั้ง

Descriptives									
Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
BG2015	3.000	82.940	0.410	0.237	81.922	83.958	82.530	83.350	
BG2018	3.000	116.907	0.415	0.240	115.876	117.938	116.490	117.320	
KS2002	3.000	0.453	0.015	0.009	0.415	0.491	0.440	0.470	
KS3005	3.000	2.087	0.076	0.044	1.899	2.275	2.000	2.140	
SN2006	3.000	0.130	0.010	0.006	0.105	0.155	0.120	0.140	
SS1003	3.000	0.103	0.006	0.003	0.089	0.118	0.100	0.110	
Total	18.000	33.770	49.185	11.593	9.311	58.229	0.100	117.320	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41124.967	5.000	8224.993	142451.534	0.000
Within Groups	0.693	12.000	0.058		
Total	41125.659	17.000			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
SS1003	3.000	0.103			
SN2006	3.000	0.130			
KS2002	3.000	0.453			
KS3005	3.000		2.087		
BG2015	3.000			82.940	
BG2018	3.000				116.907
Sig.		0.115	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ข.7 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่ตรึงรูปด้วยอัลจินตหลังการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซ้ำ 2 ครั้ง

Descriptives									
Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
BG2015	3.000	63.383	2.881	1.664	56.225	70.541	60.090	65.440	
BG2018	3.000	73.333	0.664	0.383	71.685	74.982	72.850	74.090	
KS2002	3.000	0.273	0.012	0.007	0.245	0.302	0.260	0.280	
KS3005	3.000	1.277	0.100	0.058	1.028	1.525	1.200	1.390	
SN2006	3.000	0.060	0.000	0.000	0.060	0.060	0.060	0.060	
SS1003	3.000	0.060	0.000	0.000	0.060	0.060	0.060	0.060	
Total	18.000	23.064	33.107	7.803	6.601	39.528	0.060	74.090	

ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18615.375	5.000	3723.075	2552.023	0.000
Within Groups	17.506	12.000	1.459		
Total	18632.881	17.000			

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SN2006	3.000	0.060		
SS1003	3.000	0.060		
KS2002	3.000	0.273		
KS3005	3.000	1.277		
BG2015	3.000		63.383	
BG2018	3.000			73.333
Sig.		0.275	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ตารางที่ ข.8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* และ *Pseudomonas sp.* ที่ตรึงรูปด้วยอัลจินตหลังการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซ้ำ 3 ครั้ง

Descriptives									
Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
BG2015	3.000	42.660	0.857	0.495	40.530	44.790	41.970	43.620	
BG2018	3.000	39.163	2.385	1.377	33.240	45.087	36.420	40.740	
KS2002	3.000	0.067	0.006	0.003	0.052	0.081	0.060	0.070	
KS3005	3.000	1.347	0.125	0.072	1.036	1.657	1.260	1.490	
SN2006	3.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
SS1003	3.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
Total	18.000	13.873	19.726	4.650	4.063	23.682	0.000	43.620	

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6602.209	5.000	1320.442	1230.722	0.000
Within Groups	12.875	12.000	1.073		
Total	6615.084	17.000			

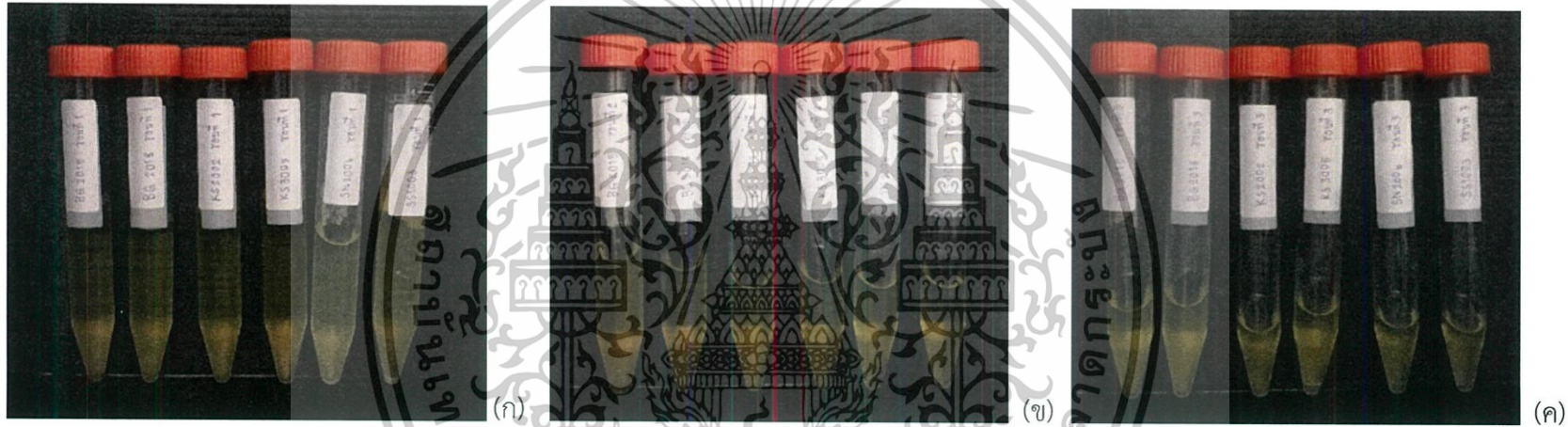
Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SN2006	3.000	0.0000		
SS1003	3.000	0.0000		
KS2002	3.000	0.0667		
KS3005	3.000	1.3467		
BG2018	3.000		39.1633	
BG2015	3.000			42.6600
Sig.		0.165	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed; a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ภาคผนวก ฅ
ผลผลิตไบโอดีเซล



รูปที่ ฅ.1 ผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์จากแบคทีเรีย แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ตามลำดับ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อ น้ำมัน 4:1 ทั้งหมด 3 ครั้ง (ก) ครั้งที่ 1 (ข) ครั้งที่ 2 (ค) ครั้งที่ 3

ภาคผนวก ญ

ขนาดเม็ดของแคลเซียมอัลจิเนต



รูปที่ ญ.1 ผลขนาดเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ตามลำดับ