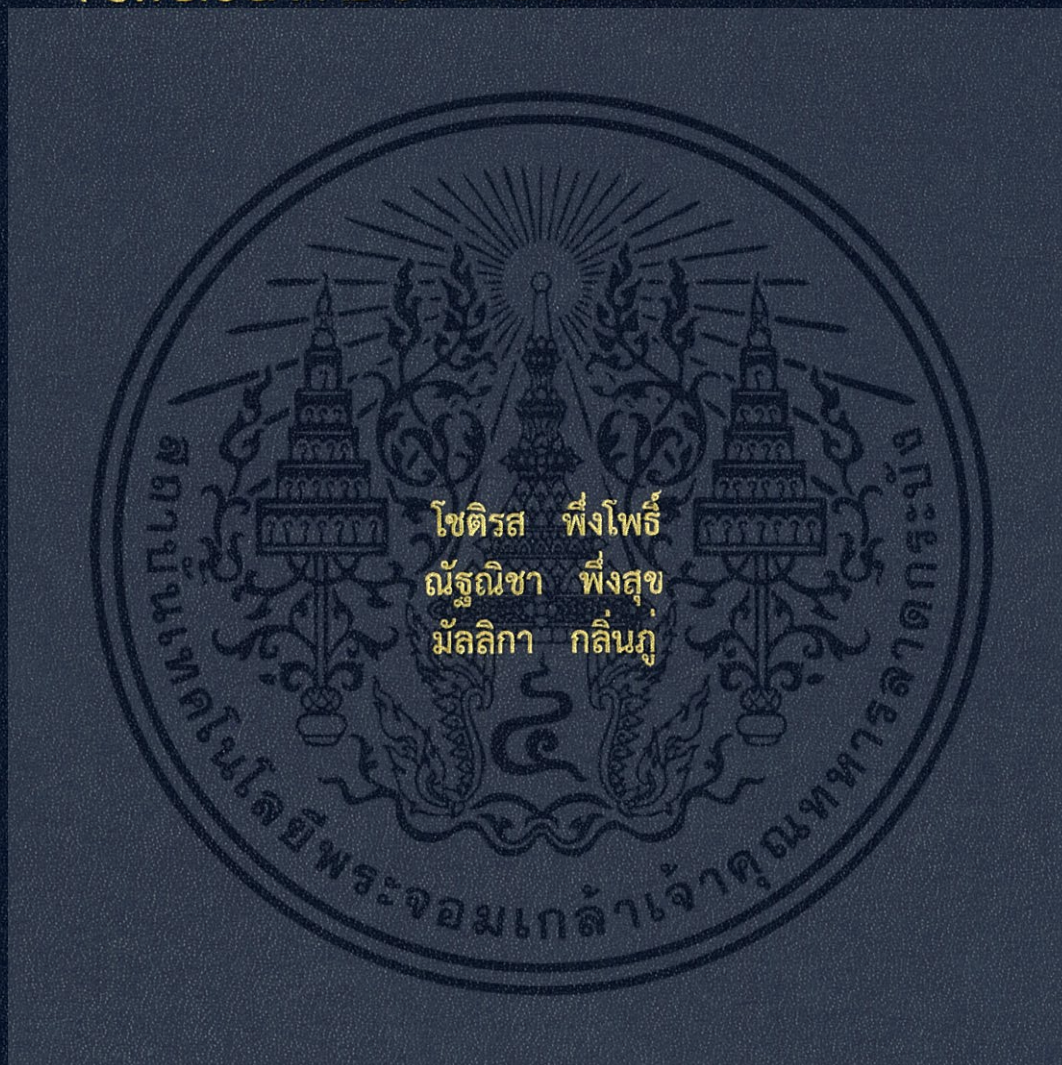


การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. เพื่อเป็นตัวเร่ง
ปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

USING LIPASE FROM *Pseudomonas* sp.
FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. เพื่อเป็นตัวเร่ง
ปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

USING LIPASE FROM *Pseudomonas* sp.
FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

USING LIPASE FROM *Pseudomonas* sp.
FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION



CHOTIROS PHUNGPHO
NATNICHA PUNGSUK
MUNLIKA GLINPOO

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

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE KING
MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

Using Lipase from *Pseudomonas* sp. for Biocatalyst in Biodiesel Production

ชื่อนักศึกษา

นางสาวโชติรส พึ่งโพธิ์ รหัสนักศึกษา 56050981

นางสาวณัฐนิชา พึ่งสุข รหัสนักศึกษา 56050988

นางสาวมัลลิกา กลิ่นภู รหัสนักศึกษา 56051053

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา

ชีววิทยา

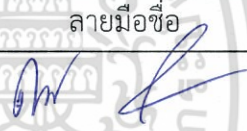


ปีการศึกษา

2559

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T149518

หัวข้อโครงการพิเศษ	การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก <i>Pseudomonas</i> sp. เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวโชติรส พิงโพธิ์	รหัสนักศึกษา 56050981
	นางสาวณัฐนิชา พิงสุข	รหัสนักศึกษา 56050988
	นางสาวมัลลิกา กลิ่นภู	รหัสนักศึกษา 56051053
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2559	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ	

บทคัดย่อ

ไบโอดีเซลเป็นอีกหนึ่งพลังงานทดแทนที่สำคัญ เนื่องจากมีคุณสมบัติการเผาไหม้ที่ดี และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์โดยใช้กรด-ด่าง หรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เป็นเมทิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สภาวะเหมาะสมจำนวน 13 ไอโซเลท จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำการแยกสารผ่านเยื่อ (Dialysis) พบว่าแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 และ SN2006 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 329.66 ± 4.12 256.04 ± 4.71 0.28 ± 0.00 0.24 ± 0.00 และ 0.14 ± 0.00 ยูนิต์/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำเอนไซม์ที่ได้มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาร้อยละ 10 30 และ 50 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 3:1 4:1 และ 5:1 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 35 45 และ 55 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography และ Gas Chromatography พบว่าสภาวะที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 4:1 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 45 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มที่สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ จากผลการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. เพื่อเพิ่มผลผลิตไบโอดีเซลต่อไป

คำสำคัญ : ไบโอดีเซล ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เอนไซม์ไลเปส *Pseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	USING LIPASE FROM <i>Pseudomonas</i> sp. FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION	
Student	Miss Chotiros Phungpho	Student ID 56050981
	Miss Natnicha Pungsuk	Student ID 56050988
	Miss Munlika Glinpoo	Student ID 56051053
Degree	Bachelor for Science (Industrial Microbiology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic year	2016	
Advisor	Asst. Prof. Dr.Worakrit Woranathakij	

Abstract

Biodiesel is one of important renewable energy because it has complete combustion and is environmental friendly due to Transesterification reaction of Triglycerides with alcohol using acid-base or lipase as catalyst to Methyl ester and Glycerol. The aim of this study is to optimize biodiesel production from palm oil by using lipase from *Pseudomonas* sp. to catalyze a reaction. 13 isolates of bacteria were grown in basal medium that could produce lipase under the optimal condition, then enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation and dialysis. BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 and SN2006 isolates gave the high enzyme activity at 329.66 ± 4.12 , 256.04 ± 4.71 , 0.28 ± 0.00 , 0.24 ± 0.00 , and 0.14 ± 0.00 U/mL, respectively. Purified lipase was used to catalyze of biodiesel production under optimal conditions which were Enzyme loading at 10, 30 and 50%wt Methanol to palm oil molar ratio at 3:1, 4:1 and 5:1 and Reaction temperature at 35, 45 and 55°C with shaking at 200 rpm for 72 hr. Biodiesel were analyzed by Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography. Optimal condition was likely to be achieve 50%wt enzyme loading, 4:1 methanol to palm oil molar ratio and 45 °C reaction temperature. This study could be applied for the optimization of biodiesel production using lipase from *Pseudomonas* sp.

Keywords : Biodiesel Transesterification Lipase *Pseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากคณะผู้จัดทำได้รับความกรุณา และความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณ ดังนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภต วรรณทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่คอยให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือแนะแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องในการทำเล่มโครงการพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นด้วยความเอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ ที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะเพื่อทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีเนื้อหาที่สมบูรณ์ครบถ้วนมากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา ที่คอยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้วิชาการ ซึ่งทางผู้จัดทำโครงการได้นำความรู้มาใช้เป็นพื้นฐานในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารสถานที่ ตลอดจนพนักงานแม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยา อาคารจุฬารัตน์วลัยลักษณ์ 1 ทุกๆ ท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของคณะผู้จัดทำที่ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ และเป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และบุคคลอื่นๆ ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวมา ที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการทำโครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ทางคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้อง หากมีโครงการพิเศษฉบับนี้ผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำขออภัยเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

โชติรส พึ่งโพธิ์
ณัฐนิชา พึ่งสุข
มัลลิกา กลิ่นภู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต่ออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ไปโอดีเซล.....	3
2.2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน.....	3
2.2.1 ชนิดของตัวเร่งปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน.....	4
2.2.2 ปัจจัยสำคัญของปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อการผลิตไปโอดีเซล.....	5
2.3 เอนไซม์ไลเปส.....	7
2.3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส.....	7
2.3.2 ชนิดของเอนไซม์ไลเปส.....	8
2.3.3 ปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเปส.....	10
2.4 เชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp.	11
2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างไปโอดีเซล.....	14
2.5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง.....	14
2.5.2 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี.....	15
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	22
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	22
3.2 สารเคมี.....	22
3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	22
3.2.2 สารเคมี.....	22
3.3 อุปกรณ์.....	23
3.4 เครื่องมือ.....	24
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
3.5.1 การจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถผลิต เอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น	27
3.5.3 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp. ในสภาวะที่เหมาะสม.....	27
3.5.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วย Colorimetric method.....	27
3.5.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์	28
3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Lowry method.....	28
3.5.7 การทดสอบการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม.....	28
3.5.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง	29
3.5.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	31
4.1 ผลการจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.	31
4.1.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา	31
4.1.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น.....	31
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถ ผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น	35
4.3 ผลการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp. ในสภาวะที่เหมาะสม.....	38
4.4 ผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์	39
4.5 ผลการทดสอบการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม	40
4.5.1 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์	40
4.5.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม	41
4.5.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิ.....	43
4.6 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง.....	44
4.6.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography	44
4.6.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography.....	45
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	46
5.1 สรุปผลการวิจัย	46
5.2 ข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	55
ภาคผนวก ข สารเคมี.....	60
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	62
ภาคผนวก ง สูตรคำนวณ.....	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก จ ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน	66
ภาคผนวก ฉ ผลการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น	67
ภาคผนวก ช ผลการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม	72
ภาคผนวก ซ ผลการวิเคราะห์ดัชนีเอนไซม์.....	73
ภาคผนวก ฌ ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์.....	74
ภาคผนวก ฎ ข้อมูลดิบของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร.....	75
ภาคผนวก ฏ ข้อมูลดิบของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	80
ภาคผนวก ก ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	83



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ทางการค้า.....	9
2.2 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส.....	12
3.1 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.	24
3.2 คุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.	25
3.3 การอ่านผลการทดสอบ Oxidative/Fermentative.....	26
4.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	32
4.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น.....	35
4.3 การเปรียบเทียบของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ ของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท.....	42
ข.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate ในอัตราส่วน ระหว่างสารละลาย A และ B ที่ pH ต่างๆ.....	61
ค.1 การเจือจาง p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	62
ค.2 การเจือจาง Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	63
จ.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่ร้อยละความอิ่มตัวต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส.....	66
ช.1 ค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท.....	73
ฌ.1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท.....	74
ญ.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.....	75
ฎ.1 ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ของแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.....	80
ฏ.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท.....	83
ฏ.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท.....	85
ฏ.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของ แบคทีเรียในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.....	87
ฏ.4 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการไดอะไลซิสของ แบคทีเรียในกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp.....	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน	3
2.2 การจัดจำแนกชนิดของตัวเร่งปฏิกริยา.....	4
2.3 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์.....	9
2.4 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์.....	10
2.5 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์.....	10
2.6 ลักษณะของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp. ที่ย้อมด้วยสี Gram Stain กำลังขยาย 1000 เท่า ..	13
2.7 การแยกสารของโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง และหลังการแยกสาร	15
2.8 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.....	15
2.9 ชนิดของคอลัมน์ (ก) Packed column (ข) Capillary column	16
2.10 รูปแบบ Detector ของ Gas Chromatography	17
4.1 ผลการทดสอบบนอาหาร MP-3 agar ของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท.....	36
4.2 ผลการทดสอบบนอาหาร Tributyrin agar ของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท	37
4.3 ดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp. ที่เจริญบนอาหาร Tributyrin agar	38
4.4 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Pseudomonas</i> sp. ที่เจริญในสภาวะที่เหมาะสม	39
4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยศึกษาปริมาณเอนไซม์	41
4.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม.....	43
4.7 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยการศึกษาร้อยละของไขมัน.....	44
4.8 ผลวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography ของการผลิตไบโอดีเซล ในสภาวะที่เหมาะสม (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรีย ไอโซเลท BG2015 (2) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรีย ไอโซเลท BG2018 ที่ปริมาณร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอล ต่อน้ำมันปาล์ม 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	45
4.9 โครมาโทแกรมของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค Gas Chromatography.....	45
ค.1 กราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร.....	62
ค.2 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	63
ค.3 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเมทานอล	64
ฉ.1 ผลการเจริญบนอาหาร Tyrptic soy agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	67
ฉ.2 ผลการเจริญบนอาหาร Tyrptic soy agar ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส.....	67
ฉ.3 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ฉ.4 ผลการทดสอบซีเตรท.....	68
ฉ.5 ผลการทดสอบ Oxidative/Fermentative	69
ฉ.6 ผลการทดสอบออกซิเดส.....	70
ฉ.7 ผลการทดสอบคะตะเลส.....	70
ฉ.8 ผลการทดสอบการย่อยแป้ง.....	71
ช.1 ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ แบคทีเรียรหัส BG2015 และ BG2018.....	72



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันทุกประเทศประสบปัญหาภาวะโลกร้อน ทำให้หลายประเทศมีความตื่นตัวในการลดใช้พลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล โดยการเปลี่ยนมาใช้พลังงานทดแทนหรือพลังงานหมุนเวียน ประเทศไทยมีการจัดทำแผนแม่บทพลังงานทดแทน 15 ปี ซึ่งมีการให้ความสำคัญทั้งหมด 3 ด้าน ได้แก่ ด้านความมั่นคงทางพลังงาน ด้านเศรษฐกิจ และด้านสิ่งแวดล้อม โดยหนึ่งในแผนทางด้านความมั่นคงทางพลังงานได้ส่งเสริมให้มีการใช้ไบโอดีเซล (แผนพัฒนาพลังงานทดแทน และพลังงานทางเลือก, 2558) ซึ่งเป็นการนำวัตถุดิบที่มาจากพืช เช่น ปาล์ม อ้อย มันสำปะหลัง เป็นต้น มาผลิตเป็นไบโอดีเซลเพื่อเป็นการส่งเสริมการผลิตพลังงานจากวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศได้เต็มตามศักยภาพ เพื่อลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ และเพื่อให้สามารถบรรลุเป้าหมายของแผนพลังงานทดแทน 15 ปีในการส่งเสริมการใช้ไบโอดีเซล รวมถึงเกษตรกรจะได้รับผลประโยชน์จากการที่สามารถจำหน่ายผลผลิตได้เพิ่มขึ้น

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่ได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ ที่ผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยในกระบวนการผลิตมีการผสมน้ำมันพืช หรือน้ำมันสัตว์ให้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือเอทานอล จนเกิดเป็นสารเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล (พุดิพัฒน์ และคณะ, 2555) นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และในปฏิกิริยาการเผาไหม้จะได้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ ซัลเฟอร์ และไฮโดรคาร์บอน ในโตรเจนออกไซด์ในปริมาณน้อย (สุกาญดา, 2558) ในปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลสามารถผลิตโดยใช้สารจำพวกกรด ต่าง หรือใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การผลิตไบโอดีเซลในเชิงอุตสาหกรรมมักนิยมใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้จะต้องมีการกำจัดส่วนเกินออก ซึ่งในขั้นตอนดังกล่าวต้องสูญเสียพลังงานในการกำจัด

การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลเริ่มได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย เนื่องจากกลีเซอรอลที่เกิดจากปฏิกิริยาสามารถกำจัดออกได้ง่าย โดยมีการนำเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เช่น *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas* sp. *Candida cyindracea* *Bacillus* sp. และ *Bacillus thermaleovorans* เป็นต้น (จิราวรรณ และคณะ, 2555) เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก เร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะ มีประสิทธิภาพสูง (ปกรณ, 2554) และนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีได้ จากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อม พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 13 ไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ โดยในงานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. จากการคัดแยกแบคทีเรียของ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. และการศึกษาของโชตินันท์ และคณะ (2557) มาทำการศึกษการใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

1.2.3 เพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่น (Thin Layer Chromatography) และแก๊สโครมาโทกราฟี Gas Chromatography

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้จาก ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. จำนวน 2 ไอโซเลท และการศึกษาของ โชตินันท์ และคณะ (2557) จำนวน 11 ไอโซเลท ทำการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สภาวะจากการศึกษาของจารินี และคณะ (2558) เพื่อนำเอนไซม์ไลเปสมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ที่ร้อยละ 10 30 และ 50 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 3:1 4:1 และ 5:1 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 35 45 และ 55 องศาเซลเซียส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.4.2 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ กรด-ด่าง

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

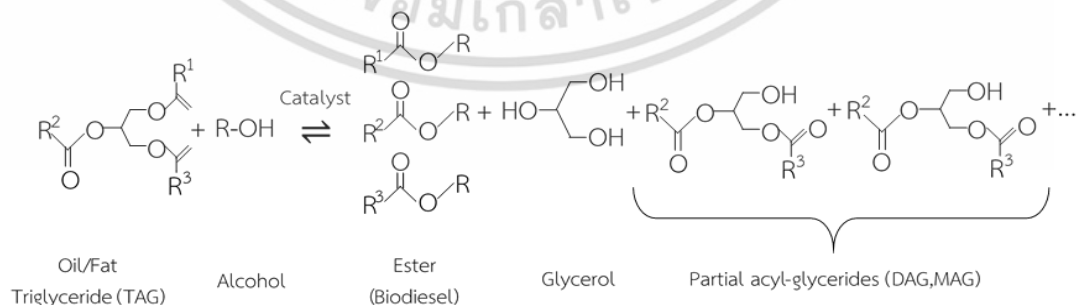
2.1 ไบโอดีเซล (Biodiesel)

ไบโอดีเซล คือ เชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำมันพืชชนิดต่างๆมาสกัดเอายางเหนียว และสิ่งสกปรกออก (degumming) ผ่านกระบวนการทางเคมี เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างไขมันให้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน มักได้มาจากการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์เป็น alkyl ester ของกรดไขมันด้วยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือที่เรียกว่าแอลกอฮอล์ไลซิส (Ghisleri และคณะ, 2017) โดยไตรกลีเซอไรด์จะทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น (เอทานอล หรือเมทานอล) ในตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี หรือเอนไซม์ (Fan และคณะ, 2016) ซึ่งไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเครื่องยนต์ (พิสมัย และคณะ, 2549)

ดังนั้นไบโอดีเซล คือ เชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตได้จากการนำน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ทานตะวัน สบู่ดำ หรือน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้วมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ร่วมกับเมทานอล หรือ เอทานอลจนเกิดเป็นสารเอสเทอร์ ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล สามารถนำมาใช้งานในเครื่องยนต์ดีเซลได้เป็นอย่างดีโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ และยังได้กลีเซอรอลและกรดไขมันเป็นผลพลอยได้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งจำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดผลผลิตเร็วและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน คือ ปฏิกิริยาที่เกิดจากการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ ได้แก่ เมทานอลหรือเอทานอล โดยมีกรด ต่างหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ซึ่งก็คือน้ำมันดีเซลชีวภาพ และมีกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Szybist และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ที่มา : Szybist และคณะ (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ตัวเร่งปฏิกิริยาจำแนกได้ 3 ชนิดโดยพิจารณาจากสถานะของตัวเร่งปฏิกิริยากับสถานะของสารตั้งต้น ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดแรกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีสถานะแตกต่างจากสารตั้งต้น หรือไม่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันเรียกว่า ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดวิวิธพันธุ์ (heterogeneous) ชนิดที่สองคือตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเอกพันธุ์ (homogeneous) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ไม่มีขอบเขตของสถานะโดยสถานะของสารตั้งต้นสามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนชนิดที่สามคือ ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดวิวิธพันธุ์-เอกพันธุ์ (hydrogenized homogeneous catalyst) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเอกพันธุ์แต่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีขนาดใหญ่ เช่น เอนไซม์ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีน มีโมเลกุลขนาดใหญ่ อีกทั้งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะและมีอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาสูง การจำแนกชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 2.2 (วิทยา, 2554)



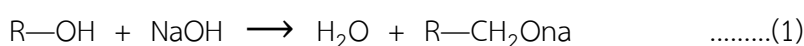
รูปที่ 2.2 การจำแนกชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : วิทยา (2554)

การนำตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะช่วยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีและผลิตภัณฑ์ดีขึ้น โดยชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมกันทั่วไปมีดังนี้

2.2.1.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (Base Catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งควรใช้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือเอทานอล โดยน้ำมันที่ใช้จะเป็นชนิดใดก็ได้เช่น น้ำมันดิบ (Crude Oil) น้ำมันที่ใช้แล้ว เป็นต้น ก่อนทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันควรเปลี่ยนจากรูปเบส (NaOH, KOH) ไปเป็นในรูปของสารประกอบ อัลคอกซี (alcoxy) ก่อน โดยการเตรียมสารประกอบอัลคอกซีดังแสดงในสมการที่ (1) (Marchetti และคณะ, 2007)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด (Acid Catalyst)

กรดที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะทำให้ได้ผลผลิตคือน้ำมันไบโอดีเซลในปริมาณมากแต่ปฏิกิริยาจะเกิดช้ามาก อาจจะใช้เวลามากกว่า 1 วันกว่าปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดสามารถใช้ได้ดีกับกลีเซอไรด์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและน้ำในปริมาณสูงได้เช่น ในน้ำมันที่ใช้แล้วเป็นต้น (Fukuda และคณะ, 2001)

2.2.1.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (Biocatalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่นิยมนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล คือ ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลสที่พบในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์บางชนิด (Sztajer และ Maliszewska, 1988) ซึ่งการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานแต่มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่กำจัดยาก ไม่สิ้นเปลืองพลังงานเพราะใช้อุณหภูมิต่ำในการทำปฏิกิริยา และมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาสูง นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สามารถนำมาใช้กับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้อีกด้วย (Marchetti และคณะ, 2007)

2.2.2 ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

สภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน ซึ่งเห็นได้ว่าปัจจัยที่มีผลกระทบบต่อการทำปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ ความดัน อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาโดยอิทธิพลของแต่ละตัวแปรมีรายละเอียด ดังนี้

2.2.2.1 อุณหภูมิและความดัน

อุณหภูมิและความดันถือเป็นตัวแปรสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาโดยตรง เนื่องจากการเพิ่มพลังงานจลน์ภายในโมเลกุลทำให้สารตั้งต้นทำปฏิกิริยากัน ไบโอดีเซลจะเกิดขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสมักนิยมใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาใกล้จุดเดือดของแอลกอฮอล์ คือ ประมาณ 65 องศาเซลเซียส (Liu และคณะ, 2008) โดยทั่วไปการทำปฏิกิริยาจะมีการให้ความดันกับระบบเล็กน้อย 2-3 ความดันบรรยากาศ เพื่อพยายามทำให้เมทานอลกลั่นตัวอยู่ในสภาวะของเหลวให้มากที่สุด สำหรับการทำให้ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดวิกฤตของแอลกอฮอล์ (ประมาณ 240-270 องศาเซลเซียส) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีในระยะเวลาสั้น 15 นาที โดยไม่ต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในเฟสเดียวกันที่สภาวะดังกล่าวและประกอบกับสภาวะอุณหภูมิที่สูงทำให้เกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว (Imahara และคณะ, 2008) แต่อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันไม่ควรมีค่าสูงเกิน 300 องศาเซลเซียส เพราะจะเกิดการแตกตัวของผลิตภัณฑ์ และมีการเปลี่ยนจากไอโซเมอร์แบบ *cis* เป็น *trans* ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 350 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสารตั้งต้นที่มีพันธะคู่มากซึ่งมีความไม่อิ่มตัวสูง (Demirbas, 2009)

2.2.2.2 อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน

แอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยเริ่มต้นที่น้ำมันปริมาณ 1 โมล จะใช้แอลกอฮอล์ปริมาณ 3 โมล แต่ทั่วไปแล้วจะนิยมใช้ปริมาณแอลกอฮอล์มากเกินไป เพื่อเป็นการผลักดันให้ปฏิกิริยาเกิดในทิศทางของผลิตภัณฑ์มากขึ้น จากการทดลองของ Soriano และคณะ (2009) พบว่าที่สภาวะ 75 องศาเซลเซียส ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดร้อยละ 5 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 18 ชั่วโมง ศึกษาที่อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 6:1 12:1 24:1 42:1 พบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 6:1 ได้ผลผลิตไบโอดีเซลสูงสุดที่ร้อยละ 86 และถ้าอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันมากกว่า 42 :1 จะทำให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้ลดลงเพราะการเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยาเจือจางลง โดยส่วนใหญ่แอลกอฮอล์ที่นิยมใช้ คือ เมทานอล เพราะหาง่ายและราคาถูก ทำให้ต้นทุนต่ำ สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดี

2.2.2.3 ชนิดและปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา

การเลือกชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบเป็นหลัก และปริมาณของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาส่งผลอย่างมากต่อร้อยละการเกิดผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสนิยมกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดเพราะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็วกว่า แต่จากงานวิจัยของ Ramadhans และคณะ (2005) ได้นำสารตั้งต้นที่มีกรดไขมันอิสระเจือปนทดลองศึกษาปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อยละ 0.3-1 โดยน้ำหนักน้ำมัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 45 ± 5 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 9:1 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 30 นาที พบว่าปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อยละ 0.5 ได้ผลผลิตไบโอดีเซลมากที่สุดประมาณร้อยละ 98 และลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาเพราะอาจจะมีสบู่เกิดขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดจะเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสแต่เหมาะสำหรับน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระปนเปื้อน ในการใช้งานยังสามารถเลือกใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่อยู่ในสถานะเดียวกับสารตั้งต้น คือของเหลวเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเอกพันธ์ หรือสามารถเลือกใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์ มักเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็ง สามารถทำการแยกออกได้ง่ายหลังการทำปฏิกิริยา (Sun และคณะ, 2010)

2.2.2.4 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

Freedman และคณะ (1984) พบว่าอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันขึ้นอยู่กับเวลา โดยในตอนต้นปฏิกิริยาจะเกิดค่อนข้างช้า เนื่องจากการผสมและกระจายตัวของแอลกอฮอล์ในน้ำมัน แต่หลังจากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นค่อนข้างรวดเร็ว จากนั้นจะคงที่ถึงแม้ระยะเวลาจะเพิ่มมากขึ้น โดยระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของตัวเร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิดมีดังนี้ ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบกรดจะใช้ช่วงระยะเวลา 300-4,140 นาที ซึ่งนานกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเบสซึ่งมีระยะเวลา 30-180 นาที เพื่อให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซลร้อยละ 95-100 และการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเอนไซม์จะใช้ระยะเวลานานถึง 480-3600 นาที ส่วนการทำปฏิกิริยาในสภาวะเหนือวิกฤตจะใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด คือ 25-40 นาที

2.2.2.5 การใช้ตัวทำละลาย

การใช้ตัวทำละลายเข้าช่วยสามารถลดการใช้อุณหภูมิสูงและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาได้ การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเบส (โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์) สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน (THF) ไม่ต่ำกว่า 10% ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมทิลบิวทิลอีเทอร์ (TMBE) ไดเอทิลอีเทอร์ (DEE) ไดมethylอีเทอร์ (DME) หรือเตตระไฮโดรฟูแลน (THF) ที่สภาวะการเขย่าความถี่ 2.6 เฮิร์ตส์ เวลาการทำปฏิกิริยา 10 นาที ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา โฟแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักน้ำมัน และเมื่อเทียบตัวทำละลายทั้งหมดพบว่าร้อยละไบโอดีเซลจะเพิ่มขึ้นผกผันกับค่าความหนืดของตัวทำละลายโดยไดเมทิลอีเทอร์ มีประสิทธิภาพมากที่สุด ให้ปริมาณไบโอดีเซลถึงร้อยละ 80 แต่ถ้าไม่ใช้ตัวทำละลายจะได้ผลผลิตไบโอดีเซลเพียงเล็กน้อยร้อยละ 60 นอกจากนี้ถ้าอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันดอกทานตะวันเพิ่มขึ้น อิทธิพลของตัวทำละลายจะลดลง ถ้าเพิ่มอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 8:1 ร้อยละไบโอดีเซลที่เกิดขึ้นโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันจะไม่มี ความแตกต่าง และให้ผลผลิตร้อยละ 99 เนื่องจากเมทานอลมีส่วนช่วยในการทำละลายด้วยทำให้ น้ำมันและเมทานอลผสมกันได้ดีขึ้น (Guan และคณะ, 2009)

Pena และคณะ (2009) ได้วิจัยการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมันละหุ่ง และใช้ตัวทำละลายคือ เฮกเซน จากผลการทดลองพบว่าถ้าไม่มีการเพิ่มตัวทำละลายร้อยละ 15 โดยปริมาตร ส่งผลให้เกิดไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 15 โดยปริมาตร ส่งผลให้เกิดไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 93.7 โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเบส คือ โซเดียมเมทอกไซด์ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลและน้ำมันคือ 6:1 และใช้เวลาทำปฏิกิริยา 30 นาที

2.3 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส (lipase, glycerol ester hydrolase, EC.3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในอุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อมที่สามารถเร่งปฏิกิริยาหลักๆได้หลายชนิด เช่น การย่อยสลาย การสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ ซึ่งประกอบด้วย การย่อยสลายด้วยกรด (acidolysis) การย่อยสลายด้วยแอลกอฮอล์ (alcoholysis) การแลกเปลี่ยนหมู่เอสเทอร์ (ester-exchange) และการสลายของหมู่อะมิโน (aminolysis) เป็นต้น (Yamane และคณะ, 1987) โดยแหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ เช่น ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง และไลเปสจากตับอ่อน เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะกับหมู่เอสเทอร์ที่มีโซ่คาร์บอนสายยาว ในกรณีการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีคาร์บอนสายยาว เอนไซม์ไลเปสจะทำงานได้เฉพาะบริเวณที่น้ำมันสัมผัสกับน้ำเท่านั้นเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจะต้องละลายอยู่ในเฟสของน้ำ ขณะที่น้ำมันไม่ละลายในน้ำ (อรัญ, 2555) ปัจจุบันสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณมากและมีความคงตัวดีได้จากจุลินทรีย์ เช่น *P. fluorescens*, *Candida rugosa* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์สำคัญในเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของไขมันซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต จึงพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นต้น

2.3.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Animal lipases)

พบได้ทั้งใน เนื้อเยื่อสัตว์ และอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้ หัวใจ ไต กล้ามเนื้อ และสมอง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบไลเปสในน้ำมันสัตว์ ไลเปสจากตับอ่อนมี 2

รูปแบบ คือ ไลเปส-เอ และ ไลเปส-บี นอกจากนี้ไลเปสแล้วยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งช่วย ไลเปสในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (Shahani, 1975)

2.3.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อพืช ผัก ผลไม้ และในเมล็ดพืช โดยส่วนใหญ่จะพบในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโอ๊ต ข้าว ข้าว ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และเมล็ดคละหุ้ง เป็นต้น Shahani (1975) ศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดคละหุ้งพบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์จะอยู่ในช่วงเป็นกรดและได้รายงานการใช้เอนไซม์ไลเปสจากข้าวสาลีในรูปสารละลายเข้มข้นแต่ไม่มีรายงานการใช้เอนไซม์จากข้าวสาลีในรูปสารละลายบริสุทธิ์

2.3.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

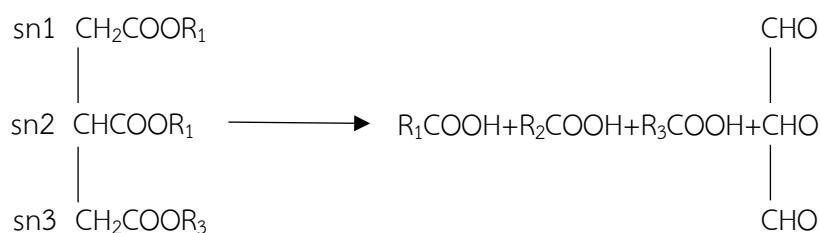
ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ละชนิดผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดผลิตอัลคาไลน์ไลเปส (Alkaline lipase) เช่น *Alcaligenes* sp. No 679 บางชนิดผลิตนิวทรัลไลเปส เช่น *Chromobacterium* sp. และบางชนิดผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ เช่น *Humicola lanuginosa* นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถผลิตไลเปสได้หลายชนิดที่มีสมบัติแตกต่างกัน เช่น *Saccharomyces lipolytica* สามารถผลิตไลเปส I ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสมที่ 8.2 และไลเปส II ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสมที่ 8.0 (Ota และคณะ, 1982) จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ ประหยัดพื้นที่ในการผลิต ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยว สามารถแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสได้จากแหล่งต่างๆ มากมาย ซึ่งดินเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสได้จำนวนมาก เช่น *Penicillium citrinum*, *Pseudomonas* sp. และ *Aspergillus terreus* นอกจากนี้ยังสามารถพบจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในเนยแข็ง ผลปาล์ม และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม อีกทั้งมีปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์สูง และไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน สำหรับแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ทางการค้า (ตารางที่ 2.1) ซึ่งมีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง เครื่องหนัง และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น

2.3.2 ชนิดของเอนไซม์ไลเปส

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

2.3.2.1 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมัน และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังแสดงในรูปที่ 2.3 แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารมัธยันตร์ในปฏิกิริยาได้ เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacteria acnes* และ *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 2.3 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์
ที่มา : Macrae (1983)

ตารางที่ 2.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ทางการค้า

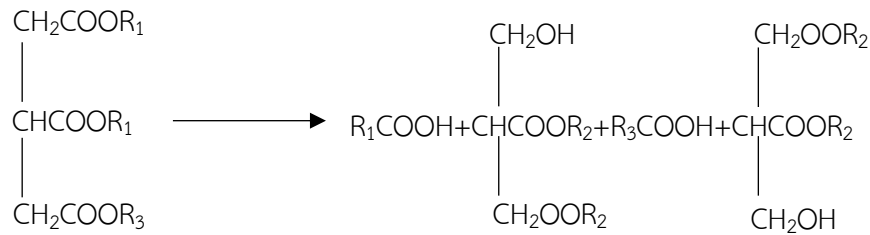
ชนิดของจุลินทรีย์	แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	การใช้ประโยชน์	บริษัทที่ผลิต
รา	<i>Candida rugosa</i>	สังเคราะห์สารอินทรีย์	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	สังเคราะห์สารอินทรีย์	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
แบคทีเรีย	<i>Burkholderia cepacia</i>	สังเคราะห์สารอินทรีย์	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	สารชำระล้าง	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	สารชำระล้าง	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	สังเคราะห์สารอินทรีย์	Asahi, Biocatalyst

ที่มา : Sharma และคณะ (2001)

2.3.2.2 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้เมื่อย่อยโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์จะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่คงตัว หากมีการบ่มเป็นเวลานานจะเกิดการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ แล้วต่อมาจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกรดไขมันกับกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2.4 เอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicans* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์
ที่มา : Macrae (1983)

2.3.2.3 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปมีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geotrichum candidum* จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมัน *cis* พันธะคู่ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่ถ้าเป็นกรดไขมันอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 9 จะย่อยได้ไม่ดี และเอนไซม์ไลเปสจาก *Botrytis cinerea* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว ดังแสดงในรูปที่ 2.5

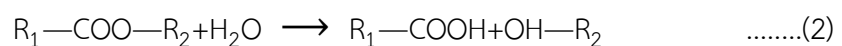


รูปที่ 2.5 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์
ที่มา : Macrae (1983)

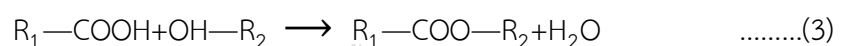
2.3.3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 แบบ ได้แก่ การย่อยสลายเอสเทอร์ การสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ (Yamane และคณะ, 1987)

2.3.3.1 การย่อยสลายเอสเทอร์ เป็นปฏิกิริยาการเติมน้ำที่พันธะเอสเทอร์



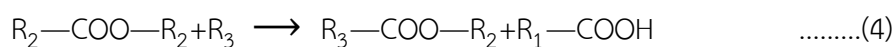
2.3.3.2 การสังเคราะห์เอสเทอร์ เป็นปฏิกิริยาผันกลับของการย่อยเอสเทอร์ คือ การดึงน้ำออกจากปฏิกิริยา ซึ่งจะเกิดได้ดีในสภาวะที่มีน้ำน้อยหรือไม่มีน้ำ



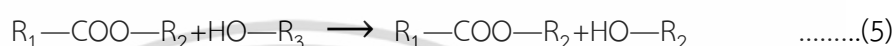
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.3 การย้ายหมู่เอสเทอร์

1. Acidolysis คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันด้วยกรดหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นกรดไขมันชนิดสายกลาง ดังแสดงในสมการที่ (4)



2. Alcoholysis คือ ปฏิกิริยาเปลี่ยนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์เป็นเอสเทอร์ตัวใหม่ หรือโมโนแอลคิลเอสเทอร์ และกลีเซอรอล ดังแสดงในสมการที่ (5)



3. Ester exchange (Intereaterification) คือ ปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมันหรือสารที่ประกอบด้วย Fatty Acid Esters กับกรดไขมัน แอลกอฮอล์หรือเอสเทอร์อื่นที่มีการแลกเปลี่ยนกรดไขมัน ทำให้เกิดเอสเทอร์ ชนิดใหม่ ผลจากการอินเทอร์เอสเทอริฟายน์ทำให้คุณสมบัติไขมันและน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป ดังแสดงในสมการที่ (6)



เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีหลายชนิดและมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกเอนไซม์ไลเปสไปใช้ประโยชน์จึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของไลเปสในการทำปฏิกิริยาและมีการนำไปใช้ประโยชน์ตามความจำเพาะของเอนไซม์ (ตารางที่ 2.2)

2.4 เชื้อ *Pseudomonas* sp.

ในปี ค.ศ. 1882 Gessard ค้นพบ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีความรุนแรงต่ำ เป็นสิ่งมีชีวิตที่แพร่หลายโดยมีความต้องการสภาพแวดล้อมที่ความชื้นเป็นหลัก เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำและดิน สายพันธุ์ *Pseudomonal* ถูกพบในดิน น้ำ พืชและสัตว์ มีรายงานว่าอาณานิคมของเชื้อ *P. aeruginosa* เกิดขึ้นได้มากกว่า 50% ของมนุษย์ โดยเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในกลุ่ม *pseudomonal* ในโตเมนแบคทีเรียการจัดกลุ่ม และการระบุชนิด (Identification) ของแบคทีเรียต้องอาศัยคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่าง รูปแบบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อการติดสีย้อมแกรม เป็นต้น ลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ โครงสร้างทางเคมีของเซลล์ ความต้องการสารอาหาร กระบวนการเมตาโบลิซึมภายในเซลล์ (ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท โปรตีน และไขมัน เป็นต้น) ความต้องการทางกายภาพ (ความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง) และคุณสมบัติของดีเอ็นเอ (ได้แก่ การหาปริมาณของกัวนีน ขนาดของจีโนม) ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในการจับคู่กันใหม่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและไม่เหมาะสม ตลอดจนความสามารถในการทนต่อความร้อน เป็นต้น นอกจากนี้การใช้คุณสมบัติของดีเอ็นเอสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ถึงระดับชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

ความจำเพาะ	แหล่งของเอนไซม์
Regio specificity	
1,3-Regioselective	<i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Porcine pancreatic lipase</i>
Non specific	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Chromobacterium viscocum</i> , <i>Candida rugosa</i>
Fatty acid specific	
Long chain poly-unsaturated acids	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Candida rugosa</i>
Saturated acids	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Cis-9</i> Unsaturated acid	<i>Geotrichum candidum</i> B
Short acid	<i>Cuphea</i> sp.
Acylglycerol specific	
Monoacylglycerols	Potato acrylhydrolase (Patatin)
Mono- and Diacylglycerols	<i>Penicilium camembertii</i> , <i>Penicilium cyclopium</i> M1, <i>Fusarium</i> sp.
Triacylglycerols	<i>Penicilium roqueferti</i> , <i>Penicilium expansum</i> , <i>Penicilium cyclopium</i> M1

ที่มา : Diks และ Bosley (2000)

จากหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 ค.ศ. 2005 จัดสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต 2 โดเมน ได้แก่ อาเคีย และ แบคทีเรีย จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จัดเป็นพวก rRNA homology กลุ่มที่ 1 อยู่ใน subclass γ ของ proteobacteria มีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: *Pseudomonas*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Pseudomonas* spp. มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรง หรือโค้งเล็กน้อย มีขนาด 0.5-1.0 x 1.5-5.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น บางสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาข้างไม่สร้างสปอร์ มีค่าโมลเปอร์เซ็นต์ G + C ของ DNA เท่ากับ 58-70 (Palleroni, 1984).

เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งของอิเล็กตรอน สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน (นันทนา, 2537) ในสภาวะต้องการอากาศจะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ สร้างพลังงานแบบออกซิเดทีฟฟอสโฟไรเลชัน จึงให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส ยกเว้น *Pseudomonas luteola* และ *Pseudomonas oryzae* (Versalovic และคณะ, 2011) และในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ไม่หมักน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นเมื่อทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสแบบออกซิเดทีฟ หรือเฟอร์เมนทีเพทีฟ จึงให้ผลเป็นแบบออกซิเดทีฟ (นันทนา, 2537) นอกจากนี้เชื้อ *Pseudomonas* ยังมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonad ได้แก่ *Burkholderia*, *Xanthomonas* และ *Zoogloea* เป็นต้น มีลักษณะเป็นท่อนตรง หรือโค้ง ติดสีแกรมลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น ไม่สร้างสปอร์แบคทีเรียใน Family Pseudomonadaceae บางชนิดสามารถก่อโรคในคนได้ เช่นเดียวกับแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae แต่มีข้อแตกต่างกันคือ Family Enterobacteriaceae สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับ Family Pseudomonadaceae.



รูปที่ 2.6 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่ย้อมด้วยสี Gram Stain กำลังขยาย 1,000 เท่า

เชื้อ *Pseudomonas* sp. และไรโซแบคทีเรียหลายชนิดอาศัยในดินบริเวณรากพืช เป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในดิน เพราะสามารถอยู่อาศัยร่วมกับพืชได้ยังให้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในดิน มีรายงานการใช้ไรโซแบคทีเรียหลายชนิดควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* และ *Arthrobacter* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ ย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราได้ (Basha และ Ulaganathan, 2002) กลไกการควบคุมทางชีวภาพของแบคทีเรียเหล่านี้ ได้แก่ การผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ย่อยไฮโดรเจนไซยาไนด์ ไฮเดรอร์โรฟอร์ หรือ การแก่งแย่งแข่งขันสารอาหารและการเข้าครอบครองพื้นที่ เป็นต้น (Chaiharu และคณะ, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซล

2.5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin-layer chromatography; TLC)

โครมาโทกราฟีชนิดแผ่นระนาบ (Planar Chromatography) ได้แก่ โครมาโทกราฟีชนิดกระดาษ และโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ซึ่งนิยมใช้มากในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร หรือความบริสุทธิ์ของสารโดยเปรียบเทียบตำแหน่งของจุดหรือแถบของตัวอย่างที่ปรากฏบนแผ่นระนาบกับตำแหน่งสารมาตรฐานที่ได้จากกระบวนการโครมาโทกราฟีในสภาวะเดียวกัน รวมทั้งในปัจจุบันยังมีการประยุกต์ใช้โครมาโทกราฟีชนิดแผ่นระนาบในการวิเคราะห์เชิงปริมาณอีกด้วย

ข้อมูลที่ได้จากการแยกด้วยโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นระนาบจะปรากฏในลักษณะของจุดหรือแถบต่างๆซึ่งเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่แตกต่างกันบนแผ่นระนาบ นับจากตำแหน่งเริ่มต้นที่ทำการจุด (spot) สารตัวอย่าง และมีแนวของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase front) ปรากฏนำหน้าจุดต่างๆเหล่านั้น (Rouessac และคณะ, 2007)

การบอกตำแหน่งจุดขององค์ประกอบแต่ละชนิด นิยมใช้ค่า Retardation factor (R_f) ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration) ขององค์ประกอบชนิดนั้นเทียบกับวัฏภาคเคลื่อนที่ หรืออาจคำนวณได้ดังสมการที่ (7)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}} = \frac{x}{x_0} \dots\dots\dots(7)$$

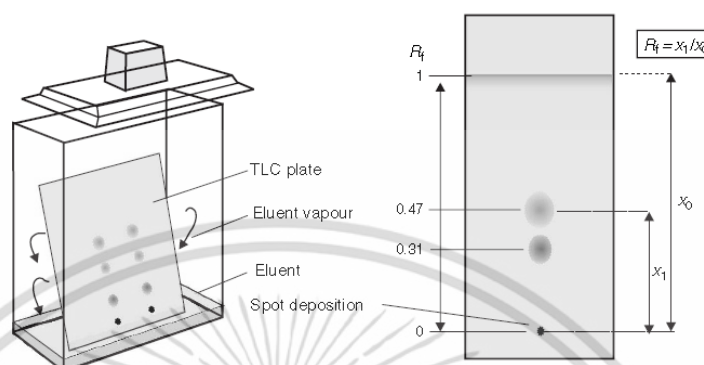
โครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางเป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว สะดวก และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม

หลักการของโครมาโทกราฟีแผ่นบางจะคล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ต่างกันเพียงโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางวัฏภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระดาษ แผ่นอลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกบางๆ สารจะถูกแต้มไว้ใกล้ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะที่ใส่วัฏภาคเคลื่อนที่ไว้ตื้นๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้นด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวอย่างเช่น หากใช้ซิลิกาเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่แต่ถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งได้น้อยจึงเคลื่อนที่ได้ดี ด้วยระยะที่มากกว่าสารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัฏภาคนิ่งได้ดี เนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางจึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือเชิงวิเคราะห์มากกว่าเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละองค์ประกอบดังในกรณีของคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังแสดงในรูปที่ 2.7

ประโยชน์ของโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบางนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังรวมถึงการใช้ในการทดสอบหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ โครมาโทกราฟีด้วยตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง ได้แก่ อลูมินา และซิลิกาเจลเช่นเดียวกับที่ใช้ในการทำคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทกราฟี ดังนั้นระบบตัวทำละลายรวมถึงความเร็วเข้าของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้วและ ไม่มีขั้ว จึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ ตัวดูดซับ เป็นอนุมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้วเช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น



รูปที่ 2.7 การแยกสารของโครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง และหลังการแยกสาร

ที่มา : Rouessac และคณะ (2007)

2.5.2 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography; GC)

แก๊สโครมาโทกราฟี (รูปที่ 2.8) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยได้โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง ไอจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas ตาม flow rate ที่ต้องการภายในคอลัมน์บรรจุด้วยสารที่ทำหน้าที่ในการแยก เรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆที่คอลัมน์นี้ด้วยความแตกต่างของสมบัติทางเคมีโครงสร้างน้ำหนักโมเลกุล จุดเดือดสารที่แยกได้ผ่านออกไปสู่ส่วนตรวจวัดทำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าส่งไปยังระบบประมวลผล ซึ่งสามารถคำนวณและรายงานผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ให้ทราบถึงองค์ประกอบหรือเทียบปริมาณของสารตัวอย่างได้ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ



รูปที่ 2.8 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

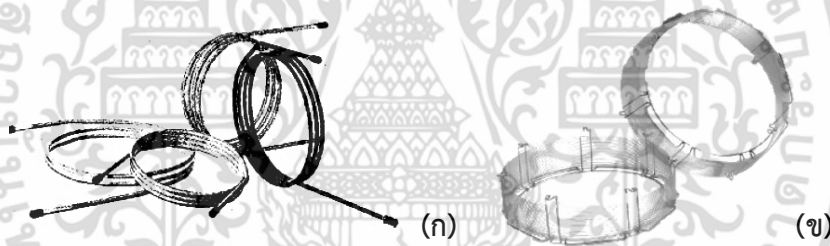
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักการและส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (ต้นกล้า, 2558)

1. แก๊สพา (Carrier gases) มีหน้าที่นำแก๊สตัวอย่างจากจุดฉีด (injection port) ผ่านเข้าสู่คอลัมน์และไปยัง detector แก๊สที่ใช้ร่วมกับเครื่อง GC เป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำ ปฏิกิริยากับ โมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น แก๊สฮีเลียม ไฮโดรเจน หรือไนโตรเจน

2. อินเจคเตอร์ (Injector port) เป็นส่วนที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยทั่วไป ส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) มักจะมีตัวให้ความร้อน (heater) ติดตั้งอยู่ด้วย เพื่อให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอการเลือกใช้งานว่าจะใช้ inlet แบบใดนั้นขึ้นขึ้นอยู่กับสารตัวอย่างหากสารตัวอย่างเป็นแก๊สมักจะฉีดตัวอย่างเข้าไปด้วย gas sampling valve หากสารตัวอย่างเป็นของเหลวโดยมากจะใช้ micro syringe ฉีดสารตัวอย่างขึ้นมาตามปริมาตรที่ต้องการแล้วฉีดผ่าน siliconeseptum ที่ injection port ไปยังปลายของคอลัมน์

3. คอลัมน์ (Column) เป็นส่วนที่ใช้แยกสารตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้กันทั่วไปใน GC นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ packed column และ capillary column แสดงดังรูปที่ 2.9 การเลือกใช้คอลัมน์ แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารผสม ไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน แต่สามารถพิจารณาเลือกจาก catalog ที่บริษัทผู้ผลิตคอลัมน์ออกมาจำหน่าย และค้นคว้าจากงานวิจัยในวารสารด้านโครมาโทกราฟี



รูปที่ 2.9 ชนิดของคอลัมน์ (ก) Packed column (ข) Capillary column

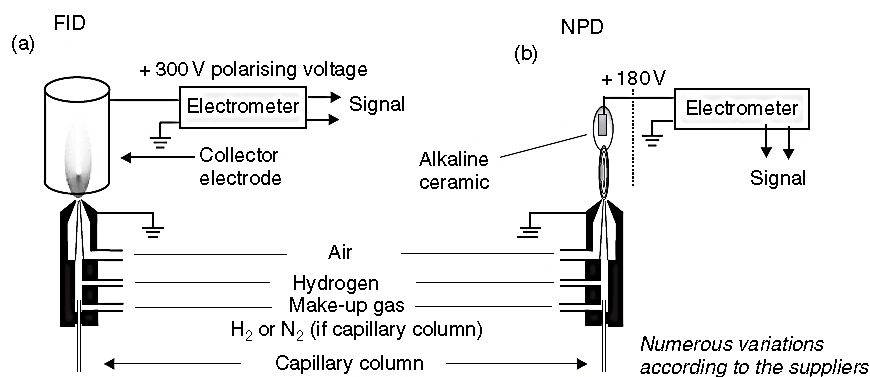
ที่มา : Rouessac และคณะ (2007)

4. ส่วนตรวจวัด (Detector) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารเชิงเดี่ยวที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผลสามารถจำแนกประเภทของส่วนตรวจวัดได้เป็นหลายประเภทตามคุณสมบัติการตรวจวัด โดยรูปแบบตรวจวัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวางและสามารถทำได้ในเครื่อง GC-2014 ได้แก่

4.1 Flame Photometric Detector (FID) ใช้ในการตรวจหาสารประกอบอินทรีย์ (สารประกอบที่มี C-C, C-H bonds)

4.2 Electron Capture Detector (ECD) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ดีในการตรวจหาสารประกอบที่มีแอลอเจินอะตอมเป็น องค์ประกอบ เช่น ยาฆ่าแมลง และยาปราบวัชพืช เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 รูปแบบ Detector ของ Gas chromatography

ที่มา : Rouessac และคณะ (2007)

5. ระบบประมวลผล (Data system) เป็นส่วนที่ ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ซึ่งคำนวณ และรายงานผลเป็น retention time คือเวลาที่สารแต่ละชนิด ใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของของพีคที่ได้จากโครมาโทแกรม retention time สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อระบุว่าเป็นสารชนิดใดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ลักษณะและขนาดของพีคที่ได้จากโครมาโทแกรมใช้ เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภักทรวิทย์ (2559) ศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณภาพของไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ใช้แล้วโดยการดูดซับโดยการนำน้ำมันที่ใช้แล้วมาผลิตเป็นไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับ 2 วิธี ได้แก่ ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณ ร้อยละ 1-3 โดยน้ำหนัก ปริมาณเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 6:1 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 90 นาที และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 60 องศาเซลเซียส และปฏิกิริยาสองขั้นตอน ใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกในปริมาณกรดร้อยละ 1 - 2 โดยน้ำหนัก ปริมาณเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 6:1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 60 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 60 นาที ในขั้นตอนที่สองจะใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณ ร้อยละ 1 - 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 6:1 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 90 นาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไบโอดีเซลไปทำการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ โดยออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken โดยมีตัวแปร 3 ตัว ได้แก่ ปริมาณถ่านกัมมันต์ ร้อยละ 0.5 - 3.5 เวลาที่ใช้ในการดูดซับ 30 - 90 นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการดูดซับ 15 - 55 องศาเซลเซียส พบว่าร้อยละเมทิล-เอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาสองขั้นตอนมีค่ามากกว่าไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน และในส่วนของ การดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์ พบว่าสภาวะการดูดซับที่ดีที่สุดคือ ปริมาณถ่านกัมมันต์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เวลาที่ใช้ในการดูดซับ 38 นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการดูดซับ 56 องศาเซลเซียส สามารถทำให้ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติที่ดีขึ้น คือ ค่ากากตะกอนคาร์บอนที่มีค่าลดลงจากร้อยละ 0.812 ไปเป็นร้อยละ 0.448 และค่าเมทิลเอสเทอร์มีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 94.25 ไปเป็นร้อยละ 96.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภัทรติกรณ์ และสมชาย (2555) วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทอดพืชและสัตว์ที่มีผลต่อการผลิตและคุณภาพของไบโอดีเซล การทดลองได้สุ่มตัวอย่างน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระระหว่าง 0.427 ถึง 1.435% ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล ด้วยกระบวนการทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมัน มีเมทานอลเป็นตัวทำปฏิกิริยาที่มี ปริมาณ 15, 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 30, 60 และ 120 นาที จากการทดลองพบว่าการผลิตไบโอดีเซลที่ระดับกรดไขมันอิสระ 0.427 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ ปริมาณเมทานอล 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีให้ปริมาณ เมทิลเอสเทอร์และร้อยละผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 96.81 และ 97.30 ตามลำดับ แต่สำหรับ การผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ปริมาณเมทานอล 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีที่ระดับกรดไขมันอิสระร้อยละ 0.427 ให้ เปอร์เซ็นต์ FAME ต่อบาทสูงสุด เท่ากับ 3.22 โดยมีร้อยละ FAME มากกว่า 90 พบว่า ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์และร้อยละผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 91.14 และ 85.72 ตามลำดับ

ปกรณ (2554) รายงานว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อใช้ผลิตไบโอดีเซลนั้นมีเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลายเนื่องจากไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพดีได้ อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาของกระบวนการหลังการผลิต นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถใช้อย่างมีประสิทธิภาพกับน้ำมันที่มีคุณภาพแตกต่างกัน รวมไปถึงน้ำมันคุณภาพต่ำหรือน้ำมันเหลือใช้จากการปรุงอาหารซึ่งมีความเป็นกรดค่อนข้างสูง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งไตรเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระให้เป็นโมโนอัลคิลเอสเทอร์ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายที่สูงของเอนไซม์ยังถือเป็นอุปสรรคสำคัญในการประยุกต์นำไลเปสมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นการหมุนเวียนเอาเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่โดยตรึงเอนไซม์ไว้บนวัสดุที่เป็นของแข็งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้การใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยายังช่วยลดกระบวนการหลังการผลิตในขั้นตอนการแยกตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้สามารถแยกออกมาจากส่วนผสมอื่นๆของปฏิกิริยาได้ง่ายโดยการกรอง นอกจากนี้การเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพไม่มีการใช้กรดหรือเบสในปฏิกิริยาจึงไม่ทำให้เกิดน้ำเสียจากการผลิต ทำให้กระบวนการผลิตไบโอดีเซลแบบนี้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าวิธีแบบดั้งเดิม ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส ความจำเพาะต่อส่วนที่เป็นกรดไขมันในน้ำมัน และ ความเสถียรของเอนไซม์เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้

เกษรา (2553) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่เป็นเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้วกับเอทานอล ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปในระบบกะและระบบต่อเนื่อง โดยการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 4 ชนิด คือ เอนไซม์ไลเปสอิสระ, Lipase PS, Lipase AK และ Lipase AY จากเชื้อ *P. cepacia*, *P. fluorescens* และ *Candida rugosa* ตามลำดับ ที่ผ่านการตรึงรูปด้วยตัวพุงแอกคูเรล EP100 กับเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Lipozyme TL IM จากเชื้อ *Thermomysis lauginosa* พบว่า Lipase AY และ Lipase AK มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตเอทิลเอสเทอร์ เนื่องจาก Lipase AY สามารถย่อยสลายน้ำมันให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระได้ร้อยละ 53 ในขณะที่ Lipase AK มีความสามารถในการทรานส์เอสเตอริฟิเคชันให้เกิดเป็นเอทิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นชอบที่จะใช้เอกสารนี้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละ 91 เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปทั้งสองชนิดมาผสมกันเพื่อใช้ในการผลิตระบบกะ พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานร่วมกันได้ดี ให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ ร้อยละ 89 ในสภาวะที่ใช้ Lipase AY ต่อ Lipase AK ที่สัดส่วน 1:1 ในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักน้ำมัน ซึ่งมีน้ำในระบบร้อยละ 2 และสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3 ต่อ 1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และพบว่าการแบ่งเติมเอทานอลครั้งละ 1 เท่าของโมลน้ำมันจำนวน 3 ครั้ง จะให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 91 จากการศึกษาการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าสามารถใช้เอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซลได้ 12 ครั้ง และยังให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ที่มากกว่าร้อยละ 50 การผลิตเอทิลเอสเทอร์โดยเอนไซม์ตรึงรูปผสมในระบบต่อเนื่องแบบกึ่งกะ (fed batch) พบว่าการบรรจุเอนไซม์โดยผสมเป็นเนื้อเดียวกันจะให้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์เฉลี่ยร้อยละ 20 แต่เมื่อแยกคอลัมน์ระหว่าง Lipase AY กับ Lipase AK โดยทำการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วด้วย Lipase AY ก่อน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันได้เป็นอย่างดีส่งผลให้เกิดกรดไขมันอิสระได้มากกว่าร้อยละ 60 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกน้ำออกแล้วนำไปเติมเอทานอลเพื่อผลิตเอทิลเอสเทอร์ด้วย Lipase AK พบว่าเกิดการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้มากกว่าร้อยละ 70 จากการศึกษาคุณสมบัติของเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลและระเหยเอทานอลส่วนเกินออก พบว่ามีค่าความหนืดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ 5.66 เซ็นติสโตก และมีค่าจุดวาบไฟ จุดชุนและจุดไหลเทเท่ากับ 120, 8 และ 6 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ดุขฎี (2549) ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้เชื้อ *P. fluorescens* ที่ทำการตรึงไลเปสโคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันระหว่างน้ำมันเมล็ดทานตะวันกับเมทานอล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ คือ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงร้อยละ 100 โดยน้ำหนักน้ำมัน มีน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 20 โดยน้ำหนักน้ำมัน เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 25 และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะเดียวกันจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 33

ปรเมษฐ์ และสินศุภา (2549) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพื่อทำการย่อยไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันชนิดต่างๆให้เป็นกรดไขมันมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อการสังเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซลชนิดอัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน การใช้เอนไซม์ในลักษณะต่างกันส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์อิสระให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูป และมีการล้างน้ำมันมากกว่าการตรึงรูปเอนไซม์ 3-4 เท่า สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือความเร็วรอบของการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Ali และคณะ (2017) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้ด้วยเมทานอลเพื่อการสังเคราะห์ไบโอดีเซลพบว่ามีประสิทธิภาพมาก ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาใช้ไลเปสบริสุทธิ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และสภาวะที่เหมาะสม คืออุณหภูมิ 44.2 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลเมทานอลต่อน้ำมัน (3.05: 1) ปริมาณไลเปส 0.782 กรัมและความเร็วในการหมุน 170 รอบต่อนาที ระยะบ่ม 24 ชั่วโมง ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์เป็นร้อยละ 85.8 และ 87 ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยในการผลิตเมทิลเอสเทอร์

Kaur และคณะ (2017) การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย 46 สายพันธุ์เพื่อการผลิตไลเปส บนพื้นฐานนี้ 4 สายพันธุ์แบคทีเรียได้แก่ *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus aryabhatai*, *P. aeruginosa* และ *P. fluorescens* ถูกประเมินความสามารถในการผลิตไลเปส ดัชนีการเคลื่อนไหวของเอนไซม์ไลเปส (LAI) ของสายพันธุ์แบคทีเรียที่เลือกมีค่าตั้งแต่ 1.57 ถึง 2.90 โดย ค่าสูงสุดที่พบใน *P. aeruginosa* (2.90) การตรวจพบเชื้อมีฤทธิ์เอนไซม์ไลเปสที่สูงอย่างมีนัยสำคัญของ 726.35, 505.33 และ 355.98 pkat มล.⁻¹ ในน้ำมันมะกอก หยีน้ำ (*Pongamia glabra* seed) และน้ำมันสบูดำ ตามลำดับ ใน 4 สายพันธุ์แบคทีเรีย พบว่า *P. aeruginosa* มีกิจกรรมไลเปสสูงมากในน้ำมันทั้งสามชนิด น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต lipases จากแบคทีเรียตามด้วยน้ำมันหยีน้ำ และสบูดำ การเปลี่ยนน้ำมันมะกอก หยีน้ำ สบูดำและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ 64.2 59.7 57.4 และ 57.9 ตามลำดับ

Alhassan และคณะ (2014) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไขมันฝ้ายและใช้ตัวทำละลายคือ ไดเอทิลอีเทอร์ ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มตัวทำละลายร้อยละ 10 โดยปริมาตร ได้ผลผลิตไบโอดีเซลร้อยละ 70 แต่เมื่อเพิ่มตัวทำละลายเป็นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ได้ไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 97 โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบเบส คือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ อัตราส่วนโดยโมลเมทานอลต่อน้ำมัน 6:1 ใช้เวลาทำปฏิกิริยา 60 นาที การเพิ่มตัวเร่งปฏิกิริยามีอิทธิพลอย่างมากต่อการเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลจากหลายงานวิจัย

Micic และคณะ (2014) พบว่าการใช้แอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาช้าลง และทำให้ร้อยละผลผลิตไบโอดีเซลในระยะเวลาที่เท่ากันลดลงจาก 90 เป็น 77 และ 70 เมื่อใช้เมทานอล เอทานอล และโพรพานอล ตามลำดับ

Lam และคณะ (2013) พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิค่าประมาณอุณหภูมิห้อง (25 และ 30 องศาเซลเซียส) อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน (สาหร่าย *Chlorella vulgaris*) คือ 180:1 กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณของไบโอดีเซลจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นคือ ร้อยละ 5 ถึง 10 หลังทำปฏิกิริยาโดยใช้เวลานานถึง 6 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นที่ 60 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณของร้อยละเมทิลเอสเทอร์สูงถึง 95 อย่างไรก็ตามเมื่อใช้อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส ปริมาณร้อยละของเมทิลเอสเทอร์ลดลงเหลือ 81 อาจเพราะเมทานอลระเหยทำให้ลดความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา

Agarwal และคณะ (2012) ทำการศึกษาช่วง 3:1 ถึง 10:1 ที่สภาวะอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ตัวเร่งปฏิกิริยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง จะพบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันที่ 6:1 จะมีค่าผลผลิตไบโอดีเซลมากที่สุดที่ร้อยละ 98.5 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงที่อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 10:1 ซึ่งได้ผลผลิตไบโอดีเซลที่ร้อยละ 94.1 เพราะปริมาณของแอลกอฮอล์ส่งผลทำให้ความเข้มข้นรวมของสารตั้งต้นลดลงเกิดความเจือจาง จึงทำให้เกิดผลผลิตไบโอดีเซลน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันมากกว่า 9:1 ทำให้แยกกลีเซอรอลยากขึ้นอีกด้วย อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดนั้นจะใช้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดเบส

Charpe และ Rathod (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวัน เหลือทิ้งจากครัวเรือนด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายในถึงปฏิกิริยาแบบกะ โดยทำการทดสอบการใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างๆผ่านปฏิกิริยาทรานส์

เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต และทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน ความเข้มข้นของเอนไซม์ และตัวทำละลายที่ใช้ในการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ พบว่า เชื้อ *P. fluorescens* ให้ผลผลิตที่ได้สูงที่สุด และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อ *P. fluorescens* คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 5 อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 สำหรับวิธีการหลีกเลี่ยงผลกระทบจากการยับยั้งของเมทานอลสามารถทำได้โดยการเติมเมทานอลแบบ 3 ขั้นตอน

Kiran และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. ที่แยกได้จากทะเล พบว่าสามารถใช้ไตรบิวไทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและให้กิจกรรมของไลเปสสูงกว่าการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน

Salis และคณะ (2005) ได้เปรียบเทียบชนิดของแอลกอฮอล์ที่จะใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันไตรโอสีน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *P. cepacia* พบว่าแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ แอลกอฮอล์สายสั้นซึ่งมีหมู่แอลคิลเป็นสายคาร์บอนจำนวน 2-4 ทั้งสายตรงและแตกแขนง ในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่า a_w เท่ากับ 0.432 โดยพบว่าการใช้บิวทานอล ไอโซบิวทานอล โพรพานอลและไอโซเมอร์ของเพนทานอลในการทำปฏิกิริยาสามารถให้ผลผลิตโอเลอิกเอทิลเอสเทอร์กว่าร้อยละ 95 ในขณะที่การใช้เอทานอลจะให้ผลผลิตที่สูงเช่นกันที่ประมาณร้อยละ 90 ส่วนแอลกอฮอล์ทุติยภูมิคือ 2-บิวทานอล (2-butanol) ให้ผลผลิตที่น้อยกว่าปริมาณร้อยละ 85 เนื่องจากผลของการไม่เข้ากันของแอลกอฮอล์กับสารในปฏิกิริยา ส่วนเมทานอลให้ผลผลิตต่ำที่สุดที่ประมาณร้อยละ 40 เนื่องจากการละลายของเมทานอลในน้ำมันจะมีน้อยกว่าอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การเติมแอลกอฮอล์ที่เป็นสายแขนงยังช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของไบโอดีเซลโดยช่วยให้เครื่องยนต์ทำงานได้ดีขึ้นทำให้สามารถใช้ไบโอดีเซลได้ในภูมิภาคที่มีอากาศหนาว

Soumanou และ Bornscheuer (2003) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. fluorescens* ที่ตรึงบนโพลีโพรไพลีน (polypropylene, EP100) ซึ่งเป็นตัวพองที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยใช้สภาวะในการตรึง คือความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.0 พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงร้อยละ 10 โดยน้ำหนักของน้ำมัน ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน ไสโคลเฮกเซน เอ็น-เฮปเทน ไอโซออกเทน อะซีโตน และบิวโทรลีสเมออีเทอร์ พบว่า เฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเฮกเซน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายเข้ากับน้ำได้ดีและไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างของเอนไซม์

Dong และคณะ (1999) พบว่า สภาวะที่เป็นต่างไม่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันมะกอกของไลเปสจาก *Pseudomonas* spp. ซึ่งมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 7.0-9.0 และ 45-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จึงจัดเป็นไลเปสชนิด Alkaline stability lipase ซึ่งไลเปสชนิดนี้มีความคงทนที่ต่ำมากต่อพีเอช 6.0-12.0 แต่เอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853
- 3.1.2 แบคทีเรียรหัส BG2015
- 3.1.3 แบคทีเรียรหัส BG2018
- 3.1.4 แบคทีเรียรหัส KS1001
- 3.1.5 แบคทีเรียรหัส KS1008
- 3.1.6 แบคทีเรียรหัส KS2002
- 3.1.7 แบคทีเรียรหัส KS3003
- 3.1.8 แบคทีเรียรหัส KS3005
- 3.1.9 แบคทีเรียรหัส SN2002
- 3.1.10 แบคทีเรียรหัส SN2006
- 3.1.11 แบคทีเรียรหัส SN2007
- 3.1.12 แบคทีเรียรหัส SS1003
- 3.1.13 แบคทีเรียรหัส SS3005
- 3.1.14 แบคทีเรียรหัส SS3007

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.2.1.1 Nutrient broth (NB)
 - 3.2.1.2 Nutrient agar (NA)
 - 3.2.1.3 Tryptic Soy Broth (TSB)
 - 3.2.1.4 Tryptic Soy Agar (TSA)
 - 3.2.1.5 Motility test
 - 3.2.1.8 Starch agar
 - 3.2.1.7 Simmons Citrate Agar
 - 3.2.1.9 OF Basal medium
 - 3.2.1.10 MP-3
 - 3.2.1.11 Tributyrin Agar
 - 3.2.1.12 Basal medium
- 3.2.2 สารเคมี
 - 3.2.2.1 Iodine solution
 - 3.2.2.2 Oxidase reagent
 - 3.2.2.3 Crystal violet
 - 3.2.2.4 Safanin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.2.5 Hexane
- 3.2.2.6 Ethyl acetate
- 3.2.2.7 Acetic acid/Isopropanol
- 3.2.2.8 สารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8)
- 3.2.2.9 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.6)
- 3.2.2.10 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0)
- 3.2.2.11 p-Nitrophenol
- 3.2.2.12 p-Nitrophenyl palmitate/iodine
- 3.2.2.13 Bovine serum albumin
- 3.2.2.14 Gum Arabic
- 3.2.2.15 Ammonium sulfate
- 3.2.2.16 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.17 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.2.18 Triton X-100
- 3.2.2.19 Tween-80
- 3.2.2.20 Paraffin oil
- 3.2.2.21 น้ำมันไบโอดีเซลมาตรฐานจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา
- 3.2.2.22 น้ำมันปาล์ม

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 งานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.3.2 หลอดทดลอง (Test tube)
- 3.3.3 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 3.3.4 ปีกเกอร์ขนาด 50 250 600 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.3.5 กระจกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.3.6 ขวดปรับปริมาตรขนาด 5 10 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.3.7 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.3.8 ขวดดูแรนขนาด (Duran bottle) 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.3.9 ปีเปตแก้วขนาด 0.1 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.3.10 ไมโครปีเปตขนาด 0.5-10 2-20 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.3.11 ปีเปต ทิป ขนาด 0.5-10 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.3.12 ขวดเก็บสาร (Vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.3.13 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- 3.3.14 96-Well Microplate ยี่ห้อ Costar
- 3.3.15 ขวดสี่ขา
- 3.3.16 จุกยาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 เครื่องมือ

- 3.4.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น High-pressure sterilizer ES-315 ยี่ห้อ Tomy
- 3.4.2 ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ Telstar Bio all Advance
- 3.4.3 ตู้บ่มเพาะเชื้อ รุ่น UN100 ยี่ห้อ Memert
- 3.4.4 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า รุ่น 4230 ยี่ห้อ Innova
- 3.4.5 ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Memert
- 3.4.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น PG-803 ยี่ห้อ Mettler
- 3.4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Z326K ยี่ห้อ Hermle
- 3.4.8 เครื่องสารละลาย รุ่น VORTEX-GENIE2 ยี่ห้อ Scientific Industries
- 3.4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ Shimadzu
- 3.4.10 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครไทเทอร์เพลท รุ่น FLUOstar Omega ยี่ห้อ BMG labtech
- 3.4.11 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ Testo
- 3.4.12 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น GC-2014 ยี่ห้อ Shimadzu

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

นำแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกจากสิ่งแวดล้อมซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก ผศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 และ BG2018 จากงานวิจัยของโชตินันท์ และคณะ (2557) จำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปจัดจำแนกเชื้อดังนี้

3.5.1.1 การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาตามลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียโดยใช้วิธีของ Atta และคณะ (2012) เพื่อระบุเชื้อจำนวน 13 ไอโซเลท โดยทำการตรวจสอบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีของโคโลนี การย้อมสีแกรม รูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย และการเคลื่อนที่ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ผลลัพธ์ที่ได้
สีของโคโลนี	สีเหลือง
การย้อมสีแกรม	-
รูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย	แท่ง
การเคลื่อนที่	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ก. การตรวจสอบลักษณะ และสีของโคโลนี
สังเกตลักษณะ และสีของโคโลนีบนอาหาร TSA ที่บ่มครบระยะ 24 ชั่วโมง
อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมทำการจดบันทึก
- ข. การย้อมสีแกรม และตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย
ทำการย้อมสีแกรมเพื่อดูสีแกรมของแบคทีเรีย และรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย ที่
บ่มครบระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมทำการจดบันทึก
- ค. การทดสอบการเคลื่อนที่
เตรียมอาหารลักษณะกึ่งเหลวที่มีความเข้มข้นของวุ้นประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์
หรือน้อยกว่า ใช้เข็มเขี่ยเชื้อและเชื้อที่ต้องการทดสอบ จากนั้นแทง (stab) ลงบนอาหารลักษณะกึ่ง
เหลว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- การอ่านผล ไม่พบการเจริญของเชื้อออกจากรอยแ่ง = Negative (-)
พบการเจริญของเชื้อออกจากรอยแ่ง = Positive (+)

3.5.2.1 การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น

ทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นโดยดัดแปลงวิธีจาก Casanovas-Massana และคณะ (2010) และ Gaby และ Hadley (1957) เพื่อระบุเชื้อจำนวน 13 ไอโซเลท โดย
ทำการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิที่ 4 และ 42 องศา
เซลเซียส การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test) การทดสอบคะตะเลส (Catalase Test) การ
ทดสอบซิเตรท (Citrate Test) การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch Hydrolysis) และ
การทดสอบ Oxidative/Fermentative ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 คุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

คุณลักษณะทางชีวเคมี	ผลลัพธ์ที่ได้
การเจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	D
การเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	D
การทดสอบออกซิเดส	+
การทดสอบคะตะเลส	+
การทดสอบซิเตรท	+
การทดสอบการย่อยแป้ง	-
การทดสอบ Oxidative/Fermentative	Oxidative

D = แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (Different reaction in different taxa)

- ก. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 4 และ 42 องศาเซลเซียส
ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหารเอียง TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ
4 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผล ไม่พบการเจริญของเชื้อ = Negative (-)
พบการเจริญของเชื้อ = Positive (+)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. การทดสอบออกซิเดส (Oxidase Test)

หยดสารละลาย N,N,N',N' - Tetramethyl - p - phenylenediamine dihydrochloride - 2HCl 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรอง 1 หยด จากนั้นนำเข็มเย็บเยื่อปลายแหลมแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบขีดลงบนกระดาษกรองรอผลประมาณ 15-30 วินาที

การอ่านผล ไม่เกิดสีตามรอยขีดเชื้อ = Negative (-)
เกิดสีม่วงตามรอยขีดเชื้อ = Positive (+)

ค. การทดสอบคะตะเลส (Catalase Test)

ใช้ห่วงเย็บเยื่อปลายกลมแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบแตะลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นหยดสารละลาย Hydrogen peroxide 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมรอยเชื้อที่ต้องการทดสอบ

การอ่านผล ไม่เกิดฟองแก๊ส = Negative (-)
เกิดฟองแก๊ส = Positive (+)

ง. การทดสอบซิเตรท (Citrate Test)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยง Simmons' citrate agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การอ่านผล ไม่เกิดการเปลี่ยนสี = Negative (-)
เปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน = Positive (+)

จ. การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch Hydrolysis)

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหาร Starch agar และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาการบ่มให้นำสารละลายไอโอดีนหยดให้ทั่วผิวหน้าอาหาร จากนั้นสังเกตผล

การอ่านผล ไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี = Negative (-)
เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี = Positive (+)

ฉ. การทดสอบ Oxidative/Fermentative

นำเข็มเย็บเยื่อปลายแหลมแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วแทงลงในอาหาร OF Basal medium จำนวน 2 หลอด โดยหลอดที่ 1 ไม่หยด Paraffin oil (หลอด Aerobic) และหลอดที่ 2 หยด Paraffin oil (หลอด Anaerobic) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การอ่านผลการทดสอบ Oxidative/Fermentative

หลอด Aerobic	หลอด Anaerobic	การอ่านผล
สีเหลือง	สีเขียว	Oxidative
สีเหลือง	สีเหลือง	Fermentative
สีเขียว	สีเขียว	ไม่เกิดปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 13 ไอโซเลท โดยดัดแปลงวิธีจากสุรอรธ และคณะ (2550) ถ่ายแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ลงบนอาหารแข็ง MP-3 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาบ่มทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีบริเวณไฮรอปโคโลนีเป็นสีเหลือง แล้วจุดแบคทีเรียลงบนอาหาร Tributyrin agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-38 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไฮ และโคโลนี นำมาคำนวณหาค่าดัชนีเอนไซม์ดังสมการ

$$\text{ดัชนีเอนไซม์ (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไฮ (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

3.5.3 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ในสภาวะที่เหมาะสม

เตรียมหัวเชื้อโดยการถ่ายแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการปรับหัวเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Basal medium ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ทำการบ่มโดยกำหนดสภาวะตามวิธีของ จารินี และคณะ (2558) ดังนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำอาหารเหลว Basal medium ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง และเก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วย Colorimetric method

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงวิธีจาก Selvakumar และ Sivashamugam (2017) และ Massadeh และSabra (2011) ดังนี้ เตรียมสารละลาย A โดยชั่ง p-Nitrophenyl palmitate ปริมาณ 30 มิลลิกรัม ละลายใน Isopopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย B โดยชั่ง Gum Arabic ปริมาณ 0.1 กรัม และ Triton X-100 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลล์ (pH 8.0) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 10:90 เข้าด้วยกันจะได้เป็นสารละลาย Substrate solution จากนั้นปิเปตตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Substrate solution ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นหยดลงในหลุม 96 well plate ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol

3.5.5 การทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

3.5.5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5 ไอโซเลท ให้ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium ในสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้งเพื่อนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้วิธีของ Kukreja และ Bera (2004) ที่ความอิ่มตัว 0-30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถึงจุดสมดุลนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนตะกอนไว้ และนำสารละลายส่วนใสไปตกตะกอนอีกครั้งที่ความอิ่มตัว 30-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถึงจุดสมดุลนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้จากการอิ่มตัว 0-30 และ 30-80 เปอร์เซ็นต์ มาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล (pH 7.6) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำการเก็บสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

3.5.5.2 การแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส

แยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลทโดยดัดแปลงวิธีจาก Vishwe และ Chowdhary (2015) ดังนี้ นำถุงเซลโลเฟนขนาด 12 เซนติเมตร มาแช่น้ำเพื่อให้ถุงแยกออกจากกัน จากนั้นใช้เส้นด้ายมัดปิดปากถุง และนำสารละลายที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตใส่ถุงเซลโลเฟนแล้วมัดปิดปากถุงให้แน่น นำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล (pH 7.6) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วงเวลาที่ 6 12 และ 18 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บสารละลายโปรตีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Lowry method

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิสของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลทโดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ดังนี้ เตรียมสารละลาย A โดยละลายสาร Sodium carbonate ร้อยละ 2 ในสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมสารละลาย B โดยละลายสาร Copper(II) sulfate pentahydrate ร้อยละ 0.5 ในสารละลาย Sodium potassium tartrate ร้อยละ 1 จากนั้นผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 50:1 จะได้เป็นสารละลาย C จากนั้นทำการเจือจางสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 และใช้ตัวอย่างเอนไซม์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

3.5.7 การทดสอบการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม

นำเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลโดยดัดแปลงวิธีจาก Kupepethkaew และคณะ (2017) และ Guldhe และคณะ (2015) จำนวน 3 ตัวแปร ดังนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7.1 การศึกษาปริมาณเอนไซม์

เตรียมปริมาณเอนไซม์ไลเปสเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่เหมาะสม ได้แก่ 10 30 และ 50 ร้อยละโดยน้ำหนัก ใช้อัตราส่วนระหว่างเมทานอล และน้ำมันปาล์มเท่ากับ 3:1 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบตัวอย่างไปโอติเซลด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography

3.5.7.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอล และน้ำมันปาล์ม

เตรียมอัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอล และน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ได้แก่ 3:1 4:1 และ 5:1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.7.1 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบตัวอย่างไปโอติเซลด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography

3.5.7.3 การศึกษาอุณหภูมิ

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยใช้ อุณหภูมิที่ 35 45 และ 55 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.7.1 อัตราส่วนระหว่างเมทานอล และน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.7.2 บ่มด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดทำการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบตัวอย่างไปโอติเซลด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography

3.5.8 การวิเคราะห์ตัวอย่างไปโอติเซลที่ได้จากการทดลอง

3.5.8.1 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

ตรวจองค์ประกอบตัวอย่างไปโอติเซลโดยใช้วิธีของ Kuepethkaew และคณะ (2017) ดังนี้ เตรียมสารละลาย Mobile phase โดยผสมสารละลาย Hexane Ethyl acetate และ Acetic acid ในอัตราส่วน 90:10:1 จากนั้นตัดแผ่น TLC plate (Silica gel) เป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 5×10 เซนติเมตร โดยมีระยะห่างจากขอบล่าง (Origin line) 1 เซนติเมตร และระยะห่างจากขอบบน (Solvent front line) 0.5 เซนติเมตร ทำการจุดไปโอติเซลมาตรฐานในเลนที่ 1 น้ำมันปาล์มในเลนที่ 2 และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในเลนถัดไปบนเส้นของ Origin line จากนั้นนำแผ่น TLC plate ใส่ลงในแทงค์ที่มีสารละลาย Mobile phase อิมตัวอยู่ รอให้สารละลายเคลื่อนที่จนถึงจุด Solvent front แล้วนำออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเอาไปประเหยด้วยไอโอตินจะเห็นแถบแบนต่างๆ เป็นสีเหลือง

3.5.8.2 การตรวจสอบด้วยเทคนิค Gas Chromatography

ตรวจองค์ประกอบตัวอย่างไปโอติเซลโดยใช้โดยวิธี EN14110 (David และคณะ, 2005) ดังนี้ นำตัวอย่างไปโอติเซลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น GC-2014 โดยผสมตัวอย่างไปโอติเซล และสารละลายไพโรพานอลในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นตั้งค่าสภาวะของระบบโดยใช้คอลัมน์แบบ DB-Wax ขนาด 30 m × 0.25 mm เครื่องตรวจวัด (Detector) แบบ FID อุณหภูมิที่เข้าทางท่อ (Inlet temperature) 250 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีดตัวอย่าง (Injector volume) 1 ไมโครลิตร Split ratio เท่ากับ 1/50 ใช้แก๊สไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแก๊สดำพา (Carrier gas) ความดันของหัวป้อน (Head pressure) 53 กิโลปาสกาล อุณหภูมิของเครื่องตัวตรวจวัด (Detector temperature) 280 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

3.5.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่คำนวณได้ มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) จากโปรแกรม IBM SPSS Statistics เวอร์ชัน 23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

4.1.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการนำแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 มาทำการจำแนกเชื้อตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การตรวจสอบสีของโคโลนี การย้อมสีแกรม รูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย และการเคลื่อนที่ พบว่าสีของโคโลนีจะมีสีขาว เหลือง ผิวเรียบ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีรูปร่างเป็นแท่ง แกรมลบ ติดสีแดงของสีย้อม Safranin และผลการทดสอบการเคลื่อนที่โดยสังเกตลักษณะพุ่งรอบรอยแหว่งในอาหารกึ่งเหลว พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท มีความสามารถในการเคลื่อนที่ สังเกตได้จากอาหารจะมีลักษณะพุ่งรอบรอยแหว่ง เมื่อเทียบคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา กับเอกสารอ้างอิงจากหนังสือ 2nd Edition Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005) ระบุว่ามีความใกล้เคียงกับลักษณะภายนอกของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น




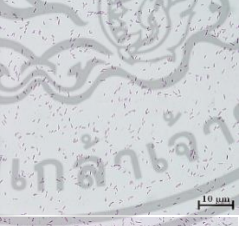

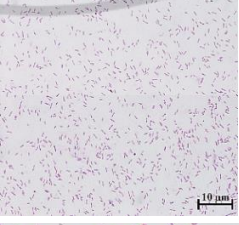

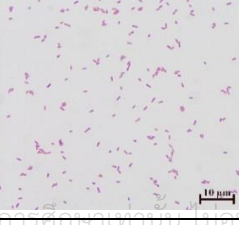
จากการนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการจำแนกด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมี จำนวน 13 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 โดยทำการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 4 และ 42 องศาเซลเซียส การทดสอบออกซิเดส การทดสอบคะตะเลส การทดสอบซิเตรท การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง และการทดสอบ Oxidative/Fermentative ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยผลการทดสอบพบว่า

แบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ได้แก่ KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 และ SN2007 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS1008 KS3003 KS3005 SN2002 SS1003 และ SS3007 ให้ผลออกซิเดสเป็นบวก สังเกตได้จากเกิดสีม่วงตามรอยขีดเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ cytochrome oxidase แบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท ให้ผลคะตะเลสเป็นบวก สังเกตได้จากการเกิดฟองแก๊ส เมื่อหยดสารละลาย Hydrogen peroxide ร้อยละ 3 แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ เชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS3003 และ SS3007 ให้ผลซิเตรทเป็นบวก สังเกตได้จากการเจริญบนผิวหน้าของอาหาร และการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons citrate agar โดยทำให้สีของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำเงินได้ แบคทีเรียทั้งหมด 7 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 และ SS3007 ให้ผลการทดสอบเป็นบวก เกิดโซนใสขึ้นรอบโคโลนี เนื่องจากเกิดการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังเว็บไซต์อื่น การคัดลอกหรือการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต ถือว่าผิดกฎหมาย

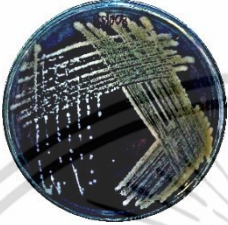

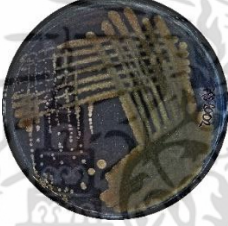
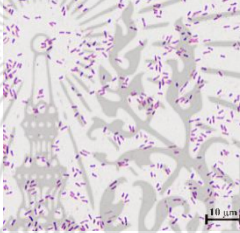




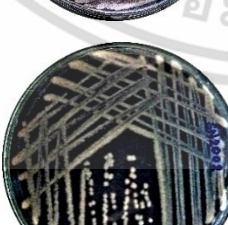

แบ่ง แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ แบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 SN2002 และ SS3005 ให้ผลการทดสอบเป็น Oxidative เนื่องจากเกิดการออกซิเดชันคาร์โบไฮเดรต ส่งผลให้เกิดการผลิตกรดโดยทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองได้ในหลอด Aerobic ส่วนในหลอด Anaerobic ไม่เกิดการออกซิเดชันคาร์โบไฮเดรต ส่งผลให้ไม่เกิดการผลิตกรดเนื่องจากสีของอาหารยังเป็นสีเขียวดังเดิม แบคทีเรีย 7 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2006 และ SS3007 ให้ผลการทดสอบเป็น Fermentative เนื่องจากเกิดการหมักคาร์โบไฮเดรตส่งผลให้เกิดการผลิตกรดโดยทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองได้ในทั้งสองหลอด คือหลอด Aerobic และหลอด Anaerobic ส่วนไอโซเลท SN2007 และ SS1103 ให้ผลการทดสอบเป็นลบ เนื่องจากไม่เกิดการออกซิเดชันและการหมักคาร์โบไฮเดรต ส่งผลให้ไม่เกิดการผลิตกรด สีของอาหารยังเป็นสีเขียวดังเดิมในทั้งสองหลอด คือหลอด Aerobic และหลอด Anaerobic

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แบคทีเรีย	คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา					การเคลื่อนที่
	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TSA	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	สีของโคไลนี	การย้อมสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	
<i>P. aeruginosa</i>			ขาว เหลือง	-	ท่อน	+
BG2015			ขาว เหลือง	-	ท่อน สั้น	+
BG2018			ขาว เหลือง	-	ท่อน สั้น	+
KS1001			ขาว เหลือง	-	ท่อน สั้น	+








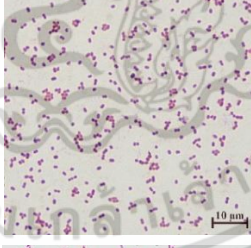
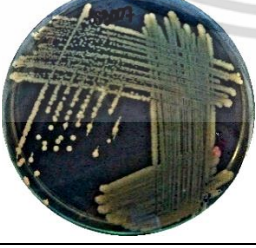

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านธุรกิจ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TSA	คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา				การเคลื่อนที่
		ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	สีของโคโลนี	การย้อมสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	
KS1008			ขาว เหลือง	-	ท่อน ยาว แท่ง	+
KS2002			ขาว เหลือง	-	ท่อน	+
KS3003			ขาว เหลือง	-	ท่อน สั้น	+
KS3005			ขาว เหลือง	-	ท่อน	+
SN2002			ขาว เหลือง	-	ท่อน	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แบคทีเรีย	คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา					
	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร TSA	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	สีของโคโลนี	การย้อมสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	การเคลื่อนที่
SN2006			ขาว เหลือง	-	ท่อน	+
SN2007			ขาว ครีม	-	แท่ง	+
SS1003			ขาว เหลือง	+	ท่อน	+
SS3005			ขาว เหลือง	-	ท่อน สั้น	+
SS3007			ขาว เหลือง	-	ท่อน	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น

แบคทีเรีย	คุณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น						OF
	การเจริญที่อุณหภูมิ		ออกซิเดส	คะตะเลส	ซิเตรท	การย่อยแป้ง	
	4°C	42°C					
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	-	O
BG2015	-	+	-	+	+	-	O
BG2018	-	+	-	+	+	-	O
KS1001	-	+	+	+	+	+	F
KS1008	-	+	+	+	+	-	F
KS2002	+	+	-	+	+	+	F
KS3003	+	+	+	+	+	+	F
KS3005	+	+	+	+	+	+	F
SN2002	+	+	+	+	+	+	O
SN2006	+	+	-	+	+	+	F
SS1003	-	+	+	+	+	-	O
SS3005	-	+	-	+	-	-	O
SS3007	-	+	+	+	+	+	O

หมายเหตุ : + หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive)
 - หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)
 O หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็น Oxidative
 F หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็น Fermentative

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และSS3007 บนอาหารแข็ง MP-3 (ประกอบไปด้วย น้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตร ยีสตสกัด 0.3 กรัม เปปโตน 1.0 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 กรัม K_2HPO_4 0.5 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 กรัม tween 80 0.5 มิลลิลิตร Bromocresol purple 0.64 กรัม และวุ้น 20 กรัม) ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SS1003 และ SS3007 ให้ผลการทดสอบเป็นบวก สังเกตได้จากมีการเปลี่ยนสีบนผิวหน้าอาหารจากสีม่วงเกิดเป็นโซนใสสีเหลือง แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และแบคทีเรีย

2 ไอโซเลท ได้แก่ SN2007 และSS3005 ให้ผลการทดสอบเป็นลบ เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนสีบนผิวหน้าอาหาร อย่างไรก็ตาม ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผิวหนังอาหาร ยังคงเป็นสีม่วงดั้งเดิม ดังแสดงในรูปที่ 4.1 สอดคล้องกับการศึกษาของ สุวรรณ และคณะ (2550) ที่ทำการศึกษาคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 7 ไอโซเลท ได้แก่ SSB-6 SSB-7 SSB-8 SSB-9 SSB-10 SSB-11 และ SSB-12 บนอาหาร MP-3 agar ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 7 ไอโซเลท ให้ผลการทดสอบเป็นบวก สังเกตได้จากมีการเปลี่ยนสีบนผิวหนังอาหารจากสีม่วงเกิดเป็นโซนใสเหลือง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และจากการศึกษาของ สุวรรณ และคณะ (2540) ที่ได้ทำการศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน โดยทำการคัดแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ 221 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ 33 สายพันธุ์ มีการเปลี่ยนสีบนผิวหนังอาหาร MP-3 agar จากสีม่วงเกิดเป็นโซนใสเหลือง



รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบบนอาหาร MP-3 agar ของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท

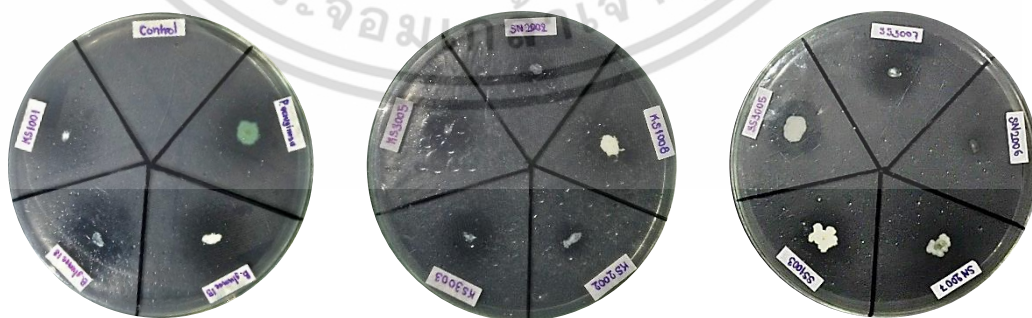
ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สามารถวิเคราะห์ได้จากค่าดัชนีของเอนไซม์ที่คำนวณได้จากโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีบนอาหารแข็งไตรบิวไทรีน โดยนำแบคทีเรียทั้งหมด 13 ไอโซเลท ได้แก่ B2015 B2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และSS3007 มาจุดลงบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีไตรบิวไทรีนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35-38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และวัดขนาดโคโลนีเพื่อทำการคำนวณค่าดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรบิวไทรีนได้แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.2 แบคทีเรียที่เกิดโซนใสรอบโคโลนี คาดว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ ไลเปสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส เนื่องจากสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (วีระ, 2555)

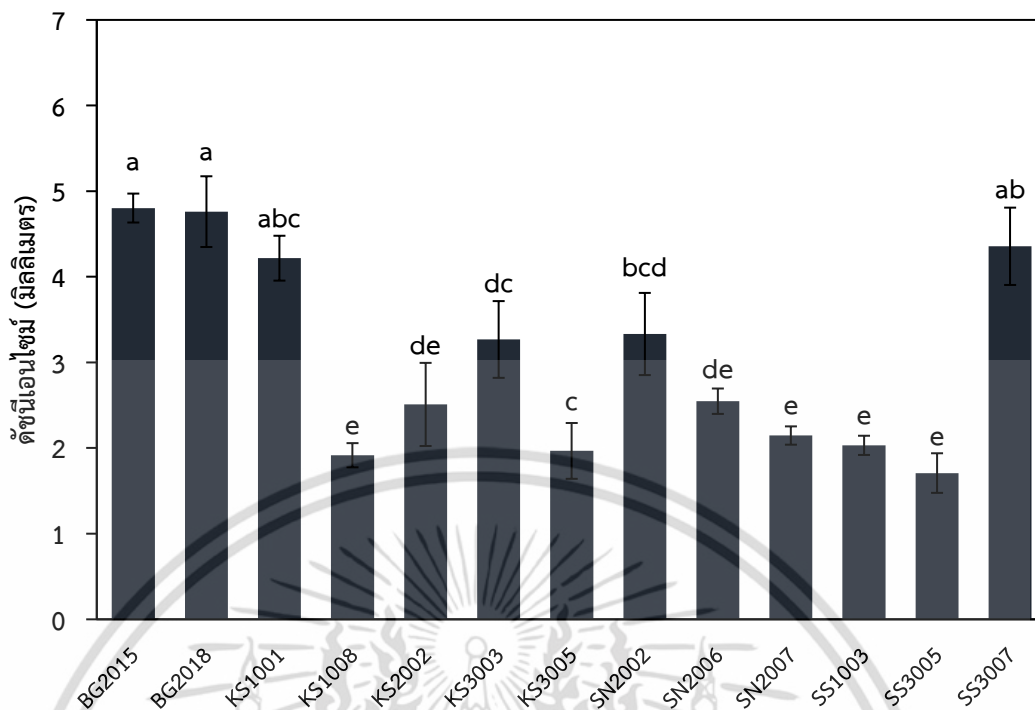
ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียที่มีค่าดัชนีเอนไซม์สูงที่สุด 5 ลำดับ ได้แก่ ไอโซเลท BG2015 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดสังเกตจากค่าดัชนีเอนไซม์ เท่ากับ 4.8 ± 1.68 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท BG2018 ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 4.76 ± 0.71 มิลลิเมตร ไอโซเลท SS3007 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.36 ± 0.45 มิลลิเมตร ไอโซเลท KS1001 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 4.22 ± 0.26 มิลลิเมตร และไอโซเลท SN2002 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.33 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท SS3005 มีค่าดัชนีเอนไซม์ต่ำที่สุดคือ 1.71 ± 0.23 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3

สอดคล้องกับการศึกษาของ รสมันต์ และ สาวิตรี (2548) ที่ได้ทำการศึกษาศามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ SR-1 SCP-2 SCP-7 SM-2 และ WA-1 ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและโรงงานอุตสาหกรรม โดยแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา คือแบคทีเรียแกรมลบ ผลการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียรหัส SR-1 และ WA-1 แสดงให้เห็นว่ามีลักษณะที่ตรงกันกับแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นบนอาหารแข็งซึ่งมีไตรบิวไทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 2 ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส SR-1 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.44 ± 0.73 มิลลิเมตร และไอโซเลท WA-1 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.68 ± 0.17 มิลลิเมตร ซึ่งผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ และจากการศึกษาของทิพวรรณ และคณะ (2555) ได้ทำการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหาร จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับกลุ่ม *Bacillus* spp. โดยนำมาทดสอบบนอาหารแข็งซึ่งมีไตรบิวไทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อสังเกตการย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (สังเกตจากบริเวณ Clear Zone) พบว่ามีจุลินทรีย์จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 7 ไอโซเลท 6 ไอโซเลท 4 และไอโซเลท 1 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณ Clear Zone มีค่าเท่ากับ 9.0 7.0 6.0 และ 6.0 ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบบนอาหาร Tributyrin agar ของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ที่เจริญบนอาหาร Tributyrin agar หมายถึง ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) และตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

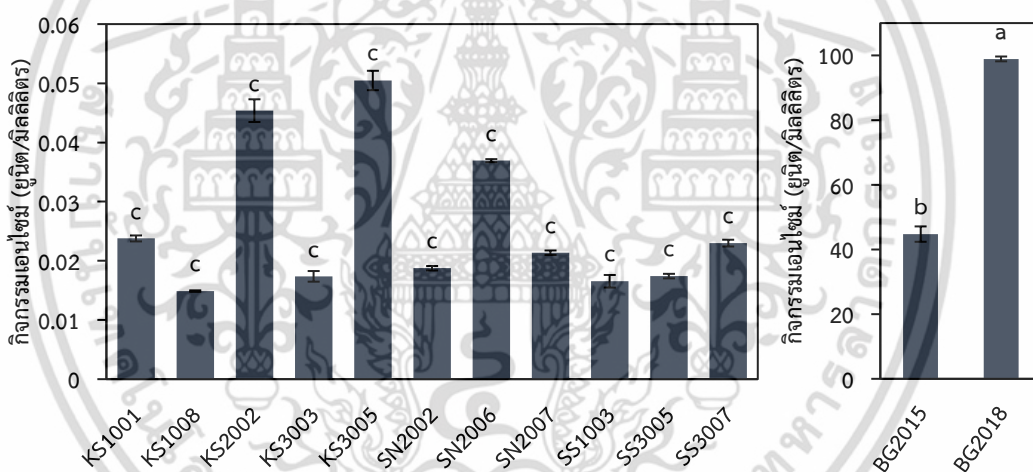
4.3 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ในสภาวะที่เหมาะสม

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่เหมาะสมโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 ในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับหัวเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 โดยใช้ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Basal medium (ประกอบไปด้วยน้ำมันมะกอกร้อยละ 1 โดยปริมาตร ทริปโตน ร้อยละ 0.3) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง นำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บสารละลายส่วนใสมาวัดกิจกรรมเอนไซม์ด้วย Colorimetric method พบว่าไอโซเลทของแบคทีเรียมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 5 ลำดับ ได้แก่ ไอโซเลท BG2018 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 98.92 ± 0.74 หนึ่งต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลท BG2015 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 44.75 ± 2.37 หนึ่งต่อมิลลิลิตร ไอโซเลท KS3005 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.05 ± 0.01 หนึ่งต่อมิลลิลิตร ไอโซเลท KS2002 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.04 ± 0.00 หนึ่งต่อมิลลิลิตร และไอโซเลท SN2006 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.04 ± 0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท KS1008 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำที่สุดคือ 0.01 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

การทดลองดังกล่าวพบว่า แบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 และ SN2006 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดี เมื่อใช้น้ำมันมะกอกร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยสังเกตได้จากค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดของแบคทีเรีย สอดคล้องกับการศึกษาของ Kulkarni และคณะ (2002) ในส่วนที่ได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *P. fluorescens* NS2W พบว่าเมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* NS2W มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 69.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาของพัคตร์พิมล (2552) ได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. EQ3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปส เมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในสภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ 4.4 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* sp. ที่เจริญในสภาวะที่เหมาะสม หมายถึง ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) และตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

4.4 ผลการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

ทำการเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5 อันดับ ได้แก่ ไอโซเลท BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 และ SN2006 จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Basal medium ในสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง เพื่อนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดย ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 เมื่อถึงจุดสมดุลนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอนไว้ และนำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายส่วนใสไปตกตะกอนอีกครั้งที่ความอืดตัวร้อยละ 30-80 เมื่อถึงจุดสมดุลนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้จากความอืดตัวร้อยละ 0-30 และ 30-80 ตามลำดับ มาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล (pH 7.6) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำการเก็บสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เลเปส

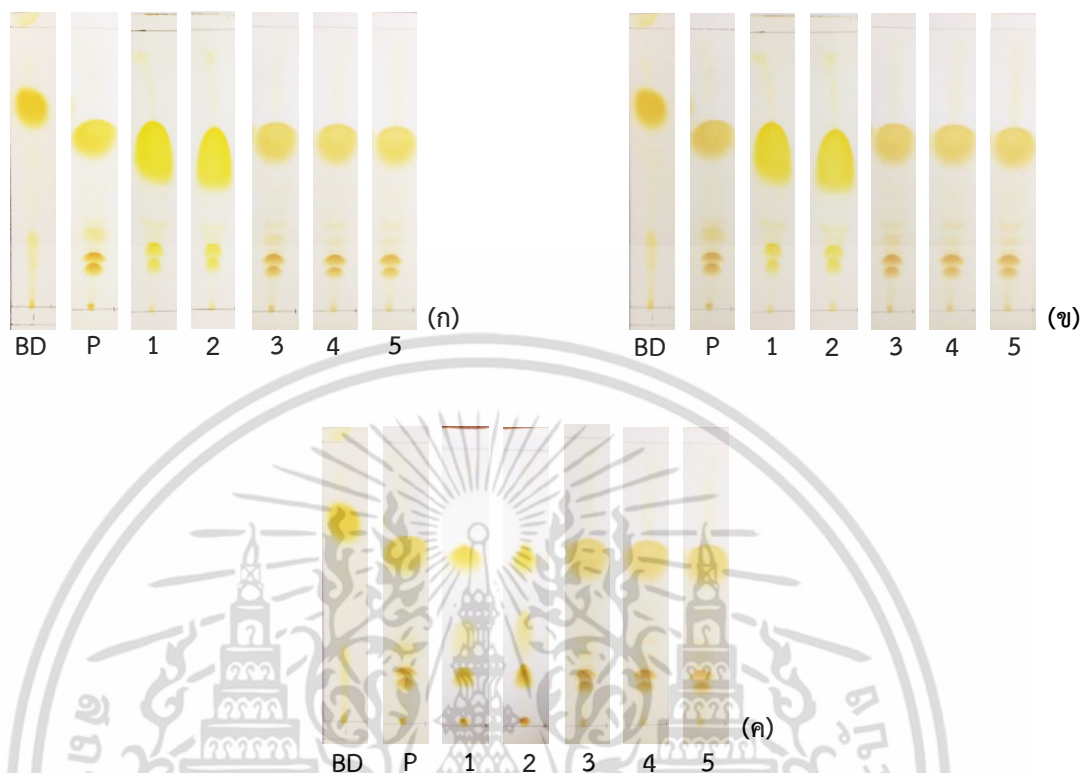
จากนั้นทำการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส พบว่าสามารถตกตะกอนเอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2015 ทำให้มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 30.03 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 423.82 ± 12.26 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 14.1 เท่า แบคทีเรียรหัส BG2018 พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 99.26 ± 1.36 หน่วยต่อมิลลิกรัม ไปเป็น $3,262.23 \pm 34.51$ หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 32.9 เท่า ไอโซเลท KS2002 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.24 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 2.42 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 10.1 เท่า ไอโซเลท KS3005 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.04 ± 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัม เป็น 0.37 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 9.3 เท่า และไอโซเลท SN2006 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.04 ± 0.00 หน่วยต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 0.35 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 8.8 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า แบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 และ SN2006 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่สูง เป็นผลเนื่องมาจากภายหลังการปั่นเหวี่ยงตะกอนที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลอยู่บริเวณก้นหลอด ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prita และคณะ (2009) ที่ได้ทำการตกตะกอนเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *P. aeruginosa* SRT 9 โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอืดตัวร้อยละ 30-90 พบว่าภายหลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว เอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 125.59 หน่วยต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 2,618.07 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 20.84 เท่า และจากการศึกษาของพัคตร์พิมล (2552) ได้ทำการศึกษการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. EQ3 ในสภาวะที่เหมาะสม ภายหลังการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอืดตัว 50-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถตกตะกอนเอนไซม์ของแบคทีเรียได้เพิ่มขึ้นอีก 10.3 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ขึ้น 0.8 เท่า และจากการศึกษาของ Makhzoum และคณะ (1996) ได้ทำการตกตะกอนเอนไซม์ไลเปสจาก *P. fluorescens* Strain 2D โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอืดตัวร้อยละ 80 พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 1.2 หน่วยต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 2.6 หน่วยต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2 เท่า

4.5 ผลการทดสอบการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม

4.5.1 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด 5 อันดับ ได้แก่ BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 และ SN2006 นำมาเตรียมปริมาณเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการในข้อ 3.5.7.1 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 ปริมาตรร้อยละ 50 เมื่อนำไปทดสอบด้วยการทำ Thin Layer Chromatography (รูปที่ 4.5) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าบริเวณแถบแบน

ของไตรกลีเซอไรด์มีขนาดแบนเล็กกลง ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.5ค



รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยศึกษาปริมาณเอนไซม์ (ก) ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 10 (ข) ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 30 (ค) ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2015 (2) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2018 (3) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS2002 (4) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS3005 (5) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส SN2006

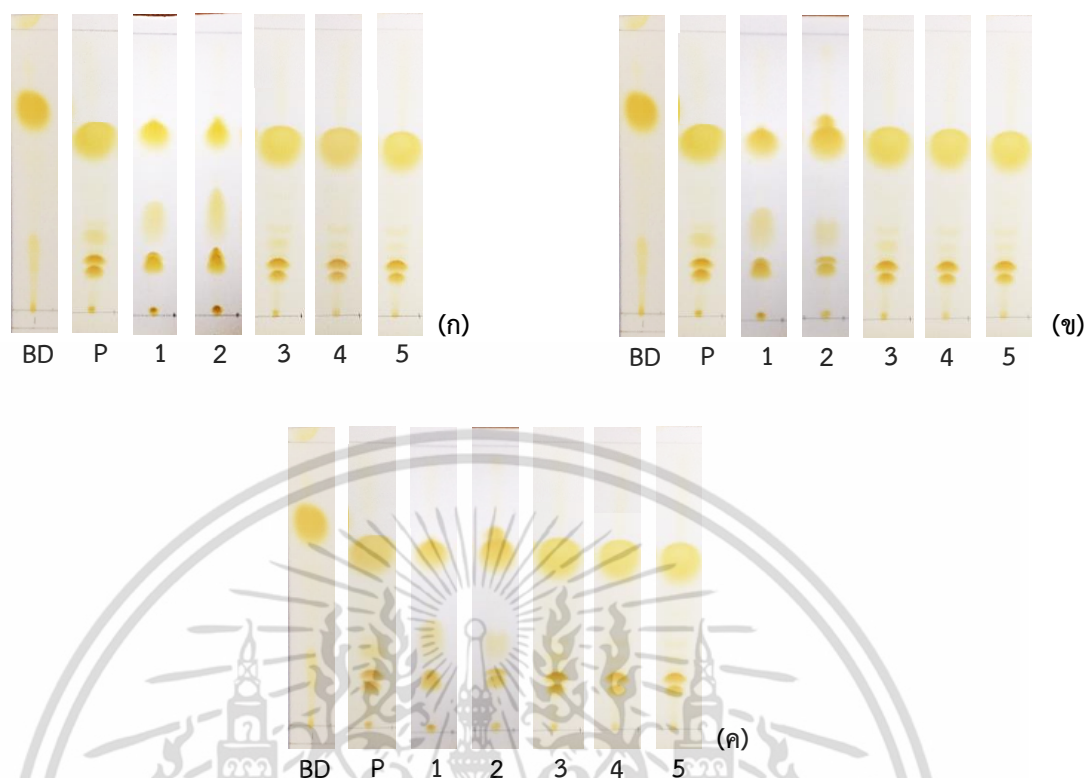
4.5.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม

เตรียมอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ 3:1 4:1 และ 5:1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากแบคทีเรียรหัส BG2015 และ B2018 ที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลและน้ำมันปาล์ม 4:1 และ 5:1 เมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (รูปที่ 4.6) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ โดยในงานวิจัยนี้ทำการเลือกอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 4:1 มาใช้ในการทดลอง เนื่องจากใช้ปริมาณเมทานอลน้อยกว่าที่อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 5:1 และผลที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 4.6ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดต ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ของแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท

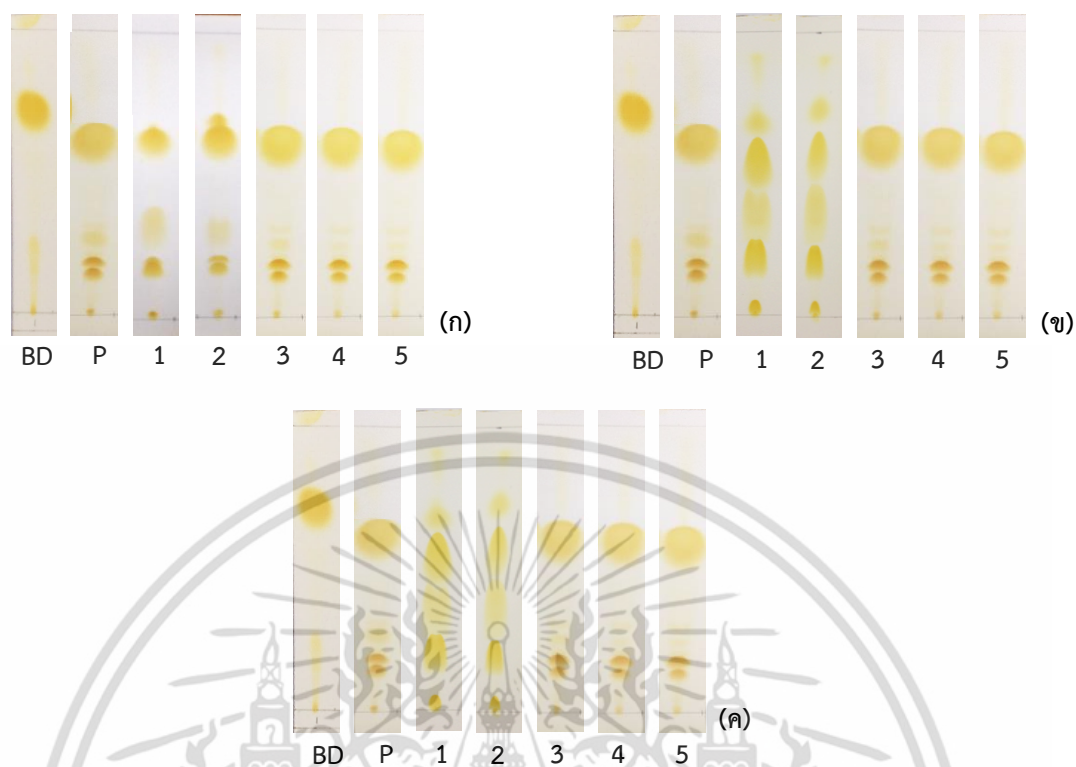
แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิต)	ความบริสุทธิ์(เท่า)
BG2015	Crude enzyme	44.75±2.37 ^c	1.48±0.03	30.03±0.03	2,237.68±8.88	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	184.91±5.33 ^b	0.75±0.05	246.72±1.89	9,245.28±6.28	8.22
	Dialysis	256.04±4.71 ^a	0.60±0.01	423.82±2.26	12,583.72±9.94	14.11
BG2018	Crude enzyme	98.92±0.74 ^c	0.99±0.02	99.26±1.36	4,945.88±7.44	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	107.52±2.59 ^b	0.13±0.00	821.42±7.94	5,376.44±9.69	8.28
	Dialysis	329.66±4.12 ^a	0.10±0.00	3,262.23±4.51	16,483.76±6.21	32.87
KS2002	Crude enzyme	0.04±0.00 ^c	0.46±0.00	0.24±0.01	2.26±0.10	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.10±0.00 ^b	0.24±0.00	1.01±0.01	4.91±0.02	4.21
	Dialysis	0.24±0.00 ^a	0.26±0.00	2.42±0.03	12.31±0.10	10.08
KS3005	Crude enzyme	0.05±0.01 ^c	1.05±0.01	0.04±0.02	2.52±0.82	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.10±0.00 ^b	0.52±0.00	0.20±0.01	5.33±0.04	5.00
	Dialysis	0.28±0.00 ^a	0.76±0.01	0.37±0.01	14.30±0.32	9.25
SN2006	Crude enzyme	0.03±0.00 ^c	0.89±0.00	0.04±0.00	1.84±0.01	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.10±0.00 ^b	0.31±0.01	0.29±0.00	4.51±0.02	7.25
	Dialysis	0.14±0.00 ^a	0.41±0.01	0.35±0.01	7.12±0.03	8.75



รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยศึกษาอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม (ก) MeOH:Palm Oil 3:1 (ข) MeOH:Palm Oil 4:1 (ค) MeOH: Palm Oil 5:1 (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2015 (2) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2018 (3) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS2002 (4) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS3005 (5) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส SN2006

4.5.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิ

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ อุณหภูมิ 35 45 และ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.1 อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลและน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมจากข้อ 4.5.2 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล คือ อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปทดสอบด้วยการทำ Thin Layer Chromatography (รูปที่ 4.7) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าทั้งสองอุณหภูมิมิมีแนวโน้มในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน แต่เนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสแถบแบนที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกับอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทางคณะผู้จัดทำจึงเลือกอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมาใช้ในการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.7ข

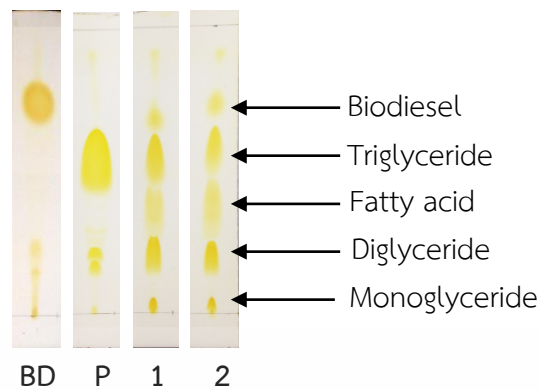


รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography โดยการศึกษาดูอุณหภูมิ (ก) อุณหภูมิ 35°C (ข) อุณหภูมิ 45°C (ค) อุณหภูมิ 55°C (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2015 (2) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2018 (3) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS2002 (4) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS3005 (5) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส SN2006

4.6 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง

4.6.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography

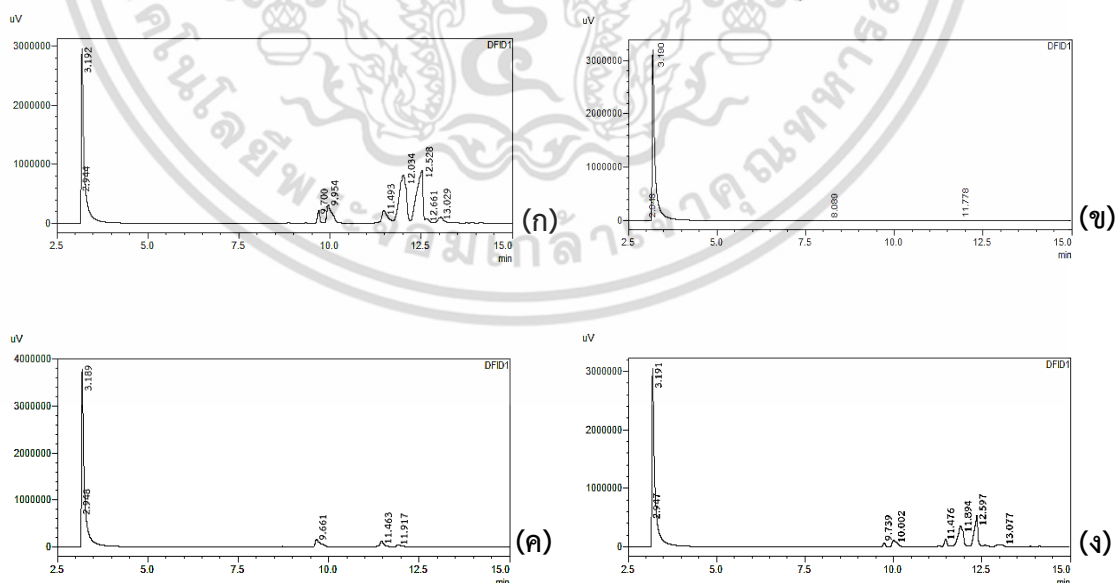
จากการนำตัวอย่างที่ได้จากแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ได้แก่ BG2015 BG2018 KS2002 KS3005 และ SN2006 มาทำการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้สภาวะต่างๆที่เหมาะสมเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน คือ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม และอุณหภูมิ พบว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียรหัสBG2015 BG2018 ที่ปริมาณร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่มีแนวโน้มสามารถผลิตไบโอดีเซลได้มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 ผลวิเคราะห์ Thin Layer Chromatography ของการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2015 (2) ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส BG2018 ที่ปริมาณร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 4:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

4.6.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (รูปที่ 4.9) พบว่าพีคที่เกิดขึ้นของตัวอย่าง ไบโอดีเซลที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 ดังแสดงในรูปที่ 4.9ค-ง ปรากฏออกมาในช่วง Retention time ที่ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับพีคของไบโอดีเซลมาตรฐานจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา ดังแสดงในรูปที่ 4.9ข ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography



รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (ก) ไบโอดีเซลมาตรฐานโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา (ข) น้ำมันปาล์ม (ค) BG2015 (ง) BG2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. โดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ลักษณะโคโลนี การย้อมสีแกรม ลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรีย การเคลื่อนที่ การเจริญที่อุณหภูมิ 4 และ 42 องศาเซลเซียส การทดสอบออกซิเดส การทดสอบคตะเลส การทดสอบซิเตรท การทดสอบการย่อยแป้ง และการทดสอบ Oxidative/Fermentative พบว่าแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ได้แก่ BG2015 BG2018 KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และSS3007 มีผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหาร Basal medium เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีของ จารินี และคณะ (2558) โดยแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 KS2002 และ SN2006 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเท่ากับ 98.92 ± 0.74 44.75 ± 2.37 0.05 ± 0.01 0.04 ± 0.00 และ 0.04 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อผ่านขั้นตอนทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 และ 30-80 ตามลำดับ และทำการแยกสารผ่านเยื่อ (Dialysis) พบว่าแบคทีเรียที่กล่าวข้างต้นมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ขึ้นเท่ากับ 329.66 ± 4.12 256.04 ± 4.71 0.28 ± 0.00 0.24 ± 0.00 และ 0.14 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ได้แก่ 32.87 14.11 9.25 10.08 และ 8.75 เท่าตามลำดับ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography วิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ร้อยละโดยน้ำหนัก 10 และ 30 ไม่เกิดปฏิกิริยาใดๆแต่ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก สามารถเร่งปฏิกิริยาให้เกิดแถบแบนด์ของไตรกลีเซอไรด์มีขนาดเล็กลง อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 3:1 4:1 และ 5:1 สามารถเร่งปฏิกิริยาให้เกิด Methyl ester ได้เล็กน้อย โดยการทดลองนี้ได้เลือกอัตราส่วน 4:1 เนื่องจากปฏิกิริยาต้องเติมเมทานอลให้มากเกินไปเพื่อทำให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางขวาและอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอล และน้ำมันปาล์มไม่ทำให้คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสเสียสภาพ อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 45 และ 55 องศาเซลเซียส สามารถเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิด Methyl ester มากกว่าอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography และ Gas Chromatography พบว่าเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารร่างที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ BG2015 มีแนวโน้มที่จะสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ในสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลและน้ำมันปาล์มที่ 4:1 และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 มีลักษณะโครมาโทแกรมคล้ายกับไบโอดีเซลมาตรฐานจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดามากที่สุด และเอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS3005 KS2002 และ SN2006 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการตรวจสอบการจัดจำแนกของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท ด้วยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16 rRNA เพื่อพิสูจน์หรือระบุชนิดของแบคทีเรียที่แน่นอน

ควรเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ไลเปสให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต) ให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มอัตราการเกิด Methyl ester นอกจากนี้ต้องกำจัดน้ำออกจากขั้นตอนการแยกสารผ่านเยื่อ (Dialysis) ให้มากที่สุดเนื่องจากน้ำเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้ปฏิกิริยาผันกลับ และควรศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อเพิ่มความคงทนต่อเมทานอล เพราะการใช้เอนไซม์อิสระจะทำให้เสียคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ นอกจากนี้ควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เช่น การแบ่งเติมเมทานอล ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค Gas Chromatography โดยใช้วิธี EN14103 เพื่อผลได้ของไบโอดีเซลที่แน่นอน

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงพลังงาน. 2558. **แผนปฏิบัติการพัฒนาพลังงานทดแทน พลังงานทางเลือก พ.ศ. 2558-2579**. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาพลังงานและอนุรักษ์พลังงาน (พพ.).
- เกษรา ทองบริบูรณ์. 2553. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในระบบกะและระบบต่อเนื่อง” วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- จารินี โอริส, ณิชนันท์ พรพิมล และดลนภา โอทอง. 2558. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล.” ปรินญาวิทยาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- จิรวรรณ มลาไวย้, สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2555. “การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 14(2): 71-77.
- โชตินันท์ จันประดิษฐ์, ภัสราภรณ์ รูปเพ็ง และรัชดา ช่างไทย. 2557. “การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล.” ปรินญาวิทยาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ดุชฎี รัตนพระ. 2549. “การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน” ปรินญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ต้นกล้า อินสว่าง. 2558. “เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี.” *จดหมายข่าวศูนย์เครื่องมือวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 2(7) : 2-3.
- ทิพวรรณ ประพันธ์, เนทียา กริธาชาติ, พิลานี ไวยถนอมสัถย์ และต่อพงศ์ กริธาชาติ. 2555. “การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสสำหรับการย่อยสลายของเสียจากกากไขมัน.” ปรินญาวิทยาสตรบัณฑิต วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยพะเยา.
- นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- ปกรณ วนะยานูวัติน. 2554. “เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล.” *วารสารวิจัยพลังงาน*. 8(2): 61-75.
- ปรเมษฐ์ น่วมเปี่ยม และ สิ้นสุภา จุ้ยจุลเจิม. 2549. “การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโอลีนดิบโดย ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา” *วารสารวิชาการ*. 7(1) : 54-62
- พัคตร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์. 2552. “การคัดเลือกและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้.” ปรินญาวิทยาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- พุดพัฒนา เบญจปรีชาพัฒน์, ไพรัช วงศ์ยุทธไกร และสมพล มงคลพิทักษ์สุข. 2555. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนมอนต์มอริลโลไนต์.” *วารสารวิชาการอุตสาหกรรมศึกษา*. 6(2) : 27-40.
- พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล, ลลิตา อัตนโถ, ยุทธนา ฐานมงคล และอมรรัตน์ ส้อมโนธรรม. 2549. **รอบรู้...เรื่องราว ไบโอดีเซล**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- ภัทรติกรณ์ รัศมีศักดิ์ศรี และสมชาย พัวจินดาเนตร 2555. “การผลิตและตรวจสอบคุณภาพของไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่มีกรดไขมันอิสระแตกต่างกัน” หน้า 1037-1042. ในการประชุมวิชาการช่างงานวิศวกรรมอุตสาหกรรม กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภัทรวิทย์ กระโจมทอง, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, เมธี สายศรีหยุด และอนุสิทธิ์ ธนะพิมพ์เมธา. 2559. “การปรับปรุงคุณภาพของไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ใช้แล้วโดยการดูดซับด้วยถ่านกัมมันต์และออกแบบการทดลองด้วย Box-Behnken” หน้า 291-300. ในการประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รสมันต์ จงเจริญ และสาวิตรี วาญญูไพศาล. 2548. “การศึกษาความสามารถในการผลิตไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและโรงงานอุตสาหกรรม.” *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 43 : 347-355.
- วิทยา เรื่องพรวิสุทธิ. 2554. **เคมีพื้นผิวและปฏิกิริยาเร่ง**. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : ท่อปิระ ปิยะธีรวงศ์. 2555. “การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสสำหรับการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 17(1) : 192-197.
- สุกาญดา ปาลีโกชน. 2558. “ผลของ MTBE ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันจากน้ำมันปาล์มเอสเตอร์ไฟยัด.” *ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*.
- สุรอรธ ศุภจัตุรัส, วีระสิทธิ์ กัลยาภฤต, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และศุภพงษ์ ภูพัฒนะพันธ์. 2550. “การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร.” *การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 45 : 721-728
- สุวรรณา เนียมสนธิ, งามนิจ นนทโส, ประสาท โพธิ์นัมแดง, พลสัมพันธ์ มหาจันทร์, สุรศักดิ์ ศิริพลอดุลศิลป์ และนิยม กำลั้งดี. 2540. “การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน.” *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 2(1): 1-9.
- อรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2555. **เทคโนโลยีเอนไซม์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สงขลา : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Agarwal, M., Chauhan, G., Chaurasia, S.P. and Singh, K. 2012. “Study of catalytic behavior of KOH ashomogeneous and heterogeneous catalyst for biodiesel production.” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 43(1) : 89–94.
- Ali, C.H., Qureshi, A.S., Mbadinga, S.M., Liu, F.J., Yang, S.Z. and Mu, B.Z. 2017. “Biodiesel production from waste cooking oil using onsite produced purified lipase from *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH- 1 : Central composite design approach” *Renewable Energy*. 109 : 93 -100.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Alhassan, Y., Kumar, N., Bugaje, I.M., Paliand, H.S. and Kathkar, P. 2014. "Co-solvents transesterification of cotton seed oil into biodiesel: Effects of reaction conditions on quality of fatty acids methyl esters." *Energy Conversion Management*. 84 : 640–648.
- Atta, H. M. and Radwan, H. G. 2012. "Biochemical studies on the production of Sparsomycin antibiotic by *Pseudomonas aeruginosa*, AZ-SH-B8 using plastic wastes as fermented substrate." *Journal of Saudi Chemical Society*. 16(1): 35-44.
- Basha, S. and Ulaganathan, K. 2002. "Antagonism of Bacillus species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*" *Centre for Plant Molecular Biology*. 82(12) : 1457-1463
- Biovision. 2004. **Ammonium sulfate saturated solution**. California : Biovision incorporate.
- Brenner, D.J., Kriej, N.R., Staley, J.T. and Garrity, G.M. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed.** New York : Springer-Verlag
- Casanovas-Massana, A., Lucena, F. and Blanch, A. R. 2010. "Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006." *Journal of Microbiological Methods*. 81(1) : 1-5.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A. and Lumyong, S. 2008 "Pyrroloquinoline Quinone is a Plant growth promoting activitives" *KMITL Science Technology*. 99 : 6702-6707
- Charpe, T.W. and Rathod V.K. 2011. "Biodiesel production using waste frying oil." *Waste Management*. 31(1) : 85-90.
- Demirbas, A. 2009. "Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical methanol transesterification." *Energy Conversion Management*. 50(4) : 923–927.
- Devid, F., Sandra, P. and Vickers, A.K. 2005. "Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters." *Food Analysis*. 1-12
- Diks, R.M.M. and Bosley, J. 2000. **Enzymes in Lipid Modification**. Germany : University of Greifswald
- Dong, H., Gao, S., Han, Sp. and Cao, Sg. 1999. "Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media." *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 30(3) : 251-6.
- Fan, Y., Wu, G., Su, F., Li, K., Xu, L., Han X and Yan, Y. 2016. "Lipase oriented-Immobilized on dendrimer-coated magnetic multi-walled carbon nanotubes toward catalyzing biodiesel production from waste vegetable oil." *Fuel*. 178 : 172-178.

- Freedman, B., Pryde, E.H. and Mounts, T.L. 1984. "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils." *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 61(10) : 1638–1643.
- Fukuda, H. , Kondo, A. and Noda, H. 2001. " Biodiesel fuel production by transesterification oils." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92 : 405-416.
- Gaby, W. L. and Hadley, C. 1957. "Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*." *Division of Microbiology*. Hahnemann Medical College and Hospital.
- Gessard, C. 1882. "Sur les colorations bleue et verte des linges a pansements." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 94 : 536-8.
- Ghisleri, F., Fu, P. and Secundo, F. 2017. "Water-Retaining Polymers in Organic Solvent Increase Lipase Activity for Biodiesel Synthesis." *Insights in Enzyme Research*. 1 : 1-8.
- Guan, G., Kusakabe, K., Sakurai, N. and Moriyama, K. 2009. "Transesterification of vegetable oil to biodieselfuel using acid catalyts in the presence of dimethyl ether." *Fuel*. 88(1) : 81–86.
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Permaul, K. and Bux, F. 2015. "Biocatalytic conversion of lipids from microalgae *Scenedesmus obliquus* to biodiesel using *Pseudomonas fluorescens* lipase." *Fuel*. 147: 117-124.
- Imahara, H., Minami, E., Hari, S. and Saka, S. 2008. "Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol." *Fuel*. 87(1) : 1–6.
- Kaur, B., Taggar, M.S., Sharma, P. and Kaur, P. 2017. "Screening of bacterial strains for lipase production and its application in biodiesel synthesis." *International Journal of Chemical Studies*. 5(3) : 230-236.
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S. and Klomkiao, S. 2017. "Optimized synthesis of biodiesel using lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas." *Renewable Energy*. 104 : 139-147.
- Kukreja, V. and Bera, B. M. 2004. "*Lipase from Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2488: Partial purification, characterization and calcium dependent thermostability". *Indian Journal of Biotechnology*. 4 : 222-226.
- Kulkarni, N. and Gadre, R.V. 2002. "Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28 : 344-348.
- Lam, M.K. and Lee, K.T. 2013. "Catalytic transesterification of high viscosity crude microalgae lipid to biodiesel : Effect of co- solvent. " *Fuel Processing Technology*. 110 : 242–248.
- Liu, X., He, H., Wang, Y., Zhu, S. and Piao, X. 2008. "Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst." *Fuel*. 87(2) : 216–221.

- Lowry, H. O., Rosebrough, J. N., Farr, L. A. and Randall, J. R. 1951. "Protein measurement with the floin phenol reagent." Department of Pharmacology. Washington University School of Medicine.
- Macrae, A.R. 1983. "Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats." *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 60(2) : 291-294.
- Makhzoum, A., Owusu-Apenten, R.K. and Knapp, J.S. 1996. "Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D." *International Dairy Journal*. 6(5) : 459-427.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U. and Errazu. A.F. 2007. "Possible methods for biodiesel production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 6 : 1300-1311.
- Massadreh, I. M. and Sabra, M. F. 2011. "Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*." *African Journal of Biotechnology*. 10(61): 13139-13146.
- Micic, R.D., Tomic, M.D., Kiss, F.E., Nikolic-Djoric, E.B. and Simikic, M.D. 2014. "Influence of reaction conditions and type of alcohol on biodiesel yields and process economics of supercritical transesterification." *Energy Conversion Management*. 86 : 717-726.
- Ota, Y., K. Gomi, S. Kato, T. Sukiura and Y. Minoda. 1982. "Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*." *Agricultural and Biological Chemistry*. 46(12) : 2885-2893.
- Palleroni, N.J. 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. United States of America : Williams and Wilkins.
- Pena, R., Romero, R., Martínez, S.L., Ramos, M.J., Martínez, A. and Natividad, R. 2009. "Transesterification of Castor Oil : Effect of Catalyst and CoSolvent." *Industrial and Engineering Chemistry Research (ACS Publications)*. 48(3) : 1186-1189.
- Prita, S. Borkar, Ragini, G. Bodade, Srinivasa R. Rao and Khobragade C.N. 2009. "Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9." *Journal of Microbiology*. 40(2) : 358-366.
- Ramadhass, A.S., Jayaraj, S. and Muraleeharan, C. 2005. "Biodiesel production from high FFA rubber seed oil." *Fuel*. 84 : 335-340.
- Rouessac, F. and Rouessac, A. 2007. **Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques Second Edition**. France : University of Le Mans.
- Kiran, S. and Bassetto, G. 2008 "Evaluating the effectiveness of semantic-based treatment for naming deficits in aphasia." *NIH Public Access and PMC*. 29(1) : 71-82
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M. and Solinas, V. 2005. "Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis." *Journal of Biotechnology*. 119(3) : 291-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Selvakumar, P. and Sivashanmugam, P. 2017. "Optimization of lipase production from organic solid waste by anaerobic digestion and its application in biodiesel production". *Fuel Processing Technology*. 165 : 1-8.
- Shahani, K.W. 1975. "Lipase and esterases." *Enzyme in Food Processing*. 2 : 181– 217.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C. 2001. "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnology Advances*. 19 : 627-662.
- Soumanou, M.M. and Bornscheuer, U.T. 2003. "Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils." *European Journal of Lipid Science and Technology*. 105 : 656–660
- Soriano, Jr.N.U., Venditti, R. and Argyropoulos, D.S. 2009. "Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification." *Fuel*. 88(3) : 560–565.
- Sun, H., Ding, Y., Duan, J., Zhang, Q., Wang, Z., Lou, H. and Zheng, X. 2010. "Transesterification of sunflower oil to biodiesel on ZrO₂ supported La₂O₃ catalyst." *Bioresource Technology*. 101(3) : 953–958.
- Sztajer, H. and Maliszewska, I. 1988. "The effect of culture conditions on lipolytic productivity of microorganisms." *Biotechnology Letters*. 10(3) : 199–204.
- Szybist, J.P., Song, J., Alam, M. and Boehman, A.L. 2007 "Biodiesel combustion, emissions and emission control." *Fuel Processing Technology*. 88(7) : 679-691.
- Versalovic, J., Carroll, C.K, Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Warnock, D.W. 2011. **Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition**. United States of America : Washington, DC
- Vishwe, V. and Chowdhary, A. 2015. "Production and Immobilization of extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." *International of Science and Research*. 4(10) : 1479-1482.
- Yamane, N., Morikawa, Y. and Hamada, H. 1987. "Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview." *Journal of the American Oil Chemistry Society*. 64 : 1657-1661



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Peptic digest of animal tissue	5.0
Sodium chloride	5.0
Beef extract	1.5
Yeast extract	1.5
Final pH (25°C)	7.4±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 13 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Peptic digest of animal tissue	5.0
Sodium chloride	5.0
Beef extract	1.5
Yeast extract	1.5
Agar	15.0
Final pH (25°C)	7.4±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 28 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Tryptone	17.0
Soytone	3.0
Glucose	2.5
Sodium Chloride	5.0
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5
Final pH (25°C)	7.3±0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 30 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
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 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Motility test

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Tryptose	10.0
Sodium chloride	5.0
Agar	5.0
Final pH (25°C)	7.2±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 20 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Meat extract	3.0
Peptic digest of animal tissue	5.0
Starch soluble	2.0
Agar	15.0
Final pH (25°C)	7.2±0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 25 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar

สูตรอาหาร

	กรัม/ลิตร
Magnesium sulphate	0.2
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0
Dipotassium phosphate	1.0
Sodium citrate	2.0
Sodium chloride	5.0
Bromothymol blue	0.08
Agar	15.0
Final pH (25°C)	6.8±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 24.28 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ OF Basal medium

สูตรอาหาร

	กรัม/ลิตร
Casein enzymic hydrolysate	2.0
Sodium chloride	5.0
Dipotassium phosphate	0.3
Bromo thymol blue	0.08
Glucose	10.0
Agar	2.0
Final pH (25°C)	6.8±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 24.28 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin Agar

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Peptic digest of animal tissue	5.0
Yeast extract	3.0
Agar	15.0
Final pH (25°C)	7.5±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 23 กรัม ลงในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร และเติม Tributyrin ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

10. อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal medium)

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Tryptone	0.3% (w/v)
Yeast extract	1.0
Dipotassium phosphate	2.0
Potassium dihydrogen phosphate	1.0
Ammonium sulphate	1.0
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2
Calcium chloride	0.15
Olive oil	1% (v/v)

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

11. อาหาร MP-3

สูตรอาหาร	กรัม/ลิตร
Olive oil	10 มิลลิลิตร
Yeast extract	0.3
Peptone	1.0
Ammonium sulfate	5.0
Dipotassium phosphate	0.5
Magnesium sulfate heptahydrate	0.3
Tween 80	0.5 มิลลิลิตร
Bromocresol purple	0.64
Agar	20.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. อาหาร MP-3 (ต่อ)

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข สารเคมี

1. สารละลาย Iodine solution

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
Iodine	3.3
Potassium iodine	6.8

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายสารปริมาณ 10.1 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นเก็บสารละลาย Iodine solution ในขวดสีชา

2. สารละลาย Oxidase reagent

ส่วนประกอบ	%
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine-2HCl	1%

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายสาร N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine-2HCl 1% ลงในน้ำกลั่นในปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา หากสารละลายสัมผัสอากาศเป็นเวลานานจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีม่วง ทำให้การอ่านผลผิดพลาด

3. สารละลาย Crystal violet

ส่วนประกอบสารละลาย A

Crystal violet (ความเข้มข้นของสีย้อม 90%)	2.0	กรัม
Ethanol 95%	20	มิลลิลิตร

ส่วนประกอบสารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ถ้าหากสารละลายมีสีเข้มจนเกินไปให้เจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

4. สารละลาย Safanin O (Stock solution)

ส่วนประกอบสารละลาย A

Safanin O	2.5	กรัม
Ethanol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเจือจางสีย้อมเป็น 1:10 กรองสีด้วยกระดาษกรองก่อนการ

ใช้งาน และเก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สารละลาย Phosphate Buffer 0.05M

ส่วนประกอบสารละลาย A

ละลาย 50mM Sodium Monohydrogen Phosphate Heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 13.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบสารละลาย B

ละลาย 50mM Sodium Dihydrogen Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ปริมาณ 7.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate ในอัตราส่วนระหว่างสารละลาย A และ B ที่ pH ต่างๆ

pH	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

6. สารละลาย 50mM Tris-HCl Buffer

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

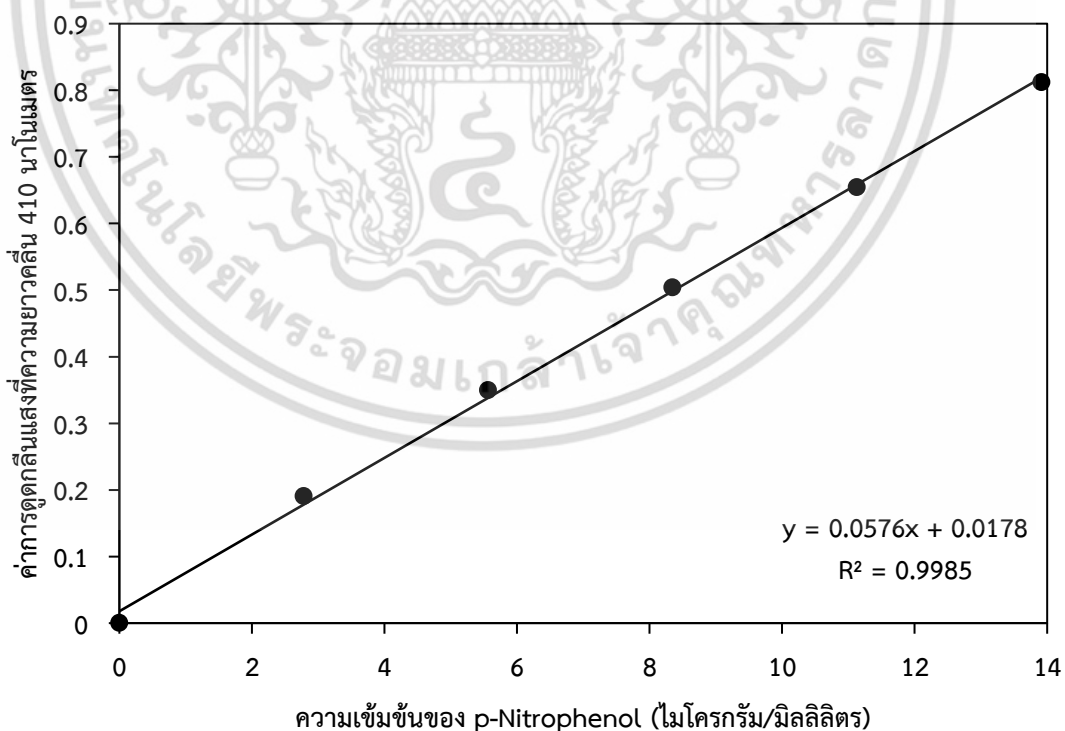
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol

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

ตารางที่ ค.1 การเจือจาง p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1mM p-NP (μL)	50mM Phosphate Buffer (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย p-NP (mM)
0	2,000	0
40	1,960	0.02
80	1,920	0.04
120	1,880	0.06
160	1,840	0.08
200	1,800	0.10



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

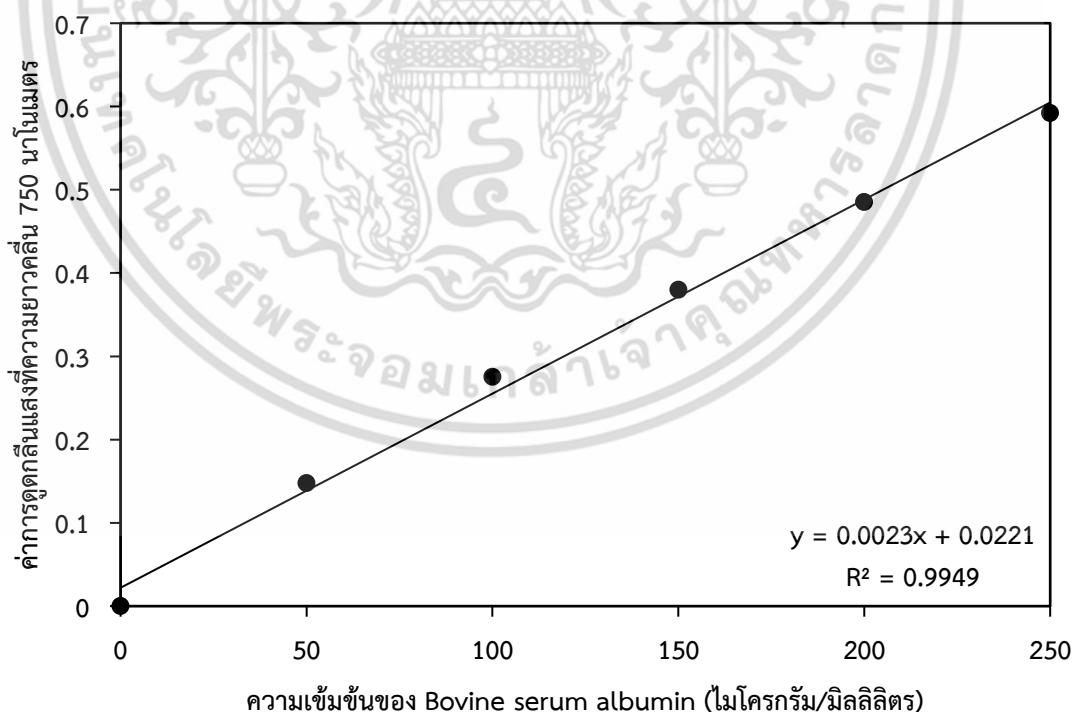
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL และเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 µg/mL ดังตารางที่ 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 (µL)	น้ำกลั่น (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย BSA (µg/mL)
0	2,000	0
100	1,900	50
200	1,800	100
300	1,700	150
400	1,600	200
500	1,500	250



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

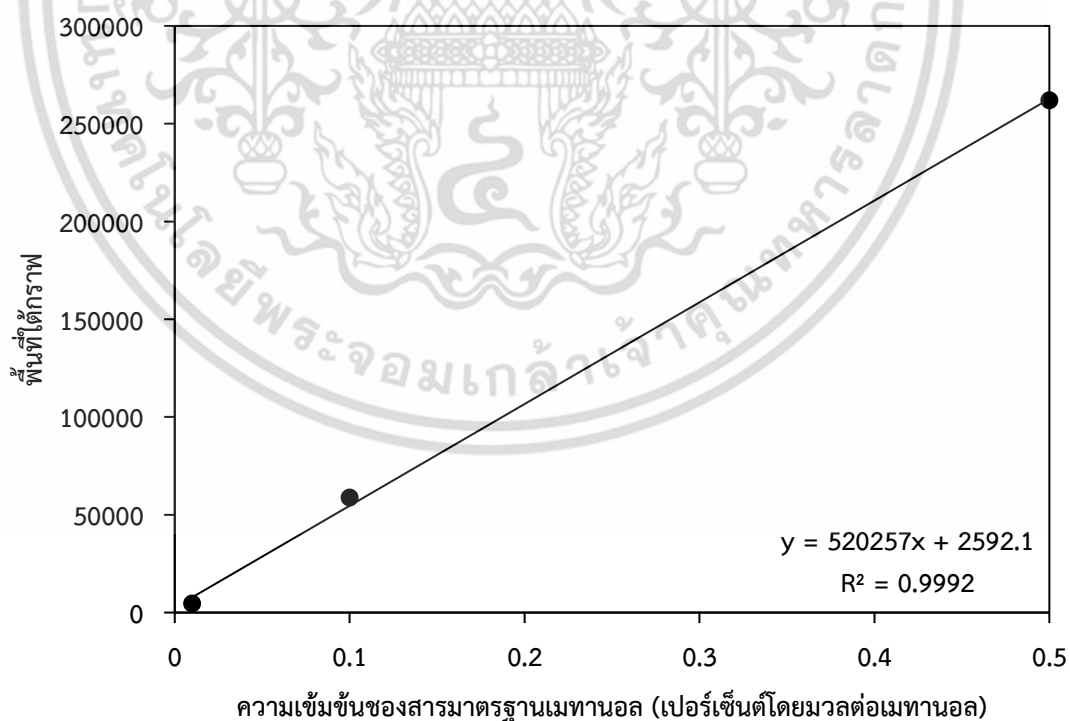
3. กราฟมาตรฐานเมทานอลโดยวิธี EN 14110

การเตรียมไบโอดีเซลที่ปราศจากเมทานอล

1. ทำการล้างไบโอดีเซลปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง
2. นำไบโอดีเซลที่ผ่านการล้างน้ำกลั่นแล้วลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร และให้ความร้อนโดยใช้เครื่องกวนสารละลายให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงพร้อมการปั่นกวนตลอดระยะเวลาให้การความร้อน
3. เก็บไบโอดีเซลที่ปราศจากเมทานอลในขวดเก็บสารละลายเมื่อครบระยะเวลาการให้ความร้อน และไม่ให้สัมผัสกับอากาศ

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทานอล

1. เตรียมสารละลาย Calibrate A โดยการปิเปตเมทานอลปริมาตร 142 ไมโครลิตร ลงในไบโอดีเซลที่ปราศจากเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐานเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
2. เตรียมสารละลาย Calibrate B โดยการปิเปตจากสารละลาย Calibrate A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในไบโอดีเซลที่ปราศจากเมทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐานเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์
3. เตรียมสารละลาย Calibrate C โดยการปิเปตจากสารละลาย Calibrate B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในไบโอดีเซลที่ปราศจากเมทานอลปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐานเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

สูตรคำนวณ

$$\text{ดัชนีเอนไซม์ (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{p-NP (ไมโครโมล) จากกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรม}}$$

โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต/มิลลิลิตร ของเอนไซม์ไลเปส คือ ปริมาตรเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็น p-Nitrophenol 1 ไมโครโมล/นาที่ ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต)} = \text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}$$

$$\text{กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)}}$$

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตารางที่ จ.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่ร้อยละการอิ่มตัวต่างๆ ที่ 0 องศาเซลเซียส

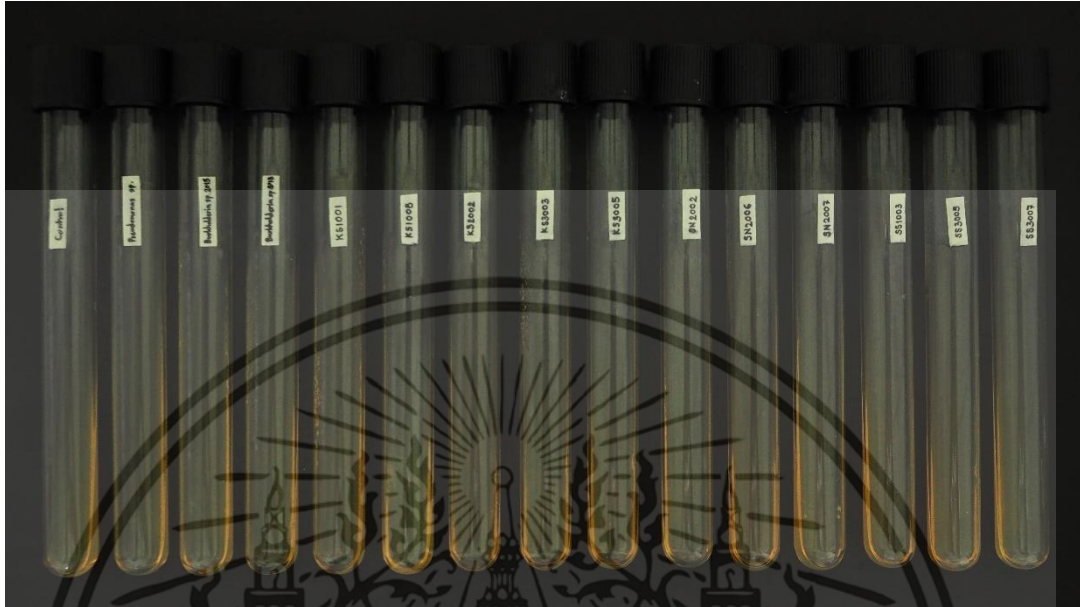
%	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100			
0	56	84	144	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767			
5		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694			
10			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657			
15				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619			
20					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	436	485	533	583			
25						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	401	449	496	546			
30							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	378	426	472	522			
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506			
40									31	63	97	132	168	205	245	285	328	375	420	469			
45										32	65	99	134	171	210	250	293	339	383	431			
50											33	66	101	137	176	214	256	302	345	392			
55												33	67	103	141	179	220	264	307	353			
60													34	69	105	143	183	227	269	314			
65														34	70	107	147	190	232	275			
70															35	72	110	153	194	237			
75																36	74	115	155	198			
80																	38	77	117	157			
85																		39	77	118			
90																				38	77		
95																					38	77	
																						39	77

ที่มา : Biovision (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ผลการศึกษาคูณลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น



รูปที่ ฉ.1 ผลการเจริญบนอาหาร Tryptic Soy Agar ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ ฉ.2 ผลการเจริญบนอาหาร Tryptic Soy Agar ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

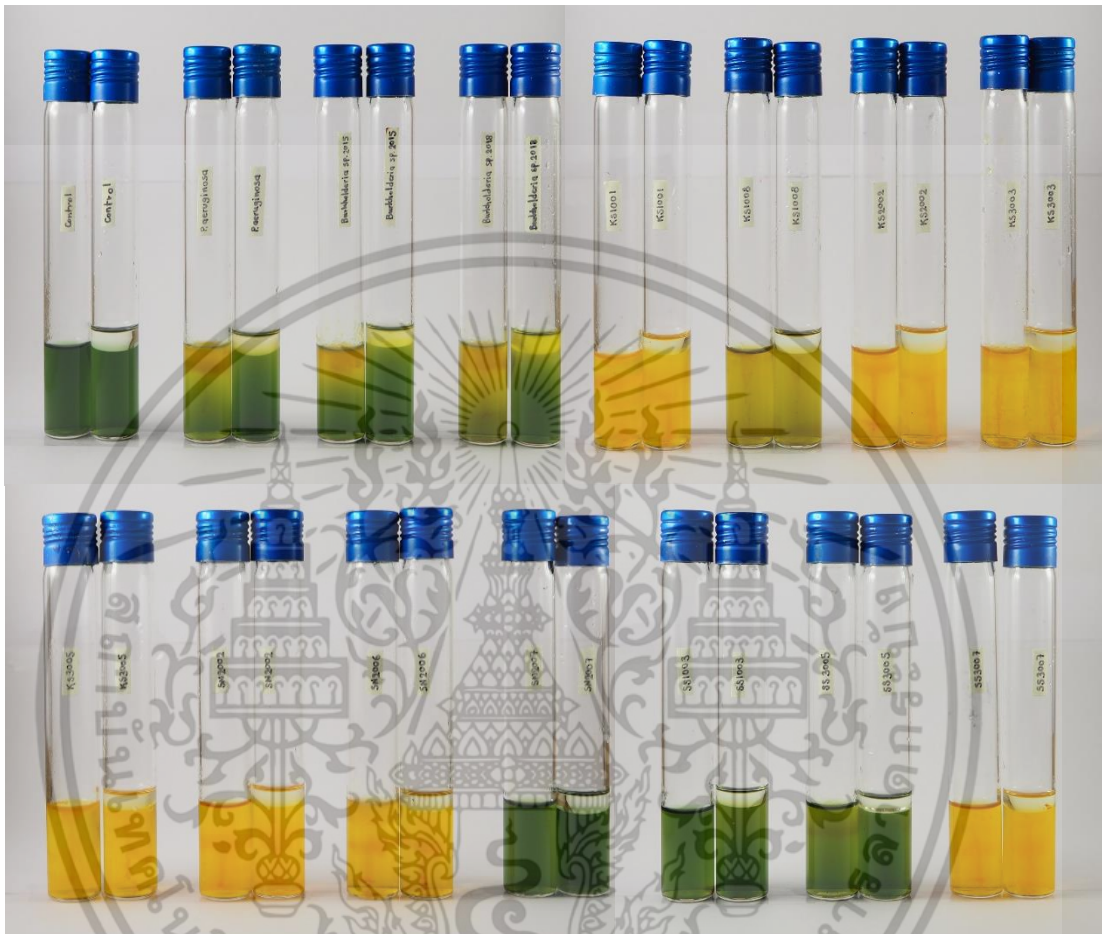


รูปที่ ๓.3 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่



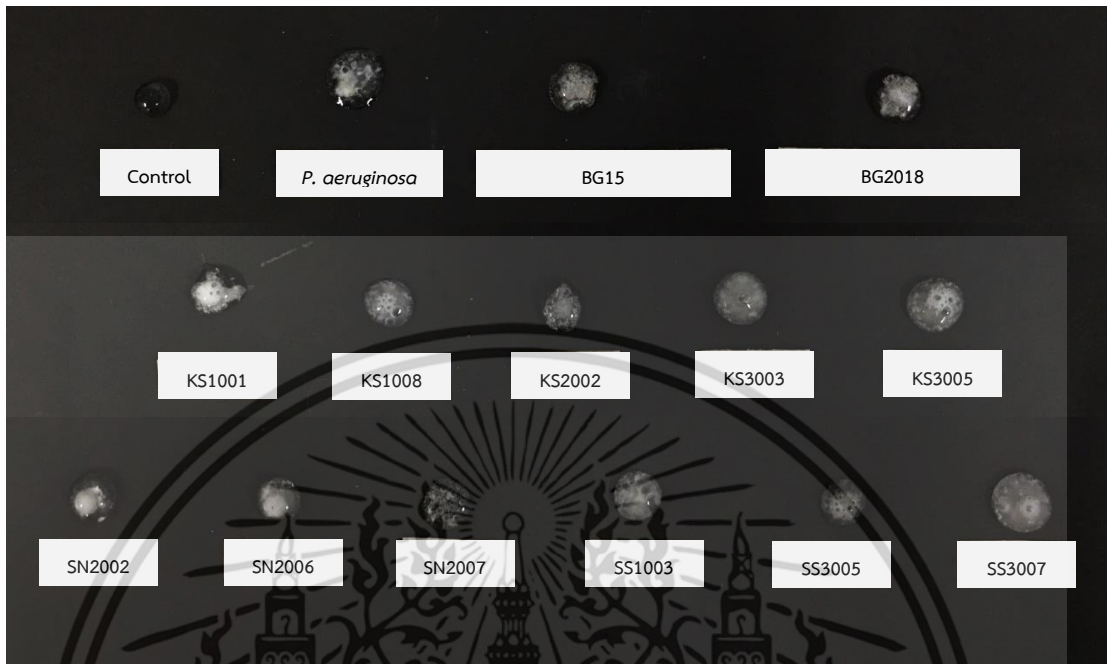
รูปที่ ๓.4 ผลการทดสอบซีเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

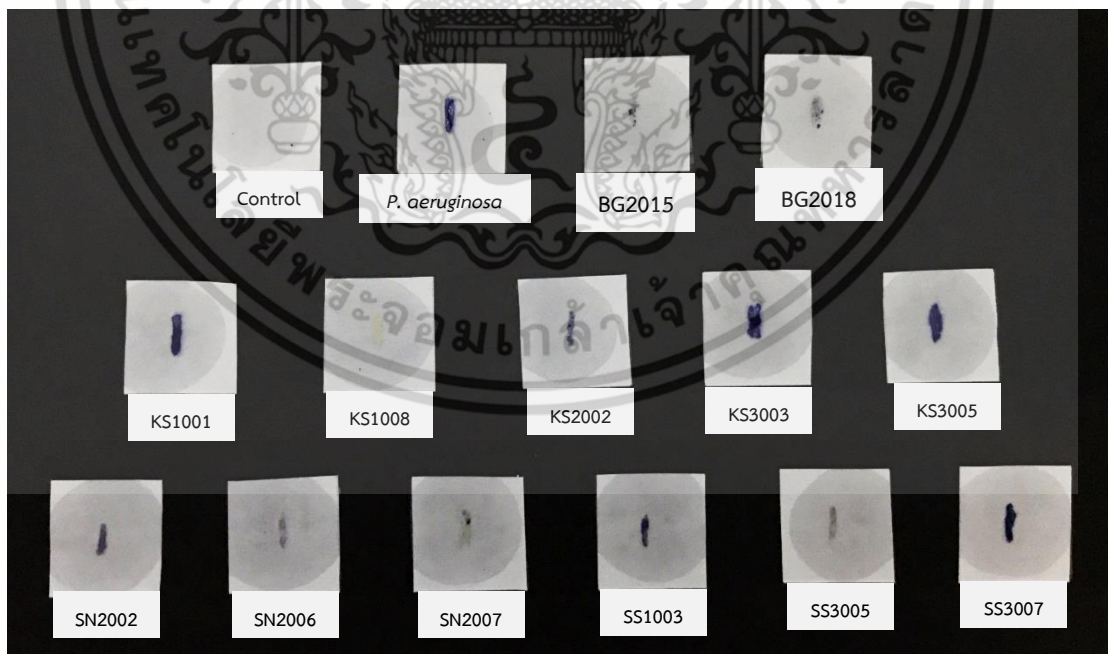


รูปที่ ๑.5 ผลการทดสอบ Oxidative/Fermentive

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๖.6 ผลการทดสอบออกซิเดส



รูปที่ ๖.7 ผลการทดสอบคะตะเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๘.๘ ผลการทดสอบการย่อยแป้ง
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ผลการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ ข.1 ตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียห้ำส BG2015 และ BG2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ
ผลการวิเคราะห์ดัชนีเอนไซม์

ตารางที่ ซ.1 ค่าดัชนีเอนไซม์เปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร)			เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยดัชนีเอนไซม์ (มิลลิเมตร)
	ซัฟที่ 1	ซัฟที่ 2	ซัฟที่ 3	ซัฟที่ 1	ซัฟที่ 2	ซัฟที่ 3	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.95	12.95	11.98	16.95	17.03	16.93	1.38±0.06
BG2015	4.30	3.05	2.22	14.46	13.37	14.79	4.8±1.68 ^a
BG2018	3.99	3.82	2.77	17.11	16.86	15.46	4.76±0.71 ^a
KS1001	4.01	3.68	3.92	16.39	16.63	15.86	4.22±0.26 ^{abc}
KS1008	5.87	4.73	5.79	10.87	9.83	10.53	1.92±0.14 ^e
KS2002	3.48	4.37	4.22	10.6	9.18	10.05	2.51±0.48 ^{de}
KS3003	3.63	4.32	3.15	11.33	12.58	11.88	3.26±0.44 ^{cd}
KS3005	5.68	4.73	5.61	9.62	11.01	10.54	1.96±0.32 ^c
SN2002	4.19	3.02	3.72	12.08	12.04	11.63	3.33±0.58 ^{bcd}
SN2006	3.97	3.61	3.99	9.71	9.81	9.89	2.54±0.14 ^{de}
SN2007	6.05	5.67	5.49	12.35	12.15	12.38	2.14±0.11 ^e
SS1003	6.24	5.97	5.75	12.10	11.94	12.40	2.03±0.11 ^e
SS3005	7.21	7.84	9.00	14.24	12.40	14.11	1.71±0.23 ^e
SS3007	3.49	3.13	3.53	14.15	15.26	14.61	4.36±0.45 ^{ab}

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฅ

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

ตารางที่ ฅ.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.290	0.294	0.293	0.03±0.00
BG2015	3,000	0.141	0.13	0.141	44.75±2.37 ^b
BG2018	3,000	0.309	0.297	0.309	98.92±0.74 ^a
KS1001	1	0.206	0.213	0.206	0.02±0.00 ^c
KS1008	1	0.136	0.138	0.137	0.01±0.00 ^c
KS2002	1	0.399	0.371	0.374	0.04±0.00 ^c
KS3003	1	0.155	0.165	0.151	0.02±0.00 ^c
KS3005	2	0.295	0.193	0.172	0.05±0.01 ^c
SN2002	1	0.165	0.171	0.168	0.02±0.00 ^c
SN2006	1	0.312	0.316	0.313	0.04±0.00 ^c
SN2007	1	0.186	0.192	0.189	0.02±0.00 ^c
SS1003	1	0.142	0.150	0.159	0.02±0.00 ^c
SS3005	1	0.158	0.160	0.154	0.02±0.00 ^c
SS3007	1	0.201	0.198	0.207	0.02±0.00 ^c

ภาคผนวก ญ
ข้อมูลดิบของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ตารางที่ ญ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
BG2015	เอนไซม์หยาบ	3000 เท่า	0.141	0.141	0.14±0.00 ^c
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	3000 เท่า	0.505	0.502	0.51±0.01 ^b
	ไดอะไลซิส	3000 เท่า	0.707	0.700	0.69±0.01 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ ญ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมแอนิเมลอปของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
BG2018	เอโนซิมทอยาบ	3000 เท่า	0.284	0.282	0.28±0.00 ^c
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	3000 เท่า	0.309	0.297	0.31±0.01 ^b
	ไดอะไลซิส	3000 เท่า	0.911	0.891	0.89±0.01 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ ญ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมแอนิเมลอปเลของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
KS2002	เอโนซิมเทยาบ	1 เท่า 0.399	0.371	0.374	0.40±0.01 ^c
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	2 เท่า 0.407	0.413	0.411	0.41±0.00 ^b
	ไดอะไลซิส	3 เท่า 0.677	0.671	0.679	0.68±0.00 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ ญ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมแอนิเมลอปสของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
KS3005	เอนไซม์หยาบ	2 เท่า	0.295	0.193	0.22±0.06 ^c
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	2 เท่า	0.416	0.442	0.44±0.01 ^b
	ไดอะไลซิส	5 เท่า	0.465	0.486	0.48±0.01 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ตารางที่ ญ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมแอนิเมลอปเลของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
SN2006	เอโนซิมเทยาบ	1 เท่า	0.312	0.316	0.313	0.31±0.00 ^c
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	1 เท่า	0.744	0.741	0.739	0.74±0.00 ^b
	ไดอะไลซิส	2 เท่า	0.589	0.591	0.586	0.58±0.00 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

ภาคผนวก ฎ
ข้อมูลดิบของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ ฎ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3
BG2015	เอนไซม์ย่อย	10 เท่า	0.372	0.357	0.365	0.36±0.01
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	6 เท่า	0.312	0.289	0.329	0.31±0.02
	ไดอะไลซิส	5 เท่า	0.295	0.298	0.304	0.30±0.00
BG2018	เอนไซม์ย่อย	10 เท่า	0.255	0.253	0.246	0.25±0.00
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	2 เท่า	0.177	0.170	0.171	0.17±0.00
	ไดอะไลซิส	2 เท่า	0.141	0.136	0.138	0.14±0.00

ตารางที่ ฎ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
KS2002	เอนไซม์หยาบ	5 เท่า	0.456	0.457	0.46±0.00
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	5 เท่า	0.244	0.242	0.24±0.00
	ไดอะไลซิส	7 เท่า	0.253	0.257	0.26±0.00
KS3005	เอนไซม์หยาบ	5 เท่า	0.502	0.514	0.51±0.01
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	5 เท่า	0.260	0.259	0.26±0.00
	ไดอะไลซิส	7 เท่า	0.273	0.271	0.27±0.00

ตารางที่ ฎ.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
SN2006	เอโนไซม์ทายา	5 เท่า	0.432	0.432	0.43±0.00
	การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	3 เท่า	0.260	0.265	0.26±0.00
	ไดอะไลซิส	7 เท่า	0.158	0.153	0.15±0.00

ภาคผนวก ฎ
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ฎ.1 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลต

Descriptives

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BG 015	3	4.8029	1.68917	.97524	.6067	8.9990	3.36	6.66
BG2018	3	4.7610	.71308	.41170	2.9896	6.5324	4.29	5.58
KS1001	3	4.2174	.26202	.15128	3.5665	4.8683	4.05	4.52
KS1008	3	1.9162	.14127	.08156	1.5653	2.2672	1.82	2.08
KS2002	3	2.5094	.48545	.28027	1.3035	3.7153	2.10	3.05
KS3003	3	3.2682	.44816	.25875	2.1549	4.3815	2.91	3.77
KS3005	3	1.9667	.32603	.18824	1.1568	2.7766	1.69	2.33
SN2002	3	3.3321	.57989	.33480	1.8915	4.7726	2.88	3.99
SN2006	3	2.5473	.14824	.08559	2.1791	2.9156	2.45	2.72
SN2007	3	2.1464	.10689	.06171	1.8809	2.4119	2.04	2.26
SS1003	3	2.0319	.11216	.06476	1.7533	2.3105	1.94	2.16
SS3005	3	1.7081	.23123	.13350	1.1337	2.2826	1.57	1.98
SS3007	3	4.3562	.45160	.26073	3.2344	5.4781	4.05	4.88
Total	39	3.0434	1.22287	.19582	2.6470	3.4398	1.57	6.66

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	47.560	12	3.963	11.121	.000
Within Groups	9.266	26	.356		
Total	56.826	38			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
SS3005	3	1.7081				
KS1008	3	1.9162				
KS3005	3	1.9667				
SS1003	3	2.0319				
SN2007	3	2.1464				
KS2002	3	2.5094	2.5094			
SN2006	3	2.5473	2.5473			
KS3003	3		3.2682	3.2682		
SN2002	3		3.3321	3.3321	3.3321	
KS1001	3			4.2174	4.2174	4.2174
SS3007	3				4.3562	4.3562
BG2018	3					4.7610
BG2015	3					4.8029
Sig.		.145	.134	.076	.056	.283

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลท

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Descriptives			
BG2015	3	44.7538	2.37778	1.37281	38.8470	50.6605	42.01	46.13
BG2018	3	98.9175	.74881	.43232	97.0574	100.7777	98.17	99.67
KS1001	3	.0238	.00050	.00029	.0225	.0250	.02	.02
KS1008	3	.0149	.00012	.00007	.0146	.0152	.01	.02
KS2002	3	.0454	.00192	.00111	.0406	.0501	.04	.05
KS3003	3	.0174	.00090	.00052	.0151	.0196	.02	.02
KS3005	3	.0505	.01642	.00948	.0097	.0913	.04	.07
SN2002	3	.0187	.00037	.00022	.0178	.0197	.02	.02
SN2006	3	.0369	.00026	.00015	.0363	.0376	.04	.04
SN2007	3	.0214	.00037	.00022	.0204	.0223	.02	.02
SS1003	3	.0165	.00106	.00061	.0139	.0192	.02	.02
SS3005	3	.0174	.00038	.00022	.0165	.0184	.02	.02
SS3007	3	.0230	.00057	.00033	.0216	.0244	.02	.02
Total	39	11.0736	28.37382	4.54345	1.8759	20.2714	.01	99.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30580.370	12	2548.364	5330.578	.000
Within Groups	12.430	26	.478		
Total	30592.799	38			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
KS1008	3	.0149		
SS1003	3	.0165		
KS3003	3	.0174		
SS3005	3	.0174		
SN2002	3	.0187		
SN2007	3	.0214		
SS3007	3	.0230		
KS1001	3	.0238		
SN2006	3	.0369		
KS2002	3	.0454		
KS3005	3	.0505		
BG2015	3		44.7538	
BG2018	3			98.9175
Sig.		.957	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

BG2018

Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3	44.7538	2.37778	1.37281	38.8470	50.6605	42.01	46.13
Protein precipitation	3	184.9056	5.32567	3.07478	171.6759	198.1353	181.29	191.02
Dialysis	3	255.0440	3.19891	1.84689	247.0974	262.9905	251.67	258.04
Total	9	161.5678	92.78497	30.92832	90.2469	232.8886	42.01	258.04

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68783.911	2	34391.956	2331.678	.000
Within Groups	88.499	6	14.750		
Total	68872.411	8			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan^a

Method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3	44.7538		
Protein precipitation	3		184.9056	
Dialysis	3			255.0440
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

BG2015

Descriptives

Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3	98.9175	.74881	.43232	97.0574	100.7777	98.17	99.67
Protein precipitation	3	107.5288	2.59395	1.49762	101.0851	113.9725	104.53	109.03
Dialysis	3	329.6752	4.12411	2.38106	319.4303	339.9200	326.93	334.42
Total	9	178.7072	113.31418	37.77139	91.6062	265.8082	98.17	334.42

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	102672.238	2	51336.119	6338.425	.000
Within Groups	48.595	6	8.099		
Total	102720.833	8			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan^a

Method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3	98.9175		
Protein precipitation	3		107.5288	
Dialysis	3			329.6752
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* sp.

KS3005

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3	.04537	.001919	.001108	.04060	.05014	.044	.048
Protein precipitation	3	.09814	.000499	.000288	.09690	.09938	.098	.099
Dialysis	3	.24631	.001559	.000900	.24244	.25018	.245	.248
Total	9	.12994	.090227	.030076	.06059	.19929	.044	.248

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.065	2	.033	15357.212	.000
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.065	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

Method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3	.04537		
Protein precipitation	3		.09814	
Dialysis	3			.24631
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

KS2002

Descriptives

Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3	.05047	.016423	.009482	.00967	.09127	.038	.069
Protein precipitation	3	.10413	.004154	.002398	.09381	.11445	.099	.107
Dialysis	3	.28592	.006574	.003796	.26959	.30225	.279	.292
Total	9	.14684	.107251	.035750	.06440	.22928	.038	.292

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.091	2	.046	415.056	.000
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.092	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan^a

Method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3	.05047		
Protein precipitation	3		.10413	
Dialysis	3			.28592
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* sp.

SN2006

Descriptives

Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3	.03692	.000260	.000150	.03628	.03757	.037	.037
Protein precipitation	3	.09030	.000314	.000181	.08952	.09108	.090	.091
Dialysis	3	.14249	.000628	.000363	.14093	.14405	.142	.143
Total	9	.08990	.045714	.015238	.05477	.12504	.037	.143

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.017	2	.008	44720.003	.000
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.017	8			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan^a

Method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3	.03692		
Protein precipitation	3		.09030	
Dialysis	3			.14249
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.4 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมแอมไซม์ในขั้นตอนการไดอะไลซิสของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas sp.*

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Descriptives			
BG2015	3	255.0440	3.19891	1.84689	247.0974	262.9905	251.67	258.04
BG2018	3	329.6752	4.12411	2.38106	319.4303	339.9200	326.93	334.42
KS2002	3	.2463	.00156	.00090	.2424	.2502	.24	.25
KS3005	3	.2859	.00657	.00380	.2696	.3023	.28	.29
SN2006	3	.1425	.00063	.00036	.1409	.1441	.14	.14
Total	15	117.0788	150.15297	38.76933	33.9268	200.2307	.14	334.42

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	315588.324	4	78897.081	14481.117	.000
Within Groups	54.483	10	5.448		
Total	315642.807	14			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SN2006	3	.1425		
KS2002	3	.2463		
KS3005	3	.2859		
BG2015	3		255.0440	
BG2018	3			329.6752
Sig.		.944	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้