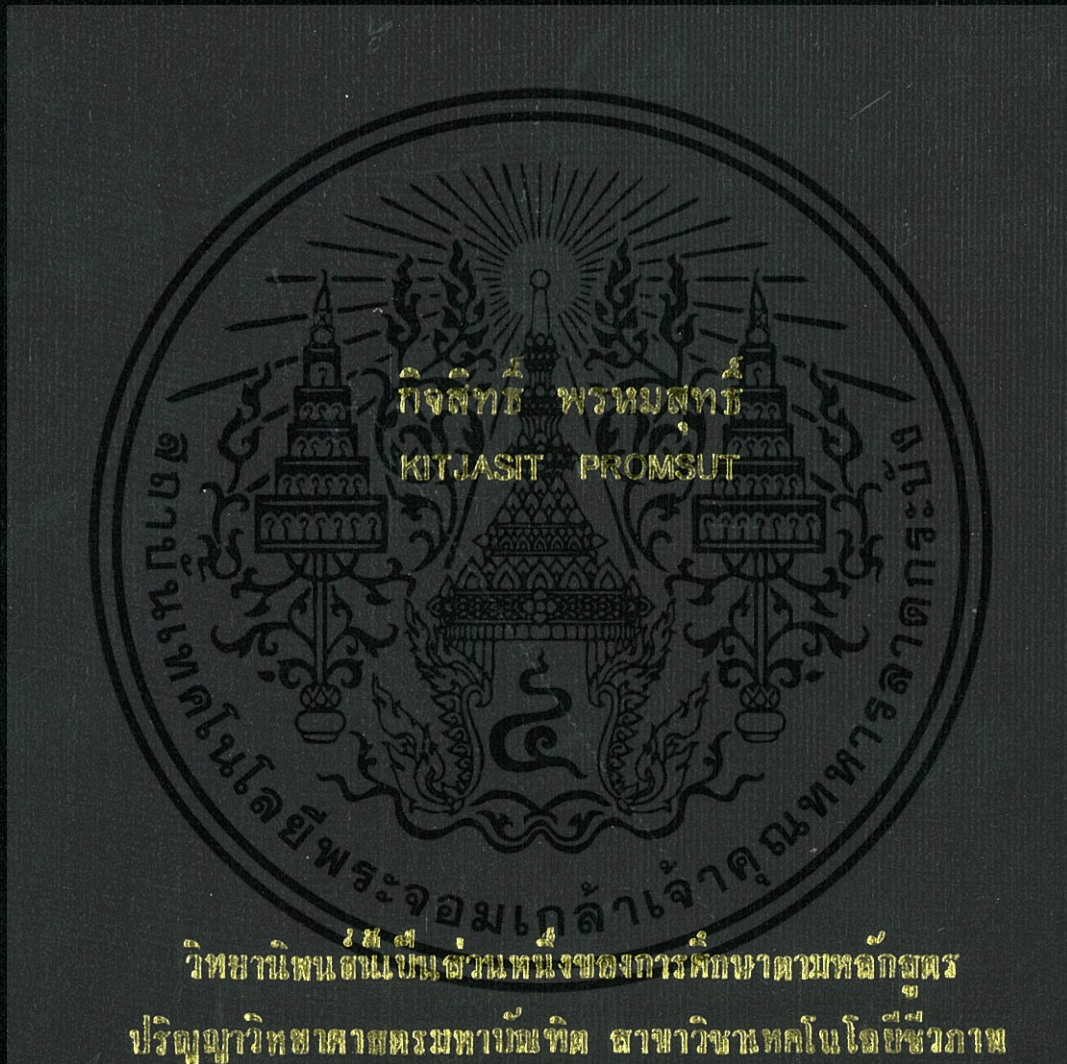


การพัฒนาเซลล์จุลินทรีย์ผสมที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
ไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

DEVELOPMENT OF LIPASE PRODUCING MIXED WHOLE-CELL
MICROORGANISMS AS BIODIESEL CATALYST
BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-SC-M-020-029

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาเซลล์จุลินทรีย์ผสมที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
ไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

DEVELOPMENT OF LIPASE PRODUCING MIXED WHOLE-CELL
MICROORGANISMS AS BIODIESEL CATALYST
BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



เลขหมู่
เลขทะเบียน 143985
วันเดือนปี 10 ต.ค. 2559

b. 00 266994
l.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ KMITL-2016-SC-M-020-029 ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEVELOPMENT OF LIPASE PRODUCING MIXED WHOLE-CELL
MICROORGANISMS AS BIODIESEL CATALYST
BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2016

KMITL-2016-SC-M-020-029

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2016

FACULTY OF SCIENCE

เอ KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“การพัฒนาเซลล์จุลินทรีย์ผสมที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง”
 (DEVELOPMENT OF LIPASE PRODUCING MIXED WHOLE-CELL MICROORGANISMS AS BIODIESEL CATALYST BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY)

ชื่อนักศึกษา

นายกิจสิทธิ์ พรหมสุทธิ

รหัสประจำตัว

54651606

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

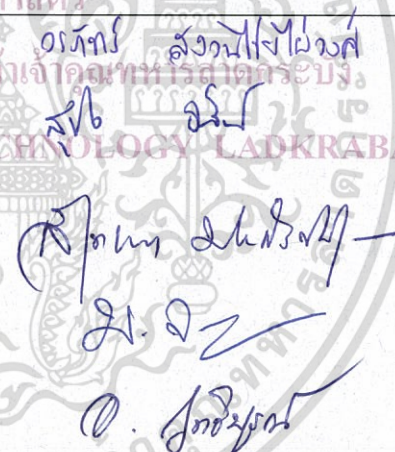
ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.อารี ฤทธิบุรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี) รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) รศ.ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 14 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 เวลา 09.00 - 12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 306 อาคารพระจอมเกล้า

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ธนะบริพัฒน์)
 คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา วันที่.....เดือน.....ปี.....

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การพัฒนาเซลล์จุลินทรีย์ผสมที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง
ชื่อนักศึกษา	นายกฤษสิทธิ์ พรหมสุทธิ
รหัสประจำตัว	54651606
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบุรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. มาริสา จาคะพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียและยีสต์ที่แยกได้จากดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันรวมทั้งยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพื่อผลิตเป็นตัวเร่งชีวภาพของจุลินทรีย์ผสมเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 8 สายพันธุ์ ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม 7 สายพันธุ์ และยีสต์สายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกเบื้องต้นด้วยการเลี้ยงเชื้อในสถานะอาหารแข็งที่มี Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีโคโลนีสีชมพูอมส้ม จากนั้นคัดเลือกอีกครั้งในสถานะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB8 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับสายพันธุ์อื่น คือมีค่าเท่ากับ 0.31, 0.34 และ 0.4 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายไปทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยการเลี้ยงเชื้อในน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนร่วมกับเอทานอลและเมื่อคำนวณปริมาณร้อยละการผลิตเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนโสมบสุกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วย GC-MS พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และสายพันธุ์กลาย G47 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันได้เป็นเอสเทอร์ได้ดีซึ่งมีร้อยละของปริมาณเอสเทอร์ เท่ากับร้อยละ 30.7, 12.2 และ 42.9 ตามลำดับ จากนั้นทำการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกด้วย 16s rRNA สำหรับแบคทีเรีย และ 26s rRNA สำหรับยีสต์พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม KPB10 มีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus siamensis* ที่ระดับร้อยละ 99.78 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 มีความเหมือนกับเชื้อ *Pichia guilliermondii* ที่ระดับร้อยละ 99 และสายพันธุ์กลาย G47 มีความเหมือนกับเชื้อ *Candida orthopsilosis* ที่ระดับร้อยละ 100 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมโดยใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก และการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ตัวเร่งชีวภาพคือ ร้อยละปริมาณรำข้าวมีค่าเท่ากับ 5.37 น้ำหนักต่อปริมาตร ร้อยละปริมาณกากน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 2.10 ปริมาตรต่อปริมาตร และค่าความเป็นกรดต่างมีค่าเท่ากับ 7.32 จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณตัวเร่งชีวภาพสูงสูงที่ 2.58 โคโลนิฟอร์มมิ่งยูนิตต่อ มิลลิลิตร และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งชีวภาพจากการผสมสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก เป็นตัวเร่งชีวภาพคือ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันมีค่าเท่ากับ 3.78:1 โมลต่อโมล ร้อยละปริมาณตัวเร่ง ชีวภาพมีค่าเท่ากับ 10.52 น้ำหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาในการบ่มมีค่าเท่ากับ 72 ชั่วโมงจะได้ร้อยละ ปริมาณเอสเทอร์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 96.67 และร้อยละของผลผลิตที่ได้มีค่าเท่ากับ 86.07

คำสำคัญ : ไบโอดีเซล ตัวเร่งชีวภาพ โรตามิน บี ไลเปส ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พื้นผิวตอบสนอง



Thesis Title	Development of lipase producing mixed whole-cell microorganisms as biodiesel catalyst by response surface methodology
Student Name	Kitjasit Promsut
Student ID	54651606
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2016
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Marisa Jatupompiput

ABSTRACT

This research emphasized on screening and morphological study of lipase-producing bacteria and yeasts isolated from soil in the area of oil manufacture as well as lipase-producing mutant yeast. The strains with high lipase activity were conducted to use as mixed culture for using as biocatalyst in biodiesel production. It was found 8 strains of bacteria, 7 strains of wild type yeast, and 1 strain of mutant yeast were obtained from primary screening by cultivation in solid media containing 1 mg/ml of rhodamine B and waste cooking oil as carbon source at 30 °C for 48 hr. The orange-pink colonies were selected and, subsequently secondary screened in liquid media containing waste cooking oil as carbon source, in order to determine for lipase activity. The results revealed that strain KPB8 (bacterium), KPY9 (wild type yeast), and G47 (mutant yeast) gave maximum lipase activity and had significantly values of 0.31, 0.34 and 0.4 U/mL, respectively at $p < 0.05$. Therefrom, they were subjected to examine as biocatalyst for transesterification by culturing as mixed culture in waste cooking oil and ethanol. The percentage of esters produced from reaction was calculated, after analyzed the supernatant by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). The result showed that isolate KPB10, KPY9 and G47 had great transesterification catalyst ability, which increased the percentage of esters of 30.7, 12.2 and 42.9, respectively. The strain KPB10, KPY9 and G47 were identified by compared 16S rRNA for bacteria and 26S rRNA for yeast with NCBI. It was found that KPB10 were identified as *Bacillus siamensis*, KPY9 were identified as *Pichia guilliermondii* and G47 were identified as *Candida orthopsilosis*. Subsequently, they were subjected to optimize as biocatalyst by

response surface method. The optimal conditions for high lipase activity (0.36 U/mL) were 5.36 % (w/v) of bran, 2.10 % (v/v) of molasses with pH 7.32. This mixed-culture was biocatalyst selected for optimization of biodiesel production using response surface method. The optimal condition for high percentage of esters (96.67%) were oil to ethanol ratio of 3.78:1 (mol/mol), 10.52 % (w/v) of biocatalyst at 72 hr and 86.07 % of biodiesel yield.

Keywords : Biodiesel, Biocatalyst, Rhodamine B, Lipase, Transesterification, Response surface methodology.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดีด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ อารี ฤทธิ
บูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. มาริสสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่
ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาเสียสละเวลาเพื่อให้ความรู้ คำแนะนำ แนวทางในการดำเนินงานค้นคว้าวิจัย
รวมถึงแนวทางในการแก้ไขปัญหาระหว่างการดำเนินงาน อีกทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์
ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วรภัทร สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการสอบ รอง
ศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา และ รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท
ประสงค์สุข อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงาน
ค้นคว้าวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนทั้งทางด้านทุนทรัพย์
และเป็นกำลังใจให้เสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณนางกลอยใจ แก้วสุวรรณ นางสาวคันสุณีย์ ภูประกิจ นางสาวจุฑามาศ วิเศษศรี
นางสาวณิชชาภัทร ชื่นจิตร และนางสาวจิรนนท์ โพธิสาร นักศึกษาปริญญาโทที่ได้ช่วยเหลือและคอย
เป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบคุณนาย ศักรินทร์ บุญล้ำ นักศึกษาปริญญาเอกที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ
ตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด สำหรับคุณค่า
และประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กิจสิทธิ์ พรหมสุทธิ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไบโอดีเซล.....	4
2.2 ไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว.....	4
2.3 มาตรฐานไบโอดีเซล.....	6
2.4 โอกาสของไบโอดีเซลในการเป็นพลังงานทางเลือก.....	7
2.4.1 ปัญหาคาน้ำมันเชื้อเพลิง.....	7
2.4.2 ปัญหาสิ่งแวดล้อม.....	10
2.5 ประโยชน์ของการใช้เชื้อเพลิงไบโอดีเซล.....	11
2.6 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	11
2.6.1 การใช้โดยตรงและการผสม.....	12
2.6.2 ไมโครอิมัลชัน.....	12
2.6.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน.....	12
2.6.4 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	12
2.6.5 ปฏิกริยาสะปอนิฟิเคชัน.....	14
2.6.6 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	15
2.6.7. ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส.....	15
2.6.8 ปฏิกริยาอะมิโนไลซิส.....	15
2.6.9 การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบอื่นๆ.....	15
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 น้ำหรือความชื้น.....	16
2.7.2 ตัวเร่งปฏิกิริยา.....	16
2.7.3 ผลของเวลาและอุณหภูมิ.....	16
2.7.4 ปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยา.....	17
2.7.5 การกวนผสม.....	17
2.7.6 สัดส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน.....	17
2.8 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน.....	18
2.8.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี.....	18
2.8.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ.....	18
2.9 ข้อดีของการใช้ไบโอดีเซล.....	20
2.9.1 ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อม.....	20
2.9.2 ประโยชน์ด้านสมรรถนะของเครื่องยนต์.....	21
2.9.3 ประโยชน์ด้านสุขภาพ.....	21
2.9.4 ประโยชน์ด้านเศรษฐกิจ.....	21
2.10 ข้อเสียของการใช้ไบโอดีเซล.....	21
2.11 ความแตกต่างของไบโอดีเซลกับน้ำมันดีเซล.....	22
2.12 เอนไซม์ไลเปส.....	22
2.12.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส.....	22
2.12.2 ความจำเพาะของไลเปส.....	27
2.13 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์.....	28
2.14 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์.....	30
2.15 การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์.....	34
2.16 ไขมันและน้ำมัน.....	34
2.16.1 ไตรกลีเซอไรด์.....	34
2.16.2 ไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์.....	35
2.16.3 กรดไขมัน.....	35
2.17 การวิเคราะห์สมบัติเฉพาะทางเคมีของน้ำมันพืช.....	36
2.18 ปริมาณการผลิตน้ำมันพืชของประเทศไทย.....	37
2.19 ปริมาณน้ำมันพืชที่ใช้แล้วในประเทศไทย.....	37
2.20 น้ำมันทอดซ้ำ.....	39
2.20.1 อันตรายจากน้ำมันทอดซ้ำ.....	39
2.20.2 การเปลี่ยนแปลงของไขมันและน้ำมันระหว่างทอด.....	40

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.21 น้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว.....	40
2.21.1 ปริมาณน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว.....	41
2.21.2 ลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว.....	41
2.21.3 การบำบัดน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว.....	42
2.21.4 องค์ประกอบของน้ำมันพืชใช้แล้ว.....	43
2.22 การนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล.....	43
2.22.1 ใช้น้ำมันพืชโดยตรงหรือใช้ผสมกับน้ำมันดีเซล.....	43
2.22.2 น้ำมันพืชผสมน้ำมันก๊าด.....	44
2.22.3 ไบโอดีเซล.....	44
2.23 การแช่เยือกแข็ง.....	44
2.23.1 ขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง.....	46
2.23.2 เครื่องมือและระบบที่ใช้ในกระบวนการแช่เยือกแข็ง.....	47
2.24 แก๊สโครมาโตกราฟี.....	49
2.24.1 ประเภทของแก๊สโครมาโตกราฟี.....	49
2.24.2 องค์ประกอบของแก๊สโครมาโตกราฟี.....	50
2.25 การออกแบบพื้นที่ผิวการตอบสนอง.....	55
2.26 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	58
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	65
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	65
3.2 เครื่องมือ.....	65
3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	66
3.4 วัตถุประสงค์ เชื้อจุลินทรีย์ และการเก็บรักษา.....	66
3.5 การคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะอาหารแข็ง.....	67
3.6 การคัดเลือกขั้นที่สองของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหาร เหลว.....	67
3.7 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่ คัดเลือกและสายพันธุ์ผสม.....	67
3.8 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก.....	68

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง.....	68
3.10 การตรวจสอบยืนยันผล.....	70
3.11 การวางแผนการทดลองและสถิติ.....	71
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	74
4.1 ผลการคัดเลือกเบื้องต้น (primary screening) ของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็ง.....	74
4.2 ผลการคัดเลือกขั้นที่สอง (Secondary screening) ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว.....	75
4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก.....	76
4.4 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก.....	77
4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและการผลิตไบโอดีเซล.....	81
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	100
เอกสารอ้างอิง.....	103
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	114
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารละลายและวิธีการวิเคราะห์.....	117
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	129
ประวัติผู้เขียน.....	136

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล.....	5
2.2 องค์ประกอบเฉลี่ยกรดไขมันของน้ำมันพืชก่อนและหลังการใช้ประกอบอาหาร.....	8
2.3 ข้อกำหนดคุณสมบัติของไบโอดีเซลและวิธีการตรวจสอบ.....	9
2.4 การเปรียบเทียบการใช้เบสคะตะลิสต์และเอนไซม์คะตะลิสต์ในการผลิตไบโอดีเซล.....	19
2.5 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า.....	25
2.6 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยการใช้การเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว.....	31
2.7 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป.....	37
2.8 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช.....	38
2.9 ปริมาณการผลิตพืชน้ำมันของประเทศไทย.....	38
2.10 ปริมาณน้ำมันพืชที่ใช้และปริมาณน้ำมันพืชที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต.....	42
2.11 ลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วก่อนและหลังการบำบัด.....	45
2.12 องค์ประกอบเฉลี่ยของกรดไขมันของน้ำมันพืชใช้แล้ว.....	46
2.13 แสดงลักษณะที่สำคัญของคอลัมน์ในเครื่อง GC.....	52
3.1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับสำหรับหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม ตามแผนการทดลองแบบ CCD.....	71
3.2 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับสำหรับหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซล ตามแผนการทดลองแบบ CCD.....	71
3.3 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมโดยสายพันธุ์เชื้อซึ่งคัดเลือกจากแผนการทดลองแบบ CCD.....	72
3.4 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อร้อยละปริมาณของเอสเทอร์ของการผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมซึ่งคัดเลือกจากแผนการทดลองแบบ CCD.....	73
4.1 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	75
4.2 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	76
4.3 ผลของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมทรีเมื่อทำปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนกับเอทานอลบริสุทธิ์ที่อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	77
4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD.....	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS ของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม..... 83

4.6 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองเพื่อคำนวณหาค่า F ของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม..... 86

4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณของเชื้อในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD..... 89

4.8 การคาดคะเนกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้จากพื้นผิวตอบสนอง..... 90

4.9 ร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD 92

4.10 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS ของการผลิตไบโอดีเซล..... 91

4.11 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองเพื่อคำนวณหาค่า F ของการผลิตไบโอดีเซล..... 95

4.12 การคาดคะเนร้อยละปริมาณเอสเทอร์ด้วยปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้จากพื้นผิวตอบสนอง..... 98

ภาคผนวกที่ ข1 องค์ประกอบของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนประเภทน้ำมันถั่วเหลือง..... 120

ภาคผนวกที่ ค1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง..... 129

ภาคผนวกที่ ค2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง..... 129

ภาคผนวกที่ ค3 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง..... 130

ภาคผนวกที่ ค4 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 131

ภาคผนวกที่ ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 131

ภาคผนวกที่ ค6 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 132

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ค7 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของแบคทีเรีย และยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในอัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมตรี..... 133

ภาคผนวกที่ ค8 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในอัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมตรี..... 134

ภาคผนวกที่ ค9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในอัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมตรี..... 135



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กระบวนการแตกสลายทางความร้อน.....	13
2.2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	13
2.3 ขั้นตอนต่อเนื่องของการทำปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	14
2.4 ปฏิกริยาสaponifiเคชันจากกรดไขมันอิสระ.....	14
2.5 ปฏิกริยาสaponifiเคชันจากเอสเทอร์.....	14
2.6 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	15
2.7 ปฏิกริยาย่อยสลายและการสังเคราะห์เอสเทอร์ของเอโนไซม์ไลเปส.....	23
2.8 โครงสร้างโมเลกุลและตัวอย่างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์.....	35
2.9 โครงสร้างโมเลกุลของไดกลีเซอไรด์และโมนอกลิเซอไรด์.....	35
2.10 แสดงวิธีอิเล็กตรอนอิมแพ็คของโมเลกุลของสารตัวอย่าง.....	54
2.11 แสดงวิธีอิเล็กตรอนอิมแพ็คของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีพลังงานมาก.....	54
2.12 โครงสร้าง 3 มิติของพื้นที่ผิวการตอบสนอง.....	57
2.13 แสดงพื้นที่ผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟแบบโครงร่างพื้นผิว (ก) กราฟ 3 มิติ (ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ.....	57
2.14 จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองในแบบ composite design สำหรับ 3 ปัจจัย.....	58
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย และยีสต์ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar สำหรับแบคทีเรีย และ ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar สำหรับยีสต์ ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนร้อยละ 1 และ Rhodamine B.....	74
4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีแกรมบวก เซลล์รูปท่อน เรียงตัวเป็นสายยาว ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	77
4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ KPY9 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methylene blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	78
4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methylene blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลืองใช้ในครีวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	78
4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณรำข้าวและร้อยละปริมาณกากน้ำตาลที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....	87
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณรำข้าวและค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....	87
4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณกากน้ำตาลและค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....	88
4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมที่มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....	96
4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและระยะเวลาในการบ่มที่มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....	97
4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและระยะเวลาในการบ่มที่มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot).....	97
ภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร	117
ภาคผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 487 นาโนเมตร.....	123
ภาคผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ดีไนโตรซาลิกไซคลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.....	124
ภาคผนวกที่ ข4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย KPB10 บริเวณ 16S rRNA โดยใช้ปฏิกิริยาถูกลง.....	125
ภาคผนวกที่ ข5 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์ KPY9 บริเวณ 26S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาถูกลง.....	127

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนเวลาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อนักผู้ใดเห็นจำเป็นต้องขอขานการคำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ข6 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์ G47 บริเวณ 26S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยา
ลูกโซ่..... 128



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานสะอาดที่ได้จากการนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากสัตว์มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับโมเลกุลแอลกอฮอล์สายสั้นโดยมีกรด ต่าง หรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Gupta และคณะ, 2007; Leelaruji และคณะ, 2013) ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจที่เกิดจากการย่อยสลายทางชีวภาพอีกทั้งยังเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่ไม่เป็นพิษ อย่างไรก็ตามการเติมกรดหรือด่างซึ่งเป็นสารเคมีเพื่อเร่งปฏิกิริยาจะมีข้อเสียมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Leelaruji และคณะ, 2013) ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งนั้นสามารถนำไปใช้ในสภาวะของปฏิกิริยาที่ไม่มีความรุนแรงและสามารถแยกกลีเซอรอลออกได้ง่ายโดยไม่มีสารประกอบเชิงซ้อนปะปน แต่เนื่องจากกระบวนการเตรียมของเอนไซม์ไลเปสมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และการตรึงเอนไซม์ค่อนข้างซับซ้อนจึงทำให้มีราคาสูงตามไปด้วย ซึ่งทางเลือกใหม่ของการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์นั้นคือ การใช้ตัวเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งชีวภาพแทนเอนไซม์ไลเปสจึงช่วยลดปัญหาด้านต่างๆจากการใช้เอนไซม์ไลเปสในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Arabmarkadeh และคณะ, 2014)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งทางชีวภาพซึ่งจุลินทรีย์มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสแสดงให้เห็นว่าจะสามารถลดต้นทุนของการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Fukuda และคณะ, 2008) โดยได้มีการวิจัยและศึกษาทดลองซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยใช้เซลล์ของ *Rhizopus oryzae* ที่ตรึงเซลล์ที่มีศักยภาพเป็นตัวเร่งชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Tan และคณะ, 2010; Fukuda และคณะ, 2001) และใช้เซลล์ของ *Escherichia coli* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมมาใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลซึ่งเมทานอลจะทำปฏิกิริยากับ rapeseed oil ได้เป็นไบโอดีเซลถึงร้อยละ 97.7 (Gao และคณะ, 2009) ในขณะที่การใช้ตัวเซลล์ของ *Rhizopus oryzae* สามารถที่จะให้ผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลถึงร้อยละ 80 (Tamalampudi และคณะ, 2008) และมีการใช้ตัวเซลล์ของ *Rhodotorula mucilagenosa* P1189 ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลให้ผลิตภัณฑ์ของ Oleic methyl ester และ Fatty acid methyl ester ร้อยละ 64.12 และร้อยละ 51.26 (Srimhan และคณะ, 2011)

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้ คือทำการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากดินบริเวณ

โรงงานผลิตน้ำมันที่เก็บรักษาไว้ที่สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เอกสาร์เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้พิมพ์ใบใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจ้าคุณทหารลาดกระบังที่มีคุณสมบัติในการใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและทำการทดสอบหาสภาวะความเหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพของจุลินทรีย์ผสมและการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology ;RSM) โดยการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design ;CCD) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซลหลักเลียงการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิต รวมถึงลดอัตราค่าใช้จ่ายที่สูงสำหรับการใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองโดยใช้แผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองโดยใช้แผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการใช้ น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.2 ทดสอบความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

1.3.3 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกในระดับฟลาสก์

1.3.4 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมที่คัดเลือกในระดับฟลาสก์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.4 สามารถนำแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาใช้ในการผลิตเป็นตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้

1.4.2 สามารถประยุกต์ใช้ตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน เพื่อลดการใช้ตัวเร่งทางเคมีที่เป็นพิษทางสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

1.4.3 เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม เพื่อนำไปสู่ระดับอุตสาหกรรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ไบโอดีเซล (Biodiesel)

ไบโอดีเซล คือ แอลคิลเอสเทอร์ (alkyl esters) ของกรดไขมันสายโซ่ยาวที่พบในน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ โดยคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงของไบโอดีเซล คือ มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและมีความคงตัว ความหนืดเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน จุดวาบไฟของไบโอดีเซลมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง นอกจากนั้นแล้วไบโอดีเซลยังมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ถึงร้อยละ 10 -11 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นผลทำให้การเผาไหม้ในเครื่องยนต์สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซล (Srivastava และ Prasad, 2000) คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลแสดง ดังตารางที่ 2.1

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่นิยมในปัจจุบัน คือ การนำน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์รวมทั้งน้ำมันใช้แล้วจากการปรุงอาหาร มาเข้ากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (transesterification process) โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล และตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูง เพื่อเปลี่ยนให้เป็น เมทิลเอสเทอร์ เอทิลเอสเทอร์ หรือ แอลคิลเอสเทอร์อื่น ๆ และได้กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้

2.2 ไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว

น้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ที่ใช้แล้ว สามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก ทางเลือกหนึ่งคือการนำมาผลิตไบโอดีเซล โดยนำมาทำปฏิกิริยาทางเคมีกับแอลกอฮอล์ ถ้าใช้ต่างจำพวก โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ข้อสำคัญในการนำเอาน้ำมันพืชที่ใช้แล้วมาผลิตไบโอดีเซล คือ การขจัดสิ่งปนเปื้อนในน้ำมันก่อนทำปฏิกิริยา โดยตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วดูดหรือกรองน้ำมันส่วนชั้นน้ำมันใสขึ้นมา สิ่งที่ต้องพิจารณาได้แก่

1. มีน้ำปนเปื้อนในน้ำมันซึ่งจะมีผลเสียต่อการทำปฏิกิริยาสำหรับไบโอดีเซล ดังนั้นต้องกำจัดน้ำออกจากน้ำมัน

2. มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงในน้ำมัน ทำให้น้ำมันเป็นกรดมากและอาจทำให้เกิดเป็นสบู่ได้ง่าย ดังนั้นต้องกำจัดกรดโดยการใช้ปริมาณด่างที่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำมันและกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) ในน้ำมันเพื่อให้ไขมันไบโอดีเซลมีค่าเป็นกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล

Vegetable Oil methyl ester	Kinematic Viscosity (mm ² /s)	Cetane Number	Lower Heating Value (MJ/l)	Cloud Point (°C)	Flash Point (°C)	Density (g/L)	Sulfur Content (wt%)
Peanut ^a	4.9(37.8°C)	54	33.6	5	176	0.883	-
Soybean ^a	4.5(37.8°C)	45	33.5	1	178	0.885	-
Soybean ^b	4.0(40.0°C)	45.7-46	32.7	-	-	0.880(15°C)	-
Babassu ^a	3.6(37.8°C)	63	31.8	4	127	0.879	-
Palm ^a	5.7(37.8°C)	62	33.5	13	164	0.880	-
Palm ^b	4.3-4.5 (40.0°C)	64.3-70	32.4	-	-	0.872-0.877(15°C)	-
Sunflower ^a	4.6(37.8°C)	49	33.5	1	183	0.860	-
Tallow ^a	-	-	-	12	96	-	-
Rapeseed ^b	4.2(40°C)	51-59.7	32.8	-	-	0.882	-
Used Rapeseed ^c	9.48(30°C)	53	36.7	-	192	0.895	0.002
Used corn oil ^c	6.23(30°C)	63.9	42.3	-	166	0.884	0.0013
Diesel fuel ^b	1.2-3.5 (40°C)	51	35.5	-	-	0.830-0.840 (15°C)	-
JIS-2D ^c (gas oil)	2.8(30°C)	58	42.7	-	59	0.883	0.05

ที่มา : Srivastava และ Prasad (2000)

Varese และ Varese (1996)

Yamane และคณะ (2001)

Fukuda และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันพืชใช้แล้วมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวสูงขึ้น และการกระจายขนาด โมเลกุลที่มีขนาดมวลโมเลกุลต่ำมีร้อยละสูงขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำมันพืชก่อนการใช้แสดงดังตารางที่ 2.2 อาจมีสาเหตุจากการทำให้แตกตัวบางส่วนด้วยความร้อนขณะเมื่อถูกความร้อนระหว่างการถูกประกอบอาหาร นอกจากนี้ยังพบปริมาณเพอรอกไซด์ในน้ำมันพืชใช้แล้วมีค่าสูงเกินกว่ามาตรฐาน

2.3 มาตรฐานไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลอาจนำมาใช้โดยการผสมกับน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ ซึ่งเราเรียกชื่อของน้ำมันชนิดนี้โดยใช้สัญลักษณ์เป็น B แล้วตามด้วยตัวเลขที่แสดงปริมาณร้อยละของไบโอดีเซลที่ใช้ผสมเช่น B5 หมายถึง ไบโอดีเซลผสมที่มีไบโอดีเซลผสมอยู่ร้อยละ 5 โดยปริมาตร หรือการนำไบโอดีเซลมาใช้โดยไม่ผสมที่เราเรียกว่า B100 ไบโอดีเซลนอกจากจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับดีเซลแล้ว ยังเป็นเชื้อเพลิงที่เผาไหม้ได้ดี มีการสันดาปที่ต่ำกว่าน้ำมันดีเซล ช่วยลดแก๊ซคาร์บอนมอนอกไซด์ เขม่าและควันดำจากท่อไอเสียของเครื่องยนต์ จึงทำให้ปัจจุบันมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศ สำหรับประเทศไทยรัฐบาลได้ให้การสนับสนุนด้านการศึกษากระบวนการผลิตไบโอดีเซลเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำมันไบโอดีเซลและมีปริมาณเพียงพอที่จะนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล รวมทั้งการกำหนดมาตรฐานและวิธีการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของไบโอดีเซลเพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันล้วนโดยกรมธุรกิจพลังงาน ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษาเมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2548 ดังแสดงในตารางที่ 2.3 เมื่อพิจารณาข้อกำหนดและมาตรฐานวิธีทดสอบการตรวจสอบไบโอดีเซลในตารางที่ 2.3 สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน (รติกร, 2549) คือ

1. การตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไปที่เป็นข้อกำหนดคุณภาพที่ดีของน้ำมัน ได้แก่ ค่าความหนาแน่น ความหนืด จุดวาบไฟ ปริมาณกำมะถัน ปริมาณกากถ่าน จำนวนซีเทน ปริมาณเถ้าซัลเฟต ปริมาณน้ำ สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด การกักตกร้อนแผ่นทองแดง ค่าความเป็นกรด และปริมาณโลหะอัลคาไลน์และอัลคาไลน์เอิร์ทที่ปนเปื้อน

2. การตรวจสอบคุณสมบัติเฉพาะของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ ได้แก่

- ก. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์และกรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเทอร์ (สัดส่วนของปริมาณกรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันทั้งหมด) ซึ่งจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ที่ใช้

- ข. ปริมาณเมทานอล โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ กลีเซอรินอิสระ และกลีเซอรินทั้งหมด ซึ่งกำหนดเกณฑ์ให้มีปริมาณสารเหล่านี้อยู่ในปริมาณน้อย เพราะเป็นการบ่งชี้ถึงคุณภาพของไบโอดีเซล ยิ่งมีปริมาณสารเหล่านี้มาก ยิ่งบ่งชี้ถึงคุณภาพที่ต่ำลง อย่างไรก็ตาม ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บอกถึงความสมบูรณ์ของการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในน้ำมันพืชและสัตว์กับเมทานอล และมีกระบวนการแยกกลีเซอรินที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกไปได้เป็นอย่างดี

ค. ทดสอบการมีเสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ณ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และค่าไอโอดีน เนื่องจากไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนในอากาศ ซึ่งมีผลต่อเสถียรภาพการในเก็บรักษา

2.4 โอกาสของไบโอดีเซลในการเป็นพลังงานทางเลือก

แนวคิดเรื่องการนำน้ำมันพืชมาเป็นเชื้อเพลิงเริ่มต้นจาก Dr. Rudolph Diesel ได้ใช้น้ำมันถั่วลิสงเป็นเชื้อเพลิงให้กับเครื่องยนต์สันดาปภายในและแสดงในงานเอกซ์โปที่กรุงปารีสในปี ค.ศ. 1900 แต่ไม่เป็นที่สนใจมากนักเนื่องจากราคาน้ำมันดีเซลในขณะนั้นยังมีราคาถูก การนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงจึงมักใช้ในสถานการณ์คับขันเท่านั้น เช่น ในปี ค.ศ. 1980 ประเทศแถบอเมริกาใต้ถูกกดดันทางการเมืองและถูกปิดล้อมการขนส่งน้ำมัน ก็ได้ใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวันผสมน้ำมันเบนซินเป็นเชื้อเพลิง จนกระทั่งเหตุการณ์ขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในช่วงทศวรรษที่ 70 และสงครามอ่าวเปอร์เซียในปี ค.ศ. 1991 อีกทั้งปัญหาต่างๆ เช่น ราคาน้ำมันที่สูงขึ้น ปริมาณผลผลิตเกษตรที่เกินความต้องการและกระแสตื่นตัวในปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นตัวเร่งอย่างดีให้แต่ละประเทศค้นหาพลังงานจากแหล่งอื่นๆ เพื่อมาทดแทน ความตื่นตัวในการหาพลังงานน้ำมันดีเซลได้ขยายกว้างขวางขึ้น โดยมีสาเหตุมาจากปัญหาที่สำคัญ 2 ประการคือ

2.4.1 ปัญหาราคาน้ำมันเชื้อเพลิง

วิกฤติการณ์ขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในช่วงทศวรรษที่ 70 และสงครามอ่าวเปอร์เซียในปี ค.ศ. 1991 อีกทั้งประกาศเตือนจาก International Energy Agency ที่ออกมาระบุว่าน้ำมันปิโตรเลียมจะค่อยๆ หดไปจากส่วนต่างๆ บนโลกในอนาคตอันใกล้ สวนทางกับอุปสงค์จากประเทศกำลังพัฒนาโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากประเทศที่มีจำนวนมหาศาลอย่างประเทศจีน ยิ่งจะเป็นปัจจัยเร่งทำให้พลังงานสำรองของโลกลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่มีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีและนำเข้าพลังงานเกือบทั้งหมด เช่น สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ต้องหันกลับมาพิจารณาหาพลังงานทางเลือกของตนเองไม่ว่าจะเป็นไบโอดีเซล ไบโอดีทานอล พลังงานแสงแดด และพลังงานลม เป็นต้น

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบเฉลี่ยกรดไขมันของน้ำมันพืชก่อนและหลังการใช้ประกอบอาหาร

ชนิดของกรดไขมัน	ชื่อของกรดไขมัน	ร้อยละกรดไขมัน	
		ก่อนประกอบอาหาร	หลังประกอบอาหาร
C12:0	กรดลอริก (lauric acid)	0.45	0.32
C14:0	กรดไมริสติก (myristic acid)	0.38	0.93
C16:0	กรดปาล์มิติก (palmitic acid)	34.13	38.37
C18:0	กรดสเตียริก (stearic acid)	4.58	4.00
C20:0	กรดอาราซิดิก (arachidic acid)	0.34	0.34
รวมกรดไขมันอิ่มตัว		40.38	43.97
C16:1	กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic acid)	1.51	0.25
C18:1	กรดโอเลอิก (oleic acid)	42.89	45.59
C18:2	กรดลิโนเลอิก (linoleic acid)	14.60	10.03
C18:3	กรดลิโนเลนิก (linolenic acid)	0.62	0.16
รวมกรดไขมันไม่อิ่มตัว		59.62	56.03
ค่าเพอร์ออกไซด์ (peroxide Value)	มิลลิอิกวิวาเลนต์ของเปอร์ออกไซด์ต่อกิโลกรัม	2.98	28.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ข้อกำหนดคุณสมบัติของไบโอดีเซลและวิธีการตรวจสอบ

รายการ	คุณสมบัติ	ข้อกำหนด	วิธีทดสอบ
1	เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่ต่ำกว่า 96.5	EN 14103
2	ความหนาแน่น ณ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (density at 15 °C) กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร	ไม่ต่ำกว่า 860 และ ไม่สูงกว่า 900	ASTM D 1298
3	ความหนืด ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (viscosity at 40 °C) เซนติสโตกส์	ไม่ต่ำกว่า 3.5 และ ไม่สูงกว่า 5.0	ASTM D 445
4	จุดวาบไฟ (flash point) องศาเซลเซียส	ไม่ต่ำกว่า 120	ASTM D 93
5	กำมะถัน ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.0010	ASTM D 2622
6	กากถ่าน (ร้อยละ 10 ของกากที่เหลือจากการกลั่น)(carbon residue, on 10% distillation residue)	ไม่สูงกว่า 0.30	ASTM D 4530
7	จำนวนซีเทน (cetane number) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่ต่ำกว่า 51	ASTM D 613
8	เถ้าซัลเฟต (sulfated ash) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.02	ASTM D 874
9	น้ำ (water) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.050	ASTM D 2709
10	สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด (total contaminant) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า หมายเลข 1	ASTM D 5452
11	การกัดกร่อนแผ่นทองแดง (copper strip corrosion)	ไม่สูงกว่า หมายเลข 1	ASTM D 130
12	เสถียรภาพต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ณ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส (oxidation stability at 110 °C) ชั่วโมง	ไม่ต่ำกว่า 6	EN 14112
13	ค่าความเป็นกรด (acid number) มิลลิกรัมต่อโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม	ไม่สูงกว่า 0.50	ASTM D 664
14	ค่าไอโอดีน (Iodine value) กรัมไอโอดีนต่อ 100	ไม่สูงกว่า 120	EN14111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรัมนักเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

รายการ	คุณสมบัติ	ข้อกำหนด	วิธีทดสอบ
15	กรดลิโนลินิกเมทิลเอสเทอร์ ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 12.0	EN 14103
16	เมทานอล (methanol) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.20	EN 14110
17	โมนอกลิเซอไรด์ (monoglyceride) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.80	EN 14105
18	ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.20	EN 14105
19	ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.20	EN 14105
20	กลีเซอรินอิสระ (free glycerine) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.20	EN 14105
21	กลีเซอรินทั้งหมด (total glycerine) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.20	EN 14105
22	โลหะกลุ่มที่ 1 (โซเดียมและโพแทสเซียม) มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม โลหะกลุ่มที่ 2 (แคลเซียมและแมกนีเซียม) มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	ไม่สูงกว่า 5.0 ไม่สูงกว่า 5.0	EN 14108 และ EN14109 prEN14538
23	ฟอสฟอรัส (phosphorus) ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.0010	ASTM D 4951
24	สารเติมแต่ง (additive)(ถ้ามี)	ให้เป็นไปตามที่ได้รับความเห็นชอบจากอธิบดีกรมธุรกิจพลังงาน	

ที่มา : รติกร (2549)

2.4.2 ปัญหาสิ่งแวดล้อม

ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี ทางเศรษฐกิจ ทางการขนส่ง ได้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น โลกร้อน มลภาวะทางอากาศ โดยเฉพาะความร้อนที่

ได้จากการเผาผลาญน้ำมันเชื้อเพลิงของยานยนต์คิดเป็นร้อยละ 75 ของมลภาวะโลกทั้งหมดและมี
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวโน้มที่จะทวีความรุนแรงมากขึ้น เหล่านี้ล้วนเป็นภัยคุกคามต่อสุขภาพและคุณภาพชีวิตของมนุษย์ ทั้งสิ้น ในกลุ่มพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน ไบโอดีเซลมีความสำคัญในอนาคตอันใกล้เนื่องจากเป็นพลังงานหมุนเวียน ซึ่งมีอยู่ไม่จำกัดตราบดีที่โลกยังมีพืชและแสงแดด เป็นพลังงานสีเขียว ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม เมื่อเผาผลาญจะให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่าน้ำมันดีเซลปกติและไม่ปล่อยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ช่วยลดผลกระทบจากปรากฏการณ์เรือนกระจก นอกจากนี้ปัญหาเรื่องการขาดแคลนปิโตรเลียมและแรงกดดันจากสังคมเรื่องการแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อม ไบโอดีเซลยังเป็นแนวทางในการพัฒนาความยั่งยืนของระบบพลังงานและการเกษตร

2.5 ประโยชน์ของการใช้เชื้อเพลิงไบโอดีเซล

น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากการแปรสภาพน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์จากกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้เมื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์มีประโยชน์ดังนี้

1. เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงสะอาดและปลอดภัยโดยพบว่าก๊าซไอเสียจากน้ำมันไบโอดีเซลมีอันตรายน้อยกว่าน้ำมันดีเซลโดยผ่านการทดสอบจาก US-EPA Tier I Health Effects Testing ซึ่งเป็นหน่วยงานที่ได้รับการยอมรับในเรื่องการดูแลผลกระทบต่อสุขภาพทางสิ่งแวดล้อมของมนุษย์
2. สามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลรอบสูงหรือรอบต่ำได้เลยโดยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์ได้เหมือนกับเครื่องยนต์ดีเซลทั่วไปและสามารถยืดอายุการใช้งานของเครื่องยนต์ดีเซลเพราะไบโอดีเซลมีสารหล่อลื่นที่ดีกว่าน้ำมันดีเซล
3. ปลอดภัยในการจัดเก็บและขนส่งเพราะน้ำมันไบโอดีเซลมีจุดวาบไฟ (Flash point) สูงกว่าน้ำมันดีเซลและลุกติดไฟได้ยากกว่าในสภาพบรรยากาศ
4. การเผาไหม้ของน้ำมันไบโอดีเซลสมบูรณ์กว่าการเผาไหม้ของน้ำมันดีเซลจึงช่วยลดปริมาณคาร์บอนมอนอกไซด์ ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เผาไหม้และฝุ่น เป็นเชื้อเพลิงทางเลือกที่สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบภายในประเทศและเป็นพลังงานทดแทนที่สามารถนำมาใช้งานโดยนำมาผสม (Blends) กับน้ำมันดีเซลหรือใช้โดยตรงไม่ผสมกับน้ำมันดีเซลก็ได้

2.6 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Khan, 2002)

สำหรับวิธีการที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันมีหลายวิธี ทั้งที่เป็นแบบง่าย เช่น การผสมโดยตรง และจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และแบบยากที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบันคือ การทำปฏิกิริยากับเมทานอลที่สถานะเหนือวิกฤต ดังนั้นกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอาจแบ่งได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 การใช้โดยตรงและการผสม (direct use and blending)

เป็นการนำน้ำมันพืชบริสุทธิ์ไปใช้โดยตรงกับเครื่องยนต์ หรือการนำน้ำมันพืชผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้ ซึ่งอาจก่อปัญหาและผลกระทบต่อเครื่องยนต์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว แม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถใช้งานได้น้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูง มีปริมาณกรดไขมันอิสระและยางเหนียวที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและพอลิเมอไรเซชันในระหว่างการเก็บรักษา (Fukuda และคณะ, 2001) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของน้ำมันพืชต่อ น้ำมันดีเซล 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

2.6.2 ไมโครอิมัลชัน (microemulsions)

ไมโครอิมัลชัน คือคอลลอยด์ที่กระจายตัวอยู่ในสถานะสมดุล ซึ่งเกิดจากการก่อรูปขึ้นเองจากของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายในกันและกัน เนื่องจากในน้ำมันพืชบริสุทธิ์มีความหนืดสูง ไมโครอิมัลชันจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืดได้โดยการใช้ตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายคลึงกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

2.6.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermal cracking or pyrolysis)

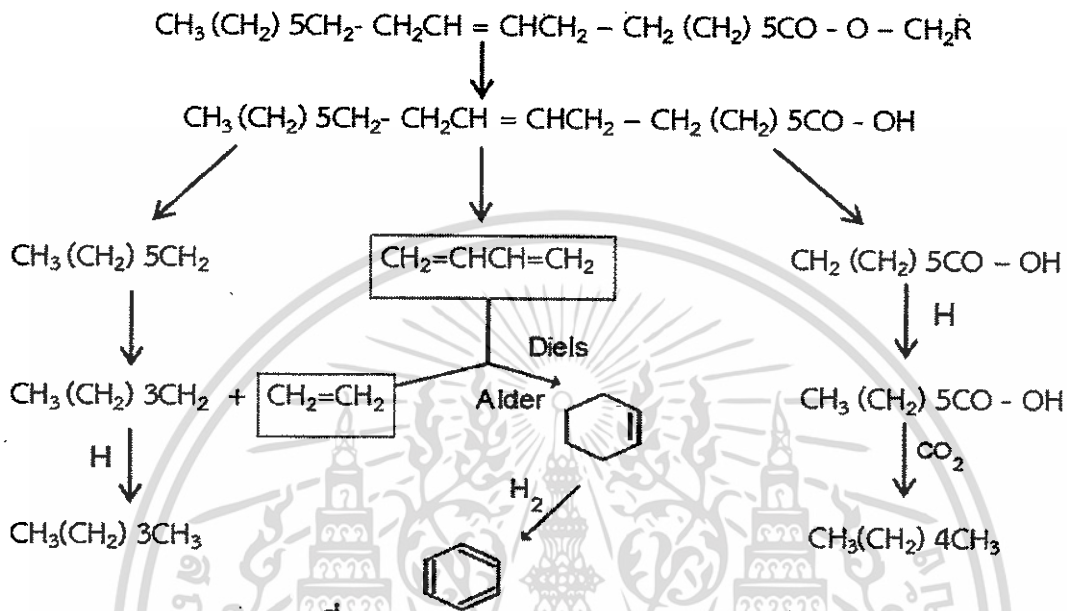
ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่นโดยอาศัยความร้อน เช่น ความร้อนที่ไม่ใช้ออกซิเจนหรือออกซิเจน ในช่วงอุณหภูมิ 450 – 850 องศาเซลเซียส การไพโรไลซิสไขมันเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลง โดยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ ได้แก่ SiO_2 หรือ Al_2O_3 แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมได้ นอกจากนี้กระบวนการนี้มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนแก๊สโซลีนมากกว่าไบโอดีเซลแสดงดังภาพที่ 2.1

2.6.4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (transesterification or alcoholysis)

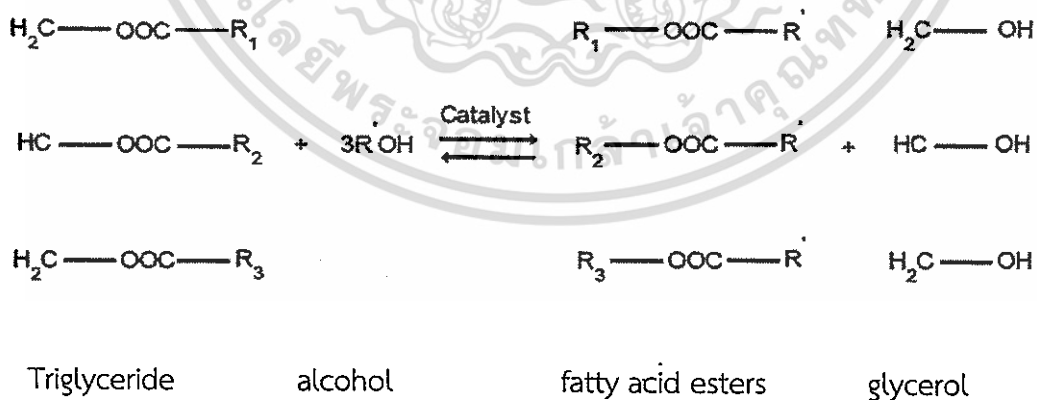
ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาของไขมันกับแอลกอฮอล์เพื่อเปลี่ยนรูปให้เป็นสารประกอบเอสเทอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาทั่วไปแสดงดังภาพที่ 2.2 และภาพที่ 2.3 แสดงขั้นตอนต่อเนื่องในการทำปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาเป็นแบบย้อนกลับ เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ จากนั้นไดกลีเซอไรด์จะเปลี่ยนต่อเป็นโมโนกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์จะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอล ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์หนึ่งโมเลกุล (Fukuda และคณะ, 2001) การเติมแอลกอฮอล์ที่มากเกินไปจะทำให้เป็นการบังคับปฏิกิริยาให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยสัดส่วนโมลของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน คือ 3:1 ไม่วารณใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือสามารถเพิ่มอัตราส่วนเป็น 6:1 เพื่อเพิ่มผลผลิต ตัวเร่งที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันนี้มีทั้งสารละลายกรด สารละลายเบส และเอนไซม์ไลเปส แอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพลพานอล บิวทานอล และเอมิลแอลกอฮอล์

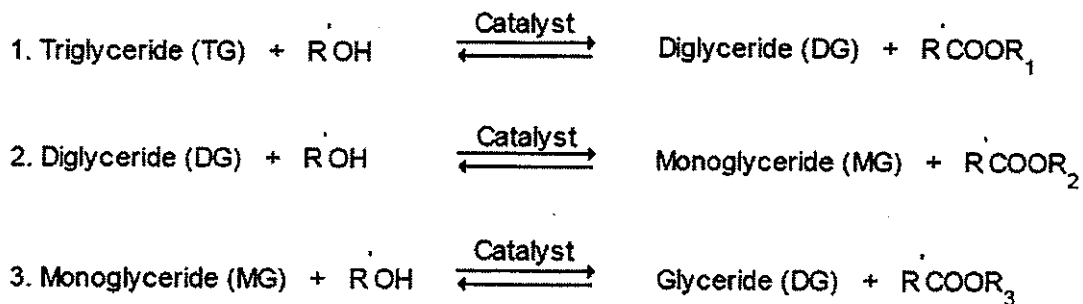


ภาพที่ 2.1 กระบวนการแตกสลายทางความร้อน
ที่มา: Srivastava และ Prasad (2000)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
ที่มา: Ma และ Hanna (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนต่อเนื่องของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา: Fukuda และคณะ (2001)

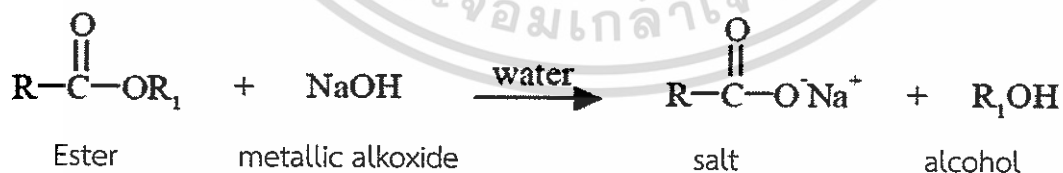
2.6.5 ปฏิกิริยาสaponification (saponification)

ปฏิกิริยาสaponification เป็นปฏิกิริยาที่สร้างสบู่ขึ้น เกิดจากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระกับสารละลายเบสโดยมีความร้อนในปฏิกิริยา หรือ เอสเทอร์กับสารละลายเบสโดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา ดังภาพที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาสaponification จากกรดไขมันอิสระ

ที่มา: Ma และ Hanna (1999)



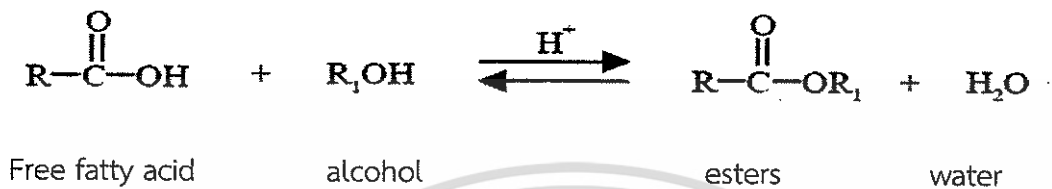
ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาสaponification จากเอสเทอร์

ที่มา: Ma และ Hanna (1999)

จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นว่า การใช้สารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยา กล่าวคือไม่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้เป็นแอลคิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลได้ แต่กลับทำให้เกิดสบู่ขึ้นซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการ และทำให้ต้องกำจัดสบู่เหล่านั้นออกอีกด้วย ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.6 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification)

ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดจากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระและแอลกอฮอล์ได้ผลิตภัณฑ์คือเอสเทอร์ ดังภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้โดยใช้กรดแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก และกรดไฮโดรคลอริก



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ที่มา: Khan (2002)

2.6.7 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง ได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล

2.6.8 ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis)

ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิสเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกลีเซอไรด์กับเอมีนได้เอไมด์และกลีเซอรอล จากนั้นเอสเทอร์จะเกิดจากการเติมหมู่ไนวคลีโอฟิลิก ซึ่งไปแทนที่ที่เอซิลคาร์บอนอะตอมของเอไมด์

2.6.9 การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบอื่นๆ

1. ปฏิกิริยาที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalysts)

ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ใช้ปกติ คือ ไลเปส แต่ต้องควบคุมสภาวะให้ดีที่สุดเพื่อรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์

2. ปฏิกิริยาเมทานอลเหนือวิกฤต (supercritical methanol)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้โดยปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้เมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤตโดยต้องกระทำที่อุณหภูมิ และความดันสูง

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นวิธีที่นิยมนำมาผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก อุณหภูมิและความดันที่ใช้ต่ำ ราคาต้นทุนต่ำเหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ (Schuchardt และคณะ, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (เกษรา, 2553)

2.7.1 น้ำหรือความชื้น

การที่มีความชื้นในไขมันจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขมันหรือน้ำมัน โดยน้ำจะเป็นสาเหตุให้ เกิดสบู่และสบู่ที่เกิดขึ้นจะปนกับเอสเทอร์และกลีเซอรินที่ได้ ทำให้สารละลายผสมทั้ง 2 มีความหนืดสูงขึ้น ส่งผลให้การแยกกลีเซอรินออกจากเอสเทอร์ได้ยากขึ้น วิธีป้องกันคือ แอลกอฮอล์ไขมันหรือน้ำมันควรมีน้ำหรือความชื้นปนน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย เพื่อให้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดได้สมบูรณ์

2.7.2 ตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล มีทั้งที่เป็นสารอนินทรีย์ และสารอินทรีย์ ที่เป็นสารอนินทรีย์คือ กรด และเบส ที่นิยมใช้คือตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส เนื่องจากเบส มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงและให้ผลดีที่อุณหภูมิต้องต่ำกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในกรณีที่ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้เป็นเบส ควรใช้เร่งปฏิกิริยาที่สอดคล้องกับแอลกอฮอล์ เช่น ถ้าใช้เอทานอลตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ควรเป็นโซเดียมเอธิลออกไซด์หรือโซเดียมเมธิลออกไซด์ ซึ่งจะมีประสิทธิภาพมากกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากปริมาณน้ำที่เกิดขึ้นจากการใช้โซเดียมเอธิลออกไซด์จะมีปริมาณน้อยกว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด พบว่ามีข้อเสียหลายประการ ได้แก่ ภาวะที่ใช้งานจะต้องมีความทนทานต่อการกัดกร่อนของกรด อัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อไขมันที่ใช้ต้องสูงและอุณหภูมิสูง และใช้เวลานานในการทำปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นสารอินทรีย์คือเอนไซม์ไลเปส มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้และการควบคุมสภาวะในการทำปฏิกิริยา เอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถเร่งปฏิกิริยากับสับเสตรทที่เป็นสารไม่มีขั้วคือน้ำมันได้ ซึ่งทำให้สามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติ หรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ปัจจุบันไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและมีคุณภาพสม่ำเสมอ

2.7.3 ผลของเวลาและอุณหภูมิ

อัตราการเกิดไบโอดีเซลจะแปรผันโดยตรงกับเวลา นั่นคือถ้าเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณเอสเทอร์มากขึ้นเช่นกัน อุณหภูมิเป็นปัจจัยอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลกระทบต่อเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาให้เพียงพอ ปฏิกิริยาก็คงเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เช่นกัน ภายใต้การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับจุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ เช่น ถ้าเป็นเมทานอล อุณหภูมิที่ใช้คือ 60-70 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศ (โดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา)

2.7.4 ปริมาณของตัวเร่งปฏิกิริยา

การผลิตไบโอดีเซลนั้นใช้กระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ ที่มาจากพืชน้ำมันหรือไขมันของสัตว์ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล และมีตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดหรือเบสหรือเอนไซม์ ซึ่งชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และความชื้นที่มีในวัตถุดิบน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ ตัวเร่งปฏิกิริยาเอกพันธ์ชนิดกรด (homogeneous acid catalyst) นั้นเหมาะกับน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง เช่น ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เพราะปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจะไม่ทำให้เกิดสบู่เจือปนในไบโอดีเซล แต่ก็มีข้อเสียที่ปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ช้าใช้เวลาในการทำปฏิกิริยามากกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเอกพันธ์ชนิดเบส (homogeneous base catalyst) ถึง 100 เท่า และใช้อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันค่อนข้างสูง เช่น การใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะใช้อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน 12 ต่อ 1 ใช้เวลาทำปฏิกิริยานานถึง 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส เช่น โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) จะให้ร้อยละของผลผลิตสูง แต่ต้องใช้กับวัตถุดิบน้ำมันหรือไขมันที่มีความชื้นและปริมาณของกรดไขมันอิสระต่ำหรือน้อยกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก จึงทำให้มีต้นทุนเพิ่มมากขึ้น

2.7.5 การกวนผสม

การกวนผสมถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากสำหรับปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน เพราะน้ำมันหรือไขมันที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลนั้นไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับแอลกอฮอล์และตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงต้องมีการผสมให้เนื้อสารสัมผัสกันปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันจึงจะเกิดและเป็นไบโอดีเซล

2.7.6 สัดส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน

สัดส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันมีผลต่อปริมาณของเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น โดยตามทฤษฎีสัดส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันจะเท่ากับ 3 ต่อ 1 ในทางปฏิบัติจะต้องใช้ปริมาณของแอลกอฮอล์มากกว่าตามทฤษฎี เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งปกติจะใช้อัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันระหว่าง 6 ต่อ 1 ถึง 15 ต่อ 1 ดังนั้นจะมีแอลกอฮอล์เหลือจากการทำปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ซึ่งจะต้องมีระบบการกลั่นเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตเมทิลเอสเทอร์แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (chemical catalyst) และ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (enzymatic catalyst) (Fukuda และคณะ, 2001)

2.8.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี

2.8.1.1 กรดอะซิติก

กรดที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ กรดซัลฟูริกกรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลโฟนิก การใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาจะใช้เวลานาน(3-4 ชั่วโมง) และอุณหภูมิสูง (100 องศาเซลเซียส) (Encinar และคณะ, 2002) แต่จะเหมาะสมกับกลีเซอไรด์ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระ และปริมาณน้ำสูง (Fukuda และคณะ, 2001)

2.8.1.2 เบสอะซิติก

เบสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น เบสอะซิติก สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่ากรดอะซิติก 4000 เท่า เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน (Fukuda และคณะ, 2001) และมีรายงานว่า เบสอะซิติกสามารถเร่งปฏิกิริยาได้สมบูรณ์โดยใช้เวลาเพียง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Encinar และคณะ, 2002) แต่อย่างไรก็ตามเบสอะซิติกมีข้อเสียคือ ในน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสaponification ระหว่างกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์กลายเป็นสบู่ ทำให้มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล

2.8.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (ผกาวดี และยุเรศ, 2550)

การใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ถึงแม้จะใช้เวลานานในการทำปฏิกิริยา แต่มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่กำจัดยาก ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน เพราะใช้อุณหภูมิที่ต่ำในการทำปฏิกิริยา มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาสูง แสดงดังตารางที่ 2.4 เอนไซม์ที่นำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ส่วนมากมีต้นทุนในการผลิตสูงและมีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ทั่วไป คือไม่เสถียร ดังนั้น จึงมีการพัฒนาการนำเอนไซม์ไลเปสกลับมาใช้ได้หลาย ๆ รอบ โดยการจับตรึงบนตัวพุง (Immobilization)

ตารางที่ 2.4 การเปรียบเทียบการใช้เบสคตะลิสต์และเอนไซม์คตะลิสต์ในการผลิตไบโอดีเซล

รายละเอียด	เบสคตะลิสต์	เอนไซม์คตะลิสต์
อุณหภูมิในปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
กรดไขมันอิสระ	สูง	เมทิลเอสเทอร์
น้ำในองค์ประกอบ	สูง	เมทิลเอสเทอร์
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ธรรมดา	สูงกว่า
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ล้างซ้ำหลายครั้ง	ไม่ต้องล้าง
ต้นทุนในการผลิต	ราคาสูง	ราคาแพงกว่า

ที่มา : Fukada และคณะ (2001)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพหรือที่เรียกว่า ตัวคตะลิสต์ชีวภาพ (biocatalyst) ในแง่ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหมายถึง เอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายกรดไขมันในพืชและไขมันสัตว์ได้ซึ่งในที่นี้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส (lipase enzyme) ที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นต้น

วิธีการเตรียมหรือการนำตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลสามารถทำได้ 4 รูปแบบ กล่าวคือการใช้จุลินทรีย์อิสระไปเลี้ยงในสารละลายของน้ำมันกับแอลกอฮอล์ เพื่อให้เซลล์จุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ไลเปสออกมาช่วยย่อยน้ำมัน อีกรูปแบบหนึ่งเป็นการควบคุมไม่ให้เซลล์จุลินทรีย์เคลื่อนที่โดยการนำมาตรึงไว้กับวัสดุบางอย่างที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับสารละลายของน้ำมันกับแอลกอฮอล์ หรือเรียกว่า ตัวค้ำจุน (Support) (Lu และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์อิสระไปเติมลงในสารละลายน้ำมันกับแอลกอฮอล์โดยตรงขณะเดียวกันเอนไซม์บริสุทธิ์ดังกล่าวก็สามารถนำมาตรึงไว้ไม่ให้เคลื่อนที่ได้เรียกว่า เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzymes) อย่างไรก็ตามมีรายงานอ้างว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพชนิดเซลล์ตรึงรูปและเอนไซม์ตรึงรูป ให้ประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซลมากกว่าการใช้เซลล์อิสระหรือเอนไซม์อิสระ (Lu และคณะ, 2007; Vicente และคณะ, 2004)

ข้อดีของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล โดยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพนับเป็นแนวทางใหม่ที่น่าสนใจอย่างยิ่งเพราะวิธีการดังกล่าวไม่ก่อปัญหาให้กับสิ่งแวดล้อม ไม่สิ้นเปลืองพลังงานมากเพราะปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นในสภาวะอุณหภูมิปกติทั่วไป ผิดกับในกรณีที่ใช้

กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรง อีกทั้งต้องใช้อุณหภูมิในการทำไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาสูง ส่วนกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันไม่สร้างปัญหาใดๆ และในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้น สามารถแยกออกจากไบโอดีเซลได้ง่าย และสามารถใช้ประโยชน์ต่อไปโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งแตกต่างจากการผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งจะต้องผ่านขั้นตอนการล้างด้วยน้ำอีกหลายครั้ง นอกจากนี้วิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสให้อยู่ในรูปตรึงบนวัสดุแข็งจะสามารถนำเซลล์ตรึงรูปนั้น กลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลายครั้ง (Köse และคณะ, 2002) โดยที่ยังรักษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาหรือกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ไว้ได้เหมือนเดิม (Royon และคณะ, 2007) ซึ่งจะทำให้ลดปัญหาราคาของเอนไซม์ที่สูงอยู่ให้ลดลงได้ นอกจากนี้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ยังมีข้อดีอีกหลายประการ เช่น การรักษาสภาพของวิตามินอีในน้ำมันปาล์มในปริมาณสูงไม่สูญเสียซึ่งสามารถแยกออกมาใช้ประโยชน์ได้และมีมูลค่าสูงในขณะที่สารเหล่านี้ถูกทำลายด้วยความร้อนในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี

2.9 ข้อดีของการใช้ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลมีที่มาจากพืชหรือสัตว์ สามารถผลิตทดแทนได้ ไม่มีวันหมด ย่อยสลายได้เอง ไม่มีพิษ ขณะที่น้ำมันดีเซลผลิตได้จากปิโตรเลียมและนับวันมีแต่จะใช้หมดไปและไม่สามารถสร้างมาทดแทนใหม่ได้นอกจากนี้วัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลอาจเป็นสิ่งที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น น้ำมันที่ใช้แล้วหรือเศษไขมันสัตว์ แต่เมื่อพิจารณาจะพบว่าการใช้พืชที่สามารถสกัดน้ำมัน เช่น ถั่วเหลือง และปาล์มในการผลิตไบโอดีเซลมีข้อดีคือ ทำให้ราคาของพืชชนิดนั้นสูงขึ้นและเกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น ลดการพึ่งพาน้ำมันที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และเป็นอีกทางเลือกของเกษตรกรที่นิยมหันมาปลูกพืชพลังงานมากขึ้น

2.9.1 ประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อม

1. สามารถช่วยลดปริมาณมลพิษจากท่อไอเสีย สามารถลดควันดำลงได้อย่างมีนัยสำคัญ (สามารถลดจำนวนสารชนิดต่างๆดังนี้คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 100 ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร้อยละ 100 ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ร้อยละ 10-50 ก๊าซไฮโดรคาร์บอนร้อยละ 10-50 และโพลีไซคลิกอะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน ทุกชนิด)
2. เป็นเชื้อเพลิงสะอาด มีปริมาณกำมะถันน้อยมาก เมื่อเทียบกับน้ำมันดีเซล เมื่อนำมาใช้ในเมืองใหญ่และพื้นที่ที่มีปัญหาสิ่งแวดล้อม จะช่วยลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมได้และลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 ประโยชน์ด้านสมรรถนะของเครื่องยนต์

1. จะช่วยยืดอายุการใช้งานของเครื่องยนต์ดีเซล เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีความหนืดน้อยช่วยหล่อลื่นเครื่องยนต์ได้ดีกว่าน้ำมันดีเซล
2. เพิ่มประสิทธิภาพการเผาไหม้ดีขึ้น เนื่องจากไบโอดีเซลมีออกซิเจนผสมอยู่ประมาณร้อยละ 10
3. เป็นน้ำมันเพียงชนิดเดียวที่สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลทั่วไปได้ทันที โดยที่กำลังเครื่อง แรงบิด การจุดระเบิด และอัตราการกินน้ำมันยังคงเหมือนเดิม และสามารถเลือกได้ว่า จะใช้ไบโอดีเซลร้อยละ 10 เพียงอย่างเดียว หรือจะใช้ผสมน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ ได้ตามต้องการ

2.9.3 ประโยชน์ด้านสุขภาพ

1. สามารถลดสารไดออกซิน ที่เป็นสารก่อมะเร็งโดยนำน้ำมันใช้แล้วมาผลิตเป็นไบโอดีเซล แทนการนำกลับไปใช้ประกอบอาหารอีก
2. ลดมลพิษทางอากาศ ส่งผลดีต่อสุขภาพโดยรวมของประชาชน

2.9.4 ประโยชน์ด้านเศรษฐกิจ

1. ช่วยประหยัดเงินตราต่างประเทศในการลดการนำเข้าน้ำมันดีเซล
2. ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการปรับแต่งเครื่องยนต์ สามารถใช้ได้เลย
3. สามารถใช้ร่วมกับน้ำมันดีเซลได้โดยไม่ต้องรอให้น้ำมันหมดถัง

โดยรวมแล้วการใช้ไบโอดีเซลสามารถลดมลพิษทางอากาศ ซึ่งเป็นผลจากการเผาไหม้ในเครื่องยนต์ได้ส่วนหนึ่ง เนื่องจากองค์ประกอบของไบโอดีเซลไม่มีธาตุกำมะถัน แต่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักจึงช่วยการเผาไหม้ได้ดีขึ้นและลดมลพิษจากซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน คาร์บอนมอนอกไซด์ ฝุ่นละออง ฯลฯ นอกจากนี้ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติในการหล่อลื่นดีกว่าน้ำมันดีเซล จึงมีการนำไบโอดีเซลมาใช้ผสมน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ กัน ที่สำคัญคือ ไบโอดีเซลยังเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถผลิตได้ในแต่ละท้องถิ่น โดยไม่ต้องอาศัยโรงงานหรือเครื่องมือที่สลับซับซ้อน จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะสามารถผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงใช้ตัวเอง ทำให้สามารถพึ่งพาตนเองได้

2.10 ข้อเสียของการใช้ไบโอดีเซล

ในด้านเทคนิคที่มักจะเกิดขึ้นเสมอในเครื่องยนต์ดีเซลที่ใช้น้ำมันไบโอดีเซลก็คือ หากใช้ไบโอดีเซลร้อยละ 10 จะทำให้ชิ้นส่วนต่างๆ ที่ทำจากยางธรรมชาติเปื่อยยุ่ยได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเปลี่ยนการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นส่วนท่อต่างๆ ที่น้ำมันไหลผ่านให้เป็นอย่างสังเคราะห์ก็จะสามารถแก้ปัญหาได้ สำหรับการใช้น้ำมันไบโอดีเซลแบบผสมกับน้ำมันดีเซล เช่น ดีเซล ร้อยละ 95 ไบโอดีเซลร้อยละ 5 ที่จำหน่ายโดยการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย อยู่ในเวลานี้ก็ไม่ต้องเปลี่ยนท่อใดๆ เพียงแต่เปลี่ยนไส้กรองน้ำมันหลังจากใช้น้ำมันไบโอดีเซลในครั้งแรกไปได้สักพักเท่านั้นก็พอ เพราะตัวไบโอดีเซลจะไปชะล้างคราบเขม่าและคราบสกปรกอื่นๆ ที่เคยติดค้างอยู่ในระบบเครื่องยนต์ หลังจากนั้นก็ใช้ไปตามปกติเหมือนเดิม

2.11 ความแตกต่างของไบโอดีเซลกับน้ำมันดีเซล

ไบโอดีเซลมีที่มาจากพืชหรือสัตว์ สามารถหาทดแทนได้ด้วยการปลูกหรือเลี้ยงใหม่ แต่น้ำมันดีเซลเป็นสิ่งที่ได้มาจากการกระทำของธรรมชาติโดยตรง อาจจะต้องใช้เวลาหลายล้านปีจึงจะได้เป็นน้ำมันดีเซล ขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลต้องใช้สารเคมีชนิดต่างๆ เข้าร่วมด้วย รวมทั้งการใช้เอนไซม์ซึ่งต้องอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมี แต่การผลิตน้ำมันดีเซลต้องใช้ในการขุดเจาะไปได้ดินเพื่อนำน้ำมันดิบมากลับเป็นน้ำมันชนิดต่างๆ ประเทศไทยไม่มีแหล่งในการขุดเจาะน้ำมันที่เพียงพอต่อการใช้งาน จึงจำเป็นต้องพึ่งพาการนำเข้ามาจากต่างประเทศ แต่สำหรับไบโอดีเซลนั้นสามารถผลิตได้เองในประเทศ ทำให้สามารถที่จะควบคุมราคาของน้ำมันไบโอดีเซลได้ง่ายกว่าน้ำมันดีเซล

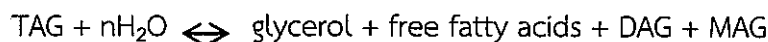
เนื่องจากไบโอดีเซลมีอยู่ด้วยกัน 3 ชนิด คือ ไบโอดีเซล B5, B20 และ B100 ซึ่งทั้ง 3 ชนิดจะมีสมบัติทางฟิสิกส์และสมบัติทางการเผาไหม้ที่แตกต่างกันรวมทั้งค่าการปลดปล่อยของเสียสู่สิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน

2.12 เอนไซม์ไลเปส (ณัฎฐภัทร, 2547)

เอนไซม์ไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ประเภท triacylglycerol acylhydrolases ตาม The International Union of Biochemistry (IUB) system มีรหัส เป็น EC.3.1.1.3 ไลเปสที่แท้จริง (true lipase) ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (triacylglycerol) ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันอิสระ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และ กลีเซอรอล ดังภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบที่มีน้ำน้อย (microaqueous) หรือในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยปฏิกิริยาผันกลับได้นี้มี 2 ปฏิกิริยา คือ ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันและเอสเทอร์ิฟิเคชัน

2.12.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเมตาบอลิซึม (metabolism) ของไขมันซึ่งมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด ความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต จึงพบในทั้ง สัตว์ พืช และจุลินทรีย์



TAG = ไตรกลีเซอรอล

DAG = ไดเอซิลกลีเซอรอล

MAG = โมโนเอซิลกลีเซอรอล

ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาย่อยสลาย (hydrolysis) และ การสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) ของ เอนไซม์ไลเปส

ที่มา: Jaeger และ Reetz (1998)

2.12.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (animal lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากตับ (pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลไขมันในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เอนไซม์ประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อ (tissue lipases) นี้มีบทบาทและความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคและในทางการแพทย์ จึงมีความพยายามเสาะหาแหล่งเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งใหม่ ๆ อยู่ตลอดเวลา พบว่าไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล *Canine* เป็นแหล่งของไลเปสที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) คล้ายกับของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์สายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ *Sus scrofa* (หมู) *Bos taurus* (วัว) และโดยเฉพาะใน *Homo sapiens* (มนุษย์) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจไลเปสจากสัตว์ตระกูล *Canine* มากขึ้นเนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้

แมลงเป็นแหล่งของไลเปสอีกแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* ซึ่งผลิตไลเปสชนิดใหม่ที่ทำงานได้ดีในพีเอชเป็นกลาง (neutral lipase) ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารทดแทนของ pregastric lipase ที่นำมาใช้เป็นยารักษาภาวะน้ำหนักเกิน (obesity) และการทำงานผิดปกติของกระบวนการย่อยและสังเคราะห์สารต่าง ๆ (metabolic disorder) ในมนุษย์

2.12.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช (plant lipases)

ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูงและมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและจุลินทรีย์ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจเพื่อนำไลเปสจากแหล่งนี้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

ผลปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้าเป็นแหล่งสำคัญของไลเปส รายงานว่าโดยธรรมชาติเมล็ดพืช (seed) สะสมไขมันไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใน lipid-bodies และ glyoxysomes อันเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปสด้วย ขณะที่ไลเปสของเมล็ดธัญพืช (grain lipase) พบได้ในรำ (bran) เช่น รำข้าวสาลี และ รำข้าวเจ้า

Carica papaya latex (CPL) หรือยางมะละกอ ซึ่งทราบกันว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteases) ได้แก่ papain และ thiol protease อื่น ๆ อย่างไรก็ตาม Mangos และคณะ, 1999 พบไลเปสในยางมะละกอด้วย นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ไลเปสในพืชตระกูลหญ้า (*Gramineae*) ที่มีราคาไม่แพง ซึ่ง Mohamed และคณะ, 2000 รายงานว่าพบเอนไซม์ไลเปสใน *Avena fatua* สูงถึง 93.9 หน่วยต่อกรัม

2.12.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (microbial lipases)

เนื่องจากไลเปสจากพืชจะพบในเนื้อเยื่อที่ให้พลังงาน (energy tissue) ส่วนไลเปสจากสัตว์ มักเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเมแทบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism) ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมัน และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (lipoprotein metabolism) ทำให้เกิดความซับซ้อนในการสกัดยังเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้แหล่งไลเปสทั้งสองจึงยังไม่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ต่างกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เป็นแหล่งของไลเปสที่ถูกนำไปใช้อย่างมากมายในอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ไลเปสจากแหล่งนี้มีคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญ 4 ประการ คือ (1) มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (2) ในการทำงานไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactors) (3) มีความจำเพาะต่อสับสเตรตหลายชนิด และ (4) มี enantioselectivity สูง

จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสพบได้ในแหล่งต่าง ๆ ทางธรรมชาติ เช่น ในน้ำเสีย หรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหรือไขมัน เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารที่เน่าเสีย กองปุ๋ยคอก (compost heaps) ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ในทางการค้า 129 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อรา 53 สายพันธุ์ ยีสต์ 23 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 53 สายพันธุ์ สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังกล่าวแสดงในตารางที่ 2.5

2.12.1.3.1 เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์

ไลเปสที่ใช้กันแพร่หลายในทางการค้าส่วนใหญ่ได้มาจากเชื้อรา ได้แก่ *Mucor javanicus*, *Humicola launginosa*, *Rhizopus sp.*, *Geotrichum sp.* และ ยีสต์ ได้แก่ *Candida lipolytica*, *C. antarctica*, *C. rugosa* และ *C. cylindracea* เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งนี้มักนิยมใช้ในการ resolution ของ secondary alcohol esters

ตารางที่ 2.5 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า

Bacteria	Fungi	Yeast
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Absida corymbifera</i>	<i>Candida</i> sp.
<i>A. lipolyticus</i>	<i>A. byalospora</i>	<i>C. antarcea</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Asperfillus</i> sp.	<i>C. auricularia</i>
<i>A. calocoaceticus</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>C. curvata</i>
<i>A. pseudoalcaligenes</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>C. cylindracea</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>C. lipolitica</i>
<i>A. denitrificans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. deformans</i>
<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>C. foliorum</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>A. niger</i>	<i>C. humicula</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. rugosa</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Chaetomium thermophile</i>	<i>C. tsukubaensis</i>
<i>B. laterosporus</i>	<i>Coelomyceles</i>	<i>Pichia miso</i>
<i>B. spherecius</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Proteus</i> sp.
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>F. solari</i>	<i>S. fragilis</i>
<i>B. thaiminolyticus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>S. fibuligera</i>
<i>B. thermocatenulatus</i>	<i>Glomus versiforme</i>	<i>S. lipolytica</i>
<i>B. thermoleovocans</i>	<i>Hansenula anomala</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Chromobacterium</i> sp.	<i>H. insulens</i>	<i>Sporotrichum hermophile</i>
<i>C. chokolatum</i>	<i>H. lanuginosa</i>	<i>Talaromyces thermophilus</i>
<i>C. viscosum</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	<i>Thielavia minor</i>
<i>Corynebacterium arborescens</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Torula thermophila</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Mucor javanicus</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Mucor lipolyticus</i>	
<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Mucor miehei</i>	
<i>F. ferruginem</i>	<i>Mucor pusillus</i>	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 (ต่อ)

Bacteria	Fungi	Yeast
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Nocardia amarae</i>	
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	
<i>Malbrancheae pulcella</i>	<i>P. camembertii</i>	
<i>Micrococcus frendenreichii</i>	<i>P. cyclopium</i>	
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>P. roquefortii</i>	
<i>Myxococcus xantus</i>	<i>P. candidum</i>	
<i>Propiomibacterium acnes</i>	<i>P. citrinum</i>	
<i>P. granulorum</i>	<i>P. simplicissimum</i>	
<i>Protaminobacter alboflavus</i>	<i>P. solitum</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. urticae</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Phycomyces nitens</i>	
<i>P. cepacia</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>	
<i>P. fluorescen</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	
<i>P. fragi</i>	<i>Rchinensis</i>	
<i>P. pseudoalcligens</i>	<i>R. delemar</i>	
<i>P. stutzeri</i>	<i>R. japonicus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>R. oligospora</i>	
<i>S. hyicus</i>	<i>R. niveus</i>	
<i>S. wameri</i>	<i>R. nodosus</i>	
<i>S. xylosus</i>	<i>R. oryzae</i>	
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>R. nigricans</i>	
<i>S. lactis</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	
<i>S. coelicolor</i>	<i>R. pilimonate</i>	
<i>S. fradiae</i>	<i>R. glutinus</i>	
<i>S. panayensis</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	
<i>Rhodococcus rubra</i>	<i>Sphaeroides</i>	

ที่มา: Godtfredsen (1990); Pandey และคณะ (1999); Mayordomo และคณะ (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.1.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

ไลเปสจากแบคทีเรียมีความสำคัญที่สุดในตลาดเอนไซม์และการวิจัยทางด้านเอนไซม์ เนื่องจากไม่เพียงสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ๆ แต่ยังมีความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่างอุณหภูมิสูงและตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งยังมีคุณสมบัติ regioselectivity และ chiral selectivity ที่เด่นชัดด้วย เอนไซม์จากแหล่งนี้มี 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

กลุ่มที่ 1 มี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas alcaligenes* เอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 258 โมเลกุล ส่วนชนิดที่สองเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas glumae* และ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 320 โมเลกุล

กลุ่มที่ 2 ได้แก่เอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas fluorescens* และ *enterobacterium*, *Serratia marcescens* เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ากลุ่มแรก และมีขนาดและลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึง (sequence homology) เล็กน้อย ยกเว้น ส่วนที่เป็น N-terminal และลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับบริเวณเร่งชีรีน (active site serine)

กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้แก่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus sp.* และ *Staphylococcus* เอนไซม์ในกลุ่มที่ 3 นี้มีกรดอะมิโน alanine (Ala) เป็นกรดอะมิโนตัวแรกใน consensus pentapeptide sequence (Gly-X-Ser-X-Gly) แทนที่จะเป็น glycine (Gly) แบบเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ (Lee และคณะ, 2001)

2.12.2 ความจำเพาะของไลเปส (เชิตศักดิ์, 2535)

ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของไลเปสต่อกรดไขมันตำแหน่งที่ 1 ในโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ถูกไฮโดรไลส์ ทำให้สามารถจำแนกไลเปสได้เป็น 3 กลุ่ม (Macrae, 1983)

กลุ่มที่หนึ่ง คือไลเปสที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1, 3-specific lipase) ซึ่งไฮโดรไลส์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้กรดไขมันอิสระและ 1, 2- หรือ 2, 3-ไดเอซิลกลีเซอรอล และได้ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่เนื่องจากเอซิลกลีเซอรอลที่ได้นี้มักไม่เสถียร ถ้าให้เวลาในการย่อยนานขึ้นก็จะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 1, 3- ไดเอซิลกลีเซอรอลและ 1- หรือ 3- โมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่ถ้าให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างของไลเปสกลุ่มนี้ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, และไลเปสจากรำข้าว

กลุ่มที่สอง คือไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันในเอกลูของเอซิลกลีเซอรอล (non-specific lipase) สามารถที่จะไฮโดรไลส์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล แต่อาจพบไตรเอซิลกลีเซอรอลและโมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นสาร intermediate ในปฏิกิริยา ตัวอย่างของไลเปสในกลุ่มนี้ เช่น ไลเปส *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphyococcus aureus* และไลเปสจากตับอ่อนสุกร

กลุ่มที่สาม คือไลเปสที่มีความจำเพาะกับชนิดของกรดไขมัน (fatty acid-specific lipase) ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักไม่แสดงคุณสมบัตินี้ แต่มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geotrichum candidum* ที่ผลิตไลเปสที่ไฮโดรไลสเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันโมเลกุลสายยาวซึ่งประกอบด้วยพันธะคู่ที่เป็น cis-form ในตำแหน่งที่ 9 ส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัวหรือชนิดไม่อิ่มตัวไม่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 จะถูกไฮโดรไลสได้อย่างช้า ๆ

2.13 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ (วารารุณี, 2539)

จุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติสามารถใช้วัตถุดิบจำพวกสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติได้โดยอาศัยการย่อยสลาย (decomposed) ซึ่งอาจเกิดการทำงานของเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจากจุลินทรีย์เหล่านั้น ดังนั้นในการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ที่จะผลิตเอนไซม์ จึงอาจจะอาศัยแหล่งสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เช่น จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนิน (lignolytic enzyme) จะพบในดินที่อยู่ในป่าหรือในมูลสัตว์ อย่างไรก็ตามในดินทั่วไปก็สามารถที่จะหาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้เช่นกัน

ในการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อาศัยเทคนิคที่สำคัญคือ การเสริมอาหาร (enrichment) และการเลือกอาหารที่เฉพาะต่อจุลินทรีย์ที่ต้องการ ดังนั้นสับสเตรทที่เฉพาะสำหรับเอนไซม์จึงเป็นแหล่งอาหารที่เป็นหัวใจของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นั้น เช่น ในการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ureate oxidase จะใช้อาหาร uric acid salt เป็นต้น

นอกจากนี้ในการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้เร็ว จะต้องอาศัยวิธีการทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว วิธีการหนึ่งที่นิยมทำกันมากคือ agar diffusion method ซึ่งจัดเป็นวิธีการทดสอบอย่างหยาบๆซึ่งใช้ในการพัฒนาเอนไซม์ใหม่ๆที่ใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง เช่น เบต้าอะไมเลส (beta-amylase) พุลลูลานเนส (pullulanase) ไอโซอะไมเลส (isoamylase) อไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) และกลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase) การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะผลิตเอนไซม์เหล่านี้ทำได้โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์บนจานวุ้นที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สำหรับวิธีการทดสอบ โดยการเทสารละลายไอโอดีนลงไปบนจานทดลองคัดเลือกเชื่อนั้น ถ้าเกิดบริเวณใส (clear zone) แสดงว่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดบริเวณใสนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งได้ ในกรณี

ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ละลาย (insoluble protein) การคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อจุลินทรีย์นั้นผลิตเอนไซม์โปรติเอสก็จะย่อยโปรตีนที่ผสมอยู่ในจานวุ้นทำให้เห็นพื้นที่ถูกย่อยได้อย่างชัดเจนเช่นกัน

ดังนั้นในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดที่ต้องการให้ประสบความสำเร็จจึงต้องอาศัยแหล่งจุลินทรีย์ที่ดีและเทคนิควิธีการแยกที่เฉพาะเจาะจง

นอกจากนี้แล้วในการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์จะต้องคำนึงถึงปัญหาเพื่อการปฏิบัติอีกสองประการ ประการแรกคือประสิทธิภาพของการคัดเลือก อีกประการหนึ่งคือการคัดเลือกการพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ

ในกรณีประสิทธิภาพของการคัดเลือก วิธีการที่เลือกใช้เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมนั้นจำเป็นที่จะต้องพิจารณาขอบเขตจำกัดของการคัดเลือก และควรจะใช้วิธีที่จะชี้ให้ได้สายพันธุ์ที่ต้องการและโอกาสที่จะได้จุดคุ้มทุนกลับคืนมามากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป และวิธีการที่ใช้วิเคราะห์จะต้องสามารถตรวจพบการเพิ่มของเอนไซม์ได้ละเอียดถึงแม้จะเพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้นก็ตาม นอกจากนี้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงควรจะมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ เพื่อความแน่ใจว่าจะมีกำลังผลิตได้สูง ในบางครั้งจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มีสมบัติไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้นเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้นซึ่งในจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์เดิมมักจะมีการผลิตเอนไซม์อื่นๆที่ไม่ต้องการปะปนออกมาด้วยเสมอซึ่งมักจะก่อให้เกิดผลเสียมากกว่าผลดีเช่น ในกรณีเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (transglucosidase) ที่ปะปนมากับการผลิตเอนไซม์กลูโคสอไมเลสซึ่งจะมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสอไมเลสลดลง เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่เพื่อให้มีสมบัติในการผลิตเอนไซม์ตามที่ต้องการ สำหรับแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่ อาศัยการทำให้กลายพันธุ์ (mutation) โดยอาศัยสารผ่าเหล่า (mutagen) เช่น UV, ethylene imine (EI), N-methyl-N-nitro-N-nitrosoquandine (MNNG) และรังสีเอ็กซ์ (x-rays) เป็นต้น และวิธีการที่นิยมมากในปัจจุบันคือ DNA recombination ซึ่งเป็นวิธีการในการตัดต่อยีนส์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ต้องการใส่เข้าไปในจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเพื่อผลิตเอนไซม์ที่ต้องการให้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น

ส่วนกรณีสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ มีหลักการในการคัดเลือกจุลินทรีย์ ดังต่อไปนี้

1. สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ (recovery product) ได้ง่าย
2. มีอัตราการเจริญเร็วในถังหมักขนาดใหญ่ และสามารถใช้อาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สูงสุด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไม่จำเป็นต้องเติมสารกระตุ้นในการผลิตเอนไซม์
4. จุลินทรีย์ที่ใช้มีลักษณะทางสรีระที่คงตัว
5. ผลิตเอนไซม์ได้จำนวนมาก โดยผลิตสารอื่นปนมาน้อยที่สุด
6. ไม่สร้างสารพิษลงมาในน้ำหมัก
7. ปราศจากปฏิกิริยาทางอ้อมที่เป็นอันตรายในเอนไซม์

Kumar และคณะ (2012) ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอร์สในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยทำการคัดเลือกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ประเภทคือไตรบิวทีริน (tributylin) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำมันโอลีฟรวมกับ Rhodamine B พบว่ามีเชื้อ 3 สายพันธุ์คือ PM1, PM2 และ PM3 ที่มีคุณสมบัติในผลิตเอนไซม์ดังกล่าวโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์เท่ากับ 112 ยูนิตต่อลิตร และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ภายนอกเซลล์เท่ากับ 33 ยูนิตต่อลิตร

Srimhan และคณะ (2011) ได้ศึกษาการคัดแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งทนต่อสภาวะที่มีเมทานอลสูงได้โดยจะนำตัวเซลล์ไปใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ซึ่งทำการทดสอบคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นของเชื้อโดยใช้ rhodamine-B เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีเชื้อทั้งหมด 49 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดโอเลอิกและเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 3 และมีเชื้อเพียง 16 สายพันธุ์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มและเมทานอลได้ โดยมีเพียงเชื้อสายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* P11189 ซึ่งคัดแยกจากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และปริมาณ oleic methyl ester และ fatty acid methyl ester ที่ได้จากปฏิกิริยา esterification และปฏิกิริยา tranesterification ที่ 72 ชั่วโมง ในอัตราส่วนโดยโมลต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 โดยเชื้อ *Rhodotorula mucilagenosa* P11189 มีค่าร้อยละ 64.123 และ 51.260 ตามลำดับ

2.14 การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (วราวุฒิ, 2539)

ในอุตสาหกรรมผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์นั้น การเลือกวิธีการผลิตจะต้องเหมาะสมต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ จุลินทรีย์บางชนิดจำเป็นต้องเลี้ยงบนอาหารแข็งเช่น รำข้าวสาลี ดังเช่นในกรณีการผลิตเอนไซม์กลูโคมิเลสจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ในอาหารแข็งดีกว่าอาหารเหลว เส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญและขยายได้ดีในอาหารแข็งแต่ถ้านำไปหมักในน้ำ กรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงในอาหารเหลวจะทำให้การเจริญมีขีดจำกัด ในทางกลับกันเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในสภาพอาหารเหลวเช่น การผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสจาก *Bacillus subtilis*

จะเห็นได้ว่าการผลิตเอนไซม์โดยอาศัยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและบนอาหารเหลวมีทั้งข้อได้เปรียบและเสียเปรียบซึ่งกันและกัน แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โดยการใช้การเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว

อาหารแข็ง	อาหารเหลว
1. ต้องการเนื้อที่เป็นจำนวนมากเพื่อที่จะใช้วางภาชนะอาหารเลี้ยงเชื้อ	1. ใช้ถังหมักขนาดใหญ่ (Fermenter)
2. ใช้แรงงานมาก	2. ใช้แรงงานน้อย
3. ระบบการควบคุมต่างๆ น้อย	3. ระบบการควบคุมต่างๆ ต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก
4. ปัญหาจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนมีน้อย	4. ปัญหาจุลินทรีย์เกิดขึ้นปนเปื้อนได้ง่ายต้องมีความระมัดระวังอย่างมาก
5. การแยกเอนไซม์ประกอบด้วยการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย การกรองหรือใช้การเหวี่ยงและในบางครั้งทำให้น้ำระเหยและ/หรือทำการตกตะกอนเอนไซม์	5. การแยกเอนไซม์ประกอบด้วยการกรองหรือการเหวี่ยงและบางครั้งทำให้น้ำระเหย และ/หรือทำให้เอนไซม์ตกตะกอน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Smith (1985)

จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่ากรรมวิธีในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมมีสองวิธีคือ วิธีที่เลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง (solid state หรือ Koji culture method) หรือบางครั้งเรียกว่าอาหารแข็ง (เนื่องจากการเติมน้ำหรือความชื้นในปริมาณเล็กน้อยเพื่อเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเท่านั้น) และวิธีเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (submerged culture method) ซึ่งการเลี้ยงทั้งสองแบบจัดเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบครั้งคราว นอกจากนี้แล้วในปัจจุบันยังมีการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องแต่เป็นวิธีที่ใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการยังไม่แพร่หลายในการใช้ทางด้านการค้า

2.14.1 การผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว (submerged culture method)

การเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวได้ประยุกต์นำมาใช้ผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมจากแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อยีสต์ ซึ่งแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้จะเป็นสารประกอบอินทรีย์หรืออนินทรีย์ก็ได้ การผลิตเอนไซม์โดยวิธีนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14.1.1 การเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกะ (batch-fermentation)

ในการผลิตเอนไซม์ด้วยกรรมวิธีนี้จะใช้ถังหมักทรงลึก (deep fermenter) ถ้ากำลังผลิตสูงจะใช้ถังหมักขนาดใหญ่กว่า 100 ลูกบาศก์เมตร แต่ถ้าผลิตในขั้นโรงงานต้นแบบ (pilot-plant scale) ใช้ถังหมักขนาด 1 ถึง 15 ลูกบาศก์เมตร ส่วนการผลิตในห้องปฏิบัติการจะใช้ภาชนะตั้งแต่พลาสติกขนาด 250 ถึง 500 มิลลิลิตร จนถึงถังหมักขนาดเล็ก 1 ถึง 100 ลิตร

การหมักเพื่อผลิตเอนไซม์บางครั้งจะเกิดปัญหาจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นปะปนซึ่งจะทำให้การหมักเกิดการเน่าเสียโดยเฉพาะในการกรณีที่ใช้อาหารสมบูรณ์ และสภาพของ pH เป็นกลาง การป้องกันอาจจะใช้สารปฏิชีวนะเติมลงไป แต่จะทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องระมัดระวังอย่างสูง นอกจากนี้ในระหว่างการหมักยังต้องคำนึงถึงการควบคุมอากาศที่เข้าไป ปริมาณออกซิเจนที่ใช้ การควบคุม pH และการควบคุมการเกิดฟองเป็นต้น

2.14.1.2 การผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่อง

การผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องอาศัยพื้นฐานและเทคนิคการเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องในถังหมักอาหารเหลว ถังหมักที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์อาจจะใช้ถังเดียวหรือหลายๆ ถังต่อเนื่องกันก็ได้ การผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องส่วนใหญ่เป็นเพียงการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างของเอนไซม์ที่ผลิตได้แก่ เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. และเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma* sp. เป็นต้น

การผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องแบบใช้ถังหมักเดียว จะป้อนอาหารเหลวเข้าสู่ถังหมักอย่างสม่ำเสมอเมื่อจุลินทรีย์ภายในถังหมักผลิตเอนไซม์ สารละลายเอนไซม์จะไหลออกจากถังหมักโดยอัตโนมัติเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายเอนไซม์และเซลล์จุลินทรีย์ออกจากกันเซลล์จุลินทรีย์ที่แยกออกมาได้ป้อนกลับเข้าสู่ถังหมักอีกครั้ง ดังนั้นกระบวนการผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องจะมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น ถ้าสามารถทำให้สอดคล้องกับการแยกเอนไซม์อย่างต่อเนื่องได้โดยตรง

การผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องแบบหลายถัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบบสองถัง (two stages system) พบว่าใช้ได้ผลดีในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งแบบแผนในการหมักสองถังโดยในถังหมักแรกจะปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยอาจมีการเติมอาหารเฉพาะบางอย่างสำหรับการเจริญเติบโตลงไป (อาจเรียกว่า limiting nutrient) จากนั้นเซลล์ของจุลินทรีย์จากถังหมักแรกจะป้อนลงสู่ถังหมักซึ่งมีการปรับสภาพให้เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า อาจจะมีการปรับทั้งอาหารที่ใช้ผลิตเอนไซม์ และสภาพความเป็นกรดต่าง เป็นต้น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องมีข้อได้เปรียบว่าการผลิตแบบกะคือการใช้สารอาหารจำกัด (limiting nutrient) ที่เหมาะสมจะช่วยให้ในการแก้ไขปัญหาของกลไกการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ก็ได้ อาทิเช่น กรณีเกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์เนื่องจากสารตัวกลางในวิถีการผลิต (pathway) ย้อนกลับไปยับยั้งการทำงานของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่นิยมเรียกว่า Catabolite repression อย่างไรก็ตามสามารถแก้ไขได้โดยอาศัยการจำกัดอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนเป็นต้น ในบางกรณีอาจจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของสารเข้าเซลล์ที่เรียกว่า cell permeability โดยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของอาหารและการใช้สารอาหารจำกัดที่เหมาะสม เป็นต้น นอกจากนี้แล้วการเติมการผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องยังให้ผลผลิตของการผลิตสูงกว่าการผลิตแบบกะอีกด้วย

อย่างไรก็ตามมักจะพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องจะไม่มากเท่ากับที่พบในการเลี้ยงแบบกะ ถึงแม้ว่าอัตราการเกิดเอนไซม์จะสูงกว่าทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่อาหารอยู่ในถังหมักอย่างต่อเนื่องสั้นกว่าในกระบวนการผลิตแบบกะ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงอัตราการเกิดเอนไซม์กับเวลาของอาหารที่อยู่ในถังหมักแล้วจึงทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตน้อยกว่า ลักษณะเช่นนี้เป็นข้อเสียเปรียบของการผลิตเอนไซม์อย่างต่อเนื่องเพราะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง แต่ปัญหานี้อาจจะแก้ไขได้ถ้าสามารถแยกเซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้แล้วหมุนเวียนกลับมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้อีก และสาเหตุอีกอย่างที่ทำให้กรรมวิธีนี้ยังไม่แพร่หลายในอุตสาหกรรมคือ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นไม่คงทนต่อสภาพการใช้นั้นเอง

Cui และ Zhang (2011) ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าในสภาวะอาหารเหลวต่อการผลิตสารเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ และหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ พบว่าสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าตั้งนิ่งและการหมักแบบเขย่าควบคุมกับการตั้งนิ่ง จะให้ชีวมวลของเส้นใยและการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกัน หมักแบบ 2 ขั้นตอน (การหมักแบบเขย่าควบคุมกับการตั้งนิ่ง) จะให้ประสิทธิภาพดี เนื่องจากออกซิเจนช่วยในการเจริญของเส้นใยทำให้ได้ปริมาณเส้นใยที่เพิ่มมากขึ้น ในการเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าแต่ในการเลี้ยงในสภาวะตั้งนิ่งจะเป็นการเพิ่มการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์และการเจริญของเซลล์จะถูกจำกัด ในระดับที่ออกซิเจนละลายน้ำในระดับที่ต่ำ โดยความเข้มข้นของออกซิเจนปริมาณมากที่ละลายอยู่ในอาหารจะทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้พีเอชที่เป็นกรดมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยและการผลิตสารเมแทบอลิต์

Arabmarkadeh และคณะ (2014) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในถังปฏิกรณ์แบบกะ (batch) และแบบแพ็คเบด (packed-bed) โดยใช้ตัวเร่งชีวภาพแบบตัวเซลล์ตรึงรูปของเชื้อราสายไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ *Rhizopus oryzae* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมัน canola กับเมทานอล ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 พบว่าร้อยละของปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 85.3 ในแบบกะ และร้อยละของปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับ 92 ในถังปฏิกรณ์แบบแพ็คเบท.

2.15 การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (วรารุณี, 2539)

เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะต้องเก็บเกี่ยวออกจากอาหารเหลวหรืออาหารแข็งที่ใช้โดยอาศัยกรรมวิธีในการเก็บเกี่ยวที่ต้องขึ้นกับวัตถุประสงค์ว่าจะให้เอนไซม์จำหน่ายในรูปแห้งหรืออยู่ในรูปของเหลวสำหรับขั้นตอนต่างๆที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวเอนไซม์

ในกรณีของเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็งสามารถนำเอนไซม์ในอาหารรำข้าวที่ใช้ไปอบแห้งเพื่อใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ในรูปแห้งซึ่งอาจเรียกว่า enzyme bran ในขณะที่ถ้าต้องการเอนไซม์เหลวจำเป็นต้องนำเอนไซม์ในรำข้าวไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เอนไซม์ที่สกัดได้สามารถทำให้เป็นเอนไซม์เข้มข้นหรือเอนไซม์ผงโดยที่เอนไซม์ที่สกัดได้จะต้องผ่านขั้นตอนต่อไปคือการกรอง การทำให้เข้มข้น การตกตะกอน การทำแห้ง ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการใช้งานสำหรับเอนไซม์จากการหมักในอาหารเหลวจะผ่านขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับเอนไซม์จากการหมักในอาหารแข็งยกเว้นขั้นตอนการสกัดตอนแรกเท่านั้น

2.16 ไขมันและน้ำมัน

ไขมันและน้ำมันที่พบในสัตว์และพืช เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ร้อยละ 90 - 98 มีไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) อยู่เพียงเล็กน้อย นอกจากนั้นยังมีกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) อยู่ร้อยละ 1 - 5 ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ฟอสฟาไทด์ (phosphatides) โทโคอ์ฟีรอล (tocopherols) คาร์โรทีน(carotenes) ซัลเฟอร์ (sulphur) และน้ำอีกเล็กน้อย (Srivastava และ Prasad, 2000)

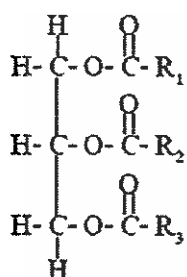
2.16.1 ไตรกลีเซอไรด์

ไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุลและกลีเซอรอล 1 โมเลกุล โครงสร้างทั่วไปของไตรกลีเซอไรด์และตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ แสดงดังภาพที่ 2.8 (Srivastava และ Prasad, 2000) ไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชตามธรรมชาติจะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ที่อุณหภูมิห้องจะมีสถานะเป็นของเหลว ซึ่งต่างจากไขมันจากสัตว์ ที่จะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสูง และจะมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง (Ma และ Hanna, 1999)

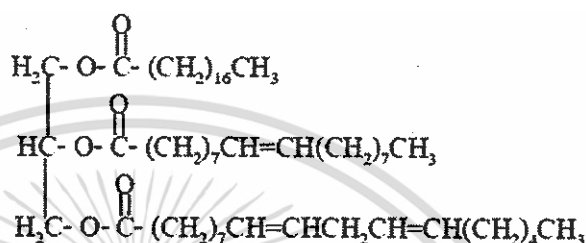
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.16.2 ไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์

ไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุล ตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนกลีเซอไรด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลเหลืออยู่ 2 หมู่ กลีเซอไรด์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติแต่จะพบในไขมันที่เกิดการไฮโดรไลซิสไม่สมบูรณ์แสดงดังภาพที่ 2.9



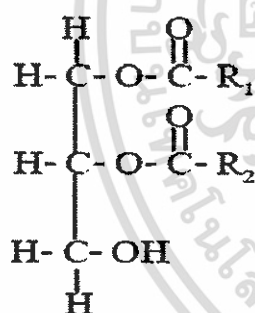
ไตรกลีเซอไรด์



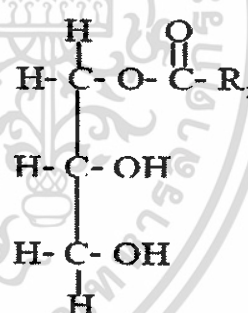
ตัวอย่างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

ภาพที่ 2.8 โครงสร้างโมเลกุลและตัวอย่างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: Srivastava และ Prasad (2000)



1,2- ไตรกลีเซอไรด์



1-โมโนกลีเซอไรด์

ภาพที่ 2.9 โครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์

ที่มา: อากัสตรา (2537)

2.16.3 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ส่วนมากมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 4-24 ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลปลายอีกข้างหนึ่งมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของนอนโพลาร์ไฮโดรคาร์บอน ทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ และเป็นสายโซ่ยาวที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์จะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 16 และ 18 พบได้มากที่สุด กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ (C16-C18) ละลายน้ำไม่ได้ แต่เกลือของมันสามารถสร้างไมเซลล์ในน้ำได้และไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (อาภัสสร, 2537) โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป แสดงดังตารางที่ 2.7 และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช แสดงดังตารางที่ 2.8

2.17 การวิเคราะห์สมบัติเฉพาะทางเคมีของน้ำมันพืช

1. ค่าสะพอนิฟิเคชัน (Saponification Value) หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับน้ำมันหรือไขมัน 1 กรัม เป็นตัวบ่งชี้ให้ทราบถึงขนาดหรือน้ำหนักของโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในโมเลกุลของไขมันหรือน้ำมันนั้น ไขมันหรือน้ำมันที่โมเลกุลประกอบด้วยกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือขนาดของโมเลกุล หรือมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลน้อยจะมีค่าสะพอนิฟิเคชันสูง ในทางตรงกันข้ามไขมันหรือน้ำมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะทำให้ค่าสะพอนิฟิเคชันต่ำ

2. ค่าของกรด (Acid Value) เป็นจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ทำให้กรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในไขมัน 1 กรัมสะเทินพอดี กรดไขมันอิสระที่มีในน้ำมันก็ เนื่องมาจากการสลายตัวของกลีเซอไรด์ทางเคมีหรือโดยการกระทำของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือน้ำมันถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสเป็นกรดไขมันอิสระมากน้อยเพียงใด ถ้าค่าสูงแสดงว่าไตรกลีเซอไรด์ถูกสลายได้เป็นกรดไขมันอิสระมาก

3. ค่าไอโอดีน (Iodine Value) เป็นอีกลักษณะที่มีการกำหนดค่ามาตรฐาน ตามประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่องกำหนดลักษณะและคุณภาพไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พ.ศ. 2548 โดยกำหนดค่าไอโอดีนของเมทิลเอสเทอร์ควรมีค่าไม่สูงเกิน 120 กรัมไอโอดีนต่อ 100 กรัมไขมัน ซึ่งใช้วิธีทดสอบ EN 14111

ค่าไอโอดีน คือ ค่าที่มีความสัมพันธ์กับความไม่อิ่มตัวของน้ำมันพืช โดยวัดเป็นจำนวนกรัมของไอโอดีนที่ถูกดูดซับด้วยน้ำมัน 100 กรัม ซึ่งค่าไอโอดีนสามารถใช้เป็น ดัชนีบ่งชี้การเกิดพอลิเมอร์ไรซ์ (การเกิดยางเหนียวในเครื่องยนต์) ถ้าน้ำมันพืชที่ถูกนำมาใช้ เป็นเชื้อเพลิงมีค่าตัวเลขไอโอดีนต่ำก็จะป้องกันการเกิดพอลิเมอร์ไรซ์ของน้ำมันพืชในเครื่องยนต์ได้ นอกจากนี้ น้ำมันพืชที่มีค่าไอโอดีนสูงจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศได้มาก ทำให้โครงสร้างของน้ำมันพืชเกิดการเสียสภาพได้เป็นสารประเภทคีโตนแอลดีไฮด์ และกรดออกมาผสมอยู่ในน้ำมัน

2.18 ปริมาณการผลิตน้ำมันพืชของประเทศไทย

ประเทศไทยทำการเพาะปลูกพืชน้ำมัน 6 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ปาล์ม น้ำมัน ถั่วลิสง มะพร้าว ละหุ่ง และงา ในจำนวนพืชทั้ง 6 ชนิดนี้ ปรากฏว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีรายงานปริมาณผลผลิตในแต่ละปีสูงที่สุด โดยในปี พ.ศ. 2543-2544 ประเทศไทยมีการผลิตปาล์มน้ำมันประมาณ 3.3 ล้านตัน รองลงมาได้แก่ มะพร้าว ซึ่งมีปริมาณการผลิตประมาณ 1.4 ล้านตัน สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้รายงานสรุปปริมาณผลผลิตของพืชน้ำมันทั้ง 6 ชนิดนี้ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป

กรดไขมัน	ชื่อโครงสร้าง	โครงสร้าง	สูตรโมเลกุล
Lauric	Dodecanoic	12:0	$C_{12}H_{24}O_2$
Myristic	Tetradecanoic	14:0	$C_{14}H_{28}O_2$
Palmitic	Hexadecanoic	16:0	$C_{16}H_{32}O_2$
Stearic	Octadecanoic	18:0	$C_{18}H_{36}O_2$
Arachidic	Eicosanoic	20:0	$C_{20}H_{40}O_2$
Behenic	Docosanoic	22:0	$C_{22}H_{44}O_2$
Lignoceric	Tetracosanoic	24:0	$C_{24}H_{48}O_2$
Oleic	<i>cis</i> -9-Octadecanoic	18:1	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleic	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecadienoic	18:2	$C_{18}H_{32}O_2$
Linolenic	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-Octadecatrienoic	18:3	$C_{18}H_{30}O_2$
Erueic	<i>cis</i> -13-Docosenoic	22:1	$C_{22}H_{42}O_2$

ที่มา : Srivastava และ Prasad (2000)

2.19 ปริมาณน้ำมันพืชที่ใช้แล้วในประเทศไทย

จากการสำรวจปริมาณการใช้น้ำมันพืชในอุตสาหกรรมอาหารที่คาดว่าจะมีน้ำมันเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตพบว่าโรงงานอุตสาหกรรมและสถานประกอบการประเภทฟาสต์ฟู้ดทั้งประเทศมีการใช้น้ำมันพืช 83,147,825 ลิตรต่อปี และมีปริมาณน้ำมันที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต 16,490,676 ล้านต่อปี สถานประกอบการส่วนใหญ่อยู่ในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ซึ่งมีการใช้น้ำมันประมาณร้อยละ 55 ของการใช้ทั้งประเทศและมีปริมาณน้ำมันที่เหลือทิ้งประมาณร้อยละ 67 ของปริมาณที่เหลือทิ้งประเทศ รองลงมาเป็นภาคตะวันออกเฉียงใต้มีการใช้น้ำมันพืชร้อยละ 27 มีปริมาณน้ำมันพืชที่เหลือทิ้งร้อยละ 13 ส่วนภาคอื่นๆ มีปริมาณการใช้น้ำมันพืชและปริมาณน้ำมันพืชที่เหลือทิ้งไม่ต่างกันเท่าไร ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 2 ถึงร้อยละ 8 รองลงมาได้แก่ มะพร้าว ซึ่งมีปริมาณการผลิตประมาณ 1.4 ล้านตัน สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้รายงานสรุปปริมาณผลผลิตของพืชน้ำมันทั้ง 6 ชนิดนี้ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช

น้ำมันจากพืช	ร้อยละองค์ประกอบของกรดไขมัน								
	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	22:1	18:2	18:3
Corn	12	2	Tr	0	0	25	0	6	Tr
Cottonseed	28	1	0	0	0	13	0	58	0
Crambe	2	1	2	1	1	19	59	9	7
Linseed	5	2	0	0	0	20	0	18	55
Peanut	11	2	1	2	1	48	0	32	1
Rapeseed	3	1	0	0	0	64	0	22	8
Safflower	9	2	0	0	0	12	0	78	0
H.O.Safflower	5	2	Tr	0	0	79	0	13	0
Sesame	13	4	0	0	0	53	0	30	0
Soya bean	12	3	0	0	0	23	0	55	6
sunflower	6	3	0	0	0	17	0	74	0

Tr = traces

ที่มา: Srivastava และ Prasad (2000)

ตารางที่ 2.9 ปริมาณการผลิตพืชน้ำมันของประเทศไทย(หน่วย:พันตัน)

ปี พ.ศ.	ปาล์ม น้ำมัน	มะพร้าว	ถั่วเหลือง	ถั่วลิสง	ละหุ่ง	งา
2538/2539	2,255	1,413	386	147	6	34
2539/2540	2,688	1,419	359	147	6	34
2540/2541	2,681	1,386	338	126	6	35
2541/2542	2,465	1,372	321	135	7	36
2542/2543	3,512	1,381	319	138	7	37
2543/2544	3,256	1,400	324	135	9	39

ที่มา : พุทธชาติ และคณะ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.20 น้ำมันทอดซ้ำ

ตามมาตรฐานของน้ำมันที่ยังไม่ผ่านการใช้งานจะมีสารโพลาร์ (Polar compound) ค่อนข้างต่ำ แต่สารนี้จะพบในน้ำมันที่ใช้แล้วในปริมาณสูง ซึ่งสารโพลาร์เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพ น้ำมันทอดอาหารที่ใช้ทอดมาแล้ว

สำหรับประชาชนทั่วไปที่ใช้ น้ำมันทอดหรือประกอบอาหารบริโภคระดับครัวเรือนควรเลือก ประเภทน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับการปรุงอาหาร ได้แก่ กรณียทอดอาหารประเภทเนื้อสัตว์ชิ้นใหญ่ แบบ น้ำมันท่วมที่ใช้ น้ำมันปริมาณมาก อุณหภูมิของน้ำมันสูงประมาณ 170 ถึง 180 องศาเซลเซียส ควรใช้ น้ำมันปาล์มโอเลอิน น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมัน ดอก ค้าฝอย เป็นต้น

2.20.1 อันตรายจากน้ำมันทอดซ้ำ

จากรายงานการวิจัยพบว่าน้ำมันที่ผ่านการทอดซ้ำหลายๆครั้ง จะมีคุณภาพที่เสื่อมลงทั้งสี กลิ่น รสชาติที่เปลี่ยนไป จุดเกินควันลดลง ที่สำคัญจะเกิดสารประกอบที่สามารถสะสมในร่างกายและส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ได้ จากข้อมูลการศึกษาใน สัตว์ทดลองพบสาร mutagenesis ซึ่งอาจส่งผลให้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลายพันธุ์ รวมทั้งยังก่อให้เกิดเนื้องอกในตับ ปอด และก่อให้เกิดมะเร็งในเม็ดเลือดขาวในหนูที่ใช้ทดลอง ขณะเดียวกันก็ยังมีพบสาร carcinogenesis ที่ก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังอีกด้วยระหว่างการทำอาหารแบบน้ำมันท่วมที่ใช้ น้ำมันปริมาณมาก อุณหภูมิสูงประมาณ 170 ถึง 180 องศาเซลเซียส และทอดเป็นระยะเวลาานานน้ำในอาหารและออกซิเจนจากอากาศจะไปเร่งการเสื่อมสภาพของน้ำมันทำให้น้ำมันแตกตัวทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและสร้างเป็นสารพอลิเมอร์ในน้ำมัน มีผลให้สี กลิ่น และรสชาติของน้ำมันเปลี่ยนไป จุดเกิด ควันลดต่ำลง ฟองและความหนืดมากขึ้น

นอกจากนี้ น้ำมันซึ่งเดิมเป็นสารไม่มีประจุเกิดการแตกตัวเป็นสารมีประจุ (สารโพลาร์) เช่นกรดไขมันอิสระ โมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอล แม้สารประกอบดังกล่าวไม่ อันตรายต่อร่างกายแต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน หากใช้น้ำมันทอดซ้ำหลายๆครั้ง การเสื่อมสภาพของน้ำมัน ทอดอาหารจะเกิดมากขึ้น มีการสะสมที่ไม่พึงประสงค์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

น้ำมันที่ผ่านการทอดอาหารซ้ำนานเกินไป มีคุณค่าทางโภชนาการลดลง พบว่าทำให้ การเจริญเติบโตของหนูทดลองลดลง ตับและไตมีขนาดใหญ่ มีการสะสมไขมันในตับ การหลั่งน้ำย่อย เพื่อทำลายสารพิษในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นมีการดไขมันที่ถูกออกซิไดซ์ ปริมาณสูงอาจ

ทำให้ไลโปโปรตีนชนิดแอลดีแอลมีโอกาสดูดไขมันมากขึ้น รวมทั้งมีการดัดไขมันทรานส์เกิดขึ้น จึงมีโอกาเสี่ยงก่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (ภักดี โพธิศิริ, 2547)

2.20.2 การเปลี่ยนแปลงของไขมันและน้ำมันระหว่างการทอด

การใช้ไขมันหรือน้ำมันในการทอดอาหาร ระหว่างที่ไขมันหรือน้ำมัน ได้รับความร้อน และขณะทอด จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล

1. คุณค่าทางโภชนาการของน้ำมันและไขมัน เมื่อได้รับความร้อนสูงจะเกิดเป็น สารพิษขึ้นได้

2. คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของน้ำมันขณะทอดอาหารที่จะเห็นได้ชัดเจนคือ น้ำมันมีสีคล้ำมากขึ้น มีความหนืดเพิ่มขึ้น smoke point ลดลง และเกิดฟองมากขึ้น นอกจากนี้ยังมี ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นขณะได้รับความร้อนได้อีก คือ

ก. ไขมันและน้ำมันถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็นกรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอรอล และไดเอซิลกลีเซอรอล

ข. ไขมัน ถูก ออกซิไดซ์ ได้ เป็น สาร ประกอบ ชนิดใหม่ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อีพอกไซด์ ไฮดรอกไซด์ คีโตน และ conjugated dienoic acid สารประกอบเหล่านี้ อาจเกิด fission ได้เป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงหรืออาจยังคงอยู่เป็นส่วนหนึ่งในโมเลกุลไตรเอซิลกลีเซอรอลหรืออาจจะมาจับตัวรวมกัน (cross-link) ทำให้เกิดเป็นไดเมอร์ และพอลิเมอร์ขึ้น

3. ไขมันและน้ำมันสามารถเกิดพันธะใหม่ระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอน ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ซึ่งถ้าเกิดพันธะใหม่ระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนภายในโมเลกุลของกรดไขมันเดียวกันจะทำให้เกิดวงแหวน (cyclic fatty acid) ถ้าเกิดพันธะใหม่ระหว่างคาร์บอนกับคาร์บอนจากกรดไขมันต่างโมเลกุลกัน จะทำให้เกิดไดเมอร์หรืออาจเกิดขึ้นได้ระหว่างกรดไขมันที่มีอยู่ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เดียวกันหรือต่างโมเลกุลกันก็ได้ ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นพอลิเมอร์ของสารประกอบที่มี น้ำหนักโมเลกุลสูง

2.21 น้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว

เนื่องจากต้นทุนการผลิตจะขึ้นอยู่กับราคาของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ซึ่งที่ผ่านมานิยมใช้น้ำมันพืชใหม่ (Fresh vegetable oil) มาผลิตเป็นไบโอดีเซล ในแง่ของร้อยละของผลได้ (yeild) นั้นค่อนข้างดีแต่ราคาของน้ำมันพืชยังคงสูงอยู่ ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซล การนำน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วมาเป็นวัตถุดิบจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีราคาถูกมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำพืชใหม่ นอกจากนี้ยังมีปริมาณมากหากได้จากร้านอาหารหรือตามบ้านเรือนต่างๆ ทั้งยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากการทิ้งน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วลงในแหล่งน้ำอีกด้วย ซึ่งที่ผ่านมามีเพียงการนำน้ำมันเหล่านี้ไปผสมกับอาหารสัตว์เท่านั้น ทำให้เหลืออีกจำนวนมาก ดังนั้นการนำน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลจะทำให้เกิดประโยชน์คุ้มค่าทั้งในแง่ทางเศรษฐศาสตร์และสิ่งแวดล้อม

2.21.1 ปริมาณน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว

จากการสำรวจการใช้ไขมันพืชในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทย ซึ่งเป็นงานวิจัยของ พุทธชาติ และคณะ, 2546 แสดงดังตารางที่ 2.10 พบว่าจากกระบวนการผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม และฟาร์มสัตว์ทั้งประเทศมีการใช้น้ำมัน 83.15 ล้านลิตรต่อปี และน้ำมันเหลือทิ้งใช้ถึง 16.49 ล้านลิตร คิดเป็นร้อยละ 67 ของปริมาณที่เหลือทั้งประเทศ

Supple และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาน้ำมันที่ใช้ผ่านการทอดแล้ว โดยแบ่งน้ำมันที่ใช้ผ่านการทอดแล้วออกเป็น 2 ลักษณะคือ ถ้ามีปริมาณของกรดไขมันอิสระน้อยกว่าร้อยละ 15 จะเรียกว่า เยลโลว์ กรีส (Yellow grease) และถ้ามีปริมาณของกรดไขมันอิสระมากกว่าร้อยละ 15 จะเรียกว่า บราวน์ กรีส (Brown grease) สำหรับลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วจะแตกต่างกับน้ำมันที่ยังไม่ผ่านความร้อน ดังนั้นจึงต้องศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะเหล่านี้และวิธีการปรับปรุงคุณภาพก่อนที่จะนำไปผลิตเป็นไบโอดีเซล

2.21.2 ลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว

เนื่องจากการใช้น้ำมันพืชมาประกอบอาหารและใช้ความร้อนที่ต่างกันย่อมส่งผลถึงลักษณะทั้งทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมัน ซึ่งส่วนใหญ่กรรมวิธีในการประกอบอาหารด้วยน้ำมันก็คือ การทอด โดยใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 160-200 องศาเซลเซียส และใช้เวลาการทอดช่วงหนึ่ง จากการศึกษาพบว่าลักษณะทางกายภาพของน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วเปลี่ยนไปคือ ความหนืดเพิ่มขึ้น ความจุความร้อนจำเพาะเพิ่มขึ้นและมีการเปลี่ยนสีของน้ำมันที่เข้มข้น น้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วจะมีลักษณะทางเคมีที่เปลี่ยนไปเนื่องจากความร้อน ซึ่งก่อให้เกิด Degraded Compound ได้แก่ Fixed Oxidation Compound กรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ Non-polar Oligomer และ Cyclic Monomers เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนของอาหาร และเครื่องปรุงรสอีกด้วย ซึ่งการที่น้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วมีคุณสมบัติแตกต่างน้ำมันใหม่นี้เอง ทำให้กระบวนการสังเคราะห์เป็นสารเอสเทอร์ จึงมีความแตกต่างจากการผลิตเอสเทอร์ด้วยน้ำมันพืชใหม่ไปบ้าง

ตารางที่ 2.10 ปริมาณน้ำมันพืชที่ใช้และปริมาณน้ำมันพืชที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต

ภาค/จังหวัด	จำนวน โรงงาน	น้ำมันพืชที่ใช้		น้ำมันพืชที่เหลือทิ้ง	
		ลิตร/ปี	ร้อยละ	ลิตร/ปี	ร้อยละ
กรุงเทพมหานคร	464	16,558,267	20	5,310,276	32
ปริมณฑล	137	29,404,612	35	5,778,219	35
ภาคกลาง	47	4,923,024.7	6	1,349,320	8
ภาคตะวันออก	49	22,588,212	27	2,090,434	13
ตะวันออกเฉียงเหนือ	78	1,671,611	2	576,257	3
ภาคใต้	75	3,737,029	5	876,120	5
ภาคเหนือ	55	4,265,067	5	510,050	8
รวม	905	83,147,825	100	16,490,676	100

ที่มา : พุทธชาติ และคณะ (2546)

จากการศึกษาของ Mittelbach และ Enzelsberger (1999) ทำการทดลองโดยให้ความร้อนกับน้ำมันงุ่นที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วจึงนำน้ำมันงุ่นที่ผ่านความร้อนนี้มาทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อวิเคราะห์เอสเทอร์ที่ผลิตได้ด้วยวิธี HPSEC Analysis พบว่ามี Dimeric Fatty Acid Methyl Ester และมีสารประกอบโพลิโกลเมอริก (Oligomeric) เกิดขึ้นทำให้น้ำมันมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นและค่าการละลายลดลง นอกจากนี้เอสเทอร์ที่ผลิตได้จากน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วจะมีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงแตกต่างกันไป เช่น ความหนืดเพิ่มขึ้น ค่าความสามารถในการเผาไหม้ลดลง ทำให้เกิด Conradon Carbon Residue (CCR) ซึ่งจากผลดังกล่าวจะทำให้เพิ่มปริมาณของกลีเซอไรด์และสบู่

2.21.3 การบำบัดน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว (Pre-treatment)

เนื่องจากน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วมักจะมีสารปนเปื้อนหลายชนิดซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของไบโอดีเซล ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงคุณภาพหรือการบำบัดน้ำมันก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การฉีดด้วยไอน้ำ (Steam Injection) การทำให้เป็นกลางโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography Neutralization) และการระเหยภายใต้สุญญากาศ (Film Vacuum Evaporation) ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะช่วยให้น้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วมีความบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป โดยมีงานวิจัยที่

เกี่ยวข้องกับเรื่องนี้สารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Supple และคณะ (2002) ได้ศึกษาการบำบัดน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วด้วยการฉีดด้วยไอน้ำ การทำให้ตกตะกอน และการกลั่น ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสกับน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้ว โดยเรียกว่าบำบัดครั้งที่ 1 และทำซ้ำตามวิธีการเดิมในการบำบัดครั้งที่ 2 ซึ่งผลจากการบำบัดปรากฏว่าลักษณะทางกายภาพและเคมีที่ต่างไปจากก่อนการบำบัดให้ผลดังตารางที่ 2.11

Ki-Teak และคณะ (2002) ได้ทดลองใช้วิธีการบำบัดน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วด้วยวิธีการแยกสารโดยใช้คอลัมน์ (Column Chromatography) จากการทดลองพบว่าเมื่อผ่านกระบวนการนี้จะทำให้น้ำมันมีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยทำการทดลองกับไขมันที่ได้จากร้านอาหารที่มีปริมาณกรดไขมันร้อยละ 10.6 และมีปริมาณน้ำร้อยละ 0.2 ไหลผ่านคอลัมน์ที่บรรจุแมกนีเซียมซิลิเกต (Magnesium Silicate) ร้อยละ 50 และอะลูมิเนียมออกไซด์ (Aluminium Oxide) ร้อยละ 50 หลังจากผ่านกระบวนการแล้วสามารถลดกรดไขมันอิสระจากร้อยละ 10.6 เป็นร้อยละ 0.23 และลดปริมาณน้ำจากร้อยละ 0.2 เป็นร้อยละ 0.02 ซึ่งก่อนการปรับปรุงคุณภาพน้ำมัน มีค่าร้อยละการแปลงผันเป็นไบโอดีเซลเท่ากับร้อยละ 25 แต่หลังการปรับปรุงจะมีค่าร้อยละการแปลงผันเป็นไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 96

2.21.4 องค์ประกอบของน้ำมันพืชใช้แล้ว

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำมันพืชใช้แล้ว ประกอบด้วยกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่เรียกว่าสารเอสเทอร์ และสารที่ไม่ใช่กรดไขมัน โดยแบ่งกรดไขมันที่สำคัญ จะเห็นได้ว่าน้ำมันพืชใช้แล้วมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณเกือบเท่ากันและองค์ประกอบของไขมันข้างต้นอาจแปรผันได้โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ น้ำมันในการประกอบอาหาร เป็นต้น ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.12

2.22 การนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล

มนุษย์ได้มีการนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลมานานแล้ว โดยสามารถแบ่งการใช้งานได้เป็น 3 ลักษณะคือ ใช้ น้ำมันพืชโดยตรง (Direct Use) หรือใช้ผสมกับน้ำมันดีเซล (Blending) น้ำมันพืชผสมน้ำมันก๊าด (Veggie/Kero mix) และไบโอดีเซล (Biodiesel)

2.22.1 ใช้ น้ำมันพืชโดยตรงหรือใช้ผสมกับน้ำมันดีเซล

เป็นวิธีการนำน้ำมันพืชบริสุทธิ์หรือน้ำมันพืชที่ผ่านการใช้แล้วมาเดินเครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งจำเป็นต้องมีถังน้ำมันดีเซลเพื่อใช้ในการสตาร์ทเครื่องยนต์ และใช้ก่อนหยุดเครื่องยนต์ สิ่งสำคัญของการใช้น้ำมันพืชโดยตรงคือ ต้องมีการอุ่นน้ำมันในทุกจุดที่มีน้ำมันผ่านได้แก่ ถังน้ำมัน ท่อทางเดิน

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมัน ชุดกรองน้ำมัน ควรทำการอุ่นน้ำมันที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส การนำน้ำมันพีชมาใช้โดยตรงเป็นวิธีการที่ใช้น้ำมันในราคาที่ถูกกลง โดยเฉพาะการนำน้ำมันพีชซึ่งยังไม่ผ่านกระบวนการกลั่นมาใช้ การที่จะนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยความร้อนในการหลอมเหลวไขที่แข็ง และลดความหนืดของน้ำมัน แต่วิธีนี้อาจส่งผลต่อสภาพของเครื่องยนต์เมื่อใช้เป็นระยะเวลานาน

2.22.2 น้ำมันพีชผสมน้ำมันก๊าด (Vigie/Kero mix)

เป็นการผสมระหว่างน้ำมันพีชกับน้ำมันก๊าด น้ำมันที่ได้จากวิธีการนี้เหมาะกับกรณีที่มีความจำเป็นต้องการใช้น้ำมันอย่างเร่งด่วนในภูมิภาคอากาศเขตร้อน อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันก๊าดและน้ำมันพีชจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของพื้นที่การใช้งาน เริ่มที่อัตราส่วนผสมตั้งแต่ น้ำมันพีชร้อยละ 10 น้ำมันก๊าดร้อยละ 90 จนถึงน้ำมันพีชร้อยละ 40 น้ำมันก๊าดร้อยละ 60 สำหรับอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมคือ ที่น้ำมันพีชร้อยละ 20 น้ำมันก๊าดร้อยละ 80 ปัจจุบันมีการนำวิธีดังกล่าวไปใช้งานน้อยลง เนื่องจากราคาของน้ำมันก๊าดค่อนข้างสูง และหากผสมกับปริมาณของน้ำมันก๊าดที่น้อยเกินไป จะส่งผลกระทบต่อเครื่องยนต์จากปัญหาการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของน้ำมันผสม

2.22.3 ไบโอดีเซล

วิธีการผลิตไบโอดีเซลโดยทั่วไปคือ การนำน้ำมันพีชหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดหรือเบส จะได้ไบโอดีเซลซึ่งอยู่ในรูปของอัลคิลเอสเทอร์และผลพลอยได้เป็นกลีเซอรอล ไบโอดีเซลที่ได้จะมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก สามารถนำไปเติมในเครื่องยนต์ดีเซลได้ทุกชนิดทั้งเติมโดยตรงและผสมตามสัดส่วน

2.23 การแช่เยือกแข็ง (freeze dry) (สมบุญ, 2553)

เครื่องแช่เยือกแข็งเป็นเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการรักษาคุณค่าสารอาหารสูง เช่น สารสกัดต่างๆ การอบสมุนไพร การอบแห้งในความเย็นมักจะใช้ความดันต่ำมากประมาณ 1 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งสามารถทำให้น้ำแข็งระเหิดกลายเป็นไอน้ำได้ ในสภาวะความดันต่ำดังกล่าวจะทำให้ น้ำเดือดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เวลาในการแช่เยือกแข็งประมาณ 24-36 ชั่วโมงขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบ ผลผลิตที่ได้จะมีคุณลักษณะต่างๆเหมือนกับของสด เมื่อทำการแช่เยือกแข็งแล้วสามารถทำให้กลับคืนน้ำได้ และจะกลับไปมีคุณลักษณะเหมือนของสดการแช่เยือกแข็ง คือ ขบวนการที่ทำให้สารที่เปียกแห้งได้โดยทำให้สารนั้นเย็นจนแข็งตัวระเหิดเอาน้ำแข็งออกไปและอยู่ในบรรยากาศที่มีความชื้นต่ำคือการเปลี่ยนแปลงสภาวะของแข็งเป็นสภาวะก๊าซโดยไม่มีการละลาย ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการดูแลให้เป็นสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.11 ลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วก่อนและหลังการบำบัด

คุณสมบัติ	ตัวอย่างที่ 1			ตัวอย่างที่ 2		
	ไม่ได้ บำบัด	บำบัด ครั้งที่ 1	บำบัด ครั้งที่ 2	ไม่ได้ บำบัด	บำบัด ครั้งที่ 1	บำบัด ครั้งที่ 2
ปริมาณน้ำ (ร้อยละ)	1.1	0.5	0.4	1.4	0.6	0.4
ความหนาแน่น(กิโลกรัม ต่อลูกบาศก์เมตร)	0.937	0.925	0.921	0.39	0.929	0.922
ความหนืดแบบคินเนเมติก (ตารางมิลลิเมตรต่อ วินาที)	190.2	130.1	85.3	201.3	110.2	70.1
ค่าความเป็นกรด (mg KOH /g)	5.3	4.4	3.9	6.3	4.9	4.3
ค่าไอโอดีน	104.3	103.7	105.2	115.3	117.2	116.2
ค่าสปอนนิไฟเคชัน	204.5	194.2	184.2	195.1	194.3	193.9
Unsaponifiable Matter (ร้อยละน้ำหนักต่อ น้ำหนัก)	3.9	2.7	1.9	4.9	3.0	2.1
ค่าพลังงานความร้อน (กิโลจูลต่อกรัม)	37.2	38.8	38.6	37.9	38.3	39.1
Peroxide Value (meq/kg)	5.6	5.3	4.6	6.3	5.7	4.4

ที่มา : Supple และคณะ (2002)

การใช้ที่ต้องการเทคนิคเฉพาะ รวมทั้งการดูแลรักษา จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ในกระบวนการผลิตทั่วไป นอกจากผลิตภัณฑ์บางอย่าง เช่น สารชีวภาพ(biological substrate) หรือผลิตภัณฑ์ยาบางชนิด ซึ่งผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ในวิธีการทำแห้งแบบต่างๆไปได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีนี้นั้นมีคุณสมบัติของสารที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดสามารถคงตัวอยู่ได้นาน อนุกรมมิห้อง และข้อดีที่สำคัญคือ สามารถนำกลับมาละลายน้ำ (reconstitute) ได้ง่ายมากและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือกายภาพ และเอนไซม์มักจะรวมกับการทำแห้งโดยวิธีอื่น มีการทำให้มีความชื้นต่ำ และการดูดบรรยากาศให้เป็นสุญญากาศ

ตารางที่ 2.12 องค์ประกอบเฉลี่ยของกรดไขมันของน้ำมันพืชใช้แล้ว (น้ำมันพืชหลังการใช้ประกอบอาหารของร้านขายอาหารไก่ทอด)

ชนิดของกรดไขมัน	ชื่อของกรดไขมัน	ร้อยละปริมาณของกรดไขมันก่อนประกอบอาหาร	ร้อยละปริมาณของกรดไขมันหลังประกอบอาหาร
C12:0	Lauric acid	0.45	0.32
C14:0	Myristic acid	0.35	0.93
C16:0	Palmitic acid	34.13	38.37
C18:0	Stearic acid	4.58	4.00
C20:0	Arachidic acid	0.34	0.34
Total Saturated	-	40.38	43.97
Unsaturated			
C16:1	Palmitoleic acid	1.51	0.25
C18:1	Oleic acid	42.89	45.59
C18:2	Linoleic acid	14.60	10.03
C18:3	Linolenic acid	0.62	0.16
Total Unsaturated	-	59.62	56.03
Peroxide Value	Meq of peroxide Oxygen/kg	2.98	28.08

ที่มา : ธนาทิพย์ และคณะ (2546)

2.23.1 ขั้นตอนการแช่เยือกแข็ง แบ่งเป็น 3 กระบวนการ คือ (สมบูรณ์, 2553)

1 การแช่แข็งก่อน (pre-freezing) เป็นการลดอุณหภูมิของสารเพื่อทำให้เกิดผลึกของน้ำก่อนทำ primary drying จะทำให้สารแข็งตัวในเครื่องแช่เยือกแข็ง (internal freezing) หรืออาจให้แข็งตัวในภาชนะเฉพาะ (external freezing) ซึ่งความหนาของสารที่เหมาะสมเพื่อให้เวลาในการแช่เยือกแข็ง และรอบของการทำแห้ง (drying cycle) สั้น คือประมาณ 10 มิลลิเมตร หรือไม่ควรเกิน 15 มิลลิเมตร จุดเยือกแข็งของน้ำ (freezing point) คือ 0 องศาเซลเซียส อาจจะมีปัญหาถ้าการละลายนั้นมีส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลหรือเกลือโซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิจุดเยือกแข็งจะต้องต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส การที่จะต้องทำให้วัตถุนั้นให้อยู่ในสภาพ solid matrix เพื่อที่จะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีหรือทางกายภาพ ในขณะที่น้ำถูกกำจัดให้หมดไปผลิตภัณฑ์จะแข็งตัวอย่างสมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิลดต่ำจนถึง Eutectic Temperature ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของแต่ละองค์ประกอบในส่วนผสมของผลิตภัณฑ์นั้น แต่โดยทั่วไป การลดอุณหภูมิที่ -40 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์แทบทุกชนิดจะแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ภายใน 2-3 ชั่วโมง

2 การทำแห้งเริ่มต้น (primary drying) เป็นสภาวะระเหิดหรือการ freeze drying โดยเฉพาะเพื่อดึงน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ เมื่อ primary drying เสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายหมดไป และจะมีความชื้นหลงเหลืออยู่ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่แห้งจะดูดความชื้นนั้นไว้จึงต้องเอาความชื้นนั้นออกโดยใช้ secondary drying สิ่งแสดงว่า primary drying เสร็จสมบูรณ์ คือ รอบคอกของน้ำแข็ง และส่วนที่แห้งหมดไป (ถ้าภาชนะเป็นแก้วจะสังเกตเห็น) อุณหภูมิเพิ่มขึ้นไปจนถึงหรือใกล้เคียงกับสภาวะแวดล้อมความดันของ drying chamber ใกล้กับ condenser chamber น้ำแข็งหรือความชื้นหายไปจากภาชนะบรรจุ ขณะที่อุณหภูมิไปถึงขีด ถึงแม้กระบวนการ primary drying จะเสร็จสมบูรณ์แล้วก็มักจะใช้เวลาของการทำแห้งต่อไปอีก 30 นาที หรือ 1 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีน้ำหลงเหลืออยู่ สิ่งแสดงว่า primary drying ยังไม่เสร็จคือภาชนะบรรจุเมื่อนำออกจากตู้แล้ว สัมผัสดูรู้สึกเย็น สารที่แห้งจะหดตัวหรือสารละลายเป็นน้ำ

3 การทำแห้งครั้งที่สอง (secondary drying) เป็นกระบวนการที่ดูดความชื้นที่หลงเหลือจากการทำแห้งครั้งแรกเพื่อลดปริมาณความชื้นและเพิ่มความคงตัวของสารที่มักจะมี ความชื้นจากการทำแห้งครั้งแรกหลงเหลืออยู่

2.23.2 เครื่องมือและระบบที่ใช้ในกระบวนการแช่เยือกแข็ง

1 คอนเดนเซอร์ (low temperatures condenser) จะทำหน้าที่ดักจับไอน้ำในระบบ ไอน้ำที่อยู่เหนือผิวผลิตภัณฑ์ น้ำแข็งจะเคลื่อนตัวไปสู่พื้นที่ความดันต่ำ (low temperatures area) คือบริเวณรอบๆผิวคอนเดนเซอร์ (อุณหภูมิต่ำกว่า) ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง -40 องศาเซลเซียส ถึง -60 องศาเซลเซียส แล้วแต่ชนิดของเครื่องมือที่ใช้ ซึ่งอุณหภูมิช่วงนี้จะมีประสิทธิภาพเพียงพอในการทำการแช่เยือกแข็งซึ่งเครื่องมือที่ให้อุณหภูมิของคอนเดนเซอร์ต่ำกว่าย่อมมีประสิทธิภาพมากกว่า ทั้งนี้เพราะว่าอุณหภูมิต่ำลง vapor pressure จะลดลงต่ำไปด้วย ทำให้ความแตกต่าง vapor pressure ของผลิตภัณฑ์ที่ทำน้ำแข็ง (product ice) และคอนเดนเซอร์เพิ่มขึ้น นั่นคือการเพิ่มอัตราการทำให้บริสุทธิ์ (rate of sublimation)

2 สภาพสุญญากาศ (high vacuum) บีมที่มีประสิทธิภาพจะลดความดันในระบบทำให้เกิดสุญญากาศเพียงพอ (0.1 มิลลิเมตรปรอท) เป็นสิ่งที่จำเป็นจะทำให้เกิดการทำให้บริสุทธิ์ของไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำแข็ง และเป็นการกำจัดอากาศ หรือ non condenser gas ออกไป สดแรงเสียดทานในระบบช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่ของไอน้ำได้ดี และยังเป็นการป้องกันการเกิดออกซิเดชันระหว่างกระบวนการและช่วงการเก็บรักษาด้วย โดยปกติ high vacuum ประมาณ 5-50 millitorr (0.005-0.05 มิลลิลิตรปรอท) จะมีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ในเครื่องมือแช่เยือกแข็งทั่วไปสามารถลดความดันได้ประมาณ 100-200 มิลลิทอร์ หรือต่ำกว่าซึ่งนับว่าเพียงพอ (Int. Unit 1 millitorr or micron = 10^{-3} Torr = 10^{-3} mm./Hg)

3 การควบคุมความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ การให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์ก็เพื่อที่จะช่วยให้การทำให้บริสุทธิ์เกิดได้อย่างสม่ำเสมอ แต่การเพิ่มอุณหภูมิต้องควบคุมให้เพียงพอที่จะผลักดันให้ water vapor ถูกกำจัดได้ โดยไม่เกิดการหลอมละลายของผลิตภัณฑ์ขณะทำการแช่เยือกแข็งให้ต่ำกว่าจุดที่ผลิตภัณฑ์จะเกิดการหลอมละลายเล็กน้อย หลังจากผลิตภัณฑ์แช่แข็งส่วนใหญ่ถูกกำจัดออกไปเกือบหมดแล้วจึงค่อยๆเริ่มเพิ่มความร้อนให้ผลิตภัณฑ์ คือ ปรับอุณหภูมิให้ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง 20 องศาเซลเซียส หรือ 30 องศาเซลเซียส แล้วแต่ผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

Devakate และคณะ (2009) ได้อธิบายว่า การนำเครื่องแช่เยือกแข็งในระดับห้องปฏิบัติการมาใช้ในการศึกษา ซึ่งประกอบด้วย cylindrical stainless drying chamber (ความยาวเท่ากับ 0.4 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เมตร) รวมทั้งเพลทให้ความร้อน (3 นอส พื้นที่ผิวให้ความร้อนเท่ากับ 0.25 ตารางเมตร) คอนเดนเซอร์ (ความจุน้ำแข็งสูงสุด 18 กิโลกรัม พื้นที่ผิวเท่ากับ 0.25 ตารางเมตร) สามารถทำงานได้ที่ -35 องศาเซลเซียส และ vacuum pump มีอัตราการแทนที่ของอากาศ เท่ากับ 16 ตารางเมตร/ชั่วโมง และมีการเชื่อมต่อกอนเดนเซอร์กับส่วนที่ทำแห้ง (drying chamber) โดยท่อ มีการวางเครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าไว้ในส่วนที่ทำแห้งเมื่อชั่งน้ำหนักแบบออนไลน์ซึ่งสามารถสังเกต (ชั่งได้ 0.1 กรัม) ได้จากหน้าต่างใส มีการวัด และบันทึกค่าของความดันภายในส่วนที่ทำแห้ง ทำการวัดโดยพารามิเตอร์ (pyranimonometers) และควบคุมโดยวาล์วโซลีนอยด์ (solenoid valve) อุณหภูมิของ heating plate และตัวอย่างทำการวัดด้วยเทอร์โมคอปเปอร์ (PT 600) (3 นอส) และควบคุมโดยการใช้ integrated electrical resistance heater ทำการใส่ตัวอย่างโบรมีนเลนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (20 มิลลิลิตร) ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปแช่เยือกแข็งเริ่มต้น และอุณหภูมิของคอนเดนเซอร์จะมีระดับอุณหภูมิต่ำสุดถึง -35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวางบนเครื่องชั่งในส่วนที่ทำแห้ง และเริ่มการทำงานของปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) และเครื่องทำความร้อน ทำการเช็คอุณหภูมิของตัวอย่าง และความดันภายใน chamber เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และ 30 ปาสคาลตามลำดับ ทำการบันทึกน้ำหนักตัวอย่างทุกๆ 5 นาที จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Devakate และคณะ (2009) ทำการศึกษาการทำผงเอนไซม์ด้วยวิธี Spray drying และ Vacuum freeze drying การทดลองนี้กำหนดค่า abomizer pressure 2 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร และอัตราการทำให้แห้งเท่ากับ 255 มิลลิลิตร/ชั่วโมง อุณหภูมิเริ่มต้นอยู่ในช่วง 100-170 องศาเซลเซียส อัตราการไหลเวียนของลมร้อน เท่ากับ 41 ลูกบาศก์เมตร/ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ใช้เวลา spray drying 90 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะ และร้อยละของผลได้ของผงเอนไซม์ เท่ากับ 78 ± 2 ยูนิต/มิลลิลิตร 73 ± 2 ยูนิต/มิลลิลิตร 462.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และร้อยละ 73 ± 2 ตามลำดับ และการทำแบบ vacuum freeze drying จะใช้สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอน 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในระหว่างนั้นเปิดเครื่องแช่เยือกแข็ง ลดอุณหภูมิลงในระดับ -33 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่แช่แข็งมาวางในตัวถังเครื่องแช่เยือกแข็งจากนั้นเปิดปั๊มสุญญากาศ และเครื่องทำความร้อนโดยอุณหภูมิ และความดันภายในตัวถังเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และ 30 ปาสคาล ตามลำดับ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะ และร้อยละของผลได้ของผงเอนไซม์ เท่ากับ 98 ± 2 ยูนิต/มิลลิลิตร 87 ± 3 ยูนิต/มิลลิลิตร 482.3 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และ 96 ± 1 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.24 แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) (เกษศิริรินทร์พร, 2553)

แก๊สโครมาโตกราฟี เป็นรูปแบบหนึ่งของกระบวนการแยกสารทางโครมาโตกราฟี โดยที่โครมาโตกราฟีทุกรูปแบบเกี่ยวข้องกับ distribution หรือ partition ของสารประกอบใดๆ ระหว่างเฟสที่แตกต่างกัน 2 เฟส ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ในการแยกสารขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย (relative solubility) เมื่อสารในของผสมเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่โดยมีเฟสเคลื่อนที่นำไป สารแต่ละตัวจะถูกเหนี่ยวรั้งมากน้อยต่างกัน เนื่องจากความสามารถในการละลายที่แตกต่างกัน สารจึงถูกแยกออกจากกันได้ สารใดมีความสามารถในการละลายในเฟสอยู่กับที่มากกว่าก็จะใช้เวลามากกว่า ในการเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ (Column) นิยมใช้แก๊สเฉื่อยเป็นเฟสเคลื่อนที่ หรือเรียกว่า แก๊สพา (Carrier gas) โดยปกติมักจะใช้แก๊สฮีเลียม ไฮโดรเจน หรือไนโตรเจนเป็นแก๊สพา (มงคส, 2537)

2.24.1 แก๊สโครมาโตกราฟีแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. แก๊สโครมาโตกราฟีแบบของแข็ง (Gas-solid chromatography, GSC) โครมาโตกราฟีชนิดนี้จะใช้ของแข็ง เช่น ซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ กลไกการแยกสารที่เกิดขึ้นเป็นแบบการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดซับ ดังนั้นการแยกสารจะดีหรือไม่ขึ้นกับคุณสมบัติการดูดซับของสารที่บรรจุในคอลัมน์ แต่โดยทั่วไปโครมาโตกราฟีชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมมากนัก

2. แก๊สโครมาโตกราฟีแบบของเหลว (Gas-liquid chromatography, GLC) โครมาโตกราฟีชนิดนี้จะใช้ของเหลวเป็นเฟสอยู่กับที่ จึงต้องทำการเคลือบของเหลวให้เป็นชั้นบางๆ บนของแข็งเฉื่อยที่เรียกว่า solid support กลไกการแยกสารที่เกิดขึ้นเป็นแบบ partition ซึ่งสามารถใช้ได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างมากและให้ผลการทดลองที่ดีกว่า GSC จึงทำให้ GLC เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

2.24.2 องค์ประกอบของแก๊สโครมาโตกราฟี ประกอบด้วย

1. แก๊สพา (Carrier gas) คือ แก๊สที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่จะต้องเป็นแก๊สเฉื่อย โดยปกติจะใช้แก๊สไนโตรเจน ฮีเลียม อาร์กอนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการเลือกชนิดของแก๊สจะขึ้นกับชนิดของตัวตรวจวัด เฟสเคลื่อนที่ที่จะถูกนำเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีผ่านทางตัวควบคุมอัตราการไหลเพื่อรักษาอัตราการไหลให้คงที่ ถ้าอัตราการไหลเปลี่ยนแปลงไปเพียงร้อยละ 1 จะทำให้เวลาในการหน่วงเหนี่ยวเปลี่ยนไปร้อยละ 1 เช่นกัน

2. สารตัวอย่าง (Sample introduction) จะแบ่งออกเป็น 2 สถานะคือ สถานะที่เป็นไอหรือแก๊ส (gaseous samples) สถานะที่เป็นของเหลว (liquid sample) ตัวอย่างที่เป็นของเหลวสามารถนำเข้าสู่เครื่อง GC ได้โดยใช้ micro syringe ดูด สารตัวอย่างของเหลวให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการแล้วฉีดผ่าน silicone rubber septum ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

ก. การฉีดด้วยมือ (manual) การฉีดแบบนี้ผู้ทดลองต้องมีความชำนาญ จึงจะทำให้การวิเคราะห์มีความเที่ยงตรงสูง ข้อเสียของวิธีนี้คือ สิ้นเปลือง septum เพราะการฉีดแต่ละครั้งผู้ทดลองไม่สามารถฉีดเข้าที่จุดเดิมได้ ทำให้ septum เกิดการฉีกขาด และแก๊สรั่วได้ง่ายต้องมีการเปลี่ยน septum บ่อยๆ

ข. การฉีดด้วยเครื่อง auto injector จะให้ผลที่เที่ยงตรงกว่าการฉีดด้วยมือ และสามารถใช้ได้กับปริมาตรของตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยกว่า 1 ไมโครลิตรได้ด้วย

3. ส่วนฉีดสาร (Injection system) เมื่อตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง GC ลงสู่บริเวณ Inlet ที่มีความร้อนสูงพอที่จะทำให้ตัวอย่างกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ด้วยแก๊สตัวพา อุณหภูมิที่เหมาะสมของ injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้ตัวอย่างระเหยได้แต่ต้องไม่ทำให้สารสลายตัว ซึ่งเรียกระบบของการพาว่า sample inlet system ระบบของการพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์มีหลายแบบคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. Split injection mode เหมาะกับสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าคอลัมน์มีปริมาณมากหรือความเข้มข้นสูง ซึ่งตัวอย่างชนิดนี้อาจทำให้คอลัมน์เกิดการ overload ทำให้การแยกไม่ดีพีคซ้อนทับกันและรูปร่างของพีคไม่สมมาตรจึงมีการปรับปรุงการวิเคราะห์ได้โดยการเลือก split mode

ข. Splitless injection mode เหมาะกับสารที่ต้องการวิเคราะห์มีปริมาณน้อยๆหรือความเข้มข้นน้อยๆ (trace analysis)

ค. Purged packed inlet การฉีดสารตัวอย่างด้วยระบบ purged packed ใช้กับ packed column และสามารถใช้กับ wide – bore capillary column ได้เมื่ออัตราการไหลของแก๊สพามากกว่า 10 มิลลิลิตรต่อนาที

ง. Cool on – column inlet เป็นวิธีการฉีดตัวอย่างที่เป็นของเหลวตรงเข้าสู่คาพิลลารีคอลัมน์ ซึ่งวิธีการนี้ส่วนของ inlet และ oven ต้องมีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายเมื่อทำการฉีดสารตัวอย่าง

จ. Programmable Temperature Vaporisation Inlet (PTV) เนื่องจากวิธีการฉีดตัวอย่างที่เป็นของเหลวเข้าคอลัมน์โดยตรงพบว่า สารที่ไม่ระเหย (non-volatile) ที่ติดมากับตัวอย่าง สามารถเข้าไปติดแน่นในคอลัมน์ วิธีการของ PTV จึงได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อให้สามารถทำงานได้หลายๆ mode เมื่อใช้อุณหภูมิคงที่สามารถเลือกระบบเป็นแบบ split/splitless ถ้าใช้การทำโปรแกรมอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิเริ่มต้นต่ำและใช้กับ wide – bore capillary column จะสามารถเลือกใช้ on- column injection ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้กับการฉีดสารตัวอย่างที่มีตัวทำละลายมากๆ ซึ่งเรียกว่า Solvent vent mode โดยใช้การฉีดแบบปริมาตรมาก (large volume injection)

4. คอลัมน์ (Column) คอลัมน์ที่ใช้กันในเครื่อง GC โดยทั่วไป จัดได้เป็น 2 ประเภทคือ แพ็คคอลัมน์ (pack column) และ WCOT (wall-coated open tubular column) หรือ คาพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ทั้งนี้ได้มีการพัฒนาแพ็คคอลัมน์มาก่อน ส่วนคาพิลลารีคอลัมน์มีการพัฒนามาตั้งแต่ พ.ศ. 2523 ลักษณะสำคัญของคอลัมน์แสดงดังตารางที่ 2.13

ก. แพ็คคอลัมน์ (pack column) แพ็คคอลัมน์มีประสิทธิภาพและขีดความสามารถในการแยกต่ำกว่าคาพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) แต่เป็นคอลัมน์ที่มีความจุมากกว่า ซึ่งทำให้การนำสารเข้าสู่คอลัมน์ง่ายขึ้น และยังมีองค์ประกอบของสารตัวอย่างในปริมาณมากขึ้นสำหรับการนำเข้าสู่ตัวตรวจวัด แพ็คคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ทั่วไปมีความยาว 2-5 เมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2 มิลลิเมตร เป็นคอลัมน์ที่ใช้อัตราการไหลของแก๊สประมาณ 20-50 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับคอลัมน์ที่ใหญ่กว่านี้ สามารถที่จะออกแบบให้เป็นการเฉพาะที่จะใช้งานสำหรับ GC ชนิดที่ใช้เตรียมสาร (preparative – scale GC) เท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. คาพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) คาพิลลารีคอลัมน์ทำจาก SiO_2 ที่บริสุทธิ์และแข็งแรงทนทานเป็นพิเศษ โดยเคลือบฉนวนด้านนอกด้วย polyimide polymer ปัจจุบันคาพิลลารีคอลัมน์มีการใช้เทคโนโลยีการผลิตที่มีคุณภาพสูง ควบคุมเส้นผ่านศูนย์กลางภายในและความหนาของฟิล์มที่เคลือบได้ซึ่งมีทั้งแบบเฟสที่มีขั้วและไม่มีขั้ว คอลัมน์ที่ผลิตลักษณะนี้มีความยาว 10-100 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.20-0.53 มิลลิเมตร และใช้อัตราการไหลของแก๊สพา 2-5 มิลลิลิตรต่อนาที คาพิลลารีคอลัมน์เหมาะกับการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ปริมาณน้อยๆ ที่เฉพาะเจาะจงในของผสมที่ซับซ้อน (มงคล, 2537)

ตารางที่ 2.13 แสดงลักษณะที่สำคัญของคอลัมน์ในเครื่อง GC

Parameter	Pack column	Capillary column
ความยาว (เมตร)	1-6	10-100
เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน (มิลลิเมตร)	2-4	0.20-0.53
ความจุ (Capacity)	10 ไมโครกรัมต่อพีค	50 นาโนกรัมต่อพีค
ความหนาของเฟสอยู่กับที่ (ไมโครเมตร)	1-10	0.05-0.5
อัตราการไหลของแก๊สพา (มิลลิลิตรต่อนาที)	10-60	0.5-10
ความดันตกของคอลัมน์ (Column pressure drop; psi)	10-40	3-40

ที่มา: มงคล ราชนาคร (2537)

5. ตู้อบให้ความร้อน (Oven) เป็นส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุคอลัมน์และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับวิธีการที่ต้องการวิเคราะห์สารผสม การควบคุมอุณหภูมิของตู้อบให้ความร้อนนั้นมี 2 แบบ คือ แบบ Isothermal จะใช้อุณหภูมิเดียวตลอดการวิเคราะห์ และแบบ temperature program จะสามารถเปลี่ยนอุณหภูมิได้ในระหว่างการวิเคราะห์ ซึ่งนิยมใช้กับสารผสมที่มีช่วงของจุดเดือดกว้าง ทำให้โครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ได้มีลักษณะของพีคที่ไม่กว้างและช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ตัวตรวจวัด (Detector) เป็นส่วนที่อยู่ต่อจากทางออกของคอลัมน์ ทำหน้าที่ตรวจวัดองค์ประกอบต่างๆ ของสารตัวอย่าง ในขณะที่สารเคลื่อนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ โดยที่ตัวตรวจวัดจะต้องไม่ว่องไวต่อแก๊สพา เมื่อตัวตรวจวัดทำการตรวจวัดองค์ประกอบของสารจะทำการบันทึกผลเทียบกับเวลา ทำให้ได้โครมาโตแกรม (chromatogram) ตัวตรวจวัดที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ เพลมไอออไนเซชัน (Flame Ionization Detector, FID) ไนโตรเจนฟอสฟอรัส (Nitrogen Phosphorous Detector, NPD) อิเล็กตรอนแคปเจอร์ (Electron Capture Detector, ECD) เทอร์มอลคอนดักทิวิตี (Thermal Conductivity Detector, TCD) เพลมโฟโต (Flame Photo Detector, FPD) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass Spectrometry, MS)

ก. ตัวตรวจวัดแบบเพลมไอออไนเซชัน เป็นตัวตรวจวัดมาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในแก๊สโครมาโตกราฟี เนื่องจากสารโดยเฉพาะสารประกอบอินทรีย์ทุกๆ ชนิดสามารถเกิดการไอออไนซ์ได้ในเปลวไฟ ทำให้เกิดกระแสของไอออนที่สามารถสะสมอยู่ระหว่างขั้วที่มีประจุตรงข้าม 2 ขั้ว ได้ตามปริมาณของไอออน ลักษณะตัวตรวจวัดแบบเพลมไอออไนเซชัน ในระบบของ FID ประกอบด้วยแก๊ส 3 ชนิด คือ แก๊สพารวมกับไฮโดรเจนและอากาศ โดยแก๊สไฮโดรเจนจะทำหน้าที่เป็นเชื้อเพลิงในการจุดเปลวไฟด้วยความร้อน อากาศเป็นตัวช่วยทำให้เกิดการสันดาป (combustion) และช่วยพาให้แก๊สที่เผาไหม้แล้วออกไป อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจนและอากาศต้องปรับให้เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมกับแก๊สพา ถ้าสัดส่วนไม่เหมาะสม การจุดเปลวไฟที่ตัวตรวจวัดจะจุดติดยาก เปลวไฟของแก๊สไฮโดรเจนและอากาศจะถูกจุดที่หัว jet โดยมีตำแหน่งของขั้ว (electrode) วางอยู่เหนือเปลวไฟเพื่อเป็นที่สะสมของไอออนของสารตัวอย่าง แก๊สพาและไอของสารตัวอย่างจะเข้าสู่เปลวไฟแล้วทำให้สารตัวอย่างเกิดการไอออไนซ์ได้อิเล็กตรอนและไอออนบวก หลังจากนั้นอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ไปยัง flame jet ไอออนบวกจะเคลื่อนที่ไปยังอิเล็กโทรด สัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกบันทึกด้วยเครื่องบันทึกสัญญาณได้เป็นโครมาโตแกรม (แมน และอมร, 2539) ข้อมูลที่วิเคราะห์เชิงคุณภาพแสดงอยู่ในรูปของ retention time ซึ่งค่อนข้างเฉพาะสำหรับแต่ละสาร ส่วนข้อมูลที่วิเคราะห์เชิงปริมาณแสดงอยู่ในรูปของพื้นที่พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak height) โดยโครมาโตแกรมมีผลจากตัวแปรต่างๆ เช่น อุณหภูมิ อัตราการไหลของแก๊สพา และชนิดของคอลัมน์ เป็นต้น ตัวแปรเหล่านี้สามารถคำนวณหาค่าที่เหมาะสมได้เพื่อทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพมากขึ้น การตอบสนองของตัวตรวจวัดชนิดนี้เร็วมากและให้ค่าของกราฟมาตรฐานที่มีช่วงความเข้มข้นที่กว้าง เปลวไฟไฮโดรเจนผลิตไอออนได้ไม่มากนัก คิดเป็นกระแสประมาณ 10 – 14 แอมแปร์ แต่เมื่อมีสารประกอบอินทรีย์จะทำให้มีไอออนเกิดขึ้นปริมาณมากมาย การตอบสนองของ FID ขึ้นกับจำนวนไอออนที่เกิดขึ้นจากแต่ละสารประกอบ ขึ้นกับจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของสารไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างและปริมาณของสาร การตอบสนองนี้แตกต่างกันไประหว่างสารประกอบแต่ละกลุ่ม (มจคส, 2537)

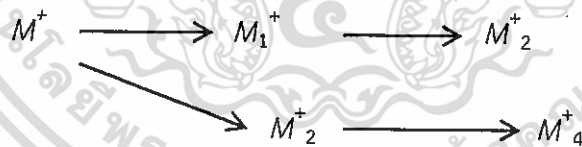
ข. ตัวตรวจวัดแบบแมสเปกโทรเมทรี เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการทางสเปกโตรสโคปีในการวิเคราะห์โครงสร้างและมวลโมเลกุลของสารโดยให้พลังงานแก่มอเลกุลของสารมากพอที่จะทำให้โมเลกุลเหล่านั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออนแล้วทำการแยกและตรวจสอบไอออนที่เกิดขึ้น โดยที่แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเกิดเป็นไอออนและเกิดการแตกตัว โดยวิธีที่นิยมกันมากที่สุด คือ วิธีอิเล็กตรอนอิมแพ็ค (electron-impact, EI) แสดงดังภาพที่ 2.10 ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่าง (M) เกิดการแตกตัวเป็นไอออนและมีประจุบวก (molecular ion, M^+) ด้วยการชนกับอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง เช่น



ภาพที่ 2.10 แสดงวิธีอิเล็กตรอนอิมแพ็คของโมเลกุลของสารตัวอย่าง

ที่มา: เกษศิริรินทร์พร (2553)

โดยโมเลกุลที่มีประจุบวกนี้ ถ้ามีพลังงานมากพอแสดงดังภาพที่ 2.11 จะเกิดการแตกตัวออกเป็นไอออนย่อยและจะแตกตัวต่อไปเรื่อยๆ จนเหลือพลังงานน้อยลงและไม่พอที่จะแตกตัวต่อไปได้อีก



ภาพที่ 2.11 แสดงวิธีอิเล็กตรอนอิมแพ็คของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีพลังงานมาก

ที่มา: เกษศิริรินทร์พร (2553)

กระบวนการในแมสเปกโทรเมทรี สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการ คือ ไอออไนเซชัน (ionization) และการแยกมวล (mass separation) วิธีการไอออไนซ์เป็นการทำให้เกิดไอออน เมื่อโมเลกุลถูกไอออไนซ์ในสุญญากาศ กลุ่มที่มีลักษณะเฉพาะของไอออนของมวลต่าง ๆ กันก็จะเกิดขึ้น แมสเปกโทรมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวัดมวลของไอออนด้วยการใช้อัตราส่วนของมวลต่อประจุ (m/Z) โดยทั่วไปแล้วไอออนมักมีประจุ +1 ($z = 1$) ดังนั้นค่า m/Z จึงมีค่าเท่ากับมวลของไอออนโดยตรง เมื่อแยกไอออนเหล่านี้ หากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

abundance) เทียบกับมวลจะได้แมสสเปกตรัม (mass spectrum) สเปกตรัมเหล่านี้สามารถใช้ในการบ่งบอกเอกลักษณ์ของโมเลกุลได้หรือรวมรูปแบบของการแตกตัวของแต่ละไอออนทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วก็จะได้รูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) ของโมเลกุล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบแต่ละชนิด (มงคล, 2537; แม้น และอมร, 2539)

2.25 การออกแบบวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

เป็นวิธีการและการออกแบบการทดลองโดยการรวบรวมเทคนิคทางด้านคณิตศาสตร์และสถิติ ซึ่งจะเอื้อต่อการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และทำการวิเคราะห์ปัญหาโดยที่ผลตอบสนองนั้นจะขึ้นอยู่กับหลายตัวแปรที่ทำการศึกษา และมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาค่าที่ดีที่สุดหรือการตอบสนองของผลตอบสนองต่ำสุด (response) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการออกแบบการทดลอง และสามารถประยุกต์ใช้ได้กับการพัฒนาเกี่ยวกับกระบวนการผลิตต่างๆ ที่ต้องการข้อมูลซึ่งเหมาะสมมากที่สุดเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตหรือการทดลองนั้นๆ ในระดับอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ไพโรจน์, 2544)

วิธีการออกแบบการทดลองโดยใช้พื้นที่การตอบสนองนี้คิดค้นโดย Box ในปี ค.ศ. 1948 โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี full factorial ที่อาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าตอบสนองสูงสุด โดยนิยมออกแบบการทดลองเป็น 2 วิธีคือ Central Composite Design, CCD และ Box-Behnken Design, BBD ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ประเภทคือ ตัวแปรตาม (dependent variable) และตัวแปรอิสระ (independent variable) ซึ่งเรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ซึ่งจะคำนวณหลังจากที่ได้สร้างหรือกำหนดรูปแบบจำลองความสัมพันธ์แบ่งออกเป็น 4 รูปแบบคือ Linear model, Linear และ interaction model, Linear และ square model และ Full quadratic model ซึ่งจะต้องพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error : SE) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination : R^2) เพื่อหาความเหมาะสมของระดับในแต่ละปัจจัยที่สนใจศึกษา เมื่อพิจารณาสมการที่ 2.1 (ไพโรจน์, 2555)

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) + \varepsilon \quad (2.1)$$

โดยกำหนดให้ Y = ค่าตอบสนองที่สังเกตได้ (dependent variable)

f = ฟังก์ชันของการตอบสนองของ X_1, X_2, \dots, X_n ซึ่งเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ (independent variable)

ε = เทอมของความคลาดเคลื่อนนั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการคำนวณ
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้ากำหนดว่า $E(Y) = f(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้น สามารถเขียนสมการของพื้นที่ผิวการตอบสนองได้ตามสมการที่ 2.2 คือ

$$\eta = f(X_1, X_2) \quad (2.2)$$

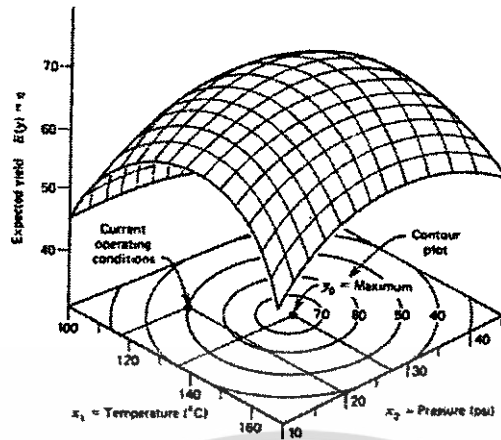
ซึ่งจะเรียกว่าพื้นที่ผิวการตอบสนอง (response surface) โดยส่วนใหญ่จะแสดงผลการตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวในรูปของกราฟฟิก โดยที่จะทำการพลอต η กับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นที่ผิวการตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.12 และ 2.13

อย่างไรก็ตามในการศึกษาโดยใช้วิธีการแสดงผลพื้นที่ผิวการตอบสนองนั้น จำเป็นต้องค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างตัวแปรตามของค่าตอบสนองต่อตัวแปรอิสระต่างๆ เป็นลำดับแรก การค้นหาฟังก์ชันต่างๆ เหล่านี้มักใช้ความสัมพันธ์แบบพหุนาม (polynomial) ลำดับต้นๆ เช่น ลำดับหนึ่งหรือกำลังหนึ่ง (first order) ลำดับสองหรือกำลังสอง (second order) เป็นต้น โดยทั่วไปฟังก์ชันซึ่งประมาณความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (Linear regression relationship) ดังสมการที่ 2.3 ซึ่งสมการดังกล่าวเป็นสมการพื้นฐานง่ายสุด ที่มักรู้จักกันว่าเป็นรูปแบบสมการลำดับที่หนึ่ง (first-order model or equation)

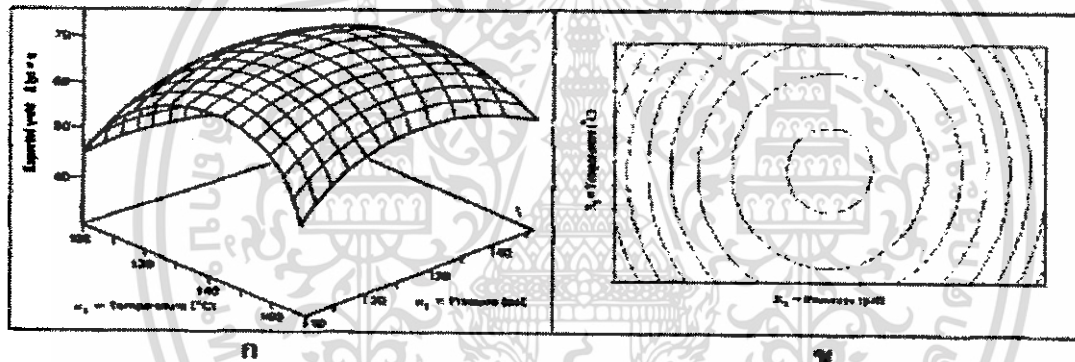
$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2.3)$$

การพิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานโดยพิจารณาถ้าค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่ามาก นั้นบ่งบอกถึงตัวแบบจำลองที่นำมาใช้มีความเหมาะสมน้อยมาก แต่ถ้าค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าน้อย นั้นบ่งบอกถึงตัวแบบจำลองที่นำมาใช้มีความเหมาะสมค่อนข้างมาก และถ้าในกรณีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าเท่ากับศูนย์นั้นบ่งบอกถึงตัวแบบจำลองมีความเหมาะสมดีมาก (ศิริชัย, 2548)

การพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2) ซึ่งเป็น การวัดความใกล้เคียงของเส้นถดถอยของตัวอย่างกับค่าสังเกตต่างๆ ของตัวอย่าง ถ้า R^2 มีค่ามากนั้นบ่งบอกว่าเส้นถดถอยจะผ่านเข้าใกล้ค่าสังเกตต่างๆ มากกว่าค่า R^2 ที่มีค่าน้อยกว่า ซึ่งค่า R^2 มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ซึ่งค่า R^2 จะต้องมามีค่าใกล้เคียงกับ 1 หรือเท่ากับ 1 จะทำให้ตัวแปรอิสระในแบบจำลองมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงของผลการทดลองหรือตัวแปรตามได้ดี (ศิริชัย, 2548)



ภาพที่ 2.12 โครงสร้าง 3 มิติของพื้นที่ผิวการตอบสนอง
ที่มา: อิศรพงษ์ (2550)



ภาพที่ 2.13 แสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟแบบโครงสร้างพื้นผิว (ก) กราฟ 3 มิติ (ข)
กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (contour plot)
ที่มา: Montgomery (1991)

สำหรับการออกแบบการทดลองแบบพื้นที่ผิวการตอบสนอง การวิเคราะห์ความไม่สอดคล้องของแบบจำลอง (Lack of fit of estimated model) นั้น ถือเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับทดสอบความถูกต้องของแบบจำลองเนื่องจากการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง ดังนั้นจึงสามารถพิจารณาได้จากผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (Sum of Square of the Residual Error: ESS) ในการตัดสินใจความถูกต้องของแบบจำลองจะพิจารณาค่า F ซึ่งเป็นตัวสถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับความแปรปรวน นั่นคือ ถ้าค่า F ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าค่า F ที่เปิดจากตารางสถิติ แสดงว่าฟังก์ชันถดถอยไม่มีความสัมพันธ์เป็นแบบเดียวกับแบบจำลองที่ใช้

ในการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของตัวแปรหรือปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามหรือผลการทดลองนั้น ซึ่งตัวแปรหรือปัจจัยดังกล่าวที่ต้องการศึกษาจะต้องมีผลต่อค่านัยสำคัญทางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) จะต้องปรากฏในสมการ ซึ่งสมการที่ได้ อาจเป็นสมการกำลังหนึ่ง (first order model) ที่มีลักษณะกราฟเป็นเส้นตรงหรือสมการกำลังสอง (second order model) ที่มีหลายเทอม และจากสมการที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำมาสร้างกราฟ 3 มิติ ที่เรียกว่ากราฟของพื้นที่ผิวการตอบสนอง (response surface plot) ซึ่งแสดงระดับของตัวแปรในแนวระนาบและแสดงค่าตอบสนองในแนวแกนตั้งหรือสร้างกราฟ 2 มิติ ที่เรียกว่า contour plot ซึ่งแสดงค่าตอบสนองในรูปเส้นกราฟหลายเส้น (Roberto, 2000)

การออกแบบพื้นผิวผลการตอบสนองสำหรับการทดลองนี้ได้เลือกใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^k แฟกตอเรียล (factorial 2^k) อย่างไรก็ตาม CCD ที่มีตัวแปรอิสระหลายตัวแปรและให้หน่วยการทดลองที่ไม่มากเกินไป แต่ครอบคลุมจุดที่สำคัญ จึงเพิ่มระดับการทดลองแฟกตอเรียลที่จุดศูนย์กลาง (center) และแนวกลาง (axial) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับคือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง ($+1$) และระดับสูงสุด ($+\alpha$) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 2^k factorial in CRD หรือ RCBD อย่างสมบูรณ์หรือเพียงบางส่วน 2^k axial point หรือจุดที่อยู่บนแกน coordinate และจุดศูนย์กลาง เมื่อ k คือปัจจัยในการทดลองและ m คือจำนวนการทดลองที่จุดศูนย์กลาง ดังนั้นหน่วยการทดลองทั้งหมด (n) ได้จาก $n = 2^k + 2k + m$ แสดงดังภาพที่ 2.14 ถ้าในการทดลองมี 3 ปัจจัยและจำนวนการทดลอง 6 จะได้จำนวนการทดลองเท่ากับ 20 การทดลอง



ภาพที่ 2.14 จุดของการออกแบบ 15 สิ่งทดลองในแบบ composite design สำหรับ 3 ปัจจัย
ที่มา: ไพโรจน์ (2544)

2.26 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ghadge และ Raheman (2006) ได้สนใจน้ำมัน Mahua Oil (*Madhuca indica*) มาผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากในประเทศอินเดียมีพืชน้ำมันที่ไม่สามารถมาเป็นอาหารได้ (non-edible oil) อยู่หลายชนิดและน่าสนใจที่จะนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงไบโอดีเซลซึ่งหนึ่งในนั้นคือ น้ำมัน Mahua เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้เห็นใบใช้ประโยชน์ทางการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oil แต่เนื่องน้ำมันชนิดนี้มีปริมาณกรดไขมันอิสระ อยู่ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 20 ซึ่งถ้าน้ำมันมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงมากกว่าร้อยละ 1 เมื่อนำเอาน้ำมันนั้นมาผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการ ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยโซเดียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสบู่ขึ้น สบู่จะไปทำให้การแยกชั้นระหว่างไบโอดีเซลกับกลีเซอรอลเป็นไปได้ยากขึ้น ดังนั้น Ghadge และ Raheman (2006) จึงสนใจที่จะศึกษาน้ำมัน Mahua Oil มาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) กับเมทานอลโดยใช้กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เป็นตัวเร่งเพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมัน จากนั้นจึงนำเอาน้ำมันที่ผ่านกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันไปผลิตไบโอดีเซลโดยใช้โซเดียมเป็นตัวเร่งต่อไปในขั้นตอนเอสเทอร์ฟิเคชันนั้นเริ่มด้วยออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) มีทั้งหมด 23 การทดลองตัวแปร (Factor) ที่ศึกษามี 3 ตัวแปรได้แก่ สัดส่วนโดยปริมาตรระหว่างน้ำมันต่อเมทานอลมี 5 ระดับคือ 0.22, 0.25, 0.30, 0.35 และ 0.38 ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยามี 5 ระดับคือ 0.66, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.34 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเวลาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันมี 5 ระดับคือ 0.16, 0.50, 1.00, 1.50 และ 1.84 ชั่วโมง โดยทั้งนี้ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาคงที่ที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำมัน Mahua Oil มาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันตามแผนการทดลองข้างต้น นำค่าความเป็นกรด (acid value) จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันมาวิเคราะห์ทางสถิติอันได้แก่ การวิเคราะห์เชิงถดถอย (Regression Analysis) การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) พร้อมทั้งวิเคราะห์พื้นผิวการตอบสนองโดยใช้รูปแบบ (model) กำลังสอง (Quadratic Polynomial Equation) มาวิเคราะห์ข้อมูล ผลการวิเคราะห์ได้รูปแบบของสมการกำลังสองดังนี้

$$AV = 89.773 - 434.400M - 1.103C - 28.304T + 703.340M^2 + 5.177C^2 + 6.474T^2 - 44.500MC + 2.020CT + 29.400MT$$

โดยที่ AV = ค่าความเป็นกรด (acid value)

M = ปริมาณเมทานอล

C = ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา

T = เวลาทำปฏิกิริยา

จากการวิเคราะห์เชิงถดถอยพบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination: R^2) เท่ากับ 0.842 ดังนั้นรูปแบบที่ได้จึงมีความเหมาะสมสำหรับการใช้ทำนายค่าความเป็นกรด นอกจากนั้นผลการทดลอง (ค่าความเป็นกรด) ยังถูกนำไปพลอตกราฟพื้นผิวการตอบสนองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อลดค่าความเป็นกรดของน้ำมัน Mahua oil คือ ใช้สัดส่วนโดยปริมาตรระหว่างน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 0.32 ปริมาณตัวเร่ง

เอกลสารเป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดที่นำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่แจ้งชื่อผู้แต่งการคัดลอกหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมายและต้องแจ้งถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาร้อยละ 1.24 โดยปริมาตร และเวลาในการทำปฏิกิริยา 1.26 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายคือนำน้ำมัน Mahua oil ที่ผ่านกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งมีค่าความเป็นกรดลดลงเหลือ 1.64 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยใช้ เมทานอลในสัดส่วน 0.25 โดยปริมาตร ตัวเร่งปฏิกิริยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ปริมาณร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส พบว่าผลได้ได้ผลิตภัณฑ์มากถึงร้อยละ 98 สุดท้ายไบโอดีเซลที่ผลิตได้นั้นถูกนำไปทดสอบคุณสมบัติทางด้านเชื้อเพลิงพบว่ามีคุณสมบัติเป็นไปตามมาตรฐาน ASTM D 6751-02 และ DIN EN 14214

Leelaruji และคณะ (2013) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ (*Jatropha curcas*) โดยใช้ตัวเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งชีวภาพโดยทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการผลิตและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อโดยทำการทดสอบที่ช่วงเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง จากการทดลองจะได้ว่าช่วงเวลา 3 ถึง 48 ชั่วโมงเป็นการเจริญของเชื้อในช่วง log phase ช่วง 48 ถึง 120 ชั่วโมงเป็นการเจริญของเชื้อในช่วง stationary phase และช่วง 120 ถึง 168 เป็นช่วงการเจริญ death phase และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุดของเชื้อคือ 9.7 ± 1.20 หน่วยต่อมิลลิกรัมที่ 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบความเหมาะสมของระดับอุณหภูมิที่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และระดับอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมของเมทานอล 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 2, 1 ต่อ 3, 1 ต่อ 4, 1 ต่อ 5, 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 7 จากการทดลองจะได้ว่าในช่วงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและอัตราส่วนของเมทานอล 1 ต่อ 3 จะมีความสอดคล้องกับอัตราการผลิตของเชื้อซึ่งมีการเจริญที่มากที่สุด และได้ปริมาณของ FAME มากที่สุดคือร้อยละ 71.8 ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง

Arabmarkadeh และคณะ (2014) ได้ศึกษาการใช้เชื้อ *Rhizopus oryzae* ในรูปตรึงตัวเซลล์ (cell immobilization) เพื่อใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซลซึ่งได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของแอลกอฮอล์กับน้ำมันคาโนลา (canola oil) ในถังปฏิกรณ์แบบกะ (Batch bioreactor) และแบบแพ็คเบด (Packed-Bed bioreactor) พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 85.3 เนื่องจากมีการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 0.10-0.50 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาณน้ำ (water content) เท่ากับร้อยละ 15 และในอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันคาโนลาต่อเมทานอลเท่ากับ 3:1 ซึ่งมีการเติมเมทานอลปริมาตร 0.1 ถึง 0.24 มิลลิลิตรสามารถในทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ผลิตได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 85.3 เช่นกัน และปริมาณของเมทิลเอสเทอร์จะลดลงเท่ากับร้อยละ 40.4 ก็ต่อเมื่ออัตราส่วนของน้ำมันคาโนลาต่อเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 7:1 และปริมาณของน้ำมันคาโนลาซึ่งเป็นสารตั้งต้นเพิ่มขึ้น จากนั้นเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์แบบแพ็คเบด (Packed-Bed bioreactor) จะให้ผลผลิตปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 92

Hashemizadeh และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลจากความแตกต่างของตัวแปรที่ส่งผลให้กระบวนการผลิต Fatty acid methyl esters (FAME) โดยใช้ตัวเซลล์ของ *Rhizopus oryzae* ในรูปแบบตรึงตัวเซลล์ (cell immobilization) มีปริมาณของ FAME ที่เพิ่มขึ้น พบว่าปัจจัยแรกที่ทำการศึกษาคือขนาดของ Biomass support particles (BSPs) ที่มีผลต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เท่ากับร้อยละ 84 คือรูปแบบทรงลูกบาศก์ (cuboid form) ปัจจัยที่สองคือประเภทของน้ำมันที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเช่น น้ำมันโอลีฟ (olive oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) และน้ำมันคาโนลา (canola oil) พบว่าน้ำมันโอลีฟ (olive oil) ปัจจัยที่สามคือ emulsification ของปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเมทิลเอสเทอร์แบบ ultrasonicated และ non-ultrasonicated พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 32 จากแบบ ultrasonicated มากกว่าแบบ non-ultrasonicated ปัจจัยที่สี่คือผลของปริมาณน้ำ (water content) และน้ำหนักของตัวเร่งชีวภาพ พบว่าภายหลัง 96 ชั่วโมงจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเมทิลเอสเทอร์มากที่สุดในช่วงที่ปริมาณน้ำ (water content) เท่ากับร้อยละ 15 และปริมาณของตัวเร่งชีวภาพเท่ากับร้อยละ 7 ปัจจัยที่ห้าคือผลของช่วงเวลาต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน พบว่าในช่วงระหว่าง 48 ชั่วโมงมีปริมาณเมทิลเอสเทอร์มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 84 จากนั้นได้ทำการทดสอบถึงปริมาณของ Novozyme 435 ที่มีผลต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่มากที่สุด พบว่าปริมาณของ Novozyme เริ่มต้นที่ร้อยละ 4 ถึง 6 จะให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ได้มากถึงร้อยละ 90 และได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ตัวเร่งชีวภาพแบบตรึงตัวเซลล์ (cell immobilized) กับ Novozyme 435 ในการทำปฏิกิริยา methanolysis ของน้ำมันถั่วเหลืองพบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เข้าใกล้ร้อยละ 84 เมื่อใช้ตัวเร่งชีวภาพแบบตรึงตัวเซลล์จากเชื้อ *Rhizopus oryzae* และเมื่อใช้ Novozyme 435 จะได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ถึงร้อยละ 90

Ketsara และคณะ (2010) ทำการศึกษาผลกระทบของการใช้เอนไซม์ไลเปสผสมในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ใช้อัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลแปรผันตั้งแต่ 1 ต่อ 1 จนถึง 1 ต่อ 4 พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลจาก 1 ต่อ 1 เป็น 1 ต่อ 2 ผลผลิตไบโอดีเซลจะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 33 เป็นร้อยละ 67 เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลเป็น 1 ต่อ 3 ผลผลิตไบโอดีเซลจะเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ ร้อยละ 89 และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลเป็น 1 ต่อ 4 ผลผลิตไบโอดีเซลจะลดต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sun และ Xu (2008) ได้ศึกษาตัวแปรของกระบวนการที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการสังเคราะห์ของทั้งเซลล์ของเชื้อรา *Rhizopus chinensis* ในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้สับสเตรทเป็นแป้งสาลีกับรำข้าวสาลี (3 ต่อ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ให้มีการเจริญเติบโตของชีวมวลและการผลิตเอนไซม์ที่ดี กิจกรรมการสังเคราะห์สูงสุด 24,447 หน่วยต่อกิโลกรัมของสารตั้งต้น โดยใช้ความชื้นร้อยละ 70 พีเอชเริ่มต้น 6.5 เพิ่มเปปโตน (ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม และน้ำมันมะกอก (ร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก) เป็นสารชักนำหลังจากบ่ม 72 ชั่วโมง ทำให้เอนไซม์ไลเปสที่สังเคราะห์ขึ้นบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยใช้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำและเจลฟิวเตรชัน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ผลผลิตและจำนวนเท่าของการทำให้บริสุทธิ์ คือร้อยละ 2.6 และ 55.2 ตามลำดับ และน้ำหนักโมเลกุลก็จะประมาณ 60 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ได้ดำเนินการโดยเร่งการสังเคราะห์ของเอทิลเอสเทอร์ และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเกิดเอทิลออกทานอยด์และเอทิลคาเปรทถึงร้อยละ 95

Liu และคณะ (2013) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Burkholderia cenocepacia* เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซล ผ่านการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง และการประยุกต์ใช้ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ผ่านการเติมโดยตรงของอาหารแข็งที่ผ่านการทำแห้งแล้วสู่ระบบดีกรีทพิทานอล กิจกรรมการยอยน้ำมันมะกอกที่สูงที่สุดของการหมักเป็น 72.3 หน่วยต่อกกรัมของอาหารแข็งที่ 9 ชั่วโมง ผ่านการเพิ่มของน้ำมันมะกอกเป็นตัวชักนำร้อยละ 8 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง หลังจากการทำแห้ง (lyophilization) และ delipidation จะใช้อาหารแข็งจากการเลี้ยงเชื้อเพื่อเร่งปฏิกิริยาเอทานอลิซิสของน้ำมันถั่วเหลืองสำหรับการผลิตไบโอดีเซลในดีกรีทพิทานอลซึ่งผลิตไบโอดีเซลที่มากที่สุดคือร้อยละ 86 หลังจาก 96 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่ดีที่สุดคือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราความเร็ว 200 รอบต่อนาที อัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน คือ 4 ต่อ 1 ปริมาณของแข็งร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก ดีกรีทพิทานอล ร้อยละ 40 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และความชื้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก วิธีในการผลิตไบโอดีเซลนี้แสดงให้เห็นถึงทางเลือกที่มีศักยภาพที่จะลดค่าใช้จ่ายสำหรับปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่วนการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งโดยศึกษาสภาวะต่างๆดังนี้ อัตราส่วนเมล็ดขานอ้อยต่อเมล็ดทานตะวัน คือ 5 ต่อ 3, 5 ต่อ 4, 5 ต่อ 5, 5 ต่อ 6 และ 5 ต่อ 7 ปริมาณความชื้นของสับสเตรท ร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 และเวลาที่ใช้บ่ม 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 28 ± 2.1 หน่วยต่อกกรัม โดยใช้อัตราส่วนเมล็ดขานอ้อยต่อเมล็ดทานตะวัน 5 ต่อ 5 และเวลาที่ใช้บ่ม 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดทานตะวัน 5 ต่อ 3 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเมล็ดทานตะวันที่ความชื้นร้อยละ 50 ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

Cristobal Verdugo และคณะ (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา คือ อุณหภูมิ 23 อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันและค่าพีเอช โดยใช้วิธีพื้นผิวการตอบสนอง (Response surface methodology : RSM) ในการเปลี่ยนน้ำมันดอกทานตะวันเป็นแพตตี เอซิด เอซิด เอสเทอร์ (Fatty Acid Ethyl Esters) โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerols) และ ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerols) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของเอทานอลต่อน้ำมันคือ 3.4 ต่อ 1 และค่าพีเอช 12 เวลาที่ทำปฏิกิริยา คือ 1 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงประมาณร้อยละ 70 ความหนืดไคเนมาติก (kinematic viscosity) คือ 8.5 ตารางมิลลิเมตรต่อวินาที

Noureddini และคณะ, (2005) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง โดยการเร่งปฏิกิริยาของ Lipase PS ที่ตรึงอยู่บน hydrophobic sol-gel พบว่าสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 11 ครั้ง โดยเอนไซม์ยังคงเร่งปฏิกิริยาและให้ผลผลิตมากกว่าร้อยละ 50 ทั้งในระบบที่มีสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 7.6, 9.5, 11.4 และ 13.3 โดยระบบที่มีสัดส่วนโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 9.5 จะเกิดการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด เนื่องจากมีเอทานอลในปริมาณที่สมดุลพอที่จะใช้ในการทำปฏิกิริยาและไม่มากเกินไปจนเกิดการยับยั้งเอนไซม์

Rigo และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ในกากถั่วเหลืองที่มีอาหารเสริมที่แตกต่างกัน โดยใช้จุลินทรีย์สองสายพันธุ์ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ตามมาในแง่ของกิจกรรมการย่อยสลายที่ค่าพีเอชที่แตกต่างกัน คือ 4, 7 และ 9 โดยใช้อาหารเสริมที่มียูเรียและน้ำมันถั่วเหลือง มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์สำหรับทุกค่าพีเอชและอุณหภูมิที่ศึกษา เชื้อจุลินทรีย์ *Penicillium* P58 และ *Penicillium* P74 แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีลักษณะที่แตกต่างกันในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ในการเลี้ยงเชื้อด้วยกากถั่วเหลืองเสริมด้วยยูเรียและน้ำมันถั่วเหลือง จุลินทรีย์นี้ให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปส 139.2 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต และ 140.7 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต ในเวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะที่เป็นด่างและกรดตามลำดับ พฤติกรรมที่แตกต่างกันก็สังเกตเห็นเมื่อประเมินสารสกัดเอนไซม์ในสภาพที่เป็นกลางซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 180 หน่วยต่อกรัมสับสเตรต ใน 72 ชั่วโมง ซึ่งสายพันธุ์ใหม่ที่มีแนวโน้มที่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี ที่ทดสอบด้วยกากถั่วเหลืองที่มีอาหารเสริมที่แตกต่างกัน พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งด้วยกากถั่วเหลืองไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสริมด้วยยูเรียและน้ำมันถั่วเหลือง คือ *Penicillium* P58 ที่พีเอช 4 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ที่พีเอช 9 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสใน 48 ชั่วโมง ส่วนที่พีเอช 7 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงหลังจาก 72 ชั่วโมงจนมากที่สุดที่ 120 ชั่วโมง เท่ากับ 203.72 ยูนิตต่อกรัม

Yucel (2012) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* ที่ตรึงบนโพลีกลูตาโรลดีไฮด์ (polyglutaraldehyde) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาน้ำมันจากกากมะกอกและเมทานอล โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology: RSM) ร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Design: CCD) ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา คือ อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งทางชีวภาพและเวลาที่ทำปฏิกิริยา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันคือ 5.3 ต่อ 1 ปริมาณตัวเร่งทางชีวภาพร้อยละ 5.8 โดยน้ำหนักและเวลาที่ทำปฏิกิริยาคือ 24 ชั่วโมง จากการทำนายได้ผลผลิตไบโอดีเซลร้อยละ 92.87

Salum และคณะ (2010) ศึกษาเอนไซม์ไลเปสจาก *B. cepacia* LTEB11 ในการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล ในถังปฏิกรณ์แบบ Fixed bed reactor มีการเปลี่ยนแปลงถึงร้อยละ 95 หลังจาก 46 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้อัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันคือ 3 ต่อ 1 ซึ่งมีการเติมแอลกอฮอล์สองชั้นตอน และเติมน้ำร้อยละ 1

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. กระบอกตวง
2. ขวดปรับปริมาตร
3. ขวดรูปชมพู่
4. ขวดแก้วใส่อาหาร
5. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
6. ปีกเกอร์
7. ปีเปิดแก้ว
8. ไมโครปิเปต
9. หลอดทดลอง
10. คิวเวตแก้ว

3.2 เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) บริษัท Olympus
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บริษัท Thermo Scientific
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท Boss Tech
4. เครื่องบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) บริษัท Unitron
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) บริษัท HERMLE
6. หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท TOMY Digital Biology
7. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo
8. เครื่องผสมเนื้อสาร (homogenizer) บริษัท Vibra cell
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) บริษัท Thermo Scientific
10. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) บริษัท GenTech
11. เครื่องผสมสาร (vortex) บริษัท Scientific Industries
12. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) บริษัท Contherm Labnet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์ใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บริษัท HIMEDIA Laboratories
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar (YMA) บริษัท HIMEDIA Laboratories
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutreint broth (NB) บริษัท HIMEDIA Laboratories
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt broth (YMB) บริษัท HIMEDIA Laboratories
5. Rhodamine B บริษัท SIGMA-ALDRICH
6. สารมาตรฐานเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) บริษัท SIGMA-ALDRICH
7. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท HIMEDIA Laboratories
8. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท MERCK
9. น้ำกลั่น (distilled water)
10. กลูโคส (glucose) บริษัท SIGMA-ALDRICH
11. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) บริษัท SIGMA-ALDRICH
12. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท CARLO ERBA REAGENTS
13. พาราไนโตรฟีนิลพาล์มิเตต (*p*-nitrophenyl palmitate) บริษัท SIGMA-ALDRICH
14. 2-โพรพานอล (2-propanol) บริษัท MERCK
15. Absolute ethanol บริษัท MERCK
16. ไตรตรอน เอ็ก-100 (triton X-100) บริษัท Fisher Scientific
17. Tris (hydroxymethyl) aminomethane
18. เฮกเซน (hexane) บริษัท JT Baker[®]
19. กัม อาราบิก (gum arabic) บริษัท MERCK

3.4 วัตถุประสงค์ เชื้อจุลินทรีย์และการเก็บรักษา

แบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่คัดแยกจากวัสดุประเภทต่างๆคือ ดิน กากไยพาล์ม น้ำเสีย และทะเลสาบพาล์มจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันประเภทต่างๆ บริเวณแถบกรุงเทพมหานครและปริมณฑล และเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทำการกลายพันธุ์โดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เอทิลเมทิลซัลโฟเนต และรังสีแกมมา (วรรณิสา และคณะ, 2557) โดยเก็บรักษาไว้ที่สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยการนำมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient agar (NA) และ Yeast malt agar (YMA) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ตามลำดับ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และน้ำมันเหลือใช้ที่ได้จากครัวเรือน โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำมันถั่วเหลือง

3.5 การคัดเลือกเบื้องต้น (Primary screening) ของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็ง

เลี้ยงแบคทีเรีย และยีสต์ในอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) และ Yeast malt agar (YMA) ตามลำดับ ที่มีการเติมน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนร้อยละ 1 และ Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร (Kumar และคณะ, 2012) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสคือโคโลนีที่มีสีชมพูอมส้ม

3.6 การคัดเลือกขั้นที่สอง (Secondary screening) ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไลเปสโดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารเหลว

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จากการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) และ Yeast malt broth (YMB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย และยีสต์ มาทำการเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนและส่วนประกอบอื่นๆ เป็นกรัมต่อลิตรดังนี้คือ Peptone 0.5, Yeast extract 0.5, NaCl 0.05, CaCl₂ 0.005 และอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ซึ่งมีส่วนประกอบเป็นกรัมต่อลิตรดังนี้คือ Glucose 2, Peptone 5, MgSO₄ 0.1, K₂HPO₄ 1 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Silva และคณะ, 2005) และ 48 ชั่วโมง (Kumar และคณะ, 2005) สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ตามลำดับ แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้เอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) เพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Silva และคณะ, 2005) (ภาคผนวก ข)

3.7 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก (Srimhan และคณะ, 2011)

น้ำมันที่ผ่านการกรองปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 0.932 มิลลิลิตร อัตราส่วนโดยโมลต่อโมลของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4 ต่อ 1 ผสมใส่ในขวด จากนั้นทำการเติมตัวเซลล์ของแบคทีเรีย และยีสต์ แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 เอลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการแยก
 ไม่ว่าจะเป็นกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนใส ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสส่วนบนสุด ไปทำการวิเคราะห์ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี (Gaschromatography Mass spectrometry) (ภาคผนวก ข)

3.8 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก

แบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่คัดเลือกไว้เพื่อนำไปใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมในการผลิตไบโอดีเซล ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ได้แก่ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลืองใช้จากคร่าวเรื้อนและ Rhodamine B ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Kumar และคณะ, 2012) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และส่งวิเคราะห์โดยทดสอบและจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี

3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

เลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในสภาวะอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ตัดแปลงวิธีของ Sekhon และคณะ, 2006 ; Sabat และคณะ, 2012) (ภาคผนวก ข) และศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ทุก 24 ชั่วโมงด้วยเทคนิคการเจือจาง (Serials ten-fold dilution) โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ย (Spread plate technique) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate count agar)

เติมตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมภายหลังการทำแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) ในน้ำมัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการผลิตไบโอดีเซลเป็นเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อร้อยละของปริมาณเอสเทอร์ และร้อยละของผลผลิตที่ได้ (yield) (ภาคผนวก ข) (ตัดแปลงวิธีของ Srimhan และคณะ, 2011 ; Hashemizadeh และคณะ, 2014 ; Hashemizadeh และคณะ, 2011 ; Yan และคณะ, 2014 ; Leelaruji และคณะ, 2013) และศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ทุกๆ 24 ชั่วโมงด้วยเทคนิคการเจือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาง (Serials ten-fold dilution) โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ย (Spread plate technique) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate count agar)

นำปัจจัยที่ต้องการศึกษาและผลการทดลองที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และร้อยละปริมาณเอสเทอร์จากการผลิตไบโอดีเซลมาคัดเลือกด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology : RSM) ด้วยการออกแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design : CCD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^k แฟกทอเรียล (factorial 2^k) โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมจำนวน 3 ตัวแปรคือ ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่างแสดงดังตารางที่ 3.1 ร้อยละปริมาณเอสเทอร์สำหรับการผลิตไบโอดีเซลจำนวน 3 ตัวแปรคือ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และเวลาในการบ่มแสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้นในการผลิตไบโอดีเซลทำการเติมเอทานอลเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันก่อนเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอสเทอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการออกแบบการทดลองแบบ CCD จะมีการออกแบบในทุกสภาวะความเหมาะสมของแต่ละปัจจัย และมีการทำซ้ำที่จุดกลางของการทดลอง ทำการกำหนดระดับของปัจจัยที่ศึกษา ซึ่งประกอบด้วย จุดแฟกทอเรียล จุดขอบ และจุดกึ่งกลาง โดยแปรผันระดับของตัวแปรในแต่ละปัจจัยเป็น 5 ระดับ คือ ระดับสูงสุด (+ α) ระดับสูง (+) ระดับกลาง (0) ระดับต่ำ (-) และระดับต่ำสุด (- α) ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 20 การทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.3 และ 3.4 ประกอบด้วย จุดกึ่งกลาง (center point) จำนวน 6 จุด จุดขอบ (axial point) จำนวน 6 จุด และ factorial point จำนวน 8 จุด ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของสภาวะที่เหมาะสมต่ออิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (dependent variable) กับตัวแปรตาม (independent variable) การผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม แสดงดังสมการที่ 3.1 และการผลิตไบโอดีเซล แสดงดังสมการที่ 3.2

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.1)$$

โดยที่ Y คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงสุด

X_1 X_2 X_3 คือ ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่าง

β_0 คือค่าคงที่ $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ quadratic term

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ interaction term

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.2)$$

- โดยที่ Y คือ ค่าร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่สูงสุด
 X_1 X_2 X_3 คือ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และเวลาในการบ่ม
 β_0 คือค่าคงที่ $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย
 $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ quadratic term
 $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ interaction term

หลักจากนั้นทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม (ภาคผนวก ข) และร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของการผลิตไบโอดีเซล (ภาคผนวก ข) แล้วนำผลการทดลองที่ได้ มาสร้างกราฟในรูปแบบสามมิติ (3D surface) และกราฟเส้นโครงร่างสองมิติ (contour plot) ของวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ด้วยโปรแกรม STATISTICA เวอร์ชัน 7 ส่วนข้อมูลและระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามาวิเคราะห์สมการถดถอยด้วยโปรแกรม SPSS ผลการทดลองที่ทำการวิเคราะห์นำมาสร้างสมการ Quadratic กำกับสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรต่างๆ ที่ทำการศึกษาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและร้อยละปริมาณเอสเทอร์ โดยแต่ละตัวแปรจะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลที่แสดงส่วนนูนและจุดศูนย์กลางในวงกลมของแต่ละกราฟ จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละตัวแปร เมื่อแทนค่าลงในสมการจะได้ค่าที่เหมาะสมที่สุดของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และร้อยละปริมาณเอสเทอร์จากการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นค่าจากการทำนาย (predict value) ด้วยโปรแกรม STATISTICA เวอร์ชัน 7

3.10 การตรวจสอบยืนยันผล (Validation)

ยืนยันผลของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และการผลิตไบโอดีเซลอีกครั้งในระดับพลาสก์ โดยใช้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเหลว ซึ่งได้จากกราฟในรูปแบบโครงร่างพื้นผิวสามมิติ (3D surface) และกราฟเส้นโครงร่างสองมิติ ซึ่งทำนายค่า (predict value) ด้วยโปรแกรม STATISTICA เวอร์ชัน 7 โดยนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสำหรับการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม (ภาคผนวก ข) เมื่อได้ผลการทดลองเรียบร้อยแล้วจึงนำไปทำการแช่เยือกแข็ง (freeze drying) (ภาคผนวก ข) เพื่อใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซลจากนั้นทำการทดสอบกิจกรรมของ

เอนไซม์ไลเปส (ภาคผนวก ข) และศึกษาการเจริญของเชื้อในตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมภายหลังการทำแช่เยือกแข็ง (freeze drying) สำหรับการผลิตไบโอดีเซลนำไปวิเคราะห์ร้อยละปริมาณเอสเตอร์ (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับสำหรับหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม ตามแผนการทดลองแบบ CCD

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	รหัส (code factor level)				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
ปริมาณรำข้าว (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร)	X_1	0.046	2	5	8	10.046
ปริมาณกากน้ำตาล (ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร)	X_2	0.318	1	2	3	3.682
ค่าความเป็นกรดต่าง	X_3	5.318	6	7	8	8.682

หมายเหตุ ระยะเวลาในการบ่มเท่ากันคือ 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับสำหรับหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซล ตามแผนการทดลองแบบ CCD

ตัวแปรอิสระ	สัญลักษณ์	รหัส (code factor level)				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
อัตราส่วนของเอทานอลต่อ น้ำมัน (โมลต่อโมล)	X_1	0.592	1.863	3.726	5.589	6.86
ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร)	X_2	1.59	5	10	15	18.41
เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	X_3	31.632	48	72	96	112.368

3.11 การวางแผนการทดลองและสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD; Completely Randomized Design) ในหัวข้อที่ 3.6 และ 3.8 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลตัวอย่างด้วย one-way ANOVA โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS เวอร์ชัน 8.0

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง CCD (Central composite design) ในการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (RSM) ในหัวข้อ 3.12 ขั้นตอนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพและการผลิตไบโอดีเซล โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำผลการทดลองวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 8.0 และสร้างกราฟในรูปแบบสามมิติ (3D surface) รวมถึงกราฟเส้นโครงร่างสองมิติ (contour plot) โดยใช้โปรแกรม STATISTICA เวอร์ชัน 7

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมโดยสายพันธุ์เชื้อซึ่งคัดเลือกจากแผนการทดลองแบบ CCD

จำนวนการทดลอง	รหัสของปัจจัย			ระดับของปัจจัย		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	2	1	6
2	-1	-1	+1	2	1	8
3	-1	+1	-1	2	3	6
4	-1	+1	+1	2	3	8
5	+1	-1	-1	8	1	6
6	+1	-1	+1	8	1	8
7	+1	+1	-1	8	3	6
8	+1	+1	+1	8	3	8
9	-1.68	0	0	0.046	2	7
10	+1.68	0	0	10.046	2	7
11	0	-1.68	0	5	0.318	7
12	0	+1.68	0	5	3.682	7
13	0	0	-1.68	5	2	5.318
14	0	0	+1.68	5	2	8.682
15	0	0	0	5	2	7
16	0	0	0	5	2	7
17	0	0	0	5	2	7
18	0	0	0	5	2	7
19	0	0	0	5	2	7
20	0	0	0	5	2	7

หมายเหตุ X_1 คือปริมาณรำข้าว (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร) X_2 คือร้อยละปริมาณกากน้ำตาล (ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร) X_3 คือค่าความเป็นกรดต่าง ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 สถานะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมต่อร้อยละปริมาณของเอสเทอร์ของ การผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมซึ่งคัดเลือกจากแผนการทดลองแบบ CCD

จำนวนการ ทดลอง	รหัสของปัจจัย			ระดับของปัจจัย		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	1.863	5	48
2	-1	-1	+1	1.863	5	96
3	-1	+1	-1	1.863	15	48
4	-1	+1	+1	1.863	15	96
5	+1	-1	-1	5.589	5	48
6	+1	-1	+1	5.589	5	96
7	+1	+1	-1	5.589	15	48
8	+1	+1	+1	5.589	15	96
9	-1.68	0	0	0.592	10	72
10	+1.68	0	0	6.86	10	72
11	0	-1.68	0	3.726	1.59	72
12	0	+1.68	0	3.726	18.41	72
13	0	0	-1.68	3.726	10	31.632
14	0	0	+1.68	3.726	10	112.368
15	0	0	0	3.726	10	72
16	0	0	0	3.726	10	72
17	0	0	0	3.726	10	72
18	0	0	0	3.726	10	72
19	0	0	0	3.726	10	72
20	0	0	0	3.726	10	72

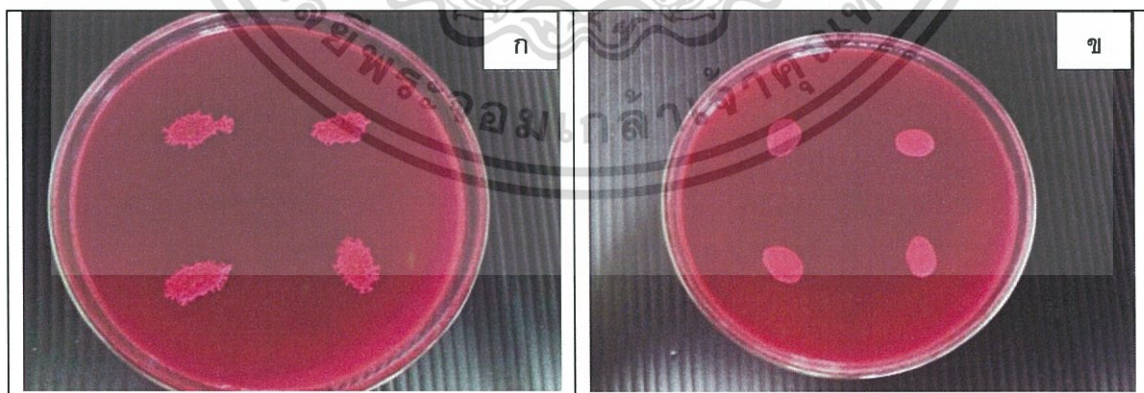
หมายเหตุ X_1 คืออัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล) X_2 คือปริมาณตัวเร่งชีวภาพจาก จุลินทรีย์ผสม (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร) X_3 คือเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกเบื้องต้น (Primary screening) ของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะอาหารแข็ง

จากการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะอาหารแข็งซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือน และ Rhodamine B พบว่าโคโลนีของแบคทีเรีย KPB1, KPB3, KPB5, KPB6, KPB7, KPB8, KPB9 และ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9, KPY11, KPY14, KPY21, KPY29, KPY33 และ KPY42 สายพันธุ์กลาย G47 มีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้มเมื่อส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต หรือภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ (Kumar และคณะ, 2012) เนื่องจากเชื้อมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและสามารถไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นซึ่งเป็นน้ำมันกับ Rhodamine B ได้ (Jarvis และ Thiele, 1997; Rueda, 2005) ซึ่งวิธีการใช้ Rhodamine B เป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีอื่นๆ ในการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพราะ Rhodamine B สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถนำมาทำการคัดเลือกเชื้อซ้ำได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีนี้สามารถใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความจำเพาะระหว่างเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรส (Kouker และ Jaeger, 1987)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะสัญญาณวิทยาของแบคทีเรีย และยีสต์ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม ก) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar สำหรับแบคทีเรีย และ ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar สำหรับยีสต์ ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนร้อยละ 1 และ Rhodamine B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกขั้นที่สอง (Secondary screening) ของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไลเปส โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการนำส่วนใส ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสสกัดหยาบ ของแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเท่ากับ 0.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans* BTS-3 ที่มีการใช้น้ำมันโอลีฟ (Olive) เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Kumar และคณะ, 2005) เนื่องจากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* sp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (true lipase) ในกลุ่มแฟมิลี 1 เพราะแบคทีเรียในจีนัสนี้มีบริเวณเร่ง (active site) ของอะลานีนคือ Ala-Xaa-Ser-Xaa-Gly (Arpigny และ Jaeger, 1999) และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 กับสายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดคือเท่ากับ 0.40 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4.2 และแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อ *Rhodotorula mucilagenosa* P11189 โดยการใช้ไขมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อจากการเปลี่ยนสีของพาราไนโตรฟีนิลพาล์มิเตต (*p*-nitrophenyl palmitate) (Srimhan และคณะ, 2011)

ตารางที่ 4.1 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

แบคทีเรีย	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
KPB6	0.04 ^h
KPB5	0.07 ^g
KPB10	0.07 ^f
KPB3	0.08 ^e
KPB7	0.09 ^d
KPB9	0.13 ^c
KPB1	0.15 ^b
KPB8	0.31 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น 0.31^a มีอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ในสภาวะอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ยีสต์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตภายนอกเซลล์ของยีสต์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
KPY29	0.07 ^h
KPY21	0.11 ^s
KPY11	0.16 ^f
KPY42	0.19 ^e
KPY14	0.21 ^d
KPY33	0.33 ^c
KPY9	0.34 ^b
G47	0.40 ^a

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของแบคทีเรียกับยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและยีสต์สายพันธุ์กลายด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี แมสเปกโตรเมตรี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 จะให้ค่าของเอสเทอร์มากที่สุด คือเท่ากับร้อยละ 30.7 รองลงมาคือสายพันธุ์ KPB1 เท่ากับร้อยละ 26.3 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีคุณสมบัติที่สามารถตรึงเอนไซม์ภายในเซลล์และสามารถปลดปล่อยออกมาได้ง่าย (Matsumoto และคณะ, 2001 ; Matsumoto และคณะ, 2002) ซึ่งแตกต่างจากการใช้เซลล์ของ *Escherichia coli* ที่มีการดัดแปลงทางพันธุกรรมใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพระหว่างเมทานอลทำปฏิกิริยากับ rapeseed oil ได้เป็นไบโอดีเซลร้อยละเท่ากับ 97.7 (Gao และคณะ, 2009) ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 จะให้ค่าของเอสเทอร์มากที่สุดคือเท่ากับร้อยละ 12.2 รองลงมาคือสายพันธุ์ KPY42 เท่ากับร้อยละ 11 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ให้ค่าเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 42.9 ซึ่งแตกต่างจากการใช้เซลล์ของ *Rhodotorula mucilagenosa* P11189 ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลได้เป็นร้อยละไบโอดีเซลเท่ากับ 51.26 (Srimhan และคณะ, 2011) ซึ่งการใช้ตัวเซลล์จุลินทรีย์เป็นตัวเร่งชีวภาพแทนการใช้เอนไซม์ไลเปสสามารถลดผลของแอลกอฮอล์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Srimhan และคณะ, 2011) ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี แมสเปกโตรเมทรีเมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนกับเอทานอลบริสุทธิ์ที่อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 4 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ยีสต์	ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์	แบคทีเรีย	ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์
G47	42.9 ^a	KPB1	26.3 ^c
KPY9	12.2 ⁱ	KPB3	23.5 ^d
KPY11	10.5 ^{jj}	KPB5	18.4 ^e
KPY 14	10.7 ^{jj}	KPB6	17.9 ^e
KPY 21	8.4 ^l	KPB7	21.3 ^f
KPY 29	9.4 ^{jk}	KPB8	15 ^h
KPY 33	9.4 ^{jk}	KPB9	23 ^{ef}
KPY 42	11 ^{ij}	KPB10	30.7 ^b

4.4 การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือก

4.4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

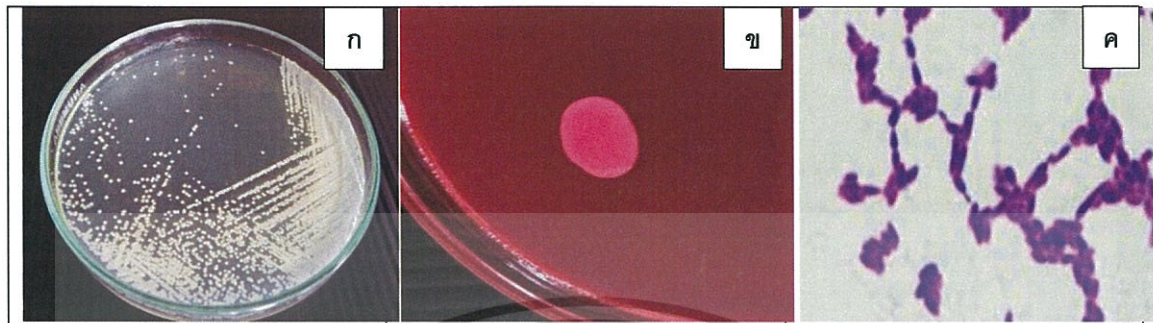
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและ Rhodamine B และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงในรูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีแกรมบวก เซลล์รูปท่อน เรียงตัวเป็นสายยาว ลักษณะโคโลนิบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวส้มขุ่น ผิวหน้า

โคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนิบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ข) ลักษณะโคโลนิบนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ KPY9 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methylene blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methylene blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ก) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast malt agar ข) ลักษณะโคโลนีบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนและ Rhodamine B และ ค) รูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกคือ แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย KPY9 และ G47 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกดังนี้

1. แบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม KPB10 คือ

5'GATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAA
GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATA
AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
GTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGG
GCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGAGAAGAGGAGAGTG
GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCT
AGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
CCTGGGCTACCACCGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCC
ACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTG-3'

2. ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 คือ

5'GGGATCATTATGCCAGCATCCTTGATAAAATCGCAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAG
GCTATAACACTTCACCGAGGTAAAGTCACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGG
CCCATAAGCTGCGGGTACCCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACC

CTTCCCTTTCAACAATTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGT
 ACTTGTTGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCA
 TTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCA
 CCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTAC
 AACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAGGC
 AATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCT3'

3. ยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 คือ

5'AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA
 CTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTTCTTGTCTATGTTTCTTGAACA
 GAACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCAGACCTATGAAAAGTTCCCTTCGAAGA
 GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGA
 GACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACG
 TGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGG
 CCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGACAATTGCAAAGAAATGTGGCACTGCC
 TCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGA
 TGTTGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT'3'

พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก KPB10 มีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus siamensis* ที่ระดับร้อยละ 99.78 ยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือก KPY9 มีความเหมือนกับเชื้อ *Pichia guilliermondii* ที่ระดับร้อยละ 99 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 มีความเหมือนกับเชื้อ *Candida orthopsilosis* ที่ระดับร้อยละ 100 ซึ่งต่างจากการใช้ตัวเซลล์แบคทีเรียของ *Escherichia coli* ซึ่งผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม โดยคัดแยกจากตัวอย่างดินและน้ำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA โดยนำไปใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลที่สภาวะความเข้มข้นของเมทานอลต่อน้ำมันที่ 5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 100 (Gao และคณะ, 2009) และเซลล์ยีสต์ของ *Rhodotorula mucilagenosa* P11189 โดยคัดแยกจากตัวอย่างน้ำเสีย ดิน และกากใยปาล์ม และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลให้ผลิตภัณฑ์ของ Oleic methyl ester และ Fatty acid methyl ester ร้อยละ 64.12 และร้อยละ 51.26 ตามลำดับ (Srimhan และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและการผลิตไบโอดีเซล

4.5.1 ตัวเร่งชีวภาพ

4.5.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การออกแบบผลการทดลองโดยใช้พื้นผิวตอบสนอง (RSM) โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมของสายพันธุ์แบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก จำนวน 3 ตัวแปรคือ ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่าง การวางแผนการทดลองแบบ CCD ทำให้ได้ชุดการทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง ผลการศึกษาการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมโดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ที่เวลา 120 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.4 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 8 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่าง และสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรงด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7 เพื่อทำนายค่าตอบสนอง ในการสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรนั้นได้กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการพิจารณาค่า p-value ของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวแปรที่แสดงในตารางที่ 4.5 โดยพจน์ที่มีความสำคัญต่อค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 นั้นต้องมีค่า p-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ตัวแปรนั้นจึงจะปรากฏในสมการ จากนั้นพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่า F ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองด้วยโปรแกรม SPSS ซึ่งแบบจำลองจะมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ก็ต่อเมื่อค่า F ที่ได้จากโปรแกรมต้องมีค่ามากกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

4.5.1.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i)

การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 8 และใช้วิธี Response Surface Regression ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD

การทดลองที่	ปริมาณรำข้าว (ร้อยละน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	ปริมาณกากน้ำตาล (ร้อยละปริมาตรต่อ ปริมาตร)	ค่าความเป็น กรดต่าง	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
1	2	1	6	0.233
2	2	1	8	0.232
3	2	3	6	0.238
4	2	3	8	0.245
5	8	1	6	0.251
6	8	1	8	0.235
7	8	3	6	0.233
8	8	3	8	0.258
9	0.046	2	7	0.271
10	10.046	2	7	0.266
11	5	0.318	7	0.272
12	5	3.682	7	0.257
13	5	2	5.318	0.235
14	5	2	8.682	0.28
15	5	2	7	0.386
16	5	2	7	0.391
17	5	2	7	0.384
18	5	2	7	0.39
19	5	2	7	0.392
20	5	2	7	0.391

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS

Factors	Code	Coefficients	Unstandardized Coefficient		t-value	p-value*
			β_i	Standard error		
Constant		β_0	0.39	0.02	168.944	0.000
Bran	X_1	β_1	0.008	0.02	4.968	0.000*
Molasses	X_2	β_2	0.005	0.02	-0.064	0.95
pH	X_3	β_3	0.001	0.02	0.353	0.726
Bran x Molasses	X_1X_2	β_{12}	-0.002	0.02	-0.867	0.39
Bran x pH	X_1X_3	β_{13}	0.000	0.02	0.162	0.872
Molasses x pH	X_2X_3	β_{23}	0.006	0.02	2.933	0.005*
Bran ²	X_1^2	β_{11}	-0.05	0.01	-33.435	0.000*
Molasses ²	X_2^2	β_{22}	-0.047	0.01	-31.692	0.000*
pH ²	X_3^2	β_{33}	-0.046	0.01	-30.708	0.000*
Coefficient of correlation (R^2) = 0.981 , Coefficient of determination (adj. R^2) = 0.978 Lack of fit = 0.305						

หมายเหตุ : สัมประสิทธิ์การถดถอยที่กำกับด้วย * คือแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

โดยที่ Coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร

t-value คือ สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน

p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

จากตารางที่ 4.5 เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (β) ไปแทนในสมการที่ 4.1 จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมกับตัวแปรอิสระ (ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่าง) แสดงดังสมการที่ 4.2

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (4.1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Y = 0.39 + 0.008 X_1 + 0.005 X_2 + 0.001 X_3 - 0.002 X_1 X_2 + 0.000 X_1 X_3 + 0.006 X_2 X_3 - 0.05 X_1^2 - 0.047 X_2^2 - 0.046 X_3^2 \quad (4.2)$$

หมายเหตุ : Y คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม

X_1 คือ ร้อยละปริมาณรำข้าว

X_2 คือ ร้อยละปริมาณกากน้ำตาล

X_3 คือ ค่าความเป็นกรดต่าง

4.5.1.3 การวิเคราะห์นัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร (Test on Individual Regression Coefficients)

เมื่อได้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยดังสมการที่ 4.2 แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ซึ่งเป็นการทดสอบว่าตัวแปรอิสระ (X_i) แต่ละตัวในสมการที่ 4.2 นั้นมีอิทธิพลหรือไม่ต่อตัวแปรตาม (ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส) โดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$H_0 : \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k = 0$ ตัวแปรอิสระที่ i (X_i) ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

$H_1 : \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \neq 0$ ตัวแปรอิสระที่ i (X_i) มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

จากตารางเมื่อพิจารณาในส่วนของ Linear Terms ได้แก่ X_1, X_2 และ X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.00, 0.95 และ 0.726 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 พบว่าค่า p-value ของตัวแปรอิสระ X_1 มีค่าน้อยกว่า 0.05 และตัวแปรอิสระ X_2 และ X_3 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสกับตัวแปรอิสระ X_1 เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส และสามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 4.2 ได้

ลำดับต่อไปพิจารณาส่วนของ Square Terms อันได้แก่ X_1^2, X_2^2 และ X_3^2 พบว่ามีค่า p-value เท่ากับ 0.00 ทุกตัวแปร และมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสกับตัวแปรอิสระ X_1^2, X_2^2 และ X_3^2 เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า X_1^2, X_2^2 และ X_3^2 สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์สถานะที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในสมการที่ 4.2 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดท้ายพิจารณาส่วนของ Interaction Terms ได้แก่ X_1X_2 , X_1X_3 และ X_2X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.39, 0.872 และ 0.005 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) 0.05 พบว่าค่า p-value ของตัวแปรอิสระ X_2X_3 มีค่าน้อยกว่า 0.05 และตัวแปรอิสระ X_1X_2 , และ X_1X_3 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสกับตัวแปรอิสระ X_2X_3 เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส และสามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 4.2 ได้

เมื่อพิจารณาครบทุกส่วนแล้วสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสกับตัวแปรอิสระ (ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่าง) ดังสมการที่ 4.3 กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ซึ่งแม้บางปัจจัยจะมีค่าสัมประสิทธิ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ไม่สามารถตัดปัจจัยดังกล่าวไปได้ เนื่องจากผลกระทบร่วมระหว่างปัจจัยยังคงมีเหลืออยู่ดังนั้นสมการถดถอยจึงมีความสามารถในการคาดคะเนผลกระทบของปัจจัยต่างๆ ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้

$$Y = 0.39 + 0.008X_1 + 0.005X_2 + 0.001X_3 - 0.002X_1X_2 + 0.000X_1X_3 + 0.006X_2X_3 - 0.05X_1^2 - 0.047X_2^2 - 0.046X_3^2 \quad (4.3)$$

4.5.1.4 การวิเคราะห์นัยสำคัญของแบบจำลอง (Test for Significant of Regression)

เป็นการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของตัวแปรอิสระทุกตัวพร้อมๆกันโดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0 \text{ ตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

$$H_1 : \beta_j \neq 0 \text{ มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

ในการทดสอบสมมติฐานจะพิจารณาจากผลรวมกำลังสองทั้งหมด (SST: Total Sum of Squares) ซึ่งเป็นผลบวกระหว่างผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากตัวแบบ (SSR: Sum of Squares due to Regression) กับผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (SSE: Sum of Squares due to Residual error) สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐานคือค่า F ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้โปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.6 มีค่าเท่ากับ 288.024 แต่ค่า F ที่เปิดจากตารางสถิติมีค่าเท่ากับ 6.16 ($F_{0.05,6,4}$) เมื่อ

กำหนดระดับนัยสำคัญ (α) เป็น 0.05 แสดงว่าแบบจำลองมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เนื่องจากค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F ที่ได้จากตารางสถิติมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 ทำให้สรุปได้ว่า มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม (ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส) สามารถนำไปพยากรณ์ในตัวแบบได้ นอกจากจะพิจารณาจากค่า F แล้ว ยังสามารถพิจารณาได้จากค่า p-value ของตัวแบบ (Regression Model) ได้ด้วย โดยจะปฏิเสธ H_0 ก็ต่อเมื่อ p-value มีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดจากตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่า p-value ของตัวแบบมีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นปฏิเสธ H_0 (Myers และ Montgomery, 2002)

ตารางที่ 4.6 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองเพื่อคำนวณหาค่า F

Source	Sum of Squares (SS)	df	Mean Squares (MS)	F-value	p-value
Regression	0.249	9	0.028	288.024	0.000
Residual Error	0.005	50	0.000		
Total	0.254	59			

โดยที่ SS คือ ผลบวกกำลังสอง (Sum of Square)

df คือ องศาความเป็นอิสระ (Degrees of Freedom)

F-value คือ สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับความแปรปรวน

p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

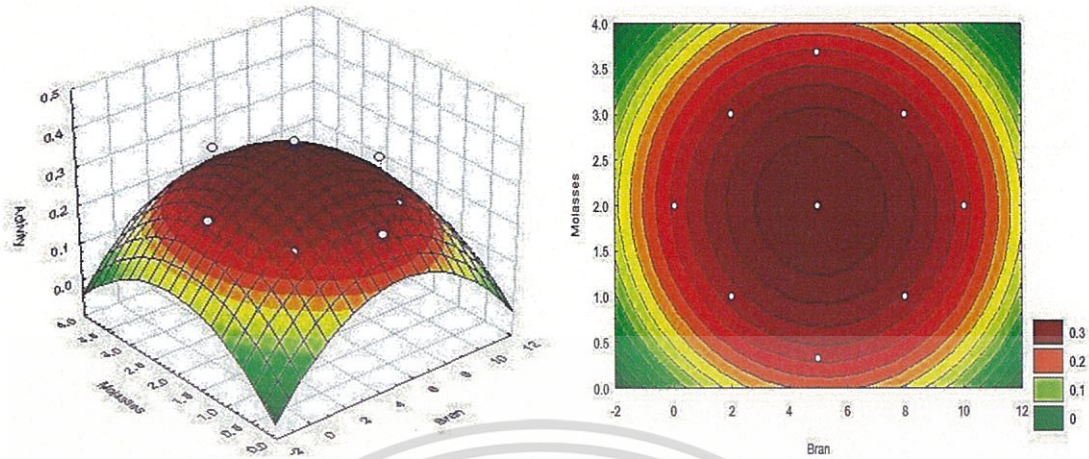
4.5.1.5 การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

เมื่อนำข้อมูลค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการทดลองทั้ง 20 การทดลองในตารางที่ 4.4 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7 เพื่อดูผลของอันตรกิริยาระหว่างตัวแปร โดยโปรแกรมจะแสดงผลออกมาในรูปของกราฟแบบ 3 มิติ (Response surface plot) และกราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot) ดังนี้

1. อิทธิพลของร้อยละปริมาณรำข้าวและร้อยละปริมาณกากน้ำตาล

จากภาพที่ 4.5 แสดงอิทธิพลของร้อยละปริมาณรำข้าวและร้อยละปริมาณกากน้ำตาลที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ภาพที่ 4.5 ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งร้อยละปริมาณรำข้าวและร้อยละปริมาณกากน้ำตาลก็มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส และในภาพที่ 4.5 ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส คือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด (สีแดง) มีค่าร้อยละปริมาณรำข้าวประมาณ 5.37 น้ำหนักต่อปริมาตร และร้อยละปริมาณกากน้ำตาลประมาณ 2.10 ปริมาตรต่อปริมาตร จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์

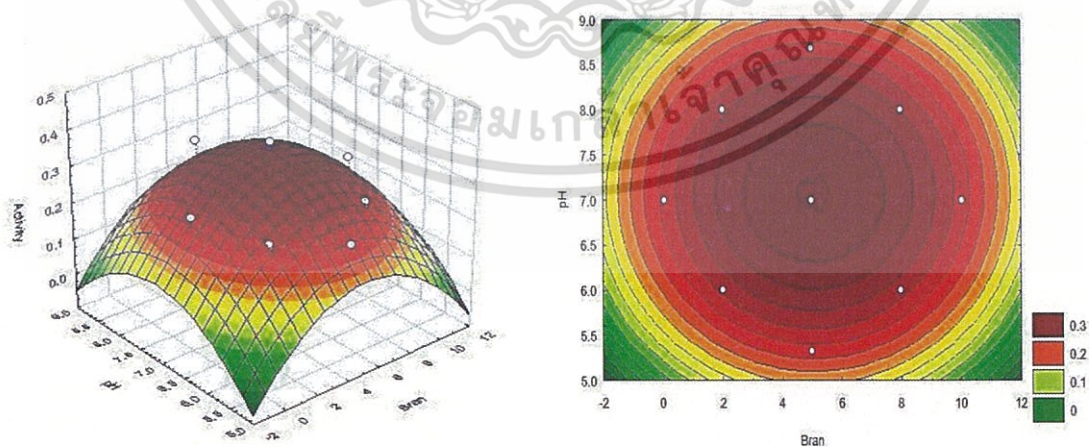
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไลเปสสูงที่สุด ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณรำข้าวและร้อยละปริมาณกากน้ำตาลที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

2. อิทธิพลของร้อยละปริมาณรำข้าวและค่าความเป็นกรดต่าง

จากภาพที่ 4.6 แสดงอิทธิพลของร้อยละปริมาณรำข้าวและค่าความเป็นกรดต่างที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ภาพที่ 4.6 ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งร้อยละปริมาณรำข้าวและค่าความเป็นกรดต่างก็มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส และในภาพที่ 4.6 ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสคือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด (สีแดง) มีค่าร้อยละปริมาณรำข้าวประมาณ 5.37 น้ำหนักต่อปริมาตร และค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 7.32 จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

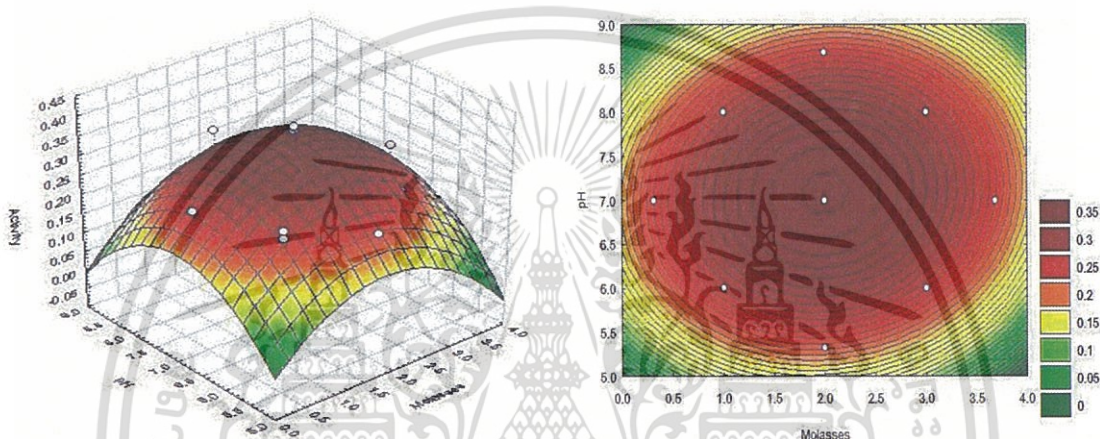


ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณรำข้าวและค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อิทธิพลของร้อยละปริมาณกากน้ำตาลและค่าความเป็นกรดต่าง

จากภาพที่ 4.7 แสดงอิทธิพลของร้อยละปริมาณกากน้ำตาลและค่าความเป็นกรดต่างที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ภาพที่ 4.7 ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งร้อยละปริมาณกากน้ำตาลและค่าความเป็นกรดต่างก็มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส และในภาพที่ 4.7 ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส คือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด (สีแดง) มีค่าร้อยละปริมาณกากน้ำตาลประมาณ 2.10 ปริมาตรต่อปริมาตร และค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 7.32 จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณกากน้ำตาลและค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

จากกราฟพื้นผิวตอบสนองในภาพที่ 4.5-4.7 จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม จุดยอดของกราฟ (บริเวณสีแดง) จะให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด เมื่อเลยจุดที่เหมาะสมออกไปผลที่ได้ก็คือค่าการตอบสนองจะลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมที่คำนวณได้จากสมการที่ 4.3 แสดงดังตารางที่ 4.8 จะได้ว่าร้อยละปริมาณรำข้าวมีค่าเท่ากับ 5.37 น้ำหนักต่อปริมาตร ร้อยละปริมาณกากน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 2.10 ปริมาตรต่อปริมาตร และค่าความเป็นกรดต่างมีค่าเท่ากับ 7.32 จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R^2) เท่ากับ 0.981 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยปริมาณสูงสุดของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ของกากน้ำตาลที่ใช้พบว่ามีค่าเท่ากับ 591.84 และ 2.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับการใช้ร้อยละ 1.5 ของปริมาณ

กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.5 โดยมีการใช้แบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* MTCC 37 เนื่องจากมีการนำเอนไซม์หยาบที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 0.1 โมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์จึงส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงขึ้น พบว่าในสภาวะที่เหมาะสมจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 24.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Sabat และคณะ, 2012) และแตกต่างกับการใช้ร้อยละ 1 ของปริมาณรำข้าว ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus megaterium* AKG-1 ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว เนื่องจากมีการใช้ seed cakes, peptone และ mannitol ปริมาตรร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร ซึ่งเป็นแหล่งช่วยเสริมให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้น พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Sekhon และคณะ, 2006) ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยปริมาณของเชื้อในการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD

การทดลองที่	ปริมาณรำข้าว (ร้อยละน้ำหนักต่อ ปริมาตร)	ปริมาณกากน้ำตาล (ร้อยละปริมาตรต่อ ปริมาตร)	ค่าความเป็น กรดต่าง	ค่าเฉลี่ยปริมาณของเชื้อ (โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อ มิลลิลิตร)
1	2	1	6	1.62×10^9
2	2	1	8	1.51×10^9
3	2	3	6	1.65×10^9
4	2	3	8	1.41×10^9
5	8	1	6	1.64×10^9
6	8	1	8	1.61×10^9
7	8	3	6	1.42×10^9
8	8	3	8	1.8×10^9
9	0.046	2	7	1.55×10^9
10	10.046	2	7	1.81×10^9
11	5	0.318	7	1.5×10^9
12	5	3.682	7	1.6×10^9
13	5	2	5.318	1.5×10^9
14	5	2	8.682	1.93×10^9
15	5	2	7	2.58×10^9
16	5	2	7	2.32×10^9
17	5	2	7	2.45×10^9
18	5	2	7	2.1×10^9
19	5	2	7	2.28×10^9
20	5	2	7	2.14×10^9

ตารางที่ 4.8 การคาดคะเนกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้จากพื้นผิวตอบสนอง

ชุดทดลองที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากการคาดคะเน	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการทดลองจริง
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃		
1	5.37	1.89	6.89	0.12	-0.11	-0.11	0.38	0.31
2	5.37	1.89	7.1	0.12	-0.11	0.1	0.38	0.33
3	5.37	1.89	7.32	0.12	-0.11	0.32	0.38	0.31
4	5.37	2.1	6.89	0.12	0.1	-0.11	0.38	0.34
5	5.37	2.1	7.1	0.12	0.1	0.1	0.38	0.34
6	5.37	2.1	7.32	0.12	0.1	0.32	0.38	0.36

ผลของค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อในแต่ละชุดการทดลองด้วยเทคนิคการเจือจางบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) แสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อในชุดการทดลองที่ 1 ถึง 14 มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 1.41×10^5 ถึง 1.93×10^5 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร และจะเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่ 15 ถึง 20 มีค่าเท่ากับ 2.1×10^5 ถึง 2.58×10^5 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าชุดการทดลองที่ 15 จะมีจำนวนโคโลนีของเชื้อมากที่สุด ในชุดการทดลองทั้งหมด 20 ชุดการทดลอง ที่เวลา 120 ชั่วโมง และแตกต่างกับการใช้ยีสต์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ซึ่งคัดแยกจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน (Vitisant และคณะ, 2010) ด้วยวิธี Total plate count และเทคนิค spread plat ในการใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพโดยทำการเลี้ยงในอาหารสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเฉพาะประกอบด้วย physic nut oil ซึ่งเป็นตัวชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สูงขึ้นและส่งผลกระทบต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่สูงขึ้นในการผลิตไบโอดีเซล (Kumari และคณะ, 2009 ; Tamalampudi และคณะ, 2008) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีการเจริญของเชื้อเท่ากับ 1.65×10^5 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร (Leelarajuji และคณะ, 2013)

4.5.2 การผลิตไบโอดีเซล

4.5.2.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การออกแบบผลการทดลองโดยใช้พื้นผิวตอบสนอง (RSM) โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลจำนวน 3 ตัวแปรคือ อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และระยะเวลาในการบ่ม การวางแผนการทดลองแบบ CCD ทำให้ได้ชุดการทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง ผลการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยพิจารณาจากร้อยละของปริมาณเอสเทอร์ แสดงดังตารางที่ 4.9 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ไปใช้

ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 8 เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และระยะเวลาในการบ่ม และสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรงด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7 เพื่อทำนายค่าการตอบสนอง ในการสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรนั้นได้กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการพิจารณาค่า p-value ของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวแปรที่แสดงในตารางที่ 4.10 โดยพจน์ที่มีความสำคัญต่อค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 นั้นต้องมีค่า p-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ตัวแปรนั้นจึงจะปรากฏในสมการ จากนั้นพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่า F ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองด้วยโปรแกรม SPSS ซึ่งแบบจำลองจะมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ก็ต่อเมื่อค่า F ที่ได้จากโปรแกรมต้องมียค่ามากกว่าค่า F ที่ได้จากการเปิดตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

4.5.2.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i)

การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 8 และใช้วิธี Response Surface Regression ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ได้ผลดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS

Factors	Code	Coefficients	Unstandardized Coefficient		t-value	p-value*
			β_i	Standard error		
Constant		β_0	96.416	2.677	36.020	0.000
Ethanol	X_1	β_1	2.324	1.776	1.309	0.197
Biocatalyst	X_2	β_2	2.968	1.776	1.671	0.101
Time	X_3	β_3	2.192	1.776	1.234	0.223
Ethanol x Biocatalyst	X_1X_2	β_{12}	3.834	2.320	1.653	0.105
Ethanol x Time	X_1X_3	β_{13}	3.720	2.320	1.603	0.115
Biocatalyst x Time	X_2X_3	β_{23}	3.828	2.320	1.650	0.105
Ethanol ²	X_1^2	β_{11}	-23.706	1.729	-13.715	0.000*
Biocatalyst ²	X_2^2	β_{22}	-23.323	1.729	-13.493	0.000*
Time ²	X_3^2	β_{33}	-23.377	1.729	-13.524	0.000*

Coefficient of correlation (R^2) = 0.905 ; Coefficient of determination (adj. R^2) = 0.888 Lack of fit = 0.505

หมายเหตุ : สัมประสิทธิ์การถดถอยที่กำกับด้วย * คือแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

โดยที่ Coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร

t-value คือ สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน

p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

ตารางที่ 4.9 ร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของการผลิตไบโอดีเซลในสภาวะที่ได้จากแผนการทดลองแบบ CCD

การทดลองที่	อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล)	ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม (ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร)	ระยะเวลาในการป่ม (ชั่วโมง)	ร้อยละของปริมาณเอสเทอร์ทั้งหมด
1	1.863	5	48	14.51
2	1.863	5	96	13.77
3	1.863	15	48	12.52
4	1.863	15	96	13.84
5	5.589	5	48	13.87
6	5.589	5	96	14.76
7	5.589	15	48	13.97
8	5.589	15	96	43.42
9	0.592	10	72	42.49
10	6.86	10	72	41.89
11	3.726	1.59	72	38.27
12	3.726	18.41	72	46.42
13	3.726	10	31.632	41.15
14	3.726	10	112.368	41.37
15	3.726	10	72	98.44
16	3.726	10	72	94.51
17	3.726	10	72	85.02
18	3.726	10	72	98.41
19	3.726	10	72	98.65
20	3.726	10	72	99.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการค้าหรือเผยแพร่ขึ้น ไปโดยไม่ขออนุญาตล่วงหน้า อาจเป็นโทษได้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.10 เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (β_j) ไปแทนในสมการที่ 4.5 จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของการผลิตไบโอดีเซลกับตัวแปรอิสระ (อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และระยะเวลาในการบ่ม) แสดงดังสมการที่ 4.6

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (4.5)$$

$$Y = 96.416 + 2.324X_1 + 2.968X_2 + 2.192X_3 - 3.834X_1X_2 + 3.720X_1X_3 + 3.828X_2X_3 - 23.706X_1^2 - 23.323X_2^2 - 23.377X_3^2 \quad (4.6)$$

หมายเหตุ : Y คือ ร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของการผลิตไบโอดีเซล

X_1 คือ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน

X_2 คือ ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม

X_3 คือ ระยะเวลาในการบ่ม

4.5.2.3 การวิเคราะห์นัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_j) ของแต่ละตัวแปร (Test on Individual Regression Coefficients)

เมื่อได้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยดังสมการที่ 4.6 แล้ว ขั้นตอนต่อไปเป็นขั้นตอนการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ซึ่งเป็นการทดสอบว่าตัวแปรอิสระ (X_i) แต่ละตัวในสมการที่ 4.6 นั้นมีอิทธิพลหรือไม่ต่อตัวแปรตาม (ร้อยละปริมาณของเอสเทอร์) โดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$$H_0 : \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k = 0 \text{ ตัวแปรอิสระที่ } i (X_i) \text{ ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

$$H_1 : \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \neq 0 \text{ ตัวแปรอิสระที่ } i (X_i) \text{ มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม}$$

จากตารางเมื่อพิจารณาในส่วนของ Linear Terms ได้แก่ X_1 , X_2 และ X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.197, 0.101 และ 0.223 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 พบว่าค่า p-value ของตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณเอสเทอร์กับตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 ไม่สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 4.6 ได้

ลำดับต่อไปพิจารณาส่วนของ Square Terms อันได้แก่ X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 พบว่ามีค่า p-value เท่ากับ 0.00 ทุกตัวแปร และมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณเอสเทอร์กับตัวแปรอิสระ X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์สถานะที่เหมาะสมต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ในสมการที่ 4.6 ได้

สุดท้ายพิจารณาส่วนของ Interaction Terms ได้แก่ X_1X_2 , X_1X_3 และ X_2X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.105, 0.115 และ 0.105 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ (α) 0.05 พบว่าค่า p-value ของตัวแปรอิสระ X_1X_2 , X_1X_3 และ X_2X_3 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณเอสเทอร์กับตัวแปรอิสระ X_1X_2 , X_1X_3 และ X_2X_3 ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ตัวแปรอิสระ X_1X_2 , X_1X_3 และ X_2X_3 ไม่สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 4.6 ได้

เมื่อพิจารณาครบทุกส่วนแล้วสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละปริมาณเอสเทอร์กับตัวแปรอิสระ (อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพ จากจุลินทรีย์ผสม และระยะเวลาในการบ่ม) ดังสมการที่ 4.7 กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

$$Y = 96.416 - 23.706X_1^2 - 23.323X_2^2 - 23.377X_3^2 \quad (4.7)$$

4.5.2.4 การวิเคราะห์นัยสำคัญของแบบจำลอง (Test for Significant of Regression)

เป็นการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β) ของตัวแปรอิสระทุกตัว พร้อมๆกันโดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$ ตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

$H_1 : \beta_j \neq 0$ มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

ในการทดสอบสมมติฐานจะพิจารณาจากผลรวมกำลังสองทั้งหมด (SST: Total Sum of Squares) ซึ่งเป็นผลบวกระหว่างผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากตัวแบบ (SSR: Sum of Squares due to Regression) กับผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (SSE: Sum of Squares due to Residual error) สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐานคือค่า F ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้โปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม แสดงดัง

ตารางที่ 4.11 มีค่าเท่ากับ 52.82 แต่ค่า F ที่เปิดจากตารางสถิติมีค่าเท่ากับ 6.16 ($F_{0.05,6,4}$) เมื่อไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดระดับนัยสำคัญ (α) เป็น 0.05 แสดงว่าแบบจำลองมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เนื่องจากค่า F ที่ได้จากรางสถิติมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 ทำให้สรุปได้ว่า มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม (ร้อยละปริมาณเอสเทอร์) สามารถนำไปพยากรณ์ในตัวแบบได้ นอกจากจะพิจารณาจากค่า F แล้ว ยังสามารถพิจารณาได้จากค่า p-value ของตัวแบบ (Regression Model) ได้ด้วย โดยจะปฏิเสธ H_0 ก็ต่อเมื่อ p-value มีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดจากรางที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่า p-value ของตัวแบบมีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นปฏิเสธ H_0 (Myers และ Montgomery, 2002)

ตารางที่ 4.11 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองเพื่อคำนวณหาค่า F

Source	Sum of Squares (SS)	df	Mean Squares (MS)	F-value	p-value
Regression	61431.116	9	6825.680	52.821	0.000
Residual Error	6461.1	50	129.222		
Total	67892.217	59			

โดยที่ SS คือ ผลบวกกำลังสอง (Sum of Square)

df คือ องศาความเป็นอิสระ (Degrees of Freedom)

F-value คือ สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับความแปรปรวน

p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

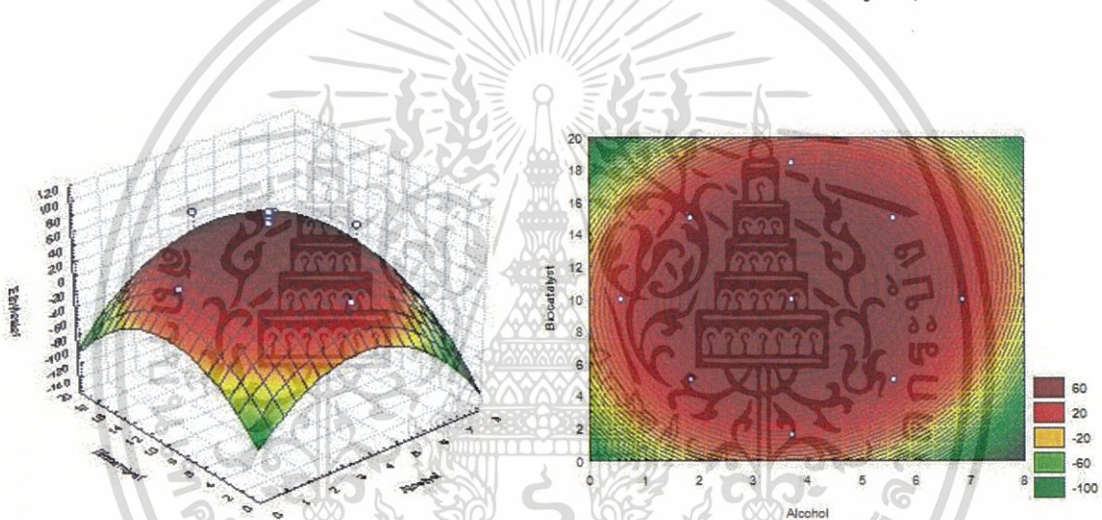
4.5.2.5 การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์

เมื่อนำข้อมูลร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลองทั้ง 20 การทดลองในตารางที่ 4.9 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7 เพื่อดูผลของอันตรกิริยาระหว่างตัวแปร โดยโปรแกรมจะแสดงผลออกมาในรูปของกราฟแบบ 3 มิติ (Response surface plot) และกราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot) ดังนี้

1. อิทธิพลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพ

จากจุลินทรีย์ผสม

จากภาพที่ 4.8 แสดงอิทธิพลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมที่ส่งผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ ภาพที่ 4.8 ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมก็มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ และในภาพที่ 4.8 ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์คือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด (สีแดง) มีค่าอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันประมาณ 3.79: 1 โมลต่อโมล และร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมประมาณ 10.53 น้ำหนักต่อปริมาตร จะได้ร้อยละปริมาณเอสเทอร์สูงที่สุด

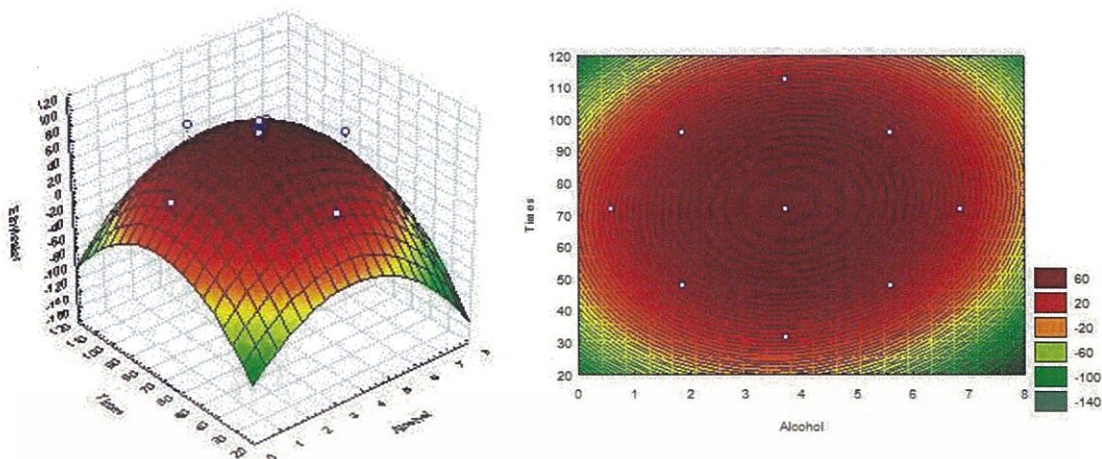


ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมที่มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

2. อิทธิพลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและระยะเวลาในการบ่ม

จากภาพที่ 4.9 แสดงอิทธิพลของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและระยะเวลาในการบ่มที่ส่งผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ ภาพที่ 4.9 ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและระยะเวลาในการบ่มก็มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์ และในภาพที่ 4.9 ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์คือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด (สีแดง) มีอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันประมาณ 3.79:1 โมลต่อโมล และระยะเวลาในการบ่มประมาณ 72 ชั่วโมงจะได้ร้อยละปริมาณเอสเทอร์สูงที่สุด

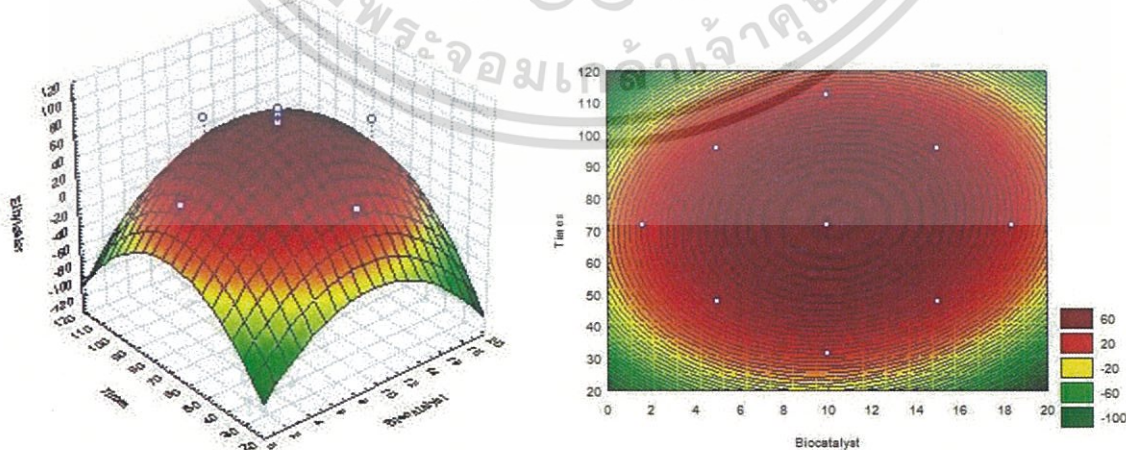
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันและระยะเวลาในการบ่มที่มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเตอร์ ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

3. อิทธิพลของร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพและระยะเวลาในการบ่ม

จากภาพที่ 4.10 แสดงอิทธิพลของร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและระยะเวลาในการบ่มที่ส่งผลต่อร้อยละปริมาณเอสเตอร์ ภาพที่ 4.10 ก) จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม (Dome shape) แสดงว่าทั้งร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและระยะเวลาในการบ่มก็มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเตอร์ และในภาพที่ 4.10 ข) แสดงให้เห็นจุดที่เหมาะสมต่อร้อยละปริมาณเอสเตอร์คือจุดที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด (สีแดง) มีค่าร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมประมาณ 10.53 น้าหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาในการบ่มประมาณ 72 ชั่วโมงจะได้ร้อยละปริมาณเอสเตอร์สูงที่สุด



ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมและระยะเวลาในการบ่มที่มีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเตอร์ ก) กราฟ 3 มิติ (Response surface plot) ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)

จากกราฟพื้นผิวตอบสนองในภาพที่ 4.8-4.10 จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม จุดยอดของกราฟ (บริเวณสีแดง) จะให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุด เมื่อเลยจุดที่เหมาะสมออกไปผลที่ได้ก็คือค่าการตอบสนองจะลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อร้อยละปริมาณเอสเทอร์

ตารางที่ 4.12 การคาดคะเนร้อยละปริมาณเอสเทอร์ด้วยปัจจัยต่างๆ ซึ่งได้จากพื้นผิวตอบสนอง

ชุดทดลองที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			ร้อยละปริมาณเอสเทอร์จากการคาดคะเน	ร้อยละปริมาณเอสเทอร์ที่ได้จากการทดลองจริง
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃		
1	3.78	10.52	72	0.03	0.10	0.03	96.12	96.67
2	4.21	10.52	72	0.26	0.10	0.03	94.51	89.48
3	4.21	11.57	72	0.26	0.10	0.03	92.46	87.43
4	3.78	11.57	72	0.03	0.10	0.03	94.08	95.94

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลที่คำนวณได้จากสมการที่ 4.7 แสดงดังตารางที่ 4.12 จะได้ว่าอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันมีค่าเท่ากับ 3.78:1 (โมลต่อโมล) ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมมีค่าเท่ากับ 10.52 น้าหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาในการบ่มมีค่าเท่ากับ 72 ชั่วโมง จะได้ร้อยละปริมาณเอสเทอร์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 96.67 มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination : R²) เท่ากับ 0.905 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) ซึ่งแตกต่างกับการใช้เซลล์ตรึงของ *Rhizopus oryzae* ที่อัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันคาโนล่า 1:3 พบว่ามีค่าร้อยละปริมาณเอสเทอร์เท่ากับ 85.3 (Arabmarkadeh และคณะ, 2014) ซึ่งใช้สายพันธุ์เชื้อในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลเพียงสายพันธุ์เดียวและเซลล์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเป็นเซลล์ที่ผ่านการตรึงจึงทำให้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดี (Tan และคณะ, 2010 ; Fukada และคณะ, 2001) และการใช้ตัวเซลล์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ซึ่งใช้สายพันธุ์เชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่อัตราส่วนแอลกอฮอล์ 1:3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อวินาที และที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีค่าร้อยละปริมาณเอสเทอร์มากที่สุดเท่ากับ 71.8 (Leelaruji และคณะ, 2013) ถึงแม้ว่ามีการรายงานว่ายีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสภายนอกเซลล์ได้ดี (Yurlova และคณะ, 1999) สามารถเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับนักศึกษาใช้เพื่อการศึกษานั่นเอง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าได้ เราสามารถให้เร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้หลากหลาย (Chi และคณะ, 2009) และสามารถผลิตไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาโดยที่ไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์และการตรึงเอนไซม์ซึ่งส่งผลต่อมูลค่าที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ (Li และคณะ, 2008) หรืออาจจะเป็นเพราะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากการใช้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูง และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่นานจนเกินไปจึงส่งผลต่อการผันกลับของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลทำให้ร้อยละปริมาณเอสเทอร์ลดลง (Meher และคณะ, 2006) และจากการคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้และตรวจสอบปริมาณเชื้อจากตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมก่อนและหลังการเติมเอทานอล พบว่าร้อยละของผลผลิตที่ได้เท่ากับ 86.07 และปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ 2.14×10^9 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณเชื้อจะมีการลดลงหลังจากการเติมเอทานอล อาจเกิดจากเอทานอลมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่ปฏิกิริยาไบโอดีเซลยังสามารถดำเนินปฏิกิริยาได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อยังสามารถทนต่อการยับยั้งของเอทานอลได้ (Matsumoto และคณะ, 2001 ; Matsumoto และคณะ, 2002) ซึ่งการใช้ตัวเซลล์จุลินทรีย์เป็นตัวเร่งชีวภาพแทนการใช้เอนไซม์ไลเปสสามารถลดผลของแอลกอฮอล์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Srimhan และคณะ, 2011)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายเบื้องต้นที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งจากวัสดุประเภทต่างๆ คือ ดิน กากใยปาล์ม น้ำเสีย และทะเลสาบปาล์มจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันประเภทต่างๆ บริเวณแถบกรุงเทพมหานครและปริมณฑล และเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้จากการทำการกลายพันธุ์โดยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เอทิลเมทิลซัลโฟเนต และรังสีแกมมา พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมทั้งหมด 7 สายพันธุ์ และยีสต์สายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีชมพูอมส้ม เมื่อส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต หรือภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์

จากการทดลองการคัดเลือกแบคทีเรีย ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายเบื้องต้นที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดเท่ากับ 0.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 กับสายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดคือเท่ากับ 0.40 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี แมสเปกโตรเมทรี พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 จะให้ค่าของเอสเทอร์มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 30.7 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 จะให้ค่าของเอสเทอร์มากที่สุดคือเท่ากับร้อยละ 12.2 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 ให้ค่าเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 42.9

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนและ Rhodamine B และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือกคือแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม KPY9 และยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ KPB10 ลักษณะจุลินทรีย์ยัดสีแกรมบวก เซลล์รูปท่อน เรียงตัวเป็นสายยาว ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวส้มขุ่น ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว และมีความเหมือนกับเชื้อ *Bacillus siamensis* ที่ระดับร้อยละ 99.78 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์

KPY9 ลักษณะจุลินทรีย์ยัดสีของ Methylene blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์กลาย และมีความเหมือนกับเชื้อ *Pichia guilliermondii* ที่ระดับร้อยละ 99 ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์สายพันธุ์ G47 ลักษณะจุลินทรีย์ติดสีของ Methylene blue เซลล์รูปวงรี ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีสีขาวขุ่นนูน ผิวหน้าโคโลนีไม่มันวาว และมีความเหมือนกับเชื้อ *Candida orthopsilosis* ที่ระดับร้อยละ 100

จากการทดลองการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมของแบคทีเรีย (KPB10) ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม (KPY9) และสายพันธุ์กลาย (G47) โดยการออกแบบผลการทดลองโดยใช้พื้นผิวดอกสนอง (RSM) และการวางแผนการทดลองแบบ CCD โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมจำนวน 3 ตัวแปรคือ ปริมาณรำข้าว ปริมาณกากน้ำตาล และค่าความเป็นกรดต่าง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม คือ ร้อยละปริมาณรำข้าวมีค่าเท่ากับ 5.37 น้ำหนักต่อปริมาตร ร้อยละปริมาณกากน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 2.10 ปริมาตรต่อปริมาตร และค่าความเป็นกรดต่างมีค่าเท่ากับ 7.32 จะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการทำการทดลองการผลิตไบโอดีเซลโดยการออกแบบผลการทดลองโดยใช้พื้นผิวดอกสนอง (RSM) และการวางแผนการทดลองแบบ CCD โดยมีตัวแปร (variable) ที่เลือกศึกษาและมีอิทธิพลต่อการผลิตไบโอดีเซลจำนวน 3 ตัวแปรคือ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสม และระยะเวลาในการบ่ม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลคืออัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำมันมีค่าเท่ากับ 3.78:1 โมลต่อโมล ร้อยละปริมาณตัวเร่งชีวภาพจากจุลินทรีย์ผสมมีค่าเท่ากับ 10.52 น้ำหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาในการบ่มมีค่าเท่ากับ 72 ชั่วโมง จะได้ร้อยละปริมาณเอสเทอร์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 96.67 และร้อยละของผลผลิตที่ได้เท่ากับ 86.07

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย และยีสต์ โดยวิธีการที่แตกต่างกันเช่น ใช้ไตรบิวทรีนหรืออาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงที่มีส่วนผสมของน้ำมันเพื่อให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงกว่าเดิม
2. ทำการทดสอบและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อได้ดียิ่งขึ้น
3. สภาวะความเหมาะสมของการผลิตตัวเร่งชีวภาพโดยทำการศึกษาปัจจัยที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของน้ำตาลที่นำมาใช้ สิ่งเหลือใช้ทางการเกษตรอื่นๆที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำมัน ระยะเวลา

ในการบ่ม และอุณหภูมิในการบ่มอื่นๆ เป็นต้น เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของตัวเร่งชีวภาพที่ดีขึ้นกว่าเดิม

4. สภาวะความเหมาะสมของการผลิตไบโอดีเซลโดยทำการศึกษาปัจจัยที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของน้ำมัน อัตราการเขย่า อุณหภูมิอื่นๆที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของการผลิตไบโอดีเซลที่ดีขึ้นกว่าเดิม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกษรา ทองบริบูรณ์. 2553. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มใช้แล้วโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในระบบกะและระบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เกษศิริรินทร์พร กุลเกื้อ. 2553. การตรวจเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในพลาสมาโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดเฟลมไอออนเซชัน วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

คณินทร์ เอี่ยมจิตต์. 2551. ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำเพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกริยาวิวิธพันธุ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทรรณ พลขำนิ. 2548. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยไลเปสจากแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุฑามาศ เทียนเมธางกูร. 2551. การตรึงไบโอดีเซลจากน้ำมันที่ผ่านการใช้ทอดแล้วโดยกระบวนการใช้ตัวเร่งปฏิกริยาแบบสองขั้นตอน. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เชิดศักดิ์ เมธาธโนศวรรย์. 2535. การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพของปฏิกริยาทรานส์ เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณกัญภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*. 24(3): 21-31.

ธนาทิพย์ อัครมดฺดุสิทธิ นุจรี เล่าห์ประเสริฐ สุขญา นิตวิฒนนานนท์ และธราพงษ์ วิจิตตานต์. 2546. การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันพืชที่ประกอบอาหารมาใช้ประโยชน์ทดแทนในด้านพลังงาน. หน้า 102-103 ใน การสัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านพลังงานทดแทน. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ผกาวดี แก้วเนตร และยุวเรศ เพ็งเจริญ. 2550. ตัวเร่งปฏิกริยาชีวภาพ:ทางเลือกใหม่ในการผลิตไบโอดีเซล. *วารสารศูนย์บริการวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 15(4): 7-11.

พุดิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์. 2555. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนมอนต์มอริลโลไนต์ ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมศึกษา, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

- พุทธชาติ เมฆทอง สุทธินันท์ นันทจิต สุวิน อภิชาติพัฒนศิริ และวนิดา คูอมรพัฒนะ. 2546. การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำมันพืชใช้แล้วจากอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ประโยชน์ ในด้านพลังงาน. หน้า 89-101 ใน การสัมมนาเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านพลังงานทดแทน. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- ไพโรจน์ วิริยจारी. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง : Response Surface Design. เชียงใหม่ :มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ไพโรจน์ วิริยจारी. 2555. การออกแบบการทดลองขั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่ : ตรีโอ แอเวอร์ไท ชิ่ง แอนด์ มีเดีย จำกัด.
- ภักดี โพธิศิริ. 2547. การควบคุมมาตรฐานน้ำมันทอดมือสองสกัดมะเร็งร้ายทำลายชีวิต [Online]. Available : <http://wave.prohosting.com/biotik/oil4.html>. สืบค้นวันที่ 29 พฤษภาคม 2558.
- มงคล ราชะนาคร. 2537. แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2539. หลักการและเทคนิควิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: ชวนชม.
- รติกร อลงกรณ์โชติกุล. 2549. เชื้อเพลิงไบโอดีเซล (BIODIESEL). *วารสารวิทยาศาสตร์*. 61(2) : 143-147.
- วรรณิสา ปันสุข อารี ฤทธิบุรณ์ และมารีสา จาตุพรพิพัฒน์. 2557. การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อ ยีสต์สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล หน้า 60-67. ใน: *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 52*. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วราวุฒิ ครุสง และกรวิกา สุขศรีวงษ์. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศิริชัย พงษ์วิชัย. 2548. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมบุรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2553. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อาทิตย์สรสา ชมิทธ์. 2537. เทคนิคที่สำคัญทางชีวเคมี. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สมมิตรพรินติ้ง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรม. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Arabmarkadeh, A., Jalili, F. and Chegini, P. 2014. Use of loofa-Immobilized *Rhizopus oryzae* as a whole-cell biocatalyst in batch and packed-bed bioreactor. *Switzerland Research Park Journal*. 103(1): 671-676.

Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*. 343: 177-183.

Azócar, L., Ciudad, G., Heipieper, H.J., Navia, R. 2010. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils : A review. *Applied Microbiology Biotechnology*. 88: 621-636.

Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G. and Zhang, T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82: 793-804.

Cristobal Verdugo, Diego Luna, Alejandro Posadillo, Enrique, D. Sancho, Salvador Rodriguez, Felipa Bautista, Rafael Luque, Jose, M., Marinas, and Antonio, A. Romero. 2011. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus* : Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*. 167: 107-112.

Cui, J.D. and Zhang, B.Z. 2011. Comparison of culture methods on exopolysaccharide production in the submerged culture of *Cordyceps militaris* and process optimization. *Letters in Applied Microbiology* 52: 123-128.

Devakate, R.V., Patil, V.V., Waje, S.S. and Thorat, B.N. 2009. Purification and drying of bromelain. *Separation and Purification Technology*, 64: 259-264.

Encinar, J.M., Gonzalez, J.F., Rodriguez, J.J. and Tejedor, A. 2002. Biodiesel fuels vegetable oils: transesterification of *cynara cardunculus* L. oils with ethanol. *Energy & Fuels*. 16: 443-450.

Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S. and Noda, H. 2008. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production: A review. *Trends in Biotechnology*. 26(12): 668-673.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5): 405-416.
- Gao, B., Su, E., Lin, J., Jing, Z., Ma, Y. and Wei, D. 2009. Development of recombinant *Escherichia coli* whole-cell biocatalyst expressing a novel alkaline lipase-coding gene from *Proteus* sp. for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*. 139: 169-175.
- Ghadge, S.V. and Raheman, H. 2006. Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 97: 379-384.
- Godtfresen, S.E. 1990. Microbial Lipase 255-274. In William, C.T.K. and Fogarty, M. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. New York : Elsevier Science Publisher.
- Gupta, N., Shai, V. and Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry*. 42: 518-526.
- Hashemizadeh, N. S., Tavakoli, O., Tabandeh, F., Karkhane, A. and Forghanipour, Z. 2011. A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipase as a biocatalyst for biodiesel production from soybean oil. *Bioenergy Technology*. 1: 311-318.
- Hashemizadeh, N. S., Tabandeh, F., Tavakoli, O. and Karkhane, A. 2014. Effect of parameters on enhanced production of fatty acid methyl esters through immobilized whole cell biocatalyst. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(2): 741-752.
- Jaeger, K-E. and Reetz, T.M. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16: 396-403.
- Jarvis, G.N. and Thiele, J.H. Qualitative rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 29: 41-47.

- Ketsara, T., Benjamas, C. and Aran, H.K. 2010. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *Energy*. 67: 52-59.
- Khan, A.K. 2002. Research into Biodiesel Kinetics & Catalyst Development. Ph.D. Thesis University of Queensland.
- Ki-Teak, L., Foglia, T.A. and Chang, K. 2002. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restarant grease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79(2): 191-195.
- Kouker, G. and Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 211-213.
- Köse, Ö., Tüter, M. and AyÖe A.H. 2002. Immobilized *Candida Antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*. 83: 125-129.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S. and Gupta, R. 2005. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*. 41: 38-44.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R. and Gupta, V. K. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*. 4(4): 1763-1770.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V.K. and Banerjee, R. 2009. Enzymatic tranesterification of *Jatropha* oil. *Biotechnology for Biofuels*. 2(1): 1-7.
- Leelarujji, W., Piamtongkam, R., Chulalaksananukul, S. and Chulalaksananukul, W. 2013. Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil catalyzed by whole cells of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3. *African Journal of Biotechnology*. 12(27): 4380-4386.
- Lee, D-W., Kim, H.W., Lee, K.W., Kim, B.C., Choe, E.A., Lee, H-S., Kim, D-S. and Pyun, Y.R. 2001. Purification and characterization of two distinct thermostable

- lipase from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 363-371.
- Leung, D.Y.C. and Guo, Y. 2006. Tranesterification of neat and used frying oil : Optimization for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*. 87(10): 883-890.
- Li, W., Du, W., Liu, D. and Yao, Y. 2008. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and tert-butanol system. *Biochemical Engineering Journal*. 41: 111-115.
- Liu, Y., Li, C., Meng, X. and Yan, Y. 2013. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. *Fuel Processing Technology*. 106: 303-309.
- Lu, J., Nie, K., Xie, F., Wang, F. and Tan, T. 2007. Enzymatic synthetic of fatty acid methyl ester from lard with immobilized *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*. 42(9): 99-125.
- Macrae, A.R. 1983. Lipase- catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 60: 291-294.
- Ma, F. and Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technology*. 70: 1-15.
- Mangos, T.J., Jones, K.C. and Folia, T.A. 1999. Lipase-catalyzed synthesis of structured low calorie triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76: 1127-1132.
- Mason, R.L., Gunst, R.F. and Hess, J.L. 2003. Statistical design and analysis of experiments with application to engineering and science. 2nd ed. Hoboken : Willey-Interscience.
- Mayordomo, I., Randez-Gil, F. and Prieto, J.A. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 105-109.

- Meher, L.C., Vidya, S.D. and Naik, S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by tranesterification-a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10(3): 248-268.
- Mittelbach, M. and Enzelsberger, H. 1999. Tranesterification of heated rapeseed oil for extending diesel fuel. *Journal of The American Oil Chemists' Society*. 76: 545-550.
- Mohamed, M.A., Mohamed., T.M., Mohamed, S.A. and Fahmy, A.S. 2000. Distribution of lipase in the Gramineae Partial purification and Characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresour Technology* 73: 227-234.
- Montgomery, D.C. 1991. Response surface methods and designs. 201-222. In Karl, A. and Wisnowski, J. *Design and Analysis of Experiments*. U.S.A. : John Wiley & Sons.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2nd ed. U.S.A. : John Wiley and Sons.
- Noureddini, H., Gao, X. and Philkana, R.S. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technology*. 96: 769-777.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V.T. 1999. The realm of microbial lipase in biotechnology. *Biotechnology Apply Biochemistry*. 29: 119-131.
- Rigo, E., Ninow, L.J., Luccio, D.M., Oliveira, V.J., Polloni, E.A., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Oliveira, D. and Treichel, H. 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT-Food Science and Technology*. 43: 1132-1137.
- Roberto, V. 2000. Response surface methods for high dimension structural design problem. Ph.D.Thesis of University of Florida.

- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. and Locatelli, S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*. 98: 648-653.
- Rueda, C.R. 2005, Microbial Lipase with Interest in Biotechnology and Infectious Diseases: Isolation, Characterization and Inhibition by Natural Substances. Ph.D. Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Barcelona University.
- Sabat, S., Murthy, K.V., Pavithra, M., Mayur, P. and Chandavar, A. 2012. Production and characterization of extracellular lipase from *Bacillus stearothermophilus* MTCC 37 under different fermentation conditions. *International Journal of Engineering Research and Application*. 2(3): 1775-1781.
- Salum, T.F.C., Villeneuve, P., Barea B., Yamamoto, C.I., L.C., Mitchell D.A. and Krieger N. 2010. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*. 45: 1348-1354.
- Schuchardt, U., Sercheli, R. and Vargas, R.M. 1998. Transesterification of Vegetable Oil: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 9(1): 199-210.
- Sekhon, A., Dahiya, N., Tewari, P.R. and Hoondal, S.G. 2006. Production of extracellular lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in submerged fermentation. *Indian Journal of Biotechnology*. 5: 179-183.
- Silva, W. O. B., Mitidieri, S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40: 321-326.
- Smith, J.E. 1985. *Biotechnology Principles*. Van Nostrand Reinhold Com., Ltd. Berkshire.
- Srimhan, P., Kongnum, K., Taweerodjanakam, S. and Hongpattarakere, T. 2011. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*. 48: 293-298.

- Srivastava, A. and Prasad, R. 2000. Triglycerides – based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Review*. 4: 111-133.
- Sun, S.Y. and Xu, Y. 2008. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*. 43: 219–224.
- Supple, B., Holward-Hildige, R., Gonzalez-Gomez, E. and Leahy, J.J. 2002. The effect of steam treating waste cooking oil on the yield of methyl ester. *Journal of the American Oil Chemist Society*. 79(2): 175-178.
- Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A. and Fukuda, H. 2008. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*. 39: 185-189.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L. and Wang, F. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase : A review. *Biotechnology Advances*. 28: 628-634.
- Varese, R. and Varese, M. 1996. Methyl ester biodiesel: opportunity or necessity. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 7: 816-824.
- Vicente, G., Martinez, M. and Aracil, J. 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalyst systems. *Bioresourse Technology*. 92: 297-305.
- Vitisant, T., Wattayakorn, G. and Chulalaksananukul, S. 2010. Production and characterization of yeast lipase isolated from soils around Sichang Island. Sixteenth Asian Agricultural Symposium and First International Symposium on Agricultural Technology. Bangkok, Thailand.
- Yamane, K., Ueta, A. and Shimamoto, Y. 2001. Influence of physical and chemical properties of biodiesel fuel on injection, combustion and exhaust emission characteristic in a DI-CI engine. *International Journal of Engine Research*. 2: 402-409.

- Yan, J., Zheng, X. and Li, S. 2014. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresourse Technology*. 151: 43-48.
- Yucel, Y. 2012. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. *Fuel Processing Technology*. 99: 97-102.
- Yurlova, N.A., de Hoog, G.S. and Gerrits van den Ende, A.H.G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology Journal*. 43: 63-69.





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt agar (YMA)

สารสกัดจากยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
เปปโตเน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

เนื้อเยื่อจากสัตว์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารแข็ง Yeast Malt agar (YMA) ที่ประกอบด้วย Rhodamine B และน้ำมันเกลือใช้จากคร่าวเรือนร้อยละ 1 (ดัดแปลงจากวิธีของ Kumar และคณะ, 2012)

สารสกัดจากยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
เปปโตเน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผงวุ้น	20	กรัม
Rhodamine B	1	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
*น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน	10	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สูตรอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ที่ประกอบด้วย Rhodamine B และน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนร้อยละ 1 (ดัดแปลงจากวิธีของ Kumar และคณะ, 2012)

เนื้อเยื่อจากสัตว์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	1.5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
Rhodamine B	1	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
*น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน	10	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สูตรอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ (Kumar และคณะ, 2005)

กลูโคส	2	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	1	กรัม
*น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน	10	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. สูตรอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Silva และคณะ, 2005)

เปปโตเน	0.5	กรัม
สารสกัดยีสต์	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.05	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.005	กรัม
*น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน	10	กรัม

เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

*หมายเหตุ ผสมน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนกับน้ำกลั่นให้รวมกันเป็นเนื้อเดียวกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยใช้เครื่องผสมเนื้อสารที่แอมพิจูด 40 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งเวลาการทำงาน 5 วินาที และหยุด 1 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที

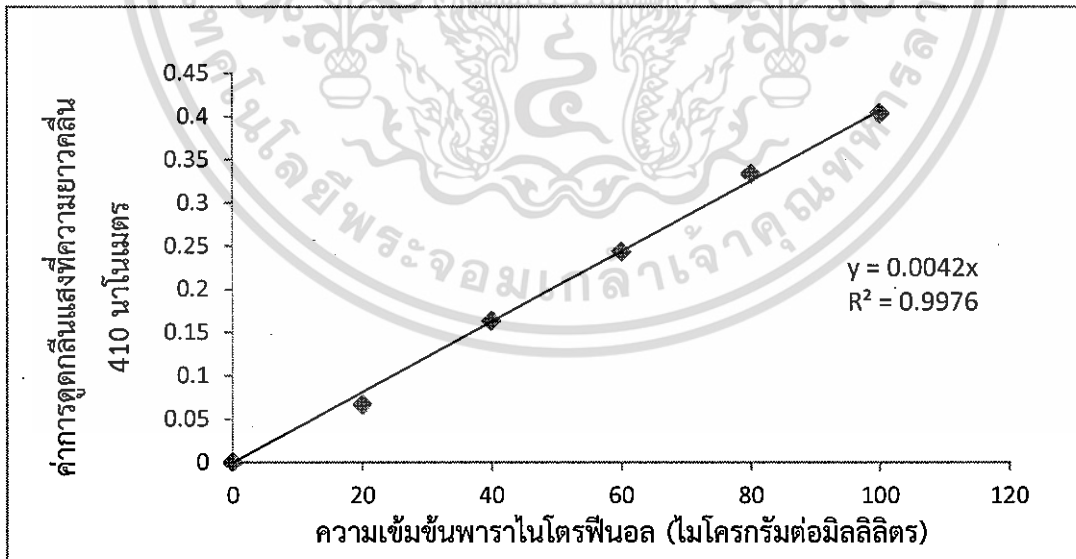
ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารละลายและวิธีการวิเคราะห์

1. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Silva และคณะ, 2005)

ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ ตามลำดับ โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) ปริมาตร 3 มิลลิกรัม ละลายใน iso-propanal ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร Triton X-100 40 มิลลิกรัม และ Arabic gum ปริมาตร 10 มิลลิกรัม แล้วนำมา 0.9 มิลลิลิตร ผสมกับเอนไซม์หยาบ 0.1 มิลลิลิตร โดยที่หนึ่งหน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol ที่ปลดปล่อยจาก *p*-nitrophenyl ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด และคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดังสมการที่ 1 และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานพาราโบลาในโตรฟินอล (ภาพภาคผนวกที่ ข1)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ไมโครกรัมของพาราโบลาในโตรฟินอล } X \text{ จำนวนเท่าของการเจือจาง}}{\text{น้ำหนักของพาราโบลาในโตรฟินอล } X \text{ ระยะเวลาการบ่ม } X \text{ ปริมาณสารละลายเอนไซม์}} \quad (1)$$



ภาพภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายในโตรฟินอลที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณเอสเทอร์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี (Gaschromatography Mass spectrometry)

โดยการใช้ Methyl heptadecanoate เป็น internal standard และคอลัมน์ DB-wax ความยาว 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร (I.D.) x 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่สภาวะอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 3 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิของ injector 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ oven เริ่มต้นที่ 150 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส และอัตราการ Split ที่ 20 : 1 และสภาวะของ MS (Mass Spectrometry) ใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบ EI (Electron Impact) อุณหภูมิของ MS Source ที่ 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ MS quadrupole ที่ 150 องศาเซลเซียส และการเก็บข้อมูลแบบสแกน (scan mode) โดยเลือกใช้ช่วงสแกนตั้งแต่ 30 ถึง 500 amu. (atomic mass unit) โดยคำนวณปริมาณไปโอดีเซลตามมาตรฐาน BS EN 14103:2003 (พุดิพัฒน์, 2555)

3. วิธีการแช่เยือกแข็ง

1. ทำความสะอาดเครื่อง ตรวจสอบเช็คปิดปลายท่อน้ำทิ้ง และต่ออุปกรณ์ให้เรียบร้อย ก่อนทำแห้งประมาณ 30 นาที ให้เปิดเครื่อง และเปิดสวิทซ์ลดอุณหภูมิ และลดความดัน

2. นำตัวเร่งชีวภาพที่ได้มาบรรจุลงในขวดทรงลูกแพร์ปริมาณ 1 ใน 3 ของปริมาตรทั้งหมด และนำไปกลิ้งในอ่างเอทานอลเย็นจนตัวเร่งชีวภาพกลายเป็นน้ำแข็งเกาะอยู่ภายในขวดแล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่อง จากนั้นเครื่องจะดูดเอาอากาศออก สภาวะในเครื่องจะเป็นสุญญากาศการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเริ่มขึ้น

3. เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ในการทดลองครั้งนี้ใช้เวลา 10 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์ลดความดัน เปิดท่อให้อากาศเข้า นำตัวเร่งชีวภาพผงที่ได้ออกมาเก็บในภาชนะที่เหมาะสม

4. ปิดสวิทซ์ลดอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำแข็ง เปิดปลายท่อทิ้งน้ำให้น้ำไหลออก และเช็คทำความสะอาดเครื่องให้เรียบร้อย

4. การเตรียมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างที่ 8

ทำการเตรียม Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.06 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ทำการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 1.24 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ได้ปริมาตร 170 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane ให้มีระดับค่าความเป็นกรดต่างที่ 8 โดยทำการวัดด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

5. การเตรียมสารละลายและวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (คณินทร์, 2551)

นำเอทิลเอสเทอร์ที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันแล้วมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่องวิเคราะห์แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิทรี โดยมีขั้นตอนและการเตรียมการดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างเอทิลเอสเทอร์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที มาชั่งให้ได้ปริมาณ 50 มิลลิกรัมบรรจุลงในขวดเก็บสาร
2. เติมสารละลายมาตรฐานเมทิลเฮปตะดีคาโนเอตความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
3. เขย่าตัวอย่างที่เตรียมได้อย่างรุนแรงเพื่อให้เกิดการผสมเข้ากันอย่างดี
4. นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ไปฉีดกับเครื่องวิเคราะห์ GC-MS ในปริมาณ 1 ไมโครลิตร
5. นำพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์มาคำนวณหาปริมาณเอทิลเอสเทอร์จากสมการที่ 2

$$C = \frac{(\sum A - AEI)}{AEI} \times \frac{(CEI \times VEI)}{m} \times 100 \quad (2)$$

กำหนดให้

C คือ ร้อยละของเอทิลเอสเทอร์ (โดยน้ำหนัก)

$\sum A$ คือ พื้นที่พีค (Peak) รวมของเอทิลเอสเทอร์ตั้งแต่ C_{12} ถึง C_{20}

A_{EI} คือ พื้นที่พีคที่ตรงกันกับของเมทิลเฮปตะดีคาโนเอต

C_{EI} คือ ความเข้มข้นหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายเมทิลเฮปตะดีคาโนเอต

VEI คือ ปริมาตรในหน่วยมิลลิลิตรของสารละลายเมทิลเฮปตะดีคาโนเอต

m คือ มวลในหน่วยมิลลิกรัมของสารตัวอย่าง

6. การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน (จันทร์นาก, 2548)

มวลโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ คำนวณจากสมการที่ 3 และ 4

$$R_{aver} = \frac{\sum(\%FA_n \times MW_n)}{100} \quad (3)$$

$$MW_{TG} = 3R_{aver} + 173 \quad (4)$$

กำหนดให้

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

MW_{TG} คือ มวลโมเลกุลของของไตรกลีเซอไรด์หรือมวลโมเลกุลของน้ำมัน

MW_n คือ มวลโมเลกุลของกรดไขมันที่ลบออกด้วยมวลโมเลกุลของ $-COOH$ ออกแล้ว

$\%FA_n$ คือ ร้อยละของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมัน

คำนวณมวลโมเลกุลของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน แทนค่าในสมการที่ 3

$$\begin{aligned} R_{aver} &= (256.42 \times 11.8) + (284.48 \times 3.2) + (282.46 \times 23.3) + (280.45 \times 5.5) + (278.43 \times \\ &6.3)/100 \\ &= 137.916 \end{aligned}$$

นำค่า R_{aver} ที่ได้แทนค่าในสมการที่ 4

$$\begin{aligned} MW_{TG} &= 3(137.916) + 173 \\ &= 586.748 \text{ กรัมต่อโมล} \end{aligned}$$

Azócar และคณะ (2010) ได้วิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนประเภทน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อการผลิตไบโอดีเซล ไว้ดังตารางภาคผนวกที่ ข1

ตารางภาคผนวกที่ ข1 องค์ประกอบของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนประเภทน้ำมันถั่วเหลือง

กรดไขมัน	ร้อยละ
กรดปาล์มิติก	11.8
กรดสเตียริก	3.2
กรดโอเลอิก	23.3
กรดลิโนเลอิก	5.5
กรดลิโนเลนิก	6.3

7. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน (พุดพิพัฒน์, 2555)

เมื่อทราบมวลโมเลกุลของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนแล้ว สามารถคำนวณน้ำหนักและปริมาณของเอทานอลที่จะต้องเติมลงในแต่ละการทดลองได้โดยกำหนดไว้ว่าจะต้องใช้น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน 5 กรัม ดังตัวอย่างต่อไปนี้

อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนต่อเอทานอลเป็น 1 ต่อ 4

$$\begin{aligned} \text{น้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนคิดเป็น } & 5 \div \text{มวลโมเลกุลของน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน (586.748)} \\ = & 8.52 \times 10^{-3} \text{ โมล} \end{aligned}$$

เอทานอลมีมวลโมเลกุล 46.07 กรัมต่อโมล และมีความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องใช้เอทานอล $4 \times 8.52 \times 10^{-3}$ โมล คิดเป็น $4 \times 8.52 \times 10^{-3} \times 46.07 = 1.57$ กรัม

หรือคิดเป็น $1.57 \div 0.789 = 1.989$ มิลลิลิตร

8. การคำนวณจำนวนสิ่งทดลองและระดับปัจจัยที่ใช้เป็นตัวแปรอิสระในการทดลองด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

จำนวนสิ่งทดลองสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5 (ไพโรจน์, 2544)

$$N = 2^k + 2k + r \quad (5)$$

กำหนดให้

N คือ จำนวนสิ่งทดลอง

k คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

r คือ จำนวนการทดลองซ้ำ

ตัวอย่างคำนวณจำนวนสิ่งทดลอง แทนค่าในสมการที่ 5

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

ระดับปัจจัยสามารถคำนวณได้จากค่า α ซึ่งเป็นระยะห่างจากจุดกึ่งกลางจากสมการที่ 6 (Mason และคณะ, 2003)

$$\alpha = F^{1/4} \quad (6)$$

กำหนดให้

α คือ ระยะห่างจากจุดศูนย์กลาง

F คือ จำนวนจุดของการออกแบบการทดลองแบบ 2^N แฟคทอเรียล

N คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

คำนวณค่า α แทนค่าในสมการที่ 6

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

ตัวอย่างการคำนวณของระดับปัจจัยร้อยละปริมาณรำข้าว

กำหนดระดับปัจจัยกลางคือ 0 เท่ากับ 5 กรัม ระดับปัจจัยสูง +1 เท่ากับ 8 กรัม ระดับปัจจัยต่ำ -1 เท่ากับ 2 กรัม เพราะฉะนั้นระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง 0 ถึง +1 และ -1 มีระยะห่างเท่ากับ 3 กรัม ดังนั้น ที่ระยะห่าง 1 จะมีค่าเท่ากับ 3

ที่ระยะห่าง 1.682 จะมีค่าเท่ากับ $(3 \times 1.682)/1 = 5.046$

ดังนั้น ระดับปัจจัยสูงสุด (+1.682) จะมีค่าเท่ากับ $5 + 5.046 = 10.046$ กรัม

ระดับปัจจัยต่ำสุด (-1.682) จะมีค่าเท่ากับ $5 - 5.046 = 0.046$ กรัม

9. การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาล (Dubois และคณะ, 1956)

9.1 การเตรียมสารละลายฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5

ทำการชั่งฟินอล 2.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลโดยวิธีฟินอลซัลฟูริก

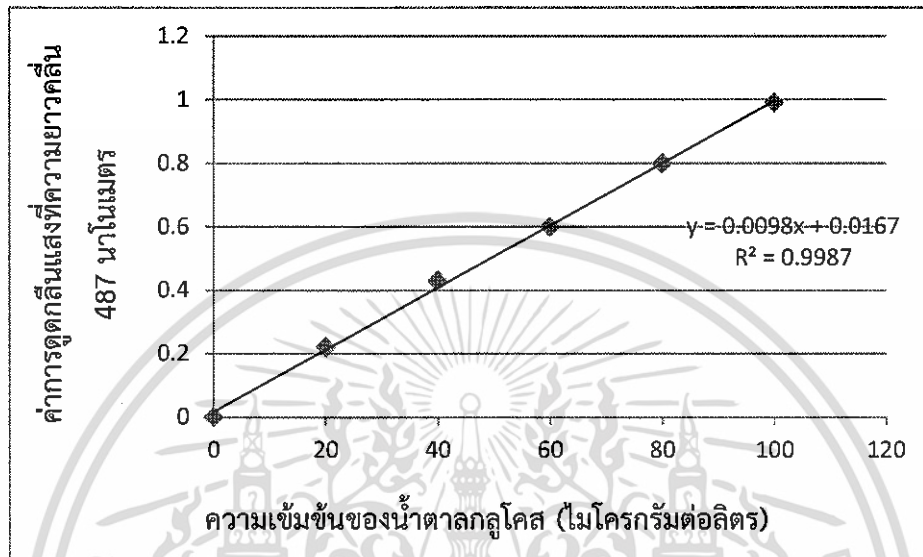
ทำการเจือจางกากน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำสารละลายกากน้ำตาลปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายฟินอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 487 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปทำการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

9.3 การสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก

นำน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายน้ำให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำการเติมกรดซัลฟูริก เข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 487 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐานกลูโคส



ภาพภาคผนวกที่ข2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 487 นาโนเมตร

10. การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

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

การเตรียมโดยการชั่ง NaOH 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆเติม DNS 10 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 200 กรัม เติมฟีนอล 0.2 กรัม และ Na_2SO_3 0.5 กรัม โดยค่อยๆละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

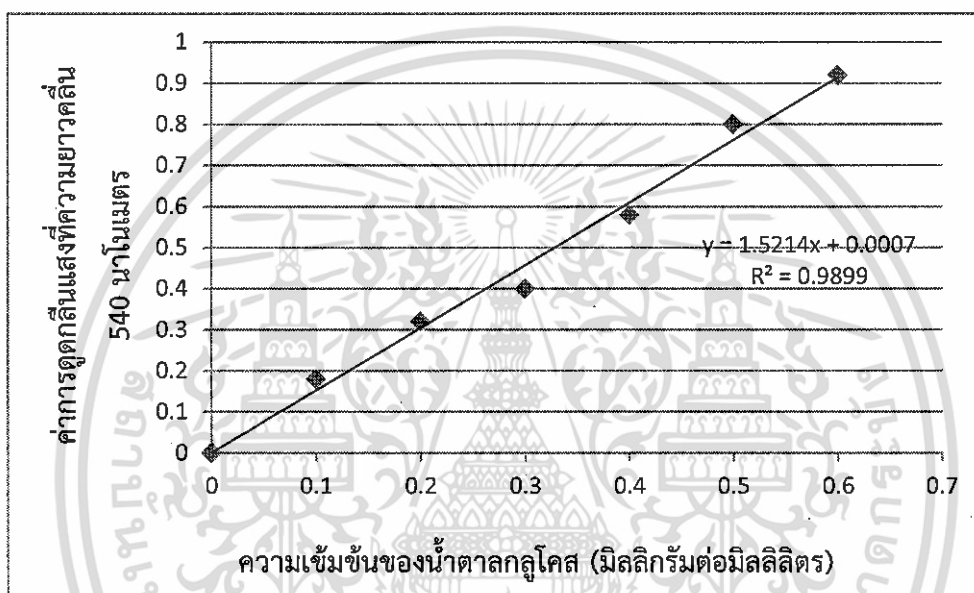
10.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลโดยวิธีกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก

ทำการเจือจางกากน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำสารละลายกากน้ำตาลที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน สารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.3 การสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก

นำน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม มาละลายน้ำให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



ภาพภาคผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

11. การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก

11.1 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย KPB10

11.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (ดัดแปลงวิธีของ Marmer, 1961)

ทำการถ่ายเชื้อจำนวน 1 ลูบของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมี TE buffer ค่าความเป็นกรดต่างที่ 8 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมไลโซซามปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ 10 ของ โซเดียมโอดีซิซัลเฟต ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมนิวคลีโอไซด์ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมนิวคลีโอไซด์ ปริมาตร 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25 ต่อ 24 ต่อ 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ และทำการเติมสารฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25 ต่อ 24 ต่อ 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 โมลาร์ โดยคิดเป็นอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ของส่วนใส เติมเอทานอลบริสุทธิ์ที่เย็นปริมาตร 200 ไมโครลิตรหรือเติมไอโซโพรพานอลที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นตากดีเอ็นเอ และละลายใน TE บัฟเฟอร์หรือน้ำอัลตราเพียวปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูโซ่แสดงดังภาพภาคผนวกที่ ข4

11.1.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูโซ่ตามวิธีของ (Yukphan และคณะ, 2004 ; Lino และคณะ, 2007) ด้วยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) 27F-(5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') และรีเวิร์ดไพรเมอร์ (reverse primer) 1492R-(5'-CGTTACCTTGTACGACTT-3')

11.1.3 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST

ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn Homology Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)

Pre-denatured 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

30 รอบ

ภาพภาคผนวกที่ ข4 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย KPB10 บริเวณ 16S rRNA โดย

ใช้ปฏิกิริยาถูกลูโซ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11.2 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมของยีสต์ KPY9

11.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของยีสต์ (ดัดแปลงวิธีของ Marmer, 1961)

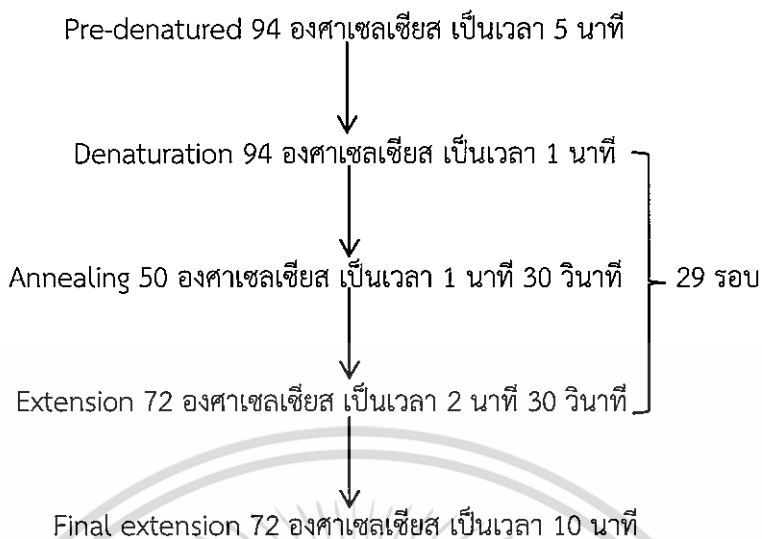
ทำการถ่ายเชื้อจำนวน 1 ลูบ ของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมี Lysis บัฟเฟอร์ (100 มิลลิโมลาร์ ของ Tris ค่าความเป็นกรดต่างที่ 8, 30 มิลลิโมลาร์ EDTA ค่าความเป็นกรดต่างที่ 8 และร้อยละ 5 ของโซเดียมโอดีเตียมซัลเฟต) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการต้มเป็นเวลา 15 นาที เติม 2.5 โมลาร์ของโพแทสเซียมอะซิเตท ค่าความเป็นกรดต่างที่ 8 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมโดยใช้เครื่องผสม จากนั้นแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแล้วเลือกส่วนใบบนสุดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ไม่ เติม CHCl_3 - isoamylalcohol อัตราส่วน 24 ต่อ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเลือกส่วนใบบนสุด จากนั้นทำวิธีข้างต้นซ้ำอีกครั้ง แล้วเลือกส่วนใบบนสุดซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลเย็น เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที แล้วทำการเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วยร้อยละ 70 ของเอทานอลบริสุทธิ์ โดยทำการผสมและตามด้วยปั่นเหวี่ยงที่ 14500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตากตะกอนของดีเอ็นเอ ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำอัลตราเพียวปริมาณ 20 ถึง 30 ไมโครลิตรแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งต้องการใช้ หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่แสดงดังภาพภาคผนวกที่ ข5

11.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของบริเวณ D1/D2 26S rDNA

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ตามวิธีของ (Yukphan และคณะ, 2004 ; Lino และคณะ, 2007) ด้วยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3') และรีเวิร์ดไพรเมอร์ (reverse primer) (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG -3')

11.1.3 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST

ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn Homology Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)



ภาพภาคผนวกที่ ข5 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์ KPY9 บริเวณ 26S rDNA โดยใช้
ปฏิกิริยาลูกโซ่

11.3 การตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของยีสต์สายพันธุ์กลาย G47

11.3.1 การสกัดดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 (ดัดแปลงจากวิธีของ Maniatis และคณะ, 1982)

ทำการถ่ายเชื้อ 1 ลูบลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนิวซีลอสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้ม เป็นเวลา 15 นาที เมื่อต้มเสร็จแล้วเติมโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดส่วนใสมาสกัด 2 ครั้ง ด้วยคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 ตามลำดับ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำ Milli Q ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่แสดงดังภาพภาคผนวกที่ ข6

11.3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

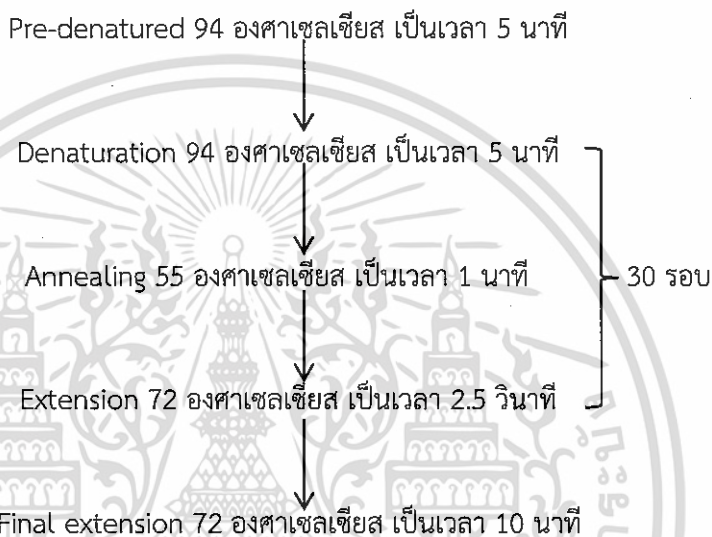
ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ (ตามวิธีของ Kurtzman และ Robnett, 1998) ด้วยฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (forward primer) NL-1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GAG GAA AAG-3') และรีเวิร์ดไพรเมอร์ (reverse primer) NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')

11.3.3 การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST

ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสจากบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTn Homology Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)



ภาพภาคผนวกที่ ข6 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์สายพันธุ์กลาย G47 บริเวณ 26S rDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่

12. การคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้ (Yield) (จุฑาเกษตร, 2551)

การคำนวณร้อยละของผลผลิตที่ได้ในที่นี้คือ ไบโอดีเซลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ชั้นบนหลังจากแยกกลีเซอรอลที่อยู่ชั้นล่างออกจากไบโอดีเซลแล้ว ตามวิธีของ Leung และ Guo (2006) โดยสามารถคำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{Yield} = \frac{\text{weight of product (g)}}{\text{weight of raw oil (g)}} \times 100$$

โดยที่ weight of product คือ น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่ได้หน่วยเป็นกรัม

weight of raw oil คือ น้ำหนักวัตถุดิบเริ่มต้นหน่วยเป็นกรัม

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ค่าสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Sample	N	Mean	Std. Deviation
KPB1	3	0.15531	0.001114
KPB3	3	0.08837	0.001549
KPB5	3	0.07525	0.000858
KPB6	3	0.04082	0.000720
KPB7	3	0.09851	0.000659
KPB8	3	0.31119	0.001223
KPB9	3	0.13521	0.001814
KPB10	3	0.07797	0.001985
Total	24	0.12283	0.080334

ตารางภาคผนวกที่ ค2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.148	7	0.021	12065.769	0.000
Within Groups	0.000	16	0.000		
Total	0.148	23			

ตารางภาคผนวกที่ ค4 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของ ยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็น แหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Sample	N	Mean	Std. Deviation
KPY9	3	0.34485	0.005490
KPY 11	3	0.16995	0.000396
KPY 14	3	0.21439	0.000110
KPY 21	3	0.11550	0.000290
KPY 29	3	0.07677	0.000290
KPY 33	3	0.33566	0.000380
KPY 42	3	0.19486	0.000220
G47	3	0.40063	0.006113
Total	24	0.23158	0.111415

ตารางภาคผนวกที่ ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารเหลวที่มีน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือนเป็นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.285	7	0.041	4793.320	0.000
Within Groups	0.000	16	0.000		
Total	0.286	23			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค7 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในอัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสเปกโตรเมทรี

Sample	N	Mean	Std. Deviation
G47	3	42.9333	4.56216
KPY33	3	9.4000	0.00000
KPY9	3	12.2000	0.00000
KPY42	3	11.0000	0.00000
KPY29	3	9.4000	0.00000
KPY21	3	8.4000	0.00000
KPY14	3	10.7000	0.00000
KPY11	3	10.5000	0.00000
KPB8	3	15.0000	0.00000
KPB10	3	30.7000	0.00000
KPB9	3	23.0000	0.00000
KPB1	3	26.3000	0.00000
KPB3	3	23.5000	0.00000
KPB5	3	18.4000	0.00000
KPB6	3	17.9000	0.00000
KPB7	3	21.3000	0.00000
Total	48	18.1646	9.36107

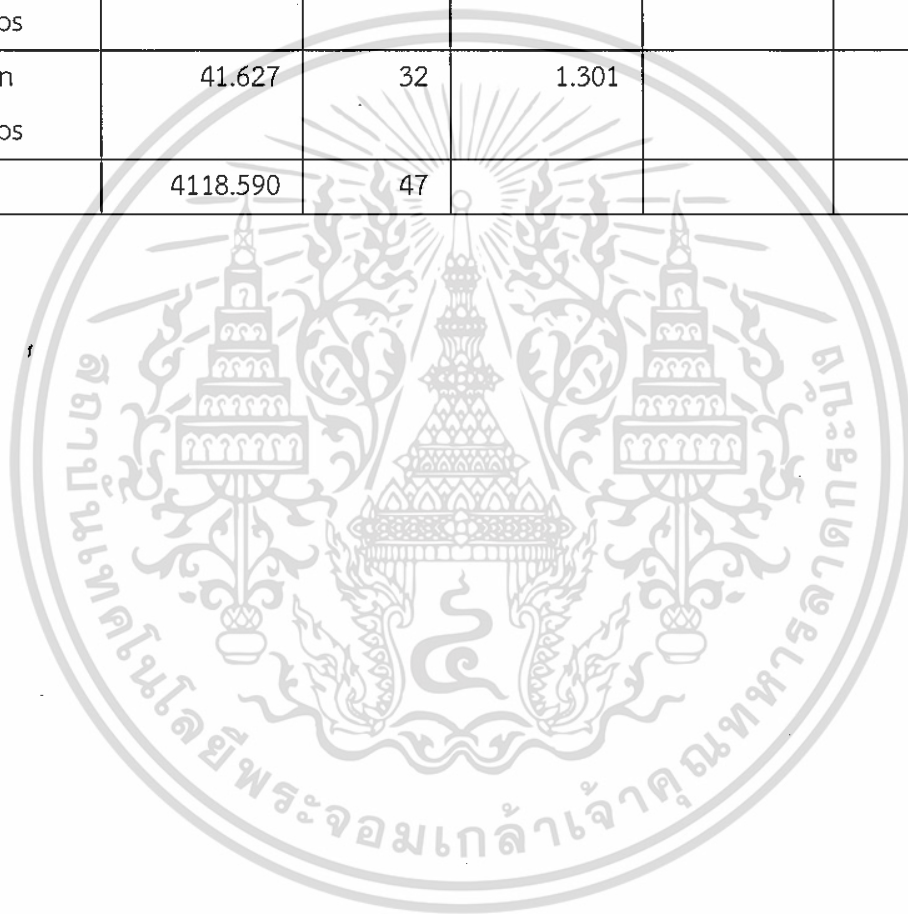
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค8 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในอัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี

Cultures	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KPY21	3	8.4000									
KPY33	3	9.4000	9.4000								
KPY29	3	9.4000	9.4000								
KPY11	3		10.5000	10.5000							
KPY14	3		10.7000	10.7000							
KPY42	3		11.0000	11.0000							
KPY9	3			12.2000							
KPB8	3				15.0000						
KPB6	3					17.9000					
KPB5	3					18.4000					
KPB7	3						21.3000				
KPB9	3						23.0000	23.0000			
KPB3	3							23.5000			
KPB1	3								26.3000		
KPB10	3									30.7000	
G47	3										42.9333
Sig.		.319	.134	.104	1.000	.595	.077	.595	1.000	1.000	1.000

ตารางภาคผนวกที่ ค9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของร้อยละปริมาณเอสเทอร์ของแบคทีเรียและ ยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันใน อัตราส่วนน้ำมันต่อเอทานอล 1 ต่อ 4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี

source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4076.963	15	271.798	208.941	0.000
Within Groups	41.627	32	1.301		
Total	4118.590	47			



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายกิจสิทธิ์ พรหมสุทธิ
วัน เดือน ปีเกิด	21 มิถุนายน 2528
ที่อยู่ปัจจุบัน	228/10 ถนนประชาอุทิศ ตำบลปากแพรก อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110
ประวัติการศึกษา	2552 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ผลงานทางวิชาการ	เรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์เพื่อใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันจากน้ำมันเหลือใช้ในครัวเรือนในการผลิตไบโอดีเซล (Screening of bacteria and yeasts for transesterification biocatalyst in biodiesel production using waste cooking oil)วารสารวิทยาศาสตร์ มข 44(1) 153-163 (2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้