การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล

OPTIMIZATION OF *Pseudomonas* sp. LIPASE PRODUCTION FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION

จารินี โอริส

ณิชนันทน์ พรพิมล

ดลนภา โอทอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล

OPTIMIZATION OF *Pseudomonas* sp. LIPASE PRODUCTION FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION

จารินี โอริส
ณิชนันทน์ พรพิมล
ดลนภา โอทอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMIZATION OF *Pseudomonas* sp. LIPASE PRODUCTION FOR BIOCATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION

JARINEE ORIS
NITCHANUN PORNPIMON
DONNAPA OTHONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล Optimization of *Pseudomonas* sp. Lipase Production for Biocatalyst in Biodiesel Production
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจารินี โอริส รหัสนักศึกษา 55051247 นางสาวณิชนันทน์ พรพิมล รหัสนักศึกษา 55051281 นางสาวดลนภา โอทอง รหัสนักศึกษา 55051282
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจารินี โอริส รหัสนักศึกษา 55051247
	นางสาวณิชนันทน์ พรพิมล รหัสนักศึกษา 55051281
	นางสาวดลนภา โอทอง รหัสนักศึกษา 55051282
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรนันทกิจ

บทคัดย่อ

ไบโอดีเซลถือเป็นพลังงานทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงดีเซลจากปิโตรเลียม เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันและแอลกอฮอล์ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม โดยได้ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีค่าดัชนีเอนไซม์สูงที่สุด คือ SS1003 ในอาหารสูตรพื้นฐานเพื่อหาช่วงเวลา (0 6 12 24 36 48 และ 72 ชั่วโมง) ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน (กลูโคส ซูโครส น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม และไตรบิวไทริน) และแหล่งไนโตรเจน (ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างทริปโตน ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟต) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์สูงที่สุดที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ น้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ และทริปโตน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.119±0.003 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ($p<0.05$) เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารพื้นฐาน 15.53 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้นำเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 SS3005 และ SN2007 ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 เปอร์เซ็นต์ และทำการแยกเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้มีความบริสุทธิ์ขึ้น 1.6 2.2 และ 15.2 เท่า ตามลำดับ และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล วิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography และ Gas Chromatography พบว่าไม่มีไบโอดีเซลเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อให้ได้กิจกรรมที่เพิ่มมากขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : ไบโอดีเซล, ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน, เอนไซม์ไลเปส, *Pseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimization of *Pseudomonas* sp. Lipase Production for Biocatalyst in Biodiesel Production
Students	Miss Jarinee Oris Student ID 55051247
	Miss Nitchanun Pornpimon Student ID 55051281
	Miss Donnapa Othong Student ID 55051282
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic year	2015
Advisor	Asst. Prof. Dr.Worakrit Worananthakij

Abstract

Biodiesel is an alternative fuel that can replace diesel from Petroleum fuel. Biodiesel is the product from transesterification between oil and alcohol with catalyst. Therefore, this study is interested in optimization of *Pseudomonas* sp. lipase -Isolated from natural sources- production for transesterification from palm oil. The highest enzyme index bacteria isolate SS1003 was grown in basal medium under various time (0, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours), type amount of carbon sources (glucose, sucrose, olive oil, palm oil and tributyrin) and nitrogen sources (tryptone, yeast extract, ammonium sulphate and mixture of tryptone, yeast extract and ammonium sulphate) to find the optimum condition. For the optimum condition for lipase production by *Pseudomonas* sp. it was found that bacteria can produce the highest enzyme activity at 48 hours with 2% olive oil as a carbon source and 0.3% tryptone as a nitrogen source. Under these conditions, the culture exhibited a lipase activity of 0.119±0.003 Unit/ml ($p<0.05$) which increased of 15.53% from basal medium. Crude enzymes from SS103 SS3005 and SN2007 that grown in the optimum condition were purified by 40% saturation ammonium sulfate precipitation and dialysis. After the purification process, these enzymes have 1.6 2.2 and 15.2 purification fold, respectively. These enzymes were used as the catalysts in the production of biodiesel. From the analysis of the results obtained by using Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography, it was found that there was no biodiesel occurred. However, the results of this study can be applied to the optimal conditions for lipase production from *Pseudomonas* sp.

Keywords: biodiesel, transesterification, lipase, *Pseudomonas* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล โครงงานพิเศษนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้หากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรกฤต วรนันทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานเล่มนี้ที่ให้ความรู้และคำแนะนำ ช่วยแก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดีเสมอมา นอกจากนี้ผู้จัดทำโครงงานต้องขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการสอบ และอาจารย์ท่านอื่นๆ ทุกท่าน ที่ให้ความกรุณาในการให้คำแนะนำ แก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่องของโครงงานเล่มนี้ให้ถูกต้อง และมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ ช่วยเหลือ แนะนำ ในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในโครงงานพิเศษ และขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา, กรุงเทพฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซลมาตรฐานเพื่อเป็นชุดเปรียบเทียบในการตรวจสอบผลการผลิตไบโอดีเซลจากการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของคณะผู้จัดทำเป็นอย่างสูงที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนให้การทำโครงงานพิเศษนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จารินี โอริส

ณิชนันทน์ พรพิมล

ดลนภา โอทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ไขมัน น้ำมัน กรดไขมันอิสระ	3
2.2 ไบโอดีเซล	4
2.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	5
2.3.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส	5
2.3.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด	6
2.3.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ	6
2.4 เอนไซม์ไลเปส	7
2.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	8
2.4.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	9
2.4.3 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	9
2.5 แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.	10
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Pseudomonas* sp.	12
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส	13
2.7.1.ชนิดของเอนไซม์ไลเปส	13
2.7.2 ปริมาณเอนไซม์	13
2.7.3 ชนิดและสัดส่วนของแอลกอฮอล์	13
2.7.4 ปริมาณน้ำในระบบ	14
2.7.5 อุณหภูมิ	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8 การทดสอบวัดคุณภาพไบโอดีเซล	14
2.8.1 เทคนิคโครมาโตรกราฟีแผ่นบาง	14
2.8.2 เทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟี	15
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.	22
3.2 การตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีของเชื้อ *Pseudomonas* sp.	22
3.2.1 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test)	23
3.2.2 การทดสอบคะตะเลส (Catalase test)	23
3.2.3 การทดสอบซิเตรท (Citrate test)	23
3.2.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)	23
3.2.5 การตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)	23
3.2.6 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 4 37 และ 41 องศาเซลเซียส	24
3.3 การตรวจวัดประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.	24
3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric method	24
3.4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	24
3.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol (p-NP)	25
3.5 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	25
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ	25
3.5.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปส	26
3.5.3 การวัดช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	26
3.6 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	26
3.7 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	27
3.8 การแยกเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	27
3.9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	28
3.10 การผลิตและการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอดีเซล	28
3.10.1 การผลิตไบโอดีเซล	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.10.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคThin layer chromatography (TLC)	29
3.10.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC)	30
3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ	30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	31
4.1 ผลการตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีของเชื้อ *Pseudomonas* sp.	31
4.2 ผลการตรวจวัดประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.	34
4.3 ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	36
4.4 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	37
4.5 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	39
4.6 ผลการแยกเอนไซม์ไลเปสโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	41
4.7 ผลการผลิตและการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอดีเซล	42
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	45
5.1 สรุปผลการวิจัย	45
5.2 ข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	53
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	55
ภาคผนวก ค ผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้น	56
ภาคผนวก ง ผลดัชนีของเอนไซม์	60
ภาคผนวก จ ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง	61
ภาคผนวก ฉ ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง	62
ภาคผนวก ช ผลการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง	63
ภาคผนวก ซ ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง	64
ภาคผนวก ฌ ผลการศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง	65
ภาคผนวก ญ การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์	66
ภาคผนวก ฎ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 ผลของการใช้ไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับการใช้ดีเซลจากปิโตรเลียม 4

2.2 ความเหมือนและความแตกต่างของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิด 7

3.1 ผลการตรวจสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. 22

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน p-Nitrophenol 25

3.3 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล 29

4.1 ตารางแสดงลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 32

4.2 ตารางแสดงผลการตกตะกอนเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 SS3005 และ SN2007 ในขั้นตอนต่างๆ 42

ง ผลดัชนีเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. 11 ไอโซเลท 60

จ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตร ของการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง 61

ฉ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตร ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง 62

ช ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตร ของการศึกษาปริมาณของน้ำมันมะกอก (แหล่งคาร์บอน) ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง 63

ซ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตร ของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง 64

ฌ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตร ของการศึกษาปริมาณของทริปโตน (แหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ 3

2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน 5

2.3 แผนภาพการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบส (a) และเอนไซม์ไลเปส (b) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 6

2.4 ลักษณะเชื้อ *Pseudomonase* sp. ย้อมด้วยสี Gram stain กำลังขยาย 100 เท่า 11

2.5 เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas chromatography) 16

2.6 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่อง Gas Chromatography 16

4.1 โซนใสบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 35

4.2 ดัชนีเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็งพื้นฐานไตรบิวไทริน 35

4.3 กราฟแสดงอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 36

4.4 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน (ก) และผลของปริมาณน้ำมันมะกอก (ข) ที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารสูตรพื้นฐานภายหลังการบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง 38

4.5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน (ก) และผลของปริมาณทริปโตน (ข) ที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังการบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง 40

4.6 ผลการทำ Thin Layer Chromatography (TLC) 43

4.7 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) 44

ค.1 ผลการเจริญบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 56

ค.2 ผลการเจริญบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส 56

ค.3 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลวของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 57

ค.4 ผลการทดสอบคะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 57

ค.5 ผลการทดสอบออกซิเดสของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 58

ค.6 ผลการทดสอบซิเตรทบนอาหาร Simmons citrate agar ของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 58

ค.7 การทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) ของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยต้องพึ่งการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศคิดเป็นร้อยละ 80 และจากข้อมูลรายงานภาพรวมพลังงานของสำนักนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน พบว่าในช่วง 4 เดือนแรกของปี 2558 มีการนำเข้าน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นจากช่วงเดียวกันของปีก่อนร้อยละ 5.6 ยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอีก เนื่องจากประเทศไทยยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตปิโตรเลียมได้ทันตามความต้องการ การพัฒนาพลังงานทดแทนจึงเป็นทางเลือกที่จะช่วยลดการพึ่งพาและการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นพลังงานทางเลือกรูปแบบหนึ่งที่มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันดีเซล จึงนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงดีเซลจากปิโตรเลียมได้ ไบโอดีเซลเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นไตรกลีเซอไรด์ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด เบส และตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยทั่วไปแล้วมักใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสในการเร่งปฏิกิริยา แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้มีข้อเสียคือ มีความไวต่อปริมาณน้ำและกรดไขมันอิสระในวัตถุดิบตั้งต้น เมื่อกรดไขมันอิสระทำปฏิกิริยากับน้ำโดยที่มีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน ทำให้ได้สบู่และกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์หลัก จึงมีต้นทุนเพิ่มในการกำจัดผลพลอยได้และการทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์แต่ปริมาณน้ำและกรดไขมันอิสระในวัตถุดิบตั้งต้นจะไม่มีผลเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดในการเร่งปฏิกิริยา ข้อจำกัดของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดคือมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ช้ากว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสมาก เพราะฉะนั้นการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ไลเปส จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากปฏิกิริยาจะสามารถเกิดได้ในสภาวะปกติ ปริมาณกรดไขมันอิสระและปริมาณน้ำไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา และไม่เกิดสบู่ในกระบวนการผลิต เอนไซม์ไลเปสจึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดีสำหรับการผลิตไบโอดีเซล แต่ข้อด้อยของการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคือ ราคาสูงกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดอื่น (Tripathiและคณะ, 2014)

จากการศึกษาของ โชตินันท์ และคณะ (2557) ที่ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลด้วยน้ำมันปาล์มจากสิ่งแวดล้อม 5 แหล่ง พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 11 ไอโซเลทที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้จึงได้นำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ของโชตินันท์และคณะ (2557) มาทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อให้มีกิจกรรมสูงที่สุด สำหรับใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

2) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากการศึกษาของ โชตินันท์ และคณะ (2557) นำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สนใจ คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. ได้

2) ทราบถึงความสามารถในการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้

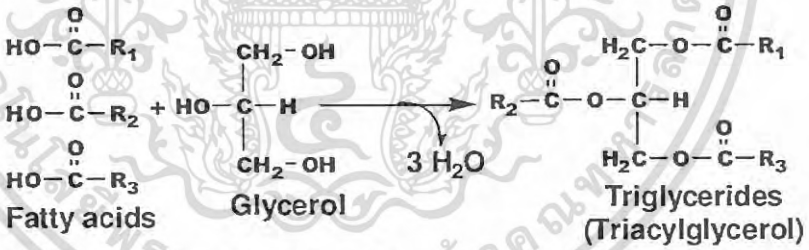
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไขมัน น้ำมัน กรดไขมันอิสระ

ไขมันและน้ำมันเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรีน โดยไขมันเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ส่วนน้ำมันเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง กรดไขมันที่อยู่ในไขมันและน้ำมันอาจเป็นชนิดเดียวกันทั้ง 3 โมเลกุล หรือต่างชนิดกันก็ได้ ถ้ากรดไขมันทั้งสามโมเลกุลมีลักษณะทางโครงสร้างเหมือนกันเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์อย่างง่าย (Simple triglyceride) ถ้าต่างกันเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ผสม (Mixed triglyceride) ในธรรมชาติจะน้ำมันพืชและไขสัตว์จะประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ผสมอยู่มาก ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันพืชและไขสัตว์ที่เกิดตามธรรมชาติจะต่างกัน แม้ว่าจะมาจากสัตว์หรือพืชชนิดเดียวกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของพืชและสัตว์นั้น ไขมันหรือน้ำมันจากสัตว์มีกรดไขมันที่อิ่มตัวอยู่มากและมักเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ส่วนไขมันและน้ำมันที่มาจากพืช จะมีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวอยู่มาก (จันทรนาถ, 2544)

กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) คือ กรดไขมันที่ไม่ได้รวมอยู่ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งโดยปกติแล้วไตรกลีเซอไรด์ จะประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล กับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล ยึดกันด้วยพันธะเอสเทอร์



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์

ที่มา : Chartterjee (2012)

ซึ่งไตรกลีเซอไรด์สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันอิสระได้ด้วย ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอรไรด์ด้วยน้ำได้กรดไขมันอิสระที่มีเอนไซม์ไลเปส (Lipase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะทำให้มีค่าความเป็นกรด (Acid value) สูงขึ้น ต่อมาเป็นปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification) ใช้ดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ ในน้ำมันหรือไขมัน โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนแปลงชนิดหรือตำแหน่งของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เรียกว่า Structure triglyceride สุดท้ายเป็นปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) เกิดกับไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นส่วนประกอบทำให้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการเหม็นหืน (rancidity) ดังนั้นการเกิดกรดไขมันอิสระในอาหาร จึงเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันพืช ไขมันและน้ำมันทอดซ้ำ รวมทั้งอาหารที่มีไขมันสูง ปริมาณกรดไขมันอิสระจึงเป็นต้นเหตุสำคัญของการเสื่อมเสียของอาหาร ส่วนในร่างกายไตรกลีเซอไรด์จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสได้กรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล เมื่อลำเลียงเข้าสู่เซลล์ กรดไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็นแอซีทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl CoA) โดยกระบวนการบีตาออกซิเดชัน (β-oxidation) แล้วนำเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs' cycle) ส่วนกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phoshate (PGAL) และเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2557)

2.2 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (Biodiesel) คือ เชื้อเพลิงเหลวที่ได้จากน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เช่น ถั่วเหลือง ปาล์ม สบู่ดำ หรือน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ที่ผ่านการใช้งานแล้ว นำมาทำปฏิกิริยาเคมีร่วมกับแอลกอฮอล์จึงได้ไบโอดีเซลออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งไบโอดีเซลนี้เป็นสารพวกเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม สามารถใช้แทนกันได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ เช่น นำมาใช้แทนในอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกว่า B100 ถ้านำมาใช้ผสมกับดีเซลจากปิโตรเลียมในสัดส่วน 5-10 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกว่า B5-B10 นอกจากนั้นการใช้ไบโอดีเซลแทนน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมสามารถช่วยลดการเกิดคาร์บอนมอนอกไซด์ ลดการเกิดฝุ่นละอองขนาดเล็ก ผลกระทบต่อการทำลายชั้นโอโซนลดลง และเครื่องยนต์ที่ใช้ไบโอดีเซลจะมีสารพิษในไอเสียน้อยกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันดีเซล ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลของการใช้ไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับการใช้ดีเซลจากปิโตรเลียม

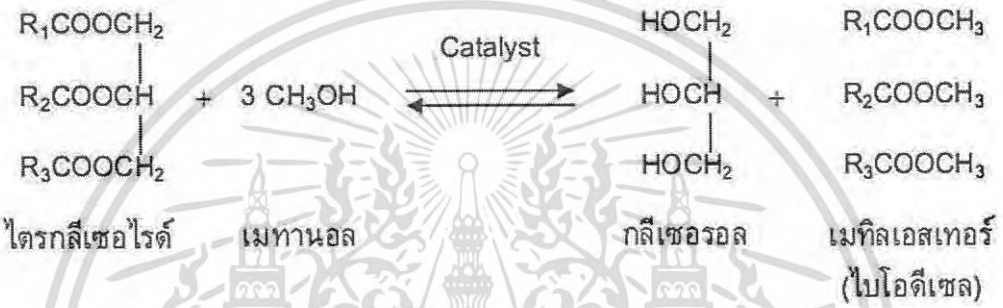
ผลการทดลอง	ไบโอดีเซล	น้ำมันดีเซล
มลพิษจากสารซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2)	ไม่พบ	พบ
การทำลายชั้นโอโซน	ลดได้ 50 เปอร์เซ็นต์	ไม่ลดลง
การเกิดฝุ่นละอองขนาดเล็ก	ลดได้ 30 เปอร์เซ็นต์	ไม่ลดลง
การเกิดก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO)	ลดได้ 50 เปอร์เซ็นต์	ไม่ลดลง
เกิดสารไฮโดรคาร์บอน	ลดได้ 80 เปอร์เซ็นต์	ไม่ลดลง
ไอเสียที่เกิดจากเครื่องยนต์	ไม่มี	มี

ที่มา :ธงชัย (2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมัน (Triglyceride) กับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือเอทานอล ในสภาวะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (ไบโอดีเซล) และได้กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ ดังรูปที่ 2.2 โดยปกติปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะเกิดขึ้นได้ช้าและเป็นปฏิกิริยาที่สามารถผันกลับได้ ดังนั้นการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปจึงต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อกระตุ้นให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น รวมทั้งเพิ่มปริมาณของแอลกอฮอล์ตั้งต้นให้เกินความต้องการของระบบ เพื่อให้สมดุลของปฏิกิริยาเลื่อนไปในทิศทางการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาผันกลับ (นวพรรษ, 2551)



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
ที่มา : จักรพงศ์ และพนิตา (2556)

ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด และตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ คือ เอนไซม์

2.3.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสโดยทั่วไปมักใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ซึ่งในการใช้เบสเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันควรเปลี่ยนรูปจากเบสไปเป็นรูปของสารประกอบอัลคอกซี (Alkoxy) ก่อนที่จะนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยา (Marchetti และคณะ, 2005) การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด แต่ข้อจำกัดของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสคือ ปริมาณน้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันหรือไขมันที่นำมาทำปฏิกิริยา เนื่องจากเมื่อกรดไขมันอิสระทำปฏิกิริยากับน้ำโดยที่มีด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชันขึ้น ทำให้เกิดสบู่และส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ (Tripathi และคณะ, 2014)

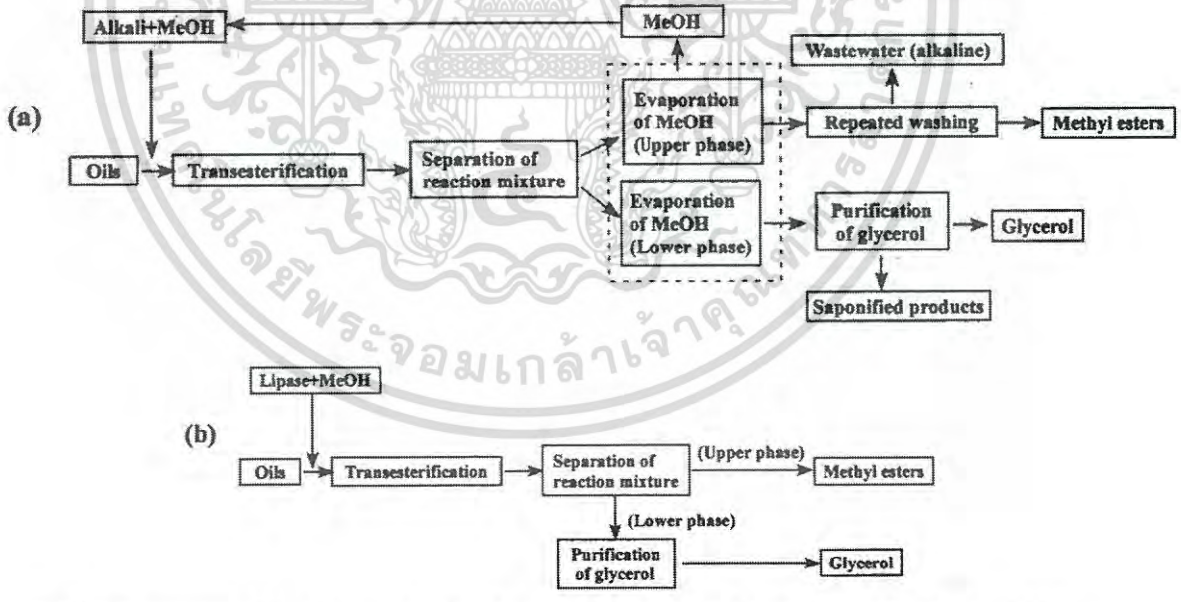
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดที่ใช้โดยทั่วไป คือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูง แต่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ช้า ระยะเวลาที่ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้อย่างสมบูรณ์อาจใช้เวลามากกว่า 1 วัน (Marchetti และคณะ, 2007) ข้อดีของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสารตั้งต้นที่มีปริมาณน้ำ และปริมาณกรดไขมันที่สูง โดยไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชันขึ้น

2.3.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ

เอนไซม์ไลเปส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกลีเซอรอล ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Marchetti และคณะ, 2007) การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สามารถแก้ปัญหาที่เกิดจากการใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ เพราะปริมาณน้ำ และปริมาณกรดไขมันอิสระไม่มีผลต่อการทำปฏิกิริยา สามารถแยกกลีเซอรอลออกได้ออกง่าย ไม่มีกระบวนการล้างที่ยุ่งยาก สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ที่สภาวะปกติและยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ (Fukuda และคณะ, 2001) ดังรูปที่ 2.3 และตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.3 แผนภาพการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบส (a) และเอนไซม์ไลเปส (b) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา :Fukuda และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ความเหมือนและความแตกต่างของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิด

ข้อเปรียบเทียบ	ตัวเร่งชนิดเบส	ตัวเร่งชนิดกรด	เอนไซม์ไลเปส
อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา	60°C– 70°C	55°C– 80°C	30°C– 40°C
ปริมาณกรดไขมันอิสระ	เกิดสบู่	เกิดเมทิลเอสเทอร์	เกิดเอสเทอร์
ปริมาณน้ำในน้ำมัน	มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา	มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา	ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง
การกำจัดผลพลอยได้	ยาก	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ทำการล้างซ้ำ	ทำการล้างซ้ำ	ไม่ต้องล้าง
ราคา	ถูก	ถูก	ค่อนข้างแพง

ที่มา : Marchetti และคณะ (2007)

2.4 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (EC 3.1.1.3 : Glycerol ester hydrolase) เป็นสารอินทรีย์ประเภทโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตของพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ไลเปสมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยมีน้ำเข้าร่วมทำปฏิกิริยา (Hydrolysis) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ ได้กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) และกลีเซอรอล (Glycerol) โดยไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาได้ในบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมัน (Oil-Water Interface) (พักตร์พิมล, 2552) โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ไลเปสสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (อำพล, 2553) นอกจากนั้นยังสามารถจัดกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสได้โดยแยกตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และแยกตามความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ ดังนี้

จากการศึกษาของ Macrae (1983) ได้มีการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracae*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เมื่อเกิดการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็น 2, 2-(2,3)- ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่กรดไขมันทั้งสองชนิดนี้จะไม่มีความคงตัว และจะเกิดการย้ายหมู่เอซิลเกิดเป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ ตามลำดับ และเมื่อเกิดการย่อยสลายอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบูรณ์จะได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลในที่สุด ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และ *Rhizopus* หลากหลายสายพันธุ์

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีซอไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวก เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidum* ซึ่งมีความจำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว ที่มีพันธะคู่เป็นคอนฟิกูเรชันแบบ *cis* อยู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 9 และ 10

จากการศึกษาของ Yamane (1987) ได้มีการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสตามความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ไลเปสกลุ่มเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ (Hydrolysis of ester) เป็นการย่อยสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล

$$RCOOR' + H_2O \longleftrightarrow RCOOH + HOR'$$

กลุ่มที่ 2 เอนไซม์ไลเปสกลุ่มเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Synthesis of ester) เป็นการสังเคราะห์เอสเทอร์จากกรดไขมันกับกลีเซอรอล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์กับน้ำ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกับของปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์

$$RCOOH + HOR' \longleftrightarrow RCOOR' + H_2O$$

กลุ่มที่ 3 เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ โดยเกิดจากการย้ายหมู่เอซิล หรือกรดไขมันบนโมเลกุลเอสเทอร์ไปสร้างพันธะใหม่กับโมเลกุลอื่น มี 4 ชนิด คือ

ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส (Acidolysis)

$$R_1COOR' + R_2COOH \longleftrightarrow R_2COOR' + R_1COOH$$

ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis)

$$RCOOR'_1 + HOR'_2 \longleftrightarrow RCOOR'_2 + HOR'_1$$

ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (Aminolysis)

$$RCOOR'_1 + H_2NR'_2 \longleftrightarrow RCONHR'_2 + HOR'_1$$

ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification)

$$R_1COOR'_1 + R_2COOR'_2 \longleftrightarrow R_1COOR'_2 + R_2COOR'_1$$

2.4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์สามารถวัดได้ในหน่วยที่ถูกกำหนดให้เป็นหน่วยมาตรฐาน โดยหน่วยที่ใช้กันมากที่สุด คือ ยูนิต (Unit) บางครั้งเรียกเป็น International unit หรือ Enzyme unit โดยที่ 1 ยูนิต ที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หมายถึง การเปลี่ยนสารตั้งต้น 1 ไมโครโมล หรือ การเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลใน 1 นาที ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเป็นต้องมีสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และทำการทดลองที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและค่าพีเอชที่เหมาะสม (อารี, 2555)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric method โดยที่มี p-Nitrophenylpalmitate (p-NPP) เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา และสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้จากการ hydrolysis สารตั้งต้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร p-Nitrophenol (p-NP) ซึ่งมีสีเหลืองและสามรถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 nm (Mohamed และคณะ, 2013)

2.4.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความสามารถในการละลาย (Solubility) เป็นการแยกโดยอาศัยคุณสมบัติการละลายของโปรตีน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการตกตะกอนโปรตีนที่ต้องการออกจากสารละลาย โดยปกติเอนไซม์จะสามารถละลายได้เนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชัน (R-group) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยากับน้ำ หากว่าหมู่ฟังก์ชันจับตัวกับน้ำได้น้อยลง เอนไซม์ก็จะสามารถตกตะกอนได้ (อารี, 2555)

การศึกษาในครั้งนี้ใช้เกลือในการตกตะกอน เมื่อเกลือละลายน้ำจะแตกตัวเป็นไอออนบวกและไอออนลบ ไอออนบวกและลบจะเกิดปฏิกิริยายึดจับกับน้ำ ทำให้เอนไซม์จับกับน้ำได้น้อยลง แล้วเกิดการจับตัวกันเองจึงตกตะกอนลงมาได้ ความสามารถในการละลายของเอนไซม์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูง เรียกว่า “Salting out” พบว่าการที่เพิ่มความเข้มข้นของเกลือ จะสามารถตกตะกอนโปรตีนแต่ละชนิดในความเข้มข้นต่างๆกันได้ วิธีการตกตะกอนโดยใช้เกลือความเข้มข้นต่างๆกัน เรียกว่า “Salt fractionation” เกลือที่นิยมใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยทั่วไปจะนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมากที่สุดเนื่องจากมีข้อดีคือ ราคาถูก ไม่ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพตามธรรมชาติ มีความสามารถในการละลายได้สูงถึงแม้ว่าอุณหภูมิต่ำ ใช้ได้สะดวกรวดเร็ว และใช้ตกตะกอนเอนไซม์ปริมาณมากๆได้ หลังจากนั้นจะนำเอนไซม์เข้าสู่การทำไดอะไลซิส (Dialysis) ซึ่งเป็นขั้นตอนการแยกเกลือออกจากเอนไซม์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดหรือมวลด้วยการใช้ถุงที่มีรูพรุน เรียกว่า ถุงเซลโลเพน (cellophane) นำเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้ละลายในบัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปใส่ในถุงเซลโลเพนแล้วแช่ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยโมเลกุลของเกลือหรือโมเลกุลของสารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนจะแพร่ผ่านออกมาจากถุง ส่วนเอนไซม์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูพรุนจะถูกกักอยู่ภายในถุง ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (อารี, 2555)

2.4.3 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งของการสร้างเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์สามารถพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อเซลล์ และในอวัยวะส่วนต่างๆของสัตว์ เช่น ตับอ่อน หัวใจ กระเพาะอาหาร สมอง กล้ามเนื้อ และในน้ำนมของสัตว์ เป็นต้น โดยในตับอ่อน จะพบเอนไซม์ไลเปส 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไลเปส-เอ และ เอนไซม์ไลเปส-บี ยังสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบโปรตีนได้อีกชนิดหนึ่งที่ตับอ่อนสร้างขึ้นมา ซึ่งมีหน้าที่เพื่อช่วยเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไตรกลีเซอร์ไรด์

เอนไซม์ไลเปสจากพืช สามารถพบได้จากทั้งเนื้อเยื่อของพืช ผัก ผลไม้ และในเมล็ดพืช โดยเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จะพบได้ในเมล็ดพืช เช่น ข้าวโอ๊ต รำข้าว เมล็ดปาล์ม เมล็ดยางพารา เมล็ดถั่วเหลือง และเมล็ดระหุ่ง เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ไลเปสในเมล็ดระหุ่งนั้น ได้มีการศึกษากันอย่างมากในปัจจุบัน (เอกรัตน์, 2545)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีมากกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ เนื่องจากมีการเพาะเลี้ยงที่ง่าย และการเจริญเติบโตได้รวดเร็วมากกว่าพืชและสัตว์ ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวผลผลิตของเอนไซม์ ประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง และยังมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ โดย Jaeger และ Reetz (1998) ได้อธิบายไว้ว่า เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญๆ 4 ประการ คือ (1) จะมีความคงตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (2) ในการทำงานจะไม่ต้องการสารประกอบบางอย่างนอกเหนือจากโปรตีน (3) มีความจำเพาะต่อสับเสตรทหลายชนิด และ (4) มี enantioselectivity ที่สูง

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจะสามารถพบได้ตามแหล่งต่างๆของธรรมชาติ เช่น ในน้ำเสีย หรือดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันหรือไขมัน เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารเน่าเสีย กองปุ๋ยคอก หรือพบในน้ำพุร้อน เป็นต้น (ณกัญภัทร, 2547)

2.5 แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

จากหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 ปีพ.ศ. 2005 จัดสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคารีโอตออกเป็น 2 โดเมน ได้แก่ อาร์เคีย และแบคทีเรีย เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal RNA พบว่าเชื้อ *Pseudomonas* จัดอยู่ในโดเมนแบคทีเรียมีการจัดลำดับอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ดังนี้

Domain: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomodanaceae

Genus: *Pseudomonas*

เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* มีลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย ขนาด 0.5–1.0 x 1.5–5.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ (Gram negative bacilli) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่ปลายเซลล์ (Polar flagella) ซึ่งมีอย่างน้อยที่สุด 1 เส้น บางสายพันธุ์เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลาด้านข้าง (Lateral flagella) ไม่สร้างสปอร์ (Non – spore forming) มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมลเปอร์เซ็นต์ G + C ของดีเอ็นเอเท่ากับ 58-68 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งพลังงานและแหล่งของอิเล็กตรอน (Chemoorganotrophs) สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ไม่ไวต่อยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Penicillin sensitivity) ต้องการอากาศ (Strictly aerobes) ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (Terminal electron acceptor) ในกระบวนการเมทาบอรึซึมสร้างพลังงานแบบออกซิเดทีฟฟอสโฟไรเลชัน (Oxidative phosphorylation) จึงให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrome oxidase test) และในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะไม่หมักน้ำตาลกลูโคส (Fermentation) ดังนั้นเมื่อทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสแบบออกซิเดทีฟหรือเฟอร์เมนท์เตตีฟ (Oxidative-fermentative test หรือ O-F test) จึงให้ผลเป็นแบบออกซิเดทีฟ (Oxidative) (นันทนา, 2537)

รูปที่ 2.4 ลักษณะเชื้อ *Pseudomonas* sp. ย้อมด้วยสี Gram stain กำลังขยาย 1,000 เท่า

นอกจากลักษณะข้างต้นที่กล่าวมาพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* สามารถสร้างสารบางอย่างที่ก่อให้เกิดโทษและประโยชน์ได้ โดยโทษที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* ในด้านการเสื่อมเสียของอาหาร (food spoilage) พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์เพกทิเนส (pectinase) ซึ่งจะไปย่อยเพกทิน (pectin) ทำให้เกิดโรคเน่าเละในผักและผลไม้ หรือแม้กระทั่งในไข่จะทำให้ไข่เน่าเหม็น และเป็นจุดสีหรือเรืองแสงที่ไข่ขาวหรือไข่แดง เช่น *P. fluorescens* ทำให้เกิดการเน่าแบบ green rot โดยไข่ขาวมีจุดสีเขียว และเรืองแสงเมื่อนำมาส่องด้วยแสง Ultraviolet เป็นต้น (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2559) นอกจากนี้ยังสามารถก่อให้เกิดโรคในสัตว์ เช่น โรคตกเลือดทั้งภายนอกและภายในลำตัวของปลา และก่อให้เกิดโรคในคน โดยเป็นเชื้อฉวยโอกาสในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือเมื่อเข้าสู่ร่างกายเมื่อไม่มีความต้านทานปกติทางเยื่อเมือก หรือผิวหนังที่ถลอก เช่น *P. aeruginosa* ก่อให้เกิดโรคการติดเชื้อในกระแสเลือด (bactermia) โรคปอดอักเสบ เป็นต้น

ในด้านของประโยชน์พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. มีประโยชน์ในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในดิน เพราะสามารถอยู่อาศัยร่วมกับพืชได้ และยังให้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในดินได้ดีอีกด้วย มีรายงานการสร้างสารออกฤทธิ์ทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวภาพของ Ramesh และคณะ, 2002 รายงานว่า Growth-promoting rhizobacteria (PGPR), *P. fluorescens* สามารถสร้างสาร 2,4-diacetyl phloroglucinol ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุโรคพืชได้ โดยสารเหล่านี้จะไปสลาย fusaric acid ที่ผลิตโดยเชื้อ *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชหลายชนิด ทำให้ป้องกันกระบวนการ Pathogenesis ได้ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. บางสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในทางอุตสาหกรรม ใช้สลายพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันในตัวกลางที่เป็นน้ำและสังเคราะห์เอสเทอร์ในตัวกลางที่ไม่เป็นน้ำ เช่น การย่อยสลายไขมันในการบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมอาหารและผงซักฟอก การสังเคราะห์เปปไทด์ในอุตสาหกรรมยาหรือแม้กระทั่งนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของกระบวนการผลิตไบโอดีเซล สอดคล้องกับงานวิจัยของ Guldhe และคณะ (2015) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำมันของสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ไปเป็นไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* ในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งผลออกมาพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สามารถเร่งปฏิกิริยาให้ได้ไบโอดีเซลสูงถึง 66.55 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 ปริมาณเอนไซม์ 10 เปอร์เซ็นต์ และใช้ปริมาณน้ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของน้ำมัน

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Pseudomonas* sp.

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของเอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ทั้งเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย แต่มีจุลินทรีย์บางพวกที่ผลิตเอนไซม์แต่ไม่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Intracellular enzyme) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Alcaligenes denitrificans* บางพวกผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดที่ยึดติดอยู่กับผนังเซลล์ (Cell-bond lipase) เช่น เอนไซม์จากเชื้อ *Saccharomycopsis lipolytica* (กนกพร, 2547)

เมื่อพิจารณาช่วงของการเจริญ (Growth phase) ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลาย Logarithmic phase แต่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่ออยู่ในช่วง Stationary phase และในการเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมานั้น พบว่าถ้าเลี้ยงจุลินทรีย์ให้อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหารจะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มาก เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากถูกปลดปล่อยออกมาในช่วง late หรือ Post exponential growth phase ซึ่งเป็นสภาพที่แหล่งอาหารสำคัญเริ่มขาดแคลน (นภา, 2540) นอกจากช่วงเวลาของการเจริญแล้ว แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหารในสูตรอาหารก็มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เช่นกัน

แหล่งคาร์บอนที่สำคัญมีความจำเป็นต่อการกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ เช่น น้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ ไตรกลีเซอไรด์ เป็นต้น นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์โดยตรง การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนและการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

แหล่งไนโตรเจน มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการแหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์แต่ละชนิดทีความสามารถในการใช้ไนโตนเจนแตกต่างกัน บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนได้ในรูปของสารอินทรีย์ ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนและการเลือกใช้ในปริมาณที่เหมาะสม จึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งเช่นกัน (สุวัฒน์ศักดิ์, 2556)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ในการผลิตไบโอดีเซลจะประกอบไปด้วยหลายๆปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา หากควบคุมปัจจัยต่างๆเหล่านี้ได้ จะทำให้ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปได้อย่างสมบูรณ์และได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในปริมาณที่สูง (ณัฐนันท์ และคณะ, 2558) ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมา ได้แก่

2.7.1 ชนิดของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์เป็นสิ่งที่สำคัญในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากผลิตภัณฑ์จะเกิดได้สมบูรณ์หรือดีมากน้อยเพียงใด จะขึ้นอยู่กับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหลัก ส่วนการควบคุมปัจจัยอื่นๆมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพและมีความคงตัวสูงสุด

2.7.2 ปริมาณเอนไซม์

ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารตั้งต้นในปฏิกิริยาโดยจะต้องมีมากพอที่จะสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นที่มีอยู่ให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุด และไม่มากเกินความจำเป็น ซึ่งปริมาณที่ใช้อาจรายงานเป็นน้ำหนักหรือร้อยละของเอนไซม์ต่อน้ำหนักของสารตั้งต้นน้ำมัน หรือเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการทำปฏิกิริยาในหน่วยของยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์แล้วจึงคำนวณหาปริมาณยูนิตของเอนไซม์ที่ต้องเติม เทียบกับปริมาณของสารตั้งต้นที่จะใช้ หากมีสัดส่วนของปริมาณเอนไซม์และสารตั้งต้นไม่เหมาะสมกัน โดยมีปริมาณของสารตั้งต้นมากกว่าจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์บางส่วนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

2.7.3 ชนิดและสัดส่วนของแอลกอฮอล์

แอลกอฮอล์มีความสำคัญในการที่จะกำหนดชนิดของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ โดยส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์สายสั้นๆ (short chain alcohol) เช่น เมทานอล เอทานอล โพรพานอล และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอล เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้เมทานอลเนื่องจากสามารถหาได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่น

นอกจากนี้สัดส่วนของแอลกอฮอล์ก็มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เช่นกันหากใช้ปริมาณของแอลกอฮอล์ไม่เหมาะสม เช่น ใช้แอลกอฮอล์ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้แอลกอฮอล์ไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ได้ผลผลิตที่ลดลงหรือปฏิกิริยาไม่สามารถดำเนินต่อไปได้

2.7.4 ปริมาณน้ำในระบบ

น้ำเป็นสิ่งจำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้เอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ต้องอาศัยน้ำเป็นตัวช่วยในการทำปฏิกิริยา แต่ถ้ามีปริมาณน้ำที่มากเกินไป จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ทำให้สูญเสียคุณสมบัติของไบโอดีเซล ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามสภาวะของการทำปฏิกิริยา โดยต้องเป็นปริมาณที่จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในอัตราที่สูง และเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้อย

2.7.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นองค์ประกอบของโปรตีน จึงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป

2.8 การทดสอบวัดคุณภาพไบโอดีเซล

2.8.1 เทคนิคโครมาโตรกราฟีแผ่นบาง

เทคนิคโคมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง หรือ Thin Layer Chromatography (TLC) มีลักษณะคล้ายกับ Paper Chromatography (PC) ซึ่งจะใช้แผ่นกระจก อะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติกแทนกระดาษกรอง และมีขนาดที่ต่างกับของ PC โดยจะเคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุนและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8-40 ไมโครเมตร เฟสคงที่ที่นิยมใช้กันมากคือ siliga gel, alumina, cellulose, polyamindes และ ion-exchange resins เป็นต้น

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค TLC นั้น ถ้าจะให้ได้ผลที่มีความแม่นยำต้องมีความระมัดระวังเป็นอย่างมาก และต้องทำให้ chromatographic condition มีมาตรฐาน การจุด (spot) สารตัวอย่างและสารมาตรฐานลงบนแผ่น TLC จะต้องมีขนาดและความเข้มข้นเท่ากัน การเตรียมตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่รวมถึงภาชนะจะต้องอยู่ในสมดุล นอกจากนั้นการใช้สารละลายเพื่อบอกตำแหน่งของจุดที่แยกได้จะต้องเหมือนกัน และสามารถวัดได้โดยตรงจากแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC หรือสามารถแยกเอาสารออกมาวัดด้วยวิธีการอย่างอื่น (ศิริกัญญา, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 เทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟี

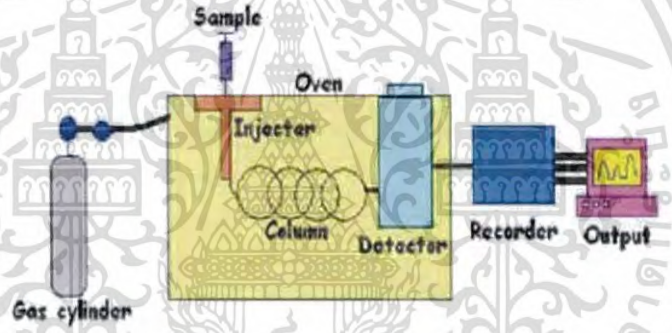
แก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography, GC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง เมื่อสารนั้นถูกเปลี่ยนให้อยู่ในแก๊สเฟสแล้ว ให้สารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมภ์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ ทำให้สารผสมเหล่านั้นเกิดการแยกเกิดขึ้น นอกจากนี้ GC ยังมีความสามารถในการวิเคราะห์ได้ทั้งในทางปริมาณและทางคุณภาพ

ระบบในแต่ละส่วนของ GC จะประกอบไปด้วย แก๊สพา ระบบของการใส่สารตัวอย่าง คอลัมภ์ และเครื่องดีเทคเตอร์ โดยมีหลักการทำงาน คือ (1) แก๊สพา เป็นแก๊สที่ใช้สำหรับพาสารตัวอย่างที่ถูกทำให้เป็นไอ หรือแก๊สเฟตแล้วที่ injectionport ให้เข้าสู่คอลัมภ์ โดยจะต้องควบคุมอัตราการไหลของแก๊สพาให้สม่ำเสมอ แก๊สพาที่นิยมใช้โดยทั่วไปคือ แก๊สไนโตรเจน แก๊สฮีเลียม หรือแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแก๊สเฉื่อย แพร่น้อย มวลโมเลกุลต่ำ หาง่าย มีความบริสุทธิ์สูง ราคาไม่แพง และเหมาะสมกับดีเทคเตอร์ที่ใช้ (2) ระบบของการใส่สารตัวอย่าง โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (inlet) จะมีเครื่องให้ความร้อน (heater) ประกอบอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ ซึ่งระบบของการใส่สารตัวอย่างจะขึ้นกับสถานะของสารตัวอย่างดังนี้ คือ Gas Simple Inlet, Liquid Sample Inlet, Solid Sample และ Headspace Analysis (3) คอลัมภ์ ซึ่งถือว่าเป็นหัวใจหลักของการแยกสารด้วย GC เมื่อแก๊สผสมหรือไอของสารที่ปนกันอยู่ในสารตัวอย่างผ่านคอลัมภ์ สารที่บรรจุอยู่ในคอลัมภ์จะทำหน้าที่เป็นตัวแยกแก๊สหรือไอผสมออกเป็นส่วนๆ โดยประเภทของคอลัมภ์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ Packed column และ Capillary column (4) เครื่องดีเทคเตอร์ เป็นเครื่องที่จะบอกว่ามีสารที่ต้องการวิเคราะห์หรือมีสารอื่นที่แตกต่างไปจากแก๊สพาออกมาจากคอลัมภ์หรือไม่ ถ้ามีจะสามารถวัดได้ปริมาณเท่าใด ดังนั้นเครื่องดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน GC ควรมีลักษณะเฉพาะในการตอบสนองต่อสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์ คือ ควรจะต้องให้สภาพไวสูง (height sensitivity) และควรมีความเฉพาะต่อการตรวจหาสาร (selectivity) (ศิริกัญญา, 2552)

ในการวิเคราะหหาปริมาณของสารประกอบอินทรียในไบโอดีเซลจำพวกโมโนกลีเซอไรด ไดกลีเซอไรด และไตรกลีเซอไรดได โดยสวนประกอบที่สำคัญสำหรับการใช้เครื่อง GC ในการวิเคราะหหาปริมาณเมทิลเอสเทอรคือตัวตรวจวัดหรือดีเทคเตอร (Detector) สวนใหญจะนิยมใชตัวตรวจวัดแบบ Flame-Ionization Detector หรือที่เรียกวา FID หลักการของ FID คือเมื่อสารตัวอยางออกจากคอลัมนจะถูกเผาดวยเปลวไฟเพื่อทำใหแตกตัวจนเปนไอออนแลวเขาสูตัววัดไอออนเพื่อวัดคาการนำไฟฟาของไอออน คาการนำไฟฟาจะแปรผันตรงกับปริมาณสาร เนื่องจากตัวตรวจวัดแบบ FID มีสภาพไวกับสารอินทรียหรือสารที่ติดไฟได ดังนั้นตัวตรวจวัดประเภทนี้จึงเปนที่นิยมใชในการวิเคราะหหาปริมาณไบโอดีเซล (ภิเษก และสายรุ้ง, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.5 เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas chromatography)



รูปที่2.6 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่อง Gas Chromatography

ที่มา : ศิริกัญญา (2552)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซล โดยมีวัตถุดิบเป็นน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ การนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลสามารถทำได้หลายวิธี คือ การนำน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง และการนำน้ำมันพืชมาผสมกับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล ซึ่งสองวิธีการนี้จะส่งผลให้เกิดปัญหากับเครื่องยนต์ เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้หัวฉีดน้ำมันฉีดเป็นฝอยได้ยาก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสันดาปที่ไม่สมบูรณ์ อีกวิธีหนึ่งในการนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลคือ นำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์มาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งไบโอดีเซลที่ได้จากกระบวนการนี้จะนิยมทำมากที่สุด เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อเครื่องยนต์มากกว่า และมีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซลมากที่สุด (จันทรนาถ, 2548) โดยตัวเร่งที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อให้ได้ไบโอดีเซลจะนิยมใช้ตัวเร่งที่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรด เบส และเอนไซม์ โดยตัวเร่งที่เป็นกรดจะเกิดปฏิกิริยาที่ช้ากว่าเบส และจะต้องใช้อุณหภูมิสูงจึงไม่นิยมนำมาใช้ ตัวเร่งที่เป็นเบสจะเกิดการกัดกร่อนที่น้อยกว่ากรด ได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์มากและใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย แต่ก็มีข้อด้อยคือแยกกลีเซอรอลออกจากปฏิกิริยาได้ยาก เกิดน้ำเสียที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มในการบำบัด เสียค่าใช้จ่ายมากในการแยกตัวเร่งที่เป็นเบสออกจากผลิตภัณฑ์ เป็นต้น สุดท้ายคือตัวเร่งที่เป็นเอนไซม์ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการใช่เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยาได้ง่าย และมีการเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ที่สภาวะปกติ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง จึงมีการศึกษาการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้แทนเอนไซม์จากพืชและสัตว์ เนื่องจากมีการเพาะเลี้ยงได้ง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวผลผลิต ประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์มีปริมาณที่สูงกว่าที่ได้จากพืชและสัตว์ ทั้งนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น ช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหาร เป็นต้น เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้ประโยชน์

ณัฐนันท์ และคณะ (2554) ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อของยีสต์โดยแสงอัลตร้าไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเพื่อเพิ่มการผลิตไบโอดีเซล พบว่าเชื้อยีสต์มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 8.26 จากการฉายแสงอัลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นระยะเวลา 40 วินาที จากนั้นนำเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายมาเลี้ยงในอาหารไตรบิวไทรินที่มีการเติมนิสเตติน ความเข้มข้น 0.54 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้โดยดูจากวงใสรอบโคโลนี ทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายมา 50 สายพันธุ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร พบว่าเชื้อสายพันธุ์ D38 ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดถึง 0.296 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงนำเชื้อสายพันธุ์ D38 มาผลิตไบโอดีเซลโดยการเติมเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 เพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยมีน้ำมันเหลือใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อนละ 1, 5, 10 และ15 แล้วนำมาทดสอบโดยวิธีการทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟี ผลการทดลองพบว่า ไม่เกิดการสร้างเมทิลเอสเทอร์

พักตร์พิมล (2552) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบๆบ่อดักไขมันจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตปลากระป๋อง พบว่าไอโซเลท EQ3 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด จึงนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วย 16S rDNA พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderis* sp. 99 เปอร์เซ็นต์ และได้ศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เอทิลแอลกอฮอล์ และอะซิโตน พบว่าอะซิโตนสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้กิจกรรมเฉพาะสูงที่สุดถึง 4.7 ยูนิตต่อมิลลิลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 9.4 เท่า และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำเอนไซม์ที่ได้ไปใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ โดยใช้ไขมันจากบ่อดักไขมัน พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 40 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างไขมันจากบ่อดักไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อซีทิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:2 ละลายในไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุด 95.07 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

ดุษฎี (2549) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ที่ถูกตรึงบนตัวกลางไคโตซานและซีไลท์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เปรียบเทียบกับการตรึงบนโซเดียมอัลจิเนตและไคโตซานด้วยวิธีการห่อหุ้ม เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานและซีไลท์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 856.76 ยูนิต และ 753.39 ยูนิตตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโซเดียมอัลจิเนตและไคโตซานด้วยวิธีการห่อหุ้มมีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 778.21 ยูนิต และ 651.42 ยูนิตตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวกลางไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 ปริมาณน้ำ และปริมาณเอนไซม์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมัน ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียา ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ปริมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาในสภาวะเดียวกันจะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 33 เปอร์เซ็นต์

Guldhe และคณะ (2015) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำมันจากสาหร่าย *Scenedesmus obliquus* ไปเป็นไบโอดีเซล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระของ *Candida* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* ที่นำไปผ่านการตรึง เอนไซม์ไลเปสอิสระจากตับอ่อนหมู และเอนไซม์ไลเปสอิสระจากจมูกข้าวสาลีมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ให้ผลออกมาว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระของ *P. fluorescens* ที่นำไปผ่านการตรึง มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งอื่นๆที่นำมาศึกษา โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาวิเคราะห์ตามหลักการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (RSM) พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 ปริมาณเอนไซม์ 10 เปอร์เซ็นต์ และใช้ปริมาณน้ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของน้ำมัน สามารถเร่งปฏิกิริยาให้ได้ไบโอดีเซลสูงถึง 66.55 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังศึกษาการปรับปรุงขั้นตอนในการเติมเมทานอลในกระบวนการทำปฏิกิริยา ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้ถึง 90.81 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาพบว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระของ *P. fluorescens* ที่นำไปผ่านการตรึง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการเร่งปฏิกิริยาได้ถึง 4 รอบ โดยที่ได้ปริมาณของไบโอดีเซลมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไบโอดีเซลในรอบแรก และสุดท้ายเป็นการศึกษาคุณสมบัติเชื้อเพลิงไบโอดีเซล มีค่าซีเทนเท่ากับ 51.77 และค่าความร้อนเท่ากับ 37.67 เมกะจูนต่อกิโลกรัมซึ่งส่วนใหญ่คุณสมบัติเชื้อเพลิงไบโอดีเซลที่ได้จะสอดคล้องกับมาตรฐาน ASTM และมาตรฐาน EN

Sujatha และ Dhandayuthapani (2013) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีรีย *P. aeruginosa* KDP ที่คัดแยกได้จากดิน โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ทั้งสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น พีเอช อุณหภูมิ และสารอาหาร เช่น แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย ซีลีเนียมและนิกเกิล พบว่าสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทและยูเรียที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 21.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 15.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และการใส่ซีลีเนียมและนิกเกิลที่ความเข้มข้น 40 และ 60 ไมโครโมลต่อลิตรเป็นแร่ธาตุเสริม พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* KDP มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด

Tembhurkar และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Minimal medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ช่วงระยะเวลาที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดคือ 72 ชั่วโมง และมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเมื่อใช้น้ำมันจากเมล็ดมัสตาดเป็นแหล่งคาร์บอน จะได้กิจกรรมเท่ากับ 0.276 ยูนิต และใช้แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะได้กิจกรรมเท่ากับ 0.223 ยูนิต และสภาวะที่เหมาะสมในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 8.0 และใช้น้ำมันมะกอก 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตั้งต้น

Mobarak และคณะ (2011) ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไอโซเลท KM110 จากน้ำเสียของโรงงานน้ำมัน นำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้ลักษณะทางจีโนไทป์โดยการเปรียบเทียบ 16S rDNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242T มีความเหมือนอยู่ที่ 98.94 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่าน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ และเปปโตน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด นอกจากนี้ยังศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์ไลเปสจะมีกิจกรรมสูงที่สุด ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความคงตัวที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

Ji และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* LX1 ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* LX1 ถูกคัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันและสารเคมีในเขต Jiangsu ประเทศจีน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium ที่มี rapeseed oil เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เท่ากับ 36.4 ยูนิต เมื่อเอนไซม์ผ่านการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและ Dialysis พบว่า มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 64.6 ยูนิต เอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะถูกตรึงบนตัวกลางที่เป็น Celite และเอนไซม์อิสระ หลังจากนั้นจึงนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาพบว่า ร้อยละไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น มีค่าเท่ากับ 71.5 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงบน Celite เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Li และ Yan (2010) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์จากเชื้อ *P. cepacia* G63 เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจาก Sapium sebiferum oil โดยเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จะถูกนำไปตรึงบนตัวกลางก่อนเข้าทำปฏิกิริยา พบว่าปัจจัยที่มีผลทำให้เกิดไบโอดีเซลจากปฏิกิริยามากที่สุดคือ ใช้อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 4:1 ปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเป็น 2.7 เปอร์เซ็นต์ และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่าคือ 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาคือ 12 ชั่วโมง และเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ในปฏิกิริยาได้อีกมากกว่า 20 รอบ

Mahanta และคณะ (2008) ศึกษาการใช้เมล็ดสบู่ดำเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยกระบวนการหมักแบบ solid-state fermentation (SSF) ซึ่งก่อนหน้านี้พบว่าการใช้สบู่ดำเป็นสารตั้งต้นสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 1818 ยูนิตต่อกรัม และเอนไซม์ไลเปส 625 ยูนิตต่อกรัม เมื่อมีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้ระยะเวลาการเจริญเติบโต 72 และ 120 ชั่วโมง และค่า pH ตั้งต้น 6.0 และ 7.0 ตามลำดับหลังจากเพิ่มประสิทธิภาพโดยการเพิ่มปริมาณมอลโตส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้ถึง 6.3 และ1.6 เท่า และเพิ่มปริมาณไนโตรเจนกับเปปโตน พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้ถึง 11,376 ยูนิตต่อกรัม และ 1084 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ

Ruchi และคณะ (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *P. aeruginosa* และวิเคราะห์ด้วยการตอบสนองต่อพื้นที่ผิว(RSM) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีส่วนประกอบ 11 อย่าง (เปปโตน ทริปโตน แอมโมเนียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรท สารสกัดยีสต์ กลูโคส กลีเซอรอล ไซโลซ กัมอาราบิก แมกนีเซียมซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์) วิเคราะห์ด้วยวิธีการออกแบบ Plackett–Burman โดยมีปัจจัยที่สำคัญได้แก่ กัมอาราบิก แมกนีเซียมซัลเฟต ทริปโตน และสารสกัดยีสต์ ผลที่ได้พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสได้ถึง 5.58 เท่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4,580 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Noureddini และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *P. cepacia* เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาจากบริษัท Amano Enzyme ประเทศญี่ปุ่น โดยเอนไซม์ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาจะถูกตรึงบนตัวกลางที่เป็น Silica พบว่า ปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นไบโอดีเซลได้ดีที่สุดคือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างน้ำมันและเมทานอลเป็น 1:7.5 ปริมาณน้ำ 0.5 กรัม และใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงปริมาณ 465 มิลลิกรัม และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างน้ำมันและเอทานอลเป็น 1:15.2 ปริมาณน้ำ 0.3 กรัม และใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงปริมาณ 465 มิลลิกรัม จากทั้งสองสภาวะนี้ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ปริมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ และ 67 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 1 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาและจากการศึกษายังพบว่า เอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ถูกตรึงจะมีความสามาถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระ

Salis และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากไตรโอลีน โดยใช้แอลกอฮอล์สายสั้น และใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Candida Antarctica* B, *Rizohomucor miehie* และ *Pseudomonas cepacia* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Pseudomonas cepacia* เร่งปฏิกิริยาได้ประสิทธิภาพสูงที่สุด และได้ทำการศึกษาสภาวะและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยา พบว่าอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมงค่าแอคทิวิตี้ของน้ำที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.4-0.6 อัตราส่วนระหว่างบิวทานิลต่อไตรโอลีนที่เหมาะสมคือ 3:1 และระยะเวลาที่ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์อยู่ที่ 12 ชั่วโมง

Dharmsthiti และ Kuhasuntisuk (1998) ศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไอโซเลท LP602 จากน้ำเสียแหล่งชุมชน ได้ทำการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร Minimal Medium P (MMP) พบว่าที่ระยะเวลา 50 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญและมีกิจกรรมสูงสุด ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเมื่อใช้เวย์โปรตีน 6.25 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันถั่วเหลือง 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร Minimal Medium P (MMP) จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด 2.6 และ3.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

Gilbert และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* EF2 โดยการเพาะเลี้ยงแบบ Batch โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหาร Minimal salt medium พบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 6 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญที่เป็น Stationary phase และและมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเมื่อใช้ Tween 80 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 35.5 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 6.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

นำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากงานวิจัยของ โชตินันท์ และคณะ (2557) จำนวน 11 ไอโซเลท มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 ตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีของเชื้อ *Pseudomonas* sp.

จากหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology 2nd (2005) ระบุว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สามารถตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีได้หลายวิธี โดยในการศึกษานี้ได้เลือกทำการตรวจสอบ 5 วิธีคือ การทดสอบออกซิเดส การทดสอบคะตะเลส การทดสอบซิเตรท การทดสอบการเคลื่อนที่ ความสามารถในการย่อยแป้ง และการเจริญที่อุณหภูมิ 4, 41 และ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการตรวจสอบแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

การตรวจสอบทางชีวเคมี	**ผลของ *Pseudomonas* sp.**
การทดสอบออกซิเดส	D
การทดสอบคะตะเลส	+
การทดสอบซิเตรท	+
การทดสอบการเคลื่อนที่	+
ความสามารถในการย่อยแป้ง	D
การเจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	+*
การเจริญที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส	-**
การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	+

หมายเหตุ : D หมายถึง แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (Different reaction in different taxa)

* ยกเว้น*P. aeruginosa* ให้ผลเป็น –

** ยกเว้น*P. aeruginosa* ให้ผลเป็น +

นำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จำนวน 11 ไอโซเลท ที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง NA จากข้อ 3.1 มาใช้ในการตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1 การทดสอบออกซิเดส (Oxidaes test)

วิธีการตรวจสอบหยด Kovac's oxidase reagent (1 เปอร์เซ็นต์ Tetramethyl-phenylenediamine dihydrochloride) 1 หยด ลงบนกระดาษกรอง จากนั้นใช้ลูป หรือแท่งแก้วเขี่ยเชื้อ แล้วนำมาขีดบนกระดาษกรองเชื้อที่มี cytochrome oxidase จะเปลี่ยนสีของ Kovac's oxidase reagent จากไม่มีสีให้เป็นสีม่วง การอ่านผล เกิดสีม่วงเข้มขึ้นภายใน 10 – 30 วินาที แสดงว่าให้ผลเป็นบวกไม่เกิดสีม่วง แสดงว่าให้ผลเป็นลบ

3.2.2 การทดสอบคะตะเลส (Catalase test)

วิธีการตรวจสอบ เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนสไลด์แล้วหยด 3 เปอร์เซ็นต์ H_2O_2 ลงบนเชื้อ 1 หยดการอ่านผล พบว่ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นให้ผลเป็นบวก ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นให้ผลเป็นลบ

3.2.3 การทดสอบซิเตรท (Citrate test)

วิธีการตรวจสอบ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดลอบ นำมา streak ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Simmon's citrate agar ที่มีลักษณะเอียงเล็กน้อย แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง การอ่านผล อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงินผลเป็นบวก หากเป็นสีเขียวเช่นเดิมผลเป็นลบ

3.2.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

วิธีการตรวจสอบ เตรียมอาหารลักษณะกึ่งเหลว ที่มีความเข้มข้นของวุ้นประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ หรือน้อยกว่านั้น ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ แทงลงไปตรงๆบนอาหาร Tryptone salt agar (Atlas, 2010) ลักษณะกึ่งเหลว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลพบการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยแทงจนทำให้อาหารขุ่นให้ผลเป็นบวก เชื้อเจริญเฉพาะรอยแทงเท่านั้นให้ผลเป็นลบ

3.2.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

วิธีการทดสอบ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบมาจุดลงบนอาหาร Starch agar (Atlas, 2010) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การอ่านผล หยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วจานอาหาร หากเชื้อสามารถย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนี แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก หากไม่พบบริเวณใสรอบๆโคโลนี แสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 4 37 และ 41 องศาเซลเซียส

วิธีการตรวจสอบ เตรียมอาหาร Nutrient agar ลงในหลอดทดลอง ให้อาหารมีลักษณะเอียงเล็กน้อย จากนั้นทำการ streak เชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหาร จำนวน 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 37 และ 41 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผล ดูการเจริญของเชื้อตามรอยที่ streak ไว้ หากพบการเจริญให้ผลเป็นบวก ไม่พบการเจริญให้ผลเป็นลบ

3.3 การตรวจวัดประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

ตรวจวัดประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการวัดบริเวณโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อที่ทดสอบนำมาคำนวณเป็นค่าดัชนีเอนไซม์ ทำได้ดังต่อไปนี้

1. นำแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทจากอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มาจุดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีไตรบิวไทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (ประกอบด้วย ทริปโตน 1.0 กรัม ยีสต์สกัด 1.0 กรัม K_2HPO_4 2.0 กรัม KH_2PO_4 1.0 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม $CaCl_2$ 0.15 กรัม และ ไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อปริมาตร 1 ลิตร)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ตรวจผลโดยการวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีและวัดขนาดโคโลนีด้วย Vernier Calipers ที่มีความละเอียด 0.05 มิลลิเมตร เพื่อหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งคำนวณได้ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)}}$$

3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยวิธี Colorimetric method

3.4.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงวิธีของ Kuan และคณะ, 2013)

1. เตรียมสารละลาย 10mM p-Nitrophenyl palmitate (p-NPP) เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการวิเคราะห์กิจกรรม (Solution A) โดยชั่ง p-NPP 0.0377 กรัม ละลายใน Propanol ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

2. เตรียมสารละลาย Solution B โดยละลาย Tween-80 0.4 เปอร์เซ็นต์ (v/v) Gum Arabic 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 0.05M Phosphate buffer พีเอช 8.0

3. ผสมสารละลาย Solution A 90 ไมโครลิตร Solution B 810 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม Vortex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำสารลายผสมใส่ 96-well ปริมาตร 200ไมโครลิตร/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader

5. นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน p-NP เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็น p-NP 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0

3.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol (p-NP)

1. เตรียม Stock สารละลายมาตรฐาน p-NP ความเข้มข้น 1mM โดยชั่ง p-NP 0.0139 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน p-NP ที่ประกอบไปด้วย Stock 1 mM p-NP และ 0.05M Phosphate buffer พีเอช 8.0 โดยใช้ปริมาณของสารละลายดังตารางที่ 3.2

3. นำสารละลายมาตรฐาน p-NP ที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/well

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน p-Nitrophenol

Stock 1 mM p-NP (ไมโครลิตร)	0.05M Phosphate buffer พีเอช 8.0 (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ p-NP (mM)
0	3,000	0
60	2,940	0.02
120	2,880	0.04
180	2,820	0.06
240	2,760	0.08
300	2,700	0.10

3.5 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ

1.นำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่มีผลค่าดัชนีของเอนไซม์สูงที่สุดจากวิธีการข้อ 3.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Mitra และคณะ, 2014; Bhatti และคณะ, 1976) (มีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง 10^8-10^9 CFU/ml โดยการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธี Serial dilution spread plate บนอาหาร NA)

3.5.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปส

1. ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐาน (ดังภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 6 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (พักตร์พิมล, 2552)

3.5.3 การวัดช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

1. นำตัวอย่างที่เก็บได้ (1 มิลลิลิตร) ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. เก็บสารละลายส่วนใส (Crude enzyme) ที่ได้มาทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ เพื่อให้ทราบช่วงเวลาที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด

3. ส่วนของตะกอนนำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ประกอบด้วย NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร) จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Mitra และคณะ, 2014; Bhatti และคณะ, 1976) โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็น Blank

3.6 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1. เตรียมหัวเชื้อดังวิธีการข้อ 3.5.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 5 แหล่ง ได้แก่ น้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v), น้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v), กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v), ซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

2. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลาที่กำหนดวัดการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังข้อ 3.5.3 ทำให้ทราบว่าแหล่งคาร์บอนใดให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ตามวิธีการทดลองข้างต้น โดยใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนเป็น 0 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์

3.7 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1. เตรียมหัวเชื้อดังวิธีการข้อ 3.5.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐานใช้แหล่งคาร์บอนและปริมาณที่เหมาะสมจากวิธีการข้อ 3.6 โดยที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 แหล่ง ได้แก่ ทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างทริปโตน ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 1:1:1 ปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์

2. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เมื่อครบเวลาที่กำหนด วัดการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังวิธีการข้อ 3.5.3 ทำให้ทราบว่าแหล่งไนโตรเจนใดให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

4. ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดตามวิธีการทดลองข้างต้น โดยใช้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์

3.8 การแยกเอนไซม์ไลเปสโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

1. เตรียมหัวเชื้อดังวิธีการข้อ 3.5.1 จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีการปรับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมตามที่ได้ทำการศึกษาข้างต้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. เมื่อครบกำหนดเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. นำสารละลายเอนไซม์ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาใส่แอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดในช่วงความเข้มข้นที่ 0–40 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 22.6 กรัมต่อมิลลิลิตร (ดัดแปลงจากวิธีของ Tripathi และคณะ, 2014) โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายเอนไซม์อย่างช้าๆ และปั่นกวนตลอดเวลาด้วยเครื่อง Magnetic stirrer จนกระทั่งแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดและถึงจุดสมดุล

4. นำสารละลายเอนไซม์ส่วนใสหลังการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที

5. รินสารละลายส่วนใสออก และปรับปริมาตรของตะกอนเอนไซม์ด้วย 0.05M Phosphate buffer พีเอช 8.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ทำการแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายเอนไซม์ออกโดยกระบวนการ Dialysis ด้วยบัฟเฟอร์ 0.05M Phosphate buffer พีเอช 8.0 ใน Dialysis tubing (D0530-100FT Sigma-Aldrich) และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 24 ชั่วโมง

7. เมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ภายใน Dialysis tubing มาวัดปริมาตรวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (อารี, 2555)

3.9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยดัดแปลงวิธีการจาก Lowry และคณะ (1951) ดังนี้

1. เตรียมสารละลาย Lowry A โดยชั่ง NaOH 0.4 กรัม และNa_2CO_3 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย Lowry B โดยชั่ง $CuSO_4$ 0.5 กรัม และ Potassium sodium tartrate tetrahydrate 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลาย Lowry C โดยผสมระหว่างสารละลาย Lowry A กับสารละลาย Lowry B ในอัตราส่วน 50:1

4. นำสารละลายผสม Lowry C 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin & Ciocalteu's phenol reagent เจือจางในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

5. เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายที่เตรียมไว้นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

6. นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.10 การผลิตและการตรวจสอบประสิทธิภาพของตัวอย่างไบโอดีเซลจากการทดลอง

3.10.1 การผลิตไบโอดีเซล

นำสารละลายเอนไซม์หลังจากกระบวนการ Dialysis ในข้อ 3.8 มาใช้เป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Guldhe และคณะ (2015) สารละลายที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ น้ำมันปาล์ม เมทานอล น้ำ และเอนไซม์ โดยกำหนดอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเท่ากับ 3:1 ปริมาณน้ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำมัน และใช้เอนไซม์ในปริมาณที่เท่ากันกับน้ำมัน ซึ่งปริมาตรของสารละลายที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

สารละลาย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
น้ำมันปาล์ม	10.00
เมทานอล	1.79
น้ำ	0.25
เอนไซม์	10.00

1. เติมสารละลายน้ำมันปาล์ม น้ำ เอนไซม์ และเมทานอล ตามตารางที่ 3.3 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในการเติมเมทานอลจะแบ่งเติม 3 ช่วงเวลา คือ ชั่วโมงที่ 0 24 และ 48

3. หลังจากครบเวลาที่กำหนด เก็บเกี่ยวผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีจะเกิดการแยกชั้นไบโอดีเซลจะอยู่ส่วนบนสุด เก็บไบโอดีเซลที่ได้เพื่อไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพต่อไป

3.10.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

1. เตรียมสารละลาย Mobile phase โดยนำเฮกเซน : เอทิลอะซิเตท : กรดอะซิติก ผสมในอัตราส่วน 90:10:1 จากนั้นเทลงในแทงค์ TLC โดยให้ความสูงของตัวทำละลายประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายอิ่มตัว ใช้เวลา 1.30 นาที

2. ตัดแผ่น TLC เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 6.5x30 เซนติเมตร ใช้ดินสอขีดเส้นตรง ขนานกับขอบกระดาษ โดยให้อยู่ห่างจากขอบกระดาษล่าง 1.0 มิลลิเมตร (จุดเริ่มต้น) และห่างจากขอบบน 0.5 มิลลิเมตร (จุด Solvent front)

3. ทำการจุดไบโอดีเซลมาตรฐานจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา น้ำมันปาล์ม และตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง ตามลำดับ

4. ใส่แผ่น TLC ลงในแทงค์ TLC ที่เตรียมไว้ จากนั้นปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงเส้น Solvent front นำแผ่น TLC ออกจากแทงค์ TLC ทิ้งไว้ให้แห้ง

5. นำแผ่น TLC ใส่ลงในแทงค์ที่มีไอระเหยของไอโอดีนไม่เกิน 30 นาที สังเกตแถบแบนการเคลื่อนที่ของสาร (โชตินันท์ และคณะ, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC)

1. เตรียมตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากฟลาสก์ที่ผลิตไบโอดีเซล นำมาละลายในเฮกเซนอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที เก็บส่วนที่ละลายในเฮกเซน เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ FAME โดยเครื่อง GC-FID

2.เริ่มจากฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยใช้ column รุ่น DB-WAX (Agilent) ใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน คือ 40 มิลลิลิตรต่อนาที อากาศ 450 มิลลิลิตรต่อนาที และแก๊สฮีเลียม 30 มิลลิลิตรต่อนาที split ratio คือ 1:50 อุณหภูมิอินเจคเตอร์ เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดีเทคเตอร์ เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิคอลัมภ์ เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส holding time เท่ากับ 1 นาที แล้วเพิ่มถึง 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนอุณหภูมิสุดท้ายของคอลัมภ์ เท่ากับ 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียสต่อนาที holding time เท่ากับ 18 นาที (David และคณะ, 2005)

3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าดัชนีของเอนไซม์ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่คำนวณได้ มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) โดย Duncan's new multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

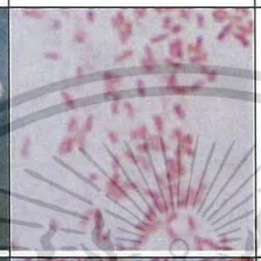
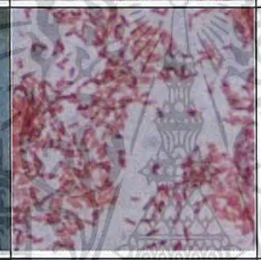
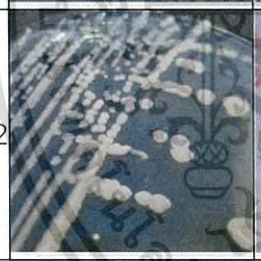
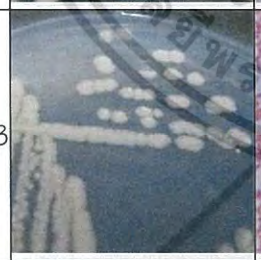
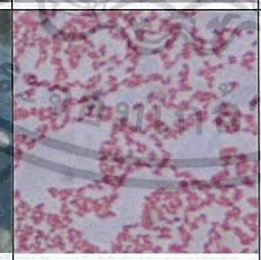
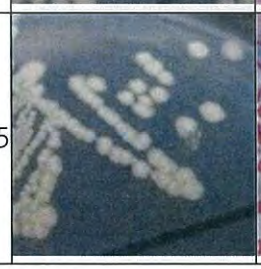
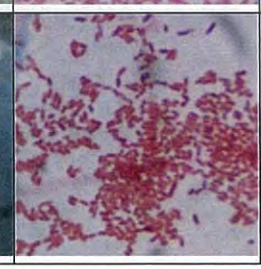
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีของเชื้อ *Pseudomonas* sp.

จากการนำเชื้อแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 มาทำการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ได้แก่ การทดสอบออกซิเดส การทดสอบคะตะเลส การทดสอบซิเตรท การทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) และการเจริญที่อุณหภูมิ 4 41 และ 37 องศาเซลเซียส โดยผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อเทียบคุณลักษณะทางชีวเคมีกับเอกสารอ้างอิง จากหนังสือ Bergey's manual of Systematic Bacteriology 2nd (2005) ระบุว่าลักษณะโคโลนีภายนอกของเชื้อ *Pseudumonas* sp. จะมีสีขาวเหลือง ผิวเรียบ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomoas* sp. จะมีรูปร่างเป็นท่อน แกรมลบติดสีแดงของ Safanine จากผลของลักษณะทางสัณฐาณวิทยาและผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้น (ตารางที่ 4.1) สามารถระบุได้เบื้องต้นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Pseudomonas* sp. ผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ บนอาหาร NA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS1008 KS2002 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ได้แก่ KS2002 SN2002 SN2006 และ SN2007 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส และเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดอสอบการเคลื่อนที่โดยสังเกตลักษณะขุ่นรอบรอยแทงในอาหารกึ่งเหลว พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท มีความสามารถในการเคลื่อนที่ สังเกตได้จากอาหารจะมีลักษณะขุ่น รอบๆ รอยแทง ผลการทดสอบออกซิเดสและคะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท ให้ผลเป็นบวก แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Cytochrome oxidase และเอนไซม์คะตะเลสได้ ตามลำดับ ผลการทดสอบซิเตรท สังเกตได้การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons citrate agar พบว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากสามารถเจริญบนผิวหน้าของอาหารและทำให้สีของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำเงินได้ และสุดท้ายการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Starch agar พบว่าเกิดโซนใสขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทให้ผลการทดสอบเป็นบวก แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้

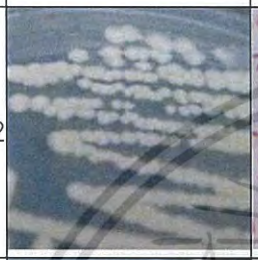
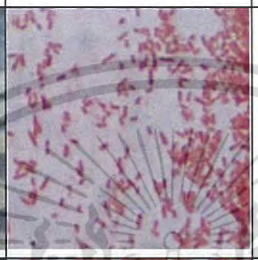
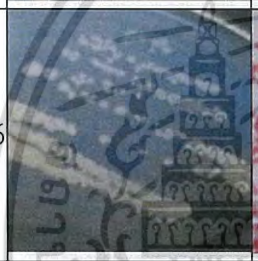
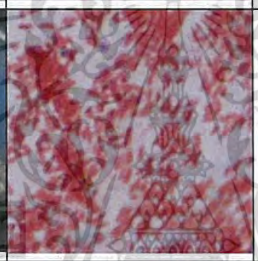
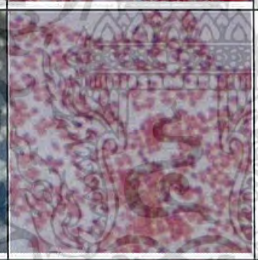
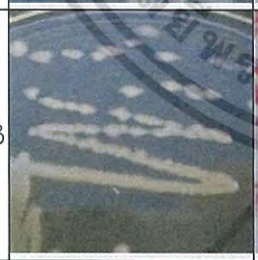
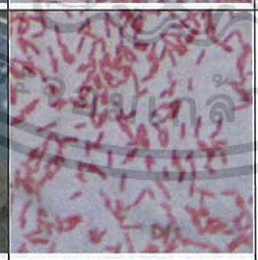
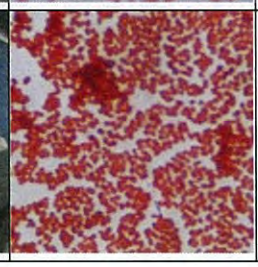
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การติดสีแกรม	การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (°C)			การทดสอบการเคลื่อนที่	การทดสอบกระบวนการทางชีวเคมี			
				4	37	41		ออกซิเดส	คะตะเลส	ซิเตรท	การย่อยแป้ง
KS1001			−	+	+	−	+	+	+	+	+
KS1008			−	+	+	−	+	+	+	+	+
KS2002			−	+	+	+	+	+	+	+	+
KS3003			−	−	+	−	+	+	+	+	+
KS3005			−	+	+	−	+	+	+	+	+

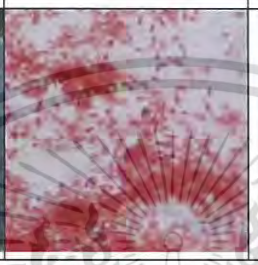
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ตารางแสดงลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การติดสีแกรม	การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (°C)			การทดสอบการเคลื่อนที่	การทดสอบกระบวนการทางชีวเคมี			
				4	37	41		ออกซิเดส	คะตะเลส	ซิเตรท	การย่อยแป้ง
SN2002			−	+	+	+	+	+	+	+	+
SN2006			−	+	+	+	+	+	+	+	+
SN2007			−	+	+	+	+	+	+	+	+
SS1003			−	+	+	−	+	+	+	+	+
SS3005			−	+	+	−	+	+	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ตารางแสดงลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การติดสีแกรม	การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ (°C)			การทดสอบการเคลื่อนที่	การทดสอบกระบวนการทางชีวเคมี			
				4	37	41		ออกซิเดส	คะตะเลส	ซิเตรท	การย่อยแป้ง
SS3007			–	+	+	–	+	+	+	+	+

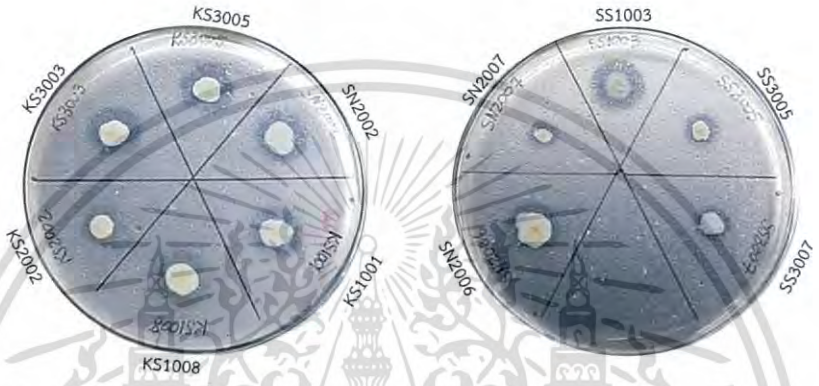
หมายเหตุ : + หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive)
– หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative)

4.2 ผลการตรวจวัดประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

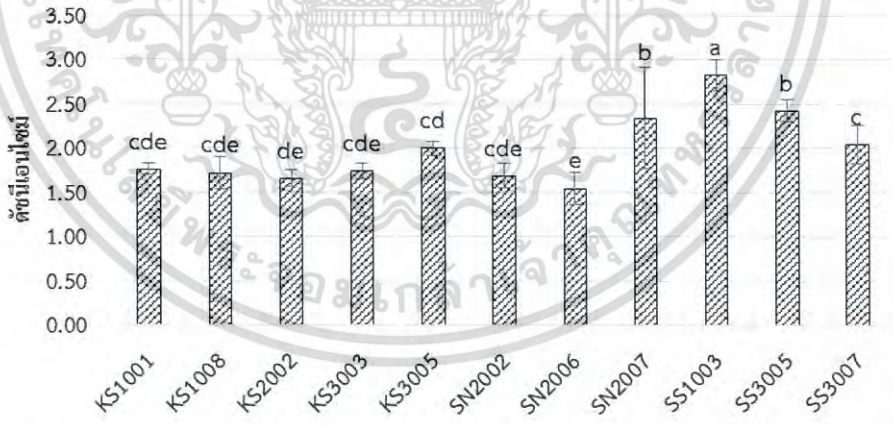
ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สามารถวิเคราะห์ได้จากค่าดัชนีของเอนไซม์ที่คำนวณได้จากโซนใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งไตรบิวไทริน โดยนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 11 ไอโซเลท มาจุดลงบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีไตบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วสังกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นผลจากการสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดขนาดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีและวัดขนาดโคโลนีเพื่อทำการคำนวณค่าดัชนีเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไตรบิวไทรินได้แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรียที่เกิดโซนใสรอบโคโลนีนี้ คาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ (Hydrolysis of ester) คือ ไลเปสหรือเอสเทอเรส อ้างจากการศึกษาการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ตามความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ Yamane (1987) โดยไอโซเลท SS1003 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงที่สุดสังเกตจากค่าดัชนีเอนไซม์ เท่ากับ 2.83±0.17 รองลงมาคือไอโซเลท SS3005 ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 2.43±0.12 และตามด้วยไอโซเลท SN2007 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.42±0.57 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท SN2006 มีค่าดัชนีของเอนไซม์ต่ำที่สุดคือ 1.56±0.18 อย่างมีนัยสำคัญทางสิถิติ ($p<0.005$) (รูปที่ 4.2) สอดคล้องกับการศึกษาของ Noormohamadi และคณะ (2013) ที่ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. ชนิดใหม่ เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารที่มีไตรบิวไทรินเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี พบว่าเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 มิลลิเมตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 41.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Veerapagu และคณะ (2013) ในขั้นตอนการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารที่มีไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 20 ไอโซเลทจากทั้งหมด 200 ไอโซเลทที่มีโซนใสเกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.1 โซนใสบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

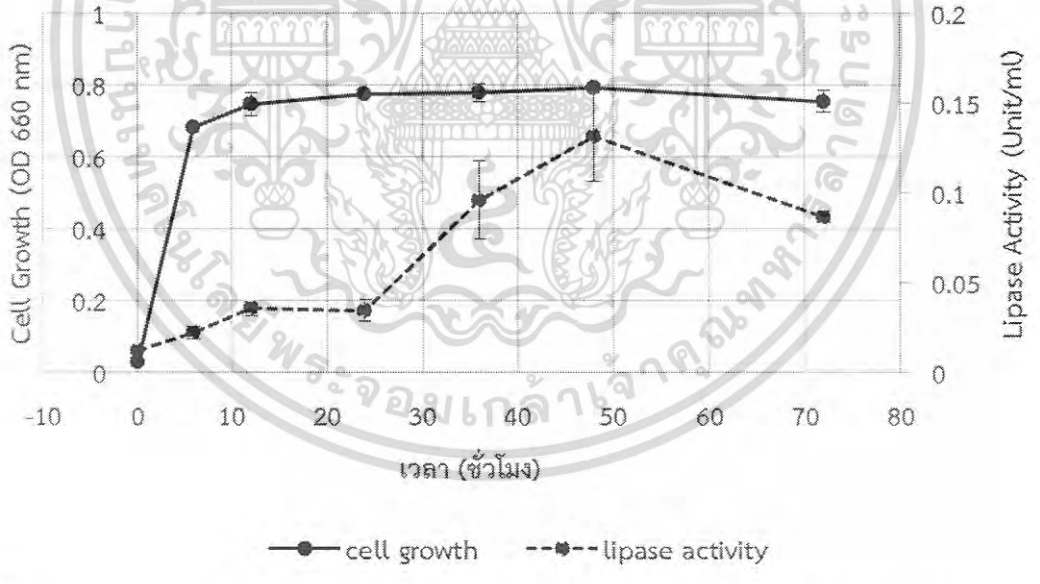


รูปที่ 4.2 ดัชนีเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหารแข็งพื้นฐานไตรบิวไทริน (ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=4$, $p<0.05$) ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=4$, $p<0.05$))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 สามารถเจริญได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.794 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.131±0.024 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.3) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Dharmsthiti และ Kuhasuntisuk (1998) ที่ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* LP602 ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย พบว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 3.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Veerapagu และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย *Pseduomonas gessardii* ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ พบว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจะมีกิจกรรมสูงที่สุดประมาณ 68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากการทดลองได้นำระยะเวลาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการทดลองปัจจัยอื่นต่อไป



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงอัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีกลูโคส ซูโครส น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม และไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเวลาที่ 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีที่แตกต่างกันออกไปเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการวัดค่าการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตะกอนเซลล์ภายหลังการปั่นเหวี่ยง โดยใช้น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% เป็น blank (พักตร์พิมล, 2552)) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันมะกอก กลูโคส ไตรบิวไทริน น้ำมันปาล์ม และซูโครส (แหล่งละ 1 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (รูปที่ 4.4 ก)

ชุดการทดลองที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 0.734 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 0.094±0.008 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (คำนวณได้จากสมการในภาคผนวก ญ) ชุดการทดลองที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.446 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยที่สุดเท่ากับ 0.061±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 0.753 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 0.091±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.752 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.103±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลองที่มีไตรบิวไทรินเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.393 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 0.094±0.003 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพราะฉะนั้นเชื้อแบคทีเรียจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้กิจกรรมสูงที่สุด เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาลงมา คือ กลูโคส ไตรบิวไทริน น้ำมันปาล์มและซูโครส ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสิถิติ ($p<0.05$)

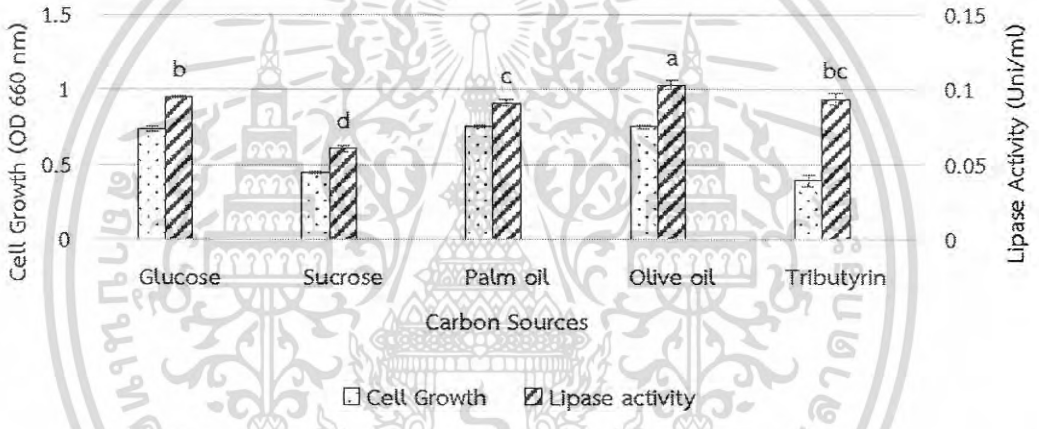
จากผลการทดลองดังกล่างพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงทำการศึกษาปริมาณของน้ำมันมะกอกที่เหมาะสมส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้กิจกรรมสูงที่สุด โดยศึกษาปริมาณของน้ำมันมะกอกที่ 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเวลาที่ 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดในอาหารที่มีปริมาณน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรสูงที่สุด เท่ากับ 0.821 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

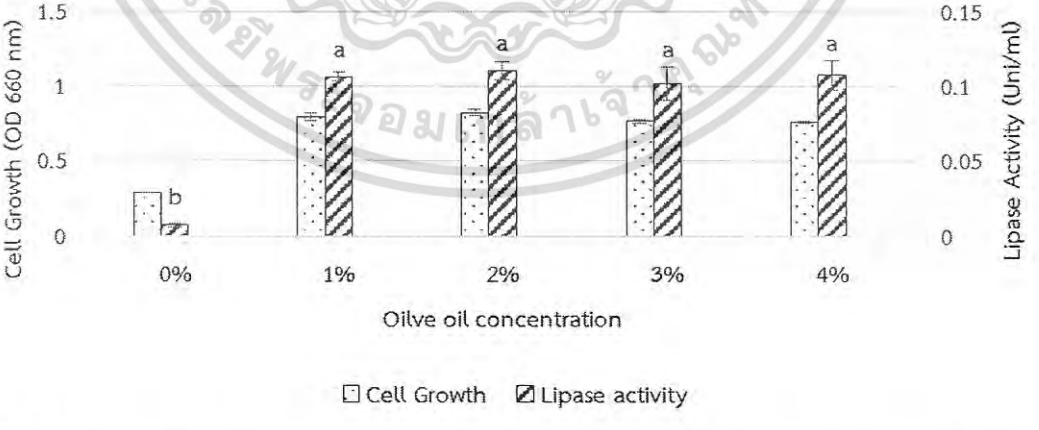
เท่ากับ 0.110±0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ปริมาณของน้ำมันมะกอก 4 1 3 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 4.4 ข)

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mobarak และคณะ (2011) ที่ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* KM110 พบว่าน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เมื่อใช้น้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 0.46 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Shukla และ Desai (2016) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. Acc. No. KP-307769 พบว่าน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เมื่อใช้น้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 2.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ก



ข



รูปที่ 4.4 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน (ก) และผลของปริมาณน้ำมันมะกอก (ข) ที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารสูตรพื้นฐานภายหลังการบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ยีสต์สกัด ทริปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และยีสต์สกัด : ทริปโตน : แอมโมเนียมซัลเฟต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารที่มีทริปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างทริปโตน ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟต (อัตราส่วน 1:1:1) แหล่งละ 0.3 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ (รูปที่ 4.5 ก)

ชุดการทดลองที่มีทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน วัดการเจริญของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.656 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดถึง 0.116±0.007 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อเจริญได้ดีมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 0.736 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 0.069±0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ชุดการทดลองที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อเจริญได้น้อยที่สุดมีค่าดูดกลืนแสงน้อยที่สุดเท่ากับ 0.318 และผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยที่สุด คือ 0.052±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และชุดการทดลองสุดท้ายที่มียีสต์สกัด : ทริปโตน : แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน วัดการเจริญของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.733 และผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 0.080±0.001 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพราะฉะนั้นเชื้อแบคทีเรียจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้กิจกรรมสูงที่สุด เมื่อใช้ทริปโตรเป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงมา คือ แหล่งไนโตรเจนผสม (ยีสต์สกัด : ทริปโตน : แอมโมเนียมซัลเฟต) ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

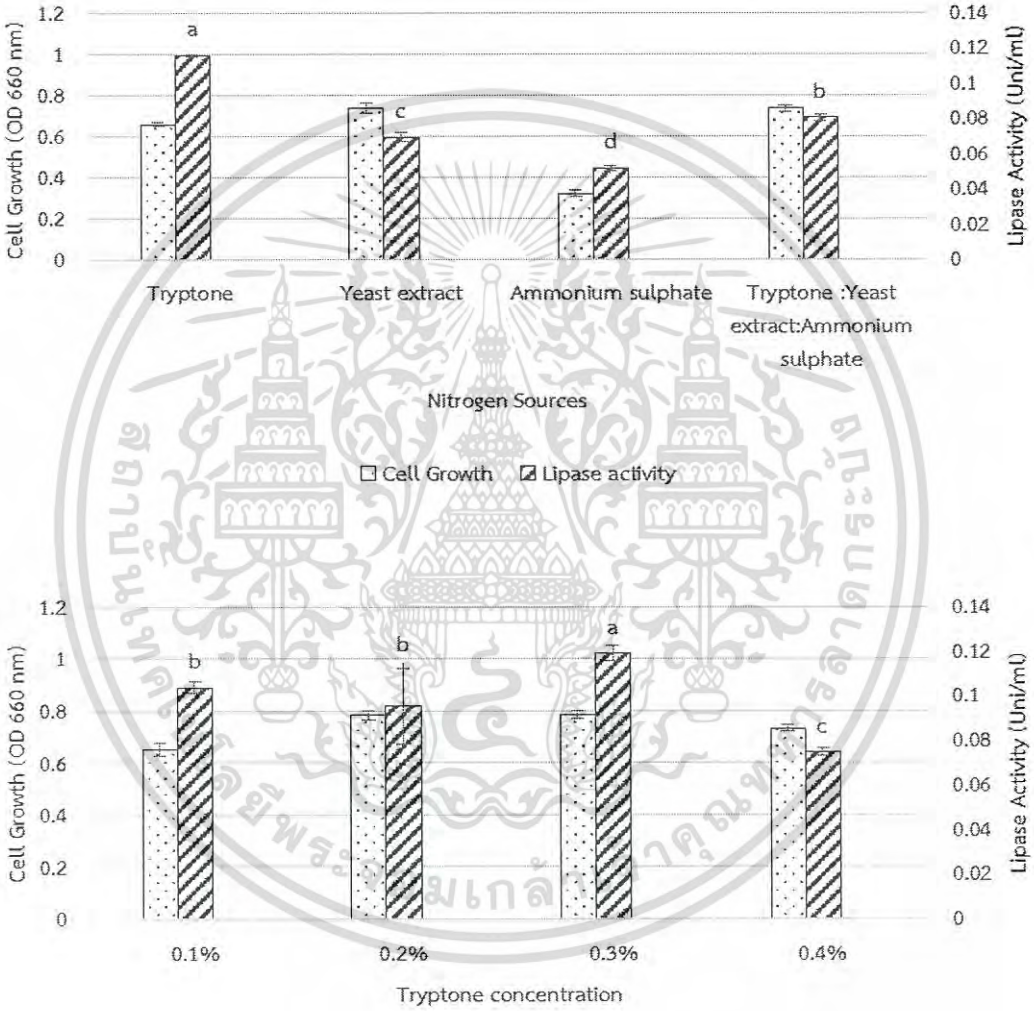
จากผลการทดลองดังกล่างพบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงทำการศึกษาความปริมาณของทริปโตนที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสได้กิจกรรมสูงที่สุด โดยศึกษาปริมาณของทริปโตนที่ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5 พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดในอาหารที่มีทริปโตน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรสูงที่สุด เท่ากับ 0.783 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.119±0.003 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 0.1 0.2 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 4.5 ข)

ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ruchi และคณะ (2008) ที่ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* พบว่าทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ส่งผลทำให้ให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 185

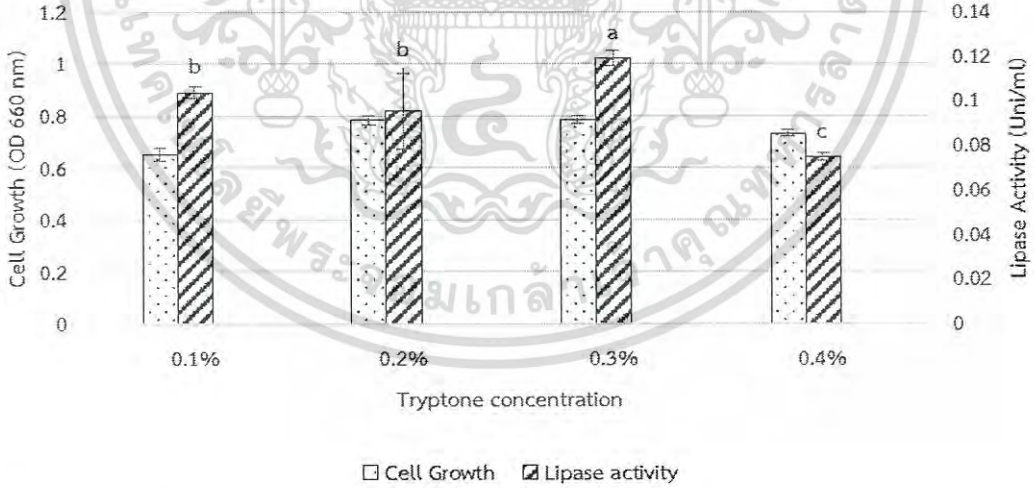
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kulkarni และ Gadre (2002) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* NS2W ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าเมื่อใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เอนไซม์ของชื้อแบคทีเรียมีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 24.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

ก



ข



รูปที่ 4.5 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน (ก) และผลของปริมาณทริปโตน (ข) ที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังการบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่ 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการแยกเอนไซม์ไลเปสโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ (ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์) มากที่สุด 3 ลำดับ ได้แก่ SS1003 SS3005 และ SN2007 (รูปที่ 4.2) ในอาหารเหลวพื้นฐานพื้นฐานที่มีการปรับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมตามที่ได้ทำการศึกษาข้างต้น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย ทริปโตน 3.0 กรัม K_2HPO_4 2.0 กรัม KH_2PO_4 1.0 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม $CaCl_2$ 0.15 กรัม น้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ต่อปริมาตร 1 ลิตร) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำการแยกเอนไซม์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 เปอร์เซ็นต์ และมีการแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกโดยกระบวนการ Dialysis

ภายหลังการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเรียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 เปอเซ็นต์และการทำ Dialysis สามารถตกตะกอนเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ทำให้มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเป็น 0.48 ยูนิตต่อมิลลิกรัมมีความบริสุทธิ์ขึ้น 1.6 เท่า ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS3005 พบว่ามีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.30 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เป็น 0.67 ยูนิตต่อมิลลิกรัมมีความบริสุทธิ์ขึ้น 2.2 เท่า และเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SN2007 มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.32 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเป็น 4.84 ยูนิตต่อมิลลิกรัมมีความบริสุทธิ์ขึ้น 15.2 เท่า (ตารางที่ 4.2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nishiho และคณะ (1987) ที่ได้ทำการตกตะกอนเอนไอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomoas fragi* 22.39 B โดยการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 เปอร์เซ็นต์พบว่าภายหลังจากตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว เอนไซม์มีกิจกรรมเฉพาะเพิ่มขึ้นจาก 31.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 106 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 3.3 เท่า และมีร้อยละของผลได้เท่ากับ 87.2 เปอน์เซ็นต์ Bose และ Keharia (2013) ได้ทำการตกตะกอนเอนไอนไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* AAU2 โดยการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 เปอร์เซ็นต์พบว่าภายหลังจากตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว เอนไซม์มีกิจกรรมเฉพาะเพิ่มขึ้นจาก 2.44 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ไปเป็น 10.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ขึ้น 4.48 เท่า และมีร้อยละของผลได้เท่ากับ 82.9 เปอน์เซ็นต์

พบว่ากิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SN2007 มีค่าสูงที่สุด อาจเป็นผลมาจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 และ SS3005 นั้น ภายหลังจากการหมุนเหวี่ยง ตะกอนที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม เกาะกันแผ่นบางๆ ลอยอยู่ด้านบนและด้านข้างของหลอด ยากต่อการเก็บเกี่ยว ซึ่งแตกต่างจากตะกอนของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SN2007 ที่ตะกอนของเอนไซม์มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น อยู่บริเวณก้นของหลอด ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 และ SS3005 มีกิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SN2007 คล้ายคลึงกับผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาของ พักตร์พิมล (2552) ที่พบว่าตะกอนของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. EQ3 ภายหลังการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50 เปอร์เซ็นต์ เกิดเป็นสีน้ำตาลขุ่น ลอยอยู่ด้านบนของหลอด

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการแยกเอนไซม์ไลเปสโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 SS3005 และ SN2007

รหัส	ขั้นตอนการแยกเอนไซม์	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	กิจกรรมทั้งหมด* (ยูนิต)	กิจกรรมเฉพาะ* (ยูนิต/มก.)	ผลได้* (%)	ความบริสุทธิ์* (เท่า)
SS1003	Crude	74.01	22.50	0.30	100	1.0
	$(NH_4)_2SO_4$ 40%	29.51	9.89	0.34	44	1.1
	Dialysis	3.07	1.46	0.48	7	1.6
SS3005	Crude	72.64	21.81	0.30	100	1.0
	$(NH_4)_2SO_4$ 40%	19.43	10.24	0.53	47	1.8
	Dialysis	2.28	1.53	0.67	7	2.2
SN2007	Crude	70.12	22.41	0.32	100	1.0
	$(NH_4)_2SO_4$ 40%	2.46	10.46	4.25	47	13.3
	Dialysis	0.32	1.55	4.84	7	15.2

*หมายเหตุ: คำนวณได้จากสมการในภาคผนวก ญ

4.7 ผลการผลิตและการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของไบโอดีเซล

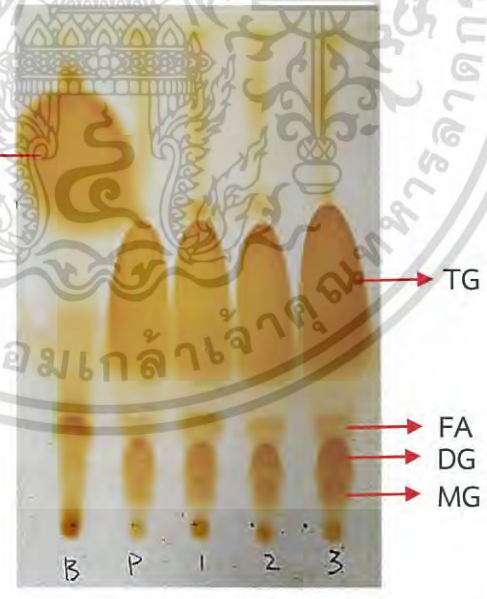
จากการนำเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์อย่างหยาบโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำ Dialysis มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยมีสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาคือ น้ำมันปาล์ม เมทานอล และน้ำ โดยอัตราส่วนที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3 ซึ่งดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Guldhe และคณะ (2015) จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเกี่ยวส่วนใสด้านบน นำมาวิเคราะห์ผลหาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างภายหลังการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทราส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatrography (TLC) พบว่า ตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ SS1003 SS3005 และ SN2007 ไม่เกิดการสร้างไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้น (รูปที่ 4.6) และเมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatrography (GC) พบว่าพีค (Peak) ที่เกิดขึ้นของตัวอย่างที่ได้จากการใช้เอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท (รูปที่ 4.7 ข-ง) ปรากฏออกมาในช่วงเวลา (Retention time) ที่ไม่ตรงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบกับพีคของไบโอดีเซลมาตรฐานจากสวนจิตรลดา (รูปที่ 4.7 ก) ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลของการทำ TLC

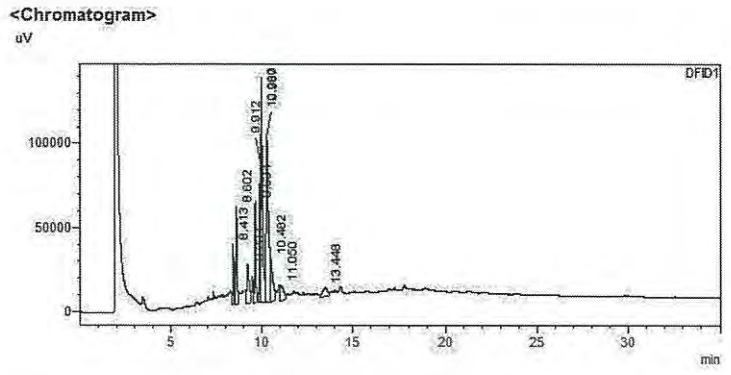
ผลการทดลองที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ ณัฐนันท์ และคณะ (2554) ที่ได้ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์สายพันธ์ D38 นำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าไม่เกิดการสร้างเมทิลเอสเทอร์เช่นเดียวกัน ซึ่งสาเหตุที่เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้นั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำในการทำปฏิกิริยาที่ไม่เหมาะสม เนื่องจาก ปฏิกิริยาทราส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลเอสเทอร์ในสภาวะที่มีน้ำในปฏิกิริยา (ดุษฎี, 2549; ณัฐนันท์ และคณะ, 2554) เพราะฉะนั้นการที่มีปริมาณน้ำในปฏิกิริยามากเกินไปจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแทนปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิชัน อ้างอิงจากศึกษาของ Salis และคณะ (2005) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cepacia* พบว่า ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ทำให้มีกิจกรรมสูงที่สุดอยู่ในช่วง 0.4-0.6 เพราะฉะนั้นในขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อย่างหยาบ ภายหลังจากการทำ Dialysis ควรนำเอนไซม์ที่ได้มาผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultra filtration เพื่อลดปริมาณน้ำในเอนไซม์ เนื่องจากปริมาณน้ำที่อยู่ในระบบ เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์และส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทราส์เอสเทอริฟิเคชัน



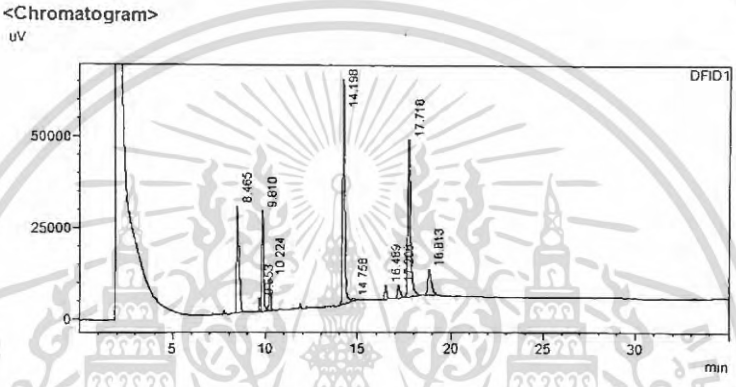
รูปที่ 4.6 ผลการทำ Thin Layer Chromatrography (TLC) (B) ไบโอดีเซลมาตรฐาน จากสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ตัวอย่างที่ได้จากใช้เอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 (2) ตัวอย่างที่ได้จากใช้เอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS3005 (3) ตัวอย่างที่ได้จากใช้เอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SN2007 (MG) โมโนกลีเซอร์ไรด์ (DG) ไดกลีเซอร์ไรด์ (TG) ไตรกลีเซอร์ไรด์ (FA) กรดไขมันอิสระ (BD) และไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

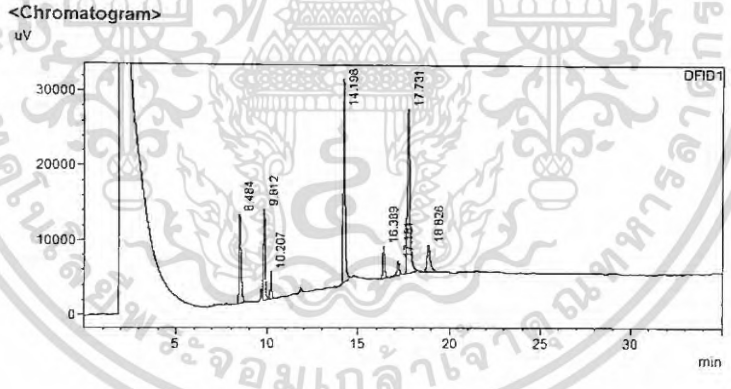
ก



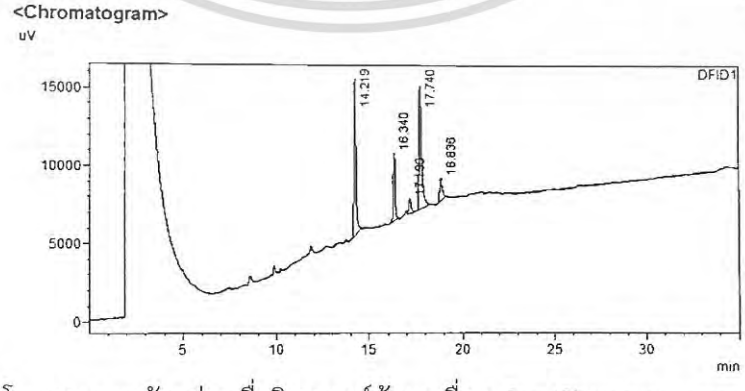
ข



ค



ง



รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมของตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatrography (GC) (ก) ไบโอดีเซลมาตรฐานจากสวนจิตรลดา (ข) SS1003 (ค) SS3005 และ (ง) SN2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบกระบวนการทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท ได้แก่ KS1001 KS1008 KS2002 KS3003 KS3005 SN2002 SN2006 SN2007 SS1003 SS3005 และ SS3007 มาทำการทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การทดสอบออกซิเดส การทดสอบคะตะเลส การทดสอบซิเตรท การทดสอบการเคลื่อนที่ การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) และการเจริญที่อุณหภูมิ 4 41 และ 37 องศาเซลเซียส เซลล์มีลักษณะเป็นรูปท่อน ติดสีแกรมลบ โคโลนีสีขาวเหลือง ผิวเรียบ ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทมีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas* sp. และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลทนี้สามารถเกิดโซนใสบนอาหารแข็งที่มีไตรบิวไทรินเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่มีดัชนีเอนไซม์สูงที่สุดคือ SS1003 SS3005 และ SN2007 ตามลำดับ

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 พบว่าเชื้อมีการเจริญและสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.794 และมีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.131 ยูนิต่อมิลลิลิตร และจึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารสูตรพื้นฐานก่อนการปรับปรุงโดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.752 และมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.103 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาหาชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และมีทริปโตน 0.3 เปอเซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดี มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.783 และมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.119 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรพื้นฐานคิดเป็นร้อยละ 15.53 เปอร์เซ็นต์

การแยกเอนไซม์โดยอาศัยหลักการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 SS3005 และ SN2007 เกิดผลได้จากการตกตะกอนถึง 7 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์ขึ้น 1.6 2.2 และ 15.2 เท่า ตามลำดับ และเมื่อนำเอนไซม์ไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล พบว่าไม่เกิดการสร้างไบโอดีเซล หรือเมทิลเอสเทอร์ อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในการผลิตโอดีเซลมีปริมาณไม่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรนำเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา มาทำการพิสูจน์หรือระบุชนิดของเชื้อ (Identification) ให้ทราบถึงระดับชนิดด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณยีน 16s rRNA

ควรศึกษาหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมและส่งผลต่อการทำงานและกิจกรรมของเอนไซม์ (Characterization of enzyme) เช่น พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น สารลดแรงตึงผิว ตัวทำละลายอินทรีย์ ไอออนของโลหะ และตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เพื่อนำมาใช้ในการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

ควรศึกษาหาปริมาณน้ำ และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่เหมาะสม โดยปริมาณน้ำที่มีอยู่ในระบบควรอยู่ในช่วงที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด ที่จะสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และเกิดผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นไบโอดีเซลได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร เสถียรดี. 2547. "รายงานการวิจัยการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งน้ำทิ้ง." ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

จักรพงศ์ ไชยบุรี และพนิตา สุมานะตระกูล. 2556. "การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากกระดองปลาหมึก." *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา.* 18(2): 1-7.

จันทรนาถ พลชำนิ. 2548. "ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยไลเปสจากแบคทีเรีย." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์หมาวิทยาลัย.

โชตินันท์ จั่นประดิษฐ์ภัสราภรณ์ ธูปเพ็ง และรัชดา ช้างไทย. 2557. "การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล." ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณกัญภัทร จินดา. 2547. "เอนไซม์ไลเปสแหล่งและประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม." *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.* 24(3): 24-25.

ณัฐนันท์ เฉลียวสินติกุล, พิชิตชัย อัศตรศักดิ์ และภานุพงศ์ ช่อประทีป. 2554. "การกลายพันธุ์เชื้อยีสต์โดยแสงอัลตร้าไวโอเลตและการคัดเลือกสายพันธุ์กลายเพื่อเพิ่มการผลิตไบโอดีเซล." โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดุษฎี รัตนพระ. 2549. "การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens*เพื่อผลิตไบโอดีเซล จากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธงชัย พรรณสวัสดิ์. 2550. "**ไบโอดีเซล**" กรุงเทพฯ: กราฟิคคัล. น. 12

นภา ศิวรังสรรค์. 2540. "รายงานวิจัยการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*" ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นวพรรษ คำไส. 2551. "การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดสำโรง โดยการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในไมโครเวฟ." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีพลังงาน คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอ. เอส. พรินติง เฮาส์. 200 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พักตร์พิมล อึ่งเจริญวิวัฒน์. 2552. "การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. **Free fatty acid.** [Online].Available: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1537/free-fatty-acid

ภิเษก รุงโรจนชัยพร และสายรุง ชาวสุภา. 2555. "เทคนิคการตรวจวัดปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในไบโอดีเซล." *วรสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง.* 21(2): 66-77

ศิริกัญญา เรืองศรี. 2552. "การแยกแอมเฟตามีนกับไดเมทิลแอมเฟตามีนในตัวอย่างยาบ้าด้วยวิธี Thin Layer Chromatrography (TLC) และวิธี Gas Chramatrography (GC)." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สุวัฒน์ศักดิ์ ด่านศักดา. 2556. "การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันและน้ำมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากโรงงานปาล์ม." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2555. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์.** พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. น. 15-20

อำพล เลือดสงคราม. 2553. "การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสโดยวิธีทากูชิจากกากเมล็ดสบู่ดำด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง." ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน. 2545. "การโคลนยีน การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. UN16a." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาสงขลานครินทร์.

Atlas, R.M. 2010. **Handbook of Microbiological Media**. 4th ed. Taylor and Francis Group, New York, NY. p. 1635 and 1798.

Bhatti, A.R., Devoe, I.W. and Ingram, J.M. 1976. "Cell Division in *Pseudomonas aeruginosa*: Participation of Alkaline Phosphatase." *Journal of Bacteriology*. 126(1): 400-409.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. and Garrity, G.M. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., vol. 2, parts A, B and C, Springer-Verlag, New York, NY. p. 140-179

Chaiyaso, T. 2007. "Synthesis of Sugar Ester and Fatty Acid Methyl Ester from Palm Oil and Palm Fatty Acid Distillates by Two Bacteria Llipase." Ph. D. Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chartterjee, G. 2012. **Lipid Chemistry.** [Online].Available: http://www.slideshare.net/gangadharchatterjee/my-lipid-chemistry.

David, F., Sandra, P. and Vickers, A.K. 2005. "Column Selection foe the Analysis of Fatty Acid Methyl Ester." *Agilent Technology*. p. 1-12

Dharmsthiti, S. and Luchai, S. 1998. "Lipase from *pseudomonas aeruginosa* LP602 : biochemical properties and application for wastewater treatment." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 21: 75-80.

Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. "Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils." Journal of Bioscience and Bioengineering. 5(92): 405-416.

Gilbert, E.J., Drozd, J.W. and Jones, C.W. 1991. "Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2." *Journal of General Microbiology*. (131): 2215-2221.

Guldhe, A., Singh, P., Kumari, S., Rawat, I., Permaul, K. and Bux, F. 2016. "Biodiesel synthesis from microalgae using immobilize d *Aspergillusniger* whole cell lipase biocatalyst." *Renewable Energy.* (85): 1002-1010.

Jaeger, K-E., and Reetz, T.M. 1998. " Microbial lipases form versatile tools for Biotechnology." *Tibtech.* (16): 396-403.

Ji, Q., Xiao, S., He, B. and Liu, X. 2010. "Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonasaeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production." *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic.* (66): 264–269.

Kuan, I., Lee, C., Tsai, B., Lee, S., Lee, W. and Yu, C. 2013. "Optimizing the Production of Biodiesel Using Lipase Entrapped in Biomimetic Silica." *Energies*. (6): 2052-2064.

Kulkarni, N. and Gadre R.V. 2002. "Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. (28): 344–348.

Li, Q. and Yan, Y. 2010. "Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapiumsebiferum* oil in micro-aqueous phase." *Applied Energy*. (87): 3148–3154.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. "Protein Meturement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry*. (193): 265-275.

Macrae, A.R. 1983. "Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats." *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 60(2): 291-292.

Mahanta, N., Gupta, A. and Khare, S.K.. 2008. "Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using Jatroa curcas seed cake as substrate." *Bioresource Technology*. (99): 1729–1735.

Marchetti, J.M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2007. "Possible methods for biodiesel production." *Renewable and Sustainable Energy Reviews.*11 : 1300–1311.

Mitra, D., Mondal, A.K., Mondol, M. and Mukhopadhyay A. 2014. "Plant Growth Promoting Traits and Prospects of Using Phosphate Solubilizing *Psuedomonas* sp. Isolated from Laterite soil." *Annals Food Science and Technology*. 309-315.

Mobarak, Q.E., Kasra, K.R. and Moosavi, N.Z.. 2011. "Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110." *Journal of microbiology*. 92-98.

Mohamed, A.A., Ahmed, M.E. and Taher, A.A. 2013. "New Colorimetric Method for Lipases Activity Assay in Microbial Media." *American Journal of Analytical Chemistry*. (4): 442-444.

Nishio, T., Chikano, T. and Kamimura, M. 1987. "Purification and Some Properties of Lipase Produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B" *Agricultural and Biological Chemistry.* 51(1): 181-186.

Noormohamadi, R., Tabandeh, F., Shariati, P. and Otadi, M. 2013. "Characterization of a lipase from a newly isolated *Pseudomonas* sp." *Iranian Journal of Microbiology*. 5(4): 422-427.

Noureddini, H., Gao, X. and Philkana, R.S.. 2005. "Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil." *Bioresource Technology.* (96): 769–777.

Ramesh, K.N., Thirumalai, A.V., and Gunasekaran, P. 2002. "Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*." *Current Science*. 82(12): 1463-1466.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ruchi, G., Anshu, G. and Khare, S. K. 2008. "Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain : Production optimization by response surface methodology and application." *Bioresource Technology*. 99: 4796-4802.

Salis, A., Pinna M., Monduzzi, M. and Solinas V. 2005. "Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis." *Journal of Biotechnology*. (119): 291–29.

Sujatha, K. and Dhandayuthapani, K. 2013. "Optimization of process parameters for the extracellular lipase production by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* KDP." *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 2(7): 116-122.

Shukla, B. N. and Desai, P. V. 2016. "Isolation, Characterization and Optimization of Lipase Producing *Pseudomonas* spp. from Oil Contaminated Sites." International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 5(5): 902-909.

Tembhurkar, V.R., Kulkarni, M.B. and Peshwe, S.A. 2012. "Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture." *Science Research Reporter*. 2(1): 46-50.

Tripathia, R., Singha, J., Bhartia, R.K. and Thakura, I.S. 2014. "Isolation, Purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production." *Energy Procedia*. (54): 518-529.

Veerapagu, M., Narayanan, A.S., Ponmurugan, K. and Jeya, K.R. 2013. "Screening Selection Identification Production and Optimizaion of Bacterial Lipase From Oil Spilled Soil." *Asian Journal of Phamaceutical and Clinical Research*. 3(6): 62-67.

Yamane, T. 1987. "Enzyme Technology for the Lipids Industry: An Engineering Overview." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 64(12): 1657-1658.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal medium)

สูตรอาหาร

Tryptone	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2$	0.15	กรัม
Olive oil	1.0	เปอร์เซ็นต์ (v/v)
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA)

สูตรอาหาร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดเติมน้ำกลั่นละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นต้มพร้อมกับคนด้วยแท่งแก้ว รอจนส่วนผสมเดือดประมาณ 1 นาที ปรับ พีเอช ให้ได้ประมาณ 7.0 ถ้าอาหารเป็นกรดหรือด่างมากเกินไปให้ปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้ พีเอช ประมาณ 7.0 ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

สูตรอาหาร

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

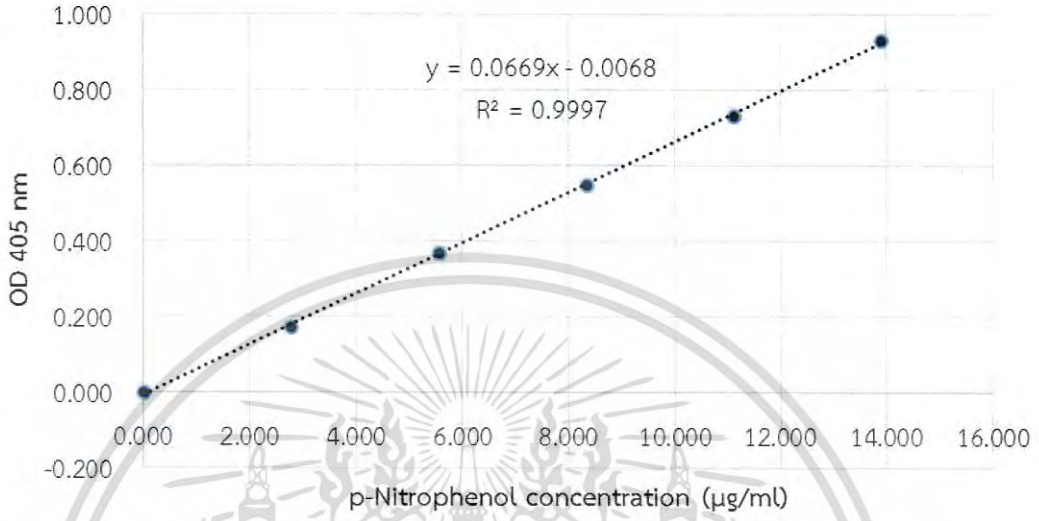
ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดเติมน้ำกลั่นละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันคนด้วยแท่งแก้ว จนส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันดี ปรับพีเอช ให้ได้ประมาณ 7.0 ถ้าอาหารเป็นกรด หรือด่างมากเกินไปให้ปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้พีเอช ประมาณ 7.0 ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

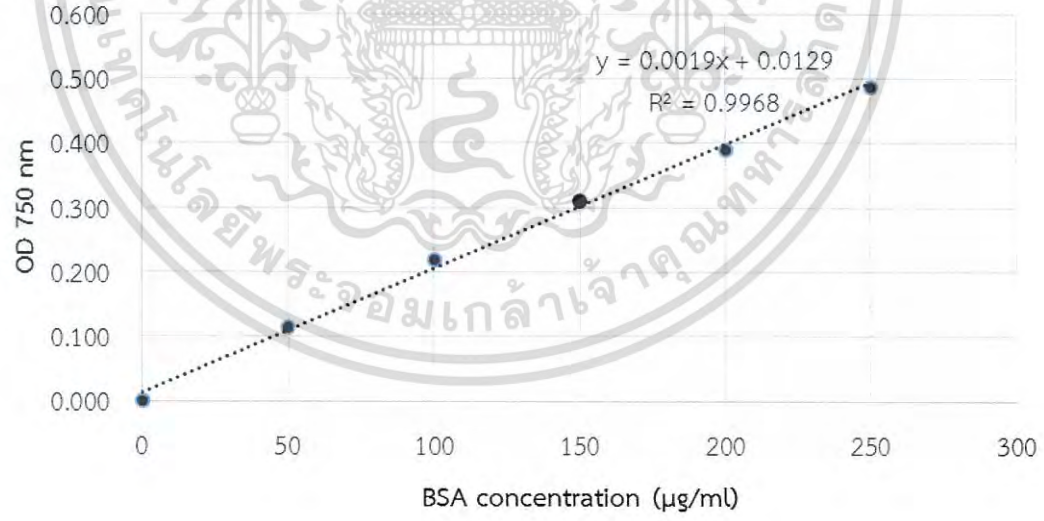
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสาร p-Nitrophenol (p-NP) ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์



2. กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin ในการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's method



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

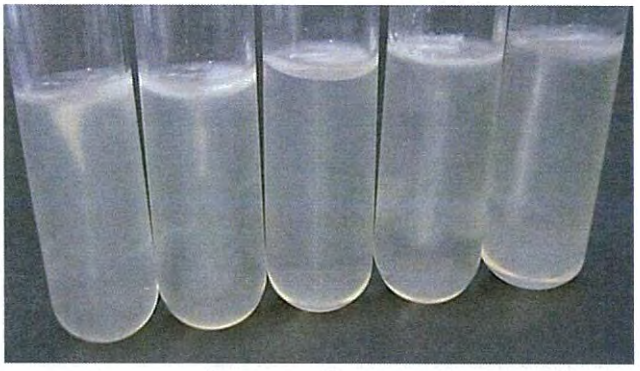
ภาคผนวก ค

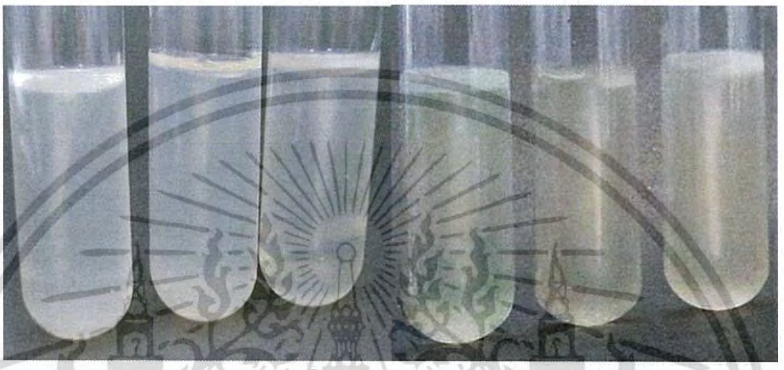
ผลการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และผลการทดสอบกระบวนการทางชีวเคมีเบื้องต้น

รูปที่ ค.1 ผลการจริญบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

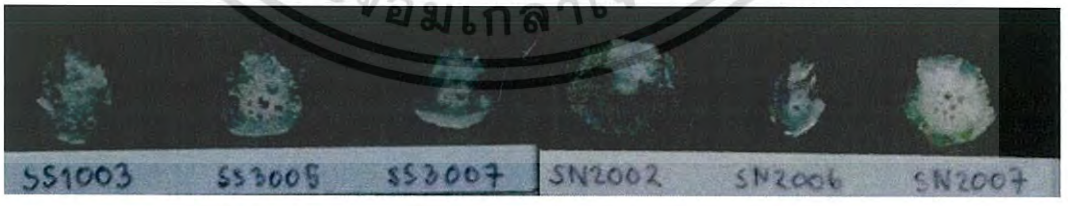
รูปที่ ค.2 ผลการจริญบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



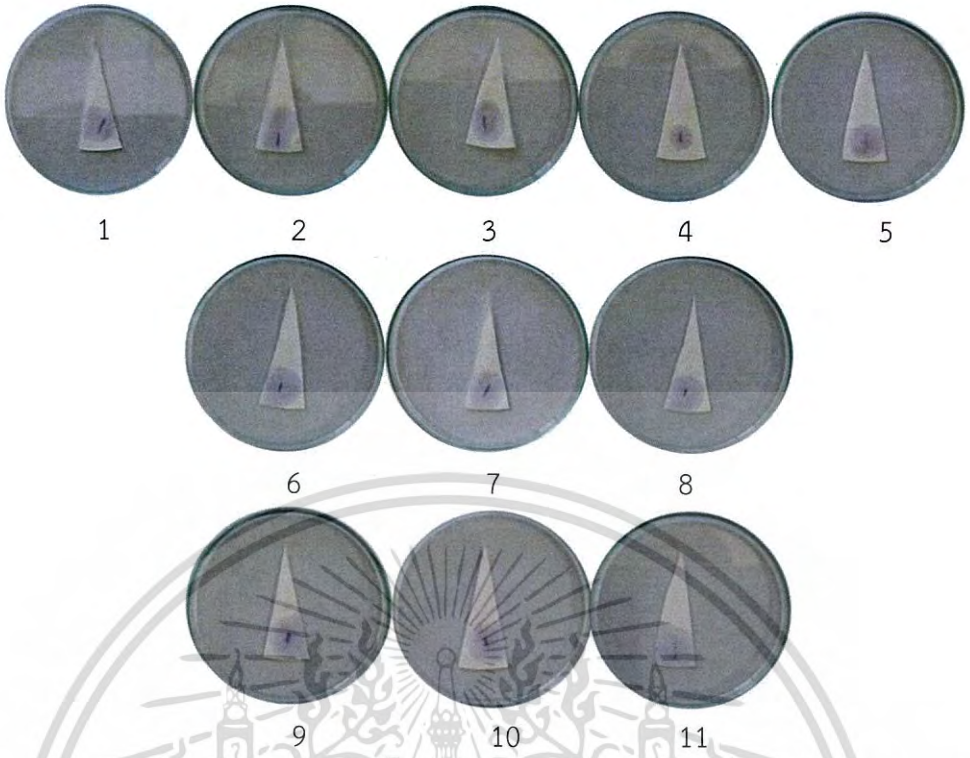


รูปที่ ค.3 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งเหลวของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท (1) KS1001 (2) KS1008 (3) KS2002 (4) KS3003 (5) KS3005 (6) SN2002 (7) SN2006 (8) SN2007 (9) SS1003 (10) SS3005 (11) SS3007



รูปที่ ค.4 ผลการทดสอบคะตะเลสของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

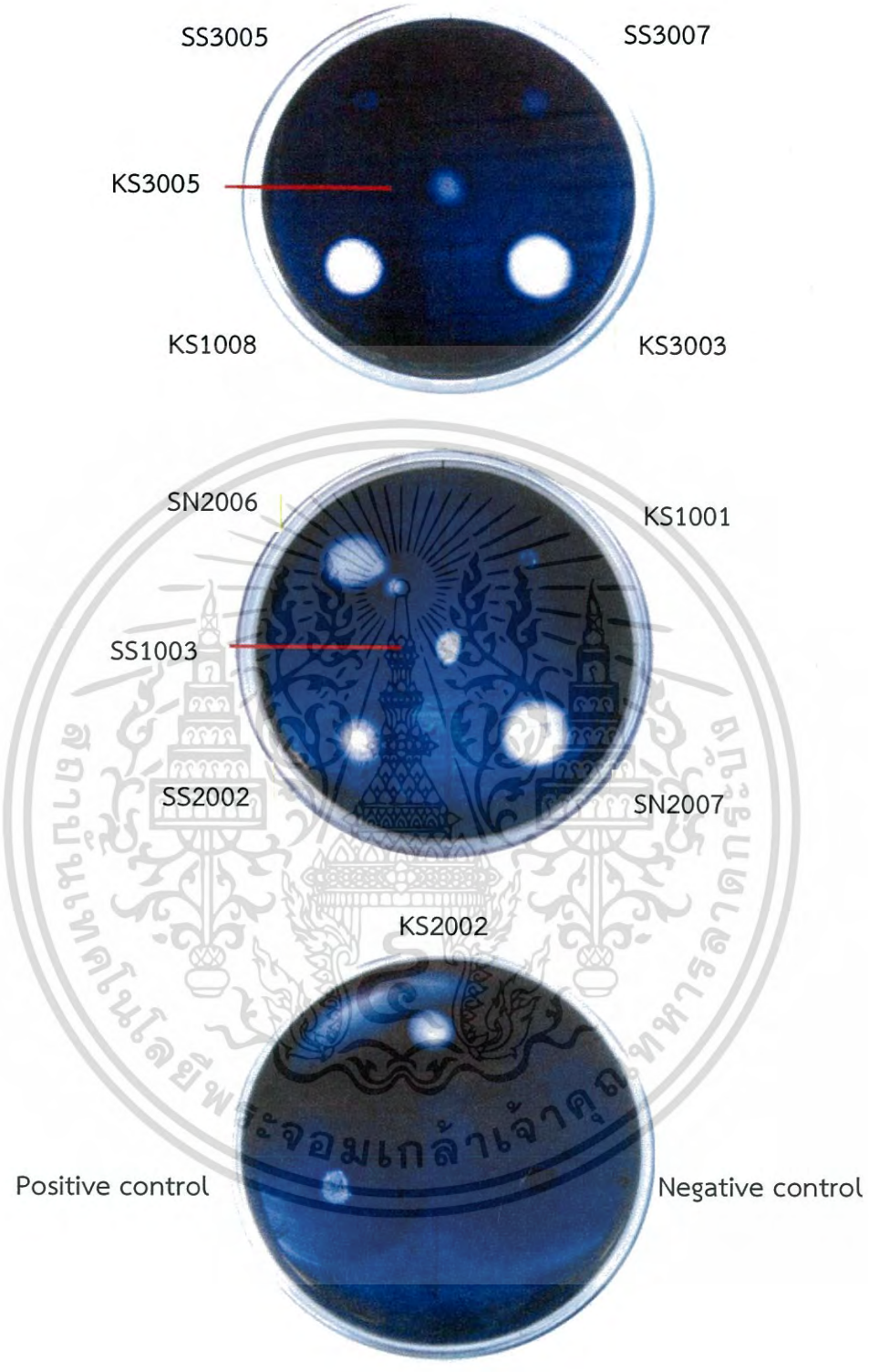
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.5 ผลการทดสอบออกซิเดสของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท (1) KS1001 (2) KS1008 (3) KS2002 (4) KS3003 (5) KS3005 (6) SN2002 (7) SN2006 (8) SN2007 (9) SS1003 (10) SS3005 (11) SS3007

รูปที่ ค.6 ผลการทดสอบซิเตรทบนอาหาร Simmons citrate agar ของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.7 ผลการทดสอบการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) ของเชื้อแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ผลดัชนีของเอนไซม์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. 11 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปส นำมาหาค่าดัชนีเอนไซม์ของแต่ละไอโซเลท โดยทำการวัด 4 ซ้ำ ไอโซเลทที่ให้ค่าดัชนีเอนไซม์สูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟเคชัน พบว่าไอโซเลท SS1003 SS3005 และ SN2007 มีค่าดัชนีเอนไซม์สูงที่สุด

ตารางภาคผนวก ง ผลดัชนีเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. 11 ไอโซเลท

รหัส	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm)				เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (mm)				ค่าเฉลี่ยโคโลนี	ค่าเฉลี่ยโซนใส	ดัชนีเอนไซม์
KS1001	7.08	7.67	6.56	7.55	13.15	13.45	11.24	12.97	7.22	12.70	1.76 ± 0.06^{cde}
KS1008	8.32	8.53	6.95	8.40	13.67	13.23	13.65	14.77	8.05	13.83	1.72 ± 0.17^{cde}
KS2002	5.32	5.17	5.17	5.02	9.50	8.14	8.53	8.12	5.17	8.57	1.65 ± 0.09^{de}
KS3003	7.43	7.11	6.8	7.21	12.51	11.78	12.5	12.81	7.14	12.40	1.73 ± 0.08^{cde}
KS3005	6.56	6.33	6.23	5.92	12.61	12.53	12.3	12.53	6.26	12.49	1.99 ± 0.08^{cd}
SN2002	8.19	7.27	6.81	7.47	12.75	12.13	12.83	12.43	7.44	12.54	1.69 ± 0.13^{cde}
SN2006	9.92	8.59	7.93	7.72	12.73	13.9	13.16	12.98	8.54	13.19	1.56 ± 0.18^{e}
SN2007	3.34	2.06	2.34	2.73	6.09	6.41	6.22	5.78	2.62	6.13	2.42 ± 0.57^{b}
SS1003	5.34	6.23	5.71	6.16	16.27	16.56	16.57	16.84	5.86	16.56	2.83 ± 0.17^{a}
SS3005	4.32	3.87	4.03	3.97	9.69	9.76	10.08	9.78	4.05	9.83	2.43 ± 0.12^{b}
SS3007	4.57	5.5	4.74	5.08	10.36	12.03	8.92	9.31	4.97	10.16	2.04 ± 0.21^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=4$, $p<0.05$)

ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=4$, $p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ทำการเพราะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เก็บผลที่เวลา 0 6 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวก จ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตรของการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ค่าการดูดกลืนแสงที่	ชั่วโมงที่						
	0	6	12	24	36	48	72
660 nm	0.024	0.682	0.711	0.777	0.762	0.777	0.724
	0.035	0.686	0.762	0.775	0.768	0.803	0.781
	0.029	0.683	0.77	0.771	0.807	0.802	0.761
ค่าเฉลี่ย	0.029	0.684	0.748	0.774	0.779	0.794	0.755
405 nm	0.090	0.215	0.301	0.262	0.774	1.128	0.816
	0.125	0.165	0.307	0.308	0.767	1.041	0.764
	0.105	0.222	0.367	0.379	1.121	1.474	0.817
ค่าเฉลี่ย	0.107	0.201	0.325	0.317	0.888	1.215	0.799
กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)	0.012 ± 0.001^{c}	0.022 ± 0.003^{c}	0.035 ± 0.003^{c}	0.034 ± 0.006^{c}	0.096 ± 0.021^{b}	0.131 ± 0.026^{a}	0.086 ± 0.003^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (n=3, $p<0.05$)
ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (n=3, $p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v), น้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v), กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v), ซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ ไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เก็บผลที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวก ฉ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตรของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ค่าการดูดกลืนแสงที่	แหล่งคาร์บอน				
	กลูโคส 1%(w/v)	ซูโครส 1%(w/v)	น้ำมันปาล์ม 1% (v/v)	น้ำมันมะกอก 1% (v/v)	ไตรบิวไทริน 1% (v/v)
660 nm	0.715	0.439	0.740	0.759	0.420
	0.718	0.451	0.742	0.760	0.422
	0.740	0.450	0.761	0.766	0.423
	0.742	0.438	0.762	0.736	0.353
	0.754	0.452	0.761	0.737	0.347
ค่าเฉลี่ย	0.734	0.446	0.753	0.752	0.393
SD	0.017	0.007	0.011	0.014	0.039
405 nm	0.861	0.571	0.818	0.919	0.870
	0.877	0.581	0.842	0.968	0.857
	0.882	0.542	0.853	0.964	0.814
	0.874	0.527	0.824	0.931	0.883
	0.878	0.567	0.867	0.978	0.905
ค่าเฉลี่ย	0.874	0.558	0.841	0.921	0.866
กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)	0.094 ± 0.008^{b}	0.061 ± 0.002^{d}	0.091 ± 0.002^{c}	0.103 ± 0.002^{a}	0.094 ± 0.003^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช
ผลการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีปริมาณน้ำมันมะกอกที่แตกต่างกับเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ 0, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เก็บผลที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวก ช ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตรของการศึกษาปริมาณของน้ำมันมะกอก (แหล่งคาร์บอน) ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ค่าการดูดกลืนแสงที่	น้ำมันมะกอก				
	0%(v/v)	1%(v/v)	2%(v/v)	3%(v/v)	4%(v/v)
660 nm	0.287	0.790	0.809	0.781	0.762
	0.290	0.819	0.813	0.772	0.780
	0.289	0.826	0.824	0.751	0.749
	0.289	0.768	0.803	0.769	0.760
	0.286	0.767	0.858	0.748	0.750
ค่าเฉลี่ย	0.288	0.794	0.821	0.764	0.760
SD	0.002	0.028	0.022	0.014	0.012
405 nm	0.049	0.944	0.946	0.836	0.892
	0.052	0.958	0.975	0.825	0.905
	0.057	0.985	1.038	1.03	1.059
	0.074	1.006	1.054	1.006	1.099
	0.074	1.009	1.079	1.01	1.004
ค่าเฉลี่ย	0.061	0.980	1.018	0.941	0.992
กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)	0.007 ± 0.001^{b}	0.106 ± 0.003^{a}	0.110 ± 0.005^{a}	0.101 ± 0.010^{a}	0.107 ± 0.009^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ
ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v)โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ทริปโตนยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟตและ ทริปโตน : ยีสต์สกัด : แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เก็บผลที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวก ซ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตรของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ค่าการดูดกลืนแสงที่	แหล่งไนโตรเจน			
	ทริปโตน 0.3%(w/v)	ยีสต์สกัด 0.3%(w/v)	แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3% (w/v)	ทริปโตน : ยีสต์สกัด : แอมโมเนียมซัลเฟต 0.3% (w/v)
660 nm	0.668	0.737	0.342	0.757
	0.665	0.746	0.317	0.730
	0.644	0.725	0.305	0.719
	0.656	0.702	0.321	0.726
	0.645	0.768	0.303	0.735
ค่าเฉลี่ย	0.656	0.736	0.318	0.733
SD	0.011	0.025	0.016	0.014
405 nm	1.060	0.650	0.491	0.743
	1.068	0.654	0.454	0.710
	1.071	0.650	0.472	0.751
	1.072	0.635	0.465	0.754
	1.078	0.597	0.481	0.747
ค่าเฉลี่ย	1.070	0.637	0.473	0.741
กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)	0.115 ± 0.007^{a}	0.069 ± 0.002^{c}	0.052 ± 0.001^{d}	0.080 ± 0.001^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฌ
ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท SS1003 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันมะกอก 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v)โดยใช้ปริมาณทริปโตนที่แตกต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เก็บผลที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์อัตราการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

ตารางภาคผนวก ฌ ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 และ 405 นาโนเมตรของการศึกษาปริมาณของทริปโตน (แหล่งไนโตรเจน) ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

ค่าการดูดกลืนแสงที่	ทริปโตน			
	0.1%(w/v)	0.2%(w/v)	0.3%(w/v)	0.4%(w/v)
660 nm	0.695	0.788	0.793	0.749
	0.636	0.796	0.762	0.716
	0.634	0.767	0.781	0.732
	0.653	0.762	0.795	0.724
	0.642	0.791	0.784	0.736
ค่าเฉลี่ย	0.652	0.781	0.783	0.731
SD	0.025	0.015	0.013	0.012
405 nm	0.934	0.723	1.107	0.687
	0.935	1.035	1.076	0.683
	0.952	0.788	1.146	0.670
	0.978	1.067	1.063	0.681
	0.986	0.790	1.101	0.713
ค่าเฉลี่ย	0.814	0.767	0.966	0.639
กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)	0.103 ± 0.002^{b}	0.095 ± 0.017^{b}	0.119 ± 0.003^{a}	0.074 ± 0.001^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

ตัวอักษรต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($n=5$, $p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ญ
การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ไมโครโมลของ p-NP ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน x การเจือจางของเอนไซม์}}{\text{ระยะเวลาการบ่ม x ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรม}}$$

โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ไลเปส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็น p-NP 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต)} = \text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) x ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}$$

$$\text{กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)}}$$

$$\text{ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดในแต่ละขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ x 100}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดของ crude}}$$

$$\text{จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์} = \frac{\text{กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์}}{\text{กิจกรรมเฉพาะของ crude}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฎ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติของดัชนีเอนไซม์

Descriptives

a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ks1001	4	1.7605564	.06698286	.03349143	1.6539717	1.8671410	1.71341	1.85734
ks1008	4	1.7290969	.17811534	.08905767	1.4456756	2.0125181	1.55100	1.96403
ks2002	4	1.6569039	.09126354	.04563177	1.5116832	1.8021245	1.57447	1.78571
ks3003	4	1.7388676	.08382240	.04191120	1.6054875	1.8722477	1.65682	1.83824
ks3005	4	1.9981477	.08305939	.04152969	1.8659817	2.1303137	1.92226	2.11655
sn2002	4	1.6933152	.13720668	.06860334	1.4749887	1.9116416	1.55678	1.88399
sn2006	4	1.5605737	.18671949	.09335974	1.2634613	1.8576861	1.28327	1.68135
sn2007	4	2.4275849	.57228100	.28614050	1.5169581	3.3382117	1.82335	3.11165
ss1003	4	2.8351538	.17405465	.08702732	2.5581940	3.1121136	2.65811	3.04682
ss3005	4	2.4324340	.12855317	.06427659	2.2278772	2.6369908	2.24306	2.52196
ss3007	4	2.0421912	.21692725	.10846362	1.6970116	2.3873709	1.83268	2.26696
Total	44	1.9886205	.43898420	.06617936	1.8551571	2.1220839	1.28327	3.11165

ANOVA

a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.686	10	.669	13.784	.000
Within Groups	1.601	33	.049		
Total	8.286	43			

Duncan[a]

	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
sn2006	4	1.5605737				
ks2002	4	1.6569039	1.6569039			
sn2002	4	1.6933152	1.6933152	1.6933152		
ks1008	4	1.7290969	1.7290969	1.7290969		
ks3003	4	1.7388676	1.7388676	1.7388676		
ks1001	4	1.7605564	1.7605564	1.7605564		
ks3005	4		1.9981477	1.9981477		
ss3007	4			2.0421912		
sn2007	4				2.4275849	
ss3005	4				2.4324340	
ss1003	4					2.8351538
Sig.		.269	.061	.055	.975	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติของช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

Descriptives

a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	3	.0121922	.00188680	.00108934	.0075052	.0168793	.01040	.01416
6	3	.0222928	.00334025	.00192849	.0139951	.0305904	.01846	.02459
12	3	.0356527	.00392164	.00226416	.0259108	.0453946	.03307	.04017
24	3	.0347214	.00633361	.00365671	.0189878	.0504550	.02888	.04146
36	3	.0960766	.02174743	.01255588	.0420530	.1501002	.08315	.12118
48	3	.1312135	.02461157	.01420950	.0700750	.1923521	.11259	.15912
72	3	.0865850	.00325742	.00188067	.0784932	.0946769	.08282	.08852
Total	21	.0598192	.04380350	.00955871	.0398801	.0797583	.01040	.15912

ANOVA

a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.036	6	.006	36.279	.000
Within Groups	.002	14	.000		
Total	.038	20			

Duncan[a]

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	.0121922		
6	3	.0222928		
24	3	.0347214		
12	3	.0356527		
72	3		.0865850	
36	3		.0960766	
48	3			.1312135
Sig.		.057	.382	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

Descriptives

a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
glu	5	.094687	.0008616	.0003853	.093617	.095757	.0932	.0955
su	5	.060646	.0023998	.0010732	.057666	.063626	.0574	.0632
palm	5	.091077	.0021749	.0009727	.088376	.093777	.0886	.0939
olive	5	.103025	.0027427	.0012266	.099620	.106431	.0995	.1058
tri	5	.093763	.0036482	.0016315	.089233	.098293	.0882	.0980
Total	25	.088640	.0150346	.0030069	.082434	.094846	.0574	.1058

ANOVA

a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	4	.001	206.495	.000
Within Groups	.000	20	.000		
Total	.005	24			

Duncan[a]

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
su	5	.060646			
palm	5		.091077		
tri	5		.093763	.093763	
glu	5			.094687	
olive	5				.103025
Sig.		1.000	.109	.570	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

Descriptives

a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0%	5	.0073068	.00129256	.00057805	.0057018	.0089117	.00600	.00868
1%	5	.1060769	.00309623	.00138468	.1022324	.1099213	.10217	.10915
2%	5	.1101601	.00599455	.00268084	.1027168	.1176033	.10238	.11667
3%	5	.1018862	.01092996	.00488803	.0883149	.1154576	.08938	.11141
4%	5	.1073018	.00985560	.00440756	.0950645	.1195392	.09658	.11882
Total	25	.0865463	.04106675	.00821335	.0695948	.1034979	.00600	.11882

ANOVA

a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.039	4	.010	186.799	.000
Within Groups	.001	20	.000		
Total	.040	24			

Duncan[a]

	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0%	5	.0073068	
3%	5		.1018862
1%	5		.1060769
4%	5		.1073018
2%	5		.1101601
Sig.		1.000	.113

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

Descriptives

a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
tryptone	5	.1156831	.00070625	.00031584	.1148062	.1165600	.11463	.11656
yeast	5	.0691993	.00253756	.00113483	.0660485	.0723500	.06488	.07100
ammo	5	.0515126	.00153209	.00068517	.0496103	.0534150	.04951	.05349
mix	5	.0803528	.00191464	.00085625	.0779755	.0827301	.07702	.08175
Total	20	.0791869	.02411219	.00539165	.0679021	.0904718	.04951	.11656

ANOVA

a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.011	3	.004	1131.922	.000
Within Groups	.000	16	.000		
Total	.011	19			

Duncan[a]

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ammo	5	.0515126			
yeast	5		.0691993		
mix	5			.0803528	
tryptone	5				.1156831
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ข้อมูลการวิเคราะห์สถิติของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

Descriptives

a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0.1%	5	.1035625	.00258779	.00115730	.1003493	.1067757	.10109	.10668
0.2%	5	.0953531	.01700712	.00760581	.0742360	.1164703	.07842	.11538
0.3%	5	.1187777	.00344065	.00153871	.1145056	.1230499	.11495	.12387
0.4%	5	.0745289	.00171318	.00076616	.0724017	.0766561	.07272	.07734
Total	20	.0980556	.01827503	.00408642	.0895026	.1066085	.07272	.12387

ANOVA

a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	3	.002	21.897	.000
Within Groups	.001	16	.000		
Total	.006	19			

Duncan[a]

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0.4%	5	.0745289		
0.2%	5		.0953531	
0.1%	5		.1035625	
0.3%	5			.1187777
Sig.		1.000	.160	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้