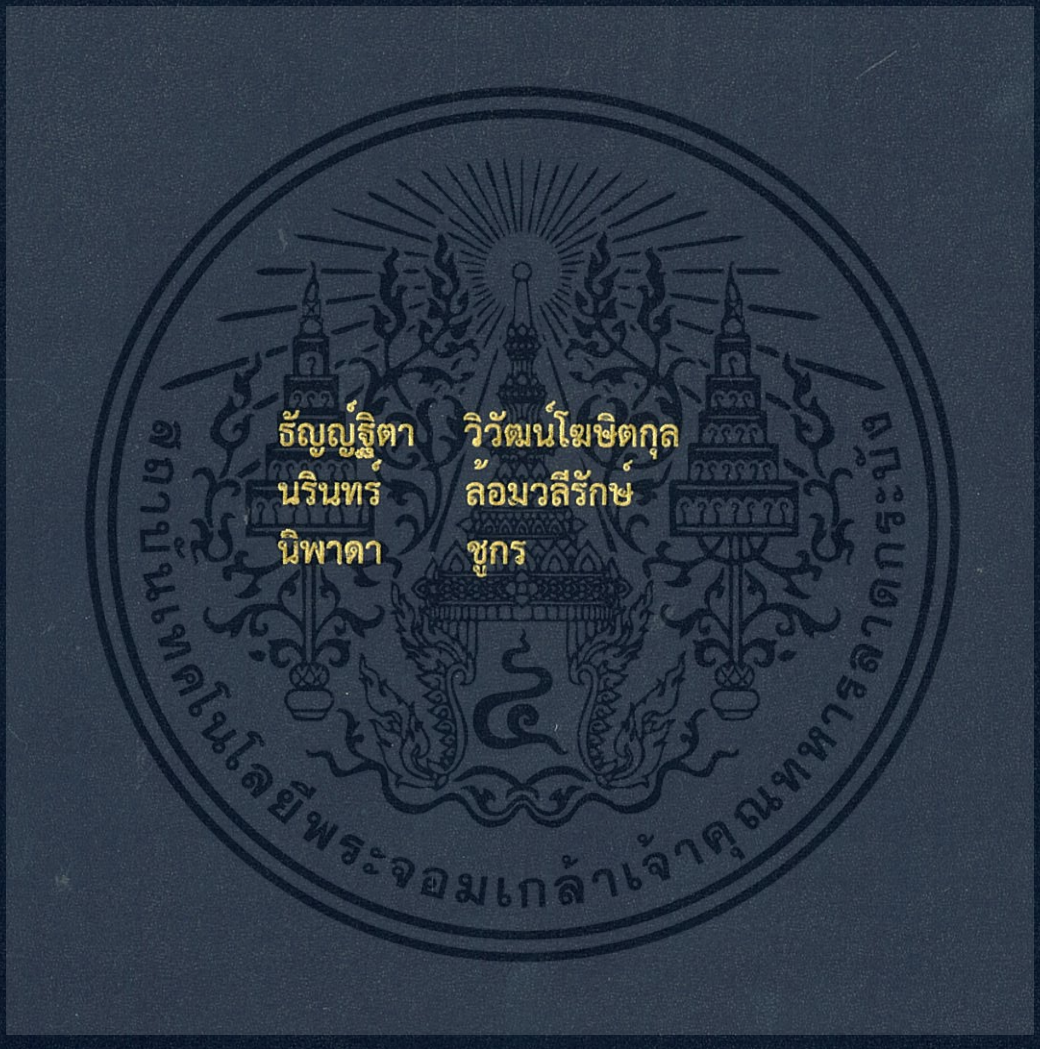
การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากถังหมักก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน

ISOLATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM BIOGAS FERMENTER FOR USED OIL AND GREASE DEGRADATION



ธัญญ์ฐิตา วิวัฒน์โฆษิตกุล
นรินทร์ ล้อมวลีรักษ์
นิพาดา ชูกร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากถังหมักก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน

ISOLATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM BIOGAS FERMENTER FOR USED OIL AND GREASE DEGRADATION

ธัญญ์ฐิตา วิวัฒน์โฆษิตกุล
นรินทร์ ล้อมวลีรักษ์
นิพาดา ชูกร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM BIOGAS FERMENTER FOR USED OIL AND GREASE DEGRADATION

THANTITA WIWATKHOSITKUL
NARIN LOMWALEERAK
NIPADA CHUGORN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE (ENVIRONMENTAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากถังหมักก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน
ISOLATION OF LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM BIOGAS FERMENTER FOR USED OIL AND GREASE DEGRADATION

ชื่อนักศึกษา นางสาวธัญญ์ฐิตา วิวัฒน์โฆษิตกุล รหัสนักศึกษา 57050604
นายนรินทร์ ล้อมวลีรักษ์ รหัสนักศึกษา 57050608
นางสาวนิพาดา ชูกร รหัสนักศึกษา 57050613

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.กานต์ วงศาริยะ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.เอกรัฐ เดชศรี ประธานกรรมการ	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการ	
ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากถังหมักก๊าซชีวภาพเพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน

ชื่อนักศึกษา นางสาวธัญญ์ฐิตา วิวัฒน์โฆษิตกุล รหัสนักศึกษา 57050604
นายนรินทร์ ล้อมวลีรักษ์ รหัสนักศึกษา 57050608
นางสาวนิพาดา ชูกร รหัสนักศึกษา 57050613

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีสิ่งแวดล้อม)

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.กานต์ วงศาริยะ

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและกากไขมันจากบ่อดักไขมัน ด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากถังหมักก๊าซชีวภาพ โดยทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียโดยการเจือจางลำดับส่วน จากนั้น Spread Plate บนอาหารแข็ง Tryptone soya agar ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Corn oil agar ด้วยวิธี Simple Streak Technique วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Spot Test บนอาหารแข็ง Tryptone soya agar ผสมไตรบิวทิรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน จากนั้น นำเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุด ไปศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ในอาหารเหลว Mineral growth medium ที่ประกอบด้วย Tween 80 ร้อยละ 0.01 โดยปริมาตร ความเข้มข้นของน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันร้อยละ 2 โดยปริมาตร ศึกษาระยะเวลาการย่อยสลายที่ 0, 7, 15 วัน ในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นำระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองไปศึกษาความเข้มข้นเหมาะสมของน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันที่ร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 โดยปริมาตร วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยวิธีมาตรฐาน Official method for fatty acids จากผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 88 ไอโซเลท โดยมี 9 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ จากผลการวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยไขมันพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 48 เจริญเติบโตเร็วและมีความสามารถในการย่อยน้ำมันทั้ง 4 ประเภท ได้แก่ ไตรบิวทิรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน โดยเกิดวงใสรอบโคโลนีกว้างที่สุด จากผลการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ความเข้มข้นน้ำมันปาล์มใช้แล้วร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร และกากไขมันร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ระยะเวลาบ่ม 7 วัน แบคทีเรียไอโซเลท 48 สามารถย่อยน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันได้กรดไขมันอิสระร้อยละ 71.34 โดยน้ำหนักและร้อยละ 15.22 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

คำสำคัญ : กากไขมัน น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of Lipase Producing Bacteria from Biogas Fermenter for Used Oil and Grease Degradation
Students	Ms. Thantita Wiwatkhositkul Student ID 57050604
	Mr. Narin Lomwaleerak Student ID 57050608
	Ms. Nipada Chugorn Student ID 57050613
Degree	Bachelor of Science (Environmental Chemistry)
Department	Chemistry
Academic year	2017
Advisor	Asst. Prof. Dr. Suwannee Junyapoon
Co-Advisor	Dr. Karn Wongsariya

Abstract

This special project studied the degradation of used palm oil and grease from grease trap using lipase producing bacteria isolated from biogas fermentor. Bacteria were isolated from feed part of biogas fermenter using Serial Dilution and Spread Plate Techniques on Tryptone soya agar. Then, bacteria produced lipase were isolated using Simple Streak Technique on Corn oil agar. Lipase activity was analyzed using Spot Test on Tryptone soya agar mixed with tributyrin, palm oil, used palm oil and grease. Bacteria containing high lipase activity were investigated for degradation efficiency of used palm oil and grease. Amount of 5% by volume of inoculum was added into Mineral growth medium containing 0.01% by volume of Tween 80 and 2% by volume of used palm oil or grease. The experiment was carried out under room temperature in a shaking incubator at 150 rpm for 0, 7 and 15 days. Amounts of used palm oil and grease were varied at 0.5, 1 and 2 % by volume using optimum incubation period obtained from the experiment. Free fatty acids obtained from used oil and grease degradation were measured by Official method for fatty acids (AOCS, 2012). The experimental results showed that 88 isolates of bacteria were found and 9 isolates were lipase producing bacteria. Isolate No. 48 had wildest clear zones in four types of oils and grease (tributyrin, palm oil, used palm oil and grease) indicating the best lipase enzyme activity. It was found that the optimum conditions of the degradation were 1 % by volume of used palm oil and 2 % by volume of grease with incubation period for 7 days. Under these conditions, 71.34 % and 15.22 % of free fatty acids were produced from used palm oil and grease, respectively.

Keywords: Grease, Used palm oil, Lipase producing bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากทุกๆท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุวรรณี จรรยาพูน ที่คอยสนับสนุนโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างดี ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.กานต์ วงศาริยะ ที่คอยดูแลและให้คำแนะอย่างใกล้ชิดตั้งแต่ก้าวแรกของการเริ่มต้น จึงทำให้การทำโครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยา อาคารวิทยาศาสตร์ นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาเคมี อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 และอาคารพระจอมเกล้า ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำการทดลอง และให้คำแนะนำตลอดจนการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ ทำให้การทำโครงงานพิเศษสำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำนักสิ่งแวดล้อมกรุงเทพมหานคร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างจุลินทรีย์ในถังหมักก๊าซชีวภาพ

ขอขอบคุณ เพื่อนๆที่ให้กำลังใจและให้คำแนะนำที่หลากหลาย ทำให้เกิดแนวคิดใหม่ๆในการทำงาน เป็นส่วนหนึ่งในการทำให้โครงงานพิเศษมีความสมบูรณ์มากขึ้น

ธัญญ์ฐิตา วิวัฒน์โฆษิตกุล
นรินทร์ ล้อมวลีรักษ์
นิพาดา ชูกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญรูปภาพ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ที่มาและความสำคัญ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ..... 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 ไขมัน (Lipid)..... 4
2.1.1 องค์ประกอบของไขมัน..... 4
2.1.2 สมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมัน..... 5
2.1.3 สมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมัน..... 5
2.1.4 ประเภทของไขมันและน้ำมัน..... 6
2.2 น้ำมันที่ใช้แล้ว..... 6
2.3 กากไขมัน..... 8
2.4 วิธีการกำจัดน้ำมันและไขมัน..... 8
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... 16
3.1.1 อุปกรณ์..... 16
3.1.2 สารเคมี..... 16
3.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้คัดแยกเชื้อ..... 17
3.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส..... 18
3.4 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้..... 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.1 การตรวจสอบรูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 18
3.4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 19
3.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมัน 19
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum) 19
3.5.2 การย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในสภาวะมีอากาศด้วยแบคทีเรีย 19
1) การย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Tryptone soya broth 20
1.1) ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียด้วยอาหาร Triple Sugar Iron Agar 20
2) การย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Mineral growth medium 20
2.1) วิธีปรับสภาพกากไขมัน 20
2.2) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน 20
2.3) ศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่เหมาะสม 21
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 21

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 22
4.1.1 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 22
4.1.2 ผลการศึกษาการกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย 24
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน 26
4.2.1 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Tryptone soya broth 26
4.2.2 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Mineral growth medium 27
1) ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Minearal growth medium 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.) ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในอาหาร Minearal growth medium..... 28

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย..... 30

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 30

เอกสารอ้างอิง..... 31

ภาคผนวก..... 35

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 36

ภาคผนวก ข. วิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ..... 39

ภาคผนวก ค. ข้อมูลผลการทดลอง..... 41

ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของกากไขมันจากบ่อดักไขมันของครัวเรือน	8
2.2	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า	11
4.1	ผลการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Corn oil agar และชนิดของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้	23
4.2	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ ไตรบิวทิรีน น้ำมันปาล์ม น้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน	25
ค.1.1	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมไตรบิวทิรีน ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	41
ค.1.2	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมไตรบิวทิรีน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	42
ค.1.3	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมไตรบิวทิรีน ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	42
ค.1.4	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	43
ค.1.5	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	43
ค.1.6	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	44
ค.1.7	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	45
ค.1.8	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	45
ค.1.9	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	46
ค.1.10	ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมกากไขมัน ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค.1.11 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมกากไขมัน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง..... 47
ค.1.12 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมกากไขมัน ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง..... 48
ค.2.1 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในอาหาร Mineral growth medium (MGM)..... 49
ค.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในอาหาร Mineral growth medium (MGM)..... 50
ง.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าเวลาในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน..... 51
ง.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าเวลาในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้ว..... 52
ง.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าเวลาในการย่อยสลายกากไขมัน..... 53
ง.4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าความเข้มข้นในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน..... 54
ง.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าความเข้มข้นในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้ว..55
ง.6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าความเข้มข้นในการย่อยสลายกากไขมัน.. 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์	4
2.2	แผนภูมิปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในน้ำมันในระหว่างการทอดอาหาร	7
2.3	การทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปส	9
2.4	โครงสร้างลิพิดที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ	10
2.5	โครงสร้างลิพิดที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง	10
2.6	โครงสร้างลิพิดที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน	11
3.1	ของเหลวจากผิวหน้าถังหมักก๊าซชีวภาพส่วนที่เติมเศษอาหารและกากไขมัน	17
3.2	วิธี Stab และ Streak สำหรับการทดสอบในอาหารวุ้นเอียง	20
4.1	ผลการทดสอบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Corn oil agar	22
4.2	การเรียงตัวและการติดสีของแบคทีเรีย	23
4.3	ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยสังเกตวงใสรอบโคโลนี	24
4.4	ผลการทดสอบการผลิตกรดของแบคทีเรียในอาหาร Triple sugar Iron Agar	26
4.5	กราฟแสดงปริมาณการผลิตกรดไขมันอิสระที่ระยะเวลา 0, 7 และ 15 วัน	27
4.6	กราฟแสดงปริมาณการผลิตกรดไขมันอิสระที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 โดยปริมาตร	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

น้ำมันและไขมัน (Oil and Fat) เป็นสารอาหารที่มีอยู่ในธรรมชาติมีทั้งที่ได้มาจากพืชและสัตว์ มีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ เป็นสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายโดยแบคทีเรียได้ยาก ทำให้ยากต่อการบำบัดโดยวิธีทางชีวภาพ การบำบัดน้ำมันและไขมันอย่างไม่ถูกหลักสุขาภิบาล ก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ส่งกลิ่นไม่พึงประสงค์ อุดตันท่อระบายน้ำ ขัดขวางการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้สกปรก และก่อให้เกิดพาหะนำโรค โดยทั่วไป น้ำมันและไขมันปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียจากบ้านเรือนประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการประกอบอาหาร (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) และมีปริมาณน้ำมันและไขมันจากบ้านเรือนเท่ากับ 0.2 และ 0.8 กิโลกรัมต่อวันต่อครัวเรือน สำหรับการติดตั้งและไม่ติดตั้งตะแกรงดักเศษอาหาร ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2538) สถานประกอบการร้านอาหารมีปริมาณน้ำมันและไขมันที่ปนเปื้อนอยู่เฉลี่ยเท่ากับ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) ร้านอาหารขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่มีปริมาณน้ำมันและไขมันเท่ากับ 1.5, 4.2 และ 19.2 กิโลกรัมต่อวันต่อร้าน ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) ในปัจจุบันการบำบัดกากไขมันที่ได้จากบ่อดักไขมัน นิยมใช้วิธีฝังกลบ ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้พื้นที่มาก และยังก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม (ธีรยุทธ, 2554)

การลดปริมาณน้ำมันหรือไขมันที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ สามารถทำโดยลดการใช้น้ำมันในการปรุงอาหาร แยกน้ำมันใช้แล้วใส่ภาชนะเพื่อนำไปกำจัด รวมทั้งไม่เทน้ำมันใช้แล้วลงในน้ำทิ้งหรือท่อระบายน้ำ สำหรับวิธีกำจัดน้ำมันและไขมันสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1) วิธีทางกายภาพ เช่น ติดตั้งบ่อดักไขมัน ทำให้ไขมันลอยตัวบนผิวน้ำแล้วตักชั้นไขมันออก วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำ แต่ต้องนำกากไขมันไปบำบัดต่ออีก 2) วิธีทางเคมี เช่น ใส่สารลดแรงตึงผิวเพื่อให้การกระจายตัวของไขมันดีขึ้น เป็นวิธีที่รวดเร็ว แต่อาจเกิดปัญหาในการกำจัดสารเคมีที่ตกค้าง 3) วิธีทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการย่อยสลายโมเลกุลของไขมันและน้ำมันซึ่งอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ ให้เป็นไขมันโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ซึ่งสามารถนำไปใช้เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซชีวภาพได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน จึงจำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง

การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันและกากไขมัน จะได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการบำบัดไขมันได้สูงมากกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์พิเศษที่นำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านการคัดเลือกจากธรรมชาติแล้ว สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมนั้นๆได้ และมีผลกระทบต่อระบบนิเวศน์โดยรวมน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ นอกจากนี้ ยังไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในระบบบำบัด (Lanciotti et al., 2005)

โครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาการกำจัดน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากถังหมักก๊าซชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และนำเชื้อที่คัดแยกได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมัน เพื่อที่จะได้กรดไขมันอิสระที่ได้ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซชีวภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดี
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมันด้วยกระบวนการหมักแบบใช้อากาศโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากถังหมักก๊าซชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ใช้เศษอาหารและกากไขมันเป็นวัสดุหมัก โดยการขีดเชื้อ (Streak Plate) ในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารแข็ง Tryptone soya agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural characteristics)
2. คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมัน โดยการขีดเชื้อ (Streak Plate) ในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหารแข็ง Corn oil agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดสีน้ำเงินของแอซิดซอลท์ (Acid salt) ของกรดไขมันรอบๆ โคโลนีของเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน
3. ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (Enzymatic activity) ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยการ Spot test บนอาหารแข็ง Tryptone soya agar (TSA) ที่มีส่วนผสมของไตรบิวทิรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน ร้อยละ 1 โดยปริมาตร สังเกตบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ
4. ย่อยกากไขมันและน้ำมันใช้แล้ว ด้วยวิธีการหมักแบบใช้อากาศ โดยใช้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่คัดแยกได้มาย่อยสลายน้ำมันทั้ง 2 ชนิดที่ผสมในอาหาร Mineral growth medium (MGM) บ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน โดยศึกษาปริมาณน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมันที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย ที่ร้อยละ 0.5, 1 และ 2 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร จากนั้นวิเคราะห์ค่ากรดไขมันอิสระเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ด้วยวิธีการไทเทรต (Titration method)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมัน
2. ได้กรดไขมันอิสระจากการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมันแบบใช้อากาศสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตก๊าซชีวภาพ
3. ช่วยลดปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อม

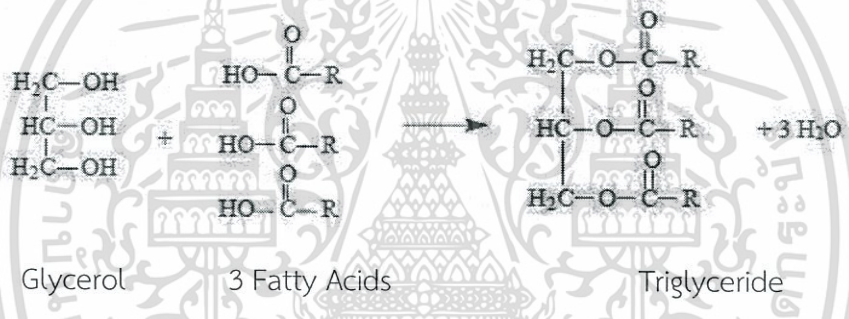
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไขมัน (Lipid)

ไขมัน (lipid) เป็นสารชีวโมเลกุลเดี่ยวขนาดใหญ่ที่ไม่เป็นพอลิเมอร์ มีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของร่างกาย และเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ประกอบไปด้วยกรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 ไขมันมีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) มีคุณสมบัติที่ไม่มีขั้วจึงไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ไม่สามารถละลายในน้ำได้ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว (nonpolar) คือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ โพรพาโนน เบนซีน (สนธยา, 2544)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ (Newman and Willard, 2016)

2.1.1 องค์ประกอบของไขมัน

1) กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ประเภทหนึ่ง มีลักษณะเป็นโมเลกุลที่เกิดจากอะตอมของธาตุคาร์บอน มักจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 อะตอมขึ้นไป และมีไฮโดรเจนมาเชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ยาว มีปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่ –COOH (หมู่คาร์บอกซิล) ซึ่งมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมตัวกันอยู่ อีกส่วนหนึ่งเรียกว่าหมู่ -R (อัลคิล) โดยมีธาตุคาร์บอนยึดเหนี่ยวกันเป็นพันธะ ส่วนที่เป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนนี้เป็นส่วนที่มีผลทำให้เกิดเป็นกรดไขมันที่มีสมบัติแตกต่างกัน ขนาดโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์บ่งชี้ได้ด้วยค่า saponification number หรือค่าดัชนีบ่งชี้ขนาดของโมเลกุล หากมีค่าสูงแสดงว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบมีโมเลกุลขนาดเล็ก ในทางตรงข้ามหากมีค่าต่ำแสดงว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบมีโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยกรดไขมันสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว (ดาวัลย์, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids)** เป็นกรดไขมันที่ในสายไฮโดรคาร์บอนมีพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนทั้งหมดเป็นพันธะเดี่ยว โมเลกุลจึงไม่สามารถรับไฮโดรเจนเพิ่มได้อีก กรดไขมันส่วนมากมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ ระหว่าง 14 - 24 อะตอม พบได้มากในไขมันสัตว์และน้ำมันมะพร้าว ตัวอย่างของกรดไขมันอิ่มตัวชนิดที่พบมากที่สุดคือ กรดพาล์มมิทิกมีคาร์บอน 16 อะตอม (C_{16}) และกรดสเตียริกมีคาร์บอน 18 อะตอม (C_{18}) กรดไขมันอิ่มตัวที่มีขนาดเล็ก (C_8 – C_{14}) พบในน้ำนมวัวและสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่นๆ ส่วนกรดไขมันขนาดใหญ่ (C_{20} – C_{28}) พบในเนื้อเยื่อสมองและในไขสันหลัง (ดาวัลย์, 2548)

- **กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids)** เป็นกรดไขมันที่ในสายไฮโดรคาร์บอนมีพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนบางพันธะเป็นพันธะคู่ ในธรรมชาติพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว อาจมีพันธะคู่เพียงแห่งเดียวหรือหลายแห่งก็ได้ และผลจากการที่มีพันธะคู่ ทำให้โมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีจำนวนอะตอมไฮโดรเจนน้อยกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ตัวอย่างของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไลโนเลอิก กรดโอเลอิก เป็นต้น (ดาวัลย์, 2548)

2) กลีเซอรอล

กลีเซอรอล (glycerol) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นพอลิออล (polyol) เป็นสารที่เป็นของเหลวหนืดใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ โมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 3 หมู่ จึงทำให้ละลายน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดี มีสมบัติในการดูดจับน้ำได้ดี (hydroscopic) แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายจำพวกไฮโดรคาร์บอน เบนซีน อีเทอร์ กลีเซอรอลมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา และสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 290 องศาเซลเซียส กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบหลักในโมเลกุลของไตรกลีเซอร์ไรด์ (triglyceride) ซึ่งได้จากการรวมตัวของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน (fatty acid) 3 โมเลกุล (ศิริพร, 2551)

2.1.2 สมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมัน

ไขมันและน้ำมันจะมีลักษณะเป็นของแข็งหรือของเหลว ณ อุณหภูมิหนึ่ง จะเบากว่าน้ำ มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ และไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม กรดไขมันอิ่มตัวจะมีจุดเดือดสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (บุญล้อม, 2546)

2.1.3 สมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมัน

ไขมันและน้ำมันมีลักษณะเป็นสารประกอบที่เรียกว่าไตรกลีเซอไรด์ เกิดจากกลีเซอรอล 1 โมเลกุลทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน 3 โมเลกุล โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาและความร้อนร่วมด้วย ไขมันหรือน้ำมันอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ และในหมู่แอลคิลอาจมีพันธะเดี่ยวและพันธะคู่ ขึ้นอยู่กับชนิดของไขมัน โดยการรวมตัวของกลีเซอรอลจะควบแน่นกับหมู่ไฮดรอกซิลแต่ละหมู่ในโมเลกุลของกลีเซอรอลกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดไขมันแล้วได้หมู่โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันที่มาควบแน่นด้วยนั้นอาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีคาร์บอนในโมเลกุลตั้งแต่ 4 อะตอมจนถึง 24 อะตอม อาจเป็นกรดไขมันที่อิ่มตัวหรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ตั้งแต่ 1-5 ตำแหน่ง (บุญล้อม, 2546)

2.1.4 ประเภทของไขมันและน้ำมัน

การจำแนกตามลักษณะสูตรโครงสร้างแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1.) ลิพิดเชิงซ้อน (complex lipid) เป็นลิพิดที่มีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ลิพิดเชิงซ้อนแต่ละชนิดต่างกันที่โครงสร้างที่กรดไขมันมาจับด้วยพันธะโควาเลนต์ ลิพิดกลุ่มนี้อาจเรียกว่า ลิพิดที่ให้สบู่ (saponifiable lipid) เพราะเมื่อทำปฏิกิริยากับเบสได้สบู่ซึ่งเป็นเกลือของกรดไขมัน ลิพิดเชิงซ้อน ได้แก่ เอซิลกลีเซอรอล ฟอสโฟกลีเซอไรด์ สฟิงโกลิพิด และไข เป็นต้น (ดาวัลย์, 2548)

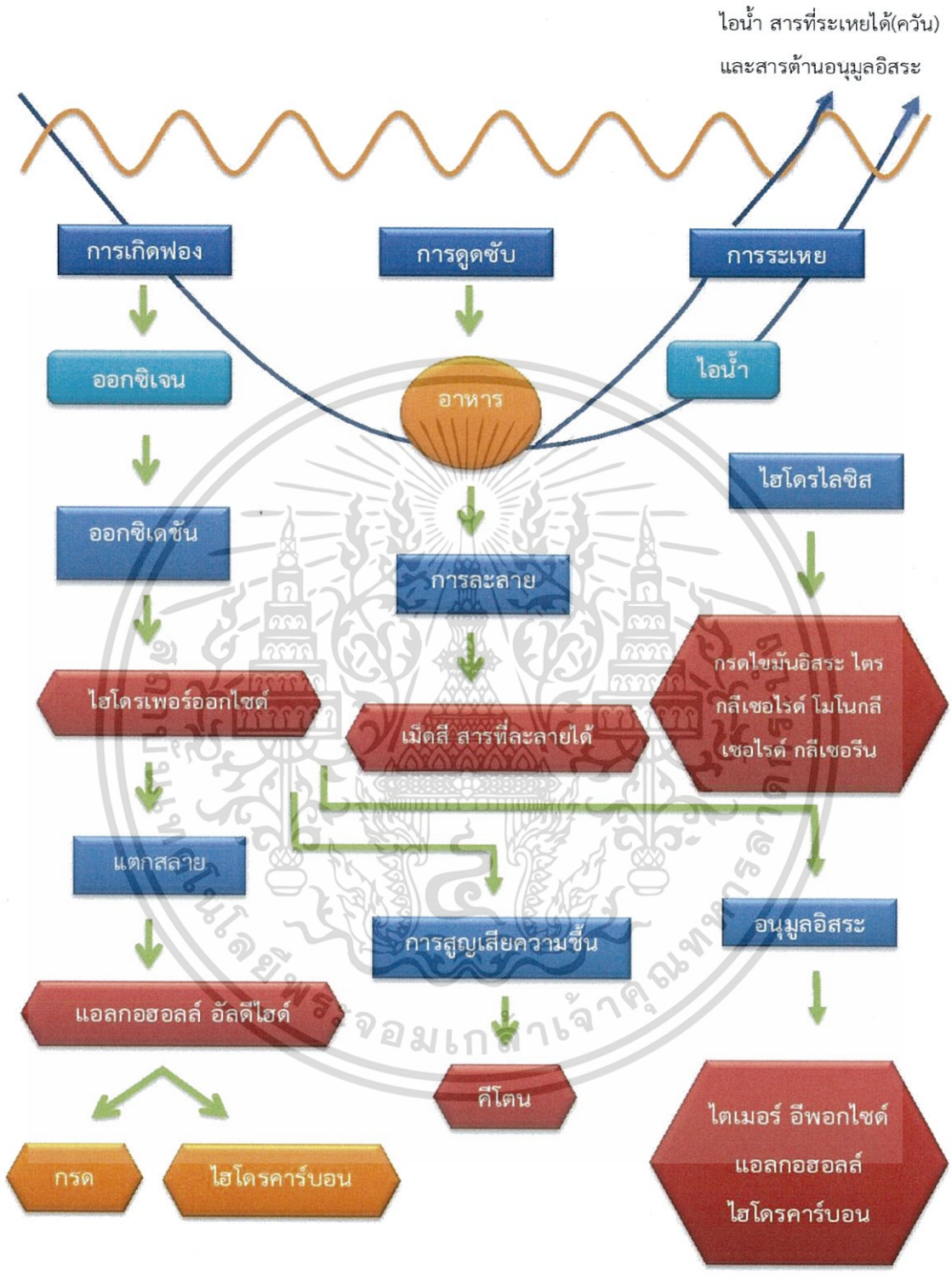
2.) ลิพิดอย่างง่าย (simple lipid) เป็นลิพิดที่ไม่มีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเบสได้ เรียกอีกชื่อว่า ลิพิดที่ไม่ให้สบู่ (non-saponifiable lipid) ลิพิดอย่างง่าย ได้แก่ เทอร์ฟีน สเตอรอยด์ และพรอสทาแกลนดิน เป็นต้น (ดาวัลย์, 2548)

2.2 น้ำมันที่ใช้แล้ว

โดยทั่วไปแล้วน้ำมันพืชที่ยังไม่ผ่านการทอดนั้นจะมีกรดไขมันอิสระอยู่น้อยมาก จะมีสีเหลืองและไม่มีกลิ่นเหม็นหืน แต่เมื่อน้ำมันได้รับความร้อนสูง และใช้ทอดอาหารซ้ำหลายๆครั้ง น้ำมันที่ใช้ในการทอดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆพร้อมๆกันคือ ไขมันสัมผัสกับอากาศจึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างรวดเร็วและการสลายพันธะเอสเทอร์ จนในที่สุดได้กรดอินทรีย์และสารไฮโดรคาร์บอนที่ระเหยง่าย และเกิดคีโตน ไตรเมอร์ อีพอกไซด์ แอลกอฮอลล์ และ ไดเมอร์ภายใต้ความร้อนสูง ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน ในขณะเดียวกันไอน้ำที่ระเหยออกจากอาหารจะก่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันที่ใช้ทอดอาหาร ทำให้ไตรกลีเซอไรด์ แตกตัวได้เป็นกรดไขมันอิสระ, ไดกลีเซอไรด์, โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรีน

นอกจากนี้ อาหารที่ทอดจะละลายสารบางชนิดที่ละลายได้ในน้ำมันออกมาสู่น้ำมัน ปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในเวลาใกล้เคียงกันและรวดเร็วเป็นผลให้น้ำมันเสื่อมคุณภาพ เช่น เกิดควัน เกิดฟอง และมีสีเข้มขึ้นและมีความหนืดมากขึ้น แผนภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ แสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยพบปริมาณน้ำมันและไขมันปนเปื้อนในน้ำเสียร้อยละ 10 ของปริมาณสารอินทรีย์ทั้งหมด โดยลักษณะน้ำเสียจากครัวเรือนกรณีไม่ผ่านตะแกรงจะมีน้ำมันและไขมันประมาณ 2,700 มิลลิกรัมต่อลิตร หากผ่านตะแกรงจะมีน้ำมันและไขมันประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับลักษณะน้ำเสียจากร้านอาหารจะมีน้ำมันและไขมันประมาณ 1,500 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นการกำจัดน้ำมันและไขมันโดยใช้บ่อดักไขมันต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอที่จะกักน้ำเสียไว้ระยะหนึ่งเพื่อให้ไขมันและน้ำมันลอยตัวขึ้นมาสะสมกันอยู่บนผิวน้ำ เมื่อมีปริมาณสะสมมากขึ้นจึงตักออกไปกำจัด (กรมควบคุมมลพิษ, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แผนภูมิปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในน้ำมันในระหว่างการทอดอาหาร (Jadhav *et al.*, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กากไขมัน

กากไขมันเหลือใช้หรือกากไขมันเหลือทิ้ง (waste grease) หมายถึง ไขมันหรือน้ำมันที่ได้จากบ่อดักไขมัน เป็นส่วนที่ลอยตัวขึ้นเหนือน้ำออกมาอยู่ชั้นบนในถังหรือบ่อดักไขมัน (กรมควบคุมมลพิษ, 2551) ปริมาณน้ำมันและไขมันที่ได้จากบ่อดักไขมันนั้นมีปริมาณแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประเภทของแหล่งกำเนิดมลพิษ และปริมาณน้ำที่ใช้ โดยน้ำมันและไขมันมีปริมาณมากที่สุดจากน้ำทิ้งร้านอาหาร และมีปริมาณน้อยที่สุดในน้ำทิ้งจากกลุ่มหอพัก ตามลำดับ โดยค่าความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันเพิ่มขึ้นตามขนาดพื้นที่ (กรมควบคุมมลพิษ, 2546) คุณสมบัติของกากไขมันจากบ่อดักไขมันของครัวเรือน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกากไขมันจากบ่อดักไขมันของครัวเรือน

พารามิเตอร์	หน่วย	ความเข้มข้น
พีเอช	-	5-7
สภาพนำไฟฟ้า	S/cm	300-2500
สี	ADMI	60-700
ไนโตรเจน	mg/L	9-106
กรดไขมันอิสระ	%	0.25-85
ไขมันและน้ำมัน	mg/L	14-38,000
ฟอสฟอรัส	mg/L	0.13-100

ที่มา : กรมควบคุมมลพิษ, 2551

2.4 วิธีการกำจัดน้ำมันและไขมัน

1) วิธีทางชีวภาพ

เป็นการนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ มาหมักร่วมกับของเสียน้ำมันและไขมัน เพื่อย่อยสลายโมเลกุลน้ำมันและไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์ ให้แตกตัวจนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เป็นวิธีที่ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Lanciotti *et al.*, 2005)

1.1) เอนไซม์ไลเปส (Lipases)

เอนไซม์ไลเปสหรือเรียกอีกชื่อว่า triacylglycerol acylhydrolase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) และ กลีเซอรอล (glycerol) โดยทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอร์ไรด์ ที่มักจะมีกรดไขมันสายยาวเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายอินทรีย์ หรือตัวกลางที่ประกอบด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Mitsuhashi *et al.*, 1999) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสนั้นยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ (ester) และกลีเซอรอล (glycerol) ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 2.1-2.6 (Yamane, 1987)

1. Hydrolysis

(2.1)

2. Synthesis

(2.2)

3. Transesterification

3.1 Acidolysis

(2.3)

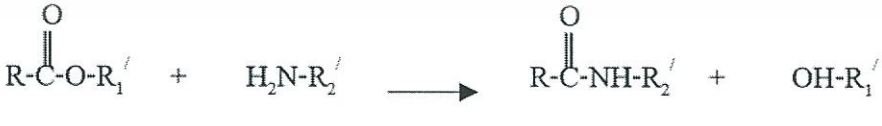
3.2 Alcoholysis

(2.4)

3.3 Interesterification

(2.5)

3.4 Aminolysis



(2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2) แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในสัตว์ พืช หรือแม้แต่จุลินทรีย์ (Jaeger *et al.*, 1994) โดยไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจและถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากกว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น เนื่องจากสามารถผลิตได้เป็นมากในระยะเวลาสั้น โดยมีต้นทุนที่ต่ำและมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ โดยเฉพาะกับเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้จะมีความคงตัวสูงกว่าเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงและสภาวะที่รุนแรง เช่น มีความคงตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด

1.3) ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

ชนิดของเอนไซม์ จำแนกตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

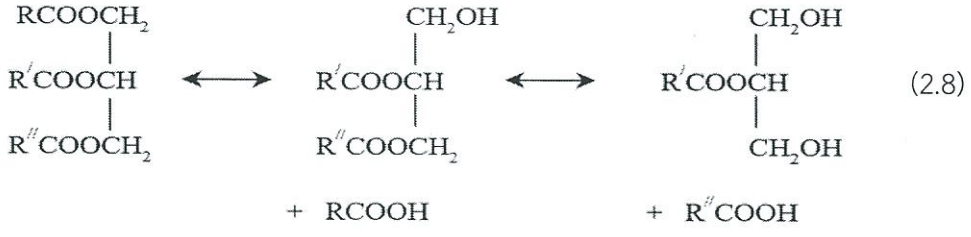
กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ (non-specific lipase)

เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้ทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ ได้ผลผลิตเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอร์ไรด์เป็นสารประกอบในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 2.7 (Macrae, 1983)

(2.7)

กลุ่มที่ 2 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (positional or regiospecific)

เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์กลุ่มนี้จึงจะสามารถย่อยได้และได้ผลิตภัณฑ์เป็น กรดไขมัน 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride แต่โมเลกุลเหล่านี้นั้นไม่คงตัว ถ้าบ่มไว้นานเกินไปจะเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 2.8 (Macrae, 1983)



(2.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน (fatty acid or acyl selective)

เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะสามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ 2.9 (Macare, 1983)

(2.9)

ในปัจจุบันเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลปสและมีการนำมาใช้ทางการค้าแล้ว มีจำนวน 129 สายพันธุ์ แบ่งเป็นแบคทีเรีย 53 สายพันธุ์ ยีสต์ 23 สายพันธุ์ และเชื้อรา 53 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า

Bacteria	Fungi	Yeast
Achromobacter sp.	*Absidacorymbifera*	*Candida* sp.
A. lipolyticus	*A. hyalospora*	*C. antarcea*
Acinetobacter sp.	*Aspergillus* sp.	*C. auricularia*
A. calcoaceticus	*Arthrobacter* sp.	*C. curvata*
A. pseudoalcaligenes	*Aspergillus awamori*	*C. cylindracea*
Alcaligenes sp.	*A. flavus*	*C. lipolytica*
A. denitrificans	*A. fumigatus*	*C. deformans*
Amylomycesrouxii	*A. nidulans*	*C. foliorum*
Arthrobacter sp.	*A. niger*	*C. humicula*
Bacillus cereus	*A. oryzae*	*C. rugosa*
B. megaterium	*Chaetomium thermofile*	*C. tsukubaensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า

Bacteria	Fungi	Yeast
B. laterosporus	*Coelomyceles*	*Pichia miso*
B. sphereicus	*Fusarium oxysporum*	*Proteus* sp.
B. stearothermophilus	*F. solari*	*S. fragilis*
B. thaiminolyticus	*Geotrichum candidum*	*S. fibuligera*
B. thermocatenulatus	*Glomus versiforme*	*S. lipolytica*
B. thermolevacons	*Hansenula anomala*	*S. cerevisae*
Burkholderia cepacia	*Humicola grisea*	*Schizosaccharomyces pombe*
Chromobacterium sp.	*H. insulens*	*Sporotrichum thermophile*
C. chocolatum	*H. lanuginose*	*Talaromyces thermophile*
C. viscosum	*Microthrix pavicella*	*Thielavia minor*
Corynebacterium acnes	*Mucor* sp.	*Torula thermophila*
Crytococcus laurentii	*Mucor javanicus*	*Ustilagomaydis*
Entercoccus faecalis	*Mucor lipolyticus*	
Flavobacterium arborescens	*Mucor miehei*	
F. derrugiem	*Mucor pusillus*	
Lactobacillus sp.	*Neurosporasit ophila*	
Leishmanis donovani	*Nocardia amarae*	
Malbrancheae pulcella	*Penicillium crustosum*	
Micrococcus frendenreichii	*P. camembertii*	
Mycobacterium chelonae	*P. cyclopium*	
Myxococus xantus	*P. roquefortii*	
Propionibacterium acnes	*P. candidum*	
P. granulosum	*P. citrinum*	
Protaminobacter alboflavus	*P. simplicissimum*	
Pseudomonas sp.	*P. solitum*	

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) วิธีทางเคมี

เป็นวิธีการเติมสารเคมีลงไปในน้ำมันและไขมัน เช่น เติมสารลดแรงตึงผิวให้โมเลกุลน้ำมันและไขมันแตกตัวจนมีขนาดเล็กลง เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปกำจัดในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถนำกากไขมันไปแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สบู่ ไบโอดีเซล เป็นต้น แต่วิธีนี้อาจก่อให้เกิดสารเคมีสะสมในร่างกาย และมีสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ (Khamyot, 1997)

3) วิธีทางกายภาพ

วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติเฉพาะของน้ำมันและไขมันไม่ใช้สารเคมี เช่น การทำให้ลอยตัวตามธรรมชาติ เนื่องจากน้ำมันมีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าน้ำ จะลอยตัวขึ้นมาเหนือผิวน้ำ ต้องนำไปกำจัดต่อด้วยบ่อดักไขมัน หรือเครื่องแยกไขมันแล้วนำไปทิ้ง ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก และไม่สามารถกำจัดน้ำมันและไขมันได้ทั้งหมด จะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรคและก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (ธีรยุทธ, 2554)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กิจจา และ ปธานิน (2555) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยไขมันของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียจากถังดักไขมัน (4 ตัวอย่าง) น้ำหมักชีวภาพ (2 ตัวอย่าง) น้ำจากคลองรวบรวมน้ำเสีย (2 ตัวอย่าง) และตะกอนดินป่าชายเลน (3 ตัวอย่าง) พบแบคทีเรียที่ย่อยไขมันได้ 39 ไอโซเลท นำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธีการวัดวงใส คัดเลือกแบคทีเรียที่ผ่านคุณสมบัติได้ 13 ไอโซเลท ซึ่งแยกแบคทีเรียได้จากน้ำเสียถังดักไขมัน น้ำหมักชีวภาพ น้ำเสียจากคลอง และตะกอนดินป่าชายเลน จำนวน 7, 4, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้น นำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไขมัน พบว่า แบคทีเรียที่แยกจากถังดักไขมัน T3/2 สามารถย่อยไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งอื่น คือ สามารถย่อยไขมันได้ร้อยละ 52.0 อัตราการย่อยไขมัน 0.025 มิลลิลิตรต่อวันในช่วงเวลาทดสอบ 21 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และลักษณะทางกายภาพมีการเปลี่ยนแปลงสภาพตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 11 ของการทดสอบ โดยน้ำใสขึ้น มีการตกตะกอน และความหนาของชั้นไขมันลดลง

ทิพวรรณ และคณะ (2555) ได้ศึกษาเพื่อประเมินกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. โดยทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหาร จากนั้นนำมาคัดแยกจุลินทรีย์ พบจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1, 4, 6 และ 7 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง นำมาศึกษาการย่อยสลายกากไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ ควบคุมความชื้นภายในถังหมักแบบเติมอากาศเท่ากับ 60% ภายในถังหมักบรรจุวัสดุหมักร่วมกับกากไขมันสัดส่วน 50:50 ที่อัตราเติมอากาศเท่ากับ 4.0 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าไอโซเลท 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นสูงสุด ปริมาณ 295.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร และประสิทธิภาพการกำจัดไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 98.29% รองลงมาคือ ไอโซเลท 4 ไอโซเลท 6 และ ไอโซเลท 1 ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัดไขมันเท่ากับ 97.95%, 95.88%, 95.84% ตามลำดับ

Bhumibhamon และคณะ (2002) ได้ศึกษาเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียปนเปื้อนไขมัน นำมาคัดแยกเชื้อได้ 200 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายบนอาหารที่มีน้ำมันมะกอกด้วยวิธี double layer technique พบ 8 ไอโซเลทที่มีวงใสกว้างที่สุด นำมาทดลองโดยใช้แบคทีเรีย 2 กลุ่ม คือ single culture และ mixed culture โดยทดลองนำเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมาบ่มในน้ำเสียจากโรงงานผลิตขนมปัง ระยะเวลา 7 วันพบว่า single culture ลดปริมาณไขมันในน้ำเสีย และ ค่า COD ที่ 73%-88% และ 81%-99% พบว่าเชื้อ KUL8 และ KUL39 มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ดี และการย่อยด้วยเชื้อ single culture ให้ผลดีกว่าการใช้ mixed culture นอกจากนี้ได้นำเชื้อมาบ่มในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มและโรงงานผลิตขนมปัง ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถย่อยสลายไขมันในน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มได้ดีกว่าน้ำเสียจากโรงงานผลิตขนมปัง โดยเชื้อ KUL8 และ KUL39 สามารถลดปริมาณไขมันได้ดี มีค่า COD ลดลง 87.7% และ 80.6% ในน้ำเสียจากน้ำมันปาล์ม และ 70% และ 64% ในน้ำเสียจากการผลิตขนมปัง ตามลำดับ

Dhiman และ Chapadgaonkar (2013) ได้ศึกษาการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ISC 1 ที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงถึง 25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral growth medium (MGM) 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อใส่ลงไป แล้วนำไปใส่เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทำให้การทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 42 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Koc และคณะ (2015) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการผลิตไลเปสของ *Bacillus* spp. ทนความร้อนสายพันธุ์ต่างๆ โดยคัดแยกเชื้อทนความร้อน 32 ไอโซเลท และ *Bacilli* spp. 20 ชนิด พบว่ามี 11 ไอโซเลทและ 7 ชนิด ที่สามารถผลิตไลเปสได้ นำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยการวงใส ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีส่วนผสมของ tributyrin และ น้ำมันมะกอก ที่ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 บันทึกผลที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ F84a, F84b และ *G. Thermodentrificans* DSM 465^{T} ในอาหารแข็งน้ำมันมะกอกได้ผลดีที่สุดคือ 0.009, 0.008 และ 0.008 U/mg ตามลำดับ ขณะที่ *G. stearothermophilus* A113 มีค่ากิจกรรมไลเปสสูงที่สุดในอาหารแข็ง tributyrin คือ 0.011 U/mg

Kumari และคณะ (2017) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการนำเชื้อ *Penicillium chrysogenum* มาย่อยสลายจาระบีด้วยวิธีบำบัดทางชีวภาพเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมัน โดยปรับสภาพจาระบีด้วยเอนไซม์ไลเปสก่อนนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น ทดสอบด้วยวิธี response surface methodology (RSM) นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาระบีที่ผ่านการบำบัดขั้นต้น 10.0 กรัมผสมกับรำข้าวสาลี 5.0 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อ czapek-dox medium 10.0 มิลลิลิตร หมักด้วยวิธี solid state fermentation ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดไขมัน พบว่า $FeCl_2$ 1.25 mM, ความเข้นข้นของเชื้อ 5×10^{11} spores/ml และระยะเวลา 16 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณกรดไขมันมากที่สุดคือ 6.6 มิลลิกรัมต่อกรัม และวิเคราะห์ด้วยวิธี gas chromathography พบว่าให้กรดปาล์มมิติกปริมาณสูง จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกผลึก ได้กรดปาล์มมิติกปริมาณ 2.8 กรัม จากกากไขมัน 1.0 กิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Holten, Holten Laminair Denmark
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) Tomy, Tomy Kogyo, Japan
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) Contherm, Contherm Scientific, New Zealand
4. กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) Olympus Optical, Japan
5. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าควบอุณหภูมิ (Incubator shaker) Gallenkamp, United kingdom
6. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance) Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance) Sartorius, Germany
8. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) Mettler Toledo, Switzerland
9. แคลลิเปอร์แบบเวอร์เนีย (Vernier callipera)
10. ลวดเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
12. จานเพาะเชื้อ (Plate)
13. เครื่องแก้วต่างๆ

3.1.2 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen phosphate) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี
4. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี
5. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี

7. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulfate) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี

8. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid) เกรดวิเคราะห์ ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศอิตาลี

9. เอทานอล 95% (Ethyl alcohol) เกรดการค้า กรมสรรพสามิต องค์การสุรา

10. สารละลายไอโอดีน (Gram's iodine)

11. ไตรบิวทีรีน (Tributyrin)

12. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)

13. คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)

14. สีย้อมซาฟรานิน (Safranin)

15. วิกตอเรียบลูบี (Victoria blue B)

16. ทวีน 80 (Tween 80)

17. เพปโตน (Peptone) Sisco Reseach Laboratories, India

18. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

19. วุ้นผง (Agar) Bio agars

20. Tryptone soya broth (TSB) Srl Chem, India

3.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้คัดแยกเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างของเหลว จากถังหมักก๊าซชีวภาพ (ดังแสดงในรูปที่ 3.1) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสำนักสิ่งแวดล้อม กรุงเทพมหานคร บริเวณที่เติมวัสดุหมัก ซึ่งใช้เศษอาหารและกากไขมันเป็นวัสดุหมัก โดยเก็บตัวอย่างที่ผิวหน้าของเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Lipase producing bacteria)

รูปที่ 3.1 ของเหลวจากผิวหน้าถังหมักก๊าซชีวภาพส่วนที่เติมเศษอาหารและกากไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

1. นำตัวอย่างของเหลวที่ได้จากข้อ 3.2 มาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate technique (นงลักษณ์, 2541) โดยนำตัวอย่างมาเจือจาง (serial dilution) ด้วยวิธีเจือจางลำดับส่วน โดยเจือจางทีละ 10 เท่า (Ten-fold serial dilution) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.89 โดยมวลต่อปริมาตร (ภาคผนวก ก.6) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. นำสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารแข็ง Tryptone soya agar (TSA) (ภาคผนวก ก.1) โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล (Spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆไปทำการคัดแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate บนอาหาร TSA

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. ทำการถ่ายเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดียวลงบนอาหารวุ้นเอียง (Slant agar) เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อที่คัดแยกได้

3.4.1 การตรวจสอบรูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจสอบรูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีของเชื้อที่คัดแยกได้ ด้วยวิธีการย้อมสีแบบแกรม (Gram staining) มีวิธีดังนี้

1. นำเชื้อมาผสมกับหยดน้ำแล้วเกลี่ยให้เชื้อกระจายออกเป็นฟิล์มบางๆบนสไลด์ (Smear) แล้วทิ้งให้รอยสเมียร์แห้ง

2. ทำการตรึง (Fix) เซลล์โดยนำสไลด์มาผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง

3. หยดสี Crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอย Smear ทิ้งไว้ 1 นาที

4. ล้างสีออกด้วยน้ำยาแกรมไอโอดีน

5. หยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอย Smear ทิ้งไว้ 1 นาที

6. ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วยเอทานอล 95% จนไม่มีสีติด (ใช้เวลาไม่เกิน 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำทันที)

7. ย้อมทับ (Counterstain) ด้วยสี Safranin นาน 1 นาที

8. ล้างออกด้วยน้ำและซับด้วยกระดาษทิชชู วางทิ้งไว้ให้แห้ง

9. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า ดูรูปร่าง การเรียงตัวและการติดสีของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

1. เพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3 บนอาหาร Corn oil agar ปรับปรุงจากปฏิบัติการจุลชีววิทยา สจล. (ภาคผนวก ก.2) ด้วยวิธี Simple streak ทำซ้ำไอโซเลทละ 2 ครั้ง

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. สังเกตการเกิดสีน้ำเงินของแอซิดซอลท์ (Acid salt) และรอยกรดไขมันที่เกิดรอบๆโคโลนีของเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

4. นำเชื้อที่สามารถย่อยไขมันได้ข้างต้นมาทำการทดสอบเพื่อยืนยันความสามารถในการย่อยสลายไขมัน ด้วยวิธี Spot test บนอาหารแข็ง TSA ที่มีองค์ประกอบของน้ำมันที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไตรบิวทิรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยเชื้อที่สามารถย่อยไขมันได้จะปรากฏวงใส (Clear zone) รอบๆโคโลนีเชื้อ

5. ทำการบันทึกผลโดยวัดระยะการแพร่ของเอนไซม์ไลเปสโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าของอาหาร

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมัน

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่าง ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดีมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptone soya broth (TSB) โดยใช้เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2 การย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในสภาวะมีอากาศ

1) การย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Tryptone soya broth (TSB)

1. เติมตัวอย่างน้ำมันปาล์ม ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร, Tween 80 ร้อยละ 0.01 โดยปริมาตร และหัวเชื้อ (จากข้อ 3.5.1) ร้อยละ 5.0 โดยปริมาตร ในอาหาร Tryptone soya broth (TSB)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบนาที เป็นเวลา 7 วัน

3. เมื่อครบกำหนดนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Official method for fatty acids (AOCS, 2012)

4. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 อีก 2 ซ้ำ

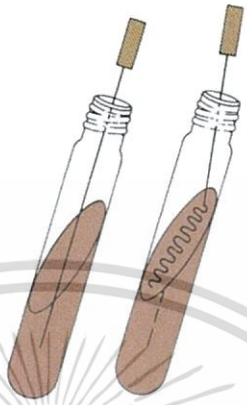
5. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-4 แต่ไม่ใส่หัวเชื้อ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม

6. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันปาล์ม ร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร เป็นน้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมันร้อยละ 1 โดยปริมาตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1) ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียด้วยอาหาร Triple Sugar Iron Agar (TSI)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ Stab และ Streak บนอาหาร TSI (ภาคผนวก ก.4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผล



รูปที่ 3.2 วิธี Stab และ Streak สำหรับการทดสอบในอาหารวุ้นเอียง

ที่มา : https://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/

2) การย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

2.1) วิธีปรับสภาพกากไขมัน

1. ให้ความร้อนกากไขมันที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 20 นาที กรองเศษขยะและเศษอาหารด้วยผ้าขาวบาง

2. ปิเปตกากไขมันปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์

3. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.5 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4. เติมเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยกรดซัลฟิวริก

2.2) ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

1. เติมตัวอย่างน้ำมันใช้แล้ว ร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร, Tween 80 ร้อยละ 0.01 โดยปริมาตร และหัวเชื้อ (จากข้อ 3.5.1) ร้อยละ 5.0 โดยปริมาตร ในอาหาร Minearal growth medium (MGM)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบนาที เป็นเวลา 0, 7 และ 15 วัน

3. นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Official method for fatty acids (AOCS, 2012) ที่ระยะเวลา 7 และ 15 วัน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 อีก 2 ซ้ำ

5. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-4 แต่ไม่ใส่หัวเชื้อ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม

6. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นกากไขมันที่ผ่านการปรับสภาพ ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

2.3) ศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่เหมาะสมในการย่อยสลายในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

1. เติมตัวอย่างน้ำมันปาล์มใช้แล้ว กำหนดปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ คือร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 โดยปริมาตร ตามลำดับ Tween 80 ร้อยละ 0.01 โดยปริมาตร และหัวเชื้อ (จากข้อ 3.5.1) ร้อยละ 5 โดยปริมาตร ในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบนาที เป็นเวลา 7 วัน

3. เมื่อครบกำหนดนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Official method for fatty acids (AOCS, 2012)

4. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-3 อีก 2 ซ้ำ

5. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-4 แต่ไม่ใส่หัวเชื้อ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม

6. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1-5 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นกากไขมันที่ผ่านการปรับสภาพ ร้อยละ 2 โดยปริมาตร

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วย Excel – 2010 จากนั้นวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Minitab รุ่น 16.0 ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และวิธี General linear model ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

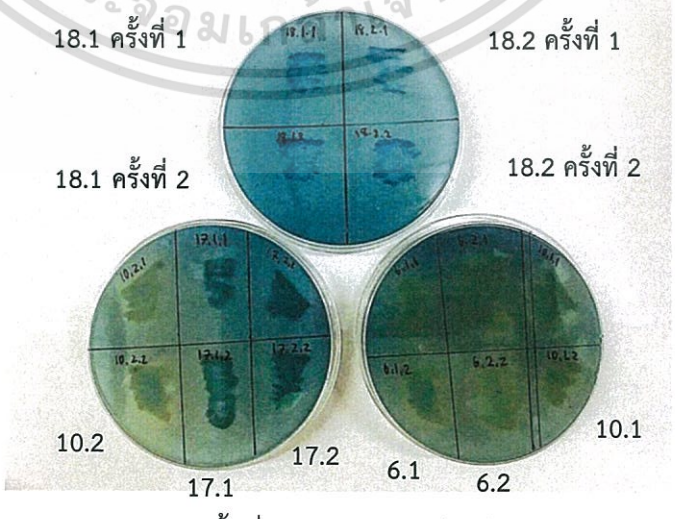
โครงงานพิเศษนี้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากถังหมักก๊าซชีวภาพ ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย และศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน ที่ระยะเวลา 0, 7 และ 15 วัน และความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่ร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 โดยปริมาตร ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันจากถังหมักก๊าซชีวภาพบริเวณที่เติมเศษอาหารและกากไขมัน โดยทำการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมักโดยการเติมเศษอาหารที่มีน้ำมันผสมอยู่และกากไขมันมามากกว่า 1 ปี ทำการเจือจางลำดับส่วนเชื้อแบคทีเรียด้วย NaCl 0.89% แล้วคัดแยกด้วยวิธี Spread plate technique จากผลการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวน 88 ไอโซเลท จากนั้น ทำการคัดแยกเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Streak plate technique แล้วจึงนำไปทดสอบหาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ต่อไป

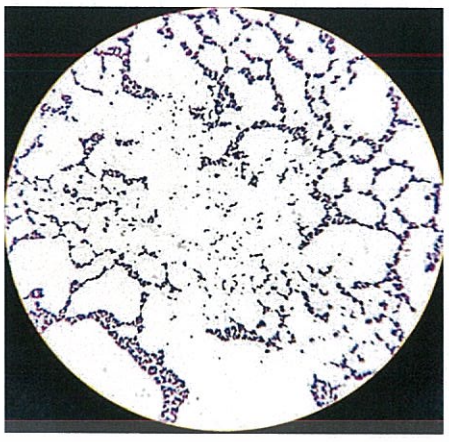
4.1.1 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Corn oil agar ด้วยวิธี Simple streak โดยเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จะเกิดตะกอนสีน้ำเงินและรอยกรดไขมันรอบโคโลนีจากการทำปฏิกิริยาของกรดไขมันอิสระกับสีย้อม Victoria blue b



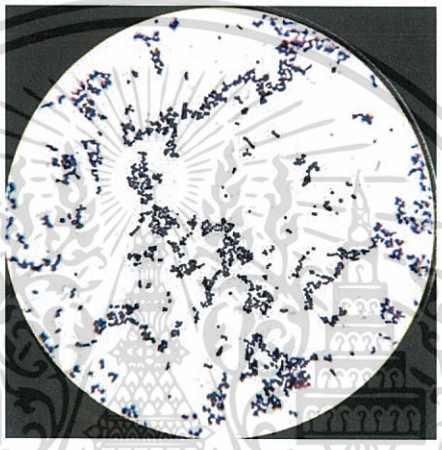
รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Corn oil agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) ไอโซเลท 48

(ข) ไอโซเลท 40.1



(ค) ไอโซเลท 18

รูปที่ 4.2 การเรียงตัวและการติดสีของแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Corn oil agar การติดสี การเรียงตัว และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

หมายเลขเชื้อ	การเกิดแอซิดซอลท์	Gram's Strain	รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์
6	✓	G-	ท่อนสั้น
10	✓	G-	ท่อนสั้น
17	✓	G+	กลม
18	✓	G+	กลม
33	✓	G+	กลม
40	✓	G+	กลม
40.1	✓	G+	กลม
41	✓	G+	กลม
48	✓	G+	กลม

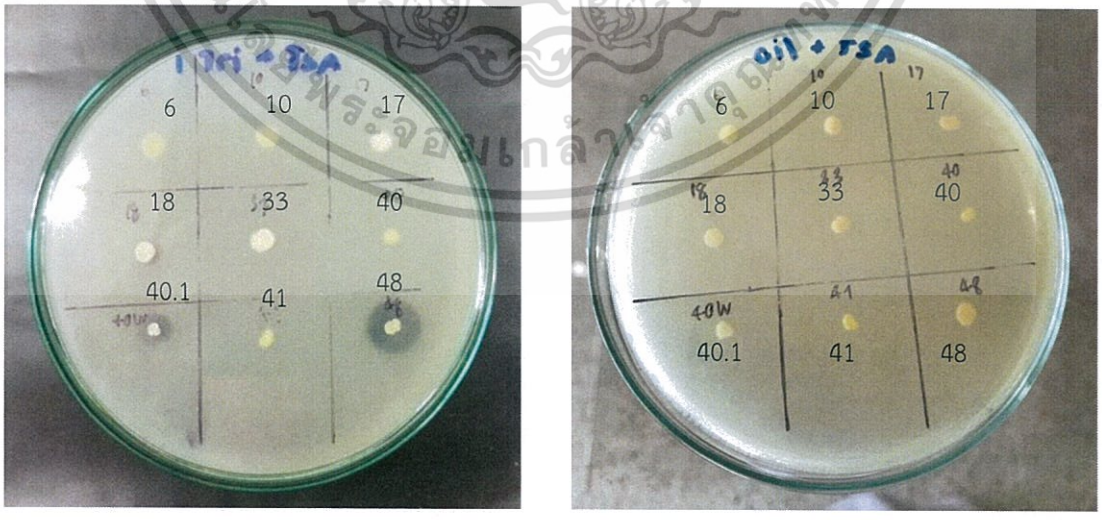
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 6, ไอโซเลท 10, ไอโซเลท 17, ไอโซเลท 18, ไอโซเลท 33, ไอโซเลท 40, ไอโซเลท 40.1, ไอโซเลท 41 และไอโซเลท 48 มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 6 และ 10 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแบบท่อนสั้น ในขณะที่ไอโซเลท 17, 18, 33, 40, 40.1, 41 และ 48 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแบบกลม ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

4.1.2 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

นำเชื้อที่คัดแยกได้จากข้อ 4.1.1 ทั้งหมด 9 ไอโซเลท มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Spot test บนอาหารแข็ง TSA ที่มีส่วนผสมของน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ ไตรบิวทิรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าของอาหารแล้วนำไปหาค่าเฉลี่ย พบว่า ไอโซเลท 48 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าของอาหารแข็งที่ผสมไตรบิวทิรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมันได้ 13.83±0.29, 6.33±0.58, 4.33±0.29 และ 3.00±0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.2 (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค 1.1 – ค 1.12)

ดังนั้น จึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท 48 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันให้เป็นกรดไขมันอิสระ เนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลท 48 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีที่สุด และสามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ทั้ง 4 ชนิด อีกทั้งยังสามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ง่ายและเร็ว



(ก) อาหารแข็งผสมไตรบิวทิรีน (ข) อาหารแข็งผสมน้ำมันปาล์ม

รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยสังเกตวงใสรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ ไตรบิวทิรีน น้ำมันปาล์ม น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน

หมายเลขเชื้อ	วันที่	ความกว้างเฉลี่ยของวงใส (มิลลิเมตร)			
		ไตรบิวทิรีน	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันปาล์มใช้แล้ว	กากไขมัน
6	1	3.5±1.32	0.5±0	0.5±0	1.36±0.13
	2	6±0	1±0	1±0	2.55±0.09
	3	8±0	1.5±0	1.5±0	4±0
10	1	3±1	0.44±0.1	0.44±0.1	0.72±0.03
	2	5.17±0.58	1±0	0.92±0.14	1.33±0.29
	3	7.17±0.29	1.5±0	1.5±0	2.08±0.14
17	1	3.33±1.15	0.67±0.14	1±0	0.5±0
	2	5.33±0.58	1.5±0	2±0	1±0
	3	6.77±0.76	2.25±0.25	2.83±0.29	1.5±0
18	1	4.5±0.5	0.92±0.14	1.67±0.14	1.36±0.13
	2	6.77±0.64	2±0	3.25±0.25	2.55±0.09
	3	8.5±0.87	3±0	4.83±0.29	3.83±0.29
33	1	4±1.32	0.55±0.09	1±0	0.7±0.05
	2	6.17±0.29	1±0	2±0	1.52±0.13
	3	7.27±0.25	1.5±0	3±0	2.11±0.19
40	1	4.33±1.61	0.72±0.05	1±0	0.5±0
	2	3.25±0.43	1.5±0	2±0	1±0
	3	3.67±0.29	2.08±0.14	3±0	1.33±0.29
40.1	1	5±1	1.42±0.38	2.55±0.09	1±0
	2	7.67±1.15	3.28±0.25	5.08±0.14	2±0
	3	9.67±0.58	4.92±0.38	7.33±0.29	3±0
41	1	2.33±0.76	0.55±0.09	0.67±0.14	0.1±0
	2	4±0	0.92±0.14	1.5±0	0.1±0
	3	4.17±0.29	1.33±0.29	2.17±0.14	0.1±0
48	1	8.17±0.29	2.08±0.14	1.5±0	1±0
	2	11±0	4±0	2.92±0.14	2.08±0.14
	3	13.83±0.29	6.33±0.58	4.33±0.29	3±0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองนี้ใช้วิธี Spot test เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น โดยสังเกตจากระยะการแพร่ของวงใสและขนาดของเชื้อ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ปริมาณเชื้อตั้งต้นอาจไม่เท่ากัน จากผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Disk diffusion agar method พบว่า ได้ผลที่ไม่ชัดเจน เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสอยู่ใน Supernatant มีความเจือจางมาก จึงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นก่อนนำมาใช้งาน จึงเป็นการเพิ่มขั้นตอนและระยะเวลาในการทดลอง

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน

4.2.1 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Tryptone soya broth (TSB)

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน ของไอโซเลท 48 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth (TSB) ที่ผสมไขมัน 3 ประเภท ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมัน เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลและผลิตกรดของแบคทีเรีย ด้วยอาหาร Triple Sugar Iron Agar (TSI) พบว่า อาหารแข็งเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองที่ปลายหลอด (รูปที่ 4.4) แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการสร้างกรดได้ ดังนั้น ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจากการใช้อาหาร TSB ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน จึงไม่ได้เป็นปริมาณกรดไขมันเพียงอย่างเดียว อาจเป็นกรดที่เกิดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสและเปลี่ยนเป็นกรด ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soya broth (TSB) จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในการศึกษา

(ก) อาหาร TSI (ข) ผลการทดสอบหลังบ่ม 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบการผลิตกรดจากน้ำตาลของแบคทีเรียในอาหาร TSI โดยอาหารแข็งเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองที่ปลายหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

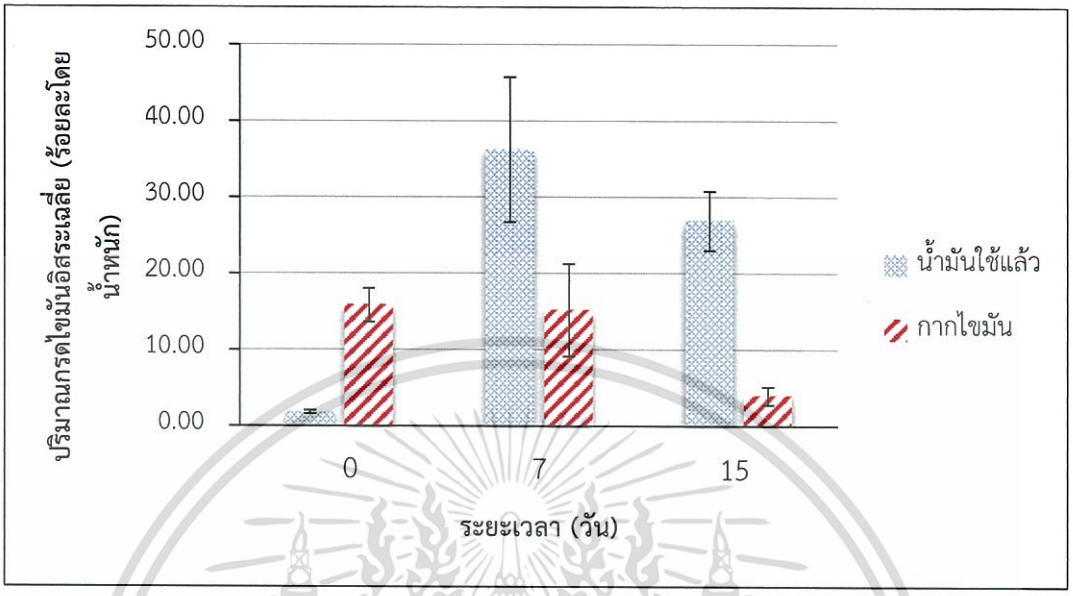
4.2.2 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Mineral Growth Medium (MGM)

1) ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันในอาหาร Mineral Growth Medium (MGM)

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระของแบคทีเรียไอโซเลท 48 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Growth Medium (MGM) ที่เวลา 0, 7 และ 15 วัน โดยทำชุดควบคุมที่สภาวะการทดลองเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 48 พบว่า มีปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยเกิดขึ้นร้อยละ 1.84±0.23, 36.25±9.48 และ 26.92±3.89 โดยน้ำหนัก ส่วนกากไขมันมีปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยเกิดขึ้นร้อยละ 15.88±2.21, 15.22±6.07 และ 3.97±1.19 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ดูรายละเอียดในตาราง ค.2.1 ภาคผนวก ค.) จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี General linear model ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า การย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและกากไขมันที่ระยะเวลา 0, 7 และ 15 วัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ดูรายละเอียดในตาราง ง.1 ภาคผนวก ง) และผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี One – way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า การย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วที่ระยะเวลา 0 และ 7 วัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ดูรายละเอียดในตาราง ง.2 ภาคผนวก ง) เนื่องจากแบคทีเรียมีการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระ แต่ที่ระยะเวลา 7 และ 15 วัน จะมีแนวโน้มปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากกรดไขมันอิสระบางส่วนอาจถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Schaich, 2013) ส่วนการย่อยสลายกากไขมันที่ระยะเวลา 0 และ 7 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ดูรายละเอียดในตาราง ง.3 ภาคผนวก ง) เนื่องจากกากไขมันนั้นถูกย่อยสลายได้ยาก ปริมาณกรดไขมันอิสระเริ่มต้นที่พบอาจได้มาจากการปรับสภาพกากไขมันด้วยด่าง ทำให้กากไขมันถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดไขมันอิสระ และโครงสร้างของกากไขมันมีการเปลี่ยนแปลง (Felix, 2009) นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรดด่างจากการปรับสภาพกากไขมัน อาจเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียไอโซเลท 48 รวมถึงกากไขมันอาจมีองค์ประกอบที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (Lipase inhibitor) ทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสลดลง ดังนั้น จึงควรศึกษาองค์ประกอบของกากไขมัน และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรีย ส่วนปริมาณกรดไขมันอิสระที่ระยะเวลา 15 วัน จะแตกต่างกับที่ระยะเวลา 0 และ 7 วัน อย่างมีนัยสำคัญ นั่นคือ ในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วเป็นกรดไขมันอิสระช่วงระยะเวลาการย่อยสลายที่ 7 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสม ในงานวิจัยนี้จึงใช้ระยะเวลาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่ระยะเวลา 7 วัน มาทำการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาต่อไปในอนาคต ควรศึกษาการย่อยสลายน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้แล้วและกากไขมันในช่วงเวลาระหว่าง 7 ถึง 15 วัน เพื่อศึกษาว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันให้เป็นกรดไขมันอิสระได้ปริมาณมากที่สุดที่ช่วงระยะเวลาใด



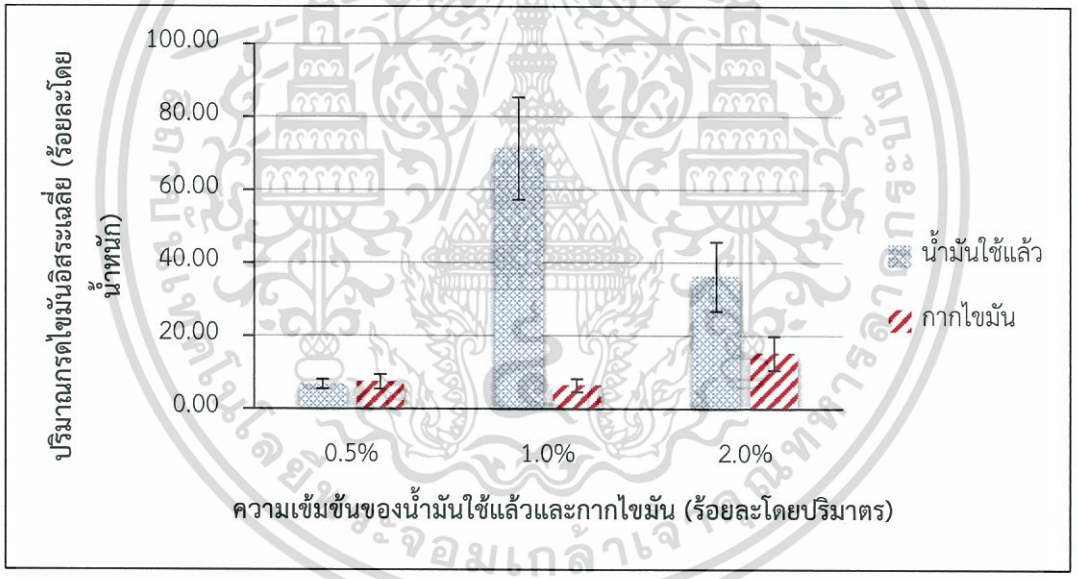
รูปที่ 4.5 ปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยที่เวลา 0, 7 และ 15 วัน ในอาหาร MGM

2) ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมัน ให้เป็นกรดไขมันอิสระของแบคทีเรียไอโซเลท 48 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mineral Growth Medium (MGM) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 โดยปริมาตร เป็นเวลา 7 วัน โดยทำชุดควบคุมที่สภาวะการทดลองเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 48 พบว่า น้ำมันใช้แล้วมีปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยร้อยละ 6.74±1.31, 71.34±14 และ 36.25±9.48 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนกากไขมันมีปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยเกิดขึ้นร้อยละ 7.42±1.98, 6.36±1.81 และ 15.22±4.65 โดยน้ำหนักตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 (ดูรายละเอียดในตาราง ง.2 ภาคผนวก ง.) จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี General linear model ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วและกากไขมันที่ร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 โดยปริมาตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ดูรายละเอียดในตาราง จ.4 ภาคผนวก จ) และผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี One – way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า การย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0 และ 2.0 โดยปริมาตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ดูรายละเอียดในตาราง จ.5 ภาคผนวก จ) ซึ่งน้ำมันใช้แล้วความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร ถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระปริมาณเฉลี่ยมากที่สุด และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 2.0 โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันปาล์มใช้แล้วที่สูงเกินไป อาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kumari (2017) ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันเพิ่มขึ้น ส่วนผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการย่อยสลายกากไขมันโดยวิธี One – way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ดูรายละเอียดในตาราง จ.6 ภาคผนวก จ) พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 โดยปริมาตร ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากกากไขมันถูกย่อยสลายด้วยแบคทีเรียไอโซเลท 48 ได้ยาก แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยปริมาตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 โดยปริมาตร โดยพบปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยมากที่สุด เนื่องจาก พื้นที่ผิวสัมผัสของกากไขมันที่เพิ่มขึ้นจากการปรับสภาพ, ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และค่าความเป็นกรดด่างจากการปรับสภาพ มีผลทำให้กากไขมันทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้มากขึ้น (ปราณี, 2556) ดังนั้น ในการศึกษาขั้นต่อไป ควรวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Fat, oil and grease) ก่อนและหลังการทดลอง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นและความเข้มข้นของน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันเริ่มต้น



รูปที่ 4.6 ปริมาณกรดไขมันอิสระเฉลี่ยที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันจากถังหมักก๊าซชีวภาพ และประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันที่ใช้แล้วและกากไขมันในสภาวะมีอากาศ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากถังผลิตก๊าซชีวภาพบริเวณที่เติมเศษอาหารและกากไขมัน โดยวิธี Spread plate บน Tryptone soya agar พบแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ทั้งหมด 88 ไอโซเลท จากนั้น ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียด้วย Corn oil agar พบแบคทีเรียที่ย่อยสลายน้ำมันได้ ทั้งหมด 9 ไอโซเลท โดยไอโซเลท 48 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสดีที่สุดและย่อยไตรบิวทีรีน, น้ำมันปาล์ม, น้ำมันปาล์มใช้แล้ว และกากไขมันได้ทั้ง 4 ชนิด จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม
2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันให้เป็นกรดไขมันอิสระ แล้ววิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยวิธี Official method for fatty acids พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 48 สามารถย่อยน้ำมันที่ใช้แล้วให้กลายเป็นกรดไขมันได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 7 วัน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ส่วนการย่อยสลายกากไขมันเป็นกรดไขมันอิสระเป็นไปได้ยาก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีนอกเหนือจากการทดสอบด้วยวิธี Spot test ซึ่งเป็นเพียงวิธีทดสอบเบื้องต้น
2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยในการย่อยสลายไขมันเป็นกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น เช่น ความเข้มข้นของเชื้อ, ระยะเวลาการบ่ม เป็นต้น
3. ควรวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Fat, Oil and Grease) ก่อนและหลังการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันใช้แล้วและกากไขมันที่ถูกย่อยสลาย
4. ศึกษาวิธีการปรับสภาพกากไขมันเบื้องต้นที่เหมาะสมก่อนนำกากไขมันมาใช้ในการวิเคราะห์
5. นำเชื้อที่ได้ไปประยุกต์ใช้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ. 2538. **คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับบ้านเรือน.** กรุงเทพฯ. บริษัท ทีคิวพี จำกัด.

กรมควบคุมมลพิษ. 2546. **คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับบ้านเรือน.** กรุงเทพฯ. บริษัท ทีคิวพี จำกัด.

กรมควบคุมมลพิษ. 2551. **คู่มือแนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับบ้านเรือน.** กรุงเทพฯ. บริษัท ทีคิวพี จำกัด.

กิจจา จิตรภิรมย์. ปธานิน แสงอรุณ. 2555. **การตรวจหาแบคทีเรียย่อยไขมันจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม.** วารสารสาธารณสุขศาสตร์ ปีที่ 42 ฉบับที่ 3. 3-18.

คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. 2560. **การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์.** บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดาวัลย์ ฉิมพู่. 2548. **กรดไขมัน (Fatty acid).** ชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทิพวรรณ ประพันธ์. เนทิยา กรีธาชาติ. พิลาณี ไวยถนอมสัตย์. ต่อพงศ์ กรีธาชาติ. **การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสสำหรับการย่อยสลายของเสียจากกากไขมัน.** การประชุมวิชาการพะเยาวิจัย ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยพะเยา. 2555.

ธีรยุทธ กำศิริพิมาน. 2554. **ผลิตปุ๋ยหมักด้วยกากไขมัน.** (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://km.reo15.net/index.php?option=com_content&view=article&catid=9:recycle&id=115:2554-11-03-02-50-52. 1 ตุลาคม 2560.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. **การแยกเชื้อบริสุทธิ์และลักษณะการเจริญเติบโต ของเชื้อบริสุทธิ์.** จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 116-134.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. **อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์.** จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 7. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 74-96.

นัทพงศ์ จันทมาศ. 2557. **กากไขมันเหลือใช้ไม่ไร้ประโยชน์: การใช้ประโยชน์จากของเสียเหลือทิ้ง (The Utilization of Waste Grease: Waste Utilization).** วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชียฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 8 ฉบับที่ 1: หน้า 47-54.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2546. **ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์.** ปรับปรุงครั้งที่ 2. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ธรบรรณการพิมพ์. เชียงใหม่. 202 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ปราณี **พัฒนพิพิธไพศาล. 2556. ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์.** เอนไซม์เทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 1. **กรุงเทพฯ.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีระ ปิยธีรวงศ์. 2555. **การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสสำหรับการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Application of lipase for preparation of polyunsaturated fatty acids).** วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 17 ฉบับที่ 1. หน้า 192-197.

สนธยา ศรีเมฆ. 2544. **ไขมัน (Lipid).** ชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. บริษัท ประชุมช่าง จำกัด.

ศิริพร จงผาติวุฒิ. 2551. **กลีเซอรอลผลิตภัณฑ์พลอยได้จากไบโอดีเซล.** วารสารส่งเสริมเทคโนโลยี 35 (198). 70-76.

อธิยา คงเซ็น. รัตนชัย ไพรินทร์. เก้ากันยา สุดประเสริฐ. วารุณี ลิ่มมั่น. 2557. **การศึกษาปริมาณกรดไขมันอิสระ ที่เกิดขึ้นในน้ำมันพืชและน้ำมันสัตว์ในขณะการเก็บรักษา (Free Fatty Acid in Vegetable oil and Animal Fat during Storage).** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 45 ฉบับที่ 2 (พิเศษ). หน้า 261-264.

อนุสิษฐ์ เกื้อกูล. 2560. **ไขมันและน้ำมัน.** (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.scimath.org/lesson-chemistry/item/7163-2017-06-04-15-11-40 . 12 กันยายน 2560.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. **Standard Solution of Sodium Hydroxide.** 15th edition. (936.16).

Bhumibhamon O., Koprasertsak A., Funthong S. 2002. **Biotreatment of High Fat and Oil Wastewater by Lipase Producing Microorganisms.** National Science. Vol.36. 261-267.

Dhiman S., Chapadgaonkar S. S. 2013. **Optimization of lipase production medium for a bacterial isolate.** International Journal of ChemTech Research. Vol.5, 6. 2837-2843.

Felix W. D., Riley M. R., Zimmt W., Kazz M. 2009. **Pretreatment of yellow grease for efficient production of fatty acid.** Biomass and Bioenergy. Vol.33. 558-563.

Godtfredsen S. E. 1990. **Microbial Lipases.** Micorbial Enzymes and Biotechnology. 2 ed. Elsevier Science Publisher. 255-274.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Jadhav S.J., Nimbalkar S.S., Kulkarni A.D., Madhavi D.L. 1996. **Lipid oxidation in biological and food systems.** Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker Inc.; New York: 5-63.

Jaeger K. E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C. van Heuvel M., Misset O. 1994. **Bacterial Lipases.** FEMS Microbial Rev. 15(1): 29-63.

Khamyot P. 1997. **Effects of dishwashing detergents on grease trap efficiency in treating restaurant wastewater [In Thai].** Unpublished master's thesis, Mahidol University.

Koc M., Cokmus C., Cihan A. C. 2015. **The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera.** Brazilian Journal of Microbiology. Vol.46, 4. 1065-1076.

Kumari A., Ahmad R., Negi S., Khare S. K. 2017. **Biodegradation of waste grease by *Penicillium chrysogenum* for production of fatty acid.** Bioresource Technology. 226. 31-38.

Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D. 2005. **Use of Yarrowia lipolytica strains for the treatment of olive mill wastewater.** Bioresource Technology. 96. 317-322.

Macrae R. G. 1983. **Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 60(2) : 243A-246A.

Mayordomo I., Randez G. F., Prieto J. A. 2000. **Isolation, purification, and characteriza tion of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*.** J. Agric Food Chem. 48:105-109.

Mitsuhashi K., Yamashita M., Hwan Y.S., Ihara F., Nihira T., Yamada Y. 1999. **Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter* nov. sp. Strain KM109.** Biosci Biotechnol Biochem. 63(11): 1959-1964.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Mobarak-Qamsari E., Karsa-Kermanshasi R., Moosavi-nejad Z. 2011. **Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM 110.** Ran. Journal Microbiology. 3(2). 92-98.

Newman C., Willard K. E. 2016. **Triglyceride Structure.** (Online). Available: http://www.cmecorner.com/wp/update-on-hypertriglyceridemia. (12 September 2017)

Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 2012. **Official Method for Fatty Acids.** 7th edition. Ca 5a-40.

Pandey A. Benjamin S., Soccol C. R., Nigam P., Krieger N., Soccol V. T. 1999. **The realm of microbial lipases in biotechnology.** Biotecnology Applied Biochem. 29:119-131.

Satyarthi J. K., Srinivas D., Ratnasamy P. 2011. **Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts.** Applied Catalysis A: General 391. 427-435.

Schaich K. M., Shahidi F., Zhong Y., Michael Eskin N. A. 2013. **Chapter 11 – Lipid Oxidation.** Biochemistry of Foods. 3rd edition. 419-478.

Singh R., Gupta N., Goswami V. K., Gupta R. 2006. **A simple activity staining protocol for lipases and esterases.** Applied Microbiology Biotechnology. 70. 679-682.

Tankeshwar A. 2013. **Triple Sugar Iron Agar (TSI): Principle, Procedure and Interpretation.** (Online). Available: https://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/. (8 November 2017)

Veerapagu M., Narayanan S. A., Jeya K. R., Alagendran S. 2014. **Isolation and Identification of a Novel Lipase Producing Bacteria from Oil Spilled Soil.** International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. Vol. 3. Issue 12. 18122-18129.

Yamane T. 1987. **Enzyme technology for the lipids industry an engineering overview.** J. Amae. Oil. Chem. Soc. 64 (2) : 1657-1661.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 อาหารแข็ง Tryptone Soya Agar

Tryptone soya broth	30	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อ

ก.2 อาหาร Corn oil agar (ดัดแปลงจากวิธีของคณะวิทยาศาสตร์ สจล.)

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Tween 80	0.01 %	โดยปริมาตร
Victoria Blue B	100	มิลลิลิตร
Corn oil	2 %	โดยปริมาตร
NaOH 1 N		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เทลงในจานเพาะเชื้อ

ก.3 อาหาร Mineral Growth Medium (ดัดแปลงจากวิธีของ Dhiman และคณะ, 2013)

Disodium hydrogen pthalate (Na_2HPO_4)	12	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Calcium Chloride ($CaCl_2$)	0.25	กรัม
Ammonium sulphate (NH_4SO_4)	2	กรัม
Olive oil	2 %	โดยปริมาตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.4 Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Triple Sugar Iron Agar	64.52	กรัม

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เตรียมเป็นวุ้นอาหารเอียง (Slant agar)

ก.5 Victoria blue B

$C_{33}H_{32}ClN_3$	1	กรัม

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ก.6 Sodium Chloride 0.89 % โดยมวลต่อปริมาตร

Sodium Chloride (NaCl)	8.9	กรัม

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.7 Sodium hydroxide 1 N

Sodium hydroxide (NaOH)	40	กรัม

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ก.8 Phenolphthalein 0.1% โดยมวลต่อปริมาตร

Phenolphthalein	0.1	กรัม
Ethanol	50	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.9 Phenol red 0.05% โดยมวลต่อปริมาตร

Phenol red sodium salt	0.05	กรัม

ละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ

ข.1 วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Standard Solution of Sodium Hydroxide, Association of Official Analytical Chemists, 1990)

เครื่องมือ

1. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร (buret หรือ burette)
2. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
4. บีกเกอร์

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N
2. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต
3. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (Phenolphthalein) 0.1%

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ประมาณ 1 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อยแล้วรินใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. เทสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมา 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด
3. นำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
4. คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

$$M_{NaOH} = \frac{(MV)_{KHP}}{V_{NaOH}}$$

M = ความเข้มข้นของสารละลาย

V = ปริมาตรของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน (Official Method for Fatty Acids, American Oil Chemists' Society, 2012)

เครื่องมือ

1. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร (buret หรือ burette)
2. กระบอกตวง ขนาด 25 ml (Cylinder)
3. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน
2. ไอโซโพพิล แอลกอฮอล์ (Isopropyl Alcohol; IPA)
3. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (Phenolphthalein) 0.1%

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ขวดชมพู่
2. เติมไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ 25 มิลลิลิตร
3. หยดฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 3-5 หยด แล้วเขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปไทเทรตกับสารละลายด่างจนได้สีชมพูอ่อน บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

$$\text{ปริมาณกรดไขมัน (\%)} = \frac{(A-B)xNx28.2}{W}$$

A	=	ปริมาตรสายละลายด่างที่ใช้ไปของตัวอย่าง
B	=	ปริมาตรสายละลายด่างที่ใช้ไปของแบลงค์
N	=	ความเข้มข้นของสายละลายด่าง
28.2	=	โมเลกุลของกรดไขมัน
W	=	น้ำหนักตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

ค.1 ตารางผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

ตารางที่ ค.1.1 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมไตรบิวทิรีน ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วัน	1				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	2.00	4.50	4.00	3.50	1.32
10	2.00	3.00	4.00	3.00	1.00
17	2.00	4.00	4.00	3.33	1.15
18	4.00	5.00	4.50	4.50	0.50
33	2.50	5.00	4.50	4.00	1.32
40	5.00	5.50	2.50	4.33	1.61
40.1	4.00	6.00	5.00	5.00	1.00
41	1.50	2.50	3.00	2.33	0.76
48	8.00	8.50	8.00	8.17	0.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.2 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมไตรบิวทิรีน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

วัน	2				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	6.00	6.00	6.00	6.00	0.00
10	5.50	4.50	5.50	5.17	0.58
17	5.00	6.00	5.00	5.33	0.58
18	7.50	6.30	6.50	6.77	0.64
33	6.00	6.50	6.00	6.17	0.29
40	3.00	3.00	3.75	3.25	0.43
40.1	7.00	9.00	7.00	7.67	1.15
41	4.00	4.00	4.00	4.00	0.00
48	11.00	11.00	11.00	11.00	0.00

ตารางที่ ค.1.3 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมไตรบิวทิรีน ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

วัน	3				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	8.00	8.00	8.00	8.00	0.00
10	7.00	7.50	7.00	7.17	0.29
17	6.00	7.00	7.50	6.83	0.76
18	9.00	7.50	9.00	8.50	0.87
33	7.30	7.50	7.00	7.27	0.25
40	3.50	4.00	3.50	3.67	0.29
40.1	10.00	10.00	9.00	9.67	0.58
41	4.00	4.00	4.50	4.17	0.29
48	13.50	14.00	14.00	13.83	0.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.4 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วัน	1				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00
10	0.50	0.50	0.33	0.44	0.10
17	1.00	1.00	1.00	1.00	0.14
18	1.75	1.50	1.75	1.67	0.14
33	1.00	1.00	1.00	1.00	0.09
40	1.00	1.00	1.00	1.00	0.05
40.1	2.50	2.66	2.50	2.55	0.38
41	0.75	0.75	0.50	0.67	0.09
48	1.50	1.50	1.50	1.50	0.14

ตารางที่ ค.1.5 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

วัน	2				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
10	1.00	1.00	0.75	0.92	0.00
17	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00
18	3.50	3.00	3.25	3.25	0.00
33	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00
40	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00
40.1	5.00	5.00	5.25	5.08	0.25
41	1.50	1.50	1.50	1.50	0.14
48	3.00	3.00	2.75	2.92	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.6 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์ม ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

วัน	3				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
10	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
17	3.00	3.00	2.50	2.83	0.25
18	4.50	5.00	5.00	4.83	0.00
33	3.00	3.00	3.00	3.00	0.00
40	3.00	3.00	3.00	3.00	0.14
40.1	7.00	7.50	7.50	7.33	0.38
41	2.00	2.25	2.25	2.17	0.29
48	4.50	4.50	4.00	4.33	0.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.7 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วัน	1				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00
10	0.50	0.50	0.33	0.44	0.10
17	0.75	0.75	0.50	0.67	0.00
18	1.00	1.00	0.75	0.92	0.14
33	0.50	0.66	0.50	0.55	0.00
40	0.75	0.75	0.66	0.72	0.00
40.1	1.75	1.00	1.50	1.42	0.09
41	0.50	0.66	0.50	0.55	0.14
48	2.00	2.25	2.00	2.08	0.00

ตารางที่ ค.1.8 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

วัน	2				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
10	1.00	1.00	1.00	1.00	0.14
17	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
18	2.00	2.00	2.00	2.00	0.25
33	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
40	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
40.1	3.50	3.00	3.33	3.28	0.14
41	1.00	1.00	0.75	0.92	0.00
48	4.00	4.00	4.00	4.00	0.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.9 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมน้ำมันปาล์มใช้แล้ว ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

วัน	3				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
10	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
17	2.00	2.25	2.50	2.25	0.29
18	3.00	3.00	3.00	3.00	0.29
33	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
40	2.00	2.00	2.25	2.08	0.00
40.1	4.50	5.00	5.25	4.92	0.29
41	1.50	1.00	1.50	1.33	0.14
48	6.00	7.00	6.00	6.33	0.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.10 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมกากไขมัน ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วัน	1				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	1.33	1.50	1.25	1.36	0.13
10	0.70	0.75	0.70	0.72	0.03
17	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00
18	1.33	1.25	1.50	1.36	0.13
33	0.70	0.75	0.66	0.70	0.05
40	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00
40.1	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
41	0.10	0.10	0.10	0.10	0.00
48	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00

ตารางที่ ค.1.11 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมกากไขมัน ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

วัน	2				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	2.66	2.50	2.50	2.55	0.09
10	1.00	1.50	1.50	1.33	0.29
17	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
18	2.50	2.66	2.50	2.55	0.09
33	1.40	1.50	1.66	1.52	0.13
40	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
40.1	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00
41	0.20	0.20	0.20	0.20	0.00
48	2.00	2.25	2.00	2.08	0.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1.12 ระยะการแพร่เฉลี่ยของเอนไซม์ไลเปสวัดจากขอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่ผสมกากไขมัน ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

วัน	3				
ไอโซเลท	1	2	3	เฉลี่ย	SD
6	4.00	4.00	4.00	4.00	0.00
10	2.25	2.00	2.00	2.08	0.14
17	1.50	1.50	1.50	1.50	0.00
18	3.50	4.00	4.00	3.83	0.29
33	2.00	2.33	2.00	2.11	0.19
40	1.00	1.50	1.50	1.33	0.29
40.1	3.00	3.00	3.00	3.00	0.00
41	0.30	0.30	0.30	0.30	0.00
48	3.00	3.00	3.00	3.00	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2 ตารางผลการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

ตารางที่ ค.2.1 ผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

ชนิดของน้ำมัน	วัน	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร)			น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เฉลี่ย	S.D.
		ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ผลต่าง				
น้ำมันใช้แล้ว	0	14.9	14.5	0.4	0.3435	1.5762	1.8390	0.23
		15.2	14.7	0.5	0.3435	1.9703		
		14.5	14.0	0.5	0.3435	1.9703		
	7	27.2	20.3	6.9	0.3435	27.1902	36.2536	9.48
		27.1	18.1	9.0	0.3435	35.4655		
		27.0	15.3	11.7	0.3435	46.1052		
	15	25.4	18.1	7.3	0.3435	28.7665	26.9275	3.89
		24.4	18.7	5.7	0.3435	22.4615		
		25.9	18.4	7.5	0.3435	29.5546		
กากไขมัน	0	21.5	18.0	3.5	0.3409	13.8973	15.8827	2.21
		21.9	18.0	3.9	0.3409	15.4856		
		22.0	17.4	4.6	0.3409	18.2651		
	7	24.5	21.0	3.5	0.3409	13.8973	15.2209	6.07
		25.6	23.1	2.5	0.3409	9.9267		
		25.3	19.8	5.5	0.3409	21.8387		
	15	22.3	21.0	1.3	0.3409	5.1619	3.9707	1.19
		22.5	21.5	1.0	0.3409	3.9707		
		22.0	21.3	0.7	0.3409	2.7795		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันและไขมันที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในอาหาร Mineral growth medium (MGM)

ชนิดของน้ำมัน	ความเข้มข้นของน้ำมัน (ร้อยละ)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร)			น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เฉลี่ย	S.D.
		ชุดทดลอง	ชุดควบคุม	ผลต่าง				
น้ำมันใช้แล้ว	0.5	22.3	18.8	3.5	0.8900	5.3231	6.7427	1.31
		23.1	17.9	5.2	0.8900	7.9087		
		23.5	18.9	4.6	0.8900	6.9961		
	1	26.1	16.6	9.5	0.1619	79.4268	71.345	14.00
		26.3	16.8	9.5	0.1619	79.4268		
		23.6	17.0	6.6	0.1619	55.1807		
	2	27.2	20.3	6.9	0.3435	27.1902	36.254	9.48
		27.1	18.1	9	0.3435	35.4655		
		27.0	15.3	11.7	0.3435	46.1052		
กากไขมัน	0.5	20.7	20.2	0.5	0.0790	8.5671	7.4248	1.98
		20.6	20.1	0.5	0.0790	8.5671		
		20.9	20.6	0.3	0.0790	5.1403		
	1	21.9	21.0	0.9	0.1561	7.8042	6.359	1.81
		22.0	21.2	0.8	0.1561	6.9371		
		22.0	21.5	0.5	0.1561	4.3357		
	2	24.5	19.8	4.7	0.3409	18.6621	15.221	4.65
		25.6	23.1	2.5	0.3409	9.9267		
		25.3	21.0	4.3	0.3409	17.0739		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าเวลาในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน

General Linear Model: FFA versus oil, day

```
Factor  Type   Levels  Values
oil     fixed       2  1, 2
day     fixed       3  0, 7, 15


Analysis of Variance for FFA, using Adjusted SS for Tests

Source   DF   Seq SS   Adj SS  Adj MS      F      P
oil       1   448.38   448.38  448.38  18.16  0.001
day       2   868.13   868.13  434.07  17.58  0.000
oil*day   2  1301.55  1301.55  650.78  26.35  0.000
Error    12   296.34   296.34   24.69
Total    17  2914.40


S = 4.96940   R-Sq = 89.83%   R-Sq(adj) = 85.60%


Unusual Observations for FFA

Obs      FFA      Fit  SE Fit  Residual  St Resid
  4  27.1902  36.2536  2.8691   -9.0634     -2.23 R
  6  46.1052  36.2536  2.8691    9.8515      2.43 R

R denotes an observation with a large standardized residual.
```

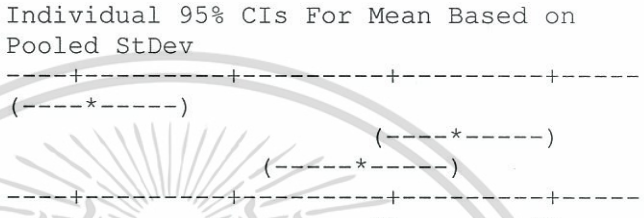
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าเวลาในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้ว

One-way ANOVA: FFA versus day

```
Source  DF      SS     MS      F      P
day      2  1900.8  950.4  27.13  0.001
Error    6   210.2   35.0
Total    8  2110.9

S = 5.918   R-Sq = 90.04%   R-Sq(adj) = 86.73%
```




```
Level  N    Mean  StDev
 0     3   1.839  0.228
 7     3  36.254  9.482
15     3  26.928  3.888

Pooled StDev = 5.918


Grouping Information Using Tukey Method

day  N    Mean  Grouping
 7   3  36.254  A
15   3  26.928  A
 0   3   1.839     B

Means that do not share a letter are significantly different.


Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of day

Individual confidence level = 97.80%


day =  0 subtracted from:

day   Lower  Center   Upper
 7   19.585  34.415  49.244
15   10.259  25.089  39.918
                            -20         0        20        40


day =  7 subtracted from:

day    Lower  Center  Upper
15   -24.155  -9.326  5.503
                            -20         0        20        40
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าเวลาในการย่อยสลายกากไขมัน

One-way ANOVA: FFA versus day

```
Source  DF     SS     MS     F      P
day      2  268.9  134.5  9.36  0.014
Error    6   86.2   14.4
Total    8  355.1

S = 3.790   R-Sq = 75.73%   R-Sq(adj) = 67.64%

                          Individual 95% CIs For Mean Based on
                          Pooled StDev
Level  N    Mean  StDev  --+---------+---------+---------+-------
 0     3  15.883  2.211                    (-------*--------)
 7     3  15.221  6.065                 (--------*--------)
15     3   3.971  1.191  (--------*--------)
                          --+---------+---------+---------+-------
                          0.0       6.0      12.0      18.0

Pooled StDev = 3.790


Grouping Information Using Tukey Method

day  N    Mean  Grouping
 0   3  15.883  A
 7   3  15.221  A
15   3   3.971     B

Means that do not share a letter are significantly different.


Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of day

Individual confidence level = 97.80%


day =  0 subtracted from:

day    Lower   Center   Upper  --------+---------+---------+---------+-
 7   -10.159   -0.662   8.835            (------*-------)
15   -21.409  -11.912  -2.415  (-------*-------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                    -12         0        12        24


day =  7 subtracted from:

day    Lower   Center   Upper  --------+---------+---------+---------+-
15   -20.747  -11.250  -1.753   (-------*-------)
                              --------+---------+---------+---------+-
                                    -12         0        12        24
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าความเข้มข้นในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้วและกากไขมัน

General Linear Model: FFA versus oil, percent

```
Factor   Type   Levels  Values
oil      fixed       2  1, 2
percent  fixed       3  0.5, 1.0, 2.0


Analysis of Variance for FFA, using Adjusted SS for Tests

Source        DF   Seq SS  Adj SS  Adj MS      F      P
oil            1   3641.1  3641.1  3641.1  69.05  0.000
percent        2   3058.3  3058.3  1529.2  29.00  0.000
oil*percent    2   3357.8  3357.8  1678.9  31.84  0.000
Error         12    632.8   632.8    52.7
Total         17  10690.1


S = 7.26190   R-Sq = 94.08%   R-Sq(adj) = 91.61%


Unusual Observations for FFA

Obs      FFA      Fit  SE Fit  Residual  St Resid
  6  55.1807  71.3448  4.1927  -16.1641     -2.73 R

R denotes an observation with a large standardized residual.
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าความเข้มข้นในการย่อยสลายน้ำมันใช้แล้ว

One-way ANOVA: FFA versus percent

```
Source   DF      SS      MS      F      P
percent   2  6275.7  3137.9  32.73  0.001
Error     6   575.2    95.9
Total     8  6850.9

S = 9.791   R-Sq = 91.60%   R-Sq(adj) = 88.81%

                          Individual 95% CIs For Mean Based on
                          Pooled StDev
Level  N    Mean   StDev  ---+---------+---------+---------+------
0.5    3   6.743   1.311  (-----*----)
1.0    3  71.345  13.998                                (-----*----)
2.0    3  36.254   9.482                     (-----*----)
                          ---+---------+---------+---------+------
                             0        25        50        75

Pooled StDev = 9.791


Grouping Information Using Tukey Method

percent  N    Mean  Grouping
1.0      3  71.345  A
2.0      3  36.254    B
0.5      3   6.743      C

Means that do not share a letter are significantly different.


Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of percent

Individual confidence level = 97.80%


percent = 0.5 subtracted from:

percent   Lower  Center   Upper  -----+---------+---------+---------+----
1.0      40.069  64.602  89.135                           (-----*-----)
2.0       4.978  29.511  54.044                 (------*------)
                          -----+---------+---------+---------+----
                             -40         0        40        80


percent = 1.0 subtracted from:

percent    Lower   Center    Upper  -----+---------+---------+---------+----
2.0      -59.624  -35.091  -10.558  (-----*-----)
                                    -----+---------+---------+---------+----
                                       -40         0        40        80
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองแปรค่าความเข้มข้นในการย่อยสลายกากไขมัน

One-way ANOVA: FFA versus percent

```
Source   DF      SS     MS     F      P
percent   2  140.45  70.22  7.31  0.025
Error     6   57.65   9.61
Total     8  198.10

S = 3.100   R-Sq = 70.90%   R-Sq(adj) = 61.20%

                          Individual 95% CIs For Mean Based on
                          Pooled StDev
Level  N    Mean  StDev  ------+---------+---------+---------+---
0.5    3   7.425  1.978    (--------*--------)
1.0    3   6.359  1.805  (--------*-------)
2.0    3  15.221  4.653                    (--------*--------)
                          ------+---------+---------+---------+---
                              5.0       10.0      15.0      20.0

Pooled StDev = 3.100


Grouping Information Using Tukey Method

percent  N    Mean  Grouping
2.0      3  15.221  A
0.5      3   7.425    B
1.0      3   6.359    B

Means that do not share a letter are significantly different.


Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of percent

Individual confidence level = 97.80%


percent = 0.5 subtracted from:

percent   Lower  Center   Upper  -------+---------+---------+---------+--
1.0      -8.833  -1.066   6.701          (-------*-------)
2.0       0.029   7.796  15.563                   (-------*-------)
                                -------+---------+---------+---------+--
                                     -10         0        10        20


percent = 1.0 subtracted from:

percent  Lower  Center   Upper  -------+---------+---------+---------+--
2.0      1.095   8.862  16.629                    (-------*-------)
                                -------+---------+---------+---------+--
                                     -10         0        10        20
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้