สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืช

นายณัฐพงษ์ ธนะไพรินทร์
นางสาวรุ่งนภา วิมลทรัพย์
นางสาวสวรส ทับทิมดี

2ฟ
ส463391
9549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72586
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550

.b 11769725
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and selection fungi from oil factory for lipase production

Mr. Natthapong Thanapirin

Miss Rungnapa Vimolsub

Miss Sawarot Thubthimdee

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Biotechnology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืช

นักศึกษา นายณัฐพงษ์ ธนะไพรินทร์
นางสาวรุ่งนภา วิมลทรัพย์
นางสาวสวรส ทับทิมตี
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2549

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ กรรมการ ผศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ กรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	

.....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	**การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืช**
นักศึกษา	**นายณัฐพงษ์ ธนะไพรินทร์** **นางสาวรุ่งนภา วิมลทรัพย์** **นางสาวสวรส ทับทิมดี**
ภาควิชา	**ชีววิทยาประยุกต์**
สาขาวิชา	**จุลชีวอุตสาหกรรม**
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	**ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	**ผศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์**

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในปริมาณสูงจากกากพืชน้ำมันเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกแหล่งที่มา และสายพันธุ์เชื้อรา ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเน้นที่พืชน้ำมันเศรษฐกิจ คือ ปาล์มสายพันธุ์ไทย ปาล์มสายพันธุ์มาเลเซีย ทานตะวัน และถั่วเหลือง จากผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงโดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในการย่อยน้ำมัน จากเชื้อรา 9 ไอโซเลต จากทั้งหมด 32 ไอโซเลต ในแหล่งต่างกันคือ ตามโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันทานตะวัน และเชื้อราจากดิน(ศึกษาเพิ่มเติมพิเศษ) อีก 30 ไอโซเลต พบว่าเชื้อราจากกากทานตะวัน บริเวณลานตากกลางแจ้ง (SUN 08) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในกลุ่มกากพืชน้ำมันทั้งหมดที่นำมาทดสอบ คือมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.6583 ยูนิต/มล. ส่วนบริเวณเครื่องบีบอัดน้ำมันกากทานตะวัน (SUN 05) เชื้อราที่พบมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดคือ 0.452 ยูนิต/มล. แต่ทั้งนี้ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมคือ เชื้อราจากดิน (BGG 06) พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 1.9800 ยูนิต/มล. โดยทั้ง 9 ตัวอย่างมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันฉะนั้นประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ตัวอย่างเชื้อราจากดิน(BGG 06) จึงดีที่สุด ส่วนเชื้อราอีก 8 ตัวอย่างนั้นประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมัน จะมีค่าที่ใกล้เคียงกันแต่จะน้อยกว่าเชื้อราจากดิน (BGG 06)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project	Isolation and selection fungi from oil factory for lipase production
Name	Mr. Natthapong Thanapirin
	Miss Rungnapa Vimolsub
	Miss Sawarot Thubtimdee
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2006
Special Project Advisor	Asst. Prof. Aree Rittiboon
Special Project Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Marisa Jatupornpipat

Abstract

In isolating and selecting fungi, which are able to produce lipase enzyme from oil plant in high quantity, their sources and species need to be concerned, for the effectiveness of lipase enzyme production. The selected oil sources, which are mostly industrial drop, are Thai palm, Malaysian palm, sunflower, and soybean. The experiment is to analyze quality of lipase enzyme's digestive activity of 9 isolate from total 32 isolate from different sources, which are palm oil factory, soybean oil, and sunflower oil, including 30 isolate in fungi from soil (additional study). The result of isolating and selecting fungi, which are able to produce lipase enzyme in high quantity, proves that fungi from sunflower pomace from sun-dried area (sun 08) possess the highest quality of enzyme activity. Its quality of enzyme activity is 0.6583unit/ml. While around the compress machine of the sunflower pomace oil (SUN 05), the found fungi possess the lowest enzyme activity, which is only 0.452unit/ml. Besides, the additional study of fungi from soil (BGG 06) proves the highest enzyme activity, which is 1.9800unit/ml. As the 9 isolate possess similar quality of enzyme activity, the fungi from soil (BGG 06), therefore, is the best for effectively enzyme digesting. The other 8 isolate of fungi, which have quality of oil digestion, possess the similar quality of enzyme activity but less than the fungi from soil (BGG 06).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีวอุตสาหกรรม ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการช่วยเหลือ และการสนับสนุน จากบุคคลผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์อาจารย์ร่วมที่ปรึกษา และกรรมการโครงงานพิเศษ ที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษา ระหว่างการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่เป็นประธานกรรมการ และกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้อ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆสำหรับใช้ในการทดลองและช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่างๆทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บริษัทสีมาอินเตอร์โปรดักส์ อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา บริษัทไทยวัฒนาจำกัด อ.บางละมุง จ.ชลบุรี และบริษัทบุศราคัมซันฟลาวเวอร์ จำกัด อ.วังม่วง จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่เก็บตัวอย่างวัตถุดิบ และช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่างๆทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ครอบครัว เพื่อนๆที่ให้กำลังใจและผู้มีส่วนร่วมในโครงงานพิเศษทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ และเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ

นายณัฐพงษ์ ธนะไพรินทร์
นางสาวรุ่งนภา วิมลทรัพย์
นางสาวสวรส ทับทิมดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 สบู่ดำ	4
2.2 คุณสมบัติน้ำมันใช้แล้ว	6
2.3 ไบโอดีเซล	7
2.4 เชื้อรา	13
2.5 เอนไซม์ไลเปส	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	25
3.1 วิธีการทดลอง	26
3.1.1 การทำการแยกเชื้อตัวอย่าง	26
3.1.2 การตรวจสอบความบริสุทธ์ของเชื้อ	26
3.2 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เชิงปริมาณ	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล	30
4.1 ผลการแยกเชื้อราจากตัวอย่างโรงงาน	30
4.2 ผลการคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส	32
4.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์เชิงคุณภาพ	38
4.4 อภิปรายผลการทดลอง	39
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	49
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสง	50
ภาคผนวก ค การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันสบู่ดำ	6
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างคุณสมบัติของน้ำมันใช้แล้วจาก 2 แหล่ง	6
ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	11
ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันสบู่ดำและน้ำมันดีเซล	23
ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณต่างๆ	30
ตารางที่ 4.2 เชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณต่างๆ	31
ตารางที่ 4.3 เชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณต่างๆ	31
ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากปาล์ม	32
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากทานตะวัน	33
ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง	34
ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้ดิน	36
ตารางที่ 4.8 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่คัดเลือก	38
ตารางที่ 4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต SUN 06 และ BGG 07	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ลักษณะของคอกสบู่ดำ	4
รูปที่ 2.2 ลักษณะของเมล็ดสบู่ดำ	5
รูปที่ 2.3 เมล็ดสบู่ดำหีบเป็นน้ำมันไบโอดีเซล	5
รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการแยกสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อน	8
รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นจากไตรกรีเซอร์ไรด์และแอลกอฮอล์	9
รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่นจากกรดไขมันอิสระโดยความร้อน	9
รูปที่ 2.7 ฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่นจากเอสเทอร์ในปฏิกิริยาที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ	9
รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเกิดจากกรดไขมันอิสระ	10
รูปที่ 2.9 ภาพจำลองเอนไซม์ไลเปส	11
รูปที่ 2.10 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	12
รูปที่ 2.11 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	12
รูปที่ 2.12 สปอร์ภายในอับสปอร์ และสปอร์ที่ไม่ได้อยู่ภายในอับสปอร์ หรือคอนิเดียม	14
รูปที่ 2.13 วงชีวิตของ Rhizopus sp. ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง zygospore	15
รูปที่ 2.14 แสดงรูปร่างและภาคตัดขวางของ ascocarp แบบต่างๆ	16
รูปที่ 2.15 แสดงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore ใน ascus	17
รูปที่ 2.16 แสดงการสืบพันธุ์ของยีสต์	18
รูปที่ 2.17 แสดงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง basidiospore บน basidium	19
รูปที่ 2.18 แสดงลักษณะคอนิดิโอฟอร์ของ Aspergillus (ก) Penicillium (ข)	20
รูปที่ 2.19 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะกลุ่มที่ 1	22
รูปที่ 2.20 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะกลุ่มที่ 2	23
รูปที่ 2.21 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะกลุ่มที่ 3	23
รูปที่ 4.1 ลักษณะเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา BGG 06 และ SUN 08 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรที่ 2 เป็นเวลา 3 วัน	40
รูปที่ 4.2 ลักษณะการเกิดวงใส ของเชื้อรา BGG 06 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Tributyrin เป็นเวลา 3 วัน	40
รูปที่ 4.3 ลักษณะการเกิดวงใส ของเชื้อรา SUN 08 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Tributyrin เป็นเวลา 3 วัน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.4 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร PDA เป็น เวลา 7 วัน 42

รูปที่ 4.5 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน 42

รูปที่ 4.6 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า 43

รูปที่ 4.7 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า 43

รูปที่ 4.8 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blueและศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า 44

รูปที่ 4.9 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต BGG 07 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blueและศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า 44

รูปที่ 4.10 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 1200 เท่า 45

รูปที่ 4.11 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 1200 เท่า 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

จากความต้องการพลังงานเชื้อเพลิงที่สูงมากในปัจจุบันส่งผลให้พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียม ที่ได้จากฟอสซิล (Fossil Fuel) ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และมีแนวโน้มที่จะหมดลงในไม่ช้านี้ จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยน้ำมันที่สามารถช่วยลดปัญหาเหล่านี้

ไบโอดีเซล (Biodiesel) จึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงสำรองได้ในภายภาคหน้า เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นพืชน้ำมันที่มีปลูกอยู่เกือบทุกภาคของประเทศไทย อาทิเช่น มะพร้าว ปาล์ม ทานตะวัน ถั่วเหลือง และสบู่ดำพืชที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างสูง ในขณะนี้รวมไปถึงไบโอดีเซล ที่ได้จากน้ำมันที่เหลือจากการประกอบอาหารตรงจุดนี้ที่เองที่ทำให้ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่เชื้อเพลิงที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมากและยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันที่ได้จากฟอสซิล (ศศิธร, 2544)

ไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล (Biomass) สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับยานพาหนะได้ โดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซล (diesel) จึงสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยไม่จำเป็นต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ อีกทั้งยังช่วยรักษาสภาพเครื่องยนต์ ให้ใช้งานได้นานอีกด้วย เนื่องจากออกซิเจนในไบโอดีเซลให้การสันดาปที่ดีกว่าดีเซลปกติ ทำให้มีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงช่วยลดการอุดตันของระบบไอเสีย นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังเป็นเชื้อเพลิงสะอาด กล่าวคือไม่มีก๊าซซัลเฟอร์ (Sulfur) จากการเผาไหม้และไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ การใช้ไบโอดีเซล สามารถลดปรากฏการณ์ฝนกรด ลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ กลุ่มซัลเฟอร์ไดออกไซด์และสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่สมบูรณ์ลงได้ (Dossat, 2001) ทำให้ไบโอดีเซลได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน

อย่างไรก็ดีสารชีวมวลที่ได้จากพืชหรือน้ำมันจากสัตว์ชนิดต่างๆไม่สามารถนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยตรง (วัฒนาและคณะ, 2526) เนื่องจากน้ำมันเหล่านี้มีค่าความหนืดสูงกว่าน้ำมัน ดีเซลประมาณ 10-20 เท่า มีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันอิสระที่อยู่ในน้ำมัน และยางเหนียว (Gum) เนื่องจากปฏิกิริยาการรวมตัวกับออกซิเจน (Oxidation) การตกตะกอนของคาร์บอน และปฏิกิริยาการเกิดเป็นโพลิเมอร์ (Polymer) ในขั้นตอนการเก็บและการเผาไหม้ (Combustion) มีน้ำเป็นองค์ประกอบเป็นต้น จึงได้มีผู้ที่จะดัดแปลงคุณภาพของน้ำมันต่างๆ ให้ใกล้เคียงกับคุณสมบัติของน้ำมันดีเซลโดยทำได้หลายวิธีคือการเจือจาง (Dilution) ไมโครอิมัลซิฟิเคชั่น (microemulsification) ไพโรไลซิส (pyrolysis) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (tanesterification)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น เป็นวิธีการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันวิธีหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมในการสังเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซล เนื่องจากทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ กระบวนการไม่ยุ่งยาก เป็นกระบวนการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีทั้งใช้กรด เบส และเอนไซน์ไลเปส เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ แอลคิลเอสเทอร์ โดยทั่วไปการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นที่นิยมเนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสั้น แต่การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดอยู่หลายประการคือ มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากผลิตภัณฑ์มากใช้ ต้องใช้พลังงานสูงในการเกิดปฏิกิริยา (ปวีณา, 2547)

ดังนั้นการใช้เอนไซน์ไลเปสจึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งการใช้เอนไซน์นั้น มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ประหยัดพลังงานในการผลิต ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ช่วยลดความหนืดในน้ำมันจะได้ผลผลิตต่ำเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันนี้ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถผลิตเอนไซน์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซน์ไลเปสที่มีคุณสมบัติต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการผลิต แต่การใช้เอนไซน์ไลเปสยังมีข้อจำกัดในด้านราคา สายพันธุ์ที่สังเคราะห์เอนไซน์และความคงตัวของไลเปสในบางสายพันธุ์ (ปวีณา, 2547) ซึ่งการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะนำมาสังเคราะห์เอนไซน์ก่อนที่จะนำเอนไซน์ไปใช้ทำปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนั้น เป็นแนวทางที่จะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ลงได้ดัง นั้นจึงมีแนวคิดที่จะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรา เพื่อหาสายพันธ์ที่ดี มีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซน์ไลเปสและศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยใช้เอนไซน์ที่สังเคราะห์จากเชื้อราเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.1.1 ศึกษาการคัดเลือกเชื้อราจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืช และจากดินที่สามารถสังเคราะห์เอนไซน์ไลเปสได้ในปริมาณสูง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน

1.1.2 ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสในเชิงปริมาณ โดยการเกิดขนาดวงใสและเชิงคุณภาพโดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

1.1.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการศึกษาการคัดเลือกเชื้อราในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืชที่ต่างชนิดกันในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน โดยคัดเลือกสายพันธุ์ ที่มีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซน์ไลเปสให้ได้ปริมาณมากที่สุด โดยการทดสอบเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูงในการผลิตเอนไซน์ไลเปส

1.3.2 สามารถคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สามารถใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 สบู่ดำ

สบู่ดำ เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง น้ำมันที่ได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่เกษตรกรใช้ได้อยู่ โดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค ใช้ปลูกเป็นแนวรั้วเพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงเข้าไปทำลายผลผลิต เนื่องจากมีสารพิษ Hydrocyanic มีกลิ่นเหม็นเขียว สบู่ดำจึงเป็นพืชที่น่าให้ความสนใจเป็นอย่างยิ่งในสภาวะที่ราคาน้ำมันดีเซลมีราคาสูงอย่างในปัจจุบัน สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas* Linn. อยู่ในวงศ์ไม้ยางพารา ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสนำเข้ามาปลูกในประเทศไทย ในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อนำมาบีบน้ำมันสำหรับทำสบู่ ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคเหนือเรียกว่ามะหุ่งยั้ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามะเยาหรือสีหลอด ภาคใต้เรียกว่ามาเกาะ(http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.htm)

2.1.1 ลักษณะสบู่ดำ

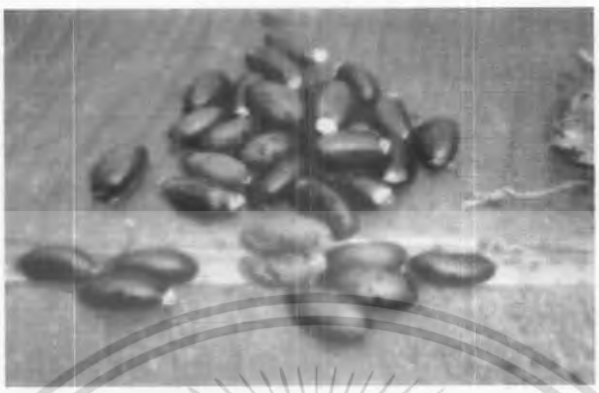
ต้นสบู่ดำ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง ความสูง 2-7 เมตร ลำต้นและยอดคล้ายละหุ่ง แต่ไม่มีขน ลำต้นเกลี้ยงเกลาใช้มือหักได้ง่ายเพราะเนื้อไม้ไม่มีแก่น ใบหยักคล้ายใบละหุ่งแต่หยักตื้นกว่ามี 4 หยัก ดอกสบู่ดำ ดอกสบู่ดำเป็นช่อกระจุกที่ปลายส่วนปลายยอด ขนาดเล็กสีเหลือง มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ มีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมียในช่อเดียวกันผลสบู่ดำ ผลมีลักษณะเป็นพู โดยส่วนมากจะมี 3 พู สีเขียวอ่อน เวลาสุกแก่จัดจะมีสีเหลือง อายุของผลสบู่ดำตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ประมาณ 60-90 วัน

รูปที่ 1 ลักษณะของดอกสบู่ดำ

ที่มา : http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดสบู่ดำ เมล็ดมีสีดำ ขนาดเล็กกว่าเมล็ดละหุ่งพันธุ์ลายขาวดำเล็กน้อย สีตรงปลายเมล็ดมีจุดสีขาวเล็ก ๆ ติดอยู่ ความยาวประมาณ 1.7-1.9 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.8-0.9 เซนติเมตร น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 69.8 กรัม



รูปที่ 2 ลักษณะของเมล็ดสบู่ดำ

ที่มา : http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.htm

2.1.2 ประโยชน์ของสบู่ดำ

1. ยางจากก้านใบ ใช้ป้ายรักษาโรคปากนกกระจอก ห้ามเลือด แก้ปวดฟัน แก้ลิ้นเป็นฝ้าขาว โดยผสมกันน้ำนมมารดาป้ายลิ้น

2. ลำต้น ตัดเป็นท่อนต้มน้ำให้เด็กกินแก้ซางตาลขโมย ตัดเป็นท่อนแช่น้ำอาบแก้โรคพุพอง ใช้เป็นแนวรั้วป้องกันสัตว์เลี้ยง เช่น โค กระบือ ม้า แพะ เข้าทำลายผลผลิต

3. เมล็ดหีบเป็นน้ำมัน ใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล ใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้กากที่เหลือจากการหีบน้ำมัน ซึ่งมีธาตุอาหารหลัก มากกว่าปุ๋ยหมักและมูลสัตว์หลายชนิด และยังมีสารพิษ Curcin มีฤทธิ์เหมือนสลอด เมื่อกินเข้าไปแล้วจะทำให้ท้องเดิน

รูปที่ 3 เมล็ดสบู่ดำหีบเป็นน้ำมันไบโอดีเซล

ที่มา : http://aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันสบู่ดำ

คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำ	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ค่าความถ่วงจำเพาะ	0.915
ดัชนีหักเห	1.4634
ค่าของกรด (AV), มิลลิกรัม KOH/กรัมน้ำมัน	0.99
ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ร้อยละ)	n/a
ค่าไอโอดีนแบบวิจส์, เซนติกรัมไอโอดีน/กรัมน้ำมัน	101.40
ค่าสะปอนนิฟิเคชั่น, มิลลิกรัม KOH/กรัมน้ำมัน	145.20
ปริมาณน้ำและสิ่งที่ระเหยได้, %น้ำหนัก	0.14
ค่าความหนืดที่ 40 องศาเซลเซียส, เซนติโตรก	40.29
ค่าความร้อน, กิโลแคลอรี/กิลกรัม	9,328

As lauric acid, %FFA (As lauric acid) = AV/2.81, n/a ไม่มีข้อมูล

ที่มา : กรมส่งเสริมการเกษตร (2547)

2.2 น้ำมันใช้แล้ว

น้ำมันใช้แล้วเป็นน้ำมันที่ได้จากการใช้ในครัวเรือน ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นได้ได้อีก จึงมีแนวคิดที่นำมาทดลองใช้เป็นวัตถุดิบการผลิตไบโอดีเซล โดยผ่านกระบวนการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

คุณสมบัติของน้ำมันที่ใช้แล้ว

คุณสมบัติของน้ำมันที่ใช้แล้วขึ้นกับน้ำมันที่นำมาใช้ ฉะนั้นน้ำมันใช้แล้วที่มาจากน้ำมันต่างชนิดกันจึงมีคุณสมบัติต่างกัน

ตารางที่ 2 เป็นตัวอย่างคุณสมบัติของน้ำมันใช้แล้วจาก 2 แหล่ง

คุณสมบัติค่าการวิเคราะห์	น้ำมันพืชใช้แล้ว 1	น้ำมันพืชใช้แล้ว 2
ค่าความถ่วงจำเพาะ	0.866	0.865
ดัชนีหักเห	1.459	1.459
ค่าของกรด (AV), มิลลิกรัม KOH/กรัมน้ำมัน	1.37	0.33
ปริมาณกรดไขมันอิสระ, (ร้อยละ)	0.49	0.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติค่าการวิเคราะห์	น้ำมันพืชใช้แล้ว 1	น้ำมันพืชใช้แล้ว 2
ค่าไอโอดีนแบบวิจส์, เซนติกรัมไอโอดีน/กรัมน้ำมัน	119.39	57.49
ค่าสะปอนนิฟิเคชั่น, มิลลิกรัม KOH/กรัมน้ำมัน	191.53	194.78
ปริมาณน้ำและสิ่งที่ระเหยได้, %น้ำหนัก	0.13	0.11
ค่าความหนืดที่ 40 องศาเซลเซียส, เซนติโตรก	24.90	24.70
ค่าความร้อน, กิโลแคลอรี/กิลกรัม	n/a	9410

As lauric acid, %FFA (As lauric acid) = AV/2.81, n/a ไม่มีข้อมูล

2.3 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลโดยทั่วไป มีองค์ประกอบที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมดีเซล ซึ่งสามารถผลิตได้จากน้ำมันจากพืชและน้ำมันจากสัตว์ กระบวรการผลิตทำได้หลายวิธี แต่โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นโดยกลีเซอไรด์ในไขมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์กับเมทานอลเป็นสารตั้งต้น(Foidl และคณะ, 1997)

2.3.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการทั่ว ๆ ไปที่ปัจจุบันใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมีดังนี้ ทั้งที่เป็นแบบยากและง่าย แบบง่ายจะได้มาจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น และการผสมโดยตรง ตัวอย่างการผลิตดังต่อไปนี้ (Martinez และคณะ, 2006)

2.3.1.1 การใช้โดยตรง (direct use and blending)

2.3.1.2 ไมโครอิมัลชั่น (microemultion)

2.3.1.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermalcracking or pyrolysis)

2.3.1.4 กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งประกอบไปด้วยวิธีการย่อย ๆ ก็คือ

2.3.1.4.1 สปอนิฟิเคชั่น (sponification)

2.3.1.4.2 เอสเทอริฟิเคชั่น (esterification)

2.3.1.1 การใช้โดยตรง (direct usc and blending)

การใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรือผสมลงในน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่าง ๆ เพื่อต้องการลดความหนืดของน้ำมันพืช เมื่อนำมาใช้จะก่อปัญหากับเครื่องยนต์ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถทำงานได้ดีกับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม แต่ก็มีปัญหามากมายเกิดขึ้นตามมา เช่น มียางเหนียวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไขมันอิสระในระหว่างการเก็บรักษา หรือปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่น (Polymerization) จากขั้นตอนการเผาไหม้ ซึ่งลักษณะการเผาผลาญพลังงานระหว่างน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันดีเซลพบว่าเป็นไปในแบบเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของ น้ำมันพืชต่อน้ำมันดีเซล ในอัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

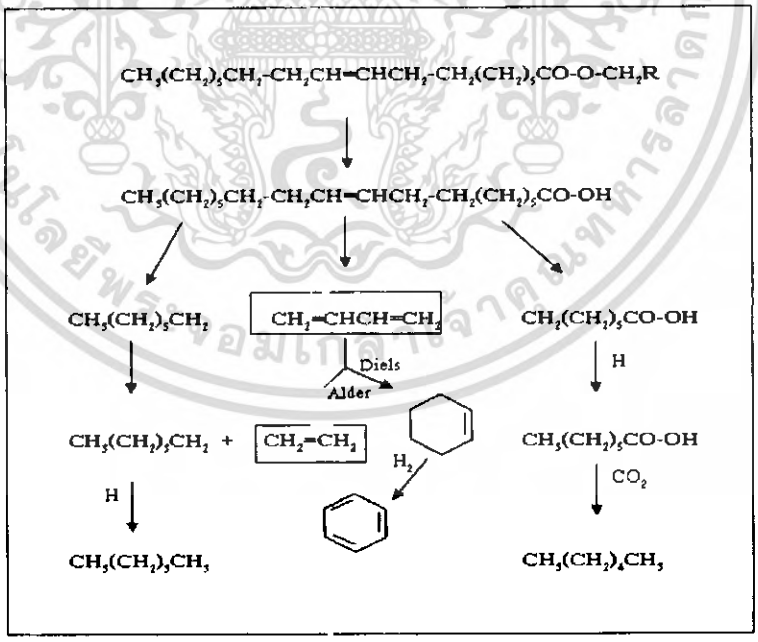
2.3.1.2 ไมโครอิมัลชั่น (Microemultion)

ไมโครอิมัลชั่น คือ คอลลอยด์ที่อยู่ในสภาวะสมดุลของระบบสองวัตภาคระหว่างน้ำและน้ำมัน ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 1-150 นาโนเมตร ต้องมีสารช่วยลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดมีประจุและไม่มีประจุเพื่อทำให้เกิดความคงสภาพ วิธีการทำไมโครอิมัลชั่นนี้ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืด โดยการใช้สารละลาย เช่น แอลกอฮอล์

คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชั่นจะคล้ายกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

2.3.1.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermalcracking or pyrolysis)

ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่นโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 450-850 องศาเซลเซียส ไขมันสามารถถูกไพโรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลงได้ดังแสดงในรูปที่ 1 แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกกำจัดออกไป ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้กระบวนการนี้ มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนน้ำมันเบนซินมากกว่าเกิดไบโอดีเซล



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาการแยกสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อน

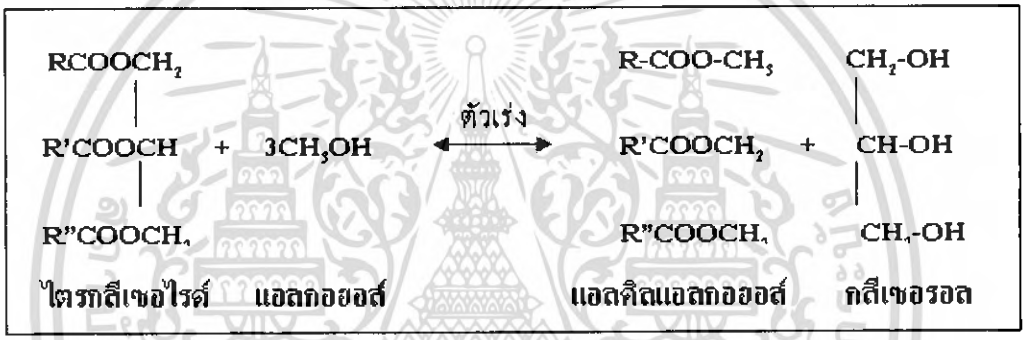
ที่มา : Martinez และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.4 กระบวนการเกิดทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไขมันสัตว์ หรือน้ำมันพืช กับแอลกอฮอล์ เพื่อเปลี่ยนรูปสารประกอบเป็นสารประกอบเอสเทอร์โดยผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาเป็นไปดังรูปที่ 2 ซึ่งปฏิกิริยาเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับและการเติมแอลกอฮอล์มากเกินมักจะใช้เพื่อเป็นการบังคับปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สัดส่วนโดยโมล ของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน คือ 3 : 1 ซึ่งตัวเร่งที่ใช้ในนี้มีทั้งสารละลายกรด สารละลายเบส และเอนไซม์ไลเปส

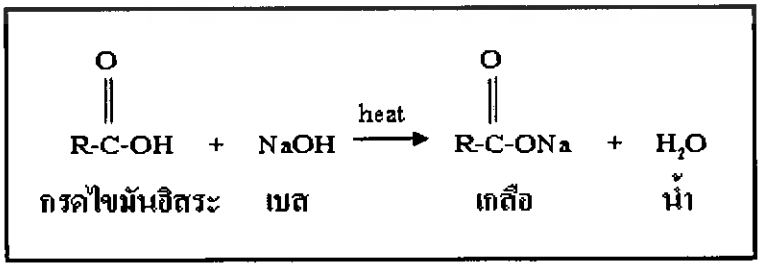
ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นที่สุดและเป็นของเหลวที่มีขั้วสูง ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้มากที่สุดดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นจากไตรกรีเซอร์ไรด์และแอลกอฮอล์

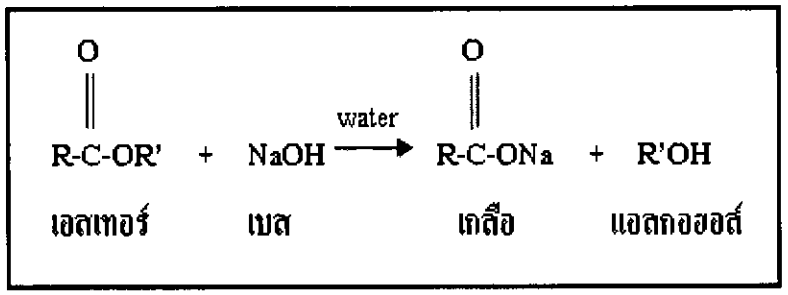
2.3.1.4.1 สปอนิฟิเคชั่น (sponification)

ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่นเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสบู่ขึ้น สามารถเกิดได้จากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระกับสารละลายเบสโดยมีความร้อนในปฏิกิริยา หรือ เอสเทอร์กับสารละลายเบสโดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา



รูปที่ 6 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่นจากกรดไขมันอิสระโดยความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

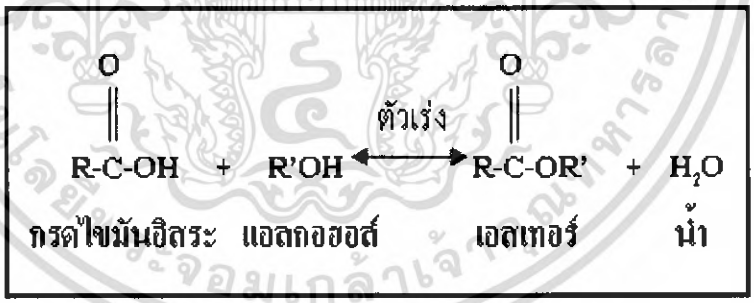


รูปที่ 7 ปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่นจากเอสเทอร์ในปฏิกิริยาที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ

จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยา กล่าวคือ ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้เป็นแอลคิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลได้ แต่กลับทำให้กรดไขมันอิสระและแอลคิลเอสเทอร์เปลี่ยนเป็นสบู่ซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการ และทำให้ต้องกำจัดสบู่เหล่านั้นออกอีกด้วย

2.3.1.4.2 เอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification)

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเกิดจากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระ และแอลกอฮอล์ ได้สารผลิตภัณฑ์คือ เอสเทอร์ ดังรูปที่ 8 ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้โดยใช้เอนไซม์ไลเปส หรือใช้กรดแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



รูปที่ 8 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเกิดจากกรดไขมันอิสระ

2.3.2 การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นสามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด ดังนี้

1. เบส
2. กรด
3. เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีข้อจำกัดดังนี้ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรง สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้องปฏิกิริยามีความจำเพาะสูงง่ายต่อการแยกกลีเซอรอล ไม่มีกระบวนการล้างที่ยุ่งยาก

รูปที่ 9 ภาพจำลองเอนไซม์ไลเปส
ที่มา : www.biofitweb.com

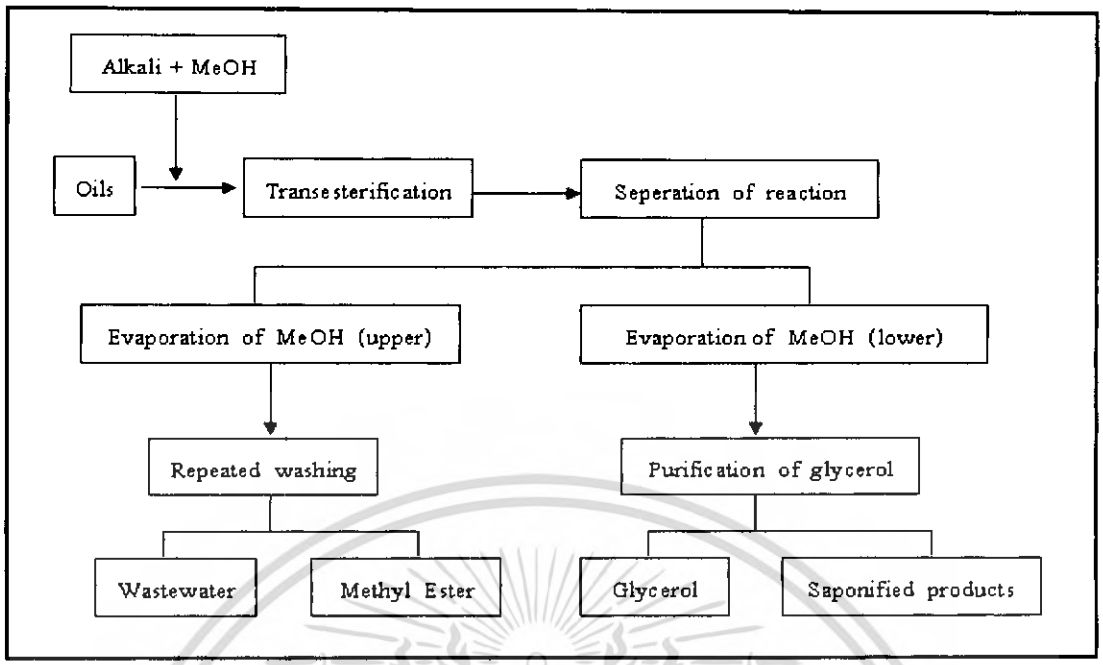
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Properties	Alkali-catalysis process	Lipase-catalysis process
Reaction Temperature	60-70 ^{o}C	30-40 ^{o}C
Free fatty acid in raw material	Saponified product	Methyl esters
Water in raw material	Interferance with the reaction	No influence
Yield of methyl esters	Normal	Higher
Recovery of glycerol	Diffucult	Easy
Purifivation of methyl ester	Repeated washing	None
Production cost of catalyst	Cheap	Relatively expensive

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

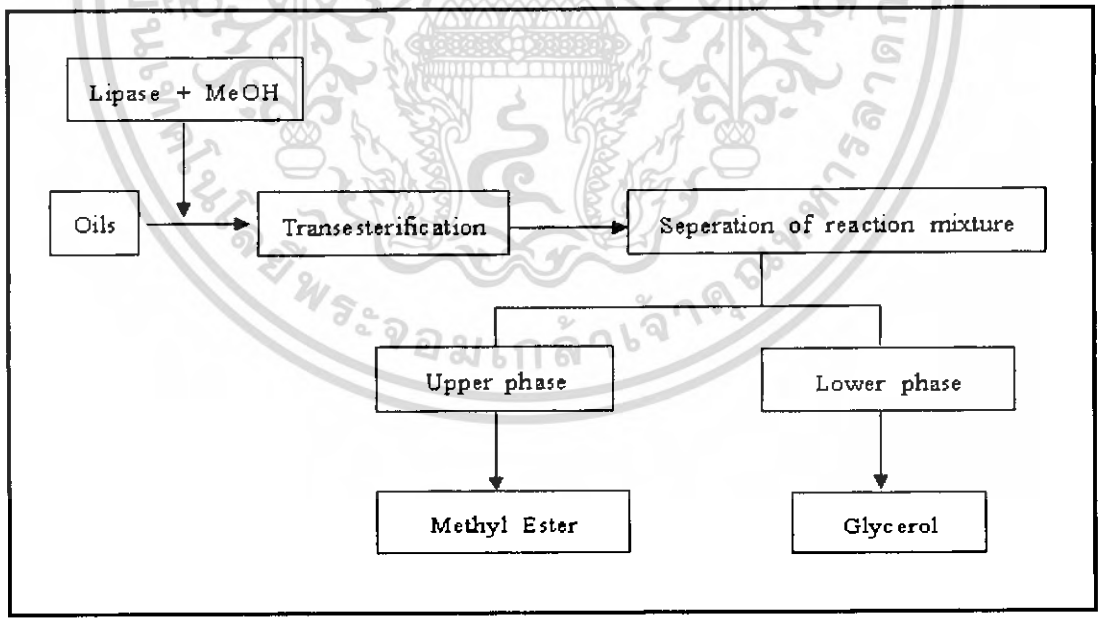
เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแสดงดังรูปที่ 10 และ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)



รูปที่ 11 แผนภูมิการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ที่มา : Fukuda และคณะ (2001)

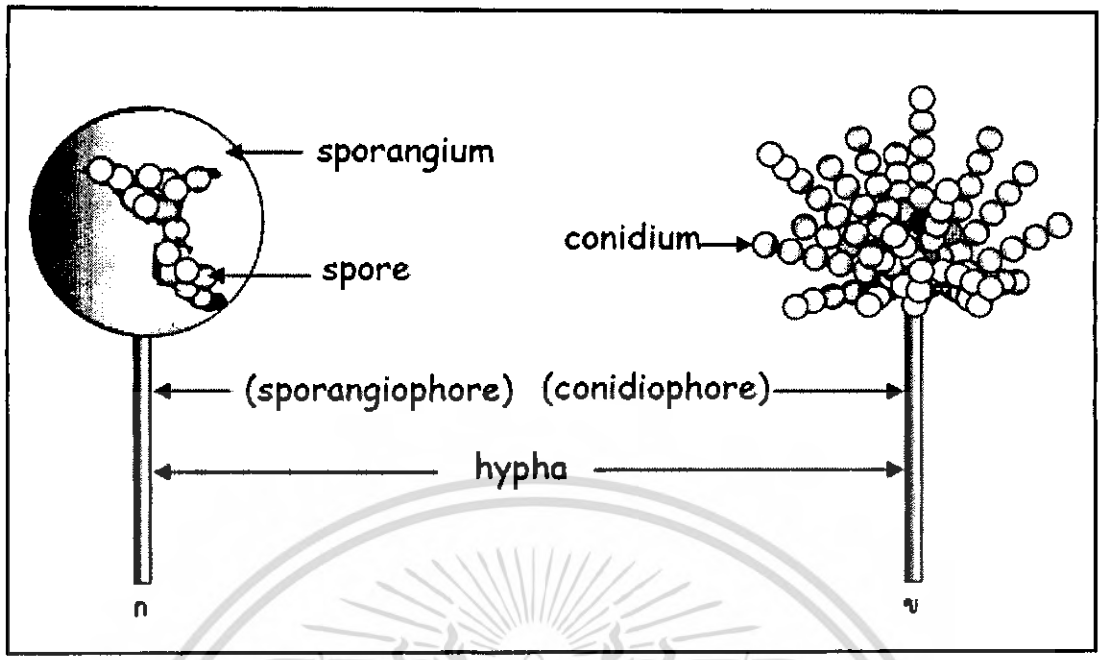
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เชื้อรา (Fungi)

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตพวกยูคารีโอต (eukaryote) โดยทั่วไปเป็นสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ (multicellular organism) แต่บางกลุ่มก็เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยว (unicellular organism) เซลล์ของเห็ดราจะมีผนังเซลล์ (cell wall) ล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ผนังเซลล์ของเห็ดราประกอบขึ้นจากสารประกอบไคติน(chitin) ซึ่งแตกต่างจากผนังเซลล์ของพืชที่มีองค์ประกอบหลักเป็นพวกเซลลูโลส (cellulose) ในอดีตเห็ดราถูกจัดเอาไว้เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มเดียวกับพืช ต่อมาก็ถูกจับแยกออกจากพืชแล้วจัดไว้ในอาณาจักรโพรติสตา (Protista) เนื่องจากเห็ดราไม่มีระยะเอมบริโอ (embryo) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรพืช และในที่สุดจากข้อมูลต่างๆที่ได้จากการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความเห็นว่าเห็ดรามีความสัม พันธ์ใกล้ชิดกับสัตว์ในทางวิวัฒนาการมากกว่าพืชโดยอาจมีบรรพบุรุษร่วมกันกับสัตว์ โดยวิวัฒนาการมาจากสิ่งมีชีวิตพวกโพรทิส (protist) บางชนิดที่มีแฟลกเจลลา (flagella) และอาศัยอยู่ในน้ำ นักวิทยาศาสตร์จึงจับเห็ดราแยกออกมาจากอาณาจักรโพรติสตา แล้วยกระดับขึ้นมาเป็นอาณาจักรใหม่คืออาณาจักรฟังไจ (Kingdom Fungi) เห็ดราส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเส้นใยที่เรียกว่า ไฮฟา (hypha) ซึ่งอาจมีการแตกแขนงและสานกันไปมารวมกันกลายเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) กลุ่มไมซีเลียมของราบางชนิดอาจเรียงตัวอัดกันแน่น และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บางบริเวณ โดยเฉพาะบริเวณรอบนอกของไมซีเลียมทำให้มีลักษณะคล้ายเป็นเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียว่า "fruiting body" ตัวอย่างของ fruiting body ของราที่เห็นได้ชัดเจนได้แก่ เห็ดชนิดต่างๆ โดยปกติไฮฟาของเห็ดรามีลักษณะที่ประกอบขึ้นจากเซลล์หลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว โดยมีผนังกั้น (septum) กั้นแบ่งไฮฟาออกเป็นเซลล์ เรียกลักษณะไฮฟาแบบนี้ว่า "septate hypha" แต่เห็ดราบางชนิดไฮฟาจะมีไม่มีผนังกั้น เรียกไฮฟาแบบนี้ว่า "non-septate hypha" ดังนั้นไฮฟาของเห็ดราพวกนี้จะมีไซโทพลาซึม (cytoplasm) ที่ต่อเนื่องกันไปตลอดทั้งสาย และภายในมีนิวเคลียส (nucleus) อยู่เป็นจำนวนมากกระจายอยู่ภายในเส้นใยไฮฟา

การสืบพันธุ์ของเห็ดรามีทั้งแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) และแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยปกติราจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ (spore) ที่อยู่ภายในอับสปอร์ (sporangium) โดยอับสปอร์จะเกิดอยู่ที่ปลายของไฮฟา (รูปที่12 ก) หรืออาจสร้างสปอร์ที่ไม่ได้อยู่ภายในอับสปอร์แต่จะเรียงอยู่เป็นแถวที่ปลายไฮฟาเรียกสปอร์ที่ไม่ได้อยู่ภายในอับสปอร์นี้ว่า คอนิเดียม (conidium) หรือคอนิดิโอสปอร์ (conidiospore) (รูปที่ 12 ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 สปอร์ภายในอับสปอร์ (ก) และสปอร์ที่ไม่ได้อยู่ภายในอับสปอร์ หรือคอนิเดียม (ข)
ที่มา : www.moldinspector.com

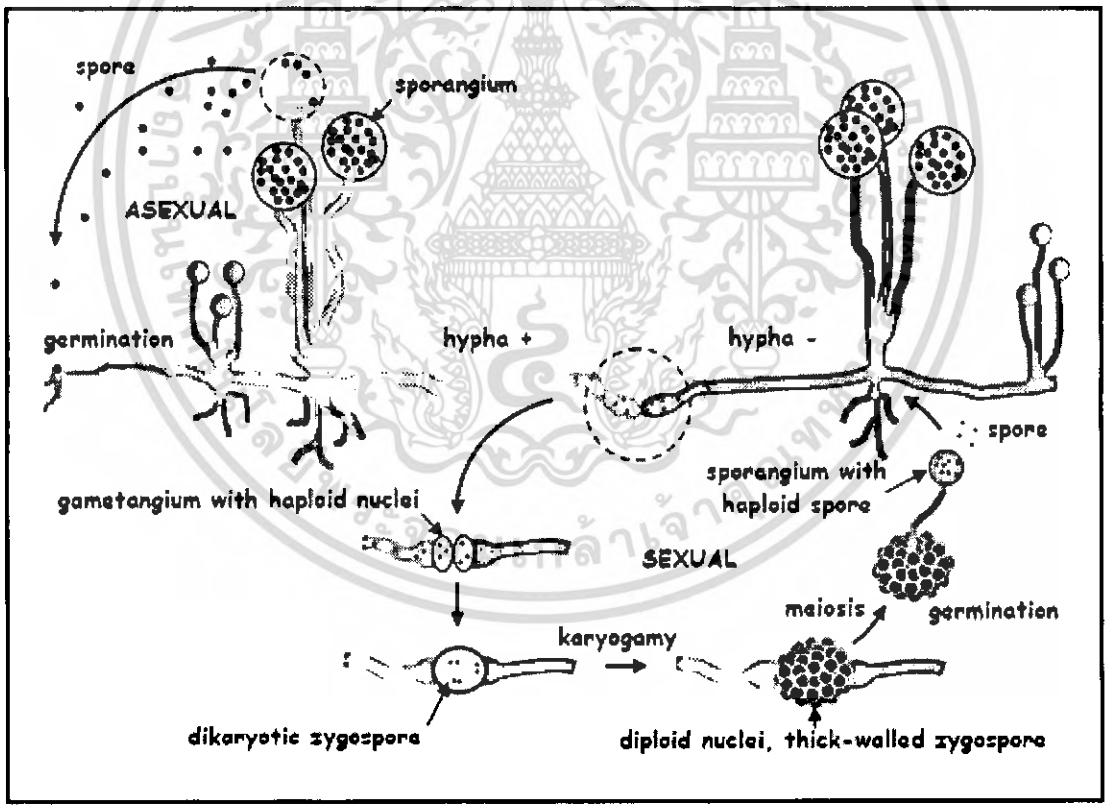
ราบางชนิดมีวงชีวิตแบบแฮพลอนติก (haplontic life cycle) ไฮฟาปกติของราก่อนที่จะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีลักษณะเป็นแฮพลอยด์ (haploid) เมื่อจะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ไฮฟาสองสายของราที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกันจะมาเข้าคู่กัน แล้วเกิดกลไกบางอย่างทำให้มีการเชื่อมต่อของเส้นใยไฮฟาเข้าด้วยกัน เกิดการรวมกันของไซโตพลาซึม (plasmogamy) แต่ไม่เกิดการรวมกันของนิวเคลียส เซลล์ที่มีการรวมกันของไซโตพลาซึมนี้จะแบ่งเซลล์เจริญต่อไป ทำให้ได้ไฮฟาเส้นใหม่ที่มีนิวเคลียสคู่ (dikaryotic hypha) และไฮฟาที่มีนิวเคลียสคู่นี้จะสามารถเจริญต่อไปเป็นกลุ่มไมซีเลียมได้ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดขึ้นต่อเมื่อเซลล์บางเซลล์ในเส้นใยไฮฟาที่มีนิวเคลียสคู่เกิดการรวมกันของนิวเคลียส (karyogamy) ทำให้เกิดไซโกต (zygote) ซึ่งมีลักษณะเป็นดิพลอยด์ (diploid) ขึ้น หลังจากนั้นไซโกตจะเกิดไมโอซิส (meiosis) เซลล์ลูกที่ได้จากไมโอซิสของไซโกตจะพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นสปอร์ที่เป็นแฮพลอยด์ (haploid spore) รูปแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดหรือกลุ่มของเห็ดรา เช่น ไซโกสปอร์ (zygospore) เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) หรือ แอสโคสปอร์ (ascospore) ซึ่งสปอร์เหล่านี้จะงอก (germination) และเจริญไปเป็นไฮฟาของเห็ดราในรุ่นถัดไป เนื่องจากเห็ดราไม่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) จึงไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง จะต้องดูดซึมเอาอาหารจากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวมาใช้ ซึ่งวิธีการดูดซึมเอาอาหารของราอาจอยู่ในลักษณะที่เป็นผู้ย่อยสลาย(decomposer) คือย่อยสลายอินทรีย์วัตถุต่างๆ ในบริเวณที่เห็ดราเจริญเติบโตอยู่ เช่น เห็ดที่ขึ้นตามขอนไม้ หรือราที่ขึ้นบนขนมปังหรืออาหารต่างๆ เห็ดราบางชนิดมีการดำรงชีวิตในรูปแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาวะเบียน (parasitism) คือเข้าไปเจริญเติบโตหรืออาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ แล้วดูดซึมเอาอาหารจากสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นมาใช้ ซึ่งเห็ดราเหล่านี้มักทำให้เกิดโรคต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต หรือเห็ดราบางชนิดก็อาจเข้าไปอยู่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นในรูปแบบของภาวะพึ่งพา (mutualism) แม้ว่าเห็ดราจะดูดซึมเอาอาหารจากสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันแล้ว แต่เห็ดราก็จะให้ประโยชน์บางประการ คืนกลับแก่สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นเช่นกัน เช่น เห็ดราที่อาศัยอยู่ในรากพืชแบบไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) หรือเห็ดราที่อาศัยอยู่รวมกับสาหร่ายสีเขียวและหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในรูปแบบของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่าไลเคนส์ (lichens) เห็ดราที่พบทั่วไปสามารถแบ่งอย่างง่าย ๆ ตามวิธีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่พบได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.4.1 Zygomycetes

เป็นเห็ดราที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างไซโกสปอร์ (รูปที่ 13) ไฮฟาของเห็ดรากลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่มีผนังกั้น (non-septate hypha) เห็ดราที่รู้จักกันดีในกลุ่มนี้คือราขนมปัง หรือ Rhizopus ซึ่งสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ภายในอับสปอร์



รูปที่ 13 วงชีวิตของ Rhizopus sp. ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง zygospore

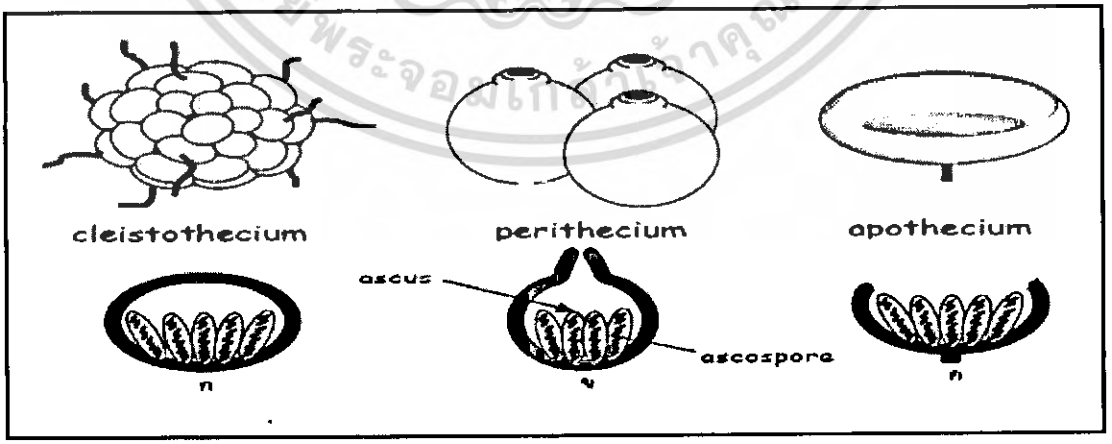
ที่มา : www.moldinspector.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เส้นใยไฮฟาสองสายที่แตกต่างกันจะมาจับคู่กัน และมีการสร้างแกมีแทนเจียม (gametangium) เข้ามาชนหรือแตะกัน โดยจะมีการสร้างผนัง (septum) ขึ้นมากั้นแกมีแทนเจียมเอาไว้ และภายในจะมีนิวเคลียสอยู่จำนวนหนึ่ง หลังจากนั้นผนังของแกมีแทนเจียมจะเชื่อมรวมกันและเกิดการรวมกันของไซโตพลาซึม นิวเคลียสของเห็ดราจากทั้งสองสายจะมาจับคู่กัน แต่ยังไม่เกิดการรวมตัวกันของนิวเคลียส ทำให้เกิดสภาพนิวเคลียสคู่ (dikaryotic) ขึ้นเรียกโครงสร้างที่เกิดจากการเชื่อมรวมกันของแกมีแทนเจียมในระยะนี้ว่าไซโกสปอร์ (zygospore) หลังจากนั้นไซโกสปอร์จะมีการสร้างผนังที่มีลักษณะหนาขึ้นล้อมรอบ ต่อมาภายหลังจึงจะเกิดการรวมตัวกันของนิวเคลียส (karyogamy) ดังนั้นภายในไซโกสปอร์จะเกิดนิวเคลียสที่อยู่ในสภาพดิพลอยด์ (diploid nucleus) ขึ้นมาจำนวนหนึ่ง และนิวเคลียสเหล่านี้จะเกิดไมโอซิส (meiosis) ทันทีทำให้ได้นิวเคลียสที่เป็นแฮพลอยด์ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงต่อไป

2.4.2 Ascomycetes

เห็ดรากลุ่มนี้สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ ในถุงที่เรียกว่าแอสคัส (ascus) (รูปที่ 14) เส้นใยของเห็ดราในกลุ่มนี้มีผนังกั้น (septate hypha) เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เส้นใยไฮฟามักจะรวมกลุ่มกันเกิดเป็น fruiting body ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะสำหรับเห็ดรากลุ่มนี้ว่า แอสโคคาร์พ (ascocarp) ซึ่งมีรูปร่างหรือรูปทรงหลายแบบได้แก่ ไคลส์โทเทเชียม (cleistothecium) ซึ่งแอสโคคาร์พจะมีรูปร่างกลม ไม่มีช่องเปิด (รูปที่ 14 ก) ถ้าแอสโคคาร์พมีลักษณะคล้ายขวด และมีช่องเปิด เรียก เพอริเทเชียม (perithecium) (รูปที่ 14 ข) แต่ถ้ามีรูปร่างคล้ายแก้วแชมเปญหรือจานจะเรียก อะพอเทเชียม (apothecium) (รูปที่14 ค) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรากลุ่มนี้เกิดขึ้นโดยการสร้างคอนิเดียม เส้นใยไฮฟาที่มีการสร้างคอนิเดียมมีชื่อเรียกเฉพาะว่า คอนิดิโอฟอร์ (conidiophore)

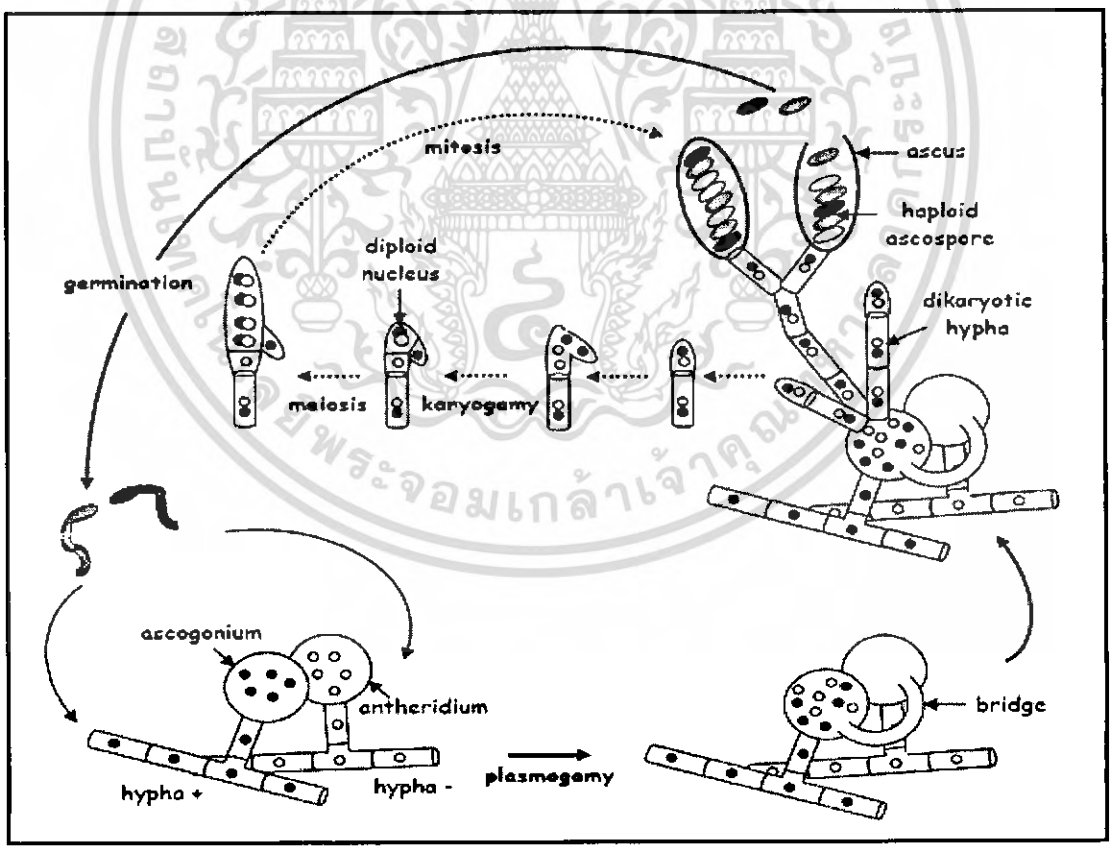


รูปที่ 14 แสดงรูปร่างและภาคตัดขวางของ ascocarp แบบต่างๆ

ที่มา : www.moldinspector.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดรากลุ่มนี้ (รูปที่ 15) เส้นใยไฮฟาของราสองสายที่แตกต่างกันจะมาจับคู่กัน สายหนึ่งจะสร้างโครงสร้างที่เรียกแอสโคโกเนียม (ascogonium) อีกสายหนึ่งจะสร้างแอนเทอริเดียม (antheridium) ต่อจากนั้นจะมีการเชื่อมต่อกันระหว่างแอสโคโกเนียมและแอนเทอริเดียม โดยแอนเทอริเดียมจะส่งโพรโทพลาซึม (protoplasm = cytoplasm + nucleus) ทั้งหมดเข้าไปในแอสโคโกเนียม เกิดการรวมกันของไซโตพลาซัม แต่ยังไม่มีการรวมตัวกันของนิวเคลียส ดังนั้นสภาพภายในแอสโคโกเนียมจะมีนิวเคลียสอยู่เป็นคู่ๆ หลายคู่ หลังจากนั้นจะมีการสร้างไฮฟาจากแอสโคโกเนียม ซึ่งไฮฟาที่สร้างขึ้นมานี้จะมีสภาพของนิวเคลียสคู่ (diakaryotic hypha) และทั้งไฮฟาปกติและไฮฟาที่มีสภาพนิวเคลียสคู่นี้จะสานกันไปมาเกิดเป็นแอสโคคาร์พ เมื่อถึงระยะเวลาที่เหมาะสมเซลล์ที่ปลายสายไฮฟาที่มีนิวเคลียสคู่จะสร้างถุงที่เรียกว่าแอสคัส ต่อมาจะมีการรวมกันของนิวเคลียส (karyogamy) ทำให้ได้นิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์ (diploid nucleus) ซึ่งจะเกิดไมโอซิส (meiosis) ได้แฮพลอยด์นิวเคลียส (haploidnucleus) 4 เซลล์ หลังจากนั้นแต่ละนิวเคลียสจะเกิดไมโตซิส เกิดเป็นแปดนิวเคลียส เมื่อมีการสร้างผนังล้อมรอบ แต่ละนิวเคลียสจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นแอสโคสปอร์อยู่ภายในแอสคัสซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นไฮฟาเส้นใหม่ในรุ่นถัดไป

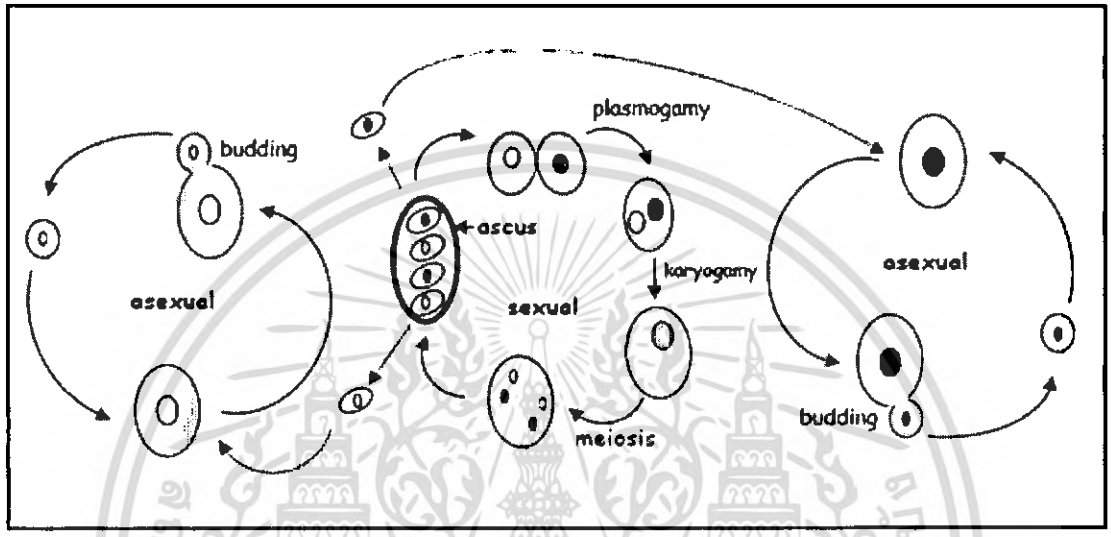


รูปที่ 15 แสดงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore ใน ascus

ที่มา : www.moldinspector.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72586

ยีสต์ (yeast) ก็จัดเป็นเห็ดราในกลุ่มนี้เนื่องจากมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างแอสโคสปอร์ภายในถุงแอสคัส แต่ไม่มีการสร้างแอสโคคาร์พ นอกจากนี้ยีสต์ยังต่างจากเห็ดราโดยทั่วไปที่สร้างเส้นใย เพราะยีสต์เป็นเห็ดราแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular fungi) และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) แสดงดังรูปที่ 16



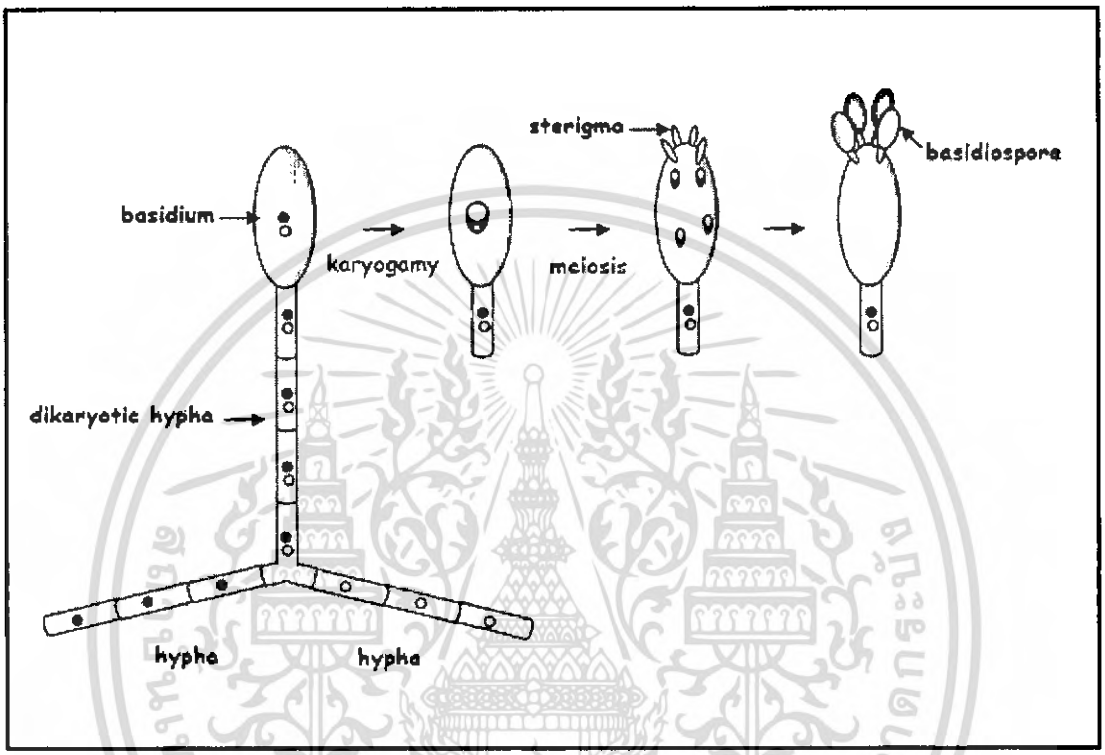
รูปที่ 16 แสดงการสืบพันธุ์ของยีสต์
ที่มา : www.moldinspector.com

2.4.3 Badidiomycetes

เป็นกลุ่มเห็ดราที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างเบสิดิโอสปอร์บนโครงสร้างที่เรียกว่าเบสิเดียม (basidium) เส้นใยของเห็ดราในกลุ่มนี้มีผนังกั้น เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเส้นใยไฮฟาจะรวมกลุ่มกันเกิดเป็น fruiting body ที่มีชื่อเรียกว่า เบสิดิโอคาร์พ (basidiocarp) ซึ่งได้แก่ดอกเห็ดที่เราพบเห็นกันทั่วไป และมีรูปร่างแตกต่างกันไป เช่นอาจมีลักษณะคล้ายรูปทรงของร่มเหมือนเห็ดฟาง เห็ดกระดุม เห็ดหอม หรืออาจมีลักษณะคล้ายเป็นแผ่นเหมือนเห็ดหูหนูเมื่อจะเกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะเกิดการเชื่อมกันระหว่างเส้นใยไฮฟาที่แตกต่างกันสองสาย ทำให้เกิดเส้นใยไฮฟาที่มีสภาพของนิวเคลียสคู่ (dikaryotic hypha) เกิดขึ้น ไฮฟาที่มีนิวเคลียสคู่สามารถเจริญเติบโตและแยกแขนงต่อไปได้อีกมากมายจนเป็นไมซีเลียมของไฮฟานิวเคลียสคู่ และอาจมีชีวิตอยู่ในสภาพนี้เป็นระยะเวลานาน จนกระทั่งเส้นใยไฮฟารวมตัวกันเข้าเกิดเป็นโครงสร้างของเบสิดิโอคาร์พ และที่เซลล์ปลายสุดของไฮฟานิวเคลียสคู่ในเบสิดิโอคาร์พจะเกิดเป็นโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าเบสิเดียม ซึ่งภายในจะมีการรวมกันของนิวเคลียส (karyogamy) เกิดเป็นดิพลอยด์นิวเคลียส (diploid nucleus) ซึ่งจะเกิดไมโอซิสต่อไปทันที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้แฮพลอยด์นิวเคลียสจำนวน 4 นิวเคลียส และที่บริเวณส่วนปลายของเบสิเดียมจะเกิดยางค์ยื่นออกไปจำนวน4อันเรียก สเตอริกมา (sterigma) นิวเคลียสที่ได้จากไมโอซิสทั้ง 4รวมทั้งไซโตพลาซึมนี้จะถูกบีบออกไปที่ส่วนปลายของสเตอริกมา และเกิดการสร้างผนังล้อมรอบเกิดเป็นเบสิดิโอสปอร์ในที่สุดแสดงดังรูปที่ 17



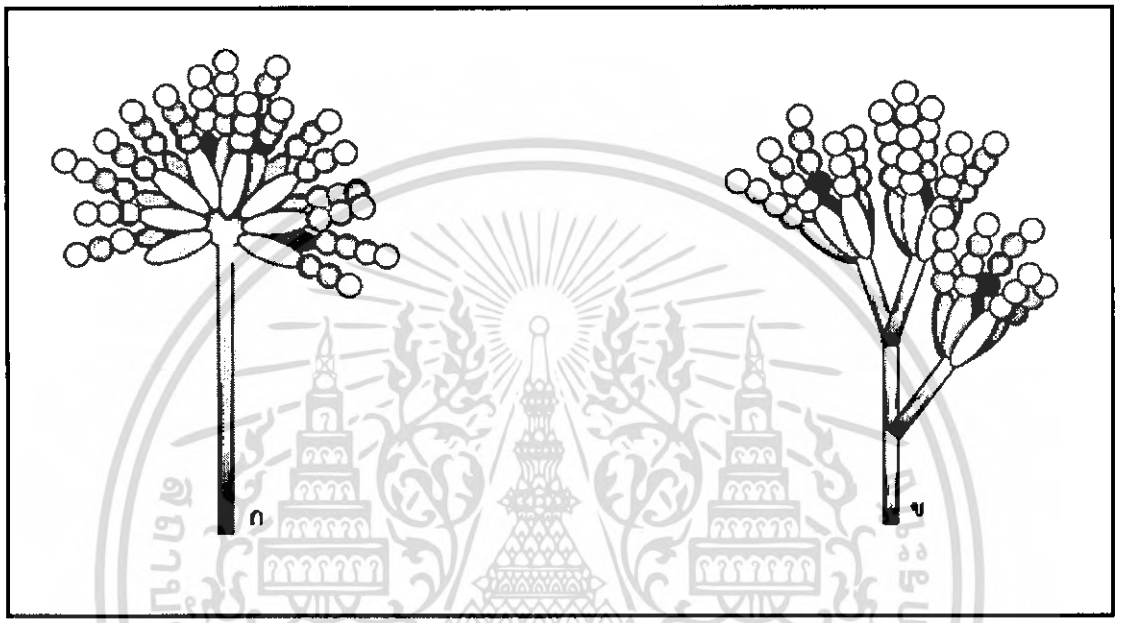
รูปที่ 17 แสดงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง basidiospore บน basidium
ที่มา : www.moldinspector.com

2.4.4. Deuteromycetes หรือ Imperfect fungi

เป็นกลุ่มของเห็ดราที่ยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบแต่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้าง คอนิเดียและมีลักษณะเส้นใยไฮฟาคล้ายกับเห็ดราในกลุ่ม Ascomycetes และ Basidiomycetes เมื่อใดก็ตามที่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ราชนิดนั้นๆ ก็จะถูกย้ายหมวดหมู่ไปไว้ใน Ascomycetes หรือ Basidiomycetes ภายหลัง ขึ้นอยู่กับชนิดของสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual spore) ที่พบ ดังนั้นในระบบการจัดจำแนกหมวดหมู่ใน Deuteromycetes นี้จึงเป็นกลุ่มของเห็ดราที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเห็ดราในกลุ่มใดแน่หมวดหมู่ย่อยที่อยู่ใน Deuteromycetes นี้ จึงมักถูกเรียกว่าเป็น form genera หรือ form family เพื่อแสดงว่าสกุล (genera) หรือวงศ์ (family) ของเห็ดราที่ถูกจำแนกขึ้นนั้นอาจไม่ได้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันอย่างแท้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus และ Penicillium เป็นสอง form genera ที่เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี ลักษณะความแตกต่างระหว่าง Aspergillus และ Penicillium อยู่ที่ลักษณะของคอนิเดียที่เกิดขึ้น ถ้าเป็น Aspergillus นั้นส่วนปลายสุดของคอนิดิโอฟอร์ หรือไฮฟาที่สร้างคอนิเดียจะพองออก และคอนิเดียจะเรียงกันเป็นแถวกระจายออกไปในแนวรัศมีจากส่วนปลายที่พองออก (ภาพที่ 18 ก) ส่วนใน Penicillium จะเรียงเป็นแถวบนคอนิดิโอฟอร์ที่แยกสาขาออกมามากมาย (ภาพที่ 18 ข)



รูปที่ 18 แสดงลักษณะคอนิดิโอฟอร์ของ Aspergillus (ก) Penicillium (ข)
ที่มา : www.moldinspector.com

ประโยชน์ของเห็ดรามีหลายประการ นับตั้งแต่ใช้เป็นอาหาร เช่น เห็ดหอม เห็ดนางฟ้า เห็ดหูหนู เห็ดบางชนิดก็มีราคาแพงมาก ในประเทศไทยเห็ดที่มีราคาแพงได้แก่ เห็ดโคน และเห็ดเผาะ เห็ดราบางชนิดเชื่อกันว่ามีสรรพคุณทางยา หรือใช้เป็นอาหารเสริม เช่น เห็ดหมื่นปี เห็ดราบางชนิดให้สีย้อมที่มีสีสันสวยงาม นอกจากนั้นเห็ดราบางชนิดยังใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม เช่น ยีสต์ และยาบางชนิดก็ได้มาจากสารที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา เช่น ยาเพ-นิซิลลินก็ได้มาจากราบางชนิดในสกุล Penicillum รวมทั้ง Penicillium บางชนิดยังใช้ทำเนยแข็ง (cheese) ชนิดพิเศษซึ่งมีราคาแพงอีกด้วย (www.agr.ku.ac.th/DATA/015281)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) มีชื่อตามระบบว่า systematic name ว่า Triacyglycerol acylhydrolase และมีชื่อเรียกตามรหัส หรือตามระบบตัวเลข (Code or Number System) คือ EC 3.1.1.3 ไลเปสสามารถพบได้โดยทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไลเปสได้รับความสนใจในการศึกษาคุณสมบัติทั้งทางด้านสรีรวิทยา และการนำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องด้วยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยมีน้ำเข้าร่วมทำปฏิกิริยา (hydrolysis) มีความคงตัวสูงนอกจากเอนไซม์ไลเปสจะช่วยย่อยสลายไขมันที่มีโครงสร้างทางเคมีจำเพาะเจาะจงแล้ว (reio-and enantiomerselective hydrolysis) เอนไซม์ไลเปสยังสามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับความต่างกันของสารตั้งต้น (ปวีณา, 2547)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งอาจจะผลิตเอมไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายใน และที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ไลเปสที่ได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรั่ม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูง และสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย (ปวีณา, 2547)

ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยโดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugora* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคมีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphycoccus* (ปวีณา, 2547)

2.5.1 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Barnwal, 2004) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชทีเหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ปริมาณเกลือและชนิดของอิมัลซิฟายเออร์ (emulsify)ที่ใช้ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Kurl., 2002) ในส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีช่วงพีเอชเป็นกรด พบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วย

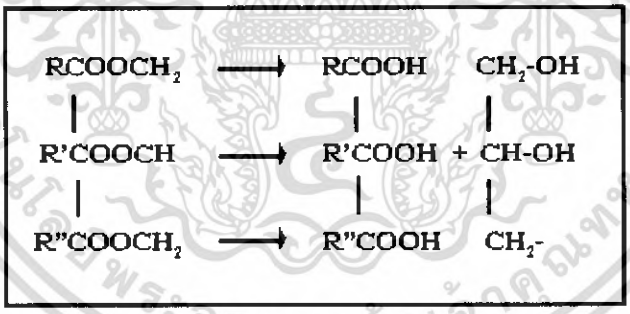
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำนม สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.9-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ โดยเฉพาะไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสารตั้งต้น เป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Katsivela , 1995)

2.5.2 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่ง บนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอรอลได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอร์ไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นอินเตอร์มีเดียตในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea, Corynebacterium acnes, Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens* แสดงการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้คือ

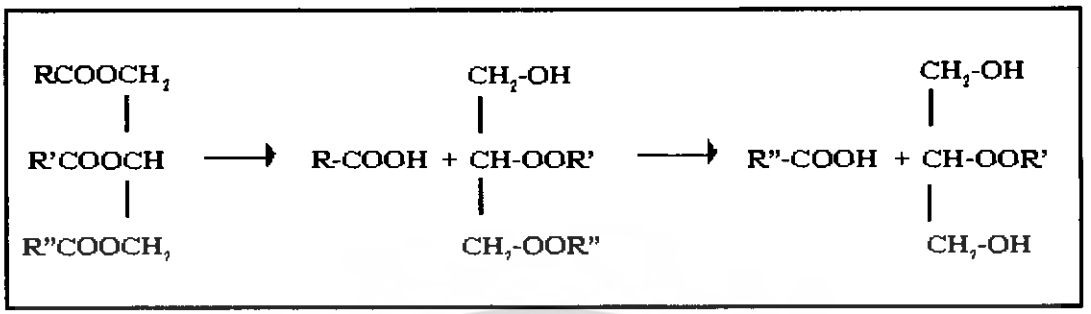


รูปที่ 19 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะกลุ่มที่ 1
ที่มา : Macrae (1983)

กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไดกลีเซอร์ไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ (1,2) (2,3) – โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้ามีการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3- ไดกลีเซอร์ไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์

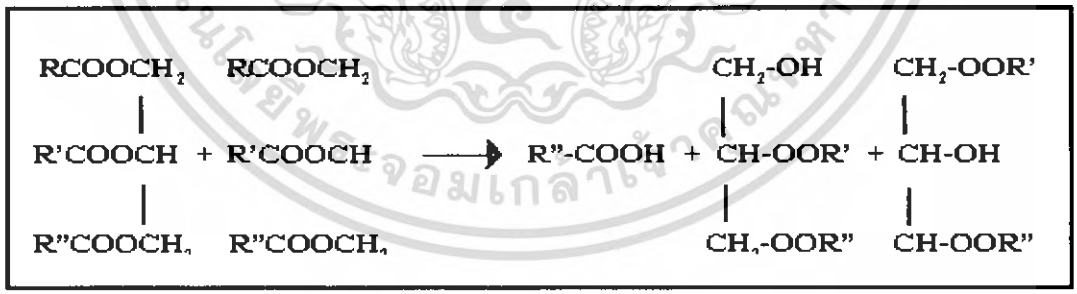
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus niger, Mucoro javanicus และในพวก *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์แสดงการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้คือ



รูปที่ 20 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะกลุ่มที่ 2
ที่มา : Macrae (1983)

กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไปมีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวก ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลแต่ถ้ามีเอซิลกลีเซอรอลหรือไดรเอซิลกลีเซอรอลความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลงซึ่งแสดงการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้คือ



รูปที่ 21 การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะกลุ่มที่ 3
ที่มา : Macrae (1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ การย่อยสลาย (hydrolysis) การสังเคราะห์เอสเทอร์ (ester) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (tranesterification) (Namita , 2002)

1. ปฏิกิริยาสลายเอสเทอร์ (hydrolysis of ester)

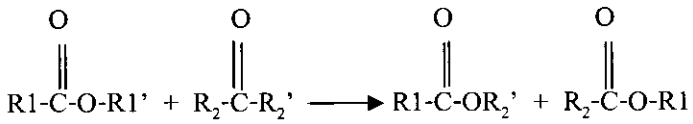
2. ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of ester)

3. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification reaction)

3.1 ปฏิกิริยาแอซิโดไลซิส (acidolysis)

3.2 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis)

3.3 ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

E. Katsivela *et al* : ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ Ustilago magdis เพื่อใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาเอสเทอร์ โดยวิธีการตรึงเอนไซม์ ไว้กับแอมเบอร์ไลท์ เอ็กซ์เอดี 2 พบว่าการผลิตเอนไซม์ของเชื้อนี้ไม่ขึ้นกับแหล่งคาร์บอน แต่ถูกเหนี่ยวนำด้วยยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน

Fukada *et al* (2001) : ศึกษาวิธีการผลิตกรดไขมันที่มีโลเวอร์แอลกอฮอล์เอสเทอร์โดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยโลเวอร์แอลกอฮอล์ ที่ได้เป็นเมธานอลร้อยละ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

1. กากปาล์มน้ำมัน
2. กากทานตะวัน
3. กากถั่วเหลือง
4. น้ำมันสบู่ดำ จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar)
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin

3.1.2 อุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
3. ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
4. บีกเกอร์
5. ปิเปต
6. ขวดลูกชมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร 2 ขวด
7. ช้อนตักสาร
8. ผ้าขาวบางและสำลี
9. แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ70
10. Lactophenol blue
11. ลวดเขี่ยเชื้อ (needle)
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. กล้องจุลทรรศน์
14. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
15. เครื่องชั่งสาร
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
17. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
18. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
19. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์(UV/VIS - spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืช โดยแบ่งตามโรงงานดังนี้

1. โรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม

ที่อยู่ บริษัทสีมาอินเตอร์โปรดักส์

อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา

2. โรงงานผลิตน้ำมันถั่วเหลือง

ที่อยู่ บริษัทไทยวัฒนาจำกัด

อ.บางละมุง จ.ชลบุรี

3. โรงงานผลิตน้ำมันทานตะวัน

ที่อยู่ บริษัทบุศราคัมซันฟลาวเวอร์ จำกัด

อ.วังม่วง จ.สระบุรี

จุดที่เก็บตัวอย่างเชื้อมีดังนี้คือ

1. บริเวณเครื่องบีบอัดน้ำมัน
2. บริเวณตากกากพืชน้ำมันแจ้ง
3. บริเวณที่ทิ้งกากน้ำมัน
4. บริเวณคลังเก็บวัตถุดิบ
5. บริเวณจุดนำเข้าวัตถุดิบ

3.2.1.1 การแยกเชื้อราจากตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1. นำตัวอย่างกากที่ได้ในแต่ละโรงงานมาทำการเพาะเลี้ยง โดยวิธีวางบนผิวหน้าอาหาร PDA
2. บ่มกากเพื่อให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. เมื่อครบกำหนด ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธ์
4. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่าง โดยการนำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร PDA
5. ถ้ายังมีราชนิดอื่นปนอยู่ก็ทำการแยกเป็นแต่ละจานเพาะเชื้อของแต่ละเชื้อ จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเพื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธ์ของเชื้อ

3.2.1.2 ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อรา โดยการนำเชื้อราที่เลี้ยงไว้ในจานเพาะเชื้อย้อมด้วย Lactophenol cotton blue และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อพบว่าเชื้อที่ได้มีความบริสุทธิ์จึงเก็บรวบรวมเชื้อไว้ในหลอดอาหารวุ้นเอียง (slant) ปิดเคลือบด้วยแผ่นพาราฟิน เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การนำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว และปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสดังนี้คือ

3.2.2.1 Primary Screcning ซึ่งเป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงปริมาณ นำเชื้อราที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่1 มาทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เฉพาะโดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันจากสบู่ดำ ในสภาวะอาหารแข็ง และวัดขนาดของวงใส ที่เกิดขึ้น คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิดวงใส นำมาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

3.2.2.2 ทำสารละลายสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดอาหารวุ้นเอียงจนท่วมเส้นใยรา ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเส้นใยของเชื้อราให้สปอร์หลุดออกมา นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ จากนั้นนำมาทำสารละลายสปอร์โดยมีจำนวนสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2.3 ถ่ายสารละลายสปอร์ของเชื้อราลงในอาหารเหลวที่ ประกอบด้วย ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5, เบคโท-เปปโตนร้อยละ 3, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1, $NaNO_3$ ร้อยละ 0.1, $MgSO_4$ ร้อยละ 0.05 และน้ำมันมะกอกหรือน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตร (Cardenas และคณะ, 2001) ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารอยู่ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตรเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนใส จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบการเกิดวงใส ในอาหารที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อไป

3.2.2.4 การคัดเลือกขั้นต้น(primary screening)โดยการทดสอบการเกิดวงใสของเชื้อรา โดยใช้หลอดกาแฟปราศจากเชื้อเจาะวุ้นในจานอาหาร PDA และอิมัลชันของน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2 (Ko และคณะ, 2005) จานละ 5 หลุม ปิเปตส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงข้อ 3.5.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบหลุมอาหารทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน เลือกเชื้อราที่มีบริเวณวงใสมาก ๆ มาทำการทดสอบการย่อยสลายน้ำมันจากสบู่ดำของเอนไซม์ไลเปส และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

3.2.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 (secondary screening) ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ

โดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (lipase activity) นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่พบวงใสมาปั่นเหวี่ยง เพื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ ไปเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมSPSS version 14

กำหนด : ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol อิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อนาที (Katsivela และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก

คัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะของเส้นใย ลักษณะและขนาดสปอร์ของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการแยกเชื้อราจากตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมัน

จากผลการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อรา จากบริเวณจุดนำเข้าวัตถุดิบ บริเวณเครื่องบีบอัดน้ำมัน บริเวณลานตากกากพืชน้ำมันกลางแจ้ง บริเวณที่ทิ้งกาก บริเวณคลังเก็บกากพืชน้ำมัน และเชื้อราตัวอย่างจากดิน ได้รวมทั้งสิ้น 62 ไอโซเลต

จากการทดลองทำการแยกเชื้อรา จากการเก็บตัวอย่าง ณ โรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมันปาล์มสายพันธุ์ไทยและปาล์มสายพันธุ์มาเลเซียโดยใช้อาหาร PDA ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลตแสดงตังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณต่างๆ ของโรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมันสายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์มาเลเซีย

บริเวณคลังเก็บกากปาล์มสายพันธุ์ไทย และสายพันธุ์มาเลเซีย	จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากการเลี้ยงบนอาหารPDA(ไอโซเลต)	รหัสของเชื้อราที่แยกได้
1. บริเวณกากปาล์มก่อนทำการสกัดสายพันธุ์ไทย	3	PALM TH (01- 03)
2. บริเวณกากปาล์มหลังทำการสกัดสายพันธุ์ไทย	3	PALM TH (04- 06)
3. บริเวณกากปาล์มก่อนทำการสกัดสายพันธุ์มาเลเซีย	3	PALM ML (07- 09)
4. บริเวณกากปาล์มหลังทำการสกัดสายพันธุ์มาเลเซีย	3	PALM ML (10- 12)
รวมจำนวนเชื้อราทั้งหมด	12	–

จากการทดลองทำการแยกเชื้อราจากการเก็บตัวอย่าง ณ โรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมันทาน ตะวัน โดยใช้อาหาร PDA ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณต่างๆของโรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมันทานตะวัน

บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างกากทานตะวัน	จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากการเลี้ยงบนอาหารPDA(ไอโซเลต)	รหัสของเชื้อราที่แยกได้
1. บริเวณเครื่องบีบอัดน้ำมัน	5	SUN 01 - SUN 05
2. บริเวณตากกากทานตะวันกลางแจ้ง	3	SUN 06 - SUN 08
3. บริเวณที่ทิ้งกากทานตะวัน	1	SUN 09
4. บริเวณคลังเก็บกากทานตะวัน	1	SUN 10
รวมจำนวนเชื้อราทั้งหมด	10	–

จากกากทดลองทำการแยกเชื้อราจากการเก็บตัวอย่าง ณ โรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมันถั่วเหลืองโดย ใช้อาหารPDA ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลตแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 เชื้อราที่คัดแยกได้จากบริเวณต่างๆของโรงงานอุตสาหกรรมพืชน้ำมันถั่วเหลือง

บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างกากถั่วเหลือง	จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากการเลี้ยงบนอาหารPDA(ไอโซเลต)	รหัสของเชื้อราที่แยกได้
1. บริเวณจุดนำเข้าเมล็ดถั่วเหลือง	3	BEAN 01 - BEAN 03
2. บริเวณเครื่องบีบสกัดน้ำมันถั่วเหลือง	1	BEAN 04
3. บริเวณลานตากกากถั่วเหลือง	4	BEAN 05 - BEAN 08
4. บริเวณคลังเก็บกากถั่วเหลือง	1	BEAN 09
5. บริเวณจุดทิ้งกากถั่วเหลือง	1	BEAN 10
รวมจำนวนเชื้อราทั้งหมด	10	–

และจากการแยกเชื้อราที่แยกได้จากดิน (เชื้อทดสอบเพิ่มเติม)

จากการทดลองทำการแยกเชื้อราตัวอย่างจากดินในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยใช้อาหาร PDA ผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราได้ จำนวน 30 ไอโซเลต

*หมายเหตุ แทนรหัสไอโซเลตด้วย BGG 01-30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

การนำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวและปั่นเหวี่ยงนำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงปริมาณ โดยนำเชื้อราที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 1 มาทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ประเภทคือประเภทแรก PDA ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันจากสบู่ดำโดยมีความเข้มข้นของน้ำมันสบู่ดำร้อยละ 0.1, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 และประเภทที่สองอาหาร Tributyrin จากนั้นวัดขนาดของส่วนใส ซึ่งแสดงถึงการเกิดการย่อยไขมันที่เกิดขึ้นรอบๆบริเวณที่เจาะผิววุ้น

4.2.1ผลการแยกเชื้อตัวอย่างกากปาล์มสายพันธุ์ไทยและปาล์มสายพันธ์มาเลเซีย

จากการทดลองการคัดแยกเชื้อราทั้ง 12 ชนิดในกากปาล์ม และนำมาเลี้ยงเพื่อทำการตรวจสอบขนาดวงใส พบว่ามีเพียงชนิดเดียวที่ให้วงใส คือเชื้อราชนิด PALM TH 03 ซึ่งเชื้อราชนิดนี้พบวงใส ในอาหาร Tributyrin โดยวงใสมีขนาด 5 มิลลิเมตร ซึ่งเชื้อราชนิดนี้ไม่พบวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากปาล์ม

ไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้จากกากปาล์ม	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำความเข้มข้นระดับต่างๆ					อาหาร Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
PALM TH 01	–	–	–	–	–	–
PALM TH 02	–	–	–	–	–	–
PALM TH 03	–	–	–	–	–	5
PALM TH 04	–	–	–	–	–	–
PALM TH 05	–	–	–	–	–	–
PALM TH 06	–	–	–	–	–	–
PALM ML 07	–	–	–	–	–	–
PALM ML 08	–	–	–	–	–	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4(ต่อ) ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากปาล์ม

ไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้จากกากปาล์ม	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำ ความเข้มข้นระดับต่างๆ					อาหาร Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
PALM ML 09	–	–	–	–	–	–
PALM ML 10	–	–	–	–	–	–
PALM ML 11	–	–	–	–	–	–
PALM ML 12	–	–	–	–	–	–

* หมายเหตุ - ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

4.2.2 ผลการแยกเชื้อตัวอย่างจากกากทานตะวัน

จากการทดลองการคัดแยกเชื้อราทั้ง 10 ชนิดในกากทานตะวัน และนำมาเลี้ยงเพื่อทำการตรวจสอบขนาดวงใส ได้ตรวจพบการเกิดวงใสในอาหาร Tributyrin ทั้งสิ้น 3 ชนิดคือเชื้อราชนิด SUN 05, SUN 08 และ SUN 09 ขนาด ซึ่งมีขนาดวงใสเท่ากับ 1, 3 และ 7 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งเชื้อราตัวอย่างนี้ไม่พบวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากทานตะวัน

เชื้อราที่ได้จากการแยกกากทานตะวัน	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำ ความเข้มข้นระดับต่างๆ					Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
SUN 01	-	-	-	-	-	-
SUN 02	-	-	-	-	-	-
SUN 03	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5(ต่อ) ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากทานตะวัน

เชื้อราที่ได้จากการแยกกากทานตะวัน	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำ ความเข้มข้นระดับต่างๆ					Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
SUN 04	-	-	-	-	-	-
SUN 05	-	-	-	-	-	1
SUN 06	-	-	-	-	-	-
SUN 07	-	-	-	-	-	-
SUN 08	-	-	-	-	-	3
SUN 09	-	-	-	-	-	7
SUN 10	-	-	-	-	-	-

* หมายเหตุ - ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

4.2.3 ผลการแยกเชื้อตัวอย่างจากกากถั่วเหลือง

จากการทดลองการคัดแยกเชื้อราทั้ง 10 ชนิดในกากถั่วเหลือง และนำมาเลี้ยงเพื่อทำการตรวจสอบขนาดวงใสปรากฏว่าไม่พบการเกิดวงใสทั้งในอาหาร Tributyrin และเชื้อราตัวอย่างนี้ ไม่พบวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในอัตราส่วนต่างๆผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง

เชื้อราที่ได้จากการแยกกากถั่วเหลือง	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำ ความเข้มข้นระดับต่างๆ					Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
BEAN 01	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6(ต่อ) ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากกากถั่วเหลือง

เชื้อราที่ได้จากการแยกกากถั่วเหลือง	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำความเข้มข้นระดับต่างๆ					Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
BEAN 02	-	-	-	-	-	-
BEAN 03	-	-	-	-	-	-
BEAN 04	-	-	-	-	-	-
BEAN 05	-	-	-	-	-	-
BEAN 06	-	-	-	-	-	-
BEAN 07	-	-	-	-	-	-
BEAN 08	-	-	-	-	-	-
BEAN 09	-	-	-	-	-	-
BEAN 10	-	-	-	-	-	-

* หมายเหตุ - ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

4.2.4 ผลการการแยกเชื้อตัวอย่างจากดิน

จากการทดลองการแยกเชื้อราจากดิน และนำมาเลี้ยงเพื่อทำการตรวจสอบขนาดวงใสพบว่าสามารถนำมาแยกได้ทั้งสิ้น 30 เชื้อและพบการเกิดวงใส 4 ชนิด คือ BGG 02, BGG 05, BGG 06 และ BGG 10 โดยให้ขนาดวงใสเท่ากับ 2 มิลลิเมตร ในอาหาร Tributyrin เชื้อราตัวอย่างนี้ ไม่พบวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน ในอัตราส่วนต่างๆผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้จากดินจำนวน 30 สายพันธุ์เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และอาหาร Tributyrin เป็นเวลา 3 วัน

เชื้อราที่ได้จากดิน	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำ ความเข้มข้นระดับต่างๆ					Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
BGG 01	-	-	-	-	-	-
BGG 02	-	-	-	-	-	2
BGG 03	-	-	-	-	-	-
BGG 04	-	-	-	-	-	-
BGG 05	-	-	-	-	-	2
BGG 06	-	-	-	-	-	2
BGG 07	-	-	-	-	-	-
BGG 08	-	-	-	-	-	-
BGG 09	-	-	-	-	-	-
BGG 10	-	-	-	-	-	2
BGG 11	-	-	-	-	-	-
BGG 12	-	-	-	-	-	-
BGG 14	-	-	-	-	-	-
BGG 15	-	-	-	-	-	-
BGG 16	-	-	-	-	-	-
BGG 17	-	-	-	-	-	-
BGG 18	-	-	-	-	-	-
BGG 19	-	-	-	-	-	-
BGG 20	-	-	-	-	-	-

* หมายเหตุ - ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7(ต่อ) ผลการทดสอบวงใสของเชื้อราที่แยกได้ดินจำนวน 30 สายพันธุ์เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และอาหาร Tributyrin เป็นเวลา 3 วัน

เชื้อราที่ได้จากดิน	การเกิดวงใสของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)					
	อาหาร PDA ที่เติมน้ำมันสบู่ดำ ความเข้มข้นระดับต่างๆ					Tributyrin
	0.1%	0.5%	1%	1.5%	2.0%	
BGG 21	-	-	-	-	-	-
BGG 22	-	-	-	-	-	-
BGG 23	-	-	-	-	-	-
BGG 24	-	-	-	-	-	-
BGG 25	-	-	-	-	-	-
BGG 26	-	-	-	-	-	-
BGG 27	-	-	-	-	-	-
BGG 28	-	-	-	-	-	-
BGG 29	-	-	-	-	-	-
BGG 30	-	-	-	-	-	-

* หมายเหตุ - ไม่พบวงใสของการยับยั้ง

จากการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อราจากแหล่งดินธรรมชาติได้ทั้งสิ้น 64 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยดูการเกิดวงใสบนอาหาร tributyrin พบว่ามีเพียง 9 ไอโซเลตเท่านั้นที่เกิดวงใส และอาหาร PDA ซึ่งมีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนปรากฏไม่พบวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากอาหารใน PDA มีแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หรือแสดงถึงประสิทธิภาพของเชื้อราในการย่อยน้ำมัน เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง บนไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นคุณสมบัติทั่วไปของเชื้อราที่ผลิตไลเปสยกเว้นเอนไซม์จากเชื้อราบางพวก ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลแต่ถ้ามีเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรเอซิลกลีเซอรอลความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง (Macrae ,1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การแยกเชื้อขั้นที่ 2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (lipase activity) ในเชิงคุณภาพ นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่พบวงใสจากขั้นตอนที่ 2.1 มาปั่นเหวี่ยงเพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้พบค่าสูงสุด 2 ค่าคือ ไอโซเลต SUN 08 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.6583 ยูนิต/มล. เป็นของค่าสูงสุดของราในกลุ่มพืชตัวอย่าง SUN 05 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คือ 0.4520 ยูนิต/มล. ต่ำสุดของราในกลุ่มพืชตัวอย่าง และไอโซเลต BGG 06 ค่ากิจกรรมเอนไซม์คือ 1.9800 ยูนิต/มล. เป็นค่าสูงสุดของกลุ่มเชื้อราจากดินที่ทดสอบเพิ่มเติม

ตารางที่ 4.8 ค่ากิจกรรมของของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่คัดเลือก

เชื้อราที่พบการเกิดวงใส (ไอโซเลต)	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
1. PALM TH 03 กากปาล์มก่อนทำการสกัด (ไทย)	0.6103^{de}
2. SUN 05 บริเวณเครื่องบีบอัดน้ำมัน	0.5497^{f}
3. SUN 08 บริเวณลานตากกากทานตะวันกลางแจ้ง	0.6583^{cd}
4. SUN 09 บริเวณลานตากกากทานตะวันกลางแจ้ง	0.4520^{g}
5. BGG 02 เชื้อราจากดิน(เชื้อทดสอบเพิ่มเติม)	0.4493^{g}
6. BGG 05 เชื้อราจากดิน(เชื้อทดสอบเพิ่มเติม)	0.7123^{b}
7. BGG 06 เชื้อราจากดิน(เชื้อทดสอบเพิ่มเติม)	1.9800^{a}
8. BGG 07 เชื้อราจากดิน(เชื้อทดสอบเพิ่มเติม)	0.6913^{bc}
9. BGG 10 เชื้อราจากดิน(เชื้อทดสอบเพิ่มเติม)	0.5837^{ef}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 อภิปรายผลการทดลอง

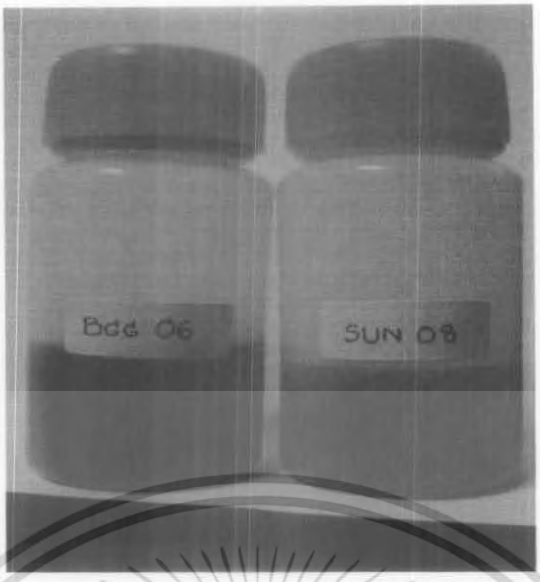
จากผลการทดลองไม่พบวงใสบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำมันสบู่ดำที่ความเข้มข้นอัตราส่วนร้อยละต่างๆเนื่องจากเชื้อรานำแหล่งคาร์บอนจากอาหาร PDA มาใช้ในการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้ง่ายกว่าการนำเอาแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันสบู่ดำมาใช้ในการเจริญ จึงสรุปได้ว่าการทดลองนี้ใช้อาหาร Selective media ผิดประเภท เนื่องจาก อาหาร Selective media จะต้องไม่แฝงแหล่งคาร์บอนอื่นใดนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนที่เราต้องการทดสอบนั่นคือน้ำมันสบู่ดำ

ในการคัดเลือกสถานที่บริเวณเก็บตัวอย่างเชื้อรา ควรมีการเพิ่มเติมในส่วนของโรงงานคือ คัดเลือกจากโรงงานที่เกี่ยวข้องกับการนำพืชน้ำมันมาเป็นวัตถุดิบ เช่น โรงงานน้ำมันรำข้าว มะพร้าว หรืองา หรือจากโรงงานที่มีการใช้ไขมันในกระบวนการผลิตร่วมด้วย เช่นโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง เพื่อเป็นการเพิ่มเติมแหล่งที่มาในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์

จุดเก็บตัวอย่างควรเลือกจุดที่เกี่ยวข้องกับการใช้ไขมันในกระบวนผลิต หรือมีไขมัน น้ำมันเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิต เช่น บริเวณเครื่องบีบอัดเมล็ดน้ำมันพืช หรือบริเวณจุดปล่อยน้ำเสีย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่จะใช้นำมาสกัดเอนไซม์ไลเปส จะใช้สารตั้งต้นคือแหล่งไขมันเป็นสารชักนำ ดังนั้นบริเวณจุดที่มีการปล่อยของเสียเพิ่มเติม เช่น บริเวณจุดทิ้งน้ำเสียจากโรงงานจะมีน้ำล้างหรือของเสียที่มีไขมันเป็นส่วนผสมปนออกมา รวมทั้งบริเวณเครื่องบีบอัดเมล็ดน้ำมันพืช จุลินทรีย์จะสามารถใช้ไขมันในบริเวณนั้นเป็นแหล่งอาหารได้โดยตรงทำให้สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถ ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงกว่าการคัดเลือกจากสถานที่ที่ไม่มีแหล่งอาหารเพียงพอที่จะชักนำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30–37 องศาเซลเซียส และค่า pH ช่วงที่ 4-8(ดวงพร, 2540) ดังนั้นการเลือกสถานที่เก็บควรคำนึงถึงปัจจัยด้านนี้ เชื้อจุลินทรีย์ที่พบ ส่วนใหญ่จึงเป็นเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ดังนั้นควรเลือกเก็บตัวอย่างโดยคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเชื้อราที่จะแยกได้ให้มีจำนวนมากขึ้น

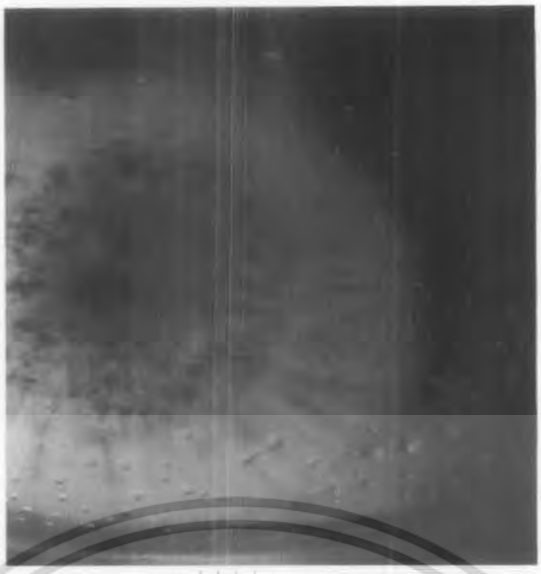
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา BGG 06 และ SUN 08 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรที่ 2 เป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 4.2 ลักษณะการเกิดวงใส ของเชื้อรา BGG 06 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร Tributyrin เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะการเกิดวงใส ของเชื้อรา SUN 08 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Tributyrin เป็นเวลา 3 วัน

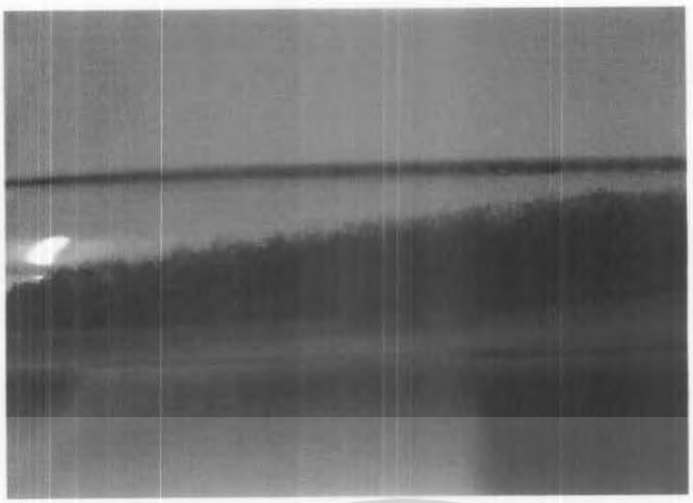
2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

จากการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสพบว่าไอโซเลต SUN 08 เชื้อราจากกากทานตะวัน และ BGG 06 เชื้อราจากดิน มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้ออื่นซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 0.693และ 1.9897ตามลำดับ จึงนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยการสังเกตลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต SUN 08 และ BGG 06

รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
	สังเกตด้วยตาเปล่า	สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์
SUN 08	เส้นใยสีขาว สปอร์สีดำเข้ม	เส้นใยมีผนังกั้น พบไรซอยด์ สปอร์มีลักษณะเรียงกันเป็นเส้น และมีขนาดสปอร์เฉลี่ย 0.02 มิลลิเมตร
BGG 06	เส้นใยสีขาว ช่วงระยะเริ่มต้นสปอร์มีสีเขียวปนเหลือง หลังจาก 7 วันสปอร์มีสีเขียวเข้ม	เส้นใยมีผนังกั้น พบไรซอยด์ สปอร์มีลักษณะกลมเรียงกันเป็นเส้น และมีขนาดสปอร์เฉลี่ย 0.02 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร PDA เป็น เวลา 7 วัน

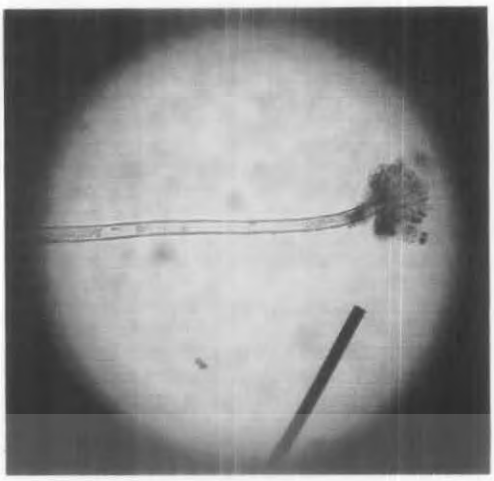
รูปที่ 4.5 ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า

รูปที่ 4.7 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า

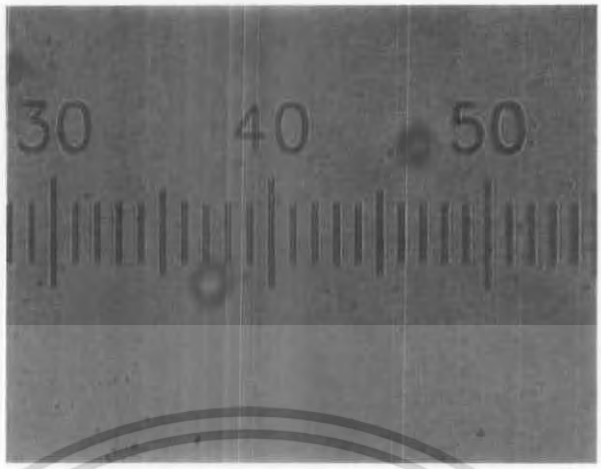
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า

รูปที่ 4.9 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต SUN 08 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 1200 เท่า

รูปที่ 4.11 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต BGG 06 เมื่อทำการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 1200 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงจากกากพืชน้ำมันในโรงงาน อุตสาหกรรมพืชน้ำมันเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษา และการนำมาประยุกต์ใช้ ในเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องด้วยเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยมีน้ำเข้าร่วมทำปฏิกิริยา (Hydrolysis) นับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่ง ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยช่วยลดขั้นตอนการเกิดปฏิริยาได้ดีกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ไลเปส จะช่วยย่อยสลายไขมัน ช่วยลดความหนืดในน้ำมัน โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ประหยัดพลังงานในการผลิต

ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในปริมาณสูง จากกากพืชน้ำมัน จึงเน้นที่พืชน้ำมันเศรษฐกิจ คือ ปาล์มสายพันธุ์ไทย ปาล์มสายพันธุ์มาเลเซีย ทานตะวัน และถั่วเหลือง จากผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงโดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในการย่อยน้ำมัน จากทั้ง 9 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อราจากกากทานตะวันบริเวณลานตากกลางแจ้ง (SUN 08) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในกลุ่มกากพืชน้ำมันทั้งหมดที่นำมาทดสอบ คือมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.693 ยูนิต/มล. ส่วนบริเวณเครื่องบีบอัดน้ำมันกากทานตะวัน (SUN05) เชื้อราที่พบมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำสุดคือ 0.452 ยูนิต/มล. แต่ทั้งนี้ได้มีการ ศึกษาเพิ่มเติมคือ เชื้อราจากดิน (BGG 06) พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 1.9897 ยูนิต/มล. โดยทั้ง 9 ตัวอย่างมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันฉะนั้นประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันของเอนไซม์ตัวอย่าง เชื้อราจากดิน(BGG 06) จึงดีที่สุด ส่วนอีก 8 ตัวอย่างนั้นประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมัน จะมีค่าที่ใกล้เคียงกันแต่จะน้อยกว่าเชื้อราจากดิน (BGG 06)และเมื่อนำราที่ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดทำการศึกษาสัณฐานวิทยาพบว่าราทั้งสองชนิด เส้นใยมีผนังกั้น มีไรซอยด์สปอร์เรียงกันเป็นเส้น และราทั้งสองชิดมีขนาดสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.02 มิลลิเมตร

ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้จากเชื้อราในแหล่งต่างๆไม่ว่าจะเป็นในกากปาล์มกาก ทานตะวัน กากถั่วเหลือง หรือในดิน ล้วนเป็นแนวทางหนึ่งในการวิจัยขั้นต่อไป เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกแหล่งที่มาและสายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้เอนไซม์ชนิดนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2547. สบู่ดำ. พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 191 หน้า.

ปวีณา ตั้งเจริญ. 2547. เทคโนโลยีและพลังงานทดแทนในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.

ศศิธร จารุสมบัติ. 2544. เอกสารประกอบคำบรรยายวิชาพืชน้ำมัน. ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Barnwal B.K., Sharma M.P. 2004. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Indian Institute of Technology. Roorkee 247667. Uttaranchal, India

Cardenas F., Castro M.S. de, Sanchez-Montero J.M., Sinisterrs J.V., Valmaseda M., Elson S.W., Alvarez E. 2001. Novel microbial lipase: catalytic activity in reactions in organic Media. Enzyme and Microbial Technology 28 : 145-154.

Dossat, V., Combes D. and Marty A. 2001. Lipasecatalyst transesterification of high oleic sunflower oil. Enzyme and Microb. Technol. 30:90-94.

Foidl, N., Foidl, G. Sanchez, M. Mittelbach, M. and Hackel, S. 1997. Jatropha curcus L.as asource for the production of biofuel in Nicaragua. Bioresource Technology. 58:77- 82.

Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H 2001. Bio diesel Fuel Production by Tranesterification of Oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92:405 – 416.

Katsivela E., Kleppe F, Lang S, and Wagner F. 1995. Ustilago maydis lipase I. Hydrolysis and ester synthesis activities of crude enzyme preparation. Technical University of Brounschweig, Germany

Ko, W.H., Wang, I.T. and Ann, P.J. 2005. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. Soil Biology and Biochemistry. 37: 597-599.

Kurl-Erich Jaeger andThorsten Eggert. 2002. Lipase for biotechnology. Institute for Molecutar Enzyme Technology, Heinrich-Heine-University Dusseldorf, Forschungszentrum Julich, D-52425 Julich, Germany. 13:390-397

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Macrae R. A. Wisdom, P. Dunnill and M. D. LillyA. 1983. Enzymic interesterification of fats:Factors influencing the choice of support for immobilized lipase. Enzyme and Microbial Technology, 6(10) : 443-446.

Martinez-Herrera J., Siddhuraju P., Francis G., Davila-Ortiz G., Becker K. 2006. Chemical composition, toxis/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of Jatropha curcas L. from Mexico. Food Chemistry. 96 : 80-89

Namita Gupta, Pooja Rathi, and Rani Gupta. 2002. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. Analytical Biochemistry 311 (2002) 98–99

www.agr.ku.ac.th/DATA/015281

www.//aopdm01.doae.go.th/data/physicnut21.htm

www.ethanol-thailand.com/

www.biofitweb.com

www.moldinspector.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหาร

สูตรที่ 1

- Potato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป

สูตรที่ 2

- ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5
- เบคโท-เปปโตน (bacto-peptone) ร้อยละ 3
- KH_2PO_4 ร้อยละ 0.1
- $NaNO_3$ ร้อยละ 0.1
- $MgSO_4$ ร้อยละ 0.05
- น้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตร

สูตรที่ 3

- เตรียมPotato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป ผสมอิมัลชั่นของน้ำมันสบู่ดำลงไปร้อยละ 1 ของปริมาตรน้ำมันที่ต้องการเตรียมนำไปละลายและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

วิธีการเตรียมอิมัลชั่นของน้ำมันสบู่ดำ

-ผสม Tween 80 ลงไปร้อยละ 1 ของปริมาตรน้ำมันที่ต้องการเตรียม นำไปเขย่าอย่างรุนแรงด้วยเครื่องเขย่า(vortex)

วิธีการเตรียมสารละลายฟีนอลเรด (Phenol red solution)

- ละลายฟีนอลเรด 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสง

การเตรียมสารละลาย *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp) (สารละลาย A)

- ชั่งสาร *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp) 30 มิลลิกรัม ละลายใน ไอโซโพรพานอล 10 มิลลิลตร

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (สารละลาย B)

A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ตารางภาคผนวกที่1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ผสม X มิลลิลิตร ของ A กับ Y มิลลิลิตร ของ B ปรับปริมาตรเป็น 200.0 มิลลิลิตร

X มล.	Y มล.	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92	8	5.8
90	10	5.9
87.7	12.3	6
85	15	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51	49	6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่1(ต่อ) การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

X มล.	Y มล.	พีเอช
45	55	6.9
39	61	7
33.3	67	7.1
28	72	7.2
23	77	7.3
19	81	7.4
16	84	7.5
13	87	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7	93	7.9
5.3	94.7	8

การเตรียมสารละลาย p-nitrophenol เพื่อทำกราฟสารละลาย p-nitrophenol มาตรฐาน

การเตรียมสารละลาย p-nitrophenol เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งสาร p-nitrophenol 95 เปอร์เซ็น 0.10526 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

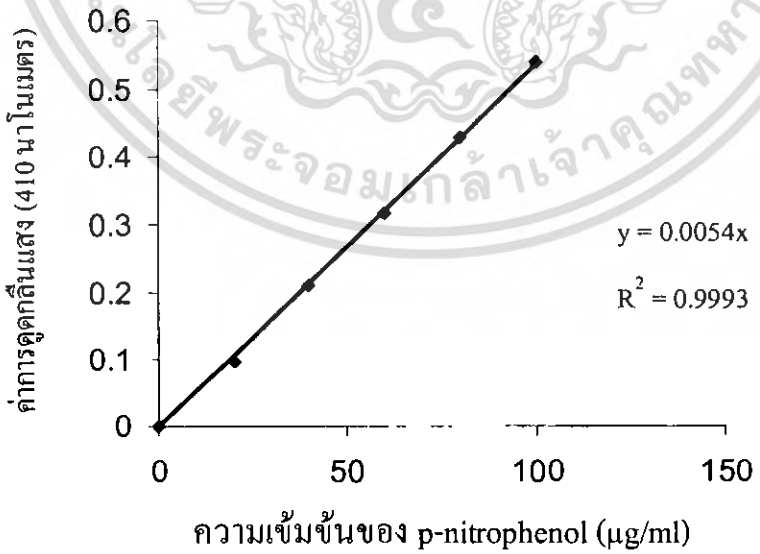
ภาคผนวก ค.

การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ตารางภาคผนวกที่2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐาน *p*- nitrophenol

p-nitrophenol (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
20	0.0804	0.0980	0.1145	0.0976
40	0.2115	0.2188	0.2008	0.2104
60	0.3190	0.3155	0.3185	0.3177
80	0.4485	0.4255	0.4184	0.4308
100	0.4966	0.5421	0.5783	0.5390

กราฟสารละลาย *p*-nitrophenol มาตรฐาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหากิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.) = $\frac{\text{ไมโครกรัมของ p-nitrophenol} \times 10^6 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ p-nitrophenol} \times \text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ (มล.)}}$

$= \frac{\text{ไมโครกรัมของ p-nitrophenol} \times 10^6 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{139.11\ \text{g/mol} \times 15\ \text{นาที} \times 0.1\ \text{มล.}}$

จากสมการของกราฟมาตรฐาน y = 0.0054x เมื่อแทนค่า x ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของ p-nitrophenol (µg/ml) และนำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่3 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
P 3	1	0.682	1	0.605
	2	0.672		0.596
	3	0.659		0.585
S 5	1	0.524	1	0.465
	2	0.503		0.446
	3	0.501		0.445
S 8	1	0.623	1	0.553
	2	0.608		0.54
	3	0.627		0.556
S 9	1	0.743	1	0.659
	2	0.725		0.643
	3	0.758		0.673
BGG 02	1	0.512	1	0.454
	2	0.505		0.448
	3	0.502		0.446

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่3(ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก

ตัวอย่าง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการเจือจาง	ค่ากิจกรรม
BGG 05	1	0.823	1	0.73
	2	0.788		0.699
	3	0.798		0.708
BGG 06	1	0.428	5	1.9
	2	0.452		2.005
	3	0.474		2.035
BGG 07	1	0.775	1	0.688
	2	0.764		0.678
	3	0.798		0.708
BGG 10	1	0.655	1	0.581
	2	0.672		0.596
	3	0.64		0.574

ตารางที่ภาคผนวกที่4 ค่าการคำนวณทางสถิติโดยโปรแกรมSPSSของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.377	8	0.672	829.586	0
Within Groups	0.015	18	0.001		
Total	5.391	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

DATA

Duncan

	N	Subset for alpha = .05					
ACTIVITY							
	1	2	3	4	5	6	7
5							
3	0.44933						
2							
3	0.452						
3							
3		0.54967					
9							
3		0.58367	0.58367				
1							
3			0.61033	0.61033			
4							
3				0.65833	0.65833		
8							
3					0.69133	0.6913	
6							
3						0.7123	
7							
3							1.98
Sig.	0.91	0.161	0.266	0.054	0.173	0.378	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้