สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การแยกและคัดเลือกเชื้อราจากดินเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นางสาวประภากร โต๊ะแอใบเซ็น
นางสาวปัตติยาค์ น้ำฟ้า
นางสาวสิรินทร เป็นสุข

ว.ฟ
ป32ก
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72587
วัน,เดือน,ปี 20 ส.ค. 2550

b 11769737
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and selection of fungi form soil for lipase production

Miss Prabhakorn Tohabaisen

Miss Pattiya Namfar

Miss Sirinthorn Pensuk

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 การแยกและการคัดเลือกเชื้อราจากดิน เพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นักศึกษา นางสาวประภากร โต๊ะแอใบเซ็น รหัส 46050470

นางสาวปัตติยาภ์ น้ำฟ้า รหัส 46050472

นางสาวสิรินทร เป็นสุข รหัส 46050490

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.สุขใจ ชูจันทร์	.....
กรรมการ	ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	.....
กรรมการ	ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์	.....
กรรมการ	อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	.....

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การแยกและคัดเลือกเชื้อราจากดินเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส
นักศึกษา นางสาวประภากร โต๊ะแอใบเซ็น
นางสาวปัดติยาค์ น้ำฟ้า
นางสาวสิรินทร เป็นสุข
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2549
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์
ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

ไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญกับการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากมายทางเทคโนโลยีชีวภาพ งานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาการคัดเลือกเชื้อราจากแหล่งดินธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และสามารถใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยการคัดแยกเชื้อราจากแหล่งดินธรรมชาติโดยใช้วิธี spread plate บนอาหาร selective media ดูการเกิดวงใสและทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและหากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงจาก เชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลตมี 31 ไอโซเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส และจากเชื้อรา 31 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้มี 18 ไอโซเลตที่สามารถใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดมี 2 ไอโซเลตคือ S 1546 และ S 1649 ซึ่งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสได้มากกว่า 10 มิลลิเมตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์ 0.7946 และ 0.7747 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Isolation and selection of fungi form soil for lipase production

Name Miss Prabhakorn Tohabaisen

Miss Pattiya Namfar

Miss Sirinthorn Pensuk

Department Applied Biology

Program Industrial Microbiology

Academic Year 2006

Special Project Advisor Asst. Prof. Aree Rittiboon

Abstract

Lipase constitutes an interesting class of enzyme with many biochemical applications. This research was done by selecting fungi from soil that can produce lipase and can use *Jatropha curcas* oil as a carbon source. We selected fungi from soil by the spread plate method on selective media in order to detect clear zones and to test the efficiency of lipase by measuring the diameters of the clear zone. Enzyme activity can be determined by spectrophotometer. Sixty-four fungal isolates were selected and isolates could produce lipase. Among the 31 isolates, there were 18 that could use *Jatropha curcas* oil as a carbon source. The isolate S 1546 and the S 1649 could produce highest lipase with the diameters of clear zones of more than 10 millimeters. They had lipase activities of 0.7946 and 0.7747 unit/milliliter, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ซึ่งได้สำเร็จด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาและคณะกรรมโครงงานพิเศษที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัยตลอดจนการตรวจงาน แก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ผศ.ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ และอาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่เป็นประธานกรรมการและกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ช่วยในการตรวจงาน แก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลองและอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ พี่ๆ เพื่อนทุกคน และผู้มีส่วนร่วมในโครงงานพิเศษทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จนี้

นางสาวประภากร โต๊ะแอใบเซ็น
นางสาวปัตดิยาค์ น้ำฟ้า
นางสาวสิรินทร เป็นสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 จุลินทรีย์ดิน	3
2.2 เชื้อรา	4
2.3 เอนไซม์ไลเปส	5
2.4 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส	6
2.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา	13
2.6 สบู่ดำ	15
2.7 น้ำมันดอกทานตะวัน	20
2.8 การใช้น้ำมันสบู่ดำผลิตไบโอดีเซล	21
2.9 การใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อการผลิตไบโอดีเซล	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงาน	24
3.2 การเก็บตัวอย่างดิน	25
3.3 การเตรียมอาหารที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงเชื้อรา	25
3.4 การแยกเชื้อราจากดิน	26
3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก	26
3.6 การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทางสถิติ	27
3.8 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก	27
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติ	28
4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส	31
4.3 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก	38
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก	40
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 กลุ่มของเส้นใย (mycelium) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	4
รูปที่ 2.2 การย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส	6
รูปที่ 2.3 การใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆของต้นสบู่ดำ	18
รูปที่ 2.4 เครื่องสกัดน้ำมันสบู่ดำ	19
รูปที่ 2.5 ลักษณะเมล็ดสบู่ดำที่นำมาสกัดน้ำมัน	20
รูปที่ 2.6 น้ำมันสบู่ดำ	20
รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	23
รูปที่ 4.1 ตัวอย่างดินที่ใช้คัดแยกเชื้อรา	30
รูปที่ 4.2 ลักษณะการเกิดวงใสบนอาหาร tributyrin agar เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา เป็นเวลา 3 วัน	34
รูปที่ 4.3 ลักษณะการเกิดวงใสบนอาหาร selective media ที่ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน	34
รูปที่ 4.4 ลักษณะการเกิดวงใสบนอาหาร selective media ที่ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน	35
รูปที่ 4.5 เชื้อราที่เจริญในอาหารเหลวสูตรที่ 3 โดยเลี้ยงเชื้อราในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน	38
รูปที่ 4.6 ลักษณะการเกิดวงใส (clear zone) ในอาหาร tributyrin agar	38
รูปที่ 4.7 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1546 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน	41
รูปที่ 4.8 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1546 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน	41
รูปที่ 4.9 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1546 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการทำ slide cultureเป็นเวลา 3 วัน ที่กำลังขยาย 400 เท่า	42
รูปที่ 4.10 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต S1546 ที่ผ่านการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	42
รูปที่ 4.11 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1649 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.12 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1649 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน 43

รูปที่ 4.13 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1649 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยการทำ slide cultureเป็นเวลา 3 วัน ที่กำลังขยาย 400 เท่า 44

รูปที่ 4.14 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต S1649 ที่ผ่านการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า 44

รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟสารละลาย *p*-nitrophenol มาตรฐาน 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส 8

ตารางที่ 2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส(ยูนิต/มล.) จากเชื้อราที่ทำการศึกษา 14

ตารางที่ 2.3 ผลจากใช้แหล่งน้ำมันที่แตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *Metarhizium anisopliae* กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 14

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ 16

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ 17

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ 17

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันทานตะวัน 20

ตารางที่ 2.8 ชนิดของน้ำมันทานตะวันและองค์ประกอบของกรดไข 21

ตารางที่ 2.9 คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำและไบโอดีเซล 21

ตารางที่ 2.10 คุณสมบัติของน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันสบู่ดำและน้ำมันดีเซล 22

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินแหล่งต่างๆ 28

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการเกิดวงใสบนอาหาร selective media tributyrin agar และ selective media ที่ใช้น้ำมันทานตะวันและน้ำมันสบู่ดำ เป็นแหล่งคาร์บอน 31

ตารางที่ 4.3 ขนาดของวงใสที่เกิดจากเอนไซม์ไลเปส 36

ตารางที่ 4.4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่คัดเลือก 38

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต S1546 และ S1649 40

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50

ตารางภาคผนวกที่ 2 แหล่งดินธรรมชาติที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อรา 52

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol 53

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก 54

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยโปรแกรม SPSS version 11 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

เนื่องจากสภาพการณ์ในปัจจุบันน้ำมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานมีราคาแพงและมีแนวโน้มว่าราคาจะสูงขึ้นทุกวัน จึงได้มีการหันมาสนใจการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงจากวัตถุดิบจากธรรมชาติ เช่น ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว รวมไปถึงน้ำมันจากสบู่ดำซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมาก

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากสัตว์ พืชและจุลินทรีย์ ได้แก่ แอคติโนมัยซีท แบคทีเรียและรา ทำหน้าที่ในการย่อยไตรกลีเซอไรด์ โดยย่อยพันธะเอสเทอร์ของกลีเซอรอลและกรดไขมันสายโซ่ยาว (Cardenas และคณะ, 2001) เนื่องจากน้ำมันจากสบู่ดำมีลักษณะสายโซ่ยาวจึงทำให้มีความหนืดสูง ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จึงนำน้ำมันจากสบู่ดำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ยาก ซึ่งงานวิจัยนี้ทำการศึกษาและคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิดเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันจากสบู่ดำต่อไปในอนาคด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราจากดินที่สามารถผลิดเอนไซม์ไลเปส
2. เปรียบเทียบการแยกและคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหาร 3 ชนิด
3. ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราโดยการใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อราชนิดต่างๆ ในสูตรอาหารที่เหมาะสม
2. คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด โดยใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน
3. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์และทดสอบความสามารถของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือกในการย่อยน้ำมันจากสบู่ดำ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สามารถใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 . เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดโดยใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 จุลินทรีย์ดิน (สมศักดิ์, 2528)

จุลินทรีย์ดิน (soil microorganism) คือสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ที่ผิวดินและในดิน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน สามารถจำแนกได้เป็น 4 ประเภทคือ แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีท และ สาหร่าย ส่วนไวรัส นั้นมีขนาดเล็กกว่าจุลินทรีย์ 4 ชนิดแรกมาก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่งที่พบในดินเช่นกัน แต่ไม่มีความสำคัญต่อความอุดมสมบูรณ์ของดินโดยตรง นอกจากเป็นเชื้อโรคของโรคพืชบางชนิดและเป็นเชื้อโรคหรือศัตรูของจุลินทรีย์ 4 ชนิดแรก จุลินทรีย์ทั้ง 4 ประเภทมีความแตกต่างกันอย่างมากในรูปแบบของการดำรงชีวิต ซึ่งกำหนดเป็นเกณฑ์ในการแบ่งประเภทได้ดังนี้

1. ตามความสามารถสร้างสารอาหารและแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์บางพวกสามารถสร้างสารอาหารได้เองจากสารอนินทรีย์ที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์พวกนี้เรียกว่าพวกสร้างสารอาหารได้เอง (autotrophic) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยเป็นพวกที่สามารถใช้พลังงานจากแสง (photoautotrophic) และพวกที่ใช้พลังงานจากปฏิกิริยาเคมี (chemoautotrophic) สาหร่ายและแบคทีเรียบางชนิด (รวมทั้งพืชชั้นสูงทุกชนิด) เป็นพวกสร้างสารอาหารได้เองโดยใช้พลังงานจากแสงขณะเดียวกันก็มีแบคทีเรียบางชนิดสร้างสารอาหารได้เองโดยใช้พลังงานจากปฏิกิริยาเคมี จุลินทรีย์อีกพวกหนึ่งไม่สามารถสร้างสารอาหารได้เอง ต้องได้รับสารอินทรีย์ที่มีจุลินทรีย์หรือพืชชั้นสูงสร้างไว้เป็นอาหาร (แหล่งคาร์บอน) และแหล่งพลังงาน จุลินทรีย์พวกนี้เรียกว่า พวกสร้างสารอาหารเองไม่ได้ (heterotrophic)

2. แบ่งโดยความต้องการแก๊สออกซิเจนในการหายใจ เชื้อรา สาหร่าย แอคติโนมัยซีท และแบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการหายใจ (aerobic) มีแบคทีเรียบางชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจน แต่สามารถใช้อะตอมของออกซิเจนที่เป็นองค์ประกอบในสารอนินทรีย์ได้ เช่น NO_3^-, SO_4^{2-} และ F_2O_3 ในการหายใจ (anaerobic) การหายใจของจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน (รวมทั้งมนุษย์ สัตว์ และพืชชั้นสูง) ทำให้ได้แก๊ส CO_2 ในขั้นสุดท้ายของกระบวนการ ส่วนการหายใจที่ไม่ต้องการออกซิเจนได้ CH_4 (แก๊สมีเทน) เป็นผลผลิต

3. แบ่งโดยการตรึงไนโตรเจนคือ ใช้ประโยชน์จากแก๊สไนโตรเจน (N_2) ได้โดยตรง จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนมีทั้งแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีทและสาหร่าย ซึ่งทั้งหมดสามารถแบ่งย่อยไปได้เป็นพวกที่ตรึง ไนโตรเจน แบบชีวสัมพันธ์ คือต้องมีชีวิตอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นแบบต่างได้รับประโยชน์จากกันและกัน จึงสามารถตรึงไนโตรเจนได้ และพวกที่ตรึงไนโตรเจนได้

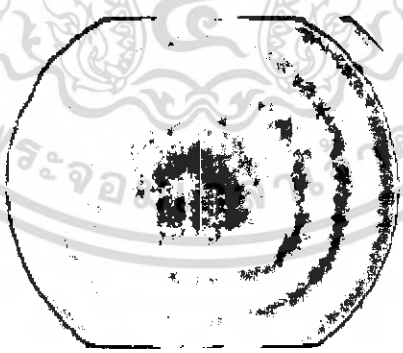
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีชีวิตอิสระ คือกินสารอินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมเป็นอาหารแล้วตรึงไนโตรเจนได้เลย เรียกว่าตรึงไนโตรเจนแบบไร้ชีวสัมพันธ์

4. แบ่งตามอุณหภูมิ จุลินทรีย์แต่ละประเภทมีพวกที่ต้องการอุณหภูมิพอเหมาะกับการเจริญเติบโตแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 พวกคือ พวกที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส (mesophiles) อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส พวกที่ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychrophiles) และพวกที่มีอุณหภูมิพอเหมาะใน ช่วง 45-60 องศาเซลเซียส (thermophiles)

2.2 เชื้อรา

เชื้อราจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเซลล์แบบยูคาริโอต (eukaryotic) มีทั้งลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) เช่น รา น้ำและยีสต์ หรือมีหลายเซลล์ (multicellular) ที่เรียงต่อกันเป็นเส้นใย (filamentous hyphae) เมื่อเส้นใยหลายๆ เส้นรวมกันเรียกว่า mycelium ดังแสดงในรูปที่ 2.1 เชื้อรามีผนังเซลล์เหมือนพืชชั้นสูงแต่ไม่มี chlorophyll ไม่มีระบบท่อลำเลียง (vascular system) และไม่สามารถแยกเป็นราก ลำต้น ใบ ได้อย่างชัดเจน ผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบไปด้วยสารไคตินและกลูแคนหรือเซลลูโลสอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง เชื้อราหนึ่งเซลล์อาจประกอบด้วยนิวเคลียสอันเดียว (uninucleate) หรือหลายนิวเคลียส (multinucleate) เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non motile) ยกเว้นเซลล์สืบพันธุ์ (reproductive cell) เช่น zoospore ของราบางชนิดที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) เชื้อราสามารถดำรงชีพได้หลายแบบทั้งสภาวะที่เป็นปรสิต (parasitsm) ผู้ย่อยสลาย (saprophytism) และอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ (mutualism)



รูปที่ 2.1 กลุ่มของเส้นใย (mycelium) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มา : http://agserver.kku.ac.th/e-learning/100221/E-Learning100221/detail/main/main_committee.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราทุกชนิดไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง (heterotrophic) จึงต้องอาศัยสารอินทรีย์จากพืชและสัตว์อื่นทั้งที่มีชีวิตและที่ตายแล้ว เชื้อรามีตั้งแต่พวกเซลล์เดียวได้แก่ ยีสต์ (yeasts) พวกหลายเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเส้นใย และพวกที่เส้นใยอยู่รวมกลุ่มกันจนปรากฏให้เห็นเป็นดอกเห็ด เชื้อราทุกชนิดยกเว้นยีสต์ต้องการแก๊สออกซิเจนในการหายใจ ดังนั้นจึงไม่พบเชื้อราในสภาพน้ำขัง เชื้อราทนแล้งได้ดี ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท

บทบาทหลักของเชื้อราในระบบนิเวศของดินได้แก่ การย่อยสลาย (decomposition) อินทรียวัตถุ เชื้อราเป็นผู้ย่อยสลายที่สำคัญโดยเฉพาะกับอินทรีย์สารที่ถูกย่อยสลายได้ยากเช่น เซลลูโลสและลิกนิน (cellulose and lignins) ซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของไม้เนื้อแข็ง เส้นใย (fiber) และไขมัน (lipids) เป็นต้น เชื้อรายังมีข้อได้เปรียบแบคทีเรีย คือ รามีรูปร่างเป็นเส้นใยจึงสามารถเจริญเข้าไปย่อยสลายภายในอินทรียวัตถุได้ดีกว่าแบคทีเรีย เชื้อรามีบทบาทย่อยสลายอินทรียวัตถุในช่วงแรกของการย่อยสลาย ดังเห็นว่าเมื่ออินทรียวัตถุสดเน่าเปื่อยนั้นต้องมีเชื้อราขึ้น ก่อนให้เห็นเป็นเส้นใยหรือเป็นเห็ด จนกระทั่งเห็ดและราลดจำนวนลงแล้วอินทรียวัตถุนั้นจึงเน่าเปื่อยต่อไปโดยการย่อยสลายของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท

2.2.1 การสืบพันธุ์ของเชื้อรา

การสืบพันธุ์ของเชื้อราแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

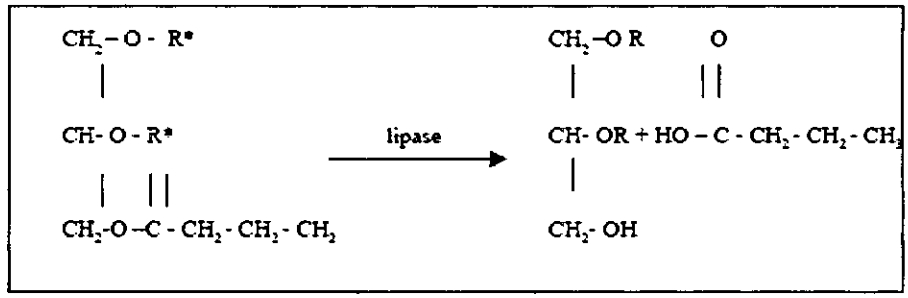
1. การสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual reproduction) เป็นการสืบพันธุ์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากการรวมตัวของ nuclei sex cell หรือ sex organ การสืบพันธุ์แบบนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการแพร่ระบาดของโรคพืช เนื่องจากเชื้อราสามารถเพิ่มจำนวนได้หลายๆครั้งในฤดูเดียว

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) เป็นการสืบพันธุ์ที่มีการรวมตัวและแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

2.3 เอนไซม์ไลเปส (lipases)

ไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโลเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมันน้ำมันในภาวะที่มีน้ำให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Fickers และคณะ, 2006) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 มีชื่อสามัญว่า ไลเปส และมีชื่อตามระบบว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ EC. 3.1.1.3 โดยทั่วไปไลเปสพบในคนและสัตว์ มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการย่อยอาหาร สำหรับปัจจุบันมีการสกัดไลเปสจากจุลินทรีย์และผลิตจำหน่าย ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสมี 2 ลักษณะ ใหญ่ ๆ คือ ทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ (non - specific lipase) และทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะที่พันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 1,3 (1,3 - specific lipase) ซึ่งการย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส
ที่มา : Fickers และคณะ (2006)

ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ไลเปสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ โดยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชั่น ไทโอเอสเทอร์ริฟิเคชั่น และอะมิโนไลซีส (Nutan และคณะ, 2002) เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย) ในสัตว์พบในน้ำนมและตับอ่อน ส่วนพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอก เช่น เมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง เป็นต้น ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความคงตัวต่ำกว่าจุลินทรีย์ ไลเปสจากจุลินทรีย์จะพบทั้งที่สร้างอยู่ในเซลล์ และขับออกมานอกเซลล์ จุลินทรีย์จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็ว เลี้ยงง่าย ไม่ต้องการพื้นที่มากในการเลี้ยง ไม่ขึ้นกับฤดูกาล สามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ง่ายต่อการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ เนื่องจากเอนไซม์มีคุณสมบัติคงทนต่อค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิสูงและมีความจำเพาะต่อสับสเทรตหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ และ ยา

2.4 ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส

เนื่องจากไลเปสสามารถคะตะไลซ์ (catalyse) กระบวนการ transesterification หรือ interesterification ทำให้เกิดการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเอสเทอร์ได้มากมาย จากคุณสมบัติพื้นฐานของไลเปสจึงมีการนำเอาไลเปสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิตยาและการบำบัด กระบวนการผลิตอาหารทางอุตสาหกรรมการผลิตสารเพิ่มกลิ่นรส ในการบำบัดน้ำเสีย การผลิตเครื่องสำอาง การผลิตสารซักฟอกและการผลิตไบโอดีเซล (Fickers และคณะ, 2005 ; Jaeger และ Eggert , 2000 ; Corzo และ Revah, 1999) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการปรับปรุงกลิ่น สี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความนุ่มและโครงสร้างของขนมปัง ใช้ในการกำจัดไขมันในน้ำเสียและกำจัดขยะ และลดการใช้สารเคมีในการผลิตและทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์ เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีข้อดีมากกว่าการใช้วิธีทางเคมี คือ ไม่ต้องใช้ความดันสูงหรือผ่านหลายขั้นตอนและไม่ทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมตามมา ผลผลิตที่ได้สะอาด เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อสับสเตรท

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสมีข้อเสีย คือ เป็นต้นเหตุทำให้เกิดการหืนในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม กลิ่นหืนที่เกิดขึ้นเป็นกลิ่นของกรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เช่น กรดบิวทิริค การโฮโมจีไนเซชั่นน้ำนมจะช่วยทำให้เอนไซม์ไลเปสไฮโดรไลซ์ไขมันนมได้เร็วขึ้น เกิดกลิ่นหืนได้ถึงแม้จะทำภายในระยะเวลาสั้นก็ตาม เพราะการโฮโมจีไนเซชั่น การกวน หรือการเขย่าช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนั้นการทำให้น้ำนมเย็นลงถึง 4 องศาเซลเซียส แล้วทำให้ร้อนขึ้นถึง 30 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นลงถึง 5 องศาเซลเซียส อีกครั้งหนึ่ง จะช่วยทำให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปย่อย fat globule ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เพราะเป็นการช่วยให้เอนไซม์ถูกดูดซับอยู่บน fat globule ได้ดีขึ้น นอกจากนั้นยังมีผู้ทดสอบพบว่าไลเปสเป็นตัวทำให้เกิดการหืนในเนยด้วย

2.4.1 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้ในแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา (Mahadik และคณะ, 2002) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสดังแสดงในตารางที่ 2.1 เชื้อราเป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุด และถูกนำมาใช้อย่างมากในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร (Mahadik และคณะ,2002) เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Geotrichum, Penicillium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus* และ *Rhizomucor* เป็นต้น (Cardenas และคณะ, 2001 ; Tan และคณะ , 2003) ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Candida* และ *Yarrowia lipolytica* (Tan และคณะ, 2003 ; Fickers และคณะ, 2006) เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Pseudomonas, Bacillus* และ *Staphylococcus* เป็นต้น (Jaeger และ Eggert , 2000)

2.4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในแบคทีเรีย รา และในสัตว์ ซึ่งมีการนำมาใช้ประโยชน์มากมาย วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไป คือ การไทเทรตกรดไขมันด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ อีก ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ชนิดจุลินทรีย์	จีนัส	สปีชีส์
แบคทีเรีย (แกรมบวก)	*Bacillus*	*B. megaterium*
		B. cereus
		B. stearothermophilus
		B. subtilis
		Recombinant B. subtilis 168
		B. brevis
		B. thermocatenulatus
		Bacillus sp. IHI-91
		Bacillus strain WAI 28A5
		Bacillus sp.
		B. coagulans
		B. acidocaldarius
		Bacillus sp. RS-12
		B. thermoleovorans ID-1
		Bacillus sp. J 33
	Staphylococcus	*S. canosus*
		S. aureus
		S. hyicus
		S. epidermidis
		S. warneri
	Lactobacillus	*Lactobacillus delbruckii sub* sp.*bulgaricus*
		Lactobacillus sp.
	Streptococcus	*Streptococcus lactis*
	Micrococcus	*Micrococcus freudenreichii*
		M. luteus
	Propionibacterium	*Propionibacterium acne*
		P. granulosum
	Burkholderia	*Burkholderia* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ชนิดจุลินทรีย์	จีนัส	สปีชีส์
แบคทีเรีย (แกรมลบ)	*Pseudomonas*	*B. glumae*
		Pseudomonas sp.
		Pseudomonas sp. KWI56
		P. mendocina
		P. putida 3SK
		P. glumae
		P. cepacia
		P. fluorescens
		P. aeruginosa KKA-5
		P. pseudoalcaligenes F-111
		P. fluorescens MF0
	Chromobacterium	*C. viscosum*
	Acinetobacter	*A. pseudoalcaligenes*
		A. radioresistens
	Aeromonas	*A. hydrophila*
		A. sorbia LP004
รา	*Rhizopus*	*R. delemar*
		R. oryzae
		R. arrhizus
		R. nigricans
		R. nodosus
		R. microsporous
		R. chinensis
		R. japonicus
		R. niveus
	Aspergillus	*A. flavus*
		A. niger
		A. japonicus
		A. awamori

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ชนิดจุลินทรีย์	จีนัส	สปีชีส์
		A. fumigatus
		A. oryzae
		A. carneus
		A. repens
		A. nidulans
	Penicillium	*Penicillium* sp.
		P. cyclopium
		P. citrinum
		P. roqueforti
		P. fumiculosum
		P. camambertii
		P. wortmanii
	Mucor	*M. miehei*
		M. javanicus
		M. circinelloides
		M. hiemalis
		M. racemosus
	Ashbya	*A. gossypii*
	Geotrichum	*Geotrichum* sp.
		G. candidum
	Beauveria	*B. bassiana*
	Humicola	*H. lanuginosa*
	Rhizomucor	*R. miehei*
	Fusarium	*F. oxysporum*
		F. heterosporum
	Acremonium	*A. strictum*
	Alternaria	*A. brassicicola*
	Eurotrium	*E. herbanorium*
	Ophiostoma	*O. piliferum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ชนิดจุลินทรีย์	จีนัส	สปีชีส์
ยีสต์	*Candida*	*C. deformans*
		C. curvata
		C. valida
	Yarrowia	*Y. lipolytica*
	Rhodotorula	*R. glutinis*
		R. pilimornae
	Pichia	*P. bispora*
		P. maxicana
		P. sivicola
		P. xylosa
		P. burtonii
	Saccharomyces	*S. lipolytica*
		S. crataegenesis
	Torulospora	*T. globora*
	Trichosporon	*T. asteroides*
แอคติโนมัยซีส	*Streptomyces*	*S. fradiae* NCIB8233
		Streptomyces sp. PCB27
		Streptomyces sp. CCM 33
		S. coelicolor
		S. cinnamomeus

ที่มา : Sharma และคณะ, 2001

2.4.2.1 การวิเคราะห์ด้วยการดูดกลืนแสง

เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophynyl ester และ aliphatic cycle ที่มีสายโซ่ยาวเช่น laurate palmitate หรือ oleate เริ่มจากการเตรียมสารละลาย *p*-nitrophynyl ester ใน CH_2Cl_2 100-250 มิลลิโมลาร์ โดยนำสารละลายที่ได้ 20 ไมโครลิตรมาเจือจางในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl (พีเอช 8.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ NaCl ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตรมาบ่มร่วมกับสารละลายสับสเทรต 0.2 มิลลิลิตรในไมโครเพลท 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม *p*-nitrophynol และนำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ภายใต้แสงอุลตร้าไว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอเลตที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยใช้แบลงค์ที่ปราศจากเอนไซม์ (Gilham และ Lehner, 2005)

การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดการดูดกลืนแสงประกอบด้วย สารละลายสารตั้งต้น (สารละลาย A : สารละลาย B อัตราส่วน 1 : 9 ปริมาตร : ปริมาตร) 2.4 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ (สารละลาย A คือ 30 มิลลิกรัม *p*-nitrophenylpalmitate (*p*-npp) ในไอโซโพรพานอล 10 มิลลิลิตร สารละลาย B คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ KH_2PO_4 หรือ Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล พีเอช 8) 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร 1 ยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol อิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อนาที (Katsivela และคณะ, 1995)

2.4.2.2 การวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต

สารละลายที่จะทำการไทเทรตประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ 2 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KH_2PO_4 หรือ Na_2HPO_4 พีเอช 6.0) ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล 2 มิลลิลิตร และน้ำมันมะกอก 1 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำการเขย่าที่ 240 รอบต่อนาที อย่างต่อเนื่องตลอด 30 นาทีของการบ่ม เมื่อครบ 30 นาทีหยุดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติม 20 มิลลิลิตรของเอทานอล : อะซิโตน อัตราส่วน 1 : 1 (ปริมาตร : ปริมาตร) หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นโดยการไทเทรตด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล จนกระทั่งมีค่าพีเอช 10.4 (Gilham และ Lehner, 2005)

1 ยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 1 ไมโครโมลของกรดไขมันอิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อนาที (Gilham และคณะ, 2005)

Sarda และ Desnuelle (1958) อธิบายถึงกิจกรรมการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเอนไซม์ไลเปสไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับระดับของอีมัลชันที่อยู่ระหว่างรอยต่อของน้ำและน้ำมัน เพราะการทำปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นบริเวณนี้ (Katsivela และคณะ, 1995)

2.4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันที่นิยมใช้ คือ วิธีโครมาโตกราฟีซึ่งเป็นวิธีวัดกรดไขมันที่เกิดขึ้นโดยตรง สามารถทำได้หลายแบบ เช่น thin-layer chromatography เป็นการหาปริมาณกรดไขมันจากไตรกลีเซอไรด์ด้วยหลักการวัดความหนาแน่น การฉายรังสีและการเรืองแสง gas chromatography เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถแยกชนิดของโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไดรกลีเซอไรด์ได้ สารละลายมาตรฐาน ที่ใช้ในการเปรียบเทียบเช่น tridecanoylglycerols เหมาะสำหรับการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ และ high performance liquid chromatographyn (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophynol palmitate เป็นสับสเตรท สามารถแยกสารผสมระหว่างกรดไขมันอิสระและไตรกลีเซอรอลชนิดต่าง ๆ ได้ (Gilham และคณะ, 2005)

2.4.2.4 การวิเคราะห์การเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์

เป็นการวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยการทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารชนิดต่าง ๆ เช่น 1,2-diol-eoyl-3-(1-pyren-1-yl)decanoyl-*rac*-glycerol และ 4-methylumbelli ferone เป็นต้น แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ อาจทำลายคุณสมบัติของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (Gilham และคณะ, 2005)

2.4.2.5 การวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์

ทำการวิเคราะห์โดยวิธี Thin-later chromatography โดยใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 F_{254} (type no. 5554; Merck, Darmstadt, Germany) ขนาด 0.02 มิลลิเมตร $CHCl_3$: อะซิโตน อัตราส่วน 94 : 4 ปริมาตร : ปริมาตร เป็นระบบ และ แอลฟา-เนฟทอล:กรดซัลฟิวริก เป็นสารตรวจสอบ (Katsivela และคณะ, 1995)

2.4.2.6 การวิเคราะห์โครงสร้างทางโมเลกุล

ทำได้โดย ^{1}H และ ^{13}C –nuclear magnetic resonance และการวิเคราะห์ร่วมกันของ gas chromatography และ mass spectrometry

2.4.2.7 การหาน้ำหนักแห้ง (Katsivela และคณะ)

เซลล์เปียกจะทำให้แห้งโดยทำการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาลดอุณหภูมิในเดซิเคเดอร์ จากนั้นจึงทำการชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้ง การหาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) หาได้จาก

$$\mu_{max} = \frac{\ln DW_1 - \ln DW_0}{t_1 - t_0}$$

DW คือ น้ำหนักแห้ง

t_0 คือ เวลาเริ่มต้นในการบ่ม (เวลาที่ 0)

t_1 คือ เวลาที่ใช้ในการบ่ม

2.5 การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา

Cadenes และคณะ, 2001 ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้อาหาร 2 สูตรคือ H1 ประกอบด้วย 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 และน้ำมันมะกอก ร้อยละ1 ปริมาตรต่อปริมาตร และอาหารสูตร H2 ประกอบด้วย แป้งถั่วเหลือง ร้อยละ 7.2 กลูโคส ร้อยละ 2 KH_2PO_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0.1 $NaNO_3$ ร้อยละ 0.1 $MgSO_4$ ร้อยละ 0.05 และน้ำมันมะกอก ร้อยละ1 ปริมาตรต่อปริมาตร ควบคุมพีเอชที่ 7.2 เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ได้ผลดังตาราง 2.2

ตารางที่ 2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส(ยูนิต/มิลลิลิตร) จากเชื้อราที่ทำการศึกษา

เชื้อรา	อาหารเลี้ยงเชื้อ	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	
		น้ำมันมะกอก	tributyrin
Acremonium murorum	H1	0.72	5.18
Monascus mucorodies	H1	3.02	4.31
Monascus sp.	H1	2.35	2.37
Arthroderma ciferrii	H2	1.43	1.89
Fusarium poae	H2	0.93	1.47
Fusarium solani	H2	0.60	1.25
Fusarium oxysporum	H2	2.83	5.70
Penicillium chrysogenum	H2	0.64	4.68
Ovadendron sulphureo-ochraceum	H2	4.33	6.10

จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสับสเทรตที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรามีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไลเปส

Orlando Beys Silva และคณะ, 2005 ได้ทำการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส ร้อยละ 0.2 เปปโตน ร้อยละ 0.5 K_2HPO_4 ร้อยละ 0.1 $MgSO_4$ ร้อยละ 0.01 โดยใช้น้ำมันจากแหล่งต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ไลเปสดังตารางที่ 2.3 พีเอชอาหารเท่ากับ 7.2

ตารางที่ 2.3 ผลจากใช้แหล่งน้ำมันที่แตกต่างกันในการเลี้ยงเชื้อ *Metarhizium anisopliae* กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งไขมัน	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต/มล.)
Babasu oil 2%	3.30 ± 0.89
Olive 2%	4.25 ± 0.69
Sunflower 2%	4.23 ± 0.34
Lineseed 2%	2.72 ± 0.06
Soybean 2%	4.26 ± 1.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งไขมัน	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต/มล.)
Corn 2%	3.45 ± 0.18
Cotton seed 2%	2.51 ± 0.61
Canola 2%	2.17 ± 0.16
Rice 2%	4.48 ± 0.63
Palm 2%	2.20 ± 0.37
Pig fat 2%	1.64 ± 0.35
Sesame 2%	3.51 ± 0.78
Bovine fat 2%	2.57 ± 0.72
HSF 2%	3.51 ± 1.00
Sunflower 1%	1.98 ± 0.75
Sunflower 2%	3.93 ± .53
Sunflower 3%	4.97 ± 0.54
Sunflower 4%	4.27 ± 0.65
Soybean 1%	4.90 ± 0.63
Soybean 2%	4.85 ± 1.18
Soybean 3%	3.94 ± 1.21
Soybean 4%	3.20 ± 1.04

HSF : hydrogenate soybean fat

จากผลงานวิจัยของ Orlando Beys Silva และคณะ, 2005 พบว่าการใช้แหล่งน้ำมันในการเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ต่างกันทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้มีค่าแตกต่างกันไปด้วย

2.6 สบู่ดำ

สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas* Linn. เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล ไม้ยางพารา Euphgrbiaceae เช่นเดียวกันกับสบู่แดง ปัตตาเรีย ฟิ่นต้น หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน ท่านผู้รู้และเอกสารหลายเล่มบอกว่า เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกากลาง มีชาวโปรตุเกสนำเข้ามาในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา สบู่ดำ มีชื่อภาษาไทยตามภูมิภาคต่างๆ คือ ภาคเหนือเรียกว่า มะหุ่งยั้ว มะหัว มะโห่ง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า มะเยา หรือ สีหลอด หรือ หมักเยา ภาคกลางเรียกว่า สบู่ดำ สบู่หัวเทศ สลอดดำ สลอดใหญ่ สีหลอด ภาคใต้เรียกว่า มาเดาะ มะหุงเทศ คนจีนเรียกว่า หมาเพิ่งสู้ มั่วฮวงซิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 ลักษณะทั่วไปของสบู่ดำ

สบู่ดำมีลำต้นเป็นพุ่ม แตกกิ่งก้านสาขาออกมากมาย เปลือกของลำต้นมีสีน้ำตาลอ่อน เรียบและลื่น เมื่อหักส่วนก้านหรือลำต้นและใบจะมียางสีขาวไหลออกมาสามารถเป่าเป็นฟองคล้ายผงซักฟอก ลำต้นสูงประมาณ 2-5 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะใบเกือบกลม ปลายใบมน โคนใบเว้า ขอบใบเรียบถึงเป็นคลื่น ใบยาวประมาณ 3-6 นิ้ว สีเขียวสด ตรงใบจะมีขนอ่อนๆ ปกคลุม ก้านใบสีเขียวยาว 2-7 นิ้ว ดอกเป็นช่อ อยู่ตรงยอดของต้นข้อหรือข้อเมื่อออกดอกแล้วจะเริ่มแตกยอดกิ่งใหม่ เมื่อใบเริ่มแก่ก็จะออกดอกอีกเป็นอย่างนี้เรื่อยไปประมาณ 2-3 ครั้ง ต่อฤดูกาล ผลเป็นลูกกลมๆ สีเขียวอ่อน เกลี้ยงเกลาติดผลเป็นพวงมีหลายผล เวลาสุกแก่ผลจะเป็นสีเหลือง ถ้าหากไม่เก็บผลในช่วงนี้ผลจะกลายเป็นสีดำและร่วงลงพื้น ถ้าหากมีความชื้นเมล็ดจะงอกเป็นต้นอ่อนต่อไป ภายในผลลูกกลม ๆ มีพู 3 พู คล้ายผลสลอด มีเมล็ดอยู่ 3 เมล็ด ลักษณะกลมรี มีสีดำ ผิวเรียบ ซึ่งเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันร้อยละ 30 - 35 (ไพจิตร, 2530)

2.6.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ และองค์ประกอบกรดไขมัน

คุณสมบัติทางเคมี (ตารางที่ 2.4) และฟิสิกส์ (ตารางที่ 2.5)และองค์ประกอบของกรดไขมัน (ตารางที่ 2.6) ของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

Properties	Value
Acid value	2.13 mg KOH/g
Free fatty acid (as oleic acid)	1.07%
Peroxide value	1.31 meq/kg
Iodine value	97.17 g Iodine/100 g
Saponification value	189.87 mg KOH/g
Calculated saponification value	184.05 mg KOH/g
Unsaponification matter	5.01%

ที่มา : Srivastava และ Prasad, 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

Properties	Jatropha oil
Viscosity at 30oC (Cst)	46.6
Density at 15oC (g/cm3)	0.903
Sulfate ash (% by wt)	0.0078
Total glycerol (% by wt)	-

ที่มา : Banerji และคณะ, 1985, Foidl และคณะ, 1996

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

Fatty acid	ร้อยละ
Palmitic acid (16:0)	14.66 ± 0.17
Palmitoleic acid (16:1)	0.82 ± 0.02
Stearic acid (18:0)	6.93 ± 0.02
Oleic acid (18:1)	42.36 ± 0.48
Linoleic acid (18:2)	35.21 ± 0.56
Total saturated fatty acids	21.65
Total unsaturated fatty acid	78.39

ที่มา : Openshaw, 2000

2.6.3 การขยายพันธุ์

สบู่ดำเป็นพรรณไม้กลางแจ้งชอบแสงแดดจัด เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุย ปัจจุบันการขยายพันธุ์ทำได้ 3 วิธี คือ

1. การเพาะเมล็ด

เมื่อแกะเมล็ดออกจากผลแล้ว นำไปผึ่งแดดให้แห้ง เตรียมถุงดำขนาด 5x7 นิ้ว ใช้ดินผสมขี้เถ้าแกลบ หยอดเมล็ดลง รดน้ำและเก็บไว้ในเรือนเพาะชำ เมล็ดที่เพาะจะเริ่มงอกประมาณ 5-7 วัน หลังหยอดเมล็ด จากนั้นย้ายถุงออกให้ได้แสงแดดรำไร รดน้ำ 2 วันต่อครั้ง ต้นกล้าอายุประมาณ 35 วัน นำไปปลูกในแปลงได้

2. การปักชำ

ควรใช้กิ่งพันธุ์ที่มีสีเขียวปนน้ำตาล ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ยาวประมาณ 30-50 เซนติเมตร ปักชำลงในถุงดำที่มีวัสดุเพาะคือ ทราย 1 ส่วน ดิน 1 ส่วน ขี้เถ้าแกลบ 1 ส่วน รดน้ำเก็บไว้ในที่ร่มรำไร หลังจากแตกใบอ่อนและรากเริ่มเดินแล้ว อายุประมาณ 35 วัน เอาออกมาให้ได้

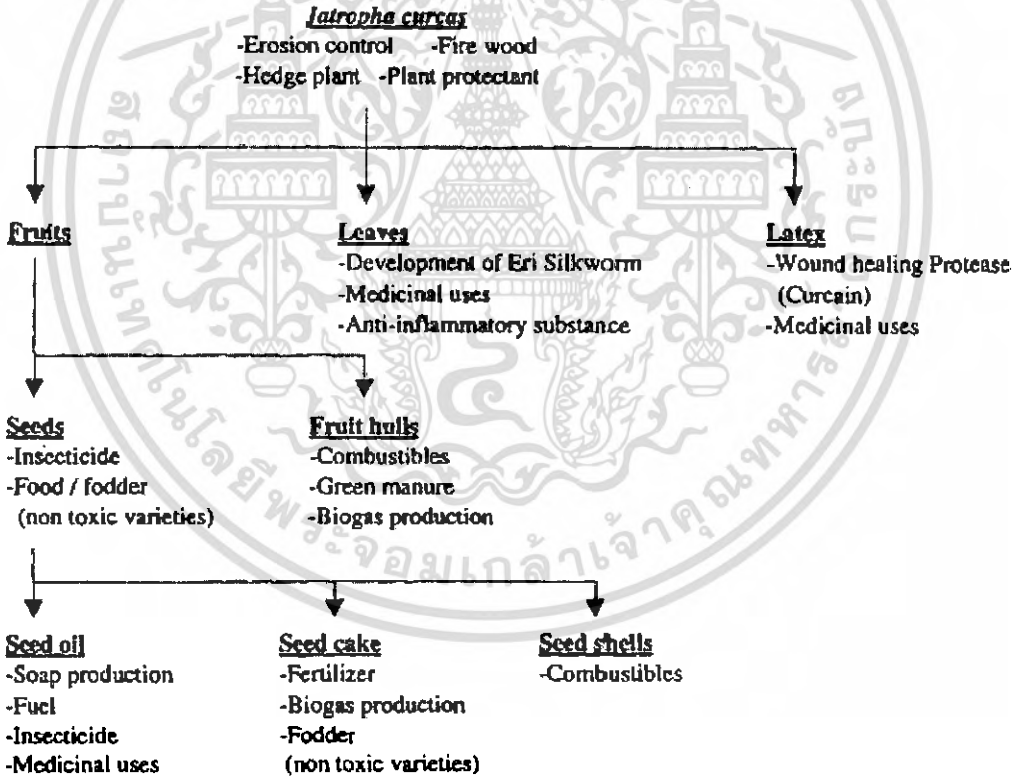
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
72587

แสงแดดประมาณร้อยละ 50 รดน้ำทุกเช้าหรือเย็น วันเว้นวันประมาณ 7 วัน แล้วย้ายออกแดดร้อยละ 100 รดน้ำทุกเช้าหรือเย็น ประมาณ 10 วัน สามารถย้ายปลูกในแปลงได้เลย

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.6.4 การใช้ประโยชน์ของสบู่ดำ

ส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง (รูปที่ 2.3)เช่น ด้านสมุนไพรใช้ใบและเมล็ด แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน หิดและฆ่าแมลง เปลือก ต้นและใบแก้อาการปวดบวม รักษากระดูกหัก แก้บาดแผล และแก้อาการเคล็ดขัดยอก เมล็ดมีฤทธิ์เป็นยาถ่ายอย่างแรงแต่อ่อนกว่าสลอด เมื่อกะเทาะเปลือกออกเอาแต่เมล็ดมาบดเป็นผงกิน จะทำให้อาเจียนและถ่ายท้อง เพราะในเมล็ดจะมีสาร curcin phytosterols และ resin ใบและเปลือกต้นมีสาร steroidal saponin นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดและใบสบู่ดำยังมีผลในการต่อต้านการเจริญของหอย แมลง และเชื้อราบางชนิดได้ (Gubitz และ Mittelbach, 1999)



รูปที่ 2.3 การใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆของต้นสบู่ดำ

ที่มา Gubitz และ Mittelbach, 1999

2.6.5 การสกัดน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

วิธีการสกัดแยกน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำที่นิยมทำกันมากคือ ใช้วิธีการบีบอัด (pressing)จะได้น้ำมันประมาณร้อยละ 25-30 มีน้ำมันตกค้างในกากร้อยละ 10-15 อาจใช้เครื่องอัดแบบไฮโดรลิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(hydraulic press) หรือเครื่องอัดแบบสกรู (screw press) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 จะได้น้ำมันประมาณการแยกด้วยวิธีนี้จะได้น้ำมันปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับแรงอัดที่ใช้ ถ้าใช้แรงอัดสูงจะได้น้ำมันมาก แต่น้ำมันที่ได้จะมีคุณภาพลดลง เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นจะไปเร่งปฏิกิริยาเคมีบางอย่าง ทำให้น้ำมันเสื่อมเสียได้เร็วขึ้น ดังนั้นการบีบอัดอาจทำได้ 2 แบบ คือ การบีบอัดโดยใช้แรงดันสูงเพื่อให้ได้น้ำมันมาก หรือการบีบอัดแบบด้วยแรงดันต่ำก่อน แล้วจึงสกัดน้ำมันที่เหลือในกากต่อด้วยสารทำละลาย

รูปที่ 2.4 เครื่องสกัดน้ำมันสบู่ดำ

ที่มา : http://www.rae.mju.ac.th/Extension/paper/sop/index.html

2.6.6 การสกัดน้ำมันสบู่ดำ

การสกัดน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำเพื่อการผลิตไบโอดีเซลโดยทั่วไปทำได้โดย

1. การสกัดในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีบดให้ละเอียด แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ จะได้น้ำมันร้อยละ 34.96 จากเมล็ดรวมเปลือก และร้อยละ 54.68 จากเนื้อเมล็ด

2. การสกัดด้วยระบบไฮดรอริค จะได้น้ำมันประมาณร้อยละ 25-30 มีน้ำมันตกค้างในกากร้อยละ10-15

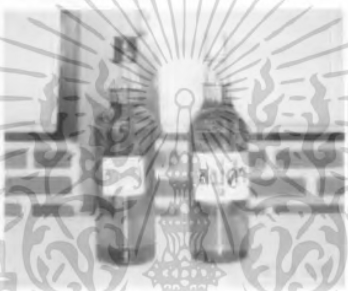
3. การสกัดด้วยระบบอัดเกลียว จะได้น้ำมันประมาณร้อยละ 25-30 มีน้ำมันตกค้างในกากร้อยละ 10-15

การสกัดน้ำมันด้วยวิธีที่ 2 และ 3 จะต้องนำเมล็ดสบู่ดำจากผลแก่ซึ่งมีสีเหลืองปนดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 มาทุบพอแตก นำไปเพิ่มความร้อนโดยการนำตากแดด นึ่ง หรือนำเข้าตู้อบก่อนนำเข้าเครื่องสกัด เพื่อให้การสกัดน้ำมันกระทำได้ง่ายขึ้น น้ำมันที่ได้จากการสกัดจะต้องนำไปกรองสิ่งสกปรกออก หรือทิ้งให้ตกตะกอนก่อนนำไปใช้งาน น้ำมันที่ได้จากการสกัดดังแสดงในรูปที่ 2.6 สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่เกษตรกรใช้อยู่ได้เลยโดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษเฉพาะทำให้เกษตรกรมีความสะดวกที่จะใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.5 ลักษณะเมล็ดสบู่ดำที่นำมาสกัดน้ำมัน

ที่มา : http://www.rae.mju.ac.th/Extension/paper/sop/index.html



รูปที่ 2.6 น้ำมันสบู่ดำ

ที่มา : http://www.rae.mju.ac.th/Extension/paper/sop/index.html

2.7 น้ำมันดอกทานตะวัน

องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันทานตะวัน ดังตาราง 2.7 และชนิดของน้ำมันทานตะวันและองค์ประกอบของกรดไขมัน ดังตาราง 2.8

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันทานตะวัน

Fatty acid	ร้อยละ
Palmitic acid (16:0)	4.0 – 9.0
Stearic acid (18:0)	1.0 – 7.0
Oleic acid (18:1)	14.0 – 40.0
Linoleic acid (18:2)	48.0 – 74.0

ที่มา : http://www.en.wikipedia.org/wiki/Sunflower_oil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.8 ชนิดของน้ำมันทานตะวันและองค์ประกอบของกรดไขมัน

ชนิด	Oleic/Monounsaturated (ร้อยละ)	Linoleic Acid /Polyunsaturated (ร้อยละ)	Saturated (ร้อยละ)
Linoleic	20.0	69.0	11.0
High Oleic	82.0	9.0	9.0
NuSun	65.0	26.0	9.0

ที่มา : http://www.sunflowernsa.com/health/default

2.8 การใช้น้ำมันสบู่ดำผลิตไบโอดีเซล

น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากสบู่ดำส่วนใหญ่มักใช้ในเครื่องยนต์ทางการเกษตรซึ่งจากคุณสมบัติที่มีความหนืดสูงของน้ำมันทำให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องยนต์ที่มีความเร็วรอบสูงได้ นอกจากนี้น้ำมันพืชโดยเฉพาะน้ำมันสบู่ดำมีจำนวนอะตอมคาร์บอนค่อนข้างสูง การเผาไหม้จึงเกิดไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดควันปริมาณมาก แต่เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำมีจุดวาบไฟที่สูงกว่าน้ำมันดีเซลจึงมีความปลอดภัยมากกว่า (Reddy และ Ramesh, 2006) คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำและไบโอดีเซลแสดงดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 คุณสมบัติของน้ำมันสบู่ดำและไบโอดีเซล

Properties	Diesel	Jatropha. curcas oil
Density (gm/cc), 30°C	0.836–0.850	0.93292
Kinematic viscosity (cSt), 30°C	4–8	52.76
Cetane No.	40–55	38.00
Flash point,°C	45–60	210.00
Calorific value, MJ/kg	42–46	38.20
Saponification value	–	198.00
Iodine No.	–	94.00

ที่มา : Pramanik (2003)

นอกจากปัญหาข้างต้นแล้วการใช้น้ำมันสบู่ดำบริสุทธิ์ที่ไม่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพอาจก็ให้เกิดปัญหากับเครื่องยนต์ได้เช่น การติดเครื่องในขณะที่เครื่องเย็นจะสตาร์ทติดยากกว่าปกติแต่เมื่อเครื่องติดแล้วเครื่องจะเดินต่อเนื่องเป็นปกติไม่มีอาการน็อก กรองน้ำมันเชื้อเพลิงเกิดการอุดตันเร็วกว่าปกติ หากไม่มีระบบกรองน้ำมันที่ดีก่อนนำไปใช้ หากหยุดใช้เครื่องยนต์เป็นเวลานาน ๆ จะเกิดยางเหนียวเกาะที่ปั๊มเชื้อเพลิงและหัวฉีด การปรับปรุงคุณภาพน้ำมันอาจทำได้ โดยการผสมน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนของน้ำมันสบู่ดำที่มากกว่าร้อยละ 30 จะทำให้ไบโอดีเซลมีความหนืดสูงเมื่อเปรียบเทียบกับดีเซลธรรมดา (Pramanik, 2003) ดังแสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 คุณสมบัติของน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันสบู่ดำและน้ำมันดีเซล

% of J. curcas oil (v/v)	% of diesel fuel (v/v)	Density (g/cc), 30°C	Viscosity (cSt), 30°C	Viscosity reduction (%)	Observation
70	30	0.900	23.447	55.56	Stable mixture
60	40	0.890	19.222	62.13	Stable mixture
50	50	0.853	17.481	66.86	Stable mixture
40	60	0.880	13.953	73.55	Stable mixture
30	70	0.871	9.848	81.00	Stable mixture
20	80	0.862	6.931	86.86	Stable mixture

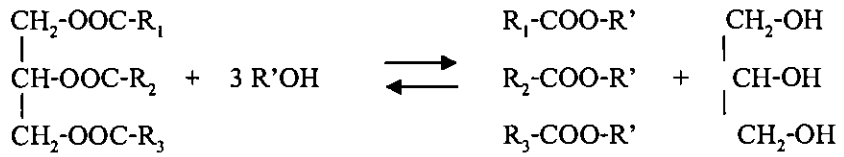
ที่มา : Pramanik (2003)

2.9 การใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อการผลิตไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้โดยตรงหรือการผสม (direct use and blending) ไมโครอิมัลชั่น (microemulsion) ไพโรไลซิส (pyrolysis) ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) และผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบอื่น ๆ ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่น หรือแอลกอฮอไลซิส (alcoholysis) เกิดจากไขมันหรือน้ำมันทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ไบโอดีเซลหรือแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชั่น ได้แก่ กรด เบส และเอนไซม์ เบสคะตะลิสต์จะเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่ากรด แต่จะทำให้กรดไขมันอิสระถูกเปลี่ยนเป็นสบู่โดยปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่น (sponification) ทำให้ได้เอสเทอร์น้อยลงและมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยา

การผลิตไบโอดีเซลด้วยการใช้เอนไซม์ไลเปส นับเป็นกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงวิถีทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน ซึ่งมีประโยชน์หลายประการคือ การผลิตไบโอดีเซลนั้นไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นทำให้ได้ผลผลิตสูง จึงมีการใช้วิธีนี้กันมาก เพื่อผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งพบปัญหาหลายอย่าง เช่น การแยกสารเร่งปฏิกิริยาออกมาทำได้ยาก ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดสิ่งที่ไม่ต้องการเพิ่มขึ้น มีค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียและการทำให้ผลผลิตบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานสเอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

ที่มา : Dossat และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงาน

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
2. ตู้อบแห้ง
3. กล้องจุลทรรศน์
4. ตู้เขี่ยเชื้อ
5. เครื่องเขย่าขวดรูปชมพู่
6. เครื่องแก้ว
7. เครื่องชั่ง
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV-1601 ยี่ห้อ Shimadzu
9. ตู้เย็น
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
11. เข็มเขี่ยเชื้อ
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์

สารเคมี

1. ฟีนอลเรด
2. แคลเซียมคาร์บอเนต
3. ยูเรีย
4. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส
5. แมกนีเซียมซัลเฟต
6. โซเดียมไนเตรต
7. พาราไนโตรฟีนอลปาล์มมีเตต
8. พาราไนโตรฟีนอล
9. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ของไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต (พีเอช 8)
10. ไอโซโพรพานอล
11. น้ำมันตอกทานตะวัน
12. น้ำมันสบู่ดำ จากคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ โดยเลือกเก็บเฉพาะผิวหน้าดินซึ่งมีความลึกไม่เกิน 15 เซนติเมตร

3.3 การเตรียมอาหารที่ใช้คัดเลือกและเลี้ยงเชื้อรา

3.2.1. การเตรียมสารสกัดจากดิน สารสกัดจากดินเตรียมโดยการนำดิน 100 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.2 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ทิ้งให้สารละลายดินตกตะกอน 20 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Ko และคณะ, 2005)

3.2.2. การเตรียมอิมัลชันของน้ำมัน โดยการผสม Tween 80 ลงไปร้อยละ 10 ของปริมาตรน้ำมันที่เตรียม (Ko และคณะ, 2005)

3.2.3 การเตรียมอาหารที่ใช้คัดเลือกและเพาะเลี้ยงเชื้อรา

อาหารที่ใช้ในการทดสอบมี 3 สูตรดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารที่ใช้การคัดเลือกและทดสอบการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ประกอบด้วย สารสกัดจากดินร้อยละ 10 ยูเรียร้อยละ 0.02 ผงวุ้นร้อยละ 1.5 และอิมัลชันของน้ำมันดอกทานตะวันหรือน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 0.1 นำอาหารที่เตรียมไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที โดยอิมัลชันของน้ำมันจะทำการใส่หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อเมื่ออุณหภูมิของอาหารลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส และนำไปเทลงในจานเพาะเชื้อ (Ko และคณะ, 2005)

สูตรที่ 2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา คือ อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เตรียมอาหารแล้วนำนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

สูตรที่ 3 อาหารเหลวที่ประกอบด้วย 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 และน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตร (ดัดแปลงมาจาก Cardenas และคณะ, 2001) เตรียมอาหารใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 70 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Tributyrin agar สำเร็จรูปประกอบด้วย เปปโตน ยีสต์สกัด เคซีน วุ้น และกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต เตรียมได้โดย ชั่งอาหารมา 20 กรัม ผสมน้ำ 1000 มิลลิลิตร และเติม กลีเซอรอลไตรบิวไทเรต ลงไป 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.5 $\pm$ 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4. การเตรียมสารละลายดิน โดยชั่งดินตัวอย่าง 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-2}- 10^{-5} เท่า ตามลำดับ

3.4 การแยกเชื้อราจากดิน

3.3.1. ปิเปตสารละลายดินที่เตรียมไว้ที่อัตราการเจือจาง 10^{-2}- 10^{-5} เท่า ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร selective media สูตรที่ 1 ประกอบด้วยสารสกัดจากดินร้อยละ 10 ยูเรียร้อยละ 0.02 ผงวุ้นร้อยละ 1.5 และอิมัลชันของน้ำมันดอกทานตะวันร้อยละ 0.1 (Ko และคณะ, 2005) จานละ 0.1 มิลลิลิตร อัตราการเจือจางละ 2 ซ้ำ จากนั้นทำการกระจายเชื้อโดยวิธี spread plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

3.3.2. ทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อราที่มีวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน นำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อราโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อราในจานอาหาร selective media มาวางในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ให้ถ่ายเชื้อเพื่อเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง PDA ที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3.3 ถ่ายเชื้อราที่บริสุทธิ์แล้วลงบนอาหาร selective media คือ tributyrin agar เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5-7 วัน

3.3.4 ถ่ายเชื้อที่เกิดวงใสบนอาหาร tributyrin agar ลงบนอาหาร selective media ที่ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5-7 วัน นำเชื้อที่เกิดวงใสมาทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่อไป

3.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก

3.4.1. ทำสารละลายสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดอาหารวุ้นเอียงจนท่วมเส้นใยรา ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเส้นใยของเชื้อราให้สปอร์หลุดออกมา นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ จากนั้นนำมาทำสารละลายสปอร์โดยมีจำนวนสปอร์ 10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.4.2. ถ่ายสารละลายสปอร์ของเชื้อราลงในอาหารเหลวที่ ประกอบด้วย 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 และ น้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตร (Cardenas และคณะ, 2001) ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารอยู่ปริมาตร 70 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายสปอร์ 10 มิลลิลิตรเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียสเพื่อแยกส่วนใส จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบการเกิดวงใส (clear zone) ในอาหารที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.4.3. ทดสอบการเกิดวงใสของเชื้อราบนอาหาร selective midia สูตรที่ 1 ประกอบด้วย สารสกัดจากดินร้อยละ 10 ยูเรียร้อยละ 0.02 ผงวุ้นร้อยละ 1.5 และอิมัลชันของน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 0.1 (Ko และคณะ, 2005) เติมฟีนอล เรด ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อให้เห็นวงใสได้ชัดเจนขึ้น โดยใช้หลอดกาแฟปราศจากเชื้อเจาะวุ้นในจานอาหาร จานละ 3 หลุม ปิเปตส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงข้อ 3.4.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบหลุมอาหาร เลือกเชื้อราที่มีบริเวณวงใส มาทำการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.6 การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเลี้ยงเชื้อราที่มีบริเวณวงใสมาก ที่คัดเลือกไว้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการวิเคราะห์ด้วยการดูดกลืนแสง โดยการเตรียมสารละลายสำหรับการวัดการดูดกลืนแสงประกอบด้วย 2.4 มิลลิลิตรของสารละลายสารตั้งต้น (สารละลาย A : สารละลาย B อัตราส่วน 1 : 9 ปริมาตร : ปริมาตร) และ 100 ไมโครลิตรของสารละลายเอนไซม์ (สารละลาย A คือ ละลาย 30 มิลลิกรัมของ *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp) ใน ไอโซโพรพานอล 10 มิลลิลิตร สารละลาย B คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล KH_2PO_4 หรือ Na_2HPO_4 พีเอช 8) ทำการบ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร 1 ยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 1 ไมโครโมลของ *p*-nitrophenol อิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ 1 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อนาที (Katsivela และคณะ, 1995)

3.7 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทางสถิติ

นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่หาได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบมีนัยสำคัญ โดยนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่หาได้ทั้ง 18 ไอโซเลตมาเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11

3.8 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือก

คัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยบันทึกลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี ย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจดูลักษณะของเส้นใย ลักษณะและขนาดสปอร์ของเชื้อราที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติ

จากการคัดแยกเชื้อราในดินจากแหล่งต่างๆ (รูปที่ 4.1) โดยใช้อาหาร selective media สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินแหล่งต่างๆ

แหล่งที่นำมาศึกษา	รหัสเชื้อ
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0101
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0102
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0103
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0104
อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี	S 0205
ข้างโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 0306
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0107
สวนพระนคร เขตลาดกระบัง กทม.	S 0408
แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กทม.	S 0509
ร้านอาหารตามสั่ง เขตคลองสามวา กทม.	S 0610
ข้างโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 0311
สนามบินดอนเมือง กทม.	S 0712
อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี	S 0213
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0114
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	S 0115
ปั๊มน้ำมัน ESSO เขตบางเขน กทม.	S 0816
ข้างโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 0317
ร้านอาหารตามสั่ง เขตคลองสามวา กทม.	S 0618
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0919
ร้านอาหารตามสั่ง เขตคลองสามวา กทม.	S 0620

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินแหล่งต่างๆ

แหล่งที่นำมาศึกษา	รหัสเชื้อ
ข้างโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 0321
แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กทม.	S 0522
ข้างโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 0323
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0924
ร้านอาหารตามสั่ง เขตคลองสามวา กทม.	S 0625
แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กทม.	S 0526
สนามบินดอนเมือง กทม.	S 0727
บริเวณใต้ต้นสบู่ดำ เขตคลองสามวา กทม.	S 1028
บริเวณใต้ต้นสบู่ดำ เขตคลองสามวา กทม.	S 1029
สนามบินดอนเมือง กทม.	S 0730
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0931
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0932
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0933
ร้านอาหารตามสั่ง เขตคลองสามวา กทม.	S 0634
แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กทม.	S 0535
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0936
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	S 0937
สนามบินดอนเมือง กทม.	S 0738
ปั๊มน้ำมัน ESSO เขตบางเขน กทม.	S 0839
ดินผสมของสวน 22 พันธุ์ไม้	S 1140
ดินผสมของสวน 22 พันธุ์ไม้	S 1141
ดินผสมของสวนห้างหุ้นส่วน	S 1242
ดินรอบโคนต้นชาเทียนทองของไปรษณีย์ลาดกระบัง	S 1343
ดินรอบโคนต้นคทาเงินเต็มบ้าน หลังคอนโดบางกะปิ	S 1444
ดินผสมของสวน 22 พันธุ์ไม้	S 1145
หน้าสำนักงานนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง	S 1546
หน้าสำนักงานนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง	S 1547
ดินผสมของสวนห้างหุ้นส่วน	S 1248
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สจล.	S 1649

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

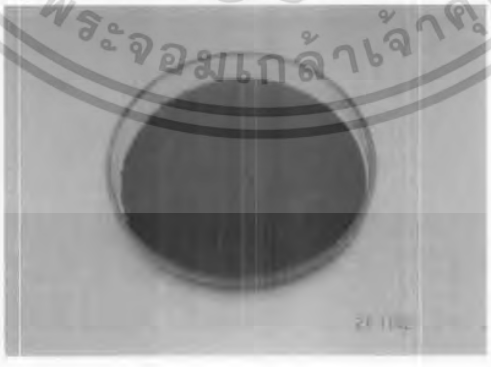
ตารางที่ 4.1 (ต่อ) เชื้อราที่คัดแยกได้จากดินแหล่งต่างๆ

แหล่งที่นำมาศึกษา	รหัสเชื้อ
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1750
หน้าตึกวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1851
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1752
ข้างหอประชุมจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1953
หน้าที่ทำการไปรษณีย์ ลาดกระบัง	S 1354
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1755
ข้างหอประชุมจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1956
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1757
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1758
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1759
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1760
ดินผสมของสวน 22 พันธุ์ไม้	S 1161
หน้าตึกวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	S 1862
ดินผสมของสวนห้างหุ้นส่วน	S 1263
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สจล.	S 1664

หมายเหตุ การกำหนดรหัสเชื้อ S (soil) หมายถึง ตัวอย่างดินที่ศึกษา

รหัส 2 ตัวแรก หมายถึง ลำดับของดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆ

รหัส 2 ตัวหลัง หมายถึง ลำดับของเชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกได้



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างดินที่ใช้คัดแยกเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

เมื่อนำเชื้อราบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร tributyrin agar (รูปที่ 4.2)และอาหาร selective media ที่มีน้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.3) และที่มีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.4) โดยสังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 และเมื่อนำเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในอาหาร selective media ที่มีน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีโดยใช้อาหารเหลวสูตร 3 (รูปที่ 4.5) ที่ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกันมาทดสอบและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (รูปที่ 4.6)ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบการเกิดวงใสบนอาหาร selective media คือ tributyrin agar และ selective media ที่ใช้น้ำมันทานตะวันและน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

รหัสเชื้อ	ไอโซเลตที่เกิดวงใสบนอาหาร selective media		
	tributyrin agar	ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน	ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน
S 0101	-	-	-
S 0102	-	-	-
S 0103	-	-	-
S 0104	-	-	-
S 0205	-	-	-
S 0306	-	-	-
S 0107	-	-	-
S 0408	-	-	-
S 0509	-	-	-
S 0610	-	-	-
S 0311	-	-	-
S 0712	✓	✓	✓
S 0213	-	-	-
S 0114	-	-	-
S 0115	✓	✓	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบการเกิดวงใสบนอาหาร selective media คือ tributyrin agar และ selective media ที่ใช้น้ำมันทานตะวันและน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

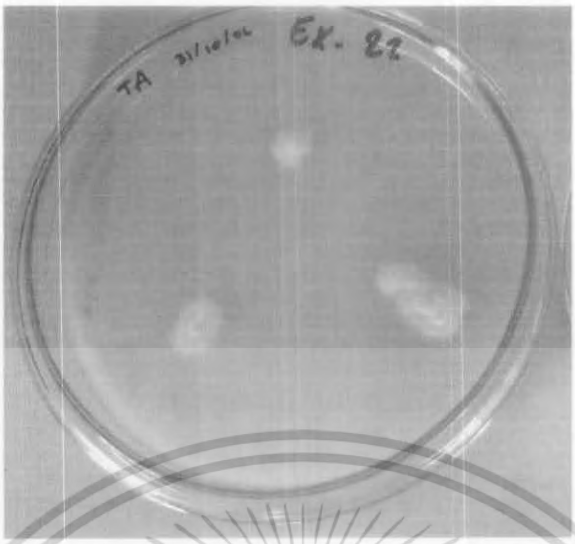
รหัสเชื้อ	ไอโซเลตที่เกิดวงใสบนอาหาร selective media		
	tributyrin agar	ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน	ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน
S 0816	✓	✓	✓
S 0317	-	-	-
S 0618	-	-	-
S 0919	✓	✓	
S 0620	✓	✓	✓
S 0321	-	-	-
S 0522	-	-	-
S 0323	-	-	-
S 0924	-	-	-
S 0625	✓	✓	✓
S 0526	-	-	-
S 0727	-	-	-
S 1028	✓	✓	✓
S 1029	-	-	-
S 0730	-	-	-
S 0931	-	-	-
S 0932	-	-	-
S 0933	-	-	-
S 0634	✓	✓	✓
S 0535	✓	✓	✓
S 0936	✓	✓	✓
S 0937	-	-	-
S 0738	-	-	-
S 0839	-	-	-
S 1140	✓	✓	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ผลการทดสอบการเกิดวงใสบนอาหาร selective media คือ tributyrin agar และ selective media ที่ใช้น้ำมันทานตะวันและน้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน

รหัสเชื้อ	ไอโซเลตที่เกิดวงใส บนอาหาร selective media		
	tributyrin agar	ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน	ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน
S 1141	✓	✓	-
S 1242	✓	✓	-
S 1343	✓	✓	-
S 1444	✓	✓	✓
S 1145	✓	✓	✓
S 1546	✓	✓	✓
S 1547	✓	✓	✓
S 1248	✓	✓	✓
S 1649	✓	✓	✓
S 1750	✓	✓	
S 1851	✓	✓	✓
S 1752	✓	✓	-
S 1953	✓	✓	-
S 1354	✓	✓	✓
S 1755	✓	✓	-
S1956	✓	✓	✓
S 1757	✓	✓	-
S 1758	✓	✓	✓
S 1759	✓	✓	✓
S 1760	✓	✓	-
S 1161	-	-	-
S 1862	-	-	-
S 1263	-	-	-
S 1664	-	-	-

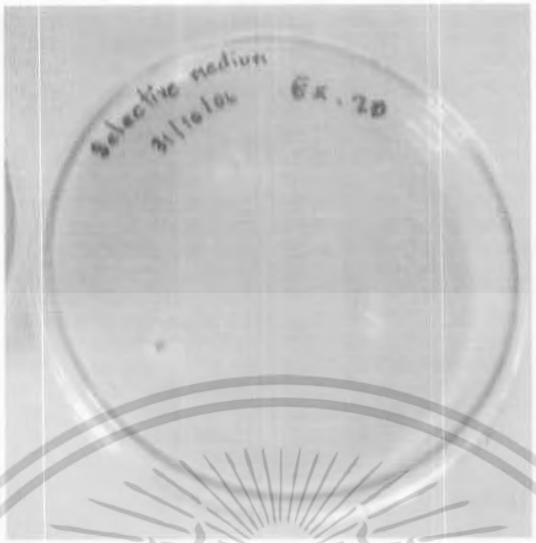
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะการเกิดวงใสบนอาหาร tributyrin agar เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 4.3 ลักษณะการเกิดวงใสบนอาหาร selective media ที่ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเกิดวงใสบนอาหาร selective media ที่ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 4.5 เชื้อราที่เจริญในอาหารเหลวสูตรที่ 3 โดยเลี้ยงเชื้อราในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทำวิจัยโครงงานพิเศษสามารถคัดแยกเชื้อราจากแหล่งดินธรรมชาติได้ทั้งสิ้น 64 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยดูการเกิดวงใสบนอาหาร tributyrin agar และอาหาร selective media โดยใช้น้ำมันทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเชื้อรา 31 ไอโซเลต ที่เกิดวงใส แสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Ko และคณะ, 2005) และเมื่อนำเชื้อราที่เกิดวงใสทั้ง 31 ไอโซเลตไปทดสอบการเกิดวงใสในอาหาร selective media ที่มีน้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเพียง 18 ไอโซเลตเท่านั้นที่เกิดวงใส แสดงว่าเชื้อราทั้ง 18 ไอโซเลตนี้สามารถใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เนื่องจากน้ำมันสบู่ดำมีโครงสร้างที่มีสายโซ่ยาว ทำให้น้ำมันมีความหนืดสูง (46.6 เซนติสโตกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) (Banerji และคณะ, 1985, Foidl และคณะ, 1996) ซึ่งเชื้อราสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ยาก เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันทานตะวันที่มีความหนืดน้อยกว่า(4.6 เซนติสโตกที่อุณหภูมิ 37.8 องศาเซลเซียส)(Fukuda และคณะ, 2001) นอกจากนั้นใบและเมล็ดของสบู่ดำยังมีคุณสมบัติยังมีสารที่มีคุณสมบัติในการกำจัดหอย กำจัดแมลงและต้านเชื้อราบางชนิด (Gubitz และคณะ, 1999) เช่น curcin hydrocyanic acid เป็นต้น หากการสกัดน้ำมันสบู่ดำไม่มีประสิทธิภาพเพียงพออาจทำให้มีการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ลงในน้ำมันสบู่ดำได้ ทำให้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด

ตารางที่ 4.3 ขนาดของวงใสที่เกิดจากเอนไซม์ไลเปส

รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน
S 0712	+
S 0115	-
S 0816	+
S 0919	-
S 0620	+
S 0625	+
S 1028	+
S 0634	+
S 0936	+
S 0839	+
S 1140	-
S 1141	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ขนาดของวงใสที่เกิดจากเอนไซม์ไลเปส

รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน
S 1242	-
S 1343	-
S 1444	-
S 1145	+
S 1546	++
S 1547	+
S 1248	+
S 1649	++
S 1750	-
S 1851	+
S 1752	-
S 1953	-
S 1354	+
S 1755	-
S 1956	+
S 1757	-
S 1758	+
S 1759	+
S 1760	-

หมายเหตุ ++ หมายถึงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) 10-20 มิลลิเมตร

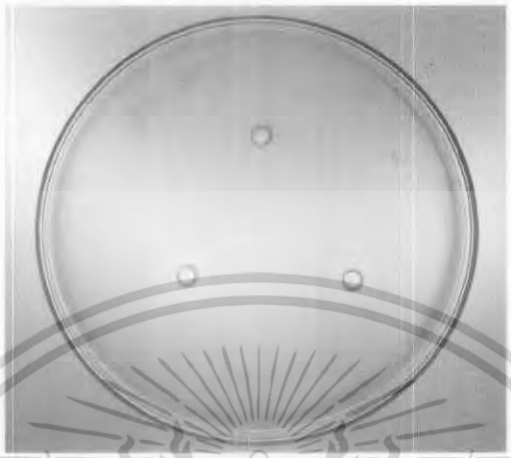
\+ หมายถึงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear zone) < 10 มิลลิเมตร

\- หมายถึงไม่เกิดวงใส (clear zone)

จากการนำเชื้อราที่คัดเลือก 18 ไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสโดยการนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 3 ที่ใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบไปทดสอบการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสบนอาหาร selective media ที่ใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 4.4) ปรากฏว่าขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่เกิน 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร ยกเว้นไอโซเลต S1546 และ S1649 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสมากกว่า 10 มิลลิเมตร แสดงว่าไอโซเลต S1546 และ S1649 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าเชื้อราอีก 16 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้



รูปที่ 4.6 ลักษณะการเกิดวงใส (clear zone) ในอาหาร tributyrin agar

4.3 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก

เมื่อเลือกไอโซเลตที่เกิดวงใสชัดเจนมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติจะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่คัดเลือก

รหัสไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
S 0712	0.6079^{d}
S 0816	0.5906^{cd}
S 0620	0.6452^{c}
S 0625	0.5754^{ef}
S 1028	0.5674^{f}
S 0634	0.3961^{j}
S 0936	0.3189^{k}
S 0839	0.3003^{l}
S 1145	0.6375^{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราที่คัดเลือก

รหัสไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
S 1546	0.7946[a]
S 1547	0.5884[e]
S 1248	0.5893[dc]
S 1649	0.7747[b]
S 1851	0.4988[h]
S 1354	0.5344[g]
S 1956	0.4813[h]
S 1758	0.4488[i]
S 1759	0.5342[g]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบมาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol (ตารางที่ 4.4) พบว่าเชื้อราไอโซเลต S1546 และ S1649 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.7946 และ 0.7747 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้ออื่น แสดงว่าเชื้อราที่คัดเลือกไอโซเลต S1546 และ S1649 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อราไอโซเลตอื่นที่ทำการคัดเลือก

จากงานวิจัยของ Cadenes และคณะ, 2001 ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าสับสเทรตที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรามีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจากผลการทดลองการใช้ tributyrin เป็นสับสเทรตทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าการใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเทรตและเชื้อราที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ *Ovadendron sulphureo-ochraceum* ได้ค่ากิจกรรมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ tributyrin เป็นสับสเทรตเท่ากับ 6.10 ยูนิต/มล. และค่ากิจกรรมเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเทรตเท่ากับ 4.33 ยูนิต/มล.

จากงานวิจัยของ Orlando Beys Silva และคณะ, 2005 ได้ทำการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* โดยใช้น้ำมันจากแหล่งต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ไลเปส พบว่าการใช้แหล่งน้ำมันในการเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ต่างกันทำให้กิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้มีค่าแตกต่างกันไปด้วย แสดงให้เห็นว่าแหล่งน้ำมันมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อราจะสามารถผลิตได้

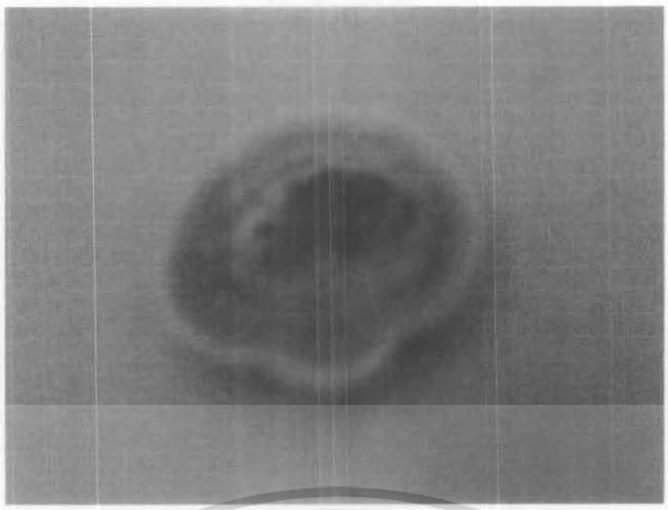
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

จากการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสพบว่าไอโซเลต S1546 และ S1649 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้ออื่นซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 0.7946 และ 0.7747 ตามลำดับ จึงนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการสังเกตลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต S1546 และ S1649

รหัสไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
	สังเกตด้วยตาเปล่า	สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์
S1546	เชื้ออายุ 3 วันมีเส้นใยสีขาวสปอร์สีเหลือง (รูปที่ 4.7) เมื่ออายุ 7 วันจะเห็นเส้นใยเป็นสีขาวสปอร์สีน้ำตาล (รูปที่ 4.8)	เส้นใยใสไม่มีสี มีผนังกั้น (รูปที่ 4.9) ลักษณะสปอร์กลมรีขนาดด้านกว้างโดยเฉลี่ย 0.03 มิลลิเมตร ขนาดด้านยาวโดยเฉลี่ย 0.07 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.10)
S1649	เชื้ออายุ 3 วันเส้นใยสีเขียว สปอร์ขาว (รูปที่ 4.11) เมื่ออายุ 7 วันจะมองไม่เห็นเส้นใย สปอร์สีเขียวเข้มอัดตัวกันแน่น (รูปที่ 4.12)	เส้นใยใสไม่มีสี มีผนังกั้น (รูปที่ 4.13) ลักษณะสปอร์กลมและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 0.03 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.14)

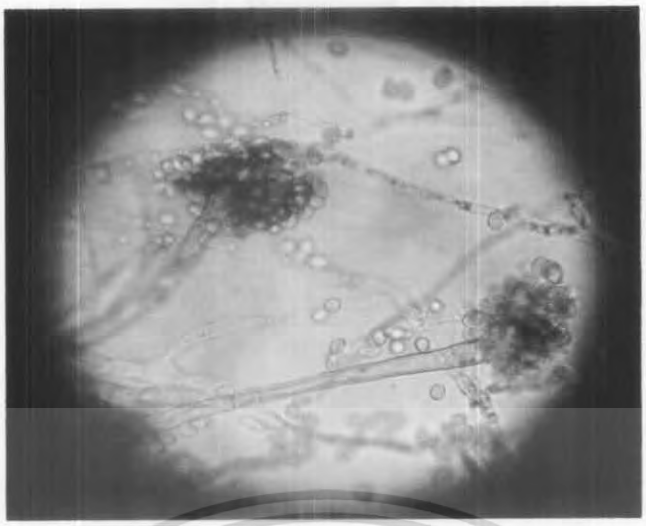
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1546 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 4.8 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1546 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

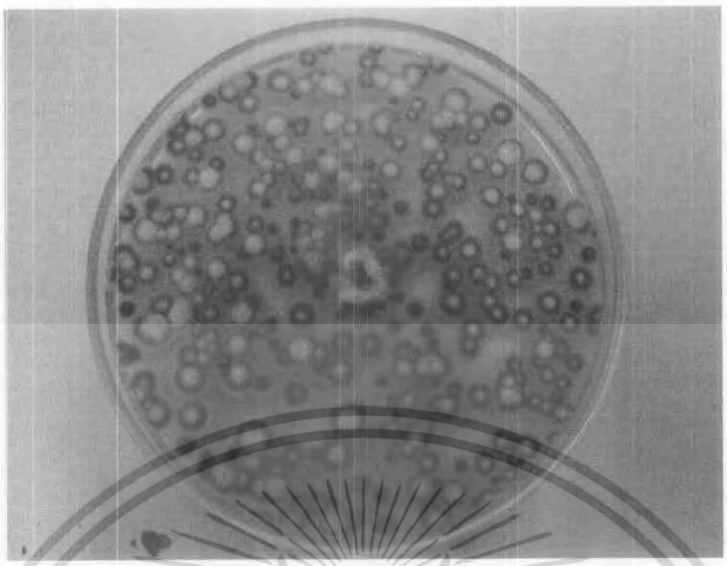
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1546 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยการทำ slide culture เป็นเวลา 3 วัน ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

รูปที่ 4.10 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต S1546 ที่ผ่านการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

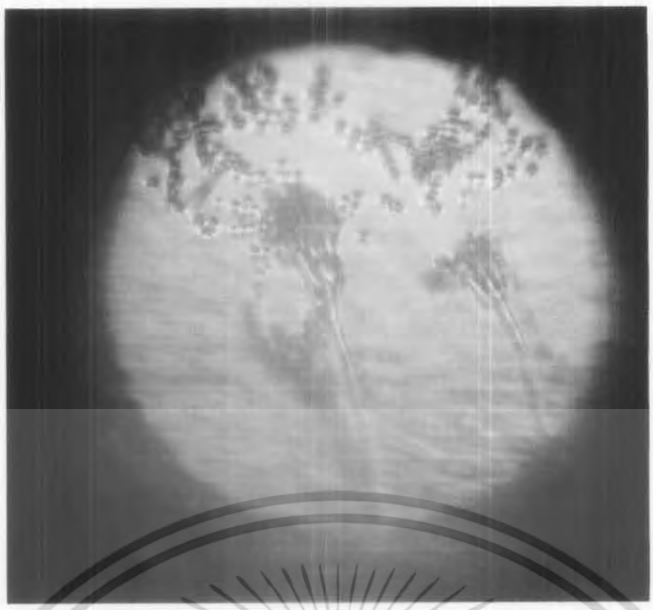
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1649 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน

รูปที่ 4.12 ลักษณะและสีของเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1649 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราไอเลต S1649 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยการทำ slide culture เป็นเวลา 3 วัน ที่กำลังขยาย 400 เท่า

รูปที่ 4.14 ลักษณะและขนาดของสปอร์ของเชื้อราไอโซเลต S1649 ที่ผ่านการย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทำการคัดแยกเชื้อราจากแหล่งดินธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันจากสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อราได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 31 ไอโซเลต ซึ่งใน 31 ไอโซเลตนี้มีเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นแหล่งคาร์บอนได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเชื้อราไอโซเลต S 1546 ที่คัดแยกได้จากหน้าสำนักงานนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง และเชื้อราไอโซเลต S 1649 ที่คัดแยกได้จากคระครุศาตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมากเมื่อเทียบกับเชื้อราไอโซเลตอื่นๆ ที่ได้ทำการศึกษามา

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ดินจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป สามารถพบเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตยา การบำบัดน้ำเสีย การผลิดผงซักฟอก และอื่นๆ รวมถึงการช่วยลดความหนืดของน้ำมันจากสบู่ดำ เพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันในการผลิตไบโอดีเซลทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งมีการส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร.

ไพจิตร จันทรวงศ์. 2530. พืชน้ำมันและน้ำมันพืช 52 ชนิด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภา.

สมศักดิ์ วังใน. 2528. จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช.

Banerji, R. Chowdhury, A.R., Misra, G., Sudarasanam, G., Verma, S.C. and Srivatana, G.S. 1985 Jatropha seed oil for energy. Biomass. 8:277-282.

Barnwal, B. W. and Sharma M. P. 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 9:363-378.

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

Corzo, G. and Revah, S. 1999. Production and characteristics of lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource Technology. 70:173-180.

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

Fickers, P., Fudalej, F., Nicaud, J.M., Destain, J. and Thonart, P. 2005. Selection of new over-producing derivertives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Biotechnology. 115:379–386.

Fickers, P., Destain, J., Ongena, M., Weekers, F. and Thonart, P. 2006. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Enzyme and Microbial Technology. 38:756-759.

Foidl, N., Foidl, G. Sanchez, M. Mittelbach, M. and Hackel, S. 1996. *Jatropha curcus* L. as asource for the production of biofuel in Nicaragua. Bioresource Technology. 58:77-82.

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

Gilham, D. and Lehner R. 2005. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. Method.36 :139–147.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glick, D. and King, C. G. 1932. Relationships between the activation of pancreatic lipase and the surface effects of the compounds involved. The Journal of Biological Chemistry. 245: 675-684.

Gubitz, G. M. and Mittelbach, M. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. Bioresource Technology. 67: 73-82.

Jaeger, K.E. and Eggert, T. 2002. Lipase for biotechnology . Current Opinion in Biotechnology. 13:390-397.

Katsivela E.,Kleppe F.,Lang S. and Wagner F.1995.Ustilago maydis lipase I. Hydrolysis and ester-synthesis activites of crude enzyme preparation. Enzyme and Microbial Technology 17:739-745.

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.

Mahadik, N.D., Puntambeker, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., and Gokhale, D.V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochemistry . 38:715-721.

Nutan, D. Mahadik, Ulka, S. Puntambekar, Kulbhshan, B. Bastawde, Jayant, M. Khire, Digambar, V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochemistry. 38: 715-721.

Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcus* : an oil plant of unfulfilled promise. Biomass and Bioenergy. 19:1-15.

Pramanik, K. 2003. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. Renewable Energy. 28: 239-248.

Reddy, J.N. and Ramesh, A. 2006. Parametric studies for improving the performance of a Jatropha oil-fuelled compression ignition engine. Renewable Energy. 31:1994-2016.

Sharmaa, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances. 19: 627–662.

Srivastava, A. and Prasad, R. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. Renewable and Sutainable Energy Reviews. 4:111-133.

Tan, T. Zhang, M. Wang, B. Ying C and Deng L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. Process Biochemistry . 39:459-465.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.doae.doae.go.th/article/article41.html

http://www.en.wikipedia.org/wiki/Sunflower_oil

http://www.eng.cmu.ac.th

http://www.kanchanapisek.or.th/kp1/data/37/lipase.html

http://www.rae.mju.ac.th/Extension/paper/sop/index.html

http://www.research.bsru.ac.th/old_version/But11/st

http://www.sunflowernsa.com/health/default

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหาร

สูตรที่ 1 ประกอบด้วย - สารสกัดจากดินร้อยละ 10 ยูเรียร้อยละ 0.02 ผงวุ้นร้อยละ 1.5 และอิมัลชันของน้ำมันตอกทานตะวันหรือน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 0.1 ซึ่งมีวิธีการเตรียม คือ ทำการผสม Tween 80 ลงไปร้อยละ 10 ของปริมาตรน้ำมันที่ต้องการเตรียม

สูตรที่ 2

- Potato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป โดยชั่งอาหาร PDA มา 39 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 3 ประกอบด้วย 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 และน้ำมันจากสบู่ดำร้อยละ 1 โดยปริมาตร

Tributyrin agar สำเร็จรูปประกอบด้วย เปปโตน ยีสต์สกัด เคซีน วุ้น และกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต เตรียมได้โดย ชั่งอาหารมา 20 กรัม ผสมน้ำ 1000 มิลลิลิตร และเติม กลีเซอรอลไตรบิวไทเรต ลงไป 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.5 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียมสารละลายฟีนอลเรด (Phenol red solution)

- ละลายฟีนอลเรด 0.1 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ความเข้มข้นร้อยละ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลายสำหรับการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การเตรียมสารละลาย *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp) (สารละลาย A) ทำโดยการชั่งสาร *p*-nitronylpalmitate (*p*-npp) 30 มิลลิกรัม ละลายใน ไอโซโพรพานอล 10 มิลลิลิตร

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)

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

ตารางภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

X มล.	Y มล.	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	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
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.3	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

X มล.	Y มล.	พีเอช
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol เพื่อทำกราฟสารละลาย *p*-nitrophenol มาตรฐาน เตรียมจากสารละลาย *p*-nitrophenol เข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสาร *p*-nitrophenol 95 เปอร์เซ็น 0.10526 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

แหล่งดินธรรมชาติที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อรา

ตารางภาคผนวกที่ 2 แหล่งดินธรรมชาติที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อรา

แหล่งดินที่นำมาศึกษา	รหัส
แขวงทรายกองดิน เขตคลองสามวา กทม.	01
อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี	02
ข้างโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สจล.	03
สวนพระนคร เขตลาดกระบัง กทม.	04
แขวงมีนบุรี เขตมีนบุรี กทม.	05
ร้านอาหารตามสั่ง เขตคลองสามวา กทม.	06
สนามบินตอนเมือง กทม.	07
ปั๊มน้ำมัน ESSO เขตบางเขน กทม.	08
แขวงสามวาตะวันออก เขตคลองสามวา กทม.	09
บริเวณใต้ต้นสมุ่ดำ เขตคลองสามวา กทม.	10
ดินผสมของสวน 22 พันธุ์ไม้	11
ดินผสมของสวนห้างหุ้นส่วน	12
ดินรอบโคนต้นชาเทียนทองของไปรษณีย์ลาดกระบัง	13
ดินรอบโคนต้นคทาเงินเต็มบ้าน หลังคอนโดบางกะปิ	14
หน้าสำนักงานนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง	15
คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สจล.	16
หน้าตึกจุฬาภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	17
หน้าตึกวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	18
ข้างหอประชุมจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	19

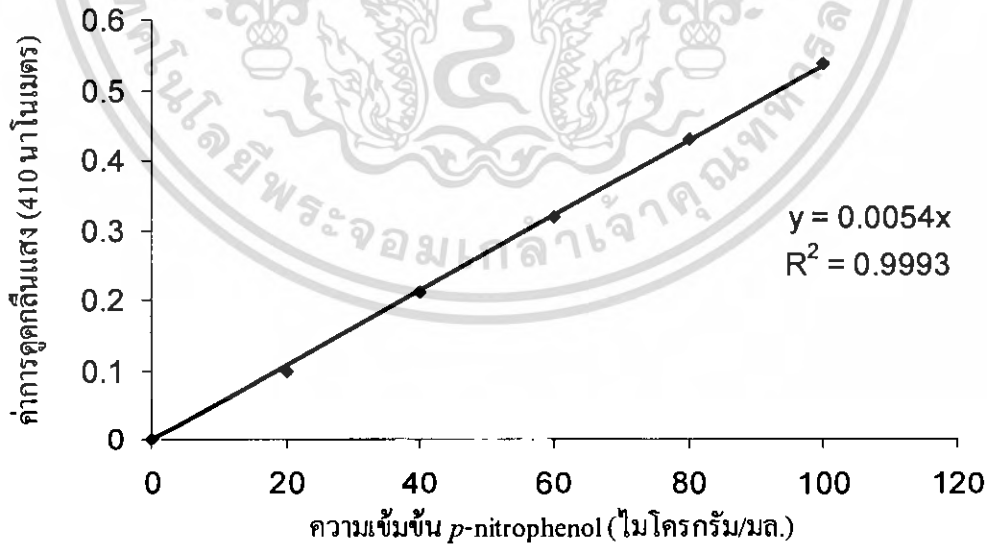
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol

p-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	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



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟสารละลาย *p*-nitrophenol มาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหากิจกรรมของเอนไซม์

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

จากสมการของกราฟมาตรฐาน y = 0.0054x เมื่อแทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.) และนำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
S 0712	1	0.683	1	126.4815	0.6061
	2	0.685	1	126.8519	0.6079
	3	0.687	1	127.2222	0.6097
S 0816	1	0.669	1	123.8889	0.5931
	2	0.665	1	123.1481	0.5902
	3	0.663	1	122.7778	0.5884
S 0620	1	0.725	1	134.2593	0.6434
	2	0.726	1	134.4444	0.6443
	3	0.729	1	135.0000	0.6480
S 0625	1	0.646	1	119.6296	0.5733
	2	0.649	1	120.1852	0.5760
	3	0.650	1	120.3704	0.5768
S 1028	1	0.643	1	119.0701	0.5706
	2	0.634	1	117.4074	0.5626
	3	0.641	1	118.7037	0.5689
S 0634	1	0.442	1	81.8519	0.3923
	2	0.447	1	82.7778	0.3967
	3	0.450	1	83.3333	0.3994
S 0936	1	0.335	1	62.0370	0.2973
	2	0.342	1	63.3333	0.3035
	3	0.401	1	74.2593	0.3559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่4(ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราที่คัดเลือก

รหัสไอโซเลต	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง (410 นาโนเมตร)	ค่าการเจือจาง	ความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)
S 0839	1	0.335	1	62.0370	0.2973
	2	0.342	1	63.3333	0.3035
	3	0.338	1	62.5926	0.3000
S 1145	1	0.713	1	132.0370	0.6328
	2	0.726	1	134.4444	0.6443
	3	0.716	1	132.5926	0.6354
S 1546	1	0.895	1	165.7407	0.7943
	2	0.893	1	165.3704	0.7925
	3	0.898	1	166.2963	0.7970
S 1547	1	0.668	1	123.7037	0.5928
	2	0.670	1	124.0741	0.5946
	3	0.651	1	120.5556	0.5777
S 1248	1	0.654	1	121.1111	0.5804
	2	0.665	1	123.1481	0.5902
	3	0.673	1	124.6296	0.5973
S 1649	1	0.869	1	160.5259	0.7712
	2	0.875	1	126.0370	0.7765
	3	0.875	1	126.0370	0.7765
S 1851	1	0.551	1	102.0370	0.4890
	2	0.558	1	103.3333	0.4952
	3	0.577	1	106.8519	0.5121
S 1354	1	0.588	1	108.8889	0.5218
	2	0.610	1	112.9630	0.5414
	3	0.608	1	112.5930	0.5400
S 1956	1	0.551	1	102.0370	0.4890
	2	0.553	1	102.4074	0.4908
	3	0.523	1	96.8519	0.4641
S 1758	1	0.523	1	96.8519	0.4668
	2	0.494	1	91.4815	0.4384
	3	0.497	1	92.0370	0.4412
S 1759	1	0.612	1	113.3333	0.5431
	2	0.598	1	110.7408	0.5307
	3	0.596	1	110.3704	0.5289

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยโปรแกรม SPSS version 11

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

DATA

Duncan

	N	Subset for alpha = 0.05											
Activity		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
8	3	0.300267											
7	3		0.318900										
6	3			0.396133									
17	3				0.448800								
16	3					0.481300							
14	3					0.498767							
18	3						0.534233						
15	3						0.534400						
5	3							0.567367					
4	3							0.575367	0.575367				
11	3								0.588367				
12	3								0.589300	0.589300			
2	3								0.590567	0.590567			
1	3									0.607900			
9	3										0.637500		
3	3										0.645200		
13	3											0.774733	
10	3												0.794600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	0.055	0.985	0.370	0.123	0.052	0.388	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
A Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.