

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วย
วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง

BIODIESEL PRODUCTION USING LIPASE ENZYME BY
RESPONSE SURFACE-CENTRAL COMPOSITE DESIGN
METHODOLOGY

ชื่อนนภัทร ศรีศาสนา
เทพินทร์ ยายี
ภาณุชนาถ ตำราเรียง

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วย
วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง

BIODIESEL PRODUCTION USING LIPASE ENZYME BY
RESPONSE SURFACE-CENTRAL COMPOSITE DESIGN
METHODOLOGY

ฉันทนภักทร ศรึศาศนา
เทพินทร ยายี
ภานุชนาถ ตำราเรียง

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560




BIODIESEL PRODUCTION USING LIPASE ENZYME BY
RESPONSE SURFACE-CENTRAL COMPOSITE DESIGN
METHODOLOGY

CHINNAPHAT SRISASSANA
TEPIN YAYEE
PANUCHNAT TAMRAREANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACEDMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับ หลักการออกแบบส่วนผสมกลาง Biodiesel Production Using Lipase Enzyme by Response Surface-Central Composite Design Methodology	
ชื่อนักศึกษา	นายชินนภัทร	ศรีศาสนา รหัส 57050819
	นางสาวเทพินทร์	ยายี รหัส 57050830
	นางสาวภาณุชนาถ	ตำราเรียง รหัส 57050870
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีว
วิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการ	
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง		
ชื่อนักศึกษา	นายชินนภัทร	ศรียา	รหัส 57050819
	นางสาวเทพินทร์	ยายี	รหัส 57050830
	นางสาวภาณุชนาถ	ตำราเรียง	รหัส 57050870
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
คณะ	วิทยาศาสตร์		
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรกฤต วรรณนทกิจ		

บทคัดย่อ

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีคุณสมบัติการเผาไหม้ได้ดีเทียบเท่ากับน้ำมันดีเซล และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสารประกอบโมโนแอลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ โดยอาศัยกรด ต่าง หรือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมันและกลีเซอรอล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. จำนวน 6 ไอโซเลท เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ จากนั้นทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส แล้วนำไปทดสอบหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากนั้นทำการผลิตไบโอดีเซลตามสภาวะที่ได้จากการออกแบบด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง ซึ่งปัจจัยที่ทำการศึกษาคือ อุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ไลเปส และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน จากนั้นตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography และวิเคราะห์หาปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรีย 6 ไอโซเลท (*Burkholderia* sp. รหัส BG2018 และ BG2015 และ *Pseudomonas* sp. รหัส SS1003 KS3005 KS2002 และ SN2006) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 335.39 ± 3.04 327.90 ± 10.31 6.68 ± 0.00 6.27 ± 0.02 0.61 ± 0.02 และ 0.61 ± 0.03 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 มีปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับร้อยละ 86.63 82.11 และ 65.78 ตามลำดับ จากผลการศึกษาในครั้งนี้

สามารถนำวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลางเพื่อไปประยุกต์ใช้กำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้

คำสำคัญ : ไบโอดีเซล ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง เอนไซม์ไลเปส

Title	Biodiesel Production Using Lipase Enzyme by Response Surface-Central Composite Design Methodology		
Student	Mr. Chinnaphat	Srisassana	Student ID 57050819
	Miss Tepin	Yayee	Student ID 57050830
	Miss Panuchnat	Tamrareang	Student ID 57050870
Degree	Bachelor for Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic year	2017		
Advisor	Asst.Prof.Dr.Worakrit Worananthakij		

Abstract

Biodiesel is biofuels that has complete combustion similar to diesel and environmental friendly. It is the compound of mono alkyl esters, produced by transesterification reaction of triglycerides with alcohol, forming fatty acid alkyl esters and glycerine. The reaction requires acid alkaline or lipase as the catalyst. This study aims to study lipase enzyme from *Burkholderia* sp. and *Pseudomonas* sp. which are biodiesel processing catalyst. Cultivation of 6 isolated bacteria were at condition that bacteria could be produced enzyme. Then enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation and dialysis. Then enzyme activity was measured. Biodiesel was produced at conditions that were designed by Response surface-Central composite design methodology and evaluate the effects of temperature, dosage of lipase and methanol-oil molar ratio. The chemical compositions were analyzed by using Thin layer chromatography. Biodiesel content obtained from the lipase of the most enzyme activity bacteria was analyzed. It was found that the enzyme activity of lipase from 6 isolated bacteria (*Burkholderia* sp. strains BG2018, BG2015 and *Pseudomonas* sp. strains KS3005, SS1003, KS2002 and SN2006) were 335.39 ± 3.04 , 327.90 ± 10.31 , 6.68 ± 0.00 , 6.27 ± 0.02 , 0.61 ± 0.02 and 0.61 ± 0.03 units/ml, respectively. The optimum condition was at temperature 55 °C, dosage of enzyme 50% and oil to methanol molar ratio 4:1 was biodiesel yields from the lipase of BG2018 BG2015 and

KS3 0 0 5 that were 86.63%, 82.11% and 65.78%, respectively. This study could be applied for increasing biodiesel production using lipase enzyme.

Keywords : Biodiesel, Transesterification, Response surface-Central composite design methodology, Lipase

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากคณะผู้จัดทำได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากผู้มีพระคุณ ดังนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภุช วรรณทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา และชี้แนวทางอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือแนะแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องในการทำเล่มโครงการพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นด้วยความเอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการในการสอบที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ เพื่อให้โครงการพิเศษเล่มนี้มีเนื้อหาที่สมบูรณ์ครบถ้วนมากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้วิชาการ ซึ่งผู้ดำเนินโครงการได้นำความรู้มาใช้เป็นพื้นฐานในการทำโครงการพิเศษ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติชีววิทยา เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารและสถานที่ ตลอดจนแม่บ้านประจำภาควิชาชีววิทยา อาคารจุฬารัตนวลัยลักษณ์ 1 และเจ้าหน้าที่ประจำคณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำรายการทดลอง ตลอดจนผู้ทรงคุณวุฒิในหลากหลายสาขาที่คณะผู้จัดทำได้นำข้อมูลมาใช้ประกอบการทำการทดลองและโครงการเล่มนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และผู้ปกครองที่ได้รับการศึกษาตลอดจนเลี้ยงดูอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจและเป็นแรงผลักดันในการทำให้โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณนางสาวปณิดา อุไทย ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ แนวคิด ในการใช้โปรแกรมสำหรับการออกแบบการทดลองรวมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ และบุคคลอื่นๆ ทุกคนที่ไม่ได้กล่าวมาที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดระยะเวลาการทำโครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านและผู้เกี่ยวข้องในการนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ดังกล่าวข้างต้นต่อไป หากมีข้อผิดพลาดประการใดในเนื้อหาทางคณะผู้จัดทำขออภัยอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ฉัตรนภัทร ศรีศาสนา
เทพินทร์ ยายี
ภาณุชนาด ตำราเรียง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ไบโอดีเซล	4
2.1.1 ไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหรือไขมันจากสัตว์โดยตรง	4
2.1.2 ไบโอดีเซลแบบลูกผสม	5
2.1.3 ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์	5
2.2 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน	6
2.2.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน	6
2.2.2 ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ในการผลิตไบโอดีเซล.....	8
2.3 เอนไซม์ไลเปส	11
2.3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	11
2.3.2 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์	13
2.3.3 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส	14
2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	15
2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซล	16
2.4.1 โครมาโทกราฟี	16
2.4.2 แก๊สโครมาโทกราฟี	18
2.5 วิธีส่วนผสมกลาง	20
2.6 การเก็บเกี่ยวผลผลิต	22
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
2.7.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปส	22
2.7.2 การผลิตไบโอดีเซล	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	26
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	26
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	26
3.3 สารเคมี	26
3.4 อุปกรณ์	27
3.5 เครื่องมือ	27
3.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย	28
3.6.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	28
3.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric	28
3.6.3 การทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์	29
3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลารวี	30
3.6.5 การทดสอบการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับ หลักการออกแบบส่วนผสมกลางในการออกแบบการทดลอง	30
3.6.6 การล้างไบโอดีเซล	30
3.6.7 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง ไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography	31
3.6.8 การตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี โดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103	32
3.6.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	33
4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	33
4.2 ผลการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีน ด้วยวิธีไดอะไลซิส	34
4.3 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)	34
4.4 การตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี โดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103	37
4.5 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยและค่าความแปรปรวน	43
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	49
5.1 สรุปผลการวิจัย	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2 ข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	60
ภาคผนวก ข สารเคมี	62
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	63
ภาคผนวก ง ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน	65
ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์	66
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร	67
ภาคผนวก ช ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	70
ภาคผนวก ซ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	73
ภาคผนวก ฌ ผลผลิตไปโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง	91
ภาคผนวก ญ โครมาโทแกรมของไปโอดีเซล	97

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอนไซม์	10
2.2 แสดงชนิดของไลเปสที่ได้จากสิ่งมีชีวิต	14
2.3 การเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับ Factors ที่ Alpha = 1	21
3.1 ตัวแปรต่างๆ และค่าที่ใช้ในการทดลอง	31
3.2 สภาวะที่ใช้ในแต่ละการทดลอง	31
4.1 การเปรียบเทียบของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท	35
4.2 แสดงปริมาณไบโอดีเซลที่สภาวะต่างๆ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสของ <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ	43
4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	46
4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	47
4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	48
ค.1 การเจือจาง p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ	63
ค.2 การเจือจาง Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ	64
ง.1 แสดงปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่ เปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวต่างๆ ที่ 0 องศาเซลเซียส	65
จ.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	66
ฉ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่า กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	67
ช.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่า กิจกรรมเอนไซม์ของ <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	70
ช.1 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ของ <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	73
ช.2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย วิธีตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตของ <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	87
ช.3 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย วิธีไดอะไลซิสของ <i>Burkholderia</i> sp. และ <i>Pseudomonas</i> sp.	89

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์	6
2.2 ปฏิกริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ของแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน	7
2.3 ปฏิกริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ของแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน	8
2.4 ปฏิกริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification)	9
2.5 แสดงขั้นตอนการหยดสารลงบนแผ่น Thin Layer Chromotography	17
2.6 แสดงวิธีการวางแผ่น Thin Layer Chromotography ในภาชนะตัวทำละลาย เคลื่อนที่และภาชนะแก้วหรือแท่ง สำหรับแผ่น Thin Layer Chromotography	17
2.7 แสดงองค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	19
2.8 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้จาก เครื่องบันทึกข้อมูลของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	19
2.9 วิธีส่วนผสมกลางที่มีตัวแปร 3 ตัวแปร	21
4.1 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2018 และ BG2015 และ แบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส SS1003 KS3005 KS2002 และ SN2006	34
4.2 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography	37
4.3 ผลการวิเคราะห์ Thin Layer Chromatography ของการผลิตไบโอดีเซลที่อุณหภูมิ 28.18 และ 35 องศาเซลเซียส.....	38
4.4 ผลการวิเคราะห์ Thin Layer Chromatography ของการผลิตไบโอดีเซลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	39
4.5 ผลการวิเคราะห์ Thin Layer Chromatography ของการผลิตไบโอดีเซลที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	40
4.6 ผลการวิเคราะห์ Thin Layer Chromatography ของการผลิตไบโอดีเซลที่อุณหภูมิ 61.82 องศาเซลเซียส	41
ค.1 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร	63
ค.2 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	64
ฅ.1 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ ก่อนและหลังทำการล้าง	91
ฅ.2 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ ก่อนและหลังทำการล้าง	92
ฅ.3 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS2002 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ ก่อนและหลังทำการล้าง	93

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ฅ.4 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ไ้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ ก่อนและหลังทำการล้าง	94
ฅ.5 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ไ้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส SN2006 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ ก่อนและหลังทำการล้าง	95
ฅ.6 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ไ้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส SS1003 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ ก่อนและหลังทำการล้าง	96
ญ.1 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลจากสวนจิตรลดา และน้ำมันปาล์ม	97
ญ.2 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	98
ญ.3 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	99
ญ.4 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	100
ญ.5 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	101
ญ.6 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 60 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	102
ญ.7 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	103
ญ.8 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 9.7 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	104
ญ.9 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	105

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ญ.10 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	106
ญ.11 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	107
ญ.12 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	108
ญ.13 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 1.32:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	109
ญ.14 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4.68:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	110
ญ.15 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 28.18 องศาเซลเซียส	111
ญ.16 โครมาโทแกรมของตัวอย่างแบคทีเรีย <i>Burkholderia</i> sp. รหัส BG2015 BG2018 และ <i>Pseudomonas</i> sp. รหัส KS3005 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 61.82 องศาเซลเซียส	112

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันมีการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกและใช้พลังงานฟอสซิลเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณปิโตรเลียมลดลงและเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั่วโลก ทำให้หลายประเทศมีการตั้งเป้าหมายเพื่อรองรับกับสถานการณ์ดังกล่าว หนึ่งในนั้นคือการใช้พลังงานจากทรัพยากรที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงมีการนำไบโอดีเซลมาทดแทนน้ำมันดีเซล เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่มีพิษ ปล่อยมลพิษในปริมาณต่ำ และเป็นพลังงานหมุนเวียน นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ เป็นการลดความรุนแรงในการเกิดปรากฏการณ์เรือนกระจกลดลง นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังมีศักยภาพในการลดมลพิษทางอากาศจากเครื่องยนต์ดีเซล อีกทั้งยังเป็นเชื้อเพลิงที่สะอาดที่มีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันดีเซล ส่งผลให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Austrian Biofuels Institute, 2002)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นสารประกอบโมโนแอลคิลเอสเทอร์ (Mono-alkyl ester) ของกรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวเกิดจากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้วผ่านกระบวนการทางเคมี โดยกระบวนการที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ การผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สามารถเตรียมได้จากการนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ที่มีสารประกอบอินทรีย์ประเภทไตรกลีเซอไรด์ ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันกับแอลกอฮอล์สายสั้น โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด ต่างหรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (เบญจมาศ, 2552) ทำให้ได้ผลผลิตเป็นแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) หรือไบโอดีเซล รวมถึงกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (เกตน์ณินภา, 2552) ซึ่งไบโอดีเซล มีคุณสมบัติในการเผาไหม้ได้ดีไม่ต่างจากน้ำมันปิโตรเลียม แต่มีข้อดีกว่าหลายอย่าง คือ มีการเผาไหม้ที่สะอาดกว่า ไอเสียมีคุณภาพที่ดีกว่า เนื่องจากออกซิเจนในไบโอดีเซลทำให้มีการสันดาปที่สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซลปกติ จึงมีปริมาณ แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้อยกว่า นอกจากนี้ไบโอดีเซลไม่มีสารกำมะถัน จึงไม่ทำให้เกิดปัญหาสารซัลเฟต อีกทั้งยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย ทำให้เกิดการอุดตันของระบบไอเสียได้ยาก (อาภาณี, 2549)

เอนไซม์ไลเปส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากสามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูง โดยไม่จำเป็นต้องใช้โคเอนไซม์ มีความเสถียร ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่มีคุณภาพ อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาของการแยกกลีเซอรอล เพราะสามารถทำการแยกออกได้ง่าย อย่างไรก็ตามในการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีต้นทุนค่อนข้างสูง และเอนไซม์เสียสภาพได้ง่าย โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

ปริมาณมาก คือ แบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสกุลที่สำคัญที่สุด คือ *Pseudomonas* sp. (Gilbert, 1993)

วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Design, CCD) เป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้สำหรับออกแบบการทดลอง โดยมีการเพิ่มข้อมูลในแต่ละปัจจัยเพื่อให้มีจุดเพียงพอสำหรับการสร้างแบบจำลองเชิงประจักษ์ (empirical model) และนำข้อมูลที่ใช้ในการทดลองมาอธิบายอันตรกิริยา (interaction) ของตัวแปรต้นหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตาม (ธนพงศ์, 2554) ซึ่งสามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกัน และสามารถลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้

การศึกษาครั้งนี้จึงมีการใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล และมีการนำวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลางมาประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

1.2.2 เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท จากการคัดแยกของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. และ *Pseudomonas* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท จากการคัดเลือกแบคทีเรียจากการศึกษาของ โชตินันท์ และคณะ (2557) ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุด เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม โดยนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม และใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลางในการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลบริสุทธิ์และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบวิธีการผลิตเอนไซม์ไลเปสให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

1.4.2 สามารถออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง

1.4.3 ทราบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลให้มีความบริสุทธิ์ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นสารประกอบของกรดไขมันและเอทิลแอลกอฮอล์สายสั้นที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไขมันสัตว์หรือไขมันพืชกับแอลกอฮอล์ โดยแอลกอฮอล์ที่นิยมใช้คือ เมทิลแอลกอฮอล์ เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพ และมีราคาถูก (Chaudhry *et al.*, 2017)

เมื่อนำไบโอดีเซลมาใช้กับเครื่องยนต์พบว่ามีความสัมพันธ์ในการเผาไหม้ได้ดีไม่ต่างจากน้ำมันปิโตรเลียม แต่มีข้อดีที่หลายอย่าง คือ มีการเผาไหม้ที่สะอาดกว่า ไอเสียมีคุณภาพที่ดีกว่า เนื่องจากออกซิเจนในไบโอดีเซลทำให้มีการสันดาปที่สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซลปกติ จึงมีปริมาณแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนน้อยกว่า นอกจากนี้ในไบโอดีเซลไม่มีสารกำมะถัน จึงไม่ทำให้เกิดปัญหาสารซัลเฟต อีกทั้งยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย ทำให้เกิดการอุดตันของระบบไอเสียได้ยาก จึงเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานได้เป็นอย่างดี โดยไบโอดีเซลที่ผลิตได้มี 3 ประเภท ได้แก่

2.1.1 ไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหรือไขมันจากสัตว์โดยตรง

ไบโอดีเซลที่ใช้น้ำมันพืชหรือไขมันจากสัตว์โดยตรงเป็นการนำน้ำมันพืช เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม หรือน้ำมันที่ได้จากไขมันสัตว์ เช่น น้ำมันหมู เป็นต้น ป้อนลงไปเครื่องยนต์ดีเซล โดยไม่ต้องผสมหรือเติมสารเคมีใด อย่างไรก็ตามสิ่งสำคัญของการใช้น้ำมันพืชโดยตรง คือ ต้องมีการอุ่นน้ำมันในทุกจุดที่มีน้ำมันผ่านได้แก่ ถังน้ำมัน ท่อทางเดินน้ำมัน ชุดกรองน้ำมัน อุ่นหมุมิของน้ำมันที่อุ่นอย่างน้อย 70 องศาเซลเซียส แนวทางในการนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรง เป็นวิธีการที่ได้น้ำมันในราคาที่ถูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำน้ำมันพืช ซึ่งยังไม่ผ่านกระบวนการกลั่นมาใช้ แต่การนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสมจำเป็นต้องอาศัยความร้อนในการหลอมเหลวไขแข็งและลดความหนืดของน้ำมัน เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลประมาณ 11-17 เท่า หากอุณหภูมิต่ำลงความหนืดของน้ำมันพืชยิ่งเพิ่มขึ้นจนเกิดเป็นไข การที่น้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลทำให้เกิดน้ำมันออกมาเป็นฝอยได้ยาก เกิดเป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิงเข้าสู่ห้องเผาไหม้ และเกิดการสันดาปไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้แล้ว น้ำมันพืชมีคุณสมบัติที่ระเหยกลายเป็นไอได้ช้าและน้อยมาก (slow/low volatility) ยิ่งทำให้เกิดการจุดระเบิดได้ยาก เครื่องยนต์ติดยาก และหลงเหลือคราบเขม่าเกาะที่หัวฉีด ผนังลูกสูบ แหวน และวาล์ว จากคุณสมบัติที่น้ำมันพืช มีความหนืดสูง และระเหยตัวได้ต่ำกว่าน้ำมันดีเซลนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากเมื่อใช้น้ำมันพืชโดยตรงในเครื่องยนต์

2.1.2 ไบโอดีเซลแบบลูกผสม

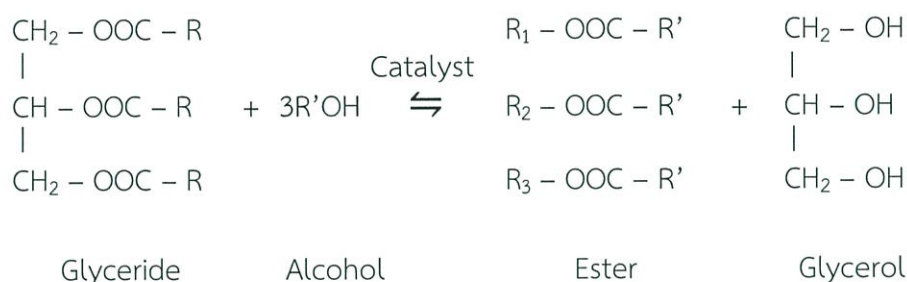
ไบโอดีเซลแบบลูกผสมเป็นการผสมกันระหว่างน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล เพื่อลดความหนืดของน้ำมันพืชลง ทำให้ได้ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลให้มากที่สุด ตัวอย่างของไบโอดีเซลแบบลูกผสม ได้แก่ ไบโอดีเซลที่ผสมกับน้ำมันมะพร้าว เรียกว่า โคโคดีเซล (Cocodiesel) ซึ่งจุดกำเนิดไบโอดีเซลในประเทศไทยอยู่ที่ อำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เนื่องจากปีพ.ศ. 2542 เกิดวิกฤติราคาน้ำมันเชื้อเพลิงเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ภาวะเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศชะลอตัวลง ประกอบกับในช่วงเวลานี้ผลผลิตทางการเกษตรหลายๆ ชนิดล้นตลาด ทำให้ราคาผลผลิตตกต่ำ จึงส่งผลให้กลุ่มเกษตรกรต่างๆ ทำการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลไว้จำหน่ายเพื่อใช้กับเครื่องจักรกลทางเกษตรต่างๆ ภายในชุมชน ซึ่งน้ำมันที่ได้จากวิธีการดังกล่าวเหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการใช้น้ำมันอย่างเร่งด่วน และใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้งานหนัก ตลอดจนใช้งานในภูมิภาคเขตร้อน อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันก๊าดและน้ำมันพืชขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของพื้นที่ใช้งาน อัตราส่วนผสมมีตั้งแต่ น้ำมันก๊าดร้อยละ 10 น้ำมันพืชร้อยละ 90 จนถึงน้ำมันก๊าดร้อยละ 40 น้ำมันพืชร้อยละ 60 โดยอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมอยู่ที่น้ำมันก๊าดร้อยละ 20 น้ำมันพืชร้อยละ 80 อย่างไรก็ตามหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้น้ำมันพืชผสมน้ำมันก๊าด สามารถติดตั้งถังน้ำมันดีเซลหรือน้ำมันไบโอดีเซลเพื่อใช้ในการสตาร์ทเครื่องยนต์และก่อนเลิกใช้งานเครื่องยนต์ มีการนำวิธีดังกล่าวไปใช้งาน แต่ผสมน้ำมันก๊าดในอัตราส่วนที่น้อยเกินไป เนื่องจากราคาของน้ำมันก๊าดที่ค่อนข้างสูง ทำให้เกิดปัญหาการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้เมื่อนำไปใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลที่ไม่มีการดัดแปลงเครื่องยนต์ จำเป็นต้องเลือกชนิดน้ำมันพืช ชนิดของตัวทำละลาย และสัดส่วนผสมที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเกิดไขในท่อส่งน้ำมันทำให้เกิดการอุดตัน เป็นต้น

2.1.3 ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์

ไบโอดีเซลแบบเอสเทอร์เป็นไบโอดีเซลที่ได้รับการยอมรับในสากล และมีการใช้อย่างแพร่หลาย เช่น สหพันธรัฐเยอรมัน สหรัฐอเมริกา มีคำจำกัดความว่า เป็นเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนกับน้ำมันดีเซลมากที่สุดทำให้ไม่มีปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ ได้น้ำมันที่มีความคงตัวมากขึ้น สามารถนำไปเติมในเครื่องยนต์ดีเซลได้ทุกชนิด ทั้งเติมโดยตรงและผสมลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่างๆ เช่น B5 หมายถึงการผสมไบโอดีเซลต่อน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 5:95 หรือ B100 ซึ่งเป็นน้ำมันไบโอดีเซลร้อยละ 100 เป็นต้น แต่ปัญหาคือ ต้นทุนการผลิตมีราคาแพงกว่าเมื่อเทียบกับไบโอดีเซลแบบอื่นๆ อย่างไรก็ตามการนำมาใช้กับเครื่องยนต์มักจะนำน้ำมันดีเซลมาผสมด้วย ซึ่งได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในระบบขนส่งมวลชน เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีราคาไม่ต่างจากน้ำมันดีเซลมากนัก นอกจากนี้การเผาไหม้สมบูรณ์ทำให้ไม่มีเขม่าควันที่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยเชื้อเพลิงชนิดนี้ มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล และจุดวาบไฟของไบโอดีเซลมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง นอกจากนั้นแล้วค่าซีเทนที่เป็นดัชนีบอกลักษณะการติดไฟของไบโอดีเซลยังมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซลอีกด้วย (อาภาณี, 2549)

2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) หรือเรียกอีกอย่างว่า ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) เป็นปฏิกิริยาเคมีระหว่างไขมันหรือน้ำมัน (Triglyceride) กับแอลกอฮอล์ได้ผลผลิตเป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล โดยมีตัวเร่งในปฏิกิริยา ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดผลผลิตได้เร็วขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Ma and Hanna, 1999; Agarwal, 2006)



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์
ที่มา : Schuchardt (1998)

2.2.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นการทำให้ปฏิกิริยาสมดุล โดยเกิดการย้ายหมู่เอสเทอร์ของน้ำมัน ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยา เช่นกรดแก่ และเบสแก่ ทำหน้าที่สำคัญในการปรับให้ปฏิกิริยาอยู่ที่จุดสมดุลเร็วขึ้น ส่งผลให้เกิดผลผลิตเอสเทอร์เป็นปริมาณมาก และแอลกอฮอล์จะถูกใช้จนหมดในปฏิกิริยา โดยประเภทของตัวเร่งปฏิกิริยาจำแนกตามการใช้งานได้ดังนี้

2.2.1.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดโดยทั่วไปนิยมใช้กรดซัลฟอนิกและกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เนื่องจากตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ให้ผลผลิตแอลคิลเอสเทอร์สูง แต่ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างช้าโดยใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 3 ชั่วโมงเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ เช่น ในการทำปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส (methanolysis) ของน้ำมันถั่วเหลือง ใช้กรดซัลฟิวริกร้อยละ 1 อัตราส่วนโดยมวลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน 30:1 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 ชั่วโมง ในขณะที่การทำปฏิกิริยาบิวทาโนไลซิส (Butanolysis) ที่อุณหภูมิ 117 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 3 ชั่วโมง และการทำปฏิกิริยาเอทานอลไลซิส (Ethanolysis) ที่อุณหภูมิ 117 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 18 ชั่วโมง โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา และแอลกอฮอล์ชนิดเดียวกัน

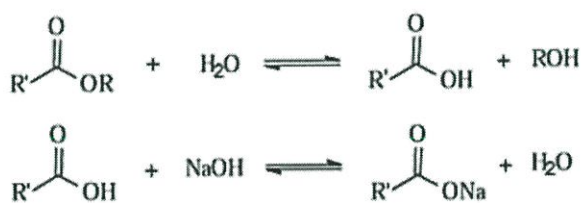
อัตราส่วนโดยมวลของแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งแอลกอฮอล์ที่มีปริมาณมากเกินไปจะทำให้เปลี่ยนเป็นผลผลิตได้

และนอกจากนี้ยังทำให้เกิดกลีเซอรอลได้ยากขึ้นอีกด้วย ดังนั้นในส่วนของอัตราส่วนโดยมวลของ แอลกอฮอล์ต่อน้ำมันที่ใช้จะพิจารณาตามการทดลองของแต่ละการทดลอง

2.2.1.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส

การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีฤทธิ์กัดกร่อนน้อยกว่าสารประกอบที่เป็นกรด โดยทั่วไปในอุตสาหกรรมมักใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น สารประกอบของโลหะแอลคาไลน์ (Alkaline metal alkoxides) และไฮดรอกไซด์ (Hydroxides) เช่นเดียวกับโซเดียมหรือโพแทสเซียมคาร์บอเนต

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสนิยมใช้สารประกอบของโลหะแอลคาไลน์ (เช่น โซเดียมเมทอกไซด์) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากให้ผลผลิตที่มาก (มากกว่าร้อยละ 98) ภายในเวลาสั้นๆ ถึงแม้ว่าตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มีความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 0.5) ซึ่งจากการที่ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสไม่ต้องการน้ำผสมอยู่ในสารประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ทำให้ไม่เหมาะสมกับกระบวนการทางอุตสาหกรรม โดยสารประกอบของโลหะแอลคาไลน์มีราคาต่ำกว่าโลหะอัลลอยด์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำกว่า แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นร้อยละ 1 หรือ 2 ทำให้เกิดผลผลิตสูงเช่นเดียวกัน ถึงแม้ว่าในการทำปฏิกิริยาไม่มีการเติมน้ำเข้าไป แต่การทำปฏิกิริยาของไฮดรอกไซด์กับแอลกอฮอล์สามารถเกิดน้ำได้บางส่วน โดยน้ำที่เกิดขึ้นจะเข้าไปสลายเอสเทอร์ เกิดเป็นสบู่ จึงทำให้ปริมาณของผลผลิตเอสเทอร์ที่ได้ลดลง (รูปที่ 2.2) โดยสบู่ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้ผลผลิตเอสเทอร์ลดลงและทำให้การเก็บเกี่ยวกลีเซอรอลเป็นไปได้ยาก เนื่องจากเกิดการอิมัลชัน (Emulsion)



R' คือ โซ่คาร์บอนของกรดไขมัน

R คือ หมู่แอลคิลของแอลกอฮอล์

รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ของแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

ที่มา : Schuchardt (1998)

ในการใช้โพแทสเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะให้ผลผลิตสูง เมื่อมีความเข้มข้นร้อยละ 2 หรือ 3 และสามารถลดการเกิดสบู่ได้ เนื่องจากโพแทสเซียมคาร์บอเนตสร้างไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) แทนการสร้างน้ำ (รูปที่ 2.3) ทำให้ไม่เกิดการสลายเอสเทอร์



R คือ หมู่แอลคิลของแอลกอฮอล์

รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification) ของแอลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

ที่มา : Schuchardt (1998)

2.2.1.3 เอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องใช้โคเอนไซม์ มีความเสถียร ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ มีความจำเพาะ และเหมาะกับวัตถุดิบที่มีปริมาณกรดไขมันและน้ำปนเปื้อน ทำให้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีคุณภาพ ถึงแม้ว่ายังไม่มี การนำกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาพัฒนาในเชิงการค้า แต่มีบทความและงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสม (สารละลาย อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส ชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ และอื่นๆ) เพื่อปรับใช้ในอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามปริมาณของผลผลิตที่ได้ไม่น่าพอใจเมื่อเทียบกับการทำปฏิกิริยาโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.2.2 ปัจจัยสำคัญของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการทำปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิและความดัน ความชื้นและกรดไขมันอิสระ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน ชนิดและปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาและการกวนผสม โดยแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลมีรายละเอียด ดังนี้

2.2.1.1 อุณหภูมิและความดัน

อุณหภูมิและความดันเป็นปัจจัยสำคัญในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมีอุณหภูมิสูง หากใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มักใช้อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส หากใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มักใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส ถ้าหากมีการใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงเกินไปทำให้เกิดการเสถียรภาพของเอนไซม์และเกิดการระเหยของเมทานอลส่งผลให้ผลผลิตไบโอดีเซลลดลง โดยผลกระทบจากการที่อุณหภูมิมากกว่า 300 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการแตกตัวของผลผลิตไบโอดีเซล และที่อุณหภูมิสูงกว่า 350 องศาเซลเซียส จะมีการเปลี่ยนโครงสร้างจาก cis เป็น trans ในส่วนของความดันที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามักใช้ความดันประมาณ 2-3 ความดันบรรยากาศ เพื่อให้เมทานอลกลั่นตัวเป็นของเหลวให้มากที่สุด

2.2.1.2 ความชื้นและกรดไขมันอิสระ

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ คาร์บอเนต เป็นต้น) กลีเซอไรด์ และแอลกอฮอล์ที่ใช้จะต้องไม่มีน้ำเป็นส่วนผสม เนื่องจากน้ำเป็นสาเหตุทำให้เกิดสบู่ขึ้นในระหว่างการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยที่ทำให้ปฏิกิริยาการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเกิดสบู่ได้ นอกจากน้ำแล้วยังมีกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) ที่มีอยู่ในน้ำมันวัตถุดิบ ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบควรมีค่าความเป็นกรด (Acid value) ไม่เกิน 4 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม เนื่องจากการมีกรดไขมันอิสระในน้ำมันวัตถุดิบที่มากเกินไปจะทำให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้ลดลง แต่สำหรับน้ำมันใช้เป็นวัตถุดิบที่มีค่าความเป็นกรดสูง (มากกว่า 4 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อกรัม) ต้องมีการนำน้ำมันมาทำการลดค่าความเป็นกรดลง โดยทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งมีการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Acid esterification) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Ramsdhas *et al.*, 2005)



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน (Saponification)

ที่มา : Schuchardt (1998)

2.2.1.3 อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมัน

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับ เพราะฉะนั้นแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องใช้ในปริมาณที่มากเกินไป เพื่อที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางขวามากขึ้น ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นเช่นกัน โดยสัดส่วนที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 3 โมลของแอลกอฮอล์ต่อ 1 โมลของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นยิ่งใช้อัตราส่วนมากเท่าไรก็จะทำให้ได้เอสเตอร์ (ไบโอดีเซล) มากขึ้นเท่านั้น และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะสั้นลงด้วย ซึ่งอัตราส่วนโดยโมลระหว่างแอลกอฮอล์ต่อน้ำมันที่ 6:1 เป็นค่าที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม โดยพบว่าได้เมทิลเอสเตอร์มากกว่าร้อยละ 98 (Agarwal, 2006; Fukuda *et al.*, 2001)

2.2.1.4 ชนิดและปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งสามารถแบ่งได้เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด หรือเอนไซม์ กระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วกว่าเมื่อใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มในปริมาณมากและมีน้ำผสมอยู่ด้วยการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะสมกว่า (Ma and Hanna, 1999) โดยการเปรียบเทียบข้อแตกต่างของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอนไซม์ แสดงดังตารางที่ 2.1

เมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเบสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-1 โดยน้ำหนัก ทำให้ได้ผลผลิต (Yield) ร้อยละ 94-99 การที่ตัวเร่งปฏิกิริยาเบสเพิ่มปริมาณมากขึ้นก็ไม่ได้เป็นการช่วยทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น แต่กลับเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในขั้นตอนของการล้างเอาตัวเร่งปฏิกิริยาเบสออกจากผลิตภัณฑ์อีกด้วย (Agarwal, 2006)

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิด เบส กรด และเอนไซม์

ตัวแปร	ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส	ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด	เอนไซม์ไลเปส
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	60-70	55-80	30-40
กรดไขมันอิสระในน้ำมัน	เกิดสบู่	เกิดเอสเทอร์	เกิดเอสเทอร์
น้ำในน้ำมัน	มีผลกระทบต่อ การเกิดปฏิกิริยา	มีผลกระทบต่อ การเกิดปฏิกิริยา	ไม่มีผลกระทบต่อ การเกิดปฏิกิริยา
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง
การเก็บเกี่ยวกลีเซอรอล	ยาก	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ทำการล้างซ้ำ	ทำการล้างซ้ำ	ไม่ต้องล้าง
ราคา	ถูก	ถูก	ค่อนข้างแพง

ที่มา : Marchetti *et al.* (2007)

2.2.1.5 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

อัตราการเกิดไบโอดีเซลจะแปรผันโดยตรงกับเวลา ถ้าหากเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นก็จะทำให้ได้ปริมาณเอสเทอร์มากขึ้นเช่นกัน และอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอย่างมาก อย่างไรก็ตามหากเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาให้เพียงพอ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใต้อุณหภูมิห้อง แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิใกล้เคียงกับจุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ เช่น หากแอลกอฮอล์ที่ใช้ คือ เมทานอล อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันประมาณ

60-70 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศ โดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Meher *et al.*, 2004; Agarwal, 2006)

2.2.1.6 การกวนผสม

การกวนผสมเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมาก สำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน เพราะน้ำมันหรือไขมันที่นำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลนั้นไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับแอลกอฮอล์ และตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงต้องมีการกวนผสมเพื่อให้เนื้อสารสัมผัสกันมากขึ้น เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันและได้เป็นไบโอดีเซล (Meher *et al.*, 2004)

2.3 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (EC 3.1.1.3 : glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลายพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ มักเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมันที่ยาวเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในลักษณะอิมัลชันที่ไม่ได้อยู่ในรูปโมโนเมอร์ แต่มีเอนไซม์ไลเปสบางชนิดที่สามารถสลายโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสเข้าทำปฏิกิริยาเมื่อโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์อยู่ในรูปของ oil-water interface (Robert, 1997; Fogarty, 1983; Macrae, 1983) และจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเปสพบว่า บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์มีสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ทำหน้าที่เป็นฝาปิดตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับซับสเตรตได้ โดยสายโพลีเปปไทด์นี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่ และขดตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (α -helical lid) โดยฝาปิดนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากกรดอะมิโนอีก 2 ชนิด ได้แก่ ฮิสทีดีน (histidine) และกรดแอสพาทิก (aspartic acid) ที่เป็นตัวช่วยในการทำงานของกรดอะมิโนเซอรีนที่เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ (Balcao *et al.*, 1996)

2.3.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Jaeger *et al.*, 1994) และมีการนำเอนไซม์ไลเปสบางชนิดไปทำให้บริสุทธิ์ และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมกระดาษ และการผลิตเครื่องสำอาง (Rubin and Dennis, 1997; Kazlauskas and Bornscheuer, 1998) โดยในทางปฏิบัติเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

2.3.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสัตว์พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อสัตว์และอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้ หัวใจ กล้ามเนื้อ และสมอง นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ไลเปสในน้ำนม สัตว์ (Wong, 1995) ไลเปสจากตับอ่อนมี 2 รูปแบบ คือไลเปส-เอ และไลเปส-บี โดยระบบเอนไซม์ไลเปสในตับอ่อนยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 8,000 ดาลตัน ซึ่งทำหน้าที่ช่วยเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ (Shahami, 1975)

2.3.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืช พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อพืช ผัก ผลไม้ และในเมล็ดพืช โดยเอนไซม์ไลเปสจากพืชที่พบส่วนใหญ่จะพบในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโอ๊ต รำข้าว เมล็ดปาล์ม เมล็ดยางพารา ถั่วเหลือง ข้าวสาลี และเมล็ดละหุ่ง เป็นต้น (Kaur *et al.*, 1993; Wong, 1995; Shahami, 1975)

2.3.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์สามารถทำได้ง่าย และเจริญเติบโตได้เร็วกว่าพืชและสัตว์ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไม่ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ ประหยัดพื้นที่ในการผลิต ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยง รวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่ได้สูงกว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น และเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันอีกด้วย เช่น *Bacillus sp.*, *Rhizopus oryzae* และ *Cryptococcus sp. S-2* (Hiol *et al.*, 2000) จะผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง *Chromobacterium sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 และ *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Frost and Moss, 1987; Dharmsthiti *et al.*, 1998) ผลิตไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง *R. chinensis* และ *Aspergillus nidulans* (Mayordomo *et al.*, 2000) ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด และ *Humicola lanuginosa* ผลิตไลเปสที่ทนความร้อน (Liu *et al.*, 2013) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้หลายชนิดที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น *B. thermocatenulatus* จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 2 ชนิด ได้แก่ ไลเปส BTL-1 มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ 7.0-8.0 และไลเปส BTL-2 มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ 8.0-9.0 (Schmidt-dannert *et al.*, 1996) และจากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสได้ต่างชนิดกันทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ (กิตติเดช, 2532) โดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ปริมาณมาก คือ แบคทีเรียแกรมลบ และชนิดที่สำคัญที่สุดคือ *Pseudomonas sp.* โดยเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเอนไซม์ไลเปสกลุ่มอื่น คือ มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (Gilbert, 1993; Pramanik *et al.*, 2018)

2.3.2 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์บริเวณโมเลกุลของส่วนที่ไม่ละลายน้ำและส่วนที่ละลายน้ำ โดยเอนไซม์ไลเปสจะเข้าไปเร่งการสลายพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันที่ไม่ละลายน้ำในตำแหน่งโมเลกุลที่ต่างกัน จากงานวิจัยของ Macrae (1983) ได้แบ่งเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

2.3.2.1 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ได้ผลผลิตเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล แต่อาจพบโมโนกลีเซอไรด์และไดกลีเซอไรด์เป็นสารประกอบในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของไลเปสกลุ่มนี้มาจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

2.3.2.2 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ชนิดนี้เมื่อย่อยโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ผลผลิต คือ กรดไขมัน 1,2(3)-diglyceride และ 2-mono-glyceride แต่โมเลกุลที่ได้ทั้ง 2 ชนิดไม่คงตัว หากบ่มไว้เป็นเวลานานจะเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-mono-glyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้มาจาก *A. niger*, *M. javanicus* และ *Rhizopus* sp.

2.3.2.3 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geotrichum candidum* สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ไม่ได้

จากงานวิจัยของ Yamane (1987) แบ่งเอนไซม์ไลเปสออกเป็น 2 กลุ่มเท่านั้น คือ กลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะบนตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ และกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1,3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ โดยให้ความเห็นว่า คำว่าเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันนั้นไม่ชัดเจน เนื่องจากเมื่อกล่าวถึงความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันจะกล่าวในรูปของอัตราเร็วที่ใช้ในการสลายไตรกลีเซอไรด์ (relative hydrolysis rate) ของไตรกลีเซอไรด์ 1 โมเลกุลกับจำนวนคาร์บอนที่อยู่ในรูปของกรดไขมัน คือ เอนไซม์ไลเปสยังคงสลายไตรกลีเซอไรด์ได้หลายชนิด แต่เวลาที่ใช้ในการสลายไตรกลีเซอไรด์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสไม่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันโดยแท้จริง เพราะฉะนั้นไลเปสจึงควรมี 2 กลุ่มเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เอนไซม์ไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้จะไม่ถูกแบ่งออกจากกัน

โดยเด็ดขาด เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่มีความจำเพาะบนตำแหน่ง 1,3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์นั้นจัดเป็นไลเปสในกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

2.3.3 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม จากงานวิจัยของ Macrae (1983) และ Yamane (1987) ได้แบ่งความจำเพาะของไลเปสออกเป็น 2 กลุ่ม ต่อมาปี 1997 ได้มีการแบ่งไลเปสจากสิ่งมีชีวิตออกเป็น 5 กลุ่ม (Villeneuve and Foglia, 1997) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสิ่งมีชีวิต

ความจำเพาะ	แหล่งที่มาของไลเปส
Substrate specific	
Monoacylglycerols	Rat adipose tissue
Mono-and diacylglycerols	<i>Penicillium camembertii</i>
Triacylglycerols	<i>Penicillium</i> sp.
Regiospecific	
1,3-Regioselective	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus arrhizus</i>
Sn-2-Regioselective	<i>Candida antarctica</i>
Nonspecific	<i>P. expansum</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Pseudomonas cepacia</i>
Fatty acylspecific	
Short-chain fatty acid (FA)	<i>P. roqueforti</i> <i>Premature infant gastric</i>
Cis-9 Unsaturated FA	<i>Geotrichum candidum</i>
Long-chain unsaturated FA	<i>Botrytis cinerea</i>
Stereospecific	
Sn-1 Stereospecific	<i>Humicola lanuginosa</i> <i>P. aeruginosa</i>
Sn-3 Stereospecific	<i>Fusarium solani cutinase</i> Rabbit gastric

ที่มา : Villeneuve and Foglia (1997)

2.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคือ ความเป็นกรดต่าง (pH) อุณหภูมิ และตัวทำละลายอินทรีย์ โดยแต่ละปัจจัยมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

2.3.4.1 ความเป็นกรดต่าง (pH)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะต่างกัน เช่น เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *B. subtilis* 168 และ *P. aeruginosa* EF2 (Lessuisse *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1991) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียทนร้อนมักเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางและค่อนข้างไปทางสภาวะที่เป็นด่าง ในส่วนความคงตัวต่อ pH ของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีความคงตัวต่อ pH ในช่วงที่กว้าง เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *P. putida* 3SK มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-10.0 (Lee and Rhee, 1993) เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. 398 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-11.0 (Kim *et al.*, 1994) เป็นต้น

2.3.4.2 อุณหภูมิ

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติในการทำงานและความคงตัวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus nidulans* จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 0-20 องศาเซลเซียส (Mayordomo *et al.*, 2000) เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากกว่าร้อยละ 96 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Iizumi *et al.*, 1990) เอนไซม์ไลเปสจาก *P. putida* 3SK จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 70 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Lee and Rhee, 1993) เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* MB5001 จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Chartrain *et al.*, 1993) เป็นต้น

2.3.4.3 ตัวทำละลายอินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไขมัน และน้ำมันได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์และการย้ายหมู่เอสเทอร์ได้รับความสนใจอย่างมากในอุตสาหกรรม (Mitsuhashi *et al.*, 2000) เนื่องจากสามารถสังเคราะห์โมเลกุลชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพตามที่ต้องการได้ การทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักลดความคงตัวของเอนไซม์ และทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (Klibanov, 2001) โดยตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น เมทานอล ทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* MB5001 (Chartrain *et al.*, 1993) มีความคงตัวลดลง นอกจากนี้

นี้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดสามารถเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น ไอโซออกเทนจะช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสจาก *R. oryzae* (Hiol *et al.*, 2000) แต่พบว่าไอโซออกเทนจะลดความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสจาก *P. putida* 3SK (Lee and Rhee, 1993) เป็นต้น

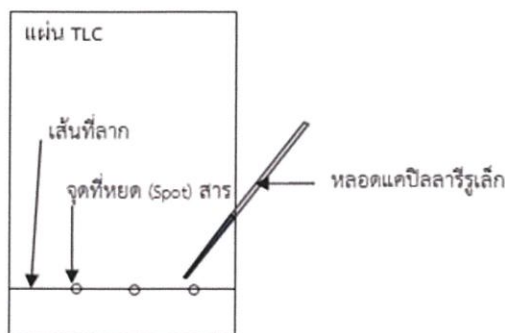
2.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างไบโอดีเซล

ปัจจุบันมีวิธีการแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีที่ทันสมัย เพื่อให้การแยกสารเกิดขึ้นได้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น โดยสารมีความคงสภาพอยู่และโครงสร้างเคมีไม่ถูกทำลาย ซึ่งมีขั้นตอนการแยกสารไม่ยุ่งยาก จึงทำให้ง่าย สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ดังนั้นก่อนทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ควรมีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารนั้น และเทคนิคเบื้องต้นทางโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อให้การแยกสารนั้นเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ (รามและผกาภาศ, 2555)

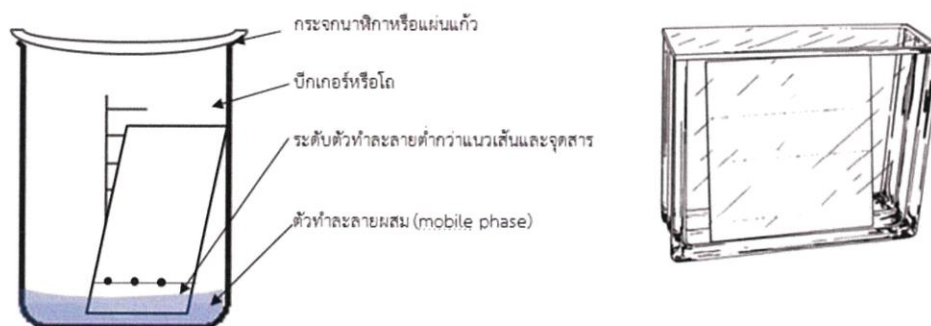
2.4.1 โครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากในปัจจุบันสำหรับการทำสารให้บริสุทธิ์และทำการแยกสารผสมออกจากกัน อีกทั้งยังสามารถระบุชนิดของสารอินทรีย์ และสารชีวเคมีได้ เช่น กรดอะมิโน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ซึ่งคำว่า โครมาโทกราฟี แปลว่า การแยกออกเป็นสี (the production of color scheme) เนื่องจากในปี ค.ศ. 1906 ชาเวร์สเซียชื่อ Tswett ซึ่งเป็นผู้เริ่มใช้เทคนิคนี้เป็นคนแรก โดยทำการแยกสารที่สกัดออกจากใบไม้ได้เป็นสีต่างๆ ในคอลัมน์ นอกจากจะใช้เทคนิคนี้ในการแยกสารที่มีสีได้แล้ว ยังสามารถแยกสารที่ไม่มีสีได้อีกด้วย (สายใจ และอาอีเซาะส์, 2559)

Thin Layer Chromotography (TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็ว ซึ่งนิยมใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสาร เพื่อใช้ในการยืนยันชนิดของสารและสามารถตรวจสอบหาองค์ประกอบในสารผสมนั้นได้อีกด้วย โดยใช้ตัวดูดซับเป็นของแข็งที่เป็นชั้นหรือเป็นฟิล์มบางๆ หนา 0.25-1 มิลลิเมตร ติดอยู่บนแผ่นกระจกแผ่นอลูมิเนียมหรือแผ่นพลาสติกบางๆ จากนั้นทำการจุด (spot) สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนตัวดูดซับที่ใกล้ปลายด้านหนึ่งของแผ่น โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 เมื่อตัวทำละลายระเหยไปแล้วสารจะติดอยู่บนตัวดูดซับ จากนั้นนำแผ่นไปใส่ในภาชนะที่มีตัวทำละลายชนิดหนึ่ง (อาจเป็นตัวทำละลายผสม) โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร ดังแสดงในรูปที่ 2.6 และทำการปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายจะซึมขึ้นมาข้างบนตามแนวตั้งผ่านจุดที่มีการจุดสารไว้ก่อนหน้า โดยสารต่างๆ เคลื่อนที่ไปตามตัวทำละลายด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตัวอย่างตัวทำละลายและตัวดูดซับ



รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการหยดสารลงบนแผ่น Thin Layer Chromatography
ที่มา : <https://elife-news.blogspot.com/2017/06/thin-layer-chromatography-tlc.html?m=1>



รูปที่ 2.6 แสดงวิธีการวางแผ่น Thin Layer Chromatography ในภาชนะตัวทำละลายเคลื่อนที่
และภาชนะแก้วหรือแท่ง สำหรับแช่แผ่น Thin Layer Chromatography
ที่มา : <https://elife-news.blogspot.com/2017/06/thin-layer-chromatography-tlc.html?m=1>

วิธีการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ในกรณีที่รังสีนี้ทำให้สารนั้นเรืองแสงได้) โดยเมื่อนำแผ่นไปส่องด้วยหลอดรังสียูวีของสารที่ทำการจุดไปบนแผ่นนั้นจะปรากฏขึ้น หรือเคลือบตัวดูดซับด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อนำแผ่นไปทำการมองภายใต้แสงยูวีในที่มืด สารประกอบฟลูออเรสเซนต์จะมีความสว่างเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำแผ่นที่มีการจุดสารไปใส่ในภาชนะปิดที่มีเกิลด์ไอโอดีน โดยสารประกอบอินทรีย์ส่วนมากจะเกิดสารเชิงซ้อนอย่างอ่อนที่ผันกลับได้ (reversible weak complex) กับไอโอดีน ซึ่งจะเห็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น เวลาที่ใช้อาจเป็น 5-10 วินาที หรืออาจนานถึง 10-15 นาที ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดกลืนไอโอดีนของสารแต่ละชนิด

การบอกตำแหน่งจุดขององค์ประกอบแต่ละชนิด นิยมใช้ค่า Retardation factor (R_f) ซึ่งเป็นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration) ขององค์ประกอบชนิดนั้นเทียบกับวัฏภาคเคลื่อนที่หรืออาจคำนวณได้ดังสมการ

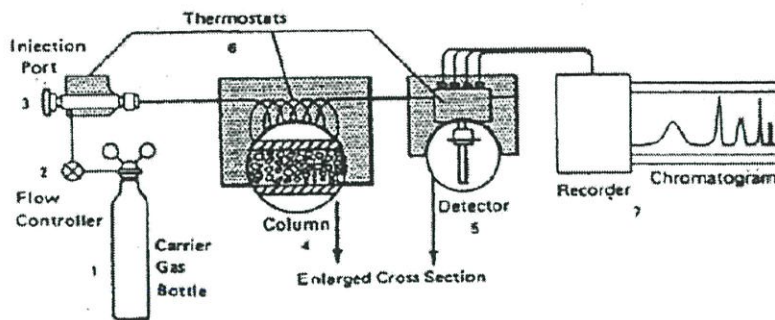
$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

2.4.1.1 ประโยชน์ของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromotography มีดังนี้

- 1) ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยการเปรียบเทียบค่า Retardation factor ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารตัวเดียวกัน ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบผลขั้นต้นที่รวดเร็วกว่าวิธีอื่น
- 2) ใช้ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยา โดยหาค่า Retardation factor ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์เมื่อเวลาผ่านไปสารตั้งต้นมีปริมาณน้อยลง แต่ผลิตภัณฑ์มีมากขึ้น โดยสามารถใช้เทคนิค Thin Layer Chromotography ตรวจสอบระยะเวลาของปฏิกิริยาตั้งแต่เกิดขึ้นจนปฏิกิริยาเสร็จสิ้น
- 3) ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่าง เนื่องจากเวลาที่สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ยอมให้จุดเพียงจุดเดียวบนแผ่น Thin Layer Chromotography ในทุกระบบตัวทำละลาย
- 4) ใช้หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.4.2 แก๊สโครมาโทกราฟี

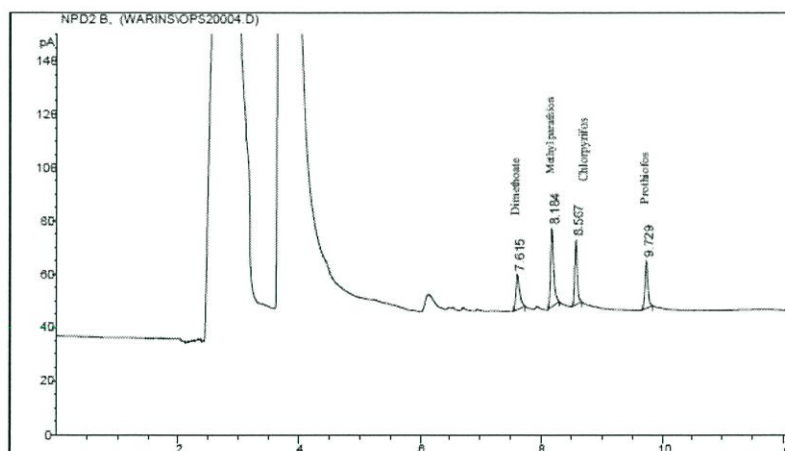
แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) เป็นเทคนิคของการวิเคราะห์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนได้ และยังให้ผลที่เที่ยงตรงอีกด้วย แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคสำหรับการแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยตัวอย่างจะกลายเป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง จากนั้นไอของสารละลายจะผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (Stationary phase) อาศัยการพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) หรือแก๊สตัวพา (Carrier gas) โดยองค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ๆ ต่างกัน จะแยกออกจากกันในเวลาที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์สารตัวอย่างเริ่มจากการฉีดสารตัวอย่างเข้าที่อินเจคเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ให้ความร้อนแก่สารตัวอย่างจนกลายเป็นไอ และสารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์โดยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารตัวอย่างจะแยกออกจากเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ จากนั้นส่วนตรวจวัดจะทำการตรวจวัดสารและแสดงสัญญาณการวัดที่ได้ออกมาในรูปของโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.7 แสดงองค์ประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : file:///C:/Users/WINDOWS%207/Downloads/262380_app.pdf

ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีสามารถวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยในเชิงคุณภาพสามารถหาชนิดของสารได้จากการเปรียบเทียบกับค่า Retention time คือ เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ นับจากเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์ถึงตำแหน่งเวลาที่ส่วนตรวจวัดอ่านค่าสัญญาณสูงสุดของพีคที่ได้จากโครมาโทแกรม ส่วนในเชิงปริมาณสามารถคำนวณปริมาณความเข้มข้นของสารได้จากการเปรียบเทียบพื้นที่หรือความสูงของพีคกับพีคของสารละลายมาตรฐาน



รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องบันทึกข้อมูลของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : file:///C:/Users/WINDOWS%207/Downloads/262380_app.pdf

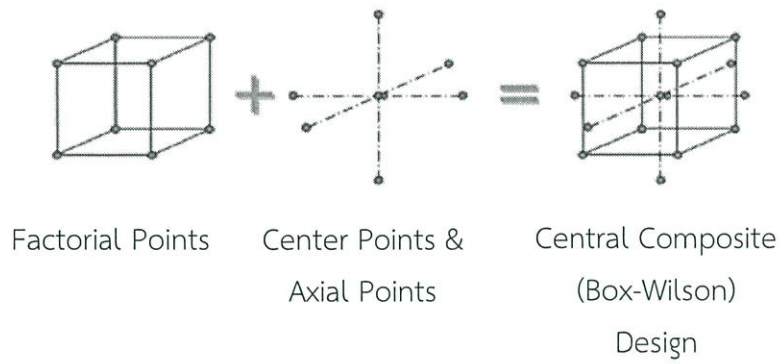
2.5 วิธีส่วนผสมกลาง (Central Composite Design)

วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) และหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Design, CCD) เป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้สำหรับการสร้างแบบจำลองเชิงประจักษ์ (empirical model) เพื่อนำไปสู่ข้อมูลที่ใช้ในการทดลองมาอธิบายอันตรกิริยา (interaction) ของตัวแปรต้นหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตาม (Cho and Zoh, 2007) ซึ่งดีกว่าการออกแบบโดยใช้วิธีดั้งเดิม (Full Factorial Design) เนื่องจากสามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกัน จึงสามารถช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้ อีกทั้งยังได้รับการยอมรับว่าเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาความเหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมเคมี เอนไซม์ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมาก จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล (Chen *et al.*, 2008)

การออกแบบการทดลองที่มีการใช้วิธีดั้งเดิม เมื่อต้องการศึกษาตัวแปร 3 ตัว จำนวนจำนวนหาสภาวะของการทดลอง ก็จะต้องใช้จำนวนสภาวะการทดลองคือ 3^3 เท่ากับ 27 สภาวะการทดลอง และหากต้องศึกษาตัวแปร 4 ตัว ต้องใช้ 3^4 เท่ากับ 81 สภาวะการทดลอง และหากศึกษา 5 ตัวแปร ต้องใช้ 3^5 เท่ากับ 234 สภาวะการทดลอง แนวทางดังกล่าวถือว่าไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองในอุตสาหกรรม ซึ่งมีทรัพยากรสำหรับใช้ในการออกแบบการทดลองค่อนข้างจำกัด จึงมีการใช้วิธีส่วนผสมกลางออกแบบการทดลอง สำหรับการศึกษาตัวแปรที่อาจมีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง แต่ใช้จำนวนสภาวะการทดลองไม่มากนัก เช่น ศึกษาตัวแปร 3 ตัวแปร ใช้เพียง 16 สภาวะการทดลอง ศึกษา 4 ตัวแปร ใช้เพียง 28 สภาวะการทดลอง และศึกษา 5 ตัวแปร ใช้เพียง 30 สภาวะการทดลอง จะเห็นได้ว่าใช้ทรัพยากรในการทดลองน้อยลงอย่างมาก

วิธีส่วนผสมกลาง (หรือ box-wilson design) เป็นการทดลองที่ 3 ระดับ (นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ -1, 0, +1) กล่าวคือ จะปรับตัวแปรที่ต้องการศึกษาไป ตัวแปรละ 3 ค่า แต่แทนที่จะปรับตัวแปรแบบ Full Combination หรือ Full Factorial กลับเลือกบางสภาวะการทดลองที่จำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ โดย Model ที่ได้จะยังคงมีทั้ง Main Effect, Interaction และ Quadratic Terms โดยใช้ทรัพยากรไม่มากจนเกินไป

ตัวอย่างของ Central Composite Design สำหรับการศึกษาตัวแปร 3 ตัว แสดงไว้ดังรูปที่ 2.9 และตารางที่ 2.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ Factorial Points ซึ่งในที่นี้เป็นการนำ 2-Level Full Factorial มาเป็นส่วนหนึ่งของการทดลองนั่นเอง ส่วนที่สอง Axial Points เป็นการปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในขณะที่กำหนดให้ค่าตัวแปรอื่นอยู่ที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) และส่วนสุดท้าย Center Points เป็นการปรับค่าของตัวแปรทุกตัวแปรที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) สำหรับ ตัวอย่างในตารางที่ 1 เลือกค่า Alpha เท่ากับ 1 หรือ ระยะจาก Axial Point ไปยัง Center Point เป็น 1 ซึ่งค่าดังกล่าวมักเหมาะสมในทางปฏิบัติ (บางครั้งเรียก design ที่ $\alpha = 1$ แบบนี้ว่า face centered design)



รูปที่ 2.9 วิธีส่วนผสมกลางที่มีตัวแปร 3 ตัวแปร
ที่มา : จรัล (2552)

ตารางที่ 2.3 การเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับ 3 Factors ที่ Alpha = 1

A	B	C	Point Type
-1	-1	-1	Factorial Point
1	-1	-1	Factorial Point
-1	1	-1	Factorial Point
1	1	-1	Factorial Point
-1	-1	1	Factorial Point
1	-1	1	Factorial Point
-1	1	1	Factorial Point
1	1	1	Factorial Point
-1	0	0	Axial Point
1	0	0	Axial Point
0	-1	0	Axial Point
0	1	0	Axial Point
0	0	-1	Axial Point
0	0	1	Axial Point
0	0	0	Central Point
0	0	0	Central Point

ที่มา : จรัล (2552)

2.6 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

การล้างไบโอดีเซลเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่จะลดปริมาณแอลกอฮอล์ลง นอกจากนี้การล้างไบโอดีเซลด้วยน้ำ ยังสามารถกำจัดสิ่งตกค้างสิ่งสกปรกอื่นๆ ทุกอย่างในไบโอดีเซลด้วย เช่น คราบไขมัน กลิเซอรินส่วนที่ยังแยกไม่หมด ตะกอน แอลกอฮอล์ที่หลงเหลืออยู่ เป็นต้น สามารถสังเกตได้ว่าถ้าหากทำการใส่ตัวเร่งปฏิกิริยามากเกินไป จะเกิดเห็นเป็น 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นของไบโอดีเซล ชั้นกลีเซอริน และชั้นของไขมันขุ่น ซึ่งอาจทำให้ปนเปื้อนในไบโอดีเซลด้วย ดังนั้นควรทำการกำจัดออกโดยการล้างด้วยน้ำอุ่น ซึ่งปริมาณน้ำอุ่นที่ใช้แต่ละครั้งประมาณ 1:4 ของปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ เมื่อทำการเติมน้ำจนเพียงพอ ทำการเขย่าเบาๆ รอให้น้ำแยกชั้นจากไบโอดีเซล (ประมาณ 5-10 นาที) จากนั้นทำการแยกไบโอดีเซลออกมาและทำการล้างแบบเดิมอีกประมาณสองครั้ง หลังจากทีล้างสิ่งปนเปื้อนออกหมดแล้ว ขั้นตอนสุดท้ายก็คือ การขจัดน้ำที่หลงเหลือ ซึ่งกระทำได้โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที และเมื่อตั้งไว้ให้เย็นก็สามารถนำไปเก็บเพื่อใช้งานต่อไป (กรมชลประทาน สำนักชลประทานที่ 17, 1999; ชาคริต และคณะ, 2545)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปส

ประด็นันท์ รัตมีพงศ์ (2559) ได้ทำการศึกษาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลังออกนอกเซลล์ได้จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 22 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลท มาทำการศึกษายืนยันโดยการใช้สารตั้งต้น tributyrin เป็นแหล่งคาร์บอนพบการสร้างวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทั้งสิ้น 7 ไอโซเลท ซึ่งแสดงถึงการหลั่งเอนไซม์ไลเปสออกนอกเซลล์ อันเกิดจากกิจกรรมการย่อย tributyrin และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *B. cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium miluonense*, *Pseudoxanthomonas* sp. และ *Staphylococcus* sp. ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่ามีรายงานวิจัยที่กล่าวถึงสายพันธุ์แบคทีเรียซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อที่คัดแยกได้ เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *P. fluorescens* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงที่ 55 องศาเซลเซียส (Kulkarni and Gadre, 2002)

Jin *et al.* (2012) พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis* และ *Burkholderia cepacia* สามารถผลิต alkaline thermotolerant lipase ได้ โดยแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงคือ สภาวะที่อยู่ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 50 และ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ยังสามารถทนทานต่อตัวทำละลายอินทรีย์ และสามารถทนต่อระดับ pH ที่สูงได้ (Li and Yan, 2010; Dalal *et al.*, 2008)

Rhati *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *B. cepacia* ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย *B. cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-55 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารที่มี pH เท่ากับ 7 และ 10 แต่พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ในอาหารที่มี pH เท่ากับ 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์มากกว่าที่อาหารที่มี pH เท่ากับ 10

2.7.2 การผลิตไบโอดีเซล

เดือนรัตน์ (2558) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้สาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็กเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตไบโอดีเซล ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตไฮโดรคาร์บอนของสาหร่าย โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองซึ่งเป็นกระบวนการทางสถิติที่ใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อตัวแปรตาม คือ ค่าตอบสนอง เนื่องจากการศึกษาที่ละปัจจัยใช้เวลานาน ดังนั้นการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง จะช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิจัยได้มาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อการผลิตไบโอดีเซลต่อไปในอนาคต

วุฒิชัย และคณะ (2557) พบว่าการวิเคราะห์ไบโอดีเซลด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography นี้เป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว และประหยัด อีกทั้งสามารถวิเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซลได้ทั้งในเชิงคุณภาพด้วยการเทียบค่า R_f ของน้ำมันไบโอดีเซลมาตรฐานและไบโอดีเซลตัวอย่าง โดยเทคนิคนี้นอกจากจะวิเคราะห์ร้อยละไบโอดีเซลทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณแล้วยังสามารถใช้ในการตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลได้ด้วย

พุดิพัฒน์ (2555) จากการวิจัยพบว่า การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนมอนต์มอริลโลไนต์ ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ มีค่าเท่ากับร้อยละ 88.88 และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ คือ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล คือ 1:4 และมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย (1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปร้อยละ 90 โดยน้ำหนักเทียบกับน้ำมันปาล์ม สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7 (1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสัมผัส 96 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 94.61

เบญจมาศ และคณะ (2552) เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาศึกษาคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. cepacia* สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดปาล์มดิกกับเอทานอลในสภาวะที่มีเฮกเซนเป็นตัวทำละลายได้ผลผลิตเอสเทอร์สูงสุด ในขณะที่ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *P. fluorescens* สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มใช้แล้วกับเอทานอลได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์สูงสุด ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลเดียวกัน

คือ *Pseudomonas* sp. เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันได้ดี ทั้งยังสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีเอทานอลเป็นสับสเตรทและมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

Chaudhry *et al.* (2017) ได้ทำการศึกษาปริมาณของน้ำมันที่ใช้แล้ว เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลโดยมีการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้วิธีพื้ที่ผิวตอบสนองในการหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย 4 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ปริมาณไลเปสที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และความเร็วรอบ ซึ่งสามารถนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาใช้คาดคะเนสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันร้อยละ 86 จากการนำน้ำมันที่ใช้แล้วมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 44.2 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเป็น 3.05:1 ปริมาณเอนไซม์ไลเปส 0.782 กรัม และความเร็วรอบ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Razack *et al.* (2016) ทำการศึกษาปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันที่ใช้แล้วโดยใช้ไลเปสที่ตรึงจากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้แก่ *Burkholderia cepacia* (MTCC 1617) และ *Bacillus subtilis* โดยปัจจัยที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาได้ปรับให้เหมาะสมโดยใช้เทคนิคพื้ผิวตอบสนอง ซึ่งออกแบบการทดลองโดยอาศัยหลักการออกแบบประสมกลาง สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลคือ ปริมาณเอนไซม์ 2 กรัม อัตราส่วนระหว่างน้ำมันกับเมทิลอะซิเตท 1:12 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลผลิตของไบโอดีเซลล์สูงสุด 93.61% ซึ่งเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ จึงทำให้การศึกษาคั้งนี้มีต้นทุนน้อยลง

Narwal and Gupta (2013) ได้ทำการศึกษานิตของแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าการใช้เอทานอลให้ผลผลิตไบโอดีเซลมากกว่าเมทานอล (Mittelbach 1990; Nelson *et al.* 1996; Abigor *et al.* 2000; Hsu *et al.* 2000) เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสทนต่อเอทานอลได้มากกว่าเมทานอล หรือเอนไซม์ไลเปสทำงานร่วมกับแอลกอฮอล์สายยาวได้ดีกว่าแอลกอฮอล์สายสั้น (Fukuda *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 1997; 1998) อย่างไรก็ตามเมทานอลยังคงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากการใช้เมทานอลทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำกว่า

Ebrahimi *et al.* (2012) ทำการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เช่น การนำตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และมีการเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงอื่นๆ และนำมาวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 5 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 45 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ซึ่งผลผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำปฏิกิริยาชั่วโมงที่ 8 (ร้อยละ 16) หลังจากนั้นผลผลิตไบโอดีเซลมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (น้อยกว่าร้อยละ 6) สำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างชั่วโมงที่ 24 ถึง ชั่วโมงที่ 72 ผลผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 ซึ่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับ ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาเป็นเวลานานควรลดอัตราการเปลี่ยนหมู่

เอสเทอร์ เนื่องจากอัตราการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นส่งผลให้ผลผลิตมีมากขึ้นและทำให้ปฏิกิริยาเกิดการย้อนกลับ และได้ทำการศึกษาส่วนอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 1:1 2:1 3:1 4:1 และ 5:1 โดยอัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำเท่ากับ 3:1 ให้ปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลได้มากที่สุดและปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันดำเนินไปได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่ออัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมันมากกว่า 4:1 ผลผลิตไบโอดีเซลลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีแอลกอฮอล์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาบางส่วนยังคงหลงเหลืออยู่ แอลกอฮอล์เหล่านี้อยู่ในรูปของละอองแล้วจะเข้าไปจับกับเอนไซม์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

Silva *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเอทานอล โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อน้ำมัน ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา อุณหภูมิ และเวลา ซึ่งได้นำหลักการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2^4 และเทคนิคพื้นที่ผิวตอบสนอง เพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการทดลองทั้งหมด 30 การทดลอง จากนั้นนำผลผลิตของเอทิลเอสเทอร์ที่ได้จากทั้งหมด 30 การทดลองมาหาสมการถดถอยเพื่อใช้ในการคาดคะเนผลผลิตของเอทิลเอสเทอร์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา คือ ที่สภาวะอุณหภูมิ 56.7 องศาเซลเซียส เวลา 80 นาที อัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อน้ำมัน 9:1 และความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา 1.3 โมลาร์

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 แบคทีเรีย *Burkholderia* sp.

3.1.1.1 รหัส BG2015

3.1.1.2 รหัส BG2018

3.1.2 แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp.

3.1.2.1 รหัส KS2002

3.1.2.2 รหัส KS3005

3.1.2.3 รหัส SN2006

3.1.2.4 รหัส SS1003

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Basal medium

3.2.2 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.2.4 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สาร Ammonium sulphate

3.3.2 สาร Bovine serum albumin

3.3.3 สาร Gum Arabic

3.3.4 สาร Iodine crystal

3.3.5 สาร Isopropanol

3.3.6 สาร p-Nitrophenol

3.3.7 สาร p-Nitrophenyl palmitrate

3.3.8 สาร Triton X-100

3.3.9 สารละลาย Acetic acid

3.3.10 สารละลาย Ethyl acetate

3.3.11 สารละลาย Folin-ciocalteu reagent

3.3.12 สารละลาย Hexane

3.3.13 สารละลาย Propanol

- 3.3.14 สารละลาย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.6)
- 3.3.15 สารละลาย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8)
- 3.3.16 น้ำมันปาล์ม
- 3.3.16 น้ำมันไบโอดีเซลมาตรฐานจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา
- 3.3.17 แอลกอฮอล์ร้อยละ 70
- 3.3.18 แอลกอฮอล์ร้อยละ 95

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 จานเพาะเชื้อ
- 3.4.2 หลอดทดลอง
- 3.4.3 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
- 3.4.4 ปีกเกอร์ขนาด 50 250 600 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.5 กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.6 ขวดปรับปริมาตรขนาด 5 10 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.7 หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.4.8 ขวดดูดแรนขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.4.9 ปิเปตแก้วขนาด 0.1 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.4.10 ไมโครปิเปตขนาด 2-20 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.4.11 ปิเปตทิปขนาด 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.4.12 ขวดเก็บสาร ขนาด 1.5 มิลลิตร
- 3.4.13 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- 3.4.14 96-Well Microplate
- 3.4.15 ขวดสีชา
- 3.4.16 จุกยาง

3.5 เครื่องมือ

- 3.5.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น High-pressure sterilizer ES-315
- 3.5.2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น HICLAVE HVE-50
- 3.5.3 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น V4-T
- 3.5.4 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น 120-BS
- 3.5.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อ รุ่น UN100
- 3.5.6 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า รุ่น 4230
- 3.5.7 ตู้บลมร้อน

- 3.5.8 เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น PG-803
- 3.5.9 เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TE2145
- 3.5.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Z326K
- 3.5.11 เครื่องเขย่าสารละลาย รุ่น Vortex-Genie 2
- 3.5.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1601
- 3.5.13 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครไทเทอร์เพลท รุ่น FLUOstar Omega
- 3.5.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง
- 3.5.15 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น GC-2014

3.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.6.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

การผลิตเอนไซม์ไลเปส มีการนำแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท จากการคัดแยกของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และจากการคัดแยกของ โชตินันท์ และคณะ (2557) ได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 นำไปถ่ายลงในอาหาร Tryptic soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับหัวเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 โดยใช้ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วถ่ายเชื้อปริมาตรร้อยละ 10 ลงในอาหาร Basal medium ที่ประกอบด้วย น้ำมันมะกอกร้อยละ 1 และทริปโตนร้อยละ 0.3 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (จารินี และคณะ, 2558) เมื่อครบเวลาทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

3.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric method

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ มีการเตรียมสารละลาย A โดยซั่ง p-Nitrophenyl palmitate ปริมาตร 30 มิลลิกรัม ละลายใน Isopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย B โดยซั่ง Gum Arabic ปริมาตร 100 มิลลิกรัม และ Triton X-100 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl Buffer (pH 8.0) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 10:90 เข้าด้วยกัน จะได้ Substrate solution ทำการผสมตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับ Substrate solution ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ให้เข้ากันและหยดลงใน Microplate well ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (Selvakumar and Sivashamugam, 2017) จากนั้นนำมาคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ ดังสมการ (Chakraborty *et al.*, 2014)

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{p-NP (ไมโครโมล) จากกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ระยะเวลาบ่ม} \times \text{ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรม}}$$

กำหนดให้ 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ของเอนไซม์ไลเปส คือ ปริมาตรเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็น p-Nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

3.6.3 การทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

3.6.3.1 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.6.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บสารละลายส่วนใสและส่วนตะกอน นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตต่อที่ความอิ่มตัวร้อยละ 30-80 จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บส่วนตะกอน (Kukreja and Bera, 2004) โดยนำส่วนตะกอนที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 และร้อยละ 30-80 ละลายด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (pH 7.6) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร (Vishwe and Chowdhary, 2013) ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารละลายที่ได้

3.6.3.2 การแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส

นำถุงไดอะไลซิสที่มีความยาว 12 เซนติเมตร แช่น้ำเพื่อให้ถุงเซลไดอะไลซิสแยกออกจากกัน และใช้เส้นด้ายมัดปิดปากถุง แล้วนำสารละลายที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตใส่ลงในถุงไดอะไลซิส แล้วมัดปากถุงด้วยเส้นด้าย นำไปแช่ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (pH 7.6) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer (pH 7.6) ในชั่วโมงที่ 4 เมื่อครบ 8 ชั่วโมงทำการเก็บสารละลายเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีน จากนั้นนำมาคำนวณหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด ดังสมการ (Iheme *et al.*, 2017; Bisswanger, 2014)

$$\text{ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)} = \frac{\text{กิจกรรมจำเพาะของแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์บริสุทธิ์}}{\text{กิจกรรมจำเพาะของ Crude enzyme}}$$

กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต) = กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) × ปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน มีการเตรียมสารละลาย A โดยผสมสารโซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย B โดยผสมสารคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ร้อยละ 0.5 และสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย C โดยผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 50:1 ทำการเจือจางสารละลาย Folin-ciocalteu reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ผสมตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 200 ไมโครลิตรและสารละลาย C ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดเติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ที่เจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากนั้นนำมาคำนวณหากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ ดังสมการ (Iheme *et al.*, 2017)

$$\text{กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)}}$$

3.6.5 การทดสอบการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลางในการออกแบบการทดลอง

การผลิตไบโอดีเซลมีการนำเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ของแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้หลักการออกแบบส่วนผสมกลาง ด้วยโปรแกรม Design-Expert version 7.0.0 ทำการศึกษาตัวแปร 3 ตัวแปร คือ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างเมทานอล ต่อน้ำมัน และอุณหภูมิ อ้างอิงค่าที่ใช้ในการทดลองจาก โชติรส และคณะ (2559) ปฏิบัติการดำเนินไป ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยกำหนดค่าของตัวแปร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และสภาวะที่ใช้ในการทดลองทั้ง 20 การทดลอง จะแสดงดังในตารางที่ 3.2

3.6.6 การล้างไบโอดีเซล

การล้างไบโอดีเซลโดยใช้น้ำสะอาดอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร ร้อยละ 10 ใส่ลงในไบโอดีเซลที่ผลิตได้เพื่อล้างตัวเร่งปฏิกิริยาออก เขย่าเบาๆ ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 4 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นสีของไบโอดีเซลชั้นบนสุดอ่อนลงกว่าก่อนการล้าง และเกิดไขสบู่ขึ้นเหนือชั้นน้ำ ทำการดูดไบโอดีเซลชั้นบนสุด จากนั้นนำมาล้างซ้ำด้วยวิธีการแบบเดิม ประมาณสองครั้ง ทำให้ไบโอดีเซลที่ได้ใสขึ้น วัดค่า pH ของไบโอดีเซล ให้มีค่าเท่ากับ 7 (สำนักชลประทานที่ 17 กรมชลประทาน, 2542) แล้วนำไปตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin layer Chromatography (TLC)

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรต่างๆ และค่าที่ใช้ในการทดลอง

Factor	Name	Units	Low Actual	high Actual	Low coded	high coded	Mean
A	อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	35.00	55.00	-1.00	1.00	45.00
B	ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วน	ร้อยละ	20.00	50.00	-1.00	1.00	35.00
C	ระหว่าง เมทานอลต่อ น้ำมัน	โมลต่อโมล	2.00	4.00	-1.00	1.00	3.00

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในแต่ละการทดลอง

การทดลอง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ)	อัตราส่วนระหว่างเมทานอล ต่อน้ำมัน
1	35.00	50.00	2.00
2	28.18	35.00	3.00
3	35.00	20.00	4.00
4	45.00	35.00	3.00
5	55.00	50.00	2.00
6	55.00	20.00	2.00
7	35.00	20.00	2.00
8	45.00	60.00	3.00
9	61.82	35.00	3.00
10	55.00	20.00	4.00
11	35.00	50.00	4.00
12	55.00	50.00	4.00
13	45.00	35.00	1.32
14	45.00	35.00	4.68
15	45.00	9.77	3.00

3.6.7 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography

ทำการวิเคราะห์โดยเตรียมตัวทำละลายโดยผสมสารละลาย Hexane:Ethyl acetate:Acetic acid ในอัตราส่วน 90:10:1 ใส่ลงในแท่งครอให้สารละลายอิมิตัว (Kuepethkaew *et al.*, 2017) ตัดแผ่น TLC (Silica gel) เป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 7×10 เซนติเมตร โดยมีระยะห่าง

จากขอบล่าง (Origin line) 1 เซนติเมตร และระยะห่างจากขอบบน (Solvent front line) 0.5 เซนติเมตร ทำการจุดไปโอติเซลมาตรฐานในเลนที่ 1 น้ำมันปาล์มในเลนที่ 2 และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในเลนถัดไปบนเส้นของจุดเริ่มต้น นำแผ่น TLC ใส่ลงในแทงค์ที่มีตัวทำละลายอิ่มตัว จากนั้นรอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่บนแผ่น TLC จนถึงจุด Solvent front และนำแผ่น TLC ออกอ่านผลโดยการนำ TCL ที่แห้งสนิทมาฉายด้วยรังสียูวีและระเหยด้วยเกลือไอโอดีนรอจนเกิดสีเหลืองของสารที่เคลื่อนที่ (วุฒิชัย และคณะ, 2557)

3.6.8 การตรวจหาปริมาณไปโอติเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างไปโอติเซลที่ได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยผสมตัวอย่างไปโอติเซล และสารละลายโพรพานอลในอัตราส่วน 1:1 ตั้งค่าสภาวะระบบโดยใช้คอลัมน์แบบ DB-Wax ขนาด 30 m×0.25 mm เครื่องตรวจวัด (Detector) แบบ Flame Ionization Detector (FID) อุณหภูมิเข้าทางท่อ (Inlet temperature) 250 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีดตัวอย่าง (Injector volume) 1 ไมโครลิตร Split ratio เท่ากับ 100 ใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็นแก๊สตัวพา (Carrier gas) ความดันของหัวปั๊ม (Head pressure) 53 กิโลปาสคาล อุณหภูมิของเครื่องตัวตรวจวัด (Detector temperature) 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตู้อบ (Oven temperature) เริ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสคงที่ที่อุณหภูมินี้เป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิครั้งสุดท้ายเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่อุณหภูมินี้เป็นระยะเวลา 18 นาที เครื่องตรวจวัดแก๊ส (Detector gases) ควบคุมโดยใช้อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจนเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 450 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของแก๊สฮีเลียมเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อนาที (David *et al.*, 2005) จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณร้อยละไปโอติเซล ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละไปโอติเซล} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง}-\text{พื้นที่ใต้กราฟของน้ำมันปาล์ม})}{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของไปโอติเซลมาตรฐาน}-\text{พื้นที่ใต้กราฟของน้ำมันปาล์ม})} \times 100$$

3.6.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

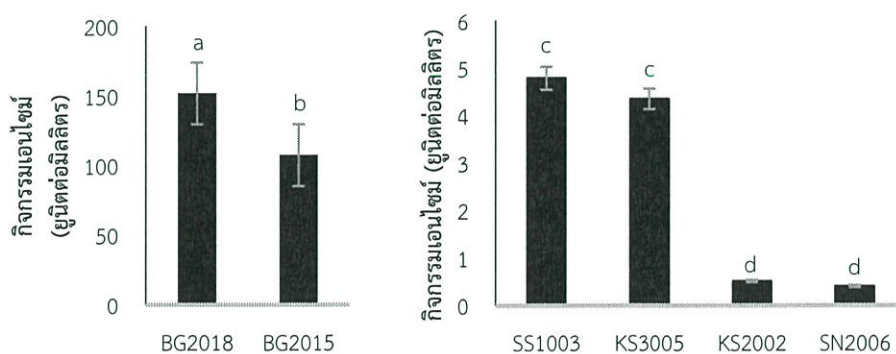
ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยใช้ โปรแกรม IBM SPSS Statistics base 23.0.0 และทำการวิเคราะห์ค่าปริมาณร้อยละไปโอติเซลโดยใช้ โปรแกรม Design expert 7.0.0 เพื่อวิเคราะห์สมการถดถอย และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 ในอาหาร Basal medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี Colorimetric method พบว่าแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 SS1003 KS3005 KS2002 และ SN2006 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 151.93 ± 1.01 107.53 ± 1.62 4.79 ± 0.18 4.35 ± 0.09 0.51 ± 0.01 และ 0.40 ± 0.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูป 4.1 แสดงให้เห็นว่า สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. สามารถผลิต เอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Feng *et al.* (2012) และ Kulkarni and Gradre (2002) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. HL-10 และ *Pseudomonas fluorescens* NS2W ตามลำดับ โดยเลี้ยงแบคทีเรีย ในอาหาร Basal medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็น เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียดังกล่าวมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 122.3 และ 69.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2018 และ BG2015 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส SS1003 KS3005 KS2002 และ SN2006
หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$, $n = 3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$)

4.2 ผลการทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส

จากการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. จากสภาวะที่แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 30-80 และทำการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส พบว่า เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 SS1003 KS2002 และ SN2006 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น $1,242.1 \pm 91.26$ 496.81 ± 15.62 20.24 ± 0.00 15.68 ± 0.05 1.53 ± 0.05 และ 1.43 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.13 5.96 4.28 1.87 2.09 และ 1.59 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp. เพิ่มขึ้นหลังจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส

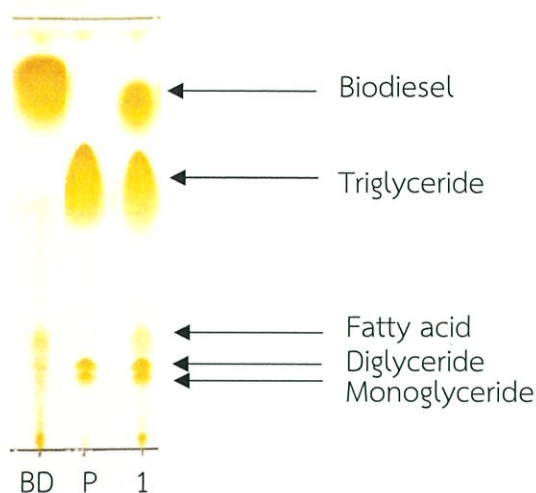
จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2009) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* LP08 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 30-70 แล้วแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *B. cepacia* LP08 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 2.46 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เป็น 8.20 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.33 เท่า และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prita *et al.* (2009) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* SRT 9 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 30-90 แล้วแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส จากนั้นนำมาวัดค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียดังกล่าวมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 125.59 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เป็น 2,618.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 20.8 เท่า

4.3 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังสภาวะที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง โดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography พบว่า ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองประกอบไปด้วย ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ และกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลท

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (ยูนิต)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
BG2015	Crude Enzyme	107.53±1.62 ^c	1.29±0.02	83.36±1.26	4,301.20±64.80	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	191.37±12.74 ^b	1.05±0.04	182.25±12.13	7,654.80±509.60	2.18
	Dialysis	327.90±10.31 ^a	0.66±0.00	496.81±15.62	13,116.00±412.40	5.96
BG2018	Crude Enzyme	151.93±1.01 ^c	0.75±0.01	202.57±1.35	6,077.20±40.40	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	210.90±4.63 ^b	0.27±0.01	430.41±9.45	8,436.00±185.20	2.12
	Dialysis	335.39±3.04 ^a	0.49±0.01	1,242.1±91.26	13,415.60±121.60	6.13
KS2002	Crude Enzyme	0.51±0.01 ^c	0.70±0.00	0.73±0.02	20.40±0.40	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.55±0.06 ^b	0.41±0.01	1.34±0.15	22.00±2.40	1.84
	Dialysis	0.61±0.02 ^a	0.40±0.00	1.53±0.05	24.40±0.80	2.09
KS3005	Crude Enzyme	4.35±0.09 ^c	0.92±0.01	4.73±0.10	174.00±3.60	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.48±0.54 ^b	0.59±0.01	7.59±0.92	179.20±21.60	1.60
	Dialysis	6.68±0.00 ^a	0.33±0.02	20.24±0.00	267.20±0.00	4.28
SN2006	Crude Enzyme	0.40±0.02 ^c	0.44±0.01	0.90±0.05	16.00±0.80	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.55±0.00 ^b	0.44±0.01	1.00±0.00	22.00±0.00	1.11
	Dialysis	0.61±0.03 ^a	0.43±0.00	1.43±0.06	24.53±1.01	1.59
SS1003	Crude Enzyme	4.79±0.18 ^c	0.57±0.00	8.40±0.32	191.60±7.20	1.00
	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.01±0.06 ^b	0.41±0.01	14.66±0.15	240.40±2.40	1.75
	Dialysis	6.27±0.02 ^a	0.40±0.02	15.68±0.05	250.80±0.80	1.87



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography ของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม (1) ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง

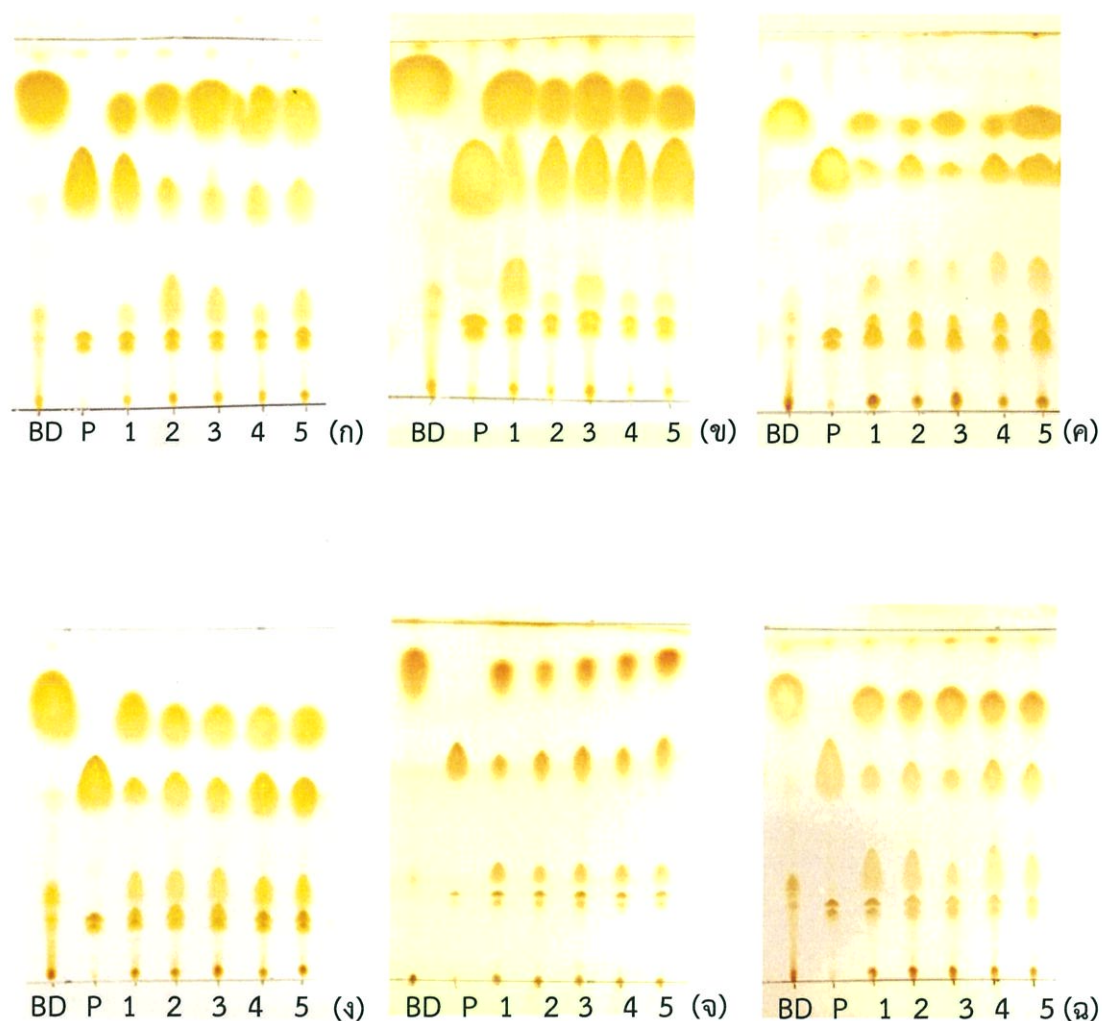
จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 30-80 และทำการแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะไลซิส จากแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะทั้งหมด 15 การทดลอง (ตารางที่ 3.2) พบองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตไบโอดีเซลดังแสดงในรูปที่ 4.3 4.4 4.5 และ 4.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้ง 15 การทดลอง สามารถผลิตไบโอดีเซลได้อย่างไรก็ตามจากการสังเกตแถบแบนด์ของไบโอดีเซลและไตรกลีเซอไรด์ พบว่า ที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้มากที่สุด

จากสภาวะดังกล่าว พบว่า ผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้แถบแบนด์ของผลผลิตไบโอดีเซลมีขนาดใหญ่ และแถบแบนด์ของไตรกลีเซอไรด์มีขนาดเล็กกว่าการใช้เอนไซม์ของแบคทีเรียรหัส KS2002 SN2006 และ SS1003 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 SS1003 KS2002 และ SN2006 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ $1,242.1 \pm 91.26$ 496.81 ± 15.62 20.24 ± 0.00 15.68 ± 0.05 1.53 ± 0.05 และ 1.43 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

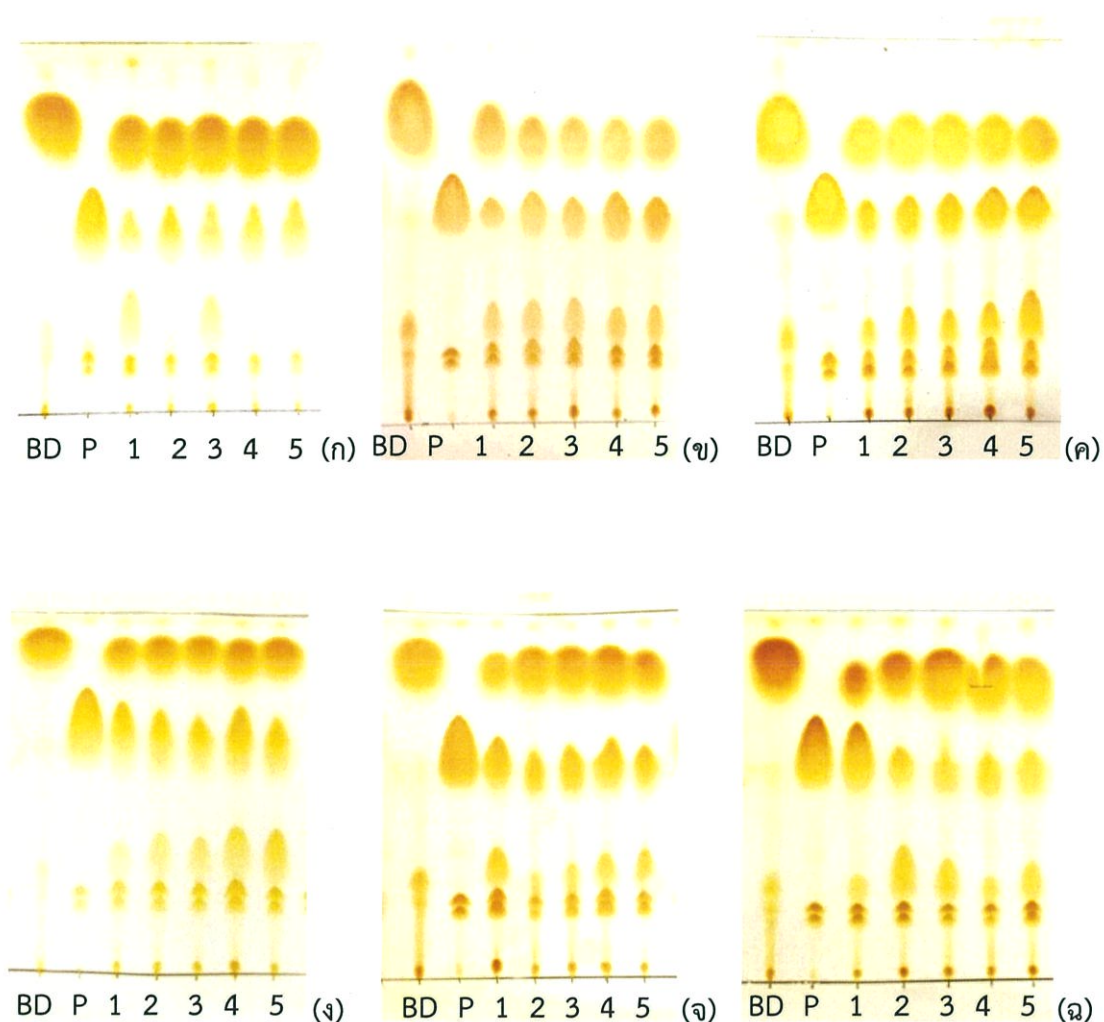
นอกจากนี้จากการตรวจสอบปริมาณน้ำมันของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสถานะที่ได้จากการออกแบบการทดลอง พบว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีปริมาณมากกว่า 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งเพียงพอสำหรับการนำไปตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ในขณะที่ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้จากใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส KS2002 SN2006 และ SS1003 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในสถานะที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 พบปริมาณน้ำมันน้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร และพบไขสบู่ในปริมาณมาก เนื่องจากเมทานอลที่ใช้ทำปฏิกิริยามีปริมาณน้อย แต่เอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีปริมาณมากและในเอนไซม์มีน้ำผสมอยู่ ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Freedman *et al.* (1986) ได้ศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับแอลกอฮอล์ พบว่า การเติมน้ำเข้าไปสามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดการผันกลับเนื่องจากน้ำจะเข้าไปสลายพันธะเอสเทอร์ของผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ ทำให้เกิดการสร้างสบู่แทนการสร้างเมทิลเอสเทอร์ ส่งผลให้เมทิลเอสเทอร์มีปริมาณลดลง ดังนั้นจึงทำการเลือกผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไปตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

4.4 การตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีโดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103

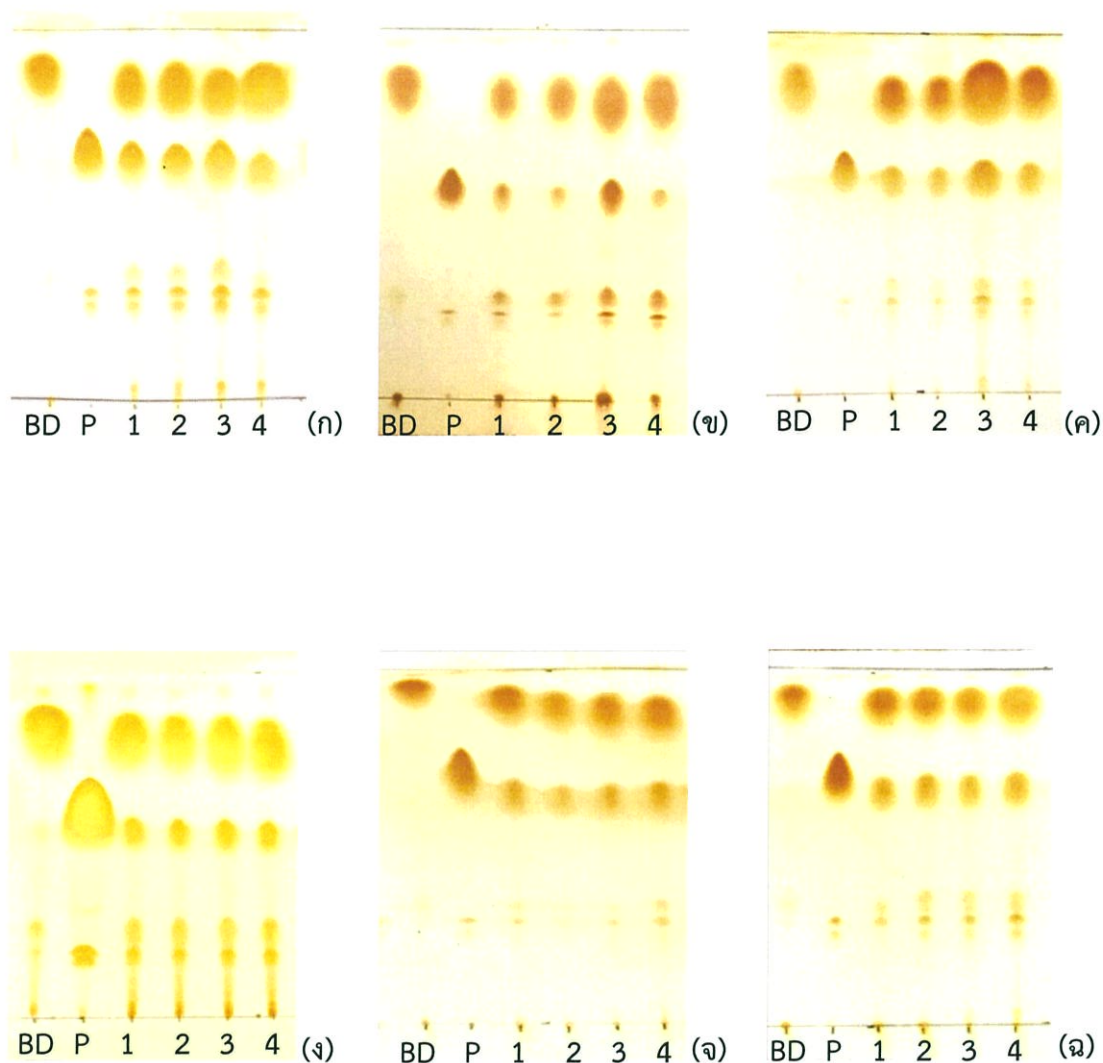
จากการตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ผลิตในสถานะที่ได้จากการออกแบบการทดลอง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า ที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามากที่สุดเท่ากับร้อยละ 82.11 86.63 และ 65.78 ตามลำดับ รองลงมาคือ ที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ให้ผลผลิตไบโอดีเซลเท่ากับร้อยละ 83.3 79.47 และ 60.94 ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 และที่สภาวะอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 60 อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ให้ผลผลิตไบโอดีเซลลดลงตามลำดับ ดังนี้ ร้อยละ 77.91 76.63 58.94, 74.16 71.24 58.68 และ 69.87 67.81 56.06



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography ของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม และผลผลิตไบโอดีเซลที่สภาวะ (1) อุณหภูมิ 28.18 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 และอัตราส่วนระหว่าง เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 (2) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 และ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 (3) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ ร้อยละ 20 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 (4) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 (5) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 (ก) BG2018 (ข) และ *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 (ค) KS3005 (ง) SN2006 (จ) SS1003 (ฉ)



รูปที่ 4.4 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography ของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม และผลผลิตไบโอดีเซลที่สภาวะ (1) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 9.7 และอัตราส่วนระหว่าง เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 (2) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 และ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 1.32:1 (3) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณ เอนไซม์ร้อยละ 35 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4.68:1 (4) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 (5) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 60 และอัตราส่วนระหว่าง เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 (ก) BG2018 (ข) และ *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 (ค) KS3005 (ง) SN2006 (จ) SS1003 (ฉ)



รูปที่ 4.5 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography ของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม และผลผลิตไบโอดีเซลที่สภาวะ (1) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 และอัตราส่วนระหว่าง เมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 (2) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 และ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 (3) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ ร้อยละ 50 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 (4) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 (ก) BG2018 (ข) และ *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 (ค) KS3005 (ง) SN2006 (จ) SS1003 (ฉ)



รูปที่ 4.6 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography ของ (BD) ไบโอดีเซลมาตรฐานสวนจิตรลดา (P) น้ำมันปาล์ม และผลผลิตไบโอดีเซลที่สภาวะ อุณหภูมิ 61.82 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 และอัตราส่วนระหว่าง เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส (1) BG2015 (2) BG2018 และ *Pseudomonas* sp. รหัส (3) KS2002 (4) KS3005 (5) SN2006 (6) SS1003

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ผกผันตามอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน กล่าวคือ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเอนไซม์ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น สังเกตได้จากที่อุณหภูมิ 28.18 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณไบโอดีเซลมีค่าน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 45 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Chartrain *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 พบว่า เอนไซม์ไลเปสของ *P. aeruginosa* MB5001 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อป้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นถึง 61.82 องศาเซลเซียส พบปริมาณไบโอดีเซลน้อยที่สุด เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 55 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสเสียสภาพและไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงเกิดไบโอดีเซลในปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prita *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไลเปส โดยเอนไซม์ไลเปสทำงานได้ดี และมีความเสถียรที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ pH 6.9 แต่เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 55 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

เมื่อพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์ พบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shah *et al.* (2004) ได้ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่ส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม โดยปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่

10 50 75 และ 100 มิลลิกรัม พบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ดีที่สุดสำหรับเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 50 และ 70 มิลลิกรัม แต่เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 100 มิลลิกรัม ปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลมีค่าลดลง เนื่องจากการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป สารละลายจะมีความหนืดมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการทำปฏิกิริยาลดลง

หากพิจารณาจากอัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน พบว่า การเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.68:1 ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลลดลง เนื่องจากเมทานอลจะทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* MB5001 *P. fluorescens* Strain 2D *M. hiemalis* f. *hiemalis* และ *Rhizopus oryzae* (Chartrain et al., 1993; Makhzoum et al., 1996) มีความคงตัวลดลง

อย่างไรก็ตามจากการหาปริมาณไบโอดีเซลในสถานะที่ได้จากการออกแบบการทดลองโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบปริมาณไบโอดีเซลเท่ากับร้อยละ 86.63 82.11 และ 65.78 ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 335.39 ± 10.31 327.90 ± 10.31 และ 6.68 ± 0.00 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณไบโอดีเซลที่ได้มีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีความแตกต่างกันมาก อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 และ BG2015 มีคุณสมบัติความคงตัวต่อปัจจัยที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (อุณหภูมิและเมทานอล) น้อยกว่าเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส KS3005 โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโนบนโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปส รวมไปถึงความแตกต่างในการเรียงตัวของกรดอะมิโนเซอร์อินฮิสทีดีน และกรดแอสพาทิก ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Balcao et al., 1996) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sánchez et. al. (2017) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *B. cepacia* พบว่า เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *B. cepacia* ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 320 ตัวเรียงต่อกันเป็นสายโพลีเปปไทด์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 33 กิโลดาลตัน และบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบกรดอะมิโนเซอร์อินฮิสทีดีน และกรดแอสพาทิก ที่ตำแหน่ง 87 286 และ 264 ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Jaeger et. al. (1993) ที่ได้ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* พบว่า เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียดังกล่าวประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 285 ตัวเรียงต่อกันเป็นสายโพลีเปปไทด์ และมีน้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตัน โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบกรดอะมิโนเซอร์อินฮิสทีดีน และกรดแอสพาทิก ที่ตำแหน่ง 82 229 และ 251 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณไบโอดีเซลที่สภาวะต่างๆ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ

การทดลอง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ)	อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน	ปริมาณไบโอดีเซล (ร้อยละ)		
				BG2015	BG2018	KS3005
1	55.00	50.00	2.00	76.63	77.91	58.94
2	35.00	50.00	4.00	45.10	52.81	35.56
3	45.00	35.00	3.00	56.16	66.78	53.63
4	45.00	35.00	4.68	33.68	42.95	32.00
5	35.00	50.00	2.00	43.21	52.65	35.43
6	55.00	20.00	4.00	79.47	83.3	60.94
7	28.18	35.00	3.00	29.56	33.75	19.82
8	45.00	9.70	3.00	53.24	58.33	52.45
9	35.00	20.00	2.00	41.92	52.07	34.35
10	35.00	20.00	4.00	42.73	47.84	35.27
11	45.00	60.00	3.00	67.81	69.87	56.06
12	55.00	50.00	4.00	82.11	86.63	65.78
13	45.00	35.00	1.32	36.77	45.4	32.37
14	61.82	35.00	3.00	2.61	7.70	1.59
15	55.00	20.00	2.00	71.24	74.16	58.68

4.5 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยและค่าความแปรปรวน (ANOVA)

จากการตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบปริมาณไบโอดีเซล ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน และคาดคะเนปริมาณร้อยละไบโอดีเซลจากสมการถดถอย โดยใช้โปรแกรม Design expert 7.0.0 เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยจากปริมาณร้อยละไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้สมการดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละไบโอดีเซล} = & -96.5554 + 7.3844A - 2.3420B + 2.8944C \\ & + 0.0036AB + 0.1376AC - 0.0139BC \\ & - 0.0806A^2 + 0.0343B^2 - 1.2966C^2 \end{aligned}$$

กำหนดให้ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) B คือ ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ) C คือ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน และเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า Model ของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีค่า F เท่ากับ 0.38 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ค่า P value Prob > F เท่ากับ 0.90 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 จึงส่งผลให้ปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ในแต่ละสภาวะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และ Lack of fit มีค่า P value Prob > F น้อยกว่า 0.0001 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทดลองและการคาดคะเนจากสมการถดถอยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำให้ไม่สามารถใช้สมการถดถอยในการคาดคะเนปริมาณไบโอดีเซลได้

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยจากปริมาณร้อยละไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้สมการดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละไบโอดีเซล} = & -108.4897 + 8.4779A - 1.7405B - 3.7861C \\ & + 0.0013AB + 0.2741AC - 0.0331BC \\ & - 0.0979A^2 + 0.0249B^2 - 1.499C^2 \end{aligned}$$

กำหนดให้ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) B คือ ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ) C คือ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน วิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4.4 พบว่า Model ของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า มีค่า F เท่ากับ 0.38 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ค่า P value Prob > F เท่ากับ 0.90 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 จึงส่งผลให้ปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ในแต่ละสภาวะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และ Lack of fit มีค่า P value Prob > F น้อยกว่า 0.0001 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทดลองและการคาดคะเนจากสมการถดถอยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำให้ไม่สามารถใช้สมการถดถอยในการคาดคะเนปริมาณไบโอดีเซลได้

และเมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยจากปริมาณร้อยละไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้สมการดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละไบโอดีเซล} = & -161.1697 + 9.3640A - 1.7826B + 11.0954C \\ & + 0.0031AB + 0.1006AC - 0.0316BC \\ & - 0.1027A^2 + 0.0230B^2 - 2.6719C^2 \end{aligned}$$

กำหนดให้ A คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) B คือ ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ) C คือ อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน และเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจากตารางที่ 4.5 พบว่า Model ของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่า มีค่า F เท่ากับ 0.65 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ค่า P value Prob > F เท่ากับ 0.73 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 จึงส่งผลให้ปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ในแต่ละสภาวะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ และ Lack of fit มีค่า P value Prob > F น้อยกว่า 0.0001 แสดงให้เห็นว่าค่าที่ได้จากการทดลองและการคาดคะเนจากสมการถดถอยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำให้ไม่สามารถใช้สมการถดถอยในการคาดคะเนปริมาณไบโอดีเซลได้

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยและความแปรปรวนของผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2015 BG2018 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ไม่สามารถใช้สมการถดถอยในการคาดคะเนปริมาณไบโอดีเซลได้ เนื่องจากการกำหนดระยะห่างของค่าที่ใช้ในแต่ละปัจจัยที่ได้ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีส่วนประสมกลางไม่เหมาะสมกับการทดลอง เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่า P value Prob > F ของ Lack of fit จึงทำให้มีค่าน้อยกว่า 0.0001 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสมการถดถอยที่ได้นั้นไม่เหมาะสมสำหรับการคาดคะเนปริมาณไบโอดีเซล

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อยืนยันว่าสามารถใช้สมการถดถอยในการคาดคะเนหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้จากงานวิจัยของ Razack and Duraiarasan (2015) ได้ศึกษาปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันที่ใช้แล้วโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปของแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *B. cepacia* ออกแบบการทดลองด้วยเทคนิคพินที่ผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง โดยมีปัจจัยที่ใช้ในการออกแบบการทดลองได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนระหว่างเมทิลอะซิเตรทกับน้ำมัน อุณหภูมิ และเวลา จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ พบว่า Model มีค่า P value Prob > F น้อยกว่า 0.0001 ส่งผลให้ปริมาณไบโอดีเซลที่ได้ในแต่ละสภาวะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และ Lack of fit มีค่า P value Prob > F เท่ากับ 19.08 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าปริมาณไบโอดีเซลในแต่ละสภาวะที่ได้จากการทดลองและที่ได้จากการคาดคะเนโดยใช้สมการถดถอยมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ กล่าวคือ ค่าที่ได้กำหนดในแต่ละปัจจัยมีความเหมาะสมกับการทดลอง ทำให้สามารถใช้สมการถดถอยในการคาดคะเนหาปริมาณไบโอดีเซลได้

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	2727.3430	9.0000	303.0381	0.3795	0.9021
A - อุณหภูมิ	608.5722	1.0000	608.5722	0.7621	0.4226
B - ปริมาณเอนไซม์	101.8840	1.0000	101.884	0.1275	0.7355
C - อัตราส่วนเมทานอลต่อ					
น้ำมัน	9.2068	1.0000	9.206894	0.0115	0.9187
AB	2.3871	1.0000	2.387112	0.0029	0.9585
AC	15.1525	1.0000	15.15251	0.0189	0.8958
BC	0.3486	1.0000	0.348612	0.0004	0.9841
A ²	394.3924	1.0000	394.3924	0.4939	0.5135
B ²	357.7315	1.0000	357.7315	0.4480	0.5329
C ²	10.1966	1.0000	10.19664	0.0127	0.9144
Residual	3992.4910	10.0000	399.2491		
Lack of Fit	4006.454	5.0000	801.2907	170.3621	<0.0001
Pure Error	23.5173	5.0000	4.7034		
Cor Total	6719.8340	14.0000			

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	2453.6270	9.0000	272.6252	0.383125	0.9000
A - อุณหภูมิ	388.2776	1.0000	388.2776	0.545654	0.4933
B - ปริมาณ เอนไซม์	79.3566	1.0000	79.3566	0.111521	0.7520
C - อัตราส่วนเม ทานอลต่อน้ำมัน	6.8464	1.0000	6.8464	0.009621	0.9257
AB	0.2926	1.0000	0.2926	0.0004	0.9846
AC	60.1156	1.0000	60.1156	0.0844	0.7830
BC	1.9701	1.0000	1.9701	0.0027	0.9601
A ²	581.4389	1.0000	581.4389	0.8171	0.4075
B ²	188.7277	1.0000	188.7277	0.2652	0.6285
C ²	13.6458	1.0000	13.6458	0.0191	0.8953
Residual	3557.9110	10.0000	355.7911		
Lack of Fit	3573.9050	5.0000	714.7810	129.5638	<0.0001
Pure Error	27.5841	5.0000	5.5168		
Cor Total	6011.537	14.0000			

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Pseudomonas sp.* รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	2376.7110	9.0000	264.0790	0.6483	0.7307
A - อุณหภูมิ	390.9655	1.0000	390.9655	0.9598	0.3722
B - ปริมาณเอนไซม์	12.9745	1.0000	12.9745	0.0318	0.8654
C - อัตราส่วนเมทานอล ต่อน้ำมัน	6.6470	1.0000	6.6470	0.0163	0.9033
AB	1.7391	1.0000	1.7391	0.0042	0.9504
AC	8.1003	1.0000	8.1003	0.0198	0.8934
BC	1.7955	1.0000	1.7955	0.0044	0.9496
A ²	639.2835	1.0000	639.2835	1.5695	0.2657
B ²	161.2992	1.0000	161.2992	0.3960	0.5568
C ²	43.3018	1.0000	43.3018	0.1063	0.7576
Residual	2036.5640	10.0000	203.6564		
Lack of Fit	2049.2070	5.0000	409.8413	139.0454	< 0.0001
Pure Error	14.7376	5.0000	2.9475		
Cor Total	4413.2760	14.0000			

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003 พบว่าหลังจากการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-30 และ 30-80 ตามลำดับ และทำการแยกสารโดยวิธีโคอะไลซิส เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 KS3005 SS1003 KS2002 และ SN2006 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 335.39 ± 3.04 327.90 ± 10.31 6.68 ± 0.00 6.27 ± 0.02 0.61 ± 0.02 และ 0.61 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสภาวะที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการออกแบบส่วนผสมกลาง โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography ในการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี พบว่า ไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองประกอบด้วย ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน ไคโลสเตอรอล และโมโนกลีเซอไรด์ จากสภาวะทั้ง 15 การทดลองสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ โดยสภาวะที่ผลิตไบโอดีเซลได้เหมาะสมที่สุด คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 และการใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่เพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส KS2002 SN2006 และ SS1003

จากการตรวจหาปริมาณไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยดัดแปลงมาจากวิธี EN14103 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ ที่สภาวะอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนโดยมวลระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 86.63 82.11 และ 65.78 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยและค่าความแปรปรวนจากการตรวจหาปริมาณร้อยละไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส BG2018 BG2015 และ KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ไม่สามารถนำสมการถดถอยมาใช้ในการคาดคะเนปริมาณไบโอดีเซลที่อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการกำหนดระยะห่างของค่าที่ใช้ในแต่ละปัจจัยที่ได้ทำการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีส่วนผสมกลางไม่เหมาะสมกับการทดลอง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์ไลเปสให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (ยูนิต) ของเอนไซม์ไลเปสให้มีค่ามากขึ้น เพื่อเพิ่มอัตราการเกิดไบโอดีเซล นอกจากนี้กำจัดน้ำออกจากขั้นตอนการแยกสารผ่านเยื่อไดอะไลซิสให้ได้มากที่สุด เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ปฏิกิริยาผันกลับ

5.2.2 ควรศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อเพิ่มความคงทนต่อเมทานอล เนื่องจากการเพิ่มอัตราส่วนเมทานอลจะส่งผลให้เอนไซม์อิสระเสียสภาพได้ง่าย

5.2.3 ควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน เช่น ชนิดของแอลกอฮอล์ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น

5.2.4 ควรมีการกำหนดค่าของปัจจัยต่างๆ ที่ทำการศึกษาให้มีระยะห่างน้อยลง เนื่องจากการใช้โปรแกรม Design Expert 7.0.0 ในการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล พบว่าค่า Model ที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และค่า Lack of fit แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่งผลให้ไม่สามารถนำสมการถดถอยมาคาดคะเนหาปริมาณไบโอดีเซลได้

เอกสารอ้างอิง

- กิตติเดช สุวรรณชัย, 2532. “การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกตนธ์นิภา วันชัย. 2552. “การแปลงซิติกาเอสปีเอ-15 เป็นซีโอไลต์ปีตาสำหรับการแตกตัวของขยะพลาสติกและน้ำมันดิบที่ได้จากพลาสติก.” วิทยาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาเคมี, บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จารินี โอริส, นิชนันท์ พรพิมล และดลนภา โอทอง. 2558. “การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล.” ปรินญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชาคริต ทองอุไร, สัญชัย กลิ่นพิกุล, ชิต ลีมวรพันธ์ และเสถียร วาณิชวิริยะ. 2545. รายงานการวิจัยเพื่อการแปรรูปน้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องจักรกลการเกษตร. คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- โชติรส พึ่งโพธิ์, ณัฐนิชา พึ่งสุข และมัลลิกา กลิ่นภู. 2559. “การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล.” ปรินญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- จรัล ทรัพย์เสรี. 2552. “การออกแบบการทดลอง ตอน Central Composite Design.”
- จิราวรรณ มลาไว้อย์ สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และปราณี พัฒนพิพิศไพศาล. 2555. “การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียขอบอนุกรมสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 14(2) : 71-77.
- เดือนรัตน์ ชลอุดมกุล. 2558. “การผลิตไบโอดีเซลโดยสาหร่ายน้ำจืดขนาดเล็ก.” สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เบญจมาศ เขียร์ศิลป์, อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และเกษรา ทองบริบูรณ์. 2552. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่มีความจำเพาะต่างกัน”. รายงานวิจัย คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปกรณ์ วินะยานุวัตติคุณ. 2554. “เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อการผลิตไบโอดีเซล”. *วารสารวิจัยพลังงาน*. 8(2) : 61-75.

- ประดินันท์ รัชมีพงศ์. 2559. “การคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม.” *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 11(1) : 37-45.
- พุดมิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์. 2555. “การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงบนมอนต์มอริลโลไนต์.” *ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (อุตสาหกรรมศึกษา)*. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ราม แยมแสงสังข์ และผกา มาศ เจริญพัฒนานนท์. 2555. “การสกัดพรีไบโอติกส์และสารประกอบฟีนอลิกส์จากเมล็ดขนุนในระดับโรงงานจำลอง.” *รายงานวิจัยภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*.
- วุดมิชัย รสชาติ, เทิดเกียรติ แก้วพวง, บุญญาวิทย์ อยู่สุข และวินิช พรหมอารักษ์. 2557. “การวิเคราะห์ไบโอดีเซลอย่างง่ายด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC)” ใน การประชุมสัมมนาเชิงวิชาการ รูปแบบพลังงานทดแทนสู่ชุมชนแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 1. นครราชสีมา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สายใจ แก้วอ่อน และอาอีเซาะส์ เบ็ญหาวัน. 2559. “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดดาหลา (*Etlingera elatior* L.) ต่อแบคทีเรียก่อโรคในพืช.” *คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. เอกสารอัดสำเนา*.
- อาภาณี เหลืองนฤมิตรชัย. 2549. “ไบโอดีเซล.” *บทความเทคโนโลยีและนวัตกรรม*. วิทยาลัยปิโตรเลียมและ ปิโตรเคมี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Agarwal, A.K. 2006. “Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines.” *Progress in Energy and Combustion Science*. 919-925
- Ali, C.H., Qureshi, A.S., Liu, J.-F., Yang, S.-H., Gu, J.-D. and Mu, B.-Z. 2015. “Significant enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH1 lipase production using response surface methodology and analysis of its hydrolysis capability.” *Journal of the Taiwan institute of chemical engineers*. 52(2017) : 7-13.
- Austrian Biofuels Institute. 2002. “The development of biodiesel in Germany.” 10-13. In Bockey, D. and Prankl, H. **Biodiesel a Success Story**. Vienna : UFOP
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P.N., Mehrotra R. 2010. “Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62(2010) : 9-14.
- Balcao, V.M., Paiva, A.L. and Malcata, X.F. 1996. “Bioreactors with immobilize lipases: state of art.” *Enzyme and Microbial Technology*. 18(1996) : 392-416.
- Bisswanger, H. 2014. “Enzyme assays.” *Perspectives in science*. 1(2014) : 41-55.

- Chakraborty, A. and Mahajan, A. 2014. "Cellulase Activity Enhancement of bacteria Isolated From Oil-Pump Soil Using Substrate and Medium Optimization." *American Journal of Microbiological Research*. 2(2) : 52-56.
- Chartrain, M., Katz, L., Marcin, C., Thien, M., Smith, S., Fisher, E., Goklen, K., Salmon, P., Brix, T., Price, K. and Greasham, R. 1993. "Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB5001". *Enzyme and Microbial Technology*. 15(7) : 575-580.
- Chaudhry, H. A., Qureshi, A. S., Mbadanga, S. M., Liu J.-F., Yang, S.-Z. and Mu B.-Z. 2017. "Biodiesel production from waste cooking oil using onsite produced purified lipase from *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH-1: Central composite design approach." *Renewable Energy*. 109(2017) : 93-100
- Chen, X., Du, W. and Liu, D. 2008. "Response surface optimization of biocatalytic biodiesel production with acid oil." *Biochemical Engineering Journal*. 40(2008) : 423-429.
- Cho, I.-H. and Zoh, K.-D. 2007. "Photocatalytic degradation of azo dye (Reactive Red 120) in TiO₂/UV system: Optimization and modeling using a response surface methodology (RSM) based on the central composite design." *Dyes and Pigments*. 75(2007) : 533-543
- Dalal, S., Singh, P.K., Raghava, S., Rawat, S. and Gupta, M.N. 2008. "Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609". *Biotechnol Appl Biochem*. 51(2008) : 23-31.
- David, F., Sandra, P. and Vicker, A. K. 2005. "Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Ester." *Food Analysis*. 1-12.
- Dharmsthiti, S. and Kuhasuntisuk, B. 1998. "Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment." *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 21(1998) : 75-80.
- Ebrahimi, S., Amini, G., Younesi, H., and Ghasem, D.N. "Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D." *International Dairy Journal*. 6(5) : 459-472.
- Fangrui, M. and Milford, H.A. 1999. "Biodiesel production". *Bioresource Technology*. 70(1999) : 1-15.
- Fogarty, M.F. 1983. "Protease". *In microbial enzyme and biotechnology*. 111-123.

- Freedman, B., Butterfield, R.O. and Pryde, E.H. 1986. "Transesterification Kinetics of Soybean DiP." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 63(10) : 1375-1380.
- Frost, M.G. and Moss, D.A. 1987. "Production of enzyme by fermentation." *In Biotechnology*. 7(1987) : 65-212.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. "Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*." 92(2001) : 405-416.
- Gilbert, E.J., Cornish, A. and Jones, C.W. 1991. "Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF 2." *Gen Microbiol*. 137(1991) : 2223-2229.
- Gilbert, E.J. 1993. "*Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning." *Enzyme and Microbial Technology*. 15(8) : 634-645.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. and Comeau, L.C. 2000. "Purification and characterization of extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit." *Enzyme and Microbial Technology*. 26(2000) : 421-430.
- Iheme, C.I., Ukairo, D.I., Ibegbulem, C.O., Okorom, O.O. and Chibundu K. 2017. "Analysis of Enzyme Activities on Domestic Waste Dump Sites." *Journal of Bioremediation & Biodegradation*. 8(2017) : 4.
- Iizumi, T., Nakamura, K. and Fukase, T. 1990. "Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56." *Agricultural and Biological Chemistry*. 54(1990) : 1253-1258.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Heuvel, M. and Misset, O. 1994. "Bacterial lipase." *FEMS Microbiology Reviews*. 15(1994) : 29-63.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Koch, H. B., Ferrato, F. and Dijkstra B. W. 1993. "Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Federation of European Biochemical Societies*. 332(1-2) : 143-9.
- Jin, D., Wang, Z., Cao, J. and Yu, L. 2012. "Purification and characterization of a novel coldadapted lipase from *Burkholderia anthina* NT15". *Microbiology*. 6(31) : 6075-6080.
- Kaur, J., Ramamurthy, V. and Kothari, R.M. 1993. "Characterization of oat lipase for lipolysis of rice bran oil." *Biotechnology*. 15(1993) : 257-262.

- Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T. 1998. "Biotransformation with lipases." *Biotechnology*. 8(1998) : 37-192.
- Kim, E.K., Song, M.H., Kim, H.M. and Oh, T.K. 1994. "Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 58(1994) : 961-962.
- Klibanov, A.M. 2001. "Improving Enzymes by Using Them in Organic Solvents." *Nature*. 409(2001) : 241-246.
- Kuepethkaew, S., Sangkharak, K., Benjakul, S. and Klomkiao, S. 2017. "Optimized synthesis of bioiesel using lipase from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas." *Renewable Energy*. 104(2017) : 139-147.
- Kukreja, V. and Bera, B.M. 2004. "Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2488: Partial purification, characterization and calcium dependent thermostability." *Indian Journal of Biotechnology*. 4(2004) : 222-226.
- Kulkarni, N. and Gadre, R.V. 2002. "Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28 (6) : 344-8.
- Lee, S.Y. and Rhee, J.S. 1993. "Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK." *Enzyme Microb Technol*. 15(1993) : 617-24
- Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. 1993. "Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme." *Biochem*. 216(1993) : 155-160.
- Li, Q. and Yan, Y. 2010. "Production of biodiesel catalysed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from Sapium sebiferum oil in micro-aqueous phase". *Applied Energy*. 87(10) : 3148-3154.
- Liu, Y., Li, C., Meng, X., and Yan, Y. 2013. "Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation." *Fuel Processing Technology*. 106(2013) : 303-309.
- Liu, Y., Li, C., Wang, S., and Chen, W. 2014. "Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics." *Applied Energy*. 113(2014) : 713-721.

- Lo, C.-F., Yu, C.-Y., Kuan, I.-C. and Lee, S.-L. 2012. "Optimization of Lipase Production by *Burkholderia* sp. Using Response Surface Methodology." *International Journal of Molecular Sciences*. 13(2012) : 14889-14897.
- Ma, F, and Hanna, M.A. 1999. "Biodiesel production: a review." *Bioresource Technology*. 70(1999) : 1-15.
- Macrae, A.R. 1983. "Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 60(2) : 291-292.
- Marchetti, J. M., Miguel, V.U. and Errazu, A.F. 2007. "Possible methods for biodiesel production." *Renewable and Sustainable Energy*. 11(2007) : 1300-1311.
- Mayordomo, I., Gil-Randez, F. and Prieto, J.A. 2000. "Isolation purification and characterization of a cold-active lipase of *Aspergillus nidulans*." *Agric Food Chem*. 48(2000) : 105-109.
- Meher, L.C., Sagar D. and Naik S.N. 2004. "Technical aspects of biodiesel production by Transesterification." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 10(2004) :1-21.
- Mitsuhashi, N., Takashi, M., Senbongi, H., Yokoi, N., Yano, H., Miyazaki, M., Nakajimai, N., Iwanaga, T., Yokoyama, Y., Shibata, T., and Seino, S. 2000. "MTABC3, a Novel Mitochondrial ATP-binding Cassette Protein Involved in Iron Homeostasis." *the Journal of biological chemistry*. 275(23) : 17536-17540.
- Narwal, S.K. and Gupta, R. 2013. "Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase." *Biotechnology*. 35(2013) : 479-490.
- Park, H., LEE, K.-S., Chi, Y.-M. and Jeon, S.-W. 2005. "Effects of Methanol on the Catalytic Properties of Porcine Pancreatic Lipase." *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15(2) : 296-301.
- Pramanik, K., Saren, S., Mitra, S., Ghosh, P.K. and Maiti, T.K. 2018. "Computational elucidation of phylogenetic, structural and functional characteristics of *Pseudomonas* Lipases." *Computational Biology and Chemistry*. 74(2018) : 190-200.
- Prita, S.B., Ragini, G., Srinivasa, B.R. and Khobragade, C.N. 2009. "Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9." *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(2) : 358-366.
- Ramsdhas, A.S., S. Jayaraj and C. Muraleecharan. 2005. "Biodiesel production from high FFA rubber seed oil." *Fuel*. 84(2005) : 335-340.

- Rathi, P., Saxena, R.K. and Gupta, R. 2001. "A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation." *Process Biochemistry*. 37(2) : 187-192.
- Razack, S.A. and Duraiarasan, S. 2016. "Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme." *Waste Management*. 47(2016) : 98-104.
- Robert, V. 1997. "Interfacial activation of lipase facts and artifacts." *Trends in Biotechnology*. 15(1997) : 32-38.
- Rubin, B. and Dennis, E.A. 1997. "Lipases: Enzyme characterization and utilization Methods in enzymology." *Academic Press*. 286(1997) : 1-563.
- Sánchez, D. A., Tonetto, G. M. and Ferreira, M. L. 2017. " *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions." *Biotechnology and Bioengineering*. 115(1) : 6-24.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H. and Schmi, R.D. 1996. "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties." *Biochimica et Biophysica Acta*. 1301(1996) : 105-114.
- Schuchardt, U., Serchelia, R. and Vargas R.M. 1998. "Transesterification of Vegetable Oils: a Review." *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 9(1) : 199-210.
- Selvakumar, P. and Sivashanmugam, P. 2017. "Optimization of lipase production from organic solid waste by anaerobic digestion and its application in biodiesel production." *Fuel Processing Technology*. 165(2017) : 1-8.
- Shah, S., Sharma, S., and Gupta, M.N. 2015. "Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of *Jatropha* Oil." *Energy and fuels*. 18(2014) : 154-159
- Shahami, K.M. 1975. "Lipase and esterases." *In Enzyme in Food*. 2(1975) : 181-217.
- Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnology Advances*. 19(2001) : 627-662.
- Silva, G.F., Camargo, F.L. and Ferreira, A.L.O. 2011. "Application of response surface methodology for optimization of bioiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol." *Fuel Processing Technology*. 92(2011) : 407-413.
- Villeneuve, P. and Foglia, A. 1997. "Specificity of *Carica papaya* latex in lipase-catalyzed interesterification reactions." *Biotechnology Techniques*. 11(1997) : 91-94.

- Vishwe, V. and Chowdhary, A. 2013. "Production and Immobilization of extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." *International of Science and Research*. 4(10) : 1479-1482.
- Wang, H.-K., Liu, R.-J., Lu, F.-P., Qi, W., Shao, J. and Ma, H.-J. 2009. " A novel alkaline and low temperature lipase of *Burkholderia cepacia* isolated from Bohai in China for detergent formulation." *Annals of Microbiology*. 59(1) : 105-110.
- Wong, D.W.S. 1995. "Structure and mechanism." *In Food Enzyme*. 13(1995) : 170-200.
- Yamane, T. 1987. "Enzyme technology for the lipids industry: engineering overview." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 64(1987) : 1657-1661.
- Yasuda, M., Ogino, H., Kiguchi, T., Kotani, T., Takakura, S., Ishibashi, T., Nakashima, T., Fukua, H. and Ishihawa, H. 1999. "Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cell." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88(1999) : 571-573.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Tryptone	17.0
Soytone	3.0
Glucose	2.5
Sodium Chloride	5.0
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5
Final pH (25°C)	7.3±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 30 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Tryptone	15.0
Soytone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	15.0
Final pH (25°C)	7.3±0.2

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมปริมาณ 30 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal medium)

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Tryptone	0.3% (w/v)
Yeast extract	1.0
Dipotassium phosphate	2.0
Potassium dihydrogen phosphate	1.0
Ammonium sulphate	1.0
Magnesium sulphate heptahydrate	0.2
Calcium chloride	0.15

สูตรอาหาร	กรัมต่อลิตร
Olive oil	1% (v/v)

ขั้นตอนการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนเพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากันจนหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลาย Tris-HCl Buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ละลาย Tris-Base ปริมาณ 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH ตามที่
ต้องการด้วยกรดไฮโดรคลอริก

ภาคผนวก ค

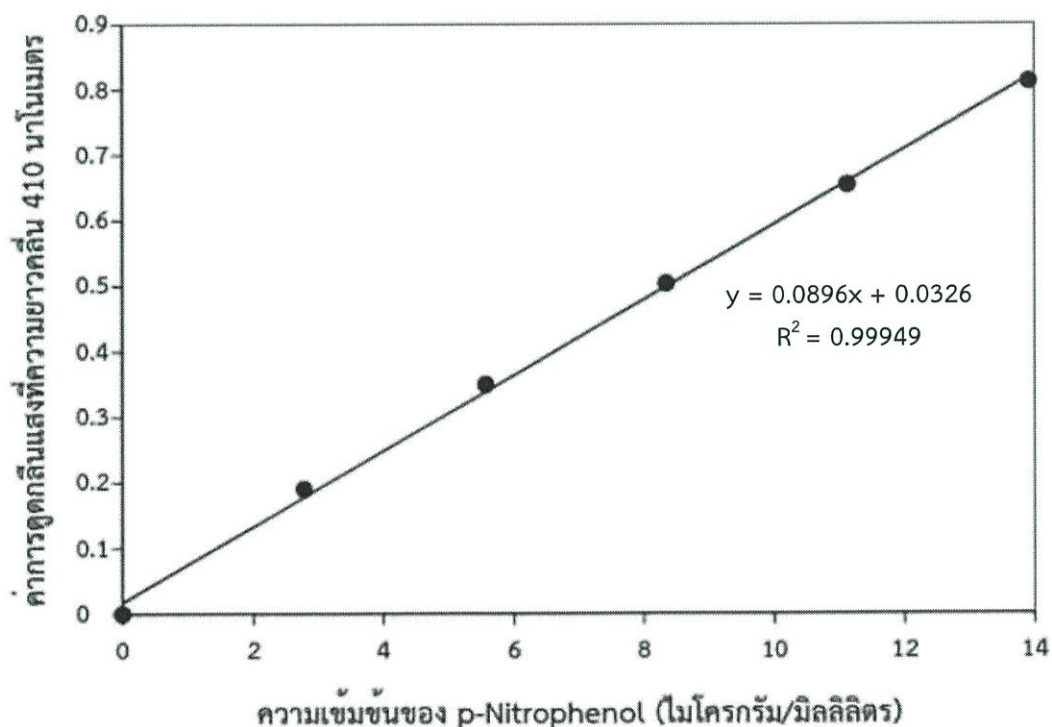
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐาน p-Nitrophenol

เตรียมสารละลาย p-Nitrophenol (p-NP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสารปริมาณ 0.014 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ ด้วย Tris-HCl (pH 8.0) ความเข้มข้น 50 mM ดังตารางที่ ค.1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

ตารางที่ ค.1 การเจือจาง p-Nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1mM p-NP (ไมโครลิตร)	50 mM Phosphate Buffer (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย p-NP (มิลลิโมลาร์)
0	2,000	0
40	1,960	0.02
80	1,920	0.04
120	1,880	0.06
160	1,840	0.08
200	1,800	0.10



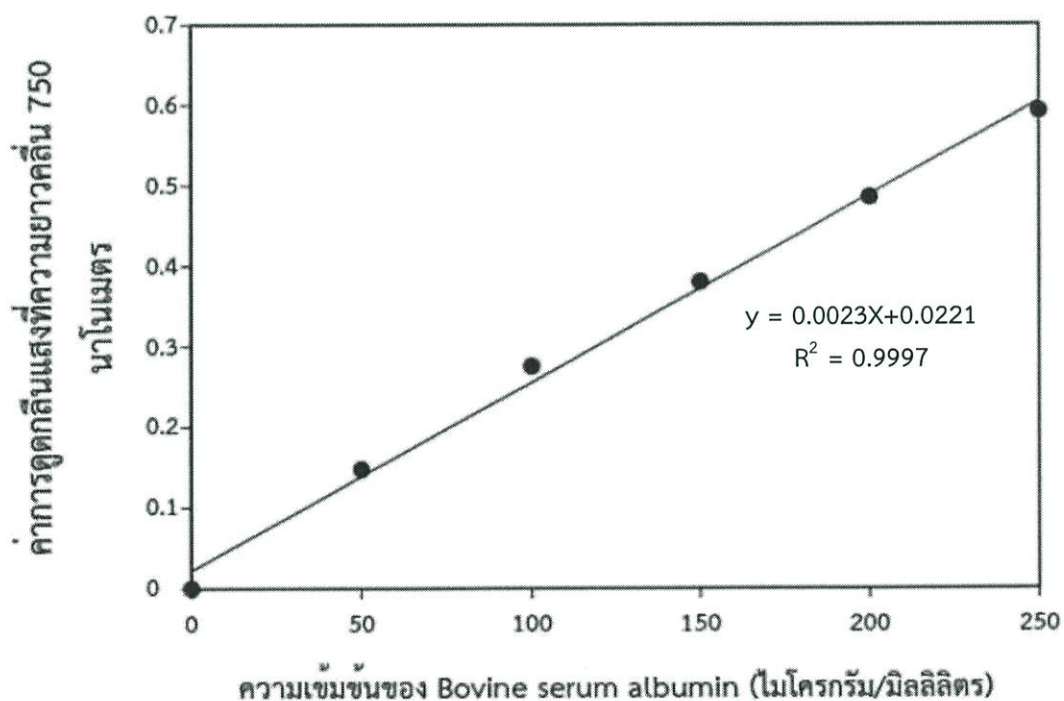
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของ p-Nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

2. กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ ค-2 จากนั้น ปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วจึงเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

ตารางที่ ค.2 การเจือจาง Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Stock BSA	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย BSA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
0	2,000	0
100	1,900	50
200	1,800	100
300	1,700	150
400	1,600	200
500	1,500	250



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง

ปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (เปอร์เซ็นต์การอิมิตัว) ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่เปอร์เซ็นต์การอิมิตัวต่างๆ ที่ 0 องศาเซลเซียส

ร้อยละ	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75
0	56	84	144	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516
5		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449
10			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415
15				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382
20					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348
25						19	30	62	94	127	162	198	235	273	315
30							12	43	74	107	142	177	214	252	292
35								31	63	94	129	164	200	238	278
40									31	63	97	132	168	205	245
45										32	65	99	134	171	210
50											33	66	101	137	176
55												33	67	103	141
60													34	69	105
65														34	70
70															35

ที่มา : Biovision (2004)

ภาคผนวก จ
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

ตารางที่ จ.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และ *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 KS3005 SN2006 และ SS1003

แบคทีเรีย	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
BG2015	5000	0.411	0.409	0.414	107.53±1.620 ^b
BG2018	5000	0.300	0.305	0.297	151.93±1.010 ^a
KS2002	10	0.567	0.570	0.587	0.51±0.010 ^d
KS3005	10	0.649	0.674	0.664	4.35±0.090 ^c
SN2006	10	0.689	0.716	0.718	0.40±0.020 ^d
SS1003	100	0.606	0.651	0.632	4.79±0.180 ^c

ภาคผนวก ฉ
ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ตารางที่ ฉ.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
BG2015	เอนไซม์หยาบ	5000 เท่า	0.411	0.409	0.414	0.410±0.035 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	5000 เท่า	0.473	0.528	0.528	0.509±0.268 ^b
	ไดอะไลซิส	5000 เท่า	0.821	0.870	0.859	0.850±0.190 ^a
BG2018	เอนไซม์หยาบ	5000 เท่า	0.300	0.305	0.297	0.301±0.037 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	5000 เท่า	0.545	0.565	0.557	0.555±0.060 ^b
	ไดอะไลซิส	5000 เท่า	0.874	0.860	0.872	0.868±0.077 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
KS2002	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.567	0.570	0.587	0.575±0.100 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	10 เท่า	0.624	0.626	0.614	0.624±0.055 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	10 เท่า	0.864	0.865	0.864	0.864±0.005 ^a
KS3005	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.649	0.674	0.664	0.663±0.130 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ	10 เท่า	0.800	0.670	0.670	0.713±0.645 ^b
	แอมโมเนียมซัลเฟต	100 เท่า	0.771	0.771	0.810	0.788±0.200 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
SN2006	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.689	0.716	0.718	0.708±0.148 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	10 เท่า	0.723	0.728	0.721	0.713±0.123 ^b
	ไดอะไลซิส	10 เท่า	0.833	0.833	0.746	0.793±0.494 ^a
SS1003	เอนไซม์หยาบ	100 เท่า	0.606	0.651	0.632	0.630±0.229 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	100 เท่า	0.786	0.773	0.786	0.781±0.065 ^b
	ไดอะไลซิส	10 เท่า	0.817	0.815	0.811	0.814±0.025 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ภาคผนวก ข
ข้อมูลดิบของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
BG2015	เอนไซม์หยาบ	10 เท่า	0.319	0.314	0.321	0.318±0.035 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	6 เท่า	0.438	0.409	0.427	0.425±0.150 ^b
	ไดอะไลซิส	5 เท่า	0.245	0.249	0.243	0.246±0.025 ^a
BG2018	เอนไซม์หยาบ	9 เท่า	0.214	0.210	0.214	0.212±0.020 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	2 เท่า	0.322	0.338	0.334	0.332±0.036 ^b
	ไดอะไลซิส	5 เท่า	0.324	0.332	0.325	0.324±0.010 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
KS2002	เอนไซม์หยาบ	4 เท่า	0.218	0.204	0.202	0.215±0.075 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	5 เท่า	0.439	0.447	0.446	0.444±0.040 ^b
	ไดอะไลซิส	5 เท่า	0.291	0.284	0.287	0.290±0.030 ^a
KS3005	เอนไซม์หยาบ	4 เท่า	0.257	0.261	0.254	0.258±0.040 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	4 เท่า	0.344	0.347	0.346	0.346±0.010 ^b
	ไดอะไลซิส	4 เท่า	0.253	0.255	0.251	0.253±0.020 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

แบคทีเรีย	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร				ค่าเฉลี่ย
		ระดับการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
SN2006	เอนไซม์หยาบ	5 เท่า	0.223	0.223	0.220	0.222±0.021 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	3 เท่า	0.317	0.362	0.319	0.332±0.157 ^b
	ไดอะไลซิส	4 เท่า	0.268	0.267	0.267	0.267±0.005 ^a
SS1003	เอนไซม์หยาบ	4 เท่า	0.248	0.260	0.242	0.250±0.055 ^c
	การตกตะกอนตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	3 เท่า	0.336	0.339	0.323	0.333±0.075 ^b
	ไดอะไลซิส	4 เท่า	0.284	0.284	0.284	0.284±0.000 ^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกัน คือ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$)

ภาคผนวก ซ
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ซ.1 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BG2015	3.000	107.534	1.621	0.936	103.507	111.561	106.060	109.270
BG2018	3.000	151.928	1.010	0.583	149.420	154.436	150.990	153.000
KS2002	3.000	0.505	0.0101	0.006	0.480	0.530	0.490	0.510
KS3005	3.000	4.349	0.087	0.05	4.134	4.564	4.290	0.450
SN2006	3.000	0.404	0.0367	0.021	0.407	0.447	0.430	0.400
SS1003	3.000	4.790	0.181	0.105	4.340	5.241	0.600	0.960
Total	18.000	44.944	63.1172	14.876	13.556	76.329	0.490	153.000

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	67704.890	5.000	13540.978	22022.093	0.000
Within Groups	7.379	12.000	0.615		
Total	67712.268	17.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
KS2002	3.000	0.505			
SN2006	3.000	0.404			
KS3005	3.000		4.349		
SS1003	3.000		4.790		
BG2015	3.000			107.534	
BG2018	3.000				151.927
Sig.		0.936	0.504	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

BG2015

Method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Crude enzyme	3.000		
Protien Precipitation	3.000	191.373	12.738	7.354	159.731	223.016	176.670	198.730
Dialysis	3.000	327.898	10.313	5.954	302.278	353.518	316.260	335.920
Total	9.000	223.731	80.389	26.796	161.940	285.526	150.990	335.920

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51160.251	2.000	25580.125	284.612	0.000
Within Groups	539.264	6.000	89.877		
Total	51699.515	8.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3.000	151.928		
Protien Precipitation	3.000		191.373	
Dialysis	3.000			327.898
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* และ *Pseudomonas sp.*

Descriptives

BG2018

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
					Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3.000	107.534	1.621	0.936	103.507	111.562	106.060	109.270
Protien Precipitation	3.000	210.896	4.632	2.674	199.390	222.401	205.550	213.570
Dialysis	3.000	335.386	3.037	1.754	327.840	342.931	331.910	337.530
Total	9.000	217.939	98.846	32.949	141.959	293.919	106.060	337.530

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	78097.685	2.000	39048.842	3516.894	0.000
Within Groups	66.619	6.000	11.103		
Total	78164.304	8.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3.000	107.534		
Protien Precipitation	3.000		210.896	
Dialysis	3.000			335.386
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

KS2002

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
					Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3.000	0.505	0.010	0.006	0.478	0.531	0.490	0.510
Protien Precipitation	3.000	0.546	0.060	0.035	0.400	0.696	0.510	0.620
Dialysis	3.000	0.607	0.016	0.009	0.568	0.646	0.590	0.620
Total	9.000	0.553	0.054	0.018	0.511	0.594	0.490	0.620

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.016	2.000	0.008	5.869	0.039
Within Groups	0.008	6.000	0.001		
Total	0.024	8.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3.000	0.505		3.000
Protien Precipitation	3.000	0.546	0.546	3.000
Dialysis	3.000		0.607	3.000
Sig.		0.219	0.088	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

KS3005

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Crude enzyme	3.000		
Protien Precipitation	3.000	4.349	0.087	0.050	4.134	4.564	4.290	4.450
Dialysis	3.000	6.678	0.000	0.000	6.678	6.678	6.680	6.680
Total	9.000	5.170	1.165	0.388	4.274	6.066	3.860	6.680

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.264	2.000	5.132	51.800	0.000
Within Groups	0.594	6.000	0.099		
Total	10.859	8.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3.000	4.349		3.000
Protien Precipitation	3.000	4.483		3.000
Dialysis	3.000		6.678	3.000
Sig.		0.621	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

SN2006

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
					Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3.000	0.557	0.036	0.021	0.466	0.648	0.530	0.600
Protien Precipitation	3.000	0.554	0.002	0.001	0.547	0.561	0.550	0.560
Dialysis	3.000	0.608	0.034	0.020	0.521	0.695	0.570	0.640
Total	9.000	0.573	.0036	0.012	0.545	0.601	0.530	0.640

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.005	2.000	0.003	3.167	0.115
Within Groups	0.005	6.000	0.001		
Total	0.011	8.000			

Post Hoc Test

Homogeneous Subsets

Duncan^a

method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3.000	4.349		3.000
Protien Precipitation	3.000	4.482		3.000
Dialysis	3.000		6.678	3.000
Sig.		0.621	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ซ.1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Burkholderia sp.* และ *Pseudomonas sp.*

Descriptives

SS1003

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
					Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
Crude enzyme	3.000	4.790	0.181	0.104	4.340	5.240	4.600	4.960
Protien Precipitation	3.000	6.009	0.060	0.034	5.860	6.159	5.940	6.040
Dialysis	3.000	6.269	0.024	0.013	6.209	6.328	6.250	6.290
Total	9.000	5.689	0.690	0.230	5.158	6.220	4.600	6.290

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.742	2.000	1.871	151.464	0.000
Within Groups	0.074	6.000	0.012		
Total	3.816	8.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

method	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Crude enzyme	3.000	4.790		
Protien Precipitation	3.000		6.009	
Dialysis	3.000			6.269
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ซ.2 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BG2015	3.000	191.373	12.738	7.354	159.730	223.017	176.670	198.730
BG2018	3.000	210.896	4.631	2.674	199.389	222.402	205.550	213.570
KS2002	3.000	0.546	0.060	0.034	0.396	0.695	0.510	0.620
KS 3005	3.000	4.482	0.538	0.310	3.145	5.819	3.860	4.820
SN2006	3.000	0.554	0.002	0.001	0.547	0.561	0.550	0.560
SS1003	3.000	6.009	0.060	0.034	5.860	6.159	5.940	6.040
Total	18.000	68.977	96.467	22.737	21.005	116.949	0.510	213.570

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	157832.681	5.000	31566.536	1029.275	0.000
Within Groups	368.024	12.000	30.669		
Total	158200.705	17.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
KS2002	3.000	0.546			3.000
SN2006	3.000	0.554			3.000
KS3005	3.000	4.482			3.000
SS1003	3.000	6.009			3.000
BG2015	3.000		191.373		3.000
BG2018	3.000			210.896	3.000
Sig.		0.284	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ๓.3 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไดอะไลซิสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. และ *Pseudomonas* sp.

Descriptives

Isolate	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BG 2015	3.000	327.897	10.313	5.954	302.277	353.517	327.897	10.313
BG 2018	3.000	335.385	3.037	1.753	327.840	342.931	335.385	3.037
KS 2002	3.000	0.606	0.015	0.009	0.567	0.645	0.606	0.015
KS 3005	3.000	6.677	0.001	0.000	6.674	6.679	6.677	0.001
SN 2006	3.000	0.608	0.034	0.020	0.521	0.695	0.608	0.034
SS 1003	3.000	6.268	0.023	0.013	6.210	6.327	6.268	0.023
Total	18.000	112.907	159.230	37.530	33.724	192.095	112.903	159.230

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	430790.127	5.000	86158.025	4472.040	0.000
Within Groups	231.191	12.000	19.266		
Total	431021.318	17.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

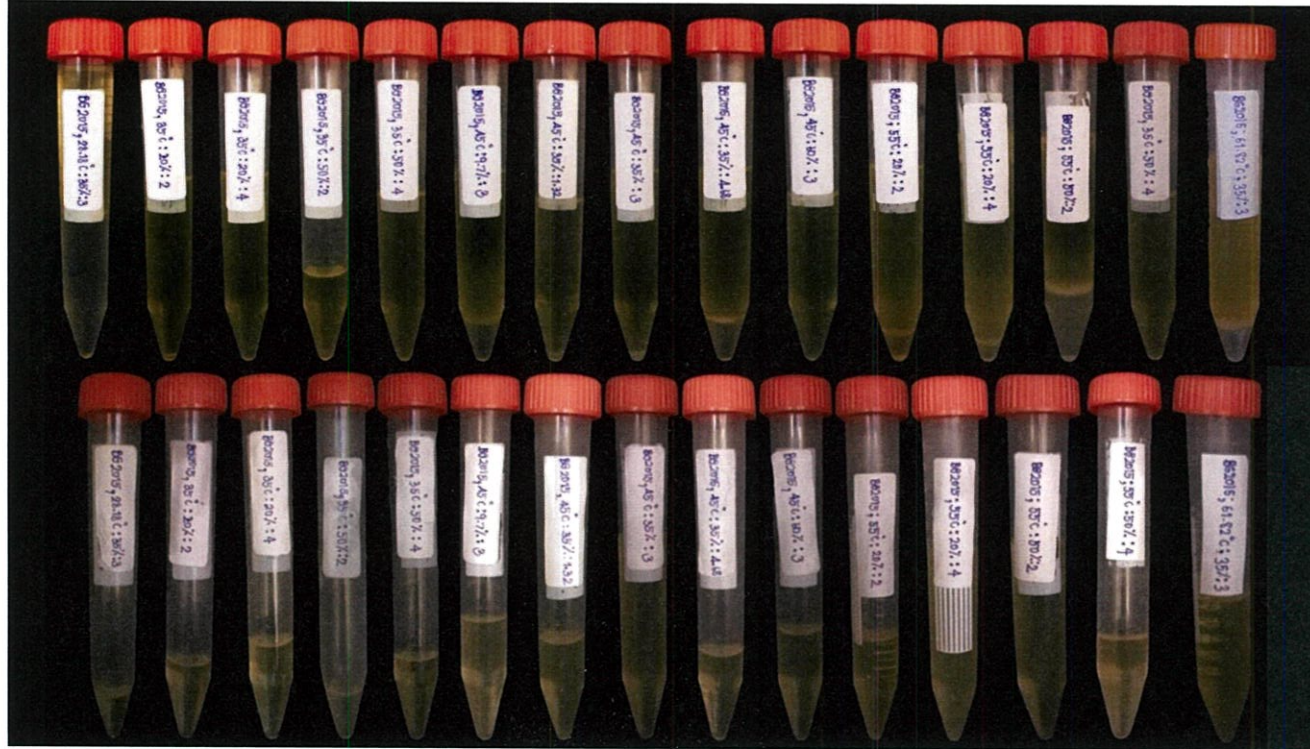
Duncan^a

Isolate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
KS2002	3.000	0.606		3.000	0.606
SN2006	3.000	0.608		3.000	0.608
KS3005	3.000	6.268		3.000	6.268
SS1003	3.000	6.677		3.000	6.677
BG2015	3.000		327.897	3.000	
BG2018	3.000		335.385	3.000	
Sig.		0.142	0.059		0.142

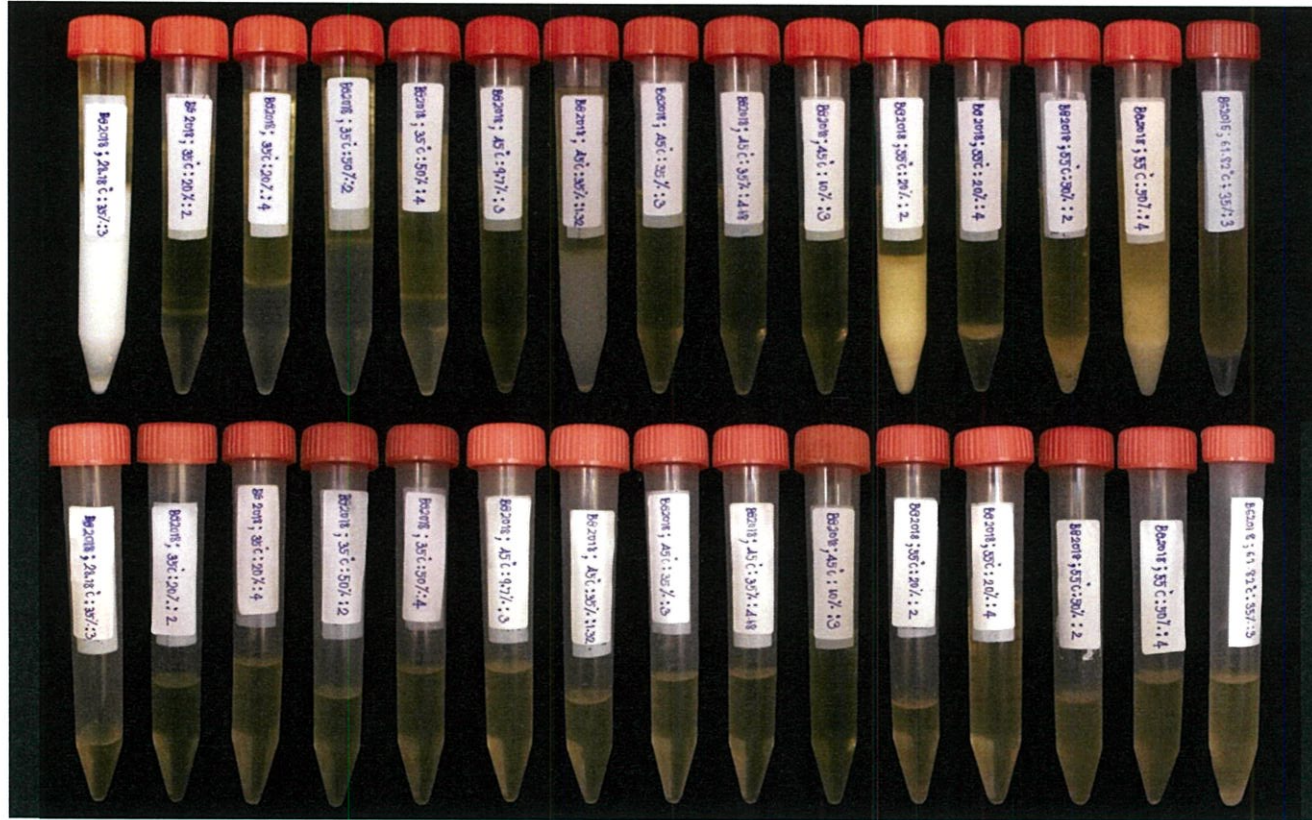
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

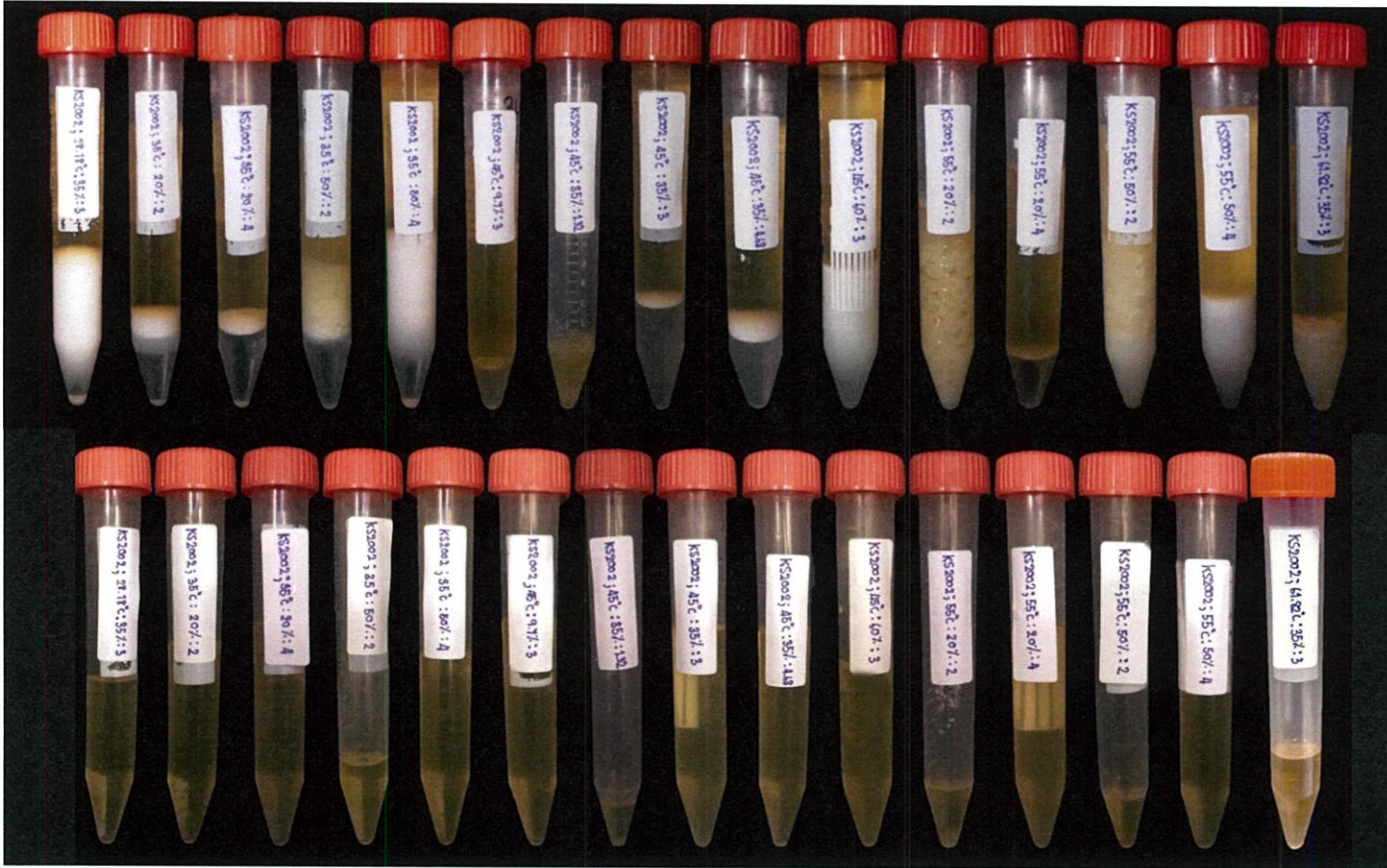
ภาคผนวก ฅ
ผลผลิตไบโอดีเซลที่ได้จากการทดลอง



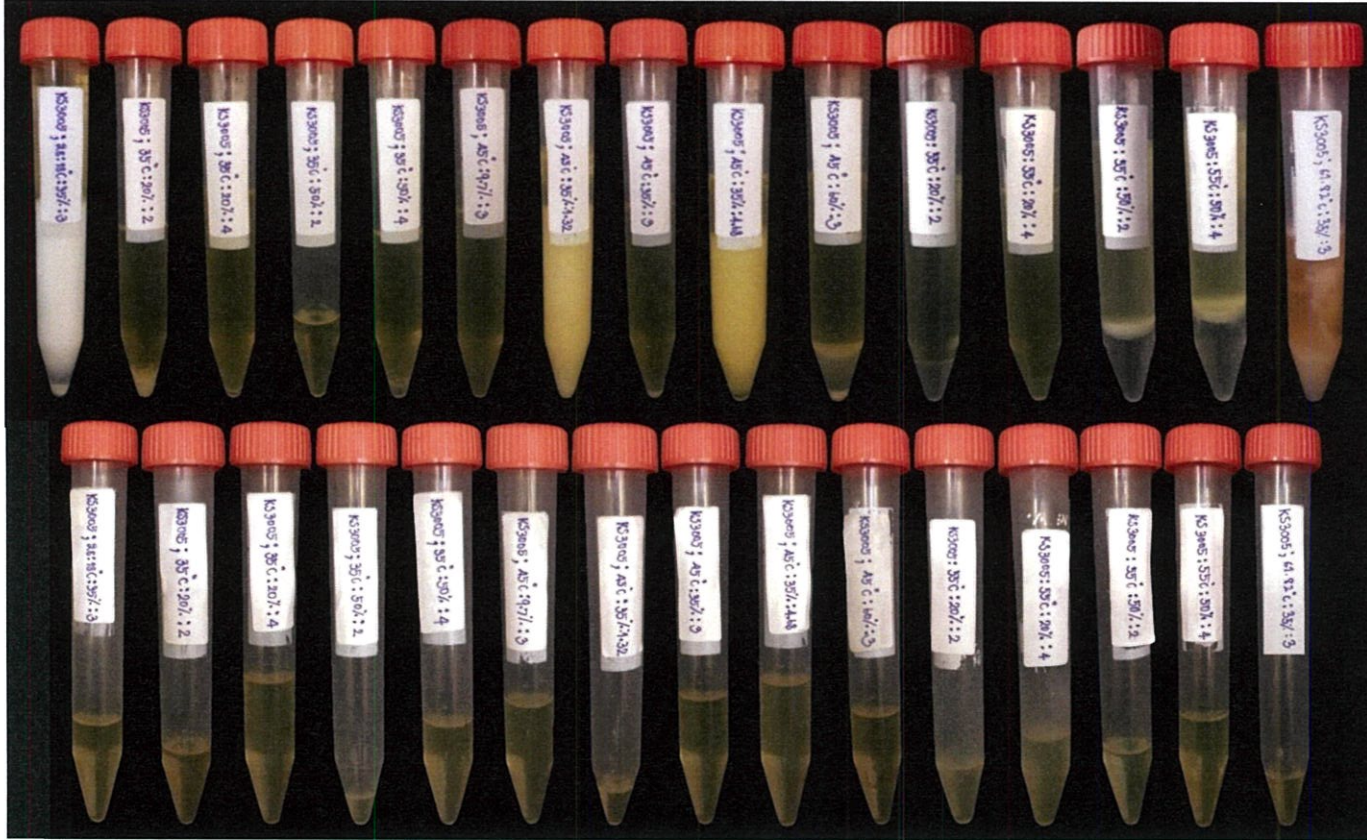
รูปที่ ฅ.1 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอานไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ โดยระบุอุณหภูมิ ปริมาณเอานไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ก่อนและหลังทำการล้าง ตามลำดับ



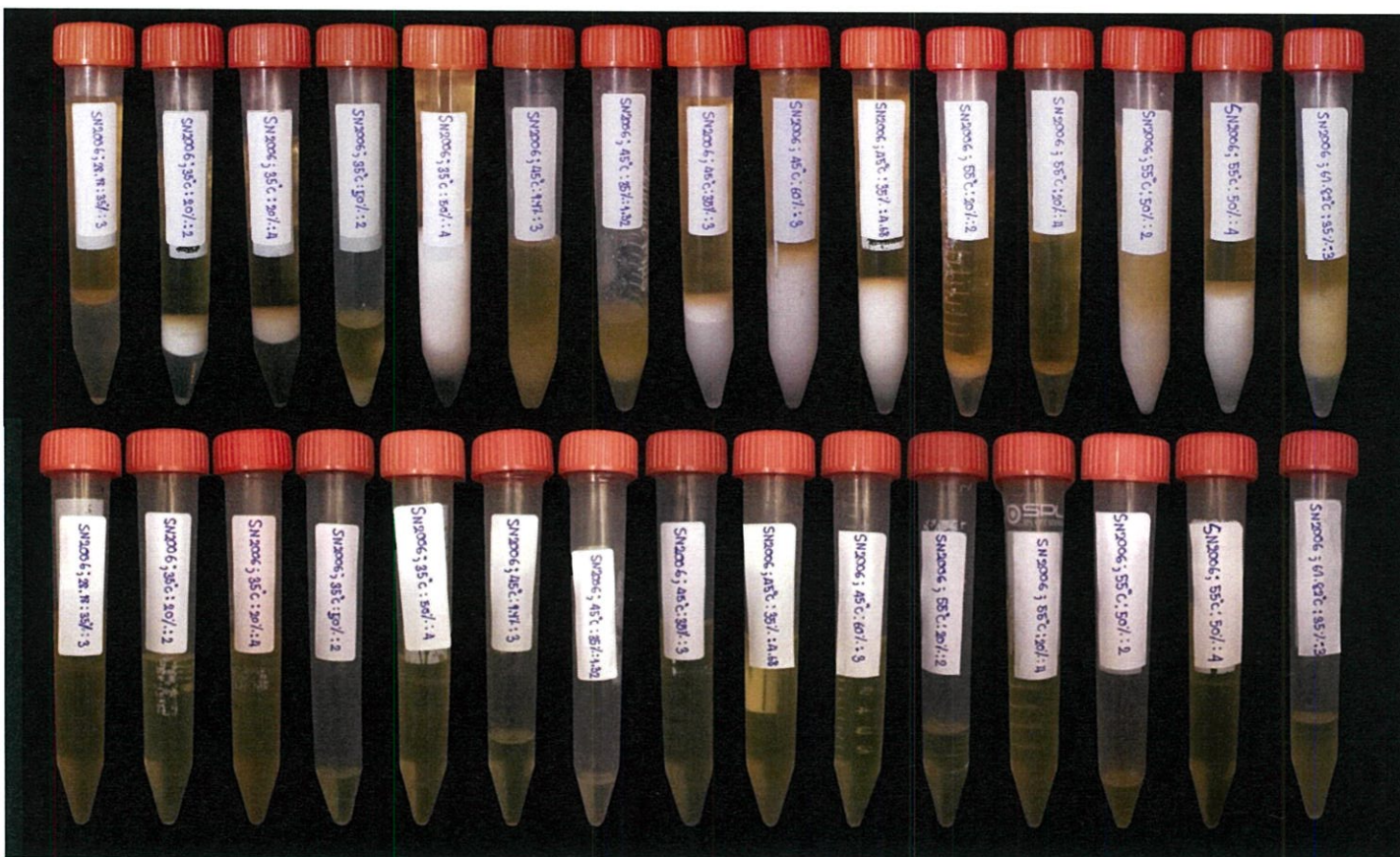
รูปที่ ฃ.2 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2018 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ โดยระบุอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ก่อนและหลังทำการล้าง ตามลำดับ



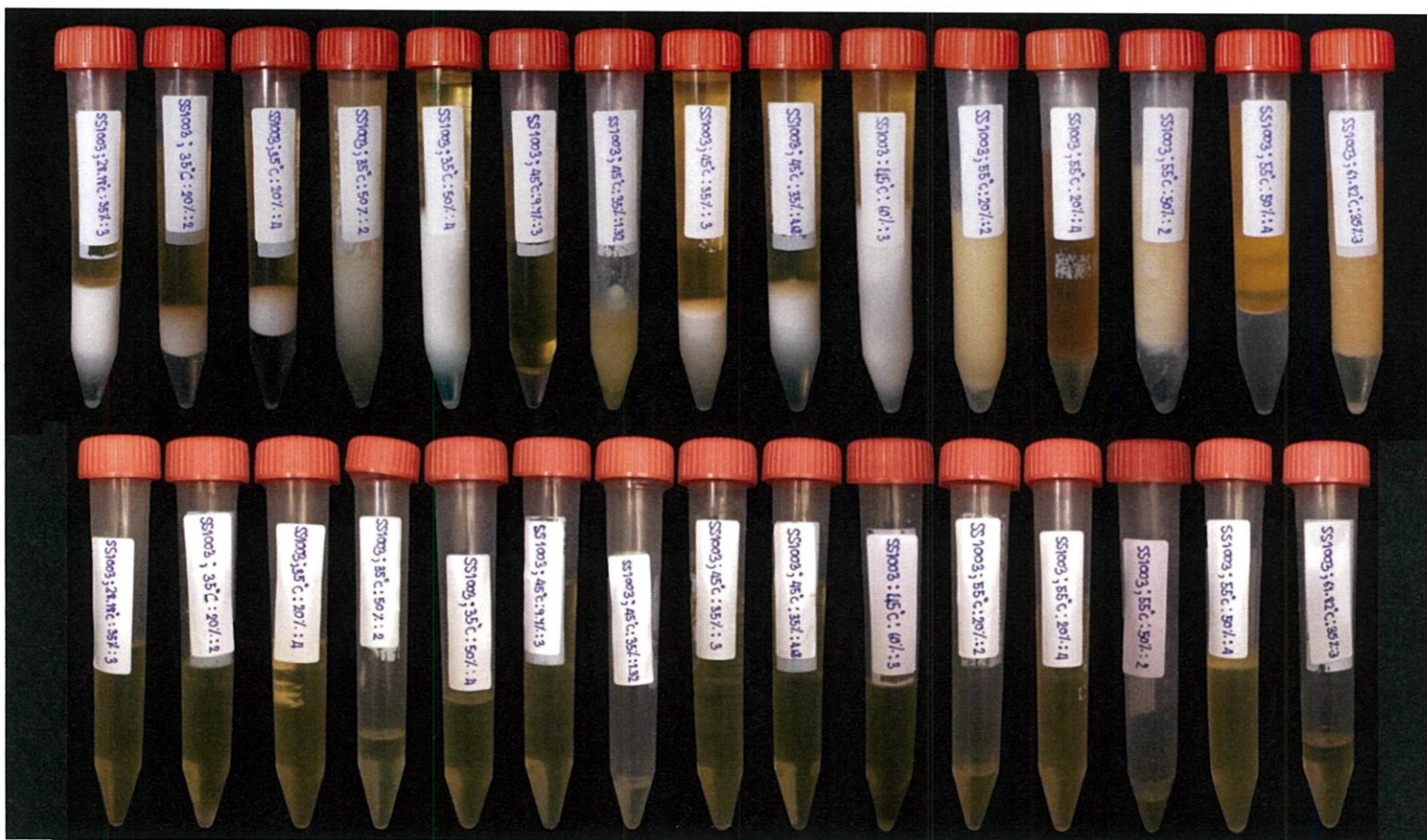
รูปที่ ๓.3 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS2002 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ โดยระบุอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ก่อนและหลังทำการล้าง ตามลำดับ



รูปที่ ๓.4 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ โดยระบุอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ก่อนและหลังทำการล้าง ตามลำดับ

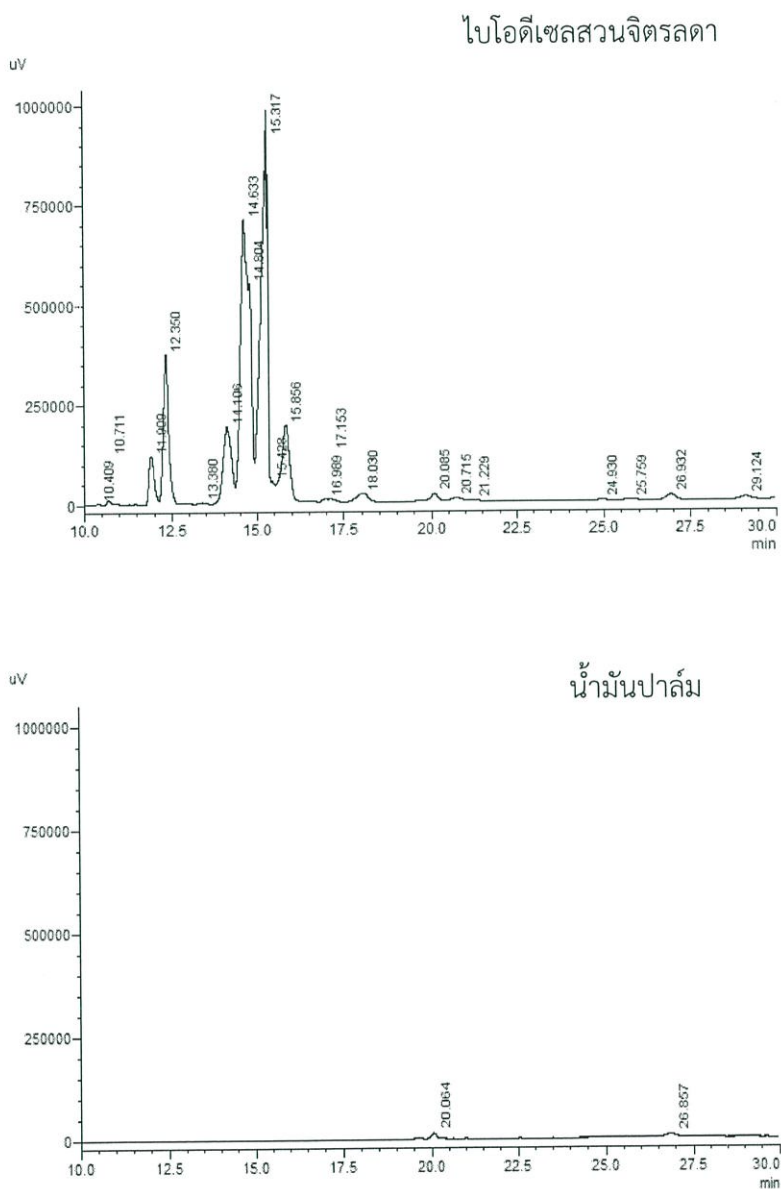


รูปที่ ๕.5 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส SN2006 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ โดยระบุอุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ก่อนและหลังทำการล้าง ตามลำดับ

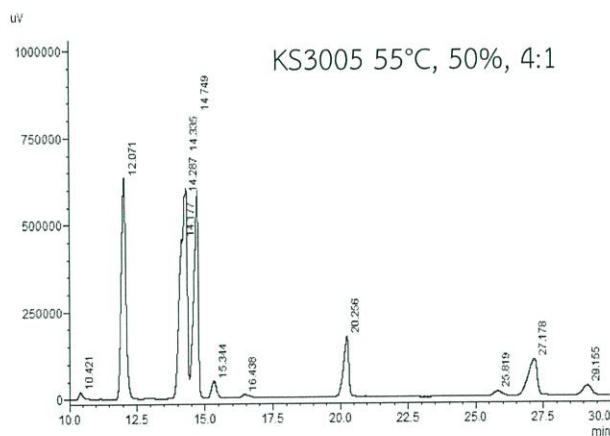
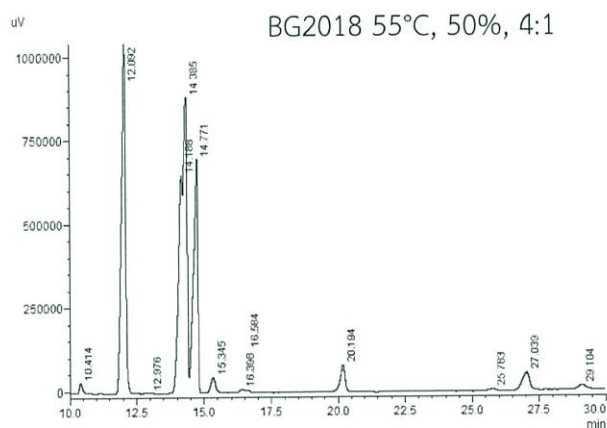
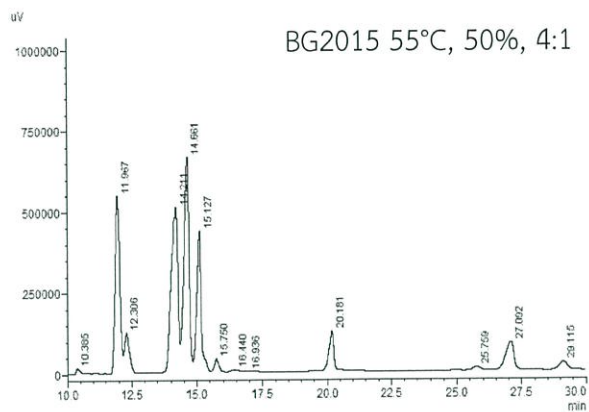


รูปที่ ๓.6 แสดงผลผลิตไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส SS1003 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ โดยระบุอุณหภูมิ ปริมาณ เอนไซม์ และอัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน ก่อนและหลังทำการล้าง ตามลำดับ

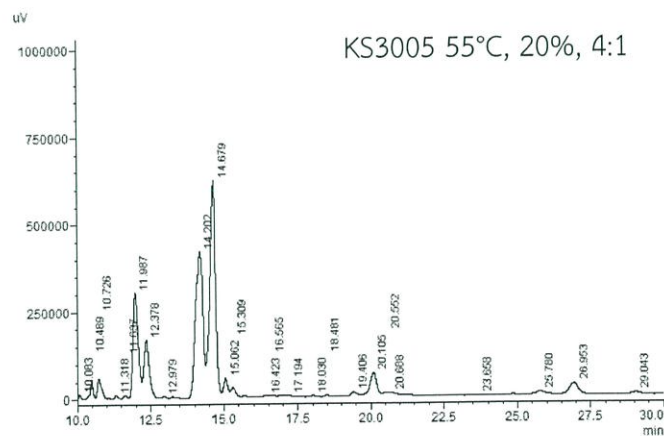
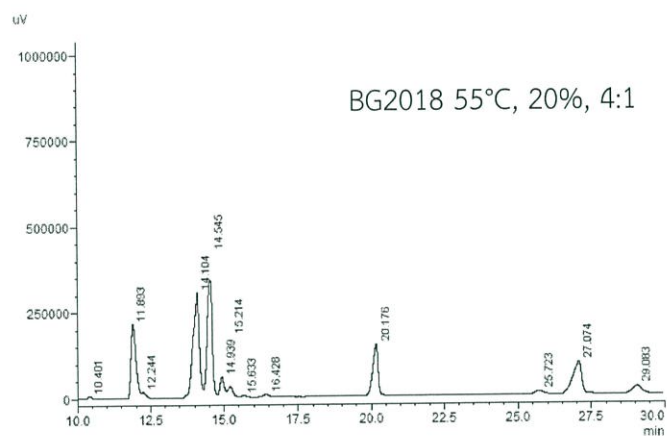
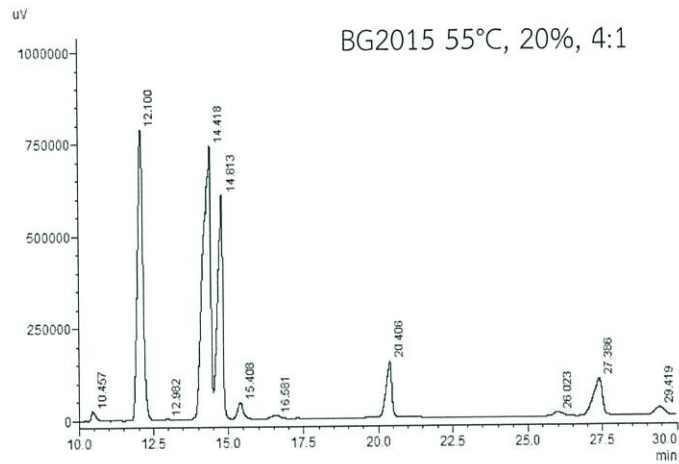
ภาคผนวก ญ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซล



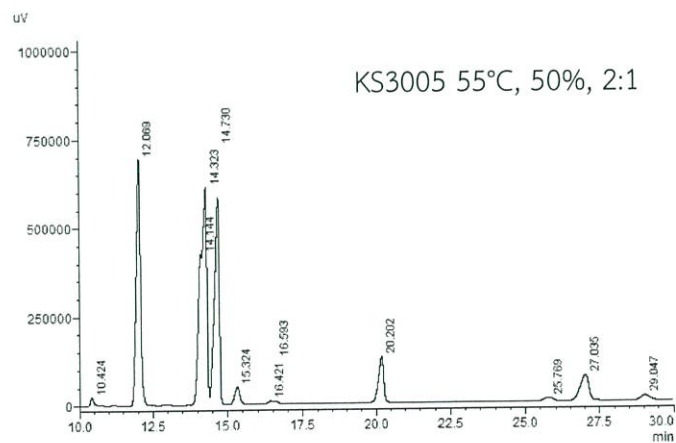
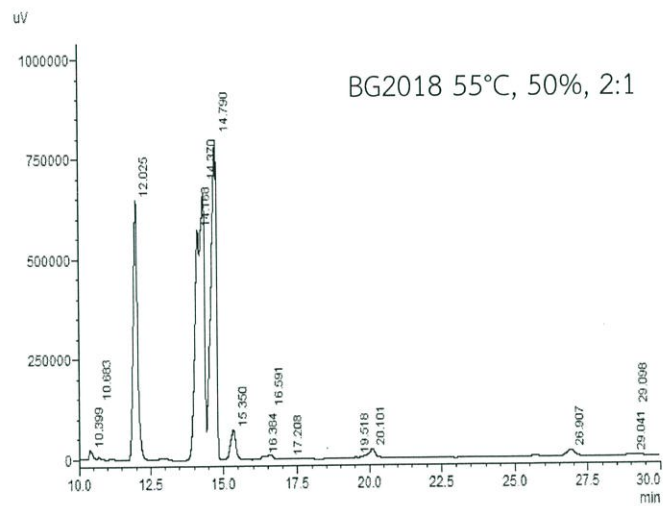
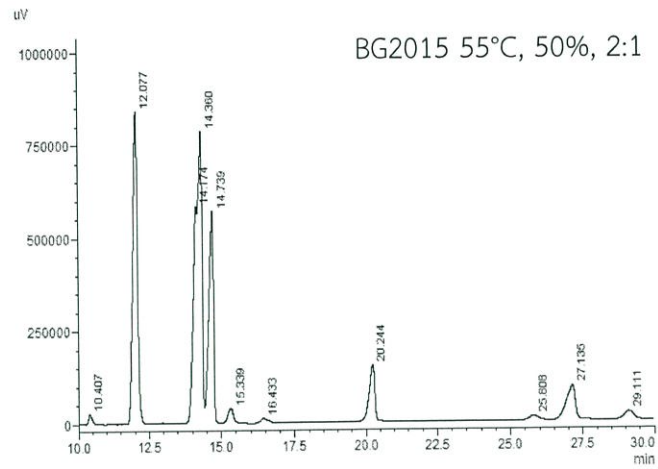
รูปที่ ญ.1 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลจากสวนจิตรลดา (สารมาตรฐาน) และน้ำมันปาล์ม (Blank) เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



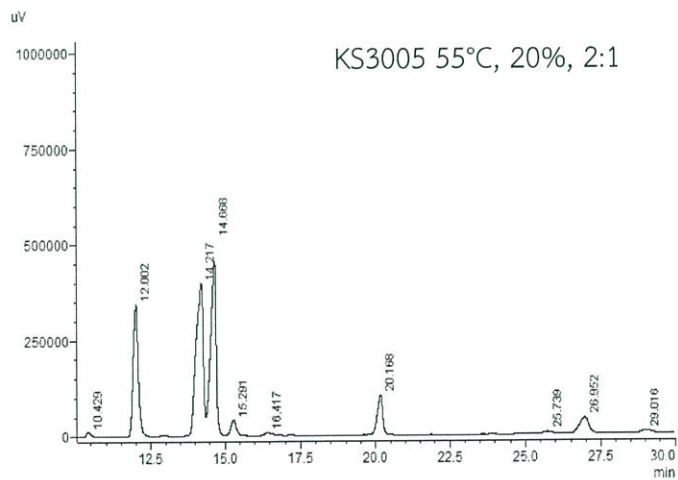
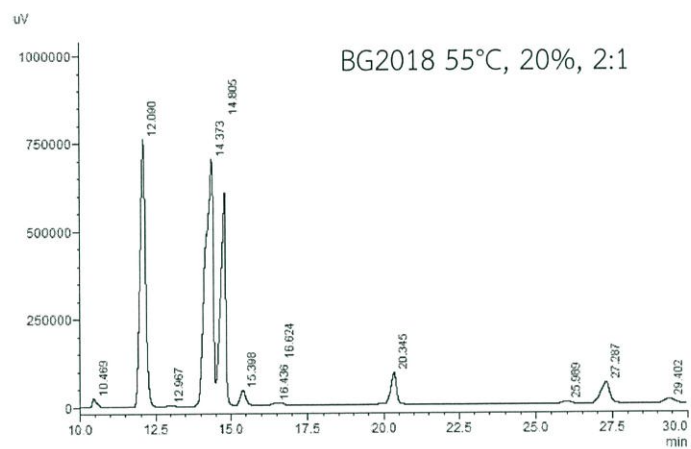
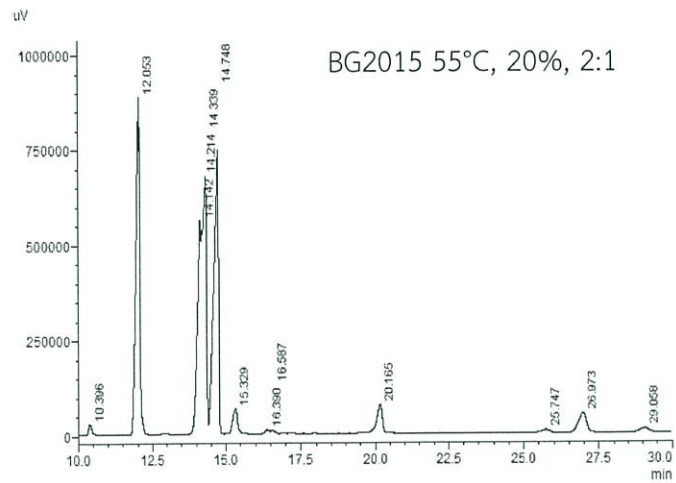
รูปที่ ๒ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



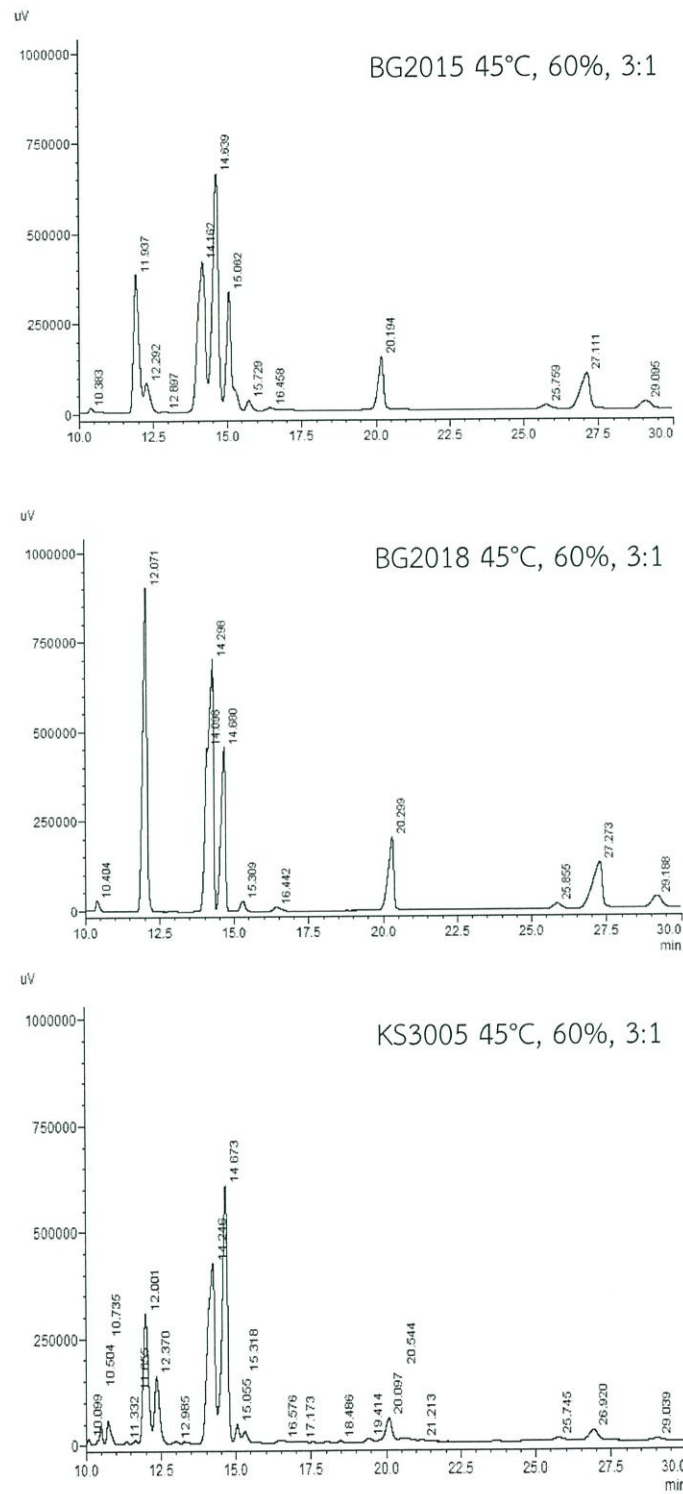
รูปที่ ๓ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



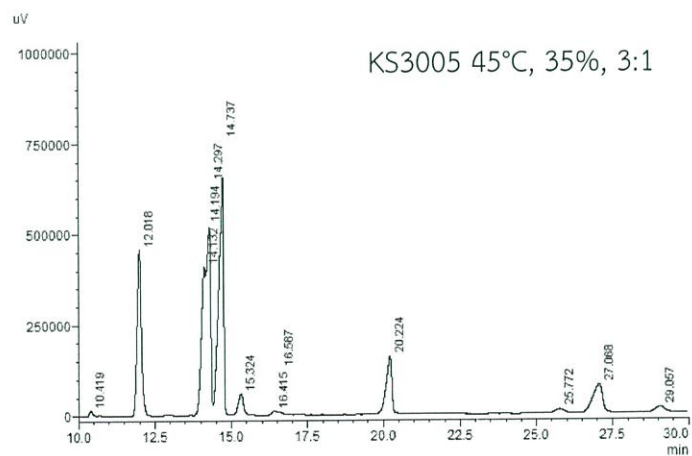
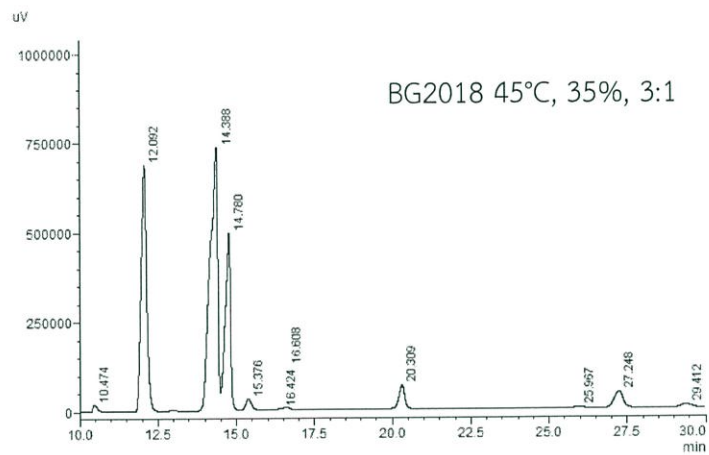
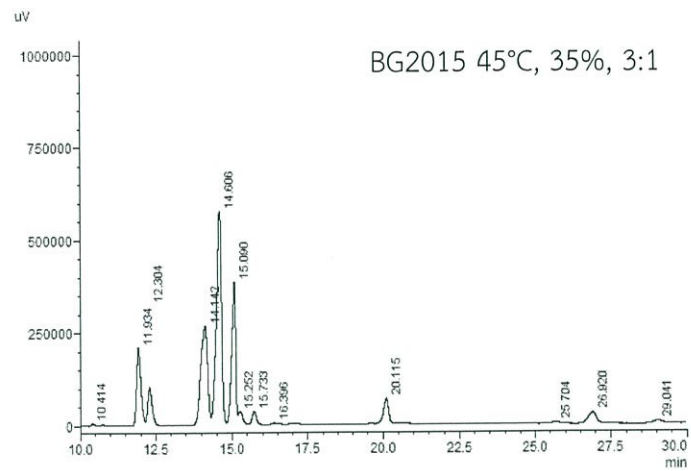
รูปที่ ๔ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



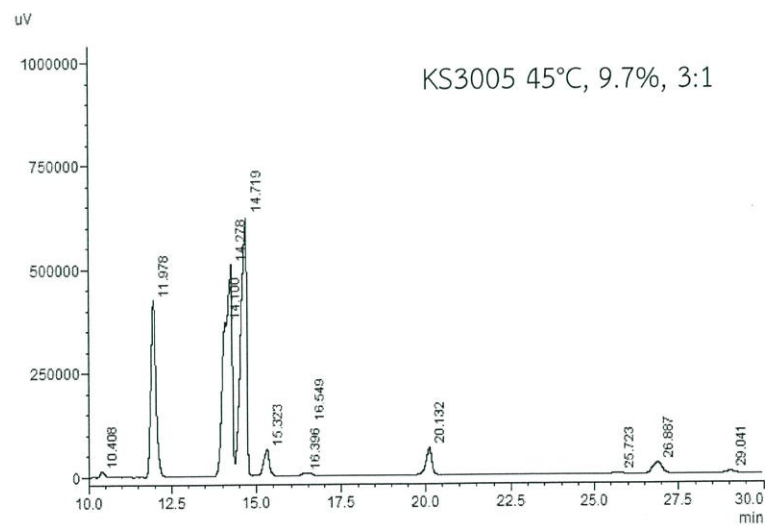
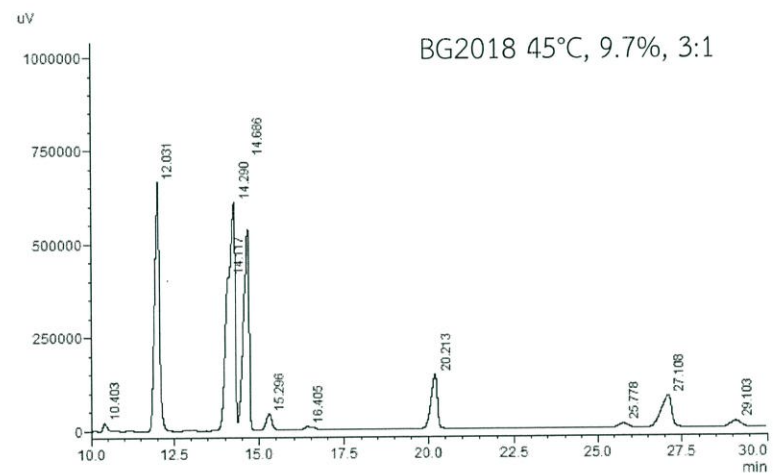
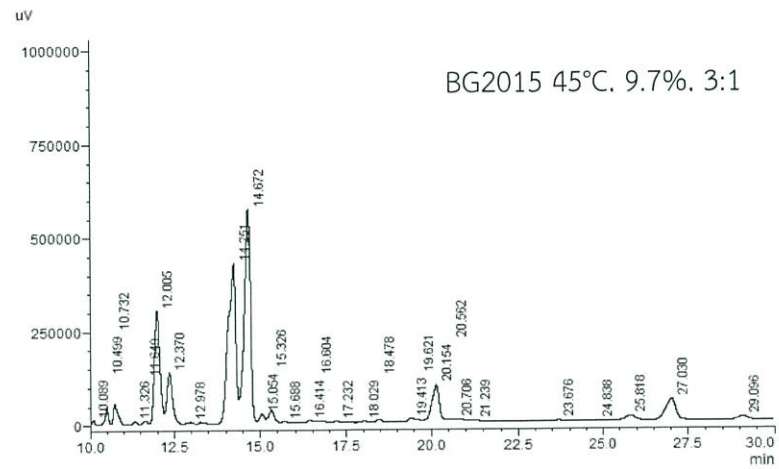
รูปที่ ๕ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



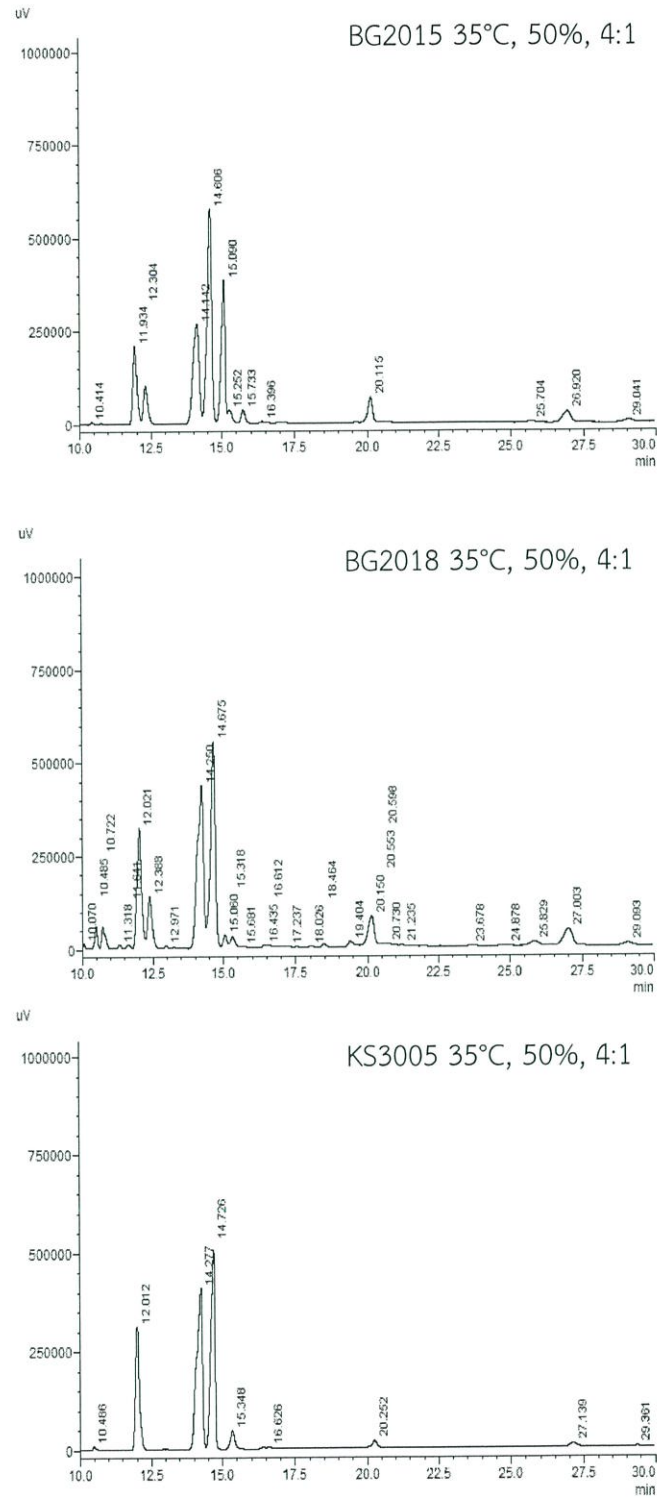
รูปที่ ๖.6 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 60 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



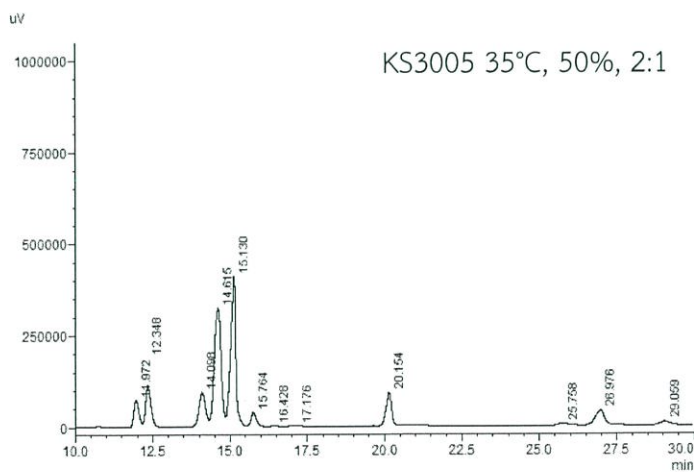
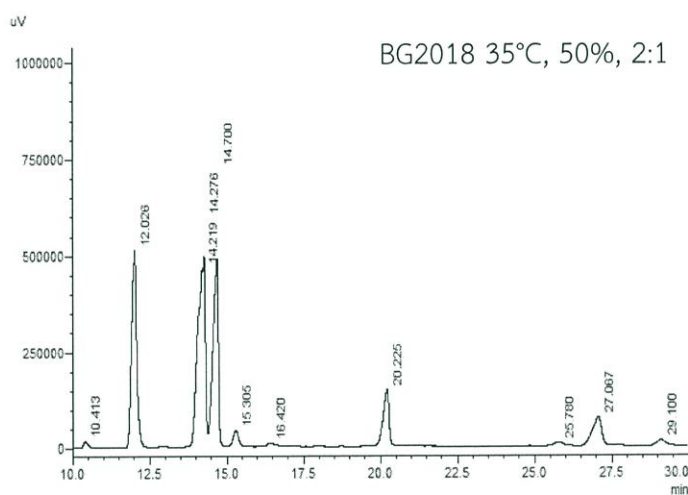
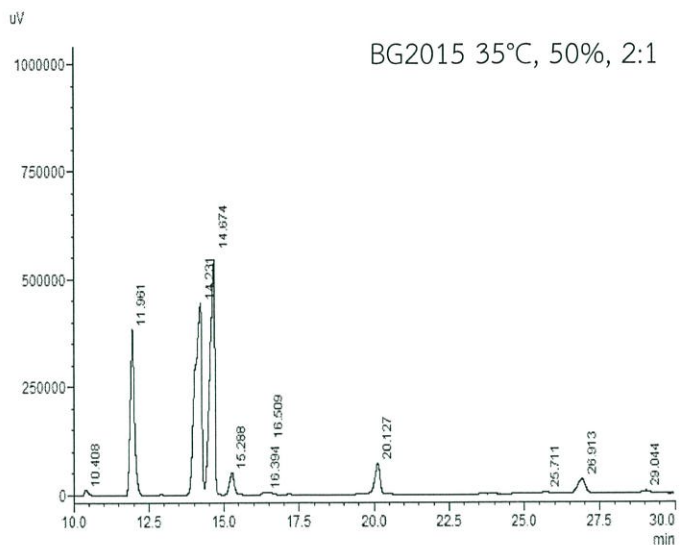
รูปที่ ๗.7 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



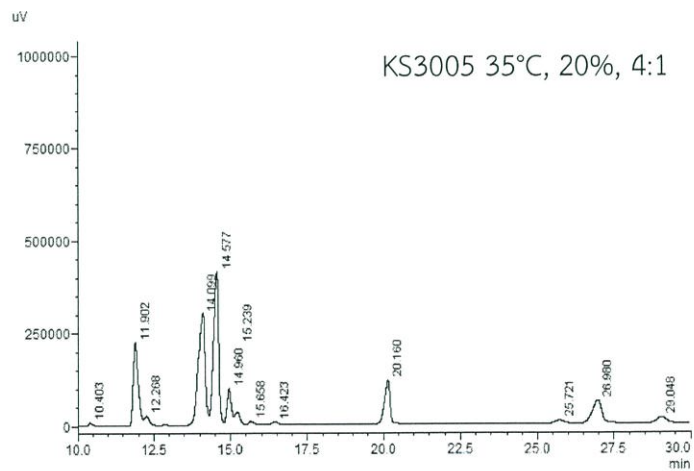
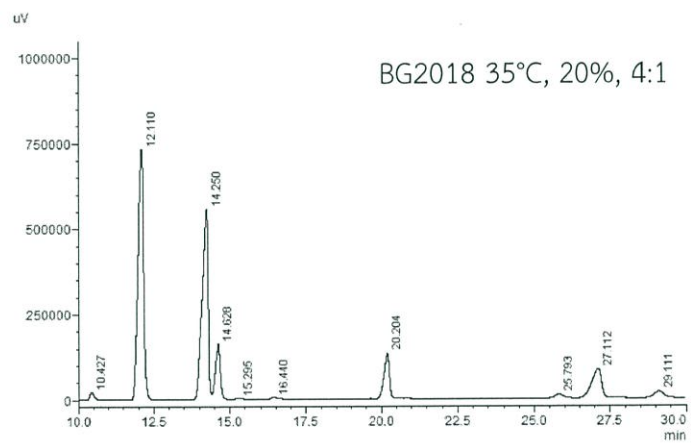
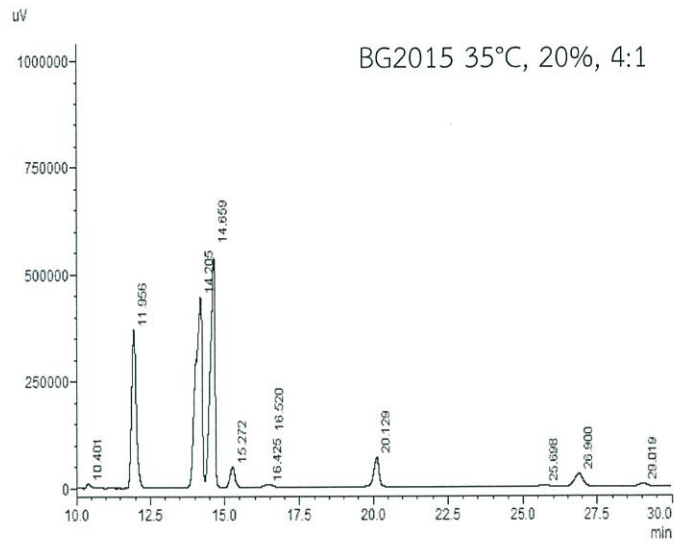
รูปที่ ๘ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 9.7 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



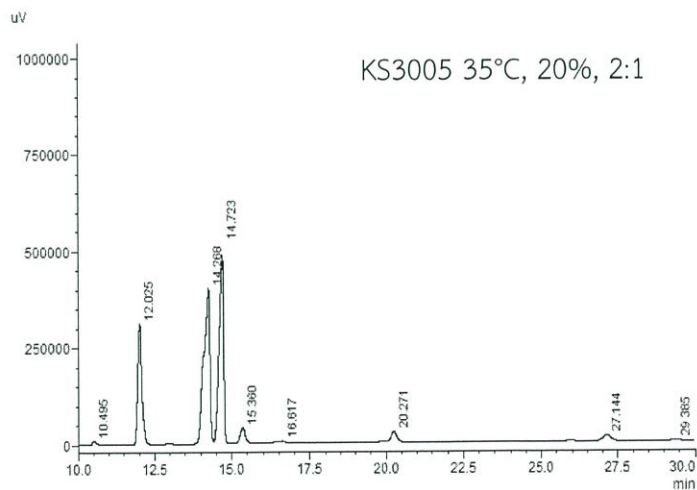
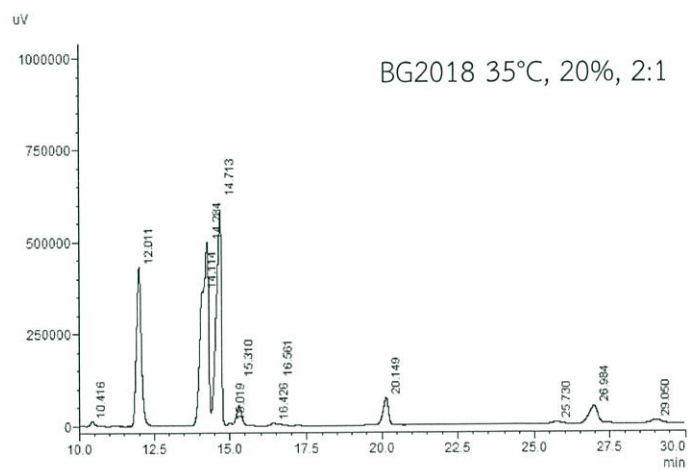
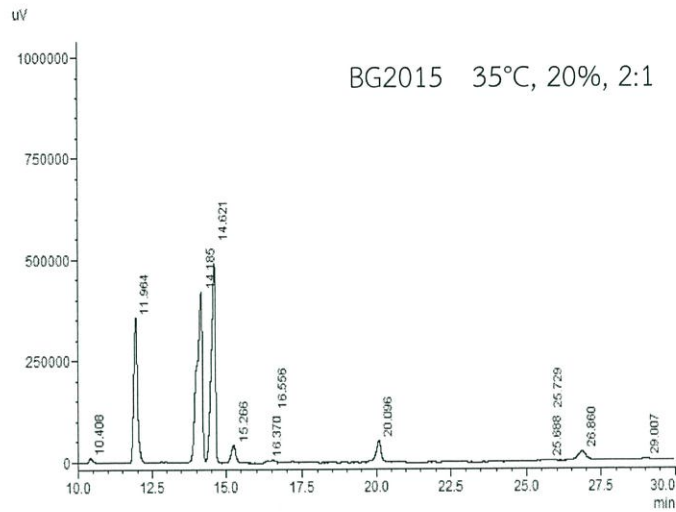
รูปที่ ๙.๙ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



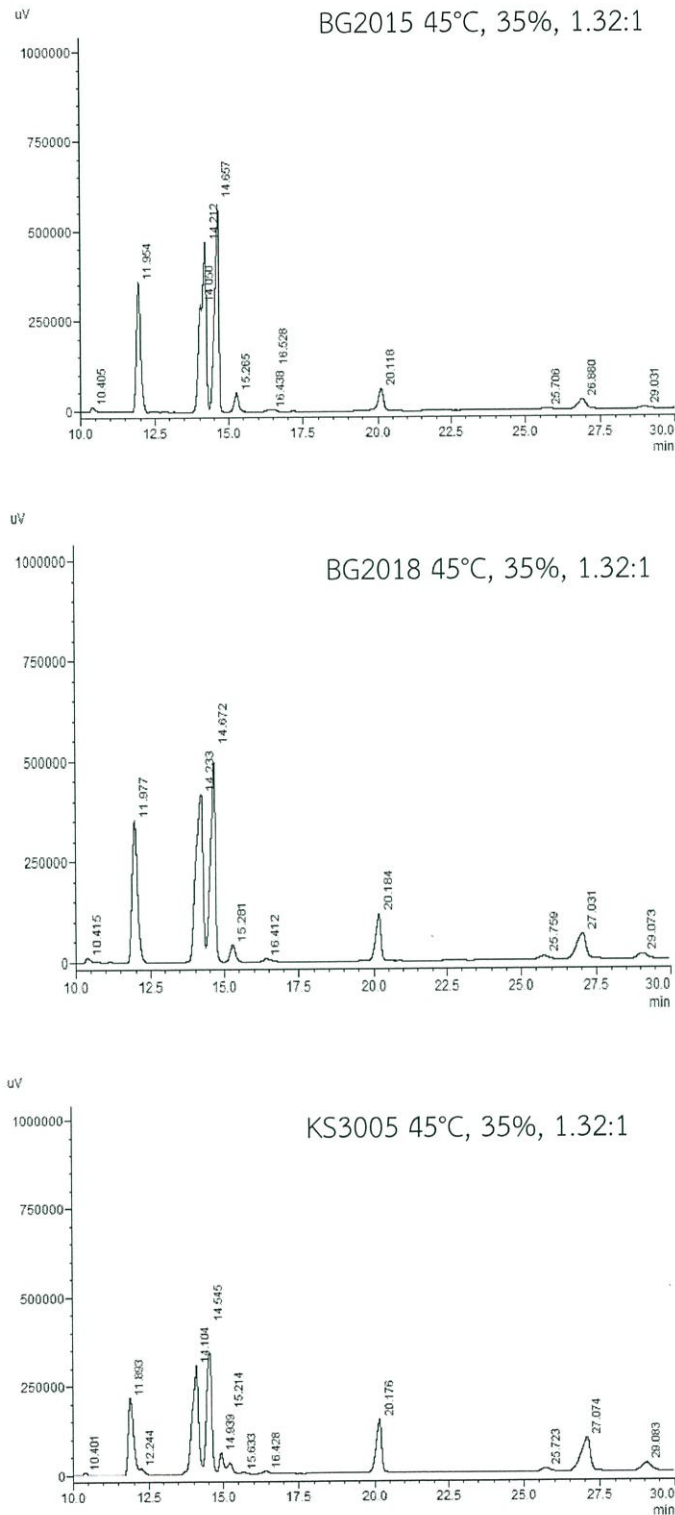
รูปที่ ๑๐ โครมาโทแกรมของไปโอติเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 50 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



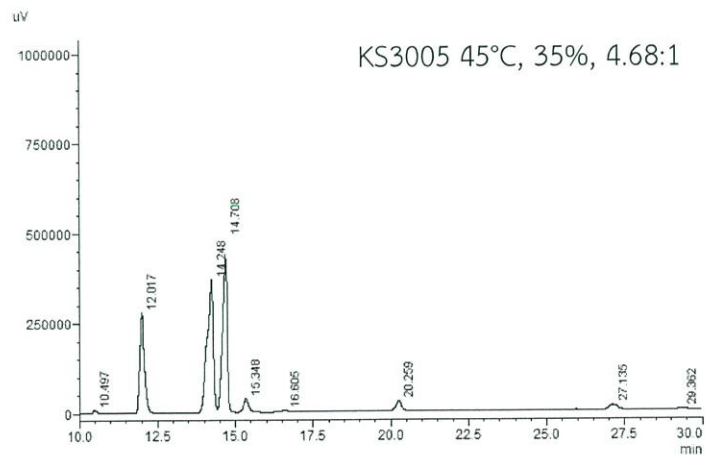
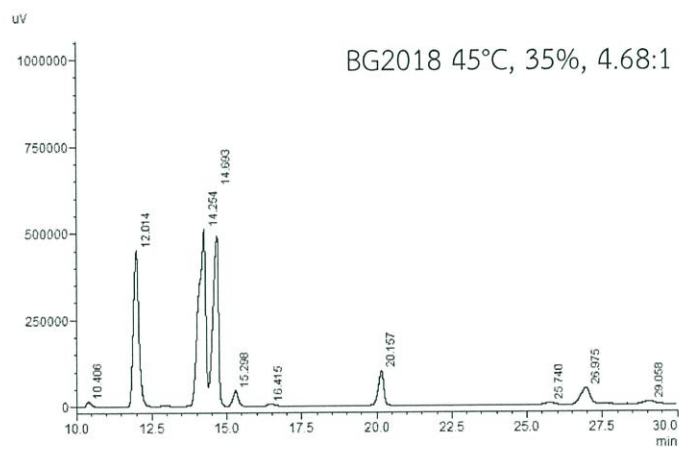
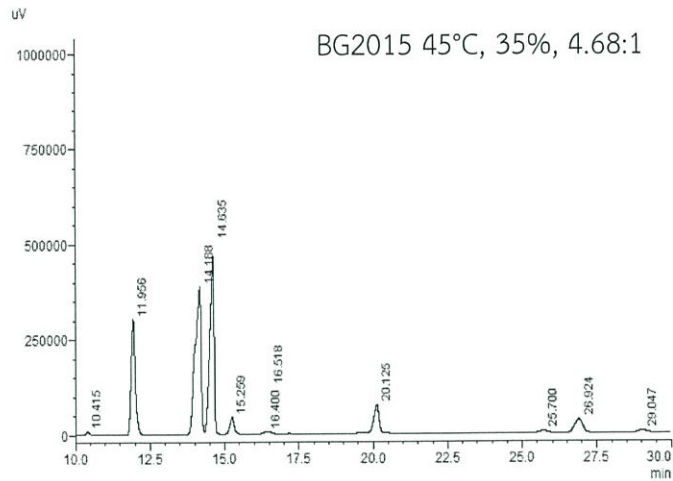
รูปที่ ๑๑.11 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



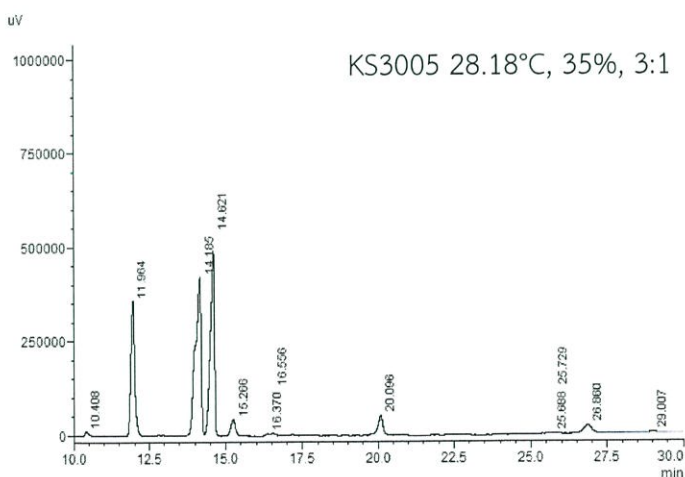
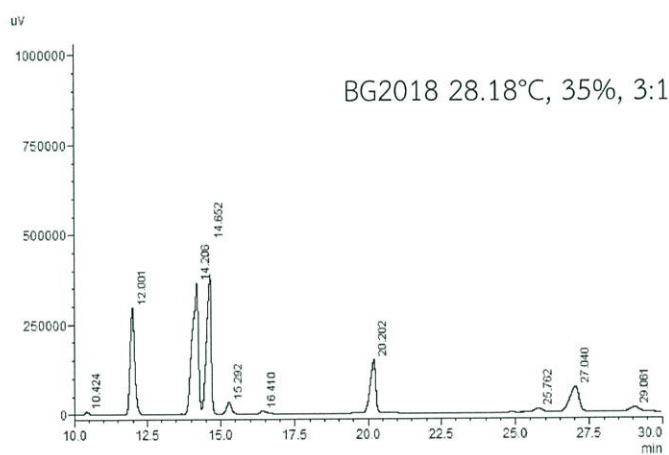
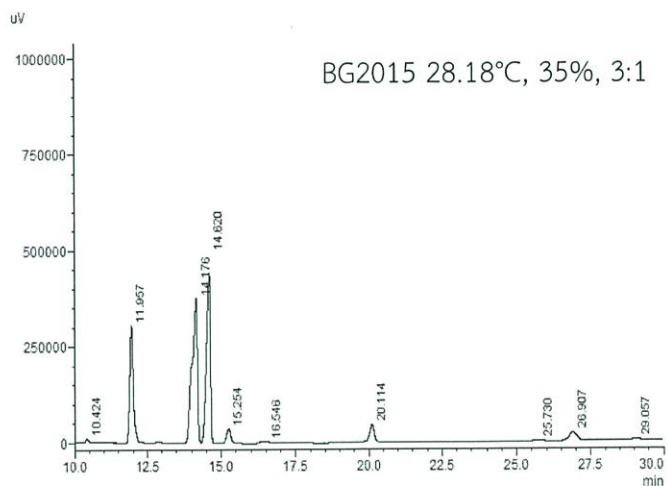
รูปที่ ๑๒ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 20 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 2:1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



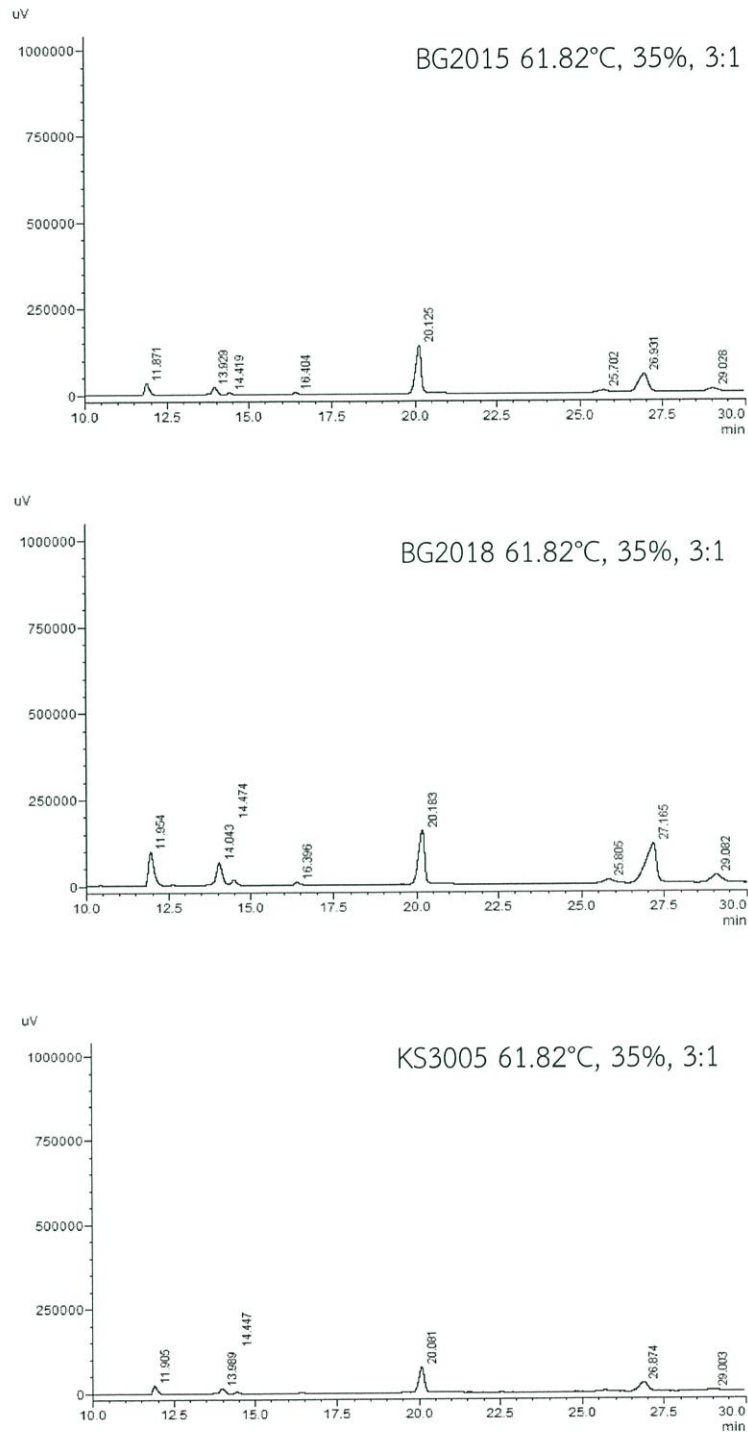
รูปที่ ๑๓ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 1.32:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ ๑๔.14 โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 4.68:1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ ๑๕ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 28.18 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ ๑๖ โครมาโทแกรมของไบโอดีเซลที่ใช้เอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. รหัส BG2015 และ BG2018 และแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. รหัส KS3005 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 35 อัตราส่วนเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 61.82 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 7 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2561

ข้าพเจ้า นายชินนภัทร ศรีศาสนา รหัสประจำตัว 57050819

นางสาวเทพินทร์ ยายี รหัสประจำตัว 57050830

นางสาวภาณุชนาถ ตำราเรียง รหัสประจำตัว 57050870

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับหลักการ
ออกแบบส่วนผสมกลาง

ชื่อภาษาอังกฤษ Biodiesel Production Using Lipase Enzyme by Response Surface-Central
Composite Design Methodology

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขรวิสุทธิ์ 0.77 %

ลงชื่อ.....*นายชินนภัทร ศรีศาสนา*.....

(นายชินนภัทร ศรีศาสนา)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....*นางสาวเทพินทร์ ยายี*.....

(นางสาวเทพินทร์ ยายี)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....*นางสาวภาณุชนาถ ตำราเรียง*.....

(นางสาวภาณุชนาถ ตำราเรียง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วรภฤต วรรณทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของ
นักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้
เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

(รศ.ดวงใจ โอชัยกุล)

ประธานกรรมการ

ลงชื่อ.....*ผศ.ดร.วรภฤต วรรณทกิจ*.....

(ผศ.ดร.วรภฤต วรรณทกิจ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ.....

(ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา)

กรรมการ