

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน  
โดยไลเปสจากแบคทีเรีย



นางสาวจันทรา นพขำ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-6452-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL CONDITIONS FOR BIODIESEL PRODUCTION WITH TRANSESTERIFICATION  
USING BACTERIAL LIPASE



Miss Chantanarth Ponchamni

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology  
Department of Microbiology

Faculty of Science  
Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-6452-9



จันทรนาถ พลขำนิ : ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์  
เอสเทอร์ฟิเคชันโดยไลเปสจากแบคทีเรีย (OPTIMAL CONDITIONS FOR BIODIESEL  
PRODUCTION WITH TRANSESTERIFICATION USING BACTERIAL LIPASE)

อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ จำนวน 106 หน้า. ISBN 974-17-6452-9.

จากตัวอย่างดินและน้ำ สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ได้ทั้งสิ้น  
14 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบขนาดของวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไตรบูไทรินและตรวจสอบ  
แอกติวิตีของไลเปส พบว่าแบคทีเรีย C2 ให้ขนาดของวงใสและแอกติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 1.30  
เซนติเมตร และ 1.821 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรีย C2 มาศึกษาภาวะที่  
เหมาะสมในการผลิตไลเปสพบว่าสามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา  
เซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาวิธี  
เตรียมไลเปสตรังรูปพบว่าการตรึงโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพโดยมีเม็ดแก้วเป็นตัวพุง  
เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรึงรูปไลเปส โดยอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการ  
ทำงานของไลเปสตรังรูปอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ เมื่อนำไลเปสตรังรูปไปใช้เป็น  
ตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มโดยมีเมทานอล พบว่าภาวะที่เหมาะสมใน  
การผลิตเมทิลเอสเทอร์คือ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็น 1:25 อุณหภูมิ 55  
องศาเซลเซียส และมีเฮกเซนในปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร โดยมีร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เมื่อเทียบกับ  
ปริมาณน้ำมันปาล์มตั้งต้นคือ 0.68

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา .....ลายมือชื่อนิสิต..... สำนักหาบ พสขำนิ  
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม .....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา 2548 .....

## 4572244223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: LIPASE / TRANSESTERIFICATION / BIODIESEL

CHANTANARTH PONCHAMNI : OPTIMAL CONDITIONS FOR BIODIESEL  
 PRODUCTION WITH TRANSESTERIFICATION USING BACTERIAL LIPASE.  
 THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 106 pp.  
 ISBN 974-17-6452-9.

From soil and water samples collected from potential sources for having extracellular lipase producing bacteria, 14 isolates with lipase activity were found. Among those isolates, C2 was the highest lipase producing strain with 1.30 cm. clear zone on tributyrin media and showed 1.821 unit/mg for specific activity. The optimal conditions for lipase producing were 30°C, pH 7.0 and 18 h incubation. Immobilization of C2 lipase using physical adsorption onto glass beads was studied and the optimal conditions for lipase immobilization were 65°C and pH 7.0. Transesterification of palm oil with immobilized C2 lipase was investigated. The effects of oil/methanol molar ratio, temperature, time and solvent were analyzed. The optimal reaction conditions were, respectively, 1:25, 55°C, 18 h and at the present of 2 ml hexane. Under these conditions the methyl ester yield was 0.68%. C2 was identified as *Staphylococcus warneri* by 16S rDNA analysis (98% identities).

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Microbiology.....Student's signature.....*C. Pondhomi*.....  
 Field of study.....Industrial Microbiology.....Advisor's signature.....*C. Kositanont*.....  
 Academic year ..2005.....



## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โสมชิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ส่องศรี กุลปรีชา รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. พรพจน์ เปี่ยมสมบูรณ์ ที่กรุณารับเป็นประธานและคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ คำปรึกษา และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนในงานวิจัยนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณพี่น้องทุกคนในห้องวิจัย453 และที่อยู่บนแผนก ที่ช่วยให้มีกำลังใจและกำลังกายในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณสิริภัทร พฤกษ์ไพบูลย์ คุณ วัชรီ ชุณหกุล และเพื่อนๆร่วมรุ่นที่น่ารักทุกคน รวมถึงคุณโรจน์ คุณเบญ และเพื่อนจากอัสสัมชัญสำโรงทุกคนที่คอยเอาใจช่วย และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่และพี่ชาย ที่คอยสนับสนุนเอาใจช่วยและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป .....	ฏ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. ปรัชศน์วรรณกรรม .....	4
2.1 ไขมันและน้ำมัน .....	4
2.2 น้ำมันปาล์ม (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545).....	5
2.3 การใช้ประโยชน์จากน้ำมันปาล์ม (คณะกรรมการการพลังงานสภา ผู้แทนราษฎร, 2545) .....	6
2.3.1 อุตสาหกรรมด้านอาหาร .....	6
2.3.2 อุตสาหกรรมโพลิโอเคมีคอล.....	6
2.3.2.1 การผลิตกรดไขมันประเภทต่างๆ ทั้งกรดไขมันอิ่มตัว และ กรดไขมันไม่อิ่มตัว เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลาย ประเภท.....	6
2.3.2.2 การผลิตเมทิลเอสเทอร์ .....	7
2.4 น้ำมันดีเซล (ปราโมทย์ ไชยเวช, 2537).....	7
2.5 ไบโอดีเซล.....	8
2.6 ประวัติความเป็นมาของการนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์..	10
2.7 การนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลมี 3 แนวทาง คือ.....	10
2.7.1 การนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง .....	10
2.7.2 การผสมน้ำมันพืชหรือสัตว์กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล .....	13

2.7.3 การนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์มาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.....	14
2.7.3.1 การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	15
2.7.3.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	16
2.7.3.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	17
2.8 ไลเปส.....	18
2.9 เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme).....	22
2.9.1 ตัวพุง (carrier) สำหรับการตรึงรูปเอนไซม์.....	22
2.9.1.1 ตัวพุงที่ไม่มีรูพรุน .....	23
2.9.1.2 ตัวพุงที่มีรูพรุน .....	23
2.9.1.3 ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์.....	24
2.9.1.4 ตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์.....	25
2.10 วิธีการตรึงเอนไซม์.....	27
2.10.1 การตรึงโดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับตัวพุง (carrier binding).....	27
2.10.1.1 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption).....	27
2.10.1.2 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยพันธะไอออนิก (ionic binding).....	27
2.10.1.3 การตรึงรูปเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding).....	28
2.10.2 การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมโยง (cross-linking).....	28
2.10.3 การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ใน (entrapment).....	29
2.10.3.1 การจำกัดเขตเอนไซม์ในตัวพุง (lattice type).....	29
2.10.3.2 การจำกัดเขตเอนไซม์ในแคปซูลขนาดเล็ก (microcapsule type).....	29
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง .....	35
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	35



3.2	เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	36
3.3	วิธีดำเนินการทดลอง.....	37
3.3.1	แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสสูงจากตัวอย่างดิน.....	37
3.3.1.1	เก็บตัวอย่างน้ำและดินเพื่อแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส.....	37
3.3.1.2	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสส่งออกมานอกเซลล์.....	37
3.3.1.3	การเตรียมหัวเชื้อ.....	37
3.3.1.4	การเตรียมสารละลายไลเปส.....	38
3.3.1.5	การตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปส (Merianne และคณะ, 1991).....	38
3.3.1.6	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951).....	38
3.3.2	ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (Perry, 1989).....	39
3.3.3	การเตรียมไลเปสตรังรูป.....	40
3.3.3.1	การเลือกตัวพุง.....	40
3.3.3.2	การเตรียมตัวพุง.....	40
3.3.3.2.1	การเตรียมไลเปสตรังรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 1.....	40
3.3.3.2.2	การเตรียมไลเปสตรังรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 2.....	41
3.3.3.3	การวิเคราะห์แอกติวิตีของไลเปสตรังรูป.....	41
3.3.3.4	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของไลเปสตรังรูป.....	42
3.3.3.5	การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ.....	42
3.3.4	ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้การทดลองเชิงแฟกทอเรียล.....	42
3.3.5	การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์.....	44
3.3.5.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน.....	44
3.3.5.2	การเตรียมตัวอย่าง (Zheng และ Hanna, 1996).....	44

3.3.5.3 การวิเคราะห์โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟี .....	44
3.3.5.4 การพิจารณาผลการฉีดตัวอย่าง.....	45
3.3.6 การศึกษาจลนพลศาสตร์ ณ ภาวะที่เหมาะสม .....	45
3.3.7 การศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก .....	45
3.3.8 การพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรียตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA).....	45
3.3.8.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ เมอเรส.....	45
3.3.8.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	46
3.3.8.3 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	47
3.3.8.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	48
4. ผลการทดลอง .....	49
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส.....	49
4.2 การตรวจแอกติวิตีของไลเปส .....	51
4.3 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย C2 .....	52
4.4 การเตรียมไลเปสตรังรูป .....	54
4.4.1 วิธีที่เหมาะสมสำหรับเตรียมไลเปสตรังรูป .....	54
4.4.2 คุณสมบัติที่เหมาะสมในการเตรียมไลเปสตรังรูป .....	56
4.4.3 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปส อิสระ.....	57
4.4.3.1 คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูป เทียบกับไลเปสอิสระ .....	57
4.4.3.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส ตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ .....	57
4.5 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้การทดลองเชิง แฟกทอเรียล .....	60
4.6 การหาค่า Km ของไลเปสตรังรูป .....	64

4.7 การศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก .....	65
4.8 จำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ C2 โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA .....	66
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	69
รายการอ้างอิง .....	77
ภาคผนวก .....	87
ภาคผนวก ก .....	88
ภาคผนวก ข .....	90
ภาคผนวก ค .....	96
ภาคผนวก ง .....	99
ภาคผนวก จ .....	101
ภาคผนวก ฉ .....	103
ภาคผนวก ช .....	105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	106

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	คุณสมบัติและค่าความร้อนของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ (พิศมัย เจนวนิชปัญญกุล, 2544) .....	2
1.2	ปริมาณการผลิตพืชน้ำมันของประเทศไทย (พินตัน) (พิศมัย เจนวนิชปัญญกุล, 2544).....	2
2.1	ปัญหาการใช้งานระยะสั้นและระยะยาวพร้อมแนวทางแก้ไขสำหรับการนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรงในเครื่องยนต์ดีเซล (Harwood, 1984).....	12
2.2	เปรียบเทียบระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดกับเอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซล (Fukuda และคณะ, 2001).....	18
2.3	แสดงอัตราการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปสที่ได้จาก <i>Geotrichum candidum</i> (Macrae, 1983).....	21
2.4	เปรียบเทียบข้อดีและข้อบกพร่องของตัวพุงที่มีรูพรุนและไม่มีรูพรุน.....	24
2.5	การจัดประเภทของตัวพุงโดยใช้สมบัติทางเคมี.....	26
2.6	แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ (Kennedy และ Cabral, 1987).....	30
2.7	การตรึงรูปไลเปสโดยวิธีต่างๆ.....	31
2.8	แสดงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ.....	34
3.1	แสดงสภาวะปฏิบัติการของปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อสร้างไลเปสโดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลสำหรับ 3 ปัจจัย.....	39
3.2	แสดงสภาวะปฏิบัติการของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลสำหรับ 4 ปัจจัย.....	43
3.3	สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA .....	47
4.1	แสดงการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสจากแหล่งต่างๆ.....	49
4.2	แสดงลักษณะโคโลนีและขนาดของวงใสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	50

ตารางที่	หน้า
4.3 ผลของภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยใช้ วิธีออกแบบการทดลองเชิง แฟกทอเรียลแบบ $2^3$ .....	52
4.4 ผลของวิธีเตรียมไลเปสตรังรูปบนเม็ดแก้วขนาด 0.1, 2.0 และ 5.0 มิลลิเมตร.....	54
4.5 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมไลเปสตรังรูป.....	56
4.6 ร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันปาล์มตั้งต้นจากการแปรผัน ปัจจัยต่างๆโดยการออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลแบบ $2^4$ .....	61
5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียต่างๆ .....	72

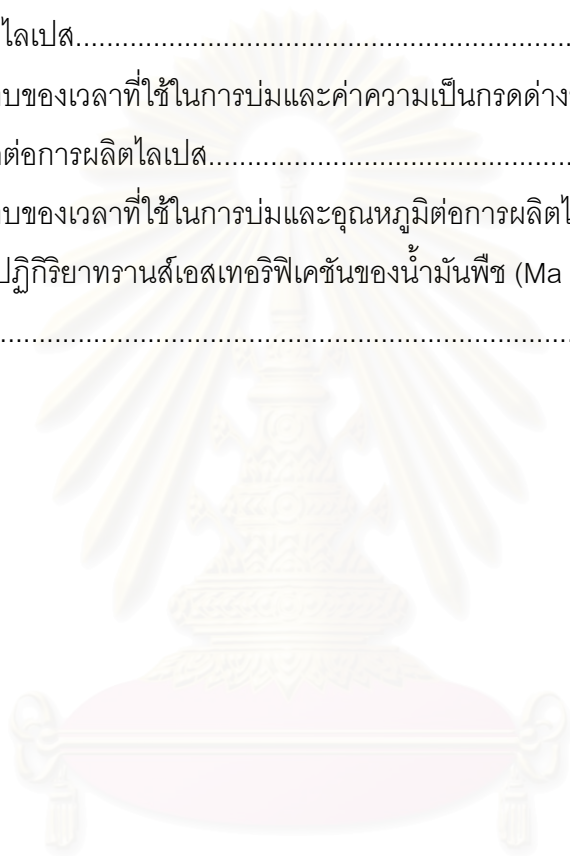
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืช (Ma และ Hanna, 1999).....	14
2.2	การเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์.....	28
4.1	แสดงวงใสของแบคทีเรีย C2 บนอาหารแข็งไทรูบูไทริน .....	50
4.2	กราฟเปรียบเทียบแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของไลเปสจากแบคทีเรีย ไอโซเลท SW2, SS1, SS3, C2 และ C3.....	51
4.3	ผลการเปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของไลเปส ตีรังรูปจากวิธีการตีรัง 2 วิธี.....	55
4.4	คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตีรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ.....	58
4.5	ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตีรังรูปเทียบกับไลเปส อิสระ.....	59
4.6	แสดงกราฟพื้นผิว 3 มิติระหว่างผลของปัจจัยที่ระดับสูงและระดับต่ำของ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณเฮกเซน (มิลลิลิตร) ต่อ ร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้.....	63
4.7	แสดงกราฟพื้นผิว 3 มิติระหว่างผลของปัจจัยที่ระดับสูงและระดับต่ำของ คุณสมบัติ (องศาเซลเซียส) และเวลา (ชั่วโมง) ต่อร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้.....	63
4.8	การประมาณค่า Km โดยวิธีไลน์เวออร์-เบิร์กของไลเปสตีรังรูป.....	64
4.9	แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย C2 กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	65
4.1	แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย C2 บนอาหารแข็งไทรูบูไทริน.....	65
4.11	รูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย C2.....	66
4.12	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย C2 เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Staphylococcus warneri</i> (Accession No. L37603) ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN...	68

รูปที่		หน้า
5.1	ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไลเปส.....	70
5.2	ผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการบ่มและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไลเปส.....	70
5.3	ผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการบ่มและอุณหภูมิต่อการผลิตไลเปส.....	71
5.4	การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันพืช (Ma และ Hanna, 1999).....	75



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ตลอดหลายปีที่ผ่านมา วิกฤติการณ์ราคาน้ำมันแพงกับปริมาณน้ำมันสำรองที่น้อยลงส่งผลกระทบต่อประเทศไทยอย่างมาก นับตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2543 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน (2548) ราคาน้ำมันดีเซลได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากราคาปกติลิตรละ 7-8 บาท ได้พุ่งสูงขึ้นถึงลิตรละ 26.29 บาท ตามปริมาณการใช้น้ำมันที่เพิ่มขึ้นของประเทศ ทำให้ประเทศต้องพึ่งพาการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศปีหนึ่งๆเป็นจำนวนหลายแสนล้านบาท ดังนั้นการแสวงหาแหล่งพลังงานใหม่ที่ได้จากผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งจัดว่าเป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) จึงได้รับความสนใจเพื่อนำมาใช้แทนน้ำมันดิบที่จัดว่าเป็นพลังงานสิ้นเปลือง (non-renewable energy) ประมาณการว่าน้ำมันจะหมดไปในอีก 40 ปีข้างหน้า ([www.dmr.go.th](http://www.dmr.go.th), 2546) จึงได้มีการตื่นตัวเพื่อแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทน ไบโอดีเซลจึงเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซล โดยมีวัตถุดิบเป็นน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ การนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลสามารถทำได้หลายวิธี คือ การนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง การผสมน้ำมันพืช (หรือสัตว์) กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล และการนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สำหรับการนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรงและการผสมน้ำมันพืชกับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซลนั้น พบว่าก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันพืชกับน้ำมันดีเซลในตารางที่ 1.1 จะเห็นว่าน้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลมากกว่า 10 เท่า ความหนืดของน้ำมันพืชทำให้หัวฉีดน้ำมันฉีดเป็นฝอยได้ยาก เป็นอุปสรรคต่อระบบป้อนน้ำมันเข้าสู่ห้องเผาไหม้ และเกิดการสันดาปที่ไม่สมบูรณ์ และเกิดกากคาร์บอนหลงเหลือหลังการเผาไหม้เป็นคราบเขม่าเกาะที่หัวฉีด ดังนั้นไบโอดีเซลที่ได้จากกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จึงเป็นวิธีที่นิยมทำมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากไบโอดีเซลที่ได้จากวิธีนี้มีความปลอดภัยต่อเครื่องยนต์มากกว่าและมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด

ตารางที่ 1.1 คุณสมบัติและค่าความร้อนของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ (พิศมัย เจนวนิชปัญญกุล, 2544)

น้ำมัน	ค่าไอโอดีน	ความถ่วงจำเพาะที่ 21 °C (g/ml)	ความหนืดที่ 21°C (centipoise)	ค่าความร้อน (kJ/kg)
ถั่วเหลือง	124-139	0.918	57.2	39,350
มะพร้าว	6-11	0.915	51.9	37,540
ถั่วลิสง	86-107	0.914	67.1	39,470
ปาล์ม	14-21	0.898	88.6	39,550
เมล็ดในปาล์ม	50-55	0.904	66.3	39,720
เมล็ดสบูดำ	101	0.915	36.9 ที่ 38°C	39,000
น้ำมันดีเซล	ND	0.845	3.8	46,800

เนื่องจากราคาของไบโอดีเซลที่ได้จากกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชันยังมีราคาสูงอยู่เมื่อเทียบกับราคาน้ำมันดีเซล ทั้งนี้เป็นเพราะต้นทุนวัตถุดิบมีราคาสูง ดังนั้นการนำวัตถุดิบที่ได้จากพืชน้ำมันที่มีการปลูกมากภายในประเทศสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ จากตารางที่ 1.2 พบว่าประเทศไทยผลิตน้ำมันปาล์มได้มากที่สุดและพบว่าเป็นผู้ผลิตรายใหญ่เป็นอันดับ 4 ของโลก รองจาก มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไนจีเรีย (กล้าณรงค์ ศรีรอด และคณะ, 2546)

ตารางที่ 1.2 ปริมาณการผลิตพืชน้ำมันของประเทศไทย (พันตัน) (พิศมัย เจนวนิชปัญญกุล, 2544)

ปี พ.ศ.	ปาล์มน้ำมัน	ถั่วเหลือง	ถั่วลิสง	มะพร้าว	ละหุ่ง	งา
2538	2,255	386	147	1,413	6	34
2539	2,688	359	147	1,419	6	34
2540	2,681	338	126	1,386	6	35
2541	2,465	321	135	1,372	7	36
2542	3,512	-	-	-	-	-

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ดังนั้นหากสามารถนำผลผลิตทางการเกษตรมาแปรรูปโดยทำเป็นไบโอดีเซลเพื่อทดแทนการใช้ น้ำมันดีเซลโดยตรงได้บางส่วนแล้ว ก็จะเป็นการลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศลงได้ และยังทำให้ลดการขาดดุลการค้าได้

งานวิจัยนี้มุ่งหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) จากน้ำมันปาล์มโดยใช้ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรีย เพื่อนำไปปรับปรุงใช้ประโยชน์ต่อไป

### ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. การคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสสูงจากตัวอย่างดินและน้ำ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียล
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียล
4. ศึกษาจลนพลศาสตร์เอนไซม์ ณ สภาวะเหมาะสม

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 2

### ปรัทัศน์วรรณกรรม

ในภาวะปัจจุบันประเทศที่พัฒนาแล้วให้ความสนใจผลิตและใช้ไบโอดีเซลอย่างแพร่หลาย โดยมีการทดลองผลิตเพื่อใช้กันเองในครอบครัว และการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบ จนถึงระดับที่ผลิตเพื่อจำหน่ายเป็นอุตสาหกรรม วัตถุประสงค์ในการผลิตไบโอดีเซลคือน้ำมันพืชและน้ำมันสัตว์ น้ำมันพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบสามารถสกัดจากพืชน้ำมันได้ทุกชนิด การพิจารณาเลือกพืชชนิดใดมาใช้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำมันในพืชชนิดนั้น รวมทั้งความเหมาะสมของปริมาณการเพาะปลูก พืชน้ำมันในพื้นที่นั้นๆด้วย เช่น ในยุโรปตอนเหนือจะผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันrapeseed ทางยุโรปตอนใต้จะผลิตจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน อเมริกาและแคนาดาจะผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดเรพ มาเลเซียผลิตจากน้ำมันปาล์ม นิคารากัวใช้น้ำมันเมล็ดสบู่ดำ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีการปลูกมากที่สุด (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545) จึงเป็นพืชน้ำมันที่เหมาะสมในการนำมาผลิตไบโอดีเซล

#### 2.1 ไขมันและน้ำมัน

ไขมันและน้ำมันเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอริน ไขมันเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ส่วนน้ำมันเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ไขมันและน้ำมันมีส่วนประกอบทางเคมีเหมือนกัน กรดไขมันที่อยู่ในไขมันและน้ำมันอาจเป็นชนิดเดียวกันทั้ง 3 โมเลกุล หรือต่างชนิดกันก็ได้ ถ้ากรดไขมันทั้งสามโมเลกุลมีลักษณะทางโครงสร้างเหมือนกัน ไตรกลีเซอไรด์ที่ได้เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์อย่างง่าย (simple triglyceride) ถ้าไม่เหมือนกันก็จะเรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ผสม (mixed triglyceride) ในธรรมชาติน้ำมันพืชและไขมันจะประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ผสมเป็นส่วนมาก ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ลักษณะทางกายภาพของน้ำมันพืชและไขมันที่เกิดตามธรรมชาตินั้น มีความแตกต่างกันแม้ว่าจะมาจากสัตว์หรือพืชชนิดเดียวกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของพืชและสัตว์นั้น ไขมันหรือน้ำมันจากสัตว์มีกรดไขมันที่อิ่มตัวอยู่มาก และมักเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ไขมันและน้ำมันจากสัตว์ได้แก่ ไขมันในเนื้อสัตว์ ไขมันในไข่แดง ไขมันนํานม และน้ำมันหมู ส่วนไขมันและน้ำมันจากพืช มีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวอยู่มาก

(ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว) ได้แก่ น้ำมันรำ น้ำมันถั่ว น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์ม น้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันดอกทานตะวัน เป็นต้น (ประดิษฐ์ มีสุข, 2544)

## 2.2 น้ำมันปาล์ม (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในที่ลุ่มเขตร้อนทวีปแอฟริกาทางฝั่งตะวันออก แหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกากลาง และทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันที่สำคัญอยู่ในภาคใต้และภาคตะวันออก โดยในภาคใต้ บริเวณที่ปลูกมากที่สุดอยู่ที่จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ในภาคตะวันออกปลูกมากที่จังหวัดชลบุรีและระยอง

น้ำมันปาล์มสกัดได้จาก 2 ส่วน คือ

- ส่วนแรกจากเปลือกผลชั้นนอกและเนื้อผลชั้นนอกเรียกว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil)
- ส่วนที่สองจากเนื้อผลชั้นในและเอนบริโอ เรียกว่าน้ำมันเมล็ดในปาล์ม (palm kernel oil) น้ำมันทั้งสองชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน น้ำมันเมล็ดในปาล์มมีสมบัติคล้ายน้ำมันมะพร้าวคือ มีกรดลอริกสูง ส่วนน้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบคล้ายน้ำมันหมู มีวิตามินเอและอีสูงกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น มีกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ โดยมีกรดปาล์มมีติกและกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงถึง 0.6 - 0.8 ตัน/ไร่/ปี เมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารและใช้ในการประกอบอาหารเนื่องจากมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูง ไม่ทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง น้ำมันปาล์มมีราคาต่ำกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น และประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ในปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันชนิดอื่น

## 2.3 การใช้ประโยชน์จากน้ำมันปาล์ม (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

น้ำมันปาล์มสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และแบ่งกลุ่มการนำไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

### 2.3.1 อุตสาหกรรมด้านอาหาร

น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์มประมาณ 80% นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น น้ำมันทอด น้ำมันปรุงอาหาร มาการีน ไอศกรีม ครีมเทียม นมเทียม เนยขาว ขนมหั้ว ขนมหั้วบั้ง ฯลฯ รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ เช่น วิตามินอี วิตามินเอ

### 2.3.2 อุตสาหกรรมโอเลโอเคมิคอล

น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม ประมาณ 20% นำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสินค้าอุปโภค โดยผ่านกระบวนการทางเคมี ดังนี้

2.3.2.1 การผลิตกรดไขมันประเภทต่างๆ ทั้งกรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัว เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น

- กรดลอริก ใช้ทำเป็นเรซินในอุตสาหกรรมสี
- กรดปาล์มมิติก ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราเพื่อสกัดเป็นยาปฏิชีวนะ ผสมกับกรดสเตียริกเพื่อทำเทียนไข
- กรดโอเลอิก ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ
- กรดสเตียริก ใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง สบู่เด็ก ผสมกับกรดปาล์มมิติกเพื่อทำเทียนไข
- กรดลิโนเลอิก ใช้เป็นยาฉีดสำหรับลดไขมันในเส้นเลือด

2.3.2.2 การผลิตเมทิลเอสเทอร์ เป็นสารที่ได้จากการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่าง น้ำมันปาล์มกับเมทิลแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรด ต่าง หรือเอนไซม์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งในด้านพลังงาน หรือใช้เป็นสารสำหรับผลิตอนุพันธ์ของกรดไขมัน ประเภทต่างๆ และมีผลพลอยได้ที่สำคัญและมีมูลค่าสูงคือ กลีเซอรอล และเมทิลเอสเทอร์

- Fatty Alcohol ใช้ประโยชน์ในการผลิต Sodium Alkyl Sulphates และ Surfactant ที่ใช้ผลิตผงซักฟอก

- Fatty Acid Amides มีคุณสมบัติช่วยกันน้ำ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การผลิตกระดาษ ไม้อัด โลหะ ยาง ฯลฯ

- Fatty Amines ที่มีความสำคัญนิยมใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การผลิตพลาสติก น้ำมันหล่อลื่น สารควบคุมเชื้อราและแบคทีเรีย ฯลฯ

## 2.4 น้ำมันดีเซล (ปราโมทย์ ไชยเวช, 2537)

น้ำมันดีเซล (diesel fuel) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในกลุ่มพาราฟิน ที่ได้จากการกลั่นน้ำมันดิบ มีช่วงจุดเดือดและความข้นใสสูงกว่าน้ำมันเบนซิน เนื่องจากเครื่องยนต์ดีเซลเป็นเครื่องยนต์ที่มีการทำงานแตกต่างจากเครื่องยนต์เบนซิน การจุดระเบิดของเครื่องยนต์ดีเซลใช้ความร้อนที่เกิดจากการอัดอากาศอย่างมากภายในกระบอกสูบ แล้วฉีดเชื้อเพลิงเข้าไปเพื่อทำการเผาไหม้ ไม่ใช่เป็นการจุดระเบิดจากหัวเทียนเหมือนในเครื่องยนต์เบนซิน เครื่องยนต์ดีเซลในสมัยแรกๆนั้นมีขนาดใหญ่โตมาก เพราะต้องการให้ทนกับความร้อนและแรงอัดสูงๆได้ เครื่องยนต์ดีเซลสมัยก่อนนำไปใช้เป็นเครื่องต้นกำลัง เช่น ใช้เป็นต้นกำลังในการผลิตกระแสไฟฟ้า โรงงานอุตสาหกรรมและใช้ในเรือ ต่อมาได้มีการพัฒนาสร้างเครื่องยนต์ให้มีขนาดเล็กกลงแต่มีประสิทธิภาพสูง เช่น ใช้เป็นเครื่องต้นกำลังของเครื่องมือและอุปกรณ์หลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น รถไฟ รถบรรทุก รถแทรกเตอร์ เรือประมง เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันดีเซลให้เหมาะสมกับเครื่องยนต์ที่ใช้กับงานนั้นๆ

น้ำมันดีเซลที่ใช้อยู่ในประเทศไทยมีอยู่ 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

- น้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องรอบเร็ว (automotive diesel oil)
- น้ำมันดีเซลสำหรับเครื่องรอบช้า (industrial diesel oil)

น้ำมันดีเซลที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีหลายบริษัท เช่น ปตท. เอสโซ่ เชลล์ ฯลฯ น้ำมันดีเซลที่ท้องตลาดเรียกว่าโซล่าสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบเร็ว ซึ่งส่วนมากใช้กับยานยนต์ เรือขนาดเล็ก เครื่องกำเนิดไฟฟ้าขนาดเล็กและอุปกรณ์ก่อสร้าง หรือใช้เผาไหม้ให้ความร้อนในงานอุตสาหกรรม หรือใช้ต้มน้ำร้อนในโรงแรม ส่วนน้ำมันซีดี สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลรอบช้าและปานกลางซึ่งนิยมใช้ในงานอุตสาหกรรมและเรือขนาดใหญ่ หรือใช้เผาไหม้ให้ความร้อน แต่น้ำมันชนิดนี้มีสีเข้มกว่าโซล่า สีของน้ำมันดีเซลโดยธรรมชาติมีสีชาอ่อน แต่บางครั้งสีอาจเปลี่ยนไปบ้างเนื่องจากในกระบวนการกลั่นน้ำมันอาจจะใช้น้ำมันดิบจากแหล่งต่างๆกัน ซึ่งอาจทำให้น้ำมันดีเซลมีสีอ่อนหรือเข้มไปบ้าง แต่คุณสมบัติในการเผาไหม้ยังคงเดิม สีของน้ำมันดีเซลไม่ได้เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพิจารณาคุณภาพของน้ำมัน แต่ได้กำหนดไว้ให้อยู่ในมาตรฐานของ ASTM ไม่เกิน 3 ซึ่งเป็นสีคล้ายกับสีชา และสีนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ คือสีจะเข้มขึ้นถ้าเก็บไว้นานๆ ในกรณีที่สีของน้ำมันดีเซลเปลี่ยนแปลงไปมาก เช่น เป็นสีเขียวหรือสีดำคล้ำ ควรตั้งข้อสังเกตว่าอาจมีการปลอมปนของน้ำมันก๊าด (สีน้ำเงิน) หรือน้ำมันเตาหรือน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้ว (สีดำ)

## 2.5 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลคือเชื้อเพลิงที่ได้จากน้ำมันพืชและสัตว์ผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) เกิดเป็นสารที่เรียกว่าเมทิลเอสเทอร์ หรือเอทิลเอสเทอร์ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลที่กลั่นจากน้ำมันปิโตรเลียม สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่ต้องทำการดัดแปลงเครื่องยนต์ (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

เนื่องจากต้นทุนวัตถุดิบสูงเป็นอุปสรรคสำคัญ ที่ทำให้ไบโอดีเซลไม่สามารถแข่งขันกับน้ำมันดีเซลจากฟอสซิลได้ การผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันจึงพัฒนาเพื่อให้สามารถใช้ส่วนผสมของน้ำมันหลายชนิดเป็นวัตถุดิบได้ ตั้งแต่ น้ำมันที่กลั่นบริสุทธิ์ไปจนถึงน้ำมันใช้แล้ว การที่สามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด และบางชนิดยังเป็นผลผลิตหลักของประเทศ สามารถลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลได้

ในจำพวกพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่จะมีความสำคัญในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากเป็นพลังงานหมุนเวียน ซึ่งมีอยู่ไม่จำกัดตราบใดที่โลกยังมีพืชและแสงแดดเป็นพลังงานสีเขียว ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม เมื่อเผาผลาญจะให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbonmonoxide, CO) น้อยกว่าน้ำมันดีเซลปกติ และไม่ปล่อยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfurdioxide, SO<sub>2</sub>) ช่วยลดผลกระทบจากปรากฏการณ์เรือนกระจก (greenhouse effect) ใน



เอกสารของ Korbitz (1999) ได้ระบุว่าในการใช้ไบโอดีเซล 1 กิโลกรัม จะได้ก๊าซผสมในกลุ่มก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลดลงถึง 99% ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ลดลง 20% ไฮโดรคาร์บอนลดลง 32% เหม่าลดลง 50% และฝุ่นละอองลดลง 39% และเนื่องจากไบโอดีเซลผลิตมาจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร จึงสามารถถูกจุลินทรีย์ในธรรมชาติย่อยสลายได้ คาร์บอนที่ย่อยสลายจะหมุนเวียนเป็นวัฏจักรโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช จึงไม่เพิ่มภาวะเรือนกระจกเหมือนการใช้น้ำมันดีเซล มีรายงานว่าไบโอดีเซลสามารถถูกย่อยสลายได้ 90% ภายใน 3 สัปดาห์ เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (Rodinger, 1994)

การพัฒนาอย่างเป็นรูปธรรมของไบโอดีเซลเกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1985 เมื่อออสเตรเลียได้ตั้งโรงงานต้นแบบในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมัน rapeseed เป็นครั้งแรก และในปี 1990 ได้มีการผลิตทางการค้าเป็นครั้งแรก ในระยะแรกมีความตั้งใจจะใช้ไบโอดีเซลกับเครื่องจักรกลทางการเกษตรซึ่งได้รับการรับรองจากผู้ผลิตรถแทรกเตอร์เกือบทุกยี่ห้อเป็นอย่างดี เช่น Massey-Ferguson, John Deere ต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของตลาดไปเป็น ยานพาหนะที่ใช้เครื่องยนต์ดีเซล ซึ่งได้รับการสนับสนุนอย่างดีจากกลุ่มอุตสาหกรรมยานยนต์ต่างๆ เช่น Ford, Mercedes เป็นต้น นอกจากนั้นเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นแก่ผู้บริโภค ออสเตรเลียยังได้ออกมาตรฐานไบโอดีเซลฉบับแรกสำหรับ rapeseed-methyl ester (ON C 1190) ในปี 1991 และสำหรับ fatty acid methyl ester (ON C 1191) ในปี 1997 ต่อมาประเทศอื่นๆ ได้ออกมาตรฐานไบโอดีเซลตามมา ได้แก่ ฝรั่งเศสและอิตาลีในปี 1993 สาธารณรัฐเชคโกลโวะเกียในปี 1994 สวีเดนในปี 1996 (SS 15 54 36) และสหรัฐอเมริกา (ASTM)

นอกจากจะช่วยปัญหาการขาดแคลนน้ำมันปิโตรเลียมแล้ว ไบโอดีเซลยังเป็นแนวทางในการพัฒนาความยั่งยืนของระบบพลังงานและการเกษตร ลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ สร้างงานและกระจายรายได้สู่ท้องถิ่น ลดปัญหาแรงงานอพยพเข้าเมือง นำไปสู่การพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนที่ยั่งยืน

## 2.6 ประวัติความเป็นมาของการนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืชได้ถูกทำขึ้นในปี ค.ศ. 1853 ก่อนที่เครื่องยนต์ดีเซลจะถูกคิดค้นขึ้นโดย Duffy และ Patrick แต่แนวคิดในการใช้น้ำมันพืชเพื่อเป็นเชื้อเพลิงเริ่มต้นจาก Rudolph Diesel โดยได้ใช้น้ำมันถั่วลิสงเป็นเชื้อเพลิงให้กับเครื่องยนต์สันดาปภายในและแสดงในงานเอกซ์โปที่กรุงปารีสในปี ค.ศ. 1900 (Altil และคณะ, 2001) แต่ไม่เป็นที่สนใจมากนักเนื่องจากราคาน้ำมันดีเซลในขณะนั้นยังมีราคาถูก การนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงจึงมักใช้ในสถานการณ์คับขันเท่านั้น เช่น ในปี ค.ศ.1980 ประเทศแถบอเมริกาใต้ถูกกดดันทางการเมืองและถูกปิดล้อมการขนส่งน้ำมัน (oil embargo) จึงได้ใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวันผสมน้ำมันเบนซินเป็นเชื้อเพลิง จนกระทั่งเหตุการณ์ขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงในช่วงทศวรรษที่ 70 และสงครามอ่าวเปอร์เซียในปี ค.ศ. 1991 อีกทั้งปัญหาต่าง ๆ เช่น ราคาน้ำมันที่สูงขึ้น การประกาศเตือนปริมาณน้ำมันที่จะหมดในอนาคตอันใกล้ ปริมาณผลผลิตทางเกษตรที่เกินความต้องการและกระแสตื่นตัวในปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นตัวเร่งอย่างดี ให้แต่ละประเทศค้นหาพลังงานจากแหล่งอื่น ๆ เพื่อมาทดแทน และในปี ค.ศ.1982 ได้มีการประชุมทางวิชาการนานาชาติเกี่ยวกับการใช้น้ำมันพืชเป็นเชื้อเพลิงเป็นครั้งแรก (The first international conference on plant and vegetable oils as fuels) ที่ North Dakota สหรัฐอเมริกา (Ma และ Hanna, 1999) และหลังจากนั้นมา ความตื่นตัวในการหาพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลได้ขยายกว้างขวางขึ้น โดยมีสาเหตุมาจากปัญหาที่สำคัญ 2 ประการคือ ปัญหาน้ำมันเชื้อเพลิงและปัญหาสิ่งแวดล้อม

## 2.7 การนำน้ำมันพืชมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลมี 3 แนวทาง คือ

### 2.7.1 การนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง

วิธีนี้ทำได้โดยเติมน้ำมันพืชหรือสัตว์ลงในเครื่องยนต์โดยไม่มีการเติมสารเคมีหรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำมันแต่อย่างใด

ข้อดีของวิธีนี้คือ

- ธรรมชาติของน้ำมันพืชเป็นของเหลวจึงสามารถเติมลงในเครื่องยนต์ได้ทันที
- มีค่าความร้อนสูงประมาณ 80% ของน้ำมันดีเซล
- หาได้ง่ายทั่วไปแต่อาจต่างชนิดกันตามแหล่งพื้นที่เกษตรกรรม

ข้อเสียของวิธีนี้คือ

- น้ำมันพืชเป็นสารที่ไม่อยู่ตัว กล่าวคือน้ำมันพืชจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายรวมทั้งเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้ที่อุณหภูมิสูง ทำให้น้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้หัวฉีดน้ำมันฉีดน้ำมันให้เป็นฝอยได้ยากเป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิงเข้าสู่ห้องเผาไหม้ และเกิดการสันดาปไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดปัญหาสำหรับเครื่องยนต์เมื่อใช้น้ำมันพืชเป็นเชื้อเพลิงโดยตรง
- สิ่งเจือปนเช่น น้ำ หรือกัม (gum) ในน้ำมันพืช เป็นสาเหตุให้การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดเขม่าในเครื่องยนต์

Harwood (1984) ได้รายงานเรื่องปัญหาและแนวทางแก้ไขปัญหาในการใช้น้ำมันพืชในเครื่องยนต์ดีเซลโดยตรงดังแสดงในตารางที่ 2.1

มีรายงานในประเทศไทยถึงการนำน้ำมันพืชมาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงในเครื่องยนต์ดีเซลดังนี้

- พิศมัย เจนวนิชปัญญกุล และคณะ (2525) รายงานการวิจัยโดยใช้น้ำมันถั่วลิสงเป็นเชื้อเพลิงเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ยี่ห้อขนาด 7 แรงม้า โดยไม่มีการดัดแปลงเครื่องยนต์ พบว่าน้ำมันถั่วลิสงมีความหนืดสูง การติดเครื่องยนต์เป็นไปได้ยาก เครื่องเดินสะดุด การสันดาปเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และพบว่าที่เครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันถั่วลิสงมีเขม่าจับที่ลูกสูบและวาล์วมากกว่าที่ใช้น้ำมันดีเซล

- ในปี พ.ศ. 2543 พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงมีพระราชกระแสรับสั่งให้ดำเนินการทดลองนำน้ำมันปาล์มกลั่นบริสุทธิ์มาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลของรถยนต์ ในกองงานส่วนพระองค์ จากผลการทดลองพบว่าไม่มีผลกระทบใดๆในทางลบกับเครื่องยนต์ดีเซล (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

ตารางที่ 2.1 ปัญหาการใช้งานระยะสั้นและระยะยาวพร้อมแนวทางแก้ไขสำหรับการนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรงในเครื่องยนต์ดีเซล (Harwood, 1984)

ปัญหา	สาเหตุ	แนวทางแก้ไข
<p>การใช้งานระยะสั้น</p> <p>1. การเดินเครื่องมีปัญหาที่อุณหภูมิต่ำ</p> <p>2. ระบบหัวฉีดน้ำมันอุดตัน</p> <p>3. เครื่องน็อค</p>	<p>น้ำมันพืชมีความหนืดสูง มีค่าซีเทนและจุดวาบไฟต่ำ</p> <p>กัม(gum)ที่มีอยู่ในน้ำมันพืช</p> <p>น้ำมันพืชมีค่าซีเทนต่ำและการลุกไหม้เกิดขึ้นช้ามาก</p>	<p>อุ่นน้ำมันพืชก่อนนำมาใช้หรือใช้ปฏิกิริยาเคมีเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชให้เป็นเอสเทอร์</p> <p>ทำน้ำมันพืชให้บริสุทธิ์หรือกรองโดยใช้ตัวกรองขนาด 4 ไมครอน</p> <p>ใช้ความดันของหัวฉีดน้ำมันและเลือกห้องเผาไหม้ที่เหมาะสม</p>
<p>การใช้งานระยะยาว</p> <p>4. หัวฉีดฉีดน้ำมันเป็นฝอยได้ยาก เกิดการสันดาปไม่สมบูรณ์</p> <p>5. เกิดตะกอนถ่านที่กระบอกสูบ</p>	<p>น้ำมันพืชมีความหนืดสูง</p> <p>น้ำมันพืชมีความหนืดสูง</p>	<p>อุ่นน้ำมันพืชก่อนนำมาใช้หรือใช้ปฏิกิริยาเคมีเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชให้เป็นเอสเทอร์</p> <p>อุ่นน้ำมันพืชก่อนนำมาใช้หรือใช้ปฏิกิริยาเคมีเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันพืชให้เป็นเอสเทอร์หรือเติมน้ำมันพืชสลับกับน้ำมันดีเซล</p>
<p>6. ชิ้นส่วนเครื่องยนต์ถูกกัดกร่อน</p>	<p>เกิดการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากกรดไขมันอิสระ, น้ำมันหล่อลื่นในเครื่องยนต์เจือจางเพราะมีน้ำมันพืชที่เผาไหม้ไม่หมดมาเจือปน</p>	<p>ใส่สาร motor oil additives เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน</p>
<p>7. น้ำมันหล่อลื่นในเครื่องยนต์ไม่สามารถทำงานได้</p>	<p>เกิดการรวมตัวกันของกรดไขมันอิสระในน้ำมันพืช</p>	<p>ใส่สาร motor oil additives เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน</p>

## 2.7.2 การผสมน้ำมันพืชหรือสัตว์กับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซล

วิธีนี้แก้ปัญหาคความหนืดของน้ำมันพืชได้แต่เมื่อใช้งานที่อุณหภูมิต่ำอาจเกิดไขของน้ำมันพืชได้

Peterson และคณะ (1983) พบว่าเมื่อผสมน้ำมันrapeseedกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 สามารถนำมาใช้ในเครื่องยนต์โดยไม่เกิดปัญหาเครื่องน็อคหรือส่งผลกระทบต่อการทำงานของน้ำมันหล่อลื่นแต่อย่างใด

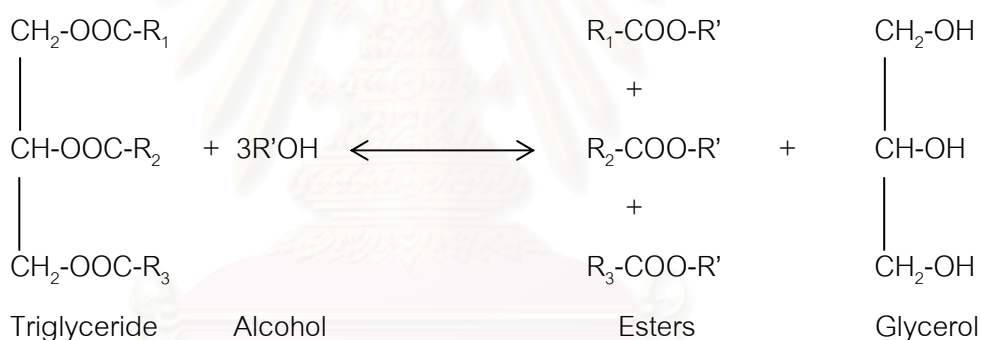
Strayer และคณะ (1983) พบว่าเมื่อผสมน้ำมันคาโนลา (canola oil) กับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 ทำให้ความหนืดของน้ำมันคาโนลาลดลงจาก 37.82 เซนติสโตรก เหลือเพียง 19 เซนติสโตรก และนอกจากผสมกับน้ำมันดีเซลแล้ว ยังสามารถลดความหนืดได้โดยผสมกับเอทานอลในอัตราส่วน 10 ต่อ 1 ซึ่งจะทำให้ค่าความหนืดลดลงเหลือ 21.15 เซนติสโตรก

สำหรับในประเทศไทยการผสมน้ำมันพืชกับน้ำมันก๊าดหรือน้ำมันดีเซลนั้นใช้อัตราส่วนแตกต่างกันไปในแต่ละจังหวัดของประเทศ เช่น

- สูตรอำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม ใช้ น้ำมันมะพร้าวดิบ:น้ำมันก๊าด:น้ำมันดีเซล ในอัตราส่วน 20:1:4
- สูตรอำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ใช้ น้ำมันมะพร้าวดิบ:น้ำมันก๊าด ในอัตราส่วน 20:1
- สูตรจังหวัดชุมพร ใช้ น้ำมันปาล์มดิบ:น้ำมันก๊าด:น้ำมันดีเซล ในอัตราส่วน 60:7:40

### 2.7.3 การนำน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์มาผ่านกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) หรือแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน (ไขมันหรือน้ำมัน) ได้เอสเทอร์และกลีเซอรอล เป็นปฏิกิริยาชนิดย้อนกลับได้ (reversible reaction) จึงจำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาและต้องใช้แอลกอฮอล์มากเพื่อให้ได้ผลผลิต (yield) และชนิดผลิตภัณฑ์ตามต้องการ ซึ่งเอสเทอร์ที่ได้นี้ จะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมมากที่สุด หรือที่เรียกว่าไบโอดีเซล



#### รูปที่ 2.1 การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืช (Ma และ Hanna, 1999)

แอลกอฮอล์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจะเป็นแอลกอฮอล์โมเลกุลตรงที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ที่ตำแหน่งแรก (primary) หรือตำแหน่งที่สอง (secondary) มีจำนวนคาร์บอนอยู่ในช่วง 1-8 อะตอม ได้แก่ เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) โพรพานอล (propanol) บิวทานอล (butanol) และ เอมีลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมทานอลและเอทานอลจะใช้มากที่สุดเนื่องจากราคาถูก ง่ายและมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเหมาะสม (เป็นโพลาร์ (polar) และสายโมเลกุลสั้น (shortest chain alcohol) ทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และตัวเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น)



### 2.7.3.1 การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเกิดช้ากว่าเมื่อใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังต้องใช้อุณหภูมิที่สูง และใช้เวลานานกว่าถึงจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามถ้ากลีเซอรอลมีส่วนประกอบของกรดไขมันอิสระและน้ำอยู่มาก ดังนั้นการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดจะดีกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Ma และ Hanna, 1999) กรดที่ใช้ควรเป็นกรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลโฟนิกของสารอินทรีย์ มีรายงานการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้

สุรกิตติ ศรีสกุล และคณะ (2544) กล่าวถึงขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม โดยนำน้ำมันปาล์มดิบมาผสมกับเมทานอล แล้วผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความดัน 3 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้กรดในสถานะของแข็ง เช่น โซเดียมไบซัลเฟต (sodium bisulphate), โพแทสเซียมไบซัลเฟต (potassium bisulphate) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะได้กลีเซอรอลที่ไม่บริสุทธิ์ (crude glycerol) และ เมทิลเอสเทอร์

Mohamad และคณะ (2002) ใช้กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มใช้แล้วจากร้านอาหาร โดยแปรผันความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น 0.5 1.0 1.5 และ 2.25 โมลาร์ตามลำดับ พบว่ายิ่งความเข้มข้นของกรดที่ใช้มากขึ้น ปฏิกิริยาจะเกิดได้เร็วขึ้นและค่าความหนืดของเอทิลเอสเทอร์ที่ได้จะน้อยลงด้วย และพบว่าที่ความเข้มข้น 2.25 โมลาร์ กรดซัลฟิวริกเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่ากรดไฮโดรคลอริก

Tashtoush และคณะ (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนไขมันสัตว์ที่ใช้แล้วไปเป็นเมทิลและเอทิลเอสเทอร์ โดยใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เอทานอลที่มากเกินไป สามารถเปลี่ยนไขมันสัตว์เป็นเอสเทอร์ได้มากกว่าเมื่อใช้เมทานอล และยังได้เอทิลเอสเทอร์ ที่มีความหนืดต่ำกว่าเมทิลเอสเทอร์ และมีภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเมื่อใช้เอทานอลคือ ใช้เอทานอลมากเกินไป ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาในการทำปฏิกิริยา คือ 2 ชั่วโมง เกิดเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 78 โดยน้ำหนัก

### 2.7.3.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เบสที่ใช้กัน ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมเมทอกไซด์ โซเดียมเอไมด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โปแทสเซียมเมทอกไซด์ โปแทสเซียมเอไมด์ และ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยทั่วไปนิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งราคาถูก การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดการกัดกร่อนน้อยกว่ากรด นอกจากนี้เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากันปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วกว่าใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาถึง 4000 เท่า (Formo, 1954) จึงมักนิยมใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสอย่างกว้างขวางในระดับระบบการผลิตขนาดใหญ่

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเบสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น กลีเซอรอลและแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องมีน้ำในโมเลกุลให้น้อยที่สุด (Wright และคณะ, 1944) ทั้งนี้เพราะน้ำจะไปทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (saponification) ซึ่งหมายถึงการเกิดสบู่ ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอสเทอร์ลดลง และทำให้การแยกกลีเซอรอลออกจากเอสเทอร์ยากขึ้น มีรายงานการใช้เบสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันดังนี้

มูทิตา ยันบูรพา และคณะ (2545) สังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันพืช 3 ชนิด คือ ละครุ่ง เมล็ดในปาล์มและเมล็ดฝ้าย โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเกิดเมทิลเอสเทอร์สูงสุดในปฏิกิริยาที่ใช้น้ำมันละครุ่งโดยคิดเป็นร้อยละ 83.6 ของสารตั้งต้น สัดส่วนโดยมวลที่เหมาะสมของน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 1:5 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักของน้ำมันพืช ส่วนปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้สูงสุดจากปฏิกิริยาที่ใช้น้ำมันเมล็ดในปาล์มและน้ำมันเมล็ดฝ้ายคือ 92.1 และ 94.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เท่ากับในปฏิกิริยาที่ใช้น้ำมันละครุ่ง แต่มีสัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 1:6.67 และจากการศึกษาคุณสมบัติของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันทั้ง 3 ชนิด พบว่า เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากน้ำมันเมล็ดฝ้ายให้คุณสมบัติที่ใกล้เคียงน้ำมันดีเซลที่สุด

ธนาทิพย์ อัครผดุงสิทธิ์ และคณะ (2547) ทำการทดลองเพื่อสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันพืชใช้แล้วในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำมันพืชใช้แล้วจากร้านอาหารและเมทานอล โดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์คือ อัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมันพืชที่ใช้แล้วเป็น 4.5:1 ใช้ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักของน้ำมันพืช ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที ได้เมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 92.3 ของปริมาณสารตั้งต้น

Nimcevic และคณะ (2000) ศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจากน้ำมัน rapeseed กับ แอลกอฮอล์ โดยใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์สามารถเกิดเฉพาะเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ สำหรับกรดซัลฟิวริกสามารถเกิดโพรพิลเอสเทอร์และบิวทิลเอสเทอร์ได้เท่านั้น นอกจากนี้ที่อุณหภูมิใกล้จุดเดือดของแอลกอฮอล์การใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ลดเวลาในการทำปฏิกิริยา และแอลกอฮอล์ชนิดไซกิงจะเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าแอลกอฮอล์ชนิดไซตรง

Saka และ Kusdiana (2001) ได้พัฒนากระบวนการผลิตใหม่โดยใช้เมทานอลภาวะเหนือวิกฤต (supercritical method) ซึ่งวิธีใหม่นี้จะได้กระบวนการที่ง่ายขึ้น ลดเวลาในการทำปฏิกิริยาเหลือเพียง 120-240 วินาที ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งยังได้ผลผลิตสูงขึ้นอีกด้วย

### 2.7.3.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ถึงแม้ว่าการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์มากและใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยก็ตาม แต่การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยายังมีข้อเสียอยู่มาก เช่น การแยกกลีเซอรอลออกจากปฏิกิริยาทำได้ยาก เสียค่าใช้จ่ายในการแยกตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสออกจากผลิตภัณฑ์ น้ำเสียที่ได้จากการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มในการบำบัด และนอกจากนี้ปริมาณกรดไขมันอิสระและปริมาณน้ำยังส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาได้อีกด้วย

ไลเปสทั้งที่ได้จากในเซลล์และที่ผลิตออกมานอกเซลล์ สามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ทั้งในสภาวะที่มีและปราศจากน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 พบว่าการใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถช่วยลดปัญหาที่เกิดจากกระบวนการที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสกับเอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซล (Fukuda และคณะ, 2001)

	ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส	ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเอนไซม์
อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
ปริมาณกรดไขมันอิสระในสารตั้งต้น	ทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันได้สมบูรณ์	ได้อัลคิลเอสเทอร์
ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา	มีผลมาก	ไม่ค่อยมีผล
ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้	ปกติ	สูง
การแยกกลีเซอรอลออกจากปฏิกิริยา	ทำได้ยาก	ทำได้ง่าย
กระบวนการทำอัลคิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ต้องล้างผลิตภัณฑ์หลายครั้ง	ไม่ต้องล้างผลิตภัณฑ์
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ถูก	ค่อนข้างแพง

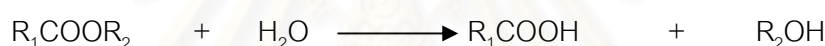
## 2.8 ไลเปส

ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบของ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ ไฮโดรเลส (EC 3.1.1.3) ไลเปสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสสามารถพบได้โดยทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ ไลเปสจากพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวโอ๊ต ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง ไลเปสจากสัตว์จะพบมากในตับอ่อนและน้ำมัน ส่วนไลเปสจากจุลินทรีย์จะพบได้ทั้งในยีสต์ เชื้อราและแบคทีเรีย ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสที่ได้จากพืชหรือสัตว์ ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่ายกว่า นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็ว โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทั้งวิธีผ่าเหล่าและวิธีทางพันธุวิศวกรรม ปัจจุบันนี้มีการนำไลเปสไปใช้ประโยชน์ในหลายทางด้วยกัน เช่น

อุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารหมัก เพราะไลเปสจะทำหน้าที่ผลิตกลิ่นและรสให้อาหารมีกลิ่นและรสเฉพาะตัวทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* และ *Aspergillus sp.* ใช้ในการผลิตชีสอิตาลีเลียน ส่วนไลเปสที่ใช้ในกระบวนการผลิตบลูชีสได้มาจาก *Penicillium roqueforti* แอลคาไลไนไลเปสที่ผสมในผงซักฟอกและน้ำยาซักผ้าจะทำหน้าที่ช่วยขจัดคราบไขมันในเสื้อผ้าได้ (Aehle, 2004) นอกจากนี้ไลเปสยังถูกนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลได้อีกด้วย

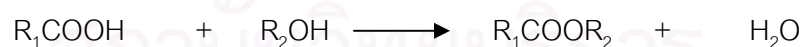
การเกิดปฏิกิริยาโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ สามารถจำแนกได้เป็น 3 แบบ คือปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Cambou และคณะ, 1984, Langrand และคณะ, 1986)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส



ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาระหว่างเอสเทอร์กับน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปของไลเปส ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดไขมันอิสระได้ (Kang และคณะ, 1988)

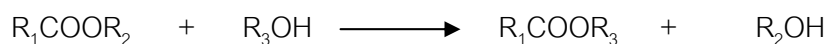
ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification)



ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอินทรีย์กับแอลกอฮอล์ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์กับน้ำ โดยเอสเทอร์ที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ยา และ เชื้อเพลิง แต่การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้น จะเกิดขึ้นในตัวกลางที่ไม่ใช่น้ำ แต่ต้องมีน้ำในปริมาณเล็กน้อยเพียงพอที่จะรักษาโครงรูปของเอนไซม์ไว้ (Stamatis และคณะ, 1993)



### ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

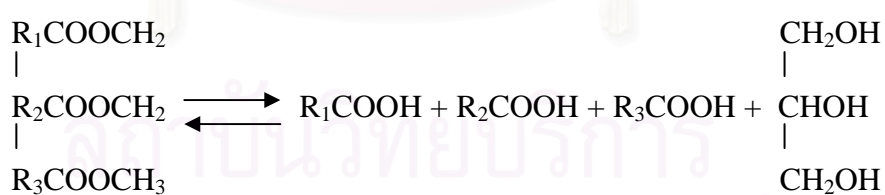


ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่มีการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิล (acyl group) ของสารประกอบเอสเทอร์ ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างเอสเทอร์กับกรดไขมันอิสระ (acidolysis) เอสเทอร์กับแอลกอฮอล์ (alcoholysis) เอสเทอร์กับเอสเทอร์ (interesterification) หรือเอสเทอร์กับกรดอะมิโน (aminolysis) ก็ได้แล้วแต่ชนิดของสารตั้งต้น (Yamane, 1987)

### ความจำเพาะของไลเปส

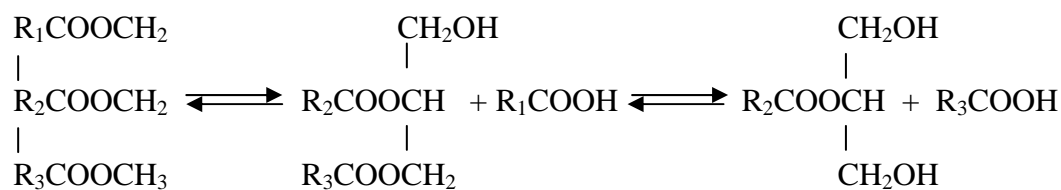
Kun (2003) แบ่งไลเปสตามความจำเพาะต่อสับสเตรทได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งของโมเลกุลของกลีเซอรอลหรือกรดไขมันที่เข้าทำปฏิกิริยา ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการย่อยสลายได้ทุกตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์และจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ ได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ไลเปสในกลุ่มนี้ได้จาก *Candida cylindraceae*, *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*



2. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินไปโดยมีการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 เท่านั้น ส่วนตำแหน่งที่ 2 ไม่เกิดการย่อยสลาย ไลเปสในกลุ่มนี้ได้จาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rhizopus arrhizus*





3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสในกลุ่มนี้จะย่อยสลายกรดไขมันที่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 (*cis* double bond) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ดี ไลเปสในกลุ่มนี้ได้จาก *Geotrichum candidum*

ตารางที่ 2.3 แสดงอัตราการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปสที่ได้จาก *Geotrichum candidum* (Macrae ,1983)

Triglyceride	Relative rate
Triolein( <i>cis</i> -9-18:1)	100
Trilinolein( <i>cis</i> , <i>cis</i> -9,12-18:2)	106
Trilinolenin(all <i>cis</i> -9,12,15-18:3)	99
Tripalmitolein( <i>cis</i> -9-16:1)	99
Trielaidin( <i>trans</i> -9-18:1)	21
Tripetroselenin( <i>cis</i> -6-18:1)	4
Tributylin(4:0)	2
Trihexanoin(6:0)	5
Trioctanoin(8:0)	29
Tridecanoin(10:0)	14
Trilaurin(12:0)	7
Trimyristin(14:0)	3
Tripalmitin(16:0)	5
Tristearin(18:0)	3

Saxena และคณะ (1999) ได้แบ่งไลเปสตามคุณสมบัติความจำเพาะต่อสับสเตรทได้ 2 แบบ เท่านั้นคือ ไลเปสที่ไม่จำเพาะต่อโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งจะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ กับไลเปสที่ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของโมเลกุล

## 2.9 เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme)

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง การจำกัดเขตของเอนไซม์ให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดให้ แต่ยังคงคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตามระบบการสร้างเอนไซม์ตรึงรูปนั้น (Wang และคณะ, 1979) อีกทั้งยังได้มีการพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีสมบัติที่ดีขึ้นหลายประการ ได้แก่

1. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสิ่งแวดล้อมที่เกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ง่าย
2. สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ได้อีก
3. กระบวนการผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำในระบบต่อเนื่องได้
4. เอนไซม์บางชนิดหลังจากตรึงรูปแล้วจะมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น ความเสถียรต่อความร้อน การเก็บรักษา ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ความไวต่อการตอบสนองต่อตัวยับยั้ง อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น

### 2.9.1 ตัวพยุ่ง (carrier) สำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

องค์ประกอบสำคัญสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ ตัวพยุ่ง วิธีการที่ทำให้เอนไซม์ติดยึดกับตัวพยุ่งหรืออยู่ภายในตัวพยุ่ง วัสดุที่ใช้เป็นตัวพยุ่งมีความสำคัญมากต่อแอกติวิตีและความคงตัวของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ตัวพยุ่งที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

- เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ
- มีพื้นผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึดของเอนไซม์
- มีการซึมผ่านได้ของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์
- มีความคงตัวต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระแทก
- มีรูปร่างและขนาดพอเหมาะ

- มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์
- สามารถนำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้

การจัดแบ่งชนิดของตัวพุง สามารถแบ่งตัวพุงตามลักษณะทางกายภาพหรือแบ่งตามสมบัติทางเคมี ได้ดังนี้

ชนิดของตัวพุงแบ่งตามลักษณะทางกายภาพได้เป็น 2 ชนิดคือ ตัวพุงที่ไม่มีรูพรุนและตัวพุงที่มีรูพรุน

#### 2.9.1.1 ตัวพุงที่ไม่มีรูพรุน

เมื่อใช้ตัวพุงที่ไม่มีรูพรุนมาตรึงเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีโอกาสถูกดูดยึดไว้ได้ในขอบเขตที่จำกัดเฉพาะที่ผิวของตัวพุงเท่านั้น เนื่องจากตัวพุงชนิดนี้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่ำ ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้เส้นใยหรือสารที่มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็ก เพื่อที่จะให้มีขนาดของพื้นที่ผิวมากพอที่จะให้เอนไซม์ยึดเกาะได้ ตัวพุงชนิดนี้มีข้อดีคือ สับสเตรทสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้โดยง่าย เนื่องจากเอนไซม์ถูกยึดไว้ที่ผิวบริเวณรอบนอกของตัวพุง

#### 2.9.1.2 ตัวพุงที่มีรูพรุน

ตัวพุงชนิดนี้มีพื้นที่ผิวสำหรับให้เอนไซม์เกาะหรือดูดยึดมากขึ้นเมื่อเทียบกับในปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนักกับตัวพุงที่ไม่มีรูพรุน ดังนั้นตัวพุงที่มีรูพรุนสามารถดูดยึดเอนไซม์ไว้ได้มากกว่า แต่มีข้อเสียเนื่องจากพื้นที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงนั้น จะต้องมีขนาดของรูพรุนใหญ่เพียงพอสำหรับให้โมเลกุลของสับสเตรทผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ และขณะเดียวกันจะต้องให้สารผลิตภัณฑ์ผ่านออกได้สะดวก ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการแพร่กระจายของสับสเตรทและสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านเข้าและออกจากตัวพุง ในตารางที่ 2.4 ได้แสดงการเปรียบเทียบข้อดีและข้อบกพร่องของตัวพุงที่มีรูพรุนและไม่มีรูพรุน

## ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบข้อดีและข้อบกพร่องของตัวพุงที่มีรูพรุนและไม่มีรูพรุน

ชนิดของตัวพุง	ข้อดี	ข้อบกพร่อง
ไม่มีรูพรุน	มีความต้านทานการถ่ายเทมวลสารน้อย	มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่ำ มีความจุในการตรึงเอนไซม์ต่ำ ในกรณีที่ตัวพุงมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดจะทำให้ยากต่อการแยกออก ไม่สะดวกในการใช้ในระบบต่อเนื่องเพราะปัญหาจากแรงดันลดลง และอัตราการไหลผ่านถูกจำกัด
มีรูพรุน	มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมาก มีความจุเอนไซม์สูง	จำกัดการแพร่กระจายของสาร มีราคาสูง (กรณีที่ควบคุมขนาดรูพรุน)

ชนิดของตัวพุงแบ่งตามสมบัติทางเคมีได้เป็น 2 ชนิด คือ ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์ และตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์

### 2.9.1.3 ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์

ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์นั้นมีข้อได้เปรียบกว่าในการใช้งานทางอุตสาหกรรม ทั้งนี้ สารอินทรีย์มีกลุ่มฟังก์ชัน (functional group) จำนวนมาก ที่สามารถตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อเสียเนื่องจากสมบัติทางกายภาพที่ทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์นี้ มีการสูญเสียความคงตัวได้ง่ายเมื่อได้รับการกระทบจากความร้อน สารเคมี และ จุลินทรีย์ เป็นต้น

#### 2.9.1.4 ตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์

ตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์มีความเหมาะสมหลายประการในการใช้งานทางอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความคงทนต่อแรงกระแทก ทนต่อความร้อนและสารเคมี ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ง่ายต่อการเก็บรักษา มีอายุการใช้งานนาน และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกโดยง่าย นอกจากนี้ตัวพุงอนินทรีย์ยังมีรูปร่างคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง ความดันหรือ อุณหภูมิก็ตาม ตัวพุงมีเพียงหมู่ไฮดรอกซิลเท่านั้นที่จะดูยึดเข้ากับปลายด้านที่ประกอบด้วย หมู่คาร์บอกซิลหรือหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ด้วยการดูดซับหรือระหว่างอ็อกอน และจะไม่เกิดพันธะ โคเวเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 การจัดประเภทของตัวพุงที่ใช้สมบัติทางเคมี (Chibata, 1978)

ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์	ตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์
<p>พอลิเมอร์ธรรมชาติ</p> <p>พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)</p> <p>    เซลลูโลส (cellulose)</p> <p>    แป้ง</p> <p>    เอการ์ (agar)</p> <p>    อกาโรส (agarose)</p> <p>    อัลจีเนต (alginate)</p> <p>    คาร์ราจีแนน (carrageenan)</p> <p>โปรตีน</p> <p>    คอลลาเจน (collagen)</p> <p>    เจลาติน (gelatin)</p> <p>    ไหม</p> <p>คาร์บอน</p>	<p>แร่ธาตุธรรมชาติ</p> <p>ดินเอททาพูลไกท์ (attapulgitite)</p> <p>หินพูไมซ์ (pumice stone)</p> <p>ทราย</p> <p>เบนโทไนท์ (bentonite)</p>
<p>พอลิเมอร์สังเคราะห์</p> <p>พอลิสไตรีน (polystyrene)</p> <p>พอลิเอคริเลต (polyacrylate)</p> <p>    เอคริเลต (acrylate)</p> <p>    เอคริลาไมด์ (acrylamide)</p> <p>พอลิเมอร์ของไวนิลและอัลลิล (vinyl and allyl polymers)</p> <p>พอลิเมอร์ของแมเลอิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride polymers)</p> <p>พอลิเอไมด์ (polyamide)</p> <p>    ไนลอน (nylon)</p>	<p>สารสังเคราะห์</p> <p>แก้วมีรูพรุน/แก้วไม่มีรูพรุน</p> <p>อลูมินา (alumina)</p> <p>ซิลิกา (silica)</p> <p>เหล็กออกไซด์</p> <p>นิกเกิล/นิกเกิลออกไซด์</p>



## 2.10 วิธีการตรึงเอนไซม์

วิธีการตรึงรูปของเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท (Aehle, 2004) คือ การตรึงโดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับตัวพุง (carrier binding) การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมโยง (cross-linking) และการตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ภายใน (entrapment)

### 2.10.1 การตรึงโดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับตัวพุง (carrier binding)

สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

#### 2.10.1.1 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ

(physical adsorption)

การดูดซับกับตัวพุงนั้นเกิดขึ้นกับแรงดึงดูดได้หลายแบบ เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic Interaction) แรงวานเดอร์วาล (van der waal's force) วิธีนี้ดีในแง่ที่เกิดการตรึงรูปได้ง่าย ไม่ซับซ้อน และภาวะการตรึงไม่รุนแรง แต่แรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงไม่ค่อยแข็งแรง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ และเกิดความเสียหายกับเอนไซม์น้อยสามารถนำตัวพุงกลับมาใช้ใหม่ได้ ตัวพุงที่มีการนำมาใช้ตรึงโดยวิธีนี้ได้แก่ ไคโตซาน (chitosan beads) เรซิน (resin beads) และ เม็ดแก้ว (glass beads)

#### 2.10.1.2 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยพันธะไอออนิก (ionic binding)

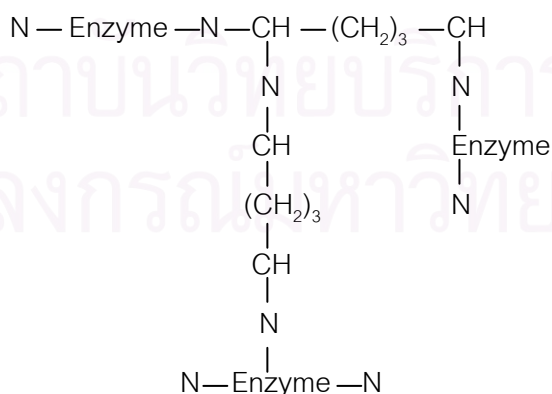
ในการตรึงวิธีนี้ตัวพุงจะมีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ (ion-exchange residue) การเชื่อมกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงเกิดโดยพันธะไอออนิก พันธะไอออนิกเป็นพันธะเคมีที่เกิดจากอะตอม 2 อะตอม รวมกันโดยถ่ายเทอิเล็กตรอนจากอะตอมหนึ่งไปอีกอะตอมหนึ่ง พันธะไอออนิกเป็นพันธะที่เกิดง่าย ดังนั้นจึงมีผลต่อการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์น้อย แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงอ่อน เอนไซม์สามารถหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย อุณหภูมิ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงความแรงของพันธะ ฉะนั้นการรักษาค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย อุณหภูมิ และความแรงของพันธะให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ ตัวพุงที่นำมาใช้ในการตรึงวิธีนี้ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) เซฟาเดกซ์ (sephadex) และเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange resins)

### 2.10.1.3 การตรึงรูปเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding)

การตรึงวิธีนี้เกิดจากการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังก์ชันนัลบนตัวพุงกับเอนไซม์ เกิดปฏิกิริยาเชื่อมกันเป็นพันธะโควาเลนต์ใหม่ บางครั้งจะนำตัวพุงมากระตุ้นโดยเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ต่างๆ การเชื่อมเอนไซม์ติดกับตัวพุงจะพยายามเชื่อมโดยใช้กลุ่มฟังก์ชันนัลของเอนไซม์ ที่ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์ แต่บางครั้งก็ควบคุมไม่ได้ เพราะเกิดการเชื่อมแบบสุ่ม เอนไซม์มักมีอายุการใช้งานยาวนานกว่าวิธีการตรึงแบบอื่นๆ

### 2.10.2 การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมโยง (cross-linking)

การตรึงวิธีนี้ทำโดยใช้สารโบและมัลติฟังก์ชันนัลซึ่งทำหน้าที่เชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ ทำให้เกิดเป็นอนุภาคใหญ่ขึ้น วิธีการตรึงแบบนี้จะเกิดขึ้นง่าย ไม่ค่อยซับซ้อน สามารถควบคุมสมบัติทางกายภาพและขนาดของอนุภาคที่ตรึงได้ แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ เอนไซม์จะเสียแอกติวิตีไปในกระบวนการตรึงรูปด้วยสารพวกนี้ จึงมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน สารโบฟังก์ชันนัลที่นิยมใช้ในการตรึงวิธีนี้คือ กลูตารัลดีไฮด์ (Taylor, 1991) นอกจากนี้ยังมี โทลูอีนไดไอโซไซยานาท และเฮกซะเมทิลีน ปฏิกิริยาการตรึงรูปโดยวิธีนี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ สภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมโยงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดของสารเชื่อมโยง ความเป็นกรดต่าง ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย อุณหภูมิ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา



รูปที่ 2.2 การเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ (Crueger และ Crueger, 1991)

### 2.10.3 การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ภายใน (entrapment)

วิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

#### 2.10.3.1 การจำกัดเขตเอนไซม์ในตัวพอง (lattice type)

เป็นการกักขังเอนไซม์ไว้ในโพรงของเจล เกิดจากการพอลิเมอร์เซชันของเจลในสารละลายที่มีเอนไซม์อยู่ ได้เป็นโครงสร้างของเจลขังเอนไซม์ให้อยู่ตามโพรงในโครงสร้างของเจลเหล่านั้น โพลีเมอร์ที่ใช้ได้แก่ แป้ง ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) อัลจิเนต (alginate)

#### 2.10.3.2 การจำกัดเขตเอนไซม์ในแคปซูลขนาดเล็ก (microcapsule type)

เป็นการตรึงรูปเอนไซม์ในรูปทรงกลมผนังบางแบบกึ่งซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) ผนังบางนี้จะไม่ยอมให้เอนไซม์ที่ถูกกักขังไว้ภายในซึมผ่านออกมา แต่จะยอมให้สับสเตรทและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านได้

ตารางที่ 2.6 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอ็นไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ (Kennedy และ Cabral, 1987)

ข้อเปรียบเทียบ	เทคนิคการตรึงเอ็นไซม์				
	เชื่อมโยง	ดูดยึดทางกายภาพ	ดูดยึดด้วยพันธะไอออนิก	ดูดยึดด้วยพันธะโควาเลนต์	ดักจับ
1. วิธีการเตรียม	สะดวก	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
2. การยึดระหว่างเอ็นไซม์กับตัวพยุง	แข็งแรง	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	ปานกลาง
3. การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่	ไม่ได้	ได้	ได้	ได้ในบางกรณี	ไม่ได้
4. ต้นทุนในการตรึง	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	สูง
5. ความคงตัวของเอ็นไซม์ตรึงรูป	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	ปานกลาง
6. การประยุกต์ใช้งาน	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้	ได้
7. การป้องกันการสลายตัวของเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์	ได้ บางครั้ง	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้

ตารางที่ 2.7 การตรึงรูปไลเปสโดยวิธีต่างๆ

ผู้ทำการวิจัย	แหล่งที่มาของไลเปส	วิธีการตรึง	ตัวพุง
Neito และ คณะ (2005)	<i>Rhizomucor miehei</i>	เชื่อมแบบพันธะไอออนิก เชื่อมแบบพันธะโควาเลนต์	Amberlite Eupergit
Yadav และ คณะ (2005)	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida antarctica</i>	ดูดซับทางกายภาพ ห่อหุ้มแคปซูล	Hexagonal mesoporous silica Calcium alginate beads
Vidinha (2005)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	ห่อหุ้มแคปซูล	Sol-gel
Tien และ คณะ (2003)	<i>Candida rugosa</i>	การเชื่อมโยง	Chitosan beads
Kristy และ คณะ (2000)	<i>Fusarium solani</i>	เชื่อมแบบพันธะโควาเลนต์	Polyacrylamide beads
Roxana และ คณะ (1998)	<i>Pseudomonas sp.</i>	ดูดซับทางกายภาพ	CaCO <sub>3</sub>
Helga และ คณะ (1998)	<i>Candida antarctica</i>	ดูดซับทางกายภาพ	Controlled-pore glass beads
Kang และ คณะ (1988)	<i>Candida rugosa</i>	ดูดซับทางกายภาพ	Sephadex LH
Pronk และ คณะ (1988)	<i>Candida rugosa</i>	ดูดซับทางกายภาพ	Cellulose

มีรายงานการนำไลเปสมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันดังนี้

Mittelbach (1990) ศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสของน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* *Mucor miehei* และ *Candida* sp. พบว่าเมื่อใช้ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้ไลเปสที่ผลิตจาก *Mucor miehei* และ *Candida* sp. และปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้เอทานอลในการทำปฏิกิริยา

Nelson และคณะ (1996) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไลเปสจาก *Mucor miehei* *Candida antarctica* *Geotrichum candidum* *Pseudomonas cepacia* และ *Rhizopus delemar* พบว่าไลเปสจาก *M. miehei* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของไตรกลีเซอไรด์ (น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง และ grease) ด้วยไพรมารีแอลกอฮอล์ ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงให้กลายเป็นอัลคิลเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังศึกษาพบว่าปริมาณน้ำมีผลยับยั้งการเกิดเอสเทอร์

Wu และคณะ (1999) ศึกษาสภาวะการเกิดเอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันใช้แล้วจากภัตตาคาร โดยใช้เอทานอล 95% และไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าสภาวะที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงสุดคือที่ 38.4 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 2.47 ชั่วโมง ปริมาณไลเปสที่ใช้คือ 13.7 % โดยน้ำหนักของน้ำมัน และอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันและเอทานอลเป็น 1 ต่อ 6.6 ภายใต้สภาวะนี้ได้เอทิลเอสเทอร์ 85.4% ของสารตั้งต้น

Shimada และคณะ (1999) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืชโดยใช้ไลเปสตรังรูปจาก *Candida antarctica* พบว่าเอนไซม์จะสูญเสียแอกติวิตีเมื่อมีสัดส่วนของเอทานอลต่อน้ำมันมากกว่า 1.5 ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนน้ำมันให้กลายเป็นเอสเทอร์คือ การเติม เมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 1 โมล โดยทำปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียส ใช้ 4 % ของไลเปสตรังรูปและเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที เมื่อเติมเมทานอลในครั้งแรก ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นเติมเมทานอลครั้งที่ 2 แล้วปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปเป็นเวลา 14 ชั่วโมง จึงเติมเมทานอลครั้งสุดท้าย ดังนั้นเวลารวมที่ใช้คือ 48 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณเอสเทอร์คิดเป็น 98.4 % โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น



Iso และคณะ (2001) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของ triolein และ safflower oil โดยใช้ไลเปส ตรึงรูปจาก *Pseudomonas fluorescens* *P. cepacia* *Mucor javanicus* *Candida rugosa* และ *Rhizopus niveus* พบว่าไลเปสจาก *P. fluorescens* มีแอกติวิตีสูงสุด ถ้าใช้เอทานอลและเมทานอลจะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ 1,4-ไดออกเซน (1,4-dioxane) เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้นแต่ถ้าใช้ 1-โพรพานอลและ1-บิวทานอล ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ปฏิกิริยาเกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและมีปริมาณน้ำเท่ากับ 0.3 % โดยน้ำหนัก

Abigor และคณะ (2000) ศึกษากระบวนการผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากแอลกอฮอล์ต่างชนิดกันคือ เอทานอล เมทานอล 1-บิวทานอล 1-โพรพานอล ไอโซบิวทานอล และ ไอโซโพรพานอล โดยใช้น้ำมัน 2 ชนิดคือ น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะพร้าว พบว่าเมื่อใช้น้ำมันปาล์มแอลกอฮอล์ที่ให้เอสเทอร์สูงสุดคือ เอทานอล ส่วนในน้ำมันมะพร้าว 1-บิวทานอลและไอโซบิวทานอล ให้เอสเทอร์สูงสุด และอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้ยังมีค่าความหนืดได้มาตรฐานไบโอดีเซลของยุโรปนั่นคือ อยู่ใน 6-9 mm<sup>2</sup>/s และมาตรฐานของไบโอดีเซลประเทศออสเตรเลียคือ อยู่ใน 6.5-9.0 mm<sup>2</sup>/s ด้วย

Shah และคณะ (2004) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* และ *Candida rugosa* พบว่าไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างไลเปสอิสระกับไลเปสตรึงรูปพบว่า ไลเปสตรึงรูปจาก *Chromobacterium viscosum* สามารถเร่งปฏิกิริยาแล้วได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากกว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งถึงร้อยละ 10

Noureddini และคณะ (2005) นำไลเปสตรึงรูปที่ได้จาก *Pseudomonas cepacia* มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของน้ำมันถั่วเหลืองด้วยเมทานอลและเอทานอล พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเมื่อใช้เมทานอล คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของน้ำมันต่อเมทานอลที่เหมาะสมคือ 1 ต่อ 7.5 โมล และเมื่อใช้เอทานอลมีสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของน้ำมันต่อเอทานอลที่เหมาะสมคือ 1 ต่อ 15.2 โมล ได้เมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์คิดเป็นร้อยละ 67 และ 65 ของสารตั้งต้นตามลำดับ และพบว่าในปฏิกิริยาที่ใช้ไลเปสตรึงรูปจะได้เมทิลและเอทิลเอสเทอร์มากกว่าไลเปสที่ไม่ได้ตรึงรูป

ตารางที่ 2.8 แสดงปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

ผู้ทำการวิจัย	แหล่งน้ำมัน	แอลกอฮอล์	แหล่งที่มาของไลเปส	ร้อยละผลที่ได้ (โดยน้ำหนักสารตั้งต้น)	ตัวทำละลาย
Mohamed และคณะ (2003)	น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	เมทานอล	<i>R. miehei</i> <i>T. lanuginosa</i> <i>C. antarctica</i>	96.3 72.9 53.2	เฮกเซน เฮกเซน เฮกเซน
Shieh และคณะ (2003)	น้ำมันถั่วเหลือง	เมทานอล	<i>R. miehei</i>	92.2	ไม่ใช้
Abigor และคณะ (2000)	น้ำมันเมล็ดในปาล์ม	เมทานอล เอทานอล	<i>P. cepacia</i>	15 72	ไม่ใช้
Wu และคณะ (1999)	น้ำมันใช้แล้วจากการประกอบอาหาร	เอทานอล	<i>P. cepacia</i>	85.4	ไม่ใช้
Linko และคณะ (1998)	น้ำมันrapeseed	2-เอทิล-1-เฮกซานอล	<i>C. rugosa</i>	97	ไม่ใช้
Selmi และ Thomas (1998)	น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	เอทานอล	<i>M. miehei</i>	83	ไม่ใช้
Nelson และคณะ (1996)	น้ำมันrapeseed	เมทานอล เอทานอล	<i>M. miehei</i> <i>M. miehei</i>	19.4 65.5	ไม่ใช้ ไม่ใช้

## บทที่ 3

### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น innova 4330  
บริษัท New Brunswick Scientific CO., INC, USA
2. ตู้ป่นควบคุมอุณหภูมิ รุ่น U-600 บริษัท Memmert, Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเร็ว (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น kubota 6500  
บริษัท Kubota, Japan.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง รุ่น S-20K บริษัท Mettler Toledo, USA
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 บริษัท  
Spectronic Instrument, U.S.A.
6. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S บริษัท Satorius U.S.A.
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co.,Ltd., Japan  
และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
8. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท ISSCO, U.S.A.
10. ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 บริษัท Sanyo  
Electronic Co., Ltd., Japan
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น TW 20 บริษัท Julabo Labortechnik GMBH,  
Germany
12. เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A.
13. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น VSM-3 บริษัท Snelton Scientific Inc., U.S.A.
14. เครื่องแกสโครมาโตกราฟี รุ่น CP-3800 บริษัท Varian, Germany
15. Lyophilizer รุ่น FD-1 บริษัท Tokyo Rikakikai Co.,LTD.

### 3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

ไตรบิวไทรีน (tributyrin) บริษัท Fluka, Switzerland.

แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) บริษัท Unilab, U.S.A.

แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) บริษัท J.T. Baker Inc., U.S.A.

ซอยโตน เปปโตน (soytone peptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

น้ำมันมะกอก (olive oil) บริษัท Bertolli, Italy.

น้ำมันปาล์ม (palm oil) บริษัท ไอลีน จำกัด

พารา-ไนโตรฟีนิล อะซิเตท (*p*-nitrophenyl acetate) บริษัท Fluka, Switzerland.

พารา-ไนโตรฟีนิล (*p*-nitrophenol) บริษัท Sigma, U.S.A.

เมทานอล (methanol)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

เฮกเซน (hexane) บริษัท Baker, USA

กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) บริษัท Fluka, Switzerland

อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีซิลแลน (Aminopropyltriethoxysilane, APTS) บริษัท Sigma, U.S.A.

เมทานอล (Methanol) บริษัท Merck, USA

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.3.1 แยกและคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสสูงจากตัวอย่างดิน

##### 3.3.1.1 เก็บตัวอย่างน้ำและดินเพื่อแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบริเวณที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสออกมานอกเซลล์ เช่น บริเวณโรงอาหาร หรือโรงงานที่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิต นำตัวอย่างดินที่ได้มาบ่มในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายอาหารเหลว น้ำมันมะกอกที่ดัดแปลงจาก Masanobu และคณะ (1995) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยใส่ดินตัวอย่าง 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และน้ำตัวอย่าง 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเฉพาะขวดที่มีจุลินทรีย์แยกเก็บไว้

##### 3.3.1.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสส่งออกมานอกเซลล์

เตรียมอาหารแข็งไทรูบูไทริน (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงให้มีปริมาณมากขึ้นจากข้อ 3.3.1.1 มา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วจาน บ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เลือกโคโลนีที่เกิดวงใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ทำซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้โคโลนีที่บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้เตรียมหัวเชื้อในการตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปส

##### 3.3.1.3 การเตรียมหัวเชื้อ

เลือกแบคทีเรียที่สร้างวงใสมากกว่า 0.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว น้ำมันมะกอก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ที่ต่อด้วยหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสงขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางหัวเชื้อใน 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) น้ำเกลือที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ต่อปริมาตร 5 มิลลิลิตร

### 3.3.1.4 การเตรียมสารละลายไลเปส

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.1.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในสารละลายอาหารเหลวน้ำมันมะกอกปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยกระดาษกรองวอทแมน (whatman) เบอร์ 1 เพื่อแยกน้ำมันออก

### 3.3.1.5 การตรวจสอบแอกติวิตีของไลเปส (Merianne และคณะ, 1991)

ผสมสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย สารละลายพารา-ไนโตรฟินิลอะซิเตทในเมทานอล และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 จากนั้นนำสารละลายสับสเตรท 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลายไลเปสที่ต้องการทดสอบลงในหลอดทดลอง โดยมีสับสเตรทแบลнк (substrate blank) คือสารละลายสับสเตรท 900 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 100 ไมโครลิตร และเอนไซม์แบลнк (enzyme blank) คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 900 ไมโครลิตร เติมสารละลายไลเปส 100 ไมโครลิตร นำไปปมในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้ พาราไนโตรฟินอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

1 หน่วยของไลเปส เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟินิลอะซิเตท แล้วให้ พารา-ไนโตรฟินอล ปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

### 3.3.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยนำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (Lowry C : ภาคผนวก ข หมายเลข 1) 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลาย D (Lowry D : ภาคผนวก ข หมายเลข 1) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



คำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

### 3.3.2 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (Perry, 1989)

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3.1 จากนั้นแปรผันสภาวะในการเลี้ยงโดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลแบบ  $2^k$  สำหรับ 3 ปัจจัย โดยมีจุดศูนย์กลางการออกแบบ โดยมีปัจจัยที่ใช้ศึกษาคือ ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ (องศาเซลเซียส) และเวลาในการบ่มเชื้อ (ชั่วโมง) แปรผันปัจจัยที่ใช้ศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3.1 เตรียมสารละลายไลเปส และวัดแอกติวิตีของไลเปสจากการทดลองในข้อ 3.3.1.4 และ 3.3.1.5

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะปฏิบัติการของปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ เพื่อสร้างไลเปสโดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลสำหรับ 3 ปัจจัย

ปัจจัยที่ศึกษา	สภาวะปฏิบัติการ	
	-1	+1
ค่าความเป็นกรดต่าง	6	8
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	20	40
เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	12	24

หมายเหตุ - 1 หมายถึงปัจจัยที่ระดับต่ำ

+1 หมายถึงปัจจัยที่ระดับสูง

จุดศูนย์กลางการออกแบบคือ อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง และ ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0

### 3.3.3 การเตรียมไลเปสตรังรูป

#### 3.3.3.1 การเลือกตัวพุง

ตัวพุงที่คัดเลือกนำมาใช้ตรึงไลเปสในงานวิจัยนี้คือ เม็ดแก้ว ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ต่างๆกัน (ภาคผนวก ข ) คือ

เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร

เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร

เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร

#### 3.3.3.2 การเตรียมตัวพุง

เม็ดแก้วที่นำมาใช้เป็นตัวพุง ต้องนำมาทำความสะอาดก่อนนำไปใช้ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Trivedi และคณะ (2005) นำเม็ดแก้วมาล้างและแช่ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และล้างน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บใส่ภาชนะสะอาดปิดฝาสนิท

##### 3.3.3.2.1 การเตรียมไลเปสตรังรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 1

ดัดแปลงจากวิธีของ Pijanowska และคณะ (2001) โดยชั่งเม็ดแก้วปริมาณ 20 กรัม ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารกระตุ้นตัวพุง APTS 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นละลาย APTS ที่ทิ้ง แล้วล้างเม็ดแก้วด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เติมน้ำกลั่นละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่ใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วม ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเม็ดแก้วด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้น เติมน้ำกลั่นละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และสารละลายไลเปส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปกวนบน

เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเม็ดแก้วด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 3 ครั้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (lyophilizer) จากนั้นนำไลเปสตรังรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.3.3 และ 3.3.3.4 ตามลำดับ

### 3.3.3.2.2 การเตรียมไลเปสตรังรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 2

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Trivedi และคณะ (2005) โดยซึ่งเม็ดแก้วปริมาณ 20 กรัม ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และสารละลายไลเปสปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปกวนบนเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างเม็ดแก้วด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 3 ครั้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (lyophilizer) จากนั้นนำไลเปสตรังรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน ตามวิธีการทดลอง ในข้อ 3.3.3.3 และ 3.3.3.4 ตามลำดับ

### 3.3.3.3 การวิเคราะห์แอกติวิตีของไลเปสตรังรูป

ดัดแปลงวิธีเล็กน้อยจากการหาแอกติวิตีของไลเปสดังนี้ ผสมพารา-ไนโตรฟีนอลอะซิเตท และ สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ในอัตราส่วน 1ต่อ 9 จากนั้นนำมา 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี 1 กรัมของไลเปสตรังรูป นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้ พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ความเข้มข้นในช่วง 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค หมายเลข 1)

1 หน่วยของไลเปสตรังรูปเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนอลอะซิเตท แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาตร 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

### 3.3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของไลเปสตรังรูป

ใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบวิธีทางอ้อม โดยวิเคราะห์จากผลต่างของโปรตีนของไลเปสอิสระที่เริ่มต้นก่อนทำปฏิกิริยากับปริมาณโปรตีนของไลเปสที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาในน้ำล้าง โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry (1951) เช่นเดียวกับวิธีการทดลองในข้อ 3.3.1.6

### 3.3.3.5 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ

- อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ  
นำไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระมาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.1.5 และ  
3.3.3.3 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35 - 70 องศาเซลเซียส

- ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ  
นำไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระมาวิเคราะห์แอกติวิตีตามวิธีการในข้อ 3.3.1.5 และ  
3.3.3.3 โดยแปรความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างต่างๆดังนี้

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 4.0-6.5
100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 6.0-8.0
100 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์	ในช่วง pH 8.0-9.0

### 3.3.4 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้การทดลองเชิงแฟกทอเรียล

แปรผันปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งได้แก่ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล อุณหภูมิ เวลา และตัวทำละลาย ซึ่งในที่นี้ใช้เฮกเซน โดยทำการออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลสำหรับ 4 ปัจจัย ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะปฏิบัติการของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลสำหรับ 4 ปัจจัย

ปัจจัยที่ศึกษา	สภาวะปฏิบัติการ	
	-1	+1
อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล	1:12.5	1:25
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	35	55
เวลา (ชั่วโมง)	12	18
เฮกเซน (มิลลิลิตร)	0	2

หมายเหตุ -1 หมายถึงปัจจัยที่ระดับต่ำ

+1 หมายถึงปัจจัยที่ระดับสูง

จากนั้นดำเนินการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยซึ่งไลเปสตรังรูป 1 กรัมลงในหลอดทดลอง เติมน้ำมันปาล์ม, เมทานอลและเฮกเซน ตามตารางที่ 3.2 นำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 230 ครั้งต่อนาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้โดยใช้ gas chromatography (GC)

วัดปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งเป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันหลักที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์ม

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์

โดยใช้เทคนิคการหาปริมาณสารแบบ external standardization

#### 3.3.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายจากเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานที่ทราบน้ำหนักแน่นอน โดยละลายเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานในเฮกเซน จากนั้นนำพื้นที่ที่ฟีกไปคำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค 3) เพื่อใช้หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์จากผลิตภัณฑ์

#### 3.3.5.2 การเตรียมตัวอย่าง (Zheng และ Hanna, 1996)

เก็บตัวอย่างตามที่ระบุเวลาในข้อ 3.3.4 จากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง เดิมเฮกเซนให้ได้ความเข้มข้น 0.5 กรัม ต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนที่ละลายในเฮกเซนเพื่อมาวิเคราะห์โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟี

#### 3.3.5.3 การวิเคราะห์โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟี

ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแกสโครมาโตกราฟี (VARIAN CP-3800) โดยมีดีเทคเตอร์แบบเปลวไอออไนส์ (flame ionization detector, FID) ใช้คอลัมน์ชนิดแคพพิลลารี (capillary column) รุ่น CP-Sil 5 CB ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ใช้ไนโตรเจนเป็นเฟสตัวพา (carrier phase) อัตราการไหลของไนโตรเจน 5.0 มิลลิลิตรต่อนาที split ratio 1:50 อุณหภูมิอินเจคเตอร์ (injector) 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจวัด (detector) ชนิด FID 300 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์คือ 100 องศาเซลเซียส เวลาที่อุณหภูมิคงที่ (hold time) 2 นาที แล้วเพิ่มขึ้นจนถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที เวลาที่อุณหภูมิคงที่ (hold time) 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนอุณหภูมิสุดท้ายของคอลัมน์เป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที เวลาที่คงที่ (hold time) 3.5 นาที



### 3.3.5.4 การพิจารณาผลการฉีดตัวอย่าง

ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สามารถหาได้โดยเปรียบเทียบเวลาและพื้นที่ใต้กราฟของ เมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิดในผลิตภัณฑ์กับเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน โดยหาปริมาณ ของเมทิลเอสเทอร์จากการนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการประมวลผลของเครื่องแกส โครมาโตกราฟี เทียบกับกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานแต่ละชนิด

### 3.3.6 การศึกษาจลนพลศาสตร์ ณ ภาวะที่เหมาะสม

ดำเนินปฏิบัติการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันตามวิธีทดลองในข้อ 3.3.4 แต่แปรจำนวนโมล ของน้ำมันปาล์มเป็น 0.80 1.30 1.80 2.30 และ 2.80 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ หาปริมาณ เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามวิธีของไลเนวีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk) ระหว่าง 1/ความเร็ว (ไมโครโมลของเมทิลเอสเทอร์ ต่อนาที) และ 1/ความเข้มข้นของ สับสเตรท (1/มิลลิโมลาร์) เพื่อนำไปคำนวณหาค่า Km

### 3.3.7 การศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3.1 มาตรวจสอบรูปร่างและการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ ติดตามลักษณะการเจริญของแบคทีเรียโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว น้ำมันมะกอกวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ทุกๆช่วงเวลาที่กำหนดเป็นเวลา 28 ชั่วโมง

### 3.3.8 การพิสูจน์ลักษณะของแบคทีเรียตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA)

#### 3.3.8.1 การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรส

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ แบคทีเรียตัวอย่างแกรมบวกตามวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) โดยเชื้อโคโคไลนีเดียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไป เขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด ไมโครพิพพ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เท ส่วนน้ำใส่ทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข 6) ปริมาตร 425 ไมโครลิตร

กระจายตะกอนเซลล์โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นเติมไลโซไซม์ (ภาคผนวก ข 15) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (ภาคผนวก ข 10) ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับ ปริมาตรของสารละลายสุดท้าย ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดีจนกระทั่งเป็นอิมัลชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่อยู่เหนือชั้นตะกอนและชั้นฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ไปใส่ในหลอดไมโครพีพิจ์หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol ด้วยอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารละลายสุดท้าย กลับหลอดไปมาจนกระทั่ง ตะกอนขาวของดีเอ็นเอปรากฏ นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เท absolute ethanol ที่ทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัดปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 ครั้ง โดยการปั่นล้างเก็บตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอน ดีเอ็นเอที่ได้ไประเหยเอทานอลให้แห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 16) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอปนเปื้อน เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.3.8.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}$  และ  $A_{280}$ ) คำนวณค่า  $A_{260}$  ต่อ  $A_{280}$  ค่าที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

$$\text{ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

### 3.3.8.3 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ คือ forward primer 10f (5'-AGTTTGATCCTGGCTC-3') (Auburn University Environmental Institute, 2002) และ reverse primer 1540r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Lambert และคณะ, 1998) นอกจากนี้ในตารางที่ 3.3 จะแสดงส่วนผสมสารในปฏิกริยา ความเข้มข้นสุดท้ายและปริมาณที่ใช้ในปฏิกริยาของสารแต่ละตัว

ตารางที่ 3.3 สารละลายที่ใช้เป็นส่วนผสมในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับการเพิ่มจำนวน 16S ribosomal DNA

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้น สุดท้าย
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3	1.5 mM
Taq DNA polymerase buffer	10 X	5	1 X
ไพรเมอร์ 10f	50 µM	1	1.0 µM
ไพรเมอร์ 1540r	50 µM	1	1.0 µM
dNTP	2 mM	5	200 µM
	(ของแต่ละตัว)		(ของแต่ละตัว)
Taq DNA polymerase	1 U/ µl	1.5	1.5 U
ดีเอ็นเอแม่แบบ	1 pg -1 µg/µl	1	1 pg -1 µg
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ		32.5	
ปริมาตรสุทธิ		50	

โปรแกรมในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นดังนี้

hot start	ที่อุณหภูมิ	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ	46 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
extention	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
final extention	ที่อุณหภูมิ	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที	

ดำเนินปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycle) (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

#### 3.3.8.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงในข้อ 3.3.8.3 มาแยกชิ้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ออกจาก อะกาโรสด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ภาคผนวก ข 2) ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ซึ่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยใส่ไว้ในหลอดไมโครพิวซ์ เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตรเป็น 3 เท่าของปริมาตรชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใสสีเหลือง นำสารละลายดังกล่าวใส่ใน QIAquick spin column นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เดิมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ PE ที่เหลือติดคอลัมน์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวซ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในส่วนน้ำใสเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้คือ forward primer 10f (5'-AGTTTGATCCTGGCTC-3') (Auburn University Environmental Institute, 2002), forward primer 350f (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3') (Weber และคณะ, 2001), reverse primer 1240r (5'-CCATTGTAGCACGTGT-3') (Laurie และคณะ, 2002) และ reverse primer 1540r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Lambert และคณะ, 1998) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส

จากการเก็บตัวอย่างดิน 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 1 ตัวอย่าง ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.1.1 พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 14 ไอโซเลท (isolate) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 แต่ละไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี และขนาดของวงใสบนอาหารแข็งไตรบูไทรินต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยขนาดของวงใสจะบ่งบอกถึงปริมาณไลเปสโดยประมาณที่แบคทีเรียผลิตออกมานอกเซลล์ ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท SW2, SS1, SS3, C2 และ C3 ซึ่งมีขนาดของวงใสมากกว่า 0.5 เซนติเมตร เพื่อนำไปทดสอบแอกติวิตีของไลเปสต่อไป

#### ตารางที่ 4.1 แสดงการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสจากแหล่งต่างๆ

แหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	รหัสไอโซเลท
ดินร้านอาหาร จ. สระแก้ว	3	SK
ดินร้านอาหาร จ. อัญญา	2	A
น้ำทิ้งจากการประกอบอาหาร จ. สมุทรปราการ	3	SW
ดินโรงงานผลิตอาหาร จ.สมุทรปราการ	3	SS
ดินบริเวณโรงอาหารอาคารจุลจักรพงษ์	3	C
รวม		14



ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนีและขนาดของวงใสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

รหัสไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ขนาดของวงใส (เซนติเมตร)
SK1	สีครีม โคโลนีรูปร่างกลม	0.50
SK2	สีครีม โคโลนีรูปร่างกลม ขอบไม่เรียบ ฐานตรงกลาง	0.47
SK3	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลม	0.30
A1	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลม ขอบเรียบ	0.45
A2	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลม ขอบไม่เรียบ	0.45
SW1	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ	0.47
SW2	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก ขอบเรียบ ฐานตรงกลาง	0.55
SW4	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ ขอบหยัก	0.37
SS1	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก เป็นมันวาว ขอบไม่เรียบ	0.97
SS3	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ ด้าน ขอบเรียบ	0.90
SS4	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ เป็นมันวาว ขอบไม่เรียบ	0.30
C1	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ เป็นมันวาว ขอบไม่เรียบ ฐานตรงกลาง	0.35
C2	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก เป็นมันวาว ขอบเรียบ ฐานตรงกลาง	1.30
C3	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ ด้าน ขอบหยัก	0.57

หมายเหตุ ขนาดของวงใสที่ได้คือขนาดของวงใสที่หักลบจากขนาดของโคโลนี

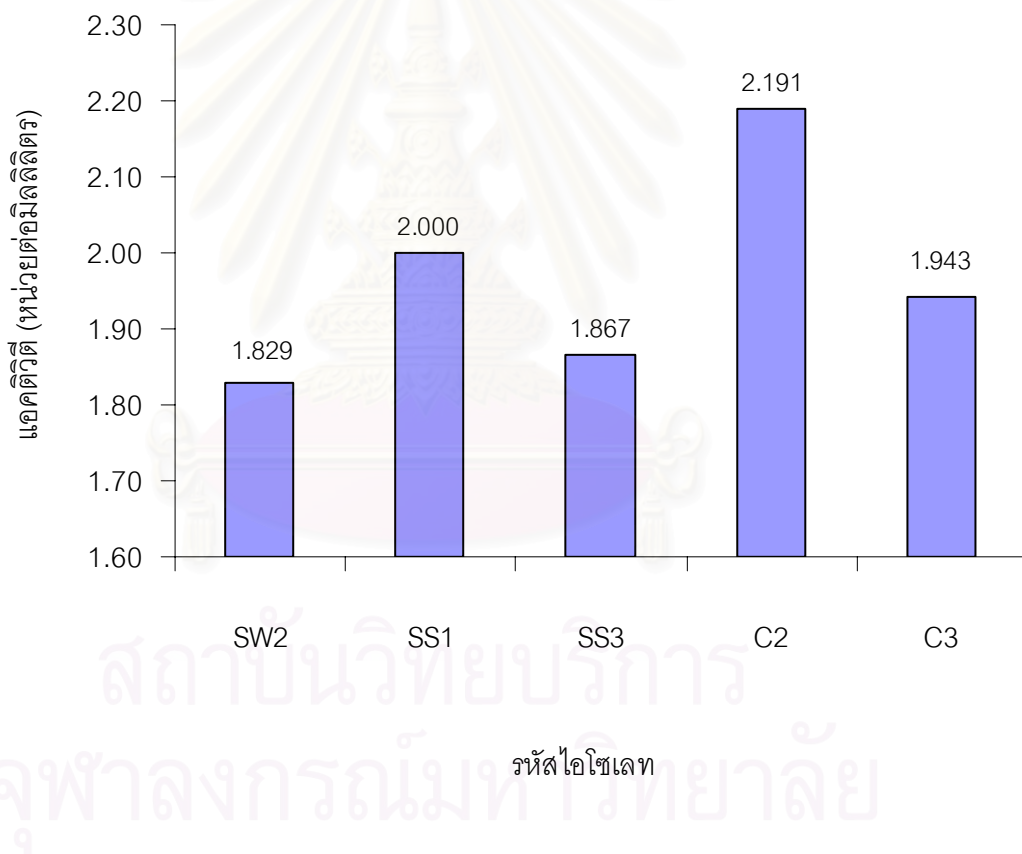


รูปที่ 4.1 แสดงวงใสของแบคทีเรีย C2 บนอาหารแข็งไตรบูไทริน



#### 4.2 การตรวจแอกติวิตีของไลเปส

นำแบคทีเรียไอโซเลท SW2, SS1, SS3, C2 และ C3 มาเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.1.4 และตรวจแอกติวิตีของไลเปสตามวิธีในข้อ 3.3.1.5 พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียไอโซเลท C2 มีแอกติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.2 คือ 2.191 หน่วยต่อมิลลิเมตร จึงนำแบคทีเรียไอโซเลท C2 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.2 กราฟเปรียบเทียบแอกติวิตีของไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลท SW2, SS1, SS3, C2 และ C3

#### 4.3 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย C2

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย C2 และแปรสภาวะการเลี้ยงเชื้อตามวิธีทดลองในข้อ 3.3.2 ปัจจัยที่ใช้ศึกษาคือ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และเวลาในการบ่มเชื้อ โดยแปรผันอุณหภูมิ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส แปรผันค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 6 7 และ 8 แปรผันเวลาในการบ่ม 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย C2 สามารถให้แอกติวิตีของไลเปสสูงสุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 เวลาในการบ่มเชื้อ 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 ผลของภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยใช้ วิธีออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลแบบ 2<sup>3</sup>

ลำดับที่	ปัจจัยที่ศึกษา			แอกติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
	ค่าความเป็น กรดต่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)		
1	8	40	24	2.401	2.088
2	8	40	12	2.267	1.799
3	8	20	24	2.492	2.225
4	6	20	12	1.372	1.088
5	8	20	12	1.905	1.401
6	6	20	12	1.467	1.163
7	8	20	24	2.322	2.073
8	8	40	24	2.261	1.966
9	6	20	24	1.600	1.496
10	6	40	12	2.191	1.981
11	7	30	18	2.534	2.368
12	8	40	12	2.115	1.678
13	6	40	24	1.772	1.704
14	6	40	24	1.448	1.392
15	8	20	12	2.324	1.709

ลำดับที่	ปัจจัยที่ศึกษา			แอดติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	แอดติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
	ค่าความเป็น กรดต่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)		
16	6	40	12	2.019	1.826
17	6	20	24	1.505	1.406
18	7	30	18	2.153	2.012

เมื่อพิจารณาจากการตารางที่ 4.2 เมื่อใช้วิธีออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลแบบ  $2^k$  โดยมีจุดศูนย์กลางการออกแบบ ทำการทดลอง ซ้ำ 2 ครั้ง ดังนั้นจำนวนการทดลองทั้งหมดเป็น  $(2 \times 2^3) + 2 = 18$  ครั้ง จากตารางพบว่าภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 ให้ค่าแอดติวิตีจำเพาะของไลเปสเฉลี่ยจากการทำการทดลองซ้ำสองครั้ง เท่ากับ 2.190 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าแอดติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ  $20^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 ซึ่งมีค่า 2.149 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่เมื่อพิจารณาในแง่อุตสาหกรรมพบว่าภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ  $30^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเปส เพราะใช้เวลาน้อยกว่าและไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มเพื่อลดอุณหภูมิหรือปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเลือกภาวะนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มในตอนแรกของงานวิจัยนี้ได้ใช้ไลเปสในรูปสารละลาย (soluble lipase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์ขึ้น ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากมีน้ำปริมาณมากเป็นองค์ประกอบในสารละลายไลเปส ทำให้ปฏิกิริยากลายเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Shah, 2004) นอกจากนี้ไลเปสอาจสูญเสียแอดติวิตีเนื่องจากเมทานอล Kaieda และคณะ (2001) ได้เสนอแนวทางแก้ไขปัญหาการสูญเสียแอดติวิตีของไลเปสจากเมทานอลโดยการเปลี่ยนสถานะไลเปสจากสารละลายให้อยู่ในรูปผง (powder) โดยใช้เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (lyophilizer) ก่อนนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งผลการทดลองใช้ไลเปสในรูปผงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่ายังคงไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์ขึ้นเช่นกัน จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงว่าไลเปสอิสระไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จึงแก้ปัญหาโดยการเตรียมไลเปสตรังรูปเพื่อนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อไป

#### 4.4 การเตรียมไลเปสตรังรูป

##### 4.4.1 วิธีที่เหมาะสมสำหรับเตรียมไลเปสตรังรูป

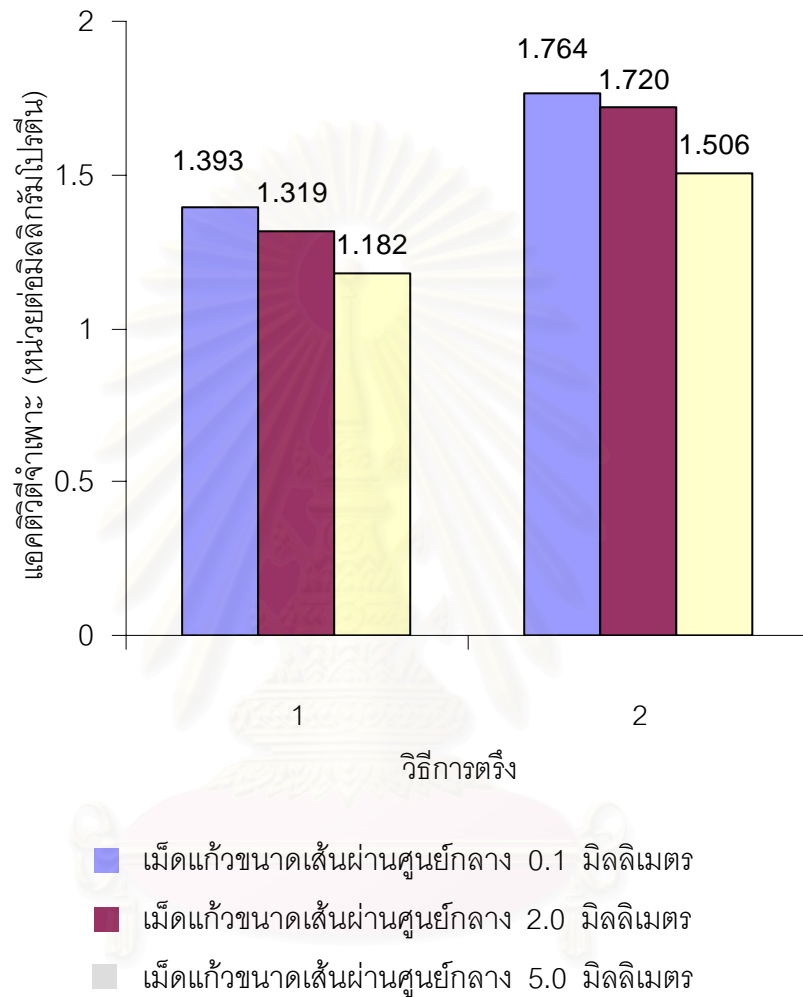
ตรังรูปไลเปสบนตัวพุงของแข็งที่เป็นเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1, 2.0 และ 5.0 มิลลิเมตร ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2.1 และ 3.3.3.2.2 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของไลเปสตรังรูปจากทั้ง 2 วิธีแสดงในรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ผลของวิธีเตรียมไลเปสตรังรูปบนเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1, 2.0 และ 5.0 มิลลิเมตร

วิธีการตรึง	ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง เม็ดแก้ว (มิลลิเมตร)	แอกติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง (มิลลิกรัม)
1. การตรึงโดยอาศัย พันธะโควาเลนต์	0.1	0.705	0.506
	2.0	0.686	0.520
	5.0	0.648	0.548
2. การตรึงโดยอาศัย หลักการดูดซับทาง กายภาพ	0.1	0.762	0.432
	2.0	0.743	0.432
	5.0	0.705	0.468
ไลเปสอิสระเริ่มต้น	-	2.590	-

หมายเหตุ 1. วิธีการตรึงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ คือตรึงโดยเติม APTS กลูตารัลดีไฮด์ และ สารละลายไลเปส

2. วิธีการตรึงโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพ คือตรึงโดยเติมสารละลายไลเปส



- หมายเหตุ 1. วิธีการตรึงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ คือตรึงโดยเติม APTS กลูตารัลดีไฮด์ และ สารละลายไลเปส
2. วิธีการตรึงโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพ คือตรึงโดยเติม สารละลาย ไลเปส

รูปที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ของไลเปสตรึง รูปจากวิธีการตรึง 2 วิธี

จากวิธีการตรึงแบบที่ 1 และ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันของแอคติวิตีของไลเปสตรึงรูปไม่มากนัก แต่เมื่อพิจารณาในแง่แอคติวิตีจำเพาะพบว่า วิธีการตรึงแบบที่ 2 ให้แอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าวิธีการตรึงแบบที่ 1 และขนาดของเม็ดแก้วมีผลต่อการตรึงรูปไลเปส โดยจากรูปที่ 4.3 พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสตรึงรูปเมื่อใช้เม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร เป็นตัวพุง สูงกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสตรึงรูปเมื่อใช้เม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 และ 5.0 มิลลิเมตร เป็นตัวพุง ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการเตรียมแบบที่ 2 และใช้เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตรเป็นตัวพุงในการเตรียมไลเปสตรึงรูปเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 4.4.2 คุณภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมไลเปสตรึงรูป

เตรียมไลเปสตรึงรูปจากวิธีตรึงรูปที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.4.1 แต่ใช้คุณภูมิในการตรึงที่ 4 องศาเซลเซียส และ คุณภูมิห้อง (27-31 องศาเซลเซียส) เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อตรึงรูปไลเปสที่ 4 องศาเซลเซียสได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าเมื่อตรึงรูปไลเปสที่ คุณภูมิห้องถึง 3 เท่า

ตารางที่ 4.5 ผลของคุณภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมไลเปสตรึงรูป

คุณภูมิที่ใช้ตรึง	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)
4 องศาเซลเซียส	0.752	0.529	1.422
คุณภูมิห้อง	0.257	0.524	0.490
ไลเปสอิสระเริ่มต้น	2.370	-	-



#### 4.4.3 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ

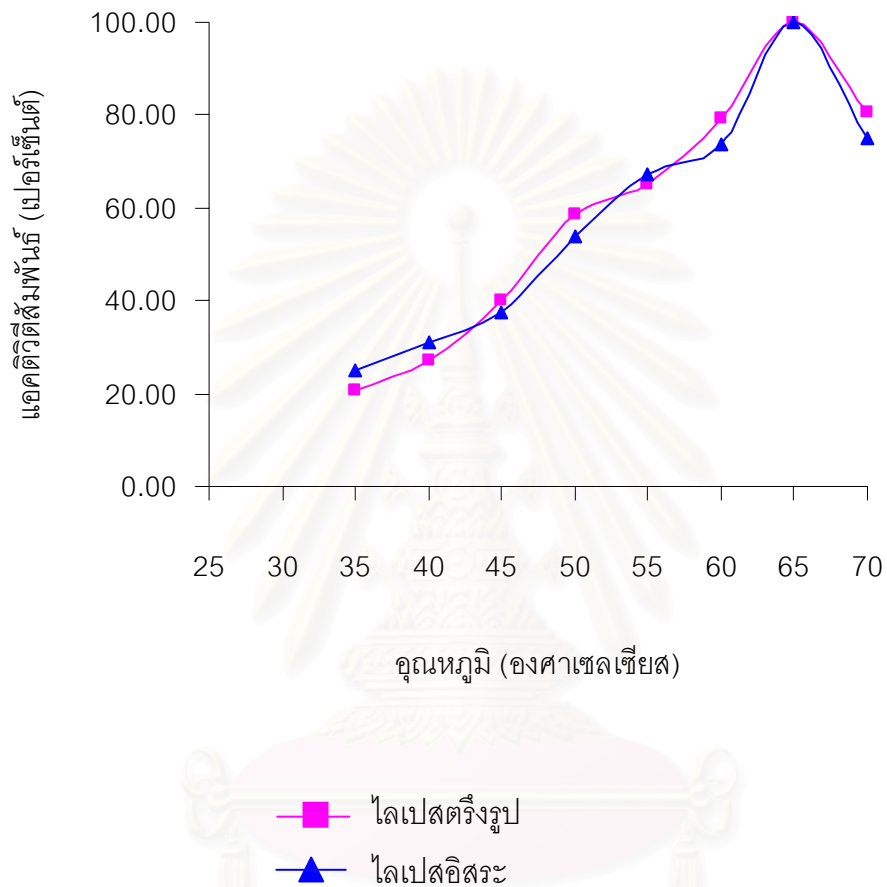
##### 4.4.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ

เมื่อนำไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระมาวิเคราะห์แอกติวิตีโดยการแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 35-70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระเท่ากันคือ 65 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้ไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระให้แอกติวิตีสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.4

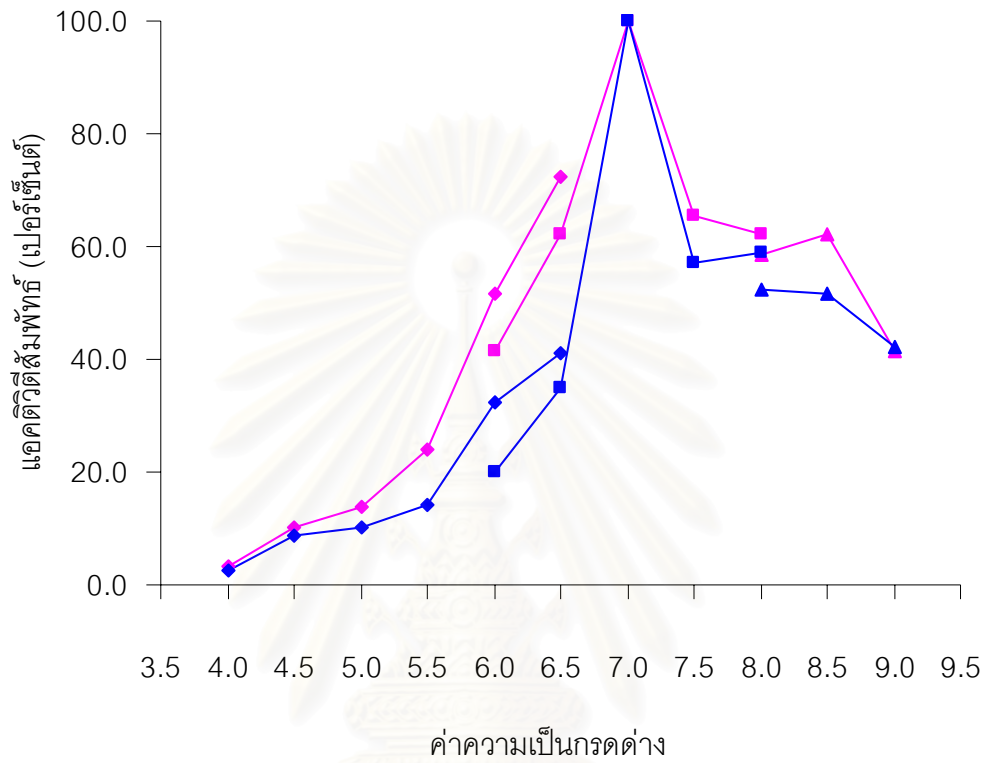
##### 4.4.3.2 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระ โดยการทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ที่แปรค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0-9.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 เท่ากัน เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ



- ◆— อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0-6.5 (ไลเปสตรังรูป)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0-8.0 (ไลเปสตรังรูป)
- ▲— ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0-9.0 (ไลเปสตรังรูป)
- ◆— อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0-6.5 (ไลเปสอิสระ)
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0-8.0 (ไลเปสอิสระ)
- ▲— ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0-9.0 (ไลเปสอิสระ)

รูปที่ 4.5 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ

#### 4.5 ศึกษาภาวะเหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้การทดลองเชิงแฟกทอเรียล

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไอโซแปนตรีงรูป 1 กรัมลงในหลอดทดลอง เต็ม น้ำมันปาล์ม, เมทานอลและเฮกเซน ตามตารางที่ 3.2 นำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อัตราการเขย่า 230 ครั้งต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้โดยใช้ gas chromatography (GC) จากนั้นนำไปคำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟสารละลายเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน (ภาคผนวก ค 3) เพื่อใช้หาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เทียบกับปริมาณน้ำมันปาล์มตั้งต้นในแต่ละลำดับการทดลอง

เมื่อพิจารณาจากการตารางที่ 4.6 เมื่อใช้วิธีออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลแบบ  $2^k$  มีปัจจัยที่ใช้ศึกษา 4 ปัจจัย คือ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล (1:12.5 และ 1:25) อุณหภูมิ (35 และ 55 องศาเซลเซียส) เวลา (12 และ 18 ชั่วโมง) และตัวทำละลายเฮกเซน (0 และ 2 มิลลิลิตร) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ดังนั้นจำนวนการทดลองทั้งหมดเป็น  $3 \times 2^4 = 48$  ครั้ง จากตารางพบว่าได้ร้อยละเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็น 1:25 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 55 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง และเติมเฮกเซน 2 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปัจจัยระดับสูงทั้งหมดที่ศึกษา นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟพื้นผิว 3 มิติได้ดังรูปที่ 4.6 และ 4.7

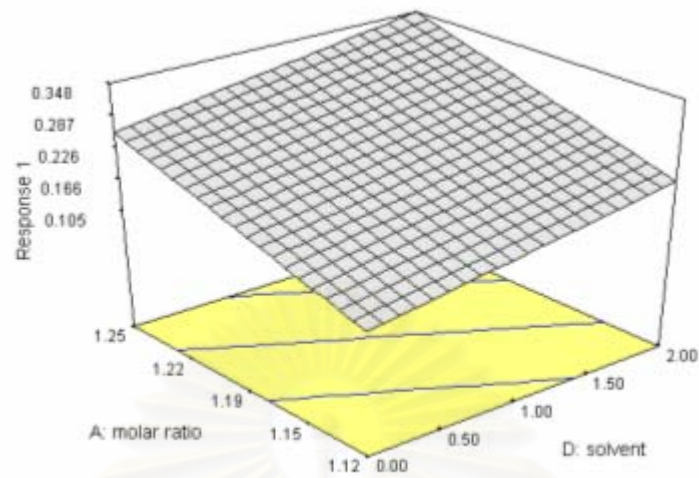
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันปาล์มตั้งต้นจากการแปรผันปัจจัยต่างๆโดยการออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลแบบ 2<sup>4</sup>

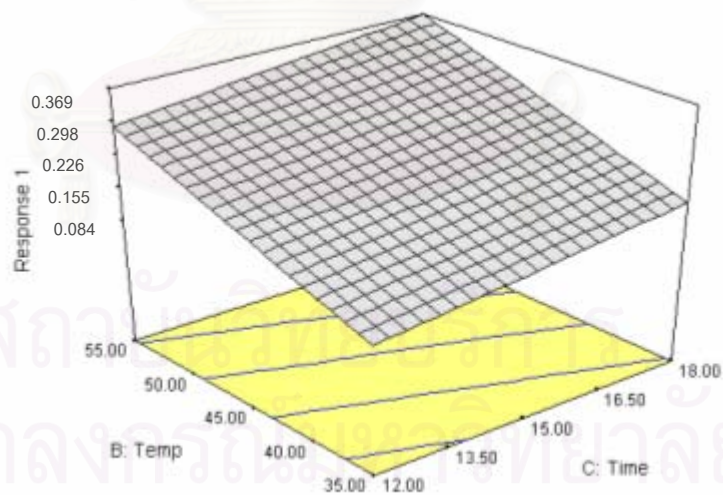
ลำดับที่	อัตราส่วนโดยโมล น้ำมันปาล์มต่อเมทานอล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเฮกเซน (มิลลิลิตร)	ร้อยละ เมทิลเอส เทอร์ (wt/wt)
1	1:12	55	18	2	0.188
2	1:12	35	18	2	0.201
3	1:12	35	12	2	0.085
4	1:25	35	18	0	0.159
5	1:12	55	12	2	0.280
6	1:25	35	18	0	0.125
7	1:25	55	18	0	0.135
8	1:25	35	12	2	0.169
9	1:25	55	18	0	0.483
10	1:25	35	12	0	0.078
11	1:25	55	18	0	0.630
12	1:25	55	18	2	0.223
13	1:12	55	12	2	0.106
14	1:12	55	18	0	0.128
15	1:12	35	12	2	0.059
16	1:12	55	12	2	0.244
17	1:25	55	12	0	0.115
18	1:25	35	12	2	0.096
19	1:12	55	12	0	0.130
20	1:12	35	18	0	0.056
21	1:25	35	18	2	0.239
22	1:25	55	12	0	0.541

23	1:12	35	12	2	0.166
24	1:12	35	12	0	0.036
25	1:25	35	12	2	0.204
26	1:25	55	12	2	0.121
27	1:25	35	18	2	0.132
28	1:12	55	12	0	0.115
29	1:12	35	12	0	0.180
30	1:25	55	12	2	0.602
31	1:12	55	12	0	0.111
32	1:12	35	18	2	0.072
33	1:12	55	18	0	0.168
34	1:25	55	12	2	0.423
35	1:25	35	12	0	0.103
36	1:12	55	18	2	0.396
37	1:12	35	18	0	0.119
38	1:25	55	18	2	0.860
39	1:25	55	18	2	0.948
40	1:12	35	18	0	0.057
41	1:25	35	12	0	0.046
42	1:25	55	12	0	0.432
43	1:25	35	18	2	0.296
44	1:12	55	18	2	0.295
45	1:12	35	12	0	0.055
46	1:12	35	18	2	0.125
47	1:25	35	18	0	0.111
48	1:12	55	18	0	0.248





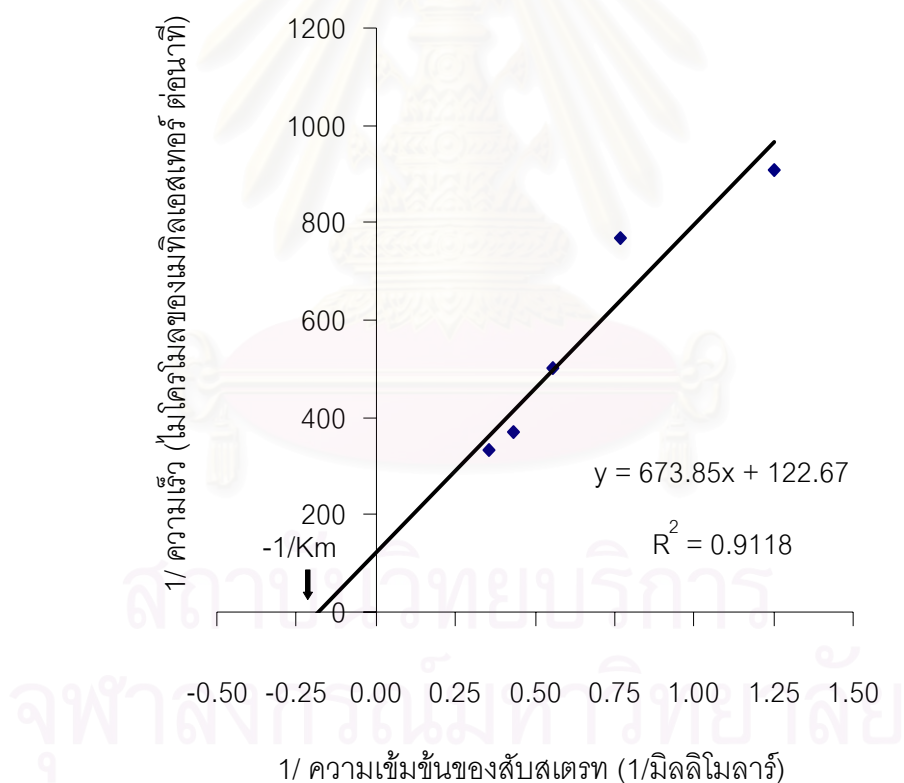
รูปที่ 4.6 แสดงกราฟพื้นผิว 3 มิติระหว่างผลของปัจจัยที่ระดับสูงและระดับต่ำของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณเฮกเซน (มิลลิลิตร) ต่อร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้



รูปที่ 4.7 แสดงกราฟพื้นผิว 3 มิติระหว่างผลของปัจจัยที่ระดับสูงและระดับต่ำของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และเวลา (ชั่วโมง) ต่อร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้

#### 4.6 การหาค่า Km ของไลเปสตรังรูป

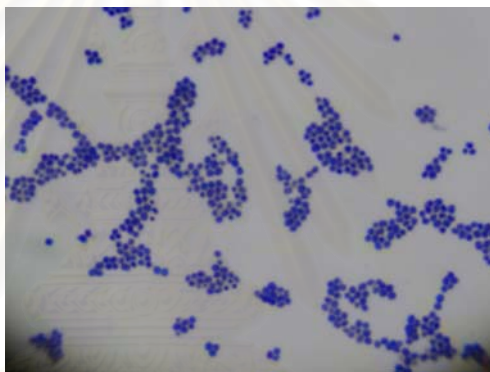
วิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของการทำงานของไลเปสตรังรูป โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มแล้วหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk) ระหว่าง  $1/\text{ความเร็ว}$  (ไมโครโมลของเมทิลเอสเทอร์ ต่อ นาที) และ  $1/\text{ความเข้มข้นของสับสเตรท}$  (1/มิลลิโมลาร์) ดังรูปที่ 4.8 พบว่าได้ค่า Km เท่ากับ 5.49 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 4.8 การประมาณค่า Km โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์กของไลเปสตรังรูป

#### 4.7 การศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียที่คัดแยก

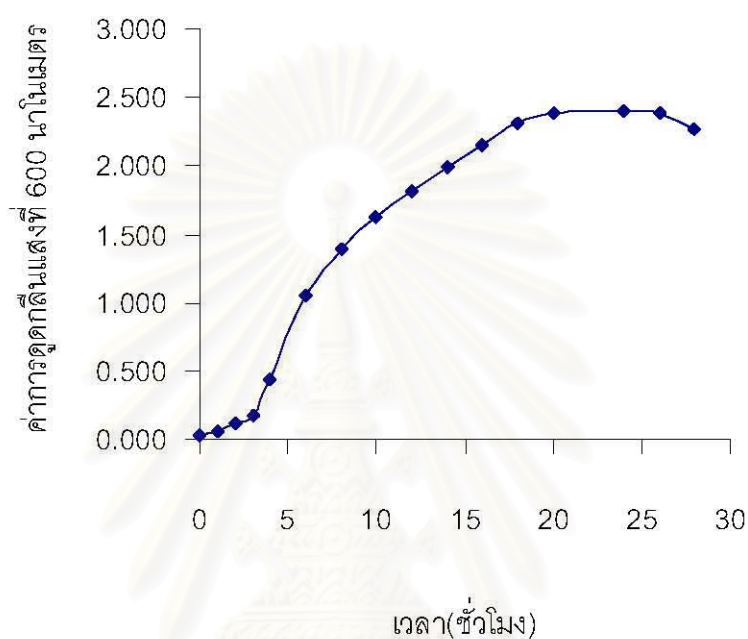
คัดเลือกแบคทีเรีย C2 ที่มีแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะสูงสุด มาตรวจสอบรูปร่างและการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรีย C2 มีรูปร่างกลม อยู่กันติดกันเป็นกลุ่มและติดสีแกรมบวก ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว โคโลนีรูปร่างกลมขนาดเล็ก เป็นมันวาว ขอบเรียบ ฐานตรงกลาง เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งไตรบูไทรินดังแสดงในรูปที่ 4.10 เมื่อติดตามลักษณะการเจริญของแบคทีเรียโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว น้ำมันมะกอก วัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ทุกๆช่วงเวลาที่กำหนด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.11 พบการเจริญของเชื้อในระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างชั่วโมงที่ 4-18 และระยะ late log อยู่ที่ชั่วโมงที่ 18 จากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ช่วงระยะ stationary



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรีย C2 กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย C2 บนอาหารแข็งไตรบูไทริน



รูปที่ 4.11 รูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย C2

#### 4.8 จำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ C2 โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากสายพันธุ์ C2 ที่วิเคราะห์โดยใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพ, BSU) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,458 เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Staphylococcus warneri* (Accession No. L37603) มากที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98% ดังแสดงในรูปที่ 4.12

>gi|576609|gb|L37603.1|STARGDH *Staphylococcus warneri* 16S ribosomal  
RNA (16S rRNA) gene

Length = 1470

Score = 2694 bits (1359), Expect = 0.0

Identities = 1441/1460 (98%), Gaps = 8/1460 (0%)

Strand = Plus / Plus

```

C2:          1   ggcgtgcctaatacatgcaacgatcagagcgaacagataaggagcttgctcctttgacgt 60
                |||
S. warneri: 14   ggcgtgcctaatacatgcaag--tc-gagcgaacagataaggagcttgctcctttgacgt 70

C2:          61   tagcggcggacgggtgagtaaacctggataacctacctataagactgggataacttcgg 120
                |||
S. warneri: 71   tagcggcggacgggtgagtaaacctggataacctacctataagactgggataacttcgg 130

C2:          121  gaaaccggagctaataaccggataacatattgaaccgcatggttcaatagtgaaggcggc 180
                |||
S. warneri: 131  gaaaccggagctaataaccggataacatattgaaccgcatggttcaatagtgaaggcggc 190

C2:          181  tttgctgtcacttatagatggatccgcgcgctattagctagttggtaaggtaacggccta 240
                |||
S. warneri: 191  tttgctgtcacttatagatggatccgcgcgctattagctagttggtaaggtaacggccta 250

C2:          241  ccaaggcaacgatacgtagccgacctgagagggtgatcggccacactggaactgaga-ac 299
                |||
S. warneri: 251  ccaaggcaacgatacgtagccgacctgagagggtgatcggccacactggaactgagacac 310

C2:          300  gggcccaaatccttacggaaggca-caataaggaaatctcccgcatggcgaaagcctg 358
                |||
S. warneri: 311  ggtccagactcct-acgggaggcagcagtagggaatctcc-gcaatggcgaaagcctg 368

C2:          359  acggagcaacgccgcnctgagtgatgaaggctctcggatcgtaaaactctgttatcaggg 418
                |||
S. warneri: 369  acggagcaacgccgcnctgagtgatgaaggctctcggatcgtaaaactctgttatcaggg 427

C2:          419  aagaacaaatgtgtaagtaactgtgcacatcttgacggtacctgatcagaaagccacggc 478
                |||
S. warneri: 428  aagaacaaatgtgtaagtaactgtgcacatcttgacggtacctgatcagaaagccacggc 487

C2:          479  taactacgtgccagcagccggttaatacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgg 538
                |||
S. warneri: 488  taactacgtgccagcagccggttaatacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgg 547

C2:          539  gcgtaaagcgcgctagcgggtttttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccctg 598
                |||
S. warneri: 548  gcgtaaagcgcgctagcgggtttttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccctg 607

C2:          599  gagggtcattggaaactgaaaaacttgagtgcagaagaggaaagtggaattccatgtgta 658
                |||
S. warneri: 608  gagggtcattggaaactgaaaaacttgagtgcagaagaggaaagtggaattccatgtgta 667

C2:          659  gcggtgaaatgcgagagatatggaggaacaccagtggcgaaggcgactttctggctctg 718
                |||
S. warneri: 668  gcggtgaaatgcgagagatatggaggaacaccagtggcgaaggcgactttctggctctg 727

C2:          719  aactgacgctgatgtgcgaaagcgtgggatcaaacaggattagataccctggtagtcca 778
                |||
S. warneri: 728  aactgacgctgatgtgcgaaagcgtgggatcaaacaggattagataccctggtagtcca 787

C2:          779  cgccgtaaacgatgagtgtcaagtgttaggggtttccgccccttagtctgcagctaac 838
                |||
S. warneri: 788  cgccgtaaacgatgagtgtcaagtgttaggggtttccgccccttagtctgcagctaac 847

```



```

C2:          839  gcattaagcactccgcctggggagtagcaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgg 898
              |||
S. warneri: 848  gcattaagcactccgcctggggagtagcaccgcaaggttgaaactcaaaggaattgacgg 907

C2:          899  ggacccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaacctacca 958
              |||
S. warneri: 908  ggacccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgaagaacctacca 967

C2:          959  aatccttgacatcctttgaccgctctagagatagagtcttccccttcgggggacaaagtga 1018
              |||
S. warneri: 968  aatccttgacatcctttgaccgctctagagatagagtcttccccttcgggggacaaagtga 1027

C2:          1019  cagggtggtgcatggttgcgtcagctcgtgctgagatggtgggtaagtcccgcaacg 1078
              |||
S. warneri: 1028  cagggtggtgcatggttgcgtcagctcgtgctgagatggtgggtaagtcccgcaacg 1087

C2:          1079  agcgcaacccttaagcttagttgccatcattaagttgggcactctaagttgactgccggt 1138
              |||
S. warneri: 1088  agcgcaacccttaagcttagttgccatcattaagttgggcactctaagttgactgccggt 1147

C2:          1139  gacaaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatacatcatgcccttatgattggggcta 1198
              |||
S. warneri: 1148  gacaaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatacatcatgcccttatgattggggcta 1207

C2:          1199  cacacgtgctacaatggacaatacaaaagggcagctaaaaccgcgaggtcaagcaaatcca 1258
              |||
S. warneri: 1208  cacacgtgctacaatggacaatacaaaagggcagctaaaaccgcgaggtcaascaaatcca 1267

C2:          1259  taaagttgttctcagttcggattgtagtctgcaactcgactacatgaagctggaatcgct 1318
              |||
S. warneri: 1268  taaagttgttctcagttcggattgtagtctgcaactcgactacatgaagctggaatcgct 1327

C2:          1319  agtaatcgtagatcagcatgctacgggtgaatacgttcccgggtcttgtacacaccgccc 1378
              |||
S. warneri: 1328  agtaatcgtagatcagcatgctacgggtgaatacgttcccgggtcttgtacacaccgccc 1387

C2:          1379  tcacaccacgagagtttgaacaccgcaagccgggtggagtaaccatztatggagctagcc 1438
              |||
S. warneri: 1388  tcacaccacgagagtttgaacaccgcaagccgggtggagtaaccatztatggagctagcc 1447

C2:          1439  gtcgaaggtgggacaaatga 1458
              |||
S. warneri: 1448  gtcgaaggtgggacaaatga 1467

```

รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบความเหมือน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย C2 เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Staphylococcus warneri* (Accession No. L37603) ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastN



## บทที่ 5

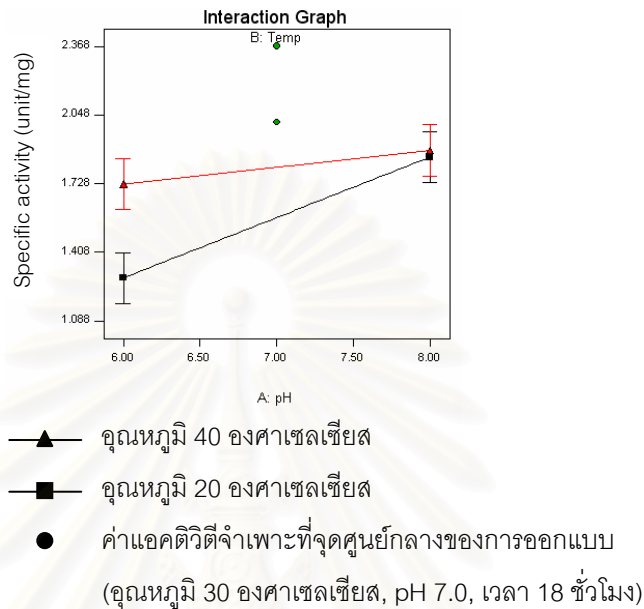
### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากทางเทคโนโลยีชีวภาพ ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากสามารถผลิตได้ปริมาณมาก ในปัจจุบันจึงนำไลเปสมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น การสังเคราะห์โพลีเมอร์ สังเคราะห์สารเคมีบางชนิดในองค์ประกอบยา ผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นรสในอาหาร ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพื่อมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในการผลิตเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นอีกแนวทางในการประยุกต์ใช้ไลเปสทางเทคโนโลยีชีวภาพ

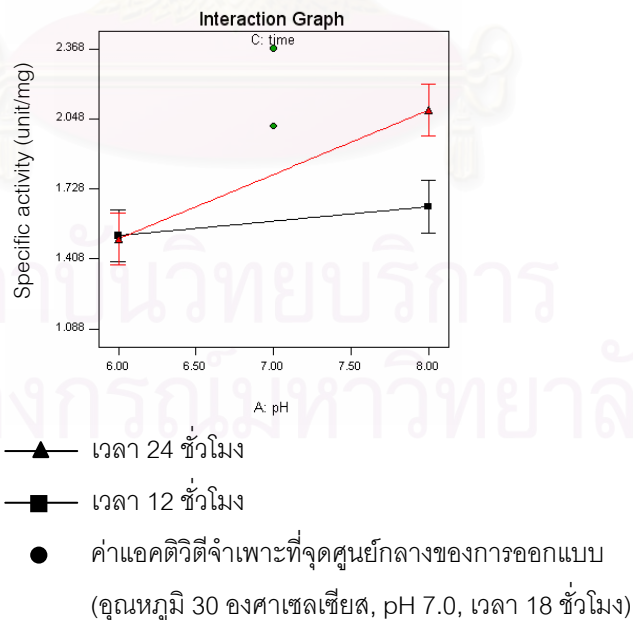
งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสจากแหล่งต่างๆได้ 14 ไอโซเลท (isolate) พบแบคทีเรียที่มีขนาดวงใสบนอาหารแข็งไทรูบูไทรินมากกว่า 0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ไอโซเลท คือ SW2, SS1, SS3, C2 และ C3 จึงคัดแยกไว้เพื่อนำไปทดสอบแอกติวิตีของไลเปส โดยพบว่าแบคทีเรีย C2 ให้แอกติวิตีสูงที่สุด คือ 2.191 หน่วยต่อมิลลิลิตร จึงคัดเลือกแบคทีเรีย C2 เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสต่อไป

เมื่อนำแบคทีเรีย C2 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียล โดยมีปัจจัยที่ใช้ศึกษา คือ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ เวลาในการบ่มเชื้อ (ชั่วโมง) เมื่อศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 5.1 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงค่าความเป็นกรดต่างไม่มีผลมากนักต่อการผลิตไลเปส และมีค่าแอกติวิตีจำเพาะของไลเปสสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้น้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดลดลง (Wade, 1995) และกระจายตัวได้มากขึ้นเมื่อมีการเขย่าอย่างต่อเนื่อง ทำให้ไลเปสสามารถย่อยสลายน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น เมื่อศึกษาผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการบ่มและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 5.2 พบว่า เวลาไม่มีผลต่อการผลิตไลเปสที่ค่าความเป็นกรดต่ำ แต่เวลาจะมีผลเมื่อค่าความเป็นกรดสูงขึ้นไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรีย C2 สามารถเจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดค่อนข้างสูง ดังนั้นเมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้นแบคทีเรียจึงสามารถเจริญเติบโตและผลิตไลเปสได้มากขึ้น จากรูปที่ 5.3 เมื่อศึกษาผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการบ่มและอุณหภูมิต่อการผลิตไลเปส พบว่าที่อุณหภูมิสูง

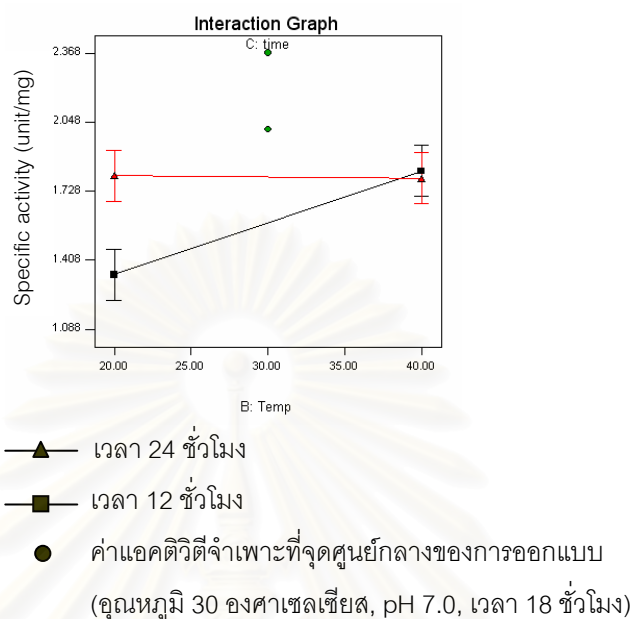
แบบที่เรียสามารถผลิตไลเปสได้ดี และเวลาไม่มีผลกระทบต่อการผลิตไลเปสที่อุณหภูมิสูง ทั้งนี้ เพราะว่าที่อุณหภูมิสูงน้ำมันจะกระจายตัวได้ดีมากอยู่แล้วไม่ว่าใช้เวลาในการบ่มน้อยหรือมาก



รูปที่ 5.1 ผลกระทบของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไลเปส



รูปที่ 5.2 ผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการบ่มและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไลเปส



**รูปที่ 5.3 ผลกระทบของเวลาที่ใช้ในการบ่มและอุณหภูมิต่อการผลิตไลเปส**

อย่างไรก็ดีผลจากการออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียลพบว่าแบคทีเรีย C2 สามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด เมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 เวลาในการบ่ม 18 ชั่วโมง โดยมีค่าแอกติวิตี 2.344 (หน่วยต่อมิลลิลิตร) ซึ่งจากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย C2 พบว่าเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ โดยอุณหภูมิที่บ่มและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมนี้เป็นอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียในตอนแรก เมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ANOVA พบว่าทั้งอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ เวลาในการบ่มเชื้อ ทุกปัจจัยมีผลต่อการผลิตไลเปสอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นจึงใช้ภาวะนี้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย C2 เพื่อผลิตไลเปส สำหรับนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากงานวิจัยนี้เทียบกับงานวิจัยอื่นดังแสดงในตาราง 5.1

ตารางที่ 5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียต่างๆ

แหล่งที่มาของไลเปส	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ค่าความเป็นกรดต่าง	แอกติวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
C2	30	7	2.344	งานวิจัยนี้
<i>Geotrichum sp.</i>	30	7	17.000	Burkert และ คณะ (2004)
<i>Fusarium solani</i> FS1	28	6	9.500	Maia และ คณะ (1999)
<i>Acinetobacter</i> <i>radioresistens</i>	30	7	0.190	Chen และ คณะ (1998)
<i>Mucor hiemalis</i>	25	7	1.980	Akhtar และ คณะ (1980)

การศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มในตอนแรกของงานวิจัยนี้ได้ใช้ไลเปสในรูปสารละลาย (soluble) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งพบว่าไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์ขึ้น ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากน้ำปริมาณมากที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายไลเปส ทำให้ปฏิกิริยากลายเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Shah, 2004) นอกจากนี้ไลเปสอาจสูญเสียแอกติวิตีเนื่องจากเมทานอล Kaieda และคณะ (2001) ได้เสนอแนวทางแก้ไขปัญหาค่าการสูญเสียแอกติวิตีของไลเปสจากเมทานอลโดยการเปลี่ยนสถานะไลเปสจากสารละลายให้อยู่ในรูปผง (powder) โดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (lyophilizer) ก่อนนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งผลการทดลองใช้ไลเปสในรูปผงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพบว่ายังคงไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์ขึ้นเช่นกัน จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงว่าไลเปสอิสระไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจึงแก้ปัญหาโดยการเตรียมไลเปสตรังรูปเพื่อนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อไป

การเตรียมไลเปสตรังรูปโดยการเปรียบเทียบวิธีการตรังรูป 2 วิธี คือ การตรังโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพ กับการตรังโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์พบว่า ไลเปสที่ตรังโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพให้แอกติวิตีจำเพาะดีกว่าไลเปสที่ตรังโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากวิธีการตรังโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ในตอนแรกอะมิโนโพรพิลไดเรทอกซีไซเลน

(aminopropyltriethoxysilane, APTS) จะกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลบนผิวเม็ดแก้วให้กลายเป็นหมู่อะมิโน จากนั้นกลูตารัลดีไฮด์ที่มีหมู่อัลดีไฮด์ 2 หมู่จะมาเชื่อมกับหมู่อะมิโนที่อยู่บนผิวของเม็ดแก้วและหมู่อะมิโนของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ในกรณีที่เกิดพันธะโควาเลนต์ขึ้นมากทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงบนเม็ดแก้วมีมากจนเกินไปจนไปดบังบริเวณเร่งของเอนไซม์จากโมเลกุลของเอนไซม์ตัวอื่นทำให้สับสเตรทไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ (Aehle, 2004) พันธะโควาเลนต์ที่มากเกินไปยังมีผลให้เอนไซม์ถูกจำกัดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ซึ่งจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อีกด้วย แต่ไลเปสที่ตรึงโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพนั้น จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไลเปส ทำให้เกิดการเสถียรภาพของเอนไซม์ระหว่างการตรึงน้อยที่สุด และวิธีการตรึงสามารถทำได้ง่ายและสะดวก ดังนั้นในงานวิจัยนี้วิธีการเตรียมไลเปสตรึงรูปโดยใช้หลักการดูดซับทางกายภาพกับเม็ดแก้วจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมไลเปสตรึงรูปมากกว่าการตรึงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Trivedi และคณะ (2004)

เนื่องจากเม็ดแก้วทนทานต่อแรงกระแทกได้ดี โครงรูปเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงหรือความเป็นกรดด่างที่รุนแรงได้ นอกจากนี้ยังไม่ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ จึงมีรายงานการนำเม็ดแก้วมาใช้เป็นตัวพวยงในการตรึงรูปเอนไซม์ต่างชนิดกันมากมาย โดย Trivedi และคณะ (2004) ได้ใช้เม็ดแก้วเพื่อเป็นตัวพวยงในการตรึงรูปแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) Ikediobi และคณะ (1998) ใช้เม็ดแก้วเพื่อเป็นตัวพวยงในการตรึงรูปลินามาเลส (linamarase) Brockman และคณะ (1973) ใช้เม็ดแก้วเพื่อเป็นตัวพวยงในการตรึงรูปไลเปส

ในงานวิจัยนี้เมื่อพิจารณาขนาดของเม็ดแก้วที่เลือกใช้เป็นตัวพวยงในการตรึงรูปไลเปสโดยพิจารณาจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแก้วที่เลือกใช้คือ 0.1 มิลลิเมตร 2.0 มิลลิเมตร และ 5.0 มิลลิเมตร ตามลำดับพบว่าเมื่อเตรียมไลเปสตรึงรูปโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพ เมื่อใช้เม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร ให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะของไลเปสสูงสุด คือ 1.764 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเทียบกับเม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร และ 5.0 มิลลิเมตร ที่ให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะ 1.720 และ 1.506 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแก้ว 0.1 มิลลิเมตร เป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับเม็ดแก้วที่ Trivedi และคณะ (2005) ใช้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาขนาดพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเม็ดแก้วพบว่าเม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเท่ากับ 60.38 (มิลลิเมตร<sup>-1</sup>) ซึ่งมีค่ามากกว่าเม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 มิลลิเมตร และ เม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร ที่มีขนาดพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเท่ากับ 3.0 (มิลลิเมตร<sup>-1</sup>) และ



1.2 (มิลลิเมตร<sup>-1</sup>) ตามลำดับ นั้นแสดงว่าการใช้เม็ดแก้วที่มีขนาดเล็กลงทำให้พื้นที่ผิวของตัวพุงมีมากขึ้น จึงมีผลให้เอนไซม์ติดบนตัวพุงมากขึ้น ( Chibata, 1978 และ Trivedi, 2005) ดังนั้นเม็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร จึงเป็นขนาดของเม็ดแก้วที่เหมาะสมในการเตรียมไลเปสตรังรูปเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาคุณสมบัติที่ใช้ในการเตรียมไลเปสตรังรูปโดยเปรียบเทียบการตรังรูปไลเปสที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ( 27-31 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองพบว่าการเตรียมไลเปสตรังรูปที่ 4 องศาเซลเซียส ให้แอกติวิตีจำเพาะของไลเปส 1.422 (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และการเตรียมไลเปสตรังรูปที่อุณหภูมิห้อง ให้แอกติวิตีจำเพาะของไลเปส 0.490 (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) จะเห็นว่าการเตรียมไลเปสตรังรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะสูงกว่าการเตรียมไลเปสตรังรูปที่อุณหภูมิห้องถึงเกือบ 3 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ เอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไม่มากนักและยังสามารถคงแอกติวิตีอยู่ได้ (Liao และ Chen, 2001)

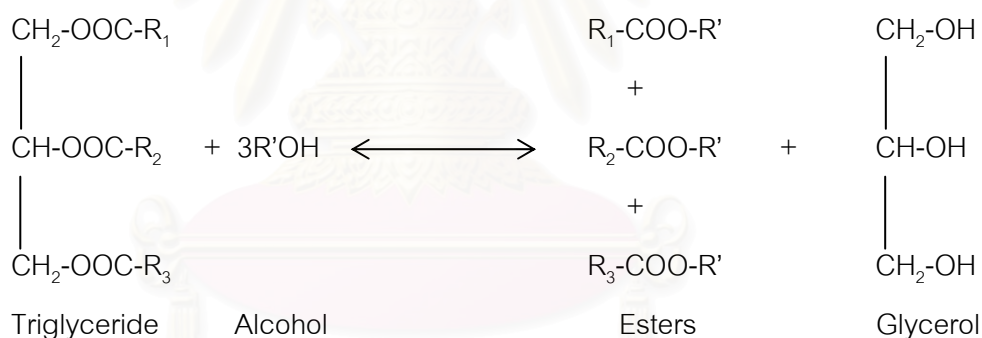
ผลการศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ พบว่าไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระ มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากันคือ 65 องศาเซลเซียส และเมื่อศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสตรังรูปเทียบกับไลเปสอิสระ พบว่าไลเปสตรังรูปและไลเปสอิสระสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 เท่ากัน นั่นอาจเป็นเพราะไลเปสที่ตรึงโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพนั้น จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไลเปส ดังนั้นไลเปสตรังรูปจึงอาจมีคุณสมบัติเบื้องต้นบางประการเหมือนกับไลเปสอิสระ (Chibata, 1978)

จากการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริเฟชันของน้ำมันปาล์ม โดยมีไลเปสตรังรูปจากแบคทีเรีย C2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงแฟกทอเรียล มีปัจจัยที่ใช้ศึกษา 4 ปัจจัย คือ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล (1:12.5 และ 1:25) อุณหภูมิ (35 และ 55 องศาเซลเซียส) เวลา (12 และ 18 ชั่วโมง) และตัวทำละลายเฮกเซน ( 0 และ 2 มิลลิลิตร) พบว่าได้อัลลอะเมทิลเอสเทอร์เมื่อเทียบกับน้ำมันปาล์มตั้งต้นสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 0.68 เมื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริเฟชัน โดยมีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็น 1:25 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 55 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง และในสภาวะที่มีเฮกเซน 2 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปัจจัยระดับสูงทั้งหมดที่ศึกษาเมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่าทั้ง อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล อุณหภูมิ และผลของ



ตัวทำละลายเฮกเซน มีผลต่อการผลิตไลเปสอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ทุกปัจจัย ยกเว้นเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งไม่มีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ที่เวลา 12 ชั่วโมง ถึง 18 ชั่วโมง ปฏิกิริยาอาจเกิดขึ้นเกือบสมบูรณ์แล้ว เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันคงที่ในทุกการทดลองคือ 1 กรัม

เมื่อพิจารณาสมการของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจากรูปที่ 5.4 พบว่าเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับได้และไตรกลีเซอไรด์ 1 โมล จะทำปฏิกิริยาพอดีกับเมทานอล 3 โมล ดังนั้นในการดำเนินปฏิกิริยาจะต้องใช้เมทานอลมากเกินไปเพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปข้างหน้า (Meher และคณะ, 2004) จากการทดลองครั้งนี้ใช้อัตราส่วนจำนวนโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:12.5 และ 1:25 พบว่าร้อยละของเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเมื่อมีจำนวนโมลของเมทานอลมากขึ้นคือที่ 1: 25 แสดงว่าเมทานอลที่มากเกินไปทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nouredini และคณะ (2005)



รูปที่ 5.4 การเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันพืช (Ma และ Hanna, 1999)

เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน Du และคณะ (2003) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเปสตรึงรูปอยู่ที่ 40-50 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้เลือกศึกษาอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาในช่วง 35 และ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าร้อยละเมทิลเอสเทอร์ที่ได้มากขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยามากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Salis และคณะ (2005)

Jaegar และ Eggert (2002) รายงานว่าไลเปสตรังรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นเมื่อมีตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยา งานวิจัยนี้เลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายเพื่อศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยเติมและไม่เติมเฮกเซนลงในปฏิกิริยา จากผลการทดลองพบว่าได้ร้อยละของเมทิลเอสเทอร์มากขึ้นเมื่อเติมเฮกเซนปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในปฏิกิริยา ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nelson และคณะ (1996), Iso และคณะ (2001) ทั้งนี้เนื่องจากในภาวะที่มีเฮกเซนจะลดการเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไลเปสในส่วน of hydration layer – protein interaction ของเอนไซม์ ทำให้ลดการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้ (Desai และคณะ, 2006)

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการทำงานของไลเปสตรังรูป โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มเป็น 0.80 1.30 1.80 2.30 และ 2.80 มิลลิโมลาร์ ดำเนินปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่ 55 องศาเซลเซียส โดยมีเฮกเซนในปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร และปริมาณเมทานอลคงที่คือ 45 มิลลิโมลาร์ในทุกการทดลอง จากนั้นหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk) พบว่าได้ค่า  $K_m$  เท่ากับ 5.49 มิลลิโมลาร์

เมื่อจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ C2 จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากสายพันธุ์ C2 ที่วิเคราะห์โดยใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพ, BSU) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,458 เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Staphylococcus warneri* (Accession No. L37603) มากที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98% ดังนั้นไลเปสที่ใช้ในงานวิจัยนี้จึงเป็นไลเปสที่ได้จาก *Staphylococcus warneri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ผลิตไลเปสได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Walavalka และคณะ (2002)

งานวิจัยนี้พบว่าไลเปสตรังรูปที่ได้จากแบคทีเรีย C2 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ แต่ร้อยละเมทิลเอสเทอร์เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำที่ได้จากงานวิจัยนี้ค่อนข้างน้อย คือ ร้อยละ 0.68 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไลเปสที่นำมาใช้ตรังรูปเป็นไลเปสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนก่อนนำมาใช้ตรังรูปอาจทำให้ได้ร้อยละเมทิลเอสเทอร์มากขึ้น

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- กล้าณรงค์ ศรีรอด, พูนสุข ประเสริฐสรรพ, สมพร อิศวิลานนท์ และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2546. รายงานการวิจัยการศึกษาสถานภาพวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพมหานคร : แพลน พรินท์ติ้ง.
- ธนาทิพย์ อัครผดุงสิทธิ์, นุจรี เลาะห์ประเสริฐ, สุชญา นิติวฒนานนท์ และ ธราพงษ์ วิทิตสานต์. 2547. ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันน้ำมันพืชใช้แล้วด้วยเมทานอลโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์. 2:161-171.
- ประดิษฐ์ มีสุข. 2544. เคมีอินทรีย์เบื้องต้น. การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ .
- ปราโมทย์ ไชยเวช. 2537. ปิโตรเลียมเทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สุนทรออฟเซท.
- ฝ่ายประมวลผลข้อมูลพลังงาน. 2545. ไบโอดีเซล. [online]. Available from [http://www.dmr.go.th/~adm\\_msd /MSD\\_WEBSITE/events\\_biodiesel/biodiesel](http://www.dmr.go.th/~adm_msd /MSD_WEBSITE/events_biodiesel/biodiesel). [10/12/2546].
- พิศมัย เจนวนิชปัญจกุล, 2544. ความก้าวหน้าของงานวิจัยไบโอดีเซลในประเทศไทย. วารสารแลบทูเดย์. 1: 59-63.
- มูทิตา ยันนุรพา, ลักษณะศักดิ์ พอดิงาม, และ กัญจนา บุญเกียรติ. 2545. ไบโอดีเซล (Biodiesel) จากน้ำมันพืช 3 ชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์. 2: 78-84.
- สุรกิตติ ศรีสกุล, สุณีย์ นิตศพัตรพงศ์ และ ชาย โสมวิธ. 2544. การพัฒนาการผลิตและการปรับปรุงพืชน้ำมัน (ปาล์มน้ำมัน). เอกสารประกอบการประชุม เรื่องแนวทางการวิจัย และพัฒนาไบโอดีเซลไปสู่เชิงพาณิชย์, 18 มิถุนายน ณ โรงแรมมารวยการ์เด็น . กรุงเทพมหานคร.

## ภาษาอังกฤษ

- Abdulmazid, M. 1993. Biocatalysis and immobilized enzyme / cell bioreactor, Bio Technology. Bioeng. Technology. 11:690-696.
- Abigor, R., Uadia, P., Foglia, T.A., Haas, M., Jones, K., Okpefa, E., Obibuzor, K., and Bafor, M. 2000. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. Biochem. Soc. Trans. 28:979-981.
- Aehle, W. 2004. Enzymes in Industry. WILEY-VHC Verlag GmbH & Co. Germany. p.70-80.
- Akhtar, M.W., Mirza, A.Q., and Chughtai, M.I.D. 1980. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. Appl. Environ. Microbiol. 40:257-263.
- Altin, R., Cetinkaya, S., and Yucesn, H.S. 2001. The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines. Energy Conversion and Management. 42:529-538.
- Auburn University Environmental Institute. 2002. Identification of Bacteria in the Environment. [Online] Available from : <http://www.auburn.edu/academic/classes/biol/4600/dale/Lab%20project.htm>
- Brady, C., Metcalte, L., Slaboszewski, D., and Frank, D. 1980. Lipase immobilized on a Hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 65: 917-921.
- Brevik, H., Haraldsson, G.G., and Kristinsson, B. 1997. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. J. Am. Oil Chem. Soc. 74:1425-1429.
- Brockman, H.L., Law, J.H., and Kezdy, F.J. 1973. Catalysis by Adsorbed Enzymes. J Biol Chem. 248:4965-4970.

- Burkert, J.F.M., Maugeri, F., and Rodrigues, M.I. 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. Bioresource technology. 91:77-84.
- Cambou, B., and Klibanov, A.M. 1984. Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: Asymmetric hydrolysis, esterification and transesterification. Biotechnol. Bioeng. 26:1449-1454.
- Chen, S.J., Cheng, C.Y., and Chen, T.L. 1998. Production of Alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. J.Ferment Bioeng. 86:308-312.
- Chibata, I. 1978. Immobilized Enzyme (Reserch and development). John Wiley and Sons, New york. p.5-7.
- Crueger, W. and Crueger, A. 1991. Biotechnology : A textbook of Industrial Microbiology. Science Tech, Madison. P. 386.
- Darmoko, D., and Cheryan, M. 2000. Kinetics of palm oil transesterification in a Batch reactor. J. Am. Oil Chem. Soc. 77:1263-1267.
- De, B.K., Bhattacharyya, D.K., and Bandhu, C. 1999. Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. J. Am. Oil Chem. Soc. 76:451-453.
- Desai, P.D., Dave, A.M., and Devi, S. 2006. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalent bound lipase onto chitosan beads. Food Chemistry. 95:193-199.
- Du, W., Xu, Y., and Liu, D. 2003. Lipase-catalysed transesterification of soybean oil for biodiesel production during continuous batch operation. Biotechnol Appl. Biochem. 38:103-106.
- Formo, M.W. 1954. Ester reactions of fatty materials. J. Am. Oil Chem. Soc. 31:548-559.
- Freedman, B., Pryde, E.H., and Mounts, T.L. 1988. Variables affecting the yields of fatty acid esters from transesterified vegetable oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 65:936-938.

- Fukuda, H., AKondo, A., and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils : review. J. Biosci. Bioeng. 92:405-416.
- Harwood, H.J. 1984. Oleochemicals as a fuel: Mechanical and economic feasibility. J. Am. Oil Chem. Soc. 61:315-324.
- Helga, G., Kristin, W., and Björn, S. 1998. Alcoholysis and glyceride synthesis with immobilized lipase on controlled-pore glass of vary hydrophobicity in supercritical carbondioxide. Enzyme and Microbial Technology. 22:360-367.
- Ikediodi, C.O., Stevens, M., and Latinwo, L. 1998. Immobilization of linamarase on non-porous glass beads. Process Biochem. 33:491-494.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of molecular catalysis B:Enzymatic. 16:53-58.
- Jaegar, K.E., and Eggert, T. 2002. Lipase for Biotechnology. Current opinion in Biotechnology. 13:390-397.
- Kaieda , M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., and Fukuda, H. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. J. Biosci. Bioeng. 88:627-631.
- Kang, S.T., and Shick, R.J. 1988. Characteristics of immobilized lipase catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. Biotechnol. Bioeng. 33:1469-1476.
- Kennedy, J. F., and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme immobilization, p. 347-404. In Biotechnology, vol. 7a Enzyme technology, ed. J.F. Kennedy. Weinheim:VCH Verlagsgesellschaft GmbH. , Weinheim, Germany.



- Kirsty, K., Maria, C.B.P., Marcia, M.C.M., William, M.L., José, L.L.F., and Maria, M.D.M. 2000. Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. Brazilian Journal of Microbiology. 31:220-222.
- Korbitz, W. 1999. Biodiesel production in Europe and North America and Encouraging Prospect. Renewable Energy. 16:1078-1083.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., and Veeger, C. 1986. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng. 30:81-87.
- Lambert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rossello-Mora, R.A., Del, Cueto, C., Dodge, D.E., Cano, R.J. 1998. *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from dominican amber. International Journal of Systematic Bacteriology. 48:511-518.
- Langrand, G., Baratti, J., Buono, G., and Triantaphylides, C. 1986. Lipase catalyzed reaction and strategy for alcohol resolution. Tetrahedron Lett. 27:29-32.
- Laurie, A.A., Jennifer, C., and Michael, T.M. 2002. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 67:2922-2926.
- Liao, M.H., and Chen, D.H. 2001. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. Biotechnol. Lett. 23:1723-1727.
- Linko, Y.Y., Lämsä, M., Wu, X., Uosukainen, W., Sappälä, J., and Linko, P. 1998. Biodegradable products by lipase biocatalysis. J. Biotechnol. 66:41-50.
- Ma, F., and Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production : a review. Bioresource technology. 70:1-15.
- Macrae, A.R. 1983. Extracellular Microbial lipases, p. 123-123. In *Microbial enzymes and Biotechnology*. Applied Science. London.

- Maia, M.M., Morais, M.M., Morais, M.A., Melo, E.H., and Filho, J.L. 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. Revista de Microbiologica. 30:304-309.
- Marianne, K., Bergit, H., Dietmar, S., and Rolf, D.S. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808, Purification, Characterization, Crystallization and Preliminary X-ray diffraction Data. Journal of Bacteriology. 15:4836-4841.
- Masanobu, T., Sakata, M., Takaya, H., and Miruma, K. 1995. Hydrolysis of palm stearin oil by a thermostable lipase in a draft tube-type reactor. Journal of fermentation and bioengineering. 80:340-345.
- Meher, L.C., Sagar, D.V., and Naik, S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. Renewable and Sustainable Energy. 10:248-268.
- Mittelbach, M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 67:168-170.
- Mohamad, I.A., and Al-Shyoukh, A.O. 2002. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. Bioresource Technology. 85:253-256.
- Mohamed, M.S., and Uwe, T.B. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of Methyl esters from sunflower oil. Enzyme and Microbial Technology. 33:97-103.
- Neito, I., Rocchietti, S., Ubiali, D., Speranza, G., Morelli, C.F., Fuentes, I.E., Alcantara, A.R., and Terreni, M. 2005. Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract: Enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol. Enzyme and Microbial Technology. 37:514-520.
- Nelson, L.A., Foglia, T.A., and Marmer, W.N. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. J. Am. Oil Chem. Soc. 73:1191-1195.

- Nimcevic, D., Puntigum, R., Worgetter, M., and Richard, G.J. 2000. Preparation of Rapeseed oil esters of lower aliphatic alcohols. J. Am. Oil Chem. Soc. 77:275-280.
- Noureddini, H., Gao, X., and Philkana, R.S. 2005. Immobilized *P. cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technology. 96:769-777.
- Perry, D.H. 1989. Experimental Design in Biotechnology. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Peterson, C.L., Auld, D.L., and Korus, R.A. 1983. Winter rape oil fuel for diesel engines: Recovery and utilization. J. Am. Oil Chem. Soc. 60:1579-1587.
- Pijanowska, D.G., Baraniecka, A., Wiater, R., Ginalska, G., Lobarzewski, J., and Torbicz, W. 2001. The pH-detection of triglycerides. Sensors and Actuators. 78:263-266.
- Pronk, W., Kerhof, A.M., Helden, C.V., and Riet, K.V. 1987. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. Biotechnol. Bioeng. 32:512-518.
- Rodinger, W. 1994. Neue Daten zur Umweltverträglichkeit von RME im Vergleich zu Dieselkraftstoff. Bundesanstalt für Wassergüte, Vienna, Australia.
- Roxana, R., Yugo, I., Nobuyoshi, S., Nobushike, D., and Tsuneo, Y. 1998. Intensification of lipase performance in a transesterification reaction by immobilization on CaCO<sub>3</sub> Powder. J. Biotechnology. 66:51-59.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saka, S., and Kusdiana, D. 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. Fuel. 80:225-231.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V. 2005. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. J. Biotech. 119:291-299.

- Saxena, R.K., Gosh, P.K, Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S., and Gulati, R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. Current Science. 77:101-115.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., and Vargas, R.M. 1998. Transesterification of vegetable oils : a review. J. Braz. Chem. Soc. 9:199-210.
- Selmi, B., and Thomas, D. 1998. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. J. Am. Oil Chem. Soc. 75:691-695.
- Shah, S., Sharma, S., and Gupta, M.N. 2004. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. Energy and Fuel. 18:154-159.
- Shieh, C.J., Liao, H.F. and Lee, C.C. 2003 . Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. Bioresource Technology. 88:103-106.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H. and Tominaga, Y.1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 76:789-793.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. J. Molecular Catalysis B : Enzymatic. 17:133-142.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Menge, U., and Kolisis, F.N. 1993. Kinetic study of lipase catalyzed esterification reaction in water-in-oil microemulsions. Biotechnol. Bioeng. 42:931-937.
- Strayer, R.C., Blake, J.A., and Craig, W.K. 1983. Canola and high crude rapeseed oil as substitutes for diesel fuel: Preliminary tests. J. Am. Oil Chem. Soc. 60:1587-1592.
- Tashtoush, G.M., Al-Widyan, M.J., and AJ-Jarrah, M.M. 2004. Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel. Energy Conversion and Management. 45:2697-2711.

- Taylor, R.F. 1991. Commercially Available Supports for Protein Immobilization. Marcel Dekker Inc., New York. p. 337.
- Tien, C.H., Giridhar, R., Chiou, S.H., and Wu, W.T. 2003. Binary immobilization of *Candida Rugosa* lipase on chitosan. J Molecular Catalysis B : Enzymatic. 26:69-78.
- Trivedi, A., Heinemann, M., Spiess, A.C., Dausmann, T., and Büchs, D. 2005. Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. J. Biosci. Bioeng. 99:340-347.
- Vidinha, P., Augusto, V., Almedia, M., Fonseca, I., Fidalgo, A., Ilharco, L., Cabral, J.M.S., and Barreiros, S. 2005. Sol-gel encapsulation: An efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. Journal of Biotechnology. 121:23-33.
- Wade, L.G. 1995. Organic Chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, USA.
- Walavalkar, G.S., and Bapat, M.M. 2002. *Staphylococcus warneri* BW94-a new source of lipase. Indian J Exp. Biol. 40:1280-1284.
- Wang, D.I.C., Coony, C.L., and Demain, A.L. 1979. Enzyme Kinetics and Immobilization in Ferment. Technol. John Wiley and Sons. USA. p. 318-336.
- Weber, S., Stubner, S., and Conrad, R. 2001. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. Appl. Environ. Microbiol. 67:1318-1327.
- Wright, H.J., Segur, J.B., Clark, H.V, Coburn, S.K., Langdon, E.E, and Dupuis, R.N. 1944. A report on ester interchange. Oil and soap. 21:145-148.
- Wu, W.H., Foglia, T.A., Marmer, W.N., and Phillips, J.G. 1999. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. J. Am. Oil Chem. Soc. 76:517-521.

Yadav, G.D., and Jadhav, S.R. 2005. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. Microporous and Mesoporous Materials. 86:215-222 .

Zheng, D., and Hanna, A.M. 1996. Preparation and properties of Methyl Esters of beef tallow. Bioresource Technology. 57:137-142.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวน้ำมันมะกอก (olive oil medium)

แอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	กรัม
ซอยโตน เปปโตน (soytone Peptone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract )	1.0	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำมันมะกอก (olive oil) 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหารแข็งไตรบูไทรีน (tributylin agar) /อาหารแข็งเอียงน้ำมันมะกอก (olive oil slant agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.0	กรัม
ซอยโตน เปปโตน (soytone Peptone)	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract )	1.0	กรัม
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมไตรบูไทรีน/น้ำมันมะกอก 10 มิลลิลิตรและวุ้นผง (agar) 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตน (tryptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

## สารเคมี

## 1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

## Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต	0.6	กรัม
น้ำกลั่น	3.0	ลิตร

## Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ )	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

## Lowry C

Lowry A	50	ส่วน
Lowry B	1	ส่วน

## Lowry D

สารละลายฟอลินฟีนอล (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

## 2. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction kit

ประกอบด้วย

- Buffer QG
- Buffer PE (concentrate)
- Buffer EB
- Collection tube
- QIAquick Spin colum

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลให้เติมเอทานอลปริมาตร 24 มล. ลงใน Buffer PE ทำการสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ให้โดยบริษัทผู้ผลิต

## 3. สารละลาย 10%SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อครั้งแรกแล้วจะไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำได้อีกเพราะสารละลาย SDS จะเสียสภาพ)

## 4. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Trismabase (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	121.1 กรัม
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	42 มล.

ละลาย Trismabase ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

## 5. สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ )	186.1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. จากนั้นเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันรอให้เย็นลงแล้วจึงปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 8.0 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 6. บัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0

Tris-HCl	10.0	มิลลิโมลาร์
EDTA	1.0	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 10 มล. เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ปริมาตร 2 มล. เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 7. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Tris base	242	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	57.1	มล.
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0	100	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มล. แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 8. สารละลาย CTAB/NaCl (10%CTAB ใน 0.7 M NaCl)

CTAB	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.7	โมลาร์



ละลาย CTAB ในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เมื่อละลายหมดแล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

### 9. สารละลายฟีนอล (phenol)

นำฟีนอลในรูปเกล็ดของแข็งมาหลอมเหลวในน้ำอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมผง Hydroxy quinoline ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% แล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาข้ามคืน นำชั้นฟีนอลมาวัดความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับมากกว่า 7.8 (ใช้ pH paper วัด) ถ้ายังไม่ได้ให้ดูดสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติม Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ลงไปอีกครั้ง ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งชั้นฟีนอลมีความเป็นกรด-ด่างมากกว่าหรือเท่ากับ 7.8 สุดท้ายเติมบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.0 ในอัตราส่วน 1:1 อีกครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาที่ปิดฝาแน่น

### 10. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วย Tris-HCl เข้ากับคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เป็น 25 : 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 11. สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 12. สกัดตาม

Bromphenolblue	0.025%
สารละลายชูโคส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 13. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE

ละลายผงเอธิเดียมโบรไมด์ในบัฟเฟอร์ TAE ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

## 14. สารละลายไซเตียมอะซีเตท เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.2

ละลายไซเตียมอะซีเตท น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มล. นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซีติกปริมาตรประมาณ 57 มล. เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มล. นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

## 15. สารละลายไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผงไลโซไซม์ น้ำหนัก 20 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 16. สารละลาย RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผง RNase A น้ำหนัก 10 มก. ในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 17. สารละลายผสม dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ของแต่ละตัว)

ผสม dNTP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรสารละลาย 10 ไมโครลิตร เข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

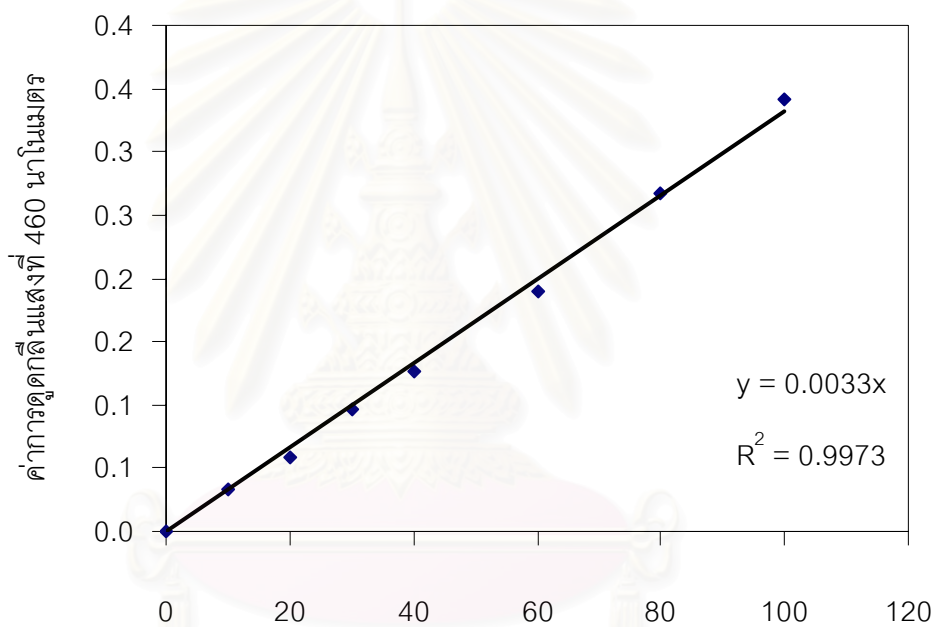


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## กราฟมาตรฐาน

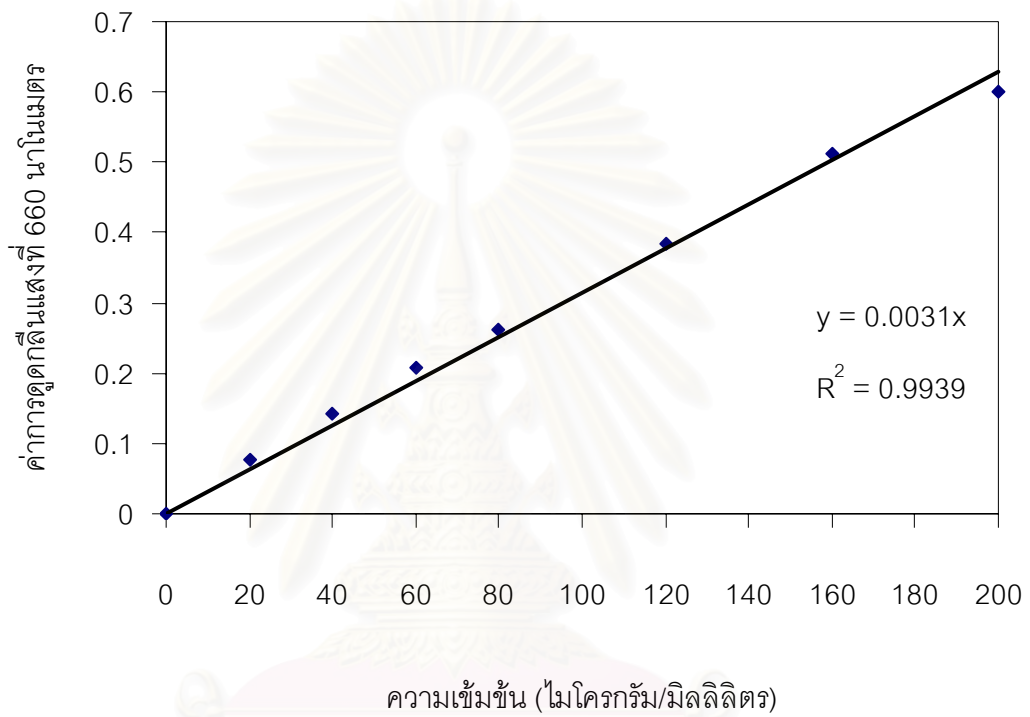
1. กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol)



ความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

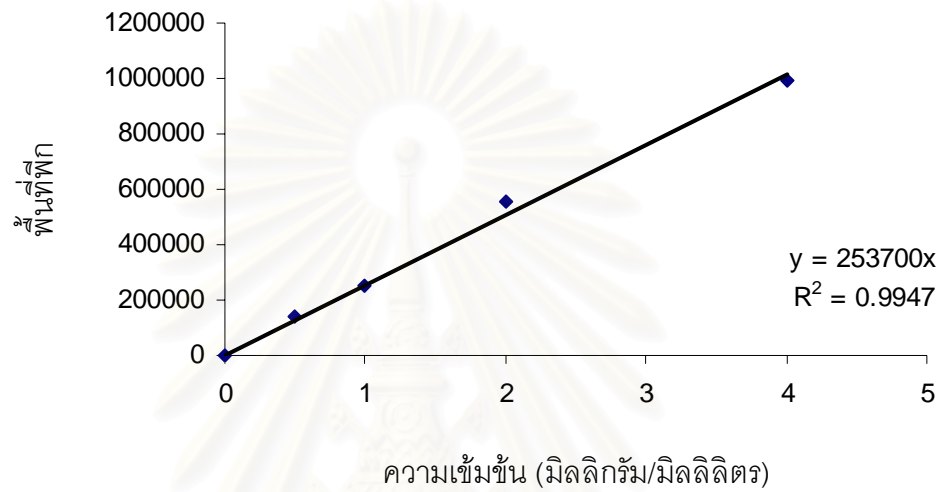
## 2. กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)



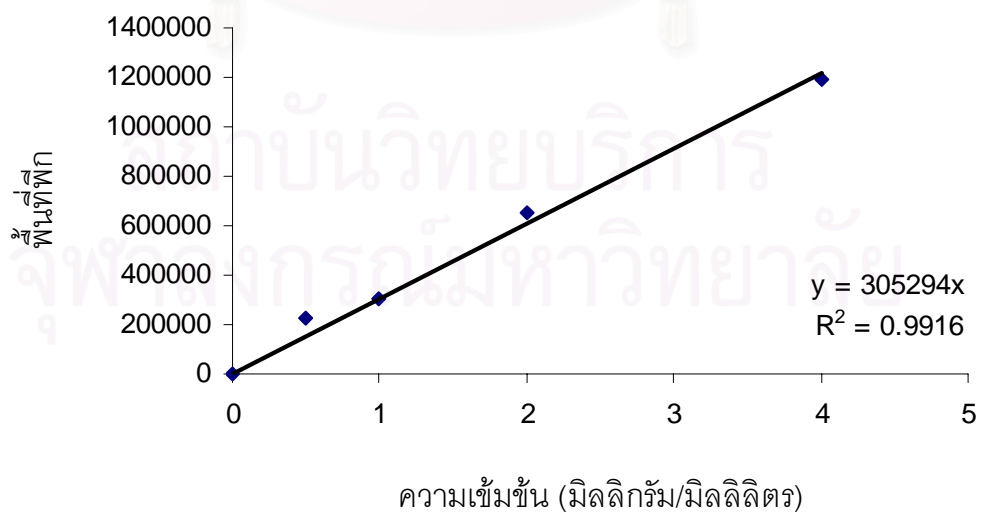
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 3. กราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์

กราฟมาตรฐานของเมทิลปาล์มมิเตท



กราฟมาตรฐานของเมทิลโอเลเอท

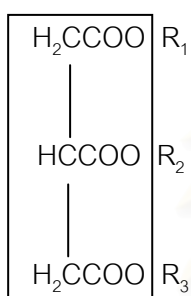




## ภาคผนวก ง

## การคำนวณปริมาณของผลิตภัณฑ์

1. การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม



มวลโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ คำนวณโดย

$$MW_{TG} = 3R_{aver} + 173$$

$$R_{aver} = \sum \left[ \frac{\%F_{an} \times MW_n}{100} \right]$$

ไตรกลีเซอไรด์

มวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม โดยมีองค์ประกอบของกรดไขมันน้ำมันพืช จากภาคผนวก จ

$$R_{aver} = (0.0411 \times 155) + (0.0201 \times 183) + (0.3628 \times 211) + (0.0360 \times 239) + (0.4201 \times 237) + (0.1201 \times 235)$$

$$= 223$$

$$MW_{TG} = (3 \times 223) + 173$$

$$= 842$$

## 2. การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์

### 2.1 การคำนวณปริมาณเมทิลเอสเทอร์แต่ละชนิด

$$W_{MFA} = \frac{C \times W_p}{D}$$

### 2.2 การคำนวณน้ำหนักไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันแต่ละชนิด

$$W_{TG(Fa)} = W_o \times \% \text{Fatty acid}$$

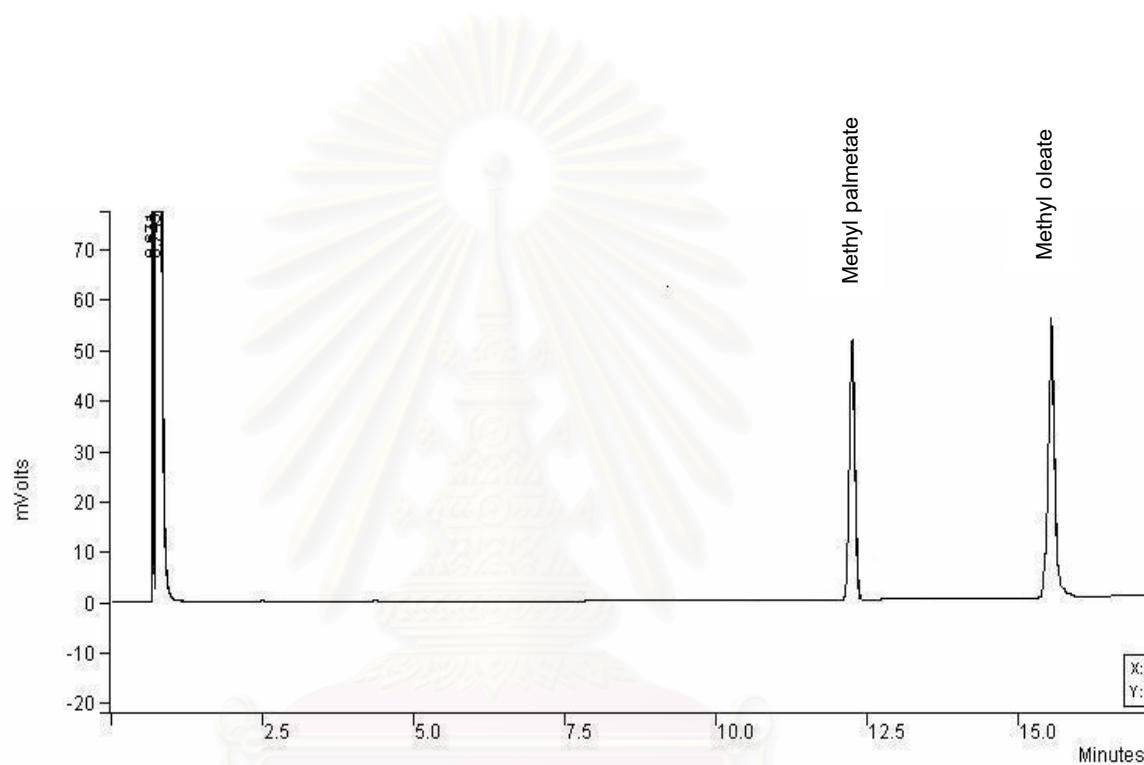
### 2.3 การคำนวณร้อยละของเมทิลเอสเทอร์

$$\% \text{ME} = \frac{W_{MFA}}{W_{TG(Fa)}} \times 100$$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก จ

โครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret Time (min)	Time Offset (min)	Peak Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		12.6775	0.674	0.000	909376	0.00	BV	0.9		0
2		73.2400	0.747	0.000	5253628	0.00	VB	4.4		0
3		6.4382	12.257	0.000	461825	0.00	BP	5.9		0
4		7.6443	15.555	0.000	548338	0.00	VV	6.8		0
<b>Totals</b>		<b>100.0000</b>		<b>0.000</b>	<b>7173167</b>					



สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร  
กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.10900

102

กษ 0925/

รายงานผลการวิเคราะห์

โทร. : 0-2579-8600 ต่อ 600

0-29405468-9 Fax.: 0-2940-5470

ผู้ส่งตัวอย่าง: นางสาวจันทร์นาด พลธานี	CP.No. 1628/48 OSL.No. 160/48
ที่อยู่: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 10330 ถ.พญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ	วันที่รับตัวอย่าง: 6 พฤษภาคม 2548
โทรศัพท์: 02-218-5027 โทรสาร: -	วันที่ดำเนินการ: 12 พฤษภาคม 2548
ชนิดและลักษณะตัวอย่าง: น้ำมันปาล์ม	บรรจุภัณฑ์และสภาพตัวอย่าง: ขวดแก้ว ปิดสนิท

รายงานผลการวิเคราะห์ดังนี้

รายการ	ผลวิเคราะห์	วิธีวิเคราะห์
Fatty acid composition (%)		Ce 2-66, Ce 1-60 AOCS 1993
C12:0 Lauric acid	4.11	
C14:0 Myristic acid	2.01	
C16:0 Palmitic acid	36.28	
C18:0 Stearic acid	3.60	
Total Saturated fatty acid	45.98	
C18:1 Oleic acid	42.01	
C18:2 Linoleic acid	12.01	
Total Unsaturated fatty acid	54.02	

ผลการวิเคราะห์ของผลผลิตตัวอย่างที่ได้ตรวจสอบแล้ว

สถาบันวิจัยและบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....ผู้วิเคราะห์  
(นางสาววิไลศรี ลิ้มปทุมอม)

.....รักษาราชการแทน  
(นางสาววิไลศรี ลิ้มปทุมอม) หัวหน้ากลุ่ม

.....ผู้อำนวยการ  
(นางสมคิด รื่นภาคภูมิ)  
นักวิทยาศาสตร์ 8 ว รักษาาราชการแทน  
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการ  
หลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

วันที่ 17 พ.ค. 48  
รายงานที่ 2344/48  
วันที่รายงาน 18 พฤษภาคม 2548

## ภาคผนวก จ

## ผลการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ANOVA

1. ผลการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ANOVA ของการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไลเปส

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	1.57	7	0.22	9.88	0.0014
A	0.52	1	0.52	22.84	0.0010
B	0.22	1	0.22	9.64	0.0126
C	0.18	1	0.18	7.99	0.0198
AB	0.17	1	0.17	7.28	0.0245
AC	0.21	1	0.21	9.15	0.0143
BC	0.24	1	0.24	10.70	0.0097
ABC	0.035	1	0.035	1.55	0.2446
Curvature	0.45	1	0.45	19.76	0.0016
Pure Error	0.20	9	0.023		
Cor Total	2.23	17			
Std. Dev.	0.15			R-Squared	0.8848
Mean	1.74			Adj R-Squared	0.7953
C.V.	8.65			Pred R-Squared	0.6324
PRESS	0.82			Adeq Precision	9.983

2. ผลการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ANOVA ของการศึกษาภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม โดยมีไคเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ANOVA for Selected Factorial Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.96	4	0.24	10.35	< 0.0001
A	0.28	1	0.28	11.95	0.0012
B	0.51	1	0.51	21.99	< 0.0001
C	0.075	1	0.075	3.23	0.0795
D	0.098	1	0.098	4.22	0.0461
Residual	1.00	43	0.023		
Lack of Fit	0.24	11	0.022	0.93	0.5237
Pure Error	0.76	32	0.024		
Cor Total	1.96	47			

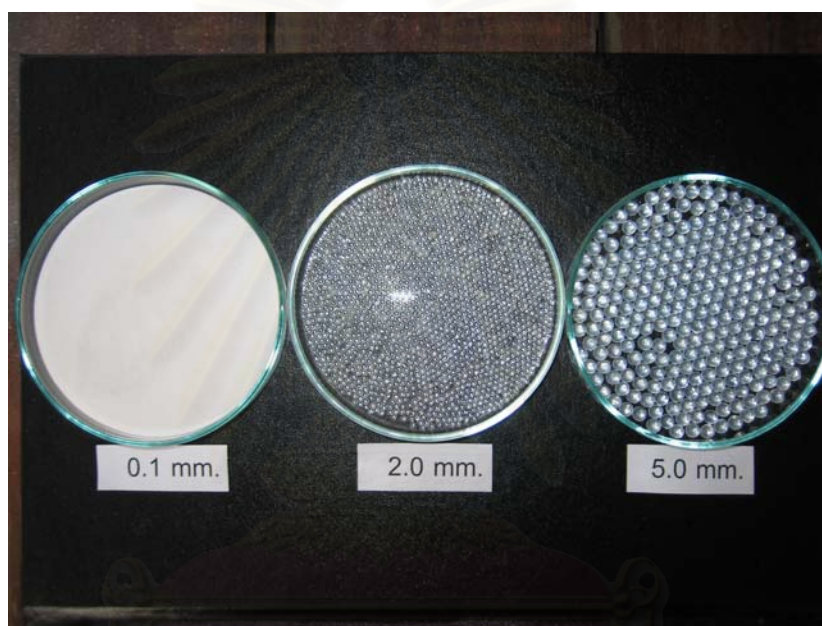
Std. Dev.	0.15	R-Squared	0.4904
Mean	0.23	Adj R-Squared	0.4430
C.V.	67.19	Pred R-Squared	0.3650
PRESS	1.25	Adeq Precision	10.730



## ภาคผนวก ซ

### อุปกรณ์อื่นๆ

1. เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างๆที่นำมาใช้ในการตริงรูป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวจันทร์นถ พลขำนิ เกิดเมื่อวันที่ 22 กันยายน พ.ศ. 2523 ที่ กรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 80/490 ซอย 28 หมู่บ้านทิพวัล1 ตำบลบางเมืองใหม่ อำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรปราการ 10270



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย