

การผลิตกรดไขมันแบบกิ่งกะโดยจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

นางสาวนันทิยา กาวิตะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์นี้ยังถูกฝากไว้ในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

FED BATCH FATTY ACID PRODUCTION BY MICROBIALS IN ROTARY BIOLOGICAL
CONTACTOR REACTOR

Miss Nantiya Kawitay

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental Science
(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---------------------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยจุลินทรีย์ใน ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ |
| โดย | นางสาวนันทิยา กาวิตะ |
| สาขาวิชา | วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา |

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพ็ชรสม)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรทัย ชวาลภาฤทธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาวนันต์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วรกันต์ บุรพาธนะ)

นันทิยา กาวีเต : การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ. (FED BATCH FATTY ACID PRODUCTION BY MICROBIALS IN ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR REACTOR) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร.สมใจ เพ็งปรีชา, 124 หน้า.

จากการศึกษาการเจริญ อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมันในขวดเขย่า ของจุลินทรีย์ 4 ไอโซเลท ประกอบด้วยยีสต์ *Yarrowia lipolytica* (Y2) *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3) *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3)) มีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเพิ่มขึ้นตามอัตราการเจริญเติบโตที่สัมพันธ์กัน การย่อยทำให้ได้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) มากที่สุดในชั่วโมงที่ 5 จากการทดลองแบบแฟคทอเรียลพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันคือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กรดคาปริลิก (C8) เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร และพบว่าผลผลิตกรดคาปริลิก (C8) มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทั้งสามอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) และให้กราฟพื้นผิวตอบสนองเป็นรูปโค้งระฆังคว่ำ จากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพพบว่าในชั่วโมงที่ 10 ให้กรดคาปริลิก (C8) สูงที่สุด เท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตร และทำการศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพพบว่าที่ชั่วโมงที่ 20 กรดคาปริลิก (C8) เพิ่มขึ้นสูงที่สุด เท่ากับ 2.69 กรัมต่อลิตร

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม.....ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5387158620 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEYWORDS : CAPRYLIC ACID/ FATTY ACID/ MICROBIALS/ ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR REACTOR

NANTIYA KAWITAY : FED BATCH FATTY ACID PRODUCTION BY MICROBIALS IN ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR REACTOR. ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMCHAI PENGPRECHA, Ph.D., 124 pp.

In batch shake flask studies of growth rate, palm oil degradation, type and amount of fatty acids of 4 isolated microbials including yeast *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) and bacteria *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3), *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3)) were related and produced a maximum concentration of Caprylic acid (C8) at 5th hour. From the factorial experimental design and the data analysis, it was found that factors within the range of studies effecting on Caprylic acid (C8) yield. The conditions to obtain the maximum concentration of Caprylic acid (C8) of 2.08 g/l were pH 7.5, 37°C and 2.5% carbon source (palm oil) and statistically significant at 95% ($P \leq 0.05$). However, the response surface was shown in maximum curve. In batch rotary biological contactor reactor, the results showed that 2.18 g/l of Caprylic acid (C8) was obtained at 10th hour. In fed batch rotary biological contactor reactor, the results showed that the maximum Caprylic acid (C8) of 2.69 g/l was achieved at 20th hour.

Field of Study : Environmental Science Student's Signature

Academic Year : 2012 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โสมะนิทานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ และข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ และข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรทัย ชวาลภาฤทธิ์ ที่กรุณารับเป็นประธานขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาวสันต์ และดร.วรกันต์ บุรพาธนะ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และได้ให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาวิจัยนี้ และขอขอบคุณสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้สถานที่ทำงานวิจัย รวมทั้งเครื่องมือทำงานวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาอำนวยความสะดวกช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ชั้น 17 สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่คอยให้กำลังใจ คำปรึกษา และความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฎ |
| สารบัญภาพ..... | ฏ |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... | ด |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 3 |
| 1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... | 4 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 4 |
| 2 การทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 5 |
| 2.1 ไชมัน..... | 5 |
| 2.2 กรดไขมัน..... | 5 |
| 2.2.1 การจำแนกชนิดกรดไขมัน..... | 6 |
| 2.2.2 คุณสมบัติกรดไขมัน..... | 8 |
| 2.2.3 กรดไขมันที่พบในพืช..... | 11 |
| 2.2.4 กรดไขมันที่พบในสัตว์..... | 13 |
| 2.2.5 กรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์..... | 14 |
| 2.2.6 กระบวนการผลิตกรดไขมัน..... | 19 |
| 2.2.7 ประโยชน์ของกรดไขมัน..... | 20 |
| 2.3 ปาล์มน้ำมัน..... | 21 |
| 2.3.1 การผลิตน้ำมันปาล์มในประเทศไทย..... | 22 |

| บทที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.4 ไลเปส..... | 23 |
| 2.4.1 ประเภทของเอนไซม์ไลเปส..... | 24 |
| 2.5 การย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์..... | 29 |
| 2.5.1 ปฏิกริยาเบต้าออกซิเดชัน (Beta-Oxidation)..... | 30 |
| 2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์..... | 31 |
| 2.6.1 แหล่งคาร์บอน..... | 31 |
| 2.6.2 แหล่งไนโตรเจน..... | 32 |
| 2.6.3 แร่ธาตุ..... | 33 |
| 2.6.4 พีเอชและอุณหภูมิ..... | 34 |
| 2.6.5 ออกซิเจน..... | 35 |
| 2.6.6 สารลดแรงตึงผิว..... | 35 |
| 2.7 กระบวนการหมัก (Fermentation)..... | 37 |
| 2.7.1 กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation)..... | 37 |
| 2.7.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)..... | 37 |
| 2.7.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)..... | 37 |
| 2.8 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor; RBC)..... | 38 |
| 2.8.1 หลักการทำงานของระบบ..... | 39 |
| 2.8.2 ส่วนประกอบของระบบ..... | 40 |
| 2.8.3 ข้อดีและข้อเสียของระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ..... | 41 |
| 2.8.4 การประยุกต์ใช้ระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ..... | 42 |
| 2.9 การออกแบบการทดลองทางสถิติ..... | 42 |
| 2.9.1 การออกแบบการทดลองแบบ Full factorial design..... | 43 |
| 2.9.2 การออกแบบการทดลองแบบ Fractional factorial design..... | 43 |
| 2.9.3 พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)..... | 44 |
| 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... | 45 |
| 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย..... | 45 |
| 3.2 เคมีภัณฑ์..... | 46 |

| บทที่ | หน้า |
|--|------|
| 3.3 แหล่งจุลินทรีย์..... | 47 |
| 3.4 ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (Rotary Biological Contactor Recator)..... | 47 |
| 3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย..... | 50 |
| 3.5.1 ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน... 50 | 50 |
| 3.5.2 ศึกษาการเจริญ อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมันของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในขวดเขย่า..... | 50 |
| 3.5.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ในขวดเขย่า..... | 51 |
| 3.5.4 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของ จุลินทรีย์ผสมในขวดเขย่า..... | 53 |
| 3.5.5 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดไขมัน..... | 53 |
| 3.5.6 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ.... | 54 |
| 3.5.7 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบ แผ่นหมุนชีวภาพ..... | 55 |
| 3.5.8 วิธีการวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID)..... | 55 |
| 3.5.9 การสกัดแยกกรดไขมัน วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมัน ที่สกัดแยกได้ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)..... | 57 |
| 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล..... | 59 |
| 4.1 ศึกษาคุณลักษณะและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายน้ำมัน..... | 60 |
| 4.2 ศึกษาการเจริญอัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมัน ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในขวดเขย่า..... | 63 |
| 4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ในขวดเขย่า..... | 69 |

| บทที่ | หน้า |
|--|------|
| 4.3.1 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบเชิงแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) แบบ 2^k ครั้งที่ 1..... | 71 |
| 4.3.2 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสม ในขวดเขย่า..... | 76 |
| 4.4 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ..... | 78 |
| 4.5 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ..... | 82 |
| 5 สรุปผลการทดลอง..... | 87 |
| รายการอ้างอิง..... | 90 |
| ภาคผนวก..... | 96 |
| ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... | 97 |
| ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... | 100 |
| ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... | 102 |
| ภาคผนวก ง โครมาโตรแกรมของกรดไขมันที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน..... | 105 |
| ภาคผนวก จ ตารางแสดงค่า OD.600 nm เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟ กรดไขมันชนิดต่างๆของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ในขวดเขย่า..... | 107 |
| ภาคผนวก ฉ ตารางแสดงค่า OD.600 nm เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆในขวดเขย่าโดยการทดลอง แบบเชิงแฟคทอเรียล (factorial experiment)..... | 113 |
| ภาคผนวก ช ตารางแสดงค่า OD.600 nm เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆในขวดเขย่า ของปริมาณ หัวเชื้อผสม (mixed culture) ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ในขวดเขย่า..... | 117 |
| ภาคผนวก ซ ตารางแสดงค่า OD.600 nm เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์ แบบแผ่นหมุนชีวภาพ..... | 119 |
| ภาคผนวก ฌ ตารางแสดงค่า เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟ กรดไขมันชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบ แผ่นหมุนชีวภาพ..... | 122 |

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 124

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 1.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด..... | 2 |
| 1.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด (ต่อ)..... | 3 |
| 2.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด..... | 8 |
| 2.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด (ต่อ)..... | 9 |
| 2.2 ปริมาณกรดไขมันโดยน้ำหนักที่มีในน้ำมันพืชแต่ละชนิด..... | 12 |
| 2.3 องค์ประกอบของสาหร่ายในทะเลบางชนิด..... | 12 |
| 2.3 องค์ประกอบของสาหร่ายในทะเลบางชนิด (ต่อ)..... | 13 |
| 2.4 องค์ประกอบของกรดไขมันในสัตว์บางชนิด..... | 13 |
| 2.5 องค์ประกอบของกรดไขมันในปลา..... | 14 |
| 2.6 องค์ประกอบของกรดไขมันในแบคทีเรียชนิดต่างๆ..... | 14 |
| 2.7 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ชนิดต่างๆ..... | 15 |
| 2.7 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ชนิดต่างๆ (ต่อ)..... | 16 |
| 2.8 องค์ประกอบของกรดไขมันในราชนิดต่างๆ..... | 17 |
| 2.9 องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม..... | 22 |
| 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้..... | 26 |
| 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้ (ต่อ)..... | 27 |
| 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้ (ต่อ)..... | 28 |
| 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้ (ต่อ)..... | 29 |
| 2.11 เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ..... | 36 |
| 2.12 เปรียบเทียบการผลิตกรดไขมันโดยใช้จุลินทรีย์ วัตถุประสงค์ และวิธีการเพาะเลี้ยง ที่แตกต่างกัน..... | 38 |
| 3.1 ปัจจัย และระดับที่สนใจในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสม ครั้งที่ 1..... | 51 |
| 3.2 การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล..... | 51 |
| 3.3 การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (ต่อ)..... | 52 |

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 4.1 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ ได้กล้องจุลทรรศน์..... | 60 |
| 4.1 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ ได้กล้องจุลทรรศน์ (ต่อ)..... | 61 |
| 4.2 การเกิดบริเวณใสของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งไตรบูไทรีน (tributyryn agar)..... | 62 |
| 4.3 ปัจจัย และระดับที่สนใจในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสม..... | 71 |
| 4.4 ปัจจัย และระดับที่สนใจในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมแบบแฟคทอเรียล... | 71 |
| 4.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณหัวเชื้อ กรดคาปริลิก (C8) และ OD.600 นาโนเมตร ที่เวลา 5 ชั่วโมง..... | 87 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์..... | 5 |
| 2.2 โครงสร้างกรดไขมันอิ่มตัว..... | 6 |
| 2.3 โครงสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว..... | 7 |
| 2.4 ส่วนที่มีหัวและไม่มีหัวของกรดไขมัน..... | 8 |
| 2.5 ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส..... | 10 |
| 2.6 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน..... | 10 |
| 2.7 แผนผังกระบวนการผลิตกรดไขมันในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล..... | 19 |
| 2.8 ปฏิกิริยาของไลเปส..... | 24 |
| 2.9 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปส..... | 30 |
| 2.10 ปฏิกิริยาเบต้าออกซิเดชัน (Beta-Oxidation)..... | 31 |
| 2.11 ลักษณะทั่วไปของระบบแผ่นหมุนชีวภาพ..... | 39 |
| 2.12 ตัวอย่างระบบเทศบาลตำบลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์..... | 41 |
| 2.13 ภาพ 3 มิติกราฟพื้นผิวตอบสนอง..... | 44 |
| 3.1 แสดงถึงปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ ขนาดความจุ 4 ลิตร..... | 48 |
| 3.2 แผ่นหมุนชีวภาพ..... | 48 |
| 3.3 ถังหมักสแตนเลสความจุ 4 ลิตร..... | 49 |
| 3.4 ฐานรองถังหมักและมอเตอร์..... | 49 |
| 3.5 แผ่นอะคลิริกครอบตัวถังหมัก..... | 49 |
| 3.6 เครื่องโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (IATROSCAN TLC-FID Analyzer)..... | 56 |
| 3.7 เครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)..... | 58 |
| 4.1 การเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ บนอาหารเหลวน้ำมันปาล์ม..... | 64 |
| 4.2 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย <i>Yarrowia lipolytica</i> (จุลินทรีย์รหัส Y2)..... | 64 |
| 4.3 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย <i>Candida tropicalis</i> strain vaucher (L9)..... | 65 |

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.4 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain A17 (T3) | 65 |
| 4.5 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain E28 (V3) | 66 |
| 4.6 ปริมาณกรดไขมันที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ <i>Yarrowia lipolytica</i> (Y2), <i>Candida tropicalis</i> strain Vaucher (L9) และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain A17 (T3), <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain E28 (V3) | 69 |
| 4.7 ปริมาณกรดไขมันที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง | 73 |
| 4.8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณกรดคาปริลิก (C8) ด้วยวิธีทางสถิติ (a) แผนภูมิแสดงปัจจัยหลัก (b) แผนภูมิแสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (c) แผนภาพแสดงการกระจายแบบปกติของปัจจัยต่างๆ (d) แผนภูมิ cube plot แสดงปริมาณกรดไขมันที่ได้ในแต่ละสภาวะที่มุมของลูกบาศก์ | 73 |
| 4.9 ภาพ 3 มิติกราฟพื้นผิวตอบสนองของระหว่างสองปัจจัย | 76 |
| 4.10 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) เมื่อแปรผันปริมาณหัวเชื้อที่เวลา 5 และ 10 ชั่วโมง | 77 |
| 4.11 การเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนวันที่ 1-4 | 79 |
| 4.12 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ | 81 |
| 4.13 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ | 83 |
| 4.14 แผ่นอะคริลิกติดด้วยผ้าขาวบางที่มีจุลินทรีย์เกาะความหนา 1.5 มิลลิเมตร เมื่อสิ้นสุดการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะ | 83 |

| ภาพที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.15 แนวโน้มปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะ ในขวดเขย่า (5 ชั่วโมง) แบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 ชั่วโมง) และแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 20 และ 30 ชั่วโมง)..... | 86 |
| 4.16 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะในขวดเขย่า (5 ชั่วโมง) แบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 ชั่วโมง) และแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 20 และ 30 ชั่วโมง)..... | 86 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|-------------|---|---|
| OD. 600 nm. | = | ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร |
| °C | = | องศาเซลเซียส |
| mm | = | มิลลิเมตร |
| cm | = | เซนติเมตร |
| g/l | = | กรัมต่อลิตร |
| mg/ml | = | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร |
| w/w | = | น้ำหนักต่อน้ำหนัก |
| SD | = | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
| - | = | ไม่สามารถตรวจวัดได้ |
| % | = | เปอร์เซ็นต์ |
| C8 | = | กรดคาปริลิก |
| C10 | = | กรดคาปริก |
| C12 | = | กรดลอริก |
| C14 | = | กรดไมริสติก |
| C16 | = | กรดปาล์มิติก |
| C18 | = | กรดสเตียริก |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดไขมันเป็นผลิตภัณฑ์พื้นฐานสำคัญที่สกัดได้จากน้ำมันพืช และสามารถใช้งานได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรค สบู่ เครื่องสำอาง และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคมีชีวภาพอื่นๆ เช่น แฟตตี้แอลกอฮอล์ (fatty alcohol) เอสเทอร์ (ester) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) โพลีเอสเตอร์ (polyester) เป็นต้น (Scrimgeour, 2005) นอกจากนี้ยังมีการนำกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 16 และ 18 อะตอมไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลอีกด้วยเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล (Li และคณะ, 2008) ในปี 2551 ประเทศไทยมีการส่งออกกรดไขมัน 35,300 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,065 ล้านบาท และมีการนำเข้ากรดไขมัน 34,922 ตันคิดเป็นมูลค่า 1,534 ล้านบาท (องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ, 2554) การศึกษาหาแนวทางในการผลิตกรดไขมันให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งคือการใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนวัตถุดิบราคาถูกให้เป็นกรดไขมัน โดยในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ผลิตสารชีวภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากต้นทุนในการผลิตต่ำ ในขณะที่ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้กว้างขวาง ประเทศไทยปลูกปาล์มน้ำมันจำนวนมากให้ผลผลิตสูงและผลิตน้ำมันได้ในราคาถูก และในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มดิบยังมีน้ำเสียที่อยู่ในรูปของไขมัน (fat) และน้ำมัน (oil) ที่เกิดจากกระบวนการนี้และแยกน้ำออกจากน้ำมันซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 25 กรัมต่อลิตร ถึง 25.6 กรัมต่อลิตร โดยโรงงานขนาดใหญ่จะมีน้ำเสียถึง 2.5 ตันต่อปาล์ม 1 ตัน (สุภัณฑิต นิมรัตน์, 2548)

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการผลิตกรดไขมันโดยใช้อาหารเหลือสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มและใช้จุลินทรีย์ร่วมกับเทคโนโลยีการหมักเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมและผลผลิตปริมาณมาก โดยใช้จุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วของ นางสาวจุฑาทกานต์ บุญมี (2553) จากงานวิจัยเรื่อง การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีที่สุดมา 4 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3) และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3)

เทคโนโลยีการหมักที่เลือกใช้สำหรับงานวิจัยนี้ คือถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (rotating biological contactor reactor) โดยอาศัยการเกาะติดของจุลินทรีย์บนแผ่นจานหมุนเป็นเมือกชีวภาพ (biofilm) ย่อยสลายน้ำมันโดยการหมุนของแผ่นจานผ่านอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนจะกระตุ้นให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ไลเปสออกมา เมื่อแผ่นจานหมุนขึ้นมาสัมผัสกับอากาศก็จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับออกซิเจนจากอากาศ และแผ่นจานจะหมุนลงไปสัมผัสกับอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำมันถึงปฏิกรณ์อีกครั้งเกิดการย่อยสลายน้ำมัน และออกซิเจนส่วนที่ไม่ถูกใช้ก็จะผสมกับอาหารสังเคราะห์ในถังซึ่งเป็นการเติมออกซิเจนให้กับอาหารสังเคราะห์อีกส่วนหนึ่ง ในขณะเดียวกันความปั่นป่วนที่เกิดขึ้นจากการหมุนของแผ่นจานทำให้เพิ่มการละลายของออกซิเจนในน้ำเสียได้สลับกันเช่นนี้ตลอดไปเป็นวัฏจักร และเมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ยึดเกาะแผ่นจานหมุนหนามากขึ้นจะทำให้มีตะกอนจุลินทรีย์บางส่วนหลุดออกจากแผ่นจาน เนื่องจากแรงเฉือนของการหมุน (shear force) ซึ่งเป็นการรักษาความหนาของแผ่นฟิล์มให้คงที่โดยอัตโนมัติ ข้อดีของระบบนี้คือใช้พลังงานในการเดินระบบน้อยโดยใช้พลังงานไฟฟ้าใช้สำหรับขับเคลื่อนมอเตอร์เท่านั้น เนื่องจากแผ่นจานหมุนมีการลอยตัวและแรงเสียดทานเพลลาเกิดน้อยมากกำลังงานส่วนใหญ่ที่ต้องการก็เพื่อหมุนเอาชนะแรงลากระหว่างแผ่นจานกับของเหลวเท่านั้น ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการและบำรุงรักษาต่ำ และสามารถพัฒนาระบบการผลิตให้มีประสิทธิภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชนิดอื่นๆแสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1.1 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของถังปฏิกรณ์แต่ละประเภท

| ชนิดถังปฏิกรณ์ | ข้อดี | ข้อเสีย |
|-------------------------------------|--|--|
| Rotating Biological Contactor (RBC) | 1) ใช้พลังงานในการเดินระบบน้อยโดยใช้พลังงานไฟฟ้าใช้สำหรับขับเคลื่อนมอเตอร์เท่านั้น 2) ช่วยให้อากาศถ่ายเทในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี 3) ควบคุมความหนาของแผ่นฟิล์มได้โดยตรง โดยการปรับรอบหมุนสามารถเปลี่ยนอัตราการถ่ายเทออกซิเจน 4) ใช้พื้นที่ในการเดินระบบน้อย | 1) เพลลาแกนหมุนที่ต้องรับทั้งแรงอัดและแรงบิดซ้ำรูดบ่อยครั้ง 2) แผ่นจานหมุนชีวภาพชำรุดเสียหายง่าย หากสัมผัสรังสีอัลตราไวโอเล็ตและสารพิษเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่อง |

ตารางที่ 1.1 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของถังปฏิกรณ์แต่ละประเภท (ต่อ)

| ชนิดถังปฏิกรณ์ | ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|--|--|
| Packed tower | 1) ใช้พื้นที่ในการเดินระบบน้อย 2) ง่ายต่อการควบคุมและดำเนินงาน | 1) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงการไหลขึ้นกับรูพรุนของวัสดุที่ใช้แพ็ค |
| Continuous Stirred Tank Reactors (CSTR) | 1) ควบคุมระบบได้ง่าย 2) ลักษณะของสสารที่อยู่ภายในถังซึ่งมีความเข้มข้นของสารละลายเท่ากันทุกจุด 3) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำเสียโดยเฉพาะน้ำเสียประเภทที่มีของแข็งแขวนลอยสูงได้ดี เนื่องจากมีการกวนผสมที่ดี | 1) เกิดแรงเฉือนจากใบกวนทำให้เซลล์ถูกทำลายระหว่างการผลิต 2) ให้อากาศในปริมาณสูงมาก ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น |
| Air-lift fermenter | 1) การผสมเกิดขึ้นอย่างไม่รุนแรง จึงไม่เกิด shearing force เหมือนกับการกวน 2) ลดพลังงานที่ใช้ในการขับเคลื่อน (Power consumption) | 1) ใช้การเป่าอากาศในปริมาณมาก ใช้ต้นทุนในการผลิตสูง 2) มีปัญหาเรื่องการระบายความร้อนออกจากระบบ |

ที่มา: สมใจ ศิริโชค (2547)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญ อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ C8-C16 โดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1) ศึกษาการเจริญ การย่อยสลายน้ำมัน และชนิดกรดไขมันที่เกิดขึ้นของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3) ในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดเขย่า

2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดเขย่า

3) ศึกษาการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสมโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบกึ่งกะในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

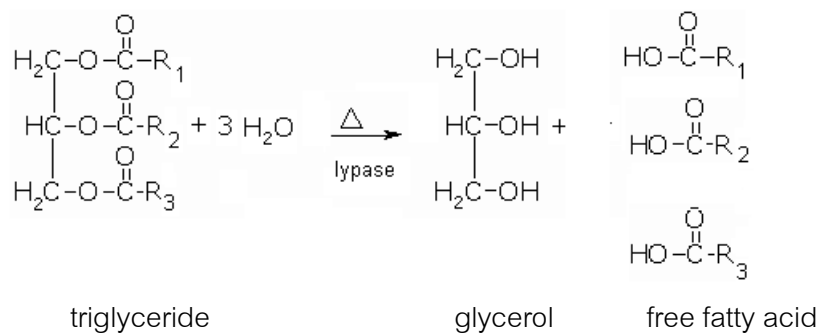
ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมันจากการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวิจัย และการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคตได้

บทที่ 2

การทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไขมัน

ไขมันหรือลิพิด (lipid) จัดเป็นสารประกอบชีวโมเลกุลที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้โดยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น คลอโรฟอร์ม เมทานอล อีเทอร์ เป็นต้น ไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มไขมันไม่มีขั้ว (nonpolar lipid) เช่น triglyceride และ cholesterol กับกลุ่มไขมันมีขั้ว (polar lipid) ซึ่งมีโครงสร้างแบบ แอมฟิพาธิค (amphiphatic) คือมีส่วนของโมเลกุลที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เช่น ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) โดยไขมันมีหน้าที่สำคัญคือ เป็นแหล่งสะสมพลังงานของร่างกาย เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ ป้องกันอวัยวะภายในต่างๆ เป็นส่วนประกอบของเมมเบรน ผนังเซลล์จุลินทรีย์ และเป็นส่วนประกอบของพืชชั้นสูง เป็นต้น ไขมันส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) (Gunstone, 2001)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์

2.2 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มสารประกอบคาร์บอน (carbon compounds) ซึ่งประกอบด้วยธาตุคาร์บอนต่อกันเป็นโซ่ยาวและมีหมู่คาร์บอกซิล ($\text{R}-\text{COOH}$) ต่อที่ปลายข้างหนึ่ง

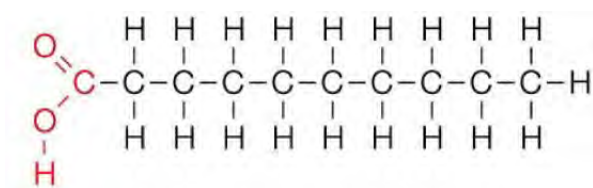
ของโมเลกุล ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่จะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ ระหว่าง 4-24 อะตอม โดยอาจเป็นโซ่ยาวที่อิ่มตัว ไม่มีพันธะคู่ (saturated fatty acid) หรือไม่อิ่มตัว มีพันธะคู่ 1 คู่ (monounsaturated fatty acid) หรือมากกว่า (polyunsaturated fatty acid) ซึ่งแต่ละชนิดมีความยาวของสายโซ่ ตำแหน่ง และจำนวนของพันธะเดี่ยวหรือคู่แตกต่างกันจึงมีความอิ่มตัวไม่เท่ากัน (Gunstone, 2001)

2.2.1 การจำแนกชนิดกรดไขมัน

กรดไขมันที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีประมาณ 40 ชนิด โดยโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วยส่วนของไฮโดรคาร์บอนและหมู่คาร์บอกซิล กรดไขมันอาจมีพันธะเดี่ยว พันธะคู่ หรือพันธะสาม ดังนั้นจึงจัดจำแนกชนิดของกรดไขมันออกเป็น 2 ชนิด คือกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) (ดัดแปลงจาก สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพลิชยกิจ, 2547)

1) กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid, SFA)

กรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นกรดไขมันที่เกิดพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนกับคาร์บอนยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเดี่ยว (single bond) ทั้งหมด มีลักษณะเป็นสายโซ่ตรง (ภาพที่ 2.2) พบทั้งในพืชและสัตว์ กรดไขมันอิ่มตัวเหล่านี้ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นได้ ในทางโภชนาการจึงจัดว่าเป็น กรดไขมันที่ไม่จำเป็น (nonessential fatty acid) กรดไขมันชนิดนี้จะพบในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์หรือหนังสัตว์ปีกที่เห็นเป็นชั้นขาวๆ ไขแดง นม เนย น้ำมันหมู รวมถึงน้ำมันที่ได้จากพืชบางชนิด เช่น กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) ที่มีมากในน้ำมันปาล์ม เป็นต้น ตัวอย่างกรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดบิวทริก (Butyric acid, C4:0) กรดปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0) กรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างกรดไขมันอิ่มตัว

2) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid, UFA)

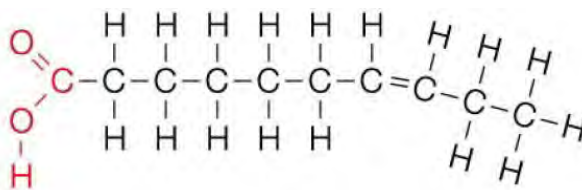
กรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างอะตอมคาร์บอนกับคาร์บอนยึดเหนี่ยวกัน และมีบางตำแหน่งที่จับกับไฮโดรเจนไม่เต็มกำลังเกิดมีพันธะคู่ (double bond) อยู่บางตำแหน่งหรือมากกว่า ทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีความว่องไวในปฏิกิริยาเคมีพร้อมที่จะเปิดรับปฏิกิริยาต่างๆ โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ จึงจัดว่าเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) เช่น กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2) กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1) กรดอะราชิโดนิก (Arachidonic acid, C20:4) ซึ่งสามารถแบ่งกรดไขมันชนิดนี้ออกเป็น 2 ชนิดได้แก่

2.1) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid, MUFA)

เป็นกรดไขมันที่มีธาตุคาร์บอนต่อกันด้วยพันธะคู่เพียง 1 ตำแหน่ง โดย กรดไขมันกลุ่มนี้ที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ กรดโอเลอิก (18:1n-9) กรดปาล์มมิโอเลอิก (16:1n-7)

2.2) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA)

เป็นกรดไขมันที่มีธาตุคาร์บอนต่อกันกับพันธะคู่อยู่หลายตำแหน่ง โดยกรดไขมันกลุ่มนี้ที่พบมากในธรรมชาติ ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (18:2n-6) กรดอะราชิโดนิก (20:4n-6)

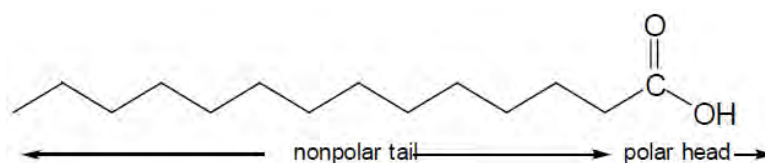


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว

2.2.2 คุณสมบัติกรดไขมัน

1) สมบัติทางกายภาพของกรดไขมัน (Gunstone, 2001)

1.1) กรดไขมันมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว คือ หมู่คาร์บอกซิล และส่วนที่ไม่มีขั้ว (ภาพที่ 2.4) คือ สายโซ่ไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกับหมู่คาร์บอกซิล เมื่อความยาวของสายโซ่เพิ่มขึ้นทำให้กรดไขมันมีขั้วน้อยลง



ภาพที่ 2.4 ส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วของกรดไขมัน

1.2) จุดเดือดและจุดหลอมเหลว

1.2.1) จุดเดือดและจุดหลอมเหลวของกรดไขมันอิ่มตัวจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอน

1.2.1) จุดหลอมเหลวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากันแต่มีพันธะคู่ต่างกัน จะพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าจะมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวต่ำกว่า ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติและโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด

| ชื่อ | จำนวน คาร์บอน | โครงสร้าง | จุดเดือด (°C) | จุดหลอมเหลว (°C) |
|--------------------|------------------|---|------------------|---------------------|
| กรดไขมันอิ่มตัว | | | | |
| กรดคาปริลิก | 8 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ | 239.7 | 16.7 |
| กรดคาปริก | 10 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ | 269 | 31.6 |
| กรดลอริก | 12 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ | 298.9 | 44 |
| กรดไมริสติก | 14 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ | 320 | 54 |
| กรดปาล์มิติก | 16 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ | 351 | 53 |
| กรดสเตียริก | 18 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ | 383 | 70 |
| กรดอะราซิดิก | 20 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$ | 398 | 75 |
| กรดไขมันไม่อิ่มตัว | | | | |
| กรดปาล์มิโตเลอิก | 16 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | 332 | 32 |
| กรดโอเลอิก | 18 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ | 360 | 13 |
| กรดลิโนเลอิก | 18 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ (<i>cis</i>) | 230 | -5 |
| กรดอะราซิดอนิก | 20 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ (<i>all cis</i>) | 170 | -50 |

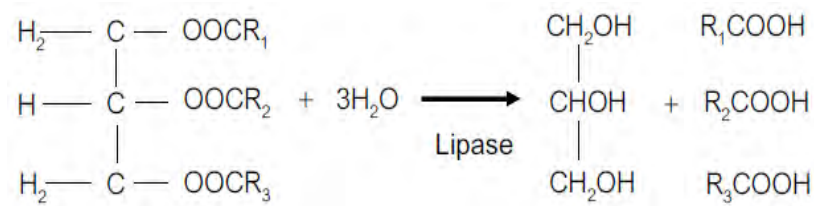
ที่มา: ดัดแปลงจาก สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพนิชยกิจ (2547)

1.3) จำนวนคาร์บอนอะตอม กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากัน แต่มีจำนวนพันธะคู่ต่างกัน จำนวนพันธะคู่ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้จุดหลอมเหลวลดลง

1.4) ความหนาแน่น กรดไขมันมีน้ำหนักโมเลกุลที่เบากว่าน้ำ เพราะ hydrophobic interaction ของกรดไขมันจึงทำให้โมเลกุลเข้ากันได้ไม่สนิท และ hydrogen bond ของน้ำมีแรงยึดเหนี่ยวสูงทำให้โมเลกุลเกาะกันแน่น

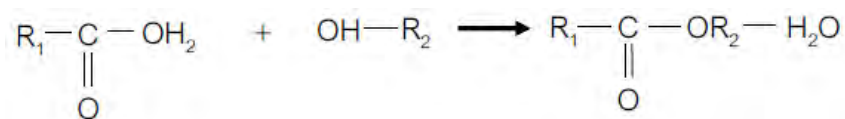
2) สมบัติทางเคมีของกรดไขมัน (Christie, 2002)

2.1) ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาการสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำและได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการย่อยสลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ (ภาพที่ 2.5) โดยเกิดได้ทั้งในสภาวะกรดและเบส



ภาพที่ 2.5 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส

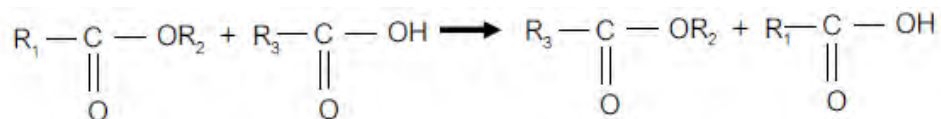
2.2) ปฏิกริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification) เป็นปฏิกริยาย้อนกลับของปฏิกริยาไฮโดรไลซิส โดยการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมันตรงตำแหน่งของหมู่คาร์บอกซิล และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการย่อยสลายเป็น ไตรกลีเซอไรด์ (ภาพที่ 2.6)



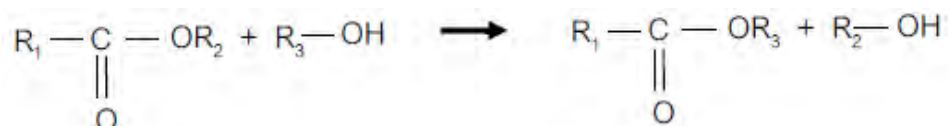
ภาพที่ 2.6 ปฏิกริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน

2.3) ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) เป็นปฏิกริยาการเปลี่ยนหมู่ของสารหนึ่งไปยังอีกสารหนึ่งซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกัน โดยแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบคือ

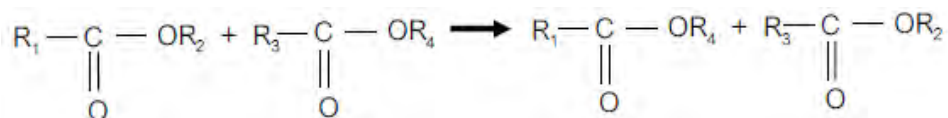
2.3.1) acidolysis



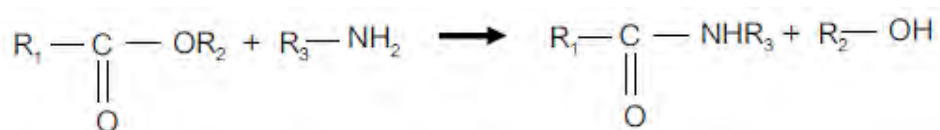
2.3.2) alcoholysis



2.3.3) ester exchange (interesterification)



2.3.4) aminolysis



2.3) ปฏิกริยาการเติมไฮโดรเจน เป็นปฏิกริยาการเติมหมู่ไฮโดรเจน (hydrogenation) ลงในตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยมีโลหะเช่น Pt, Pd, Ni และ Cu เป็นตัวเร่งปฏิกริยา

2.4) ปฏิกริยาการเติมฮาโลเจน เป็นปฏิกริยาที่พันธะคู่ในไขมันหรือน้ำมันชนิดไม่อิ่มตัวมีการเติมฮาโลเจน เช่น Cl_2 , I_2 และ Br_2 ตรงตำแหน่งของพันธะคู่ของกรดไขมันโดยปฏิกริยาที่เกิดขึ้นสามารถนำไปใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อหาความอิ่มตัวของไขมันหรือน้ำมัน

2.2.3 กรดไขมันที่พบในพืช

กรดไขมันที่พบในพืชส่วนใหญ่จะพบในส่วนที่เป็นเมล็ดโดยเฉพาะส่วนที่เรียกว่า เอนโดสเปิร์มเป็นส่วนของเมล็ดที่ทำหน้าที่ในการสะสมอาหารจำพวก คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดไขมัน โดยมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัว เช่น กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดไลโนเลอิก กรดไลโนเลนิก กรดโอเลอิก โดยในพืชแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิด สภาพการเจริญ ของพืชชนิดนั้นๆ โดยเฉพาะพืชกลุ่มที่ให้ น้ำมัน เช่น ปาล์ม น้ำมัน ถั่วเหลือง ทานตะวัน ละหุ่ง งา มะพร้าว และสบู่ดำ เป็นต้น (Were และ คณะ, 2006) โดยปริมาณกรดไขมันโดยน้ำหนักที่มีในน้ำมันพืชแต่ละชนิด แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณกรดไขมันโดยน้ำหนักที่มีในน้ำมันพืชแต่ละชนิด

| ชนิดน้ำมัน | องค์ประกอบกรดไขมันหลัก | | | | | | | |
|---------------|------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|
| | C8:0 | C10:0 | C12:0 | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C18:1 | C18:2 |
| ปาล์ม | - | - | 0.5 | 0.5-2.0 | 32.0-47.0 | 3.5-6.0 | 40.0-52.0 | 9.0-12.0 |
| ปาล์มโกลีน | 5.4 | 3.9 | 0.1-0.5 | 0.5-1.5 | 38.0-43.5 | 3.5-5.0 | 39.8-46.0 | 10.0-13.5 |
| ปาล์มสเตียรีน | - | - | 0.1-0.5 | 1.0-2.0 | 48.0-74.0 | 3.9-6.0 | 15.5-36.0 | 3.0-10.0 |
| เมล็ดในปาล์ม | 4.4 | 3.7 | 45.0-55.0 | 14.0-18.0 | 6.5-10.0 | 1.0-3.0 | 12.0-19.0 | 1.0-3.5 |
| มะพร้าว | 8.0 | 7.0 | 45.1-53.2 | 16.8-21.0 | 7.5-10.2 | 2.0-4.0 | 5.0-10.0 | 1.0-2.5 |
| ถั่วลิสง | - | - | 0.1 | 0.1 | 8.0-14.0 | 1.0-4.5 | 35.0-67.0 | 13.0-43.0 |
| เมล็ดสบู่ดำ | - | - | - | - | 15.0 | 6.0 | 43.0 | 35.0 |
| เมล็ดเรพ | - | - | - | 0.2 | 1.5-6.0 | 0.5-3.1 | 8.0-60.0 | 11.0-23.0 |
| ถั่วเหลือง | - | - | 0.1 | 0.2 | 8.0-13.5 | 2.0-5.4 | 17.7-28.0 | 48.0-59.0 |

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม (2551)

น้ำมันพืชส่วนใหญ่จะมีกรดไขมันที่มีคาร์บอนอะตอม 16 ถึง 22 อะตอมเป็นองค์ประกอบ น้ำมันหลักของไทย คือ ปาล์มน้ำมัน มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดโอเลอิก (C18:1) 40-52 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรดปาล์มิติก (C16:0) 32-47 เปอร์เซ็นต์ และที่เหลือเป็นส่วนประกอบของกรดไมริสติก (C14:0) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดลิโนเลอิก (C18:2) (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2551)

นอกจากกรดไขมันที่พบในเมล็ดของพืชแล้ว ยังมีพืชได้นำบางชนิด เช่น สาหร่ายทะเล *Schizochytrium sp.* และ *Nannochloropsis oculata* ที่พบว่าสามารถนำมาสกัดกรดไขมันได้ โดยกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันในกลุ่มกรดไขมันโอเมก้า 3 (Omega-3 fatty acid) เช่น กรดไลโนเลนิก (18:3, n-3) กรดไอโคซาเพนทีโนอิก หรือมีชื่อย่อว่า EPA (22:5, n-3) กรดโดโคซาเฮกซาอีโนอิก หรือมีชื่อย่อว่า DHA (22:6, n-3) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของสาหร่ายในทะเลบางชนิด

| Marine source | Fatty acid (w/w) | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------|------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
| | 16:0 | 18:0 | 18:1 cn-9 | 18:2 n-6 | 18:3 n-3 | 20:5 n-3 | 22:5 n-3 | 22:6 n-3 | Reference |
| Marine algae | | | | | | | | | |
| <i>Schizochytrium sp.</i> | 18.0 | 0.33 | 0.11 | 0.31 | 0.25 | 1.28 | 6.95 | 17.1 | Sardi et al., 2006 |

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของสาหร่ายในทะเลบางชนิด (ต่อ)

| Marine source | Fatty acid (w/w) | | | | | | | | Reference |
|--------------------------------|------------------|------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
| | 16:0 | 18:0 | 18:1 cn-9 | 18:2 n-6 | 18:3 n-3 | 20:5 n-3 | 22:5 n-3 | 22:6 n-3 | |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | 17.9 | 0.7 | 5.6 | 7.4 | 6.7 | 37.1 | - | - | Fredrikson et al., 2006 |

ที่มา: Woods และFearon (2009)

2.2.4 กรดไขมันที่พบในสัตว์

สัตว์จะมีไขมันแทรกอยู่ตามบริเวณผิวหนังและส่วนที่เป็นเนื้อตามส่วนต่างๆของลำตัวโดยไขมันจากสัตว์จะมีไขมันอิ่มตัว 38-43 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่กรดไขมันไขมันที่พบคือกรดปาล์มติก 25-28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรดสเตียริก 12-14 เปอร์เซ็นต์ และไมริสติก 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไขมันไม่อิ่มตัวมี 56-62 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว 47-50 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยกรดโอเลอิก 44-47 เปอร์เซ็นต์ และกรดปาล์มโตเลอิก 3 เปอร์เซ็นต์ และไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ที่ประกอบด้วยกรดลิโนเลอิก 6-10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ชนิดและปริมาณของกรดไขมันจะขึ้นกับชนิดของสัตว์ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 และตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของกรดไขมันในสัตว์บางชนิด

| Animal source | Fatty acid (w/w) | | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------|------|------|------|------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----|
| | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 18:0 | 18:1c n-9 | 18:2 n-6 | 18:3 n-3 | 20:4 n-6 | 20:5 n-3 | 22:5 n-3 | 22:6 n-3 | |
| Beef | Muscle | - | - | 2.5 | 24.6 | 15.0 | 39.1 | 2.8 | 0.8 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | - |
| | Fat | - | 0.3 | 3.1 | 25.7 | 17.4 | 36.6 | 1.0 | 0.5 | - | - | - | - |
| Lamp | Muscle | 0.3 | 0.5 | 0.6 | 21.7 | 17.6 | 32.3 | 1.8 | 1.2 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.1 |
| | Fat | 0.3 | 0.6 | - | 21.8 | 19.9 | 28.8 | 1.2 | 1.1 | 0.1 | - | 0.1 | - |
| Pork | Muscle | - | - | - | 22.8 | 12.4 | 37.4 | 14.8 | 1.4 | 1.1 | 0.3 | 0.5 | 0.3 |
| | Fat | 0.1 | - | - | 23.3 | 13.3 | 38.7 | 14.8 | 1.5 | 0.2 | - | 0.2 | 0.2 |
| Chicken | Dark meat | - | - | - | 20.4 | 6.0 | 42.7 | 16.6 | 2.6 | 0.4 | - | 0.4 | 0.4 |
| | Light meat | - | - | - | 18.9 | 6.0 | 36.1 | 13.7 | 1.7 | 0.8 | - | 0.8 | 0.8 |

ที่มา: Woods และFearon (2009)

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบของกรดไขมันในปลา

| Marine source | Fatty acid (w/w) | | | | | | | | Reference |
|---------------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------------|
| | 16:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:5 | 22:5 | 22:6 | |
| | | | cn-9 | n-6 | n-3 | n-3 | n-3 | n-3 | |
| Fish oil | | | 20.4 | 23.4 | 1.27 | 10.8 | 1.34 | 6.13 | Baucells et al., 2000 |

ที่มา: Woods และ Fearon (2009)

2.2.5 กรดไขมันที่พบในจุลินทรีย์

ไขมันเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์จุลินทรีย์ ทั้งยีสต์ รา แบคทีเรีย และสาหร่าย โดยไขมันหลักประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เรียกว่า Oleaginous microorganisms สามารถสะสมไขมันไว้ในเซลล์ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง (Ratledge และคณะ, 2008) และองค์ประกอบของกรดไขมันจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2.6, 2.7, 2.8 และ 2.9)

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของกรดไขมันในแบคทีเรียชนิดต่างๆ

| Microorganisms | Fatty acid (w/w) | | | | | | |
|----------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 |
| <i>Lactobacillus arabinosus</i> | 1.1 | 2.3 | 1.2 | 18.7 | - | - | - |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 2.1 | 2.8 | 2.1 | 24.3 | - | 7.0 | - |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 0.5 | 1.2 | 2.5 | 27.5 | - | 10.8 | - |
| <i>Streptococcus sp.</i> | 0.5 | 5.2 | 4.4 | 26.6 | - | 8.0 | - |
| <i>Clostridium butyricum</i> | 2.5 | 2.4 | 0.4 | 49.0 | - | 6.2 | - |
| <i>Escherichia coli</i> | 0.3 | 0.3 | 0.7 | - | - | - | - |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 0.9 | 4.0 | 1.1 | 8.2 | - | - | - |

ที่มา: William (1992)

จากการศึกษาของ Kaneda (1967) พบว่าองค์ประกอบกรดไขมันหลักของ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus* อื่นๆ นั้นมีองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่เป็น branch chain ได้แก่ anteiso-C15 เท่ากับ 33-40 เปอร์เซ็นต์, anteiso-C17 เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์, iso-14 เท่ากับ

2-4 เปอร์เซ็นต์, iso-15 เท่ากับ 13-14 เปอร์เซ็นต์, iso-16 เท่ากับ 9-11 เปอร์เซ็นต์ และ iso-17 เท่ากับ 13-15 เปอร์เซ็นต์ ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมดนอกจากนั้นยังมี normal chain เช่น กรดไมริสติก (C14) เท่ากับ 3-4 เปอร์เซ็นต์และกรดปาล์มิติก (C16) เท่ากับ 5-6 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการเลี้ยงคือ พีเอช 6 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ชนิดต่างๆ

| Microorganisms | Fatty acid (w/w) | | | | | | | Reference |
|--------------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|-----------------------------|
| | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | |
| <i>Candida</i> sp. 107 | 5 | 37 | 1 | 14 | 36 | 7 | - | Gill et al. |
| <i>Candida</i> sp. 107 | - | 28 | - | 8 | 41 | 16 | 7 | Davies |
| <i>Candida</i> sp. | - | 23 | 13 | 3 | 54 | 5 | 2 | Aggelis et al. |
| <i>Rhodotorula gracilis</i> | 1 | 21 | - | 13 | 51 | 11 | 3 | Choi et al. |
| <i>Candida curvata</i> | - | 36 | - | 14 | 40 | 7 | - | Evans and Ratledge |
| <i>Candida curvata</i> | - | 37 | - | 10 | 44 | 6 | - | Evans and Ratledge |
| <i>Apiotrichum curvarum</i> | - | 34 | - | 10 | 43 | 7 | 2 | Hassan et al. |
| <i>Cryptococcus curvatus</i> | - | 24 | - | 10 | 46 | 9 | 6 | Hassan et al. |
| <i>Cryptococcus curvatus</i> | - | 18 | - | 16 | 50 | 16 | - | Meesters et al. |
| <i>Cryptococcus curvatus</i> | - | 31 | - | 22 | 42 | 1 | - | Wu et al. |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | - | 14 | - | 9 | 53 | 18 | 2 | Hansson and Dosta 'lek |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | - | 20 | - | 11 | 59 | 6 | 6 | Davies |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | - | 15 | 2 | 11 | 47 | 21 | 3 | Papanikolaou and Aggelis |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | - | 12 | 11 | 9 | 57 | 11 | - | Andre et al. |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | - | 13 | 17 | 6 | 55 | 7 | - | Makri et al. |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 1 | 20 | 1 | 15 | 47 | 13 | 3 | Li et al. |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 1 | 34 | - | 13 | 48 | 1 | - | Hu et al. |
| <i>Rhodospiridium toruloides</i> | 1 | 26 | 2 | 5 | 62 | 3 | - | Wu et al. |

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ชนิดต่างๆ (ต่อ)

| Microorganisms | Fatty acid (w/w) | | | | | | | Reference |
|--------------------------------|------------------|------|------|-------|------|------|------|----------------------|
| | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | |
| <i>Rhodosporidium</i> | | | | | | | | |
| <i>toruloides</i> | 1 | 43 | - | 16 | 35 | 2 | - | Wu et al. |
| <i>Lipomyces starkeyi</i> | - | 56 | 2 | 14 | 26 | - | - | Angerbauer et al. |
| <i>Lipomyces starkeyi</i> | - | 37 | 4 | 6 | 49 | 1 | - | Zhao et al. |
| <i>Rhodotorula mucilaginos</i> | - | 22 | 2 | 9 | 55 | 11 | - | Zhao et al. |
| <i>Trichosporon capitatum</i> | | | | | | | | |
| <i>Trichosporon capitatum</i> | - | 12 | 1 | 2 | 74 | 9 | - | Wu et al. |
| <i>Rhodotorula sp.</i> | - | 22 | 1 | 7 | 56 | 12 | - | Chatzifragkou et al. |
| <i>Candida oleophila</i> | - | 13 | 3 | 7 | 66 | 11 | - | Chatzifragkou et al. |
| <i>Candida tropicalis</i> | - | 24 | 3-8 | 50-56 | 7-15 | 1-2 | - | Dey and Maiti |

ที่มา: Papanikolaou และ Aggeli (2011)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันคล้ายกับที่กรดไขมันที่พบในน้ำมันจากพืช และสามารถผลิตกรดไขมันได้สูง โดยกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 14 ถึง 18 อะตอม เป็นกรดโอเลอิก (C18:1) มากที่สุด รองลงมาคือกรดปาล์มติก (C16) กรดสเตียริก (C18:0) และ กรดลิโนเลอิก (C18:2) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ยีสต์บางกลุ่มสามารถผลิตกรดไขมันได้สูงถึง 40-20 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง เช่น *Cryptococcus sp.*, *Endomycopsis sp.*, *Rhodotorula sp.* และ *Trichosporon sp.* (Tehlivets และคณะ, 2007)

Yarrowia lipolytica เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งในกลุ่มของ Oleaginous yeast ที่สามารถสะสมไขมันไว้ในเซลล์ได้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้ง (Rattledge และคณะ, 2008) โดยจากการศึกษาของ Papanikolaou และ Aggelis (2011) พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของยีสต์สายพันธุ์นี้คือ กรดโอเลอิก (C18:1) 47 เปอร์เซ็นต์ กรดลิโนเลอิก (C18:2) 21 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรดปาล์มติก (C16:0) และกรดสเตียริก (C18:0) เท่ากับ 15 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Candida tropicalis เป็นยีสต์อีกสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถสะสมไขมันไว้ในเซลล์ได้มากเช่นกัน โดยจากงานวิจัยของ Dey และ Maiti (2011) พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้มีองค์ประกอบของกรดไขมันส่วนใหญ่เป็น กรดสเตียริก (C18:0) 50-56 เปอร์เซ็นต์ กรดพาลมิติก (C16:0) 24 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรดโอเลอิก (C18:1) 7-15 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2.8 องค์ประกอบของกรดไขมันในราชนิดต่างๆ

| Microorganisms | Fatty acid (w/w) | | | | | | | | |
|---|------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| | 8:0 | 9:0 | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> (Ri-1.473) | 7.7 | 4.9 | 7.5 | 2.3 | 5.3 | 14.5 | - | - | 30.8 |
| <i>Aspergillus sydowii</i> (Ri-1.474) | 1.2 | 1.4 | 1.3 | | 3.2 | 18.6 | - | - | 62.9 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> (Ri-1.470) | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 7.6 | 29.5 | - | - | 52.4 |
| <i>Fusarium equiseti</i> (Ri-1.471) | 0.7 | 0.5 | 0.4 | 4.0 | 0.6 | 34.0 | - | - | 46.0 |

ที่มา: Azeem และคณะ(1999)

2.2.6 กระบวนการผลิตกรดไขมันในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล (ดัดแปลงจาก Biermann และคณะ, 2001)

กระบวนการผลิตกรดไขมันที่นิยมโดยทั่วไปประยุกต์จากเทคโนโลยีในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล โดยกระบวนการผลิตที่สำคัญๆของการผลิตกรดไขมัน (ภาพที่ 2.6) แยกออกเป็นกระบวนการหลักๆดังนี้

2.2.6.1 การเตรียมเบื้องต้น (pre-treatment process)

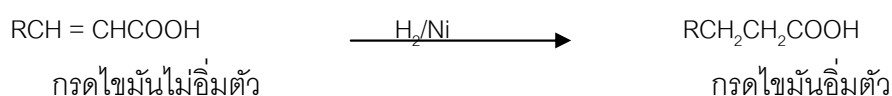
ในไขมันและน้ำมันมีสิ่งเจือปนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ เช่น เลซิทีน คลอโรฟิลล์ เป็นต้น ซึ่งปนเปื้อนมาจากแหล่งกำเนิดทางธรรมชาติของไขมันและน้ำมัน รวมถึงสิ่งเจือปนอื่นๆ เช่น โปรตีน คีโตน เพอร์ออกไซด์ อัลดีไฮด์ ซึ่งสิ่งเจือปนต่างๆ เหล่านี้มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเพื่อทำให้สารบริสุทธิ์

2.2.6.2 การแยกกรดไขมัน (splitting process)

การแยกกรดไขมันเป็นกระบวนการที่ทำการแยกเอากรดไขมันและกลีเซอรินที่จับตัวกันในรูปไตรกลีเซอไรด์ให้ออกมาในรูปของกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระชนิดต่างๆ ด้วยวิธี การไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ

2.2.6.3 กระบวนการเติมก๊าซไฮโดรเจน (hydrogenation process)

เป็นกระบวนการเติมก๊าซไฮโดรเจน เป็นขั้นตอนที่ทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิ่มตัว เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับกระบวนการผลิตต่อเนื่องอื่นๆ ต่อไป โดยในขั้นตอนนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะถูกไฮโดรจีเนตด้วยก๊าซไฮโดรเจน และมีโลหะที่เกิดขึ้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญ ภายใต้สภาวะที่มีความดันและอุณหภูมิที่เหมาะสมได้เป็นสมการดังนี้



2.2.6.4 กระบวนการฟอกขาว (Bleaching process)

ผลิตภัณฑ์ของกรดไขมันบางชนิดต้องนำมาฟอกขาวเพิ่มเติม ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับข้อกำหนดทางการค้าว่าต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีสีมากน้อยเพียงใด โดยกระบวนการฟอกขาวจะใช้ผงดิน (bleaching earth) และถ่านกัมมันต์ (activated carbon) เป็นสารฟอกขาว ภายใต้ระบบสุญญากาศเพื่อป้องกันไม่ให้ไขมันสัมผัสกับอากาศ

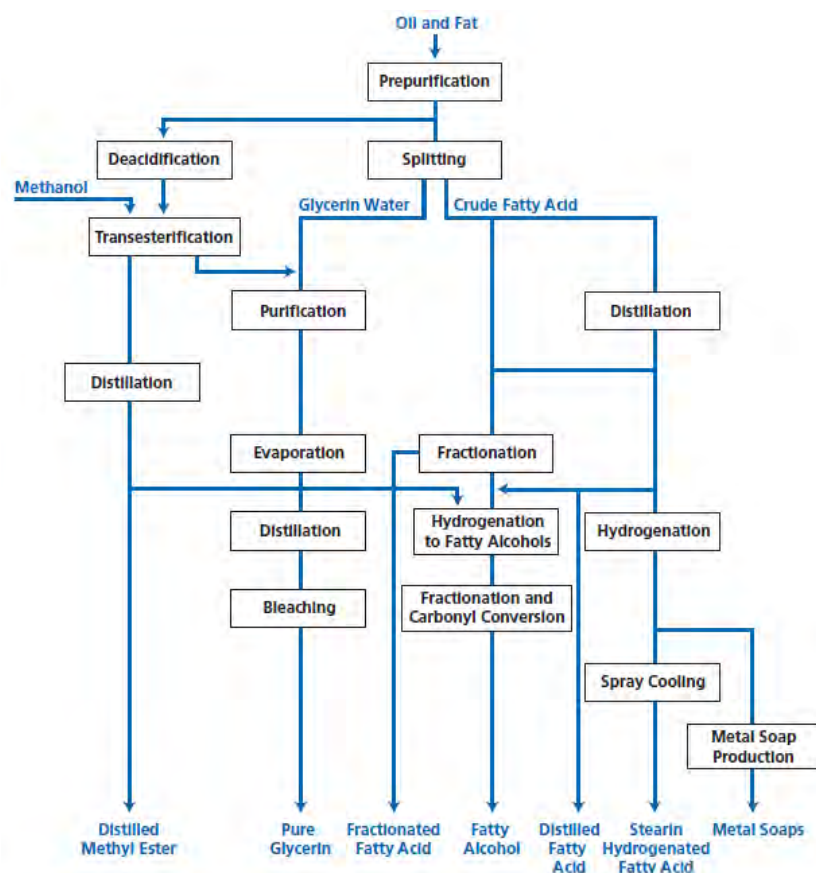
2.2.6.5 กระบวนการกลั่นบริสุทธิ์ (distillation process)

กระบวนการกลั่นเป็นกระบวนการที่นำกรดไขมันที่ได้จากกระบวนการแยกกรดไขมันมาผ่านการกลั่นเพื่อให้ได้กรดไขมันบริสุทธิ์แต่ละชนิด โดยใช้คุณสมบัติเรื่องจุดเดือดและขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกันของกรดไขมันแต่ละชนิด ซึ่งมีจุดเดือดและมวลโมเลกุลแตกต่างกันตามองค์ประกอบเคมีที่มีอยู่ กรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลน้อย มีโมเลกุลขนาดเล็ก จะมีจุดเดือดต่ำ

เมื่อเข้าสู่กระบวนการกลั่นจะถูกแยกออกมาก่อน โดยกรดไขมันที่มีมวลโมกุลมากขึ้นจะมีจุดเดือดสูงขึ้นและการกลั่นตัวในกระบวนการกลั่นก็จะแยกออกมาทีหลังตามลำดับ

2.2.6.6 กระบวนการกลั่นกรดไขมัน (fatty acid distillation)

กรดไขมันที่ได้จากกระบวนการแยกกรดไขมันนั้นจะถูกแยกน้ำและแก๊สที่เหลืออยู่โดยใช้สุญญากาศฉีดเข้าไปในหอกกลั่น ที่มีอุณหภูมิประมาณ 200 องศาเซลเซียส และมีความดันที่ประมาณ 1.2 กิโลปาสคาลหรือต่ำกว่าโดยใช้ไอน้ำความดันสูงหรือน้ำมันร้อนเป็นตัวพาความร้อนให้กับหอกกลั่น กรดไขมันส่วนเบา (light end) ที่กลั่นได้จะมีลักษณะเป็นน้ำสีขาว และมีสิ่งเจือปนน้อย มีจุดเดือดต่ำ ส่วนกรดไขมันหนัก (heavy end) จะมีจุดเดือดที่สูงกว่า มีคุณภาพที่ต่ำกว่า และอาจถูกส่งกลับไปยังหอกกลั่นซ้ำอีก ส่วนกรดไขมันที่เหลือ และเป็นส่วนหนักมากจะตกลงสู่หอกกลั่นและถูกเคียวจนกลายเป็นของเหลวหนืดนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงให้แก่หม้อต้มไอน้ำต่อไป



ภาพที่ 2.7 แผนผังกระบวนการผลิตกรดไขมันในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคอล

ที่มา: www.lurgi.com

2.2.7 ประโยชน์ของกรดไขมัน

2.2.7.1 กรดคาปริลิก (Caprylic acid) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ใช้ในการรักษาการติดเชื้อในกระเพาะอาหารและลำไส้ จาก *Salmonella* sp. *Staphylococcus* sp. และ *Candida albicans*. เพราะกรดคาปริลิกเป็นกรดไขมันสายสั้นจึงทำให้ง่ายต่อการแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (Nair และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดคาปริลิกเป็นเป็นส่วนผสมของเจลทำความสะอาดในอุตสาหกรรมเบียร์ ไวน์ และเครื่องดื่มต่างๆ และยังมีการนำไปใช้ในการผลิตเอสเทอร์เพื่อใช้สำหรับการผลิตน้ำหอมและสีย้อม

2.2.7.2 กรดคาปริก (Capric acid) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำหอม สีย้อม พลาสติก น้ำมันหล่อลื่น สารแต่งเติมอาหารและอุตสาหกรรมยา โดยในอุตสาหกรรมยาจะสังเคราะห์กรดคาปริกให้อยู่ในรูปของเอสเทอร์และผสมกับยาเพื่อใช้เป็นยาฉีดช่วยเสริมประสิทธิภาพในการเปลี่ยนโมโนโรลลินเป็นสารโมโนคาปรีน ซึ่งมีฤทธิ์ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Tenda และคณะ, 2009)

2.2.7.3 กรดลอริก (Lauric acid) เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันมะพร้าวและพบมากในเมล็ดในปาล์ม โดยมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส รา และแบคทีเรีย มีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง กรดลอริกถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาอย่างแพร่หลาย เพราะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย โดยกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ ในร่างกายของมนุษย์กรดลอริกจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ โมโนลอริน ซึ่งจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Nakatsuji และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดลอริกในอุตสาหกรรมผลิตน้ำยาขัน โดยใช้เติมลงในน้ำยาขันร่วมกับแอมโมเนีย เพื่อควบคุมความเสถียรของน้ำยาขัน

2.2.7.4 กรดไมริสติก (Myristic acid) พบในลูกจันทร์เทศ (Nutmeg) น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดในปาล์ม ใช้ในการผลิตไกลซีนสำหรับใช้เป็นสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมอาหารและยา นอกจากนี้เอสเทอร์ของกรดไมริสติกยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา เพื่อช่วยในการดูดซึมยาเข้าสู่ผิวหนัง

2.2.7.5 กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) พบมากในน้ำมันปาล์ม ใช้ในการผลิตเรตินิลปาล์มิตเตท (Retinyl Palmitate) สำหรับใช้เป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ และใช้เติมในนมพว่องมันเนย เพื่อทดแทนวิตามินเอในส่วนที่ถูกกำจัดออกไปพร้อมกับไขมัน และยังช่วยให้วิตามินเอสามารถละลายในนมได้ อนุพันธ์ของกรดปาล์มิติกใช้ในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ

2.2.7.6 กรดสเตียริก (Stearic acid) ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมผลิตเทียน สบู่ เครื่องสำอาง พลาสติก สีเทียน ในอุตสาหกรรมยางช่วยให้ยางอ่อนนุ่ม นอกจากนี้เอสเทอร์ของกรด สเตียริกกับเบทีลีนไกลคอล ไกลคอลสเตียเรต และไกลคอลโดสเตียเรต ใช้ทำให้แชมพูมีลักษณะเป็นสีมุก และใช้เป็นสารที่ช่วยให้เกิดการตกผลึกในสบู่และเครื่องสำอาง

2.2.7.7 กรดโอเลอิก (Oleic acid) หรือ โอเมกา 9 (ω -9) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองได้ ช่วยลดปริมาณคอเรสเตอรอลและลดไขมันในเส้นเลือด ทำให้ไม่เกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดสำหรับในทารกหรือเด็กแรกเกิดกรดโอเลอิกจะช่วยบำรุงสมองและช่วยในเรื่องของความจำ นอกจากนี้ยังมีรายงานของงานวิจัยที่พบว่าสามารถช่วยป้องกันโรคหัวใจ และโรคมะเร็งได้อีกด้วย (Mendez, 2005) ในทางอุตสาหกรรมจะใช้กรดโอเลอิกเป็นสารลดแรงตึงผิว

2.2.7.8 กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) เป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ช่วยรักษาการบกพร่องของชั้นส่วนเนื้อเยื่อ ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่สึกหรอ รักษาบาดแผล นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสบู่ อิมัลซิไฟเออร์ เครื่องสำอางบำรุงผิว โดยมีคุณสมบัติช่วยลดริ้วรอย รักษาความชุ่มชื้นให้กับผิว

2.3 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Palmae* หรือ *Areaceae* และอยู่ในสกุล (genus) *Elaeis* ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 2 ชนิด (Species) ได้แก่ *Elaeis guineensis* เป็นชนิดที่นิยมปลูกในปัจจุบันและมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา ตอนกลางและแอฟริกาตะวันตก ให้ผลผลิตทะลายสูง น้ำหนักผลเปลือกนอกและผลผลิตน้ำมันสูง ส่วนชนิดที่สองคือ *Elaeis deifera* มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ทวีปอเมริกาใต้และอเมริกากลางมีลักษณะลำต้นเตี้ยและมีความต้านทานโรคตาเนา โดยน้ำมันปาล์มที่สกัดได้จะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (unsaturated fatty acid) ประมาณร้อยละ 77-78 มีวิตามินเอและวิตามินอีสูง แต่ให้ผลผลิตและ

ปริมาณน้ำมันน้อยกว่าพันธุ์ *Elaeis guineensis* จึงนิยมใช้พันธุ์ *Elaeis deifera* สำหรับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมข้ามสายพันธุ์ (Ravigadevi และคณะ, 2000)

2.3.1 การผลิตน้ำมันปาล์มในประเทศไทย

ปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทยชนิดหนึ่งและสามารถนำมาผลิตน้ำมันได้มากที่สุด โดยน้ำมันที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทด้วยกัน คือ น้ำมันที่สกัดได้จากเนื้อผลปาล์มจากส่วนที่เรียกว่า mesocarp (crude palm oil) และเมล็ดในปาล์ม (palm kernel oil) โดยน้ำมันประเภทที่ใช้ในการบริโภคเป็นหลักคือ น้ำมันที่สกัดได้จากเนื้อผลปาล์ม ส่วนน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดในปาล์มส่วนใหญ่จะถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโอเลโอเคมีคัล (Oleochemical industry) ต่อไป (Gustone, 2002)

ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม

| กรดไขมัน | น้ำมันปาล์มดิบ (crude palm oil) | น้ำมันเมล็ดในปาล์ม (palm kernel oil) |
|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| กรดไขมันอิ่มตัว | 50% | 82% |
| กรดคาโปรอิก (Caproic acid) | - | 0.1-0.5 |
| กรดคาปริลิก (Caprylic acid) | - | 3.4-5.9 |
| กรดคาปริก (Capric acid) | - | 3.3-4.4 |
| กรดลอริก (Lauric acid) | 0.1-0.4 | 46.3-51.1 |
| กรดไมริสติก (Myristic acid) | 1.0-1.4 | 14.3-16.8 |
| กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) | 40.9-47.5 | 6.5-8.9 |
| กรดสเตียริก (Stearic acid) | 3.8-4.8 | 1.6-2.6 |
| กรดอะราซิดิก (Arachidic acid) | 0-0.8 | - |
| กรดไขมันไม่อิ่มตัว | 50% | 18% |
| กรดปาล์มิโตเลอิก (Palmitoleic acid) | 0-0.6 | - |
| กรดโอเลอิก (Oleic acid) | 36.4-41.2 | 13.2-16.4 |

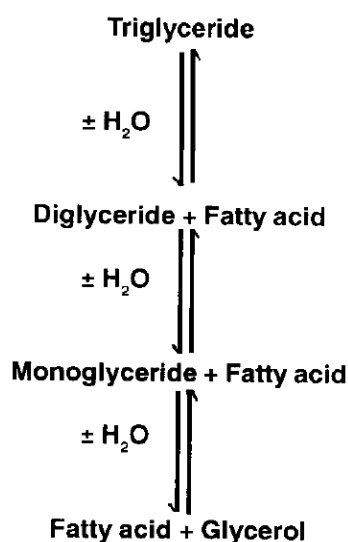
ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555

ปัจจุบันประเทศไทยมีเกษตรกรที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากกว่า 1.28 แสนครัวเรือน พื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดคิดเป็น 4.28 ล้านไร่ สามารถผลิตน้ำมันปาล์มดิบได้ปีละ 1.9 ล้านตัน และในปี 2555 มีแนวโน้มการผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 5-7 จากปี 2554 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) เนื่องจากปาล์มน้ำมันจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้นจึงทำให้มีการเพาะปลูกเป็นจำนวนมากทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกมากได้แก่ จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง โดยจังหวัดที่มีการปลูกมากที่สุดคือ จังหวัดกระบี่ คิดเป็นร้อยละ 39.40 รองลงมาคือจังหวัดสุราษฎร์ธานี ร้อยละ 29.70 และจังหวัดชุมพร ร้อยละ 15.89 ตามลำดับ

2.4 ไลเปส

ไลเปส (Lipase) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union Of Biochemistry คือ "Triacylglycerol acylhydrolases" (E.C. 3.1.1.3) สามารถละลายน้ำได้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases เร่งปฏิกิริยาทั้งการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยจะทำปฏิกิริยาบนตำแหน่ง carboxylic ester เปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ เป็น ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ นอกจากนั้นไลเปสยังเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กระบวนการเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) อินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification) และทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) (Houde และคณะ, 2004)

ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหลักที่มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ทั่วไปทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีต (Joseph และคณะ, 2008) โดยไลเปสจากพืชและสัตว์จะมีความคงตัวต่ำกว่าไลเปสที่พบในจุลินทรีย์ ไลเปสจากจุลินทรีย์จะพบทั้งที่สร้างในเซลล์และขับออกมานอกเซลล์ จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญเนื่องจาก สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว เลี้ยงง่าย ไม่ต้องการพื้นที่ในการเลี้ยง ไม่ขึ้นกับฤดูกาล เก็บเกี่ยวง่าย และสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรม (Wiseman, 1995)



ภาพที่ 2.8 ปฏิกริยาของไลเปส

ที่มา: (Ghosh และคณะ, 1996)

2.4.1 ประเภทของเอนไซม์ไลเปส

2.4.1.1 แบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ 2 แบบ

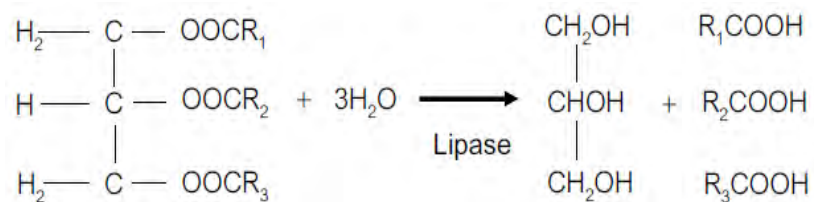
ดังนี้

1) เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ทำให้เกิดการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์จะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์

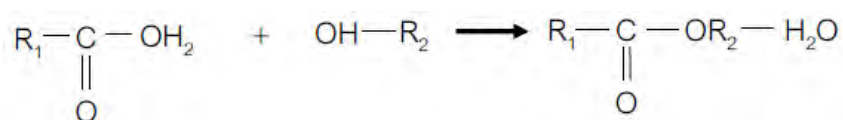
2) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้ 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride เป็นผลิตภัณฑ์

2.4.2.2 แบ่งตามรูปแบบการเร่งปฏิกิริยา ได้ 3 แบบ ดังนี้

1) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

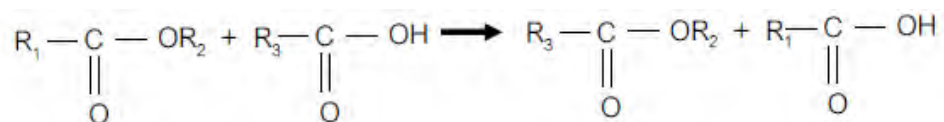


2) ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification)

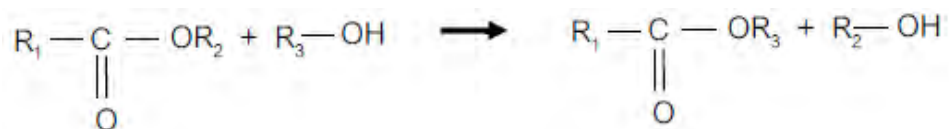


3) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification)

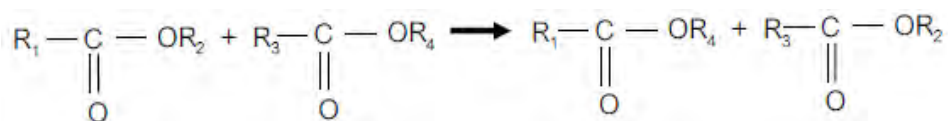
3.1) acidolysis



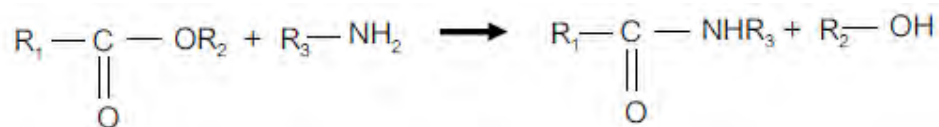
3.2) alcoholysis



3.3) ester exchange (interesterification)



3.4) aminolysis



ตารางที่ 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้

| Source | Genus | Species | Reference(s) | |
|-----------------------------|--|------------------------------------|---|--|
| Bacteria (Gram-positive) | <i>Bacillus</i> | <i>B. megaterium</i> | Godtfredsen, 1990 | |
| | | <i>B. cereus</i> | El-Shafei and Rezkallah, 1997 | |
| | | <i>B. stearothermophilus</i> | Gowland et al., 1987; Kim et al., 1998 | |
| | | <i>B. subtilis</i> | Kennedy and Rennarz, 1979 | |
| | | Recombinant <i>B. subtilis</i> 168 | Lesuisse et al., 1993 | |
| | | <i>B. brevis</i> | Hou, 1994 | |
| | | <i>B. thermocatenuatus</i> | Rua et al., 1998 | |
| | | <i>Bacillus</i> sp. IHL-91 | Becker et al., 1997 | |
| | | <i>Bacillus</i> strain WAI 28A5 | Janssen et al., 1994 | |
| | | <i>Bacillus</i> sp. | Helisto and Korpela, 1998 | |
| | | <i>B. coagulans</i> | El-Shafei and Rezkallah, 1997 | |
| | | <i>B. acidocaldarius</i> | Manco et al., 1998 | |
| | | <i>Bacillus</i> sp. RS-12 | Sidhu et al., 1998a,b | |
| | | <i>B. thermoleovorans</i> ID-1 | Lee et al., 1999 | |
| | | <i>Bacillus</i> sp. J 33 | Nawani and Kaur, 2000 | |
| | | <i>Staphylococcus</i> | <i>S. canosus</i> | Tahoun et al., 1985 |
| | | | <i>S. aureus</i> | Lee and Yandolo, 1986 |
| | | | <i>S. hyicus</i> | Van Oort et al., 1989; Meens et al., 1997; van Kampen et al., 1998 |
| | | | <i>S. epidermidis</i> | Farrell et al., 1993; Simons et al., 1998 |
| | | <i>Lactobacillus</i> | <i>S. warneri</i> | Talon et al., 1995 |
| | <i>Lactobacillus delbruckii</i> sub sp. <i>bulgaricus</i> | | El-Sawah et al., 1995 | |
| | Bacteria (Gram-negative) | <i>Streptococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> sp. | Meyers et al., 1996 |
| | | | <i>Streptococcus lactis</i> | Sztajer et al., 1988 |
| | | <i>Micrococcus</i> | <i>Micrococcus freudenreichii</i> | Hou, 1994 |
| | | | <i>M. luteus</i> | Hou, 1994 |
| | | <i>Propionibacterium</i> | <i>Propionibacterium acne</i> | Sztajer et al., 1988 |
| <i>Pr. granulosum</i> | | | Sztajer et al., 1988 | |
| <i>Burkholderia</i> | | <i>Burkholderia</i> sp. | Yeo et al., 1998 | |
| | | <i>Bu. glumae</i> | El Khattabi et al., 2000 | |
| <i>Pseudomonas</i> | | <i>Pseudomonas</i> | <i>P. aeruginosa</i> | Aoyama et al., 1988; Hou, 1994; Ito et al., 2001 |
| | | | <i>P. fragi</i> | Mencher and Alford, 1967 |
| | <i>P. mendocina</i> | | Jaeger and Reetz, 1998 | |
| | <i>P. putida</i> 3SK | | Lee and Rhee, 1993 | |
| | <i>P. glumae</i> | | Frenken et al., 1993; | |

ตารางที่ 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้ (ต่อ)

| Source | Genus | Species | Reference(s) | |
|--------|------------------------|-----------------------------------|---|------------------------------|
| Fungi | <i>Chromobacterium</i> | <i>P. fluorescens</i> | Maragoni, 1994; Lacointe et al., 1996 | |
| | | <i>P. aeruginosa</i> KKA-5 | Sharon et al., 1998 | |
| | | <i>P. pseudoalcaligenes</i> F-111 | Lin et al., 1995, 1996 | |
| | | <i>Pseudomonas</i> sp. | Sin et al., 1998; Miyazawa et al., 1998; Reetz and Jaeger, 1998; Dong et al., 1999 | |
| | | <i>P. fluorescens</i> MF0 | Guillou et al., 1995 | |
| | | <i>Pseudomonas</i> sp. KW156 | Yang et al., 2000 | |
| | | <i>Ch. viscosum</i> | Rees and Robinson, 1995; Helisto and Korpela, 1998; Jaeger and Reetz, 1998; Diogo et al., 1999 | |
| | | <i>Acinetobacter</i> | <i>Aci. pseudoalcaligenes</i> | Sztajer et al., 1988 |
| | | | <i>Aci. radioresistens</i> | Chen et al., 1999 |
| | | <i>Aeromonas</i> | <i>Ae. hydrophila</i> | Anguita et al., 1993 |
| | | | <i>Ae. sorbia</i> LP004 | Lotrakul and Dhamsthit, 1997 |
| | <i>Rhizopus</i> | <i>Rhizop. delemar</i> | Klein et al., 1997; Espinosa et al., 1990; Haas et al., 1992; Lacointe, et al., 1996 | |
| | | <i>Rhizop. oryzae</i> | Salleh et al., 1993; Coenen et al., 1997; Beer et al., 1998; Essamri et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Hiol et al., 2000 | |
| | | <i>Rhizop. arrhizus</i> | Sztajer and Maliszewska, 1989; Elibol and Ozer, 2001 | |
| | | <i>Rhizop. nigricans</i> | Ghosh et al., 1996 | |
| | | <i>Rhizop. nodosus</i> | Nakashima et al., 1988 | |
| | | <i>Rhizop. microsporous</i> | Ghosh et al., 1996 | |
| | | <i>Rhizop. chinensis</i> | Ghosh et al., 1996 | |
| | | <i>Rhizop. japonicus</i> | Nakashima et al., 1988 | |
| | | <i>Rhizop. niveus</i> | Kohno et al., 1994, 1999 | |
| | <i>Aspergillus</i> | <i>A. flavus</i> | Long et al., 1996, 1998 | |
| | | <i>A. niger</i> | Chen et al., 1995 | |
| | | <i>A. japonicus</i> | Satyanarayan and Johri, 1981 | |
| | <i>A. awamori</i> | Satyanarayan and Johri, 1981 | | |
| | <i>A. fumigatus</i> | Satyanarayan and Johri, 1981 | | |
| | <i>A. oryzae</i> | Ohnishi et al., 1994a,b | | |
| | <i>A. carneus</i> | Helisto and Korpela, 1998 | | |
| | <i>A. repens</i> | Kaminishi et al., 1999 | | |
| | <i>A. nidulans</i> | Mayordomo et al., 2000 | | |

ตารางที่ 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้ (ต่อ)

| Source | Genus | Species | Reference(s) | |
|-------------------|------------------------|---|--|--|
| Yeasts | <i>Penicillium</i> | <i>Pe. cyclopium</i> | Chahinian et al., 2000 | |
| | | <i>Pe. citrinum</i> | Sztajer and Maliszewska, 1989 | |
| | | <i>Pe. roqueforti</i> | Petrovic et al., 1990 | |
| | | <i>Pe. funiculosum</i> | Hou, 1994 | |
| | | <i>Penicillium</i> sp. | Helisto and Korpela, 1998 | |
| | | <i>Pe. camambertii</i> | Ghosh et al., 1996 | |
| | | <i>Pe. wortmanii</i> | Costa and Peralta, 1999 | |
| | <i>Mucor</i> | <i>Mucor miehei</i> | Rantakyla et al., 1996; Lacointe et al., 1996; Plou et al., 1998 | |
| | | <i>Mu. javanicus</i> | Ishihara et al., 1975 | |
| | | <i>Mu. circinelloides</i> | Balcão et al., 1998 | |
| | | <i>Mu. hiemalis</i> | Ghosh et al., 1996 | |
| | | <i>Mu. racemosus</i> | Ghosh et al., 1996 | |
| | | <i>Ashbya</i> | <i>Ashbya gossypii</i> | Stahmann et al., 1997 |
| | | <i>Geotrichum</i> | <i>G. candidum</i> | Sugihara et al., 1991; Ghosh et al., 1996 |
| | <i>Geotrichum</i> sp. | | Macedo et al., 1997 | |
| | <i>Beauveria</i> | <i>Beauveria bassiana</i> | Hegedus and Khachatourians, 1988 | |
| | <i>Humicola</i> | <i>H. lanuginosa</i> | Ghosh et al., 1996; Takahashi et al., 1998; Plou et al., 1998; Zhu et al., 2001 | |
| | <i>Rhizomucor</i> | <i>R. miehei</i> | Merek and Bednasski, 1996; Weber et al., 1999; Jaeger and Reetz, 1998; Dellamora-Ortiz et al., 1997 | |
| | <i>Fusarium</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | Rapp, 1995 | |
| | | <i>F. heterosporum</i> | Takahashi et al., 1998 | |
| | <i>Acremonium</i> | <i>Ac. strictum</i> | Okeke and Okolo, 1990 | |
| | <i>Alternaria</i> | <i>Alternaria brassicicola</i> | Berto et al., 1997 | |
| | <i>Eurotrium</i> | <i>Eu. herbanorium</i> | Kaminishi et al., 1999 | |
| <i>Ophiostoma</i> | <i>O. piliferum</i> | Brush et al., 1999 | | |
| <i>Candida</i> | <i>C. rugosa</i> | Wang et al., 1995; Frense et al., 1996; Yee et al., 1995; | | |
| | <i>C. tropicalis</i> | Takahashi et al., 1998 | | |
| | <i>C. antarctica</i> | Weber et al., 1999; Jaeger and Reetz, 1998; Arroyo et al., 1999 | | |
| | <i>C. cylindracea</i> | Kamiya and Gotto, 1998; Helisto and Korpela, 1998 | | |
| | <i>C. parapsilosis</i> | Lacointe et al., 1996 | | |
| | <i>C. deformans</i> | Lacointe et al., 1996 | | |

ตารางที่ 2.10 จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตไลเปสได้ (ต่อ)

| Source | Genus | Species | Reference(s) |
|---------------|----------------------|--|--|
| | | <i>C. curvata</i> | Ghosh et al., 1996 |
| | | <i>C. valida</i> | Ghosh et al., 1996 |
| | <i>Yarrowia</i> | <i>Y. lipolytica</i> | Merek and Bednasski, 1996; Pignede et al., 2000 |
| | <i>Rhodotorula</i> | <i>Rho. glutinis</i> | Papaparaskevas et al., 1992 |
| | | <i>Rho. pilimorae</i> | Tahoun et al., 1985 |
| | <i>Pichia</i> | <i>Pi. bispora</i> | Hou, 1994 |
| | | <i>Pi. maxicana</i> | Hou, 1994 |
| | | <i>Pi. sivicola</i> | Sugihara et al., 1995 |
| | | <i>Pi. xylosa</i> | Sugihara et al., 1995 |
| | | <i>Pi. burtonii</i> | Sugihara et al., 1995 |
| | <i>Saccharomyces</i> | <i>Sa. lipolytica</i> | Tahoun et al., 1985 |
| | | <i>Sa. crataegenesis</i> | Hou, 1994 |
| | <i>Torulospora</i> | <i>Torulospora globora</i> | Hou, 1994 |
| | <i>Trichosporon</i> | <i>Trichosporon asteroides</i> | Dharmstithi and Ammaranond, 1997 |
| Actinomycetes | <i>Streptomyces</i> | <i>Streptomyces fradiae</i> NCIB 8233 | Sztajer et al., 1988 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. PCB27 | Sztajer et al., 1988 |
| | | <i>Streptomyces</i> sp. CCM 33 | Sztajer et al., 1988 |
| | | <i>Str. coelicolor</i> | Hou, 1994 |
| | | <i>Str. cinnamomeus</i> | Sommer et al., 1997 |

ที่มา: Sharma และคณะ (2001)

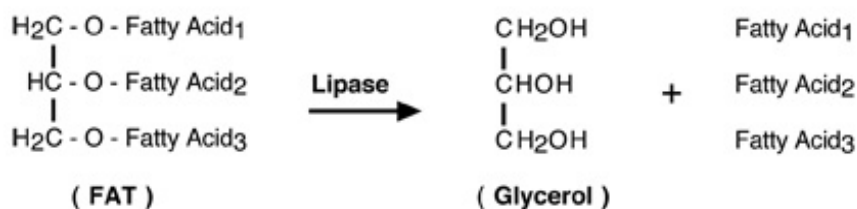
2.5 การย่อยสลายน้ำมันโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ จำเป็นต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือมีเซลล์เมมเบรน (membrane bound) และระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase) โดยทั้งสองคุณสมบัตินี้จะทำให้เกิดความเหมาะสมระหว่างการสัมผัสกันของจุลินทรีย์กับไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ชอบน้ำ (water-insoluble hydrocarbon) Rosenberg และคณะ (1992) ศึกษาพบว่า *Acinetobacter calcoaceticus* RAC-1 นั้นมีกลไกในการดูดซับน้ำมันและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยจะจับตัวกับหยดน้ำมันเมื่อเซลล์เข้าไปสัมผัสกับหยดน้ำมันแล้วจะมีการปล่อยแคปซูล (capsules) ที่เป็นสารพอลิเมอร์ (emulsan) ซึ่งสารเหล่านี้จะเข้าไปจับกับพื้นผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเข้าไปเกาะผิวของหยดน้ำมันโดยรอบได้ป้องกันการหลุดของหยดน้ำมัน และจะเกิดการย่อยสลายน้ำมัน (hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ต่อไป

จากงานวิจัยของ จุฑากานต์ บุญมี (2553) ในการศึกษาการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน พบว่าจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีที่สุดใน 4 สายพันธุ์

ประกอบด้วย ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3), *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3) เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนในขวดเขย่า ที่เวลา 72 ชั่วโมงสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ เท่ากับ 95.51, 89.14, 91.78 และ 91.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รวมกันในถังปฏิกรณ์ได้นานต่อเนื่องเป็นเวลา 168 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันเท่ากับ 90.50 เปอร์เซ็นต์

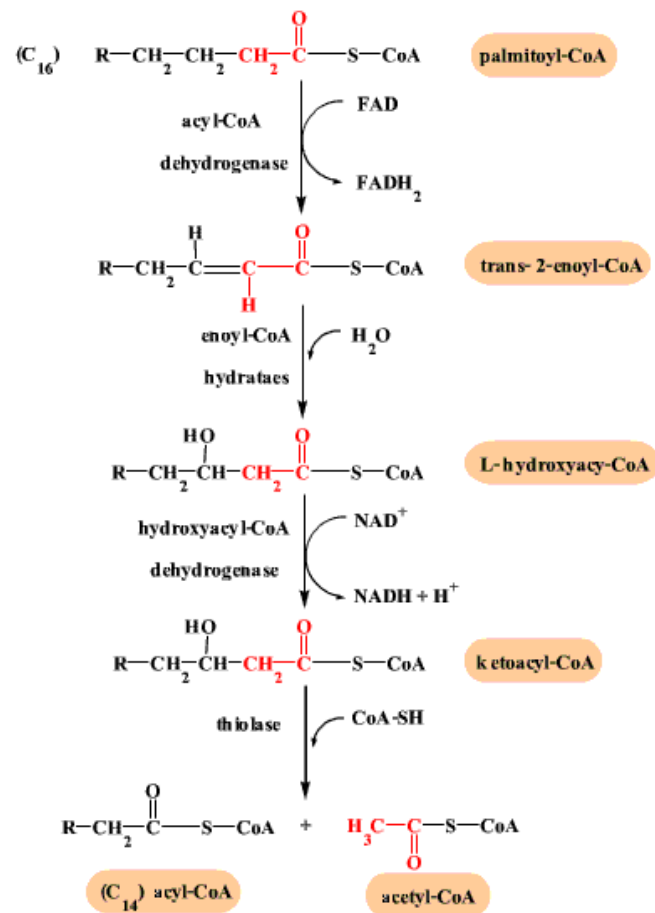
2.5.1 ปฏิกริยาเบต้าออกซิเดชัน (Beta-Oxidation)



ภาพที่ 2.9 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปส

ที่มา: Fickers และคณะ (2005)

หลังจากเกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปส (Lipase) แล้วได้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (ภาพที่ 2.9) กรดไขมันอิสระที่ได้จะถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายต่อในกระบวนการที่เรียกว่า เบต้าออกซิเดชัน (Beta-oxidation) กรดไขมันจะถูกกระตุ้นด้วย Coenzyme A และได้ออกมาเป็น Acetyl CoA และกรดไขมันที่มีคาร์บอนหายไป 2 อะตอม (ภาพที่ 2.10) และหลังจากนั้นจะเกิดปฏิกริยาเบต้าออกซิเดชัน (Beta-oxidation) ซ้ำอีกครั้ง โดยในครั้งที่สอง Acetyl CoA จะถูกออกซิไดซ์หมดและถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำผ่านวัฏจักร Tricarboxylic acid cycle (TCA) หรือมีการเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของเซลล์โดยผ่านวัฏจักร Glyoxylate ในส่วนของกลีเซอรอลนั้นจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ Pyruvic Acid ก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็น Acetyl CoA (Fickers และคณะ, 2005)



ภาพที่ 2.10 ปฏิกริยาเบต้าออกซิเดชัน (Beta-Oxidation)

ที่มา: Fickers และคณะ (2005)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานและเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศจะใช้คาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสร้างเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสร้างเซลล์ (สมใจ ศิริโชค, 2547) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ต่างกัน โดยในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถเลือกใช้แหล่ง

คาร์บอนต่างๆ เช่น กลูโคส แป้ง ฟรุกโตส เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีการใช้น้ำมันและไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้น

Tianwei และคณะ (2003) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ *Candida* sp. 99-125 จากการศึกษาพบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถใช้ไขมันและน้ำมันจากแหล่งธรรมชาติ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันงาที่ประกอบด้วยกรดโอเลอิก (Oleic acid) และกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) เป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรง ซึ่งเป็นเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ยีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาได้ปริมาณสูง ในขณะที่ไขมันที่มาจากสัตว์ เช่น ไขมันจากแกะ จะมียับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์สายพันธุ์นี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pogaku และคณะ (2009) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. Lp12 จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันจากแหล่งธรรมชาติให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงเช่นกัน และจากงานวิจัยของ Shah และคณะ (2007) ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาได้ในปริมาณสูงเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มาจากน้ำพืชชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันละหุ่ง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วลิสง และไตรบูไทริน นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อใช้น้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนแหล่งอื่นๆ

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งโดยประมาณ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์ บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน และบางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอนินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ ได้แก่ แอมโมเนีย กลีโอส แอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น โดยกลีโอสแอมโมเนียมที่นิยมใช้และมีราคาถูกได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไปจะเกิด SO_4^{2-} ทำให้เกิดสภาพความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปแบบของกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย เช่น สารสกัดจากยีสต์

เปปไทด์ และสารสกัดจากเนื้อเป็นต้นโดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน

Tianwei และคณะ (2003) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ *Candida* sp. 99-125 จากการศึกษาพบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปอินทรีย์ฟอสเฟตไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างมีบทบาทที่สำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยที่อินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นถั่วเหลืองบดและเคซีนสามารถส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีเพราะในถั่วเหลืองบดมีองค์ประกอบที่เป็นน้ำมันอยู่ซึ่งเป็นตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของอนินทรีย์ไนโตรเจนนั้นพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ดีที่สุดโดยสามารถชักนำให้ยีสต์สายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมามากกว่าที่เลี้ยงในอาหารที่เติมอนินทรีย์ไนโตรเจนตัวอื่นๆถึง 3 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Shah และคณะ (2007) ที่ศึกษาพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดที่ชักนำให้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาได้สูงที่สุด ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือสารสกัดจากยีสต์

Namita และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Burkholderia multivorans* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าอินทรีย์ไนโตรเจนที่มาจากสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ชักนำให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมามากกว่าการใช้แอมโมเนียฟอสเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ 2.5 เท่า

2.6.3 แร่ธาตุ

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว แร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน โดยทั่วไปแร่ธาตุที่ต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) โพแทสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอรีน (Cl) นอกจากนั้นยังมี trace element ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โคบอลต์ (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) และสังกะสี (Zn)

Gordillo และคณะ (1998) ศึกษาพบว่าฟอสเฟตที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นช่วยในการสังเคราะห์สารพันธุกรรมและโปรตีน การหายใจของเซลล์และควบคุมระดับ ATP ในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ และช่วยให้ปล่อยเอนไซม์ออกมาออกเซลล์ได้ง่ายขึ้น

Zhao และคณะ (2008) ศึกษาพบว่าการเติมแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัมต่อลิตรนั้นมีส่วนช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และช่วยปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ติดกับผนังเซลล์จุลินทรีย์ได้ และช่วยให้เกิดการสะสมของไขมันที่เซลล์อีกด้วย

2.6.4 พีเอชและอุณหภูมิ

พีเอชและอุณหภูมิมิมีผลต่อทั้งการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเจริญและทำงานได้ดีที่สุดในช่วงของพีเอชและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดเจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาในสภาวะที่ค่าพีเอชเป็นกรด (acidophiles) เช่น *Bacillus* sp. (Sevgi และคณะ, 2007) จุลินทรีย์บางชนิดเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาในสภาวะที่ค่าพีเอชเป็นกลาง (neutrophiles) เช่น *Aspergillus niger* (Kamini และคณะ, 1997) และจุลินทรีย์บางชนิดเจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาในสภาวะที่ค่าพีเอชเป็นเบส (alkalophiles) เช่น *Pseudomonas fluorescens* (Kiran และคณะ, 2008) ค่าพีเอชของอาหารเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเป็นเวลานานจะมีค่าเปลี่ยนไปเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและปล่อยสารบางอย่างออกมาซึ่งอาจจะเป็นกรดหรือเบส ดังนั้นในการเตรียมอาหารหรือระหว่างการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารจำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมกับการเจริญและการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ด้วย หรืออาจเติมสารบางอย่างที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ เช่น KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

Sevgi และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่คัดแยกจากน้ำเสียที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันมะกอก พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมและให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ ช่วงพีเอช 6-9 โดยพบว่าที่พีเอช 6 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด

Serri และคณะ (2008) ศึกษากรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วด้วย *Candida rugosa* โดยแปรผันช่วงของพีเอชและอุณหภูมิ ดังนี้คือ พีเอช 6.5-8.5 อุณหภูมิ

35-45 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 4.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Sirisha และคณะ (2010) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันพบว่าที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 25 หน่วย ต่อมิลลิลิตร และในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. Lp12 ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันของ Pogaku และคณะ (2009) พบว่าที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 4.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร

2.6.5 ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญสำหรับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobic microorganisms) โดยจุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ ในสภาวะที่มีอากาศในปริมาณที่เหมาะสมและต่อเนื่องจุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายอาหารและสร้างพลังงานได้ดี โดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการจะใช้เครื่องเขย่าสำหรับให้อากาศในการเลี้ยงจุลินทรีย์ และในระดับถึงปฏิบัติการนั้นจะมีการควบคุมการให้อากาศโดยจะมีการปรับค่าการเติมอากาศให้เหมาะสมกับความต้องการของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

Serri และคณะ (2008) ศึกษากรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วด้วย *Candida rugosa* โดยแปรผันความเร็วในการเขย่าที่ 180-260 รอบต่อนาที พบว่าความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมที่สุดและให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 200 รอบต่อนาที

2.6.6 สารลดแรงตึงผิว (surfactant)

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารที่ช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำ โดยสารลดแรงตึงผิวจะมีคุณสมบัติในการรวมโมเลกุลให้น้ำหนักมากขึ้นลดแรงเกาะกันระหว่างสสาร นำไปใช้ประโยชน์ได้คือ ช่วยทำให้น้ำกับน้ำมันเข้ากันได้ (emulsifier) ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวจึงมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายน้ำมันและมีผลต่อเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ด้วย นอกจากนี้ยังมี

การพบสารลดแรงตึงผิวที่เรียกว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant) ที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์เองระหว่างการย่อยสลายน้ำมันอีกด้วย

Gerardo และ Sergio (1999) ศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Yarrowia lipolytica* โดยใช้ Tween 80 เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ความเข้มข้นของ Tween 80 0.5-2 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด และพบว่าที่ความเข้มข้นที่น้อยกว่านี้นั้นจะทำให้ *Yarrowia lipolytica* ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาได้น้อยลง เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์พบว่าทั้งอาหารที่เติม Tween 80 และไม่เติม Tween 80 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอาหารทั้งสองแบบ แสดงว่าจุลินทรีย์ไม่ได้นำ Tween 80 ไปใช้สำหรับการสร้างเซลล์ แต่ Tween 80 ช่วยให้น้ำมันละลายในน้ำได้ดีและส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น

ตารางที่ 2.11 เปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

| Microorganisms | Cultivation mode | Optimization | Lipase activity (U/ml) | Reference |
|---|-----------------------|---|---------------------------|----------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ขวดเขย่า | พีเอช 8 อุณหภูมิ 37°C น้ำมันมะกอก | 4.5 | Vahdera และ Harmon, 1969 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ขวดเขย่า | พีเอช 8 อุณหภูมิ 37°C ไตรบูไทริน | 17.0 | Matez และ Sudakewitz, 1973 |
| <i>Chromobacterium viscosum</i> Var. <i>paralipolyticum</i> | ถังปฏิกรณ์ 30 ลิตร | พีเอช 7 อุณหภูมิ 40°C น้ำมันหมู | 10.8 | Abe และคณะ 1970 |
| <i>Micrococcus caseolyticus</i> | ขวดเขย่า | พีเอช 9.5 อุณหภูมิ 40°C น้ำมันมะกอก | 15.0 | Jonson และ Synge, 1970 |
| <i>Bacillus Licheniformis</i> | ขวดเขย่า | พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 45°C น้ำมันมะกอก | 6.0 | Jonson และ Synge, 1970 |

ที่มา: Rehm และ Reed (1987)

2.7 กระบวนการหมัก (fermentation)

2.7.1 กระบวนการหมักแบบกะ (batch fermentation)

เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงไปแล้ว จะไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเข้าไปอีก

2.7.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง มีการเติมอาหารใหม่และถ่ายเอาอาหารเก่าออกในอัตราเดียวกันตลอด ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

2.7.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation)

เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปให้อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ ซึ่งการหมักแบบนี้จะใช้แก้ปัญหาในเรื่องของข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น

ตารางที่ 2.12 เปรียบเทียบการผลิตกรดไขมันโดยใช้จุลินทรีย์ วัตถุประสงค์ และวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

| Microbials | Substrate | Cultivation mode | Biomass [g/l] | Lipid [g/l] | Fatty acid composition (%) | | | | | Reference |
|----------------------|---------------------|------------------|---------------|-------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------------------|
| | | | | | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | |
| <i>C. curvatus</i> | Glycerol | Fed-batch | 118 | 29.1 | - | 18 | 5 | 34 | 40.5 | Papanikolaou et al. (1996) |
| <i>R. toruloides</i> | Glucose | Fed-batch | 106.5 | 71.9 | 1.7 | 23.6 | 6.7 | 55.3 | 8.2 | Li et al. (2001) |
| <i>C. curvata</i> | Xylose | Continuous | 15 | 5.6 | - | 15 | 15 | 51 | 4 | Evans et al. (1983) |
| <i>Y. lipolytica</i> | Industrial glycerol | Continuous | 8.1 | 3.5 | - | 15 | 13 | 47 | 21 | Papanikolaou et al. (2002) |
| <i>A. curvatum</i> | Whey permeates | Batch fermentor | 19.7 | 11.4 | - | 26 | 36 | 20 | 9 | Ykema et al. (1988) |

ตารางที่ 2.12 เปรียบเทียบการผลิตกรดไขมันโดยใช้จุลินทรีย์ วัตถุประสงค์ และวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน (ต่อ)

| Microbials | Substrate | Cultivation mode | Biomass [g/l] | Lipid [g/l] | Fatty acid composition (%) | | | | | Reference |
|----------------------|-----------------|------------------|---------------|-------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------------|
| | | | | | C14:0 | C16:0 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | |
| <i>A. curvatum</i> | Glucose | Batch fermentor | 14.5 | 6.6 | - | 34 | 10.2 | 42.8 | 7.0 | Hassan <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Y. lipolytica</i> | Stearin | Batch flask | 15.2 | 7.9 | - | 17 | 78 | 5 | - | Papanikolaou <i>et al.</i> (2001) |
| <i>Y. lipolytica</i> | Industrial fats | Batch flask | 8.7 | 3.8 | - | 14 | 50 | 24 | 4 | Papanikolaou <i>et al.</i> (1996) |

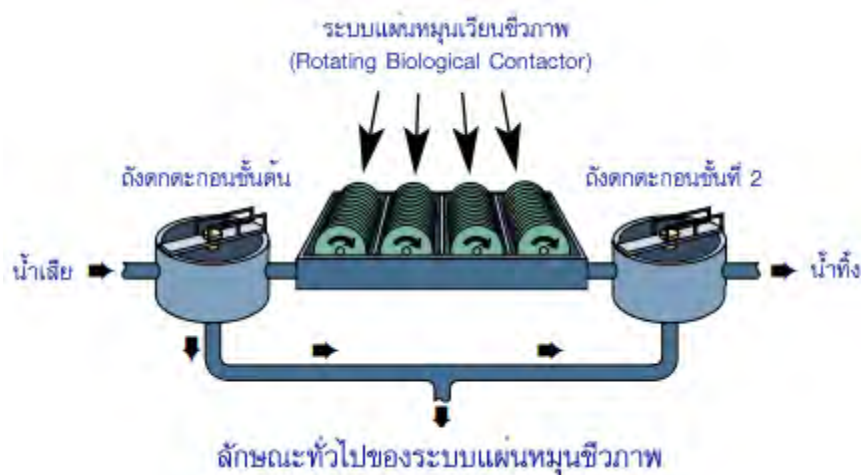
จากตารางที่ 2.12 จะเห็นว่า ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ วัตถุประสงค์ และวิธีการเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิต ถึงแม้ว่าจะมีบางปัจจัยที่คล้ายกันก็ตาม ส่วนใหญ่กรดไขมันที่ได้จะเป็นกรดโอเลอิก (C18:1) กรดสเตียริก (C18:0) และกรดปาล์มิติก (C16:0) และจากงานวิจัยทั้งหมดในตารางที่ 2.12 พบว่างานวิจัยของ Li และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดไขมันโดยใช้ ยีสต์ *Rhodospiridium toruloides* เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ให้ปริมาณและชนิดของกรดไขมันหลากหลายมากที่สุด และยังได้ปริมาณเซลล์มากที่สุดอีกด้วย

2.8 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (rotating biological contactor; RBC)

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (rotating biological contactor) เริ่มเป็นที่รู้จักในปี 1960 และเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในระบบบำบัดน้ำเสียอุตสาหกรรมในปี 1970 เนื่องจากใช้พลังงานต่ำและง่ายต่อการควบคุมระบบ โดยระบบนี้จะอาศัยจุลินทรีย์ยึดเกาะติดผิว (attached microbial growth) ตัวกลางเป็นแผ่นฟิล์ม (biofilm) (Ghasem และคณะ, 2005) และมีน้ำเสียไหลผ่านตัวกลางที่มีลักษณะทรงกระบอกหรือแผ่นจานหมุนที่จุ่มอยู่ในถังบำบัด โดยตัวกลางจะหมุนแบบช้าๆ และเมื่อหมุนขึ้นพื้นน้ำสัมผัสกับอากาศจุลินทรีย์ที่ติดอยู่กับตัวกลางจะใช้ออกซิเจนจากอากาศย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่ติดกับตัวกลางขึ้นมา และเมื่อมีการหมุนกลับลงไปก็จะนำน้ำเสียขึ้นมาบำบัดใหม่สลับไปเรื่อยๆ

2.8.1 หลักการทำงานของระบบ

หลักการทำงานของระบบจะอาศัยจุลินทรีย์แบบใช้อากาศที่ยึดเกาะบนแผ่นจานหมุนมีลักษณะเป็นเมือกชีวภาพ (biofilm) สำหรับใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ในการหมุนแผ่นจานหมุนผ่านน้ำเสียนั้นเมื่อแผ่นจานหมุนขึ้นมาสัมผัสกับอากาศก็จะพาเอาฟิล์มน้ำเสียที่ติดกับแผ่นจานขึ้นสู่อากาศด้วยทำให้จุลินทรีย์ได้รับทั้งออกซิเจนจากอากาศสำหรับใช้ในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารอินทรีย์ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์จุลินทรีย์ และเมื่อแผ่นจานหมุนลงไปสัมผัสกับน้ำเสียในถังปฏิบัติการอีกครั้งก็จะทำให้ออกซิเจนที่เหลือผสมกับน้ำเสีย ซึ่งเป็นการเติมออกซิเจนให้กับน้ำเสียได้อีกด้วย และจะสลับเช่นนี้ไปเรื่อยๆ เป็นวัฏจักร เมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์เกาะบนแผ่นจานหมุนหนามากขึ้นทำให้จุลินทรีย์ด้านในไม่สามารถรับออกซิเจนได้ เซลล์จุลินทรีย์บางส่วนจะหลุดออกมาเนื่องจากแรงเฉือนจากการหมุน ซึ่งจะเป็นการรักษาความหนาของแผ่นฟิล์มให้คงที่โดยอัตโนมัติ สำหรับตะกอนของจุลินทรีย์ที่แขวนลอยและไหลออกจากถังปฏิบัติการนี้ จะไหลเข้าสู่ถังตกตะกอนต่อไปเพื่อแยกตะกอนของจุลินทรีย์และน้ำทิ้ง ทำให้น้ำทิ้งที่ออกจากระบบนั้นมีคุณภาพดีขึ้น



ภาพที่ 2.11 แสดงลักษณะทั่วไปของระบบแผ่นหมุนชีวภาพ

ที่มา: <http://www.usfilter.com>

2.8.2 ส่วนประกอบของระบบ

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพเป็นระบบบำบัดน้ำเสียอีกรูปแบบหนึ่งของระบบบำบัดขั้นที่สอง (secondary treatment) โดยองค์ประกอบหลักประกอบด้วย

1) ถังตกตะกอนขั้นต้น (primary sedimentation tank) ทำหน้าที่แยกของแข็งที่มากับน้ำเสีย

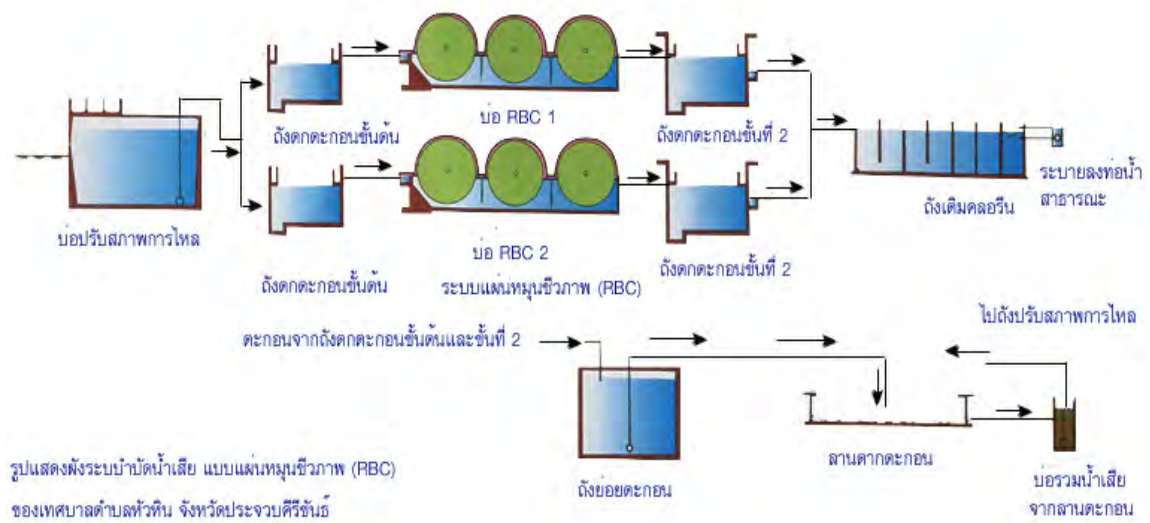
2) ถังปฏิกริยา ทำหน้าที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

3) ถังตกตะกอนขั้นที่สอง (secondary sedimentation tank) ทำหน้าที่ในการแยกตะกอนจุลินทรีย์ และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้ว

ส่วนของถังปฏิกริยาประกอบด้วยแผ่นจานพลาสติกที่ทำมาจาก polyethylene (PE) หรือ high density polyethylene (HDPE) วางเรียงซ้อนกันจำนวนมาก โดยติดแผ่นตั้งฉากกับเพลตามแนวนอนตรงจุดศูนย์กลางแผ่น (Cortez, 2008) ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจะยึดติดบนแผ่นจานหมุนเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ และมีความหนาประมาณ 1-4 มิลลิเมตร (Waskar, 2012) หรือเรียกระบบการบำบัดน้ำเสียชนิดนี้ว่าระบบ fixed film โดยในระบบส่วนที่เป็นชุดแผ่นจานทั้งหมดวางติดตั้งในถังคอนกรีตเสริมเหล็ก และระดับของเพลลาจะอยู่เหนือผิวน้ำเล็กน้อย ทำให้พื้นที่ผิวของแผ่นจานหมุนจะจมอยู่ในน้ำประมาณร้อยละ 35 ถึง 40 ของพื้นที่แผ่นทั้งหมด และการหมุนของแผ่นหมุนนั้นจะใช้มอเตอร์เป็นตัวขับเคลื่อนเพลลาและเฟืองทดรอบเพื่อหมุนจาน

ระบบแผ่นหมุนชีวภาพ ประกอบด้วย

- 1) บ่อปรับสภาพการไหล (equalizing tank)
- 2) ถังตกตะกอนขั้นต้น (primary sedimentation tank)
- 3) ระบบแผ่นหมุนชีวภาพ
- 4) ถังตกตะกอนขั้นที่สอง (secondary sedimentation tank)
- 5) บ่อเติมคลอรีน



ภาพที่ 2.12 ตัวอย่างระบบเทศบาลตำบลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ที่มา: www.pcd.go.th

2.8.3 ข้อดีและข้อเสียของระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ

2.9.4.1 ข้อดีของระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ

- 1) ระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ ไม่ต้องมีการหมุนเวียนตะกอนกลับทำให้ไม่มีการสะสมของแข็งและตะกอนที่ก้นถัง
- 2) การเริ่มต้นระบบไม่ยุ่งยากใช้เวลาเพียง 1-2 สัปดาห์
- 3) การดูแลและบำรุงรักษาง่ายไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญมากนัก
- 4) ในการเดินระบบใช้พลังงานไฟฟ้าสำหรับขับเคลื่อนมอเตอร์เท่านั้นทำให้ใช้พลังงานในการเดินระบบน้อย ลดค่าใช้จ่ายในการดำเนินการและบำรุงรักษา
- 5) สามารถรับภาวะเฉียบพลัน (shock load) หรือสภาวะที่ไม่คงที่ (transient state) ได้ดีกว่าระบบอื่นๆ

2.9.4.2 ข้อเสียของระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ

- 1) ยากต่อการคงความหนาของแผ่นฟิล์มให้คงที่ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม (Cortez, 2008)
- 2) เปลือกแทนหมุนชำรุดได้ง่ายเนื่องจากต้องรับแรงอัดและแรงบิด

3) แผ่นจานหมุนชำรุดเสียหายได้ง่ายหากมีการสัมผัสกับรังสีอัลตราไวโอเล็ตและสารพิษเป็นระยะเวลานาน

2.8.4 การประยุกต์ใช้ระบบบำบัดแบบแผ่นหมุนชีวภาพ

- 1) ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียเทศบาลหรือชุมชน (municipal wastewater treatment)
- 2) ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (food and beverage wastewater treatment)
- 3) ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของโรงกลั่นและปิโตรเลียม (refinery and petrochemical wastewater treatment)
- 4) ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ (pulp and paper wastewater treatment)

2.9 การออกแบบการทดลองทางสถิติ (Haaland, 1989)

การออกแบบการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยตั้งแต่สองปัจจัยขึ้นไป มักจะใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial designs) โดยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล คือการทดลองที่มีการแบ่งปัจจัยออกเป็นระดับที่แตกต่างกัน สามารถศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อกระบวนการและเกิดขึ้นพร้อมๆกันได้ การแบ่งปัจจัยเป็นระดับต่างๆ ในการทดลองเพื่อลดความผิดพลาดที่อาจจะเกิดขึ้นในการทดลอง อีกทั้งยังทำให้ได้งานที่มีประสิทธิภาพทั้งเรื่องการประหยัดเวลาและต้นทุน โดยแบ่งอิทธิพลของปัจจัยเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1) อิทธิพลหลัก (main effect) คือ การเปลี่ยนแปลงของผลลัพธ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนระดับของปัจจัยจากระดับต่ำไปยังระดับสูง

2) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (interaction effect) คือ การเปลี่ยนแปลงของผลลัพธ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับปัจจัยหนึ่งจากระดับต่ำไปยังระดับสูงโดยขึ้นอยู่กับระดับของอีกปัจจัยหนึ่ง

2.9.1 การออกแบบการทดลองแบบ full factorial design

การทดลองแบบ full factorial เป็นการทดลองที่จะต้องทำการทดลองให้ครบทุกเงื่อนไขของทุกๆค่าระดับปัจจัยที่มีในการทดลอง และวิเคราะห์ค่าตอบสนองของทุกกรณี โดยเงื่อนไขของแต่ละการทดลองจะถูกเรียกว่า รัน (run) หรือหน่วยการทดลอง ซึ่งจะแบ่งการทดลองแบบ full factorial ออกเป็น 2 แบบคือ

2-level full factorial design ในการทดลองจะกำหนดให้ทุกๆปัจจัยมีค่าระดับเพียง 2 ระดับเท่านั้น คือการทดลองทั้งหมดเท่ากับ 2^k โดยที่ k คือจำนวนปัจจัยหลัก (main effect) เช่น ถ้าในการทดลองมี 3 ปัจจัยหลัก การทดลองนี้จะมีจำนวนรันทั้งหมด $2^3 = 8$ การทดลอง

3-level full factorial design ในการทดลองจะกำหนดให้ทุกๆปัจจัยมีค่าระดับเพียง 3 ระดับเท่านั้น คือการทดลองทั้งหมดเท่ากับ 3^k โดยที่ k คือจำนวนปัจจัยหลัก (main effect) เช่น ถ้าในการทดลองมี 3 ปัจจัยหลัก การทดลองนี้จะมีจำนวนรันทั้งหมด $3^3 = 27$ การทดลอง

2.9.2 การออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial design

การทดลองแบบ fractional factorial design เป็นการทดลองที่ไม่ต้องทำการทดลองให้ครบทุกเงื่อนไข มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการทดลองเพื่อคัดเลือกรันปัจจัย (screening) เพราะมีการลดจำนวนรันลง โดยรันที่ถูกเลือกมาทำการทดลองจะเป็นรันที่อยู่ในการทดลองแบบ full factorial ซึ่งในกรณีนี้คือไม่ได้ทำการทดลองครบทุกเงื่อนไขของทุกระดับปัจจัย จะทำให้เกิดผลที่เรียกว่า confounded หมายถึง อิทธิพลของปัจจัยที่ไม่สามารถประเมินค่าแยกออกมาเดี่ยวๆได้ ดังนั้นในการทำ fraction factorial ต้องเลือกส่วนของการทดลองที่ดีที่สุดเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ใช้งานได้

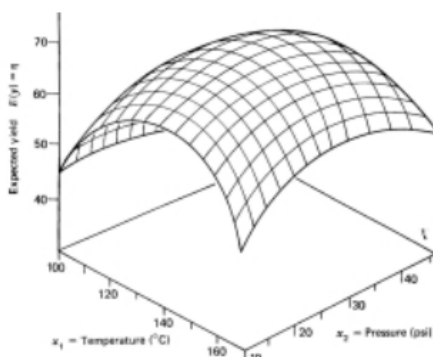
2.9.3 พื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM)

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี response surface methodology (RSM) สำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับค่าการตอบสนองที่สนใจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยใช้การวิเคราะห์แบบ multiple analysis ถ้าหากตัวแปรใดมีผลต่อค่าการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการอันดับสองดังตัวอย่างสมการ (Montgomery, 1991)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j < i}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

| | | |
|------------|-----|--|
| Y | คือ | ค่าการตอบสนอง |
| b_0 | คือ | ค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดล |
| b_i | คือ | ค่าสัมประสิทธิ์ของ linear effect |
| b_{x_i} | คือ | ค่าสัมประสิทธิ์ของ squared effect |
| b_{ij} | คือ | ค่าสัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย |
| x_i, x_j | คือ | ตัวแปรอิสระ (ตัวเลข) |
| ϵ | คือ | ค่า error |

เมื่อทำการประมวลผลด้วยโปรแกรมประเมินผลทางสถิติเพื่อสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface response) เพื่อใช้ประเมินผลระหว่างปัจจัยร่วมกราฟจะมีลักษณะเป็นกราฟเส้นโค้งดังตัวอย่าง



ภาพที่ 2.13 ภาพ 3 มิติกราฟพื้นผิวตอบสนอง

ที่มา: Montgomery, 1991

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา (Binocular compound microscope) รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical co.Ltd., Taiwan
- เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Co. Inc., USA
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler-Toledo, Switzerland
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Hach DR/2400 บริษัท Hach, USA
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น 100P ยี่ห้อ Eppendorf
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น 1000P ยี่ห้อ Lio Lab
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น Contherm serie five บริษัท Contherm Scientific Ltd., New Zealand
- กระดาษกรอง (Nylon membrane) ขนาด 47 มิลลิเมตร ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Munktell
- ชุดกรองลำไส้รูป PTFE (Poly tetra fluoro ethylene) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Vertical Chromatography Co., Ltd.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Sigma 4-15 บริษัท Scientific Promotion Co. Ltd., USA
- เครื่องซั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 100 C บริษัท Presica, Switzerland
- เครื่องซั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-5 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- กระบอกรีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท Tuberculin Nipro, Japan
- หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen, Co. Inc., USA
- ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 บริษัท International Scientific Supply, USA

- เครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น LC1200 บริษัท Agilent, USA
- คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ Eclipse XDB-C18 บริษัท Agilent, USA
- เครื่อง IATROSCAN TLC-FID Analyzer, Japan
- เครื่องแก้ว บริษัท Pyrex, USA
- เครื่องแก้ว บริษัท Schott Duran, Germany
- เครื่องวัดและควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH controller) รุ่น FM-2000 บริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan
- บั๊มเติมสาร (Pump box) รุ่น FB-2000 บริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
- บั๊มเติมสารอาหาร (Peristatic pump) รุ่น MP-1000-H บริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan
- อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH probe) รุ่น 405-DPAS-SC-K8S/225 บริษัท Mettler-Toledo GmbH Schwenzenbach, Switzerland
- บั๊มอากาศ (Air pump) รุ่น DOA-P104-BN บริษัท MFG.CORP., USA
- เครื่องควบคุมอัตราการให้อากาศ (Air flow meter) รุ่น FBC-V-S-A-30-LM บริษัท New-Flow Technologies.Inc., USA
- เครื่องปรับค่ากระแสไฟฟ้า (Step down transformer) Auto-05 บริษัท Tron Advance Technology Transformer., USA

3.2 เคมีภัณฑ์

- กรดคาปริลิก ($C_8H_{16}O_2$) บริษัท Sigma Aldrich, Singapore
- กรดคาปริก ($C_{10}H_{20}O_2$) บริษัท Sigma Aldrich, Singapore
- กรดลอริก ($C_{12}H_{24}O_2$) บริษัท Sigma Aldrich, Singapore
- กรดไมริสติก ($C_{14}H_{28}O_2$) บริษัท Sigma Aldrich, Singapore
- กรดปาล์มติก ($C_{16}H_{32}O_2$) บริษัท Sigma Aldrich, Singapore
- กรดสเตียริก ($C_{18}H_{36}O_2$) บริษัท Fluka, Switzerland
- น้ำมันปาล์มโกลิอิน ยี่ห้อหยก
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Scharlau Chemie S.A., Spain
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem, Australia

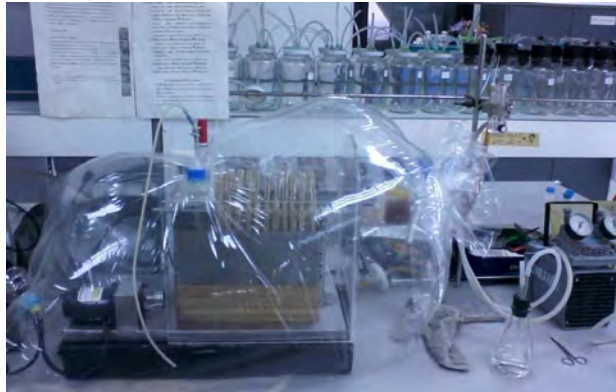
- โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (KMnO_4) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) บริษัท HBD Laboratories Chemicals Ltd., England
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
- คลอโรฟอรั่ม (CHCl_3) บริษัท APS Finechem, Australia
- ฟอรั่มาลดีไฮด์ (CH_2O) บริษัท APS Finechem, Australia
- เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Malinckordt Chemicals, USA
- ผงวุ้น
- แบคโตเปปโทน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
- ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- ไตรบูไทรีน (Tributylin) บริษัท Fluka, Switzerland

3.3 แหล่งจุลินทรีย์

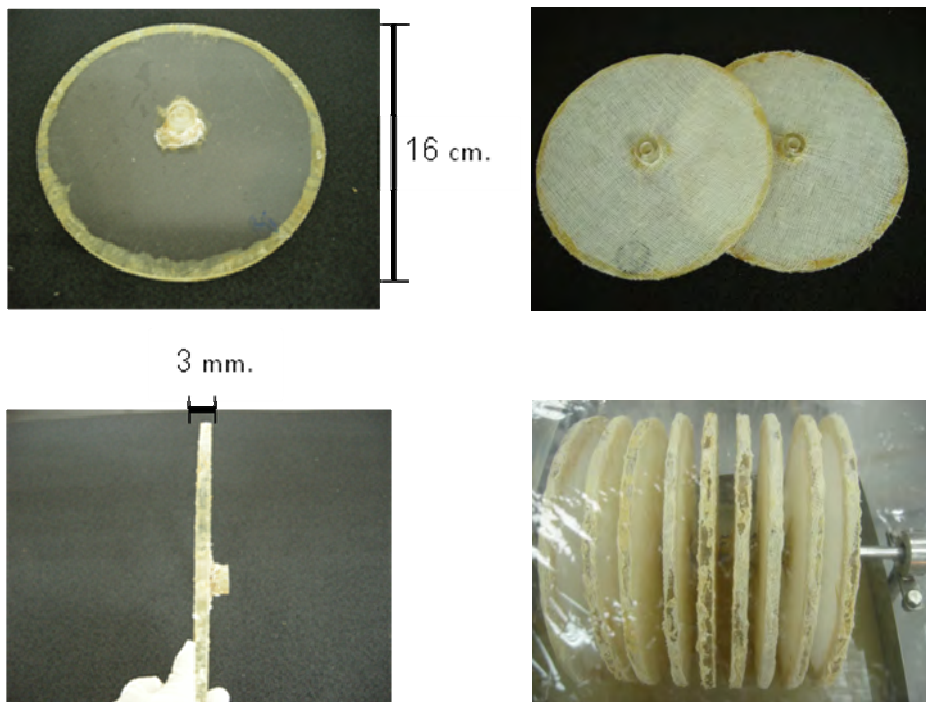
งานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์ที่คัดแยกแล้วของ นางสาวจุฑาทกานต์ บุญมี (2553) จากงานวิจัยเรื่องการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดีที่สุดใน 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3)

3.4 ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (rotary biological contactor reactor)

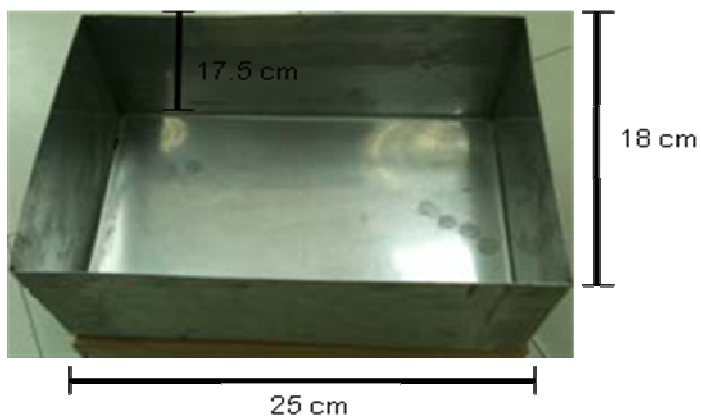
ถังหมักขนาดความจุ 4 ลิตร ประกอบด้วยแผ่นตัวกลางที่ใช้มีลักษณะเป็นแผ่นอะคริลิก (acrylic) แผ่นกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 เซนติเมตร หนา 3 มิลลิเมตร ติดด้วยวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อ เรียงซ้อนกัน 9 แผ่นบนเพลากลาง โดยแกนเพลากลางจะหมุนในแนวรอบอัตราการหมุนของแผ่นหมุน สามารถปรับระดับได้เป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที ส่วนระดับการจมตัวของแผ่นหมุนได้ระดับอาหารสามารถปรับระดับได้เป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของวัฏจักรตามลำดับ (สกุลรัตน์ พุกกะวรรณ, 2548)



ภาพที่ 3.1 ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ ขนาดความจุ 4 ลิตร



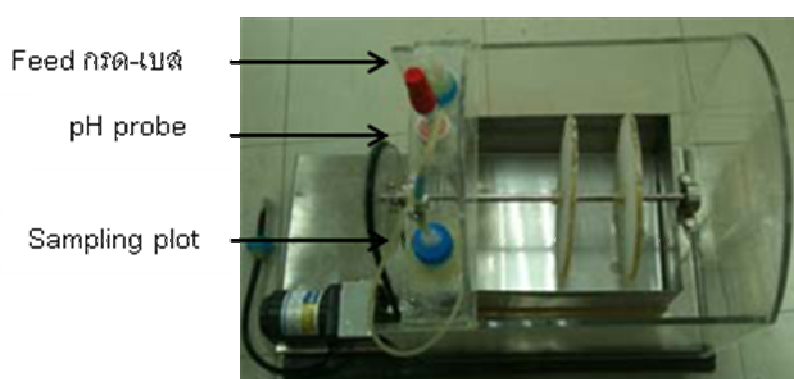
ภาพที่ 3.2 แผ่นหมุนชีวภาพ



ภาพที่ 3.3 ถังหมักสแตนเลสความจุ 4 ลิตร



ภาพที่ 3.4 ฐานรองถังหมักและมอเตอร์



ภาพที่ 3.5 แผ่นอะคลีริกครอบตัวถังหมัก

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ จะนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใส่แบคทีเรียลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และยีสต์ลงในอาหาร yeast extract-malt extract broth (YM) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง ใส่แบคทีเรียลงในอาหารแข็ง nutrient agar (NA) และยีสต์ลงในอาหาร yeast extract-malt extract agar (YM) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยปลายเข็มเขี่ยเชื้อและจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ไตรบูไทรีน (tributylin agar) (พัชรวิภา ใจจักรคำ, 2545) คัดเลือกโคโลนีที่ทำให้เกิดบริเวณใส วัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้น ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ โดยศึกษาสีและโครงสร้างของโคโลนี และย้อมสีแกรมตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์ยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน

3.5.2 ศึกษาการเจริญ อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมัน ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในขวดเขย่า

การศึกษากการเจริญ อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมัน โดยใช้เข็มเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.4.1 เลี้ยงแบคทีเรียลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และยีสต์ลงในอาหาร yeast extract-malt extract broth (YM) เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิดจุลินทรีย์แต่ละชนิดปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างตามช่วงเวลา ดังนี้คือ ที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 4, 5, 10, 14, 15, 16, 20 และ 24 วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร และวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมัน ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

3.5.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ในขวดเขย่า

ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบเชิงแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) แบบ 2^k เพื่อวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดไขมันมากที่สุด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.4.3.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมัน โดยตัวแปรที่สนใจศึกษา ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอน แสดงดังตารางที่ 3.1 และได้ตารางแฟคทอเรียลแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยและระดับที่สนใจในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสม ครั้งที่ 1

| ปัจจัย | ระดับ | | |
|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | ระดับต่ำ (-1) | ระดับกลาง (0) | ระดับสูง (+1) |
| พีเอช; A | 6.0 | 8.0 | 10.0 |
| อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$); B | 30 | 34 | 38 |
| เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอน; C | 1% | 5% | 10% |

ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล

Number of Factor: 3 Design Name: FF0308

Resolution: V Factorial: 2^3

Base Design: 8 Fraction: Full

Base Design: 3^*

| run | Factor | | |
|-----|--------|----|----|
| | A | B | C |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | +1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 |
| 4 | -1 | +1 | +1 |
| 5 | +1 | -1 | -1 |

ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (ต่อ)

Number of Factor: 3 Design Name: FF0308
 Resolution: V Factorial: 2^3
 Base Design: 8 Fraction: Full
 Base Design: 3^*

| run | Factor | | |
|-----|--------|----|----|
| | A | B | C |
| 6 | +1 | -1 | +1 |
| 7 | +1 | +1 | -1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |

ที่มา: Haaland, 1989

3.4.3.2 วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการสร้างพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) สำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับปริมาณกรดไขมันที่สนใจ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิจัย โดยกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นกราฟเส้นโค้ง

วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร และวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

3.5.4 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสมในขวดเขย่า

ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมโดยใช้เข็มเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.4.1 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และยีสต์ลงในอาหาร yeast extract-malt extract broth (YM) เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตจุลินทรีย์แต่ละชนิดปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับปริมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ให้มี OD.600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 4 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ติดตามการเจริญโดยการวัดค่า OD.600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

3.5.5 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดไขมัน

การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดไขมันโดยใช้เข็มเขี่ยโคโลนีบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.4.1 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และยีสต์ลงในอาหาร yeast extract-malt extract broth (YM) เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตจุลินทรีย์แต่ละชนิดปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับปริมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ให้มี OD.600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.4

3.5.6 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

3.5.6.1 ทดสอบการทำงานของถังปฏิกรณ์

- 1) ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวหน้าของถังหมักชีวภาพแบบหมุน (surface sterile) ในส่วนของแผ่นหมุน ถังหมัก แผ่นรอง และแผ่นอะคริลิก โดยจะทำการล้างและนำส่วนต่างๆด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
- 2) ประกอบถังปฏิกรณ์โดยกำหนดค่าต่างๆของถังภายในตู้เขี่ยเชื้อ เช่น การจมตัวของแผ่น หมุนลงได้ระดับอาหาร 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี จากนั้นนำถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบเสร็จแล้วใส่ลงในถังพลาสติก ขนาด 30x60 นิ้ว ทำการปิดปากถุง
- 3) นำถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหมุนที่ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิว (surface sterile) เสร็จแล้วไปทำการฆ่าเชื้อโดยการ Fumigation ด้วยโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตและฟอร์มาลดีไฮด์ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่ฟอร์มาลดีไฮด์ ให้ท่วมโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตในตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วัน
- 4) นำถังหมักที่ประกอบเสร็จและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไปประกอบเข้ากับชุดควบคุม pH probe ที่เป่าอากาศ ชุดต่อมอเตอร์ sampling port ที่เติม กรด-เบส
- 5) ทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หลังการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยอาหารเหลว nutrient broth (NB) ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.6.2 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามข้อ 3.4.5 ทำการผลิตโดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 3.4.3 ทำการหมักจนกระทั่งจุลินทรีย์มีการสร้างเมือกชีวภาพ (biofilm) หนาประมาณ 1-4 มิลลิเมตร (Waskar, 2012) เลี้ยงแบบกะโดยทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามผลการทดลองโดย ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 4, 5, 10, 13, 15, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจะนำไปวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมัน ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลว

สมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมันแบบกิ่งกะ และติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดค่า OD.600 นาโนเมตร และสังเกตการณ์สร้างเมือกชีวภาพของจุลินทรีย์บนแผ่นหมูน

3.5.7 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกิ่งกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมูนชีวภาพ

ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกิ่งหลังจากสูบอาหารจากการเลี้ยงแบบกะในข้อ 3.4.6.2 ออกแล้วเติมอาหารใหม่เข้าไปโดยใช้เวลาและความเข้มข้นของน้ำมันในชั่วโมงที่เหมาะสมคือให้ความเข้มข้นของกรดไขมันมากที่สุดจากข้อ 3.4.6.2 ทำการหมักแบบกิ่งกะโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.4.6.2 ติดตามผลการทดลองโดยวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC) และสังเกตการณ์สร้างเมือกชีวภาพของจุลินทรีย์บนแผ่นหมูน

3.5.8 วิธีการวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID)

หลังจากทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละชั่วโมงทำการวัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือโดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่คงเหลือโดยวิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยเติมคลอโรฟอร์มลงไปปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายชั้นคลอโรฟอร์ม ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC-FID)



ภาพที่ 3.6 เครื่องโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC-FID Analyzer)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลืองด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC-FID)

- 1) สแกนแท่งโครมาทออดก่อนใช้งานเพื่อทำความสะอาดแท่งโครมาทออด
- 2) หลังจากทำสแกนเสร็จให้นำแท่งโครมาทออดจุ่มลงในสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อเคลือบแท่งโครมาทออด
- 3) นำแท่งโครมาทออดออกจากสารละลายและไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 4) หลังจากนั้นนำแท่งโครมาทออดไปทำการเบลนดิงสแกนอีก 1 ครั้ง
- 5) ดูดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จดลงบนแท่งโครมาทออด
- 6) นำแท่งโครมาทออดที่ดูดตัวอย่างเสร็จแล้วไปจุ่มลงในสารละลายที่ใช้เป็นตัวพาสารให้เคลื่อนที่ (mobile phase) ไปบนแท่งโครมาทออด สำหรับวิธีการนี้จะใช้ตัวทำละลาย 2 ระบบ โดยระบบแรกจะใช้โครโพรฟอร์มเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 8 เซนติเมตร และระบบที่สอง จะใช้โครโพรฟอร์มเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 70 มิลลิเมตร ผสมกับตัวทำละลายเมทานอลผสมกับแอมโมเนีย (อัตราส่วน 8 ต่อ 2) ปริมาตร 0.05 มิลลิเมตร สำหรับพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร
- 7) นำแท่งโครมาทออดไปอบที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
- 8) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ อัตราการไหลของก๊าซไฮโดรเจน 160 มิลลิเมตรต่อ นาที และอัตราการไหลของอากาศ 2.0 ลิตรต่อ นาที

3.5.9 การสกัดแยกกรดไขมัน วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมัน ที่สกัดแยกได้ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

3.5.9.1 การสกัดแยกกรดไขมัน (Kaluzyn et al., 1985)

ในขั้นตอนการสกัดแยกกรดไขมัน หลังจากทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างแล้ว ปิเปต 1 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก เต็ม คลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เมทานอล 2 มิลลิลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.8 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม คลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น ดูดชั้น คลอโรฟอร์มใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ และตั้งทิ้งให้คลอโรฟอร์มระเหยออก หลังจากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายและกรองตัวอย่างผ่านไมโครฟิวเออร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร สำหรับ วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมันด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

3.5.9.2 การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมันด้วย โครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.5.9.1 บรรจุลงในขวดสำหรับวิเคราะห์ (vials) ตรวจสอบหาปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดคาปริลิก (C8) กรดคาปริก (C10) กรดลอริก (C12) กรดไมริสติก (C14) และกรดปาล์มิติก (C16) โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น LC1200 โดยใช้คอลัมน์ Eclipse XDB-C18 มีขนาด 5 ไมโครเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.60 มิลลิเมตร วิเคราะห์ตัวอย่างโดยอาศัยการกระจายแสงผ่านเครื่องตรวจสอบชนิด DAD (diode array detector) ค่าความเข้มข้นที่วัดได้จะถูกบันทึกและแปลผลโดยผ่านโปรแกรม Chemstation Software ของบริษัท Agilent ใช้เมทานอล (HPLC Grade) ในน้ำกลั่นปลอดประจุ (Milli Q water) ในอัตราส่วน 97 ต่อ 3 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา โดยให้อัตราการ

ไหลเป็น 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณของกรดคาปริลิก (C8) กรดคาปริก (C10) กรดลอริก (C12) กรดไมริสติก (C14) และกรดปาล์มิติก (C16) สามารถวัดได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน



ภาพที่ 3.7 เครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล


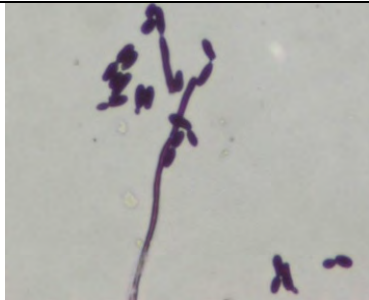
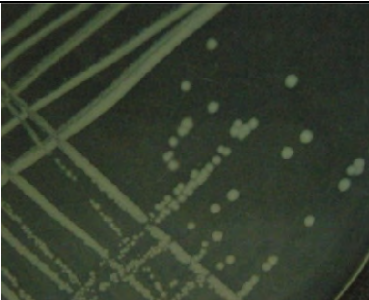
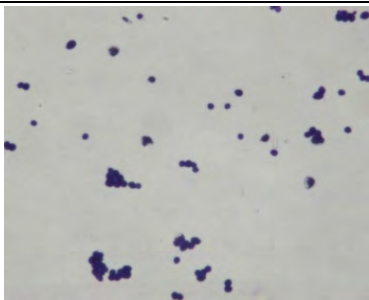
4.1 ศึกษาคุณลักษณะและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดไขมันโดยใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันเพื่อให้ได้กรดไขมัน ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้จะต้องมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน ดังนั้นจึงเลือกใช้จากงานวิจัยของ จุฑากานต์ บุญมี (2553) เรื่องการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันมากที่สุดมา 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3)

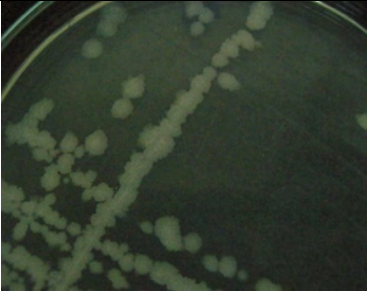
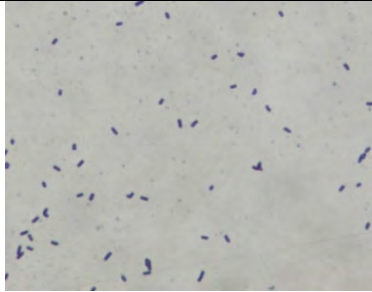
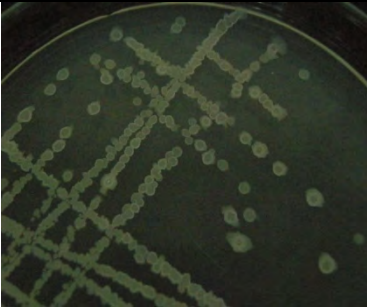

การศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์ จะนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกแล้วข้างต้นเลี้ยงในอาหารแข็งโดยเชื้อโคโลนีแบคทีเรียลงในอาหารแข็ง nutrient agar (NA) และยีสต์ลงในอาหารแข็ง yeast extract-malt extract agar (YM) หลังจากเลี้ยงให้จุลินทรีย์เจริญเป็นเวลา 20-24 ชั่วโมงศึกษาลักษณะโคโลนีบนจานอาหารแข็งและลักษณะของเซลล์จุลินทรีย์ได้กล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 4.1

หลังจากศึกษาลักษณะของจุลินทรีย์แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันโดยใช้อาหารแข็งไตรบูไทรีน (tributyryn agar) เนื่องจากไตรบูไทรีนเป็นไตรกลีเซอไรด์มาตรฐานที่นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยน้ำมันจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีและเห็นบริเวณใสได้อย่างชัดเจน (พัชรวิภา ใจจักรคำ, 2545) หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงสังเกตดูบริเวณใสและวัดความกว้างจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นเพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน โดยจากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีอย่างชัดเจนแสดงว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ไต้กล้องจุลทรรศน์

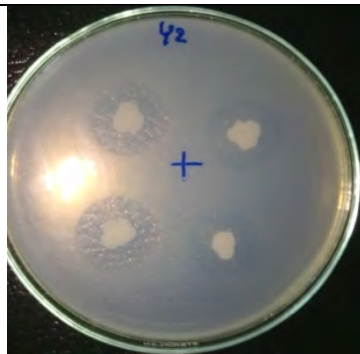
| สายพันธุ์จุลินทรีย์ | ลักษณะโคโลนี | ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง | ลักษณะเซลล์ไต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40x) |
|--|---|--|--|
| <i>Yarrowia lipolytica</i> (รหัส Y2) | โคโลนีสีขาวครีม โคโลนีขนาดเล็ก ผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ |  |  |
| <i>Candida tropicalis</i> strain Vaucher (รหัส L9) | โคโลนีสีขาวครีม ผิวด้าน ผิวหน้าโคโลนีเรียบ โคโลนีนูนสูง ขอบโคโลนีเรียบ |  |  |

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งและลักษณะเซลล์ไต้กล้องจุลทรรศน์(ต่อ)

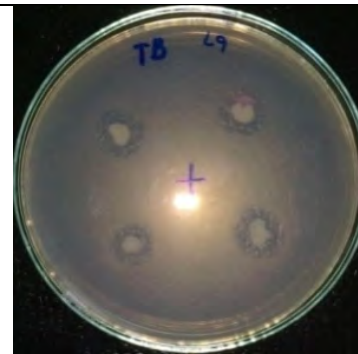
| สายพันธุ์จุลินทรีย์ | ลักษณะโคโลนี | ภาพแสดงลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง | ลักษณะเซลล์ไต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40x) |
|---|--|--|--|
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain A17(รหัส T3) | โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน โคโลนีแผ่ขยาย ผิวหน้าโคโลนีเป็นคลื่น แบบราบ ขอบโคโลนีหยัก |  |  |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain E28(รหัส V3) | โคโลนีสีน้ำตาลอ่อน โคโลนีแผ่ขยาย ผิวหน้าโคโลนีเป็นคลื่น แบบราบ ขอบโคโลนีหยัก |  |  |

ตารางที่ 4.2 การเกิดบริเวณใสของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งไตรบูไทรีน(Tributylin agar)

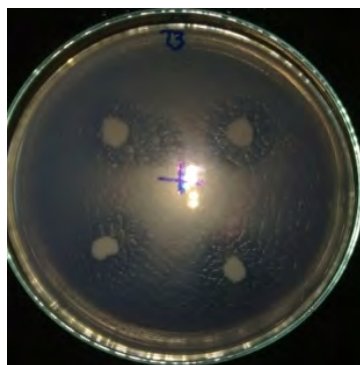
การเกิดบริเวณใสของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารแข็งไตรบูไทรีน(tributylin agar)



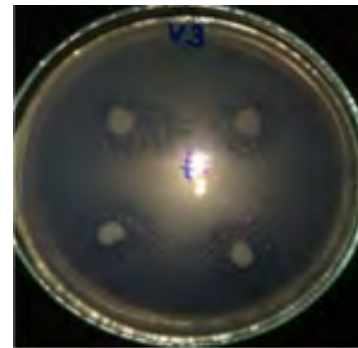
Yarrowialipolytica(รหัส Y2)



Candida tropicalis strain Vaucher(รหัส L9)



Bacillus subtilis subsp. subtilis strain A17 (รหัส T3)

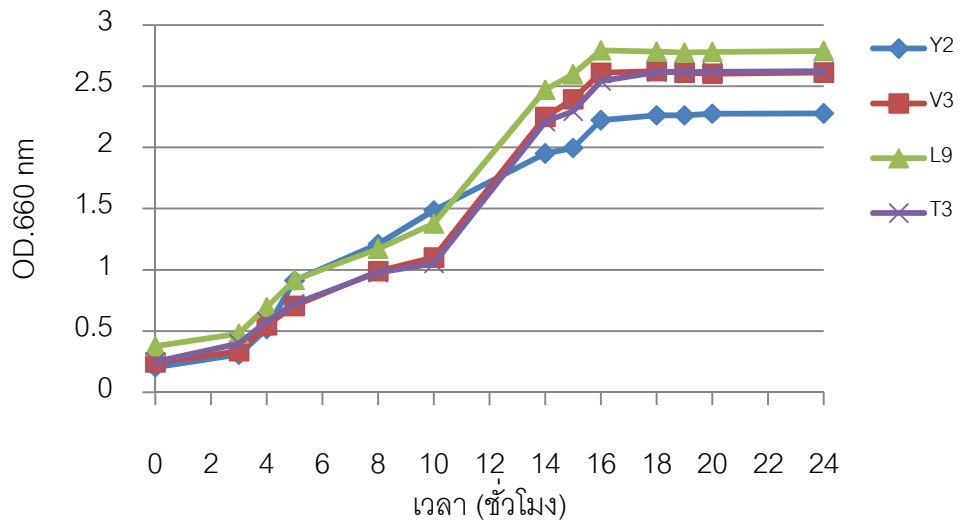


Bacillus subtilis subsp. subtilis strain E28 (รหัส V3)

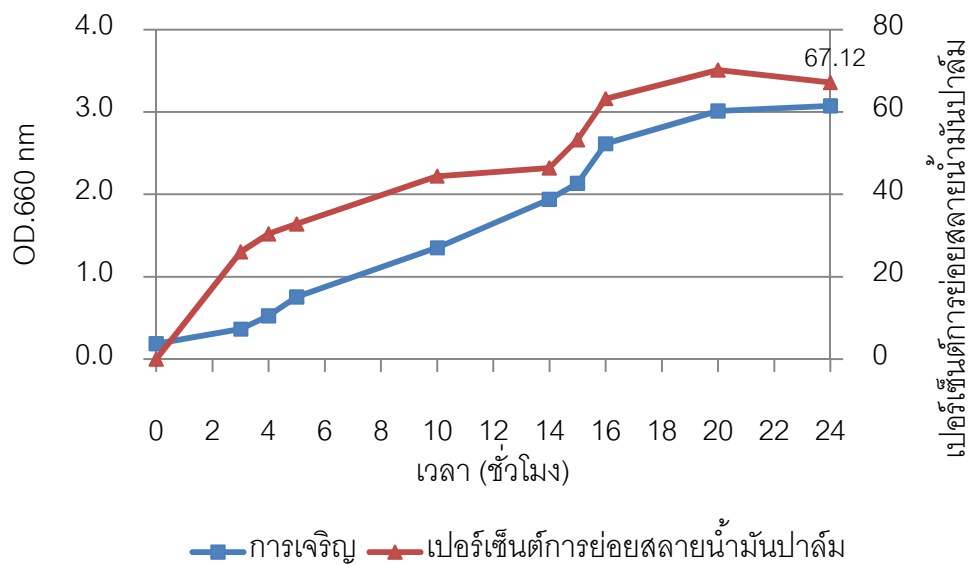
4.2 ศึกษาการเจริญอัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมันของ จุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วในขวดเขย่า

เนื่องจากจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ คัดเลือกมาจากการวิจัยของ จุฑาทกานต์ บุญมี (2553) เรื่องการสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันดั่งนั้นในการศึกษาการเจริญ และหาอัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในตอนแรกจึงเลือกให้สภาวะจากการวิจัยดังกล่าว คือ บ่มที่เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 และปริมาณหัวเชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อพิสูจน์ว่าจุลินทรีย์ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มอยู่หรือไม่

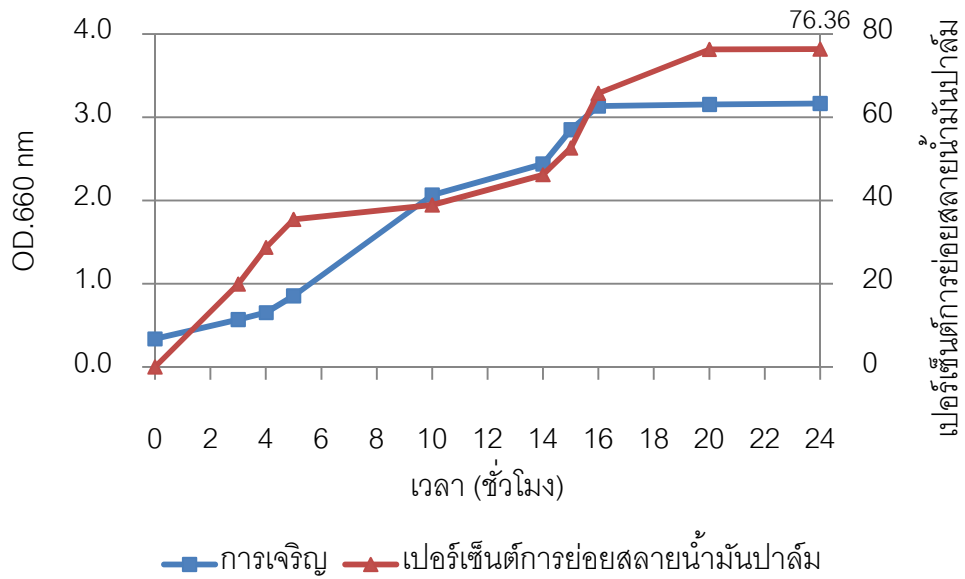
โดยเริ่มจากเลี้ยงแบคทีเรียลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และยีสต์ลงในอาหาร yeast extract-malt extract broth (YM) เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้วเปิดเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร (ปริมาณหัว 4 เปอร์เซ็นต์) ลงในอาหารเหลวน้ำมันปาล์มปริมาณ 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากมีการศึกษาการเจริญในอาหารเหลวน้ำมันปาล์มในช่วงเริ่มต้นของการทดลองและพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีช่วงการเปลี่ยนเฟส (จากช่วง lag phase เป็น log phase) ในชั่วโมงที่ 3, 4, 5 (จากช่วง log phase เป็น stationary phase) ในชั่วโมงที่ 14, 15, 16 แสดงดังภาพที่ 4.1 โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะมีการสร้างเอนไซม์ออกมามากในช่วงที่มีการเปลี่ยนเฟสดังนั้นจึงเลือกเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่มีการเปลี่ยนเฟสของการเจริญ คือ ชั่วโมงที่ 0, 3, 4, 5, 10, 14, 15, 16, 20 และ 24 (ช่วง stationary phase) วัดค่า OD.600 นาโนเมตรและศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพิจารณาจากพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี TLC-FID และนำผลจากพื้นที่ใต้กราฟไตรกลีเซอไรด์มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานปริมาณน้ำมันปาล์มและทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)



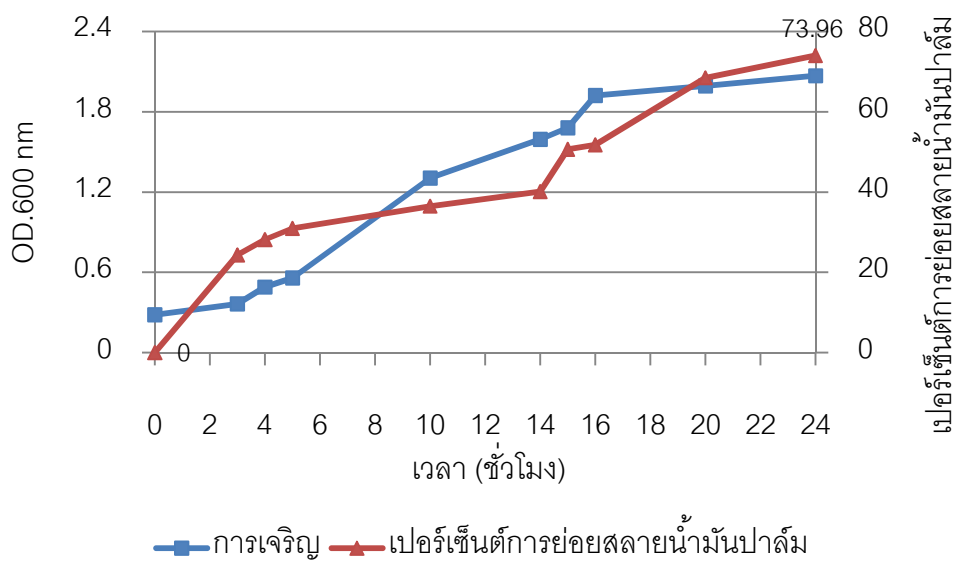
ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ บนอาหารเหลวไขมันปาล์ม



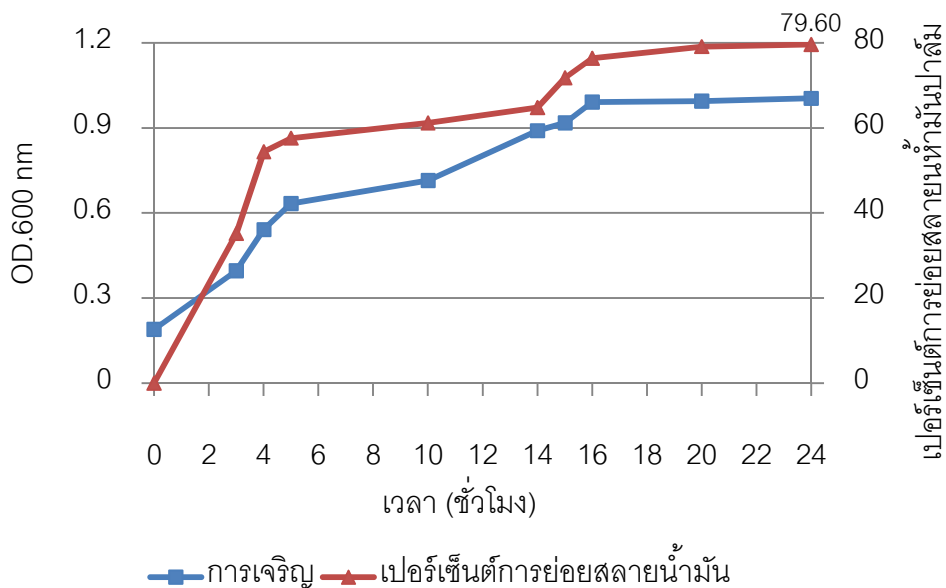
ภาพที่ 4.2 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย *Yarrowia lipolytica* (จุลินทรีย์รหัส Y2)



ภาพที่ 4.3 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย *Candida tropicalis* strain vaucher (L9)



ภาพที่ 4.4 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3)



ภาพที่ 4.5 การเจริญและการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนโดย *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3)

จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการเจริญและอัตราการย่อยสลายที่สัมพันธ์กันคือ เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราการเจริญเติบโตเมื่อพิจารณา ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พบว่า *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุดโดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนได้ 79.60 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และบ่มที่เครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีดังรูปที่ 4.4สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เป็นอันดับที่สองคือ *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 76.36 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 73.96 เปอร์เซ็นต์ และ *Yarrowia lipolytica* (Y2) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 67.12 เปอร์เซ็นต์ดังรูปที่ 4.2, 4.3 และ 4.1 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันปาล์มกับงานวิจัยของ จุฑากานต์ บุญมี (2553) ที่ 24 ชั่วโมงพบว่า เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวน้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสูงกว่าของ จุฑากานต์ บุญมี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์มี

ค่าดังนี้ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุด 48.41 เปอร์เซ็นต์อันดับที่สองคือ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 28.95 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ *Yarrowia lipolytica* (Y2) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 2.88 เปอร์เซ็นต์และ *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 2.18 เปอร์เซ็นต์

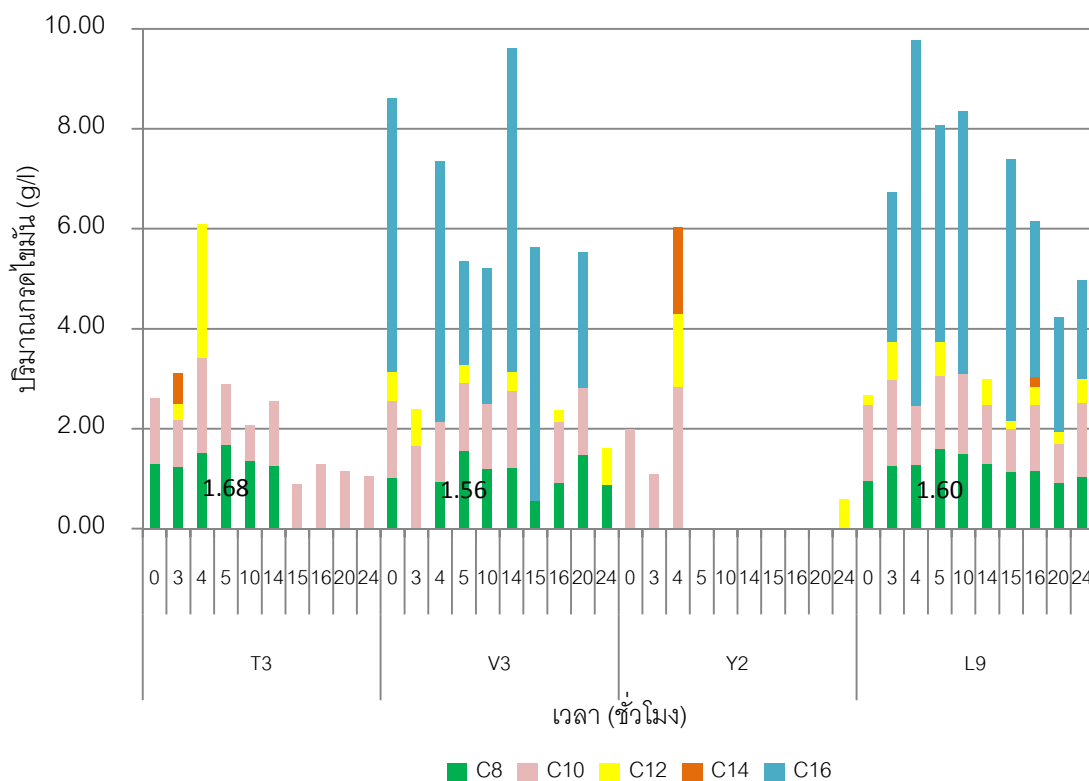
เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันนั้นแตกต่างกันจึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่ได้ออกมานั้นแตกต่างกันถึงแม้ว่าจะใช้จุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์เหมือนกันก็ตาม และนอกจากนั้นองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต เช่น แห้งโตรเจน (แบคโตเปปโตเน ผงสกัดจากยีสต์ ผงสกัดจากเนื้อ) ที่จำเป็นสำหรับการสร้างเซลล์ของจุลินทรีย์ในอาหารน้ำเสียสังเคราะห์ (แบคโตเปปโตเน 0.6 กรัม ผงสกัดจากเนื้อ 0.4 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 1 กรัม ยูเรีย 0.1 กรัม Na_2HPO_4 0.1 กรัม NaCl 0.014 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.014 กรัม KCl 0.014 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัม Tween 80 0.5 มิลลิลิตร และน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) มีน้อยกว่าในอาหารเหลว น้ำมันปาล์ม (แบคโตเปปโตเน 5 กรัม ผงสกัดจากยีสต์ 1 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัม KH_2PO_4 5 กรัม และน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) ถึง 5 เท่า จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายที่น้อยกว่า

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันของแต่ละสายพันธุ์ (ภาพที่ 4.6) พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของกรดไขมันโดย *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3) และ *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) มีปริมาณกรดไขมันรวมสูงที่สุดและมีแนวโน้มของปริมาณกรดคาปริลิก (C8) และกรดคาปริก (C10) สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 5 เช่นเดียวกับ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3) ส่วน *Yarrowia lipolytica* (Y2) มีปริมาณกรดไขมันรวมสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 4 และไม่พบกรดไขมันทุกชนิดหลังจากชั่วโมงที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่าระหว่างการเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ไม่พบกรดไมริสติก (C14) และกรดปาล์มิติก (C16) อีกด้วย อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีการย่อยสลายกรดปาล์มิติก (C16) และนำกรดไขมันที่ได้เข้าสู่เซลล์จนหมดหลังจากชั่วโมงที่ 4

น้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีปริมาณของกรดปาล์มิติกและกรดโอเลอิกสูงจากทฤษฎีการย่อยกรดไขมันของจุลินทรีย์ กรดไขมันอิสระที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันด้วยเอนไซม์ไลเปสจะถูกผ่านกระบวนการบีต้าออกซิเดชัน (Beta-oxidation) ได้เป็น Acetyl CoA และ

Fatty acyl CoA ที่มีคาร์บอนลดลงไป 2 อะตอมเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงาน (Papanikolaou และ Aggelis, 2003) ดังนั้นปริมาณกรดไขมันน่าจะเป็นสัดส่วนกันคือหากมีการย่อยสลายกรดสเตียริก (C18) จะได้ กรดปาล์มิติก (C16) และเมื่อมีการย่อยสลายต่อไปเรื่อยๆเพื่อให้ได้กรดไขมันสายสั้นที่จุลินทรีย์สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้จะได้ กรดไมริสติก (C14) กรดลอริก (C12) กรดคาปริก (C10) กรดปริลิก (C8) และกรดไขมันสายสั้นตัวอื่นๆต่อไป และสัดส่วนของกรดไขมันควรจะมีความที่ลดลงเมื่อเข้าสู่ช่วงการเจริญตอนปลาย (stationary phase) แต่กลับพบว่าในการเลี้ยง *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3) กลับพบกรดปาล์มิติก (C16) ในช่วงเวลาที่ 20 แต่ไม่พบในช่วงเวลาที่ 16 ซึ่งกรดไขมันดังกล่าวควรจะถูกย่อยสลายไปหมดแล้วในช่วงนี้อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการดูแลตัวอย่างออกมาวิเคราะห์นั้นมีการดูแลเอาน้ำมันส่วนที่ไม่ได้ถูกย่อยสลายไปและยังลอยอยู่ที่ผิวหน้าซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะตรวจพบกรดปาล์มิติก (C16) ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาแนวโน้มของกรดไขมันจำแนกตามประเภทพบว่ากรดคาปริลิก (C8) มีราคาสูงที่สุดในกรดไขมันทุกประเภท และมีแนวโน้มของราคาเพิ่มสูงขึ้นทุกปี โดยกรดคาปริลิก (C8) จะถูกนำไปใช้ในการผลิตเอสเทอร์เพื่อใช้สำหรับการผลิตน้ำหอมและสีย้อม นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา ยีสต์ และแบคทีเรียจึงเลือกที่จะศึกษากรดไขมันชนิดนี้ โดยจากผลการวิเคราะห์ของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์(ภาพที่ 4.6) กรดคาปริลิก (C8) มีปริมาณสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 5 ยกเว้น *Yarrowia lipolytica* (Y2) ที่ไม่พบกรดคาปริลิก (C8) ในระหว่างการเลี้ยง จึงเลือกชั่วโมงที่ 5 สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบการทดลองถัดไป



ภาพที่ 4.6 ปริมาณกรดไขมันที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) และ แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3)

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสม(mixed culture)ในขวดเขย่า

ในการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันนั้น จำเป็นต้องมีปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับส่งเสริมให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายน้ำมันสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญโดยปัจจัยที่เหมาะสมนั้นมีทั้งปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน และปัจจัยทางเคมี เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ(แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ)

Arafiles และคณะ (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างมวลชีวภาพและกรดไขมันของ *Thraustochytrids* โดยทำการแปรผันปัจจัยต่างๆ 4ปัจจัย คือ อุณหภูมิในการบ่ม ความ

เข้มข้นของน้ำทะเล ความเข้มข้นของกลูโคส และพีเอช พบว่าที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำทะเล 50-60 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ความเข้มข้นของกลูโคส 3-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และพีเอช 6 นั้นให้ปริมาณมวลชีวภาพที่สูง และได้กรดไขมันดังนี้ กรดโอเลอิก (Oleic acid) 70.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรดปาล์มิติก (Palmitic acid) 17.7 เปอร์เซ็นต์ และกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) 11.7 เปอร์เซ็นต์

Anamnart และคณะ (1998) ศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในยีสต์ *Hansenulapolyomorpha* ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวสูงขึ้นและปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะลดลง เนื่องจากจากเซลล์ของยีสต์ต้องรักษาความยืดหยุ่นเยื่อหุ้มเซลล์ให้เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต

Azeem และคณะ (1999) ศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของรา 4 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus nidulans* (Ri-1.473), *Aspergillus sydowii* (Ri-1.474), *Fusarium oxysporum* (Ri-1.470) และ *Fusarium quisetti* (Ri-1.471) โดยเลือกพีเอชเป็นปัจจัยทางกายภาพที่ใช้ในการศึกษา และปัจจัยอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (ซูโครส) แหล่งไนโตรเจน (NH_4NO_3) แร่ธาตุ ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) จากการศึกษาพบว่าที่ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.8 ให้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิ่มตัวคือ กรดโอเลอิก (Oleic acid) สูงที่สุด รองลงมาคือ กรดปาล์มิติก (Palmitic acid)

Serri และคณะ (2008) ศึกษากรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วด้วย *Candida rugosa* โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ พีเอช 6.5-8.5 อุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 180-260 รอบต่อนาที และปริมาณน้ำมัน 0.1-0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และปริมาณน้ำมัน 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร

จากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าปัจจัยที่สำคัญและถูกเลือกมาสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันนั้น ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ สารอาหารโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่เป็นแหล่งสำคัญในการสร้างพลังงาน

และเซลล์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงเลือกปัจจัย พีเอช อุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอน สำหรับทำการทดลองแบบเชิงแฟคทอเรียล (factorial experiment) ต่อไป

4.3.1 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบเชิงแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) แบบ 2^k

ตารางที่ 4.3 ปัจจัย และระดับที่ใช้ในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสม

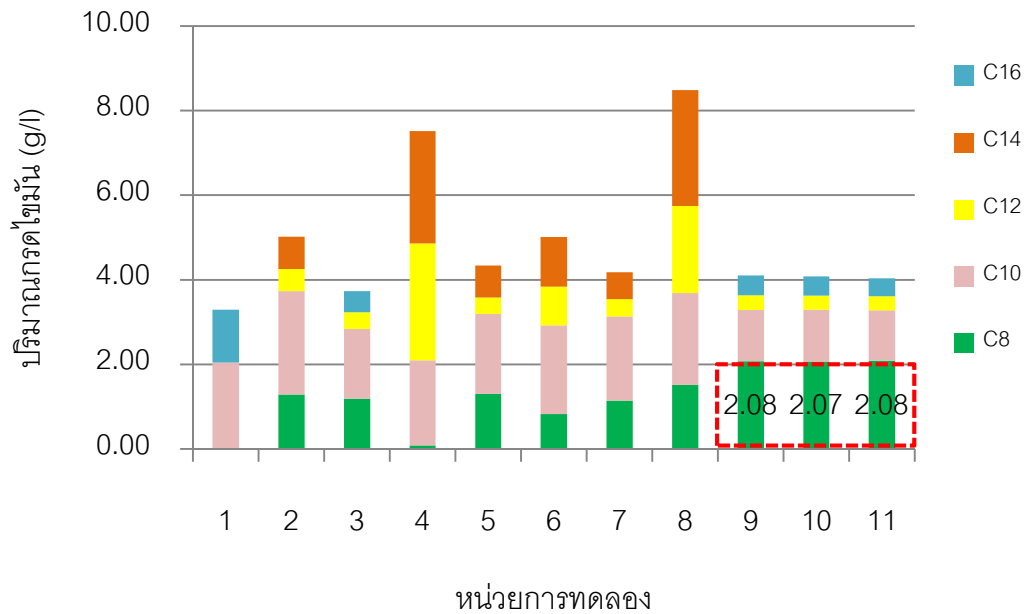
| ปัจจัย | ระดับ | | |
|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | ระดับต่ำ (-1) | ระดับกลาง (0) | ระดับสูง (+1) |
| พีเอช; A | 6.5 | 7.5 | 8.5 |
| อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$); B | 30 | 37 | 45 |
| เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอน; C | 1% | 2.5% | 5% |

ตารางที่ 4.4 ปัจจัย และระดับที่ใช้ในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมแบบแฟคทอเรียล

| หน่วยการทดลอง | ปัจจัย | | |
|---------------|--------|----------|-----------------------|
| | พีเอช | อุณหภูมิ | ร้อยละของแหล่งคาร์บอน |
| 1 | 6.5 | 30 | 1 |
| 2 | 6.5 | 30 | 5 |
| 3 | 6.5 | 45 | 1 |
| 4 | 6.5 | 45 | 5 |
| 5 | 8.5 | 30 | 1 |
| 6 | 8.5 | 30 | 5 |
| 7 | 8.5 | 45 | 1 |
| 8 | 8.5 | 45 | 5 |
| 9 | 7.5 | 37 | 2.5 |
| 10 | 7.5 | 37 | 2.5 |
| 11 | 7.5 | 37 | 2.5 |

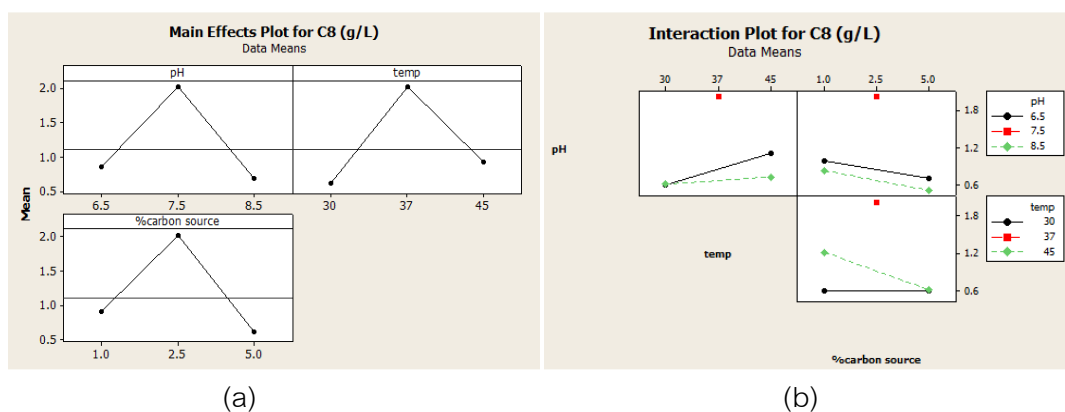
Sirisha และคณะ (2010) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันพบว่าที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้น้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์เป็นคาร์บอน ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 25 หน่วย ต่อมิลลิลิตร และในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. Lp12 ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันของ Pogaku และคณะ (2009) พบว่าที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และน้ำมันมะกอก 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 4.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้ จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันของ จุฬากานต์ บุญมี (2553) เช่นกัน แต่ในงานวิจัย ของ จุฬากานต์ บุญมี สภาวะที่ใช้ คือ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและใช้น้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์เป็นคาร์บอนให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดคือ 3.00 หน่วยต่อมิลลิลิตร

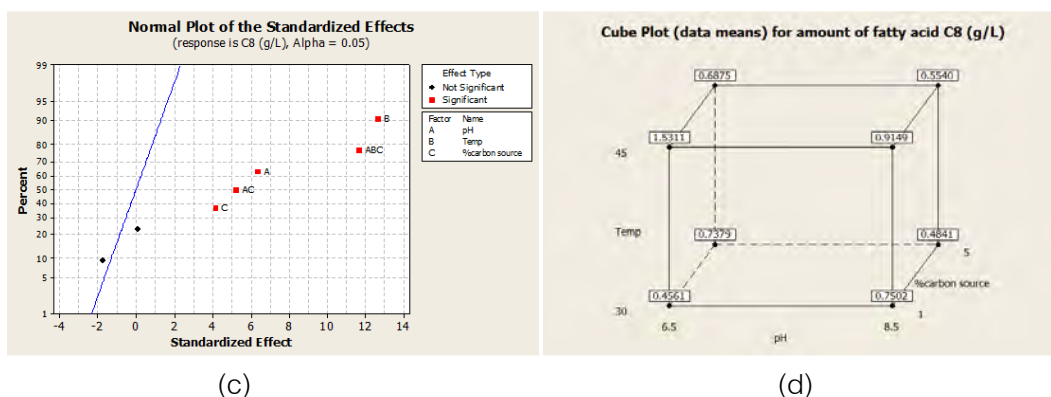
เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันเพื่อให้ได้กรดไขมันดังนั้นการศึกษา ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมจึงเลือกแปรผันปัจจัย พีเอชในช่วง 6.5-8.5 โดยให้ค่าพีเอชที่ 7.5 เป็นค่ากลาง (ค่าปัจจัยควบคุม) ปัจจัยที่สองคือ อุณหภูมิในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าอุณหภูมิที่ 37 เป็นค่ากลาง(ค่าปัจจัยควบคุม) ทั้งนี้พีเอชและอุณหภูมินั้น มีผลต่อเอนไซม์ที่ผลิตออกโดยประจุของพีเอชจะมีผลต่อตำแหน่งที่จับกันระหว่างเอนไซม์กับ ซับสเตรท และอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไปนั้นส่งผลต่อการเสถียรภาพของเอนไซม์ทำให้บริเวณ ตำแหน่งเร่งหรือเข้าจับกับซับสเตรทของเอนไซม์นั้นเปลี่ยนไปเช่นกันส่งผลต่อค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ในการย่อยสลาย และปัจจัยที่สามคือร้อยละของแหล่งคาร์บอนในช่วง 1-5 เปอร์เซ็นต์ โดย ให้ค่าร้อยละของแหล่งคาร์บอนที่ 2.5 เป็นค่ากลาง (ค่าปัจจัยควบคุม) แสดงดังตารางที่ 4.8 เนื่องจากการศึกษานี้ต้องการหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันดังนั้นปัจจัย ร้อยละของแหล่งคาร์บอนจึงแปรผันค่ากลางให้มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับ การผลิตเอนไซม์ไลเปส และค่าร้อยละของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 2.5 นั้นเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ ปริมาณของน้ำมันที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเสียด้วย



ภาพที่ 4.7 ปริมาณกรดไขมันที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การการทดลองพบว่าที่สภาวะควบคุม (หน่วยการทดลองที่ 9, 10 และ 11) ที่เอช 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) สูง จึงเลือกสภาวะนี้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป นอกจากนี้สภาวะดังกล่าวยังทำให้ได้ปริมาณของกรดคาปริก (C10) และกรดไมริสติก (C14) สูงอีกด้วย และยังพบว่าหน่วยการทดลองควบคุม ปริมาณของ กรดคาปริก (C10) มีปริมาณสูงสุด แสดงดังภาพที่ 4.7





ภาพที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณกรดคาปริก (C8) ด้วยวิธีทางสถิติ (a) แผนภูมิแสดงปัจจัยหลัก (b) แผนภูมิแสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (c) แผนภาพแสดงการกระจายแบบปกติของปัจจัยต่างๆ โดยปัจจัยที่ศึกษาที่มีนัยสำคัญทางสถิติจะแสดงด้วยสัญลักษณ์สี่เหลี่ยม (d) แผนภูมิ cube plot แสดงปริมาณกรดไขมันที่ได้ในแต่ละสภาวะที่มุมของลูกบาศก์

ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติเมื่อแยกพิจารณาปัจจัยหลัก (main effect) ที่มีผลต่อปริมาณกรดคาปริก (C8) พบว่าค่าระดับกลางของปัจจัยทั้ง พีเอช อุณหภูมิ และร้อยละของแหล่งคาร์บอนนั้นให้ปริมาณกรดไขมันเฉลี่ยเด่นค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดไขมันทั้ง 11 หน่วยการทดลอง นั่นคือที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 4.8 (a)

เมื่อพิจารณาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (interaction effect) ที่มีผลต่อปริมาณกรดคาปริก (C8) ภาพที่ 4.8 (b) สามารถอธิบายได้ดังนี้คือ

1) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและอุณหภูมิที่ค่าระดับกลางคือ พีเอชเท่ากับ 7.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ได้กรดคาปริก (C8) ในปริมาณสูงที่สุด โดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยนี้มีผลต่อกันในเชิงบวกคือ เมื่อเพิ่มระดับของอุณหภูมิที่ระดับค่าของพีเอช 6.5 และ 8.5 ต่างทำให้ผลผลิตกรดคาปริก (C8) นั้นเพิ่มสูงขึ้นสังเกตได้จากเส้นกราฟทั้งสองเส้นที่ ชันขึ้น

2) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพีเอชและร้อยละของแหล่งคาร์บอน ที่ระดับค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 และแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ได้กรดคาปริก (C8) ในปริมาณสูงที่สุดในขณะเดียวกันปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยนี้มีผลต่อกันในเชิงลบสังเกตได้จากความชันของ

เส้นกราฟที่ลดลงคือเมื่อเพิ่มระดับร้อยละของแหล่งคาร์บอนทั้งที่พีเอช 6.5 และ 8.5 นั้นทำให้ผลผลิตกรดคาปริลิก (C8) ลดลง

3) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและร้อยละของแหล่งคาร์บอนที่ระดับค่าอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ได้กรดไขมันในปริมาณสูงที่สุดในขณะเดียวกันปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยนี้มีผลต่อกันในเชิงลบสังเกตได้จากความชันของเส้นกราฟที่ลดลงคือเมื่อเพิ่มระดับร้อยละของแหล่งคาร์บอนทั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ 45 องศาเซลเซียสนั้นทำให้ผลผลิตกรดคาปริลิก (C8) ลดลง

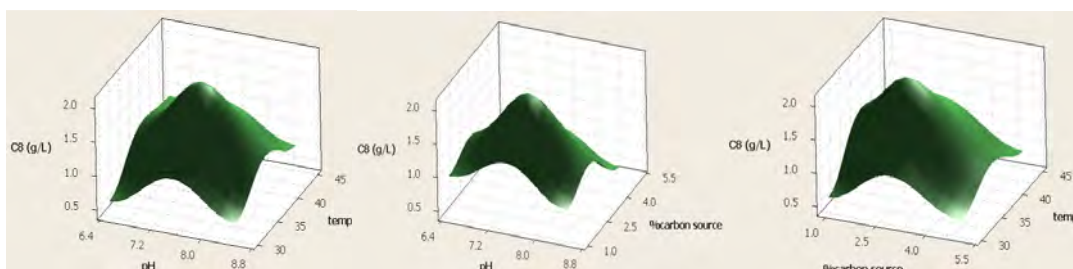
Haaland และคณะ (1989) กล่าวถึงอิทธิพลร่วมระหว่างสองปัจจัยว่าถ้าเส้นสองเส้นไม่ตัดผ่านกันแสดงว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยไม่ได้สำคัญไปกว่าปัจจัยหลัก (พีเอช อุณหภูมิ และร้อยละแหล่งคาร์บอน) และถ้าหากเส้นสองเส้นตัดผ่านกันแสดงว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยสำคัญและมีอิทธิพลต่อผลผลิตมากกว่าปัจจัยหลัก ซึ่งจากภาพที่ 4.9 (b) นั้นแสดงให้เห็นถึงปัจจัยร่วมระหว่าง พีเอช และอุณหภูมิ ที่เส้นสองเส้นตัดกันและมีปฏิสัมพันธ์ในเชิงบวกแสดงว่าปัจจัยร่วมระหว่าง พีเอช และอุณหภูมิ มีอิทธิพลมากกว่าปัจจัยหลัก

จากภาพที่ 4.8 (c) แสดงถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่าตอบสนองของปริมาณกรดคาปริลิก (C8) โดยปัจจัยที่ศึกษาที่มีนัยสำคัญทางสถิติจะแสดงด้วยสัญลักษณ์สี่เหลี่ยม และจากผลการวิเคราะห์พบว่ากรดคาปริลิก (C8) มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญตอบสนองต่อปัจจัย พีเอชอุณหภูมิ และร้อยละของแหล่งคาร์บอน สองปัจจัยระหว่าง พีเอช และเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอนสามปัจจัยร่วมระหว่าง พีเอช อุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี response surface methodology (RSM) สำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับค่าการตอบสนองที่สนใจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยใช้การวิเคราะห์แบบ multiple analysis ถ้าตัวแปรใดมีผลต่อค่าการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏในสมการอันดับสอง (Montgomery, 1991) แสดงดังสมการที่ 1 และภาพ 3 มิติกราฟพื้นผิวตอบสนอง(response surface) แสดงดังภาพที่ 4.9

สมการกำลังสอง

$$\text{กรดคาปริลิก (C8)} = -12.064 + 0.106 \cdot \text{pH} + 0.471 \cdot \text{Temp} - 0.560 \cdot \text{Oil} - 0.230 \cdot \text{Oil}^2 - 0.011 \cdot \text{pHTemp} + 0.003 \cdot \text{pHTempOil} \quad (\text{สมการที่ 1})$$

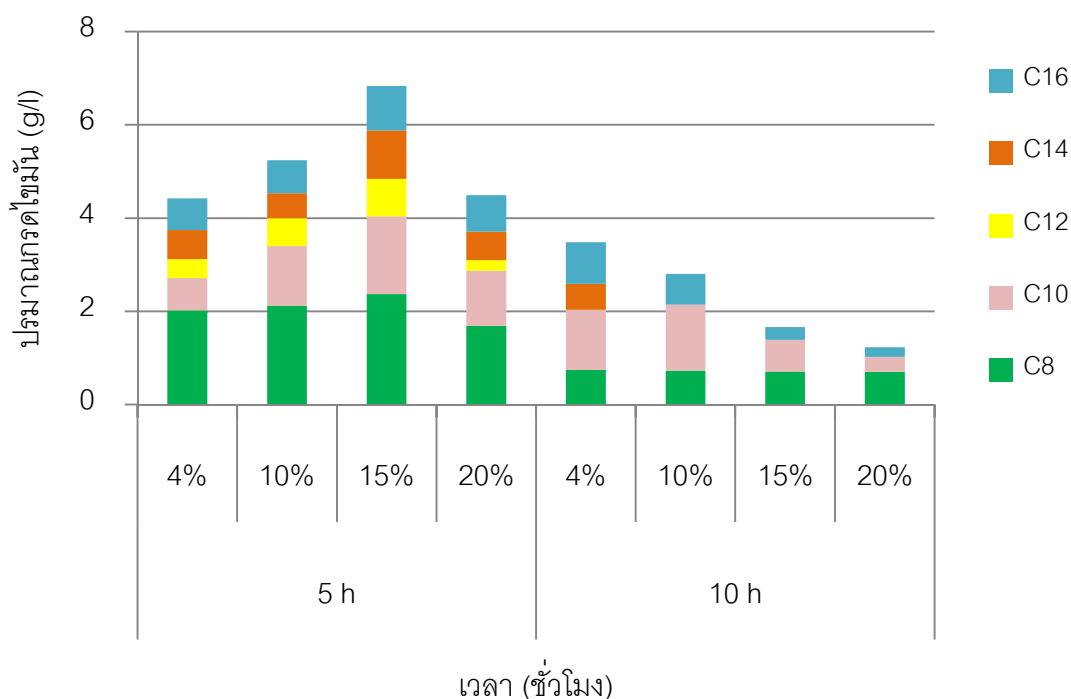


ภาพที่ 4.9 ภาพ 3 มิติกราฟพื้นผิวตอบสนองระหว่างสองปัจจัย

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการผลิตกรดคาปริลิกในชั่วโมงที่ 5 ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์และจุลินทรีย์ผสม พบว่าการผลิต (C8) โดยใช้จุลินทรีย์ผสมนั้นให้ปริมาณกรดไขมันที่เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการผลิตกรดไขมันของ *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain A17 (T3) (1.68 กรัมต่อลิตร) *Bacillus subtilis subsp. subtilis* strain E28 (V3) (1.56 กรัมต่อลิตร) และ *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) (1.60 กรัมต่อลิตร) จึงเลือกใช้จุลินทรีย์ผสมในการผลิตกรดไขมันในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพต่อไป

4.3.2 ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสมในขวดเขย่า

เนื่องจากการย่อยสลายน้ำมันต้องใช้เอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์จึงจำเป็นต้องหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม เจริญเติบโตได้เร็วพอ สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีและให้กรดไขมันได้ในปริมาณสูง ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 4 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ติดตามการเจริญโดยการวัดค่า OD.600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)



ภาพที่ 4.10 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) เมื่อแปรผันปริมาณหัวเชื้อที่เวลา 5 และ 10 ชั่วโมง

เตรียมหัวเชื้อผสมเริ่มต้น (mixed culture) อายุ 16 ชั่วโมงโดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 4.3.2 คือพีเอช 7.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ติดตามการเจริญและกรดไขมันที่ 0, 3, 4, 5 และ 10 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาที่เวลา 5 ชั่วโมงพบว่า เมื่อใช้หัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ให้ กรดคาปริลิก (C8) มากที่สุดเท่ากับ 2.37 กรัมต่อลิตร อันดับที่สองคือ ที่หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ให้ กรดคาปริลิก (C8) เท่ากับ 2.12 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ เมื่อใช้หัวเชื้อที่ 4 เปอร์เซ็นต์ให้กรดคาปริลิก (C8) เท่ากับ 2.02 กรัมต่อลิตร และหัวเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์ให้กรดคาปริลิก (C8) เท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.10) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ายิ่งเพิ่มเปอร์เซ็นต์หัวเชื้อก็ยิ่งทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันที่สูงขึ้นแต่เมื่อเพิ่มหัวเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์กลับทำให้ได้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) น้อยลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่มีปริมาณหัวเชื้อมากเกินไปนั้นทำให้จุลินทรีย์นำกรดไขมันที่ย่อยได้เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่า และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณหัวเชื้อและกรดคาปริลิก (C8) ที่ได้นั้นสรุปได้ดังตาราง 4.7

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณหัวเชื้อ กรดคาปริลิก (C8) และ OD.600 นาโนเมตร ที่เวลา 5 ชั่วโมง

| ปริมาณหัวเชื้อ (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) | ปริมาณของหัวเชื้อที่ เพิ่มขึ้น (ปริมาตรต่อปริมาตร) | ปริมาณกรดคาปริลิก(C8) ที่เพิ่มขึ้น/ลดลง (กรัมต่อลิตร) | OD.600 nm |
|---|--|---|-----------|
| 4% | 0% | 0 | 1.296 |
| 10% | +6% | +0.1 | 1.588 |
| 15% | +5% | +0.25 | 1.808 |
| 20% | +5% | -0.68 | 2.002 |

หมายเหตุ : + คือเพิ่มขึ้น, - คือลดลง

เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาณหัวเชื้อที่เพิ่มขึ้นและปริมาณความแตกต่างของกรดคาปริลิก (C8) ที่ได้ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อจาก 10 เปอร์เซ็นต์เป็น 15 เปอร์เซ็นต์นั้นได้กรดคาปริลิก (C8) เพิ่มขึ้นถึง 0.25 กรัมต่อลิตร และมากกว่า 0.15 กรัมต่อลิตรเมื่อเทียบกับปริมาณหัวเชื้อที่เพิ่มขึ้นจาก 4 เปอร์เซ็นต์ เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่ปริมาณหัวเชื้อที่เพิ่มขึ้นแตกต่างกันแค่ 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้ออีก 5 เปอร์เซ็นต์เป็น 20 เปอร์เซ็นต์กลับพบว่าได้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) ลดลงถึง 0.68 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดโดยให้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) ถึง 2.37 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 5 และวัดค่าการเจริญของเซลล์จากค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 1.808 จึงเลือกปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.4 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

การเลือกใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพในงานวิจัยนี้เป็นถังปฏิกรณ์เดียวกันกับที่ใช้ในงานวิจัยของ สกุรัตน์ พุกกะวรรณะ (2548) โดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพสำหรับการย่อยสลายน้ำมันดิบโดยกลุ่มจุลินทรีย์ และชนภักฎ์ ลักษณะวิลาศ (2553) ใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบคทีเรียจากรา *Penicillium* sp. H12

โดยระบบแบบแผ่นหมุนชีวภาพมีข้อดี คือประหยัดค่าไฟฟ้าเนื่องจากใช้มอเตอร์ในการหมุนเพลลาอย่างช้าๆเท่านั้น ใช้พื้นที่ในการเดินระบบน้อย และส่งกลิ่นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับระบบอื่นๆ นอกจากนี้จากการสังเกตลักษณะของโคโลนีบนจานอาหารแข็งพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างเมือกชีวภาพได้ซึ่งการสร้างเมือกชีวภาพนี้มีความจำเป็นมากสำหรับระบบนี้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพมาประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตกรดไขมันและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากระบบอื่นๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไป

การศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อผสมเริ่มต้น (mixed culture) อายุ 16 ชั่วโมง ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากข้อ 4.3.3 ใช้อัตราการผลิต 2 รอบต่อนาที และทำการผลิตโดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 4.3.2 คือค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่ 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำมันเริ่มต้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้แผ่นหมุนจมลงใต้อาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที ทำการหมักจนกระทั่งจุลินทรีย์มีการสร้างเมือกชีวภาพ (biofilm) หนาประมาณ 1-4 มิลลิเมตร (Waskar, 2012) หลังจากนั้นทำการสูบน้ำออกจาก ถังปฏิกรณ์ และเติมอาหารใหม่เข้าไป ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ค่าดูดกลืนแสง 600 นาโน-เมตร สังเกตการสร้างเมือกชีวภาพของจุลินทรีย์บนแผ่นหมุนวิเคราะห์หัววัดปริมาณน้ำมันที่คงเหลือด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบ Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดไขมัน ด้วยโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง High-performance liquid chromatography (HPLC)





วันที่ 2

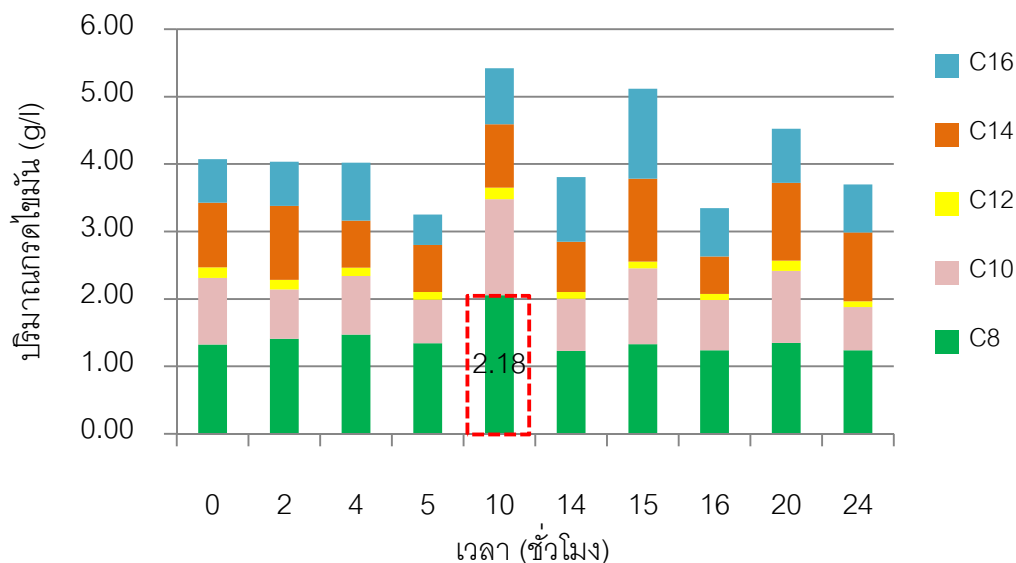


วันที่ 3



วันที่ 4

ภาพที่ 4.11 การเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมวนวันที่ 1-4



ภาพที่ 4.12 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

จากผลการศึกษากการผลิตกรดไขมันแบบกะพบว่า เมื่อคิดเทียบจากเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอน (น้ำมันปาล์ม) ที่เติมเข้าไป คือ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหาร 4 ลิตร คิดเป็นปริมาณน้ำมันทั้งหมด 100 กรัมต่อ 4 ลิตร ในชั่วโมงที่ 10 ได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต ของกรดไขมัน ทั้ง 6 ชนิดรวมกันเท่ากับ 5.54 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 22.16 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกรดคาปริลิก (C8) สูงที่สุด เท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับ 8.72 เปอร์เซ็นต์ อันดับที่สองคือกรดคาปริก (C10) เท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 5.68 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรดไมริสติก (C14) เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 3.76 เปอร์เซ็นต์ กรดปาลมิติก (C16) เท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตรคิดเป็น 3.32 เปอร์เซ็นต์ และอันดับสุดท้ายคือกรดลอริก (C12) เท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 30.68 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.12) ซึ่งเมื่อเทียบกับการผลิตกรดไขมันแบบกะในขวดเขย่าที่ได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของกรดไขมันทั้ง 6 ชนิดรวมกันเท่ากับ 16.32 เปอร์เซ็นต์ ได้กรดคาปริลิก (C8) ได้มากที่สุดในช่วงที่ 5 เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับ 8.32 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.7)

ทั้งนี้การเพิ่มสเกลของการผลิตให้มีขนาดใหญ่ขึ้นนั้นอาจส่งผลต่อการย่อยสลายและกรดไขมันที่ได้ นอกจากนั้นในการศึกษาในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพนั้นมีการเลี้ยงให้จุลินทรีย์เกาะบนแผ่นหมุนจึงทำให้เวลาที่ผลิตกรดไขมันได้สูงที่สุดเปลี่ยนไปจากการเลี้ยงในขวดเขย่าที่

เซลล์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะอยู่ในอาหารเหลว จึงใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในการทดลองนี้เป็นข้อมูลในการศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพต่อไป

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield)

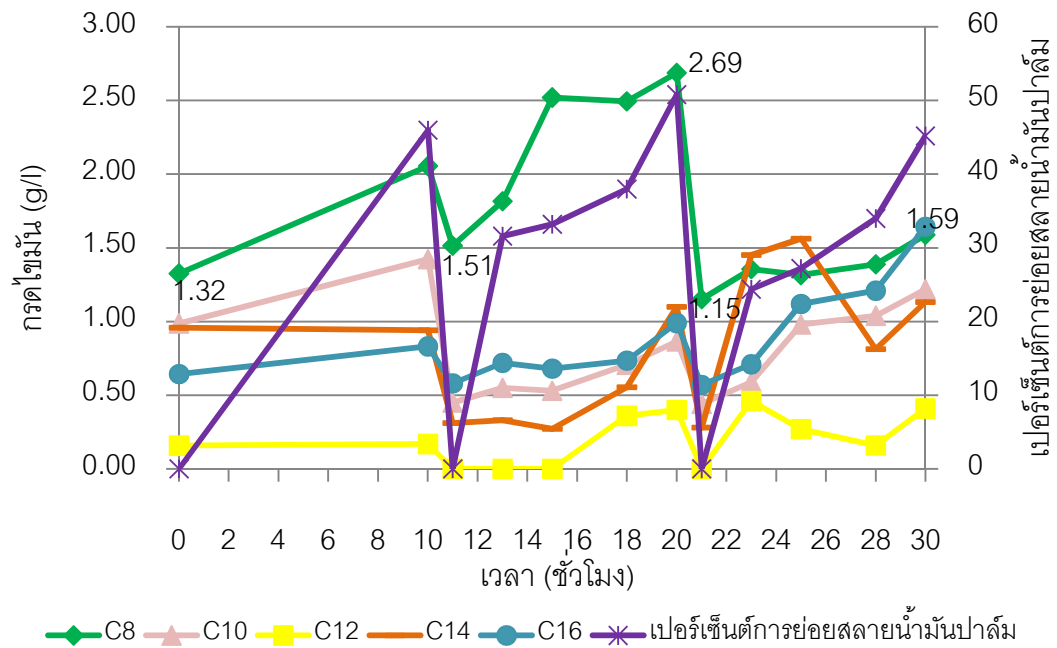
$$\% \text{ yield} = \frac{\text{Fatty acid (g/l)}}{\Delta \text{ Oil (g/l)}}$$

การผลิตกรดไขมันแบบกะ ที่ 10 ชั่วโมง

$$\begin{aligned} \text{กรดไขมันทั้ง 6 ชนิด} &= \frac{5.54 \times 4 \text{ (g/4l)}}{25 \times 4 \text{ (g/4l)}} \times 100 = 22.16 \% \\ \text{กรดคาปริลิก(C8)} &= \frac{2.18 \times 4 \text{ (g/4l)}}{25 \times 4 \text{ (g/4l)}} \times 100 = 8.72 \% \end{aligned}$$

4.5 ศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

จากการศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะพบว่า มีกรดไขมันเกิดขึ้นปริมาณมากใน 10 ชั่วโมงแรกของการหมักและเริ่มลดลงหลังจากนั้น ดังนั้นในการทดลองแบบกึ่งกะจึงเลือกเวลาที่ 10 ชั่วโมงสำหรับการหมัก โดยควบคุมสภาวะการหมักเหมือนข้อ 4.4 ทุกประการ แล้วจึงเติมอาหารที่มีน้ำมัน โดยการเติมน้ำมันในการศึกษาครั้งนี้จะเติมแบบกึ่งกะในปริมาตร 2 ลิตร เติมหหลังจากสูบน้ำออกจากถังปฏิกรณ์ปริมาตร 2 ลิตร เท่ากัน เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 ลิตร เท่าเดิม โดยสามารถคำนวณการเติมน้ำมันจากการผลิตแบบกะที่ชั่วโมงที่ 10 เหลือน้ำมันอยู่ 13.5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการเลี้ยงแบบกึ่งกะจะต้องเอาอาหารออก 2 ลิตร ทำให้เหลือน้ำมันในถังปฏิกรณ์ 27 กรัม ใน 2 ลิตร ต้องการให้อาหารมีความเข้มข้นของน้ำมันคงอยู่ 25 กรัมต่อลิตร โดยในอาหาร 4 ลิตร ต้องมีน้ำมัน 100 กรัม ดังนั้นในอาหาร 2 ลิตรที่จะเติมเข้าไปนั้นต้องมีความเข้มข้นของน้ำมันเท่ากับ $(100-27)/2 = 36.5$ กรัมต่อลิตร โดยทำการเติมอาหาร 2 รอบที่ ชั่วโมงที่ 10 และ 20 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.13 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ



ภาพที่ 4.14 แผ่นอะคริลิกติดด้วยผ้าขาวบางที่มีจุลินทรีย์เกาะความหนา 1.5 มิลลิเมตรเมื่อสิ้นสุดการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะ

ผลการหมักใน 10 ชั่วโมงแรกหลังจากเติมอาหาร 2 ลิตร โดยปรับให้ความเข้มข้นของน้ำมันประมาณ 25 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมันจากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดไขมันในข้อ 4.3.2 หลังการเติมอาหารแล้วปริมาณกรดไขมันทุกชนิดเพิ่มขึ้น ได้กรดไขมันทั้ง 6 ชนิดรวมกันเท่ากับ 5.78 กรัมต่อลิตร คิดเป็น

เปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับ 23.81 เปอร์เซ็นต์ โดยกรดคาปริลิก (C8) เพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 20 เท่ากับ 2.69 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับ 11.08 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 20 แต่หลังจากทำการสูบน้ำออก 2 ลิตร และเติมอาหารรอบที่สองพบว่า ได้กรดไขมันทั้ง 6 ชนิด รวมกันเท่ากับ 5.99 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับ 23.86 เปอร์เซ็นต์ และกรดคาปริลิก (C8) มีความเข้มข้นลดลงเหลือ 1.59 กรัมต่อลิตรคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เท่ากับ 6.33 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั่วโมงที่ 30 แต่กรดคาปริก (C10) และกรดปาลมิติก (C16) กลับมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นกว่า 20 ชั่วโมงแรกของการหมัก (ภาพที่ 4.13)

เปอร์เซ็นต์ผลผลิตทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพเท่ากับ ของกรดไขมันทั้ง 6 ชนิดรวมกันเท่ากับ 22.73 เปอร์เซ็นต์ และได้กรดคาปริลิก (C8) เท่ากับ 9.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ผลผลิตทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพพบว่า การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิต มากกว่าการผลิตกรดไขมันแบบกะ โดยเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของกรดไขมันทั้ง 6 ชนิดรวมกันมากกว่า 2.72 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของกรดคาปริลิก (C8) มากกว่า 2.36 เปอร์เซ็นต์

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield)

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{Fatty acid (g/l)}}{\Delta \text{ Oil (g/l)}}$$

การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะ ที่เวลา 10 ชั่วโมง

$$\text{กรดไขมันทั้ง 6 ชนิด} = \frac{5.42 \times 4 \text{ (g/4l)}}{25 \times 4 \text{ (g/4l)}} \times 100 = 21.68 \%$$

$$\text{กรดคาปริลิก(C8)} = \frac{2.06 \times 4 \text{ (g/4l)}}{25 \times 4 \text{ (g/4l)}} \times 100 = 8.24 \%$$

การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะ ที่เวลา 20 ชั่วโมง

$$\text{กรดไขมันทั้ง 6 ชนิด} = \frac{6.04 \times 4 \text{ (g/4l)}}{(12.3 \times 2) + (36.5 \times 2) \text{ (g/4l)}} \times 100 = 24.88 \%$$

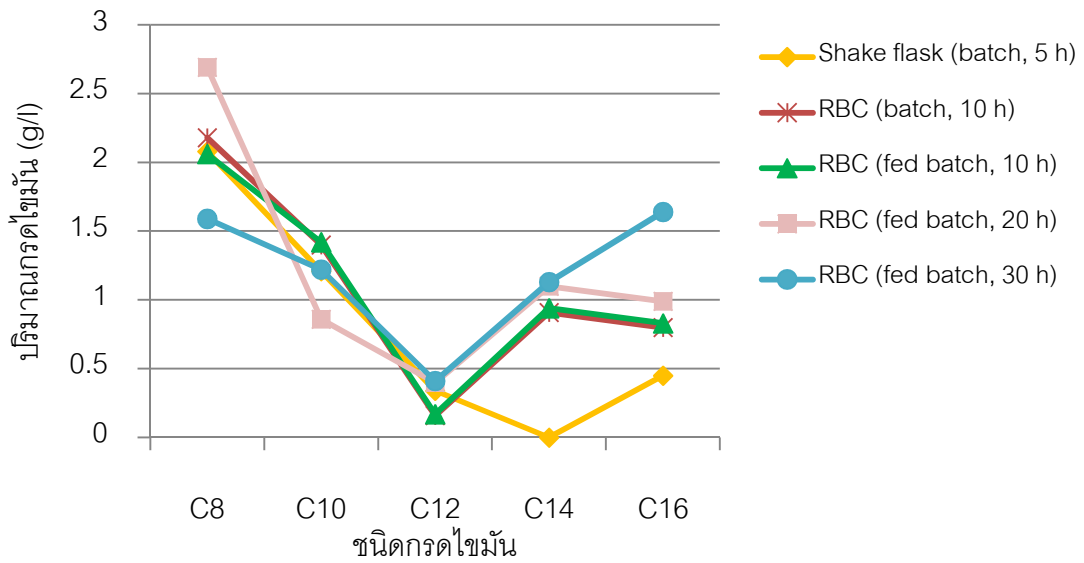
$$\text{กรดคาปริลิก (C8)} = \frac{2.69 \times 4 \text{ (g/l)}}{(12.3 \times 2) + (36.5 \times 2) \text{ (g/4l)}} \times 100 = 11.08 \%$$

การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะ ที่เวลา 30 ชั่วโมง

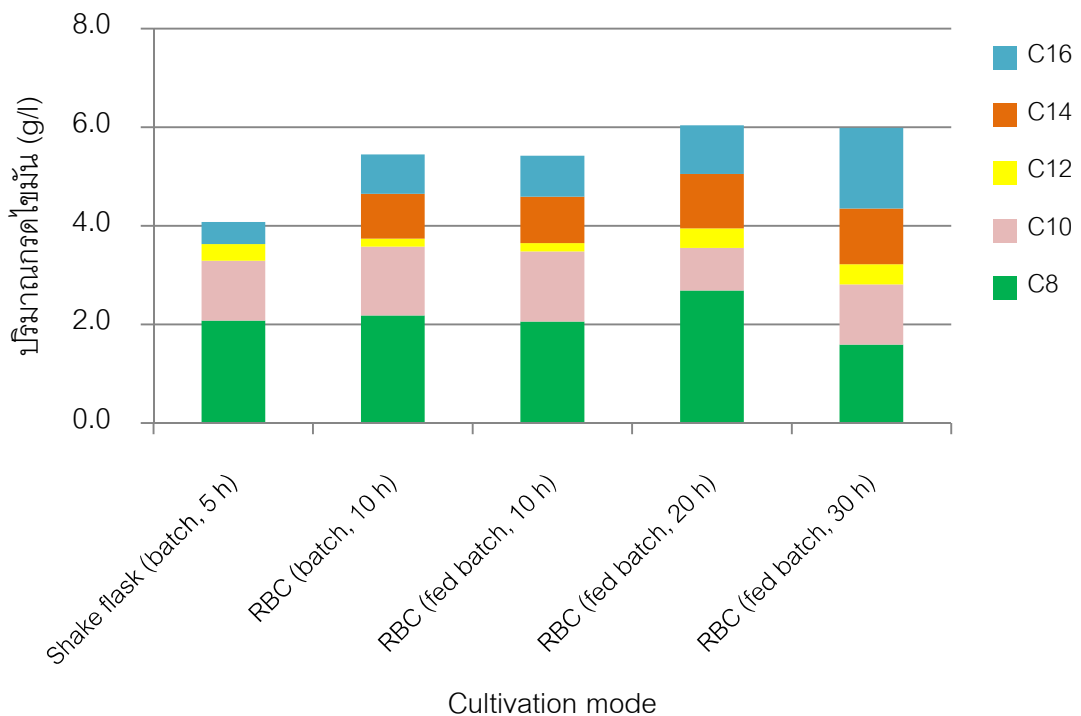
$$\text{กรดไขมันทั้ง 6 ชนิด} = \frac{5.99 \times 4 \text{ (g/4l)}}{(13.72 \times 2) + (36.5 \times 2) \text{ (g/4l)}} \times 100 = 23.86 \%$$

$$\text{กรดคาปริลิก (C8)} = \frac{1.59 \times 4 \text{ (g/l)}}{(13.72 \times 2) + (36.5 \times 2) \text{ (g/4l)}} \times 100 = 6.33 \%$$

เนื่องจากการทดลองต้องการให้จุลินทรีย์สร้างเมือกชีวภาพ (biofilm) และจากการทดลองเริ่มมีการเลี้ยงแบบกะเมื่อเชื้อสร้างเมือกชีวภาพหนา 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.11) และวัดความหนาได้ 1.5 มิลลิเมตร หลังจากเสร็จสิ้นการหมักแบบกึ่งกะ (ภาพที่ 4.14) ซึ่งความหนาที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนของจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่ภายในซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันและการผลิตเอนไซม์ไลเปสสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันที่ลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และระหว่างการเลี้ยงพบว่าจุลินทรีย์บางส่วนที่หลุดออกจากแผ่นหมวนเนื่องจากแรงเฉือนระหว่างการหมวน ซึ่งจุลินทรีย์ที่หลุดออกไปจะลอยอยู่ในอาหารและมีการย่อยน้ำมันที่อยู่ในอาหารโดยจุลินทรีย์จะนำกรดไขมันสายสั้นที่เกิดจากการย่อยเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรงสังเกตได้จากปริมาณกรดคาปริลิก (C8) ที่ลดลง นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาถึงวิธีการเติมน้ำมันแบบกึ่งกะนั้นมีลักษณะคล้ายกับการเติมแบบกะหลายๆครั้ง คือ กรดคาปริลิก (C8) ในการเลี้ยงแบบกะจะมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ดังนั้นเมื่อเลือกที่เวลา 10 ชั่วโมง สำหรับการเติมน้ำมันแบบกึ่งกะและเมื่อพิจารณาแนวโน้มของการผลิตกรดไขมันในการผลิตแบบกะและแบบกึ่งกะนั้นมีลักษณะที่คล้ายกัน ดังภาพที่ 4.15 จึงทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก (ภาพที่ 4.16) ซึ่งในการทำการทดลองครั้งต่อไปอาจต้องทำการทดลองการเติมอาหารแบบที่เหมาะสมกว่านี้เช่นการเติมแค่น้ำมันอย่างเดียวเพื่อเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์มีการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยน้ำมันไปใช้สำหรับการเจริญมากกว่าการเติมน้ำมันไปพร้อมกับอาหารซึ่งองค์ประกอบของอาหารอื่นๆเช่น แร่ธาตุ จะช่วยให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญมากกว่าการย่อยจากน้ำมันโดยตรงทั้งนี้อาหารที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นอาหารสังเคราะห์ที่มีการเติมน้ำมันเข้าไปสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ดังนั้นผลผลิตของกรดไขมันที่ได้จะขึ้นกับปริมาณของน้ำมันที่เติมเข้าไปด้วย



ภาพที่ 4.15 แนวโน้มปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะในขวดเขย่า (5 ชั่วโมง) แบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 ชั่วโมง) และแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 20 และ 30 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4.16 ปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อลิตร) ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะในขวดเขย่า (5 ชั่วโมง) แบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 ชั่วโมง) และแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (10 20 และ 30 ชั่วโมง)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณลักษณะและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ คือ *Yarrowia lipolytica* (Y2), *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3) และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3) ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมัน พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันคือ มีการสร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีบนอาหารแข็งไตรบูไทรีน (tributyryn agar) เมื่อศึกษาการเจริญ อัตราการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ชนิดและปริมาณกรดไขมันในขวดเขย่า พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการเจริญและอัตราการย่อยสลายที่สัมพันธ์กันคือ เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอัตราการเจริญเติบโต เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พบว่า *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain E28 (V3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากที่สุดโดยสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนได้ 79.60 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เป็นอันดับที่สองคือ *Candida tropicalis* strain Vaucher (L9) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 76.36 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain A17 (T3) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 73.96 เปอร์เซ็นต์ และ *Yarrowia lipolytica* (Y2) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 67.12 เปอร์เซ็นต์

ในการศึกษาการผลิตกรดไขมันในงานวิจัยนี้ มีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตกรดคาปริลิก (C8) โดยจากแนวโน้มของราคากรดไขมันจำแนกตามประเภทกรดคาปริลิก (C8) มีราคาสูงที่สุดในกรดไขมันทุกประเภท และมีแนวโน้มของราคาเพิ่มสูงขึ้นทุกปี และจากผลการวิเคราะห์ของจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีกรดคาปริลิก (C8) ปริมาณสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 5 จึงเลือกชั่วโมง ที่ 5 สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบการทดลองถัดไป

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ในขวดเขย่า โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดลองแบบเชิงแฟคทอเรียล (factorial experiment) โดยปัจจัยที่สนใจศึกษาได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ และร้อยละของแหล่งคาร์บอนแปรผัน

ปัจจัยพีเอชในช่วง 6.5-8.5 โดยให้ค่าพีเอชที่ 7.5 เป็นค่ากลาง (ค่าปัจจัยควบคุม) อุณหภูมิในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าอุณหภูมิที่ 37 เป็นค่ากลาง (ค่าปัจจัยควบคุม) และร้อยละของแหล่งคาร์บอนในช่วง 1-5 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าที่สภาวะควบคุม (หน่วยการทดลองที่ 9 10 และ 11) พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) สูง จึงเลือกสภาวะนี้ใช้สำหรับทำการทดลองต่อไป นอกจากนี้สภาวะดังกล่าวยังทำให้ได้ปริมาณของกรดคาปริก (C10) และกรดไมริสติก (C14) สูงอีกด้วย และยังพบว่าหน่วยการทดลองควบคุมปริมาณของ กรดคาปริก (C10) มีปริมาณสูงสุด และจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ากรดคาปริลิก (C8) มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญตอตอบสนองต่อปัจจัย พีเอช อุณหภูมิ และร้อยละของแหล่งคาร์บอน สองปัจจัยระหว่าง พีเอช และเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอน สามปัจจัยร่วมระหว่าง พีเอช อุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์ของแหล่งคาร์บอน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$) และจากการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) สำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับค่าการตอบสนองที่สนใจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดคาปริลิก (C8) พบว่าสภาวะที่ควบคุม (หน่วยการทดลองที่ 9, 10 และ 11) พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแหล่งคาร์บอน 2.5 เปอร์เซ็นต์ให้กราฟพื้นผิวตอบสนองเป็นรูปประฆังคว่ำ โดยให้กรดคาปริลิก (C8) เฉลี่ย เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร

ในการศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันของจุลินทรีย์ผสมในขวดเขย่าปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดโดยให้ปริมาณกรดคาปริลิก (C8) ถึง 2.37 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 5 ซึ่งมากกว่าตอนทำการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันด้วยการออกแบบการทดลองเชิงแฟคทอเรียล 0.3 กรัมต่อลิตร และวัดค่าการเจริญของเซลล์จากค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.808 จึงเลือกปริมาณหัวเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์สำหรับทำการทดลองขั้นต่อไป

จากการศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ พบว่ามีกรดคาปริลิก (C8) สูงที่สุดในช่วงที่ 10 เท่ากับ 2.18 กรัมต่อลิตร อันดับที่สองคือกรดคาปริก (C10) เท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือกรดไมริสติก (C14) เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตร กรดปาล์มิติก (C16) เท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตร และอันดับสุดท้ายคือกรดลอริก (C12) เท่ากับ 0.17

กรัมต่อลิตรเมื่อเทียบกับการผลิตกรดไขมันแบบกะในขวดเขย่าที่สามารถผลิตกรดคาปริลิก (C8) ได้มากที่สุดในช่วงเวลาที่ 5 เท่ากับ 2.08 กรัมต่อลิตร

การศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะใช้ข้อมูลการผลิตกรดไขมันจากแบบกะโดยจากการศึกษาการผลิตกรดไขมันแบบกะพบว่าปริมาณกรดคาปริลิก (C8) สูงที่สุดใน 10 ชั่วโมงแรกของการหมักและเริ่มลดลงหลังจากนั้น ดังนั้นในการทดลองแบบกึ่งกะจึงเลือกเวลาที่ 10 ชั่วโมงสำหรับการผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะ โดยทำการเติมอาหาร 2 รอบที่ชั่วโมงที่ 10 และ 20 ชั่วโมง ในการเติมอาหารรอบที่หนึ่ง กรดคาปริลิก (C8) เพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 20 เท่ากับ 2.69 กรัมต่อลิตร แต่หลังจากทำการเติมอาหารรอบที่สองที่ชั่วโมงที่ 20 กลับพบว่ากรดคาปริลิก (C8) มีความเข้มข้นลดลงเหลือ 1.59 กรัมต่อลิตร และกรดคาปริก (C10) และกรดปาล์มิติก (C16) มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าชั่วโมงแรกของการหมัก

เมื่อคิดเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield) ทั้งหมดที่ได้จากการผลิตกรดไขมันแบบกะโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพพบว่า การผลิตกรดไขมันแบบกึ่งกะได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของกรดไขมันทั้ง 6 ชนิดรวมกัน และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของกรดคาปริลิก (C8) มากกว่าการผลิตกรดไขมันแบบกะ เท่ากับ 2.72 และ 2.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

- 1) การผลิตกรดไขมันในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพแบบกึ่งกะให้ผลผลิตของกรดไขมันในปริมาณไม่สูงมากเมื่อเทียบกับแบบกะ ดังนั้นควรมีการศึกษาการผลิตแบบต่อเนื่องเพื่อเพิ่มปริมาณของกรดไขมัน
- 2) ในการผลิตกรดไขมันในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพนั้นพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองความหนาของเมือกชีวภาพ (biofilm) นั้นเพิ่มขึ้น 0.5 มิลลิเมตร จากความหนาเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตแบบกึ่งกะ ในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการควบคุมความหนาของเมือกชีวภาพให้คงที่
- 3) ควรนำสภาวะการทดลองที่ได้มาประยุกต์ใช้กับน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ควบคุมมลพิษ, กรม. 2551. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.pcd.go.th/palm/> [2555, กรกฎาคม 25]
- วิชาการเกษตร, กรม. 2555. วิชาการปาล์มน้ำมัน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/palm/> [2556, สิงหาคม 10]
- จุฬากานต์ บุญมี. 2553. การสร้างกลุ่มจุลินทรีย์เพื่อบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พัชรวิภา ใจจักรคำ. 2545. การแยกแบคทีเรียทนร้อนและลักษณะสมบัติบางประการของไลโปสเทรปที่ทนร้อนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. 340 หน้า.
- สกุลรัตน์ พุกกะวรรณ. 2548. การย่อยสลายน้ำมันดิบโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ในระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ. 2547. ชีวโมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุภัณฑิลา นิมรัทธ์. 2548. จุลชีววิทยาของน้ำเสีย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. ปริมาณการผลิตและการใช้น้ำมันปาล์มในประเทศ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.ksmecare.com> [2556, มกราคม 10]
- สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2551. ปาล์มน้ำมัน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.oie.com> [2555, ธันวาคม 8]

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ. 2554. กรดไขมันในประเทศไทย. [ออนไลน์].
แหล่งที่มา: <http://www.faostat.fao.org> [2555, ธันวาคม 20]

ภาษาอังกฤษ

Anamnat, S., Tolstorukov, I., Kaneko, Y., and Harashima, S. 1998. Fatty acid and desaturation in methylotrophic yeast *Hansenula polymorphica* strain CBS 1976 and unsaturated fatty acid auxotrophic mutants. Journal of Fermentation Engineering. 85: 476-482.

Arafiles, K. H. V., Alcantara, J. C. O., Cordero, P. R. F., Batoon, J. A. L., Galura, F.S., Leano, E. M., and Dedeles, G.R. 2011. Culture optimization of thraustochytrids for biomass and fatty acid production. Mycosphere. 2(5): 521-531.

Azeem, A., Neelagund, Y. F., and Rathod, V. 1999. Biotechnological production of oil: Fatty acid composition of microbial oil. Plant Foods for Human Nutrition. 53: 381-386.

Bierman, U., Furmeier, S., Metzger, J. O., Gunstone, F.D. and Hamilton, R. J. 2001. Oleochemical Manufacture and Applications. U.K : Sheffield Academic Press, Sheffield. pp: 266-299.

Christie, W. W. 2002. Lipid Analysis. 3rd Edition. U.K: The Oily Press, Bridgwater. 489: 91-98.

Cortez, P., Teixeira, R., and Oliveira, M. 2008. Rotating biological contactors: main factors affecting performance. Environmental Science Biotechnology. 7: 155-172.

Dey, P., and Maiti, M. T. 2011. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. Journal of Applied Microbiology. 114: 1357-1398.

Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit., M. S., and Nicaud, J. M. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research. 5(6): 527-543.

- Gerado, C., and Sergio, R. 1999. Production and characteristics of lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource Technology. 70: 173-189.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., and Davidson, S. 1996. Microbial lipases: production and applications. Science Progress. 79(2): 119-157
- Ghasem, N., Hii, A. Y., Habibollah, Y., and Aliakbar, Z. 2005. Effect of organic loading on performance of rotating biological contactors using palm oil mill effluents. Process Biochemistry. 40: 2879-2884.
- Gordillo, M. A., Sanchez, A., Valero, F., Montesinos, J. L., and Lafuente, J. 1998. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operation strategies. Biotechnology and Bioengineering. 60: 156-168.
- Gunstone, F. D. 2001. Fatty Acid and Lipid Chemistry. Journal Lipid Science Technology. 103: 307-314.
- Gunstone, F. D. 2002. Vegetable oils in food technology composition, properties and uses. USA., Blackwell Publishing. pp: 59-93.
- Haaland, P. D. 1989. Experimental design in biotechnology. New York. USA: Marcel Dekker Inc. pp: 1-80.
- Houde, A., Kademi, A., and Leblanc, D. 2004. Lipases and their industrial applications. Applied Biochemistry Biotechnology. 118(3): 70-155.
- International Conference on Information Systems (ICIS). 2012. Chemical prices and chemical industry trends. [Online]. Available from: <http://www.icispricing.com> [2012, April 21]
- Joseph, B., Ramteke, P. W., and Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. Biotechnology Advance. 26: 457-470.
- Kaluzyn, M. A., Ducan, L. A., Merritt, M. V., and Epps, D. E. 1985. Rapid separate of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. Journal Lipid Research. 26: 135-139.
- Kaneda, T. 1967. Fatty acid in the genus *Bacillus*. Journal of Bacteriology. 93(3): 894-903.

- Kamimi, N. R., Mala, J. G. S., and Puvanakrishnan, R. 1998. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. Process Biochemistry. pp: 505-511.
- Kiran, S. G., and others. 2008. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). Bioprocess Biosynthesis Engineering. 31: 483-492.
- Li, Q., Du, W., and Liu, D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Applied Microbiology Biotechnological. 80: 749–756.
- Lurgi GmbH. 2010. Fatty acid technology. [Online]. Available from: <http://www.lurgi.com> [2013, Feb 21]
- Mendez, J. A., Vellon, L., Colomer, R., and Lupu, R. 2005. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhance the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu on cogene amplification. European Society for Medical Oncology. [Online]. Available from: <http://www.annonc.oupjournals.org> [2013, Jan 21]
- Montgomery, D. C. 1991. Design and analysis of experiments. 3rd Edition. New York: John Wiley Publisher. pp: 40-42.
- Nair, M. K. M., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T. A., and Venkitanarayana, K. S. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. Journal of Dairy Science. 88(10): 3488-3495.
- Nakatsuji, T., Kao, C. M., Fang, J. Y., Zouboulis, C. C., Zhang, L., Gallo, L. R., and Huang, M. C. 2009. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium Acnes*: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. Journal of Investigative Dermatology. 129: 2480-2488.
- Nakazawa, A., Matsuura, H., Kose, R., Ito, K., Ueda, M., Honda, D., Inouye, I., Kaya, K., and Watanabe, M. M. 2012. Optimization of biomass and fatty acid production by *Aurantiochytrium* sp. Strain 4W-1b. Environmental Science. 15: 27-33.

- Namita, G., Vikran, S., and Rani, G. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderiamultivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. Process Biochemistry. 42: 518-526.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. 2003. Selective uptake of fatty acids by yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal Lipid Science Technology. 105: 651-655.
- Papanikolaou, S., and Aggelis, G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. Journal Lipid Science Technology. 113: 1031–1051.
- Pogaku, P., Suresh, A., Srinivas, P., and Reddy, S. R. 2009. Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. Journal of Biotechnology. 9(6): 882-886
- Ratlidge, C., and Cohen, Z. 2008. Microbial and algal lipids: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils. Lipid Technology. 20: 155–160.
- Ravigadevi, S., Kalyana, S., and Yew, A. T. 2000. Chemistry and biochemistry of palm oil. Progress in Research. 39: 507-558.)
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., and Ron, E. Z. 1992. Petroleum bioremediation a multiple phase problem. Biodegradation. 3: 337-350.
- Scrimgeour, C. 2005. Chemistry of fatty acid. Bauley's Industrial Oil and Fat Products. 6th Edition. African: John Wiley & Sons, Inc. 6: 1-43.
- Serri, N. A., Kamarudin, A. H., and Rahaman, A. 2008. Preliminary studies for production of fatty acid from hydrolysis of cooking palm oil using *Candida rugosa* lipase. Journal of Physical Science. 19(1): 78-88
- Sevgi, E., Gonul, D., and Serpil, T. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive oil mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of hazards materials. 149: 720-724.
- Shah, K. R., Patel, P. M., and Bhatt, S. A. 2007. Lipase production by *Bacillus* sp. Under different phisio-chemical conditions. Journal of cell and tissue research. 7: 913-916.
- Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. 2001. Production purification characterization and applications of lipases. Biotechnology Advances. 19: 627–662.

- Sirisha, E., Rajasekar, N., and Narasu, L. M. 2010. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. Advance in Biological Research. 4(5): 249-252.
- Tenda, E. T., Tulato, M. A., and Novariant, A. 2009. Diversity of oil and medium fatty acid content of local coconut cultivars grown on different attitudes. Indonesia Journal of Agriculture. 2(1): 6-10.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., and Kohlwein, D. S. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. Biochemical and Biophysical. 7: 255-270.
- Tianwei, T., Mu, Z., Bingwu, W., Chunha, Y., and Li, D. 2003. Screening of high lipases producing *Candida* sp. And production of lipase by fermentation. Process Biochemistry. 39: 459-456.
- USfilter. 2010. RBC process operation. [Online]. Available from: <http://www.waow.com/Brochures/RBC> [2013, Jan 10]
- Waskar, V. G., Kulkarni, G. S., and Kore, V. S. 2012. Process, Application and Performance of Rotating Biological Contactor (RBC). International Journal of Scientific and Research. 2(7): 1-6.
- Were, B. A., Onkwere, A. O., Gudu, S. W. M., and Carlsson, A. S. 2006. Seed oil content and fatty acid composition in East African sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions evaluated over 3 years. Journal Field Crops Research. 97: 254-260.
- Wiseman A. 1995. Introduction to principles of enzyme. Handbook of enzyme biotechnology. 3rd Edition. U.K: T.J. Press. pp: 3-8.
- William, M. O. L. 1992. The fatty acid of bacteria. Bacteriology. 26(4): 421-447.
- Woods, V. B., and Fearon, A. M. 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs. Livestock Science. 126: 1–20.
- Zhao, X., Kong, Xiangli., Hua, Y., Feng, B., and Zhao, K. Z. 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. Journal of Lipid Science Technology. 110: 405-412.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient Agar (NA)

| | | |
|-----------------|-------|-----------|
| สารสกัดจากเนื้อ | 5 | กรัม |
| แบคโตเปปโตน | 3 | กรัม |
| ผงวุ้น (Agar) | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient Broth (NB)

| | | |
|-----------------|-------|-----------|
| สารสกัดจากเนื้อ | 5 | กรัม |
| แบคโตเปปโตน | 3 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract-Malt extract Agar (YM)

| | | |
|----------------|-------|-----------|
| กลูโคส | 10 | กรัม |
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ | 3 | กรัม |
| ผงสกัดจากมอลต์ | 3 | กรัม |
| ผงวุ้น | 15 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast extract-Malt extract Broth (YM)

| | | |
|----------------|-------|-----------|
| กลูโคส | 10 | กรัม |
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ | 3 | กรัม |
| ผงสกัดจากมอลต์ | 3 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารแข็งไตรบูไทรีน (Tributyryn Agar)

| | | |
|--|---------------|-----------|
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ | 1 | กรัม |
| แอมโมเนียมซัลเฟต (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 1 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄) | 5 | กรัม |
| ไตรบูไทรีน | 1 เปอร์เซ็นต์ | |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมไตรบูไทรีน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวน้ำมันปาล์ม (Palm oil Medium)

| | | |
|--|---|------|
| แบคโตเปปโตน | 5 | กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ | 1 | กรัม |
| แอมโมเนียมซัลเฟต (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 | กรัม |

| | | |
|--|-------|-------------|
| แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 1 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 5 | กรัม |
| น้ำมันปาล์ม | 1 | เปอร์เซ็นต์ |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมไตรนูไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 82.5 มิลลิลิตร มาผสมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชา

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชา

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4

ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.709 กรัม ละลายใน ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 ด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ เก็บสารละลายที่ได้แช่เย็นที่ 4 °C

สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 3%

ชั่งกรดบอริก 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชา

สารละลายเอทานอล 70%

นำสารละลายเอทานอล 99.9% ปริมาตร 700 มิลลิลิตร มาผสมในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 N

เตรียมน้ำกลั่นนำปริมาตร 67 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ผสมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 33 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้ตู้ดูดควัน

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 N

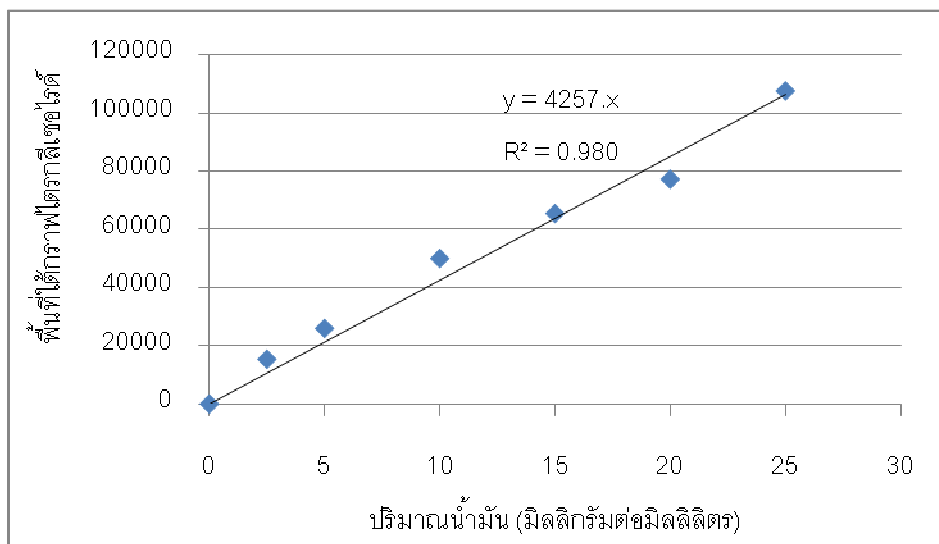
เตรียมน้ำกลั่นนำปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัมละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้ตู้ดูดควัน

สารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 10%

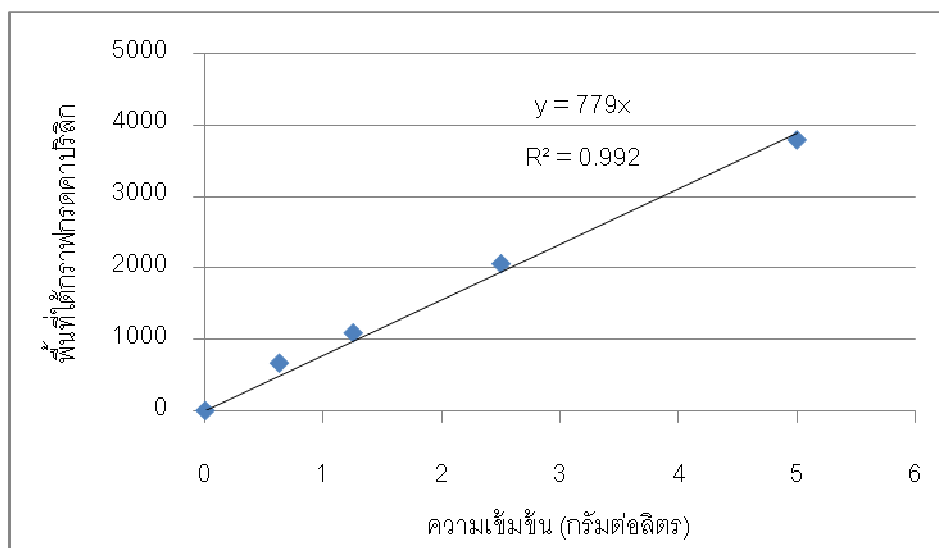
เตรียมน้ำกลั่นนำปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปิเปตสารละลายคลอริกซ์ 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ หยด Tween 20 ลงไปประมาณ 2-3 หยด และเขย่าให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค

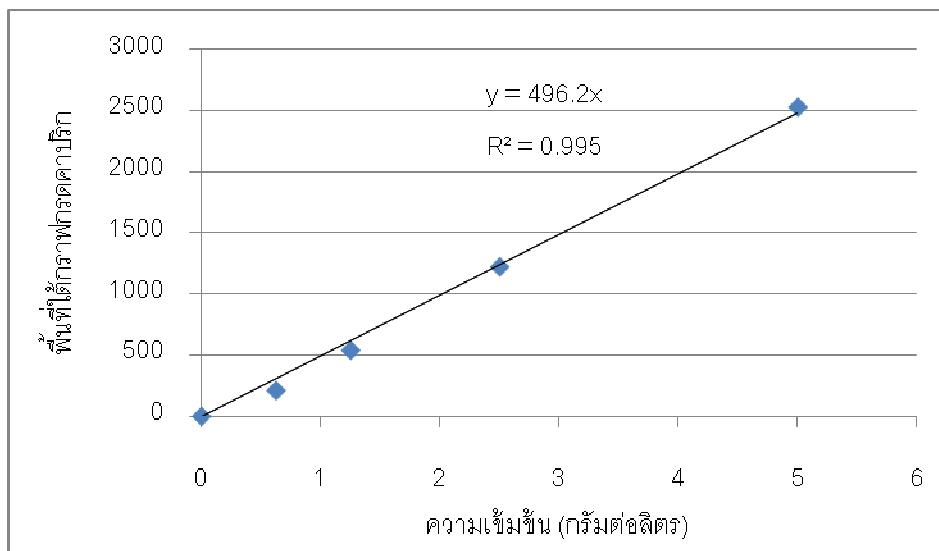
กราฟมาตรฐาน



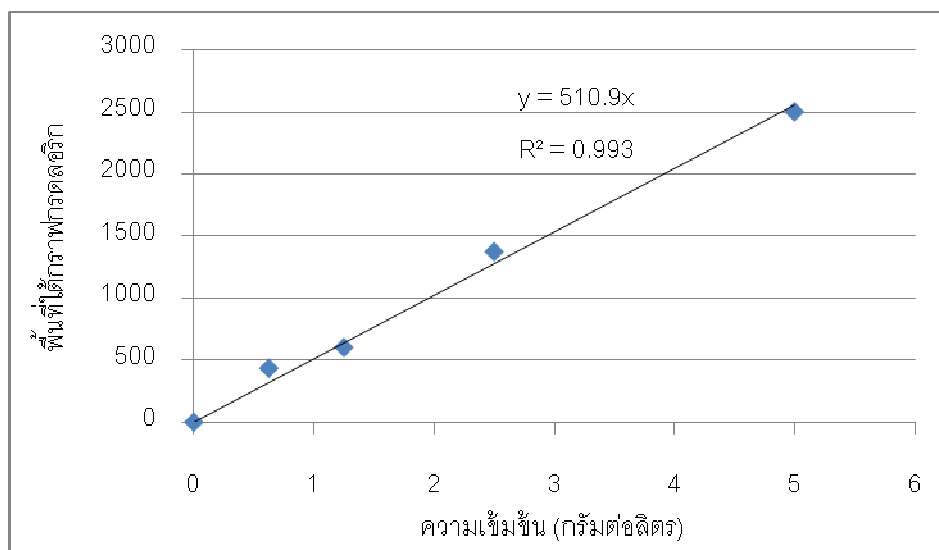
ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อพื้นที่ใต้กราฟ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID



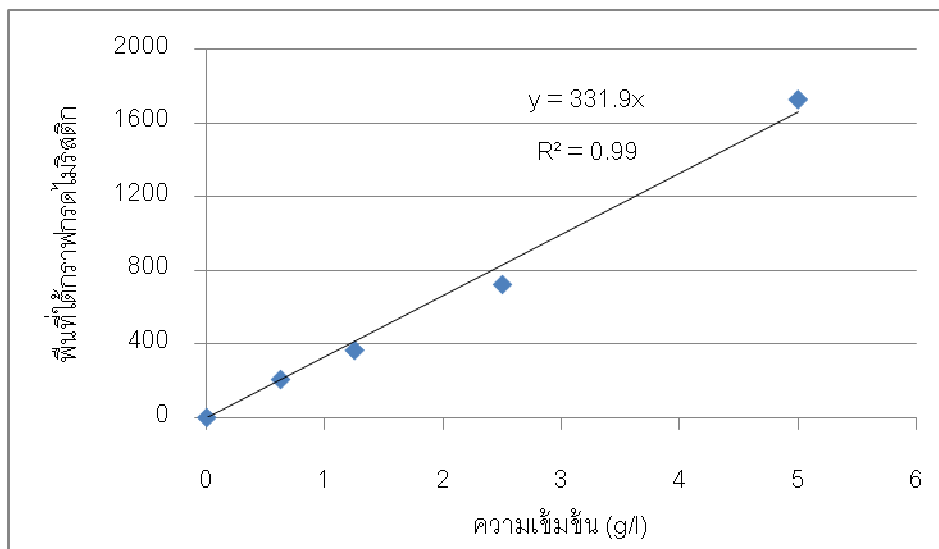
ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของกรดไขมันของกรดคาปริลิก (Caprylic acid) เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีโครมาโตการพีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



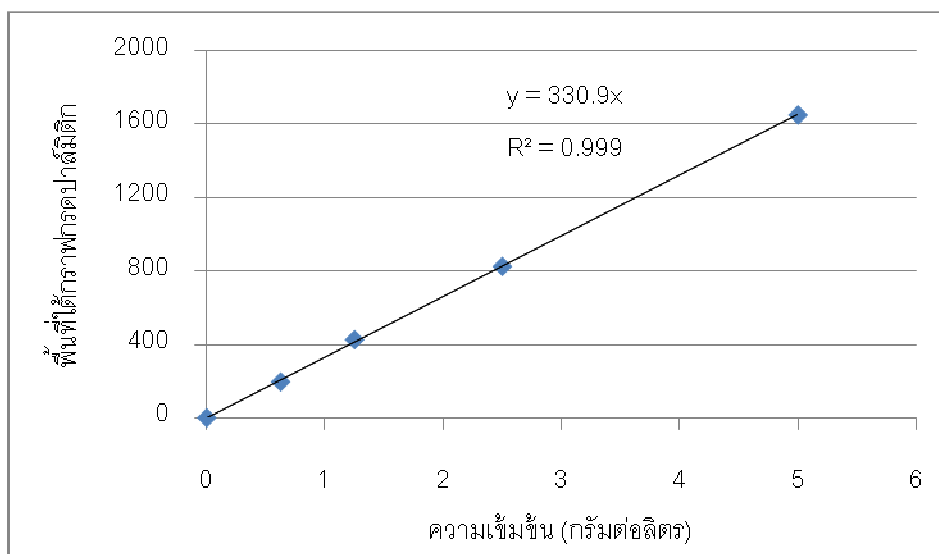
ภาพที่ ค.3 กราฟมาตรฐานของกรดไขมันของกรดคาปริก (Capric acid) เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีโครมาโตการฟิซนิตของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



ภาพที่ ค.4 กราฟมาตรฐานของกรดไขมันของกรดลอริก (Lauric acid) เมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีโครมาโตการฟิซนิตของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



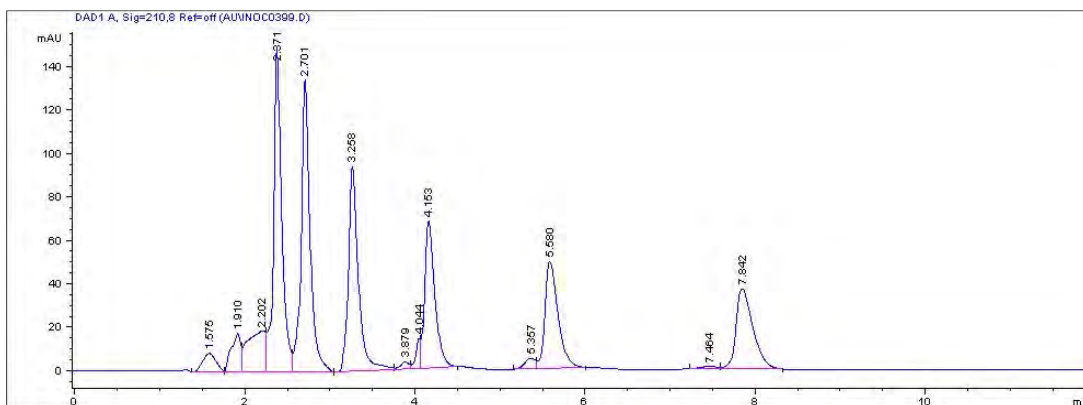
ภาพที่ ค.5 กราฟมาตรฐานของกรดไมริสติก (Myristic acid) เมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการพีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



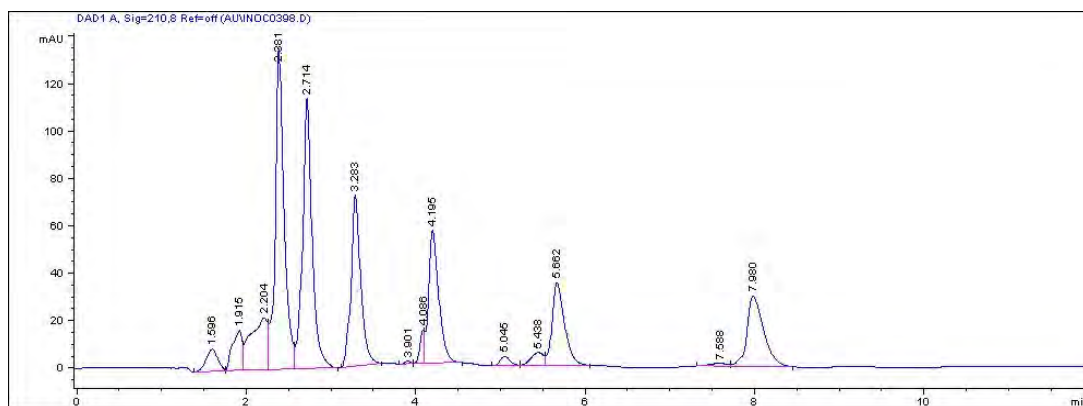
ภาพที่ ค.6 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก (Palmitic acid) เมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการพีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ภาคผนวก ง

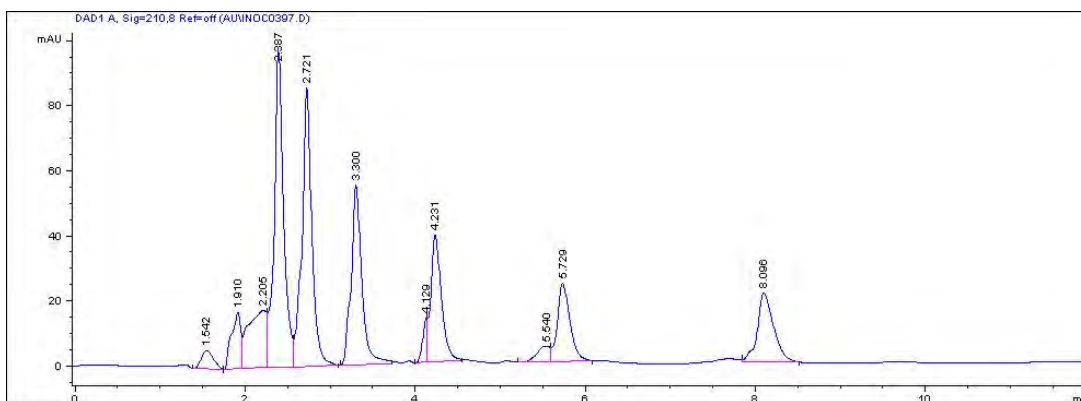
โครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน



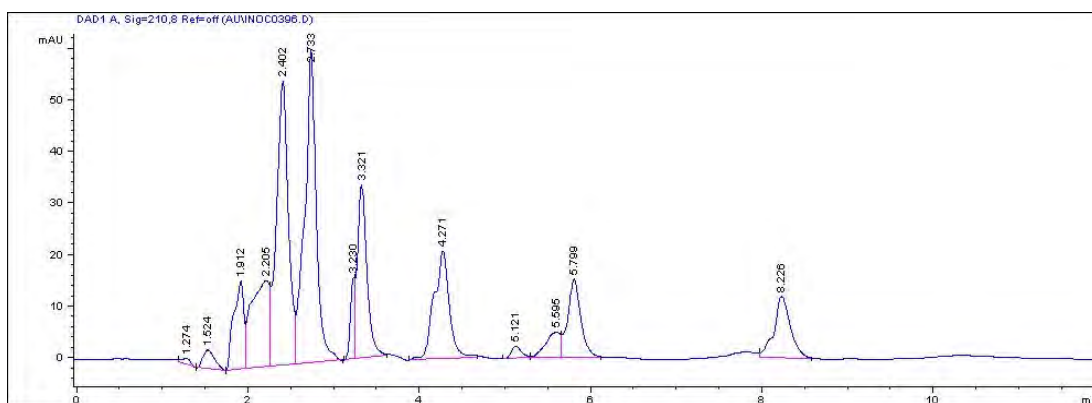
ภาพที่ ง.1 กราฟมาตรฐานกรดไขมันชนิดต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการพีซีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของกรดไขมัน 100 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ ง.2 กราฟมาตรฐานกรดไขมันชนิดต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการพีซีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของกรดไขมัน 80 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ ง.3 กราฟมาตรฐานกรดไขมันชนิดต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการพีซีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของกรดไขมัน 60 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ ง.4 กราฟมาตรฐานกรดไขมันชนิดต่างๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการพีซีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของกรดไขมัน 40 เปอร์เซ็นต์

ค่ารีเทนชันไทม์ของกรดไขมันชนิดต่างๆ

| ชนิดของกรดไขมัน | รีเทนชันไทม์ |
|--------------------|--------------|
| กรดคาปริลิก (C8) | 2.381 |
| กรดคาปริก (C10) | 2.701 |
| กรดลอริก (C12) | 3.258 |
| กรดไมริสติก (C14) | 4.153 |
| กรดปาล์มิติก (C16) | 5.580 |
| กรดสเตียริก (C18) | 7.842 |

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงค่า OD.600 nm เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟ กรดไขมันชนิดต่างๆของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า

ตาราง จ.1 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า

| รหัส จุลินทรีย์ | เวลา (h) | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 1 | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 2 | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 3 | OD ₆₀₀ nm. เฉลี่ย | SD |
|--------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------|
| Y2 | 0 | 0.187 | 0.136 | 0.177 | 0.167 | 0.03 |
| | 3 | 0.366 | 0.336 | 0.369 | 0.357 | 0.02 |
| | 4 | 0.525 | 0.520 | 0.554 | 0.533 | 0.02 |
| | 5 | 0.754 | 0.745 | 0.741 | 0.747 | 0.01 |
| | 10 | 1.353 | 1.356 | 1.366 | 1.358 | 0.01 |
| | 14 | 1.938 | 1.930 | 1.987 | 1.952 | 0.03 |
| | 15 | 2.133 | 2.139 | 2.130 | 2.134 | 0.00 |
| | 16 | 2.617 | 2.698 | 2.677 | 2.664 | 0.04 |
| | 20 | 3.012 | 3.011 | 3.016 | 3.013 | 0.00 |
| | 24 | 3.072 | 3.078 | 3.056 | 3.069 | 0.01 |
| L9 | 0 | 0.323 | 0.353 | 0.346 | 0.341 | 0.02 |
| | 3 | 0.565 | 0.550 | 0.594 | 0.570 | 0.02 |
| | 4 | 0.676 | 0.689 | 0.601 | 0.655 | 0.05 |
| | 5 | 0.870 | 0.819 | 0.870 | 0.853 | 0.03 |
| | 10 | 2.078 | 2.088 | 2.031 | 2.066 | 0.03 |
| | 14 | 2.403 | 2.452 | 2.456 | 2.437 | 0.03 |
| | 15 | 2.828 | 2.829 | 2.890 | 2.849 | 0.04 |
| | 16 | 3.107 | 3.100 | 3.199 | 3.135 | 0.06 |
| | 20 | 3.168 | 3.170 | 3.120 | 3.153 | 0.03 |
| | 24 | 3.177 | 3.189 | 3.128 | 3.165 | 0.03 |

ตาราง ๑.2 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า (ต่อ)

| รหัส จุลินทรีย์ | เวลา (h) | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 1 | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 2 | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 3 | OD ₆₀₀ nm. เฉลี่ย | SD |
|--------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------|
| T3 | 0 | 0.283 | 0.298 | 0.299 | 0.293 | 0.01 |
| | 3 | 0.364 | 0.369 | 0.364 | 0.366 | 0.00 |
| | 4 | 0.492 | 0.421 | 0.486 | 0.466 | 0.04 |
| | 5 | 0.557 | 0.550 | 0.541 | 0.549 | 0.01 |
| | 10 | 1.304 | 1.308 | 1.311 | 1.308 | 0.00 |
| | 14 | 1.593 | 1.566 | 1.598 | 1.586 | 0.02 |
| | 15 | 1.678 | 1.657 | 1.668 | 1.668 | 0.01 |
| | 16 | 1.921 | 1.986 | 1.906 | 1.938 | 0.04 |
| | 20 | 1.991 | 2.013 | 2.009 | 2.004 | 0.01 |
| | 24 | 2.070 | 2.088 | 2.098 | 2.085 | 0.01 |
| V3 | 0 | 0.190 | 0.199 | 0.198 | 0.196 | 0.01 |
| | 3 | 0.396 | 0.368 | 0.364 | 0.376 | 0.02 |
| | 4 | 0.543 | 0.577 | 0.589 | 0.570 | 0.02 |
| | 5 | 0.634 | 0.644 | 0.643 | 0.640 | 0.01 |
| | 10 | 0.715 | 0.711 | 0.723 | 0.716 | 0.01 |
| | 14 | 0.891 | 0.896 | 0.864 | 0.884 | 0.02 |
| | 15 | 0.918 | 0.912 | 0.913 | 0.914 | 0.00 |
| | 16 | 0.991 | 0.998 | 0.993 | 0.994 | 0.00 |
| | 20 | 0.994 | 0.997 | 1.002 | 0.998 | 0.00 |
| | 24 | 1.015 | 1.009 | 1.036 | 1.020 | 0.01 |

ตาราง ๑.3 พื้นที่ใต้กราฟน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย น้ำมันปาล์ม และปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า

| รหัส จุลินทรีย์ | เวลา (h) | พื้นที่ใต้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์ | น้ำมันที่ เหลืออยู่ (g/l) | น้ำมันที่ถูกย่อย สลายไป (g/l) | เปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายน้ำมัน ปาล์ม |
|--------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| Y2 | 0 | 107291 | 25.00 | 0 | 0 |
| | 3 | 83753 | 18.50 | 6.5 | 26.00 |
| | 4 | 78909 | 17.40 | 7.6 | 30.40 |
| | 5 | 76411 | 16.80 | 8.2 | 32.80 |
| | 10 | 63187 | 13.90 | 11.1 | 44.40 |
| | 14 | 60842 | 13.40 | 11.6 | 46.40 |
| | 15 | 53146 | 11.70 | 13.3 | 53.20 |
| | 16 | 41722 | 9.20 | 15.8 | 63.20 |
| | 20 | 33791 | 7.46 | 17.54 | 70.16 |
| | 24 | 37212 | 8.22 | 16.78 | 67.12 |
| L9 | 0 | 107345 | 25 | 0 | 0 |
| | 3 | 90624 | 20.02 | 4.98 | 19.92 |
| | 4 | 80685 | 17.82 | 7.18 | 28.72 |
| | 5 | 73072 | 16.14 | 8.86 | 35.44 |
| | 10 | 69149 | 15.27 | 9.73 | 38.92 |
| | 14 | 60955 | 13.46 | 11.54 | 46.16 |
| | 15 | 53651 | 11.85 | 13.15 | 52.60 |
| | 16 | 38813 | 8.57 | 16.43 | 65.72 |
| | 20 | 26862 | 5.93 | 19.07 | 76.28 |
| | 24 | 26761 | 5.91 | 19.09 | 76.36 |

ตาราง ๑.4 พื้นที่ใต้กราฟน้ำมันปาล์มเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TLC-FID เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย น้ำมันปาล์ม และปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในขวดเขย่า (ต่อ)

| รหัส จุลินทรีย์ | เวลา (h) | พื้นที่ใต้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์ | น้ำมันที่ เหลืออยู่ (g/l) | น้ำมันที่ถูกย่อย สลายไป (g/l) | เปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายน้ำมัน ปาล์ม |
|--------------------|-------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| T3 | 0 | 101535 | 25.00 | 0 | 0 |
| | 3 | 85631 | 18.92 | 6.08 | 24.32 |
| | 4 | 81315 | 17.96 | 7.04 | 28.16 |
| | 5 | 78166 | 17.27 | 7.73 | 30.92 |
| | 10 | 71923 | 15.88 | 9.12 | 36.48 |
| | 14 | 67808 | 14.98 | 10.02 | 40.08 |
| | 15 | 55867 | 12.34 | 12.66 | 50.64 |
| | 16 | 54648 | 12.07 | 12.93 | 51.72 |
| | 20 | 35758 | 7.89 | 17.11 | 68.44 |
| | 24 | 29476 | 6.51 | 18.49 | 73.96 |
| | V3 | 0 | 107292 | 25.00 | 0 |
| 3 | | 73605 | 16.20 | 8.80 | 35.20 |
| 4 | | 51661 | 11.40 | 13.60 | 54.40 |
| 5 | | 48206 | 10.60 | 14.40 | 57.60 |
| 10 | | 44341 | 9.70 | 15.30 | 61.20 |
| 14 | | 40055 | 8.80 | 16.20 | 64.80 |
| 15 | | 31949 | 7.05 | 17.95 | 71.80 |
| 16 | | 26734 | 5.90 | 19.10 | 76.40 |
| 20 | | 23635 | 5.22 | 19.78 | 79.12 |
| 24 | | 23123 | 5.10 | 19.90 | 79.60 |

ตาราง ๑.5 พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์
ในขวดเขย่า

| รหัส จุลินทรีย์ | เวลา (h) | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|----------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|
| | | C8 | SD. | C10 | SD. | C12 | SD. | C14 | SD. | C16 | SD. |
| Y2 | 0 | - | - | 986.9 | 10.33 | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | - | - | 1410.4 | 11.12 | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | - | - | 2201 | 19.87 | 979.2 | 12.11 | 469.6 | | - | - |
| | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 14 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | - | 610.5 | 9.33 | - | - | - | - |
| L9 | 0 | 748.8 | 11.36 | 756.9 | 11.77 | 94.6 | 1.21 | - | - | - | - |
| | 3 | 979.7 | 13.69 | 858.4 | 13.96 | 328.6 | 4.65 | - | - | 992.6 | 9.78 |
| | 4 | 991.1 | 13.87 | 586.6 | 9.88 | - | - | - | - | 2417.9 | 15.15 |
| | 5 | 1245.7 | 14.56 | 726.2 | 11.56 | 345.2 | 3.27 | - | - | 1434.1 | 14.23 |
| | 10 | 1169.5 | 14.34 | 796.4 | 11.71 | - | - | - | - | 1736 | 13.98 |
| | 14 | 1010.1 | 13.77 | 588.2 | 9.73 | 257 | 1.44 | - | - | - | - |
| | 15 | 887.3 | 11.32 | 419.4 | 8.45 | 93.9 | 1.03 | - | - | 1728.2 | 13.36 |
| | 16 | 893.3 | 11.56 | 653.4 | 8.33 | 195.4 | 2.69 | 64.4 | 2.11 | 1031.9 | 11.53 |
| | 20 | 712.5 | 12.76 | 386.3 | 7.10 | 125.4 | 1.12 | - | - | 758.2 | 7.56 |
| | 24 | 798.4 | 10.95 | 744 | 12.98 | 238.2 | 3.88 | - | - | 650.7 | 7.98 |

ตาราง ๑.6 พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์
ในขวดเขย่า (ต่อ)

| รหัส จุลินทรีย์ | เวลา (h) | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|--------|-------|
| | | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| T3 | 0 | 1090.6 | 10.03 | 650.3 | 7.63 | - | - | - | - | - | - |
| | 3 | 967 | 8.96 | 464 | 2.33 | 160.4 | 2.56 | 205.6 | 2.22 | - | - |
| | 4 | - | - | 947.7 | 11.12 | 1366 | 12.36 | - | - | - | - |
| | 5 | 1307.4 | 12.95 | 597.1 | 10.02 | - | - | - | - | - | - |
| | 10 | 1181.2 | 11.36 | 355.1 | 2.36 | - | - | - | - | - | - |
| | 14 | 1051.3 | 11.23 | 644.3 | 8.80 | - | - | - | - | - | - |
| | 15 | - | - | 438.5 | 4.24 | - | - | - | - | - | - |
| | 16 | - | - | 646.1 | 4.86 | - | - | - | - | - | - |
| | 20 | - | - | 572.8 | 3.56 | - | - | - | - | - | - |
| | 24 | - | - | 524.8 | 4.72 | - | - | - | - | - | - |
| V3 | 0 | 734.4 | 2.40 | 819.6 | 9.96 | 368 | 2.22 | - | - | 1825.3 | 12.63 |
| | 3 | - | - | 600.9 | 5.66 | 378 | 2.20 | - | - | - | - |
| | 4 | 730.4 | 2.36 | 672.6 | 5.36 | - | - | - | - | 1725.3 | 10.50 |
| | 5 | 981.5 | 4.76 | 673.3 | 5.97 | 184.8 | 1.16 | - | - | 685.1 | 7.86 |
| | 10 | 960.4 | 4.55 | 1.31 | 0.24 | - | - | - | - | 894.9 | 10.52 |
| | 14 | 950.4 | 4.53 | 758.1 | 11.30 | 202.8 | 3.36 | - | - | 2141.5 | 14.53 |
| | 15 | 434.2 | 3.34 | 670.3 | 7.74 | - | - | - | - | 1680.5 | 8.79 |
| | 16 | 708.2 | 3.98 | 613.6 | 5.68 | 118.3 | 2.46 | - | - | - | - |
| | 20 | 1147.4 | 12.27 | 673.3 | 6.66 | - | - | - | - | 894.9 | 8.56 |
| | 24 | 686.1 | 8.99 | - | - | 371.8 | 3.35 | - | - | - | - |

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงค่า OD.600 nm เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมัน ชนิดต่างๆในขวดเขย่าโดยการทดลองแบบเชิงแฟคทอเรียล (Factorial Experiment)

ตาราง จ.1 ค่า OD.600 nm ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย และ เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ที่เวลา 5 ชั่วโมง ครั้งที่ 1

| หน่วยการทดลอง | 5 ชั่วโมง | | | |
|---------------|-----------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | OD.600 nm | น้ำมันที่เหลืออยู่ (g/l) | น้ำมันที่ถูกย่อย สลายไป (g/l) | เปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายน้ำมัน |
| 1 | 0.563 | 14.23 | 10.77 | 43.06 |
| 2 | 0.976 | 18.54 | 6.46 | 25.85 |
| 3 | 0.693 | 13.72 | 11.28 | 45.12 |
| 4 | 1.317 | 12.19 | 12.81 | 51.22 |
| 5 | 0.659 | 13.85 | 11.15 | 44.62 |
| 6 | 1.197 | 12.68 | 12.32 | 49.28 |
| 7 | 0.518 | 18.76 | 6.24 | 24.97 |
| 8 | 1.597 | 13.49 | 11.51 | 46.04 |
| 9 | 1.221 | 17.74 | 7.26 | 29.04 |
| 10 | 1.298 | 17.82 | 7.18 | 28.70 |
| 11 | 1.187 | 17.98 | 7.02 | 28.07 |

ตาราง จ.2 ค่า OD.600 nm ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย และ เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ที่เวลา 5 ชั่วโมง ครั้งที่ 2

| หน่วยการทดลอง | 5 ชั่วโมง | | | |
|---------------|-----------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| | OD.600 nm | น้ำมันที่เหลืออยู่ (g/l) | น้ำมันที่ถูกย่อย สลายไป (g/ml) | เปอร์เซ็นต์การ ย่อยสลายน้ำมัน |
| 1 | 1.131 | 15.22 | 9.78 | 39.12 |
| 2 | 1.129 | 18.56 | 6.44 | 25.76 |
| 3 | 1.134 | 14.96 | 10.04 | 40.16 |
| 4 | 1.011 | 14.85 | 10.15 | 40.60 |
| 5 | 1.063 | 13.6 | 11.40 | 45.60 |
| 6 | 1.178 | 12.93 | 12.07 | 48.28 |
| 7 | 1.059 | 18.02 | 6.98 | 27.92 |
| 8 | 1.157 | 13.33 | 11.67 | 46.68 |
| 9 | 1.091 | 16.44 | 8.56 | 34.24 |
| 10 | 1.011 | 16.52 | 8.48 | 33.92 |
| 11 | 1.027 | 16.28 | 8.72 | 34.88 |

ตาราง จ.3 พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ในขวดเขย่าที่เวลา 5 และ 10 ชั่วโมง ครั้งที่ 1

| หน่วยการ ทดลอง | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย (5 ชั่วโมง) | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-----|----|
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 1 | 214.5 | 2.12 | 215.4 | 2.08 | 91.2 | 2.23 | - | - | - | - |
| 2 | 395.0 | 3.56 | 207.4 | 2.10 | 41.4 | 1.20 | - | - | - | - |
| 3 | 295.6 | 4.12 | 119 | 2.16 | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 315.2 | 3.20 | 137.6 | 2.80 | - | - | 400.4 | 3.56 | - | - |
| 5 | 402.3 | 1.56 | 208.7 | 3.54 | 81 | 2.20 | - | - | - | - |
| 6 | 585.2 | 4.20 | 202.1 | 3.34 | 158.3 | 2.58 | - | - | - | - |
| 7 | 359.0 | 3.32 | 224 | 2.30 | - | - | 173.8 | 2.50 | - | - |
| 8 | 544.2 | 3.88 | - | - | 279 | 2.20 | - | - | - | - |
| 9 | 234.5 | 2.10 | 404.6 | 3.75 | 127.9 | 1.86 | - | - | - | - |
| 10 | 238.8 | 2.12 | 112.2 | 1.50 | 45.6 | 1.20 | 46.8 | 1.08 | - | - |
| 11 | 232.5 | 2.14 | - | - | 77.6 | 1.10 | - | - | - | - |
| หน่วยการ ทดลอง | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย (10 ชั่วโมง) | | | | | | | | | |
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 1 | 214.5 | 2.56 | 215.4 | 2.50 | 91.2 | 1.12 | - | - | - | - |
| 2 | 395.0 | 3.52 | 207.4 | 1.45 | 41.4 | 1.06 | - | - | - | - |
| 3 | 295.6 | 2.80 | 119 | 2.90 | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 315.2 | 2.88 | 137.6 | 1.45 | - | - | 400.4 | 5.65 | - | - |
| 5 | 402.3 | 3.10 | 208.7 | 2.08 | 81 | 1.57 | - | - | - | - |
| 6 | 585.2 | 4.56 | 202.1 | 2.80 | 158.3 | 2.50 | - | - | - | - |
| 7 | 359.0 | 5.52 | 224 | 5.30 | - | - | 173.8 | 2.50 | - | - |
| 8 | 544.2 | 5.50 | - | - | 279 | 2.64 | - | - | - | - |
| 9 | 234.5 | 2.86 | 404.6 | 4.45 | 127.9 | 2.20 | - | - | - | - |
| 10 | 238.8 | 2.80 | 112.2 | 2.60 | 45.6 | 1.02 | 46.8 | 1.05 | - | - |
| 11 | 232.5 | 2.86 | - | - | 77.6 | 1.21 | - | - | - | - |

ตาราง จ.4 พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ในขวดเขย่าที่เวลา 5 และ 10 ชั่วโมง ครั้งที่ 2

| หน่วยการ ทดลอง | พื้นที่ได้กราฟเฉลี่ย (5 ชั่วโมง) | | | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|------|--------|------|--------|------|-------|------|-------|------|
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 1 | - | - | 1014.4 | 11.2 | - | - | - | - | 414.1 | 2.25 |
| 2 | 574.8 | 5.60 | 1214.3 | 11.8 | 267.3 | 2.21 | 254.8 | 1.60 | - | - |
| 3 | 530.8 | 5.54 | 820.2 | 7.64 | 202.5 | 2.20 | - | - | 164.3 | 1.10 |
| 4 | 35.6 | 1.02 | 1001.9 | 9.80 | 1408.9 | 9.96 | 883.1 | 7.60 | - | - |
| 5 | 584.4 | 5.68 | 939.1 | 8.82 | 195.3 | 1.50 | 251.5 | 1.80 | - | - |
| 6 | 368.4 | 5.55 | 1040.1 | 9.95 | 471.2 | 3.45 | 388.5 | 1.15 | - | - |
| 7 | 512.7 | 6.52 | 987.6 | 8.30 | 208.6 | 2.20 | 212 | 1.30 | - | - |
| 8 | 677.5 | 7.86 | 1078.9 | 9.64 | 1051.4 | 12.3 | 909.4 | 11.3 | - | - |
| 9 | 929.5 | 10.5 | 600.2 | 5.50 | 176.3 | 1.05 | - | - | 155.4 | 1.06 |
| 10 | 926.2 | 9.98 | 608.7 | 5.62 | 170.9 | 1.56 | - | - | 150.1 | 1.12 |
| 11 | 933.4 | 9.76 | 590.6 | 5.52 | 172.4 | 1.80 | - | - | 140.2 | 1.50 |
| หน่วยการ ทดลอง | พื้นที่ได้กราฟเฉลี่ย (10 ชั่วโมง) | | | | | | | | | |
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 1 | 549.6 | 5.30 | 1343.5 | 12.5 | 132.2 | 1.12 | 201.5 | 2.30 | - | - |
| 2 | 563.7 | 6.50 | 881.8 | 8.50 | 168.7 | 1.32 | - | - | - | - |
| 3 | 606.7 | 4.52 | 298.4 | 1.25 | 113.9 | 1.10 | 288.6 | 2.70 | 37.7 | 0.80 |
| 4 | 542.6 | 4.45 | 1116.6 | 10.2 | 380.4 | 2.30 | 436 | 2.86 | - | - |
| 5 | 565.0 | 4.65 | 356.6 | 2.60 | 387.2 | 2.20 | 204.8 | 1.87 | - | - |
| 6 | 631.3 | 4.75 | 1112.2 | 8.96 | 154.8 | 1.14 | 241.7 | 1.80 | - | - |
| 7 | 568.6 | 5.98 | 1028.6 | 6.98 | 558.1 | 4.50 | 253.6 | 1.58 | - | - |
| 8 | 671.6 | 6.64 | 1578.3 | 5.68 | 941.8 | 8.95 | 314.5 | 2.56 | - | - |
| 9 | 732.3 | 10.5 | 660.1 | 5.66 | 275.6 | 1.20 | - | - | 85.5 | 0.96 |
| 10 | 722.2 | 10.2 | 625.8 | 5.86 | 261.5 | 1.50 | - | - | - | - |
| 11 | 751.9 | 10.7 | 647.9 | 5.60 | 285.6 | 1.56 | - | - | 113 | 1.20 |

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงค่า OD.600 nm เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟกรดไขมัน ชนิดต่างๆในขวดเขย่า ของปริมาณหัวเชื้อผสม (Mixed culture) ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ในขวดเขย่า

ตาราง ข.1 ค่า OD.600 nm ของปริมาณหัวเชื้อผสม (Mixed culture) ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ในขวดเขย่า

| % | OD.600 nm | | | | | | | | | | |
|-----|-----------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | inoculums | 0h | SD | 3h | SD | 5h | SD | 7h | SD | 10h | SD |
| 4% | | 0.563 | 0.01 | 0.755 | 0.01 | 1.296 | 0.16 | 1.589 | 0.05 | 2.100 | 0.08 |
| 10% | | 0.658 | 0.04 | 0.809 | 0.00 | 1.588 | 0.11 | 1.871 | 0.03 | 2.253 | 0.04 |
| 15% | | 0.740 | 0.04 | 0.916 | 0.01 | 1.808 | 0.05 | 1.986 | 0.01 | 2.506 | 0.10 |
| 20% | | 0.865 | 0.02 | 1.192 | 0.06 | 2.002 | 0.04 | 2.308 | 0.01 | 2.953 | 0.03 |

ตาราง ข.2 พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของปริมาณหัวเชื้อผสม (Mixed culture) ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ในขวดเขย่า

| % | พื้นที่ได้กราฟเฉลี่ย (5 ชั่วโมง) | | | | | | | | | | |
|-----|----------------------------------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|
| | inoculums | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 4% | | 458.80 | 5.60 | 725.30 | 8.82 | 107.70 | 1.56 | 205.10 | 1.56 | 223.70 | 1.56 |
| 10% | | 570.30 | 5.69 | 656.60 | 5.60 | 102.10 | 1.20 | 177.00 | 1.60 | 234.20 | 1.25 |
| 15% | | 681.20 | 6.42 | 730.60 | 8.20 | - | - | 345.10 | 1.50 | 315.60 | 1.40 |
| 20% | | 701.50 | 6.80 | 737.70 | 8.24 | - | - | 202.00 | 2.21 | 258.00 | 1.42 |

ตาราง ข.2 พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของปริมาณหัวเชื้อผสม (Mixed culture) ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ในขวดเขย่า (ต่อ)

| % inoculums | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย (10 ชั่วโมง) | | | | | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------|--------|------|-----|----|--------|------|--------|------|
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 4% | 579.20 | 5.20 | 639.50 | 4.96 | - | - | 184.30 | 1.62 | 295.60 | 2.45 |
| 10% | 572.20 | 5.06 | 698.50 | 4.80 | - | - | - | - | 218.00 | 2.14 |
| 15% | 550.10 | 5.60 | 339.10 | 1.96 | - | - | - | - | 88.60 | 1.06 |
| 20% | 544.40 | 5.55 | 156.40 | 1.80 | - | - | - | - | 69.20 | 1.02 |

ภาคผนวก ซ

ตารางแสดงค่า OD.600 nm เพอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมัน ชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

ตารางที่ ซ.1 ค่า OD.600 nm ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

| เวลา (ชั่วโมง) | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 1 | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 2 | OD ₆₀₀ nm. ซ้ำที่ 3 | OD ₆₀₀ nm. เฉลี่ย | SD |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------|
| 0 | 0.301 | 0.307 | 0.309 | 0.306 | 0.004 |
| 3 | 0.344 | 0.350 | 0.345 | 0.346 | 0.003 |
| 4 | 0.497 | 0.491 | 0.490 | 0.493 | 0.004 |
| 5 | 0.546 | 0.559 | 0.549 | 0.551 | 0.007 |
| 10 | 0.803 | 0.810 | 0.813 | 0.809 | 0.005 |
| 14 | 1.101 | 1.103 | 1.111 | 1.105 | 0.005 |
| 15 | 1.353 | 1.355 | 1.350 | 1.353 | 0.003 |
| 16 | 2.056 | 2.094 | 2.067 | 2.072 | 0.020 |
| 20 | 2.411 | 2.433 | 2.441 | 2.428 | 0.016 |
| 24 | 2.511 | 2.502 | 2.509 | 2.507 | 0.005 |

ตารางที่ ๓.2 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย และเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

| เวลา (ชั่วโมง) | พื้นที่ได้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์ | น้ำมันที่เหลืออยู่ (g/l) | น้ำมันที่ถูกย่อย สลายไป (g/l) | เปอร์เซ็นต์การย่อย สลายน้ำมัน |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 107290.70 | 25 | 0 | 0 |
| 3 | 83753.00 | 18.5 | 6.5 | 26 |
| 4 | 78909.33 | 17.4 | 7.6 | 30.4 |
| 5 | 76410.67 | 16.8 | 8.2 | 32.8 |
| 10 | 63186.67 | 13.5 | 11.5 | 46 |
| 14 | 60842.00 | 13.4 | 11.6 | 46.4 |
| 15 | 53145.67 | 11.7 | 13.3 | 53.2 |
| 16 | 41722.00 | 9.2 | 15.8 | 63.2 |
| 20 | 33791.33 | 7.46 | 17.54 | 70.16 |
| 24 | 37212.33 | 8.22 | 16.78 | 67.12 |

ตารางที่ ๓.3 พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

| เวลา (ชั่วโมง) | พื้นที่ได้กราฟเฉลี่ย | | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 0 | 674.3 | 5.56 | 361.3 | 2.30 | 72.3 | 1.02 | 364.3 | 2.40 | 216.5 | 2.10 |
| 3 | 633 | 6.50 | 489.1 | 2.10 | 80.9 | 0.80 | 318.5 | 2.60 | 213.2 | 1.70 |
| 4 | 702.3 | 7.45 | 431.4 | 2.65 | 62.5 | 0.56 | 232.2 | 1.80 | 285.1 | 1.89 |
| 5 | 642.8 | 6.52 | 320.2 | 1.80 | 56.5 | 0.40 | 231.8 | 1.96 | 148.9 | 1.21 |
| 10 | 992 | 8.90 | 695.3 | 5.68 | 58.1 | 0.50 | 300.4 | 2.50 | 265.1 | 1.30 |
| 14 | 586.4 | 5.20 | 385.6 | 2.60 | 49.6 | 0.56 | 247.2 | 2.30 | 318.1 | 2.65 |
| 15 | 635.7 | 6.56 | 557.2 | 5.60 | 50.16 | 1.09 | 409.1 | 3.20 | 441.9 | 4.78 |
| 16 | 591.1 | 5.20 | 371.7 | 2.64 | 46 | 0.56 | 184.4 | 1.05 | 236.4 | 2.20 |

ตารางที่ ๗.3 พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงแบบกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ (ต่อ)

| เวลา (ชั่วโมง) | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย | | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 20 | 643.3 | 5.80 | 530.6 | 5.60 | 78.2 | 1.03 | 382.3 | 3.56 | 266.6 | 2.10 |
| 24 | 591.1 | 5.56 | 317.7 | 4.20 | 46.0 | 0.06 | 337.3 | 3.50 | 236.4 | 1.80 |

ภาคผนวก ฅ

ตารางแสดงค่า เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พื้นที่ได้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

ตารางที่ ฅ.1 ปริมาณน้ำมันที่เหลืออยู่ ปริมาณน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย และเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายน้ำมันของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

| เวลา (ชั่วโมง) | พื้นที่ได้กราฟ ไตรกลีเซอไรด์ | น้ำมันที่เหลืออยู่ (g/l) | น้ำมันที่ถูกย่อย สลายไป (g/l) | เปอร์เซ็นต์การย่อย สลายน้ำมัน |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 0 | 104624.00 | 25 | 0 | 0 |
| 10 | 48892.50 | 13.5 | 11.5 | 46 |
| 11 | 77470.75 | 25 | 0 | 0 |
| 13 | 65318.00 | 17.1 | 7.9 | 31.6 |
| 15 | 59685.75 | 16.7 | 8.3 | 33.2 |
| 18 | 58312.50 | 15.5 | 9.5 | 38 |
| 20 | 51145.00 | 12.3 | 12.7 | 50.8 |
| 21 | 77338.50 | 25 | 0 | 0 |
| 23 | 43570.50 | 18.9 | 6.1 | 24.4 |
| 25 | 59188.25 | 18.2 | 6.8 | 27.2 |
| 28 | 57315.00 | 16.5 | 8.5 | 34 |
| 30 | 51915.25 | 13.7 | 11.3 | 45.2 |

ตารางที่ ๓.2 พื้นที่ใต้กราฟกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC ของจุลินทรีย์ผสม (mixed culture) เมื่อเลี้ยงแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์แบบแผ่นหมุนชีวภาพ

| เวลา (ชั่วโมง) | พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย | | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | C8 | SD | C10 | SD | C12 | SD | C14 | SD | C16 | SD |
| 0 | 633.0 | 5.62 | 489.1 | 2.36 | 80.9 | 1.12 | 318.5 | 3.88 | 213.2 | 1.12 |
| 10 | 982.0 | 8.85 | 706.3 | 7.80 | 86.5 | 1.10 | 312.4 | 3.12 | 275.1 | 1.52 |
| 11 | 723.6 | 6.75 | 223.3 | 2.10 | - | - | 102.9 | 1.23 | 191.9 | 1.10 |
| 13 | 868.2 | 8.90 | 272.9 | 2.14 | - | - | 109.6 | 1.10 | 238.2 | 2.14 |
| 15 | 1203.9 | 10.2 | 263.4 | 2.45 | - | - | 90.1 | 0.89 | 225.0 | 2.10 |
| 18 | 1192.2 | 11.5 | 350.5 | 3.67 | 184.1 | 1.23 | 184.1 | 1.10 | 243.1 | 2.12 |
| 20 | 1284.3 | 14.3 | 429.0 | 4.12 | 204.4 | 2.54 | 365.2 | 3.50 | 327.6 | 3.27 |
| 21 | 550.7 | 5.60 | 218.7 | 2.12 | - | - | 93.0 | 0.85 | 188.6 | 1.17 |
| 23 | 648.1 | 6.54 | 292.8 | 2.56 | 235.0 | 2.36 | 482.1 | 2.56 | 234.9 | 2.27 |
| 25 | 629.0 | 6.15 | 486.3 | 4.30 | 137.9 | 1.20 | 518.8 | 4.86 | 370.6 | 3.40 |
| 28 | 663.8 | 6.19 | 515.2 | 4.68 | 81.3 | 1.08 | 269.7 | 2.20 | 400.4 | 3.80 |
| 30 | 759.3 | 7.45 | 605.4 | 5.75 | 209.4 | 2.36 | 375.8 | 3.12 | 543.6 | 5.34 |

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนนธิยา กาวีเต เกิดเมื่อวันที่ 17 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2530 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเทคโนโลยีธนบุรี ในปีการศึกษา 2551 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 23/3 หมู่ 7 ตำบลหัวเสือ อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง 52150

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน The 24th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2012) ระหว่างวันที่ 29-30 พฤศจิกายน 2555 ณ ศูนย์แกรนด์ไฮเทล จังหวัดอุบลราชธานี ในหัวข้อเรื่อง “Factors Affecting Fatty Acid Production by Mixed Culture”