บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยกราจากแหล่งตัวอย่าง

จากการคัดแยกราจากดิน ตะกรันน้ำมัน และพืชน้ำมัน 21 แหล่งตัวอย่าง โดยวิธีทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA พบว่า จะสามารถคัดแยกราได้ทั้งสิ้น 70 ไอโซเลต โดยจำนวนราที่คัดแยกได้ในแต่ละแหล่ง และลักษณะโคโลนีของราที่แยกได้ แสดงดังตารางที่ 3 และรูปที่ 4

ตารางที่ 3 จำนวนราที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ และลักษณะโคโลนีของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งPDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

แหล่ง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA	ความหนาและฟูของโคโลนี
ดินหลังร้านขายอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU)	CU1	โคโลนีสีขาว เส้นใยฟูเล็กน้อย มีการเจริญเติบโตช้า	++
	CU2	โคโลนีสีขาวครีม เส้นใยฟูตรงกลาง	++
	CU3	โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู ตรงกลางมีสปอร์สีน้ำตาล ด้านหลังสีส้มย่น	+++
	CU4	โคโลนีสีขาวเหลือง เส้นใยแนบไปกับอาหาร ขอบไม่เรียบ	+
	CU5	โคโลนีมีสปอร์สีดำเป็นชั้น ๆ วง ๆ รอบโคโลนี ด้านหลังเป็นจีบ ๆ	+++
ดินจากน้ำพุร้อน จ.เชียงใหม่ (SKP)	SKP1	โคโลนีมีสปอร์สีดำ ขอบรอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาว	++
	SKP2	มีสีขาวรอบนอกโคโลนีกว้างเล็กน้อย มีสปอร์สีดำ	++
	SKP3	โคโลนีสปอร์สีเขียวเข้ม ขอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาวโดยรอบ โตช้า	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่ง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA	ความหนาและฟูของโคโลนี
ดินจากน้ำพุร้อน จ.เชียงใหม่ (SKP) (ต่อ)	SKP4	โคโลนีสปอร์สีเขียวอมเทาตรงกลางโคโลนี ขอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาวโดยรอบ	+
ดินจากน้ำพุร้อน จ.แม่ฮ่องสอน (PAI)	PAI1	มีสปอร์สีเขียวเข้ม เส้นใยสีขาวรอบโคโลนี	+++
	PAI2	โคโลนีมีเส้นใยสีเหลือง ตรงกลางมีสปอร์สีเหลืองน้ำตาล	++
	PAI3	เส้นใยสีขาวรอบนอกโคโลนี มีสปอร์สีดำ	+++
	PAI4	เส้นใยขาวรอบโคโลนีและสปอร์มีสีเหลืองตรงกลางโคโลนี	++
	PAI5	เส้นใยฟูแค่รอบ ๆ โคโลนี ตรงกลางเป็นเส้นใยแนบไปกับอาหาร	+
	PAI6	โคโลนีมีสปอร์เป็นผงละเอียดสีเขียวเทา ๆ ขอบเรียบ โตขยายโคโลนีเร็ว	+
ดินจากป่าเต็งรัง จ.น่าน (NAN)	NAN101	โคโลนีมีสปอร์เกาะกันเป็นก้อนเล็ก	+
	NAN102	โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู	++
	NAN103	โคโลนีมีเส้นใยฟูสีขาวคล้ายสำลี	+++
	NAN104	โคโลนีสีขาว เส้นใยฟูทั้งโคโลนี ด้านหลังตรงกลางเป็นสีเหลือง	++
	NAN105	โคโลนีมีสปอร์สีเหลืองเข้ม ขอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาว	++
	NAN106	โคโลนีมีลักษณะเส้นใยเป็นกงจักรสีขาว เจริญช้า	+++
	NAN107	มีสปอร์เกาะกันเป็นก่อนเล็กสีขาวและสีเขียว	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่ง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA	ความหนาและฟูของโคโลนี
ดินจากป่าเต็งรัง จ.น่าน (NAN) (ต่อ)	NAN108	โคโลนีมีสปอร์สีดำ	++
	NAN109	โคโลนีสีขาว โคโลนีเส้นใยฟูตรงกลางโคโลนี แต่รอบนอกมีเส้นใยฟูน้อยกว่าตรงกลางโดโลนี	+++
ดินจากเกาะไผ่ จ.กระบี่ (PI)	PI1	โคโลนีมีสปอร์สีเขียว ตรงกลางสปอร์เป็นผง ๆ สปอร์รอบนอกเป็นเม็ด ๆ	++
	PI2	โคโลนีแบนติดกับอาหาร และมีเส้นใยฟูเป็นกระจุกอยู่รอบโคโลนี	+
	PI3	โคโลนีมีสปอร์สีเหลืองเข้ม ขอบโคโลนีมีเส้นใยฟูสีขาว	++
ดินร่วน จ.กระบี่ (KB)	KB1	เส้นใยฟูสีขาว ขอบเรียบ ตรงกลางเส้นชี้แหลมเป็นพุ่ม โตช้า	++
	KB2	เส้นใยสีขาว ไม่ฟูจะแนบกับอาหาร ขอบไม่เรียบ โตช้า	+
ดินจากสุสานหอย จ.กระบี่ (SH)	SH1	โคโลนีสีคล้ายรังกระดาษสีน้ำตาล เส้นใยไม่ฟู โตช้ามาก	+
	SH2	โคโลนีมีสปอร์สีเหลืองเข้มตรงกลางโคโลนี รอบโคโลนีมีเส้นใยสีขาวขอบเรียบ	++
	SH3	โคโลนีสีเหลือง ขอบไม่เรียบ โตช้า	+
	SH4	โคโลนีมีสปอร์สีเขียวเข้ม ขอบโคโลนีมีเส้ยใยสีขาวเล็กน้อย	+
	SH5	โคโลนีมีสปอร์สีเขียว ขอบขาว	+
	SH6	โคโลนีสีเหลือง ขอบไม่เรียบ	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่ง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA	ความหนาและฟูของโคโลนี
ดินจากโรงงานน้ำมันปาล์ม จ.กระบี่ (KBP)	KBP1	เส้นใยสีขาว ฟูตรงกลาง ขอบเรียบ	++
	KBP2	โคโลนีมีเส้นใยสั้นๆ สีขาวเทาๆ โตช้า ด้านหลังเป็นสีดำ ขอบเรียบ	+
	KBP3	โคโลนีสีขาว ด้านหน้าโคโลนีเป็นก้อนนูน ขอบไม่เรียบ โตช้า	+
ดินจากศูนย์สิ่งแวดล้อมศึกษา จ.เชียงใหม่ (SVL)	SVL1	โคโลนีสีม่วงอ่อน ไม่ฟู โตช้า	+
	SVL2	โคโลนีสีขาว เส้นใยสั้น โตช้า	+
ดินจอมปลวก จ.อยุธยา (AU)	AU1	เส้นใยสีขาว และมีการเจริญของเส้นใยบาง ๆ รอบโคโลนี	++
	AU2	เส้นใยสีน้ำตาลยาว สปอร์เป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อน	+++
ดินจากไร่หม่อน จ.มุกดาหาร (MD)	MD1	สปอร์เป็นผงละเอียดสีเขียวขี้ม้า	+
	MD2	สปอร์เป็นผงละเอียดสีดำ	+
	MD3	สปอร์เป็นผงละเอียดสีน้ำตาล ขอบโคโลนีสีขาว	+
ดินดำจาก อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว (SK)	SK1	สปอร์เป็นผงคล้ายดินทรายมีสีเขียวขอบ ๆ โคโลนี เป็นสีเหลืองอ่อน	++
	SK2	สปอร์เป็นผงคล้ายดินทรายสีดำ เส้นใยเป็นสีเหลืองอ่อน	+
	SK3	สปอร์เป็นผงละเอียดสีเขียวเข้ม	+
	SK4	สปอร์เป็นผงละเอียดสีเขียวเข้มปนดำ	+
	SK5	ตรงกลางโคโลนีมีสปอร์เป็นผงละเอียดสีน้ำตาลคล้าย ๆ ดินทราย บริเวณขอบรอบ ๆ โคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อนชัดเจน	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่ง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA	ความหนาและฟูของโคโลนี
ดินจากสวนมะขาม จ.ยโสธร (YSH)	YSH1	สปอร์เป็นผงละเอียดสีดำ ขอบรอบ ๆ โคโลนีมีเส้นใยสีขาว	+
	YSH2	สปอร์คล้าย ๆ ดินทราย มีสีน้ำตาลปนดำ	++
	YSH3	สปอร์เป็นผงละเอียด เส้นใยโตแนบไปกับอาหาร	+
ตะกรันน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชตราองุ่น จ.นครปฐม (SIDI)	SIDI	มีสปอร์สีดำกระจายทั่วโคโลนี เส้นใยฟูเล็กน้อย	++
เชื้อจากผลปาล์มแหล่ง A จ. ชุมพร (PFA)	PFA	โคโลนีสีขาว มีสปอร์สีเหลือง เส้นใยเกาะกันเป็นก้อน	+
เชื้อผลปาล์มน้ำมันแหล่ง B จ. ชุมพร (PFB)	PFB1	สปอร์สีเขียวเข้ม	+
	PFB2	เส้นใยสีขาวหม่น มองเห็นสปอร์ไม่ชัดเจน	+
	PFB3	เส้นใยสีขาวรอบโคโลนี เริ่มแรกสปอร์สีดำ แล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียว	+
เชื้อผลปาล์มน้ำมันแหล่ง C จ. ชุมพร (PFC)	PFC1	สปอร์มีสีเขียว ขอบโคโลนีลักษณะเกาะกันเป็นก้อนสีขาว	+
	PFC2	เส้นใยฟู สีขาว สปอร์สีเทาดำกระจายไม่อัดกันแน่น โตเร็วมาก	++++
เมล็ดปาล์ม จ. ชุมพร (PS)	PS1	เส้นใยสีขาวบางเห็นชัดที่ขอบโคโลนี สปอร์สีเขียวอ่อน	+
	PS2	เส้นใยสีขาวหม่น ๆ สปอร์สีเขียวแก่	++
มะพร้าวขูดแหล่ง A (COA)	COA1	สปอร์สีเขียวเทา โตช้า ขอบไม่เรียบ	+
	COA2	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเทาอมเขียว ผลิตของเหลวสีดำคล้ายหยดน้ำมันบนเส้นใย ไม่ค่อยฟู	+

ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่ง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนีของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA	ความหนาและฟูของโคโลนี
มะพร้าวขูดแหล่ง A กรุงเทพมหานคร (COA)	COA3	สปอร์สีเขียว เห็นเส้นใยสีขาวรอบนอกชัดเจน เมื่ออายุมากขึ้นด้านหลังจะมีลักษณะเป็นจีบๆ	+
มะพร้าวขูดแหล่ง B กรุงเทพมหานคร (COB)	COB	เส้นใยสีขาว เส้นใยฟูเล็กน้อย พื้นผิวโดยรวมเป็นจีบ ๆโดยรอบ	++
เมล็ดทานตะวัน จ.สระบุรี (SSF)	SSF1	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ขอบเรียบ โตช้า	+
	SSF2	เส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวอ่อน	+
	SSF3	เส้นใยสีขาวฟู โตเร็ว	+++
	SSF4	เส้นใยสีขาวอยู่รอบโคโลนีและมีสปอร์สีเหลือง	+

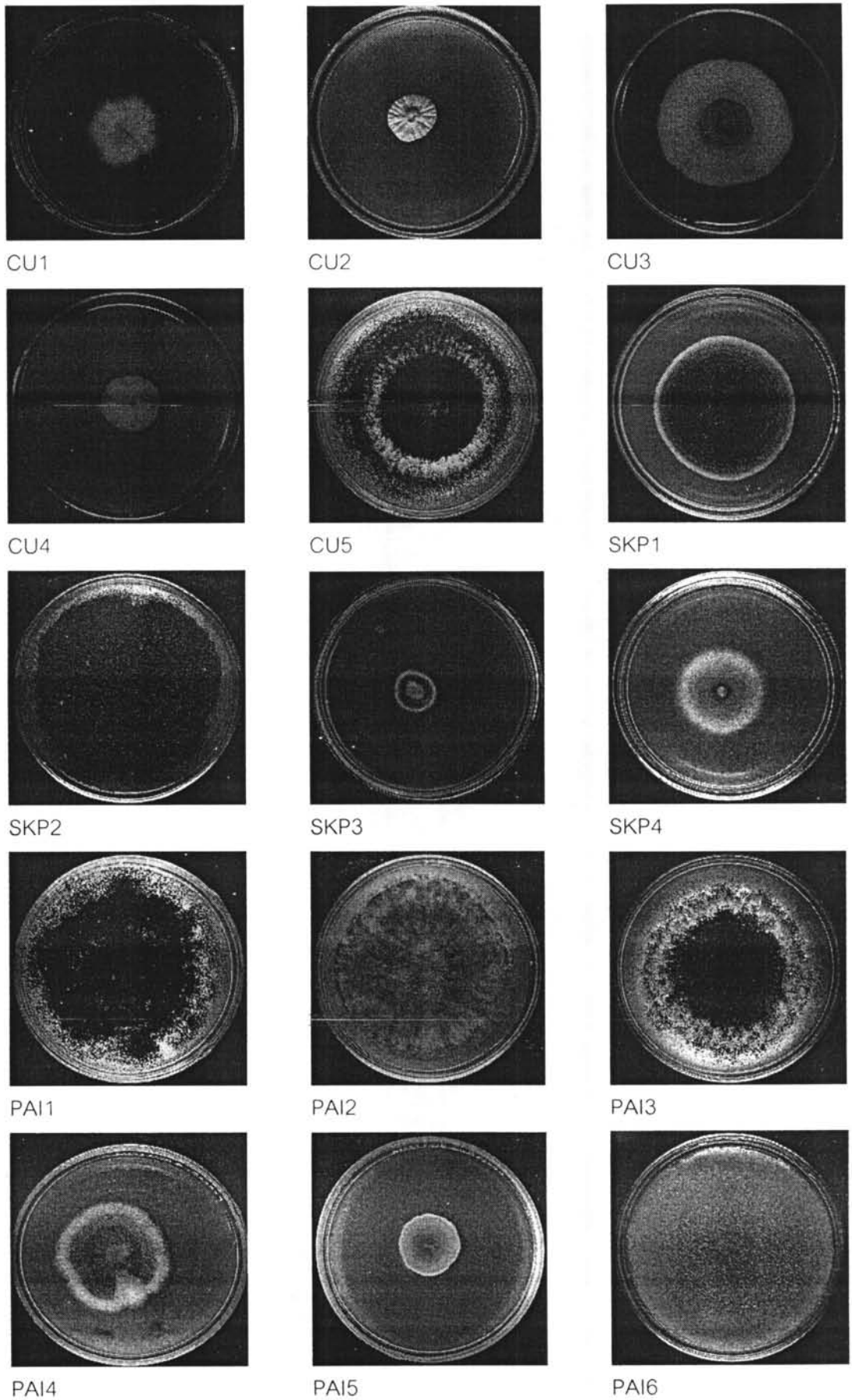
หมายเหตุ : เครื่องหมาย + แสดงระดับความหนาและฟูของโคโลนี

+ น้อย คือ เส้นใยแนบไปกับอาหาร

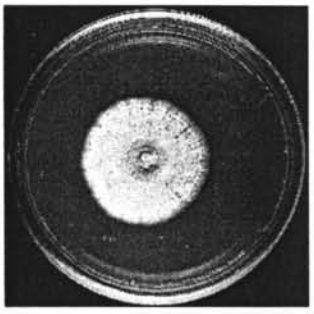
++ ปานกลาง คือ เส้นใยฟูชูขึ้นในอากาศ (aerial mycelium) เล็กน้อย

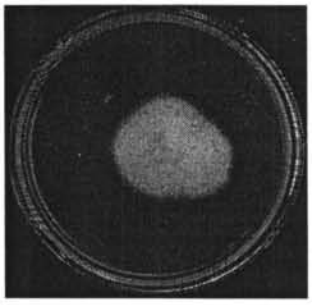
+++ มาก คือ เส้นใยฟูมาก เส้นใยชูขึ้นในอากาศเห็นได้อย่างชัดเจน โตเร็ว

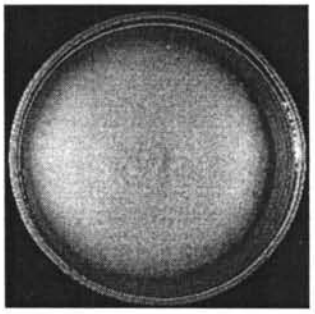
++++ มากที่สุด คือ เส้นใยฟูจนเติมจานเพาะเชื้อ

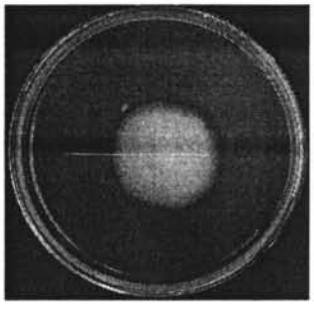


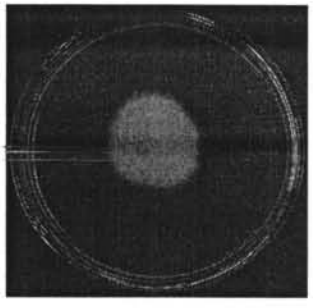
รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีราจากตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน

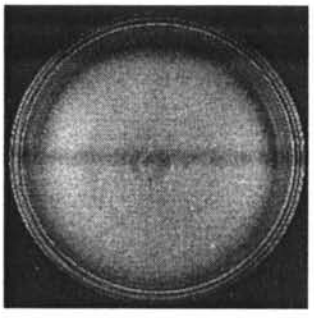

NAN101

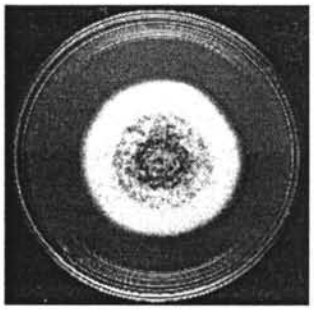

NAN102

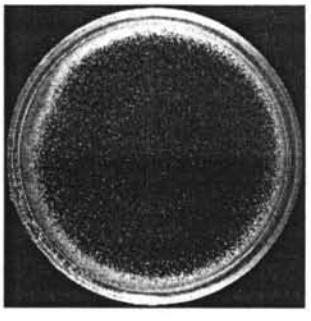

NAN103

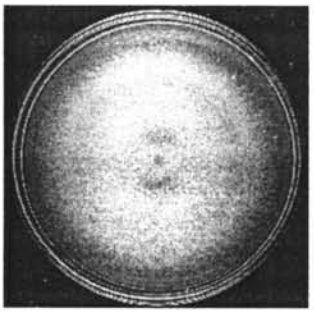

NAN104

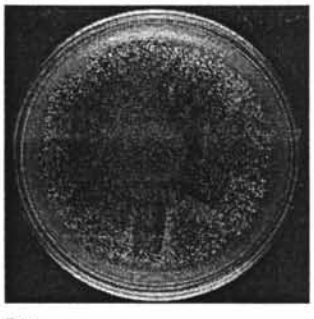

NAN105

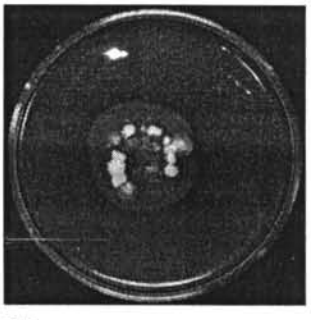

NAN106

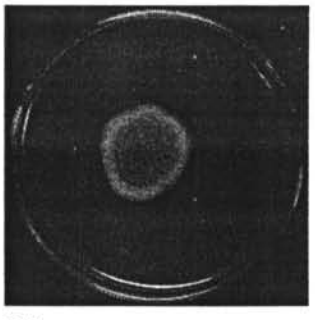

NAN107

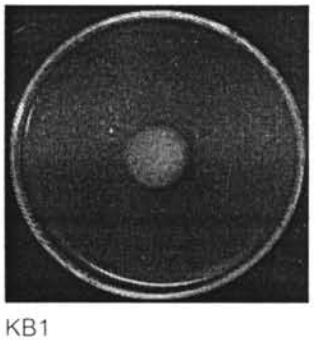

NAN108

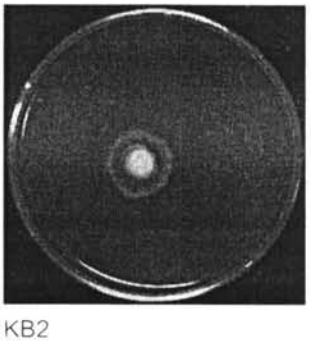

NAN109

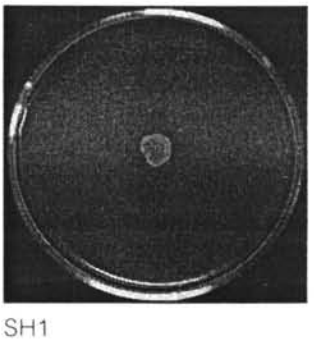

PI1


PI2

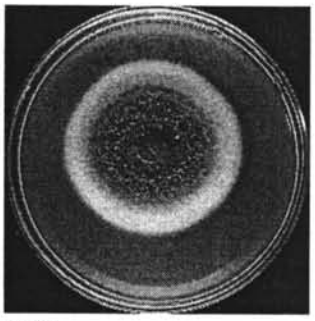

PI3

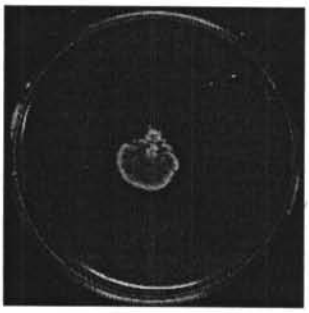

KB1

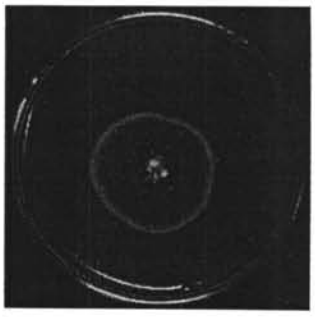

KB2

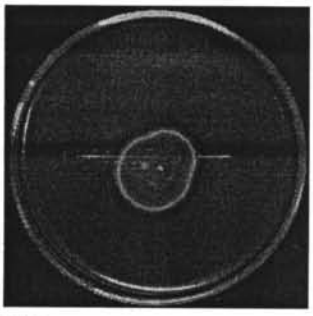

SH1

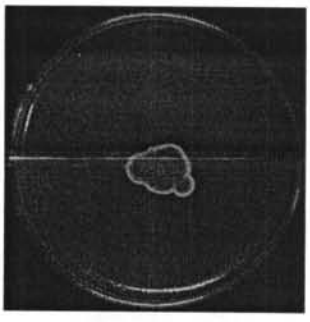
รูปที่ 4 (ต่อ)

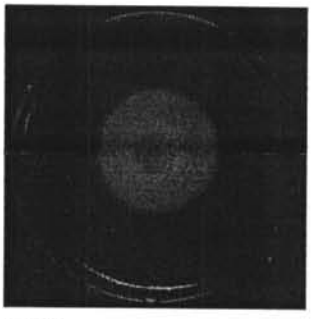

SH2

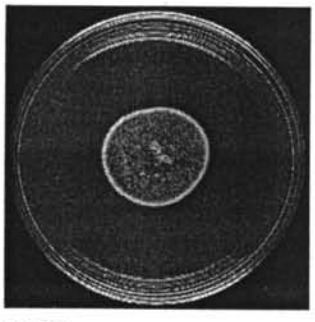

SH3

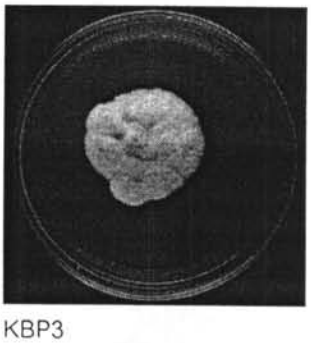

SH4

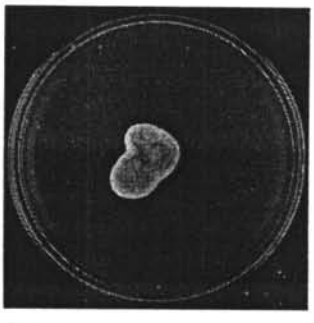

SH5

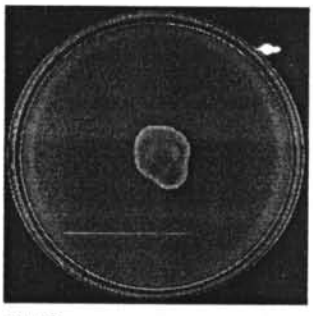

SH6

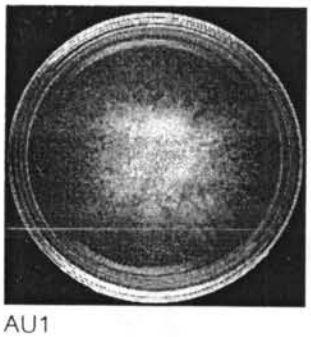

KBP1

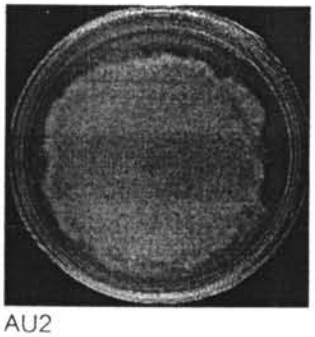

KBP2

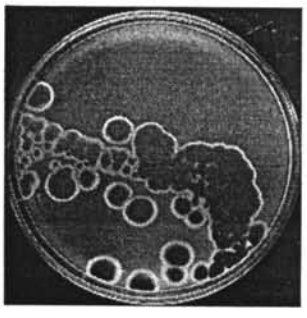

KBP3

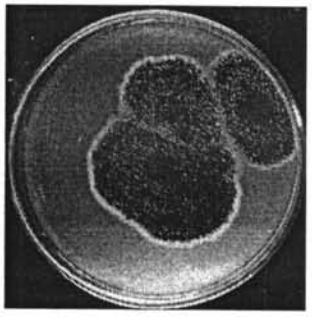

SVL1

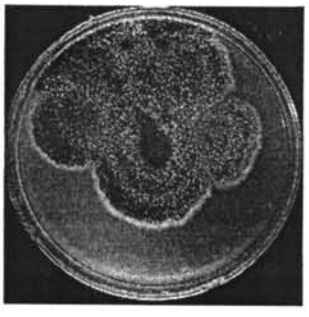

SVL2


AU1

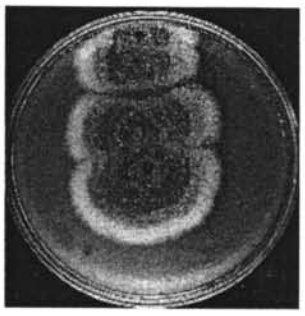

AU2


MD1

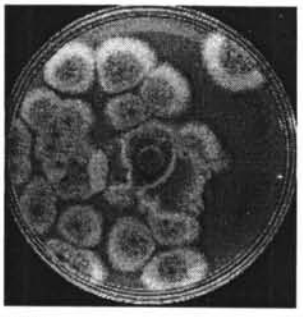

MD2


MD3

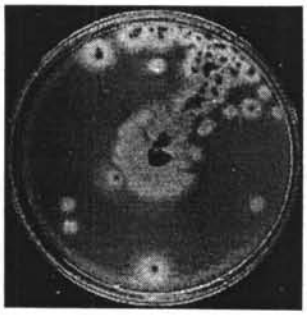
รูปที่ 4 (ต่อ)



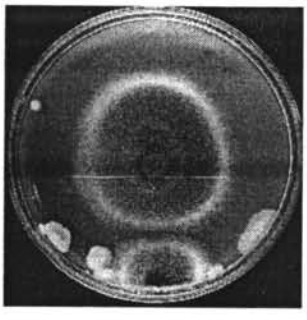
SK1



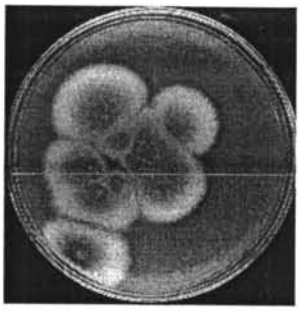
SK2



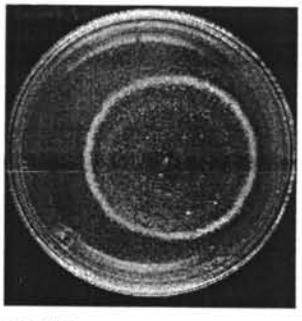
SK3



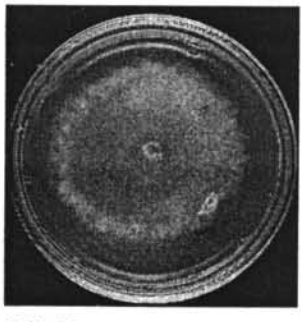
SK4



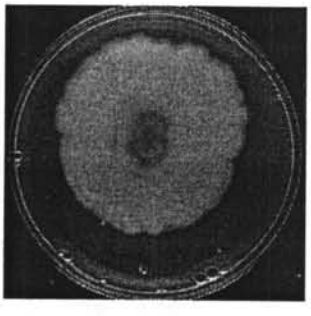
SK5



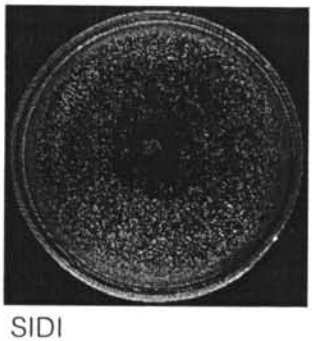
YSH1



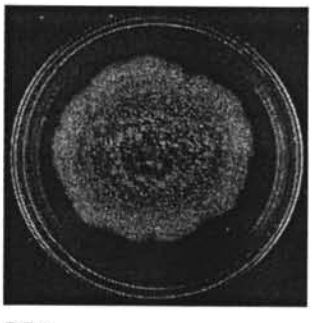
YSH2



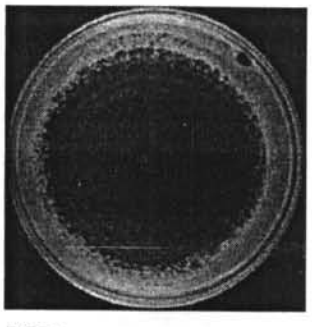
YSH3



SIDI

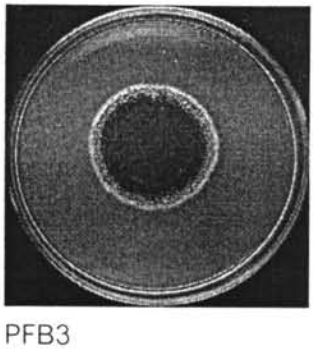


PFA

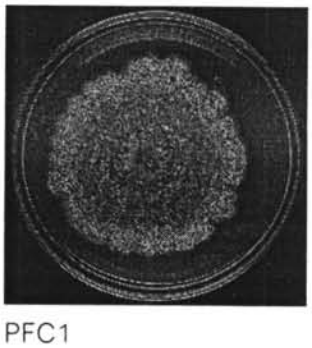


PFB1

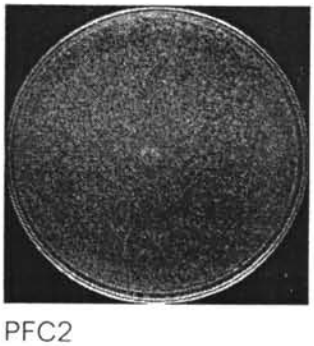
PFB2



PFB3



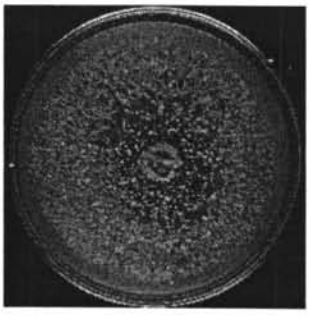
PFC1



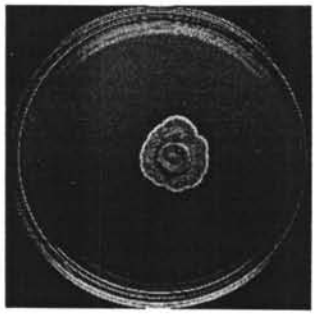
PFC2

รูปที่ 4 (ต่อ)

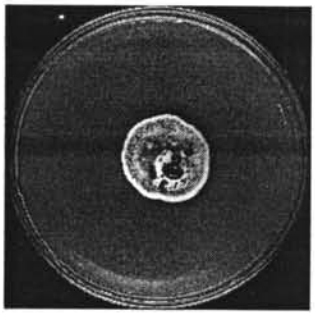
PS1



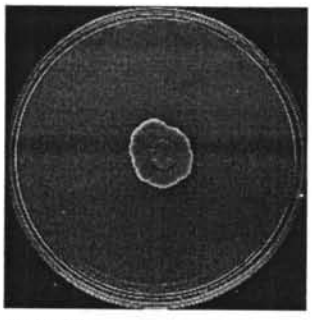
PS2



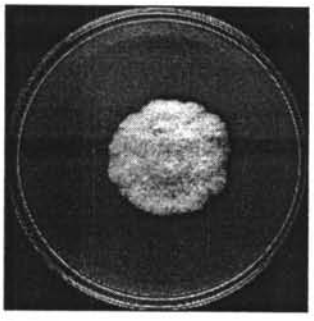
COA1



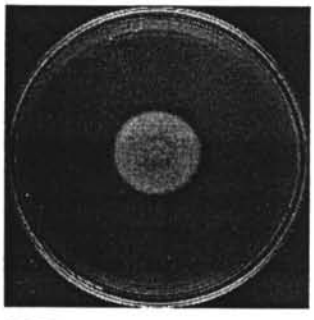
COA2



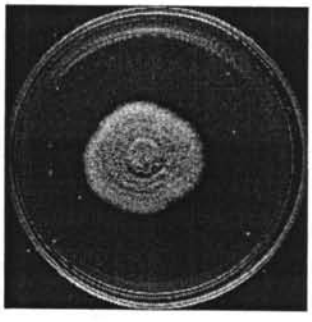
COA3



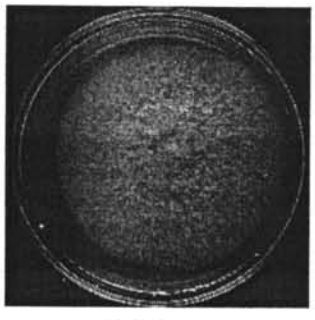
COB



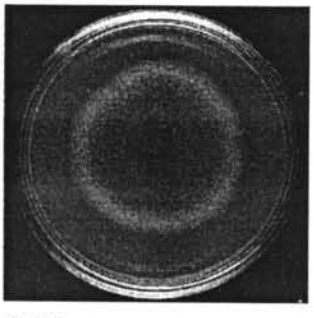
SSF1



SSF2



SSF3



SSF4

รูปที่ 4 (ต่อ)

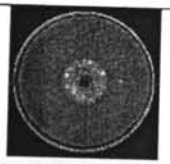
2. การคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพสของราที่แยกได้จำนวน 70 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่เติมโรดามีน บี เป็นเวลา 7 วัน โดยราที่สามารถผลิตไลเพสได้จะมีการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร พบว่าสามารถคัดเลือกราที่สามารถผลิตไลเพสได้ทั้งสิ้น 38 ไอโซเลต (ตารางที่ 4)

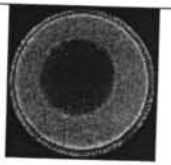
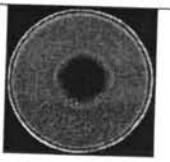
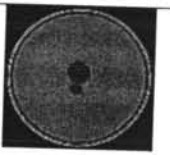
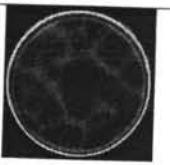
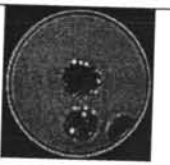
3. การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสของราที่คัดเลือกได้

จากการตรวจวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสของราที่มีการเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่เติมโรดามีน บี ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตทั้ง 38 ไอโซเลต พบว่าราไอโซเลต NAN103 ที่แยกได้จากดินในป่าเต็งรัง จ.น่าน มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะ 87.73±0.99 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เป็นไอโซเลตที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดของไอโซเลตราที่ทำการคัดเลือกทั้งหมด (ดังรูปที่ 5)

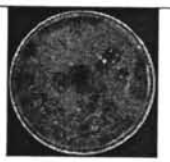
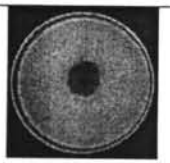
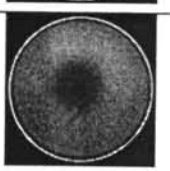
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบราที่คัดเลือกจากแหล่งต่าง ๆ บนอาหารโรดามีน บี

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
CU1	-	
CU2	+	
CU3	+	
CU4	-	
CU5	+	

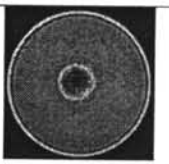
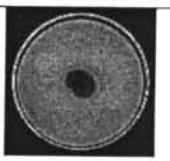
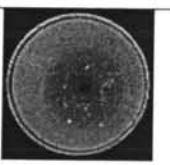
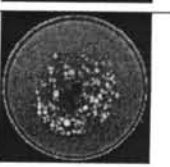
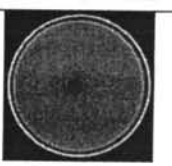
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
SKP1	+	
SKP2	+	
SKP3	-	
SKP4	+	
PAI1	+	

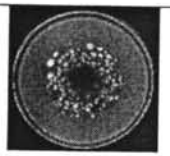
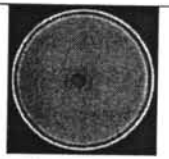
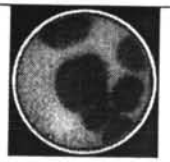
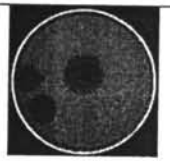
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
PAI2	+	
PAI3	-	
PAI4	+	
PAI5	-	
PAI6	-	

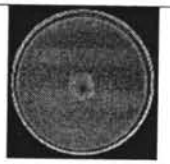
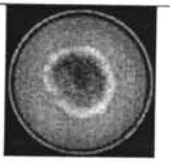
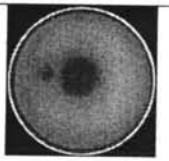
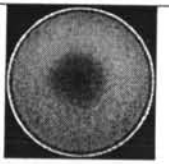
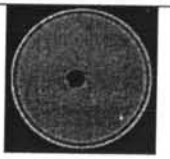
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
NAN101	+	
NAN102	-	
NAN103	+	
NAN104	+	
NAN105	-	

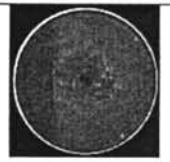
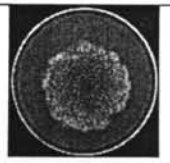
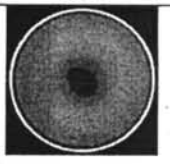
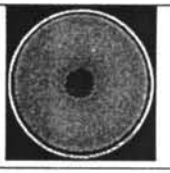
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
NAN106	+	
NAN107	-	
NAN108	+	
NAN109	-	
PI1	-	

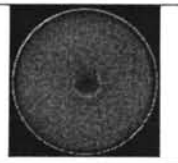
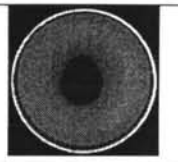
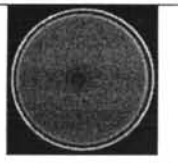
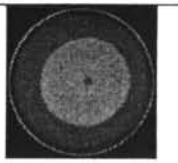
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
PI2	-	
PI3	+	
KB1	-	
KB2	-	
SH1	-	

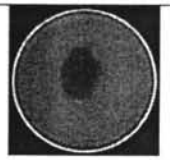
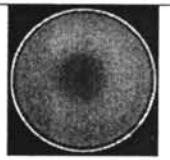
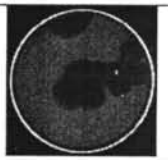
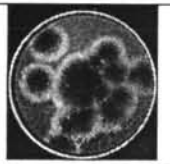
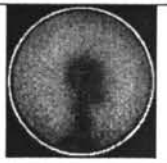
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
SH2	+	
SH3	+	
SH4	-	
SH5	-	
SH6	-	

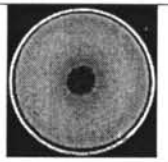
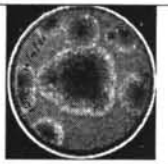
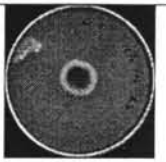
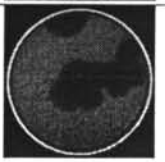
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
KBP1	+	
KBP2	-	
KBP3	-	
SVL1	-	
SVL2	+	

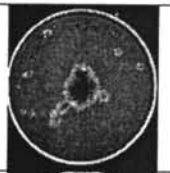
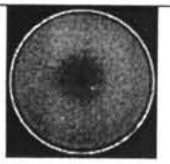
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
AU1	-	
AU2	-	
MD1	-	
MD2	+	
MD3	-	

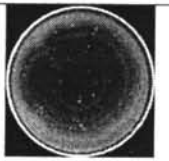
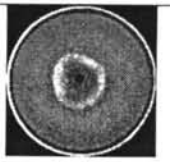
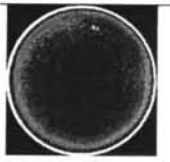
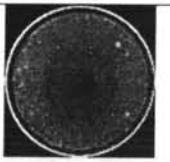
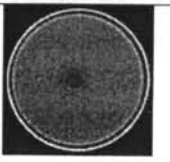
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
SK1	-	
SK2	+	
SK3	+	
SK4	+	
SK5	-	

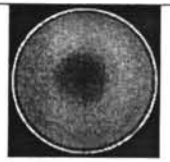
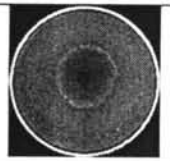
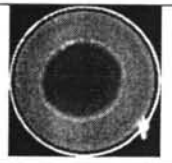
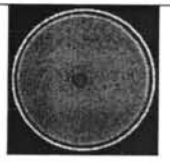
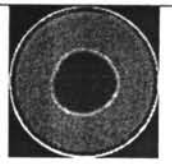
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
YSH1	-	
YSH2	+	
YSH3	+	
SIDI	+	
PFA	-	

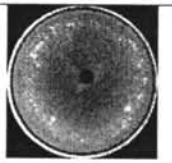
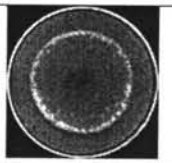
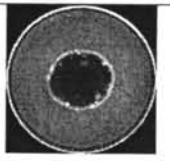
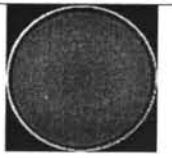
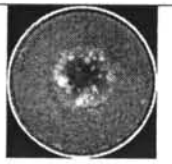
ตารางที่ 4 (ต่อ)

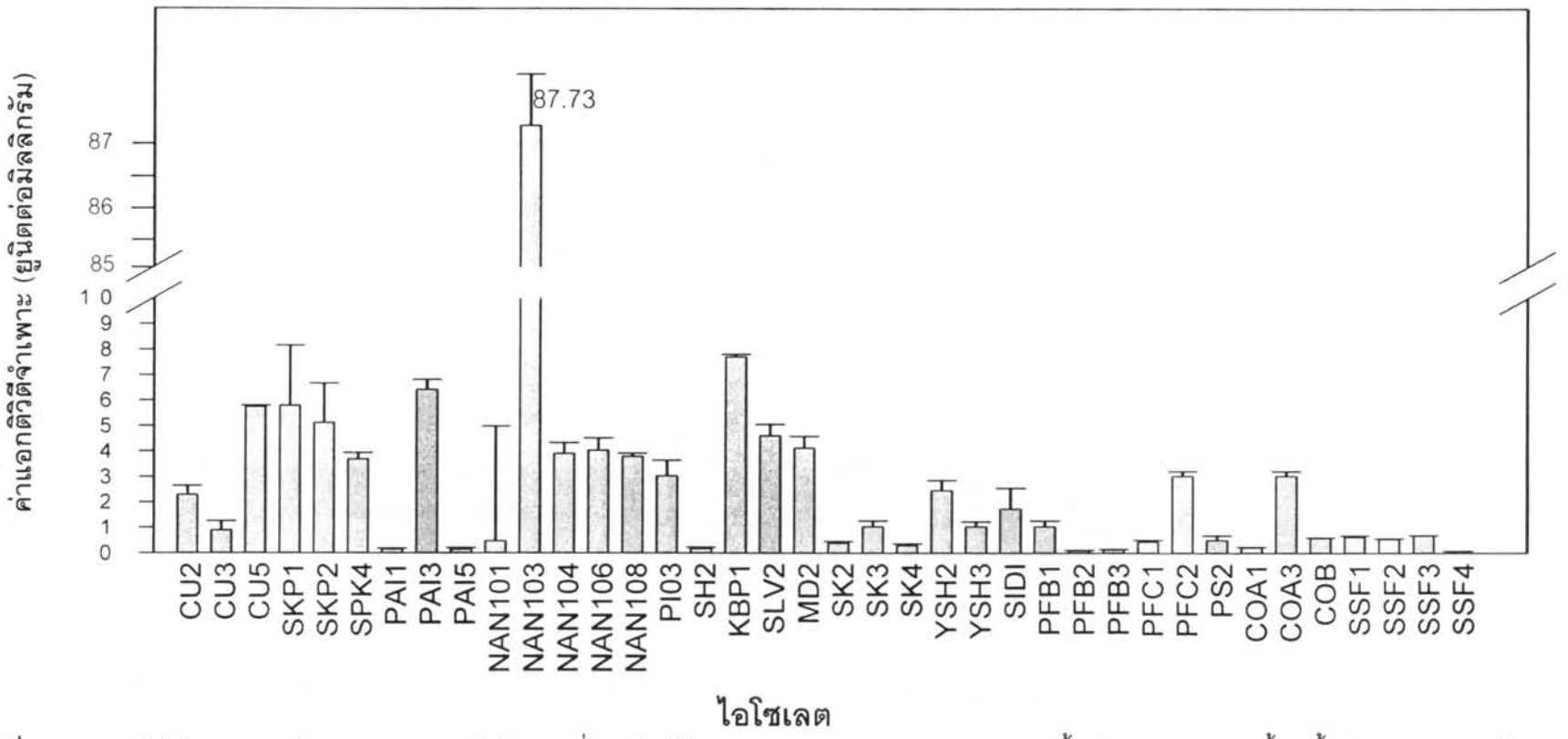
ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
PFB1	+	
PFB2	+	
PFB3	+	
PFC1	+	
PFC2	-	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
PS1	-	
PS2	+	
COA1	+	
COA2	-	
COA3	+	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปราบนอาหารโรดามีน บี
COB	+	
SSF1	+	
SSF2	+	
SSF3	+	
SSF4	+	

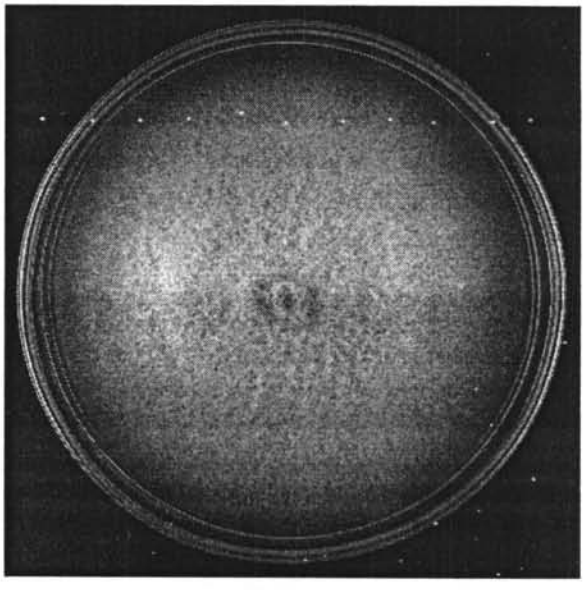


รูปที่ 5 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากรา 38 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเพส (LP medium) ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ค่าที่ได้มาจากการเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ (ยูนิต: นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของราที่คัดเลือกได้เพื่อระบุสายพันธุ์

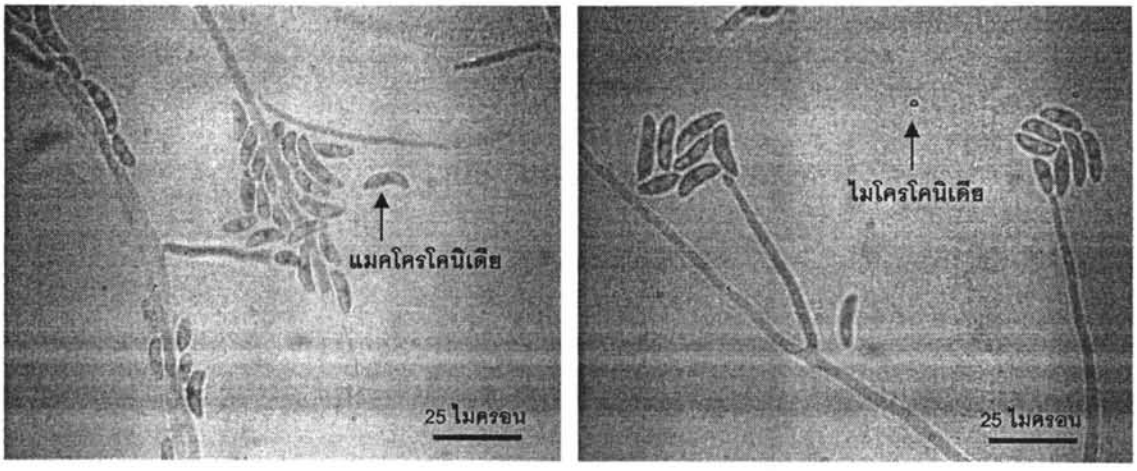
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไอโซเลต NAN103

ราไอโซเลต NAN103 เป็นราเส้นใยที่สามารถแยกได้จากดินในป่าเต็งรัง จ.น่าน ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน คือ มีเส้นใยสีขาวฟู ขอบโคโลนีเรียบ (รูปที่ 6) มีการสร้างสปอร์แต่จะเห็นไม่ชัดเจน ต้องศึกษาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ของราไอโซเลต NAN103

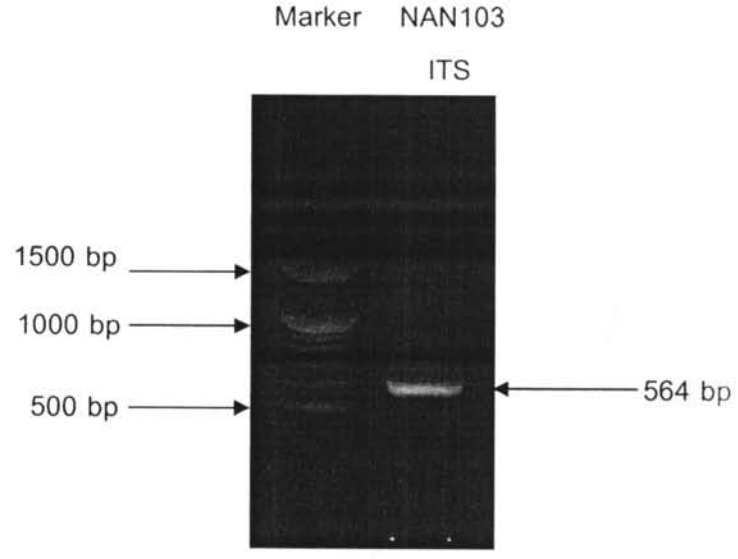
ส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าราไอโซเลต NAN103 มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น มีโคนิดิโอสปอร์เป็นลักษณะยาวรี มีขนาดสปอร์เล็ก (microconidia) และใหญ่ (macroconidia) ปะปนกัน แต่ละสปอร์ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 1-4 เซลล์ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต NAN103 ที่เจริญบนชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

4.2 การศึกษาอณูพันธุศาสตร์เพื่อระบุสายพันธุ์ของราไอโซเลต NAN103

จากการตรวจสอบลำดับเบส ITS 564 คู่เบส (รูปที่ 9) หลังจากการเพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR การโคลน และการวิเคราะห์ลำดับเบส (ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4)(รูปที่ 8) เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank พบว่าข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ของราไอโซเลต NAN103 ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบริเวณ ITS ของรา *Fusarium solani* โดยมี Query coverage 100 เปอร์เซ็นต์ คะแนนรวม 1070 บิต (bits) และ Identity สูงสุด 98 เปอร์เซ็นต์ คือ *Fusarium sp.*(accession : AB255352.1) และที่ Query coverage 98 เปอร์เซ็นต์ มีคะแนนรวม 1063 บิต (bits) และ Identity สูงสุด 99 เปอร์เซ็นต์ คือ *Fusarium solani* (accession : AM412642.1) (ภาคผนวก ซ)



รูปที่ 8 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 หลังจากแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส ที่กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

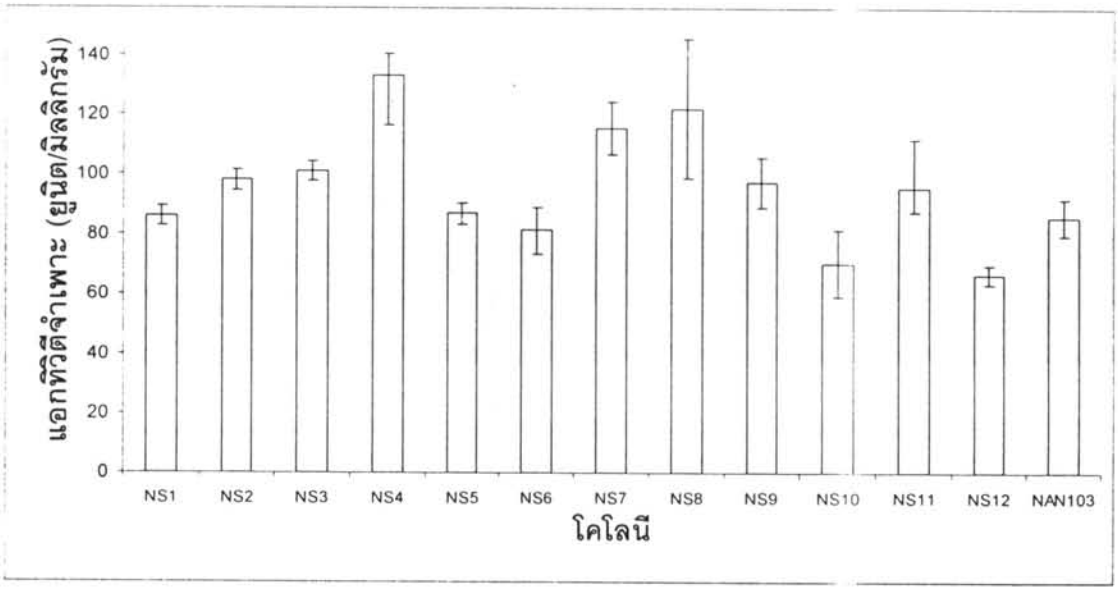
TTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATTCGAGGTCAACATTCAGAAGTTG
GGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGCCGCTCTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTAC
TACGCAATGGAAGCTGCGGCGGGACCGCCACTGTATTTGGGGGACGGCGT
TGTGCCCACAGGGGGCTTCCGCCGATCCCCAACGCCAGACCCGGGGGCCT
GAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACAT
TACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCC
GTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGCTTGTTTACTCAGAAAAAACATTATA
GAAACAGAGTTAGGGGGTCCTCTGGCGGGGGCGGCCCGTGTTACGGGGCC
GTCTGTTCCCGCCGAGGCAACGTTTTAGGTATGTTCACAGGGTTGATGAGT
TGTATAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTT
ACGACTT

รูปที่ 9 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราไอโซเลต NAN103 ที่เพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4

5 ชักนำให้เกิดมิวเทชันและการคัดเลือกในราที่คัดเลือกได้

5.1 การคัดเลือกราโคโลนีเดี่ยวจากราไอโซเลต NAN103

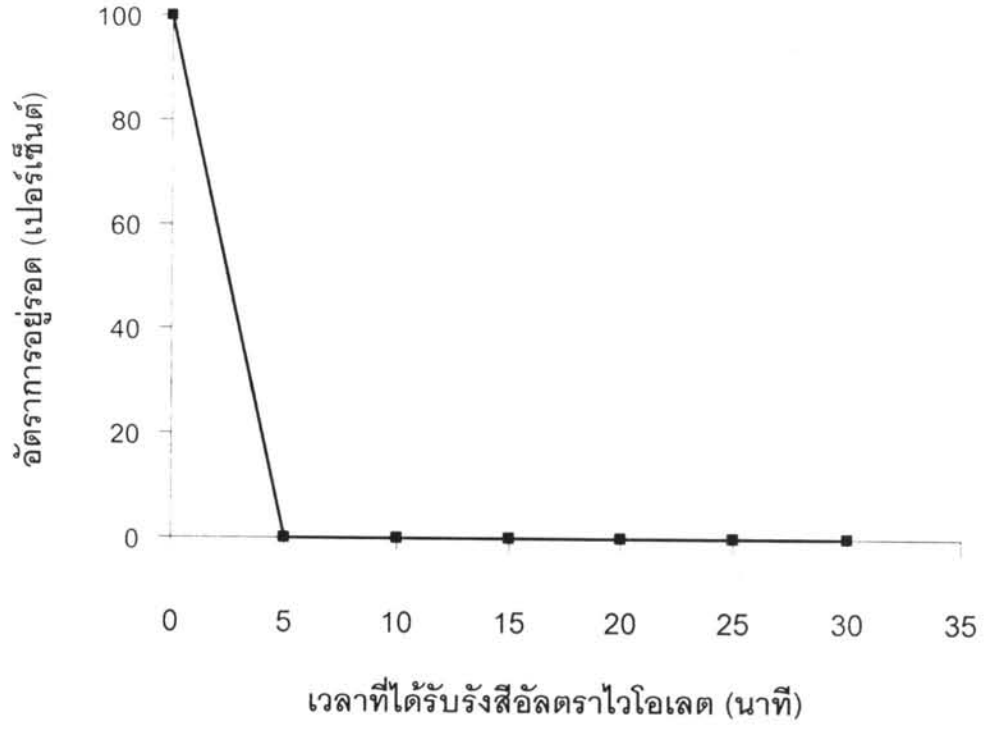
การคัดเลือกราโคโลนีเดี่ยวจากราไอโซเลต NAN103 โดยทำการเก็บราที่มีการเจริญแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต คือ NS1 NS2 NS3 NS4 NS5 NS6 NS7 NS8 NS9 NS10 NS11 และ NS12 นำราทั้ง 12 ไอโซเลต มาวัดค่าแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะ โดยพบว่าราที่แยกได้ไอโซเลต NS4 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเฉลี่ยสูงสุด คือ 132.64 ±7.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับราไอโซเลต NAN103 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 10 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากราที่คัดเลือกจากสปอร์เดี่ยว
(ยูนิต: นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที)

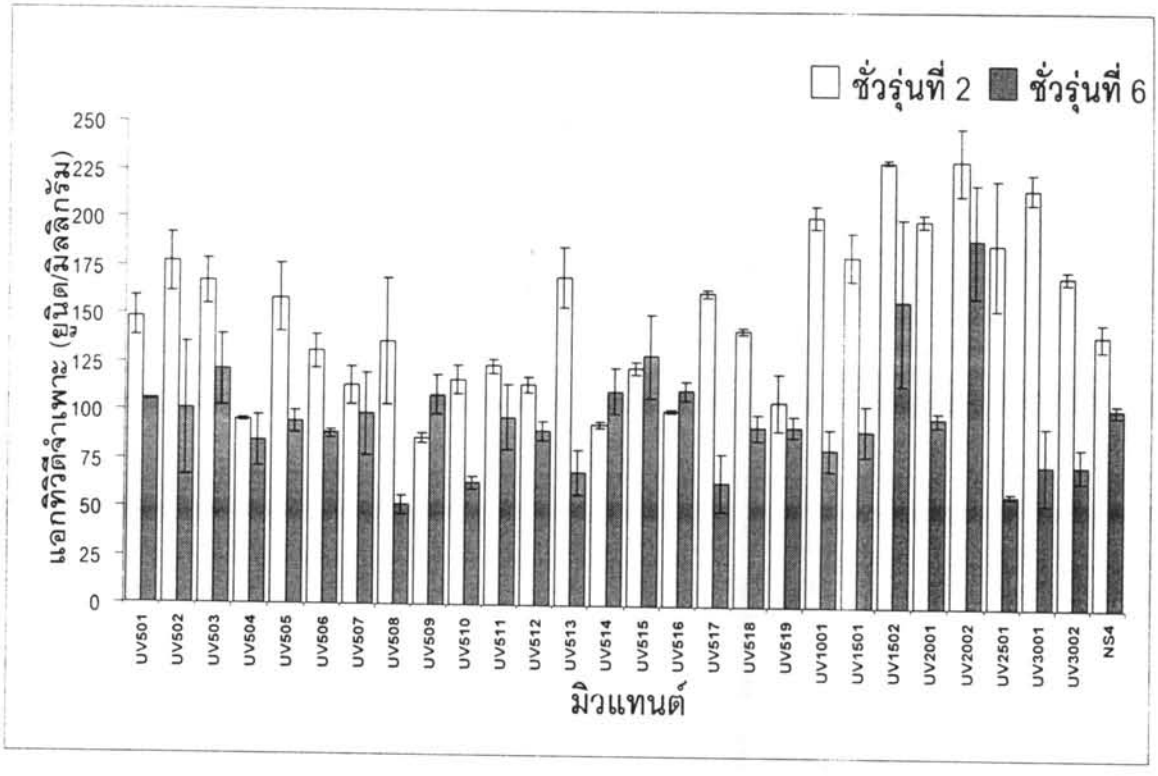
5.2 การชักนำให้เกิดมิวเทชันของราโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

นำราไอโซเลต NS4 ที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดจากการคัดเลือกสปอร์เดี่ยวมาชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลาต่าง ๆ พบว่าช่วงเวลาของการฉายรังสีที่ทำให้ราอัตราการอยู่รอด 1 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่ 5 นาที (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาของการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตกับเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของราไอโซเลต NS4

ทำการเก็บเชื้อที่สามารถอยู่รอดในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต คือ UV501 UV502 UV503 UV504 UV505 UV506 UV507 UV508 UV509 UV510 UV511 UV512 UV513 UV514 UV515 UV516 UV517 UV518 UV519 UV1001 UV1501 UV1502 UV2001 UV2002 UV2501 UV3001 และ UV3002 จากนั้นนำราทั้ง 27 ไอโซเลต มาวัดค่าแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและ คำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 2 และ ชั่วรุ่นที่ 6 (ภาคผนวก ช และ รูปที่ 12)

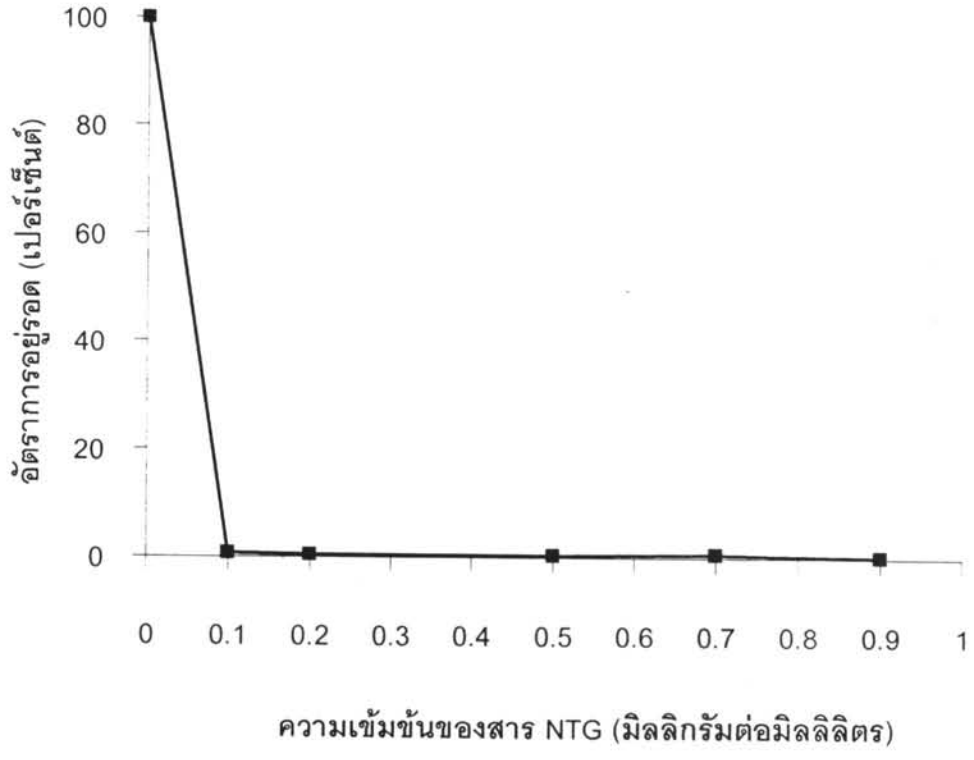


รูปที่ 12 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากราที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 5–30 นาทีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมคือราไอโซเลต NS4
(ยูนิต: นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที)

จากการทดลองเลี้ยงราที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 5–30 นาที ที่ชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6 แล้วนำมาวัดค่าแอกทิวิตีจำเพาะพบว่าเมื่อเลี้ยงราถึงชั่วรุ่นที่ 6 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของแต่ละโคโลนีส่วนใหญ่มีค่าที่สูงกว่าค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราชั่วรุ่นที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่าราไอโซเลต UV2002 ชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6 มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะที่สูงและสูงกว่าสายพันธุ์เดิม (ราไอโซเลต NS4) และมิวแทนต์อื่น ๆ ดังนั้นจึงเลือกราไอโซเลต UV2002 ไปชักนำให้เกิดการกลายโดยใช้สาร NTG ต่อไป

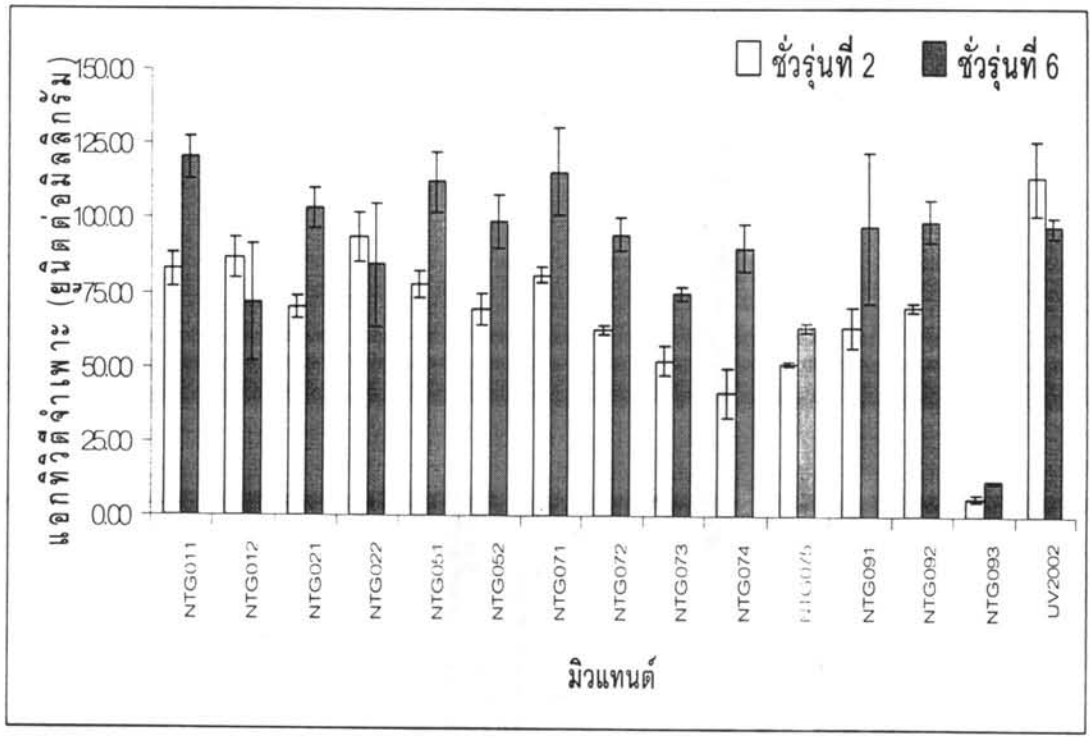
5.3 การชักนำให้เกิดมิวเทชันของราโดยใช้สาร NTG

นำราไอโซเลต UV2002 ที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดหลังจากการชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต มาชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้สาร NTG จากการศึกษาผลของ NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่มีต่อราไอโซเลต UV2002 พบว่าอัตราการอยู่รอดของราที่ 1 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ช และ รูปที่ 13)



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร NTG ที่ใช้ในการชักนำกับเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของราไอโซเลต UV2002

ราไอโซเลต UV2002 เมื่อนำมาชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้สาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าราที่มีอัตราการอยู่รอด 1 เปอร์เซ็นต์ อยู่ที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงทำการเก็บเชื้อที่สามารถอยู่รอดในแต่ละความเข้มข้น ซึ่งคัดเลือกได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลต คือ NTG011 NTG012 NTG021 NTG022 NTG051 NTG052 NTG071 NTG072 NTG073 NTG074 NTG075 NTG091 NTG092 และ NTG093 จากนั้นนำรา 14 ไอโซเลตมาวัดค่าแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและคำนวณค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั่วรุ่นที่ 2 และ ชั่วรุ่นที่ 6 (ภาคผนวก ช และ รูปที่ 14)

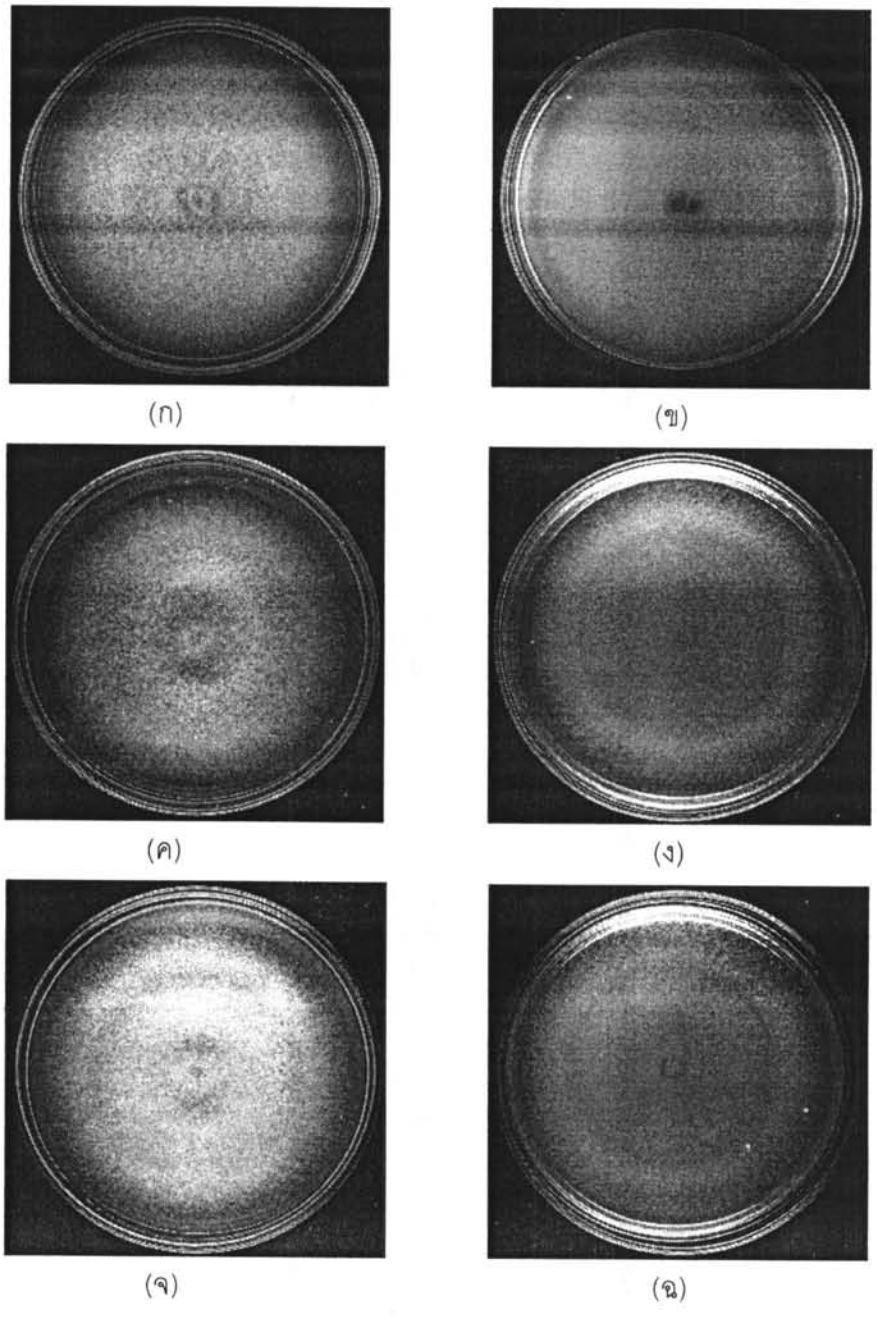


รูปที่ 14 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากราที่ถูกชักนำด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมราไอโซเลต UV2002 (ยูนิต:นาโนโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที)

จากการทดลองเลี้ยงราที่ถูกชักนำด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6 แล้วนำมาวัดค่าแอกทิวิตีจำเพาะดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ราที่ถูกคัดเลือกมามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมทุกไอโซเลต และเมื่อเลี้ยงราถึงชั่วรุ่นที่ 6 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราก็สูงขึ้นกว่าชั่วรุ่นที่ 2 ยกเว้น NTG022 ที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะต่ำลงเล็กน้อยและ NTG022 ในชั่วรุ่นที่ 2 ก็มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าไอโซเลตอื่น ๆ แต่ก็ยังต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม แต่เนื่องจาก NTG022 มีความเสถียรกว่าไอโซเลตอื่น ๆ จึงทำการเลือก NTG022 มาใช้ในการทดลองต่อไป

6. ศึกษาลักษณะของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์

6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA

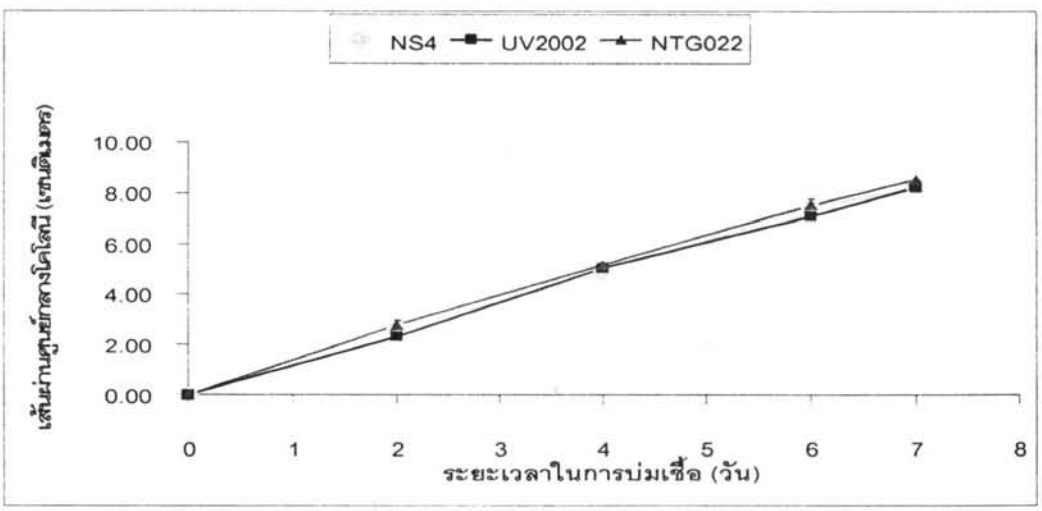


รูปที่ 15 ลักษณะโคโลนีด้านหน้าของราไอโซเลต NS4 (ก) UV2002 (ค) NTG022 (จ) และลักษณะโคโลนีด้านหลังของของราไอโซเลต NS4 (ข) UV2002 (ง) NTG022 (ฉ)

จากการนำราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะโคโลนีและเส้นใยแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย กล่าวคือ ราไอโซเลต NS4 ถือเป็นราสายพันธุ์เดิมเส้นใยฟูโคโลนีสีขาวทั้งโคโลนีดังรูปที่ 15 (ก) ส่วนมิวแทนต์คือ ราไอโซเลต UV2002 ซึ่งได้จากการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยการฉายรังอัตราไวโอเลตที่ช่วงเวลาที่ 20 นาทีของการฉายรังสี และ ราไอโซเลต NTG022 ซึ่งได้จากการชักนำ ราไอโซเลต UV2002 ด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มิวแทนต์ทั้งสองมีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกัน โดยมีลักษณะเส้นใยฟูโคโลนีสีขาวออกเหลืองอ่อน แต่บริเวณตรงกลางโคโลนีมีเส้นใยฟูสีขาวล้วน รอบนอกโคโลนีเส้นยังจะเจริญในแนวเฉียงเล็กน้อย ซึ่งจะมองเห็นว่าเป็นเช่นนั้นเมื่อดูด้านหลังโคโลนีดังรูปที่ 15 (ง) และ (จ) และเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นว่ามีโคโลนีของมิวแทนต์ทั้งสองจะขนาดเล็กกว่าราสายพันธุ์เดิมไอโซเลต NS4 เล็กน้อย ส่วนลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์มีลักษณะคล้ายคลึงกัน

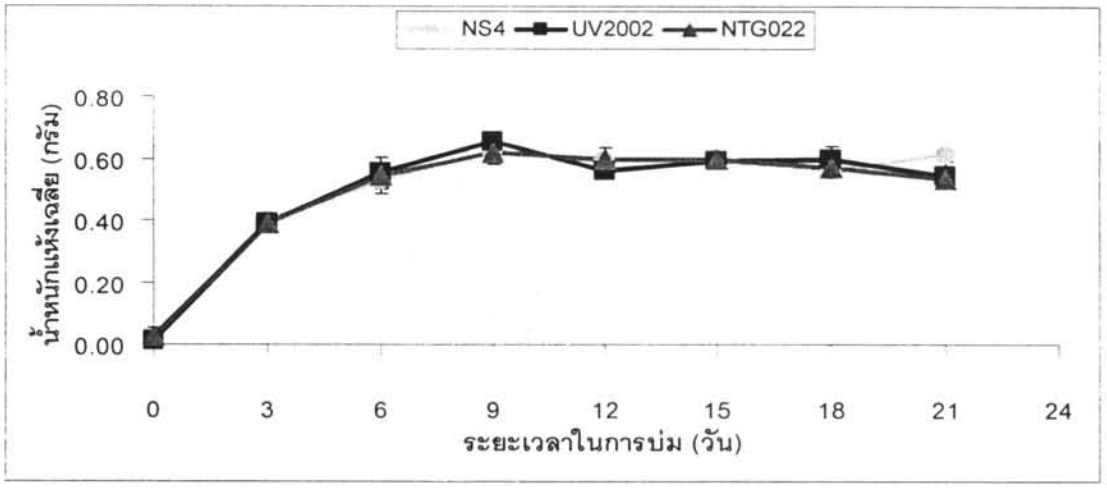
6.2 ผลการศึกษาอัตราการเติบโตของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA และอาหารเหลวสำเร็จรูป PDB

ผลการศึกษาอัตราการเติบโตของ NS4 UV2002 และ NTG022 บนอาหารกึ่งแข็งเลี้ยงเชื้อ PDA โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเป็นเวลา 7 วันโดยวัดผลทุก ๆ 2 วัน พบว่าการเจริญบนอาหารกึ่งแข็งของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 16)



รูปที่ 16 อัตราการเติบโตของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อนำเส้นใยของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน มาตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และตรวจวัดน้ำหนักแห้งทุก 3 วัน พบว่าทุกไอโซเลตมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันโดยในช่วง 3 ถึง 6 วันอยู่ในช่วง Exponential phase และเริ่มเข้าสู่ Stationary phase ในช่วงวันที่ 9 ถึง วันที่ 21 (รูปที่ 17)

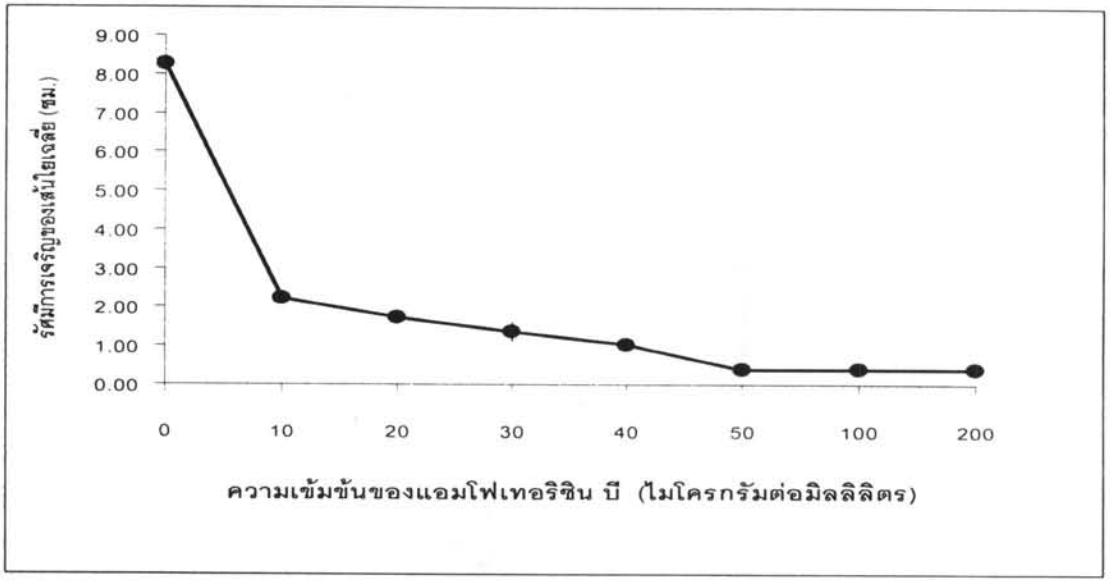


รูปที่.17.อัตราการเติบโตของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ที่เจริญในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB เป็นเวลา 21 วัน โดยเก็บผลน้ำหนักแห้งทุก 3 วัน

6.3 การศึกษาหา Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) เพื่อใช้คัดเลือกมิวแทนต์

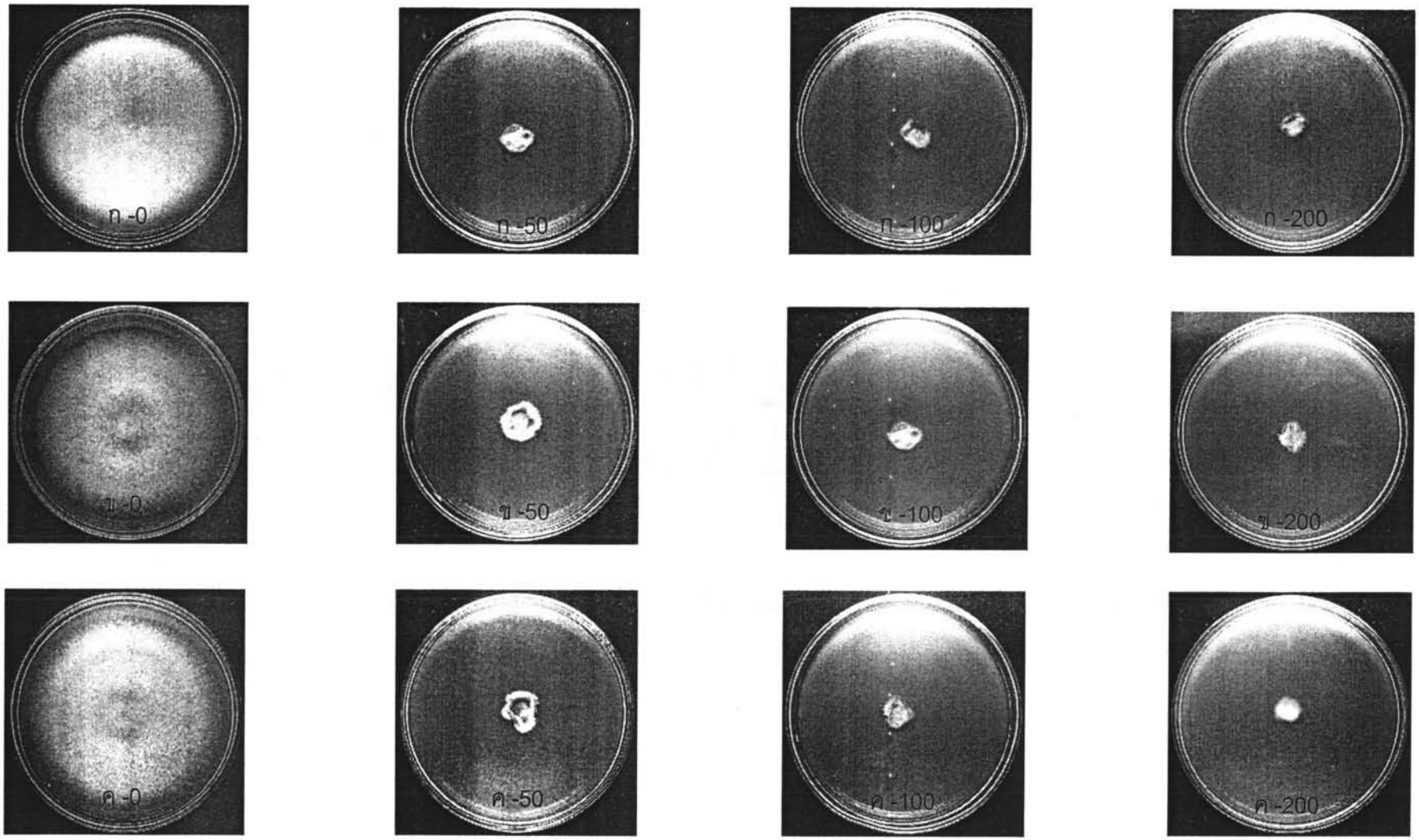
เมื่อนำราไอโซเลต NS4 ซึ่งเป็นราสายพันธุ์เดิมมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมคีโตโคนาโซล ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 120 และ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบการเติมคีโตโคนาโซลที่ความเข้มเข้นดังกล่าว ไม่มีผลต่อการยับยั้งหรือการเจริญเติบโตของราสายพันธุ์เดิมไอโซเลต NS4 เนื่องจากราสายพันธุ์เดิมยังคงสามารถสร้างเส้นใยและเจริญบนอาหารที่คีโตโคนาโซลได้อยู่ โดยเทียบจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 7 เมื่อนำราสายพันธุ์เดิมไอโซเลต NS4 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเส้นใยราไอโซเลต NS4 สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงความเข้ม 0 10 20 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เส้นใยราจะเจริญได้น้อยมากและไม่สามารถสร้างเส้นใยแผ่กว้างไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บีได้ จะมีเพียงเส้นใยเล็กน้อยที่เจริญอยู่บนชิ้นวุ้นที่ตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA

ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บีที่คววมเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เส้นใยราไอโซเลต NS4 ก็เจริญเช่นเดียวกับที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บีที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเฉลี่ยของราไอโซเลต NS4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี เป็นเวลา 7 วันที่คววมเข้มข้น10 20 30 40 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อทดสอบการเจริญของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเข้มข้น 0 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าราสายพันธุ์เดิมไอโซเลต NS4 ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนราที่ถูกชักนำให้เกิดมิวเทชัน คือ ราไอโซเลต UV2002 และ NTG022 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มิวแทนต์ทั้ง 2 ไอโซเลตไม่สามารถเจริญได้ (รูปที่ 19)



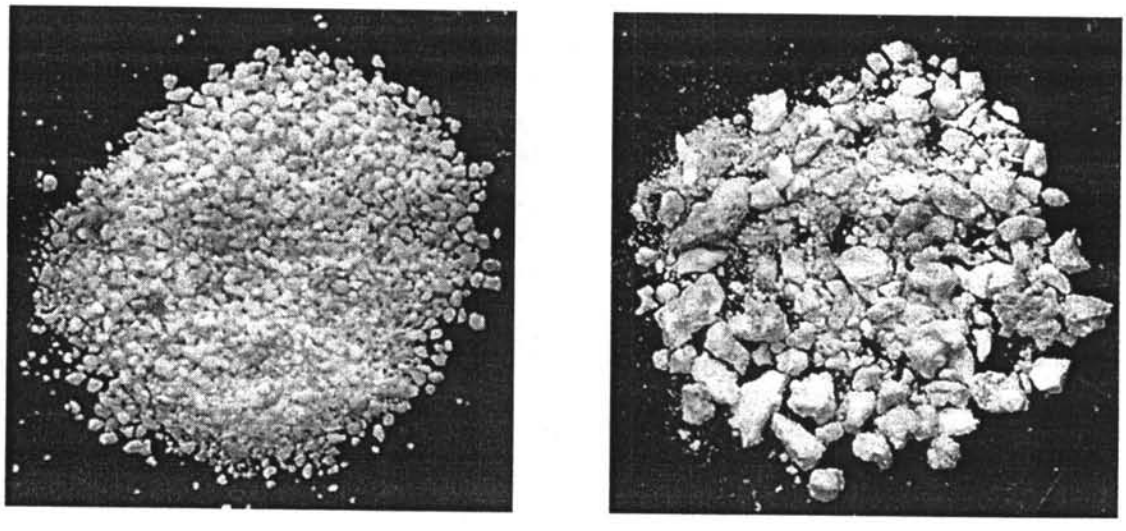
รูปที่ 19 การเจริญของราไอโซเลต NS4 (ก) UV2002 (ข) และ NTG022 (ค) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี เป็นเวลา 7 วันที่ความเข้มข้น 0 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การตรึงรูปไลเพสจากราที่คัดเลือกบนวัสดุค้ำจุนและการตรวจสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยวิธี TLC และ HPLC

ในการทดลองนี้ได้เลือกวัสดุค้ำจุน 2 ชนิด คือ โดโลไมต์ และไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ เพื่อทดสอบเบื้องต้นในการที่จะนำไปใช้ตรึงรูปไลเพสของราไอโซเลต NAN103 ผลการทดลองจากการคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ (protein loading) และค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง (% immobilization efficiency) (ภาคผนวก จ) ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าปริมาณโปรตีนบนวัสดุค้ำจุน และร้อยละประสิทธิภาพการตรึงรูปจากการตรึงรูปไลเพสจากสารละลายเอนไซม์ของราไอโซเลต NAN103

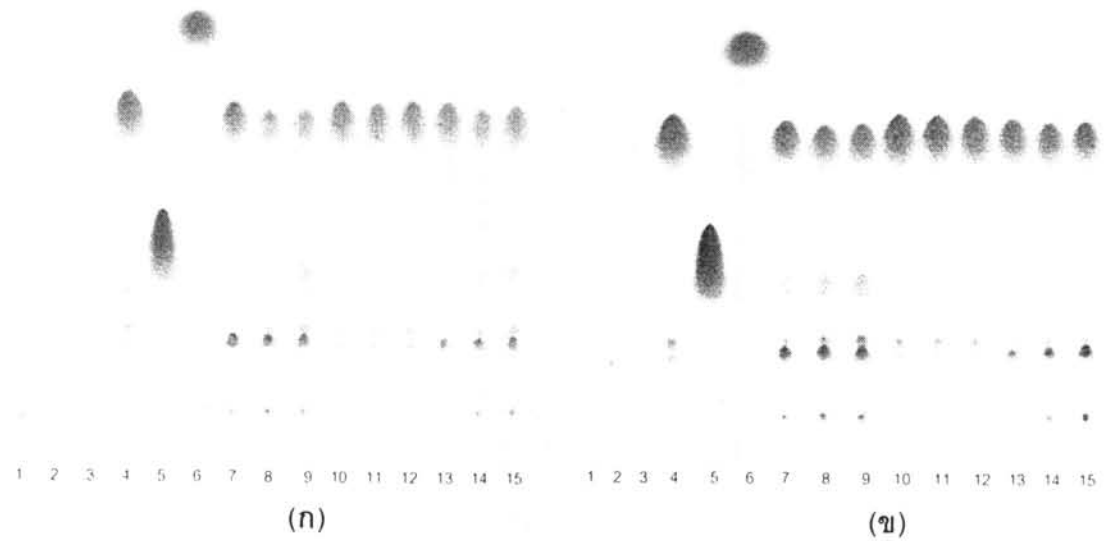
ชนิดวัสดุค้ำจุน	ปริมาณโปรตีนบนวัสดุค้ำจุน (มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมวัสดุค้ำจุน)	ร้อยละประสิทธิภาพการตรึงรูป
โดโลไมต์	63.09	21.99
ไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ	67.95	78.12



(ก) (ข)

รูปที่ 20 ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุน 2 ชนิด (ก) โดโลไมต์ และ (ข) ไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพและตกตะกอน

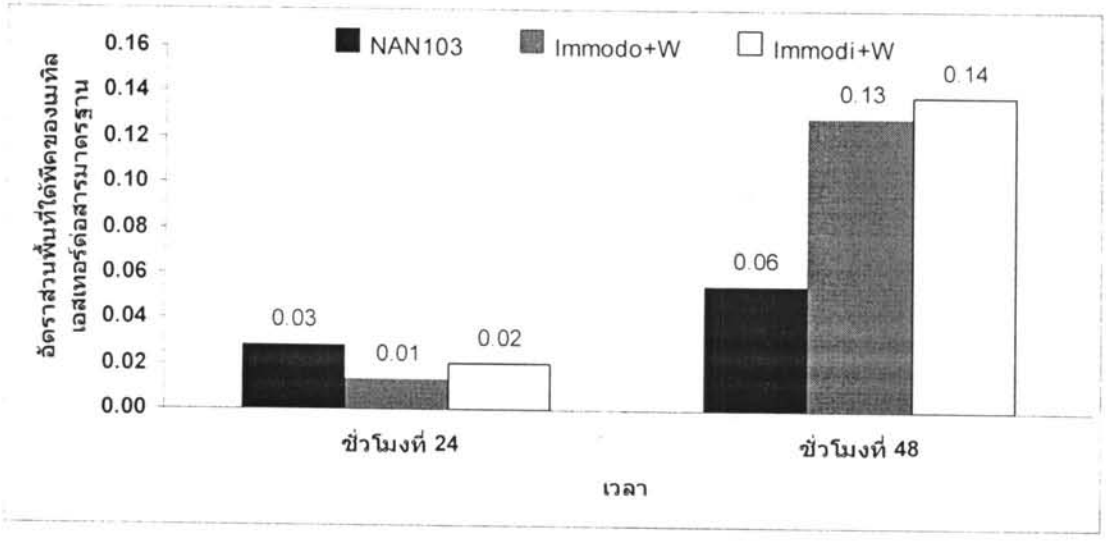
จากตารางที่ 5 พบว่าค่าปริมาณโปรตีนบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ คือ 63.09 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมวัสดุค้ำจุน ส่วนปริมาณโปรตีนบนวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ คือ 67.95 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมวัสดุค้ำจุน พบว่าโปรตีนที่อยู่บนวัสดุค้ำจุนทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกัน และจากการคำนวณค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึงบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ 21.99 และค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึงบนวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ 78.12 พบว่าประสิทธิภาพของการตรึงบนวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธสูงกว่าการตรึงบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ถึงประมาณ 5 เท่า และเมื่อนำไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุน 2 ชนิดดังกล่าว (รูปที่ 20) ไปใช้ทดสอบในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วย TLC (รูปที่ 21)



(ก) (ข)

รูปที่ 21 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยการเติมเมทานอลแบบต่อเนื่อง โดยเร่งด้วยไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ (ก) ไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (ข) ของราไอโซเลต NAN103 โดยเทียบกับสารละลายเอนไซม์ไลเพสของราไอโซเลต NAN103 โดย*เลนที่ 1-6* โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก และ เมทิลโอลิเอต *เลนที่ 7-9* สารละลายเอนไซม์ไลเพสของราไอโซเลต NAN103 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมโปรตีน ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง *เลนที่ 10-12* ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ (ก) และไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (ข) ของ NAN103 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมโปรตีน ที่ 0 24 และ 48 *เลนที่ 13-15* ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ (ก) และไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (ข) ของราไอโซเลต NAN103 ปริมาณ 5 มิลลิกรัมโปรตีนและผสมน้ำที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง (ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัมทุกปฏิกิริยา)

สารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบชนิดของสารตัวอย่างในการทำด้วย TLC ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ได้แก่ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก เมทิลโอลิเอต และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซอร์ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นตัวแทนเมทิลโอลิเอต) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 8.2 กล่าวคือ โมโนกลีเซอไรด์ มีค่า R_f เท่ากับ 0.01 ไดกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.14 ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.57 กรดโอลีอิกมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เมทิลโอลิเอตมีค่า R_f 0.72 และ B100 มีค่า R_f เท่ากับ 0.70 จากโครมาโทแกรมรูปที่ 24 พบว่า สารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NAN103 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ ส่วนไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ และ วัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ แต่ถ้ามีการเติมน้ำลงไปในระหว่างการทำปฏิกิริยา พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ และ วัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ โดยพิจารณาจากค่า R_f เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน แต่เนื่องจากการทดสอบด้วย TLC ยังไม่สามารถบอกถึงปริมาณที่เกิดของเมทิลเอสเทอร์ได้ จึงนำไปทดสอบด้วย HPLC พบว่าเมื่อนำอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานมาเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NAN103 และไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์และวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ พบว่าชั่วโมงที่ 24 มีอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐาน ของสารละลายเอนไซม์ ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์และไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ จากราไอโซเลต NAN103 เท่ากับ 0.03 0.01 และ 0.02 ตามลำดับ และพบว่าสารละลายเอนไซม์มีค่ามากกว่าของไลเพสตรึงรูป แต่ชั่วโมงที่ 48 พบว่าไลเพสตรึงรูปมีค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานมากกว่าสารละลายเอนไซม์อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานของสารละลายเอนไซม์ ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์และไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ จากราไอโซเลต NAN103 เท่ากับ 0.06 0.13 และ 0.14 และพบว่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานของไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธมีค่ามากกว่าของไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ทั้งชั่วโมงที่ 24 และ 48 (รูปที่ 22)



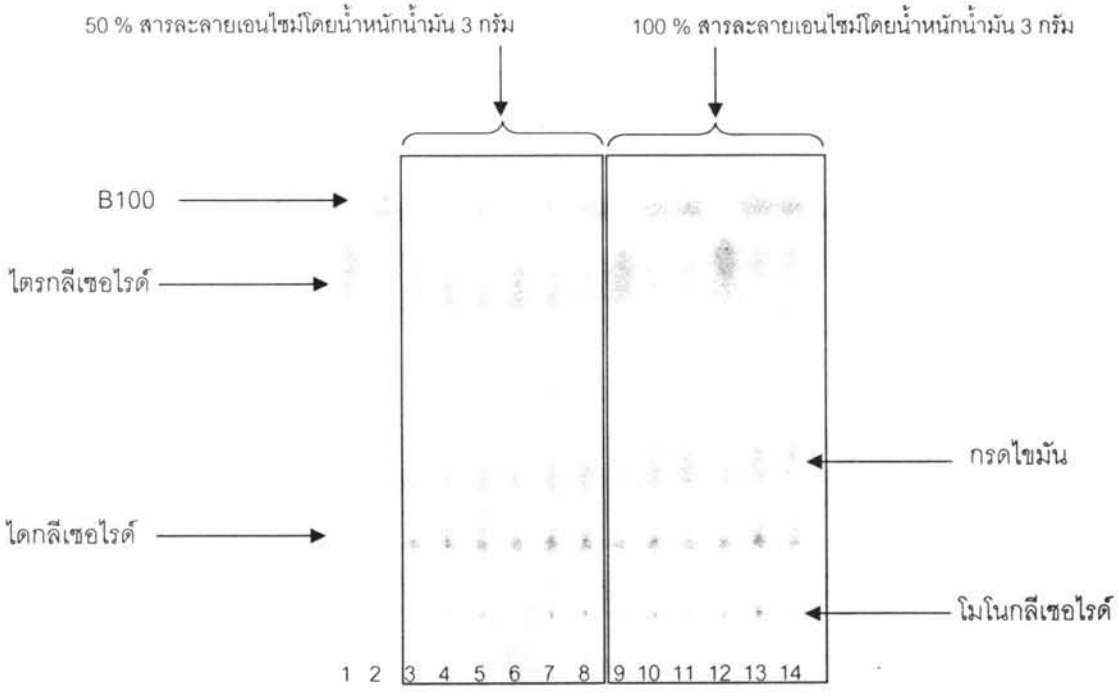
รูปที่ 22 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ของผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยการเติมเมทานอลแบบต่อเนื่อง ชั่วโมงที่ 24 และ 48 โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NAN103 ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ซึ่งมีน้ำในปฏิกิริยาที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (Immodo+W) และ ไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธซึ่งมีน้ำในปฏิกิริยาที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (Immodi+W) (กำหนดใช้เอนไซม์ไลเพสปริมาณ 5 มิลลิกรัมโปรตีนทุกปฏิกิริยา)

8. ผลการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์

8.1 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยวิธี TLC

ผลการทดลองด้วย TLC ของราที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสสูงสุดโดยคัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ก็คือราไอโซเลต NAN103 ซึ่งได้จากป่าเต็งรัง จ. น่าน สารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบชนิดของสารตัวอย่างในการทำด้วย TLC ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ได้แก่ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก เมทิลโอลิเอต และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซอร์ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นตัวแทนเมทิลโอลิเอต) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 8.2 กล่าวคือ โมโนกลีเซอไรด์ มีค่า R_f เท่ากับ 0.01 ไดกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.14 ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.57 กรดโอลีอิกมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เมทิลโอลิเอตมีค่า R_f 0.72 และ B100 มีค่า R_f เท่ากับ 0.70 จากการทำทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่ 0 24 และ 48

ชั่วโมง ได้ทดสอบการใส่เมทานอลใน 2 รูปแบบ คือ โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัมแล้วนำไปทดสอบด้วย TLC แสดงดังรูปที่ 23

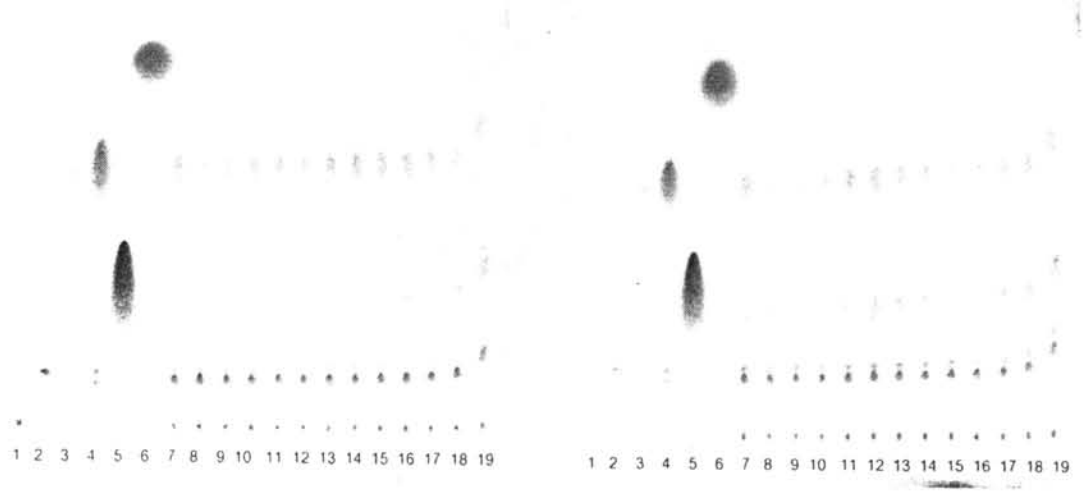


รูปที่ 23 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยเร่งด้วยไลเพสของรา โดย*เลนที่ 1* น้ำมันปาล์ม *เลนที่ 2* B100 *เลนที่ 3-5* ราไอโซเลต NAN103 ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 6-8* ราไอโซเลต NAN103 ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 9-11* ราไอโซเลต NAN103 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 12-14* ราไอโซเลต NAN103 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากรูปที่ 23 พบว่าถ้าใช้สารละลายเอนไซม์ปริมาณมากจากราไอโซเลต NAN103 เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันก็ทำให้สามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ปริมาณที่มากด้วยเช่นกัน โดยพิจารณาจากแถบบนโครมาโทแกรมที่ R_f เท่ากับ 0.75 พบว่าแถบเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นที่ใช้

100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัมมีแถบขนาดใหญ่กว่าและสีเข้มกว่า ที่ใช้ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม ส่วนการทดสอบการใส่เมทานอลใน 2 รูปแบบ คือ โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง พบว่าจากการพิจารณาการทดสอบด้วย TLC การเติมเมทานอลทั้ง 2 รูปแบบโดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 ยังไม่สามารถทราบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นจริงได้ จึงต้องมีการนำไปทดสอบด้วย HPLC ต่อไป

นอกจากนี้ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสารละลายเอนไซม์ราที่คัดเลือกจากโคโลนีเดี่ยวจากราไอโซเลต NAN103 ทั้ง 12 ไอโซเลต ดังนี้ NS1 NS2 NS3 NS4 NS5 NS6 NS7 NS8 NS9 NS10 NS11 NS12 และรวมทั้งราไอโซเลต NAN103 พบว่าผลการทดสอบด้วยวิธี TLC สามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ทั้ง 12 ไอโซเลตรวมถึง สายพันธุ์เดิม (NAN103) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง และสามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ในปริมาณที่ต่างกัน โดยเทียบจากขนาดของแถบเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น (รูปที่ 24) แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการนำไปตรวจสอบในเชิงปริมาณต่อไป เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นจริงในปฏิกิริยาของราในแต่ละโคโลนี ส่วนในการคัดเลือกในเบื้องต้นราไอโซเลต NS4 ถูกคัดเลือกนำไปใช้ขั้นต่อไป เพราะมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด

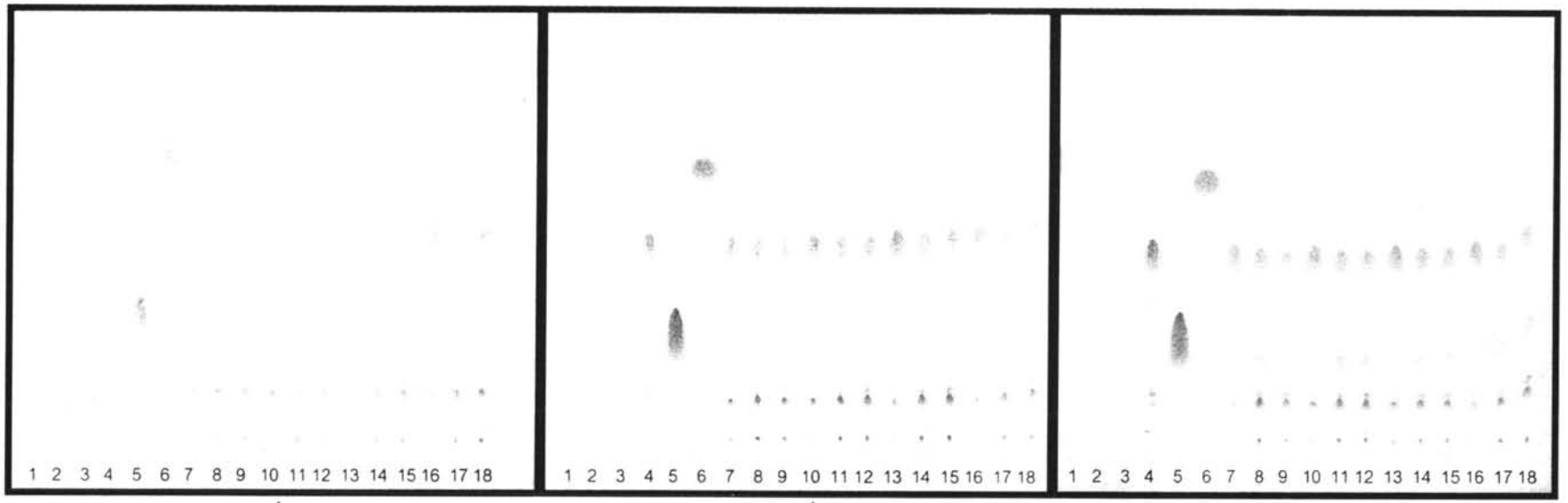


(ก) (ข)

รูปที่ 24 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 24 ชั่วโมง (ก) และ 48 ชั่วโมง (ข) เร่งด้วยไลเพสของรา โดยใช้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง โดยเลนที่ 1-6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก และเมทิลโอลิเอต

เลนที่. 7-19 NS1 NS2 NS3 NS4 NS5 NS6 NS7 NS8 NS9 NS10 NS11 NS12 และ NAN103 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบด้วยวิธี TLC ของราที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตชั่วรุ่นที่ 2 จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากมิวแทนต์ที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตทั้ง 27 ไอโซเลต คือ UV501 UV502 UV503 UV504 UV505 UV506 UV507 UV508 UV509 UV510 UV511 UV512 UV513 UV514 UV515 UV516 UV517 UV518 UV519 UV1001 UV1501 UV1502 UV2001 UV2002 UV2501 UV3001 และ UV3002 สามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ทั้ง 27 ไอโซเลต แต่เนื่องจากการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากมิวแทนต์ที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตและสายพันธุ์เดิม จะใช้สารละลายเอนไซม์ที่ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5 มิลลิกรัมเพื่อเป็นกำหนดปริมาณโปรตีนที่ใช้ในปฏิกิริยาให้เท่า ๆ กัน ซึ่งก็ผลการทดลองดังรูปที่ 25-27



แผ่นที่ 1 **แผ่นที่** 2 **แผ่นที่** 3

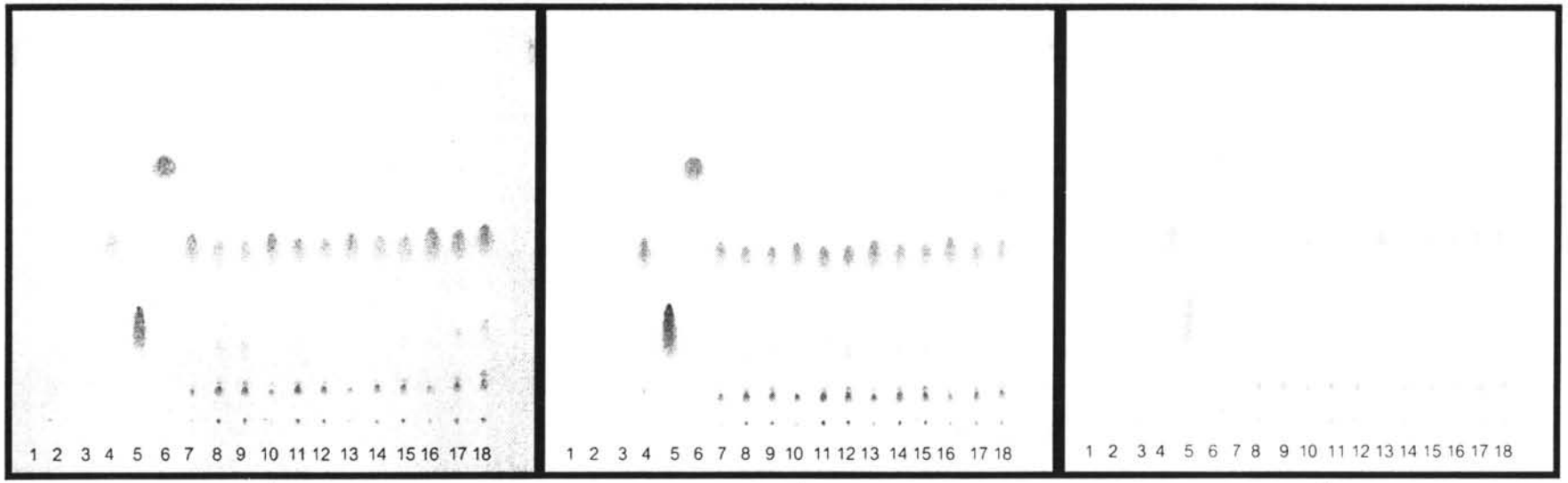
รูปที่ 25 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสของราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัตราไวโอเลต โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน คือ UV501 UV502 UV503 UV504 UV505 UV506 UV507 UV508 UV509 UV510 UV511 และ UV512

โดย*เลนที่ 1-6* โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก และเมทิลโอลิเอต (แผ่นที่ 1- แผ่นที่ 3)

แผ่นที่ 1 *เลนที่ 7-9* UV501 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV502 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV503 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV504 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

แผ่นที่ 2 *เลนที่ 7-9* UV505 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV506 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV507 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV508 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

แผ่นที่ 3 *เลนที่ 7-9* UV509 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV510 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV511 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV512 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ



แผ่นที่ 4 **แผ่นที่ 5** **แผ่นที่ 6**

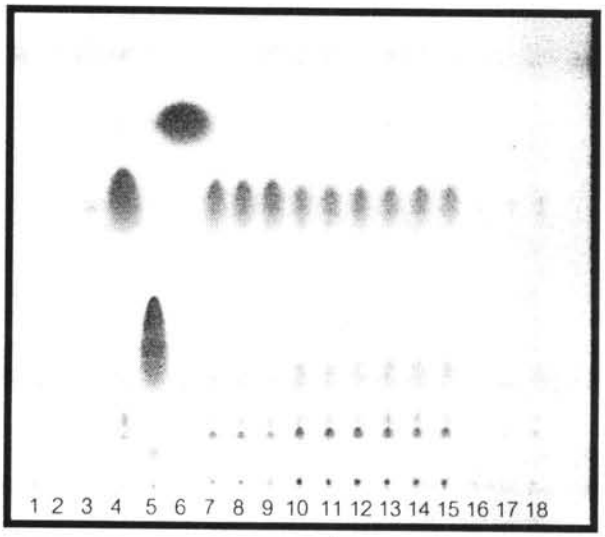
รูปที่ 26 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสของราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัตราไวโอเลต โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน คือ UV513 UV514 UV515 UV516 UV517 UV518 UV519 UV1001 UV1501 UV1502 UV2001 และ UV2002

โดย*เลนที่ 6-1* โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก และเมทิลโอลิเอต (แผ่นที่ 1- แผ่นที่ 3)

แผ่นที่ 4 *เลนที่ 7-9* UV513 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV514 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV515 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV516 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

แผ่นที่ 5 *เลนที่ 7-9* UV517 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV518 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV519 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV1001 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

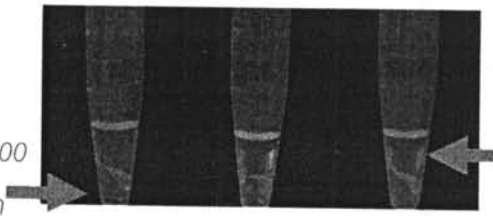
แผ่นที่ 6 *เลนที่ 7-9* UV1501 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV1502 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV2001 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV2002 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ



แผ่นที่ 7

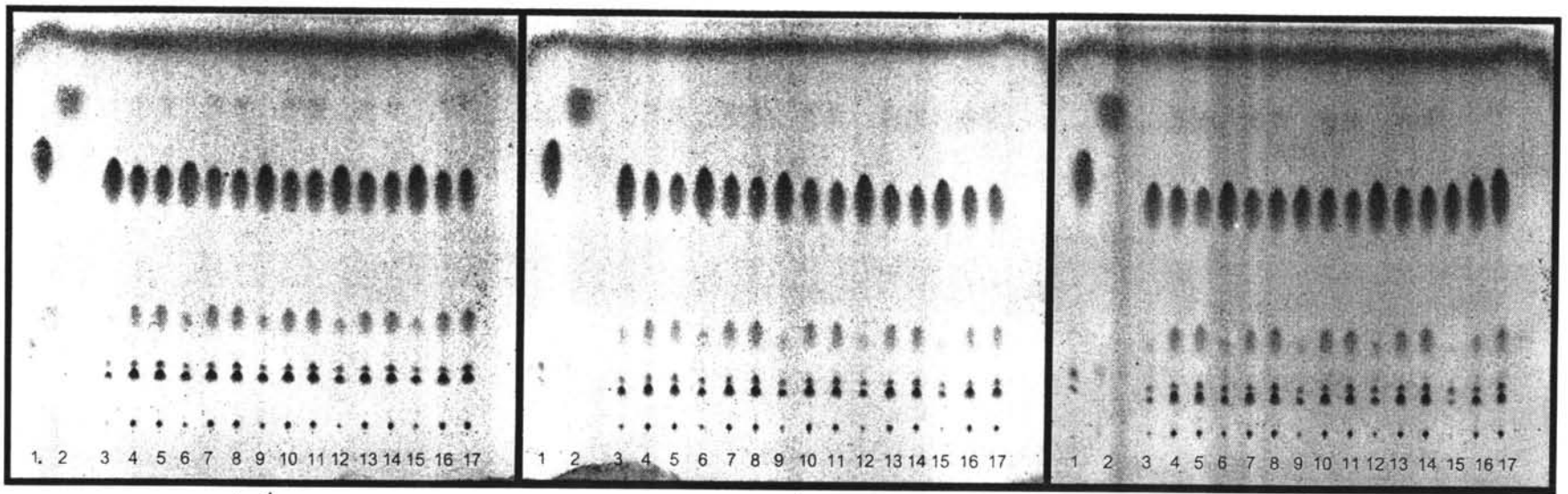
รูปที่ 27 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสของราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัตราไวโอเลต โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีนและใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง คือ UV2501 UV3001 และ UV3002 โดย*เลนที่ 1-6* โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก และเมทิลโอลิเอต *เลนที่ 7-9* UV2501 UV3001 UV3002 ชั่วโมงที่ 0 ตามลำดับ เลนที่ 10-12 UV2501 UV3001 UV3002 ชั่วโมงที่ 24 ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV2501 UV3001 UV3002 ชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV2501 UV3001 UV3002 ชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับ สำหรับ*เลนที่ 16-18* เป็นส่วนของชั้นล่างจากการเก็บตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 28

เนื่องจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้มีการเติมน้ำลงไปในปฏิกิริยา เมื่อทำการเก็บตัวอย่างแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที จะพบว่าตัวอย่างแยกออกเป็น 2 ชั้นทุกๆสารละลายเอนไซม์ที่นำมาทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงทำการทดลองตัวอย่างทั้ง 2 ชั้นที่เกิดขึ้นด้วยวิธี TLC จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 48 ชั่วโมงของ UV2501 UV3001 UV3002 ซึ่งผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 31 กล่าวคือ ในส่วนของตัวอย่างชั้นล่างจะไม่มีการเกิดเมทิลเอสเทอร์ ส่วนของตัวอย่างชั้นบนมีการเกิดเมทิลเอสเทอร์ ดังนั้นพบว่าเมทิลเอสเทอร์จะอยู่ในชั้นบนของตัวอย่าง จึงได้ทำการทดลองด้วยวิธี TLC เฉพาะตัวอย่างชั้นบนกับสารละเอนไซม์ที่ได้มาจากมิวแทนต์ตัวอื่น ๆ



รูปที่ 28 ตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันหลังการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างจะแยกเป็น 2 ชั้น

ผลการทดสอบด้วยวิธี TLC จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากมิวแทนต์ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร NTG ทั้ง 14 ไอโซเลต คือ NTG012 NTG021 NTG022 NTG051 NTG052 NTG071 NTG072 NTG073 NTG074 NTG075 NTG091 NTG092 และ NTG093 สามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ทั้ง 14 ไอโซเลต แต่เนื่องจากการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากมิวแทนต์ที่ผ่านการชักนำด้วยสาร NTG จะใช้สารละลายเอนไซม์ที่ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5 มิลลิกรัมเพื่อเป็นกำหนดปริมาณโปรตีนที่ใช้ในปฏิกิริยาให้เท่าๆ กัน ซึ่งก็ผลการทดลองดังรูปที่ 29



แผ่นที่ 8 **แผ่นที่** 9 **แผ่นที่** 10

รูปที่ 29 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสจากราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร NTG โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีนและใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง คือ NTG012 NTG021 NTG022 NTG051 NTG052 NTG071 NTG072 NTG073 NTG074 NTG075 NTG091 NTG092 และ NTG093

โดย*เลนที่* 1-6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอลีอิก และเมทิลโอลิเอต (แผ่นที่ 1- แผ่นที่ 3)

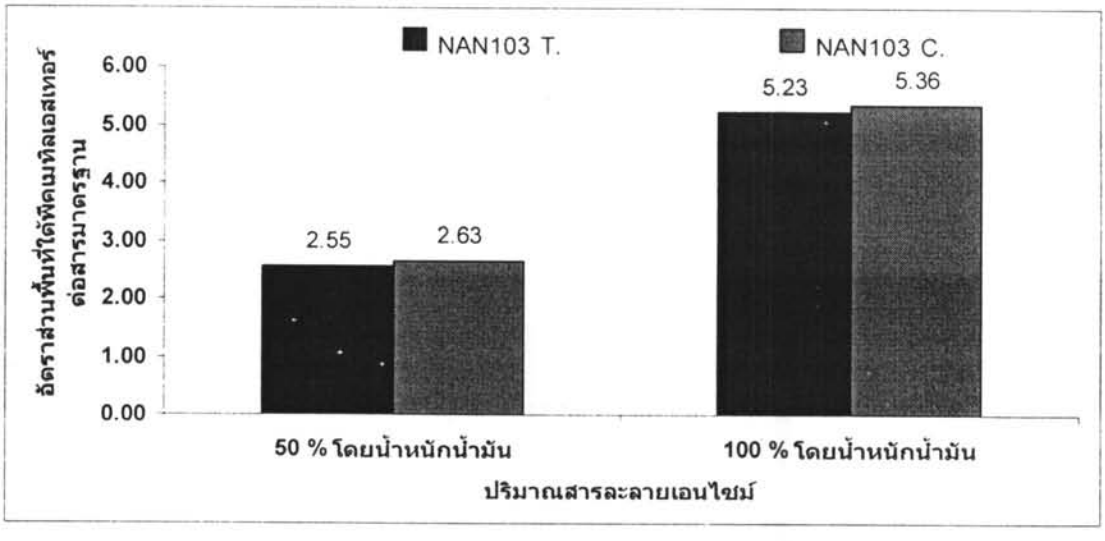
<u>แผ่นที่ 4</u> *เลนที่ 7-9* UV513 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV514 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV515 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV516 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

<u>แผ่นที่ 5</u> *เลนที่ 7-9* UV517 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV518 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV519 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV1001 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

<u>แผ่นที่ 6</u> *เลนที่ 7-9* UV1501 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 10-12* UV1502 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 13-15* UV2001 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ *เลนที่ 16-18* UV2002 ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

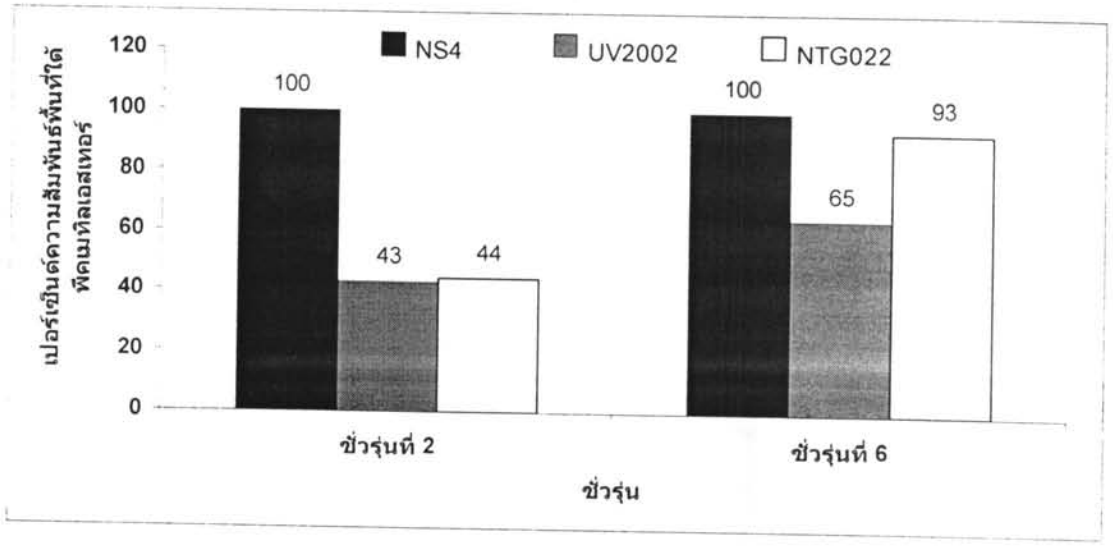
8.2 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยวิธี HPLC

จากการนำไลเพสจากราไอโซเลต NAN103 มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลชั่วโมงที่ 48 ได้ทดสอบการใส่เมทานอลใน 2 รูปแบบ คือ โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี HPLC และหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐาน พบว่าการใส่เมทานอลทั้ง 2 รูปแบบให้ค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานใกล้เคียงกัน ทั้งในส่วนที่มีการเติมปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (รูปที่ 30 และภาคผนวก ช)

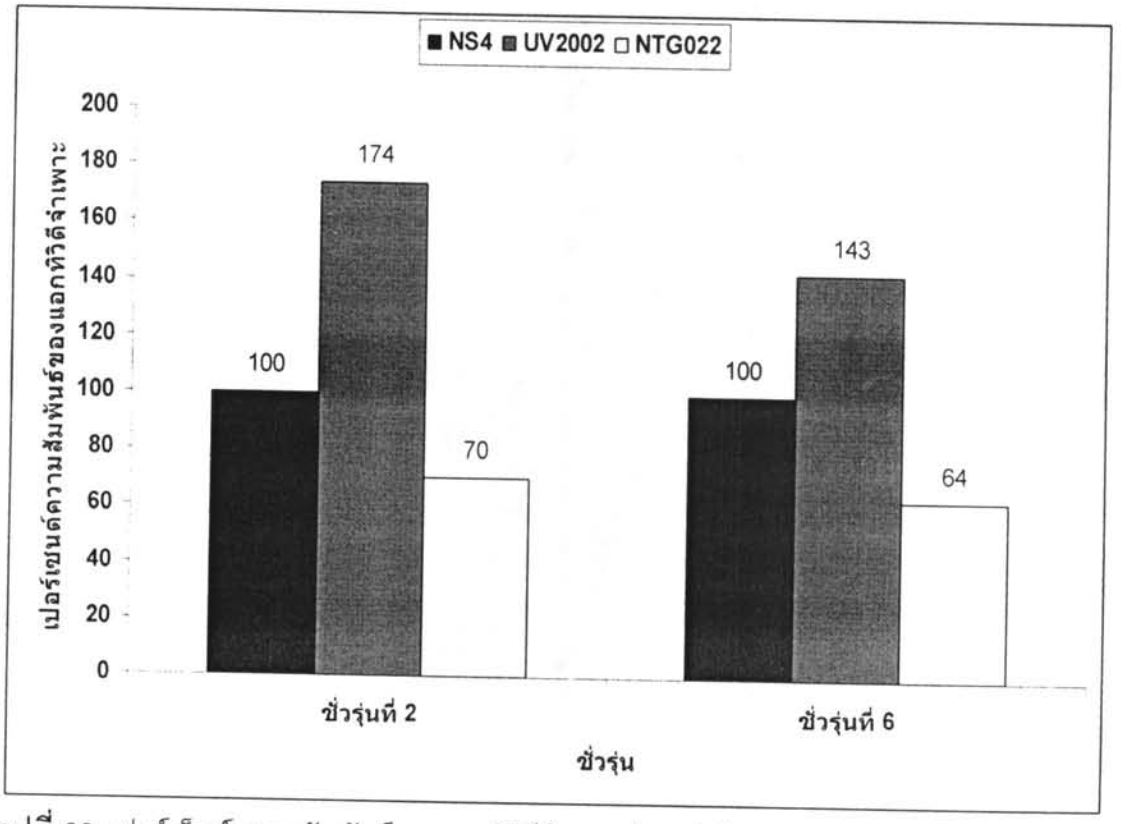


รูปที่ 30 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี HPLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันชั่วโมงที่ 48 โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NAN103 ที่ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น (NAN103 T.) และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง (NAN103 C.)

พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์ที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต และสาร NTG มีเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลชั่วโมงที่ 48 โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ ไลเพสจากราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง



รูปที่ 32 เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของแอกทิวิตีจำเพาะโดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6

จากรูปที่ 31 พบว่าจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลชั่วโมงที่ 48 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NS4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์สายพันธุ์เดิมมีเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์สูงกว่ามิวแทนต์ราไอโซเลต UV2002 และ NTG022 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของแอกทิวิตีจำเพาะ (รูปที่ 32) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน