การคัดเลือกและชักนำให้เกิดมิวเทชันของราที่ย่อยลิปิดเพื่อเพิ่มไฮโดรไลติกแอกทิวิตี

นางสาววราภรณ์ มลิลาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING AND INDUCED MUTATION OF LIPOLYTIC FUNGI TO ENHANCE HYDROLYTIC ACTIVITY

MissWaraporn Malilas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492195

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและชักนำให้เกิดมิวเทชันของราที่ย่อยลิปิดเพื่อเพิ่มไฮโดรไลติกแอกทิวิตี
โดย	นางสาววราภรณ์ มลิลาศ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

วราภรณ์ มลิลาศ : การคัดเลือกและชักนำให้เกิดมิวเทชันของราที่ย่อยลิปิดเพื่อเพิ่มไฮโดรไลติกแอกทิวิตี (SCREENING AND INDUCED MUTATION OF LIPOLYTIC FUNGI TO ENHANCE HYDROLYTIC ACTIVITY) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว 133 หน้า.

จากการคัดแยกราจากตัวอย่างดินและพืชน้ำมัน 21 แหล่งด้วยวิธีทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต และเมื่อนำราที่ได้มาทดสอบการสร้างไลเพสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BYPO ที่ใส่น้ำมันปาล์มและโรดามีน บี พบว่ามีราจำนวน 38 ไอโซเลตสามารถสร้างไลเพสได้ จากนั้นนำราที่ได้มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสำหรับการสร้างไลเพสโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวชักนำในการสร้างไลเพส เมื่อทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส พบว่า *Fusarium solani* (ราไอโซเลต NAN103) มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 87.73±0.99 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จึงเลือกราไอโซเลต NAN103 มาชักนำให้เกิดมิวเทชันเพื่อเพิ่มไลเพสแอกทิวิตี ขั้นแรกทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญจากสปอร์ของราไอโซเลต NAN103 ด้วยวิธีการคัดเลือกโดยธรรมชาติบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ได้โคโลนีเดี่ยวทั้งสิ้น 12 ไอโซเลต พบว่าราไอโซเลต NS4 มี แอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 132.64±7.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จึงเลือกราไอโซเลต NS4 ไปทำการชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยใช้รังสีอัตราไวโอเลต โดยในขั้นตอนนี้สามารถคัดเลือกราได้ทั้งสิ้น 27 ไอโซเลต และพบว่าราไอโซเลต UV2002 มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 230.80±17.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จึงเลือกรา ไอโซเลต UV2002 ไปทำการชักนำให้เกิดมิวเทชันต่อด้วยสาร NTG ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถคัดเลือกราได้ทั้งสิ้น 14 ไอโซเลต พบว่าราไอโซเลต NTG022 มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงและเสถียรกว่าไอโซเลตอื่น ๆ เมื่อทำการเลี้ยงราถึงชั่วรุ่นที่ 6 คือ 93.14±8.33 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ดังนั้นจึงพบว่าการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัตราไวโอเลตและสาร NTG ยังไม่สามารถคัดเลือกมิวแทนต์ที่มีดีตามต้องการได้ นำสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 ทั้งหมด ทั้งที่ได้มาจากการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว 12 ไอโซเลต การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัตราไวโอเลต 27 ไอโซเลต และการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร NTG 14 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่า สารละลายเอนไซม์ทุกไอโซเลตสามารถเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังนำสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 มาตรึงรูปด้วยวัสดุค้ำจุน 2 ชนิด คือ โดโลไมต์ และ ไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธหลังการทำทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าน้ำเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....วราภรณ์ มลิลาศ.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....จิตรตรา เพียภูเขียว.....

4772456123: MAJOR GENETICS

KEYWORDS: INDUCED MUTATION/ LIPASE/ TRANSESTERIFICATION/ FUNGI

WARAPORN MALILAS : SCREENING AND INDUCED MUTATION OF LIPOLYTIC FUNGI TO ENHANCE HYDROLYTIC ACTIVITY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., THESIS COADVISOR : JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D.,133 pp.

A total of 70 fungi were isolated from 21 sources of soil samples and oil plants by serial dilution method, using PDA plate and screened for lipolytic potential by employing agar plate method, using BYPO medium supplemented with palm oil and Rhodamine B. To determine lipase activity, thirty-eight lipase-producing isolates were cultured in liquid medium using palm oil as inducer. The results showed that *Fusarium solani* (NAN103) exhibited the highest specific activity, 87.73±0.99 U/mg. Therefore NAN103 were subjected to induced mutation for enhancing lipase activity. Single spore selection was separated single colony. A total of 12 fungal spore suspension were isolated and NS4 was the best single spore selectant that showed the specific activity 132.64±7.68 U/mg. Hence, NS4 was induced mutation by ultraviolet irradiation and mutagenic inducer, NTG, respectively. From UV inducing for mutation experiment, UV2002 which was the best mutant of 27 fungal isolates had the specific activity, approximately 230.80±17.65 U/mg. UV2002 was subsequently for induced mutation by NTG. The result illustrated that NTG022 from 14 fungal isolates was the most stable and yielded highest specific activity, 93.14±8.33 U/mg. Thus Finally, crude enzyme from NAN103 including 12 natural selected isolates, 27 UV induced mutant isolates and 14 NTG induced mutant isolates were the enzyme-catalysed transesterification for methyl ester production. The results showed that all through enzyme solution form NAN103 isolates were capable of catalysis for production. In addition, the enzyme produced by NAN103 were immobilized on dolomite and diatomaceous earth experimented for optimal condition of methyl ester production.The results indicated that water was essential for enzyme-mediated methyl ester synthesis by transesterification reaction.

Department.....BOTANY.....Student's signature.....Waraporn Malilas

Field of study....GENETICS.....Advisor's signature.....Warawut Chulalaksananukul

Academic year.....2006.....Co-advisor's signature...Jittra Piapukiew

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการตีพิมพ์และเผยแพร่ แก่งานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

กราบขอบพระคุณบิดามารดา ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมา

และท้ายที่สุด ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญภาพ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 22
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 38
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 86
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 98
รายการอ้างอิง..... 100
ภาคผนวก
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 133

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเพสได้.....	8
2	การเปรียบเทียบระหว่างวิธีการใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการใช้ไลเพสเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล.....	14
3	จำนวนราที่คัดเลือกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ และลักษณะโคโลนีของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งPDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7วัน.....	38
4	ผลการทดสอบราที่คัดเลือกจากแหล่งต่างๆ บนอาหารโรดามีน.....	50
5	ค่าปริมาณโปรตีนบนค้ำจุน และร้อยละประสิทธิภาพการตรึงรูปจากการตรึงรูปไลเพสจากสารละลายเอนไซม์ของ NAN103.....	71
ง-1	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.....	116
ง-2	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม.....	118
ฉ-1	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างไอโซเลตNS1-NS12 จาก NAN103 เมื่อคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธีการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว.....	122
ฉ-2	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตของราชั่วรุ่นที่ 2.....	122
ฉ-3	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตของราชั่วรุ่นที่ 6.....	122
ฉ-4	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการชักนำด้วยสารเอ็นทีจีของราชั่วรุ่นที่ 2.....	123
ฉ-5	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราระหว่างสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์จากการชักนำด้วยสารเอ็นทีจีของราชั่วรุ่นที่ 6.....	123

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ช-1	ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกได้	124
ช-2	ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว	126
ช-3	ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกโดยฉายรังสีอัลตราไวโอเลต	127
ช-4	ความสามารถในการทำงานของไลเพสจากราที่คัดเลือกได้ ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	128
ช-5	จำนวนราที่อยู่รอดเมื่อคิดจากจำนวนเซลล์ในสารละลายเซลล์เริ่มต้น เปอร์เซนต์อัตราการตายและอัตราการอยู่รอด ที่ระยะเวลาจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตในช่วงเวลา 0-30 นาที	129
ช-6	จำนวนราที่อยู่รอดเมื่อคิดจากจำนวนเซลล์ในสารละลายเซลล์เริ่มต้น เปอร์เซนต์อัตราการตายและอัตราการอยู่รอด ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	129
ช-7	ตารางข้อมูลจากการทดสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี HPLC ด้วยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น (NAN103 T.) และต่อเนื่อง (NAN103 C.) โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยสารละลายเอนไซม์จากราไอโซเลต NAN103 ที่เอนไซม์ 50 เปอร์เซนต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (ก) ที่เอนไซม์ 100 เปอร์เซนต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม (ข)	130
ช-8	ตารางข้อมูลจากการทดสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี HPLC ของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ชั่วโมงที่ 48 ที่เอนไซม์ 50 เปอร์เซนต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม ที่ชั่วรุ่นที่ 2 (ก) ชั่วรุ่นที่ 6 (ข)	130
ช-9	ตารางข้อมูลจากการทดสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธี HPLC ของเอนไซม์ตรึงรูปของราไอโซเลต NAN103 บนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ในปฏิกิริยามีน้ำ (Immdo+W) และบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ในปฏิกิริยามีน้ำชั่วโมงที่ 24 (ก) และ 48 (ข) เอนไซม์ 50 เปอร์เซนต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการเติมเมทานอลแบบต่อเนื่องทุกปฏิกิริยา	131
ช-1	ผล 5 อันดับแรกจากการตรวจสอบลำดับเบสบริเวณ ITS ของราไอโซเลต NAN103 ที่ได้มาจากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจาก GenBank	132

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	1
2	ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส	5
3	การเกิดไทมีนไดเมอร์เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต	18
4	ลักษณะโคโลนีราจากแหล่งตัวอย่างเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน	44
5	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากรา 38 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ	57
6	ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วันของราไซเลต NAN103	58
7	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราไอโซเลต NAN103 ที่เจริญบนชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง	59
8	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 หลังจากแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ เจลอะกาโรส ที่กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาทีแล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์	60
9	ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราไอโซเลต NAN103 ที่เพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4	60
10	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากราที่คัดเลือกจากสปอร์เดี่ยว	61
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาของการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตกับเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของราไอโซเลต NS4	62
12	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากราที่ผ่านการฉายรังสีอัตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 5–30 นาทีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม คือราไอโซเลต NS4	63
13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร NTG ที่ใช้ในการชักนำกับเปอร์เซ็นอัตราการอยู่รอดของราไอโซเลต UV2002	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากราที่ถูกชักนำด้วยสาร NTG ที่ความเข้มข้น 0.1–0.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมราไอโซเลต UV2002.....	65
15	ลักษณะโคโลนีด้านหน้าของราไอโซเลต NS4 (ก) UV2002 (ค) NTG022 (จ) และ ลักษณะโคโลนีด้านหลังของของ NS4 (ข) UV2002 (ง) NTG022 (ฉ).....	66
16	อัตราการเติบโตของราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน.....	67
17	อัตราการเติบโตของ NS4 UV2002 และ NTG022 ที่เจริญในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ PDB เป็นเวลา 21 วัน โดยเก็บผลน้ำหนักแห้งทุก 3 วัน.....	68
18	อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเฉลี่ยของราไอโซเลต NS4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี เป็นเวลา 7 วันที่ความเข้มข้น10 20 30 40 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	69
19	การเจริญของราไอโซเลต NS4 (ก) UV2002 (ข) และ NTG022 (ค) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA ที่เติมแอมโฟเทอริซิน บี เป็นเวลา 7 วันที่ความเข้มข้น 0 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	70
20	ไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุน 2 ชนิด (ก) โดโลไมต์ และ (ข) ไดอะโตมาเซียส เอิร์ธ ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพและตกตะกอน.....	71
21	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนโดโลไมต์ (ก) และไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (ข) ของ NAN103.....	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
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)	74
23	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยเร่งด้วยไลเพสของ NAN103 ที่ 50 %และ 100 % สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง.....	75
24	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสของรา โดยใช้ที่ 50 % สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องของ NS1-NS12 และ NAN103 ตามลำดับ.....	76
25	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสของราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัตราไวโอเลต โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน และใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง คือ UV501 UV502 UV503 UV504 UV505 UV506 UV507 UV508 UV509 UV510 UV511 และ UV512.....	78
26	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสของราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัตราไวโอเลต โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีนและใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง และใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง คือ UV513 UV514 UV515 UV516 UV517 UV518 UV519 UV1001 UV1501 UV1502 UV2001 และ UV2002.....	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
27	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ 0, 24, 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสของราที่ผ่านการชักนำด้วยรังสีอัตราไวโอเลต โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน และใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องคือ UV2501 UV3001 และ UV3002.....	80
28	ตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันหลังการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างจะแยกเป็น 2 ชั้น.....	81
29	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเร่งด้วยไลเพสจากราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร NTG โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน และใส่เมทานอลแบบต่อเนื่องคือ NTG012 NTG021 NTG022 NTG051 NTG052 NTG071 NTG072 NTG073 NTG074 NTG075 NTG091 NTG092 และ NTG093.....	82
30	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ต่อสารมาตรฐานโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี HPLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันชั่วโมงที่ 48 โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NAN103 ที่ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น (NAN103 T.) และการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง (NAN103 C.).....	83
31	เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์พื้นที่ใต้พีคของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลชั่วโมงที่ 48 โดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ ไลเพสจากราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม โดยการใส่เมทานอลแบบต่อเนื่อง.....	84
32	เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของแอกทิวิตีจำเพาะโดยเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเพสจากราไอโซเลต NS4 UV2002 และ NTG022 ชั่วรุ่นที่ 2 และชั่วรุ่นที่ 6.....	84
ข-1	รูปวาดแสดงลักษณะของอุปกรณ์นับเม็ดเลือด และส่วนประกอบต่าง ๆ.....	109
ข-2	อุปกรณ์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....	109

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

ข-3 แสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C, D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น..... 110

ง-1 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร... 115

ง-2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม..... 117