

การผลิตไบโอดีเซลที่เร่งปฏิกิริยาโดยไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา



นางสาวชุตินา แก้วพิบูลย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF BIODIESEL
CATALYZED BY LIPASES FROM BACTERIA, YEAST AND FUNGI



Miss Chutima Kaewpiboon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

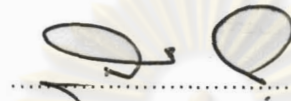
Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตไบโอดีเซลที่เร่งปฏิกิริยาโดยไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
โดย นางสาวชุตินา แก้วพิบูลย์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวนิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล

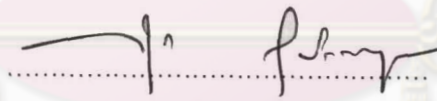
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

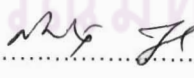
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อรรถ อินเจริญศักดิ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวนิชย์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

ชุตินา แก้วพิบูลย์ : การผลิตไบโอดีเซลที่เร่งปฏิกิริยาโดยไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (PRODUCTION OF BIODIESEL CATALYZED BY LIPASES FROM BACTERIA, YEAST AND FUNGI) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ทิฆัมพร ยงวณิชย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล 131 หน้า.

ไบโอดีเซลหรือเมทิลเอสเทอร์ เป็นเชื้อเพลิงที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพ และไม่เกิดมลพิษ ปัจจุบันการใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ แต่ราคาของเอนไซม์สูง จึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการ เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ เร่งปฏิกิริยาโดยไลเปสที่แยกจากจุลินทรีย์ 3 ประเภท ดังนี้คือ แบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ที่คัดเลือกจากแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกแล้วว่าผลิตไลเปสได้ 4 ชนิด เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และเชื้อรา *Fusarium solani* เมื่อนำไลเปสที่แยกได้จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบ และสัมพรรคภาพชนิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก พบว่าไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*; เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต และเชื้อรา *Fusarium solani* มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 4.2; 4.44; 4.25 และ 6.2 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ประมาณ 31.5; 16.37; 17.82 และ 16.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีไซโตเคมีโคเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่ามีค่าประมาณ 45; 60; 60 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถเร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของไลเปสบริสุทธิ์ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส และการสังเคราะห์เอสเทอร์ ที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ฟิเคชัน และ ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสที่มีพารา-ไนโตรฟินิลปาล์มิเตตเป็นสารตั้งต้น พบว่าไลเปสจากเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 5.42 ± 0.87 ; 312.28 ± 5.12 ; 763.6 ± 4.37 และ 8.18 ± 0.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8 ถึง 10 ; 4 ถึง 16 และ 12 ตามลำดับ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในการสังเคราะห์ไดโอดีคาโนเอต พบว่าเชื้อทั้ง 4 ชนิดมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12.69 ± 0.52 ; 33.33 ± 0.12 ; 50.23 ± 0.11 และ 2.4 ± 0.15 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่าเชื้อทั้ง 4 ชนิดมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.124 ± 0.01 ; 0.33 ± 0.03 0.78 ± 0.02 และ 0.102 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีน้ำมันปาล์ม และเมทานอลเป็นสารตั้งต้น เร่งโดยไลเปสจากเชื้อทั้ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 21.59 ± 3.42 ; 32.21 ± 2.32 ; 59.46 ± 3.47 และ 23.98 ± 3.21 ตามลำดับ

จากผลงานวิจัยทั้งหมด พบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส และสังเคราะห์เอสเทอร์ได้ดีที่สุดในจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ที่น่าสนใจคือสายพันธุ์กลายพันธุ์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า

ภาควิชา.....ลายมือชื่อ นิสิต.....ชุตินา แก้วพิบูลย์
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4872271423: MAJOR Biotechnology

KEYWORDS: LIPASES / BACTERIA, YEAST AND FUNGI / TRANSESTERIFICATION /BIODIESEL

CHUTIMA KAEWPIBOON: PRODUCTION OF BIODIESEL CATALYZED BY LIPASES FROM BACTERIA, YEAST AND FUNGI. THESIS ADVISER: ASSOC. PROF. TIKAMPORN YONGVANICH.THESIS COADVISER: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D 131 pp.

Biodiesel or methyl ester has been regarded as a biodegradable and nonpolluting fuel. Recently, the production of biodiesel employing lipase catalyzed transesterification has attracted much attention as it produces high purity product. However, the cost of enzyme remains a barrier for its industrial implementation. Therefore , the objective of this research is to compare the production of biodiesel obtained from transesterification process catalyzed by lipases isolated from 3 various types of microorganisms namely: bacterium selected from 4 types of screened lipase producing bacteria *Staphylococcus warneri*, wild type and UV irradiated mutant unicellular yeast *Candida rugosa* and finally filamentous fungus *Fusarium solani*.When the isolated crude lipases obtained from these 4 microorganisms were purified by anion-exchange DEAE Hitrap followed by affinity phenylsepharose hydrophobic interaction chromatography, the purification folds for lipases from *Staphylococcus warneri* , wild type and UV irradiated mutant unicellular yeast *Candida rugosa* and filamentous fungus *Fusarium solani* were 4.2, 4.44, 4.25 and 6.2 and the activity yields obtained were 31.5,16.37,17.82 and 16.5 respectively. The purified lipases were later analyzed for purity by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and the molecular weight of lipase for each microorganism was found to be approximately 45, 60, 60 and 30 kDa respectively. Then, the crude and purified lipases from each microorganism were compared for catalytic activities and substrate specificities in the hydrolytic reaction. In addition, the ester synthetic activities which consist of direct esterification and transesterification from palm oil were also studied. The results from hydrolysis using para-nitrophenylpalmitate as substrate showed that specific activities of lipases from 4 microorganisms were 5.42±0.87; 312.28±5.12; 763.6±4.37 and 8.18±0.52 unit per milligram protein and showed specificities for substrates with the number of carbon chain lengths of 8-10: 4-16 and 12 respectively. For the ester synthetic reactions, the specific activities of lipases in esterification process for the production of dodecanoate from 4 microorganisms were 12.69±0.52; 33.33±0.12; 50.23±0.11 and 2.4±0.15 unit per milligram protein respectively. On the other hand, specific activities of lipases in transesterification process for methylester or biodiesel from 4 microorganisms were 0.124±0.01; 0.33±0.03 0.78±0.02 and 0.102±0.01 unit per milligram protein respectively. When the production of biodiesel using the palm oil and methanol as substrates and catalyzed by purified lipases from all 4 types of microorganisms were determined in comparison at 40 degree celcius for 48 hours, the percent conversion were found to be 21.59±3.42; 32.21±2.32; 59.46± 3.47 and 23.98±3.21 respectively. Overall, among 4 microorganisms studied, it can be seen that *Candida rugosa* lipases from both wild type and mutants similarly exhibited highest hydrolytic and synthetic activities. More interestingly, the activities from purified lipase in mutant strain showed approximately 2 folds higher than that of the wild type.

Department.....Student's signature..CHUTIMA KAEWPIBOON.....
Field of study....BIOTECHNOLOGY.....Advisor's signature.....*Tikamporn Yongvanich*.....
Academic year.....2007.....Co-advisor's signature.....*Warawut Chulalak*.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดต่าง ๆ และเป็นกำลังใจ ทั้งการเรียน
และการทำวิจัย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล อาจารย์ที่
ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ ทางด้านห้อง
ปฏิบัติการในการทำวิจัย จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปกรณ์ วินะยานุวัตติคุณ ที่กรุณาให้ความรู้
คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการทำวิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้
ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ ที่กรุณาเป็นประธานใน
การสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ และ รองศาสตราจารย์
ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ
ภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุเมธ น้องหมวย จอย ปิง หลี และเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ
และให้กำลังใจตลอดมา

และสุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่คอยสนับสนุน และให้
กำลังใจตลอดมา

ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไปโอดีเซล.....	4
2.2 ไลเพส.....	8
2.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.....	17
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	19
3.2 สารเคมี.....	20
3.3 เชื้อจุลินทรีย์.....	21
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	22
3.5 วิธีดำเนินการทดลอง.....	22
4. ผลการทดลอง.....	36
4.1 การแยกไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา.....	36
4.2 การเปรียบเทียบไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในปฏิกิริยา ไฮดรอลิซิส เอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	58
4.3 การทำไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และราให้บริสุทธิ์ และการ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์.....	61
4.4 การศึกษาสมบัติของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา.....	73
4.5 การเปรียบเทียบไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในปฏิกิริยา ไฮดรอลิซิส เอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	89

4.6 การเปรียบเทียบไลเพสหยาบ และบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชัน.....	92
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	93
5.1 การแยกไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา.....	93
5.2 การทำไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และราให้บริสุทธิ์ และการ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์.....	97
5.3 การศึกษาสมบัติของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา.....	99
6. สรุปผลการทดลอง.....	102
รายการอ้างอิง.....	104
ภาคผนวก.....	102
ภาคผนวก ก.....	111
ภาคผนวก ข.....	115
ภาคผนวก ค.....	119
ภาคผนวก ง.....	122
ภาคผนวก จ.....	127
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	131

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติของไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล.....	4
2	ข้อกำหนดลักษณะ และคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน พ.ศ. 2548.....	5
3	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลเมื่อใช้ต่างเป็นตัวเร่งเปรียบเทียบกับการใช้ไลเพส.....	8
4	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพส.....	10
5	อัตราการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเพสจากเชื้อรา <i>Geotrichum candidum</i>	16
6	การทำไลเพสจากเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์.....	18
7	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบแยกจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส.....	39
8	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบแยกจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	40
9	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบแยกจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	47
10	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบแยกจากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส.....	53
11	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบแยกจากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	55
12	ขั้นตอนการทำไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ให้บริสุทธิ์.....	62
13	ขั้นตอนการทำไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิมให้บริสุทธิ์.....	64
14	ขั้นตอนการทำไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตให้บริสุทธิ์.....	65
15	ขั้นตอนการทำไลเพสหยาบจากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ให้บริสุทธิ์.....	67
16	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	77

ตารางที่	หน้า	
17	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	78
18	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	79
ค-1	ปริมาตรสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์.....	120
ค-2	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0.1- 0.6 ไมโครกรัม.....	121
ง-1	กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม.....	125



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	2
2	ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส.....	14
3	เชื้อแบคทีเรีย (a-d) <i>Microbacterium</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> และ <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA (e-h) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ผสมด้วยโรดามีน บี 0.001 % (W/V) และน้ำมันปาล์ม 1 % (W/V) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	36
4	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Microbacterium</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> และ <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	37
5	การเจริญและแอกทิวิตีของเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง.....	38
6	ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลาต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสหายาจากเชื้อ <i>Staphylococcus warneri</i>	39
7	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสหายาของเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> โดยใช้ที่ 50 % สารละลายไลเพสหายา โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม เติมน้ำมันอลแบบสามชั้นที่เวลา 0, 8 และ 16 ชั่วโมง...	41
8	ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	42
9	เชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> (a) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ (b) สายพันธุ์กลายพันธุ์ ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YM และ (c) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ (d) สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ผสมด้วยโรดามีน บี 0.001 % (W/V) และน้ำมันปาล์ม 1 % (W/V) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง.....	43

รูปที่	หน้า	
10	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบแยกจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (mutant by UV irradiation) ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส.....	44
11	การเจริญและแอกทิวิตีของเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 178 ชั่วโมง.....	45
12	การเจริญและแอกทิวิตีของเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตในอาหารเหลวผสมน้ำมันปาล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 178 ชั่วโมง.....	45
13	เปรียบเทียบการเจริญและแอกทิวิตีของเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	46
14	ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลาต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต.....	47
15	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสหยาบของเชื้อ ยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต โดยใช้ที่ 50 % สารละลายไลเพสหยาบ โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม เติมนีทานอลแบบสามชั้นที่เวลา 0, 8 และ 16 ชั่วโมง.....	49
16	ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	50
17	แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	51

รูปที่	หน้า	
18	เชื้อรา <i>Fusarium solani</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA (a) ด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (b) ด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และ (c) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ผสมด้วยโรดามีน บี 0.001 % (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 และ 72 ชั่วโมง.....	52
19	การเจริญและแอกทิวิตีของเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน.....	54
20	ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลาต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสหยาบจากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i>	54
21	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสหยาบของเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> โดยใช้ที่ 50 % สารละลายไลเพสหยาบ โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม เติมนเมทานอลแบบสามชั้นที่เวลา 0, 8 และ 16 ชั่วโมง.....	56
22	ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสหยาบจากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	57
23	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส.....	58
24	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	59
25	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	60
26	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	69
27	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	70

รูปที่	หน้า	
28	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบน โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	71
29	การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	72
30	แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ต่อพารา-ไนโตรฟีนอลชนิดต่าง ๆ.....	74
31	แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม ต่อพารา-ไนโตรฟีนอลชนิดต่าง ๆ.....	75
32	แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ต่อพารา-ไนโตรฟีนอลชนิดต่าง ๆ.....	75
33	แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ต่อพารา-ไนโตรฟีนอลชนิดต่าง ๆ.....	76
34	ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลาต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i>	77
35	ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลาต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต.....	78
36	ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลาต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i>	79
37	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> เติมเมทานอลแบบสามขั้นที่เวลา 0, 8 และ 16 ชั่วโมง.....	81
38	ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	82

รูปที่	หน้า	
39	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจาก ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบด้วยไลเพสบริสุทธิ์ของ เชื้อ ยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ต เดิมเมทานอลแบบสามชั้นที่เวลา 0, 8 และ 16 ชั่วโมง.....	83
40	ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อ ยีสต์ <i>Candida rugosa</i> สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	85
41	โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจาก ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบด้วยไลเพสบริสุทธิ์ของ เชื้อรา <i>Fusarium solani</i> เดิมเมทานอลแบบสามชั้นที่เวลา 0, 8 และ 16 ชั่วโมง....	86
42	ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา <i>Fusarium solani</i> ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	88
43	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ใน ปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส.....	89
44	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ใน ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	90
45	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ใน ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	91
46	เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของ ไลเพสหยาบ และบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในการผลิตไบโอดีเซล...	92
ค-1	กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์.....	119
ค-2	กราฟมาตรฐานความเข้มข้น BSA ที่ 0.1-0.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....	121
ง-1	โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์.....	124
ง-2	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล.....	126

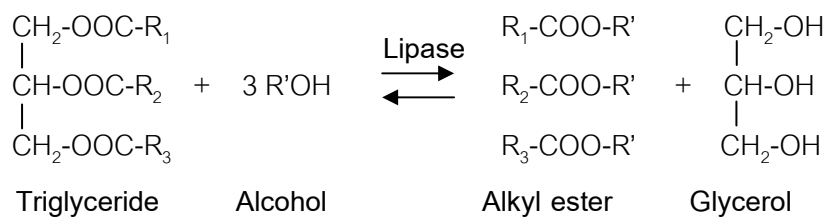
บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปริมาณความต้องการในการใช้พลังงานเชื้อเพลิงมีแนวโน้มสูงขึ้น ในขณะที่พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญมีเหลืออยู่อย่างจำกัด ประกอบกับสถานการณ์ปัจจุบันราคาน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น จึงมีการศึกษาแหล่งพลังงานทดแทน ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล (Biomass) มีองค์ประกอบที่มีลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมดีเซล สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับการยานพาหนะได้โดยมีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล (Diesel) จึงสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ อีกทั้งยังช่วยรักษาสภาพเครื่องยนต์ให้ใช้งานได้ยาวนานอีกด้วย เนื่องจากออกซิเจนในไบโอดีเซลให้การสันดาปที่สมบูรณ์กว่าดีเซลปกติ ทำให้มีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงช่วยลดการอุดตันของระบบไอเสีย นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังเป็นเชื้อเพลิงสะอาด กล่าวคือไม่มีกำมะถัน (Sulfur) จากการเผาไหม้ ลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) กลุ่มไนโตรเจนออกไซด์ (NO_x) กลุ่มซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_x) และสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่สมบูรณ์ลงได้ (Gerpen, 2005) โดยทั่วไปการผลิตไบโอดีเซลนิยมใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการ ยุ่งยากต่อกระบวนการแยกไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเวลามากขึ้น การใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีหลายประการ เช่น มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากกว่า และได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ ในปัจจุบันมีการใช้ ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากไบโอดีเซลที่ได้จากปฏิกิริยานี้มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด โดยใช้ไขมันพืช ทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ จะได้แอลคิลเอสเทอร์ ซึ่งก็คือไบโอดีเซล (Ranganathan และคณะ, 2007)

ไลเปส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า “glycerol ester hydrolase” เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ของปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) (Al-Zuhair และคณะ, 2007) ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ จะเกิดได้ในภาวะ oil-water interface (Cihangir และ Sarikaya, 2004) นอกจากนี้ไลเปสสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
(Fukuda และคณะ, 2001)

อย่างไรก็ตามไลเปสที่ผลิตในเชิงการค้ามีราคาสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพยายามที่จะคัดเลือกไลเปสที่แยกจากแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในธรรมชาติ ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่ได้จากปฏิกิริยาที่เร่งโดยไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

ขั้นตอนการวิจัย

- 1) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส
- 2) แยกไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส และทดสอบการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส เอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเปสหยาบ
- 3) ทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
- 4) ศึกษาสมบัติของไลเปส โดยการทดสอบความจำเพาะต่อสารตั้งต้นในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
- 5) เปรียบเทียบการผลิต ไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่เร่งโดยใช้ไลเปสหยาบ และบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
- 6) วิเคราะห์ สรุปผลงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเลือกใช้ไลเพสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา
ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล (Biodiesel)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล เช่น น้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ รวมถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วนำมาแปรสภาพซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี ทั้งนี้เพื่อลดความหนืดลงทำให้สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับยานพาหนะได้โดยตรง เนื่องจากมีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติของไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล

สมบัติ	ดีเซล	ไบโอดีเซล
เชื้อเพลิงมาตรฐาน	ASTM D957	ASTM D6751
ความหนืด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	1.3-4.1	4.06-6.0
ความต้วงจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮต์	0.85	0.88
ความหนาแน่น ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส	7.079	7.328
ปริมาณน้ำ และตะกอน, ร้อยละโดยปริมาตร	ไม่สูงกว่า 0.05	ไม่สูงกว่า 0.05
ปริมาณคาร์บอน, ร้อยละโดยน้ำหนัก	87	77
ปริมาณไฮโดรเจน, ร้อยละโดยน้ำหนัก	13	12
ปริมาณออกซิเจน, ร้อยละโดยน้ำหนัก	0	11
ปริมาณซัลเฟอร์, ร้อยละโดยน้ำหนัก	ไม่สูงกว่า 0.05	0-0.0024
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	180-340	315-350
จุดวาบไฟ (องศาเซลเซียส)	60-80	100-170
จุดหมอก (องศาเซลเซียส)	-15-5	-3-12
จุดไหลเท (องศาเซลเซียส)	(-35)-(-15)	-15-10
ดัชนีซีเทน	40-55	48-65

ที่มา: Dwivedi และคณะ (2006)

ตารางที่ 2 ข้อกำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซลประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

รายการ	รายการข้อกำหนด	ระดับ ความ เข้มข้น	หน่วยที่วัด	วิธี ทดสอบ 1	เครื่องมือ ที่ใช้ ตรวจวัด
1	เมทิลเอสเทอร์(Methyl Ester)	>96.5	% wt	EN14103	GC-FID
2	กรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเทอร์ (Linolenic Acid Methyl Ester)	<12	% wt	EN14103	GC-FID
3	โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride)	<0.8	% wt	EN 14105	GC-FID
4	ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride)	<0.2	% wt	EN 14105	GC-FID
5	ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride)	<0.2	% wt	EN 14105	GC-FID
6	กลีเซอรินอิสระ (Free Glycerin)	<0.2	% wt	EN 14105	GC-FID
7	กลีเซอรินทั้งหมด (Total Glycerin)	<0.25	% wt	EN 14105	GC-FID
8	เมทานอล (Methanol)	<0.2	% wt	EN 14110	GC-FID
9	โลหะกลุ่ม 1 โซเดียม (Na) และโปแตสเซียม (K)	<5	mg/kg(ppm)	EN 14108 EN 14109	AAS
10	โลหะกลุ่ม 2 (แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg))	<5	mg/kg(ppm)	EN 14538	AAS
11	ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	<0.001	% wt	ASTM D4951	ICPS
12	ซัลเฟอร์ (Sulphur)	<0.001	% wt	ASTM D2622	X-ray
13	น้ำ (Water)	<0.05	% wt	ASTM D2709	Centrifuge

หมายเหตุ : 1. วิธีทดสอบอาจใช้วิธีอื่นที่เทียบเท่าก็ได้ แต่ในกรณีที่มีข้อโต้แย้งให้ใช้วิธีที่กำหนดในรายละเอียดแนบท้ายนี้

ที่มา : ตามรายละเอียดแนบท้ายประกาศกรมธุรกิจพลังงาน พ.ศ. 2548 (นำมาเฉพาะบางรายการที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์)

2.1.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไตรกลีเซอไรด์ สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานให้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้ แต่การนำไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในน้ำมันสกัดจากพืชหรือสัตว์ไปใช้กับเครื่องยนต์โดยตรงยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ พบปัญหาหลายอย่างในการใช้น้ำมันดังกล่าว ดังนั้นจึงมีกระบวนการเพื่อพัฒนาน้ำมันดังกล่าวให้มีความเหมาะสมกับเครื่องยนต์ ซึ่งมีอยู่หลายวิธี (Ma, และ Hanna, 1999) เช่น

2.1.1.1 การใช้โดยตรง (Direct use and blending)

การใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรือผสมลงในน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่าง ๆ เพื่อต้องการลดความหนืดของน้ำมันพืช เมื่อนำมาใช้จะก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถทำงานได้กับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม แต่ก็มีปัญหาเกิดขึ้นตามมา เช่น มียางเหนียวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระในระหว่างการเก็บรักษา หรือปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) จากขั้นตอนการเผาไหม้ ซึ่งลักษณะการเผาผลาญพลังงานระหว่างน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันดีเซลพบว่าเป็นไปในแบบเดียวกัน และมีรายงานการทดลองของ Ma, และ Hanna, 1999 ว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนของน้ำมันพืชต่อน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 1:10 ถึง 1:20 สามารถนำไปใช้งานได้

2.1.1.2 ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

เป็นการนำของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถรวมตัวกันได้ตามธรรมชาติมาทำให้รวมตัวกันได้โดยอาศัยแรงกลและสารลดแรงตึงผิว ในการผลิตไบโอดีเซลจะนำน้ำมันที่สกัดจากพืชหรือสัตว์มาผสมกับตัวทำละลายบางชนิด เช่น เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) และ 1-บิวทานอล (1-butanol) การผสมดังกล่าวช่วยทำให้ความหนืดของน้ำมันลดลง สมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายคลึงกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

2.1.1.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis)

เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นอีกสารอื่นโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 450-850 องศาเซลเซียส ไขมันสามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็ก แต่

ด้วยวิธีไพโรไลซิสมีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกกำจัดออกไป ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้กระบวนการนี้ มักใช้การผลิตเชื้อเพลิงที่มีสมบัติเหมือนแก๊สโซลีนมากกว่าไบโอดีเซล

2.1.1.4 กระบวนการทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification)

เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยไลเพสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เกิดเป็น กรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แอลกอฮอล์ลิซิส (alcoholysis) เป็นการแทนที่แอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในหมู่เอสเตอร์เดิมด้วยแอลกอฮอล์ตัวใหม่ แอลกอฮอล์ที่เหมาะสมนำมาใช้แทนที่ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล (propanol) บิวทานอล และ เอมีล แอลกอฮอล์ (amyl alcohol) จากการทดลองพบว่า เมทานอลและเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะเมทานอลซึ่งมีราคาถูก และมีสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ดี ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่ได้จากพืชน้ำมัน ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้ว นำมาผ่านกระบวนการที่ทำให้โมเลกุลเล็กลง ให้อยู่ในรูปของ เอทิลเอสเตอร์ (ethyl esters) หรือ เมทิลเอสเตอร์ (methyl esters) ซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก (ตารางที่ 1 และ 2) สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้ โดยตรงไบโอดีเซลจะมีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Li และคณะ, 2006) ในการใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมีข้อดีว่าการใช้กรดหรือด่างซึ่งได้เปรียบเทียบดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 กล่าวคือการใช้ไลเพสมีความจำเพาะมากกว่า ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แอลคิลเอสเตอร์ที่จำเพาะ และสามารถแยกผลิตภัณฑ์ร่วมที่เป็นกลีเซอรอลออกได้ง่าย และบริสุทธิ์กว่าการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Ranganathan และคณะ, 2007) และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้ว่ามีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง ดังนั้นจากข้อดีต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วนี้ จึงได้มีการพิจารณานำเอาไลเพสมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ทั้งชนิดที่ปล่อยออกมานอกเซลล์และที่อยู่ภายในเซลล์มาใช้ในปฏิกิริยานี้ได้ในระบบที่มีน้ำและไม่มีน้ำ ด้วยการใส่เอนไซม์นี้สามารถนำมาใช้ เพื่อแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการใช้กรดหรือด่างเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ ง่ายในการแยกกลีเซอรอล โดยที่ไม่ต้องใช้กระบวนการที่ยากหลายขั้นตอน และกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันหรือไขมันที่ใช้แล้ว ก็สามารถเปลี่ยนมาเป็นเมทิลเอสเตอร์ได้อย่างสมบูรณ์ด้วย อย่างไรก็ตาม ต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากการใช้ไลเพสนี้ยังสูงกว่าการใช้ด่างอยู่มาก จึงต้องมีการพัฒนาการผลิตไลเพสต่อไป

ตารางที่ 3 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลเมื่อใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกริยาเปรียบเทียบกับการใช้ไลเพส

	ตัวเร่งปฏิกริยาต่าง	ตัวเร่งปฏิกริยาไลเพส
อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกริยา	60-70	30-40
กรดไขมันอิสระในวัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์สูง	เมทิลเอสเทอร์
น้ำในวัตถุดิบ	รบกวนปฏิกริยา	ไม่มีผลต่อปฏิกริยา
ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	สูงกว่า
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	ไม่ต้องล้าง
ราคาของตัวเร่งปฏิกริยา	ถูก	ค่อนข้างแพง

ที่มา: Fukada และคณะ (2001)

2.2 ไลเพส

ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮดรอลเลส (glycerol ester hydrolase) และยังมีชื่อเรียกอื่น อีก เช่น เอซิลกลีเซอรอล ไฮดรอลเลส (acylglycerol hydrolase) ไตรเอซิลกลีเซอรอล ไฮดรอลเลส (Triacylglycerol hydrolase) นอกจากนี้คณะกรรมการเอนไซม์ (Enzyme Commission; EC) ได้กำหนดการตั้งชื่อเอนไซม์ (nomenclature) โดยได้จัดแบ่งเอนไซม์ออกเป็นพวกต่าง ๆ (classification) ตามชนิดปฏิกริยาที่เอนไซม์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) รหัสเอนไซม์นี้ประกอบด้วยตัวเลข 4 ชุด แต่ละชุดจะแยกออกจากกันโดยจุด ตัวเลขชุดแรกจะบ่งถึงพวก (class) ที่เอนไซม์นั้นถูกจัดไว้ ซึ่งมี 6 พวก ส่วนตัวเลขชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ของรหัสเอนไซม์ จะบอกถึงชนิดของปฏิกริยาที่ถูกเร่ง สำหรับตัวเลขชุดที่ 4 จะช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาล้ำยกันออกจากกัน ไลเพสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ที่บ่งบอกปฏิกริยาดังนี้

E.C.3.-.- - Hydrolases.

E.C.3.1.-. - Acting on ester bonds.

E.C.3.1.1. - Carboxylic ester hydrolases.

E.C.3.1.1.3 Triacylglycerol lipase.

2.2.1 แหล่งของไลเปส

ไลเปสพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์จะพบได้ที่ตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) ในพืชจำพวกถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ส่วนไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดในปริมาณที่สูงกว่าในพืช และสัตว์ ส่วนมากในทางการค้าจะใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ (Sharma และ คณะ, 2001) จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถผลิตได้ทั้งจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่ละชนิดให้ไลเปสที่มีสมบัติต่างกัน ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่า ไลเปสจากพืชหรือสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ มีสมบัติที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ และความเป็นกรดต่างมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (Cardenas และคณะ, 2000) ง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชสัตว์ ดังนั้นจึงมีการนำไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท อย่างไรก็ตามเนื่องจากไลเปสที่ได้จากแต่ละแหล่งมีสมบัติแตกต่างกัน จึงต้องเลือกไลเปสให้มีสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ดังแสดงในตารางที่ 4

2.2.2 การสร้างไลเปสของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสได้ ทั้งที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular lipases) และไลเปสที่ผลิตอยู่ในเซลล์ (intracellular lipases) ไลเปสที่นำมาใช้เพื่อผลิตไบโอดีเซลจะนิยมใช้ ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตและการผลิตไลเปส พบว่าช่วงการเจริญที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสสูงสุดในช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) เช่น *Staphylococcus warneri* (Talon และคณะ, 1995) *Candida rugosa* (Zhang และคณะ, 2003) และ *Fusarium solani* (Maia และคณะ, 1999)

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปส

	สกุล	ชนิด	อ้างอิง
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. thermocatenulatus</i>	Rua et al., 1998
		<i>Bacillus</i> sp. IHI-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 delbrueckii</i> sub sp. <i>bulgaricus</i>	El-Sawah et al., 1995
	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	Meyers et al., 1996
	<i>Micrococcus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	Sztajer et al., 1988
<i>Micrococcus freudenreichii</i>		Hou, 1994	
<i>Propionibacterium</i>	<i>M. luteus</i>	Hou, 1994	
	<i>Propionibacterium acne</i>	Sztajer et al., 1988	
<i>Burkholderia</i>	<i>Pr. granulorum</i>	Sztajer et al., 1988	
	<i>Burkholderia</i> sp.	Yeo et al., 1998	
Bacteria (Gram-negative)	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bu. glumae</i>	El Khattabi et al., 2000
		<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; Noble et al., 1994
		<i>P. cepacia</i>	Penereac'h and Baratti, 1996; Lang et al., 1998; Hsu et al., 2000
		<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>Chromobacterium</i>	<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>
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aci. radioresistens</i>	Chen et al., 1999
		<i>Ae. hydrophila</i>	Anguita et al., 1993
		<i>Ae. sorbia</i> LP004	Lotrakul and Dharmsthiti, 1997

ตารางที่ 4 (ต่อ)

	สกุล	ชนิด	อ้างอิง
Fungi	<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. microsporus</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
<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. fusiculosum</i>		Hou, 1994
	<i>Penicillium sp.</i>		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>		Balcao 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 sp.</i>		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

ตารางที่ 4 (ต่อ)

	สกุล	ชนิด	อ้างอิง	
Yeasts	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>	Wang et al., 1995; Frense et al., 1996; Yee et al., 1995; Brocca et al., 1998; Xie et al., 1998	
		<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	
		<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> <i>Rho. pilimornae</i>
	<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>	Dharmsthiti 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3 สมบัติด้านเคมีและกายภาพ

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon และคณะ, 1995) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (pH 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ปริมาณเกลือและชนิดของอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH ที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Malcata และคณะ, 1992) ในส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกรด พบมากในไลโซโซมในเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วง pH 5.6-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วง pH ที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gilbert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสารตั้งต้น เป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata และคณะ, 1992)

2.2.4 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสในพันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Al-Zuhair และคณะ, 2007) ซึ่งจะได้กรดไขมัน และกลีเซอรอล เป็นผลิตภัณฑ์ และยังพบว่า ไตรกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ (Macrae, 1983) ไลเปสจะทำการย่อยสารตั้งต้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในรูป oil-water interface (Cihangir และ Sarikaya, 2004) เนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ในพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสารตั้งต้น

นอกจากไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสได้ แล้วยังมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่น ๆ ได้ อีกหลายปฏิกิริยาดังรูปที่ 2 เช่น ในปฏิกิริยาที่มีสารละลายอินทรีย์ ไลเปสสามารถทำให้เกิดการย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสได้ เกิดเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ จะได้เอสเทอร์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ หรือเร่งปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายหมู่เอซิล สารจำพวกแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ ไกลโคไซด์ และเอมีน เป็นต้น (Schmidt-Dannert และคณะ, 1994).

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 แบบ (Yamane, 1987) คือ

2.2.4.1 ปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

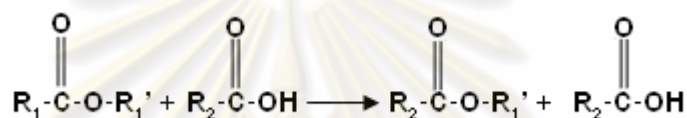


2.2.4.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน



2.2.4.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

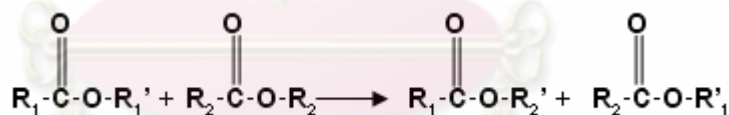
2.2.4.3.1 แอซีโดลิซิส



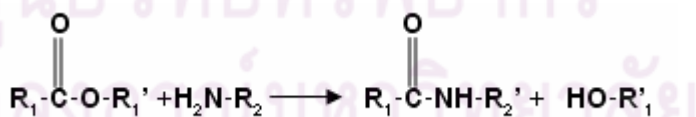
2.2.4.3.2 แอลกอฮอล์ลิซิส



2.2.4.3.3 อินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน



2.2.4.3.4 อะมิโนลิซิส

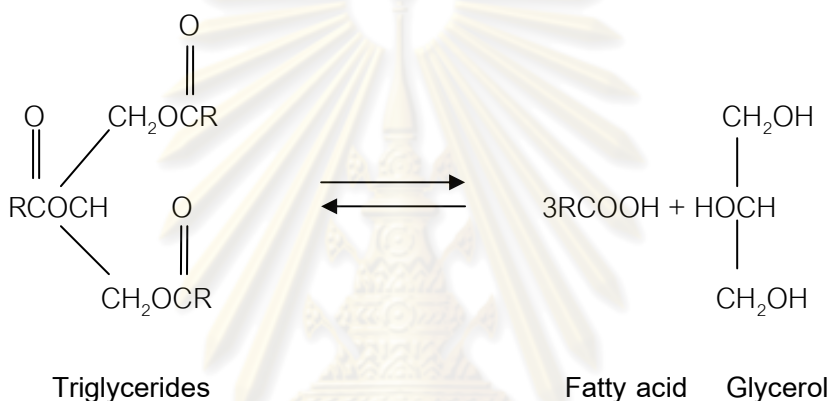


รูปที่ 2 ปฏิกิริยาที่เร่งโดยไลเปส

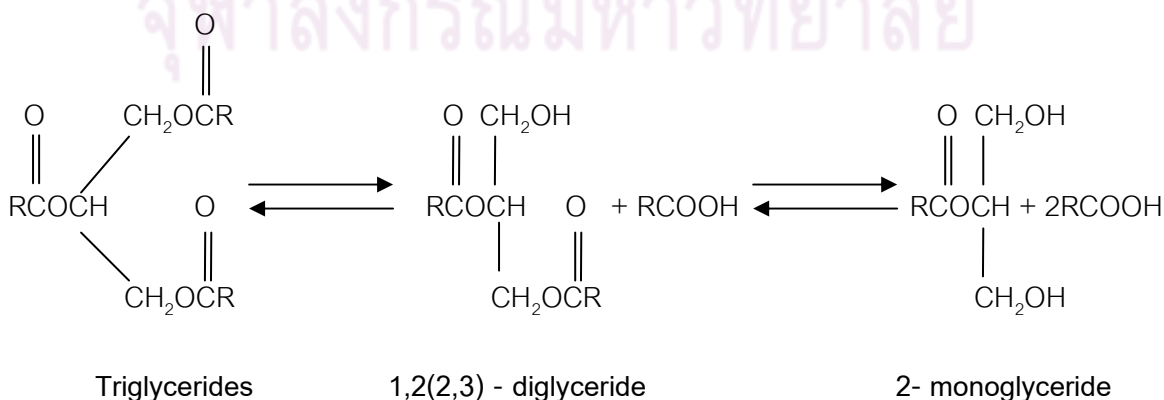
2.2.5 ความจำเพาะของไลเปสต่อสารตั้งต้น

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่ง บนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม มีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์และโมนอกลิเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens*



กลุ่มที่ 2 เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์ และ 2 - โมนอกลิเซอไรด์ แต่ (1,2) , (2,3) - โมนอกลิเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้าให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3- ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3) - โมนอกลิเซอไรด์ ซึ่งถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ โดยกรดไขมัน และกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้จากจุลินทรีย์ดังนี้ *Aspergillus niger* , *Mucoro javanicus* และในพวก *Rhizopus* อีกหลายชนิด



กลุ่มที่ 3 เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสในกลุ่มนี้จะย่อยสลายกรดไขมันที่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 (*cis* double bond) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ดี เอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวก ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจากเชื้อรา *Penicillium cyclopium* และ *Geotrichum candidum* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่ถ้ามีไดเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อัตราการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปสจากเชื้อรา *Geotrichum candidum* (Macrae, 1983)

Triglyceride		Relative rate
Triolein	(<i>cis</i> -9-18:1)	100
Trilinolein	(<i>cis</i> , <i>cis</i> -9, 12-18:2)	106
Trilinolinin	(all <i>cis</i> -9, 12, 15-18:3)	99
Tripalmitolein	(<i>cis</i> -9-16:1)	99
Trielaidin	(<i>trans</i> -9-18:1)	214
Tripetroselenin	(<i>cis</i> -6-18:1)	4
Tributylin	(4:0)	2
Trihexanoin	(6:0)	5
Trioctanoin	(8:0)	29
Tridecanoin	(10:0)	14
Trilaurin	(12:0)	7
Trimyristin	(14:0)	3
Tripalmitin	(16:0)	5
Tristearin	(18:0)	3

2.2.6 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

การทำโปรตีนที่ต้องการให้บริสุทธิ์ มีหลายวิธีขึ้นกับสมบัติของโปรตีน ดังนี้

2.2.6.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยสมบัติด้านการละลาย แบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้

- 1) การเปลี่ยนแปลงค่า pH (Isoelectric precipitation)
- 2) การเปลี่ยนแปลงค่าความแรงไอออน (Ionic strength change)
- 3) การลดค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant decrease)

2.2.6.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาด หรือ มวล

- 1) เจลฟิลเตรชัน (Gel filtration)
- 2) อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)
- 3) ไดอะลิซิส (Dialysis)

2.2.6.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของประจุ

- 1) โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน (Ion- exchange chromatography)
- 2) ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Isoelectric focussing)

2.2.6.4 การทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยสมบัติด้านความจำเพาะทางชีวภาพ

- 1) โครมาโทกราฟีแบบสัมพันธ์ภาพ (Affinity chromatography)

การทำไลเพสให้บริสุทธิ์ได้ผ่านกระบวนการข้างต้น ดังจะเห็นได้จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ดังแสดงในตารางที่ 6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การทำไลเพสจากเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์

เชื้อจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	แยกที่วิธีที่เหลืออยู่ (%)/ความบริสุทธิ์ (เท่า)	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	อ้างอิง
<i>Bacillus</i> spp.	ammonium sulfate fractionation, treatment with acrinol, DEAE-Sephadex A-50, Toyopearl	9%/7762	22	Sugihara et al., 1991
<i>Bacillus thermocatenuates</i> (lipase gene cloned into <i>Escherichia coli</i>)	HW-55F and butyl-Toyopearl 650 M cell disintegration, heat precipitation, ion exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography	312	16	Schmidt-Dannert et al., 1996
<i>Bacillus</i> spp. THL027	ultrafiltration and Sephadex G-100	2.6	69	Dharmstithi and Luchai, 1999
<i>Bacillus pumilus</i>	ammonium sulfate fractionation and gel filtration on Sephadex G-100	75		Jose and Kurup, 1999
<i>Bacillus alcalophilus</i>	ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100	111		Ghanem et al., 2000
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (lipase gene cloned into <i>Escherichia coli</i>)	CM-Sepharose and DEAE-Sepharose	62.2%/11.6		Kim et al., 2000
<i>Bacillus</i> spp.	acetone fractionation, two acetone precipitations and, octyl-Sepharose CL-4B, Q-Sepharose and Sepharose-12	20%/3028	25	Imamura and Kitaura, 2000
<i>Pseudomonas fragi</i>	acidification, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Toyopearl 650 M and DEAE-Sepharose CL-6B	48%/68	33	Nishio et al., 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ammonium sulfate precipitation and chromatography on DEAE-cellulose and octyl-Sepharose CL-4B	21%/3390	45	Sztajer et al., 1992
<i>Pseudomonas</i> spp. ATCC 21808	Q-Sepharose, octyl-Sepharose and the enzyme eluted with isopropanol	56%/159	35	Kordel et al., 1991
<i>Pseudomonas cepacia</i>	liquid-liquid (10% PEG 6000 and 10% Dextran 500) extraction and chromatography using Q-Sepharose	30%/55	58	Dunhaupt et al., 1991
<i>Pseudomonas cepacia</i>	polyoxyethylene detergent C14EO6-based aqueous two-phase partitioning	76%/24	60	Terstappen et al., 1992
<i>Pseudomonas putida</i> 3SK	DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-100	21%/5.3	45	Lee and Rhee, 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ultrafiltration, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl 650 M and phenyl-Toyopearl 650	42%/6.1	33	Kojima et al., 1994
<i>Pseudomonas</i> spp. Yo103	ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose and Sephadex G-200	3.7%/62	38	Kim et al., 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ammonium sulfate precipitation, hydroxyapatite column chromatography	518	30	Sharon et al., 1998
<i>Rhizopus japonicus</i> NR 400	hydroxyapatite, octyl-Sepharose and Sephacryl S-200	31%/93	30	Suzuki et al., 1986
<i>Rhizopus oryzae</i>	acetone precipitation (80%), Sephadex G-100	64%/160		Razak et al., 1997
<i>Rhizopus delemar</i>	oleic acid affinity chromatography, CM-Sephadex	30%/10.3	30.3	Haas et al., 1992
<i>Rhizopus arrhizus</i>	ammonium sulfate fractionation and Sephadex G-100 gel filtration	42%/720	67	Chattopadhyay et al., 1999
<i>Rhizopus chinensis</i>	CM-Cellulofine C-500, ether Toyopearl 650 M, Super Q Toyopearl and CM-Cellulofine C-500	27.6%	28.4	Yasuda et al., 2000
<i>Rhizopus oryzae</i>	ammonium sulfate fractionation, sulfopropyl-Sepharose, Sephadex G-75 and again on sulfopropyl-Sepharose	22%/1260	32	Hiol et al., 2000

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	(Clean model, Lab service Ltd)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	(Vision Scientific Co., Ltd)
เครื่องชั่งแบบละเอียด	(Sartorius, Germany)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)	(Barnstead, U.S.A.)
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	(Model 250, Denver Instrument)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ANTHOS Zenyth 200 Microplate Spectrophotometer)	
เครื่องปั่นเหวี่ยง (microrefrigerated centrifuge)	(Kubota 3700, Japan)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	(Mammert, Germany)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	(Ta Chang Medical instrument, Taiwan)
กระดาษกรองเบอร์ 1	(Whatman, England)
อุปกรณ์กรองปั่นเหวี่ยง (Centrifugal Filter Devices) ฐกรอง 10 KDa	(Millipore, U.S.A.)
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)	(Shimudzu, Japan)
แผ่นโครมาโทกราฟี ชนิดอะลูมิเนียม ซิลิกา เจล 60 F ₂₅₄	(Merck, Germany)
เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (slab gel electrophoresis equipment)	
รุ่น Mini-Protein II Dual	(BioRad, U.S.A)
ปั๊มดูด-จ่ายสาร (peristaltic pump)	(LKB-Pump P.1 Pharmacia, Sweden)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	(T.S. Instument, Thailand)
เครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร (cork borer)	

3.2 สารเคมี

แบคโต-ทริบิตอน (bacto-tryptone)	(Difco Laboratories, U.S.A.)
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	(Hi media, India)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Merck, Germany)
โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	(Merck, Germany)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	(Merck, Germany)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Ajax Finechem, Australia)
โพเตโตเดกซ์โทรสเอการ์ (PDA)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)
โรดามีน บี (rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)
กัมอะราบิก (gum arabic)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิล อะซิเตท (<i>p</i> -nitrophenyl acetate: C_2)	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล บิวทิเรท (<i>p</i> -nitrophenyl butyrate: C_4)	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล คาปริเลท (<i>p</i> -nitrophenyl caprylate: C_8)	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล คาเพรท (<i>p</i> -nitrophenyl caprate: C_{10})	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรท (<i>p</i> -nitrophenyl laurate: C_{12})	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล ไมริสเทท (<i>p</i> -nitrophenyl myristate: C_{14})	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเทท (<i>p</i> -nitrophenyl palmitate: C_{16})	(Sigma,U.S.A.)
พารา-ไนโตรฟีนิล สเตียเรท (<i>p</i> -nitrophenyl stearate: C_{18})	(Sigma,U.S.A.)
2-โพรพานอล (2-propanol: CH_3CHOH)	(Lab scan,Thailand)
ไตรตอน เอกซ์-100 (triton x-100)	(Scharlau,Spain)
ทริส Tris (hydroxymethyl) aminomethane	(Scharlau,Spain)
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	(Merck, Germany)
สารเบรด์ฟอร์ด (Bradford's reagent)	(Biorad,U.S.A)
เฮกเซน (hexane)	(Labscan, Thailand)
เมทานอล (methanol)	(Labscan, Thailand)
อีโคเซน (eicosane)	(Aldrich, Germany)
กรดฟอร์มิก (formic acid)	(Labscan, Thailand)
เฮปเทน (heptane)	(Labscan, Thailand)
เอทานอล (ethanol)	(Lab scan, Ireland)

กรดโอเลอิก (oleic acid)	(Sigma,U.S.A.)
โดเดคานอล (dodecanol)	(Sigma,U.S.A.)
คอปเปอร์ อะซิเตท (copper acetate)	(Sigma,U.S.A.)
ไพริดีน (pyridine)	(Sigma,U.S.A.)
ชุดโปรตีนมาตรฐาน (protein marker)	(Fermentus, U.S.A.)
2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-Mercaptoethanol)	(Sigma, U.S.A.)
คูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-200 (Coomassie brilliant blue G-200)(Fluka, Switzerland)	
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)	(Sigma, U.S.A.)
อะคริลาไมด์ (acrylamide)	(Sigma, U.S.A.)
N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bis acrylamide)	(Sigma, U.S.A.)
N,N,N',N'-เทตระเมธิลีนไดอามีน (N,N,N',N'-tetramethylenediamine, TEMED)	(Sigma, U.S.A.)
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS)	(Sigma, U.S.A.)
ดีอีเอดี ไฮแทรป คอลัมน์ (DEAE HiTrap column chromatography)	(GE Healthcare, Singapore)
ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป คอลัมน์ (Phenyl Sepharose HiTrap chromatography)	(GE Healthcare, Singapore)
น้ำมันปาล์ม ชนิดไฮ โอลีน	(มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ไทย)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

- เชื้อแบคทีเรีย *Microbacterium* sp.
- เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*
- เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*
- เชื้อแบคทีเรีย *Stenotrophomonas maltophilia*
- เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม
- เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต
- เชื้อรา *Fusarium solani*

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ทางสถิติ	(Graph Pad Prism4)
โปรแกรมที่ใช้ในการสร้างกราฟวิเคราะห์ข้อมูล	(Graph Pad InStat3)

3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองทั้งหมดแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ ได้แก่

- 3.5.1 การแยกไลเปสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
- 3.5.2 การทำไลเปสหยาบให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปส
- 3.5.3 การศึกษาสมบัติของไลเปสบริสุทธิ์

3.5.1 การแยกไลเปสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

แบ่งขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

- 3.5.1.1 การทดสอบการผลิตไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
- 3.5.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตไลเปส
- 3.5.1.3 การวัดการเจริญ และการผลิตไลเปสของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
- 3.5.1.4 การแยกไลเปสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา
- 3.5.1.5 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

3.5.2 การทำไลเปสหยาบให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปส

- 3.5.2.1 การทำไลเปสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
- 3.5.2.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์โดยวิธีไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

3.5.3 การศึกษาสมบัติของไลเปสบริสุทธิ์

- 3.5.3.1 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส
- 3.5.3.2 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์
 - 3.5.3.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน
 - 3.5.3.2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ในการผลิตไบโอดีเซล

3.5.1 การแยกไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

3.5.1.1 การทดสอบการผลิตไลเพสของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

3.5.1.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA (nutrient agar) ได้แก่ *Microbacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพส โดยเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO (Frenken และคณะ, 1992) ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปลา 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการผลิตไลเพสของเชื้อแบคทีเรียจากความสามารถในการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

3.5.1.1.2 เชื้อยีสต์

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* 2 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type) และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Mutant by UV irradiation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YM (Yeast malt extract agar) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพส โดยเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO (Frenken และคณะ, 1992) ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปลา 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตการผลิตไลเพสของเชื้อยีสต์จากความสามารถในการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

3.5.1.1.3 เชื้อรา

นำเชื้อรา *Fusarium solani* เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งโพเตโตเดกซ์โทรส เอการ์ (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันแล้วใช้เครื่องตัดจุกคออร์กเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่

มีราเส้นใยเจริญอยู่ แล้วนำขึ้นวุ้นดังกล่าวไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO (Frenken และคณะ, 1992) ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการผลิตไลเพสของเชื้อยีสต์จากความสามารถในการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

3.5.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตไลเพส

3.5.1.2.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA (nutrient agar) ได้แก่ *Microbacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ลงในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Rapp และ Backhaus, 1992) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเอาของเหลวส่วนบนไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าเอกทิวิตีจำเพาะ เปรียบเทียบค่าเอกทิวิตีจำเพาะของแบคทีเรีย 4 ชนิด และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่าเอกทิวิตีสูงสุด

3.5.1.3 การวัดการเจริญและการผลิตไลเพสของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

3.5.1.3.1 เชื้อแบคทีเรีย

3.5.1.3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก เลี้ยงในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Rapp และ Backhaus, 1992) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด

250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญเติบโต โดยนำไปวัดความขุ่นของอาหารที่ 600 นาโนเมตร และวัดการผลิตไลเปส โดยนำตัวอย่างที่เก็บไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบการทำงานของไลเปสโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Maia et al., 2000) และเขียนกราฟระหว่างการเจริญ และการผลิตไลเปสของเชื้อแบคทีเรียที่เวลาต่าง ๆ

3.5.1.3.2 ยีสต์

3.5.1.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

นำโคโคไลน์เดี่ยวของเชื้อยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลว YM (Yeast malt extract) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเปส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Fadiloglu และ Erkman, 2001) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 และ 158 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญเติบโต โดยนำไปวัดความขุ่นของอาหารที่ 600 นาโนเมตร และวัดการผลิตไลเปส โดยนำตัวอย่างที่เก็บไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบการทำงานของไลเปสโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Maia et al., 2000) และเขียนกราฟระหว่างการเจริญ และการผลิตไลเปส ของเชื้อยีสต์ที่เวลาต่าง ๆ

3.5.1.3.3 เชื้อรา

3.5.1.3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งโพเตโตเดกซ์โทรสเอการ์ (PDA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้เครื่องตัดจุกคอริกเบอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ที่มีราเส้นใยเจริญอยู่ แล้วนำขึ้นวุ้นดังกล่าวจำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเพส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Cardenas และคณะ, 2001) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 10 วัน เพื่อวัดการเจริญเติบโต โดยวัดจากน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา และการผลิตไลเพส โดยนำตัวอย่างที่เก็บไปกรองแยกเส้นใยราออก และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบการทำงานของไลเพสโดยใช้วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Maia et al., 2000) และเขียนกราฟระหว่างการเจริญ และการผลิตไลเพสของเชื้อราที่เวลาต่าง ๆ

3.5.1.4 การแยกไลเพสจากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

3.5.1.4.1 เชื้อแบคทีเรีย

3.5.1.4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารเหลว NB (nutrient broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Rapp และ Backhaus, 1992) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเอาของเหลวส่วนบนไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะ

3.5.1.4.2 เชื้อยีสต์

3.5.1.4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลว YM (Yeast malt extract) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร

เหลวสำหรับการผลิตไลเพส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Fadiloglu และ Erkman, 2001) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเอาของเหลวส่วนบนไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะ

3.5.1.4.3 เชื้อรา

3.5.1.4.3.1 การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้เครื่องตัดจุกคอริกเบอร์ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีราเส้นใยเจริญอยู่แล้ว นำชิ้นวุ้นดังกล่าวจำนวน 3 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิต ไลเพส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Cardenas และคณะ, 2001) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมากรองแยกเส้นใยราออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเอาของเหลวส่วนบนไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะ

3.5.1.5 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสหายาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

3.5.1.5.1 การเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

วัดค่าแอกทิวิตีทั้งหมดของไลเพสด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี (Maia และคณะ, 2000) โดยใช้สารตั้งต้น คือ พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตต (p -NPP : p -nitrophenyl palmitate) ตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนอล (p -NP : p -nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยา

ไฮดรอลิซิสโดยวัดที่ 410 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้น

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U : Unit) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟินิล ปาล์มมิเตทแล้วให้พารา-ไนโตรฟินอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

3.5.1.5.2 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

วัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานโบวีน ซีรั่มอัลบูมิน (BSA = Bovine serum albumin) ที่มีปริมาณโปรตีน 0.1-0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.1.5.3 การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันด้วยวิธีของ Sandoval และ Marty, 2007 โดยนำกรดโอเลอิก และโดเดคานอล ที่มีความเข้มข้น 1.9 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้นในเฮปแทนปริมาตร 10 มิลลิลิตร เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการปั่นกวนคงที่ตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่เวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง และเติมสารคอปเปอร์อะซิเตท 60 ไมโครลิตร นำไปปั่นให้เข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดโอเลอิกที่เหลืออยู่ แล้วเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดโอเลอิกจากกราฟมาตรฐาน

3.5.1.5.4 การเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ในการผลิตไบโอดีเซล

3.5.1.5.4.1 การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมล ผสมกับสารละลายเอโนไซม์ แล้วนำมาบ่มโดยปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะมีการเติมเมทานอล 3 โมล แบบสามขั้น (Three step feeding of methanol) (Shimada และคณะ, 2002)

3.5.1.5.4.2 การเติมเมทานอลแบบสามขั้น (Three step feeding of methanol)

เติมเมทานอล 3 โมล แล้วทำปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยแบ่งใส่เมทานอลครั้งละ 1 โมล ครั้งแรกเติมเมทานอลในตอนเริ่มต้นเพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ส่วนอีกสองครั้งเติมที่ชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ, 2002) ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการกวนให้เข้ากันที่ 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 200 ไมโครลิตร ที่ 0, 8, 16, 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนไปทำการตรวจสอบเชิงคุณภาพของการเกิดเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC) และตรวจสอบเชิงปริมาณโดยโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

3.5.1.5.4.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้เชิงคุณภาพด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

นำตัวอย่างน้ำมันที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับเฮกเซน 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย 1 ไมโครลิตร ด้วยหลอด capillary จุดลงบนแผ่นโครมาโทกราฟี ที่ผ่านการอบด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยแบ่งเลนตามแนวกว้างให้แต่ละเลนมีระยะห่างจากกัน 1 เซนติเมตร แล้วนำแผ่นโครมาโทกราฟีไปใส่ใน

แก๊งศ์สารละลายอิมิตัวที่ผสมด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซีเตต : กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 90 : 10 : 2 โดยปริมาตร (Samukawa และคณะ, 2000) เมื่อสารละลายดังกล่าวเคลือบที่เกือบเต็มแผ่นโครมาโทกราฟีจึงนำไปพันด้วยสารละลายผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริกและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วอบแผ่นโครมาโทกราฟีด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สังเกตแถบที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อหาค่า R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงจุดกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงระยะทางที่สารละลายเครื่องได้บนแผ่น TLC

3.5.1.5.4.4 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้เชิงปริมาณด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

3.5.1.5.4.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอล แล้วเตรียมตัวอย่างโดยละลายในเฮกเซน เพื่อให้เจือจาง และใช้อิโคเซน (eicosane) เป็น สารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard) จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

3.3.8.1.4.2 การเตรียมเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-20A series, Japan)

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ สาร A ประกอบด้วยเฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอทิล อะซีเตต : กรดฟอร์มิก (85 : 10 : 10 : 0.1 v/v) สาร B ประกอบด้วย เฮกเซน : กรดฟอร์มิก (100 : 0.2 v/v), อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร ต่อ นาที โดยใช้ Apollo Silica Column 5U 250×4.6 mm 5um เครื่องตรวจสอบ (detector) สำหรับ HPLC คือ ELSD

3.5.2 การทำไลเปสหยาบให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปส

3.5.2.1 การทำไลเปสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และราให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารละลายไลเปสไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนชนิดคัตขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน แล้วทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิด ได้แก่ คอลัมน์ดีไอเออี ไฮแทรป และ คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออนลบ (anion- exchange chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบสัฟฟรคภาพชนิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction chromatography) ตามลำดับ

3.5.2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

นำสารละลายไลเปสเข้มข้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีของ Talon และคณะ, 1995 โดยนำสารละลายไลเปสเข้มข้นผ่านการย่อยด้วยทริปซิน (trypsin digestion) ซึ่งใช้ทริปซิน 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี

3.5.2.1.1.1 คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (Phenyl sepharose HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายไลเปสลงในเจลชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลโดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ เอทิลีนไกลคอล 0-90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล วัดแอกทิวิตีแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีของไลเปสสูงเข้าด้วยกัน เพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนการคัตขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตันวัด

ปริมาณ แอกทิวิตีของไลเปส และปริมาณโปรตีน ของสารละลายที่ได้ นำไปตรวจทดสอบความบริสุทธิ์ และ น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสบริสุทธิ์

3.5.2.1.2 เชื้อยีสต์

นำสารละลายไลเปสเข้มข้นทำให้บริสุทธิ์โดยการดัดแปลงวิธีของ Rua และคณะ, 1994 และ Rua และคณะ, 1993 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิด ได้แก่ คอลัมน์ดีอีเออี ไฮแทรป และ คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออนลบ (anion-exchange chromatography) และ โครมาโทกราฟีแบบสัฟฟรคภาพชนิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction chromatography)

3.5.2.1.2.1 คอลัมน์ดีอีเออี ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (DEAE HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ ที่มี 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจลด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายไลเปสลงในเจล ชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วย 0-1 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล วัดแอกทิวิตีในแต่ละลำดับส่วน จากนั้นนำลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีสูงไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.5.2.1.2.2 คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (Phenyl sepharose HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายไลเปสลงในเจล ชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล จึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลโดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ ไตรตอน เอ็กซ์-100 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร

10 เท่าของปริมาตรเจล วัดแยกทีละลำดับ ส่วน จากนั้นรวมลำดับ ส่วนที่มีแยกทีละลำดับของไลเพสสูงเข้าด้วยกัน เพิ่มความเข้มข้นของสาร ตัวอย่างด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตันวัดปริมาตร แยกทีละลำดับของไลเพส และปริมาณโปรตีน ของ สารละลายที่ได้ นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ นำหนักโมเลกุลของไล เพสบริสุทธิ์

3.5.2.1.3 เชื้อรา

นำสารละลายไลเพสเข้มข้นทำให้บริสุทธิ์โดยการดัดแปลงวิธีของ Rua และ คณะ, 1994 และ Rua และคณะ, 1993 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิด ได้แก่ คอลัมน์ดีเออี ไฮแตรป และ คอลัมน์ฟินิลเซฟาโรส ไฮแตรป โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออนลบ (anion- exchange chromatography) และ โครมาโทกราฟีแบบสัฟฟรอกาฟชนิดแรงกระทำ ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction chromatography)

3.5.2.1.3.1 คอลัมน์ดีเออี ไฮแตรป โครมาโทกราฟี (DEAE HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ ที่มี 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 5 เท่า ของปริมาตรเจลด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นเติม สารละลายไลเพสลงในเจล ชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย สารละลายบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากนั้นจึงชะ โปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วย 0-1 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล วัดแยกทีละลำดับ ส่วน จากนั้นนำลำดับ ส่วน ที่มีแยกทีละลำดับสูงไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.5.2.1.3.2 คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (Phenyl sepharose HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลายไลเพสลงในเจล เซโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล จึงเซโปรตีนที่จับอยู่กับเจลโดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 และ ไตรตอน เอ็กซ์-100 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล วัดแอกทิวิตีแต่ละลำดับส่วน จากนั้นรวมลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีของไลเพสสูงเข้าด้วยกัน เพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตันวัดปริมาตร แอกทิวิตีของไลเพส และปริมาณโปรตีน ของสารละลายที่ได้ นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์

3.5.2.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)

นำไลเพสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน มาแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล สารละลายผสมของเซพาเรตติ้งเจล (separating gel) ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) สารละลายผสมสแตคกิงเจล (stacking gel) ความเข้มข้นร้อยละ 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ จนสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาใกล้ถึงปลายสุดของแผ่นเจล ย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูเมสซี บลู (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของไลเพสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของไลเพสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน

3.5.3 การศึกษาสมบัติของไลเพสบริสุทธิ์

3.5.3.1 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

วิธีทดลองเช่นเดียวกับการวัดค่าแอกทิวิตีทั้งหมดของไลเพสด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Maia และคณะ, 2000) โดยใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 ได้แก่ พารา-ไนโตรฟีนิล อะซิเตท (*p*-nitrophenyl acetate: C₂), พารา-ไนโตรฟีนิล บิวทิเรท (*p*-nitrophenyl butyrate: C₄), พารา-ไนโตรฟีนิล คาพริเลท (*p*-nitrophenyl caprylate: C₈), พารา-ไนโตรฟีนิล คาเพรท (*p*-nitrophenyl caprate: C₁₀), พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรท (*p*-nitrophenyl laurate: C₁₂), พารา-ไนโตรฟีนิล ไมริสเตท (*p*-nitrophenyl myristate: C₁₄), พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate: C₁₆), พารา-ไนโตรฟีนิล สเตียเรท (*p*-nitrophenyl stearate: C₁₈) ตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนิล (*p*-NP : *p*-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส โดยวัดที่ 410 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณพารา-ไนโตรฟีนิลที่เกิดขึ้น

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U: Unit) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตทแล้วให้พารา-ไนโตรฟีนิล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อ นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

3.5.3.2 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์

3.5.3.2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

วิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสที่ยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา

3.5.3.2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ในการผลิตไบโอดีเซล

วิธีทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบความสามารถของไลเพสที่ยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา โดยควบคุมปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำให้เท่ากับการใช้ไลเพสที่ยาบ

บทที่ 4

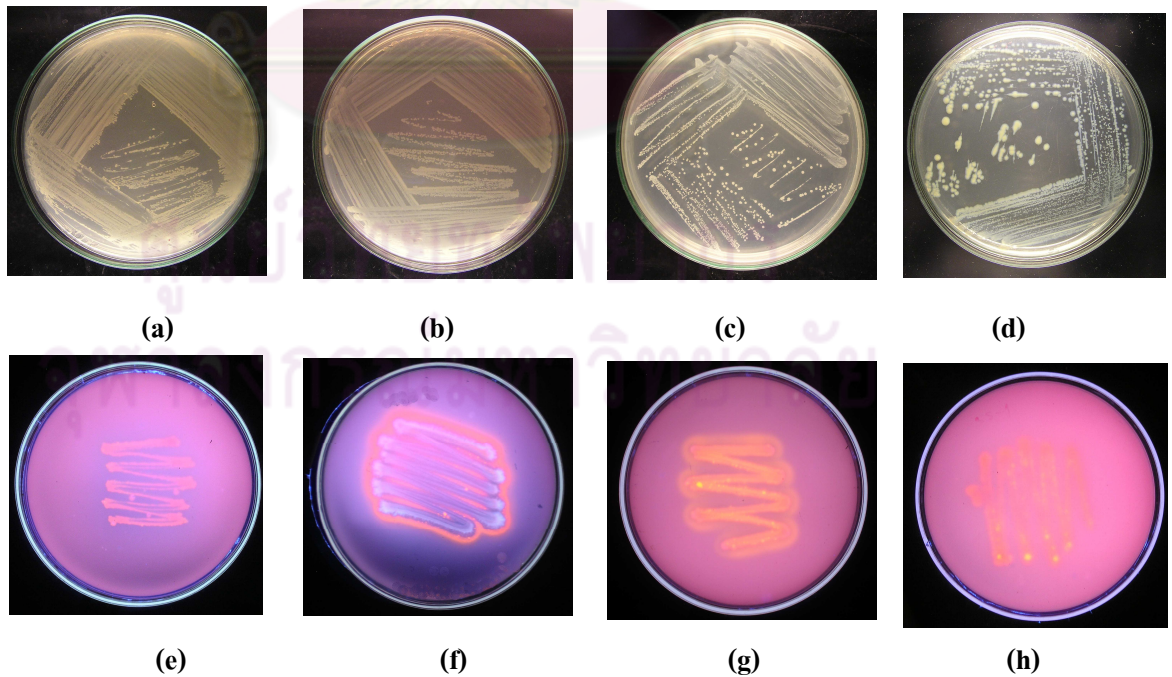
ผลการทดลอง

4.1 การแยกไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

4.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตไลเพส

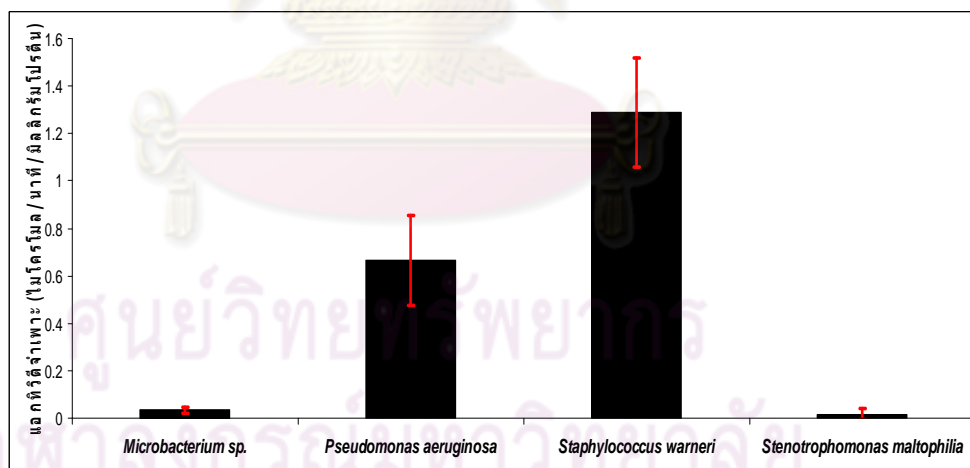
จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Microbacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* โดยนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตไลเพส จากรูป (f-h) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีการเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตสามารถผลิตไลเพสได้ และนำไปทดสอบแยกทีวิตีต่อไป



รูปที่ 3 เชื้อแบคทีเรีย (a-d) *Microbacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA (nutrient agar) ตามลำดับ (e-h) *Microbacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่ผสมด้วยโรดามีน บี 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.1 การตรวจแยกทิวติของไลเพส

นำแบคทีเรีย 4 ชนิดมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.2.1 และวัดแยกทิวติ และโปรตีนตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.1 และ 3.5.1.5.2 ตามลำดับ พบว่าที่ 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* มีแยกทิวติจำเพาะสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4 คือ 1.29 ± 0.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

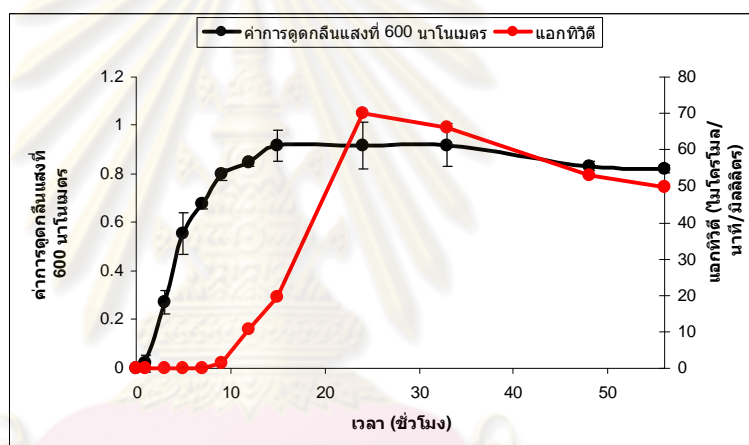


รูปที่ 4 ค่าแยกทิวติจำเพาะของไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

(ยูนิต: ไมโครโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที)

1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกทิวิตีของไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

จากการคัดเลือกแบคทีเรียพบว่า *Staphylococcus warneri* มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด จึงคัดเลือกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกทิวิตีของไลเพส โดยวัดการเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอกทิวิตีของไลเพสในอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่า *Staphylococcus warneri* สามารถผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเจริญ และ แอกทิวิตีของ *Staphylococcus warneri* ในอาหารอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเพส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 ชั่วโมง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที

2. การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส (hydrolysis) ของไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* จึงนำมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.4.1 และแยกไลเพสเพื่อนำมาวัดแอกทิวิตีและความเข้มข้นโปรตีนตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.1 และ 3.5.1.5.2 ตามลำดับ

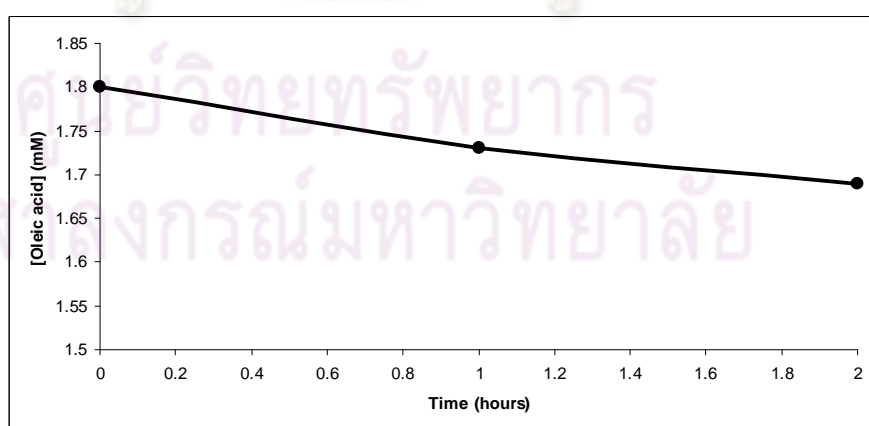
ตารางที่ 7 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

เชื้อแบคทีเรีย	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อ นาทีต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาที ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
<i>Staphylococcus warneri</i>	0.19±0.03	0.15±0.05	1.29±0.23

(ยูนิต: ไมโครโมลของพารา-ไนโตรฟินอลที่วัดได้ในปฏิกิริยาต่อนาที)

3. การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย

นำไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.3 และวัดแอกทิวิตีจำเพาะโดยคำนวณจากความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เป็นสารตั้งต้นที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.33 ± 0.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 8



รูปที่ 6 ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน เร่งโดยไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

เชื้อแบคทีเรีย	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
<i>Staphylococcus warneri</i>	29.75±1.43	0.28±0.02	8.33±0.4

(ยูนิต: ไมโครโมลของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาต่อนาที่)

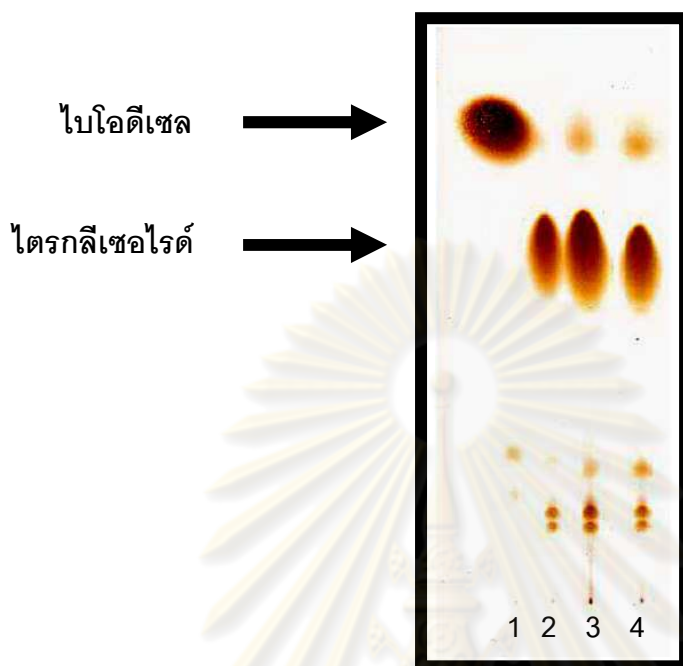
4. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย

นำไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4.1 และตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC และ HPLC ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4.3 และ 3.5.1.5.4.4

4.1 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงคุณภาพด้วย TLC ที่เร่งโดยไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยสารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (เป็นสารที่แทนไตรกลีเซอไรด์) และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารที่แทนเมทิลเอสเทอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้ภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 3.5.1.5.4.3 กล่าวคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.6 และเมทิลเอสเทอร์มีค่า R_f เท่ากับ 0.70 จากการทำทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ

น้ำมันปาล์ม ต่อสารละลายเอนไซม์ (น้ำมัน 3 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วย TLC ดังแสดงในรูปที่ 7

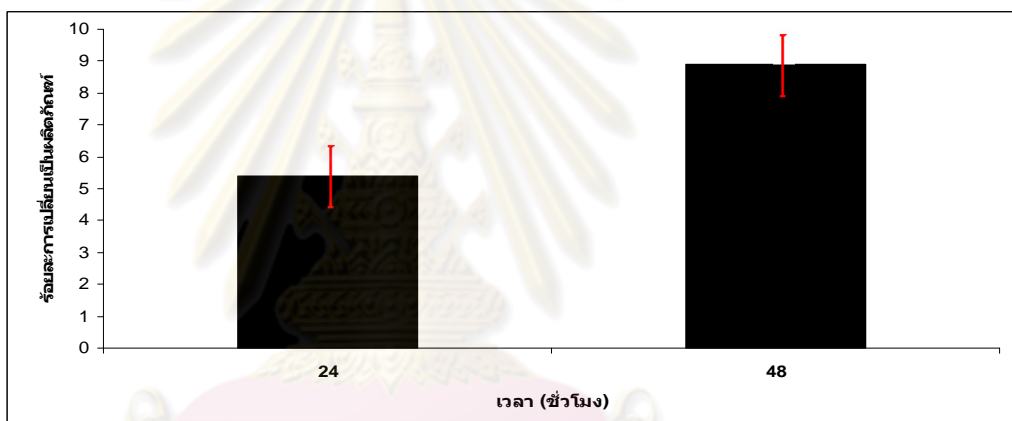


รูปที่ 7 โคโรมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์ (โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม) เติมเมทานอลแบบสามขั้น ที่เวลา 0 8 และ 16 ชั่วโมง โดยเลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลตัวอย่าง (B-100) เลนที่ 2 น้ำมันปาล์ม เลนที่ 3 และ 4 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาโดยไลเปสจาก *Staphylococcus warneri* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากรูปที่ 7 พบว่าการใช้ไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สามารถให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากแถบบนโคโรมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.7 พบว่าแถบของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีความเข้มของแถบไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อสังเกต แถบของไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.6 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงมีความเข้มของแถบไตรกลีเซอไรด์ น้อยกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

4.2 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography:HPLC)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่เร่งโดยไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม ต่อสารละลายเอนไซม์ (น้ำมัน 3 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร) และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 8



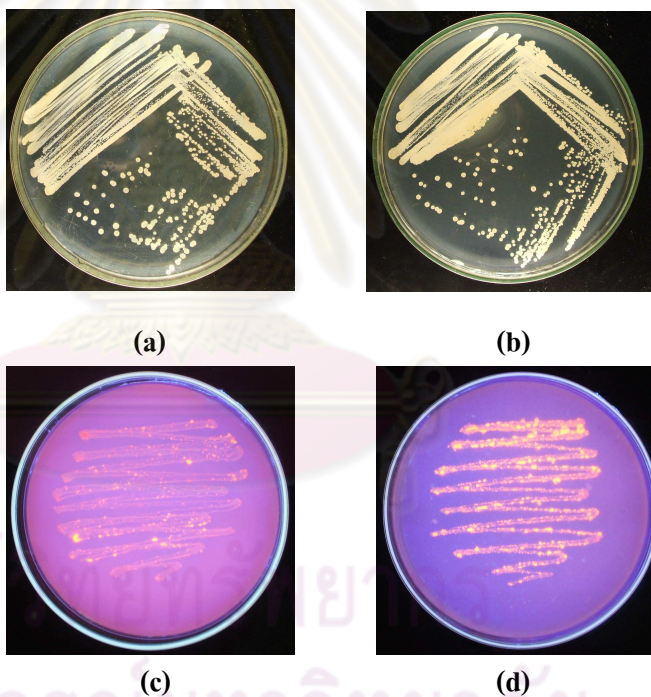
รูปที่ 8 ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเปสจาก *Staphylococcus warneri* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน และเกิดผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.4 ± 1.3 และ 8.9 ± 2.2 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8 แสดงว่าเมื่อเวลาผ่าน 24 ชั่วโมง ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้อีกประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 เชื้อยีสต์

1. การคัดเลือกยีสต์ *Candida rugosa* ที่ผลิตไลเพส

จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* 2 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตไลเพส จากรูป (c-d) พบว่าเชื้อยีสต์มีการเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตสามารถผลิตไลเพสได้ และการเรืองแสงสีส้มของยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และนำไปทดสอบแอกทิวิตีต่อไป



รูปที่ 9 *Candida rugosa* ชนิด (a) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ (b) สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YM (Yeast malt extract agar) และ (c) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ (d) สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่ผสมด้วยโรดามีน บี 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.1 การตรวจแอกทิวิตีของไลเพส

นำยีสต์ *Candida rugosa* 2 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.4.2 และวัดแอกทิวิตี และโปรตีนตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.1 และ 3.5.1.5.2 ตามลำดับ พบว่าที่ 120 ชั่วโมง สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ประมาณ 2 เท่า คือ 167.44 ± 3.3 และ 74.53 ± 2.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10



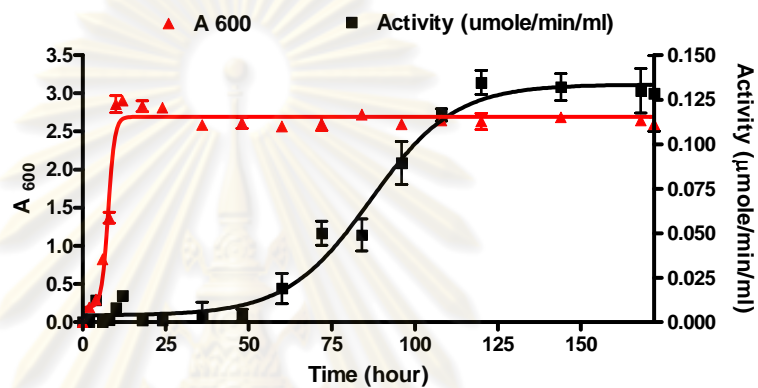
รูปที่ 10 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) ในปฏิกริยาไฮดรอลิซิส

1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกทิวิตีของไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* 2 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation)

นำเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* 2 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกทิวิตีของไลเพส โดยวัดการเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอกทิวิตีของไลเพสในอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 3 และ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า

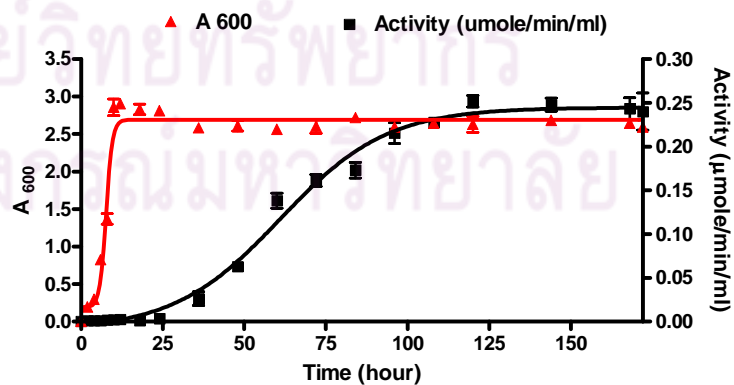
เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน คือ มีการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) ที่เวลา 0-18 ชั่วโมง หลังจาก 18 ชั่วโมง เริ่มเข้าสู่การเจริญแบบ Stationary phase แต่แอกทิวิตีของไลเปสจากสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (mutant by UV irradiation) สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่เวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) ดังแสดงในรูปที่ 11, 12 และ 13

1.2.1 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม

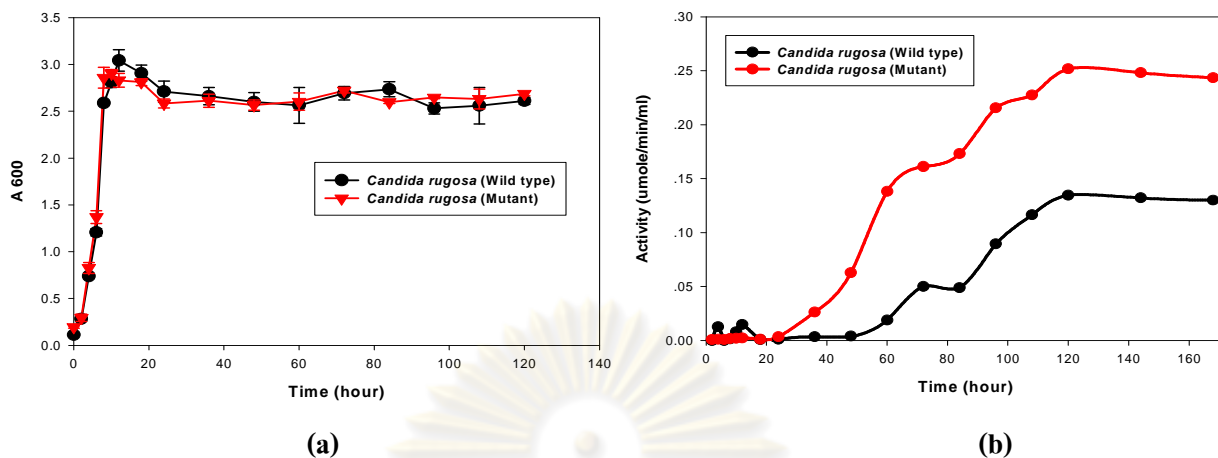


รูปที่ 11 การเจริญ และ แอกทิวิตีของเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเปส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

1.2.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต



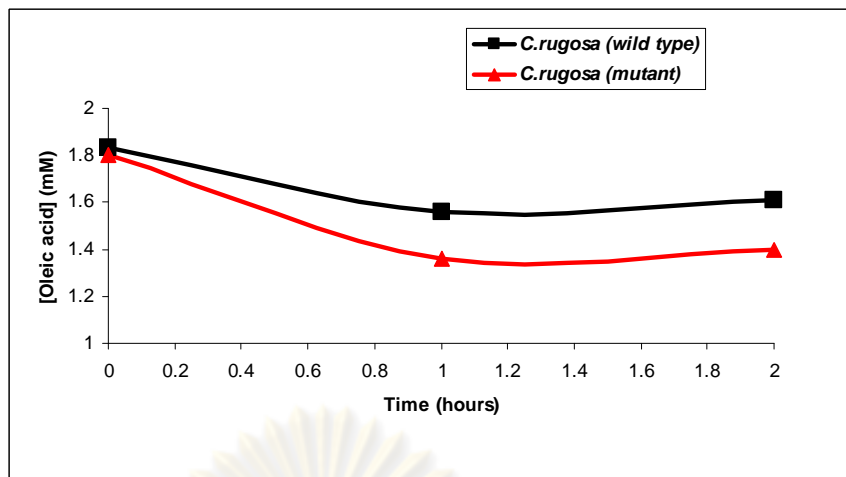
รูปที่ 12 การเจริญ และ แอกทิวิตีของเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตไลเปส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 13 เปรียบเทียบ (a) การเจริญ และ (b) แอกทิวิตีของเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิด สายพันธุ์ดั้งเดิมและ สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในอาหารเหลว สำหรับการผลิตไลเพส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

2. การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) ของไลเพสหายาจากเชื้อยีสต์

เปรียบเทียบความสามารถของไลเพสหายาในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.2 และวัดแอกทิวิตีจำเพาะโดยคำนวณจากความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เป็นสารตั้งต้นที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 20.93 ± 2.15 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 48.89 ± 4.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 9



รูปที่ 14 ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเปสหายาบจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเปสหายาบจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

<i>Candida rugosa</i>	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อ นาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	8.99±0.45	0.43±0.02	20.93±2.15
สายพันธุ์กลายพันธุ์	14.667±0.98	0.3±0.01	48.89± 4.02

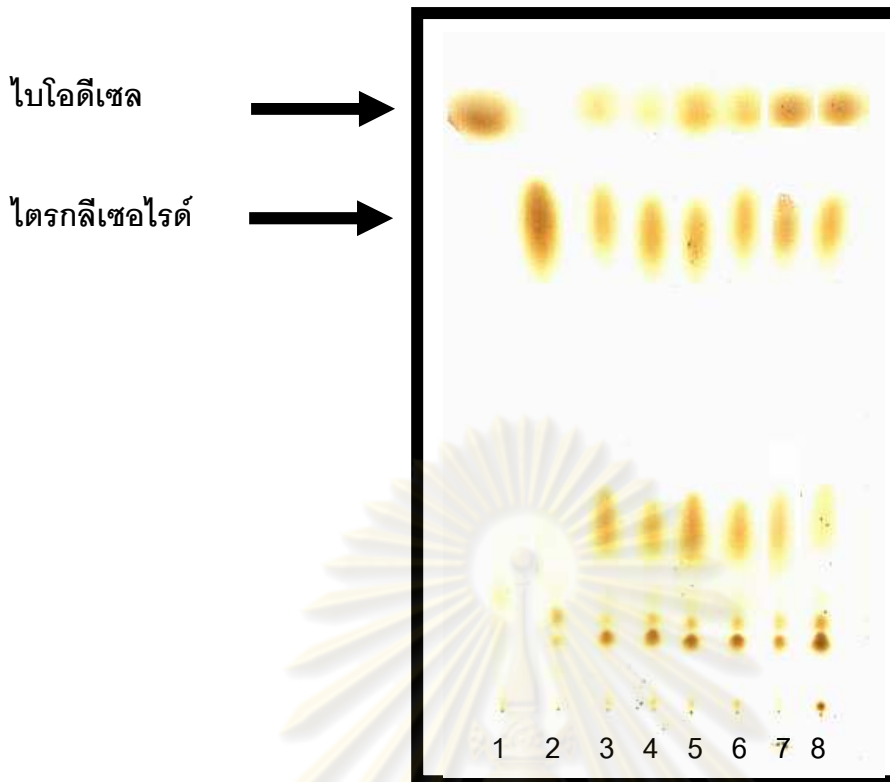
(ยูนิต: ไมโครโมลของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาต่อนาที่)

3. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสหายาจากเชื้อยีสต์

นำไลเพสหายาที่แยกจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบความสามารถของไลเพสหายาในการเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4 และตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC และ HPLC ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4.3 และ 3.5.1.5.4.4 ตามลำดับ

3.1 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงคุณภาพด้วย TLC ที่เร่งโดยไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยสารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (เป็นสารใช้แทน ไตรกลีเซอไรด์) และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้แทนเมทิลเอสเทอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้ภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 3.5.1.5.4.3 กล่าวคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.6 และเมทิลเอสเทอร์มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 จากการทำทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากเชื้อยีสต์ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม ต่อสารละลายเอนไซม์ (น้ำมัน 3 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร) และตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วย TLC แสดงดังรูปที่ 15



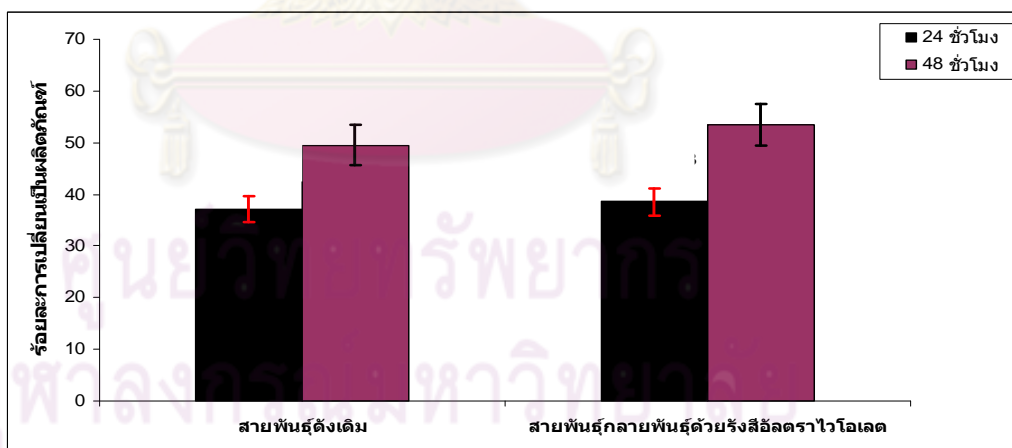
รูปที่ 15 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสของเชื้อยีสต์ โดยใช้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์ (โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม) เติมเมทานอลแบบสามขั้น ที่เวลา 0 8 และ 16 ชั่วโมง โดยเลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลตัวอย่าง (B-100) เลนที่ 2 น้ำมันปาล์ม เลนที่ 3 5 และ 7 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสจาก *Candida rugosa* ชนิดสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เวลา 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เลนที่ 4 6 และ 8 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิดสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากรูปที่ 15 พบว่าการใช้ไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน สามารถให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ ตั้งแต่เวลาที่เวลา 8 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากแถบบนโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 พบว่าแถบของเมทิลเอสเทอร์ มีความ

เข้มข้นของแถบเพิ่มมากขึ้นจากเวลาที่ 8 ชั่วโมง ถึงเวลาที่เวลา 24 ชั่วโมง และพบว่าการใช้ ไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีความเข้มข้นของแถบเมทิลเอสเทอร์ในโครมาโทแกรม มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม หลังจากนั้นตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

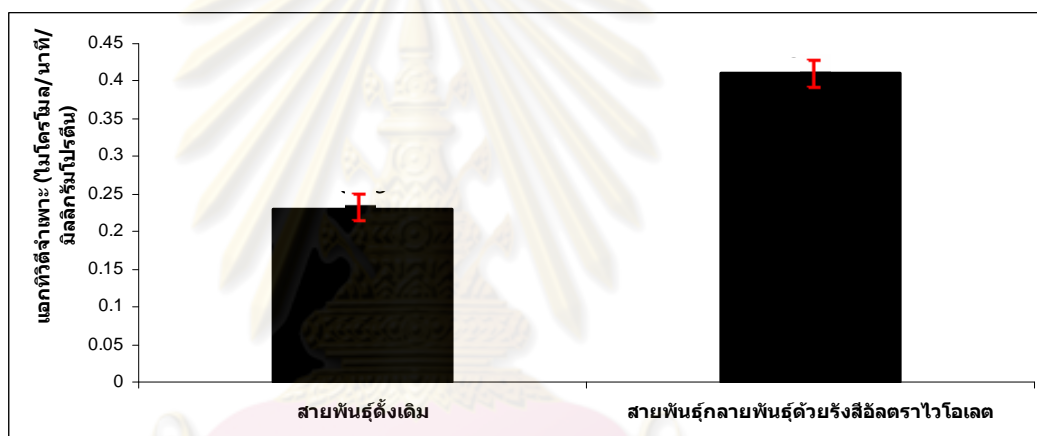
3.2 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่เร่งโดยไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิด สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากเชื้อยีสต์ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม ต่อสารละลายเอนไซม์ (น้ำมัน 3 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร) และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิด สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

พบว่าไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมให้ค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 37.13 ± 2.58 และ 49.48 ± 3.94 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และไลเพสจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ให้ค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 38.52 ± 3.23 และ 53.48 ± 4.21 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16 แสดงว่าเมื่อเวลาผ่าน 24 ชั่วโมง ไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้อีกประมาณ 33 และ 38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในการใช้ไลเพสเร่งปฏิกิริยาปริมาณโปรตีนที่ใช้ของสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ไม่เท่ากัน ดังนั้นในการเปรียบเทียบจึงต้องคำนวณเป็นค่าแอกทิวิตีจำเพาะ แสดงดังในรูปที่ 17



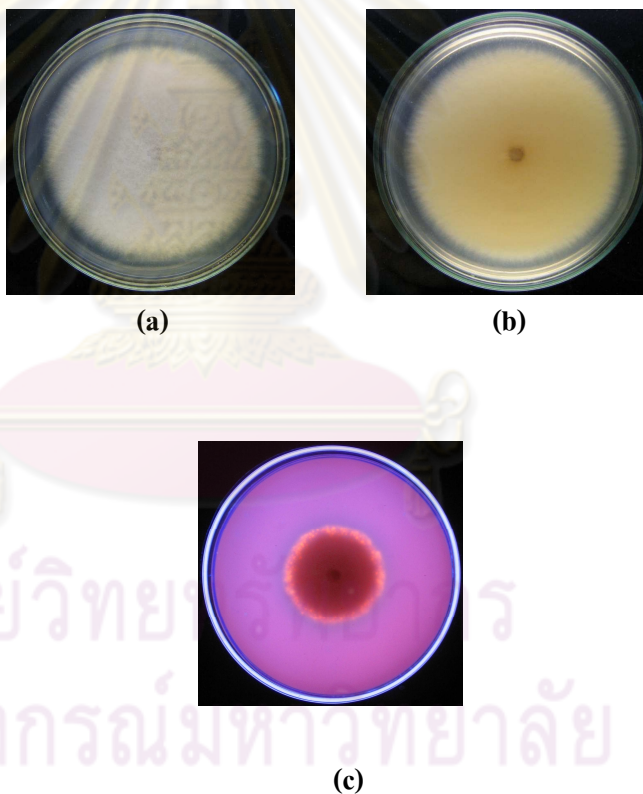
รูปที่ 17 แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิดสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน

พบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.23 ± 0.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.41 ± 0.06 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 17

4.1.3 เชื้อรา

1. การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส (hydrolysis) ของไลเปส หยาบจากเชื้อรา

นำเชื้อรา *Fusarium solani* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ที่ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตไลเปส จากรูป (c) พบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* มีการเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตสามารถผลิตไลเปสได้ และนำไปทดสอบแยกทีละต่อไป



รูปที่ 18 เชื้อรา *Fusarium solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA (potato dextrose agar) (a) ด้านหน้าของจานเลี้ยงเชื้อ. (b) บนอาหาร PDA ด้านหลังของจานเลี้ยงเชื้อ และ (c) บนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ผสมด้วยโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v) และน้ำมันปาล์ม 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.3 การตรวจแอกทิวิตีของไลเพส

นำเชื้อรา *Fusarium solani* มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.1.4.3 วัดแอกทิวิตี และโปรตีนตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.1 และ 3.5.1.5.2 ตามลำดับ พบว่าที่ 72 ชั่วโมง มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด ประมาณ 1.41 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10

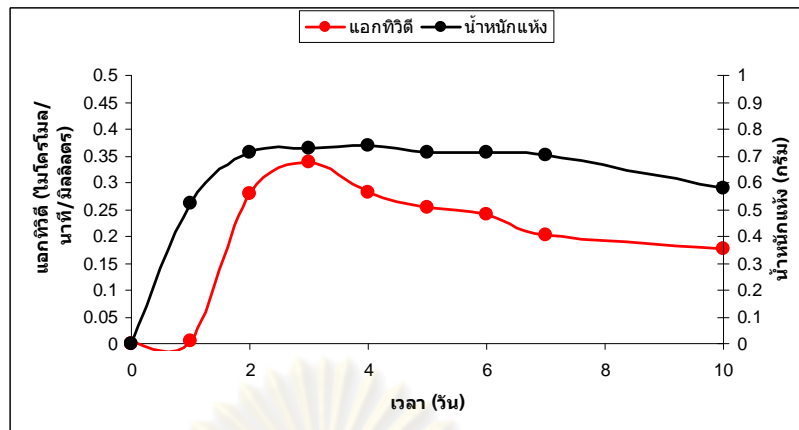
ตารางที่ 10 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากเชื้อรา *Fusarium solani*
ในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

เชื้อรา	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อนาที ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีน)
<i>Fusarium solani</i>	0.27 ± 0.034	0.192 ± 0.1	1.41 ± 0.08

(ยูนิต: ไมโครโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่วัดได้ในปฏิกิริยาต่อนาที)

1.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกทิวิตีของไลเพสจากเชื้อรา *Fusarium solani*

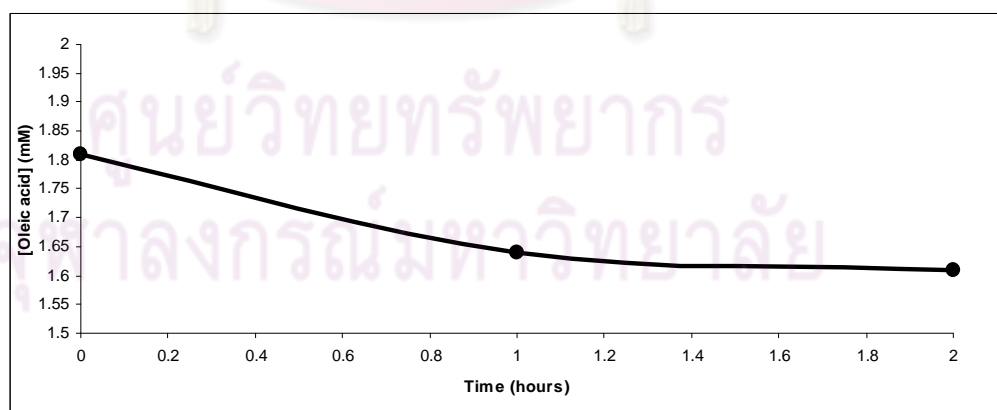
นำเชื้อรา *Fusarium solani* มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกทิวิตีของไลเพส โดยวัดการเจริญด้วยวิธีการชั่งน้ำหนักแห้ง และวัดแอกทิวิตีของไลเพสในอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* การเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน คือ มีการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ที่เวลา 0-18 ชั่วโมง หลังจาก 18 ชั่วโมง เริ่มเข้าสู่การเจริญแบบ Stationary phase แต่แอกทิวิตีของไลเพสผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 การเจริญ และ แอกทิวิตีของ *Fusarium solani* ในอาหารเหลือ สำหรับการผลิตไบโเพส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน

2. การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) ของไบโเพสหายาบจากเชื้อรา

นำไบโเพสหายาบที่แยกจากเชื้อรา *Fusarium solani* ทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.3 และวัดแอกทิวิตีจำเพาะ โดยคำนวณจากความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เป็นสารตั้งต้นที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 18.89 ± 0.42 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 11



รูปที่ 20 ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ลดลง ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่เร่งโดยไบโเพสหายาบจากเชื้อรา *Fusarium solani* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 11 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสจากเชื้อรา *Fusarium solani* ใน
 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อ นาที่ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อ นาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
<i>Fusarium solani</i>	5.66±0.41	3.25±0.2	1.74±0.42

(ยูนิต: ไมโครโมลของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกริยาต่ออนาที)

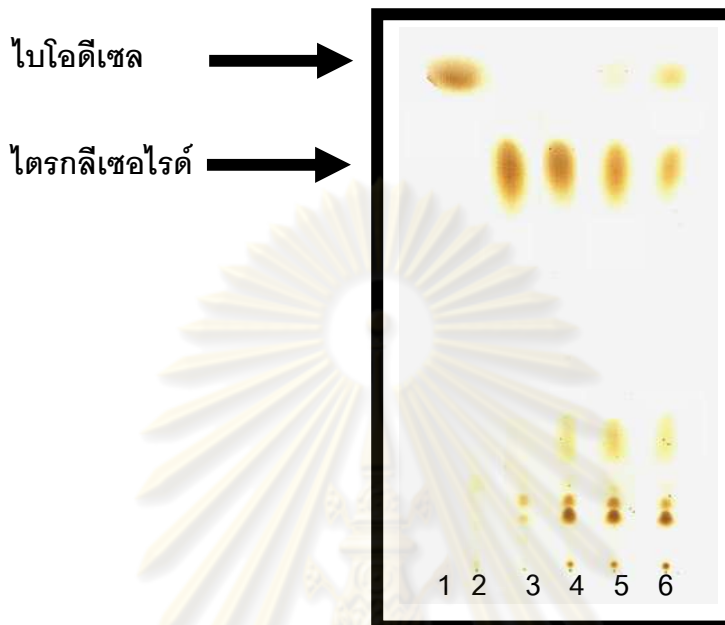
3. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่ง โดยไลเพสหยาบจากเชื้อรา

นำไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อรา *Fusarium solani* ในการเร่งปฏิกริยาทรานส์เอส
 เทอร์ฟิเคชัน ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4 และตรวจสอบปฏิกริยาด้วย TLC และ
 HPLC ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4.3 และ 3.5.1.5.4.4 ตามลำดับ

3.1 การตรวจสอบการเร่งปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโท กราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงคุณภาพ
 ด้วย TLC ที่เร่งโดยไลเพสจากเชื้อรา *Fusarium solani* ในปฏิกริยาทรานส์เอส
 เทอร์ฟิเคชัน โดยสารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม
 (เป็นสารใช้แทนไตรกลีเซอไรด์) และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์
 ซึ่งเป็นสารที่ใช้แทนเมทิลเอสเทอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่
 (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้
 ภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 3.5.1.5.4.3 กล่าวคือ
 ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.6 และเมทิลเอสเทอร์มีค่า R_f เท่ากับ 0.75
 จากการทำทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็นเวลา
 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้นเร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จาก

เชื้อราปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม ต่อสารละลาย เอนไซม์ (น้ำมัน 3 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร) และตรวจสอบ ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วย TLC แสดงดังรูปที่ 21

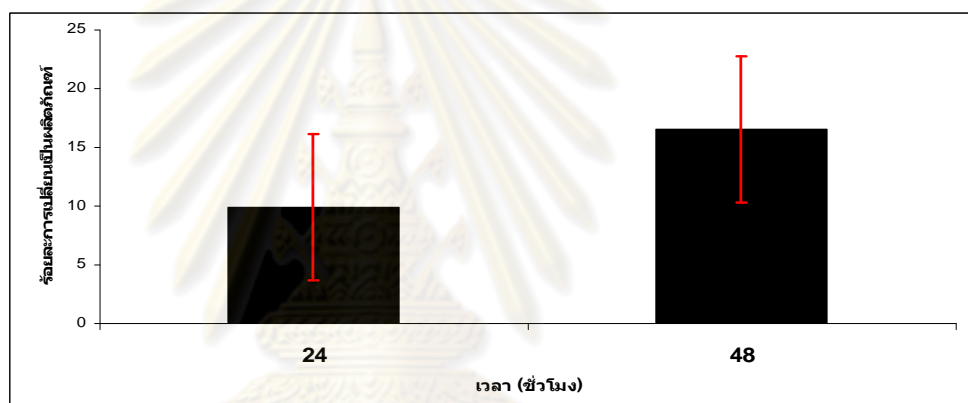


รูปที่ 21 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เรังด้วยไลเปสของเชื้อรา โดยใช้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเอนไซม์โดย น้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม การเติมเมทานอลแบบสามขั้น ที่เวลา 0 8 และ 16 ชั่วโมง โดยเลนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลตัวอย่าง (B-100) เลนที่ 2 น้ำมันปาล์ม เลนที่ 4-6 ผลิตภัณฑ์ ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเปสจากเชื้อรา *Fusarium solani* ที่ เวลา 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากรูปที่ 21 พบว่าการใช้ไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อรา *Fusarium solani* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สามารถให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ เริ่มเกิดที่เวลา 16 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากแถบบนโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 พบว่าแถบของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 16 และ 24 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง มีความเข้มของแถบเมทิลเอสเทอร์มากกว่าที่ เวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

3.2 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่เร่งโดยไลเปสจากเชื้อรา *Fusarium solani* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์จากเชื้อราปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม ต่อสารละลายเอนไซม์ (น้ำมัน 3 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ 1.5 กรัม) และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเร่งโดยไลเปสจาก *Fusarium solani* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

พบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* มีค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 9.9 ± 5.8 และ 16.53 ± 6.2 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 22 แสดงว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้อีกประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์

4.2 การเปรียบเทียบไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในปฏิกริยาไฮดรอลิซิส, เอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.2.1 ปฏิกริยาไฮดรอลิซิส

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาไฮดรอลิซิสของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 1.29 ± 0.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 74.53 ± 2.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 167.44 ± 3.3 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 1.41 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาไฮดรอลิซิสของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย และรา มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) คือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ประมาณ 2 เท่า และเชื้อรา และแบคทีเรียมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 เปรียบเทียบแอกทิวิตี้จำเพาะของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในปฏิกริยาไฮดรอลิซิส

4.2.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.33 ± 0.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 20.93 ± 2.15 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 48.89 ± 4.02 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.74 ± 0.42 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) คือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ประมาณ 2 เท่า และเชื้อรา *F.solani* และแบคทีเรีย *S.warneri* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

4.2.3 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.071 ± 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* มีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.23 ± 0.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตมีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.41 ± 0.06 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.027 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. warneri* และรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเชื้อยีสต์มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) คือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ประมาณ 2 เท่า และเชื้อรา *F.solani* และแบคทีเรีย *S.warneri* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 เปรียบเทียบแอกทิวิตี้จำเพาะของไลเปสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.3 การทำไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์

4.3.1 การทำไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ให้บริสุทธิ์

นำสารละลายไลเพสหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการทดลองที่ 3.5.2 .1 ได้ผลการทดลองดังนี้

4.3.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

นำสารละลายไลเพสเข้มข้นผ่านการย่อยด้วยทริปซิน (trypsin digestion) เพื่อย่อยเอนไซม์โปรตีนออกจากสารละลายไลเพสหยาบ ก่อนทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล เซโปรตินที่ไม่จับกับคอลัมน์ออก ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเซโปรตินที่จับอยู่กับเจลโดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยเอทิลีนไกลคอล 10-90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากนั้นวัดแอกทิวิตีแต่ละลำดับส่วน พบว่าเมื่อใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยเอทิลีนไกลคอล 50 เปอร์เซ็นต์ มีแอกทิวิตีสูงสุด จึงรวมลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีของไลเพสสูงเข้าด้วยกัน เพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน และวัด แอกทิวิตีของไลเพส และปริมาณโปรตีน ของสารละลาย ได้ผลการทำไลเพสให้บริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ขั้นตอนการทำไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตีทั้งหมด (ไมโครโมลต่อนาที)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกทิวิตีที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายไลเพสหยาบ	5.6	7.22	1.29	100	1
ไลเพสที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน	2.1	3.36	1.6	46.54	1.24
ไลเพสที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสไฮแทรป	0.42	2.28	5.42	31.58	4.2

จากตารางที่ 12 พบว่าหลังจากการนำไลเพสย่อยด้วยทริปซิน มีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 2.1 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 3.36 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.6 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.24 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 46.54 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำไลเพสที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซินผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสไฮแทรป ใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยเอทิลีนไกลคอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น พบว่ามีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 0.42 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 2.28 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 5.42 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.2 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 31.58 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ในขั้นต่อไป

4.3.1.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa*

นำสารละลายไลเปสเข้มข้นที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.3.1.2.1 คอลัมน์ดีอีเออี ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (DEAE HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายไลเปสเข้มข้นลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ ที่มี 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 และ 0-1 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล เมื่อวัดแอกทิวิตีในแต่ละลำดับส่วน พบว่าในลำดับ ที่ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 มีแอกทิวิตีไลเปสสูงสุด จึงนำลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีสูงไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.3.1.2.2 คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (Phenyl sepharose HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายไลเปสที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไฮแทรป ลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลโดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไตรตอน เอ็กซ์-100 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล เมื่อวัดแอกทิวิตีในแต่ละลำดับส่วน พบว่าลำดับส่วนที่ใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไตรตอน เอ็กซ์-100 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีแอกทิวิตีสูงสุด จึงรวมลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีของไลเปสสูงเข้าด้วยกัน เพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน และวัด แอกทิวิตีของไลเปส และปริมาณโปรตีน ของสารละลาย ได้ผลการทำไลเปสให้บริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 13 ขั้นตอนการทำไลเพสหายาบจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตีทั้งหมด (ไมโครโมลต่อนาที)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกทิวิตีที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายไลเพสหายาบ	8.4	591.36	70.4	100	1
ไลเพสที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีไฮแทรป	3.19	326.5	102.35	55.21	1.45
ไลเพสที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสไฮแทรป	0.31	96.81	312.28	16.37	4.44

จากตารางที่ 13 พบว่าหลังจากการนำไลเพสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออีไฮแทรป โดยใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น มีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 326.5 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 3.19 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 102.35 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.45 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 55.21 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อนำไลเพสที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซินผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสไฮแทรป ซึ่งใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไทรตอน เอ็กซ์-100 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น พบว่ามีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 96.81 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.31 มิลลิกรัม แอกทิวิตี

จำเพาะเท่ากับ 312.28 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.44 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 16.37 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 14 ขั้นตอนการทำไลเปสหายาจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตีทั้งหมด (ไมโครโมลต่อนาที)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกทิวิตีที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายไลเปสหายา	6.2	1,114	179.67	100	1
ไลเปสที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีไฮแทรป	4.32	992.87	229.83	89.13	1.28
ไลเปสที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสไฮแทรป	0.26	198.54	763.60	17.82	4.25

จากตารางที่ 14 พบว่าหลังจากการนำไลเปสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี ไฮแทรป โดยใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีอีเอเอ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น มีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 992.87 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 4.32 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 229.83

หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.28 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 89.13 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำไลเพสที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซินผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป ซึ่งใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไตรตอน เอ็กซ์-100 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น พบว่ามีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 198.54 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.26 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 763.60 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.25 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 17.82 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ในขั้นต่อไป

4.3.1.3 เชื้อรา *Fusarium solani*

นำสารละลายไลเพสเข้มข้นที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium solani* ทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.3.1.3.1 คอลัมน์ดีอีเออี ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (DEAE HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายไลเพสเข้มข้นลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วย 0-1 โมลาร์ แอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล เมื่อวัดแอกทิวิตีในแต่ละลำดับส่วน พบว่าในลำดับส่วนแรก ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 มีแอกทิวิตีไลเพสสูงสุด จึงนำลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีสูงไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.3.1.3.2 คอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โครมาโทกราฟี (Phenyl sepharose HiTrap chromatography)

ผ่านสารละลายไลเพสที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไฮแทรป ลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราไหล

60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และชะโปรตีนที่จับอยู่กับเจลโดยใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไตรตอน เอ็กซ์-100 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล เมื่อวัดแอกทิวิตีในแต่ละลำดับส่วน พบว่าลำดับส่วนที่ใช้ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไตรตอน เอ็กซ์-100 0.15 เปอร์เซ็นต์ มีแอกทิวิตีสูงสุด จึงรวมลำดับส่วนที่มีแอกทิวิตีของไลเปสสูงเข้าด้วยกัน เพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล 10,000 ดาลตัน และวัด แอกทิวิตีของไลเปส และปริมาณโปรตีน ของสารละลาย ได้ผลการทำไลเปสให้บริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ขั้นตอนการทำไลเปสหายาจากเชื้อรา *Fusarium solani* ให้บริสุทธิ์

ลำดับขั้นการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอกทิวิตีทั้งหมด (ไมโครโมลต่อนาที)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกทิวิตีที่เหลือ (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายไลเปสหายา	20.9	27.72	1.33	100	1
ไลเปสที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออีไฮแทรป	10.4	17.52	1.67	63.20	1.25
ไลเปสที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรสไฮแทรป	0.56	4.58	8.18	16.52	6.15

จากตารางที่ 15 พบว่าหลังจากการนำไลเพสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี ไฮแทรป โดยใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น มีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 17.52 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 10.4 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.67 หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.25 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 63.2 เปอร์เซ็นต์

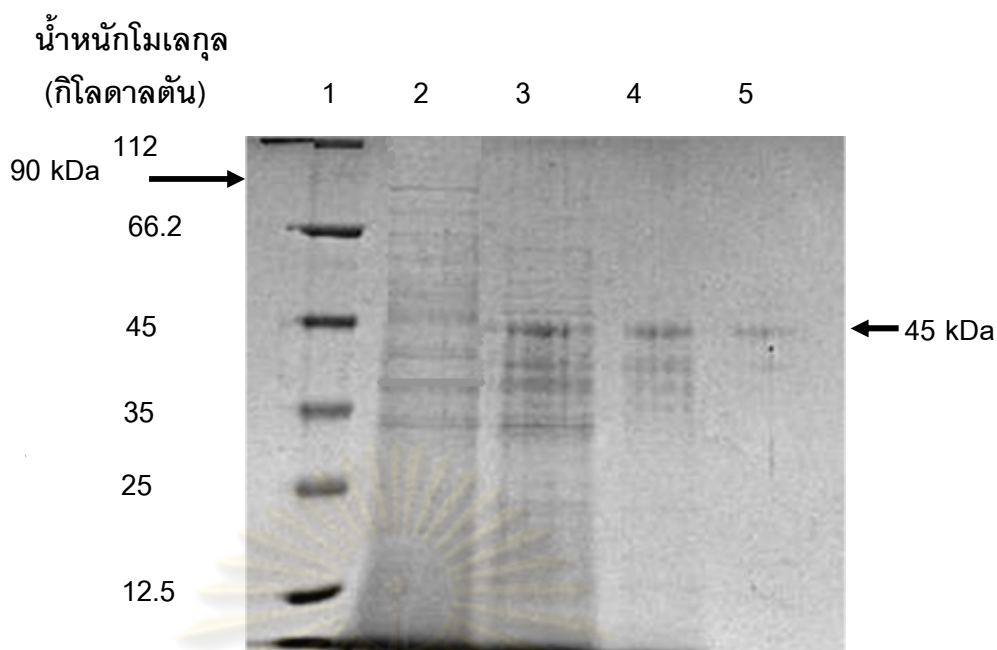
เมื่อนำไลเพสที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซินผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป ซึ่งใช้ตัวชะคือ 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ประกอบด้วยไตรตอน เอ็กซ์-100 0.15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรเจล หลังจากทำให้เข้มข้น พบว่ามีแอกทิวิตีทั้งหมดเท่ากับ 4.58 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.56 มิลลิกรัม แอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.18 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.15 เท่า และยังมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 16.52 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ในขั้นต่อไป

4.3.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสบริสุทธิ์ โดยวิธีไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE)

นำไลเพสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ค่าของน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

4.3.2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ของไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* ที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โดยใช้ 50 เปอร์เซ็นต์ เอทิลีน ไกลคอล แสดงดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

โดยการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 ไลเปสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*
ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

แถวที่ 3-4 ไลเปสที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน ปริมาณโปรตีน 10 และ 5
ไมโครกรัม ตามลำดับ

แถวที่ 5 ไลเปสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โดยใช้ 50
เปอร์เซ็นต์ ของเอทิลีนไกลคอล เป็นตัวชะ ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

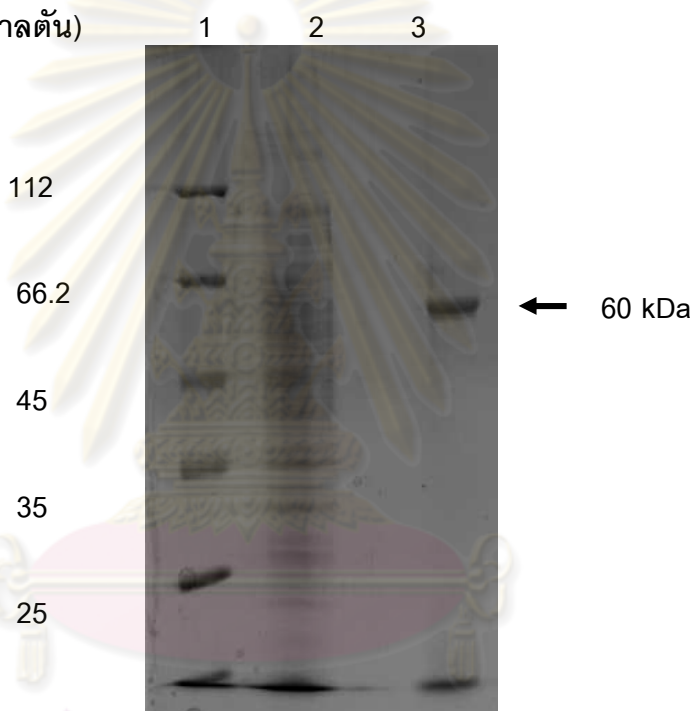
จากผลการทดลองในรูปที่ 26 พบว่า ไลเปสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย *S. warneri* พบว่าไลเปสหายาน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 กิโลดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐานในแถวที่ 1 และไลเปสหายาที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน ในแถวที่ 3 และ 4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน เมื่อนำไลเปสหายาที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โดยใช้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเอทิลีนไกลคอล เป็นตัวชะ พบแถบโปรตีนแถบเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน ในแถวที่ 5 ดังนั้นไลเปสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *S. warneri* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 26

4.3.2.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa*

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล ของไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี ไฮแทรป และฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป แสดงดังรูปที่ 27 และ 28

1) เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม

น้ำหนักโมเลกุล
(กิโลดาลตัน)

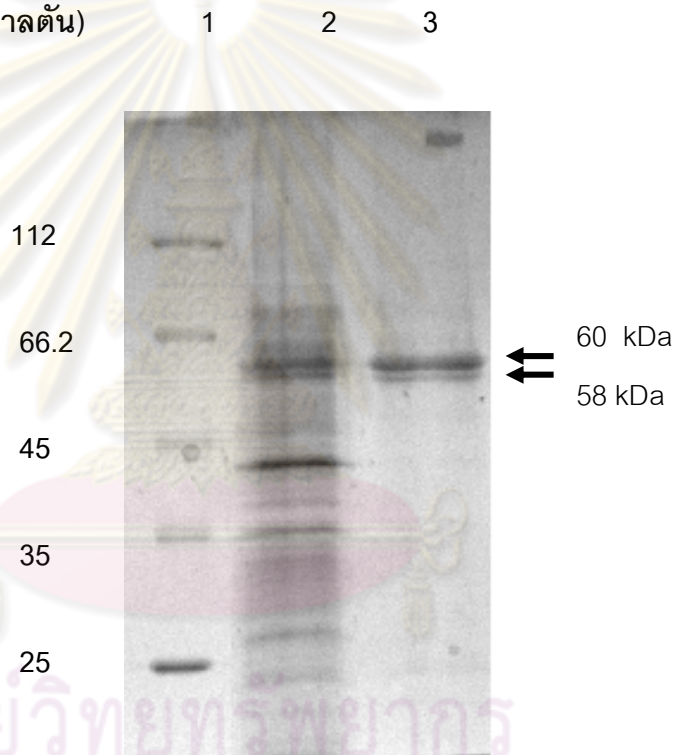


รูปที่ 27 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมโดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล
 แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
 แถวที่ 2 ไลเปสหายาบจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม
 แถวที่ 3 ไลเปสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรปโดยใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของไตรตอน เอกซ์-100 เป็นตัวชะ ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

จากผลการทดลองในรูปที่ 27 แถวที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐานที่มีขนาด 12.5 – 112 กิโลดาลตัน แถวที่ 2 คือไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อนำไลเพสหยาบทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรปโดยใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของ ไตรตอน เอกซ์-100 เป็นตัวชะ พบแถบโปรตีนแถบที่มีความเข้มที่สุดแถบเดียวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน ในแถวที่ 3 ดังนั้นไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 27

2) เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ถูกกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

น้ำหนักโมเลกุล
(กิโลดาลตัน)

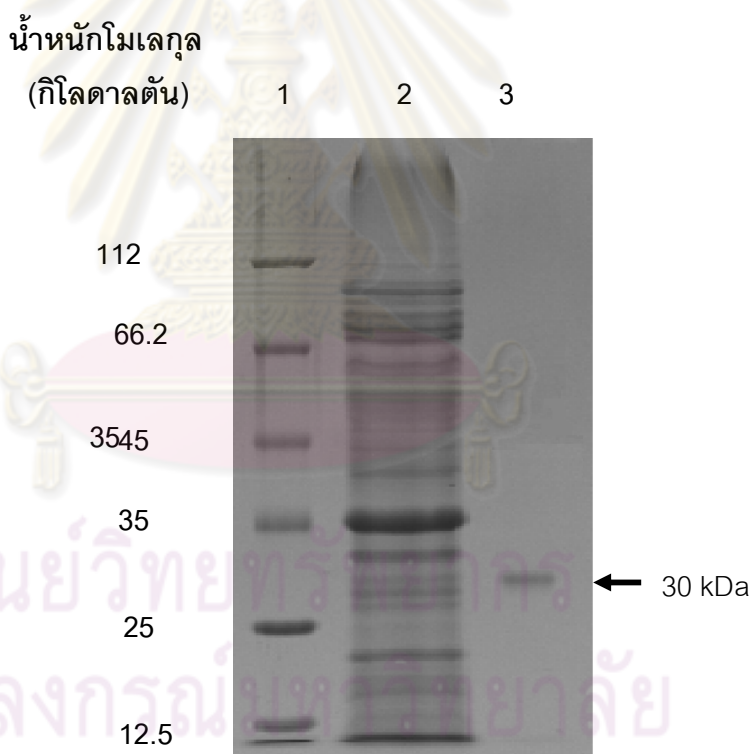


รูปที่ 28 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์
กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตโดยการแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิล
ซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 ไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์
กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม
แถวที่ 3 ไลเพสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โดยใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์
ของไตรตอน เอกซ์-100 เป็นตัวชะ ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

จากผลการทดลองในรูปที่ 28 แถวที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐานที่มีขนาด 12.5 – 112 กิโลดาลตัน แถวที่ 2 คือไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม แถวที่ 3 ไลเพสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรปโดยใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของไตรตอน เอกซ์-100 เป็นตัวชะ พบแถบโปรตีน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 และ 58 กิโลดาลตัน ดังนั้นไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 และ 58 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 28

4.3.2.3 เชื้อรา *Fusarium solani*

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสโดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจล ของไลเพสจากเชื้อรา *F. solani* ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี ไฮแทรป และฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป แสดงดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเพสจากเชื้อรา *Fusarium solani* โดยการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะครีลาไมด์เจล แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2 ไลเพสหยาบจากเชื้อรา *Fusarium solani* ปริมาณโปรตีน 10 ไมโครกรัม แถวที่ 3 ไลเพสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป โดยใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของไตรตอน เอกซ์-100 เป็นตัวชะ ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

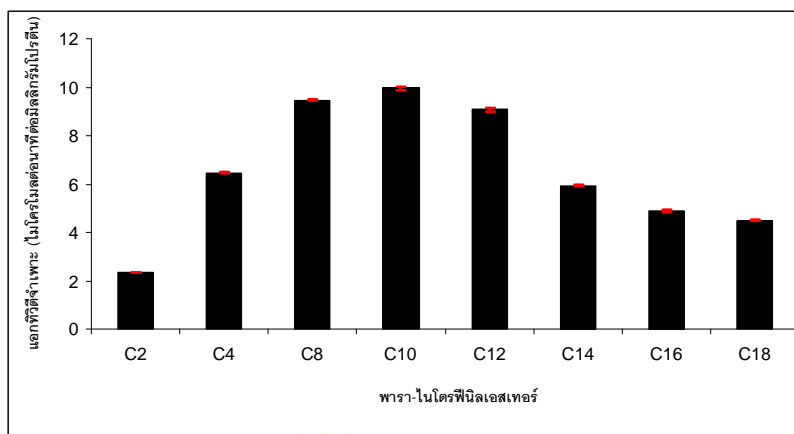
จากผลการทดลองในรูปที่ 29 แถวที่ 1 คือโปรตีนมาตรฐานที่มีขนาด 12.5 – 112 กิโลดาลตัน แถวที่ 2 คือไลเพสหยาบจากเชื้อรา *F. solani* แถวที่ 3 ไลเพสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรปโดยใช้ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ของไตรตอน เอกซ์-100 เป็นตัวชะ พบว่ามีแถบโปรตีนแถบเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ดังนั้นไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *F. solani* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 29

4.4 การศึกษาสมบัติของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา

4.4.1 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

4.4.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

จากผลการทดลอง นำไลเพสบริสุทธิ์ทดสอบความจำเพาะต่อสารตั้งต้น โดยใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 ได้แก่ พารา-ไนโตรฟีนิล อะซิเตท (*p*-nitrophenyl acetate: C₂), พารา-ไนโตรฟีนิล บิวทิเรท (*p*-nitrophenyl butyrate: C₄), พารา-ไนโตรฟีนิล คาพริเลท (*p*-nitrophenyl caprylate: C₈) , พารา-ไนโตรฟีนิล คาเพรท (*p*-nitrophenyl caprate: C₁₀) , พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรท (*p*-nitrophenyl laurate: C₁₂) , พารา-ไนโตรฟีนิล ไมริสเทท (*p*-nitrophenyl myristate: C₁₄) , พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate: C₁₆) , พารา-ไนโตรฟีนิล สเตียเรท (*p*-nitrophenyl stearate: C₁₈) พบว่าไลเพสบริสุทธิ์มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่คาร์บอน 10 มากที่สุด มีแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 10 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามเมื่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นตั้งแต่คาร์บอน 14 ถึง 18 ไลเพสบริสุทธิ์มีแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสบริสุทธิ์ลดลงประมาณ 2 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 30

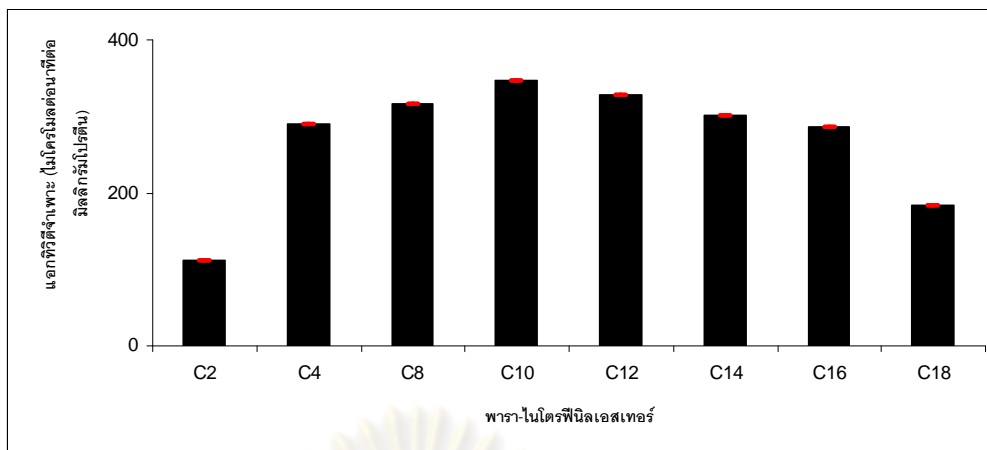


รูปที่ 30 แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ต่อพารา-ไนโตรฟีนิลชนิดต่าง ๆ ที่มีความยาวของสายคาร์บอนตั้งแต่ 2-18

4.4.1.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa*

4.4.1.2.1 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม

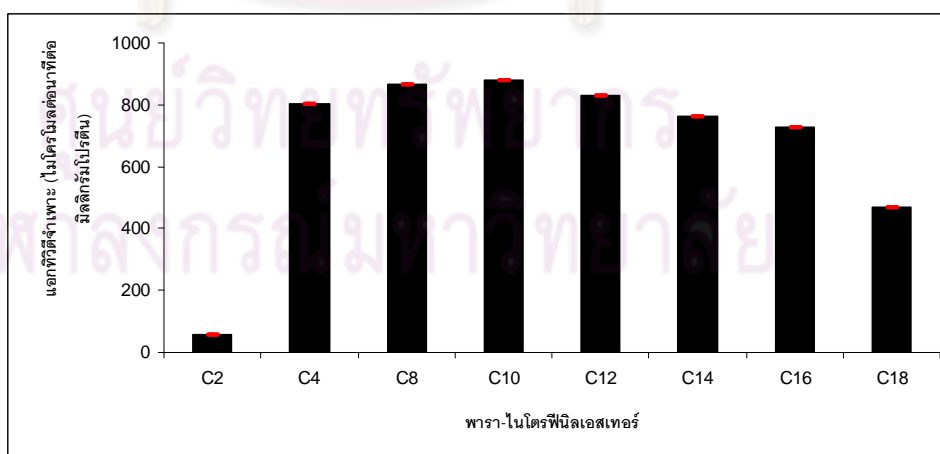
จากผลการทดลอง นำไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิด สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต มาทดสอบความจำเพาะต่อสารตั้งต้น โดยใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 ได้แก่ พารา-ไนโตรฟีนิล อะซิเตท (*p*-nitrophenyl acetate: C₂), พารา-ไนโตรฟีนิล บิวทิเรท (*p*-nitrophenyl butyrate: C₄), พารา-ไนโตรฟีนิล คาพริเลท (*p*-nitrophenyl caprylate: C₈), พารา-ไนโตรฟีนิล คาเพรท (*p*-nitrophenyl caprate: C₁₀), พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรท (*p*-nitrophenyl laurate: C₁₂), พารา-ไนโตรฟีนิล ไมริสเทท (*p*-nitrophenyl myristate: C₁₄), พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate: C₁₆), พารา-ไนโตรฟีนิล สเตียเรท (*p*-nitrophenyl stearate: C₁₈) พบว่าไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* ทั้ง 2 ชนิด ให้ผลความจำเพาะต่อความยาวของสารตั้งต้นไม่แตกต่างกัน แต่มีแอกทิวิตีจำเพาะต่างกัน กล่าวคือไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 แต่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอน 4 ถึง 12 มีแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 300 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามเมื่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นเป็น 14 ถึง 16 มีผลทำให้แอกทิวิตีจำเพาะลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสารตั้งต้นมีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นเป็น 18 พบว่าแอกทิวิตีจำเพาะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 31



รูปที่ 31 แยกทิวติจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม ต่อพารา-ไนโตรฟีนอลชนิดต่าง ๆ ที่มีความยาวของสายคาร์บอนตั้งแต่ 2-18

4.4.1.2.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์

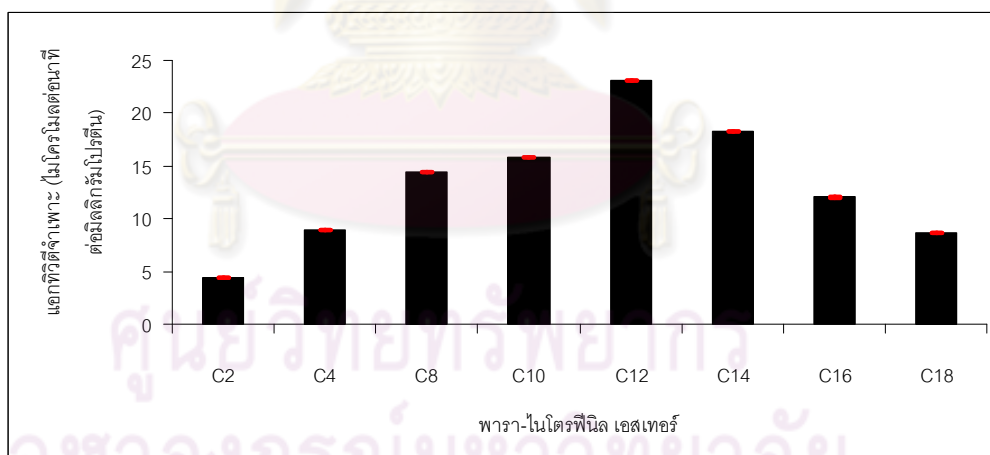
ส่วนไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 แต่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอน 4 ถึง 12 มีแอกทิวติจำเพาะประมาณ 700 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามเมื่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นเป็น 14 ถึง 16 มีผลทำให้แอกทิวติจำเพาะลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสารตั้งต้นมีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นเป็น 18 พบว่าแอกทิวติจำเพาะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 31



รูปที่ 32 แยกทิวติจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อพารา-ไนโตรฟีนอลชนิดต่าง ๆ ที่มีความยาวของสายคาร์บอน ตั้งแต่ 2-18

4.4.1.3 เชื้อรา *Fusarium solani*

จากผลการทดลอง นำไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* ทดสอบความจำเพาะต่อสารตั้งต้น โดยใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 ได้แก่ พารา-ไนโตรฟีนิล อะซิเตท (*p*-nitrophenyl acetate: C₂), พารา-ไนโตรฟีนิล บิวทิเรท (*p*-nitrophenyl butyrate: C₄), พารา-ไนโตรฟีนิล คาพริเลท (*p*-nitrophenyl caprylate: C₈), พารา-ไนโตรฟีนิล คาเพรท (*p*-nitrophenyl caprate: C₁₀), พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรท (*p*-nitrophenyl laurate: C₁₂), พารา-ไนโตรฟีนิล ไมริสเตท (*p*-nitrophenyl myristate: C₁₄), พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate: C₁₆), พารา-ไนโตรฟีนิล สเตียเรท (*p*-nitrophenyl stearate: C₁₈) พบว่าไลเพสบริสุทธิ์มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 ถึง 18 และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่คาร์บอน 12 มีแอกทิวิตีประมาณ 20 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน อย่างไรก็ตามสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนมากขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสบริสุทธิ์ลดลง พบว่าเมื่อสารตั้งต้นมีจำนวนคาร์บอน 18 มีผลให้แอกทิวิตีจำเพาะลดลงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 33



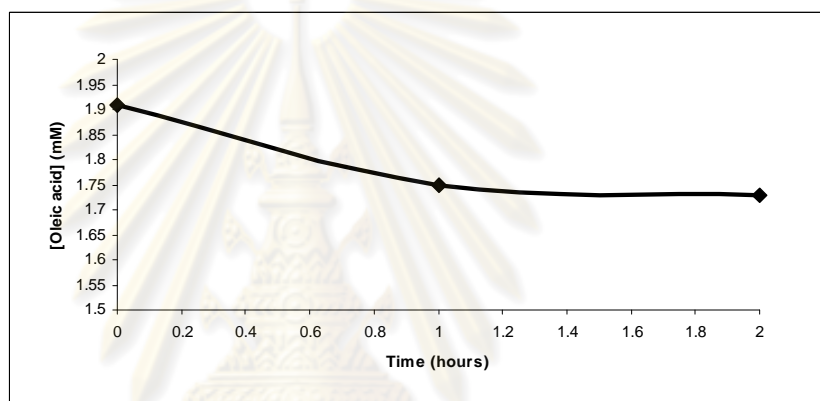
รูปที่ 33 แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* ต่อพารา-ไนโตรฟีนิล ชนิดต่าง ๆ ที่มีสายคาร์บอนตั้งแต่ 2-18

4.4.2 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์

4.4.2.1 การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) ของไลเพสบริสุทธิ์

4.4.2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

นำไลเพสบริสุทธิ์ที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.3 และวัดแอกทิวิตีจำเพาะโดยคำนวณจากความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เปลี่ยนสารตั้งต้นที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 34 พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12.69 ± 0.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 16



รูปที่ 34 ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

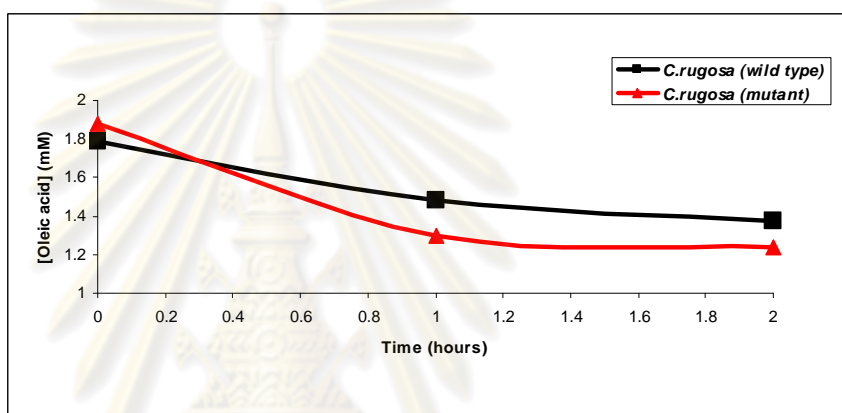
ตารางที่ 16 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรียในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

เชื้อแบคทีเรีย	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
<i>Staphylococcus warneri</i>	5.33 ± 0.38	0.42 ± 0.02	12.69 ± 0.52

(ยูนิต: ไมโครโมลของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาต่อนาที่)

4.4.2.1.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa*

เปรียบเทียบความสามารถของไลเปสบริสุทธิ์ในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.3 และวัดแอกทิวิตีจำเพาะโดยคำนวณจากความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เป็นสารตั้งต้นที่ลดลง พบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ สามารถใช้สารตั้งต้นได้เร็วกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในช่วง 1 ชั่วโมงแรก ดังแสดงในรูปที่ 35 พบว่าเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 33.33 ± 0.12 55.23 ± 0.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 17



รูปที่ 35 ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเร่งโดยไลเปสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

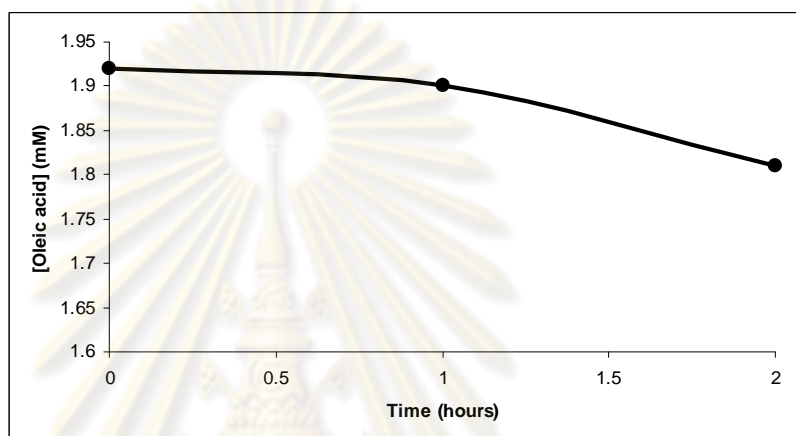
ตารางที่ 17 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเปสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

<i>Candida rugosa</i>	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อ นาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
สายพันธุ์ดั้งเดิม	8.67 ± 0.6	0.26 ± 0.03	33.33 ± 0.12
สายพันธุ์กลายพันธุ์	17.12 ± 0.74	0.31 ± 0.01	55.23 ± 0.11

(ยูนิต: ไมโครโมลของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาต่อนาที่)

4.4.2.1.3 เชื้อรา *Fusarium solani*

นำไลเพสบริสุทธิ์ที่แยกจากเชื้อรา *Fusarium solani* ทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.3 และวัดแอกทิวิตีจำเพาะโดยคำนวณจากความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เป็นสารตั้งต้นที่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 36 พบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.4 ± 0.51 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 18



รูปที่ 36 ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาเอสเทอร์ริเคชัน

เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 18 ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อราในปฏิกิริยาเอสเทอร์ริเคชัน

เชื้อรา	แอกทิวิตี (ไมโครโมลต่อ นาที่ต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ไมโครโมลต่อ นาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
<i>Fusarium solani</i>	0.67 ± 0.01	0.28 ± 0.2	2.4 ± 0.15

(ยูนิต: ไมโครโมลของกรดโอเลอิกที่ลดลงในปฏิกิริยาต่อนาที่)

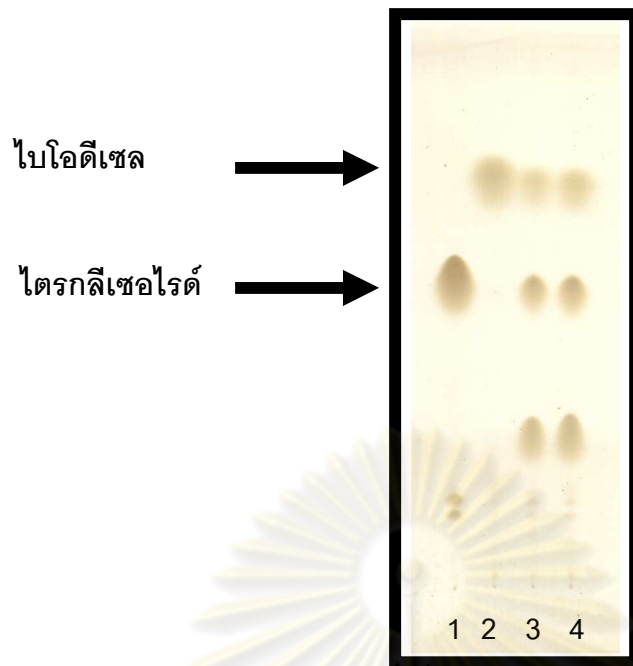
4.4.2.2 การผลิตไบโอดีเซลที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา

นำไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.3.5.3.2.2 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่ได้ด้วย TLC และ HPLC ดังวิธีการทดลองในข้อ 3.5.1.5.4.3 และ 3.5.1.5.4.4 ตามลำดับ

4.4.2.2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

4.4.2.2.1.1 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟแบบชั้นบาง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงคุณภาพด้วย TLC ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สารมาตรฐาน ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (เป็นสารใช้แทนไตรกลีเซอไรด์) และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้แทนเมทิลเอสเทอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 3.5.1.5.4.3 กล่าวคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.57 และเมทิลเอสเทอร์มีค่า R_f เท่ากับ 0.79 จากการทำทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วย TLC แสดงดังรูปที่ 37

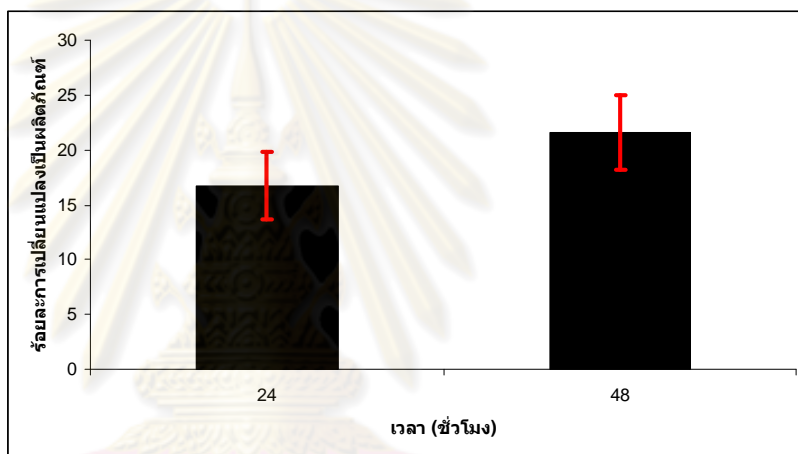


รูปที่ 37 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย เดิมเมทานอลแบบสามชั้น ที่เวลา 0 8 และ 16 ชั่วโมง **เลนที่ 1** น้ำมันปาล์ม **เลนที่ 2** ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลตัวอย่าง (B-100) **เลนที่ 3 และ 4** ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จาก *Staphylococcus warneri* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากรูปที่ 37 พบว่าการใช้ไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน สามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากแถบบนโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.79 พบว่าแถบของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีความเข้มของแถบไม่แตกต่างกัน หลังจากนั้นตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

4.4.2.2.1.2 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามชั้น เร่งด้วยสารละลายไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 38



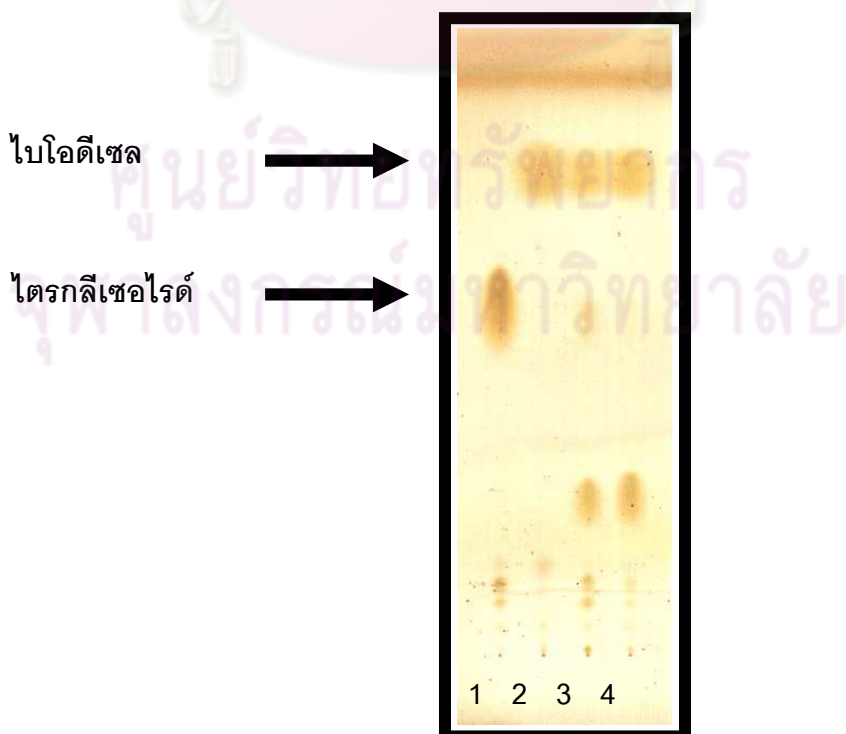
รูปที่ 38 ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

พบว่าไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และเกิดผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซล ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 16.74 ± 3.1 และ 21.59 ± 3.42 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 38 แสดงว่าเมื่อเวลาผ่าน 24 ชั่วโมง ไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้อีกประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์

4.4.2.2.2 เชื้อยีสต์ *Candida rugosa*

4.4.2.2.2.1 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงคุณภาพด้วย TLC ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิเคชัน โดยสารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (เป็นสารใช้แทนไตรกลีเซอไรด์) และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้แทนเมทิลเอสเทอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สมการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 3.5.1.5.4.3 กล่าวคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.56 และเมทิลเอสเทอร์มีค่า R_f เท่ากับ 0.8 จากการทำทรานส์เอสเทอร์ซิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายไลเพสบริสุทธิ์ และตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วย TLC แสดงดังรูปที่ 39



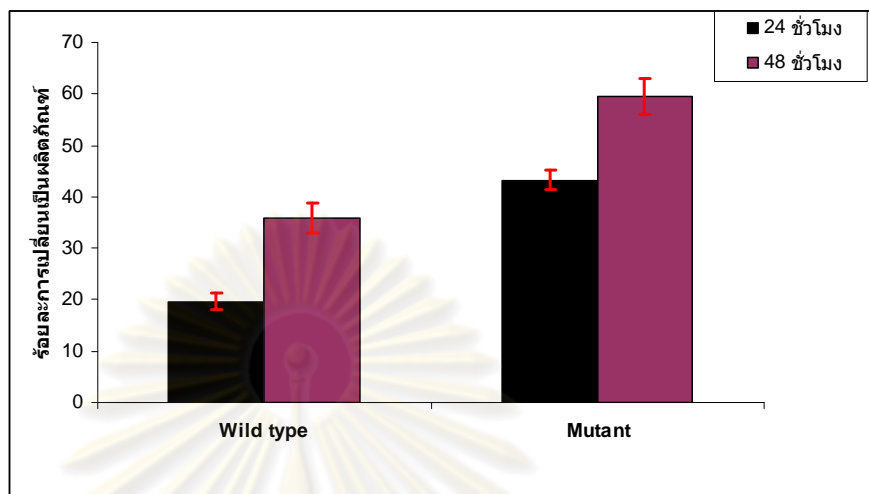
รูปที่ 39 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วยไลเพสบริสุทธิ์ของเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* เติมเมทานอลแบบสามขั้น ที่เวลา 0.8 และ 16 ชั่วโมง **เลนที่ 1** น้ำมันปาล์ม **เลนที่ 2** ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลตัวอย่าง (B-100) **เลนที่ 3** ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จาก *Candida rugosa* ชนิดสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เวลา 48 ชั่วโมง **เลนที่ 4** ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิดสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 39 พบว่าการใช้ไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน สามารถให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ ได้ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากแถบบนโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.8 ไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีความเข้มของแถบเมทิลเอสเทอร์ในโครมาโทแกรมใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่เมื่อสังเกตแถบของไตรกลีเซอไรด์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.56 พบว่าที่ไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีความเข้มของแถบไตรกลีเซอไรด์ น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม หลังจากนั้นตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

4.4.2.2.2 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิด สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์

ไลเพสบริสุทธิ และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 40



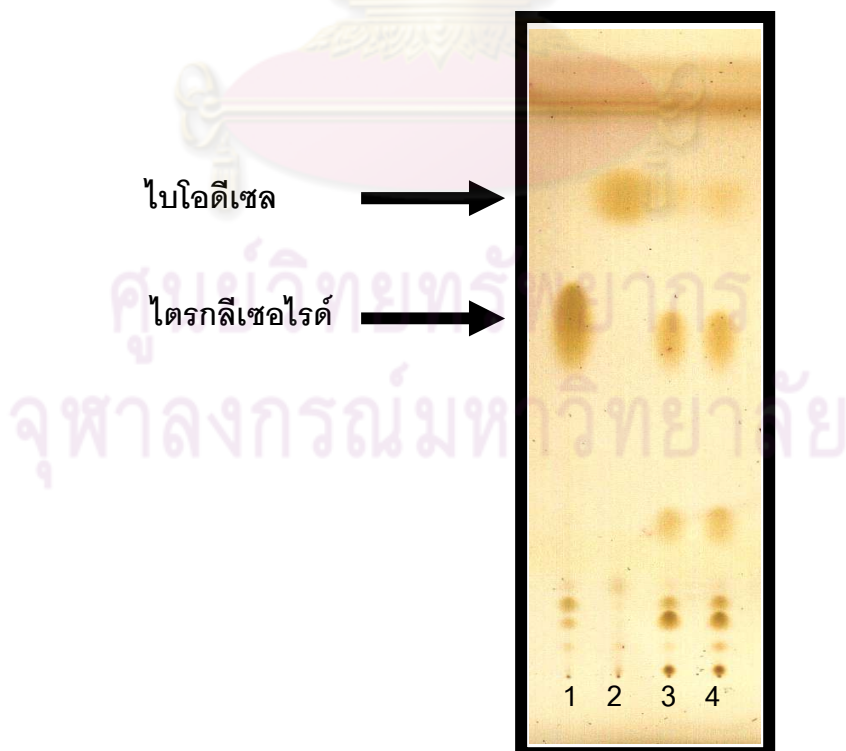
รูปที่ 40 ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ชนิด สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่าไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ให้ค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 19.67 ± 1.71 และ 43.31 ± 1.9 ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 35.9 ± 2.9 และ 59.46 ± 3.47 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 40 แสดงว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ประมาณ 2 เท่า เมื่อเวลาผ่าน 24 ชั่วโมงไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้อีกประมาณ 82 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.4.2.2.3 เชื้อรา *Fusarium solani*

4.4.2.2.3.1 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงคุณภาพด้วย TLC ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยสารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (เป็นสารใช้แทนไตรกลีเซอไรด์) และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้แทนเมทิลเอสเทอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 3.5.1.5.4.3 กล่าวคือ ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.56 และเมทิลเอสเทอร์มีค่า R_f เท่ากับ 0.8 จากการทำทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามขั้น เร่งด้วยสารละลายไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา และตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ด้วย TLC แสดงดังรูปที่ 41

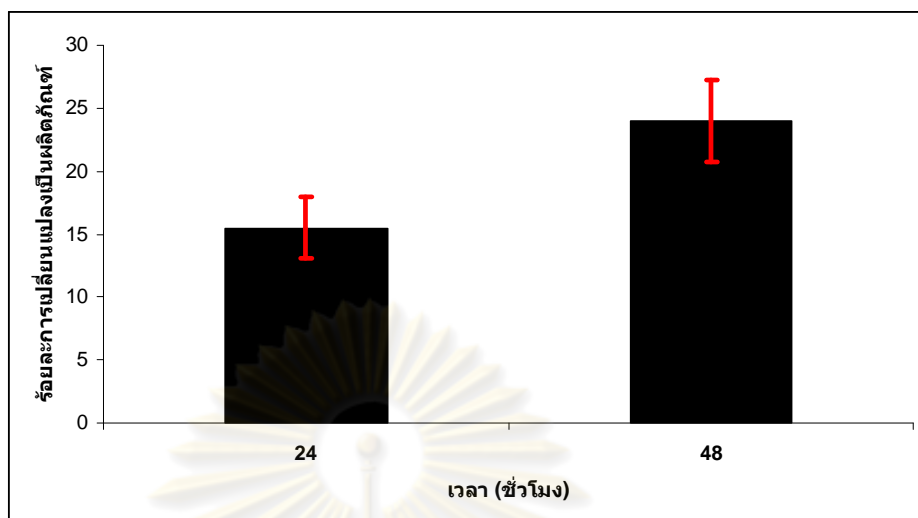


รูปที่ 41 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เร่งด้วย ไลเพสบริสุทธ์ของเชื้อรา เต็มเมทานอลแบบสามชั้น ที่เวลา 0 8 และ 16 ชั่วโมง โดยเลขที่ 1 น้ำมันปาล์ม เลขที่ 2 ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลตัวอย่าง (B-100) เลขที่ 3-4 ผลิตภัณฑ์ ไบโอดีเซลที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเร่งโดยไลเพสบริสุทธ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากรูปที่ 41 พบว่าการใช้ไลเพสบริสุทธ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน สามารถให้ผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากแถบบนโครมาโทแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 พบว่าแถบของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีความเข้มของแถบเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นตรวจสอบในเชิงปริมาณด้วย HPLC ต่อไป

4.4.2.2.3.2 การตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ในเชิงปริมาณด้วย HPLC ที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการเติมเมทานอลแบบสามชั้น เร่งด้วยสารละลายเอนไซม์บริสุทธ์จากเชื้อรา และคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ แสดงดังรูปที่ 42



รูปที่ 42 ร้อยละการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 15.5 ± 2.4 และ 23.98 ± 3.21 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 42 แสดงว่าเมื่อเวลาผ่าน 24 ชั่วโมงไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Fusarium solani* สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเพิ่มปริมาณไบโอดีเซลได้อีกประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การเปรียบเทียบความสามารถของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสเอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.5.1 ปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

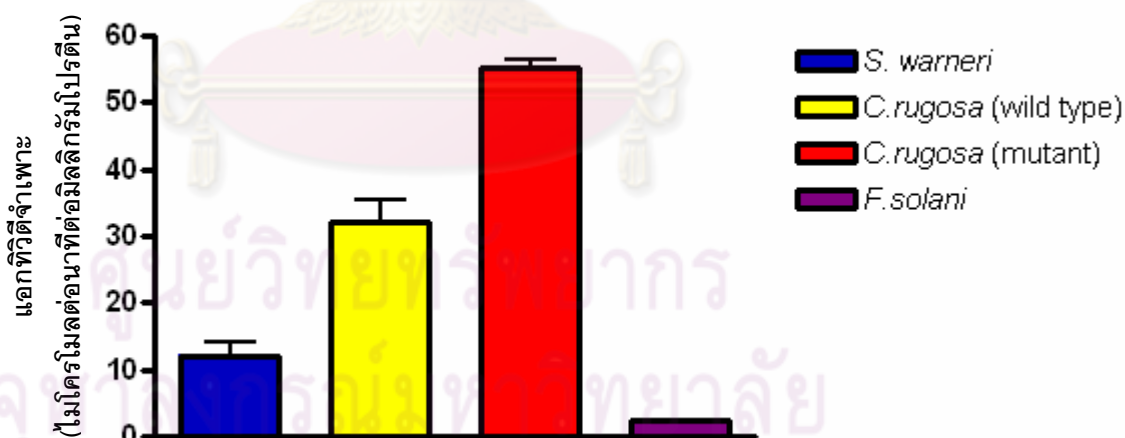
จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสของไลเพสบริสุทธิ์ จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 5.42 ± 0.87 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 312.28 ± 5.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 763.6 ± 4.37 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.18 ± 0.52 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) คือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเชื้อรา *F.solani* และแบคทีเรีย *S.warneri* พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 43



รูปที่ 43 เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และราในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

4.5.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

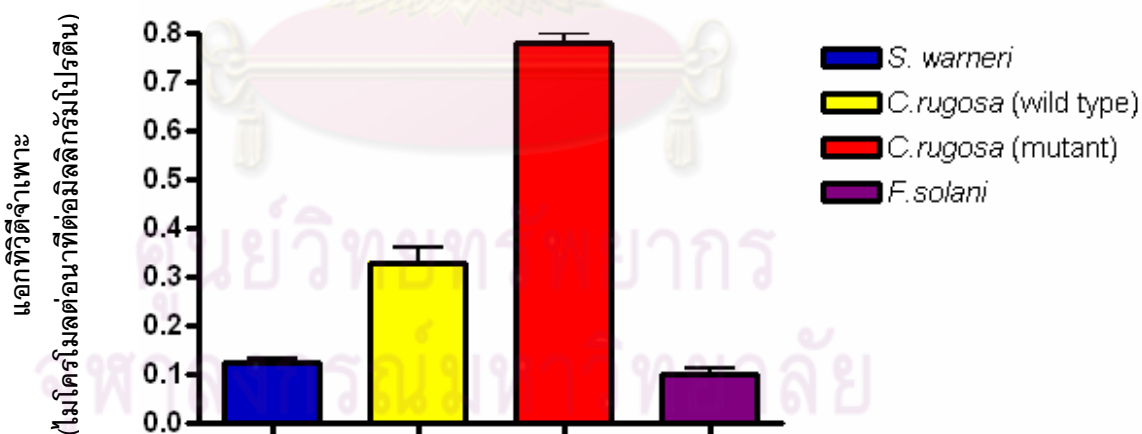
จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12.69 ± 0.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 33.33 ± 0.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 50.23 ± 0.11 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.4 ± 0.15 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ โดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และรา *F. solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) คือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเชื้อรา *F. solani* และเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 44



รูปที่ 44 เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และราในปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

4.5.3 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

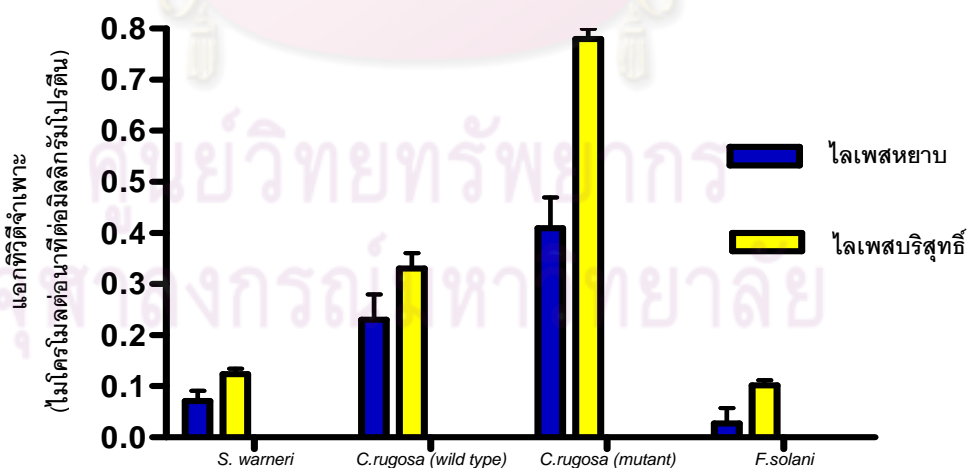
จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.124 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.33 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.78 ± 0.02 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.102 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ โดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และแตกต่างจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) คือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเชื้อรา *F. solani* และแบคทีเรีย *S. warneri* พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 45



รูปที่ 45 เปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และราในปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

4.6 การเปรียบเทียบไลเพสหยาบ และบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ในการผลิตไบโอดีเซล ของไลเพสหยาบ และบริสุทธิ์ พบว่าไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.071 ± 0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.23 ± 0.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.41 ± 0.06 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.027 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.124 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิมมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.33 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.78 ± 0.02 และเชื้อรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.102 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่าไลเพสหยาบ และบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และ เชื้อรา *F.solani* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ไลเพสจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และ ($P < 0.001$) ตามลำดับ นอกจากนี้จะเห็นได้ชัดเจนว่าไลเพสจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ดีที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 46



รูปที่ 46 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไลเพสหยาบและบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ในการผลิตไบโอดีเซล

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การแยกไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

5.1.1 การทดสอบการผลิตไลเพสของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

จากการทดสอบการผลิตไลเพสของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Microbacterium* sp. ;*Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ในเชิงคุณภาพ ด้วยวิธี Plate assay ที่มีโรดามีน บี และน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง BYPO ถ้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตไลเพสและย่อยน้ำมันเป็นกรดไขมันอิสระและจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโรดามีน บี ซึ่งเรืองแสงสีส้มรอบโคโลนีของแบคทีเรีย ได้รังสีอัลตราไวโอเล็ต พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเรืองแสงสีส้ม 3 สายพันธุ์ แต่ไม่พบในเชื้อแบคทีเรีย *Microbacterium* sp. ส่วนเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ และเชื้อรา *Fusarium solani* พบว่ามีการเรืองแสงสีส้ม และเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์มีการเรืองแสงมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม อาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถผลิตไลเพสปริมาณที่มากกว่า หรือมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงต้องทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพสของเชื้อจุลินทรีย์เชิงปริมาณต่อไป

5.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตไลเพส

จากการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพส จากเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Microbacterium* sp. *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus warneri* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุด และนำมาเปรียบเทียบกับไลเพสจากเชื้อยีสต์ และรา ที่คัดเลือกโดยคณะผู้วิจัย ได้แก่เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* (วันภิเชษ จุฑาทักต์) รวมถึงเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (นิรมล จันตาเวียง) และเชื้อรา *Fusarium solani* (วารภรณ์ มลิลาศ) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* เนื่องจากสามารถผลิตไลเพสได้ดีที่สุด และยังไม่มี

การศึกษาด้านความสามารถในการผลิตไบโอดีเซลมากนัก นอกจากนี้มีรายงานในการนำไลเพสมาทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติบางประการของไลเพส (Talon และคณะ, 1995) และนำไลเพสไปใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน เพื่อสังเคราะห์เอสเทอร์ที่มีกลิ่น (Talon และคณะ, 1996) ส่วนการผลิตไบโอดีเซล มีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* จากดิน แล้วแยกไลเพสหายาเพื่อตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ด้รร้อยละการเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลต่ำ เท่ากับ 0.68 (จันทรนาถ พลขำนิ, 2005)

5.1.3 การวัดการเจริญเติบโต และการผลิตไลเพสของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และการผลิตไลเพสของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเพส ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 3 ชนิด เริ่มผลิตไลเพสในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) จนสูงสุดในช่วงปลายแล้วเริ่มคงที่ในช่วงการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) เชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* เริ่มผลิต ไลเพสที่เวลา 10 ชั่วโมง และที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถผลิตได้สูงสุด มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 1.29 ± 0.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในงานวิจัยของ Talon และคณะ, 1995 และจันทรนาถ พลขำนิ, 2005 สรุปว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* ผลิตไลเพส ได้สูงสุดมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 81 และ 2.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของ Talon และคณะ, 1995 แตกต่างจากงานวิจัยนี้มาก ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการวัดแอกทิวิตีของไลเพสที่ต่างกัน แต่เมื่อใช้วิธีการวัดแอกทิวิตีแบบเดียวกัน ค่าแอกทิวิตีก็มีค่าใกล้เคียงกัน (จันทรนาถ พลขำนิ, 2005) ส่วนเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน เริ่มผลิตไลเพสที่เวลา 36 ชั่วโมง และผลิตไลเพสสูงที่สุดมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 74.53 ± 2.12 และ 167.44 ± 3.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่เวลา 120 ชั่วโมง สายพันธุ์กลายพันธุ์มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า จากงานวิจัยของ Lakshmi และคณะ, 1999 สรุปว่าเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สามารถผลิตไลเพสสูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง และเมื่อมีการเติมสารเหนี่ยวนำ (inducer) Tween-85 พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเพสสูงสุดมีแอกทิวิตีเท่ากับ 135.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในเวลาที่สั้นลง คือที่เวลา 24 ชั่วโมง (Zhang และคณะ, 2003) ส่วนเชื้อรา *F.solani* จากผลการทดลองพบว่าเริ่มผลิตไลเพสที่เวลา 24 ชั่วโมง และที่เวลา 72 ชั่วโมงสามารถผลิตไลเพสได้สูงสุด มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะประมาณ 1.41 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัย

ที่ผ่านมา พบว่าในภาวะที่เหมาะสม เชื้อ *F.solani* สามารถผลิตไลเพสสูงสุดมีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.89 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่เวลา 96 ชั่วโมง (Maia และคณะ, 1999)

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญเติบโต และการผลิตไลเพสของเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรีย และราใช้เวลา 1 และ 3 วันตามลำดับ ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิด ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้นกว่าเชื้อยีสต์ แต่มีค่าแอกทิวิตีค่อนข้างต่ำ ในทางตรงกันข้ามเชื้อยีสต์ใช้เวลาในการเจริญเติบโตนานที่สุด แต่มีค่าแอกทิวิตีสูง ดังนั้นเชื้อยีสต์น่าจะมีความเหมาะสม เราสามารถลดเวลาการเลี้ยงได้โดยการเติมสารเหนียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.4 การแยกไลเพสของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

เมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบ (ภาคผนวก ก) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโต และผลิตไลเพสปล่อยออกนอกเซลล์ได้ จากนั้นแยกไลเพสโดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไลเพสไปทำให้เข้มข้นขึ้น เพื่อให้ในการทดลองขั้นต่อไป

5.1.5 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสหายาจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา

เมื่อแยกไลเพสจากเชื้อดังกล่าว และทดสอบความสามารถของไลเพสหายาที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส และการสังเคราะห์เอสเทอร์ 2 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน และ ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เนื่องจากผลการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสของไลเพสในเชื้อจุลินทรีย์ ไม่สัมพันธ์โดยตรงกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ กล่าวคือ เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสได้ดี แต่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ได้ (Wu และคณะ, 1996) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทดสอบความสามารถในการเร่งทั้ง 2 ปฏิกิริยา

จากผลการทดลองใช้ไลเพสหายาเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสพบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri*; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.29 ± 0.23 ; 74.53 ± 2.12 ; 167.44 ± 3.3 และ 1.41 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทางสถิติ โดยใช้ ANOVA พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย และรามีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากไลเพสจากเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างมี

นัยสำคัญ ($P < 0.001$) และไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่าง จากไลเพสจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ส่วนเชื้อรา และแบคทีเรียมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

สำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ ในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri*; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 8.33 ± 0.4 ; 20.93 ± 2.15 ; 48.89 ± 4.02 และ 1.74 ± 0.42 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทางสถิติ โดยใช้ ANOVA พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย และรา มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากไลเพสจากเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากไลเพสจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ($P < 0.001$) ส่วนไลเพสจากเชื้อรา และไลเพสจากแบคทีเรีย มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

สำหรับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri*; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.071 ± 0.02 0.23 ± 0.05 0.41 ± 0.06 0.027 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย และรา มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และแตกต่างจากไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) ไลเพสจากเชื้อรา และแบคทีเรีย *S.warneri* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

ดังนั้นในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส ไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด และไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 2 เท่า ส่วนไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และเชื้อรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาใกล้เคียงกันในปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์

ทั้ง 2 ปฏิกริยา ไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาได้ดีที่สุด และ ไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต สามารถเร่งปฏิกริยาได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 2 เท่า ส่วนไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และเชื้อรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาต่ำกว่าเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ไลเพสหยาบจากเชื้อรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกริยาต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* ทั้งนี้อาจพอสรุปได้ว่า ไลเพสหยาบจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* สามารถเร่งปฏิกริยาไฮดรอลิซิส เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับปฏิกริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ แต่ไลเพสหยาบจากเชื้อรา *F.solani* ให้ผลการเร่งปฏิกริยาไฮดรอลิซิส ไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับปฏิกริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านของ Wu และคณะ, 1996 ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Chromobacterium viscosum* และเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ให้ผลการเร่งปฏิกริยาไฮดรอลิซิส เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับปฏิกริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ แต่ในเชื้อรา *Rhizomucor miehei* และ *Rhizopus* sp. ให้ผลการเร่งปฏิกริยาไฮดรอลิซิส ไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับปฏิกริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์

5.2 การทำไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย, ยีสต์ และรา ให้บริสุทธิ์

เมื่อแยกไลเพสหยาบ และทดสอบความสามารถของไลเพสที่ได้ แล้วจึงนำเอนไซม์ดังกล่าวจากเชื้อทั้ง 4 ชนิด มาทำให้บริสุทธิ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

5.2.1 เชื้อแบคทีเรีย

จากการทดลองพบว่าโปรตีนไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90 กิโลดาลตัน พบว่ามีแอกทิวิตี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Talon และคณะ, 1995 เรียกโปรตีนนี้ว่าโปรไลเพส (prolipase) ซึ่งมีความสามารถเร่งปฏิกริยาได้สมบูรณ์ เช่นเดียวกับไลเพสแต่มีเอนไซม์โปรติเอสอยู่ด้วย จึงต้องผ่านการย่อยเอนไซม์โปรติเอสด้วยทริปซิน และแยกต่อด้วยคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป ผลที่ได้คือไลเพสที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน เรียกว่า mature lipase และไม่พบเอนไซม์โปรติเอส หรือไม่มีแอกทิวิตีของการย่อยตัวเอง (autolysis activity) มีความบริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 4 เท่า มีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 31.58 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน

5.2.2 เชื้อยีสต์

จากการทดลองนำไลเปสหยาบจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มาแยกด้วยคอลัมน์ดีเอตี ไฮแทรป และคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า และมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pernas และคณะ, 2002 และ Maria และคณะ, 2006 พบว่า ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* เป็นไอโซเอนไซม์ (isoenzymes) มีเอ็นที่เกี่ยวกับการผลิตไลเปสเรียกว่า Lip ประมาณ 7 ยีน ได้มีการศึกษาแล้ว 5 ยีน คือ Lip1-5 ไลเปสที่ได้จากแต่ละยีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ประมาณ 60 กิโลดาลตัน แต่ต่างกันที่ชนิดของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง ทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา หรือความจำเพาะต่อสารตั้งต้นแตกต่างกัน แต่จากงานวิจัยนี้พบว่าไลเปสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ มีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58 และ 60 กิโลดาลตัน อาจเป็นผลจากการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ทำให้ผลิตไลเปสแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งอาจเกิดขึ้นขั้นตอนหลังจากการแปลรหัสจากเอ็มอาร์เอ็นเอ (post-translation) จึงทำให้ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างจากเดิม และมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของเชื้อ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาในระดับโมเลกุลเชิงลึกต่อไป

5.2.3 เชื้อรา

จากการทดลองนำไลเปสหยาบจากเชื้อรา *F.solani* มาแยกด้วยคอลัมน์ดีเอตี ไฮแทรป และคอลัมน์ฟีนิลเซฟาโรส ไฮแทรป พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า และมีแอกทิวิตีเหลืออยู่ประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับรายงานของ Andre และ Charmoille, 1999 พบว่าการศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสจากเชื้อรา *F.solani* ที่แยกได้จากธรรมชาติ มีค่า isoelectric point เท่ากับ 6.9 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน

5.3 การศึกษาสมบัติของไลเพสบริสุทธิ์

5.3.1 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา และความจำเพาะต่อสารตั้งต้นในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

จากการทดลองศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสของไลเพสจากเชื้อทั้ง 4 ชนิด พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri*; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 5.42 ± 0.87 ; 312.28 ± 5.12 ; 763.6 ± 4.37 และ 8.18 ± 0.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และ พบว่าไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8 ถึง 10 (Talon และคณะ, 1995) เชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน คือ ไลเพสมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 4 ถึง 16 ดังนั้นจากงานวิจัยนี้ไลเพสที่แยกได้น่าจะเป็นไลเพสที่ผลิตจากยีน Lip1-3 และมีการทำงานรวมกันของไลเพส และเอสเทอร์เอส เนื่องจากมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นทั้งที่มีคาร์บอนสายสั้น และยาว สืบเนื่องจากงานวิจัยของ Lopez และคณะ, 2004 พบว่าไลเพสจาก *C.rugosa* มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด และมีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอน 4 ถึง 12 มากที่สุด เมื่อสารตั้งต้นมีคาร์บอน 3 และมากกว่า 16 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบแอกทิวิตีของไลเพสจากยีน Lip 1-3 พบว่าไลเพสจาก Lip 1 มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสได้ดีที่สุด และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีคาร์บอนสายสั้นจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 8 ถึง 10 ไลเพสจากยีน Lip2 และ3 มีคุณสมบัติเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิสของสารตั้งต้นที่สามารถละลายในน้ำได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเอนไซม์เอสเทอร์เอส ไลเพสจาก Lip 4 มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่คาร์บอนสายยาว จำนวนคาร์บอนเท่ากับ 16 และ 18 (Tang และคณะ, 2001) Lip5 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับไลเพสจาก Lip3 (Mancheno และคณะ, 2003) และในเชื้อรา *F.solani* มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่มีจำนวน 12 มากที่สุด

5.3.2 การทดสอบความสามารถของไลเพสบริสุทธิ์ในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเตอร์

จากการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเตอร์ ของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา และเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับการใช้ไลเพสหยาบกล่าวคือไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเตอร์ แต่ไลเพสจากเชื้อรา *F.solani* ให้ผลการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส ไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเตอร์

5.3.2.1 ปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชัน

พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri*; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 12.69 ± 0.52 ; 33.33 ± 0.12 ; 50.23 ± 0.11 และ 2.4 ± 0.15 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชัน ของไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทางสถิติโดยใช้ ANOVA พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย และรา มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากไลเพสจากเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากไลเพสจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ($P < 0.001$) ส่วนไลเพสจากเชื้อรา และไลเพสจากแบคทีเรีย มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

5.3.2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชัน

พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri*; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และรา *F.solani* มีแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.124 ± 0.01 ; 0.33 ± 0.03 0.78 ± 0.02 และ 0.102 ± 0.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชัน โดยใช้ ANOVA พบว่าเชื้อไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย และรา มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และแตกต่างจากสายพันธุ์กลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และไลเพสจากเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจาก

สายพันธุ์กลายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) กล่าวคือเชื้อยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้น้อยกว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ประมาณ 2 เท่า และไลเพสจากเชื้อรา มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

การผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่มีน้ำมันปาล์ม และเมทานอลเป็นสารตั้งต้น เร่งโดยไลเพสจากเชื้อทั้ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 21.59 ± 3.42 ; 32.21 ± 2.32 ; 59.46 ± 3.47 และ 23.98 ± 3.21 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าไลเพสจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลได้ดีที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นไลเพสจากยีน Lip 1 เนื่องจากมีความสามารถใช้อัลกอฮอล์สายตรงได้ดีที่สุด ส่วนไลเพสจากยีน Lip 2,3 ไม่สามารถใช้อัลกอฮอล์สายตรงได้ แต่จะใช้สายกิ่งได้ดี (Maria และคณะ, 2006)

จากการทดลองพบว่าความสามารถของสารละลายไลเพสบริสุทธิ์ ในการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล เกิดผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลได้ต่ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ อาจเกิดจากปริมาณน้ำในสารละลายไลเพสที่มากเกินไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส แทนการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Shah, 2004) ถ้าสามารถทำให้สารละลายไลเพสให้แห้งในรูปผงโดยใช้ความเย็น (lyophilization) อาจทำให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงขึ้นกว่าเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตไลเพส จากเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไลเพสได้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุด สำหรับเชื้อยีสต์ และรา ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้มีผู้วิจัยทำการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเพสไว้แล้ว ได้แก่เชื้อยีสต์ *Candida rugosa* สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและเชื้อรา *Fusarium solani*

เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต และการผลิตไลเพส ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน กล่าวคือเชื้อทุกชนิด เริ่มผลิตไลเพสในช่วงการเจริญแบบทวีคูณจนสูงสุดในช่วงปลายแล้วเริ่มคงที่ เมื่อแยกไลเพสหยาบ แล้วนำมาศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส รวมทั้งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ผลการทดลองพบว่าไลเพสหยาบที่แยกจากเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ ให้ผลที่สอดคล้องกัน กล่าวคือทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถเร่งได้ทั้ง 2 ปฏิกิริยาที่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไลเพสหยาบจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์มีความสามารถดีที่สุด และสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า อย่างไรก็ตามเชื้อรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส และการสังเคราะห์เอสเทอร์ ที่ไม่เป็นไปในแนวทางเดียวกัน

จากนั้นได้นำไลเพสหยาบจากเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ทำให้บริสุทธิ์ พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* มีความบริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 4 เท่า มีแอกทิวิตีเหลืออยู่ 31.58 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน เชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม และกลายพันธุ์ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า แอกทิวิตีเหลืออยู่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน ส่วนเชื้อรา *F.solani* พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า แอกทิวิตีเหลืออยู่ประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน

เมื่อนำไลเพสบริสุทธิ์ที่ได้มาเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทั้ง 3 ทางสถิติ พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าไลเพสหยาบ ในทำนองเดียวกันไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* สายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถเร่งได้ดีที่สุด และสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า ส่วนไลเพสบริสุทธิ์จากทั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* และเชื้อรา *F.solani* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึงความจำเพาะต่อสารตั้งต้น

พบว่าไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย *S.warneri* ; ยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์ และเชื้อรา *F.solani* มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8 ถึง 10 ; 4 ถึง 16 และ 12 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น กล่าวคือไลเพสจากเชื้อยีสต์ *C.rugosa* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย และรา



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทรนาถ พลขำนิ. 2005. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยไลเปสจากแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Andre, C. and Charmoille, L. 1999. *Fusarium* isolate and lipases, cutinases and enzyme compositions derived therefrom. US Patent Issued 5990069.

Al-zuhair, S., Ramachandran, K.B. and Hasan, M. 2007. Effect of enzyme molecules covering of oil-water interfacial area on the kinetic of oil hydrolysis. Chemical Engineering Journal ARTICLE IN PRESS. CEJ-5490.

Cardenas, F., Castro, M.S de., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W. and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. Enzyme and Microbial Technology 28: 145-154.

Cardenas, F., Alvarez, E., Castro-Alvarez, M. S. de., Sanchez-Montero, J. M., Valmaseda, M., and Elson, S. W. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 14: 111-123.

Cihangir, N., and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 193-197.

Dwivedi, D., Agarwal, A.K. and Sharma, M. 2006. Particulate emission characterization of a biodiesel vs diesel-fuelled compression ignition transport engine: A comparative study. Atmospheric Environment 40: 5586-5595.

- Fadiloglu, S. and Erkmen, O. 2001. Effect of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. Turkish Journal of Engineering Environmental and Science 26:249-254.
- Frenken, L.G.J., Egmond, M.R., Batenburg, A.M., Bos, J.W. and Verrips, C.T. 1992. *Pseudomonas glumae* lipase: gene cloning and determination of the active site residues. Applied and Environmental Microbiology 58: 3787-3791.
- Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering 92: 405-416.
- Gerpen, J.V. 2005. Biodiesel processing and production. Fuel Processing Technology 86: 1097– 1107.
- Gilbert E.J. 1993. *Pseudomonas* lipases: Biochemical properties and molecular cloning. Enzyme and Microbial Technology 15,8: 634-645.
- Hasan, F., Shah, A.A. and Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology 39: 235-251.
- Kwon, S.J., Han, J.J. and Rhee, S.J. 1995. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane Enzyme and Microbial Technology 17: 700-704.
- Lakshmi, B.S., Kanguane, P., Abraham, B. and Pennathur, G. 1999. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). Letters in Applied Microbiology 29: 66-70.

- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L. and Li, Z. 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 43: 58-62.
- Lopez, N., Pernas, M.A., Pastrana, L.M., Sanchez, A., Valero, F. and Rúa, M.L. 2004. Reactivity of Pure *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in Aqueous and Organic Media. Influence of the Isoenzymatic Profile on the Lipase Performance in Organic Media. Biotechnol. Prog 20: 65-73.
- Ma, F. and Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology 70: 1-15.
- Macrae, A. R. 1983. Extracellular Microbial Lipase. In Fogarty WM (ed) Microbial Enzyme and Biotechnology New York: Applied Science Publishers, 225–250.
- Maia, M.M.D., Morais, M.M.C., Morais Jr., M.A.M., Melo, E.H.M. and Filho, J.L. 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. Revista de Microbiologia 30: 304-309.
- Maia, M. M. D., and Heasley, A. 2000. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology. 76: 23-27.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundson, C. 1992. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. Enzyme and Microbial Technology 14,6: 426-446.
- Mancheno J.M., Pernas, M., Martinez, M.J., Ochoa, B., Rúa, M.L. and Hermoso, J. 2003. Structural insights into the lipase/esterase behaviour in the *Candida rugosa* Lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 197 Å^o resolution. Journal of Molecular Biology 332: 1059-1069.

- Maria, P.D.D., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V. and Acantara, A.R. 2006. Understanding *Candida rugosa* lipase: An overview. Biotechnology Advances 24: 180-196.
- Pernas, M., Lopez, C., Prada, A., Hermoso, J and Rua, M.L. 2004. Structural basis for the kinetics of *Candida rugosa* Lip1 and Lip3 isoenzymes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 26: 67-74.
- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., and Muthukumar, K. 2007. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology *ARTICLE IN PRESS*.
- Rapp, P. and Backhaus, S. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. Enzyme Microbiology Technology 14: 938-943.
- Rua, M., Diaz-Maurino, T., Fernandez, V. M., Otero, C., and Ballesteros, A. 1993. Purification and characterization of two distinct lipases from *C. rugosa*. International Journal of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology 1156: 181–189.
- Rua, M. and Ballesteros, A. 1994. Rapid purification of two lipase isoenzymes from *Candida rugosa*. Biotechnology Techniques 8:21–26.
- Samukawa, T., Kaieda M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. Journal of Bioscience and Bioengineering 90: 180–183.
- Sandoval, G. and Marty, A. 2007. Screening methods for synthetic activity of lipases. Enzyme and Microbial Technology 40: 390-393.

- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. and Davidson, W.S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. Journal of Microbiological Methods 52: 1–18.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U. and Schmid, R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochimica et biophysica acta, L. Lipids and lipid metabolism 1214: 43-53.
- Shah, S., Sharma, S. and Gupta, M.N. 2004. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. Energy and Fuel 18: 691-695.
- Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances 19: 627–662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 17: 133-142.
- Talon, R., Dublet, N., Montel, M.C and Cantonnet, M. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. Current Microbiology 30: 11-16.
- Talon, R., Montel, M.C., Berdague, J.L., 1996. Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. Enzyme Microbial Technology 19: 620–622.

Tang, S.J., Shaw, J.F., Sun, K.H., Sun, G.H., Chang, T.Y., Lin, C.K., Lo, Y.C. and Lee, G.C. 2001. Recombinant Expression and Characterization of the *Candida rugosa lip4* Lipase in *Pichia pastoris*: Comparison of Glycosylation, Activity, and Stability. Archives of Biochemistry and Biophysics 387: 93-98.

Wu, X.Y., Jaaskelainen, S. and Linko, Y.Y. 1996. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme and Microbial Technology 19: 226-231.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. Journal of American Oil Societies 64: 1659-1661.

Zhang, L.Y., Wei, D.Z. and Tong, W.Y. 2003. Effective inducers for lipase production by *Candida rugosa*. Annals of Microbiology 53 (4): 499-504.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เชื้อแบคทีเรีย

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว nutrient (nutrient broth)

เนื้อสกัด (beef extract)	3	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง nutrient (nutrient agar)

เนื้อสกัด (beef extract)	3	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเฟส

แบคโต-ทริปโตเน (Bacto-tryptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
เนื้อสกัด (Beef extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	7	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
น้ำมันปาล์ม	1	% (v/v)

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เชื้อยีสต์

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว yeastr malt extract

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง yeastr malt extract

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเปส

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
โซเดียมไนเตรต	1	กรัม
น้ำมันปาล์ม	3	% (v/v)
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.5 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. เชื้อรา

3.1 อาหารกึ่งแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
น้ำตาลเดสโทรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1×1×1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรอกมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลเดสโทรสแล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทไฮ มีเดีย (Hi media)

PDA 39 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเฟส

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.5	กรัม
น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารกึ่งแข็ง BYPO + Rhodamine B

แบคโต-ทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
เนื้อสกัด (Beef extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	7	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
วุ้นผง	20	กรัม
10 % (v/v) Palm oil emulsion เตรียมใน		
10 % (w/v) Gum Arabic solution		
โรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001% (w/v)		

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดค่าแอกทิวิตีในปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

1.1 การเตรียมทริสบัฟเฟอร์ (Tris-HCl)

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0

ทริส เบส (Tris base)	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย ทริส เบส ให้เข้ากันกับน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	475	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลาย ก.

พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (<i>p</i> -nitrophenyl palmitate)	30	ไมโครกรัม
2-โพรพานอล (2-propanol)	10	มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย ข.

ไตรตอน เอกซ์ -100 (triton x -100)	0.4	กรัม
กัม อะราบิก (gum arabic)	0.1	กรัม

ละลายในทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย ก. และ ข. ที่เตรียมไว้ให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา โดยสามารถเก็บได้ 2 สัปดาห์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

สารเบรด์ฟอร์ด (Bradford' reagent 4 เท่า)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	4	ส่วน

กรองด้วยกระดาษกรอง What man เบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดสีชา เก็บได้ 4 สัปดาห์ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายตรวจวัดค่าแอกทิวิตีในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

3.1 สารละลาย ก.

กรดโอเลอิก	32	ไมโครลิตร
เฮปแทน	10	มิลลิลิตร

3.2 สารละลาย ข.

โตเดคานอล	23	ไมโครลิตร
เฮปแทน	10	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ก. และ ข. ที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน ให้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.9 มิลลิโมลาร์ และปรับปริมาตรด้วยเฮปแทนเท่ากับ 10 มิลลิลิตร ก่อนใช้ในการทำปฏิกิริยา

3.3 สารละลายคอปเปอร์ อะซิเตท

คอปเปอร์ อะซิเตท	5	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 6.1 ด้วยไฟรีดิน และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายสำหรับการทำโซเดียมโตเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

4.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโตเดซิลซัลเฟต	3	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร

4.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6	กรัม
------	---	------

ปรับ pH เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

ทริส	18.15	กรัม
------	-------	------

ปรับ pH เท่ากับ 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.6	กรัม
-------------	------	------

บิส อะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bis acrylamide)	0.4	กรัม
---	-----	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
-----------------------	-----	------

ละลายในน้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร
-----------------	---	-----------

4.6 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1	กรัม
----------------------	---	------

ละลายในน้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร
-----------------	----	-----------

4.7 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	1	มิลลิลิตร
--	---	-----------

กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
-----------	-----	-----------

สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	1.6	มิลลิลิตร
---	-----	-----------

2-เมอร์แคปโตเอทานอล	0.4	มิลลิลิตร
---------------------	-----	-----------

สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ บรอมฟินอลบลู	0.4	มิลลิลิตร
-------------------------------------	-----	-----------

4.8 สารละลายผสมของเซฟาเวติงเจด 12 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	3.3 มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH8.8 ความเข้มข้น1.5 โมลาร์	2.5 มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4 มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.1 มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.1 มิลลิลิตร
TEMED	0.004มิลลิลิตร

4.9 สารละลายผสมของสแตกกิงเจด 4 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	2.1 มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	0.38 มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	0.5 มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.03 มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	0.03 มิลลิลิตร
TEMED	0.003มิลลิลิตร

4.10 สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

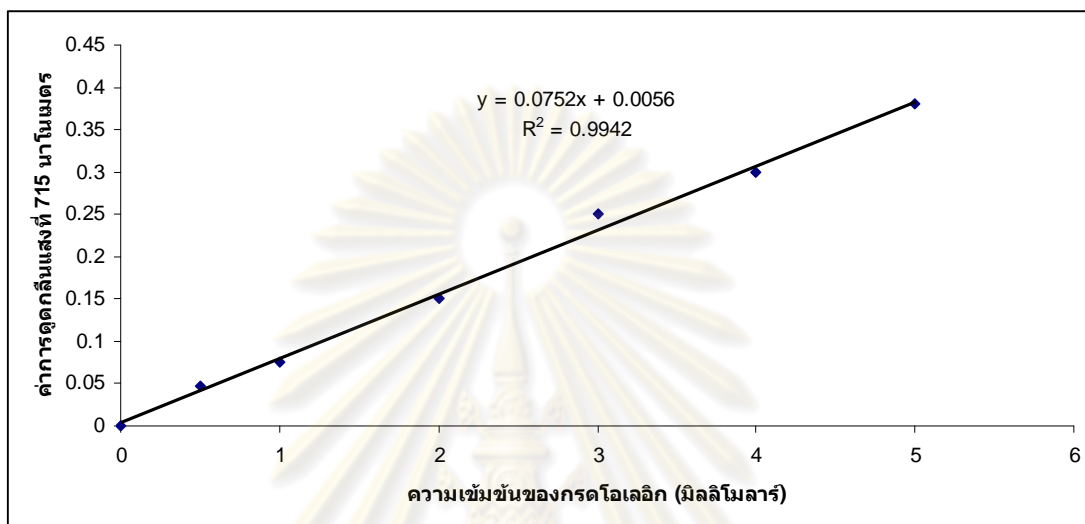
สีคูแมสซี ปริลเลียนท์ บลู จี-250	0.1 เปอร์เซ็นต์
เมทานอล	40 เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10 เปอร์เซ็นต์

4.11 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมทานอล	40 เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์

สารที่ใช้: เฮปแทน

10 มิลลิโมลาร์ ของกรดโอเลอิก

วิธีการทำกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก

โดยใช้วิธีของ Sandoval และ Marty (2007)

- 1.เตรียมสารละลายกรดโอเลอิกในเฮปแทนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
- 2.เตรียมสารละลายกรดโอเลอิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 0-5 มิลลิโมลาร์ ในหลอดขนาด 1 มิลลิลิตร ดังตารางที่ ค-1

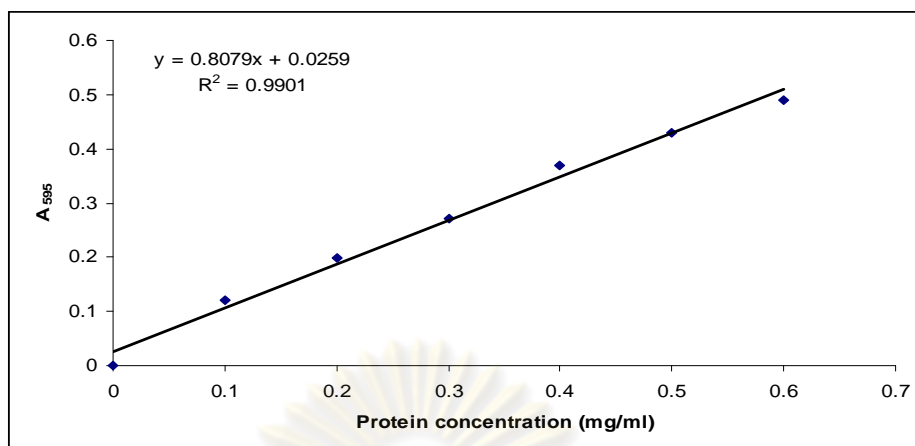
ตารางที่ ค-1 ปริมาตรสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้นของกรดโอเลอิก (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	กรดโอเลอิก (10 มิลลิโมลาร์)	เฮปแทน
0	-	300
0.5	15	285
1	30	270
2	60	240
3	100	200
4	120	180
5	150	150

- 3.เติมสารละลายคอปเปอร์ อะซิเตท 60 ไมโครลิตร ลงในสารละลายกรดโอเลอิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
- 4.ผสมให้เข้ากัน และดูดสารละลายส่วนบนที่ความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์ ลงในแต่ละหลอดของไมโครเพลตปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลอด โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายพารา -ไนโตรฟีนอล
- 5.วัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดโอเลอิกที่ 715 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0.1-0.6 ไมโครกรัม



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0.1-0.6 ไมโครกรัม

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน BSA

- 1.เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางปริมาณโปรตีนให้ได้ 0.1-0.6 ไมโครกรัม โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นดังตารางที่ ค-2
- 2.เติม BSA จาก stock ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลอดของไมโครเพลต ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ตารางที่ ค-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0.1-0.6 ไมโครกรัม

ปริมาณ BSA (ไมโครกรัม)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	BSA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	น้ำกลั่น
0	-	1000
0.1	100	900
0.2	200	800
0.3	300	700
0.4	400	600
0.5	500	500
0.6	600	400

- 3.เติมสารละลายเบรดฟอร์ด ลงในหลอดของไมโครเพลตปริมาตร 300 ไมโครลิตร
- 4.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง
วิธีการคำนวณ

1. ค่าแอกทิวิตี (Activity: units/ml)

คำนวณจากค่า Extinction coefficient ของ พารา-ไนโตรฟีนอล เท่ากับ 1.9×10^3 ได้สมการดังนี้

$$\text{แอกทิวิตี} = (\Delta \text{ mOD } 410 / \text{เวลา}) \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 0.00111$$

แอกทิวิตีของไลเพสหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (units/ml)

2. ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (Total protein: mg)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองของแต่ละเชื้อมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (BSA = Bovine serum albumin) ได้สมการดังนี้

$$Y = aX + b$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

เมื่อได้ค่า X จากการแทนค่าในสมการ คุณจำนวนเท่าของการเจือจางด้วย

3. การหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสาร ในการวิเคราะห์ด้วย TLC

สูตร

$R_f =$ ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางที่สารเคลื่อนที่ได้ ต่อ ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

หมายเหตุ: สารชนิดเดียวกันจะมีค่า R_f เท่ากัน ถ้าใช้สภาวะเดียวกัน

ค่า R_f จะมีค่าไม่เกิน 1 และไม่มีหน่วย

4. การหาปริมาณไบโอดีเซล

ร้อยละการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ =

$$\frac{\text{FAME}}{\text{FAME} + \text{FFA} + (3 \times \text{TAG}) + (2 \times 1,3 \text{ DAG}) + (2 \times 1,2 \text{ DAG}) + \text{MAG}}$$

โดยที่ FAME คือ ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล)

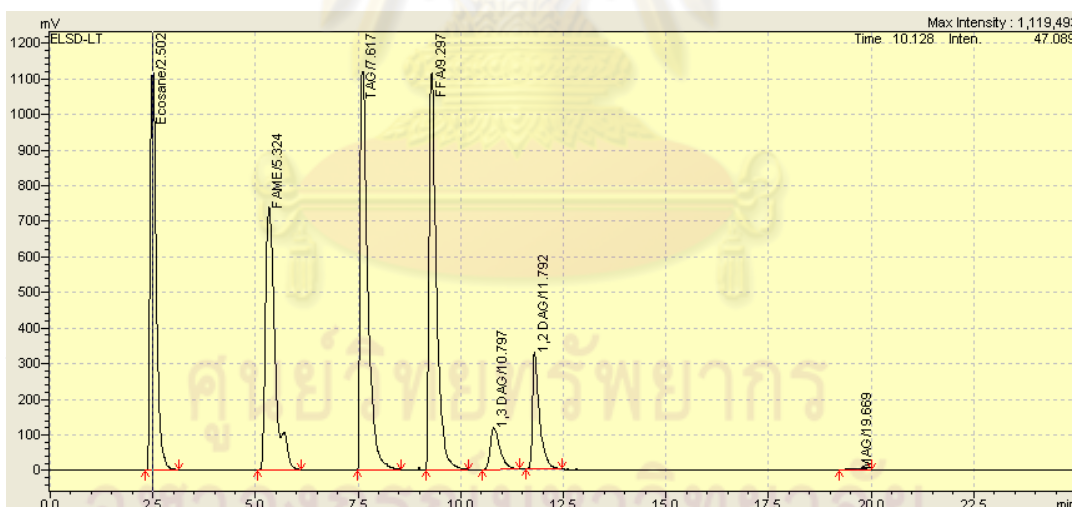
FFA คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ

TAG คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์

DAG คือ ความเข้มข้นของไดกลีเซอไรด์

MAG คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์

ตัวอย่าง โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์



โดยที่ Peak 1: อีโคเซน (สารมาตรฐาน) Peak 2: Fatty acid methyl ester (FAME หรือ Biodiesel) Peak 3: ไตรกลีเซอไรด์ (TAG) Peak 4: กรดไขมันอิสระ (FFA) Peak 5: 1,3 ไดกลีเซอไรด์ Peak 6: 1,2 ไดกลีเซอไรด์ และ Peak 7: โมโนกลีเซอไรด์

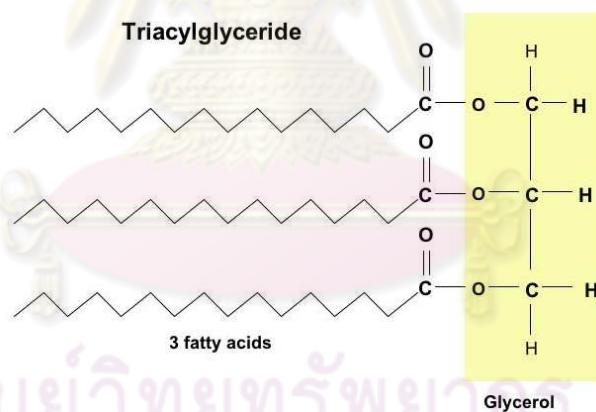
5. การคำนวณค่ามวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม

ค่ามวลโมเลกุลของน้ำมัน โดยทั่วไปมีสูตรในการหา ดังนี้

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

$$R_{Aver} = \frac{(\%FA_n \times MW_n)}{100}$$

โดยที่	MW_{TG}	คือ มวลโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เท่ากับ มวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม
	R_{Aver}	คือ มวลของกรดไขมันทั้งสามตำแหน่งที่มา esterified กลีเซอรอลซึ่งหักน้ำหนักของ $-COOH$ ออกแล้ว
	$\%FA_n$	คือ เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบน้ำมัน
	MW_n	คือ มวลโมเลกุลของกรดไขมันที่หักน้ำหนักของ $-COOH$ ออกแล้ว เท่ากับ $MW_{FA} - 45$ จากสูตรโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นสปีชีส์หลักในน้ำมันดังรูปที่ 16



รูปที่ ง-2 โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์

น้ำมันแต่ละชนิดจะมีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันออกไป เมื่อนำกรดไขมันมา esterified กับกลีเซอรอลจะเกิดการสูญเสียหมู่ $-OH$ ออกไป การคือน้ำหนักของ MW_n ก็คือการคือน้ำหนักของกรดไขมันที่มา esterified กับกลีเซอรอล แต่หักส่วนที่ซ้ำกันออกไป ซึ่งก็คือส่วนที่เป็น $-CO$ และต้องหักส่วนที่เป็น $-OH$ ออกด้วย เนื่องจากกรดไขมันสูญเสียหมู่ $-OH$ นี้ไปแล้วในระหว่างการเข้า esterified กับกลีเซอรอล ดังนั้น MW_n ก็คือกรดไขมันที่หักน้ำหนักของ $-COOH$ ออกแล้ว ซึ่ง $-COOH$ นหนักเท่ากับ 45 ดังนั้น

MW_n คำนวณได้จากการเอาน้ำหนักของกรดไขมันชนิดหนึ่งที่ทราบอยู่แล้วว่าหนักเท่าใดมาหักออกด้วย 45

ตารางที่ ง-1 กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม

Common name	Abbreviation	% Fatty acid
Lauric acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	12 : 0	0.59
Myristic acid (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	14 : 0	0.96
Palmitic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	16 : 0	38.67
Palmitoleic acid (C ₁₆ H ₃₀ O ₂)	16 : 1	0.11
Stearic acid (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	18 : 0	3.32
Oleic acid (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	18 : 1	45.45
Linoleic acid (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	18 : 2	10.87
Linolenic acid (C ₁₈ H ₃₀ O ₂)	18 : 3	0.20
Arachidic acid (C ₂₀ H ₄₀ O ₂)	20 : 0	0.23
Behenic acid (C ₂₂ H ₄₄ O ₂)	22 : 0	0.02

หามวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์มได้โดยแทนค่าลงในสูตร ดังนี้

$$\begin{aligned}
 R_{Ave} &= \left(\frac{0.59}{100} \times 155\right) + \left(\frac{0.96}{100} \times 183\right) + \left(\frac{38.67}{100} \times 211\right) + \left(\frac{0.11}{100} \times 209\right) + \left(\frac{3.32}{100} \times 239\right) \\
 &\quad + \left(\frac{45.45}{100} \times 237\right) + \left(\frac{10.87}{100} \times 235\right) + \left(\frac{0.20}{100} \times 233\right) + \left(\frac{0.23}{100} \times 267\right) + \left(\frac{0.02}{100} \times 295\right) \\
 &= 0.915 + 1.757 + 81.594 + 0.221 + 7.935 + 107.717 + 25.545 + 0.466 \\
 &\quad + 0.614 + 0.059 \\
 &= 226.823 \\
 MW_{TG} &= (3 \times 226.823) + 173 \\
 &= 853.469
 \end{aligned}$$

ดังนั้นมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม เท่ากับ 853.47

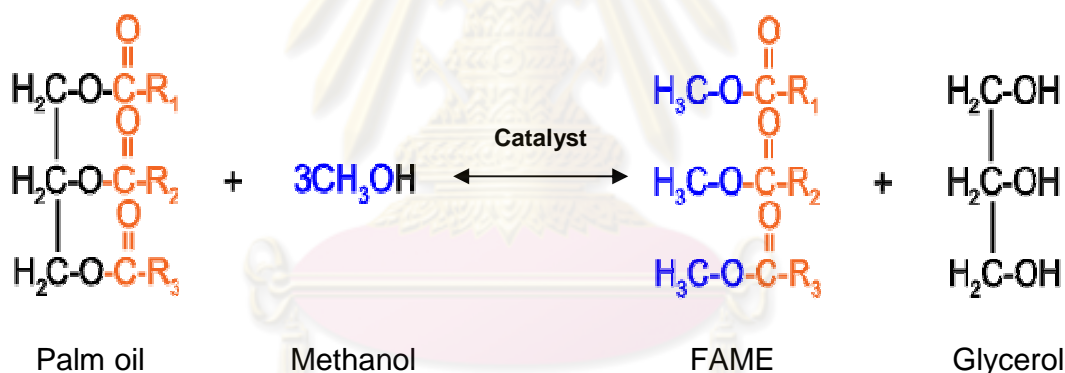
6. การคำนวณปริมาณเมทานอลที่ใช้

อัตราส่วนน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่พอดีกันตามสมการเป็น 1:3 (รูปที่ ง-2) ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยจะทราบว่าจะต้องใช้เมทานอลเท่าใดนั้น จะคำนวณโดยใช้มวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม จากมวลโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม เท่ากับ 853.47 ดังนั้นน้ำมันปาล์ม 1 กรัม เท่ากับ $1/853.47 \sim 1.171 \times 10^{-3}$ โมล

ดังนั้น จะใช้เมทานอล เท่ากับ $3 \times 1.171 \times 10^{-3} = 3.513 \times 10^{-3}$ โมล

เมทานอล 3.513×10^{-3} โมลหนักเท่ากับ $3.513 \times 10^{-3} \times 32 = 0.1124$ กรัม

จะได้ปริมาตรของเมทานอล เท่ากับ มวล/ความหนาแน่น คือ $0.1124/0.792 \sim 0.140$ มิลลิลิตร



รูปที่ ง-2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล

ภาคผนวก จ
ผลการวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

1. ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสหายาบจากเชื้อจุลินทรีย์
วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Instat
- 1.1 ปฏิกริยาไฮดรอลิซิส

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001 , considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance. Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test If the value of q is greater than 4.529 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
bacteria vs Yeast wt	-68.950	60.778	*** P<0.001
bacteria vs Yeast mt	-178.38	157.24	*** P<0.001
bacteria vs fungi	0.1500	0.1322	ns P>0.05
Yeast wt vs Yeast mt	-109.43	96.461	*** P<0.001
Yeast wt vs fungi	69.100	60.911	*** P<0.001
Yeast mt vs fungi	178.53	157.37	*** P<0.001

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	63897	21299
Residuals (within columns)	8	30.887	3.861
<hr/>			
Total	11	63928	

$F = 5516.6 = (MStreatment/MSresidual)$

1.2 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

Comparison	Mean		
	Difference	q	P value
bacteria vs Yeast wt	-12.630	9.520	*** P<0.001
bacteria vs Yeast mt	-40.590	30.596	*** P<0.001
bacteria vs fungi	6.580	4.960	* P<0.05
Yeast wt vs Yeast mt	-27.960	21.076	*** P<0.001
Yeast wt vs fungi	19.210	14.480	*** P<0.001
Yeast mt vs fungi	47.170	35.556	*** P<0.001

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	3919.6	1306.5
Residuals (within columns)	8	42.239	5.280
Total	11	3961.9	

1.3 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

Comparison	Mean		
	Difference	q	P value
bacteria vs Yeast wt	-0.1590	6.831	** P<0.01
bacteria vs Yeast mt	-0.3390	14.565	*** P<0.001
bacteria vs fungi	0.04400	1.890	ns P>0.05
Yeast wt vs Yeast mt	-0.1800	7.733	** P<0.01
Yeast wt vs fungi	0.2030	8.722	** P<0.01
Yeast mt vs fungi	0.3830	16.455	*** P<0.001

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	0.2718	0.09061
Residuals (within columns)	8	0.01300	0.001625
Total	11	0.2848	

$$F = 55.751 = (MStreatment/MSresidual)$$

2. ผลการการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสบริสุทธิ์จากเชื้อจุลินทรีย์
วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Instat

2.1 ปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส

Comparison	Mean Difference	q	P value
Bacteria vs Yeast (WT)	-291.58	34.399	*** P<0.001
Bacteria vs Yeast (MT)	-734.03	86.598	*** P<0.001
Bacteria vs Fungi	-2.983	0.3520	ns P>0.05
Yeast (WT) vs Yeast (MT)	-442.45	52.198	*** P<0.001
Yeast (WT) vs Fungi	288.60	34.047	*** P<0.001
Yeast (MT) vs Fungi	731.05	86.246	*** P<0.001

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	1077990	359330
Residuals (within columns)	8	1724.4	215.55
Total	11	1079714	

F = 1667.1 = (MStreatment/MSresidual)

2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

Comparison	mean Difference	q	P value
Bacteria vs Yeast (WT)	-21.640	16.895	*** P<0.001
Bacteria vs Yeast (MT)	-44.280	34.571	*** P<0.001
Bacteria vs Fungi	-12.713	9.926	*** P<0.001
Yeast (WT) vs Yeast (MT)	-22.640	17.676	*** P<0.001
Yeast (WT) vs Fungi	8.927	6.969	** P<0.01
Yeast (MT) vs Fungi	31.567	24.645	*** P<0.001

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	3134.5	1044.8
Residuals (within columns)	8	39.374	4.922
Total	11	3173.9	

F = 212.29 = (MStreatment/MSresidual)

2.3 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

Comparison	Mean Difference	q	P value
bacteria vs Yeast wt	-0.2060	18.425	*** P<0.001
bacteria vs Yeast mt	-0.6560	58.674	*** P<0.001
bacteria vs fungi	0.02200	1.968	ns P>0.05
Yeast wt vs Yeast mt	-0.4500	40.249	*** P<0.001
Yeast wt vs fungi	0.2280	20.393	*** P<0.001
Yeast mt vs fungi	0.6780	60.642	*** P<0.001

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	0.8906	0.2969
Residuals (within columns)	8	0.003000	0.0003750
Total	11	0.8936	

$$F = 791.62 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชุติมา แก้วพิบูลย์ เกิดวันที่ 8 เมษายน พ.ศ. 2526 ที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2547 และระดับปริญญาโทเข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2548 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย