การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อน้ำมันดอกคำฝอยจากตะกอนทะเลใกล้สะพานปลา อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

Screening of an organic solvent tolerant bacterium that can secrete lipolytic enzyme high specific for safflower oil from marine sludge near fishmarket in Angsila, Chonburi

สุดารัตน์ ศิลปชัย

SUDARAT SINLAPACHAI

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โครงงานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

หัวข้อโครงงานวิจัย	การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งมีความจำเพาะต่อน้ำมันดอกคำฝอยจากตะกอนทะเลใกล้สะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี
ชื่อนิสิต	นางสาวสุดารัตน์ ศิลปชัย
รหัสนิสิต	48035103
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช
ปีการศึกษา	2551

คณะกรรมการการสอบได้พิจารณาโครงการวิจัยฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.....ประธานกรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา
(อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช)

.....กรรมการ
(ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

.....กรรมการ
(อ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต)

ภาควิชาชีวเคมีอนุมัติรับโครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.....หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี
(อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช)
วันที่...../...../.....

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อโครงงานวิจัย	การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งมีความจำเพาะสูงต่อน้ำมันดอกคำฝอยจากตะกอนทะเลใกล้สะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี
ชื่อนิสิต	นางสาวสุดารัตน์ ศิลปชัย
รหัสนิสิต	48035103
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษา	อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ 20 ไอโซเลทจากตัวอย่างในบริเวณจังหวัดชลบุรี 9 แหล่ง ทำโดยการเลี้ยงบำรุงในอาหารที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ จากแบคทีเรียที่แยกทั้งหมด ไอโซเลทที่ 1 ซึ่งแสดงการทนต่อบิวทานอลร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร), อะซิโตนร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเฮกซาดีเคนร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แสดงความสามารถในการขับเอนไซม์ไลเปส 4.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนในอาหารที่ปราศจากเซลล์ เอนไซม์ไลเปสที่ได้แสดงความจำเพาะสูงต่อน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบสูง เช่น น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันดอกทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด การแสดงออกของเอนไซม์เหนี่ยวนำได้โดยน้ำมันข้าวโพดและน้ำมันงา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

PROJECT TITLE	Screening of an organic solvent tolerant bacterium that can secrete lipolytic enzyme high specific for safflower oil from marine sludge near fishmarket in Angsila, Chonburi
NAME	Miss Sudarat Sinlapachai
STUDENT NUMBER	48035103
PROGRAM	Bachelor of Science (Biochemistry)
ADVISOR	Jittima Charoenpanich, Ph.D.
ACADEMIC YEAR	2008

Abstract

A total 20 isolates of organic solvent-tolerant bacteria originating from nine sampling areas in Chonburi were successfully isolated via enrichment method using a medium containing organic solvents. Among all isolates, isolate No.1, which demonstrated highly tolerance to 1% (v/v) of butanol, 5% (v/v) of acetone, and 25% (v/v) of hexadecane showed the ability to secrete lipolytic enzyme as 4.41 unit/mg protein into the culture supernatant. The secreted enzyme gave high specific to various vegetable oils containing large composition of unsaturated fatty acids such as safflower, sunflower and corn oils. Moreover, expression of the enzyme could be induced by corn and sesame oils.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยทางชีวเคมีฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี ต้องขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร.จิตติมา เจริญพานิช ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้ข้อคิด คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางทั้งการทำโครงการวิจัยและวิถีการใช้ชีวิต รวมถึงช่วยแก้ไขโครงการวิจัยฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ กรุณาพาไปโรงพยาบาลและออกค่าใช้จ่ายให้ก่อน ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่งที่คอยดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการให้ อบรมสั่งสอน และวิถีการใช้ชีวิตเสมอมา รวมถึงการให้คำแนะนำในการแก้ไขโครงการวิจัยฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร.ทรงกลด สารภูษิต ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการให้ และรวมถึงการให้คำแนะนำในการแก้ไขโครงการวิจัยฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ซึ่งอบรม สั่งสอนและให้ความรู้และวิถีการใช้ชีวิตเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำเนิด ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ที่ทำให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสได้มาศึกษาเล่าเรียน อบรมสั่งสอน ให้ความรัก ให้กำลังใจและปลอบโยนข้าพเจ้าเสมอมา รวมถึงค่าใช้จ่ายต่างๆ ตลอดการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณศุภชัย คุณสงวนศรี สุทธิพงษ์ชัย ที่ให้โอกาสดีๆ และให้การอุปถัมภ์ข้าพเจ้าให้ได้รับทุนการศึกษา บริษัทกรุงไทยการไฟฟ้า จำกัด ตั้งแต่มัธยมศึกษาปีที่ 6 จนจบมหาวิทยาลัย ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งใจยิ่งนัก

ขอขอบคุณ น.ส. ศศิธร อุทรตรี น.ส. กนกหทัย บูรณศิลป์ และน.ส. เนตรชนก แย้มศรี ที่คอยช่วยเหลือ ในการทำโครงการวิจัยฉบับนี้ และขอขอบคุณ น.ส. พนิดา รัตนชน เพื่อนสนิทคนพิเศษ ที่คอยช่วยเหลือ คอยรับฟังและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดารัตน์ ศิลปชัย

20 มีนาคม 2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

		หน้า
ปกใน		ก
หน้าอนุมัติ		ข
บทคัดย่อภาษาไทย		ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ง
ประกาศคุณูปการ		จ
สารบัญ		ฉ
สารบัญตาราง		ช
สารบัญรูปภาพ		ฌ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง	2
	1.3 สมมติฐานของการทดลอง	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง	2
	1.5 ขอบเขตของการทดลอง	2
2	ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	2.1 ทฤษฎี	3
	2.1.1 เอนไซม์ไลเปส	3
	2.1.2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส	3
	2.1.3 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล	4
	2.1.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส	8
	2.1.5 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืช	10
	2.1.6 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว	11
	2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
3	วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	15
	3.1 วัสดุ และอุปกรณ์	15
	3.2 สารเคมี	16
	3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	16

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง (ต่อ)	
	3.2.2 สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	16
	3.2.3 น้ำมันที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส	17
	3.2.4 ตัวทำละลายอินทรีย์	17
	3.3 วิธีการทดลอง	18
	3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์	18
	3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส	19
	3.3.3 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยโรดามีนบี	19
	3.3.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อน้ำมันพืช	20
	3.3.5 การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันพืช	20
4	ผลการทดลอง	21
	4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์	21
	4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส	21
	4.3 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยโรดามีนบี	24
	4.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อน้ำมันพืช	25
	4.5 การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันพืช	28
5	อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	30
	5.1 อภิปรายผลการทดลอง	30
	5.2 สรุปผลการทดลอง	31
	5.3 ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง		33
ภาคผนวก		36
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี		37
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินและวิธีการคำนวณปริมาณโปรตีน		39
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol และวิธีการคำนวณแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส		40
ประวัติย่อของนิสิต		41

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	การเปรียบเทียบข้อแตกต่างในการผลิตไบโอดีเซลระหว่างตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสกรดและเอนไซม์	8
2-2	องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	11
2-3	ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ	12
4-1	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดแยกได้ 20 ไอโซเลท	22
4-2	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 20 ไอโซเลท	24
4-3	ความเข้มในการเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของเชื้อและสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อเจริญในอาหารแข็งโรดามีนบีที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท	26
4-4	ค่าแอคติวิตี้ทั้งหมด ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำการแสดงออกโดยน้ำมันชนิดต่างๆ	29

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์ไลเปส.....	4
2-2	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส.....	4
2-3	การไฮโดรไลซิสวัตถุดิบน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงในเครื่องปฏิกรณ์แบบไหลสวนทางต่อเนื่อง.....	5
2-4	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไทรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	6
2-5	ปฏิกิริยาเคมีในการเตรียมสารประกอบอัลคอกซี.....	6
2-6	กลไกของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์.....	7
2-7	การเร่งปฏิกิริยาตรงพันธะเอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง.....	9
4-1	การเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของส่วนใสและและโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อเจริญในอาหารแข็งโรดามีนบีที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท.....	25
4-2	การเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของโคโลนีและส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อเจริญในอาหารแข็งโรดามีนบีที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง.....	27
4-3	การเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของโคโลนีและส่วนใสของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อเจริญในอาหารแข็งโรดามีนบีที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....	28

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไบโอดีเซลหรือกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl ester) เป็นน้ำมันดีเซลธรรมชาติที่ได้มาจากการเปลี่ยนรูปไทรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ที่ทำปฏิกิริยากับเมทานอล (Methanol) ผ่านตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ภายใต้สภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (Fukuda et al., 2001) เมื่อเร็วๆ นี้เอนไซม์ไลเปส (Lipase) จัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ในการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเหนือตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น กรดและเบส คือ ช่วยลดข้อเสียเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำมันพืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบ โดยเอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับกรดไขมันอิสระและไทรกลีเซอไรด์จึงสามารถนำน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงมาใช้เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาได้ เป็นการลดต้นทุนการผลิตเมื่อเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสใช้อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียสและหลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้นสมบูรณ์ยังสามารถแยกไบโอดีเซลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกมาได้ง่าย รวมทั้งสามารถนำเอนไซม์ไลเปสกลับมาใช้ใหม่ได้ หากใช้ในรูปของเอนไซม์ตรึง (Immobilized enzyme) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสทำให้ได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์สูง ปลอดภัย สามารถลดต้นทุนจากการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส รวมทั้งไม่เกิดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการ เมื่อเทียบกับกระบวนการผลิตแบบใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยายังสามารถใช้วัตถุดิบที่หลากหลายไม่ว่าจะเป็นไขมันสัตว์ แบคทีเรียที่ผลิตน้ำมัน หรือน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง รำข้าว มะพร้าว ปาล์ม เป็นต้น รวมทั้งกลีเซอรอลที่ได้จากปฏิกิริยายังสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นได้ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตอาหาร สบู่ ยา (วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2548) สำหรับประสิทธิภาพของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เมื่อเทียบกับน้ำมันดีเซลนั้นเคยมีรายงานของบริษัท ปตท. จำกัดมหาชน ร่วมกับกระทรวงพลังงานและกองทัพเรือ พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลจะช่วยให้อัตราเร่งของเครื่องยนต์ดีขึ้นร้อยละ 12.5 ช่วยลดควันดำลงร้อยละ 70 และมีความสิ้นเปลืองในการผลิตระดับที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม จากที่กล่าวไว้ข้างต้นจะเห็นว่าปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชัน มักเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เป็นที่ทราบกันดีว่าตัวทำละลายอินทรีย์สามารถลดค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) ส่งผลให้เอนไซม์ที่เป็นโปรตีนเสียสภาพได้ ด้วยเหตุนี้โครงงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่พบได้ในธรรมชาติ ซึ่งคาดว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีความจำเพาะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต่อน้ำมันธรรมชาติที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะสูงต่อน้ำมันดอกคำฝอยจากตัวอย่างตะกอนทะเลใกล้สะพานปลา อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

1. ตะกอนทะเลใกล้สะพานปลา อ่างศิลา น่าจะมีปนเปื้อนของตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำมัน และมีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

2. เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ น่าจะมีความจำเพาะสูงต่อน้ำมันดอกคำฝอย ซึ่งมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบสูง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกคำฝอยด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

1.5 ขอบเขตของการทดลอง

คัดแยกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตและขับเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์จากตะกอนทะเลบริเวณสะพานปลา อ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยการเลี้ยงบำรุงในอาหารเจือจาง LB ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารตั้งต้นพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตท (*p*-nitrophenylpalmitate) และการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มและโรดามีนบี (Rhodamine B) เป็นสารตั้งต้นและตัวบ่งชี้ตามลำดับ และศึกษาความจำเพาะในการสลายน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนล่า น้ำมันงา น้ำมันหมู น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและไตรบิวทิลิน ด้วยการเจริญในอาหารแข็งที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้นและมีโรดามีนบีเป็นตัวบ่งชี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

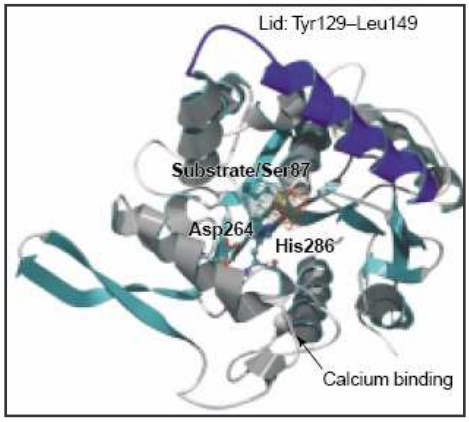
2.1.1 เอนไซม์ไลเปส (Bornscheuer et al., 2002)

เอนไซม์ไลเปส หรือเรียกอีกชื่อว่าไทรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (Triacylglycerol acylhydrolase) มีรหัสตามระบบ คือ EC 3.1.1.3 จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (Hydrolase) ที่ประกอบด้วย เอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) เอนไซม์โปรติเอส (Protease) และเอนไซม์ฮาโลเพอ-รอกซิเดส (Haloperoxidase) เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) สลายพันธะเอสเทอร์ของไทรกลี-เซอไรด์ (Triglyceride) ได้เป็นกลีเซอไรด์ (Glyceride) และกรดไขมัน รวมทั้งสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับในสภาวะที่ไม่มีน้ำ (มีตัวทำละลายอินทรีย์) หรือในสภาวะที่มีน้ำน้อย สร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันและแอลกอฮอล์สายสั้นที่รู้จักดีในชื่อของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

2.1.2 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส (Bornscheuer et al., 2002)

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสมักเกิดขึ้นที่บริเวณผิวรอยต่อระหว่างชั้นไขมันและน้ำ และจะแสดงคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาสูงในสภาวะที่ไม่มีน้ำ เช่น ในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการทำงานของไฮโดรโฟบิกโอลิโกเปปไทด์ (Hydrophobic oligopeptide) ที่อยู่ในบริเวณทางเข้าของบริเวณแอคทีฟ (Active site) ของเอนไซม์ โดยทั่วไปการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้เฉพาะในสภาวะที่ไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) โดยหยดของสารประกอบที่มีไขมันซึ่งมีขนาดเล็กถูกทำให้แตกตัวในน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ ข้อเท็จจริงนี้สัมพันธ์กับการมีของไฮโดรโฟ-บิกโอลิโกเปปไทด์ (ลิ้น (เปิด/ปิด) หรือปีกห้อย) ซึ่งปิดทางเข้าสู่บริเวณแอคทีฟ สภาพแวดล้อมของปฏิกิริยาที่มีการไล่น้ำ ทำให้ลิ้นเปิด/ปิดเลื่อนไปอยู่ข้างๆ สารตั้งต้นที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยาจึงสามารถเข้ามายังพื้นที่ซึ่งถูกปิดไว้ เอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่ที่ได้จากแบคทีเรียจะมีระบบนี้ยกเว้น เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Pseudomonas glumae*, *P. aeruginosa* และ *Candida antarctica* B ซึ่งบรรจุลิ้นเปิด/ปิด (ที่มีขนาดเล็กกว่า) โดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสทุกชนิดจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ช่วยเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด ได้แก่ เซอรีน (Serine), ฮีสทิดีน (Histidine) และแอสปาเทท (Aspartate) (หรือกลูตาเมตในเอนไซม์ไลเปสจำนวน 2 – 3 ชนิด เช่น กลูตาเมตจาก *Geotrichum candidumor* และ *C. rugosa*) โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์ไลเปสแสดงดังรูปที่ 2-1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

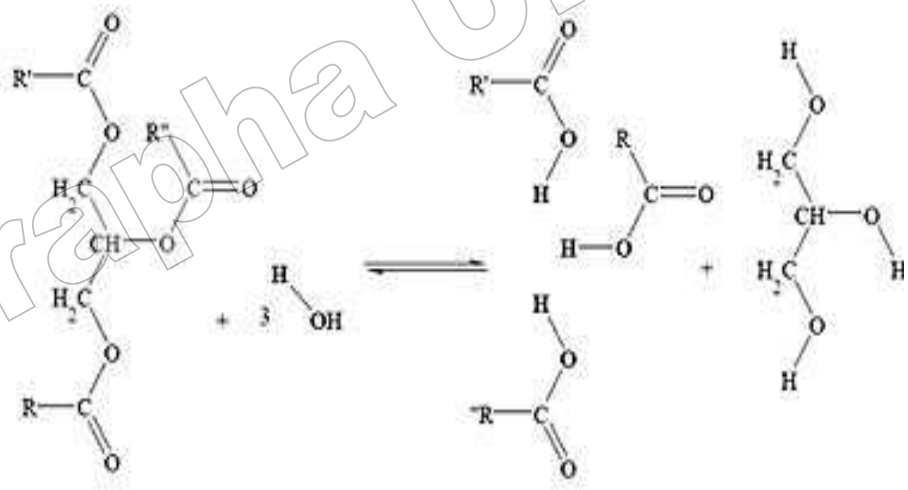


รูปที่ 2-1 โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์ไลเปส
(ที่มา : Bornscheuer et al., 2002)

2.1.3 ปฏิกิริยาที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (http://www.biodiesel.rdi.ku.ac.th สืบค้นเมื่อ 17/01/2552)

2.1.3.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

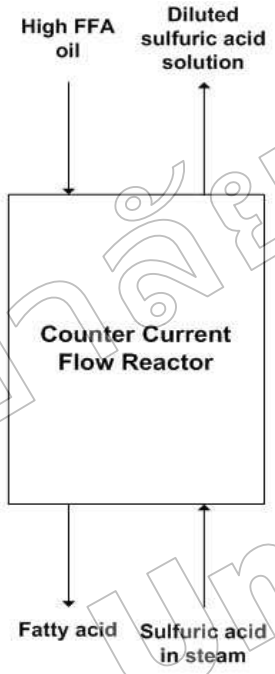
เป็นวิธีการหนึ่งในการผลิตไบโอดีเซลจากวัตถุดิบราคาถูกที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง ทำโดยการเปลี่ยนน้ำมันพืชตั้งต้นทั้งหมดเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในสภาวะที่มีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส
(ที่มา : http://www.biodiesel.rdi.ku.ac.th สืบค้นเมื่อ 17/01/2552)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปกติขั้นตอนนี้มักทำในเครื่องปฏิกรณ์แบบไหลสวนทางต่อเนื่อง (Counter-current continuous flow reactor) โดยใช้กรดซัลฟิวริกและไอน้ำช่วยเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 2-3) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกรดไขมันบริสุทธิ์และกลีเซอรอล สิ่งเจือปนอื่นๆ ที่ผสมอยู่ในวัตถุดิบน้ำมันส่วนใหญ่จะปะปนในชั้นกลีเซอรอล และบางส่วนจะออกมาพร้อมกับไอน้ำและน้ำ กรดไขมันบริสุทธิ์จะถูกป้อนเข้าเครื่องปฏิกรณ์แบบไหลสวนทางอีกเครื่องหนึ่ง เพื่อทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) โดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อไป

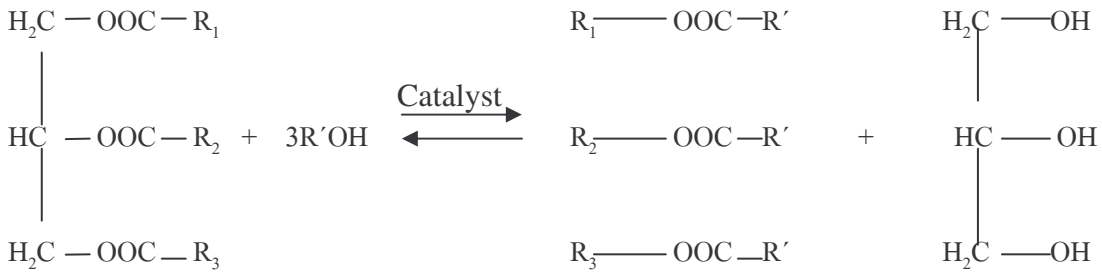


รูปที่ 2-3 การไฮโดรไลซิสวัตถุดิบน้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงในเครื่องปฏิกรณ์แบบไหลสวนทางต่อเนื่อง (ที่มา : http://www.biodiesel.rdi.ku.ac.th สืบค้นเมื่อ 17/01/2552)

2.1.3.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

เป็นการทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างไขมันหรือน้ำมันในรูปของไทรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์สายสั้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์หรือที่รู้จักในชื่อไบโอดีเซลและกลีเซอรอล โดยมีตัวเร่งช่วยในปฏิกิริยาให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น (Ma et al., 1999) ดังแสดงปฏิกิริยาในรูปที่ 2-4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไทรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
(ที่มา: Ma et al., 1999)

การนำตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะช่วยทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีและผลิตภัณฑ์เกิดได้ดีขึ้น โดยชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถแบ่งได้ดังนี้ (Marchetti et al., 2005)

ก. ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (Base catalyst)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียม-ไฮดรอกไซด์ ซึ่งควรใช้ทำปฏิกิริยากับเมทานอลหรือเอทานอล โดยน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นจะเป็นชนิดใดก็ได้เช่น น้ำมันดิบ (Crude Oil) น้ำมันที่ใช้แล้ว (Wasting oil) เป็นต้น ก่อนทำปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชันควรเปลี่ยนจากรูปเบส (NaOH, KOH) ไปเป็นในรูปของสารประกอบอัลคอกซี (Alcoxy compound) ก่อน โดยการเตรียมสารประกอบอัลคอกซีให้ทำปฏิกิริยาดังแสดงในรูปที่ 2-5

รูปที่ 2-5 ปฏิกิริยาเคมีในการเตรียมสารประกอบอัลคอกซี
(ที่มา: Marchetti et al., 2005)

ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสนี้จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกทั้งยังให้ผลิตภัณฑ์ (ไบโอดีเซล) ในปริมาณที่สูงกว่าอีกด้วย (Ma et al., 1999) สำหรับข้อจำกัดของตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบสคือ หากมีน้ำและปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมันดิบ (Free fatty acid) อยู่ในระบบของการเกิดปฏิกิริยาในปริมาณมากจะทำให้มีสบู่เกิดขึ้นแทนที่จะได้น้ำมันไบโอดีเซลเป็นผลิตภัณฑ์

ข. ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรด (Acid catalyst)

กรดที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำมันไบโอดีเซลในปริมาณมากแต่ปฏิกิริยาจะเกิดช้ามาก อาจจะใช้เวลามากกว่า 1 วันกว่าปฏิกิริยาจะ

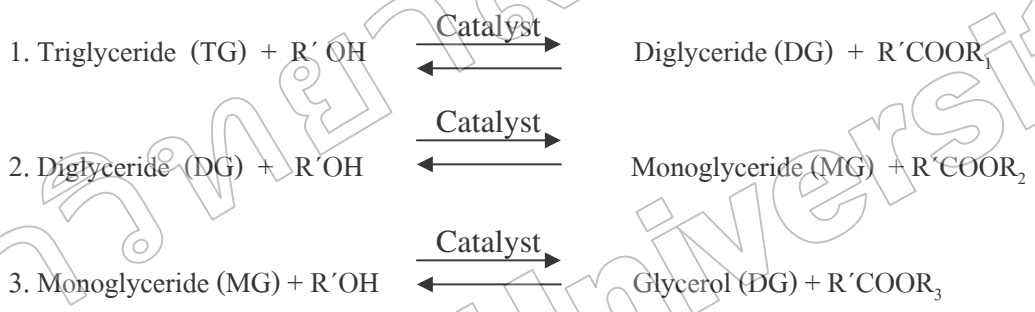
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เกิดอย่างสมบูรณ์ โดยทั่วไปตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดกรดสามารถใช้ได้ดีกับกลีเซอไรด์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและน้ำในปริมาณสูง เช่น ในน้ำมันที่ใช้แล้ว เป็นต้น (Fukuda et al., 2001)

ค. เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปสถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการต่างๆ เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) และแอซิโดไลซิส (Acidolysis) ข้อดีของเอนไซม์ไลเปส คือ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก หากใช้ในรูปของเอนไซม์ตรึง และไม่มีของเสียออกมาจากกระบวนการผลิต แต่ข้อเสียของเอนไซม์คือมีราคาค่อนข้างแพง (Fukuda et al., 2001)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยแบบผันกลับได้ 3 ขั้นตอนย่อย คือ เริ่มจากไทรกลีเซอไรด์ เปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) และโมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ตามลำดับ สุดท้ายได้เป็นเอสเทอร์กับกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2-6 จากกลไกข้างล่างพบว่าแต่ละขั้นตอนย่อยจะได้ 1 โมลของเอสเทอร์เกิดขึ้น



รูปที่ 2-6 กลไกของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ (ที่มา: Fukuda et al., 2001)

ตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน สามารถแบ่งได้เป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กรด หรือเอนไซม์ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดได้เร็วกว่าเมื่อใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามหากสารตั้งต้นเป็นกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันอิสระในปริมาณมากและมีน้ำผสมอยู่ด้วย การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะกว่า (Ma et al., 1999) ตารางที่ 2-1 แสดงเปรียบเทียบข้อแตกต่างในการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กรด และเอนไซม์ นอกจากนี้เคยมีรายงานว่าเมื่อใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเบสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 – 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ (Yield) ร้อยละ 94 – 99 การเพิ่มปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาเบสไม่ได้เป็นการช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดมากขึ้น แต่กลับเพิ่มค่าใช้จ่ายในขั้นตอนของการล้างเอาตัวเร่งปฏิกิริยาเบสออกจากผลิตภัณฑ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-1 การเปรียบเทียบข้อแตกต่างในการผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส กรด และเอนไซม์

ตัวแปร	ตัวเร่งชนิดเบส	ตัวเร่งชนิดกรด	เอนไซม์ไลเปส
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	60-70	55-80	30-40
กรดไขมันอิสระในน้ำมัน	เกิดสบู่	เกิดเอสเทอร์	เกิดเอสเทอร์
น้ำในน้ำมัน	มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยา	มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยา	ไม่มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยา
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง
การกำจัดกลีเซอรอลออกจากผลิตภัณฑ์	ยาก	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ทำการล้างซ้ำ	ทำการล้างซ้ำ	ไม่ต้องล้าง
ราคา	ถูก	ถูก	ค่อนข้างแพง

(ที่มา: Marchetti et al., 2005)

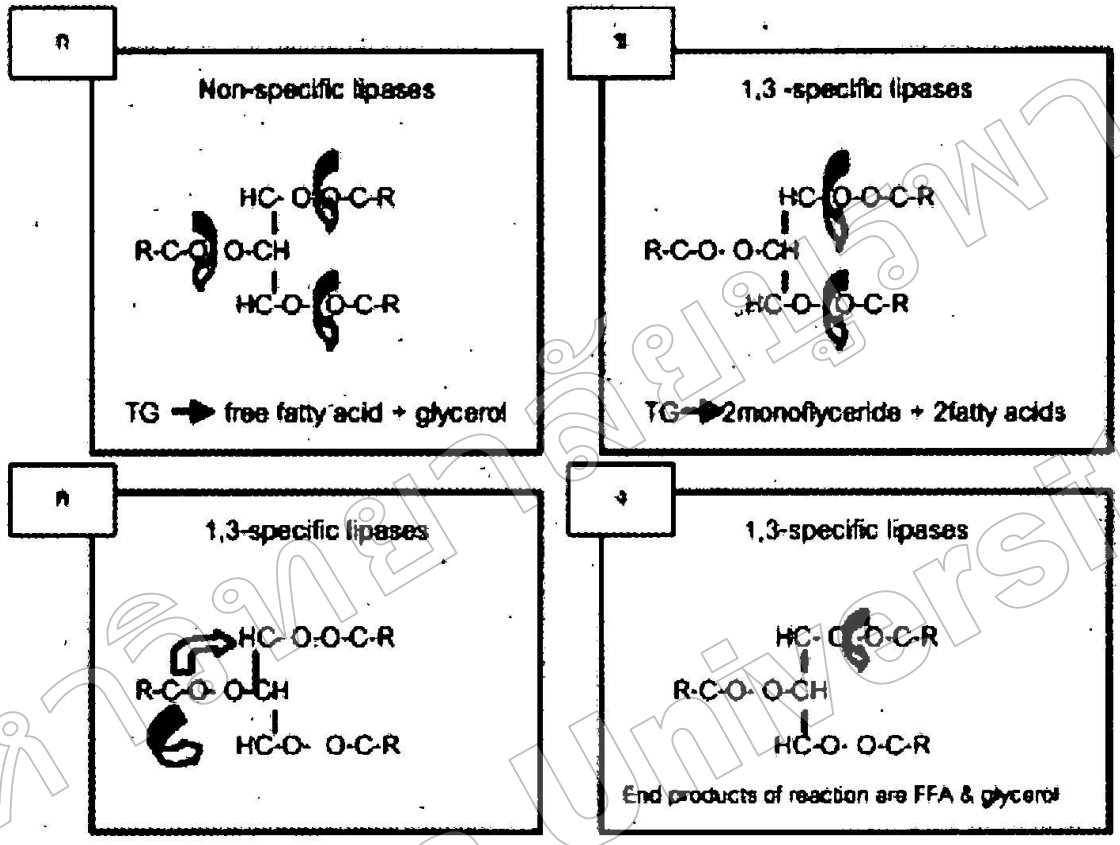
2.1.4 ความจำเพาะ (Specificity) ของเอนไซม์ไลเปส มี 3 ลักษณะคือ (ณกัญภัทร จินดาและทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง, 2549)

ก. ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งมี 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1, 3 *Sn* specificity) บนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโมเลกุลน้ำมัน (รูปที่ 2-7ข) เอนไซม์กลุ่มนี้มักถูกนำไปใช้เร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เป็นแอลกอฮอล์อันดับที่หนึ่ง (Primary alcohol) และไดออล (Diol) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์กลุ่มนี้มักได้จากแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas sp., Bacillus thermoleovorans* ID-1, *B. sterothermophilus* L1 และ *B. thermocatenulatus* (Sugihara et al., 1994; Rua et al., 1997; Schmidt-Dannert et al., 1994; Gao et al., 2000) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 (2 *Sn* specificity) บนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่พบในเนื้อเยื่อสัตว์และเชื้อรา เช่นจากตับอ่อน และ *Rhizopus niveus* เป็นต้น (Bornscheuer et al., 1999) กลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่ไม่จำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์ (Okumura et al., 1979) เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาตรงพันธะเอสเทอร์ทั้ง 3 ตำแหน่ง จากปฏิกิริยานี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีทั้งกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ (รูปที่ 2-7ก) และสามารถใช้กับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สับสเตรทที่เป็นแอลกอฮอล์อันดับหนึ่งและสองในปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ได้ (Okumura et al.,1979) ส่วนใหญ่ได้จาก *Geotrichum candidum* และ *P. cyclipium* (Rua et al., 1997; Gao et al., 2000)



รูปที่ 2-7 การเร่งปฏิกิริยาตรงพันธะเอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (ก) และของเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์โดยตัดที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 (ข), ตำแหน่งที่ 3 (ค), และตำแหน่งที่ 1 (ง)
(ที่มา : Ghazali et al., 1995)

ข. ความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันหรือชนิดสับสเตรท

การทราบว่าเอนไซม์แต่ละตำแหน่งมีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดใดนั้นเป็นข้อมูลที่ช่วยให้มีการเลือกใช้เอนไซม์ให้เหมาะสมกับสับสเตรท Jacobsen และ Poulsen (1995) ได้ศึกษาสับสเตรทที่เหมาะสมต่อไอโซไซม์ (Isozyme) 2 ชนิด คือชนิด A และ B ของเอนไซม์ไลเปสจาก *G. candidum* พบว่า ไอโซไซม์ชนิด A ไม่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมัน ส่วนไอโซไซม์ชนิด B มีความจำเพาะต่อกรดโอเลอิค (C18:1) ขณะที่เอนไซม์ไลเปสจาก *Trichoderma* sp. AM 076 มีความจำเพาะต่อ 9, 12 cis hexadecadienoic (16:2ω4) acid (Selmi et al., 1998) นอกจากนี้ Rathi และคณะ (2001)

พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมัสตาด และน้ำมันลินซีด (Linseed oil) ได้ดีกว่า น้ำมันสะเดา น้ำมันละหุ่ง ถั่วบด (groundnut) และน้ำมันมะพร้าว ขณะที่ Litthauer et al. (2002) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *P. luteola* มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นโมโนเอสเทอร์ (Monoester) ส่วนเอนไซม์จาก *Candida deformans* มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 ของเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้น (Vaysse et al., 2002) บ่อยครั้งที่การทำงานของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับความยาวของสายกรดไขมัน ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสหลายชนิดจึงเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง เช่นเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger* (Iwai & Tsujisaka, 1984 อ้างถึงใน ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง, 2549) และเอนไซม์ไลเปสบางชนิดมีความจำเพาะต่ออันดับของพันธะคู่ในสายของกรดไขมัน เช่น ไลเปสจาก *G. candidum* มีความจำเพาะต่อพันธะคู่ตำแหน่งที่ 9 ของกรดไขมันโอเลอิค เป็นต้น (Macrae, 1985) ในปี ค.ศ. 2000 Xu ได้รายงานว่าความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อขนาดของกรดไขมันนั้นมีผลต่อตำแหน่งที่จะสร้างพันธะเอสเทอร์บนโมเลกุล ไทรกลีเซอไรด์ จากความรู้นี้ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ไทรกลีเซอไรด์กลุ่มใหม่ที่เรียกว่า สตรัคเจอร์ไทรเอซิลกลีเซอรอล (Structured triacylglycerols) ดังเช่นรายงานของ Zhou และคณะ (2001) ที่สังเคราะห์น้ำมันจากผลเรปซีด (rapeseed) ที่ให้พลังงานน้อยลง โดยการแทนที่กรดไขมันบนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์ด้วยกรดคาโปรอิคโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ทำให้น้ำมันชนิดใหม่นี้มีปริมาณกรดคาโปรอิคมากขึ้น

ค. ความจำเพาะต่อไอโซเมอร์ (Stereochemical specificity)

ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไทรกลีเซอไรด์และสับสเตรทเป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับการนำไปใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในระดับอุตสาหกรรม (ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง, 2549)

2.1.5 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืช (จิตติมา เจริญพานิช, 2551)

องค์ประกอบทั่วไปของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ พบว่าประกอบด้วยทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว ทำให้น้ำมันชนิดต่างๆ มีค่าองศาความไม่อิ่มตัว (Iodine number) ที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-2 องค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Carbon atoms: Double bonds	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	Iodine No
Canola oil	-	-	-	0.1	4.0	0.3	1.8	60.9	21.0	8.8	0.7	1.0	0.3	0.7	0.2	100-115
Castor oil	-	-	-	-	2.0	-	1.0	7.0	3.0	-	-	-	-	-	-	81-91
Coconut oil	7.1	6.0	47.1	18.5	9.1	-	2.8	6.8	1.9	0.1	0.1	-	-	-	-	7-12
Corn	-	-	-	0.1	10.9	0.2	2.0	25.4	59.6	1.2	0.4	-	0.1	-	-	118-128
Cottonseed oil	-	-	0.1	0.7	21.6	0.6	2.6	18.6	54.4	0.7	0.3	-	0.2	-	-	98-118
Linseed oil	-	-	-	-	6.0	-	4.0	22.0	16.0	52.0	0.5	-	-	-	-	>177
Olive oil	-	-	-	-	9.0	0.6	2.7	80.3	6.3	0.7	0.4	-	-	-	-	76-88
Palm oil	-	-	0.1	1.0	44.4	0.2	4.1	39.3	10.0	0.4	0.3	-	0.1	-	-	50-55
Palm kernel oil	3.3	3.4	48.2	16.2	8.4	-	2.5	15.3	2.3	-	0.1	0.1	-	-	-	14-19
Peanut oil	-	-	-	0.1	11.1	0.2	2.4	46.7	32.0	-	1.3	1.6	2.9	-	1.5	84-100
Rapeseed oil	-	-	-	0.1	3.8	0.3	1.2	18.5	14.5	11.0	0.7	5.6	0.5	41.1	1.0	100-115
Safflower oil	-	-	-	0.1	6.8	0.1	2.3	12.0	77.7	0.4	0.3	0.1	0.2	-	-	140-150
Safflower oil (high oleic)	-	-	-	0.1	3.6	0.1	5.2	81.5	7.3	0.1	0.4	0.2	1.2	-	0.3	82-92
Soybean oil	-	-	-	0.1	10.6	0.1	4.0	23.3	53.7	7.6	0.3	-	0.3	-	-	123-139
Sunflower oil	-	-	-	0.1	7.0	0.1	4.5	18.7	67.5	0.8	0.4	0.1	0.7	-	-	125-140
Sunflower oil (high oleic)	-	-	-	-	3.7	0.1	5.4	81.3	9.0	-	0.4	-	0.1	-	-	81-91

(ที่มา : จิตติมา เจริญพานิช, 2551)

2.1.6 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Partition coefficient; log *P*)

การกระจายตัวของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นอยู่กับความไม่ชอบน้ำของตัวทำละลายอินทรีย์นั้น ซึ่งแสดงออกมาในรูปของค่า log *P* หรือค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถเลือกกระจายตัวอยู่ในระหว่างชั้นของออกทานอล (Octanol) และในชั้นน้ำในอัตราส่วน 1:1 (Heipieper et al., 2007) โดยทั่วไปตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วต่ำมักมีค่า log *P* สูง ตัวอย่างเช่น ไซลีนและเฮกเซนมีค่า log *P* เท่ากับ 3.1 และ 3.6 ตามลำดับ ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วสูงมีค่า log *P* ที่ต่ำ เช่น อะซิโตร-

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไนไตร์ลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ มีค่า log P เท่ากับ -0.15 และ -1.22 ตามลำดับดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2-3 (Hun et al., 2003) ในระบบที่มีการนำตัวทำละลายอินทรีย์มาประยุกต์ใช้ และต้องใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพนั้น จำเป็นต้องมีการคัดเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์โดยพิจารณาจากค่า log P เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P อยู่ในช่วง 2 ถึง 4 อาจส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (Harold & Tsung, 2002)

ตารางที่ 2-3 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ

ตัวทำละลายอินทรีย์	**Log P**
Acetone	-0.23
Acetonitrile	-0.15
Benzene	2.0
Butanol	0.8
Chloroform	2.0
Decane	5.6
Dimethylsulphoxide	-1.22
Ethanol	-0.24
Ethybenzene	3.1
Heptane	4.0
Hexadecane	8.8
Hexanes	3.6
Isoamyl alcohol	1.1
Isopropanol	0.05
Methanol	-0.8
Styrene	3.0
Toluene	2.3
Xylene	3.1

(ที่มา : Hun et al., 2003)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปีค.ศ. 1991 Sugihara และคณะ ได้ศึกษาชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับในปี ค.ศ. 1993 Lee และคณะ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *P. fluorescens* S1K WI ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงถึง 7,359 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน นอกจากน้ำมันมะกอกแล้ว ในปี ค.ศ. 1992 Papaparaskevas และคณะ รายงานว่าน้ำตาลฟรุคโตส และน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* และพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรุคโตสถึง 12 เท่า อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 2004 Jinda ได้เติมน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* sp. KLB1 เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าการใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 68.54 หน่วยต่อมิลลิกรัม

ในปีค.ศ. 1998 Essamri และคณะ รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *R. oryzae* จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำมันเป็นสารเหนี่ยวนำ จากการเติมน้ำมันชนิดต่างๆ ลงในอาหารสำหรับการผลิต พบว่าทั้งการเจริญของ *R. oryzae* และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่าในอาหารที่ไม่เติมน้ำมันถึง 3 เท่า เช่นเดียวกับรายงานของ Sharon และคณะในปีเดียวกันที่พบว่า *P. aeruginosa* KKA-5 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้นเมื่อเติมน้ำมันละหุ่ง (Castor oil) ความเข้มข้นร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยง และต่อมาในปีค.ศ. 2001 Vanot และคณะ พบว่า *Penicillium cyclopium* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากถึง 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีคอร์นสตีป (Corn steep) และน้ำมันมะกอกความเข้มข้นอย่างละร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ขณะที่การสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสจากการใช้น้ำมันชนิดต่างๆ เป็นสารเหนี่ยวนำร่วมกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และในปีเดียวกัน Rathi และคณะ พบว่าน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสารเหนี่ยวนำที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia cepacia*

จากผลการทดลองในรายงานต่างๆ ข้างต้นจะเห็นว่า น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ต่างกัน ซึ่งเป็นในทำนองเดียวกันกับงานวิจัยของ Maia และคณะในปีค.ศ. 2001 ที่ศึกษาผลของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันงา ไตรโอเลอีน (triolein) น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันจากลูกบาบาสซูนัท (babassu oil) น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Fusarium solani* พบว่าน้ำมันงามีผลทำให้เชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด รองลงมาคือ ไตรโอเลอีน น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันมะกอก ส่วนอาหารที่เติมน้ำมันมะพร้าวให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำที่สุด ซึ่งจากงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แม้ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่ก็มีความสามารถในการใช้น้ำมันแต่ละชนิดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันแต่ละชนิด

ในปีพ.ศ. 2549 กิตติพล กสิภาร์และคณะ ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวันด้วยวิธีทางเคมีและชีวภาพ พบว่าการผลิตที่ใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ *C. antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้น้ำมันเมล็ดทานตะวันดิบหรือไทรกลีเซอไรด์หลงเหลืออยู่ในระบบเป็นจำนวนมาก ขณะที่ไม่พบปริมาณของน้ำมันเมล็ดทานตะวันดิบหรือไทรกลีเซอไรด์ในระบบที่มีการเร่งปฏิกิริยาด้วยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เลย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าระบบที่มีการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *C. antarctica* ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต ซึ่งหากมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจาก *C. Antarctica* อาจทำให้สามารถเพิ่มปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ให้มากขึ้นได้ อีกทั้งไม่สามารถใช้เมทานอลในปริมาณที่สูงกว่านี้ได้เนื่องจากเมทานอลเป็นสารตั้งต้นที่ยับยั้งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปส จึงอาจทำให้ผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ในปริมาณต่ำ ดังนั้นหากมีการรักษาอัตราส่วนโดยโมลของเมทานอลต่อน้ำมันเมล็ดทานตะวันให้อยู่ที่ 3:1 ตลอดปฏิกิริยาโดยอาจใช้ถังปฏิกรณ์แบบ Fed batch อาจทำให้สามารถได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์สูงขึ้นได้

เมื่อเร็วๆ นี้ Winayanuwattikun และคณะ (2008) ศึกษาศักยภาพของวัตถุดิบน้ำมันจากพืชในประเทศไทยสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า มีน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันปาล์ม สบู่ดำ (Physic nut) มะละกอ และเงาะสามารถผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึง Novozyme 435 หรือ Lipozyme RM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีแนวโน้มสูงที่จะนำพืชเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในประเทศไทยได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. กระบอกฉีด (Syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร ยี่ห้อ MIRA ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 10, 100 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท ISOLAB ประเทศเยอรมนี
3. กล้องถ่ายรูป รุ่น IXY DIGITAL 800IS บริษัท Canon ประเทศญี่ปุ่น
4. ขวดมีฝาปิด ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร บริษัท ISOLAB ประเทศเยอรมนี
5. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 1000 บริษัท JENWAY ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น Precisa404A บริษัท Mono Bioc ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifugation) รุ่น J.P.Selecta บริษัท Bio-Active ประเทศสเปน
8. เครื่องผสมสาร (Vortex) รุ่น KS1 บริษัท Velp sciencetifica ประเทศมาเลเซีย
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Hewlett packaro ประเทศเยอรมนี
10. เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น AMA2405 ประเทศอังกฤษ
11. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น HB-1 บริษัท Bio-Active ประเทศสาธารณรัฐไต้หวัน
12. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 850 มิลลิเมตร
13. จุกซิลิโคลน ขนาด 40 มิลลิเมตร บริษัท Toyobo ประเทศญี่ปุ่น
14. ช้อนตักสาร (Spatula) ขนาด 220 มิลลิเมตร
15. ตะเกียงแอลกอฮอล์
16. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) รุ่น BE 500 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมันนี
17. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (Shaking incubator) รุ่น Innova 4230 บริษัทไซแอนติฟิค-โปรโมชั่น ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) บริษัท Clean ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. ตู้อบ (Oven) รุ่น AM003 บริษัท BINDER ประเทศเยอรมันนี
20. ทิปพลาสติก ขนาด 10, 200, 1000 ไมโครลิตร บริษัท Quality Scientific Plastic ประเทศสหรัฐอเมริกา
21. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack) และที่วางหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 200 ไมโครลิตร และ 1.5 มิลลิลิตร
22. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (Magnetic bar) ขนาด 5 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

23. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ขนาด 0.2-2, 1-10, 2-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร บริษัท Finpipette ประเทศฟินแลนด์
24. พาราฟิล์ม บริษัท Pechiney plastic packaging ประเทศสหรัฐอเมริกา
25. เมมเบรนกรองสารแบบฉีด (Syringe filter) รูกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร บริษัท Whatman ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
27. ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
28. หลอดทดลอง ขนาด 10 และ 20 มิลลิลิตร บริษัท PYREX ประเทศญี่ปุ่น
29. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Molecular BioProducts ประเทศแคนาดา
30. อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Agar Bacteriology Grade บริษัท Criterion ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Bacto-tryptone บริษัท BD-Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Gum Arabic บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์
4. Nutrient Broth Chemical Grade บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
5. Rhodamine B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$) MW 479.02 Practical Grade บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย
6. Sodium chloride (NaCl) MW 58.443 Foranalysis Grade บริษัท Carlo erba ประเทศมาเลเซีย
7. Yeast Extract Chemical Grade บริษัท Criterion ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

1. Bovine serum albumin (BSA) บริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Bradford Dye Reagent บริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. Hydrochloric acid (HCl) MW 36.46 ความหนาแน่น 1.180 บริษัท VWR ประเทศสิงคโปร์
4. 4-Nitrophenol บริษัท SIGMA-ALDRICH ประเทศเยอรมันนี
5. 4-Nitrophenyl palmitate FW 377.5 บริษัท SIGMA-ALDRICH ประเทศเยอรมันนี
6. 2-Propanol Analytical Grade บริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. Sodium hydroxide (NaOH) MW 40.00 Analytical Grade บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์
8. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane MW 121.14 Molecular Biology Grade บริษัท Vivantis ประเทศมาเลเซีย
9. Triton X-100 บริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน

3.2.3 น้ำมันที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

1. น้ำมันข้าวโพด ตรา มาโซลา บริษัท ล่ำสูง ประเทศไทย
2. น้ำมันคาโนลา ตรา โกลเด้น ดร็อป บริษัท ไซม์ดาร์บี้ เอดิเบิ้ล โปรดักส์ ลิมิเต็ด ประเทศสิงคโปร์
3. น้ำมันงา ตรา ช้างคู่ บริษัท ชัยเสรี ประเทศไทย
4. น้ำมันดอกคำฝอย ตรา โอไฮโอ บริษัท เซซาฮาล เอช เอ กัวดาลาจารา ฮาล ประเทศเมกซิโก
5. น้ำมันถั่วเหลือง ตรา องุ่น บริษัท น้ำมันพืชไทย ประเทศไทย
6. น้ำมันปาล์ม ตรา โอลีน บริษัท โอลีน ประเทศไทย
7. น้ำมันปาล์มใช้แล้ว ร้านค้าในมหาวิทยาลัยบูรพา
8. น้ำมันเมล็ดชา ตรา เนเชอรอล บริษัท ล่ำสูง ประเทศไทย
9. น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ตรา มรกต บริษัท มรกต อินดัสตรีส์ ประเทศไทย
10. น้ำมันมะกอก ตรา ซาโบรโซ บริษัท อิโฮส เด อิบาร์รา เอส เอ ประเทศสเปน
11. น้ำมันมะพร้าว ผลิตเองจากมะพร้าวกะทิขูด ตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี (ภาคผนวก ก)
12. น้ำมันรำข้าว ตรา คิง บริษัท น้ำมันบริโภคไทย ประเทศไทย
13. น้ำมันหมู ตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี
14. Tributyrin ($C_{15}H_{26}O_6$) Mr 302.37 บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.4 ตัวทำละลายอินทรีย์

1. Acetone (C_3H_6O) MW 58.08 Analytical Grade บริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน
2. Acetonitrile (CH_3CN) MW 41.05 HPLC/Spectroscopy Grade บริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน
3. Benzene (C_6H_6) MW 78.11 Analytical Grade บริษัท Panreac ประเทศสเปน
4. Butanol ($CH_3(CH_2)_2CH_2OH$) FW 74.124 Analytical Grade บริษัท Carlo erba ประเทศอิตาลี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. Chloroform ($CHCl_3$) MW 119.38 Analytical Grade บริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน
6. Decane ($C_{10}H_{22}$) Mr 142.99 Analytical Grade บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
7. Dimethylsulphoxide (CH_3SOCH_3) FW 78.134 Analytical Grade บริษัท Carlo erba ประเทศอิตาลี
8. Ethanol (C_2H_6O) Mr 46.070 Analytical Grade บริษัท Carlo erba ประเทศอิตาลี
9. Ethybenzene (C_8H_{10}) Mr 106.17 Analytical Grade บริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
10. Heptane ($CH_3(CH_2)_5CH_3$) MW 100.21 Analytical Grade บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์
11. Hexadecane ($C_{16}H_{34}$) Mr 226.45 Analytical Grade บริษัท Fluka ประเทศเยอรมันนี
12. Hexane (C_6H_{14}) FW 86.18 Analytical Grade บริษัท Mallinckrodt chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Isoamyl alcohol ($C_5H_{11}OH$) MW 88.15 Analytical Grade บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์
14. Methanol (CH_4O) MW 32.04 Analytical Grade บริษัท VWR International S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส
15. 2-Propanol (C_3H_8O) MW 60.00 Analytical Grade บริษัท Scharlau Chemie S.A. ประเทศสเปน
16. Styrene (C_8H_8) MW 104.15 Analytical Grade บริษัท Acros ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. Toluene ($C_6H_5CH_3$) Mr 92.142 Analytical Grade บริษัท Carlo erba ประเทศอิตาลี
18. Xylene ($C_6H_4(CH_3)_2$) MW 106.17 Analytical Grade บริษัท Panreac ประเทศสเปน

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์

สุ่มเก็บตัวอย่างตะกอน, กรวด, โคลน, น้ำทะเล, ดินและน้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดชลบุรีจำนวนทั้งหมด 9 แหล่ง ได้แก่ ตะกอนจากทะเล, น้ำทะเล, กรวดและโคลนจากท่อระบายน้ำและน้ำจากท่อน้ำทิ้งบริเวณชุมชนสะพานปลา อ่างศิลา กรวดจากท่อระบายน้ำ, โคลนจากท่อน้ำทิ้งและน้ำในสระบัวบริเวณหลังอาคารสิรินธร และน้ำจากท่อน้ำทิ้งและน้ำเสียบริเวณอาคารวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ทดสอบการเจริญโดยการเลี้ยงบำรุง 7 ครั้ง ในอาหารเจือจาง LB (0.2x LB) ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulphoxide) เมทานอล (Methanol) เอทานอล (Ethanol) อะซิโตน (Acetone) อะซิโตร-

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไนไตร์ล (Acetonitrile) ไอโซโพรพานอล (Isopropanol) บิวทานอล (Butanol) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เบนซีน (Benzene) โทลูอีน (Toluene) สไตรลีน (Styrene) ไซลีน (Xylene) เอทิลเบนซีน (Ethybenzene) เฮกเซน (Hexane) เฮบเทน (Heptane) ดีเคน (Decane) และเฮกซะดีเคน (Hexadecane) ที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ ร้อยละ 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, และ 75 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อ นำเชื้อเจริญปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 ไมโครลิตร มากระจาย (spread) ลงบนอาหารแข็ง NB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส

ลงเชื้อที่คัดแยกได้จากข้อ 3.3.1ในอาหารเหลว NB นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนใส (Supernatant) ซึ่งคาดว่าคือสารละลายเอนไซม์ไลเปส วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford (BioRad) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) ดังแสดงในภาคผนวก ข และวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสับสเตรทพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตท (*p*-nitrophenylpalmitate; pNPP) ได้เป็นพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ในเวลา 5 นาที 1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณโปรตีนที่สามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่สภาวะที่ทำปฏิกิริยา (ภาคผนวก ค) ชุดควบคุมใช้น้ำแทนสารละลายเอนไซม์ ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (Triplicate) เลือกเชื้อที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสสูงสุด มาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.3 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยโรดามีนบี

คัดแยกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ 1) เขี่ยเชื้อ (Streak) บนอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสับสเตรท และโรดามีน บี ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวบ่งชี้ และ 2) ทำโดยลงเชื้อในอาหารเหลว NB นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส ซึ่งคาดว่าคือสารละลายเอนไซม์ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ปริมาตร 12 ไมโครลิตร หยอดลงในรูกลมบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปริมาตร) เป็นสับสเตรท และโรดามีน บี ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวบ่งชี้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 และ 48 ชั่วโมง ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง นำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

3.3.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อน้ำมันพืช

นำเชื้อที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ได้จากการวิเคราะห์ในหัวข้อ 3.3.2 และ 3.3.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสจากปริมาณการเรืองแสงยูวีบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนล่า น้ำมันงา น้ำมันหมู น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและไตรบิวทิลินเป็นสับสเตรท และโรดามีน บี ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวบ่งชี้ เมื่อบ่มเชื้อหรือสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 และ 48 ชั่วโมง ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง นำมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

3.3.5 การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันพืช

นำเชื้อที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ได้จากการวิเคราะห์ในหัวข้อ 3.3.2 และ 3.3.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวเจือจาง LB (0.2x LB) ที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนล่า น้ำมันงา น้ำมันหมู น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและไตรบิวทิลินเป็นสับสเตรท ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนใส ซึ่งคาดว่าคือสารละลายเอนไซม์ไลเปส ทำการวัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส ดังวิธีที่อธิบายมาแล้วในหัวข้อ 3.3.2 ชุดควบคุม คือ อาหารเจือจางที่ไม่ใส่น้ำมัน ดูการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมัน จากค่าแอคติวิตี้จำเพาะที่คำนวณได้ ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์

เมื่อนำตัวอย่างน้ำทะเล ตะกอนทะเล กรวด น้ำ โคลนและน้ำจากท่อน้ำทิ้งที่สุ่มเก็บมาจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดชลบุรี 9 แหล่ง มาคัดแยกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการเลี้ยงบำรุง 7 ครั้ง ในอาหารเจือจาง LB (0.2x LB) ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ต่างกัน ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน อะซิโตรไนไตร์ล ไอโซโพรพานอล บิวทานอล ไอโซเอมิล-แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม เบนซีน โทลูอีน สไตรลีน ไซลีน เอทิลเบนซีน เฮกเซน เฮบเทน ดีเคน และเฮกซะดีเคน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังอธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.1 พบโคโลนีแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดและความเข้มข้นต่างกัน ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันและพบจากแหล่งตัวอย่างที่ต่างกันทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท สรุปดังตารางที่ 4-1

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส

เมื่อนำแบคทีเรีย 20 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงเก็บสารละลายเอนไซม์ ดังที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.2 นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส พบว่าแบคทีเรียทั้งหมด 20 ไอโซเลท แสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสได้โดย แบคทีเรียที่แสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ แบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกมาจากตะกอนทะเลใกล้สะพานปลา อ่างศิลา ซึ่งให้ค่าแอคติวิตี้ทั้งหมดเท่ากับ 4.01±0.01 หน่วย, ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.91±0.01 มิลลิกรัมและมีค่าแอคติวิตี้จำเพาะ (Specificity activity) เท่ากับ 4.41±0.02 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดแยกได้ 20 ไอโซเลท

ไอโซเลทที่	ลักษณะโคโลนี	แหล่งที่พบ	ชนิดและความเข้มข้นสูงสุด (ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เจริญได้
1	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	ตะกอนจากทะเลใกล้สะพานปลาอ่างศิลา	อะซิโตน (log *P* = -0.23, 5%) บิวทานอล (log *P* = 0.8, 1%) เฮกซาดีเคน (log *P* = 8.8, 25%)
2	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก มันวาว	ตะกอนจากทะเลใกล้สะพานปลาอ่างศิลา	DMSO (log *P* = -1.22, 5%) อะซิโตน (log *P* = -0.23, 5%) อะซิโตไนไตร์ (log *P* = -0.15, 5%) เฮกซาดีเคน (log *P* = 8.8, 75%)
3	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก ไม่มันวาว	ตะกอนจากทะเลใกล้สะพานปลาอ่างศิลา	อะซิโตน (log *P* = -0.23, 5%)
4	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก ไม่มันวาว	กรวดจากท่อระบายน้ำบริเวณอ่างศิลา	โทลูอีน (log *P* = 2.3, 25%)
5	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	กรวดจากท่อระบายน้ำบริเวณอ่างศิลา	เมทานอล (log *P* = -0.8, 5%)
6	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก ไม่มันวาว	กรวดจากท่อระบายน้ำอาคารสิรินธร	ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (log *P* = 1.1, 0.5%)
7	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	โคลนจากท่อน้ำทิ้งอาคารสิรินธร	เมทานอล (log *P* = -0.8, 5%)
8	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	โคลนจากท่อน้ำทิ้งอาคารสิรินธร	ดีเคน (log *P* = 5.6, 75%)
9	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก มันวาว	โคลนจากท่อน้ำทิ้งอาคารสิรินธร	เมทานอล (log *P* = -0.8, 5%)
10	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	น้ำในสระบัวบริเวณหลังอาคารสิรินธร	เอทานอล (log *P* = -0.24, 5%) อะซิโตน (log *P* = -0.23, 5%) เฮกซาดีเคน (log *P* = 8.8,75%)
11	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก มันวาว	น้ำในสระบัวบริเวณหลังอาคารสิรินธร	DMSO (log *P* = -1.22, 5%)
12	สีส้ม จุดกลม ขอบหยัก มันวาว	น้ำในสระบัวบริเวณหลังอาคารสิรินธร	ไอโซโพรพานอล (log *P* = 0.05, 3%)
13	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	น้ำทะเลอ่างศิลา	เอทานอล (log *P* = -0.24, 3%)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดแยกได้ 20 ไอโซเลท (ต่อ)

ไอโซเลทที่	ลักษณะโคโลนี	แหล่งที่พบ	ชนิดและความเข้มข้นสูงสุด (ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เจริญได้
14	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก ไม่มันวาว	น้ำทะเลอ่างศิลา	เบนซีน (log *P* = 2.0, 3%)
15	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก มันวาว	น้ำทะเลอ่างศิลา	ดีเคน (log *P* = 5.6, 75%)
16	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	น้ำจากท่อน้ำทิ้งอาคารวิทยาศาสตร์การอาหาร	เอทานอล (log *P* = -0.24, 5%)
17	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก มันวาว	น้ำจากท่อน้ำทิ้งอาคารวิทยาศาสตร์การอาหาร	เอทานอล (log *P* = -0.24, 5%)
18	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบหยัก ไม่มันวาว	น้ำจากท่อน้ำทิ้งอาคารวิทยาศาสตร์การอาหาร	เบนซีน (log *P* = 2.0, 3%)
19	สีแดง จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	น้ำจากท่อน้ำทิ้งอ่างศิลา	เมทานอล (log *P* = -0.8, 5%)
20	สีขาวขุ่น จุดกลม ขอบเรียบ มันวาว	น้ำจากท่อน้ำทิ้งอ่างศิลา	เมทานอล (log *P* = -0.8, 5%)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 20 ไอโซเลท

ไอโซเลทที่	แอคติวิตี้ทั้งหมดของไลเปส (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตี้จำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
1	4.01±0.01	0.91±0.01	4.41±0.02
2	0.05±0.01	1.06±0.04	0.05±0.03
3	0.53±0.02	1.10±0.03	0.48±0.03
4	0.04±0.02	0.52±0.01	0.08±0.02
5	0.32±0.03	1.05±0.02	0.30±0.03
6	0.01±0.01	0.53±0.02	0.02±0.01
7	0.14±0.08	0.73±0.04	0.20±0.06
8	0.02±0.02	0.74±0.03	0.03±0.02
9	0.38±0.02	0.54±0.02	0.70±0.02
10	0.04±0.01	0.89±0.007	0.05±0.01
11	0.02±0.03	0.64±0.01	0.03±0.06
12	0.03±0.01	0.22±0.01	0.13±0.02
13	0.07±0.02	0.57±0.002	0.12±0.01
14	0.02±0.02	0.45±0.01	0.04±0.05
15	0.02±0.04	0.74±0.03	0.03±0.07
16	0.52±0.03	1.13±0.28	0.46±0.06
17	0.08±0.02	0.83±0.01	0.10±0.03
18	0.02±0.03	0.86±0.01	0.02±0.01
19	0.04±0.02	0.96±0.02	0.04±0.01
20	0.06±0.03	0.98±0.01	0.06±0.02

หมายเหตุ : ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard derivative ; SD)

4.3 การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยโรดามีนบี

การยืนยันการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยใช้อาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท และมีโรดามีน บี เป็นตัวบ่งชี้ ดังวิธีที่ได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อ 3.3.3 พบว่า โคโลนี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

และส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเชื้อเจริญของไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าบางไอโซเลทสามารถเรืองแสงได้เล็กน้อยและบางไอโซเลทดูเหมือนว่าจะไม่เรืองแสงสีส้ม เมื่อส่องภายใต้แสงยูวี จะมีแต่ไอโซเลทที่ 1 ที่ให้การเรืองแสงสีส้มเด่นชัดที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4-1

รูปที่ 4-1 การเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของส่วนใส (ซ้าย) และโคโลนี (ขวา) ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อเจริญในอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสับสเตรท และมีโรดามีน บี ความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นตัวบ่งชี้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อน้ำมันพืช

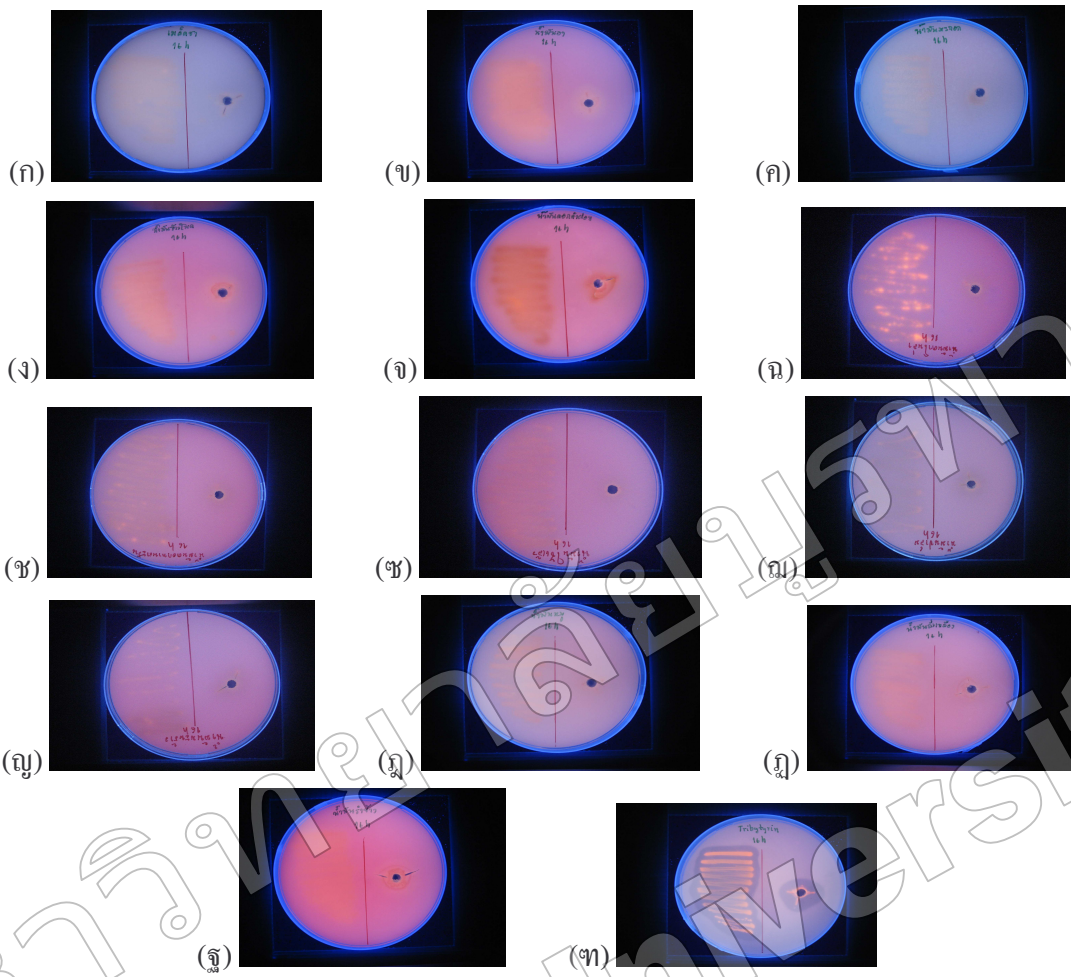
เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่แสดงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด มาทดสอบความจำเพาะต่อน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นสับสเตรท ในอาหารแข็งที่มีโรดามีนบีเป็นตัวบ่งชี้และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันที่ให้การเรืองแสงมากที่สุดภายใต้แสงยูวีเรียงตามลำดับมากไปน้อย คือ น้ำมันดอกคำฝอย (+5) > น้ำมันรำข้าวและไตรบิวทิลิน (+4) > น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันคาโนล่า (+3) > น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้ว น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันหมู (+2) > น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดชาและน้ำมันมะกอก (+1) ตามลำดับ และเมื่อบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง น้ำมันที่ให้การเรืองแสงมากที่สุดภายใต้แสงยูวีเรียงตามลำดับมากไปน้อย คือ น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันรำข้าว (+5) > น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์มที่ใช้แล้วและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (+4) > น้ำมันคาโนล่า น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าวและไตรบิวทิลิน (+3) > น้ำมันเมล็ดชาและน้ำมันมะกอก (+2) ดังสรุปในตารางที่ 4-3 รูปที่ 4-2 และรูปที่ 4-3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-3 ความเข้มในการเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของเชื้อและสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย ไอโซเลทที่ 1 ที่คัดเลือกได้เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 และ 48 ชั่วโมง ในอาหารแข็งโรดามีนบีที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นสับสเตรท

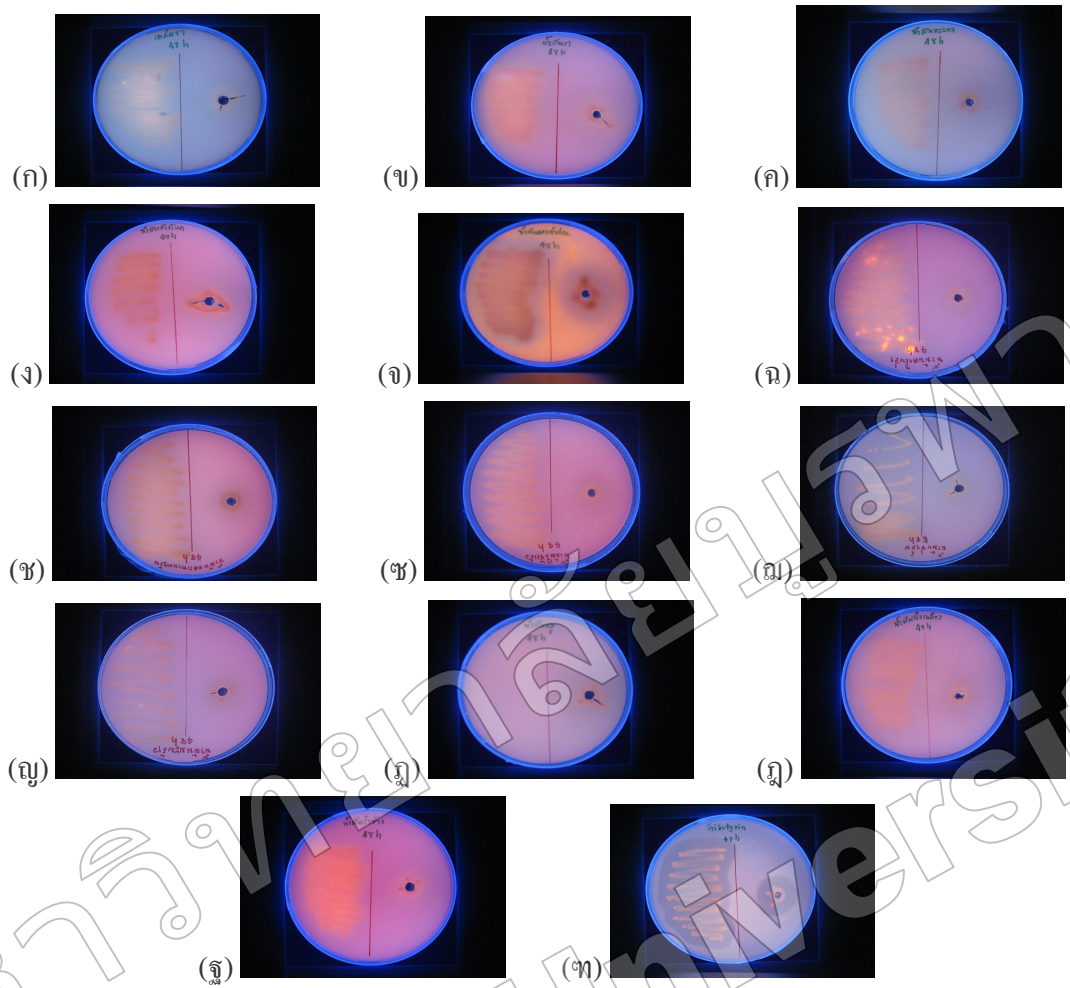
ชนิดของน้ำมัน	**เวลาบ่ม**	
	16 ชั่วโมง	**48 ชั่วโมง**
ข้าวโพด	+3	+4
คาโนล่า	+3	+3
งา	+2	+3
ดอกคำฝอย	+5	+5
ถั่วเหลือง	+2	+3
ปาล์ม	+1	+3
ปาล์มใช้แล้ว	+2	+4
เมล็ดชา	+1	+2
เมล็ดดอกทานตะวัน	+2	+4
มะกอก	+1	+2
มะพร้าว	+2	+3
รำข้าว	+4	+5
หมู	+2	+1
ไตรบิวทิลิน	+4	+3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-2 การเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของโคโลนี (ซ้าย) และส่วนใส (ขวา) ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บนอาหารแข็งที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสับสเตรทและมีโรดามีนบีความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 เป็นตัวบ่งชี้ ก) น้ำมันเมล็ดชา ข) น้ำมันงา ค) น้ำมันมะกอก ง) น้ำมันข้าวโพด จ) น้ำมันดอกคำฝอย ฉ) น้ำมันคาโนล่า ช) น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ซ) น้ำมันปาล์มใช้แล้ว ฌ) น้ำมันปาล์ม ญ) น้ำมันมะพร้าว ฎ) น้ำมันหมู ฏ) น้ำมันถั่วเหลือง ฐ) น้ำมันรำข้าว ฑ) ไตรบิวทิลิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-3 การเรืองแสงสีส้มภายใต้แสงยูวีของโคโลนี (ซ้าย) และส่วนใส (ขวา) ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็งที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสับสเตรทและมีโรดามีนบีความเข้มข้นร้อยละ 0.0001 เป็นตัวบ่งชี้ ก) น้ำมันเมล็ดชา ข) น้ำมันงา ค) น้ำมันมะกอก ง) น้ำมันข้าวโพด จ) น้ำมันดอกคำฝอย ฉ) น้ำมันคาโนล่า ช) น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ซ) น้ำมันปาล์มใช้แล้ว ฌ) น้ำมันปาล์ม ญ) น้ำมันมะพร้าว ฎ) น้ำมันหมู ฏ) น้ำมันถั่วเหลือง ฐ) น้ำมันรำข้าว ฑ) ไตรบิวทิลิน

4.5 การเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันพืช

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 มาทดสอบการเหนี่ยวการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ดังที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.5 พบว่าน้ำมันที่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันงา น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันและน้ำมันรำข้าว โดยให้ค่าแอคติวิตี้จำเพาะเท่ากับ 5.52, 7.35, 5.53, 2.44, และ 3.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 4-4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-4 ค่าแอคติวิตี้ทั้งหมด ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 เมื่อถูกเหนี่ยวนำการแสดงออกโดยน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ร้อยละ 0.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเจือจาง LB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของน้ำมันที่เหนี่ยวนำ	แอคติวิตี้ทั้งหมดของไลเปส (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิตี้จำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
ตัวควบคุม	3.78±0.13	2.01±0.09	1.88±0.15
ข้าวโพด	2.92±0.21	0.53±0.42	5.51±0.28
คาโนล่า	2.88±0.11	1.31±0.22	2.20±0.14
งา	3.44±0.05	0.47±0.06	7.32±0.09
ดอกคำฝอย	1.22±0.08	0.66±0.12	1.85±0.18
ถั่วเหลือง	2.32±0.23	1.31±0.21	1.77±0.32
ปาล์ม	3.40±0.12	0.61±0.05	5.57±0.19
ปาล์มใช้แล้ว	1.90±0.24	1.57±0.16	1.21±0.13
เมล็ดชา	1.38±0.03	1.44±0.07	0.96±0.04
เมล็ดดอกทานตะวัน	4.57±0.39	1.87±0.28	2.44±0.24
มะกอก	2.75±0.16	1.55±0.25	1.77±0.19
มะพร้าว	0.57±0.03	0.81±0.09	0.70±0.06
รำข้าว	4.54±0.06	1.47±0.11	3.09±0.20
หมู	1.00±0.17	0.54±0.23	1.85±0.21
ไตรบิวทิลิน	0.72±0.07	1.53±0.04	0.47±0.03

หมายเหตุ : ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในการผลิตไบโอดีเซล ข้อดีของเอนไซม์ไลเปส คือ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกหากอยู่ในรูปเอนไซม์ตรึงและไม่มีของเสียอันตรายออกมาจากกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามจากข้อเสียเปรียบของเอนไซม์ไลเปส คือ มีราคาค่อนข้างแพง (Fukuda et al., 2001) และสูญเสียสภาพได้ง่าย ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมักเป็นสภาวะที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำให้มีคณะผู้วิจัยจำนวนมากพยายามที่จะปรับปรุงคุณภาพและความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส โดยการดัดแปลงสับสเตรทที่เหมาะสม (Substrate engineering) การดัดแปลงสูตรอาหารในการผลิตเอนไซม์ (Medium engineering) และรวมทั้งการดัดแปลงโครงสร้างของเอนไซม์เองโดยเทคนิคทางวิศวกรรมโปรตีน (Protein engineering) (Bornscheuer et al., 2002) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็เป็นวิธีที่มีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง แบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งคาดว่าจะมีความเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์และยังเป็นวิธีที่ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการผลิตเอนไซม์ไลเปสอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียนั้นสามารถเลี้ยงให้เจริญได้ง่าย ในระยะเวลาอันสั้น และผลิตได้ในปริมาณมาก เมื่อนำตัวอย่างโคลน ตะกอน และน้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดชลบุรีจำนวน 9 แหล่ง มาทำการเลี้ยงบำรุง 7 ครั้ง ในอาหารเจือจาง LB (0.2X LB) ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดและที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าอาหารเหลวมีลักษณะขุ่น แสดงถึงการเจริญของแบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ และเมื่อนำเชื้อเจริญที่ได้มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ปกคลุมในความเข้มข้นเช่นเดียวกับในอาหารเหลว พบโคโลนีแบคทีเรียเจริญบนจานเพาะเลี้ยงที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน 20 ไอโซเลท

การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อที่คัดแยกได้โดยการติดตามแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสับสเตรทพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท และการสังเกตการเรืองแสงสีส้มในอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรทและมีโรดามีนบีเป็นตัวบ่งชี้ พบว่า ไอโซเลทที่ 1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ คือ บิวทานอลร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร), อะซิโตนร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเฮกซาดีเคนร้อยละ 25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด โดยมีค่าแอคติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 4.41 หน่วยต่อปริมาณโปรตีน ในขั้นนี้แสดงถึงการได้มาซึ่งแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อทดสอบความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากไอโซเลทที่ 1 กับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ จากการสังเกตความเข้มของการเรืองแสงสีส้มในอาหารแข็งที่มีโรดามีนบีเป็นตัวบ่งชี้และมีน้ำมันชนิดต่างๆเป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อไอโซเลทที่ 1 มีความจำเพาะกับน้ำมันพืชเกือบทุกชนิด และมีความจำเพาะสูงกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบสูง (มีค่าไอโอดีนนัมเบอร์สูง) เช่น น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ดังแสดงองค์ประกอบกรดไขมันในตารางที่ 2-3 และเมื่อทดสอบการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันชนิดต่างๆ พบว่าน้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบสูง เช่น น้ำมันข้าวโพดและน้ำมันงาสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Maia และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 อย่างไรก็ตาม กลไกในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสโดยน้ำมันเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ในเรื่องของความหนืดและความยาวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันแต่ละชนิดที่สามารถเข้าไปเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนไลเปสได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดลองพิสูจน์ต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวอย่างตะกอน โคลน กรวด น้ำทะเล และน้ำทิ้งจากท่อระบายน้ำในจังหวัดชลบุรีจำนวน 9 แหล่ง พบแบคทีเรียที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 20 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตี้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสับสเตรทพาราไนโตรฟีนิลปาล์ลมิเตท พบว่าไอโซเลทที่ 1 ซึ่งทนต่อบิวทานอล, อะซีโตน และเฮกซาดีเคน ความเข้มข้นร้อยละ 1, 5 และ 25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ 4.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อวิเคราะห์โดยการเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีน้ำมันพืชต่างๆ เป็นสับสเตรทและมีโรดามีนบีเป็นตัวบ่งชี้ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 แสดงความจำเพาะกับน้ำมันพืชเกือบทุกชนิด และแสดงความจำเพาะสูงกับน้ำมันพืชที่มีปริมาณองค์ประกอบไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบมาก เช่น น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน และน้ำมันข้าวโพด นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันข้าวโพดและน้ำมันงาสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลทที่ 1 ที่คัดแยกได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ การพิจารณาแยกความแตกต่างของโคโลนีอาจไม่ดีเท่าที่ควร เพราะโคโลนีที่ได้มีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกันมาก เพื่อความถูกต้องและน่าเชื่อถือควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี รวมทั้งจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของชิ้นยีน 16S rRNA นอกจากนี้การพิจารณาความเข้มในการเรืองแสงสีส้มบนอาหารแข็งโรดามีนบีเพื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของน้ำมันต่อเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อที่คัดแยกได้ เป็น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเทียบโดยสายตาของผู้ทำการทดลองจึงอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ หากสามารถเปรียบเทียบโดยใช้เครื่องวัดความเข้มแสงได้อาจให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

เอกสารอ้างอิง

กิตติพล กสิภาร์, ธนากร เกาะทอง, สุกัญญา จันทิสา, จรัญ ฉัตรมานพ, และเพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. 2549. การผลิตไบโอดีเซลน้ำมันเมล็ดทานตะวันด้วยวิธีทางเคมีและชีวภาพ. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จิตติมา เจริญพานิช. 2551. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 318711 หัวข้อเลือกสรรทางวิทยาศาสตร์ (Selected topics in biological science). หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2549. เอนไซม์ไลเปส : การผลิตและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 26 : 1-18.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2548. การผลิตไบโอดีเซลโดยกระบวนการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไลเปส. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bornscheuer, U. T. and R. J. Kazlauskas. 1999. Hydrolysis in Organic Synthesis. Regio- and and Stereoselective Biotranformation. Wiley-VCH. Germany.

Bornscheuer U. T., C. Bessler, R. Srinivas and S. H. Krishna. 2002. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in biotechnology. 20 : 433-437.

Essamri, M., D. Valerie, and C. Louis. 1998. Optimization of lipase production by Rhizopus oryzae and study on the stability of lipase activity in organic solvent. Journal of Biotechnology. 60 : 97-103.

Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92 : 405-416.

Gao, X.G., S. CaO, and K.C. Zhang. 2000. Production, properties and application to nonaquous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolate *Pseudomonas* strain. Enzyme Microbial Technology. 27 : 74-82.

Ghazali, H.M., S. Hamidah, and Y.B.C. Man. 1995. Enzymatic tranesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. Journal of American Oil Chemical Society. 71 : 633-639.

Harold. W., M.K. Tsung. 2002. Lipid Biotechnology. Marcel Dekker. Switzerland.

Heipieper, H.J., G. Neumann., S. Carmelissen and F. Meinhardt. 2007. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. Applied Microbiology and Biotechnology. 74 : 961-973.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Hun C. J., R. N. Z. Rahman, A. B. Salleh, and M. Basri. 2003. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. Biochemical Engineering Journal. 15 : 147-151.

Jacobsen, T., and O.M. Poulsen. 1995. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum cadidum*. Biochemical Biophysical Acta. 1257 : 96-102.

Jinda, J. 2004. Characterization and immobilization of lipase from *Pseudomonas* sp. KLB1; Modification of crude palm oil by lipase acidolysis reaction. Dissertation of Doctor of Philosophy (Biotechnology). Kasetsart University.

Lee, Y. P., G. H. Chung, and J. S. Rhee. 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* S1K WI lipase expressed in *Escherichia coli.* Biochemical Biophysical Acta. 1169 : 156-164.

Litthauer, D., A. Ginster, and E.V. Skein. 2002. *Pseudomonas luteola* lipase : A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. Enzyme Microbial Technology. 30 : 209-215.

Ma, F., L.D. Clements and M.A. Hanna. 1999. The effect of mixing on transesterification of beef tallow. Bioresource Technology. 69 : 289–293.

Macrae, A.R. 1985. Biocatalysts. In Biocatalysts in Organic Synthesis. J. Tramper, H.C. van der Plas and P. linko. Elsevier Science Publishers B. V. Amterdam. The Netherlands. 195.

Maia, M. M.D., A. Heasley, M.M. Camargo de Morais, E.H.M. Melo, M. A. Morais Jr., W.M. Ledingham, and J.L. Filho. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology. 76 : 23-27.

Marchetti, J.M., V.U. Miguel and A.F. Errazu. 2005. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 11 : 1300-1311.

Okumura, S., M. Iwai, and Y. Tsujisaka. 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. Biochemical Biophysical Acta. 575 : 156-165.

Papaparaskevas, D., P. Christakopoulos, D. Kekos, and B. J. Macris. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotechnology Letters. 14 : 397-402.

Rathi, P., R.K. Sexena, and R. Gupta. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formation. Process Biochemical. 37 : 187-192.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Rua, M.L., C. Schmidt-Dannert, S. Wahl, A. Sprauer, and R.D. Schmid. 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*; large-scale production, purification and properties : aggregation behavior and its effect on activity. Journal of Biotechnology. 56 : 89-102.

Schmidt-Dannert, C., H. Sztajer, W. Stocklein, U. Menge, and R.D. Schmid. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. Biochemical Biophysical Acta-Lipids and lipid Metabolism. 1214 : 43-53.

Selmi B., E. Gontier, F. Ergan, and D. Thomas. 1998. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. Enzyme Microbial Technology. 23 : 182-186.

Sharon, C., S. Furugoh, T. Yamakido, H. Ogawa, and Y. Kato. 1998. Purification and characterization of a lipase from Pseudomonas aeruginosa KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 20 : 304-307.

Sugihara, A., Y. Shimada., M. Nakamura, T. Nagao and Y. Tominaga. 1994. Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipases. Protein Engineering. 7 : 585-588.

Sugihara, A., T. Tani, and Y. Tominaga. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp*. Journal Biochemistry. 109 : 211-216.

Vanot, G., V. Deyris, M. Guilhem, R. P. T. Luu, and L. C. Comeau. 2001. Optimal design for the maximization of *Penicilium cyclopium* lipase production. Applied Microbiology and Biotechnology. 57 : 342-345.

Vaysse, L., A. Ly, G. Moulin, and E. Dubreucq. 2002. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. Enzyme Microbiology and Technology. 1 : 648-655.

Winayanuwattikun P., C. Kaewpiboon, K. Piriyakananon, S. Tantong, W. Thakernkarnkit, W. Chulalaksananukul, and T. Yongvanich. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. Biomass and Bioenergy. 32 : 1279-1286.

Xu, X. 2000. Production of specific-structured triglycerols by lipase-catalyzed reactions. European Journal of Lipid Science and Technology. 102 : 287-303.

Zhou, D., X. Xu, H. Mu, C. E. Hoy, and J. Adler-Missen. 2001. Synthesis of structured triglycerols containing caproic acid by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization by response surface methodology. Journal Agricultural Food Chemistry. 49 : 5771-5777.

[Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.biodiesel.rdi.ku.ac.th สืบค้นเมื่อ 17/01/2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. อาหารเหลว 0.2 X LB

Bacto-Tryptone	1.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดทดลองปริมาตรตามความเข้มข้นเป็นร้อยละของตัวทำละลายอินทรีย์ นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้เติมตัวทำละลายอินทรีย์ตามความเข้มข้นที่ต้องการก่อนลงเชื้อ

2. อาหารแข็งนิวเทรียนส์

Nutrient broth	6.5	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร เมื่ออาหารแข็งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหารเหลวนิวเทรียนส์

Nutrient broth	6.5	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 16.5 mM pNPP (*p*-nitrophenylpalmitate) ใน 2-propanol (Isopropanol)

p-nitrophenylpalmitate	0.1869	กรัม
2-propanol	30	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) เก็บที่อุณหภูมิห้อง (เตรียมก่อนวิเคราะห์)

5. อาหารแข็ง Rhodamine B

Rhodamine B *	0.0001	%
NaCl	0.4	%
Nutrient broth	0.8	%
น้ำมันปาล์ม **	1	%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Gum arabic	1	%
Agar *	1	%

ผสมสารประกอบให้เข้ากันด้วยคลื่นแสงความถี่สูง (ultrasonication) จนเป็นเนื้อเดียวกัน (มีลักษณะขาวขุ่นคล้ายน้ำนม) จากนั้นเติม Rhodamine B และ Agar ผสมให้เข้ากัน นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร เมื่ออาหารแข็งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

* เติมทีหลัง

** สามารถเปลี่ยนชนิดของน้ำมันที่เป็นสับสเตรทได้

6. 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) + Triton X-100 (1%) + Gum Arabic (0.1%)

Tris-HCl	3.036	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับค่าพีเอชของสารละลายเป็น 8 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Triton X-100 5 มิลลิลิตร และ Gum Arabic 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน และนำไปกรองให้มีลักษณะใส

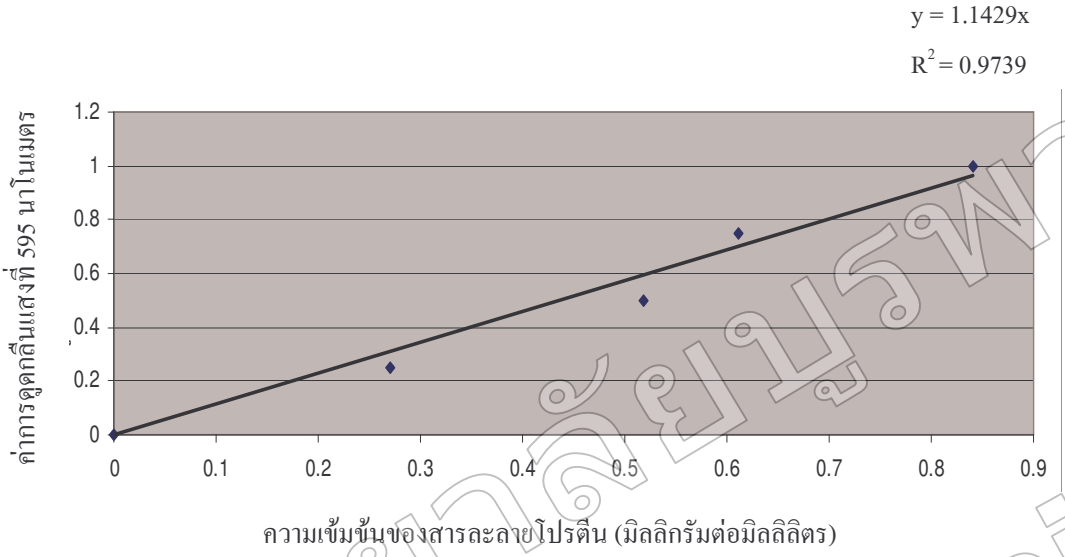
7. น้ำมันมะพร้าว

นำมะพร้าวขูดมาบีบคั้นกับน้ำอุ่น จากนั้นนำน้ำกะทิที่ได้ไปเคี่ยวไฟประมาณ 30-60 นาที จนกลายเป็นน้ำมัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมินและวิธีการคำนวณปริมาณโปรตีน



จากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน ได้สมการเส้นตรง มีค่าพารามิเตอร์ดังนี้

$y = 1.1429x$, $R^2 = 0.9739$

สูตร $A = \varepsilon bc$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ε = ความชันของกราฟ มีค่าเท่ากับ 1.1429

b = ระยะทางที่แสงเคลื่อนที่ (ความกว้างของคิวเวต) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร

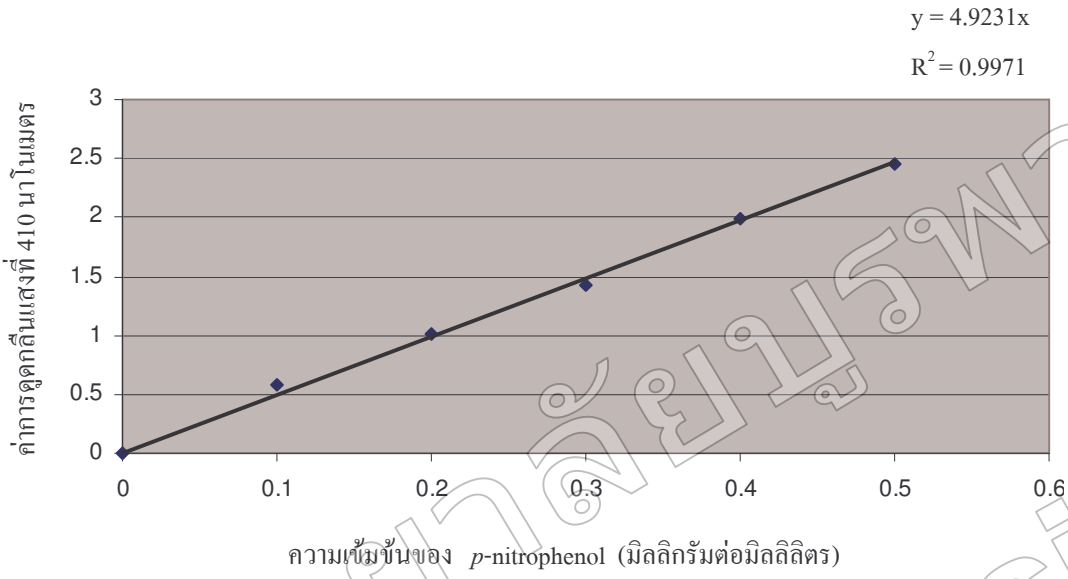
c = ความเข้มข้นของโปรตีน

ปริมาณโปรตีนทั้งหมด = ความเข้มข้นของโปรตีน x ปริมาตรของสารละลายส่วนใสที่เก็บได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol และวิธีการคำนวณแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส



จากกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol จะได้สมการ y = 4.9231x

ความชัน = $(OD_2-OD_1)/(T_2-T_1)$

แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย) = (ความชันxปริมาตรทั้งหมดที่ใช้xอัตราการเจือจาง)/ (ε x ΔT x ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้)

แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสทั้งหมด (หน่วย) = แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส x ปริมาตรของสารละลายส่วนใสที่เก็บได้

แอคติวิตี้จำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) = แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสทั้งหมด/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติย่อของนิสิต

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุดารัตน์ ศิลปชัย
วันเดือนปีเกิด	19 ธันวาคม 2529
ประวัติการศึกษา	ระดับประถมศึกษาปีที่ 1 ถึง 6 โรงเรียนบ้านวังหิน จังหวัดระยอง
	ระดับมัธยมศึกษาปีที่ 1 ถึง 6 โรงเรียนห้วยยางศึกษา จังหวัดระยอง
ที่อยู่ปัจจุบัน	8/2 ม.7 ต.วังหว้า อ.แกลง จ.ระยอง 21110
โทรศัพท์	085-2886230
อีเมลล์	raul-ohhy@hotmail.com
กิจกรรมระหว่างการศึกษา	1. ประธานนิสิตภาควิชาชีวเคมี ปีการศึกษา 2551
	2. เกียรติบัตรบำเพ็ญประโยชน์แก่ภาควิชาชีวเคมี ประจำปีการศึกษา 2549
	3. อบรมนักเรียนทุน โครงการทุนการศึกษา บริษัท กรุงไทยการไฟฟ้า จำกัด
	4. ฝึกปฏิบัติงานที่กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University