บทที่ 1
บทนำ

1.1 คณะผู้วิจัยและสัดส่วนการทำงานวิจัย

1) รศ.ดร. สิรินดา ยุ่นฉลาด
2) ดร.วีระ ปิยธีรวงศ์

1.2 ประเภทการวิจัย

การวิจัยประยุกต์

1.3 สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาการที่ทำวิจัย

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

1.4 คำสำคัญ (Keywords) ของการวิจัย

ไบโอดีเซล (biodiesel) ทรานเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (transesterification) สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase producing bacterial strain) น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgal oil)

1.5 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นเชื้อเพลิงดีเซลอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือไปจากน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมที่สามารถผลิตจากแหล่งทรัพยากรชีวภาพที่ใช้แล้วไม่หมดไป เช่นน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal oil) ไบโอดีเซลยังมีคุณสมบัติและค่าพลังงานที่ได้จากการเผาไหม้เหมือนกับดีเซล่จากปิโตรเลียม และสามารถใช้แทนกันได้ นอกจากนี้คุณสมบัติสำคัญของไบโอดีเซลล์คือ สามารถย่อยสลายได้เองตามกระบวนการชีวภาพ (biodegradable) ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (non-toxic) และก่อให้เกิดก๊าซมลภาวะ (gaseous pollutants) อันได้แก่ ก๊าซคาร์บอนมอนน๊อกไซด์ (CO) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (HC) น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณก๊าซที่เกิดจากการเผาไหม้น้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม เพราะออกซิเจนในไบโอดีเซลให้การสันดาปที่สมบูรณ์กว่าดีเซลล์จากปิโตรเลียมจึงมีคาร์บอนมอน๊อกไซด์น้อยกว่า และเนื่องจากไม่มีกำมะถันในไบโอดีเซล จึงไม่มีปัญหาสารซัลเฟตตกค้างในสิ่งแวดล้อมนอกจากนี้ยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย จึงไม่ทำให้เกิดการอุดตันของระบบไอเสียได้ง่าย ช่วยยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ได้เป็นอย่างดี ไบโอดีเซลจึงเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (clean and environmentally friendly energy) และนอกจากจะพบข้อดีในด้านการเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแล้วนั้นการใช้ไบโอดีเซลยังมีข้อดีสำหรับโลก ก็เนื่องมาจากการใช้ไบโอดีเซลไม่ทำให้

คาร์บอนไดออกไซด์สุทธิในบรรยากาศเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ช่วยลดภาวะโลกร้อน (Global warming) และผลกระทบเรือนกระจก (Greenhouse Effect) ให้เกิดช้าลง

โดยทั่วไปน้ำมันไบโอดีเซลนิยมผลิตโดยใช้ปฏิกริยาเคมีที่เรียกว่า “ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น” (Transesterification) ซึ่งเป็นการทำปฏิกริยากันระหว่างไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ที่ได้จากกรดไขมันในน้ำมันที่ได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ตลอดจนไขมันจากสัตว์กับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ อาทิ เอทานอล (ethanol) เมทานอล (Methanol) บิวทานอล (Butanol) เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่ต้องมีตัวเร่งปฏิกริยา (catalysts) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด กรดแก่ (strong acid) ด่างแก่ (strong alkali) และเอนไซม์ (Enzyme) ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส (lipase) ที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย (Bacteria) รา (Fungi) และยีสต์ (Yeast) เป็นต้น การใช้ตัวเร่งปฏิกริยาเคมี โดยเฉพาะตัวเร่งที่มีฤทธิ์เป็นด่างพบว่าจะมีข้อเสียหลายประการได้แก่ ใช้ต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานความร้อน (60-70 องศาเซลเซียส) ในการเกิดปฏิกริยาเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เป็นกลีเซอรอลได้ยาก กำจัดตัวเร่งปฏิกริยาที่เป็นกรดหรือด่างทำได้ยากและในสภาวะที่ใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกริยา ส่วนประกอบที่เป็นกรดไขมันอิสระและน้ำจะรบกวนการเกิดปฏิกริยา transesterification โดยอาจเกิดปฏิกริยา Saponification ร่วมด้วย ซึ่งจะให้สารผลิตภัณฑ์เป็นสบู่ (MA และคณะ 1999) จากข้อจำกัดเหล่านี้ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำตัวเร่งปฏิกริยาชีวภาพมาใช้แทนตัวเร่งทางเคมีอย่างเช่นเอนไซม์ไลเปสมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกริยาในการผลิตไบโอดีเซล โดยมีข้อดีคือ ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิต่ำ (30-40 องศาเซลเซียส) ผลได้ของเมททิลเอสเทอร์สูง ทำบริสุทธิ์เมททิวเอสเทอร์ได้ง่าย เก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่าย เอนไซม์ไลเปสพบได้โดยทั่วไปจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) จากพืช (plants) และจากจุลินทรีย์ (microorganisms) แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตออกจำหน่ายในเชิงการค้า (commercial lipase) มีราคาค่อนข้างแพงเมื่อเปรียบเทียบกับราคาของสารเร่งปฏิกริยาจำพวกกรดหรือเบส ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสแทนการใช้เอนไซม์ไลเปสเชิงการค้า โดยจากการที่ประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่และความหลากหลายทางชีวภาพ จึงทำให้ประเทศไทยเรามีความพร้อมด้านทรัพยากรจุลิทรีย์ (Microbial resource) ที่เป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นแหล่งที่ดีของเอนไซม์นานาชนิด รวมถึงเอนไซม์ไลเปสด้วย ดังนั้นจึงเกิดความสนใจที่จะศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยจะคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่นแหล่งน้ำพื้นดิน และตามร้านอาหาร ภัตตาคาร ฯลฯ มาเพาะเลี้ยงเพื่อให้สร้างเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยกรดไขมันได้ และนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไขมันและทดสอบความเสถียร เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเพื่อผลิตเป็นตัวเร่งปฏิกริยาทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้ทดแทนตัวเร่งปฏิกริยาเคมี ไม่ว่าจะเป็นกรดหรือด่าง ซึ่งต้องการสภาวะของการเกิดปฏิกริยาเคมีที่รุนแรง อาทิ ภาวะการกัดกร่อนสูง หรือแม้กระทั่งอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงในการทำปฏิกริยา ซึ่งหากมีการทดแทนการผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกริยาทางชีวภาพ ปัญหาเหล่านี้ก็จะหมดสิ้นไป

การพิจารณาถึงคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยเฉพาะระหว่างน้ำมันพืชและน้ำมันสัตว์ก็เป็นสิ่งสำคัญ โดยพบว่าน้ำมันพืชมีคุณสมบัติที่เป็นวัตถุดับในการผลิตไบโอดีเซลที่ดีและเหมาะกว่าน้ำมันสัตว์ เช่น มีกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) สูงกว่า ทำให้ไม่เกิดปฏิกริยาออกซิเดชันและมีค่าความหนืด ตลอดจนมีคุณสมบัติของการหล่อลื่นดีกว่า ถึงแม้น้ำมันพืชจะมีข้อได้เปรียบหลายประการดังได้กล่าวแล้วข้างต้น แต่ในแง่เศรษฐศาสตร์การใช้น้ำมันพืชบริสุทธิ์ที่ใช้ในการบริโภคทั่วไปมาผลิตไบโอดีเซลโดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรมอาจให้ผลไม่คุ้มค่ากับผู้ประกอบการ เนื่องจากมูลค่าเพิ่มของสินค้ามีน้อยมากเมื่อเทียบกับการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่น เหตุผลอีกอย่างหนึ่งคือ น้ำมันพืชจากถั่วเหลือง เป็นน้ำมันในการบริโภค จะทำให้เป็นการแย่งวัตถุดิบกันระหว่างน้ำมันพืช กับไบโอดีเซล ดังนั้นการหลีกเลี่ยงใช้วัตถุดิบอย่างอื่นสำหรับการผลิตไบโอดีเซลจึงสมควรเป็นแนวทางที่ควรได้รับการค้นคว้าหาความเป็นไปได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมองหาวัตถุดิบชนิดอื่นที่มีศักยภาพและให้ผลคุ้มค่าสำหรับการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต และเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาการแย่งวัตถุดิบกัน หนึ่งในวัตถุดิบที่ได้รับความสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้น ได้แก่ ในการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันคือ สาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) ทั้งนี้เพราะในสาหร่ายบางสายพันธุ์นั้นจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญซึ่งได้แก่ ไขมัน (lipid) อยู่ในปริมาณสูง ถ้ามีการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้สภาวะที่เรียกว่า Heterotrophic เพื่อชักนำให้สาหร่ายสะสมไขมันไว้ภายในเซลล์มากว่าจะสะสมคลอโรฟิลล์ ซึ่งไขมันดังกล่าว สามารถใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลได้ โดยการสกัดเอาส่วนที่เป็นไขมัน หรือน้ำมันที่เรียกว่า “Microalgal oil” ซึ่งมีอยู่ภายในเซลล์ออกมา นอกจากนั้นสาหร่ายยังเจริญเติบโตได้เร็วมากว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น สามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องพื้นที่ที่จะใช้เลี้ยง เพราะสามารถใช้เลี้ยงแบบในระบบเปิด (open system) เช่นแหล่งน้ำธรรมชาติหรือแม้กระทั่งสามารถนำมาเลี้ยงในระบบปิด (Close system) เช่นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่าง ๆ เช่นถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบให้แสง (photo bioreactor) เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงให้ความสนใจที่จำนำน้ำมันที่สกัดได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก มาใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล และใช้ตัวเร่งปฏิกริยาทางชีวภาพ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปน (lipase enzyme) ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยจะศึกษาภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) เพื่อประเมินศักยภาพว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเหล่านี้ จะสามารถพัฒนาสู่การพัฒนาสู่การผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรมได้หรือไม่

1.6 วัตถุประสงค์หลัก

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้คือ การศึกษาแหล่งทางเลือกของตัวเร่งปฏิกริยาทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซลแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกริยาทางเคมี โดยการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) เปลี่ยนน้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก ให้เป็นไบโอดีเซล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจะศึกษาประสิทธิภาพของตัวเร่งทางชีวภาพทั้งในรูปเซลล์แบคทีเรียและเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ กับตัวเร่งปฏิกริยาชีวภาพที่เป็นรูปเซลล์และไลเปส

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

(ก) ประโยชน์ด้านวิชาการและองค์ความรู้

1. ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่นจากดินและแหล่งน้ำตามธรรมชาติและร้านอาหารและภัตราคาร ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยกรดไขมันได้ตลอดจนการได้เอนไซม์สกัดจากเชื้อที่คัดสรรแล้ว เพื่อเตรียมใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตตัวเร่งปฏิกริยาทางชีวภาพต่อไป
2. ได้ตัวเร่งปฏิกริยาทางชีวภาพ และทราบสภาวะของตัวพยุงตลอดจนสภาวะในการทำเอนไซม์ตรึงที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไบโอดีเซล เพื่อนำไปใช้ทดสอบการผลิตไบโอดีเซลต่อไป
3. ได้กระบวนการทางชีวภาพที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซล์ โดยใช้น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็กและตัวเริ่งปฏิกริยาที่เป็นเซลล์แบคทีเรียที่ผลิตภัณฑ์ไลเปสที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

(ข) ประโยชน์ด้านการพัฒนาบุคลาการด้านการวิจัย

1. สามารถใช้เป็นโครงการวิจัยของนักศึกษาในระดับปริญญาโท มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเป็นการผลิตบัณฑิตที่มีความรู้ความชำนาญในเรื่องการผลิตไบโอดีเซล เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนที่ยั่งยืน
2. เป็นการเพิ่มพูนความรู้ความชำนาญทางวิชาการให้แก่คณะนักวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

ไลเปส (lipase; EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) และกลีเซอรอล (glycerol) นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้สามารถสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์นับเป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิสูง และ มีความจำเพาะต่อซับสเตรทหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และ ยา **(Schmid and Verger,1998 ; Kazlauskas และคณะ,1998 ; Jaeger และคณะ, 1998)**

ไลเปสแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามความจำเพาะต่อซับสเตรท (substrate) ได้แก่

1. ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (group specific) ไลเปสมีระดับของความจำเพาะต่อกรดไขมัน เช่น ไลเปสจาก *Candida antarctica* จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายโซ่สั้น(short chain fatty acid) มากกว่าสายโซ่ยาว (long chain fatty acids)

2. ความจำเพาะต่อตำแหน่ง (position specific) ไลเปสโดยทั่วไปมักมีความจำเพาะต่อตำแหน่งโดยเฉพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1, 3-specific lipase) ของไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides)

3. ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง (non-position specific) หมายถึงไลเปสที่เข้าทำปฏิกิริยากับไขมันได้อย่างไม่เจาะจง จะเป็นตำแหน่งที่ 1, 2 หรือ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ก็ได้

2. ตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst)

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถแบ่งตามชนิดตัวเร่งปฏิกริยา การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิดนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน และคุณสมบัติของน้ำมันที่ใช้ เช่นน้ำมันที่มีน้ำปนอยู่มากควรใช้ตัวเร่งชนิดกรด นอกจากนี้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์สามารถลดอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา รวมถึงสามารถกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกจากน้ำมันไบโอดีเซลได้ง่ายอีกด้วย สามารถแบ่งตัวเร่งปฏิกริยาได้ 3 ประเภทคือ ตัวเร่งปฏิกิริยาด่าง ตัวเร่งปฏิกิริยากรด และตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ **(Ma and Hanna, 1999 ; Um and Kim, 2009)** โดยตัวเร่งปฏิกิริยาแต่ละชนิดมีข้อดี – ข้อเสียแตกต่างกันขึ้นกับตัวแปรที่ต้องการศึกษาด้วย **(ตารางที่ 1)**

1. **ตัวเร่งด่าง** เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีการใช้มาเป็นเวลานานแล้ว โดยข้อดีก็คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากตัวเร่งชนิดนี้จะมีปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อย แต่ข้อจำกัดของตัวเริ่งปฏิกริยาชนิดนี้ก็คือ สารตั้งต้นที่ใช้ต้องบริสุทธิ์โดยหากสารตั้งต้นที่นำมาใช้มีปริมาณกรดไขมันอิสระปนอยู่จะส่งผลให้เกิดสบู่ (Saponification)ในระหว่างการผลิตไบโอดีเซลทำให้ยากต่อการแยกกลีเซอรอลออกจากผลิตภัณฑ์

2.ตัวเร่งกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ไขข้อจำกัดของตัวเร่งด่าง โดยข้อดีของการใช้ตัวเร่งประเภทกรดคือผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณผลได้สูง และยังสามารถใช้กับสารตั้งต้นที่มีคุณภาพด้อยกว่าน้ำมันบริสุทธิ์ได้ (เช่น มีกรดไขมันอิสระปนอยู่) แต่ข้อเสียของตัวเร่งชนิดนี้ก็คือเกิดการกัดกร่อนของอุปกรณ์ที่ใช้ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ทำปฏิกริยา จะนานกว่าการใช้ตัวเร่งชนิดด่าง ข้อเสียของการใช้กระบวนการที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่างและกรดที่เป็น ของเหลวคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องผ่านกระบวนการล้างด้วยน้ำเพื่อให้มีฤทธิ์เป็นกลางซึ่งก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสียตามมา

3. ตัวเร่งจำพวกเอนไซม์ (ไลเปส) โดยเอนไซม์ไลเปสที่นำใช้ในระดับอุตสาหกรรมสามารถคัดแยกได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งรา และแบคทีเรีย โดยสามารถนำมาใช้ในรูปของเอนไซม์อิสระ (Free enzyme) และในรูปของเอนไซม์ที่ถูกตรึง (Immobilized enzyme) กระบวนการตรึงเอนไซม์สามารถทำได้หลายชนิด เช่น การตรึงบนตัวรองรับของแข็ง (เช่น บน Polymer) การตรึงโดยอาศัยกระบวนการ Sol-Gel และเทคนิคการตรึง (immobilization) โดยใช้กระบวนการ Cross Link Enzyme Aggregates (CLEA) การใช้เทคนิคการห่อหุ้ม หรือ entrapment เช่นการห่อหุ้มด้วย sodium alginate ที่ทำได้ง่าย

ข้อดีของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์จะมีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหลายประการอันได้แก่ มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อ และไม่จำเป็นต้องมีกระบวนการบำบัดของเสีย อีกทั้งยังสามารถผลิตไบโอดีเซลได้จากทั้งไตรกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ จึงสามารถใช้กับสารตั้งต้นที่มีคุณภาพด้อยกว่าน้ำมันบริสุทธิ์ได้

ส่วนกรณีของการผลิตไบโอดีเซลแบบที่ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยานั้น ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) และเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะวิกฤตยิ่งยวดของแอลกอฮอล์ คือที่อุณหภูมิ 350-400 เซลเซียสและความดัน 45-65 เมกกะพาสคาล หรือประมาณ 450-650 เท่าของความดันบรรยากาศ ข้อดีของกระบวนการดังกล่าว คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์และเวลาที่ใช้สั้นกว่าวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสภาวะวิกฤตยิ่งยวดของเมทานอลจะไม่เกิดสบู่ และ

ปัญหาน้ำเสียเนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือด่างวิธีนี้จึงน่าสนใจนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม แต่ข้อจำกัดของการผลิตไบโอดีเซลโดยวิธีนี้คือ ต้องใช้สภาวะที่รุนแรง (อุณหภูมิและความดันที่สูง) ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตนั้นสูงตามไปด้วย

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่าง ๆ

ตัวแปรที่ศึกษา	**ตัวเร่งปฏิกริยาชนิดกรด**	**ตัวเร่งปฏิกริยาชนิดด่าง**	**ตัวเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปส**
อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกริยา	55 – 80	60 – 70	30 - 40
กรดไขมันอิสระในวัตถุดิบ	เกิดเอสเทอร์	เกิดสบู่ในผลิตภัณฑ์	เกิดเอสเทอร์
น้ำในวัตถุดิบ	รบกวนการทำปฏิกริยา	รบกวนการทำปฏิกริยา	ไม่มีผลในการทำปฏิกริยา
ผลพลอยได้ของเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	สูง เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์
การกำจัดกลีเซอรอล	ยาก	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ต้องล้างน้ำซ้ำหลายครั้ง	ต้องล้างน้ำซ้ำหลายครั้ง	ไม่ต้องล้างน้ำ
ราคาของตัวเร่งปฏิกริยา	ถูก	ถูก	ค่อนข้างแพง

(ที่มา : Shama และคณะ,2008)

3. แหล่งของจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปส

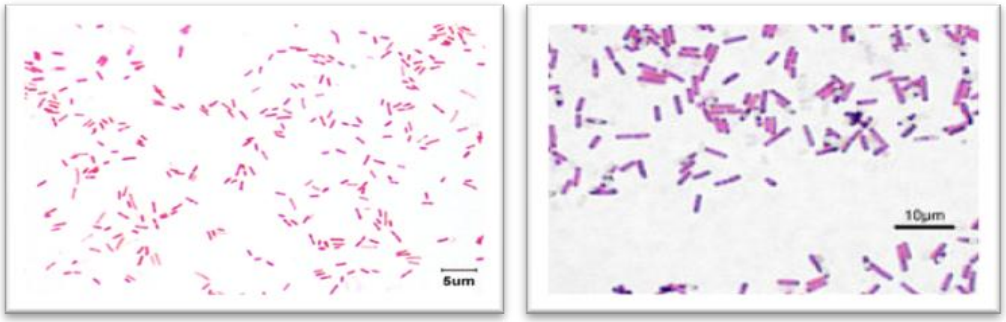
ไลเปสพบทั้งในสัตว□ พืช แบคทีเรีย และรา **(ตารางที่ 2)** ในสัตว□พบในน้ำนม และตับอ□อน (pancreas)

ไลเปสจากพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอก เช□น เมล็ดข□าวสาลีข□าวโอ□ต ข□าวไรย□ฝ□าย ถั่วเหลือง และละหุ□ง เป□นต□น ไลเปสจากพืชและสัตว□มีความเสถียร (stability) ต่ำกว□าจุลินทรีย□ และมีคุณสมบัติแตกต□างกันไลเปสที่ได□จากแบคทีเรียจะพบทั้งที่สร□างอยู□ในเซล และที่ขับออกมานอกเซล ไลเปสส่วนใหญ่จะได□จากเชื้อรา ส□วนมากจะสร□างแล□วขับออกนอกเซลขึ้นอยู□กับองค□ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไลเปสจากจุลินทรีย□มีข□อดีกว□าไลเปสจากพืช และสัตว□เนื่องจากจุลินทรีย□เติบโตได□รวดเร็ว และเลี้ยงง□ายกว□าสัตว□ไม□ต□องใช□พื้นที่มาก และไม□ขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได□โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย□

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสมบัติในการทำงานแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และกลุ่มของไขมันที่พบในแหล่งที่คัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งในที่นี้จะแบ่งจุลินทรีย์ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไว้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ เอนไซม์จากราและยีสต์ และเอนไซม์จากแบคทีเรีย

เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เป็นจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสมและสำคัญที่สุดในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้อาหารได้หลากหลายชนิด และสามารถผลิตได้ครั้งละมาก ๆ สามารถเจริญได้ทั้งอุณหภูมิแบบ mesophilic, Thermophilic และ thermotolerance รวมถึงสามาถทนความเป็น กรด – ด่าง สูง และ ตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น

ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Psudomonas aeruginosa* สามารถทนอุณหภูมิสูงของการทำปฏิกริยาได้ และยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างต่อเนื่องในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยง **(Gilbert และคณะ, 1991)** หรือเชื้อ *Bacillus coagulans* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสแบบ extracellular และสามารถทนความเป็นด่างและอุณหภูมิสูงในขณะที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ **(Kumar และคณะ, 2005)** รวมถึงเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *S. hyicus* ที่มีคุณสมบัติในการใช้สับสเตรทได้อย่างกว้างขวาง รวมถึงยังมีความสามารถในการไฮโดรไลสิท water-soluble substrates และยังพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส phospholipase A และ lysophospholipase และเชื้อ *Aeromonas sorbria*



A ***Pseudomonas aeruginosa*** **B** ***Bacillus coagulans***

รูปที่ 1 ลักษณะทางจุลชีววิทยา ของแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ไลเปส ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ (A) และติดสีแกรมบวก (B)

ที่มา : http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

Bacteria	Fungi	Yeast
Achromobacter sp.	*Coelomyceles sp.*	*Candida sp.*
A. lipolyticus	*Fusarium oxysporum*	*C. antarcea*
Aeromonas hydrophila	*F. solari*	*C. auricularia*
A. sobria	*Geotrichum candidum*	*C. curvata*
Acinetobactter sp.	*Glomus versifrome*	*C. cylindracea*
A. calcoaceticus	*Hansennula anomala*	*C. lipolytica*
A. psuedoalcagines	*Humicola grisea*	*C. deformans*
Alcaligenes sp.	*H. insulens*	*C. foliorum*
A. denitrificans	*H. lanuginose*	*C. humicula*
Bacillus cereus	*Microthrix parvicella*	*C. rugosa*
B. megaterium	*Mucor sp.*	*Pichia miso*
B. laerosporus	*M. javanicus*	*Proteus sp.*
B. sphereicus	*M. lipolyticus*	*Saccharomyces cerevisiae*
B. stearothermophilus	*M. miehei*	*Sporotrichum hermophile*
Burkholderia cepacia	*M. pusillus*	*Thielavia minor*
Chromobacterium sp.	*Neurospora sitophila*	
Corynebactrium sp.	*Norcadia amarae*	
Cryptococcus laurentii	*Penicillium crustosum*	
Enterococcus faecalis	*P. camembertii*	
Flavobacterium arbovescens	*P. cyclopium*	
F. ferruginem	*Rhizopus sp.*	
Psuedomonas aeruginosa	*R. oryzae*	
P. cepacia	*R. nigricans*	
P. fluorescen	*Rhodotorula minute*	
Streptomyces sp.	*R. pilimonae*	
S. lactis	*R. glulinus*	
Rhodococcus rubra	*Rhodopsuedomonas sp.*	

(ที่มา : Godtfredsen, 1990; Pandey และคณะ, 1999 ; Mayordomo และคณะ, 2000)

4. น้ำมันจากสาหร่าย (Algal oil)

สาหร่ายเป็นจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงและนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกิจกรรมการสร้างเซลหรือชีวมวล (biomass) โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้ง microalgae และ macroalgae มาใช้ประโยชน์ในด้านอาหารคน สัตว์ อาหารเพื่อสุขภาพ รวมถึงเครื่องสำอางค์ เป็นต้น และยังสามารถนำไปใช้ในการการบำบัดน้ำเสีย และปัจจุบันมีการวิจัยพัฒนานำสาหร่ายมาใช้ผลิตพลังงาน เช่น น้ำมันไบโอดีเซล การนำชีวมวลสาหร่ายมาผลิตไบโอก๊าซ หรือใช้สาหร่ายในการผลิตไฮโดรเจน (มรกต ตันติเจริญ, 2555) สาหร่ายหลายสายพันธุ์มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสาหร่ายนั้น ๆ ด้วย **(ตารางที่ 2)** ซึ่งองค์ประกอบหรือโครงสร้างที่พบของน้ำมันในสาหร่ายก็เหมือนกับพืชน้ำมันอื่นทั่วไป เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ประกอบไปด้วยกรดไขมัน (fatty acids) ชนิดต่าง ๆ 3 โมเลกุล ทั้งกรดไขมันอิ่มตัว (saturate) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated) และ กลีเซอรอลอีก 1 โมเลกุล **(Ma และ Hanna,1999)**

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ในสาหร่ายบางสายพันธุ์

สายพันธุ์	**ปริมาณน้ำมัน (% dry wt)**
Botryococcus braunii	25–75
Chlorella sp.	28–32
Crypthecodinium cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16–37
Dunaliella primolecta	23
Isochrysis sp.	25–33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20–35
Nannochloropsis sp.	31–68
Neochloris oleoabundans	35–54
Nitzschia sp.	45–47
Phaeodactylum tricornutum	20–30
Schizochytrium sp.	50–77
Tetraselmis sueica	15–23

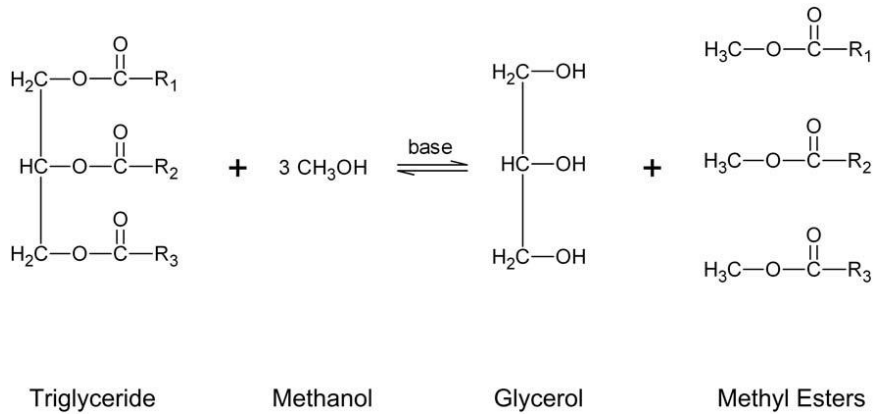
(ที่มา : Yusuf Chisti, 2007)

ข้อดีของน้ำมันที่ได้จากสาหร่าย

1. เนื่องจากความสามารถในการเจริญอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลผลิต (yield) ที่สามารถสกัดน้ำมันได้จากสาหร่ายมีมากกว่า พืชพลังงานทางเลือกอื่น เช่น ข้าวโพด 10-100 เท่า
2. พื้นที่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ใช้เพียงบ่อหรือท่อพลาสติกใส ในการเพาะเลี้ยงทำให้ใช้พื้นที่น้อยกว่า การปลูกพืชพลังงานชนิดอื่น
3. สาหร่ายมีความบำบัดทางชีวภาพที่ดีเยี่ยม โดยสามารถนำศักยภาพในการใช้ประโยชน์ก๊าซ CO_2 ซึ่งทำให้เกิดบทบาทสำคัญในการบำบัดน้ำเสีย

5. ไบโอดีเซล (Bidiesel)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) (bio = life มากจากภาษากรีกแปลว่าชีวิต, diesel เป็นชื่อที่ตั้งเพื่อเป็นเกียรติแก่นาย Diesel) หรือเรียกอีกชื่อว่า Fatty acid (ethyl) methyl esters (FAMEs) เป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตได้จาก น้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ทานตะวัน เมล็ดเรพ (rape seed) สบู่ดำ หรือ น้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ ที่ผ่านการใช้งานแล้ว นำมาทำปฏิกิริยา transesterification ร่วมกับเมทานอล หรือเอทานอลจนเกิดเป็นสารเอสเตอร์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ไบโอดีเซล (B100) โดยสามารถผสมออกมาได้หลายสูตรโดยไม่ต้องมีการปรับแต่งเครื่องยนต์ โดยทั่วไปนิยมนำไปผสมเป็นสูตรต่าง ๆ เช่น B2 (ไบโอดีเซล 2% : ดีเซล 98%) B5 (ไบโอดีเซล 5% : ดีเซล 95%) และ B20 (ไบโอดีเซล 20% : ดีเซล 90%) (Ma และ Hanna, 1999; Um และ Kim, 2009) นอกจากนี้ยังได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน เป็นผลพลอยได้ ซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นสามารถแสดงได้ดังนี้ **(รูปที่ 2)**



รูปที่ 2 ปฏิกริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ของกรดไขมันร่วมกับเมทานอล ได้น้ำมันไบโอดีเซล (Methyl esters) และ กลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลพลอยได้

ที่มา : http://ww2.mackblackwell.org/web/research/all_research_projects/2000s/2092/mbtc-2092.htm

ปฏิกริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยใช้สารเคมีที่เป็นด่าง (Acids) ด่าง (Akali) (Fukuda และคณะ, 2001 ; Meher และคณะ, 2006) รวมถึงเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzymes) โดยมีข้อได้เปรียบที่สำคัญหลายประการ เช่นมีความจำเพาะกับน้ำมันโดยตรง รวมถึงสามารถเร่งปฏิกริยาโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าการเร่งปฏิกิริยาโดยกรดหรือด่าง ทำให้ลดการสูญเสียพลังงานและค่าใช้จ่ายในการเกิดปฏิกิริยาลดลงด้วย **(Sharma และคณะ, 2001)**

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ในการทดลอง

1. เครื่องสำหรับวัดสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), รุ่น Cb 40, (GMbH, Germany)
2. เครื่องผสมสารในแนวดิ่ง (vortex mixer), รุ่นVM-300, (Gemmy Ins., Taiwan)
3. เครื่องชั่ง (Balance), รุ่น PT 1200, (Sartorius, Germany)
4. หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave), (Allamerican,USA)
5. กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope (Compound Microscope), (Olympus Optical Co, Japan)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิความเร็วสูง (Superspeed Refrigerated Centrifuge), (RC 28 S, Sorvall, USA)
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงระบบ UV-VIS (Spectrophotometer), รุ่น UV-1201, (Shimadzu, Japan)
8. แผ่นให้ความร้อนที่กวนผสมสารละลายได้ (Hot plate magnetic stirrer), รุ่น M12/1, (Franz MORA, France)
9. ตู้ปลอดเชื้อชนิดม่านลมผ่าน (Laminar flow), รุ่น BH 143, (Gelman Sciences, Australia)
10. Micropipette รุ่น pipettman Neo®, (Gilson, France)
11. Pipette Tip รุ่น Dimond,(Gilson, France)
15. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (SHIMADZU, Japan)
16. UV Box

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Rhodamine B-olive oil agar
2. Nutrient agar/broth (HiMedia Laboratories, India)
3. Modified freezing medium
3. TSB medium (HiMedia Laboratories, India)

3.3 สารเคมี

1. Gram's crystal violet (Analytical grade), (Vidhyasom Co., Ltd., Thailand)
2. Gram's iodine (Analytical grade), (Vidhyasom Co., Ltd., Thailand)
3. Gram's decolorizer (Analytical grade), (Vidhyasom Co., Ltd., Thailand)
4. Gram's safranin-O (Analytical grade), (Vidhyasom Co., Ltd., Thailand)
5. 0.1 N. NaOH

3.4 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.4.1ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน สามารถเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสคือ

1. บ่อบำบัดน้ำเสียแปลงเกษตร (คณะเกษตร)
2. ดินริมบึงสีฐาน

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน

1. เก็บตัวอย่างดินประมาณ 10-20 กรัม จากจุดต่างๆกัน 4-5 จุด

2. นำตัวอย่างดิน10 กรัมมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ ใน NB broth 90 ml บ่ม ที่ 35 ^{o}C เป็นเว □ลา 24 ชั่วโมง

3. นำหลอด NB broth ที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆมาขีดลาก (streak) ลง NA agar มา 1-2 loop บ่ม 35 ^{o}C เป็นเวลา □24 ชั่วโมง

4. นำโคโลนีเดี่ยวทั้งหมดที่คัดแยกได้จากจานวุ้นอาหาร NA agar มาขีดลาก ลงบนจานวุ้นอาหารRhodamine agar (ดูรายละเอียดวิธีเตรียมที่ภาคผนวก) บ่มที่อุณภูมิ 35 C □□1-3 วันเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยดูการเรืองแสงของภายใต้แสง UVที่มีความยาวคลื่น 340 nm

5. นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการขีดลาก (Streak)โคโลนีที่เรืองแสงทั้งหมด ลงในอาหาร NA แล้วนำมาเก็บไว้เป็น Stock สายพันธุ์ที่จะมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่แสดงกิจกรรมไลเปส

6. นำเชื้อที่เรืองแสงที่ได้คัดแยกไว้มาทดสอบกิจกรรมของไลเปส ต่อไป

3.4.2ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างที่มาจากแหล่งน้ำ

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำ สามารถเก็บตัวอย่างน้ำจากบริเวณที่มีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสคือ

1. บ่อบำบัดน้ำเสียมหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. บึงสีฐานมหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างที่มาจากแหล่งน้ำ

1. นำตัวอย่างน้ำมาทำ (Pretreatment) โดยการกรองเอาเศษผงเศษฝุ่นออกมาก่อน โดยใช้เครื่องกรองน้ำผ่าน Bucher Funnel เพื่อเอาสิ่งแขวนลอยที่อยู่ในตัวอย่างออกไป

2. นำน้ำที่ได้จากการกรองผ่าน Bucher Funnel มากรองกักเซลล์ของแบคทีเรียที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำ โดยผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 μ ทีมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเซลล์ของแบคทีเรียด้วยการใช้ filter membrane apparatus

3. นำแผ่นกระดาษกรองที่ผ่านการกรองดักเซลล์ของปบคทีเรียจากข้อ 2 ดังกล่าวมา วางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Plate เล็ก) บ่มที่อุณภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

4. นำโคโลนีทั้งหมดที่เจริญมา Streak ลงในอาหารRhodamine agar บ่มที่อุณภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยดูการเรืองแสงของเชื้อภายใต้กล้อง UV

5. ทำให้มีความบริสุทธิ์ การขีดลากโคโลนีที่เรืองแสงทั้งหมด ลงในอาหาร NA เพื่อเก็บไว้เป็น Stock

6. นำเชื้อที่เรืองแสงที่คัดแยกไว้มาทดสอบกิจกรรมของไลเปสต่อไป

3.4.3 การย้อมสีแกรม (Gram's straining)

การศึกษาคุณลักษณะทางจุลทรรศน์วิทยา ทำเป็นขั้นตอน ดังนี้

- ทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากไขมันเพื่อที่จะสามารถเกลี่ยกระจาย หรือเตรียมรอยเสมียร์เชื้อบนแผ่นสไลด์ได้เป็นระนาบเดียวกัน และทำ heat fix

-หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยเสมียร์ประมาณ 1 นาที

- เทส่วนที่เหลือทิ้ง และล้างผ่านด้วน้ำปะปา ใช้ทิชชู่ซับรอบ ๆ รอยเสมียร์ให้แห้ง

-หยด สารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเสมียร์ ประมาณ 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำปะปา

- ล้างรอยเสมียร์ด้วย 95% ethyl alcohol เป็นเวลา 30 วินาที จนสังเกตุว่าไม่มีสีม่วงไหลออกมา

- หยด safranin-O ให้ท่วมรอยเสมียร์ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำปะปา และใช้ทิชชู่ซับให้แห้ง

-ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ objective กำลังขยาย 100x สังเกตุการติดสี รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ และเปรียบเทียบสีที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนแกรมบวกและแกรมลบ

3.5 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Fox and Stepaniak, 1983)

1. นำตัวอย่างแบคทีเรียที่เรืองแสงภายใต้ UV ถ่ายเชื้อลงในอาหาร TSB 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. กรอง crude enzyme ด้วย filter membrane ที่มีขนาดรูพรุน 0.22 µl

4. เตรียม reaction mixer ประกอบด้วย substrate mixer 20 µl และเติม crude enzyme 2 ml บ่มใน water bath ที่มีการเขย่า 125 รอบ/นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (mixer control ทำเอนไซม์ให้เสียสภาพโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ก่อนการเติมลงใน reaction mixer)

5. หยุดปฏิกริยาโดยการเติม ethanol/acetone (1:1) 10 ml หยด phenolphalein 0.1 % และทำการไตเตรทกับ 0.02M NaOH จนถึงจุดยุติ (คำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยกำหนดให้ 1 unit enzyme เท่ากับการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ในปริมาณเป็น µmol ต่อ นาที ภายใต้สภาวะกำหนด

3.6 การวิเคราะห์ Lipolytic activity (ดัดแปลงจาก Castro-Ochoa และคณะ 2005)

3.6.1การเตรียมอาหารและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อวิเคราะห์ Lipolytic activity

1. เลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวปลอดเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย nutrient broth 0.32% (w/v), $CaCl_2$ 0.1% (w/v), olive oil 2.5% (v/v) และ gum Arabic 1% (w/v) ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5

2. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.4 มาเลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. เก็บตัวอย่างและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. เก็บส่วนใสที่ได้ไปวัดค่า Lipolytic activity ต่อไป

3.6.2 การวิเคราะห์ Lipolytic activity

1. หลอดปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 ml enzyme extract, 0.8 ml 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) และ 0.1 ml 0.01 M p-nitrophenyl palmitate ในเอทานอล

2. ทำปฏิกริยาโดยบ่มที่สภาวะ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.25 ml 0.1 M Na_2CO_3 และทำให้เย็นในถาดน้ำแข็ง

4. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. ดูดส่วนใสที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้น

3.7 การตรึงเซลล์ (ดัดแปลงจาก สุขใจ และคณะ, 2551)

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

1. เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดอาหารเอียง NA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2. ใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหารเอียง NA แล้วใส่ลงในอาหาร NB ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ถ่ายเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร NB ที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะกอก ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่เครื่องบ่มเขย่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อดูความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารชนิดเดียวจนได้ค่า OD เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

3.7.2 วิธีการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต

1. ใช้ปริมาณเชื้อจากหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

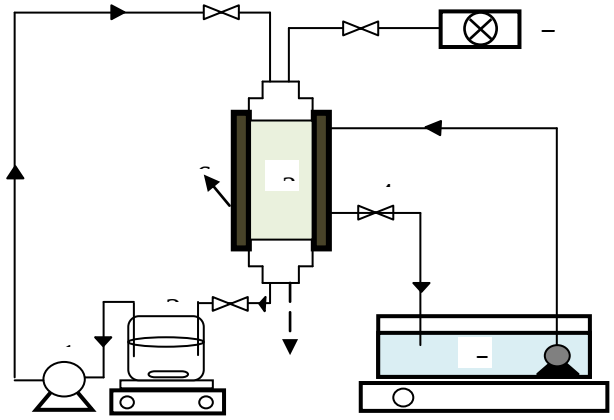
2. นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมแอลจิเนต (sodium alginate) 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

3. ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายผสม ฉีดผ่านรูเข็มขนาด 0.8 × 3 มิลลิลิตร ลงในสารสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.2 โมลาร์ เม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ นำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไปใส่ในน้ำตัวอย่างที่เตรียมไว้เพื่อศึกษา

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนของวิธีการตรึงเซลล์ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

3.8 การทำปฏิกริยาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor

ถังปฏิกรณ์มีลักษณะเป็น Packed Tower ทำด้วยท่อ PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1” สูง 12” ปริมาตร 154.36 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งจะบรรจุเอนไซม์ตรึงรูปและสารละลายตั้งต้นจะถูกดูดเข้าตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากด้านบนสู่ด้านล่าง (downward feeding) ด้วย peristaltic pump ที่มีชุดควบคุมอุณหภูมิหุ้มอยู่ด้านนอก **(ดังรูปที่ 3)**



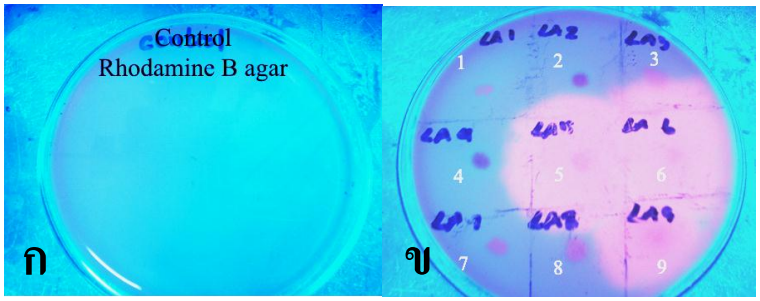
รูปที่ 3 ชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor ประกอบไปด้วย 1)ย peristaltic pump 2) ชุดกวนผสมซับสเตรต (magnetic stirrer และ ขวดฝาเกลียวขนาด 250 มล.), 3) Packed Tower, 4) วาล์ว, 5) water bath with temperature control, 6) Water heating socket, 7)หน่วยเติมเมทิลแอลกอฮอล์เป็นลำดับขั้น

สำหรับระบบ Batch – Recycle reaction จะประกอบไปด้วย Packed-Bed Tower ซึ่งจะบรรจุเอนไซม์ตรึงรูป 2.0 กรัม และสารละลายตั้งต้นถูกกวนผสมในขวดทดลองที่ประกอบกับชุด magnetic stirrer จะถูกดูดเข้าตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากด้านบนสู่ล่าง ด้วย peristaltic pump ที่มีชุดควบคุมอยู่ด้านนอก ในการเตรียมปฏิกริยาจะทำการเตรียมซับเสตรทในขวดทดลองที่ประกอบกับชุด magnetic stirrer โดยใช้อัตราส่วนเริ่มโมลต้นที่ 1 : 1 และจำทำการเติมเมทิลแอลกอฮอล์เป็นลำดับขั้นเพิ่มเติมอีกสองครั้ง โดยใช้อัตราส่วนโมล 1 : 1 ทุก ๆ 4 ชั่วโมงจากหน่วยเติมเมทิลแอลกอฮอล์เป็นลำดับขั้นซึ่งอยู่ด้านลนของ Packed-Bed Tower โดยการควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณของน้ำในปฏิกริยารวมไปถึงระยะเวลาในการทำปฏิกริยานั้น

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งจากตัวอย่างที่ได้จากดินและแหล่งน้ำตามสถานที่ต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียนผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งคัดแยกเชื้อโดยใช้อาหาร Rhodamine B olive oil agar โดยดูการเรืองแสงรอบโคโลนี (clear zone) ภายใต้แสดงอัลตราไวโอเลต **(ดังรูปที่ 4)**



รูปที่ 4 การเรืองของโคโลนีที่ให้ผล positive ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Rhodamine B olive oil agar โดยภาพ (ก.) control (ข) ไอโซเลท LA5, LA6, LA9

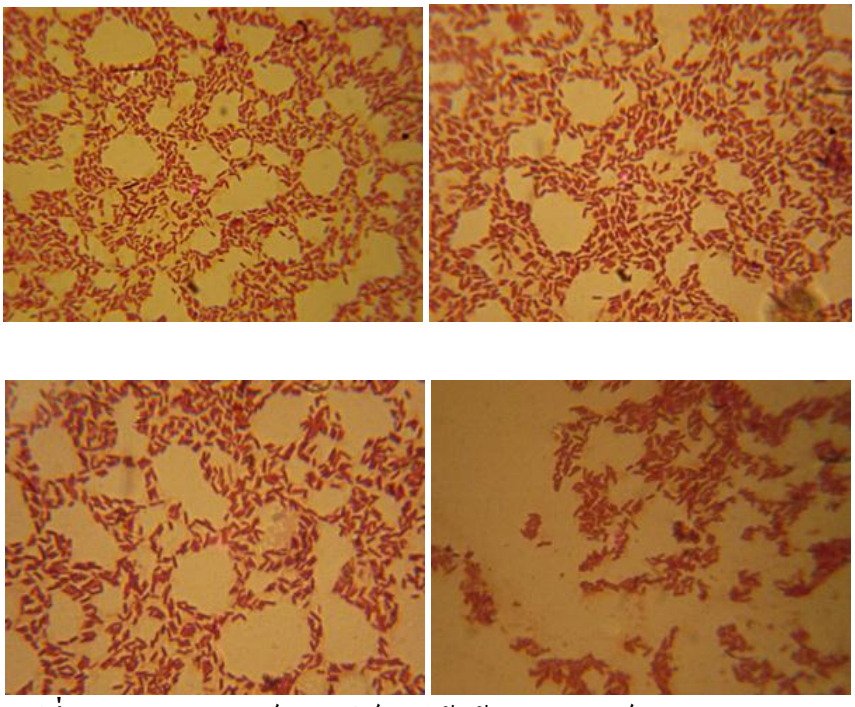
สามารถแยกเชื้อทั้งจากตัวอย่างดินและน้ำได้ทั้งหมด 95 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อที่ได้จากดินจำนวน 55 ไอโซเลท และเกิดการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจำนวน 4 โคโลนี และเชื้อที่ได้จากแหล่งน้ำจำนวน 40 ไอโซเลท และเกิดการเรืองแสดงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจำนวน 8 ไอโซเลต **(ดังแสดงในตารางที่ 4)**

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนของเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ รวมถึงค่าการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

แหล่งที่แยกเชื้อ	จำนวนไอโซเลทที่แยกได้	จำนวนไอโซเลทที่เกิดการเรืองแสงภายใต้แสดง UV
จากตัวอย่างดิน	55	4
จากตัวอย่างน้ำ	40	8

4.2 การตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยการย้อมสีแบคทีเรีย

จากการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีย้อมสีแบคทีเรีย พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้หลังจากข้อ 4.1 เซลล์ย้อมติดสีแดงของ safranin-O แสดงว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ **(ดังรูปที่ 5)**



รูปที่ 5 รูปภายของเซลล์จุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ย้อมติดสีแดงของ Safranin-O

4.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

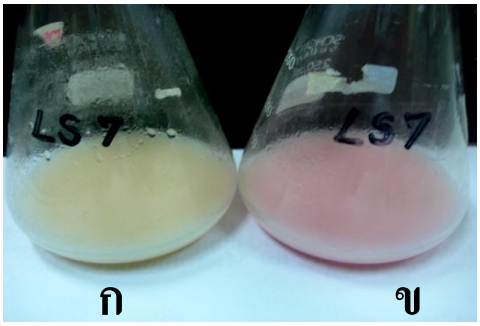
นำตัวอย่างจุลินทรีย์ที่เรืองแสงภายใต้ UV ถ่ายเชื้อลงในอาหาร TSB เพื่อส่งเสริมการเจริญ จากนั้นนำไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยหยด phenolphalein 0.1 % เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ และทำการไตเตรทกับ 0.02M NaOH จนถึงจุดยุติ **(ดังรูปที่ 6)**

(คำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยกำหนดให้ 1 unit enzyme เท่ากับการปลดปล่อยไขมัน (free fatty acid) µmol ต่อ นาที ภายใต้สภาวะกำหนด) ซึ่งคำนวณหาปริมาณได้ด้วยการนำไปไทเทรตกับ 0.02 M NaOH **(ดังแสดงในตารางที่ 5)** โดยใช้สูตร

$$\textbf{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = \frac{\text{ปริมาตร NaOH หลังทำ – ปริมาตร NaOH ก่อนทำปฏิกิริยา x [NaOH]}}{\text{เวลา (นาที) x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ (ml)}}$$

ตารางที่ 5 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการไตเตรท

จากตัวอย่างดิน		จากตัวอย่างน้ำ	
ไอโซเลท	**Lipase activity (U/mL)**	**ไอโซเลท**	**Lipase activity (U/mL)**
LS3	0.12	LH5	1.21
LS10	0.21	LH6	1.01
LS21	0.15	LH9	0.45
LS26	0.32	LH15	1.13
		LH17	0.95
		LH19	0.23
		LH25	0.21
		LH32	0.15

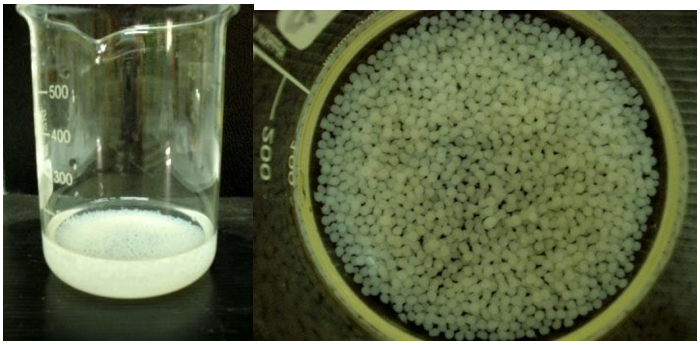


รูปที่ 6 แสดงผลการไตเตรทเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์กับ 0.02 M NaOH โดยใช้ 0.1 %phenolphalein เป็นอินดิเคเตอร์ ภาพ (ก) ก่อนไตเตรท ภาพ (ข) แสดงลักษณะของจุดยุติที่เกิดขึ้นหลังการไตเตรท

4.4 ผลการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต

หลังจากเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับตรึงด้วยโซเดียมแอลจิเนต โดยใช้สารละลายโซเดียมแอลจิเนต ที่ความเข้มข้น 1 % 1.5 % และ 2 % พบว่าที่ความเข้มข้น 2 % โซเดียมแอลจิเนต หลังจากหยดลงบนสารละลาย 0.2 M $CaCl_2$ เม็ดเจลมีความคงตัว และไม่แตกตัว เหมาะแก่การตรึงเซลล์มากที่สุด **(ดังรูปที่ 7)**

จากนั้นนำเม็ดเจลไปบรรจุลงกระบอก ของถังปฏิกรณ์ เพื่อทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นกับน้ำมันสกัดจากหร่าย สำหรับผลิตไบโอดีเซล



รูปที่ 7 แสดงเม็ดเจลที่เกิดขึ้น ของเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่ 2% โซเดียมแอลจิเนต ที่หยดลงบนสารละลาย 0.2 M $CaCl_2$

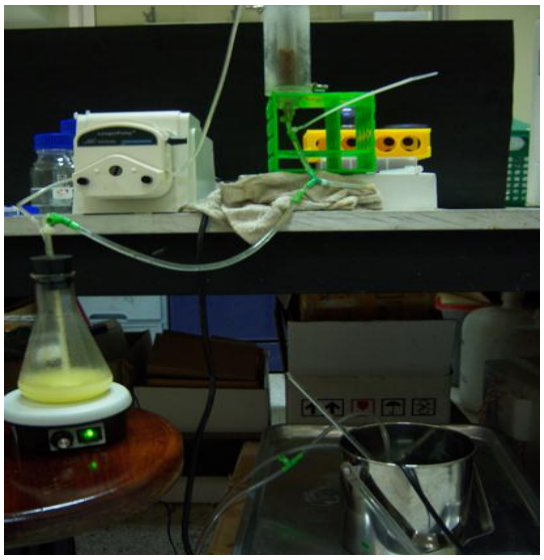
4.5 การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่าย

4.5.1 องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำมันสาหร่าย

จากการศึกษาคุณลักษณะของน้ำมันสาหร่ายก่อนที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ในชุดถังปฏิกรณ์ พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมัน ได้แก่ กรดไมริสติค (Myristic acid) กรดปาล์มมิติค (Palmitic acid) กรดปาล์มมิโตเลอิค (Palmitoleic acid) กรดสเตรียริค (Stearic acid) กรดโอเลอิค (Oleic acid) กรดลิโนเลอิค (Linoleic acid) กรดลิโนเลนิค (Linolenic acid)

4.5.2 การทดลองปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor

โดยใช้สภาวะของการทำปฏิกริยาคือ molar ratio (4 : 3), Temperature (35 ^{O}C), water add (10%wt. oil), Flow rate (60 ml/min), และ immobilize cell จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปส **(ดังรูปที่ 8)**

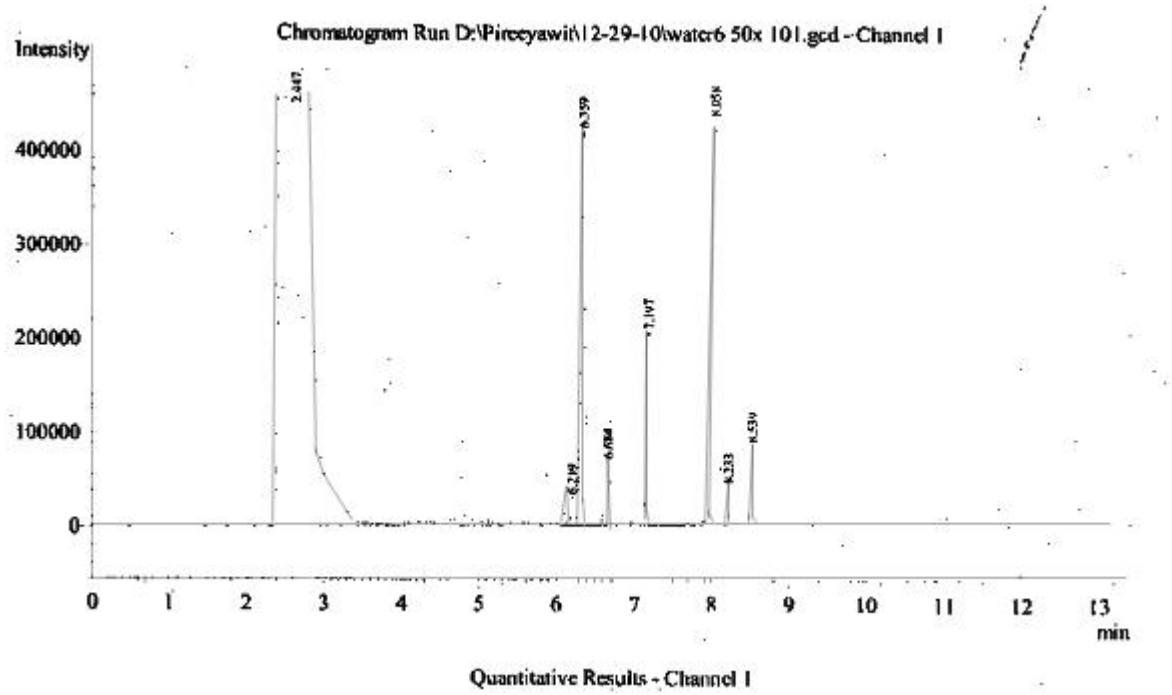


รูปที่ 8 แสดงชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor

ปฏิกริยาในขวดทดลองขนาด 250 ml. ที่ควบคุมอุณหภูมิด้วย heater ปรับอุณหภูมิได้ โดยจะทำการหมุนกวนโดยใช้ magnetic stirrer โดยมีน้ำมันมะกอก 0.01 mol เมื่อครบเวลาที่ทำการออกแบบทดลองจะทำการดูดตัวอย่าง ~ 5 ml โดยใช้ syringe ทำการกรองเอาเศษเอนไซม์ออกด้วย syringe filter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่ตู้ -20 ^{O}C และวิเคาะห์ตัวอย่างไม่เกิน 2 วัน

4.5.3 การผลิตไบโอดีเซลโดยนำไปวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography

ปริมาณสารเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น **(ดังรูปที่ 9)**



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของน้ำมันดีเซลล์หลังจากผ่านปฏิกริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นในชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch – Recycle reactor

4.6 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ คือ

4.6.1 น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้ มีสีเหลืองทอง เมื่อสังเกตุด้วยตาเปล่า

4.6.2 ค่าความหนาแน่น เท่ากับ 0.884 กรัม/มิลลิลิตร

4.6.3 ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 7.2

4.7 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสาหร่ายกับวัตถุดิบชนิดอื่น

พบว่าน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสาหร่าย และวัตถุดิบอื่น มีกรดไขมันไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่มีการศึกษาชนิดของกรดไขมันที่พบในน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบหรือพืชน้ำมันชนิดอื่นเช่น น้ำมันปาล์ม หรือ น้ำมันจากถั่วเหลือง จะแตกต่างเพียงปริมาณเปอร์เซ็นต์ที่พบเท่านั้น จากนั้นเมื่อนำมาผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นในชุดถังปฏิกรณ์แบบ Batch – Recycle reactor ก็จะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากพืชน้ำมันชนิดอื่น เช่นปริมาณสารเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น ค่าความหนาแน่นและค่าความเป็นกรดด่าง รวมถึงสีของน้ำมันที่เหมือนกับน้ำมันไบโอดีเซลทางการค้า ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานสากลของอเมริกา (ASTM)
อย่างไรก็ตามค่าผลพลอยได้ หรือ Yeild ของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ในครั้งนี้ ยังต่ำกว่ามาตรฐานคือ มีค่าเปอร์เซ็นต์ของผลพลอยได้เพียง % ซึ่งตามมาตรฐานสากลต้องมีค่าเปอร์เซ็นต์ของผลพลอยได้ตามมาตรฐาน ASTM 96.5% ขึ้นไป

บทที่ 5
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

5.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส จากแหล่งธรรมชาติ โดยเก็บจากตัวอย่าง 2 แหล่งคือ ตัวอย่างที่เก็บจากดิน และตัวอย่างที่เก็บจากน้ำ โดยสามารถคัดแยกจากดินได้ 55 ไอโซเลท และจากน้ำได้ 40 ไอโซเลท แต่เมื่อนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้น โดยดูการเรืองแสงบนอาหาร Rhodamine B olive oil agar เพื่อดูการเรืองแสงรอบโคโลนี ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกด้วยวิธีนี้ จากตัวอย่างดินเหลือเพียง 4 ไอโซเลท และตัวอย่างน้ำ เหลือเพียง 8 ไอโซเลท และเมื่อนำโคลนีที่ให้ผลบวก ไปย้อมสีแบคทีเรียและส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 X พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ

5.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกเบื้องต้นมาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยการไตเตรท พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุดอยู่ที่ 1.21 unit/mL มากกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุดเพียง 0.32 unit/mL และเมื่อเปรียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากจำนวนไอโซเลททั้งหมด พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน

5.3 การตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมแอลจิเนต

เมื่อดูความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1พบว่าเม็ดเจลมีการแตกและรั่ว ตั้งแต่ตอนเริ่มตรึงเซลล์ และที่ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 พบว่าเม็ดเจลก็ยังแตกตัว และยังคงตัวได้ไม่ดี จากนั้นทดลองตรึงด้วยความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนตร้อยละ 2 พบว่า เม็ดเจลมีความคงตัวดีซึ่งเหมาะแก่การนำไปใส่ในกระบอกของชุดถังปฏิกรณ์สำหรับทดสอบปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น สำหรับผลิตไบโอดีเซลต่อไป

5.4 การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสกัดจากสาหร่าย

น้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสกัดจากสาหร่าย หลังผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่น พบว่า มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับมาตรฐานของประเทศสหรัฐอเมริกา หรือ (ASTM) ซึ่งเป็นมาตรฐานที่กำหนดคุณสมบัติของเชื้อเพลิงในรถยนต์ โดยพบว่า จากการตรวจสอบเบื้องต้นของน้ำมันไบโอดีเซลอย่าง

น้อย 3 ค่าที่สำคัญดังนี้ การทดสอบค่าถ่วงจำเพาะโดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ ซึ่งน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าถ่วงจำเพาะอยู่ที่ 0.884 กรัม/มิลลิลิตร โดยตามมาตรฐานจะมีค่าระหว่าง 0.860-0.900 ถือว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐาน รวมถึงการทดสอบสีด้วยตาเปล่า โดยน้ำมันจะมีสีเหลืองทอง และการทดสอบค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH meter ควรจะอยู่ในช่วง 6-7.5 ซึ่งน้ำมันที่ผลิตได้นี้ก็มีค่า pH เท่ากับ 7.2

5.5 ข้อจำกัดของงานวิจัย

1. ตัว columm ที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ เมธิลเอสเทอร์ ด้วย GC มีข้อจำกัดในการตรวจหากรดไขมันได้แค่ C16 และ C18 เท่านั้น
2. ในระหว่างการทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์อาจจะมีการระเหยของ alcohol ทำให้มี substrate มีไม่เพียงพอในการทำปฏิกิริยา
3. รวมถึงความดัน หรือ pressure ของวัสดุ packing material ของการทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ ทำให้เกิดการไหลของ ของเหลวหรือ substrate ไปสัมผัสกับ enzyme เร็วเกินไป ทำให้ enzyme เร่งปฏิกิริยาได้ไม่เต็มที่
4. และเอนไซม์ที่ถูก packing อยู่ ตัวของ alcohol เองก็ไปทำให้วัสดุ packing material เสื่อมเร็วขึ้น

เอกสารอ้างอิง

สุขใจ ชูจันทร์ และ ศิริประภา มั่นตรง. 2551. การเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยชใช้เชื้อ Lactobacillus casei TISTR 11341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มรกต ตันติเจริญ. 2555. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย การวิจัยพัฒนาเพื่อการผลิตพลังงาน. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

Babcock R. E., E. C. Clausen, M. Popp, and W. B. Schulte. Yield Characteristics of Biodiesel Produced from Chicken Fat-Tall Oil Blended feed stocks Completion Report. (cited 24 Jan 2011). Available from : URL http://ww2.mackblackwell.org/web/research/all_research_projects/2000s/ 2092/mbtc-2092.htm

Castro-Ochoa, L. D., C. Rodriguez-Gomez, G. Valerio-Alfaro and R.O. Ros, 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme Microb. Technol., 37, 648 - 654.

Fox, P. F., and L. Stepaniak. 1983. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. J. Dairy Res. 50,77 – 89.

Fukuda H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. J Biosci Bioeng. 92, 405–16.

Gary E. K. 1999. Biol 230 Lab manul. (cited 12 Nov 2011). Available from : URL : http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/

Gilbert, E.J., A. Cornish and C.W. Jones. 1991. Purification and properties of extrcellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J. Gen. Microbiol. 137, 2223 - 2229.

Godtfredsen, S.E. 1990. Microbial enzymes and technology 2 ed. Elsevier science publisher LTD. New York.

Jaeger KE and M. T. Reetz. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol. 16, 396-403

Kazlauskas R.J. and U. T. Bornscheuer. 1998. Biotransformations with lipases. Wiley-VCH, Weinheim, NY.

Kumar, R., S.C. Mukherjee, K.P. Prasad and A.K. Pal. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita*(Ham.). Aquacult. Res. 37, 1215-1221.

Ma, F. And M. Hanna. 1999. Biodiesel production : a review. Bioresource Technology. 70, 1 - 15.

Mayordomo, I. F. Randez-Gil and J. A. Prieto. 2000. Isolation purification and characterization a cold active lipase from *Aspergillus nidulans*. J. Agri. Food Chem. 48, 105 – 109.

Meher L.C., D. V. Sagar and S. N. Naik. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review: Renew. Sustain. Energy. Rev. 10, 248–68.

Schmid R.D. and R. Verger. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 37, 1608-1633.

Sharma R., Y. Chisti, and U. C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol. Adv.19, 627 – 62.

Shama, Y. C., B. Singh and S.N. Upadhyay. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel : A review. Fuel, 87, 2355 – 2372.

Sorokin, D. Y and B.E.Jones 2009. Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganismd with particular emphasis on alkaline conditions. Microbiology. 78 (1), 125-130.

Um, B.H. and Y. S. Kim. 2009. Review: a chance for Korea to advance algal – biodiesel technology. J. Ind. Eng. Chem. 15, 1 – 7.

Yusuf Chisti. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology advances. 25, 294 - 306