



รายงานโครงการวิจัย

การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ  
The production of renewable energy from biomass  
using biotechnological approach.

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

MRs. Boonruanrat Ruangwised

ปี พ.ศ. 2560



## รายงานโครงการวิจัย

การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ  
The production of renewable energy from biomass  
using biotechnological approach.

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

MRs. Boonruanrat Ruangwised

ปี พ.ศ. 2560

## คำปรารภ

พลังงานทดแทนโดยทั่วไปหมายถึงพลังงานที่ใช้ทดแทนพลังงานจากฟอสซิล เช่น ถ่านหิน ปิโตรเลียม และแก๊สธรรมชาติซึ่งปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์มหาศาลอันเป็นสาเหตุโลกร้อน ตัวอย่างพลังงานทดแทนที่สำคัญเช่น พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานความร้อนใต้พิภพ เชื้อเพลิงชีวภาพ พลังงานน้ำมันดิบ น้ำมันปาล์ม เป็นต้น ในปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกพยายามศึกษาและค้นหาพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ และมีประสิทธิภาพดียิ่งกว่าพลังงานแบบเดิม เพื่อช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย ลดปัญหามลพิษและสิ่งแวดล้อมของโลก รวมทั้งช่วยประหยัดพลังงาน ดังนั้นพลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือก จึงเป็นพลังงานที่สามารถนำมาใช้ทดแทนพลังงานแบบเดิมได้อย่างไม่จำกัด ทั้งยังหาได้จากธรรมชาติและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เพื่อช่วยลดปัญหาการขาดแคลนพลังงาน รวมทั้งลดมลพิษอีกด้วย ซึ่งพลังงานส่วนใหญ่เกิดจากการนำเอาพืชมาหมักเพื่อเปลี่ยนจากแป้งเป็นน้ำตาลจากนั้นจึงเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์หรือกรดบางชนิดช่วยย่อย ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากพืช 2 ประเภท คือพืชประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย บีทรูท และพืชจำพวกแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น และยังช่วยแก้ปัญหาผลผลิตทางการเกษตรล้นตลาด เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ซึ่งส่งผลดีต่อประเทศชาติโดยรวม อีกทั้งยังสร้างความมั่นคงด้านพลังงานจากการใช้วัตถุดิบที่ผลิตได้ภายในประเทศ ในโครงการนี้ได้วิจัยเพื่อหาพลังงานทดแทนจากชีวมวลอื่นๆ ได้แก่ เซลลูโลส สาหร่าย ปาล์ม น้ำมัน ตลอดจนการศึกษาด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น โดยมุ่งเน้นการวิจัยครอบคลุมการผลิตพลังงานทดแทน ทั้งการผลิตพลังงานไบโอเอทานอล การผลิตไบโอดีเซล การสร้างเครื่องจักรกลที่เกี่ยวข้องกับการบดย่อยชีวมวล การสร้างเครื่องจักรที่เกี่ยวข้องกับการเก็บเกี่ยวสาหร่าย เป็นต้น

เอกสารรายงานโครงการการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ของกรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการจัดทำรายงานนี้ทุกท่านและหากมีข้อผิดพลาดใดๆในฐานะหัวหน้าโครงการวิจัยการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพต้องขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองงวิเศษ

หัวหน้าโครงการการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

30 มีนาคม 2561

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
บทนำ	3
บทคัดย่อ	9
<b>กิจกรรมที่ 1</b> การโคลนยีน พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตพลังงานทดแทน	11
<b>การทดลองที่ 1.1</b> การโคลนยีนแลคเคสที่ควบคุมการย่อยสลาย ลิกนินทางชีวภาพ โดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ	11
<b>การทดลองที่ 1.2</b> การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันและ ถ่ายเข้าสู่สาหร่าย <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> สำหรับผลิตไบโอดีเซล	39
<b>การทดลองที่ 1.3</b> การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> S068 ด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกระบวนการหมักแบบแห้ง	56
<b>กิจกรรมที่ 2</b> การผลิตไบโอเอทานอล	69
<b>การทดลองที่ 2.1</b> การผลิตเอทานอลจากชานอ้อยและฟางข้าว ในระดับชุมชน	69
<b>การทดลองที่ 2.2</b> การผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวลแบบครบวงจร	80
<b>กิจกรรมที่ 3</b> การผลิตไบโอดีเซล	90
<b>การทดลองที่ 3.1</b> การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำ โดยใช้ไลเปส	90
<b>กิจกรรมที่ 4</b> การพัฒนาเครื่องจักรกลในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทน จากพืชชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในระดับชุมชน	126
<b>การทดลองที่ 4.1</b> การพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน สำหรับชีวมวลในระดับชุมชน	126
<b>การทดลองที่ 4.2</b> การพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชีวมวล สำหรับการผลิตไบโอเอทานอล	144
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	155
บรรณานุกรม	
ภาคผนวก	

## กิตติกรรมประกาศ

เอกสารรายงานโครงการ การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ฉบับสมบูรณ์ ปี 2560 ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบคุณคณะผู้บริหารกรมวิชาการเกษตร ที่จัดสรรงบประมาณสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการ

ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือรายงานผลการวิจัยและวิธีการดำเนินการวิจัยด้วยความมุ่งมั่นจนทำให้ โครงการนี้สำเร็จลงได้ส่วนหนึ่งและมีความสำคัญสำหรับการวิจัยต่อไปในอนาคตที่จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อชาติบ้านเมืองและเกษตรกรซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญของชาติ

ขอขอบคุณคณะผู้บริหารสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ผู้อำนวยการสำนักฯ หัวหน้ากลุ่มวิจัย เทคโนโลยีทางการเกษตร ตลอดจนผู้เชี่ยวชาญที่ช่วยให้คำปรึกษาจนทำให้โครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอขอบคุณบุคลากรผู้ช่วยวิจัยที่ทำให้รายงานนี้เสร็จสมบูรณ์และหวังว่าจะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยและผู้ที่เกี่ยวข้องทั้งหลายเพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยใหม่ๆต่อไปในอนาคต

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

## ผู้วิจัย

### นางบุญเรือนรัตน์ เรื่องพิเศษ หัวหน้าโครงการ

นางสาวภรณ์ี สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นางสุภาวดี จ้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นางสาวอรุณทัย ชาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นางสาวมัทนา ศรีหัตถกรรม	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นางสาวจิราพร แก่นทรัพย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นายพยุงค์ศักดิ์ รวยอารี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรมวิชาการเกษตร
นายพินิจ จิระคกุล	ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น	กรมวิชาการเกษตร
นายวุฒิพล จันทร์สระคู	ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น	กรมวิชาการเกษตร
นายศักดิ์ชัย อาษาวัง	ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น	กรมวิชาการเกษตร
นายประยูร เอ็นมาก	สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร	

## บทนำ

พลังงานทดแทนคือเชื้อเพลิงที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพของโลก เช่น ไบโอดีเซล ไบโอดีเซล และไบโอแก๊ส เป็นต้น ได้มีศูนย์กลางการผลิตในทวีปยุโรปและอเมริกา แต่อนาคตคาดว่าจะย้ายมาสู่ทวีปเอเชีย เนื่องจากการใช้เชื้อเพลิงชีวภาพสูงขึ้นเรื่อยๆ และประเทศไทยจัดว่าเป็นพื้นที่ทางการเกษตรกรรม สามารถผลิตไบโอดีเซลจากพืชน้ำมันหลายชนิดซึ่งหาได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าหากพื้นที่ใดมีข้อจำกัดในเรื่องพื้นที่เพาะปลูกพืชน้ำมัน และสาหร่ายขนาดเล็กเป็นพืชที่มีศักยภาพมีข้อได้เปรียบอย่างมาก เพราะพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชให้น้ำมันถึง 3 เท่า (Chisti, 2007) อีกทั้งเป็นพืชที่สามารถส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกได้ ให้มีรายได้ที่เพิ่มขึ้น และสามารถผลิตไบโอดีเซลใช้เองภายในประเทศ ประหยัดพลังงานจากการนำเข้า มีค่าครองชีพที่ลดต่ำลง มีรายได้ที่เพิ่มขึ้น ยกระดับความเป็นอยู่ในสังคมให้ดีขึ้นตามลำดับ

การผลิตเอ็นไซม์เซลลูลาซจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เทคนิค solid state fermentation เพื่อลดต้นทุนการผลิตลงให้สามารถแข่งขันได้ เนื่องจากเอ็นไซม์นี้ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะการผลิตไบโอดีเซลจากพืชต่าง ๆ ตลอดจนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การผลิตเอ็นไซม์นี้หากทำให้มีความง่ายไม่ซับซ้อน มีความปลอดภัย จะทำให้ขยายผลสู่เกษตรกรได้โดยตรงเพื่อให้เกิดการสร้างงานกระจายตามภูมิภาคต่าง ๆ ระดับชุมชน ส่งเสริมให้เกิดวิสาหกิจชุมชนด้านการผลิตพลังงานหมุนเวียนในท้องถิ่น ใช้ทรัพยากรในท้องถิ่นอย่างมีคุณค่า ขนาดของการผลิตไม่มากจนเกินไป หารวัตถุดิบได้ง่าย ไม่มีต้นทุนการขนส่ง นอกจากการผลิตเอ็นไซม์แล้วยังสามารถขยายผลไปสู่การผลิตไบโอดีเซลจากลิกโนเซลลูโลสระดับชุมชนได้อีกด้วย

การผลิตเอทานอลจากชีวมวล เป็นกระบวนการซึ่งเกิดจากการหมักพืช เศษซากพืช ให้เป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อทำให้บริสุทธิ์ 95 % จะเรียกว่า “เอทานอล” โดยการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส แบ่งขั้นตอนการผลิตออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ การปรับสภาพวัตถุดิบ การย่อยหรือไฮโดรไลซิสและการผลิตเอทานอล แม้ว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลในปัจจุบันจะใช้แป้งและน้ำตาลเป็นหลัก เช่น มันสำปะหลัง กากน้ำตาล แป้งข้าวโพด มันสำปะหลังเส้นตากแห้ง แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น แต่เนื่องจากเป็นพืชอาหาร จึงมีการค้นคว้าหาวัสดุอื่นมาทดแทนได้แก่กลุ่มเซลลูโลสที่เรียกเอทานอลจากกระบวนการผลิตเช่นว่า lignocellulosic ethanol จะสามารถผลิตได้จากต้นพืช และเศษซากพืชหรือชิ้นส่วนกากของเสียจากพืช ในต่างประเทศเช่นสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ผลิตจาก ต้นข้าวโพด ต้นข้าวสาลีเป็นต้น ในประเทศไทยยังมีวัตถุดิบเป็นแป้งอยู่จำนวนมากที่ไม่ใช่พืชอาหารโดยตรงได้แก่มันสำปะหลัง แต่ก็เป็นพืช

อาหารสัตว์และต้องมีผลกระทบต่อการผลิตเนื้อสัตว์อย่างแน่นอน จึงมีการค้นคว้าหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆ ขึ้น สำหรับการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งเป็นยุคต่าง ๆ 4 รุ่น ได้แก่ ยุคที่ 1 เป็นยุคของการผลิตจากกากน้ำตาลและผลิตจากแป้ง ยุคที่ 2 ผลิตจากลิกโนเซลลูโลสและยุคที่ 3 ผลิตจากสาหร่าย ยุคที่ 4 ผลิตจากจุลินทรีย์ ประเทศไทยกำลังอยู่ในยุคที่ 1 และสามารถผลิตได้เพียงพอต่อการใช้ในประเทศแต่จำเป็นต้องมีงานวิจัยรองรับสำหรับการผลิตเอทานอลยุคอื่น ๆ ด้วย

การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลจากชีวมวลให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นเป็นสิ่งที่ต้องดำเนินการอย่างไรก็ดี ปัญหาอุปสรรคของการส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทน ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเอทานอล ไบโอดีเซล หรือการผลิตไฟฟ้าจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือ ปัญหาด้านการขาดแคลนวัตถุดิบ ไม่ว่าจะเป็น มันสำปะหลัง กากน้ำตาล สำหรับการผลิตเอทานอล หรือน้ำมันปาล์ม น้ำมันพืชใช้แล้ว สำหรับการผลิต ไบโอดีเซล ซึ่งแนวทางการแก้ไขจำเป็นต้องมีการส่งเสริมการปลูก มันสำปะหลัง อ้อย ปาล์มน้ำมัน หรือ การส่งเสริมการปลูกพืชพลังงานอื่น ๆ ที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล หรือ ไบโอดีเซล เช่น ข้าวฟ่างหวาน สบู่ดำ เป็นต้น แต่สำหรับปัญหาอุปสรรคของการผลิตพลังงานจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรนั้น แตกต่างกันไป กล่าวคือ ประเทศไทยมีแหล่งชีวมวลที่เป็นเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมากมายกระจัดกระจายไปในภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศ ทั้งที่เป็นเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่อยู่ในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปผลผลิตเกษตร และ ไร่ นา สวนเกษตร ทำให้ศักยภาพเชิงพาณิชย์ของการใช้เชื้อเพลิงจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีอยู่ มาก ซึ่งจากข้อมูลการสำรวจปริมาณเชื้อเพลิงชีวมวลคงเหลือ ในปี 2549 ของมูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม พบว่า มีเชื้อเพลิงชีวมวลที่ยังไม่ถูกนำมาใช้เป็นพลังงานความร้อนหรือไฟฟ้า อีกกว่า 34 ล้านตัน คิดเป็นพลังงานเทียบเท่ามันดิบ 7,200 ตัน (ktoe) จากปริมาณของวัสดุการเกษตรดังกล่าว การนำฟางข้าวมาผลิตเป็นเอทานอลก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อพัฒนาพลังงานทดแทนที่ยั่งยืนสำหรับประเทศไทยโดยปรับปรุงการผลิตให้อยู่ในขนาดที่เหมาะสมเนื่องจากการผลิตแบบเดิมมุ่งเน้นไปที่ระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ แต่นำข้าวของไทยเป็นพื้นที่ขนาดเล็ก ทำให้รวบรวมวัตถุดิบได้ยาก การลดขนาดโรงงานลงให้อยู่ในระดับชุมชนจึงน่าจะตอบโจทย์ได้ดีกว่า

ประเทศไทยก็จัดว่าเป็นพื้นที่ทางการเกษตรกรรม วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพก็มีมาก ประกอบกับสภาพอากาศในการเพาะปลูกพืชพลังงานก็เอื้ออำนวย ซึ่งพืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับที่มนุษย์บริโภค ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ ข้าวฟ่างหวาน สบู่ดำ และสาหร่าย เป็นต้น จึงเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นไบโอเอทานอล และไบโอดีเซล โดยเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กเป็นพืชที่มีศักยภาพมีข้อได้เปรียบอย่างมาก เพราะพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชให้น้ำมันถึง 3 เท่า (Chisti, 2007) การจะได้มาซึ่งน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่ายต้องมีการผ่านขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บเกี่ยว และการสกัดน้ำมัน ซึ่งขั้นตอนในกระบวนการผลิตเป็นไบโอเอทานอลหรือไบโอดีเซลจากสาหร่ายชีวมวล ปัญหาและอุปสรรคของ



อุตสาหกรรมสาหร่ายขนาดเล็ก คือ ขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากขนาดที่เล็กมากในระดับไมโครเมตร (5-50 ไมโครเมตร) จึงทำให้การแยกสาหร่ายออกจากน้ำเป็นไปได้ยากมาก ดังนั้นการพัฒนาเครื่องปั่นแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวลระดับชุมชนขนาดย่อม เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์ในปริมาณมากๆได้ และช่วยย่นระยะเวลาในขั้นตอนการผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตกตะกอนเซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ amylase cellulase และ Xylanase ที่ผลิตได้เองของกรมวิชาการเกษตร เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการหมักเป็นเอทานอลในปริมาณมากได้เช่นกัน และสามารถส่งเสริมให้เกษตรกรผลิตไบโอเอทานอลหรือไบโอดีเซลใช้เองภายในประเทศ ประหยัดพลังงานจากการนำเข้า มีค่าครองชีพที่ลดต่ำลง มีรายได้ที่เพิ่มขึ้น ยกย่องระดับความเป็นอยู่ในสังคมให้ดีขึ้นตามลำดับ สำหรับการวิจัยพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน ได้กำหนดกรอบแนวความคิดของเครื่องต้นแบบให้สามารถสร้างได้ราคาถูกกว่าการนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาค่อนข้างแพง โดยเครื่องต้นแบบควรมีความสามารถในการปั่นน้ำ (Hydraulic capacity) 3,000 ลิตร/ชั่วโมง มีความสามารถในการปั่นแยกตะกอนสาหร่าย (Feed rate) : 200-400 ลิตร/ชั่วโมง ตัวเครื่องประกอบไปด้วยมอเตอร์ขนาด 4.0 กิโลวัตต์ ความเร็วรอบในการหมุนเหวี่ยง 2,000 - 3,000 รอบ/นาที พร้อมทั้งอุปกรณ์ควบคุม และปรับความถี่ ระบบคายกากจุลินทรีย์ (สาหร่าย) และแผ่นแยก (Disc Stack) ผลิตจากสแตนเลสสตีล ความจุของช่องกักเก็บกากจุลินทรีย์ไม่น้อยกว่า 0.9 ลิตร ระบบระบายน้ำที่ผ่านกระบวนการเหวี่ยงแบบปิดภายใต้แรงดันโดยปั๊มเซนติพิทอล ระบบคายกากจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการเหวี่ยงแบบเปิด โดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลก (Gravity discharge of the solids) แผงควบคุมข้อมูลการทำงาน และระบบตั้งเวลาในการคายกากจุลินทรีย์ อุปกรณ์เชื่อมต่อส่วนระบบป้อน และ คายกากเซลล์จุลินทรีย์

โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเลี้ยงขนาดประมาณ 10,000 ลิตร โดยนักวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ที่ร่วมงานวิจัย ซึ่งออกแบบระบบการเก็บเกี่ยวสาหร่ายขึ้นจากบ่อเพาะเลี้ยง มาทำการแยกกากตะกอนและน้ำออกจากกันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายที่พัฒนาขึ้น และออกแบบให้มีระบบหมุนเวียนน้ำที่แยกออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนกากหรือตะกอนก็นำไปสู่ขั้นตอนการสกัดน้ำมันต่อไป

ในส่วนการลดขนาดของเชื้อเพลิงชีวมวล ให้มีขนาดเล็กเป็นผงละเอียด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายนั้นจะต้องทำการบดย่อยลดขนาด 2 ชั้นหรือมากกว่า โดยการลดขนาดทั้งแบบเปียกและแบบแห้งจะใช้เครื่อง Chipper/Chopper เพื่อให้ได้ขนาดเล็กลงและใช้ เครื่องบด Grinder หรือ Hammer Mills โดยลักษณะวัสดุที่จะทำการบดย่อย ชั้นที่ 2 นั้นแตกต่างกัน โดยที่ Grinder จะเหมาะสมกับการบดย่อยวัสดุที่อ่อนนุ่ม มีความชื้นสูง ส่วน Hammer Mill จะเหมาะสมกับวัสดุที่แข็งและมีความชื้นต่ำ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงสมบัติของพืชชีวมวล เช่น หญ้าเนเปียร์ ซึ่งผ่านการสับย่อยมาแล้ว การบดย่อยแบบเปียกจะใช้ Grinder บดตามอีกครั้ง หลักการบดและแรงเฉือนซึ่งจำเป็นต้องออกแบบมีความเหมาะสม เนื่องจากปัจจุบันเครื่องมือที่อยู่ในท้องตลาดยังมีประสิทธิภาพการบดต่ำ ไม่สามารถบดในปริมาณมากๆ ได้ ทำให้คณะผู้วิจัยเสนอแนวทางการออกแบบและ

พัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกที่มีอยู่ในปัจจุบันให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และเหมาะสำหรับพืชชีวมวลในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล

สำหรับการออกแบบและพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกสำหรับพืชชีวมวล ให้สามารถบดย่อยวัตถุดิบต่าง ๆ ความละเอียดตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร ถึง 5 ไมครอน จนมีความละเอียดได้ถึงระดับครีม โดยเฉพาะการบดย่อยพืชชีวมวลด้วยหินบดหรือล้อบด ซึ่งทำมาจากวัตถุดิบชนิดพิเศษ สามารถถอดเปลี่ยนไปใช้หัวบดชนิดต่าง ๆ ได้ตามความเหมาะสมของวัสดุ ต้นกำลังใช้มอเตอร์ขนาด 3-5 แรงม้า และ Inverter เพื่อปรับความเร็วรอบได้อย่างอิสระ การทำงานของเครื่องขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ไฟฟ้า 1 เฟส ความเร็วรอบ 1,450 รอบต่อนาที ส่งกำลังผ่านสายพานไปยังเกียร์ทด ทำหน้าที่เปลี่ยนทิศทางการหมุนจากระนาบแนวตั้งให้อยู่ในระนาบแนวนอน และลดความเร็วรอบ จนแกนที่ใช้ยึดล้อบดทั้งสองข้างหมุนด้วยความเร็วรอบประมาณ 100 - 120 รอบต่อนาที ขณะเครื่องทำงานล้อบดจะหมุนรอบตัวเองไปด้วย ทำให้เกิดแรงบดกดลงภายในอ่างอย่างต่อเนื่อง สามารถบดวัสดุพืชชีวมวลที่ผ่านการหั่นย่อยมาแล้วระดับหนึ่งได้อย่างสม่ำเสมอ และสามารถบดได้อย่างต่อเนื่องจนได้ขนาดตามต้องการ

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนแลคเคสที่ควบคุมการผลิตเอ็นไซม์แลคเคสจากจุลินทรีย์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันเพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สายพันธุ์ *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตไบโอดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสด้วยกระบวนการหมักแบบ solid state fermentation ศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้และความคงตัวของเอ็นไซม์ไซลาเนสภายใต้สภาวะต่าง ๆ และเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์สำเร็จรูป
3. เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการผลิตไบโอเอทานอลชนิด 95% และเอทานอล 99.5% จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและพืชชีวมวลในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง
4. เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดไหลเทต่ำ จากกรดไขมันแบบต่าง ๆ
5. เพื่อวิจัยและพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสำหรับชีวมวลในระดับชุมชน
6. เพื่อวิจัยและพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชีวมวลสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการวิจัยครอบคลุมการผลิตพลังงานทดแทนทั้งการผลิตไบโอเอทานอลและการผลิตไบโอดีเซลได้แก่ การโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอ็นไซม์แลคเคสจากเชื้อจุลินทรีย์ แล้วทำการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* หรือ ยีสต์ เพื่อให้ยีนแสดงออกปริมาณมาก (over expression) ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์

เอนไซม์ และทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายลิกนิน เป็นการศึกษาเทคนิคการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลสปริมาณมากจากเชื้อรา *A. niger*S068 ภายใต้กระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วยวัสดุที่เหมาะสม สภาวะที่เหมาะสม การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้และการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในสภาวะที่ต่างกันเพื่อหาแนวทางในการเก็บรักษาเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพสูงเป็นเวลานาน การสร้างถังหมักแบบแห้ง (solid state fermentation) และการผลิตผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเกษตรและการผลิตพลังงานหมุนเวียนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันและถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตไบโอดีเซล ได้เริ่มจากการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid) ได้แก่ ยีน thioesterase (TE) จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต ทำการออกแบบไพรเมอร์ สังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ได้ แล้วนำมาทดสอบยีนในพืชน้ำมัน เช่น ปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง โดยอาศัยเทคนิค PCR จากนั้นนำชิ้นส่วนของยีนที่ได้ มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pChlamy\_3 Vector ตรวจสอบชิ้นของยีนที่ตัดต่อเข้าสู่เวกเตอร์ แล้วถ่ายยีนเข้าไปในสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ในชุด GeneArt *Chlamydomonas Engineering Kits* จากนั้นทดสอบการผลิตผลิตน้ำมันจากสาหร่ายที่ได้รับการถ่ายยีนดังกล่าว เปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันในสาหร่ายปกติ ศึกษาเทคนิคการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ภายใต้กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องหรือแบบกะ (batch) ซึ่งประกอบด้วยการศึกษาหาวัสดุที่เหมาะสม สภาวะการพรีเทรตเมนต์หรือการเตรียมวัสดุให้พร้อมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ การหมักด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม การหมักน้ำตาลที่ได้ด้วยยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักน้ำตาลชนิด 6 คาร์บอน (กลูโคส) และน้ำตาลชนิด 5 คาร์บอน (ไซโลส) หรือน้ำตาลชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส การตรวจสอบคุณสมบัติของเอทานอล เทคนิคการกลั่นให้ได้เอทานอล 95% และการผลิตเอทานอล 99.5% และการขยายผลสู่การผลิตเอทานอลในระดับการผลิตในโรงงานต้นแบบขนาดเล็ก ศึกษาการผลิตไบโอดีทานอลจากพืชชีวมวลแบบครบวงจร ได้เริ่มจากการนำพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ อ้อยพลังงาน ฯลฯ นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องมือแปรสภาพชีวมวลให้ได้ปริมาณที่มากพอกับถังหมักขนาด 500 ลิตร และนำมาปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสออกไป โดยวิธีทางเคมี ปรับสภาพให้เป็นต่างโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้ย่อยสลาย (hydrolysis) ให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมัก (fermentation) เป็นการย่อยสลายน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ ทำให้เป็นเอทานอล และนำมาคำนวณหาต้นทุนการผลิตและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป การผลิตกรดไขมันชนิดต่างๆ การผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันต่างๆ และการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชอื่นๆ การศึกษาการผลิตไบโอดีเซล

B100 ที่มีจุดไหลเทต่ำ นอกจากนี้ยังมุ่งเน้นการวิจัยครอบคลุมการผลิตพลังงานทดแทนทั้งการผลิตไบโอเอทานอลและการผลิตไบโอดีเซล โดยการพัฒนาเครื่องจักรกลในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในระดับชุมชนอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะดำเนินการพัฒนาเครื่องมือต้นแบบเพื่อสนับสนุนกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวล ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสำหรับชีวมวลในระดับชุมชน และเครื่องบดละเอียดแบบเปียกสำหรับพืชชีวมวล เพื่อให้สามารถใช้งานร่วมกับกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลในระดับชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

## บทคัดย่อ

โครงการวิจัยการผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพได้แบ่งการทดลองเป็น 4 กิจกรรม มี 8 การทดลอง เริ่มดำเนินการในปี 2559 และจะสิ้นสุดในปี 2564 แต่แผนงานวิจัยนี้ไม่ได้รับการสนับสนุนต่อ จึงปิดโครงการเมื่อทำการวิจัยได้เพียง 2 ปี ทำให้ไม่สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ทั้งหมดได้ แต่อย่างไรก็ตาม ได้รวบรวมผลการวิจัยที่ดำเนินการวิจัยทั้งหมด 2 ปี ในกิจกรรมที่ 1 มีการวิจัย 3 เรื่องได้แก่ การโคลนยีนแลคเคสที่ควบคุมการย่อยสลายลิกนินทางชีวภาพโดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ สามารถโคลนยีนและทดสอบการผลิตโปรตีนได้ในเบื้องต้น การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันและถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สามารถโคลนได้ยีน ยีน *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) และการผลิตเอนไซม์ไลซานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* S068 ด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกระบวนการหมักแบบแห้งพบว่า ฟางข้าว เป็นสับเสตรที่ที่ดีที่สุด อุณหภูมิ 30 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด และการเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยวิธีเก็บแบบเยือกแข็งแบบแห้งสามารถรักษาประสิทธิภาพเอนไซม์ได้ดีที่สุด ส่วนกิจกรรมที่ 2 มีการวิจัย 2 เรื่องได้แก่ การผลิตเอทานอลจากขานอ้อยและฟางข้าวในระดับชุมชน เมื่อศึกษากระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลสเฟฟางข้าวเป็นสับเสตรพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริกร่วมกับเอนไซม์ เซลลูเลสได้ผลดีที่สุด และการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวลแบบครบวงจร โดยนำหญ้าเนเปียปากช่อง 1 มาการทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (hydrolysis) ให้กลายเป็นน้ำตาล ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลซานเนส เชื้อ *Actinomyces* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และ เชื้อ *Aspergillus niger* จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เมื่อนำมาทดสอบการผลิตพบว่าเชื้อ *Actinomyces* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเซลลูเลสเอนไซม์ ที่ดีที่สุด ส่วนกิจกรรมที่ 3 ทำการวิจัยการผลิตไบโอดีเซลคือ การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำโดยใช้ไลเปส สามารถผลิตไลเปสในถังหมัก โดยไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลดีกว่าเดิมได้มาตรฐานไบโอดีเซลบี100 ตามมาตรฐานสากล และกิจกรรมที่ 4 เป็นการพัฒนาเครื่องจักรกลในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนจากพืชชีวมวล ซึ่งประกอบด้วย 2 การทดลองคือ การพัฒนาเครื่องปั้นเหยียงแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวลในระดับชุมชน ดำเนินการออกแบบและสร้างเครื่องมือต้นแบบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนระดับชุมชน เปรียบเทียบกับวิธีการแยกตะกอนสาหร่ายด้วยวิธีปฏิบัติของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเพาะเลี้ยงคอนกรีตเคลือบไฟเบอร์กลาส พบวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้สูงที่สุด และการพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชีวมวลสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล ดำเนินการทดสอบการแปรสภาพของวัสดุหญ้าเนเปียร์โดยใช้เครื่องหั่นย่อยแบบสองใบมีดที่พัฒนาขึ้น ผลการทดสอบเบื้องต้นการใช้เครื่องหั่นย่อยแปรสภาพวัสดุชีวมวลหญ้าเนเปียร์ได้ละเอียดขนาดอยู่ในช่วง 2.58–4.76 มม.

## Abstract

The production of renewable energy from biomass using biotechnological approach project has divided into 4 groups with 8 experiments. The project will be started from 2016 - 2021. However this project was forced to terminate in 2017. These are the results from experiments. There are 3 experiments in Group 1, the first one is cloning of laccase gene for lignin biodegradation using *recombinant DNA technology*. The result showed gene cloning and protein production in vector. The 2<sup>nd</sup> one is cloning of genes involved in fatty acid synthesis and transformed into *Chlamydomonas reinhardtii* for ethanol production, the result showed *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) was cloned. The 3<sup>rd</sup> one is production of xylanase from *Aspergillus niger* using agricultural waste by semi-solid fermentation, the result showed rice straw is the best substrate. The optimal temperature for enzyme activity is 30 °C and freeze dry is the best method for enzyme preservation. There are 2 experiments in groups 2. The 1<sup>st</sup> one is production of ethanol from bagasse and straw at community level. The result showed hydrochloric and cellulose is the best method for rice straw pretreatment. The 2<sup>nd</sup> experiment is producing bio-ethanol from plant biomass in completed process. Nepier pakchong1 grass was hydrolysis to be reducing sugar using microorganism such as *Bacillus sp.*, *Actinomysis sp.* and *Aspergillus niger*. The result showed *Actinomysis sp.* is the best for cellulose production. In group 3 there is 1 experiment, study on the production of low density lipoproteins using lipase. The production of lipase in fermenter was involved. Lipase can degraded oil-palm, soy bean oil, jatropha oil and rice bran oil. The biodiesel quality can be improved to be better than conventional biodiesel B 100 compliance with international standards. In group 4 there is 2 experiments, the 1<sup>st</sup> one is development of centrifugal separator for algae biomass. Centrifugal separator was designed and built the prototype tools for use in community renewable energy production. Centrifugal separator was compared with seaweed sludge separation method by practice of seaweed culture farmers in fiberglass reinforced concrete ponds. The most efficient way to harvest cells was founded.

## กิจกรรมงานวิจัยที่ 1

### การโคลนยีน พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ และการผลิตเอนไซม์เพื่อผลิตพลังงานทดแทน

การทดลองที่ 1.1 การโคลนยีนแลคเคสที่ควบคุมการย่อยสลายลิกนินทางชีวภาพโดยใช้เทคโนโลยี

รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

Cloning of Laccase gene for lignin biodegradation using recombinant DNA technology.

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวภรณ์ สว่างศรี<sup>1</sup>

นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ<sup>1</sup>

นางสุภาวดี จ้อเหรียญ<sup>1</sup>

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล<sup>1</sup>

นางบุญเรือนรัตน์รัตน์ เรืองวิเศษ<sup>1</sup>

คำสำคัญ

แลคเคส การโคลนยีน เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

#### บทคัดย่อ

แลคเคส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินสามารถผลิตโดยเชื้อราขาว *Ganoderma* การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคสในอาหารเหลวที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวเหนี่ยวนำสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคส งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อ *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีที่สุด เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน of internal transcribed spacer (ITS) และเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GanBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Ganoderma lucidum* ที่ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อโคลนยีนแลคเคสจากเชื้อ *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 โดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่ายีนแลคเคสที่ได้มีขนาด 1,563 คู่เบส ซึ่งมีลำดับของเพปไทด์ เท่ากับ 520 อะมิโนแอซิด การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการเชื่อมต่อยีนแลคเคสเข้ากับ expression vector pLATE52 และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) ทดสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการชักนำด้วยสาร IPTG และวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคเคสด้วยวิธี SDS-PAGE

#### Abstract

Laccase is one of the ligninolytic enzymes of white rot fungus *Ganoderma*. Laccase producing of the isolates were tested in liquid media containing inducer, 1% (w/v) lignin as a carbon source was found to be the most efficient substrate for laccase production. *Ganoderma* sp. G1-1 was found to be the most efficient laccase-producing strains. *Ganoderma* sp. G1-1 was identified by partially sequenced and analyzed using the internal transcribed spacer. The sequenced result was exhibited as *Ganoderma lucidum* (100% similarity) with other fungal ITS sequences in the GanBank database. In other experiment, laccase gene of *Ganoderma* sp. G1-1

isolate was obtained by using RT-PCR for gene cloning technique and the full length nucleotide approximately 1,563 bp and peptides (520 amino acids) were further analyzed. Laccase gene could be overexpression within the expression vector pLATE52 and the recombinant was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The production of recombinant protein can be induced by 1 mM IPTG. The recombinant laccase was analyzed by SDS-PAGE.

**Key word:** Laccase, Cloning, linalyolytic enzyme, recombinant DNA

---

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

## บทนำ

ปัจจุบันความตระหนักถึงความยั่งยืนด้านทรัพยากรอาหาร พลังงาน และสิ่งแวดล้อม มีมากขึ้นอันเนื่องมาจากสถานการณ์ของโลกที่เปลี่ยนแปลงไป นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ทุกประเทศทั่วโลกเริ่มให้ความสนใจกับการใช้ประโยชน์จากชีวมวลจำพวกลิกโนเซลลูโลส เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากโรงเรือน การเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ เศษวัสดุจากการเกษตร (ซึ่งข้าวโพด, กากชานอ้อย) วัสดุเหลือทิ้งจากไม้ (ซึ่งเลื่อยจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง) ขยะจากกระบวนการแปรรูปอาหาร และเศษกระดาษ ฯลฯ ซึ่งชีวมวลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตพลังงานเอทานอล เซลลูโลสไบโอดีเซล และเยื่อกระดาษ เป็นต้น นับเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่าสูงสุด

ลิกนิน เป็นองค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่ย่อยสลายและกำจัดได้ยากที่สุด เนื่องจากมีองค์ประกอบของโครงสร้างที่เป็น phenyl propane เชื่อมต่อกันด้วยพันธะหลายชนิดสานต่อกันอย่างไม่มีระเบียบทำให้มีโครงสร้างที่ซับซ้อน (Crawford, 1981) แทรกอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช ทำให้ถูกย่อยสลายได้ยาก ในกระบวนการผลิตจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอน pretreatment เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้น ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอน pretreatment เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้น และเพื่อกำจัดส่วนของลิกนินออก เทคโนโลยีการกำจัดลิกนินที่ใช้กันทั่วไปมักจะอาศัยปฏิกิริยาทางกายภาพ หรือทางเคมี (กรด, ด่าง) ซึ่งมักจะปลดปล่อยสารตกค้างในบ่อน้ำเสียในสภาพแวดล้อม เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นพิษต่อคน สัตว์และพืช อีกทั้งยังย่อยสลายได้ยาก การย่อยสลายลิกนินด้วยวิธีทางเคมีมักทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตรายซึ่งต้องถูกจำกัดให้อยู่ในค่ามาตรฐาน ทั้งยังกำจัดลิกนินออกได้เพียงบางส่วนเท่านั้น หลายประเทศจึงพยายามใช้วิธีทางชีวภาพมากขึ้น Avgerinos and Wang (1983) รายงานการย่อยสลายลิกนินทางเคมีโดยใช้สารละลายต่างที่มีความเข้มข้น 5 % และที่อุณหภูมิสูง 130-280 องศาเซลเซียส หรืออาจใช้สารทำให้เกิดการออกซิไดส์ได้ เช่น  $H_2O_2$ , NaCl,  $O_2$  เป็นต้น (Gould, 1984) แต่การย่อยสลายทางเคมีนี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงและใช้อุณหภูมิสูง รวมทั้งมีการตกค้างของสารเคมีอันตรายด้วย ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาการย่อยสลายลิกนินโดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ (เอนไซม์) เพราะปฏิกิริยาไม่รุนแรง เหมือนปฏิกิริยาเคมี ส่งผล



ให้สิ่งแวดล้อมยั่งยืน และการลงทุนถูกกว่าวิธีทางกายภาพ โดยมีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกนินในด้านต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร (เบียร์, ไวน์) การผลิตเยื่อกระดาษ การผลิตเซลลูโลสบริสุทธิ์ การใช้เป็นสารชีวบำบัดภัณฑ์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ปิโตรเคมี และกำจัดสารเคมีตกค้างทางการเกษตรในสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตพลังงานเอทานอลจากชีวมวลเซลลูโลส ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบลิกนินเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือใช้ให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่ามากยิ่งขึ้น

แลคเคส (laccase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม extracellular glycoprotein สามารถย่อยสลายสารทั้งพวก phenolic และ non-phenolic compounds เช่น guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, p-phenylene diamine, syringaldazine (N,N'-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzylidene)hydrazine) และ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) จากการทดลองสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่า เป็น isoenzyme เนื่องจากการดัดแปลงโมเลกุลเพื่อความสมบูรณ์เหมาะสมต่อ extracellular location ที่แตกต่างกัน โดยมีการตัดสายของ polypeptide หรือเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต เอนไซม์นี้มีขนาด 60-80 kDa ประกอบด้วย 520-550 กรดอะมิโน มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 15-20% และมี copper 2-4 อะตอมต่อโมเลกุลของเอนไซม์

เอนไซม์แลคเคสสามารถย่อยสลาย lignin model compounds และ phenolic hydroxyl ได้เป็น phenoxy radicals โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน กลุ่มราที่สามารถผลิต laccase ได้ดีคือ *Trametes* (*Polyporus*, *Coriolus*) *versicolor* (Bollag and Leonowicz, 1984) *Pleurotus ostreatus* (Sannia et al., 1986) white-rot fungi ที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Tremates* sp., *Cerporiopsis subvermispora*, *Phebia radiata*, *Pycnoporous* sp, *Coriolopsis rigida*, *Pleurotus* sp., *Ganoderma lucidum*, *Nematoloma frowardii*, *Cyathus stercoreus* และ *Bjerkandera* spp. เป็นต้น (Kirk and Farrell, 1987) โดย Kirk et al. (1980) รายงานว่า การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา white – rot เพื่อย่อยสลายลิกนิน พบว่าช่วยประหยัดพลังงานและสารเคมี ในระบบการผลิตเยื่อโดยชีววิธี แต่การเลี้ยงเชื้อเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยตรงนั้นมีข้อจำกัดมากมาย อาทิเช่น การเลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ต้องเร่งให้เชื้อราเติบโตได้ในปริมาณมาก จึงมีข้อจำกัดในเรื่องสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในสารละลาย ปริมาณสารอาหารที่จำกัดทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และปริมาณ inducer บางชนิด จากนั้นจึงค่อยปรับสภาวะเพื่อกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องให้มากขึ้น เพื่อทำการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ โดยที่ไม่คำนึงถึงการป้อนแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างเซลล์ นอกจากสภาวะที่กระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์แล้ว การย่อยสลายลิกนินจำเป็นต้องมีสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ซึ่งอาจจะไม่ใช่สภาวะเดียวกับการผลิตเอนไซม์ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้น ได้แก่ ชนิดของสารอาหาร ค่า pH, อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นค่อนข้างนาน 1-2 สัปดาห์ จึงทำให้การนำจุลินทรีย์ไปใช้ทำงานโดยตรงนั้นทำได้ยาก

ดังนั้นการนำเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมาช่วยในการผลิตเอนไซม์แลคเคส จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ให้สามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากและรวดเร็วกว่าการผลิตจากจุลินทรีย์

โดยตรง ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการลดปัญหาการสะสมของสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายจากกระบวนการย่อย  
กำจัดลิกนินในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการรองรับการส่งเสริมการผลิตเอทานอลจากชีวมวลเซลลูโลสของภาครัฐ  
ในอนาคตอีกด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากจุลินทรีย์  
และศึกษาการแสดงออกของยีนแลคเคสและรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในเซลล์ *E. coli*

## วิธีการวิจัย

### อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
8. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
10. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
12. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloning Kit<sup>®</sup> (RBC Bioscience)
13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เซลล์แบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$ , BL21(DE)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
19. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่
  - ไพรเมอร์ สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) :  
ITS1 (forward), ITS4 (reverse)
  - ไพรเมอร์ ยีนแลคเคส (laccase gene) : lccG-F (forward), lccG-R (reverse)
  - ไพรเมอร์ T&A Cloning vector : M13-F (forward), M13-R (reverse)
  - ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse

21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
  - โปรแกรม BLAST จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/>
  - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
  - โปรแกรม DNASTar software analysis ( DNASTAR, Inc, USA )
  - โปรแกรม ChromasPro version 1.33 จาก <http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>
  - โปรแกรม NEBcutter2 จาก <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>
22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ
  - enrichment medium (LBM), Screening medium
  - Luria-Bertani (LB)
  - LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

## วิธีการ

### 1. การคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

เตรียมอาหาร LBM สำหรับใช้ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ ดังนี้  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  จำนวน 1.00 กรัม  $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$  0.50 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50 กรัม  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 กรัม Yeast Extract 0.01 กรัม  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.001 กรัม  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$  0.001 กรัม และ  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.001 กรัม ลิกนิน 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ หลังจากนั้นเติม 20% glucose solution ที่ผ่านการกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน (1 ml ต่ออาหาร LBM ปริมาตร 100 ml)

นำเชื้อรา จำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท ได้แก่ *Ganoderma* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท (ทลินจือ และ G1-1) และ *Rigidoporus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท (R.1-8) มาเลี้ยงเพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในอาหารเหลว LBM ที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1 % นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 rpm นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใส (crude enzymes) มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] บันทึกผลการตรวจวัดปฏิกิริยาบนอาหาร ABTS หากมีการผลิตเอนไซม์ Laccase จะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเขียว แต่หากไม่มีการสร้าง Laccase จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด

### 2. การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเทคนิคชีวโมเลกุล

#### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แลคเคส ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่มีแผ่นกระดาษแก้ววางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 5-7 วัน ชูดเส้นใยของเชื้อราประมาณ 0.1-0.3 กรัม ใส่โกร่งบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด เติม Extraction buffer ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 6 ไมโครลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง เท

ส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผสมทุกๆ 10 นาทีด้วยเครื่อง Vortex เติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาซ้ำๆ นาน 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc 0.3 เท่า และ isopropanol 0.6 เท่า ของปริมาตรน้ำใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย washing solution 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลาย ดีเอ็นเอด้วย TE buffer : RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (25:1) 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000) ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) โดยการหยอดดีเอ็นเอลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แช่แผ่นวุ้นในเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)

## 2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อรา ด้วยคู่ไพรเมอร์ ดังนี้

Forward : ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

Reverse : ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (Daniel and Jorge, 2007)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ ITS1 (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ ITS4 (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

#### 4 องศาเซลเซียส infinity (α)

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

#### 2.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 2.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH<sub>2</sub>O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

#### 2.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ ITS

##### 2.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ITS1/(ITS4) (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	} จำนวน 25 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

##### 2.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน



เหวี่ยง Spin Cartridge ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เก็บส่วนของ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.3 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA และทำปฏิกิริยา PCR

นำ total RNA จากข้อ 3.2 มาทำปฏิกิริยา Reverse Transcriptase PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III One-Step RT-PCR system (Invitrogen) โดยการเปลี่ยนสาย RNA ให้เป็น cDNA ในขั้นตอนแรกที่อุณหภูมิ 45°C แล้วจึงทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนแลคเคส โดยทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 µl มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 2X Reaction Mix, 10 µM Primer lccG-F 5' ATGGCGAAGTTCCAATCGTTGCTCTCCTGCGTCACCCTTC 3' และ lccG-R 5' TCAGTGATCATCAGCCGAGAGCGCATCGTACGTGGGC 3' 0.01 pg - 1 µg RNA Template, SS III RT PLATINIUM TAQ Mix, น้ำกลั่น นำปฏิกิริยาเข้าเครื่อง Thermal Cycle 9700 ตั้งการทำงานของเครื่อง 45°C 45 นาที 1 รอบ 94°C 2 นาที 1 รอบ เป็นการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ขั้นตอนต่อไปเป็นการเพิ่มปริมาณของ cDNA เป้าหมายโดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้ 94°C 15 วินาที 55°C 30 วินาที และ 68°C 1 นาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นตั้งเครื่องที่ 68°C นาน 7 นาที 1 รอบ

### 3.4 การเตรียมผลผลิต PCR (ยีนแลคเคส) ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิต PCR (ยีนแลคเคส) ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำผลผลิต PCR จากข้อ 3.3 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วข้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 2 กิโลเบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมสารละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด (สีของสารละลายควรมีสีเหลือง ถ้ามีสีม่วงให้เติม 3M NaOAc 10 ไมโครลิตร) เติม Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15-30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5 การเชื่อมต่อยีนเข้ากับ PCR Cloning vector

นำชิ้นยีนซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์จากข้อ 3.4 มาเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector โดยใช้ชุดเวกเตอร์สำเร็จรูป T&A Cloning Kit (RBC Bioscience®) โดยเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

Ligation Buffer A	1	ไมโครลิตร
Ligation Buffer B	1	ไมโครลิตร
T&A Cloning vector	2	ไมโครลิตร

T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
PCR product (จากข้อ 3.3)	2	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	3	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้ทันที นำ ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.6 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำ S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB- Ampicilin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีสีขาว ซึ่งแสดงว่ามีชิ้นส่วนของยีนแลคเคสแทรกอยู่ นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อ นาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง นำตะกอนเซลล์ไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ดังนี้ ดูดตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ จากข้อ 4.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อนำมา ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติมน้ำ Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอด 4-6 ครั้ง เติมน้ำ Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลง 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Elution Buffer 25 ไมโครลิตร บ่มนาน 15-30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ พลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสและความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 3.7 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6 ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

M13-F 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

M13-R 5' TCACACAGGAAACAGCTATGA C 3'

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร

10x PCR buffer 2 ไมโครลิตร



4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M13-R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยรอบของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (∞)		

ตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.8 การตรวจสอบความถูกต้องของยีนแลคเคสโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.8.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye <sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ไพรเมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1.6	ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	

50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	จำนวน 25 รอบ
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity ( $\infty$ )	

### 3.8.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนซ์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 3.8.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนซ์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (dH<sub>2</sub>O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใส่ทิ้งปล่อยให้แห้งในที่มืด

### 3.8.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้ยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้ก็พร้อมที่จะเข้าเครื่อง ABI PRISM 310<sup>®</sup> DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

## 4. การแสดงออกของยีนแลคเคสในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

### 4.1 การเชื่อมต่อนิยีนแลคเคสเข้ากับ Protein Expression Vector

นำผลผลิต PCR ของยีนแลคเคส และเวกเตอร์ (ขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส) ซึ่งมีตำแหน่งของ T7 promoter ทำหน้าที่ถอดรหัสและแปลรหัสของยีนให้เป็นโปรตีน ทำการสร้าง recombinant protein โดยการเชื่อมต่อนิยีนเข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) (Thermo Scientific) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ซันดีเอ็นเอของยีนแลคเคส (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* ทันที

### 4.2 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB-ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมต่อไป

#### 4.3 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสใน aLICator LIC Cloning and Expression system

ตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์

LIC Forward 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

LIC Reverse 5' GAGCGGATAACAATTTACACAGG 3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH <sub>2</sub> O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (∞)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.4 การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli*

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีนแลคเคส จากข้อ 4.2 มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB-Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำการวิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS-PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ตรวจสอบปริมาณของ fusion protein ที่เกิดขึ้น

#### เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2560 รวม 2 ปี

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

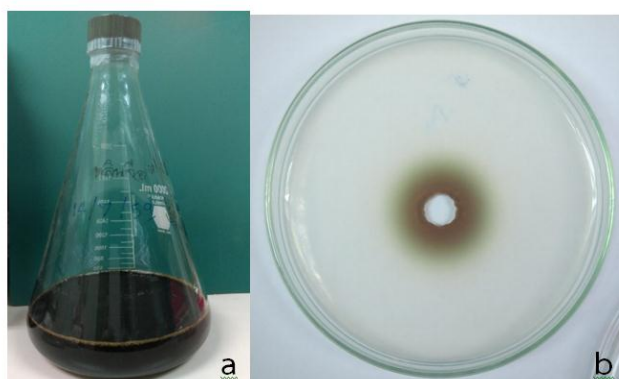
##### 1. การคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

จากการเลี้ยงเชื้อราจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ *Ganoderma* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท คือ หลินจือ และ G1-1 และเชื้อ *Rigidoporus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท R.1 R.2 R.3 R.4 R.5 R.6 R.7 และ R.8 โดยวิธีการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคสเพื่อย่อยสลายลิกนินในอาหารเหลว LBM ที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1% เมื่อนำเอนไซม์อย่างหยาบที่แยกได้จากเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินบนอาหารที่มีสารบ่งชี้ ABTS (ภาพที่ 1a, b) นาน 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท G1-1 ให้ค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาการเกิดวงสีเขียวบนอาหารได้ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 28 มม. (ตารางที่ 1) จึงได้ทำการคัดเลือก เชื้อ *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 เพื่อนำมาใช้ในการโคลนยีนแลคเคสในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีของปฏิกิริยาบนอาหารที่มีสารบ่งชี้ ABTS ของเอนไซม์อย่างหยาบจาก

เชื้อรา จำนวน 10 ไอโซเลท

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางวงสีของปฏิกิริยา บนอาหารที่มีสาร ABTS (มม.)
R.1	18
R.2	16
R.3	15
R.4	19
R.5	17
R.6	16
R.7	12
R.8	20
หลินจือ	26
G1-1	28

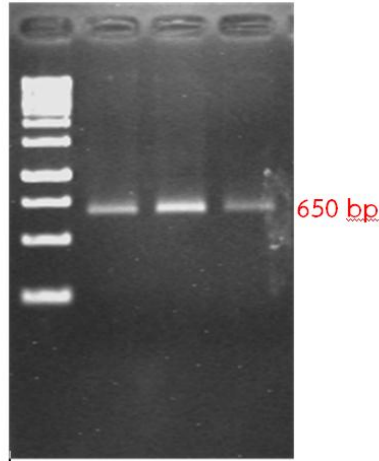


ภาพที่ 1 (a) การเลี้ยงกระตุ้นเส้นใยให้ผลิตเอนไซม์แลคเคสในอาหารเหลว

(b) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสอย่างหยาบที่ผลิตโดยเชื้อรา บนอาหารที่มีสารบ่งชี้ ABTS

## 2. การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเทคนิคชีวโมเลกุล

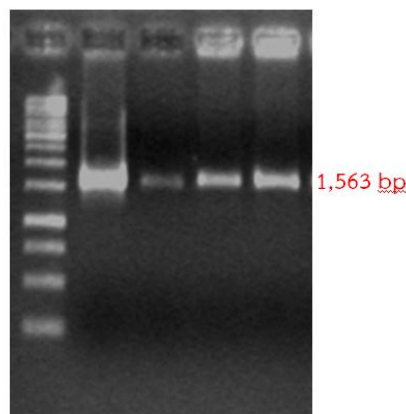
จากการคัดเลือกได้เชื้อรา *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีที่สุด จากข้อ 1 เมื่อนำมาทำการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริษัท internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ได้ชิ้นส่วนของผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (ภาพที่ 2) และเมื่อนำชิ้นส่วนของผลผลิต PCR ดังกล่าวไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า เชื้อรา *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession [No. FJ379262.1](#)) ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์



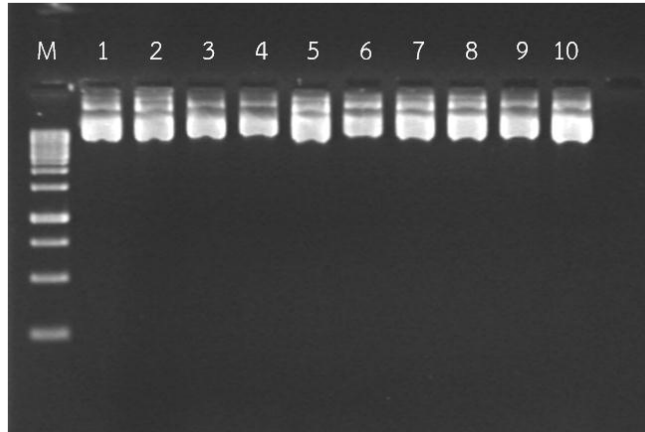
ภาพที่ 2 ผลผลิต PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1, ITS4 แล้วทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส

### 3. การโคลนยีนแลคเคส

การสกัด total RNA จากเส้นใยเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1-1 ที่ผ่านการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคสในอาหารเหลวที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ เมื่อทำปฏิกิริยา Reverse Transcription โดยอาศัยเทคนิค Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ในส่วนของยีนแลคเคส ด้วยคู่ไพรเมอร์ lccG-F และ lccG-R ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีนแลคเคส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนแลคเคสที่มีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส (ภาพที่ 3) หลังจากนั้นนำชิ้นยีนแลคเคสที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์พาหะโดยใช้ชุด T&A Cloning Kit (RBC Bioscience) แล้วนำไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เพื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB + ampicillin 50 ug/ml ทำให้สามารถสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคสได้ (ภาพที่ 4) เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automate sequencer และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* [strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds](#) (Accession No. [FJ656307.1](#)) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 แสดงชิ้นส่วนของยีนแลคเคส ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,563 bp.



ภาพที่ 4 พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ T&A Cloning Vector ที่มียีนแลคเคสขนาด 1,563 bp. แทรกอยู่ใน ภายใน ซึ่งได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-10; พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคส

Ganoderma lucidum strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds

Sequence ID: [FJ656307.1](#) Length: 1563 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 1563 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	2887 bits(1563)	0.0	1563/1563(100%)	0/1563(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGTGAAATTCCAATCGTTGCTCTCCTGCGTCACCCTTCTTTTCGCCGCCTCAGCCCAT 60				
Sbjct 1	ATGGTGAAATTCCAATCGTTGCTCTCCTGCGTCACCCTTCTTTTCGCCGCCTCAGCCCAT 60				
Query 61	GCGGGCATTGGCCCAAGGCCGACCTTACCATTTCCAACGCGAACATCGCCCCTGATGGC 120				
Sbjct 61	GCGGGCATTGGCCCAAGGCCGACCTTACCATTTCCAACGCGAACATCGCCCCTGATGGC 120				

Query 121 TACACCCGTGCCGCCGTTGTGGTGAATGGTGTCTTCCCTGGGCCGCTCATCACAGGGAAC  
180

|||||

Sbjct 121 TACACCCGTGCCGCCGTTGTGGTGAATGGTGTCTTCCCTGGGCCGCTCATCACAGGGAAC  
180

Query 181 AAGGGAGACCGTTTCCAGCTGAATGTCATCGACCAACTGACGAACCACACAATGCTGAAG  
240

|||||

Sbjct 181 AAGGGAGACCGTTTCCAGCTGAATGTCATCGACCAACTGACGAACCACACAATGCTGAAG  
240

Query 241 ACCACCAGCATTTCATTGGCATGGCTTTTTCCAGAAGGGCACGAACTGGGCGGATGGTCCC  
300

|||||

Sbjct 241 ACCACCAGCATTTCATTGGCATGGCTTTTTCCAGAAGGGCACGAACTGGGCGGATGGTCCC  
300

Query 301 GCGTTCATCAACCAGTGTCCGATTGCTAGCGGGCACTCGTTCCTCTACGATTTCCAGGTT  
360

|||||

Sbjct 301 GCGTTCATCAACCAGTGTCCGATTGCTAGCGGGCACTCGTTCCTCTACGATTTCCAGGTT  
360

Query 361 CCGGATCAGGCCGGCACTTTTTGGTACCACAGCCATCTCTCCACGCAGTACTGTGACGGT  
420

|||||

Sbjct 361 CCGGATCAGGCCGGCACTTTTTGGTACCACAGCCATCTCTCCACGCAGTACTGTGACGGT  
420

Query 421 CTCAGGGTCCATTCGTGGTATATGACCCTAAGGACCCCTCAAGGGACTGTACGACGTC  
480



|||||

Sbjct 421 CTCAGGGGTCCATTTCGTGGTATATGACCCTAAGGACCCCCTCAAGGGACTGTACGACGTC  
480

Query 481 GACAACGACTCGACTGTGATCACCCCTCTCCGACTGGTATCACGTGGCTGCCAGGCTTGGA  
540

|||||

Sbjct 481 GACAACGACTCGACTGTGATCACCCCTCTCCGACTGGTATCACGTGGCTGCCAGGCTTGGA  
540

Query 541 CCGAGCTTCCCGCTCGGCTCGGACTCGACTCTCATCAATGGCCTTGCCGTAGCACTACC  
600

|||||

Sbjct 541 CCGAGCTTCCCGCTCGGCTCGGACTCGACTCTCATCAATGGCCTTGCCGTAGCACTACC  
600

Query 601 AACGCTACCGCCGGCCTCGCTGTTATCAACGTCACACAGGGCAAACGTTATCGCTTCCGC  
660

|||||

Sbjct 601 AACGCTACCGCCGGCCTCGCTGTTATCAACGTCACACAGGGCAAACGTTATCGCTTCCGC  
660

Query 661 CTTGTGTCCTTGTCATGCGACCCCACTACACCTTCAGCATCGACGGCCATGACATGTCC  
720

|||||

Sbjct 661 CTTGTGTCCTTGTCATGCGACCCCACTACACCTTCAGCATCGACGGCCATGACATGTCC  
720

Query 721 GTTATTGAGGCGGATGGTATTGCAACGCAACCCGTGACCGCGAACGCTATTCAAATCTTC  
780

|||||

Sbjct 721 GTTATTGAGGCGGATGGTATTGCAACGCAACCCGTGACCGCGAACGCTATTCAAATCTTC  
780

Query 781 TCTGCTCAACGATATTCTTTTCGTGCTGACTGCAAATCAGACAATTGGCAACTATTGGATT  
840

|||||

Sbjct 781 TCTGCTCAACGATATTCTTTTCGTGCTGACTGCAAATCAGACAATTGGCAACTATTGGATT 840

Query 961 CTCAATGAGGTCGACCTCCACCCCTTTGTCGCTAAACAGACGCCTGGCCGCGCTACACAG  
1020

|||||

Sbjct 961 CTCAATGAGGTCGACCTCCACCCCTTTGTCGCTAAACAGACGCCTGGCCGCGCTACACAG  
1020

**ภาพที่ 5** ลำดับนิวคลีโอไทด์ (cDNA) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของ  
เชื้อ *Ganoderma lucidum* [strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds](#) (Accession No. [FJ656307.1](#))  
ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

Query 1021 GGTGGTACCGATGTGGCCATCAACATGGTCTTCAACTTTAACGGCTCGAACTTCTTCATC  
1080

|||||

Sbjct 1021 GGTGGTACCGATGTGGCCATCAACATGGTCTTCAACTTTAACGGCTCGAACTTCTTCATC  
1080

Query 1081 AACAAACGCGTCCTTCACGCCTCCCACTGTCCCCGTCTCCTTCAGATTTTGAGCGGGCGCA  
1140

|||||

Sbjct 1081 AACAAACGCGTCCTTCACGCCTCCCACTGTCCCCGTCTCCTTCAGATTTTGAGCGGGCGCA  
1140

Query 1141 CAGGCCGCCAGGACCTCCTGCCTTCCGGAAGTGTCTACACGCTGCCGATCAACAAGTCC  
1200

|||||

Sbjct 1141 CAGGCCGCCAGGACCTCCTGCCTTCCGGAAGTGTCTACACGCTGCCGATCAACAAGTCC  
1200

Query 1201 ATCGAGCTCACCTTCCCCGCCACGGTCAACGCCCCCGGGGCTCCCCACCCCTTCCACCTG  
1260

|||||

Sbjct 1201 ATCGAGCTCACCTTCCCCGCCACGGTCAACGCCCCCGGGGCTCCCCACCCCTTCCACCTG  
1260

Query 1261 CACGGTCATTTCGTTTCGCTGTGGTCCGCAGCGCCGGCTCCACAGAATACAACATAACAAT  
1320

|||||

Sbjct 1261 CACGGTCATTTCGTTTCGCTGTGGTCCGCAGCGCCGGCTCCACAGAATACAACATAACAAT  
1320

Query 1321 CCCGTATGGCGCGACGTCGTTTCGACCGGCACCCCTGCAGCGGGCGACAACGTACGATC  
1380

|||||

Sbjct 1321 CCCGTATGGCGCGACGTCGTTTCGACCGGCACCCCTGCAGCGGGCGACAACGTACGATC  
1380

Query 1381 CGCTTCCAGACCGACAACCCCGGACCGTGGTTCCTCCATTGCCACATCGACTTCCATCTC  
1440

|||||

Sbjct 1381 CGCTTCCAGACCGACAACCCCGGACCGTGGTTCCTCCATTGCCACATCGACTTCCATCTC  
1440

Query 1441 GAGGCGGGCTTCGCTGTCGTGTTCCGCCGAGGACACCGCTGATACTTCTCTGGCGAACCAT  
1500

|||||

Sbjct 1441 GAGGCGGGCTTCGCTGTCGTGTTCCGCCGAGGACACCGCTGATACTTCTCTGGCGAACCAT  
1500

Query 1501 GTCCCACAAGCATGGTCGGATCTTTGCCCGACGTACGATGCGCTCTCGGCTGATGATCAC  
1560

|||||

Sbjct 1501 GTCCACAAGCATGGTCGGATCTTTGCCCGACGTACGATGCGCTCTCGGCTGATGATCAC  
1560

Query 1561 TGA 1563

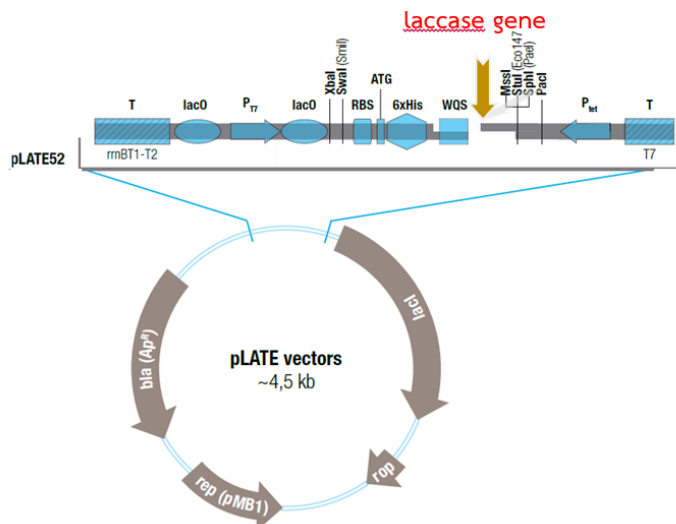
|||

Sbjct 1561 TGA 1563

ภาพที่ 5 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ (cDNA) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds* (Accession No. [FJ656307.1](#)) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

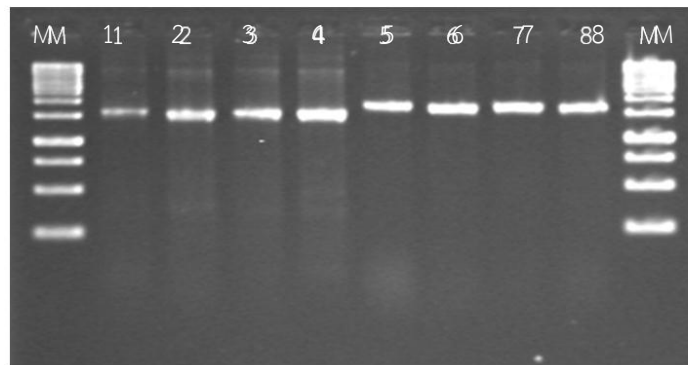
#### 4. การแสดงออกของยีนแลคเคสในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

การเชื่อมต่อยีนแลคเคสเข้ากับเวกเตอร์ pLATE52 ซึ่งเป็น protein expression vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ที่มีตำแหน่งของ T7 promoter ( $P_{T7}$ ) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน และได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์ Ex\_lccG-Fatg 5' GGTTGGGAATTGCAAGCGAAGTTCCAATCGTTGCTCTCC 3' และ Ex\_lccG-Rtaa 5' GGAGATGGGAAGTCATTAGTGATCATCAGCCGAGAGCGC 3' ให้มีความจำเพาะกับยีนแลคเคสโดยมีตำแหน่งของปลาย 5' ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวกเตอร์ pLATE52 ได้ เมื่อทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนแลคเคสซึ่งมีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส เข้ากับเวกเตอร์ pLATE52 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส จะทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมขนาดประมาณ 6,063 คู่เบส (ภาพที่ 6)

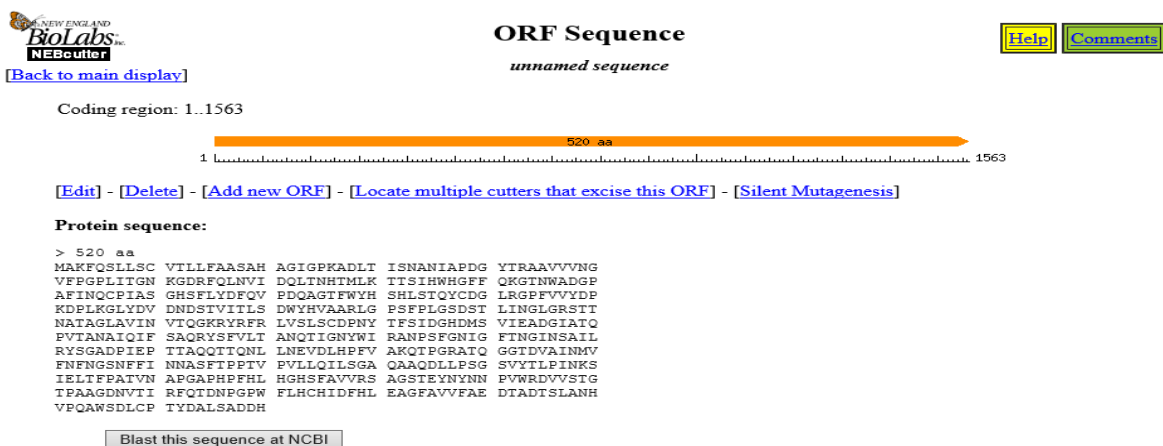


ภาพที่ 6 แผนที่ตำแหน่งของยีนแลคเคสที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคส เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน ได้ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน ตลอดจนการตรวจสอบความถูกต้องของยีนด้วยการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์เวคเตอร์ LIC Forward และ LIC Reverse และคูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนแลคเคส Ex\_lccG-Fatg และ Ex\_lccG-Rtaa พบว่า สามารถตรวจพบการปรากฏของยีนแลคเคสในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มียีนแลคเคส (ภาพที่ 7) และเมื่อนำลำดับเบสของยีนแลคเคสมาทำการแปรรหัสสารพันธุกรรมจาก cDNA เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน ด้วยโปรแกรม NEBcutter2 พบโปรตีนที่ได้มีขนาด 520 อะมิโนแอซิด (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับ Sannia *et al.* (1986) ได้รายงานว่ายีนแลคเคสมีขนาดของโปรตีนอยู่ในช่วง 60-80 kDa ซึ่งประกอบด้วย 520-550 กรดอะมิโน และเมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession No. [ACR24357.1](#)) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสในพลาสมิดลูกผสม Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-4; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีนแลคเคส (Ex\_lccG-Fatg, Ex\_lccG-Rtaa), Lane 5-8; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse)



ภาพที่ 8 ลำดับของกรดอะมิโน ที่ได้จากการแปรรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,563 คู่เบส เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน ได้กรดอะมิโนเท่ากับ 520 อะมิโนแอซิด <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

laccase [*Ganoderma lucidum*]

Sequence ID: [ACR24357.1](#) Length: 520 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 520 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
1066 bits(2757)	0.0()	Compositional matrix adjust.	520/520(100%)	520/520(100%)	0/520(0%)	

Features:

Query 1 MAKFQSLLSCVTLLFAASAHAGIGPKADLTISNANIAPDGYTRAAVVVNGVFPGLITGN 60  
MAKFQSLLSCVTLLFAASAHAGIGPKADLTISNANIAPDGYTRAAVVVNGVFPGLITGN

Sbjct 1 MAKFQSLLSCVTLLFAASAHAGIGPKADLTISNANIAPDGYTRAAVVVNGVFPGLITGN 60

Query 61 KGDRFQLNVIDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQV 120  
KGDRFQLNVIDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQV

Sbjct 61 KGDRFQLNVIDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQV 120

Query 121 PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFWYDPKDPLKGLYDNDSTVITLSDWYHVAARLG 180  
PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFWYDPKDPLKGLYDNDSTVITLSDWYHVAARLG

Sbjct 121 PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFWYDPKDPLKGLYDNDSTVITLSDWYHVAARLG 180

Query 181 PSFPLGSDSTLINGLGRSTTNATAGLAVINVTQGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHDMS 240  
PSFPLGSDSTLINGLGRSTTNATAGLAVINVTQGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHDMS

Sbjct 181 PSFPLGSDSTLINGLGRSTTNATAGLAVINVTQGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHDMS 240

Query 241 VIEADGIATQPVTANAIQIFSAQRYSFVLTANQTIGNYWIRANPSFGNIGFTNGINSAIL 300  
VIEADGIATQPVTANAIQIFSAQRYSFVLTANQTIGNYWIRANPSFGNIGFTNGINSAIL

Sbjct 241 VIEADGIATQPVTANAIQIFSAQRYSFVLTANQTIGNYWIRANPSFGNIGFTNGINSAIL 300

Query 301 RYSGADPIEPTTAQQTQNTLLNEVDLHPFVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFNGSNFFI 360  
RYSGADPIEPTTAQQTQNTLLNEVDLHPFVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFNGSNFFI

Sbjct 301 RYSGADPIEPTTAQQTQNTLLNEVDLHPFVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFNGSNFFI 360

Query 361 NNASFTPPTVPVLLQILSGAQAAQDLLPSGSVYTLPIKSIELTFPATVNAPGAPHPFHL 420  
NNASFTPPTVPVLLQILSGAQAAQDLLPSGSVYTLPIKSIELTFPATVNAPGAPHPFHL

Sbjct 361 NNASFTPPTVPVLLQILSGAQAAQDLLPSGSVYTLPIKSIELTFPATVNAPGAPHPFHL 420

Query 421 HGHSFAVRSAGSTEYNNPWRDVSTGTPAAGDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL 480  
HGHSFAVRSAGSTEYNNPWRDVSTGTPAAGDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL

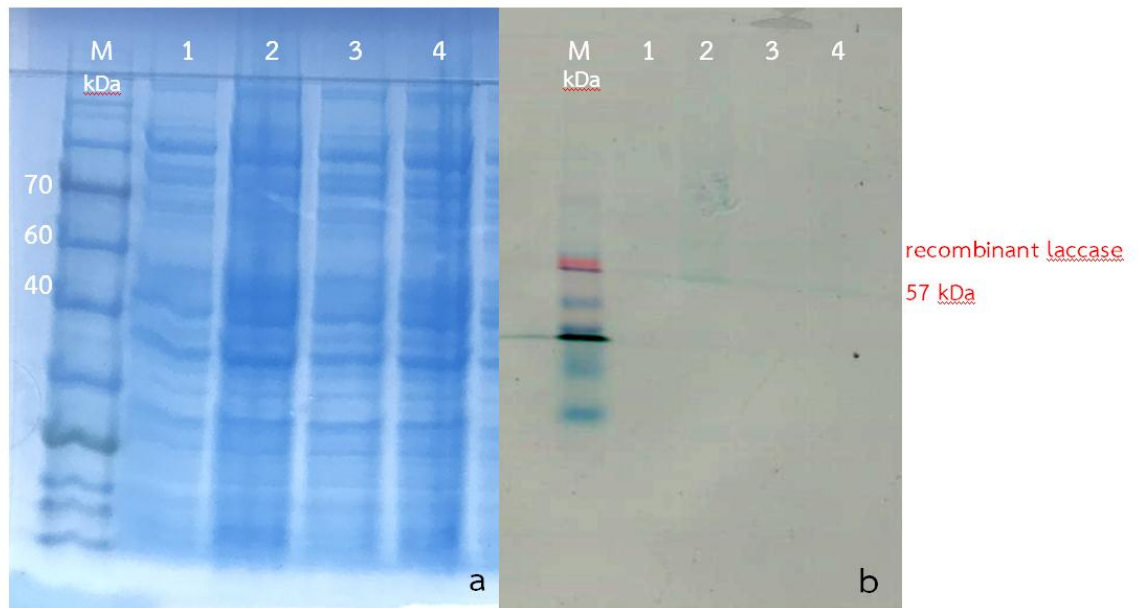
Sbjct 421 HGHSFAVRSAGSTEYNNPWRDVSTGTPAAGDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL 480

Query 481 EAGFAVFAEDTADTSLANHVPQAWSLDCPTYDALSADDH 520  
EAGFAVFAEDTADTSLANHVPQAWSLDCPTYDALSADDH

Sbjct 481 EAGFAVFAEDTADTSLANHVPQAWSLDCPTYDALSADDH 520

**ภาพที่ 9** การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีนแลคเคส ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคส ของ *Ganoderma lucidum* (Accession No. [ACR24357.1](#)) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli* เมื่อทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคสเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร IPTG เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยทำการเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง จากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนและแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Native-Page พบว่า เมื่อยีนได้รับการกระตุ้นด้วยสาร 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ *E. coli* ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IPTG ตรวจพบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคเคสในปริมาณน้อย โดยมีขนาดประมาณ 57 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตามในอนาคตสามารถนำยีนแลคเคสที่ได้ไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ได้ในปริมาณมากขึ้น จากรายงานของ Mai *et al.* (2000) ได้อธิบายไว้ว่า เอนไซม์ laccase จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้สูงเมื่อมีสารพวก phenolic เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งสาร phenolic นี้เป็นพิษต่อราแต่ไม่เป็นอันตรายต่อยีสต์ Larsson *et al.* (2001) ได้ทำการตัดต่อยีน laccase จาก *Trametes* เข้าสู่ระบบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น พบว่าสามารถเกิดการย่อยสลายเนื้อไม้ได้ดี และทนต่อสารพวก phenolic ได้



ภาพที่ 10 a) การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE Lane M; Protein marker, Lane 1,3 ; *E. coli* BL21, Lane 2,4; ปริมาณโปรตีนที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลา 6 ชั่วโมง  
 (b) การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Native-PAGE และย้อมเจลด้วยสาร ABTS ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน ขนาด~ 57 kDa Lane M; Protein marker, Lane 1,3 ; *E. coli* BL21, Lane 2,4; ปริมาณโปรตีนที่ได้รับการกระตุ้นนาน 6 ชั่วโมง



## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีนแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1-1 ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ ABTS โดยการสกัด total RNA และเพิ่มปริมาณยีนแลคเคสจาก cDNA ได้ชิ้นส่วนของยีนแลคเคสที่มีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds* (Accession No. [FJ656307.1](#)) ที่ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

การเชื่อมต่อยีนแลคเคสเข้ากับ protein expression vector (pLATE52 vector) โดยมีตำแหน่งของ T7 promoter ( $P_{T7}$ ) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนแลคเคส ทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมขนาดประมาณ 6,063 คู่เบส แล้วทำการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน สามารถตรวจพบการปรากฏของยีนแลคเคสในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝาก พลาสมิดดีเอ็นเอ การแปรรหัสสารพันธุกรรมจาก cDNA เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน พบว่า เปปไทด์ที่ได้มีขนาด 520 อะมิโนแอซิด และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession [No. ACR24357.1](#)) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยการกระตุ้นด้วยสาร 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง ตรวจพบการแสดงออกในระดับโปรตีนในปริมาณน้อย

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื้อ *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1 สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลังงานจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส การกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทอผ้า ฟอกย้อม เยื่อกระดาษ การย่อยสลายของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชพวก Isoxafutole เป็นต้น
2. สามารถนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมหรือยีน laccase ที่ได้จากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1 ถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ยีสต์เพื่อการผลิตเอนไซม์ในระบบอุตสาหกรรม ช่วยทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ

## เอกสารอ้างอิง

- [Avgerinos, G.C.](#) and [Wang, D.J.](#) 1983. Selective solvent delignification for fermentation enhancement. [Biotechnol Bioeng.](#) 1983 Jan;25(1):67-83.
- Bollag, J. M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology* 48(4): 849-854.
- Crawford, R.L. 1981. Lignin Biodegradation and Transformation. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Gould, J.M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotech. Bioeng.* 26: 46-52.
- Kirk, T.K., T. Higuchi, and H.M. Chang, 1980. Lignin Biodegradation; Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kirk, T.K. and Farrell, R.L. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41, 465-505.
- Larsson, S., P. Cassland and L.j. Jonsson. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibition in lignocellulose hydrolysates heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microb.* 67: 1163-1170.
- Mai, C., W. Schormann, O. Milstein and A. Huttermann. 2000. Enhanced stability of laccase in presence of phenolic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 510-514.
- Sannia, G., P. Giardina, M. Lana, M. Rossi and V. Buonocore. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnol. Lett.* 8: 797-800.

## การทดลองที่ 1.2 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันและถ่ายเข้าสู่สาหร่าย

*Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตไบโอดีเซล

Cloning of Genes Involved in Fatty Acid synthesis and Transformed into

*Chlamydomonas reinhardtii* for Ethanol Production

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล<sup>1</sup>

นางสุภาวดี งามเหริยญ<sup>1</sup>

นางสาวอรุณทัย ซาวา<sup>1</sup>

นางสาวภรณ์ สว่างศรี<sup>1</sup>

คำสำคัญ

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ไบโเอทานอล ไบโอดีเซล กรดไขมัน

### บทคัดย่อ

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายโมเดลที่นิยมนำมาศึกษาการถ่ายยีน สามารถผลิตไบโเอทานอลและไบโอดีเซล การทดลองนี้จึงได้โคลนยีน *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันเพื่อนำไปถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายโมเดลในลักษณะ Overexpression เพื่อผลิตไบโอดีเซล จากการโคลนยีน *ChSAD* พบว่า ได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 เบส รวมส่วนของ CDS และ Non CDS การเพิ่มปริมาณจากอาร์เอ็นเอพบว่าได้ขนาดยีน 1206 เบส สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนแอซิดได้ขนาด 401 อะมิโน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบที่มีความเหมือนกับยีน *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ และลำดับอะมิโนแอซิดพบที่มีความเหมือนกับโปรตีน plastid acyl-ACP desaturase มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยีน *FAB2* ในสาหร่าย *C. reinhardtii* ก็คือยีน *SAD* ดังนั้น ยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จะถูกนำไปสร้างคอนสตรัคเข้ากับเวกเตอร์ pChlamy3 สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่ายต่อไป

*Chlamydomonas reinhardtii* is a green alga that has been famous as a model organism in genes transformation. It has also been used in ethanol and biodiesel production. This study aims to clone gene *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)* involved in fatty acid synthesis for gene transformation into the model alga using overexpression method for biodiesel production. The result of *ChSAD* cloning shows that the length of gene on DNA is 2,898 base pairs, including CDS and non-CDS. The amplification of RNA yields the gene in length of 1,260 base pairs which could be translated into 401 amino acids. When searching the DNA sequences against databases, they are homologous to *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (FAB2) having the identity score of 100%. The amino acid sequences search against databases gives the result that they are homologous to plastid acyl-ACP desaturase with identity score of 83%. Therefore, *FAB* in *C. reinhardtii* is *SAD* and the cloned *ChSAD* will be constructed into a vector pChlamy3 for gene transformation into alga in the future study.

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

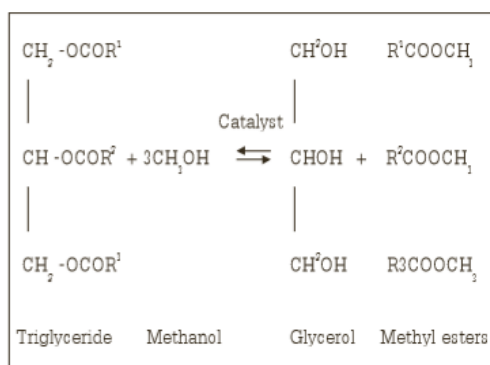
## บทนำ

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นพลังงานทดแทนที่ได้รับการส่งเสริมจากภาครัฐ ให้ผลิตขึ้นใช้เองอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายอย่าง เช่น สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ และไม่ปล่อยสารประกอบของกำมะถัน เช่น ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวการที่ทำให้เกิดฝนกรด (acid rain) ในบรรยากาศ (Miao *et al.*, 2004) การนำเอาตะไคร่น้ำ สาหร่าย (Algae) มาเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิงดีเซลมีมาตั้งแต่ปี 1980 พร้อมกับนักวิจัยจำนวนมากที่พยายามจะหาคำตอบในการที่จะทำให้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กกลายเป็นแหล่งพลังงานขนาดใหญ่โดยตะไคร่น้ำและสาหร่าย (Algae) ที่พุดถึงในเรื่องการผลิตไบโอดีเซลนี้ รวมทั้งสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายน้ำเค็ม ที่พบเห็นตามโขดหิน หรือ ในห้วยหนอง คลอง บึง และชายฝั่งทะเลทั่วไป สิ่งมีชีวิตจำพวกตะไคร่น้ำและสาหร่ายนี้ จะมีทั้งเมือกและส่วนที่เป็นน้ำมัน ทำให้เรารู้สึกกลิ่น เวลาสัมผัส จากรายงานประจำปีของสถาบันวิจัยพลังงานแสงอาทิตย์ (Solar Energy Research Institute) เมื่อเกือบ 25 ปีที่แล้ว รายงานว่า น้ำมันจากสาหร่ายนั้นมีความเหมาะสมต่อการนำมากลั่นเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง และในช่วงขาดแคลนน้ำมันปิโตรเลียม เชื้อเพลิงทางเลือกจากการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายก็ได้ถูกหยิบขึ้นมาใช้เพื่อแก้ไขสถานการณ์ เทียบกับพืชชนิดอื่นๆแล้ว เมื่อนำมากลั่นเป็นไบโอดีเซล ถั่วเหลือง จะให้น้ำมัน 50 แกลลอน ในขณะที่แคนโนล่า (พืชน้ำมันชนิดหนึ่ง) ให้น้ำมัน 130 แกลลอน ส่วนสาหร่ายนั้นให้น้ำมัน 4,000 แกลลอน ในระยะเวลา 1 ปี ในพื้นที่การผลิต 1 เอเคอร์เท่านั้น แยมสาหร่ายนั้นยังต้องการเพียงแค่แสงอาทิตย์และน้ำทิ้งที่ไม่เหมาะสำหรับการบริโภคเท่านั้น ในบ่อทดลองพบว่าสาหร่ายเล็กๆ เหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้แม้จะอยู่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส สาหร่ายเซลล์เดียวหรือ ไดอะตอม (diatom) และแพลงตอนชนิดอื่นๆที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (phytoplankton) ก็สามารถดูดซับเอาคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ใต้น้ำ หรือในมหาสมุทรมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงเช่นเดียวกับต้นไม้ แต่แพลงตอนทั้งหมดที่อยู่ในท้องทะเลนั้น สามารถกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการสังเคราะห์แสงได้มากกว่ากับต้นไม้ทุกต้นในโลกรวมกัน ในขณะที่บริษัท เชลล์ (Royal Dutch Shell and HR Biopetroleum) ได้แถลงข่าวเรื่องการก่อสร้างห้องปฏิบัติการบนเกาะ Kona ในฮาวาย เพื่อเพาะปลูกสาหร่ายทะเลสำหรับการวิจัยเรื่องไบโอดีเซล เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2551 ไม่เพียงพลังไบโอดีเซลจากสาหร่ายจะช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะถูกปล่อยออกไปในชั้นบรรยากาศ หากไบโอดีเซลจากสาหร่ายได้รับการยอมรับและนำมาพัฒนาเพื่อใช้งานอย่างจริงจังเท่านั้น แต่ด้วยตัวของสาหร่าย ที่สามารถขจัดคาร์บอนไดออกไซด์ทางตรงด้วยการสังเคราะห์แสงได้อีกด้วย

Lali (2008) ได้รายงานว่าการพัฒนาของการผลิตพลังงานชีวมวล (biofuels) แบ่งออกเป็น 4 Generation ได้แก่ Generation 1 ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย ผ่านกระบวนการหมักด้วยยีสต์ถึงจะได้เอทานอล (มีคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็น by-products) กว่าที่จะได้น้ำมันไบโอดีเซล 1 แกลลอน ต้องใช้ข้าวโพด 21 ปอนด์ กว่าที่จะได้ข้าวโพด 21 ปอนด์ การปลูก ปุ๋ย การขนส่ง ฯลฯ ต้องใช้น้ำมันปิโตรเลียม 1/2 แกลลอน หมักออกมาแล้วคุณภาพก็ยังดีไม่เท่าน้ำมันปิโตรเลียม ต้องนำมาผสมใช้ร่วมกัน ทำให้ราคาแพงขึ้น Generation 2 เซลลูโลสจากพืชผ่านกระบวนการหมักยีสต์หรือแบคทีเรียจึงจะได้เอทานอล หรือ

บิวทานอล (มีคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ เป็น by-products) Generation 3 สาหร่ายหรือแบคทีเรียที่ดูดพลังงานจากคาร์บอนไดออกไซด์และแสงแดด สังเคราะห์แสงแล้วแปลงเป็นไขมันสะสมไว้ จากนั้นใช้สารเคมีทำละลายเพื่อสกัดเอาไขมันออกมา ให้ได้ไบโอดีเซล ง่ายๆ เลย (ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์จากการผลิต) ข้อเด่นของเจนนีก็คือ สาหร่าย/แบคทีเรียพวกนี้โตเร็วมากๆ สกัดไขมันออกมาได้มากกว่า มากกว่าการผลิตไขมันจากถั่ว 250 เท่าตัวในพื้นที่เท่าๆ กัน แต่ถึงกระนั้นก็ตาม ก็ยังคงมีความยุ่งยากในการปลูกเจ้าสาหร่ายพวกนี้ให้ได้มากพอใช้งานและไม่กระทบกับพืชอาหารอื่นๆ และไม่ถูกสาหร่ายและแบคทีเรียอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการมาปนเปื้อนในแปลงปลูก และ Generation 4 สาหร่ายและแบคทีเรียที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงแล้วแปลงเป็นไขมัน จากนั้นไขมันถูกสกัดออกมาเองโดยไม่ต้องใส่สารเคมีทำละลาย และได้ไบโอดีเซล โดยที่สาหร่าย/แบคทีเรียอื่นๆ ยังไม่ตาย ยังคงสังเคราะห์แสงและปล่อยไขมันออกมาให้เราใช้ต่อไปได้เรื่อยๆ ไม่ต้องใช้เนื้อที่เพาะปลูกมากมาย และสาหร่าย/แบคทีเรียเหล่านี้จะตายถ้าไม่ได้รับสารเคมีที่เลี้ยงมัน และช่วยให้มันสกัดไขมันออกมาได้นี้ แปลว่ามันจะไม่แพร่พันธุ์ ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมข้างนอก ซึ่งสอดคล้องกับ Scientific American EARTH (2009) ได้กล่าวไว้ว่า พลังงานทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันได้ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่อง มาถึงเจนเนอเรชันที่ 4 นั่นคือ การผลิตเชื้อเพลิงจากสาหร่าย ซึ่งจะกระทบพืชเศรษฐกิจ อย่างข้าวโพด/ถั่ว ที่มนุษย์ยังต้องใช้เป็นอาหาร มีข้อถกเถียงกันว่า หันมาใช้พลังงานทางเลือก ไบโอดีเซล สกัดน้ำมันออกมาจากพืชไม่จ่อ น้ำมันดิบที่อีกไม่เกิน 30 ปี จะขาดแคลนอย่างแน่นอน

น้ำมันไบโอดีเซล ในความหมายของการผลิตในระดับอุตสาหกรรม หมายถึง การนำน้ำมันพืชและสัตว์ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล หรือเมทานอล ในปริมาณที่มากเกินไป มาทำปฏิกิริยาเคมี “ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน” (Tranesterification) โดยใช้กรด ด่าง หรือการใช้เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ไลเปส ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเกิดการรวมตัวของไตรกลีเซอไรด์ และแอลกอฮอล์ เปลี่ยนวัตถุดิบตั้งต้นไปเป็นเอทิลเอสเทอร์ (Fatty acid esters : FAEs) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl esters : FAMES) ดังภาพที่ 1 แสดงปฏิกิริยาเคมีทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือไบโอดีเซล และกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (พินดา และ ผกาวัตติ, 2551)



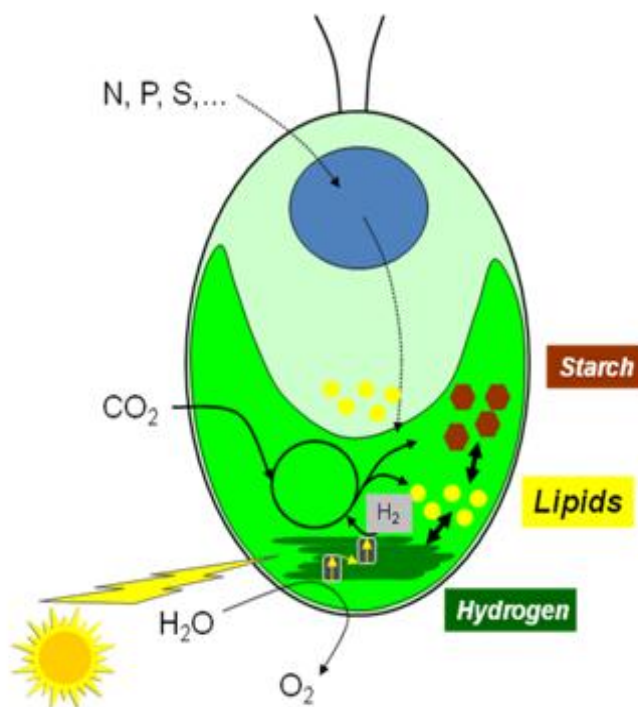
1.

ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาเคมีทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เกิดขึ้นในการผลิตไบโอดีเซล

ในน้ำมันพืชจะมีองค์ประกอบหลักคือ กรดไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated Fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated Fatty acid) ในปริมาณที่แตกต่างกัน จึงทำให้น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งกรดไขมันที่พบในน้ำมันพืชส่วนใหญ่ จะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว และโดยทั่วไปกรดไขมันจะมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลเป็นเลขคู่เสมอ ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 12-24 คาร์บอนในโมเลกุล แต่ที่พบเป็นจำนวนมากจะมีจำนวนคาร์บอน 16 (C<sub>16</sub>) และ 18 (C<sub>18</sub>) (He et al., 2007) และที่พบโดดเด่นมากในน้ำมันมะพร้าวคือ lauric acid (12:0)

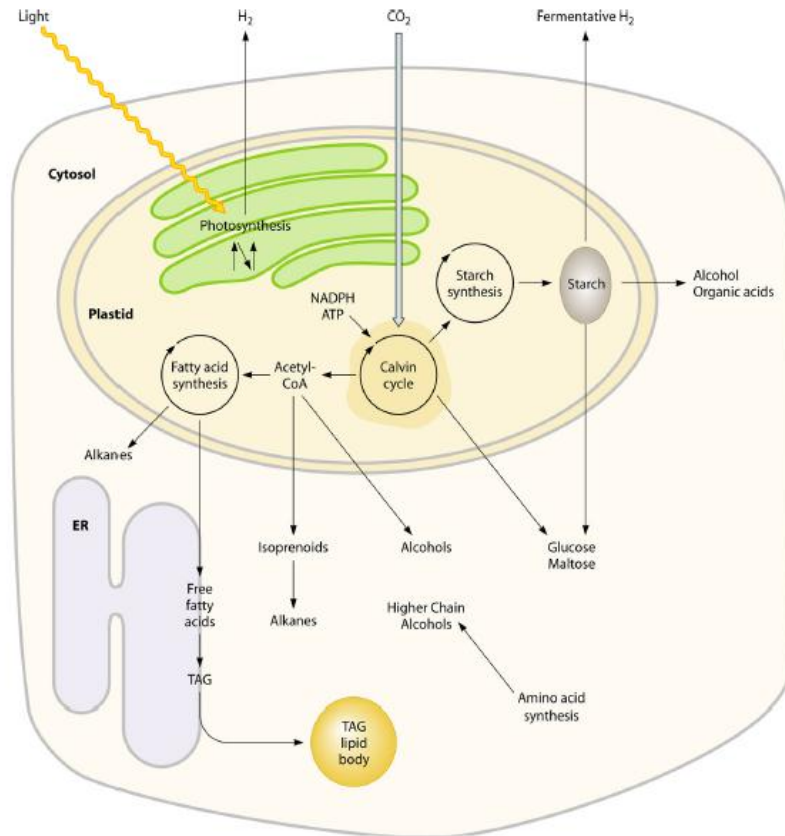
Pathways การสร้างลิพิด จะประกอบด้วย การสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งอยู่ในพลาสติด ถูกสังเคราะห์มาจาก acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) และ Triacylglycerols (TAGs) ซึ่งในสาหร่ายก็มีวิธีการสังเคราะห์เหมือนพืชชั้นสูง TAGs มีจำนวนคาร์บอนสูงเป็นแหล่งเก็บสะสมพลังงานในพืชจะพบมากในส่วนของเมล็ด มีกลุ่ม acyl อยู่ที่ผนังเมมเบรนลิพิด กรดไขมันที่พบมากได้แก่ palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) และ  $\alpha$ -linoleic acid (18:3) (Alexandro et al., 2011)

สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวสีเขียวที่นำมาใช้เป็นโมเดลทางด้านพันธุศาสตร์ บ่อยครั้งที่มีการใช้คำว่า “the green yeast” แทน *C. reinhardtii* เป็นชนิดที่มีการเลี้ยงและเจริญเติบโตได้ง่ายและแบ่งเซลล์เร็วมาก มีการศึกษาถอดรหัสทั้งจีโนมของสาหร่ายชนิดนี้ไว้สมบูรณ์แล้ว (Merchant et al., 2007) ทำให้รู้ถึงฐานข้อมูลของยีน EST และนักวิทยาศาสตร์จึงนิยมนำมาใช้เป็นโมเดลในการถ่ายยีนบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ เพราะมีจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน สาหร่ายขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต มีการสังเคราะห์ลิพิดได้สูงกว่าในกลุ่มโปรคาริโอตและในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ดังนั้น *C. reinhardtii* จึงนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์แบ่งการผลิตไฮโดรเจน และ ขบวนการเมแทบอลิซึมของลิพิด ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งปัจจุบันนำมาใช้เป็นโมเดลในการวิจัยในการสังเคราะห์ลิพิด แป้ง และ bio-hydrogen ซึ่งอยู่บนคลอโรพลาสต์ บริเวณรูปถ้วย (cup-shaped) ([http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag\\_algae/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_algae/index.htm))

การผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายกำลังเป็นที่น่าสนใจ ช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศโดยใช้กระบวนการสังเคราะห์แสง ทั้งสาหร่ายขนาดเล็กและขนาดใหญ่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นชีวมวล และที่สำคัญสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มยูคาริโอตจะมีแหล่งเก็บพลังงานได้สูงมาก เช่น triacylglycerol (TAG) และแป้ง (starch) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ทั้งไบโอดีเซลและเอทานอล เริ่มต้นของ crude oil มาจากสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอมและเป็นที่น่าสนใจในการผลิตสารในกลุ่มลิพิด (Ramachandra *et al.*, 2009) สาหร่ายขนาดเล็กมีสิ่งที่มีพิเศษสามารถดึงพลังงานจากธรรมชาติมาเก็บไว้ในเซลล์ได้โดยการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เปลี่ยนเป็นพลังงาน และเจริญเติบโตได้ทุกสภาพแหล่งน้ำทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำเสีย (Dismukes *et al.*, 2008) ซึ่งสาหร่ายขนาดเล็กมี metabolic pathways สามารถผลิตพลังงานเชื้อเพลิงได้ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 Metabolic pathways ของสาหร่ายขนาดเล็กที่สามารถผลิตเป็นพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งอยู่ใน ส่วนของเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic Reticulum : ER)

Randor *et al.* (2010) ได้ศึกษาการใช้พันธุวิศวกรรมในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพของ สาหร่าย พบว่ามีจุดที่น่าสนใจที่สามารถดัดแปลงนำมาใช้ได้ในการผลิตลิพิด แอลกอฮอล์ และ ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการดึงพลังงานแสงอาทิตย์มาสังเคราะห์แสงได้ ได้มีการพัฒนาในเรื่องของ การผลิตลิพิดและคาร์โบไฮเดรตให้สูงขึ้น และที่สำคัญขบวนการในสาหร่ายในกลุ่มยูคาริโอตมีจุดเด่นของเมแทบอลิซึมในการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพในเรื่องของการสะสมปริมาณ triacylglycerol และการ สังเคราะห์สะสมปริมาณแป้งทั้งอะมิโลส และอะมิโลเพคตินเหมือนกับพืชชั้นสูง

Wei-Luen *et al.* (2011) ได้ศึกษาการดัดแปลงวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathways) ของการ ผลิตลิพิดและ triacylglycerol ในสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งพบว่าสาหร่ายขนาดเล็กเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถ นำมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงได้ดีและมีการสะสมในส่วนของลิพิดซึ่งจุดที่สำคัญในการสร้างอยู่ที่ triacylglycerol ต้องศึกษาในส่วนของเอนไซม์ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้าช่วยปรับปรุงและ พัฒนา

Lei *et al.* (2012) ได้กล่าวว่าการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพจากสาหร่ายเป็นที่น่าสนใจมากในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา ซึ่งจัดอยู่ในยุคที่ 4 (4<sup>th</sup> generation) ในเรื่องการ metabolic engineering ในการผลิต พลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ และได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน และการ



สะสมกรดไขมันในสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ภายใต้สภาวะเครียดต่างกันเพื่อศึกษากายภาพในการผลิตไบโอดีเซล โดยการวัดปริมาณค่า FA จากเครื่อง GC-MS ภายใต้การทดลองความเครียด เช่น ขาดไนโตรเจน ความเค็มสูง หรืออุณหภูมิต่ำ พบว่าการใช้อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง และขาดไนโตรเจน พบว่าการสังเคราะห์ FA แตกต่างกัน

Gong *et al.* (2011) ได้ศึกษาคุณลักษณะของยีน thioesterase (PtTE) จากไดอะตอมชนิด *Phaeodactylum tricornutum* พบว่ามีขนาด 648 bp ในส่วนของ open reading frame (ORF) และมีลำดับเปปไทด์จำนวน 216 amino acid และถ่ายยีนเข้าสู่ *E. coli* และตรวจสอบการแสดงออกของ cDNA ด้วย XL1-Blue และ K27fadD88 พบว่า fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway มีการเปลี่ยนแปลงไปได้กรดไขมัน C18:0 และ C18:1 ซึ่งทำให้องค์ประกอบของกรดไขมันมีค่าสูงขึ้นถึง 72%

ได้มีรายงานการพัฒนาการใช้ Thioesterase ในสาหร่ายขนาดเล็กให้จำนวนคาร์บอนของกรดไขมันให้มีความยาวอยู่ระหว่าง 14-20 ซึ่งปกติที่พบมากจะเป็นชนิด C16:1, C16:0 และ C18:1 แต่ว่าการผลิตไบโอดีเซลที่ดีควรอยู่ที่ C12:0 และ C14:0 ในการควบคุมความยาวของคาร์บอนของกรดไขมันจะถูกควบคุมโดย acyl-ACP thioesterase ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป และการถ่ายยีน thioesterase ให้เกิด overexpression สามารถที่จะเปลี่ยนความยาวของกรดไขมันได้ (Oilgae club, 2010)

จากแนวโน้มความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และวิกฤตราคาน้ำมันแพงที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจทั่วโลกในขณะนี้ ทำให้รัฐบาลตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวและได้แสวงหาแหล่งและการผลิตพลังงานทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานชีวมวล แก๊สชีวภาพ เอทานอล และไบโอดีเซล และไบโอดีเซลจะได้รับการส่งเสริมให้มีการผลิตกันอย่างแพร่หลายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้เพราะประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงเอื้อต่อการนำผลิตผลทางการเกษตรชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพืชน้ำมัน เช่น ปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง มะพร้าว ทานตะวัน และสบู่ดำ เพื่อนำมาผลิตไบโอดีเซล น้ำมันเชื้อเพลิงจากพืชสาหร่ายถือเป็นพืชน้ำมันอีกประเภทหนึ่งที่มีศักยภาพสูงของโลกในอนาคต ปัจจุบันบรรดาประเทศชั้นนำต่างๆ เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย จีน ฯลฯ ต่างให้ความสนใจและทุ่มงบประมาณในการคิดค้นวิจัยพัฒนาสายพันธุ์และเทคโนโลยีการสกัดน้ำมันจากสาหร่ายอย่างจริงจัง และปัจจุบันการศึกษาวិวัฒนาการระดับโมเลกุลมีความสำคัญมากโดยเฉพาะเรื่องการควบคุมการแสดงออกของยีน หรือการดัดแปลงพันธุกรรมพืช/จุลินทรีย์ ให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ดีกว่าเดิมและหนึ่งในนั้นเรื่องการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน และถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สำหรับผลิตไบโอดีเซล จัดอยู่ในยุคที่ 3 ในเรื่องของวิวัฒนาการในการผลิตพลังงานจากชีวมวล จัดเป็นพลังงานจากพืช หรือพลังงานสะอาด ไม่ใช่พืชอาหารตลอดจนกระบวนการผลิตมีความบริสุทธิ์ สามารถย่อยสลายได้ เป็นเทคโนโลยีที่สะอาดอย่างแท้จริง ขณะที่ชีวมวลจากพืช มีโครงสร้างทำลายยาก ทำให้มีของเสียหลงเหลือจากกระบวนการผลิตดังนั้นสาหร่ายเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการลดปัญหาสภาวะแวดล้อมและการผลิตชีวมวล (biomass) สำหรับเชื้อเพลิงชีวภาพ (bio-fuels) ที่เป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษากการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันเพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* เพื่อศึกษา

เทคโนโลยีการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายที่ได้จากการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันในระดับห้องปฏิบัติการ

## วิธีการวิจัย

### วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

#### อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุลและจุลชีววิทยาและอาหารเลี้ยงสาหร่าย
2. อุปกรณ์ในการเลี้ยงสาหร่าย
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ lamina flow
4. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
8. เครื่องส่งถ่ายกระแสไฟฟ้าด้วยวิธีอิเล็กโตรโพรเซชัน electro cell manipulator 600 (BTX San Diego, California)
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ ต่ำ -20 องศาเซลเซียส

#### วิธีดำเนินการ

##### 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

นำเซลล์สาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Tris-Acetate-Phosphate (TAP medium) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที จากนั้นนำเซลล์สาหร่ายไปปั่นเหวี่ยงในหลอด 50 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เก็บตะกอนสาหร่ายที่ -80 เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอต่อไป

##### 2. การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii*

- การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นำสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผง แบ่งใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน

1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เติมน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

- การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอสำหรับ *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยชุด Nucleo Spin kit<sup>®</sup> ยี่ห้อ MACHERY-NAGEL โดยการบดตัวอย่าง *Chlamydomonas reinhardtii* ด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดที่มีบัฟเฟอร์ RA1 ผสมให้เข้ากัน นำของเหลวที่ได้ใส่ลงไปในหลอด Nucleospin<sup>®</sup> filter unit แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 1 นาที เพื่อกรองเอาส่วนใส 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล 400 ไมโครลิตร แล้ววางบนน้ำแข็ง นำของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน Nucleospin<sup>®</sup> RNA plant แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที ทิ้งของเหลว เติมบัฟเฟอร์ที่มี DNaseI บน membrane ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเมมเบรน 3 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ล้างด้วย RA2 200 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที แล้วทิ้ง

ของเหลว

ครั้งที่ 2 ล้างด้วย RA3 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 30 วินาที แล้วทิ้ง

ของเหลว

ครั้งที่ 3 ล้างด้วย RA3 250 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 2 นาที

ย้ายเมมเบรนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม RNase free water+Ribolock 40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วปั่นที่ 11000 xg นาน 1 นาที นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบ และเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

### 3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม (cDNA synthesis) จากอาร์เอ็นเอรวม

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)<sub>18</sub> 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัฟเฟอร์ 5X reaction 4.5

ไมโครลิตร Ribolock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ ReverstAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อนที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

#### 4. การเพิ่มปริมาณยีน *Stearoyl-ACP Desaturase (SAD)*

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *SAD* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ ChSADF: 5'-ATG GCT CTG GGC CAG CAG GCG AT-3' และ ChSADR: 5'-TTA CAG GGC CAC CTC GCG GTT G-3' ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 μM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 μM)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูตารางรายละเอียดที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นโคลนเข้าพีซีอาร์เวกเตอร์

#### 5. การโคลนยีนที่ได้เข้าสู่พีซีอาร์เวกเตอร์

นำชิ้นยีนที่ได้จากพีซีอาร์มาทำปฏิกิริยา ligation ด้วยวิธีโคลนปลายทู่ (blunt-End Cloning) โดยใช้ชุด CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) (ภาพผนวกที่ 1) ประกอบด้วย 2X reaction buffer 10 ไมโครลิตร ผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร DNA blunting enzyme 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Water nuclease-free ให้ได้ 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที ป้อนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/ul) 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (5U/ul) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที ป้อนปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที (สามารถบ่มได้นานถึง 30 นาที) นำปฏิกิริยา ligation ที่ได้ไปฝากถ่ายเข้าเก็บเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส

## ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

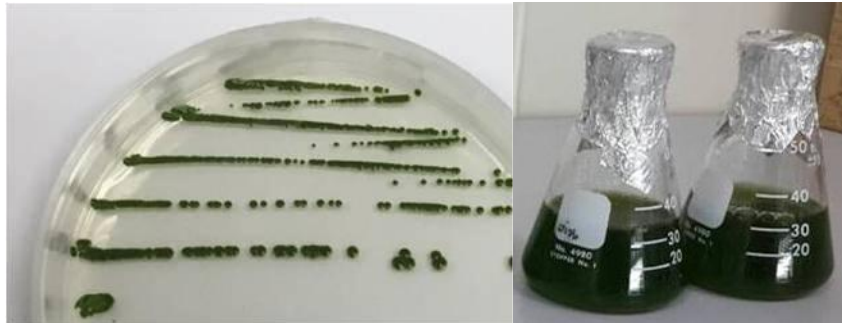
ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2560 รวม 2 ปี (เดิมสิ้นสุดปี 2562 รวม 4 ปี)

## สถานที่ดำเนินการทดลอง

ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

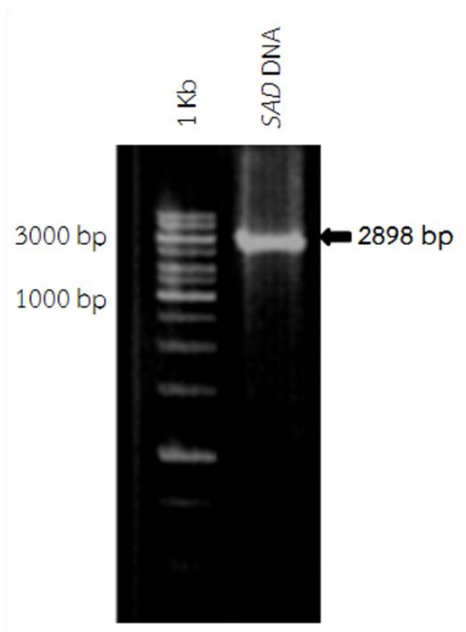
จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 พบว่า สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็ง TAP ภายใน 5-6 วัน เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่า มีการเจริญเติบโตภายใน 6-7 วัน (ภาพที่ 1) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที การเลี้ยงเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร นาน 7 วัน พบว่าเซลล์ตะกอนของสาหร่ายเพียงพอต่อการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ การเลี้ยงในอาหารเหลวต่ำกว่า 7 วัน จะได้ตะกอนเซลล์น้อย แต่ถ้าหากเลี้ยงนานกว่า 9 วัน เซลล์สาหร่าย *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 เริ่มแก่อาจมีผลต่อการสกัดอาร์เอ็นเอได้



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่าย *C. reinhardtii* C.137 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

จากการเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* ในสาหร่าย *C. reinhardtii* และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า การเพิ่มปริมาณยีนจากดีเอ็นเอได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 คู่เบส (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) รวมส่วนของ CDS (Coding Sequence) และ Non CDS (Non Coding Sequence) และการเพิ่มปริมาณยีนจากอาร์เอ็นเอได้ขนาดยีน 1290 คู่เบส (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนแอซิดได้ขนาด 429 อะมิโน (ภาพที่ 6) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบที่มีความเหมือนกับยีน *Chlamydomonas reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (*FAB2*) มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) และลำดับอะมิโนแอซิดพบที่มีความเหมือนกับโปรตีน plastid acyl-ACP desaturase มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเมื่อนำยีน *ChSAD* ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับยีน *FAB2* ซึ่ง Hwangbo และคณะ (2014) และ Jaejer และคณะ

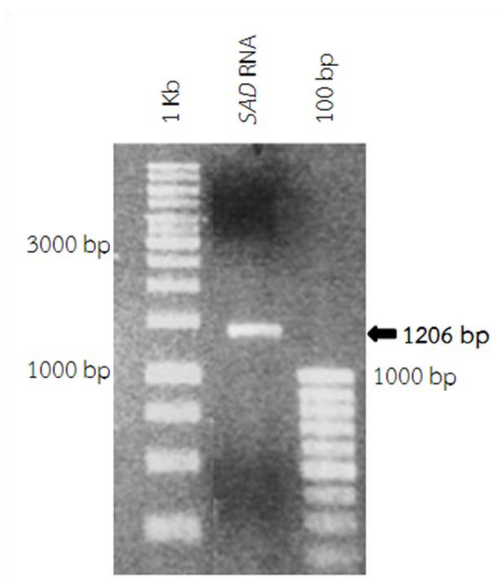
(2017) ได้รายงานไว้ว่า ยีน *FAB2* และยีน *SAD* คือยีนเดียวกัน ดังนั้นยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จึงจะถูกนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pChlmy3 เพื่อถ่ายฝากเข้าสู่สาย *C. reinhardtii* และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป



ภาพที่ 2 การเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* จากดีเอ็นเอของสาย *C. Reinhardtii* มีขนาด 2898 คู่เบส

ATGGCTCTGGGCCAGCAGGGCGATGCAGCGCAAGGGTAAGCAGGCCTTACGCGTCTCCAGCGTATGGAGCCCGGCCAGCAACGCCTTGGCTGGCGA  
 AGTCTTGTGGGCAGGCGTTAGTGGGCGGGAGGGTCCGCGTTGACATAAATGGGTTTGAATTGGTGGCTCAATTGTCGCGCCAGCTGCGGCAAC  
 CGCCTAAGCGCGGACTGGCCAGGCTTGAGGACGCGATGCTCTGCAGTGCCTTTCGCGTGCAGTCCGCGTATGCGTTACTACGCCACCTGCATATG  
 TTGAATTGCGCGCTGGTGATCTAAGCTTGTATGCGGGCTCGCAACTGCTGCTTGCAAGCGCCCTTAACGCCAACAGGGCCCTCGCGCAAGGCTTGC  
 GTCGTCGCGCGCAGGCGGTTGCCTCGGCTCCCAACAGCCGGCCACTGCTTCGCGATATGTTCCCTCACGTCCAGGGCCCGATCATCATGAATG  
 GTCAGGTGCTGCACAGCATCACGGCTGAGCGCCTGGATGTGGTGCAGCGCTGGAGGACGGCTACCTGCAGAGCCAGGTAAGCTTCAATACATC  
 TCAGATATCTCTCGTGTGCTCCACTCGCCGAGCGTGTGCCGAGTCAAGCCCGACTGGGCTGAAAGGGGGCGGTGACATGGATGTAGGCGGTACA  
 CATCGGCTTACGTAGCGTGTGTCTCTTACCTGTTCACCCGACGTCGCGCAGGTGGTGCCTCTGCTGAAGCCCGTGGAGAAAGTGCCTGGCAGCC  
 CGCCGACTTCCTGCGCCCTCGGAGGACCCCGACTTCCTGGACAAGGTGAGAGCATCCATCCCTTCCCCGTACCCGGGCGGCGGGCGTGCCTGA  
 GGACCGGACACGTTTCGCGCTTGGGTTGCAGCTTAGCAGCAGCGAACAGACCCTGACACGTATGCACCTCTGCTCAGCGTGTGTTGCTTTATAA  
 CCTACAGGTGCGCGAGCTGCGCAAGCGCGCTGCCAACCTGCCCGATGACTACCTGGTGGTCTTCCCGGCGACATGATCACCGAGGAGGGCGTG  
 CCCACCTACATGACCATGCTCAACACCCTGGACGGCGTTCGCGATGAGACCGGGCCAGCCAGACCCCTGGGCCAAGTGGACGCGCGAGTGGA  
 CCGCCGAGGAGAACCGCCAGGGCAGCTCATGAACCGCTACATGTACCTGACTGGCCGCTCAACATGAAGGCGGTGGAGGTGACCGTGCAGAA  
 CCTGATTGGCTCCGGCATGGACCCCAAGACCGGAGAACAACCCCTACCTGGGCTTCTGCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGGTGAGG  
 GGCTGGGCTGGGGTTCCGGGTGAGGAGGGGAGATGAAAGGGCGCACAAAGGAGGCGAAGGGTGGGAGGTGTCAAGGAGCAGCCTGCCAGCAGC  
 GGACGACAGCGCTAAATGCATCGGAGCAAGGACGGCTGTGCGCAAGCTGCTGGTGTGCTATGGGTCACAACTCAGCATCACCGGGTGAATTTG  
 AGCAAAGCCTTGGGGCCACACACCGTAAACGCTCCATCCCAACCCATCCCATCCCCACCCCTCCAAACCGCACCCCGCCCTCATCCCCGCCCTG  
 TTCAGGTGTCACGGCAACACCGCCCGCCACGCTCTGGAGCAGCGGCGACGCTGCTGGCCAAGATCTGCGGCTCCATCGCCTCGGACGAGG  
 GCCGCCACGAGATCGCCTACTGCAAGGTGGGTGCCGCTCCACAGCGCATGCCCCATGCATGACGTGATCGTTTCCCGCCCCGGGGGG  
 GGGGAGCGGCTGCAAGCGAGGCATGCTCTGGCACATGGTGTGCTCTCGGGCCCGTCAAGTTCCCAACATAAGCGCTGCAAAACCGTGGCC  
 CGTCTATACTCTACAGTGCTAACCTCGCACTGCACACCTCCAACTCCCATGCGCAAGATCATGGACGGCCTGTTGAGCGGACCCAGCGGC  
 GCCATGATTCGCTTCGGCGACATGATGAAGAAGCAGATCGTGTGCCCCGCCACCTCATGAACGACAACGTGCACCACGCCAACACCGGGCGCA  
 ACCCTGTTCCGGTGGGTCCCGCCGAGGGCGTGGGGCGGGGACAGGAGGGGTCAGTCAAGGAGGACTGAAGGTGTAAGCTGGACACG  
 GCGTTGCGGACGTCCCGATCTGAGCCAGTTTCTGAGCTTGTATCTTACATACCTGCTCGCGACTCAAGACACAGGGCAGCTGCGCGCCC  
 CCTGACCCCTCACCCCTCCTACCTGACCTACCCACCCACCTCGCCCAACAACATCTGACTCCCCACCCCGCCTCCACGCTCCACGC  
 CCCACAGGACTTCTCCGCTGTGGCTGAGAACACGGGCACCTACACCGCCATGGACTACGCTGACATCATGGAGCACCTGGTGGGCGGCTGGAAC  
 GTCAGAAGCTGACCGGCCTCAACGGCGACGCCCGCCATGCAGGAGTACGTATCAAGCTGCCCGACCGCATCCGCAAGCTGGCGGAGGAGG  
 CCACCGGTGCGCAGGAGGGGAGGGGGAGGGGTAGGGGGCAAGGGGGGGTAGGGGTTAGCAAGAGCGCAGGGAGGATGGAGGAAGGAGA  
 TTGTAAGGAATAGCTGTGGTGGTGGACGACGGCGTTTGGGGGAACCATGCTGATGATGTGGCGGAAAGACTCTTGGGGGCTGGTGGGGAGAGCG  
 GGAAGCACAGGAGCTGTGTACCGTATCTGAAATGCCGCTGCTGCTGCTGGGCGCAGCACTCTCATTGACCTCTCCCTCTGCCGTGTTCTCT  
 CCCGACGCCCCCGGAAGAAGGGCAAGGTGCTGCACGGCCCTTCAGCTGGGTGTCAACCGCGAGGTGGCCCTGTAA

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* บนดีเอ็นเอ ขนาด 2898 คู่เบส โดยแถบสีเหลืองคือส่วนของ CDS



ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* จากอาร์เอ็นเอของสาหร่าย *C. Reinhardtii* มีขนาด 1206 คู่เบส

```

ATGGCTCTGGGCCAGCAGGCGATGCAGCGCAAGGGCCCTTAACGCCAACAGGGCTCGCGCAAGGCTTGCCTCGTCCGCGCAGGCGGTTGCCTCGGCTCCCCAACAGCCGGCCACTGCTT
CGCAGTATGTTCTCACGTCCAGGGCCCGATCATCATGAATGGTCAGGTGCTGCACAGCATCACGGCTGAGCGCTGGATGTGGTGCGCAGCCTGGAGGACGGCTACCTGCAGAGCCAGTGGT
GCCTCTGCTGAAGCCCGTGGAGAAGTGTGGCAGCCGCCGACTTCTGCGCCCTCGGAGGACCCCGACTTCTGGACAAGGTGCGCGAGCTGCGCAAGCGCGTCCCAACCTGCCCGATGAC
TACCTGGTGTCTTACCGGCGACATGATCACCGAGGAGGCGTCCCACTACATGACCATGCTCAACACCTGGACGGCGTTCGCGATGAGACGGCGCAGCCAGACCCCTGGGCCAAGT
GGACGCGGAGTGGACCGGAGGAGAACCCGCCACGGCGACGTATGAACCGCTACATGTACTGACTGGCCGCTCAACATGAAGGCGGTGAGGTGACCGTGCAGAACCTGATTGGCTCCG
GCATGGACCCCAAGACCAGAACCAACCCCTACCTGGGCTTCTGCTACACCTCTCCAGGAGCGGCCACCAAGGTGTCCACGGCAACACCGCCCGCCACGCTCTGGAGACCGGCGACGACGT
GCTGGCCAAGATCTGCGGCTCCATCGCTCGGACGAGGGCCGCGACGAGATCGCCTACTGCAAGATCATGGACGGCTGTTTGGAGCGGACCCAGCGGCGCATGATTGCGTTCGGCGACATG
ATGAAGAAGCAGATCGTATGCCCGCCACCTCATGAACGACAACGTGCACCAACCGCCCAACCGGCGCAACCTGTTCCGGGACTTCTCCGCTGTGGTGAAGACACGGGCACCTACACCGCA
TGGACTACGCTGACATCATGGAGCACCTGGTGGGCGGTGAACGTCAAGAACCTGACCGGCTCAACGGCGACGCGCGCATGCAGGAGTACGTCATCAAGTGCCTCCGACCCGCATCCGCAA
GCTGGCGGAGAAGGCCACCGCCCGGAAGGGAAGGTCGTGCACGCGCCCTCAGCTGGGTGTTCAACCGGAGGTGGCCCTGTAA

```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* บนอาร์เอ็นเอ ขนาด 1206 คู่เบส

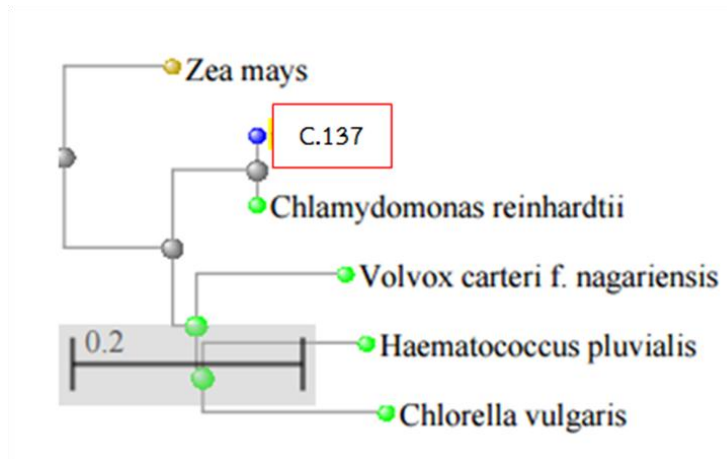
```

MALGQQAMQRK GALNANRASRKACVVRAQAVASAPQQPATASQYVPHVQGPIMNGQVLHSITAERLDVVRSLEDGYLQSQVVP LLLKPEKWCWQPADFLPP
SEDPDFLDK VRELKRKAANLPDDYL VVFTGDMITEALPTYMTMLNTLDGVRDET GASQTPWAKWTREWTAENRHGDV MNRYMYLTGRVNMKAVEVTV
QNLIGSGMDPKTENNPYLGFCYTSFQERATK VSHGNTARHALEHGDDVLAKICGSIASDEGRHEIAYCKIMDGLFERDP SGAMIAFGDMMKKQIVMPAHLMND
NVHHANTGRNLFADFSVA AENTGTYTAMDYADIMEHLVGRWNVKNLTGLNGDAAMQEVYV IKLPRIRKLAEKATARRKKGKV VHPFSWVFNREVAL -

```

ภาพที่ 6 ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *ChSAD* ขนาด 401 อะมิโน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* ของ *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) พบว่ามีความเหมือนกันกับ *C. Reinhardtii* และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *Volvox carteri* *Haematococcus pluvialis* และ *Chlorella vulgaris* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสาหร่าย และจะเห็นว่า *Zea mays* จะมีความห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด (ภาพที่ 7) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นพืชลำดับสารพันธุกรรมจึงมีความต่างกัน



ภาพที่ 7 Phylogenetic tree ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChSAD* ของ *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับยีน *C. Reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 มีการเจริญเติบโตภายใน 5-7 วัน ระยะเวลา 7 วัน ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* พบว่า ได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 เบส จากดีเอ็นเอ ในส่วนของ CDS และ Non CDS และได้ขนาดยีน 1290 เบส จากอาร์เอ็นเอ สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนแอซิดได้ขนาด 429 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับยีน *C. reinhardtii* plastid acyl-ACP desaturase (*FAB2*) มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ และลำดับอะมิโนแอซิดพบที่มีความเหมือนกับโปรตีน plastid acyl-ACP desaturase มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเมื่อนำยีน *ChSAD* ไป Blast ในฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับยีน *FAB2* ซึ่งก็คือยีน *SAD* เช่นกัน เนื่องจากการทดลองนี้ได้วางแผนการทดลองไว้ 4 ปี ซึ่งได้ดำเนินการเพียงแค่ 2 ปี ดังนั้นยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จึงจะถูกนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pChlamy3 เพื่อถ่ายฝากเข้าสำหรับยีน *C. reinhardtii* และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

#### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

สามารถนำเอายีน *SAD* ที่โคลนได้ไปถ่ายยีนเข้า *Chlamydomonas reinhardtii* แบบ Overexpression เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป



## เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มพัฒนามาตรฐานน้ำมันเชื้อเพลิง สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. 2557. ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันเชื้อเพลิง จากสารราย. 4 น.
- พนิดา รัตน์พลที และ ผกาวดี แก้วกันเนตร. 2551. ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากสารรายขนาดเล็ก. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. ปีที่ 16 ฉบับที่ 1. น. 9-13
- Alexandro, C., R. Margis, F.S. Maraschin, A.C. Turchetto-Zolet, G. Loss, M. Margis. 2011. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plant and algae. *Plant Biology*, 2 : 10, 40-52.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advance*. 25, 294-306.  
DBT-UICT centre of energy biosciences. Institute of chemical technology. Matunga, Mumbai.
- Gong, Y., X. Guo, X. Wan, Z. Liang, M. Jiang. 2011. Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*. *Basic Microbiol.* 51(6):666-72.
- He, H., Wang, T. and Zhu, S. 2007. Continunous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. *Fuel*. 86, 442-447.
- Hwangbo, K., J. Ahn, J. Lim, Y. Park. J.R. Liu and W. Jeong. 2014. Overexpression of stearoyl-ACP desaturase enhances accumulations of oleic acid in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol Rep V.8 Issue2*. pp 135–142.
- Jaeger, L., J.Springer, H.Wolbert, D.E.Martens and R.H.Wijffels. 2017. Gene silencing of stearoyl-ACP desaturase enhances the stearic acid content in *Chlamydomonas reinhardtii*. [Bioresource Technology](#) V. 245: pp 1616-1626.
- Lali, A. 2008. Biotechnology for next generation biofuels/bioenergy. ICS Workshop Trieste.
- Lei, A., H. Chen, G. Shen, Z. Hu, L. Chen and J. Wang. 2012. Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels*. 5 : 18.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.M., Marechal-Drouard, L. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 318, 245-250.
- Miao, X.L., Wu, Q.Y. and Yang, C. 2004. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Anal. Appl. Pyrolysis*. 71, 855-865.
- Oilgae Club. 2010. An online community for algae fuel enthusiasts worldwide.  
<http://oilgae.com/club/users/Aayush/blogs/465>.

- Ramachandra, T.V., D.M. Mahapatra, B.Karthic, and R. Gordon. 2009. Milking diatoms for sustainable energy : biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 : 8769-8788.
- Randor, R., R.E. Jinkerson, A. Darzins and M.C. Posewitz. 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic cell*, 486-501.
- Scientific American EARTY. 2009. น้ำมันในอนาคตสกัดจากสาหร่าย. Vol.19, No.1, 2 น.  
<http://www.Green.in.th>.
- Wei-Luen, Y.,W, Ansari, N.G. Schoepp, M.J. Hannon, S.P. Mayfield and M.D. Burkart. 2011. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylcerol production in microalgae. *Microbial cell factories*, 10 : 91.
- Yong, L.B. 2014. Triacylglycerol biosynthesis in eukaryotic microbiology. *The AOCS Lipid Library*. [http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag\\_algae/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/plantbio/tag_algae/index.htm)

### ภาคผนวก

#### สูตรการเตรียมอาหาร TAP medium

เริ่มเตรียม stock สาร ดังนี้

1. TAP salts	1	L	2	L
NH <sub>4</sub> Cl	15	g	30	g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4	g	8	g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2	g	4	g
	เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร		เติมน้ำให้ครบ 2 ลิตร	
2. Phosphate solution	100	ml	200	ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.8	g	57.6	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.4	g	18.8	g
	เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร		เติมน้ำให้ครบ 200 มิลลิลิตร	
3. Trace elements solution (Hutner's trace elements)				
	1	L	2	L
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	5	g	10	g

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2	g	4.4	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.14	g	2.28	g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5	g	1	g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	g	1	g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.16	g	0.32	g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16	g	0.32	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11	g	0.22	g

เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ครบ 200 มิลลิลิตร

ละลาย Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O ในน้ำร้อน 60-80 องศาเซลเซียส ปรับ pH เป็น 5.0 ด้วย KOH จากนั้น  
ค่อยๆ เติมแต่ละสารลงไป เก็บในขวดพลาสติก PET ที่ -20 องศา  
จากนั้นนำ stock ที่ได้มาเตรียม TAP medium ดังนี้

Tris base	2.42	g
TAP-salts	25	ml
Phosphate solution	1	ml
Trace elements solution	1	ml
Acetic acid	1	ml

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ Auto clave

การทดลองที่ 1.3 การผลิตเอนไซม์ไซลานเนสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* ด้วยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยกระบวนการหมักแบบแห้ง

Production of Xylanase from *Aspergillus niger* using Agricultural waste by semi-solid fermentation

ผู้วิจัย                      นางบุญเรือนรัตน์    เรืองวิเศษ<sup>1</sup>                      นางสาวภรณี    สว่างศรี<sup>1</sup>  
   นายพินิจ                      จิรัศคกุล<sup>2</sup>    นายวุฒิพล                      จันทรสระคู<sup>2</sup>

คำสำคัญ                      *Aspergillus niger*    ไซลานเนส    หมักแบบแห้ง    วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

### บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลานเนสโดยกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* S068 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ โดยศึกษาใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย, Xylan เป็นสับเสตรพบ ฟางข้าว เป็นสับเสตรที่ดีที่สุด สามารถผลิตเอนไซม์ไซลานเนสได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5.985 ยูนิต/มิลลิลิตร ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไซลานเนสที่อุณหภูมิ 30, 50, 80 °C และทดสอบที่ pH10, 7 และ 4 พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 6.158 ยูนิต/มิลลิลิตร และ ที่ pH10 มีกิจกรรมเอนไซม์ 8.090 ยูนิต/มิลลิลิตร ทำการเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่า หลังจากทำการเก็บรักษามีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไปเพียงเล็กน้อย

---

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ<sup>1</sup>

ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น<sup>2</sup>

### บทนำ

การผลิตเอทานอลจากกลีโคเซลลูโลสนั้นจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ 2 กลุ่มคือเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลานเนส

ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญมากชนิดหนึ่ง ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่น อุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตไวน์ และอาหารสัตว์ เป็นต้น แต่ที่กำลังมีบทบาทมากได้แก่การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวล ในการผลิตเอนไซม์นี้ใช้ไซแลนเป็นวัสดุหลักแต่ไซแลนบริสุทธิ์มีราคาสูงมาก จำเป็นต้องหาวัสดุอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงมาทดแทนซึ่งไซแลนหรือเฮมิเซลลูโลสนั้นเป็นองค์ประกอบหลักของพืชอยู่แล้วการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์พืชจึงได้รับความสนใจนำมาเป็นวัสดุทดแทนกันมากในปัจจุบัน วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย

มักมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินโดยมีอัตราส่วนประมาณ 4:3:3 ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ตัวอย่างเช่น ฟางข้าว เปลือกและซังข้าวโพด กากชานอ้อย ทะลายปาล์ม เปลือกยูคาลิปตัส การนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอ็นไซม์จะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้โดยจะต้องศึกษาชนิดและรูปแบบที่เหมาะสมในการย่อยสลายวัสดุนั้น ๆ ให้พร้อมสำหรับการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อราที่นำมาผลิตเอ็นไซม์ต่อไป

เอ็นไซม์ไซลาเนสเป็นเอ็นไซม์ที่พบได้ตามธรรมชาติในกลุ่มจุลินทรีย์หลายชนิดเช่นแบคทีเรีย รา ยีสต์ บางชนิดและแอกทิโนมัยซิส โดยส่วนใหญ่มักผลิตออกนอกเซลล์ ในการผลิตเอ็นไซม์นี้มีต้นทุนสูงมากถ้าใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท การลดต้นทุนการผลิตเอ็นไซม์นี้ทำได้โดยการผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรที่มีอยู่มากดังกล่าว ด้วยการใช้อีรา *Aspergillus niger* ที่คัดแยกจากดินในประเทศไทยและผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสเบื้องต้นแล้วในห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งการผลิตเอ็นไซม์นี้มีหลายเทคนิค ที่นิยมมากได้แก่ submerged fermentation (SmF) และ solid state fermentation (SSF) ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาแนวทางการผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสจากเชื้อรา *A. niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation ซึ่งมีรายงานว่า เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเฉพาะเมื่อใช้อีราในการผลิต ให้ผลผลิตสูง ในต้นทุนที่ต่ำ และลดขั้นตอนการจัดการลงเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค SmF

การผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยใช้เทคนิค solid state fermentation เพื่อลดต้นทุนการผลิตลงให้สามารถแข่งขันได้ เนื่องจากเอ็นไซม์นี้ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชต่าง ๆ ตลอดจนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การผลิตเอ็นไซม์นี้หากทำให้มีความง่ายไม่ซับซ้อน มีความปลอดภัย จะทำให้ขยายผลสู่วิสาหกิจชุมชนได้โดยตรงเพื่อให้เกิดการสร้างงานกระจายตามภูมิภาคต่าง ๆ ระดับชุมชน ส่งเสริมให้เกิดวิสาหกิจชุมชนด้านการผลิตพลังงานหมุนเวียนในท้องถิ่น ใช้ทรัพยากรในท้องถิ่นอย่างมีคุณค่า ขนาดของการผลิตไม่มากจนเกินไป หาวัดดูดิบได้ง่าย ไม่มีต้นทุนการขนส่ง นอกจากการผลิตเอ็นไซม์แล้วยังสามารถขยายผลไปสู่การผลิตไบโอเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสระดับชุมชนได้อีกด้วย ในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเทคนิคการผลิตเอ็นไซม์ไซลาเนสปริมาณมากจากเชื้อรา *A. niger* ภายใต้กระบวนการหมักแบบ solid state fermentation โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งประกอบด้วยวัสดุที่เหมาะสม สภาวะที่เหมาะสม การตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้และการศึกษาความคงตัวของเอ็นไซม์ในสภาวะที่ต่างกันเพื่อหาแนวทางในการเก็บรักษาเอ็นไซม์ให้มีประสิทธิภาพสูงเป็นเวลานาน การสร้างถังหมักแบบแห้ง (solid state fermentation) และการผลิตผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์สำเร็จรูปเพื่อใช้ในการเกษตรและการผลิตพลังงานหมุนเวียนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

## วิธีดำเนินการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

- เชื้อรา *Aspergillus niger*
- สารเคมีสำหรับการผลิตเอ็นไซม์ระดับชุมชน

-สารเคมีสำหรับการตรวจวิเคราะห์โปรตีน

-สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับกระบวนการหมักแบบแห้งขนาด 100 ลิตร

## วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเตรียมเชื้อราเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ 1 % , 0.2% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.02% yeast extract, 1.5% Bacto-agar, ปรับค่าความเป็นกรดต่าง 4.5 บ่มทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จนเกิดสปอร์ นำสปอร์มาละลายน้ำกลั่น หนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์  $1.2 \times 10^5$  สปอร์/สับสเตรท 1 กรัม

การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

นำสารละลายสปอร์ที่ได้มาเติมลงในอาหารเหลวปริมาณ 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติม สับสเตรทที่บดละเอียด 5 % ได้แก่ เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, รำข้าว, กากชานอ้อย , 0.2% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.02% yeast extract ปรับค่า pH 4.5 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน แล้วกรองเอาสารละลาย crude enzyme ไปตรวจสอบ ประสิทธิภาพเพื่อคัดเลือกชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

เตรียมส่วนผสมอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเอนไซม์ด้วยสับสเตรทที่คัดเลือกได้ ปริมาณ 2.5 กรัม , yeast extract 0.01 กรัม ปรับความชื้นโดยใช้ สับสเตรท 80 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 4.5 เติมสปอร์ ของเชื้อรา *A.niger* s068 ที่ละลายน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์  $1.2 \times 10^5$  สปอร์/ml นำไปบ่ม ที่ ระยะเวลาต่างกัน และอุณหภูมิต่างกัน นำอาหารที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเชื้อรามาละลายด้วย 0.02 M citrate phosphate buffer pH 5.8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

การผลิตและแยกเอนไซม์บริสุทธิ์

ขยายขนาดการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นปริมาตรรวมของสับสเตรทจำนวน 10-100 กิโลกรัม ในฟ ลาสก์หรือภาชนะที่เหมาะสม ในสภาวะ solid state fermentation แล้วชะเอนไซม์ด้วย 0.02 M citrate phosphate buffer pH 5.8 ในปริมาตรที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็น เวลา 30 นาที กรองแยกกากออกแล้วนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนอีกครั้งด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที จากนั้นนำครูดเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Affinity chromatography หรือ เทคนิคอื่นที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยการทำ SDS PAGE และ Active PAGE ต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาลเนสโดยการย่อยไซแลนชนิดต่าง ๆ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ด้วยวิธี DNS เทียบกับกราฟมาตรฐานพร้อมวัดปริมาณโปรตีนและคำนวณค่ายูนิตของเอนไซม์ที่ได้ และค่าอื่น ๆ เช่น kinetic activity ต่อไป

การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ภายใต้สภาวะต่าง ๆ

ตรวจสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของไซลาลเนสที่พีเอช 4.0-10.0 และอุณหภูมิระหว่าง 30 – 80 องศาเซลเซียส

การผลิตผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปและศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์

นำเอนไซม์ที่ได้มาทดสอบการบรรจุภัณฑ์และการทดสอบอายุของผลิตภัณฑ์ที่การเก็บอุณหภูมิต่าง ๆ และระยะเวลาต่างกัน ตรวจสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ัญบุรี จ. ปทุมธานี  
ระยะเวลาการทดลอง ปี 2559-2560

### ผลการวิจัยและอภิปราย

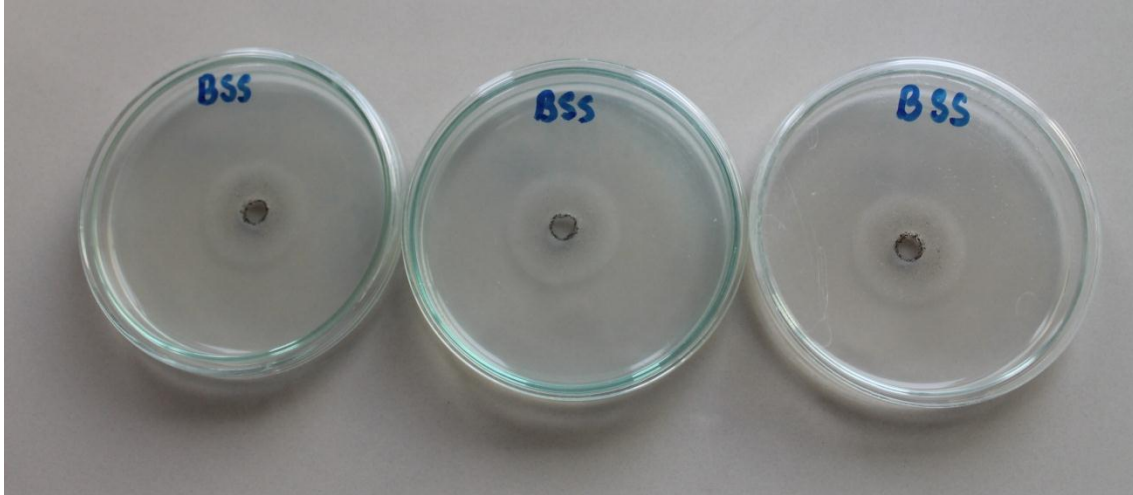
ผลการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสในอาหารแห้ง

จากผลการทดลองการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสในอาหารแห้ง โดยทำการย่อยสลายวัสดุด้วยเชื้อรา *A.niger* S068 ในอาหารแห้ง BSS และเติมสับสเตรทที่บดละเอียด 5 % ได้แก่ เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย , Xylan ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างวันที่ 3, 5 และ 7 ทำการย้อมคองโกเรด เพื่อดูลักษณะของวงใส ผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด มีวงใส มากที่สุด คือ 5.0 ซม. รองลงมาคือ ชานอ้อย, ไซแลน, ฟางข้าว และ BSS ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด มีวงใส มากที่สุด คือ 8.5 ซม. รองลงมาคือ ไซแลน, ชานอ้อย, ฟางข้าว และ BSS ตามลำดับ และในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด, ไซแลน, ชานอ้อยมีวงใส มากที่สุด คือ 9.0 ซม. รองลงมาคือ, ฟางข้าว และ BSS ตามลำดับ

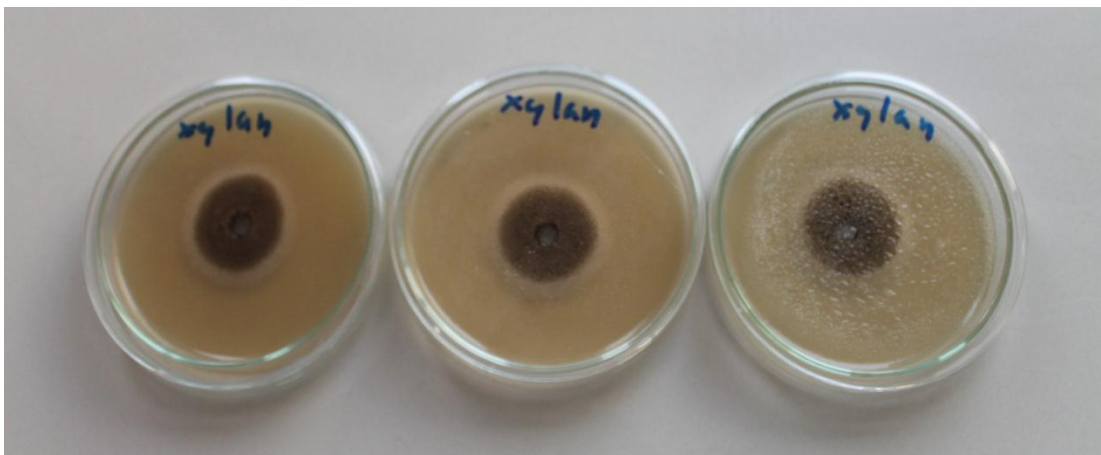
ผลการทดสอบการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในอาหารเหลว ในอาหารแห้ง BSS และเติมสับสเตรทที่บดละเอียด ได้แก่ เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย , Xylan ในอัตราส่วน 1:10 ผลการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* S068 ในอาหาร BSS + ไซแลน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มากที่สุด คือ 4.268 mg/ml รองลงมาคือ ฟางข้าว, เปลือกข้าวโพด,ชานอ้อย, และ BSS ตามลำดับ

การทดลองพบว่าวัสดุที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดได้แก่ ไซแลน รองลงมาได้แก่ฟางข้าว แต่ฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงเห็นสมควรว่า การใช้ฟางข้าวน่าจะเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

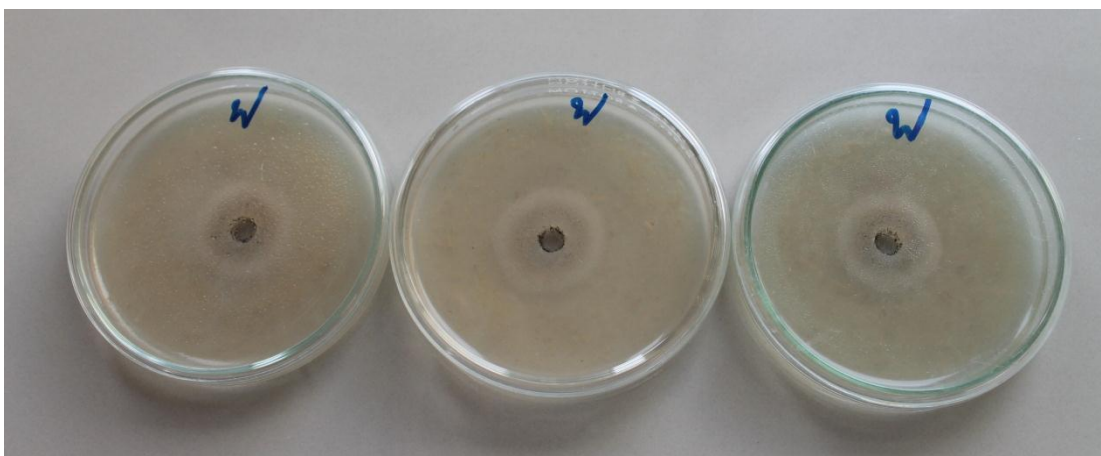
รูปภาพ ผลการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารแข็ง



รูปที่ 1 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS เป็นเวลา 3 วัน



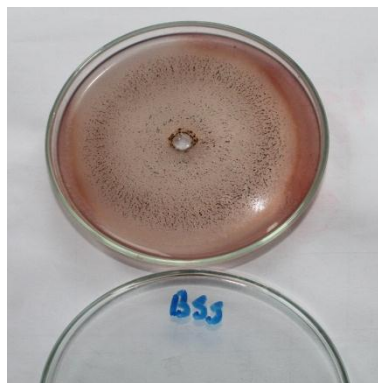
รูปที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS ที่เติม ไซแลน เป็นเวลา 3 วัน



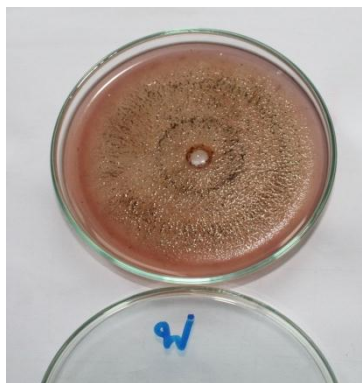
รูปที่ 2 เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS ที่เติม ฟางข้าว เป็นเวลา 3 วัน



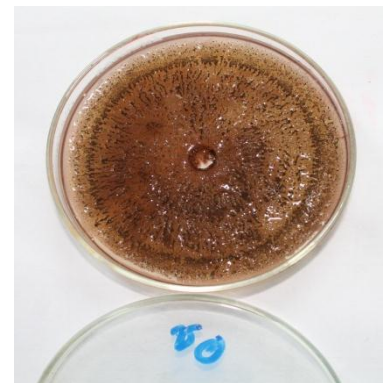
รูปภาพผลการย้อมคองโกเรด เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSS ที่เติมสับเสตรท  
ต่างๆเป็นเวลา 7 วัน



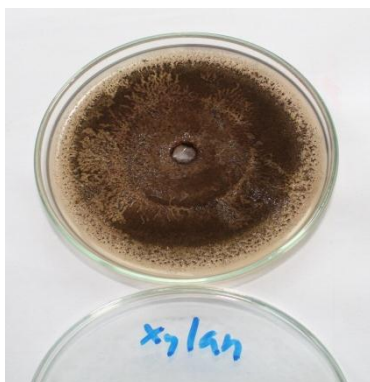
อาหาร BSS



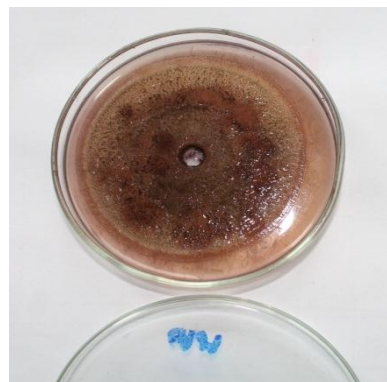
อาหาร BSS + ฟางข้าว



อาหาร BSS + ชานอ้อย



อาหาร BSS + ไชแลน



อาหาร BSS + เปลือกข้าวโพด

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในอาหารแข็ง

วันที่	วัสดุ	ซ้ำ 1 (ซม.)	ซ้ำ 2 (ซม.)	ซ้ำ 3 (ซม.)	เฉลี่ย (ซม.)
3	BSS	2.9	3.0	2.9	2.93
	ฟางข้าว	2.9	3.3	2.9	3.03
	ไชแลน	3.9	3.9	4.0	3.93
	ชานอ้อย	4.8	5.0	5.0	4.93
	เปลือกข้าวโพด	5.0	5.0	5.0	5.00
วันที่	วัสดุ	ซ้ำ 1 (ซม.)	ซ้ำ 2 (ซม.)	ซ้ำ 3 (ซม.)	เฉลี่ย (ซม.)
5	BSS	5.7	5.5	5.6	5.60

	ฟางข้าว	6.0	5.7	6.0	5.90
	ไซแลน	9.0	7.0	7.4	7.80
	ชานอ้อย	8.0	7.5	7.7	7.63
	เปลือกข้าวโพด	8.5	8.5	8.5	8.50
วันที่	วัสดุ	ซ้ำ 1 (ชม.)	ซ้ำ 2 (ชม.)	ซ้ำ 3 (ชม.)	เฉลี่ย (ชม.)
7	BSS	8.5	8.5	8.3	8.43
	ฟางข้าว	8.4	8.5	8.4	8.43
	ไซแลน	9.0	9.0	9.0	9.00
	ชานอ้อย	9.0	9.0	9.0	9.00
	เปลือกข้าวโพด	9.0	9.0	9.0	9.00

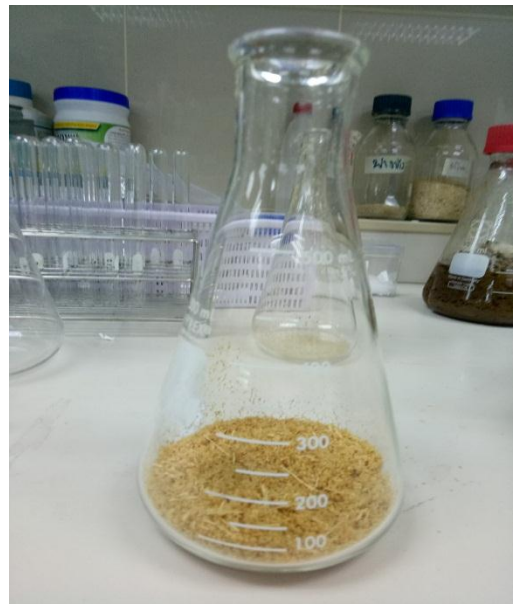
#### ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในอาหารเหลว

ชนิดวัสดุชีวมวล	ปริมาณวัสดุชีวมวล (กรัม)	อัตราส่วน	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
ฟางข้าว	5	1:10	2.278
ชานอ้อย	5	1:10	1.269
ไซแลน	5	1:10	4.268
ข้าวโพด	5	1:10	2.247
BSS	0	0	0.012

ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเอนไซม์ด้วยสับสเตรทที่คัดเลือกได้ คือ ฟางข้าวบด ปรับความชื้นโดยใช้สับสเตรท 80 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 4.5 เติมสปอร์ของเชื้อรา *A.niger* s068 ที่ละลายน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาณสปอร์  $1.2 \times 10^5$  สปอร์/ml นำไปบ่ม ที่ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า *A.niger* s068 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารฟางข้าวบด ที่ระยะเวลา 3 วัน มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 19.411 mg/ml ได้ activity enzyme 4.310 U/ml ที่ระยะเวลา 5 วัน มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 23.521 mg/ml ได้ activity enzyme 5.222 U/ml และ ที่ระยะเวลา 7 วัน มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 26.954 mg/ml ได้ activity enzyme 5.985 U/ml

รูปภาพ ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฮไลเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation



ตารางที่ 2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อรา *A.niger* ด้วยเทคนิค solid state fermentation

ตัวอย่าง (วันที่)	xylose (mg/ml)	Act. (Unit/ml)
3	19.411	4.310
5	23.521	5.222
7	26.954	5.985

การทดสอบประสิทธิภาพและความคงตัวของเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและความคงตัวของเอนไซม์โดยการย่อยไซแลน จาก birchwood ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ตรวจสอบผลของพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของไซลาเนสที่พีเอช 4.0-10.0 และอุณหภูมิระหว่าง 30 – 80 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ด้วยวิธี DNS เทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณค่ายูนิตของเอนไซม์ที่ได้ ผลการทดลองประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 50 และ 80 °C พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดี ที่อุณหภูมิ 30 °C มีค่า activity enzyme เท่ากับ 6.158 U/ml และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ activity enzyme ลดลง ผลการทดลองประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ pH 10, 7 และ 4 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดี ที่ pH 10 มีค่า activity enzyme เท่ากับ 8.090 U/ml และเมื่อ pH ลดลง และมีสภาพความเป็นกรดสูง คือ ที่ pH4 ทำให้ activity enzyme ลดลง เท่ากับ 0.324 U/ml

ดังนั้นเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตได้จาก *A.niger* S068 ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวบดเป็นสับเสตรห มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ดีที่สุดที่ อุณหภูมิ 30 °C และ pH 10

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ตัวอย่าง	xylose (mg/ml)	Act. (Unit/ml)
Room Temp	19.122	4.246
80 °C	26.233	5.825

50 °C	26.843	5.960
30 °C	27.734	6.158

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ

ตัวอย่าง	xylose (mg/ml)	Act. (Unit/ml)
pH10	36.438	8.090
pH7	33.409	7.418
pH4	1.457	0.324

การผลิตผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปและศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์

นำเอนไซม์ไซลาลเนสที่ผลิตได้จาก *A.niger* S068 ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวบด เป็นสับเสตรทที่ได้มาทดสอบการบรรจุภัณฑ์ โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) และตรวจวัด ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างเอนไซม์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มี activity enzyme เท่ากับ 4.246 U/ml เมื่อทำการเก็บรักษาแล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ พบว่า activity enzyme ลดลง เท่ากับ 4.125 U/ml

ตัวอย่าง	xylose (mg/ml)	Act. (Unit/ml)
ก่อน	19.162	4.246
หลัง	18.579	4.125

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดยกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* S068 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ โดยศึกษาใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย, Xylan การทดลองพบว่าวัสดุที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดได้แก่ ไซแลน รองลงมาได้แก่ฟางข้าว แต่ฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงเห็นสมควรว่า การใช้ฟางข้าวน่าจะเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวเป็นซัพเสตรท บ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5.985 ยูนิต/มิลลิลิตร

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kavya และ Padmavathi (2009) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และการผลิตเอนไซม์ไซลเนสของเชื้อ *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักแบบ solid state fermentation โดยทั้งสองต้องการผลิตเอนไซม์ด้วยวัสดุราคาถูก ได้แก่ รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง กากราจ และ ซีลี้อย พบว่ารำข้าวสาลีได้เอนไซม์ปริมาณมากที่สุด ซึ่งสามารถนำมาทดแทนแหล่งคาร์บอนราคาสูงได้แก่ ไซแลนจากข้าวโอ๊ต และไซแลนจากเปลือกต้นเบิร์ช

การศึกษาการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไซลเนสที่อุณหภูมิ 30, 50, 80 °C ที่อุณหภูมิ 30 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด 6.158 ยูนิต/มิลลิลิตร และทดสอบที่ pH10, 7 และ 4 พบว่า และ ที่ pH10 มีกิจกรรมเอนไซม์ 8.090 ยูนิต/มิลลิลิตร ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pereira (2003) ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์ไซลเนสจาก *B.subtilis* จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C ขึ้นไป โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลเนสที่บ่มอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียง 20 % ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีไซลเนสจากที่ผลิตได้จากแอกติโนมัยสีท ดังงานวิจัยของ Pearsai et al. (2014) ศึกษาไซลเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces mexicanus* 901 โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่ง คาร์บอน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำไซลเนสบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี แบบเจลฟิวเทรชัน ซึ่งพบว่าไซลเนสชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียสและที่พีเอช 3-6 งานวิจัยของ Liu et al. (2006) ศึกษาไซลเนสจาก *Aspergillus niger* ซึ่งพบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 และสามารถย่อยเบิร์ชขี้ไต้ไซแลน และรำข้าวได้ดี จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นพบว่าไซลเนสที่มีแหล่งที่มาต่างกัน มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสมและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การศึกษาเก็บรักษาทำการเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่าหลังจากทำการเก็บรักษามีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไปเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการเก็บรักษาด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลเนส

## เอกสารอ้างอิง

Alya Limayem , Steven C. Ricke , 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) : 449-467.

Kavya, T. Padmavathi, Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, Polish Journal of Microbiology 58 (2009) 125e130. [67]

Juturu, J.C. Wu, Microbial xylanases: engineering, production and applications,

Biotechnology Advances 30 (2012) 1219e1227.

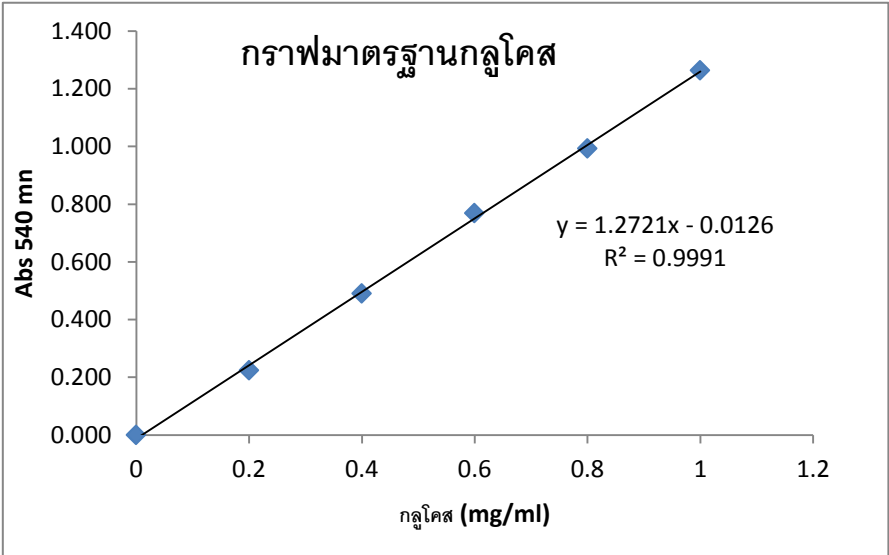
Zhu J.Y., Zhuang X.S., 2012. Conceptual net energy output for biofuel production from lignocellulosic biomass through biorefining. Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) :583-598.

#### ภาคผนวก

##### การวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคสโดยใช้ สาร Dinitrosalicylic acid (DNS)

- 1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยชั่งกลูโคส มา 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1.0 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 mg/ml
- 2 เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ในหลอด
- 3 เติม DNS reagent 0.5 ml ลงไปในหลอด
- 4 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยาแล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- 5 นำไปวัดค่า OD520 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน
- 6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือ คำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส} = \frac{(\text{ค่า OD520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$





## กิจกรรมงานวิจัยที่ 2 การผลิตไบโอเอทานอล

### การทดลองที่ 2.1 การผลิตเอทานอลจากชานอ้อยและฟางข้าวในระดับชุมชน

Production of ethanol from bagasse and straw at community level.

ผู้วิจัย	นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ <sup>1</sup>	นายพินิจ	จิรัศคกุล <sup>2</sup>
	นางสาวภรณ์ สว่างศรี <sup>1</sup>	นายวุฒิพล	จันทร์สระคู <sup>2</sup>
	นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล <sup>1</sup>	นายพยุงค์ศักดิ์	รอยอารี <sup>1</sup>

คำสำคัญ      วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ฟางข้าว เอทานอล ยีสต์

### บทคัดย่อ

การศึกษาการย่อยฟางข้าวด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์มีวัตถุประสงค์คือ 1) เพื่อศึกษาผลของการปรับสภาพของฟางข้าว โดยใช้กรด /ด่าง ร่วมกับ เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (*Aspergillus niger*) 2) เพื่อศึกษาความสามารถของ *Pichia pastoris* X-33 และ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลเสทฟางข้าวเป็นสับสเตรท จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า 0.5 ยูนิต ได้น้ำตาลกลูโคส 1.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการกำจัดสารพิษในไฮโดรไลเสทด้วย activated charcoal และหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 5 ชั่วโมง เท่ากับ 3.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

---

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ<sup>1</sup>  
ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น<sup>2</sup>

## บทนำ

พลังงานจากชีวมวล คือ พลังงานสะอาดที่ได้จากอินทรีย์สารของพืชหรือสัตว์ ได้แก่พืชเกษตรกรรม วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม พืชพลังงาน รวมทั้งขยะอินทรีย์และมูลสัตว์ มีการหมุนเวียนเกิดขึ้นใหม่ตลอดเวลา จัดเป็นพลังงานสีเขียวที่จะเข้ามาแทนที่เชื้อเพลิงจากฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปในไม่ช้านี้ การใช้เชื้อเพลิงจากชีวมวลยังช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมเนื่องจากพลังงานจากชีวมวลมีการปลดปล่อยมลพิษทางอากาศและสารพิษต่างๆ ออกมาน้อยกว่าพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดปริมาณขยะลงได้อีกมาก การนำชีวมวลเหล่านี้มาใช้ประโยชน์โดยนำมาแปรรูปเป็นพลังงานนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้งาน ในบรรดาแหล่งพลังงานชีวมวลทั้งหลายที่มีศักยภาพมากที่สุดนั้น แหล่งวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง ซึ่งได้แก่ พวกเศษวัสดุจากการเกษตรเช่น ชังข้าวโพด (corn stover) เส้นใยข้าวโพด (corn fibre) ชานอ้อย (sugar cane bagasse) วัสดุเหลือทิ้งจากไม้ เช่น ขี้เลื่อยจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง พวกขยะจากกระบวนการแปรรูปอาหาร และเศษกระดาษ ฯลฯ เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่น่าสนใจมากที่สุดเนื่องจากมีอยู่มากโดยเฉพาะพวกชานอ้อยและฟางข้าวพบว่ามีจำนวนมากหลายล้านตันในแต่ละปีในประเทศไทย ส่วนในระดับโลกเศษเหลือทิ้งจากอาหารที่เป็นพวกลิกโนเซลลูโลสมีมากถึง 3 พันล้านเมกagram ต่อปี (Kusch *et al.*, 2009) และเนื่องจากงานวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์จากลิกโนเซลลูโลสยังมีน้อย น่าจะถึงเวลาแล้วที่งานวิจัยควรจะหันทิศทางมาเพื่อพัฒนาการแปรรูปวัสดุที่มีเซลลูโลสเหล่านี้มาผลิตเป็นพลังงานทดแทน และผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า (value-added products) ต่างๆ ให้มากยิ่งขึ้น (อรุณี, 2555)

กระบวนการผลิตเอทานอลที่ผลิตได้จากเซลลูโลส เป็นเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกไม้ หรือจากต้นพืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับพืชที่มนุษย์บริโภค ได้แก่ ต้นเลา หล้าเนเปีย ข้าวฟ่างหวาน สาหร่าย สบู่ดำ อ้อยพลังงาน (อรุณี, 2553) วัตถุดิบดังกล่าวประกอบไปด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส และเรียกวัตถุดิบประเภทนี้ว่า วัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของพืช ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสจึงมีคุณสมบัติและลักษณะทางเคมีเช่นเดียวกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งที่ได้จากอ้อยหรือมันสำปะหลัง

กระบวนการผลิตเซลลูโลสเอทานอลจากพืชชีวมวล มีขั้นตอนตั้งแต่การ ปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสออกไป (Ververis *et al.*, 2007) เนื่องจากสารประกอบเหล่านี้จะทำให้มีผลต่อขั้นตอนกระบวนการย่อยสลาย ถ้าไม่กำจัดออกจะทำให้การย่อยสลายได้ยาก หรืออาจทำให้เกิดสารอนุพันธ์ที่อาจมีผลต่อกระบวนการผลิตได้ (Mussatto *et al.*, 2008) ซึ่งการปรับสภาพเบื้องต้นสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธี ได้แก่ 1. การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) เป็นการทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก เช่น การบด และใช้ความร้อน เป็นต้น 2. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment) โดยใช้

สารละลายกรดหรือด่างเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน 3. การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (physic-chemical pretreatment) เป็นการใช่วิธีทางกายภาพร่วมกับสารเคมี เช่น การใช้สารละลายเบสเจือจางและความร้อนภายใต้ความดันสูงในการปรับสภาพ ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ NaOH ซึ่งเป็นการกำจัดลิกนิน เฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วนออกไปด้วย ดังนั้น การใช้ NaOH จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้นๆ ผลผลิตที่ได้จึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Wang *et al.*, 2010) และ 4. การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการใช้ออนไซม์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรง (ประเวศ และคณะ, 2551)

กระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) คือการย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของน้ำตาลคาร์บอน 5 และ 6 อะตอม จะได้น้ำตาลไซโลส แมนโนส อะราบิโนส และกลูโคส ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Bosch *et al.*, 2010) ซึ่งการย่อยสลายสามารถย่อยด้วยกรด เป็นการใช้กรดเจือจางภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง หรือ ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้จึงต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส จะช่วยย่อยสารในกลุ่มเซลลูโลสให้มีโมเลกุลเล็กลง เอนไซม์ไซลานเนส จะช่วยย่อยสารในกลุ่มลิกนิน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสถูกเรียกรวมๆ กันว่าเฮมิเซลลูเลส ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสารตั้งต้นซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดเกี่ยวข้องเช่น อะราบิเนส ได้น้ำตาลอะราบิโนส กาแลกตาเนส แมนนาเนส ได้น้ำตาลแมนแนนและเอนไซม์ไซลานเนสได้น้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลัก เนื่องจากโครงสร้างของเซลล์พืชขบมีไซแลนถึง 80-95 % ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์จะเป็นวิธีที่นิยมกันมาก เนื่องจากให้ปริมาณน้ำตาลที่สูงจึงเหมาะแก่การหมัก เอทานอล หลังจากการย่อยสลายได้น้ำตาลแล้วจะเข้าสู่กระบวนการหมัก (fermentation) เป็นการย่อยสลายน้ำตาลโดยใช้จุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ ทำให้เกิดเป็นเอทานอล จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการหมักในปัจจุบัน ได้แก่ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจุดเด่นของ *S. cerevisiae* คือสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง 30-40 องศาเซลเซียส และทนอุณหภูมิสูงได้ (ธราพงษ์ และคณะ, 2553) Jeffries *et al.* (2007) ได้ศึกษายีสต์ *Pichia stipitis* ในการหมักน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 41 กรัม ต่อน้ำตาล 1 ลิตร ปัจจุบันมีเทคโนโลยีการหมัก 2 แบบ ธราพงษ์ และคณะ (2553) ได้แก่ 1. การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) ดังภาพที่ 2 เป็นการผสมหัวเชื้อลงในน้ำหมัก โดยเกิดขึ้นในถังหมักเพียงใบเดียว จนเสร็จสิ้นการหมักภายในเวลา 72 ชั่วโมง

Balat, M (2011) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบพบว่ามีความเป็นไปได้สูงมากสำหรับการใช้วัสดุเหล่านี้มาผลิตเอทานอล

Alya Limayem และ Steven C. Ricke (2012) ชี้ว่าผลจากการขึ้นราคาน้ำมันดิบทำให้รัฐบาลของอเมริกาหันมาให้ความสนใจการผลิตเอทานอลจากพืชซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่มีความยั่งยืนมากกว่า มวลชีวภาพกำลังมีบทบาทสำคัญในการผลิตไบโอเอทานอลในช่วงหลายปีที่ผ่านมาและการผลิตระดับอุตสาหกรรมจะมุ่งเน้นไปยังขยายขนาดการผลิตด้วยต้นทุนต่ำโดยใช้วัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบโดยเฉพาะจากการเกษตรและป่าไม้ แม้ว่าการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสมีความเหมาะสมแต่ยังมีสิ่งรบกวนในกระบวนการหมักทำให้มีความสนใจลงทุนน้อย ในการวิจัยได้ชี้ให้เห็นถึงความคุ้มค่าและความสำคัญของการนำ

ลิกโนเซลลูโลสลิกรมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลโดยการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ มาช่วยเช่น การดัดแปลง พันธุกรรม การศึกษาเทคนิคการพรีทรีตเมนต์เพื่อให้เกิดความคุ้มค่า

M. Vishnu (2012) ซึ่งให้เห็นว่าการผลิตพลังงานทดแทนจากมวลชีวภาพชนิดลิกโนเซลลูโลส กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก โดยมุ่งเน้นไปยังวัสดุธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม การพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอลเข้าสู่ยุคที่ 2 ได้แก่ลิกโนเซลลูโลสไบโอแมสซึ่งสนับสนุนทั้งด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม เป็นชีวมวลที่มีราคาถูก มีความยั่งยืน นำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างไม่มีขีดจำกัดและมีศักยภาพในการทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้อย่างหลากหลายในกลุ่มของพลังงานต่าง ๆ เช่นความร้อน พลังงานไฟฟ้า น้ำมัน วัสดุ และสารเคมีต่าง ๆ ลิกโนเซลลูโลสเป็นโครงสร้างหลักของเนื้อไม้และพืชที่ไม่ใช่เนื้อไม้ ให้ส่วนประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน การใช้ออกซิเจนประกอบหลักทั้ง 3 อย่างครบถ้วนจะเกิดความคุ้มค่าในทางเศรษฐศาสตร์ในการผลิตเอทานอลจากมวลชีวภาพ ขบวนการหมัก ไบโอแมสประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 5 ประการคือ การคัดเลือกชนิดของไบโอแมสที่เหมาะสม การทำ พรีทรีตเมนต์ที่มีประสิทธิภาพ การผลิต เอนไซม์ช่วยย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส การหมักน้ำตาล 5 และ 6 โมเลกุลของคาร์บอนและขบวนการกลั่น ซึ่งปัจจุบันพบปัญหาด้านการพรีทรีตเมนต์และการขาดเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ

ประเทศไทยมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรปริมาณมากได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ใบอ้อย กากมันสำปะหลัง ทะลายปาล์ม เปลือกยูคาลิปตัส เป็นต้น หากนำมาเพิ่มมูลค่าโดยการหมักให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอล ก็จะช่วยด้านการผลิตพลังงานทดแทนได้ดียิ่งขึ้น การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ประสบความสำเร็จในหลายประเทศเช่นสหรัฐอเมริกา แคนาดา ยุโรป เป็นต้น สำหรับประเทศไทยเรายังคงมีวัตถุดิบกลุ่มแป้งและน้ำตาลปริมาณมาก ทำให้ประเทศไทยมีแหล่งพลังงานทดแทนที่มั่นคง แต่ในอนาคตเราก็จำเป็นต้องหาทางผลิตจากแหล่งอื่น ดังนั้นเราจึงต้องเร่งกระบวนการวิจัยด้านนี้ให้มากขึ้นเพื่อรองรับปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบพวกแป้งและน้ำตาลซึ่งเป็นพืชอาหารในอนาคต นอกจากนี้การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสกำลังได้รับความสนใจจากหลายประเทศทั่วโลก มีการวิจัยอย่างกว้างขวาง มีโอกาสประสบความสำเร็จสูง เป็นเทคโนโลยีที่เราพัฒนาขึ้นเองได้โดยใช้วัสดุในท้องถิ่นและองค์ความรู้ที่มีในปัจจุบัน องค์ความรู้ที่ได้สามารถพัฒนาต่อยอดเข้าสู่วิสาหกิจชุมชนได้ เกิดการสร้างงานลดการนำเข้าประชาชนพึ่งตนเองได้

## วิธีดำเนินการ

### การปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยต่าง

นำวัสดุชีวมวลที่บดและทำให้แห้งแล้วจำนวน 50 กรัมละลายใน 5%NaOH ในอัตราส่วน 1 : 10 (W/V) บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อน 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยผ้า นำมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยเทคนิค DNS

### การปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยกรด

นำวัสดุชีวมวลที่บดและทำให้แห้งแล้วจำนวน 50 กรัมละลายใน 1%HCl ในอัตราส่วน 1 : 10 (W/V) นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยผ้าแล้ว นำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยเทคนิค DNS

### การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนวัสดุชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

นำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัสดุชีวมวลจำนวน 1 กรัม มาหมักด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสที่ผลิตได้จากฟางข้าวหรือกากมันสำปะหลังปริมาณเริ่มต้น 0.5 ยูนิต ในสารละลาย 10 ml ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความพีเอช 4.8 ลงในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก นำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่า เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง การกำจัดสารพิษนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยต่าง กรดและเอนไซม์มาผสมกับผงถ่าน activated charcoal ในอัตราส่วน 20:1 w/w นำไปเขย่าบนแมกเนติกสเตอโรร์เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 เพื่อแยกเอาผงถ่านออกไป นำมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยเทคนิค DNS

### การหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยใช้ยีสต์

#### การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ทำการหมักสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ *Pichia pastoris* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ ในอาหารเหลว YEPD เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณเซลล์ยีสต์ให้ได้  $8 \times 10^9$  cfu/ml

#### การหมัก

นำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จากข้างต้น มาเติมสารอาหารดังนี้ 1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, และ 0.1% yeast extract ปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 โดยการเตรียมสารละลายปริมาตรรวม 100 มล. ในฟลาสก์แก้วขนาด 250 มล. นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน เก็บ

ตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS วัดปริมาณเอทานอลที่ได้ด้วยเทคนิค Flash distillation

**สถานที่ทำการทดลอง** ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ัญบุรี จ. ปทุมธานี  
**ระยะเวลาทำการทดลอง** ปี 2559 – 2560

## ผลการวิจัยและอภิปราย

### ผลการทดลองการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยต่างและกรด

การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้สารละลายกรด สารละลายต่าง เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส ถ้าเป็นสารละลายกรดจะสามารถทำให้เฮมิเซลลูโลสละลายน้ำออกมา ส่วนสารละลายต่างมีส่วนทำให้เฮมิเซลลูโลสและลิกนินละลายน้ำออกมา เพิ่มความสามารถในการพองตัวซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้แก่วัตถุดิบ นอกจากเป็นการสลายโครงสร้างเพื่อให้ง่ายต่อการไฮโดรลีสแล้ว ยังทำให้ทราบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการสลายพันธะ

จากผลการทดลองผลกระทบของการใช้กรดและต่างในการปรับสภาพวัสดุชีวมวล โดยใช้ฟางข้าวเป็นตัวอย่างชีวมวล พบว่าการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยต่าง 5% NaOH ในอัตราส่วน ต่าง:ชีวมวล 1:10 เมื่อนำมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method แล้วนำค่า OD ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1.280 mg/ml และการปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยกรด 1% HCL ในอัตราส่วน กรด:ชีวมวล 1:10 เมื่อนำมาวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเทคนิค DNS method แล้วนำค่า OD ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า มีน้ำตาลรีดิวซ์ 1.587 mg/ml ซึ่งให้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าการปรับสภาพด้วยต่าง ดังนั้น การปรับสภาพวัสดุชีวมวลด้วยกรด 1% HCL ในอัตราส่วน กรด:ชีวมวล 1:10 จึงเป็นการปรับสภาพชีวมวลที่เหมาะสมกับชีวมวลฟางข้าว

### ผลการทดลองความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเปลี่ยนวัสดุชีวมวลให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

ผลการทดลองพบว่า กระบวนการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด คือ ปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูโลส 0.5 (Unit/ml) ปริมาตร 500 ul และใช้ปริมาณวัสดุชีวมวล 1:10 (g/ml) ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 1.576 mg/ml เนื่องจากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ดีจึงให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสสูง การย่อยฟางข้าวโดยใช้กรดที่มีความเข้มข้นต่ำร่วมกับเอนไซม์จะสามารถเปลี่ยนลิกนินเซลลูโลสเป็นน้ำตาลทำให้ได้น้ำตาลเป็นจำนวนมาก ได้แก่ กลูโคส, อะราบิโนส และไซโลส นอกจากนี้ยังมีผลพลอยได้อื่น ๆ ได้แก่ กรดอะซิติก, เพอร์ฟูรอล

**ตารางที่ 1** ผลการทดลองการปรับสภาพฟางข้าวด้วยกรด 1% HCL และ 5% NaoH ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส

ตัวอย่าง	ชั่วโมง	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
ฟางข้าว ปรับสภาพด้วย 5% NaoH	0	1.154
	24	1.321
	48	1.368
	72	1.393
ฟางข้าว ปรับสภาพด้วย 1% HCL	0	1.307
	24	1.372
	48	1.416
	72	1.576

ผลการทดลองการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว

สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากฟางข้าวหลังจากถูกนำไปหมักด้วยยีสต์ *P.pastoris* x-33 มีค่าลดลงจาก 1.314 เป็น 1.077 mg/ml ในวันที่ 7 ของการหมักเอทานอล ผลของการวิเคราะห์ปริมาณ เอทานอลด้วยเทคนิค Flash distillation ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 2.886 mg/ml ดังตารางที่ 2

สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากฟางข้าวหลังจากถูกนำไปหมักด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* Sc90 มีค่าลดลงจาก 1.314 เป็น 1.056 mg/ml ในวันที่ 5 ของการหมักเอทานอล ผลของการวิเคราะห์ปริมาณ เอทานอลด้วยเทคนิค Flash distillation ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 3.000 mg/ml ดังตารางที่ 3

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าว ด้วยเชื้อยีสต์ *P.pastoris* X-33 คือ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 7 วัน และ การหมักน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายฟางข้าว ด้วยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* Sc90 คือ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 5 วัน

**ตารางที่ 2** ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยใช้ยีสต์ *P.pastoris* X-33

ระยะเวลาหมัก (hr)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณเอทานอล (mg/l)
0	1.314	0.000
24	1.102	1.072
48	1.098	1.412
72	1.091	2.244
96	1.085	2.384
120	1.081	2.588
144	1.072	2.686
168	1.077	2.886

ตารางที่ 3 ผลการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวโดยใช้ยีสต์ *S.cerevisiae* Sc90

ระยะเวลาหมัก (hr)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณเอทานอล (mg/l)
0	1.314	0.000
24	1.186	1.265
48	1.184	1.603
72	1.090	2.000
96	1.066	2.825
120	1.056	3.000
144	1.066	2.855
168	1.056	2.928

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ฟางข้าวมี องค์ประกอบของเซลลูโลส 30% เฮมิเซลลูโลส 50% และลิกนิน 15% ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยได้ง่ายวัสดุได้มากขึ้นในขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น

การศึกษาผลของการปรับสภาพของฟางข้าว โดยใช้กรด /ด่าง ร่วมกับ เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (*Aspergillus niger*) จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส ทางการค้า 0.5 ยูนิต ได้น้ำตาลกลูโคส 1.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาความสามารถของ *Pichia pastoris* X-33 และ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ไฮโดรไลเสทฟางข้าวเป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 5 ชั่วโมง เท่ากับ 3.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองในครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทฟางข้าวที่มีอยู่อย่างแพร่หลายในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากวัสดุต้นทุนต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลได้เอทานอลและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเพื่อลดต้นทุนในการหล่อน้ำเย็นในการหมักระดับถึงหมัก



## เอกสารอ้างอิง

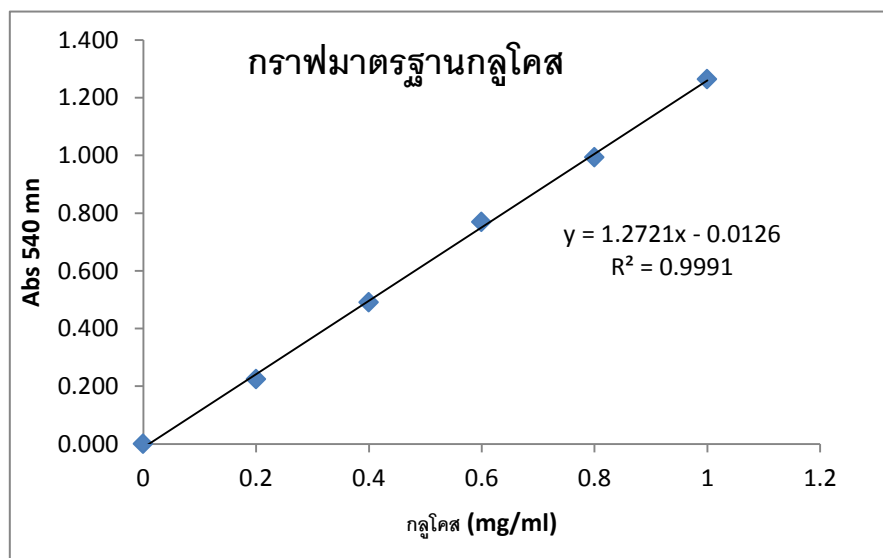
- ธราพงษ์ วิฑิตศานต์, นวดล เหล่าศิริพจน์ และประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ. 2553. รายงานสถานภาพ  
ของงานวิจัยและผลิตเอทานอลไบโอดีเซล ไบโอดีเซล และน้ำมันชีวภาพในประเทศไทย.  
สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.)
- ประเวศ ต้อยเต็มวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสวง และธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2552. การ  
ผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. วารสารสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 16 เล่มที่ 2. 8 น.
- Alya Limayem , Steven C. Ricke , 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol  
production : Current perspectives, potential issues and future prospects.  
Progress in Energy and Combustion Science. 38(4) : 449-467.
- Balat M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via  
biochemical pathway : A review. Energy Conversion and Management. 52(2) :  
858-875. <http://www.scopus.com/record/display>.
- Bosch P., Wallberg O., Joelsson E., Galbe M. and G. Zacchi. 2010. Impact of dual  
temperature profile in dilute acid hydrolysis of spruce for ethanol production.  
Biotechnology for Biofuels. 3: 15.
- Jeffries T.W., Grigoriev I.V., Grimwood J., Laplaza J.M., Aerts A., Salamov A., Schmutz J.,  
Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y.S., Passoth V. and Richardson P.M.  
2007. Genome sequence of the lignocelluloses-bioconverting and xylose-  
fermenting yeast *Pichia stipitis*. Nature Biotechnology. 25 (3) : 319-326.
- Kusch S. and M.V. Morar. Integration of lignocellulosic biomass into renewable energy  
generation concepts. ProEnvironment 2, 32-37.
- Mussatto S.I., Fernandes M., Milagres A.M.F. and Roberto I.C. 2008. Effect of  
hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's  
spent grain. Enzyme and Microbial Technology. 43 : 124-129.
- Ververis C., Georghiou, K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R. and Corleti  
V. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic  
materials and their suitability for use as paper pulp supplements. Bioresource  
Technology 98 : 296-301.
- Zhu J.Y., Zhuang X.S., 2012. Conceptual net energy output for biofuel production from  
lignocellulosic biomass through biorefining. Progress in Energy and Combustion Science.  
38(4) :583-598.

## ภาคผนวก

### การวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคสโดยใช้ สาร Dinitrosalicylic acid (DNS)

- 1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยชั่งกลูโคส มา 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml จะได้ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 1.0 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 mg/ml
- 2 เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml ในหลอด
- 3 เติม DNS reagent 0.5 ml ลงไปในหลอด
- 4 ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยาแล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่น้ำแข็ง 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- 5 นำไปวัดค่า OD520 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน
- 6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือ คำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นกลูโคส} = \frac{(\text{ค่า OD520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



## การวิเคราะห์ ปริมาณเอทานอลโดยวิธี Flash distillation

### สารเคมี

สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริก 0.5 โมลาร์ละลายโพแทสเซียมไดโครเมตหนัก 29.4 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟิวริก 98% ปริมาตร 25.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ เพื่อใช้เตรียมสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐานค่าความเข้มข้นในช่วง 2 ถึง 10 กรัมต่อลิ

วิธีเตรียม: เจือจางแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร

### วิธีการวิเคราะห์

ปริมาณแอลกอฮอล์ : ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์

โดยประมาณให้มีในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 10 กรัมต่อลิตร แล้วจึงปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในกรดซัลฟิวริก 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวปิดสนิท เติมน้ำกลั่นลงไป 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบระยะเวลาไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงนำสารละลาย ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงโดยเทียบกับสารละลายแบลนด์ นำไปอ่านค่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์บนกราฟของสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐาน

## การทดลองที่ 2.2 การผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวลแบบครบวงจร

Producing bio-ethanol from plant biomass to complete process.

ผู้วิจัย นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล<sup>1</sup> นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ<sup>1</sup>  
นางสาวภรณ์ สว่างศรี<sup>1</sup> นายพินิจ จิระคคกุล<sup>2</sup> นายวุฒิมพล จันทร์สระคู<sup>2</sup>

คำสำคัญ ไบโอเอทานอล ชีวมวล เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส

### บทคัดย่อ

ไบโอเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร กระทรวงพลังงานได้ทำการวิจัยหญ้าที่เหมาะสมเป็นพืชพลังงาน พบว่าหญ้าเนเปี่ยปากช่อง 1 ให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุดประมาณ 70-80 ตันสดต่อปีต่อไร่ ทำการออกแบบเพื่อทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (hydrolysis) ให้กลายเป็นน้ำตาลในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Bacillus* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลันเนส เชื้อ *Actinomyces* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และ เชื้อ *Aspergillus niger* จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เมื่อนำมาทดสอบการผลิตพบว่าเชื้อ *Actinomyces* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเซลลูเลสเอนไซม์ ที่ดีที่สุดโดยวัดค่าน้ำตาลได้ 0.058 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อ *Aspergillus niger* วัดปริมาณค่าน้ำตาลได้ 0.029 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. จุลิน วัดปริมาณค่าน้ำตาลได้ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กระบวนการสร้างถังหมักเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล ได้สร้างถังขนาด 100 ลิตร จำนวน 1 ถัง สำหรับขยายเชื้อจุลินทรีย์ที่ในปริมาณที่มากพอ และนำไปสู่กระบวนการผลิตเอทานอลที่มีคุณภาพตามที่ต้องการต่อไป

### Abstract

Bio-ethanol can be from agricultural waste. The Ministry of Energy has research suitable grasses as energy crops. Research results Napier Grass Pak Chong 1 the maximum yield per rai is about 70-80 tons per hectare per rai. Designed to test cellulose and hydrolysis degradation into sugar at the laboratory level. Using 3 types produced enzymes from microorganisms of Biotechnology Research and Development Office. Include *Bacillus* sp. Microorganisms with potential for production Xylanase enzymes, *Actinomyces* sp. Microorganisms with potential for production cellulase enzymes and *Aspergillus niger* Microorganisms with potential for production Hemicellulose. Result test the sugar content highest was 0.058 milligrams per milliliter for *Actinomyces* sp. Microorganisms with potential for production cellulase enzymes, Part test the sugar content was 0.029 milligrams per

milliliter for *Aspergillus niger* and last test the sugar content lowest was 0.025 milligrams per milliliter for *Bacillus* sp. The process of creating a fermentation tank for ethanol production. a tank of 100 liters was built for the expansion of microorganisms in large quantities. This will lead to the production of quality ethanol as required.

---

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ<sup>1</sup>

ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น<sup>2</sup>

## บทนำ

พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หลายๆประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็น การลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็น สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน การผลิตไบโอเอทานอลได้รับความสนใจทั่วโลก เนื่องจากเป็นอีกวิธีการ หนึ่งในการลดภาวะโลกร้อนและยังเป็นการรักษาความมั่นคงของพลังงานทั่วโลกอีกด้วย ในช่วงแรกนั้นการ ผลิตไบโอเอทานอลผลิตจากน้ำตาลและแป้งที่ได้จากพืชผลและธัญพืชจากการเกษตร แต่ในปัจจุบันไบโอเอทา นอลสามารถผลิตได้จากวัสดุทดแทนประเภทอื่นๆ นอกเหนือจากแป้งและน้ำตาล เช่น วัสดุลิกโนเซลลูโลส ที่ เรียกว่า ลิกโนเซลลูโลสเอทานอล ตัวอย่างเช่น เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษไม้ เศษวัสดุเหลือทิ้งจาก โรงงานอุตสาหกรรมและเศษขยะ และพืชพลังงานต่างๆ อย่างไรก็ตามรัฐบาลมีนโยบายทางด้านเศรษฐกิจที่จะ ส่งเสริมและผลักดันให้ปลูกพืชพลังงาน ซึ่งกระทรวงพลังงานได้ทำการวิจัยหญ้าที่เหมาะสมเป็นพืชพลังงาน จำนวน 20 ชนิด พบว่าหญ้าเนเปียปากช่อง 1 ให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุดประมาณ 70-80 ตันสดต่อปีต่อไร่ ซึ่ง มากกว่าหญ้าชนิดอื่นเกือบ 7 เท่า จึงเป็นพืชที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทน นอกจากนี้ คณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ (กพข.) ได้ปรับเป้าหมายของแผนพลังงานทดแทนและพลังงาน ทางเลือกในระยะเวลา 10 ปี (พ.ศ.2555-2564) ของประเทศไทยโดยใช้พลังงานทดแทนจากหญ้าเนเปีย (ไกร ลาศ, 2556 ; <http://webkc.dede.go.th/testmax/node/152>) และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้ ศึกษาโครงการวิจัยเรื่องการผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ในปี พ.ศ.2556-2558 ได้ ศึกษาถึงการคัดเลือกพืชและชีวมวลที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอล เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ช่วยในการ ย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส เครื่องมือแปรสภาพชีวมวลในกระบวนการย่อยสลาย และเครื่องจักรกล ในกระบวนการหมัก และเครื่องกลั่นในการผลิตเอทานอลจากชีวมวล ดังนั้นการศึกษาเทคโนโลยีแต่ละขั้นตอน มีประโยชน์อย่างยิ่ง จึงได้นำมาเข้าสู่กระบวนการผลิตรวมกันแบบครบวงจร เพื่อให้ได้ไบโอเอทานอลได้อย่าง รวดเร็วและคุ้มค่าเชิงเศรษฐศาสตร์

โดยวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ของ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เปรียบเทียบกับเอนไซม์การค้าในถังหมักแบบไม่

ต่อเนื่อง (batch fermentation) เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวลในถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการผลิตแอลกอฮอล์ในระบบการกลั่นจากเครื่องที่ได้ออกแบบในปี 2558 ของกรมวิชาการเกษตร และเพื่อศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลที่มีประสิทธิภาพและนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้

## วิธีดำเนินการ

### 1. เตรียมตัวอย่างพืชชีวมวล

ทำการปลูกพืชชีวมวลที่ได้คัดเลือก ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ขอนแก่น) อ้อยพลังงาน (ลูกผสม KJ) และ หญ้าเนเปียร์ปากช่อง1 ในพื้นที่ศูนย์วิจัยเกษตรกรรมขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น เป็นระยะเวลาประมาณ 3-4 เดือน เก็บเกี่ยวพืชดังกล่าวนำมาบดด้วยเครื่องมือแปรสภาพชีวมวลที่ได้จากการออกแบบ สับย่อยให้มีขนาดเล็กพร้อมที่จะนำมาทำการผลิตในขั้นตอนต่อไป

### 2. ปรับสภาพตัวอย่างพืชเบื้องต้น (Pre-treatment)

นำตัวอย่างพืชที่สับบดแล้วในข้อ 1 ลงในถังหมักขนาด 500 ลิตร ทำการกำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสออกไป ได้เลือกวิธีการปรับสภาพตัวอย่างพืช ด้วยวิธีทางเคมี-ฟิสิกส์ (physic-chemical pretreatment) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ในสัดส่วนเยื่อต่อต่าง 1:8 (กรัมเยื่อต่อมิลลิลิตรต่าง) และให้ความร้อนคงที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และปรับสภาพตัวอย่างให้อยู่ในสภาพเป็นกลางด้วยน้ำประปา

### 3. การย่อยสลาย (Hydrolysis)

ทำการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสตัวอย่างพืชที่ผ่านการ Pre-treatment แล้วในข้อ 2 ด้วยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) จากจุลินทรีย์ที่ผลิตได้เองในห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าเริ่มต้นด้วยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 15-35 ยูนิต/กรัมสารตั้งต้น และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

### 4. การหมัก (fermentation)

นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วในข้อ 3 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) การหมักซึ่งเป็นการย่อยสลายน้ำตาล โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงจากห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร หรือชนิด *Saccharomyces cerevisiae* โดยการเตรียมน้ำหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยีสต์สามารถย่อยได้ร้อยละ 14-18 และปรับ pH ให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ประมาณ 4.5-5.0 เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากนั้นเติมยีสต์ร้อยละ 5-8 โดยปริมาตรลงไป แล้วหมักในสภาพที่ไร้อากาศที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-72 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเอทานอลประมาณ 6-10 เปอร์เซ็นต์ นำ

ตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100)

#### 5. การกลั่น (distillation) และการกำจัดน้ำ (dehydration)

นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการหมักในข้อ 4 ผ่านการกลั่น ซึ่งเป็นการแยกเอทานอลออกจากน้ำหมักและน้ำสำ โดยใช้เครื่องเครื่องกลั่นในการผลิตเอทานอลจากชีวมวลที่ได้จากการออกแบบในปี 2558 ซึ่งจะให้ผลผลิตเอทานอลประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และสามารถทำให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ด้วยการกลั่นแบบลำดับส่วน ให้มีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่า 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพ (Multiparameter Bioanalytical System YSI 7100)

#### 6. การทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันแก๊สโซฮอล์ที่ผลิตได้กับเครื่องยนต์

ทำการผสมน้ำมันเบนซินพื้นฐานกับเอทานอลแปลงสภาพที่ผลิตได้ให้ได้เป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 คือ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ที่ได้จากการผสมน้ำมันเบนซินพื้นฐานกับเอทานอลแปลงสภาพ ในสัดส่วน 90 ต่อ 10 โดยปริมาตร แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ น้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 91 (แก๊สโซฮอล์ 91) และน้ำมันแก๊สโซฮอล์อี 10 ออกเทน 95 (แก๊สโซฮอล์ 95) จากนั้นนำน้ำมันแก๊สโซฮอล์ที่ได้ไปทดสอบกับเครื่องยนต์เพื่อดูประสิทธิภาพการใช้งาน

**สถานที่ทำการทดลอง** ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ัญบุรี จ. ปทุมธานี  
ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

**ระยะเวลาทำการทดลอง** ตุลาคม 2558 – กันยายน 2564 รวม 6 ปี

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ได้ทำการเตรียมปลูกตัวอย่างพืชชีวมวล ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ ในบริเวณพื้นที่ของ ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น เป็นระยะเวลาประมาณ 3-4 เดือน ซึ่งได้ใช้ท่อนพันธุ์ที่มีอายุประมาณ 3 เดือน



ภาพที่ 1 ท่อนพันธุ์หญ้าเนเปียร์ เพื่อนำไปใช้ปลูกในพื้นที่ ศวศ.ขอนแก่น สำหรับเป็นวัตถุดิบในการหมักเป็นเอทานอล

2. ได้ทำการทดสอบเครื่องมือแปรสภาพชีวมวลที่ได้จากการออกแบบในปี 2558 ของกรมวิชาการเกษตร โดยนำตัวอย่างหญ้าเนเปียร์มาบดด้วยสับย่อยให้มีขนาดเล็กพร้อมที่จะนำมาทำการผลิตในขั้นตอนต่อไปได้



ภาพที่ 2 ทดสอบเครื่องมือแปรสภาพชีวมวลที่ได้จากการออกแบบของกรมวิชาการเกษตร

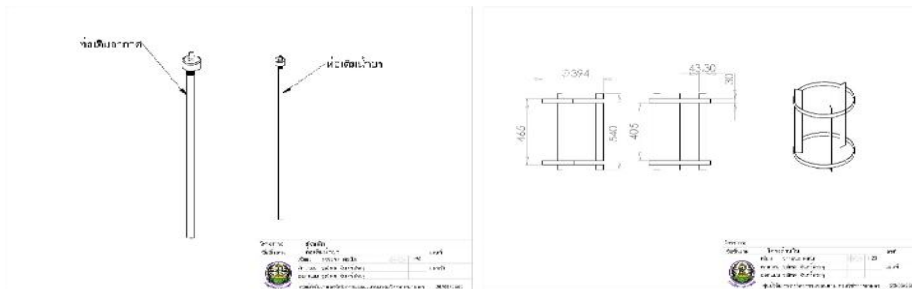
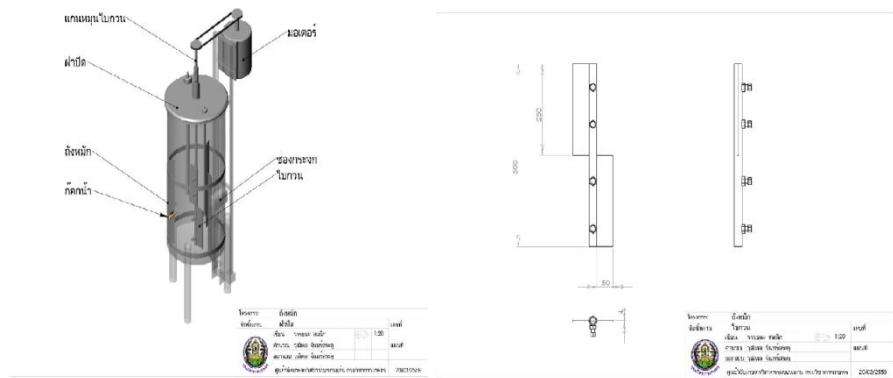
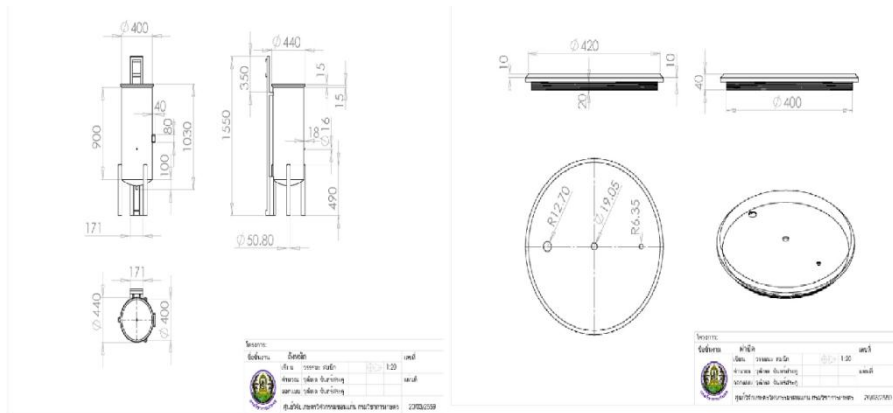
3. ศึกษาถังหมักและเครื่องกลั่นต้นแบบที่ได้เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล



ภาพที่ 3 ถังหมักและเครื่องกลั่นต้นแบบของกรมวิชาการเกษตรเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล



4. การสร้างถังหมักขนาด 100-500 ลิตร จำนวน 2 ถัง ที่ออกแบบได้จากนักวิจัย ศวศ.ขอนแก่น สำหรับผลิตเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวล





ภาพที่ 4 แบบตัวอย่างถังหมักที่ออกแบบจากนักวิจัย ศวศ.ขอนแก่น

5. ได้ถังหมักขนาด 100 ลิตร จำนวน 1 ถัง ที่ออกแบบได้สำหรับขยายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ได้เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล

6. ทำการออกแบบเพื่อการทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในพลาสติกสำหรับทดสอบการหมักขนาด 2 ลิตรก่อนเพื่อให้ได้ conditions ในการหมัก ได้แก่ ความเข้มข้นและปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในถังหมักขนาด 100 ลิตร จากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในที่เกิดได้จาก สทช. ในระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่

- 1) *Bacillus* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส
- 2) *Actinomyces* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
- 3) *Aspergillus niger* จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส

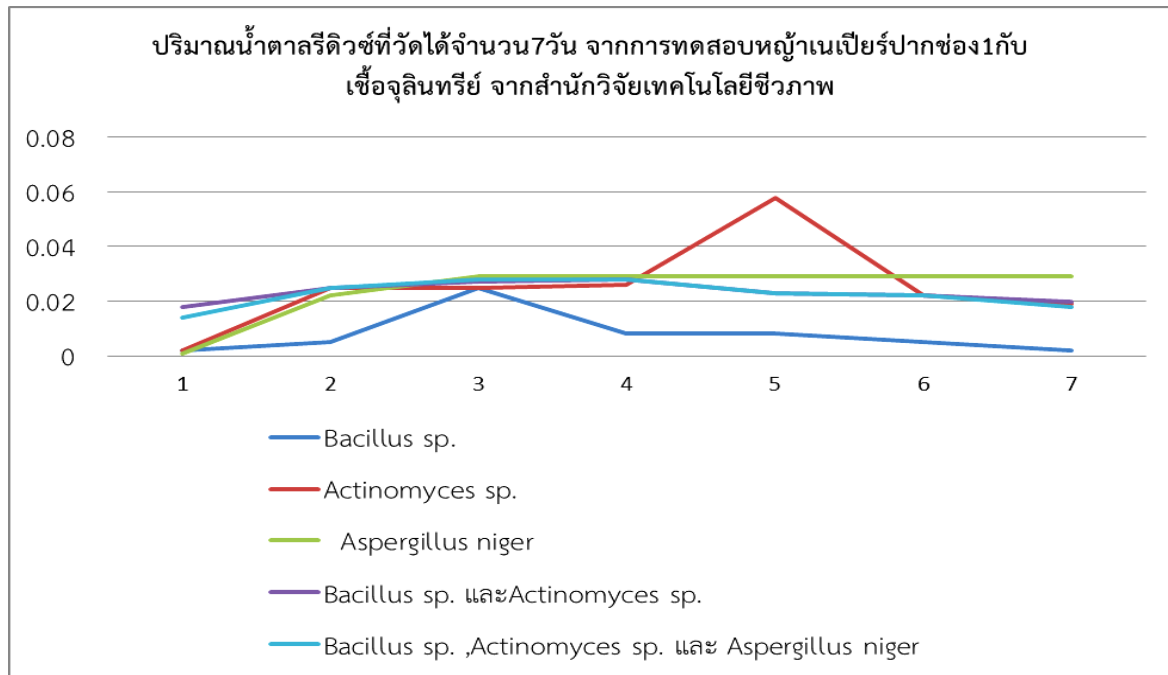
ทำการทดสอบกับพืชพลังงาน 1 ชนิด คือหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้อและเลือก conditions ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ทดสอบในถังหมักขนาด 100 ลิตร ซึ่งอยู่ระหว่างการทดสอบและวิเคราะห์ผล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการทดสอบหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 กับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิต เอนไซม์ไซลาลเนส เอนไซม์เซลลูเลส และการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ

วันที่	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus</i> sp. และ <i>Actinomyces</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp., <i>Actinomyces</i> sp. และ <i>Aspergillus niger</i>
1	0.002	0.002	0.001	0.018	0.014
2	0.005	0.025	0.022	0.025	0.025
3	0.025	0.025	0.029	0.027	0.028
4	0.008	0.026	0.029	0.028	0.028

5	0.008	0.058	0.029	0.023	0.023
6	0.005	0.022	0.029	0.022	0.022
7	0.002	0.019	0.029	0.020	0.018

ตารางที่ 5 ปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จำนวน7วัน จากการทดสอบหญาเนเปียร์ปากช่อง1กับเชื้อจุลินทรีย์ จากสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ



ภาพที่ 6 กราฟแสดงปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จำนวน7วัน จากการทดสอบหญาเนเปียร์ปากช่อง1กับเชื้อจุลินทรีย์ จากสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ

จากการทดสอบหญาเนเปียร์ปากช่อง1 กับเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus sp.* จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส วัดปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS พบว่าในวันที่สามของการหมักสามารถวัดค่าได้ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *Actinomyces sp.* จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส วัดปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS พบว่าในวันที่ห้าของการหมักสามารถวัดค่าได้ 0.058 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *Aspergillus niger* จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส วัดปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS สามารถวัดค่าได้ 0.029 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการ ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เซลลูเลส และการย่อยเฮมิเซลลูโลสได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีในระดับห้องปฏิบัติการ จำนวนสามชนิด นำเชื้อ *Bacillus sp.* และเชื้อ *Actinomyces sp.* ทดสอบกับหญาเนเปียร์ปากช่อง1 วัดปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS พบว่าในวันที่สี่ของการหมักสามารถวัดค่าได้ 0.028 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหากนำ เชื้อ *Bacillus sp.* เชื้อ

*Actinomyces* sp. และเชื้อ *Aspergillus niger* ทดสอบกับหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 วัดปริมาณค่าน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS พบว่าในวันที่สี่ของการหมักสามารถวัดค่าได้ 0.028 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ทั้งนี้ในการทดสอบหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 กับเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เซลลูเลส และการย่อยเฮมิเซลลูโลสได้ จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ในระดับห้องปฏิบัติการ นั้นผ่านปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment) เป็นการทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออก โดยวิธีการบด (Mussatto *et al.*, 2008) ส่วนกระบวนการย่อยสลาย (hydrolysis) คือการย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส และการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส (Bosch *et al.*, 2010) ซึ่งหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 เป็นพืชบกจึงมีไซแลนถึง 80-95 % การย่อยสลายด้วยเชื้อ *Actinomyces* sp. จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเอนไซม์ ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้โดยวิธี DNS ในวันที่ห้าจึงสามารถวัดค่าได้ 0.058 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวลแบบครบวงจร ได้เริ่มจากการนำพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ อ้อยพลังงาน ฯลฯ นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องมือแปรสภาพชีวมวลให้ได้ปริมาณที่มากพอกับถังหมักขนาด 500 ลิตร และนำมาปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสออกไป โดยวิธีทางเคมี ปรับสภาพให้เป็นด่างโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้ย่อยสลาย (hydrolysis) ให้กลายเป็นน้ำตาล ในระดับห้องปฏิบัติการ เชื้อ *Actinomyces* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเอนไซม์ วัดค่าน้ำตาลได้ 0.058 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 6 จากค่าน้ำตาลที่วัดได้ในระดับห้องปฏิบัติการ หากมีปริมาณที่มาก จึงสามารถนำไปสู่กระบวนการหมักและกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีคุณภาพ และมากพอต่อปริมาณที่คุ้มค่าต่อไป

กระบวนการสร้างถังหมักเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลนั้น ได้สร้างถังขนาด 100 ลิตร จำนวน 1 ถัง ที่ออกแบบสำหรับขยายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มากพอ และนำไปสู่กระบวนการผลิตเอทานอลที่มีคุณภาพตามที่ต้องการต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- ไกรลาส เขียวทอง, วีรชัย อัจหาญ, อธิพลเผ่าไพศาล, เรืองเดช ปั่นดั่ง และสรยุทธ วินิจฉัย. 2556. คู่มือการปลูกหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1. มิตรภาพการพิมพ์. นครราชสีมา. 32 น.
- ซันนันท์ นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรือวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลสเอทานอลในประเทศไทย. KKU Sci. J.40 (4) 1073-1088 (2012).
- ธราพงษ์ วิจิตตานต์, นวดล เหล่าศิริพจน์ และประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ. 2553. รายงานสถานภาพของงานวิจัยและผลิตเอทานอลไปโอดีเซล ไบโอดีเซล และน้ำมันชีวภาพในประเทศไทย. สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.)
- ประเวศ ต้อยเต็มวงศ์, จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร, ปิยรัตน์ บุญแสวง และธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2552. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. ผลงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. วารสารสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 16 เล่มที่ 2. 8 น.
- Bosch P., Wallberg O., Joelsson E., Galbe M. and G. Zacchi. 2010. Impact of dual temperature profile in dilute acid hydrolysis of spruce for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*. 3: 15.
- Jeffries T.W., Grigoriev I.V., Grimwood J., Laplaza J.M., Aerts A., Salamov A., Schmutz J., Lindquist E., Dehal P., Shapiro H., Jin Y.S., Passoth V. and Richardson P.M. 2007. Genome sequence of the lignocelluloses-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*. 25 (3) : 319-326.
- Kusch S. and M.V. Morar. Integration of lignocellulosic biomass into renewable energy generation concepts. *ProEnvironment* 2, 32-37.
- Mussatto S.I., Fernandes M., Milagres A.M.F. and Roberto I.C. 2008. Effect of hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*. 43 : 124-129.
- Ververis C., Georghiou, K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R. and Corleti V. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology* 98 : 296-301.
- Wang Z., Keshwani D.R., Redding A.P. and Cheng J.J. 2010. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*. 101 : 3583-3585.

### กิจกรรมงานวิจัยที่ 3

#### การผลิตไบโอดีเซล

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำโดยใช้ไลเปส

ผู้วิจัย นางสาวมัทนา ศรีหัตถกรรม<sup>1</sup> นางสาวภารณี สว่างศรี<sup>1</sup>  
นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์<sup>1</sup>

คำสำคัญ ไลเปส ไบโอดีเซล การกลั่น

#### บทคัดย่อ

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 °C, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> ( ปริมาณออกซิเจน ) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3, 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดขุ่นที่ 6 °C และ -12 °C ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่ 11 °C และได้มาตรฐานไบโอดีเซลปี100 ตามมาตรฐานสากล มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้ ( p<0.01 ) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ และ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว ที่มีจุดขุ่น -12 °C มากที่สุดคือ 1:2, 1:4 และ 1:3, 1:4 ตามลำดับ ดีเซลเกรด1( ปตท. พรีเมียมเกรด ) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน ที่ 2- 4 °C แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 °C ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่ 2- 4 °C ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 °C ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น 6 °C แข็งตัวที่ 2- 4 °C ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น -12 °C ใส ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่ 2- 4 °C ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น 6 °C และ -12 °C ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันทีที่ -20 °C อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น 6 °C ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น -12 °C ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น -12 °C ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน และตะกอนที่ตกลงมาในทุกการทดลอง ในทุกส่วนผสม เป็นตะกอนของดีเซล

---

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ<sup>1</sup>

## บทนำ

ปัญหาน้ำมันดีเซลที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ สังคม สภาพแวดล้อมและความสุขของประชากรทั่วโลกเป็นอย่างมากในขณะนี้ ไม่ได้มีเพียงแค่ว่าที่คาคาน้ำมันใกล้จะหมดลงในไม่ช้าและมีราคาแพงเท่านั้น แต่ยังมีที่สำคัญที่สุดคือ มลพิษที่เกิดจากการใช้น้ำมันดีเซลที่ส่งผลให้เกิดภาวะโลกร้อนอยู่ในขณะนี้ ทำให้ทุกประเทศต้องเร่งรัดค้นหาพลังงานทางเลือกอื่นๆ เช่น ไบโอดีเซล ก๊าซธรรมชาติ( LPG และ CNG ) พลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรเจน และพลังงานไฟฟ้า เพื่อทดแทนการใช้น้ำมันดีเซลในกิจกรรมต่างๆ โดยเฉพาะในกิจกรรมที่มีการใช้น้ำมันมากที่ไปเร่งการทำให้เกิดมลพิษต่อภาวะโลกร้อน เช่น ภาคอุตสาหกรรม การคมนาคมและขนส่ง จากรายงานการศึกษา พบว่า ไบโอดีเซล มีการเผาไหม้ดีกว่าและสะอาดกว่า ไอเสียจึงมีคุณภาพดีกว่าน้ำมันดีเซล จึงสามารถลดคาร์บอนออกไซด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ซึ่งเป็นตัวการสำคัญของการเกิดฝนกรดไฮโดรคาร์บอน และฝุ่นละอองจากรถยนต์ได้ร้อยละ 17 ถึง 53, 20 ถึง 99, 20 ถึง 40 และ 20 ถึง 40 ตามลำดับ และสามารถลดวงจรชีวิตของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ร้อยละ 78 ซึ่งเป็นผลให้ลดภาวะโลกร้อน( กัญญา, 2544; ข้อดี-ข้อด้อยของไบโอดีเซล<http://www.biodiesel.eng.psu.ac.th/webboard/view.php?No-133> ) และจากรายงานผลการศึกษามลพิษในเครื่องยนต์ดีเซลที่ใช้น้ำมันไบโอดีเซล กับเครื่องยนต์ดีเซลรุ่น 1KZ-TE ที่สภาวะก่อนและหลังปรับแต่งองศาหัวฉีดน้ำมัน เพื่อหาแนวทางควบคุมและลดมลพิษที่เกิดขึ้นและคำนวณเปรียบเทียบค่าสิ้นเปลืองเชื้อเพลิง พบว่าไบโอดีเซลปี100สามารถลดค่าไฮโดรคาร์บอน ออกไซด์ของไนโตรเจนและควันดำจาก 8.10( ppm.Vol), 190( ppm.Vol) และ 8(% ) ลงเหลือ 2.33, 100.3 และ 1 ตามลำดับ ส่วนน้ำมันดีเซลมีค่าออกไซด์ของไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจาก133.67เป็น173.67 ( ppm.Vol ) ส่วนค่าอื่นๆไม่แตกต่างกันกับก่อนปรับแต่งหัวฉีด ส่วนอัตราการสิ้นเปลืองน้ำมันน้อยกว่าดีเซลเล็กน้อย ([http://www.rsu.ac.th/engineer/ac/academic/\\_20percent/Pollution%20B100%\\_20Test.html](http://www.rsu.ac.th/engineer/ac/academic/_20percent/Pollution%20B100%_20Test.html) ) ก๊าซธรรมชาติสามารถลดคาร์บอนออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอนและฝุ่นละอองจากรถยนต์ได้ ส่วนพลังงานเชื้อเพลิงไฮโดรเจนและพลังงานไฟฟ้า เป็นพลังงานสะอาดอย่างแท้จริง ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่ยังคงอยู่ในช่วงระยะเริ่มแรกของการเปลี่ยนผ่านทางเทคโนโลยี และยังคงอยู่ในขั้นตอนการวิจัย ระบบต่างๆไม่พร้อมสมบูรณ์ ดังนั้นไบโอดีเซลจึงเป็นพลังงานสะอาดที่หลายๆประเทศให้ความสำคัญ และส่งเสริมให้ใช้กันอย่างแพร่หลายอยู่ในขณะนี้ เพราะช่วยในการนำน้ำมันพืชที่ใช้แล้วซึ่งมีสารไดออกซินที่เป็นสารก่อมะเร็ง ไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ ให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก ช่วยเหลือเกษตรกรผู้ปลูกพืชน้ำมันซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศ ช่วยลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศโดยเฉพาะน้ำมันดีเซลที่มีสัดส่วนการใช้น้ำมันสูงกว่าเบนซินถึงสองเท่า และเป็นการเสริมสร้างความมั่นคง และเสถียรภาพทางด้านพลังงานของประเทศ นอกจากนี้ไบโอดีเซลยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล ซึ่งสามารถใช้ทดแทนดีเซลได้เลยไม่ต้องปรับแต่งเครื่องยนต์หรือปรับแต่งเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกา(โดย the energy policy act of 2005) อังกฤษ( the renewable transport fuel obligation ) และประเทศแถบประเศยุโรป และทั่วโลก ได้มีการบังคับใช้ไบโอดีเซลมากยิ่งขึ้น ไบโอดีเซลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันปิโตรเลียมดีเซลทุกชนิด เช่น รถยนต์ รถบรรทุก รถไฟ เครื่องบิน เครื่องกำเนิดไฟฟ้า เครื่องทำความร้อน และในภาคการเกษตร เป็นต้น( <http://en.wikipedia.org/wiki/Biodiesel>; <http://www.habmigern2003.info/>

[biogas/Biodiesel.html](#) ) การผลิตไบโอดีเซลเกรดสูงๆเทียบเท่าปิโตรเลียมดีเซล หรือไบโอดีเซลบริสุทธิ์ (pure biodiesel fuel( 100 % esters of fatty acids, B100 ) น้ำมันที่ใช้ควรบริสุทธิ์ และควรมี fatty acid methyl ester ที่ต้องการในปริมาณที่เหมาะสม(Choo Yuen *et al.*, 2009; [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532005000800003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532005000800003)) และ ในบรรดาน้ำมันพืชทั้งหมดที่นำมาผลิตไบโอดีเซล น้ำมันปาล์มมีศักยภาพมากที่สุดเพราะว่า ปาล์มน้ำมันผลิตน้ำมันได้มาก น้ำมันปาล์มมีราคาต่ำ มีคุณสมบัติทนความร้อนสูง ([www.toryod.com](http://www.toryod.com); [http://en.Wikipedia.org/wiki/Palm\\_Oil](http://en.Wikipedia.org/wiki/Palm_Oil)) และมีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลได้ดี การใช้น้ำมันปาล์มที่ไม่บริสุทธิ์ จะไปเพิ่มต้นทุน ในการกำจัดสิ่งเจือปนอื่นๆในน้ำมันปาล์มในปฏิกิริยา hydrolysis ด้วยกรด และในการกลั่นให้เป็นไบโอดีเซล ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการใช้ไลเปส ในการผลิตไบโอดีเซล เพื่อให้ได้ไบโอดีเซลคุณภาพดี ต้นทุนต่ำ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม(<http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/6672>; Royon *et al.*, 2007; <http://www.spingerlink.com/content/nq764815q8287w12/>) ไลเปส( triacylglycerol acylhydrolases EC3.1. 1.3 ) มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ( hydrolyze ) ของ ester bond ตรงพันธะระหว่าง fatty acids กับ glycerol ในโมเลกุล triglyceride ในสภาพ oil-water interface และบน substrate ที่เป็นของแข็งทั้งอย่างเฉพาะเจาะจง หรือไม่เจาะจงอย่างสมบูรณ์ (Macrae, 1983; Jensen, 1983;[http://www.sciencedirect.com/science\\_ob=articleURL&\\_udi=B6TGN-45DFFGC-1&\\_user=...](http://www.sciencedirect.com/science_ob=articleURL&_udi=B6TGN-45DFFGC-1&_user=...) ) ได้เป็น glycerol, fatty acids ต่างๆ และ partial glyceride ทำให้โมเลกุลไขมันขนาดใหญ่ ถูกย่อยเป็นโมเลกุลขนาดเล็กลงอย่างเฉพาะเจาะจง ในระยะเวลาสั้นที่อุณหภูมิต่ำ 20-60 องศาเซลเซียส ไลเปสยังมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา esterification, และ transesterification ในตัวทำละลายที่ไม่ใช้น้ำ( Nagao *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2006 ) จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และในสกัดน้ำมันแทนกรรมวิธีการสกัดน้ำมันปาล์ม ที่ใช้อุณหภูมิและความดันสูง การใช้ไลเปสจะไปลดต้นทุนพลังงาน โรงงาน และอุปกรณ์ราคาแพงต่างๆลงได้ นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถผลิตเอโนไซม์ที่ใช้ได้เองปริมาณมากจากจุลินทรีย์ ในระยะเวลาอันสั้น และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันปาล์มได้ปริมาณมากถึง 0.6-0.8 ตัน/ไร่/ปี ถ้าสามารถส่งเสริมให้ผลิตและใช้ไบโอดีเซลกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในภาคการเกษตร จะช่วยให้เศรษฐกิจของครัวเรือนในชุมชน และทำยสุดของประเทศดีขึ้น

ข้อควรระวังที่สำคัญในการใช้ไบโอดีเซลบี100 คือ ไบโอดีเซลบี100จะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าน้ำมันดีเซล ( โดยส่วนใหญ่ไบโอดีเซลบี100 จะมีจุดขุ่นอยู่ที่ 1.7-15.6 ส่วนน้ำมันดีเซลเกรด2มีจุดขุ่นที่ -15 ถึง 5 °ซ และจุดไหลเทที่ -35 ถึง -15 °ซ( มงคล, 2557 ) ) ซึ่งจะไปทำให้หัวฉีดอุดตันได้ ดังนั้นการให้ความร้อนแก่ท่อส่งและถังน้ำมันอาจมีความจำเป็นแม้สภาพอากาศไม่เย็นมาก( มงคล, 2557 ) และเพื่อแก้ปัญหาอันเนื่องมาจากไบโอดีเซลบี100 กรมธุรกิจพลังงานได้กำหนดส่วนผสมของไบโอดีเซลในน้ำมันดีเซลไว้ไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานของเครื่องยนต์ แต่น้ำมันดีเซลบี20 ลดปัญหามลพิษได้ระดับหนึ่งไม่ตีเท่าน้ำมันดีเซลบี80( มงคล, 2557 ) มัทนาและคณะ( 2558 ) สามารถผลิตไบโอดีเซลบี100จากน้ำมันปาล์มโดยใช้ไลเปส แต่ไบโอดีเซลที่ได้มีจุดไหลเทที่ +11 องศาเซลเซียส ซึ่งไบโอดีเซลจะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ



กว่า +11 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในพื้นที่หนาวเย็นได้ และไม่สามารถเพิ่มอัตราส่วนในการผสมกับน้ำมันดีเซลได้ ส่งผลให้ไม่สามารถลดมลพิษลงได้ตามเกณฑ์มาตรฐาน ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการผลิตไบโอดีเซลให้มีจุดไหลเทต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำมันให้ใช้ได้ในสภาพอากาศหนาวเย็น และเพื่อการลดมลพิษต่อไป

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดไหลเทต่ำ มีคุณภาพตรงตามมาตรฐานสากล และต้นทุนในการผลิตต่ำ

### วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดลอง 6 การทดลอง ได้แก่

1. การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยใช้ไลเปส
  - 1.1 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก
  - 1.2 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆด้วยไลเปส
2. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยวิธี

chromatography

- 2.1 การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้สารเคมี

- ก. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้ยูเรีย
- ข. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆ ที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปส โดยใช้

เมทานอล

3. การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำโดยใช้กรดไขมันอัตราส่วนต่างๆ

4 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ชนิดต่างๆที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากส่วนผสมไบโอดีเซลโดยใช้ความเย็น( crystallization )

5 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

ก. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

ข. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย

ค. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

- 6 การทดลองใช้ไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์

การทดลองที่1. การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยใช้ไลเปส

### 1.1 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก

#### วิธีดำเนินการ

##### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเหลว Luria-Bertani( LB ) + ampicilin 100 ug/ml
2. ตู้บ่มเชื้อ SHE LAB
3. เครื่อง autoclave
4. ถังหมัก( Biostat B B. Braun Biotech International )
5. สารเคมีต่างๆ เช่น ammonium sulphate, IPTG, citric acid,
6. เครื่อง sonicator
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ยี่ห้อ TOMY MX301
8. ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ SHEL LAB
9. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ WATER 515
10. เครื่องแก้ว เช่น ขวดแก้วดูแรน ปีกเกอร์

##### แบบและวิธีการทดลอง

-

##### วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เลี้ยง *E. coli* BL21 ที่ได้รับยีน *lipA* ของ *Bacillus subtilis* clone 6 ในอาหารเหลว LB 400 มล.+ampicillin 100 ug/ml 800 ul บ่มเชื้อข้ามคืน ที่ 37 °ซ, 200 rpm
2. อบถังหมักที่มีอาหาร LB 4 ล. บรรจุไว้ในถัง ที่ 121 °ซ, 15 ปอนด์ 20 นาที ปล่อยให้เย็นข้ามคืน
3. ถ่ายเชื้อ *E. coli* BL21ที่เลี้ยงไว้ ลงในถังหมัก และเติม ampicillin 100 ug/ml 8 มล.ตั้งโปรแกรมการหมักที่อุณหภูมิ 37 °ซ, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> ( ปริมาณออกซิเจน ) 80 %
4. เหนี่ยวนำให้ผลิตไลเปสด้วย IPTG 2 ครั้ง  
ครั้งที่1 เมื่อเชื้อเจริญถึง O.D600 0.6-0.8  
ครั้งที่2 หลังจากครั้งที่1 1 ชม. ความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ในถังหมัก = 1 mM
5. บ่มเชื้อต่อไปอีก 5 ชม. จึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 °ซ 8,000 รอบ/นาที 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่-20 °ซ
6. ทำให้เซลล์แตก ดังนี้ นำตะกอนเซลล์มาละลายใน 1X 250 mM sodium phosphate( NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ) buffer pH 8.0 + lysozyme ใส่ lysozyme อัตรา 4 มก./ตะกอนเซลล์ 30 มก.. ผสมให้เข้ากันดี ไม่จับเป็นก้อน บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน
7. เติม RNase A ( 100 มก./มล. ) 10 µl /ตะกอนเชื้อ 30 มก. คว่ำ-หยาง ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่  $4^{\circ}\text{C}$  8,000 รอบ/นาที 10 นาที
8. เก็บส่วนใสที่มี crude enzyme ไปตกตะกอนข้ามคืนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่  $4^{\circ}\text{C}$
9. ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน crude enzyme ที่  $4^{\circ}\text{C}$  8,000 รอบ/นาที 30 นาที
10. วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และ ตรวจสอบโปรตีนที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE
8. เก็บ crude lipase ไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### การบันทึกข้อมูล

ปริมาณโปรตีน และขนาดโปรตีนที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE

## 1.2 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆด้วยไลเปส

### แบบและวิธีการทดลอง

-

### วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ทำการกำจัดยางเหนียว ( gums or phosphatides ) ออกจากน้ำมันพืชดิบโดยใช้ citric acid 1 % ของปริมาณน้ำมัน โดยดัดแปลงวิธีการของ วัชระ และ พัทรินทร์ ( 2014 ) และ Etienne Deffense (<http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40322> ) มีวิธีการดังนี้

-หน้าเปล่า 400 มล. ลงในขวดแก้วฝาเกลียว จากนั้นใส่ citric acid 1 % ของปริมาณน้ำมัน ลงไป กวนให้ละลายหมด เสร็จแล้วใส่น้ำมันพืชดิบปริมาณ 600 มล. ลงไป กวนหรือเขย่าให้กรดและน้ำมันดิบ ผสมกันดี จากนั้นนำไปวางบน hot plate อุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  กวนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer จนน้ำมันพืชดิบมีอุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  กวนต่อไปอีก 25 นาที จึงดับไฟ

-ค่อยๆเติมเกล็ด NaOH ลงไปในน้ำมันพืชดิบ กวนให้ NaOH ละลายโดยใช้ magnetic stirrer เพื่อสมดุลความเป็นกรดและด่าง = 7 ซึ่งจะทำให้ phosphatidic acid แยกตัวออกมาจากยางเหนียวที่ไม่ละลายน้ำมากขึ้น ขั้นนี้จะเกิดความร้อนสูงมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องค่อยๆเติม NaOH ลงไป และถ้ามีความร้อนสูง ต้องหยุดเติม NaOH รอให้เย็นลง จึงเติมลงไปใหม่

-เติมน้ำร้อน อุณหภูมิ  $60-70^{\circ}\text{C}$  ลงไป กวนอย่างแรง ยางเหนียวจะแยกตัวออกจากน้ำมันพืชดิบ ผสมอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำชั้นล่าง

-เทน้ำมันดิบส่วนบนลงใน separating funnel แล้วล้างด้วยน้ำอุ่น อุณหภูมิ  $60-70^{\circ}\text{C}$  3 ครั้ง

-แยกน้ำและสิ่งสกปรกที่หลงเหลืออยู่ในน้ำมันพืชดิบโดยการนำไปอบด้วยความร้อนในตู้อบ อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  30 นาที

- เก็บน้ำมันพืชดิบส่วนบนไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทำการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวด้วย crude lipase ( 30 มก./มล. ) ที่เตรียมไว้ ในถุงพลาสติกขนาด  $16 \times 26$  นิ้ว อัตรา crude lipase 500 มล./น้ำมันปาล์มหรือน้ำมัน

พืชต่างๆ 4 ล. ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 37<sup>0</sup>ซ, 80 rpm เป็นเวลา 17 ชม. หรือ crude lipase( 30 มก./มล.) อัตรา crude lipase 100 มล./น้ำมันปาล์มหรือน้ำมันพืชต่างๆ 4 ล. ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 37<sup>0</sup>ซ, 80 rpm จนกระทั่งน้ำมันใส เป็นเวลา 48-36 ชม. สำหรับน้ำมันปาล์ม ส่วนน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบูดำ และน้ำมันรำข้าว บ่มปฏิกิริยาที่ 37<sup>0</sup>ซ, 80 rpm นาน 24 ชม. ก็พอเพียงแล้ว

3. หยุดปฏิกิริยาที่ 60<sup>0</sup>ซ 3 ชม. ขั้นตอนนี้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำและสิ่งสกปรก ไม่จำเป็นต้องนำไปปั่นเหวี่ยง

4. นำน้ำมันที่ย่อยแล้ว ไปตรวจสอบการแข็งตัวของน้ำมันที่ 4 และ -20<sup>0</sup>ซ

#### การบันทึกข้อมูล

1. คุณภาพน้ำมัน
2. การแข็งตัวของน้ำมันหลังการย่อยด้วยไลเปสที่ 4 และ -20<sup>0</sup>ซ

#### เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2558 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยวิธี chromatography

2.1 การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้สารเคมี

#### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีต่างๆ เช่น ยูเรีย เมทานอล
2. tube ขนาดต่างๆ
3. เครื่อง HPLC
4. ตู้อบ
5. น้ำมันปาล์ม และน้ำมันสบูดำที่ย่อยด้วยไลเปสแล้ว
6. hot plate

#### แบบและวิธีการทดลอง

-

ก. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างๆที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้ยูเรีย

#### วิธีการทดลอง

เตรียมส่วนผสมของน้ำมันปาล์มที่ย่อยด้วยไลเปสแล้ว : ยูเรีย : เมทานอล ในอัตราส่วน 25 มล. : 10 ก. : 160 มล. ในขวดแก้วดูแรนขนาด 500 มล. แล้วเขย่าหรือกวนให้ผสมกันดี นำไปบ่มปฏิกิริยาบน hot plate ที่ 68<sup>0</sup>ซ พร้อมกับกวนส่วนผสมด้วย magnetic stirrer เมื่อยูเรียละลายหมดแล้ว และอุณหภูมิของส่วนผสมถึง 68<sup>0</sup>ซ บ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 30 นาที เสร็จแล้วกลดตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตกตะกอนแยกกรดไขมันต่างๆที่ 4 และ -20<sup>0</sup>ซ กรองตะกอนกรดไขมันที่ได้ที่อุณหภูมิต่างๆด้วยกระดาษ Kimwipes Kimtech ล้างตะกอนกรดไขมันด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 60<sup>0</sup>ซ pH 3-4 3 ครั้ง ปรับค่าความเป็นกรดและด่างของน้ำมันให้เป็น 7 ด้วยน้ำ pH 7 ตรวจสอบกรดไขมันด้วยเครื่อง HPLC

#### การบันทึกข้อมูล

1. การแข็งตัวของกรดไขมันที่อุณหภูมิต่างๆ
2. ปริมาณกรดไขมันที่ 4 และ -20 °ซ

## ข. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้เมทานอล

### วิธีการทดลอง

ผสมน้ำมันที่ย่อยแล้วกับเมทานอล ปรับตามที่เหมาะสม นำไปบ่มปฏิกิริยาใน water bath ที่ 50 °ซ นาน 30 นาที เขย่าให้น้ำมันและเมทานอลผสมกันเป็นระยะๆ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปแยกกรดไขมันที่ 4 และ -20 °ซ แยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน นำส่วนใสและตะกอนไปประเหยเมทานอลออกไป ตรวจสอบกรดไขมันด้วยเครื่อง HPLC

### การบันทึกข้อมูล

ชนิดและปริมาณกรดไขมันที่ได้

### เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2559 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

## การทดลองที่3 การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำโดยใช้กรดไขมันอัตราส่วนต่างๆ

### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

- 1 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
1. สารเคมีต่างๆ
3. water bath
4. เครื่อง HPLC

### แบบและวิธีการทดลอง

-

### วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. นำกรดไขมันที่ได้ไปผลิตเป็นไบโอดีเซล โดยการผสมกับสารละลาย methanol และ KOH ที่ 55 °ซ นาน 25 นาที แล้วนำมาเขย่าอย่างแรงบนเครื่องเขย่าที่ 37 °ซ 200 รอบ/นาที 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำมันแยกชั้น นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด และปั่นเหวี่ยงเอาน้ำออกไปให้หมด
2. นำไบโอดีเซลที่ได้ในข้อ1 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และ -20 °ซ
2. เทไบโอดีเซลที่ไม่ตกตะกอนที่ 4 °ซ และ -20 °ซ เก็บไว้ และเก็บไบโอดีเซลที่ตกตะกอนที่ 4 °ซ และ -20 °ซ ไว้ ไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ คือไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำที่ -20 °ซ
4. วิเคราะห์ fatty acid methyl ester ที่ได้โดยวิธี reversed phase HPLC เพื่อตรวจสอบ fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในไบโอดีเซล

### การบันทึกข้อมูล

1. fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในไบโอดีเซล ที่ 4 °ซ และ -20 °ซ

## การทดลองที่4 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ชนิดต่างๆที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากส่วนผสมไบโอดีเซลโดยใช้ความเย็น( crystallization )

### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ separating funnel, beaker, ขวด duran ขนาดต่างๆ
2. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ methanol AR grade, urea, KOH
3. hot plate
4. hot oven
5. tube ขนาด 50 มล.
6. ปีกเกอร์

### แบบและวิธีการทดลอง

#### วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ทำการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันสบู่ดำที่ย่อยด้วยไลเปสแล้ว โดยการผสมน้ำมัน 30 มล. กับ สารละลาย methoxide ( methanol 60 มล. และ KOH 1.2 ก. ) บน hot plate อุณหภูมิ 58 °ซ และกวนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer นาน 25 นาที เสร็จแล้วปิดไฟ และกวนต่อไปอีก 30 นาที ยกลง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด วิธีการล้าง มีดังนี้ นำไบโอดีเซลเทลงใน separating funnel เติมน้ำลงไปพอประมาณ ไม่มาก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น รอจนส่วนที่เป็นสารละลายข้างล่างใส จากนั้นเขย่าเบาๆให้ส่วนน้ำมันข้างบนสัมผัสกับส่วนของสารละลายข้างล่าง นาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอีกครั้ง และทำการปล่อยทิ้งสารละลายข้างล่าง แล้วล้างไบโอดีเซลที่ได้ด้วยน้ำ pH7 3 ครั้ง จนน้ำล้างใส วิธีการล้างแบบนี้จะประหยัดน้ำที่ใช้ล้างมาก และได้ไบโอดีเซลมาก เก็บไบโอดีเซลใส่ขวด นำไปใส่ในตู้อบอุณหภูมิ 60 °ซ 30 นาที ไบโอดีเซลจะใสแยกตัวออกจากสิ่งสกปรก ไขมันอิ่มตัวสูงและน้ำ น้ำมันที่ได้จะใสเหมือนน้ำมันที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว

2. นำไบโอดีเซลที่ได้ในข้อ1 ไปทดสอบการแข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 °ซ ข้ามคืน
3. เทไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ 4 °ซ ใส่ขวดแล้วนำไปทดสอบการแข็งตัวในตู้เย็น -20 °ซ ข้ามคืน เก็บไบโอดีเซลที่แข็งตัวที่ -20 °ซ และไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ ไว้
4. วิเคราะห์ fatty acid methyl ester ที่ได้โดยวิธี reversed phase HPLC เพื่อตรวจสอบ fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในไบโอดีเซล

#### การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาณน้ำมันไบโอดีเซลที่ได้ที่ 4 °ซ และ -20 °ซ
2. fatty acid methyl ester ที่มีปรากฏอยู่ในน้ำมันไบโอดีเซล ที่ 4 °ซ และ -20 °ซ

#### เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2559 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่5 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าวจะแข็งตัวทั้งหมด ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง จะใส ไม่แข็งตัว ส่วนไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำจะแข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ( ส่วนใหญ่จะแข็งตัวที่  $4^{\circ}\text{C}$  มีส่วนน้อยที่ไม่แข็งตัว ) และถ้าพิจารณาสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันเหล่านี้แล้ว ทำให้ได้ข้อสมมุติฐานว่าการผลิตไบโอดีเซลให้มีจุดแข็งตัวต่ำ โดยการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันผสมโดยใช้ยูเรีย น่าจะเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด

งานทดลองนี้มี 3 การทดลองย่อย

#### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ separating funnel ขวดแก้วดูแรนขนาดต่างๆ แท่งกวนสารเคมี ปีกเกอร์

2. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ KOH, methanol, urea

3. water bath

4. เครื่อง HPLC

5. ตู้เย็น  $4^{\circ}\text{C}$  และ  $-20^{\circ}\text{C}$

6. hot plate

7. tube ขนาด 50 มล.

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้

ก. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

#### แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 1/2 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 1 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 2 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 4. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 3 ส่วน( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 5. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตน้ำมันถั่วเหลือง 4 ส่วน( ปริมาตร : ปริมาตร )

### วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม และน้ำมันถั่วเหลืองตามกรรมวิธีที่แสดงไว้ใน การทดลองที่ 4
2. ผสมไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันถั่วเหลือง ตามกรรมวิธีของการทดลอง ในขวดแก้วขนาด 2 ล. ผสมให้เข้ากันดี
3. เติมนเมทานอล 1,536 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน
4. นำไปตั้งบน hot plate ใส่ยูเรีย 96 ก.ลงไป กวนให้ยูเรียละลายหมดโดยใช้ magnetic stirrer ปรับอุณหภูมิเป็น  $68^{\circ}\text{C}$  เมื่อน้ำมันร้อนถึงอุณหภูมิ  $68^{\circ}\text{C}$  กวนต่อไปอีก 30 นาที
5. ยกลง ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปตกตะกอนที่  $4^{\circ}\text{C}$  ซ้ำคืน
7. รับเศษส่วนใสใส่ขวดใหม่ นำส่วนใส ไปตกตะกอนที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ซ้ำคืน เมื่อน้ำมันที่ตกตะกอนได้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ละลาย เทน้ำมันที่ได้ใส่บีกเกอร์ และนำยูเรียที่ตกผลึกลงมาไปฝั่งแห้ง ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักได้เป็นน้ำหนักยูเรีย +ไบโอดีเซลที่หลงเหลืออยู่
8. กรองตะกอนน้ำมันที่ตกได้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ด้วยกระดาษ Kimwipes Kimtech ตักตะกอนใส่บีกเกอร์ ในข้อ 7 ที่มีตะกอนน้ำมันที่แข็งตัวที่  $4^{\circ}\text{C}$  อยู่
9. ล้าง ตะกอนที่ตกได้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  และ  $-20^{\circ}\text{C}$  และส่วนใสที่กรองได้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ด้วยน้ำ pH 3-4 อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  เพื่อแยกน้ำมันออกจากยูเรียและเมทานอล
10. เทส่วนที่เป็นน้ำมันลงใน separating funnel แล้วล้างด้วยน้ำ pH 5 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำ pH 7 1 ครั้ง เพื่อปรับความเป็นกรดและด่างของน้ำมันให้ได้ 7 เก็บน้ำมันที่ได้ไว้ในขวดแก้ว
11. นำขวดที่บรรจุน้ำมันไปใส่ไว้ในตู้อบ  $60^{\circ}\text{C}$  30 นาที เพื่อแยกน้ำและสิ่งสกปรกออกไป น้ำมันที่ตกตะกอนได้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  และ  $-20^{\circ}\text{C}$  คือน้ำมันที่มีจุดขุ่น ( cloud point ) ที่อุณหภูมิ  $6^{\circ}\text{C}$  ( RT ) ส่วนน้ำมันที่ได้จากส่วนใสที่  $-20^{\circ}\text{C}$  คือน้ำมันที่มีจุดขุ่นที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ( CP ) บันทึกปริมาตรของน้ำมัน RT และ CP
12. ตรวจสอบการแข็งตัวของน้ำมัน RT โดยการนำน้ำมัน RT ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที ที่  $8^{\circ}\text{C}$  นาน 60 นาที และตรวจสอบการแข็งตัวของน้ำมัน CP โดยการนำน้ำมัน CP ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ/นาที ที่  $-9^{\circ}\text{C}$  นาน 60 นาที
13. ส่งน้ำมัน RT และ CP อัตราส่วน 1:2 ไปวิเคราะห์คุณภาพที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ
14. คำนวณค่าสัดส่วนของน้ำมัน CP และ RT ที่ได้ ดังนี้

$$\text{ค่าสัดส่วนของน้ำมันที่ได้} = \frac{\text{ปริมาตรของน้ำมัน CP}}{\text{ปริมาตรของน้ำมัน RT}}$$

### การบันทึกข้อมูล



1. ปริมาณน้ำมัน RT และ CP
2. คุณภาพน้ำมัน RT และ CP

ข. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 1/2 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 1 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 2 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 4. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 3 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 5. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ 4 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

ค. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 1/2 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 1 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 2 ส่วน ( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 4. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 3 ส่วน( ปริมาตร : ปริมาตร )

กรรมวิธีที่ 5. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม 1 ส่วน : ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว 4 ส่วน( ปริมาตร : ปริมาตร )

### วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

### เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2560 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

## 6 การทดลองใช้น้ำมันไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์

เนื่องจากการทดลองนี้ขาดเครื่องยนต์ที่จะใช้ในการทดสอบน้ำมันกับเครื่องยนต์ และจากการสอบถามจากทางกองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตรแล้ว สรุปได้ว่า ไบโอดีเซลที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติแล้ว ไม่จำเป็นต้องทดสอบกับเครื่องยนต์ก็ได้ เพราะปตท.ได้ทำการทดสอบไว้แล้ว( ศุภชัย, 2560 <http://www.biodiesel.eng.psu.ac.th/webboard/view.php?No-133>.) ผลงานวิจัยของปตท.ที่ได้ทดสอบการใช้ไบโอดีเซลปี100 กับ เครื่องยนต์ DMAX ปี 2003 และ TOYOTA คอมมอนเรลปี 2003 มีดังนี้ อัตราการสิ้นเปลืองน้ำมันเชื้อเพลิงเพิ่มขึ้น 8-10 % อัตราการเร่งลดลง 7-10 % แต่ค่า CO ลดลง 40 % คิวตันต่ำลง 60 % และไม่มีรายงานว่าจะมีผลเสียหายต่อเครื่องยนต์ในระยะยาว ดังนั้นไบโอดีเซลที่ผลิตได้ สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้แน่นอน แต่ถ้าต้องการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันให้ใช้ได้ในสภาพอากาศหนาวเย็น และหรือเพื่อลดมลพิษ จำเป็นต้องทดสอบการตกตะกอนของน้ำมันที่อากาศเย็น เพื่อแก้ปัญหาการอุดตันของหัวฉีด ในขณะที่ใช้เครื่องยนต์หรือเมื่อต้องจอดรถทิ้งไว้นานๆ

### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ขวดดูแรน
2. หัวขนาด 50 มล.
3. ตู้เย็น 4<sup>0</sup>ซ และ -20<sup>0</sup>ซ
6. น้ำมันดีเซลเกรด1และเกรด2
7. น้ำมันไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ และ -12<sup>0</sup>ซ
8. เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง( vortex )
9. ทิปขนาด 5 มล.
10. ไมโครไปเปตขนาด 5 มล.

แบบและวิธีการทดลอง -

### วิธีปฏิบัติการทดลอง

## 1. การผลิตไบโอดีเซล

ดำเนินการผลิตไบโอดีเซล ที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  จากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง อัตราส่วน 1 : 2 ตามวิธีการการศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย จำนวน 6.5 ล.

## 2. การศึกษาการตกตะกอนของน้ำมันดีเซลที่ผสมกับไบโอดีเซล ที่มีจุดชุ่น $6^{\circ}\text{C}$ และ $-12^{\circ}\text{C}$

2.1 ทำการผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้ดีเซลเกรด1และไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.2 ทำการผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้ น้ำมันดีเซลเกรด2 และไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.3 ทำการผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้ น้ำมันดีเซลเกรด1และไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.4 ทำการผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ จำนวน 2 ชุด ชุดที่1 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ชุดที่2 นำไปตรวจสอบการตกตะกอนที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ใช้ดีเซลเกรด2และไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  เป็นตัวเปรียบเทียบ

ตรวจสอบการตกตะกอนของน้ำมันทุกวัน

## เวลาและสถานที่

ปี พ.ศ. 2560 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

## สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

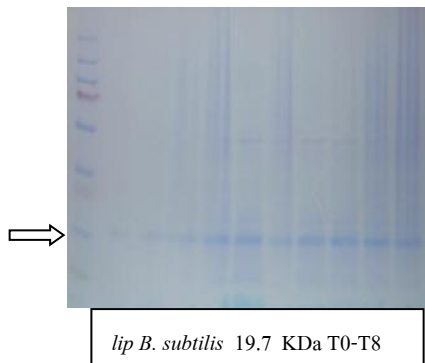
### 1 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆเช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น โดยใช้ไลเปส

#### 1.1 การศึกษาการผลิตไลเปสของแบคทีเรียในถังหมัก

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 °ซ, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> ( ปริมาณออกซิเจน ) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. หลังจาก BL21 เจริญถึง O.D.<sub>600</sub> 0.6-0.8 ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. (รูปที่1)



การผลิตไลเปสในถังหมัก



รูปที่1 การผลิตไลเปสในถังหมัก และแถบโปรตีนที่ตรวจจอบได้โดยวิธี SDS-PAGE

#### 1.2 การศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มและน้ำมันพืชต่างๆด้วยไลเปส

วิธีการกำจัดยางเหนียว ( gums or phosphatides ) โดยใช้ citric acid 1% สามารถกำจัดยางเหนียวในน้ำมันปาล์มดิบ น้ำมันสบู่ดำดิบ และน้ำมันรำข้าวดิบ ได้ผลดีมาก สูญเสียน้ำมันน้อยมาก โดยในน้ำมันปาล์มดิบเริ่มต้น 1,600 มล. จะได้ปริมาณน้ำมันใส เสียร ไม่ตกตะกอนง่าย 1,350 มล. ที่สูญหายไป 250 มล. เป็นยางเหนียว สิ่งสกปรก และไขมันอิ่มตัวที่แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง( รูปที่2 ) นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ citric acid จะไปจับกับ Ca และ Mg ในน้ำมัน กำจัดออกไปในคราวเดียวกัน( Etienne Deffense(<http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40322>) ในการศึกษาการ

ผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำโดยใช้ไลเปสให้เป็นผลสำเร็จนั้น จำเป็นต้องกำจัดยางเหนียว ไขมันอิ่มตัวที่แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และสิ่งสกปรกออกให้หมด เพื่อไม่ให้มารบกวนในขั้นตอนการผลิต และเพื่อให้ได้น้ำมันบริสุทธิ์ มีคุณภาพสูง เหตุที่เลือกใช้ citric acid 1% เพราะน่าจะปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่ากรดอื่นๆ



รูปที่2 วิธีการกำจัดยางเหนียวโดยการใช้ 1 % citric acid ซึ่งต่อมาจะทำในขวดปิดสนิท

ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว อย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3( รูปที่3 และ4 ) , 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ค่อนข้างจะได้ผลผลิตน้อย เนื่องจากในน้ำมันเหล่านี้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ปริมาณมาก และการแยกตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวออกจากสารละลาย ต้องการอุณหภูมิและความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสม ดังเช่นที่ได้ประสบมาในการทดลองนี้คือ ถ้าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2-3 กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะตกตะกอนลงมา แต่ถ้าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4-5 กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะลอยขึ้นข้างบน อยู่ที่ผิวหน้าของน้ำล้าง เมื่อการแยกตัวออกมาของกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีน้อย เป็นผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วในการกวนในขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลมีผลต่อการแยกตัวของไบโอดีเซล ซึ่งถ้าทุกอย่างเหมาะสมจะสามารถผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำได้สูงถึงร้อยละ 95 ส่วนไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว นั้น ไม่เสถียร จะตกตะกอนสีขาวลงมามากตลอดเวลาที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

### การแข็งตัวของน้ำมันที่ 4 °ซ

น้ำมันปาล์ม แข็งตัวที่ 4 °ซ ( มี melting point 42-46 °ซ, <https://www.chempro.in/fattyacid.htm> )

น้ำมันถั่วเหลือง เหลว ใส ไม่แข็งตัวที่ 4 °ซ ( มี melting point 22-27 °ซ, <https://www.chempro.in/fattyacid.htm> )

น้ำมันสบูดำ มีทั้งชนิดชั้น ไปจนถึงแข็งตัวที่ 4 °ซ ( มี melting point 31 °ซ, <https://www.chempro.in/fattyacid.htm> )

น้ำมันรำข้าว ชนิดชั้นมาก ไม่แข็งตัวที่ 4 °ซ ( มี melting point 24-28 °ซ, <https://www.chempro.in/fattyacid.htm> )

### การแข็งตัวของน้ำมันที่ -20 °ซ

น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบูดำ และน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ -20 °ซ

### การแข็งตัวของไบโอดีเซลที่ 4 °ซ

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์ม แข็งตัวที่ 4 °ซ ( มีจุดขุ่นที่ 17 °ซ และจุดไหลเทที่ 15 °ซ, Moser,2008; Vyas *et al.*,2009)

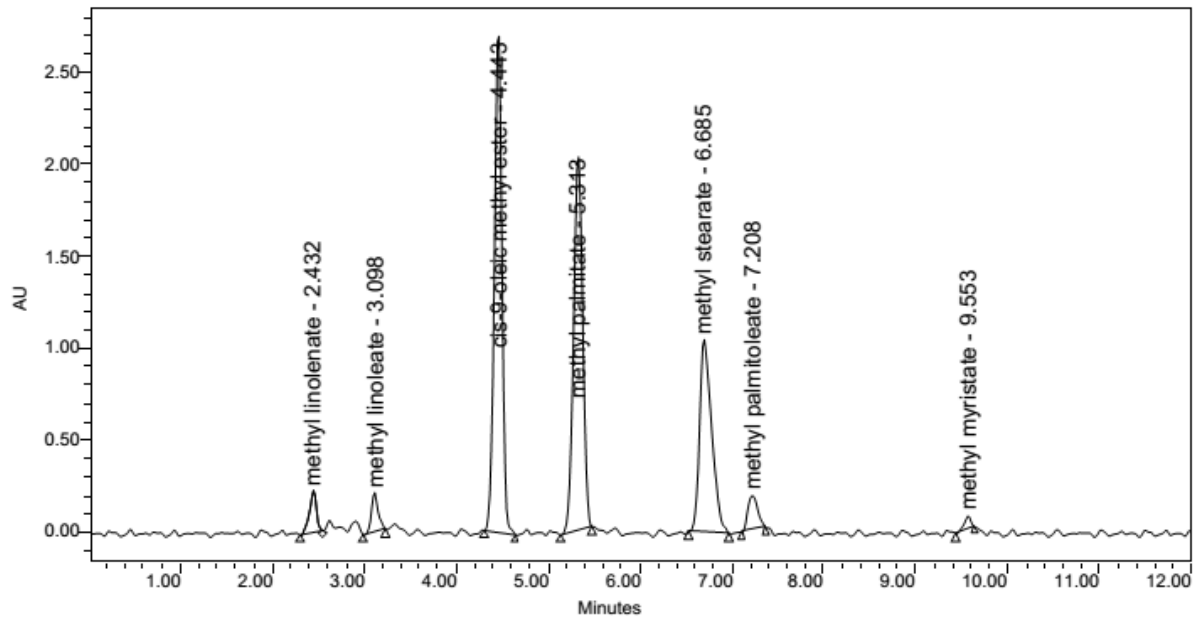
ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่ 4 °ซ มีลักษณะใส( มีจุดขุ่นที่ 1 °ซ และจุดไหลเทที่ 0 °ซ, Moser,2008; Vyas *et al.*(2009)

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบูดำ แข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่ 4 °ซ จับกันเป็นก้อน ไม่แข็งตัว มีน้ำมันใสปน( มีจุดขุ่นที่ 8 °ซ และจุดไหลเทที่ 6 °ซ, Moser,2008; Vyas *et al.*(2009)

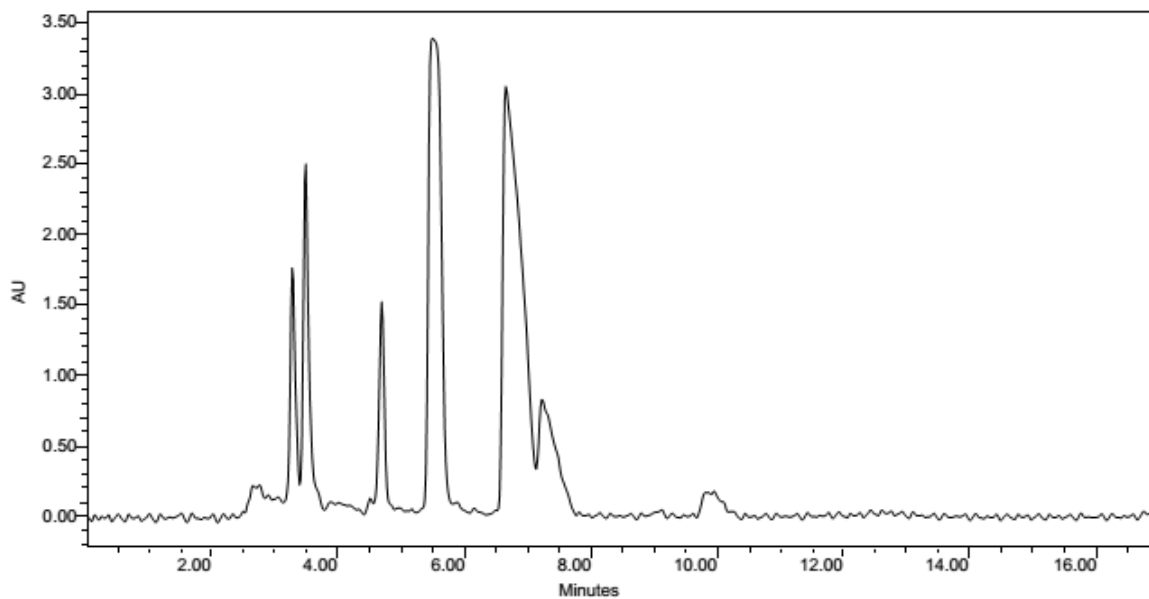
ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ 4 °ซ

### การแข็งตัวของไบโอดีเซลที่ -20 °ซ

ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชทุกชนิด แข็งตัวที่ -20 °ซ



รูปที่3 standard FAME( 2 µg/ µl )



รูปที่4 fatty acid methyl ester ที่ตรวจพบใน ไบโอดีเซลปี100ผลิตจากน้ำมันปาล์ม โดยวิธี HPLC

การแข็งตัวและไม่แข็งตัวของน้ำมันที่อุณหภูมิต่าง ๆ นั้น พบว่าขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของกรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำมันนั้นๆ โดยคุณสมบัติของกรดไขมันจะขึ้นอยู่กับความยาวของโมเลกุล (chain length) และระดับความอิ่มตัวของกรดไขมันนั้นๆ เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัว สายสั้น จะช่วยไม่ให้น้ำมันแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ กรดไขมันไม่อิ่มตัวมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายคู่ในโมเลกุล จะยังมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่ากรดไขมันแบบใดๆ ( [http://www.natuurlijkerwijs.com/english/Fatty\\_acid\\_metabolism.htm](http://www.natuurlijkerwijs.com/english/Fatty_acid_metabolism.htm) ) ถ้ามีกรดไขมันที่มีจุดหลอมเหลวต่ำและมีปริมาณมาก น้ำมันนั้นๆ จะไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ

ต่ำ( Wanasundara, *et al.*, 2005 ) กรดไขมันที่พบในน้ำมันปาล์ม และน้ำมันพืชต่าง ๆ มีดังนี้( Lukovic, *et.al*(2011)

Oil	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	Others	Ratio SFA/UFA
Almond	6,5	0,5	1,4	70,7	20			3,5	0,9	7,9/91,2
Borage	12,9	0,2	4,3	19,1	39	18,7	0,3		2	17,5/82,5
Corn	11,7		1,9	25,2	60,5	0,5	0,2			13,8/86,2
Cotton seed	28,3		0,9	13,3	57,5					29,2/70,8
Jatropha	16,4	1	6,2	37	39,2		0,2			22,8/77,2
Olive	11,8	1,5	2,7	74,1	8,5	0,7	0,4	0,3		14,9/85,1
Palm	42,6	0,3	4,4	40,5	10,1	0,2			1,9	47/51,1
Canola	3,5		0,9	64,4	22,3	8,2			0,7	4,4/94,9
Soybean	11,4		4,4	20,8	53,8	9,3	0,3			16,1/83,9
Sunflower	7,1		4,7	25,5	62,4		0,3			12,1/87,9

Table 3. Fatty acid composition for different vegetable oils (Robles-Medina *et al.*, 2007)

กรดไขมันที่พบในน้ำมันรำข้าวมีดังนี้ C14:0 [Myristic acid](#) 0.6%, C16:0 [Palmitic acid](#) 21.5%, C18:0 [Stearic acid](#) 2.9%, C18:1 [Oleic acid](#) (an [Omega 9](#) fatty acid) 38.4%, C18:2 [Linoleic acid](#) (LA, an [Omega 6](#) fatty acid) 34.4% และ C18:3 [α-Linolenic acid](#) (ALA, an [Omega 3](#) fatty acid) 2.2%( [https://en.wikipedia.org/wiki/Rice\\_bran\\_oil](https://en.wikipedia.org/wiki/Rice_bran_oil) )

## 2. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยวิธี chromatography

### 2.1 การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้สารเคมี

#### ก. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้ยูเรีย

##### น้ำมันปาล์ม

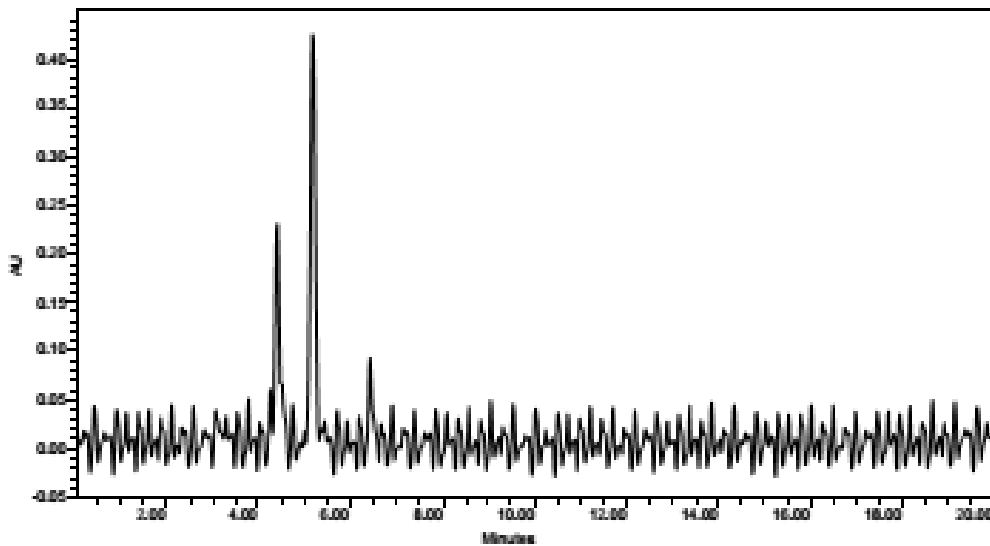
ได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ 4 °ซ 22 มล. และได้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ 1 มล. ซึ่งน้อยมากไม่เพียงพอที่จะนำไปผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำได้ การผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำต้องการกรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำในสัดส่วนที่มากพอที่จะต้านการแข็งตัวของไบโอดีเซลได้ ในทางทฤษฎียูเรียจะชอบจับกับกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันสายยาว กรดไขมันที่เป็นทรานส์ และจะว่องไวต่อพันธะคูในโมเลกุลของกรดไขมัน นอกจากนี้การจับตัวของยูเรียกับกรดไขมันจะขึ้นอยู่กับ configuration of fatty acid moieties มากกว่า จุดเดือด หรือ การละลายของกรดไขมันในตัวทำละลาย(Wanasundara *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม ยูเรียไม่สามารถแยกกรดไขมันอิ่มตัว และไม่อิ่มตัวออกจากกันได้ทั้งหมด สัดส่วนร้อยละของกรดไขมันที่ตกตะกอนและไม่ตกตะกอนด้วยยูเรีย รายงานโดย Pongket *et al.*( 2015 ) มีดังนี้

Type of fatty acids	Oil hydrolysates (%)	Non-urea complex fraction (%)	Urea complex fraction (%)
Palmitic acid (16:0)	5.63 § 0.57	1.10 § 0.46	11.62 § 1.25
Stearic acid (C18:0)	3.06 § 0.16	0.48 § 0.20	6.57 § 1.62
Oleic acid (C18:1)	47.73 § 0.25	27.91 § 3.20	53.70 § 2.60



Linoleic acid (C18:2)	43.48 § 0.12	70.07 § 3.05	27.73 § 0.76
Others	0.61 § 0.48	0.43 § 0.01	0.49 § 0.14

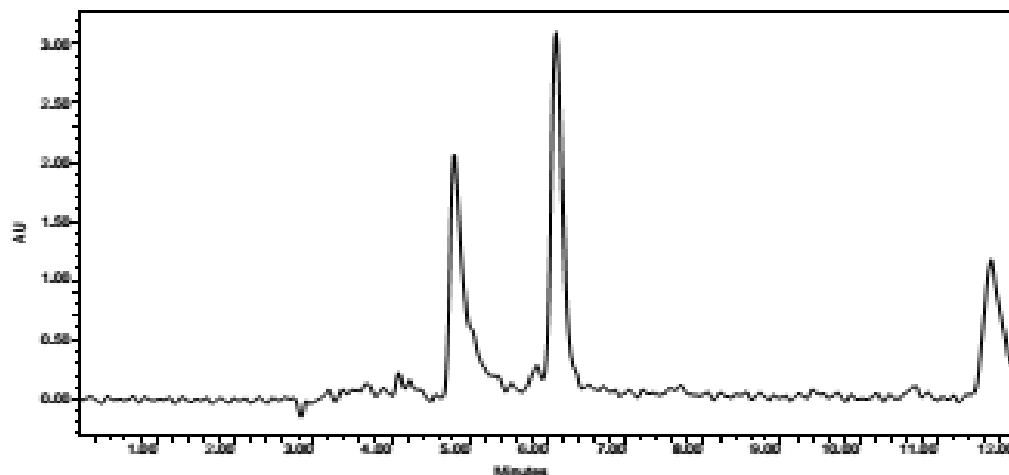
ดังนั้นจึงพอที่จะสรุปได้ว่า palmitic, stearic, oleic 18:1 *trans* และ linoleic acid ซึ่งมีอยู่ในสัดส่วนที่สูงในน้ำมันปาล์ม จะจับตัวกับยูเรีย แล้วตกตะกอนลงมามาก จึงได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ 4 °ซ เกือบทั้งหมด( รูปที่ 5 )



รูปที่ 5 กรดไขมันสีแดงในน้ำมันปาล์มที่ตกตะกอนที่ 4 °ซ มีดังนี้ cis-9 Oleic methyl ester methyl methyl palmitate, methyl stearate และอื่นๆ

### น้ำมันस्पुदा

ได้กรดไขมันอิ่มตัวแข็งตัวที่ 4 °ซ น้อย(รูปที่6 ) ได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ -20 °ซ เป็นส่วนใหญ่ และได้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ น้อยมาก



**รูปที่ 6 กรดไขมันของน้ำมันสบู่ดำที่ตกตะกอนที่ 4 °ซ มีดังนี้ methyl palmitate, methyl stearate และอื่นๆ**

เครื่อง HPLC เสีย ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบชนิดของกรดไขมันที่ปรากฏในทุกตัวอย่างได้ และการตรวจสอบด้วยวิธีการ Thin Layer Chromatography ก็ไม่สามารถกระทำได้ เนื่องจากขาดสารเคมีบางตัว เช่น silver nitrate ซึ่งมีราคาแพงและมีความเป็นพิษสูง และสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบกรดไขมัน เช่น primulin ซึ่งไม่มีจำหน่าย

**ข. การศึกษาการแยกสกัดกรดไขมันประเภทต่างที่ได้จากการย่อยด้วยไลเปสโดยใช้เมทานอล**

ได้กรดไขมันที่แข็งตัวที่ 4 °ซ เป็นส่วนใหญ่ ( รูปที่ 7 ) และได้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ น้อยมาก ( มีปริมาณแค่ติดอยู่ที่ก้นภาชนะบางๆ เมื่อระเหยเอาเมทานอลออกไป ) ซึ่งมีสาเหตุมาจาก เกิดการแข็งตัวของน้ำมันภายใน 3 ซม. ที่ -20 °ซ ทำให้กรดไขมันละลายออกมาน้อย ซึ่งถ้าพิจารณาจากจุดหลอมละลาย ( melting point ) ของกรดไขมัน จะพบว่าที่ 50 °ซ กรดไขมันที่ไม่มีการละลาย คือ Palmitic และ Stearic และที่ละลายออกมาคือ Oleic, Linoleic และ Linolenic เมื่อนำไปไว้ที่ 4 °ซ จะได้ตะกอนของกรด Palmitic, Stearic และ Oleic (<http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/551fattyacids.html> ) ส่วนที่ -20 °ซ กรดไขมันที่ยังคงละลายอยู่ในเมทานอล คือ Linolenic และ Linoleic เพราะว่าถ้าไม่มียูเรีย polyenoic compounds จะไม่ตกตะกอนลงมา ( Wanasundara *et al.*, 2005) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ เรื่อง การละลายของกรดไขมันต่างๆในสารละลายอินทรีย์ ที่อุณหภูมิต่างๆ( ก. ของกรดไขมัน/ 100 ก. สารละลาย ) ดังนี้ ในสารละลายเมทานอล palmitic และ stearic ละลายได้น้อยมาก( 1.30-0.16 และ 0.26-0.031 ตามลำดับ ) ที่ 10 ถึง -20 °ซ oleic 18:1 *cis* ละลายได้ 4.02 ที่ -20 °ซ ส่วน elaidic 18:1 *trans* ละลายได้น้อย( 0.0-0.48) ที่ 0 ถึง -20 °ซ และ linoleic 18:2 *cis* ละลายได้( 3.10 ) ที่ -50 °ซ( Wanasundara *et al.*, 2005) สรุปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

Table of Fatty Acids		
Acid Name	Structure	Melt Point
SATURATED		
Lauric	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	+44
Palmitic	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	+63
Stearic	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	+70
UNSATURATED		
Elaidic	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	+16
Linoleic	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	-5
Linolenic	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	-11
Arachi-donic	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	-50



ก.

ข.

รูปที่ 7 ก. การละลายของน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยด้วยไลเปสในเมทานอล ( น้ำมันปาล์ม 5 มล. + เมทานอล 10 มล. ) น้ำมันปาล์มละลายได้น้อย ยังคงเหลือน้ำมันเท่าเดิมคือ 5 มล. ข. การละลายของน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยด้วยไลเปสในอะซิโตน น้ำมันปาล์มละลายได้น้อย ยังคงเหลือน้ำมันเท่าเดิม

### การทดลองที่3 การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำโดยใช้กรดไขมันอัตราส่วนต่างๆ

วิธีการนี้ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่จำเป็นต่อการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดเยือกแข็งต่ำนั้นมีปริมาณน้อย สกัดได้น้อย เพราะมักจะสูญหายไปในช่วงการสกัดแต่ละขั้นตอน และมักติดกับภาชนะบรรจุ ต้องใช้สารเคมีอันตรายเช่น อะซิโตนหรือเฮกเซนชะล้างออกมา ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเทคโนโลยีสำหรับแนะนำได้ เนื่องจากสารเคมีมีราคาแพงและมีอันตรายสูงและได้ผลผลิตน้อย ในกรณีของน้ำมันสบู่ดำ ปัจจุบันเกษตรกรเลิกปลูกแล้ว จึงหาน้ำมันสบู่ดำได้ยาก นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองใช้กรดไขมันที่ไม่แข็งตัวที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ไปผลิตไบโอดีเซลเพื่อทดสอบการแข็งตัวของน้ำมันที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ผลปรากฏว่าไบโอดีเซลที่ได้สูญหายไปในช่วงขั้นตอนการล้าง เป็นน้ำขุ่นขาว ปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ต้องใช้เวลาในการทดลองเพิ่มเติมมาก ไม่สามารถดำเนินให้สำเร็จได้ในระยะเวลาอันสั้น ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องยุติการทดลอง

### การทดลองที่4 การศึกษาการแยก methyl fatty acid ester ชนิดต่างๆที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิสูง ออกจากส่วนผสมน้ำมันไบโอดีเซลโดยใช้ความเย็น( crystalization )

ผลการทดลองพบว่า

1. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มจะแข็งตัวทั้งหมดที่  $4^{\circ}\text{C}$  ไม่แยกชั้น จึงไม่สามารถแยก methyl fatty acid ester ชนิดต่างๆได้
2. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่  $4^{\circ}\text{C}$  และไม่แยกชั้น หรือ ตกตะกอนที่  $4^{\circ}\text{C}$  แต่แข็งตัวทั้งหมดที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ทำให้ไม่สามารถแยก methyl fatty acid ester ชนิดต่างๆได้

3. ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ แข็งตัวเกือบทั้งหมดที่  $4^{\circ}\text{C}$  มีส่วนใสปะปนอยู่ แต่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณทั้งหมด และแข็งตัวทั้งหมดที่  $-20^{\circ}\text{C}$

4.สรุปได้ว่า วิธีการนี้ไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองที่จะตามมา

5.จากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่าถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำจำเป็นต้องผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่ำ เช่นผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มกับไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น

6. จากค่า melting point ของ methyl ester ของกรดไขมันแต่ละชนิด([http://biorefinery.utk.edu/technical\\_reviews/BAasic%20BioDiesel%20Properties.pdf](http://biorefinery.utk.edu/technical_reviews/BAasic%20BioDiesel%20Properties.pdf)) ชี้ให้เห็นว่า ไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่  $4^{\circ}\text{C}$  จำเป็นต้องมีปริมาณ Methyl palmitate และ Methyl stearate ต่ำ ดังเช่นไบโอดีเซลที่ผลิตจากถั่วเหลือง เป็นต้น และถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวต่ำมากๆ จำเป็นต้องแยกเอา Methyl palmitate และ Methyl stearate ออกให้หมด แต่มีข้อเสียคือ จะมี Cetane number ลดลงมาก จะทำให้การสตาร์ทติดยาก และสิ้นเปลืองน้ำมัน Cetane number ของดีเซลเบอร์สองเท่ากับ 40-55

Fatty acid Methyl ester	Formula	Acronym	Molecular weight	Melting point [°C]	Cetane number
Palmitic acid Methyl palmitate	C16H32O2 C17H34O2	C16:0	256.4 270.5	63-64 30.5	--- 74.5
Stearic acid Methyl stearate	C18H36O2 C19H38O2	C18:0	184.5 198.5	70 39	--- 86.9
Oleic acid Methyl oleate	C18H34O2 C19H36O2	C18:1	282.5 296.5	16 -20	--- 47.2 - 55
Linoleic acid Methyl linoleate	C18H32O2 C19H34O2	C18:2	280.5 294.5	-5 -35	--- 28.5-42.2
Linolenic acid Methyl linolenate	C18H30O2 C19H32O2	C18:3	278.4 292.5	-11 -52/-57	--- 20.6-22.7

การทดลองที่5 การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว โดยใช้ยูเรีย

ก. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

ผลการทดลองพบว่า

1. สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดขุ่นที่  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  (รูปที่11) ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่  $11^{\circ}\text{C}$  ( มัทนาและวิภา, 2558) และได้มาตรฐานไบโอดีเซลบี100 ตามมาตรฐานสากล ปริมาณ

เมทิลเอสเทอร์ที่ต่ำกว่าค่ามาตรฐาน อาจจะมีสาเหตุมาจาก ในขั้นตอนการล้างแยกน้ำมันออกมาจากส่วนผสมของยูเรียและเมทานอลนั้น ยังมีน้ำมันไม่อิ่มตัวบางส่วนที่หลงเหลืออยู่ในน้ำล้าง ( รูปที่ 10 ) น้ำมันไม่อิ่มตัวนี้ต้องการเวลา ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการแยกตัวออกมาจากน้ำล้างมากกว่าปกติทั่วไป บางครั้งต้องใช้เวลาจนถึง 3-5 วันจึงจะแยกตัวออกมาหมด แต่เนื่องจากระยะเวลาของการทดลองมีจำกัด จึงไม่เก็บผลผลิตทั้งหมด จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ของไบโอดีเซลบี100ที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มมีค่าเท่ากับ 98.87 % ( มัทนา และวิภา, 2558; รูปที่ ) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงงานวิจัยขั้นแรก ยังต้องมีการแก้ไขปรับปรุงต่อไป

2. สาเหตุที่มีกรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเตอร์ ( มีจุดหลอมละลาย -52/-57 ) ทั้งในไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น 6<sup>0</sup>ซ และ -12<sup>0</sup>ซ นั้น พบว่าเกิดจาก ในขั้นตอนการกรองที่ดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง ( รูปที่ 4 และ 5 ) จำเป็นต้องรีบกรองเพื่อไม่ให้น้ำมันที่ตกตะกอนได้ละลายตกลงไป จึงทำให้มีส่วนใสที่ไม่ตกตะกอนที่ -20<sup>0</sup>ซ ปะปนไปมาก ซึ่งเป็นผลดี เพราะจากรายงานของ Choo Yuen *et al.*( 2009 ) พบว่า ถ้าไบโอดีเซลมี methyl oleate{ C18:1 ( >98 % purity ) มีจุดไหลเท -18 องศาเซลเซียส } และ methyl linoleate{ C18:2 ( >98 % purity ) มีจุดไหลเท -39 องศาเซลเซียส } อยู่ จะทำให้ไบโอดีเซลไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ ช่วยแก้ปัญหาการแข็งตัวของไบโอดีเซลได้ การมีกรดลิโนเลนิกเมทิลเอสเตอร์ ( มีจุดหลอมละลาย -52/-57 ) ก็ น่าจะให้ผลทำนองเดียวกัน

3. น้ำมันที่ตกตะกอนที่ -20<sup>0</sup>ซ มีมากกว่าหรือใกล้เคียงกับที่ 4<sup>0</sup>ซ

4. มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้ ( p<0.01 ) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น -12<sup>0</sup>ซ มากที่สุดคือ 1:2 ได้ไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น -12<sup>0</sup>ซ และ 6<sup>0</sup>ซ อย่างละ 1 ส่วน ( ตารางที่ 1 ) และจะใช้สัดส่วนนี้ในการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

### 5. ผลวิเคราะห์คุณภาพไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น 6<sup>0</sup>ซ มีดังนี้

รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ไบโอดีเซล		หน่วย
		น้ำมันไบโอดีเซลที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิ 6 <sup>0</sup> ซ	ASTM specification for biodeisel B100	
1. ค่าความหนาแน่น ณ. 15 <sup>0</sup> ซ ( density at 15 <sup>0</sup> ซ )	ASTMD 4052-16	879.50	860-900	กก./ลูกบาศก์เมตร
2. ความหนืดคินมาติก( จลน์) ณ. 40 <sup>0</sup> ซ ( viscosity at 40 <sup>0</sup> ซ )	ASTM D 445-17	4.370	3.5-5.0	เซนติสโตกส์ ( cSt) ( ตาราง มม./วินาที)
3. จุดชุ่น	ASTM D5771-15	6.0	Max. 18	<sup>0</sup> ซ
4. จุดวาบไฟ (flash point )	ASTM D93-16a	174.0	Min 120 Thai Min 130 USA	<sup>0</sup> ซ

5.ค่าความเป็นกรด ( acid number )	ASTM D664-11a	0.17	Max 0.50	มก. KOH/ก. น้ำมัน
6. การกัดกร่อนทองแดง ที่ 50 ° ซม. (copper strip corrosion )	ASTM D 130-12	1A	No.1 max	-
7. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ( methyl ester )	EN14103:2011	90.50	96.5	%โดยน้ำหนัก
8. กรดลิโนเลนิกเมทิล เอสเทอร์	EN14103:2011	2.1	-	-
9. เสถียรภาพต่อการเกิด ปฏิกริยา ออกซิเดชันที่110 ° ซ ( oxidation stability at 110 ° ซ )	EN15751-14	5.3	ไม่สูงกว่า 25	ซม.
10. Micro carbon residue( ถาก ถ่าน )	ASTM D 4530- 15	<0.10	Max. 0.30	% wt
11. sulphated ash( เถ้าซัลเฟต )	ASTM D 874- 13a	<0.005	Max. 0.02	% โดยน้ำหนัก
12. ปริมาณน้ำและตะกอน ( water and sediment )	ASTM D 482-13	<0.005	Max. 0.2	%vol.
13. สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด	EN12662-1998	<24		mg./kg.
14. ค่าไอโอดีน(วิจัล)	EN 14111-03	89.4	ไม่เกิน 120	กรัมไอโอดีน/ 100 กรัม

#### 6. ผลวิเคราะห์คุณภาพไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่น -12 ° ซ มีดังนี้

รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ไบโอดีเซล		หน่วย
		น้ำมันไบโอดีเซลที่ ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิ -12 °ซ	ASTM specification for biodeisel B100	
1. ค่าความหนาแน่น ณ. 15 ° ซ ( density at 15 ° ซ )	ASTMD 4052-16	884.1	860-900	กก./ลูกบาศก์ เมตร
2. ความหนืดคินเนมาติก( จลน์) ณ. 40 ° ซ (viscosity ) at 40 ° ซ	ASTM D 445-17	4.115	3.5-5.0	เซนติสโตกส์ ( cSt) ( ตาราง มม./วินาที)
3. จุดขุ่น	ASTM D5771-15	-12	Max. 18	° ซ
4. จุดวาบไฟ (flash point )	ASTM D93-16a	170.0	Min 120 Thai Min 130 USA	° ซ

5.ค่าความเป็นกรด ( acid number )	ASTM D664-11a	0.36	Max 0.50	มก. KOH/ก. น้ำมัน
6. การกัดกร่อนทองแดง ที่ 50 ° ซม. ( copper strip corrosion )	ASTM D 130-12	1A	No.1 max	-
7. ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ( methyl ester )	EN14103:2011	94.2	96.5	%โดยน้ำหนัก
8. กรดลิโนเลนิกเมทิล เอสเทอร์	EN14103:2011	3.5	-	-
9. เสถียรภาพต่อการเกิด ปฏิกริยา ออกซิเดชันที่110 °ซ ( oxidation stability at 110 °ซ )	EN15751-14	3.2	Max. 25	ซม.
10. Micro carbon residue ( กากถ่าน )	ASTM D 4530- 15	<0.10	Max. 0.30	% wt
11. sulphated ash( เถ้าซัลเฟต )	ASTM D 874- 13a	<0.005	Max. 0.02	% โดยน้ำหนัก
12. ปริมาณน้ำและตะกอน ( water and sediment )	ASTM D 482-13	<0.005	Max. 0.2	%vol.
13. สิ่งปนเปื้อนทั้งหมด	EN12662-1998	<24		mg./kg.
14. ค่าไอโอดีน(วีจล์)	EN 14111-03	128.8	ไม่เกิน 120	กรัมไอโอดีน/ 100 กรัม

ตารางที่1 ค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้จากการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่  
อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้ยูเรีย

กรรมวิธี	ranks	ค่าเฉลี่ย
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันถั่วเหลือง 1:1/2 (V:V)	4	0.778 c
2.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันถั่วเหลือง 1:1 (V:V)	5	0.758 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันถั่วเหลือง 1:2 (V:V)	1	1.012 a
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันถั่วเหลือง 1:3 (V:V)	3	0.802 c

1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันถั่วเหลือง 1:4 (V:V)	2	0.932 b
	ค่าเฉลี่ย	0.856

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

cv. = 5.5%, LSD.(  $p \leq 0.05$  ) = 0.063, LSD.(  $p \leq 0.05$  ) = 0.087



ก.



ข.

รูปที่8 ก. ตะกอนน้ำมันที่ตกได้ที่ 4 °ซ

ข. ตะกอนน้ำมันที่ตกได้ที่ -20 °ซ



ก



ข

รูปที่9 ก การกรองตะกอนน้ำมันที่แข็งตัวที่ -20 °ซ ข น้ำมันที่ไม่แข็งตัวที่ -20 °ซ





ก.



ข.

รูปที่ 10 การล้างแยกน้ำมันที่ตกตะกอนได้ที่ 4( ก ) และ  $-20^{\circ}\text{C}$  ( ข )



ก



ข

รูปที่ 11 ก ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่นที่  $6^{\circ}\text{C}$  ข ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่นที่  $-20^{\circ}\text{C}$

ข. การศึกษาการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย

มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้(  $p < 0.01$  ) และค่าสัดส่วนที่ให้ไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  มากที่สุดคือ 1:4(1.026 ) และ 1:3(0.998 ) ตามลำดับ ( ตารางที่ 2 )

**ตารางที่ 2** ค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้จากการแยก fatty acid methyl ester ที่มีจุดหลอมละลายที่อุณหภูมิสูง ออกจากไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ โดยใช้ยูเรีย

กรรมวิธี	ranks	ค่าเฉลี่ย
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 1/2 ( V : V )	3	0.798 b
2.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 1 ( V : V )	4	0.788 b
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 2 ( V : V )	5	0.710 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 3 ( V : V )	2	0.998 a
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันสบู่ดำ 1: 4 ( V : V )	1	1.026 a
	ค่าเฉลี่ย	0.864

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

cv. = 5.0%,  $LSD(p \leq 0.05) = 0.058$ ,  $LSD(p \leq 0.01) = 0.080$

ค. การศึกษาการแยก methyl fatty acid ester ในส่วนผสมของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว

มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้(  $p < 0.01$  ) และค่าสัดส่วนที่ให้ไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  มากที่สุดคือ 1:4 ได้ไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  1.8 เท่าของ  $6^{\circ}\text{C}$  ( ตารางที่ 3 )

ตารางที่3 ค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้จากการแยก methyl fatty acid ester ในส่วนผสมของน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว

กรรมวิธี	ranks	ค่าเฉลี่ย
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันรำข้าว 1: 1/2 ( V: V )	5	0.518 d
2.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันรำข้าว 1: 1 ( V: V )	4	0.880 c
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันรำข้าว 1: 2 ( V: V )	2	1.170 b
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันรำข้าว 1: 3 ( V: V )	3	1.122 b
1.ไบโอดีเซลน้ำมันปาล์ม : ไบโอดีเซลน้ำมันรำข้าว 1: 4 ( V: V )	1	1.800 a
	ค่าเฉลี่ย	1.098

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

cv = 5.2%, LSD. (p ≤ 0.05) = 0.077, LSD. (p ≤ 0.01) = 0.106

การใช้ไขมันรำข้าวดิบมาผลิตเป็นไบโอดีเซลมีข้อจำกัด คือ น้ำมันไม่อิ่มตัว ไม่ค่อยแยกตัวออกมาจากน้ำล้างและมักจะสูญเสียไปในขั้นตอนการล้าง ทำให้ได้ผลผลิตเป็นไบโอดีเซลน้อยเพียง 68.5 % นอกจากนี้ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันรำข้าว จะตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทิ้งไว้นานๆ และยังทำให้ไบโอดีเซลในอัตราส่วนผสมต่างๆ แข็งตัวในภายหลังอีกด้วย

### การทดลองที่6 การทดลองใช้น้ำมันไบโอดีเซลกับเครื่องยนต์

1. สามารถผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดชุ่น 6 °ซ และ -12 °ซ ได้ตัวอย่างละ 6.5 ล. แต่ไม่ได้ทดสอบกับเครื่องยนต์เนื่องจากไม่มีเครื่องยนต์ที่จะใช้ทดสอบ และหน่วยงานที่ให้บริการทดสอบ อยู่ในระหว่างการปรับปรุงมาตรฐานการทดสอบและเครื่องมือ

2. ดีเซลเกรด1( ปตท. พรีเมียมเกรด ) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3 วัน ที่ 2- 4 °ซ แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 °ซ และเมื่อตรวจสอบที่ 15 และ30 วัน พบว่าทั้งที่ 15 และ30 วัน ดีเซลเกรด1ตกตะกอน 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 15 และ 30 วัน( รูปที่8ก )

3. ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่ 2- 4 °ซ ในระยะเวลา 3 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่ -20 °ซ และเมื่อตรวจสอบที่ 15 และ 30 วัน พบว่า ตกตะกอนเท่าเดิม ทั้งนี้เพราะว่าดีเซล

เกรด2มีจุดขุ่นที่ -15 ถึง 5<sup>0</sup>ซ และจุดไหลเทที่ -35 ถึง -15<sup>0</sup>ซ( มงคล, 2557 ) จึงทำให้น้ำมันเป็นไขตกตะกอนลงมา( รูปที่ 8 ข)

4. ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ แข็งตัวที่ 2- 4<sup>0</sup>ซ ทันที่

5. ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น -12<sup>0</sup>ซ ใส ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่ 2- 4<sup>0</sup>ซ

6. ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ และ -12<sup>0</sup>ซ ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันที ที่ -20<sup>0</sup>ซ

7. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่าไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด1 อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ไม่ตกตะกอน ไม่จับตัวเป็นก้อนที่ 2-4<sup>0</sup>ซ ในระยะเวลา 5 วัน แต่ที่อัตรา 50:50 ตกตะกอนบางส่วนติดกันหลอดทดลองขนาด 40 มล.( หรือตกตะกอนประมาณ 5 มล. ใน 100 มล. ) ส่วนที่อัตราตั้งแต่ 60:40 ถึง 90:10 ตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนทั้งหมด และเมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ 30 วัน พบว่าที่ 15 วัน อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนเล็กน้อยพอมองเห็นได้ อัตรา 50:50 ตกตะกอนเท่าเดิม ส่วนที่ 30 วัน อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 1 มล. ใน 40 มล. อัตรา 50:50 ตกตะกอนเท่าเดิม ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 40:60 ระยะเวลาการใช้งานภายในเวลา 15 วัน

8. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่า ไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด2 อัตรา 10:90 ถึง 50:50 ไม่ตกตะกอน ไม่จับตัวเป็นก้อนที่ 2-4<sup>0</sup>ซ ในระยะเวลา 5 วัน แต่ที่อัตรา 60:40 ตกตะกอนบางส่วน ปริมาตร 7 มล. ใน 40 มล. อัตราตั้งแต่ 70 :30 ถึง 90 :10 ตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนทั้งหมด และเมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ 30 วัน พบว่า อัตรา 10:90 ถึง 50:50 ตกตะกอนมากเท่าดีเซลเกรด2 คือ 6-7 มล.ใน 40 มล. ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น 6<sup>0</sup>ซ ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา

9. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น -12<sup>0</sup>ซ กับดีเซลเกรด1 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลปี100 : ดีเซลเกรด1 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับ พบว่าที่อุณหภูมิ 2-4<sup>0</sup>ซ ในระยะเวลา 5 วัน ไม่มีการตกตะกอนในทุกอัตรา น้ำมันใส แต่เมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ 30 วัน พบว่าที่ 15 วัน อัตรา 10:90 ถึง 20:80 ตกตะกอนประมาณ 1 มล. ใน 40 มล. ส่วนอัตราอื่นๆไม่ตกตะกอน ส่วนที่ 30 วัน พบว่า อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 2.5 มล. ใน 40 มล. อัตรา 50:50 ตกตะกอนเล็กน้อยแค่ติดกันหลอดทดลอง อัตรา 60:40 ถึง 90:10 ไม่ตกตะกอน จะพบว่าในส่วนผสมยังมีไบโอดีเซลปี100มากเท่าไร น้ำมันจะใส ไม่ตกตะกอน ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล สรุปได้ว่า อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น -12<sup>0</sup>ซ ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน

10. ผลการทดลอง การผสมไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดชุน  $-12^{\circ}\text{C}$  กับดีเซลเกรด2 ในอัตราส่วนไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 ตามลำดับพบว่าที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ในระยะเวลา 5 วัน ไบโอดีเซลบี100 : ดีเซลเกรด2 ที่อัตรา 10:90 ถึง 50:50 น้ำมันผสมเริ่มชุนแต่ไม่ตกตะกอน ส่วนอัตรา 60:40 ถึง 90:10 น้ำมันใส ไม่ตกตะกอน แต่เมื่อตรวจสอบการตกตะกอนที่ 15 และ30 วัน พบว่าที่ 15 วัน อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. และอัตรา 50:50 และ 60:40 ตกตะกอนเล็กน้อยแค่เห็นติดอยู่กันตลอดทดลองประมาณ 0.2 มล. ใน 40 มล. ส่วนอัตราอื่นๆใส ไม่ตกตะกอน ส่วนที่ 30 วัน พบว่า อัตรา 10:90 ถึง 40:60 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. อัตรา 50:50 ถึง 60:40 ตกตะกอนประมาณ 2.5 มล. ใน 40 มล. อัตรา 70:30 ตกตะกอนประมาณ 1 มล. ใน 40 มล. อัตรา 80:20 ถึง 90:10 ใส ไม่ตกตะกอน ตะกอนที่ตกลงมาคือตะกอนของดีเซล ( รูปที่8ค ) สรุปได้ว่าอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดชุน  $-12^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะเวลาใช้งาน 30 วัน

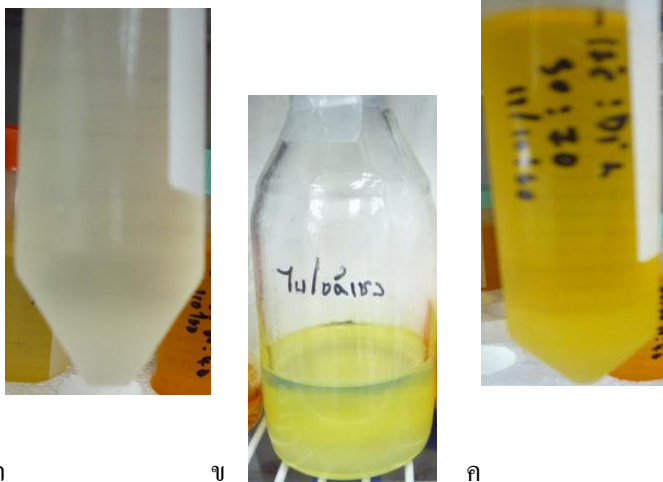
11. ไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดชุน  $-12^{\circ}\text{C}$  และ  $6^{\circ}\text{C}$  มีค่าความหนืดอยู่ที่ 4.115 และ 4.370 เซนติสโตกส์ ( cSt ) ( ตาราง มม./วินาที ) อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน 3.5-5.0 เซนติสโตกส์ ( cSt ) ( ตาราง มม./วินาที ) จึงไม่มีผลต่อระบบหัวฉีดและการก่อตัวของคราบยางเหนียวที่หัวฉีด

12. ผลการวิเคราะห์คุณภาพของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดชุน  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  มีค่า Micro carbon residue( กากถ่าน ) , sulphated ash( เถ้าซัลเฟต ) ปริมาณน้ำและตะกอน ( water and sediment ) และสิ่งปนเปื้อนทั้งหมด มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานมาก บ่งชี้ว่า ไบโอดีเซลที่ผลิตได้นี้ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมสามารถใช้กับเครื่องยนต์ได้โดยไม่ไปผลเสียต่อระบบเชื้อเพลิง ปั๊มน้ำมันและไส้กรองและสภาพแวดล้อม และไม่ก่อให้เกิดภาวะฝนกรด( มีค่าเถ้าซัลเฟต น้อยกว่า 0.005 โดยค่ามาตรฐานอยู่ที่ไม่เกิน 0.2 ) และสามารถใช้ในสภาพที่มีอากาศเย็นได้ อย่างไรก็ดีตามมลพิษที่เกิดจากค่าออกไซด์ของไนโตรเจนจำเป็นต้องตรวจวัดต่อไป

13.ค่าไอโอดีน(วีจล์)ของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดชุน  $-12^{\circ}\text{C}$  ค่อนข้างสูง 128.8 กรัมไอโอดีน/100 กรัม (ไม่เกิน 120 ) ทำให้ไบโอดีเซลที่ได้ ค่อนข้างง่ายต่อการถูกออกซิไดซ์เมื่อสัมผัสอากาศ และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิสูง ทำให้ไบโอดีเซลเสื่อมสภาพเป็นสารเหนียว ดังนั้นการป้องกันอาจทำได้โดยการเก็บน้ำมันไว้ในที่ที่ไม่สัมผัสกับออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระอื่นๆ และเก็บในที่ที่เย็นและไม่มีแสงผ่าน แต่เท่าที่ตรวจสอบการเสื่อมสภาพเป็นสารเหนียวของไบโอดีเซลบี100 ที่มีจุดชุน  $-12^{\circ}\text{C}$  ที่อุณหภูมิห้อง  $28-30^{\circ}\text{C}$  ในสภาพปิดฝาสนิท ในขวดแก้วใส เป็นเวลา 8 เดือน ไบโอดีเซลยังคงมีสภาพปกติเหมือนเดิม คือ ใส ไม่เหนียว ไม่ตกตะกอน Leung *et al* ( 2006 , กรดไขมันอิสระ [digi.library.tu.ac.th/thesis/en/0232/10CHAPTER\\_2.pdf](http://digi.library.tu.ac.th/thesis/en/0232/10CHAPTER_2.pdf) ) ได้ศึกษาคุณภาพน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันเมล็ดเรป และการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิและสภาวะที่แตกต่างกัน เช่นที่อุณหภูมิห้องและที่  $40^{\circ}\text{C}$  ในภาชนะปิดสนิท หรือในสภาพที่สัมผัสกับอากาศ หรือในสภาพที่มีหรือไม่มีควมชื้น ผลการทดลองพบว่า ถ้าอุณหภูมิการเก็บรักษาที่สูงประกอบกับสภาวะที่สัมผัสกับอากาศ ยิ่งทำให้อัตราการเสื่อมสภาพของน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น แต่อุณหภูมิหรือการสัมผัสกับอากาศอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ส่งผลน้อยมากต่อการเสื่อมสภาพของน้ำมัน แต่ บอดและคณะ( 2007 )( กรดไขมันอิสระ [digi.library.tu.ac.th/thesis/en/0232/10CHAPTER\\_2.pdf](http://digi.library.tu.ac.th/thesis/en/0232/10CHAPTER_2.pdf) ) รายงานว่า ในช่วงระยะเวลา 0-12 เดือน ไม่พบการ

เปลี่ยนแปลงมากนัก ระหว่างตัวอย่างที่ทำการเก็บรักษาในสภาพที่มีแสงผ่านกับไม่มีแสงผ่าน แต่หลังจากนั้น การเปลี่ยนแปลงก็สังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

14. การทดลองนี้ไม่ได้รายงานค่าซีเทน(ค่าที่บ่งบอกถึงความสามารถในการจุดติดไฟของน้ำมันไบโอดีเซล ) และค่าอื่นๆ เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่ให้บริการตรวจวิเคราะห์อยู่ในระหว่างการปรับปรุง หรือหยุดให้บริการตรวจวิเคราะห์ แต่หากเทียบเคียงผลวิเคราะห์กับผลงานวิจัยที่ผ่านมา มีค่าใกล้เคียงกัน



รูปที่ 12 ก ตะกอนดีเซลที่ตกลงมาในน้ำมันดีเซลเกรด1 ข ตะกอนดีเซลที่ตกลงมาในน้ำมันดีเซลเกรด2 ค ตะกอนดีเซลที่ตกลงมาในน้ำมันผสมไบโอดีเซลและดีเซล

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สามารถผลิตไบโอดีเซลในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 °C, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> ( ปริมาณออกซิเจน ) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3, 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ น้ำมันปาล์ม แข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันถั่วเหลือง เหลว ใส ไม่แข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันสบู่ดำ มีทั้งหนืดข้น ไปจนถึงแข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันรำข้าว หนืดข้นมาก ไม่แข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสบู่ดำ และน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ -20 °C ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ 4 °C ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่ 4 °C มีลักษณะใส ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสบู่ดำ แข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่ 4 °C จับกัน

เป็นก้อน ไม่แข็งตัว มีน้ำมันใสปน ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชทุกชนิด แข็งตัวที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ จำเป็นต้องผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าใช้น้ำมันพืชเดี่ยวจะได้ผลผลิตน้อย ยากต่อการปฏิบัติ และคุณสมบัติของไบโอดีเซลอาจจะไม่ได้ตามมาตรฐาน สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดขุ่นที่  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่  $11^{\circ}\text{C}$  และได้มาตรฐานไบโอดีเซลปี100 ตามมาตรฐานสากล มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้ ( $p < 0.01$ ) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ และ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว ที่มีจุดขุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  มากที่สุดคือ 1:2, 1:4 และ 1:3, 1:4 ตามลำดับ ดีเซลเกรด1( ปตท. พรีเมียมเกรด ) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน ที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  แต่แข็งตัวทันทีที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  แข็งตัวที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  ใส ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดขุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันทีที่  $-20^{\circ}\text{C}$  อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดขุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน

### 11.การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ไบโอดีเซลที่ได้ สามารถนำไปใช้กับเครื่องจักรกลการเกษตร และเครื่องยนต์ดีเซลทั่วไป ในสภาพอากาศเย็นและสภาพอากาศปกติ และสามารถลดมลพิษได้ ซึ่งถ้าดีเซลไม่ตกตะกอนลงมาก่อน จะสามารถเพิ่มอัตราส่วนของไบโอดีเซลและระยะเวลาการใช้งานได้มากกว่าที่ได้รายงานไว้
2. สามารถนำกรรมวิธีการผลิตไปเผยแพร่ให้กับกลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจ เพราะเป็นกรรมวิธีที่ง่ายประหยัด

## เอกสารอ้างอิง

- กัญญา บุญเกียรติ. 2544 . ไบโอดีเซล : พลังงานทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซล ว. *วิทยาศาสตร์*. 148-152.
- นิรนาม. 2559 . อวสานรถดีเซล. หนังสือพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ. 36(3).197.
- มัทนา และวิภา, 2558. การศึกษาไลเปสของราและแบคทีเรีย และการใช้ประโยชน์ในการผลิตไบโอดีเซล.ใน: รายงานโครงการวิจัยที่สิ้นสุดปี 2558.สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.
- มงคล สมประสิทธิ์. 2557. การทดสอบไบโอดีเซลที่ทำจากน้ำมันพืชใช้แล้วในเครื่องยนต์คอมมอนเรล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกล. คณะ วิศวกรรมศาสตร์. ม.เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. 113 น.
- วัชรระ เกื่อนถ้ำ และ พัทรินทร์ ระวียัน. 2014. สภาวะในการกำจัดยางเหนียวต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของ น้ำมันปาล์ม. GRC Graduate Research Conference 2514. Khon kaen University. 798-803.
- Choo Yuen, M., F. Cheng Sit, L. Yung Chee, N. Harrison Lau Nik, N. Ma Ah and B. Yusof. 2009. Palm diesel with low pour point for cold climate countries. US Patent 20090199463.
- Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipase. *Enz. Microb. Tech.* 39( 2 ) : 235-251.
- Jensen, R.G. 1983. Detection and determination of lipase (acyl glycerol hydrolase) activity from various source. *Lipids* 18(9): 650-657.
- Luković, N., Z. Knežević-Jugović and D. Bezbradica (2011). Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives, *Alternative Fuel*. M. Manzanera (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/21905. <https://www.intechopen.com/books/alternative-fuel/biodiesel-fuel-production-by-enzymatic-transesterification-of-oils-recent-trends-challenges-and-futu>
- Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 61(6): 1067-1071.
- Moser, B. R. 2008. Influence of blending canola, palm, soybean and sunflower oil methyl esters on fuel properties of biodiesel. *Ener. & Fuels*. 22(6) : 4301-4306.
- Nagao, T., Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga. 2002. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. *J. Molec. Catal. B: Enz.* 17( 3-5 ) : 125-132.
- Pongket, U., W. Piyatheerawong, S. Thapphasaraphong and A. H-Kittikune. 2015. Enzymatic preparation of linoleic acid from sunflower oil: an experimental design approach. *Bio. & Biotech. Equip.* 29( 5 ) : 926-934.



- Royon, D., M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresource tech.* 98( 3 ) : 648-653.
- Vyas, A. P., N. Subrahmanyam and P. A. Patel. 2009. Production of biodiesel through transesterification of Jatropha oil using KNO<sub>3</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solid catalyst. *Fuel.* 88(4) :625-628.
- Wanasundara, U. N., P. K. J. P. D. Wanasundara, and F. Shahidi. 2005. Novel separation techniques for isolation and purification of fatty acids and oil by-products. pp.585-621. F. Shahidi.( ed.) *Bailey's industrial oil and fat products.* 6<sup>th</sup>. Six volume set.

## กิจกรรมงานวิจัยที่ 4

การพัฒนาเครื่องจักรกลในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนจากพืชชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ  
ในระดับชุมชน

การทดลองที่ 4.1 การพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวลในระดับชุมชน

Development of centrifugal separator for Algae Biomass

ผู้วิจัย นายวุฒิพล จันทร์สระคู<sup>2</sup> นายพินิจ จิรคคกุล<sup>2</sup> นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล<sup>1</sup>  
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ<sup>1</sup> นายประยูร เอ็นมาก<sup>3</sup>

คำสำคัญ สาหร่าย ชีวมวล แยกตะกอน ปั่นเหวี่ยง

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อวิจัยและพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวลในระดับชุมชน โดยดำเนินการออกแบบและสร้างเครื่องมือต้นแบบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนระดับชุมชน เปรียบเทียบกับวิธีการแยกตะกอนสาหร่ายด้วยวิธีปฏิบัติของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเพาะเลี้ยงคอนกรีตเคลือบไฟเบอร์กลาส ในกระบวนการทดลองนี้ทำการแปรผันความเร็วรอบและระยะเวลาของการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 3,000, 4,000 และ 5,000 รอบต่อนาที และระยะเวลาที่ใช้ปั่น 5, 10 และ 15 นาที แล้วเก็บตัวอย่างของเหลวที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วมาใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงในห้องปฏิบัติการ พบว่าที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณเซลล์ที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงน้อยที่สุดคือ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้ จะนำไปใช้ในการพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงในระดับขยายขนาดต่อไป

### abstract

This research aims to research and develop centrifugal biomass centrifugal centrifuge at the community level. Design and build prototype tools for use for community renewable energy production. Comparison of seaweed cultures methods of practices of algae cultured farmers in fiberglass reinforced concrete ponds. In this experiment, the speed and duration of centrifugation was varied from 3,000, 4,000 and 5,000 revolutions per minute, and the spin speed was 5, 10 and 15 minutes, record data the sample of the centrifuge tube. Then separate the sediment by centrifugation in a laboratory. Found that a speed of around 5,000 rpm at 10 minutes, it is the most efficient way to harvest the cells. The smallest residue from

centrifugation was 0.23 mg/L. This preliminary information will be used to develop the centrifuge in the next scale.

---

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ<sup>1</sup>

ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น<sup>2</sup>

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร<sup>3</sup>

## บทนำ

แผนพัฒนาและส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทน ระหว่างปี 2555-2564 มีแผนที่จะให้มีการใช้พลังงานทดแทนเป็นสัดส่วน 20% ของพลังงานทั้งหมด การวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนเป็นการศึกษา ค้นคว้า ทดสอบ พัฒนา และสาธิต ตลอดจนส่งเสริม และเผยแพร่พลังงานทดแทน ซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาดไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น พลังงานลม แสงอาทิตย์ ชีวมวล และอื่นๆ เพื่อให้มีการผลิต และการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย มีประสิทธิภาพ และมีความเหมาะสมทั้งทางด้านเทคนิค เศรษฐกิจ และสังคม พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หลายประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน จากแนวโน้มความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และวิกฤติราคาน้ำมันแพงที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจทั่วโลกในขณะนี้ น้ำมันเชื้อเพลิงจากพืชสำหรับใช้เป็นพืชน้ำมันอีกประเภทหนึ่งที่มีศักยภาพสูงของโลกในอนาคต นอกจากนี้การผลิตพลังงานทดแทนจากสาหร่ายกำลังเป็นที่น่าสนใจ ช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศโดยใช้กระบวนการสังเคราะห์แสง ทั้งสาหร่ายขนาดเล็กและขนาดใหญ่เหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นชีวมวล และที่สำคัญสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มยูคาริโอตจะมีแหล่งเก็บพลังงานได้สูงมาก เช่น triacylglycerol (TAG) ซึ่งเป็นแหล่งเก็บน้ำมัน และแป้ง (starch) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuels) ทั้งไบโอดีเซล และไบโอเอทานอล จากงานวิจัยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้มีการศึกษา และวิจัยเรื่องการผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ในปี พ.ศ.2556-2558 ได้แก่ การคัดเลือกพืช และชีวมวลที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอล การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส เครื่องมือแปรรูปชีวมวลในกระบวนการย่อยสลายชีวมวล เครื่องจักรกลในกระบวนการหมัก และเครื่องกลั่นในการผลิตเอทานอลจากชีวมวล ซึ่งแต่ละขั้นตอนดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่ง แต่ยังคงขาดเครื่องจักรที่ทำให้ขั้นตอนการผลิตเป็นพลังงานทดแทนมีประสิทธิภาพได้รวดเร็วยิ่งขึ้น จึงได้มีการพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวล ซึ่งสาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วเหมาะแก่การนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นไบโอเอทานอล และไบโอดีเซล แต่การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายชีวมวลที่ได้จากการเลี้ยงเป็นปัญหาที่สำคัญมาก โดยทั่วไปเก็บเซลล์สาหร่ายโดยใช้วิธีการกรองและการตกตะกอน แต่ทำได้ในปริมาณน้อยๆ และใช้เวลานาน ในโครงการนี้จึงได้พัฒนาเครื่องมือช่วยให้สาหร่ายตกตะกอนได้รวดเร็ว

และได้ปริมาณครั้งละมากๆ อีกทั้งใช้เวลาในการเก็บเซลล์ไม่นาน ก็สามารถได้สาหร่ายชีวมวลไปใช้ในกระบวนการผลิตเป็นพลังงานทดแทนได้ต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถต่อยอดและขยายผลงานวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการนำส่งเทคโนโลยีการผลิตพลังงานทดแทนจากพืชชีวมวลสู่ชุมชนต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย คือ เพื่อวิจัยและพัฒนาเครื่องปั้นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวลในระดับชุมชน

การผลิตเอทานอลจากชีวมวล เป็นกระบวนการซึ่งเกิดจากการหมักพืช เศษซากพืช ให้เป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อทำให้บริสุทธิ์ 95% จะเรียกว่า “เอทานอล” โดยการผลิตเอทานอลจากกลีโคเซลลูโลส แบ่งขั้นตอนการผลิตออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ การปรับสภาพวัตถุดิบ การย่อยหรือไฮโดรไลซิสและการผลิตเอทานอล แม้ว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลในปัจจุบันจะใช้แป้งและน้ำตาลเป็นหลัก เช่น มันสำปะหลัง กากน้ำตาล แป้งข้าวโพด มันสำปะหลังเส้นตากแห้ง แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น กระบวนการผลิตเอทานอลที่ผลิตได้จากเซลลูโลส เป็นเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกไม้ หรือจากต้นพืชที่ไม่เกี่ยวข้องกัพืชที่มนุษย์บริโภค ได้แก่ ต้นเลา หญ้าเนเปียร์ (ไกรลาส และคณะ, 2556) ข้าวฟ่างหวาน สาหร่าย สปูด้า อ้อยพลังงาน (อรพิมพ์, 2553) วัตถุดิบดังกล่าวประกอบไปด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส และเรียกว่วัตถุดิบประเภทนี้ว่า วัสดุกลีโคเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของพืช ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสจึงมีคุณสมบัติและลักษณะทางเคมีเช่นเดียวกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งที่ได้จากอ้อยหรือมันสำปะหลัง

**ตารางที่ 1** เปรียบเทียบศักยภาพในการผลิตชีวมวล ปริมาณน้ำมันสะสม และพลังงานเชื้อเพลิงระหว่างพืช น้ำมันชนิดต่างและสาหร่ายขนาดเล็ก

ชนิดของพืชน้ำมัน	ชีวมวล (เมตริกตัน/เฮกตาร์/ปี)	ปริมาณน้ำมัน (% น้ำหนักแห้ง)	ไบโอดีเซล (เมตริกตัน/เฮกตาร์/ปี)
ถั่วเหลือง	1-2.5	20%	0.2-0.5
เมล็ดเรพ	3	40%	1.2
ปาล์มน้ำมัน	19	20%	3.7
สปูด้า	7.5-10	30-50%	2.2-5.3
สาหร่ายขนาดเล็ก	140-255	35-65%	50-100

ที่มา : สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง, 2557

สาหร่ายขนาดเล็กมีศักยภาพในการให้น้ำมันได้ในปริมาณสูง เนื่องจากมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ ระยะเวลาการเพาะปลูกกับพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ ดังแสดงใน

ตารางที่ 1 แล้ว หากสามารถนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิงทดแทนได้ย่อมสามารถลดการเกิดปัญหาในการแย่งส่วนแบ่งทางอาหารหรือเกษตรกรรมจากพืชน้ำมันทั่วไปได้

ดวงรัตน์ (มปป) ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวสาหร่ายนี้มีความสำคัญมากเพราะเกี่ยวกับต้นทุนในการผลิต ซึ่งความเข้มข้นของสาหร่ายจะไม่เกิน 500 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนมากจะอยู่ระหว่าง 200-300 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจะมีเทคนิคที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายต่างๆ ในที่นี้ จะกล่าวถึงเทคนิคที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ

การกรอง (filtration) วิธีการกรองนี้ เหมาะสำหรับสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous) หรือมีเซลล์ขนาดใหญ่ เช่น สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina* sp) จะทำโดยใช้ผ้ากรองไนลอน (nylon sieve) ที่มีรูให้กรองผ่านตามขนาดที่เหมาะสม ซึ่งวิธีการนี้ใช้ได้ผลดี สะดวก และมีราคาถูก

การปั่นแยก (centrifugation) เทคนิคนี้ใช้กันมากในการแยกสาหร่ายที่มีขนาดเซลล์เล็ก เช่น คลอเรลลา (*Chlorella* sp.) วิธีการนี้ทำให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูงเนื่องจากต้องใช้พลังงานในการแยก

การทำให้เกิดฟลอค และการตกตะกอน (flocculation and sedimentation) ซึ่งการใช้เทคนิคนี้ส่วนใหญ่จะใช้ในการแยกเซลล์สาหร่ายจากระบบบำบัดน้ำเสีย

การเก็บเกี่ยวสาหร่ายทำได้หลายวิธีโดยใช้เครื่องมือและวิธีการต่าง ๆ ตามแต่ชนิดของสาหร่ายเช่น เครื่องเหวี่ยง การตกตะกอน การกรอง ซึ่งวิธีการปั่นเหวี่ยงไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาด เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้นจึงมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ เช่น การนำเทคนิคต่างๆ มาประยุกต์ใช้ร่วมกัน เช่น การตกตะกอน (Flocculation) การชะน้ำออก (Dewatering) และการทำแห้ง (Drying) (สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. 2557)

การนำสาหร่ายขนาดเล็กมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซลนั้นไม่ใช่เพียงแค่น้ำมันของสาหร่ายมีปริมาณน้ำมันมากพอที่จะสกัดน้ำมาใช้ประโยชน์เท่านั้น สาหร่ายยังมีศักยภาพที่น่าสนใจหลายประการ ได้แก่ สาหร่ายเพาะเลี้ยงได้ง่าย สามารถเจริญเติบโตดีทั้งในน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำกร่อย แม้กระทั่งน้ำเสีย เติบโตได้ในทุกพื้นที่ที่มีแสงแดด ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตสั้น (ประมาณ 8-14 วัน) ก็สามารถเก็บเกี่ยวมาใช้ประโยชน์ได้ ในขณะที่พืชพลังงานชนิดอื่นๆ ต้องใช้ระยะเวลาในการเติบโตมากกว่า นอกจากนี้ยังแก้ไขปัญหาในเรื่องของการนำพืชอาหาร เช่น ปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง มาแปรรูปเป็นพืชพลังงาน ซึ่งถูกต่อต้านว่าการนำพืชอาหารมาใช้เป็นพืชพลังงานจะส่งผลกระทบต่อฐานอาหารของมนุษย์ และจะทำให้วัตถุดิบมีราคาสูงขึ้น จนทำให้เกิดการแย่งชิงวัตถุดิบในที่สุดเนื่องจากอาหารก็เป็นสิ่งจำเป็น ส่วนพลังงานก็เป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้สำหรับมนุษย์เช่นกัน สาหร่ายขนาดเล็กจะใช้พื้นที่ในการเพาะปลูกเพียง 2 ล้านเฮกเตอร์ โดยสามารถผลิตน้ำมันได้ปริมาณ 136,900 ลิตรต่อเฮกเตอร์ เพื่อที่จะให้ได้ 3 น้ำมันไบโอดีเซลเพียงพอที่จะทดแทน 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อการขนส่งของประเทศสหรัฐอเมริกา โดยคิดเป็น 1.1 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะปลูกทั้งหมดของประเทศสหรัฐอเมริกา (Chisti, 2007) ปัญหาและอุปสรรคที่อุตสาหกรรมสาหร่ายขนาดเล็กกำลังเผชิญอยู่นั้นคือ ขั้นตอนในการเก็บเกี่ยวสาหร่ายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากขนาดเล็กมากในระดับไมโครเมตร (5-50 ไมโครเมตร) จึงทำให้การแยกสาหร่ายออกจากน้ำเป็นไปได้ยากมาก ซึ่งนั่นจึงเป็นเหตุผลหลักที่การผลิตสาหร่ายตลอดหลายปีที่ผ่านมาไม่พัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมขนาดใหญ่ในเชิงพาณิชย์ได้ (อาภารัตน์, 2552)

เครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นเครื่องมือพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับเร่งอัตราการตกตะกอนของอนุภาค (particle) ที่ไม่ละลายออกจากของเหลว หรือใช้แยกของเหลวหลาย ๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) ต่างกันออกจากกัน ใช้ทำสารละลายให้เข้มข้นขึ้น ฯลฯ ปัจจุบันเครื่องหมุนเหวี่ยง ได้มีการพัฒนาไปจนสามารถที่จะใช้วิเคราะห์ชนิดของสารหาน้ำหนักโมเลกุลของสารได้โดยอาศัยคุณสมบัติของตัวกลาง คุณสมบัติของอนุภาคที่แตกต่างกัน และการสร้างแรงหนีศูนย์กลาง ที่เกิดจากการหมุนรอบจุดหมุน (center of rotation) ในความเร็วรอบที่สูงมาก (ชูชาติ, 2534)

เครื่องหมุนเหวี่ยงสร้างแรงหนีศูนย์กลางหรือแรงหมุนเหวี่ยง (centrifugal force ,CF) ขึ้นเพื่อเร่งให้อนุภาคตกตะกอนเร็วขึ้น ดังนั้นภายใต้สนามของแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแรงนอนก้นของอนุภาคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับแรงหนีศูนย์กลาง ทำให้อนุภาคนอนก้นด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ภายใต้สนามแรงหนีศูนย์กลางอนุภาคจะตกตะกอนด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน การปั่นแยกตะกอน จึงต้องใช้เวลาให้นานพอเพียงที่อนุภาคขนาดเล็กจะนอนก้นหมด จนกลายเป็นก้อนตะกอน (pellet) และของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) จึงนิยมใช้วิธีนี้สำหรับการปั่นแยกตะกอนทั้งหมดออกจากของเหลว แต่สามารถประยุกต์ไปใช้สำหรับแยกสารแต่ละชนิดออกจากกัน โดยการกำหนดความแรงในการปั่นแยก และระยะเวลาในการปั่นแยกที่เหมาะสม เพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออกก่อน แล้วจึงนำของเหลวเหนือตะกอนไปปั่นแยกอีกโดยอาจเพิ่มเวลาหรือความแรงในการปั่นแยก

เครื่องหมุนเหวี่ยงมีรูปแบบแตกต่างกันมีทั้งขนาดเล็ก ขนาดปานกลางที่สามารถตั้งบนโต๊ะได้ (bench model) ตลอดจนขนาดใหญ่ที่สามารถหมุนเหวี่ยงสารละลายได้ครั้งละมากๆ ซึ่งต้องตั้งบนพื้นในขณะใช้งาน (floor model) แต่ด้วยเทคโนโลยีการผลิตทำให้ขีดความสามารถไม่ได้เพิ่มมากขึ้นตามขนาดของเครื่องหมุนเหวี่ยง ดังนั้นการแบ่งชนิดที่ค่อนข้างชัดเจนจึงแบ่งตามแรงหนีศูนย์กลางออกได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้ (ชูชาติ, 2534)

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำ (low speed centrifuge) เป็นเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็กเป็นส่วนใหญ่นิยมใช้ในงานทั่วไปในห้องปฏิบัติการมีความเร็วรอบไม่เกิน 6,000 รอบต่อนาที มีแรงหนีศูนย์กลางสูงสุดในช่วง 1,800-7,000 กรัม

2. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (high speed centrifuge) มีความเร็วรอบไม่เกิน 28,000 รอบต่อนาที มีแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางสูงสุดถึง 80,000 กรัม จึงนิยมใช้เฉพาะงานที่ต้องการความแรงในการปั่นแยกปานกลาง ตัวอย่าง เช่น การแยกอนุภาคขนาดเล็กๆ หรือมีน้ำหนักเบาออกจากของเหลว ฯลฯ

3. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงมาก (ultra-speed centrifuge) เป็นเครื่องหมุนเหวี่ยงที่มีขนาดใหญ่ที่มีความเร็วรอบของการหมุนสูงถึง 150,000 รอบต่อนาที สามารถสร้างแรงหนีศูนย์กลางได้สูงถึง 800,000 กรัม บริษัท Spinco ผลิตเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดนี้ออกมาจำหน่ายตั้งแต่ปี ค.ศ.1950

ยุวดี พิรพรพิศาล จากห้องปฏิบัติการวิจัยสาขาวิจัยประยุกต์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าเซลล์ของสาหร่ายมีกรดไขมันค่อนข้างสูง โดยทั่วไปจะมีราว 20% แต่บางชนิด อาจมีถึง 60-70% ถ้าเลี้ยงเป็นปริมาณมากๆ แล้วนำมาผ่านกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า เอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) ก็จะได้ไบโอดีเซล ซึ่งใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงเติมรถยนต์ได้เลย หรือใช้

กระบวนการไพโรไลซิส (Pyrolysis) ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ความร้อนในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งในที่สุดก็จะได้น้ำมันก็ออกมาเช่นกัน นอกจากนี้ก็ยังมีกระบวนการอื่นๆ อีกหลายอย่างที่สามารถเปลี่ยนชีวมวลของสาหร่ายเป็นน้ำมันได้ โดยเฉลี่ยสาหร่ายสามารถสกัดไปเป็นน้ำมันได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับว่าในบ่อพื้นที่ 1,000 ตารางเมตรก็จะได้น้ำมัน 25 กิโลกรัม/วัน ใน 1 ปีก็จะสามารถผลิตน้ำมันได้ 9,125 กิโลกรัมหรือประมาณ 7,600 ลิตร ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์การผลิตน้ำมันได้มากกว่าพืชชนิดอื่นๆ เช่น คาโนลา สบู่ดำ ยิ่งกว่านั้นนักวิจัยของ NREL ยังระบุว่าหากพัฒนาการเพาะเลี้ยงและการสกัดน้ำมันจากสาหร่าย แบบโรงงานขนาดใหญ่ ต้นทุนในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจะมีเพียงลิตรละ 12 บาท เท่านั้น (กมลวรรณ, มปป.)

มัทนา (2555) กล่าวไว้ว่า น้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์ (Virgin cold-pressed coconut oil, VCO) ประกอบด้วย กรดไขมันสาย ปานกลาง (medium-chain fatty acids) ที่อิ่มตัวในปริมาณสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เช่น กรดลอริก (คาร์บอน 12 อะตอม) 48-52% กรดคาปริค (คาร์บอน 10 อะตอม) 6.7 % และ กรดคาปริลิก (คาร์บอน 8 อะตอม) 7.8% ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานได้อย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ร่างกาย ถูกดูดซึมและเผาผลาญได้ดี การทดลองนี้ ศึกษากรรมวิธีการแยกน้ำมันมะพร้าวออกจากกะทิจากสถานะของเหลว กะทิถูกทำให้แข็งตัวก่อนการสกัดน้ำมันมะพร้าวเพื่อให้เกิดการรวมตัวของไขมันในกะทิ ณ อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ที่ เวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่สถานะอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 50 นาที กะทิถูกแบ่งได้เป็น 3 ชั้น คือ ชั้นบนเป็นน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ชั้นกลาง คือ ชั้นครีม และชั้นล่าง คือ น้ำเปรี้ยว พบว่ากะทิที่แช่แข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันมะพร้าวสูงที่สุด คือ 26.25 และร้อยละผลได้ทั้งหมด 95.74 % การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเหวี่ยงแยกมันมะพร้าวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่ อุณหภูมิต่างกัน คือ 15, 20 และ 26 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 15 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่สามารถแยกน้ำมันมะพร้าวได้จึงนำมาเหวี่ยงแยกที่ 26 องศาเซลเซียสซ้ำอีกครั้ง พบว่าได้ปริมาณเปอร์เซ็นต์น้ำมันมะพร้าว 32.85 เท่ากัน และ ร้อยละผลได้ทั้งหมด 98.82% และ 97.45% ตามลำดับ



ภาพที่ 1 เครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ

ที่มา: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2550)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2550) ได้พัฒนาเครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ เป็นเครื่องมือสำหรับแยกสารหรืออนุภาคโดยอาศัยแรงหนีศูนย์กลาง (Centrifugal Force) ที่เกิดจากการหมุนของโรเตอร์ (Rotor) ที่ติดตั้งอยู่ภายในเครื่องปั่นแยกสาร ผลของแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่เกิดขึ้นจะทำให้อนุภาคต่างๆที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน เคลื่อนที่จนแยกออกจากกันได้ ระบบควบคุมอุณหภูมิของเครื่องฯ เป็นระบบทำความเย็นเพื่อลดอุณหภูมิให้กับสารตัวอย่าง เนื่องจากสารตัวอย่างบางชนิดอาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้น ประกอบด้วยส่วนสำคัญหลักๆ 5 ส่วนคือ 1) มอเตอร์และระบบควบคุมความเร็วรอบ เพื่อใช้สำหรับเป็นต้นกำลังให้เกิดการหมุนรอบและได้ความเร็วรอบตามความต้องการ 2) โรเตอร์ ใช้สำหรับบรรจุภาชนะใส่ตัวอย่าง เมื่อโรเตอร์เกิดการหมุนจะทำให้เกิดแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางขึ้นในบริเวณโรเตอร์ 3) ห้องที่ติดตั้งโรเตอร์ (Chamber) เป็นส่วนที่มีโรเตอร์ติดตั้งอยู่ภายใน มีฝาปิดเพื่อความปลอดภัยในขณะปฏิบัติงาน 4) ระบบทำความเย็น ใช้สำหรับควบคุมอุณหภูมิภายในห้องที่ติดตั้งโรเตอร์ และ 5) แผงควบคุม ใช้สำหรับควบคุมและแสดงผลการทำงานของเครื่องปั่นแยกสาร คุณลักษณะของเครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ ขนาดเครื่อง (กว้าง x ยาว x สูง ) 100 x 80 x 75 เซนติเมตร น้ำหนักเครื่อง 150 กิโลกรัม ไฟฟ้า 220 โวลต์ 50 เฮิร์ตซ์ 1,100 วัตต์ อุปกรณ์ควบคุม PLC แบบหน้าจอสัมผัส ความเร็วรอบโรเตอร์ 0 ถึง 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิภายในห้องที่ติดตั้งโรเตอร์ อุณหภูมิห้อง ถึง -10 องศาเซลเซียส ปริมาตรของหลอดทดลองใช้งาน ขนาด 15 มิลลิลิตร x 12 หลอด หรือขนาด 50 มิลลิลิตร x 6 หลอด



ภาพที่ 2 เครื่องเหวี่ยงแยกความเร็วสูงแบบต่อเนื่อง นำเข้าจากต่างประเทศ  
ที่มา : บริษัทจีอีเอเวสฟาเลียเซพพาเรเตอร์ (ประเทศไทย) จำกัด



เครื่องเหวี่ยงแยกความเร็วสูงแบบต่อเนื่อง มีการนำเข้าจากต่างประเทศเพื่อจำหน่ายซึ่งมีราคา ค่อนข้างสูงมากประมาณสองล้านกว่าบาท ตัวเครื่องมีความสามารถในการปั่นน้ำ (Hydraulic capacity): 3,000 ลิตร/ ชั่วโมง ความสามารถในการปั่นแยกจุลินทรีย์และสาหร่าย (Feed rate): 200-400 ลิตร/ ชั่วโมง ถึงสแตนเลส AISI 304 Storage Tank ความจุ 500 ลิตร สำหรับสำรองน้ำจุลินทรีย์ก่อนปั่นเข้าเครื่องเหวี่ยง แยก ปั่นสำหรับปั่นน้ำจุลินทรีย์เข้าเครื่องเหวี่ยงแยก ความจุไม่น้อยกว่า 400 ลิตร ต่อชั่วโมง ปั่นสำหรับ ปั่นน้ำใช้ในการกระบวนการเดินเครื่องเหวี่ยงแยกกากจุลินทรีย์ ถึงสแตนเลสสำหรับเก็บกากจุลินทรีย์ที่ผ่าน เครื่องเหวี่ยงแยกขนาด ไม่น้อยกว่า 10 ลิตร

## วิธีดำเนินการ

### สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

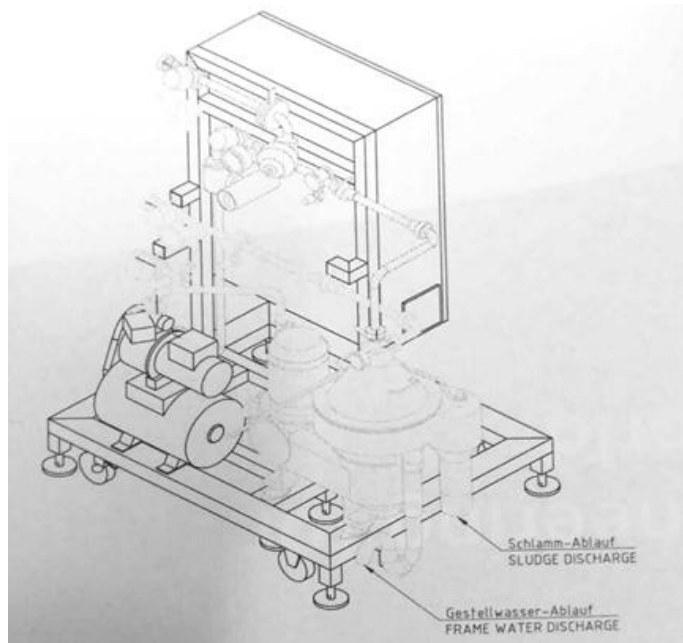
1. เครื่องมือจักรกลโรงงานสำหรับการสร้างเครื่องต้นแบบ
2. บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย สำหรับเตรียมวัตถุดิบในการทดสอบ
3. เครื่องเหวี่ยงแยกตะกอนขนาดเล็กในห้องปฏิบัติการ
4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ สทช. และ กวป.
5. มอเตอร์ไฟฟ้า ขนาด 4 กิโลวัตต์ พร้อมอุปกรณ์ควบคุมและปรับความถี่ได้
6. ปั่นน้ำแบบหอยโข่ง ขนาด 1.5 แรงม้า

### แบบและวิธีการทดลอง

เป็นการออกแบบและสร้างเครื่องต้นแบบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนระดับ ชุมชน โดยเปรียบเทียบกับวิธีการแยกตะกอนสาหร่ายด้วยวิธีปฏิบัติเดิมของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสาหร่าย แผนการทดลองแบบ t-test

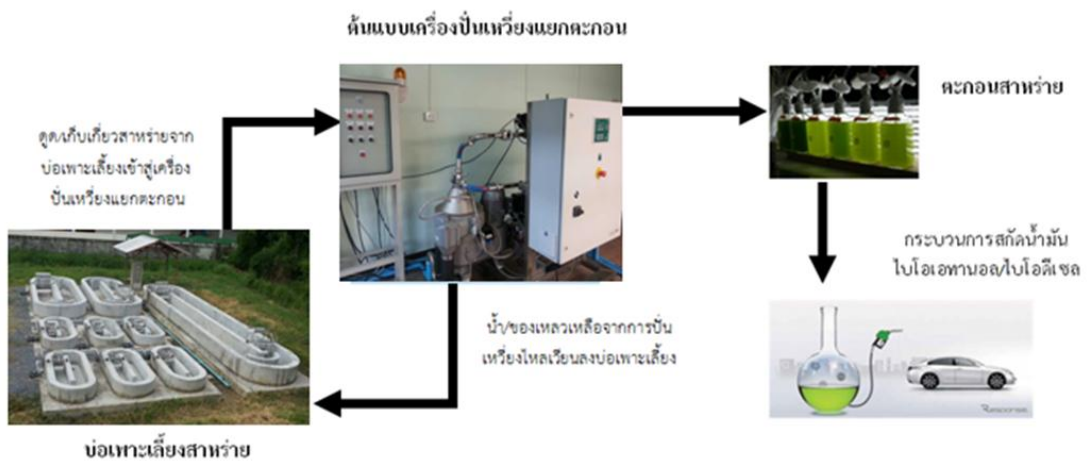
### วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ถึงสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และองค์ประกอบต่างๆ ตลอดจนใช้ในการออกแบบเครื่องมือ
2. จัดการระบบบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงสาหร่ายชีวมวลในบ่อ เปิดสภาพกลางแจ้งขนาด 1,000 และ 5,000 ลิตร เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทน ที่ ห้องปฏิบัติการและบ่อเลี้ยง กวป.
3. ศึกษาแนวทางการออกแบบเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวล ให้เหมาะสมตามกำลังการผลิตในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทน



ภาพที่ 3 แนวทางการออกแบบต้นแบบเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสำหรับรายชีวมวล

4. ออกแบบและสร้างเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน สำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนระดับชุมชน โดยทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในบ่อเลี้ยงขนาดประมาณ 5,000 ลิตร โดยนักวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงสาหร่าย ที่ร่วมงานวิจัย ซึ่งออกแบบระบบการเก็บเกี่ยวสาหร่ายขึ้นจากบ่อเพาะเลี้ยง มาทำการแยกกากตะกอนและน้ำออกจากกันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนสาหร่ายที่พัฒนาขึ้น และออกแบบให้มีระบบหมุนเวียนน้ำที่แยกออกจากเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อลงสู่บ่อเพาะเลี้ยงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนกากหรือตะกอนก็นำไปสู่ขั้นตอนการสกัดน้ำมันต่อไป



ภาพที่ 4 การออกแบบระบบการจัดการบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย และเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน

5. ศึกษาและทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแยกตะกอนสาหร่ายชีวมวล

- ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่เหมาะสม
- เวลาที่ใช้ และอัตราการป้อนวัสดุที่เหมาะสม

#### 6. ทดสอบและประเมินผล ปรับปรุงเครื่องต้นแบบ

- หาสมรรถนะการทำงานของเครื่องต้นแบบ เช่น ความสมดุลของการหมุนเหวี่ยง ความเสถียรภาพของเครื่องมือในขณะการทำงานเก็บเกี่ยวสาหร่าย
- หาประสิทธิภาพการทำงาน ได้แก่ การวัดประสิทธิภาพการตกตะกอน

#### 7. ประเมินต้นทุนการผลิตในเชิงธุรกิจ (Financial Costs) และเชิงเศรษฐศาสตร์วิศวกรรม

#### 8. สรุปและเขียนรายงานผลการทดลอง

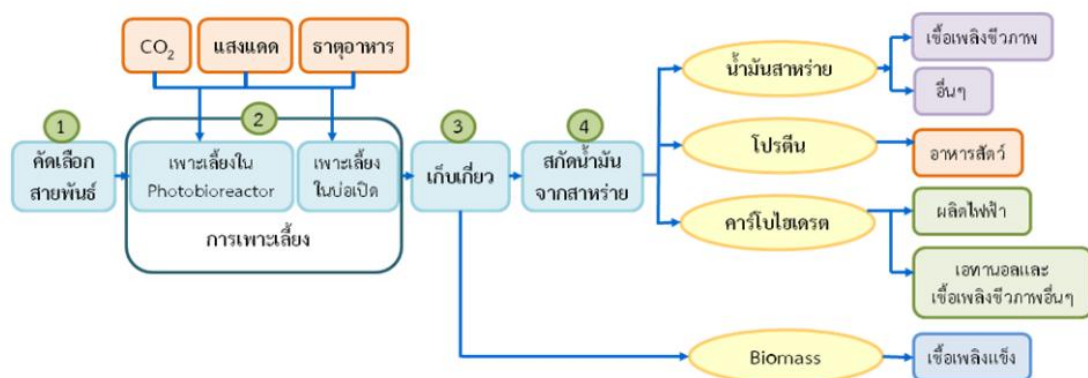
#### ค่าชี้ผลการศึกษา

- ความสามารถในการทำงานของเครื่องต้นแบบ
- ประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่อง
- ค่าพลังงานที่ใช้ในการทำงาน
- ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – สิ้นสุด กันยายน 2560 (โดนตัดงบประมาณปี 61-62)
- สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น
2. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
3. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

### ผลการวิจัยและอภิปราย

การจะได้มาซึ่งน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่ายต้องมีการผ่านขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน ได้แก่ การคัดเลือกสายพันธุ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บเกี่ยว และการสกัดน้ำมัน



ภาพที่ 5 แผนผังกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงจากสาหร่าย

การเก็บเกี่ยวสาหร่ายทำได้หลายวิธีโดยใช้เครื่องมือและวิธีการต่าง ๆ ตามแต่ชนิดของสาหร่ายเช่น เครื่องเหวี่ยง การตกตะกอน การกรอง ซึ่งวิธีการปั่นเหวี่ยงไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาด เนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตสูง การนำเทคนิคต่างๆ มาประยุกต์ใช้ร่วมกัน เช่น การตกตะกอน (Flocculation) การชะน้ำออก (Dewatering) และการทำแห้ง (Drying) เพื่อพัฒนาวิธีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและใช้ต้นทุนในการผลิต



ภาพที่ 6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนความเร็วสูงแบบอัตโนมัติ

ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นระบบการแยกตะกอนสาหร่ายด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง ซึ่งเป็นเครื่องมือที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ราคาประมาณ 2.5 ล้านบาท โดยคณะผู้วิจัยจะดำเนินการสร้างชุดทดสอบหลักการ ทำงานเพื่อหาแนวทางการพัฒนาเครื่องต้นแบบให้สามารถสร้างได้ในราคาต่ำกว่าการนำเข้าจากต่างประเทศ

## การจัดการระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

### 1. การวิเคราะห์และทดสอบทิศทางการถ่ายเทมวลเซลล์สาหร่ายในบ่อเพาะเลี้ยง

#### 1.1 การติดตั้งระบบระบายน้ำ



ภาพที่ 7 แสดงการติดตั้งระบบท่อระบายน้ำทั้ง ระบบเติมน้ำและอาหารเหลว

ทำการติดตั้งระบบระบายน้ำทั้ง เมื่อทำการล้างบ่อ ระบบเติมน้ำและอาหารเหลว ในระหว่างการเพาะเลี้ยง รวมทั้งระบบท่อสำหรับเก็บเกี่ยวเซลล์จากบ่อเพาะเลี้ยง ให้สะดวกและเหมาะสมในการปฏิบัติงาน และลดการปนเปื้อนระหว่างท่อน้ำทิ้งและท่อชีวมวลของสาหร่าย ดังแสดงในภาพที่ 7

#### 1.2 เคลือบบ่อเพาะเลี้ยงด้วยไฟเบอร์กลาส

เนื่องจากบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีวัสดุผิวที่ทำจากซีเมนต์ ทำให้ไม่สามารถขัดล้างทำความสะอาดเซลล์สาหร่ายขนาดเล็กในแต่ละครั้งของการเพาะเลี้ยงได้หมด จึงแก้ไขโดยการพ่นเคลือบบ่อด้วยไฟเบอร์กลาส ขนาด 1000 ลิตร จำนวน 6 บ่อ โดยให้มีระดับที่ลาดเอียงลงไปยังช่องระบายตะกอนของสาหร่าย ซึ่งปรับลดระดับให้เป็นจุดที่ต่ำที่สุดของบ่อ และทำช่อง service สำหรับการระบายให้เป็นชนิดสวมปิด แทนการใช้แบบเกลียวหมุน ดังแสดงในภาพที่ 8

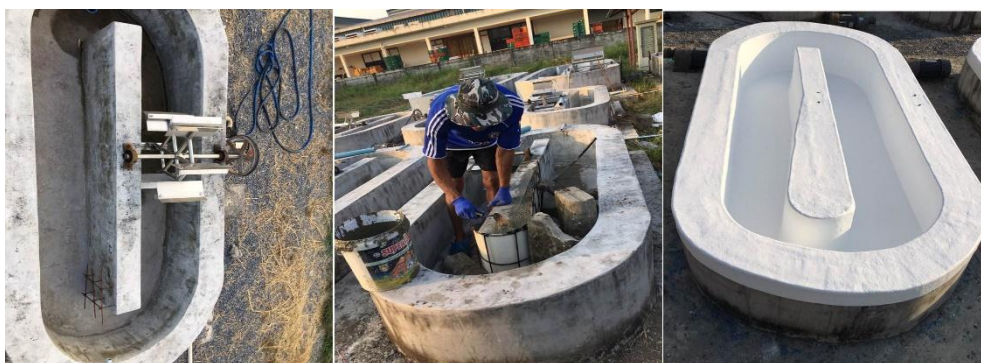




## ภาพที่ 8 แสดงการเคลือบบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยไฟเบอร์กลาส

### 1.3 การบังคับทิศทางการไหลของน้ำ

เดิมบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีแผ่นบังคับทิศทางการไหลของน้ำเป็นเส้นตรงที่ทำแนวขนานกับแนวของบ่อเพาะเลี้ยง เมื่อเดินระบบแล้วพบว่าเกิดปัญหาจุดบอดของน้ำหรือ dead zone ทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์สาหร่ายในระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงได้ทำการเตรียมบ่อแบบเปิดที่จะเคลือบด้วยไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร จำนวน 6 บ่อ โดยเพิ่มขนาดของพื้นที่สัมผัสน้ำของแผ่นบังคับทิศทางให้มีลักษณะเป็นแนวโค้งมนคล้ายหยดน้ำ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวและทำให้สามารถเพิ่มอัตราการไหลวนของน้ำเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงการบังคับทิศทางการไหลของน้ำเพื่อแก้ปัญหา Dead Zone ภายในบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย

### 1.4 ระบบใบพัด (paddle wheel)

ใบพัดของบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายเดิมใช้แผ่นสแตนเลสเชื่อมติดกับแนวแกนหมุนเมื่อเดินระบบแล้วพบว่า มีน้ำเลี้ยงเซลล์ไหลออกจากบ่อที่บริเวณขอบใบพัดในปริมาณมาก สืบเนื่องจากใบพัดที่ใช้มีองศาที่ไม่เหมาะสม ทั้งนี้ได้ทำการออกแบบใบพัดใหม่โดยใช้วิธีการปิดช่องทางน้ำออกในบริเวณด้านข้างของใบพัดทั้ง 2 ด้าน เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงการติดตั้งระบบบำบัดของบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็ก

#### 1.5 การทดสอบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในระบบเปิด

ในระยะแรกจะทำการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในบ่อขนาด 1,000 ลิตร โดยใช้อาหารสำหรับสาหร่ายน้ำจืดสูตรมาตรฐาน Modified Chu 13 เป็นระยะเวลา 25 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายโดยใช้วิธีการกรอง และประเมินผลเบื้องต้นในการวางแผนการนำน้ำเลี้ยงเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อออกแบบทิศทางการป้อนของน้ำเข้าและออกตัวเครื่องในลำดับต่อไป

#### 1.6 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเล็กในระดับขยายขนาด

สำหรับการทดลองในครั้งนี้เป็นการทดสอบระบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ SK-QSGMF6 (*Coelastrella* sp.) ในระดับขยายขนาดนอกห้องปฏิบัติการซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงในบ่อแบบเปิด (Open raceway pond) ที่มีปริมาตรเพาะเลี้ยง 500 ลิตร โดยใช้น้ำประปาที่มีอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายสูตรมาตรฐาน Modified Chu 13 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 1% ของปริมาตรเพาะเลี้ยงทั้งหมด ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์สาหร่ายเพื่อติดตามอัตราการเจริญเติบโตทุกวัน ด้วยเทคนิคการนับเซลล์และวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ลักษณะของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏเมื่อใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ลักษณะของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย SK-QSGMF6 ในบ่อแบบเปิด (Open raceway pond)

### 1.7 การปั่นเหวี่ยง

ในกระบวนการทดลองนี้ทำการแปรผันความเร็วรอบและระยะเวลาของการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 3,000, 4,000 และ 5,000 รอบต่อนาที และระยะเวลาที่ใช้ปั่น 5, 10 และ 15 นาที แล้วเก็บตัวอย่างของเหลวที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว (supernatant) มาใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที พบว่าวิธีปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณเซลล์ที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงน้อยที่สุดคือ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้ จะนำไปใช้ในการพัฒนาเครื่องปั่นเหวี่ยงในระดับขยายขนาดต่อไป



ภาพที่ 12 การเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่าย Isolate SK-QSGMF6 โดยวิธีปั่นเหวี่ยง



ผลการทดลองพบว่าวิธีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณเซลล์ที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงน้อยที่สุดคือ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้จะนำไปใช้ในการเก็บตัวอย่างในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง รวมทั้งพัฒนาวิธีการเก็บเกี่ยวในระดับขยายขนาดในลำดับต่อไป

**ตารางที่ 1** ข้อมูลเบื้องต้นนำไปใช้ในการเก็บตัวอย่างในระดับห้องปฏิบัติการ

Speed (rpm)	Time (min)	Cell recovery in supernatant (mg/L)
3000	5	0.482
	10	0.476
	15	0.425
4000	5	0.410
	10	0.404
	15	0.388
5000	5	0.451
	10	<b>0.233</b>
	15	<b>0.231</b>

#### การปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์แบบอัตโนมัติ (High performance self-cleaning Separator)

ในการศึกษาในขั้นตอนนี้จะเป็นการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบบ่อเปิดในระดับขยายขนาด ซึ่งได้ทำการแปรผันอัตราการไหลและระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย เพื่อให้ได้ลักษณะของตัวอย่างที่เหมาะสม โดยพบว่าที่ระดับอัตราการไหลของสาหร่ายเข้าสู่เครื่องเหวี่ยง  $500 \pm 50$  ลิตรต่อชั่วโมง เป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมและไม่มีเซลล์สาหร่ายเหลือทิ้งในอาหารที่เพาะเลี้ยง และใช้ระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย 50 นาทีต่อรอบของการปั่นเหวี่ยง มีลักษณะของเนื้อตัวอย่างสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการนำไปอบแห้งหรือแช่แข็งไว้สำหรับรอศึกษาในขั้นตอนต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 13 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากเซลล์จุลินทรีย์อัตโนมัติ (High performance self-cleaning Separator)



ภาพที่ 14 ลักษณะของสาหร่ายที่เก็บเกี่ยวได้ และเซลล์ของสาหร่ายที่ได้จากการอบแห้ง

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณเซลล์ที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงน้อยที่สุดคือ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้จะนำไปใช้ในการเก็บตัวอย่างในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาในขั้นตอนนี้จะเป็นการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบบ่อเปิดในระดับขยายขนาด ซึ่งได้ทำการแปรผันอัตราการไหลและระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย เพื่อให้ได้ลักษณะของตัวอย่างที่เหมาะสม โดยพบว่าที่ระดับอัตราการไหลของสาหร่ายเข้าสู่เครื่องเหวี่ยงประมาณ 500 ลิตรต่อชั่วโมง เป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมและไม่มีเซลล์สาหร่ายเหลือทิ้งในอาหารที่เพาะเลี้ยง และใช้ระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย 50 นาทีต่อ

รอบของการปั่นเหวี่ยง มีลักษณะของเนื้อตัวอย่างสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการนำไปอบแห้งหรือแช่แข็งไว้สำหรับ  
รอศึกษาในขั้นตอนต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ แก้วบุญเจริญ. มปป. เชื้อเพลิงสาหร่าย นวัตกรรมพลังงานทดแทน (ออนไลน์). สืบค้นจาก :

<https://www.gotoknow.org/posts/539176> [9 มิถุนายน 2558]

ซันนันทน์ นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรือวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลล์โลสิคเอทานอลในประเทศไทย. KKU Sci. J.40 (4) 1073-1088 (2012).

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ. 2534. เครื่องมือวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 259 หน้า.

ธราพงษ์ วิจิตตานนท์, นวดล เหล่าศิริพจน์ และประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ. 2553. รายงานสถานภาพของ  
งานวิจัยและผลิตเอทานอลไบโอดีเซล ไบโอดีเซล และน้ำมันชีวภาพในประเทศไทย. สำนักพัฒนา  
บัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.)

ดวงรัตน์ อินทร. มปป. การนำสาหร่ายมาใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ. (ออนไลน์). สืบค้นจาก :

<http://advisor1.anamai.moph.go.th/223/22310.html> [ 9 มิถุนายน 2558]

พนิดา รัตนพลที และ ผกาวัต แก้วกันเนตร. 2551. ศักยภาพการผลิตไบโอดีเซลจากสาหร่ายขนาดเล็ก. วารสาร  
ศูนย์บริการวิชาการ. ปีที่ 16 ฉบับที่ 1. น. 9-13

มณฑนา แก้วชื่น วิทยา ปันสุวรรณ และ วิเชียร ลีลาว์ขรรมาศ . 2555. การแยกน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นบริสุทธิ์  
จากน้ำกะทิด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ. การประชุมวิชาการแห่งชาติ  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2550. วิจัยพัฒนาเครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุม  
อุณหภูมิลดการนำเข้าเทคโนโลยี. สืบค้นจาก : <http://www.most.go.th>

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง. 2557. ความรู้เกี่ยวกับน้ำมันเชื้อเพลิงจากสาหร่าย. (ออนไลน์). สืบค้นจาก :

[http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal\\_biofuel\\_mar57.pdf](http://www.doeb.go.th/v5/knowledge/data/algal_biofuel_mar57.pdf)

อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. วารสารสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 16 เล่มที่ 2. 8 น.

อาภารัตน์ มหาจันทร์. 2552. พลังงานทางเลือกจาก "สาหร่าย" ความท้าทายที่รอการพิสูจน์. วิทยาศาสตร์และ  
เทคโนโลยี. ปีที่ 24 ฉบับที่ 2. เมษายน-มิถุนายน 2552. หน้า 60-64

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae, Biotechnology Advance. 25,294-306.

#### การทดลองที่ 4.2 การพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชีวมวลสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล

Development the grinding machine wet biomass for bioethanol

ผู้วิจัย นายวุฒิพล จันทร์สระคู<sup>2</sup> นายพินิจ จิระคกุล<sup>2</sup> นายศักดิ์ชัย อาชาวง<sup>2</sup>  
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล<sup>1</sup> นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ<sup>1</sup>

คำสำคัญ เครื่องบดละเอียด พืชชีวมวล พลังงานทดแทน

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชีวมวลสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล เป็นการออกแบบและสร้างเครื่องมือต้นแบบสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสมกับการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานทดแทน ดำเนินการทดสอบการแปรสภาพของวัสดุหญ้าเนเปียร์โดยใช้เครื่องหั่นย่อยแบบสองใบมีดที่พัฒนาขึ้น ต้นกำลัง 2 แรงม้า ไฟฟ้า 220 โวลต์ ผลการทดสอบเบื้องต้นการใช้เครื่องหั่นย่อยแปรสภาพวัสดุชีวมวลหญ้าเนเปียร์ได้ละเอียดขนาดอยู่ในช่วง 2.58–4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 29.33–36.36% ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาเครื่องมือบดละเอียดในห้องปฏิบัติการ และดำเนินการออกแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียกในระดับชุมชน ใช้มอเตอร์ไฟฟ้าถ่ายทอดกำลังด้วยพูลเลย์และสายพานไปยังเกียร์ส่งกำลัง จนแกนที่ใช้ยึดล้อบดทั้งสองข้างหมุนด้วยความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที ขณะเครื่องทำงานล้อบดจะหมุนรอบตัวเองไปด้วย ทำให้เกิดแรงบดตกลงภายในอ่างอย่างสม่ำเสมอ สามารถบดวัสดุได้อย่างสม่ำเสมอ

#### Abstract

This research aims to develop a grinding machine wet biomass for bioethanol. To design and build a prototype of ethanol production to suit its use as a feedstock for renewable energy production. Testing operation of processing of Napier grasses shredding using a two-blade developed power 2 hp 220 volts. The results of the initial testing for the processing of biomass of Napier grass biomass were in the range of 2.58-4.76 mm or 29.33-36.36%. The grinder was designed at the community level. The electric motor transmits power to the belt pulley and gear transmission. The grinding wheel spindle used to hold both the rotation speed of 120 rpms when the machine is working the grinding wheel rotates around itself with. The grinding force inside the sink can be crushed regularly.

---

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ<sup>1</sup>

ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น<sup>2</sup>

## บทนำ

จากแผนพัฒนาและส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทน ระหว่างปี 2555-2564 มีแผนที่จะให้มีการใช้พลังงานทดแทนเป็นสัดส่วน 20% ของพลังงานทั้งหมด การวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนเป็นการศึกษาค้นคว้า ทดสอบ พัฒนา และสาธิต ตลอดจนส่งเสริม และเผยแพร่พลังงานทดแทน ซึ่งเป็นพลังงานที่สะอาดไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่ในท้องถิ่น เช่น พลังงานลม แสงอาทิตย์ ชีวมวล และอื่นๆ เพื่อให้มีการผลิต และการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย มีประสิทธิภาพ และมีความเหมาะสมทั้งทางด้านเทคนิค เศรษฐกิจ และสังคม พลังงานจัดเป็นปัจจัยสำคัญและมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ หลายประเทศทั่วโลกจึงแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนรูปแบบใหม่เพื่อเป็นหลักประกันความมั่นคงด้านพลังงานในระยะยาว ทั้งยังเป็นการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการใช้พลังงานที่ได้จากฟอสซิล เช่น น้ำมัน และ ถ่านหิน อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน การผลิตไบโอเอทานอลได้รับความสนใจทั่วโลก เนื่องจากเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดภาวะโลกร้อน และยังเป็นการรักษาความมั่นคงของพลังงานทั่วโลกอีกด้วย ในช่วงแรกนั้นการผลิตไบโอเอทานอลผลิตจากน้ำตาลและแป้งที่ได้จากพืชผลและธัญพืชจากการเกษตร แต่ในปัจจุบันไบโอเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัสดุทดแทนประเภทอื่นๆ นอกเหนือจากแป้งและน้ำตาล เช่น วัสดุลิกโนเซลลูโลส ที่เรียกว่า ลิกโนเซลลูโลสเอทานอล ตัวอย่างเช่น เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษไม้ เศษวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและเศษขยะ และพืชพลังงานต่างๆ อย่างไรก็ตาม รัฐบาลมีนโยบายทางด้านเศรษฐกิจที่จะส่งเสริมและผลักดันให้ปลูกพืชพลังงาน ซึ่งกระทรวงพลังงานได้ทำการวิจัยหญ้าที่เหมาะสมเป็นพืชพลังงาน จำนวน 20 ชนิด พบว่าหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 ให้ผลผลิตต่อไร่สูงสุดประมาณ 70-80 ตันสดต่อปีต่อไร่ ซึ่งมากกว่าหญ้าชนิดอื่นเกือบ 7 เท่า จึงเป็นพืชที่เหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นพลังงานทดแทน นอกจากนี้คณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ (กพช.) ได้ปรับเป้าหมายของแผนพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกในระยะเวลา 10 ปี (พ.ศ.2555-2564) ของประเทศไทยโดยใช้พลังงานทดแทนจากหญ้าเนเปียร์ (ไกรลาศ, 2556)

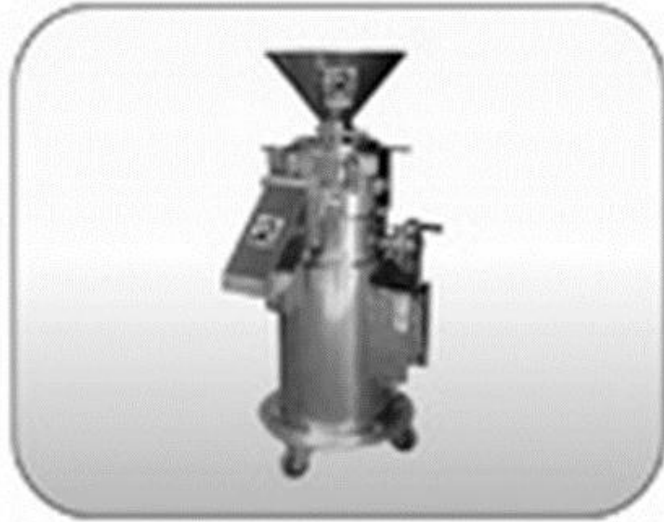
งานวิจัยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้มีการศึกษาและวิจัยเรื่องการผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ในปี พ.ศ.2556-2558 ได้แก่ การคัดเลือกพืช และชีวมวลที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอล การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส เครื่องมือแปรสภาพชีวมวลในกระบวนการย่อยสลายชีวมวล เครื่องจักรกลในกระบวนการหมัก และเครื่องกลั่นในการผลิตเอทานอลจากชีวมวล ซึ่งแต่ละขั้นตอนดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่ง แต่ยังคงขาดเครื่องจักรที่ทำให้ขั้นตอนการผลิตเป็นพลังงานทดแทนมีประสิทธิภาพได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาเครื่องบดแบบเปียกสำหรับชีวมวล เพื่อให้ขั้นตอนกระบวนการย่อยสลายจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสจากพืชชีวมวลมีโครงสร้างขนาดเล็กละเอียดและให้อยู่ในรูปแบบเปียก ทำให้เอนไซม์ทำงานเปลี่ยนรูปเป็นน้ำตาลได้ดีและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และทำให้มีผลในกระบวนการหมักเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ให้สูงขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งเครื่องจักรที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเป็นในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนจากพืชชีวมวล

โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อให้สามารถต่อยอดและขยายผลงานวิจัยให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการนำส่งเทคโนโลยีการผลิตพลังงานทดแทนจากพืชชีวมวลสู่ชุมชนต่อไป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อวิจัยและพัฒนาเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชีวมวลสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล

การผลิตเอทานอลจากชีวมวล เป็นกระบวนการซึ่งเกิดจากการหมักพืช เศษซากพืช ให้เป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อทำให้บริสุทธิ์ 95% จะเรียกว่า “เอทานอล” โดยการผลิตเอทานอลจากกลีโคเซลลูโลส แบ่งขั้นตอนการผลิตออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ การปรับสภาพวัตถุดิบ การย่อยหรือไฮโดรไลซิสและการผลิตเอทานอล แม้ว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลในปัจจุบันจะใช้แป้งและน้ำตาลเป็นหลัก เช่น มันสำปะหลัง กากน้ำตาล แป้งข้าวโพด มันสำปะหลังเส้นตากแห้ง แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น กระบวนการผลิตเอทานอลที่ผลิตได้จากเซลลูโลส เป็นเอทานอลที่ผลิตได้จากวัตถุดิบจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด เปลือกไม้ หรือจากต้นพืชที่ไม่เกี่ยวข้องกับพืชที่มนุษย์บริโภค ได้แก่ ต้นเลา หลู้เนเปียร์ (ไกรลาส และคณะ, 2556) ข้าวฟ่างหวาน สาหร่าย สปูด้า อ้อยพลังงาน (อรพิมพ์, 2553) วัตถุดิบดังกล่าวประกอบไปด้วยลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลส และเรียกวัตถุดิบประเภทนี้ว่า วัสดุกลีโคเซลลูโลส ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของพืช ซึ่งเกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เอทานอลที่ผลิตจากเซลลูโลสจึงมีคุณสมบัติและลักษณะทางเคมีเช่นเดียวกับเอทานอลที่ผลิตจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้งที่ได้จากอ้อยหรือมันสำปะหลัง

บริษัทเอเชีย เอ็นจิเนียริงแพค จำกัด (มปป.) ได้ผลิตและนำเข้าเครื่องบดละเอียดแบบเปียกเป็นเครื่องบดที่มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง สามารถทำการบดให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความละเอียดมากจนเป็นครีม มีความสามารถในการบดผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอาง เวชภัณฑ์ และอื่นๆ อีกมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงการอาหาร เช่น พริกแกง ซอสพริก เครื่องปรุงรส รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่บดได้ยาก เช่น ชิ้นกระดูก ไคร่งไก่ ข้าวสาร หินบดทำมาจากวัสดุชนิดพิเศษ ไม่แตกขณะใช้งานบดอยู่ ถึงแม้จะใช้นานติดต่อกัน 24 ชั่วโมง หินบดไม่มีรูพรุน จึงไม่มีแหล่งสะสมสิ่งสกปรกและเพาะเลี้ยงเชื้อโรค โครงสร้างของเครื่องได้รับการออกแบบมาให้ง่ายต่อการประกอบและแยกส่วน เพื่อความสะดวกในการทำความสะดวก สามารถปรับตั้งระยะของหินบดได้ในขณะที่เครื่องจักรกำลังทำงาน หินบดมีให้เลือกถึง 8 ชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการบด ประสิทธิภาพในการบดสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความละเอียดสูง และมีระบบหล่อเย็น (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เครื่องบดละเอียดแบบเปียก

ที่มา : <http://www.asiaengineeringpac.co.th>

อริยาภรณ์ และพิสิษฐ์ (2549) ได้พัฒนาเครื่องบดงา ซึ่งเป็นการแปรรูปงาด้วยการบดเมล็ดงาให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันที่มีลักษณะคล้ายครีม ซึ่งเรียกว่า “ครีมงา” หรือ “เนยงา” ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอาหารสุขภาพ และสามารถเพิ่มมูลค่าให้แก่เมล็ดงาได้ ในปัจจุบันการบดเมล็ดงาเพื่อการค้าจะใช้เครื่องบดงาที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงมากดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดงาที่ผ่านการบดในระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อศึกษาอัตราการบดและประสิทธิภาพการบดของเครื่องบดงาต้นแบบ จากการทดลองพบว่า เครื่องบดงาต้นแบบสามารถบดเมล็ดงาจำนวน 5 กิโลกรัมให้ละเอียดเป็นครีมได้ ภายใน 35 นาที มีประสิทธิภาพการบด 97.22 % ใช้กำลังไฟฟ้าเฉลี่ย 0.7719 kw นอกจากนี้สามารถบดเมล็ดถั่วลิสง และเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ให้ละเอียดเป็นครีมได้ ภายใน 15 และ 10 นาที ตามลำดับ



ภาพที่ 2 เครื่องบดงาแบบล้อบด

ที่มา : อริยาภรณ์ และพิสิษฐ์ (2549)

### วิธีดำเนินการ

แบบและวิธีการทดลอง

เป็นการออกแบบและสร้างเครื่องมือต้นแบบสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสมกับการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานทดแทน โดยเปรียบเทียบกับวิธีการบดด้วยเครื่องมือและกระบวนการแบบเดิม ใช้แผนการทดลองแบบ t-test

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ถึงสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และองค์ประกอบต่างๆ ตลอดจนใช้ในการออกแบบเครื่องมือในขั้นตอนต่อไป
2. วิเคราะห์หาปริมาณแป้ง น้ำตาล เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจากพืชชิวมวลที่ใช้ทดสอบที่ห้องปฏิบัติการ สทช.
3. ศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่ใช้ในการออกแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียกสำหรับพืชชิวมวล
4. ออกแบบเครื่องมือในกระบวนการเตรียมวัสดุพืชชิวมวลสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสมกับการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานทดแทน ได้แก่ เครื่องบดละเอียด แบบแห้งและแบบเปียก
5. ทำการสร้างต้นแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียกพืชชิวมวล ในกระบวนการผลิตเอทานอล พืชชิวมวล ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ และต้นเลา
6. ทดสอบและประเมินผล ปรับปรุงเครื่องต้นแบบ หาสมรรถนะและประสิทธิภาพการทำงานกับวัสดุชิวมวลชนิดต่างๆ โดยต้องทำการแปรสภาพวัสดุพืชชิวมวลครั้งที่ 1 ด้วยเครื่องหั่นย่อยให้มีขนาดเล็กก่อนนำเข้าเครื่องบดละเอียดแบบเปียก ซึ่งเป็นการแปรสภาพวัสดุครั้งที่ 2
7. ประเมินต้นทุนการผลิตในเชิงธุรกิจ (Financial Costs) และเชิงเศรษฐศาสตร์วิศวกรรม
8. สรุปและเขียนรายงานผลการทดลอง

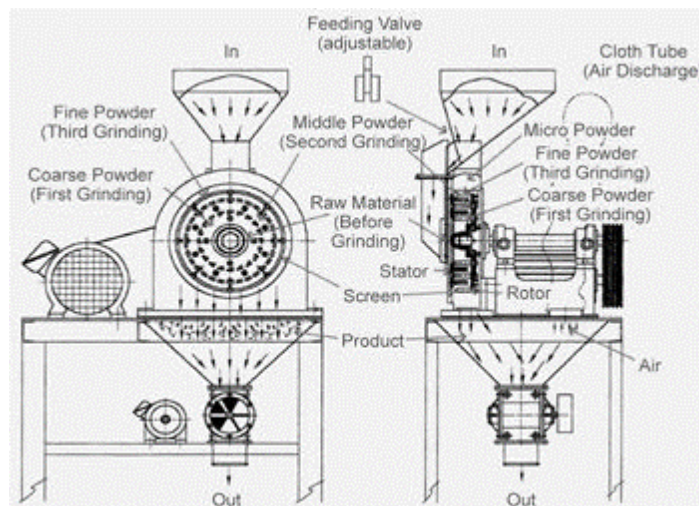
ค่าชี้ผลการศึกษา

- ความสามารถในการทำงานของเครื่องต้นแบบ
  - ประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่อง
  - ค่าพลังงานที่ใช้ในการทำงาน
- ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – สิ้นสุด กันยายน 2560 (โดนตัดงบประมาณปี 61-62)
- สถานที่ทำการทดลอง
1. ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมขอนแก่น
  2. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ



## ผลการวิจัยและอภิปราย

ได้ทำการศึกษาหลักการทำงานของเครื่องบดละเอียดที่มีอยู่หลากหลายชนิด ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำหลักการเครื่องบดแบบ Pin mill คาดว่ามีความเหมาะสมที่จะบดวัสดุชีวมวลเพื่อผลิตเอทานอล โดยสามารถเปลี่ยนแปลงขนาดความละเอียดได้โดยการเปลี่ยนกรองหน้าจ่อและการปรับตัวของความเร็วโรเตอร์ และคุณสมบัติของการเปลี่ยนแผ่นดิสก์บดเป็นตัวเลือกสำหรับวัสดุที่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องนี้เป็นเรื่องง่ายในการทำความสะอาด (ล้างน้ำ) และบำรุงรักษา การออกแบบและสร้างเครื่องให้เหมาะสมกับการใช้งานวัตถุดิบสำหรับผลิตพลังงานทดแทน เช่น หญ้าเนเปียร์ที่ผ่านการสับหยาบมาแล้ว



ภาพที่ 3 หลักการทำงานของเครื่องบดละเอียดแบบ Pin Mill



ภาพที่ 4 เครื่องบดละเอียดขนาดเล็กสำหรับห้องปฏิบัติการ

ดำเนินการทดสอบการแปรสภาพของวัสดุหญ้าเนเปียร์โดยใช้เครื่องหั่นย่อยแบบสองใบมีดที่พัฒนาขึ้นต้นกำลัง 2 แรงม้า ไฟฟ้า 220 โวลต์ และกล่องควบคุมมอเตอร์ ส่งกำลังผ่านพูลเลย์ และสายพาน ส่วนอุปกรณ์

ป้อน เป็นลูกกลิ้ง 2 ลูก เพื่อความสม่ำเสมอ สะดวกและปลอดภัยในการป้อนวัสดุในขณะเครื่องทำงาน โดยใช้วัสดุที่มีผ่านการตากแดดจนแห้ง แบ่งตัวอย่างวัสดุออกเป็นกองๆ ละประมาณ 10 กิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ ต่อการทดสอบหนึ่งความเร็รรอบในช่วง 1,000 – 1,400 รอบ/นาที ทำการทดสอบเพื่อหาความเร็รรอบที่เหมาะสมกับการใช้งานแปรรสภาพวัสดุ โดยค่าชี้ผลประเมินจากขนาดวัสดุที่ผ่านการคัดแยกจากการสุมตัวอย่างมาทำการร่อนแยก 3 ขนาด และความสามารถในการทำงานเชิงวัสดุ (กก./ไร่) ผลการทดสอบแสดงดังในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** การทดสอบการแปรรสภาพวัสดุชีวมวลหญ้าเนเปียร์โดยเครื่องหั่นย่อยแบบสองใบมีดต้นแบบ

ช่องป้อน วัสดุ	ความเร็รรอบ ใบมีด (rpm)	เปอร์เซ็นต์ปริมาณวัสดุที่ผ่านการแปรรสภาพ และคัดแยกขนาดต่างๆ (%)			ความสามารถ ในการทำงาน (kg/hr)
		มากกว่า 4.76 มม.	2.58 - 4.76 มม.	น้อยกว่า 2.58 มม.	
ด้านหน้า	1,000	39.61	33.38	22.28	107.71
	1,200	34.87	36.36	21.90	109.65
	1,400	26.90	29.33	28.82	126.27
ด้านข้าง	1,000	67.36	63.19	17.16	63.88
	1,200	46.97	68.70	24.44	65.65
	1,400	42.89	59.46	19.91	18.26

จากตารางผลการทดสอบพบว่า การป้อนวัสดุที่ช่องป้อนด้านหน้าจะมีความสามารถในการทำงานที่สูงกว่าการป้อนจากด้านข้าง มีความสามารถในการทำงาน 107.71 – 126.27 กิโลกรัม/ชั่วโมง และสามารถแปรรสภาพวัสดุได้ละเอียดขนาดน้อยกว่า 2.58 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 22.28 – 28.82% โดยใช้ความเร็รรอบตั้งแต่ 1,000 – 1,400 รอบ/นาที ทั้งนี้การใช้ความเร็รรอบเครื่องที่สูง (1,400 รอบ/นาที) จะให้ผลการทำงานที่ดีกว่าความเร็รรอบเครื่องที่ต่ำกว่า ทั้งนี้การใช้เครื่องหั่นย่อยต้นแบบ สามารถแปรรสภาพวัสดุได้ละเอียดขนาดมากกว่า 4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 26.90 – 39.61% และ อยู่ในช่วง 2.58 – 4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 29.33 – 36.36%



ภาพที่ 5 การทดสอบหั่นย่อยและเตรียมวัสดุชีวมวลสำหรับการบดละเอียด

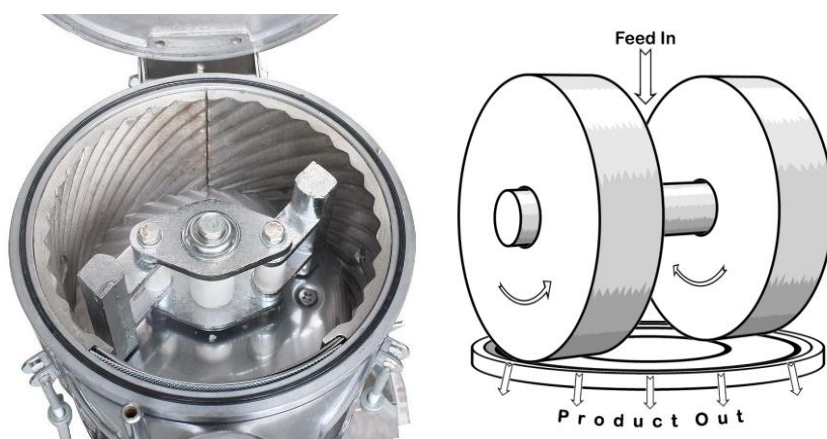


ภาพที่ 6 วัสดุชีวมวลที่ผ่านเครื่องบดละเอียดในห้องปฏิบัติการ

หลักเกณฑ์และเงื่อนไขในการออกแบบเครื่องมือในกระบวนการเตรียมวัสดุพืชชีวมวลสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสม High Speed Mill เป็นเครื่องบดแบบกระแทกที่ทำงานด้วยแรงกระแทก แรงเสียดสี แรงอัดและแรงเฉือน ระหว่าง hammer กับ liner พร้อมกัน (ภาพที่ 7) การปรับขนาดอนุภาคนั้น กำหนดด้วยลักษณะกับขนาดของ screen ระยะห่างระหว่าง hammer กับ liner และ hammer speed . ขบวนการบดเริ่มจากการเติมวัตถุดิบใน hopper จากนั้นวัตถุดิบจะถูกส่งไปสู่หม้อบดและถูก บดซ้ำด้วย hammer และ liner ที่หมุนด้วยความเร็วสูง วัตถุดิบที่บดแล้วมีขนาดเล็กกว่า ขนาดอนุภาคที่กำหนดไว้จะถูกส่งออกมาผ่าน screen



ภาพที่ 7 เครื่องบดแบบกระแทกที่ทำงานด้วยแรงกระแทก แรงเสียดสี แรงอัดและแรงเฉือน

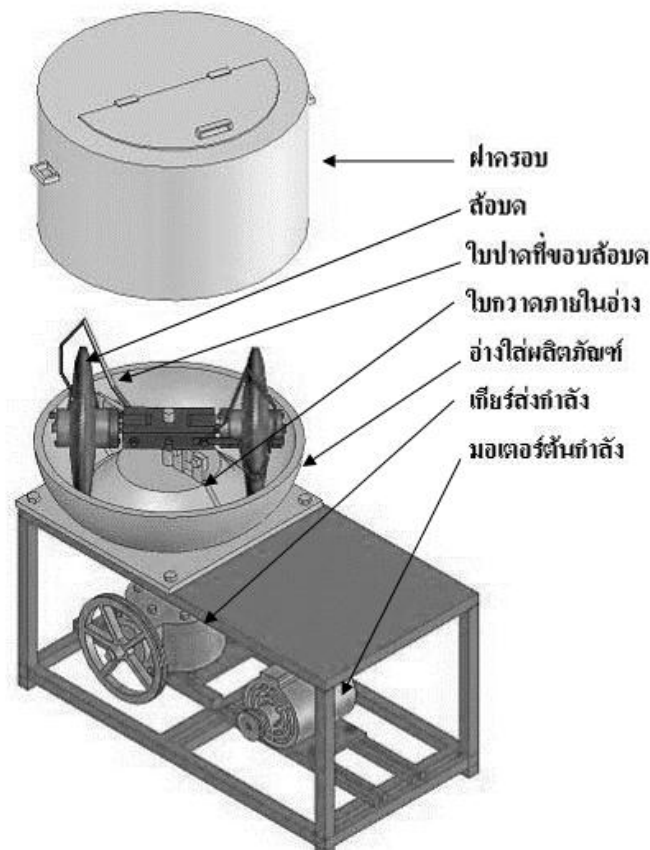


ภาพที่ 8 การออกแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียก

ออกแบบเครื่องมือในกระบวนการเตรียมวัสดุพืชชีวมวลสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสม ทั้งนี้จะทำการศึกษารูปร่างของเครื่องบดละเอียดในห้องปฏิบัติการ และดำเนินการการสร้างต้นแบบเครื่องบดในระดับชุมชนได้จัดทำเครื่องบดต้นแบบโดยตัวเครื่องทำด้วยเหล็กและสแตนเลสที่ประกอบด้วย ตัวอ่างสำหรับใส่วัสดุบดจะมีลักษณะเป็นทรงกลม ผิวเรียบตรงกลางอ่าง เพื่อให้วัสดุไม่ติดอยู่กลางอ่าง ขณะทำการบดวัสดุจะถูกบังคับให้อยู่ในร่องที่ล้อมรอบผิวผนังตลอดเวลา จำนวน 2 ร่อง ที่มีลักษณะเป็นเพอียดานเดียว เพื่อไม่ให้ลอบดสิ้นไกลในตัวอ่าง และไม้สั้นไกลขณะบด ใบปาดจะถูกติดตั้งไว้ที่ขอบลอบดโดยให้มีช่องว่างระหว่างลอบดกับใบปาดเพียงเล็กน้อย จำนวน 2 อัน เพื่อป้องกันไม่ให้วัสดุที่นำมาบดติดที่ลอบ ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการบดลดลง ใบกวาด จำนวน 1 อัน ทำหน้าที่กวาดวัสดุภายในอ่าง ใบกวาดนี้จะมีลักษณะโค้งไปตามตัวอ่าง เพื่อทำหน้าที่

พลิกวัสดุที่นำมาบด ทำให้ไม่เกิดการจับตัวกัน ฝาครอบเป็นแบบเปิดและถอดออก ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้อุณหภูมิของวัสดุที่บดได้กระเด็นออกจากตัวอย่างขณะทำการบด

สวณการทำงานของเครื่อง จะขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ต้นกำลังขนาด 1 แรงม้า แบบใช้กับไฟฟ้า 1 เฟส ความเร็วรอบ 1,440 รอบต่อนาที ทำหน้าที่ส่งกำลังผ่านสายพานไปยังเกียร์ส่งกำลัง ดังภาพที่ 9 เกียร์ส่งกำลัง ทำหน้าที่เปลี่ยนทิศทางการหมุนจากระนาบแนวตั้งให้อยู่ในระนาบแนวนอน และลดความเร็วรอบ จนแกนที่ใช้อยู่ยึดล้อบดทั้งสองข้างหมุนด้วยความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที ขณะเครื่องทำงานล้อบดจะหมุนรอบตัวเองไปด้วย ทำให้เกิดแรงบดกดลงภายในอ่างอย่างต่อเนื่อง สามารถบดวัสดุได้อย่างสม่ำเสมอ ใบปาดที่ขอบล้อทั้งสองชุดยังทำหน้าที่ไม่ให้อุณหภูมิกระเซ็นไปติดกับขอบदानในของฝาครอบทำให้อุณหภูมิถูกกดลงในอ่างผลิตภัณฑ์และไหลลงไปถูกล้อบดและสามารถบดต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง



ภาพที่ 9 ต้นแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียก

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบเบื้องต้นการใช้ความเร็วรอบเครื่องที่สูงจะให้ผลการทำงานที่ดีกว่าความเร็วรอบเครื่องที่ต่ำกว่า ทั้งนี้การใช้เครื่องหั่นย่อยแปรสภาพวัสดุชีวมวลหญ้าเนเปียร์ได้ละเอียดขนาด มากกว่า 4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 26.90 – 39.61% และ อยู่ในช่วง 2.58 – 4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 29.33 – 36.36% และ

ดำเนินการออกแบบเครื่องมือในกระบวนการเตรียมวัสดุพีซีซีวมวลสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสม ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาเครื่องบดละเอียดในห้องปฏิบัติการ และดำเนินการออกแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียกในระดับชุมชน โดยตัวเครื่องทำด้วยเหล็กและสแตนเลส การบดวัสดุจะถูกบังคับให้อยู่ในร่องที่ล้อมด้วงผานตลอดเวลา จำนวน 2 ลอ เครื่องจะขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ต้นกำลังขนาด 1 แรงม้า แบบใช้กับไฟฟ้า 220 โวลต์ ความเร็วรอบ 1,440 รอบต่อนาที ทำหน้าที่ส่งกำลังผานสายพานไปยังเกียร์ส่งกำลัง จนแกนที่ชัยด์ล้อมบดทั้งสองข้างหมุนด้วยความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที ขณะเครื่องทำงานล้อมบดจะหมุนรอบตัวเองไปด้วยทำให้เกิดแรงบดกดลงในอ่างอย่างต่อเนื่อง สามารถบดวัสดุได้อย่างสม่ำเสมอ

อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการสร้างเครื่องต้นแบบต่อให้แล้วเสร็จได้เนื่องจากขาดการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยต่อ

### เอกสารอ้างอิง

- ไกรลาส เขียวทอง วีรชัย อัจจาญา อธิพิพลเผ่าไพศาล เรืองเดช ปันด้วง และสรยุทธ วินิจฉัย. 2556. คู่มือการปลูกหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1. มิตรภาพการพิมพ์. นครราชสีมา. 32 น.
- ชชนันท์ นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรือวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลสจากเอทานอลในประเทศไทย. KCU Sci. J.40 (4) 1073-1088 (2012).
- ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ. 2534. เครื่องมือวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 259 หน้า.
- ธราพงษ์ วิฑิตตานต์, นวตล เหล่าศิริพจน์ และประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ. 2553. รายงานสถานภาพของงานวิจัยและผลิตเอทานอลไบโอดีเซล ไบโอดีเซล และน้ำมันชีวภาพในประเทศไทย. สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.)
- บริษัทเอเชีย เอ็นจิเนียริงแพค จำกัด. มปป. เครื่องบดละเอียดแบบเปียก (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://www.asiaengineeringpac.co.th> [7 มิถุนายน 2558]
- อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. วารสารสิ่งแวดล้อม. ปีที่ 16 เล่มที่ 2. 8 น.
- อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์ และ พิสิษฐ์ เตชะรุ่งไพศาล. 2549. การวิจัยและพัฒนาเครื่องบดงา. วิศวกรรมสาร มข. ปีที่ 33 ฉบับที่ 4 (403- 414) กรกฎาคม - สิงหาคม 2549



## สรุป

การโคลนยีนแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1-1 ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ ABTS โดยการสกัด total RNA และเพิ่มปริมาณยีนแลคเคสจาก cDNA ได้ชิ้นส่วนของยีนแลคเคสที่มีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds* (Accession No. [FJ656307.1](#)) ที่ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ การเชื่อมต่อยีนแลคเคสเข้ากับ protein expression vector (pLATE52 vector) โดยมีตำแหน่งของ T7 promoter (P<sub>T7</sub>) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนแลคเคส ทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมขนาดประมาณ 6,063 คู่เบส แล้วทำการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน สามารถตรวจพบการปรากฏของยีนแลคเคสในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝาก พลาสมิดดีเอ็นเอ การแปรหัสสารพันธุกรรมจาก cDNA เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน พบว่า เปปไทด์ที่ได้มีขนาด 520 อะมิโนแอซิด และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession No. [ACR24357.1](#)) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยการกระตุ้นด้วยสาร 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง ตรวจพบการแสดงออกในระดับโปรตีนในปริมาณน้อย

การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ C.137 มีการเจริญเติบโตภายใน 5-7 วัน ระยะเวลา 7 วัน ได้ปริมาณเซลล์ที่เพียงพอต่อการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณยีน *ChSAD* พบว่า ได้ขนาดยีนบนดีเอ็นเอ 2898 เบส จากดีเอ็นเอ ในส่วนของ CDS และ Non CDS และได้ขนาดยีน 1290 เบส จากอาร์เอ็นเอ สามารถแปลงเป็นลำดับอะมิโนแอซิดได้ขนาด 429 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับยีน *C. reinhardtii plastid acyl-ACP desaturase (FAB2)* มีค่าความเหมือน (identity) 100 เปอร์เซ็นต์ และลำดับอะมิโนแอซิดพบว่ามีความเหมือนกับโปรตีน *plastid acyl-ACP desaturase* มีค่าความเหมือน (identity) 83 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเมื่อนำยีน *ChSAD* ไป Blast ในฐานข้อมูล NCBI พบตรงกับยีน *FAB2* ซึ่งก็คือยีน *SAD* เช่นกัน เนื่องจากการทดลองนี้ได้วางแผนการทดลองไว้ 4 ปี ซึ่งได้ดำเนินการเพียงแค่ 2 ปี ดังนั้นยีน *ChSAD* ที่โคลนได้จึงจะถูกนำไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pChlamy3 เพื่อถ่ายฝากเข้าสู่สำหรับ *C. reinhardtii* และศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสโดยกระบวนการหมักแบบแห้งด้วยเชื้อรา *Aspergillus niger* S068 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ โดยศึกษาใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เปลือกข้าวโพด, ฟางข้าว, กากชานอ้อย, Xylan การทดลองพบว่าวัสดุที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดได้แก่ ไซแลน รองลงมาได้แก่ฟางข้าว แต่ฟางข้าวเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงเห็นสมควรว่าการใช้ฟางข้าวน่าจะเป็นวัสดุที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนส สภาวะ

เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสด้วยกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้ฟางข้าวเป็นซับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 5.985 ยูนิต/มิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kavya และ Padmavathi (2009) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไซลาลเนสของเชื้อ *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักแบบ solid state fermentation โดยทั้งสองต้องการผลิตเอนไซม์ด้วยวัสดุราคาถูก ได้แก่ รำข้าวสาลี กากถั่วเหลือง กากราจ และ ซีลี้อย พบว่ารำข้าวสาลีได้เอนไซม์ปริมาณมากที่สุด ซึ่งสามารถนำมาทดแทนแหล่งคาร์บอนราคาสูงได้แก่ ไซแลนจากข้าวโอ๊ต และไซแลนจากเปลือกต้นเบิร์ช

การศึกษากการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ไซลาลเนสที่อุณหภูมิ 30, 50, 80 °C ที่อุณหภูมิ 30 °C มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 6.158 ยูนิต/มิลลิลิตร และทดสอบที่ pH10, 7 และ 4 พบว่า และ ที่ pH10 มีกิจกรรมเอนไซม์ 8.090 ยูนิต/มิลลิลิตร ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pereira (2003) ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์ไซลาลเนสจาก *B.subtilis* จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C ขึ้นไป โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลาลเนสที่บ่มอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียง 20 % ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีไซลาลเนสจากที่ผลิตได้จากแอกติโนมัยสีท ดังงานวิจัยของ Pearsai et al. (2014) ศึกษาไซลาลเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces mexicanus* 901 โดยใช้ขังข้าวโพดเป็นแหล่ง คาร์บอน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำไซลาลเนสบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี แบบเจลฟิวเรชัน ซึ่งพบว่าไซลาลเนสชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียสและที่พีเอช 3-6 งานวิจัยของ Liu et al. (2006) ศึกษาไซลาลเนสจาก *Aspergillus niger* ซึ่งพบว่าทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5 และสามารถย่อยเบิร์ชขี้ดไซแลน และรำข้าวได้ดี จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้นพบว่าไซลาลเนสที่มีแหล่งที่มาต่างกัน มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงเป็นการเพิ่มทางเลือกในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสมและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การศึกษาเก็บรักษาทำการเก็บรักษาเอนไซม์ด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) พบว่าหลังจากทำการเก็บรักษามีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงไปเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการเก็บรักษาด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ไซลาลเนส

ฟางข้าวมี องค์ประกอบของเซลลูโลส 30% เฮมิเซลลูโลส 50% และลิกนิน 15% ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งของลิกโนเซลลูโลส ส่งผลให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยได้ง่ายวัสดุได้มากขึ้นในขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส เป็นต้น

การศึกษาผลของการปรับสภาพของฟางข้าว โดยใช้กรด /ต่าง ร่วมกับ เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า (*Aspergillus niger*) จากผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1% (v/v) ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า 0.5 ยูนิต ได้น้ำตาลกลูโคส 1.576 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาความสามารถของ *Pichia pastoris* X-33 และ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้



ไฮโดรไลสเฟสฟางข้าวเป็นสับสเตรท พบว่าเชื้อยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* Sc90 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm ปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 5 ชั่วโมง เท่ากับ 3.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองในครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทฟางข้าวที่มีอยู่อย่างแพร่หลายในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากวัสดุต้นทุนต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มผลได้เอทานอลและการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเพื่อลดต้นทุนในการหล่อน้ำเย็นในการหมักระดับถังหมัก

การศึกษการผลิตไบโอเอทานอลจากพืชชีวมวลแบบครบวงจร ได้เริ่มจากการนำพืชที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ อ้อยพลังงาน ฯลฯ นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องมือแปรรูปชีวมวลให้ได้ปริมาณที่มากพอถึงถังหมักขนาด 500 ลิตร และนำมาปรับสภาพเบื้องต้น (pretreatment) ซึ่งเป็นกระบวนการกำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสออกไป โดยวิธีทางเคมี ปรับสภาพให้เป็นด่างโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้ย่อยสลาย (hydrolysis) ให้กลายเป็นน้ำตาล ในระดับห้องปฏิบัติการ เชื้อ *Actinomyces* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเอนไซม์ วัดค่าน้ำตาลได้ 0.058 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 6 จากค่าน้ำตาลที่วัดได้ในระดับห้องปฏิบัติการ หากมีปริมาณที่มาก จึงสามารถนำไปสู่กระบวนการหมักและกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่มีคุณภาพ และมากพอต่อปริมาณที่คุ้มค่าต่อไปได้

กระบวนการสร้างถังหมักเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลนั้น ได้สร้างถังขนาด 100 ลิตร จำนวน 1 ถัง ที่ออกแบบสำหรับขยายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มากพอ และนำไปสู่กระบวนการผลิตเอทานอลที่มีคุณภาพตามที่ต้องการต่อไป

สามารถผลิตไลเปสในถังหมักโดยการใช้ 1 mM IPTG เหนียวนำไป BL21 ผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 37 °C, ความเร็วรอบของการกวน 200 rpm, pH7 และ pO<sub>2</sub> ( ปริมาณออกซิเจน ) 80 % ในระยะเวลา 6 ชม. ได้ไลเปสความเข้มข้น 30 มก/มล. ไลเปสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสนปูดำ และน้ำมันรำข้าวอย่างสมบูรณ์ น้ำมันที่ได้ใสสะอาด ตกตะกอนน้อยมากเมื่อทิ้งไว้นานๆ และเมื่อนำไปผลิตไบโอดีเซล ได้เป็นไบโอดีเซลทั้งหมด ไม่มี glycerin แยกชั้นออกมา ได้ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสนปูดำ และน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 93.3, 86.7, 75.0 และ 68.5 ตามลำดับ น้ำมันปาล์ม แข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันถั่วเหลือง เหลว ใส ไม่แข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันสนปูดำ มีทั้งหนืดข้น ไปจนถึงแข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันรำข้าว หนืดข้นมาก ไม่แข็งตัวที่ 4 °C น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสนปูดำ และน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ -20 °C ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว แข็งตัวที่ 4 °C ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันถั่วเหลือง ไม่แข็งตัวที่ 4 °C มีลักษณะใส ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันสนปูดำ แข็งตัวไม่สมบูรณ์ที่ 4 °C จับกันเป็นก้อน ไม่แข็งตัว มีน้ำมันใสปน ไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชทุกชนิด แข็งตัวที่ -20 °C จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ถ้าต้องการผลิตไบโอดีเซลที่มีจุดแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ จำเป็นต้องผสมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าใช้น้ำมันพืชเดี่ยวจะได้ผลผลิตน้อย ยกต่อการปฏิบัติ

และคุณสมบัติของไบโอดีเซลอาจจะไม่ได้ตามมาตรฐาน สามารถปรับปรุงคุณภาพไบโอดีเซลให้มีจุดชุ่นที่  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  ซึ่งดีกว่าเดิมที่มีค่าจุดไหลเทอยู่ที่  $11^{\circ}\text{C}$  และได้มาตรฐานไบโอดีเซลปี100 ตามมาตรฐานสากล มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ได้ ( $p < 0.01$ ) และค่าสัดส่วนของไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันสบู่ดำ และ น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันรำข้าว ที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  มากที่สุดคือ 1:2, 1:4 และ 1:3, 1:4 ตามลำดับ ดีเซลเกรด1( ปตท. พรีเมียมเกรด ) ตกตะกอนเล็กน้อย ประมาณ 1 มล.ใน 40 มล.แต่ไม่แข็งตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน ที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  แต่แข็งตัวทันทีที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ดีเซลเกรด2 ตกตะกอนประมาณ 6 มล. ใน 40 มล. แต่ไม่แข็งตัว ที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ในระยะเวลา 3, 15 และ 30 วัน แต่แข็งตัวทันทีที่  $-20^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  แข็งตัวที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  ไม่แข็งตัวและไม่ตกตะกอนที่  $2-4^{\circ}\text{C}$  ไบโอดีเซลปี100ที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  และ  $-12^{\circ}\text{C}$  ผสมกับ ดีเซลเกรด1และ2 ทุกอัตรา แข็งตัวทันทีที่  $-20^{\circ}\text{C}$  อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $6^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 10:90 ถึง 50:50 ในระยะเวลา 5 วัน ถ้าเกินกว่าระยะเวลา 5 วัน ใช้ไม่ได้ในทุกอัตรา อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด1 คือตั้งแต่ 50:50 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน อัตราส่วนผสมที่เหมาะสมของไบโอดีเซลปี100 ที่มีจุดชุ่น  $-12^{\circ}\text{C}$  ต่อดีเซลเกรด2 คือตั้งแต่ 80:20 ถึง 90:10 มีระยะเวลาการใช้งาน 30 วัน

ผลการทดสอบด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เวลา 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้สูงที่สุด โดยพบปริมาณเซลล์ที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงน้อยที่สุดคือ 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้จะนำไปใช้ในการเก็บตัวอย่างในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาในขั้นตอนนี้จะเป็นการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายจากบ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบบ่อเปิดในระดับขยายขนาด ซึ่งได้ทำการแปรผันอัตราการไหลและระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย เพื่อให้ได้ลักษณะของตัวอย่างที่เหมาะสม โดยพบว่าที่ระดับอัตราการไหลของสาหร่ายเข้าสู่เครื่องเหวี่ยงประมาณ 500 ลิตรต่อชั่วโมง เป็นอัตราเร็วที่เหมาะสมและไม่มีเซลล์สาหร่ายเหลือทิ้งในอาหารที่เพาะเลี้ยง และใช้ระยะเวลาในการคายกากเซลล์สาหร่าย 50 นาทีต่อรอบของการปั่นเหวี่ยง มีลักษณะของเนื้อตัวอย่างสาหร่ายที่เหมาะสมต่อการนำไปอบแห้งหรือแช่แข็งไว้สำหรับรอศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการทดสอบเบื้องต้นการใช้ความเร็วรอบเครื่องที่สูงจะให้ผลการทำงานที่ดีกว่าความเร็วรอบเครื่องที่ต่ำกว่า ทั้งนี้การใช้เครื่องหันย่อยแปรสภาพวัสดุชีวมวลหญ้าเนเปียร์ได้ละเอียดขนาด มากกว่า 4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 26.90 – 39.61% และ อยู่ในช่วง 2.58 – 4.76 มม. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 29.33 – 36.36% และดำเนินการออกแบบเครื่องมือในกระบวนการเตรียมวัสดุพืชชีวมวลสำหรับผลิตเอทานอลให้เหมาะสม ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาเครื่องบดละเอียดในห้องปฏิบัติการ และดำเนินการออกแบบเครื่องบดละเอียดแบบเปียกในระดับชุมชน โดยตัวเครื่องทำด้วยเหล็กและสแตนเลส การบดวัสดุจะถูกบังคับให้อยู่ในร่องที่ล้อมด้วงผานตลอดเวลา จำนวน 2 ลอ เครื่องจะขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ตลกำลังขนาด 1 แรงม้า แบบใช้กับไฟฟ้า 220 โวลต์ ความเร็วรอบ 1,440 รอบต่อนาที ทำหน้าที่ส่งกำลังผานสายพานไปยังเกียร์ส่งกำลัง จนแกนที่ไชยึดล้อมด้วง

สองข้างหมุนด้วยความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที ขณะเครื่องทำงานล้อยอบจะหมุนรอบตัวเองไปด้วย ทำให้เกิดแรงบดกดลงในอ่างอย่างต่อเนื่อง สามารถบดวัสดุได้อย่างสม่ำเสมอ

อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่สามารถดำเนินการสร้างเครื่องต้นแบบต่อให้แล้วเสร็จได้เนื่องจากขาดการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยต่อ

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื้อ *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1 สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลังงานจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส การกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทอผ้า ฟอกย้อม เยื่อกระดาษ การย่อยสลายของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชพวก Isoxafutole เป็นต้น
2. สามารถนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมหรือยีน laccase ที่ได้จากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1 ถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ยีสต์เพื่อการผลิตเอนไซม์ในระบบอุตสาหกรรม ช่วยทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ
3. สามารถนำเอายีน SAD ที่โคลนได้ไปถ่ายยีนเข้า *Chlamydomonas reinhardtii* แบบ Overexpression เพื่อศึกษาการผลิตไบโอดีเซลต่อไป
4. . ไบโอดีเซลที่ได้ สามารถนำไปใช้กับเครื่องจักรกลการเกษตร และเครื่องยนต์ดีเซลทั่วไป ในสภาพอากาศเย็นและสภาพอากาศปกติ และสามารถดมลพิษได้ ซึ่งถ้าดีเซลไม่ตกตะกอนลงมาก่อน จะสามารถเพิ่มอัตราส่วนของไบโอดีเซลและระยะเวลาการใช้งานได้มากกว่าที่ได้รายงานไว้
5. สามารถนำกรรมวิธีการผลิตไปเผยแพร่ใช้กับกลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจ เพราะเป็นกรรมวิธีที่ง่าย ประหยัด