

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการตรึงรูปไลเฟสจาก *Fusarium solani*



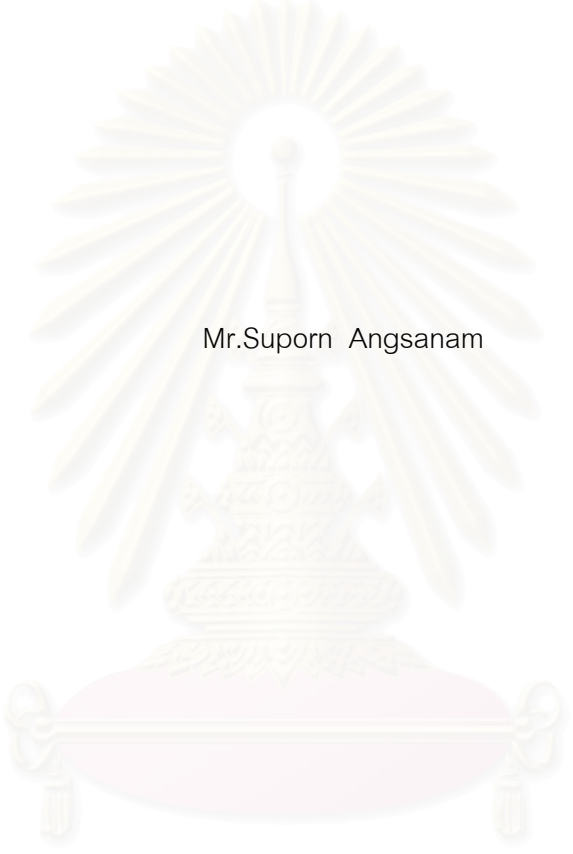
นายศุภร อังชันนาม

สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION AND IMMOBILIZATION FROM
Fusarium solani



Mr. Suporn Angsanam

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการตรึงรูปไลเพสจาก

Fusarium solani

โดย

นายศุภร อังษานาม

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณี จุฬาลักษณ์านุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

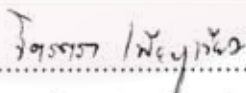
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)



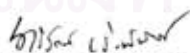
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณี จุฬาลักษณ์านุกูล)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)



..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวีเชียร)

ศุภร อังชานาม : ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการตรึงรูปไลเปสจาก *Fusarium solani*.
(OPTIMAL CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION AND IMMOBILIZATION FROM
Fusarium solani) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล, 115 หน้า.

ศึกษามลของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว และอุณหภูมิ เพื่อปรับปรุง
การผลิตไลเปสจาก *Fusarium solani* CU103 จากการทดสอบแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่า น้ำมันรำ
ข้าวที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด คือ 0.84 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อนำมาเลี้ยงใน
อาหารเหลวที่มีการเติมเปปโตนที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น
 3.64 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัม อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสของราสายพันธุ์นี้อยู่ที่ 30
องศาเซลเซียส นำสารละลายไลเปสที่ผลิตได้ทำให้มีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิลเตรชัน แล้ว
นำไปทำการตรึงรูปไลเปสบนวัสดุค้ำจุณ 5 ชนิด ได้แก่ AB8 D4020 H103 NKA และ NKA9 ด้วยวิธีตรึง
รูปโดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำไลเปสตรึงรูปทดสอบ
ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพบว่า ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุณชนิด NKA ที่ความเข้มข้น
ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ
 17.35 ± 0.83 ยูนิตต่อกรัมของไลเปสตรึงรูป และทดสอบความเสถียรของไลเปสตรึงรูปหลังจากการตรึง
รูป พบว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และทดสอบความ
เสถียรต่อสารละลายอินทรีย์พบว่าเอกเซนมีความเสถียรดีที่สุด การนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้เร่ง
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมีค่าการเร่งที่ลดลงเป็น 28.75 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้ไลเปสตรึงรูป 12 ครั้ง
เมื่อศึกษาการนำไลเปสตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยศึกษามลของอัตราส่วนโดยระหว่าง
น้ำมันกับเมทานอล และปริมาณน้ำ ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน พบว่า ภาวะที่เหมาะสมของการ
เกิดปฏิกิริยา คือ น้ำมันปาล์ม 3 กรัม อัตราส่วนโดยโมลน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 1 : 4 ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา
อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิต
เมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 92.62 ± 3.27 เปอร์เซ็นต์ การนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ เมื่อใช้เฮกเซน และไอโซ
โพรพานอล ส่วนส่วนของกลีเซอรอลออกในช่วงระหว่างนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีที่
ลดลงเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 25.41 ± 0.47 และ 18.44 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้ไลเปสตรึง
รูป 6 ครั้ง ตามลำดับ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....ศุภร อังชานาม
ปีการศึกษา.....2551.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....จิตรตรา เพ็ญเขียว
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972512823: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: *Fusarium solani* / LIPASE/ TRANSESTERIFICATION

SUPORN ANGSANAM : OPTIMAL CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION AND

IMMOBILIZATION FROM *Fusarium solani*. ADVISOR : ASST. PROF. JITTRA

PIAPUKIEW, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT

CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 115 pp.

The effects of different carbon sources and nitrogen sources added to basal medium and temperature on lipase from *Fusarium solani* CU103 were studied with the aim of improving enzyme production. Among carbon sources tested, refined rice bran oil at the concentration of 1.0% (v/v) was found to be the best carbon source with the maximum lipase specific activity of $0.84 \pm 0.06 \text{ U.mg}^{-1}$. When this medium was supplemented with peptone as nitrogen source at the concentration of 1.0% (w/v), the lipase specific activity increased to $3.64 \pm 0.05 \text{ U.mg}^{-1}$. The optimal temperature for lipase production of the fungal strain was 30°C. To study the immobilization of lipase, the crude enzyme was concentrated using ultrafiltration method. The concentrated crude lipase was immobilized within different macroporous resins such as AB8, D4020, H103, NKA and NKA9 using cross-linking method with different concentration of glutaraldehyde. The results showed that the immobilized lipase within NKA at the concentration of 2.0 % glutaraldehyde gave the highest hydrolysis activity of $17.35 \pm 0.83 \text{ U.g}^{-1}$ of immobilized lipase. The stability of lipase activity of immobilized lipase was tested. The immobilized lipase stabilized at 35°C and pH 7.0. Immobilized lipase was treated with several organic solvents, hexane gave the highest stability. The immobilized lipase was lost hydrolysis activity when was subjected to repeat uses. The activity decreased to $28.75 \pm 1.20\%$ of which enzymatic activity remained after 12 batches. Using the immobilized lipase, the effects of oil/alcohol molar ratio and water concentration in the transesterification reaction were investigated. The optimal conditions for the reaction 3 g of palm oil were: 1:4 oil/methanol molar ratio, no water and 40°C for 24 h. Maximum methyl ester yield was $92.62 \pm 3.27 \%$. The immobilized lipase was lost activity in transesterification reaction when was subjected to repeat uses. When hexane and isopropanol were adopted to remove by-product glycerol during repeated use of the immobilized lipase, the activity decreased to $25.41 \pm 0.47\%$ and $18.44 \pm 0.33\%$ of which enzymatic activity remained after 6 batches, respectively.

Department :Biotechnology.....

Student's Signature :

Suporn Angsanam

Academic Year :2008.....

Advisor's Signature :

Jittira Piapukiew

Co-Advisor's Signature :

Warawut Chulalak

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย
ดังต่อไปนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้
ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่กรุณามาเป็นประธาน
ในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อการตีพิมพ์และ
เผยแพร่ แก่งานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

กราบขอบพระคุณบิดามารดา ตลอดจนครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุน และให้
กำลังใจตลอดมา

และท้ายที่สุด ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง และทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และ
กำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.2 ขั้นตอนการวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไลเพส.....	4
2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส.....	4
2.3 แหล่งของไลเพส.....	6
2.3.1 ไลเพสจากสัตว์.....	6
2.3.2 ไลเพสจากพืช.....	7
2.3.3 ไลเพสจากจุลินทรีย์.....	7
2.3.3.1 ไลเพสจากราและยีสต์.....	9
2.4 การสร้างไลเพสของจุลินทรีย์.....	10
2.5 การผลิตไลเพส.....	11
2.6 ปัจจัยการผลิตไลเพส.....	11
2.6.1 ผลของแหล่งคาร์บอน.....	11
2.6.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน.....	12
2.6.3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง.....	13
2.7 สมบัติทางเคมีกายภาพ.....	13
2.7.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์.....	13
2.7.2 ความจำเพาะของไลเพส.....	14
2.7.2.2 ความจำเพาะต่อซับสเตรท.....	15

2.7.3 ผลของอิออนของโลหะต่อแอกทิวิตีของไลเพส.....	16
2.7.4 สารยับยั้งกิจกรรมไลเพส.....	16
2.8 เอนไซม์ตรีงรูป.....	16
2.8.1 ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรีงรูป.....	18
2.8.2 วัสดุค้ำจุนสำหรับการตรีงรูปเอนไซม์.....	18
2.8.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรีงรูป.....	20
2.8.4 กระบวนการทำเอนไซม์ตรีงรูป.....	20
2.8.5 วิธีการตรีงรูปเอนไซม์.....	21
2.8.6 รูปของเอนไซม์ตรีงรูป.....	25
2.8.7 ประโยชน์และความสำคัญของไลเพสในด้านอุตสาหกรรม.....	26
2.8.7.1 ไลเพสในสารซักล้าง.....	27
2.8.7.2 ไลเพสในยาฆ่าแมลง.....	27
2.8.7.3 ไลเพสในอุตสาหกรรมอาหาร.....	27
2.8.7.4 ไลเพสในการผลิตเชื้อเพลิง.....	28
2.9 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	28
2.9.1 การใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน.....	29
2.9.2 ระบบการผลิตไบโอดีเซล.....	32
2.9.3 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซล.....	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	35
3.2 สารเคมี.....	35
3.3 วัสดุดิบ.....	36
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	37
3.4.1. การเตรียมราสายพันธุ์ <i>F. solani</i> CU103 เพื่อใช้ทดสอบ.....	37
3.4.2. ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเพื่อสามารถผลิตไลเพสได้สูง....	38
3.4.2.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	38
3.4.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	39
3.4.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตไลเพส.....	39
3.4.2.4 การวัดค่าแอกทิวิตีของไลเพสทั้งหมด	39
3.4.2.5 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....	40
3.5 ตรีงรูปไลเพสจากราบนวัสดุค้ำจุน.....	40

3.5.1	เตรียมสารละลายไลเพส.....	40
3.5.2	สร้างรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุนด้วยวิธีการเชื่อมขวาง	40
3.6	ทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสสร้างรูป.....	42
3.6.1	อุณหภูมิ	42
3.6.2	ค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	42
3.6.3	สารละลายอินทรีย์.....	42
3.6.4	การนำกลับมาใช้ซ้ำของไลเพสสร้างรูป.....	42
3.7	ทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเพสสร้างรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	43
3.7.1	โดยทำการเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นำน้ำมันปาล์ม อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันกับเมทานอลเป็น 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6.....	43
3.7.2	การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง.....	43
3.7.3	การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง.....	44
3.7.3.1	การเตรียมตัวอย่าง.....	44
3.7.3.2	วิธีการใช้เครื่อง HPLC.....	44
3.7.4	ศึกษาความเสถียรของไลเพสสร้างรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ.....	44
บทที่ 4	ผลการทดลอง	45
4.1	ผลการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเพื่อสามารถผลิตไลเพสได้สูง....	45
4.1.1	ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยรา <i>F. solani</i> CU103.....	45
4.1.2	ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	48
4.1.3	ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	50
4.1.4	ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตไลเพส.....	53
4.2	ผลการสร้างรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุน.....	55
4.3	ผลทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสสร้างรูป.....	59
4.3.1	ผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสสร้างรูป.....	59
4.3.2	ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสสร้างรูป.....	60
4.3.3	ผลการศึกษาสารละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสสร้างรูป....	61

4.3.4 ผลการศึกษาความเสถียรของไลเพสตรึงรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ.....	62
4.4 ผลทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	62
4.4.1 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง.....	62
4.4.2 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยเทคนิค HPLC.....	65
4.4.3 ศึกษาความเสถียรของไลเพสตรึงรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ.....	68
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการทดลอง.....	69
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	78
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	89
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	92
ภาคผนวก ค.....	94
ภาคผนวก ง.....	98
ภาคผนวก จ.....	102
ภาคผนวก ฉ.....	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	115

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสที่ใช้ทางการค้า..... 8
2	แสดงการเปรียบเทียบการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธีการต่าง ๆ..... 26
3	การเปรียบเทียบระหว่างวิธีการใช้กรด-ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการใช้ไลเปส เร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล..... 31
4	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ของ <i>F. solani</i> CU103.....
5	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากราชนิดต่าง ๆ..... 49
ค. 1	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร..... 95
ค. 2	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม..... 97
จ. 1	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราสายพันธุ์ <i>F. solani</i> CU103 ระหว่างแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ..... 102
จ. 2	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราสายพันธุ์ <i>F. solani</i> CU103 ระหว่างแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ..... 102
จ. 3	ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราสายพันธุ์ <i>F. solani</i> CU103 ระหว่างอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตไลเปส..... 103
ฉ. 1	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 1..... 104
ฉ. 2	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 2..... 105
ฉ. 3	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 3..... 106
ฉ. 4	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 4..... 107
ฉ. 5	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 5..... 108

จ. 6	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 6.....	109
จ. 7	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 7.....	110
จ. 8	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 1.....	111
จ. 9	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 2.....	111
จ. 10	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 3.....	112
จ. 11	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 4.....	112
จ. 12	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 5.....	113
จ. 13	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 6.....	113
จ. 14	แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ <i>F. solani</i> CU103 วันที่ 7.....	114

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	1
2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโคไนด์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วันของราสายพันธุ์ <i>F. solani</i> CU103.....	37
3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย และโคนเดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราสายพันธุ์ <i>F. solani</i> CU103 ที่เจริญบนชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....	38
4	วัสดุค้าจุน 3 ชนิด (ก) H103 (ข) AB-8 และ (ค) NKA-9.....	41
5	วัสดุค้าจุน 2 ชนิด (ง) NKA และ (จ) D4020.....	42
6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง และระยะเวลาในการเลี้ยงรา <i>F. solani</i> CU103 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์.....	46
7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง และระยะเวลาในการเลี้ยงรา <i>F. solani</i> CU103 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์.....	47
8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง และระยะเวลาในการเลี้ยงรา <i>F. solani</i> CU103 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์.....	47
9	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา และระยะเวลาในการผลิตไลเพส เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์.....	51
10	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา และระยะเวลาในการผลิตไลเพส เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์.....	52
11	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา และระยะเวลาในการผลิตไลเพส เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ	54
12	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพส(เปอร์เซ็นต์) กับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) (ก) AB28 (ข) D402.....	56

- 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสกับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ค) H103 - (ง) NKA..... 57
- 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพส (เปอร์เซ็นต์) กับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (เปอร์เซ็นต์) กับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) (จ) NKA9..... 58
- 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส..... 59
- 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในสารละลายบัฟเฟอร์..... 60
- 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปกับชนิดสารละลายอินทรีย์..... 61
- 18 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับจำนวน(ครั้ง)ที่ทำปฏิกิริยา..... 62
- 19 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยเร่งด้วยไลเพสตรึงรูป โดยเลนที่ 1 น้ำมันปาล์ม เลนที่ 2 B100 เลนที่ 3-8 ไลเพสตรึงรูปที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม และการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 8 16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ..... 64
- 20 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่น้ำในปฏิกิริยา 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ข) เร่งด้วยไลเพสตรึงรูป โดยใช้ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม และการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเลนที่ 1-6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอเลอิก และเมทิลโอเลเอต เลนที่ 7-12 อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยเมีลตามลำดับ..... 64

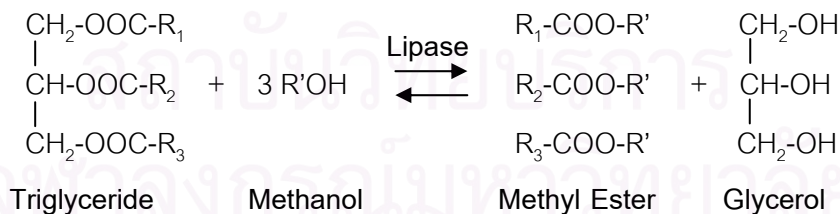
21	<p>โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่น้ำในปฏิกิริยา 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ข) เร่งด้วยไลเพสอิสระ โดยใช้ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม และการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 8 16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยเลขที่ 1-6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอเลอิก และเมทิลโอเลเอต เลขที่ 7-12 อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยโมลตามลำดับ.....</p>	65
22	<p>ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์กับอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:6) โดยไม่มีการเติมน้ำเข้าไปในปฏิกิริยา.....</p>	66
23	<p>แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์กับอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:6) โดยเติมน้ำปริมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด เข้าไปในปฏิกิริยา.....</p>	67
24	<p>แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์กับอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:6) โดยเติมน้ำปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด เข้าไปในปฏิกิริยา.....</p>	67
25	<p>แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์กับจำนวนที่ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....</p>	68
ค. 1	<p>กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร...</p>	94
ค. 2	<p>กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม.....</p>	96

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมีการผลิตไลเปสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้นในหลาย ๆ อุตสาหกรรม เนื่องด้วยจากคุณสมบัติของไลเปสที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด ความคงทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง และอุณหภูมิที่สูง จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ อาหาร น้ำยาซักล้าง เครื่องสำอาง ยา เชื้อเพลิงชีวภาพ ขจัดเศษไขมันออกจากวัตถุผลิตภัณฑเครื่องหนัง เป็นต้น (Posorske, 1984) นอกจากนี้ไลเปสสามารถนำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยเลือกนำมาทำปฏิกิริยาน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์กับเมทานอลหรือเอทานอล จะได้เมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ซึ่งก็คือ ไบโอดีเซล (Fukuda, Kondo และ Noda, 2001)

ไลเปส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry คือ "Triacylglycerol hydrolase" เป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวเร่ง (catalyst) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) (Brockerhoff และ Jensen, 1974) ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ และจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้ในสภาวะ oil-water interface (Cihangir และ Sarikaya, 2004) นอกจากนี้ไลเปสสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (transesterification) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
ที่มา : (Fukuda, Kondo และ Noda, 2001)

อย่างไรก็ตามไลเพสที่ผลิตในรูปเชิงการค้ายังมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์ให้มีแอกทิวิตีที่สูง การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจึงมีความสำคัญ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่งและพบว่าราเป็นจุลินทรีย์แหล่งที่ดีในการผลิตไลเพส

เนื่องจากไลเพสพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ไลเพสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเพสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์สามารถเจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ ไลเพสจากราเป็นแหล่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากเราสามารถหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไลเพสได้ จึงมีการนำไลเพสจากราไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมมากมายโดยเฉพาะไลเพสที่ผลิตได้จาก *Fusarium* spp. มีความสำคัญโดยสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สามารถใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลนิยมใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่เนื่องจากวิธีนี้มีข้อเสียคือ เกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการ ทำให้เกิดความยุ่งยากต่อกระบวนการแยกไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ ส่งผลให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่าย และเวลามากขึ้น การใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อดีมากกว่าการใช้สารเคมีอยู่หลายประการเช่น มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากกว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบริสุทธิ์ แต่ข้อเสียเปรียบของการใช้ไลเพสที่สำคัญคือ มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของรา *Fusarium* spp. จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง และในอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงการใช้ไลเพสให้คุ้มค่าต่อการลงทุน การตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุ้นที่เหมาะสมเพื่อที่จะสามารถนำไลเพสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง โดยมีการศึกษาเทคนิคในการตรึงรูปและการเลือกวัสดุค้ำจุ้นที่เหมาะสมกับไลเพสมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์ สารตั้งต้นของปฏิกิริยาเป้าหมายการใช้ประโยชน์ และวัสดุค้ำจุ้นซึ่งได้จากธรรมชาติ หรือสังเคราะห์ขึ้นเอง เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศเป็นอย่างมากในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการตรึงรูปไลเพสจาก *Fusarium solani* CU103

ขั้นตอนการวิจัย

- 1) คำนคว้า และรวบรวมเอกสารสำหรับการวิจัย
- 2) เตรียมวัสดุพันธุ์ *F. solani* CU103 เพื่อใช้ทดสอบ
- 3) หาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเพื่อสามารถผลิตไลเพสได้สูง
- 4) ตีรึงรูปไลเพสจาก *F. solani* CU103 บนวัสดุค้ำจุน
- 5) ทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตีรึงรูป
- 6) ทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตีรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
- 7) วิเคราะห์ สรุปลงงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการตีรึงรูปไลเพสที่แยกได้จาก *F. solani* CU103 เพื่อพัฒนาใช้ในปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไลเพส

ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (triacylglycerol hydrolase) และยังมีชื่อเรียกอื่น ๆ อีก เช่น เอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (acylglycerol hydrolase) ไตรเอซิลกลีเซอรอล ไลเพส (triacylglycerol lipase) นอกจากนี้คณะกรรมการเอนไซม์ (Enzyme Commission; EC) ได้กำหนดการตั้งชื่อเอนไซม์ (nomenclature) โดยจัดแบ่งเอนไซม์ออกเป็นพวกต่าง ๆ (classification) ตามชนิดปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) รหัสเอนไซม์นี้ประกอบด้วยตัวเลขสี่ชุด แต่ละชุดจะแยกออกจากกันโดยจุด ตัวเลขชุดแรกจะบ่งถึงพวก (class) ที่เอนไซม์นั้นถูกจัดไว้ ซึ่งมีหกพวก ส่วนตัวเลขชุดที่สองและชุดที่สามของรหัสเอนไซม์ จะบอถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง สำหรับตัวเลขชุดที่สี่จะช่วยให้แยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคล้ายกันออกจากกัน ซึ่งไลเพสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ที่บ่งบอกปฏิกิริยาดังนี้

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

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

E.C.3.1.1. - Carboxylic ester hydrolases.

E.C.3.1.1.3 Triacylglycerol lipase.

2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

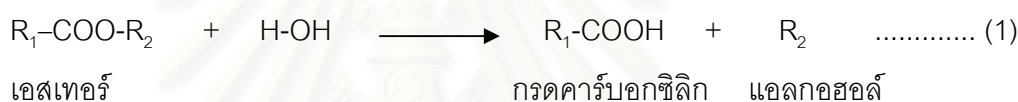
ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) (Brockerhoff และ Jensen, 1974) ซึ่งจะได้กรดไขมัน (free fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์ และยังพบว่าไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และโมนอกลิเซอไรด์ (monoglycerides) อาจเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ (Macrae, 1983) ไลเพสทำการย่อยสลายสารตั้งต้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในภาวะรูบิมัลชัน (oil-water interface) (Cihangir และ Sarikaya, 2004) เนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ

(insoluble water) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate) อาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ในพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสารตั้งต้น

นอกจากไลเปสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ ยังมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่น ๆ ได้อีกหลายปฏิกิริยาดังสมการ เช่น เมื่อในปฏิกิริยามีสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ไลเปสสามารถทำให้เกิดการย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ ซึ่งก็เป็นการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ จะได้เอสเทอร์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ หรือเร่งปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายหมู่เอซิล (acyl groups) สารจำพวกแอลกอฮอล์ (alcohols) เอสเทอร์ (ester) ไกลโคไซด์ (glycosides) และเอมีน (amines) เป็นต้น (Schmidt-Dannert และคณะ, 1994; Gupta และคณะ, 2004).

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 แบบ (Yamane, 1987) คือ

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)



ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดคาร์บอกซิลิก และแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดในสารละลายที่มีน้ำอยู่ในปริมาณที่มาก

2. ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Synthesis)

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification)



ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ของกรดคาร์บอกซิลิกด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR group) จากแอลกอฮอล์

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification)



ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการแทนที่หมู่แอลคอกซิล (OR_2 group) จากเอสเทอร์ A ด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR_3 group) จากแอลกอฮอล์ A ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ชนิดใหม่

ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification)



ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่แอลคอกซิล (OR_2 group และ OR_4 group) ระหว่างเอสเทอร์ 2 ชนิด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ใหม่ 2 ชนิด

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ก็เป็นปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายหมู่เอซิลระหว่างสาร ปฏิกิริยานี้เป็นการสังเคราะห์เอสเทอร์ในระบบที่มีน้ำน้อย (Shimada และคณะ, 1993) หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีแอลกอฮอล์และน้ำมันจากพืชเป็นสารตั้งต้น (substrate) และเร่งด้วยไลเปส เป็นปฏิกิริยาที่น่าสนใจในการนำมาไปทำการสังเคราะห์เอสเทอร์ หรือการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel)

2.3 แหล่งของไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์สำคัญในเมตาบอลิซึม (metabolism) ของไขมันซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตจึงพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และ จุลินทรีย์ (Sztajer และคณะ, 1988)

2.3.1 ไลเปสจากสัตว์ (Animal lipases)

ไลเปสจากตับอ่อน (pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลไขมันในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เอนไซม์ประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อ (tissue enzyme) นี้มีบทบาทและความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคและในทางการแพทย์ จึงมีความพยายามเสาะหาแหล่งเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งใหม่ ๆ อยู่ตลอดเวลา Steiner และ Williams (2002) พบว่า ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล Canine เป็นแหล่งของไลเปสที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องมาจากมีลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) คล้ายกับไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์สายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ *Sus scrofa* (หมู) *Bos taurus* (วัว) และโดยเฉพาะใน

Homo sapiens (มนุษย์) ปัจจุบันจึงให้ความสนใจไลเปสจาก Canine มากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้

2.3.2 ไลเปสจากพืช (Plant lipases)

ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อซับสเตรตสูง และมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและจุลินทรีย์ (Huang และคณะ, 1988) ดังนั้นจึงมีผู้ให้ความสนใจไลเปสจากแหล่งนี้ไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

ผลปาล์ม เมล็ดข้าวโพด เมล็ดทานตะวัน เมล็ดถั่วเหลือง มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้า เป็นแหล่งสำคัญของไลเปส Huang (1984) รายงานว่าโดยธรรมชาติเมล็ดพืชจะสะสมไขมันไว้ในรูป lipid-bodies และ glyoxysome อันเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปส ขณะที่ไลเปสของเมล็ดธัญพืช (grain lipase) พบได้ในรำ (bran) เช่น รำข้าวสาลี และรำข้าวเจ้า Mangos และคณะ (1999) พบไลเปสในยางมะละกอ ซึ่งเป็นที่ทราบกันอยู่ดีว่ายางมะละกอเป็นแหล่งเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteases) ได้แก่ papain และ thiol protease นอกจากนี้ยังพบไลเปสในตระกูลหญ้า (Gramineaceae) ที่มีราคาไม่แพง ซึ่ง Mohamed และคณะ (2000) รายงานว่า พบไลเปสใน *Avena fatua* สูงถึง 93.3 ยูนิตต่อกรัม

2.3.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Microbial lipases)

เนื่องจากไลเปสจากพืชถูกพบในเนื้อเยื่อที่ให้พลังงาน (energy tissue) ส่วนไลเปสจากสัตว์ มักจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเมตาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism) ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมัน และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (lipoprotein metabolism) ทำให้เกิดความซับซ้อนในการสกัดซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นแหล่งของไลเปส ด้วยเหตุนี้แหล่งไลเปสทั้งสองจึงยังไม่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งต่างกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย เป็นแหล่งของไลเปสที่ถูกนำไปใช้อย่างมากมายในอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ Jaeger และ Reetz (1998) ได้อธิบายว่าไลเปสจากแหล่งจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญ 4 ประการ คือ (1) มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (2) ในการทำงานไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactors) (3) มีความจำเพาะต่อซับสเตรตหลายชนิด (4) มี enantioselectivity สูง

จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสพบได้ในแหล่งต่าง ๆ ทางธรรมชาติ เช่น ในน้ำเสียหรือดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหรือไขมัน (Gao และคณะ, 2000; Fungthong, 2001) เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารที่เน่าเสีย (Sztajer และคณะ, 1988) กองปุ๋ยหมัก (compost heaps) (Wang และคณะ, 1995) แม้กระทั่งน้ำพุร้อน (Boonsinthalai และ Phutrakul, 1999) ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสที่ถูกใช้ในทางการค้า 98 สายพันธุ์ โดยเป็นรา 39 สายพันธุ์ ยีสต์ 20 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 39 สายพันธุ์ สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังกล่าวแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสที่ใช้ทางการค้า

แบคทีเรีย	รา	ยีสต์
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Absida corymbifera</i>	<i>Candida</i> sp.
<i>A. lipolyticus</i>	<i>A. hyalospora</i>	<i>C. antarcea</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>C. auricularia</i>
<i>A. pseudoalcaligenes</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>C. curvata</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>C. lipolitica</i>
<i>A. denitrificans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. deformans</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>A. nidulans</i>	<i>C. foliorum</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. humicola</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. rugosa</i>
<i>B. laterosporus</i>	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>C. tsukubaensis</i>
<i>B. sphereicus</i>	<i>Coelomyceles</i>	<i>Pichia miso</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Saccharomyces fragilis</i>
<i>B. thaiminolyticus</i>	<i>F. solani</i>	<i>S. fibuligera</i>
<i>B. thermonocatenulatus</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>S. lipolytica</i>
<i>B. thermoleovocans</i>	<i>Glomus versiforme</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Hansenula anomala</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
<i>C. chocolatum</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Talaromyces thermophilus</i>
<i>C. viscosum</i>	<i>H. lanuginose</i>	<i>Thielavia minor</i>
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	<i>Torula thermophila</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Mucor javanicus</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Mucor lipolyticus</i>	
<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Mucor miehei</i>	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	รา	ยีสต์
<i>F. ferruginem</i>	<i>Mucor pusillus</i>	
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Neurospora sitophila</i>	
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Nocardia amarae</i>	
<i>Malbrancheae pulcella</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	
<i>Micrococcus frendenreichii</i>	<i>P. camembert</i>	
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>P.cyclopium</i>	
<i>Myxococcus xantus</i>	<i>P. roquefortii</i>	
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>P. candidum</i>	
<i>P. granulosum</i>	<i>P. citrinum</i>	
<i>Protaminobacter alboflavus</i>	<i>P. simplicissimum</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>P. solitum</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. urticae</i>	
<i>P. cepacia</i>	<i>Phycomyces nitens</i>	
<i>P. fluorescen</i>	<i>Rhizomucor meihei</i>	
<i>P. fragi</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	
<i>P. pseudoalcaligens</i>	<i>R. chinensis</i>	
<i>P. stutzeri</i>	<i>R. delemar</i>	

ที่มา: (Godfredsen (1990); Pandey และคณะ (1991); Mayordomo และคณะ (2000))

2.3.3.1 ไลเพสจากราและยีสต์

ไลเพสที่ใช้กันแพร่หลายในทางการค้าส่วนใหญ่ได้จากรา ได้แก่ *Mucor javanicus*, *Humicola launginosa*, *Rhizopus* sp. *Geotrichum* sp. และ *Aspergillus* sp. และยีสต์ ได้แก่ *Candida lipolytica*, *C. antarctica*, *C. rugosa* และ *C. cylindracea*

ไลเพสที่ได้จากราและยีสต์มักมีหลายฟอร์ม เช่น ไลเพส I และ II (Lipase I and II) จาก *Rhizopus niveus* เอนไซม์สองชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันแม้ว่าจะได้จากสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเอนไซม์ I สามารถเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ II ได้โดย limited proteolysis (Kohno และ

คณะ, 1994) นอกจากนี้ *G. candidum* ATCC 34614 ผลิตไลเปสได้ 4 ชนิดที่มีสมบัติต่างกัน แต่ไลเปส I เป็นชนิดที่ถูกรับเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์ชนิดนี้ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันที่จับโมเลกุลของกลีเซอรอล ขณะที่ไลเปส IV จำเพาะต่อตำแหน่งกรดไขมัน (Sugihara และคณะ, 1994) สำหรับ *C. antractica* ผลิตไลเปส 2 ชนิดคือ lipase A และ lipase B โดย lipase B มี stereoselective ต่อ R-isomer ของ ketoprofen ใน chiral solvent เช่น isopentyl methyl ketone (Arroyo และ Sinisterria, 1995)

Fusarium spp. เป็นกลุ่มราที่สามารถสร้างไลเปสได้ จากที่มีการรายงานตัวอย่างเช่น Gulati และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสจาก *F. globulosum* พบว่า ราใช้ neem oil สามารถผลิตไลเปสให้แอกทิวิตีสูงที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ และยังพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส Peter Rapp (1995) ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของอาหารสำหรับการผลิตไลเปส จาก *F. oxysporum* f. sp พบว่า น้ำมันมะกอก มีผลการเพิ่มระดับแอกทิวิตีของไลเปส และ เปปโตินมีความสำคัญในการผลิตไลเปสอีกด้วย

2.4 การสร้างไลเปสของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสได้ จะมีทั้งที่สามารถผลิตไลเปสที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular lipases) และไลเปสที่ผลิตอยู่ภายในเซลล์ (intracellular lipases) กล่าวคือ จุลินทรีย์มีความสามารถผลิตเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์ จะถูกตรึงนำมาใช้ในการตรึงแบบใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นตัวเร่ง (immobilized whole cell biocatalyst) ซึ่งการตรึงแบบใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นตัวเร่งจะเป็นวิธีที่ง่ายในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์ก็จะง่ายต่อการตรึงและแยกเอนไซม์ออกมาใช้ ไลเปสที่นำมาใช้เพื่อผลิตไบโอดีเซลจะนิยมใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์ และพบว่าราเส้นใย (filamentous fungi) จะเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าว ไลเปสจากราจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมในหลาย ๆ ด้านรวมทั้งนำมาใช้เป็นเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

2.5 การผลิตไลเปส

ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งในอาหารเหลว (submerge culture) และบนอาหารแข็ง (solid state) Pandey และคณะ (1999) รายงานว่า การผลิตไลเปสบนอาหารแข็งมีข้อดีกว่าการผลิตในอาหารเหลวหลายประการ ได้แก่ จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ง่าย เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณ (yield) และความเข้มข้นสูงกว่าการผลิตในอาหารเหลว นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคในกระบวนการแยกและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า และทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตามปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่เป็นการผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะเป็นการผลิตจากรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นเพราะสามารถปรับสภาพการเลี้ยง สารอาหาร และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสในอาหารเหลวทำได้ง่ายกว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ได้แก่ ชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (Elibol และ Ozer, 2001)

2.6 ปัจจัยการผลิตไลเปส (Factors for lipase production)

2.6.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการเจริญเติบโต และการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์ นอกจากชนิดของคาร์บอนแล้วปริมาณของคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เช่นกัน การเลือกชนิดและปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตเอนไซม์ (Stanbury และคณะ, 1995)

จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้เอง จำเป็นต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำ (Inducer) เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งสารเหนี่ยวนำนี้อาจเป็นสารชนิดเดียวหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก็ได้

Essamri และคณะ (1998) รายงานว่า แอกทิวิตีของไลเปสเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำมันเป็นสารเหนี่ยวนำ จากการเติมน้ำมันชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสจาก *R. oryzae* พบว่าทั้งการเจริญของ *R. oryzae* และแอกทิวิตีไลเปสที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำมันถึง 3 เท่า เช่นเดียวกับ Vanot และคณะ (2001) พบว่า *Penicillium cyclopium* สามารถผลิตไลเปสได้มากถึง 45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มี corn steep และ

น้ำมันมะกอกอย่างละ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ขณะที่มีการสังเคราะห์ไลเปส จากการใช้ไขมันชนิดต่างๆ เป็นสารเหนียวนำร่วมกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของ Rathi และคณะ (2001) พบว่า น้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นสารเหนียวนำที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไลเปสจาก *Burkholderia cepacia*

จากผลการทดลองในรายงานต่าง ๆ ข้างต้นจะเห็นว่า น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีผลต่อแอกทิวิตีไลเปสต่างกันในการผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ Maia และคณะ (2001) ศึกษาผลของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ triolein น้ำมันงา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะกอก ต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* พบว่าน้ำมันงามีผลทำให้ราผลิตไลเปสได้สูงที่สุด รองลงมาคือ triolein น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันมะกอก ส่วนอาหารที่เติมน้ำมันมะพร้าวให้แอกทิวิตีไลเปสต่ำที่สุด ซึ่งจากการวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า แม้ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่ก็มีความสามารถในการใช้น้ำมันแต่ละชนิดในการผลิตไลเปสต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพและเคมี (physico-chemical properties) ของน้ำมันแต่ละชนิด

2.6.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ในโตรเจนแตกต่างกัน บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ได้ ขณะที่บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ได้ดี ดังนั้นการผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณสูงสุดจึงต้องเลือกใช้ไนโตรเจนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Boze และคณะ, 1995; stanbury และคณะ, 1995)

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอาหารเชิงซ้อน (complex media) ได้ถูกนำมาใช้ในอาหารผลิตมากขึ้น เช่น corn steep liquor และกากถั่วเหลือง เนื่องจากช่วยในการกระตุ้นให้มีการผลิตไลเปส แต่แอกทิวิตีเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ยังน้อยกว่าการใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังเช่น Maia และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาผลของการเติมเปปโตเนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญในการผลิตไลเปส นอกจากนี้การใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์กลับมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ไลเปส (Sztajer และ Maliszewaka, 1989) โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ผลิตไลเปสในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี แต่จากการศึกษาของ Papaparakevas และคณะ (1992) กลับพบว่า *Rhodotorula glutinis* ใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ในการผลิตไลเปสได้ดีกว่า

2.6.3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง

Rathi และคณะ (2001) รายงานว่าในการผลิตไลเปสจาก *Burkholderia cepacia* ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และ 10 แต่พบว่าแอกทิวิตีไลเปสที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 มากกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 Saad และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสจาก *F. oxysporum* พบว่า *F. oxysporum* สามารถผลิตไลเปสได้แอกทิวิตีสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0

2.7 สมบัติทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical properties)

ไลเปสที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นั้นจะต้องประกอบด้วยคุณสมบัติที่เฉพาะต่อกระบวนการผลิตนั้น ๆ ตัวอย่างเช่นอุตสาหกรรมสารซักล้าง oleochemicals เชื้อเพลิงชีวภาพ หรือแม้กระทั่งอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมเหล่านี้มักต้องใช้อุณหภูมิ และสภาพเป็นด่างสูง นอกจากนี้ในบางกระบวนการผลิตมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ในกระบวนการผลิตด้วย ดังนั้นไลเปสที่ใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้จะต้องทนอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5-11.0 และทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้

เป็นที่ทราบกันว่าคุณสมบัติทางกายภาพ จลนศาสตร์ และโมเลกุลของเอนไซม์เป็นเครื่องมือในการค้นพบหน้าที่ต่าง ๆ ของเอนไซม์ และเป็นเครื่องมือในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม ไลเปสที่นำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) และทำให้บริสุทธิ์จะต้องปฏิบัติโดยยึดคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ ได้แก่ pH-activity และ stability profiles ความคงทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น ความจำเพาะต่อซับสเตรท ความจำเพาะต่อตำแหน่งกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ และความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน

2.7.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณความเข้มข้น หรือประจุของกรดอะมิโนบางชนิดบนสายโปรตีนแตกต่างกัน สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ใกล้เคียงกับค่า isoelectric point ของเอนไซม์จะมีผลต่อแอกทิ-

วิธีเอนไซม์อย่างมาก ตัวอย่างเช่น ไลเพสที่มีค่า isoelectric point เท่ากับ 4.5 ความหนาแน่นของประจุ (ionization degree) ของกรดอะมิโนบริเวณเร่งจะลดลงอย่างมาก ถ้าละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงหรือเท่ากับ 4.5 (Dong และคณะ, 1999) ดังนั้นการทราบค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานและ isoelectric point ของเอนไซม์จึงต้องมีการศึกษาอย่างจริงจัง

ไลเพสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น Rapp (1995) พบว่า ไลเพสที่ผลิตจาก *F. oxysporum* f. sp. เร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย triolein และ tributyrin สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0-10.5 และอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วนไลเพสจาก *R. niveus* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อย่างไรก็ตามพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสชนิดนี้เปลี่ยนไปอยู่ในช่วง 7.0-7.7 เมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์ (Kermasha และคณะ, 1998) สำหรับไลเพสจาก *A. nidulans* WG312 ซึ่งถูกจัดเป็นเอนไซม์ที่ทนสภาพที่เป็นด่าง (alkali lipase) เนื่องจากไม่มีการสูญเสียแอกทิวิตีเอนไซม์หลังจากบ่มในสภาพที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แม้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็น 6.5 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Mayordomo และคณะ, 2000)

2.7.2 ความจำเพาะของไลเพส

ความจำเพาะของไลเพสมี 3 ลักษณะคือ (1) ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (2) ความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันหรือชนิดซัปสเตอร์ท และ (3) ความจำเพาะต่อไอโซเมอร์ (Stereochemical specificity) ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และซัปสเตอร์ทเป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับนำไปใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันในระดับอุตสาหกรรม

2.7.2.1 ความจำเพาะต่อตำแหน่ง

ไลเพสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งมี 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1,3 Sn specificity) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเพสในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโมเลกุลน้ำมัน เอนไซม์กลุ่มนี้มักถูกนำไปใช้เร่งปฏิกิริยากับซัปสเตอร์ทที่เป็นแอลกอฮอล์อันดับที่หนึ่ง (primary alcohol) และ ไดออล (Diol)

เอนไซม์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้จากแบคทีเรีย เช่น *Psuedomonas* sp., *B. thermoleovorans* ID-1, *B. sterothermophilus* L1 และ *B. thermocatenulatus* (Sugihara และคณะ, 1994; Rua และคณะ, 1997; Schmidt-Dannert และคณะ, 1994; Gao และคณะ, 2000) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 (2 Sn specificity) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเพสในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่พบในเนื้อเยื่อสัตว์และรา เช่น ตับอ่อน และ *Rhizopus niveus* เป็นต้น (Bornscheuer และคณะ, 1999) กลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่ไม่จำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Okumura และคณะ, 1979) ไลเพสในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาตรงพันธะเอสเทอร์ทั้ง 3 ตำแหน่ง จากปฏิกิริยานี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีทั้งกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ และสามารถใช้กับซับสเตรทที่เป็นแอลกอฮอล์ระดับหนึ่งและสองในปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (Okumura และคณะ, 1979) ไลเพสในกลุ่มนี้ได้จาก *G. candidum* และ *P. cyclospium* (Rua และคณะ, 1997; Gao และคณะ, 2000)

2.7.2.2 ความจำเพาะต่อซับสเตรท

การทราบว่าเอนไซม์แต่ละแหล่งมีความจำเพาะต่อซับสเตรทชนิดใดนั้นเป็นข้อมูลช่วยให้มีการเลือกใช้เอนไซม์ให้เหมาะสมกับซับสเตรท Jacobsen และ Poulsen (1995) ได้ทำการศึกษาซับสเตรทที่เหมาะสมต่อไอโซไซม์ 2 ชนิด คือ A และ B ของไลเพสจาก *G. candidum* พบว่า ชนิด A ไม่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน ส่วนชนิด B มีความจำเพาะต่อกรดโอเลอิก (C18:1) ขณะที่ไลเพสจาก *Trichoderma* sp. AM 076 มีความจำเพาะต่อ 9, 12 cis hexdeca dienoic (16:2W4) acid (Selmi และคณะ, 1998) Rathi และคณะ (2001) พบว่าไลเพสจาก *Psuedomonas* sp. สามารถเร่งปฏิกิริยาสลายน้ำมันมัสตาด และน้ำมันลินซีด (linseed oil) ได้ดีกว่า น้ำมันสะเดา น้ำมันละหุ่ง น้ำมันถั่วลิสง และน้ำมันมะพร้าว ขณะที่ Litthauer และคณะ (2002) พบว่าไลเพสจาก *P. luteola* มีความจำเพาะต่อซับสเตรทที่เป็น monoester ส่วนไลเพสจาก *C. deformans* มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 ของเอสเทอร์ที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้น (Vaysse และคณะ, 2002) การทำงานของไลเพสขึ้นอยู่กับความยาวของสายกรดไขมัน ดังนั้นไลเพสหลายชนิดจึงเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง เช่น ไลเพสจาก *A. niger* (Iwai และ Tsujisaka, 1984) และไลเพสบางชนิดมีความจำเพาะต่ออันดับของสายพันธะคู่ในสายของกรดไขมันเช่น ไลเพสจาก *G. candidum* มีความจำเพาะต่อพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 9 ของกรดโอเลอิก (Macrae, 1985)

2.7.3 ผลของอิออนของโลหะต่อแอกทิวิตีของไลเพส

อิออนของโลหะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราการเร่งปฏิกิริยาการย่อยและปฏิกิริยาการการสังเคราะห์เอสเทอร์ของไลเพส (Garcia และคณะ, 1991; Malcata และคณะ, 1992a) และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของแอกทิวิตีไลเพส เช่น Kgardoputo และ Ruben (1974) พบว่าไลเพสจาก *Bacillus* sp. ถูกยับยั้งด้วยอิออนของเหล็ก (Fe^{2+}) Malcata และคณะ, 1992a รายงานว่าโซเดียมอิออน (Na^+) ทำให้แอกทิวิตีของไลเพสจากตับอ่อน และจาก *A. wentii* เพิ่มขึ้น แต่มีผลการยับยั้งแอกทิวิตีของไลเพสของไอโซไซม์ 2 ชนิดของ *A. niger* ในกรณีทีไลเพสมีหลายไอโซเมอร์ผลของอิออนโลหะหนักมีผลต่อแอกทิวิตีที่แตกต่างกัน เช่น Co^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งแอกทิวิตีของไลเพส A-isomer ของ ID-1 แต่มีผลให้แอกทิวิตีของ B-isomer เพิ่มขึ้นเล็กน้อยด้วย (Lee และคณะ, 2001)

2.7.4 สารยับยั้งกิจกรรมไลเพส

นอกจากอิออนโลหะหนักมีผลต่อแอกทิวิตีเอนไซม์ แล้วยังมีสารเคมีบางชนิดโดยเฉพาะตัวทำลายอินทรีย์ก็มีผลต่อแอกทิวิตีเอนไซม์ด้วย ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีผลต่อไลเพสแต่ละแหล่งต่างกันเช่นเดียวกับยับยั้งและอิออนของโลหะหนัก เช่น ไลเพสจาก *Streptomyces rimosus* มีความไวต่อสารเคมีในกลุ่ม chelating agent เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid และ Dithiothreitol (DDT) ที่ความเข้มข้น 1 mM และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 10 mM (Abramie และคณะ, 1999) ไลเพสจาก *Cephaloleia presignis* ถูกยับยั้งโดยการเกิด phosphorylate ตรงบริเวณเร่ง serine อย่างสมบูรณ์ด้วย Diisopropyl fluorophosphate (DEP) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (Arreguin-Esinosa และคณะ, 2000) ไลเพสจาก *P. luteola* ถูกยับยั้งด้วย Certrimind Deoxycholate และ Sodium Dodecylsulfate (SDS) ที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Litthauer และคณะ, 2000)

2.8 เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized Enzymes)

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะ หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลทำให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา

ที่มา: (<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immobilized.htm>)

วิวัฒนาการของการศึกษาวิจัยด้านการเตรียมและการนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับ แม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่สามารถหาสูตรสำเร็จที่จะระบุให้ชัดว่าเอนไซม์ชนิดหนึ่งจะตรึงรูปด้วยวิธีใดก็ตามแต่มีพื้นฐานและผลงานวิจัยพอที่ชี้ได้ว่าควรใช้วิธีใด ส่วนประสิทธิภาพและความเหมาะสมของการใช้งานก็เป็นกรณี ๆ ไป อย่างไรก็ตามวิวัฒนาการเรื่องการศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปเกิดขึ้นเป็นลำดับจนปัจจุบันนี้ก็ด้วยเหตุผลที่สืบเนื่องมาจากการใช้เอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดบางประการ

ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ

1. เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
2. เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)
3. เอนไซม์อิสระใน *in vitro* ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้
4. เอนไซม์อิสระ ถ้าจะทำให้แยกทิวติสูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้งาน
5. เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในสารละลายของซับสเตรทและผลผลิต ทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะปนเปื้อนในลักษณะสารปนเปื้อนโปรตีน (proteineous contaminants) โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พีเอชของโปรตีนชนิดนั้น แยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น
6. เอนไซม์อิสระมีภาวะทำปฏิกิริยา (reaction condition) จำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออุตสาหกรรมที่ต้องใช้เอนไซม์นั้น ๆ
7. เอนไซม์อิสระ ส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะแคทาลิสต์แข็ง (solid catalyst) ไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่าง ๆ
8. เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง
9. เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้ต้องผ่านกระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์ก่อน
10. เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูดหายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก ด้วยขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ จึงเป็นทางออกที่นำไปสู่การแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ ด้วยวิธีการต่าง ๆ และแก้ปัญหาไปตามลักษณะสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปก็อาจมีบ้างดังนี้

2.8.1 ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูป

1. แอกทิวิตีอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย
2. มีปัญหาเกี่ยวกับซับสเตรทที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือซับสเตรทมีลักษณะแขวน (suspension) ด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) กับเอนไซม์ตรึงรูปซึ่งเป็นแคทาลิสต์แข็ง (solid catalyst)

2.8.2 วัสดุค้ำจุน (carrier) สำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

องค์ประกอบสำคัญสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ วัสดุค้ำจุน วิธีการที่ทำให้เอนไซม์ติดอยู่กับวัสดุค้ำจุนหรืออยู่ในวัสดุค้ำจุน วัสดุค้ำจุนมีความสำคัญมากต่อแอกทิวิตีและความคงตัวของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม วัสดุค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะดังนี้ (Kennedy และ Cabral, 1987)

1. เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ
2. มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึดของเอนไซม์
3. มีการซึมผ่านได้ของซับสเตรทและผลิตภัณฑ์
4. มีความคงตัวต่อสารเคมี ความร้อน และแรงกระแทก
5. มีรูปร่างและขนาดพอเหมาะ
6. มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์
7. สามารถนำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้

การจัดแบ่งชนิดวัสดุค้ำจุน สามารถแบ่งวัสดุค้ำจุนตามลักษณะทางกายภาพหรือแบ่งตามสมบัติทางเคมี ได้ดังนี้ คือ

ชนิดของวัสดุค้ำจุนแบ่งตามลักษณะทางกายภาพได้เป็น 2 ชนิดคือ วัสดุค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุน และวัสดุค้ำจุนที่มีรูพรุน (Chen และ Tsao, 1976)

วัสดุค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุน

วัสดุค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุนมาตรึงเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีโอกาสถูกดูดยึดไว้ได้ในขอบเขตที่จำกัดเฉพาะที่ผิวของวัสดุค้ำจุนเท่านั้น เนื่องจากวัสดุชนิดนี้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่ำ ด้วยเหตุนี้จึงมี

การใช้เส้นใยหรือสารที่มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็ก เพื่อที่จะให้มีขนาดของพื้นที่ผิวมากพอที่จะให้ เอนไซม์ยึดเกาะได้ วัสดุค้ำจุนชนิดนี้มีข้อดีคือ ซับสเตรทสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้โดยง่าย เนื่องจากเอนไซม์ถูกยึดไว้ที่ผิวบริเวณรอบนอกของวัสดุค้ำจุน

วัสดุค้ำจุนที่มีรูพรุน

วัสดุค้ำจุนชนิดนี้มีพื้นที่ผิวสำหรับให้เอนไซม์เกาะหรือดูดซับมากขึ้นเมื่อเทียบกับในปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนักกับวัสดุค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุน ดังนั้นวัสดุค้ำจุนที่มีรูพรุนสามารถดูดซับเอนไซม์ไว้ได้มากกว่า แต่มีข้อเสียเนื่องจากพื้นที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงนั้น จะต้องมีความกว้างของรูพรุนใหญ่เพียงพอสำหรับให้โมเลกุลของซับสเตรทผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ และขณะเดียวกัน จะต้องให้สารผลิตภัณฑ์ผ่านออกได้สะดวก ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการแพร่กระจายของซับสเตรทและ สารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านเข้าและออกจากวัสดุค้ำจุน

ชนิดของวัสดุค้ำจุนแบ่งตามสมบัติทางเคมีได้เป็น 2 ชนิด คือ วัสดุค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์ และ วัสดุค้ำจุนที่เป็นสารอนินทรีย์ (Laskin และคณะ, 1985)

วัสดุค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์

วัสดุค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์นั้นข้อได้เปรียบกว่าในการใช้งานทางด้านอุตสาหกรรม ทั้งนี้ สารอินทรีย์มีกลุ่มฟังก์ชัน (functional group) จำนวนมาก ที่สามารถตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อเสียเนื่องจากสมบัติทางกายภาพที่ทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยวัสดุค้ำจุนที่เป็น สารอินทรีย์นี้ มีการสูญเสียความคงตัวได้ง่ายเมื่อได้รับการกระทบจากความร้อน สารเคมี และจุลินทรีย์

วัสดุค้ำจุนที่เป็นอนินทรีย์

วัสดุค้ำจุนที่เป็นอนินทรีย์มีความเหมาะสมหลายประการในการใช้งานทางด้าน อุตสาหกรรม เนื่องจากมีความคงทนต่อแรงกระแทก ทนต่อความร้อนและสารเคมี ไม่ถูกย่อยสลาย ด้วยจุลินทรีย์ ง่ายต่อการเก็บรักษา มีอายุการใช้งานนาน และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก โดยง่าย นอกจากนี้วัสดุค้ำจุนอนินทรีย์ยังมีรูปร่างคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ความดัน หรืออุณหภูมิ วัสดุค้ำจุนมีเพียงหมู่ไฮดรอกซิลเท่านั้นที่จะดูดซับเข้ากับปลายด้านที่

ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลหรือหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ด้วยการดูดซับหรือระหว่างอิออน และจะไม่เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับวัสดุค้ำที่เป็นสารอินทรีย์

2.8.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

1. มีโอกาสเพิ่มแอกทิวิตีและความเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีการที่เหมาะสม
2. สามารถใช้กับระบบเอนไซม์หลายชนิด ในลักษณะ *in vitro* ได้
3. สามารถใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง ใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ได้
4. ใช้ภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดตัวพุงและวิธีการตรึงรูป
5. ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างตัวพุงและลักษณะซับสเตรท
6. เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์

2.8.4 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป (Immobilization Process)

แบ่งกระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูปได้เป็น 2 กระบวนการคือ กระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางกายภาพ (Kennedy และ Cabral, 1987) องค์ประกอบที่มีผลต่อความไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์กับซับสเตรท คือ

1. ความคงรูปสามมิติจำเพาะ (specific conformation) ของเอนไซม์เพื่อให้สอดคล้อง (complement) กับโครงสร้างรูปสามมิติของซับสเตรทตามทฤษฎีของฟิชเชอร์ (Fischer) และทฤษฎีเหนี่ยวนำของโคชแลนด์ (Koshland) ดังนั้นเอนไซม์จึงจะจับโมเลกุลของซับสเตรทได้ดี ปฏิกิริยาของการเร่งจึงจะเกิดต่อไปได้ผลผลิตและเอนไซม์กลับคืน ดังนั้นการที่แอกทิวิตีของเอนไซม์จะเบี่ยงเบนไปจากเดิมในลักษณะเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ตาม ก็เป็นผลสืบเนื่องมาจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ การทำเอนไซม์ตรึงรูปก็นับเป็นทางออกทางหนึ่งที่จะทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป จนกระทั่งสอดคล้องกับโครงสร้างของซับสเตรท แอกทิวิตีของเอนไซม์ก็จะสูงขึ้นด้วย และผลในทางกลับกันก็เกิดขึ้นได้ถ้าการตรึงรูปทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปอย่างไม่เหมาะสม

2. บริเวณเร่ง หรือศูนย์กลางบริเวณเร่ง (active site หรือ active center) บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วย 2 ส่วน ซึ่งทำหน้าที่ต่างกัน ส่วนหนึ่งเป็นบริเวณเร่งที่ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยา และอีกบริเวณหนึ่งเป็นบริเวณจำเพาะเชื่อมกับซับสเตรท (binding site) อย่างเจาะจง ทั้ง 2 บริเวณที่กล่าวถึงจะประกอบด้วยอนุโมลิสระกรดอะมิโนหลายชนิดต่อกันเป็นลำดับกัน การทำเอนไซม์ตรีงรูปด้วยวิธีเชื่อมพันธะของหมู่ต่าง ๆ ของเอนไซม์กับตัวพยุ่ง จะต้องหลีกเลี่ยงที่จะไม่ให้กระทบกระเทือนต่อหมู่บริเวณเร่ง จะช่วยทำให้เอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลงไป และในขณะเดียวกัน การตรีงรูปอาจมีผลทำให้โปรตีนของเอนไซม์แสดงหมู่บริเวณเร่งให้จับกับซับสเตรทได้ง่ายขึ้น และรวดเร็วก็เป็นไปได้ หากทำได้ดังนี้แล้วเอกทิวิตีและความเสถียรภาพของเอนไซม์ก็จะดีขึ้นมากกว่าเอนไซม์อิสระ

2.8.5 วิธีการตรีงรูปเอนไซม์

แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ คือ การเชื่อมกับตัวพยุ่ง การเชื่อมขวาง และการห่อหุ้ม (Kennedy และ Cabral, 1987)

1. การเชื่อมกับตัวพยุ่ง (Carrier binding) หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุ่งที่ไม่ละลายน้ำ และอาจไม่ละลายในตัวทำละลายบางชนิดด้วย

ปัจจัยที่สำคัญของกรรมวิธีนี้คือ

ก. ชนิดตัวพยุ่ง ได้แก่หมู่ต่าง ๆ ในตัวพยุ่งว่าเป็นประเภทใด มีพื้นที่ผิวขนาดอนุภาค มีความเสถียรต่อภาวะปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง และองค์ประกอบทางเคมีเหมาะสมกับระบบของปฏิกิริยาการเร่งงานได้หรือไม่ เช่น ระบบถังกวน ระบบฟลูอิดไคซ์เบด ระบบเบดบรรจุ รวมทั้งการทนต่อภาวะของปฏิกิริยาด้านอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย

ข. ชนิดของเอนไซม์ ได้แก่ บริเวณเร่งเป็นกรดอะมิโนชนิดใด ตัวยั้งแยกทิวิตีเอนไซม์ต้องไม่ใช่สารที่มาจากกรรมวิธีการตรีงรูป และถ้าเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะต้องเป็นเอนไซม์ในจุลินทรีย์ (intracellular enzyme) ดังนั้นการตรีงรูปเอนไซม์ในเซลล์จุลินทรีย์จึงต้องทำในลักษณะตรีงรูปเซลล์จุลินทรีย์ในลักษณะเซลล์ตาย

(dead cell) แต่เอนไซม์คงอยู่ หรือเซลล์มีชีวิตและเอนไซม์คงอยู่ก็ได้ โดยไม่ต้องสกัดเอนไซม์ออกมา

ค. ลักษณะซับซ้อนและผลผลิต ได้แก่

ต้องไม่มีปัญหาการถ่ายเทมวล (mass transfer) ระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท นั่นคือเอนไซม์ตรึงรูปแบบเชื่อมกับตัวพุงนี้ใช้ได้กับซับสเตรทที่ละลายในสารละลายปฏิกิริยาได้ดี ซึ่งอาจจะอยู่ในลักษณะคอลลอยด์ (colloid) หรือสารละลาย การแยกผลผลิตทำได้ง่าย และผลผลิตต้องไม่ทำปฏิกิริยาใด ๆ กับตัวพุง หรือหมักต่าง ๆ บนตัวพุงในอันที่จะทำให้แอกทิวิตีเอนไซม์ลดลง หรือผลผลิตลดลง หรือผลผลิตเสื่อมคุณภาพลงไป

ง. ลักษณะเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป

เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปสำหรับใช้ในระบบปฏิกิริยาต่อเนื่อง หรือระบบไม่ต่อเนื่องก็ตาม ควรจะต้องสอดคล้องกับชนิด รูปแบบของตัวพุง (อนุภาค หลอด แท่ง แผ่นฟิล์ม แผ่นบาง) และความคงตัวของตัวพุง (การกัดกร่อน การแตก) รวมทั้งลักษณะทางกายภาพของซับสเตรท เช่น ความข้นหนืด การไหล

1.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

การดูดซับของเอนไซม์บนผิวของตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ วิธีการตรึงรูปโดยวิธีนี้จะไม่เกิดผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติและแอกทิวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมีและแรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงอ่อนมาก ดังนั้นการนำตัวพุงมาใช้ซ้ำทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพุงราคาแพง วิธีนี้อาจมีผลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์บ้างในลักษณะของการหมุนตัวของเอนไซม์เพื่อจับกับซับสเตรท (sterespecific effect) นิยมใช้วิธีนี้ร่วมกับวิธีอื่น เช่น ร่วมกับวิธีการห่อหุ้ม วิธีนี้ใช้กับเอนไซม์ที่ถูกกระทบได้ง่ายต่อวิธีการเชื่อมพันธะเคมี เช่น อินเวอร์เทส เนื่องจากกรรมวิธีไม่ซับซ้อนและไม่รุนแรง เป็นกรรมวิธีที่ใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด และหลักการเดียวกับกรณีการทำการดูดซับทางกายภาพของสารชีวภาพประเภทโปรตีนอื่น ๆ ตัวอย่างตัวพุง เช่น เบนโตนิต เจลแคลเซียมฟอสเฟต ถ่านกัมมันต์ แก้วพูน โคลนกรด คาโอไลไนต์ อะลูมินา และพอลิเมอร์ธรรมชาติ อาทิ แป้ง กูลูเทน คอลลาเจน (Bosley และ Pielow, 1997)

1.2 วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออน (Ionic binding method)

การเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์กับตัวพุงที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยาโดยใช้พันธะไอออน ตัวอย่างตัวพุง ได้แก่ สารที่มีอนุภาคแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange residue)

เช่น โพลีแซ็กคาไรด์ พอลิเมอร์สังเคราะห์ และอนุมูลประจุในตัวพุง และเอนไซม์ต้องต่างกัน เช่น เอนไซม์มีอนุมูลประจุบวก เช่น กลูโคอะไมเลส และตัวพุงมีอนุมูลประจุลบ เช่น DEAE-cellulose DEAE-Sephadex

ลักษณะที่สำคัญของการตรึงรูป วิธีเชื่อมพันธะไอออนก็คือ

- 1.2.1 มีผลต่อเอกทิวิตีและโครงรูปสามมิติน้อย ดังนั้นเอกทิวิตีอาจจะคงเดิม
- 1.2.2 แรงแเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงอ่อน เอนไซม์หลุดง่ายที่ความเข้มข้นของไอออนสูง (ionic strength) หรือแรงแเกาะกันจะลดลงเมื่อเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง
- 1.2.3 กรรมวิธีไม่ซับซ้อน ใช้หลักการเชื่อมพันธะไอออนเหมือนการทำ ion-exchanging ของสารชีวภาพอื่น ๆ ได้ แต่ต้องป้องกันในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไว้

1.3.วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding method) หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง ด้วยพันธะโคเวเลนต์ วิธีนี้ได้นำมาศึกษามากที่สุด (Walt และ Agayn, 1994)

พันธะโคเวเลนต์ เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกัน โดยการถ่ายอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วม เช่น พันธะในโมเลกุล H_2 , O_2 , Cl_2 เป็นต้น เรียก พันธะโคเวเลนต์ หรือ เรียกให้เต็มว่า พันธะโคเวเลนต์ไม่มีขั้ว (non-polar covalent bond) ซึ่งหมายถึง ไม่มีขั้วประจุในโมเลกุลที่เกิดพันธะเพราะ e^- คู่ใช้ร่วมกัน และกระจายอย่างสมมาตร พันธะแบบนี้ ion character = 0

2. วิธีการเชื่อมขวาง (Cross-linking method) การทำการเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะโคเวเลนต์ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุง เอนไซม์จะถูกตรึงรูปอยู่ได้โดยการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างภายในโมเลกุลของเอนไซม์ โดยอาศัยการเชื่อมขวางซึ่งทำหน้าที่เชื่อมขวางระหว่างโมเลกุล 2 โมเลกุล หรือมากกว่า (bi or multifunctional reagents) หรือเรียกสารเชื่อมขวาง (cross-linkers) ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลละลายน้ำน้อยลง

ตัวอย่างการเชื่อมขวาง ซึ่งจะทำปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ในลักษณะต่าง ๆ เช่น สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ อนุพันธ์ไอโซโทไอโซยานเนต อนุพันธ์ไอโซไซยานเนต ไบซีไดอะโซเบนซีน เนื่องจากการใช้สารเชื่อมขวางเหล่านี้ก่อให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ ฉะนั้นจะมีผลต่อโครงสร้างสามมิติ และเอกทิวิตีของเอนไซม์ได้ง่าย

3.วิธีการห่อหุ้ม (Entrapping method) วิธีการห่อหุ้มเป็นวิธีการตรึงรูปแบบรวมเอนไซม์อิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) (Kennedy และ Melo, 1990) ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (lattice type) และห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในแคปซูลเล็ก (microcapsule type) การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้แตกต่างจากการเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ และวิธีเชื่อมขวาง กล่าวคือ เอนไซม์ไม่เชื่อมพันธะเคมีกับสารห่อหุ้ม ดังนั้นวิธีนี้จึงได้นิยมใช้อย่างแพร่หลาย แม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิด สารพอลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มนั้น ต้องการภาวะที่รุนแรงมาก อาจจะมีผลกระทบต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ จึงต้องเลือกหาภาวะที่มีผลกระทบต่อ

3.1 วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ไม่ละลายน้ำ ทำได้ลักษณะที่ผสมเอนไซม์เข้ากับสารห่อหุ้ม ในขณะที่กำลังจะเกิดพอลิเมอร์ โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอ ทุกช่องอย่างซ้ำ ๆ การตรึงรูปเอนไซม์ลักษณะนี้จะส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของโปรตีนเอนไซม์โดยตรง เนื่องจากสารที่กำลังรวมตัวเป็นพอลิเมอร์มักจะทำปฏิกิริยารุนแรงในการสร้างพันธะเคมี ตัวอย่างพอลิเมอร์และโมโนเมอร์ และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์ คือ พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง แป้งบุก ไคติน ไคโตซาน อัลจิเนต คาร์ราจีแนน พอลิเมอร์สังเคราะห์ ได้แก่ พอลิอะครีลาไมด์ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ พอลิเอทิลีนไกลคอล ไดเมทอะคริลเรต พอลิเมอร์

3.2 วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (Microcapsule type) เทคนิคการทำแคปซูลเล็กจะเป็นวิธีที่ช่วยป้องกันผลกระทบที่มีผลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ แคปซูลเล็กของเอนไซม์ที่ได้อาจมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-100 ไมครอน กรรมวิธีการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์มีวิธีต่าง ๆ แบ่งตามลักษณะการเกิดพอลิเมอร์ (Macario และคณะ, 2009)

3.2.1 วิธีการเกิดพอลิเมอร์ระหว่างชั้น (Interfacial polymerization method) เป็นวิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยพอลิเมอร์ ซึ่งทำเป็นแบบแผ่นบาง สารซึมผ่านได้บางส่วน การทำแคปซูลเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดพอลิเมอร์ที่เกิดจากโมโนเมอร์ต่างชนิดกัน 2 อย่าง คือ โมโนเมอร์ชอบน้ำ และโมโนเมอร์ไม่ชอบน้ำ เกิดพอลิเมอร์ที่ระหว่าง (Interfacial polymerization)

3.2.2 วิธีการทำแห้ง (Liquid drying method) เป็นวิธีการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์โดยการใช้ละลายสารพอลิเมอร์แล้วทำให้แห้ง ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกไปขณะเกิดแคปซูลเล็กของเอนไซม์

2.8.6 รูปของเอนไซม์ตรึงรูป (Forms of Immobilized Enzymes)

รูปของเอนไซม์ตรึงรูปแบ่งออกเป็น 4 รูป คือ อนุภาค เยื่อ หรือฟิล์ม หรือแผ่น หลอด และ เส้นใย รูปของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ส่วนใหญ่อยู่ในรูปอนุภาค เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการ กล่าวคือ

1. ใช้ง่าย
2. มีตัวพุงหลายประเภทที่สามารถเตรียมได้ลักษณะอนุภาค
3. ให้พื้นที่ผิวใหญ่กว่ารูปอื่น ๆ ซึ่งจะมีผลให้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาสูงกว่า

ปัจจุบันนี้งานวิจัยด้านการทำเอนไซม์ตรึงรูปในรูปเยื่อ หลอด และเส้นใยก็มีเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่มากเท่าการทำแบบอนุภาค อย่างไรก็ตาม การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปจะอยู่ในรูปแบบใดก็ตาม ก็ต้องเหมาะสมกับการใช้งานตลอดทั้งเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้รูปของเอนไซม์ตรึงรูปชนิดต่าง ๆ พอจำแนกได้ (Wu และคณะ, 2009; Chu และคณะ, 2008)

1.1 อนุภาค (Particles) การทำเอนไซม์ตรึงรูปในลักษณะอนุภาค (Yi และคณะ, 2009) ตัวพุงที่ใช้จะเป็นตัวกำหนดขนาดอนุภาค เช่น ทราช ผงคาร์บอน สารดูดซับ แก้ว พูน เปลือกไข่ ไคทิน และสารพอลิเมอร์ที่ทำเป็นแคปซูลเล็ก ขนาดโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 50-200 เมช มีรูปร่างทรงกลม

1.2 เยื่อ (Membranes) หรือฟิล์ม (Film) หรือแผ่น (Plate) (Li และคณะ, 2009) เยื่อของเอนไซม์สามารถเตรียมได้โดยการใช้ตัวพุงตรึงรูปให้อยู่ในลักษณะเยื่อ ส่วนวิธีการตรึงรูปนั้นทำได้หลายแบบ เช่น วิธีการเกาะกับตัวพุงในลักษณะมีพันธะเคมี ฟิสิกส์ หรือไม่มีพันธะเคมี และห่อหุ้มด้วยเยื่อ

1.3 หลอด (Tubes) การทำเอนไซม์ตรึงรูปแบบหลอด เป็นวิธีที่ไม่แพร่หลายเท่ากับการทำแบบเยื่อ ส่วนวิธีการตรึงรูปสามารถทำได้หลายวิธีเช่นเดียวกับแบบอนุภาคและเยื่อ ตัวอย่างตัวพุงที่เป็นหลอด ได้แก่ หลอดไนลอน หลอดพอลิอะมิโนสไตรีน (polyaminostyrene tube) และหลอดพอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide tube)

1.4 เส้นใย (Fibers) การทำเอนไซม์ให้อยู่ในรูปเส้นใย (Chu และคณะ, 2008) มักทำในลักษณะการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในเส้นใยเซลลูโลสอะซิเตต โดยมีขั้นตอนการทำดังกล่าว

ได้ย่อ ๆ คือ ผสมสารละลายเอนไซม์ในกลีเซอรอลที่ละลายลงในสารละลายของ เซลลูโลสอะซิเตตที่ละลายในเมทีลีนคลอไรด์ กวนสารละลายนี้ช้า ๆ จนกระทั่งเกิด เป็นอิมัลชัน เมื่อแช่สารละลายอิมัลชันลงในภาชนะสำหรับการตกตะกอนที่มีโพลูอี นพร้อมกับค้อย ๆ สว (spin) จะได้เส้นใย ทำเส้นใยที่ได้ให้แห้งโดยภาวะสุญญากาศ เพื่อแยกตัวทำละลาย

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (Kennedy และ Cabral, 1987)

คุณสมบัติ	เทคนิคการตรึงเอนไซม์				
	เชื่อมโยง	ดูดยึดทาง ภายนอก	ดูดยึดด้วย พันธะไอออนิก	ดูดยึดด้วย พันธะโคเวเลนต์	ดักจับ
1. วิธีการเตรียม	สะดวก	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
2. การยึดระหว่างเอนไซม์กับ วัสดุค้ำจุน	แข็งแรง	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	ปานกลาง
3. การนำตัววัสดุค้ำจุน กลับมาใช้ซ้ำ	ไม่ได้	ได้	ได้	ได้ในบางกรณี	ไม่ได้
4. ต้นทุนในการตรึง	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	สูง
5. ความคงตัวของเอนไซม์ ตรึงรูป	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	สูง
6. การประยุกต์ใช้งาน	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้	ได้
7. การป้องกันการสลายตัวของเอนไซม์จากจุลินทรีย์	ได้บางครั้ง	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้

2.8.7 ประโยชน์และความสำคัญของไลเพสในด้านอุตสาหกรรม

การใช้ไลเพสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง เทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเคมี และแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพ (Stehr และคณะ, 2003; Steiner และ Williams, 2002; Pandey และคณะ, 1999) ข้อดีที่สำคัญของไลเพส คือมีความคงทนในตัวทำละลายอินทรีย์

จึงสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ได้ทั้งในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์และปราศจากตัวละลายอินทรีย์ (Sharma และคณะ, 2001) และยังสามารถทำงานได้ในสภาพที่ปราศจาก cofactors นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะต่อซับสเตรท และมี enantioselectivity สูงด้วย

2.8.7.1 ไลเพสในสารซักล้าง

ในการผลิตสารซักล้างไลเพสที่ใช้มีความจำเพาะต่อซับสเตรทต่ำ แต่มีความคงทนต่อสภาพที่เป็นด่าง ทนต่อสารลดแรงตึงผิว (surfactants) และอุณหภูมิสูง เอนไซม์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการนี้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม surfactant lipase นอกจากนี้ยังสามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ amylase, cellulose และ protease ได้ด้วย (Jaeger และ Reetz, 1998; Pandey และคณะ, 1999; Rathi และคณะ, 2001) ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้สารซักล้างจึงต้องทนต่อด่างและความร้อน เช่นไลเพสจาก *P. alkaligenes* ทำงานได้ดีที่ pH 7-11 อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีความคงทนต่อสารลดแรงตึงผิวที่เป็นทั้ง anionic และ nonionic ในสภาพการซักล้าง (Pandey และคณะ, 1999)

2.8.7.2 ไลเพสในยาฆ่าแมลง

ด้านเทคโนโลยีชีวภาพของยาฆ่าแมลง ไลเพสถูกนำมาใช้เป็น enantioselective biocatalyst ในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกตรึงเพื่อลดต้นทุน และป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยทั่วไปยาฆ่าแมลงผลิตได้จากการทำ resolution ของ racemic mixtures ของแอลกอฮอล์ หรือ carboxylic esters ในปฏิกิริยา stereospecific synthesis reaction (Pandey และคณะ, 1999)

2.8.7.3 ไลเพสในอุตสาหกรรมอาหาร

การใช้ไลเพสในอุตสาหกรรมอาหารเริ่มต้นตั้งแต่ศตวรรษที่ 20 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงกระบวนการทางเคมีที่ใช้กันอยู่เดิมในอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันและไขมัน ไลเพสถูกนำมาใช้ในการดัดแปลง (modification) คุณสมบัติของน้ำมันโดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันที่เข้าจับกับกลีเซอรอลในโมเลกุลน้ำมันหรือไขมัน เพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการ ซึ่งวิธีนี้ทำให้ได้น้ำมันชนิดใหม่ ๆ และนำไปสู่การพัฒนาสารที่ให้กลิ่นรส (flavors) ในอาหารด้วย

Pabai และคณะ, (1995) ใช้ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา inter-esterification ของไขมันเนย (butter fat) เพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวชนิดสายยาว และเพิ่มปริมาณกรดโอเลอิก (C18:1) ตรงตำแหน่งที่ 2 ของโมเลกุลไขมันเนย ทำให้ได้ไขมันเนยที่มีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าเดิม นอกจากนี้ใช้ไลเปสในการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติน้ำมันแล้ว ยังมีการใช้ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาอื่น ๆ เพื่อผลิตเอสเทอร์ที่เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่นอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ และยา ได้อีกด้วย เช่น Weber และคณะ (2001) ใช้ไลเปสจาก *Candida rugosa* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ระหว่าง methyl esters ของ fatty acids และ sterols เพื่อผลิต steroid esters ที่ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และยา

2.8.7.4 ไลเปสในการผลิตเชื้อเพลิง

เป็นที่ทราบว่สิ่งทีได้รับความควบคุมกับการเผาไหม้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล (fossil fuel) คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์ และซัลเฟอร์ อันเป็นผลทำให้สิ่งแวดล้อมเต็มไปด้วยมลพิษ ภาวะเช่นนี้ทำให้เริ่มมีความสนใจที่จะนำเชื้อเพลิงเหลว (liquid fuel) ที่ได้จากการนำวัตถุดิบทางชีวภาพ (biomass) กลับมาใช้ใหม่และมีการพัฒนาแหล่งพลังงานนี้อย่างเนื่อง เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ของการผลิตเชื้อเพลิงในอนาคต

Fatty acid methyl esters (biodiesel fuel) คือ เชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล ที่ได้จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ และน้ำมันปรุงอาหารที่ใช้แล้วถูกนำกลับมาใช้เป็นแหล่งพลังงานอีกครั้งตั้งแต่ทศวรรษที่ผ่านมา แหล่งพลังงานประเภทนี้ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม เนื่องจากสามารถถูกย่อยสลายได้ และไม่เป็นพิษ ซึ่งมีการทดลองใช้ biodiesel fuel จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืชเพื่อนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ในทวีปอเมริกาเหนือ และยุโรป (Krawczyk, 1996; Cvengros และ Cvengrosna, 1994)

2.9 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

มี 4 วิธี

1. การผสมน้ำมันพืชในดีเซลโดยตรง (Blending)
2. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) เป็นการกระจายของอนุภาคของเหลวที่แขวนลอยในสารตัวกลางของเหลวอีกชนิดหนึ่งอย่างสมดุล (Ma, และ Hanna, 1999)
3. ไพโรไลซิส (Pyrolysis) เป็นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของน้ำมัน โดยใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว หรือใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมด้วย เพื่อทำให้น้ำมันที่มีโมเลกุลใหญ่แตกตัว

เป็นโมเลกุลที่เล็กลง ด้วยการผสมน้ำมันพืชและแอลกอฮอล์ที่มีสายสั้น (Ma, และ Hanna, 1999)

4. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้วให้สารประกอบเอสเทอร์โดยการทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ ในภาวะที่ใช้หรือไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Li และคณะ, 2006)

ไบโอดีเซล สามารถผลิตได้จากน้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง ปาล์ม ดอกคำฝอย canola และ rapeseed ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งต้องใช้สารเคมีหรือโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Clark และคณะ, 1984)

2.9.1 การใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเกิดช้ากว่าเมื่อใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และยังใช้เวลานานกว่าถึงจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ถ้ากลีเซอไรด์มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิสระและมีน้ำอยู่มาก ดังนั้นการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดจะดีกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Ma และ Hanna, 1999) กรดที่นิยมใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก หรือซัลโฟนิกของสารอินทรีย์ มีรายงานการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังนี้

Mohamad และคณะ (2002) ใช้กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มใช้แล้วจากร้านอาหาร โดยแปรผันความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น 0.5 1.0 1.5 และ 2.25 โมลาร์ ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของกรดที่ใช้เพิ่มมากขึ้นปฏิกิริยาจะเกิดได้เร็วขึ้น และค่าความหนืดของเอทิลเอสเทอร์ที่ได้จะน้อยลงด้วย และพบว่าที่ความเข้มข้น 2.25 โมลาร์ กรดซัลฟิวริกเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่ากรดไฮโดรคลอริก

Tashtosh และคณะ (2004) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนแปลงไขมันสัตว์ที่ใช้แล้วเป็นเมทิลและเอทิลเอสเทอร์ โดยใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า เมื่อใช้เอทานอลที่มากเกินไปสามารถเปลี่ยนไขมันสัตว์เป็นเอสเทอร์ได้มากกว่าเมทานอล และยังสามารถเอทิลเอสเทอร์ที่มีความหนืดต่ำกว่าเมทิลเอสเทอร์ ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ เมื่อใช้เอทานอลในปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน 50 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง จะเกิดเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 78 โดยน้ำหนัก

การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เบสที่ใช้กันประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมเมทอกไซด์ โซเดียมเอไมด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โปแทสเซียมเมทอกไซด์ และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยทั่วไปที่นิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งมีราคาถูก การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดการกัดกร่อนน้อยกว่ากรด นอกจากนี้เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเร็วกว่าเมื่อใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาถึง 4000 เท่า (Formo, 1954) จึงมักนิยมใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสอย่างกว้างขวางในระดับการผลิตขนาดใหญ่

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเบสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น กลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องมีน้ำในโมเลกุลให้น้อยที่สุด (Wright และคณะ, 1944) ทั้งนี้เพราะน้ำจะไปทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (saponification) ซึ่งหมายถึงการเกิดสบู่ ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอสเทอร์ลดลง และทำให้การแยกกลีเซอรอลออกจากเอสเทอร์ยากขึ้นด้วย มีรายงานการใช้เบสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันดังนี้

ธนาทิพย์ อัครผดุงสิทธิ์ และคณะ (2547) ศึกษาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันพืชใช้แล้วในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้น้ำมันพืชใช้แล้วจากร้านอาหารและเมทานอล โดยมีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์คือ อัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมันพืชใช้แล้วเป็น 4.5 : 1 ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักของน้ำมันพืช ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที ได้เมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 92.3 ของปริมาณสารตั้งต้น

Nimcevic และคณะ (2000) ศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจากน้ำมัน rapeseed กับแอลกอฮอล์ โดยใช้โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

พบว่าเมื่อใช้ไปแทสซีเอ็มไฮดรอกไซด์สามารถเกิดเฉพาะเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์ สำหรับกรดซัลฟิวริกสามารถเกิดโพรพิลเอสเทอร์และบิวทิลเอสเทอร์ได้เท่านั้น นอกจากนี้ที่อุณหภูมิใกล้จุดเดือดของแอลกอฮอล์การใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ลดเวลาในการทำปฏิกิริยาและแอลกอฮอล์ชนิดไซ่กึ่งจะเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าแอลกอฮอล์ชนิดไซ่ตรง

การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ถึงแม้ว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์มาก และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยก็ตาม แต่การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยายังมีข้อเสียอยู่มาก เช่น การแยกกลีเซอรอลออกจากปฏิกิริยาทำได้ยาก เสียค่าใช้จ่ายในการแยกตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสออกจากผลิตภัณฑ์ น้ำเสียที่ได้จากการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เบสต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มในการบำบัด และนอกจากนี้ปริมาณกรดไขมันอิสระ และปริมาณน้ำยังส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาได้อีกด้วย

ไลเพสทั้งที่ได้จากเซลล์และที่ผลิตออกมาจากเซลล์ สามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ทั้งในภาวะที่มีและปราศจากน้ำ และยังพบอีกว่าการใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถช่วยลดปัญหาที่เกิดจากกระบวนการที่ใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบระหว่างวิธีการใช้กรดต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการใช้ไลเพสเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

ปัจจัย	การใช้ต่างเป็น ตัวเร่งปฏิกิริยา	การใช้กรดเป็น ตัวเร่งปฏิกิริยา	การใช้ไลเพสเป็น ปฏิกิริยา
1. อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา	60-70	55-80	30-40
2. กรดไขมันอิสระที่อยู่ในวัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์สูง	เอสเทอร์	เมทิลเอสเทอร์
3. น้ำที่อยู่ในวัตถุดิบ	รบกวนปฏิกิริยา	รบกวนปฏิกิริยา	ไม่รบกวนปฏิกิริยา
4. ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	ปกติ	มากกว่า
5. การเก็บกลีเซอรอล	ยาก	ยาก	ง่าย
6. การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	ล้างซ้ำ	ไม่มี
7. ต้นทุนการผลิต	ถูก	ถูก	ค่อนข้างแพง

ที่มา: (Marchetti, Miguel และ Errazu, 2001)

Watanabe และคณะ (2001) ใช้ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่ถูกตรึงในการผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องจากน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองกับน้ำมัน rapeseed โดยทำปฏิกิริยากับเมทานอล (methanolysis reaction) จากการผลิตครั้งนี้ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงถึง 93% และสามารถใช้ไลเปสได้นานถึง 100 วัน และในปี ค.ศ. 2001 Crabbe และคณะ ใช้ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิต crude palm oil – fatty acid methyl ester (CPO-FAME) หรือ crude palm oil methyl ester (CPOE) ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพจากน้ำมันปาล์มดิบที่มีราคาถูกกว่าน้ำมันจากเมล็ด canola rapeseed และถั่วเหลืองได้สำเร็จ

การที่น้ำมันจากเมล็ดพืชได้รับความสนใจในการนำไปผลิตเชื้อเพลิง (diesel engines) มาเป็นเวลานานนั้นเป็นเพราะว่าน้ำมันประเภทนี้มีปริมาณความร้อน (heat content) ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำมันประเภท transportation fuel (No.2 diesel fuel) แต่มีข้อเสียของน้ำมันประเภทนี้ คือมีความหนืดสูงอันเป็นข้อจำกัดในการนำมาไปใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลแบบหัวฉีดรุ่นใหม่ ๆ

การนำไลเปสมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันยังไม่นิยมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากราคาของไลเปสค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยสามารถใช้ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันให้เหมาะสมกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จะสามารถแก้ปัญหาการค่าน้ำมันดีเซลที่สูงขึ้น โดยผลิตไบโอดีเซลมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล และยังแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการใช้น้ำมันไบโอดีเซล จะเกิดคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่าจากการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่า ใ้เสียน้อยกว่า เพราะปริมาณออกซิเจนในไบโอดีเซลจึงทำให้การสันดาปเกิดขึ้นได้สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซล และไม่มีกำมะถัน จึงไม่มีปัญหาเรื่องของปริมาณของซัลเฟต นอกจากนี้ยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย ทำให้ไม่เกิดการอุดตันของระบบไอเสีย และช่วยยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ (Gerpen, 2005)

2.9.2 ระบบการผลิตไบโอดีเซล (Levenspiel, 1999; Fogler, 2006)

1. การผลิตแบบกะ (batch production)

การผลิตแบบครั้งเดียวเสร็จสิ้น (one-off production) ลักษณะเด่นซึ่งเป็นจุดสำคัญของการผลิตแบบนี้ คือ สารตั้งต้นทั้งหมดของการผลิตถูกผสมเพื่อทำปฏิกิริยาไปในครั้งเดียว ณ บริเวณที่ทำปฏิกิริยาการผลิต ซึ่งอาจเป็นขวด หรือถังปฏิกรณ์ เป็นต้น หลังจากนั้นจึงจะ

เคลื่อนย้ายผลิตภัณฑ์และส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ได้จากการผลิตนี้ ไปสู่ขั้นตอนถัดไป การผลิตแบบกะ มีความไม่สะดวกอยู่หลายประการ คือ การผลิตจะไม่ต่อเนื่อง ถูกรบกวน เนื่องจากผลิตได้เป็นครั้งคราวไป หลังการผลิตแต่ละครั้ง เครื่องมือหรืออุปกรณ์การผลิตต่าง ๆ จะต้องมีการติดตั้งใหม่หมดและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตแต่ละครั้งอาจมีคุณภาพแตกต่างกันไป การผลิตแบบนี้เหมาะสมกับการผลิตในปริมาณไม่มาก หรือไม่ต้องการผลิตเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน และเหมาะสมกับการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

2. การผลิตแบบต่อเนื่อง (continuous production)

การผลิตแบบต่อเนื่อง เป็นการผลิตที่มีการผ่านสารตั้งต้นของการผลิตเข้าไปอย่างต่อเนื่อง ณ บริเวณที่ทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นคอลัมน์ หรือท่อปฏิกรณ์ เป็นต้น การผลิตแบบต่อเนื่องมีความได้เปรียบว่าการผลิตแบบครั้งเดียวอยู่หลายประการ คือ การผลิตแบบต่อเนื่องไม่ถูกรบกวน จึงได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเรื่อย ๆ ในการผลิตติดตั้งเครื่องมือหรืออุปกรณ์การผลิตตั้งแต่เริ่มแรกเพียงครั้งเดียว สามารถผลิตต่อไปได้อีกนาน ซึ่งเป็นการประหยัดเวลา และแรงงานในการผลิต ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตมีคุณภาพเท่าเทียมกันคงที่ อีกทั้งสามารถใช้ระบบการควบคุมแบบอิเล็กทรอนิกส์มาควบคุมการผลิตแบบต่อเนื่องนี้ได้ ทำให้สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายด้านแรงงาน การผลิตแบบนี้เหมาะกับการที่ต้องการผลิตในปริมาณมาก หรือต้องการผลิตเป็นระยะเวลายาวนานในระดับอุตสาหกรรม

2.9.3 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่ปราศจากสารพิษ เก็บรักษาได้อย่างปลอดภัย สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และที่สำคัญ ไบโอดีเซลผลิตจากน้ำมันพืชทำให้องค์ประกอบของไบโอดีเซลไม่มีแร่ธาตุกำมะถัน แต่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จึงช่วยในการเผาไหม้ได้ดีขึ้น และลดปริมาณมลพิษจากแก๊สพิษต่าง ๆ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนนอกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ภาวะเรือนกระจกลดลง อีกทั้งยังช่วยลดเขม่า และฝุ่นละอองด้วย นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชใช้แล้ว ช่วยลดการนำน้ำมันที่ใช้แล้วไปประกอบอาหารซ้ำ และยังช่วยป้องกันมิให้น้ำมันพืชที่ใช้แล้ว (ซึ่งมีสารไดออกซินที่เป็นสารก่อมะเร็ง) ไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ (Martin และ Otero, 2008)

การใช้ไบโอดีเซลสามารถช่วยการนำเข้าของน้ำมันดิบจากต่างประเทศได้บางส่วน ซึ่งในแต่ละปีประเทศไทยสูญเสียเงินจำนวนมากเพื่อการนำเข้าของน้ำมันดิบกว่า 300,000 ล้านบาท

และการใช้น้ำมันไบโอดีเซลที่สามารถผลิตได้ภายในประเทศ ถือเป็นการสร้างความมั่นคงและเสถียรภาพทางด้านพลังงานของประเทศ (คณะกรรมการกิจการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	(Clean model, Lab service Ltd)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	(Vision Scientific Co., Ltd)
เครื่องชั่งแบบละเอียด	(Sartorius, Germany)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)	(Barnstead, U.S.A.)
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	(Model 250, Denver Instrument)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ANTHOS Zenyth 200 Microplate Spectrophotometer)	
เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro refrigerated centrifuge)	(Kubota 3700, Japan)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	(Mettler, Germany)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	(Ta Chang Medical instrument, Taiwan)
เครื่องดูดสารแบบสุญญากาศ (suction)	(GAST, U.S.A.)
กระดาษกรองเบอร์ 1	(Whatmann)
แผ่นโครมาโทกราฟี ชนิดอะลูมิเนียม ซิลิกา เจล 60 F ₂₅₄	(Merck, Germany)
เมมเบรนฟิลเตรชัน ขนาด 10 KDa	(Millipore, U.S.A.)
เครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (cork borer)	
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)	(Shimadzu, Japan)

3.2 สารเคมี

แบคโต-ทริปโตเน (bacto-tryptone)	(Difco Laboratories, U.S.A.)
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	(Hi media, India)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	(Merck, Germany)
โซเดียมไนเตรต (NaNO ₃)	(Merck, Germany)
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	(Merck, Germany)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Merck, Germany)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Ajax Finechem, Australia)
Potato Dextrose Agar (PDA)	(Hi media, India)
Potato Dextrose Broth (PDB)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)

โรดามีน บี (rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)
กัมอะราบิก (gum Arabic)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มไมเตท (<i>p</i> -nitrophenyl palmitate)	(Sigma,U.S.A.)
2-โพรพานอล (2-propanol:CH ₃ CHOH)	(Lab scan, Ireland)
ไตรตอน เอกซ์-100 (triton x-100)	(Scharlau,Spain)
บัฟเฟอร์ทริส (tris-HCl)	(Scharlau,Spain)
พารา-ไนโตรฟีนิล (<i>p</i> -nitrophenol)	(Fluka,Switzerland)
คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO ₄ •5H ₂ O)	(Ajax Finechem, Australia)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต (C ₄ H ₄ KNaO ₈ •5H ₂ O)	(Merck, Germany)
โซเดียมคาร์บอเนต (Na ₂ CO ₃)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Ajax Finechem, Australia)
สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	(Carlo Erba, Milan, Italy)
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin = BSA)	(Merck, Germany)
สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)	(Fluka,Switzerland)
คลอโรฟอร์ม (chloroform)	(Labscan, Thailand)
เฮกเซน (hexane)	(Labscan, Thailand)
เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate)	(BDH Chemical Ltd, England)
กรดอะซิติก (acetic acid)	(BDH Chemical Ltd, England)
อะซิโตน (acetone)	(Labscan, Thailand)
กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)	(RIEDEL-DE-HAEN, Germany)
เมทานอล (methanol)	(Labscan, Thailand)
กรดฟอร์มิก (formic acid)	(Scharlau, Spain)

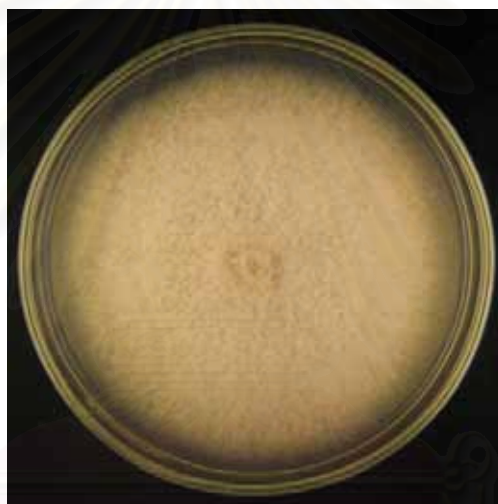
3.3 วัตถุดิบ

ผงแป้งถั่วเหลือง (soybean flour)	(โปรตาชอย, สาลีกิจ จำกัด, ไทย)
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	(มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ไทย)
น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil)	(มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ไทย)
น้ำมันรำข้าว (refined rice bran oil)	(แชนป์ อินดัสตรีส์ จำกัด, ไทย)
น้ำมันมะพร้าว (coconut oil)	
น้ำมันมะกอก (olive oil)	(ยูโรลิเมนต์ โปรวิเตอร์ ดี เอลิเมนต์ทอส ดี คาลิเดด จำกัด)

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

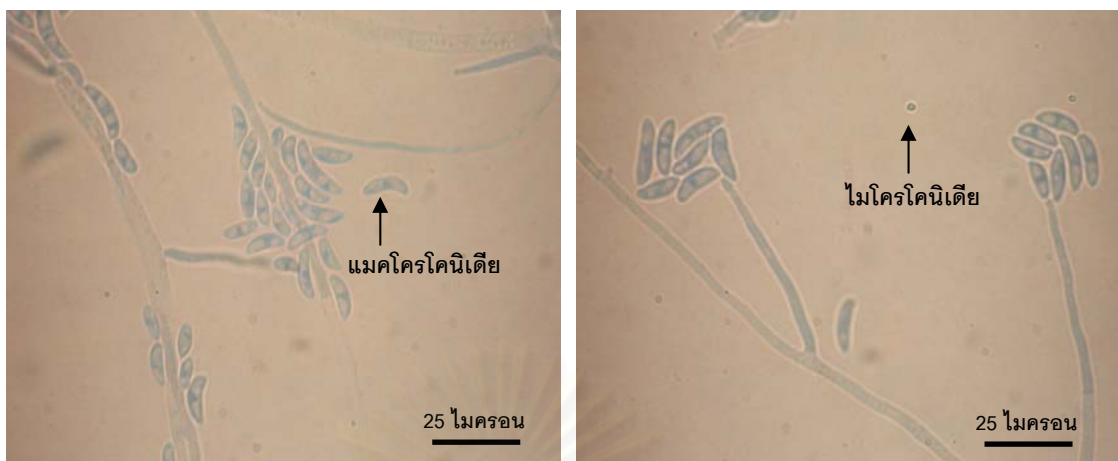
3.4.1. การเตรียมราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 เพื่อใช้ทดสอบ

นำราสายพันธุ์ *F. solani* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (วราภรณ์, 2549) ซึ่งเป็นราที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส มาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส โดยเลี้ยง *F. solani* CU103 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Potato Dextrose Agar) PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สำหรับเป็นหัวเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะสีฐานวิทยาของโคโคนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน ของราสายพันธุ์ *F. solani* CU103

ส่วนลักษณะสีฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าราไอโซเลต CU103 มีเส้นใยแบบมีผนังกัน มีโคนดิโอสปอร์เป็นลักษณะยาวรี มีขนาดสปอร์เล็ก (microconidia) และใหญ่ (macroconidia) ปะปนกัน แต่ละสปอร์ประกอบด้วยเซลล์จำนวน 1-4 เซลล์ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย และโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 ที่เจริญบนชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.2. หาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเพื่อสามารถผลิตไลเปสได้สูง

โดยทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส ดังนี้

3.4.2.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ที่เตรียมได้จากข้อ 1 โดยใช้เครื่องตัดจุกคอรัคเบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเส้นใยรา แล้วนำชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้นมาเลี้ยงใน basal medium (ดัดแปลงจากวิธีการของ Maia และคณะ, 2001) (ภาคผนวก ก) โดยมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่มีการเติมน้ำมัน 5 ชนิดดังนี้ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน และแป้งถั่วเหลือง โดยใส่ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน โดยการกรองอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อแยกเส้นใยราออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสโดยวัดค่าแอกทิวิตีของไลเปสทั้งหมด วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะ ส่วนของเส้นใยรานำมาหาค่าหนักแห้งของเส้นใยราทุกวัน โดยทำการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) 3 ซ้ำ

3.4.2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหาร basal medium ที่มีการใส่แหล่งคาร์บอนที่ผลิตไลเปสให้แยกทิวติสูงจากข้อ 2.1 และแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) เปปโตน (Peptone) และ ยีสต์สกัด (Yeast extract) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยการกรองอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสโดยวัดค่าแยกทิวติของไลเปสทั้งหมด วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแยกทิวติจำเพาะ ส่วนของเส้นใยนำมาหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุกวัน โดยทำการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) 3 ซ้ำ

3.4.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหาร basal medium ที่มีการใส่แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ผลิตไลเปสให้แยกทิวติสูงจากข้อ 2.1 และ 2.2 แล้วนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน โดยการกรองอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสโดยวัดค่าแยกทิวติของไลเปสทั้งหมด วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด และหาค่าแยกทิวติจำเพาะ ส่วนของเส้นใยนำมาหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยทุกวัน โดยทำการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) 3 ซ้ำ

3.4.2.4 การวัดค่าแยกทิวติของไลเปสทั้งหมด (Total activity)

นำสารละลายไลเปสที่ได้จากเชื้อราในข้อ 2.1 2.2 และ 2.3 มาวัดค่าแยกทิวติของไลเปสทั้งหมดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Maia และคณะ, 2000) โดยใช้สารละลายตั้งต้น คือ พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตท (*p*-NPP : *p*-nitrophenyl palmitate) ตรวจสอบโดยการวัดการดูดกลืนแสงของพารา-ไนโตรฟีนิล (*p*-NP : *p*-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายผลิตภัณฑ์หลังทำปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิสโดยวัดที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงรุ่น ANTHOS Zenyth 200 แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค.1)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U : Unit) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนอล ปาล์มมิเตทแล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.4.2.5 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.1 2.2 และ 2.3 มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี micro Lowry's assay (Held และ Hurley, 2001) ด้วยวิธีการศึกษาการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลายมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA = Bovine serum albumin) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม (ภาคผนวก ค. 2)

3.5 โครงสร้างไลเปสจากเชื้อราบนวัสดุค้ำจุน

3.5.1 เตรียมสารละลายไลเปส

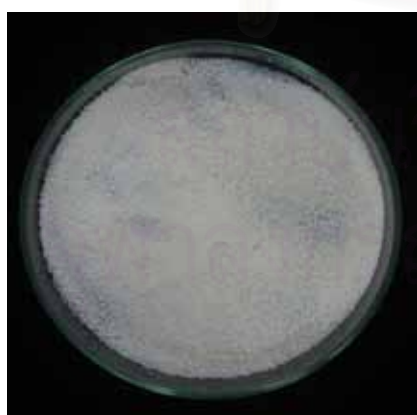
ทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหาร basal medium ที่มีการใส่แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิในภาวะที่มีการผลิตไลเปสให้แยกทิวีสสูงจากข้อ 2.1 2.2 และ 2.3 กรองแยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ด้วยวิธีการอัลตราฟิลเตรชัน (ultra filtration) โดยใช้เมมเบรนฟิลเตรชัน (Viva flow 25) ขนาด molecular weight 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำสารละลายไลเปสไปทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปสโดยวัดค่าแยกทิวีสของไลเปสทั้งหมด วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

3.5.2 โครงสร้างไลเปสบนวัสดุค้ำจุนด้วยวิธีการเชื่อมขวาง (Cross linking) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Yang และคณะ, 2006)

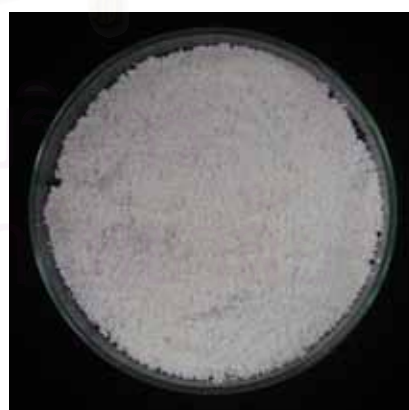
วัสดุค้ำจุนที่ใช้ในการตรึงเป็น Macroporous Resine มี 5 ชนิด (ภาพที่ 3) โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ พวกที่มีขั้ว NKA-9 พวกที่มีขั้วน้อย AB-8 และพวกที่ไม่มีขั้ว H103 D4020 และ NKA โดยทำการ cross linking กับวัสดุค้ำจุน ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 ของกลูตารัลดีไฮด์ แล้วล้างวัสดุค้ำจุนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 จำนวน 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไลเพส 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มพร้อมทั้งกวนเบา ๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไลเพสตรังรูปที่ได้นำไปล้าง และทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรังรูปในตู้ดูดความชื้น จากนั้นคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ (protein loading) และค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง (% immobilization efficiency)



(ก)



(ข)

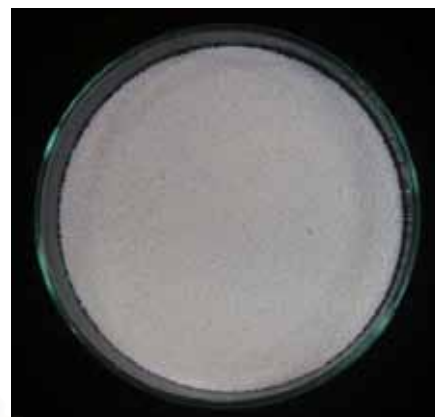


(ค)

ภาพที่ 4 วัสดุค้ำจุน 3 ชนิด (ก) H103 (ข) AB-8 และ (ค) NKA-9



(ง)



(จ)

ภาพที่ 5 วัสดุค้ำจุน 2 ชนิด (ง) NKA และ (จ) D4020

3.6 ทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตรังรูป

3.6.1 อุณหภูมิ โดยการนำไลเพสตรังรูป 30 มิลลิกรัม ไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 25 30 35 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและหาแอกทิวิตีของไลเพสตรังรูป

3.6.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการนำไลเพสตรังรูป 30 มิลลิกรัม ไปบ่มที่สารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4-6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7-9 และ สารละลาย ไกลซีน โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและหาแอกทิวิตีของไลเพสตรังรูป

3.6.3 สารละลายอินทรีย์ โดยการนำไลเพสตรังรูป 30 มิลลิกรัม ไปบ่มที่ เฮกเซน ทูโลอิน คลอโรฟอร์ม เอทานอล และเมทานอล เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและหาแอกทิวิตีของไลเพสตรังรูป

3.6.4 การนำกลับมาใช้ซ้ำของไลเพสตรังรูป โดยการนำไลเพสตรังรูป 30 มิลลิกรัม เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและหาแอกทิวิตีของไลเพสตรังรูป จากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.4 แล้วนำกลับไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสใหม่ และหาแอกทิวิตีของไลเพสตรังรูป

3.7 ทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.7.1 อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล

นำน้ำมันปาล์ม อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันกับเมทานอลเป็น 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น (Three step feeding of methanol) ทำการใส่เมทานอล ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เข้าไป ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยแบ่งใส่เมทานอลครั้งละ 1.0 โมลาร์ ครั้งแรกจะใส่เมทานอล เข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา ส่วนอีกสองครั้งใส่ที่ชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ, 2002) เก็บตัวอย่างน้ำมัน 200 ไมโครลิตร ที่ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography)

3.7.2 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

นำตัวอย่างน้ำมันที่ได้ในข้อ 5.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับเฮกเซน 50 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายมา 1 ไมโครลิตร ด้วยหลอด capillary นำไปจุดลงบนแผ่นโครมาโตกราฟี ที่ผ่านการอบด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยแบ่งเลนตามแนวกว้างให้แต่ละเลนมีระยะห่างจากกัน 1 เซนติเมตรแล้วนำแผ่นโครมาโตกราฟีไปใส่ในแท็งค์สารละลายอิมิตัวที่ผสมด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 90 : 10 : 2 โดยปริมาตร (Samukawa และคณะ, 2000) เมื่อสารละลายดังกล่าวเคลื่อนที่เกือบเต็มแผ่นโครมาโตกราฟีจึงนำไปพ่นด้วยสารละลายผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริกและเมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำการอบแผ่นโครมาโตกราฟีด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโตกราฟี โดยถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานก็จะขึ้นที่ระดับเดียวกันกับแถบของสารมาตรฐานนั้น ๆ หรือ พิจารณาจากค่า R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงจุดกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงระยะทางที่สารละลายเคลื่อนที่ได้บนแผ่นโครมาโตกราฟี (ภาคผนวก ง)

3.7.3 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

3.7.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลให้ตกออกมา แล้วเตรียมตัวอย่างโดยละลายในคลอโรฟอร์ม และใส่ eicosane เป็น internal standard จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

3.7.3.2 วิธีการใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu LC-20A series, Japan)

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับ mobile phase คือ สารเอ ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอสทิล อะซิเตต : กรดฟอร์มิก (85 : 10 : 10 : 0.1 v/v) สารบี ประกอบด้วย เฮกเซน : กรดฟอร์มิก (100 : 0.2 v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร ต่อ นาที โดยใช้ Apollo Silica Column 5U 250×4.6 mm 5um เครื่องตรวจสอบ (detector) สำหรับ HPLC คือ ELSD

3.7.4 ศึกษาความเสถียรของไลเปสตรังรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

โดยการนำไลเปสตรังรูปหลังจากเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันไปล้างด้วยสารละลายอินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน และ ไอโซโพรพานอล เพื่อทำการเปรียบเทียบสารที่เหมาะสมสำหรับใช้ล้างไลเปสตรังรูปเพื่อนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาใหม่ โดยการนำไปตรวจสอบด้วยการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน แล้วทำตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยด้วยเทคนิค HPLC

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. ผลการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเพื่อสามารถผลิตไลเพสได้สูง

4.1.1 ศึกษาการเจริญของเส้นใยรา *F. solani* CU103

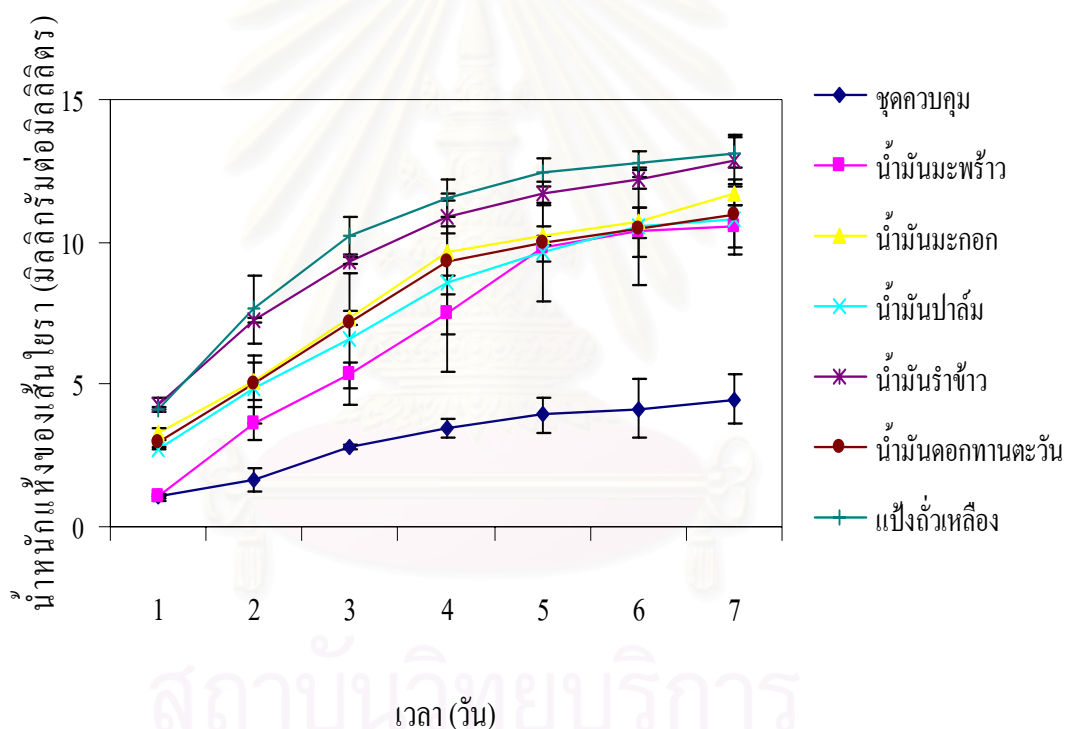
การวัดการเจริญโดยการชั่งน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยรา *F. solani* CU103 เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน และแป้งถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *F. solani* CU103 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นลำดับนับจากวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงราเพื่อผลิตไลเพส ในทุกแหล่งคาร์บอน การเจริญของเส้นใยราเมื่อทำการเลี้ยงราเส้นใยที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6) พบว่า *F. solani* CU103 มีการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 13.12 ± 0.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน รองลงมาเป็นน้ำมันรำข้าว มีการเจริญเติบโตโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 12.86 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว และชุดควบคุมมีการเจริญเติบโตโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 11.74 ± 0.16 10.96 ± 0.12 10.78 ± 0.09 10.55 ± 0.08 และ 4.48 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.1.1.1 ผลของการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

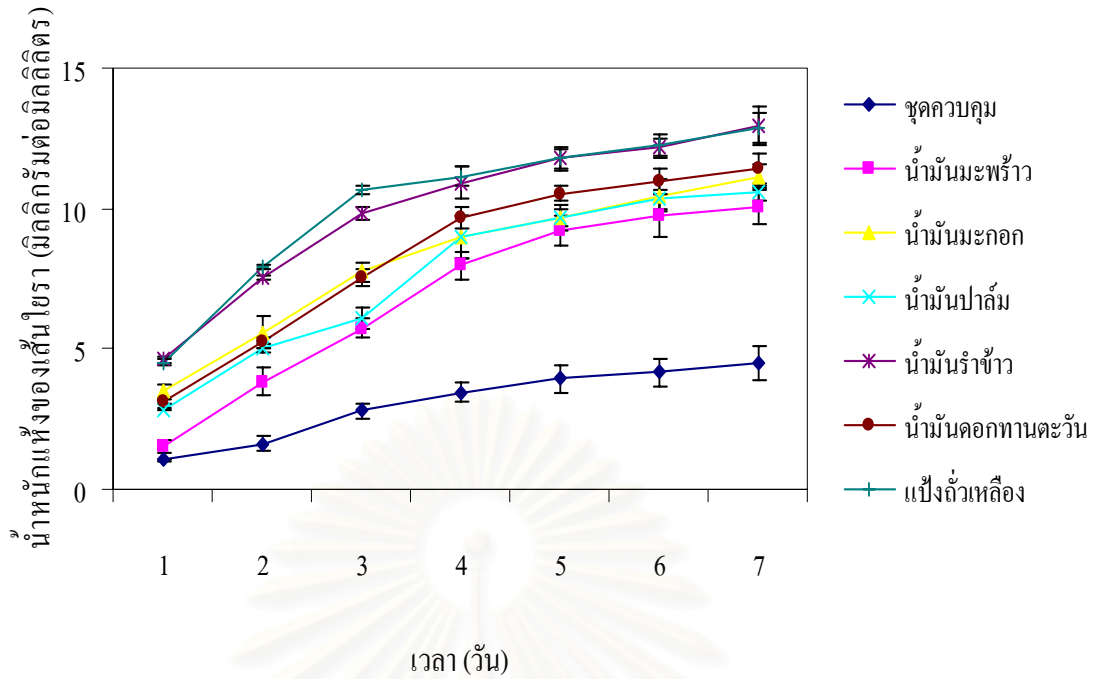
เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7) พบว่า *F. solani* CU103 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันรำข้าว โดยมีการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 13.16 ± 0.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นแป้งถั่วเหลืองมีการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 13.01 ± 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันมะพร้าว มีการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 11.12 ± 0.11 11.42 ± 0.06 10.56 ± 0.07 และ 10.08 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.1.1.2 ผลของการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

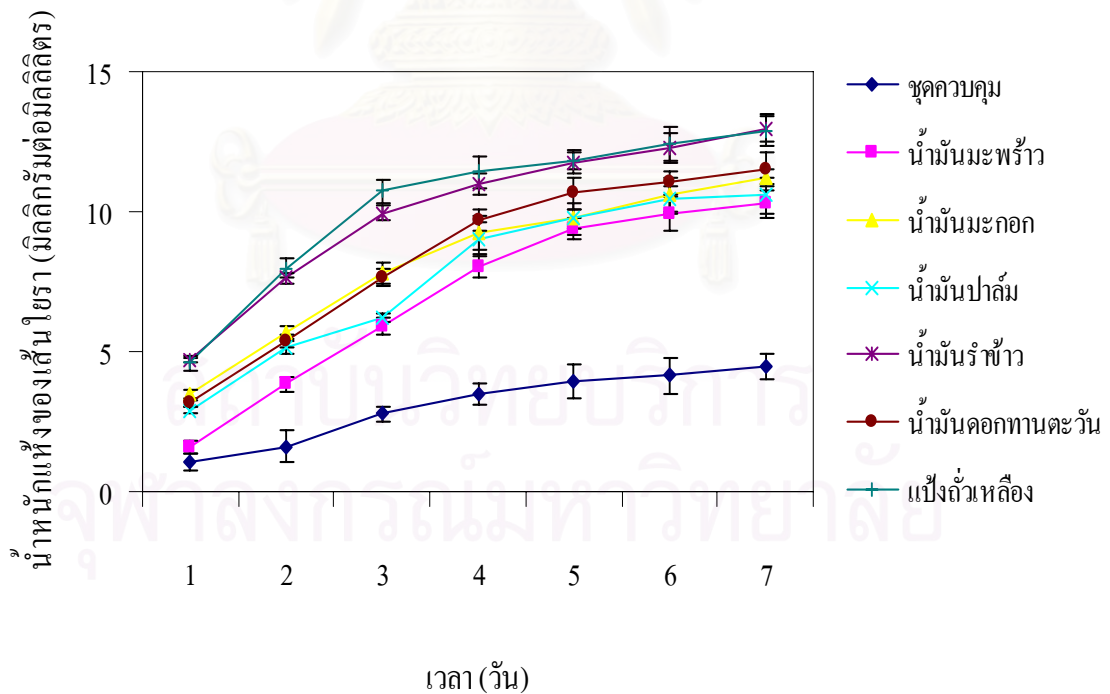
เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8) พบว่า *F. solani* CU103 มีการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้น้ำมันรำข้าว โดยมีการเจริญโตเฉลี่ยเท่ากับ 12.98 ± 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นแป้งหัวเหลืองมีอัตราการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 12.91 ± 0.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันมะพร้าว มีการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 11.24 ± 0.31 11.51 ± 0.44 10.59 ± 0.94 และ 10.27 ± 0.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้ง และระยะเวลาในการเลี้ยง *F. solani* CU103 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักรากแห้ง และระยะเวลาในการเลี้ยง *F. solani* CU103 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักรากแห้ง และระยะเวลาในการเลี้ยง *F. solani* CU103 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

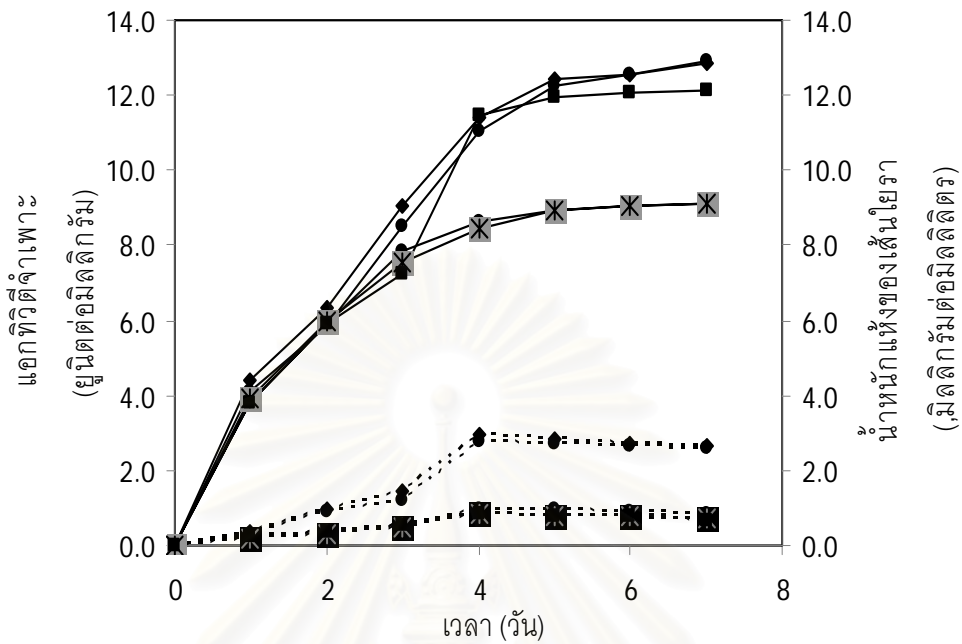
จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส โดยทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหาร basal medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน และแป้งถั่วเหลือง โดยใส่ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปส ซึ่งพบว่า แป้งถั่วเหลืองความเข้มข้นที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตไลเปสที่มีค่าแอกทิวิตีสูงสุด มีค่าเท่ากับ 73.9 ± 3.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันรำข้าวสามารถผลิตไลเปสที่มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 63.9 ± 2.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม และน้ำมันมะพร้าว สามารถผลิตไลเปสที่มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 51.1 ± 1.2 17.4 ± 1.08 25.5 ± 1.21 และ 10.2 ± 0.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่น้ำมันรำข้าวมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าแป้งถั่วเหลืองทำให้มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะมากกว่า คือ 0.84 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับแป้งถั่วเหลืองจะให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.71 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 4) ส่วนผลจากการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่า วันแรกของการบ่มเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.2 เมื่อทำการเก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการผลิตไลเปสให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุดในวันที่ 4 ของการบ่มเชื้อ ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยอยู่ในช่วง 7.08 – 8.34 ทั้งนี้ในชุดควบคุมให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเฉลี่ยเท่ากับ 7.03 ± 0.27 ดังนั้นจึงสามารถจัดกลุ่มของไลเปสที่ผลิตได้จาก *F. solani* CU103 เป็นกลุ่มของ alkaline lipase เมื่อทราบภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนก็จะทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	14.23 ± 0.34	2.26 ± 0.25	0.16 ± 0.04
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	48.33 ± 0.62	9.57 ± 0.73	0.2 ± 0.03
น้ำมันมะกอก	57.73 ± 2.26	29.46 ± 1.67	0.51 ± 0.07
น้ำมันปาล์ม	40.58 ± 0.58	13.07 ± 0.37	0.32 ± 0.06
น้ำมันรำข้าว	52.17 ± 2.59	37.12 ± 3.55	0.71 ± 0.12
น้ำมันดอกทานตะวัน	38.95 ± 1.13	10.25 ± 0.63	0.26 ± 0.04
แป้งถั่วเหลือง	72.08 ± 3.22	51.75 ± 0.62	0.72 ± 0.05
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	53.16 ± 4.85	10.2 ± 0.89	0.19 ± 0.04
น้ำมันมะกอก	75.33 ± 3.60	51.1 ± 1.2	0.68 ± 0.14
น้ำมันปาล์ม	65.27 ± 4.92	25.5 ± 1.21	0.39 ± 0.1
น้ำมันรำข้าว	76.23 ± 4.05	63.9 ± 2.45	0.84 ± 0.06
น้ำมันดอกทานตะวัน	50.6 ± 4.17	17.4 ± 1.08	0.34 ± 0.05
แป้งถั่วเหลือง	104.46 ± 4.15	73.9 ± 3.89	0.71 ± 0.04
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	55.74 ± 4.38	10.37 ± 0.25	0.18 ± 0.03
น้ำมันมะกอก	80.31 ± 3.24	56.47 ± 2.41	0.7 ± 0.07
น้ำมันปาล์ม	71.44 ± 3.77	31.45 ± 2.17	0.44 ± 0.04
น้ำมันรำข้าว	96.15 ± 4.28	65.88 ± 3.88	0.68 ± 0.05
น้ำมันดอกทานตะวัน	63.78 ± 2.68	18.53 ± 0.70	0.29 ± 0.03
แป้งถั่วเหลือง	128.07 ± 6.58	80.6 ± 3.71	0.63 ± 0.13

4.1.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *F. solani* CU103 โดยทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหาร basal medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ผลิตไลเปสให้แยกทิวิตีสูงคือ น้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์ และแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) เปปโตน (Peptone) และ ยีสต์สกัด (Yeast extract) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า เปปโตนความเข้มข้นที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้การผลิตไลเปสที่มีค่าแยกทิวิตีจำเพาะสูงสุดในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 3.64 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และรองลงมาเป็นยีสต์สกัดให้ค่าแยกทิวิตีจำเพาะมีค่าเท่ากับ 3.42 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน สำหรับ แอมโมเนียมไนเตรท และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าความเข้มข้นที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการผลิตไลเปสจะผลิตไลเปสที่ให้ค่าแยกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรท และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าแยกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.92 ± 0.02 และ 1.02 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีนซึ่งผลิตได้ในวันที่ 4 ของการบ่มเชื้อ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ เปปโตน และยีสต์สกัด ให้ค่าแยกทิวิตีจำเพาะที่น้อยกว่า ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10 ส่วนผลการวัดการเจริญสำหรับการผลิตไลเปส พบว่า *F. solani* CU103 มีการเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้เปปโตน ความเข้มข้นที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 13.56 ± 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงราเป็นเวลา 7 วัน รองลงมาคือ ยีสต์สกัด ให้ค่าการเจริญโดยมีค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 13.48 ± 0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแอมโมเนียมไนเตรท และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้ค่าการเจริญโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเฉลี่ยเท่ากับ 8.94 ± 0.09 และ 9.02 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



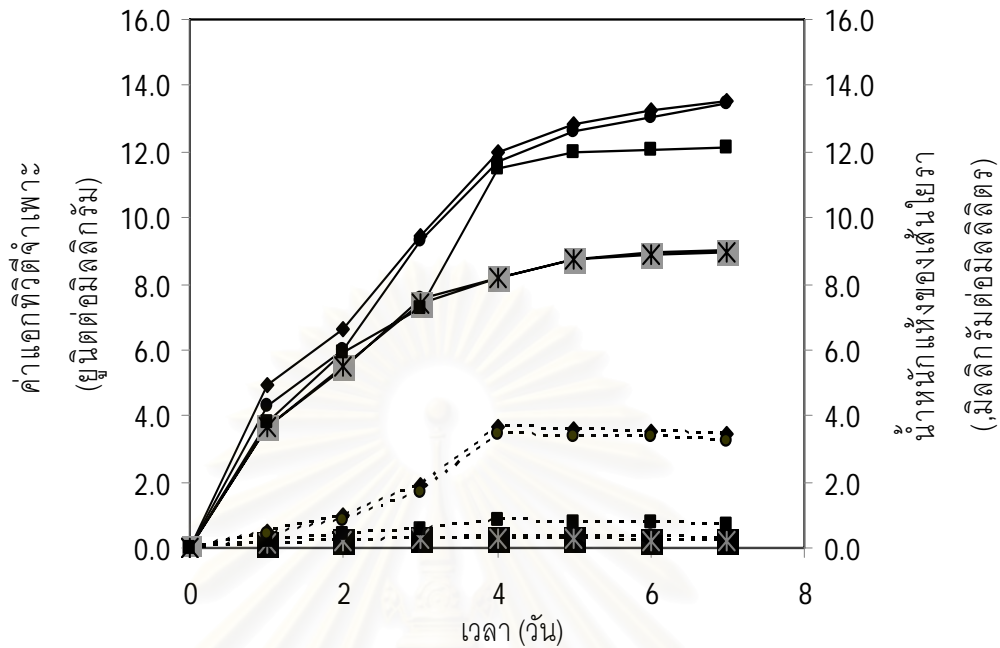
ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอมโมเนียไนโตรเจนกับน้ำหนักรวมของเส้นใย และระยะเวลาในการผลิตไลเปส เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อ ----- คือ ค่าแอมโมเนียไนโตรเจน

————— คือ น้ำหนักรวม

- การเลี้ยงในเปปตอน (Peptone)
- ◆ การเลี้ยงในยีสต์ (Yeast)
- ▲ การเลี้ยงในแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$
- × การเลี้ยงในแอมโมเนียมไนเตรท NH_4NO_3
- การเลี้ยงในชุดควบคุม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอมโมเนียไนโตรเจนกับน้ำหนักรวมของเส้นใยรา และระยะเวลาในการผลิตไลเปส เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ ----- คือ ค่าแอมโมเนียไนโตรเจน

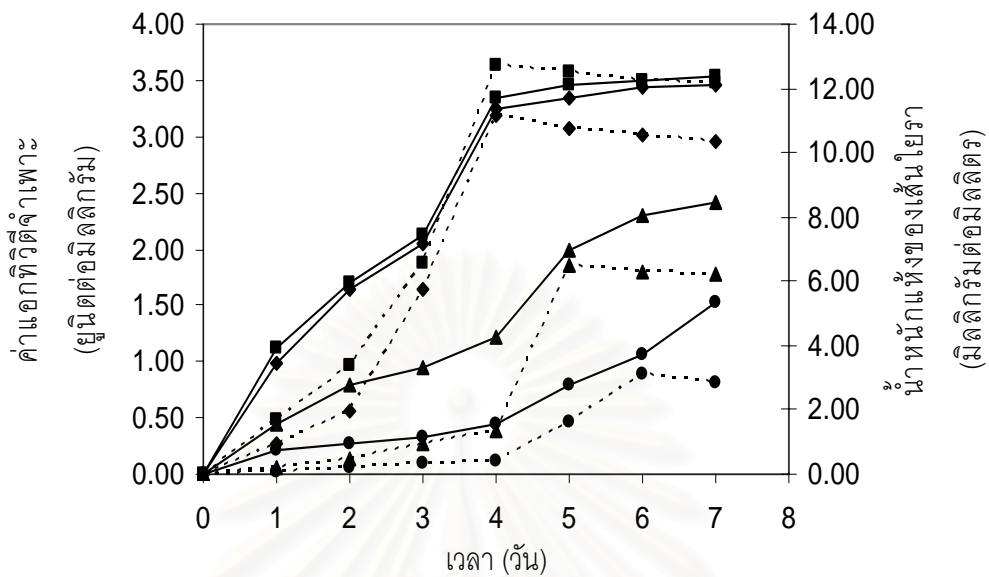
— คือ น้ำหนักรวม

- การเลี้ยงในเปปโตน (Peptone)
- ◆ การเลี้ยงในยีสต์ (Yeast)
- ▲ การเลี้ยงในแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)
- × การเลี้ยงในแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)
- การเลี้ยงในชุดควบคุม

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตไลเปส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้การผลิตไลเปส โดยทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหาร basal medium ที่มีการใส่น้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และเปปโตน 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน แล้วนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตไลเปสจาก *F. solani* CU103 สามารถผลิตไลเปสได้สูงและมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 3.66 ± 0.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะสามารถผลิตและค่าแอกทิวิตีจำเพาะรองลงมาให้ค่าเท่ากับ 2.96 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน สำหรับที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 มีช่วงระยะของ lag phase ที่ยาวนานกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถผลิตไลเปส และมีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงในวันที่ 5 และ 6 มีค่าเท่ากับ 1.77 ± 0.22 และ 0.82 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 11) นอกจากนี้ยังพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญได้ดีที่สุดซึ่งมีลักษณะที่เหมือนกัน โดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยราเท่ากับ 12.09 ± 0.24 และ 12.41 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนอุณหภูมิที่ 35 และ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของราเส้นใยเจริญได้ไม่ดี เนื่องจากจากอุณหภูมิที่ 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปสของราเส้นใย ซึ่งมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา มีค่าเท่ากับ 8.45 ± 0.16 และ 5.36 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอกทิวิตีจำเพาะกับน้ำหนักรวมของเส้นใยรา และระยะเวลาในการผลิตไลเพส เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ

- เมื่อ ----- คือ ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ
 ————— คือ น้ำหนักแห้ง
- ◆ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
 - การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
 - ▲ การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
 - การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.2 ผลการตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุน

จากการศึกษาตรึงรูปไลเพสจาก *F. solani* CU103 บนวัสดุค้ำจุนประเภท macroporous resin มี 5 ชนิด ได้แก่ พวกที่มีขี้ NKA-9 พวกที่มีขี้วน้อย AB-8 และพวกที่ไม่มีขี้ H103 D4020 และ NKA โดยการเชื่อมขวางด้วยสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า

4.2.1 เมื่อทำการตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด AB8 เมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโปรตีนถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนอยู่มากที่สุดมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10.99 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุค้ำจุน คิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพได้เท่ากับ 48.37 ± 2.76 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นสูงสุดมีค่าเท่ากับ 53.28 ± 3.34 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12)

4.2.2 การตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด D4020 เมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโปรตีนถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนอยู่มากที่สุดมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 14.31 ± 1.32 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุค้ำจุนคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพได้เท่ากับ 62.91 ± 3.59 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นสูงสุดมีค่าเท่ากับ 50.48 ± 2.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12)

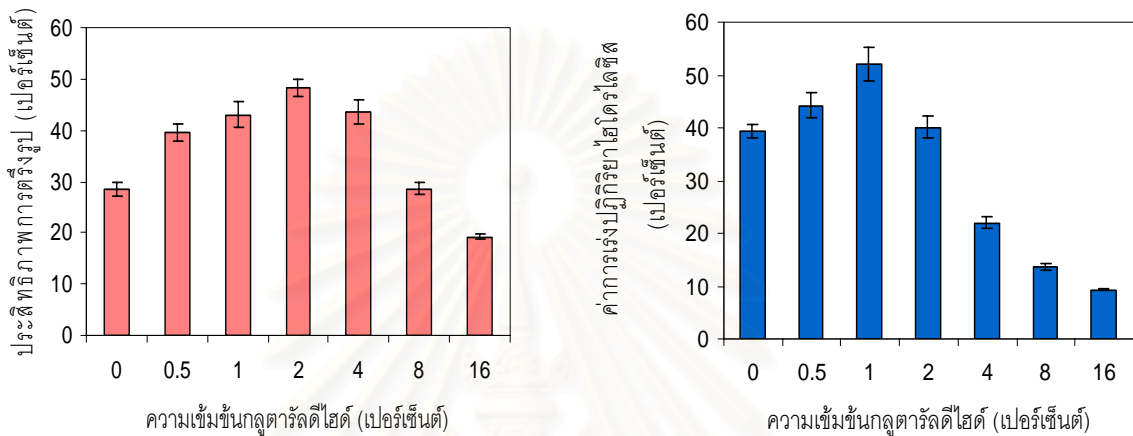
4.2.3 การตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด H103 เมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโปรตีนถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนอยู่มากที่สุดมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 14.14 ± 0.95 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุค้ำจุนคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพได้เท่ากับ 62.18 ± 3.76 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นสูงสุดมีค่าเท่ากับ 49.48 ± 2.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13)

4.2.4 การตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด NKA เมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 4.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโปรตีนถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนอยู่มากที่สุดมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 13.77 ± 0.84 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุค้ำจุนคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพได้เท่ากับ 60.57 ± 2.86 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นสูงสุดมีค่าเท่ากับ 63.57 ± 3.56 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13)

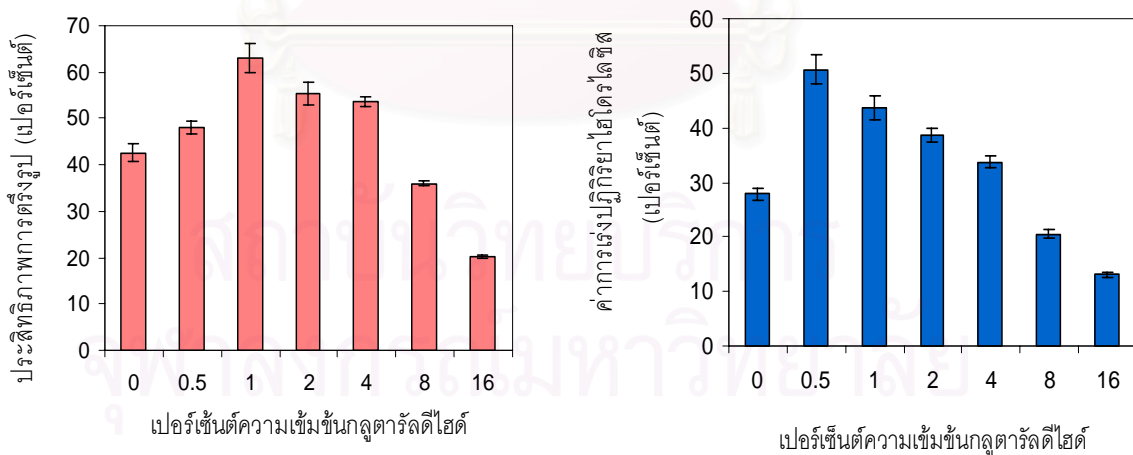
4.2.5 การตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด NKA9 เมื่อใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโปรตีนถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนอยู่มากที่สุดมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5.79 ± 0.67 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุค้ำจุนคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพได้เท่ากับ 25.46 ± 1.24

เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นสูงสุดมีค่าเท่ากับ 29.86 ± 2.03 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 14)

(ก) AB8

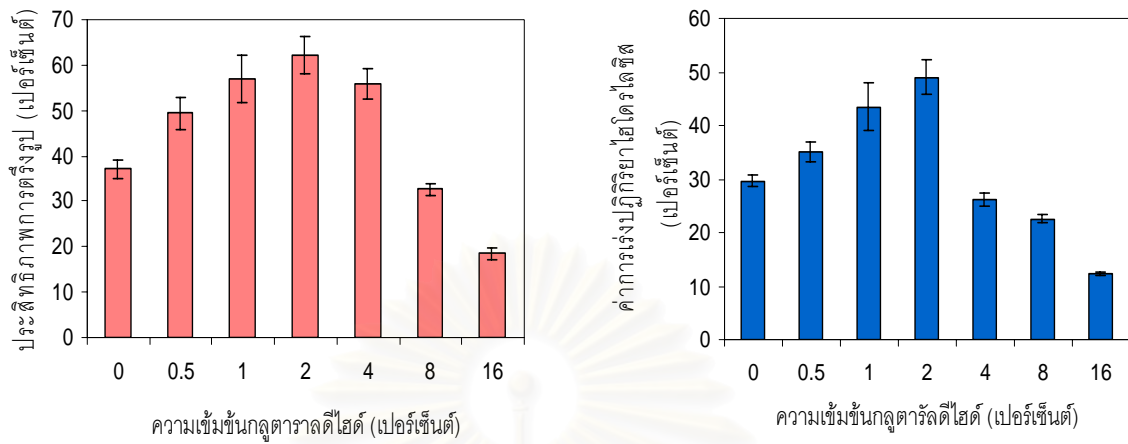


(ข) D4020

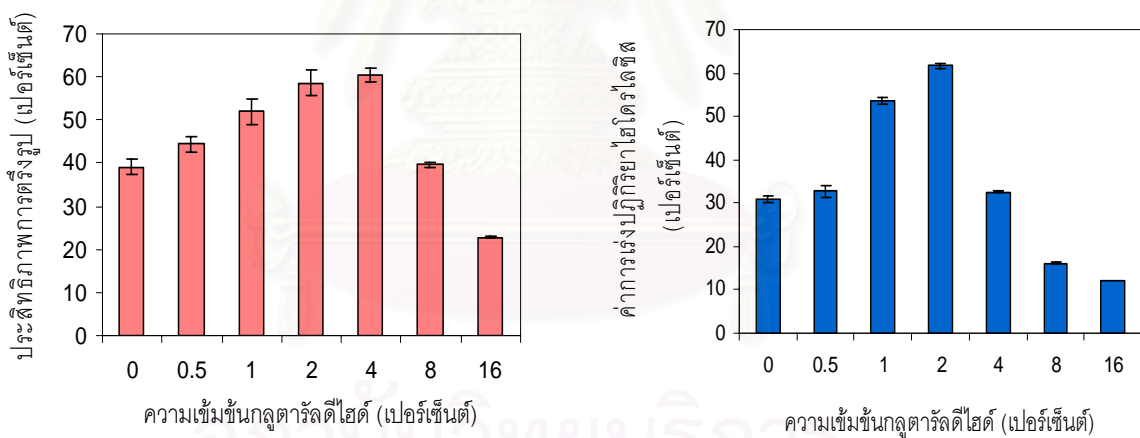


ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเฟส(เปอร์เซ็นต์) กับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) (ก) AB8 (ข) D4020

(ค) H103

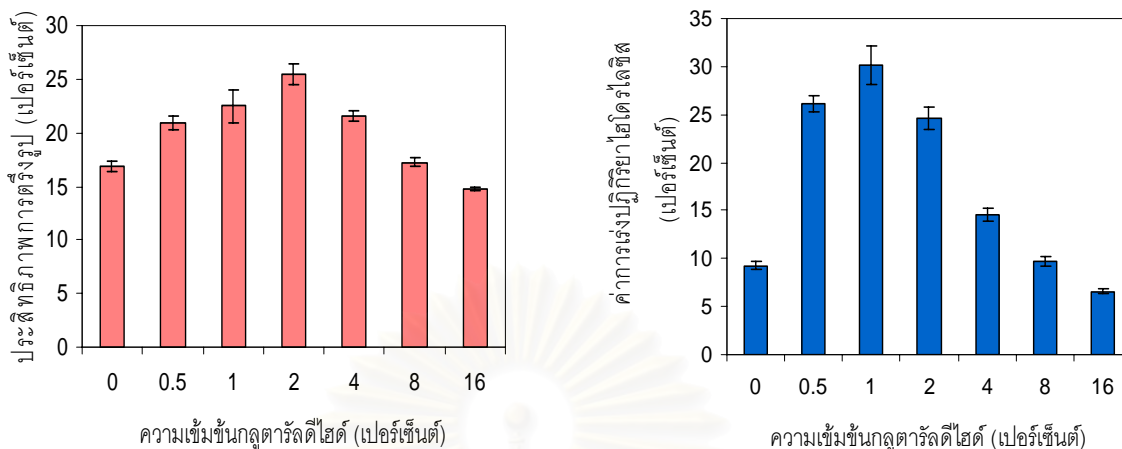


(ง) NKA



ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละประสิทธิผลการทรงรูปไลเพสกับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ค) H103 - (ง) NKA

(จ) NKA9



ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพส (เปอร์เซ็นต์) กับความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) และความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (เปอร์เซ็นต์) กับความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ (เปอร์เซ็นต์) (จ) NKA9

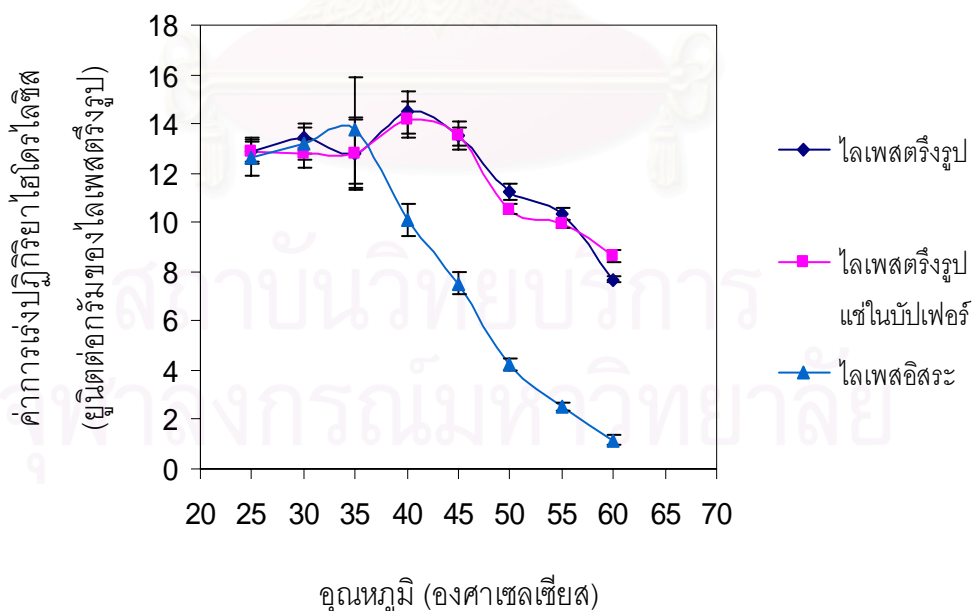
จากภาพที่ 12-14 พบว่าประสิทธิภาพของการตรึงบนวัสดุค้ำจุนชนิด D4020 สูงกว่าการตรึงบนวัสดุค้ำจุนชนิดอื่น ๆ และเมื่อนำไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุน 5 ชนิดดังกล่าว ทำการทดสอบในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่าความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุนชนิด NKA ให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันสำหรับใช้ในการเชื่อมขวาง (cross linking) และเมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น พบว่าค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสลดลง ดังแสดงในภาพที่ 12-14

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตรังรูป

4.3.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตรังรูป

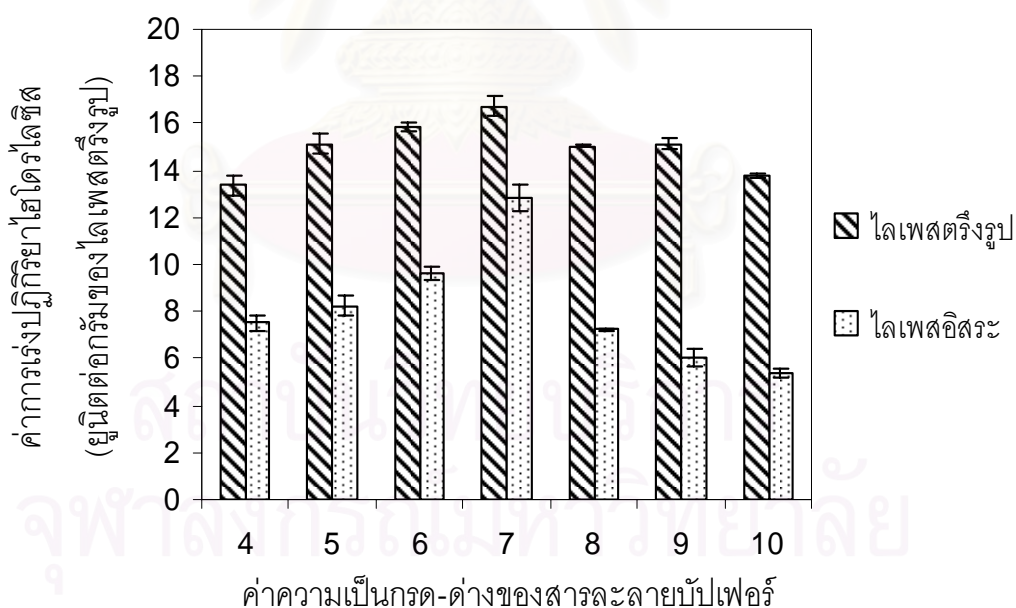
จากการศึกษาผลอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรไลเพสเตรังรูปเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ โดยนำไลเพสตรังรูป ไลเพสตรังรูปแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความกรด-ด่าง 7.4 และไลเพสอิสระ ทำการบ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25 30 35 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำมาเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไลเพสตรังรูปและไลเพสอิสระจะแตกต่างกัน คือ ไลเพสตรังรูป และไลเพสตรังรูปที่แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความกรด-ด่าง 7.4 มีความเหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่สำหรับไลเพสอิสระอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสไลเพสตรังรูป และไลเพสตรังรูปที่แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ค่าความกรด-ด่าง 7.4 ให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 14.47 ± 0.85 และ 14.15 ± 0.71 ยูนิตต่อกรัมของไลเพสตรังรูป และไลเพสอิสระให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 13.74 ± 0.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 15 ไลเพสตรังรูปมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงที่กว้างกว่าไลเพสอิสระ แสดงว่าหลังจากทำการตรังรูปไลเพส ไลเพสตรังรูปจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ



ภาพที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

4.3.2 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตรังรูป

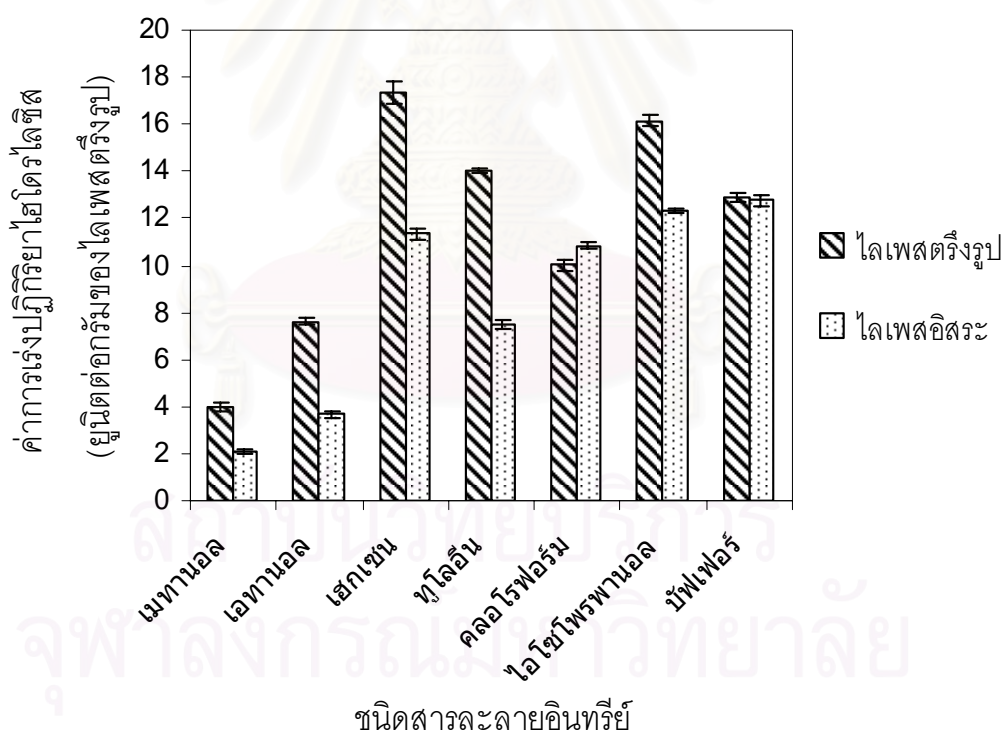
จากการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการทำงานของไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ โดยการทำปฏิกิริยาในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4-10 ผลแสดงดังภาพที่ 16 พบว่า ไลเพสตรังรูปมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่าไลเพสอิสระ จากภาพแสดงให้เห็นว่าไลเพสตรังรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และเมื่อเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ พบว่า ไลเพสตรังรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่กว้างกว่าจะอยู่ในช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่าง 5-9 ให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 15.13 ± 0.44 15.83 ± 0.76 16.74 ± 0.61 15.03 ± 0.27 และ 15.1 ± 0.28 ยูนิตต่อกรัมของไลเพสตรังรูปตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับการใช้ไลเพสอิสระทำงานได้ดีในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 เพียงค่าเดียว ให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 12.84 ± 0.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ยูนิตต่อกรัมของไลเพสตรังรูป) กับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในสารละลายบัฟเฟอร์

4.3 .4 ผลการศึกษาสารละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตรังรูป

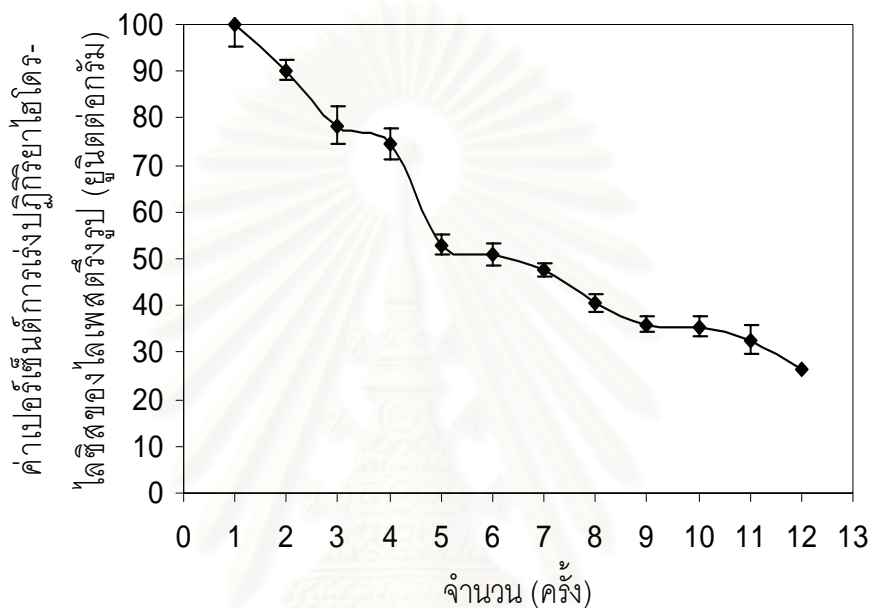
จากการศึกษาผลสารละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ โดยนำไลเพสตรังรูปและไลเพสอิสระ ทำการบ่มในสารละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซน ทูโลอิน คลอโรฟอร์ม ไอโซโพรพานอล เอทานอล และเมทานอล เป็นเวลา 60 นาที ก่อนนำมาเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่า ไลเพสตรังรูปจะมีความเสถียรต่อสารละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าไลเพสอิสระ ยกเว้น ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ดังแสดงในภาพที่ 17 จากภาพแสดงให้เห็นว่าไลเพสตรังรูป มีความเสถียรต่อเฮกเซนได้ดีที่สุดให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 17.33 ± 1.36 หน่วยต่อกรัมของไลเพสตรังรูป ส่วนไลเพสอิสระมีความเสถียรต่อสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอไรได้ดีที่สุดให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 12.75 ± 1.45 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ



ภาพที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรังรูปกับชนิดสารละลายอินทรีย์

4.3.5 ผลการศึกษาความเสถียรของไลเปสตรังรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จากการศึกษาความเสถียรไลเปสตรังรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ พบว่า ไลเปสตรังรูปเมื่อนำกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ 12 ครั้ง โดยที่ยังให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสลดลงอยู่ประมาณ 28.75 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับจำนวน(ครั้ง)ที่ทำปฏิกิริยา

4.4 ผลทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

4.4.1 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

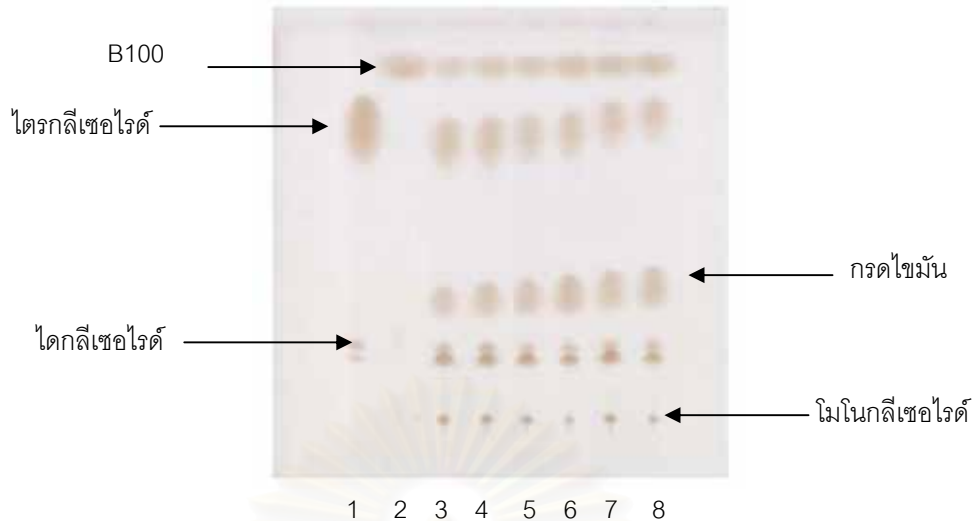
4.4.1.1 อัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล

โดยทำศึกษาอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็น 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยเปรียบเทียบระหว่างไลเปสตรังรูปกับไลเปสอิสระสำหรับใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากการทดลองโดยนำไลเปสตรังรูปและไลเปส

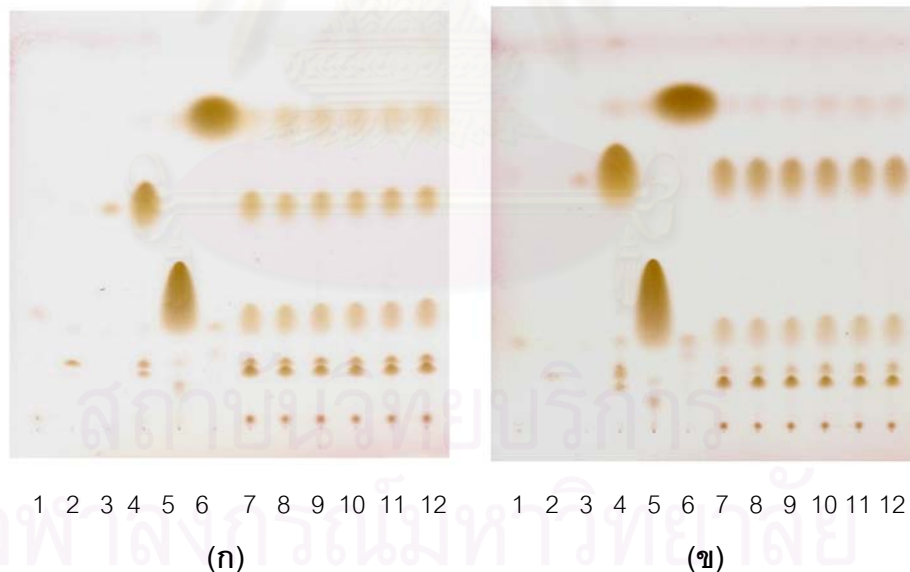
อิสระมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยโมล แล้วทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาเบื้องต้นด้วยเทคนิควิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) โดยมีสารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบชนิดของสารตัวอย่างในการทำ TLC ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอเลอิก เมทิลโอเลเอต และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นตัวแทนเมทิลโอเลเอต) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 ข้อที่ 5.2 กล่าวคือ โมโนกลีเซอไรด์ มีค่า R_f เท่ากับ 0.01 ไดกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.14 ไตรกลีเซอไรด์มีค่า R_f เท่ากับ 0.57 กรดโอเลอิกมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เมทิลโอเลเอตมีค่า R_f 0.72 และ B100 มีค่า R_f เท่ากับ 0.70 จากโครมาโทแกรมรูปที่ 11 พบว่า ไลเพสอิสระจาก *F. solani* CU103 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ทุกอัตราส่วนโดยโมล ส่วนไลเพสตรังรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุนชนิด NKA สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้ทุกอัตราส่วนโดยโมลเช่นกัน (ภาพที่ 19) โดยพิจารณาจากค่า R_f เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน แต่เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธี TLC ยังไม่สามารถบอกถึงปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นได้จึงนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC หาปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น

4.4.1.2 ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

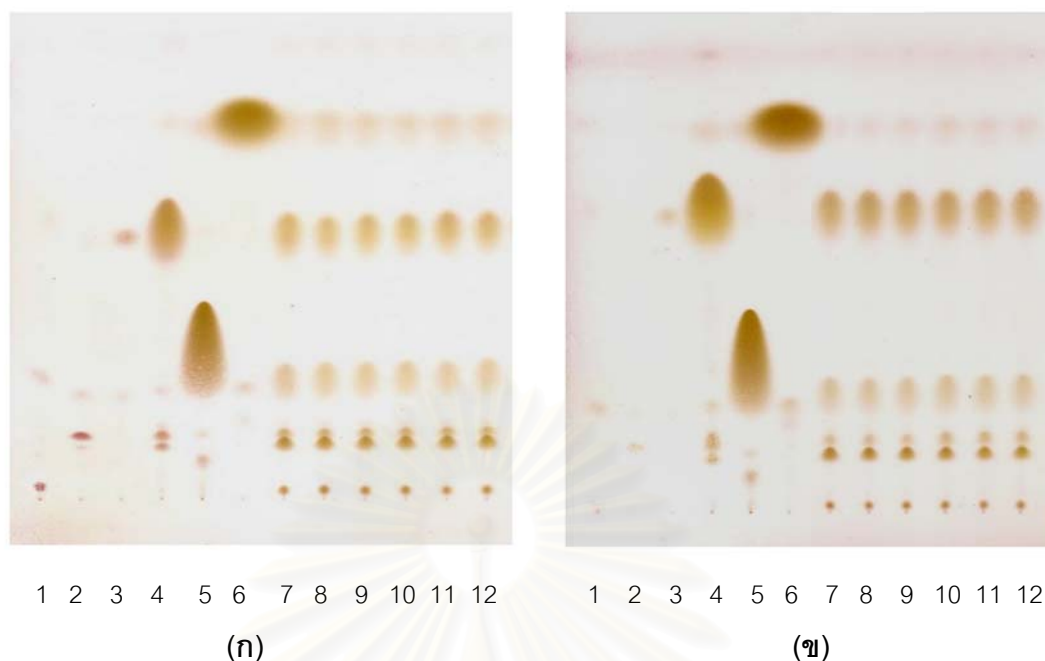
จากการทดลองได้ทำการศึกษาปริมาณน้ำที่เติมลงไปในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีการเติมน้ำ 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด พบว่าไลเพสตรังรูป และไลเพสอิสระ สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้โดยจะเกิดปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ถ้ามีการเติมน้ำในปริมาณ 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในระหว่างการทำปฏิกิริยา พบว่าไลเพสตรังรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุน NKA และไลเพสอิสระสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแล้วเกิดเมทิลเอสเทอร์ได้เช่นกัน (ภาพที่ 20-21) จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC โดยพิจารณาจากค่า R_f เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน แต่เนื่องจากการทดสอบด้วย TLC ยังไม่สามารถบอกถึงปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นได้จึงนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC



ภาพที่ 19 โคโรมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยเร่งด้วยไลเพสตรังรูป โดยเลขที่ 1 น้ำมันปาล์ม เลขที่ 2 B100 เลขที่ 3-8 ไลเพสตรังรูปที่ 20 เพลอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม และการใส่ เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 8 16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ



ภาพที่ 20 โคโรมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่น้ำในปฏิกิริยา 2.5 เพลอร์เซ็นต์ (ก) และ 50 เพลอร์เซ็นต์ (ข) เร่งด้วยไลเพสตรังรูป โดยใช้ที่ 20 เพลอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม และการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 8 16 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ โดยเลขที่ 1-6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอเลอิก และเมทิลโอเลอิต เลขที่ 7-12 อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยโมลตามลำดับ

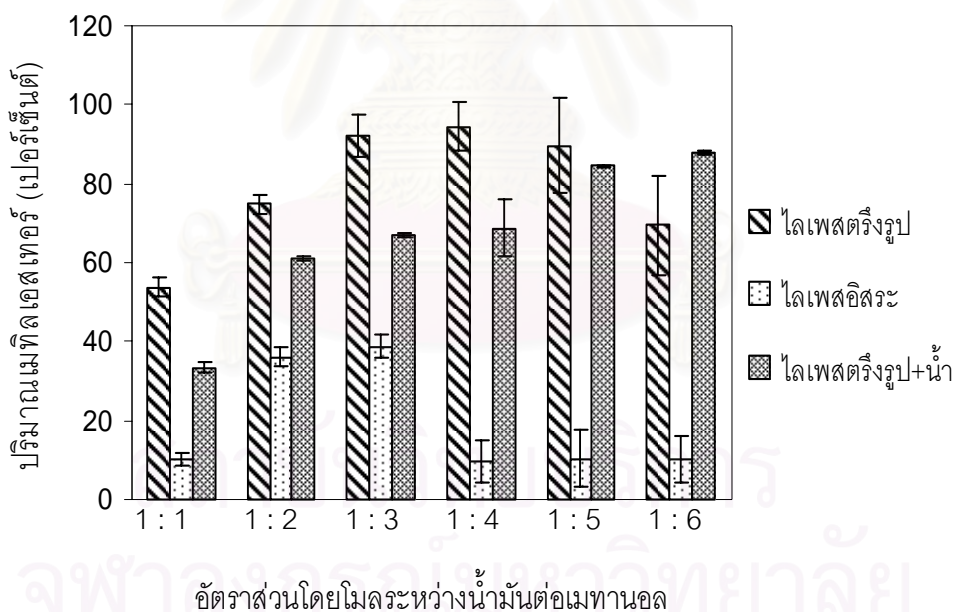


ภาพที่ 21 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่น้ำในปฏิกิริยา 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ก) และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ข) เองด้วยไลเพสอิสระ โดยใช้ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม และการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น ที่ 0 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเลนที่ 1-6 โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ น้ำมันปาล์ม กรดโอเลอิก และเมทิลโอเลเอต เลนที่ 7-12 อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยโมลตามลำดับ

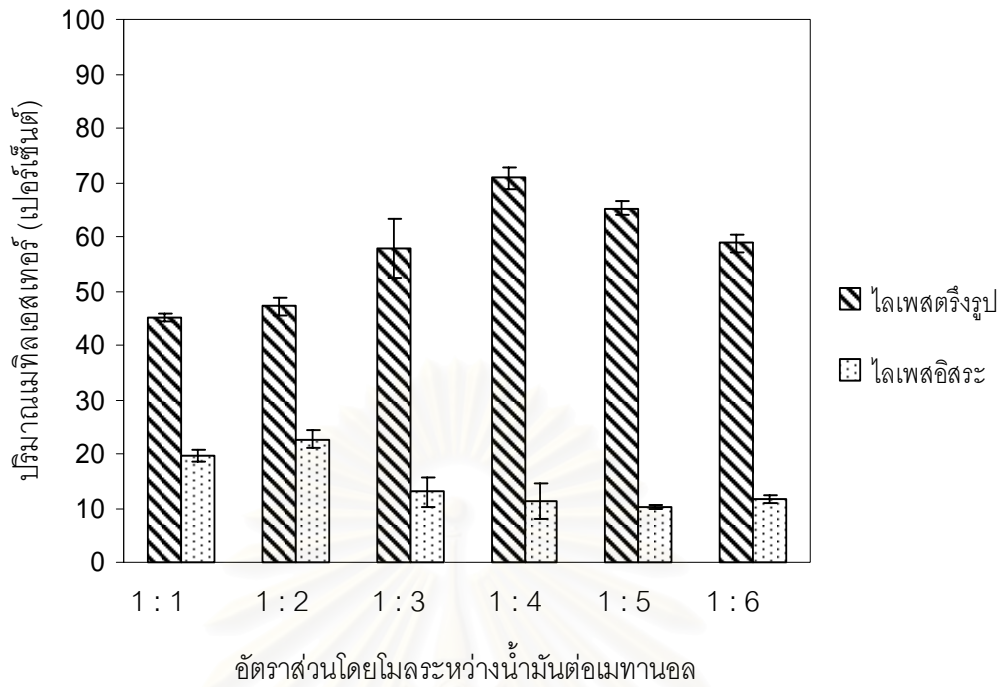
4.4.2 ผลการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเทคนิค HPLC

4.4.2.1 ผลการเปรียบเทียบไลเพสอิสระกับไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็น 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 ในการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังแสดงในกราฟรูปที่ 14 พบว่าอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมเป็น 1:4 เมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาซึ่งสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 92.62 ± 3.27 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมเป็น 1:3 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 38.73 ± 3.08 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปผสมกับน้ำในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าอัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมเป็น 1:6 สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ถึง 88.06 ± 0.56 เปอร์เซ็นต์

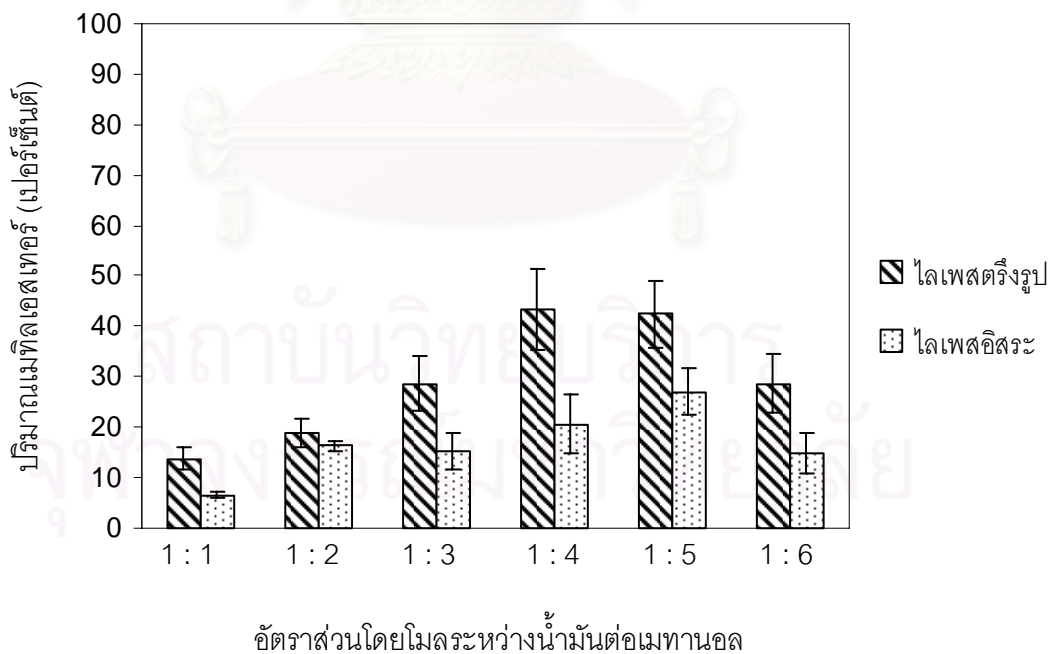
4.4.2.2 ผลการเปรียบเทียบไลเพสอิสระกับไลเพสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันกับเมทานอลเป็น 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยเติมน้ำ ปริมาณ 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด เข้าไปในปฏิกิริยาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (ภาพที่ 15 และ 16) พบว่า เมื่อมีการเติมน้ำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดอัตราส่วน โดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมเป็น 1:2 ไลเพสอิสระสามารถเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ 22.68 ± 1.68 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ไลเพสตรังรูป เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ 70.86 ± 1.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ ใช้อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมเป็น 1:4 และเมื่อมีการเติมน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมเป็น 1:5 ไลเพสอิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ 26.95 ± 4.66 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่เหมาะสมเป็น 1:4 ไลเพสตรังรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ 43.28 ± 7.98 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเอสเทอร์(เปอร์เซ็นต์) กับอัตราส่วนโดยโมลระหว่าง น้ำมันปาล์มต่อเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:6) โดยไม่มีการเติมน้ำเข้าไปในปฏิกิริยา



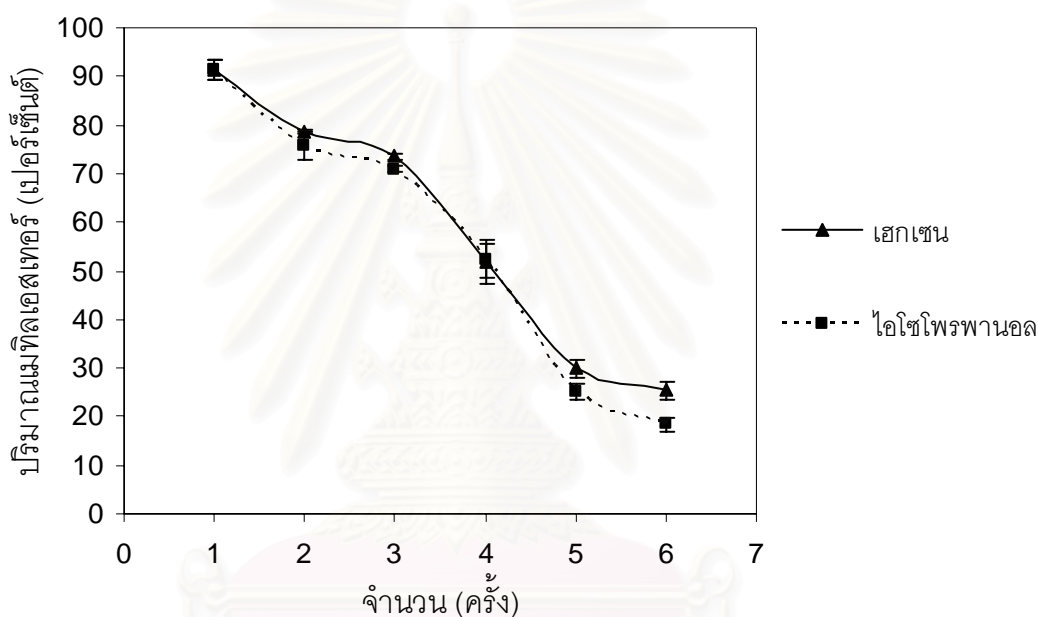
ภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเอสเทอร์(เปอร์เซ็นต์) กับอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:6) โดยเติมน้ำปริมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด เข้าไปในปฏิกิริยา



ภาพที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเอสเทอร์(เปอร์เซ็นต์) กับอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:6) โดยเติมน้ำปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด เข้าไปในปฏิกิริยา

4.4.3 ศึกษาความเสถียรของไลเปสตรึงรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

จากการศึกษาความเสถียรไลเปสตรึงรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ พบว่า เมื่อใช้ เฮกเซนและไอโซโพรพานอล ซะล้างส่วนของกลีเซอรอลออกในช่วงระหว่างนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีที่ลดลงเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 25.41 ± 0.47 และ 18.44 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์หลังจากใช้ไลเปสตรึงรูป 6 ครั้ง ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 25



ภาพที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเมทิลเอสเทอร์กับจำนวน (ครั้ง) ที่ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ไลเพสนับเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ และอุตสาหกรรมต่าง ๆ เนื่องด้วยจากคุณสมบัติของไลเพสที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด ความคงทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง และสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ไลเพสจากรามีข้อดีกว่าไลเพสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากราสามารถเจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ ไลเพสจากราเป็นแหล่งที่สำคัญสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมมากมาย เช่น การสังเคราะห์พอลิเมอร์ ผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นรสอาหาร และการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยเฉพาะไลเพสที่ผลิตได้จาก *Fusarium spp.* มีความสำคัญโดยสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สามารถใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งปัจจุบันการผลิตไบโอดีเซลนิยมใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่เนื่องจากวิธีนี้มีข้อเสียคือ เกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการ ทำให้เกิดความยุ่งยากต่อกระบวนการแยกไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ ส่งผลให้เกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม การใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีอยู่หลายประการ เช่น มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากกว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบริสุทธิ์ แต่ข้อเสียเปรียบของการใช้ไลเพสที่สำคัญคือ มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของ *Fusarium spp.* จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง งานวิจัยนี้ได้นำ *F. solani* CU103 ที่ได้ทำการคัดแยกมาจากดินในจังหวัดน่าน ซึ่งมีความสามารถนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ (วรภกรณ์, 2549) จึงสนใจทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและการตรึงรูปไลเพสจาก *F. solani* CU103 เพื่อนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม ซึ่งเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ไลเพสทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

5.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของราเพื่อสามารถผลิตไลเพส

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเพส โดยมีปัจจัยที่ใช้ศึกษา คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิ เมื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่า *F. solani* CU103 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใส่น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมน้ำมันเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน แสดงให้เห็นว่า *F. solani* CU103 สามารถใช้น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน น้ำมันรำข้าวที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตไลเพสที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด คือ 0.84

± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ และชุดควบคุม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saad และคณะ (2004) รายงานว่า น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ มีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปส จาก *Fusarium oxysporum* เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติมน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปส ยังพบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนในการผลิตที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตไลเปส (Stanbury และคณะ, 1995) Maia และคณะ (2001) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลเปสจาก *Fusarium solani* รายงานว่า *Fusarium solani* สามารถผลิตไลเปสได้ในอาหารเชื้อเห็ดที่มีน้ำมันมะกอกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้้ำมันมะกอกแล้ว ในปี ค.ศ. 1992 Papaparaskes และคณะ รายงานว่าน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณไลเปสที่ผลิตได้สูงกว่าชุดควบคุม และในปี ค.ศ. 2004 Jinda ได้ศึกษาผลการเติมน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KLB1 พบว่าการใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ให้การผลิตไลเปสได้สูงที่สุด คือ 68.54 U/mg ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ จากผลการทดลองในการรายงานต่าง ๆ ข้างต้นจะเห็นว่า น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีผลต่อค่าแอกทิวิตีของไลเปสต่างกันในการผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ที่มีผลทั้งนี้อาจเนื่องสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมัน และขึ้นอยู่กับแหล่ง และชนิดของราที่นำมาศึกษา (Maia และคณะ, 1999; Rapp Peter, 1995) เพราะราแต่ละท้องถิ่นมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและปริมาณได้แตกต่างกัน

หลังจากทราบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมก็ทำการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจน เมื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตไลเปส พบว่าเมื่อใช้น้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ พบว่า น้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเบปโตน 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตไลเปสให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุด คือ 3.64 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 4 เท่า เมื่อเทียบกับการให้แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งอาหาร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในเบปโตนมีสารอาหารบางอย่างที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปส เช่น วิตามิน แร่ธาตุบางชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saad และคณะ, (2004) สำหรับ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) พบว่า ในการผลิตไลเปสจะให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเบปโตน และยีสต์สกัด ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจาก แอมโมเนียมไนเตรท และ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดที่สูงขึ้น ซึ่งไม่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไลเปสจึงทำให้มีการสร้างไลเปสได้

ปริมาณที่น้อยและมีค่าเอกทิวิตีจำเพาะต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ (Griffin, 1994) โดยปกติราส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่าความเป็นกรดเล็กน้อยประมาณค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 - 6.8 Sztajer และคณะ (1989) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนกลับมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ไลเปส ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกัน เมื่อใช้สารกลุ่มอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน ราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 มีความสามารถที่จะใช้สารในกลุ่มอนินทรีย์ได้ดีกว่าสารอนินทรีย์ อาจเนื่องมาจากในกลุ่มสารอนินทรีย์มีแหล่งอาหารที่สมบูรณ์กว่าสารอนินทรีย์ เช่น กลุ่มวิตามิน ฮอร์โมน ที่ช่วยในการเจริญและผลิตไลเปส ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของ Saad และคณะ (2004) พบว่า เมื่อมีการเติมเปปโตินในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้มีค่าเอกทิวิตีของไลเปสเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นในการผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณที่สูงจึงต้องเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของรา (Stanbury และคณะ, 1995) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกภาวะนี้เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตไลเปส และเมื่อทำการศึกษาค่าผลกระทบบของอุณหภูมิสำหรับการผลิตไลเปส พบว่าเมื่อทำการเลี้ยง *F. solani* CU103 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเปปโติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส และยังพบว่าอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส *F. solani* CU103 ยังสามารถผลิตไลเปสได้ แต่ในช่วงระยะแรก *F. solani* CU103 จะต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับภาวะที่ใช้ในการผลิตที่ยาวนานกว่าที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า สำหรับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีการผลิตไลเปสได้ค่าเอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด เนื่องจากอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่น้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดของน้ำมันไม่มาก และมีการกระจายตัวที่ดีเมื่อมีการเขย่าแบบต่อเนื่อง ทำให้ไลเปสที่ราผลิตได้สามารถย่อยสลายน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี (Wade, 1995) โดยอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสสามารถผลิตไลเปสที่ให้ค่าเอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 3.66 ± 0.24 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน สำหรับอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส น้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดของน้ำมันน้อยกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ และมีการกระจายตัวได้ดีกว่า แต่กลับให้ค่าเอกทิวิตีจำเพาะในการผลิตไลเปสที่ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจาก อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่สูงเกินไปจึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตสำหรับราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 ทำให้ราเจริญเติบโตได้ไม่ดีส่งผลให้การผลิตไลเปสได้ในปริมาณที่น้อย และอุณหภูมิที่สูงเกินไปจึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของรา ดังนั้นจึงใช้ภาวะที่มีการเติมน้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์ เปปโติน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ต่อการเลี้ยง *F. solani* CU103 เพื่อการผลิตไลเปส โดยภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่มีกรารายงานดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจากราชนิดต่าง ๆ

แหล่งที่มาของไลเพส	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ค่าความเป็น กรด-ด่าง	แอกทิวิตี (หน่วยต่อ มิลลิลิตร)	เอกสาร อ้างอิง
<i>Fusarium solani</i> CU103	30	6.2	63.9 ± 2.45	งานวิจัย ปัจจุบัน
<i>Fusarium solani</i> FS1	28	6.0	9.5	Maia และ คณะ (1999)
<i>Fusarium oxysporum</i>	30	6.0	44.9	Saad และ คณะ (2004)
<i>Geotrichum</i> sp.	30	7.0	17.0	Burket และ คณะ (2004)
<i>Mucor hiemalis</i>	25	7.0	1.98	Akhtar และ คณะ (1980)
<i>Rhizopus chinensis</i>	30	6.5	63.45	Yun Teng และคณะ (2009)

ตารางที่ 5 แสดงความสามารถการผลิตไลเพสที่มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดของ *Fusarium solani* CU103 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ได้กล่าวมาดังตารางที่ 5 *Fusarium solani* CU103 ที่ภาวะดังกล่าวสามารถผลิตไลเพสให้ค่าแอกทิวิตีสูงที่สุดที่ได้มีรายงานมา โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นผลดีสำหรับในการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสเพื่อนำไปใช้อุตสาหกรรมต่าง ๆ

5.2 การตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุน

การเตรียมไลเพสตรึงรูปโดยใช้วิธีการตรึงรูปโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพบนวัสดุค้ำจุน 5 ชนิด คือ AB8 D4020 H103 NKA และ NKA9 ซึ่งเป็นวัสดุค้ำจุนประเภท macroporous resin ตามรายงานของ Yang และคณะ (2006) พบว่า ในการทดลองตรึงรูปไลเพสได้ใช้สารละลายเฮพเทนร่วมในการตรึงรูปส่งผลให้วัสดุค้ำจุนบางชนิด ได้แก่ H103 NKA เกิดการละลายในสารละลายเฮพเทน ดังนั้นวิธีการตรึงรูปดังกล่าวจึงไม่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้

สำหรับการเตรียมรูปไลเพสในการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นจึงทำการเปลี่ยนวิธีการเตรียมรูปไลเพสจากวิธีการเตรียมรูปโดยอาศัยหลักการดูดซับทางกายภาพมาเป็นวิธีการเตรียมรูปด้วยการเชื่อมขวาง (cross-linking) โดยใช้สารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง (Pahujani และคณะ, 2008; Taylor, 1991; Kristy และคณะ, 2000) ในงานวิจัยได้พิจารณาถึงความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้สำหรับการเตรียมรูปไลเพส โดยเลือกความเข้มข้นที่ 0 0.5 1.0 2.0 4.0 8.0 และ 16.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับใช้ในการเตรียมรูป พบว่า เมื่อเตรียมไลเพสเตรียมรูปด้วยวิธีการเตรียมรูปด้วยการเชื่อมขวาง โดยเติมสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ซึ่งมีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่จะมาเชื่อมกับหมู่อะมิโนที่อยู่บนผิวของวัสดุค้ำจุน และหมู่อะมิโนของไลเพสทำให้เกิดพันธะเชื่อมขวางกัน เมื่อเติมสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเอกทิวิตีของไลเพสเตรียมรูปสูงสุด คือ 17.35 ± 0.83 หน่วยต่อกรัมของไลเพสเตรียมรูป ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมไลเพสเตรียมรูป และจากการศึกษาวัสดุค้ำจุนที่เหมาะสมสำหรับเตรียมรูปไลเพส พบว่า วัสดุค้ำจุนชนิด D4020 มีค่าปริมาณโปรตีนที่ถูกโหลดมากที่สุด จึงทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การเตรียมรูปมากที่สุดด้วยเช่นกัน แต่เมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกลับให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาที่ต่ำกว่า มีค่าเท่ากับ 50.12 ± 2.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้วัสดุค้ำจุนชนิด NKA เป็นวัสดุในการเตรียมรูปกลับให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่สูงกว่า อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนที่ถูกเตรียมรูปในวัสดุค้ำจุนชนิด D4020 มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไลเพสทำให้เกิดการบดบังบริเวณเร่งของไลเพสทำให้ซับสเตรทไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ (Aehle, 2004) และปริมาณโปรตีนที่ถูกโหลดเข้าไปในวัสดุค้ำจุน อาจมีโปรตีนบางส่วนที่ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ เนื่องจากการเสียสภาพในช่วงระหว่างทำการเตรียมรูป เพราะสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไลเพส (Pahujani และคณะ, 2008) ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเตรียมรูปไลเพสอยู่ที่ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เพราะถ้าทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น จะมีผลต่อการเตรียมรูป ทำให้เปอร์เซ็นต์การเตรียมรูป และค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสลดลงด้วย เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ที่สูงมีผลต่อการเตรียมรูปไลเพสและมีผลต่อโครงสร้างไลเพส (Kristy และคณะ, 2000) และพบว่าความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไลเพส อาจส่งผลให้ไม่มีการบดบังบริเวณเร่งของไลเพสหรือเกิดการเสียสภาพของไลเพสระหว่างการเตรียมน้อยที่สุด และวิธีการเตรียมรูปด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและสะดวก ดังนั้นในงานวิจัยนี้วิธีการเตรียมไลเพสเตรียมรูปโดยใช้วิธีการเตรียมรูปโดยการเชื่อมขวางของสารละลายกอลลูตารัลดีไฮด์จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมไลเพสเตรียมรูปมากกว่าการเตรียมรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

5.3 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของไลเพสตรังรูป

การศึกษาค่าคุณทฤษฎีที่มีผลต่อความเสถียรไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับไลเพสอิสรจะพบว่า คุณทฤษฎีที่เหมาะสมในการทำงานของไลเพสตรังรูปและไลเพสอิสรจะแตกต่างกันคือ คุณทฤษฎีที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสตรังรูปอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ส่วนคุณทฤษฎีที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสอิสรอยู่ที่ 35 องศาเซลเซียส โดยที่คุณทฤษฎีเหมาะสมสำหรับไลเพสตรังรูปและไลเพสอิสรให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงสุด ไลเพสตรังรูปจะมีความเสถียรต่อคุณทฤษฎีได้ดีกว่าไลเพสอิสร แสดงให้เห็นว่าหลังจากทำการตรังรูปไลเพส ไลเพสตรังรูปสามารถทำงานได้ดีเมื่อคุณทฤษฎีสูงขึ้น

การศึกษาค่าของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการทำงานของไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับไลเพสอิสร โดยการทำให้ปฏิกิริยาในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ พบว่า ไลเพสตรังรูปมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่าไลเพสอิสร ไลเพสตรังรูปและไลเพสอิสรสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 (Maria และคณะ, 1999) แสดงให้เห็นว่าไลเพสตรังรูปอาจมีคุณสมบัติเบื้องต้นบางประการเหมือนไลเพสอิสร (Chibata, 1978)

การศึกษาค่าของสารละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับไลเพสอิสร เมื่อนำไลเพสตรังรูปและไลเพสอิสร บ่มในสารละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซน ทูโลอิน คลอโรฟอร์ม เอทานอล และเมทานอล ก่อนมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่า ไลเพสตรังรูปมีความเสถียรต่อสารละลายอินทรีย์มากกว่าไลเพสอิสร ไลเพสตรังรูปมีความเสถียรต่อเฮกเซนได้ดีที่สุด ส่วนไลเพสอิสรมีความเสถียรต่อไอโซโพรพานอล เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายอินทรีย์ชนิดอื่น (Maia และคณะ, 1999) แสดงให้เห็นว่าไลเพสตรังรูปอาจมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม บางประการทำให้มีความเสถียรต่อสารละลายอินทรีย์ต่างจากไลเพสอิสร (Chibata, 1978)

การศึกษาค่าความเสถียรไลเพสตรังรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ พบว่า การนำไลเพสตรังรูปกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมีค่าลดลงอย่างเป็นลำดับ หลังจากใช้ไลเพสตรังรูป 12 ครั้ง ซึ่งไลเพสตรังรูปให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส มีค่าเท่ากับ 26.47 ± 0.71 เปอร์เซ็นต์

5.4 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกริยา

5.4.1 การตรวจสอบปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเทคนิค HPLC

ผลการศึกษาปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเพสอิสระ และไลเพสตรึงรูปที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุณชนิด NKA เป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยปัจจัยที่ใช้ในศึกษา 2 ปัจจัย คือ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6) และปริมาณน้ำที่เติมลงไปทำปฏิกริยา (0 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์) ผลการตรวจสอบด้วยวิธีเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อเกิดเมทิลเอสเทอร์ คือ น้ำมันปาล์ม 1 ส่วน ต่อเมทานอล 4 ส่วนโดยโมล โดยเลือกใช้รูปแบบการเติม 3 ครั้งซึ่งทำให้เกิดปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุด เท่ากับ 92.62 ± 3.27 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติพบว่าปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกริยาแบบผันกลับได้ และไตรกลีเซอไรด์ 1.0 โมล จะทำปฏิกริยาอย่างสมบูรณ์กับเมทานอล 3.0 โมล ดังนั้นในการดำเนินปฏิกริยาจะต้องใช้เมทานอลในปริมาณมากพอเพื่อให้ปฏิกริยาดำเนินไปข้างหน้า (Meher และคณะ, 2004) จากการทดลองพบว่า อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เหมาะสมเป็น น้ำมันปาล์ม 1 ส่วน ต่อเมทานอล 4 ส่วนโดยโมล (1:4) แสดงว่าปริมาณของเมทานอลต้องมีปริมาณมากพอเพื่อให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nouredini และคณะ (2005) เมื่อใช้น้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:5 และ 1:6 สำหรับการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อเกิดเมทิลเอสเทอร์ พบว่าที่อัตราส่วน 1:5 และ 1:6 ให้เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าที่อัตราส่วน 1:4 เนื่องจากปริมาณเมทานอลที่เติมใส่ในปฏิกริยามีปริมาณที่มากเกินไปสำหรับที่ทำให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ และเมทานอลอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของไลเพสตรึงรูปทำให้ไลเพสเสียสภาพ ส่งผลให้เกิดการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ลดลง ทำให้เกิดปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 89.6 ± 3.76 และ 69.44 ± 3.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่าเมทานอลมีผลไปยับยั้งความสามารถในการเร่งปฏิกริยา รวมถึงลดความเสถียรของไลเพสตรึงรูป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shimada และคณะ (2002) และเมื่อใช้น้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 สำหรับการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อเกิดเมทิลเอสเทอร์ พบว่าที่อัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ให้เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าที่อัตราส่วน 1:4 เนื่องจากปริมาณของเมทานอลไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ส่งผลให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นได้อย่างไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อปริมาณของเมทานอลไม่เพียงพอทำให้เกิดปฏิกริยาแบบผันกลับได้ (Meher และคณะ, 2004) ดังนั้นอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 โดยโมล จึงเป็นอัตราส่วนที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกริยาทรานส์-

เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์ และจากการทดลองได้ทำการศึกษาถึงปริมาณน้ำที่เติมในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ 0 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดในระหว่างการทำปฏิกิริยา พบว่า น้ำมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยน้ำมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เนื่องจากน้ำที่เติมลงในปฏิกิริยาจะไปส่งเสริมในการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีกว่าการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ทำให้เกิดปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดลง การเติมน้ำเข้าไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้น 2 ชนิด คือ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพราะปกติแล้วการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันไม่จำเป็นต้องมีน้ำในการเกิดปฏิกิริยา แต่เมื่อมีการเติมน้ำกลับช่วยส่งเสริมในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อมีการเติมน้ำในปริมาณที่มากขึ้นส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากขึ้นตามไปด้วย และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไลเพสอิสระกับไลเพสตรังรูป โดยศึกษาผลที่ภาวะ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล (1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6) ปริมาณของไลเพสอิสระและไลเพสตรังรูปที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไลเพสอิสระมีปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อใช้ไลเพสตรังรูปสำหรับใช้เป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยา อาจเป็นเพราะว่าไลเพสอิสระไม่มีความเสถียรต่ออนุมูล และสารละลายอินทรีย์ เพราะในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้ในการทดลองจะอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสอิสระ จึงทำให้เกิดปริมาณเมทิลเอสเทอร์น้อยกว่าเมื่อใช้ไลเพสตรังรูป และอาจเกิดจากไลเพสอิสระสัมผัสกับเมทานอลโดยตรงในการทำปฏิกิริยาจึงทำให้ไลเพสอิสระบางส่วนถูกทำลายให้เสียสภาพไป ซึ่งไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาได้ ผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าไลเพสตรังรูปที่เตรียมได้มีความเสถียรต่ออนุมูล และสารละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

5.4.2 ความเสถียรของไลเพสตรังรูปในการนำกลับมาใช้ซ้ำ

สำหรับการนำไลเพสตรังรูปนำกลับมาใช้ซ้ำใหม่ พบว่า การนำไลเพสตรังรูปกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยการใส่สารละลายอินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ ไอโซโพรพานอล และเฮกเซน เป็นตัวชะล้าง ซึ่งมีค่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมีค่าลดลงอย่างเป็นลำดับ หลังจากใช้ไลเพสตรังรูป 6 ครั้ง เมื่อใช้ไอโซโพรพานอลให้ค่าการเกิดเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 18.44 ± 0.33 และเฮกเซนให้ค่าการเกิดเมทิลเอสเทอร์ 25.41 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของสารละลายอินทรีย์ที่นำมาชะล้าง ในกรณีเมื่อใช้ไอโซโพรพานอลเป็นตัวชะล้าง ซึ่งมีคุณสมบัติพื้นฐานเป็นสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้วซึ่งสามารถไปชะก่ลิเซอรอล

ที่เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งกลีเซอรอลเป็นสารโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถถูกชะออกไปได้ และอาจเป็นไปได้ว่าขณะที่ทำการล้างกลีเซอรอลออก โมเลกุลของไลเพสอาจหลุดออกมาพร้อมกับกลีเซอรอล และโมเลกุลของไลเพสอาจถูกทำลายให้เสียสภาพ ทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลงส่งผลให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ลดลง และเมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวชะล้าง ซึ่งเป็นสารละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ทำให้ไม่สามารถชะล้างกลีเซอรอลออกมาได้ ส่งผลให้ไลเพสตรังรูปทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากมีกลีเซอรอลเคลือบอยู่บริเวณผิวของไลเพสตรังรูป Wei และคณะ (2003) ได้รายงานว่ สารละลายอินทรีย์ไอโซโพรพานอล มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวชะล้าง ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยนี้ อาจเพราะว่าไลเพสตรังรูปที่ผลิตได้มีความเสถียรต่อสารละลายอินทรีย์ได้แตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของไลเพสที่ราผลิตไลเพสได้

ผลการศึกษาพบว่า การนำไลเพสจากราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 มาทดสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ยังไม่มีรายงานมาก่อน งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ทำการศึกษาในการผลิตไลเพสจากราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ดังนั้นปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นหนทางหนึ่งเพื่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ หรือ ไบโอดีเซล ปัจจุบันมีการนำไลเพสจากจุลินทรีย์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน แทนการใช้กรดและด่างเนื่องจากมีข้อดีกว่าหลายประการ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบริสุทธิ์ประโยชน์ต่อการรักษาสิ่งแวดล้อม (Kaieda และคณะ, 1999) แต่เนื่องจาก ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังมีราคาแพง จึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมสำหรับการผลิตไบโอดีเซล จากผลการทดลองนี้ ได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ *F. solani* CU103 มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาการผลิตไลเพสจาก *F. solani* CU103 ให้อยู่ในรูปเชิงการค้า สำหรับไลเพสที่ผลิตได้ก็จะถูกนำไปใช้เป็นตัวเร่งในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นต้องมีการปรับปรุงพัฒนาวิธีการตรึงรูปบนวัสดุค้าจุนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อที่จะได้นำกลับมาใช้ซ้ำใหม่ได้ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้ ดังนั้นการทำให้ไลเพสอยู่ในรูปตรึงบนวัสดุก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำใหม่ได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสจากราสาายพันธุ์ *F. solani* CU103 พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปส คือ น้ำมันรำข้าว 1.0 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ เปปโตน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส นำส่วนของสารละลายไลเปสที่ผลิตได้ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยวิธีการอัลตราฟิลเตรชัน แล้วนำสารละลายไลเปสไปตรึงบนวัสดุคาร์บอน 5 ชนิด ด้วยวิธีเชื่อมขวาง พบว่า วัสดุคาร์บอนชนิด NKA ให้ค่าการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงสุด เมื่อใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำไลเปสตรึงรูปบนวัสดุคาร์บอนชนิด NKA มาทำการศึกษาถึงความเสถียรของไลเปสตรึงรูปในปัจจุบัน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง สารละลายอินทรีย์ และการนำกลับมาใช้ซ้ำ จากการทดลองพบว่า มีความเสถียรได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และมีความเสถียรต่อตัวทำละลายเฮกเซนได้ดีที่สุด สำหรับการนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่า การนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมีค่าการเร่งที่ลดลงเป็น 26.47 ± 0.71 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้ไลเปสตรึงรูป 12 ครั้ง

เมื่อนำไลเปสตรึงรูปบนวัสดุคาร์บอน NKA มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยโมล โดยการเติมเมทานอลในรูปแบบของการเติม 3 ขั้นตอน แล้วนำไปตรวจสอบการเกิดเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่า ทุกอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล สามารถเกิดเมทิลเอสเทอร์ การทดลองยังพบอีกว่าเมื่อมีการเติมน้ำที่ 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดในทุกอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลในเกิดการปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์สามารถทำให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ได้เช่นกัน จากการศึกษาหาปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ด้วยวิธีการ HPLC พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์เป็น 1:4 โดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลทำให้เกิดปริมาณของเมทิลเอสเทอร์สูงสุด ซึ่งมีค่า 92.62 ± 3.27 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการเติมน้ำที่ 2.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ส่งผลให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์มีค่าลดลง ซึ่งมีค่า 70.86 ± 1.93 และ 43.28 ± 7.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การนำไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ เมื่อใช้เฮกเซน และไอโซโพรพานอล ล้างส่วนของกลีเซอรอลออก

ในช่วงระหว่างนำไลเพสตรังรูปกลับมาใช้ซ้ำ ซึ่งมีค่าแอกทวิตีที่ลดลงเกิดเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 25.41 ± 0.47 และ 18.44 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้ไลเพสตรังรูป 6 ครั้ง ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- คณะกรรมการธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร แพลน พรีนติ้ง.
- ธนาทิพย์ อัครดวงสิทธิ์, นุจรี เลาะห์ประเสริฐ, สุขญา นิตวัฒนานนท์ และ ธารพงษ์ วิทิตสานต์. 2547. ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันน้ำมันพืชใช้แล้วด้วยเมทานอลโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์. 2: 161-171.
- ธนาธร พ่วงพลับ, จรัญ ฉัตรมานพ และ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ. การผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง. การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 15, 27 – 28 ตุลาคม 2548, โรงแรมจอมเทียนปาล์ม บีช รีสอร์ท พัทยา ชลบุรี.
- จรรยาภรณ์ มลิลาศ. 2549. การคัดเลือกและชักนำให้เกิดการมีวเทชั่นของราที่่อยยลปิดเพื่อเพิ่มไฮโดรไลติกแอกทิวิตี. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต ภาคพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวิมล ทรัพย์ทวีวุฒ. 2550. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่เร่งปฏิกิริยาด้วยไลเปสตรึงรูป. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

- Abramie, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., and Saenger, W. 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. Enzyme and Microbial Technology 25: 522-529.
- Aehel, W. 2004. Enzyme in Industry WILEY-VHC Verlag GmbH and Co. Germany. 70: 80.
- Akhtar, R., Uadia, P., Foglia, T.A., Hass, M., Jones, K., Okpefa, E., Obibuzor, K., and Bafor, M. 2000. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. Biochemical Society Transactions 28: 979-981.
- Arroyo, S., and Sinisterra, J.V. 1995. Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. Biotechnology Lett 17: 525-530.
- Boonsinthalai, B., and Phutrakul, S. 1999. Effect of metal ions, inhibitors and denaturants on extracellular lipases from there thermophile and their clones. Journal of Science, Faculty of Science, Chiang Mai University 26: 1-11.
- Bornscheuer, U.T., and Kazlauskas, J.R. 1999. Hydrolysis in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformation Wiley-VCH.
- Bosley, A., and Pielow, A. 1997. Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. Journal of American Oil Chemists Society 74: 107-111.
- Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. 1995. Production of microbial biomass. Biotechnology: Enzyme Biomass, Food and Feed 170-220.
- Brockerhoff, H., and Jensen, R. G. 1974. Lipolytic enzyme New York: Academic press.
- Burkert, J.F.M., Maungeri, F., and Rodrigues, M.I. 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. Bioresource technology 91: 77-84.
- Cambou, B., and Klibanov, A.M. 1984. Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohol: Asymmetric hydrolysis, esterification and transesterification. Biotechnology and Bioengineering 26: 1449-1454.

- Chibata, I. 1978. Immobilized Enzymes (Research and development). John Wiley and Sons New York.
- Chu, F. Y., Hsu, H. C., Soma, K. P., and Lo, M. Y. 2009. Immobilization of bioluminescent *Escherichia coli* cell using natural and artificial fiber treated with polyethyleneimine. Bioresource Technology 100: 3167-3174.
- Cihangir, N., and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 193-197.
- Clark, S.J., Wagner, L., Schrock, M.D., and Pienaar, P.G. 1984. Methyl and ethyl soybean ester as renewable fuels for diesel engines. Journal of American Oil Chemists Society 61: 1632-1638.
- Cvengros, J., and Cvengrosova, Z. 1994. Quality control of rapeseed oil methyl esters by determination of acyl conversion. Journal of American Oil Chemists Society 71: 1349-1352.
- Dizge, N., and Keskinler, B. 2008. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. Biomass and Bioenergy 32: 1274-1278.
- Dong, H., Gao, S. H., and Cao, S. 1999. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. Biotechnology and Applied Biochemistry 30: 251-256.
- Elibol, M., and Ozer, D. 2001. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochemistry 36: 325-329.
- Fogler, H.S. 2006. Elements of Chemical Reaction Engineering 4rd edition. New Jersey. Pearson Education, Inc.
- Formo, M.W. 1954. Ester reactions of fatty materials. Journal of the American Oil Chemists Society 31: 548-559.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering 92: 405-416.
- Fungthong, S. 2001. Production of Lipase-Producing Microorganisms for High Fat Wastewater Treatment. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University.

- Garcai, H.R., Amunduson, C.H., and Hill, C.H. 1991. Partial characterization of the reaction of the action of an *Aspergillus niger* lipase on butteroil emulsion. Journal of Food Science 56: 1233-1237.
- Gao, X.G., Cao, S.G., and Zhang, K.C. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. Enzyme and Microbial Technology 27: 74-82.
- Godtfredsen, S.E. 1990. Microbial Lipases. Microbial Enzymes and Biotechnology Elsevier Science Publisher LTD. New York. 255-274.
- Griffin, H.D. Physiology of Fungi, 2nd edn, Wiley-liss, New York.
- Gupta, R., Rath, P., Gupta, N., and Bradoo, S. 2004. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. Biotechnology Applied Biochemistry 37: 63-71.
- Josh, H., and Hung, P., and Lisa M.U. 1997. Immobilized Enzyme [Online].
Avialable from: <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immob.htm>[2009, May 6]
- Huang, A.H.C., Lin, Y.H., and Wang, S. 1988. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. Journal of American Oil Chemists Society 65: 897-899.
- Held, P., and Hurley, J. 2001. Determination of total protein by lowry method using the Bio Tek Instruments' ELx808 Microplate Reader. BioTek instruments
- Iwai, M., and Tsujisaka, Y. 1984. In Lipases, B. Borgstrom and H.L.Brockman, editors, Elsevier Science Publishers B.V., Amterdam, The Netherlands. 443.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., Nomoto, F., Ohtsuka, K., Izumoto, E., and Fukuda, H. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in water containing system without an organic solvent. Journal of Bioscience and Bioengineering 88: 627-631.
- Kennedy, J. F., and Melo, E. H. M. 1990. Immobilized enzymes and cells. Chemical Engineering Process 86: 81-89.

- Kermasha, S., Safari, M., and Bisakowski, B. 1998. Characterization of purified lipase fraction from *Rhizopus niveus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4451-4456.
- Kirsty, K., Maria, C.B.P., Marcia, M.C.M., William, M.L., Jose, L.L.F., and Maria, M.D.M. 2000. Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. Brazilian Journal of Microbiology 31: 220-222.
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., and Morita, Y. 1994. Purification characterization and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry 58: 1007-1012.
- Krawczyk, T. 1996. Biodiesel: Alternative fuel make inroads but hurdles remain. INFROM. 7: 800-815.
- Langrand, G., Baratti, J., Buono, G., and Triantaphylides, C. 1986. Lipase catalyzed reaction and strategy for alcohol resolution. Tetrahedron Lett 27: 19-32.
- Lee, D.W., Kim, H., Lee, K., Kim, E., Choe, H., Lee, H., Kim, D., and Pyun, Y. 2001. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. Enzyme and Microbial Technology 29: 363-371.
- Levenspiel, O. 1999. Chemical reaction engineering 3rd edition. New York. John Wiley and Sons.
- Li, F.S., and Wu, T.W. 2009. Lipase-immobilization electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis. Biochemical Engineering Journal 45: 48-53.
- Litthauer, D., Ginster, A., and Skein, E.V. 2002. *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320 residue *Pseudomonas* lipase family. Enzyme and Microbial Technology 30: 209-215.
- Ma, F.R., and Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology 70: 1-15.
- Macrae, A. R., and William M. F. 1983. Extracellular Microbial Lipase. In Fogarty WM (ed) Microbial Enzyme and Biotechnology New York: Applied Science Publishers, 225-250.

- Maia, M.M., Morais, M.M., Morais, M.A., Melo, E.H., and Filho, J.L. 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. Revistade Microbiologica 30: 304-309.
- Macario, A., Moliner, M., Corma, A., and Giordano, G. 2009. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. Microporous and Mesoporous Materials 118: 334-340.
- Malcata, F.X., Garcia, H.S., Hill, C.G., and Amundson, C.H. 1992a Hydrolysis of butter oil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part I Lipase adsorption studies. Biotechnology Bioengineering 39: 647-657.
- Maria, M.M.D., and Heasley, A. 1999. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology 76: 23-27.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U., and Errazu, A.F. 2007. Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews 11: 1300-1311.
- Martin, E.H., and Otero, C. 2008. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozyme 435 and Lipozyme TL IM. Bioresource Thechnology 99: 277-286.
- Mayordomo, I., Randez-Gil, F., and Prieto, A.J. 200. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 105-109.
- Meher, L.C., Sagar, D.V., and Naik, S.N. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. Renewable and Sustainable Energy 10: 248-268.
- Mohamad, I.A., and Al-Shyoukh, A.O. 2002. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. Bioresource Technology 85: 253-256.
- Nimcevic, D., Puntigum, R., Worgetter, M., and Richard, G.J. 2000. Preparation of Rapeseed oil esters of lower aliphatic alcohols. Journal of American Oil Chemists Society 77: 275-280.
- Okumura, S., Iwai, M., and Tsujisaka, Y. 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. Biochimica et Biophysica Acta 575: 156-165.

- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., and Gupta, R. 2008. Glutaraldehyde activation of Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. Bioresource Technology 99: 2566-2570.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, R.C., Nigam, N., Krieger, N., and Soccol, T.V. 2001. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and Applied Biochemistry 29: 119-131.
- Posorske, L. H. 1984. Industrial-scale application of enzyme to fat and oils industry. Journal of American Oil Chemists Society 61: 1758-1760.
- Rua, M.L., Schmidt-Dannert, S., Sprauer, A.W., and Schmid D.R. 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus* ; large-scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. Journal of Biotechnology 56: 89-102.
- Rodrigues, C.R., Bolivar, M.J., Ors, P.A., Volpato, G., and Ayub, Z.A.M. 2009. Positive effect of multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. Enzyme and Microbial Technology 44: 386-393.
- Saad, M.M., Kansoh, L.A., and Gadallah, M.A. 2005. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. Arab Journal of Biotechnology 8: 19-28.
- Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. Journal of Bioscience and Bioengineering 90: 180-183.
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., and Schmid, R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1214: 43-53.
- Selmi, B., Ergan, F., and Thomas, D. 1998. Effect of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. Enzyme Microbial Technology 23: 182-186.

- Selmi, B., and Thomas, D. 1998. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. Journal of American Oil Chemists Society 75: 691-695.
- Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances 19: 627-662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 17: 133-142.
- Shu, Y. S., Yan, X., and Dong, W. 2009. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. Bioresource Technology 100: 2607–2612.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Menge, U., and Kolisis, F.N. 1993. Kinetic study of lipase catalyzed esterification reaction in water-in-oil micromulsions. Biotechnology Bioengineering 42: 931-937.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. 2th ed. Elsevier Science Ltd Progamon, New York.
- Stehr, M.K., Kroger, C.K., Hube, B., and Schafer, W. 2003. Microbial lipase a virulence factors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme 22: 347-355.
- Steiner, M.K., and Williams, D.A. 2002. Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. Biochimie 84: 1243-1251.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T., and Tominaga, Y. 1994. Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipase. Protein Engineering 7: 585-588.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., and Wieczorek, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme Microbial Technology 10: 492-497.
- Tashtoush, G.M., Al-Widyan, M.J., and AJ-Jarrah, M.M. 2004. Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel. Energy Conversion and Management 45: 2697-2711.

- Taylor, R.F., 1991. Commercially Available Supports for Protein Immobilization. Marcel Dekker Inc., New York. 337.
- Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G., and Dubreucq, E. 2002. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic medium. Enzyme Microbial Technology 31: 648-655.
- Wade, L.G. 1995. Organic Chemistry 3rd ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, USA.
- Walt, D.R., and Agayn, V. 1994. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. Trends in Analytical Chemistry 13: 425-430.
- Wang, D.I.C., Coony, C.I., and Demain, A.L., 1979. Enzyme kinetics and immobilization in ferment. Technology John Wiley and Sons USA. 318-336.
- Wang, G.Z., Wan, S.L., Liu, M.Z., Huang, J.X., and Xu, K.Z. 2009. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofiber : An overview. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 56: 189-195.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 17: 151-155.
- Weber, S., Stuber, S., and Conrad, R. 2001. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. Application Environmental Microbiology 67: 1318-1327.
- Wright, H.J., Sejur, J.B., Clark, H.V., Coburn, S.K., Langdon, E.E., and Dupuis, R.N. 1944. A report on ester interchange. Oil and soap 21: 145-148.
- Wu, Y., Wang, Yujun, W., Lou, G., and Dai, Y. 2009. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. Bioresource Technology 100: 3459-3464.
- Yang, G., Tian-Wei, T., Kai-Li, N., and Fang, W. 2006. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. Chinese Journal of Biotechnology 22: 114-118.
- Yi, S.S., Noh, M.J., and Lee, S.Y. 2009. Amino acid modified chitosan beads : Improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 57:123-129.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

- มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
- น้ำตาลเดสโทรส (Dextrose)	20	กรัม
- กู้นผง (Agar)	15	กรัม
- น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรองมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคสแล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทไฮ มีเดีย (Hi media)

PDA 39 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

2. อาหารแข็ง PDB (Potato Dextrose Broth)

- มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
- น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	20	กรัม
- น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง แล้วหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำกลั่น ให้มันฝรั่งนิ่ม แล้วกรองมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคสแล้วคนให้ละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : กรณีใช้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทไฮ มีเดีย (Hi media)

PDA 24 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

3. Lipase production medium

- เปปโตน	10	กรัม
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.52	กรัม
- โซเดียมไนเตรต (NaNO_3)	2.0	กรัม
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.52	กรัม

- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	0.52 กรัม
- ไอรอน (II) ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.001 กรัม
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.001 กรัม
- ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.001 กรัม
- น้ำมันรำข้าว	10 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลายจนหมด แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนขึ้น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดค่าแอกทิวิตี

1.1 การเตรียมทริสบัฟเฟอร์ (Tris-HCl)

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0

ทริส เบส (Tris base)	121	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย ทริส เบส ให้เข้ากันกับน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0

ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	475	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลาย ก.

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

1.3 สารละลาย ข.

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

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

2. สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

2.1 สารละลายไบยูเรต (biuret reagent)

1% คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.5 มิลลิลิตร
2% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	0.5 มิลลิลิตร
2% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	
ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M NaOH)	50 มิลลิลิตร

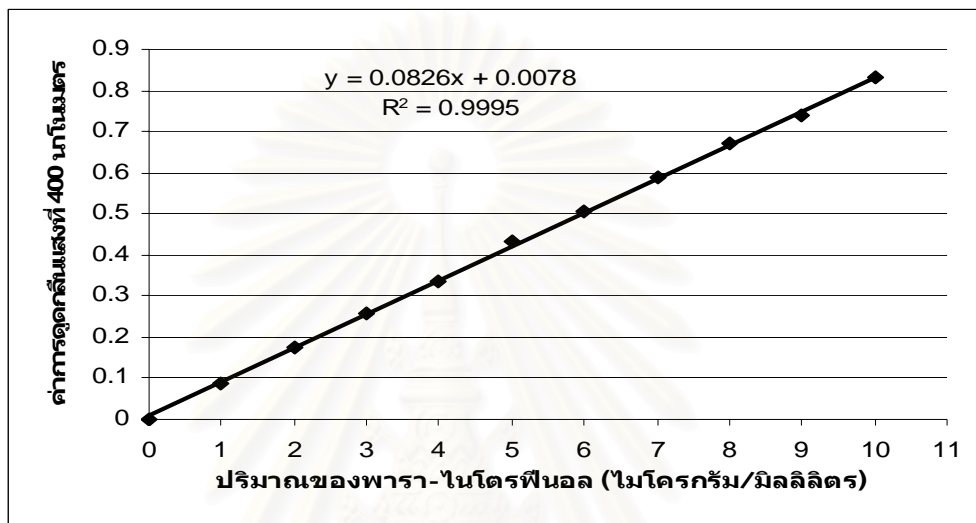
2.2 สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)

สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายพารา-ไนโตรฟินอลที่มีปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ ค. 1 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

สารที่ใช้: ทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0
0.1 % (w/v) พารา-ไนโตรฟินอล

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพารา-ไนโตรฟินอล

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Winkler และ Stuckmann (1979)

1. เตรียมสารละลายพารา-ไนโตรฟินอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟินอล 5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปเจือจาง 1:100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลายพารา-ไนโตรฟินอลที่ความเข้มข้นต่างๆที่ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ ค. 1

ตารางที่ ค. 1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล ความเข้มข้น 0- 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

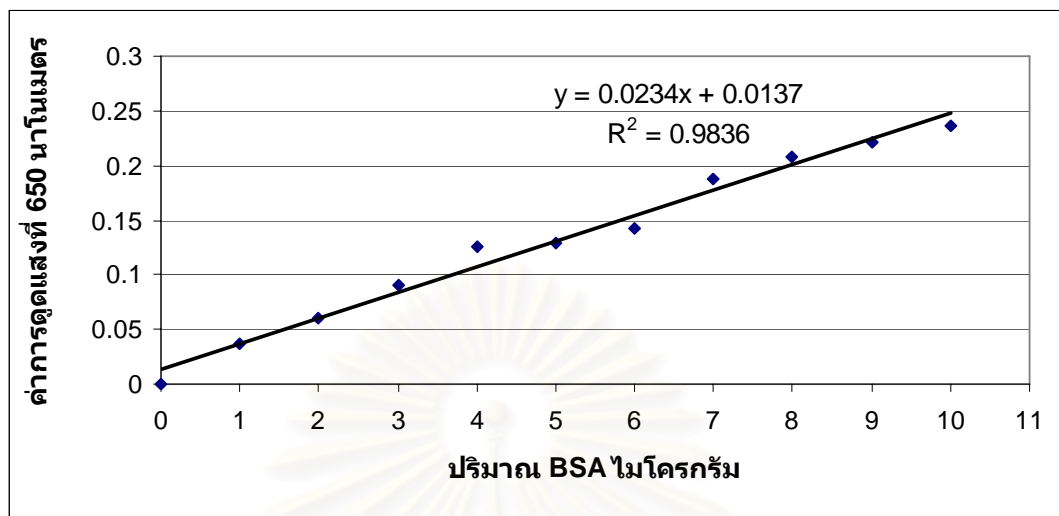
ปริมาณของพารา-ไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาณของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	พารา-ไนโตรฟีนอล 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	ทริสบัฟเฟอร์ความ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0
0	-	1,000
1	100	900
2	200	800
3	300	700
4	400	600
5	500	500
6	600	400
7	700	300
8	800	200
9	900	100
10	1000	-

4. ดูดสารละลายที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายพารา -ไนโตรฟีนอล

5. ตรวจวัดการดูดกลืนแสงของพารา -ไนโตรฟีนอลที่ 410 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย พารา -ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท แล้วให้พารา -ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะข้างต้น

2. กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม



ภาพที่ ค. 2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัม กับค่าการดูดกลืนที่ 650 นาโนเมตร

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน BSA

1.เตรียมสารละลายไบยูเรต (biuret reagent) ซึ่งประกอบด้วยประกอบด้วย 1% คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 มิลลิลิตร 2.0% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 0.5 มิลลิลิตร 2.0% โซเดียมคาร์บอเนต ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิลิตร

2.เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางปริมาณโปรตีนให้ได้ 0-10 ไมโครกรัม โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นดังตารางที่ ค. 2

3.นำสารละลายไบยูเรตปริมาตร 200 ไมโครลิตรดูดลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลตและบ่มกับ BSA 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

4.เตรียมสารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ โดยใช้สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ 1 ส่วน และน้ำกลั่น 1 ส่วน และใช้ทันทีปริมาตร 20 ไมโครลิตรในแต่ละหลุมของไมโครเพลตหลังจากบ่มสารในข้อ 3 ครบเวลา 10 นาที โดยผสมให้เข้ากันโดยเร็ว และบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และ แบล็ง (Blank) คือ น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทนปริมาณ BSA

ตารางที่ ค. 2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

ปริมาณBSA (ไมโครกรัม)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	BSAที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	น้ำกลั่น
0	-	100
1	1	99
2	2	98
3	3	97
4	4	96
5	5	95
6	6	94
7	7	93
8	8	62
9	9	91
10	10	90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

วิธีการคำนวณ

1. ค่าแอกทีวิตีทั้งหมด (Total activity: units)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองของสารละลายไลเพสมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล
ได้สมการดังนี้

$$Y = 0.0826X + 0.0078$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

เมื่อได้ค่า X จากการแทนค่าในสมการ เปลี่ยนหน่วยจาก ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น นาโนโมล (nmol) โดยหารด้วยมวลโมเลกุลของพารา-ไนโตรฟินอล คือ 139.11 หารด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา หารด้วยเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา จะได้เป็นหน่วยยูนิต (units)

2. ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (Total protein: mg)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองของแต่ละเชื้อมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (BSA = Bovine serum albumin)
ได้สมการดังนี้

$$Y = 0.0234X + 0.0137$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร

เมื่อได้ค่า X จากการแทนค่าในสมการ เปลี่ยนหน่วยจาก ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร เป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถ้ามีการเจือจางด้วยน้ำกลั่นต้องคูณจำนวนเท่าด้วย

3. แอกทิวิตีจำเพาะ (Specific activity:units/mg)

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสหาได้จากค่าแอกทิวิตีทั้งหมดหารด้วยปริมาณของโปรตีนทั้งหมด

$$\text{Specific activity: units/mg} = \frac{\text{Total activity: units}}{\text{Total protein: mg}}$$

ยูนิต: ไมโครโมลของพารา-ไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยา ต่อนาที

4. ปริมาณโปรตีนที่ใส่ (protein loading) และค่าร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง (% immobilization efficiency)

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ใส่} = (C_0V_0 - C_fV_f) / W_g$$

กำหนดให้ C_0 = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

C_f = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเพสหลังการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

V_f = ปริมาตรของสารละลายหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)

W_g = น้ำหนักของเอนไซม์ตรึงรูป (กรัม)

$$\text{ร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง} = \left\{ \frac{(E_0V_0 - E_fV_f)}{E_0V_0} \right\} \times 100$$

กำหนดให้ E_0 = แอกทิวิตีเริ่มต้นของสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

E_f = แอกทิวิตีทั้งหมดของสารละลายไลเพสหลังการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลาย (มิลลิลิตร)

V_f = ปริมาตรทั้งหมดหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)

5. การหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor; R_f)

สูตร

$$R_f = \text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางที่สารเคลื่อนที่ได้} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

หมายเหตุ: สารชนิดเดียวกันจะมีค่า R_f เท่ากัน ถ้าใช้สภาวะเดียวกัน

ค่า R_f จะมีค่าไม่เกิน 1 และไม่มีหน่วย

6. การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์

การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์นั้น คำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ตามสมการข้างล่าง



เมื่อ A คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันแต่ละชนิด

B คือ เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันแต่ละชนิด

แทนค่าเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันแต่ละชนิดในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ (สุวิมล ทรัพย์ทวีวุฒิ, 2550)

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์} &= 173 + 3 \left[\left(\frac{0.59}{100} \times 155.29 \right) + \left(\frac{0.96}{100} \times 183.35 \right) + \right. \\ &\quad \left(\frac{38.67}{100} \times 211.40 \right) + \left(\frac{0.11}{100} \times 209.38 \right) + \\ &\quad \left(\frac{3.32}{100} \times 239.17 \right) + \left(\frac{45.45}{100} \times 237.43 \right) + \\ &\quad \left(\frac{10.87}{100} \times 235.42 \right) + \left(\frac{0.20}{100} \times 233.40 \right) + \\ &\quad \left. \left(\frac{0.23}{100} \times 267.19 \right) + \left(\frac{0.02}{100} \times 295.21 \right) \right] \\ &= 854.72 \end{aligned}$$

ดังนั้น น้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ = 854.72 กรัม

7. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล

หาน้ำหนักของเมทานอล จากสูตร
$$Y = \frac{(A)(B)(MW_{MeOH})}{MW_{RPO}}$$

เมื่อ Y คือ น้ำหนักของเมทานอล

A คือ น้ำหนักของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์จากการชั่ง

B คือ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล

MW_{RPO} คือ น้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ เท่ากับ 854.72 กรัม

MW_{MeOH} คือ น้ำหนักโมเลกุลของเมทานอล เท่ากับ 32.04 กรัม

หาปริมาตรของเมทานอล จากสูตร
$$Z = \frac{Y}{D}$$

เมื่อ Z คือ ปริมาตรของเมทานอล

Y คือ น้ำหนักของเมทานอล

D คือ ค่าความหนาแน่นของเมทานอล เท่ากับ 791 กรัมต่อลิตร

8. เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์

$$\% \text{ Conversion} = \frac{[\text{FAME}] \times 100}{3[\text{TAG}] + 2[1, 3 \text{ DAG}] + 2[1, 2 \text{ DAG}] + [\text{MAG}] + [\text{FFA}] + [\text{FAME}]}$$

เมื่อ % Conversion คือ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์

[FAME] คือ ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากโครมาโทแกรม

[TAG] คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[1, 3 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1, 3 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[1, 2 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1, 2 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[MAG] คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

ภาคผนวกที่ จ

สถิติ

ตารางที่ จ. 1 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 ระหว่างแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13400.247	12	1116.687	11.130	.000
Within Groups	2608.562	26	100.329		
Total	16008.809	38			

ตารางที่ จ. 2 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทิวิตีจำเพาะของราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 ระหว่างแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	96745.640	27	3583.172	14.204	.000
Within Groups	7063.301	28	252.261		
Total	103808.941	55			

ตารางที่ ๑. 3 ตาราง ANOVA เปรียบเทียบค่าแอกทวิตีจำเพาะของราสายพันธุ์ *F. solani* CU103 ระหว่างอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ใช้ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตไลเพส

ANOVA

Activity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68497.207	27	2536.934	9.786	.000
Within Groups	14258.645	55	259.248		
Total	82755.852	82			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ จ

ข้อมูล

ตารางที่ จ. 1 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 1

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	2.76 ± 0.12	0.32 ± 0.06	0.12 ± 0.06
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	9.37 ± 0.24	1.36 ± 0.15	0.14 ± 0.07
น้ำมันมะกอก	24.66 ± 0.38	7.45 ± 0.18	0.3 ± 0.11
น้ำมันปาล์ม	10.54 ± 0.17	2.61 ± 0.27	0.25 ± 0.10
น้ำมันรำข้าว	34.82 ± 0.47	13.41 ± 0.39	0.38 ± 0.08
น้ำมันดอกทานตะวัน	16.37 ± 0.21	2.27 ± 0.14	0.14 ± 0.06
แป้งถั่วเหลือง	25.39 ± 0.52	8.97 ± 0.48	0.35 ± 0.12
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	9.41 ± 0.22	1.42 ± 0.13	0.15 ± 0.09
น้ำมันมะกอก	29.73 ± 0.37	10.57 ± 0.21	0.35 ± 0.12
น้ำมันปาล์ม	10.48 ± 0.14	2.52 ± 0.15	0.24 ± 0.09
น้ำมันรำข้าว	44.96 ± 0.48	13.94 ± 0.47	0.31 ± 0.14
น้ำมันดอกทานตะวัน	18.16 ± 0.16	3.32 ± 0.12	0.18 ± 0.07
แป้งถั่วเหลือง	36.57 ± 0.67	14.03 ± 0.55	0.38 ± 0.16
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	7.72 ± 0.18	0.83 ± 0.07	0.11 ± 0.04
น้ำมันมะกอก	18.57 ± 0.25	5.04 ± 0.16	0.27 ± 0.08
น้ำมันปาล์ม	8.61 ± 0.17	1.92 ± 0.21	0.22 ± 0.10
น้ำมันรำข้าว	25.36 ± 0.31	7.77 ± 0.34	0.31 ± 0.11
น้ำมันดอกทานตะวัน	10.18 ± 0.13	1.43 ± 0.07	0.14 ± 0.06
แป้งถั่วเหลือง	33.09 ± 0.41	9.12 ± 0.38	0.27 ± 0.09

ตารางที่ จ. 2 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 2

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	2.98 ± 0.17	0.49 ± 0.04	0.16 ± 0.05
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	17.36 ± 0.31	3.07 ± 0.11	0.18 ± 0.07
น้ำมันมะกอก	19.76 ± 1.87	10.04 ± 1.22	0.5 ± 0.06
น้ำมันปาล์ม	19.31 ± 0.27	5.21 ± 0.33	0.26 ± 0.09
น้ำมันรำข้าว	25.15 ± 2.03	11.66 ± 2.18	0.46 ± 0.11
น้ำมันดอกทานตะวัน	16.09 ± 0.57	3.71 ± 0.26	0.23 ± 0.04
แป้งถั่วเหลือง	39.45 ± 1.47	28.07 ± 0.29	0.71 ± 0.11
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	35.16 ± 1.15	5.22 ± 0.16	0.15 ± 0.04
น้ำมันมะกอก	56.73 ± 2.21	38.14 ± 1.37	0.67 ± 0.13
น้ำมันปาล์ม	36.85 ± 3.01	12.59 ± 0.42	0.34 ± 0.11
น้ำมันรำข้าว	49.22 ± 2.46	40.07 ± 1.85	0.81 ± 0.09
น้ำมันดอกทานตะวัน	28.82 ± 1.54	9.19 ± 0.33	0.31 ± 0.15
แป้งถั่วเหลือง	78.29 ± 3.51	54.76 ± 3.98	0.69 ± 0.21
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	26.75 ± 2.11	4.25 ± 0.32	0.16 ± 0.08
น้ำมันมะกอก	58.44 ± 2.72	33.64 ± 1.88	0.57 ± 0.13
น้ำมันปาล์ม	44.26 ± 2.08	17.16 ± 1.05	0.38 ± 0.16
น้ำมันรำข้าว	69.73 ± 2.55	46.37 ± 2.11	0.66 ± 0.14
น้ำมันดอกทานตะวัน	37.43 ± 1.27	8.56 ± 0.32	0.23 ± 0.1
แป้งถั่วเหลือง	87.75 ± 4.06	53.42 ± 3.17	0.60 ± 0.13

ตารางที่ จ. 3 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 3

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	7.03 ± 0.21	1.15 ± 0.11	0.16 ± 0.07
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	28.67 ± 0.41	5.16 ± 0.13	0.18 ± 0.05
น้ำมันมะกอก	34.56 ± 2.07	17.25 ± 1.43	0.5 ± 0.04
น้ำมันปาล์ม	27.72 ± 0.39	8.53 ± 0.28	0.30 ± 0.07
น้ำมันรำข้าว	34.08 ± 2.27	17.94 ± 3.14	0.53 ± 0.15
น้ำมันดอกทานตะวัน	21.58 ± 0.67	5.36 ± 0.24	0.24 ± 0.06
แป้งถั่วเหลือง	58.72 ± 2.51	41.84 ± 0.44	0.71 ± 0.07
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	41.43 ± 1.95	7.05 ± 0.24	0.17 ± 0.06
น้ำมันมะกอก	67.31 ± 3.27	46.12 ± 1.01	0.68 ± 0.17
น้ำมันปาล์ม	47.67 ± 3.55	17.45 ± 0.63	0.37 ± 0.09
น้ำมันรำข้าว	67.07 ± 3.76	55.78 ± 2.12	0.83 ± 0.11
น้ำมันดอกทานตะวัน	38.19 ± 2.88	12.04 ± 0.47	0.31 ± 0.13
แป้งถั่วเหลือง	90.16 ± 3.56	62.42 ± 4.12	0.69 ± 0.15
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	39.49 ± 3.41	7.01 ± 0.4	0.17 ± 0.09
น้ำมันมะกอก	69.48 ± 3.24	48.11 ± 2.07	0.69 ± 0.17
น้ำมันปาล์ม	54.35 ± 2.77	22.64 ± 1.33	0.42 ± 0.15
น้ำมันรำข้าว	87.26 ± 3.37	59.45 ± 3.45	0.67 ± 0.09
น้ำมันดอกทานตะวัน	48.52 ± 1.94	11.95 ± 0.51	0.25 ± 0.11
แป้งถั่วเหลือง	110.91 ± 5.37	68.16 ± 3.44	0.61 ± 0.18

ตารางที่ จ. 4 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 4

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	10.33 ± 0.23	1.52 ± 0.09	0.15 ± 0.03
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	42.26 ± 0.22	8.18 ± 0.11	0.19 ± 0.04
น้ำมันมะกอก	57.73 ± 2.26	29.46 ± 1.67	0.51 ± 0.07
น้ำมันปาล์ม	37.28 ± 0.36	11.87 ± 0.45	0.31 ± 0.09
น้ำมันรำข้าว	52.17 ± 2.59	37.12 ± 3.55	0.71 ± 0.12
น้ำมันดอกทานตะวัน	36.03 ± 0.84	9.14 ± 0.37	0.25 ± 0.04
แป้งถั่วเหลือง	72.08 ± 3.22	51.75 ± 0.62	0.72 ± 0.05
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	50.38 ± 2.16	9.27 ± 0.37	0.18 ± 0.05
น้ำมันมะกอก	75.33 ± 3.60	51.1 ± 1.2	0.68 ± 0.14
น้ำมันปาล์ม	58.81 ± 3.76	22.04 ± 0.72	0.37 ± 0.14
น้ำมันรำข้าว	76.23 ± 4.05	63.9 ± 2.45	0.84 ± 0.06
น้ำมันดอกทานตะวัน	47.61 ± 3.27	14.77 ± 0.64	0.31 ± 0.1
แป้งถั่วเหลือง	104.46 ± 4.15	73.9 ± 3.89	0.71 ± 0.04
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	49.23 ± 3.64	8.15 ± 0.57	0.17 ± 0.07
น้ำมันมะกอก	80.31 ± 3.24	56.47 ± 2.41	0.7 ± 0.07
น้ำมันปาล์ม	62.41 ± 3.18	26.94 ± 1.71	0.43 ± 0.11
น้ำมันรำข้าว	96.15 ± 4.28	65.88 ± 3.88	0.68 ± 0.05
น้ำมันดอกทานตะวัน	58.56 ± 2.18	15.24 ± 0.57	0.26 ± 0.05
แป้งถั่วเหลือง	128.07 ± 6.58	80.6 ± 3.71	0.63 ± 0.13

ตารางที่ จ. 5 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 5

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	13.26 ± 0.18	1.95 ± 0.11	0.15 ± 0.06
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	48.33 ± 0.62	9.57 ± 0.73	0.2 ± 0.03
น้ำมันมะกอก	60.43 ± 2.75	30.16 ± 1.55	0.49 ± 0.16
น้ำมันปาล์ม	40.58 ± 0.58	13.07 ± 0.37	0.32 ± 0.06
น้ำมันรำข้าว	55.76 ± 2.31	37.85 ± 2.74	0.67 ± 0.15
น้ำมันดอกทานตะวัน	39.16 ± 1.01	10.14 ± 0.44	0.25 ± 0.04
แป้งถั่วเหลือง	80.28 ± 3.59	57.15 ± 1.35	0.71 ± 0.11
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	53.16 ± 4.85	10.2 ± 0.89	0.19 ± 0.04
น้ำมันมะกอก	80.5 ± 3.74	52.8 ± 1.82	0.66 ± 0.17
น้ำมันปาล์ม	65.27 ± 4.92	25.5 ± 1.21	0.39 ± 0.1
น้ำมันรำข้าว	83.08 ± 5.24	66.45 ± 2.71	0.8 ± 0.16
น้ำมันดอกทานตะวัน	56.7 ± 3.88	17.89 ± 0.95	0.31 ± 0.07
แป้งถั่วเหลือง	114.69 ± 4.73	75.85 ± 3.29	0.66 ± 0.14
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	55.74 ± 4.38	10.37 ± 0.25	0.18 ± 0.03
น้ำมันมะกอก	88.05 ± 3.84	58.51 ± 2.73	0.66 ± 0.19
น้ำมันปาล์ม	71.44 ± 3.77	31.45 ± 2.17	0.44 ± 0.04
น้ำมันรำข้าว	102.72 ± 4.55	68.07 ± 4.16	0.66 ± 0.15
น้ำมันดอกทานตะวัน	68.33 ± 2.42	18.84 ± 0.67	0.27 ± 0.06
แป้งถั่วเหลือง	133.58 ± 6.63	83.7 ± 3.95	0.62 ± 0.16

ตารางที่ จ. 6 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 6

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	14.23 ± 0.34	2.26 ± 0.25	0.16 ± 0.04
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	50.06 ± 1.56	10.22 ± 0.83	0.2 ± 0.12
น้ำมันมะกอก	66.92 ± 3.17	37.26 ± 1.77	0.55 ± 0.13
น้ำมันปาล์ม	54.15 ± 2.13	20.7 ± 0.68	0.38 ± 0.16
น้ำมันรำข้าว	62.54 ± 2.73	40.44 ± 2.97	0.65 ± 0.09
น้ำมันดอกทานตะวัน	44.85 ± 1.72	12.54 ± 1.05	0.28 ± 0.07
แป้งถั่วเหลือง	88.15 ± 3.86	63.48 ± 1.86	0.72 ± 0.19
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	57.26 ± 4.64	12.31 ± 0.7	0.21 ± 0.08
น้ำมันมะกอก	85.76 ± 3.62	55.41 ± 2.03	0.64 ± 0.21
น้ำมันปาล์ม	70.53 ± 4.61	28.3 ± 1.94	0.4 ± 0.11
น้ำมันรำข้าว	89.18 ± 5.59	70.04 ± 3.38	0.78 ± 0.26
น้ำมันดอกทานตะวัน	50.6 ± 4.17	17.4 ± 1.08	0.34 ± 0.05
แป้งถั่วเหลือง	123.17 ± 4.93	79.11 ± 3.97	0.64 ± 0.17
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	58.01 ± 2.59	13.32 ± 0.37	0.22 ± 0.13
น้ำมันมะกอก	94.12 ± 3.47	62.71 ± 2.85	0.67 ± 0.28
น้ำมันปาล์ม	79.56 ± 4.38	35.05 ± 2.66	0.44 ± 0.17
น้ำมันรำข้าว	116.03 ± 4.72	74.28 ± 4.49	0.64 ± 0.23
น้ำมันดอกทานตะวัน	63.78 ± 2.68	18.53 ± 0.70	0.29 ± 0.09
แป้งถั่วเหลือง	144.83 ± 6.09	90.15 ± 4.33	0.62 ± 0.26

ตารางที่ จ. 7 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 7

ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	15.46 ± 0.31	2.19 ± 0.19	0.14 ± 0.05
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	54.36 ± 1.77	12.56 ± 0.95	0.23 ± 0.15
น้ำมันมะกอก	70.85 ± 3.07	42.63 ± 2.04	0.6 ± 0.18
น้ำมันปาล์ม	58.38 ± 2.49	22.92 ± 0.41	0.39 ± 0.21
น้ำมันรำข้าว	67.59 ± 2.51	47.19 ± 3.06	0.69 ± 0.27
น้ำมันดอกทานตะวัน	40.57 ± 1.05	10.43 ± 0.54	0.25 ± 0.08
แป้งถั่วเหลือง	95.08 ± 3.64	70.25 ± 2.25	0.74 ± 0.29
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	63.14 ± 4.07	15.36 ± 0.65	0.24 ± 0.18
น้ำมันมะกอก	97.26 ± 3.48	60.07 ± 2.15	0.62 ± 0.23
น้ำมันปาล์ม	80.55 ± 4.29	34.06 ± 2.54	0.42 ± 0.16
น้ำมันรำข้าว	102.34 ± 5.61	80.13 ± 3.57	0.78 ± 0.29
น้ำมันดอกทานตะวัน	54.41 ± 3.36	17.59 ± 0.85	0.32 ± 0.13
แป้งถั่วเหลือง	141.53 ± 5.26	85.16 ± 3.21	0.60 ± 0.21
ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์			
น้ำมันมะพร้าว	63.49 ± 2.86	17.19 ± 0.64	0.27 ± 0.22
น้ำมันมะกอก	102.48 ± 3.22	65.39 ± 2.92	0.64 ± 0.31
น้ำมันปาล์ม	85.27 ± 3.45	38.85 ± 2.78	0.46 ± 0.19
น้ำมันรำข้าว	128.26 ± 4.94	80.17 ± 3.72	0.62 ± 0.26
น้ำมันดอกทานตะวัน	66.57 ± 2.05	18.27 ± 0.54	0.27 ± 0.18
แป้งถั่วเหลือง	148.19 ± 5.73	95.48 ± 4.12	0.64 ± 0.34

ตารางที่ จ. 8 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเพสของ *F. solani* CU103 วันที่ 1

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเพสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	41.61 ± 1.67	10.18 ± 0.34	0.24 ± 0.06
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	47.46 ± 2.34	18.39 ± 0.34	0.39 ± 0.21
ยีสต์สกัด	47.37 ± 2.18	14.56 ± 0.41	0.31 ± 0.17
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	42.37 ± 2.09	9.67 ± 0.14	0.22 ± 0.11
แอมโมเนียมไนเตรท	46.21 ± 1.97	9.14 ± 0.12	0.19 ± 0.09
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	47.68 ± 2.41	23.37 ± 0.44	0.49 ± 0.32
ยีสต์สกัด	47.37 ± 2.27	19.39 ± 0.31	0.41 ± 0.26
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	43.67 ± 1.08	6.55 ± 0.23	0.15 ± 0.03
แอมโมเนียมไนเตรท	44.86 ± 1.25	6.03 ± 0.22	0.13 ± 0.07

ตารางที่ จ. 9 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเพสของ *F. solani* CU103 วันที่ 2

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเพสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	60.35 ± 2.16	23.52 ± 0.48	0.39 ± 0.23
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	74.06 ± 3.54	71.12 ± 2.24	0.96 ± 0.31
ยีสต์สกัด	72.27 ± 3.17	63.58 ± 2.02	0.88 ± 0.26
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	60.55 ± 2.74	22.78 ± 0.44	0.38 ± 0.18
แอมโมเนียมไนเตรท	61.67 ± 2.66	19.59 ± 0.39	0.32 ± 0.14
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	75.36 ± 3.43	73.12 ± 2.09	0.96 ± 0.27
ยีสต์สกัด	75.12 ± 3.16	67.64 ± 2.53	0.9 ± 0.22
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	48.14 ± 1.63	10.46 ± 0.15	0.21 ± 0.08
แอมโมเนียมไนเตรท	48.21 ± 1.74	9.34 ± 0.13	0.19 ± 0.07

ตารางที่ จ. 10 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 3

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	63.49 ± 2.81	33.67 ± 0.21	0.53 ± 0.18
เปปโตน	67.35 ± 2.69	98.42 ± 3.42	1.46 ± 0.41
ยีสต์สกัด	70.09 ± 3.56	87.75 ± 2.01	1.25 ± 0.37
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	64.16 ± 3.07	36.21 ± 0.53	0.56 ± 0.15
แอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์	64.46 ± 2.59	30.59 ± 0.48	0.47 ± 0.11
เปปโตน	73.06 ± 3.13	137.44 ± 7.16	1.88 ± 0.55
ยีสต์สกัด	72.53 ± 2.84	127.39 ± 6.92	1.75 ± 0.37
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	62.53 ± 2.08	19.24 ± 0.37	0.31 ± 0.09
แอมโมเนียมไนเตรท	61.67 ± 1.95	17.03 ± 0.24	0.27 ± 0.07

ตารางที่ จ. 11 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 4

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	76.13 ± 4.57	66.45 ± 2.38	0.87 ± 0.21
เปปโตน	88.37 ± 4.39	261.07 ± 9.57	2.95 ± 0.45
ยีสต์สกัด	86.14 ± 4.12	226.49 ± 8.19	2.63 ± 0.34
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	73.56 ± 3.85	72.36 ± 2.46	0.98 ± 0.21
แอมโมเนียมไนเตรท ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์	74.34 ± 3.54	62.47 ± 2.41	0.84 ± 0.17
เปปโตน	95.75 ± 5.16	348.15 ± 10.43	3.63 ± 0.58
ยีสต์สกัด	90.17 ± 4.67	292.52 ± 9.78	3.24 ± 0.42
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	43.63 ± 2.35	16.46 ± 1.27	0.38 ± 0.09
แอมโมเนียมไนเตรท	40.72 ± 2.07	12.82 ± 0.95	0.31 ± 0.07

ตารางที่ จ. 12 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 5

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	77.18 ± 4.41	62.67 ± 2.44	0.81 ± 0.19
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	82.48 ± 4.07	235.56 ± 8.03	2.86 ± 0.56
ยีสต์สกัด	85.39 ± 4.28	223.27 ± 7.23	2.61 ± 0.48
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	71.30 ± 3.42	66.85 ± 2.25	0.94 ± 0.22
แอมโมเนียมไนเตรท	63.47 ± 2.67	51.26 ± 2.08	0.81 ± 0.17
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	88.38 ± 4.55	315.22 ± 9.37	3.57 ± 0.79
ยีสต์สกัด	83.16 ± 4.31	268.37 ± 7.86	3.22 ± 0.63
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	41.57 ± 2.01	13.98 ± 0.87	0.34 ± 0.11
แอมโมเนียมไนเตรท	38.55 ± 1.67	11.47 ± 0.42	0.26 ± 0.09

ตารางที่ จ. 13 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 6

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	63.38 ± 2.09	48.37 ± 1.75	0.76 ± 0.38
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	86.59 ± 4.28	235.14 ± 8.11	2.71 ± 0.67
ยีสต์สกัด	84.91 ± 4.11	219.47 ± 7.56	2.58 ± 0.61
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	64.18 ± 2.69	56.46 ± 2.57	0.88 ± 0.46
แอมโมเนียมไนเตรท	62.59 ± 2.55	48.47 ± 1.98	0.77 ± 0.41
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	86.3 ± 4.17	301.16 ± 9.07	3.49 ± 0.73
ยีสต์สกัด	81.29 ± 4.64	257.37 ± 6.17	3.17 ± 0.58
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	43.95 ± 1.86	14.73 ± 0.67	0.33 ± 0.37
แอมโมเนียมไนเตรท	39.42 ± 1.54	9.65 ± 0.33	0.24 ± 0.24

ตารางที่ จ. 14 แสดงการเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของ *F. solani* CU103 วันที่ 7

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ปริมาตรต่อปริมาตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ไลเปสแอกทิวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
ชุดควบคุม	70.66 ± 2.37	48.21 ± 1.52	0.68 ± 0.37
ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	84.67 ± 3.67	208.65 ± 6.54	2.46 ± 0.48
ยีสต์สกัด	84.18 ± 4.07	215.3 ± 7.51	2.55 ± 0.53
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	65.48 ± 2.53	57.41 ± 2.46	0.87 ± 0.21
แอมโมเนียมไนเตรท	68.61 ± 2.44	49.25 ± 1.67	0.73 ± 0.26
ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์			
เปปโตน	87.22 ± 37.8	303.32 ± 9.01	3.47 ± 0.77
ยีสต์สกัด	81.26 ± 4.14	252.37 ± 5.93	3.11 ± 0.63
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	42.76 ± 1.71	13.46 ± 0.61	0.31 ± 0.23
แอมโมเนียมไนเตรท	39.29 ± 1.48	9.16 ± 0.31	0.23 ± 0.19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายศุภร อังชันนาม เกิดวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2525 ที่อำเภอเมือง จังหวัดระนอง ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง เมื่อปีการศึกษา 2548 และระดับปริญญาโทเข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2549 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2551

ศุภร อังชันนาม และคณะ, 2551. Screening and optimization for lipase production from *Fusarium solani* CU103. การประชุมวิชาการหัวข้อ TSB: 2008 Biotechnology for Global Care. โรงแรมตักศิลา จังหวัดมหาสารคาม วันที่ 14-17 ตุลาคม 2551 (นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์)

ศุภร อังชันนาม และคณะ, 2551. Optimal Conditions For Lipase Production From *Fusarium solani* CU103. การประชุมวิชาการหัวข้อ “The Big Bang of Biological Sciences ” (13 TH BIOLOGICAL SCIENCES GRADUATE CONGRESS) National University of Singapore ณ ประเทศสิงคโปร์ วันที่ 15 - 17 ธันวาคม 2551 (นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย