การตรึงไลเพสบนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่เชื่อมขวาง
ด้วยกลูตาราลดีไฮด์สำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

นางสาวพิชญา เคนสิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIPASE IMMOBILIZATION ON *Scirpus grossus* L.f. FIBER CROSS-LINKED WITH GLUTARALDEHYDE FOR BIODIESEL SYNTHESIS

Miss Pichaya Kensingh

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology

Department of Materials Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงไลเพสบนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตารัลดีไฮด์สำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล
โดย	นางสาวพิชญา เคนสิงห์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิรีรัตน์ จารุจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริธันว์ เจียมศิริเลิศ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิรีรัตน์ จารุจินดา)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มัณทนา โอภาประกาสิต)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล)

พิชญา เคนสิงห์ : การตรึงไลเพสบนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์สำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล. (LIPASE IMMOBILIZATION ON *Scirpus grossus* L.f. FIBER CROSS-LINKED WITH GLUTARALDEHYDE FOR BIODIESEL SYNTHESIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. สิรีรัตน์ จารุจินดา, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล 115 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรึงรูปไลเพส *Candida rugosa* บนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. บดละเอียด ที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์เพื่อใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล จากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นใยกกบดละเอียดนั้นมีความเหมาะสมที่จะเป็นตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงไลเพส เนื่องจากภายในเส้นใยพบท่อกลวงเป็นจำนวนมากที่ไลเพสสามารถเกาะติดอยู่ได้ และเมื่อนำเส้นใยกกบดไปตรึงไลเพสด้วยวิธีเชื่อมขวางที่แตกต่างกัน พบว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดคือ การนำเส้นใยกกบดที่ผ่านการแอคติเวตด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในน้ำกลั่น และตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ ไลเพสตรึงรูปที่ได้ให้ประสิทธิภาพการตรึงไลเพสสูงถึงร้อยละ 84.2 และไลเพสตรึงรูปจากวิธีดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มและไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้ปริมาณกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 43.9 และ 32.2 ตามลำดับ และเมื่อทำการตรึงไลเพสด้วยวิธีดังกล่าวโดยใช้กลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นแตกต่างกันคือร้อยละ 0.2, 0.5 และ 0.8 พบว่าไลเพสตรึงรูปด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เหมาะที่สุดที่จะนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยมีประสิทธิภาพการตรึงไลเพสร้อยละ 76.7 และพบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์สูงถึงร้อยละ 52.6 และ 49.6 ตามลำดับ และยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 6 ครั้ง

ภาควิชา วัสดุศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต..
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ	ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก....................
ปีการศึกษา 2552	ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม....................

##4972623823: MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY

KEYWORDS : LIPASE / IMMOBILIZATION / CROSS-LINKED / GLUTARALDEHYDE / BIODIESEL

PICHAYA KENSINGH : LIPASE IMMOBILIZATION ON *Scirpus grossus* L.f. FIBER CROSS-LINKED WITH GLUTARALDEHYDE FOR BIODIESEL SYNTHESIS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SIREERAT CHARUCHINDA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 115 pp.

The objective of this research is to study the immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto fine powder of *Scirpus grossus* L.f. fiber cross-linked by glutaraldehyde for catalyzing biodiesel synthesis. The morphology obtained from Scanning Electron Microscopy (SEM) indicated that the fiber was found to be the most suitable material as a support due to its large quantity of hollow tube for lipase adsorption. The different techniques of lipase immobilization using fine powder of *Scirpus grossus* L.f. conducted in this research showed that the best technique was to first activate *Scirpus grossus* L.f. with 2% of 3-aminoproplytriethoxysilane in distilled water and react with glutaraldehyde. The product obtained was then followed by lipase immobilization. The efficiency of lipase immobilization using the above technique was 84.2%. In addition, the immobilized lipase could catalyze hydrolysis-esterification reaction between palm oil and bioethanol at 50°C for biodiesel synthesis. The convesions of free fatty acid and ethyl ester were 43.9% and 32.2%, respectively. The lipase immobilization using the different concentration of glutaraldehyde at 0.2, 0.5, and 0.8% was found that obtained immobilized lipase with 0.2% glutaraldehyde was the most suitable for using as a catalyst for hydrolysis–esterification reaction. The efficiency of the lipase immobilization was 76.7%. The conversions of free fatty acid and ethyl ester were 52.6% and 49.6%, respectively. In addition, it could be reused 6 times.

Department : Materials Science	Student's Signature ....
Field of Study : Applied Polymer Science and TextileTecnology	Advisor's Signature ....
Academic Year : 2009	Co-Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิรีรัตน์ จารุจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริธันว์ เจียมศิริเลิศ ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มัณฑนา โอภาประกาสิต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย) ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะด้านสิ่งทอ และศูนย์วิจัยเฉพาะทางด้านวัสดุเซรามิกและพอลิเมอร์ขั้นสูง ศูนย์ความเป็นเลิศแห่งชาติด้านปิโตรเลียม ปิโตรเคมีและวัสดุขั้นสูง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัย และภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องแล็ป เครื่องมือและอุปกรณ์ ศูนย์วิจัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์คุณสมบัติของตัวอย่างที่เตรียมได้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในห้องปฏิบัติการทุกๆท่าน ด้วยความซาบซึ้งใจ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย รวมถึงให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อน สำหรับการสนับสนุน ความรัก และความห่วงใยที่มีให้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ... จ

กิตติกรรมประกาศ... ฉ

สารบัญ... ช

สารบัญตาราง... ฎ

สารบัญสมการ... ฐ

สารบัญภาพ... ฑ

บทที่ 1 บทนำ... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง... 6

2.1 ไลเพส... 6

2.1.1 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส... 6

2.1.2 ความจำเพาะของไลเพส... 7

2.2 การตรึงเอนไซม์... 10

2.3 วิธีการตรึงเอนไซม์... 12

2.3.1 การตรึงเอนไซม์โดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับตัวค้ำจุน........ 12

2.3.2 การตรึงเอนไซม์โดยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ภายใน... 13

2.3.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมขวาง... 13

2.4 ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงเอนไซม์... 16

2.4.1 การจำแนกชนิดของตัวค้ำจุน... 17

2.4.2 พอลิเมอร์ธรรมชาติ... 18

2.4.2.1 เซลลูโลส... 18

2.4.2.2 กกสามเหลี่ยม... 18

2.5 ไบโอดีเซล... 19

2.6 ปาล์มน้ำมัน... 19

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง... 24

บทที่ 3 วิธีการทดลอง... 26

3.1 วัสดุและสารเคมี... 26

3.1.1 วัสดุ... 26

3.1.2 สารเคมี... 26

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์... 28

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย... 29

3.3.1 ขอบเขตการทดลอง... 29
3.2.2 วิธีการทดลอง... 31
3.2.2.1 การเตรียมตัวค้ำจุนจากเส้นใยกก........................... 31
3.2.2.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของเส้นใยกกบดก่อนและหลังการตรึงไลเพส.................................. 31
3.2.2.3 การตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบด.............................. 34
3.2.3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไลเพสด้วยวิธีเชื่อมขวาง (วิธี H1)………………………………… 37
3.2.3.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไลเพสของเส้นใยกกบด... 37
3.2.3.6 การสังเคราะห์ไบโอดีเซล (เอทิลเอสเทอร์) โดยใช้ ไลเพสตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันที่มีน้ำมันปาล์ม และไบโอเอทานอลเป็น สับเสตรต 38
3.2.2.7 การตรวจสอบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์... 39
3.2.2.8 การนำไลเพสตรึงรูปมาทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำ.. 40
บทที่ 4 ผลการทดลอง... 41
4.1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)……………………… 41
4.1.1 ไลเพสอิสระ และเส้นใยกกบดก่อนทำการตรึงไลเพส..................... 41
4.1.2 ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตา-ราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี.. 42
4.1.3 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสโดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์……………… 43
4.1.4 ค่าความเป็นกรดด่าง……………………………………………… 45
4.1.5 ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน... 46
4.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไลเพสของเส้นใยกก..................... 47
4.2.1 ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตา- 47

ราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี...

4.2.2 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสโดยใช้ดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์...................... 48

4.2.3 ค่าความเป็นกรดด่าง………………………………………………… 50

4.3 วิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรุพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer…………………………………………………………………….. 52

4.3.1 วิเคราะห์พื้นที่ผิว ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer……… 52

4.3.2 วิเคราะห์ขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer…………………………………………………………….. 53

4.4 วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของเส้นใยกกโดยใช้เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR)... 55

4.5 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์………… 58

4.5.1 ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตา-ราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี………………………………… 58

4.5.2 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสโดยใช้ดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์……………… 61

4.5.3 ค่าความเป็นกรดด่าง... 63

4.5.4 ร้อยละเอนไซม์ตรึงรูปต่อปริมาณน้ำมันที่ใช้................................ 65

4.6 การศึกษาความสามารถในการใช้ซ้ำของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส.. 68

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ... 71

5.1 สรุปผลการทดลอง…………………………………………………………… 71

5.2 ข้อเสนอแนะ.. 72

รายการอ้างอิง.. 73

ภาคผนวก.. 77

ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมี.. 78

ก-1 สารละลายตรวจวัดค่าแอคติวิตี.. 78

ก-2 สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน.. 78

ภาคผนวก ข……………………………………………………………………………….. 79

ข-1 การทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพราไนโตรฟีนอล.................................. 79

ข-2 วิธีทำกราฟมาตรฐาน BSA.. 81

ภาคผนวก ค การคำนวณ... 83
ค-1 การคำนวณค่าแอคติวิตี 83
ค-2 การคำนวณหาปริมาณโปรตีน... 83
ค-3 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ.. 84
ค-4 การหาปริมาตรน้ำมันปาล์ม.. 84
ภาคผนวก ง ลักษณะกราฟของอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโคร-มาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography :HPLC)... 85
ภาคผนวก จ ข้อมูล... 91
จ-1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของไลเพสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope:SEM)........... 91
จ-2 วิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรุพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer.. 100
จ-3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยกกโดยใช้เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR).. 101
จ-4 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์............. 109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 111

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ	16
2.2	การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส และไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล..	23
3.1	วัสดุและที่มาของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย...	26
3.2	ชนิดของสารสารเคมี หน้าที่ และที่มาของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย....................	26
3.3	ชนิดของเครื่องมือและอุปกรณ์ รุ่น และที่มาของอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย...........	28
4.1	ค่าแอคติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละประสิทธิภาพของการตรึง ไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี..	47
4.2	ค่าแอคติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละประสิทธิภาพของการตรึงไลเพสด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบกับวิธีการดูดซับทางกายภาพ..	49
4.3	ค่าแอคติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละประสิทธิภาพของการตรึงไลเพสที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน...	51
ข-1	ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร...	80
ข-2	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม.......	82
จ-1	ปริมาณพื้นที่ผิวของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ............	101
จ-2	ขนาดรูพรุนของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ...................	100
จ-3	ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง	109
จ-4	ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้ซ้ำ..	110

ตารางที่		หน้า
จ-5	ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง...	111
จ-6	ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้ซ้ำ……………………………………..….	111

สารบัญสมการ

สมการที่		หน้า
2.1	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส……………………………………………………………..	7
2.2	ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน..	7
2.3	ปฏิกิริยาแอซิโดไลซิส..	7
2.4	อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน………………………………………………………….	7
2.5	ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส……………………………………………………..	7
2.6	ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส…………………………………………………………	7
2.7	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเอทริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์……………..	21
3.1	ปริมาณโปรตีนที่ใช้..	38
3.2	ร้อยละประสิทธิภาพการตรึง..	38
3.3	ร้อยละของการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระ...	39
3.4	ร้อยละของการเปลี่ยนเป็นเอทิลเอสเทอร์..	40
ค-1	สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล...............................	84
ค-2	สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ BSA……………………………………	84
ค-3	สมการคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะ……………………………………………...	85
ค-4	สูตรการหาปริมาตรน้ำมันปาล์ม..	85

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่		หน้า
2.1	การเชื่อมขวางโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้กลูตาราลดีไฮด์..........................	14
2.2	แผนภาพวิธีการตรึงรูปเอนไซม์..	15
2.3	การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน...	15
3.1	แผนภาพการดำเนินงานวิจัย..	30
3.2	กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800................	31
3.3	เครื่องวิเคราะห์พื้นที่ผิว (BET Surface Area Analyzer)............................	33
3.4	เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FT-IR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum One..	33
3.5	แผนภาพของขั้นตอนการตรึงไลเพสโดยใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยสารกลูตาราล- ดีไฮด์	35
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 750 (ก) ไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3))(*Candida rugosa*) และ (ข) เส้นใยกกบด..	41
4.2	ลักษณะการยึดติดบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากทำการตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี (ก) H1 (ข) H2 (ค) A1 และ (ง) A2...	42
4.3	การเข้าไปยึดเกาะบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากทำการตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ก) GA 0.2% (ข) GA 0.5% (ค) GA 0.8% (ง) NADHEP และ (จ) NADPB…..	44
4.4	การเข้าไปยึดเกาะบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันคือ (ก) 5 (ข) 7 และ (ค) 9	45
4.5	การเข้าไปยึดเกาะบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากทำการตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 (ก) ไลเพสตรึงรูปก่อนทำปฏิกิริยา และ (ข) ไลเพสตรึงรูปหลังเร่งปฏิกิริยาปฏิกิริยา..	46

ภาพที่		หน้า
4.6	ปริมาณพื้นที่ผิวของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ..........	52
4.7	ขนาดรูพรุนของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ................	53
4.8	(ก) IR สเปรกตรัมของเส้นใยกก (ข) IR สเปรกตรัมของเส้นใยกกที่ผ่านการการแอคติเวตด้วย APTES (ค) IR สเปรกตรัมเส้นใยกกที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ง) IR สเปรกตรัมของไลเพสตรึง....................	55
4.9	ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระเมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง...........	58
4.10	ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์เมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธีเป็นตัวเร่ง เอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง..............	59
4.11	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีที่การตรึงรูปแตกต่างกัน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง..	61
4.12	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีที่การตรึงรูปแตกต่างกัน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง..	62
4.13	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างในการตรึงรูปที่แตกต่างกันต่อปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง..	63
4.14	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างในการตรึงรูปที่แตกต่างกันต่อปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง..	64
4.15	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยา ต่อปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง..	65

ภาพที่		หน้า
4.16	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ของไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยา ต่อปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง…………………………………………………………………………	66
4.17	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ และไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพต่อปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง……………	68
4.18	การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วย กลูตาราลดีไฮด์ และไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง……….	69
ข-1	กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร………………………………………………………………...	81
ข-2	กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม	83
ง-1	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอล 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง…………………………………………………………...	86
ง-2	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง……………………………	86
ง-3	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง..	87
ง-4	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง…………………………………………………………………………	87

ภาพที่		หน้า
ง-5	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง……………………………………………………………………	88
ง-6	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง………………………………………………………...	88
ง-7	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง...	89
ง-8	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง...	89
ง-9	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโม..	90
ง-10	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.......................................	90
ง-11	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง..	91

ภาพที่		หน้า
ง-12	โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยเชื่อมขวางกลูตาราราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง......................................	91
จ-1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย ของเอนไซม์ไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3)) (Candida rugosa) (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx10,000………………………………….	92
จ-2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย x750 เอนไซม์ไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3)) (Candida rugosa) (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx10,000………………………………….	92
จ-3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H1 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx10,000……………………………………………………….	93
จ-4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H2 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx10,000……………………………………………………….	93
จ-5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A1 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยาย x10,000……………………………………………………………………….	94
จ-6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A2 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx10,000……………………………………………………….	94
จ-7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยสารกลูตาราราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000………………..	95
จ-8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยสารกลูตาราราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000………………	95

ภาพที่		หน้า
จ-9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000………………………..	96
จ-10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน (ก) กำลังขยายx750(ข) กำลังขยายx2,000……………………………………..	96
จ-11	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000…………………………………….	97
จ-12	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000……………………………………………………………	98
จ-13	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000…………………………………………………………...	98
จ-14	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 11 (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000…………………………………………………………...	99
จ-15	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกลางหลังนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน (ก) กำลังขยายx750 (ข) กำลังขยายx2,000…………………..	100
จ-16	IR สเปรกตรัมของเส้นใยกก……………………………………………………..	102
จ-17	IR สเปรกตรัมของเส้นใยกก/APTES………………………………………….	103
จ-18	IR สเปรกตรัมของเส้นใยกก/GA0.2%...	104

ภาพที่		หน้า
จ-19	IR สเปรกตรัมของไลเพสตรึงรูป /GA0.2%..	105
จ-20	IR สเปรกตรัมของเส้นใยกก/GA0.5%...	106
จ-21	IR สเปรกตรัมของไลเพสตรึงรูป /GA0.5%...	107
จ-22	IR สเปรกตรัมของเส้นใยกก/GA0.8%...	108
จ-23	IR สเปรกตรัมของไลเพสตรึงรูป /GA0.8………………………………………....	109
จ-24	เส้นใยกกบด……………………………………………………………………....	112
จ-25	เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วย APTES ในน้ำกลั่น...	112
จ-26	เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วย APTES ในน้ำกลั่น และทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2……………………………………………………..	113
จ-27	ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2…...	113
จ-28	ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 หลังจากผ่านการนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน 6 ครั้ง..............	114

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบปัญหาวิกฤตทางด้านพลังงานน้ำมันที่มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว อันเนื่องมาจากความต้องการในการใช้พลังงานเชื้อเพลิงในปริมาณมากของมนุษย์เพื่ออำนวยความสะดวกในการดำเนินชีวิตประจำวัน จึงทำให้ราคาน้ำมันมีราคาแพงขึ้น โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลเป็นพลังงานปิโตรเลียมฟอสซิลที่ถือได้ว่าเป็นแหล่งพลังงานหลักในการนำมาใช้งาน แต่ก็เป็นแหล่งพลังงานที่มีอยู่อย่างจำกัด เพราะเป็นทรัพยากรใช้แล้วสูญสิ้นไป อีกทั้งน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียมยังสร้างปัญหามลภาวะทางอากาศแก่สภาพแวดล้อมค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงเกิดความต้องการที่จะศึกษาหาพลังงานทางเลือกใหม่ขึ้นเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน และไบโอดีเซลซึ่งมีคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับเชื้อเพลิงปิโตรเลียมและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจึงเป็นพลังงานทดแทนทางเลือกหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Yusuf และคณะ, 1995) และเริ่มมีการใช้งานมากขึ้น โดยจากสถิติการจำหน่ายไบโอดีเซลในปี พ.ศ.2549 มีปริมาณการจำหน่ายไบโอดีเซล (บี 5) 0.12 ล้านลิตรต่อวัน และใน พ.ศ. 2550 มีการจำหน่าย 1.58 ล้านลิตรต่อวัน หรือเพิ่มมากกว่า 10 เท่าตัวในช่วง 1 ปี และยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง กล่าวคือในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2550 มีการจำหน่ายถึง 3.55 ล้านลิตรต่อวัน (กระทรวงพลังงาน, 2551)

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล (biomass) เช่น น้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ รวมไปถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว น้ำมันพืชโดยเฉพาะปาล์มน้ำมัน เป็นพืชน้ำมันหลักที่มีการเพาะปลูก และมีปริมาณผลผลิตมากที่สุดในประเทศไทย (คณะกรรมาธิการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545) จากสถิติพบว่าผลผลิตปาล์มน้ำมันในปี พ.ศ. 2550 มีผลผลิต 6.38 ล้านตัน และในปี พ.ศ.2551 พบว่าผลผลิตปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นเป็น 9.26 ล้านตัน ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงเป็นพืชที่เหมาะสมที่จะนำมาผลิตไบโอดีเซล (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) โดยนำเอาปาล์มน้ำมัน มาผ่านกระบวนการทางเคมีเกิดเป็นสารที่เรียกว่า อัลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) หรือ ไบโอดีเซลซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลที่กลั่นจากปิโตรเลียม กระบวนการผลิตไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากหลายวิธี เช่น จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน เป็นต้น แต่พบว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้นจะมีข้อจำกัดในการผลิตไบโอดีเซล คือจำเป็นต้องใช้น้ำมันที่มีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาต้องไม่มีน้ำในปริมาณมาก ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันนั้นสามารถผลิตไบโอดีเซลได้โดยไม่มีผลกระทบจากข้อจำกัดดังกล่าว (Ting และคณะ, 2008)

โดยทั่วไปกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมักใช้สารเคมี (กรดหรือด่าง) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่มีข้อเสียคือจำเป็นต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิตมาก และเกิดผลิตภัณฑ์สบู่ที่ไม่ต้องการ ทำให้ปริมาณไบโอดีเซลที่ต้องการลดลง ส่งผลให้เกิดความยุ่งยากต่อกระบวนการแยกไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ และเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำล้างที่เกิดจากตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ ซึ่งเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเวลามากขึ้น ในปัจจุบันมีผู้สนใจนำตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst) เช่น ไลเพส มาใช้เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น เนื่องจากไลเพสมีความจำเพาะกับสับสเตรต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลและกลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูง ส่งผลให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายทางด้านพลังงานที่ใช้ในกระบวนการผลิต และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นสารเคมี (Samukawa และคณะ, 2000) อย่างไรก็ตามการใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นยังไม่เป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรม เนื่องมาจากข้อจำกัดทางด้านราคา เพราะราคาไลเพสค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรึงเอนไซม์ (enzyme immobilization) ให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัดเพื่อรักษาแอคติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ให้มีเสถียรภาพ และสามารถนำเอนไซม์กลับไปใช้ซ้ำได้อย่างต่อเนื่องอีกด้วย (Hilal และคณะ, 2005)

วิธีการตรึงเอนไซม์และการเลือกตัวค้ำจุนนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการนำมาใช้งาน โดยต้องคำนึงถึงผลกระทบของวิธีการตรึงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย เช่น การตรึงเอนไซม์ด้วยการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และไม่มีผลกระทบต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ แต่พบว่าข้อเสียคือมีแรงดึงดูดน้อยจึงไม่มีความคงทนในการเกาะติดกับตัวค้ำจุนเมื่อผ่านการใช้งานซ้ำหลายๆ ครั้ง ตัวอย่างเช่น ไลเพส *Candida sp.* ตรึงรูปบนเมมเบรนที่ทำจากฝ้ายด้วยวีธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันสลัดกับเมทานอลได้ไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 96 และเอนไซม์ตรึงรูปดังกล่าวสามารถนำมาทำปฏิกิริยาต่อได้มากกว่า 10 วัน (Nie และคณะ, 2006) ในทางตรงกันข้ามการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) พบว่ามีแรงดึงดูดมากส่งผลให้เอนไซม์มีการเกาะติดที่ดี หลุดจากตัวค้ำจุนยากขึ้น ทำให้สามารถผ่านการใช้งานซ้ำได้มากขึ้น แต่วิธีดังกล่าวมีผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง ไลเพสตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์บนเมมเบรนที่ทำจากเส้นใยนาโนพอลิเมอร์ ระหว่างพอลิอะคริโลไนไทรล์กับ 2-ไฮดรอกซีเอทิลเมทาคริเลต (poly(acrylonitrile-co-2 hydroxyethyl-methacrylate)) ซึ่งเมมเบรนดังกล่าวได้ผ่านการแอคติเวตโดยอิพิคลอโรฮิดริน (epichlorohydrin) กับไซยานูริกคลอไรด์ (cyanuric chloride) และโดยอิพิคลอโรฮิดริน (epichlorohydrin) กับพาราเบนโซควิโนน (p-benzoquinone) พบว่าเอนไซม์มี

แอคติวิตีระหว่างร้อยละ 32.5 และร้อยละ 40.6 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น และเมื่อผ่านการใช้งานเป็นเวลา 30 วัน เอนไซม์ยังคงเหลือแอคติวิตีมากกว่าร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น (Huang และคณะ, 2008)

สำหรับการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวาง (crosslinking) ด้วยกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นอีกวิธีที่น่าสนใจ กลูตาราลดีไฮด์เป็นสารไบฟังก์ชันนัลที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงไลเพสเนื่องจากจะช่วยยึดจับไลเพสให้แน่นมากยิ่งขึ้น ทำให้สามารถนำไลเพสกลับมาใช้งานซ้ำได้หลายครั้ง ตัวอย่าง เช่น การตรึงไลเพสลงบนซิลิกาเจลที่ผ่านการแอคติเวตและทำการ เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์พบว่าเมื่อผ่านการใช้งานอย่างต่อเนื่องถึง 20 ครั้ง ไลเพสตรึงรูปยังคงมีแอคติวิตีถึงร้อยละ 80 (Lee และคณะ, 2006) การตรึงเอนไซม์โดยใช้กลูตาราลดีไฮด์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ทำการเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์บนตัวค้ำจุนที่ผ่านการแอคติเวตแล้วนำตัวค้ำจุนดังกล่าวไปทำการตรึงเอนไซม์ หรือทำการตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนแล้วจึงนำไปทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ เป็นต้น

ปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาการใช้ตัวค้ำจุนจากวัสดุธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากส่วนใหญ่วัสดุธรรมชาติมักมีโครงสร้างที่มีรูพรุน ซึ่งช่วยในการตรึงเอนไซม์ และยังสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ โดยไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Goncalves และคณะ, 2008) ในประเทศไทยนั้นมีวัสดุธรรมชาติที่เหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการนำมาผลิตเป็น ตัวค้ำจุนเอนไซม์จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ได้ ยกตัวอย่างเช่น การตรึง ไลเพส *Candida rugosa* บนเส้นใยกกบดละเอียดโดยวิธีดูดซับทางกายภาพแล้วนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล พบว่าได้ไบโอดีเซลร้อยละ 48.8 และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 1 ครั้ง เมื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็นไบโอเอทานอลพบว่าได้ ไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 51.3 และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 2 ครั้ง (ปิยะนันท์, 2007)

งานวิจัยนี้มีแนวคิดในการตรึงไลเพสบนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันสำหรับการผลิตไบโอดีเซลระหว่างน้ำมันปาล์มกับไบโอเอทานอล โดยศึกษาหาภาวะที่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของ กลูตาราลดีไฮด์ และค่าความเป็นกรด-ด่างในการตรึงไลเพส รวมถึงตรวจสอบลักษณะทาง สัณฐานวิทยาของเส้นใยกกบดก่อนและหลังตรึงรูปไลเพส การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไลเพสของเส้นใยกก โดยศึกษาแอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ไลเพส (Total activity) ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์ไลเพส (Total protein) และประสิทธิภาพการตรึงไลเพส (lipase immobilization efficiency) การตรวจสอบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) โดยคาดว่าแนวคิดดังกล่าวจะทำให้ไลเพสไม่หลุดออกมาจาก เส้นใยกกส่งผลให้สามารถสังเคราะห์ได้ไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น และยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกหลายครั้งด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ตรึงไลเพส *Candida rugosa* บนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่ทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์
2. ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อแอคติวิตีของไลเพสตรึงรูป และประสิทธิภาพการตรึงไลเพส
3. ตรวจสอบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) และการนำมาใช้ซ้ำของไลเพสตรึงรูปจากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์ม และไบโอเอทานอล

ขอบเขตการวิจัย

1. ตรึงไลเพส *Candida rugosa* บนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไลเพส โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อแอคติวิตีของไลเพสตรึงรูป และประสิทธิภาพการตรึงไลเพส ดังนี้
    - ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์
    - ค่าความเป็นกรด-ด่าง
3. ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของเส้นใยกก
    - ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
    - วิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer
4. วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของเส้นใยกกโดยใช้เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ (FTIR)
5. ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไลเพสของเส้นใยกกที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์
    - หาค่าแอคติวิตีของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี
    - หาปริมาณโปรตีนที่ใช้ด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford)
    - หาร้อยละประสิทธิภาพการตรึงไลเพส
6. สังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส- เอสเทอริฟิเคชัน
    - สับเสตรตที่ใช้ได้แก่ไบโอเอทานอลและน้ำมันปาล์ม
7. การตรวจสอบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)
8. การนำไลเพสตรึงรูปมาทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำ
9. วิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลงานวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. ที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์สำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มีความพยายามพัฒนาการประยุกต์การใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี เพื่อทดแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นสารเคมี อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับสับเสตรตจึงเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้อย่างรวดเร็วและมีสภาวะที่ไม่รุนแรง อีกทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในด้านพลังงาน และค่าใช้จ่ายสำหรับการบำบัดของเสียซึ่งจะตามมาภายหลัง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีหลากหลายตัว เช่น อะไมเลส โพรทีเอส และไลเพส เป็นต้น โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเพสที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลายและสามารถประยุกต์ใช้ในงานอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจทำการศึกษาเกี่ยวกับการนำไลเพสไปใช้งานมากขึ้น

2.1 ไลเพส

ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบของ International Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นอีก เช่น เอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (acyl glycerol hydrolase) ไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Triacyl glycerol hydrolase)

2.1.1 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

ไลเพสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์(triglyceride) เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) กรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) นอกจากนี้ไลเพสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis reaction) ได้แก่ เอสเทอริฟิเคชัน (esterification) และ ทรานส์เอสเทอ-ริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาประเภทแอซิโดลิซิส (acidolysis) อินเทอร์เอสเทอ-ริฟิเคชัน (interesterification) แอลกอฮอล์ลิซิส (alcoholysis) และ อะมิโนลิซิส (aminolysis) อีกด้วย

<u>ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส</u>

ไฮโดรลิซิส

$$R_1\text{-COO-}R_2 + H_2O \longleftrightarrow R_1\text{-COOH} + R_2\text{-OH} \quad \ldots(2.1)$$

เอสเทอริฟิเคชัน

$$R_1\text{-COOH} + R_2\text{-OH} \longleftrightarrow R_1\text{-COO-}R_2 + H_2O \quad \ldots(2.2)$$

แอซิโดลิซิส

$$R_1\text{COO-}R_2 + R_3\text{C-OH} \longleftrightarrow R_3\text{COO-}R_2 + R_1\text{-COOH} \quad \ldots(2.3)$$

อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน

$$R_1\text{-COO-}R_2 + R_3\text{-COO-}R_4 \longleftrightarrow R_3\text{COO-}R_2 + R_1\text{-COO-}R_4 \quad \ldots(2.4)$$

แอลกอฮอล์ลิซิส

$$R_1\text{-COO-}R_2 + R_3\text{-OH} \longleftrightarrow R_1\text{COO-}R_3 + R_3\text{-OH} \quad \ldots(2.5)$$

อะมิโนลิซิส

$$R_1\text{-COO-}R_2 + R_3\text{-NH}_3 \longleftrightarrow R_1\text{CONH-}R_3 + R_2\text{-OH} \quad \ldots(2.6)$$

2.1.2 ความจำเพาะของไลเพส

Macrae (1983) แบ่งไลเพสตามความจำเพาะต่อสับสเตรตออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1) ไลเพสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งของโมเลกุลของกลีเซอรอลหรือกรดไขมันที่เข้าทำปฏิกิริยา (Non-specific lipase) ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการย่อยสลายได้ทุกตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ และจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ ได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ไลเพสกลุ่มนี้ได้จาก *Candida cylindracae*, *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

2) ไลเพสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1, 3 specific lipase) ปฏิกิริยาจะดำเนินไปโดยมีการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 เท่านั้น ส่วนตำแหน่งที่ 2 ไม่เกิดการย่อยสลาย ไลเพสกลุ่มนี้ได้จาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rhizopus arrhizus*

3) ไลเพสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน (fatty acid-specific lipase) ไลเพสกลุ่มนี้จะย่อยสลายกรดไขมันที่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 (*cis* double bond) บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ดี ไลเพสกลุ่มนี้ได้จาก *Geotrichum candidum*

<u>แหล่งของไลเพส</u>

ไลเพสผลิตได้จากทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์ไลเพสสร้างขึ้นที่ตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) ในพืชพบได้ในถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ไลเพสจากจุลินทรีย์สามารถแยกได้จากทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่เนื่องจากไลเพสจากจุลินทรีย์มีความเสถียรสูง (stability) ความสามารถในการคัดเลือกสารตั้งต้นดี (selectivity) และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (substrate specificity) จึงเป็นที่น่าสนใจและมีการนำไปประยุกต์ใช้สูงที่สุด (Cardenas และคณะ, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเพสจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตง่าย วิธีเก็บรักษาไม่ซับซ้อน

ไลเพสจากยีสต์ *C. rugosa* เป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรมมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องมาจากยีสต์ชนิดนี้ผลิตไลเพสที่มีสมบัติที่ดี มีแอคติวิตีสูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์อื่นๆ (Redondo และคณะ, 1995)

<u>คุณสมบัติทางกายภาพ</u>

ไลเพสที่มีความเหมาะสมสำหรับการใช้งานในระดับอุตสาหกรรมนั้นจำเป็นต้องมีคุณสมบัติทางด้านกายภาพที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมนั้น ๆ เช่นอุตสาหกรรมซักล้าง อุตสาหกรรมอาหาร มักมีกระบวนการผลิตที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง และสภาพความเป็นด่างสูง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับความเหมาะสมของไลเพสที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากไลเพสแต่ละชนิดมีช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน เช่น ไลเพสจาก *Pseudomonas sp.* จะมีความเหมาะสมต่อการทำงานในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7-9 และ อุณหภูมิ 45-60 องซาเซลเซียส ตามลำดับ (Dong และคณะ 1999) ไลเพสจาก *Bacillus sp.* มีความเหมาะสมในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8-9 และอุณหภูมิ 50 องซาเซลเซียส ตามลำดับ (Sharma และคณะ 2002) เป็นต้น

<u>ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเพสในทางอุตสาหกรรม</u>

เอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับไขมัน น้ำมัน อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตสารเคมีและยา อุตสาหกรรมกระดาษ เครื่องสำอางค์ (Kaslauskas และ Bornscheuer, 1998) ไลเพสยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการย่อยสลายขยะไขมัน (Masse และคณะ, 2001) และ สารพอลิยูรีเทน (Takamoto และคณะ, 2001)

<u>อุตสาหกรรมอาหาร</u>

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น ในอุตสาหกรรมนมนิยมใช้เป็นอย่างมากในการไฮโดรไลซ์ไขมันนม ผลิตกลิ่นรสเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตชีส ใช้ในปฏิกิริยาไลโพลิซิสไขมันเนยและครีม กรดไขมันอิสระเองก็ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลิ่นต่างๆ เช่นกลิ่นของเอสเทอร์ แลคโตน เมทิลคีโตน และเบต้าคีโต- แอซิด เป็นต้น (Wong, 1995)

อุตสาหกรรมสารเคมีอินทรีย์

ในอุตสาหกรรมนี้ไลเพสใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะซึ่งไม่สามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมี หรือทดแทนวิธีทางเคมีซึ่งอาจมีต้นทุนการผลิตสูงหรือผลิตได้ยาก เช่น ในอุตสาหกรรมยาเพื่อใช้ผลิต หรือปรับปรุงสารแอนตี้ไบโอติก อุตสาหกรรมเคมีเกษตร ใช้ผลิตยากำจัดศัตรูพืช เป็นต้น (Pandey และคณะ ,1999)

อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสารทำความสะอาด

ไลเพสถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาดโดยเป็นองค์ประกอบของผงซักฟอก อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์โพรทีเอส (proteases) เพื่อใช้ขจัดคราบไขมันที่เลอะบนเสื้อผ้า นอกจากนี้ ไลเพสยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สำหรับผลิตภัณฑ์สบู่ และยาสระผมอีกด้วย (Schmidt และ Verger, 1998)

อุตสาหกรรมกระดาษ

ไลโพลิติกเอนไซม์มีความสำคัญในการย่อยเพื่อขจัดสารที่เรียกว่า “pitch” ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในเนื้อไม้ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมันที่จะมีผลในการรบกวนการผลิตกระดาษ และช่วยขจัดคราบไขมันที่ติดมากับกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษรีไซเคิล ทำให้ไม่เกิดการสร้างสารเหนียวที่จะรบกวนการผลิตขึ้นด้วย (Jaeger และ Reetz, 1998)

กระบวนการจัดการขยะและสารพิษ

ไลเพสมีประโยชน์ในการช่วยย่อยกำจัดไขมันที่ปนเปื้อนมาในขยะ ช่วยบำบัดน้ำเสียหรือน้ำธรรมชาติที่มีการปนเปื้อนของไขมัน นอกจากนี้ยังช่วยบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และก๊าซพิษได้ด้วย (Pandey และคณะ, 1999)

อุตสาหกรรมอื่นๆ

ไลเพสสามารถนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น เซลลูเลส เพคทิเนส และโพรทีเอส เพื่อใช้ฟอกสีในอุตสาหกรรมเส้นใยผ้า และยังมีการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของไบโอเซ็นเซอร์ ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ใช้ในกระบวนการฟอกหนังสัตว์ ใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวแข็งๆ การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว การสังเคราะห์สารพอลิเมอร์ ผลิตพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ ใช้เป็นส่วนหนึ่งในอุตสาหกรรมน้ำมันหล่อลื่น และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางด้วย (Schmidt และ Verger, 1998)

การนำเอนไซม์มาใช้ในวงการอุตสาหกรรมทั่วๆไป จะอยู่ในรูปของเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำมาใช้ได้ในอีกลักษณะหนึ่ง คือ เอนไซม์ตรึงรูป เอนไซม์ตรึงรูปนี้เมื่อใช้งานแล้วสามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้งจนกว่าแอคติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ที่ภาวะในการ

ทำปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระได้ เนื่องจากมีเสถียรภาพที่ดีกว่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของตัวค้ำจุนที่ใช้ยึดจับ กับวิธีการตรึงรูปที่เหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้งาน

2.2 การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization)

การตรึงเอนไซม์ หมายถึง การเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายมาเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้น้อยมาก โดยการนำเอาเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดหรือจัดไว้ หรือนำมาจับยึดไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ หรือทำให้โมเลกุลเอนไซม์จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้เอนไซม์ได้อยู่ในขอบเขตที่จำกัดเพื่อรักษาแอคติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ให้มีเสถียรภาพและสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้หลาย ๆ ครั้งอย่างต่อเนื่อง

<u>ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ</u>

1. เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
2. เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)
3. เอนไซม์อิสระใน in vitro ใช้แบบ multi-enzyme system ไม่ได้
4. เอนไซม์อิสระถ้าจะให้มีแอคติวิตีสูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน
5. เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในสารละลายของสารตั้งต้นและผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะปนเปื้อนในลักษณะสารปนเปื้อนโปรตีน ซึ่งถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่างของโปรตีนนั้น ต้องเพิ่มกรรมวิธีแยกอีกครั้ง
6. เอนไซม์อิสระมีภาวะทำปฏิกิริยา (reaction condition) จำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมกับการนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมที่ต้องใช้เอนไซม์นั้นๆ
7. เอนไซม์อิสระส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ มีผลทำให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆ หรือใช้ในระบบต่อเนื่องได้
8. เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

<u>ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูป</u>

1. แอคติวิตีอาจถูกกระทบกระเทือนเนื่องจากการยึดโมเลกุลเอนไซม์กับตัวค้ำจุนมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย
2. มีปัญหากับสารตั้งต้นที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือสารตั้งต้นมีลักษณะแขวนลอย(suspension) ด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) กับเอนไซม์ตรึงรูปซึ่งอยู่ในรูปของแข็ง (solid catalyst)

<u>ข้อดีของการทำเอนไซม์ตรึงรูป</u>

1. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสิ่งแวดล้อมที่เกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ง่าย

2. สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ได้อีก

3. กระบวนการผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำในระบบต่อเนื่อง (continuous system) ได้

4. เอนไซม์บางชนิดหลังจากตรึงรูปแล้วพบว่ามีสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น ความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability) ความเป็นกรดด่าง (pH) การเก็บรักษา (storage) ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity)

2.3 วิธีการตรึงเอนไซม์

วิธีการตรึงเอนไซม์สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท (Aehle, 2004) คือ การตรึงโดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับตัวค้ำจุน (support binding) การตรึงรูปเอนไซม์โดยดักจับไว้ภายใน (entrapment) และการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมขวาง (cross-linking)

2.3.1 การตรึงเอนไซม์โดยอาศัยการจับกันของเอนไซม์กับตัวค้ำจุน (support binding)

สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

ก. การตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำจุนโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption)

การดูดซับทางกายภาพกับตัวค้ำจุนนั้นเกิดขึ้นกับแรงดึงดูดได้หลายแบบ เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) แรงวันเดอร์-วาล (van der waal's force) วิธีการดูดซับทางกายภาพนั้นมีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ภาวะการณ์ตรึงไม่รุนแรง แต่แรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนไม่ค่อยแข็งแรง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ และเกิดความเสียหายกับเอนไซม์น้อย สามารถนำตัวค้ำจุนกลับมาใช้ได้ใหม่

ข. การตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำจุนโดยอาศัยพันธะไอออนิก (ionic binding)

การตรึงเอนไซม์โดยอาศัยพันธะไอออนิกนี้ตัวค้ำจุนจะมีส่วนโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ (ion-exchange residue) การเชื่อมกันระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนเกิดโดยพันธะไอออนิก พันธะไอออนิกเป็นพันธะเคมีที่เกิดจากอะตอม 2 อะตอม รวมกันโดยถ่ายเทอิเล็กตรอนจากอะตอมหนึ่งไปอีกอะตอมหนึ่ง พันธะไออนิกเป็นพันธะที่เกิดง่าย ดังนั้นจึงมีผลต่อการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์น้อย แรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนอ่อน เอนไซม์สามารถหลุดจากตัว

ค้ำจุนได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย อุณหภูมิ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงความแรงของพันธะให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้

ค. การตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำจุนโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding)

การตรึงเอนไซม์โดยอาศัยพันธะโควาเลนต์นี้จะเกิดการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังก์ชันบนตัวค้ำจุนกับเอนไซม์ เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ใหม่ ในบางครั้งจะนำตัวค้ำจุนมากระตุ้นโดยเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ การเชื่อมเอนไซม์กับตัวค้ำจุนจะพยายามเชื่อมโดยใช้กลุ่มฟังก์ชันของเอนไซม์ที่ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์ แต่บางครั้งก็ควบคุมไม่ได้ เพราะเกิดการเชื่อมแบบสุ่ม เอนไซม์มักมีอายุการใช้งานยาวนานกว่าวิธีการตรึงแบบอื่น ๆ

2.3.2 **การตรึงเอนไซม์โดยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ภายใน** (entrapment)

วิธีนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

ก. การจำกัดเขตเอนไซม์ในตัวพยุง (lattice type)

การจำกัดเอนไซม์ในตัวพยุงนี้เป็นการกักขังเอนไซม์ไว้ในโพรงเจล เกิดจากการพอลิเมอไรเซชันของเจลในสารละลายที่มีเอนไซม์อยู่ ได้เป็นโครงสร้างของเจลขังเอนไซม์ให้อยู่ตามโพรงในโครงสร้างของเจลเหล่านั้น พอลิเมอร์ที่ใช้ได้แก่ แป้ง ไคติน(chitin) ไคโตซาน (chitosan) อัลจิเนต (alginate)

ข. การจำกัดเขตเอนไซม์ในแคปซูลขนาดเล็ก (microcapsule type)

เป็นการตรึงเอนไซม์ในรูปทรงกลมผนังบางแบบกึ่งซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) ผนังบางนี้จะไม่ยอมให้เอนไซม์ที่ถูกกักขังไว้ภายในซึมผ่านออกมา แต่จะยอมให้สับเสตรตและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านได้

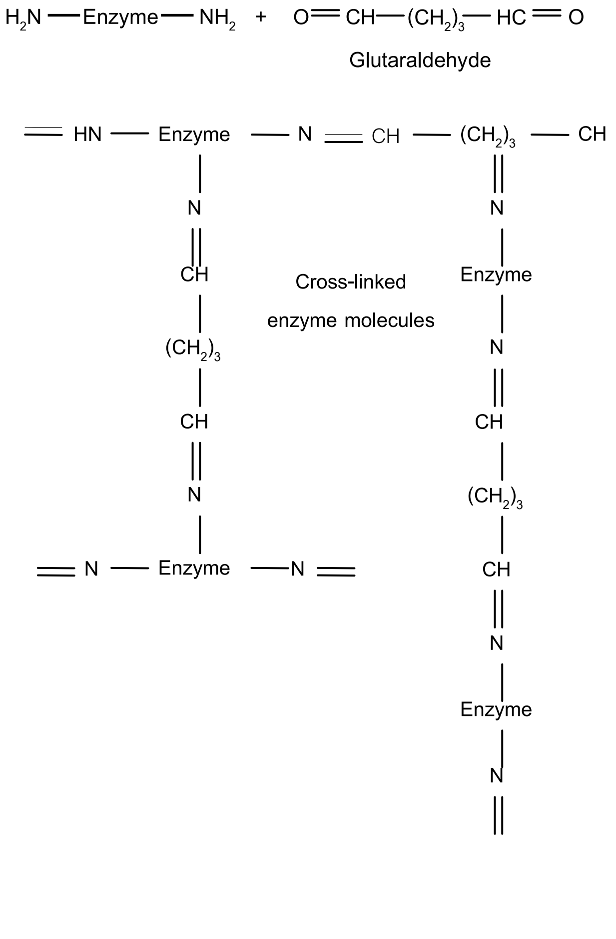
2.3.3 **การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมขวาง** (cross-linking)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมขวางนั้นทำโดยใช้สารไบฟังก์ชันนัลซึ่งทำหน้าที่เชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ ทำให้เกิดอนุภาคใหญ่ขึ้น วิธีการตรึงแบบนี้เกิดขึ้นง่าย ไม่ค่อยซับซ้อน สามารถควบคุมสมบัติทางกายภาพและขนาดของอนุภาคที่ตรึงได้สารไบฟังก์ชันนัลที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมขวาง คือ กลูตาราลดีไฮด์ (Taylor, 1991) นอกจากนี้ยังมี โทลูอีน ไดไอโซไซยาเนท และเฮกซะเมทิลิน ปฏิกิริยาการตรึงรูปโดยวิธีนี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ สภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์

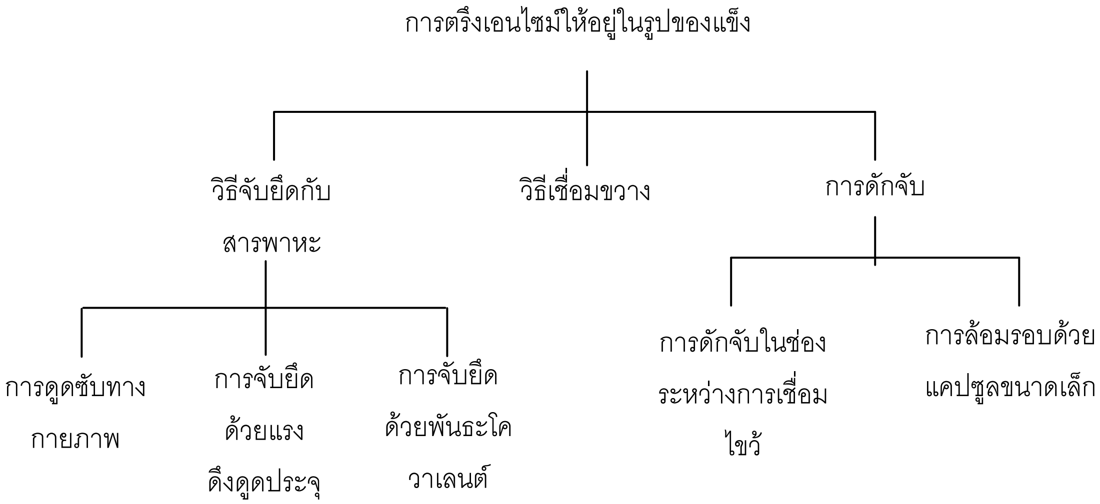
ชนิดของสารเชื่อมขวาง ความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย อุณหภูมิ และเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

กลูตาราลดีไฮด์

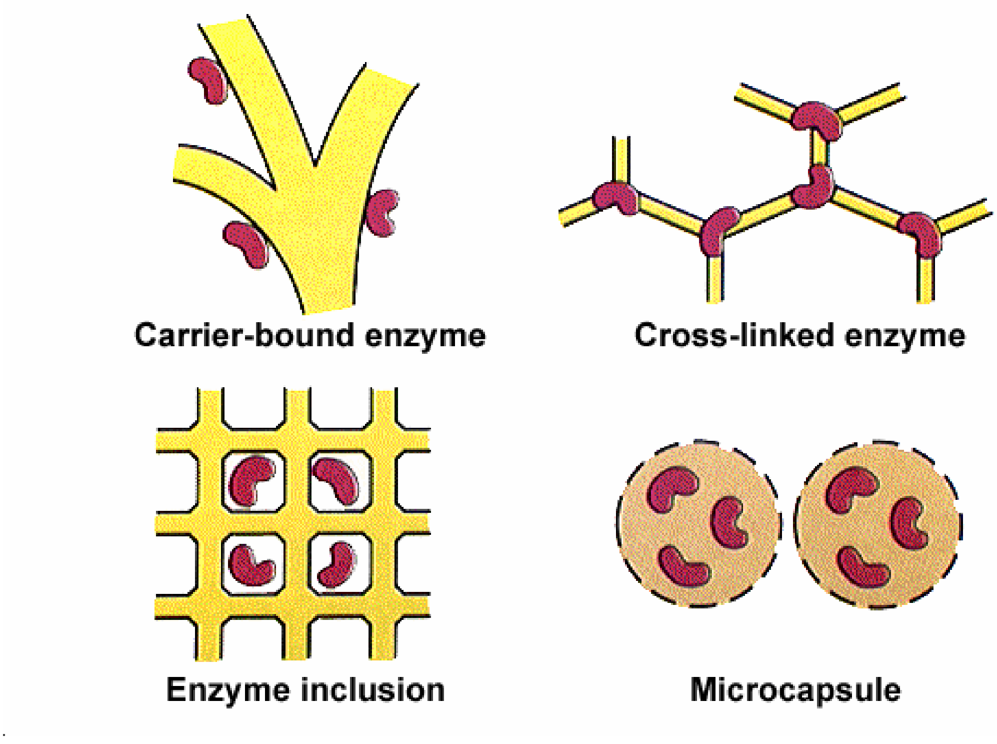
กลูตาราลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) เป็นสารไบฟังก์ชันนัลที่นิยมนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากจะช่วยยึดจับเอนไซม์ให้แน่นมากยิ่งขึ้น ทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้งานซ้ำได้หลายครั้ง การตรึงเอนไซม์โดยใช้สารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ทำการเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์บนตัวค้ำจุนที่ผ่านการแอคติเวต แล้วนำตัวค้ำจุนดังกล่าวไปทำการตรึงเอนไซม์ หรือทำการตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุน แล้วจึงนำไปทำการเชื่อมขวางด้วย กลูตาราลดีไฮด์ เป็นต้น



รูปที่ 2.1 การเชื่อมขวางโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้กลูตาราลดีไฮด์



รูปที่ 2.2 แผนภาพวิธีการตรึงเอนไซม์



รูปที่ 2.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ (Kennedy และ Cabral, 1987)

ข้อเปรียบเทียบ	เทคนิคการตรึงเอนไซม์				
	เชื่อมโยง	ดูดยึดทางกายภาพ	ดูดยึดด้วยพันธะไอออนิก	ดูดยึดด้วยพันธะโควาเลนต์	ดักจับ
1.วิธีการเตรียม	สะดวก	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
2.การยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง	แข็งแรง	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	ปานกลาง
3.การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่	ได้ในบางกรณี	ได้	ได้	ได้ในบางกรณี	ไม่ได้
4.ต้นทุนในการตรึง	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	สูง
5. ความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	ปานกลาง
6.การประยุกต์ใช้งาน	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้	ได้
7.ป้องกันการสลายตัวของเอนไซม์กับจุลินทรีย์	ได้บางครั้ง	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้

2.4 **ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงเอนไซม์**

ตัวค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ
2. มีพื้นผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึดของเอนไซม์
3. สับเสตรตและผลิตภัณฑ์สามารถซึมผ่านได้
4. มีความคงตัวต่อสารเคมี ความร้อน และแรงกระแทก
5. มีรูปร่างและขนาดพอเหมาะ
6. มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์

7. สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่

2.4.1 การจำแนกชนิดของตัวค้ำจุน

สามารถแบ่งได้ตามลักษณะทางกายภาพ หรือแบ่งตามสมบัติทางเคมีได้ดังนี้

ก. ชนิดของตัวค้ำจุนแบ่งตามลักษณะทางกายภาพได้เป็น 2 ชนิด คือตัวค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุน และตัวค้ำจุนที่มีรูพรุน

<u>ตัวค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุน</u>

ตัวค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุนจะมีขอบเขตจำกัดเฉพาะผิวของตัวค้ำจุนเท่านั้น เนื่องจากตัวค้ำจุนชนิดนี้มีพื้นผิวต่อปริมาตรต่ำ ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้เส้นใย หรือสารที่ลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็ก เพื่อให้มีขนาดของพื้นผิวมากพอที่จะให้เอนไซม์ยึดเกาะได้ ข้อดีของตัวค้ำจุนชนิดนี้ คือสับเสตรตสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่าย เนื่องจากเอนไซม์ถูกยึดไว้ที่ผิวบริเวณรอบนอกของตัวค้ำจุน

<u>ตัวค้ำจุนที่มีรูพรุน</u>

ตัวค้ำจุนที่มีรูพรุนนี้มีพื้นที่ผิวสำหรับให้เอนไซม์เกาะหรือดูดยึดมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบในปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนักเทียบกับตัวค้ำจุนที่ไม่มีรูพรุน ดังนั้นตัวค้ำจุนที่มีรูพรุนสามารถดูดยึดเอนไซม์ได้มากกว่า แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากพื้นที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงนั้นจะต้องมีขนาดใหญ่เพียงพอสำหรับโมเลกุลของสับเสตรตผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ และขณะเดียวกันจะต้องให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ผ่านออกมาสะดวก

ข. ชนิดของตัวค้ำจุนแบ่งตามสมบัติทางเคมีได้เป็น 2 ชนิด คือ ตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์และตัวค้ำจุนที่เป็นสารอนินทรีย์

<u>ตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์</u>

ตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์มีข้อได้เปรียบในการใช้งานทางอุตสาหกรรม สารอินทรีย์มีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) จำนวนมาก ที่สามารถช่วยในการตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีข้อเสียเนื่องจากสมบัติทางกายภาพที่ทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์คือ สูญเสียความคงตัวได้ง่ายเมื่อได้รับการกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น ความร้อน สารเคมี และจุลินทรีย์ เป็นต้น

<u>ตัวค้ำจุนที่เป็นสารอนินทรีย์</u>

ตัวค้ำจุนที่เป็นสารอนินทรีย์มีความเหมาะสมหลายประการในการใช้งานทางอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความคงทนต่อการกระทบจากสิ่งแวดล้อม ทนต่อแรงทางกายภาพ ความร้อน และสารเคมี ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ง่ายต่อการเก็บรักษา มีอายุการใช้งานนาน และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก นอกจากนี้ตัวค้ำจุนที่เป็นสารอนินทรีย์ยังมีรูปร่างคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง ความดัน หรืออุณหูมิ

2.4.2 พอลิเมอร์ธรรมชาติ

ตัวค้ำจุนที่นำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ส่วนมากมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ โดยเฉพาะพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย (alage) และเซลลูโลส (cellulose) จะนิยมนำมาใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ และด้วยพันธะโควาเลนต์

2.4.2.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose) ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือโมเลกุลของกลูโคส 1,000-10,000 โมเลกุล มีหน่วยย่อยพื้นฐาน คือ เซลโลไบโอส โมเลกุลของเซลลูโลสมีความเสถียรมาก เซลลูโลสมีสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้งาน เนื่องจากไม่ถูกทำลายด้วยจุลินทรีย์ มีรูพรุนจำนวนมาก จึงสามารถจุเอนไซม์ได้มาก คงทนต่อแรงกระทบ และมีราคาถูกสามารถหาได้ง่าย สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

2.4.2.2 กกสามเหลี่ยม

กกสามเหลี่ยม (Bulrush) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Scirpus grossus* L.f. ชื่อวงศ์ Cyperaceae เป็นพืชล้มลุกอายุหลายฤดู ขึ้นได้ทั้งในน้ำตื้นและน้ำไหล เช่นในนาข้าว และคันคูน้ำทั่วไป แตกเป็นกอขนาดใหญ่ สูง 1-2 เมตร ใบยาว 50-100 เซนติเมตร ลักษณะใบค่อนข้างกว้างเป็นร่อง ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อรวม มีก้านช่อดอกเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ มักนิยมนำมาตากแห้งและใช้ทอเสื่อ

งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะนำเส้นใยกก *Scirpus grossus* L.f. มาทดลองใช้เป็นตัวค้ำจุนไลเพส เนื่องจากเป็นพืชที่มีปริมาณมากในประเทศไทย โดยตัวค้ำจุนไลเพสดังกล่าวจะนำมาใช้ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากในภาวะวิกฤตทางพลังงานที่เกิดขึ้น

ในปัจจุบัน ทำให้นานาประเทศทั่วโลกต่างก็ให้ความสำคัญในการค้นหาพลังงานทางเลือกใหม่เพื่อใช้ทดแทนพลังงานปิโตรเลียมที่ใกล้จะหมดลงไปทุกที ไบโอดีเซลจึงเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถผลิตได้จากน้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ และน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว เป็นต้น

2.5 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือเชื้อเพลิงที่ได้จากน้ำมันพืชหรือสัตว์และน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้วนำมาผ่านกระบวนการทางเคมี เกิดเป็นสารที่เรียกว่า อัลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) ซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลที่กลั่นจากน้ำมันปิโตรเลียม และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลได้โดยไม่ต้องทำการดัดแปลงเครื่องยนต์

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพซึ่งเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในอนาคตอันใกล้ เนื่องจากเป็นพลังงานหมุนเวียนที่มีอยู่ไม่จำกัด ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเผาผลาญจะให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbonmonoxide, CO) น้อยกว่าน้ำมันดีเซลปกติ และไม่ปล่อยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulferdioxide, SO_2) ทำให้ช่วยลดผลกระทบจากปรากฏการณ์เรือนกระจก (greenhouse effect)

การพิจารณาเลือกน้ำมันชนิดต่าง ๆ เพื่อการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทยนั้นพบว่าปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่เหมาะสมเนื่องจากมีการเพาะปลูกในปริมาณมากที่สุดในประเทศไทย (คณะกรรมาธิการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545)

2.6 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงถึง 0.6-0.8 ตัน/ไร่/ปี และมีราคาต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น น้ำมันปาล์มเกิดขึ้นจากผลปาล์ม 2 ส่วนคือ จากเปลือกหุ้มภายนอก และจากเมล็ดในปาล์ม ซึ่งน้ำมันเมล็ดในปาล์มประกอบด้วย กรดไขมันชนิดอิ่มตัวสูงถึงร้อยละ 85-90 ทำให้ไม่เหมาะต่อการบริโภค จึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำสบู่ เครื่องสำอาง เป็นต้น ส่วนน้ำมันจากเปลือกของปาล์มหรือน้ำมันปาล์มดิบประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก) ร้อยละ 50 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (กรดโอเลอิก) ร้อยละ 40 ดังนั้นน้ำมันปาล์มดิบมีลักษณะเป็นของเหลวผสมกับของแข็ง การนำน้ำมันปาล์มดิบมาผลิตไบโอดีเซลจะช่วยลดต้นทุนในการสกัดลงได้ แต่ถ้านำน้ำมันปาล์มดิบมาสกัดแยก ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ น้ำมันปาล์มโอเลอิน (palm olein) ร้อยละ 61 โดยใช้เป็นน้ำมันพืชบริโภคเป็นหลัก อีกส่วนคือ

ไขปาล์มสเตียริน (palm stearin) ร้อยละ 39 ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเนยเทียม ไขมันผสม และสบู่ เมื่อพิจารณาถึงปริมาณผลผลิต และสมบัติของน้ำมันพืช น้ำมันเมล็ดในปาล์ม และปาล์มสเตียริน มีแนวโน้มสูงที่จะใช้เป็นเชื้อเพลิง เนื่องจากมีความต้องการเป็นอาหารน้อยกว่าน้ำมันชนิดอื่นและช่วยลดปัญหาเรื่องปาล์มสเตียรินที่ล้นตลาดด้วย

การนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล

การนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ไบโอดีเซลสามารถเตรียมได้ 4 วิธีคือ

1) การผสมน้ำมันพืชกับน้ำมันดีเซล (Blending)

การผสมน้ำมันพืชกับน้ำมันดีเซลโดยตรง หรือผสมกับตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น เอทานอล เป็นต้น โดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อทำให้ความหนืดของน้ำมันพืชลดลง สามารถผสมน้ำมันพืชได้ตั้งแต่ 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปตามความเหมาะสมของน้ำมันพืชที่ใช้ แต่หากผสมมากเกินไปจะเกิดข้อเสีย คือการกลายเป็นไอต่ำ เกิดโค้กพอกบนหัวฉีดของเครื่องยนต์ ตัวอย่างเช่น การผสมน้ำมันดอกทานตะวันกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร และนำไปทดสอบกับเครื่องยนต์ พบว่าน้ำมันผสมที่ได้ไม่เหมาะกับการใช้งานระยะยาวในเครื่องยนต์ดีเซลเนื่องจากเกิดโค้กที่หัวฉีด เช่นเดียวกับการผสมน้ำมันถั่วเหลืองกับตัวทำละลาย (ร้อยละ 48 พาราฟินผสมกับร้อยละ 52 แนฟทาลีน) ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าเมื่อนำไปใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลมีคาร์บอนเกาะติดที่วาล์วและหัวฉีด

2) การทำเป็นของผสมไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

การใช้เทคนิคไมโครอิมัลชัน เป็นการกระจายของอนุภาคของเหลวที่แขวนลอยในตัวกลางของเหลวอีกชนิดหนึ่งอย่างสมดุล ด้วยการผสมน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่สั้น เช่น เมทานอล หรือเอทานอล ซึ่งของเหลวทั้งสองชนิดไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแต่จะกระจายตัวอยู่ได้ด้วยสารลดแรงตึงผิว วิธีนี้สามารถปรับปรุงลักษณะที่เป็นละอองฝอยจากหัวฉีด เนื่องจากตัวทำละลายมีจุดเดือดต่ำเมื่อเทียบกับน้ำมันพืชและพบว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันพืชที่ผสมเมทานอลจะได้เชื้อเพลิงที่มีสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซล

3) การสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อน (Pyrolysis)

ปฏิกิริยาการสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อน คือ การเปลี่ยนแปลงสารจากชนิดหนึ่งไปเป็นอีกชนิดหนึ่ง โดยให้ความร้อน และตัวเร่งปฏิกิริยาโดยไม่มีแก๊สออกซิเจนหรืออากาศ เพื่อทำให้น้ำมันทีมีโมเลกุลใหญ่แตกเป็นโมเลกุลที่เล็กลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนั้นซับซ้อนและสามารถเกิดเป็นสารได้หลายๆ ชนิดพร้อมกัน

4) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือเอทานอล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) ของกรดไขมัน และ กลีเซอรอล เป็นผลิตภัณฑ์ร่วมของปฏิกิริยา ตัวเร่งปฏิกิริยามีทั้งที่เป็นสารเคมี และตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นต้น และตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด เช่นกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ได้แก่ เอนไซม์ไลเพส เป็นต้น

CH_2OOCR_1			R_1COOR'		CH_2	OH
$CH\ OOCR_2$	+ 3R'OH	⟷	R_2COOR'	+	CH	OH ...(2.7)
CH_2OOCR_3			R_3COOR'		CH_2	O

การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเกิดช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังต้องใช้อุณหภูมิสูง และใช้เวลานานกว่าจึงจะเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามถ้ากลีเซอไรด์มีส่วนประกอบของกรดไขมันอิสระและน้ำอยู่มาก การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดจะดีกว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กรดที่ใช้ควรเป็นกรดซัลฟิวริก กรดฟอสโฟริก กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลโฟนิกของสารอินทรีย์ Tashtoush และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนไขสัตว์ที่ใช้แล้วไปเป็นอัลคิลเอสเทอร์ โดยใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อใช้เอทานอลมากเกินพอ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเกิดเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 78 โดยน้ำหนัก

การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทั่วไปเบสที่นิยมใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์เนื่องจากมีราคาถูก การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเกิดการกัดกร่อนน้อยกว่ากรด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการใช้เบสและกรดในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสจะสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่ากรด ดังนั้นจึงมักนิยมใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์นั้นมีข้อจำกัดคือ กลีเซอไรด์ และแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะต้องมีน้ำในโมเลกุลน้อยที่สุด เนื่องจากน้ำจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (saponification) ทำให้เกิดสบู่ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตเอสเทอร์ลดลง และทำให้การแยกกลีเซอรอลออกจากเอสเทอร์ยากขึ้นอีกด้วย

การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

แม้ว่าการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั้นจะได้ปริมาณอัลคิล-เอสเทอร์มากและใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยก็ตาม แต่การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยายังมีข้อเสียอยู่มาก เช่น เกิดสบู่ในปฏิกิริยา การแยกกลีเซอรอลออกจากปฏิกิริยาทำได้ยาก จึงทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการแยกผลิตภัณฑ์ การบำบัดน้ำเสียที่เป็นสารเคมีซึ่งส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม และข้อจำกัดของปริมาณกรดไขมันและน้ำที่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาอีกด้วย

อย่างไรก็ตามการใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์มีข้อจำกัดในการผลิตไบโอดีเซลคือ จำเป็นต้องใช้น้ำมันที่มีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาต้องไม่มีน้ำในปริมาณมาก ซึ่งปฏิกิริยา ไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันนั้นสามารถผลิตไบโอดีเซลได้โดยไม่มีผลกระทบจากข้อจำกัดดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาการใช้ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยกกที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล

ข้อดีของการใช้ไลเพสเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมีที่เป็นเบสแสดงได้ดังตารางที่ 2.2 (Fukuda และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส และไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล

	กระบวนการที่ใช้เบสเร่ง	กระบวนการที่ใช้ไลเพสเร่ง
อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
กรดไขมันอิสระที่อยู่ในวัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์สบู่	อัลคิลเอสเทอร์
น้ำที่อยู่ในวัตถุดิบ	รบกวนปฏิกิริยา	ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา
ปริมาณของอัลคิลเอสเทอร์	ปกติ	สูงกว่า
การเก็บกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำให้อัลคิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	ไม่มี
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ถูก	ค่อนข้างแพง

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ting และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ใช้เอนไซม์และกรดในการเร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอล โดยใช้ไลเพสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสในภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน พบว่าเมื่อใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 จะได้ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 99 หลังจากผ่านไปเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Nie และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการตรึงไลเพส *Candida rugosa* ลงบนเยื่อฝ้ายบางโดยใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพ และนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสำหรับการสังเคราะห์ไบโอดีเซล ในระบบต่อเนื่องโดยใช้สับเสตรตที่แตกต่างกันคือ น้ำมันสลัด น้ำมันพืช และน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว กับเมทานอล โดยเติมเมทานอลแบบสามขั้น พบว่าน้ำมันสลัดให้ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลสูงสุดถึงร้อยละ 96 น้ำมันพืช และน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้วให้ผลิตภัณฑ์ไบโอดีเซลร้อยละ 90 และ 92 ตามลำดับ และไลเพสตรึงรูปนั้นมีอายุการใช้งานได้มากกว่า 10 วัน และมีข้อดีคือเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และไม่เสียค่าใช้จ่ายสูง

Yujun และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการตรึงไลเพส *Candida rugosa* ลงบนบริเวณผิวของเยื่อกรองพอลิซัลโฟนโดยการกรอง แล้วทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ หลังจากนั้นนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของน้ำมันมะกอก และตรวจสอบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นในชั้นของเหลวต่อนาที และต่อพื้นผิวของเยื่อพอลิซัลโฟน พบว่าการตรึงด้วยวิธีการดังกล่าวช่วยพัฒนาอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่อพื้นที่ผิวของเยื่อพอลิซัลโฟน และช่วยยืดอายุการใช้งานของเอนไซม์ให้มีแอคติวิตีนานขึ้น พบว่าเกิดปฏิกิริยาได้ปริมาณกรดไขมันอิสระสูงสุด 0.89 ไมโครโมลต่อตารางเซนติเมตรต่อนาที

Huang และคณะ (2008) ได้มีการศึกษาการตรึงไลเพส *Candida rugosa* ใช้เมมเบรนที่ทำจากเส้นใยนาโนโคพอลิเมอร์ระหว่างพอลิอะคริโลไนไทรล์กับ 2-ไฮดรอกซีเอทิลเมทาคริเลตในการตรึงไลเพสด้วยพันธะโควาเลนต์ แล้วนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส พบว่าเอนไซม์ไลเพสมีเสถียรภาพมากขึ้น และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 3.6

Lee และคณะ (2006) ได้มีการศึกษาการตรึงไลเพส *Rhizopus oryzae* ลงบนซิลิกาเจลที่ผ่านการแอคติเวตโดย 3-อะมิโนโพรพิวไทรเอทอกซีไซเลน ความเข้มข้นร้อยละ 15 ในอะซิโตนแล้วทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 20 องศา เป็นเวลา 120 นาที พบว่าเมื่อนำไปใช้งานอย่างต่อเนื่อง 20 ครั้ง เอนไซม์ยังคงรักษาแอคติวิตีได้ถึงร้อยละ 80

Oh และคณะ (2007) ได้มีการศึกษาการตรึงไลเพส *Candida rugosa* ลงบนเม็ดพอลิ-ไวนิลแอลกอฮอล์ที่มีขนาดไมโครเมตร ด้วยวิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ พบว่าไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีดังกล่าวมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิ สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าไลเพสอิสระ หลังจากผ่านการใช้ซ้ำถึง 10 รอบ พบว่ายังคงรักษาแอคติวิตีได้มากกว่าร้อยละ 50 ของแอคติวิตีเริ่มต้น

Iqbal และคณะ (2005) ได้มีการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ลงบนตัวค้ำจุนที่ได้จากเส้นใยของต้นมะละกอพบว่าเอนไซม์สามารถรักษาแอคติวิตี และเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน เอนไซม์ยังคงรักษาแอคติวิตีได้สูงถึงร้อยละ 95 และไม่เกิดการสลายตัวระหว่างการใช้งาน

ปิยะนันท์ (2007) ได้ตรึงไลเพส *Candida rugosa* บนเส้นใยกกบดละเอียดโดยวิธีดูดซับทางกายภาพแล้วนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอล พบว่าได้ไบโอดีเซลร้อยละ 48.8 และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 1 ครั้ง เมื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็น ไบโอเอทานอลพบว่าได้ไบโอดีเซลสูงถึงร้อยละ 51.3 และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 2 ครั้ง

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและสารเคมี

3.1.1 วัสดุ

รายละเอียดของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 วัสดุและที่มาของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุ	**ผู้ผลิต/ผู้แทนจำหน่าย**
เอนไซม์ไลเพส (Lipase(EC3.1.1.3)) (*Candida rugosa*)	Sigma-Aldrich, SN 31K1842, สหรัฐอเมริกา
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	มรกต อินดัสตรี้ส์ จำกัด, ประเทศไทย
เส้นใยกกแห้ง (*Scirpus grossus* L.f.) ใช้เป็นตัวค้ำจุน	นครราชสีมา, ประเทศไทย

3.1.2 สารเคมี

รายละเอียดของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ชนิดของสารสารเคมี หน้าที่ และที่มาของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	**หน้าที่**	**รุ่น (ยี่ห้อ)/เกรด/ผู้แทนจำหน่าย**
ไบโอเอทานอล (bioethanol)	เป็นสับสเตรต	ได้รับความอนุเคราะห์จากการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย (ปตท.), ประเทศไทย
โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	เมิร์ก, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
สารวิเคราะห์แบรดฟอร์ด (Bradford reagent)	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Bio-rad
พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต (p-nitrophenyl palmitate)	วัดแอคติวิตี	Sigma-Aldrich, เกรดมาตรฐาน, สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 3.2 ชนิด หน้าที่ และที่มาของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	หน้าที่	ยี่ห้อ/เกรด/ผู้แทนจำหน่าย
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แอนไฮดรัส (di-potassium hydrogen phosphate anhydrous)	บัฟเฟอร์	Scharlau, เกรดวิเคราะห์, ราชอาณาจักรสเปน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassim dihydrogen phosphate)	บัฟเฟอร์	เมิร์ก, เกรดวิเคราะห์, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)	เป็นสารกระตุ้น (activator)สำหรับตรึงเอนไซม์	Fluka, สหรัฐอเมริกา
กลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 ในน้ำ (glutaraldehyde 50% in water)	เป็นสารเชื่อมขวางสำหรับการตรึงเอนไซม์	Fluka, สหรัฐอเมริกา
โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)	วัดแอคติวิตี	Ajax, Finechem, ออสเตรีย
บัฟเฟอร์ทริส (tris-HCl)	วัดแอคติวิตี	Scharlau, เกรดวิเคราะห์, ราชอาณาจักรสเปน
อะซิโตไนไตร์ล (acetonitrile)	เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	แล็ปสแกน, เกรด HPLC, SN C 2502 U, ประเทศไทย
2-โพรพานอล (2-propanol)	เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	แล็ปสแกน, เกรด HPLC, SN C 2502 U, ประเทศไทย
เฮกเซน (hexane)	เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	แล็ปสแกน, เกรด HPLC, SN C 2502 U, ประเทศไทย
กรดฟอร์มิก (formic acid)	เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	Scharlau, เกรดวิเคราะห์, ราชอาณาจักรสเปน

ตารางที่ 3.2 ชนิด หน้าที่ และที่มาของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	**หน้าที่**	**ยี่ห้อ/เกรด/ผู้จำหน่าย**
อีโคเซน (Eicosane)	สารมาตรฐาน เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	Sigma-Aldrich, เกรดมาตรฐาน, สหรัฐอเมริกา
เฮปเทน (heptane)	ตรึงเอนไซม์	แล็ปสแกน, เกรดวิเคราะห์, ประเทศไทย

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ชนิดของเครื่องมือและอุปกรณ์ รุ่น และที่มาของอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือ/อุปกรณ์	**รุ่น**	**บริษัทผู้ผลิต/ผู้แทนจำหน่าย**
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง	PA4102	Sartorius, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง	PA214	Ohaus, สหรัฐอเมริกา
ออโต้ปิเปต (autopipette)	adjustable-volume	Labnet, ประเทศไทย
เครื่องบดละเอียด (pulverizer)	T15	Fritsch, สหพันธ์สาธรณรัฐเยอรมนี
เครื่องกวน (rotator mixer)	Finepcr	Bio-Active, ประเทศไทย
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate spectrophotometer)	Zenyth 200	ANTHOS, สหรัฐอเมริกา
เครื่องปั่นกวนพร้อมอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ		T.S. Instrument, ประเทศไทย
เครื่องทำความร้อนแบบอัตโนมัติ (ใช้กับเครื่องปั่นกวนพร้อมอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ)	HMT200	Heto, เดนมาร์ก

ตารางที่ 3.3 ชนิดของเครื่องมือและอุปกรณ์ รุ่น และที่มาของอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

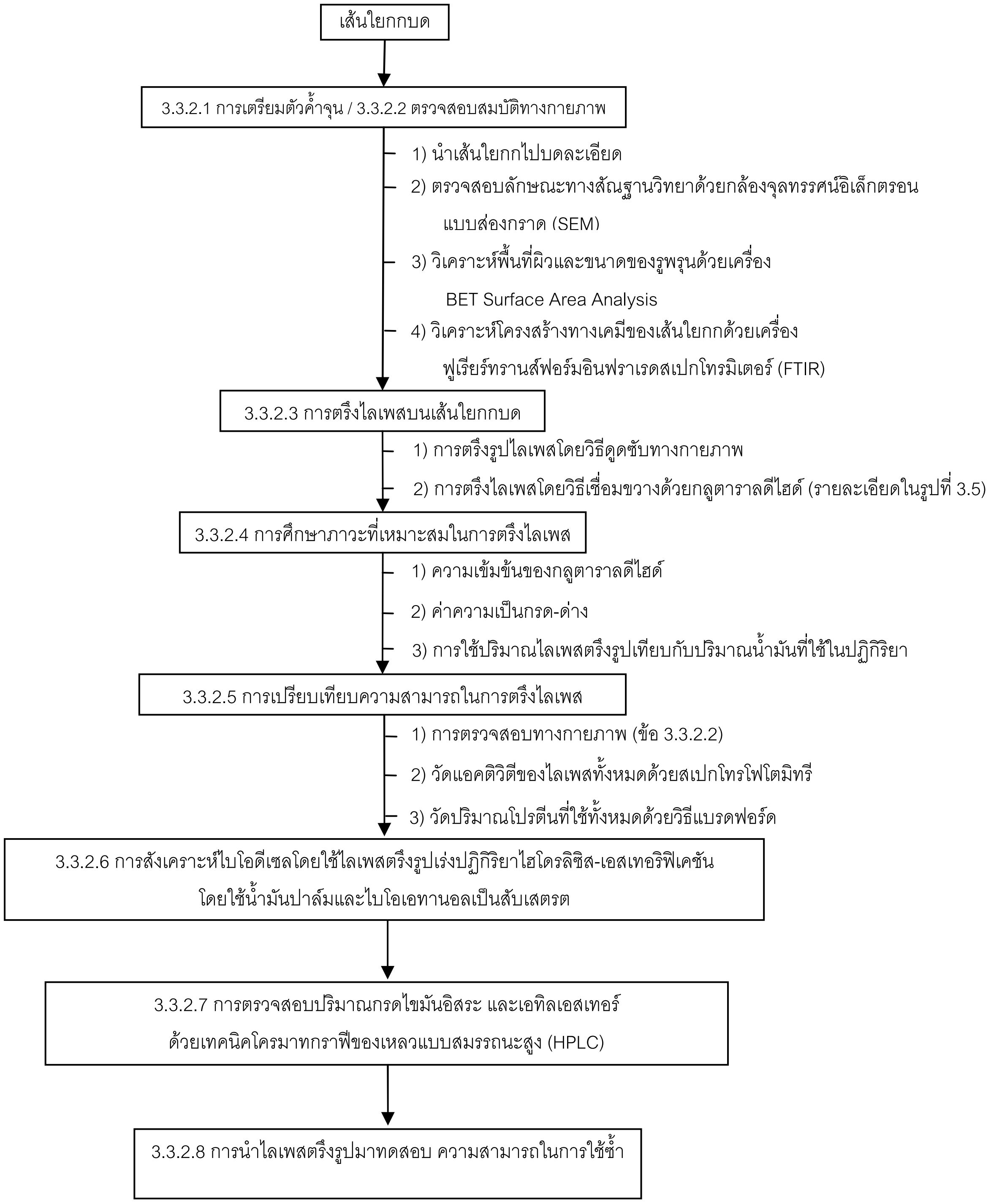
อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต/ผู้แทนจำหน่าย
เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro refrigerated centrifuge)	3700	Kubota, ญี่ปุ่น
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)	LC-20A reries	Shimadzu, ญี่ปุ่น
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)	JSM-5800LV	JEOL, ญี่ปุ่น
เครื่องวิคราะห์พื้นที่ผิว (BET surface area analyzer)	SA3100	BECKMAN COULTER
เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrometer: FTIR)	Spectrum One	Perkin Elmer

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 ขอบเขตการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดโดยใช้สารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์และค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อแอคติวิตีของไลเพสตรึงรูปและประสิทธิภาพการตรึงไลเพส ปริมาณโปรตีนที่ใช้ ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเพสตรึงรูป ตรวจสอบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) และการนำมาใช้ซ้ำของไลเพสตรึงรูปที่เตรียมได้จากการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับไบโอเอทานอล

ขั้นตอนในการทดลองสำหรับงานวิจัยนี้ แสดงได้ด้วยแผนภาพดังรูปที่ 3.1 โดยมีรายละเอียดของขั้นตอนดังนี้



รูปที่ 3.1 แผนภาพการดำเนินงานวิจัย

3.3.2 วิธีการทดลอง

3.3.2.1 การเตรียมตัวค้ำจุนจากเส้นใยกก

นำเส้นใยกกที่ตากแห้งแล้วไปบดด้วยเครื่องบดละเอียด (pulverizer รุ่น T15) โดยใช้ตะแกรงเบอร์ 0.25 ได้เส้นใยกกที่มีลักษณะเป็นผงละเอียด

3.3.2.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของเส้นใยกกบดก่อนและหลังตรึงไลเพส

1) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

นำเส้นใยกกบดก่อนและหลังการตรึงไลเพสมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV ดังแสดงในรูป 3.2 เพื่อตรวจดูลักษณะพื้นผิวของเส้นใยและลักษณะการเกาะติดของไลเพสหลังจากผ่านการตรึงรูป โดยก่อนทำการตรวจสอบต้องนำเส้นใยกกบดไปเคลือบผิวด้วยทองคำ ใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ ที่กำลังขยาย 750 และ 2000 เท่าภายใต้ภาวะสุญญากาศ

รูปที่ 3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800

2) วิเคราะห์พื้นที่ผิว (BET surface area) **และขนาดของรูพรุน** (pore diameter) **ด้วยเครื่อง** BET Surface Area Analyzer

วิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer อาศัยหลักการโดยให้สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ดูดซับก๊าซไนโตรเจนหรือก๊าซบางชนิดบริเวณผิวหน้าและสามารถแทรกซึมเข้าไปทั่วบริเวณของรูพรุนได้ ซึ่งเทคนิคที่เลือกใช้นี้เป็นเทคนิคที่ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นสารถูกดูดซับ โดยการทดสอบจะแสดงผลเป็น adsorption isotherm ซึ่งเป็นกราฟระหว่าง ปริมาตรของก๊าซที่ถูกดูดซับที่เพิ่มขึ้นกับความดัน

สัมพัทธ์ (p/p0) ของสารตัวอย่าง ในการทดสอบจะมีโพรบ (probe) ใส่สารตัวอย่าง 2 โพรบ โพรบหนึ่งใส่สารตัวอย่างที่ต้องการวัดส่วนอีกโพรบไม่ต้องใส่สารตัวอย่างใช้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบ ขั้นตอนการทดสอบในขั้นแรกคือให้ความร้อนกับสารตัวอย่างเพื่อไล่ความชื้นและโมเลกุลของสารถูกดูดซับอื่นๆ ออกไปเพื่อให้แน่ใจว่าผิวหน้าของสารที่ต้องการวิเคราะห์ไม่มีโมเลกุลของสารถูกดูดซับที่เหลือค้างบริเวณนั้น จากนั้นทำให้เป็นสุญญากาศเพื่อทำให้ภายในโพรบไม่มีโมเลกุลของก๊าซชนิดอื่น แล้วทำการทดสอบที่ภาวะอุณหภูมิต่ำ (cryogenic bath) โดยใช้ไนโตรเจนเหลว การทดสอบทำโดยให้ก๊าซไนโตรเจนผ่านเข้ามาในโพรบทั้งสองที่ความดันค่าหนึ่ง เมื่อผ่านก๊าซไนโตรเจนเข้ามาในโพรบที่มีสารตัวอย่าง โมเลกุลของก๊าซไนโตรเจนจะถูกดูดซับด้วยสารตัวอย่างทำให้ความดันภายในโพรบลดลงจนกระทั่งคงที่ ในขณะที่โพรบสารตัวอย่างที่ไม่มีสารตัวอย่าง ความดันจะไม่ลดลง เครื่องจะทำการบันทึกผลที่ได้ จากนั้นเครื่องจะปล่อยก๊าซไนโตรเจนเข้ามาอีกเช่นเดียวกับครั้งแรกเป็นเช่นนี้ไปจนกระทั่งความดันภายในโพรบที่มีสารตัวอย่างไม่ลดลง แสดงว่าไม่เกิดการดูดซับก๊าซไนโตรเจนอีกแล้ว เครื่องจะแสดงผลเป็น adsorption isotherm และทำการคำนวณออกมาเป็นขนาดของรูพรุนและ BET surface area (ศุภรัตน์, 2546)

ในการวิเคราะห์พื้นที่ผิว (BET surface area) และขนาดของรูพรุนด้วยเครื่องตรวจสอบพื้นที่ผิว (BET surface area analyzer) รุ่น SA3100 ของบริษัท BECKMAN COULTER ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยให้ความร้อนแก่เส้นใยในบรรยากาศก๊าซฮีเลียมที่มีอัตราการไหลเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อไล่น้ำที่อยู่ที่ผิวหน้าของเส้นใยออกไป จากนั้นทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง โดยชั่งน้ำหนักของเส้นใยและบันทึกข้อมูลลงในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ นำโพรบเส้นใยตัวอย่างใส่ลงในส่วนที่สองหรือส่วนดูดซับ ซึ่งมีไนโตรเจนเหลวบรรจุอยู่ในภาชนะ (dewar) จากนั้นสั่งเครื่องให้เริ่มทดสอบ ภาชนะที่บรรจุไนโตรเจนเหลวจะถูกยกขึ้นเพื่อให้โพรบเส้นใยตัวอย่างแช่อยู่ในไนโตรเจนเหลว โดยต่อโพรบเส้นใยตัวอย่างเข้ากับส่วนที่ทำสุญญากาศ ไนโตรเจนจะถูกดูดซับที่ -196 องศาเซลเซียส ที่ความดันย่อยของไนโตรเจนค่าต่างๆ ในหน่วยปริมาตร เครื่องจะทำการบันทึกค่าความดันที่ได้จนกระทั่งความดันภายในโพรบเส้นใยไม่ลดลง เครื่องจะแสดงผลเป็น adsorption isotherm และทำการคำนวณออกมาเป็น BET surface areaและขนาดของรูพรุน

รูปที่ 3.3 เครื่องวิเคราะห์พื้นที่ผิว (BET Surface Area Analyzer)

3) วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดยใช้เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR)

การตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันของเส้นใยกกที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการปรับสภาพด้วยเครื่อง FTIR ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum One โดยทำการทดสอบด้วยโหมด transmission ในช่วง wavenumber 4000 – 400 cm^{-1} จำนวนรอบของการสแกนเท่ากับ 16 ซึ่งเส้นใยที่นำมาทดสอบนั้นมีลักษณะเป็นผง ดังนั้นต้องเตรียมชิ้นทดสอบโดยผสมกับ KBr แล้วบรรจุลงในภาชนะที่ใช้เตรียมตัวอย่างพร้อมลูกบด เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้เวลาประมาณ 30 วินาที แล้วอัดเป็นแผ่นวงกลมบางๆ จากนั้นนำไปบรรจุลงในที่ยึดชิ้นตัวอย่างของเครื่อง ทำการสแกนที่ช่วง wavenumber และจำนวนสแกนที่เท่ากัน นำกราฟที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปของเส้นกกบดก่อนและหลังการตรึงรูปไลเพส

รูปที่ 3.4 เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum One

3.3.2.3 **การตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบด**

วิธีตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดในงานวิจัยนี้มี 2 วิธีหลัก

1) **การตรึงไลเพสโดยใช้วิธียึดติดด้วยการดูดซับทางกายภาพ**

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรึงไลเพสด้วยวิธียึดติดด้วยการดูดซับทางกายภาพ 2 วิธี คือมีการใช้สารตัวกลางที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่เฮปเทน และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก. **<u>การใช้เฮปเทนเป็นสารตัวกลาง</u>** (Yang และคณะ, 2006)

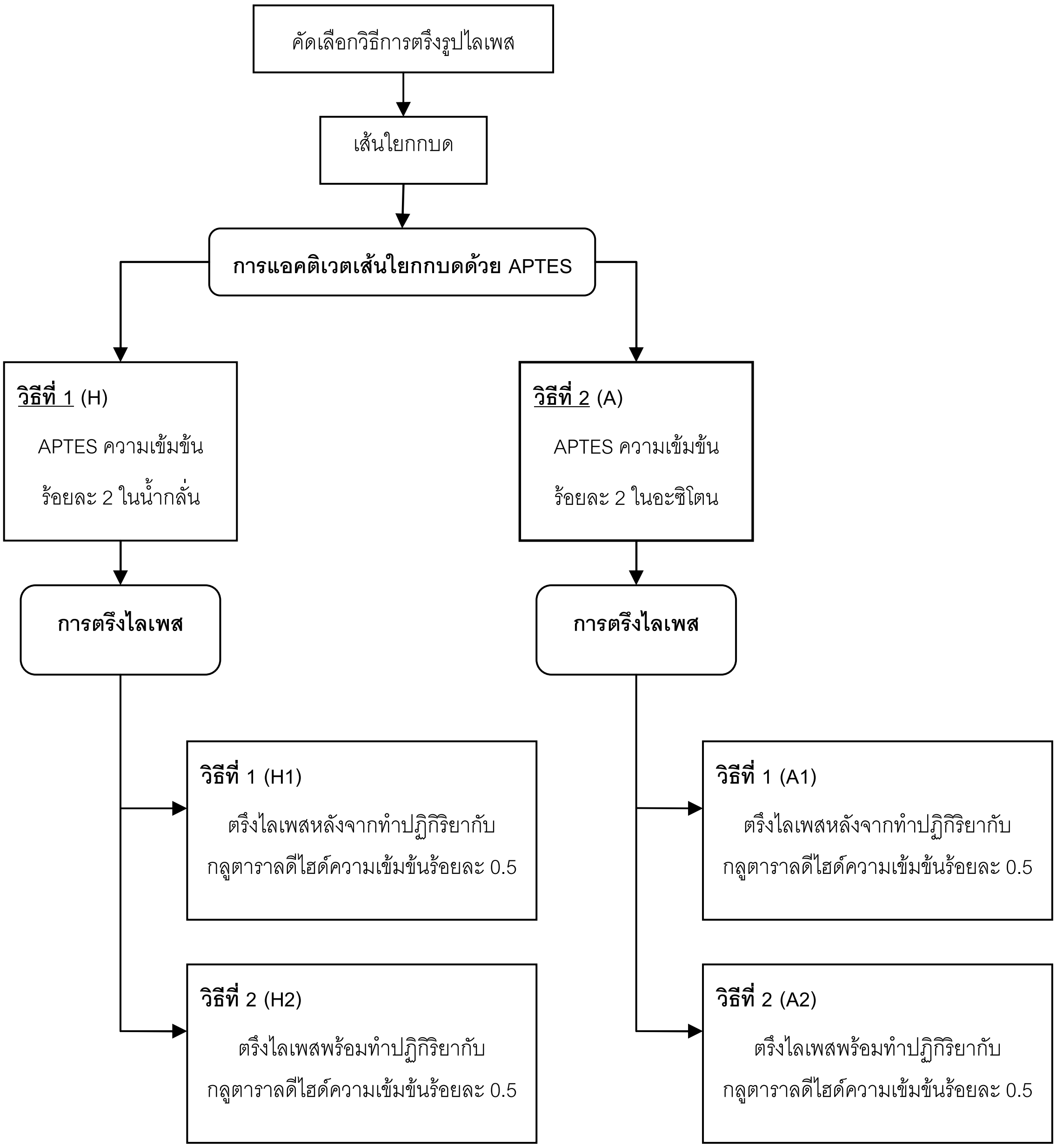
ผสมเส้นใยกกบด 0.5 กรัม ไลเพส 0.25 กรัม และเฮปเทน 10 มิลลิลิตรพร้อมทั้งกวนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องกวน และล้างไลเพสตรึงรูปด้วยเฮปเทน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไลเพสตรึงรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาศหลังจากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในเดซิกเคเตอร์เป็นเวลา 1 คืน

ข. **<u>การใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารตัวกลาง</u>** (Takac และ Bakkal, 2007)

ผสมเส้นใยกกบด 0.5 กรัม และสารละลายไลเพสความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วกวนที่ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างไลเพสตรึงรูปด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7) จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไลเพสตรึงรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในเดซิกเคเตอร์ เป็นเวลา 1 คืน

2) **การตรึงไลเพสโดยใช้วิธีการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์**

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรึงไลเพสโดยใช้วิธีการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ โดยมีขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือ การแอคติเวตเส้นใยกกบดด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) และขั้นตอนต่อมาคือ การตรึงไลเพส แสดงรายละเอียดของขั้นตอนได้ด้วยแผนภาพดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แผนภาพของขั้นตอนการตรึงไลเพสโดยใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์

ก. <u>การแอคติเวตเส้นใยกกบดด้วย APTES</u>

การแอคติเวตเส้นใยกกบดด้วย APTES ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือวิธีการเตรียมสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น และวิธีการเตรียมสารละลาย APTES ในอะซิโตน โดยมีรายละเอียดดังนี้

<u>**วิธีที่**1 (H)</u> แอคติเวตเส้นใยกกบดด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น

ผสมเส้นใยกกบด 5 กรัม ในสารละลาย APTES ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในน้ำกลั่น ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกวนที่ความเร็วรอบ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำเส้นใยไปกรองแบบสุญญากาศ จากนั้นนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

<u>**วิธีที่ 2 (A)**</u> แอคติเวตเส้นใยกกบดด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน

ผสมเส้นใยกกบด 5 กรัม ในสารละลาย APTES ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในอะซิโตน ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกวนที่ความเร็วรอบ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำเส้นใยไปกรองแบบสุญญากาศ จากนั้นนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ข. <u>การตรึงไลเพสโดยใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์</u>

การตรึงไลเพสโดยใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้ที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ และการตรึงไลเพสพร้อมทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

<u>**วิธีที่ 1 (H1 หรือ A1)**</u> ตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์

นำเส้นใยกกบดที่ผ่านการแอคติเวตด้วย APTES ความเข้มข้นร้อยละ 2 (H หรือ A) หนัก 1 กรัม มาทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7) กวนที่ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง กรองเส้นใยแบบสุญญากาศ และเก็บไว้ในเดซิกเคเตอร์ หลังจากนั้นนำเส้นใยกกบดที่ได้จากกระบวนการข้างต้น หนัก 0.5 กรัม ผสมกับสารละลายไลเพสใน 1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7) ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร กวนที่ความเร็วรอบ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างไลเพสตรึงรูปด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7) จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไลเพสตรึงรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในเดซิกเคเตอร์เป็นเวลา 1 คืน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>**วิธีที่ 2 (H2 หรือ A2)**</u> ตรึงไลเพสพร้อมทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์

นำเส้นใยกกบดที่ผ่านการแอคติเวตด้วย APTES ความเข้มข้นร้อยละ 2 (H หรือ A) ปริมาณ 0.5 กรัม ผสมกับสารละลายไลเพส 1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7

ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเติมกลูตาราลดีไฮด์ 100 ไมโครลิตร กวนที่ความเร็วรอบ 360 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างไลเพสตรึงรูปด้วย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7) จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไลเพสตรึงรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาส หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในเดซิกเคเตอร์ เป็นเวลา 1 คืน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หลังจากตรึงรูปไลเพสในข้อ 3.3.2.3 แล้ว นำสารละลายไลเพส และน้ำล้างที่ได้ ไปทำการทดสอบหาประสิทธิภาพการตรึงไลเพสของเส้นใยกกบด โดยคำนวณหาค่าโปรตีนที่ใช้ (protein loading) ดังสมการที่ 3.1 และร้อยละของประสิทธภาพการตรึง (% immobilization efficiency) ดังสมการที่ 3.2 หาค่าแอคติวิตีของไลเพสก่อนและหลังตรึงรูป นอกจากนี้ยังนำไลเพสตรึงรูปที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซลต่อไป

3.3.2.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไลเพสด้วยวิธีเชื่อมขวาง (วิธี H1)

1) ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ ร้อยละ 0.2, 0.5, และ 0.8
2) ปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่าง 5, 7, และ 9
3) ปรับเปลี่ยนปริมาณไลเพสตรึงรูปที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน ร้อยละ 3.33, 10, และ 20 โดยเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้เป็นสับสเตรต 100 ส่วน

3.3.2.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไลเพสของเส้นใยกกบด

1) ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ (ดังข้อ 3.3.2.2)
2) วัดค่าแอคติวิตีของไลเพสทั้งหมด (total activity)
   นำสารละลายไลเพส และน้ำล้าง ที่ได้จากข้อ 3.3.2.3 มาวัดค่าแอคติวิตีของไลเพสทั้งหมดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตมิทรี (Hung และคณะ, 2003)

3) วัดปริมาณโปรตีนที่ใช้ (protein loading)

นำสารละลายไลเพส และน้ำล้าง ที่ได้จากข้อ 3.3.2.3 มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford (Bradford, 1976) (ภาคผนวก ก) โดยปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละของประสิทธิภาพการตรึง สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.1 และ 3.2

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ = $(C_0V_0 - C_fV_f) / W_g$ ...3.1

กำหนดให้ C_0 = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

C_f = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเพสหลังการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายไลเพส (มิลลิลิตร)

V_f = ปริมาตรของสารละลายหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)

W_g = น้ำหนักของไลเพสตรึงรูป (กรัม)

ร้อยละของประสิทธิภาพการตรึง = $(E_0V_0 - E_fV_f)/E_0V_0 \times 100$ ...3.2

กำหนดให้ E_0 = แอคติวิตีเริ่มต้นของสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

E_f = แอคติวิตีทั้งหมดของสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายไลเพส (มิลลิลิตร)

V_f = ปริมาตรทั้งหมดหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)

3.3.2.6 การสังเคราะห์ไบโอดีเซล (เอทิลเอสเทอร์) โดยใช้ไลเพสตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันที่มีน้ำมันปาล์ม และไบโอเอทานอลเป็นสับสเตรต

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับไลเพสอิสระหรือไลเพสตรึงรูปที่ได้จากข้อ 3.3.2.3 เติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำมากวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที เพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากผ่านไป 12 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ จากนั้นทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันต่อด้วยการเติมไบโอเอทานอลแบบ 3 ขั้น โดยขั้นแรกให้เติมไบโอเอทานอลทันทีหลังจากที่ได้เก็บตัวอย่างที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนขั้นที่ 2 และขั้นที่ 3 ให้เติมไบโอเอทานอลทันทีในชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 24 ให้เก็บตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์

3.3.2.7 การตรวจสอบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์

ตรวจสอบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระและเอทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อยืนยันความสามารถของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำมันที่เก็บได้จากการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลในข้อ 3.3.2.6 ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกให้กลีเซอรอลตกลงมาอยู่ชั้นล่าง เตรียมสารละลายของตัวอย่างที่แยกออกมาจากกลีเซอรอลโดยละลายด้วยคลอโรฟอร์มและเจือจางให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ไมโครลิตร เติมอิโคเซนเพื่อใช้เป็น internal standard 10 ไมโครลิตร กรองและฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

ร้อยละของการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระ (% conversion (FFA)) คำนวณได้โดยแทนค่าที่ได้จากโครทาโทรแกรมของ HPLC ในสมการที่ 3.3

$$\%\ \text{conversion (FFA)} = \frac{\text{FFA} \times 100}{3[\text{TAG}] + 2[\text{1,2 DAG}] + 2[\text{1,3 DAG}] + [\text{MAG}] + [\text{FFA}]} \quad \text{……... 3.3}$$

เมื่อ % conversion (FFA) คือ ร้อยละการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระ

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

[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

ร้อยละของการเปลี่ยนเป็นเอทิลเอสเทอร์ (% conversion (FAEE) คำนวณได้โดยแทนค่าที่ได้จากโครทาโทรแกรมของ HPLC ในสมการที่ 3.4

$$\% \text{ conversion (FAEE)} = \frac{[FAEE] \times 100}{3[TAG] + 2[1,3\ DAG] + 2[1,2\ DAG] + [MAG] + [FFA] + [FAEE]} \quad \text{……... 3.4}$$

เมื่อ % conversion (FAEE) คือ ร้อยละการเปลี่ยนเป็นเอทิลเอสเทอร์

[FAEE] คือ ความเข้มข้นของเอทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากโครมาโทแกรม

[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

2) การเตรียมสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่สำหรับโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

เตรียมสาร 2 ชนิดสำหรับเป็นเฟสเคลื่อนที่ คือสาร A และสาร B โดย สาร A ประกอบด้วย เฮกเซน:ไอโซโพรพานอล:เอทิลแอซีเตต:กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 85 : 10 : 10 : 0.1 โดยปริมาตร สำหรับ สาร B ประกอบด้วย เฮกเซน:กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 100 : 0.2 โดยปริมาตร กำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้เครื่องตรวจสอบชนิด ELSD (Evaporative light scattering detector)

3.3.2.8 **การนำไลเพสตรึงรูปมาทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำ**

นำไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันแล้วในภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา กลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำ โดยทำการกรองเก็บไลเพสตรึงรูปจากปฏิกิริยา ด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ ล้างด้วยเฮปเทน 20 มิลลิลิตร แล้วทำให้แห้งโดยเก็บใน เดซิกเคเตอร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไลเพสตรึงรูปดังกล่าวไปเร่งปฏิกิริยาที่ภาวะเดิมอีกครั้ง ตรวจสอบผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระและเอทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยวิธี HPLC นำไลเพสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ จนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาได้อีก

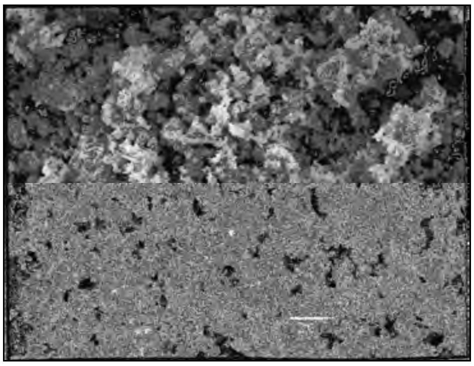
บทที่ 4

ผลการทดลอง

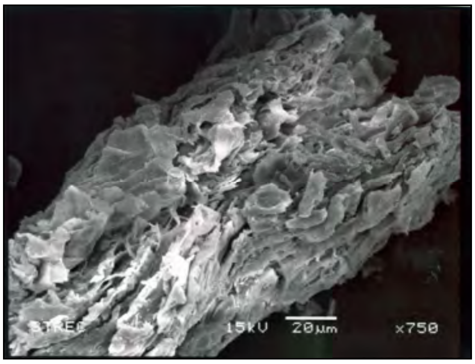
4.1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

4.1.1 ไลเพสอิสระ และเส้นใยกกบดก่อนทำการตรึงไลเพส

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3)) *Candida rugosa* ที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้มีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมขนาดเล็กประมาณ 2-3 ไมโครเมตร จับตัวกันเป็นกลุ่ม ส่วนเส้นใยกกบดนั้นมีลักษณะเป็นเส้นใยที่อัดตัวซ้อนกันอย่างหนาแน่นจำนวนมาก ดังรูปที่ 4.1



(ก)

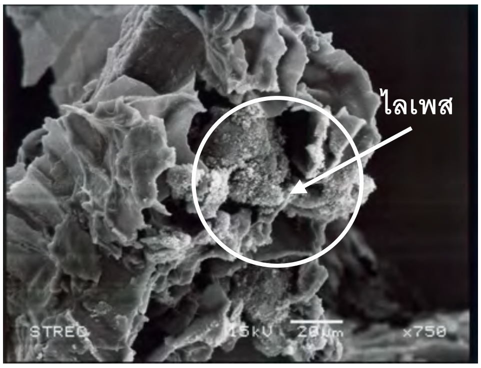


(ข)

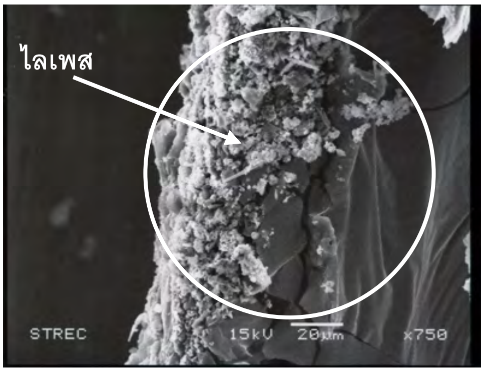
รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 750 (ก) ไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3))(*Candida rugosa*) และ (ข) เส้นใยกกบด

จึงสามารถกล่าวได้ว่าจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยกกบดนั้นมีความเหมาะสมในการนำมาทำเป็นตัวค้ำจุนไลเพส เนื่องจากมีลักษณะที่มีเส้นใยอัดตัวซ้อนกันอยู่หนาแน่น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าไลเพสจะสามารถเข้าไปยึดติดได้ดี ทั้งพื้นผิวภายนอก และบริเวณที่เส้นใยกกอัดตัวซ้อนกันทำให้เกิดช่องว่างที่จะให้ไลเพสสามารถแทรกตัวเข้าไปได้ ประกอบกับขนาดของไลเพสและเส้นใยกกบดนั้นมีความเหมาะสมในการนำมาตรึงไลเพสเนื่องจากไลเพสมีขนาดเล็กเพียงพอที่จะสามารถแทรกตัวเข้าไปภายในช่องว่างระหว่างเส้นใยได้

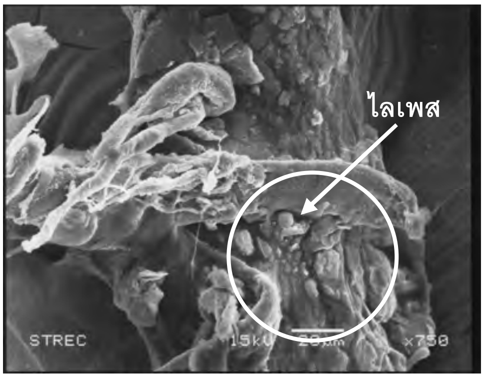
4.1.2 **ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี**



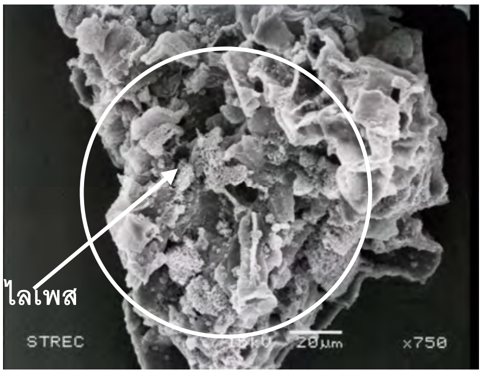
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.2 ลักษณะการยึดติดบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากทำการตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี (ก) H1 (ข) H2 (ค) A1 และ (ง) A2

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี คือ

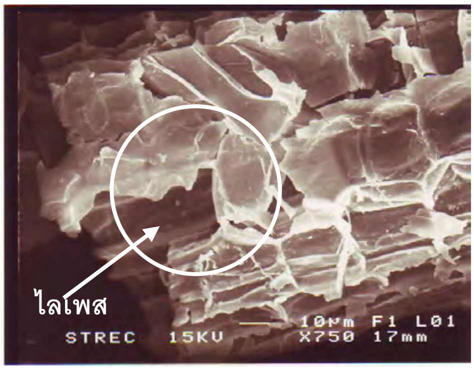
- วิธีการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1)
- วิธีการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H2)
- วิธีการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A1)
- วิธีการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A2)

พบว่าวิธีการตรึงรูปทั้งหมดสามารถใช้ตรึงไลเพสได้ โดยไลเพสสามารถยึดเกาะที่บริเวณผิวเส้นใยและแทรกตัวเข้าไปในช่องว่างระหว่างเส้นใยหลังจากผ่านการตรึงไลเพสด้วยวิธีต่าง ๆ ได้ และพบว่าวิธีการตรึงไลเพสพร้อมทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H2 และ A2) นั้นมีไลเพสยึดเกาะติดบริเวณผิวของเส้นใยจำนวนมาก อาจเนื่องจากกลูตาราลดีไฮด์เชื่อมไลเพสเข้ากับเส้นใยในเวลาเดียวกันทำให้พบไลเพสจำนวนมากซึ่งต่างกับการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H1 และ A1) ที่ทำการเชื่อมขวางก่อน ซึ่งไลเพสอาจไม่ได้เข้าไปเชื่อมขวางด้วยในปริมาณมากเมื่อเทียบกับวิธีการตรึงไลเพสพร้อมทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ ดังรูปที่ 4.2

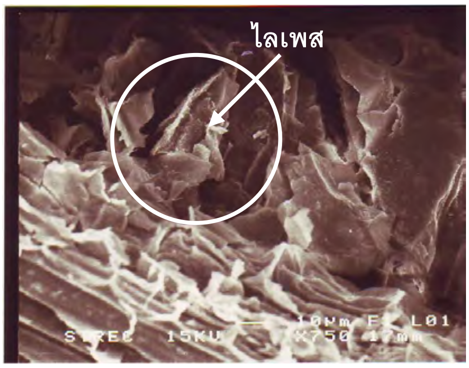
จากการตรวจสอบการนำไปเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลของไลเพสตรึงรูปด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี พบว่าวิธีการตรึงไลเพสหลังจากการทำปฏิกิริยาด้วยกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) เมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันแล้ว สามารถให้กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ในปริมาณมาก และเป็นวิธีที่ให้เอทิลเอสเทอร์สูงที่สุด จึงสามารถกล่าวได้ว่าวิธีการตรึงไลเพสหลังจากการทำปฏิกิริยาด้วยกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) นั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้การตรึงไลเพส และศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันต่อไป

4.1.3 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสโดยใช้การดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์

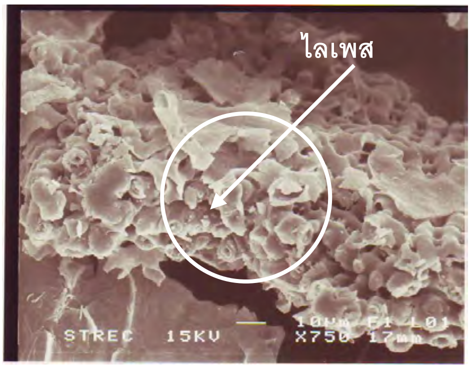
จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยาด้วยกลูตาราลดีไฮด์ โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) ทำการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราล-ดีไฮด์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ ร้อยละ 0.2, 0.5, และ 0.8 ตามลำดับ และตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮกเซน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นที่แตกต่าง ๆ กัน และตรึงรูปไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮกเซน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์นั้นสามารถใช้ตรึงไลเพสได้ โดยพบไลเพสสามารถยึดเกาะที่บริเวณผิวเส้นใยและแทรกตัวเข้าไปในช่องว่างของเส้นใยกกบดที่ผ่านการตรึงที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยสารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮกเซน (NADHEP) หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (NADPB)



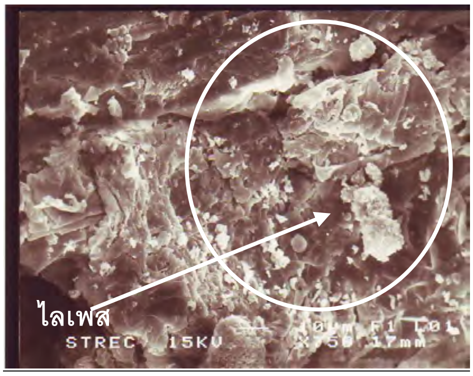
(ก)



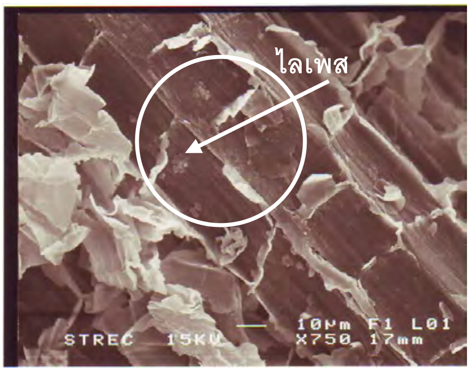
(ข)



(ค)



(ง)

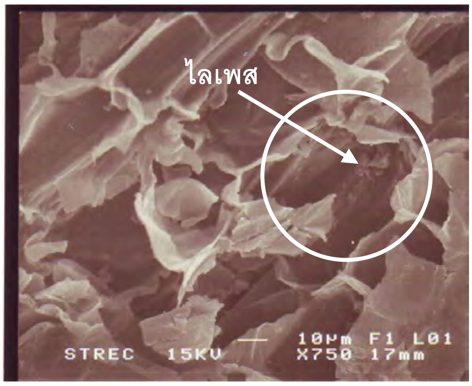


(จ)

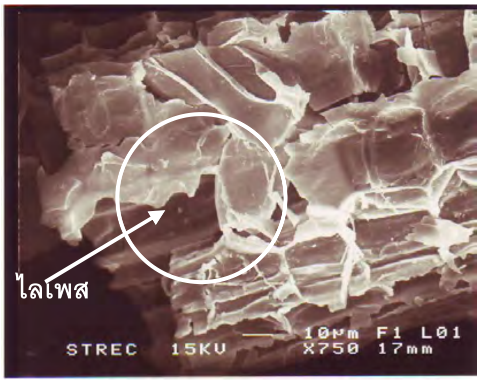
รูปที่ 4.3 การเข้าไปยึดเกาะบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ก) GA 0.2% (ข) GA 0.5% (ค) GA 0.8% (ง) NADHEP และ (จ) NADPB

4.1.4 ค่าความเป็นกรดด่าง

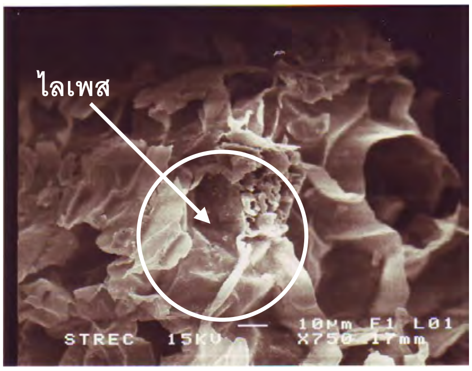
จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน คือ 5, 7, และ 9 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.4



(ก)



(ข)



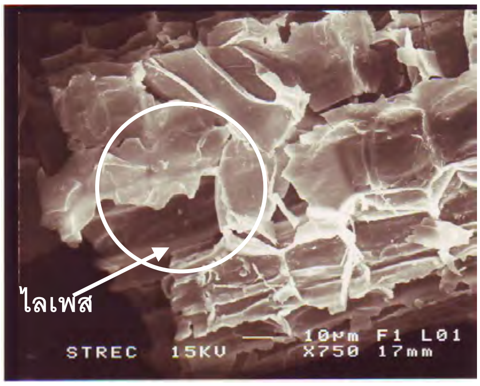
(ค)

รูปที่ 4.4 การเข้าไปยึดเกาะบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันคือ (ก) 5 (ข) 7 และ (ค) 9

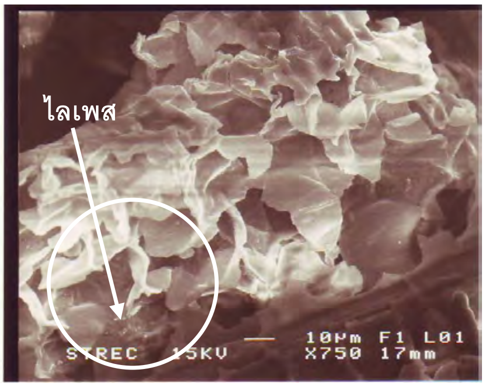
พบว่าเมื่อตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน คือ 5, 7, และ 9 ตามลำดับ นั้นสามารถใช้ตรึงไลเพสได้ โดยพบไลเพสสามารถยึดเกาะที่บริเวณผิวเส้นใยและแทรกตัวเข้าไปในช่องว่างระหว่างเส้นใยกกบดได้ทั้งหมด

4.1.5 ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน

เมื่อนำไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีที่แตกต่างกันข้างต้นมาทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันแล้ว พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 นั้นมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาจึงทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน ดังรูปที่ 4.5



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.5 การเข้าไปยึดเกาะบนเส้นใยกกบดของไลเพส หลังจากตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 (ก) ไลเพสตรึงรูปก่อนทำปฏิกิริยา และ (ข) ไลเพสตรึงรูปหลังเร่งปฏิกิริยา

หลังนำไปเร่งปฏิกิริยาแล้ว พบว่าเส้นใยที่ปกติจะมีลักษณะแข็งตัว มีความอ่อนตัวลงอาจเนื่องจากการสัมผัสกับน้ำมันที่ใช้เป็นสับเสตรตในปฏิกิริยา ซึ่งมีการติดมากับเส้นใยหลังทำปฏิกิริยาเนื่องจากการล้างน้ำมันออกไม่หมด และไลเพสตรึงรูปยังคงมีไลเพสที่ยึดเกาะ แต่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับไลเพสตรึงรูปก่อนนำไปเร่งปฏิกิริยา

4.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงไลเพสของเส้นใยกก

4.2.1 ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราล-ดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี

ตารางที่ 4.1 ค่าแอคติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละประสิทธิภาพของการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี

วิธีการตรึงไลเพส	ค่าแอคติวิตี (ยูนิต/กรัมตัวค้ำจุน)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (%)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
H1	3.31	79.64	84.17
H2	2.73	70.54	69.47

A1	3.22	74.44	81.87
A2	3.03	78.66	77.03

*1 หน่วยยูนิตของไลเพสแอคติวิตี หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อปลดปล่อยพาราไนโตรฟีนอลจากปฏิกิริยา 1 ไมโครโมลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที

จากตารางที่ 4.1 หลังจากตรึงไลเพสด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี แล้วพบว่าการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) มีประสิทธิภาพสูงกว่า การตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H2) คือมีค่าแอคติวิตี 3.31 และ 2.73 ยูนิตต่อกรัมตัวค้ำจุน ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์ตรงต่อประสิทธิภาพการตรึงไลเพส คือเมื่อมีแอคติวิตีสูงประสิทธิภาพการตรึงไลเพสก็สูงด้วยเช่นกัน คือร้อยละ 84.17 และ 69.47 ตามลำดับ

การตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A1) มีประสิทธิภาพสูงกว่าการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A2) คือมีแอคติวิตี 3.22 และ 3.03 ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์ตรงต่อประสิทธิภาพการตรึงไลเพส คือเมื่อมีแอคติวิตีสูงประสิทธิภาพการตรึงไลเพสก็สูงด้วยเช่นกัน คือร้อยละ 81.87 และ 77.03 ตามลำดับ

จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H1 หรือ A1) นั้นมีประสิทธิภาพการตรึงไลเพสสูงกว่าวิธีการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H2 หรือ A2) อาจเนื่องมาจากกลูตาราลดีไฮด์นั้น เมื่อเข้าทำปฏิกิริยาพร้อมกับการตรึงไลเพสอาจเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงเกินไป เนื่องจากกลูตาราลดีไฮด์จะมีลักษณะการยึดจับคล้ายพันธะโควาเลนต์ซึ่งอาจส่งผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้แอคติวิตีลดลงและส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไลเพสให้ลดลงด้วย แต่หากทำการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราล-ดีไฮด์แล้ว มีความเป็นไปได้ที่จะลดความรุนแรงของปฏิกิริยาลง ซึ่งส่งผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์น้อยลงทำให้เอนไซม์ยังคงแอคติวิตีไว้ได้

เมื่อพิจารณาจากปริมาณโปรตีนที่ใช้แล้วพบว่าการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตา-ราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) นั้นมีปริมาณโปรตีนที่ใช้มากกว่าการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H2) คือมีปริมาณโปรตีนที่ใช้ร้อยละ 79.64 และ 70.54 ตามลำดับ แต่ในกรณีของการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A1) นั้นมีปริมาณโปรตีนที่ใช้น้อยกว่าการ

ตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A2) คือมีปริมาณโปรตีนที่ใช้ร้อยละ 74.44 และ 78.66 ตามลำดับ ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ไม่มีความสัมพันธ์กับวิธีในการตรึงไลเพส

เมื่อพิจารณาจากค่าแอคติวิตี ประสิทธิภาพการตรึง และปริมาณโปรตีนที่ใช้สามารถสรุปได้ว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดคือ การตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) เนื่องจากให้ค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงไลเพสด้วยวิธีอื่น

4.2.2 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสที่ใช้การดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จากการศึกษาพบว่าการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) นั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมมากที่สุดในการตรึงไลเพสแล้ว จึงใช้วิธีการตรึงรูปดังกล่าวศึกษาปัจจัยด้านความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ที่แตกต่างกันคือ ความเข้มข้นกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 0.2, 0.5, และ 0.8 ต่อค่าแอคติวิตี ประสิทธิภาพการตรึงไลเพส และปริมาณโปรตีนที่ใช้

จากตารางที่ 4.2 หลังจากตรึงไลเพสโดยใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ที่แตกต่างกันพบว่า ไลเพสตรึงรูปที่ความเข้มข้นกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 0.5 มีประสิทธิภาพสูงกว่าไลเพสตรึงรูปที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.8 กล่าวคือมีค่าแอคติวิตี 3.31, 3.01, และ 2.93 ยูนิตต่อกรัมตัวค้ำจุน ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์ตรงต่อประสิทธิภาพการตรึงไลเพส คือเมื่อมีแอคติวิตีสูงประสิทธิภาพการตรึงไลเพสก็สูงด้วยเช่นกัน คือร้อยละ 84.17, 76.55, และ 74.54 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ค่าแอคติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละประสิทธิภาพของการตรึงไลเพสด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เทียบกับวิธีการดูดซับทางกายภาพ

วิธีการตรึงไลเพส	ค่าแอคติวิตี (ยูนิต/กรัมตัวค้ำจุน)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (%)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
NADHEP	3.24	82.41	82.29
NADPB	3.36	80.05	85.46
GU0.2%	3.01	80.43	76.55
GU0.5%	3.31	79.64	84.17

GU0.8%	2.93	77.73	74.54

* 1 หน่วยยูนิตของไลเพสแอคติวิตี หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อปลดปล่อยพาราไนโตรฟีนอลจากปฏิกิริยา 1 ไมโครโมลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที

จากการตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน พบว่ามีประสิทธิภาพการตรึงไลเพสน้อยกว่าการตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กล่าวคือ มีค่าแอคติวิตี 3.24 และ 3.36 ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์ตรงต่อประสิทธิภาพการตรึงไลเพส คือ เมื่อมีแอคติวิตีสูงประสิทธิภาพการตรึงไลเพสก็สูงด้วยเช่นกัน คือร้อยละ 82.29 และ 85.46 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากค่าแอคติวิตี และประสิทธิภาพการตรึงแล้วสามารถกล่าวได้ว่าวิธีการตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์นั้นมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ อาจเนื่องมาจากความรุนแรงของปฏิกิริยาที่มีผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์จากสารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์นั้นมีสูงกว่าเฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงไลเพสด้วยการดูดซับทางกายภาพ

เมื่อพิจารณาจากปริมาณโปรตีนที่ใช้แล้วพบว่าการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 นั้นมีปริมาณโปรตีนที่ใช้มากที่สุด และมีมากกว่าการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.8 คือมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 80.43, 79.64, และ 77.73 ตามลำดับ เนื่องมาจากสารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์นั้นจะสามารถยึดจับ และทำให้เกิดการรวมตัวเชื่อมพันธะเคมีซึ่งอาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ที่มากขึ้น อาจส่งผลให้มีการเชื่อมขวางในโมเลกุลและทำให้ไลเพสไม่สามารถเข้าไปแทรกตัวภายในเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์ จึงส่งผลสัมพันธ์กลับต่อปริมาณโปรตีนที่ใช้ คือเมื่อใช้กลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นน้อยจะมีปริมาณโปรตีนมาก แต่เมื่อใช้กลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นมากจะมีปริมาณโปรตีนที่ใช้น้อย

ในกรณีของการตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพพบว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้เฮปเทนในการตรึงไลเพสนั้นมีปริมาณโปรตีนมากกว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กล่าวคือมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 82.41 และ 80.05 ตามลำดับ เนื่องมาจากไลเพสสามารถกระจายตัวได้ดีในบัฟเฟอร์ แต่ไม่กระจายตัวในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นเฮปเทนจึงสามารถผลักให้ไลเพสเข้าไปยึดติดกับเส้นใยกกได้ดีกว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จึงส่งผลให้การตรึงไลเพสโดยใช้เฮปเทนมีปริมาณโปรตีนที่ใช้มากกว่าการตรึงไลเพสโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์นั่นเอง

เมื่อเปรียบเทียบการตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพพบว่ามีแนวโน้มที่จะมีปริมาณโปรตีนที่ใช้มากกว่าการตรึงไลเพสด้วยวิธีการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์อันเนื่องมาจากเมื่อมีการเชื่อมขวางทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ทำให้ไลเพสแทรกตัวเข้าไปได้ยาก จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนที่ใช้น้อยกว่า และโดยเฉพาะการตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทนที่เป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วซึ่งสามารถผลักไลเพสเข้าไปยึดเกาะกับเส้นใยได้ดีจึงทำให้มีปริมาณโปรตีนที่ใช้มากกว่า

4.2.3 ค่าความเป็นกรดด่าง

จากตารางที่ 4.3 หลังจากตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันคือ 5, 7, และ 9 พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 (เป็นกลาง) นั้นมีประสิทธิภาพสูงที่สุด และสูงกว่าไลเพสตรึงที่ค่าความเป็นเป็นกรดด่าง 5 (เป็นกรด) และ 9 (เป็นด่าง) กล่าวคือมีค่าแอคติวิตี 3.01, 2.77, และ 2.16 ยูนิตต่อกรัมตัวค้ำจุน ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์ตรงต่อประสิทธิภาพการตรึงไลเพส คือเมื่อมีแอคติวิตีสูงประสิทธิภาพการตรึงไลเพสก็สูงด้วยเช่นกัน คือร้อยละ 80.43, 72.66, และ 63.20 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ค่าแอคติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และร้อยละประสิทธิภาพของการตรึงไลเพสที่ค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน

วิธีการตรึงไลเพส	ค่าแอคติวิตี (ยูนิต/กรัมตัวค้ำจุน)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (%)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
pH5	2.77	72.66	70.41
pH7	3.01	80.43	76.55
pH9	2.16	63.20	55.11

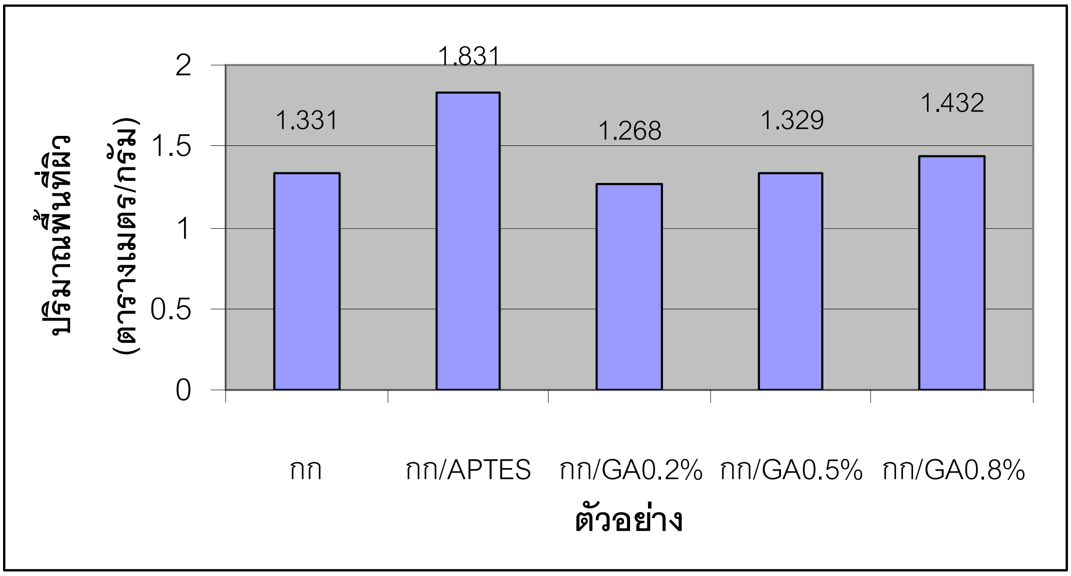
* 1 หน่วยยูนิตของไลเพสแอคติวิตี หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อปลดปล่อยพาราไนโตรฟีนอลจากปฏิกิริยา 1 ไมโครโมลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที

นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาจากปริมาณโปรตีนที่ใช้แล้วพบว่าการตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 (เป็นกลาง) นั้นมีปริมาณโปรตีนที่ใช้มากที่สุด และมีมากกว่าการตรึงไลเพสที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 (เป็นกรด) และค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 (เป็นด่าง) กล่าวคือคือมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 80.43, 72.66, และ 63.20 ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง pH7 นั้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ตรึงไลเพสมากที่สุด อาจเนื่องมาจากไลเพสชอบสภาวะที่มีความเป็นกลาง และไม่สามารถคงแอคติวิตีได้เมื่ออยู่ในสภาพที่รุนแรงคือเมื่อเป็นกรดหรือด่างที่เข้มข้นมากเกินไป อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากค่า แอคติวิตี ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และประสิทธิภาพการตรึงแล้วพบว่าค่าความเป็นกรดมีความเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงไลเพสมากกว่าค่าความเป็นด่าง

4.3 วิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer

เมื่อพิจารณาจากค่าแอคติวิตี ประสิทธิภาพการตรึง และปริมาณโปรตีนที่ใช้สามารถสรุปได้ว่าวิธีที่เหมาะสมที่สุดคือ การตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์โดยใช้เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H1) เนื่องจากให้ค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงรูปไลเพสวิธีอื่น (4.2.1) ดังนั้นการทดลองเพื่อทำการวิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6

4.3.1 วิเคราะห์พื้นที่ผิว ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer

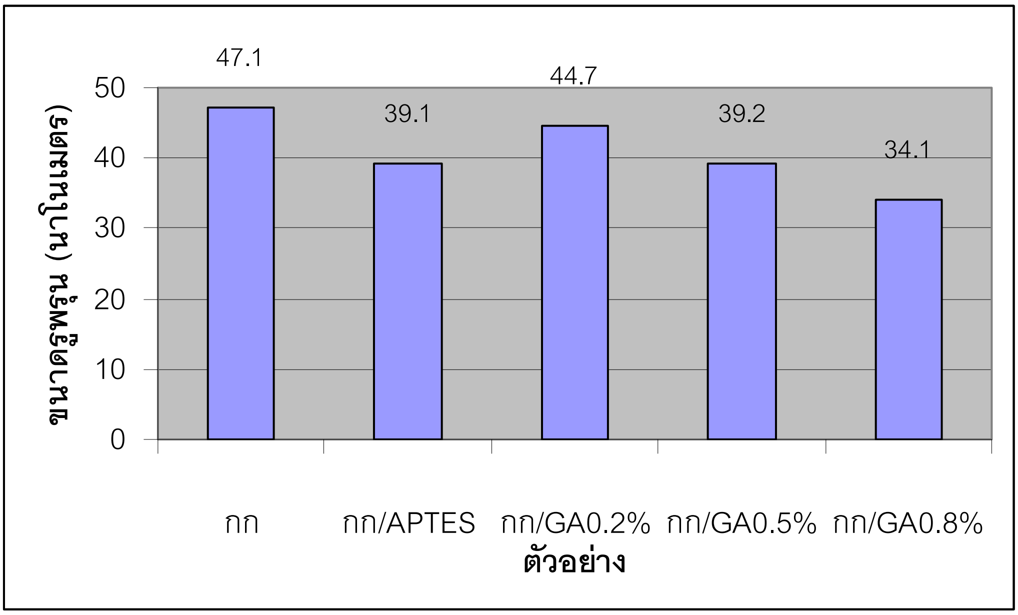


รูปที่ 4.6 ปริมาณพื้นที่ผิวของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณพื้นที่ผิวพบว่าเมื่อทำการแอคติเวตตัวค้ำจุนเส้นใยกกบดด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) แล้วทำให้เส้นใยกกบดมีปริมาณพื้นที่ผิวมากขึ้นจากเดิมคือ 1.331 เป็น 1.831

หลังจากแอคติเวตตัวค้ำจุนเส้นใยกกบดด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) แล้ว จึงทำการแอคติเวตด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือความเข้มข้นกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 0.2, 0.5, และ 0.8 ตามลำดับ พบว่ามีปริมาณพื้นที่ผิว 1.268, 1.329, และ 1.432 ตามลำดับ จึงสามารถกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์นั้นมีความสัมพันธ์ตรงกับปริมาณพื้นที่ผิวของตัวอย่าง คือเมื่อแอคติเวตด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นน้อย ปริมาณพื้นที่ผิวของตัวอย่างก็จะน้อย และเมื่อแอคติเวตด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นมาก ปริมาณพื้นที่ผิวของตัวอย่างก็จะมากขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจเกิดจากสารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์นั้นทำการเชื่อมขวางพันธะขึ้นเกิดการรวมตัวเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นจึงทำให้ตัวอย่างมีปริมาณพื้นที่ผิวเพิ่มมากขึ้น

4.3.2 วิเคราะห์ขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer



รูปที่ 4.7 ขนาดรูพรุนของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบขนาดรูพรุนของเส้นใยกก พบว่าเมื่อทำการแอคติเวตตัวค้ำจุนเส้นใยกกบดด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) แล้วทำให้เส้นใยกกบดมีขนาดรูพรุนน้อยลงจากเดิมคือ 47.1 เป็น 39.1 นาโนเมตร

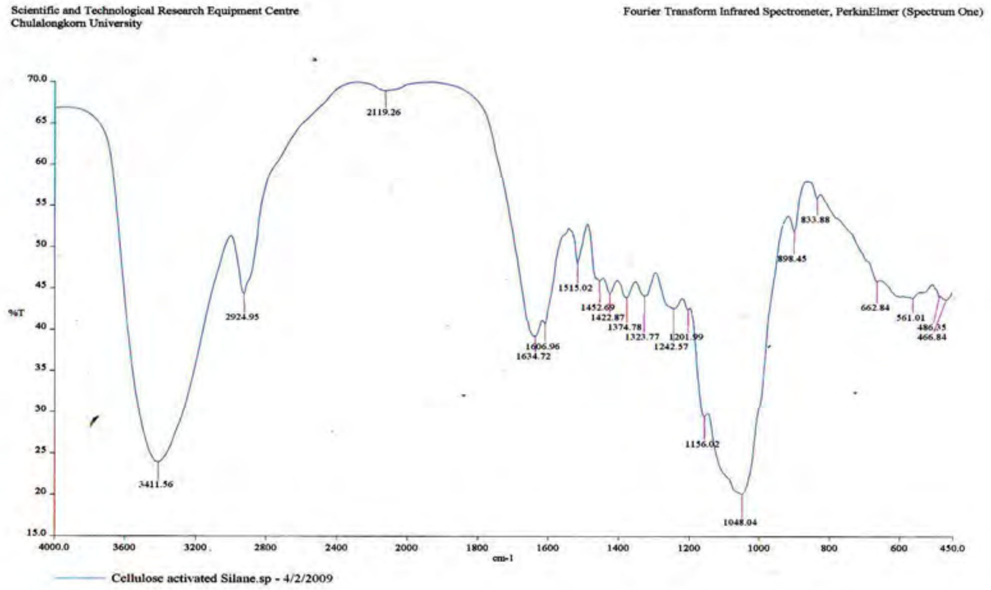
หลังจากแอคติเวตตัวค้ำจุนเส้นใยกกบดด้วย 3-อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) แล้ว จึงทำการแอคติเวตด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือความเข้มข้นกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 0.2, 0.5, และ 0.8 ตามลำดับ พบว่ามีขนาดรูพรุน 44.7, 39.2, และ 34.1 นาโนเมตร ตามลำดับ จึงสามารถกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์นั้นมีความสัมพันธ์ผกผันกับขนาดรูพรุนของตัวอย่าง คือเมื่อแอคติเวตด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นน้อย ขนาดรูพรุนของตัวอย่างก็จะมาก และเมื่อแอคติเวตด้วยกลูตา-ราลดีไฮด์ความเข้มข้นมาก ขนาดรูพรุนของตัวอย่างก็จะน้อยลง ซึ่งอาจเกิดจากสารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์นั้นทำการเชื่อมขวางพันธะขึ้นเกิดการรวมตัวเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น และอาจเข้าไปเชื่อมขวางภายในรูพรุนจึงทำให้ขนาดของรูพรุนมีขนาดเล็กลง

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเฉพาะเรื่องการแทรกตัวเข้าไปในรูพรุนของไลเพสแล้ว การเชื่อมขวางของกลูตาราลดีไฮด์อาจจะทำให้เกิดการปิดกั้นความสามารถของไลเพสในการแทรกตัวเข้าไปภายในรูพรุนของเส้นใยกกบด ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ใช้เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูตาราลดีไฮด์ที่แตกต่างกัน (4.2.2) จึงพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูตาราลดีไฮด์น้อย

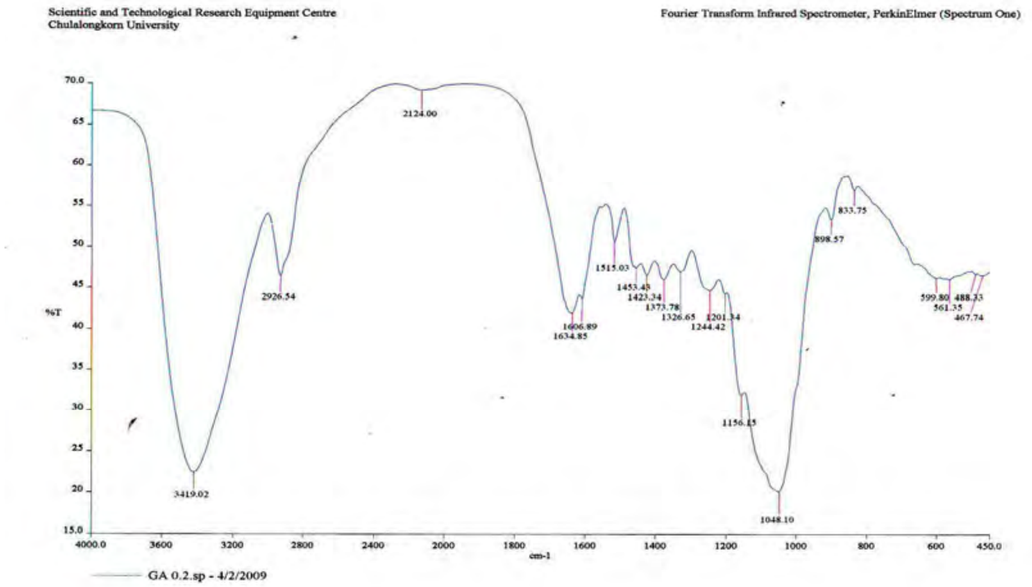
กลับมีปริมาณโปรตีนที่ใช้มาก และเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์มากกลับมีปริมาณโปรตีนที่ใช้น้อย ซึ่งสามารถอธิบายได้ตามข้อสันนิษฐานดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนที่ใช้ไม่สามารถบ่งบอกได้ถึงประสิทธิภาพของไลเพสในการเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องทดสอบโดยการนำไลเพสตรึงรูปดังกล่าวมาเร่งปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอีกครั้ง

4.4 **วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของเส้นใยกกโดยใช้เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์** (FTIR)

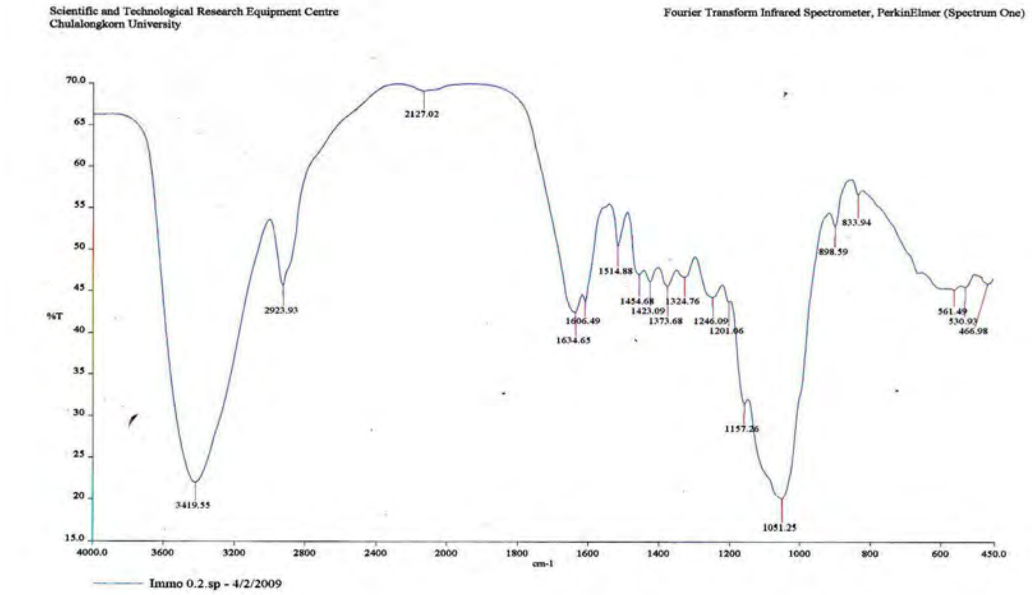
(ก)


Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University
Fourier Transform Infrared Spectrometer, PerkinElmer (Spectrum One)
%T
70.0
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15.0
4000.0
3600
3200
2800
2400
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
450.0
cm-1
2119.26
2924.95
3411.56
1634.72
1606.96
1515.02
1452.69
1422.87
1374.78
1323.77
1242.57
1201.99
1156.02
1048.04
898.45
833.88
662.84
561.01
486.35
466.84
Cellulose activated Silane.sp - 4/2/2009

(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 4.8 (ก) IR สเปกตรัมของเส้นใยกก (ข) IR สเปกตรัมของเส้นใยกกที่ผ่านการการแอคติเวตด้วย APTES (ค) IR สเปกตรัมเส้นใยกกที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ง) IR สเปกตรัมของไลเพสตรึงรูป

การตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเส้นใยกกเพื่อให้เกิดความเหมาะสมในการนำไปใช้งาน โดยสามารถวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงได้จากเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR) โดยควรมีรายละเอียดการเปลี่ยนแปลงดังนี้

เมื่อนำเส้นใยกกซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ (เซลลูโลส) ที่มีหมู่ฟังก์ชันหลักคือ OH ไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR) จะพบ IR สเปกตรัมหลักของ OH ที่ตำแหน่ง 3500 ซม.$^{-1}$ เมื่อทำการแอคติเวตเส้นใยกกด้วย APTES แล้วควรเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก OH เป็น NH_2 ซึ่งสามารถตรวจสอบพบ IR สเปคตรัมของ NH_2 stretching ที่ตำแหน่ง 3450 และ 3225 ซม.$^{-1}$ และ NH_2 deformation ที่ตำแหน่ง 1606 ซม.$^{-1}$ จากนั้นเมื่อทำปฏิกิริยาด้วยกลูตาราลดีไฮด์ จะพบ IR สเปกตรัมของ C=N และ C=O (ของอัลดีไฮด์) ที่ตำแหน่ง 1580 และ 1710 ซม.$^{-1}$ ตามลำดับ และเมื่อนำเส้นใยกกที่ได้ไปตรึงไลเพสแล้ว ตำแหน่ง IR สเปกตรัมของ C=O (ของอัลดีไฮด์) ที่ 1710 ซม.$^{-1}$ จะถูกแทนที่จากการที่ไลเพสเข้าไปจับตัวกับส้นใยกก ดังนั้น IR สเปกตรัมที่สามารถตรวจสอบพบจากไลเพสตรึงรูปคือ IR สเปกตรัมของ C=N ที่ตำแหน่ง 1580 ซม.$^{-1}$

การวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของงานวิจัยนี้ไม่พบ IR สเปรกตรัมในตำแหน่งที่ต้องการ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่าง ๆ นั้นไม่ทั่วถึง จึงมีบางบริเวณที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด จะพบก็เพียงแต่ IR สเปกตรัมของ C=O (ของคาร์บอนิล) ที่ตำแหน่งระหว่าง 1700-1800 ซม.$^{-1}$ ของเส้นใยกกมีการหายไปเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วย APTES เท่านั้น ดังรูปที่ 4.8 (ก) และ (ข)

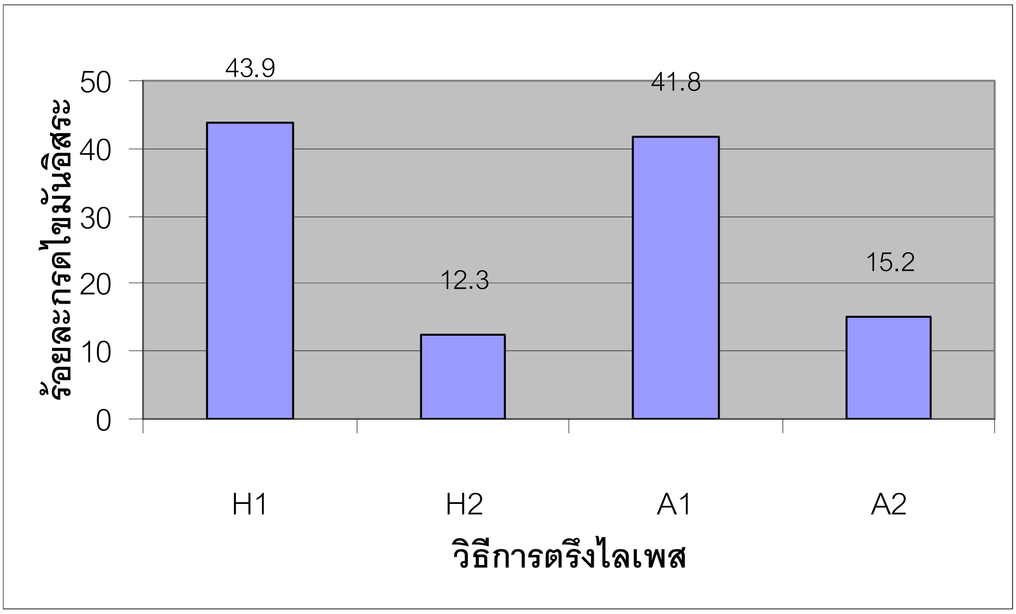
อย่างไรก็ตามการพิสูจน์ความสามารถของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์นั้นยังสามารถยืนยันได้ด้วยวิธีอื่นๆ เช่น นำไลเพสตรึงรูปดังกล่าวไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน และวิเคราะห์การเกิดผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาต่อไป

4.5 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์

4.5.1 ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี

ก. ผลของการตรึงไลเพสด้วยวิธีตรึงไลเพสที่แตกต่างกัน 4 วิธี ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไลเพสตรึงรูป

การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์หลังจากทำการตรึงไลเพสบนเส้นใยกกบดที่เชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าไลเพสตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้ โดยไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H1 ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่ากว่าไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H2 กล่าวคือ ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H1 ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 43.9 และไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H2 ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 12.3 ตามลำดับ



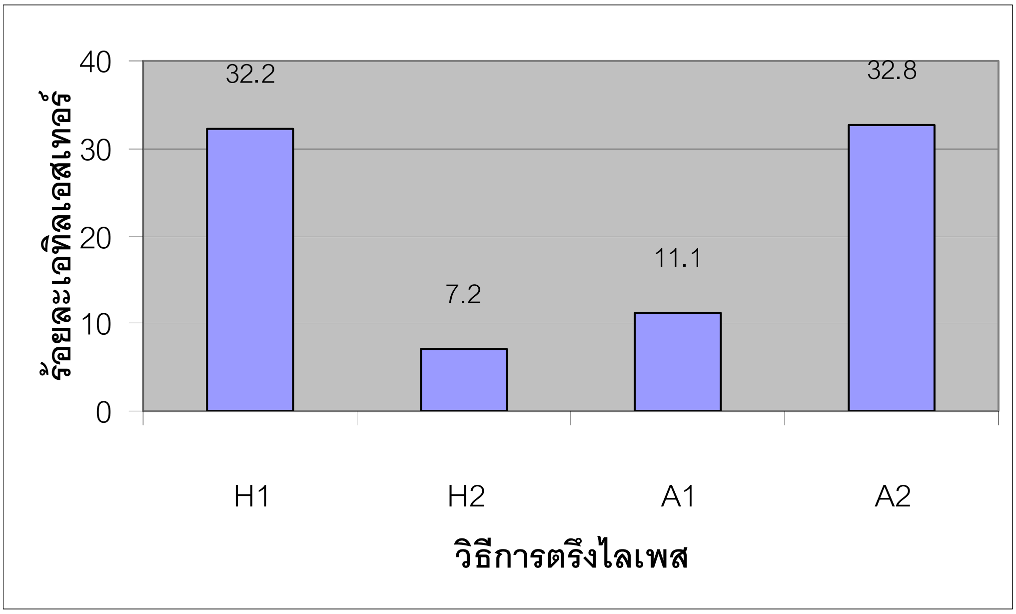
รูปที่ 4.9 ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระเมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

ในขณะที่ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A1 ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่าไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A2 กล่าวคือไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A1 ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 41.8 และ ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A2 ให้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 15.2 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.9

จากข้อมูลดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่าการแอคติเวตเส้นใยกกบดด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H) หรืออะซิโตน (A) นั้น วิธีการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H1 และ A1) สามารถให้ปริมาณกรดไขมันอิสระได้มากกว่าวิธีการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H2 หรือ A2)

ข. ผลของการตรึงไลเพสด้วยวิธีตรึงรูปที่แตกต่างกัน 4 วิธี ต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป

เมื่อนำไลเพสตรึงรูปมาใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน โดยเติมไบโอเอทานอลแบบสามขั้น พบว่าไลเพสตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเกิดเอทิลเอสเทอร์ได้ โดยไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H1 สามารถให้ผลิตภัณฑ์เอทิลเอสเทอร์ได้สูงกว่าไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H2 กล่าวคือ ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H1 ให้เอทิลเอสเทอร์ ร้อยละ 32.2 ในขณะที่ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H2 ให้เอทิล-เอสเทอร์ร้อยละ 7.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์เมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี เป็นตัวเร่งเอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ในขณะที่ผลจากไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A1 สามารถให้ผลิตภัณฑ์เอทิลเอสเทอร์น้อยกว่าไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A2 กล่าวคือไลเพสตรึงรูปวิธี A1 ให้เอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 11.1 และไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A2 ให้เอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 32.8 ดังรูปที่ 4.10

จากข้อมูลสามารถกล่าวได้ว่าการตรึงไลเพสหลังจากทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H1 และ A1) หรือการตรึงไลเพสพร้อมกับทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H2 หรือ A2) นั้นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดเอทิลเอสเทอร์

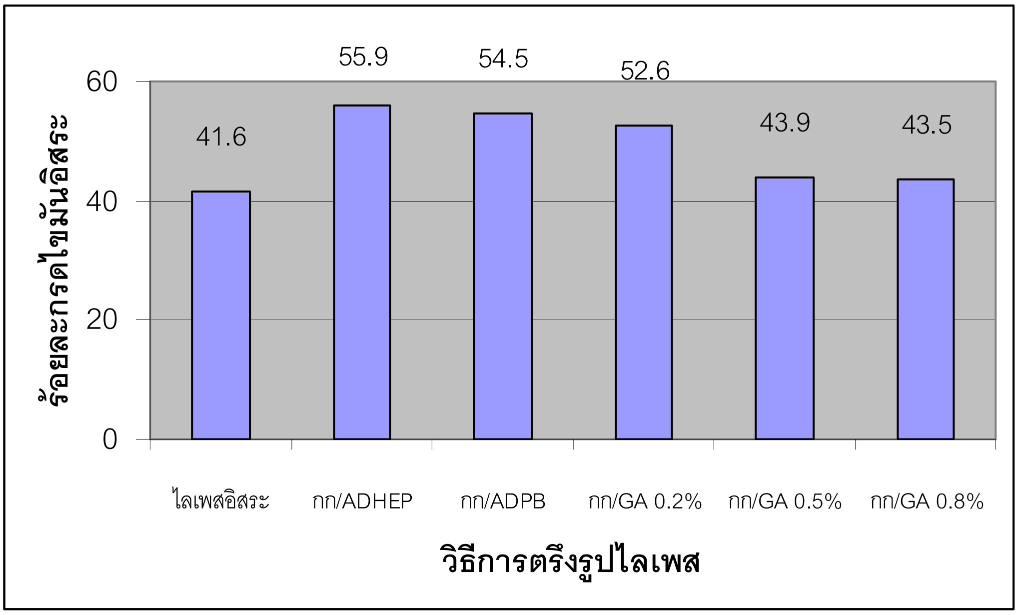
นอกจากนี้ในกรณีของการตรึงไลเพสที่มีการแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H) นั้น พบว่าการเกิดกรดไขมันอิสระมีความสัมพันธ์ตรงกับการเกิดเอทิลเอสเทอร์ คือเมื่อเกิดกรดไขมันอิสระสูงก็จะเกิดเอทิลเอสเทอร์สูงด้วยเช่นกัน แต่ในกรณีของการตรึงไลเพสที่มีการแอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A) นั้นกลับให้ผลในทางตรงกันข้าม

แต่เมื่อพิจารณาจากผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปที่ได้จากการนำเส้นใยกกแอคติเวตด้วย APTES ในน้ำกลั่นก่อน และตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ (H1) แล้วนั้นสามารถให้ผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ในปริมาณมากทั้งสองผลิตภัณฑ์ ประกอบกับเมื่อพิจารณาจากราคา และความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว ไลเพสตรึงรูปที่แอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในน้ำกลั่น (H) นั้นจึงมีความเหมาะสมมากกว่าไลเพสตรึงรูปที่แอคติเวตด้วยสารละลาย APTES ในอะซิโตน (A)

4.5.2 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสที่ใช้การดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ก. ผลของความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไลเพสตรึงรูป

การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไลเพสตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ในการตรึงไลเพสที่แตกต่างกันคือ 0.2, 0.5, และ 0.8 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.11 พบว่า ไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 นั้น ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คือกรดไขมันอิสระมากที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 52.6 และไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.8 ได้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 43.9 และ 43.5 ตามลำดับ



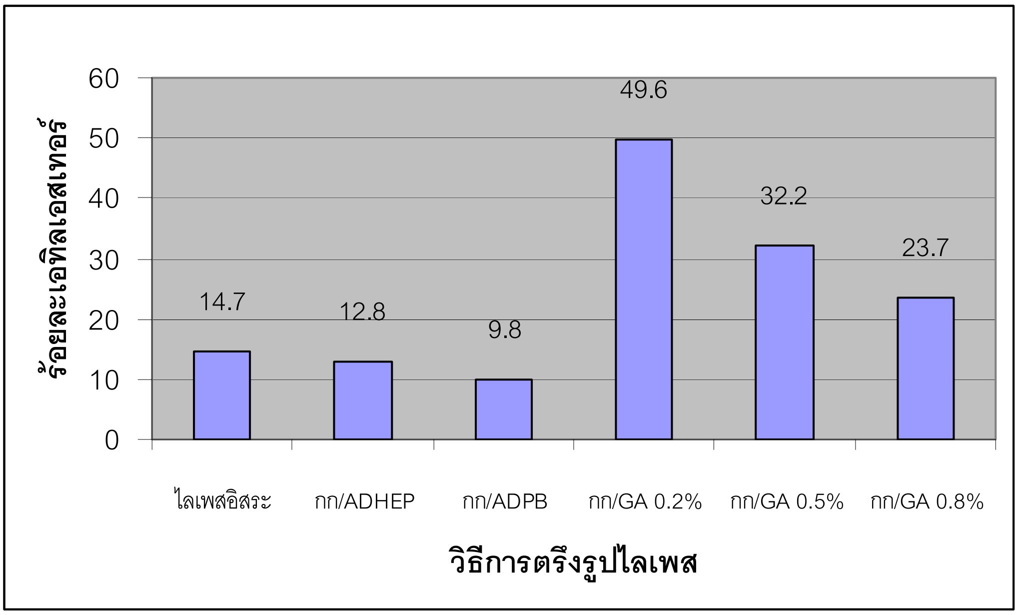
รูปที่ 4.11 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีในการตรึงไลเพสที่แตกต่างกัน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทน และฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้ว พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทนให้ปริมาณกรดไขมันอิสระ

มากกว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กล่าวคือได้ปริมาณกรดไขมันอิสระ 55.9 และ 54.5 ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพนั้นสามารถให้ปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่า ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์

ข. ผลของความเข้มข้นของสารเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป

การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ ต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปที่ใช้ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ในการตรึงไลเพสที่แตกต่างกันคือ 0.2, 0.5, และ 0.8 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเอทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 นั้น ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คือเอทิลเอสเทอร์มากที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 49.6 และไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 0.8 ได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 32.2 และ 23.7 ตามลำดับ

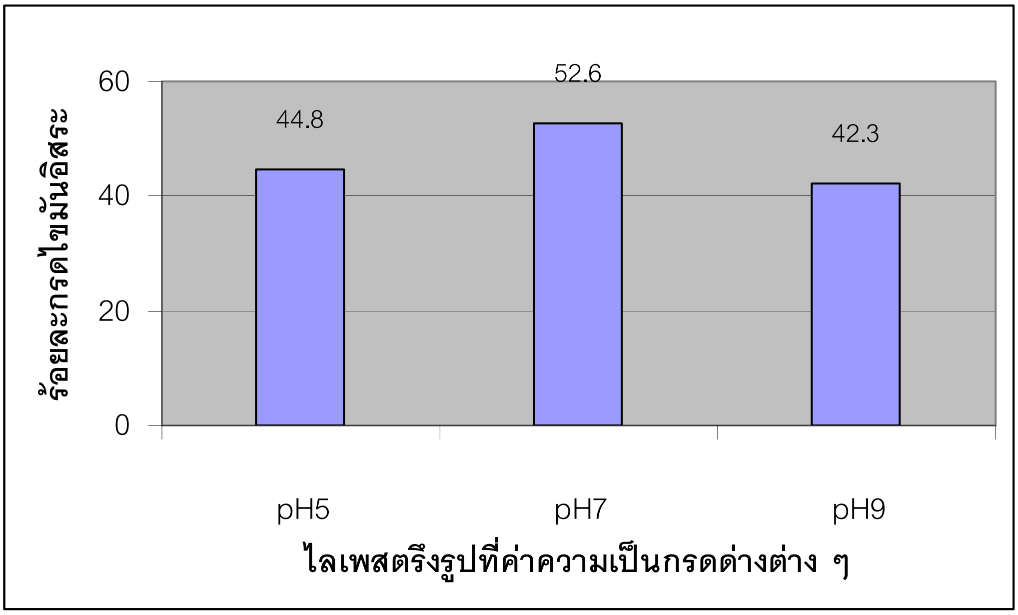


รูปที่ 4.12 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีในการตรึงไลเพสที่แตกต่างกัน เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้ว พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทนให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์มากกว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กล่าวคือได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 12.8 และ 9.8 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์นั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาให้ผลิตภัณฑ์เอทิลเอสเทอร์สูงกว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพในปริมาณมาก และพบว่าการตรึงไลเพสนั้นมีความสำคัญเนื่องจากการใช้ไลเพสอิสระจะทำให้สูญเสียแอคติวิตีจากภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา เช่น ความเป็นกรด-ด่าง, การปั่นกวนอย่างรุนแรง, และการเกิดการจับตัว (clamping) เป็นก้อนของไลเพสอิสระซึ่งส่งผลให้พื้นผิวสัมผัสของไลเพสน้อยลง จึงเร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดีเมื่อเทียบกับไลเพสตรึงรูปที่มีไลเพสกระจายตัวอยู่ทั่วบนเส้นใยกกเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาจะไม่เกิดการจับตัว และกระจายตัวได้ดีในสับเสตรตจึงมีผิวสัมผัสมากกว่าไลเพสอิสระที่มีการจับตัวเป็นก้อน

4.5.3 **ค่าความเป็นกรดด่าง**

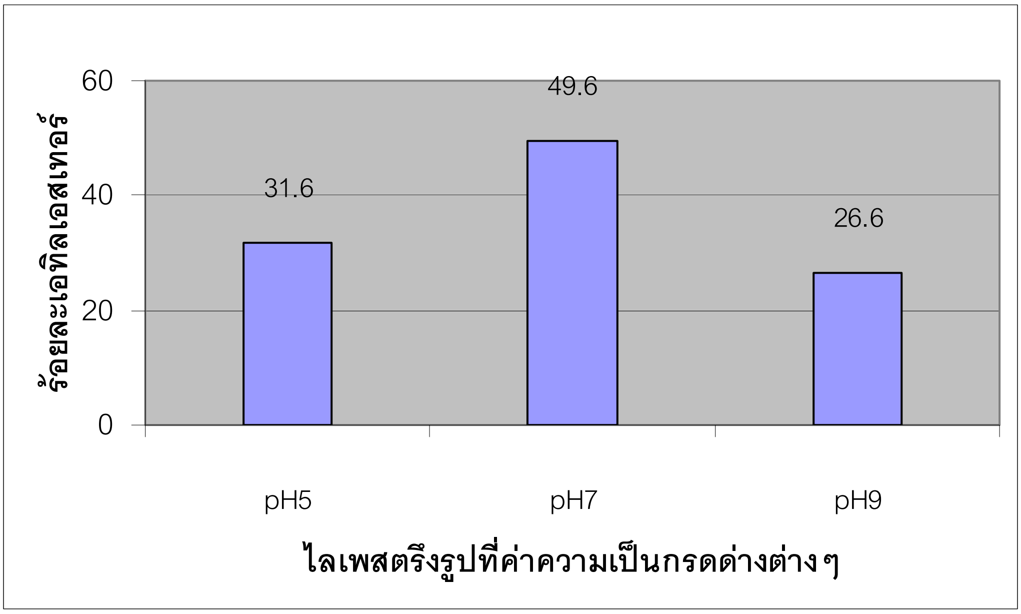
ก. ผลของความเป็นกรดด่างต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไลเพสตรึงรูป



รูปที่ 4.13 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างในการตรึงรูปที่แตกต่างกัน ต่อปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ใช้ค่าความเป็นกรดด่างในการตรึงรูปที่แตกต่างกันคือ 5, 7, และ 9 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์กรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.13 พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 นั้น ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คือกรดไขมันอิสระมากที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 52.6 และไลเพสตรึงรูปที่ใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5 และ 9 พบว่าได้ปริมาณกรดไขมันอิสระร้อยละ 44.8 และ 42.3 ตามลำดับ

ข. ผลของความเป็นกรดด่างต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป



รูปที่ 4.14 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ที่ค่าความเป็นกรดด่างในการตรึงรูปที่แตกต่างกัน ต่อปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ใช้ค่าความเป็นกรดด่างในการตรึงไลเพสที่แตกต่างกันคือ 5, 7, และ 9 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเอทิล-เอสเทอร์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.14 พบว่าไลเพสตรึง

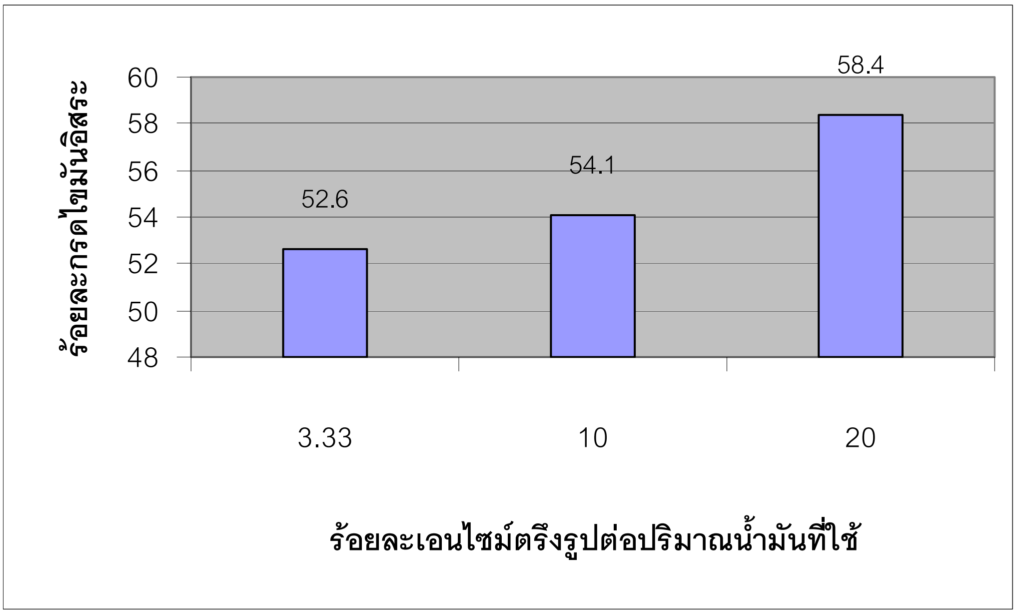
รูปที่ใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 นั้นให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คือ เอทิลเอสเทอร์มากที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 49.6 และไลเพสตรึงรูปที่ใช้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5 และ 9 พบว่าได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 31.6 และ 26.55 ตามลำดับ

จากผลการทดลองจึงสามารถกล่าวได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างที่มีสภาวะเป็นกลางนั้นมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ตรึงไลเพสมากที่สุด และพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่มีสภาวะเป็นกรด นั้นมีความเหมาะสมในการมาใช้ตรึงไลเพสมากกว่าในสภาวะที่เป็นด่าง

แต่อย่างไรก็ตามสามารถกล่าวได้ว่าในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างนั้นไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตรึงรูปไลเพสเนื่องจากอาจอยู่ในสภาวะที่รุนแรงเกินไปสำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเพส ส่งผลให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันได้ดีเท่ากับค่าความเป็นกรดด่างที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง

4.5.4 ร้อยละเอนไซม์ตรึงรูปต่อปริมาณน้ำมันที่ใช้

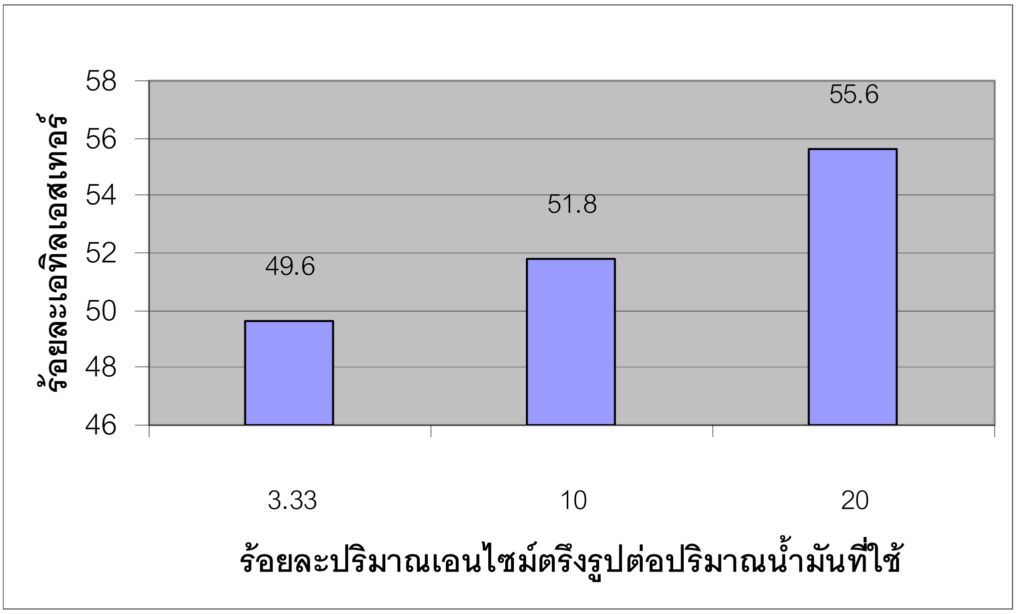
ก. ผลของการใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาต่อการเร่งปฏิกิรยาไฮโดรลิซิส



รูปที่ 4.15 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาต่อปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเทียบกับน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาในปริมาณที่แตกต่างกันคือร้อยละ 3.33, 10, และ 20 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.15 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 20 ของน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยา จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คือเอทิลเอสเทอร์มากที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 58.4 และเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 และ 3.33 ของน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาพบว่าได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 54.1และ 52.6 ตามลำดับ

ข. ผลของการใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน



รูปที่ 4.16 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ของไลเพสตรึงรูปที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาต่อปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

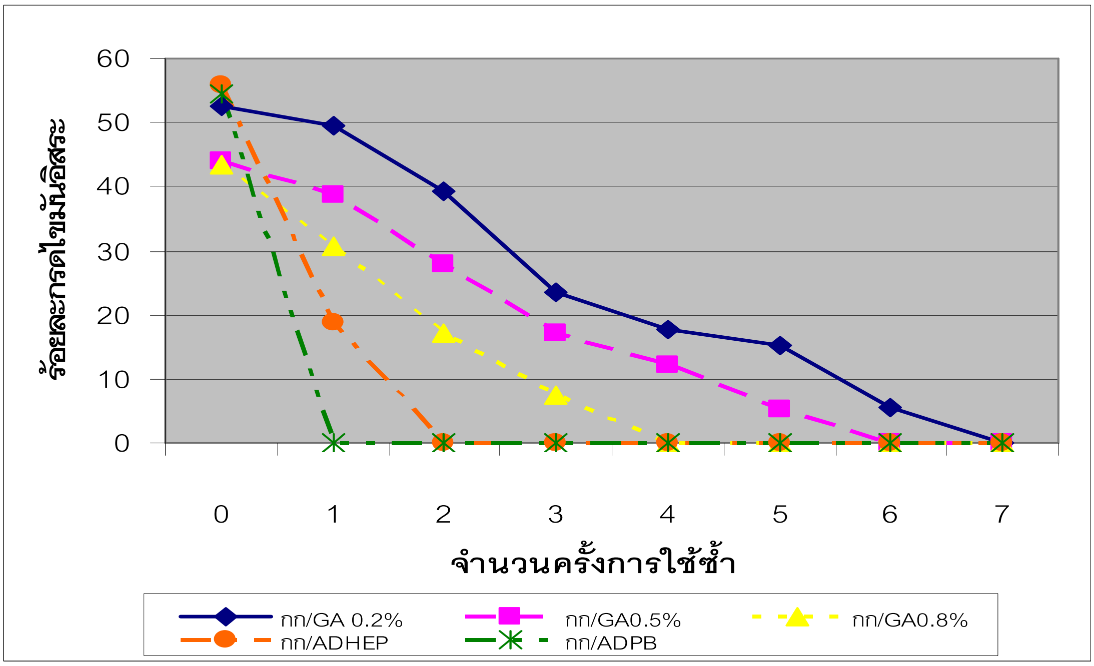
การศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปเทียบกับน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาในปริมาณที่

แตกต่างกันคือร้อยละ 3.33, 10, และ 20 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเอทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา เอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.16 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 20 ของน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยา จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์คือเอทิลเอสเทอร์มากที่สุด กล่าวคือได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 55.6 และเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 10 และ 3.33 ของน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยาพบว่าได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 51.8 และ 49.6 ตามลำดับ

จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยานั้นมีความสัมพันธ์ตรงกับการเกิดเอทิลเอสเทอร์ คือเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปสูงก็จะเกิดเอทิลเอสเทอร์สูงด้วยเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปในปริมาณมากขึ้นจะทำให้สภาวะในการเร่งปฏิกิริยานั้นไม่เหมาะสมเนื่องจากจะเกิดสภาวะข้นเหนียวจากการที่ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยกกในปริมาณมากผสมกับน้ำมันที่เป็นสับสเตรตจึงทำให้การปั่นกวนไม่มีประสิทธิภาพเช่นเดิม และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นประกอบกับราคาของเอนไซม์แล้ว จึงสามารถกล่าวได้ว่าการใช้เอนไซม์ตรึงรูปร้อยละ 3.33 ของน้ำมันที่ใช้ในปฏิกิริยานั้นก็สามารถให้เอทิลเอสเทอร์ในปริมาณสูงและมีความเหมาะสมเช่นกัน

4.6 การศึกษาความสามารถในการใช้ซ้ำของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส

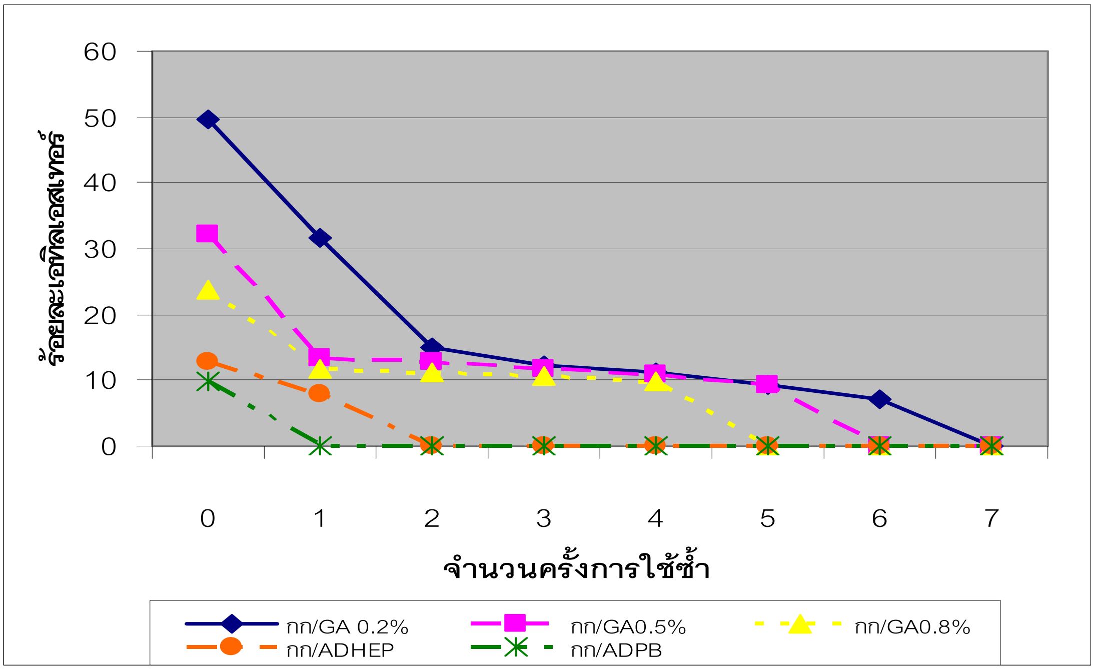
ก. ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ และไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส



รูปที่ 4.17 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ และไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพต่อปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 นั้น สามารถใช้ซ้ำได้มากที่สุด โดยสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้กรดไขมันอิสระ และสามารถนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง เมื่อเปรียบเทียบไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทนซึ่งสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้กรดไขมันอิสระ และสามารถนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้ 2 ครั้ง และในขณะที่ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเกิดกรดไขมันอิสระได้เช่นกัน แต่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก

ข. ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ และไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน



รูปที่ 4.18 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ และไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอ-ริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 นั้น สามารถใช้ซ้ำได้มากที่สุด โดยสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิ-เคชันได้เอทิลเอสเทอร์ และสามารถนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง เมื่อเปรียบเทียบไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทนซึ่งสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันได้เอทิลเอสเทอร์ และสามารถนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้ 2 ครั้ง และในขณะที่ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันเกิดเอทิลเอสเทอร์ได้เช่นกัน แต่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก

จึงสามารถสรุปได้ว่าการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์นั้นมีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้เนื่องจากมีการจับพันธะที่แข็งแรง และมีการเชื่อมขวางโมเลกุลให้มีขนาดใหญ่จึงมีพื้นที่ผิวมากขึ้น ซึ่งเมื่อเทียบกับการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพแล้วพบว่าไลเพสยึดจับพันธะไม่

แข็งแรง จึงไม่สามารถนำมาใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่สามารถนำมาใช้งานซ้ำได้หลายครั้งติดต่อกัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์และสามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

5.1.1 การคัดเลือกวิธีการตรึงไลเพสด้วยวีธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์

วิธีการตรึงไลเพสที่ดีที่สุด คือการนำเส้นใยกกบดที่ผ่านการแอคติเวตด้วย 3- อะมิโน-โพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในน้ำกลั่น และตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ มีปริมาณโปรตีนที่ใช้ร้อยละ 79.6 และประสิทธิภาพการตรึงร้อยละ 84.2 และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มและไบโอเอทานอล พบว่าได้ผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 43.9 และ 32.2 ตามลำดับ

5.1.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง

ความเข้มข้นของสารกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงไลเพส คือการนำเส้นใยกกบดที่ผ่านการแอคติเวตด้วย 3- อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในน้ำกลั่น และตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 (เป็นกลาง) มีปริมาณโปรตีนที่ใช้ร้อยละ 80.4 และประสิทธิภาพการตรึงร้อยละ 76.6 และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มและไบโอเอทานอล พบว่าได้ผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ร้อยละ 52.6 และ 49.6 ตามลำดับ

5.1.3 การศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันและความสามารถในการใช้ซ้ำ

เส้นใยกกบดที่ผ่านการแอคติเวตด้วย 3- อะมิโนโพรพิลไทรเอทอกซีไซเลน (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในน้ำกลั่น และตรึงไลเพสหลังทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 นั้นเป็นวิธีที่สามารถให้ผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระและเอทิลเอสเทอร์ในปริมาณมากที่สุด เมื่อนำมาทำการศึกษาความสามารถในการใช้

ซ้ำ พบว่าสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน ระหว่างน้ำมันปาล์มและไบโอเอทานอล ได้ 6 ครั้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์นั้นยังมีขั้นตอนการตรึงไลเพสก่อนทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ ซึ่งทางผู้วิจัยมีแนวคิดว่าการตรึงไลเพสด้วยวิธีดังกล่าว ถึงแม้จะทำให้ปริมาณโปรตีนที่ใช้เพิ่มสูงขึ้น แต่อาจเกิดการบดบังบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีเท่าที่ควร ซึ่งส่งผลให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิล-เอสเทอร์น้อย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรทำการศึกษาวิธีการดังกล่าวเพิ่มเติม เพื่อยืนยันการคัดเลือกวิธีการทดลองที่ดีที่สุดสำหรับการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์

5.2.2 การคัดเลือกวิธีในการตรึงไลเพส ควรมีการศึกษาเป็นขั้นตอนที่แน่นอนโดยเริ่มจากการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพพื้นฐานของเส้นใยกก การหาค่าแอคติวิตี ประสิทธิภาพการตรึง และปริมาณโปรตีนที่ใช้ แล้วจึงนำไปตรวจสอบการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ไบโอดีเซล เนื่องจากผลการทดลองที่ได้จะสามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเร่งปฏิกิริยากับค่าแอคติวิตี ประสิทธิภาพการตรึง และปริมาณโปรตีนที่ใช้ของไลเพสตรึงรูปในแต่ละวิธีได้อย่างถูกต้องมากขึ้น

5.2.3 ค่าแอคติวิตี และประสิทธิภาพการตรึงไลเพส ที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นเพียงค่าประมาณโดยใช้วิธีการเปรียบเทียบระหว่างแอคติวิตีของสารละลายไลเพสก่อน และหลังการตรึงที่วัดได้จากน้ำล้างหลังการตรึงไลเพส วิธีดังกล่าวสามารถยืนยันได้เพียงว่าหลังจากผ่านการล้างครั้งสุดท้ายไม่พบไลเพสที่หลุดออกจากเส้นใยกกอีก ดังนั้นจึงควรมีการวัดค่าแอคติวิตีของไลเพสตรึงรูปที่ใช้เร่งปฏิกิริยาโดยตรง และตรวจสอบกิจกรรมสัมพัทธ์ (retention activity) ที่คงเหลือเมื่อผ่านการเร่งปฏิกิริยาในแต่ละรอบ เพื่อศึกษาความสามารถในการรักษาเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสตรึงรูป

5.2.4 ข้อดีของการใช้เส้นใยกกบดเป็นตัวค้ำจุนไลเพส คือมีปริมาณผิวสัมผัสมาก เมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาจึงเกิดผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์ในปริมาณมาก ในขณะที่ไลเพสอิสระจะเกิดการจับตัวเป็นก้อนทำให้ผิวสัมผัสน้อย ดังนั้นจึงได้ผลิตภัณฑ์น้อย อย่างไรก็ตามข้อเสียของการใช้เส้นใยกกบด คือยากต่อการนำกลับมาใช้ใหม่เนื่องจากมีขนาดที่เล็กมาก ซึ่งอาจ

สูญหายได้จากกระบวนการล้างเอนไซม์ตรึงรูป นอกจากนั้นเส้นใยกกที่ผ่านการนำไปเร่งปฏิกิริยาแล้วจะมีลักษณะที่อ่อนตัวไม่คงรูป และจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน อาจเนื่องจากการล้างน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นสับเสตรตในปฏิกิริยาออกไม่หมด ดังนั้นจึงควรศึกษาหาวิธีในการนำไลเพสตรึงรูปกลับมาใช้งาน ปรับปรุงเส้นใยให้มีความคงรูป และหาตัวทำละลายที่สามารถล้างน้ำมันออกจากเส้นใยกกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ส่งผลต่อแอคติวิตีของไลเพสตรึงรูป และไม่ทำลายเส้นใยกก

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2549 [online]. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49.

คณะกรรมมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : แปลน พริ้นท์ติ้ง.

ปิยะนันท์ สุเทียนทอง. 2550. การผลิตตัวค้ำจุนไลเพสจากเส้นใยพืชเพื่อการสังเคราะห์ไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประดิษฐ์ มีสุข. 2544. เคมีอินทรีย์เบื้องต้น. การผลิตเอกสารและตำรา มหาวิทยาลัยทักษิณ. สารอินทรีย์.

พลังงาน, กระทรวง. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ.2551สถานการณ์พลังงานในปี 2551 และแนวโน้มปี 2552 [online].แหล่งที่มาhttp://www.eppo.go.th.

ศุภรัตน์ ก๊กเครือ. 2546. การศึกษาเตรียมแผ่นสารดูดความชื้นเพื่อใช้ในการลดภาระความร้อนที่ผ่านหลังคา. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุ คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.

ภาษาอังกฤษ

Aehle, W. 2004. Enzymes in Industry. WILEY-VHC Verlag GmbH & Co. Germany .70-80.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemistry. 72 : 248-255.

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

Dong, H., S. Gao, S. Han, and S. Cao. 1999. Purification and characterization of a Pseudomonas sp. Lipase and its properties in non-aqueous media. Biotechnology and Applied Biochemistry. 30: 251-256.

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

Hilal, N., Kochkodan, V., Nigmatullin, R., Goncharuk, V., and Al-Khatib, L. 2005. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: Comparison of

various approaches to membrane preparation. Journal of Membrane Science . 268: 198-207.

Huang, X., Yu, A., and Xu, Z. (2007). Covalent immobilization of lipase from Candida rugosa onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membrane for potential bioreactor application. Bioresource Technology. 99: 5459-5465.

Hung, T.C., Giridhar R., Chiou, S.H., and Wu, W.T. 2003. Binary immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic. 26: 69-73.

Iqbal, M., and Saeed, A. 2005. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. Letters in Applied Microbiology. 40: 178-182.

Jaeger, K. E., Reetz, T. M. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnology. 16: 396-403.

Kazlauskas, R. J., and Bornscheuer, U. T. 1998. Biotransformations with lipases. In: Rehm, H. J., Pihler, G., Stadler, A., Kelly, P. J. W. (ed) , Biotechnology. 8: 37-192.

Kennedy, J. F., and Cabral, J. M. S. 1987. Enzyme Immobilization. In J. F. Kennedy (ed.) Biotechnology. Enzyme Technology. Weinheim : Fed. Repub. Of Germany. 7: 349-402.

Lee, D. H., Park, C. H., Yeo, J. M., and Kim, S. W. 2006. Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. Journal of Industrial Engineering and Chemical. 12, 5: 777-782.

Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification oils and fats. Journal of American oil Chemists' Society. 60, 2: 291-294.

Masse, L., Kennedy, K. J., Chou, S. P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 79: 629-635.

Nie, K., Xie, F., and Tan, T. 2006. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel : Optimization of the biodiesel production. Journal of molecular Catalysis B : Enzymatic, 43: 142-147.

Oh, J. M., Lee, D. H., Song, Y. S., Lee, S. G., and Kim, S. W. 2007. Stability of immobilized lipase on poly(vinyl alcohol) microspheres. Journal of Industrial Engineering and Chemical. 3: 429-433.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and Applied Biochemistry. 29, 2: 119-131.

Redondo, O., Herrero, A., Bello, J. F., Roig, M. G., Calvo, M. V., Plou, F. J., and Burguillo, F. J. 1995. Comparative kinetic study of lipases A and B from Candida rugosa in the hydrolysis of lipid P-nitrophenyl esters in mixed micells with triton X-100. Biochemica et BiophysicaActa (BBA)-General Subjects. 1243, 1: 15-24.

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, R. D., and Verger, R. 1998. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications. AngewandteChemie (International ed. in English). 37,12: 1608-1633.

Sharma, R., S. K. Soni, R. M. Vohra, L. K. Gupta, and J. K. Gupta. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic Bacillus ap. RSJ-1. Process Biochemistry. 37: 1075-1084.

Takac, S. and Bakkal, M. 2007. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of Candida rugosa lipase toward S-Naproxen production. Process Biochemistry. 42: 1021-1027.

Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H., Kobayashi, S. 2001. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. Chemistry Letter. 6: 492-493.

Tashtoush, G, M., Al-Widyan, M, I., and Al-Jarrah, M, M. 2003. 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.

Ting, W., Huang, C., Giridhar, N., and Wu, W. 2008. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers. 39: 203-210.

Wong, D. W. S. 1995. Food Enzyme Structure and Mechanism. New York : Chapman & Hall,

Yang, G., Tian-Wei, T., Kai-Li, N. and Fang, W. 2006. Immobilization of lipase on maccroporous resin and Its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. Chinese J. Biotechnology. 22: 114-118.

Yujun, W., Jian, X., Guangsheng, L., and Youyuan, D. 2007. Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface. Bioresource Technology. 99: 2299-2303.

Yusuf, A., Milford A, H., and Joseph E, B. 1995. Optimization of diesel, Methyl tallowate and ethanol blend for reducing emissions from diesel engine. Bioresource Technology. 52: 237-243.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมี

ก-1 สารละลายตรวจวัดค่าแอคติวิตี

ก.1.1 การเตรียมทริสสบัฟเฟอร์ (Tris-Hcl)

1) ละลายทริสเบส 121 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้น ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส

2) ปิเปตสารละลาย 1 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.0 ลงในขวดวอลูเมตริก 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ก.1.2 การเตรียมสารละลายพราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต (p-nitrophenyl palmitate)

ละลายพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต 0.5 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร ปั่นกวนให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ก.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.25 โมลาร์

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2.7 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ก-2 สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

สารที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน ได้แก่ สารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) ของ bio-rad เตรียมได้โดยนำสารละลายแบรดฟอร์ด 4 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 4 ส่วน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ข-1 การทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพาราไนโตรฟีนอล

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เพื่อใช้ในการหาค่าแอคติวิตีทั้งหมด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Winkler และ Stuckmann (1979) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายพาราไนโตรฟีนอล 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

2) นำสารละลายในข้อ 1 ไปเจือจาง 1:100 ด้วยทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8.0 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3) เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ดังตาราง ข-1

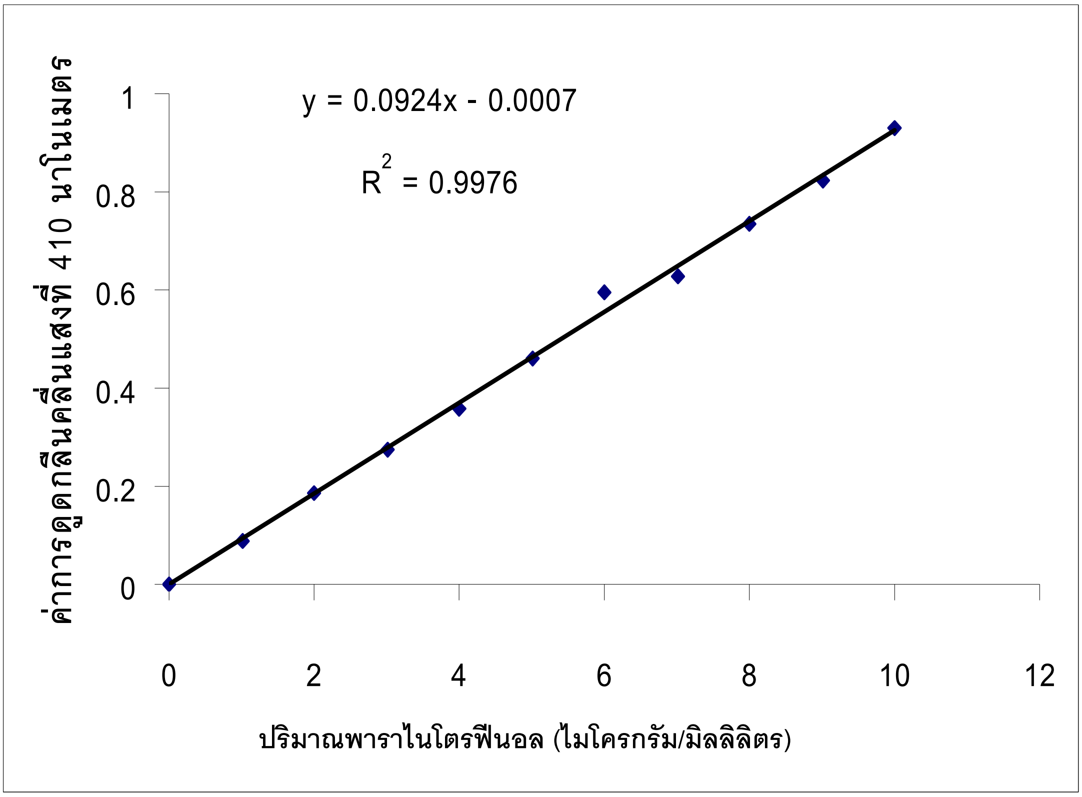
ตาราง ข-1 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

พาราไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	พาราไนโตรฟีนอล 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	ทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH8.0
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	1,000	50

4) ดูดสารละลายที่ความเข้มข้น 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำ 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายพาราไนโตรฟีนอล

5) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของพาราไนโตรฟีนอลที่ 410 นาโนเมตร

6) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของพาราไนโตรฟีนอลที่แต่ละความเข้มข้น มาพลอตเป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูป ข-1



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

หมายเหตุ กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลปาล์มมิเตต แล้วให้พาราไนโตรฟีนอลปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะข้างต้น

ข-2 วิธีทำกราฟมาตรฐาน BSA

1) เตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent)

2) เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางความเข้มข้นโปรตีนระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นดังตาราง ข-2

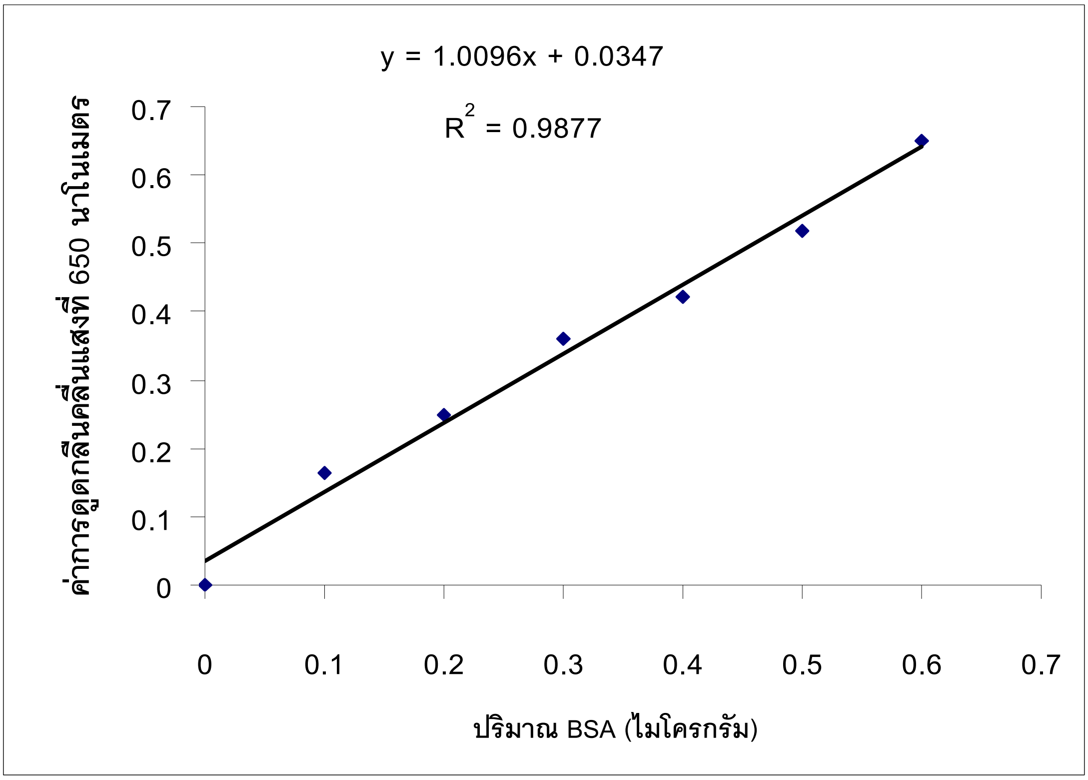
ตาราง ข-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

ปริมาณ BSA (ไมโครกรัม)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	BSA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	น้ำกลั่น
0	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	92
9	9	91
10	10	90

3) นำสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มกับ BSA 5 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และตัวควบคุม (blank) คือ น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทนปริมาณ BSA

5) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ BSA ที่แต่ละความเข้มข้นมาพลอตเป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ ข-2



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ค
การคำนวณ

ค-1 การคำนวณค่าแอคติวิตี

วิธีคำนวณทำโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัด มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ตามสมการดังนี้

$$Y = 0.0924X - 0.0007 \quad \ldots(ค\text{-}1)$$

โดยทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะทำให้ได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณของพาราไนโตรฟีนอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา จากนั้นทำการเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัมเป็นไมโครโมลโดยการหารด้วยมวลโมเลกุลของพาราไนโตรฟีนอล ซึ่งเท่ากับ 139.11 แล้วหารด้วยปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวัด ปรับหน่วยให้เป็นต่อมิลลิลิตร เช่นในกรณีที่ใช้สารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรในการวัด ก็ทำการหารด้วย 20 และคูณด้วย 1000 จะได้หน่วยเป็นไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และสุดท้ายหารด้วยเวลาที่ใช้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที จะได้หน่วยสุดท้ายเป็นหน่วย ไมโคร-โมล ต่อมิลลิลิตร ต่อนาที หรือหน่วยยูนิตนั่นเอง

ค-2 การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

วิธีคำนวณทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดตามวิธีในหัวข้อ 2.3 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ BSA ตามสมการดังนี้

$$Y = 1.0096x + 0.0347 \quad \ldots(ค\text{-}2)$$

โดยทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะทำให้ได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัม เปลี่ยนหน่วยไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม โดยคูณด้วย 1000 เปลี่ยนหน่วยให้เป็นมิลลิลิตร โดยการหารด้วยปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ แล้วปรับให้เป็นหน่วยมิลลิลิตร จะได้หน่วยสุดท้ายเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค-3 ค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity)

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของไลเพสหาได้จาก การนำค่าแอคติวิตีของไลเพสหารด้วยปริมาณโปรตีน จะได้หน่วยสุดท้ายเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังสมการ

$$\text{Specific activity : units/mg} = \frac{\text{Total activity : units}}{\text{Total protein : mg}} \quad \ldots(ค\text{-}3)$$

ค-4 การหาปริมาตรน้ำมันปาล์ม

หาปริมาตรน้ำมันปาล์มจากสูตร $D = M / V$ …(ค-4)

D คือ ความหนาแน่นของน้ำมันปาล์ม (0.89 กรัมต่อมิลลิลิตร)

M คือ มวลน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม (3 กรัม)

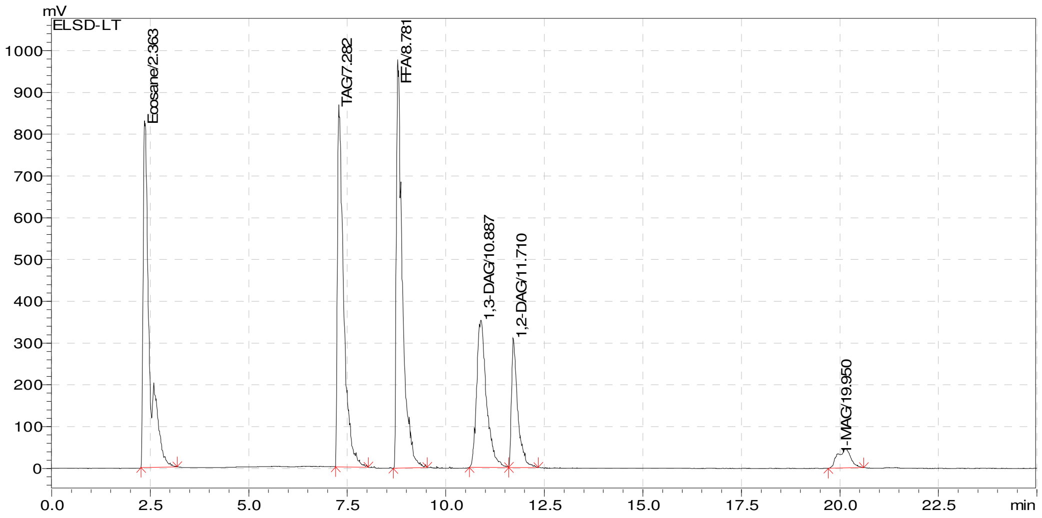
V คือ ปริมาตรของน้ำมันปาล์ม

ดังนั้น $V = 3 / 0.89 = 3.37$ มิลลิลิตร

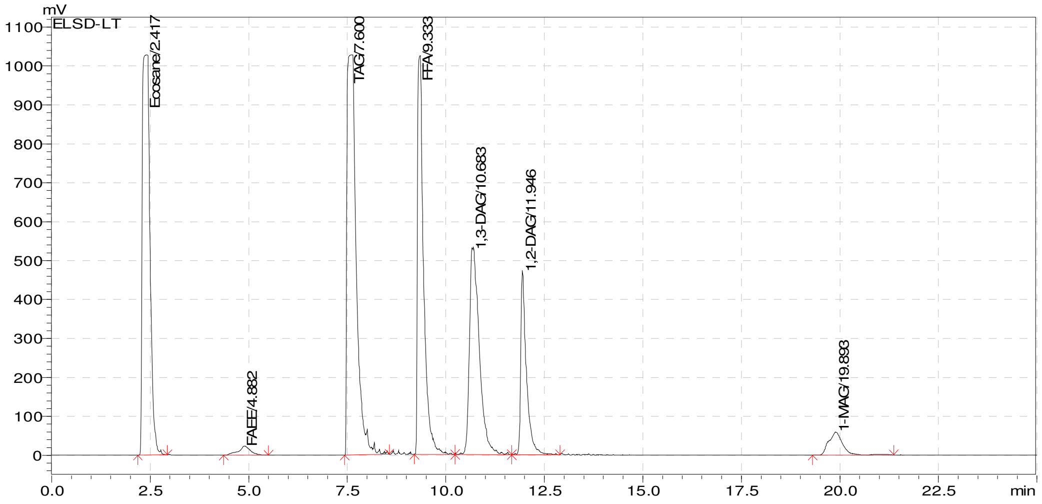
น้ำมันปาล์ม 3 กรัม มีปริมาตร 3.37 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

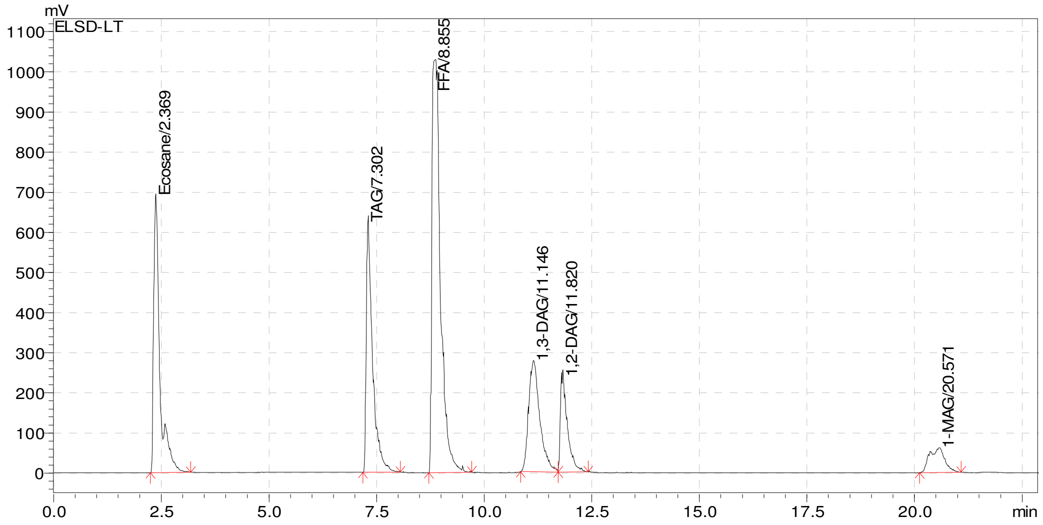
ลักษณะกราฟของอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography :HPLC)



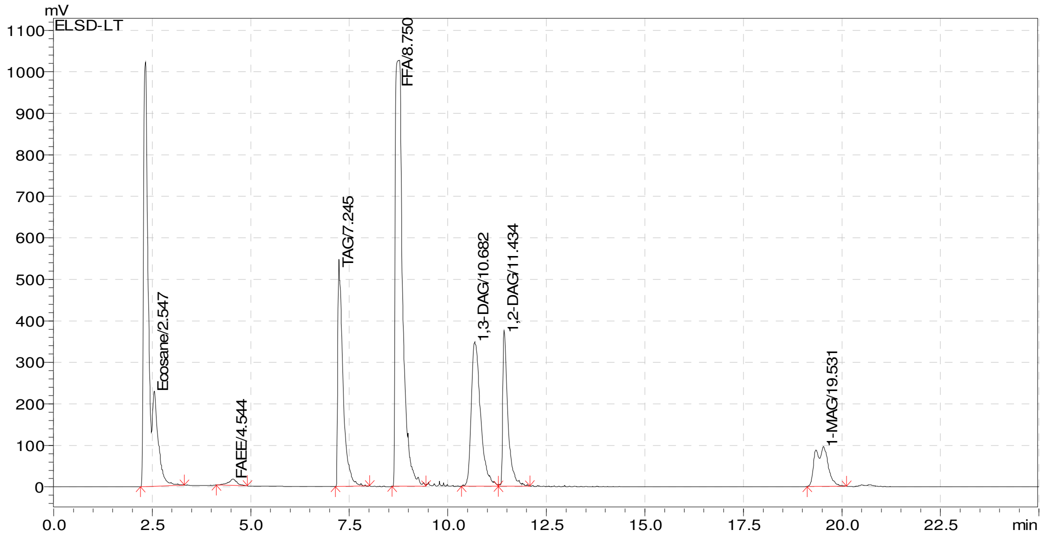
รูปที่ ง-1 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอล 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง



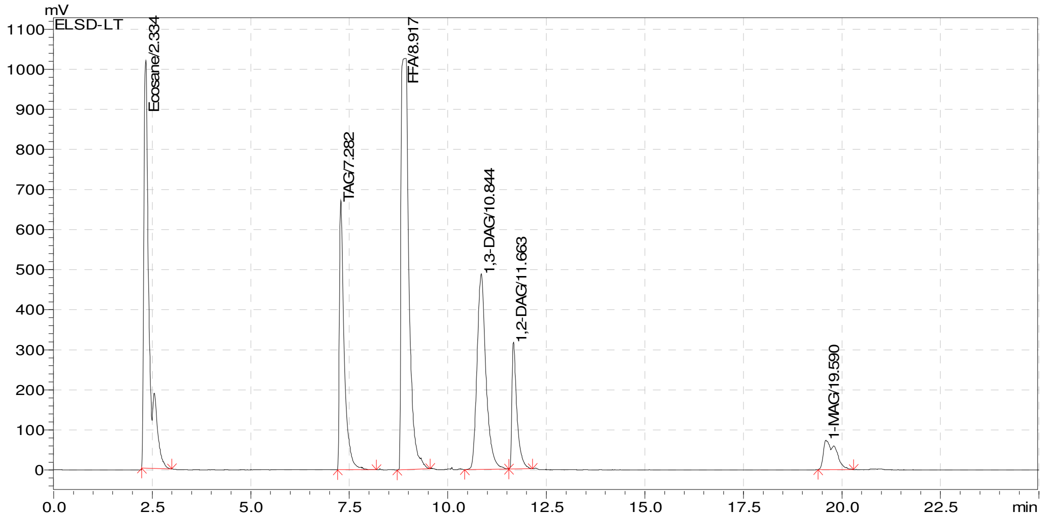
รูปที่ ง-2 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



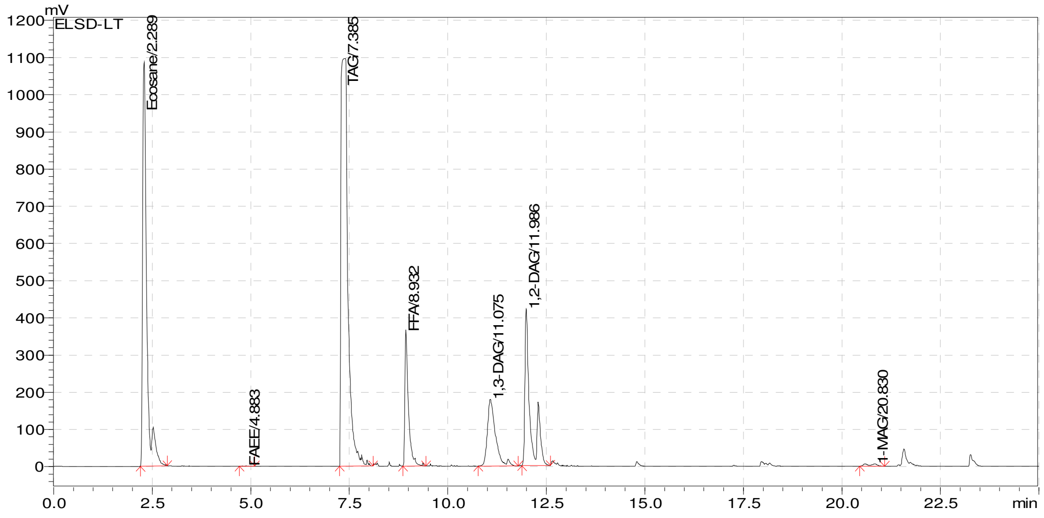
รูปที่ ง-3 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง



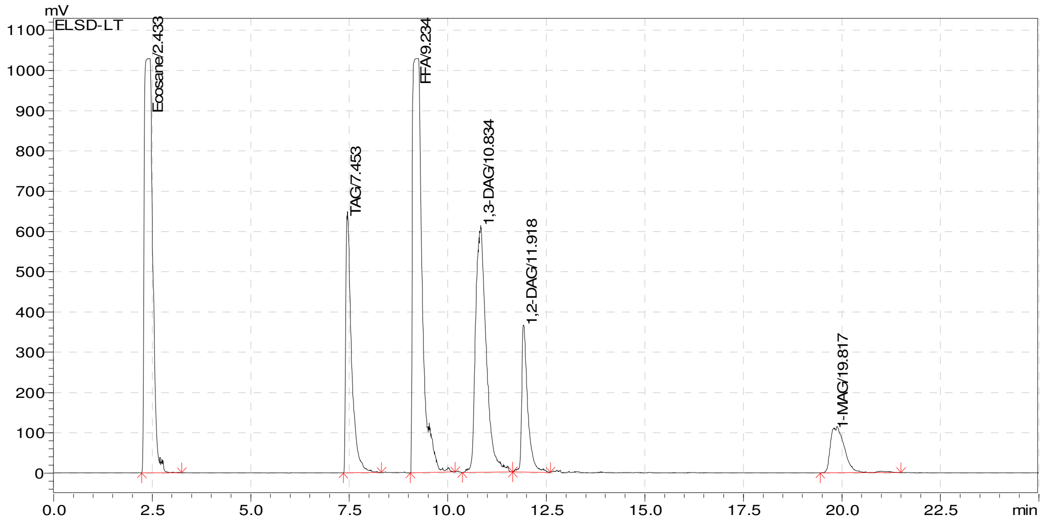
รูปที่ ง-4 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยเฮปเทนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



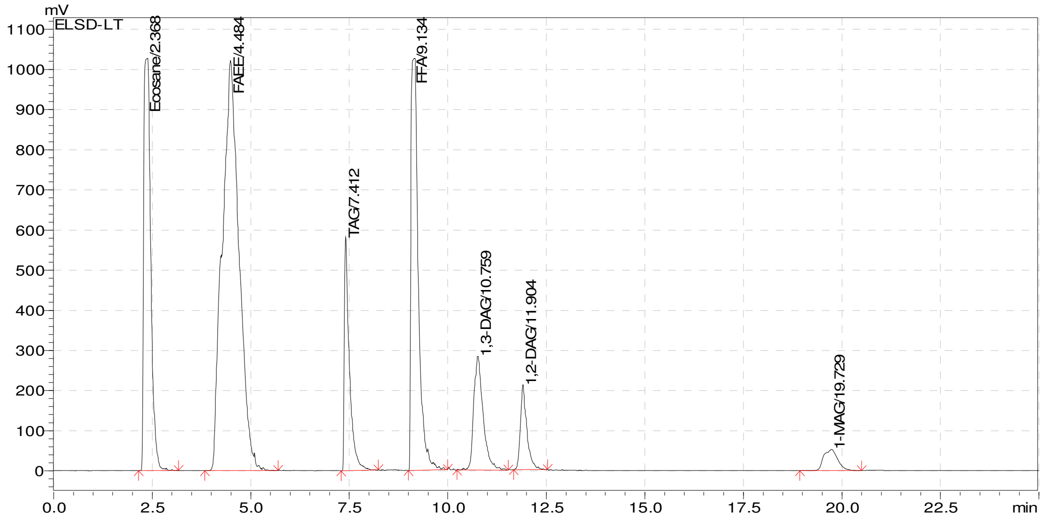
รูปที่ ง-5 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง



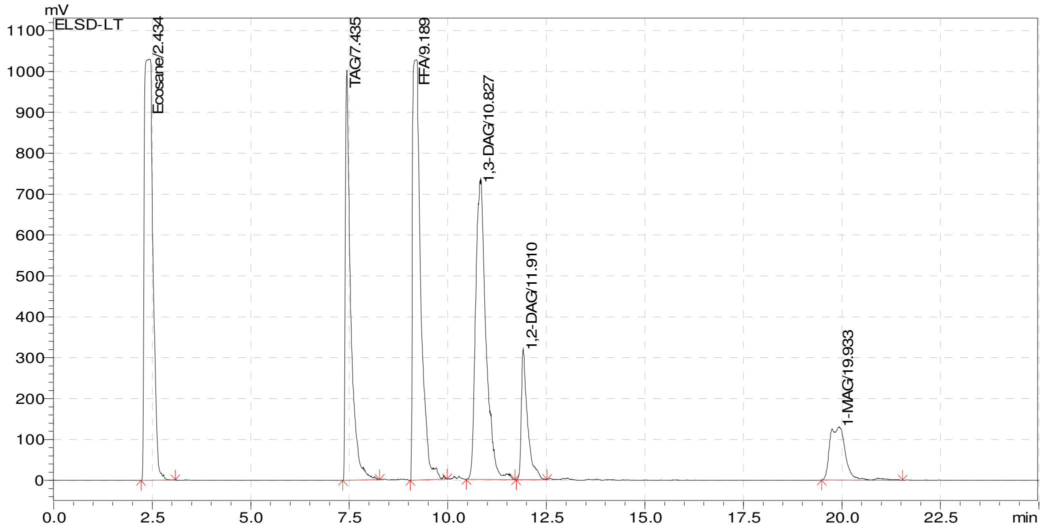
รูปที่ ง-6 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



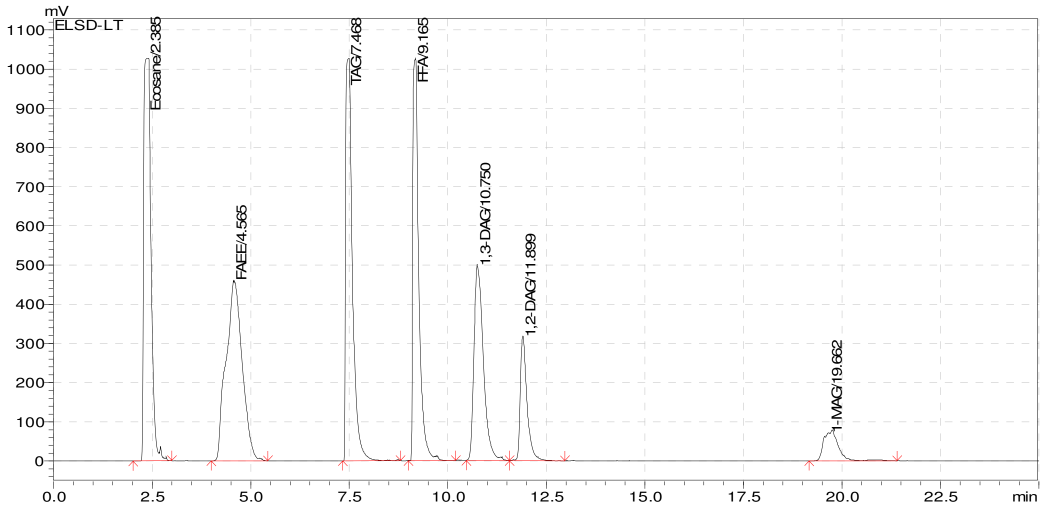
รูปที่ ง-7 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง



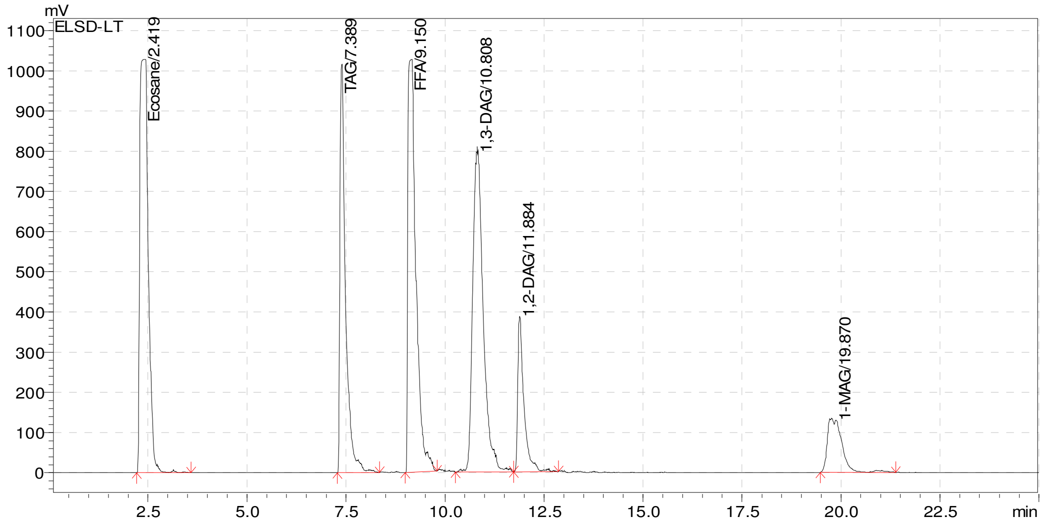
รูปที่ ง-8 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



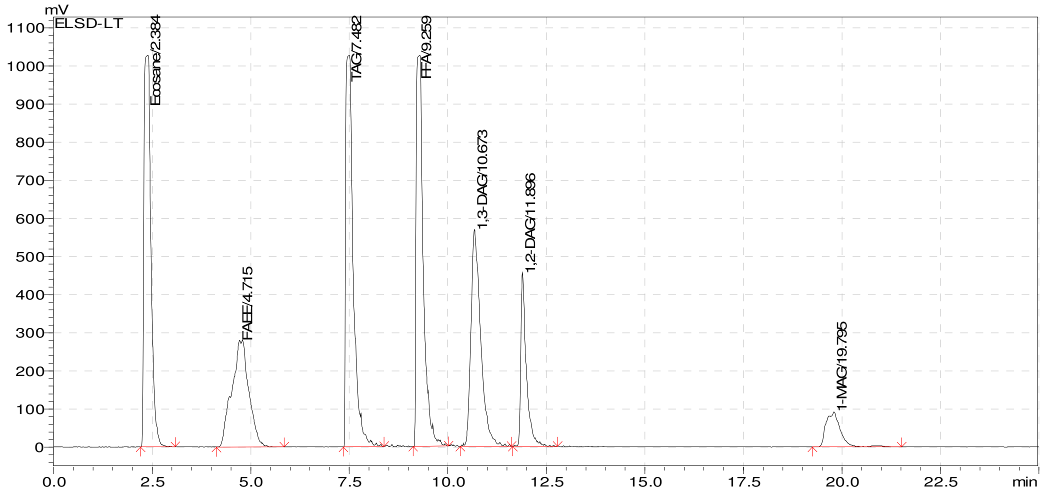
รูปที่ ง-9 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง



รูปที่ ง-10 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



รูปที่ ง-11 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

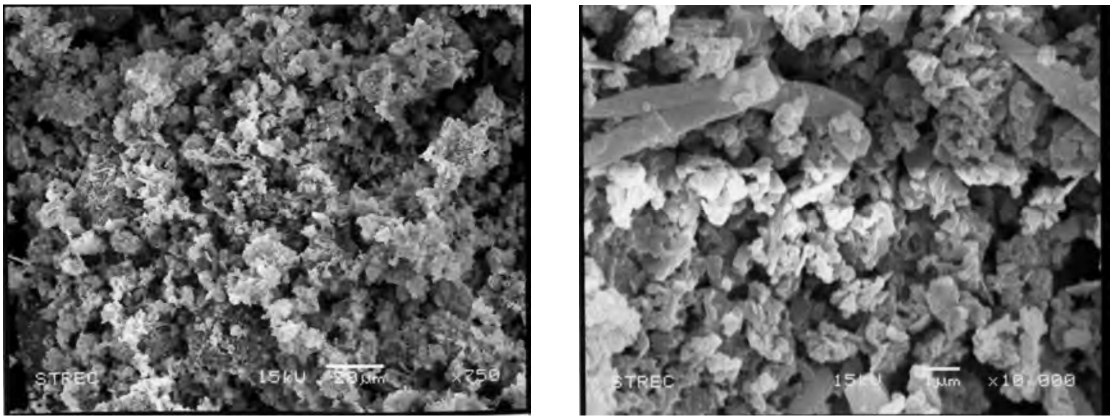


รูปที่ ง-12 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยเชื่อมขวางกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ภาคผนวก จ
ข้อมูล

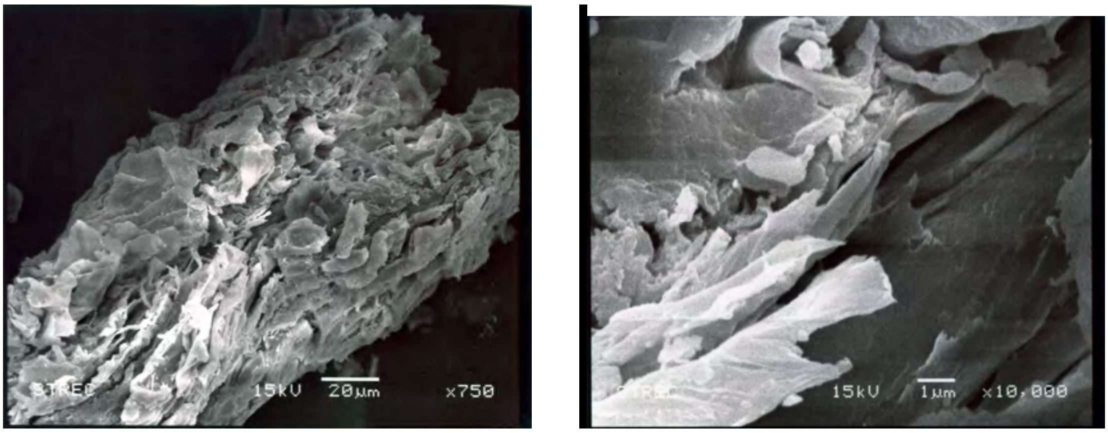
จ-1 การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของไลเพสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope:SEM)

จ.1.1 ไลเพสอิสระ และเส้นใยกกบดก่อนทำการตรึงรูปไลเพส



(ก) (ข)

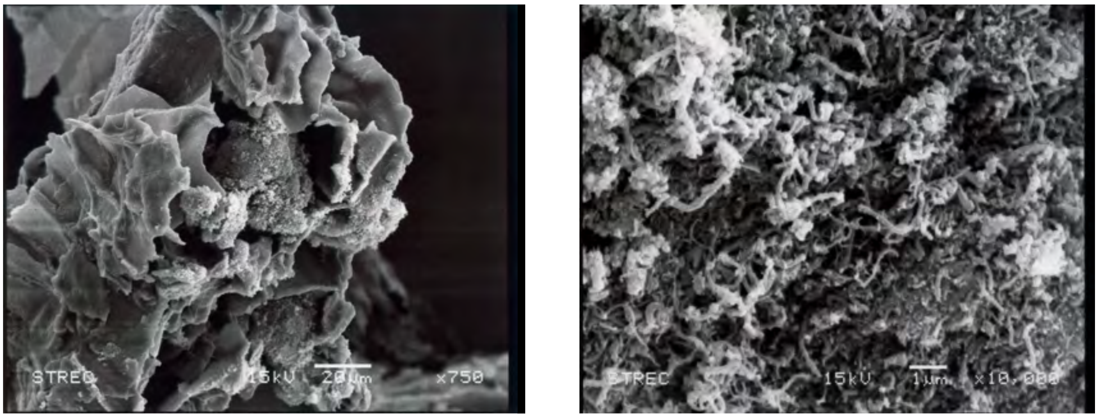
รูปที่ จ-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของเอนไซม์ไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3)) (Candida rugosa) (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x10,000



(ก) (ข)

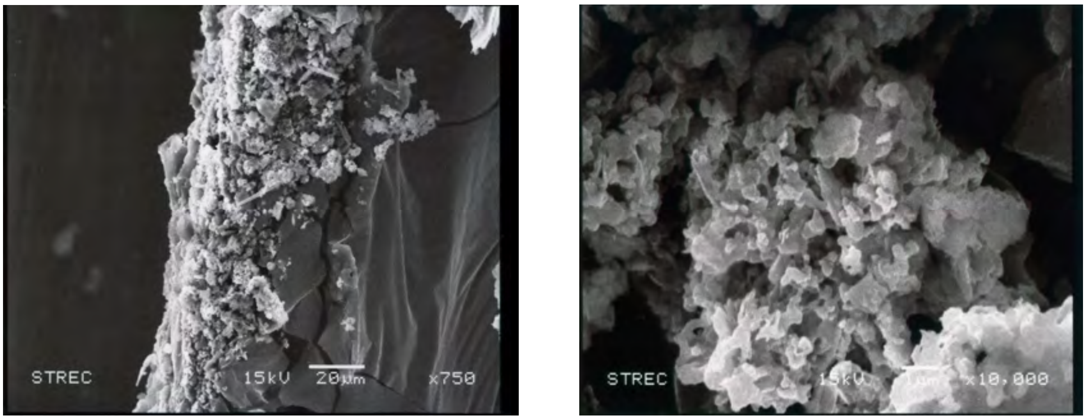
รูปที่ จ-2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย x750 เอนไซม์ไลเพส (Lipase (EC3.1.1.3)) (Candida rugosa) (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x10,000

จ.1.2 ไลเพสตรึงรูปเมื่อทำการตรึงไลเพสโดยใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี



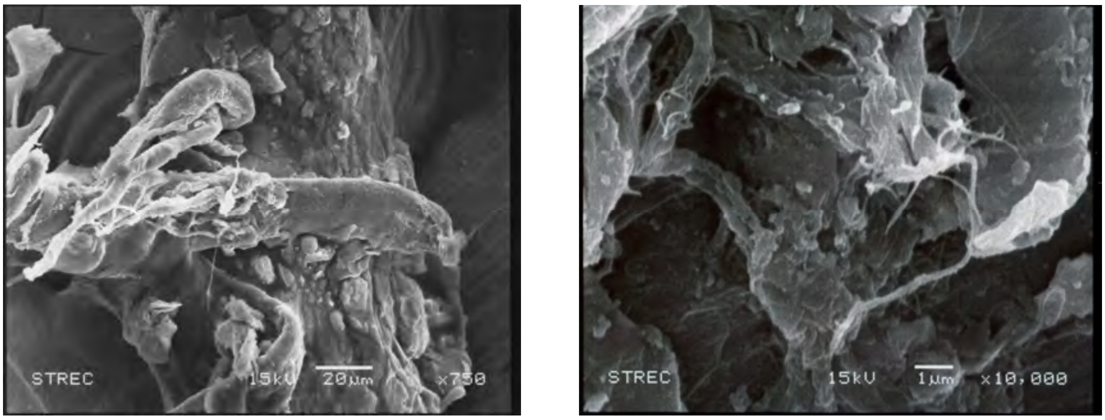
(ก) (ข)

รูปที่ จ-3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H1 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x10,000



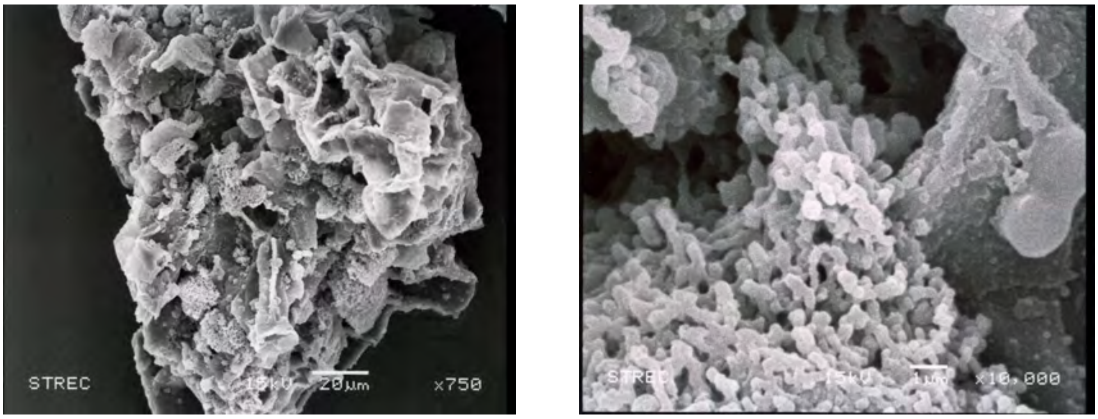
(ก) (ข)

รูปที่ จ-4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี H2 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x10,000



(ก) (ข)

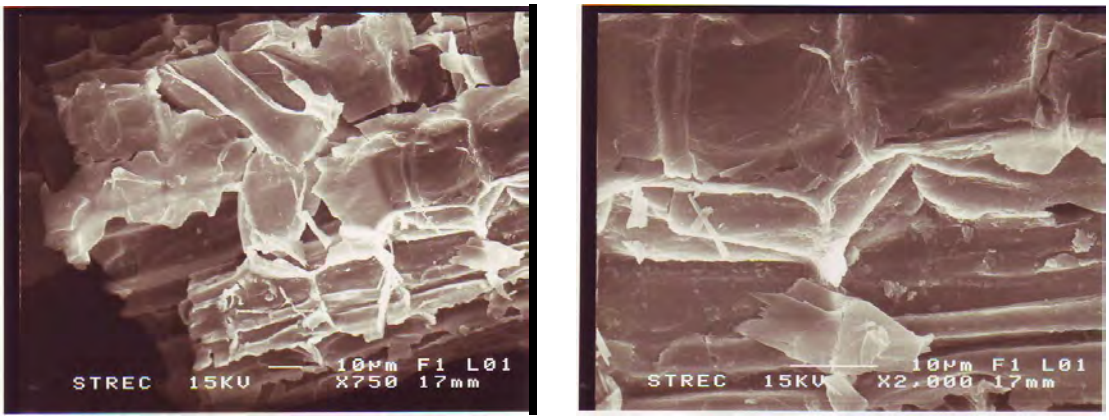
รูปที่ จ-5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A1 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x10,000



(ก) (ข)

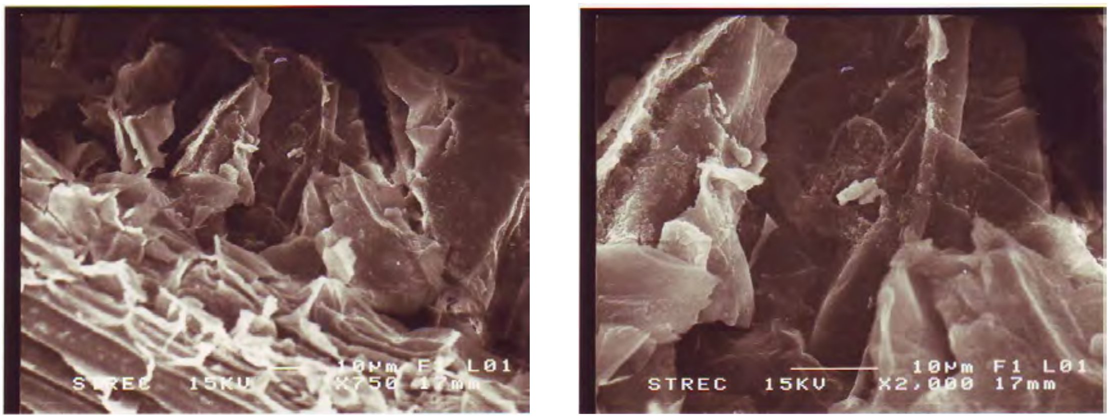
รูปที่ จ-6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธี A2 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x10,000

จ.1.3 ความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ และวิธีตรึงไลเพสโดยใช้ดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์



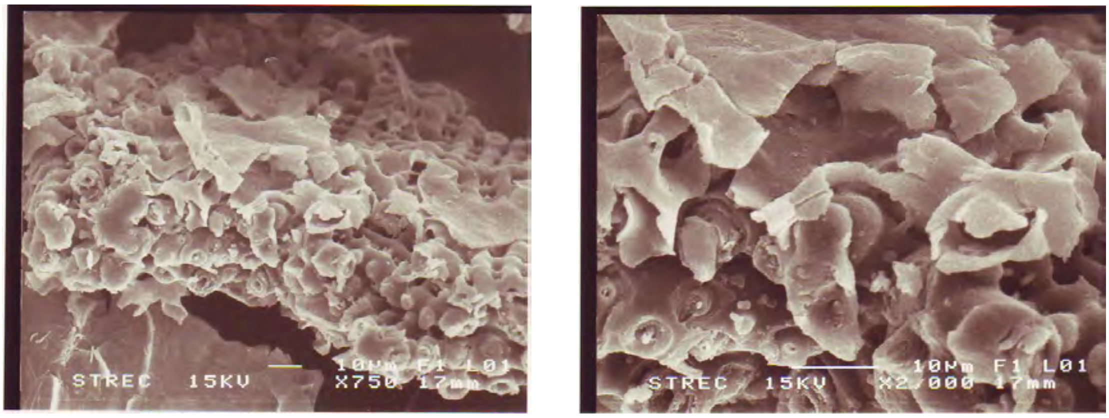
(ก) (ข)

รูปที่ จ-7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยสารกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000



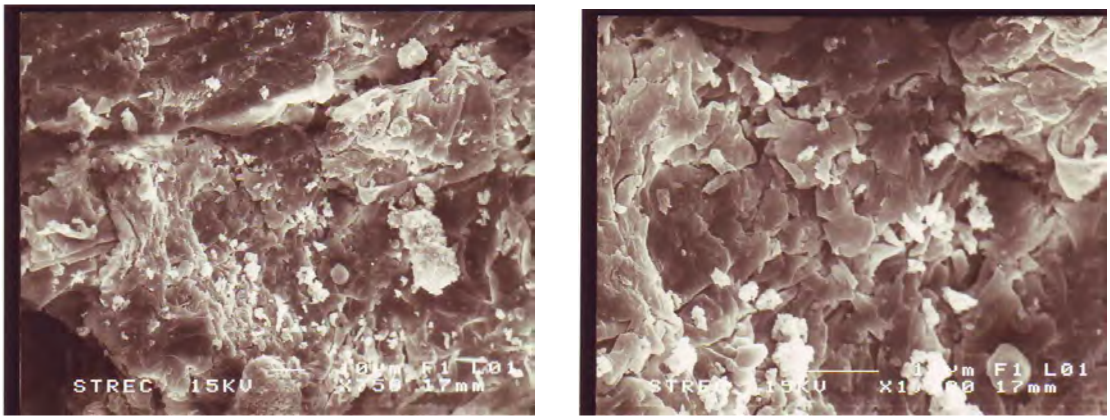
(ก) (ข)

รูปที่ จ-8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยสารกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000



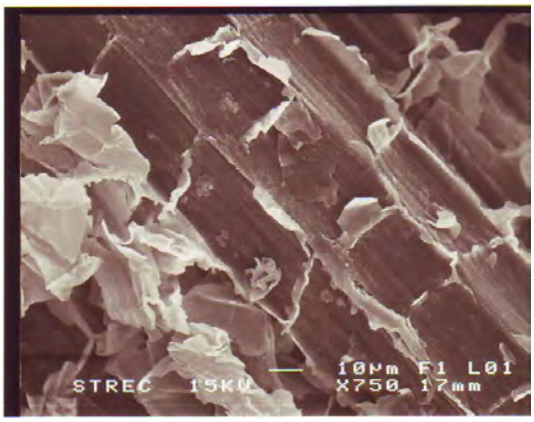
(ก) (ข)

รูปที่ จ-9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000

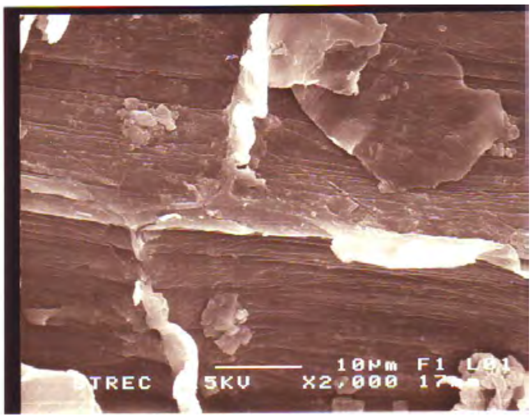


(ก) (ข)

รูปที่ จ-10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปเทน (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000



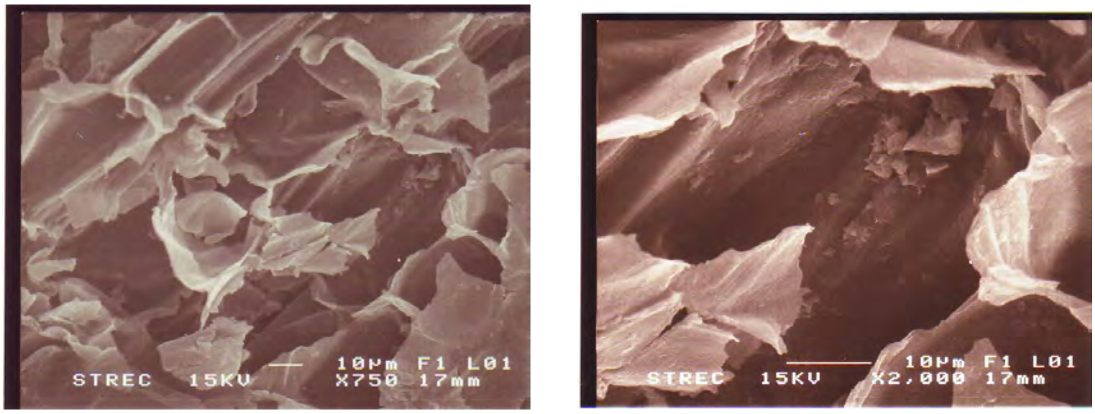
(ก)



(ข)

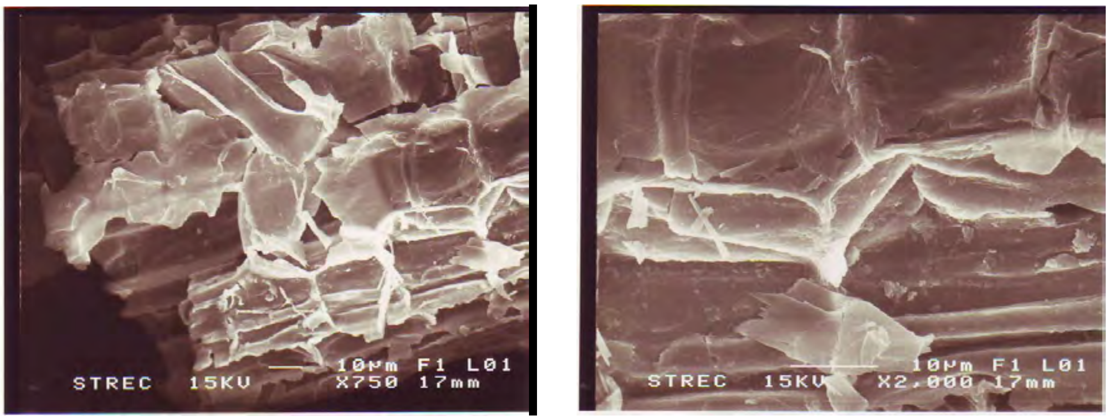
รูปที่ จ-11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีดูดซับทางกายภาพโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000

จ.1.4 ค่าความเป็นกรดด่าง



(ก) (ข)

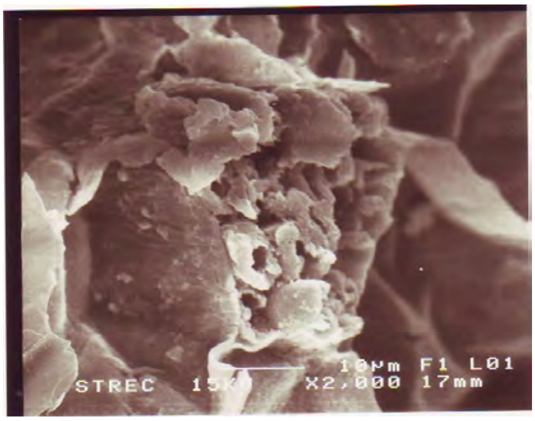
รูปที่ จ-12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000



(ก) (ข)

รูปที่ จ-13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000

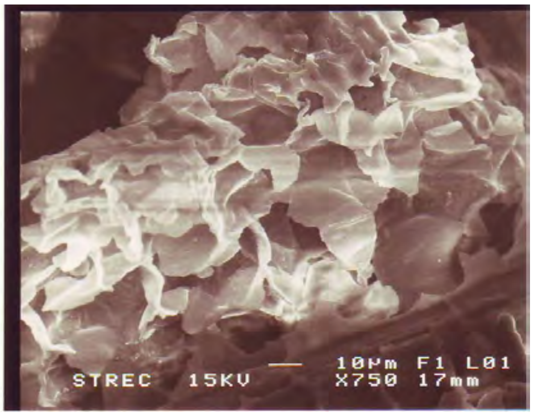
(ก)



(ข)

รูปที่ จ-14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 11 (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000

จ.1.5 ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7 ก่อนและหลังทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน



(ก)

(ข)

รูปที่ จ-15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายของไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ที่ค่าความเป็นกลางหลังนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน (ก) กำลังขยาย x750 (ข) กำลังขยาย x2,000

จ-2 วิเคราะห์พื้นที่ผิว และขนาดของรูพรุน ด้วยเครื่อง BET Surface Area Analyzer

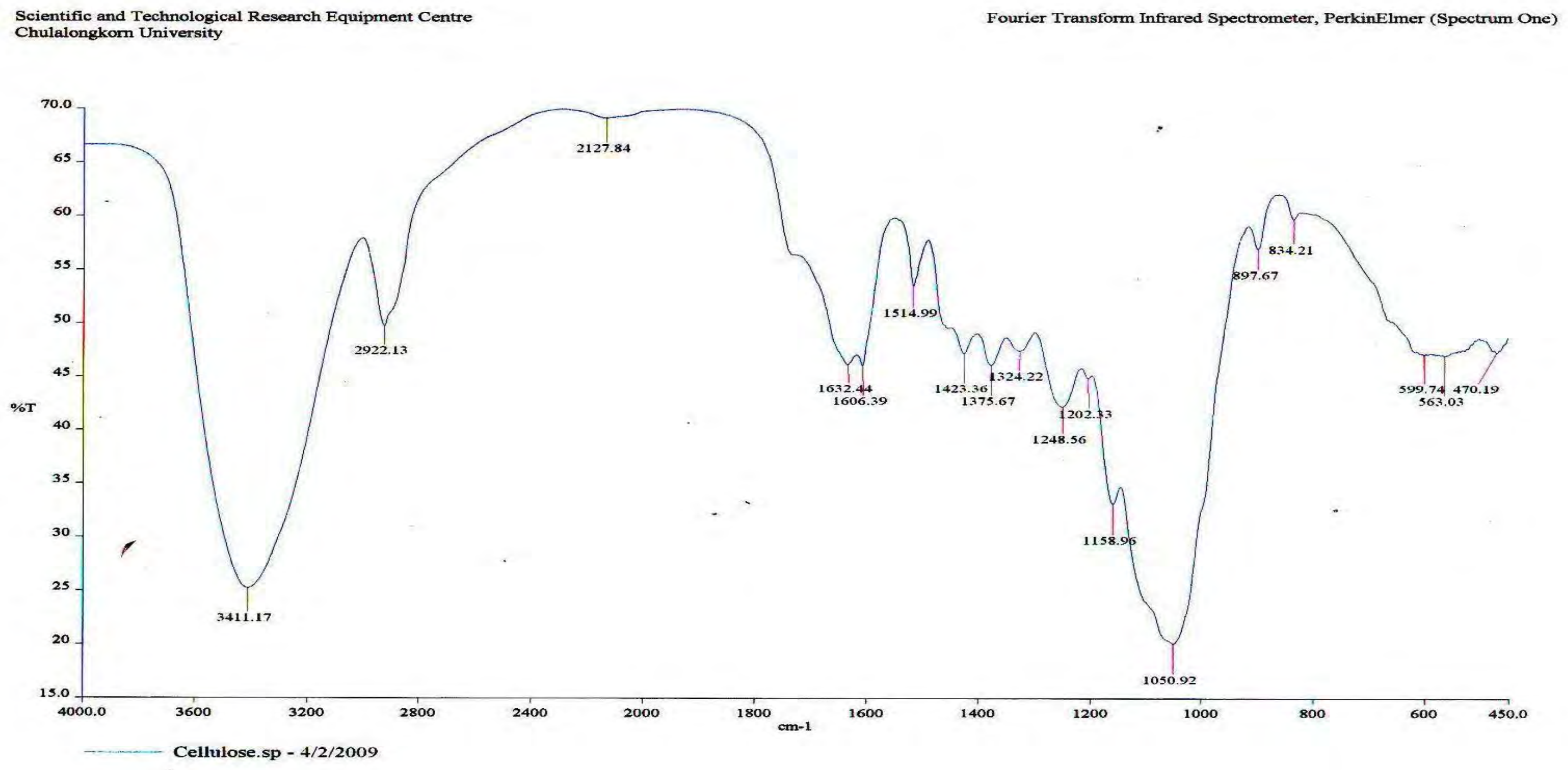
ตาราง จ-1 ปริมาณพื้นที่ผิวของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ

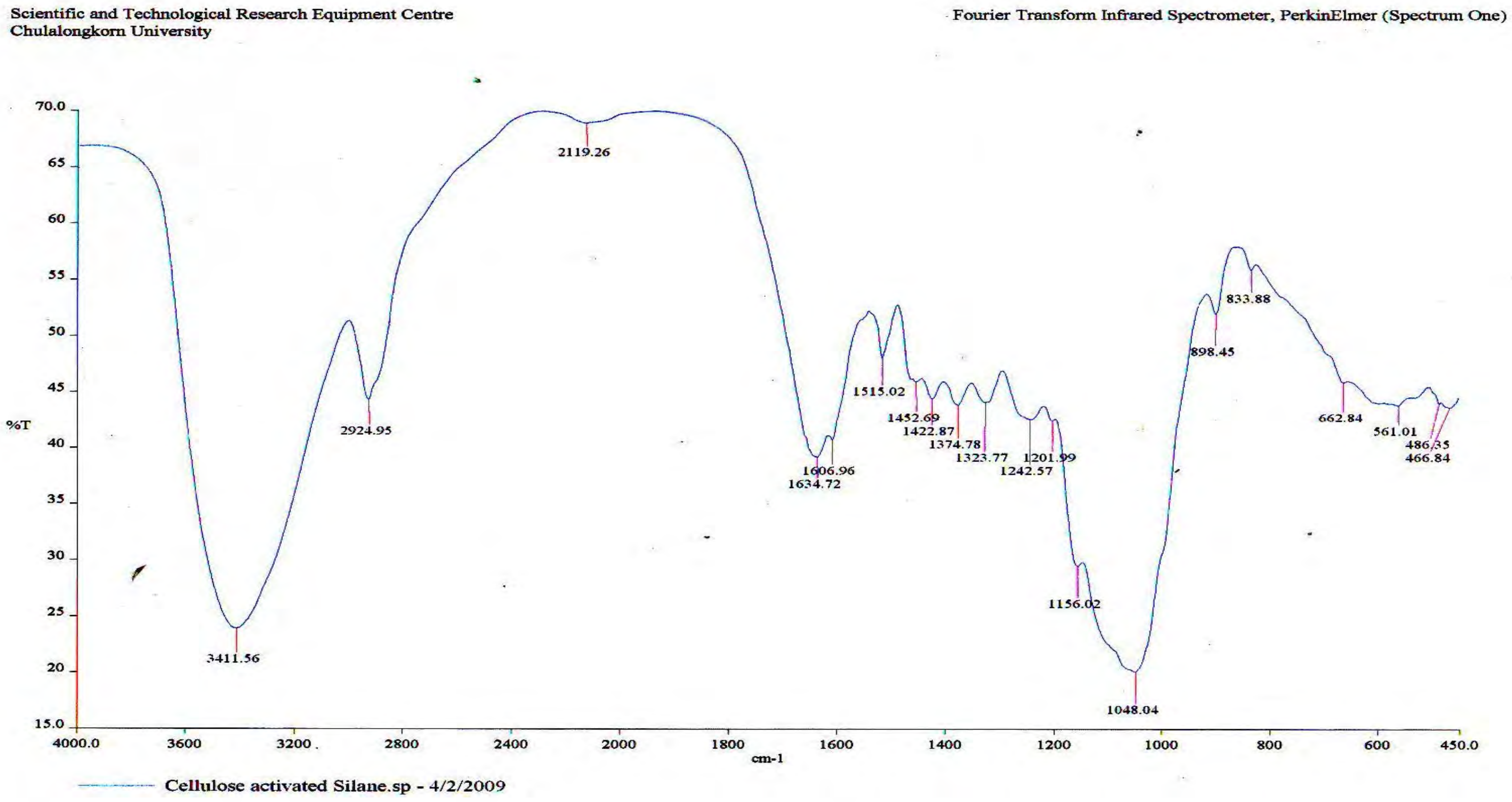
ตัวอย่าง	ปริมาณพื้นที่ผิว (ตารางเมตร/กรัม)
กก	1.331
กก/APTES	1.831
กก/GA0.2%	1.268
กก/GA0.5%	1.329
กก/GA0.8%	1.432

ตาราง จ-2 ขนาดรูพรุนของเส้นใยกกเมื่อผ่านการแอคติเวตด้วยขั้นตอนต่าง ๆ

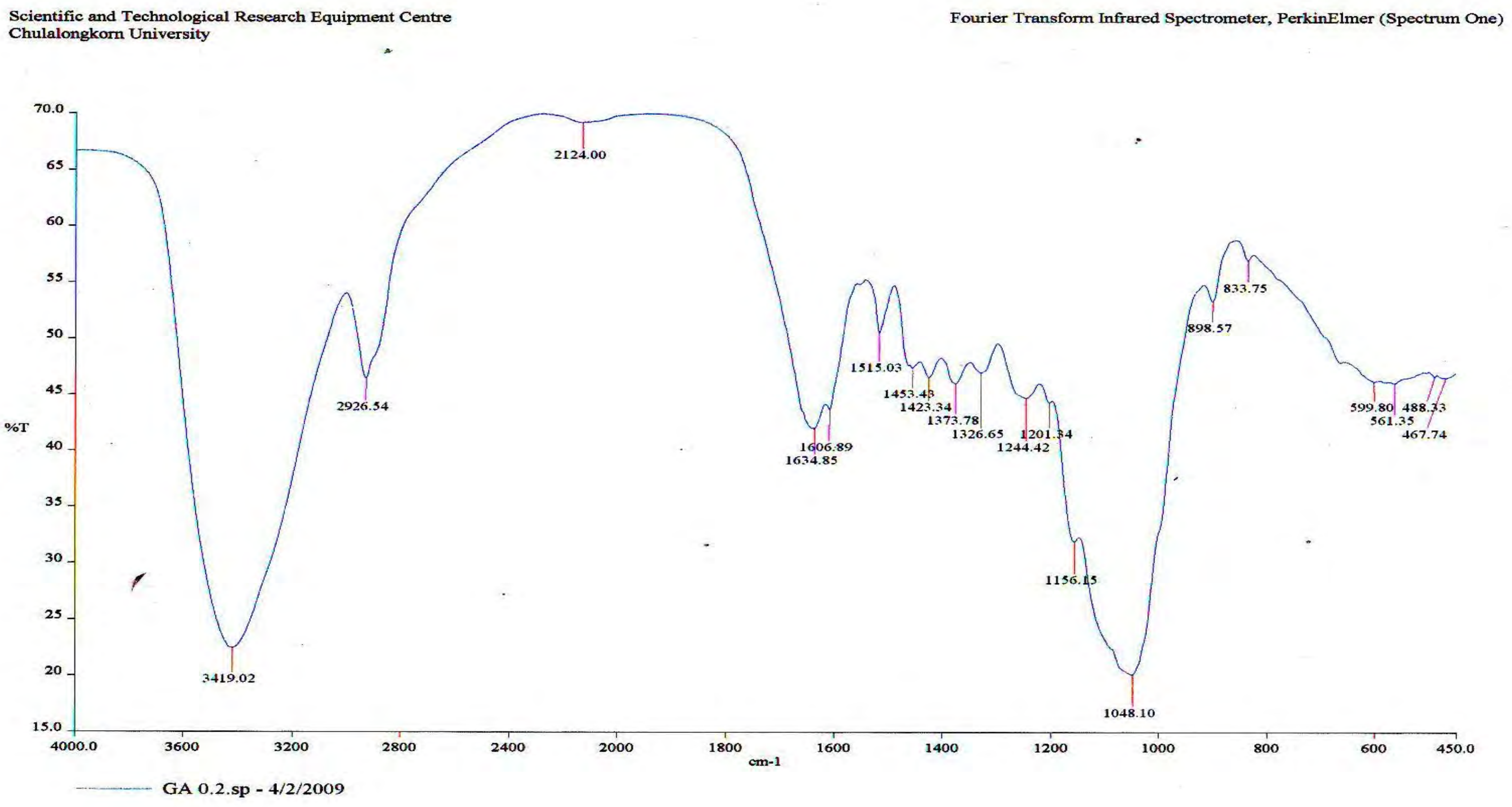
ตัวอย่าง	ขนาดรูพรุน (นาโนเมตร)
กก	47.1
กก/APTES	39.1
กก/GA0.2%	44.7
กก/GA0.5%	39.2
กก/GA0.8%	34.1

จ-3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเส้นใยกกโดยใช้เครื่องฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (FTIR)

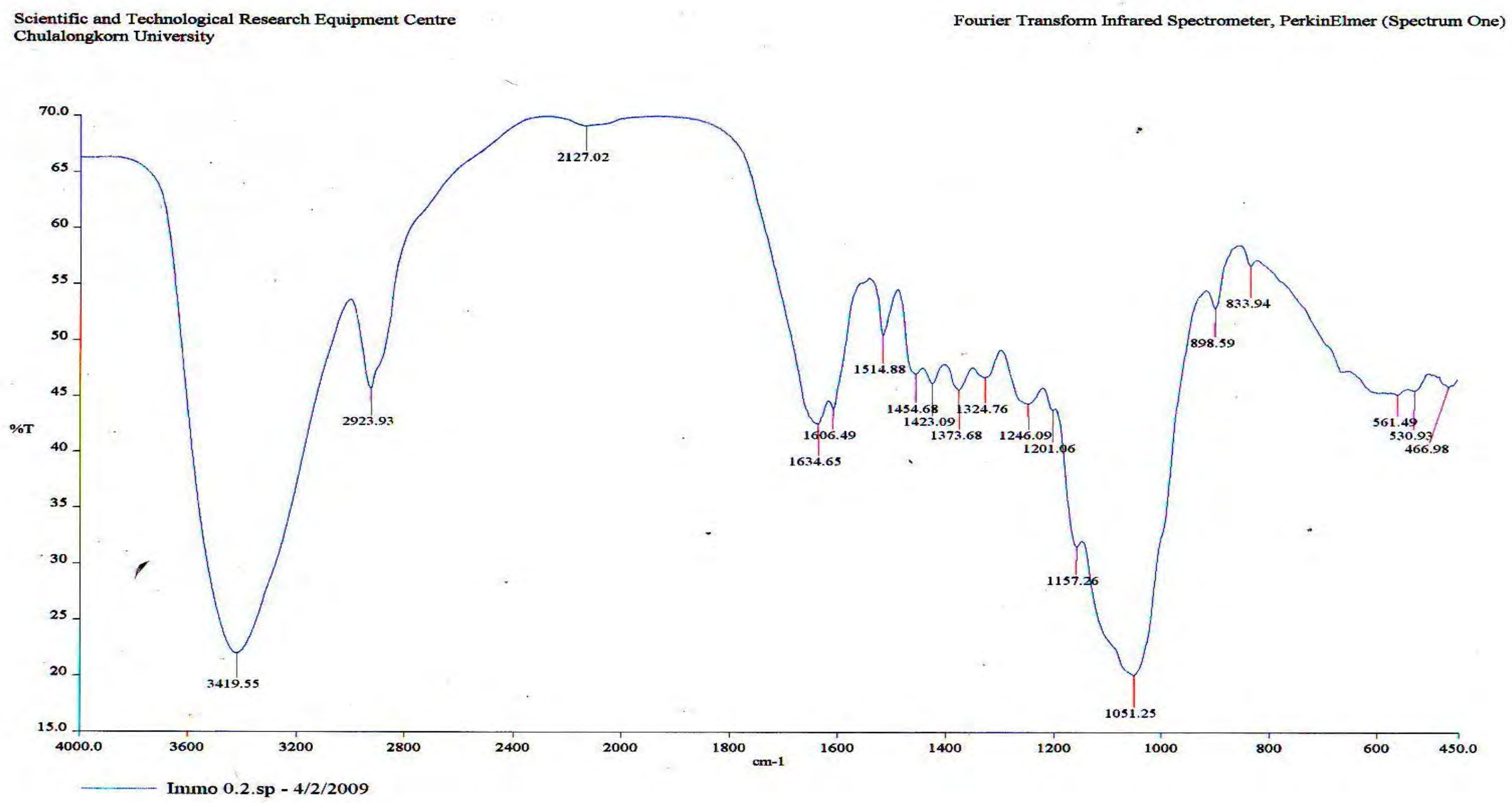




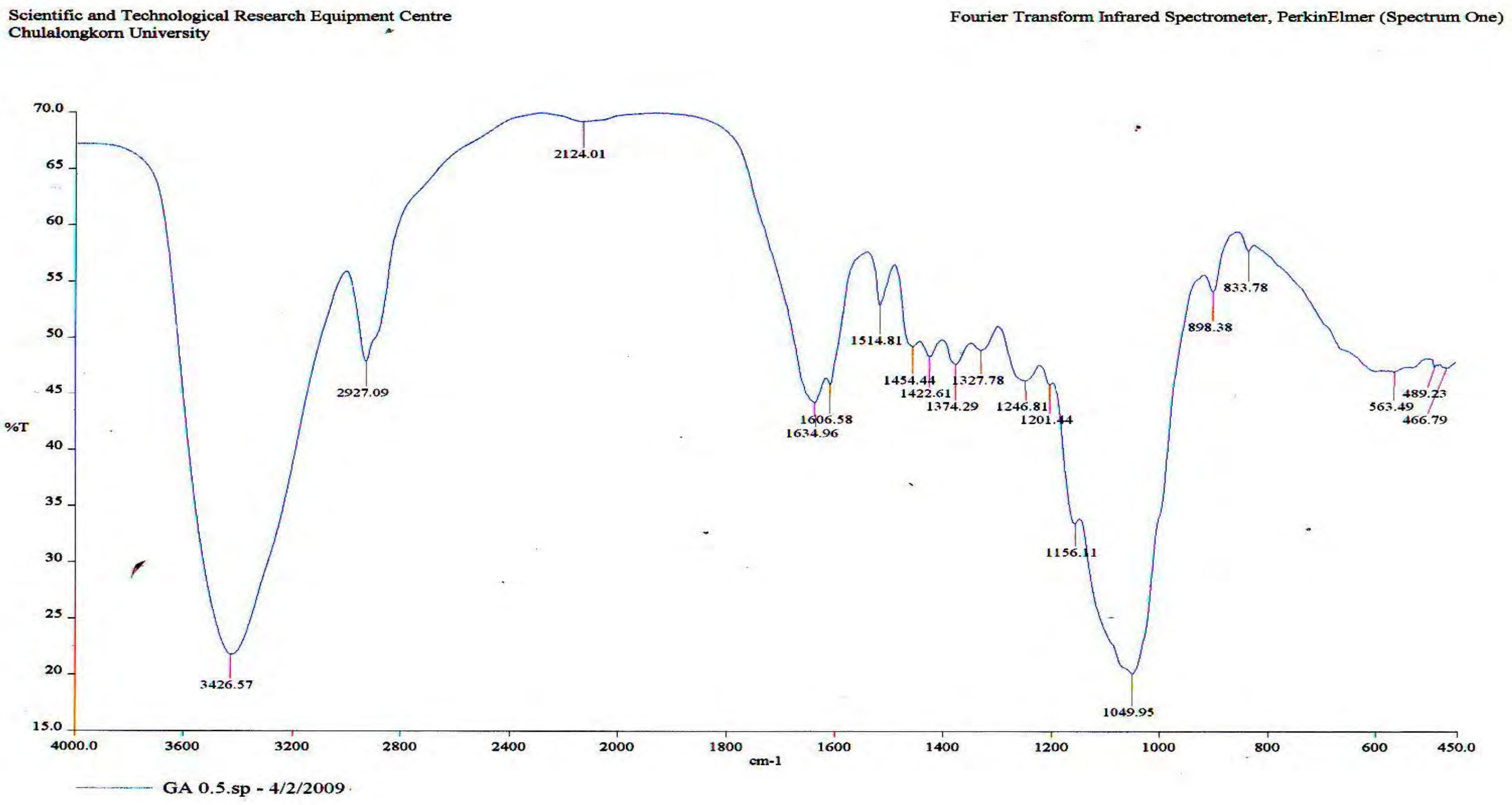
รูป จ-17 IR สเปกตรัมของเส้นใยกก/APTES



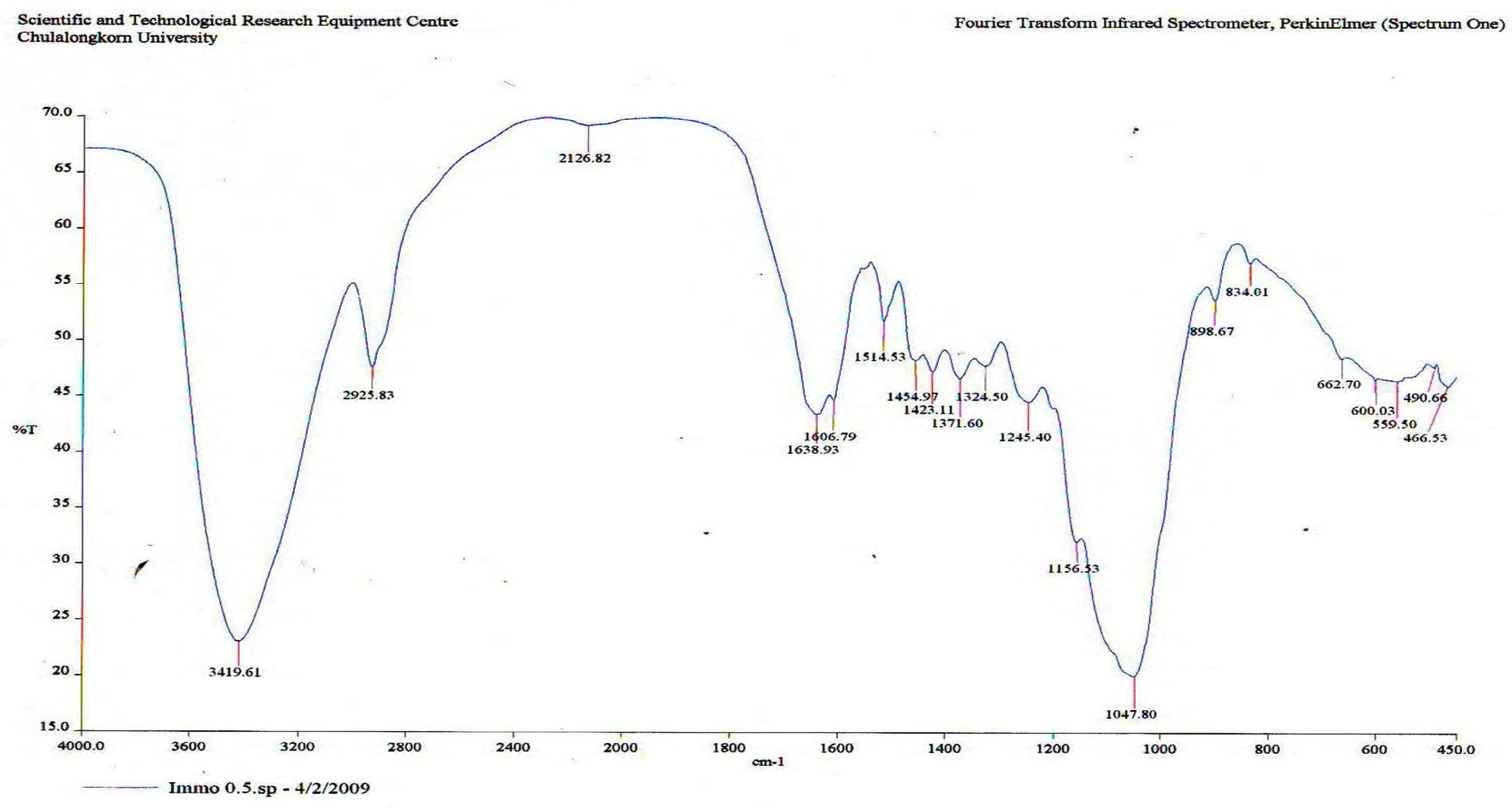
รูป จ-18 IR สเปกตรัมของเส้นใยกก/GA0.2%



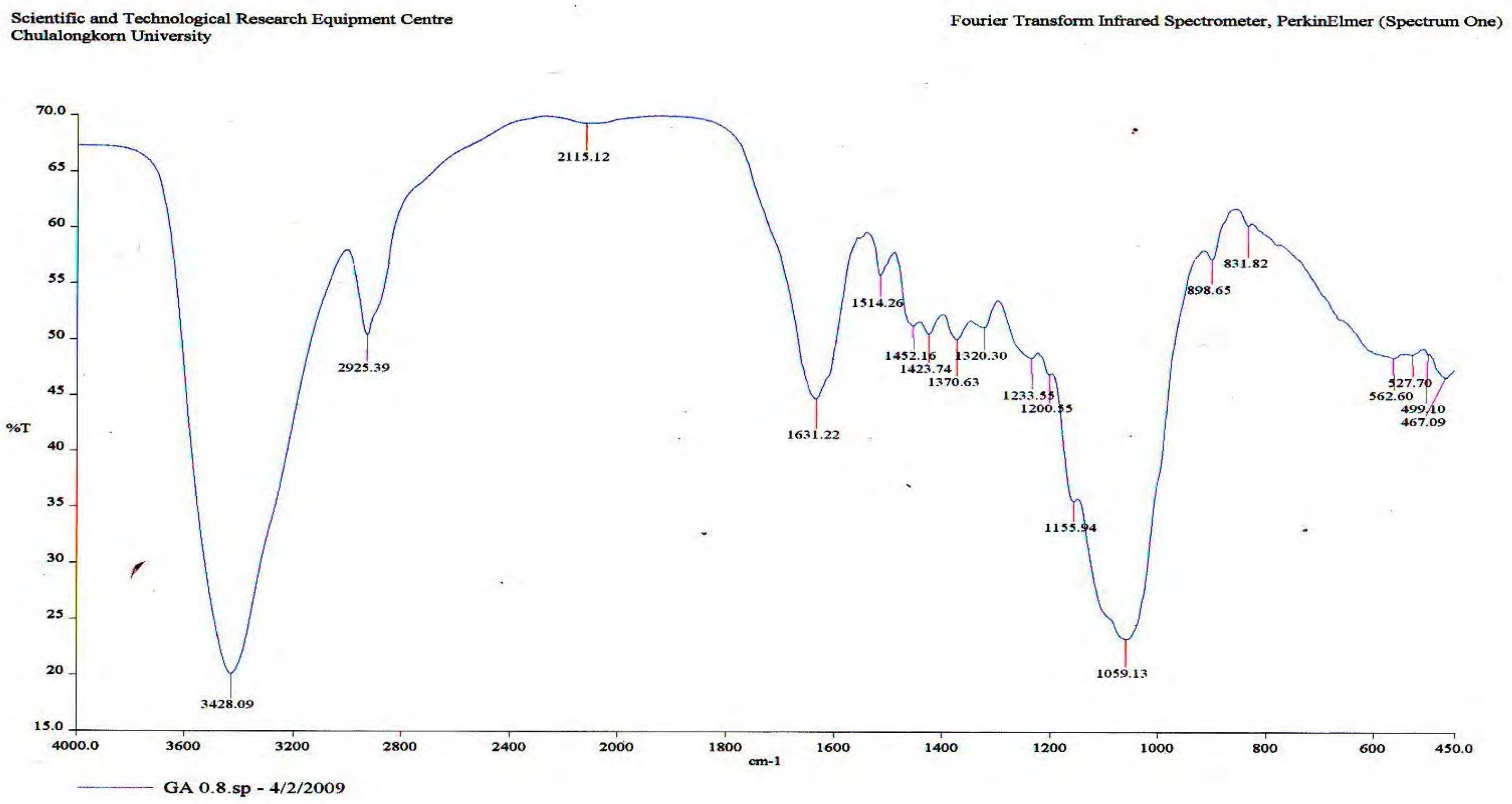
รูป จ-19 IR สเปกตรัมของไลเพสตรึงรูป /GA0.2%



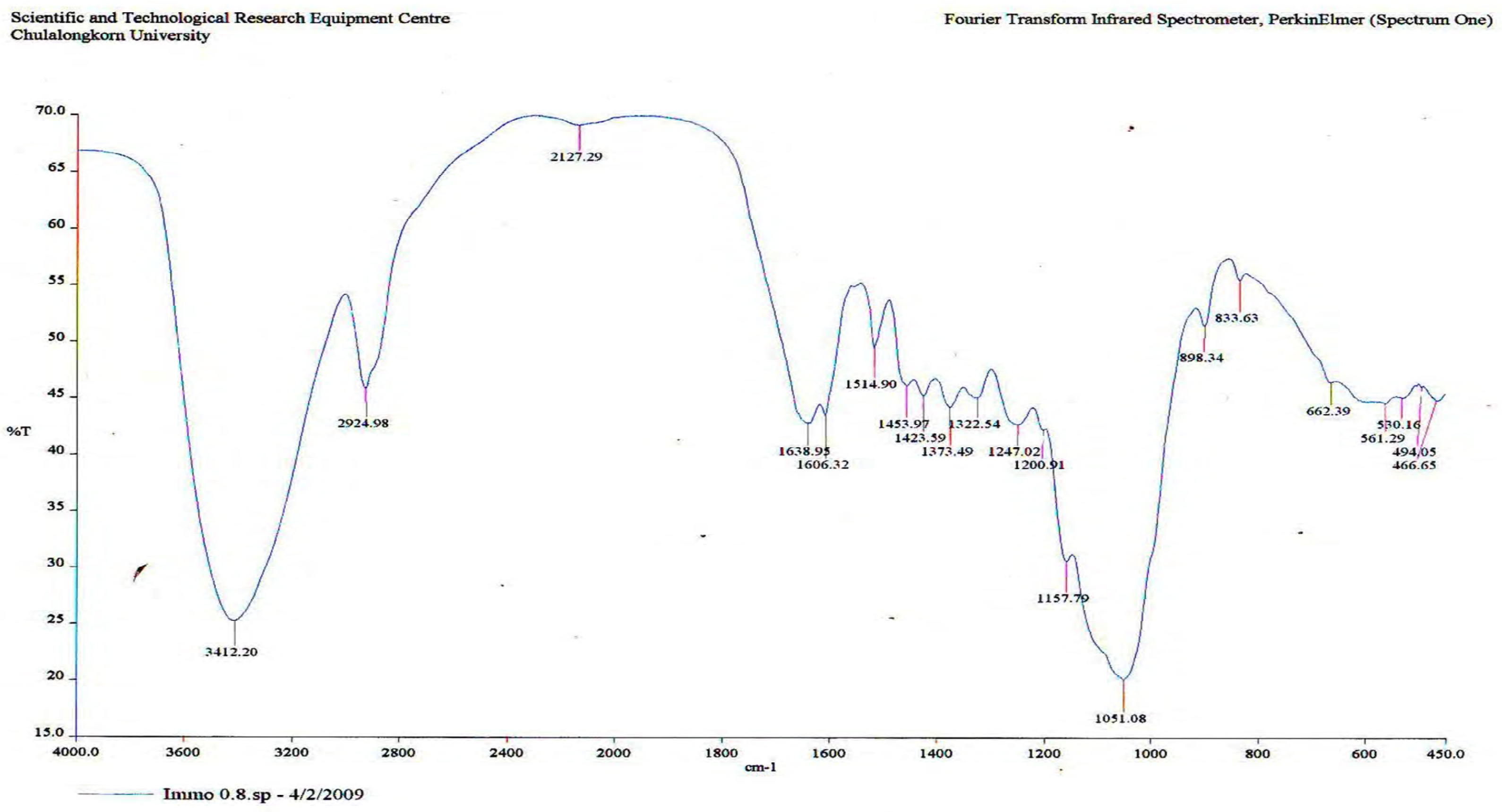
รูป จ-20 IR สเปกตรัมของเส้นใยกก/GA0.5%



รูป จ-21 IR สเปกตรัมของไลเพสตรึงรูป /GA0.5%



รูป จ-22 IR สเปกตรัมของเส้นใยกก/GA0.8%



รูป จ-23 IR สเปกตรัมของไลเพสตรึงรูป /GA0.8%

จ-4 การเปรียบเทียบปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ และเอทิลเอสเทอร์

ตารางที่ จ-3 ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์
ไลเพสอิสระ	41.6
กก/ADHEP	55.9
กก/ADPB	54.5
กก/GA0.2%	52.6
กก/GA0.5%	43.9
กก/GA 0.8%	43.5

ตารางที่ จ-4 ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้ซ้ำ

ตัวอย่าง	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 1	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 2	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 3	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 4	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 5	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 6	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 7
กก/ADHEP	55.9	18.8	0	0	0	0	0	0
กก/ADPB	57.7	0	0	0	0	0	0	0
กก/GA0.2%	54.5	49.5	39.4	23.6	17.6	15.2	5.5	0
กก/GA0.5%	40.8	38.6	28.0	17.2	12.3	5.2	0	0
กก/GA0.8%	40.3	30.7	17.1	7.4	0	0	0	0

ตารางที่ จ-5 ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์
ไลเพสอิสระ	14.7
กก/ADHEP	12.8
กก/ADPB	9.8
กก/GA0.2%	49.6
กก/GA0.5%	32.2
กก/GA 0.8%	23.7

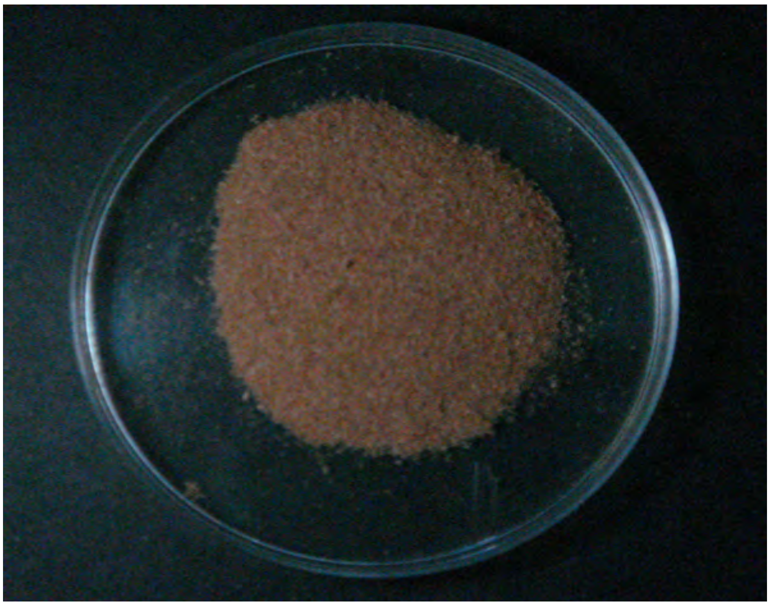
ตารางที่ จ-6 ปริมาณการเกิดเอทิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมันปาล์ม 3:1 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อมีการใช้ซ้ำ

ตัวอย่าง	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 1	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 2	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 3	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 4	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 5	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่6	ร้อยละเอทิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 7
กก/ADHEP	12.8	7.8	0	0	0	0	0	0
กก/ADPB	9.8	0	0	0	0	0	0	0
กก/GA0.2%	49.6	31.6	15.1	12.2	11.1	9.4	7.2	0
กก/GA0.5%	32.2	13.4	12.7	11.8	11	9.4	0	0
กก/GA0.8%	23.7	11.8	11.2	10.6	9.9	0	0	0

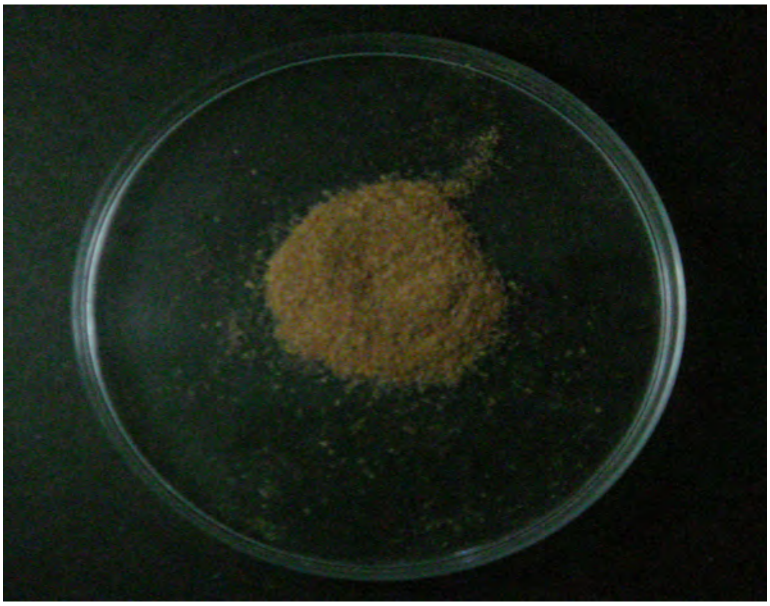
จ-5 ภาพของเส้นใยกก ที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการตรึงไลเพสที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์

รูป จ-24 เส้นใยกกบด

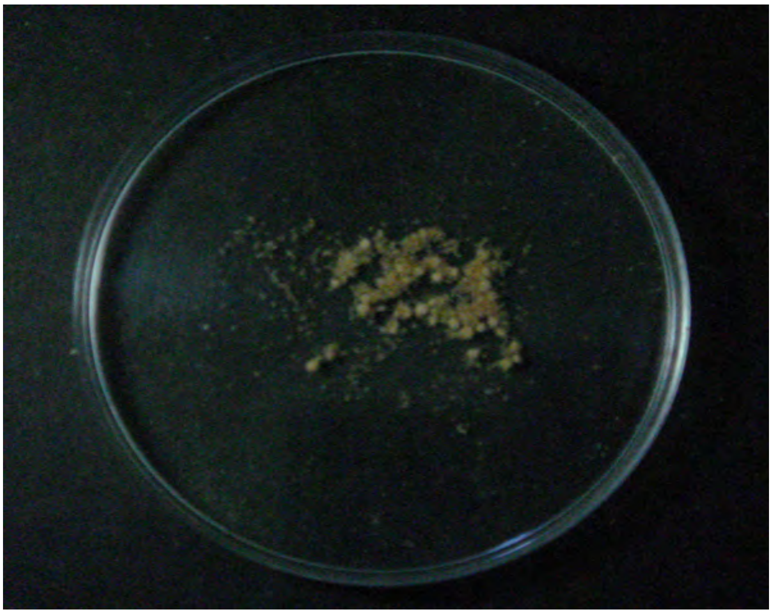
รูป จ-25 เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วย APTES ในน้ำกลั่น



รูป จ-26 เส้นใยกกบดแอคติเวตด้วย APTES ในน้ำกลั่น และทำปฏิกิริยากับกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2



รูป จ-27 ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2



รูป จ-28 ไลเพสตรึงรูปที่ใช้วิธีเชื่อมขวางด้วยกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 หลังจากผ่านการนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน 6 ครั้ง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิชญา เคนสิงห์ เกิดวันที่ 24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527 ที่อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาคหกรรมศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2549 จากนั้นเข้าศึกษาระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2552