

การผลิตตัวค้ำจุนไลเพสจากเส้นใยพืชเพื่อการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

นางสาวปิยะนันท์ สุเทียนทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIPASE SUPPORTS PRODUCTION FROM PLANT FIBERS FOR BIODIESEL SYNTHESIS

Miss Piyanan Suthiantong

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตตัวค้ำจุนไลเปสจากเส้นใยพืชเพื่อการสังเคราะห์ไบโอดีเซล
โดย	นางสาวปิยะนันท์ สุเทียนทอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรัตน์ จารุจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ เสาวรจณ์ ชัยจุลจิตร์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรัตน์ จารุจินดา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุษษา แสงวัฒนาโรจน์)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. มัณฑนา โอภาประภาสิต)

ปิยะนันท์ สุเทียนทอง: การผลิตตัวค้ำจุลินทรีย์ไลเปสจากเส้นใยพืชเพื่อการสังเคราะห์ไบโอดีเซล. (LIPASE SUPPORTS PRODUCTION FROM PLANT FIBERS FOR BIODIESEL SYNTHESIS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สิริรัตน์ จารุจินดา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล 92หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรึงไลเปสจากยีสต์ *Candida Rugosa* บนตัวค้ำจุลินทรีย์จากเส้นใยพืชเหลือใช้หลายชนิดเพื่อเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล จากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติการดูดความชื้นพบว่าเส้นใยจากต้นกกมีสมบัติที่เหมาะสมที่จะเป็นตัวค้ำจุลินทรีย์ โดยเส้นใยกกมีรูพรุนจำนวนมาก มีขนาดที่สม่ำเสมอกระจายอยู่ทั่วไป นอกจากนี้ยังมีการดูดความชื้นต่ำที่สุดเพียงร้อยละ 9.1 โดยเมื่อนำเส้นใยกกที่บดละเอียดขนาด 0.25 มิลลิเมตรไปตรึงไลเปสด้วยวิธีการตรึงที่แตกต่างกันคือการตรึงด้วยการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปแทนและบัฟเฟอร์เป็นตัวกลางและการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้ 1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล)คาร์โบไดอิมิด (อีดีซี) พบว่าการตรึงไลเปสด้วยการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปแทนเป็นตัวกลางและการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้ อีดีซี ให้ประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ได้สูงถึงร้อยละ 93.4 และ 76.2 ตามลำดับ และค่าแอกติวิตีของไลเปสตรึงรูปด้วยการดูดซับทางกายภาพดังกล่าวลดลงเพียงร้อยละ 11.2 ในขณะที่ของไลเปสตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ลดลงถึงร้อยละ 66.6 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอกติวิตีของไลเปสอิสระ หลังจากนั้นเมื่อนำไลเปสตรึงรูปไปทดสอบความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มและเมทานอล พบว่าไลเปสตรึงบนกกบดละเอียดสามารถเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 19.3 ใกล้เคียงกับการใช้ไลเปสอิสระ และไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ แต่เมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเมทานอลเป็นสับสเตรตก็พบว่าได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์สูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 48.8 ซึ่งสูงกว่าไลเปสอิสระเกือบ 2 เท่า และยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำอีก 1 ครั้ง และยิ่งกว่านั้นเมื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็นไบโอเอทานอลพบว่าได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์สูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 51.3 และยังสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 2 ครั้ง

ภาควิชาวัสดุศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4872593523 : MAJOR APPLIED POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY.

KEYWORDS:BIODIESEL/IMMOBILIZATION/TRANSESTERIFICATION/HYDROLYSIS/  
ESTERIFICATION

PIYANAN SUTHIANTHONG: LIPASE SUPPORTS PRODUCTION FROM PLANT  
FIBERS FOR BIODIESEL SYNTHESIS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.  
SIREERAT CHARUCHINDA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF.  
WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D. 92 pp.

The aim of this research is to study the immobilization of lipase from *Candida rugosa* on various renewable natural biopolymer supports for biodiesel synthesis. From the results of morphology and moisture content, the plant fiber from *Cyperus papyrus L.* was found to be the most suitable material for immobilizing lipase because of its large quantity and regular appropriate size of porosity, and also its low moisture content of 9.1%. The three different types of immobilization techniques used were physical adsorption using heptane and phosphate buffer as media and covalent bonding with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC) for the pulverized *Cyperus papyrus L.* of 0.25 mm. Results show that the technique of physical adsorption using heptane as media and covalent bonding provided percentage of immobilization 93.4 and 76.2, respectively. The activity of immobilized lipase of physical adsorption using heptane as media was reduced only to 11.2%, whereas, its activity using technique of catalyze transesterification between palm oil and methanol with 19.3% conversion of covalent bonding was extremely reduced to 66.6% comparing to the activity of free lipase. The immobilized lipase on the pulverized *Cyperus papyrus L.* can catalyze transesterification between palm oil and methanol with 19.3% conversion of alkylester which was similar to the free lipase and can catalyze hydrolysis-esterification reaction between palm oil and methanol with 48.8% conversion of alkylester with 1 time reusable. However, this immobilized lipase can catalyze hydrolysis-esterification reaction between palm oil and bioethanol with 51.3% conversion of alkylester with 2 time reusable.

Department of Materials Science

Student's signature.....

Field of study Applied Polymer Science and Textile Technology. Advisor's signature.....

Academic year 2007

Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้อย่างสมบูรณ์นั้น เป็นเพราะได้รับคำแนะนำด้านวิชาการ ความเชื่อเพื่อด้านเครื่องมือ วัสดุดิบ และสถานที่สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังได้รับความช่วยเหลือและแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์จากผู้ทรงคุณวุฒิในด้านต่างๆเป็นอย่างดี

ข้าพเจ้าใคร่ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.สิริรัตน์ จารุจินดา ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ปัญหาในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ รวมถึงการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. เสาวรจณ์ ช่วยจุลจิตร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. อุษา แสงวัฒนาโรจน์ และ อาจารย์ ดร. มณฑนา โอภาประกาศิต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจสอบการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านสิ่งทอ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยบางส่วนและภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในดีสนอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง High-performance liquid chromatography และเครื่อง Elisa microplate reader ศูนย์วิจัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สมบัติชิ้นงานที่เตรียมได้

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา น้องชาย ที่ให้การสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจ ให้ข้าพเจ้าผ่านพ้นอุปสรรคต่างๆ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกาย ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อีกทั้งอาจารย์ทุกท่านที่เคยประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า จนสามารถสร้างสรรค์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญสมการ.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์.....	4
2.1 ไบโอดีเซล.....	4
2.1.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	4
2.1.2 การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้ไลเปส.....	6
2.2 เอนไซม์.....	7
2.3 ไลเปส.....	7
2.3.1 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส.....	8
2.3.2 การทำงานของไลเปส.....	9
2.4 เอนไซม์ตรึงรูป.....	10
2.4.1 กระบวนการตรึงเอนไซม์.....	10
2.4.1.1 วิธีการยึดติดกับตัวค้ำจุน.....	10
2.4.1.2 วิธีการเชื่อมขวาง.....	12
2.4.1.3 วิธีการห่อหุ้ม.....	12
2.4.2 ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงเอนไซม์.....	14
2.4.2.1 ตัวค้ำจุนที่มีรูพรุน.....	14
2.4.2.2 ชนิดของตัวค้ำจุน.....	15
2.4.3 พอลิเมอร์ธรรมชาติ.....	15

	หน้า
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	20
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	20
3.1.1 สารเคมี.....	20
3.1.2 วัสดุ.....	23
3.1.3 อุปกรณ์.....	24
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.2.1 ขอบเขตการทดลอง.....	24
3.2.2 วิธีการทดลอง.....	26
3.2.2.1 คัดเลือกเส้นใยพืชที่เหมาะสมเป็นตัวค้ำจุน.....	26
3.2.2.2 การตรึงรูปไลเพสบนตัวค้ำจุนเส้นใยพืช.....	27
3.2.2.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงรูปไลเพส ของเส้นใยพืช.....	31
3.2.2.4 การทดสอบความสามารถของไลเพสตรึงรูปในการเป็น ตัวเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ไบโอดีเซล.....	31
3.2.2.5 การตรวจสอบปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์.....	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	34
4.1 คัดเลือกเส้นใยพืชที่เหมาะสมเป็นตัวค้ำจุน.....	34
4.1.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยพืช ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope :SEM).....	34
4.1.2 การดูความชื้นของเส้นใยพืช.....	35
4.1.3 การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography : TLC).....	36
4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสของเส้นใยกัก.....	38
4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยพืช หลังตรึงรูปไลเพสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	38



4.2.2 การตรึงรูปไลเพสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและวิธียัดติดด้วยพันธะโควาเลนต์.....	40
4.3 การตรวจสอบปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์ระหว่างปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชันและปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	42
4.3.1 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	42
4.3.2 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์ใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเมทานอลเป็นสับสเตรต.....	48
4.3.3 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์ใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีไบโอเอทาทานอลเป็นสับสเตรต.....	50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	54
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	54
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	55
รายการอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	60
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมี.....	61
ก-1 สารละลายตรวจวัดแอกติวิตี.....	61
ก-2 สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน.....	61
ภาคผนวก ข.....	62
ข-1 การทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพาราไนโตรฟินอล.....	62
ข-2 วิธีทำกราฟมาตรฐาน BSA.....	64
ภาคผนวก ค วิธีการคำนวณ.....	66
ค-1 ค่าแอกติวิตีทั้งหมด.....	66
ค.2 ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด.....	66
ค.5 การหาปริมาตรน้ำมัน 3 กรัม.....	67

ภาคผนวก ง การสังเคราะห์ไปโอดีเซล.....	63
ง-1 การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน.....	68
ง-2 การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส-เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้เมทานอลเป็นขั้บสเตรต.....	68
ง-3 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส-เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้ไปโอเอทานอลเป็นขั้บสเตรต.....	69
ง.4 การตรวจสอบปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์.....	70
ง.4.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	70
ง.4.2 การเตรียมเครื่อง HPLC.....	70
ภาคผนวก จ ลักษณะกราฟของอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC).....	71
ภาคผนวก ฉ ข้อมูล.....	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	92

## สารบัญตาราง







ตารางที่	หน้า
2.1 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสและไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา..6	
2.2 ชนิดของวัสดุค้ำจุนที่ใช้สำหรับตรึงเอนไซม์.....14	
3.1 ชนิด หน้าที และที่มาของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....20	
3.2 ชนิด และที่มาของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย..... 23	
3.3 ชนิด และที่มาของอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....24	
3.4 อักษรย่อและรายละเอียดของเอนไซม์ รูปแบบเส้นใยพืชและวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ แบบต่างๆที่ใช้ในงานวิจัย..... 29	
4.1 แสดงค่าแอกติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ ประสิทธิภาพของการตรึงรูปไลเพส ด้วยการดูดซับทางกายภาพที่ใช้สารตัวกลางแตกต่างกันและวิธียึดติดด้วย พันธะโควาเลนต์ซึ่งมีสาร EDC เป็นสารกระตุ้น..... 40	
4.2 ค่าแอกติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ ประสิทธิภาพของการตรึงรูปไลเพส ด้วยวิธียึดติดแบบดูดซับทางกายภาพ ซึ่งมีบัฟเฟอร์เป็นสารตัวกลาง..... 33	
4.3 ค่าแอกติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ ประสิทธิภาพของการตรึงรูปไลเพส ด้วยวิธียึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ซึ่งมีสาร EDC เป็นสารกระตุ้นบริเวณ หมู่ไฮดรอกซิล..... 34	
ข-1 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร..... 62	
ข-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม..... 64	
ฉ-1 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก/ADHEP.....81	
ฉ-2 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก(บด)/ADHEP.....81	
ฉ-3 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก/ADPB..... 82	
ฉ-4 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก(บด)/ADPB..... 82	
ฉ-5 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก/COEDC..... 83	
ฉ-6 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก(บด)/COEDC..... 83	
ฉ-7 น้ำหนักเฉลี่ยก่อนอบของเส้นใยพืชชนิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้..... 84	
ฉ-8 น้ำหนักเฉลี่ยหลังอบของเส้นใยพืชชนิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้..... 85	



















ตารางที่	หน้า
จ-9 แสดงร้อยละการดูดความชื้นของเส้นใยพีชชนิดต่าง ๆ.....	86
จ-10 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	86
จ-11 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 1 ครั้ง.....	87
จ-12 แสดงปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเพสแบบต่างๆเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	87
จ-13 แสดงปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 6 ครั้ง.....	88
จ-14 แสดงปริมาณปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ ทุกๆ 2 ชั่วโมง จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ไลเพส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	89
จ-15 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	89
จ-16 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 2 ครั้ง.....	90
จ-17 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	91
จ-18 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 3 ครั้ง.....	91

## สารบัญสมการ

สมการที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	6
2.2 ปฏิกริยาไฮโดรลิซิส.....	8
2.3 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	8
2.4 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	9
2.5 ปฏิกริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	9
3.1 ความสามารถในการดูดความชื้น (Moisture regain).....	26
3.2 ความสามารถในการดูดความชื้น (Moisture content).....	26
3.3 สมการหาค่า $R_f$ (Retention factor).....	27
3.4 ปริมาณโปรตีนที่ใช้.....	30
3.5 ร้อยละของประสิทธิภาพการตรึง.....	30
3.6 ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์.....	33
3.7 ร้อยละกรดไขมันอิสระ.....	33
ค-1 สมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล.....	66
ค-2 ค่าแอกติวิตีทั้งหมด.....	66
ค-3 สมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของ	
สารละลายมาตรฐาน (BSA = Bovine serum albumin).....	66
ค-4 การหาปริมาณน้ำมัน.....	67

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการตรึงเอนไซม์ (ก) วิธียัดติดโดยการดูดซับทางกายภาพ (ข) วิธียัดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ (ค) วิธีการเชื่อมขวาง (ง) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (จ) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลขนาดเล็กระดับไมโคร.....	13
2.2 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเซลลูโลส.....	16
3.1 ขอบเขตการทดลอง.....	25
4.1 ลักษณะภาคตัดขวางของเส้นใยพืช (ก) กก (ข) ฟางข้าว (ค) กระจูด (ง) ผักตบชวา (จ) กาบกล้วย และ (ฉ) ก้านกล้วย.....	34
4.2 ร้อยละการดูดความชื้นของเส้นใยพืชชนิดต่าง ๆ.....	35
4.3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ TLC.....	36
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ (ก) ไลเพสที่ไม่ผ่านการตรึงรูป (ข) ไลเพส/กก/ADHEP (ค) ไลเพส/กก (บด)/ADHEP (ง) ไลเพส/กก/ADPB (จ) ไลเพส/กก (บด)/ADPB (ฉ) ไลเพส/กก/COEDC (ช) ไลเพส/กก (บด)/COEDC.....	39
4.5 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	42
4.6 จำนวนครั้งของการใช้ไลเพสตรึงรูปเปรียบเทียบกับปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์ จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอล ต่อน้ำมัน 3 : 1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (  ) ไลเพส/กก/ ADHEP (  ) ไลเพส/กก(บด)/ADHEP (  ) ไลเพส/กก/ADPB (  ) ไลเพส/กก(บด)/ADPB (  ) ไลเพส/กก/COEDC (  ) ไลเพส/กก(บด)/COEDC....	44
4.7 ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้เอนไซม์ไลเพสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	45

รูปที่	หน้า
4.8 จำนวนครั้งของการใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปเปรียบเทียบกับปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (  ) ไลเปส/กก/ ADHEP (.....  .....) ไลเปส/กก(บด)/ADHEP (  ) ไลเปส/กก/ADPB (  ) ไลเปส/กก(บด)/ADPB (  ) ไลเปส/กก/COEDC (  ) ไลเปส/กก(บด)/COEDC... 46	
4.9 ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ ทุกๆ 2 ชั่วโมง จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ไลเปส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	47
4.10 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3 :1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	48
4.11 จำนวนครั้งการใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปเปรียบเทียบกับ ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3 :1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (  ) ไลเปส/กก/ADHEP (.....  .....) ไลเปส/กก(บด)/ADHEP (  ) ไลเปส/กก /ADPB (  ) ไลเปส/กก(บด)/ADPB (  ) ไลเปส/กก/ COEDC (  ) ไลเปส/กก(บด)/COEDC....50	
4.12 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3 :1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	51
4.13 จำนวนครั้งการใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปเปรียบเทียบกับ ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3 :1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (  ) ไลเปส/กก/ADHEP (.....  .....) ไลเปส/กก(บด)/ADHEP (  ) ไลเปส/กก /ADPB (  ) ไลเปส/กก(บด)/ADPB (  ) ไลเปส/กก/ COEDC (  ) ไลเปส/กก(บด)/COEDC.. 52	

รูปที่	หน้า
ข-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.....	63
ข-2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม.....	65
ง-1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC).....	70
จ-1 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์ของน้ำมันปาล์ม.....	71
จ-2 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของ เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	71
จ-3 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	72
จ-4 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของ เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	72
จ-5 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของ ไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	73
จ-6 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วน โดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	73
จ-7 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	74
จ-8 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้ เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วน โดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	74



รูปที่	หน้า
จ-9 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วน โดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	75
จ-10 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วน โดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	75
จ-11 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	76
จ-12 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	76
จ-13 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	77
จ-14 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเพส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	77
จ-15 โคโรนาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้เอนไซม์ไลเพส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	78

รูปที่	หน้า
จ-16 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส โดยใช้เอ็นไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP ซ้ำ 5 ครั้ง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	78
จ-17 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอ็นไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วน โดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	79
จ-18 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอ็นไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP ซ้ำ 1 ครั้ง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดย มวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	79
จ-19 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอ็นไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วน โดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	80
จ-20 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอ็นไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP ซ้ำ 2 ครั้ง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	80

# บทที่ 1

## บทนำ

ปัจจุบันปริมาณความต้องการในการใช้พลังงานเชื้อเพลิงมีแนวโน้มสูงขึ้น ในขณะที่พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญมีเหลืออยู่อย่างจำกัด ประกอบกับสถานการณ์ปัจจุบันราคาน้ำมันเพิ่มสูงขึ้นจึงได้มีการศึกษาหาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อนำมาทดแทนและไบโอดีเซลซึ่งมีองค์ประกอบที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมดีเซลจึงเป็นอีกทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเป็นลำดับ

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล (biomass) เช่น น้ำมันพืช หรือน้ำมันสัตว์ รวมถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วนำมาแปรสภาพ ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอดีเซลนิยมใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน แต่มีข้อเสียคือเกิดผลผลิตที่ไม่ต้องการซึ่งทำให้ยุ่งยากต่อกระบวนการแยกไบโอดีเซลให้บริสุทธิ์ เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้เสียค่าใช้จ่ายและเวลามากขึ้น ในขณะที่การใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันมีข้อดีกว่าการใช้กรดหรือด่าง กล่าวคือการใช้ไลเพสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากกว่าทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อัลคิลเอสเทอร์ที่จำเพาะ สามารถแยกผลิตภัณฑ์ร่วมที่เป็นกลีเซอรอลออกได้ง่าย บริสุทธิ์กว่าการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Kose และคณะ, 2002) และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้ว่ามีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง แต่การใช้ไลเพสมีข้อจำกัด คือ ราคาค่อนข้างสูงจึงไม่นิยมนำมาใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ดังนั้น จึงต้องมีการตรึงรูปร่างเอนไซม์ (enzyme immobilization) โดยการทำให้เอนไซม์ถูกจำกัดอยู่ในบริเวณที่จัดไว้เพื่อเป็นการรักษาแอกติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ส่งผลให้สามารถนำเอนไซม์ไลเพสไปใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะมีโมเลกุลใหญ่ขึ้น ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ละลายเลย ทำให้ในระหว่างการทำปฏิกิริยาเอนไซม์จะเปลี่ยนสถานะของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายเป็นของแข็ง (Chibata, 1978)

วิธีการตรึงรูปร่างเอนไซม์และการเลือกชนิดของตัวค้ำจุนขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์ สารตั้งต้นของปฏิกิริยาและวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งาน สำหรับวิธีการตรึงมีหลายวิธีแต่ละวิธีอาจมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แตกต่างกันจึงต้องเลือกวิธีที่มีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์น้อยที่สุด วิธีการตรึงรูปร่างเอนไซม์ด้วยการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) เป็นการยึด

ไลเพสด้วยพันธะอย่างอ่อนบนตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็ง (Boley และ Pielow, 1997) วิธีนี้ง่ายไม่ซับซ้อน และไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงความคงรูปของเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง แต่มีข้อเสียคือ เอนไซม์เกาะกับตัวค้ำจุนไม่แน่นเพราะแรงดึงดูดน้อย ตัวค้ำจุนที่ใช้เป็นจำพวกสารอนินทรีย์ เช่น ททราย ซิลิกา อะลูมิเนียมออกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนต และแคลเซียมซัลเฟต (Minovaska และคณะ, 2005) สำหรับวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Walt และ Agayn, 1994) จะทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวค้ำจุนยากเนื่องจากมีการยึดด้วยพันธะที่แข็งแรง แต่การเกิดพันธะโควาเลนต์มีผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและบริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งมีผลทำให้แอกติวิตีลดลง และอาจเปลี่ยนความจำเพาะต่อสับสเตรต นอกจากนี้ ยังมีการตรึงรูปเอนไซม์บนเส้นใยที่อยู่ในรูปผ้าทอ เช่น เส้นใยคาร์บอนและเส้นใยแก้ว (Debeche และคณะ, 2005) และการตรึงรูปเอนไซม์โดยทำให้เอนไซม์ถูกห่อหุ้มอยู่ในช่องว่างของฟิล์มพอลิโพรพิลีน (Taninoka และคณะ, 1998) จะเห็นได้ว่าวิธีการตรึงรูปด้วยการดูดซับทางกายภาพเป็นวิธีที่น่าสนใจนำมาศึกษาหากได้มีการเลือกใช้ตัวค้ำจุนที่เหมาะสม

สำหรับชนิดของตัวค้ำจุนที่เหมาะสมกับไลเพสมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์และสับสเตรต โดยส่วนใหญ่จะใช้ตัวค้ำจุนเรซินที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (macroporous resin) ซึ่งจะทำให้การตรึงรูปไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida sp.* 99-125 ด้วยวิธีการตรึงรูปแบบดูดซับทางกายภาพ ผลที่ได้พบว่าเรซินที่ไม่มีขั้วให้ประสิทธิภาพการตรึงสูงถึงร้อยละ 97.3 (Yang และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยนำวัสดุจากธรรมชาติมาใช้เป็นตัวค้ำจุนมากขึ้นเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ราคาถูก และช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น การตรึงรูปไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida sp.* บนเมมเบรนที่ทำจากฝ้าย (cotton membrane) เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงถึงร้อยละ 96 (Nie และ Tan, 2006) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิคใหม่โดยใช้เส้นใยจากต้นมะละกอบนตัวค้ำจุน พบว่าไม่เป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตและแอกติวิตีของเอนไซม์ เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน แอกติวิตียังคงสูงอยู่ถึง 95% โดยไม่เกิดการสลายตัวระหว่างการใช้งาน (Iqbal และ Saeed, 2005) และยังมีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นตัวค้ำจุนเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีแอกติวิตีสูงและมีความเสถียรเพิ่มขึ้นด้วย โดยทำการตรึงรูปไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida sp.* บนไคโตซานตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโนและไฮดรอกซิล เรียกเทคนิคนี้ว่า “binary immobilization” ผลที่ได้ คือ มีปริมาณโปรตีน (protein loading) 287.2  $\mu\text{g/g}$ -chitosan และมีแอกติวิตี 13.8 U/g-chitosan (Hung และคณะ, 2003)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการปรับปรุงเส้นใยพืชเหลือใช้เพื่อใช้เป็นตัวค้ำจุนไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida rugosa* พร้อมทั้งศึกษาสมบัติทางกายภาพ ตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยา ทำการตรึงรูปเอนไซม์ และทดสอบประสิทธิภาพของไลเพสตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล และทดสอบความสามารถในการนำมาใช้ซ้ำ

## บทที่ 2

### วารสารปริทรรศน์

#### 2.1 ไบโอดีเซล (Biodiesel)

ไบโอดีเซล (Biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารชีวมวล เช่น น้ำมันจากพืช หรือน้ำมันจากสัตว์รวมถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วนำมาแปรสภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับยานพาหนะได้โดยมีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล นอกจากนี้ยังแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการใช้น้ำมันไบโอดีเซลจะเกิดคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่าเนื่องจากการเผาไหม้ที่สมบูรณ์และมีไอเสียน้อยกว่า เพราะมีปริมาณออกซิเจนสูงกว่าจึงทำให้การสันดาปเกิดขึ้นได้สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซล และไม่มีกำมะถัน จึงไม่มีปัญหาเรื่องของปริมาณของซัลเฟต นอกจากนี้ยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย ทำให้ไม่เกิดการอุดตันของระบบไอเสีย และยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ (Gerpen, 2005)

ไบโอดีเซลโดยทั่วไป มีองค์ประกอบที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียมดีเซล ซึ่งสามารถผลิตได้จากน้ำมันจากพืชหรือน้ำมันจากสัตว์ กระบวนการผลิตทำได้หลายวิธี แต่โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เตรียมได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไตรกลีเซอไรด์ในไขมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์กับเมทานอลเป็นสารตั้งต้น (Krawczyk, 1996)

##### 2.1.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการต่างๆที่ปัจจุบันใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมีทั้งที่เป็นแบบยากและง่าย ในแบบง่ายจะได้มาจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือการผสมโดยตรง ตัวอย่างการผลิตดังต่อไปนี้ (Ma และ Hanna, 1999)

###### 1) การใช้โดยตรง (Direct use and blending)

การใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรือผสมลงในน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่างๆ เพื่อต้องการลดความหนืดของน้ำมันพืช เมื่อนำมาใช้จะก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถทำงานได้กับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม แต่ก็มีปัญหามากมายเกิดขึ้น

ตามมา เช่น มียางเหนียวเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระในระหว่างการเก็บรักษา หรือปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) จากขั้นตอนการเผาไหม้ ซึ่งลักษณะการเผาผลาญพลังงานระหว่างน้ำมันพืชบริสุทธิ์ และน้ำมันดีเซลพบว่าเป็นไปในแบบเดียวกัน และมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงไปนํ้ามันดีเซลในอัตราส่วนของน้ำมันพืชต่อน้ำมันดีเซล เท่ากับ 1:10 ถึง 1:20 สามารถนำไปใช้งานได้

## 2) กระบวนการไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่อยู่ในภาวะสมดุลของระบบสองวัฏภาคระหว่างน้ำและน้ำมันมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 1-150 นาโนเมตร ต้องมีสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดมีประจุและไม่มีประจุเพื่อทำให้คอลลอยด์เกิดความคงสภาพ วิธีการทำไมโครอิมัลชันนี้ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืด โดยการใช้สารละลาย เช่น แอลกอฮอล์ สมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

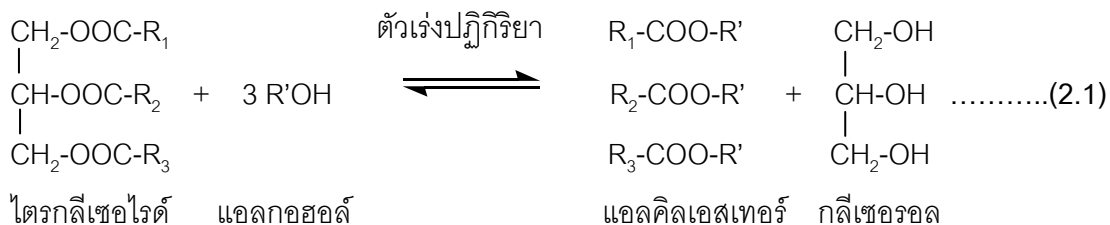
## 3) กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (Pyrolysis)

ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นอีกสารอื่นโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิในช่วง 450-850 องศาเซลเซียส เมื่อได้รับความร้อนไขมันจะเกิดการสลายตัวเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลง แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกกำจัดออกไป ทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ กระบวนการนี้ มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีสมบัติเหมือนแก๊สโซลีนมากกว่าเกิดไบโอดีเซล (Schwab และคณะ, 1987)

## 4) กระบวนการทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชัน (Transesterification)

ทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไขมันสัตว์ หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ เพื่อเปลี่ยนรูปสารประกอบเป็นสารประกอบเอสเตอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ดังสมการที่ 2.1 (Fukuda, Kondo และ Noda, 2001) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับและการเติมแอลกอฮอล์มากเกินไปมักจะใช้เพื่อเป็นการบังคับปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ สัดส่วนโดยโมลของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อไขมัน คือ 3:1 ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้มีทั้งสารละลายกรด สารละลายด่าง และเอนไซม์ไลเปส (Soumanou และ

Bornscheuer, 2003) ในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ส่วนใหญ่จะใช้แอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่คาร์บอนสั้นที่สุดและเป็นของเหลวที่มีขั้วสูง ซึ่งช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยากับ ไตรกลีเซอไรด์ได้มากที่สุด



### 2.1.2 การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้ไลเพส

การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดดังนี้ คือ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาโดยใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการกล่าวคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรง สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ง่ายต่อการแยกกลีเซอรอลไม่มีกระบวนการล้างที่ยุ่งยาก แต่การผลิตโดยใช้ไลเพสต้องใช้ต้นทุนสูงไม่สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ ดังตารางที่ 2.1 (Fukada และคณะ, 2001) ด้วยเหตุนี้ การใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจึงยังไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้ผลิตระดับอุตสาหกรรมจึงต้องมีการตรึงรูบเอนไซม์ (enzyme immobilization) เพื่อให้สามารถนำเอนไซม์กลับไปใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เบสและไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

	เบส	ไลเพส
อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา (°ซ)	60 - 70	30 - 40
กรดไขมันอิสระที่อยู่ในวัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์สูง	เมทิลเอสเทอร์
น้ำที่อยู่ในวัตถุดิบ	รบกวนปฏิกิริยา	ไม่รบกวนปฏิกิริยา
ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	สูง
การเก็บกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	ไม่มี
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ถูก	ค่อนข้างแพง



## 2.2 เอนไซม์ (Enzyme)

โดยปกติเอนไซม์ที่นำมาใช้งานจะมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ

- 1) เอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์ธรรมชาติ (native enzyme)
- 2) เอนไซม์ดัดแปร (modified enzyme)

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้มากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์อิสระมีข้อเสียหรือข้อจำกัดบางประการดังนี้

- 1) ไม่เสถียร
- 2) ใช้งานได้ไม่ต่อเนื่อง หรือใช้งานได้ครั้งเดียว
- 3) การที่จะให้เอนไซม์อิสระทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ บางครั้งจำเป็นต้องทำเอนไซม์

ให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

- 4) สภาพการทำปฏิกิริยาในบางปฏิกิริยาอาจไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์
- 5) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีการปนเปื้อนของเอนไซม์
- 6) ค่าใช้จ่ายสูงเมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม
- 7) เอนไซม์ส่วนใหญ่ละลายได้ในน้ำหรือสารละลาย ดังนั้นจึงไม่สามารถนำไปใช้กับ

เครื่องปฏิกรณ์ต่างๆ เช่น fluidized bed, packed bed ในระบบต่อเนื่อง

## 2.3 ไลเปส (Lipase)

ไลเปส (lipase) เป็นเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol-ester hydrolase) หรือ เอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (acylglycerol hydrolase) มีชื่อตามรหัสว่า EC.3.1.1.3 เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมัน และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ พบว่าไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์บางชนิดก็สามารถใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ไลเปสในกระบวนการสังเคราะห์ ทำให้มีการนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เป็นตัวสร้างกลิ่นและรส อุตสาหกรรมการผลิตหนัง เช่น ใช้กำจัดเศษเนื้อหรือเศษไขมันที่ไม่ต้องการออกจากวัตถุดิบ นอกจากนี้ยังใช้บำบัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน เป็นต้น (Macrae, 1983)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส (Sztajer และคณะ, 1988)

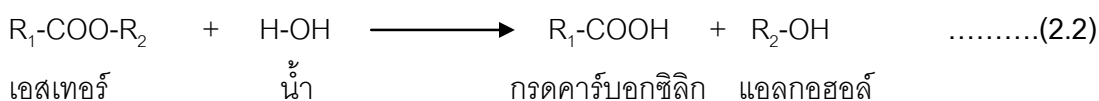
- 1) จากสัตว์ เช่น จากตับอ่อน
- 2) จากพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ฝ้าย ถั่วเหลือง เป็นต้น
- 3) จากจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas species* เป็นต้น

นิยมใช้เอนไซม์ไลเปสที่มาจากจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว เลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้อย่างรวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรม และยังสามารถปรับภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืช

### 2.3.1 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 แบบ (Yamane, 1987) คือ

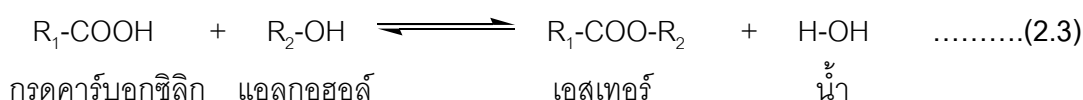
- 1) ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis)



เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดคาร์บอกซิลิก และแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดในสารละลายที่มีน้ำอยู่มาก

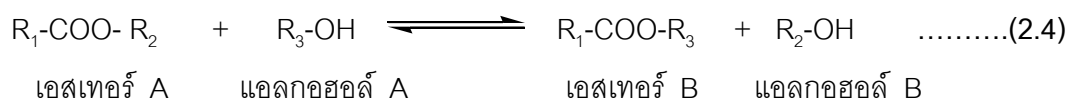
- 2) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Synthesis)

ก. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification)



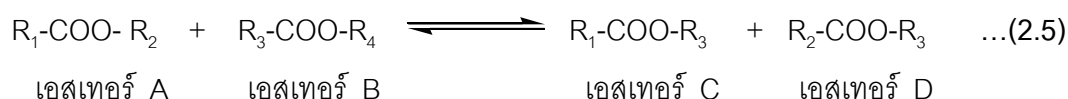
เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ของกรดคาร์บอกซิลิกด้วยหมู่แอลกอฮอล์ (OR group) จากแอลกอฮอล์

ข. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (Transesterification)



เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการแทนที่หมู่แอลคอกซิล (OR<sub>2</sub> group) จากเอสเทอร์ A ด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR<sub>3</sub> group) จากแอลกอฮอล์ A ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ชนิดใหม่

ค. ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (Interesterification)



เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่แอลคอกซิล (OR<sub>2</sub> group และ OR<sub>4</sub> group) ระหว่างเอสเทอร์ 2 ชนิด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ใหม่ 2 ชนิด

### 2.3.2 การทำงานของไลเปส

Macrse (1983) แบ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็อินเตอร์มีเดียทในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas fluorescens*

กลุ่มที่ 2 เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1,2 (2,3) ไตรกลีเซอไรด์ และ 2 – โมโนกลีเซอไรด์ แต่ (1,2) , (2,3) – โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบชนิดไม่คงตัว ถ้ามีการปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานอาจจะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1,3- ไตรกลีเซอไรด์ และ 1(3) - โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งถูกย่อยสลายได้

สมบูรณ์โดยกรดไขมัน และกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Aspergillus niger* , *Mucoro javanicus* และในพวก *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์

กลุ่มที่ 3 เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวกความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลแต่ถ้ามีไดเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง

## 2.4 เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme)

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัด อาจมีการสร้างพันธะหรือไม่ก็ได้โดยเอนไซม์นั้นยังคงมีกิจกรรมอยู่ การที่เอนไซม์ตรึงรูปจะมีสมบัติในการไม่ละลายน้ำจึงสามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งและยังสามารถนำไปใช้ในระบบต่อเนื่องได้

### 2.4.1 กระบวนการตรึงเอนไซม์

กระบวนการตรึงเอนไซม์มี 3 วิธี (Kennedy และ Cabral, 1987) ได้แก่

2.4.1.1. วิธีการยึดติดกับตัวค้ำจุน (Carrier binding method) คือการเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนที่ไม่ละลายน้ำหรือตัวทำละลายบางชนิด วิธีเชื่อมกับตัวค้ำจุนแบ่งเป็น

#### 1) วิธียึดติดโดยการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

วิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยการดูดซับไว้ที่ผิวของตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็งจัดเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด หลักการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือ การใช้แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) วิธีการในทางปฏิบัตินั้นจะผสมเอนไซม์ในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยวัดกัมมันตภาพของเอนไซม์ตรึงเมื่อเอนไซม์ถูกตรึงไว้มากที่สุดจึงทำการแยกเอนไซม์ตรึง ด้วยการหมุน (centrifugation) หรือกรอง (Nelson และ Griffin ,1976) ดังรูปที่ 2.1 (ก)

เนื่องจากในการตรึงเอนไซม์ไม่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ดังนั้นจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงในรูปร่างของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยมากหรือไม่มี ความสามารถในการดูดซับของเอนไซม์จากการตรึงด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับพีเอชของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของไอออนใน

สารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์ ตัวค้ำจุน และอุณหภูมิ การควบคุมสภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ที่เหมาะสมจะช่วยให้มีการดูดซับเอนไซม์ได้ดีและรักษากัมมันตภาพของเอนไซม์ไว้ได้ แม้ว่าเอนไซม์จะถูกจับไว้ด้วยแรงดึงดูดที่ค่อนข้างอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ แรงแไฮโดรโฟบิก เป็นต้น

ปัจจัยสำคัญที่สุดที่จะมีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดซับไว้บนผิวของตัวค้ำจุน ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ของตัวค้ำจุนในระหว่างกระบวนการตรึง กัมมันตภาพของเอนไซม์ตรึงจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้สูงขึ้นจนกระทั่งถึงจุดอิ่มตัว หลังจากนั้นกัมมันตภาพของเอนไซม์ตรึงจะลดลงแม้ว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จะเพิ่มมากขึ้น เวลาและอุณหภูมิในกระบวนการตรึงจะมีความสำคัญต่อการดูดติดของเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้สารพาหะที่มีรูพรุน ทั้งนี้เนื่องจากในสารพาหะชนิดนี้จะมีการแพร่กระจาย (diffusion) สูง

## 2) วิธียึดติดด้วยพันธะไอออนิก (Ionic binding method)

หมายถึง การเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์กับตัวค้ำจุนที่ไม่ละลายในสารละลายปฏิกิริยาโดยใช้พันธะไอออน

## 3) วิธียึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding)

หมายถึง การเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์และอะตอมใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน เช่น พันธะในโมเลกุล  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $Cl_2$  เป็นต้น เรียกว่า พันธะโคเวเลนต์ หรือเรียกให้เต็มว่า พันธะโควาเลนต์ไม่มีขั้ว (non-polar covalent bond) ซึ่งหมายถึงว่า ไม่มีขั้วประจุในโมเลกุลที่เกิดพันธะเพราะอิเล็กตรอนคู่ใช้ร่วมกัน และกระจายอย่างสมมาตร ดังรูปที่ 2.1 (ข)

ในโมเลกุลเหล่านี้ อะตอมทั้งสองที่เกิดพันธะจะใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน 1 คู่ ซึ่งมาจากอิเล็กตรอนของแต่ละอะตอม อย่างละ 1 อิเล็กตรอน เรียก พันธะเดี่ยว (single bond) เนื่องจากการเกิดพันธะโควาเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายของพันธะโควาเลนต์เดิม ดังนั้นพลังงานการสลาย (dissociation energy) ยิ่งสูง

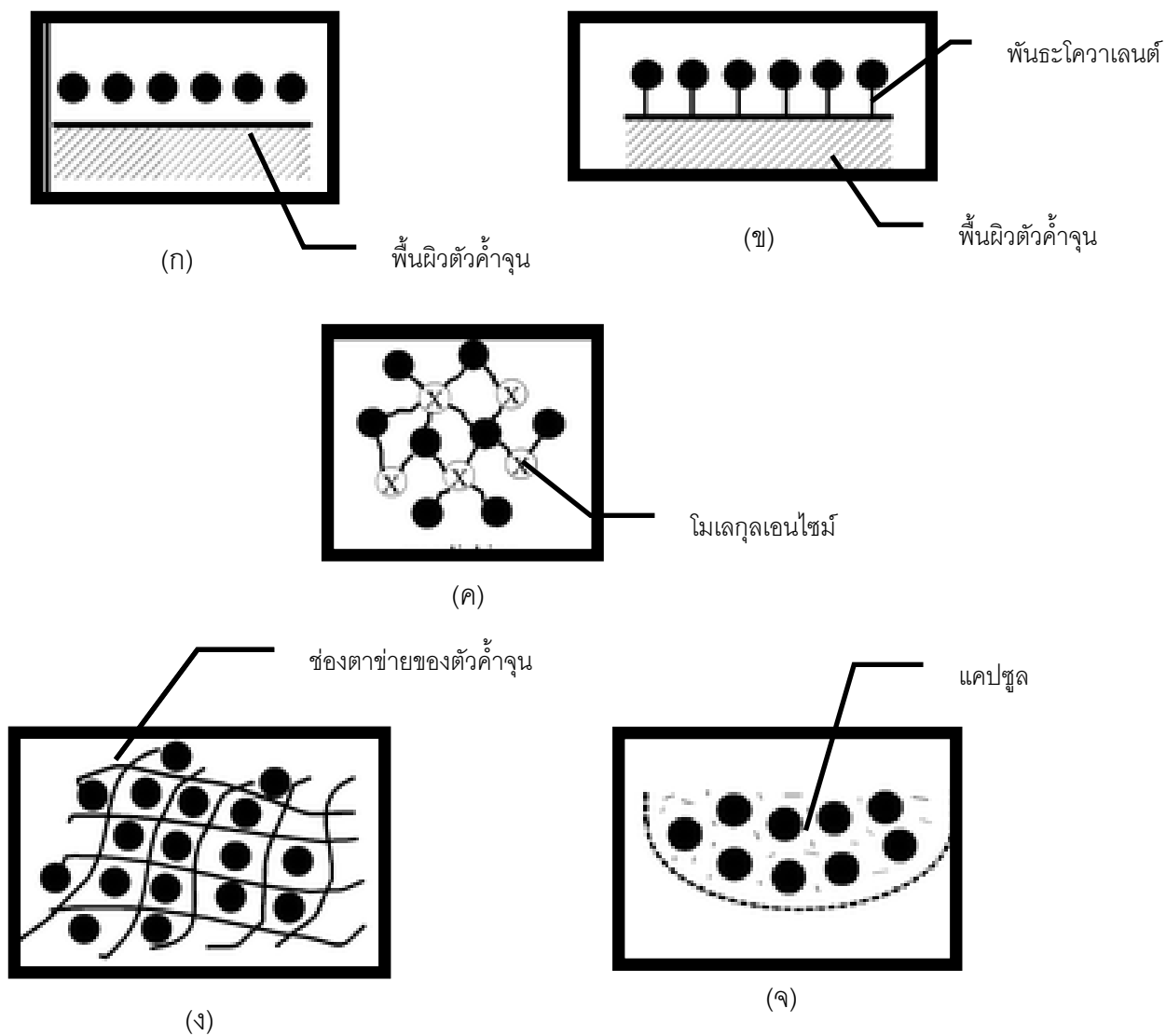
โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรง และเสถียรมากด้วย ด้วยเหตุนี้  
ภาวะของปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์จึงค่อนข้างรุนแรง และมีผลโดยตรงต่อบริเวณเร่งของ  
เอนไซม์ และโครงสร้างสามมิติด้วย ผลกระทบดังกล่าวมีทั้งช่วยทำให้แอกทิวิตีสูงขึ้นและลดลง  
ขึ้นอยู่กับภาวะการตรึงรูป

2.4.1.2 วิธีการเชื่อมขวาง (Cross-linking method) คือ การที่เอนไซม์จะถูกตรึงรูป  
ได้โดยการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์โดยไม่ต้องใช้ตัวค้ำจุน ดังรูปที่ 2.1 (ค)

2.4.1.3 วิธีการห่อหุ้ม (Entrapping method) แบ่งได้เป็น

1) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (Lattice type method) วิธีนี้เป็น  
การบรรจุเอนไซม์ในช่องว่างตาข่ายพอลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.1 (ง)

2) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลขนาดเล็กระดับไมโคร (Microencap-  
sulation method) วิธีนี้เป็นการบรรจุเอนไซม์ด้วยเยื่อบางๆ ที่ยอมให้สารซึมผ่านได้  
ดังรูปที่ 2.1 (จ)



รูปที่ 2.1 กระบวนการตรึงเอโนไทม์ (ก) วิธียึดติดโดยการดูดซับทางกายภาพ

(ข) วิธียึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ (ค) วิธีการเชื่อมขวาง

(ง) วิธีการห่อหุ้มเอโนไทม์ในช่องตาข่าย

(จ) วิธีการห่อหุ้มเอโนไทม์ในแคปซูลขนาดเล็กระดับไมโคร

ที่มา : (<http://www.rsc.org/ej/AN/2001/b008311i/b008311i-f5.gif>)

หมายเหตุ ● แทน โมเลกุลของเอโนไทม์

## 2.4.2 ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงเอนไซม์

องค์ประกอบที่สำคัญของการตรึงเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ ตัวค้ำจุน และวิธีที่ทำให้เอนไซม์ยึดติดกับตัวค้ำจุน สารที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนนี้จะมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการใช้งานของเอนไซม์ตรึง (กัมมันตภาพ และความเสถียรของเอนไซม์) ไม่มีตัวค้ำจุนชนิดใดที่สามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกรูปแบบ (ภาวิณี, 2531)

อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปตัวค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะจำเพาะดังต่อไปนี้

- มีพื้นผิวที่มากเพื่อใช้สำหรับการจับยึด
- มีการซึมผ่านได้ของสาร
- โมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ
- ไม่ละลายน้ำ
- เสถียรต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระทบ
- มีรูปร่างและขนาดที่พอเหมาะ
- มีความต้านทานต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
- นำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

ในการนำไปใช้งานนั้น ควรจะพิจารณาถึงสมบัติของตัวค้ำจุนตรึงในส่วนของพื้นที่ผิวรูปร่าง องค์ประกอบและการดัดแปร เป็นต้น

ตัวค้ำจุนอาจจะจำแนกได้เป็น 2 ประเภท สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ แต่การจำแนกพวกเช่นนี้ยังไม่เพียงพอต่อการบ่งชี้ถึงความสามารถในการจับยึดเอนไซม์ สมบัติที่จะบอกความสามารถนี้ได้คือ พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุน (pore size)

### 2.4.2.1 ตัวค้ำจุนที่มีรูพรุน

การที่สารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์มีลักษณะเป็นรูพรุนจะทำให้สารเหล่านี้มีพื้นที่ผิวมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ไม่มีรูพรุน เปรียบเทียบในปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนัก ดังนั้นสารที่มีรูพรุนจะสามารถจับเอนไซม์ไว้ได้มาก ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้การประยุกต์ในทางอุตสาหกรรมได้ผลดี อย่างไรก็ตาม สารที่มีรูพรุนจะมีข้อเสียเนื่องจากเนื้อที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงนั้นจะต้องมีของรูพรุนที่ใหญ่เพียงพอสำหรับให้โมเลกุลของสับสเตรตผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยา และในขณะเดียวกันให้สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะต้องผ่านออกไปได้โดยสะดวก ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการแพร่กระจายของสับสเตรตและสารผลิตภัณฑ์



### 2.4.2.2 ชนิดของตัวค้ำจุน

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกใช้ตัวค้ำจุน คือ (1) เสถียรภาพของวัสดุ (2) ความเข้ากันได้กับเอนไซม์ (3) ความเข้ากันได้กับสับสเตรตและวัสดุอื่นที่ใช้ในกระบวนการผลิต ชนิดของวัสดุค้ำจุนที่ใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของวัสดุค้ำจุนที่ใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ (Laskin และคณะ, 1985)

ชนิดของวัสดุค้ำจุน	ตัวอย่าง
ตัวค้ำจุนอินทรีย์	พอลิเอสเทอร์ ไนลอน พอร์มาดีไฮด์เรซิน อะคริลิก
ตัวค้ำจุนพอลิเมอร์ธรรมชาติ	เซลลูโลส พอลิเด็คซ์แทรน อะกาไรส คอลลาเจน ไคติน
ตัวค้ำจุนอนินทรีย์	เม็ดแก้ว สแตนเลส โลหะออกไซด์ ทราาย

### 2.4.3 พอลิเมอร์ธรรมชาติ

ตัวค้ำจุนที่นำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ส่วนมากจะมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสาหร่าย (algae) และเซลลูโลส (cellulose) จะนิยมนำมาตรึงเอนไซม์ด้วยวิธียึดติดและด้วยพันธะโควาเลนต์

กลุ่มไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์จะถูกก่อกัมมันต์ (activate) ได้โดยตรงด้วยการใช้สารก่อกัมมันต์ (activating agent) โดยกลุ่มอิเล็กโตรไฟล์ (electrophilic group) ของสารก่อกัมมันต์จะเข้าแทนที่ไฮโดรเจนของกลุ่มไฮดรอกซิลในโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้ออนุพันธ์เชิงกัมมันต์ (active derivative) ของพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งจะมีความว่องไวต่อการยึดเอนไซม์

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารชนิดหนึ่งในบรรดาสารที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนในระยะแรกของการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหน่วยของ  $\beta$ -D-glucopyranosyl ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\beta$  (1,4) ดังรูปที่ 2.2 และถ้ามีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมภายในลูกโซ่นี้จะเรียกว่า “elementary fiber” ซึ่งมีโครงสร้างที่เป็นระเบียบมากเมื่อทำการตกผลึก

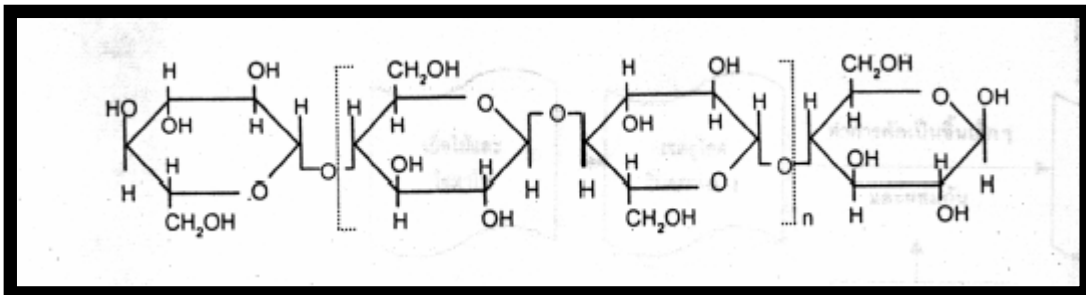
แม้ว่ากลุ่มไฮดรอกซิลของเซลลูโลสจะมีความว่องไวไม่เพียงพอสำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ แต่จะทำปฏิกิริยาของเซลลูโลสนั้นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ ความสามารถในการตกผลึก ความสามารถในการพองตัวในสารละลายที่มีการ ก่อกัมมันต์ธรรมชาติ และขนาดของโมเลกุลเอนไซม์ (Sharp และคณะ, 1969)

เซลลูโลสมีสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้งาน ซึ่งได้แก่

- ไม่ถูกทำลายด้วยจุลินทรีย์
- รูปร่างและขนาดของเส้นใยสามารถนำไปใช้งานได้สะดวก
- สามารถทำให้เป็นเม็ดที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ ซึ่งจะช่วยให้มีการซึมผ่าน

ของสารละลายสับสเตรตได้เป็นอย่างดี (Chen และ Tsao, 1976)

- มีรูพรุน
- คงทนต่อแรงกระทบ
- มีความจุเอนไซม์ได้มาก
- ราคาถูก



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเซลลูโลส (วีระศักดิ์ , 2542)

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nelson และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วย แอลกอฮอล์สายสั้น (Short-chain alcohols) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดแรกใช้ (primary alcohol) ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และไอโซบิวทานอล โดยมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ชุดที่สองใช้เมทานอล ชุดที่สามใช้ เอทานอล เข้าร่วมในปฏิกิริยา โดยทั้งสามชุดการทดลองใช้ไลเปสจาก *M. miehei* (Liposome IM60) พบว่ามีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 94.8 - 98.5 ส่วนชุดที่สี่ใช้ แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) ได้แก่ ไอโซโพรพานอล และ 2-บิวทานอล เข้าร่วมในปฏิกิริยาโดยใช้ไลเปสจาก *C. antarctica* (SP435) และมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย พบว่ามีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 61.2 - 83.8

Kaieda และคณะ (1999) ศึกษาการเติมเมทานอลต่อปฏิกิริยาเมทาโนลิซิสโดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนผสมระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและเมทานอลอัตราส่วนโดยโมลคือ 1:1 โดยใช้ไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่าเมื่อเติมเมทานอลครั้งละ 1 โมล อีกสองครั้งหลังจากเติมสารตั้งต้นเริ่มต้น สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้นและปริมาณกรดไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายลดลง นอกจากนี้ยังศึกษาปริมาณน้ำ โดยใช้เอนไซม์ 210 ยูนิต เติมน้ำให้ได้สารละลายเอนไซม์ 0.6 0.9 1.2 1.5 1.8 2.4 3.0 6.0 และ 9.0 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเวลาที่ใส่สารละลายเอนไซม์ 1.2 - 9.0 มิลลิลิตร (ปริมาณน้ำ 4-30 % ของสารตั้งต้น) สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มสูงถึงร้อยละ 80 - 90

Shimada และคณะ (1999) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาเมทาโนลิซิสของน้ำมันพืชโดยไลเปสจาก *C. antarctica* ศึกษาที่อุณหภูมิ 20 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากปฏิกิริยาดำเนินไป 6 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิกำร้อยละของผลผลิตจะเพิ่มขึ้นและเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าร้อยละของผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 29.9 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส การผลิตเมทิลเอสเทอร์จะลดลง ส่วนการศึกษาผลของน้ำต่อปฏิกิริยาเมทาโนลิซิสโดยใช้สารตั้งต้น 10 กรัม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาร้อยละ 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น ค่าร้อยละของผลผลิตจะลดลง

Dossat และคณะ (2002) ศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ลิซิสของน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ตรีงรูปในสารละลายอินทรีย์เฮกเซน ใช้แบบจำลองแบบ Ping Pong Bi Bi เพื่ออธิบายจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน พบว่าเมื่อใช้สารตั้งต้นในอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1 : 3 จะให้ปริมาณเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 65

Kose และคณะ (2002) ศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ลิซิสของน้ำมันเมล็ดฝ้ายโดยใช้ไลเปสจาก *C.antarctica* สภาวะที่เหมาะสมในการทดลองคือ ความเข้มข้นเอนไซม์ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนระหว่างน้ำมันและแอลกอฮอล์ เท่ากับ 1:4 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 91.5

Chiou และ Wu (2003) ศึกษาการตรึงรูปไลเปสที่ได้จากยีสต์ *C.rugosa* บนโคโตซานตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโนและไฮดรอกซิล โดยกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลด้วยสารช่วยประสาน (coupling agent) ประเภทคาร์โบไดอิมิด (carbodiimide) พบว่าไลเปสตรึงรูปทั้งแห้งและเปียกยังคงมีแอกติวิตีสูงถึง 78% และ 85% ตามลำดับ หลังจากใช้ซ้ำ 10 ครั้ง

Hung และคณะ (2003) ศึกษาการนำโคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นตัวค้ำจุนเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีแอกติวิตีสูงและมีความเสถียรเพิ่มขึ้นด้วย โดยทำการตรึงรูปไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Candida sp.* บนโคโตซานตรงตำแหน่งของหมู่อะมิโนและไฮดรอกซิล เรียกเทคนิคนี้ว่า “binary immobilization” ไลเปสจะตรึงกับโคโตซาน โดยเกิดการกระตุ้นที่หมู่ไฮดรอกซิลด้วยสารประเภทคาร์โบไดอิมิด พร้อมทั้งเกิดการเชื่อมขวาง (cross-linking) มากกว่าที่หมู่อะมิโนกับกลูทารอลดีไฮด์ ผลที่ได้พบว่าภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลผลิตที่ได้จะมีปริมาณโปรตีน (protein loading) 287.2 µg/g-chitosan และมีแอกติวิตี 13.8 U/g-chitosan

Soumanou และ Bornscheuer (2003) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันกับเมทานอล ผลของไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทั้งจาก ไลเปสอิสระ และ ไลเปสตรึงรูป ที่ใช้เป็นตัวเร่ง พบว่าในปฏิกิริยาที่มีสารละลายอินทรีย์ (เฮกเซนและปิโตรเลียมอีเทอร์) จะให้ผลิตภัณฑ์ได้สูงถึง ร้อยละ 80 จาก *P. fluorescens* ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ไม่ใช้สารละลายอินทรีย์พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ได้สูงที่สุดถึงมากกว่าร้อยละ 90 ที่อัตราส่วนของน้ำมันต่อเมทานอล เท่ากับ 1:4.5 จาก *P.fluorescens* เช่นกัน เนื่องจากถ้าอัตราส่วนของเมทานอลมากกว่านี้จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน และ

ได้ทำการทดลองเพื่อลดผลของเมทานอลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ โดยวิธีการเติมเป็นชั้นทั้งหมด 3 ชั้น พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกันได้

Iqbal และ Saeed (2005) ศึกษาการพัฒนาเทคนิคใหม่โดยใช้เส้นใยจากต้นมะละกอบเป็นตัวค้ำจุน พบว่าไม่เป็นอันตรายต่อการเจริญเติบโตและแอกติวิตีของเอนไซม์ เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน แอกติวิตียังคงสูงถึงร้อยละ 95 โดยไม่เกิดการสลายตัวระหว่างการใช้งาน

Nie และคณะ (2006) ศึกษาการตรึงรูปไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida sp.* บนเมมเบรนที่ทำจากฝ้าย (cotton membrane) เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงถึง ร้อยละ 96

Yang และคณะ (2006) ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida sp.* 99-125 ด้วยวิธีการตรึงรูปแบบดูดซับทางกายภาพ โดยใช้ตัวค้ำจุนเรซินที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (macroporous resin) ผลที่ได้พบว่าเรซินที่ไม่มีขั้วให้ประสิทธิภาพการตรึงสูงถึง ร้อยละ 97.3

### บทที่ 3

#### วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### 3.1.1 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 ชนิด หน้าที่ และที่มาของสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	หน้าที่	ที่มา
เมทานอล (Methanol)	เป็นสับสเตรต	แล็ปสแกน, เกรด HPLC, SN C 2517 U, ประเทศไทย
เอทานอล (Ethanol)	วัดแอกติวิตี (ละลายพาราไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตต)	เมิร์ก, เกรดวิเคราะห์, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
ไบโอเอทานอล (Bioethanol)	เป็นสับสเตรต	ประเทศไทย
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	เมิร์ก, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
สารวิเคราะห์เบรดฟอร์ด (Bradford reagent)	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Bio-rad
พาราไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตต ( <i>p</i> -nitrophenyl palmitate)	วัดแอกติวิตี	Sigma-Aldrich, เกรดมาตรฐาน, สหรัฐอเมริกา
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แอนไฮดรัส (di-Potassium hydrogen phosphate anhydrous)	บัฟเฟอร์	Scharlau, เกรดวิเคราะห์, ราชอาณาจักรสเปน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)	บัฟเฟอร์	เมิร์ก, เกรดวิเคราะห์, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)	วัดแอกติวิตี	Ajax ,Finechem, ออสเตรเลีย

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สารเคมี	หน้าที่	ที่มา
บัฟเฟอร์ทริส (tris-HCl)	วัดแอกติวิตี	Scharlau, เกรด วิเคราะห์, ราชอาณาจักรสเปน
อะซิโตไนไตร์ (Acetonitrile)	เทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวแบบสมรรถนะสูง	แล็บสแกน, เกรด HPLC, SN C 2502 U, ประเทศไทย
2-โพรพานอล (2-propanol:CH <sub>3</sub> CHOH)	เทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวแบบสมรรถนะสูง	แล็บสแกน, เกรด HPLC, ประเทศไทย
เฮกเซน (hexane)	เทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวแบบสมรรถนะสูง	แล็บสแกน, เกรด HPLC, ประเทศไทย
กรดฟอร์มิก (formic acid)	เทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวแบบสมรรถนะสูง	Scharlau, เกรด วิเคราะห์, ราชอาณาจักรสเปน
อีโคเซน (Eicosane)	สารมาตรฐาน (เทคนิคโคร- มาโทกราฟีของเหลวแบบ สมรรถนะสูง)	Sigma-Aldrich, เกรด มาตรฐาน, สหรัฐอเมริกา
เฮปเทน (Heptane)	ตรึงเอ็นไซม์	แล็บสแกน, เกรด วิเคราะห์, ประเทศไทย
1-เอทิล-3-(3-ไดเมทิลอะมิโนโพรพิล- คาร์โบไดอิมิด(1-Ethyl-3-(3- dimethylaminopropyl)carbodiimid, EDC)	ตรึงเอ็นไซม์	Sigma-Aldrich, เกรดมาตรฐาน, สหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

สารเคมี	หน้าที่	ที่มา
กรดอะซิติก (Acetic acid)	เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง	BDH Chemical, เกรดวิเคราะห์, สหราชอาณาจักร
เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate)	เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง	BDH Chemical, เกรดวิเคราะห์, สหราชอาณาจักร
กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)	เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง	RIEDEL-DE-HAEN, Approx 95-97%, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี



## 3.1.2 วัสดุ

ตารางที่ 3.2 ชนิด และที่มาของวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุ	ที่มา
เอนไซม์ไลเปส (Lipase (EC3.1.1.3) ( <i>Candida rugosa</i> )	Sigma-Aldrich , SN 31K1842, สหรัฐอเมริกา
เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (Novozym 435 ) ( <i>Candida antarctica</i> )	Novozymes, LC 200206, ราชอาณาจักรเดนมาร์ก
เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (Lipozyme RM IM) ( <i>Rhizomucor miehei</i> )	RM IM Novozymes, LUX 00205, ราชอาณาจักรเดนมาร์ก
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ประเทศไทย
ต้นกกแห้ง	นครราชสีมา, ประเทศไทย
ฟางข้าวแห้ง	สุพรรณบุรี, ประเทศไทย
กระชูดแห้ง	นครราชสีมา, ประเทศไทย
ผักตบชวาแห้ง	นครปฐม, ประเทศไทย
กาบกล้วยแห้ง	นครราชสีมา, ประเทศไทย
ก้านกล้วยแห้ง	นครราชสีมา, ประเทศไทย

### 3.1.3 อุปกรณ์

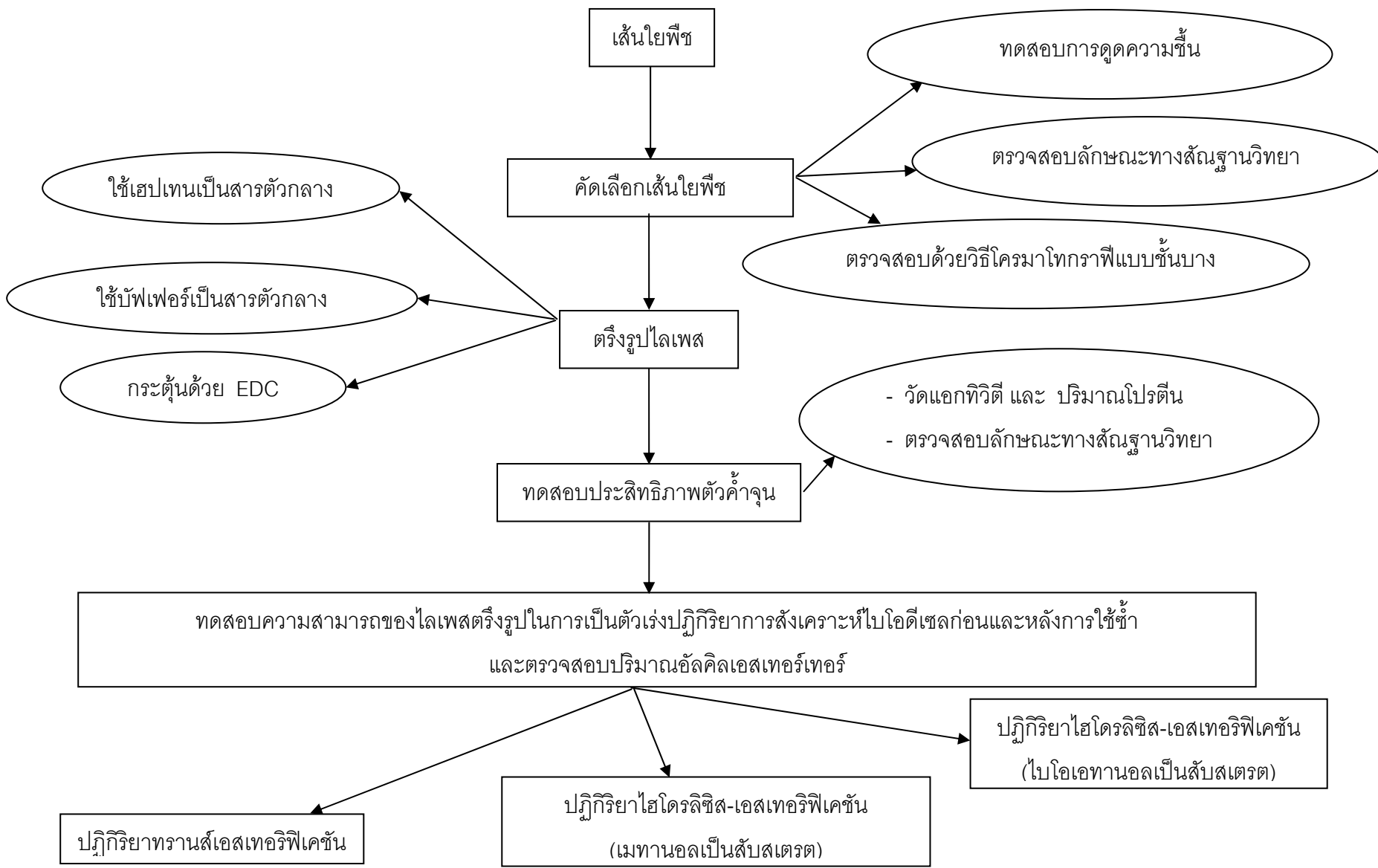
ตารางที่ 3.3 ชนิด และที่มาของอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	ที่มา
เครื่องชั่งแบบละเอียด	Sartorius, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
เครื่องชั่งอินฟราเรด	เอแอนดีดีจำกัด, AND AD-4715, ญี่ปุ่น
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	ANTHOS Zenyth 200 Microplate Spectrophotometer
เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro refrigerated centrifuge)	Kubota 3700, ญี่ปุ่น
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)	Shimadzu LC-20A series, ญี่ปุ่น
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope:SEM)	Jeol , รุ่น JSM-5800LV
เครื่องกวน (Rotator mixer)	Finepcr, Bio – Active
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	ประเทศไทย
เครื่องบดละเอียด	Fritsch, pulverizer รุ่น T15, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

## 3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 ขอบเขตการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทำการปรับปรุงเส้นใยพืชเหลือใช้ เพื่อใช้เป็นตัวค้ำจุนไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida rugosa* พร้อมทั้งศึกษาสมบัติทางกายภาพ ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา ทำการตรึงรูปเอนไซม์ และทดสอบประสิทธิภาพของไลเพสตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยาเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล และทดสอบความสามารถในการนำมาใช้ซ้ำ



รูปที่ 3.1 ขอบเขตการทดลอง

### 3.2.2 วิธีการทดลอง

#### 3.2.2.1 คัดเลือกเส้นใยพืชที่เหมาะสมเป็นตัวค้ำจุน

1) การเตรียมเส้นใยพืช ได้แก่ ต้นกก ฟางข้าว กระจูด ผักตบชวา กาบกล้วย และก้านกล้วย โดยเตรียมเป็น 2 รูปแบบ รูปแบบที่หนึ่งนำมาตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ส่วนรูปแบบที่สองได้แก่การนำเส้นใยพืชไปบดละเอียดด้วยเครื่อง pulverizer รุ่น T15 โดยใช้ตะแกรงเบอร์ 0.25 จะได้ผงละเอียดขนาดไม่เกิน 0.25 มิลลิเมตร

#### 2) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยพืชก่อนและหลังการตรึงรูปไลเฟสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-5800LV เพื่อตรวจสอบลักษณะพื้นผิวและภาพตัดขวางของเส้นใย โดยนำเส้นใยพืชไปเคลือบผิวด้วยทองคำก่อนทำการตรวจสอบโดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์

#### 3) การทดสอบการดูดความชื้น

การทดสอบการดูดความชื้นของเส้นใยพืช เพื่อคัดเลือกเส้นใยพืชที่มีความสามารถในการดูดความชื้นได้ต่ำจึงจะเหมาะที่จะใช้เป็นตัวค้ำจุนด้วยเครื่องซังอินฟราเรด รุ่น โดยใช้อุณหภูมิ 105 °C ซึ่งก่อนการทดสอบต้องเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 65 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความสามารถในการดูดความชื้น ดังสมการที่ 3.1

$$\% \text{ Moisture regain} = \frac{M_1 - M_2}{M_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3.1)$$

$$\% \text{ Moisture content} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3.2)$$

$$M_1 = \text{น้ำหนักขึ้นทดสอบก่อนอบ}$$

$$M_2 = \text{น้ำหนักขึ้นทดสอบหลังอบ}$$

4) การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

นำตัวอย่างน้ำมันผสมให้เข้ากันกับเฮกเซนแล้วนำไปจุดลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีเป็นเวลา 30 นาที โดยแบ่งเลนตามแนวกว้างให้แต่ละเลนมีระยะห่างจากกัน 1 เซนติเมตรแล้วนำแผ่นโครมาโทกราฟีไปใส่ในแท็งค์สารละลายอิมัตว (Samukawa และคณะ, 2000) เมื่อสารละลายดังกล่าวเคลื่อนที่เกือบเต็มแผ่นโครมาโทกราฟีจึงนำไปพ่นด้วยสารละลายผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริกและเมทานอล ทำการอบแผ่นโครมาโทกราฟีด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟี โดยถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานก็จะขึ้นที่ระดับเดียวกันกับแถบของสารมาตรฐานนั้น ๆ หรือ พิจารณาจากค่า  $R_f$  (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงจุดกึ่งกลางของแถบที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงระยะทางที่สารละลายเคลื่อนที่ได้บนแผ่นโครมาโทกราฟี ดังสมการที่ 3.3

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad \dots\dots\dots(3.3)$$

หมายเหตุ: สารชนิดเดียวกันจะมีค่า  $R_f$  เท่ากัน ถ้าใช้สภาวะเดียวกัน

ค่า  $R_f$  จะมีค่าไม่เกิน 1 และไม่มีหน่วย

### 3.2.2.2 การตรึงรูปไลเปสบนตัวค้ำจุนเส้นใยพืช

การตรึงรูปไลเปสบนตัวค้ำจุนเส้นใยพืชในงานวิจัยนี้มี 3 วิธี

1) การตรึงรูปไลเปสโดยประยุกต์ใช้วิธียึดติดโดยการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption)

ก. การใช้เฮปแทนเป็นสารตัวกลาง (Yang และคณะ, 2006)

ผสมตัวค้ำจุน 0.25 กรัม และไลเปส 0.12 กรัม และเฮปแทน 5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งกวนเบา ๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องกวน และล้างไลเปสตรึงรูปด้วยเฮปแทน 6 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไลเปสตรึงรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นเก็บไลเปสตรึงรูปในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 1 คืน

ข. การใช้บัฟเฟอร์เป็นสารตัวกลาง (Takac และ Bakkal, 2007)

ผสมวัสดุค้ำจุน 0.25 กรัม และสารละลายไลเพสความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นกวนที่ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างไลเพสตรังรูปด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไลเพสตรังรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรังรูปใน โถดูดความชื้น เป็นเวลา 1 คืน

2) การตรึงรูปไลเพสโดยประยุกต์ใช้วิธีการยึดติดแบบโควาเลนต์

(Covalent binding) (Chiou และ Wu, 2003)

ผสมวัสดุค้ำจุน 0.25 กรัม และสารกระตุ้น EDC ความเข้มข้น 0.75% (w/v) ซึ่งละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น และนำตัวค้ำจุนที่ได้ใส่ลงในสารละลายไลเพส ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นกวนที่ 360 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และล้างไลเพสตรังรูปด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 จำนวน 6 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร นำไลเพสตรังรูปที่ได้มากรองแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นเก็บไลเพสตรังรูปใน โถดูดความชื้น เป็นเวลา 1 คืน

ตารางที่ 3.4 แสดงอักษรย่อและรายละเอียดของเอนไซม์ รูปแบบเส้นใยพืช และวิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบบต่างๆ ที่กล่าวถึงในข้อ 3.2.2.2

**ตารางที่ 3.4** อักษรย่อและรายละเอียดของเอนไซม์ รูปแบบเส้นใยพืช และวิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบบต่างๆ ใช้ในงานวิจัย

อักษรย่อ	รายละเอียด
ไลเพส/กก/ADHEP	การตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยกกที่ตัดเป็นท่อนยาว 0.5 เซนติเมตร โดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพ ซึ่งมีเฮปแทนเป็นสารตัวกลาง
ไลเพส/กก(บด)/ADHEP	การตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยกกที่บดละเอียดขนาด 0.25 มิลลิเมตร โดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพ ซึ่งมีเฮปแทนเป็นสารตัวกลาง
ไลเพส/กก/ADPB	การตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยกกที่ตัดเป็นท่อนยาว 0.5 เซนติเมตร โดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพ ซึ่งมีบัพเฟอร์เป็นสารตัวกลาง
ไลเพส/กก(บด)/ADPB	การตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยกกที่บดละเอียดขนาด 0.25 มิลลิเมตร โดยใช้วิธีดูดซับทางกายภาพ ซึ่งมีบัพเฟอร์เป็นสารตัวกลาง
ไลเพส/กก/COEDC	การตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยกกที่ตัดเป็นท่อนยาว 0.5 เซนติเมตร โดยวิธีเชื่อมแบบพันธะโควาเลนต์ ซึ่งมีสาร EDC เป็นสารกระตุ้น หมูไฮดรอกซิล
ไลเพส/กก(บด)/COEDC	การตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยกกที่บดละเอียดขนาด 0.25 มิลลิเมตร โดยวิธีเชื่อมแบบพันธะโควาเลนต์ ซึ่งมีสาร EDC เป็นสารกระตุ้น หมูไฮดรอกซิล

หลังจากทำการตรึงรูปไลเพสตามวิธีในข้อ 3.2.2.2 แล้ว นำสารละลายเอนไซม์ น้ำล้างและ ไลเพสตรึงรูปที่ได้ ไปทำการทดสอบหาประสิทธิภาพของตัวค้ำจุนในการตรึงไลเพส โดยการคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีนที่ใช้ (protein loading) ดังสมการที่ 3.4 และร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง (% immobilization efficiency) ดังสมการที่ 3.5 หาค่าแอกติวิตีของไลเพสก่อนและหลังตรึงรูปในหัวข้อ 3.2.2.3 นอกจากนี้ยังนำไลเพสตรึงรูปที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ไบโอดีเซลต่อไป

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ใช้} = (C_0V_0 - C_fV_f) / W_g \quad \dots\dots\dots(3.4)$$

- กำหนดให้
- $C_0$  = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
  - $C_f$  = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายไลเพสหลังการตรึง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
  - $V_0$  = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)
  - $V_f$  = ปริมาตรของสารละลายหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)
  - $W_g$  = น้ำหนักของเอนไซม์ตรึงรูป (กรัม)

$$\text{ร้อยละของประสิทธิภาพของการตรึง} = \frac{(E_0V_0 - E_fV_f)}{E_0V_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots(3.5)$$

- กำหนดให้
- $E_0$  = แอกทิวิตีเริ่มต้นของสารละลายไลเพสก่อนการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
  - $E_f$  = แอกทิวิตีทั้งหมดของสารละลายไลเพสหลังการตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
  - $V_0$  = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลาย (มิลลิลิตร)
  - $V_f$  = ปริมาตรทั้งหมดหลังจากการกรอง (มิลลิลิตร)



### 3.2.2.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงรูปไลเปสของเส้นใยพืช

- 1) ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ดังข้อ 3.2.2.1)
- 2) การวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสทั้งหมด (Total activity)

นำสารละลายเอนไซม์ น้ำล้าง และไลเปสตรึงรูปที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 มาวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสทั้งหมดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี(Hung และคณะ, 2003) (ภาคผนวก ก)

- 3) การวัดปริมาณโปรตีนที่ใช้ (protein loading)

นำสารละลายเอนไซม์ และน้ำล้าง ที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford (Bradford , 1976) (ภาคผนวก ก)

### 3.2.2.4 การทดสอบความสามารถของไลเปสตรึงรูปในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ไบโอดีเซล

การสังเคราะห์ไบโอดีเซลในงานวิจัยนี้มี 3 วิธี

- 1) การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายเอนไซม์และไลเปสตรึงรูป โดยใช้สารละลายเอนไซม์ และไลเปสตรึงรูปที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 แล้วนำมากวนโดยปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน จะมีการเติมเมทานอลแบบสามขั้น (ภาคผนวก ง)

- 2) การทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เมทานอลเป็น

สับสเตรต

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายเอนไซม์และไลเปสตรึงรูป โดยใช้สารละลายเอนไซม์ และไลเปสตรึงรูปที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 เติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร เฉพาะที่เป็นไลเปสตรึงรูป หลังจากนั้นนำมากวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อ นาทีเพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตร ที่ 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยเติมเมทานอลแบบเติมสามขั้น (ภาคผนวก ง)

3) การทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไบโอเอทานอล เป็นสับสเตรต

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายเอนไซม์และไลเพสตรังรูป โดยใช้สารละลายเอนไซม์ และไลเพสตรังรูปที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 เติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร เฉพาะที่เป็นไลเพสตรังรูป หลังจากนั้นนำมากวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาทีเพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตร ที่ 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยเติมไบโอเอทานอลแบบสามชั้น (ภาคผนวก ง)

### 3.2.2.5 การตรวจสอบปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์

ตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์เพื่อยืนยันความสามารถของไลเพสและไลเพสตรังรูปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High - Performance Liquid Chromatography:HPLC)

นำตัวอย่างน้ำมันที่ได้จากการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลจากข้อ 3.2.2.4 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลออกจากนั้นละลายตัวอย่างในเฮกเซน และเติม eicosane เป็น internal standard จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการตรวจสอบมาคำนวณหาปริมาณอัลคิลเอสเทอร์และปริมาณกรดไขมันอิสระ ดังสมการที่ 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง )

$$\text{ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์} = \frac{100 \times [\text{FAME}]}{[\text{FAME}] + [\text{TG}] + [\text{FFA}] + [1,3\text{-DG}] + [1,2\text{-DG}] + [\text{MG}]} \quad (3.6)$$

$$\text{ร้อยละกรดไขมันอิสระ} = \frac{100 \times [\text{FFA}]}{[\text{TG}] + [\text{FFA}] + [1,3\text{-DG}] + [1,2\text{-DG}] + [\text{MG}]} \quad (3.7)$$

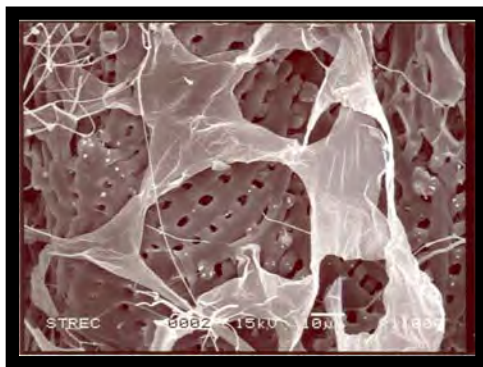
กำหนดให้	FAME	=	อัลคิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน
	FFA	=	กรดไขมันอิสระ
	TG	=	ไตรกลีเซอไรด์
	1,3-DG	=	1,3-กลีเซอไรด์
	1,2-DG	=	1,2-กลีเซอไรด์
	MG	=	โมโนกลีเซอไรด์

## บทที่ 4

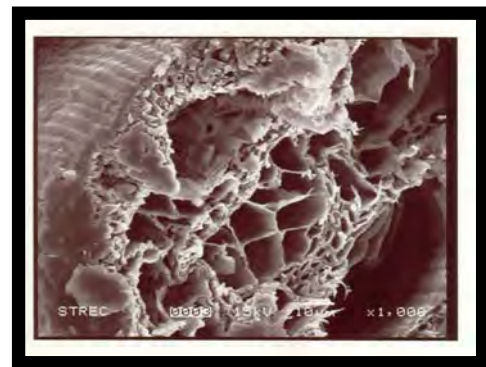
### ผลการทดลองและการอภิปรายผล

#### 4.1 การคัดเลือกเส้นใยพืชที่เหมาะสมเป็นตัวค้ำจุน

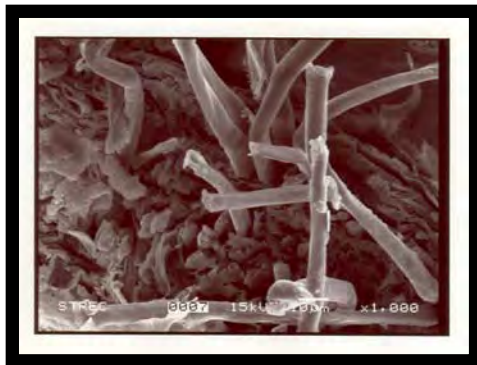
4.1.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)



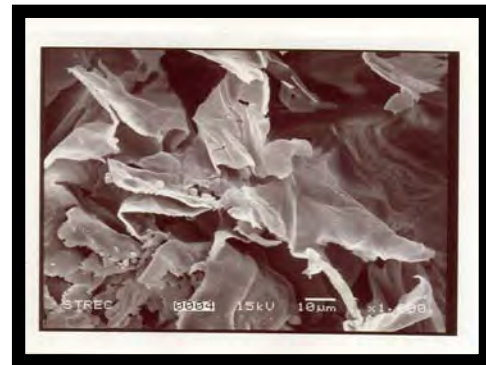
(ก)



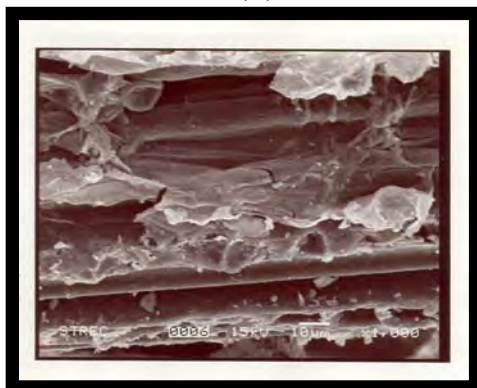
(ข)



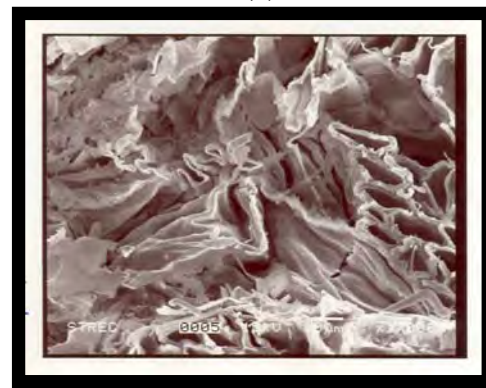
(ค)



(ง)



(จ)

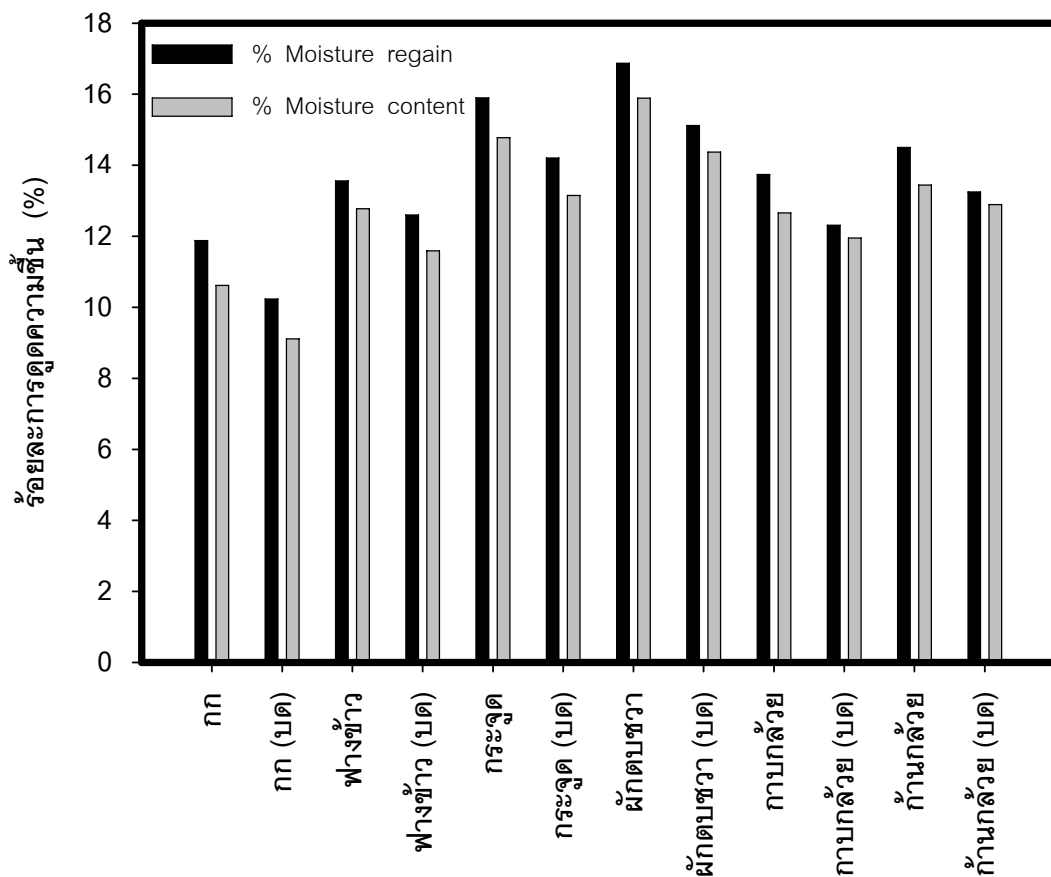


(ฉ)

รูปที่ 4.1 ลักษณะภาคตัดขวางของเส้นใยพืช (ก) กก (ข) ฟางข้าว (ค) กระจูด (ง) ผักตบชวา (จ) กาบกล้วย และ (ฉ) ก้านกล้วย

จากรูปที่ 4.1 แสดงลักษณะภาคตัดขวางของเส้นใยพืชเหลือใช้หลายชนิด พบว่าเส้นใย กกมีความเป็นรูพรุนจำนวนมากและมีขนาดของรูพรุนประมาณ 2.5 – 3 ไมโครเมตร และมีขนาดที่สม่ำเสมอกระจายอยู่ทั่วไป ในขณะที่เส้นใยจากฟางข้าวมีรูพรุนที่มีขนาดไม่สม่ำเสมอ ตั้งแต่ 10 – 20 ไมโครเมตร คละกันไป สำหรับเส้นใยกระจูดนั้นไม่ค่อยสังเกตเห็นรูพรุน เส้นใยค่อนข้างอัดแน่น ส่วนเส้นใยจากผักตบชวา จากกาบกล้วยและจากก้านกล้วยสังเกตเห็นรูพรุนบ้างแต่มีไม่มาก และมีอยู่กระจัดกระจายไม่สม่ำเสมอ

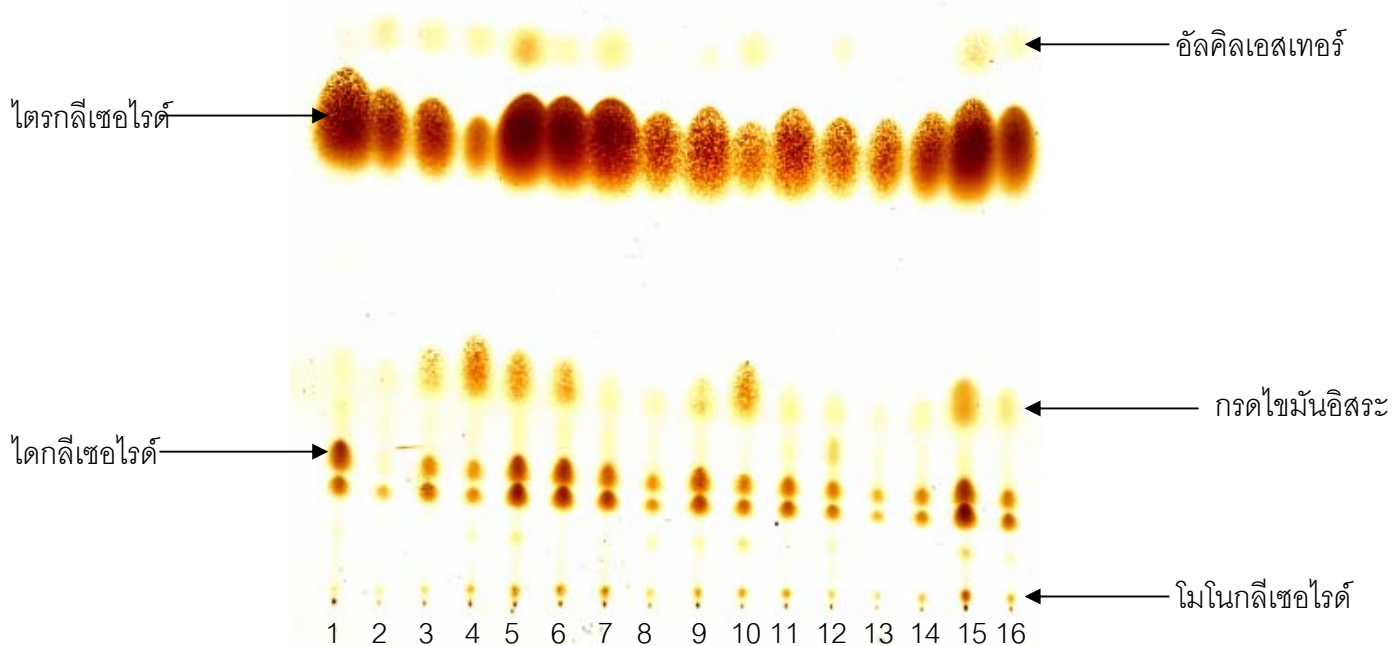
#### 4.1.2 การดูความชื้นของเส้นใยพืช



รูปที่ 4.2 ร้อยละการดูดความชื้นของเส้นใยพืชชนิดต่าง ๆ

จากรูปที่ 4.2 แสดงการดูดความชื้นของเส้นใยพืชชนิดต่างๆ พบว่าเส้นใยที่ได้จากกกทั้งที่เป็นท่อนสั้นๆ และที่บดละเอียดมีสมบัติการดูดความชื้นที่ต่ำที่สุดคือมี % Moisture regain เท่ากับ 11.9% และ 10.2% ตามลำดับ และมี % Moisture content เท่ากับ 10.6% และ 9.1% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยพืชชนิดอื่นๆ เช่น ผักตบชวาซึ่งมีการดูดความชื้นค่อนข้างสูงที่สุดคือ มี % Moisture regain เท่ากับ 16.9% และมี % Moisture content เท่ากับ 15.9% นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยพืชทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยเมื่อนำมาบดให้ละเอียดขนาด 0.25 มิลลิเมตร จะมีการดูดความชื้นต่ำกว่าเส้นใยพืชที่นำมาตัดเป็นท่อนสั้นๆ เนื่องจากเส้นใยพืชบดละเอียดจะมีพื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นซึ่งมีผลมาจากเมื่อเส้นใยพืชถูกบดจะทำให้โครงสร้างของเส้นใยเปลี่ยนแปลง กล่าวคือโครงสร้างส่วนที่ชอบน้ำหรือดูดความชื้นได้ดีถูกทำลาย

#### 4.1.3 การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)



**รูปที่ 4.3** โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์การเกิดอัลคิลเอสเทอร์ด้วยวิธี TLC ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยการเติมเมทานอลแบบต่อเนื่อง โดยเร่งด้วยไลเพสตรังรูปบนตัวค้ำจุน โดยเลนที่ 1 น้ำมันปาล์ม เลนที่ 2 น้ำมันไบโอดีเซล เลนที่ 3 ไลเพส/ฟางข้าว/ADHEP เลนที่ 4 ไลเพส/ฟางข้าว(บด)/ADHEP เลนที่ 5 ไลเพส/กก/ADHEP เลนที่ 6 ไลเพส/กก(บด)/

ADHEP เลขที่ 7 ไลเพส/ผักตบชวา/ADHEP เลขที่ 8 ไลเพส/ผักตบชวา(บด)/ADHEP เลขที่ 9 ไลเพส/กระจูด/ADHEP เลขที่ 10 ไลเพส/กระจูด(บด)/ADHEP เลขที่ 11 ไลเพส/ก้านกล้วย/ADHEP เลขที่ 12 ไลเพส/ก้านกล้วย(บด)/ADHEP เลขที่ 15 ไลเพส/กาบกล้วย/ADHEP เลขที่ 10 ไลเพส/กาบกล้วย(บด)/ADHEP

สารมาตรฐานที่นำมาในการตรวจสอบชนิดของสารตัวอย่างในการทำด้วย TLC ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ได้แก่ น้ำมันปาล์ม และ B100 (น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เป็นตัวแทนเมทิลเอสเตอร์) จากการคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Retention factor;  $R_f$ ) ของสารแต่ละชนิดที่ใช้เป็นสารมาตรฐานโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในวิธีการวิจัยบทที่ 3 B100 มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.70 จากโครมาโทแกรมรูปที่ 4.3 พบว่า ไลเพส/ฟางข้าว/ADHEP ไลเพส/ฟางข้าว(บด)/ADHEP ไลเพส/กก/ADHEP ไลเพส/กก(บด)/ADHEP ไลเพส/ผักตบชวา/ADHEP ไลเพส/ผักตบชวา(บด)/ADHEP ไลเพส/กระจูด/ADHEP ไลเพส/กระจูด(บด)/ADHEP ไลเพส/ก้านกล้วย(บด)/ADHEP ไลเพส/กาบกล้วย/ADHEP ไลเพส/กาบกล้วย(บด)/ADHEP สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันแล้วเกิดอัลคิลเอสเทอร์ ส่วนไลเพส/ผักตบชวา(บด)/ADHEP และ ไลเพส/ก้านกล้วย/ADHE ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันแล้วเกิดอัลคิลเอสเทอร์ได้ โดยพิจารณาจากค่า  $R_f$  เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน

จากการตรวจสอบลักษณะภาคตัดขวาง การดูความชื้นของเส้นใย และการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางอาจกล่าวได้ว่าเส้นใยที่เหมาะสมที่จะนำมายึดติดกับไลเพสเนื่องจากเส้นใยกมมีสมบัติที่ดีหลายประการดังนี้มีรูพรุนจำนวนมาก มีขนาดและมีการกระจายตัวของรูพรุนที่สม่ำเสมอจึงมีความจุเอินไซม์ได้มาก นอกจากนี้ยังมีราคาถูก (Chen และ Tsao, 1976)

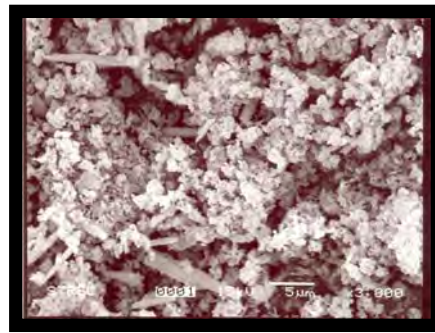
## 4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสของเส้นใยกก

จากการศึกษาการดูดความชื้นและการตรวจสอบลักษณะภาคตัดขวางของเส้นใยพืชในหัวข้อ 4.1 พบว่าเส้นใยกกที่อยู่ในรูปที่ตัดเป็นท่อนสั้นๆ ขนาด 0.5 เซนติเมตร และที่บดเป็นผงละเอียด ขนาด 0.25 มิลลิเมตรมีการดูดความชื้นที่ต่ำที่สุดและมีรพูนจำนวนมาก มีขนาดและมีการกระจายตัวของรพูนที่สม่ำเสมอจึงมีความจุเอนไซม์ได้มากเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยพืชชนิดอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกเฉพาะเส้นใยกกทั้งสองรูปแบบดังกล่าวมาใช้เป็นตัวคำนวณในการตรึงรูปไลเพสเพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

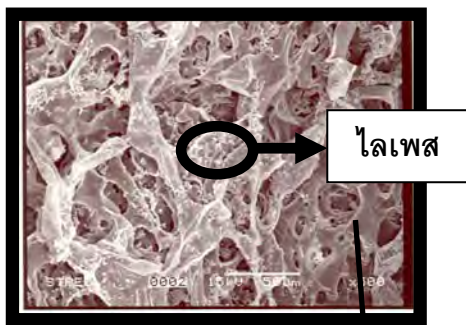
### 4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยพืชหลังตรึงรูปไลเพสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

จากรูปที่ 4.4 พบว่าในการตรึงรูปไลเพสด้วยการดูดซับทางกายภาพซึ่งมีเฮปแทนเป็นสารตัวกลางนั้นเอนไซม์จะยึดเกาะเส้นใยกกทั้งแบบที่ตัดเป็นท่อนและบดละเอียดได้ดีกว่า นอกจากนี้เอนไซม์ที่ยึดเกาะยังคงรักษาสภาพเดิมไว้ก่อนการตรึงรูปเหมือนรูปไลเพสอิสระ (ดูรูป 4.4 (ก) ถึง (ค)) โดยไม่มีการจับตัวกันเป็นก้อนเหมือนการตรึงรูปด้วยวิธียึดติดแบบดูดซับทางกายภาพซึ่งมีบัพเฟอร์เป็นสารตัวกลางและวิธียึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้ EDC (ดูรูป 4.4 (ง) ถึง (ข)) ยิ่งกว่านั้นยังสังเกตเห็นว่าเส้นใยกกที่บดละเอียดมีการยึดเกาะกับไลเพสมากกว่าเส้นใยกกทั้งแบบที่ตัดเป็นท่อนเนื่องจากมีพื้นที่ผิวสูงกว่านั่นเอง





(ก)



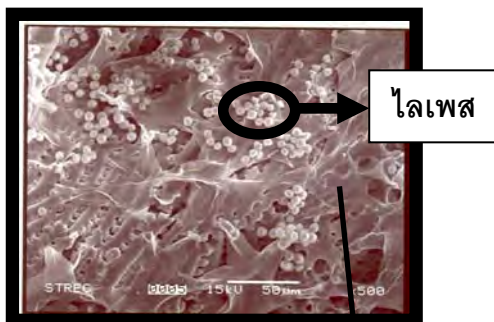
(ข)

กก



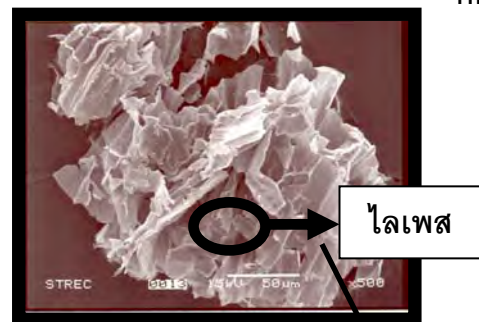
(ค)

กก



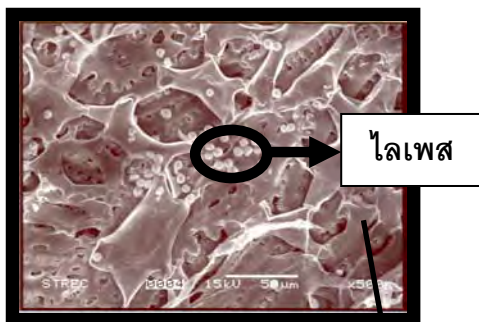
(ง)

กก



(จ)

กก



(ฉ)

กก



(ช)

กก

รูปที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ (ก) ไลเพสที่ไม่ผ่านการตรึงรูป (ข) ไลเพส/กก/ADHEP (ค) ไลเพส/กก (บด)/ADHEP (ง) ไลเพส/กก/ADPB (จ) ไลเพส/กก (บด)/ADPB (ฉ) ไลเพส/กก/COEDC (ช) ไลเพส/กก (บด)/COEDC

#### 4.2.2 การตรึงรูปไลเปสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพและวิธียึดติดด้วย

##### พันธะโควาเลนต์

**ตารางที่ 4.1** แสดงค่าแอกติวิตีทั้งหมด ปริมาณโปรตีนที่ใช้ และประสิทธิภาพของการตรึงรูปไลเปสด้วยการดูดซับทางกายภาพที่ใช้สารตัวกลางแตกต่างกันและวิธียึดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งมีสาร EDC เป็นสารกระตุ้น

เอนไซม์/ตัวค้ำจุน	ค่าแอกติวิตี (หน่วยต่อ กรัมตัวค้ำ จุน)	อัตราการ เปลี่ยนแปลง ค่าแอกติวิตี (%)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (ไมโครกรัมต่อกรัม ตัวค้ำจุน)	ประสิทธิภาพ การตรึง (%)
ไลเปส/กก/ADHEP <sup>๑</sup>	9.9	-13.4	78.2	88.4
ไลเปส/กก (บด)/ ADHEP <sup>๑</sup>	10.1	-11.2	83.2	93.4
ไลเปส/กก/ADPB <sup>๒</sup>	8.5	-54.2	78.7	78.7
ไลเปส/กก (บด)/ ADPB <sup>๒</sup>	7.1	-61.7	80.5	82.8
ไลเปส/กก/COEDC <sup>๒</sup>	5.4	-71.0	76.8	71.1
ไลเปส/กก (บด)/COEDC <sup>๒</sup>	6.2	-66.6	78.7	76.2

**หมายเหตุ** <sup>๑</sup> : อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าแอกติวิตีเทียบกับแอกติวิตีไลเปสอิสระ

11.40 ยูนิต<sup>1</sup>/มิลลิลิตร

<sup>๒</sup> : อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าแอกติวิตีเทียบกับแอกติวิตีไลเปสอิสระ

18.63 ยูนิต<sup>1</sup>/มิลลิลิตร

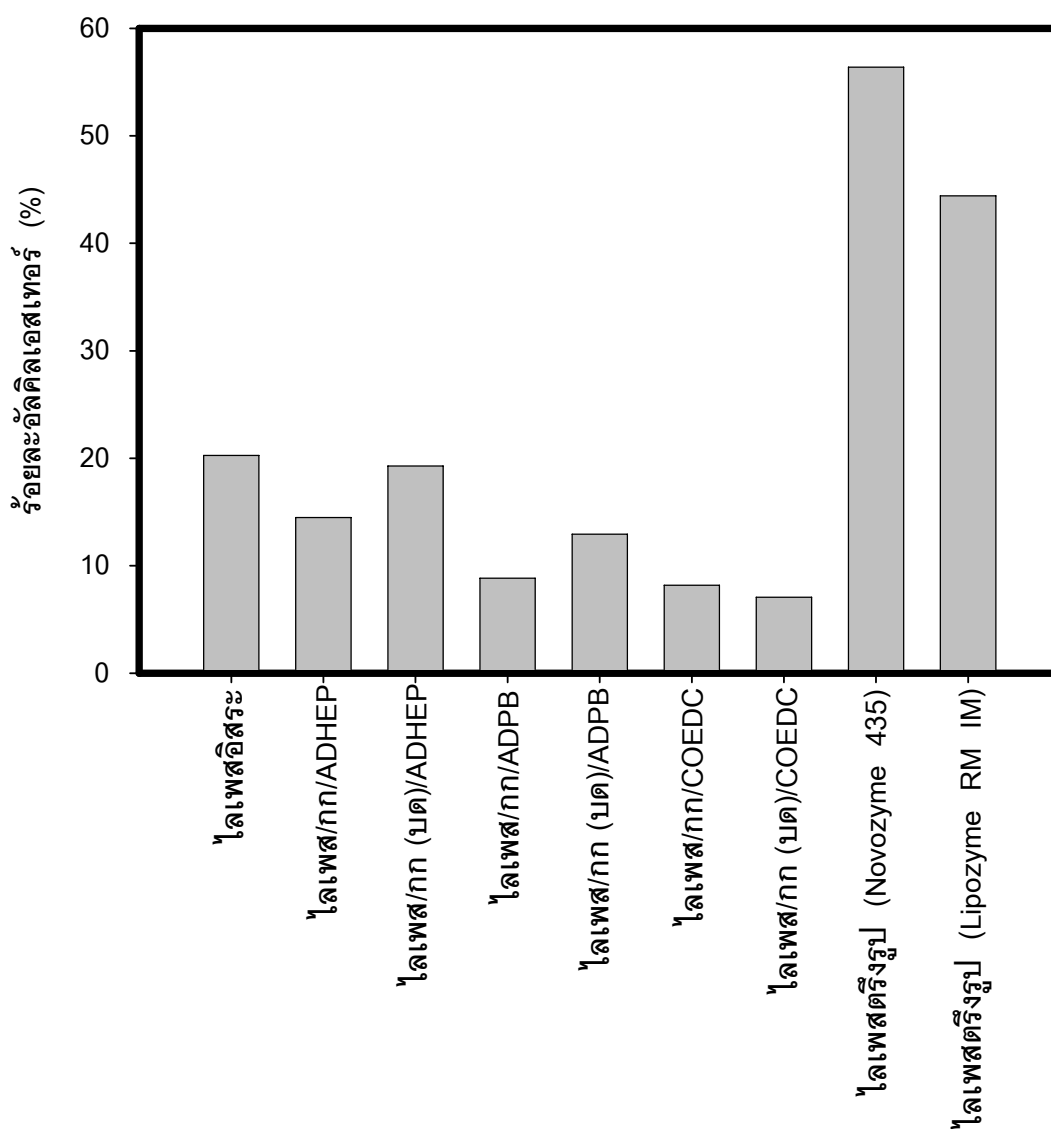
(<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในระหว่างปฏิกิริยาต่อนาที)

จากตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเปสบนเส้นใยแก้วด้วยวิธีการตรึงที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อทำการตรึงไลเปสโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพโดยใช้ เฮปแทนเป็นสารตัวกลางบนเส้นใยแก้วแบบบดละเอียดจะมีประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเปสดีกว่าบนเส้นใยแก้วที่ตัดเป็นท่อนสั้น ๆ กล่าวคือ ค่าแอกติวิตีของไลเปสตรึงรูปบนเส้นใยแก้วบดละเอียดมีค่า 10.1 หน่วยต่อกรัมตัวค้ำจุน ในขณะที่บนกักตัดเป็นท่อนมีค่าแอกติวิตี 9.9 หน่วยต่อกรัมตัวค้ำจุน อัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าแอกติวิตีลดลงเพียงร้อยละ 13.4 และ 11.2 ตามลำดับเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับไลเปสอิสระ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการตรึง นั่นคือเมื่อเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าแอกติวิตีสูง ร้อยละของประสิทธิภาพการตรึงก็จะสูงตามไปด้วยนั่นคือ ประสิทธิภาพของไลเปส

ตรึงรูปบนเส้นใยกบดละเอียดและบนเส้นใยกบที่ตัดเป็นท่อนเท่ากับ 88.4 และ 93.4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงรูปด้วยวิธีอื่นพบว่าไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยกบที่ตัดเป็นท่อนและบดละเอียดด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพซึ่งมีบัพเฟอร์เป็นสารตัวกลางมีค่าแอกติวิตีเท่ากับ 8.5 และ 7.1 ตามลำดับ และอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าแอกติวิตีลดลงถึงร้อยละ 54.2 และ 61.7 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ ทั้งนี้เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วไลเพสกระจายตัวได้ดีในน้ำแต่ไม่กระจายตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เช่นเฮปเทน จึงส่งผลให้ไลเพสแพร่กระจายและดูดติดเส้นใยพืชซึ่งได้ดีกว่าเฮปเทน ดังนั้นไลเพสคงกระจายตัวได้ดีในบัพเฟอร์จึงส่งผลให้ไลเพสดูดติดเส้นใยพืชได้น้อยกว่าการใช้เฮปเทนเป็นสารตัวกลาง (Yang และคณะ, 2006) และเช่นเดียวกันกบทั้งที่ตัดเป็นท่อนและบดละเอียดตรึงรูปไลเพสด้วยวิธียัดติดด้วยพันธะโควาเลนต์ซึ่งมีสาร EDC เป็นสารกระตุ้นบริเวณหมู่ไฮดรอกซิลมีความสามารถต่ำกว่าทั้งสองวิธีข้างต้น กล่าวคือมีค่าแอกติวิตีเพียง 5.4 และ 6.2 ตามลำดับ และอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าแอกติวิตีลดลงมากถึงร้อยละ 71.0 และ 66.6 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับไลเพสอิสระ ซึ่งส่งผลทำให้ ร้อยละประสิทธิภาพการตรึงต่ำลงคือ 71.1 และ 76.2 ตามลำดับ เนื่องจากไลเพสอาจหลุดออกจากตัวค้ำจุนยากเพราะมีการยึดด้วยพันธะที่แข็งแรง นอกจากนี้การเกิดพันธะโควาเลนต์มีผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและบริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งมีผลทำให้แอกติวิตีลดลงและอาจเปลี่ยนความจำเพาะต่อสับสเตรตอีกด้วย (Walt และ Agayn, 1994)

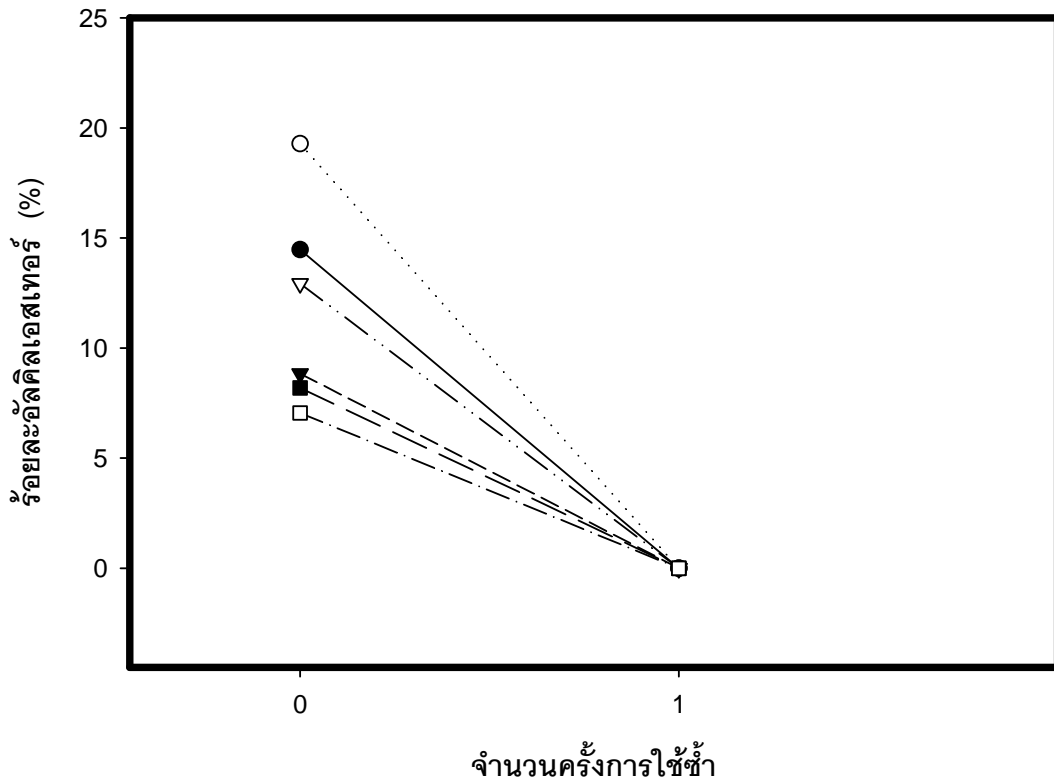
#### 4.3 การตรวจสอบปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์ระหว่างปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน

##### 4.3.1 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน



รูปที่ 4.5 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเปสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

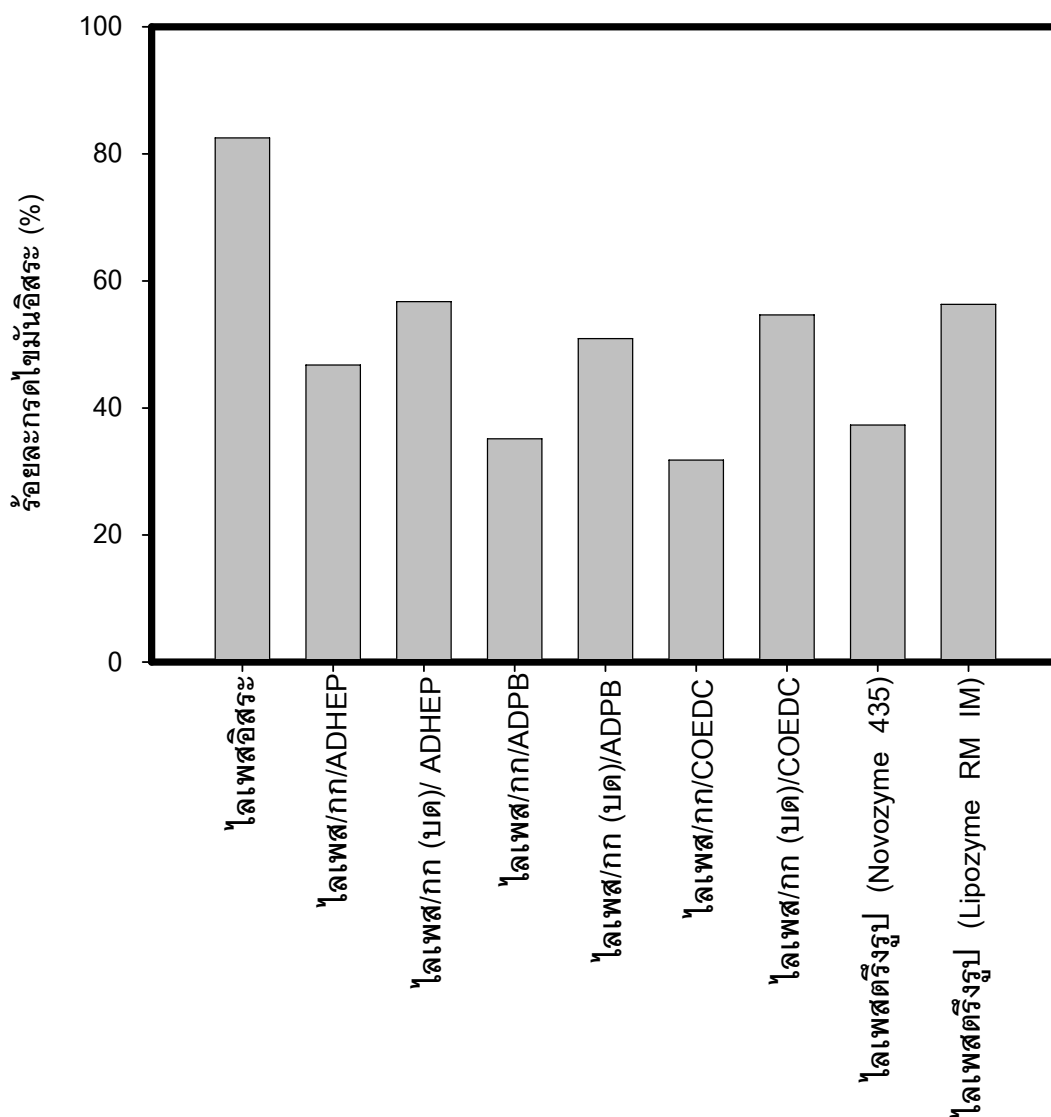
จากรูปที่ 4.5 พบว่าการใช้ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 20.2 เนื่องจากไลเพสที่ได้จากยีสต์ *Candida rugosa* นั้นเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ดังนั้นปฏิกิริยาจึงดำเนินไปแบบสุ่มและมีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งของไตรเอซิลกลีเซอรอล (Macrae, 1983) ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ ไลเพส/กก(บด)/ADHEP ซึ่งได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 19.3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไลเพส/กก(บด)/ADHEP นั้นมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ใกล้เคียงกับไลเพสอิสระมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไลเพสตรังรูปด้วยวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไลเพสตรังรูปทางการค้า Novozyme 435 และLipozyme RM IM นั้นสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 56.4 และ 44.4 ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับไลเพสอิสระ เนื่องจากไลเพสตรังรูปทางการค้า Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM เป็นไลเพสที่ได้จากแหล่งที่มาและสายพันธุ์ที่ต่างจากไลเพสอิสระ ซึ่งสายพันธุ์ของไลเพสตรังรูปทางการค้าทั้งสองประเภทนี้มีความจำเพาะต่อการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่าไลเพสอิสระ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนี้มีข้อเสียคือ ไม่สามารถนำไลเพสตรังรูปกลับมาใช้ซ้ำได้ ดังรูปที่ 4.6 เนื่องจากสับสเตรตที่ใช้คือ เมทานอลมีองค์ประกอบของน้ำน้อยจึงทำให้เกิดการยับยั้งประสิทธิภาพของเอนไซม์ และทำให้ไลเพสตรังรูปเสียสภาพ (Kaieda และคณะ, 1999)



รูปที่ 4.6 จำนวนครั้งของการใช้ไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

(●) ไลเพส/กก/ADHEP (○) ไลเพส/กก(บด)/ADHEP  
 (■) ไลเพส/กก/ADPB (□) ไลเพส/กก(บด)/ADPB  
 (▼) ไลเพส/กก/COEDC (▽) ไลเพส/กก(บด)/COEDC

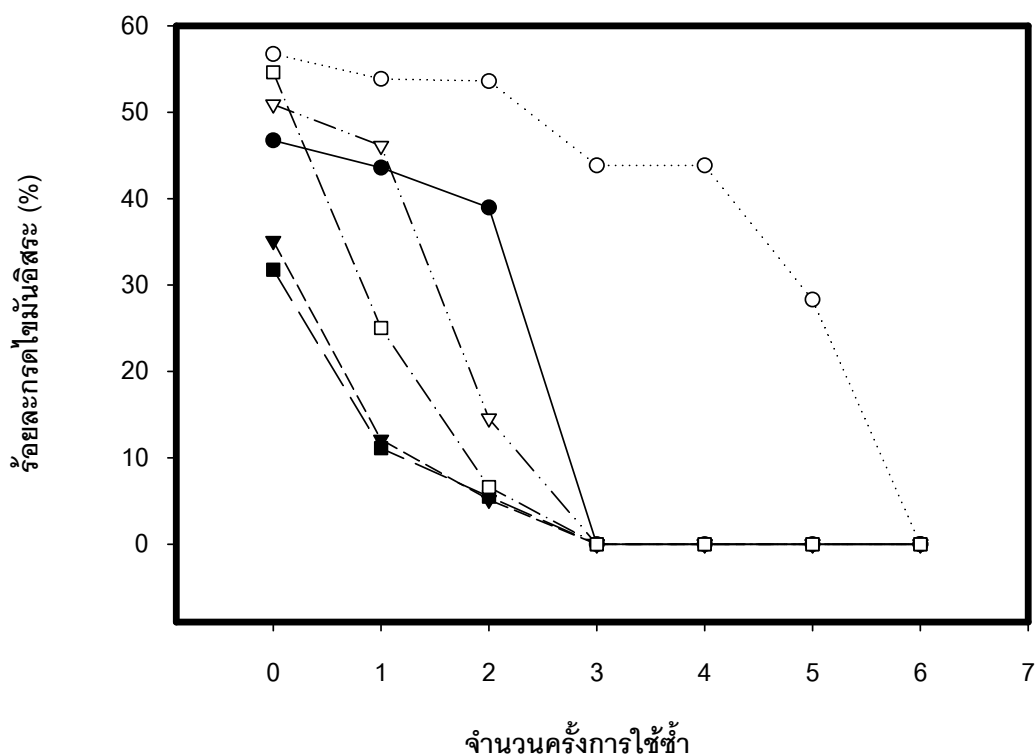
จากผลดังกล่าวข้างต้นเราจึงปรับเปลี่ยนกรรมวิธีใหม่โดยเริ่มแรกต้องนำไลเพสตรังรูปมาทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเนื่องจากเอนไซม์ไลเพสจัดอยู่ในกลุ่ม ไฮโดรเลส (Hydrolases) จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาการไฮโดรลิซิสได้ (Yamane, 1987) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 จากนั้นจึงต่อด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน



รูปที่ 4.7 ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเปสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.7 พบว่าไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้ปริมาณร้อยละกรดไขมันอิสระสูงถึงร้อยละ 82.5 แสดงว่าไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันอิสระได้ในปริมาณที่มากพอที่จะนำไปสังเคราะห์ไบโอดีเซลด้วยการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าไลเปส/กก(บด)/ADHEP ได้กรดไขมันอิสระร้อยละ 56.7 ซึ่งใกล้เคียงกับไลเปสตรังรูปทางการค้า Lipozyme RM IM ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดกรดไขมัน

อิสระร้อยละ 56.3 ในขณะที่ไลเปสตรังรูปทางการค้า Novozyme 435 เเร่งปฏิกิริยาให้เกิดกรดไขมันอิสระน้อยกว่าเพียงร้อยละ 37.3 เมื่อเทียบกับไลเปสอิสระพบว่าไลเปสตรังรูปทางการค้า Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM เเร่งปฏิกิริยาให้เกิดกรดไขมันอิสระน้อยกว่าไลเปสอิสระมาก เนื่องจากเป็นไลเปสที่ได้จากแหล่งที่มาและสายพันธุ์ที่ต่างจากไลเปสอิสระ ซึ่งสายพันธุ์ของไลเปสตรังรูปทางการค้าทั้งสองประเภทนี้ไม่มีความจำเพาะต่อการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสได้ดีเท่ากับไลเปสอิสระ

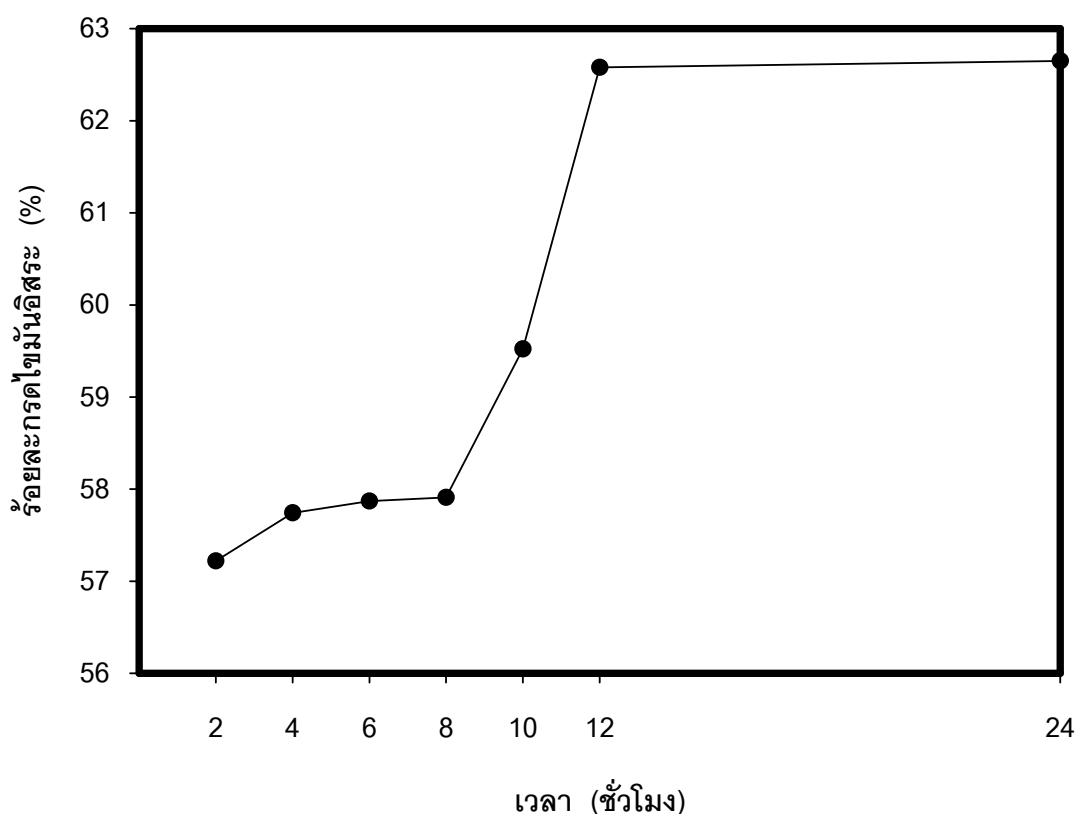


**รูปที่ 4.8** จำนวนครั้งของการใช้ไลเปสตรังรูปเปรียบเทียบกับปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง  
 (—●—) ไลเปส/กก/ADHEP (.....○.....) ไลเปส/กก(บด)/ADHEP  
 (—■—) ไลเปส/กก/ADPB (—□—) ไลเปส/กก(บด)/ADPB  
 (---▼---) ไลเปส/กก/COEDC (. —▽. —) ไลเปส/กก(บด)/COEDC



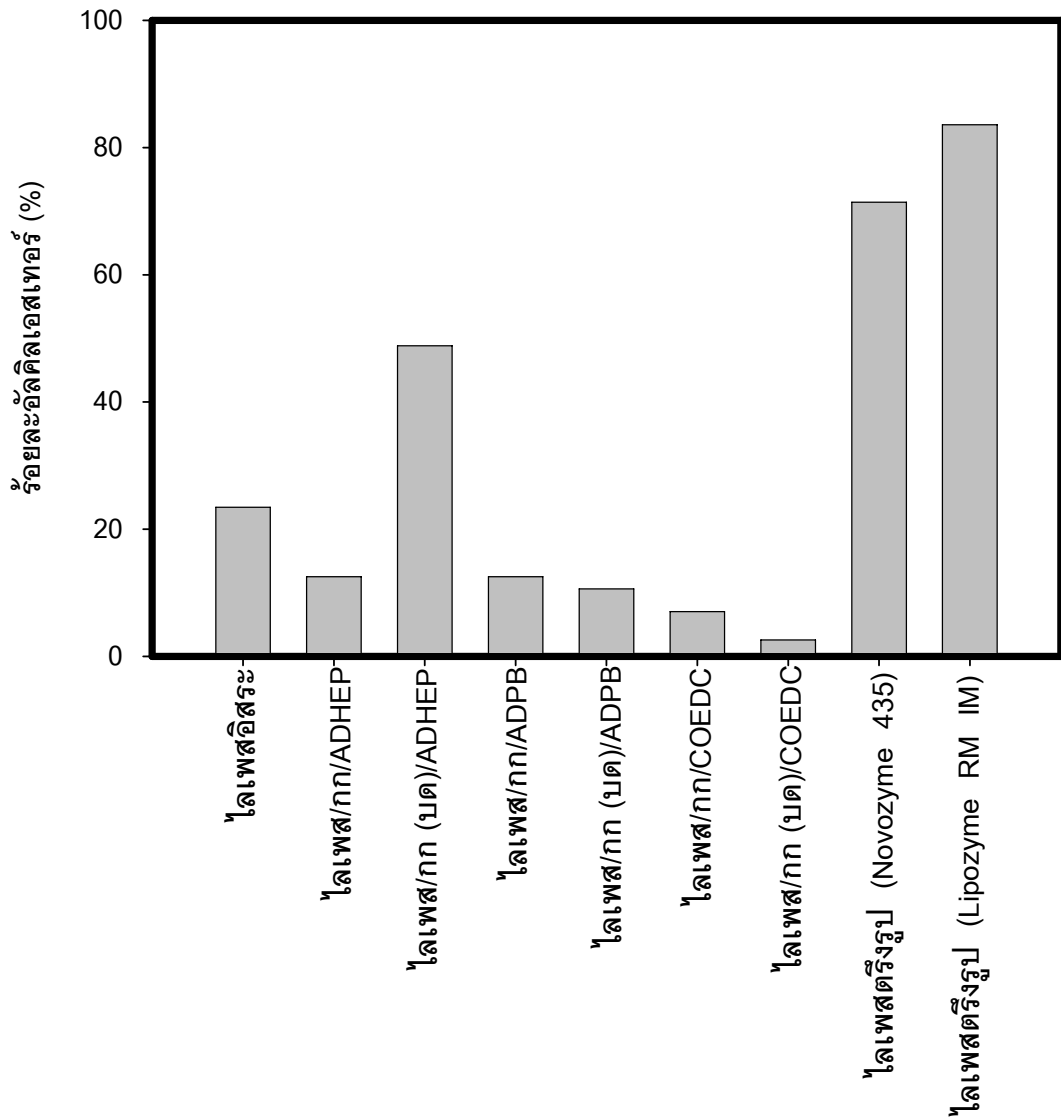
จากรูปที่ 4.8 พบว่าสามารถนำไลเพส/กก(บด)/ADHEP กลับมาใช้ซ้ำได้จำนวนครั้งสูงสุดถึง 5 ครั้ง โดยมีปริมาณกรดไขมันอิสระคือร้อยละ 28.3 เมื่อเปรียบเทียบกับไลเพส/กก/ADHEP ไลเพส/กก/ADPB ไลเพส/กก(บด)/ADPB ไลเพส/กก/COEDC และไลเพส/กก(บด)/COEDC ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้เพียง 2 ครั้ง โดยมีปริมาณกรดไขมันอิสระคือร้อยละ 38.9 5.1 14.6 11.1 และ 6.6 ตามลำดับ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสนั้นใช้เพียงน้ำในการเกิดปฏิกิริยาเท่านั้นจึงไม่ส่งผลต่อการเสถียรภาพของไลเพสจริงรูป

นอกจากนี้เมื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมสำหรับไลเพส/กก(บด)/ADHEP ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเพื่อเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันอิสระ พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นก็เพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นสูงสุดร้อยละ 62.6 ที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 24 ชั่วโมง ปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นน้อยมากค่อนข้างไม่เปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 4.9



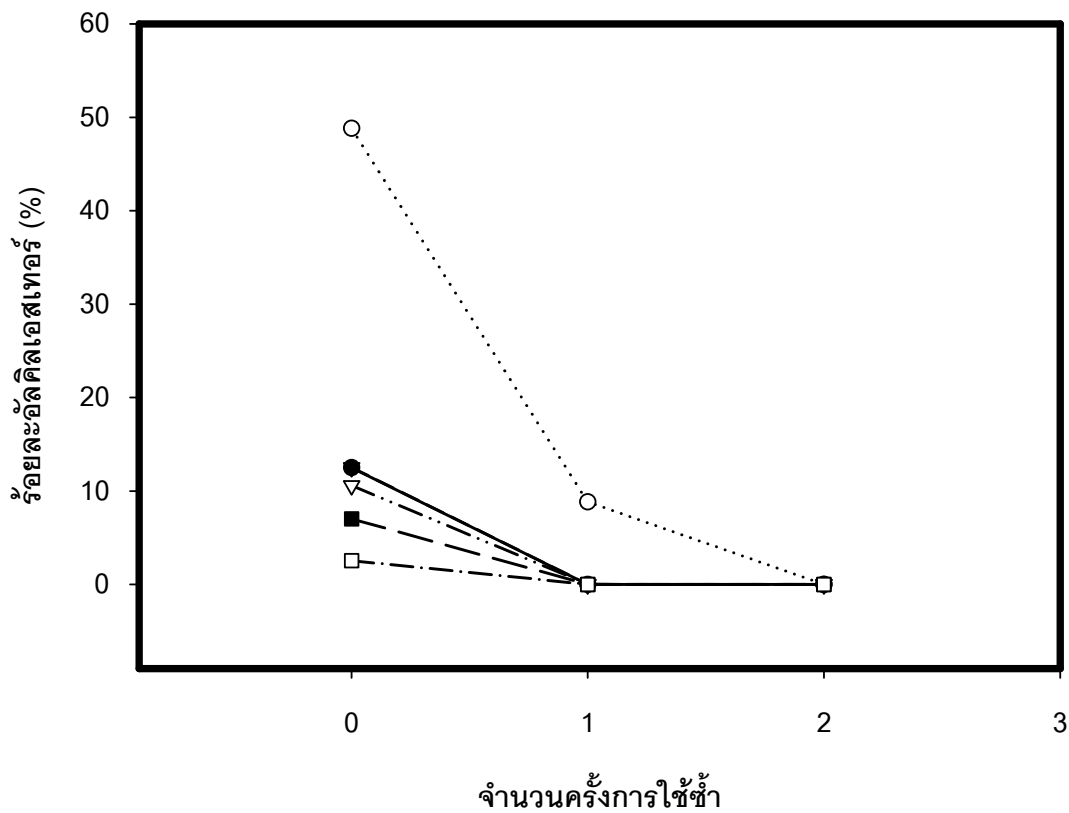
**รูปที่ 4.9** ปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ ทุกๆ 2 ชั่วโมง จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสไลเพส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

4.3.2 การเกิดปริมาณอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเตอร์ฟิเคชันโดยมีเมทานอลเป็นสับสเตรต



รูปที่ 4.10 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเตอร์ฟิเคชันด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.10 แสดงการใช้ไลเปสตรังรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนประกอบของเมทานอลต่อน้ำมัน ในอัตราส่วนโดยโมล 3:1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการใช้ไลเปส/กก(บด)/ADHEP ในการเร่งปฏิกิริยาได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 48.8 ซึ่งสูงกว่าไลเปสอิสระเกือบ 2 เท่า กล่าวคือเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 24.4 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ตรังรูปทางการค้า Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM พบว่า ได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ต่ำกว่าเกือบ 2 เท่า กล่าวคือเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูป Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับ ร้อยละ 71.4 และ 83.6 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นนั้นไม่สัมพันธ์กับการเกิดปริมาณกรดไขมันอิสระ เนื่องจากไลเปสแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันแตกต่างกัน กล่าวคือไลเปสตรังรูปทางการค้า Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM เป็นไลเปสสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่าจึงมีปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ที่สูงกว่าการใช้ไลเปสอิสระ และไลเปสตรังรูปบนกกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Macrse ,1983)

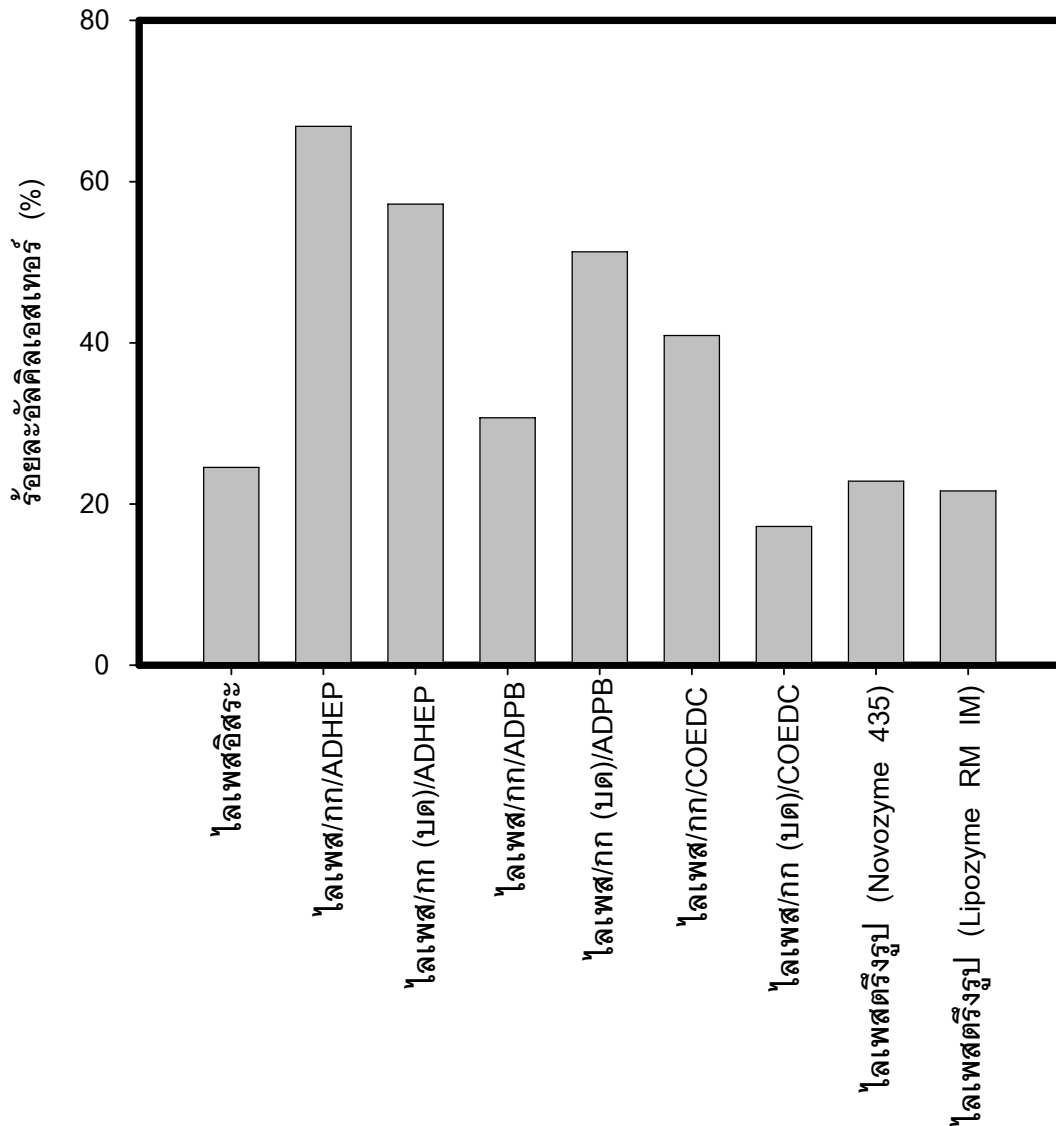


**รูปที่ 4.11** จำนวนครั้งการใช้ซ้ำของไลเพสตรังรูปเปรียบเทียบกับปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์ จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอล ต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

(—●—) ไลเพส/กก/ADHEP (.....○.....) ไลเพส/กก(บด)/ADHEP  
 (—■—) ไลเพส/กก/ADPB (—□—··) ไลเพส/กก(บด)/ADPB  
 (---▼---) ไลเพส/กก/COEDC (—▽·—) ไลเพส/กก(บด)/COEDC

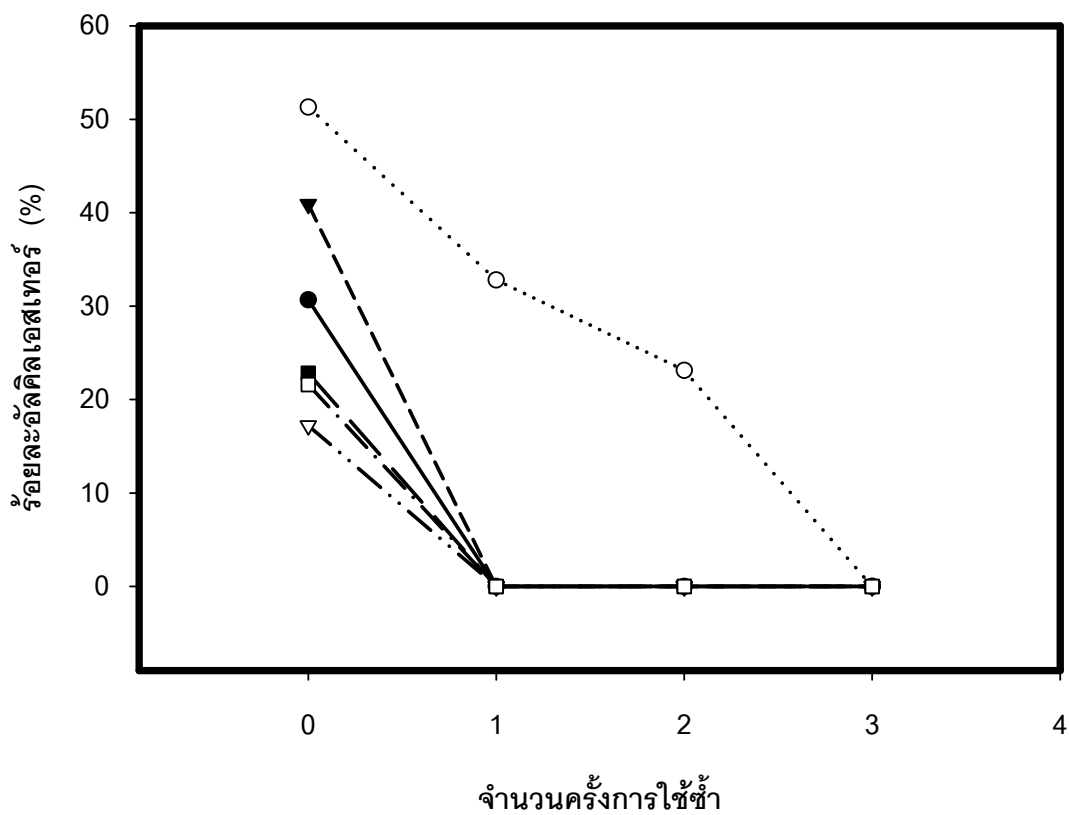
อย่างไรก็ตามเมื่อนำไลเพสตรังรูปกลับมาใช้ซ้ำได้อีกครั้ง พบว่ามีเพียงไลเพส/กก(บด)/ADHEP เท่านั้นที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกครั้ง โดยยังคงเร่งปฏิกิริยาให้เกิดอัลคิลเอสเทอร์ร้อยละ 8.83 ในขณะที่ไลเพส/กก/ADHEP ไลเพส/กก/ADPB ไลเพส/กก(บด)/ADPB ไลเพส/กก/COEDC และไลเพส/กก(บด)/COEDC ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก ยิ่งกว่านั้นการใช้ครั้งแรกยังได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์น้อยมากเท่ากับร้อยละ 12.5 12.5 10.6 7.2 2.5 ตามลำดับ ดังแสดงรูปที่ 4.11

4.3.3 การศึกษาผลของปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ที่ใช้ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีไบโอเอทานอลเป็นสับสเตรต



รูปที่ 4.12 ปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.12 เมื่อเปลี่ยนสับสเตรตเป็นไบโอเอทานอล พบว่าไลเพส/กก(บด)/ADHEP ได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 51.3 ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ไลเพสเกือบ 2 เท่า กล่าวคือเมื่อใช้เอนไซม์ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 24.5 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ตรึงรูปทางการค้า Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM ได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน กล่าวคือเมื่อใช้เอนไซม์ไลเพสตรึงรูป Novozyme 435 และ Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 66.8 และ 57.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 จำนวนครั้งของการใช้เอนไซม์ไลเพสตรึงรูปเปรียบเทียบกับปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

- (—●—) ไลเพส/กก/ADHEP (.....○.....) ไลเพส/กก(บด)/ADHEP  
 (—■—) ไลเพส/กก/ADPB (—□—·) ไลเพส/กก(บด)/ADPB  
 (---▼---) ไลเพส/กก/COEDC (—▽·—) ไลเพส/กก(บด)/COEDC

อย่างไรก็ตามเมื่อนำไลเพสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำได้อีกครั้ง พบว่ามีเพียงไลเพส/กก(บด)/ADHEP เท่านั้นที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกถึง 2 ครั้ง โดยยังคงสามารถเร่งปฏิกิริยาให้เกิดอัลคิลเอสเทอร์ได้ร้อยละ 23.1 ในขณะที่ไลเพส/กก/ADHEP ไลเพส/กก/ADPB ไลเพส/กก(บด)/ADPB ไลเพส/กก/COEDC และไลเพส/กก(บด)/COEDC ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกซึ่งได้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์เท่ากับร้อยละ 30.7 40.9 17.2 22.8 21.6 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้มากกว่าการใช้เมทานอลเป็นสับสเตรต ดังรูปที่ 4.13 เนื่องจากไบโอเอทานอลมีองค์ประกอบของน้ำมากกว่าเมทานอลจึงทำให้การยับยั้งประสิทธิภาพของเอนไซม์จากไบโอเอทานอลเกิดขึ้นน้อยกว่า (Kaieda และคณะ, 1999)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

##### 5.1.1 การคัดเลือกเส้นใยพืชที่เหมาะสมในการเป็นตัวค้ำจุนไลเปส

เส้นใยกบดเป็นเส้นใยที่เหมาะสมในการเป็นตัวค้ำจุนไลเปส เนื่องจากภาคตัดขวางของเส้นใยกบดพบว่าเส้นใยกบดมีความเป็นรูพรุนจำนวนมาก นอกจากนี้แล้วเส้นใยกบดละเอียดยังมีสมบัติการดูดซึ่มความชื้นที่ต่ำที่สุดคือมี % Moisture regain เท่ากับ 10.2% และมี % Moisture content 9.1%

##### 5.1.2 รูปแบบของเส้นใยกบดที่มีผลต่อการตรึงรูปไลเปส

เมื่อทำการตรึงไลเปสโดยวิธีการยัดติดด้วยการดูดซับทางกายภาพโดยใช้เฮปแทนเป็นสารตัวกลางบนเส้นใยกบดแบบบดละเอียดมีค่าแอดฮีซีฟิตี 10.12 หน่วยต่อกรัมตัวค้ำจุน ร้อยละของประสิทธิภาพการตรึงคือ 93.4

##### 5.1.3 การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

เมื่อใช้ไลเปสตรึงรูปทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้สารตั้งต้นที่มีส่วนประกอบของไบโเอทานอลต่อน้ำมัน ในอัตราส่วนโดยโมล 3:1 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไลเปส/กก(บด)/ADHEP มีปริมาณอัลคิลเอสเทอร์สูงที่สุดคือ ร้อยละ 51.3 และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก 2 ครั้ง โดยมีปริมาณอัลคิลเอสเทอร์สูงที่สุดคือ ร้อยละ 23.1



## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรปรับปรุงสมบัติของเส้นใยพีซีที่ได้จากต้นกกแบบบดละเอียด เพื่อให้มีประสิทธิภาพและความคงรูปสามารถใช้งานง่ายและสะดวกมากขึ้น

5.2.2 ควรศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุที่ไม่ชอบน้ำและวัสดุที่ชอบน้ำสำหรับตริงรูปเอนไซม์ไลเปส

5.2.3 ควรศึกษาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลโดยใช้สับสเตรตชนิดอื่น ๆ ที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเส้นใยพีซีให้น้อยที่สุด

## รายการอ้างอิง

- ปราณี อ่านเปรื่อง. **เอนไซม์ทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.
- ภาวิณี คณาสวัสดิ์. **การตรึงเอนไซม์และเซลล์**. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2531.
- วีระศักดิ์ อุดมกิจเดชา. **วิทยาศาสตร์เส้นใย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.
- Bosley, A., and Pielow, A. 1997. Immobilization of lipases on porous polypropylene: reduction in esterification efficiency at low loading. Journal of American Oil Chemists Society. 74: 107–111.
- 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.
- Chen, L. F., and Tsao, G. T. 1976. Biotechnology and Bioengineering. 18: 1507.
- Chibata I., editor. Immobilized enzymes. Research and Development. Tokyo: Kodansha, 1978.
- Debeche, T., Marmet, C., Kiwi-Minsher, L., Renken, A., and Kuillerat, M.A. 2005. Structured fiber supports for gas phase biocatalysis. Enzyme and Microbial Technology. 36: 911-916.
- Dassat, V., Combes, D. and Marty, A. 2002. Lipase-catalysed tranesterification of high oleic sunflower oil. Journal Enzyme Microbial Technology. 61: 1638-1643.
- Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by tranesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92: 405-416.
- Gao, X.G., Cao, S.G., and Zhang, K.C. 2000. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. Enzyme and Microbial Technology. 27: 74-82.

- 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.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., and Fukuda, H. 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. Journal of Bioscience and Bioengineering. 91: 12-15.
- Kennedy, J. F., and Melo, E. H. M. 1990. Immobilized enzymes and cells. Chemical Engineering Process. 86: 81–89.
- Kose, O., Tuter, M., and Aksoy, H.A. 2002. Immobilized *Candida Antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-medium. Bioresource Technol. 83: 125-129.
- Krawczyk, T. 1996. Biodiesel alternative fuel makes inroads but hurdles remain. Inform. 7: 801-829.
- Laskin, I., Allen, I. Immobilization of enzymes and some applications in the food industry. Enzymes and immobilized cells in biotechnology. Canada: The Benjamin/Cummings Publish Company, Inc.; 1985. 1-7.
- Ma, F. R., and Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology. 70: 1–15.
- Macrae, A. R. William, M. F. 1983. Extracellular Microbial Lipase. In Fogarty WM (ed) Microbial Enzyme and Biotechnology. New York: Applied Science Publishers, 225–250
- Minovska, V., Winkelhausen, E., and Kuzmanova, S. 2004. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. Journal of the Serbian Chemical Society. 70: 609-624.

- Nelson, J. M., and Griffin, E. G. 1916 . Journal of American Oil Chemists Society. 38: 1109.
- Nelson, Y. A., Foglia T.A., and W.N. Matmer. 1996. Lipase-Catalzed production of biodiesel. Enzyme and Microbial Technology. 73: 1191-1195.
- 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.
- Pott, G. T., Hueting, D., and Van Deursen, J. 2000. A commercially attractive method to reduce moisture sensitivity of lignocellulose fibrs, without the use of chemicals. Bioresource Hemp,Wolfsburg . 13.-16.
- Schwab, A.W., Bagby M.O., and Freedman. J. 1987. Preparation and properties of diesel fules from vegetable oils. Journal of Fule. 66: 1372-1378.
- Shap, A.K., Key, G., and Lilly, M. D. 1969. Biotechnology and Bioengineering. 11: 363.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17: 133-142.
- Soumanou, M. M. and U.T, Bornscheuer. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sulflower oil. Enzyme and Microbial Technology. 33: 97-103.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., and Wieczorek, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme Microbial Technology. 10: 492-497.
- Taninoka, A., Yokoyama, Y., Miyasaka, K. 1998. Preparation and properties of enzyme-immobilized porous polypropylene films. Journal of Colloid and Interface science. 200: 185-187.
- 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.

- Walt, D.R., and Agayn, V. 1994. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, Trends in Analytical Chemistry 13: 425–430.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17: 151-155.
- Winkler, K. U., and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology. 138: 663-670.
- Yang, G., Tian-Wei,T., Kai-Li, N. and Fang, W. 2006. Immobilization of lipase on macroporous resin and Its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. Chinese J. Biotechnology. 22: 114-118.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### วิธีการเตรียมสารเคมี

#### ก-1 สารละลายตรวจวัดค่าแอกติวิตี

##### ก.1.1 การเตรียมทริสบัฟเฟอร์ (Tris-HCl)

1) ละลาย ทริส เบส 121 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนขึ้น ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

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

##### ก.1.2 การเตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate)

ละลายพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท 0.5 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร ปั่นกวนให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

##### ก.1.3 การเตรียมสารละลายไซเดียมคาร์บอเนต 0.25 โมลาร์

ละลายไซเดียมคาร์บอเนต 2.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### ก-2 สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

สารที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน ได้แก่ สารละลายแบรดฟอร์ด (bradford reagent) ของ bio-rad เตรียมได้โดยนำสารละลายแบรดฟอร์ด 4 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 1 ส่วน แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## ภาคผนวก ข

### ข-1 การทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพาราไนโตรฟินอล

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน สารละลายพาราไนโตรฟินอลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เพื่อใช้ในการหาค่า แอภทวิตีทั้งหมด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Winkler และ Stuckmann (1979) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟินอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายพาราไนโตรฟินอล 5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

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

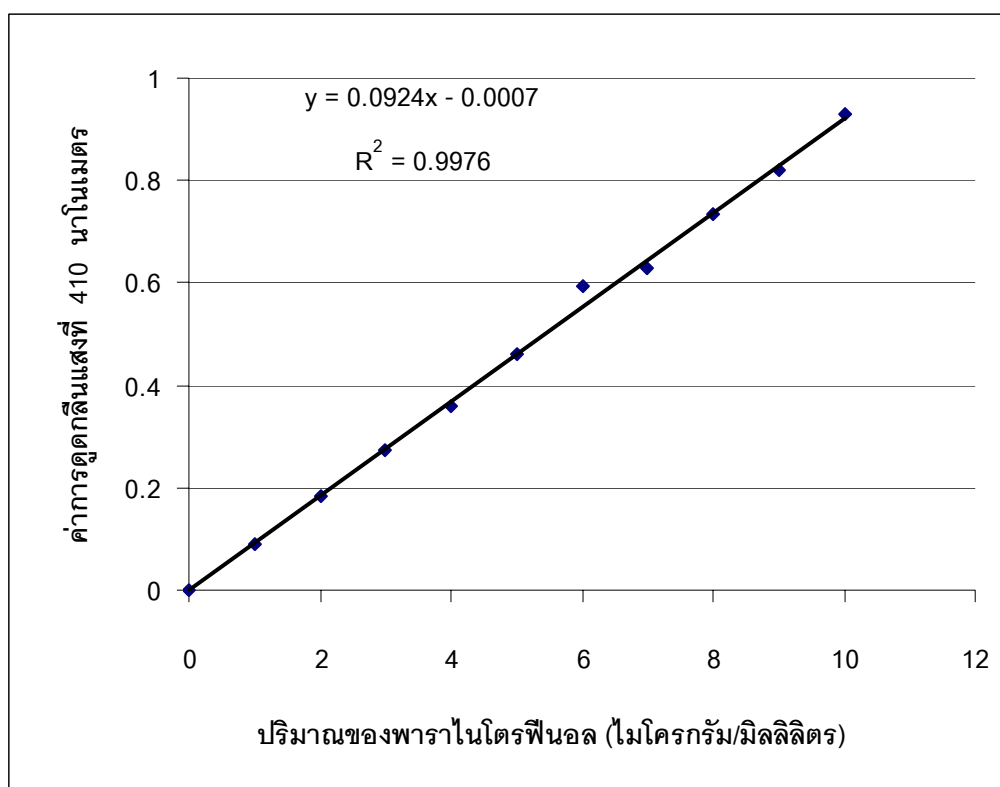
3) เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ ข-1

**ตารางที่ ข-1** ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของพาราไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	พาราไนโตรฟินอล 10 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร	ทริสบัฟเฟอร์ความ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0
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	1000	0



- 4) ดูดสารละลายที่มีความเข้มข้น 0 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายพาราไนโตรฟินอล
- 5) ตรวจสอบวัดการดูดกลืนแสงของพาราไนโตรฟินอลที่ 410 นาโนเมตร
- 6) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของพาราไนโตรฟินอลที่แต่ละความเข้มข้น มาพลอตเป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ ข-1



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

**หมายเหตุ** กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย พาราไนโตรฟินิลปาล์มมิเตท แล้วให้พาราไนโตรฟินอล ปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะข้างต้น

## ข-2 วิธีทำกราฟมาตรฐาน BSA

- 1) เตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent)
- 2) เตรียม BSA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางความเข้มข้นโปรตีนระหว่าง 0 ถึง 10 ไมโครกรัม โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นดังตารางที่ ข.2

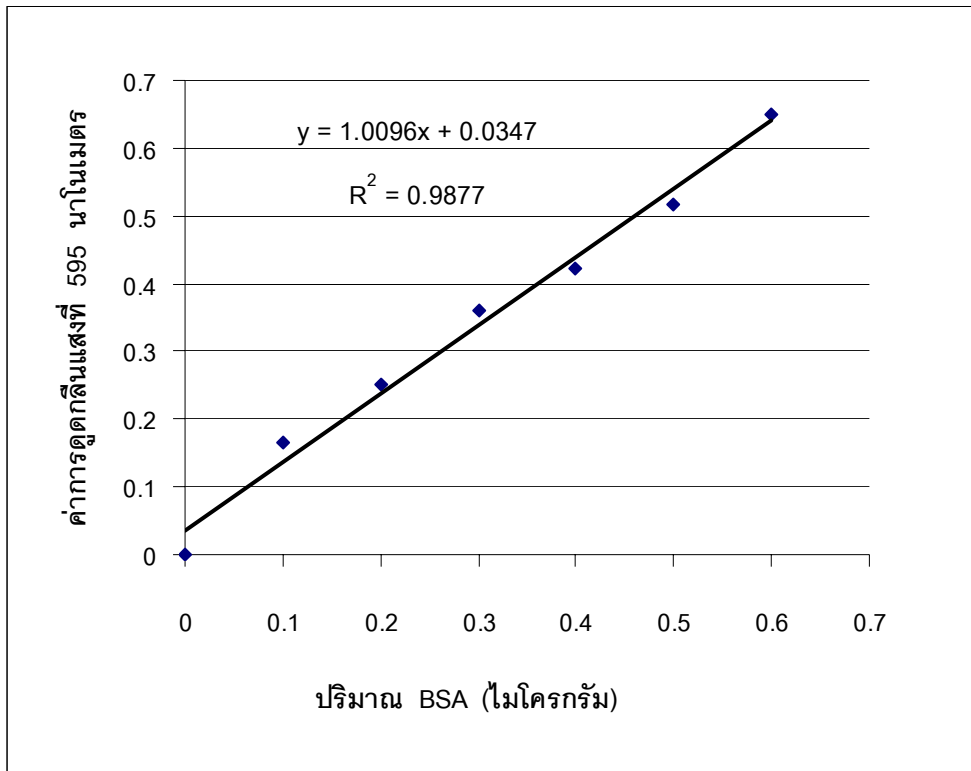
ตารางที่ ข-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

ปริมาณBSA (ไมโครกรัม)	ปริมาตรของสารที่ใช้ (ไมโครลิตร)	
	BSAที่ความเข้มข้น 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	62
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 และ ตัวควบคุม (blank) คือ น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร แทนปริมาณ BSA

5) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ BSA ที่แต่ละความเข้มข้น มาพลอตเป็นกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ ข-2



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานปริมาณ BSA ที่ 0-10 ไมโครกรัม

## ภาคผนวก ค

## วิธีการคำนวณ

## ค-1 ค่าแอกติวิตีทั้งหมด (Total activity: units)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล ได้สมการที่ ค-1

$$Y = 0.0924X - 0.0007 \quad \dots\dots\dots(ค-1)$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

$$\text{ค่าแอกติวิตีทั้งหมด (Total activity: units)} = \frac{(X*200*1000)}{(1000*25*139.11*30)} \quad \dots\dots\dots (ค-2)$$

## ค-2 ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (Total protein: mg)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการทดลองของแต่ละเชื้อมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่หาได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (BSA = Bovine serum albumin) ได้สมการที่ ค-3

$$Y = 1.0096X + 0.0347 \quad \dots\dots\dots(ค-3)$$

โดยที่ค่าของแกน X คือความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม)

ค่าของแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

## ค-4 การหาปริมาตรน้ำมัน 3 กรัม

$$D = \frac{M}{V} \quad \dots\dots\dots(ค-4)$$

D = ความหนาแน่นของน้ำมันปาล์ม (0.89)

M = มวลน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม (3 กรัม)

V = ปริมาตรของน้ำมันปาล์ม (X มิลลิลิตร)

คำนวณ

$$V = \frac{M}{D}$$

$$V = 0.89 \times 3 = 2.67 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นน้ำมันปาล์ม 3 กรัม มีปริมาตร 2.67 มิลลิลิตร

ที่เอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม

น้ำมัน 100 ส่วนใช้ปริมาตรเอนไซม์ 50 ส่วน

น้ำมัน 2.67 มิลลิลิตรใช้ปริมาตรเอนไซม์ 1.34 มิลลิลิตร

ที่เอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเอนไซม์โดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม

น้ำมัน 100 ส่วนใช้ปริมาตรเอนไซม์ 100 ส่วน

น้ำมัน 2.67 มิลลิลิตรใช้ปริมาตรเอนไซม์ 2.67 มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ง

### การสังเคราะห์ไบโอดีเซล

#### ง-1 การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายเอโนไซม์และไลเพสตรังรูป (ที่ 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอโนไซม์และไลเพสตรังรูปโดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม) โดยใช้สารละลายเอโนไซม์ และไลเพสตรังรูปที่ได้จากข้อ 3.1-3.3 แล้วนำมาบ่มโดยปั่นให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะมีการใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น (Three step feeding of methanol)

ทำการใส่เมทานอล ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยแบ่งใส่เมทานอลครั้งละ 1 โมลาร์ ครั้งแรกจะใส่เมทานอลเข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา ส่วนอีกสองครั้งใส่ที่ชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Shimada และคณะ, 2002) ซึ่งในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 100 ไมโครลิตร ที่ 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์

#### ง-2 การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เมทานอลเป็นสับสเตรต

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายเอโนไซม์และไลเพสตรังรูป (ที่ 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายเอโนไซม์และไลเพสตรังรูปโดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม) โดยใช้สารละลายเอโนไซม์ และไลเพสตรังรูปที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 เติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร เฉพาะที่เป็นไลเพสตรังรูป หลังจากนั้นนำมาปั่นเพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตร ที่ 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากนั้นทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใส่เมทานอลแบบเติมในสามขั้น (Three step feeding of methanol) ทำการใส่เมทานอล ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เข้าไปทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยแบ่งใส่เมทานอลครั้งละ 1 โมลาร์ ครั้งแรกจะใส่เมทานอลเข้าไปทำปฏิกิริยา

เอสเทอร์ฟิเคชันในตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา ส่วนอีกสองครั้งใส่ที่ชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก) ซึ่งในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 100 ไมโครลิตร ที่ 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์

### ง-3 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส-เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไบโอเอทานอลเป็นสับสเตรต

นำน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายเอนไซม์และไลเพสตรังรูป (ที่ 10 เปอร์เซนต์สารละลายเอนไซม์และไลเพสตรังรูปโดยน้ำหนักน้ำมัน 3 กรัม) โดยใช้สารละลายเอนไซม์ และไลเพสตรังรูปที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 เติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร เฉพาะที่เป็นไลเพสตรังรูป หลังจากนั้นนำมาปั่นเพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาทีเก็บตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตร ที่ 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากนั้นทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไบโอเอทานอลแบบเติมในสามขั้น (Three step feeding of methanol) ทำการใส่ไบโอเอทานอล ที่ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ เข้าไปทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยแบ่งใส่เมทานอลครั้งละ 1 โมลาร์ ครั้งแรกจะใส่ไบโอเอทานอลเข้าไปทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา ส่วนอีกสองครั้งใส่ที่ชั่วโมงที่ 8 และ 16 ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก) ซึ่งในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วในการหมุน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 100 ไมโครลิตร ที่ 8 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บตัวอย่างในส่วนของชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์

#### ง-4 การตรวจสอบปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์

การตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography:HPLC)

##### ง.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บจากการทำปฏิกิริยาไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลให้ตกออกมา แล้วเตรียมตัวอย่างโดยละลายใน เฮกเซน เพื่อให้เจือจาง และใส่ eicosane เป็น internal standard จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPLC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร



รูปที่ ง.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

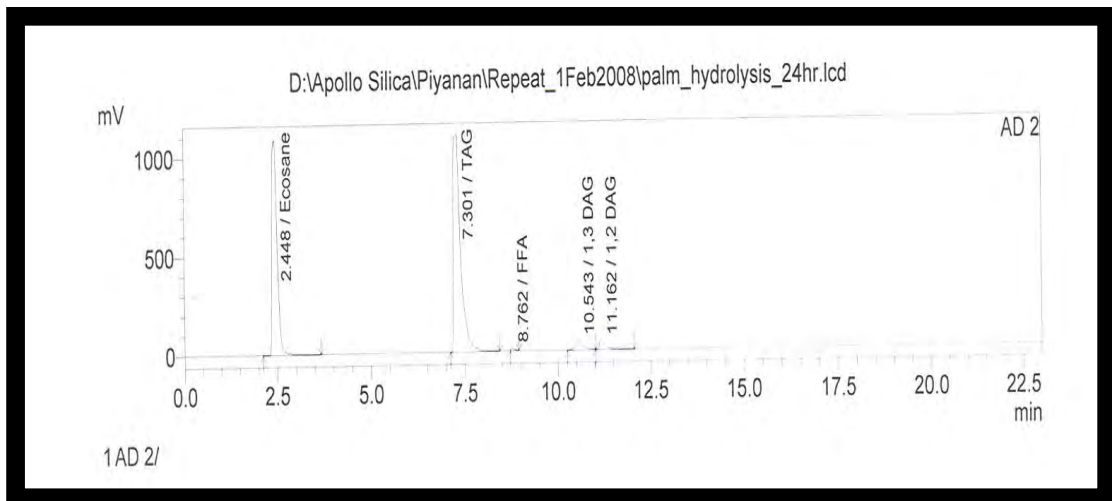
##### ง.4.2 การเตรียมเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-20A series, Japan)

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

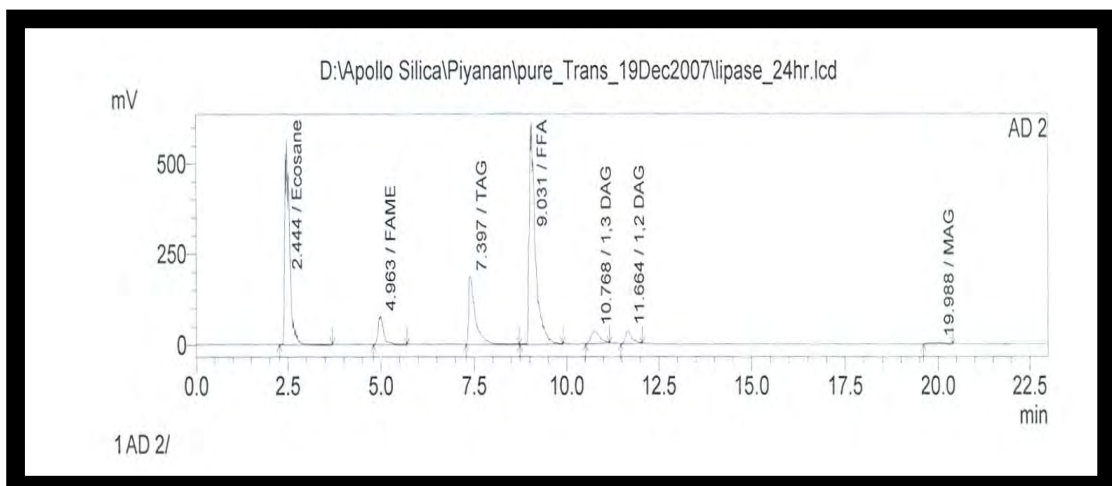


## ภาคผนวก จ

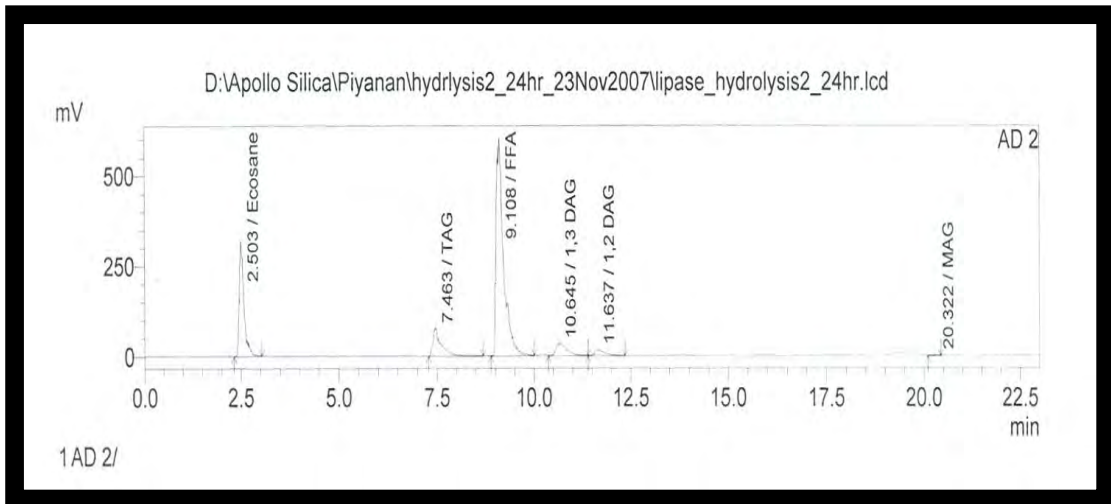
ลักษณะกราฟของอัลคิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)



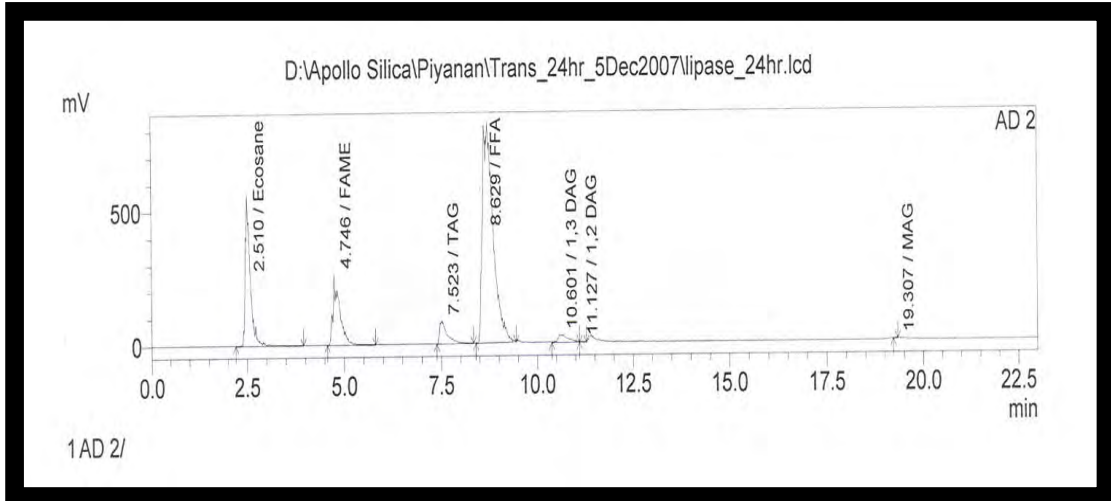
รูปที่ จ-1 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์ของน้ำมันปาล์ม



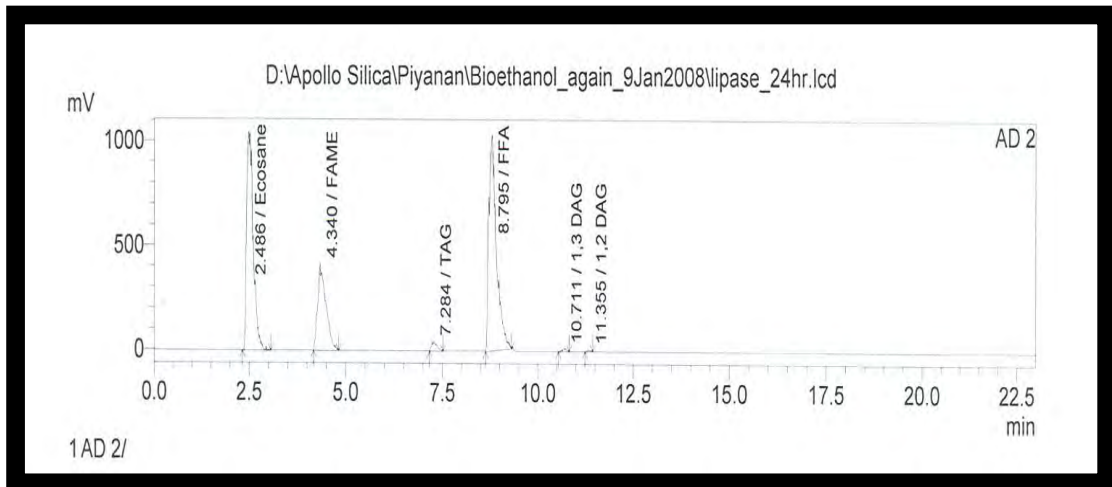
รูปที่ จ-2 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



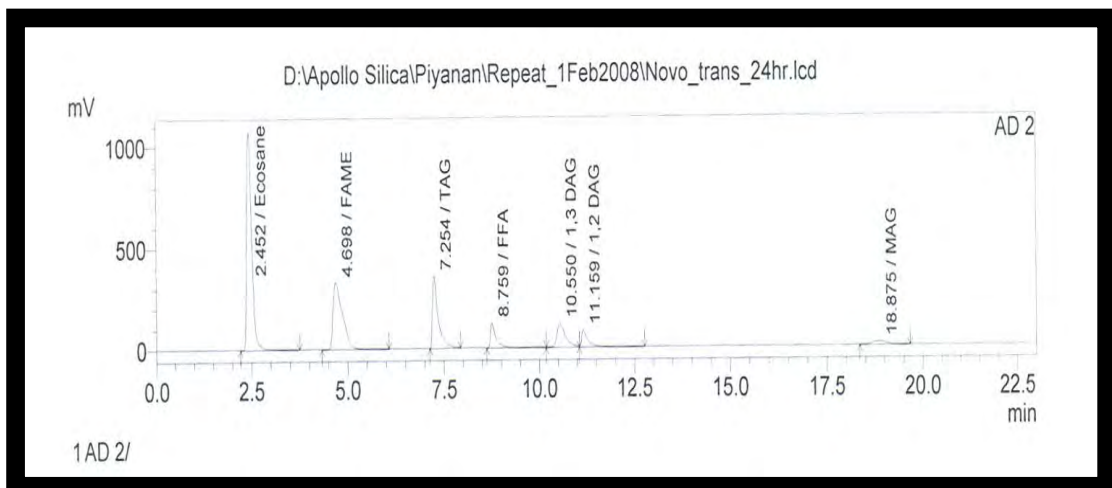
รูปที่ ๑-3 โคโรมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



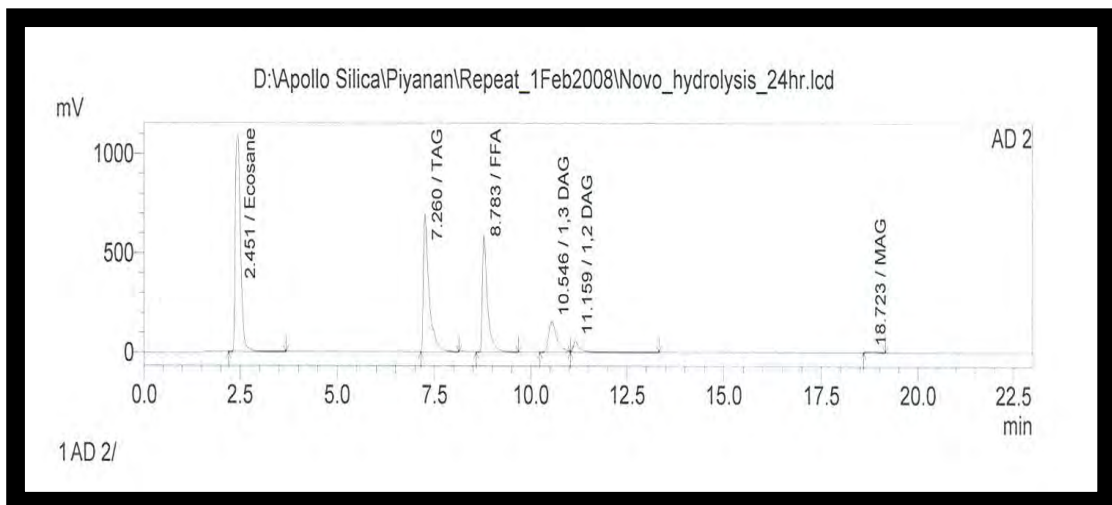
รูปที่ ๑-4 โคโรมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



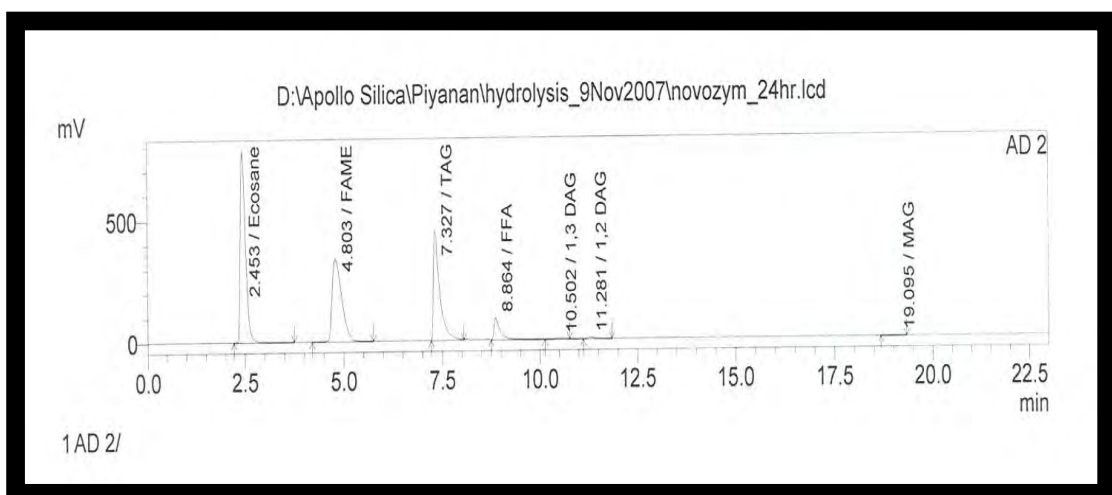
**รูปที่ ๑-5** โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเปสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



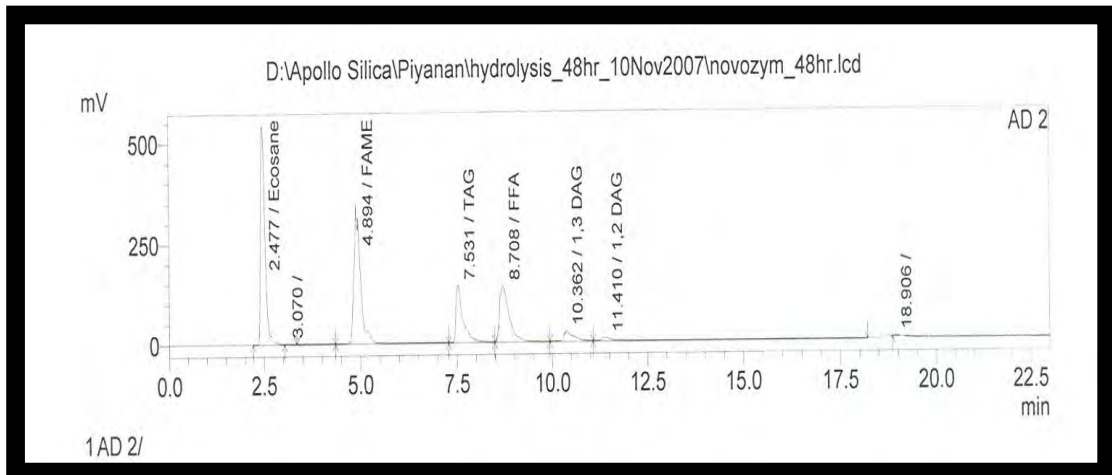
**รูปที่ ๑-6** โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



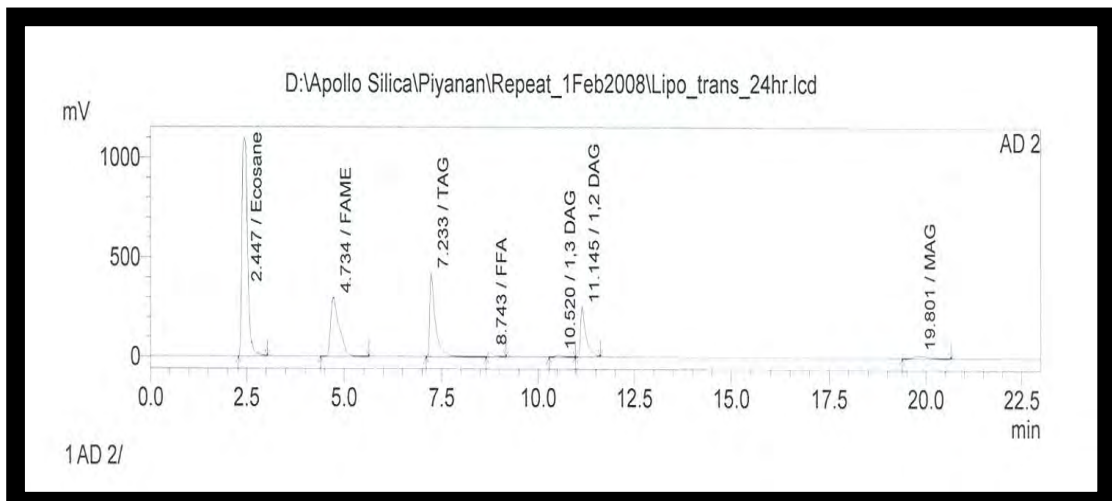
รูปที่ จ-7 โคโรมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



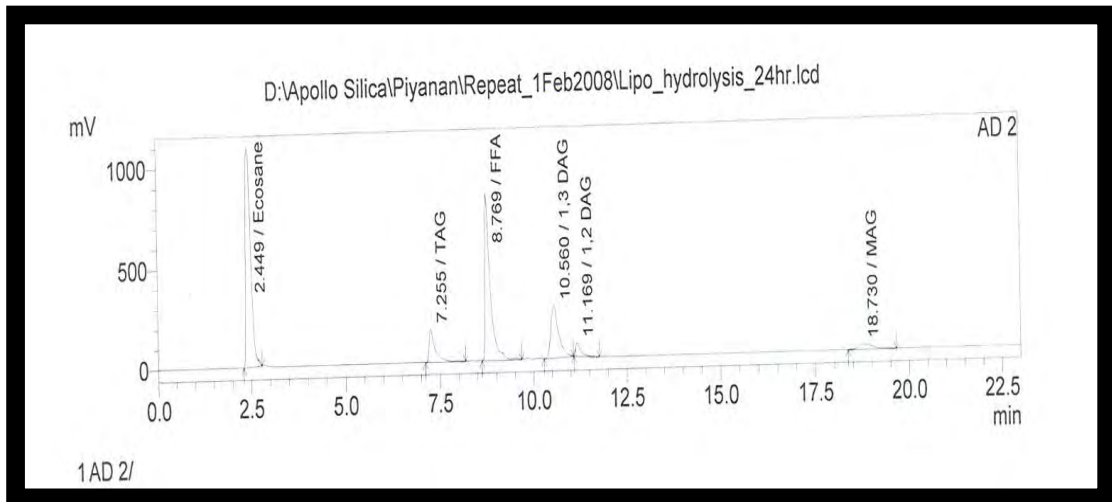
รูปที่ จ-8 โคโรมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



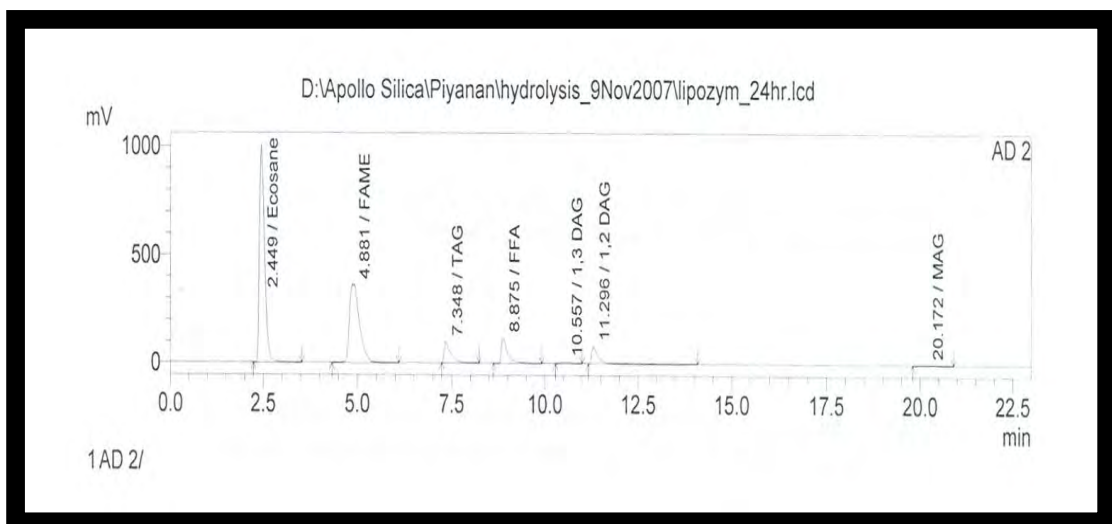
**รูปที่ ๑-9** โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรังรูป Novozyme 435 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



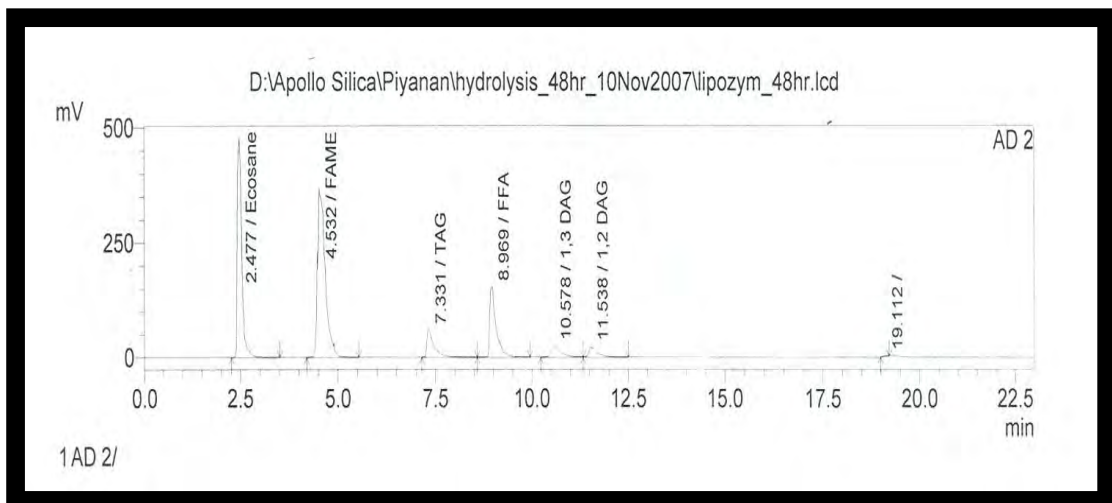
**รูปที่ ๑-10** โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรังรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



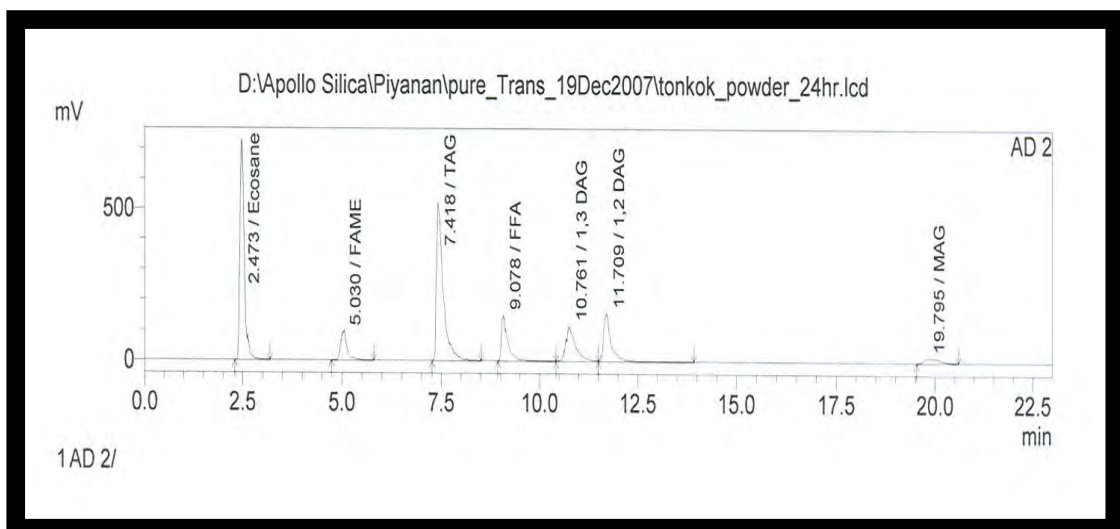
รูปที่ จ-11 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



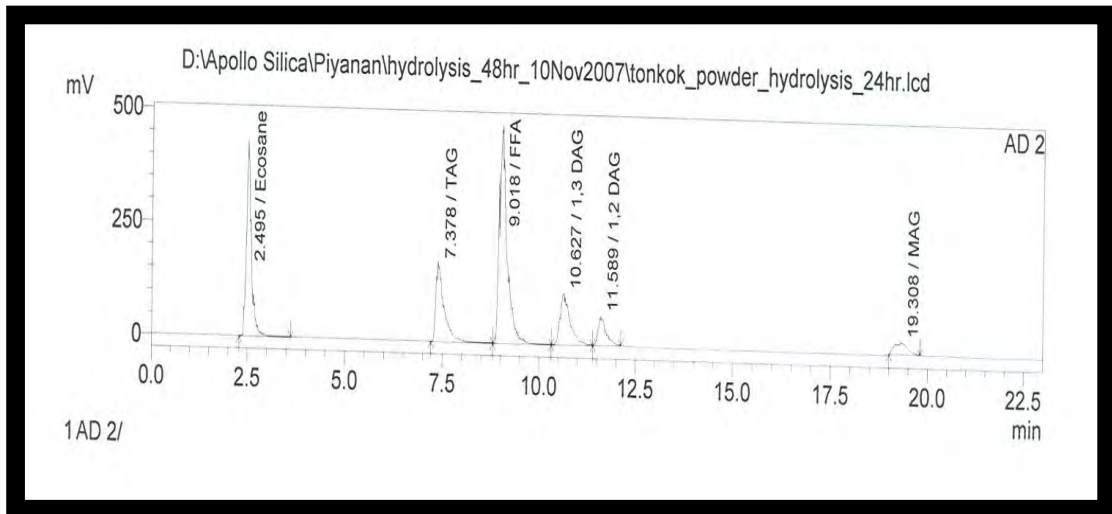
รูปที่ จ-12 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



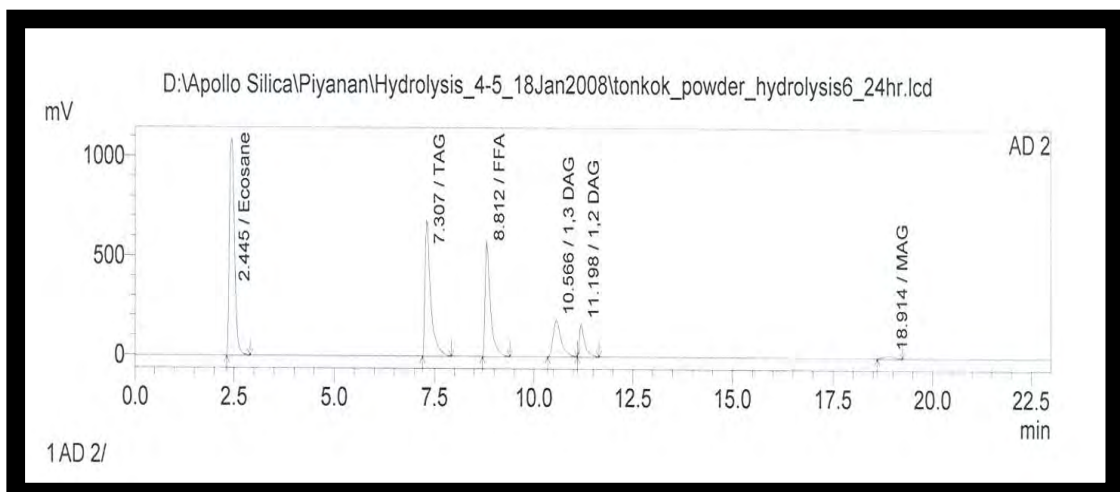
**รูปที่ ๑-13** โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Lipozyme RM IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



**รูปที่ ๑-14** โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเพส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

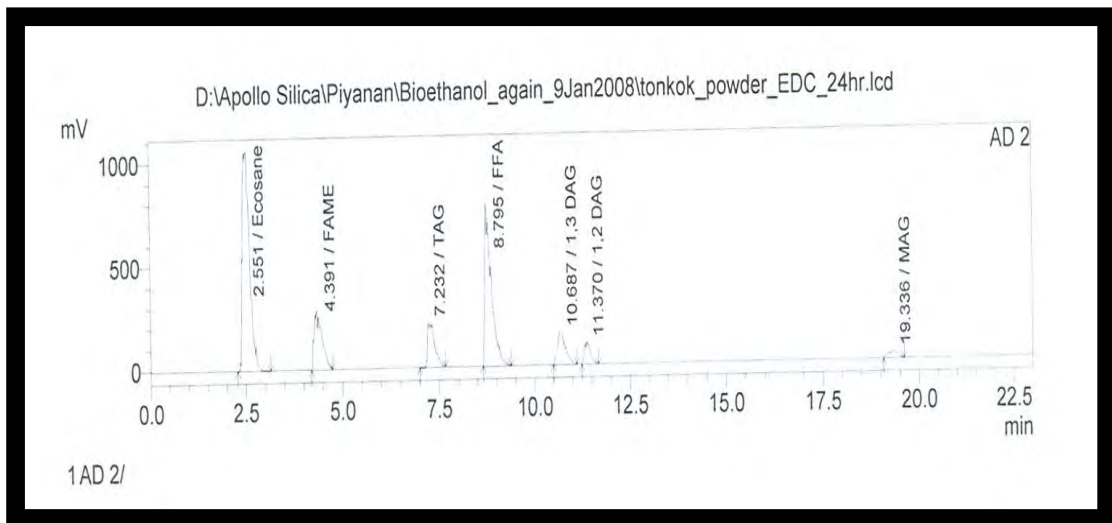


รูปที่ จ-15 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปส/กก (บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

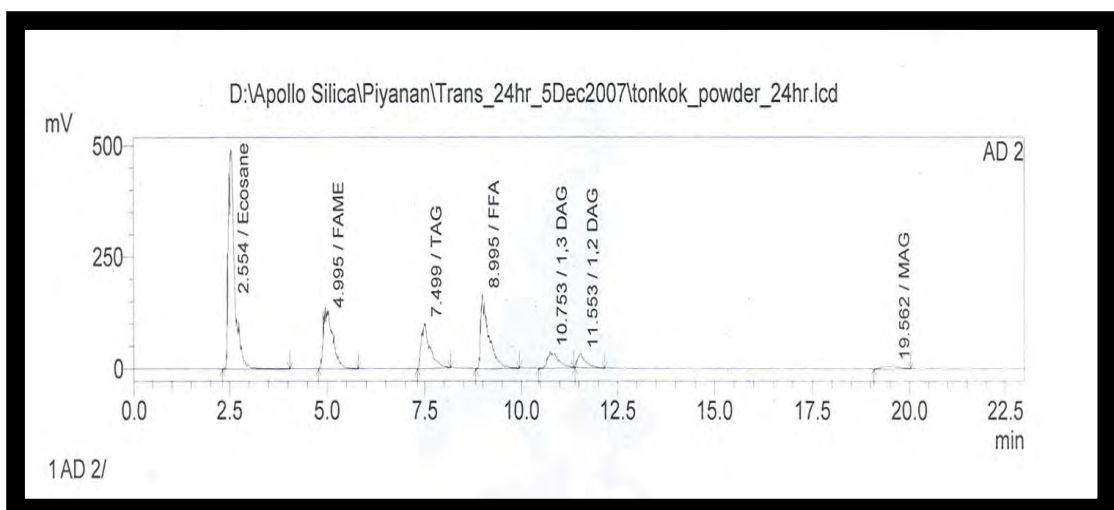


รูปที่ จ-16 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปส/กก (บด)/ADHEP ซ้ำ 5 ครั้ง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

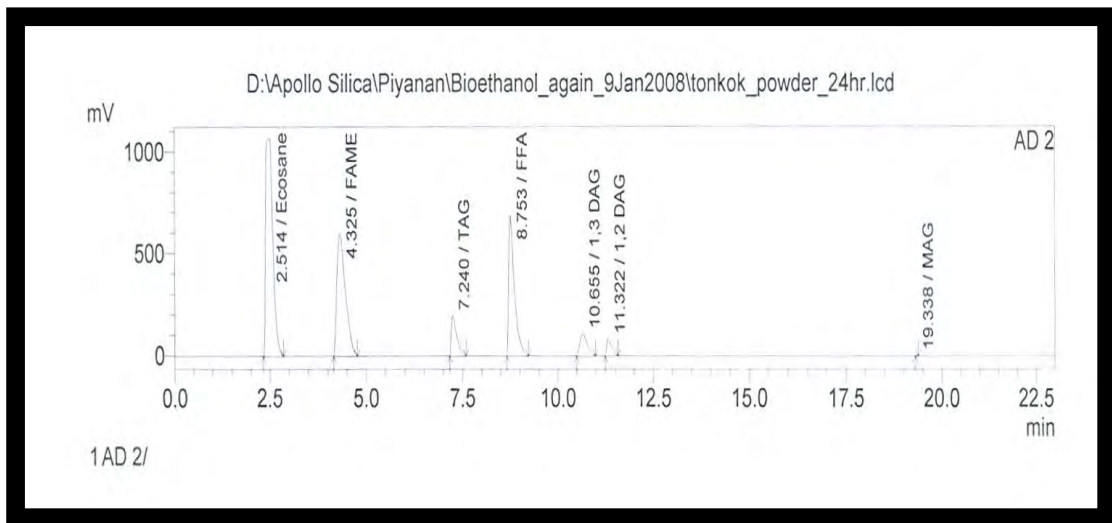




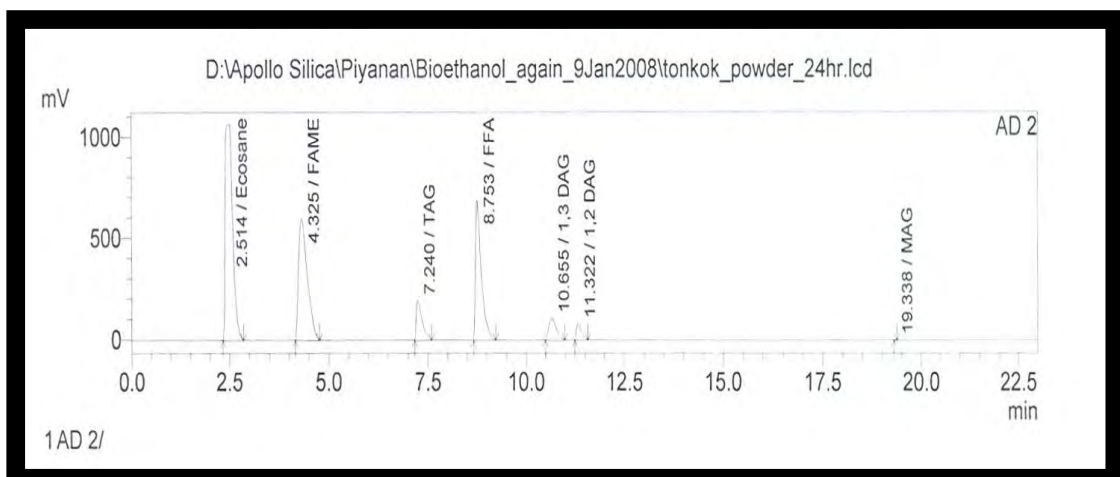
รูปที่ ๑-17 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ เอนไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดย มวลของ เมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



รูปที่ ๑-18 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ เอนไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP ซ้ำ 1 ครั้ง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดย มวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



รูปที่ จ-19 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ เอนไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของ ไบโอดีทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง



รูปที่ จ-20 โครมาโทแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ เอนไซม์ไลเปส/กก(บด)/ADHEP ซ้ำ 2 ครั้ง เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ด้วยอัตราส่วนโดย มวลของไบโอดีทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

## ภาคผนวก จ

## ข้อมูล

ตารางที่ จ-1 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก/ADHEP

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตี (ยูนิต <sup>1</sup> /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
น้ำล้าง 1	2.88	0.0818	74.73
น้ำล้าง 2	1.96	0.0561	82.78
น้ำล้าง 3	1.79	0.0347	84.30
น้ำล้าง 4	1.51	0.0186	86.73
น้ำล้าง 5	1.35	0.0147	88.17
น้ำล้าง 6	1.32	0.0135	88.40

<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟินอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ จ-2 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก(บด)/ADHEP

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตี (ยูนิต <sup>1</sup> /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
น้ำล้าง 1	0.80	0.719	92.96
น้ำล้าง 2	0.64	0.0660	94.40
น้ำล้าง 3	0.29	0.0382	97.44
น้ำล้าง 4	0.23	0.0204	97.97
น้ำล้าง 5	0.21	0.0105	98.12
น้ำล้าง 6	0.20	0.0068	98.28

<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟินอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ จ-3 ความสามารถในการทำงานของไลเฟส/กก/ADPB

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตี (ยูนิต <sup>1</sup> /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
น้ำล้าง 1	8.93	0.333	52.05
น้ำล้าง 2	3.96	0.307	78.74
น้ำล้าง 3	3.92	0.283	78.96
น้ำล้าง 4	0.95	0.0164	94.89
น้ำล้าง 5	0.49	0.0965	97.36
น้ำล้าง 6	0.22	0.0874	98.80

<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ จ-4 ความสามารถในการทำงานของไลเฟส/กก(บด)/ADPB

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตี (ยูนิต <sup>1</sup> /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
น้ำล้าง 1	8.51	0.0638	54.33
น้ำล้าง 2	2.63	0.0512	87.56
น้ำล้าง 3	1.71	0.0343	90.81
น้ำล้าง 4	0.92	0.0164	95.09
น้ำล้าง 5	0.81	0.0784	95.65
น้ำล้าง 6	0.66	0.0022	96.44

<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟีนอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ จ-5 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก/COEDC

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตี (ยูนิต <sup>1</sup> /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
น้ำล้าง 1	5.38	0.0798	71.11
น้ำล้าง 2	0.69	0.0580	96.30
น้ำล้าง 3	0.40	0.0370	97.83
น้ำล้าง 4	0.46	0.0166	97.50
น้ำล้าง 5	0.29	0.0085	98.43
น้ำล้าง 6	0.27	0.0023	98.57

<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟินอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ จ-6 ความสามารถในการทำงานของไลเพส/กก(บด)/COEDC

ตัวอย่าง	ค่าแอกติวิตี (ยูนิต <sup>1</sup> /มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการตรึง (%)
น้ำล้าง 1	3.19	0.077	82.86
น้ำล้าง 2	3.05	0.0679	83.61
น้ำล้าง 3	2.46	0.0343	86.77
น้ำล้าง 4	1.36	0.0125	92.72
น้ำล้าง 5	0.81	0.0026	95.65
น้ำล้าง 6	0.50	0.0013	97.32

<sup>1</sup>ยูนิต: นาโนโมลของพาราไนโตรฟินอลที่ปล่อยออกมาในปฏิกิริยาต่อนาที

ตารางที่ จ-7 น้ำหนักเฉลี่ยก่อนอบของเส้นใยพืชชนิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ตัวอย่าง	น้ำหนักก่อนอบ ครั้งที่ 1	น้ำหนักก่อนอบ ครั้งที่ 2	น้ำหนักก่อนอบ ครั้งที่ 3	น้ำหนักก่อนอบ เฉลี่ย
กก	1.95	2.02	2.11	2.05
กก(บด)	1.89	2.01	1.99	1.95
ฟางข้าว	2.10	2.09	2.12	2.11
ฟางข้าว(บด)	1.99	2.06	2.01	2.05
กระจูด	2.21	2.12	2.09	2.22
กระจูด(บด)	2.06	2.11	2.16	2.17
ผักตบชวา	2.45	2.35	2.25	2.56
ผักตบชวา(บด)	2.23	2.13	2.44	2.42
กาบกล้วย	2.14	2.13	2.15	2.15
กาบกล้วย(บด)	2.02	2.04	2.04	2.03
ก้านกล้วย	2.17	2.18	2.19	2.18
ก้านกล้วย(บด)	2.08	2.10	2.09	2.09

ตารางที่ จ-8 น้ำหนักเฉลี่ยหลังอบของเส้นใยพืชชนิดต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ตัวอย่าง	น้ำหนักหลังอบ ครั้งที่ 1	น้ำหนักหลังอบ ครั้งที่ 2	น้ำหนักหลังอบ ครั้งที่ 3	น้ำหนักหลังอบ เฉลี่ย
กก	1.83	1.86	1.87	1.83
กก(บด)	1.69	1.77	1.82	1.78
ฟางข้าว	1.99	2.16	1.95	2.06
ฟางข้าว(บด)	1.89	1.90	2.15	1.92
กระจูด	2.09	2.13	1.98	2.12
กระจูด(บด)	2.11	2.09	2.01	2.06
ผักตบชวา	2.22	2.43	2.15	2.31
ผักตบชวา(บด)	2.18	2.32	2.19	2.21
กาบกล้วย	2.01	1.97	2.15	2.04
กาบกล้วย(บด)	1.89	2.12	2.01	1.91
ก้านกล้วย	2.14	1.96	1.98	2.03
ก้านกล้วย(บด)	1.97	2.06	1.98	1.99

ตารางที่ จ-9 แสดงร้อยละการดูดความชื้นของเส้นใยพืชชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่าง	% Moisture regain	% Moisture content
กก	11.9	10.6
กก(บด)	10.2	9.1
ฟางข้าว	13.6	12.8
ฟางข้าว(บด)	12.7	11.6
กระจูด	15.9	14.8
กระจูด(บด)	14.2	13.1
ผักตบชวา	16.9	15.9
ผักตบชวา(บด)	15.2	14.4
กาบกล้วย	13.7	12.7
กาบกล้วย(บด)	12.3	12.0
ก้านกล้วย	14.5	13.4
ก้านกล้วย(บด)	13.2	12.9

ตารางที่ จ-10 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้  
ไลเปสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์
ไลเปสอิสระ	20.2
ไลเปส/กก/ADHEP	14.5
ไลเปส/กก(บด)/ADHEP	19.3
ไลเปส/กก/ADPB	8.8
ไลเปส/กก(บด)/ADHPB	12.9
ไลเปส/กก/COEDC	8.2
ไลเปส/กก(บด)/COEDC	7.5
ไลเปสตรึงรูป Novozyme 435	56.4
ไลเปสตรึงรูป Lipozyme RM IM	44.4



ตารางที่ จ-11 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้  
ไลเปสแบบต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง  
เมื่อใช้ซ้ำ 1 ครั้ง

ตัวอย่าง	ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์	ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 1
ไลเปสอิสระ	20.2	0
ไลเปส/กก/ADHEP	14.5	0
ไลเปส/กก(บด)/ADHEP	19.3	0
ไลเปส/กก/ADPB	8.8	0
ไลเปส/กก(บด)/ADPB	12.9	0
ไลเปส/กก/COEDC	8.2	0
ไลเปส/กก(บด)/COEDC	7.5	0
ไลเปสตรึงรูป Novozyme 435	56.4	0
ไลเปสตรึงรูป Lipozyme RM IM	44.4	0

ตารางที่ จ-12 แสดงปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสโดยใช้ไลเปส  
แบบต่างๆเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละกรดไขมันอิสระ
ไลเปสอิสระ	82.5
ไลเปส/กก/ADHEP	46.7
ไลเปส/กก(บด)/ADHEP	56.7
ไลเปส/กก/ADPB	35.1
ไลเปส/กก(บด)/ADPB	50.9
ไลเปส/กก/COEDC	31.8
ไลเปส/กก(บด)/COEDC	54.6
ไลเปสตรึงรูป Novozyme 435	37.9
ไลเปสตรึงรูป Lipozyme RM IM	56.3

ตารางที่ ฉ-13 แสดงปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 6 ครั้ง

ตัวอย่าง	ร้อยละกรดไขมันอิสระ	ร้อยละกรดไขมันอิสระ ครั้งที่ 1	ร้อยละกรดไขมันอิสระ ครั้งที่ 2	ร้อยละกรดไขมันอิสระ ครั้งที่ 3	ร้อยละกรดไขมันอิสระ ครั้งที่ 4	ร้อยละกรดไขมันอิสระ ครั้งที่ 5	ร้อยละกรดไขมันอิสระ ครั้งที่ 6
ไลเปส/กก/ADHEP	46.7	43.6	38.9	0	0	0	0
ไลเปส/กก(บด)/ADHEP	56.7	53.8	53.6	44.8	43.8	28.3	0
ไลเปส/กก/ADPB	35.1	12.1	5.1	0	0	0	0
ไลเปส/กก(บด)/ADPB	50.9	46.1	14.6	0	0	0	0
ไลเปส/กก/COEDC	31.8	11.1	5.5	0	0	0	0
ไลเปส/กก(บด)/COEDC	54.6	25.0	6.6	0	0	0	0

ตารางที่ ฉ-14 แสดงปริมาณปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ ทุกๆ 2 ชั่วโมง จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ไลเพส/กก(บด)/ADHEP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ร้อยละกรดไขมันอิสระ
2	57.2
4	57.7
6	57.9
8	58.0
10	59.5
12	62.6
24	62.7

ตารางที่ ฉ-15 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์
ไลเพสอิสระ	23.4
ไลเพส/กก/ADHEP	12.5
ไลเพส/กก(บด)/ADHEP	48.8
ไลเพส/กก/ADPB	12.5
ไลเพส/กก(บด)/ADPB	10.6
ไลเพส/กก/COEDC	7.0
ไลเพส/กก(บด)/COEDC	2.6
ไลเพสตรึงรูป Novozyme 435	71.4
ไลเพสตรึงรูป Lipozyme RM IM	83.6

ตารางที่ ฉ-16 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์-  
 ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของเมทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40  
 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 2 ครั้ง

ตัวอย่าง	ร้อยละการดัดแปลงเอสเทอร์	ร้อยละการดัดแปลงเอสเทอร์ ครั้งที่ 1	ร้อยละการดัดแปลงเอสเทอร์ ครั้งที่ 2
ไลเพส/กก/ADHEP	12.5	0	0
ไลเพส/กก(บด)/ADHEP	48.8	8.8	0
ไลเพส/กก/ADPB	12.5	0	0
ไลเพส/กก(บด)/ADPB	10.6	0	0
ไลเพส/กก/COEDC	7.0	0	0
ไลเพส/กก(บด)/COEDC	2.6	0	0

ตารางที่ ฉ-17 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์-ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ร้อยละอัลคิลเอสเทอร์
ไลเปสอิสระ	24.5
ไลเปส/กก/ADHEP	30.7
ไลเปส/กก(บด)/ADHEP	51.3
ไลเปส/กก/ADPB	41.0
ไลเปส/กก(บด)/ADPB	17.2
ไลเปส/กก/COEDC	22.8
ไลเปส/กก(บด)/COEDC	21.6
ไลเปสตรึงรูป Novozyme 435	66.8
ไลเปสตรึงรูป Lipozyme RM IM	57.2

ตารางที่ ฉ-18 แสดงปริมาณการเกิดอัลคิลเอสเทอร์จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอร์-ฟิเคชัน ด้วยอัตราส่วนโดยมวลของไบโอเอทานอลต่อน้ำมัน 3:1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ซ้ำ 3 ครั้ง

ตัวอย่าง	ร้อยละการดัลคิลเอสเทอร์	ร้อยละการดัลคิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 1	ร้อยละการดัลคิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 2	ร้อยละการดัลคิลเอสเทอร์ ครั้งที่ 3
ไลเปส/กก/ADHEP	30.7	0	0	0
ไลเปส/กก(บด)/ADHEP	51.3	32.8	23.1	0
ไลเปส/กก/ADPB	41.0	0	0	0
ไลเปส/กก(บด)/ADPB	17.2	0	0	0
ไลเปส/กก/COEDC	22.8	0	0	0
ไลเปส/กก(บด)/COEDC	21.6	0	0	0

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะนันท์ สุเทียนทอง เกิดวันที่ 19 ตุลาคม พ.ศ. 2526 ที่อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัด นครราชสีมา ระดับปริญญาตรีสำเร็จปริญญาการศึกษาระดับบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมีสิ่งทอ คณะ วิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ เมื่อปีการศึกษา 2548 และระดับ ปริญญาโทเข้าศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยี สิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2548 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550