

การผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาสองขั้นตอนโดยใช้ตัวเร่ง
ปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIODIESEL PRODUCTION FROM FREE FATTY ACIDS OF PALM OIL BY TWO-STEP
REACTION USING WHOLE CELL BIOCATALYST



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

Common Course

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์ม โดยปฏิกิริยาสองขั้นตอนโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้ง เซลล์
โดย	น.ส.สุนิสา หวังประดิษฐ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

----- คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

----- ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

----- อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล)

----- กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

----- กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูษิต กลิ่นวงษ์)

----- กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุริษา สุวรรณรังษี)

ฐนินสา หวังประดิษฐ์ : การผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาสองขั้นตอนโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์. (BIODIESEL PRODUCTION FROM FREE FATTY ACIDS OF PALM OIL BY TWO-STEP REACTION USING WHOLE CELL BIOCATALYST) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.วรุฒมิ จุฬาลักษณ์มานุกูล

การผลิตไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาสองขั้นตอนโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ยีสต์ *Candida rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ เนื่องจากเชื้อยีสต์ดังกล่าวมีความสามารถในการไฮโดรไลสน้ำมันปาล์มไปเป็นกรดไขมันอิสระ โดยพบว่าได้กรดไขมันอิสระสูงสุดเท่ากับ 82.61 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นกรดไขมันอิสระที่ผลิตโดย *C. rugosa* จะถูกนำไปใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตเอนไซม์ลิปเอสจากเชื้อ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ซึ่งหลังจากการหาภาวะที่เหมาะสมพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ลิปเอสที่มีค่าแอกทิวิตีและค่าแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด คือ 1.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 17.28 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง การศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาด้วย *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงสุดเท่ากับ 21.39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลเท่ากับ 1:1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ด้วยการใช้เทคนิคการแสดงออกที่ผิวเซลล์ยีสต์ เอนไซม์ลิปเอส 1 และเอนไซม์ลิปเอส 3 จาก *C. rugosa* (CRL1 และ CRL3) และเอนไซม์ลิปเอส จาก *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 (AML) ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับโปรตีนฐาน PpPIR1 แล้วทำการโคลนเข้าสู่ยีสต์เจ้าบ้าน *Pichia pastoris* KM 71 ได้เป็นยีสต์ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่ายีสต์สายพันธุ์คอมบิแนนท์ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 สามารถผลิตเอนไซม์ลิปเอสที่ผิวเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1,499.9 มิลลียูนิตต่อ OD_{600} และ 181.96 มิลลียูนิตต่อ OD_{600} หลังจากการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นเวลา 5 และ 4 วัน ตามลำดับ ในส่วนของสายพันธุ์คอมบิแนนท์ Pp-AML พบว่าให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิปเอสที่ผิวเซลล์สูงสุด เท่ากับ 30.48 มิลลียูนิตต่อ OD_{600} หลังจากการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ลิปเอสของยีสต์สายพันธุ์คอมบิแนนท์ Pp-CRL1, Pp-CRL3 คือที่พีเอช 7 และอุณหภูมิ 50 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่ความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ลิปเอสของ Pp-AML คือค่าพีเอชเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หลังจากการนำ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ พบว่าการใช้ Pp-CRL1 เพียงชนิดเดียวสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ผลผลิตกรดไขมันสูงสุดเท่ากับ 14.26 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการให้ Pp-AML เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันอิสระนั้นจะทำการทดสอบต่อไปในอนาคต

สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5971942023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: WHOLE CELL BIOCATALYST/ TWO-STEP REACTION/ LIPASE/ BIODIESEL/ FREE FATTY ACIDS/ YEAST CELL SURFACE DISPLAY

Tanisa Wangpradit : BIODIESEL PRODUCTION FROM FREE FATTY ACIDS OF PALM OIL BY TWO-STEP REACTION USING WHOLE CELL BIOCATALYST. Advisor: WARAWUT CHULALAKSANANUKUL

Biodiesel production can be produced from free fatty acids of palm oil by two-step reaction using whole cell biocatalyst. This study utilized yeast *Candida rugosa* as the whole cell biocatalyst because it has ability to hydrolyze palm oil into free fatty acids (FFAs). The highest conversion of FFAs by *C. rugosa* was 82.61% after 5-day cultivation. Then, FFAs produced by *C. rugosa* were utilized as an inducer for extracellular lipase production of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3. After optimization, the highest lipase volumetric activity and lipase specific activity of 1.18 U/mL and 17.28 U/mg protein were obtained by using 3% w/v FFAs at 30 °C for 5 days, respectively. Subsequently, the study of esterification by *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 revealed that the highest biodiesel conversion yield of 21.39% was achieved when FFAs concentration to methanol molar ratio of 1:1 was employed at 30°C, 72 h. For whole cell biocatalysts using yeast cell surface display technique, Lipase1 and Lipase3 genes from *C. rugosa* (CRL1 and CRL3) and Lipase gene from *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 (AML) were fused with PpPIR1 anchor protein and then cloned into *Pichia pastoris* KM71 host strain to construct Pp-CRL1, Pp-CRL3 and Pp-AML, respectively. It was found that the recombinant yeast Pp-CRL1 and Pp-CRL3 strains produced the highest lipase activity on cell surface of 1,499.9 mU/OD₆₀₀ and 181.9 mU/OD₆₀₀ at 5 and 4 days of induction with 2% v/v methanol, respectively. For the recombinant Pp-AML strains, the highest lipase activity on cell surface was achieved at 30.48 mU/OD₆₀₀ after 3 days of induction with 1% v/v methanol. In addition, the optimal pH and temperature of lipase activity of recombinant yeast Pp-CRL1 and Pp-CRL3 were pH 7 and 50°C and 40°C, respectively. On the contrary, the optimal pH and temperature of lipase activity of Pp-AML was observed at pH 8 and 35°C, respectively. After hydrolysis of palm oil by using Pp-CRL1 and Pp-CRL3 at different combinations, our results suggested that the use of Pp-CRL1 alone was able to produce the highest FFAs yield of 14.26% at 45°C for 48 h. The study of the esterification of FFAs by using Pp-AML as whole cell will be further evaluated.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขรายละเอียดในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และรองศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภามร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมภูษ กลินวงษ์ ดร. สุริษา สุวรรณรังษี ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้คำแนะนำ ที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร. สุริษา สุวรรณรังษี ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อคิดเห็นตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำวิจัยด้วยความเอาใจใส่เสมอมา

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่เชื้อเพื่อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่เชื้อเพื่อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ นายอภิสิทธิ์ เพียรลูผล ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ แนวทางการแก้ไขปัญหา ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ นายจตุพงษ์ พลจรัส และ นางสาวภาวดี บัวทอง สำหรับมิตรภาพ กำลังใจ คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นต่างๆ ความช่วยเหลือมากมายในทุกๆ ด้านมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกคนจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ เงินทุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติตามสัญญาสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย เลขที่ SCA-CO-2561-7106TH

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้ความรัก ความเอาใจใส่สนับสนุน ผลักดัน คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาข้อคิดที่ดี และความห่วงใยแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ฐนิสา หวังประดิษฐ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ไบโอดีเซล	6
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล	7
2.3 การผลิตไบโอดีเซล	10
2.4 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ิเฟเคชัน.....	11
2.5 ปฏิกริยาสองขั้นตอน.....	12
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซล	13
2.6.1 ผลของอุณหภูมิ	13
2.6.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ หรือกรดไขมันต่อแอลกอฮอล์	14
2.7 ตัวเร่งปฏิกริยาสารเคมี.....	14
2.8 ตัวเร่งปฏิกริยาชีวภาพ.....	15
2.9 ลิเพส.....	19
2.10 แหล่งที่มาของลิเพส.....	21

2.11 ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์.....	23
2.12 เทคโนโลยีการแสดงออกที่ผิวเซลล์ยีสต์.....	24
2.13 ลิเพสและยีนของ <i>Candida rugosa</i>	29
2.14 ลิเพสและยีนของ <i>Aureobasidium melanogenum</i>	30
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	31
วัสดุอุปกรณ์.....	31
สารเคมี.....	33
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	36
3.1 เพาะเลี้ยง <i>C. rugosa</i> ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส.....	36
3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนียวนำ และตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต.....	37
3.2.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ <i>A. pullulans</i> SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนียวนำ.....	37
3.2.2 การศึกษาการเจริญของ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 และกิจกรรมจำเพาะของลิเพสที่เวลาต่างๆ.....	37
3.2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ลิเพส ของ <i>C. rugosa</i> และ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> 14-3.....	38
3.2.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....	38
3.3 หาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มโดยใช้ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	39
3.3.1 การเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> 14-3.....	39

3.3.2	ศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเร่งปฏิกิริยาด้วย <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ในการผลิตไบโอดีเซล	39
3.3.3	ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเร่งปฏิกิริยาด้วย <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ในการผลิตไบโอดีเซล	40
3.3.4	การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	40
3.3.4.1	การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Shimadzu LC-20 A series, Japan)	40
3.3.4.2	การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีด โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง.	41
3.4	การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> KM 71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากยีสต์ <i>C. rugosa</i> และ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์	41
3.4.1	การเตรียมเวกเตอร์เพื่อใช้ในการโคลนนิ่งเอนไซม์ลิเพสและโปรตีนฐาน (anchoring protein) สำหรับการแสดงออกที่ผิวเซลล์ยีสต์	41
3.4.2	การเตรียมยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสจากเชื้อ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> และโปรตีนฐานสำหรับเชื่อมต่อกับเวกเตอร์	41
3.4.3	การสร้างเวกเตอร์ pPICZ α ที่มีโปรตีนฐานเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส	42
3.4.4	การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> KM71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากเชื้อ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์	44
3.4.5	การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากยีสต์ <i>Candida rugosa</i> ที่ผิวเซลล์	44
3.4.5.1	การสร้างเวกเตอร์ pPICZ α ที่มีโปรตีนฐานเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL ของ <i>C. rugosa</i>	44
3.4.5.2	การเตรียมยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1 และ CRL3 และสร้างเวกเตอร์ที่มีโปรตีนฐานเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1 และ CRL3	45

3.4.5.3 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพส CRL ที่ผิวเซลล์.....	46
3.4.6 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZαA เข้าสู่ยีสต์ <i>P. pastoris</i> KM71 ด้วย วิธีส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้า	47
3.4.7 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ เอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์	47
3.4.8 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์	48
3.5 การยืนยันตำแหน่งการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของสายพันธุ์ยีสต์ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ด้วยเทคนิค Immunofluorescence	49
3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการ.....	49
3.6.1 การหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML	49
3.6.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและศึกษาความคงทนของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML.....	49
3.7 เพาะเลี้ยงยีสต์ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ที่ภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของเอนไซม์ ลิเพสที่ผิวเซลล์เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ในการผลิตกรดไขมัน.....	50
3.7.1 การทำเซลล์แห้ง (lyophilization) เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ในการ ผลิตกรดไขมัน.....	50
3.7.2 การผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เซลล์แห้ง Pp-CRL1 และ Pp-CRL3	50
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	51
4.1 การเพาะเลี้ยง <i>C. rugosa</i> ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการทำปฏิกิริยาไฮโดรไล ซิส.....	51
4.2.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนี่ยวนำ	52

4.2.2 การศึกษาการเจริญของ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 และ กิจกรรมจำเพาะของลิเพสที่เวลาต่างๆ	54
4.3 หากภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์ม โดยใช้ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	55
4.3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล	55
4.3.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำ ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล	57
4.4 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> KM 71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากยีสต์ <i>C. rugosa</i> และ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์.....	58
4.4.1 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> KM71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก เชื้อ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์.....	58
4.4.2 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ เอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ <i>P. pastoris</i> /pPICZ α _PpPIR1-AML (Pp-AML) ...	63
4.4.3 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ <i>P. pastoris</i> KM71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก เชื้อ <i>C. rugosa</i> ที่ผิวเซลล์.....	64
4.4.4 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ เอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ <i>P. pastoris</i> /pPICZ α _PpPIR1-CRL1 (Pp- CRL1)และ <i>P. pastoris</i> /pPICZ α _ PpPIR1-CRL3 (Pp-CRL3)	67
4.5 การยืนยันตำแหน่งการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของสายพันธุ์ยีสต์ Pp-CRL1, Pp- CRL3 และ Pp-AML ด้วยเทคนิค Immunofluorescence	69
4.6 การหาสมบัติบางประการของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML.....	70
4.6.1 การหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML	70
4.6.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและศึกษาความคงทนของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML	72

4.7 การผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เซลล์แห้ง Pp-CRL1 และ Pp-CRL3.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	76
บรรณานุกรม	78
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก	88
ภาคผนวก ค	94
ภาคผนวก ง.....	98
ภาคผนวก จ.....	101
ประวัติผู้เขียน.....	104



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	6
2.2	7
2.3	8
2.4	16
2.5	17
2.6	19
2.7	22
2.8	28

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัว.....	10
2.2 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน.....	12
2.3 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิส.....	12
2.4 ปฏิกริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน.....	13
2.5 ปฏิกริยาต่างๆ ของลิเพส.....	20
2.6 การเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนฐานแบบ N-terminal fusion และ C-terminal fusion.....	25
2.7 โครงสร้างเวกเตอร์ pPICZ α A.....	27
3.1 โครงสร้าง pPICZ α A_ AML_11-kp.....	43
3.2 โครงสร้าง pPICZ α A_ PpPIR1_ AML.....	43
3.3 โครงสร้าง pPICZ α A_ PpPIR1_ CRL1.....	45
3.4 โครงสร้าง pPICZ α A_ PpPIR1_ CRL3.....	46
4.1 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากใช้ <i>C. rugosa</i> เป็นตัวเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิน้ำมันปาล์มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	51
4.2 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ของ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ กรดไขมันอิสระ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์.....	52
4.3 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ กรดไขมันอิสระ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์.....	53
4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและกิจกรรมจำเพาะของลิเพสจากยีสต์ <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว สำหรับผลิตลิเพส ในช่วงระยะเวลาที่ 0-120 ชั่วโมง.....	54

ภาพที่	หน้า
4.5 ผลผลิตไปไอดีเซลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมี <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	56
4.6 ผลผลิตไปไอดีเซลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมี <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อัตราส่วน โดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 เซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	57
4.7 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _ AML_11-kp ด้วยวิธี colony PCR	59
4.8 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _ PpPIR1_ AML ด้วยวิธี colony PCR.....	60
4.9 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _ AML-11-kp บนผิวเซลล์ของ ยีสต์ <i>P. pastoris</i> (<i>P. pastoris</i> /pPICZ α _ AML-11-kp) ด้วยวิธี colony PCR.....	60
4.10 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _ PpPIR1- AML บนผิวเซลล์ของยีสต์ <i>P. pastoris</i> (<i>P. pastoris</i> /pPICZ α _ PpPIR1- AML) ด้วยวิธี colony PCR.....	61
4.11 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ <i>P. pastoris</i> / pPICZ α _ AML-11-kp และ <i>P. pastoris</i> /pPICZ α _ PpPIR1- AML.....	62
4.12 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp- AML ที่มีการเหนี่ยวนำ ให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์โดยการเติม methanol 1%, 2% และ 3% เป็นเวลา 7 วัน.....	63
4.13 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _ PpPIR1_ CRL1 ด้วยวิธี colony PCR	64
4.14 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _ PpPIR1_ CRL3 ด้วยวิธี colony PCR	64

ภาพที่	หน้า
4.15 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_ CRL1 บนผิวเซลล์ของยีสต์ <i>P. pastoris</i> (<i>P. pastoris</i> /pPICZ α _PpPIR1-CRL1) ด้วยวิธี colony	65
4.16 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_ CRL3 บนผิวเซลล์ของยีสต์ <i>P. pastoris</i> (<i>P. pastoris</i> /pPICZ α _PpPIR1-CRL3) ด้วยวิธี colony.....	65
4.17 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของโคลน <i>P.pastoris</i> /PICZ α _PpPIR1_ CRL1 ที่เพาะเลี้ยงในขนาด tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน	66
4.18 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของโคลน <i>P. pastoris</i> /pPICZ α _PpPIR1-CRL3 ที่ เพาะเลี้ยงในขนาด tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน	67
4.19 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL1 ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์โดยการเติม methanol 1%, 2% และ 3% เป็นเวลา 7 วัน.....	68
4.20 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL3 ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ โดยการเติม methanol 1%, 2% และ 3% เป็น เวลา 7 วัน.....	69
4.21 ผลการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของโคลน Negative control, Pp-CRL1, Pp-CRL3 และPp-AML ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence.....	70
4.22 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3	71
4.23 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-AML.....	72

ภาพที่	หน้า
4.24 คุณหมุมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทนของ โคลน Pp-CRL1.....	73
4.25 คุณหมุมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทน ของโคลน Pp- CRL3.....	73
4.26 คุณหมุมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทน ของโคลน Pp-AML	74
4.27 ผลผลิตกรดไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย L1 คือ Pp-CRL และ L3 คือ Pp-CRL3.....	75
ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.24 มิลลิโมลาร์ สำหรับ <i>C. rugosa</i> และ <i>A. pullulans</i>	95
ค-2 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.6 มิลลิโมลาร์ สำหรับ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3.....	96
ค-3 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.24 มิลลิโมลาร์ สำหรับ Pp-AML	96
จ-1 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เวลา 0 ชั่วโมง.....	101
จ-2 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เวลา 120 ชั่วโมง.....	101
จ-3 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจาก ตัวเร่งปฏิกิริยาอีสต์ <i>A. pullulans</i> ที่เวลา 0 ชั่วโมง.....	102
จ-4 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจาก ตัวเร่งปฏิกิริยาอีสต์ <i>A. pullulans</i> ที่เวลา 72 ชั่วโมง.....	102
จ-5 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากตัวเร่ง ปฏิกิริยาอีสต์ Pp-CRL1 ที่เวลา 0 ชั่วโมง คุณหมุมิ 45 องศาเซลเซียส.....	103
จ-6 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากตัวเร่ง ปฏิกิริยาอีสต์ Pp-CRL1 ที่เวลา 48 ชั่วโมง คุณหมุมิ 45 องศาเซลเซียส.....	103

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีความต้องการพลังงานจากเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้น จึงมีการแสวงหาพลังงานจากแหล่งต่างๆ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ แต่การเผาไหม้เชื้อเพลิงฟอสซิล (Fossil fuel) นั้นก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมามากมาย ทำให้มีการพัฒนาแหล่งพลังงานทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ไบโอดีเซล (Biodiesel) หรือ แฟตตีเอซิดเมทิลเอสเทอร์ (Fatty Acid Methyl Esters; FAME) เป็นเชื้อเพลิงทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล มีคุณสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ มีการเผาไหม้ที่สะอาดกว่าน้ำมันดีเซลปกติ เนื่องจากมีการสันดาปที่สมบูรณ์กว่า จึงมีการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์ออกมาน้อยกว่า รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์เมื่อเผาไหม้ ซึ่งเป็นสาเหตุของฝนกรด ทำให้น้ำมันไบโอดีเซลมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันดีเซลปกติทั่วไป (Nie และคณะ, 2006)

ไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอลหรือเอทานอล โดยมีกรด ด่าง หรือลิเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลคิลเอสเทอร์ หรือไบโอดีเซล และมีกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (Fukuda และคณะ, 2001) นอกจากการผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาดังกล่าวแล้ว ก็สามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาสองขั้นตอน (Two-step reaction) โดยมีขั้นตอนเริ่มต้น คือ ผลิตกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ไตรกลีเซอไรด์แล้วนำกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids) ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับเมทานอลด้วยปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชัน (Esterification) ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถแยกกลีเซอรอลออกไปเพื่อใช้ประโยชน์ตั้งแต่ขั้นตอนไฮโดรไลซิส และการผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชันนี้จะได้ผลผลิตที่สูงเนื่องจากไม่มีกลีเซอรอลเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา และกรดไขมันสามารถเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลได้ง่ายกว่า (Meng และคณะ, 2011) กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่ผ่านมาจะใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี แต่การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี

นี้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา ทั้งยังต้องใช้อุณหภูมิสูงเพื่อให้การผลิตไบโอดีเซลได้ผลผลิตสูงและใช้เวลาสั้น จึงต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูงตามไปด้วย (Iso และคณะ, 2001) ปัจจุบันพบว่าลิเพสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการเร่งปฏิกิริยา และเป็นที่ยอมรับว่าการใช้ลิเพสมีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีหลายประการ เช่น มีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้ตามความต้องการ ไม่ก่อให้เกิดมลพิษในปฏิกิริยาจึงทำให้ได้ผลผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรงจึงลดพลังงานและต้นทุนในการผลิตได้ (Aarthy และคณะ, 2014; Akoh และคณะ, 2007)

ลิเพสพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์ลิเพสจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ได้รับความสนใจมากกว่าเอนไซม์ลิเพสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด เอนไซม์มีความเสถียร สามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (Macrae และ Hammond, 1985)

ส่วนมากลิเพสที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรม มักเป็นลิเพสที่ผลิตออกมานอกเซลล์ แต่เนื่องจากลิเพสที่ได้ต้องผ่านกระบวนการคัดแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการตรึงลิเพสลงบนตัวค้ำจุนที่มีราคาสูงก่อนนำมาใช้งาน จึงทำให้ลิเพสมีราคาสูง ไม่คุ้มค่าต่อการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล จึงเกิดการศึกษานำจุลินทรีย์ทั้งเซลล์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (whole cell biocatalyst) สำหรับการผลิตไบโอดีเซล วิธีนี้สามารถลดขั้นตอนและลดต้นทุนจากการใช้ลิเพสได้มาก (Gog และคณะ, 2012; Srimhan และคณะ, 2011) จากการศึกษาของ (Fukuda และคณะ, 2008) พบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้จุลินทรีย์ทั้งเซลล์จะช่วยลดปัญหาค่าใช้จ่ายในการตรึงเอนไซม์ และยังให้ค่าแอกทิวิตีของลิเพสกับความเสถียรที่ดีขึ้น

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มโดยใช้ *Candida rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง *C. rugosa* เป็นยีสต์ที่มีข้อมูลในการเพาะเลี้ยงและมีการศึกษามากมาย โตเร็วและมีแอกทิวิตีของลิเพสที่สูง สามารถผลิตลิเพสออกมานอกเซลล์ได้ มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นได้หลากหลาย ลิเพสที่ผลิตนั้นจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ จึงสามารถไฮโดรไลซิกรดไขมันได้

ทุกตำแหน่ง (Benjamin และ Pandey, 1998) และสนใจศึกษาผลิตไบโอดีเซล โดยหลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มในขั้นตอนแรกแล้วจะนำกรดไขมันอิสระที่ได้มาผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาด้วย *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ซึ่งเป็นยีสต์ที่ (Vitisant และคณะ, 2013) คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนคราบน้ำมันบนเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดย *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้หลายชนิด เจริญเติบโตได้เร็ว ใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย สามารถผลิตลิเพสออกมานอกเซลล์ได้ (Chi และคณะ, 2009)

นอกจากนี้วิธีการเตรียมจุลินทรีย์ทั้งเซลล์ *P. pastoris* มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยการใช้เทคโนโลยีการแสดงออกที่ผิวเซลล์ (cell surface display) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (biocatalyst) โดยมีรายงานว่ายีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์มีความสามารถในการเข้าถึงสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลได้ดีกว่าเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ (Huang และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนไซม์ลิเพสที่ถูกตรึงที่ผิวเซลล์มีความเสถียร (stability) ง่ายต่อการผลิต รวมถึงมีราคาไม่แพง (Washida และคณะ, 2001)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจวิธีการใช้จุลินทรีย์ทั้งเซลล์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยตรง โดยที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการคัดแยกลิเพส การทำให้บริสุทธิ์ และการตรึงลงบนตัวค้ำจุน ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนในการเตรียมลิเพส การผลิตกรดไขมันอิสระ และการผลิต ไบโอดีเซลลงได้ จึงได้ทำการสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพส ที่ผิวเซลล์จำนวนสองสายพันธุ์ ได้แก่ (1) *P. pastoris* สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *C. rugosa* ที่ผิวเซลล์ (2) *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เพื่อศึกษาข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำจุลินทรีย์ทั้งเซลล์มาเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มโดยใช้ *Candida rugosa*
2. เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
3. เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์สำหรับการผลิตไบโอดีเซลแบบสองขั้นตอนโดยใช้เทคนิคการแสดงออกของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์ยีสต์

ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัย
2. เเพาะเลี้ยง *C. rugosa* ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส
3. ตรวจสอบแอกทิวิตีของลิเพสของ *C. rugosa* และกรดไขมันที่เกิดขึ้น
4. หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนี่ยวนำ และตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต
5. หาภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มโดยใช้ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา
6. สร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ได้แก่ (1) *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *C. rugosa* ที่ผิวเซลล์ และ (2) *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3
7. เเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่สร้างขึ้นในระดับ shake flask เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์และเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์
8. ศึกษาสมบัติบางประการของ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *C. rugosa* และ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3
9. เเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *C. rugosa* ที่ผิวเซลล์ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

10. เพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการผลิตไบโอดีเซล

11. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เขียนบทความเผยแพร่ และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ไบโอดีเซลแบบสองขั้นตอนด้วยปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ และได้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนในเครื่องยนต์ดีเซล โดยปัจจุบันสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอลหรือเอทานอล โดยมีกรด ด่าง หรือลิเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลคิลเอสเทอร์ หรือไบโอดีเซลซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายน้ำมันดีเซล (ตารางที่ 2.1) สามารถใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลโดยตรง ไม่จำเป็นต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ก่อนการนำไปใช้และไม่เกิดความเสียหายให้กับเครื่องยนต์

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบสมบัติของไบโอดีเซลกับน้ำมันดีเซล (Shahid และ Jamal, 2011)

สมบัติ	ไบโอดีเซล	ดีเซล
จุดวาบไฟ (flash point, °C)	170	76
ปริมาณซัลเฟอร์ (%)	0.02	0.05
ปริมาณเถ้า (%)	0.02	0.01
ความหนาแน่น (density, kg m ⁻³)	885	860
ดัชนีซีเทน (cetane number)	48	50
ความหนืดที่ 30 องศาเซลเซียส (viscosity at 30°C, cSt)	5.72	3.06
ค่าความร้อน (calorific value, kJ/kg)	37,425	42,490

ไบโอดีเซลมีคุณสมบัติในการย่อยสลายทางชีวภาพ มีการเผาไหม้ที่สะอาดกว่าน้ำมันดีเซลปกติ เนื่องจากมีการสันดาปที่สมบูรณ์กว่า จึงมีการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และคาร์บอนมอนอกไซด์ออกมาน้อยกว่า รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์เมื่อเผาไหม้ ซึ่ง

เป็นสาเหตุของฝนกรด ทำให้น้ำมันไบโอดีเซลมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าน้ำมันดีเซลปกติทั่วไป (Nie และคณะ, 2006)

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

วัตถุดิบหลักที่สามารถใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ส่วนใหญ่จะเป็นพืชน้ำมัน เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันสบู่ดำ เป็นต้น เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก โดยชนิดของน้ำมันที่ใช้จะมีผลต่อคุณสมบัติของไบโอดีเซลที่ได้ นอกจากนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันพืชสามารถให้ผลผลิตไบโอดีเซลในปริมาณที่สูงดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างปริมาณผลผลิตสูงสุดที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน จากวัตถุดิบประเภทน้ำมันพืชต่างๆ (Gog และคณะ, 2012; Ribeiro และคณะ, 2011)

วัตถุดิบ	ปริมาณผลผลิตสูงสุดที่ได้ (Yield, %)
น้ำมันเมล็ดเรพซีด (Rapeseed oil or Canola Oil)	98
น้ำมันเมล็ดฝ้าย (Cottonseed oil)	97
น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil)	97
น้ำมันดอกทานตะวัน (Sunflower oil)	>95
น้ำมันปาล์ม (Palm oil (used))	91

น้ำมันปาล์ม CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์มากมายจัดเป็นพืชที่อยู่ในอาณาจักร Plantae ส่วน (Division) Magnoliophyta จัดจำแนกอยู่ในชั้น Liliopsida อันดับ Arecales วงศ์ Arecaceae โดยน้ำมันปาล์มจะได้มาจากส่วนผล ซึ่งผลของปาล์มน้ำมันจะแบ่งออกเป็น 3 คือ 1.เอ็กโซคาร์ป (exocarp) จะอยู่ด้านนอกสุด ผิวมีลักษณะเป็นมันและแข็ง 2. มีโซคาร์ป (mesocarp) เป็นส่วนที่อยู่ถัดเข้าไปมีลักษณะเป็นเส้นใย ซึ่งเป็นส่วนที่มีน้ำมันสูงสามารถนำไปสกัดเป็นน้ำมันปาล์ม (palm oil) ได้ และ 3.เอ็นโดคาร์ป (endocarp) มีลักษณะเป็นเปลือกแข็งสีดำ เมื่อสกัดน้ำมันจากมีโซคาร์ปออกมาจะเหลือส่วนนี้ซึ่งห่อหุ้มเมล็ดอยู่สามารถส่งไปขายหรือเพื่อสกัดเอาน้ำมันปาล์มจากเมล็ด (palm kernel oil) โดยปกติพืชน้ำมันแต่ละชนิดจะประกอบไปด้วยกรดไขมันในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ตามตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มเทียบกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ (Akbar และคณะ, 2009)

กรดไขมัน	น้ำมันปาล์ม	เนื้อมะพร้าว ปาล์ม	น้ำมันดอก ทานตะวัน	น้ำมันถั่ว เหลือง	น้ำมันสบู่ ดำ
กรดโอเลอิก (C18:1)	39.2	15.4	21.1	23.4	44.7
กรดลิโนเลอิก (C18:2)	10.1	2.4	66.2	53.2	32.8
กรดปาล์มิติก (C16:0)	44.0	8.4	-	11.0	14.2
กรดสเตียริก (C18:0)	4.5	2.4	4.5	4.0	7.0
กรดปาล์มิ โตเลอิก (C16:1)	-	-	-	-	0.7
กรดลิโนเลนิก (C18:3)	0.4	-	-	7.8	0.2
กรดอะราชี ดิก (C20:0)	-	0.1	0.3	-	0.2
กรดมาจาริก (C17:0)	-	-	-	-	0.1
กรดไมริสติก (C14:0)	1.1	16.3	-	0.1	0.1
กรดแค โพรอิก (C6:0)	-	0.2	-	-	-

กรดไขมัน	น้ำมันปาล์ม	เนื้อผล ปาล์ม	น้ำมันดอก ทานตะวัน	น้ำมันถั่ว เหลือง	น้ำมันสุบู่ ดำ
กรดแคปโร ลิก (C8:0)	-	3.3	-	-	-
กรดลอริก (C12:0)	0.2	47.8	-	-	-
กรดแคพริก (C10:0)	-	3.5	-	-	-
กรดไขมัน อิ่มตัว	49.9	82.1	11.3	15.1	21.6
กรดไขมันไม่ อิ่มตัว เชิงเดี่ยว	39.2	15.4	21.1	23.4	45.4
กรดไขมันไม่ อิ่มตัวเชิงซ้อน	10.5	2.4	66.2	61.0	33

กรดไขมัน (fatty acid) (Scrimgeour และ Harwood, 2007)

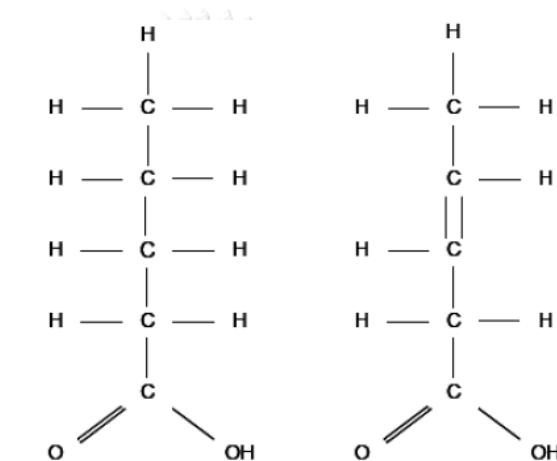
กรดไขมัน เป็นกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมักจะมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 อะตอมขึ้นไป มีสูตรทั่วไป คือ $R - COOH$ ลักษณะสูตรโครงสร้างของกรดไขมันประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เรียกว่าคาร์บอกซิล ($COOH$) ซึ่งมีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนรวมตัวกันอยู่ อีกส่วนหนึ่งเรียกว่า ห่วงโซ่คาร์บอน (R) โดยมีธาตุคาร์บอนยึดเหนี่ยวกันเป็นห่วงโซ่ กรดไขมันมีอยู่หลายชนิด ทุกชนิดจะมีหน่วยคาร์บอกซิลอยู่หนึ่งหน่วยเหมือนกัน ส่วนที่แตกต่างกันคือลักษณะทางเคมีในส่วนของโซ่คาร์บอน ทำให้กรดไขมันมีข้อแตกต่างกันไป

กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่คาร์บอนในโมเลกุลมี 46 ไฮโดรเจนจับเกาะอยู่เต็มที่แล้ว ไม่สามารถรับไฮโดรเจนหรือธาตุอื่นใดเข้าไปในโมเลกุลได้อีก

โดยที่ห่วงโซ่คาร์บอน (R) เท่ากับ C_nH_{2n+1} และ n เป็นตัวเลขที่แสดงถึงจำนวนคาร์บอนอะตอม กรดไขมันชนิดนี้พบมากในไขมันสัตว์ น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันปาล์ม

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีคาร์บอนในโมเลกุลมีไฮโดรเจนน้อยกว่าชนิดอิ่มตัว โดยที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 2 อะตอมจับกันเองด้วยพันธะคู่ (=) การมีพันธะคู่ 1 แห่ง จะทำให้มีไฮโดรเจนน้อยกว่าชนิดอิ่มตัว 2 อะตอม การมีพันธะคู่อาจมีมากกว่า 1 ตำแหน่ง กรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้พบมากในไขมันพืช ยกเว้นน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันปาล์ม



ก. กรดไขมันชนิดอิ่มตัว

ข. กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัว

2.3 การผลิตไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การนำน้ำมันพืชมาใช้โดยตรง การนำมาผสมกับน้ำมันดีเซลทั่วไปในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งสามารถใช้ได้ดีในระยะสั้น แต่ถ้าในระยะยาวจะส่งผลเสียต่อเครื่องยนต์ดีเซลได้ เพราะน้ำมันพืชมีความหนืดสูง และส่วนประกอบของกรดไขมันต่างๆ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน พอลิเมอไรเซชัน และการตกสะสมของคาร์บอน (carbon deposition) จนเกิดเป็นยางเหนียวขึ้นในเครื่องยนต์ จากข้อเสียดังกล่าวนี้จึงได้มีการหาวิธีพัฒนาสมบัติของน้ำมันพืชเพื่อที่สามารถนำมาใช้แทนน้ำมันดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันมี

หลากหลายวิธีที่สามารถพัฒนาคุณภาพของน้ำมันพืช หรือเรียกได้ว่าเป็นวิธีผลิตไบโอดีเซล (Ma และ Hanna, 1999) เช่น

การทำไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นกระบวนการที่ทำให้ของเหลวเกิดสารแขวนลอยกระจายตัวอยู่ เช่น การผสมแอลกอฮอล์กับน้ำมันพืช ซึ่งจะมีสภาพเป็นอิมัลชัน

การแตกตัวด้วยความร้อน (pyrolysis) เป็นการให้ความร้อนกับน้ำมันพืชในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อให้ไขมันแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมหรือใกล้เคียงสำหรับนำมาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล

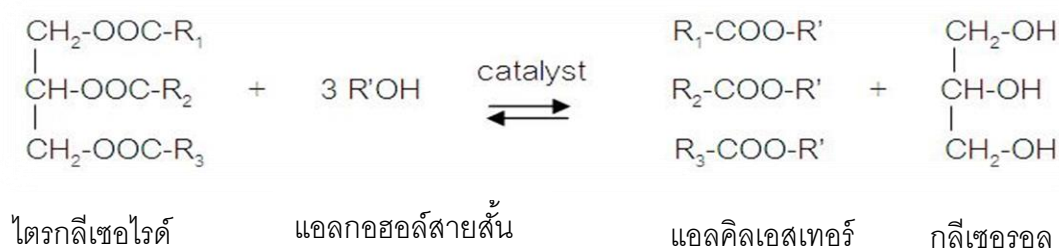
การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification reaction) คือ ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนเคลื่อนย้ายหมู่แอลคิล (Alkyl) ของเอสเทอร์ (Ester) หรือไตรกลีเซอไรด์ กับแอลกอฮอล์ เกิดเป็นสารประกอบเอสเทอร์ตัวใหม่ หรือโมโนแอลคิลเอสเทอร์ (Mono-alkylester) ได้แก่สารจำพวกเมทิลเอสเทอร์ และเอทิลเอสเทอร์

การทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) เป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันและแอลกอฮอล์ได้เป็นสารประกอบเอสเทอร์ตัวใหม่

โดยกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่นิยมและใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ การทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน และมีอีกหนึ่งปฏิกิริยาที่น่าสนใจ คือ ปฏิกิริยาสองขั้นตอน (two-step reaction) ซึ่งก็คือ การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสก่อนจากนั้นนำกรดไขมันอิสระที่ได้มาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งวิธีสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ผลผลิตที่ดีกว่าเนื่องจากกรดไขมันสามารถเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลได้ง่ายกว่าการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Meng และคณะ, 2011)

2.4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนเคลื่อนย้ายหมู่แอลคิลของเอสเทอร์หรือไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอลหรือเอทานอล จนเกิดเป็นสารประกอบจำพวกเมทิลเอสเทอร์หรือเอทิลเอสเทอร์ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2.2



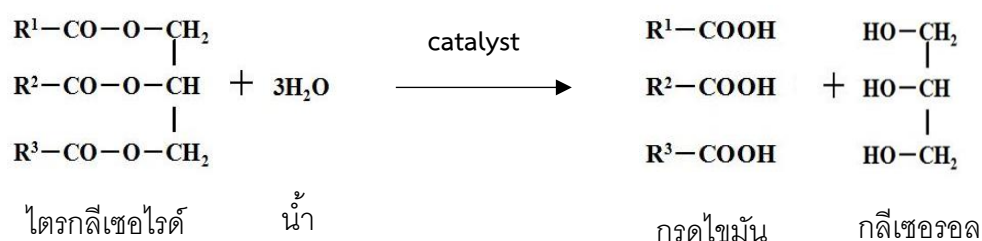
ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ในการผลิตไบโอดีเซลนั้น ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนับเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ซึ่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนั้นเป็นชื่อเรียกโดยทั่วไปของปฏิกิริยาอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ลดความหนืดของไตรกลีเซอไรด์ และเพิ่มสมบัติของเชื้อเพลิงให้มีลักษณะคล้ายกับน้ำมันดีเซล (Fukuda และคณะ, 2001; Gupta และคณะ, 2007)

2.5 ปฏิกิริยาสองขั้นตอน

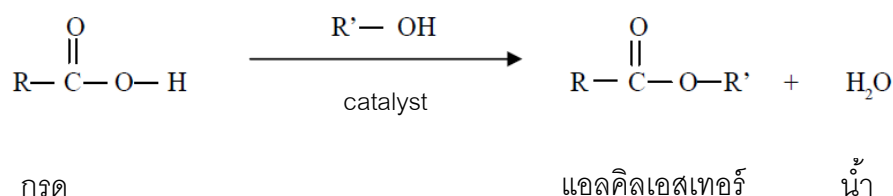
ปฏิกิริยาสองขั้นตอน หรือ two-step reaction นั้นเป็นปฏิกิริยารวมกันระหว่างปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาระหว่างเอสเทอร์หรือไตรกลีเซอไรด์กับน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ซึ่งโดยทั่วไปมีลิเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) การทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) เป็นปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันและแอลกอฮอล์ได้เป็นสารประกอบเอสเทอร์ตัวใหม่



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

ในส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยานั้นสามารถใช้ได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น กรด ต่าง หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น ลิเพส และเมื่อทำปฏิกิริยาจนเสร็จสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เรียกว่าไบโอดีเซล (Fukuda และคณะ, 2001; Gupta และคณะ, 2007)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไบโอดีเซล

ในการผลิตไบโอดีเซลมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชัน ทั้งนี้จะขอยกตัวอย่างบางปัจจัยที่เป็นปัจจัยหลักในการผลิตไบโอดีเซล

2.6.1 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชันอย่างมาก เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากอุณหภูมิสูงสามารถไปช่วยลดความหนืดของน้ำมัน นอกจากนี้ยังทำให้สารตั้งต้นทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น แต่การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือลิเพส จะใช้อุณหภูมิต่ำกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเสียสภาพและแอกทิวิตีของลิเพสในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา โดยปกติแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 30-55 องศาเซลเซียส หรือไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งที่มาของลิเพสที่ใช้ในปฏิกิริยา (Ribeiro และคณะ, 2011)

2.6.2 ผลของอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อแอลกอฮอล์ หรือกรดไขมันต่อแอลกอฮอล์

ในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชันต้องมีการใช้แอลกอฮอล์สายสั้นเป็นสารตั้งต้น ซึ่งตามทฤษฎีแล้วปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะต้องการแอลกอฮอล์ 3 โมลต่อน้ำมัน 1 โมล เพื่อเกิดเป็นไบโอดีเซล 3 โมล แต่การเพิ่มความเข้มข้นหรืออัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเกิน 1:3 นั้น จะสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลได้เนื่องจากการเพิ่มโอกาสในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันกับเมทานอล และยังเป็นการช่วยให้การเกิดปฏิกิริยาเป็นไปอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังช่วยให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นไปอย่างรวดเร็วด้วย

การผลิตไบโอดีเซลส่วนใหญ่นิยมใช้เมทานอลมากกว่าเอทานอล เนื่องจากเมทานอลมีราคาถูกกว่า รวมทั้งการใช้เมทานอลจะได้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ในจำนวนที่มากกว่าการใช้เอทานอลที่ได้ผลผลิตเป็นเอทิลเอสเทอร์ อย่างไรก็ตามหากใช้ลิเพสหรือตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมทานอลนั้นสามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อการผลิตไบโอดีเซลได้ เนื่องจากเมทานอลจะไปสะสมอยู่ตามโครงสร้างของลิเพสจนทำให้ลิเพสเสียสภาพ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการยับยั้งและลดประสิทธิภาพการทำงานของลิเพส หากเมทานอลมีความเข้มข้นที่สูงเกินไปก็จะส่งผลทางลบต่อจุลินทรีย์หรือลิเพสเมื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลผลิตมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้โดยการเติมเมทานอลแบบเป็นขั้นหรือทำการแบ่งเติมเมทานอลทีละน้อยครั้งแต่เท่าๆกัน เพื่อไม่ให้เมทานอลในปฏิกิริยามีความเข้มข้นสูง (Gog และคณะ, 2012; Ribeiro และคณะ, 2011)

2.7 ตัวเร่งปฏิกิริยาสารเคมี

ในการผลิตไบโอดีเซลสามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิด การใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น สารเคมีที่นำมาใช้ส่วนใหญ่มักจะเป็นสารเคมีประเภทกรด เช่น กรดซัลฟิวริก หรือต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น แต่ปัจจุบันในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจะใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตไบโอดีเซลที่สูงรวดเร็ว และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ เนื่องจากการทำปฏิกิริยาด้วยต่างไม่ต้องการอุณหภูมิและ

ความดันที่สูงมากนัก อีกทั้งสารเคมีประเภทต่างยังมีข้อดีว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาก เนื่องจากให้ผลผลิตที่สูงกว่าภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงและใช้เวลาทำปฏิกิริยาที่สั้นกว่าภายใต้สภาวะเดียวกัน นอกจากนี้การใช้ต่างยังกัดกร่อนเครื่องมือน้อยกว่าการใช้กรด และใช้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่น้อยกว่า จึงสามารถลดต้นทุนจากการใช้แอลกอฮอล์น้อยลงด้วย (Ghaly และคณะ, 2010)

แม้ว่าการใช้ต่างจะดีกว่ากรดในการใช้เป็นตัวเร่งในการทำปฏิกิริยา แต่ก็ยังพบข้อเสีย คือ ถึงแม้จะใช้อุณหภูมิและแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าการใช้กรดเร่งปฏิกิริยา แต่การใช้ต่างจำเป็นต้องอาศัยพลังงานและแอลกอฮอล์ในระดับที่สูงกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หรือลิเพสอยู่พอสมควร จึงทำให้มีต้นทุนมากขึ้นตามไปด้วย (Pazouki และคณะ, 2011) นอกจากนี้ต่างยังมีความไวต่อลักษณะของน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้น โดยการใช้ต่างเร่งปฏิกิริยาจะเหมาะกับน้ำมันพืชที่มีระดับกรดไขมันอิสระ และมีส่วนประกอบของน้ำต่ำ (น้ำมันที่มีคุณภาพสูง) เท่านั้น ซึ่งน้ำมันประเภทนี้มักมีราคาสูงกว่าน้ำมันประเภทอื่น การใช้ไขมันที่มีราคาถูก เช่น น้ำมันใช้แล้ว ซึ่งมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง และมีน้ำเป็นส่วนประกอบอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสบู่ (Saponification) ระหว่างการผลิตไบโอดีเซล ที่จะส่งผลให้ผลผลิตโอดีเซลต่ำลง และยังทำให้ยากต่อการแยกกลีเซอรอลที่เป็นผลผลิตร่วมออกจากผลิตภัณฑ์ด้วย (Aarthy และคณะ, 2014; Ghaly และคณะ, 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.8 ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ

จากข้อเสียของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาแบบกรดและต่าง ทำให้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการใหม่ขึ้น คือการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือลิเพส การใช้ลิเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.4 และตารางที่ 2.5 การใช้ลิเพสมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้นทำให้ได้ผลผลิตสูง สามารถทำการแยกกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ดีกว่า (Aarthy และคณะ, 2014)

อย่างไรก็ตามการนำลิเพสมาใช้เร่งปฏิกิริยายังไม่สามารถนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากยังมีข้อเสียอยู่ คือ ส่วนมากลิเพสที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมักเป็นลิเพสที่ผลิตออกมานอกเซลล์ จึงต้องผ่านการคัดแยก การทำให้บริสุทธิ์และการตรึงลิเพสลงบนตัวค้ำจุนที่

มีราคาสูงก่อนนำมาใช้งาน จึงทำให้ลิเพสมีราคาสูง ไม่คุ้มค่าต่อการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล จึงเกิดการศึกษานำจุลินทรีย์ทั้งเซลล์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (whole cell biocatalyst) สำหรับการผลิตไบโอดีเซล วิธีนี้สามารถลดขั้นตอนและลดต้นทุนจากการใช้ลิเพสได้มาก (Gog และคณะ, 2012; Srimhan และคณะ, 2011) ซึ่งจากการศึกษาของ Fukuda และคณะ (2008) พบว่าการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้จุลินทรีย์ทั้งเซลล์จะช่วยลดปัญหาค่าใช้จ่ายในการตรึงเอนไซม์ และยังให้ค่าแอกทิวิตีของลิเพสกับความเสถียรที่ดีขึ้น

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบการใช้ต่างและลิเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Fukuda และคณะ, 2008)

ปัจจัย	ตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง	ลิเพส
ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	60-80 องศาเซลเซียส	20-60 องศาเซลเซียส
ความหลากหลายของน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้น	เหมาะกับน้ำมันที่มีเป็นส่วนประกอบและกรดไขมันอิสระอยู่น้อย	มีข้อจำกัดต่ำ
กรดไขมันอิสระในวัตถุดิบ	เกิดเป็นสบู่	เป็นเมทิลเอสเทอร์
ปริมาณน้ำในสารตั้งต้น	มีผลลบต่อปริมาณผลผลิต	ไม่มีผล
ผลผลิตของไบโอดีเซลที่ได้รับ	ประมาณร้อยละ 99	ประมาณร้อยละ 90
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
น้ำเสียจากปฏิกิริยา	มีต่างปนเปื้อนในน้ำเสีย	ไม่มีน้ำเสีย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ใช้วิธีการล้างซ้ำ	สามารถแยกนำมาใช้ได้เลย
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ราคาถูก	ราคาแพง

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตไบโอดีเซลจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่
เร่งด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพและเคมี

ประเภท ตัวเร่ง ปฏิกิริยา	จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	ผลผลิต ไบโอดีเซล (ร้อยละ)	อ้างอิง
Commercial lipase/	Immobilized lipase	น้ำมันเมล็ด โหระพา	94.58	(Amini และ คณะ, 2017)
Immobilized lipase	Novozyme 435	น้ำมันข้าวโพด	81.3	(Ciftci และ คณะ Temelli, 2013)
	<i>Candida antarctica</i> B lipase and <i>Rhizomucor miehei</i> lipase	น้ำมันปาล์ม	78.35	(Shahedi และ คณะ, 2019)
Immobilized whole-cell	<i>Rhizopus oryzae</i>	น้ำมันสบู่ดำ	80	(Tamalampudi และคณะ, 2008)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	น้ำมันทำอาหาร ที่ใช่แล้ว	98.4	Pazouki และ คณะ, 2011
Whole-cell	<i>Rhizopus oryzae</i>	น้ำมันคาโนลา	73.9	(Jin และ Bierma, 2010)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	น้ำมันพืชใช้แล้ว	80.9	
ต่าง	โพแทสเซียมไฮดรอก ไซด์	น้ำมันสบู่ดำ	92	(Shah และ คณะ, 2003)
กรด	ซัลฟิวริก	น้ำมันพืช	99	(Schuchardt และคณะ, 1998)

นอกจากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันแล้ว การใช้ลิเพสสามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของขั้นตอน หรือใช้กับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ เช่น

Watanabe และคณะ (2007) ได้ใช้ลิเพสจาก *C. rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพบกรดไขมันอิสระเกิดขึ้น 92 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำกรดไขมันที่ได้ไปทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีเอนไซม์แบบตรึงจากเชื้อ *C. antarctica* มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมงเกิดผลผลิตไบโอดีเซล 96 เปอร์เซ็นต์

Meng และคณะ (2011) ได้ใช้เอนไซม์ลิเพสจาก *Yarrowia lipolytica* ในการไฮโดรไลซีน้ำมันถั่วเหลือง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำกรดไขมันอิสระมาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดไขมันอิสระ 2.89 กรัม และลิเพสที่ตรึงบนตัวค้ำจุน 0.33 กรัม เติมเอทานอล 192 ไมโครลิตร โดยเติมแบบสามขั้น (อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเอทานอล เท่ากับ 1:0.3) ได้ไบโอดีเซล 95 เปอร์เซ็นต์

Adachi และคณะ (2013) ได้ใช้เอนไซม์ลิเพสจาก *C. rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีน้ำมันถั่วเหลือง จากนั้นนำกรดไขมันที่ได้ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซล โดยใช้เชื้อ *R. oryzae* แบบตรึงที่มีการแสดงออกของลิเพสบนผิวเซลล์มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าหลังทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน 6 ชั่วโมง พบปริมาณไบโอดีเซล 90 เปอร์เซ็นต์

Zhou และคณะ (2015) ได้ใช้เอนไซม์ลิเพสจาก *Candida rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีน้ำมันสบู่ดำ ได้กรดไขมันอิสระสูงสุด 90.3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มีการใช้เชื้อ *Rhizopus oryzae* IFO4697 แบบตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ 88.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันต่อเอทานอล 1:1.2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากทำปฏิกิริยา 42 ชั่วโมง

Rakchai และคณะ (2016) ได้ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา *Aspergillus nomius* ST57 แบบตรึงไฮโดรไลซีน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำกรดไขมันไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอดีเซลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ 78.23 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2.6 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตกรดไขมันจากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ

ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ	สารตั้งต้น	ผลผลิตกรดไขมัน (ร้อยละ)	อ้างอิง
<i>Candida rugosa</i> lipase	น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	79.64	(Nguyen และคณะ, 2018)
<i>Candida rugosa</i> lipase	น้ำมันเมล็ดคําฝอย	84.1	(Aziz และคณะ, 2015)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)		90.2	
<i>Candida rugosa</i> lipase	น้ำมันสบูดำ	90.3	(Zhou และคณะ, 2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipase	น้ำมันปาล์ม	89.00	(Gaur และคณะ, 2011)

2.9 ลิเพส

ลิเพส (lipase) มีชื่อเรียกตามระบบ international union of biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Triacylglycerol hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) มอนอกลิเซอไรด์ (monoglyceride) กรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสารตั้งต้นกับชั้นน้ำ

ลิเพสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์คือ E.C 3.1.1.3 โดยตัวอักษรและตัวเลขจะถูกแบ่งเป็นชุดๆ แต่ละชุดแยกจากกันโดยใช้จุดคั่น ตัวเลขในชุดแรกบ่งบอกถึงกลุ่ม (class) ถัดมาตัวเลขชุดที่ 2 และ 3 แสดงถึงปฏิกิริยาที่ถูกระงับ และเลขสุดท้ายบ่งบอกถึงลักษณะการเร่งปฏิกิริยาซึ่งสามารถแยกปฏิกิริยาที่คล้ายออกจากกันได้ (Gandhi, 1997; Thakur, 2012)

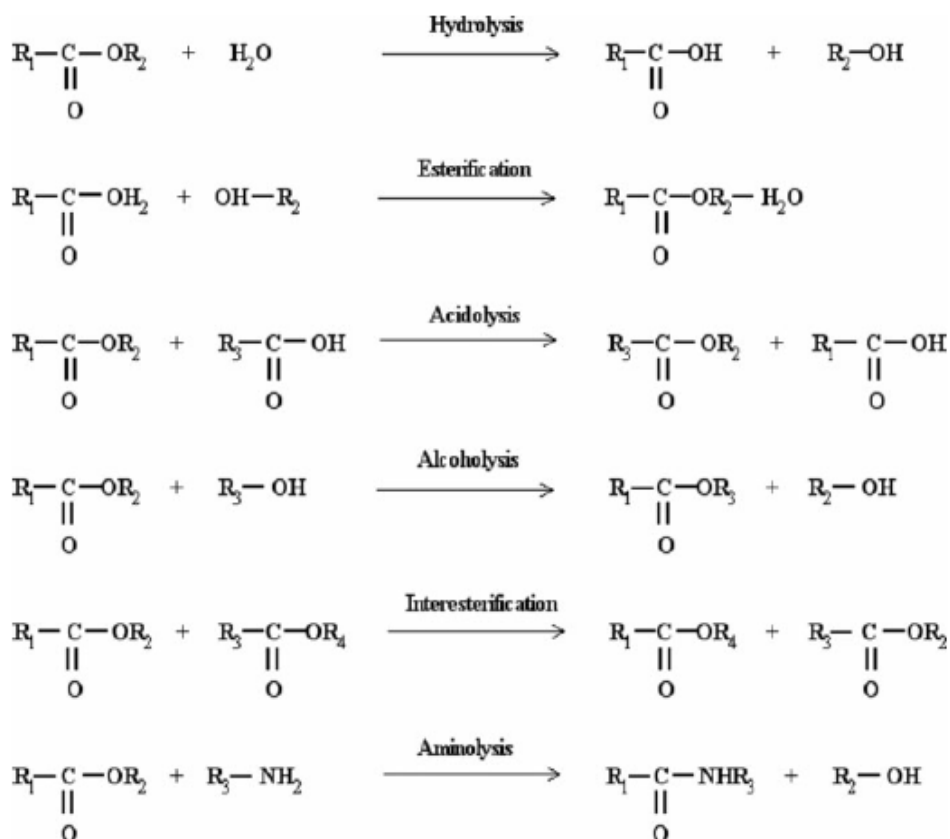
E.C.3.-.- Hydrolases.

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

E.C.3.1.1.- Carboxylic ester hydrolases.

E.C.3.1.1.3 Triglycerol lipase

นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ (Synthesis reaction) ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์จากหมู่คาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์ และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอลคิลของเอสเทอร์ กับแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ตัวใหม่ ที่เรียกว่ามอนอแอลคิลเอสเทอร์



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาต่างๆ ของลิเพส (Singh และ Mukhopadhy, 2012)

2.10 แหล่งที่มาของลิเพส

ลิเพสพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์ลิเพสจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ได้รับความสนใจมากกว่าเอนไซม์ลิเพสที่ได้จากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด เอนไซม์มีความเสถียร สามารถปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (Macrae และ Hammond, 1985)

การผลิตลิเพสจากจุลินทรีย์นั้นยังสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นแหล่งอาหารต่างๆ ในกระบวนการผลิตได้ โดยทำการหมักแบบสถานะแข็ง (solid state fermentation) ซึ่งช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ก็ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (submerged culture) ซึ่งทั้งสองวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่แล้วการผลิตลิเพสมักจะทำในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทเหลว เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสามารถควบคุมตัวแปรต่างๆ ได้ง่ายกว่า เช่น สภาพในการเลี้ยงเชื้อ สารอาหาร รวมทั้งการควบคุมปัจจัยตัวแปรต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตลิเพสของจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พีเอช อุณหภูมิ หรือแม้แต่ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิต (Treichel และคณะ, 2010)

ลิเพสสามารถแบ่งได้ 2 ลักษณะตามแหล่งที่ลิเพสทำงาน ได้แก่ ลิเพสผลิตออกภายนอกเซลล์ (extracellular lipase) และลิเพสภายในเซลล์ (intracellular lipase)

1. ลิเพสผลิตออกภายนอกเซลล์ คือ ลิเพสที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วจะปล่อยออกมาทำงานภายนอกเซลล์ ซึ่งการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยานั้นทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตลิเพสแบบภายนอกเซลล์ จากนั้นทำการคัดแยกลิเพส แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ แต่วิธีนี้มีข้อเสียเนื่องจากความมีความยุ่งยาก ซับซ้อนและมีต้นทุนที่สูงในการคัดแยกลิเพสให้บริสุทธิ์ รวมถึงการตรึงลิเพสลงบนตัวค้ำจุน ดังนั้นจึงมีการศึกษาการนำตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพแบบทั้งเซลล์ (whole cell catalyst) มาใช้เพื่อลดต้นทุนของการผลิตลิเพสในขั้นตอนการคัดแยกและทำให้ลิเพสบริสุทธิ์

2. ลิเพสภายในเซลล์ (intracellular lipase) คือ ลิเพสที่ถูกสร้างขึ้นและทำงานภายในเซลล์ การนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาจะต้องนำทั้งเซลล์ของจุลินทรีย์มาตรึงลงบนตัวค้ำจุนก่อนการนำไปใช้ อย่างไรก็ตามการใช้ลิเพสแบบภายในเซลล์นี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยม เนื่องจากจุลินทรีย์ที่

สามารถผลิต ลิเพสแบบภายในเซลล์นั้นมีจำนวนน้อย จึงทำให้ลิเพสที่ถูกนำมาใช้ทางอุตสาหกรรมมักจะเป็นลิเพสประเภทที่ผลิตออกมาจากเซลล์

นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์บางประเภทที่มีการสะสมลิเพสไว้ในเซลล์ก่อน และเมื่อสภาวะแวดล้อมภายนอกมีความเหมาะสมก็จะปล่อยลิเพสออกมาจากเซลล์ เช่น *Yarrowia lipolytica* และ *Candida lipolytica* ที่มีการสะสมลิเพสไว้จนความเข้มข้นของคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์สูงถึงระดับหนึ่งก่อน แล้วถึงจะปล่อยลิเพสออกมาจากเซลล์ (Ghaly และคณะ, 2010; Gog และคณะ, 2012)

ตารางที่ 2.7 ตัวอย่างยีสต์ที่สามารถผลิตลิเพสได้ (Sharma และคณะ, 2001)

Genus	Species
<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>
	<i>C. albicans</i>
	<i>C. tropicalis</i>
	<i>C. antarctica</i>
	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>C. deformans</i>
	<i>C. curvata</i>
<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>
<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Rh. glutinis</i>
	<i>Rh. pilimornae</i>
<i>Pichia</i>	<i>P. bispora</i>
	<i>P. maxicana</i>
	<i>P. sivicola</i>
	<i>P. xylosa</i>
	<i>P. burtonii</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. lipolytica</i>
	<i>S. crataegenesis</i>

2.11 ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์

เนื่องจากลิเพสแบบภายนอกเซลล์มีต้นทุนที่สูงจากการคัดแยกลิเพสและการทำให้ลิเพสบริสุทธิ์ ทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล จึงเกิดการศึกษและพัฒนาวิธีการเพื่อช่วยลดต้นทุนของลิเพส ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิเพสได้แบบทั้งเซลล์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นับเป็นวิธีที่มีความน่าสนใจ

ปัจจุบันพบว่า มีใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตลิเพสแบบภายในเซลล์โดยมีการตรึงเซลล์ของจุลินทรีย์ลงบนตัวค้ำจุนก่อนการนำไปใช้ ซึ่งมีข้อดี คือ ทำให้สามารถใช้ซ้ำได้หลายครั้งเป็นการช่วยลดต้นทุนของลิเพสได้ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการตรึงเซลล์ลงบนตัวค้ำจุน ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยามีต้นทุนที่สูงขึ้นเช่นกัน ดังนั้นจึงมีการศึกษาการนำเซลล์ของจุลินทรีย์มาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาโดยตรงไม่ต้องผ่านการตรึงลงบนตัวค้ำจุน ซึ่งทำให้สามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการจัดเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ได้ (Ribeiro และคณะ, 2011)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบทั้งเซลล์ เพื่อช่วยพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้ได้ผลผลิตสูงและลดต้นทุนลง เนื่องจากยีสต์สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่แพงแต่สามารถเก็บเกี่ยวเชื้อได้ในปริมาณที่สูง นอกจากนี้การใช้ยีสต์แบบทั้งเซลล์ไม่ต้องผ่านการคัดแยกและไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมลิเพสลง นอกจากนี้ยีสต์บางสายพันธุ์ก็สามารถผลิตลิเพสออกมานอกเซลล์ได้ (Sharma และคณะ, 2001)

Candida rugosa

C. rugosa เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตลิเพสที่มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นยีสต์ที่มีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สูง มีศักยภาพในการผลิตลิเพสที่มีสมบัติที่ดี มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นได้หลากหลาย เนื่องจากลิเพสที่ผลิตนั้นจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ จึงสามารถไฮโดรไลซิสกรดไขมันได้ทุกตำแหน่ง (Benzonana และ Esposito, 1971; Macrae, 1983) ด้วยคุณสมบัติที่เด่นในการผลิตลิเพส จึงมีการนำ *C. rugosa* มาใช้ประโยชน์ใช้อุตสาหกรรมที่หลากหลาย

Aureobasidium pullulans

Aureobasidium pullulans จัดเป็นเชื้อราคล้ายยีสต์สายพันธุ์เมืองร้อนชนิดหนึ่ง พบได้มากในพื้นที่ดินและในน้ำ มีลักษณะเป็นสีดำเข้ม จึงเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อว่ายีสต์สีดำ (Black yeast) ซึ่งเกิดจากการผลิตเม็ดสีด้วยตัวเอง

A. pullulans มีรูปร่างในลักษณะที่เรียกว่ามีลักษณะที่หลากหลาย (Polymorphic forms) เช่น เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเส้นใย ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมระหว่างการเจริญเติบโต โดย *A. pullulans* มีสามประเภท ได้แก่ *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum* และ *A. pullulans* var. *Aubasidani* Yurlova (Yurlova และ De Hoog, 1997) นอกจากนี้ *A. pullulans* นั้นยังจัดเป็นยีสต์ที่สามารถผลิตลิพิดออกมานอกเซลล์ และสามารถพบได้ในประเทศไทยด้วย

2.12 เทคโนโลยีการแสดงผลที่ผิวเซลล์ยีสต์

เทคโนโลยีการแสดงผลที่ผิวเซลล์ยีสต์ (yeast surface display or arming technology) เป็นเทคโนโลยีที่โปรตีนหรือเพปไทด์เป้าหมายจะถูกทำให้มีการแสดงผลที่บริเวณผิวเซลล์ของยีสต์โดยการเชื่อมต่อกับโปรตีนฐาน (anchoring protein) ซึ่งเชื้อยีสต์ที่มีการแสดงผลของโปรตีนหรือเพปไทด์เป้าหมายที่ผิวเซลล์จะถูกเรียกว่า อาร์มมิงยีสต์ (Arming yeast) (Ueda และ Tanaka, 2000) เทคโนโลยีการแสดงผลที่ผิวเซลล์ยีสต์นี้มีข้อได้เปรียบกว่าการแสดงผลโปรตีนเป้าหมายในเซลล์ (intracellular expression) และการแสดงผลออกโปรตีนเป้าหมายโดยการหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular expression) กล่าวคือ การที่โปรตีนมีการแสดงผลที่ผิวเซลล์โดยการยึดติดกับผนังเซลล์ยีสต์จะทำให้โปรตีนเป้าหมายนั้นมีสภาพเป็นโปรตีนที่ถูกตรึง (immobilized protein) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีผลทำให้โปรตีนมีความทนทาน (stability) มากยิ่งขึ้น (Su และคณะ, 2010) รวมถึงการเตรียมเชื้อยีสต์ที่มีโปรตีนหรือเพปไทด์ติดอยู่ที่ผิวเซลล์สามารถทำได้โดยผ่านกระบวนการเลี้ยงเชื้อ (cell cultivation) เท่านั้น ซึ่งถือว่าเป็นการรวมกระบวนการผลิตโปรตีนและกระบวนการตรึงโปรตีนเข้ามาเป็นเพียงหนึ่งกระบวนการทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายได้ นอกจากนี้โปรตีนหรือเพปไทด์ที่ยึดติดที่ผิวเซลล์ของยีสต์สามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่มีขนาดใหญ่หรือมีมวลโมเลกุลมากที่อยู่ด้านนอกเซลล์ได้โดยตรงซึ่งสารเคมีที่มีขนาดใหญ่เหล่านี้มักไม่สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ (Kuroda และ Ueda, 2013)

เทคนิคการแสดงออกที่ผิวของเซลล์ช่วยให้เปปไทด์เป้าหมายหรือโปรตีนสามารถแสดงออกบนผิวเซลล์ยีสต์โดยผ่านการเชื่อมกับโปรตีนฐาน ที่มีวิธีในการเชื่อมต่อ 2 แบบ คือ 1) การเชื่อมต่อแบบ N-terminal fusion (target protein–anchor protein fusion) และ 2) C-terminal fusion (anchor protein–target protein fusion) (Liu และคณะ, 2014) ดังแสดงดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 การเชื่อมต่อระหว่างโปรตีนเป้าหมายและโปรตีนฐานแบบ N-terminal fusion และ C-terminal fusion

Pichia pastoris

P. pastoris เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญเติบโต (methylotrophic yeast) และมีการพัฒนาจนสามารถใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตเฮเทอโรโลจัสโปรตีนออกมานอกเซลล์ เช่น โปรตีนของพวกยูแคริโอต เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกลงและไม่ซับซ้อน มีระดับการแสดงออกของเฮเทอโรโลจัสโปรตีนที่สูงในระดับกรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งสามารถใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมได้ง่ายเช่นเดียวกับ *S. cerevisiae* และเป็นเซลล์ให้อาศัยที่มีประสิทธิภาพ (Ciftci และ Temelli, 2013) โดยข้อดีของการใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านนั้น ได้แก่ สามารถหลั่งเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ในปริมาณมากสามารถเติบโตในเอทานอลได้ และมีอัตราการเติบโตเร็วแม้มีความหนาแน่นของเซลล์มาก สามารถสกัดโปรตีนออกมาได้ง่าย และได้ปริมาณมาก โปรตีนที่ผลิตมีการหมุนพับของโมเลกุลที่ถูกต้อง มีกระบวนการปรับแต่งพอลิเพปไทด์หลังการแปลรหัส และเอนไซม์ที่ผลิตมีเอกทิวติที่สูง (Boonvitthya และคณะ, 2012)

ปัจจุบันมีการนำ *P. pastoris* มาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบสำหรับการศึกษาในระบบการแสดงออกเฮเทอโรโลจัส เนื่องจากมีการศึกษาข้อมูลมาเป็นเวลานาน และมีภาวะที่ใช้ในการเจริญเติบโตคล้ายกับ *S. cerevisiae* ผลจากการพัฒนาระบบนี้ทำให้มีเวกเตอร์ โปรโมเตอร์ สัญญาณการผลิตโปรตีน เครื่องหมายในการคัดเลือก และสายพันธุ์ที่นำมาใช้นั้นอยู่ในรูปแบบที่หลากหลายให้เลือกใช้

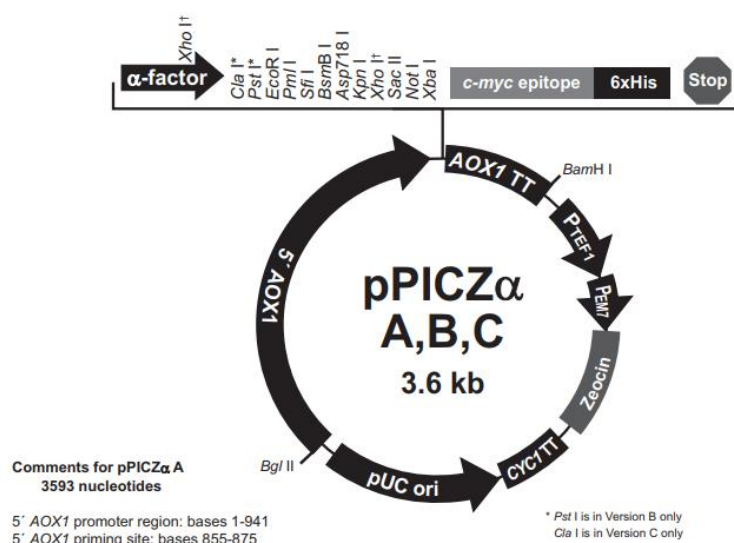
ระบบควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน

ระบบควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบการควบคุมแบบเหนี่ยวนำ (inducible expression system) และระบบควบคุมการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive expression system) (Zhang และคณะ, 2009)

1. ระบบการควบคุมแบบเหนี่ยวนำ เป็นระบบที่อาศัยการทำงานของโปรโมเตอร์ AOX1 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกในระดับสูง (strong inducible promoter) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน alcohol oxidase1 (AOX1) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำเพื่อให้มีการแสดงออกของยีน ซึ่งข้อดีของระบบนี้คือ สามารถกำหนดเวลาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนได้

2. ระบบควบคุมการแสดงตลอดเวลา การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนจากโปรโมเตอร์ในกลุ่มนี้จะแสดงออกอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมซึ่งโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้คือ โปรโมเตอร์ GAP ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกในระดับสูง (strong constitutive promoter) โดยจะควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ในการศึกษาการแสดงออกที่ผิวเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* ครั้งนี้ได้ใช้ระบบการควบคุมแบบเหนี่ยวนำ ที่อาศัยการทำงานของโปรโมเตอร์ AOX1 บนเวกเตอร์ pPICZ α



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างเวกเตอร์ pPICZ α A (invitrogen)

การใช้เวกเตอร์ pPICZ α A ในระบบการแสดงออกของยีนของ *P. pastoris* นั้นมีข้อดี คือ pPICZ α A ประกอบด้วยส่วนของโพรโมเตอร์ AOX1 ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนได้ในระดับสูงด้วยเมทานอล นอกจากนี้เวกเตอร์ pPICZ α A ยังประกอบด้วย α -factor prepeptide จาก *S. cerevisiae* ซึ่งช่วยให้ *P. pastoris* สามารถผลิตโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้ และมี C-terminal (His)6 tag ติดอยู่เพื่อช่วยในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้เวกเตอร์ pPICZ α A ยังมีส่วนของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ Zeocin ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้ว (Boonvitthya และคณะ, 2012)

โพรโมเตอร์ AOX1 เป็นโพรโมเตอร์ที่ต้องอาศัยการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล โดยเป็นโพรโมเตอร์หลักที่ทำให้ *P. pastoris* มีการแสดงออกของโปรตีนที่ได้รับมาจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้สำเร็จ โพรโมเตอร์ AOX1 ถูกนำไปใช้ในการพัฒนาดีเอ็นเอเวกเตอร์และใช้ประโยชน์ทางด้านพันธุวิศวกรรม แม้ว่าโพรโมเตอร์นี้มีประสิทธิภาพสูงแต่จำเป็นต้องใช้เมทานอลในการเหนี่ยวนำ ซึ่งเมทานอลเป็นสารไวไฟและอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากโพรโมเตอร์ AOX1 มี

ประสิทธิภาพสูงมาก จึงทำให้มีการแสดงออกของยีนในระบบเฮเทอโรโลจัสสูงมากขึ้นไปด้วย ดังนั้นระบบที่ใช้โพรโมเตอร์ AOX1 จึงเป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน (Kuwaie และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างลิเพสที่มีการนำไปแสดงออกบนผิวเซลล์ของยีสต์ (Liu และคณะ, 2014)

Lipase origin	Size	Yeasthost	Promoter	Anchor protein
<i>Rhizopus oryzae</i>	366aa	<i>S. cerevisiae</i>	UPR-ICL	Flo1p (FL)
Lipase (ROL)	366aa	<i>S. cerevisiae</i>	UPR-ICL	Flo1p (FS)
	1179bp	<i>S. cerevisiae</i>	UPR-ICL	Flo1p (FS)
	366aa	<i>S. cerevisiae</i>	GAPDH	α -Agglutinin
	35 kDa	<i>Sake yeast</i>	SED800	Flo1p (FS)
<i>Geotrichum candidum</i> lipase (GCL)	1692bp	<i>P. pastoris</i>	AOX1	Flo1p
<i>Rhizomucor Miehei</i> Lipase (RML)	269aa	<i>P. pastoris</i>	AOX1	Flo1p
	269aa	<i>P. pastoris</i>	AOX1	Flo1p
	1205 bp	<i>S. cerevisiae</i>	GAPDH	α -Agglutinin
<i>Geotrichum</i> sp. Lipase (GSL)	1692 bp	<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	Aga2of a-agglutinin
	1692 bp	<i>P. pastoris</i>	AOX1 and FLD1	Aga2of a-agglutinin
<i>Candida antarctica</i> lipase B (CALB)	1029 bp	<i>P. pastoris</i>	AOX1	Gcw21p
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	α -Agglutinin
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	Flo1p (FS)
		<i>S. cerevisiae</i>	UPR-ICL	Flo1p (FS)
		<i>S. cerevisiae</i>	GAPDH	α -Agglutinin
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	Flo1p (FS)
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	Flo1p (FL)
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW5
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW12
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW14
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW19
		<i>P. pastoris P. pastoris</i>	AOX1	GCW21
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW22
		<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW23
<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW26		
<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW28		
<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW30		
<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW34		
<i>P. pastoris</i>	AOX1	GCW42		

ซึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพยีสต์ที่มีการแสดงออกของลิเพสที่ผิวเซลล์นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

Yan และคณะ (2014) ได้ศึกษาการแสดงออกบนผิวเซลล์ของยีสต์และนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซลโดยมีน้ำมันพืชที่ใช้แล้วเป็นสารตั้งต้น ซึ่งได้

นำยีนลิเพสจาก *Thermomyces lanuginosus* ไปแสดงออกบนผิวเซลล์ของยีส *P. pastoris* พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ 82 เปอร์เซ็นต์

Jin และคณะ (2013) ได้สร้างยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *Candida antarctica* (CALB) lipase B และ *Rhizomucor miehei* lipase (RML) บนผิวเซลล์ และนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลโดยมีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้น ซึ่งได้ผลผลิตไบโอดีเซล 90 เปอร์เซ็นต์

Han และคณะ (2009) ได้สร้างยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจาก *Rhizomucor miehei* บนผิวเซลล์และนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลพบว่า สามารถผลิตไบโอดีเซลได้ 96 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง

Huang และคณะ, (2012) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของลิเพสจาก *Rhizomucor miehei* บนผิวเซลล์ โดยมีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้น ได้ผลผลิตไบโอดีเซล 83.14 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง

2.13 ลิเพสและยีนของ *Candida rugosa*

C. rugosa เดิมมีชื่อว่า *Candida cylindracea* โดยเอนไซม์ลิเพสที่ผลิตจาก *C. rugosa* เรียกว่า CRL จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตกรดไขมันอิสระ การสังเคราะห์สารเอสเทอร์ และความสามารถในการแยกสารผสมราซิมิก (racemic mixture) เป็นต้น จากการศึกษาของ Brocca และคณะ (1998) ได้ทำการแยกและโคลนยีนลิเพสที่แตกต่างกัน และพบว่ายีนลิเพสทั้ง 5 ยีน ของ *C. rugosa* ตั้งอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งหมดเกิดจากการเพิ่มซ้ำของยีน (gene duplication)

Lee และคณะ (1999) ศึกษาคลุ่มยีนลิเพสและยีนที่เกี่ยวข้องของ *C. rugosa* และระบุชื่อเป็น Lip ซึ่งพบว่าลิเพสประกอบไปด้วยอย่างน้อย 5 ไอโซไซม์ เรียกว่า Lip1 ถึง Lip5 หรืออาจเรียกว่า CRL1 ถึง CRL5 โดยไอโซไซม์ทั้งหมดนี้มีลำดับกรดแอมิโนที่คล้ายกันมาก แต่ก็มีคุณสมบัติและความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่ต่างกัน และเมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของกลุ่มยีน Lip จากแนวโน้มของปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนที่สร้างขึ้น โดยเรียงจากมากไปน้อย

เป็นดังนี้ Lip1, Lip3, Lip2, Lip5 และ Lip4 ตามลำดับ และพบว่ายีนของ Lip1 และ Lip3 แสดงออกได้อย่างต่อเนื่อง (constitutive gene) ในขณะที่ยีนอื่นต้องมีสารเหนี่ยวนำเพื่อการแสดงออก (inducible gene)

นอกจากนี้ Lopez และคณะ (2004) ได้ศึกษาแอกทิวิตีของลิเพสบริสุทธิ์จาก *C. rugosa* คือ Lip1, Lip2 และ Lip3 ในน้ำและสารตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า Lip1 และ Lip3 มีความเสถียรคล้ายๆ กัน ในขณะที่ Lip2 มีความเสถียรน้อยที่สุด และยังพบอีกว่า Lip3, Lip1 และ Lip2 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไตรเอซิลกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน โดยเหมาะสมต่อไตรเอซิลกลีเซอไรด์สายสั้น สายกลาง และสายยาวตามลำดับ

2.14 ลิเพสและยีนของ *Aureobasidium melanogenum*

A. melanogenum เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตลิเพสได้สูง โดย Vitisant และคณะ (2013) ได้ทำการคัดแยก *A. melanogenum* SRY14-3 จากแผ่นโฟมที่ปนเปื้อนน้ำมัน ที่เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี โดยพบว่า *A. melanogenum* ไอโซเลต SRY14-3 มีความสามารถในการผลิตลิเพสได้สูงกว่าไอโซเลตอื่นมาก

จากการศึกษาของ (Wongwatanapaiboon และคณะ, 2016) ได้ทำการโคลนยีนลิเพสจาก *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY14-3 และนำไปแสดงออกใน *P. pastoris* เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตลิเพสพบว่าเมื่อเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 6 วันจะให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงสุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติของลิเพสที่ผลิตได้ด้วย

จากการศึกษาของ Liu และคณะ (2008) ที่ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมจากลิเพสของ *A. pullulans* HN2.3 พบว่าการทำงานของลิเพสเหมาะสมในสภาวะที่เป็นด่าง pH 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมของลิเพสจาก *A. pullulans* อยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter paper)	(Whatman, England)
กระดาษกรอง PTFE (Membrane disc Filter, Dia. 47 mm, pore size 0.45 µm)	(National scientific, USA)
กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal laser scanning microscope)	(Olympus, Japan)
คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Model: Shim-pack VX-SIL, length 250 mm, i.d. 4.6 mm)	(Shimadzu, Japan)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirring hotplate)	(Thermolyne, USA)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator)	(Witeg wisd, Germany)
เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	(Memmert, Germany)
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง รุ่น LC-20A (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	(Shimadzu, Japan)
เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200 (Digital balance)	(Diethelm, Thailand)
เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น OHAUS (Digital balance)	(Newyonghua, Thailand)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)	(Daihan Scientific, Korea)
เครื่องปั่น (Blender)	(Moulinex, France)

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge)	(Hermle Labortechnik, Germany)
เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR thermo cycler)	(Biorad, USA)
เครื่องถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gene pulser)	(Biorad, USA)
เครื่องถ่ายเจล (Gel documentation)	(Biorad, USA)
เครื่องทำเซลล์แห้ง (Freeze dryer)	(MechaTech,UK)
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)	(Bio-Active, Thailand)
เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (IQ Scientific Instruments pH meter)	(P.Intertrade, Thailand)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Epoch Microplate reader spectrophotometer)	(BioTek, USA)
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Victor3™ Plate Reader)	(PerkinElmer, USA)
ชุดกรองสารแบบสุญญากาศ (Suction flask, Buchner funnel)	(Sartorius, Germany)
ปั๊มกรองสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ (Vacuum pump)	(GAST, USA)
ตัวกรองไนลอน (Syringe Filter Nylon, Dia. 13 mm, pore size 0.22 μm)	(National scientific, USA)
ตัวกรอง PTFE (Syringe Filter PTFE, Dia. 13 mm, pore size 0.22 μm)	(National scientific, USA)
ดีเทคเตอร์อีแอลเอสดีสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ (Shimadzu,Japan)	
สมรรถนะสูง (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)	
ตู้อบเชื้อ (Incubator)	(Schwabach, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (Streamline Laboratory products,	

(Vertical Laminar Flow Cabinet)	Singapore)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)	(Schwabach, Germany)
หลอดรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV lamp)	(Sylvania, Japan)

สารเคมี

กรดซิตริก (Citric acid)	(Ajax Finechem, New Zealand)
กรดฟอร์มิก (Formic acid)	(Scharlau, Spain)
กรดปาล์มิติก (Palmitic acid)	(Sigma, USA)
กรดปาล์มิติกเมทิลเอสเทอร์ (Palmitic acid methyl ester)	(Sigma, USA)
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	(Labscan, Thailand)
กลีเซอรอล (Glycerol)	(Univar, India)
คลอโรฟอร์ม (Chloroform)	(Labscan, Thailand)
ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล (Gel extraction kit)	(Thermo Scientific, USA)
ชุดโคลนนิ่ง pJET 1.2 blunt (CloneJET PCR Cloning Kit)	(Thermo Scientific, USA)
ชุด DNA purification (DNA purification kit)	(Thermo Scientific, USA)
ชุด NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	(Biolab, USA)
ซีโอซิน (Zeocin)	(Invitrogen, Sweden)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Scharlau, Spain)
ซอร์บิทอล (Sorbitol)	(Univar, India)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	(Ajax Finechem, Australia)
ทริส (Tris)	(Ajax Finechem, Australia)

น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	(บริษัทมรกต จำกัด, Thailand)
น้ำตาลกลูโคส (D-Glucose)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำตาลซูโครส (Sucrose)	(Ajax Finechem, Australia)
บัฟเฟอร์ 10x T4 DNA ligase (10x T4 DNA ligase buffer)	(Thermo Scientific, USA)
บัฟเฟอร์ B (10x B buffer)	(Thermo Scientific, USA)
บัฟเฟอร์ BamHI (10x BamHI buffer)	(Thermo Scientific, USA)
บัฟเฟอร์ O (10x O buffer)	(Thermo Scientific, USA)
บัฟเฟอร์ R (10x R buffer)	(Thermo Scientific, USA)
บัฟเฟอร์ Tango (10x Tango buffer)	(Thermo Scientific, USA)
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA)	(Merck, Germany)
ไบโอติน (Biotin)	(Biobasic, Canada)
เปปโตน (Peptone)	(Difco, France)
พารา-ไนโตรฟีนอล (<i>p</i> -Nitrophenol, <i>p</i> NP)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิลลอเรต (<i>p</i> -Nitrophenyl Laurate: C ₁₂ , <i>p</i> NPL)	(Sigma, USA)
พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรต (<i>p</i> -nitrophenyl butyrate, <i>p</i> NPB)	(Aldrich, Germany)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	(Merck, Germany)
โพลีเอทิลีน ไกลคอล 4000 Polyethylene Glycol 4000 (PEG 4000)	(Thermo scientific, USA)
เมทานอล (Methanol)	(Labscan, Thailand)
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	(Merck, Germany)
ยีสต์ ไนโตรเจน เบส (Yeast nitrogen base)	(Difco, France)
สารเบรด์ฟอร์ด (Bradford's reagent)	(Biorad, USA)
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	(Himedia, India)
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	(Himedia, India)
สารมาตรฐานผสมแพตตีแอสิตเมทิลเอสเทอร์คาร์บอน 12-	(Sigma, USA)

24 (Standard Mix Fatty acid methyl ester C12-C24)	
สาร Anti Flag M2	(Sigma,USA)
สาร Alexa Fluor 647 dye Goat anti-mouse IgG (H+L)	(Thermo scientific, USA)
อะซิโตน (Acetone)	(Labscan, Thailand)
เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>BstBI</i> , <i>DraI</i> , <i>PmeI</i> , <i>XhoI</i> , <i>ArvI</i>	(Thermo scientific, USA)
เอทิลแอสีเทต (Ethyl acetate)	(Labscan, Thailand)
เอ็นไซม์ T4 DNA ligase	(Thermo scientific, USA)
แอมพิซิลลิน (Ampicillin)	(Biobasic, Canada)
เฮกเซน (<i>n</i> -Hexane)	(Fisher, Thailand)
1-โมนอโอเลอยล-แร็ก-กลีเซอรอล (1-Monooleoyl-rac-glycerol: C18:1-CIS-9, MAG)	(Sigma, USA)
1,2-ไดโอเลอยล-แร็ก-กลีเซอรอล (1,2-Dioleoyl-rac-glycerol: C18:1-CIS-9, 1,2-DAG)	(Sigma,USA.)
1,3-ไดโอเลอิน-แร็ก-กลีเซอรอล (1,3-Diolein: C18:1-CIS-9, 1,3-DAG)	(Sigma,USA.)
2-โพรพานอล (2-propanol,Isopropyl alcohol: (CH ₃) ₂ CHOH)	(Labscan,Thailand)
2-เมทิล-2บิวทานอล (2-methyl-2 butanol)	(Aldrich, Germany)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เพาะเลี้ยง *C. rugosa* ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

เลี้ยงยีสต์ในอาหารกึ่งแข็ง Yeast Malt Agar (YMA) (ภาคผนวก ก) ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเชี่ยโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Yeast Malt Broth (YMB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพส (lipase production medium for *C. rugosa* : LPMC) (ภาคผนวก ก) ที่ปรับให้เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *C. rugosa* โดยเริ่มต้นหัวเชื้อในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3-0.4 ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำมันปาล์ม 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเหนียวนำไปผลิตลิเพส บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (Theerachat และคณะ, 2017) และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของลิเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนอลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น และแยกกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์ม (ส่วนบน) ไปใช้เป็นตัวเหนียวนำไป *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ผลิตเอนไซม์ลิเพสต่อไป

สำหรับการวิเคราะห์กรดไขมันอิสระจะนำตัวอย่างที่ได้ทั้งพลาสติกไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2-3 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างชั้นคลอโรฟอร์ม แล้วนำไประเหย จากนั้นนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไขมันอิสระด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) ตามวิธีการในข้อ 3.3.4

3.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนียวน้ำ และตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต

3.2.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนียวน้ำ

เลี้ยงยีสต์ในอาหาร YMA ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานเพาะเชื้อ แล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงต่อในอาหาร YMB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับผลิตลิเพส (lipase production medium for *A. pullulans* : LPMP) โดยเริ่มต้นหัวเชื้อในอาหารที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3-0.4 ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 เพื่อเหนียวน้ำให้ผลิตลิเพส บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของลิเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนอลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 และกิจกรรมจำเพาะของลิเพสที่เวลาต่างๆ

ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว YMB เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสสูตรปรับปรุงที่ได้จากการศึกษามาในข้อ 3.2.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นศึกษาการเจริญด้วยวิธี colony forming unit โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 3 6 9 12 18 24 48 72 96 120 144 และ 168 ชั่วโมง ด้วยการดูสูตรแขวนลอยเซลล์ยีสต์ในช่วงเวลาที่แตกต่างกันนี้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำเป็นสารละลายเชื้อ

จางลดความเข้มข้นลงตามลำดับด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ทำการเจือจางเป็น 10^{-1} ถึง 10^{-8} จากนั้นทำการดูดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 168 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ โดยเลือกตัวอย่างในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนเซลล์ยีสต์ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เหลือมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของลิเพสที่ยีสต์ผลิตได้ แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างการเจริญเติบโต และการผลิตลิเพสของยีสต์ที่เวลาต่างๆ

3.2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ลิเพส ของ *C. rugosa* และ *A. pullulans* var.

melanogenum 14-3

เก็บตัวอย่างที่ได้มาแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของลิเพส วิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิทรี โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรต (p-nitrophenyl butyrate : p-NPB) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้น หาปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol : p-NP) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 0-0.24 มิลลิโมลาร์

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit : U) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Piamtongkam และคณะ, 2011) (ภาคผนวก ข)

3.2.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

เก็บตัวอย่างที่ได้มาวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford's method) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐานซึ่งใช้สารละลาย

มาตรฐานจากซีรัมของลูกวัว (Bovine serum albumin, BSA) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-0.4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร (Bradford, 1976)

3.3 หากภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์ม โดยใช้ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3.3.1 การเตรียมตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ *A. pullulans* var. *melanogenum* 14-3

นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* 14-3 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งมาเลี้ยงลงในอาหารเหลว YMB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อ จากอาหาร YMB ลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิต ลิเพสที่ปรับให้เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* 14-3 โดยการเติมกรดไขมันอิสระ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเริ่มต้นหัวเชื้อในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3-0.4 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งเป็น ชั่วโมงที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จากการทดลองในข้อ 3.2.1

3.3.2 ศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการ ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเร่งปฏิกิริยาด้วย *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ในการ ผลิตไบโอดีเซล

โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลต่างๆ กัน ได้แก่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 โดยแบ่งเติมเมทานอล ออกเป็นระยะ (แต่ละครั้งมีจำนวนโมลและระยะเวลาใน การเติมเมทานอลที่เท่ากัน) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2-3 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็น เวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใสชั้นบน (ชั้นคลอโรฟอร์ม) ทำการระเหยชั้นคลอโรฟอร์ม จากนั้น นำตัวอย่างไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอดีเซลหรือ Fatty Acid Methyl Ester (FAME)

ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Leelaruji และคณะ, 2013; Shimada และคณะ, 2002) เลือกอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่ให้ไบโอดีเซลสูงสุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเร่งปฏิกิริยาด้วย *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ในการผลิตไบโอดีเซล

เติมอัตราส่วนโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่ให้ไบโอดีเซลสูงสุดจากข้อ 3.3.2 ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 72 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2-3 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใสชั้นบน (ชั้นคลอโรฟอร์ม) ทำการระเหยชั้นคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอดีเซลหรือ FAME ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.3.4 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.3.4.1 การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Shimadzu LC-20 A series, Japan)

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แก่ สารประกอบด้วยเฮกเซน (100 v/v) สารบี ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอสทิลอะซิเตต (42.5 : 10 : 5 v/v) สารในสายล้างเข็ม (injector) ประกอบด้วย เฮกเซน (100 v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิเมตรต่อนาที ใช้ Shim-pack VX-SIL ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร โดยใช้ ELSD เป็นเครื่องตรวจวัด (detector) สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.3.4.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีด โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

นำตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาในข้อ 3.1, 3.3.2 และ 3.3.3 ที่ระเหยคลอโรฟอร์มออกไปแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ละลายในเฮกเซน 990 ไมโครลิตร เพื่อให้เจือจาง จากนั้นฉีดตัวอย่างลงในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เพื่อวัดปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่เหลือ หรือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสำหรับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทิลเอสเทอร์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Leelaruji และคณะ, 2013)

3.4 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* KM 71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากยีสต์ *C. rugosa* และ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์

3.4.1 การเตรียมเวกเตอร์เพื่อใช้ในการโคลนนิ่งเอนไซม์ลิเพสและโปรตีนฐาน (anchoring protein) สำหรับการแสดงออกที่ผิวเซลล์ยีสต์

นำเวกเตอร์ pPICZ α (Invitrogen) มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ (1) *NotI* กับ *EcoRI* และ (2) *NotI* กับ *BstBI* ได้เป็น pPICZ α /*NotI*/*EcoRI* (3,543 bp) และ pPICZ α /*NotI*/*BstBI* (3,268 bp) ซึ่งเวกเตอร์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะถูกนำไปทำการเชื่อมต่อกับ (ligation) กับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสและโปรตีนฐานต่อไป

3.4.2 การเตรียมยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสจากเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* และโปรตีนฐานสำหรับเชื่อมต่อกับเวกเตอร์

ทำการสังเคราะห์ยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสจากเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 (Wongwatanapaiboon และคณะ, 2011) คือ N-term AML และ C-term AML_Stop และสังเคราะห์ชิ้นส่วนโปรตีนฐาน คือ 11-kp Anchor และ PpPIR1 Anchor flag จากนั้นนำชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทำการ sub-cloning โดยการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET 1.2 Blunt แล้วจึงทำการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นตรวจสอบผล

การเชื่อมต่อยีนที่ต้องการด้วยวิธี restriction digestion โดยการนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II หรือวิธี colony PCR แล้วจึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป

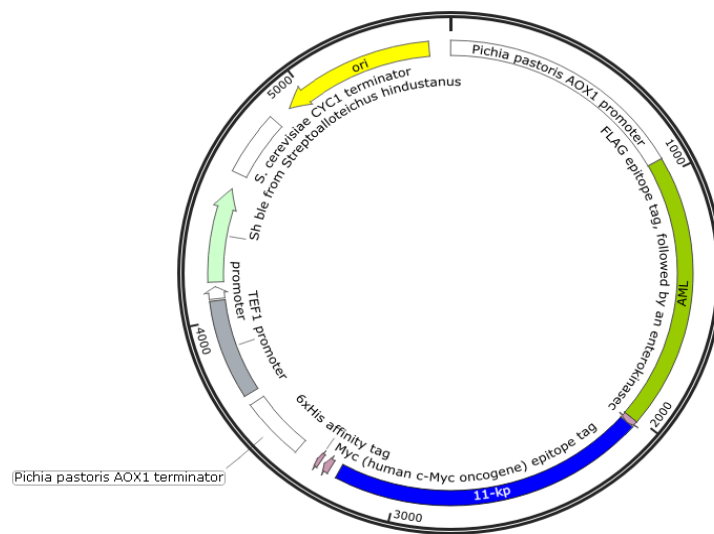
นำชิ้นส่วนโปรตีนฐานและยีนที่สร้างเอนไซม์ลิเพสมาเชื่อมต่อกันด้วยวิธี Gene assembly โดยที่ยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส N-term AML (1,212 คู่เบส) คู่กับโปรตีนฐาน 11-kp Anchor (1,038 คู่เบส) และโปรตีนฐาน PpPIR1 Anchor flag (1,233 คู่เบส) คู่กับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส C-term AML_Stop (1,236 คู่เบส) และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของโปรตีนฐานกับชิ้นยีนดังกล่าวโดยวิธี PCR และทำการ sub-cloning โดยการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET 1.2 Blunt แล้ว transformation เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นตรวจสอบผลการเชื่อมต่อยีนที่ต้องการด้วยวิธี colony PCR แล้วจึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป

หลังจากตรวจสอบผล DNA sequencing ของพลาสมิดแล้ว จะนำเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัดชิ้นส่วนคู่โปรตีนฐานกับชิ้นยีนออกจากเวกเตอร์ pJET 1.2 Blunt โดยที่คู่ของ N-term AML & 11-kp Anchor จะตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I กับ *Eco*RI ได้เป็น N-term AML & 11-kp Anchor /*Not*I /*Eco*RI และ PpPIR1 Anchor flag & C-term AML_Stop จะตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not*I กับ *Bst*BI ได้เป็น PpPIR1 Anchor flag & C-term AML_Stop /*Not*I /*Bst*BI

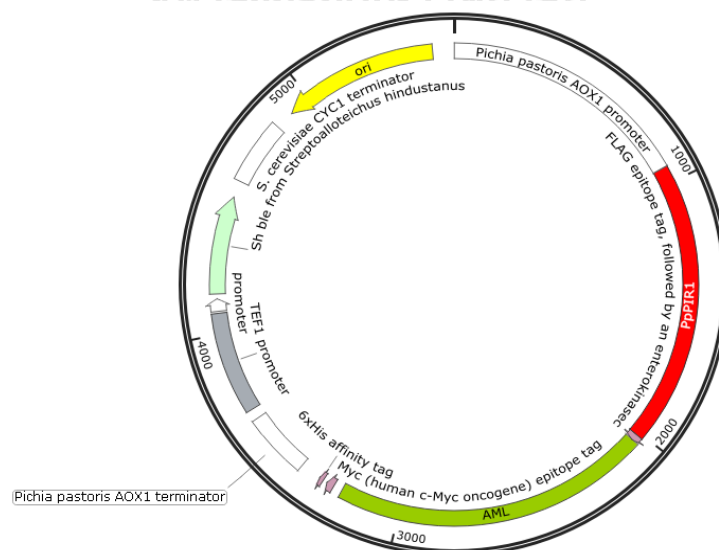
3.4.3 การสร้างเวกเตอร์ pPICZ α ที่มีโปรตีนฐานเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส

นำชิ้นส่วนคู่โปรตีนฐานและยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสดังกล่าวมาเชื่อมต่อกันกับเวกเตอร์ ที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ 3.4.2 ด้วยเอนไซม์ T4 ligase โดยจะเชื่อมต่อ pPICZ α /*Not*I/*Eco*RI เข้ากับ N-term AML & 11-kp Anchor/*Not*I/*Eco*RI (ได้เป็น pPICZ α _AML_11-kp) และเชื่อมต่อ pPICZ α /*Not*I/*Bst*BI เข้ากับ PpPIR1 Anchor flag & C-term AML_Stop /*Not*I /*Bst*BI (ได้เป็น pPICZ α _PpPIR1_AML)

ทำการส่งถ่ายเวกเตอร์ pPICZ α _ AML_11-kp (ประมาณ 5,645 คู่เบส) และ pPICZ α _ PpPIR1_ AML (ประมาณ 5,582 คู่เบส) เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นตรวจสอบผลการเชื่อมต่อกับโปรตีนฐานและยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสด้วยวิธี colony PCR แล้วจึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป



ภาพที่ 3.1 โครงสร้าง pPICZ α _ AML_11-kp



ภาพที่ 3.2 โครงสร้าง pPICZ α _ PpPIR1_ AML

3.4.4 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* KM71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์

ทำการส่งถ่าย (1) pPICZ α _AML-11-kp และ (2) pPICZ α _PpPIR1_ AML เข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* KM71 ด้วยวิธีส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้นตรวจสอบโคลนของยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสบนผิวเซลล์ด้วยวิธี colony PCR และ นำโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp และ *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1_ AML ไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ที่ความเข้มข้น 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสุ่มเลือกโคลนที่สามารถเจริญเติบโตได้ และทำการเพาะเลี้ยงใน tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงที่สุดเพื่อคัดเลือกไปศึกษาในระดับ shake flask ต่อไป และหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ โดยวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน

3.4.5 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากยีสต์ *Candida rugosa* ที่ผิวเซลล์

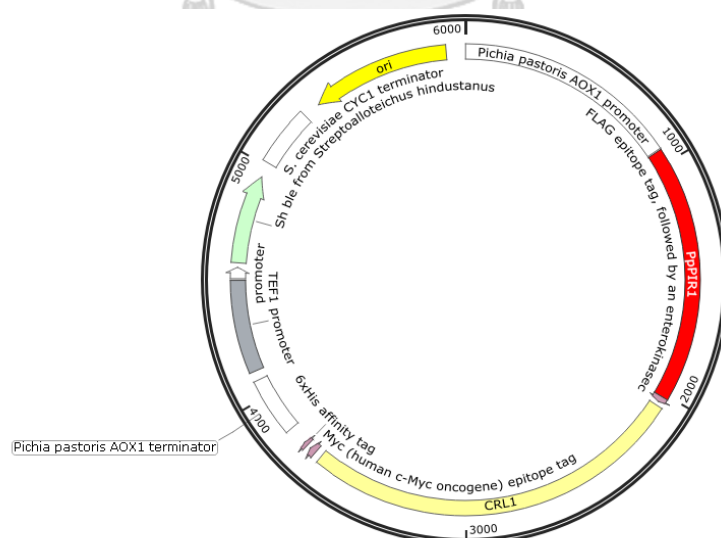
3.4.5.1 การสร้างเวกเตอร์ pPICZ α ที่มีโปรตีนฐานเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL ของ *C. rugosa*

จากผลการทดลองในข้อ 3.4.4 พบว่า *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML_C6 มีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุด จึงนำเวกเตอร์ pPICZ α _PpPIR1_ AML มาใช้ในการเชื่อมต่อกับยีน CRL ของ *C. rugosa* โดยนำเวกเตอร์ pPICZ α _PpPIR1_ AML มาตัดส่วนยีน AML ออก ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Avr*II ได้เป็น pPICZ α _PpPIR1/*Xho*I/*Avr*II (4,391bp) ซึ่งเวกเตอร์ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะถูกนำไปทำการเชื่อมต่อ (ligation) กับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1 และ CRL3 ต่อไป

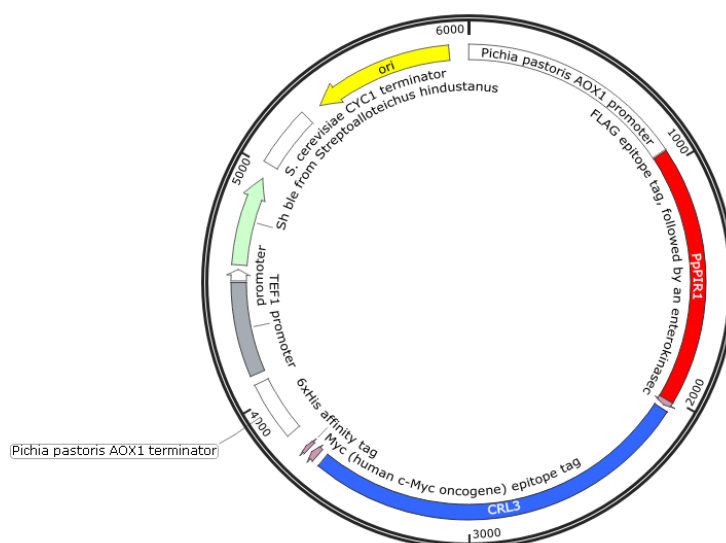
3.4.5.2 การเตรียมยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1 และ CRL3 และสร้างเวกเตอร์ที่มีโปรตีนฐานเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1 และ CRL3

ทำการสังเคราะห์ยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสจากยีสต์ *C. rugosa* ได้แก่ CRL1 (1,606 bp) และ CRL3 (1,606 bp) จากนั้นนำชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทำการ sub-cloning โดยการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pJET 1.2 Blunt แล้วจึงทำการส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock จากนั้นตรวจสอบผลการเชื่อมต่อยีนที่ต้องการด้วยวิธี restriction digestion โดยการนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Avr*II แล้วจึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป

หลังจากตรวจสอบผล DNA sequencing ของพลาสมิดแล้ว จะนำเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Avr*II ตัดชิ้นยีน ออกจากเวกเตอร์ pJET 1.2 Blunt หลังจากนั้นจะเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ที่มีโปรตีนฐาน pPICZ α _PpPIR1/*Xho*I/*Avr*II ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 กับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1/*Xho*I/*Avr*II และ CRL3/*Xho*I/*Avr*II ด้วยเอนไซม์ T4 ligase ได้เป็น pPICZ α _PpPIR1_CRL1 (ประมาณ 6.006 คู่เบส) และ pPICZ α _PpPIR1_CRL3 (ประมาณ 6.006 คู่เบส) ตามลำดับ



ภาพที่ 3.3 โครงสร้าง pPICZ α _PpPIR1_CRL1



ภาพที่ 3.4 โครงสร้าง pPICZ α _PpPIR1_CRL3

3.4.5.3 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพส CRL ที่ผิวเซลล์

ทำการส่งถ่าย (1) pPICZ α _PpPIR1_CRL1 และ (2) pPICZ α _PpPIR1_CRL3 เข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้นตรวจสอบโคลนของยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสบนผิวเซลล์ด้วยวิธี colony PCR และนำโคลน *P. pastoris*/ pPICZ α _PpPIR1_CRL1 และ *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1_CRL3 ที่ผ่านการตรวจสอบไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ที่ความเข้มข้น 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสุ่มเลือกโคลนที่สามารถเจริญเติบโตได้ มาทำการเพาะเลี้ยงใน tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงที่สุด ไปศึกษาในระดับ shake flask ต่อไป และหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ โดยวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน

3.4.6 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPICZ α เข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* KM71 ด้วยวิธีส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้า

ตัดพลาสมิด (1) pPICZ α _AML-11-kp (2) pPICZ α _PpPIR1_ AML (3) pPICZ α _ PpPIR1_ CRL3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DraI* และตัดพลาสมิด (4) pPICZ α _ PpPIR1_ CRL1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PmeI* ให้อยู่ในรูปเส้นตรง (linear form) จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ที่อยู่ในรูปเส้นตรงแล้วส่งถ่ายเข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* KM71 โดยนำคอมพลีเมนต์เซลล์ของยีสต์ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมกับรีคอมบิแนนท์ที่อยู่ในรูปเส้นตรงแล้วความเข้มข้น 5-10 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันใน microcentrifuge tube จากนั้นดูดใส่ใน electroporation cuvette ขนาด 2 เซนติเมตร ที่เย็นแช่ไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ยีสต์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ ความจุไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด ความต้านทานไฟฟ้า 200 โอห์ม จากนั้นเติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เย็นทันที ถ่ายลง tube ที่ปลอดเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเหลว YPD 1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 50-100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยให้เชื้อกระจายบนอาหารกึ่งแข็ง YPD ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Zeocin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบโคลนของยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสบนผิวเซลล์ด้วยวิธี colony PCR และนำโคลนที่ผ่านการตรวจสอบไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ที่ความเข้มข้น 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.7 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์

นำโคลนยีสต์ที่มีเอกทิวติของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงที่สุดในระดับ small scale มาเลี้ยงในอาหาร YPD ที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ปริมาณ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหาร BMGY

(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยกำหนดให้ OD_{600} เริ่มต้นในอาหาร BMGY เท่ากับ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหาร BMMY (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยให้ OD_{600} เริ่มต้นในอาหาร BMMY เท่ากับ 10 และหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ โดยในอาหาร BMMY จะเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอลให้ความเข้มข้นเมทานอลสุดท้ายเท่ากับ 1 2 และ 3% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเหนี่ยวนำทุก 24 ชั่วโมง เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และเก็บตัวอย่างปริมาตร 300 ไมโครลิตรทุกวันเพื่อนำมาวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์

3.4.8 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากข้อ 3.4.7 มาปั่นตกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดอาหารทิ้งให้เหลือแต่เซลล์ และล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์อย่างน้อย 2 รอบ ทำการปั่นตกเซลล์และเติมบัฟเฟอร์ให้ OD_{600} สุดท้าย เท่ากับ 10 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรต (p-nitrophenyl butyrate : p-NPB) ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้นสำหรับการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของยีน CRL1 และ CRL3 (Zhang และคณะ, 2013; Piamtongkam และคณะ, 2011) และใช้พารา-ไนโตรฟีนิลลอรเตต (p-nitrophenyl luarate : p-NPL) ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ สำหรับการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของยีน AML (Wongwatanapaiboon และคณะ, 2016; Zhang และคณะ, 2013) โดยในปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วยเซลล์แขวนลอยปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาณ 175 ไมโครลิตร และสารตั้งต้น 5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา และนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที นำส่วนผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (ของเหลวส่วนบน) ไปวัดหาปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol : p-NP) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

3.5 การยืนยันตำแหน่งการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของสายพันธุ์ยีสต์ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ด้วยเทคนิค Immunofluorescence

เพาะเลี้ยง Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ตามวันและเวลาในการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมของแต่ละยีนที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.4.7 เพื่อยืนยันผลการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence โดยใช้ Anti Flag M2 antibody เจือจาง 100 เท่า และ Alexa Fluor 647 dye Goat anti-mouse IgG (H+L) เจือจาง 100 เท่า จากนั้นนำไปส่องผ่านกล้อง confocal laser scanning microscope โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation) ที่ 635 นาโนเมตร และปลดปล่อย (emission) ที่ความยาวคลื่น 668 นาโนเมตร

3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการ

3.6.1 การหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML

นำโคลน Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML มาวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ ในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ โดยที่ pH 5-6 ในโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (Sodium citrate buffer) และค่า pH 6-7 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) และค่า pH 8 ในทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) สำหรับ Pp-CLR1 และ Pp-CLR3 และสำหรับ Pp-AML มีการวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์เพิ่มในในทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 9-10

3.6.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและศึกษาความคงทนของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML

นำโคลน Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML มาวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ในในทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7 (Pp-CRL1, Pp-CRL3) และใน ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH8 (Pp-AML) ที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส และศึกษาความคงทนของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส (Wongwatanapaiboon และคณะ, 2016; Zhang และคณะ, 2013)

3.7 เพาะเลี้ยงยีสต์ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ที่ภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของ เอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ในการผลิตกรดไขมัน

3.7.1 การทำเซลล์แห้ง (lyophilization) เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ในการผลิตกรดไขมัน

เพาะเลี้ยง Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ตามวันและเวลาในการเหนี่ยวนำ ให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในแต่ละยีนที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.4.7 จากนั้นนำไปปั่นตกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที พร้อมทั้งใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ล้างเซลล์ 2-3 รอบ จากนั้นละลายเซลล์ในบัฟเฟอร์และนำไปทำเซลล์แห้งต่อไป ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Jin และคณะ (2013)

3.7.2 การผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เซลล์แห้ง Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 นำเซลล์แห้งที่ได้จากข้อ 3.7.1 มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตกรดไขมัน โดยในแต่ละปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะประกอบไปด้วยน้ำ 0.3 มิลลิลิตร น้ำมันปาล์ม 0.5 กรัมและเซลล์แห้ง ดังนี้

- 1) Pp-CRL1 10 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- 2) Pp-CRL1 10 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- 3) Pp-CRL3 10 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
- 4) Pp-CRL3 10 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- 5) Pp-CRL1 5 ยูนิต : Pp-CRL3 5 ยูนิต
- 6) Pp-CRL1 7.5 ยูนิต : Pp-CRL3 2.5 ยูนิต
- 7) Pp-CRL1 2.5 ยูนิต : Pp-CRL3 7.5 ยูนิต

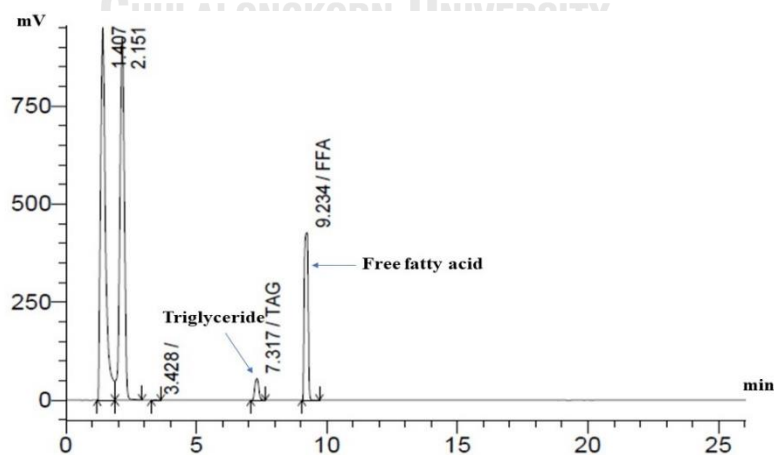
โดยปฏิกิริยาที่ 5-7 นั้น จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันและนำไปวิเคราะห์กรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC (อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้มาจากการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการ ที่ได้จากข้อ 3.6.2)

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยง *C. rugosa* ที่ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสและการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *C. rugosa* ในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพส (LPMC) บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสมีค่าเท่ากับ 0.9 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างไปสกัดกรดไขมันอิสระและตรวจสอบด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มพบปริมาณกรดไขมันอิสระเกิดขึ้น 82.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ *C. rugosa* สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพได้ดี เนื่องจากน้ำมันปาล์มประกอบไปด้วยกรดปาล์มมิติกและกรดโอเลอิก สามารถเหนี่ยวนำให้ *C. rugosa* ผลิตลิเพสที่มีแอกทิวิตีสูง (Winayanuwattikun และคณะ, 2011) นอกจากนี้ลิเพสจาก *C. rugosa* มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด ทำให้สามารถไฮโดรไลซิสไตรกลีเซอไรด์เกิดเป็นกรดไขมันอิสระในปริมาณสูง (Macrae และ Hammond, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Theerachat และคณะ (2017) ที่ใช้ลิเพสจาก *C. rugosa* ย่อยน้ำเสีย พบว่าสามารถย่อยน้ำเสียได้ถึง 94.5 เปอร์เซ็นต์ และ Aziz และคณะ (2015) ที่ศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไขมันเมล็ดคั่วฝอย โดยใช้ลิเพสจาก *C. rugosa* ได้ปริมาณกรดไขมัน 84.1 เปอร์เซ็นต์

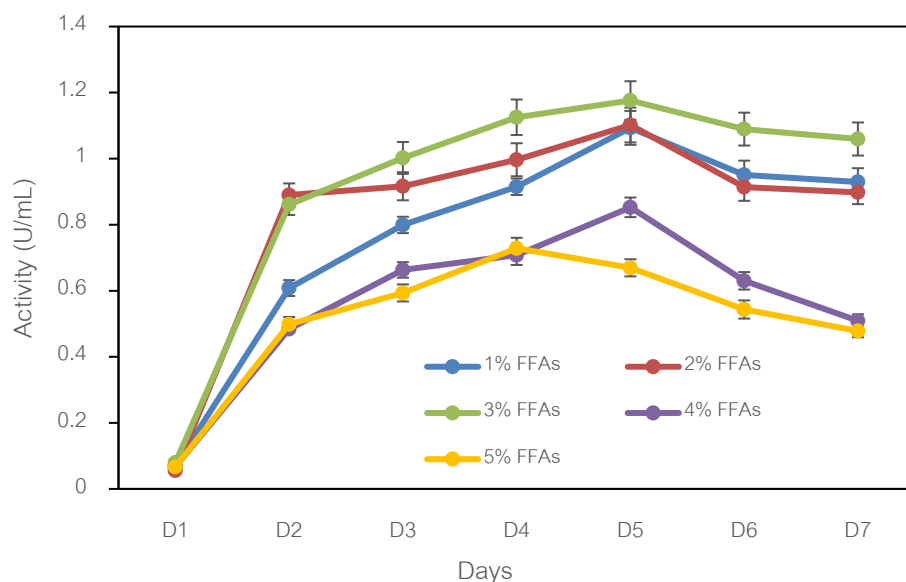


ภาพที่ 4.1 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากใช้ *C. rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนี่ยวนำ และผลการตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโต

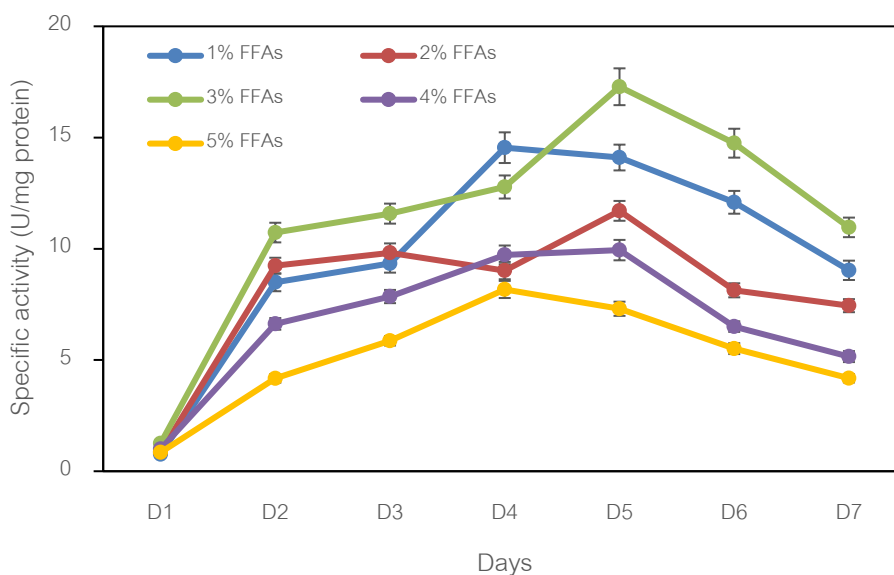
4.2.1 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มเป็นตัวเหนี่ยวนำ

จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยใช้กรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1 โดยใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มาเหนี่ยวนำให้ผลิตลิเพสเป็นเวลา 168 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนอลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น พบว่าการใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงสุด คือ 1.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 และพบว่าการใช้กรดไขมันอิสระ 1 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ก็ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 5 เช่นกัน โดยค่าแอกทิวิตีจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากวันแรก และเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่วันที่ 6 มีเพียงการใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 5 เปอร์เซ็นต์ที่ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์

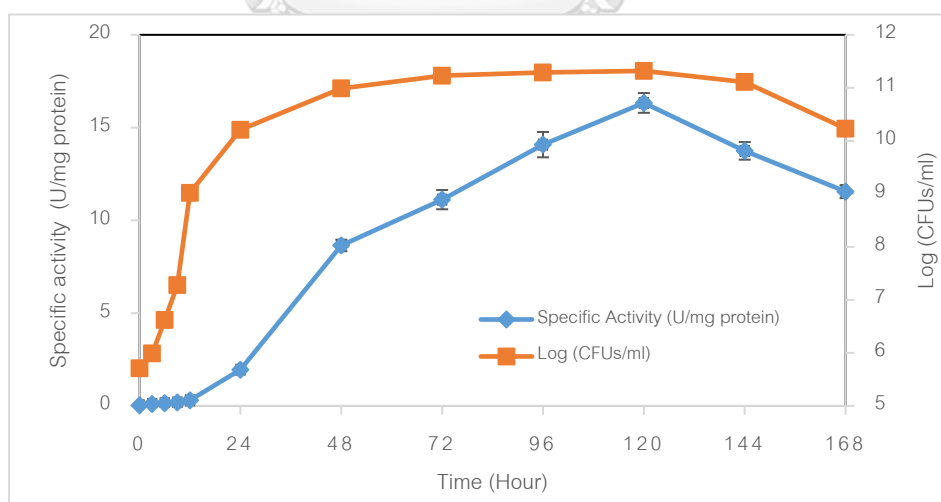
นอกจากนี้ จะเห็นว่าการใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันที่สูงจะให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ น้อยกว่าการใช้กรดไขมันที่ความเข้มข้นต่ำกว่า และจากภาพที่ 4.3 จะเห็นว่าค่ากิจกรรมจำเพาะ ของเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 3 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดใน วันที่ 5 เช่นกัน คือ 17.28 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันที่สูงขึ้นค่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะมีค่าลดลง เนื่องจากที่บริเวณผนังเซลล์ของยีสต์มีความจำเพาะต่อ กรดไขมันแตกต่างกันไป ทำให้ชนิดและความเข้มข้นของกรดไขมันที่ใช้มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (Fickers และคณะ, 2005) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Silva และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาการใช้ น้ำมันชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ ในการเหนี่ยวนำให้ *M. anisopliae* ผลิตลิเพส พบว่าการใช้น้ำมันดอกทานตะวันที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงสุด และงานวิจัยของ Fickers และคณะ (2005) พบว่าปริมาณน้ำมันที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อ ปริมาตรเป็นช่วงที่เหมาะสมในการผลิตลิเพสของยีสต์ *Y. lipolitica* ในขณะที่ปริมาณตัวเหนี่ยวนำ มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีผลยับยั้งการผลิตลิเพส



ภาพที่ 4.3 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ใน อาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 การศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 และกิจกรรมจำเพาะของลิเพสที่เวลาต่างๆ

ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพสที่มีการเติมกรดไขมันอิสระระเหินยวนำความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์เลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการเจริญด้วยวิธี Colony forming unit โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 3 6 9 12 18 24 48 72 96 120 144 และ 168 ชั่วโมง จากนั้นหาค่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสเทียบกับจำนวนล้อยอกจำนวนเซลล์ของยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ซึ่งจากการศึกษาพบว่า *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อเตรียมตัวที่จะทำการแบ่งเซลล์ ที่ช่วงเวลา 3 ชั่วโมงแรก โดยจะเจริญอย่างช้าๆ ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาปรับตัว (lag phase) ต่อมาเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ช่วงการแบ่งเซลล์หรือเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (log phase) ระหว่างชั่วโมงที่ 3-48 จากนั้นจะเข้าสู่ระยะคงที่ในชั่วโมงที่ 48-120 (stationary phase) และพบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของยีสต์ยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสสูงสุดเท่ากับ 16.33 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 120 หลังจากนั้นเซลล์เริ่มตายและค่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสก็ลดลงตามไปด้วย (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและกิจกรรมจำเพาะของลิเพสจากยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพส ในช่วงระยะเวลาที่ 0-120 ชั่วโมง

จากกราฟจะเห็นว่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสจากยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงชั่วโมงที่ 48-120 และสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Leathers และคณะ (2013) ที่พบว่า *A. pullulans* NRRL 62034 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงชั่วโมงที่ 72-120 และสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง มีค่า 19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นค่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสจะค่อยๆ ลดลง ทั้งนี้มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและแอกทิวิตีของลิเพส เช่น สายพันธุ์ของยีสต์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง สารเหนียวทำให้ยีสต์ผลิตลิเพส และวิธีการที่ใช้ในการวัดค่ากิจกรรมของลิเพส เป็นต้น Chi และคณะ (2009)

ยีสต์ *A. pullulans* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ในประเทศไทย และมีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งเซลล์เพื่อผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลในขั้นตอนต่อไป จึงเลือกใช้ยีสต์ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ในช่วงระยะเวลาชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเพื่อผลิตลิเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ค่ากิจกรรมจำเพาะของลิเพสสูงที่สุด

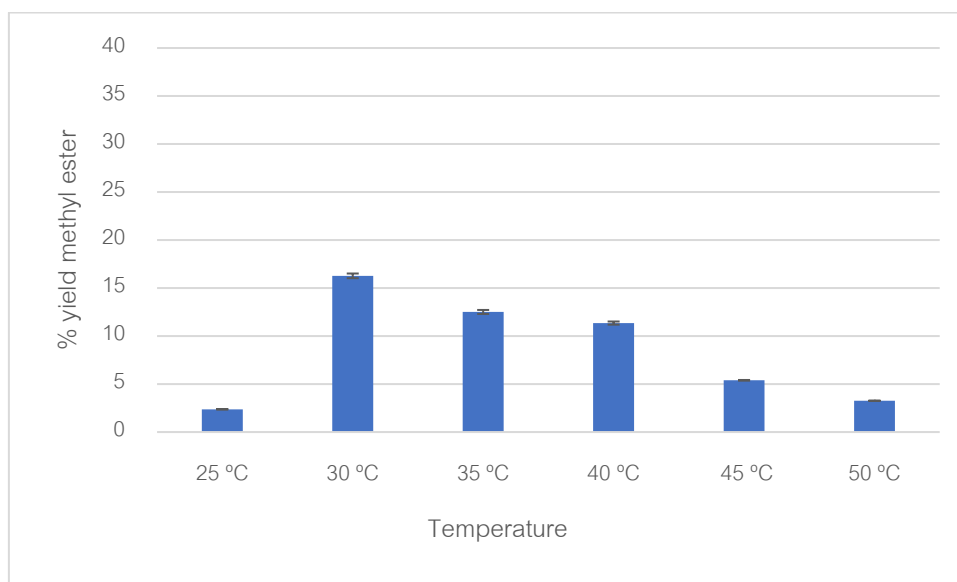
4.3 หากภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์ม โดยใช้ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

4.3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล

ในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ อุณหภูมิที่ใช้เป็นหนึ่งในปัจจัยหลักสำคัญต่อการผลิตไบโอดีเซล รวมทั้งมีผลต่อผลผลิตไบโอดีเซล

จากการศึกษาพบว่า เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นเติมกรดไขมันและเมทานอลในอัตราส่วนโดยโมล 1 : 3 ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกิดการเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลสูงสุด คือ 16.27 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามมาด้วยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียสที่เกิดการเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซล 12.51 ± 0.20 และ 11.35 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ แต่เมื่อทำปฏิกิริยาที่ 45 50 และ 25 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลมีค่าลดลง คือ 5.39 ± 0.18 3.26 ± 0.13 และ 2.37 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ผลผลิตไบโอดีเซลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมี *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

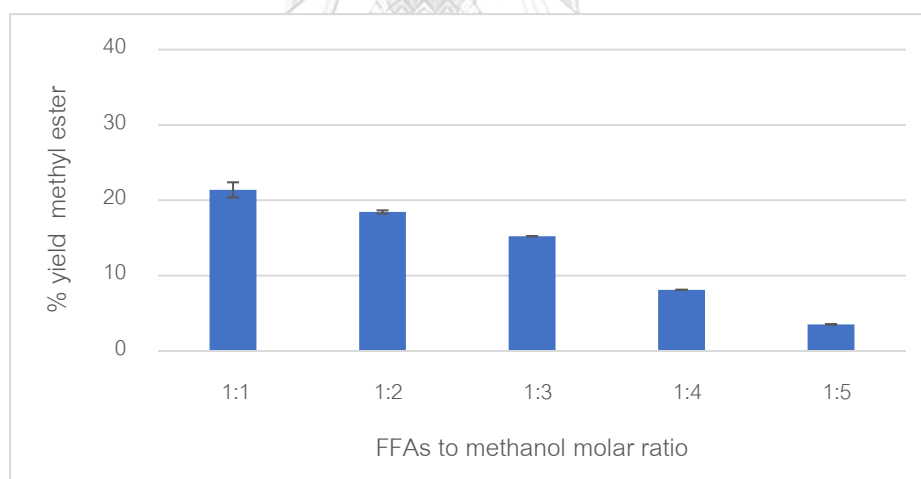
โดยปกติการเพิ่มอุณหภูมิจะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงและเร็วขึ้น แต่ถ้าใช้ อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะส่งผลให้ลิเพสเสียสภาพได้ และถ้าใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปปฏิกิริยาก็จะ เกิดขึ้นได้ยาก (Gog และคณะ, 2012) จากการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Marchetti และคณะ (2007) ที่พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อทำปฏิกิริยาเพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ลิเพส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และการศึกษาของ Leelaruji และคณะ (2013) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีน้ำมันสบู่ดำเป็นสาร ตั้งต้นพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอดีเซลมากที่สุด Zhou และคณะ (2015) ได้ใช้เอนไซม์ลิเพสจาก *C. rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันสบู่ดำ ได้กรดไขมันอิสระสูงสุด 90.3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มีการใช้เชื้อ

Rhizopus oryzae IFO4697 แบบตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4.3.2 การศึกษาอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล

ทำการศึกษ้อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลที่เหมาะสม โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลต่างๆ กัน ได้แก่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 โดยแบ่งเติมเมทานอล ออกเป็นระยะ ซึ่ง Shimada และคณะ (2002) พบว่าเมทานอลที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาไม่สามารถละลายในน้ำมันหรือกรดไขมันได้ และเมื่อเมทานอลเพิ่มสูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพและไม่สามารถทำงานต่อได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาและมีผลต่อการผลิตไบโอดีเซล จึงต้องแบ่งเติมเมทานอลแบบเป็นขั้น

จากการทดลองในข้อ 4.3.1 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดไขมันอิสระ ไปเป็นไบโอดีเซลมากที่สุด จึงนำอุณหภูมิมาใช้เป็นในการทดลองนี้



ภาพที่ 4.6 ผลผลิตไบโอดีเซลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมี *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอลต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ที่อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระ:เมทานอล 1:1 เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอดีเซลสูงสุด คือ 21.39 ± 1.00 เปอร์เซ็นต์ ตามมา

ด้วยอัตราส่วนโดยโมล ของกรดไขมันอิสระ:เมทานอล 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 ตามลำดับ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอดีเซล 18.45 ± 0.51 , 15.23 ± 0.35 , 8.12 ± 0.32 และ 3.53 ± 0.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระ:เมทานอลที่ต่ำจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นไบโอดีเซลได้สูงกว่า เนื่องจากว่าเมทานอลที่เติมในสัดส่วนที่สูงเกินไปนั้นจะทำให้เกิดการตกค้าง และทำให้เอนไซม์เสียสภาพ สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhou และคณะ (2015) ที่ใช้เอนไซม์ลิปเอสจาก *C. rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันสบูดำและนำกรดไขมันอิสระมาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เชื้อ *Rhizopus oryzae* IFO4697 แบบตรึงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าสามารถผลิตไบโอดีเซลได้ 88.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันต่อเมทานอล 1:1.2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากทำปฏิกิริยา 42 ชั่วโมง และ Meng และคณะ (2011) ได้ใช้เอนไซม์ลิปเอสจาก *Yarrowia lipolytica* ไฮโดรไลซิสน้ำมันถั่วเหลือง จากนั้นนำกรดไขมันอิสระมาทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดไขมันอิสระ 2.89 กรัม และลิปเอสที่ตรึงบนตัวค้ำจุน 0.33 กรัม เติมเอทานอลแบบสามขั้น (อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเอทานอล เท่ากับ 1:0.3) จากการศึกษาของผู้วิจัยจะเห็นว่า การเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลนั้นยังมีผลผลิตที่ต่ำ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า แอคติวิตีเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยานั้นยังไม่สูงมากพอ คือ 1.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การศึกษา Vitisant และคณะ (2013) ได้ใช้น้ำมันเมล็ดฝ้ายมาเป็นตัวเป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตพบว่า มีแอคติวิตี 2.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และการศึกษาของ Leelarujji และคณะ (2013) พบว่าการใช้น้ำมันสบูดำเป็นตัวเหนี่ยวนำในการผลิตลิเพสพบว่า มีแอคติวิตีเท่ากับ 7.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันพบว่าให้ผลผลิตไบโอดีเซลเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์

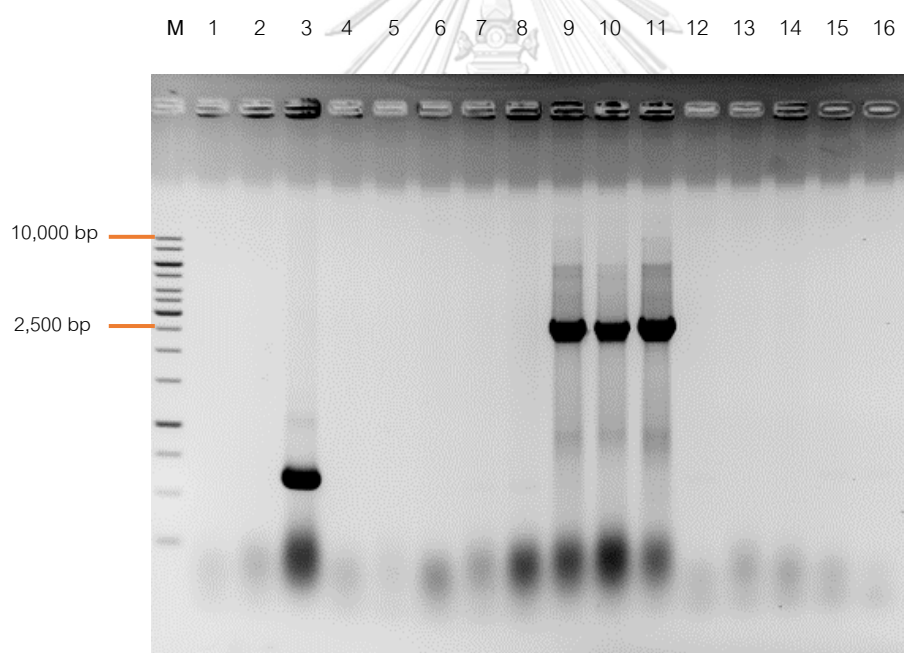
4.4 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* KM 71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิปเอสจากยีสต์ *C. rugosa* และ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์

4.4.1 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* KM71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิปเอสจากเชื้อ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 ที่ผิวเซลล์

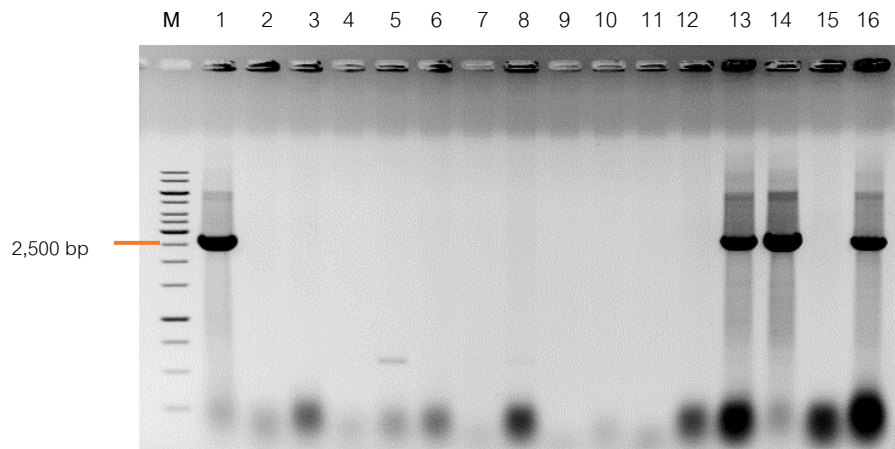
หลังจากตรวจสอบคู่ของยีนสร้างเอนไซม์ลิปเอสและโปรตีนฐาน N-term AML & 11-kp Anchor และ PpPIR1 Anchor flag & C-term AML_Stop โดยวิธี DNA sequencing

แล้ว จะเชื่อมต่อเวกเตอร์ pPICZ α เข้ากับคู่ของชิ้นยีนและโปรตีนฐานนั้น ได้เป็น pPICZ α _AML_11-kp และ pPICZ α _PpPIR1_AML

จากนั้นทำการส่งถ่ายเวกเตอร์ pPICZ α _AML_11-kp และ pPICZ α _PpPIR1_AML เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock แล้วตรวจสอบผลการเชื่อมต่อเวกเตอร์กับโปรตีนฐานและยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสด้วยวิธี colony PCR ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.7 และภาพที่ 4.8 โดยตรวจสอบพบชิ้นส่วนของยีนและโปรตีนฐาน AML_11-kp ในโคลนที่ 9 10 และ 11 ที่มีขนาดประมาณ 2,102 คู่เบส และพบโคลนคู่ของ PpPIR1_AML ในโคลนที่ 1 13 14 และ 16 ที่มีขนาดประมาณ 2,314 คู่เบส แล้วจึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing

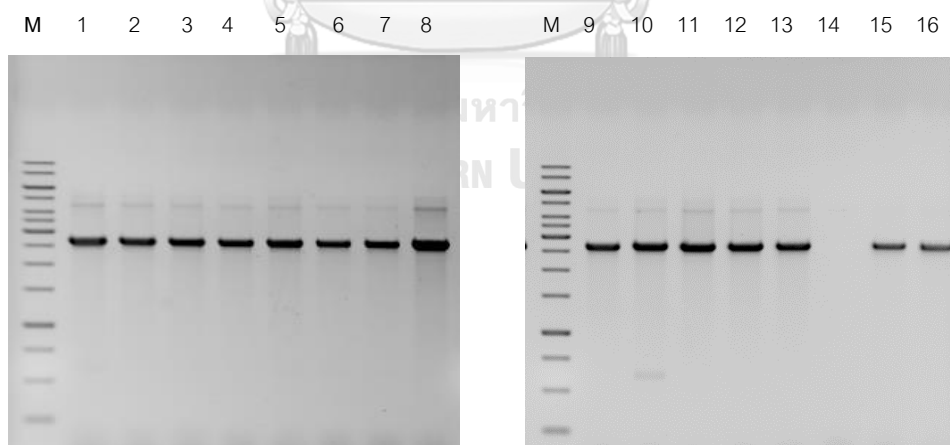


ภาพที่ 4.7 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _AML_11-kp ด้วยวิธี colony PCR



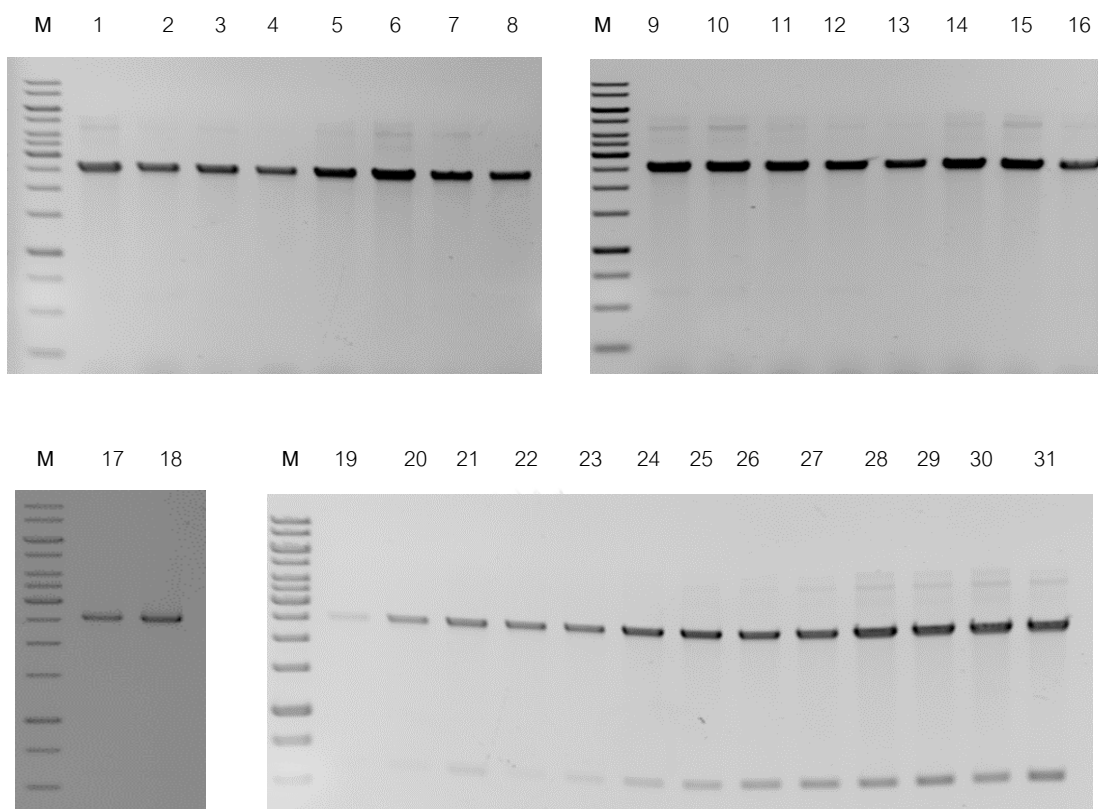
ภาพที่ 4.8 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_AML ด้วยวิธี colony PCR

ซึ่งเมื่อตรวจสอบและยืนยันผลผ่านวิธี DNA sequencing แล้ว จะทำการส่งถ่าย (1) pPICZ α _AML-11-kp และ (2) pPICZ α _PpPIR1_AML เข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้นตรวจสอบโคลนของยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสบนผิวเซลล์ด้วยวิธี colony PCR โดยภาพที่ 4.9 แสดงผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _AML-11-kp บนผิวเซลล์ของยีสต์ จำนวน 15 โคลน



ภาพที่ 4.9 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _AML-11-kp บนผิวเซลล์ของ ยีสต์ *P. pastoris* (*P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp) ด้วยวิธี colony PCR

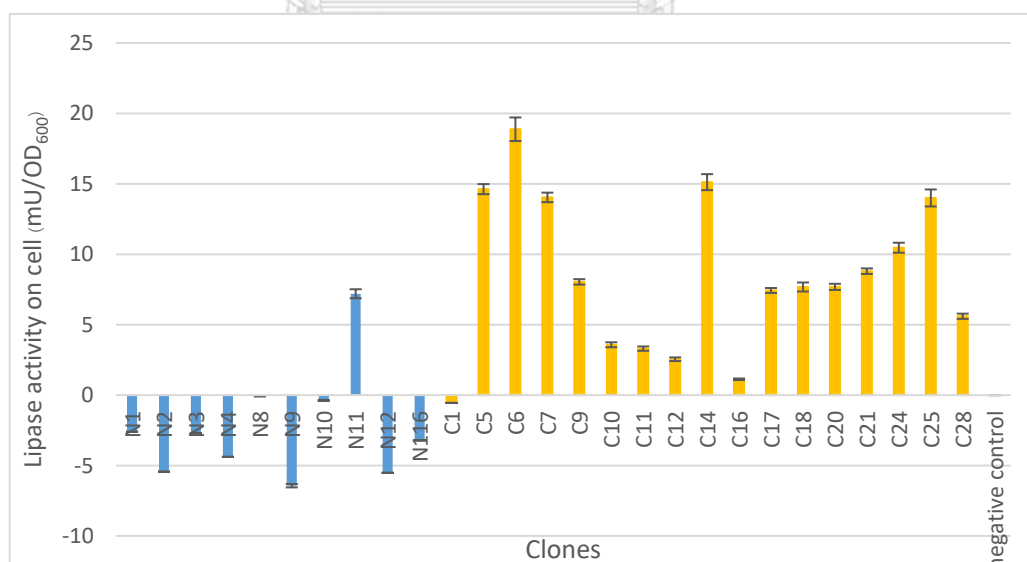
และภาพที่ 4.10 แสดงผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_AML บนผิวเซลล์ของยีสต์ จำนวน 31 โคลน



ภาพที่ 4.10 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1-AML บนผิวเซลล์ ของยีสต์ *P. pastoris* (*P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML) ด้วยวิธี colony PCR

นำโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp และ *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML ไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ที่ความเข้มข้น 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกโคลนที่น่าจะได้รับ recombinant plasmid ที่จำนวน copy number สูง โดยสุ่มเลือกโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp (โคลน N) จำนวน 10 โคลน ได้แก่ โคลน N1 N2 N3 N4 N8 N9 N10 N11 N12 และ N16 และโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML (โคลน C) จำนวน 17 โคลน ได้แก่ โคลน C1 C5 C6 C7 C9 C10 C11 C12 C14 C16 C17 C18 C20 C21 C24 C25 และ C28 รวมทั้งโคลน *P. pastoris*/pPICZ α (negative control: NC) และทำการเพาะเลี้ยงใน tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน เพื่อคัดเลือกโคลนเบื้องต้นที่มีเอกทิวติของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงที่สุด ซึ่งจากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยง *P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp จำนวน 10 โคลน และโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML จำนวน 17 โคลน ใน tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5

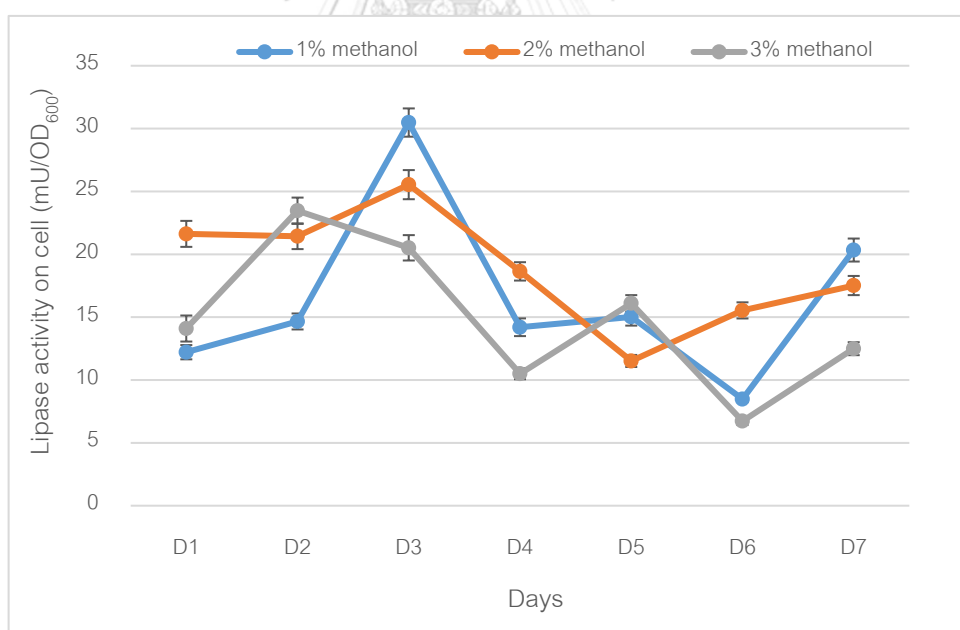
มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน พบว่า *P. pastoris* /pPICZ α _PpPIR1-AML โคลน C6 (*P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML_C6) ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์สูงที่สุด คือ 18.88 ± 0.92 mU/OD₆₀₀ ดังแสดงในภาพที่ 4.11 จากการทดลองจะเห็นว่าการเชื่อมต่อในลักษณะแบบ C-terminal fusion ของโปรตีนฐานกับยีนสร้างเอนไซม์ลิปสึนี้ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์มากกว่าโคลน negative control ต่างจากเชื่อมต่อในลักษณะแบบ N-terminal fusion พบว่าจะมีแค่โคลนเดียวเท่านั้นที่มีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์มากกว่าโคลน negative control ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yuzbasheva และคณะ (2011) ที่พบว่าการเชื่อมต่อในลักษณะแบบ C-terminal fusion ของโปรตีนฐานกับยีนสร้างเอนไซม์ลิปสึ YLip2 ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์มากถึง 9,170 U/g dry cell ในขณะที่การเชื่อมต่อในลักษณะแบบ N-terminal fusion ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์ 3,200 U/g dry cell โดยการแสดงออกของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์นั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน ชนิดของโปรโมเตอร์ ชนิดของโปรตีนฐาน และยีนนั้นๆ ซึ่งโครงสร้างเอนไซม์ลิปสึจะมีบริเวณเร่ง (active site) อยู่ทางด้าน C-terminal ของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อเชื่อมต่อกับโปรตีนฐาน แบบ C-terminal fusion จึงเป็นการรบกวนบริเวณเร่งน้อยกว่าและส่งผลทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่า (Liu และคณะ, 2014)



ภาพที่ 4.11 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิปสึที่ผิวเซลล์ของ *P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp และ *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML

4.4.2 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML (Pp-AML)

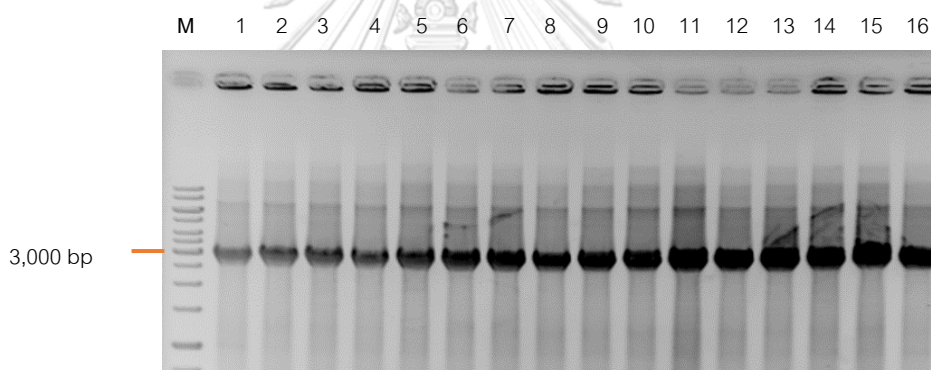
จากผลการทดลองข้อ 4.4.1 เลือกโคลน *P. pastoris*/ pPICZ α _PpPIR1-AML_C6 (หลังจากนี้เรียกว่า Pp- AML) มาเพาะเลี้ยงในระดับ shake flask และเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอลให้ความเข้มข้นเมทานอลสุดท้ายเท่ากับ 1 2 และ 3% ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่า การเหนี่ยวนำภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ AOX1 ด้วยการเติมเมทานอล 1% จะมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-AML สูงสุดในวันที่ 3 โดยมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ คือ 30.48 mU/OD₆₀₀ หลังจากนั้นค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์จะลดลง ในขณะที่การเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอล 2% ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 3 เช่นกัน ซึ่งต่างจากการเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอล 3% ที่แสดงค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 2 จากนั้นค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์จะลดลง (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-AML ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์โดยการเติม methanol 1%, 2% และ 3% เป็นเวลา 7 วัน

4.4.3 การสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* KM71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสจากเชื้อ *C. rugosa* ที่ผิวเซลล์

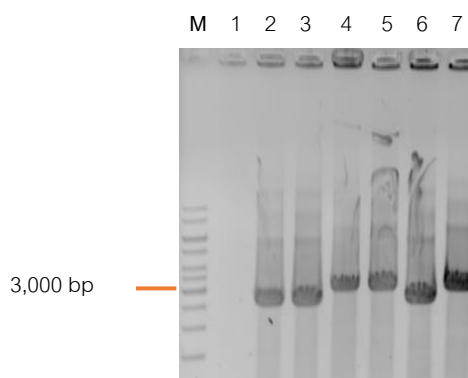
นำเวกเตอร์ pPICZ α _PpPIR1_AML มาตัดส่วนยีน AML ออก และเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพส CRL1 และ CRL3 (ได้เป็น pPICZ α _PpPIR1_CRL1 และ pPICZ α _PpPIR1_CRL3) จากนั้นทำการส่งถ่ายเวกเตอร์ pPICZ α _PpPIR1_CRL1 และ pPICZ α _PpPIR1_CRL3 เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock ตรวจสอบผลการเชื่อมต่อกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสด้วยวิธี colony PCR ซึ่งขึ้นโปรตีนฐานกับยีนสร้างเอนไซม์ลิเพสที่ได้จะมีขนาดประมาณ 2,839 คู่เบส ดังภาพที่ 4.13 และภาพที่ 4.14 โคลนที่ 4 5 และ 7 แล้วจึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบไปยืนยันผลด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.13 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_CRL1 ด้วยวิธี colony

PCR

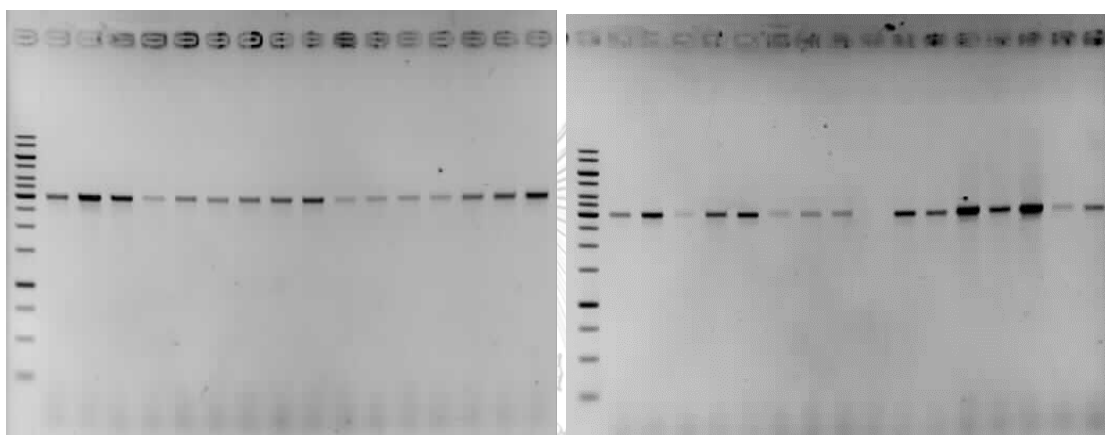


ภาพที่ 4.14 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_CRL3 ด้วยวิธี colony

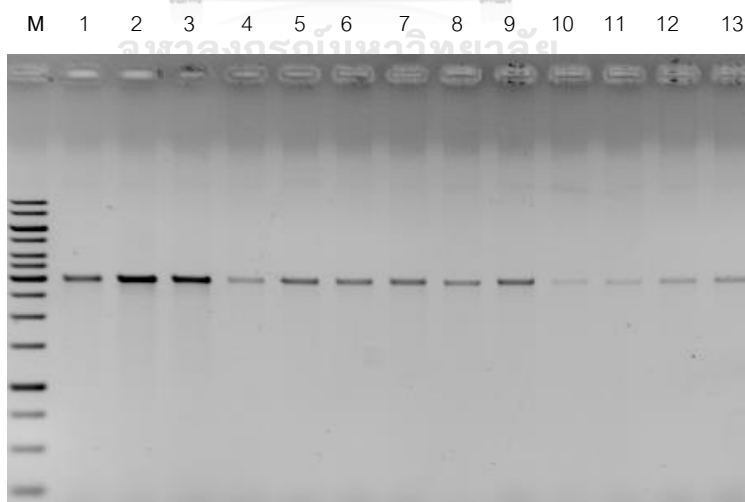
PCR

ซึ่งเมื่อตรวจสอบและยืนยันผลผ่านวิธี DNA sequencing แล้ว จะทำการส่งถ่าย pPICZ α _PpPIR1_CRL1 และ pPICZ α _PpPIR1_CRL3 เข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* ด้วยวิธีส่งถ่ายด้วยกระแสไฟฟ้าจากนั้นตรวจสอบโคลนของยีสต์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสบนผิวเซลล์ด้วยวิธี colony PCR ผลดังภาพที่ 4.15 และ 4.16

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

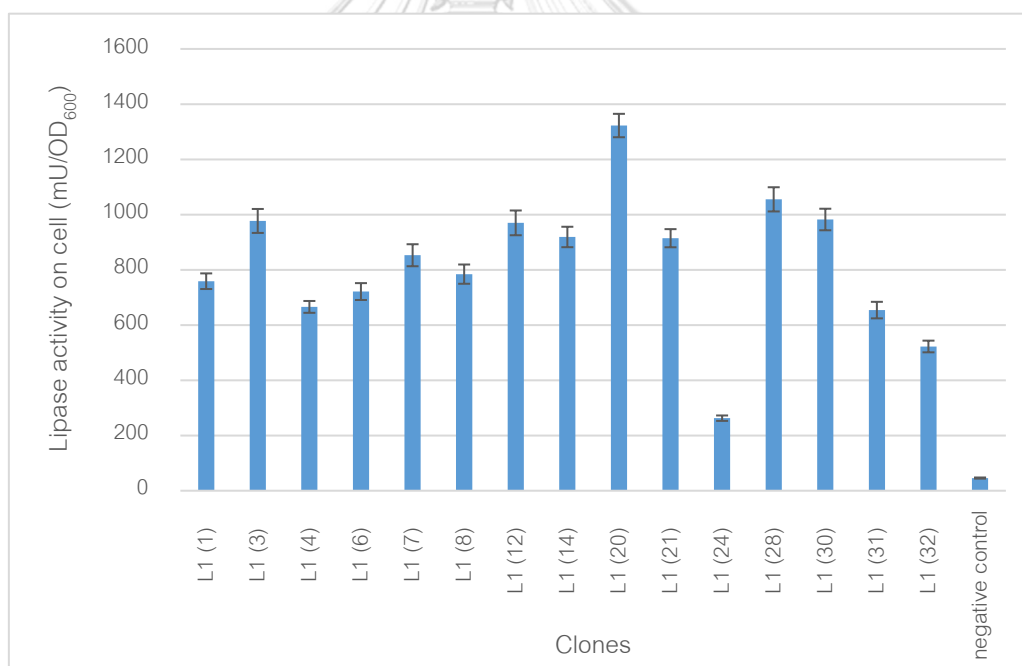


ภาพที่ 4.15 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_CRL1 บนผิวเซลล์ของยีสต์ *P. pastoris* (*P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-CRL1) ด้วยวิธี colony



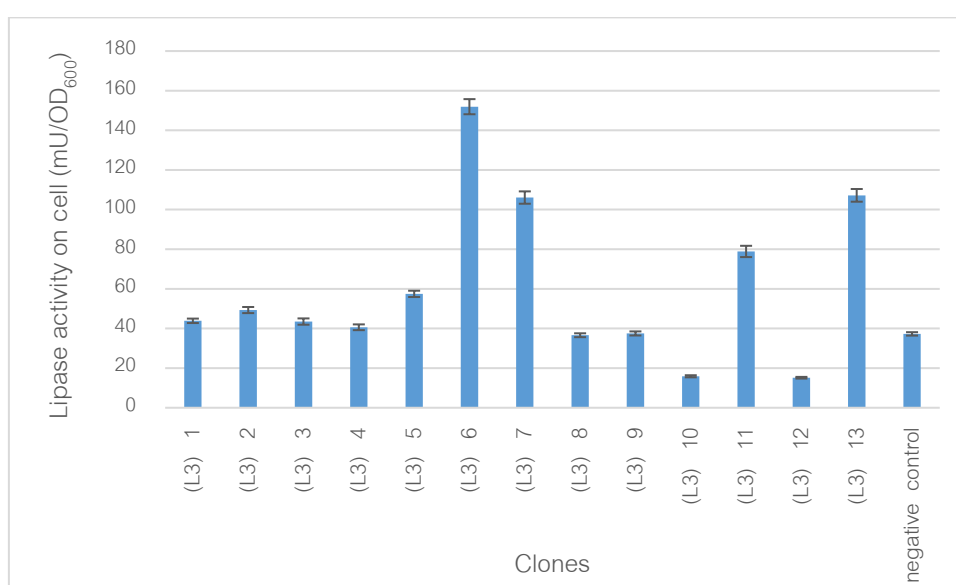
ภาพที่ 4.16 ผลการตรวจสอบโคลนที่พบชิ้นส่วน pPICZ α _PpPIR1_CRL3 บนผิวเซลล์ของยีสต์ *P. pastoris* (*P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-CRL3) ด้วยวิธี colony

นำโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1_CRL1 ไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะ Zeocin ที่ความเข้มข้น 100-1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกโคลนที่น่าจะได้รับ recombinant plasmid ที่จำนวน copy number สูง โดยสุ่มเลือกโคลน *P. pastoris*/ pPICZ α _PpPIR1-CRL1 (โคลน L1) จำนวน 15 โคลน ได้แก่ โคลน L1(1), L1(3), L1(4), L1(6), L1(7), L1(8), L1(12), L1(14), L1(20), L1(21), L1(24), L1(28), L1(30), L1(31) และ L1(32) มาทำการเพาะเลี้ยงใน tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงที่สุด ส่วนโคลน *P. pastoris*/ pPICZ α _PpPIR1-CRL3 (โคลน L3) จะนำทั้ง 13 clone ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR มาคัดเลือกโคลนในขนาด tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงที่สุดเช่นเดียวกับ clone L1



ภาพที่ 4.17 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของโคลน *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1_CRL1 ที่เพาะเลี้ยงในขนาด tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน

จากการเพาะเลี้ยง Pp-PpPIR1_CRL1 จำนวน 15 โคลน และ Pp-PpPIR1_CRL3 จำนวน 13 โคลน ใน tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน พบว่า Pp-PpPIR1_CRL1 โคลน L1(20) ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์สูงที่สุด คือ $1,322.56 \pm 42.37$ mU/OD₆₀₀ (ภาพที่ 4.17) และ Pp-PpPIR1_CRL3 โคลน L3(6) ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ที่ผิวเซลล์สูงที่สุด คือ 151.93 ± 3.81 mU/OD₆₀₀ (ภาพที่ 4.18) หลังจากนั้นนำโคลนดังกล่าวไปศึกษาในระดับ shake flask ต่อไป

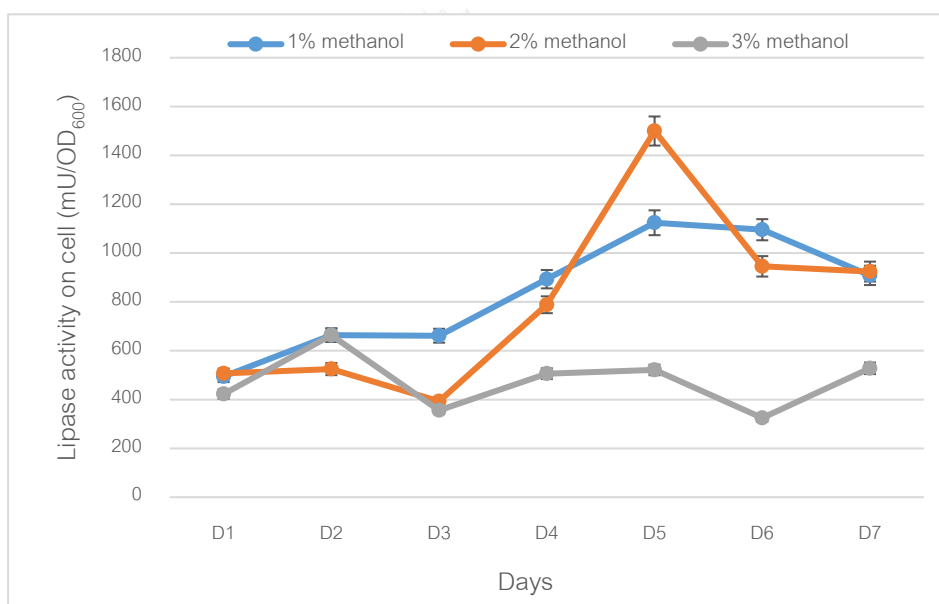


ภาพที่ 4.18 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของโคลน *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL3 ที่เพาะเลี้ยงในขนาด tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน

4.4.4 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL1 (Pp-CRL1) และ *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL3 (Pp-CRL3)

นำโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ที่ดีที่สุดในการทดลองข้อ 4.4.3 คือ *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL1 โคลน L1(20) (หลังจากนี้เรียกว่า Pp-CRL1) และ *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL3 โคลน L3(6) (หลังจากนี้เรียกว่า Pp-CRL3) มาเพาะเลี้ยงในระดับ shake flask และเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอลให้ความเข้มข้นเมทานอล

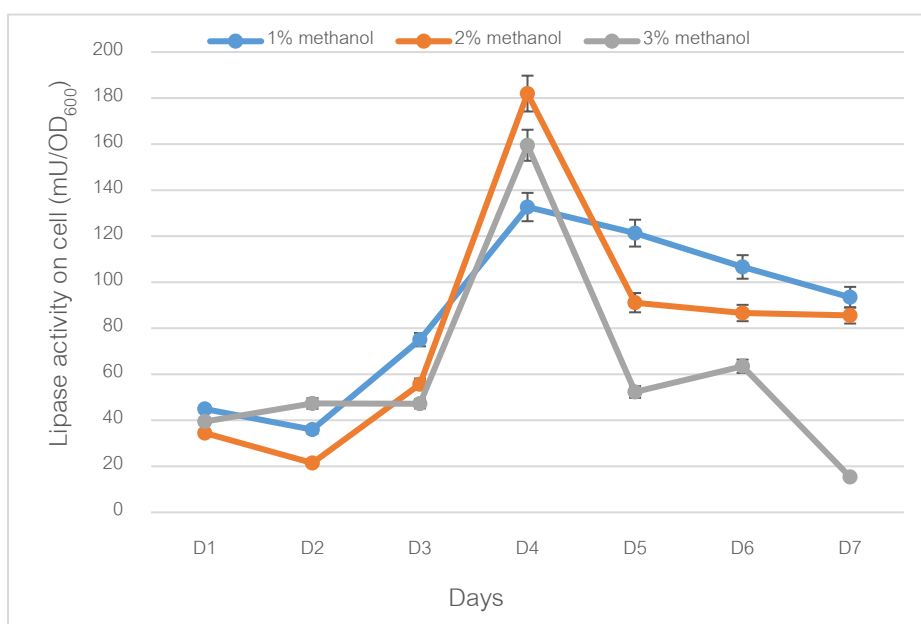
สุดท้ายเท่ากับ 1 2 และ 3% โดยวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน จากการทดลองจะเห็นเมื่อเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอล 2% จะมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL1 สูงสุดในวันที่ 5 โดยมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ คือ 1,499.9 mU/OD₆₀₀ หลังจากนั้นค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์จะลดลง ในขณะที่การเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอล 1% ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 5 เช่นกัน ซึ่งต่างจากการเหนี่ยวนำด้วยการเติมเมทานอล 3% ที่แสดงค่าแอกทิวิตีทำงานของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 2 (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL1 ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์โดยการเติม methanol 1%, 2% และ 3% เป็นเวลา 7 วัน

จากผลการทดลองหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL3 ดังแสดงในภาพที่ 4.20 ซึ่งจากกราฟจะเห็นได้ว่าการเหนี่ยวนำโดยการเติม methanol 1% 2% และ 3% นั้นต่างก็ให้ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 4 โดยค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและให้ค่าสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์จะเริ่มลดลง

โดยการศึกษาพบว่า Pp-CrLIP3 มีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 4 ด้วยการเหนี่ยวนำโดยการเติม methanol 2% ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์เท่ากับ 181.96 mU/OD₆₀₀

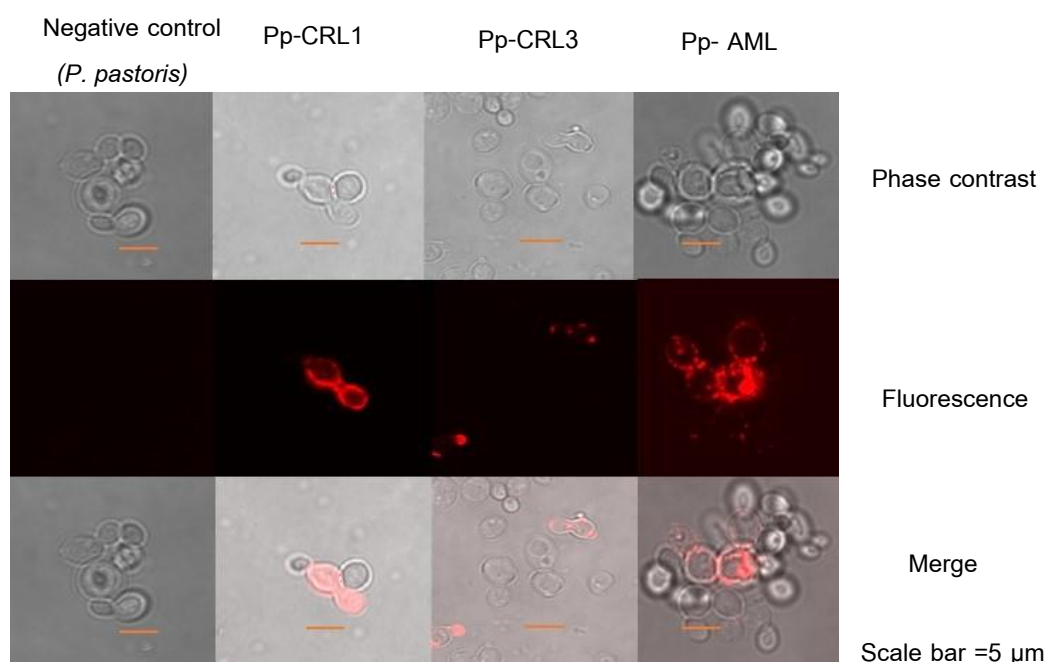


ภาพที่ 4.20 ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL3 ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์โดยการเติม methanol 1%, 2% และ 3% เป็นเวลา 7 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การยืนยันตำแหน่งการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของสายพันธุ์ยีสต์ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ด้วยเทคนิค Immunofluorescence

เพาะเลี้ยง Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML และ Pp-AML เพื่อยืนยันผลการแสดงออกเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence โดยใช้ Anti Flag M2 antibody และ Alexa Fluor 647 dye Goat anti-mouse IgG (H+L) จากผลการทดลองพบว่า ตรวจพบโปรตีน PpPIR1-CRL1, PpPIR1-CRL3 และโปรตีน PpPIR1-AML ที่ผิวเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* (ภาพที่ 4.21)



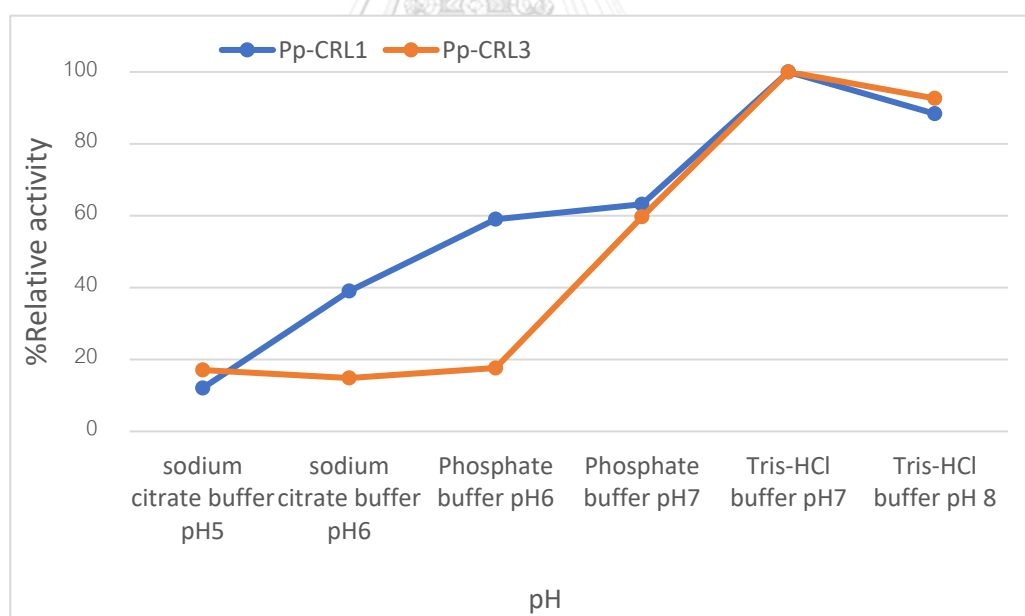
ภาพที่ 4.21 ผลการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของโคลน Negative control (*P. pastoris*), Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence

4.6 การหาสมบัติบางประการของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML

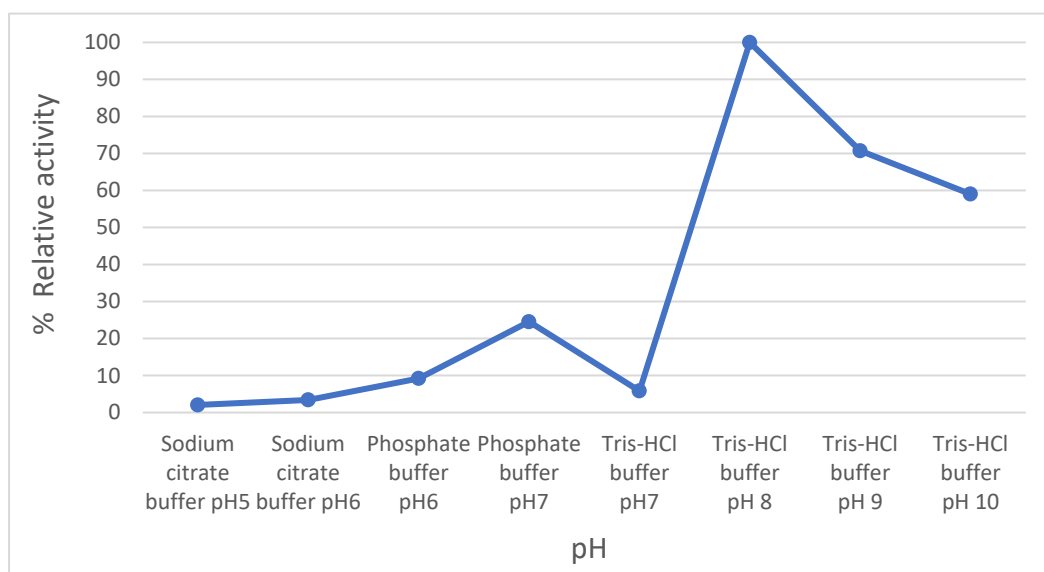
4.6.1 การหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML

ความเป็นกรดต่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกระบวนการทำงานของลิเพส เนื่องจากส่งผลกับโครงสร้างสามมิติของลิเพสโดยเฉพาะบริเวณเร่งปฏิกิริยา ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของลิเพสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ความเป็นกรดต่างต่างๆ โดยการนำโคลน Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML มาวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ ในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ โดยที่ pH 5-6 ใน Sodium citrate buffer และค่า pH 6-7 ใน Phosphate buffer และค่า pH 8 ใน Tris-HCl buffer (Pp-CRL1, Pp-CRL3) และสำหรับ Pp-AML มีการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์เพิ่มใน Tris-HCl buffer pH 9-10 ซึ่งจากการศึกษาพบว่า โคลน Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ความเป็นกรดต่างอยู่ในสภาวะที่เป็นกลาง คือ pH 7 (100% relative activity) (ภาพที่ 4.22) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง

ของ Yong และคณะ (2008) ที่พบว่าการทำงานของลิเพสจาก *C. rugosa* เหมาะสมที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาสภาวะที่เป็นกลาง และการศึกษาของ Edupuganti และคณะ (2017) ที่ศึกษาค่าเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของ *Staphylococcus epidermidis* strain L2 (MTCC 10656) และพบว่าทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางเช่นกัน ส่วนโคลน Pp-AML ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ความเป็นกรดต่างอยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง คือ pH 8 (ภาพที่ 4.23) ซึ่งจากการทดลองของ Liu และคณะ (2008) ที่ศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมจากลิเพสของ *A. pullulans* HN2.3 พบว่าการทำงานของลิเพสเหมาะสมในสภาวะที่เป็นด่าง pH 8.0 นอกจากนี้ Tripathi และคณะ (2014) พบว่าการทำงานของลิเพสของ *Microbacterium* sp. เหมาะสมในสภาวะที่เป็นด่าง pH 8.5 โดยความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของลิเพสนี้จะแตกต่างกันคือช่วง pH 5-10 ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของลิเพส ซึ่งลิเพสจากยีสต์จะมีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอยู่ในช่วง pH 5-8



ภาพที่ 4.22 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3

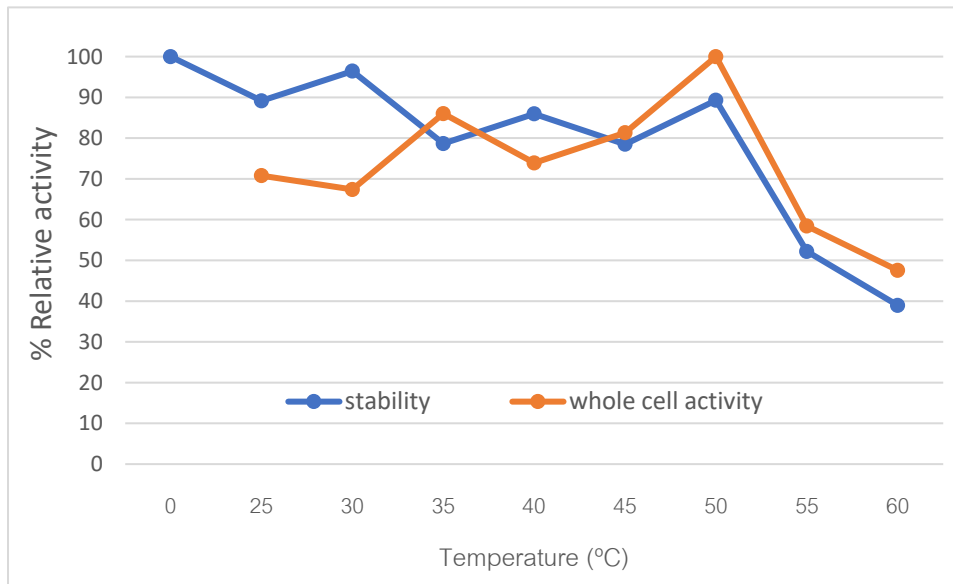


ภาพที่ 4.23 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Pp-AML

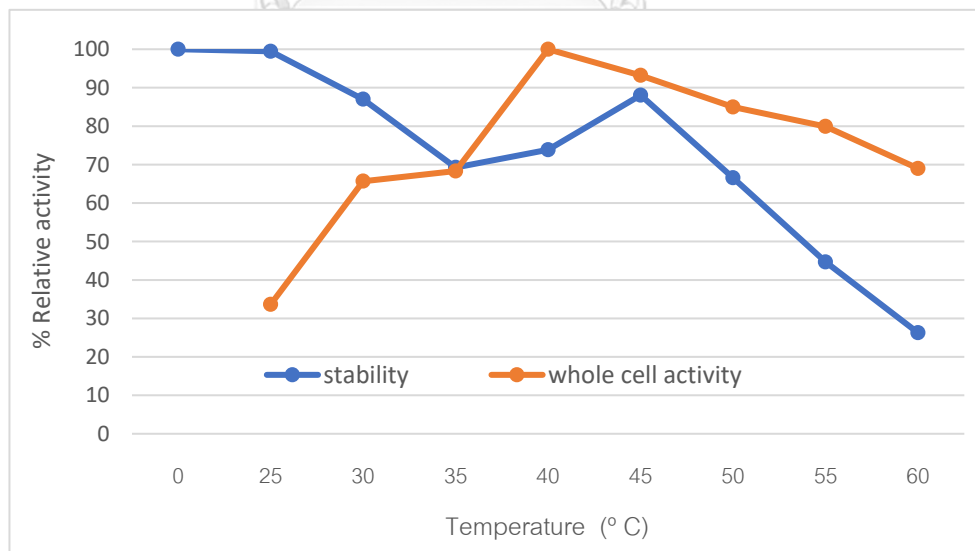
4.6.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและศึกษาความคงทนของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทน Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML จะนำโคลน Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML มาวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์ ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer pH 7 (Pp-CRL1, Pp-CRL3) และใน Tris-HCl buffer pH8 (Pp-AML) ที่อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส และศึกษาความคงทนของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่า Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 50 40 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนความคงทนของ Pp-CRL1 อยู่ในช่วง 0-50 องศาเซลเซียส Pp-CRL3 อยู่ในช่วง 0-45 องศาเซลเซียส และ Pp-AML อยู่ในช่วง 0-35 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 4.24-4.26 ซึ่งผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมของลิเพสจาก *C. rugosa* นั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yong และคณะ (2008) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของลิเพสนั้นอยู่ในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส และ Liu และคณะ (2012) ได้ศึกษาลิเพสจาก *C. antarctica* ZJB09193 พบว่าที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของลิเพส นอกจากนี้ Liu และคณะ (2008) และ Wongwatanapaiboon และคณะ (2016) ยังมีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของลิเพส จาก *A.*

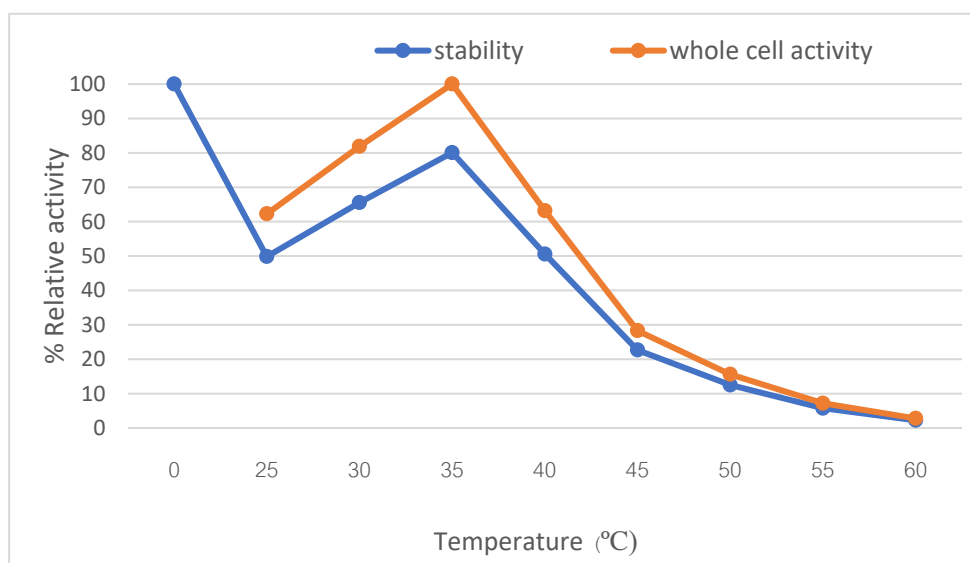
pullulans พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันคืออุณหภูมิที่เหมาะสมของไลเปสจาก *A. pullulans* อยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.24 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทนของโคลน Pp-CRL1



ภาพที่ 4.25 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทนของโคลน Pp-CRL3



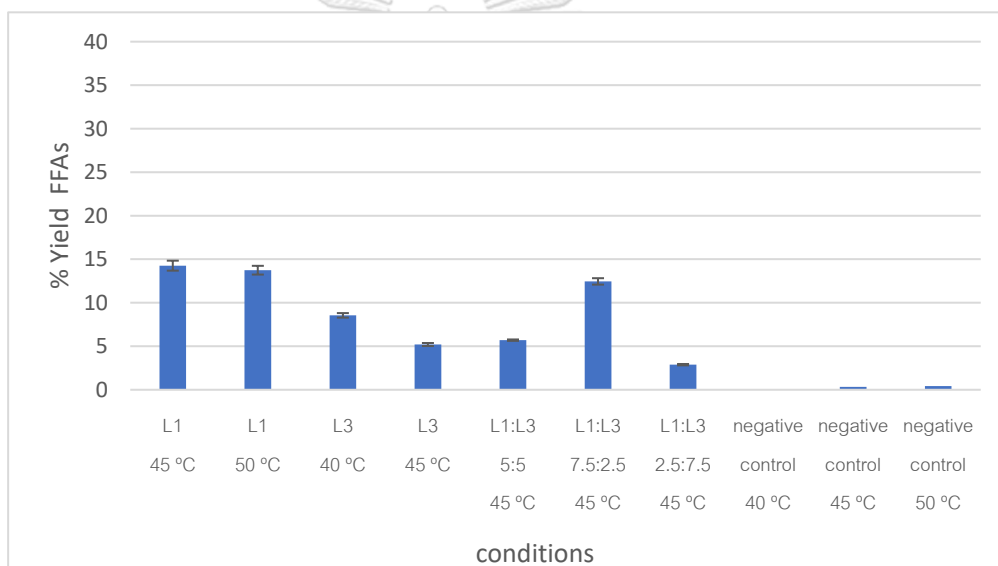
ภาพที่ 4.26 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงทนของโคลน Pp-AML

4.7 การผลิตกรดไขมันอิสระจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เซลล์แห้ง Pp-CRL1 และ Pp-CRL3

จากการนำเซลล์แห้ง Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตกรดไขมัน โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น โดยที่ Pp-CRL1 จะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส Pp-CRL3 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส และการทำปฏิกิริยาโดยการผสม Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากการศึกษาพบว่าผลผลิตกรดไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มนั้น การใช้เซลล์แห้ง Pp-CRL1 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะให้ผลผลิตกรดไขมันสูงสุด คือ 14.26 ± 0.57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รองลงมาคือการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเกิดกรดไขมัน 13.74 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้เซลล์แห้ง Pp-CRL3 ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส เกิดกรดไขมัน 8.55 ± 0.26 และ 5.20 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจากการใช้เซลล์แห้งแบบผสม Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพบว่าที่ใช้สัดส่วน Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 7.5:2.5 ยูนิต มีผลผลิตกรดไขมันที่เกิดขึ้น 12.45 ± 0.37 เปอร์เซ็นต์

ตามมาด้วย Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 สัดส่วน 5:5 ยูนิต เกิดกรดไขมัน 5.70 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ และ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 สัดส่วน 2.5:7.5 ยูนิต เกิดกรดไขมัน 2.88 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า การใช้ Pp-CRL1 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพียงอย่างเดียวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นั้นสามารถไฮโดรไลซิสได้ดีกว่าการใช้ Pp-CRL3 และดีกว่าในการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมกันกับ Pp-CRL3 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Piamtongkam (2011) ที่ศึกษา Lip1 Lip3 และ Lip4 มาใช้ในการแยกสาร (R, S)-2-bromo-phenylacetic acid octyl esters โดยการนำยีนของลิเพสทั้ง 3 ชนิดมาแสดงออกในยีสต์ *Y. lipolytica* สายพันธุ์ JMY1212 จากการศึกษพบว่าแอกทิวิตีของลิเพส Lip1 มีค่าสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุด



ภาพที่ 4.27 ผลผลิตกรดไขมันที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย L1 คือ Pp-CRL1 , L3 คือ Pp-CRL3 และ negative control คือ *P. pastoris/pPICαZA*

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากกรดไขมันอิสระของน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาสองขั้นตอนโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพทั้งเซลล์ นั้น ได้ใช้ *C. rugosa* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส น้ำมันปาล์มเป็นเวลา 5 วัน ได้กรดไขมันอิสระ 82.61 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตลิเพสของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 โดยการนำกรดไขมันอิสระที่ได้จากการไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มจาก *C. rugosa* มาเป็นตัวเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสำหรับผลิตลิเพส พบว่าการใช้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์และค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด คือ 1.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 17.28 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 120 ดังนั้นชั่วโมงที่ 120 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตลิเพส จึงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการนำยีสต์ของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 แบบทั้งเซลล์ไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อผลิตไบโอดีเซล

เมื่อทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งปฏิกิริยาด้วยยีสต์ ของ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 พบว่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันอิสระต่อเมทานอล เท่ากับ 1:1 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะเกิดเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลสูงสุด คือ 21.39 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ยังเห็นว่าการเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลเกิดขึ้นได้น้อย จึงต้องปรับปรุงพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

นอกจากนี้ได้ศึกษาและสร้างสายพันธุ์ยีสต์ *P. pastoris* KM 71 ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิเพสที่ผิวเซลล์จาก *C. rugosa* (CRL1 และ CRL3) และ *A. pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3 (AML)

โดยเริ่มจากการนำโปรตีนฐานเชื่อมกับยีน AML และนำไปเชื่อมกับเวกเตอร์ pPICZ α และส่งถ่ายเข้าสู่ *P. pastoris* ได้เป็น *P. pastoris*/pPICZ α _AML-11-kp และ *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML จากนั้นนำไปศึกษาแอกทิวิตีของลิเพสที่ผิวเซลล์พบว่า *P. pastoris*/pPICZ α _PpPIR1-AML (Pp-AML) ให้ค่าแอกทิวิตีที่สูงกว่า จึงนำเวกเตอร์ pPICZ α _PpPIR1 _AML มาตัดส่วนยีน AML ออก และทำการเชื่อมต่อยีน CRL1 และ CRL3 เข้าไป และส่ง

ถ่ายเวกเตอร์นี้เข้าสู่ *P. pastoris* ได้เป็น *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL1 (Pp-CRL1) และ *P. pastoris*/pPICZ α A_PpPIR1-CRL3 (Pp-CRL3)

จากนั้นศึกษาหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ลิปัสที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML พบว่า Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 มีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิปัสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 5 และวันที่ 4 ด้วยการเหนี่ยวนำโดยการเติมเมทานอล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิปัสที่ผิวเซลล์คือ 1,499.9 mU/OD₆₀₀ และ 181.96 mU/OD₆₀₀ ตามลำดับ และ Pp-AML ให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลิปัสที่ผิวเซลล์สูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 30.48 mU/OD₆₀₀ ด้วยการเหนี่ยวนำโดยการเติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์

หลังจากนั้นนำโคลน Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ไปตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการแสดงออกที่ผิวเซลล์ด้วยวิธี Indirect immunofluorescence จากผลการทดลองพบว่าตรวจพบโปรตีน PpPIR1-CRL1, PpPIR1-CRL3 และโปรตีน PpPIR1-AML ที่ผิวเซลล์ยีสต์ *P. pastoris*

ทำการศึกษาสมบัติบางประการของ Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML โดยศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพบว่า Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7 ในขณะที่ Pp-AML ปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 8 นอกจากนี้จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและศึกษาความคงทนพบว่า พบว่า Pp-CRL1, Pp-CRL3 และ Pp-AML ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 50 40 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนความคงทนของ Pp-CRL1 อยู่ในช่วง 0-50 องศาเซลเซียส Pp-CRL3 อยู่ในช่วง 0-45 องศาเซลเซียส และ Pp-AML อยู่ในช่วง 0-35 องศาเซลเซียส

จากการนำ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มพบว่า การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตกรดไขมันสูงสุด คือ 14.26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดลองจะต้องการภาวะที่เหมาะสมต่อไป สำหรับ Pp-AML จะนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคตต่อไป

บรรณานุกรม

- Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M., Rose, C., & Kamini, N. (2014). Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(8), 1591-1601.
- Adachi, D., Hama, S., Nakashima, K., Bogaki, T., Ogino, C., & Kondo, A. (2013). Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. *Bioresource Technology*, 135, 410-416.
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S. K., Ismail, M., & Salimon, J. (2009). Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock feedstock. *European Journal of Scientific Research*, 29(3), 396-403.
- Akoh, C. C., Chang, S.-W., Lee, G.-C., & Shaw, J.-F. (2007). Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8995-9005.
- Amini, Z., Ong, H. C., Harrison, M. D., Kusumo, F., Mazaheri, H., & Ilham, Z. (2017). Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L.(sweet basil) seed oil. *Energy Conversion and Management*, 132, 82-90.
- Aziz, M., Husson, F., & Kermasha, S. (2015). Optimization of the hydrolysis of safflower oil for the production of linoleic acid, used as flavor precursor. *International Journal of Food Science*, 2015(4), 321-331.
- Benjamin, S., & Pandey, A. (1998). *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14(12), 1069-1087.
- Benzonana, G., & Esposito, S. (1971). On the positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid*

Metabolism, 231(1), 15-22.

- Boonvitthya, N., Tanapong, P., Kannan, P., Burapatana, V., & Chulalaksananukul, W. (2012). Cloning and expression of the *Aspergillus oryzae* glucan 1, 3-beta-glucosidase A (*exgA*) in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 34(10), 1937-1943.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D., Lotti, M., & Alberghina, L. (1998). Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa lipI* gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science*, 7(6), 1415-1422.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 793-804.
- Ciftci, O. N., & Temelli, F. (2013). Enzymatic conversion of corn oil into biodiesel in a batch supercritical carbon dioxide reactor and kinetic modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 75, 172-180.
- Edupuganti, S., Parcha, L., & Mangamoori, L. N. (2017). Purification and characterization of extracellular lipase from *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 10656). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(1), 57-63.
- Fickers, P., Benetti, P.-H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M., & Nicaud, J.-M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5(6-7), 527-543.
- Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., & Noda, H. (2008). Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology*, 26(12), 668-673.
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416.

- Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6), 621-634.
- Gaur, R., & Khare, S. K. (2011). Statistical optimization of palm oil hydrolysis by *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipase. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 6(1), 147-153.
- Ghaly, A., Dave, D., Brooks, M., & Budge, S. (2010). Production of biodiesel by enzymatic transesterification. *American Journal Biochemistry Biotechnology* 6(2), 54-76.
- Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C., & Irimie, F. D. (2012). Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. *Renewable Energy*, 39(1), 10-16.
- Gupta, N., Sahai, V., & Gupta, R. (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 42(4), 518-526.
- Han, Z.-l., Han, S.-y., Zheng, S.-p., & Lin, Y. (2009). Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 117-126.
- Huang, D., Han, S., Han, Z., & Lin, Y. (2012). Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in an isoctane system. *Biochemical Engineering Journal*, 63, 10-14.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., & Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 53-58.
- Jin, G., & Bierma, T. (2010). Whole-cell biocatalysts for producing biodiesel from waste greases. ISTC Report; Illinois Sustainable Technology Center, USA.
- Jin, Z., Han, S.-Y., Zhang, L., Zheng, S.-P., Wang, Y., & Lin, Y. (2013). Combined utilization of lipase-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysts to improve biodiesel

- production in co-solvent media. *Bioresource Technology*, 130, 102-109.
- Kuroda, K., & Ueda, M. (2013). Arming technology in yeast—novel strategy for whole-cell biocatalyst and protein engineering. *Biomolecules*, 3(3), 632-650.
- Kuwae, S., Ohyama, M., Ohya, T., Ohi, H., & Kobayashi, K. (2005). Production of recombinant human antithrombin by *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(3), 264-271.
- Leathers, T. D., Rich, J. O., Anderson, A. M., & Manitchotpisit, P. (2013). Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1701-1706.
- Lee, G.-C., Tang, S.-J., Sun, K.-H., & Shaw, J.-F. (1999). Analysis of the gene family encoding lipases in *Candida rugosa* by competitive reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3888-3895.
- Leelarujji, W., Piamtongkam, R., Chulalaksananukul, S., & Chulalaksananukul, W. (2013). Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil catalyzed by whole cells of *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* SRY 14-3. *African Journal of Biotechnology*, 12(27), 4380-4386.
- Liu, Y., Zhang, R., Lian, Z., Wang, S., & Wright, A. T. (2014). Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, 17-25.
- Liu, Z.-Q., Zheng, X.-B., Zhang, S.-P., & Zheng, Y.-G. (2012). Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. *Microbiological Research*, 167(8), 452-460.
- Liu, Z., Li, X., Chi, Z., Wang, L., Li, J., & Wang, X. (2008). Cloning, characterization and expression of the extracellular lipase gene from *Aureobasidium pullulans* HN2-3 isolated from sea saltern. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(2), 245-255.

- López, N., Pernas, M. A., Pastrana, L. M., Sánchez, A., Valero, F., & Rúa, M. L. (2004). Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnology Progress*, 20(1), 65-73.
- Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70(1), 1-15.
- Macrae, A. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(2), 291-294.
- Macrae, A., & Hammond, R. (1985). Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1), 193-218.
- Meng, Y., Wang, G., Yang, N., Zhou, Z., Li, Y., Liang, X., Chen, J., Li, Y., & Li, J. (2011). Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 6-14.
- Nguyen, T., Le, T. D., Phan, H. N., & Tran, L. B. (2018). Hydrolysis Activity of Virgin Coconut Oil Using Lipase from Different Sources. *Scientifica*, 2018(2), 356-361.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., & Tan, T. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 142-147.
- Pazouki, M., Zamani, F., Zamzamin, S. A. H., & Najafpour, G. (2011). Study on reaction conditions in whole cell biocatalyst methanolysis of pretreated used cooking oil. *World Renewable Energy Congress*, Sweden,
- Piamtongkam, R., Duquesne, S., Bordes, F., Barbe, S., André, I., Marty, A., & Chulalaksananukul, W. (2011). Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1, Lip3, and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1749-1756.

- Rakchai, N., Aran, H., & Zimmermann, W. (2016). The production of immobilized whole-cell lipase from *Aspergillus nomius* ST57 and the enhancement of the synthesis of fatty acid methyl esters using a two-step reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, S128-S136.
- Ribeiro, B. D., Castro, A. M. d., Coelho, M. A. Z., & Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011(2), 1-16.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., & Vargas, R. M. (1998). Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(3), 199-210.
- Scrimgeour, C., & Harwood, J. (2007). Fatty acid and lipid structure. *The lipid handbook*, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton, 1-36.
- Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. (2003). Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40(6), 392-399.
- Shahedi, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Mohammadi, M., & As' habi, M. A. (2019). Co-immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase and *Candida antarctica* lipase B and optimization of biocatalytic biodiesel production from palm oil using response surface methodology. *Renewable Energy*, 141, 847-857.
- Shahid, E. M., & Jamal, Y. (2011). Production of biodiesel: a technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4732-4745.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627-662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., & Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3-5), 133-142.
- Silva, W. O. B., Mitidieri, S., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus

- Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 40(1), 321-326.
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 486-520.
- Srimhan, P., Kongnum, K., Taweerodjanakarn, S., & Hongpattarakere, T. (2011). Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 293-298.
- Su, G.-d., Zhang, X., & Lin, Y. (2010). Surface display of active lipase in *Pichia pastoris* using Sed1 as an anchor protein. *Biotechnology Letters*, 32(8), 1131-1136.
- Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., & Fukuda, H. (2008). Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 185-189.
- Thakur, S. (2012). Lipases, its sources, properties and applications: A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 3(7), 1-29.
- Theerachat, M., Tanapong, P., & Chulalaksananukul, W. (2017). The culture or co-culture of *Candida rugosa* and *Yarrowia lipolytica* strain rM-4A, or incubation with their crude extracellular lipase and laccase preparations, for the biodegradation of palm oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121, 11-18.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182-196.
- Tripathi, R., Singh, J., kumar Bharti, R., & Thakur, I. S. (2014). Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium sp.* and its application in biodiesel production. *Energy Procedia*, 54, 518-529.
- Ueda, M., & Tanaka, A. (2000). Cell Surface Engineering of Yeast. Construction of Arming Yeast with Biocatalyst. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(2), 125-136.

- Vitisant, T., Leelaruji, W., Chulalaksananukul, S., Wattayakorn, G., & Chulalaksananukul, W. (2013). A high-activity lipolytic yeast isolated from Sichang Island, Thailand. *Majoe International Journal of Science and Tecnology*, 7, 96-105.
- Washida, M., Takahashi, S., Ueda, M., & Tanaka, A. (2001). Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 681-686.
- Watanabe, Y., Nagao, T., Nishida, Y., Takagi, Y., & Shimada, Y. (2007). Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(11), 1015-1021.
- Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriayakanon, K., Chulalaksananukul, W., Yongvanich, T., & Svasti, J. (2011). Immobilized lipase from potential lipolytic microbes for catalyzing biodiesel production using palm oil as feedstock. *African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1666-1673.
- Wongwatanapaiboon, J., Klinbunga, S., Ruangchainikom, C., Thummadetsak, G., Chulalaksananukul, S., Marty, A., & Chulalaksananukul, W. (2016). Cloning, expression, and characterization of *Aureobasidium melanogenum* lipase in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(11), 2231-2240.
- Yan, J., Zheng, X., & Li, S. (2014). A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 151, 43-48.
- Yong, Y., Bai, Y.-X., Li, Y.-F., Lin, L., Cui, Y.-J., & Xia, C.-G. (2008). Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochemistry*, 43(11), 1179-1185.
- Yurlova, N., & De Hoog, G. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and

molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72(2), 141-147.

Yuzbasheva, E. Y., Yuzbashev, T., Konstantinova, T., Laptev, I., Perkovskaya, N., & Sineokii, S. (2011). Capacity of N-and C-domains of *Saccharomyces cerevisiae* flo1p cell wall protein homologue to expose lip2 lipase on cell surface of *Yarrowia lipolytica* yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(8), 744-753.

Zhang, A.-L., Luo, J.-X., Zhang, T.-Y., Pan, Y.-W., Tan, Y.-H., Fu, C.-Y., & Tu, F.-z. (2009). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1611-1619.

Zhang, L., Liang, S., Zhou, X., Jin, Z., Jiang, F., Han, S., Zheng, S., & Lin, Y. (2013). Screening for glycosylphosphatidylinositol-modified cell wall proteins in *Pichia pastoris* and their recombinant expression on the cell surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5519-5526.

Zhou, G.-x., Chen, G.-y., & Yan, B.-b. (2015). Two-step biocatalytic process using lipase and whole cell catalysts for biodiesel production from unrefined jatropha oil. *Biotechnology Letters*, 37(10), 1959-1963.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารกึ่งแข็ง YM (Yeast Malt Agar)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (D-Glucose)	10	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนชั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว YM (Yeast Malt Broth)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (D-Glucose)	10	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชั้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารกึ่งแข็ง YPD (Yeast Peptone Dextrose Agar)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
เปปโตน (Peptone)	20	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (D-Glucose)	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม

น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร
----------------------------	---	------

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลว YPD (Yeast Peptone Dextrose Broth)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
เปปโติน (Peptone)	20	กรัม
น้ำตาลกลูโคส (D-Glucose)	20	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารแข็ง LB (Luria-Bertani Agar)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
ทริปโติน (Tryptone)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเหลวสูตรผลิตลิเพสสำหรับ *C. rugosa* (Lipase Production Medium for *C. rugosa*: LPMC)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม

น้ำมันปาล์ม (Palm oil)

3 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 5 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเหลวสูตรผลิตลิเพสสำหรับ *A. pullulans* (Lipase Production Medium for *A. pullulans* : LPMP)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	11.7	กรัม
น้ำตาลซูโครส	14	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	10	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1	กรัม
กรดไขมันอิสระ	3	เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 5.0 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหาร BMGY (Buffer Glycerol Complex Medium)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
เปปโตน (peptone)	20	กรัม
0.1 M โพแทสเซียมฟอสเฟต pH6	100	มิลลิลิตร
1.34 % YNB (stock 10x)	100	มิลลิลิตร
ไบโอดีน 0.02 %	2	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล 1% (stock 10x)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

9. อาหาร BMMY (Buffer Methanol Complex Medium) ปริมาตร 1 ลิตร

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	10	กรัม
เปปโตน (Peptone)	20	กรัม

0.1 M โปแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH6	100	มิลลิลิตร
1.34 % YNB (stock 10x)	100	มิลลิลิตร
ไบโอดีน 0.02 %	2	มิลลิลิตร
เมทานอล 1% (stock 10x)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร



ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวัดแอกทิวิตีลิเพสของ *C. rugosa*, *A. pullulans*, Pp-CRL1 และ Pp-CRL3
100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ pH 7.2

Solution A:

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 7.8 กรัม

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2.9 กรัม

ปรับปริมาณเป็น 500 มิลลิลิตร

Solution B:

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 7.9 กรัม

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 2.9 กรัม

ปรับปริมาณเป็น 500 มิลลิลิตร

จากนั้นเท Solution A ลงใน B จนได้ pH 7.2

40 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนอลบิวทิเรต

พาราไนโตรฟีนอลบิวทิเรต 418 มิลลิกรัม

2-เมทิล-2-บิวทานอล 50 มิลลิลิตร

*สำหรับยีสต์ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3 ใช้ 120 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนอลบิวทิเรต

2. สารเคมีสำหรับวัดแอกทิวิตีลิเพสของ Pp-AML

50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ pH 7.0

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 3.9 กรัม

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.45 กรัม

ปรับปริมาณเป็น 500 มิลลิลิตร

Solution B:

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 3.95 กรัม

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1.45 กรัม

ปรับปริมาณเป็น 500 มิลลิลิตร

จากนั้นเท Solution A ลงใน B จนได้ pH 7.2

120 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนอลเรต

พาราไนโตรฟีนอลเรต 385.7 มิลลิกรัม

เอทานอล 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับศึกษาสมบัติบางประการของ Pp-CRL1 , Pp-CRL3 และ Pp-AML

2.1 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH6, pH 7

เหมือนการเตรียมที่ผ่านมาแต่ปรับให้ pH = 6 และ 7

2.2 100 มิลลิโมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอริก pH7

ทริส 1.21 กรัม

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ค่อยๆ ปรับ pH โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ให้ได้ pH สุดท้าย เท่ากับ 6 และ 7

2.3 100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรท pH 4 และ pH 5

สารละลาย A : กรดซิตริก 2.1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B : โซเดียมซิเตรท 2.94 กรัม ละลายใน 100 มิลลิลิตร

ผสมสาร A และ B จนได้ pH 4 และ 5

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

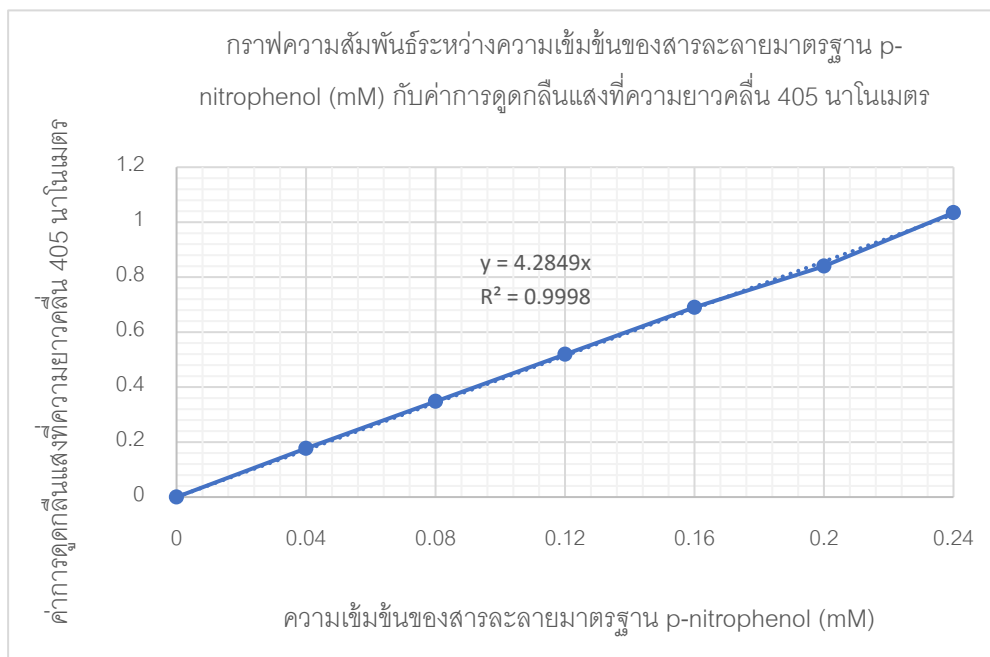
1. กราฟมาตรฐานของไนโตรฟีนอลสำหรับนำไปใช้คำนวณแอกทิวิตีของลิเพสของ *C. rugosa*, *A. pullulans*

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟีนอล

1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอล 2 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.2 เป็นตัวทำละลาย

2. บีบิตสารละลายพาราไนโตรฟีนอล จากข้อ 1 และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.2 ลงใน ไมโครเพลต ตามตารางด้านล่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรและนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง แกน X คือความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลในหน่วยมิลลิโมลาร์

พาราไนโตรฟีนอล (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	พาราไนโตรฟีนอล (2 มิลลิโมลาร์)	0.1 โมลาร์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.2
0	0	500
0.04	10	490
0.08	20	480
0.12	30	470
0.16	40	460
0.2	50	450
0.24	60	440



ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.24 มิลลิโมลาร์
สำหรับ *C. rugosa* และ *A. pullulans*

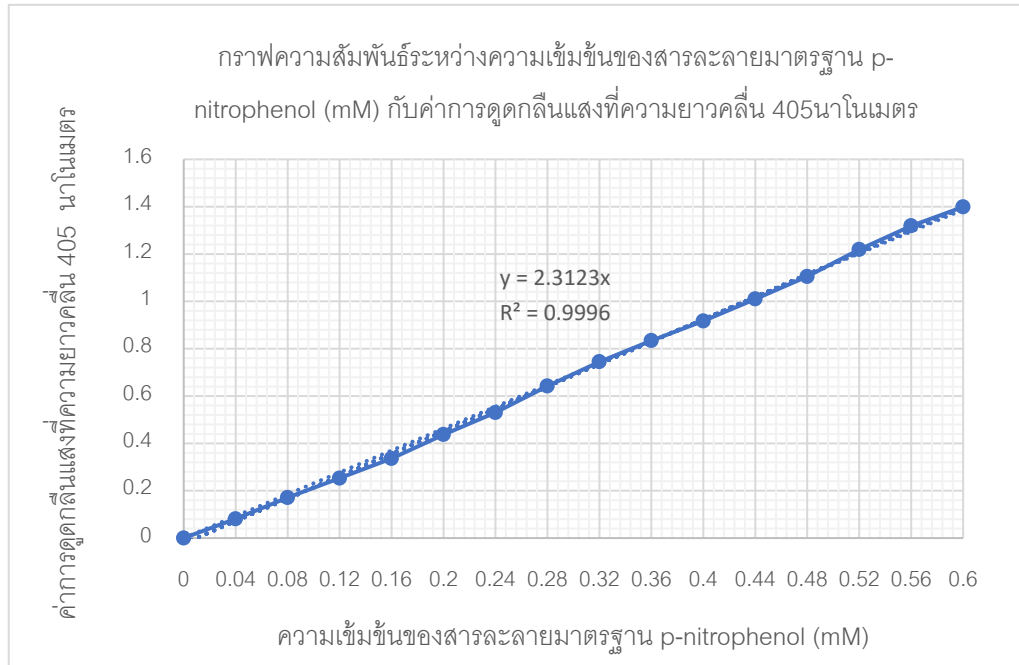
2. กราฟมาตรฐานของไนโตรฟินอลสำหรับนำไปใช้คำนวณแอกทิวิตีที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL1 , Pp-CRL3 , Pp-AML

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟินอล (ความเข้มข้น 0-0.6 มิลลิโมลาร์)

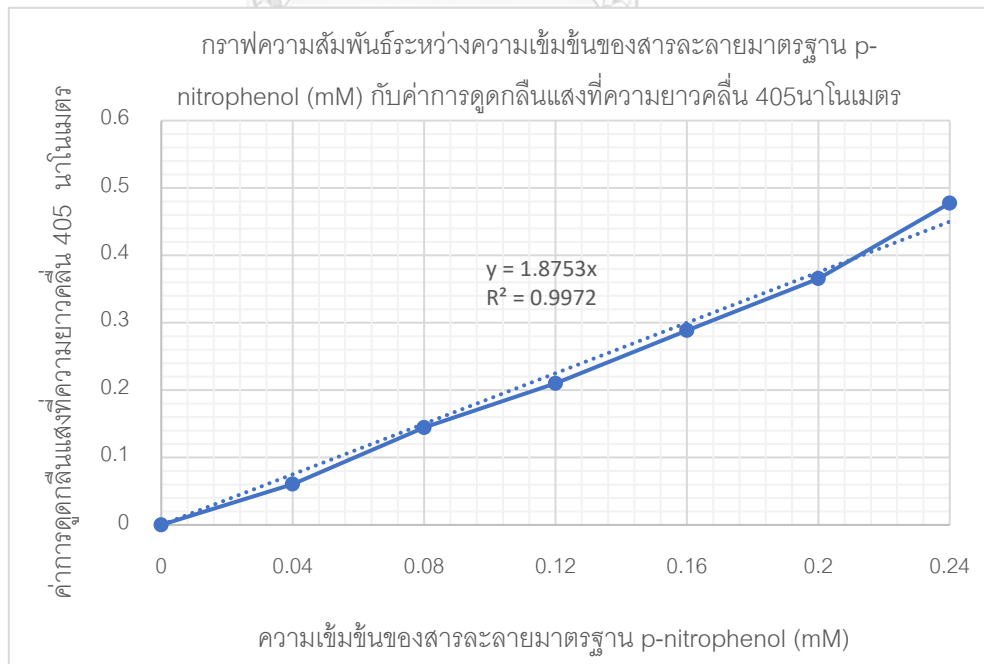
1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟินอล 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร โดยใช้ 0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง 7.2 เป็นตัวทำละลาย

2. บีบสารละลายพาราไนโตรฟินอล จากข้อ 1 และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.2 ลงใน microtube จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรและนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง แกน X คือความเข้มข้นของพาราไนโตรฟินอลในหน่วยมิลลิโมลาร์

*สำหรับ Pp-AML ใช้ 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 แทน



ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.6 มิลลิโมลาร์
สำหรับ Pp-CRL1 และ Pp-CRL3



ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.24 มิลลิโมลาร์
สำหรับ Pp-AML

การศึกษาสมบัติบางประการของ Pp-CRL1 , Pp-CRL3 , Pp-AML จะสร้างกราฟมาตรฐานของไนโตรฟินอลความเข้มข้น 0-0.64 มิลลิโมลาร์ สำหรับนำไปใช้คำนวณแอกทิวิตีในลักษณะเดียวกัน แต่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ pH 5-10



ภาคผนวก ง การคำนวณ

1. การคำนวณค่าแอกทิวิตี

วิธีคำนวณทำโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดมาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ตามสมการดังนี้

$$Y = 4.481X$$

โดยทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะทำให้ได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณของพาราไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเป็นมิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับหน่วยของพาราไนโตรฟีนอลจากมิลลิโมลาร์ให้อยู่ในหน่วยไมโครโมล แล้วคูณกลับให้เป็นการใช้เอนไซม์ในหน่วยต่อมิลลิลิตร จะได้หน่วยเป็นไมโครโมลต่อเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และสุดท้ายหารด้วยเวลาที่ให้เกิดปฏิกิริยา คือ 10 นาที จะได้หน่วยสุดท้ายเป็นหน่วย ไมโครโมล ต่อมิลลิลิตร ต่อนาที หรือหน่วยยูนิตนั่นเอง

1 ยูนิตของลิเพส (U/ml) คือ การเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนอลบิวทิเรตเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สำหรับ Pp-CRL1 , Pp-CRL3 , Pp-AML จะคำนวณในลักษณะเดียวกัน แต่อยู่ในหน่วย mU/OD₆₀₀ หรือ U/OD₆₀₀ โดยจะแทนค่า Y ตามกราฟมาตรฐานในแต่ละบัฟเฟอร์นั้นๆ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ทำได้โดยแทนค่าที่ได้จากฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในสมการ

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

เมื่อ %conversion คือ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

[FAME] คือ ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากโครมาโทแกรม

[TAG] คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

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

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

[MAG] คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

3. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของกรดไขมันต่อเมทานอล

$$\text{หาน้ำหนักของเมทานอลจากสูตร } Y = \frac{(A)(B)(MW_{\text{MeOH}})}{MW_{\text{FFA}}}$$

โดยที่ Y คือน้ำหนักของเมทานอล

A คือ น้ำหนักของกรดไขมันอิสระจากการชั่ง

B คือ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล

MW_{FFA} คือ น้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันอิสระ เท่ากับ 257.25 กรัม

MW_{MeOH} คือ น้ำหนักโมเลกุลของเมทานอล เท่ากับ 32.04 กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตัวอย่างการคำนวณ กำหนดให้อัตราส่วนของกรดไขมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จากนั้นชั่งกรดไขมัน 4 กรัม

ดังนั้น

$$Y = \frac{(4)(3)(32.04)}{257.25} = 1.494 \text{ กรัม}$$

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

เมื่อ Z คือ ปริมาตรของเมทานอล

Y คือ น้ำหนักเมทานอล

D คือ ค่าความหนาแน่นของเมทานอลเท่ากับ 791 กรัมต่อลิตร

$$\text{จะได้} \quad Z = \frac{(1.494)(1000)}{791} = 1.89 \text{ มิลลิลิตร}$$

4. วิธีคำนวณค่าแอกทิวิตีที่ผิวเซลล์ของ Pp-CRL1 , Pp-CRL3 จากเซลล์แห้ง เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์ม

ตัวอย่างเช่น

Pp-CRL1 หลังจากทำ lyophilization แล้วนำไปวัดแอกทิวิตี

10 OD₆₀₀ ใช้เซลล์แห้งในการวัดแอกทิวิตี 0.0111 g

คำนวณแอกทิวิตีได้ 360 mU/OD₆₀₀

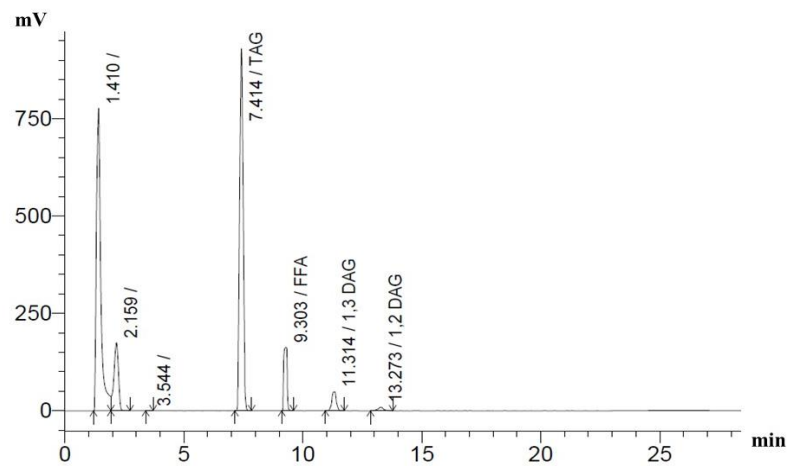
หากต้องการ Pp-CRL1 10 U

$$\text{จะต้องชั่งเซลล์แห้ง} \quad \frac{0.0111 \text{ g} \times 10 \text{ U} \times 1000}{360 \text{ U}} = 0.305 \text{ g}$$

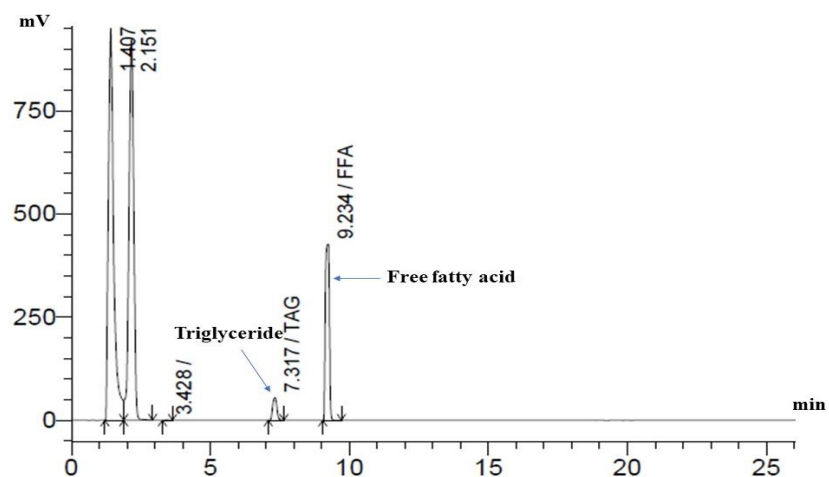
ภาคผนวก จ

ข้อมูล

การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มที่ 120 ชั่วโมง จากตัวเร่งปฏิกิริยา
ยีสต์ *C. rugosa* แบบทั้งเซลล์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

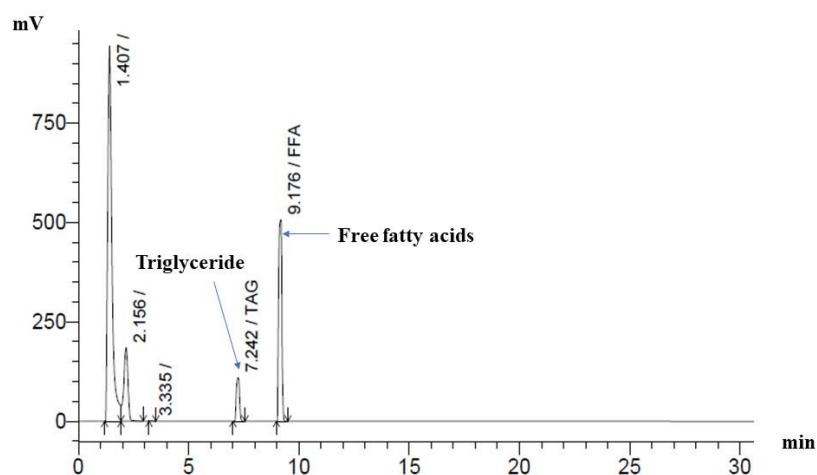


ภาพที่ จ-1 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์
C. rugosa ที่เวลา 0 ชั่วโมง

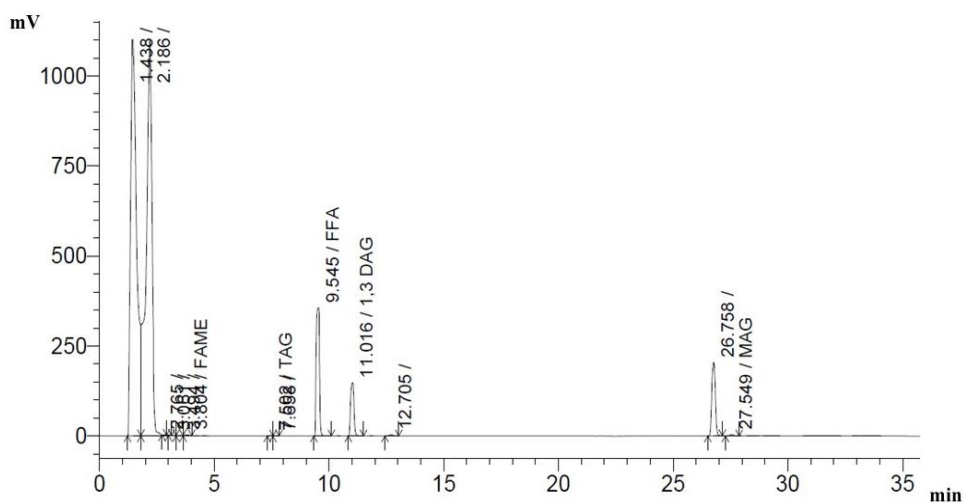


ภาพที่ จ-2 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์
C. rugosa ที่เวลา 120 ชั่วโมง

การทดลองเรื่องการผลิตเอสเตอร์ที่ 72 ชั่วโมง จากตัวเร่งปฏิกิริยาอีสต์ *A. pullulans* แบบทั้งเซลล์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนกรดไขมันต่อเมทานอลที่ 1:1

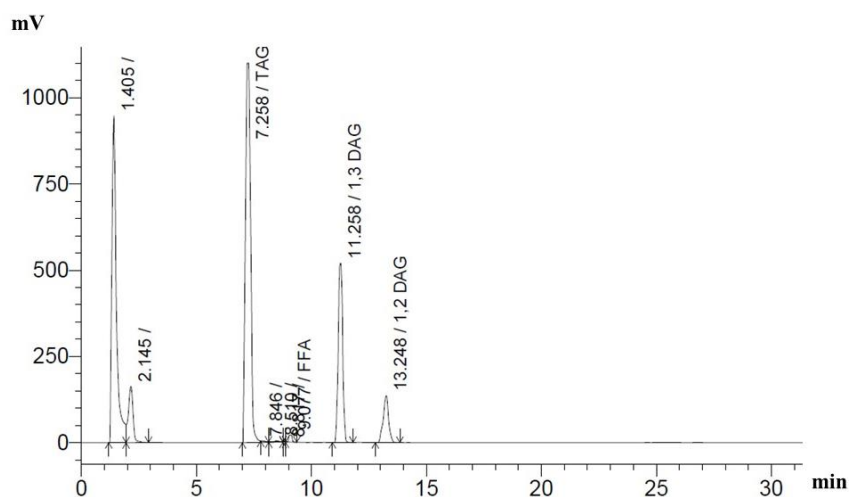


ภาพที่ จ-3 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากตัวเร่งปฏิกิริยาอีสต์ *A. pullulans* ที่เวลา 0 ชั่วโมง

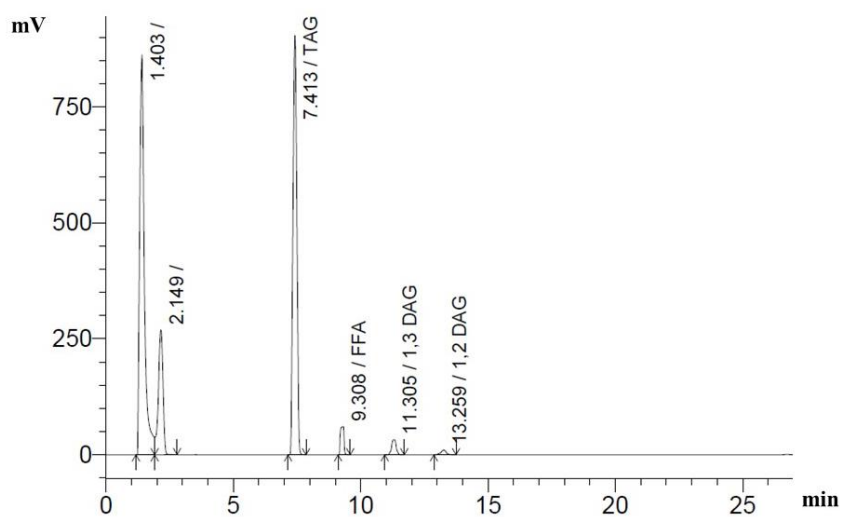


ภาพที่ จ-4 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากตัวเร่งปฏิกิริยาอีสต์ *A. pullulans* ที่เวลา 72 ชั่วโมง

การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไขมันปาล์มที่ 48 ชั่วโมง จากตัวเร่งปฏิกิริยา
ยีสต์ Pp-CRL1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



ภาพที่ จ-5 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ Pp-
CRL1 ที่เวลา 0 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



ภาพที่ จ-6 โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากตัวเร่งปฏิกิริยายีสต์ Pp-
CRL1 ที่เวลา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จุนิสา หวังประดิษฐ์
วัน เดือน ปี เกิด	7 พฤศจิกายน 2533
สถานที่เกิด	สุราษฎร์ธานี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	82/1 หมู่ 12 ตำบลห้วยยาบ อำเภอบ้านธิ จังหวัดลำพูน 51180
ผลงานตีพิมพ์	เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการในงาน “The 5th International Conference on Food and Applied Bioscience 2020 (FAB 2020): Insights for Research and Industry 4.0” ที่โรงแรม เชียงใหม่แกรนด์วิว จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 6-7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ในหัวข้อเรื่อง “The optimal condition of lipase production by whole-cell biocatalyst for biodiesel production”



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY