

เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์
สำหรับการตรึงโลหะ

นางสาวรุ่งอรุณ พัดเย็นชื่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ELECTROSPUN FIBERS FROM POLYSTYRENE/POLY(STYRENE-CO-MALEIC ANHYDRIDE)
BLENDS FOR LIPASE IMMOBILIZATION

Miss Rung-a-roon Pudyenchuen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Applied Polymer Science and Textile Technology
Department of Materials Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2010
Copyright of Chulalongkorn University

รุ่งอรุณ พัดเย็นชื่น : เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์สำหรับการตรึงไลเพส (ELECTROSPUN FIBERS FROM POLYSTYRENE/POLY(STYRENE-CO-MALEIC ANHYDRIDE) BLENDS FOR LIPASE IMMOBILIZATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.มณฑนา โอภาประกาศิต, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร.นพวรรณ ชนัญพานิช, รศ.ดร.วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกุล, 63 หน้า

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นพอลิสไตรีน (PS)/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PS/PSMA) เป็นวัสดุค้ำจุนสำหรับตรึงรูปเอนไซม์ไลเพส จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PS ต่อ PSMA ที่ 4:1 และ 1:1 พบว่าภาวะที่ใช้ ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) มีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติของเส้นใยที่เตรียมได้ ทั้งนี้ภาวะที่สามารถเตรียมเส้นใยของ 4:1 และ 1:1 PS/PSMA ให้มีลักษณะเรียบและไม่เกิดเป็นปมขึ้น รวมถึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุดคือ 6:11:15 และ 8:10:12 ตัวทำลายที่เหมาะสมสำหรับ 4:1 และ 1:1 PS/PSMA คือตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วน 2:1 และ 1:1 ตามลำดับ เมื่อนำเส้นใยที่เตรียมจากภาวะดังกล่าวไปตรึงรูปเอนไซม์ พบว่า การใช้เส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปดีที่สุด โดยมีค่าความจุเอนไซม์และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป (U/mg support) สูงกว่า 4:1 PS/PSMA และ 1:0 PS/PSMA ตามลำดับ จากการตรวจสอบความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปบน 1:1 PS/PSMA สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง ในขณะที่เอนไซม์ตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจาก PS/PSMA ที่มีสัดส่วนของ PSMA น้อยกว่าร้อยละ 50 สามารถใช้ซ้ำได้น้อยกว่า การปรับสภาพเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำไปตรึงรูปสามารถเพิ่มค่าความจุเอนไซม์ได้ถึง 2.7 เท่า

ในการศึกษานี้ยังได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA ซึ่งเป็น PS bead ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปทรงที่แตกต่างกันของวัสดุค้ำจุนมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการตรึงรูป ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบน NKA มีค่าความจุเอนไซม์ที่ต่ำกว่าแต่มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสของเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงกว่ากรณีที่ใช้เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น

ภาควิชา.....วัสดุศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา...2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5172421923: APPLY POLYMER SCIENCE AND TEXTILE TECHNOLOGY

KEYWORDS: Electrospinning / Lipase Immobilization / Nanofiber

RUNG-A-ROON PUDYENCHUEN :ELECTROSPUN FIBERS FROM POLYSTYRENE/POLY(STYRENE-CO-MALEIC ANHYDRIDE) BLENDS FOR LIPASE IMMOBILIZATION. ADVISOR: ASST. PROF. MANTANA OPPRAPASIT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. NOPPAVAN CHANUNPANICH, Ph.D., ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 63 pp.

This research is aimed to study the efficiency of using polystyrene/polystyrene-co-maleic anhydride electrospun fibers as a supporting material for lipase immobilization. It is found from the study for the optimum conditions in preparing e-spun fibers from polymer blends of PS:PSMA with mixing ratio at 4:1 and 1:1 that voltage (kV) : distance between needle and collector (cm) : concentration of polymer solution (%w/w) has significant effect on fiber morphology. The suitable conditions, in which smooth surface with bead-free fibers are obtained, for 4:1 and 1:1 PS/PSMA are 6:11:15 and 8:10:12, respectively. Suitable solvents for preparing these PS/PSMA blends are mixed solvent of DMF and THF at mixing ratio 2:1 and 1:1, respectively. It is found from using these e-spun mats for lipase immobilization that e-spun mat of 1:1 PS/PSMA provides the highest immobilization efficiency. Its protein loading and hydrolysis activity (U/mg support) are higher than those of 4:1 PS/PSMA and 1:0 PS/PSMA, respectively. From the re-usability test with hydrolysis reaction, while the immobilized enzyme on 1:1 PS/PSMA is possibly re-use for 6 times, the immobilized lipase on e-spun PS/PSMA with PSMA content less than 50% can be re-used much less. Pre-treatment of e-spun mat with alcohol can improve protein loading for ~ 2.7x.

Efficiency of lipase immobilization on commercial support as NKA (PS bead) is also studied in comparison with e-spun mat. Results show that shape (form) of the supporting materials has an influence on the immobilization efficiency. Immobilized enzyme of NKA has lower protein loading but much higher activity (U/mg lipase) than that of e-spun mats.

Department: Material Science..... Student's Signature:.....
 Field of Study : Applied Polymer Science and Textile Technology. Advisor's Signature:
 Academic Year:.....2010..... Co- Advisor's Signature.....
 Co- Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์อย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มัทธนา โอบาประกาศิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักผู้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาอย่างดียิ่งตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงแนะแนวทางในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นพวรรณ ชันญพานิช และรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ รวมถึงคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อบรมและให้ความรู้ต่างๆ อันมีค่าให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยบูรณาการนาโน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเจ้าพระนครเหนือ และภาควิชาฟิสิกส์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือด้วยดีจากเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ตลอดจน สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการดำเนินงานแก่งานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในห้องปฏิบัติการทุกๆท่าน ด้วยความซาบซึ้งใจ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย รวมถึงให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อน สำหรับการสนับสนุน ความรัก และความห่วงใยที่มีให้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ความรู้พื้นฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 อิเล็กโทรสปินนิง (ELECTROSPINNING).....	3
2.2 ไลเปส (LIPASE).....	5
2.3 การตรึงเอนไซม์ (ENZYME IMMOBILIZATION).....	9
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	12
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	16
3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ.....	16
3.1.1 สารเคมีในการทดลอง.....	16
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	17
3.1.3 เครื่องมือวิเคราะห์.....	17
3.2 ขั้นตอนการทดลอง.....	18
3.2.1 การศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปิน จากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีนและพอลิสไตรีนโคมาเลอิก แอนไฮไดรด์.....	18
3.2.2 การเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปินจาก PS/PSMA สำหรับใช้ในการ ตรึงรูปเอนไซม์.....	19
3.2.3 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้เส้นใยอิเล็กโทรสปินที่ไม่ได้ปรับสภาพ.....	20

3.2.4 การตรึงรูปเอนไซม์โดยฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์บนที่รับสภาพด้วย แอลกอฮอล์ก่อน.....	20
3.3 การวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปและประสิทธิภาพของการตรึงรูป.....	21
3.3.1 การหาค่าความจุเอนไซม์ (protein loading).....	21
3.3.2 การหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ (activity).....	23
3.3.3 การทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูปด้วย ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส.....	25
3.3.4 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ของไลเพสอิสระ.....	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	26
4.1 การเตรียมเส้นใยนาโนของพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีน (PS) และ พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PSMA) ด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์บน.....	26
4.1.1 พอลิเมอร์ผสม PS/PSMA ที่อัตราส่วนผสมเป็น 1:1 โดยน้ำหนัก (1:1 PS/PSMA).....	26
4.1.2 พอลิเมอร์ผสม PS/PSMA ที่อัตราส่วนผสมเป็น 4:1 โดยน้ำหนัก (4:1 PS/PSMA).....	31
4.1.3 พอลิเมอร์ผสม PS/PSMA ที่อัตราส่วนผสมเป็น 1:0 โดยน้ำหนัก (1:0 PS/PSMA).....	36
4.2 การตรึงเอนไซม์ไลเพสบนเส้นใยนาโนที่เตรียมได้จากวิธีอิเล็กทรอนิกส์บน.....	37
4.2.1 การตรึงรูปไลเพสโดยเส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพ.....	47
4.2.2 ปรับสภาพเส้นใยด้วยแอลกอฮอล์ก่อนใช้ในการตรึงรูป.....	48
4.3 การทดสอบความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ.....	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	50
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	50
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	51
รายการอ้างอิง.....	52
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก.....	55
ภาคผนวก ข.....	56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ภาวะที่ใช้ในการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากสารละลายพอลิเมอร์ผสม พอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PS/PSMA).....	17
3.2	สัดส่วนของสารละลายพาราไนโตรฟินอล น้ำกลั่นและฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน.....	22
3.3	สัดส่วนของสารละลายชนิดต่างๆ ที่ปีเปิดลงใน well เพื่อใช้หาค่าแอกทิวิตีของ เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป.....	24
4.1	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ 1:1 PS/PSMA ที่เตรียมจากสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 12% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับเป็น 10 cm และ ศักย์ไฟฟ้าต่างๆ.....	30
4.2	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมจากสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 15% (w/w) ในตัวทำละลายผสม DMF:THF เป็น 2:1 ที่ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับต่างๆ.....	34
4.3	% immobilization ปริมาณโปรตีน และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น PS/PSMA โดยเลือกใช้รูปแบบการตัดผืนเส้นใยต่างกัน.....	38
4.4	% immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น PS/PSMA เมื่อปรับสัดส่วนของน้ำหนักของเส้นใยและสารละลายไลเพสต่างๆ.....	39
4.5	ค่า water cotact angle ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นทั้งก่อนและหลังการตรึงรูปเอนไซม์.....	42
4.6	% immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น PS/PSMA และ NKA	44
4.7	ค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น PS/PSMA และ NKA ในแต่ละรอบของการใช้ซ้ำ.....	48
ข-1	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรึงรูปบน 1:0 PS/PSMA ที่ตัดเป็นวงกลม น้ำหนัก 10 mg.....	56
ข-2	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรึงรูปบน 4:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นวงกลม น้ำหนัก 10 mg.....	56

ตารางที่		หน้า
ข-17	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน 1:1 PS/PSMA ที่ปรับสภาพด้วยสารละลายแอลกอฮอล์.....	61
ข-18	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน NKA น้ำหนัก 500 mg.....	61
ข-19	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.1748x$	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบและหลักการของวิธีอิเล็กโตรสปินนิง (ก) ก่อนให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง และ (ข) เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงที่มีค่ามากพอแก่ระบบจนกระทั่งเกิดเส้นใยนาโนขึ้น.....	4
2.2	ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เส้นใยนาโน.....	5
2.3	ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส.....	6
2.4	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมทานอล.....	7
2.5	.การตรึงรูปเอนไซม์โดย (ก) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ข) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (ค) วิธีการดูดซับทางกายภาพ.....	10
2.6	การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมขวาง.....	11
2.7	การตรึงรูปเอนไซม์โดย (ก) วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (ข) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ ในแคปซูลเล็ก.....	12
3.1	อุปกรณ์ปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) ที่สำหรับเตรียมเส้นใยนาโนที่ใช้ในการตรึงรูป.....	19
4.1	SEM ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ความเข้มข้น 10% (w/w) และค่าศักย์ไฟฟ้าเป็น (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 ตามลำดับ.....	26
4.2	SEM ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ความเข้มข้น 12% (w/w) และค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ.....	27
4.3	SEM ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ความเข้มข้น 15% (w/w) และค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ.....	28
4.4	ร้อยละความถี่ที่สัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 1:1 PS/PSMA ที่เตรียมที่ด้วยศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ(cm):ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) เป็น (ก) 6:10:12 (ข) 8:10:12 (ค) 10:10:12.....	29
4.5	SEM ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสม 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 10% (w/w) และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm โดยปรับเปลี่ยนค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ.....	31

ภาพที่	หน้า
4.6 SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสม 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 12% (w/w) และระยะห่างระหว่างปลายเชื่อมกับฉากรับ 10 cm โดยปรับเปลี่ยนค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ	32
4.7 SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสม 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 15% (w/w) และระยะห่างระหว่างปลายเชื่อมกับฉากรับ 10 cm โดยปรับเปลี่ยนค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ.....	33
4.8 SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสม 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 15% (w/w) อัตราส่วนของ DMF และ THF เป็น 2:1 (w/w) และที่ศักย์ไฟฟ้า 6 kV โดยปรับเปลี่ยนระยะห่างระหว่างปลายเชื่อมกับฉากรับเป็น (ก) 10 cm (ข) 11 cm และ (ค) 12 cm ตามลำดับ.....	34
4.9 ร้อยละความถี่ที่สัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมที่ด้วย ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเชื่อมกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) เป็น (ก) 6:10:15 (ข) 6:11:15 (ค) 6:12:15.....	35
4.10 (ก) รูปจาก SEM และ (ข) การกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสม 1:0 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 20% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเชื่อมกับฉากรับ 10 cm ที่ศักย์ไฟฟ้า 8 kV...	36
4.11 ผืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมได้ (57 cm x 97.3 cm) จากการฉีดเส้นใยอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	37
4.12 (ก) % Immobilization และ (ข) protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้โครงสร้างไลเพสบน PS/PSMA ตามตารางที่ 4.4.....	40
4.13 (ก) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมแอนไซม์ตรึงรูป และ (ข) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมไลเพสที่ถูกตรึงรูปที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเพสบน PS/PSMA ตามตารางที่ 4.4.	41
4.14 ภาพ SEM ของเส้นใยก่อน (ซ้าย) และหลัง(ขวา) ตรึงรูปของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ (ก-ข) 1:0 (ค-ง) 4:1 และ (จ-ฉ) 1:1 PS/PSMA ตามลำดับ.....	43
4.15 (ก) % Immobilization และ (ข) protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเพสบน NKA และ 1:1 PS/PSMA.....	45

ภาพที่		หน้า
4.16	(ก) แอวกทิวิตีต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรีงรูป และ (ข) แอวกทิวิตีต่อมิลลิกรัมไลเพสที่ถูกตรีงรูปที่สัมพันธ์กับภาวะที่เชื้อตรีงรูปไลเพสบน NKA และ PS/PSMA	46
4.17	ผืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ PS/PSMA ของ 1:1 PS/PSMA (ก,ข) ก่อนการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์ เมื่อเทียบกับ (ค,ง) หลังการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์.	47
4.18	(ก) ค่าแอวกทิวิตีของเอนไซม์ตรีงรูป และ (ข) % ค่าแอวกทิวิตีคงเหลือของไลเพสตรีงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ PS/PSMA (20 mg/3 ml) และ NKA (20mg/2ml) ในแต่ละรอบของการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซ้ำ.....	49
ก-1	กราฟมาตรฐานของBSAปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม.....	55
ก-2	กราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟินอลที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม.....	55

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์เป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีความพิเศษคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ภายใต้ภาวะที่รุนแรงน้อยกว่า และมีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า ซับสเตรต ข้อดีเหล่านี้ทำให้มีการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมเคมี ยา และอาหาร รวมถึงประยุกต์ใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์คือ ความไม่เสถียรของเอนไซม์และความเป็นไปได้ในการนำกลับมาใช้ซ้ำ แนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์คือการตรึงรูปเอนไซม์

การตรึงรูปเอนไซม์ที่ดีคือ วิธีการที่ทำให้เอนไซม์อยู่ในขอบเขตที่กำหนด โดยยังคงประสิทธิภาพหรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้มากที่สุด รวมถึงสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำได้มากขึ้น การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพนั้นเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และจะส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์น้อยที่สุด แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวค้ำจุนได้ง่ายเนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์และตัวค้ำจุนไม่แข็งแรง การตรึงเอนไซม์ด้วยการยึดติดกับตัวค้ำจุนด้วยพันธะโคเวเลนต์ เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถเพิ่มโอกาสการใช้ซ้ำของเอนไซม์ได้มากกว่าวิธีอื่นๆ

ชนิด องค์ประกอบ และโครงสร้างของวัสดุที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนมีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูป โดยวัสดุค้ำจุนที่มีการทดลองนำมาตรึงเอนไซม์มีทั้งลักษณะที่เป็นอนุภาคทรงกลม (beads) และแผ่นฟิล์ม ในปัจจุบันยังมีงานวิจัยที่สนใจใช้เส้นใยที่เตรียมด้วยวิธีปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต ซึ่งมีจุดเด่นที่มีพื้นที่ผิวและความพรุนตัวที่สูงมาเป็นตัวค้ำจุนอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความเป็นไปได้ในการตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น ซึ่งวัสดุที่สนใจที่จะนำมาเตรียมเป็นเส้นใยคือพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ เนื่องจากพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์สามารถดัดแปรให้เกิดพันธะโคเวเลนต์กับเอนไซม์ไลเพสได้ โดยศึกษาอิทธิพลของลักษณะทางกายภาพของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้และอัตราส่วนผสมระหว่างพอลิสไตรีนและพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ต่อประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาอิทธิพลของภาวะที่ใช้ในการเตรียมต่อสัญญาณวิทยาของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปืนจากพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิก-แอนไฮไดรด์
- 1.2.2 ศึกษาอิทธิพลของสัญญาณวิทยาของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปืนและอัตราส่วนพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ต่อประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพส

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปืนจากพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิก-แอนไฮไดรด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปไลเพส

บทที่ 2

ความรู้พื้นฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

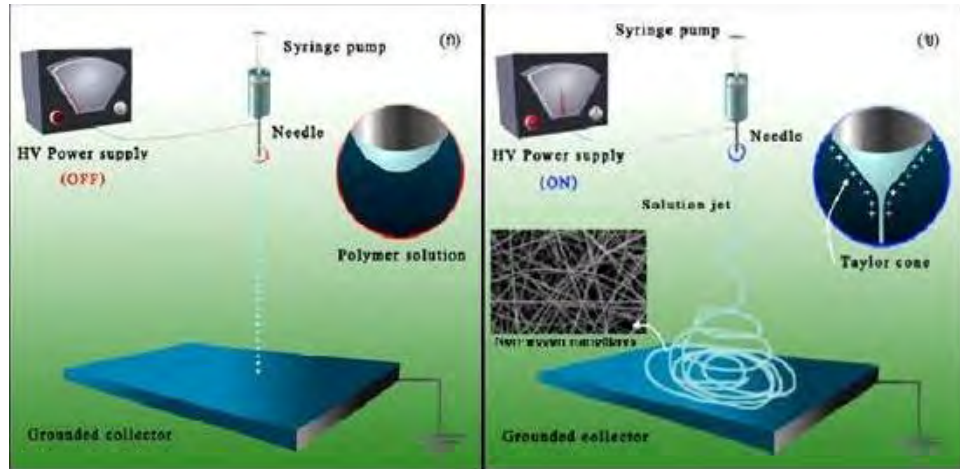
2.1 อิเล็กโทรสปินนิง (ELECTROSPINNING)

เป็นเทคนิคที่นำมาใช้เตรียมเส้นใยหรืออนุภาคโดยอาศัยแรงทางไฟฟ้าที่เกิดจาก ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคหรือเส้นใยที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 10 นาโนเมตร ถึงมากกว่า 1 ไมโครเมตร อุปกรณ์พื้นฐานประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ

- แหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง (high voltage power supply)
- หลอดบรรจุสารละลายที่ติดเข็มโลหะ (syringe with needle)
- วัสดุรองรับที่เป็นโลหะ (metal collector)

โดยจัดเป็นระบบที่ไม่ซับซ้อน เสียค่าใช้จ่ายน้อย และใช้งานได้สะดวก ทั้งนี้ สามารถพัฒนาให้ดีขึ้นโดยการใช้อุปกรณ์ควบคุมอัตราการไหลของสารละลาย (syringe pump) ทำให้การประดิษฐ์เส้นใยมีประสิทธิภาพสูงขึ้น กล่าวคือ สามารถควบคุมขนาด และปริมาณการเกิดเส้นใยได้ต่อเนื่องมากยิ่งขึ้น

การทำงานของระบบอิเล็กโทรสปินนิงแสดงในรูปที่ 2.1 ก่อนการให้ศักย์ไฟฟ้า กำลังสูงแก่ระบบ (รูปที่ 2.1 ก) สารละลายจำนวนหนึ่งจะรวมตัวกันเป็นหยดรูปร่างครึ่ง ทรงกลมที่บริเวณปลายเข็มโลหะอันเป็นผลเนื่องมาจากแรงตึงผิว (surface tension) แต่ เมื่อให้ความต่างศักย์กำลังสูงจะทำให้เกิดสนามไฟฟ้าครอบคลุมส่วนปลายของเข็มโลหะและมีประจุเกิดขึ้นที่ผิวของสารละลาย จึงเกิดแรงผลักทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic repulsion) ขึ้นในทิศตรงกันข้ามกับแรงตึงผิว ดังนั้นถ้าสนามไฟฟ้ามีค่ามากพอที่จะทำให้เกิดแรงผลักมากกว่าแรงตึงผิว จะส่งผลให้รูปร่างครึ่งทรงกลมของสารละลายที่อยู่ปลาย เข็มยืดออกเป็นรูปร่างทรงกรวยที่เรียกว่า "กรวยของเทเลอร์" (Taylor's cone) และเมื่อ สนามไฟฟ้าที่ให้แก่ระบบมีค่ามากขึ้นจนกระทั่งถึงค่าวิกฤตค่าหนึ่งจะเกิดแรงขับเคลื่อนให้ สารละลายพุ่งออกมาเป็นลำ (solution jet) ต่อมาลำของสารละลายนี้จะยืดออกจนมี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลงถึงระดับนาโนเมตร แล้วตกลงบนวัสดุรองรับในลักษณะที่ ไม่เกิดการถักทอ (non-woven nanofiber) (รูปที่ 2.1 ข)



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบและหลักการของวิธีอิเล็กโตรสปินนิง (ก) ก่อนให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง และ (ข) เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงที่มีค่ามากพอแก่ระบบจนกระทั่งเกิดเส้นใยนาโนขึ้น [1]

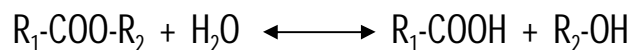
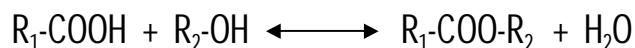
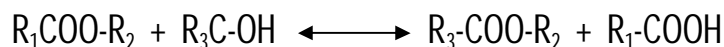
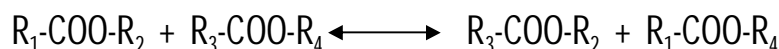
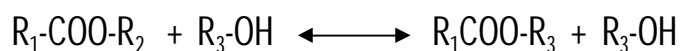
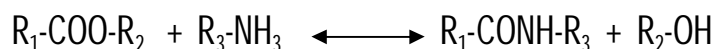
เส้นใยนาโน (Nanofibers) [1] เป็นเส้นใยที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรถึงระดับ 100 นาโนเมตร มีข้อดีคือ อัตราส่วนระหว่างพื้นผิวต่อปริมาตร (surface-to-volume ratio) สูง นอกจากนี้ยังมีขนาดของรูพรุนที่เล็กด้วย ส่งผลให้มีสมบัติพิเศษต่างๆ เช่น สมบัติเชิงกล สมบัติทางไฟฟ้า หรือสมบัติทางชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับงานเฉพาะด้าน ซึ่งต้องการความได้เปรียบของขนาดที่เล็กมากๆ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีและสารที่นำมาใช้ประดิษฐ์ ปัจจุบันเริ่มมีการประยุกต์ใช้เส้นใยนาโนทางด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การประยุกต์ใช้งานของเส้นใยนาโนพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ ไม่เป็นพิษและมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสำหรับงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ผ้าปิดแผล ระบบนำส่งยา ระบบการกรองอย่างละเอียด นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้งานทางด้านต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เส้นใยนาโน

2.2 ไลเปส (LIPASE)

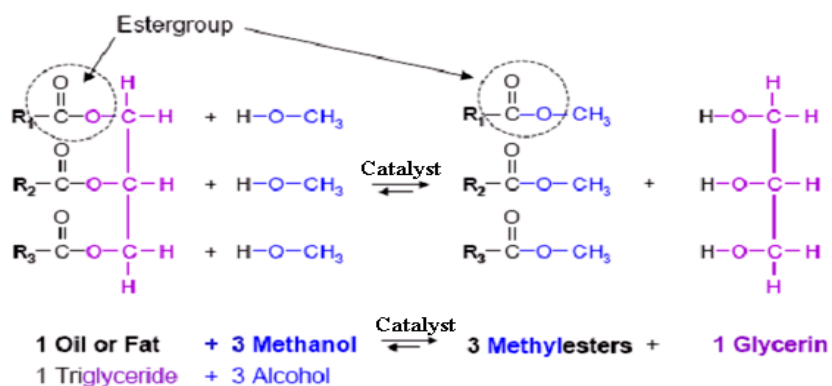
เอนไซม์ไลเปส (Lipase) [2] มีชื่อตามระบบของ International Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) และชื่อตามรหัสคือ EC 3.1.1.3 เป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่ทำให้พันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เปลี่ยนเป็นไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) กรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis reaction) ได้แก่ เอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) และทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาประเภทแอซิดโกลิซิส (acidolysis) อินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (interesterification) แอลกอฮอล์โกลิซิส (alcoholysis) และ อะมิโนโกลิซิส (aminolysis) อีกด้วย (รูปที่ 2.3)

ไฮโดรไลซิสเอสเทอร์ฟิเคชันแอซิโดไลซิสอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชันแอลกอฮอล์ไลซิสอะมิโนไลซิส**รูปที่ 2.3** ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเปส

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ไลเปส ได้แก่

- การสังเคราะห์ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลคือเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เรียกว่า **Alkyl Methyl Ester** สามารถเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์กับน้ำมันพืช (vegetable oils) เช่น ดอกทานตะวัน ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน และเมล็ดสบู่ดำ เป็นต้น หรือไขมันสัตว์ (animal fats) (รูปที่ 2.4) ทั้งนี้แอลกอฮอล์ที่นิยมใช้คือเมทานอล เนื่องจากมีราคาถูกกว่าเอทานอลและสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าเอทานอลเพราะโมเลกุลมีขนาดเล็กกว่า ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ในกระบวนการเตรียมไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification Process) คือสารเคมีประเภทกรดและด่าง นอกจากนี้ปัจจุบันยังมีการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เอนไซม์สำหรับเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกด้วย



รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับเมทานอล [3]

การเลือกใช้นิตของตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ มีข้อดีและข้อเสียดังนี้ คือ

1. การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดที่เป็นกรด เช่น กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลโฟนิก เป็นต้น ทั้งนี้จำเป็นต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงเหมาะสำหรับกลีเซอไรด์ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงและมีน้ำมาก
2. การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดที่เป็นเบส เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และสารประกอบคาร์บอเนต เป็นต้น สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่ากรดถึง 4,000 เท่า และมีการกัดกร่อนน้อยกว่า จึงมักนิยมใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้มากกว่า ทั้งนี้นิยมใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีราคาถูกกว่าสารชนิดอื่น ๆ แต่การใช้เบสเป็นตัวเร่งมีข้อด้อยคือต้องควบคุมให้น้ำในปฏิกิริยาน้อยมาก เพราะน้ำจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสaponification (Saponification) ได้สูงเกิดขึ้น เป็นผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอสเทอร์ลดลง และการแยกกลีเซอรอลออกจากเอสเทอร์ทำได้ยากขึ้น

อย่างไรก็ตามการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งที่เป็นกรดและเบสมีข้อเสียอยู่หลายประการ เช่น กระบวนการผลิตต้องใช้อุณหภูมิสูงเพื่อให้การผลิตดำเนินไปได้อย่างรวดเร็วและได้ปริมาณผลผลิตสูง นอกจากนี้ปริมาณกรดไขมันอิสระและน้ำในสารตั้งต้นมีผลต่อประสิทธิภาพในการผลิต รวมถึงการแยกกลีเซอรอล (Glycerol) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ออกจากเมทิลเอสเทอร์ อีกทั้งยังจำเป็นต้องกำจัดกรดหรือเบสที่ปะปนอยู่กับเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ และเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มในการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการทำให้ไบโอดีเซลบริสุทธิ์อีกด้วย

3. การใช้เอนไซม์ที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริเคชันเช่นไลเปส มีข้อดีคือ สามารถลดปัญหาที่เกิดจากการใช้สารเคมีได้ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูงจึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าการใช้สารเคมี จึงลดการสิ้นเปลืองพลังงานที่ใช้ได้ ปฏิกิริยาสามารถเกิดทั้งในภาวะที่มีน้ำหรือไม่มีน้ำ สามารถแยกกลีเซอรอลออกมาได้ง่าย แต่เอนไซม์ไลเปสมีราคาแพง ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาช้ากว่า และอาจมีการปนเปื้อนของเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์

- อุตสาหกรรมอาหาร

การใช้ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหารเริ่มต้นตั้งแต่ศตวรรษที่ 20 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงกระบวนการทางเคมีที่ใช้กันอยู่เดิมในอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันและไขมันนั้น ไลเปสถูกนำมาใช้ในการดัดแปรคุณสมบัติของน้ำมันโดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันที่เข้าจับกับกลีเซอรอลในโมเลกุลน้ำมันหรือไขมัน เพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการ ซึ่งวิธีนี้ทำให้ได้น้ำมันชนิดใหม่ๆและนำไปสู่การพัฒนาสารที่ให้กลิ่น- รสในอาหารด้วย

Pabai และคณะ [4] ใช้ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา **interesterification** ของไขมันเนย (**butter fat**) เพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวชนิดสายยาว และเพิ่มปริมาณกรดโอเลอิกตรงตำแหน่งที่ 2 ของโมเลกุลไขมันเนย ทำให้ได้ไขมันเนยที่มีคุณภาพมากกว่าเดิม เช่นเดียวกับ Senanayake และ Shahida [5] ได้ใช้ไลเปส PS-30 จาก *Pseudomonas sp.* เร่งปฏิกิริยา **acidolysis** ของน้ำมันผสมระหว่างน้ำมัน **borage** และน้ำมัน **evening primrose (EPO)** กับกรด **eicosapentaenoic** เพื่อเพิ่มปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน นอกจากนี้ Weber และคณะ [6] ยังได้ใช้ไลเปสจาก *Candida rugosa* เร่งปฏิกิริยา **transesterification** ระหว่าง **methyl ester** ของ **Fatty acids** และ **sterols** เพื่อผลิต **steroid esters** ที่ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและยา

- อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสารทำความสะอาด

ไลเปสถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาดโดยเป็นองค์ประกอบของผงซักฟอก อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอส (**proteases**) เพื่อใช้ขจัดคราบไขมันที่เลอะบนเสื้อผ้า นอกจากนี้ ไลเปสยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิว (**surfactant**) สำหรับผลิตภัณฑ์สบู่ และยาสระผมอีกด้วย [7]

- อุตสาหกรรมกระดาษ

ไลโปไลติกเอนไซม์มีความสำคัญในการย่อยเพื่อขจัดสารที่เรียกว่า “pitch” ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในเนื้อไม้ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมันที่จะมีผลในการรบกวนการผลิตกระดาษ และช่วยขจัดคราบไขมันที่ติดมากับกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษรีไซเคิล ทำให้ไม่เกิดการสร้างสารเหนียวที่จะรบกวนการผลิตขึ้นด้วย [8]

- อุตสาหกรรมอื่นๆ

ไลเพส สามารถนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น เซลลูเลส เพคทีเนส และโปรตีเอส เพื่อใช้ฟอกสีในอุตสาหกรรมเส้นใยผ้า และยังมีนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของไบโอเซ็นเซอร์ ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ใช้ในกระบวนการฟอกหนังสัตว์ ใช้ในการทำความสะดวกพื้นผิวแข็งๆ การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว การสังเคราะห์สารโพลีเมอร์ ผลิตพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ ใช้เป็นส่วนหนึ่งในอุตสาหกรรมน้ำมันหล่อลื่น และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางด้วย [7]

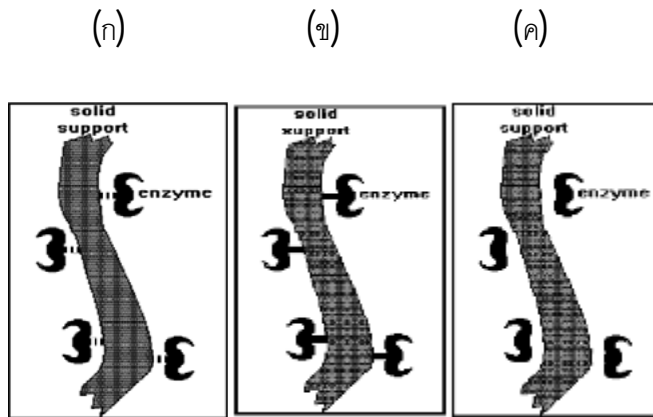
2.3 การตรึงเอนไซม์ (ENZYME IMMOBILIZATION)

การตรึงรูปเอนไซม์ [9] หมายถึง การจำกัดขอบเขตของเอนไซม์ให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดไว้โดยที่เอนไซม์นั้นยังคงมีสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอยู่ ซึ่งการตรึงรูปเอนไซม์มีประโยชน์ดังนี้

- แลกทิวติและเสถียรภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้ด้วยวิธีการตรึงรูปที่เหมาะสม
- การนำกลับมาใช้ซ้ำทำได้มากขึ้น
- สามารถใช้ในกระบวนการแบบต่อเนื่องได้
- ใช้ในภาวะที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวค้ำจุนและวิธีการตรึงรูป

การตรึงรูปเอนไซม์มีกรรมวิธีการหลักๆ อยู่ 3 วิธี ดังนี้

1. การตรึงรูปด้วยวิธีการเชื่อมยึดติดกับวัสดุค้ำจุน (carrier binding) ที่ไม่ละลายน้ำ โดยเอนไซม์อาจเป็นตัวยึดติดกับผิวของวัสดุค้ำจุนด้วยพันธะเคมีเช่น พันธะไอออนิก หรือพันธะโคเวเลนต์ (รูปที่ 2.5 ก-ข) ทั้งนี้ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจะมีผลต่อโครงสร้างและแอกทิวติของเอนไซม์ นอกจากนี้อาจใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพ (รูปที่ 2.5 ค) ทั้งนี้การยึดติดเอนไซม์กับวัสดุค้ำจุนโดยทางกายภาพมักไม่ทำให้โครงสร้างและแอกทิวติของเอนไซม์เสียไป แต่เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย



รูปที่ 2.5 การตรึงรูปเอนไซม์โดย (ก) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ข) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (ค) วิธีการดูดซับทางกายภาพ

องค์ประกอบสำคัญในการตรึงรูปเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ วัสดุตัวจุน และวิธีที่จะทำให้เอนไซม์ยึดติดกับวัสดุตัวจุน ดังนั้นแอกทิวิตีและความคงตัวของเอนไซม์ขึ้นกับวัสดุที่ใช้ในการตัวจุนมากพอสมควร ดังนั้นลักษณะของตัวจุนที่ดีคือ

- มีรูปร่างและขนาดที่พอเหมาะ
- ไม่ละลายน้ำ
- มีพื้นผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึด
- มีการซึมผ่านได้ของสาร
- มีความคงตัวต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระแทก
- มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์
- สามารถนำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้

ชนิดตัวจุนสามารถแบ่งตามสมบัติทางกายภาพได้ 2 ชนิด ดังนี้

- ตัวจุนที่ไม่มีรูพรุน ตัวจุนชนิดนี้มีพื้นผิวต่อปริมาตรต่ำทำให้บริเวณที่ถูกยึดติดจะเกิดเฉพาะบริเวณที่ผิวของตัวจุนเท่านั้น ตัวจุนชนิดนี้มีข้อดีคือซับสเตรทสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้โดยง่าย เนื่องจากเอนไซม์ถูกยึดไว้ที่ผิวบริเวณรอบนอกของตัวจุน
- ตัวจุนที่มีรูพรุน ตัวจุนที่มีรูพรุนสามารถจับยึดเอนไซม์ได้มากกว่าตัวจุนชนิดที่ไม่มีรูพรุน เนื่องจากมีพื้นที่ผิวมากกว่าเมื่อเทียบกับต่อ 1 หน่วยน้ำหนัก แต่มีข้อเสียคือ พื้นที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงนั้น ต้องมีขนาด

ของรูปพูนใหญ่เพียงพอสำหรับให้โมเลกุลของซัพสเตรทผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ และขณะเดียวกันจะต้องให้สารผลิตภัณฑ์ผ่านออกได้สะดวก

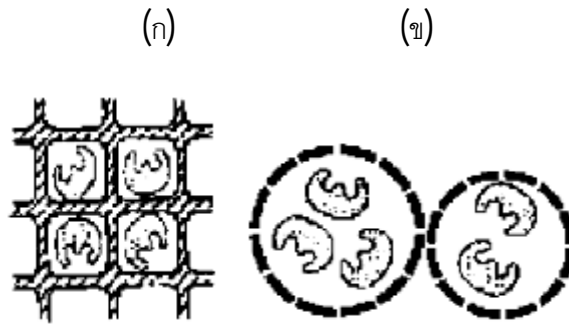
2. การตรึงรูปด้วยการเชื่อมขวาง (cross linking method) อาศัยการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับวิธีการยัดติดเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์กับวัสดุค้ำจุน แต่ละวิธีการเชื่อมขวางนี้จะใช้สารที่มีหมู่ฟังก์ชันตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไปทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ (รูปที่ 2.6) ซึ่งข้อดีของวิธีนี้ก็คือเกิดขึ้นง่าย ไม่ค่อยซับซ้อน และควบคุมสมบัติทางกายภาพและขนาดของอนุภาคของเอนไซม์ตรึงรูป แต่เอนไซม์จะเสียแอกทิวิตีไปและมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน



รูปที่ 2.6 การตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมขวาง

3. การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ (entrapping method) การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะเอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้ม และเอนไซม์ไม่ได้จับยึดกับตัวค้ำจุน หรือจับยึดกันเอง แต่จะถูกขังให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ

- เอนไซม์จะถูกขังหรือห่อหุ้มไว้อย่างสม่ำเสมอภายในช่องตาข่าย (รูปที่ 2.7 ก) ของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งอาจเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติหรือสังเคราะห์ก็ได้ ทั้งนี้ จำเป็นต้องเลือกชนิดของพอลิเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เนื่องจากพอลิเมอร์บางชนิดอาจเกิดปฏิกิริยาที่ค่อนข้างรุนแรงจนทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เสียไปได้
- เอนไซม์ถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลเล็ก (รูปที่ 2.7 ข) ที่มีสมบัติยอมให้สารบางชนิดผ่าน เข้า- ออกได้ แต่เอนไซม์ผ่านออกมาไม่ได้ การเตรียมเอนไซม์วิธีนี้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดพอลิเมอร์ให้ดี มิฉะนั้นก็ส่งผลเสียต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ได้เช่นกัน



รูปที่ 2.7 การตรึงรูปเอนไซม์โดย (ก) วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (ข) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ ในแคปซูลเล็ก

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jia และคณะ [10] ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากพอลิสไตรีนที่ผ่านการดัดแปรให้มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดพันธะโคเวเลนต์กับเอนไซม์ α -chymotrypsin ได้ จากผลการทดลองพบว่า เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมได้จากสารละลายพอลิ-เมอร์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 14 ในตัวทำละลายผสมระหว่างเมทิลเอทิลคีโตนและไดเมทิลฟอร์มาไมด์ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 0.75 กิโลโวลต์ ระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับคือ 10 เซนติเมตร มีลักษณะเส้นใยที่ไม่สม่ำเสมอ แต่เมื่อเตรียมในภาวะที่มีการเติม LiCl ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักลงในสารละลายพบว่า เส้นใยที่ได้ไม่มีปมเกิดขึ้น (bead) โดยเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมีค่า 120 นาโนเมตร เมื่อนำเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นไปตรึงเอนไซม์พบว่า สามารถจุเอนไซม์ได้ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และมีค่า hydrolytic activity เป็นร้อยละ 65 นอกจากนี้ยังพบว่า α -chymotrypsin ตรึงรูปมีค่า nonaqueous activity สูงกว่าเอนไซม์อิสระถึง 3 เท่าในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเฮกเซนและไอโซออกเทน

Nair และคณะ [11] ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (ปริมาณมาลิกแอนไฮไดรด์ร้อยละ 7) ทั้งที่ไม่ได้ปรับสภาพและปรับสภาพด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์ พบว่าการปรับสภาพดังกล่าวส่งผลให้เส้นใยเกิดการฟูและมีลักษณะเปลี่ยนจากแผ่นซีทบางๆเป็นลักษณะคล้ายก้อนสำลี อย่างไรก็ตามการปรับสภาพนี้ไม่ส่งผลต่อลักษณะพื้นผิวและขนาด

ของเส้นใย จากการวิเคราะห์ค่าความจุเอนไซม์ (enzyme loading) พบว่าการตรึงเอนไซม์บนเส้นใยที่ปรับสภาพให้ค่าความจุเอนไซม์ 42.4 ± 18.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของเส้นใย ซึ่งมากกว่าการตรึงรูปโดยใช้เส้นใยที่ยังไม่ได้ปรับสภาพถึง 8 เท่า

Ignatova และคณะ [12] ศึกษาการตรึงเอนไซม์แลคเคสบนเส้นใยอิเล็กโทรสปินจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์แบบสลับและพอลิสไตรีนโคมาเลอิก-แอนไฮไดรด์แบบสุ่ม ที่อัตราส่วน 1:1 ที่ตัดแปรด้วยพาราฟีนิลีนไดเอมีน หลังจากนำเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่ผ่านการตัดแปรแล้วไปตรึงเอนไซม์พบว่า ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าความจุเอนไซม์ 40 ± 0.7 มิลลิกรัมต่อกรัมของวัสดุค้ำจุน จากการวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยการติดตามความเข้มข้นที่ลดลงของบิสฟีนอลเอ พบว่าหลังจาก 90 นาที ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอลดลงถึงร้อยละ 60 นอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปมีความเสถียรและสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 30 ครั้ง โดยที่ค่าแอกทิวิตีลดลงเพียงร้อยละ 8 ของค่าเริ่มต้น

Tang และคณะ [13] ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เส้นใยอิเล็กโทรสปินจากพอลิสไตรีน-โคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ที่มีปริมาณมาเลอิกแอนไฮไดรด์ต่างกันคือร้อยละ 19, 32 และ 48 สำหรับเป็นไฮโดรเจล เมื่อเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปินจากพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ที่มีปริมาณมาเลอิกแอนไฮไดรด์ร้อยละ 19 โดยใช้สารละลายผสมของแอสซีโตนและไดเมทิลฟอร์มาไมด์ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายร้อยละ 20 โดยน้ำหนักเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่เตรียมจากตัวทำละลายผสมที่มีอัตราส่วนแอสซีโตนต่อไดเมทิลฟอร์มาไมด์เป็น 1:0 และ 0:1 มีลักษณะเป็นปมเกิดขึ้น โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1 และ 0.2 ไมโครเมตร ตามลำดับ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยที่เตรียมได้จากอัตราส่วน 0:1 มีค่า 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่เตรียมได้จากในอัตราส่วน 1:0 ส่วนเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่เตรียมด้วยตัวทำละลายผสมในอัตราส่วนเป็น 3:1, 2:1 และ 1:1 จะไม่มีปมเกิดขึ้น และมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณไดเมทิลฟอร์มาไมด์มากกว่าร้อยละ 67 ในตัวทำละลายผสม พบว่าเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่ได้ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นคณะวิจัยจึงสรุปว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอสซีโตนต่อไดเมทิลฟอร์มาไมด์คือ 2:1 และเมื่อนำเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่เตรียมจากพอลิเมอร์ที่มีปริมาณมาเลอิกแอนไฮไดรด์ต่างกันในภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปแล้วทำการไฮโดรไลซ์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอทานอล พบว่าเส้นใยจากพอลิเมอร์ที่มีปริมาณของมาเลอิกแอนไฮไดรด์ร้อยละ 19 จะยังคงแสดงสมบัติความไม่ชอบน้ำ และสามารถบวมตัวในน้ำได้เล็กน้อย แต่ถ้าไฮโดรไลซ์

เส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ที่มีปริมาณของพอลิมาเลอิกแอนไฮไดรด์ร้อยละ 32 และ 48 ตามลำดับ เส้นใยจะสามารถละลายน้ำหลังการไฮโดรไลซ์ อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองเชื่อมขวางเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ของพอลิเมอร์ที่มีปริมาณมาเลอิกแอนไฮไดรด์ร้อยละ 32 และ 48 ด้วยไดเอทิลีนไกลคอล แล้วจึงทำการไฮโดรไลซ์เส้นใยที่ผ่านการเชื่อมขวาง พบว่าเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์สามารถบวมตัวได้ในน้ำแต่ไม่ละลายน้ำและมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นไฮโดรเจล

จิรัชญา ทวนทัย และ ปนัดดา ศรีไทย [14] ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสบนวัสดุค้ำจุนชนิดเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ไตรีนด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ จากการศึกษาพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ไตรีน คือความเข้มข้นของสารละลายพอลิสไตรีน 20% โดยน้ำหนัก ตัวทำละลายผสมที่อัตราส่วนระหว่าง DMF :THF เป็น 1:1 และภาวะในการฉีดที่เหมาะสมคือ ศักย์ไฟฟ้า 8 กิโลโวลท์ และระยะห่างจากปลายเข็มถึงฉากรับ 10 เซนติเมตร เมื่อทดลองนำเส้นใยที่เตรียมได้ไปตรึงรูปเอนไซม์ด้วยการปล่อยให้สารละลายเอนไซม์ไหลวนผ่านด้วยอัตราเร็ว 0.24 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมขึ้นนี้ยังมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่ต่ำ ทั้งนี้เชื่อว่าเป็นผลจากปริมาณเอนไซม์ซึ่งเกาะติดบนวัสดุค้ำจุนยังมีอยู่น้อยมาก

วันนิเชก จุฑากักดี [15] ได้ทำการตรึงรูปไลเปสชนิดหยาบลงบนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ macroporous 5 ชนิด ได้แก่ชนิด AB-8 H103 NKA-9 NKA และ D4020 ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพในภาวะที่ใช้เฮปแทน ค่าแอกทิวิตีของไลเปสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด AB-8 มีค่ามากที่สุดคือ 0.343 ± 0.015 ยูนิท และแอกทิวิตีของไลเปสตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนชนิด NKA D4020 NKA-9 และ H103 มีค่าลดลงตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปดังกล่าวด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน พบว่า อัตราส่วนของปริมาณไลเปสต่อวัสดุค้ำจุน ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา มีผลต่อ % conversion ของกรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์ที่เตรียมได้ ทั้งนี้ไลเปสตรึงรูปบน H103 ให้ผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงที่สุด ภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเปสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 ปริมาณน้ำ 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 40 องศา

เซลล์เชื้อเพลิง ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูงสุด 97.74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไลเพสตรังรูปบน NKA-9 ให้ผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันได้ดีที่สุด ภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 1:1 อัตราส่วนโดย โมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:4 ปริมาณน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด 75.11 เปอร์เซ็นต์ หลังปฏิกิริยาลิ้นสุดนำไลเพสตรังรูปมากรองและล้างด้วยเฮปแทนเพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ตรังรูปบน NKA-9 สามารถนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันซ้ำได้อีก 2 ครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 31.88 และ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเอนไซม์ตรังรูปบน H103 สามารถใช้ซ้ำกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้อีก 1 ครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ 28.37 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

3.1.1 สารเคมี

1. พอลิสไตรีน (PS, Mw 280,000) (Aldrich, Germany)
2. พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์
(Alternate PSMA, Mw 350,000) (Aldrich, Germany)
3. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) (Labscan, Thailand)
4. เตตระไฮโดรฟูราน (THF) (Labscan, Thailand)
5. เอนไซม์ไลเปส (*Candida rugosa*) (Sigma-aldrich, Germany)
6. โฟแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Milan, Italy)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Scharlau, Spain)
8. คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem, Australia)
9. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Ajax Finechem, Australia)
10. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Scharlau, Spain)
11. ไตรตอน เอกซ์-100 (triton X-100) (Scharlau, Spain)
12. น้ำมันปาล์ม (palm oil) (มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ประเทศไทย)
13. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin = BSA) (Merck, Germany)
14. พาราไนโตรฟินอล (*p*-nitrophenol, *p*NP) (Fluka, Switzerland)
15. พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต
(*p*-nitrophenyl palmitate, *p*NPP) (Sigma, U.S.A.)
17. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Merck, German)
18. เมทานอล (methanol) (Labscan, Thailand)
19. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Germany)
20. สารละลายโฟลีนฟีนอลรีเอเจนท์
(folin phenol reagent) (Carlo Erba, Milan, Italy)
21. เอทิลแอสีเตต (ethyl acetate) (Labscan, Thailand)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กระดาษกรองเบอร์ 40 (filter paper) (Whatman)
2. เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Barnstead, U.S.A)
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking) (Vision Scientific Co.,Ltd)
4. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Digital Balance) (Satorius, Germany)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) (Model 250, Denver Instrument)
6. อุปกรณ์สำหรับปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้า (Electrospinning)
 - เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า
 - syringe pump
 - ฉากรับเส้นใยที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอล์ย ทั้งแบบแผ่นโลหะและแบบลูกกลิ้งโลหะ
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (centrifuge) (Hettich Zentrifugen, Germany)
8. เครื่องเขย่าแบบ Wave Platform Shaker (Heidolph instrument, Germany)
5 Degree Angle
9. ไมโครปิเปต
10. หลอดชนิดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร และ 3 มิลลิลิตร
11. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.1.3 เครื่องมือวิเคราะห์

1. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Shimadzu, Japan)
(High performance liquid chromatography, HPLC)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ANTHOS Zenyth 200, U.S.A)
(Microplate Spectrophotometer)
3. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JEOL, JSM-6480LV)
(Scanning electron microscope, SEM)

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 การศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการฉีดขึ้นรูปเส้นใยด้วยวิธีปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีนและพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์

3.2.1.1 เตรียมสารละลายของพอลิเมอร์ผสมที่มีอัตราส่วนของพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PS/PSMA) ในตัวทำละลายผสมระหว่างไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) และเตตระไฮโดรฟูราน (THF) ด้วยอัตราส่วน ดังกำหนดไว้ในตารางที่ 3.1

3.2.1.2 บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ลงในกระบอกฉีดยา จากนั้นติดหัวเข็มเบอร์ 22 ที่ปลายหลอด แล้วนำไปติดตั้งบน syringe pump ตั้งค่าการทำงานของ syringe pump เป็นอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3.2.1.3 ตั้งฉากกับ (หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอล์ย) ห่างจากปลายเข็มตามระยะที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) แล้วจึงเชื่อมต่อกับเครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า

3.2.1.4 เริ่มการปั่นเส้นใยโดยเปิดสวิตช์เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้าพร้อมปรับค่าศักย์ไฟฟ้าตามที่กำหนดไว้ในตารางที่ 3.1

3.2.1.5 ปิดสวิตช์เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้าหลังจากทดลองฉีดเป็นเวลา 2 นาที นำอะลูมิเนียมฟอล์ยออกจากฉากกับ ฝั่งให้ตัวทำละลายระเหยออกให้หมด แล้วเก็บเส้นใยที่ได้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วย SEM ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ภาวะที่ใช้ในการฉีดขึ้นรูปเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นจากสารละลายพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PS/PSMA) ในตัวทำละลายผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ

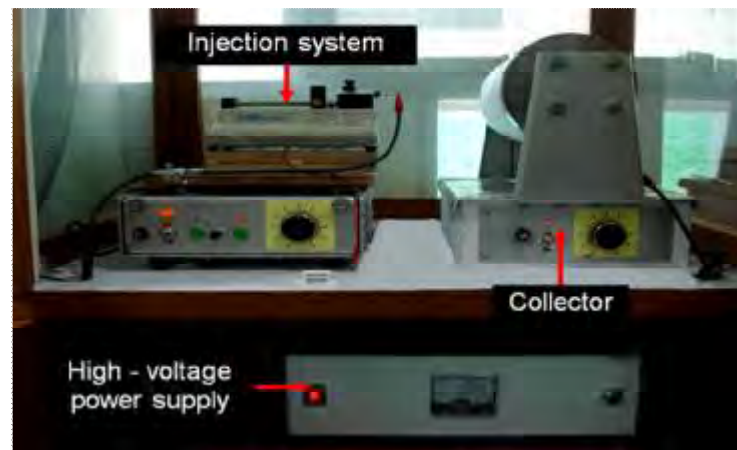
อัตราส่วนระหว่าง PS:PSMA	อัตราส่วนระหว่าง DMF/THF	ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ผสม (%w/w)	ค่าศักย์ไฟฟ้า (kV)	ระยะห่างระหว่างฉากกับกับปลายเข็ม(cm)
1:0	1:1	20	8	10
1:1	1:1	10-15	6 - 10	10
4:1	1:1 2:1	10-15 15	6 - 10 6	10 10-12

3.2.2 การฉีดขึ้นรูปเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์จาก PS/PSMA สำหรับใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

3.2.2.1 ติดตั้งเข็มฉีดยาที่บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ตามความเข้มข้นที่กำหนดกับ syringe pump ซึ่งวางอยู่บนแท่นที่สามารถควบคุมการเคลื่อนที่ไปกลับในแนวแกน X ด้วยความเร็วคงที่ ทั้งนี้ตั้งค่าการเคลื่อนที่ในแนวแกน X ของแท่นวาง syringe pump เป็น 7.5 เซนติเมตร

3.2.2.2 วางอุปกรณ์รับและม้วนเก็บเส้นใย (ลูกกลิ้งที่สามารถปรับให้หมุนรอบแกนด้วยอัตราเร็วคงที่) ห่างจากปลายเข็มฉีดยาตามระยะที่กำหนด (รูปที่ 3.1)

3.2.2.3 เริ่มฉีดเส้นใยโดยปรับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าไปที่ค่าที่ต้องการ หยุดเครื่องหลังฉีดต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเส้นใยไปตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาและขนาดของเส้นใยด้วย SEM และใช้สำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ต่อไป



รูปที่ 3.1 อุปกรณ์ปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) ที่สำหรับเตรียมเส้นใยนาโนที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

3.2.3 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ฝืนเส้นใย PS/PSMA ที่ไม่ได้ปรับสภาพ

3.2.3.1 เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเพสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายผงไลเพส 50 มิลลิกรัม ใน 25 มิลลิลิตรของ sodium phosphate buffer pH 6.5 (ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) จากนั้นกรองสารละลายไลเพสด้วย syringe filters ขนาด 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร ตามลำดับ

3.2.3.2 ตัดเส้นใยที่ได้เป็นรูปแบบที่ต้องการศึกษา 2 แบบดังนี้ ตัดเป็นวงกลมรัศมีประมาณ 5 เซนติเมตร และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5x0.5 cm. พร้อมบันทึกน้ำหนักเส้นใย

3.2.3.3 บรรจุเส้นใยลงบีกเกอร์ที่มีสารละลายไลเพสที่กรองแล้วปริมาตรที่กำหนด จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีโดยใช้เครื่อง wave platform shaker (ความเร็ว 8 รอบต่อนาที) จากนั้นคงอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

3.2.3.4 ล้างวัสดุค้างจุนหลังตรึงรูปด้วย sodium phosphate buffer pH 6.5 จำนวน 5 ครั้ง กรองน้ำล้างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 เก็บน้ำล้างไว้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน (protein loading)

3.2.3.5 เก็บไลเพสตรึงรูปไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccators) เพื่อวัดค่าแอกทิวิตีและทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส

3.2.3.6 เตรียมไลเพสตรึงรูปจำนวนไม่น้อยกว่า 5 ตัวอย่างต่อชนิดของเส้นใย อิเล็กโทรสปีน PS/PSMA

3.2.4 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ฝืนเส้นใย PS/PSMA ที่ปรับสภาพด้วย แอลกอฮอล์

3.2.4.1 ตัดฝืนเส้นใยเป็นวงกลมรัศมีประมาณ 5 เซนติเมตร พร้อมบันทึกน้ำหนักเส้นใย แล้วแช่ลงในสารละลายเมทานอล (เข้มข้น 20% โดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.4.2 บันทึกน้ำหนักเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

3.2.4.3 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเก็บเส้นใยไว้ใน sodium phosphate buffer pH 6.5 ก่อนนำมาใช้ในการตรึงรูป

3.2.4.4 บรรจุเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วลงบีกเกอร์ที่มีสารละลายไลเพสที่กรองแล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เครื่อง

wave platform shaker ด้วยความเร็ว 8 รอบต่อนาที จากนั้นคงอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

3.2.4.5 ล้างวัสดุค้างคืนหลังตรึงรูปด้วย sodium phosphate buffer pH 6.5 จำนวน 5 ครั้ง กรองน้ำล้างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 เก็บน้ำล้างไว้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน (protein loading)

3.2.4.6 เก็บไลเฟสตรึงรูปไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccators) เพื่อวัดค่าเอกทิวิตีและทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเฟส

3.2.4.7 เตรียมไลเฟสตรึงรูปจำนวนไม่น้อยกว่า 5 ตัวอย่าง ด้วยเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่ปรับสภาพ

3.3 การวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปและประสิทธิภาพของการตรึงรูป

3.3.1 การหาค่าความจุเอนไซม์ (protein loading)

3.3.1.1 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำกลั่น
- ปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาตร 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ไมโครลิตรลงใน well ของ microplate จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละ well โดยให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละ well เป็น 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย folin&ciocalteu reagent จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อ well ผสมให้เข้ากันทันทีโดยการ repeated pipeting
- หลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี 30 นาที จึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm ด้วยเครื่อง Microplate Spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
- สร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน X เป็นความเข้มข้นของ BSA ($\mu\text{g}/100\mu\text{L}$) และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm จากนั้นหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถแสดงได้ด้วยสมการที่ (1)

$$Y = 0.0222X \quad \dots\dots\dots (1)$$

3.3.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในวัสดุค้ำจุนหลังผ่านการตรึงรูป
นำน้ำล้างที่ได้จากข้อ 3.2.3.4 และ 3.2.4.5 รวมถึงสารละลาย
ไลเพสก่อนการตรึงรูปมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยมีขั้นตอน
ดังต่อไปนี้

- เปิดสารละลายไลเพสหรือน้ำล้างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน well
ของ microplate จากนั้นเติมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 200
ไมโครลิตร
- หลังบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย
folin&ciocalteu reagent 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน
อย่างรวดเร็ว บ่มต่ออีก 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่
650 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงแสดงในภาคผนวก ข)
- คำนวณปริมาณโปรตีนของสารละลายไลเพสก่อนการตรึงรูป (A) ด้วย
สมการที่ 2

$$A = \frac{X \cdot V \cdot 1000}{100} \quad (\mu\text{g}) \quad \dots\dots\dots(2)$$

เมื่อ X คือค่าที่คำนวณได้เมื่อแทนค่าการดูดกลืนคลื่นแสง
ที่ 650 นาโนเมตร ในสมการที่ 1

V คือปริมาตรของสารละลายไลเพสที่ใช้ในการตรึงรูป
(mL)

- คำนวณปริมาณโปรตีนในน้ำล้าง (B) ด้วยสมการที่ 3

$$B = \frac{X \cdot V \cdot 1000}{100} \quad (\mu\text{g}) \quad \dots\dots\dots(3)$$

เมื่อ X คือค่าที่คำนวณได้เมื่อแทนค่าการดูดกลืนคลื่นแสง
ที่ 650 นาโนเมตร ในสมการที่ 1

V คือปริมาตรของน้ำล้างแต่ละครั้ง (mL)

- คำนวณค่าความจุเอนไซม์ตรึงรูป (protein loading) และร้อยละของการตรึงรูป (% immobilization) ด้วยสมการที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

$$\text{Protein loading} = (A - SB) / W \quad \dots\dots\dots(4)$$

($\mu\text{g}/\text{mg}$ support)

$$\% \text{ Immobilization} = [(A - SB) / A] \cdot 100 \quad \dots\dots\dots(5)$$

เมื่อ ΣB คือผลรวมของปริมาณโปรตีนในน้ำล้างแต่ละครั้ง
 W คือน้ำหนัก (mg) ของวัสดุค้ำจุนที่ใช้

3.3.2 การหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ (activity)

3.3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟินอล

- เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟินอล 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย
- ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟินอล น้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตาม สัดส่วนที่แสดงในตารางที่ 3.2 ลงใน well ของ microplate แล้วนำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm

ตารางที่ 3.2 สัดส่วนของสารละลายพาราไนโตรฟินอล น้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

พาราไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	พาราไนโตรฟินอล	0.2 โมลาร์ฟอสเฟต บัฟเฟอร์พีเอช 7	น้ำกลั่น
0	0	50	150
1	10	50	140
2	20	50	130
3	30	50	120
4	40	50	110
5	50	50	100
6	60	50	90
7	70	50	80
8	80	50	70
9	90	50	60
10	100	50	50

- สร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน X เป็นปริมาณของพาราไนโตรฟินอล (ug) และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm จากนั้นหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถแสดงได้ค่าสมการที่ (6)

$$Y = 0.1748X \quad \dots\dots\dots (6)$$

3.3.2.2 การวิเคราะห์ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

- เตรียมสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วยพาราไนโตรฟินอลปาล์มมิเทต 180 มิลลิกรัม ละลายใน isopropanol 30 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย triton X-100 0.8% และ gum arabic 0.2% ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตสารละลายต่างๆลงใน well ของ microplate ตามตารางที่ 3.3
- หลังบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm (ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงแสดงในภาคผนวก ข)
- ทำการทดลองซ้ำไม่น้อยกว่า 3 ตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่าง
- คำนวณค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเปสของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปด้วยสมการที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

$$\text{แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเปสของเอนไซม์อิสระ} \\ (\text{U/mg lipase}) = \frac{X}{139.11 \cdot 60 \cdot 30} \quad \dots\dots\dots (7)$$

เมื่อ U คือปริมาณพาราไนโตรฟินอล (μmol) ที่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต่อเวลา 1 นาที

X คือค่าที่คำนวณได้เมื่อแทนค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 410 นาโนเมตร ในสมการที่ 6

$$\text{แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเปสของเอนไซม์ตรึงรูป} \\ (\text{U/mg lipase}) = \frac{X}{30 \cdot \text{protein loading} \cdot 139.11} \quad \dots\dots\dots (8)$$

เมื่อ protein loading คือค่าความจุเอนไซม์ของเอนไซม์ตรึงรูปคุณด้วย 4 แล้วหารด้วย BSA equivalent

- คำนวณค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยสมการที่ 9

$$\text{แอกทิวิตีต่อน้ำหนักของเอนไซม์ตรีงรูป} \\ (\text{U/mg support}) = \frac{X}{4 \cdot 30 \cdot 139.11} \dots\dots\dots(9)$$

ตารางที่ 3.3 สัดส่วนของสารละลายชนิดต่างๆ ที่ปีเปตลงใน well เพื่อใช้หาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูป

	ปริมาณสารตัวอย่าง	สารละลาย A	สารละลาย B	0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7	น้ำกลั่น	ปริมาตรรวม (μL)
เอนไซม์อิสระ	30 μL	9	81	50	30	200
เอนไซม์ตรีงรูป	4 mg	90	810	500	600	2000
Blank	0	9	81	50	60	200

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

- 3.3.3.1 นำเอนไซม์ตรีงรูปที่ผ่านการวัดค่าแอกทิวิตีแล้ว มาล้างด้วยน้ำกลั่นจนสีของสารละลายหมดไป จากนั้นบรรจุลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.2.2
- 3.3.3.2 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 3.3.3.1 จนกว่าค่าแอกทิวิตีที่ได้จะมีค่าต่ำจนไม่สามารถวัดได้

บทที่ 4

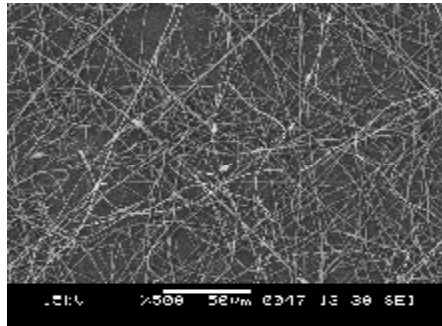
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมเส้นใยพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีน (PS) และพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PSMA) ด้วยเทคนิคปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

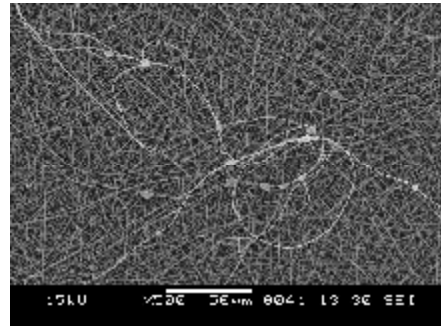
4.1.1 พอลิเมอร์ผสม PS/PSMA ที่อัตราส่วนผสมเป็น 1:1 โดยน้ำหนัก (1:1 PS/PSMA)

จากการเตรียมเส้นใยด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงโดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายและค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ รูปจาก SEM แสดงให้เห็นว่าภาวะที่เลือกใช้มีผลโดยตรงต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้ กล่าวคือเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วน 1:1 (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเชื่อมกับฉากรับ 10 cm และปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ต่างๆ (รูปที่ 4.1- 4.3) ที่ความเข้มข้นเป็น 10% (w/w)

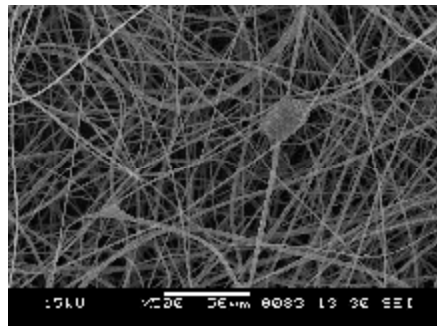
(ก)



(ข)



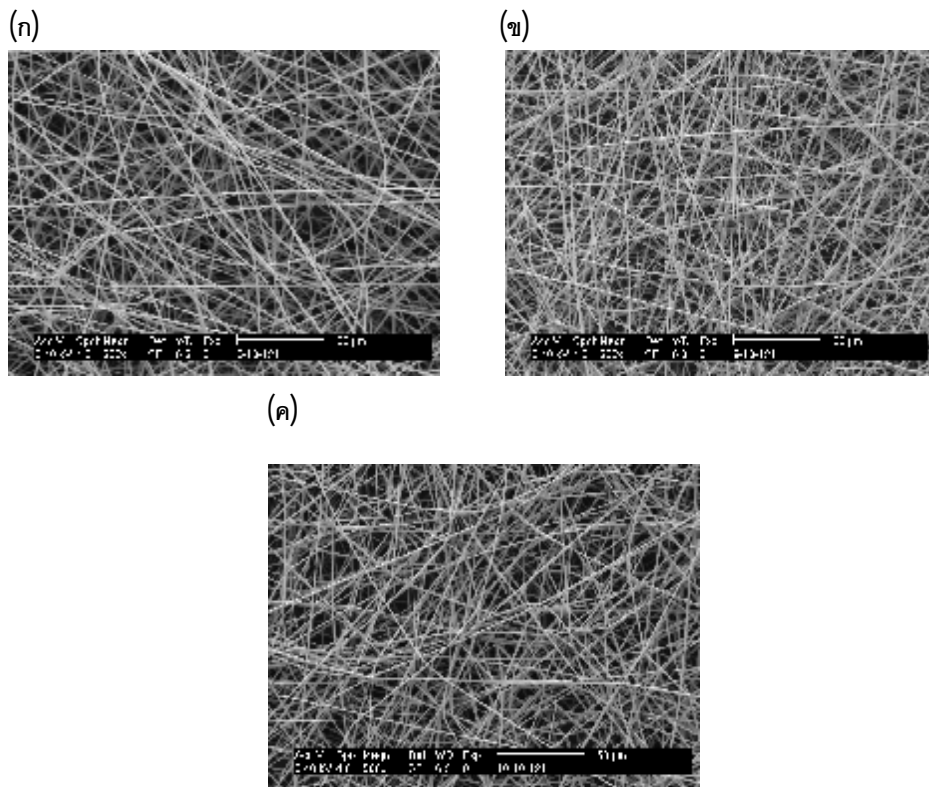
(ค)



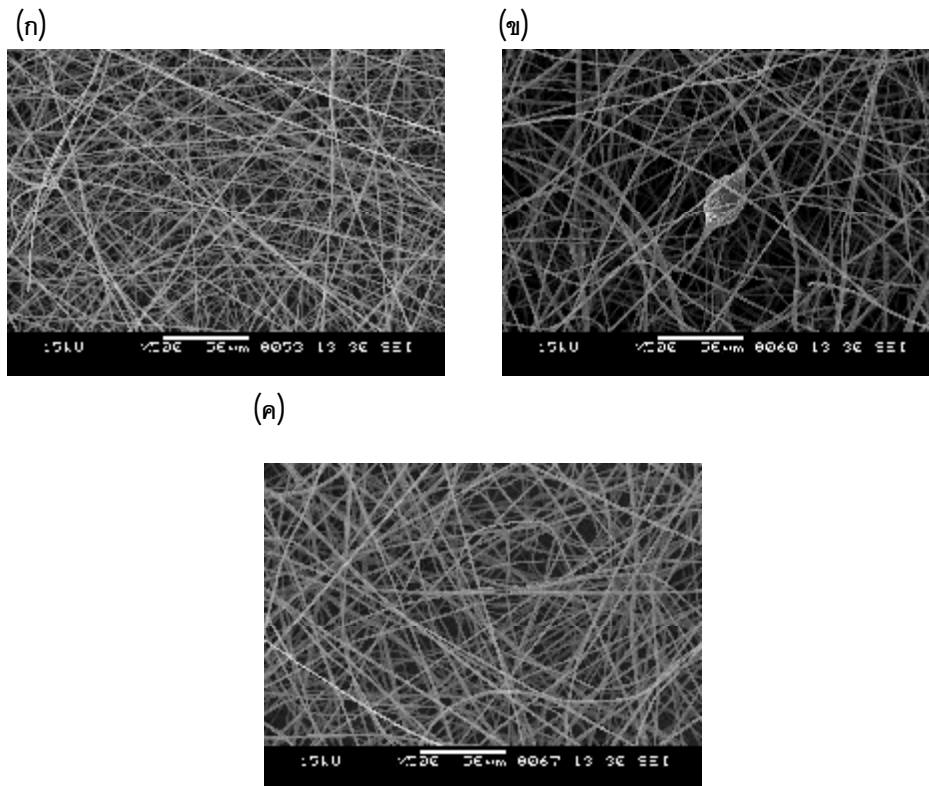
รูปที่ 4.1 SEM ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ความเข้มข้น 10% (w/w) และค่าศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ(ค) 10 kV ตามลำดับ

เส้นใยจะมีลักษณะของปมเกิดขึ้นเมื่อเลือกใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 6 - 10 kV (รูปที่ 4.1) นอกจากนี้ยังเห็นได้ชัดว่าศักย์ไฟฟ้าที่สูงขึ้นมีผลให้เส้นใยที่เตรียมได้มีปริมาณปมลดน้อยลงแต่มีแนวโน้มว่าขนาดจะใหญ่ขึ้น ในการศึกษานี้ยังได้ทดลองเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้าให้สูงกว่า 10 kV แต่พบว่าอุปกรณ์เกิดการช็อตขึ้น

เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 12% (w/w) รูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยที่เตรียมได้มีลักษณะเรียบและไม่มีการเกิดปมขึ้นทั้งที่ใช้ความต่างศักย์ 6, 8 และ 10 kV แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 15% (w/w) พบว่าที่ความต่างศักย์ 6 kV และ 10 kV เท่านั้นที่เส้นใยมีลักษณะเรียบไม่มีการเกิดปมขึ้น แต่เส้นใยที่ได้จะมีขนาดไม่สม่ำเสมอตลอดความยาว (รูปที่ 4.3) อีกทั้งยังพบว่าขนาดของเส้นใยมีแนวโน้มใหญ่ขึ้นเมื่อปรับเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายจาก 12% เป็น 15% (w/w)



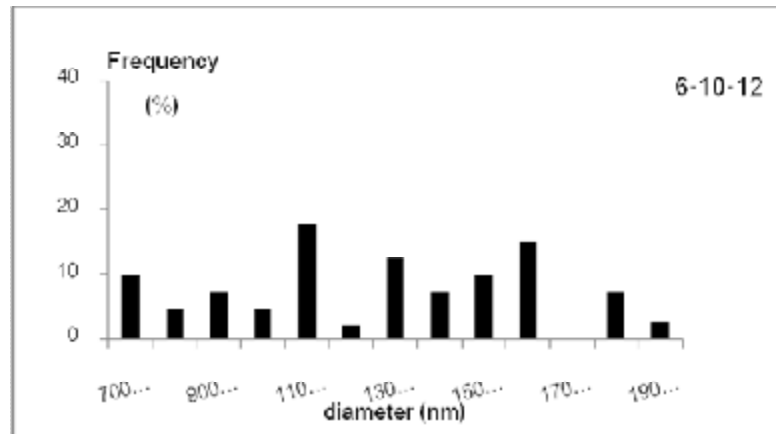
รูปที่ 4.2 SEM ของเส้นใยเล็กโทรสบันที่เตรียม 1:1 PS/PSMA ความเข้มข้น 12% (w/w) และค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ(ค) 10 kV ตามลำดับ



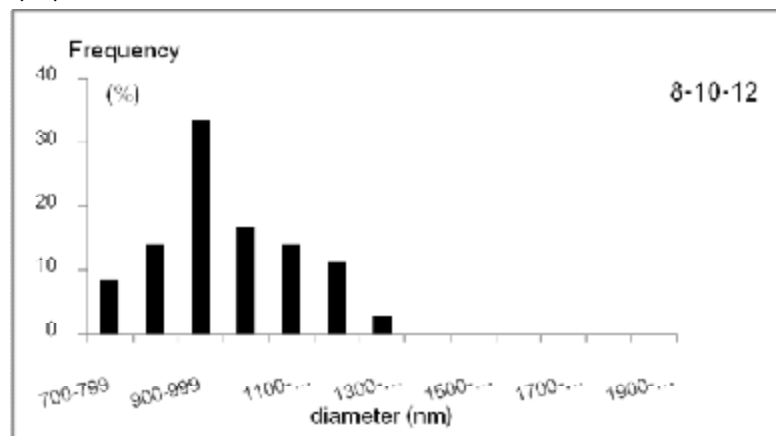
รูปที่ 4.3 SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ความเข้มข้น 15% (w/w) และค่าเป็นศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ(ค) 10 kV ตามลำดับ

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยดังที่ได้กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 1:1 PS/PSMA ที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่นให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กและมีความสม่ำเสมอตลอดความยาวโดยไม่เกิดเป็น bead fiber คือ 12% (w/w) เมื่อนำข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยซึ่งวิเคราะห์จากภาพ SEM ที่ถ่ายด้วยกำลังขยาย 500 ในตำแหน่งที่ต่างกันอย่างน้อย 3 จุด (เส้นใยจำนวนไม่น้อยกว่า 100 เส้น) มาสร้างเป็นเป็นกราฟซึ่งแสดงร้อยละของความถี่ที่พบเส้นใยแต่ละขนาด พบว่าศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อขนาดและการกระจายตัวของเส้นใยบนพื้นเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ปั่น 1:1 PS/PSMA (12% w/w) โดยเส้นใยที่เตรียมได้ที่ 6 kV (รูปที่ 4.4 (ก)) จะมีการกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าเส้นใยที่เตรียมได้ที่ 8kV และ 10 kV (รูปที่ 4.4(ข)) และ(ค))

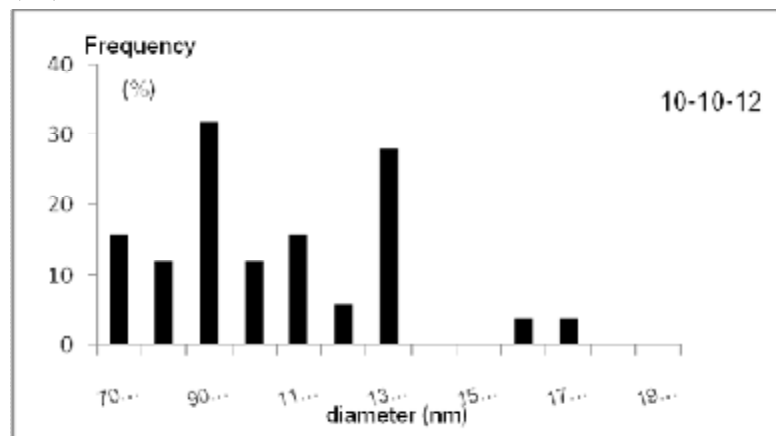
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.4 ร้อยละความถี่ที่สัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 1:1 PS/PSMA เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) คือ (ก) 6:10:12 (ข) 8:10:12 และ(ค) 10:10:12

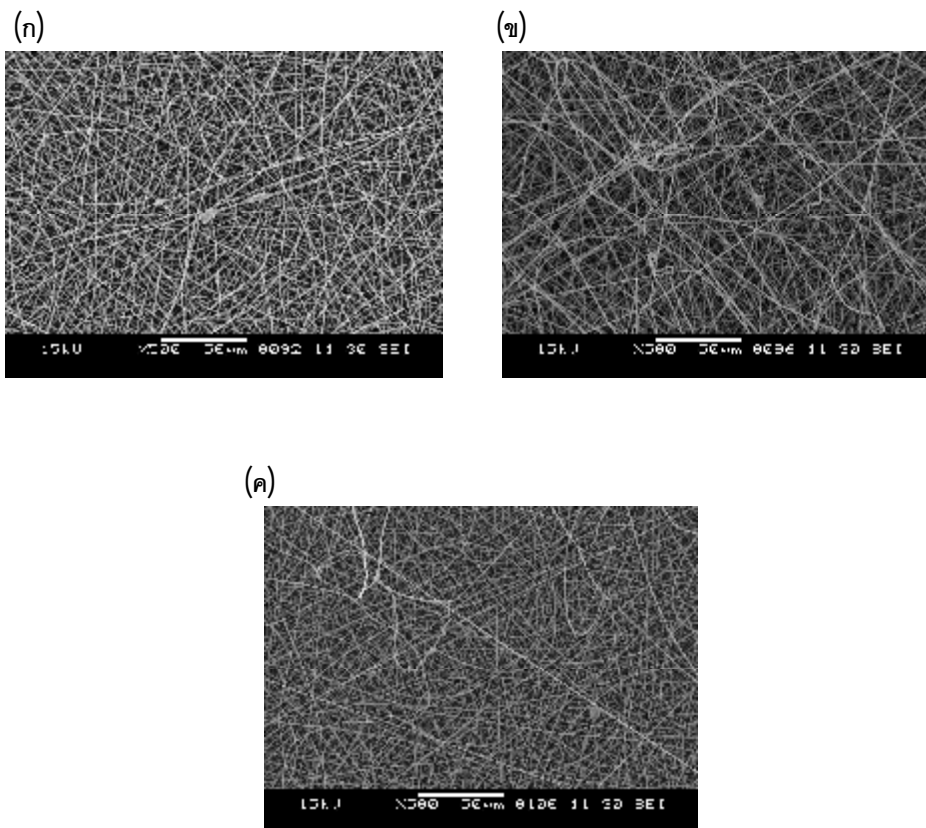
นอกจากนี้ค่าในตารางที่ 4.1 ยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าจาก 6 kV จนถึง 8 kV เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยจะลดลง แต่เมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าเป็น 10 kV เส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้จะมากขึ้น จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการปั่นเส้นใย 1:1 PS/PSMA คือ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 12% โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF:THF ที่อัตราส่วน 1:1 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้คือ 8 kV และ ระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับคือ 10 cm เนื่องจากให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด คือ 1.01 μm

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ 1:1 PS/PSMA ที่เตรียมจากสารละลาย พอลิเมอร์ความเข้มข้น 12% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ เป็น 10 cm และศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

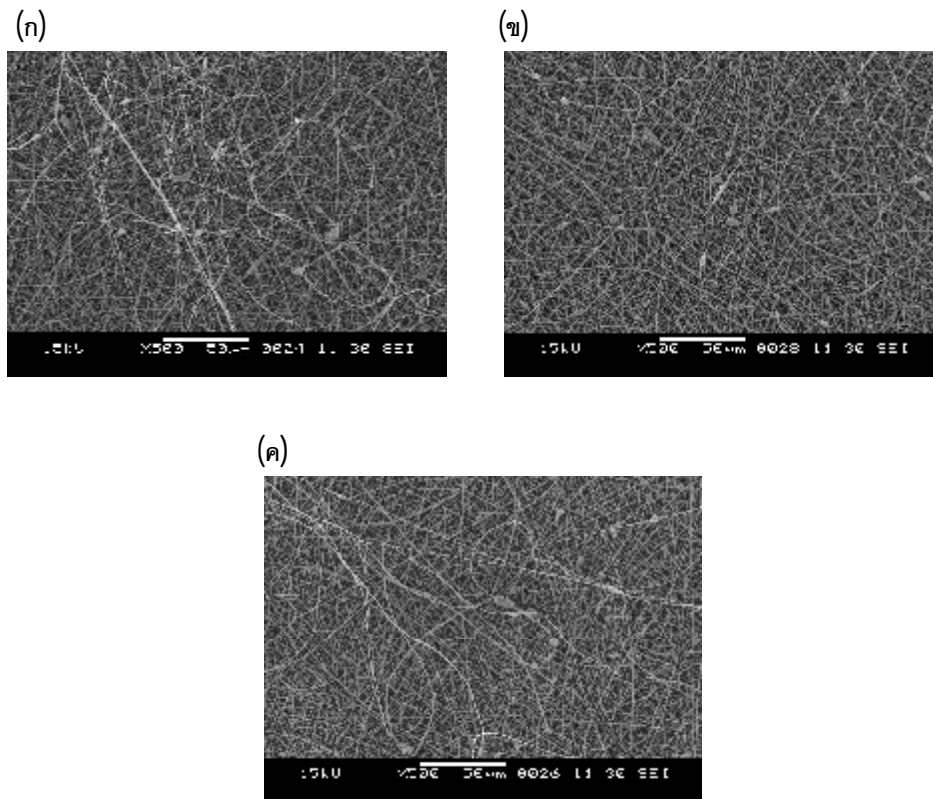
ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ (kV)	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย \pm SD (μm)
6	1.20 \pm 0.29
7	1.04 \pm 0.23
8	1.01 \pm 0.16
9	1.05 \pm 0.21
10	1.13 \pm 0.29

4.1.2 พอลิเมอร์ผสม PS/PSMA ที่อัตราส่วนผสมเป็น 4:1 โดยน้ำหนัก (4:1 PS/PSMA)

จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่มีต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย 4:1 PS/PSMA (รูปที่ 4.5- 4.8) ที่เตรียมโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วน 1:1 (w/w) และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm พบว่ากรณีที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 10% และ 12% (w/w) เส้นใยจะเกิดลักษณะเป็นปมขึ้น (bead fiber) เมื่อความต่างศักย์ที่ใช้คือ 6, 8, 10 kV (รูปที่ 4.5-4.6)



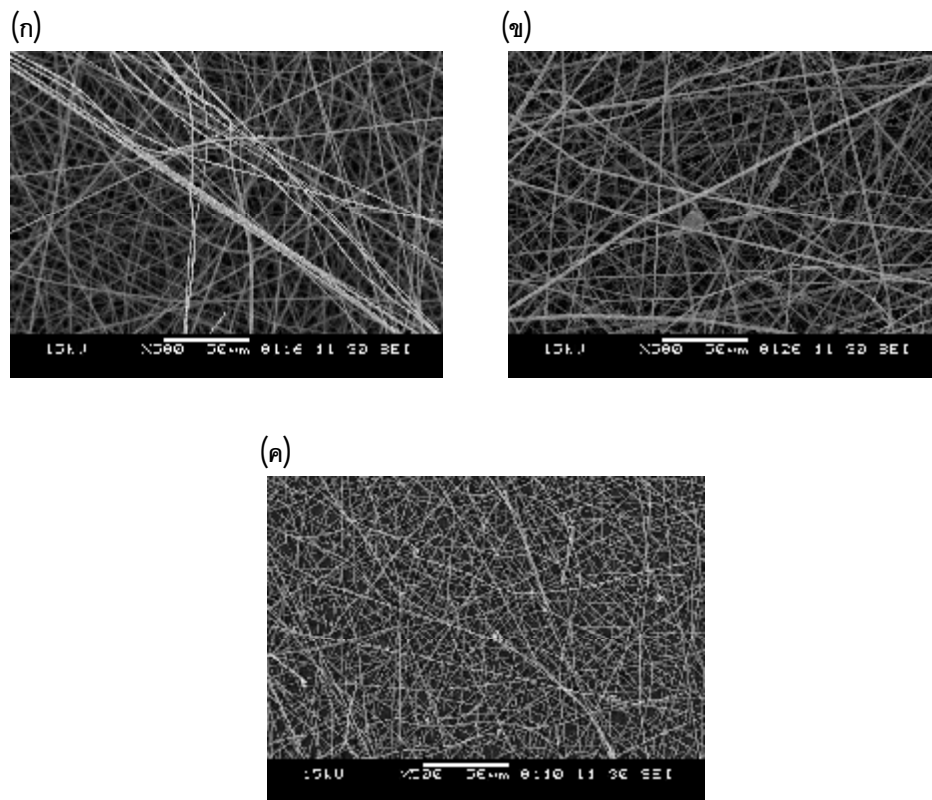
รูปที่ 4.5 SEM ของเส้นใยเล็กโทรสปินที่เตรียมจาก 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 10% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจาก 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 12% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และค่าศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

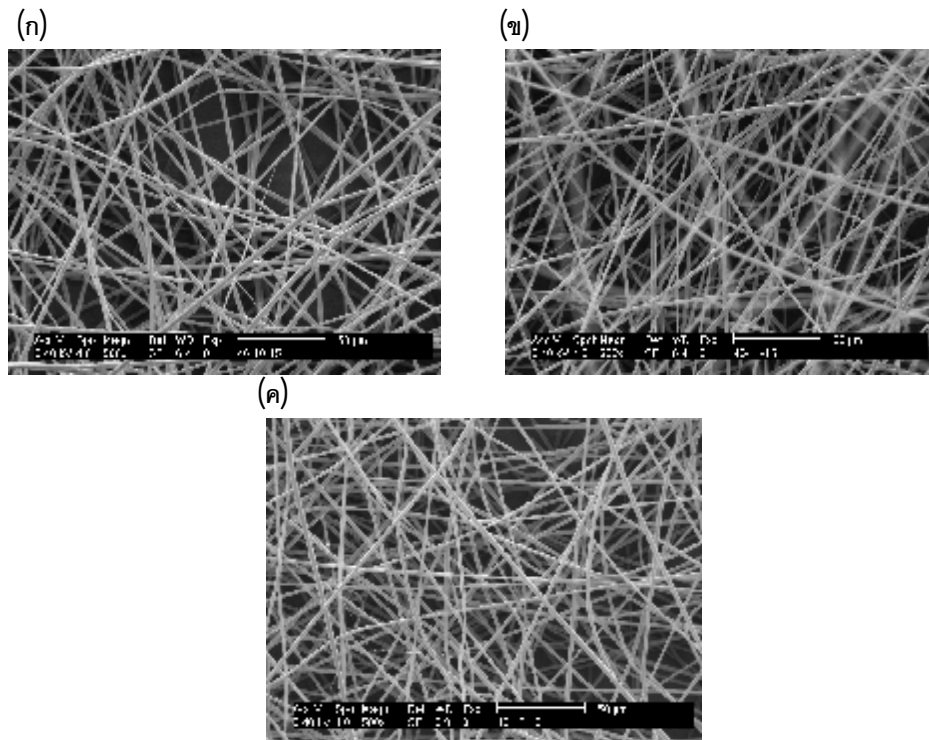
เมื่อเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 15% w/w รูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยมีลักษณะที่เรียบไม่มีปมเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้า 6 kV แต่เส้นใยที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปลี่ยนไปใช้ตัวทำละลายผสม DMF:THF ที่อัตราส่วนเป็น 2:1 (w/w) พบว่าเส้นใยที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สม่ำเสมอมากกว่า แต่มีขนาดเส้นที่ใหญ่กว่าเส้นใยที่ได้จากการใช้สัดส่วนของ DMF:THF เป็น 1:1 (w/w) (รูปที่ 4.7 (ก) และ รูปที่ 4.8 (ก)) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ DMF กลับส่งผลให้เส้นใยมีแนวโน้มที่จะใหญ่ขึ้น ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับเมื่อพิจารณารูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.2 พบว่าไม่เพียงแต่ศักย์ไฟฟ้าแต่ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับก็มีผลต่อลักษณะพื้นฐานวิทยาของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ โดยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยจะมีค่าลดลงเมื่อระยะห่างมีค่าเพิ่มขึ้น เพราะลำของ

สารละลายพอลิเมอร์ที่ถูกแรงไฟฟ้าขับออกมาเป็นเวลาในการยึดตัวก่อนตกกระทบบนฉาก
รับได้นานขึ้น



รูปที่ 4.7 SEM ของเส้นใยเล็กโพรสปีนที่เตรียมจาก 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น
15% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และค่าศักย์ไฟฟ้า
(ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

จากการทดลองข้างต้นทำให้เลือกใช้ภาวะในการเตรียมเส้นใย 4:1 PS/PSMA
เพื่อใช้ในการสร้างรูพอนโซม คือ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 15% โดยใช้ตัวทำ
ละลายผสมระหว่าง DMF:THF ที่อัตราส่วน 2:1 ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่าง
ปลายเข็มถึงฉากรับคือ 11 cm เนื่องจากให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด คือ $1.86 \mu\text{m}$

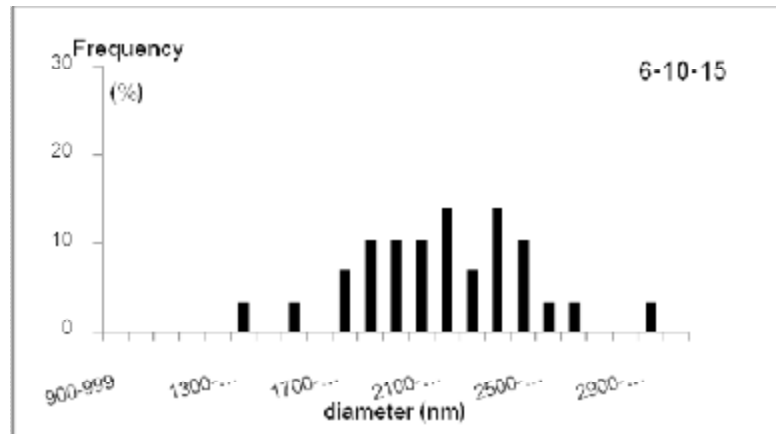


รูปที่ 4.8 SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสม 4:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 15% (w/w) อัตราส่วนของ DMF และ THF เป็น 2:1 (w/w) ที่ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับเป็น (ก) 10 cm (ข) 11 cm และ (ค) 12 cm ตามลำดับ

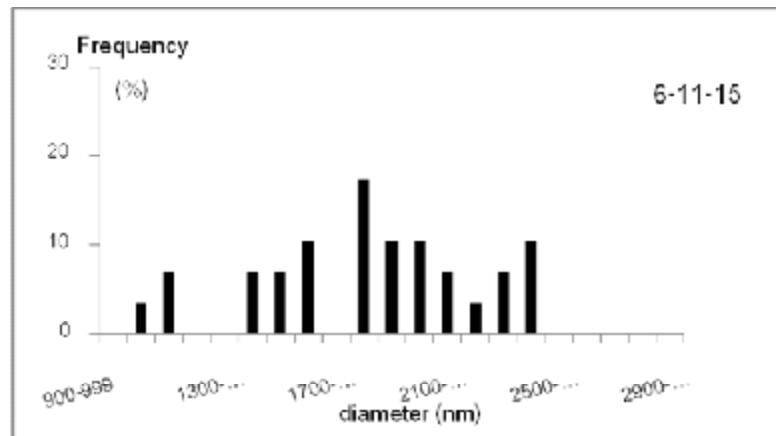
ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมจากสารละลายพอลิเมอร์ความเข้มข้น 15% (w/w) ในตัวทำละลายผสม DMF:THF เป็น 2:1 ที่ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับต่างๆ

ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm)	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย \pm SD (μm)
8	2.08 ± 0.46
9	2.01 ± 0.39
10	2.03 ± 0.34
11	1.86 ± 0.38
12	1.93 ± 0.32

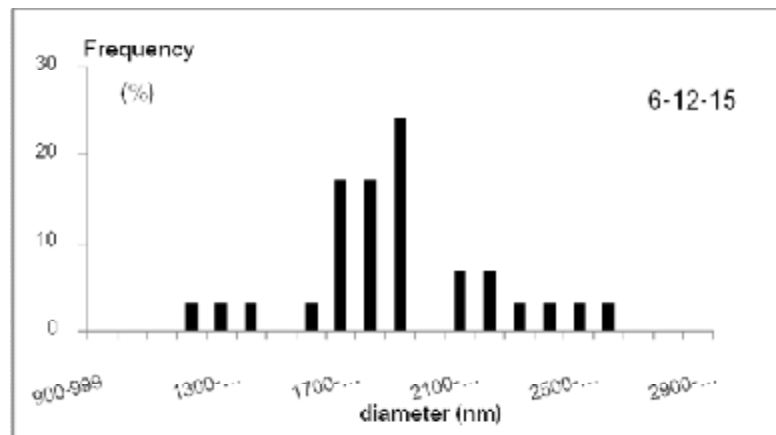
(ก)



(ข)



(ค)

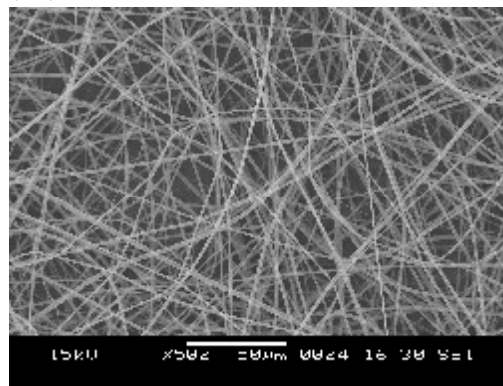


รูปที่ 4.9 ร้อยละความถี่ที่สัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 4:1 PS/PSMA เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) เป็น (ก) 6:10:15 (ข) 6:11:15 (ค) 6:12:15

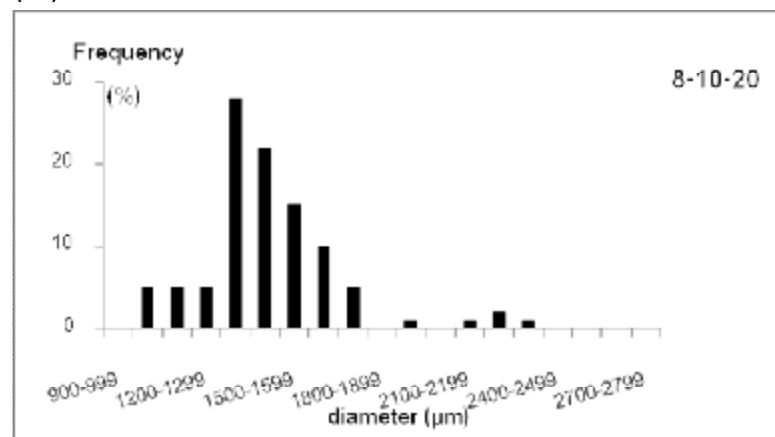
4.1.3 พอลิเมอร์ผสม PS/PSMA ที่อัตราส่วนผสมเป็น 1:0 โดยน้ำหนัก (1:0 PS/PSMA)

สำหรับ 1:0 PS/PSMA นั้นไม่ได้ทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยในวิทยานิพนธ์นี้ แต่เลือกใช้ตามที่รายงานโดยจิรัชญา ทวนทัย และ ปนัดดา ศรีไทย [7] คือ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 20% (w/w) โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลาย DMF: THF คือ 1:1 ศักย์ไฟฟ้า 8 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับคือ 10 cm เมื่อทดลองเตรียมด้วยภาวะดังกล่าว พบว่าเส้นใยที่เตรียมได้มีลักษณะเรียบและไม่มีปม (รูปที่ 4.10 (ก)) และมีการกระจายตัวของขนาดเส้นใยดังรูปที่ 4.10 (ข) ทั้งนี้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยที่เตรียมได้คือ $1.47 \mu\text{m}$ และความแปรปรวนเท่ากับ 0.23 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า $1.35 \pm 0.47 \mu\text{m}$ ที่รายงานในเอกสารอ้างอิง 14

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.10 (ก) รูปจาก SEM และ (ข) การกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่เตรียมจาก 1:0 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 20% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm ที่ศักย์ไฟฟ้า 8 kV

4.2 การตรึงเอนไซม์ไลเพสบนเส้นใยนาโนที่เตรียมได้จากวิธีปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเส้นใยจาก PS/PSMA ในแต่ละอัตราส่วนของพอลิเมอร์ผสมแล้ว จึงฉีดเส้นใยแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ฉากรับที่เป็นลูกกอล์ฟที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 cm ยาว 57 cm ผืนเส้นใยที่ได้มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.11 และความหนาของผืนเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 และ 4:1 PS/PSMA คือ 30 μm ส่วนความหนาของผืนเส้นใยที่เตรียมจาก 1:0 PS/PSMA คือ 50 μm ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าหากใช้ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์มากขึ้น ความหนาของผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่เตรียมได้ก็เพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน





รูปที่ 4.11 ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปินที่เตรียมได้ (57 cm x 97.3 cm) จากการฉีดเส้นใยอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.2.1 การตรึงรูปไลเพสโดยใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพ

การศึกษาเพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมของการใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปินในการตรึงรูปเอนไซม์ได้ดำเนินการโดยตัดผืนเส้นใยเป็น 2 ลักษณะ คือ เป็นชิ้นเดียวที่มีรูปร่างเป็นวงกลมรัศมีประมาณ 5 cm และเป็นชิ้นเล็กๆ รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยม เมื่อทดลองนำเส้นใยรูปแบบดังกล่าวน้ำหนัก 10 mg โดยประมาณไปตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.2.3 ด้วยสารละลายไลเพสความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 1.5 ml ค่าในตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของ PS ต่อ PSMA ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการตรึงรูปเอนไซม์บนเส้นใยอิเล็กโทรสปิน ทั้งนี้พบว่าปริมาณโปรตีนที่ติดอยู่บนเส้นใยอิเล็กโทรสปิน 1:1 PS/PSMA มีค่ามากกว่ากรณีที่ใช้เส้นใยชนิด 4:1 และ 1:0 PS/PSMA ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าโครงสร้าง

ที่เป็นแอนไฮไดรต์ของ PSMA อาจสามารถเกิดพันธะกับไลเปส จึงส่งผลให้ไลเปสที่ถูกตรึงได้บนวัสดุค้ำจุนชนิดที่มีสัดส่วนของ PSMA สูงกว่ามีค่ามากขึ้นได้ อย่างไรก็ตามรูปแบบที่เลือกใช้ไม่ได้ส่งผลต่อ % immobilization ค่าความจุเอนไซม์ และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ ตรึงรูปที่เตรียมได้มากนัก เพื่อให้สามารถศึกษาประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ ตรึงรูปในงานด้านต่างๆ การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปได้ในปริมาณมากๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากผลการศึกษาในเบื้องต้นที่พบว่ารูปแบบของผืนเส้นใยที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปที่ใกล้เคียงกับแบบที่ตัดเป็นชิ้นใหญ่ขึ้นเดียว ดังนั้นในการศึกษาต่อๆ มาจึงเลือกใช้รูปแบบของผืนเส้นใยแบบชิ้นเล็กๆ เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่ใช้ในการตรึงรูปได้อย่างไม่ยุ่งยาก

ตารางที่ 4.3 % immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ PS/PSMA โดยเลือกใช้รูปแบบการตัดผืนเส้นใยต่างกัน

อัตราส่วนของ PS/PSMA	รูปแบบของเส้นใยที่ใช้ในการตรึงรูป	% immobilization	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mg}$ support)	แอกทิวิตีต่อ น้ำหนักไลเปส (U/mg lipase)	แอกทิวิตีต่อ น้ำหนัก วัสดุค้ำจุน (U/mg support)
1:0	ตัดเป็นวงกลม (รัศมี 5 cm) ~ 10 mg 	10%	4.58 ± 0.031	0.076 ± 0.0006	0.0023 ± 0.000003
4:1		19%	8.88 ± 0.077	0.097 ± 0.0002	0.0055 ± 0.000036
1:1		28%	12.87 ± 0.993	0.077 ± 0.0077	0.0065 ± 0.00015
1:0	ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก ~ 10 mg 	12%	5.28 ± 0.104	0.066 ± 0.0022	0.0023 ± 0.000029
4:1		20%	9.30 ± 0.554	0.088 ± 0.0015	0.0052 ± 0.00022
1:1		30%	13.57 ± 0.177	0.071 ± 0.0006	0.0063 ± 0.00032

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า % immobilization ค่า protein loading และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้จากการทดลองปรับเพิ่มน้ำหนักของเส้นใยและปริมาตรของสารละลายไลเปสที่ใช้ในการตรึงรูป เมื่อนำค่า % immobilization และค่า protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้เตรียมมาแสดงเป็นกราฟรูปที่ 4.12 สังเกตได้ว่าภาวะที่ 1 2 และ 3 ซึ่งเลือกใช้สัดส่วนน้ำหนักวัสดุค้ำจุนต่อปริมาตรสารละลายไลเปสเป็น 6.6/1 การใช้ปริมาณของวัสดุค้ำจุนมากขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อทดลองใช้สัดส่วนเป็น 16.6/1 (ภาวะที่ 4) สังเกตได้ชัดว่าปริมาณไลเปสที่ตรึงได้มีค่าน้อยกว่ากรณีที่ใช้ 6.6/1 (ภาวะที่ 3) อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าหากใช้สัดส่วนของเส้น

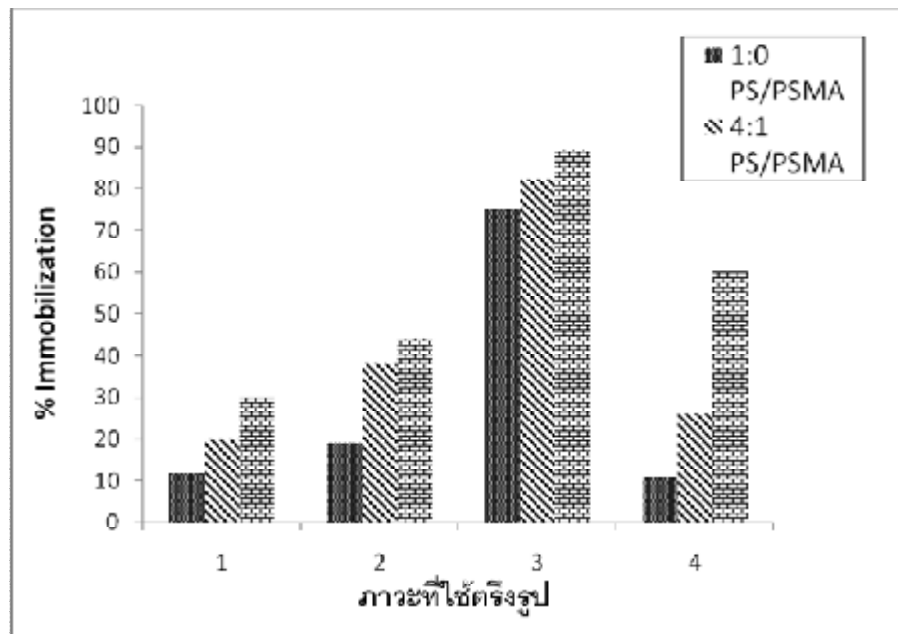
ใยต่อสารละลายไลเพสมากเกินไปจะส่งผลให้เอนไซม์มีไม่เพียงพอให้เส้นใยเล็กโทรสบัน
ดูดซับได้อย่างทั่วถึง

ตารางที่ 4.4 % immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสจริง

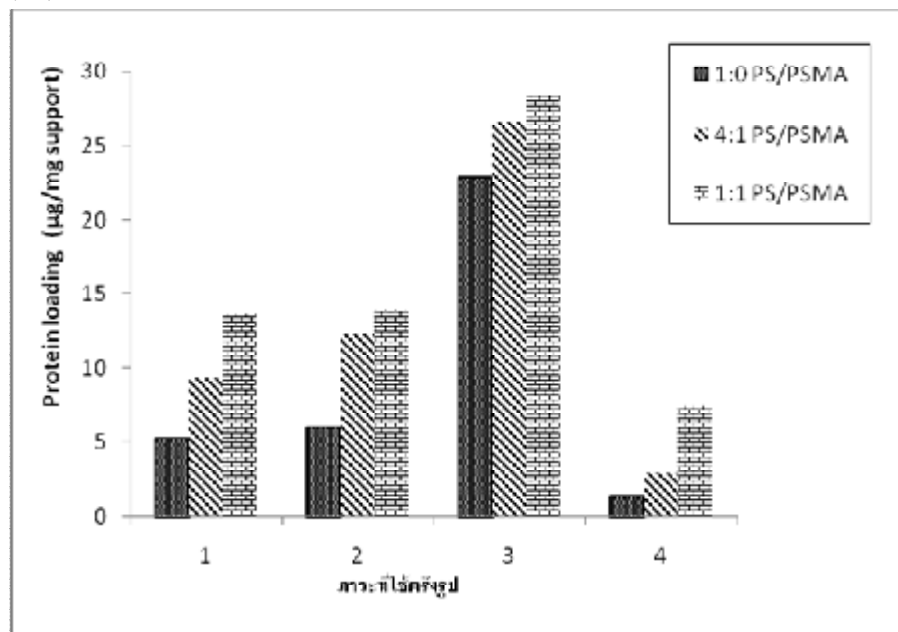
รูปบนเส้นใยเล็กโทรสบัน PS/PSMA เมื่อปรับสัดส่วนของน้ำหนักของ
เส้นใยและสารละลายไลเพสต่างๆ

ภาวะ ที่ใช้	อัตราส่วน ของ PS/PSMA	น้ำหนักเส้น ใยต่อปริมาณ สารละลาย ไลเพส	% immobilization	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mg support}$)	แอกทิวิตีต่อ น้ำหนักไลเพส (U/mg lipase)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนัก วัสดุค้ำจุน (U/mg support)
1	1:0	10 mg/1.5ml (6.6/1)	12%	5.28 ± 0.104	0.066 ± 0.002	0.0023 ± 0.000029
	4:1		20%	9.30 ± 0.55	0.088 ± 0.0015	0.0052 ± 0.00022
	1:1		30%	13.57 ± 0.18	0.071 ± 0.0006	0.0063 ± 0.00032
2	1:0	20 mg/3ml (6.6/1)	19%	6.01 ± 0.20	0.049 ± 0.002	0.0027 ± 0.00004
	4:1		38%	12.32 ± 0.16	0.047 ± 0.006	0.0054 ± 0.0007
	1:1		44%	13.84 ± 0.19	0.053 ± 0.003	0.0069 ± 0.0005
3	1:0	50mg/7.5ml (6.6/1)	75%	22.85 ± 1.07	0.009 ± 0.0005	0.0020 ± 0.00004
	4:1		82%	26.60 ± 0.18	0.007 ± 0.0002	0.0017 ± 0.00003
	1:1		89%	28.38 ± 0.21	0.023 ± 0.001	0.0064 ± 0.0002
4	1:0	50mg/3ml (16.6/1)	11%	1.34 ± 0.08	0.156 ± 0.010	0.0020 ± 0.0001
	4:1		26%	2.93 ± 0.10	0.057 ± 0.002	0.0018 ± 0.0001
	1:1		60%	7.54 ± 0.32	0.089 ± 0.005	0.0062 ± 0.0003

(ก)

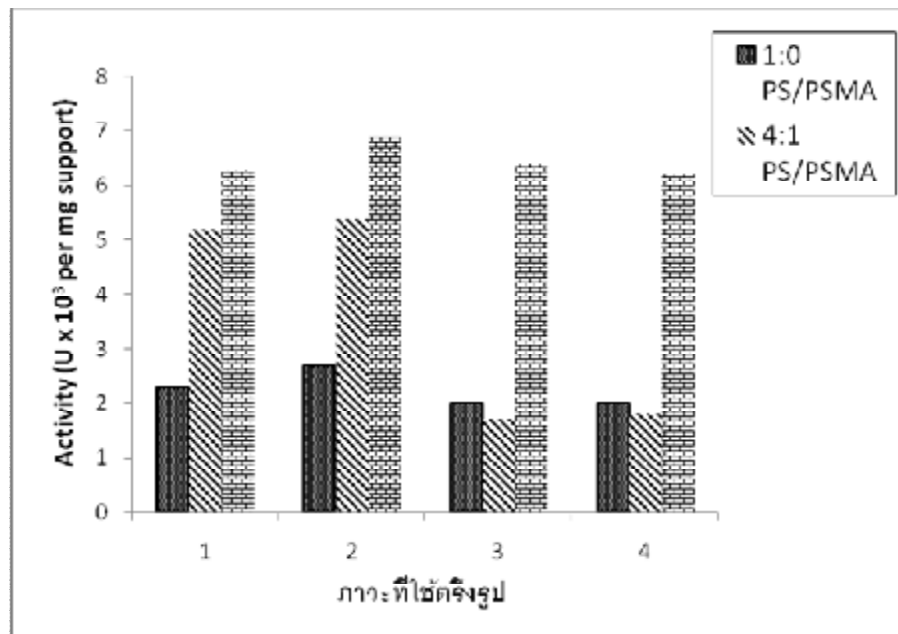


(ข)

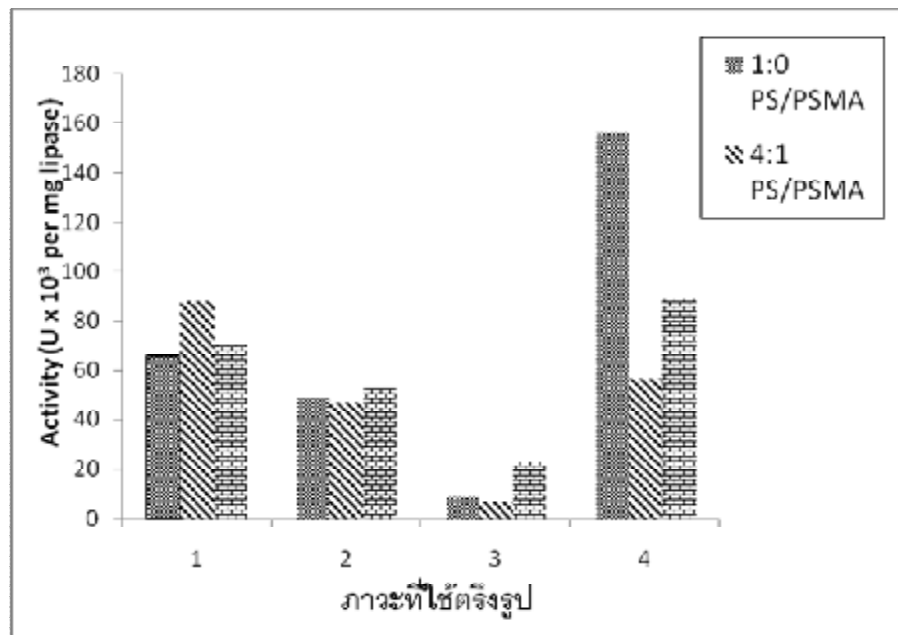


รูปที่ 4.12 (ก) % Immobilization และ (ข) protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้โครงรูปไลเฟสบน PS/PSMA ตามตารางที่ 4.4

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.13 (ก) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตั้งรูป และ (ข) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมไลเปส ที่ถูกตั้งรูปที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตั้งรูปไลเปสบน PS/PSMA ตามตารางที่ 4.4

เมื่อพิจารณาแนวโน้มของค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักเอนไซม์ที่เตรียมได้ (รูปที่ 4.13 (ก)) เปรียบเทียบกับแนวโน้มของปริมาณไลเปสที่ถูกตรึงได้บนวัสดุค้ำจุน (รูปที่ 4.12) พบว่า เอนไซม์ที่เตรียม (ไลเปส + วัสดุค้ำจุน) ที่เตรียมได้จากภาวะทั้ง 4 มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไม่แตกต่างกันแม้ว่าปริมาณไลเปสที่ถูกตรึงจะแตกต่างกันก็ตาม

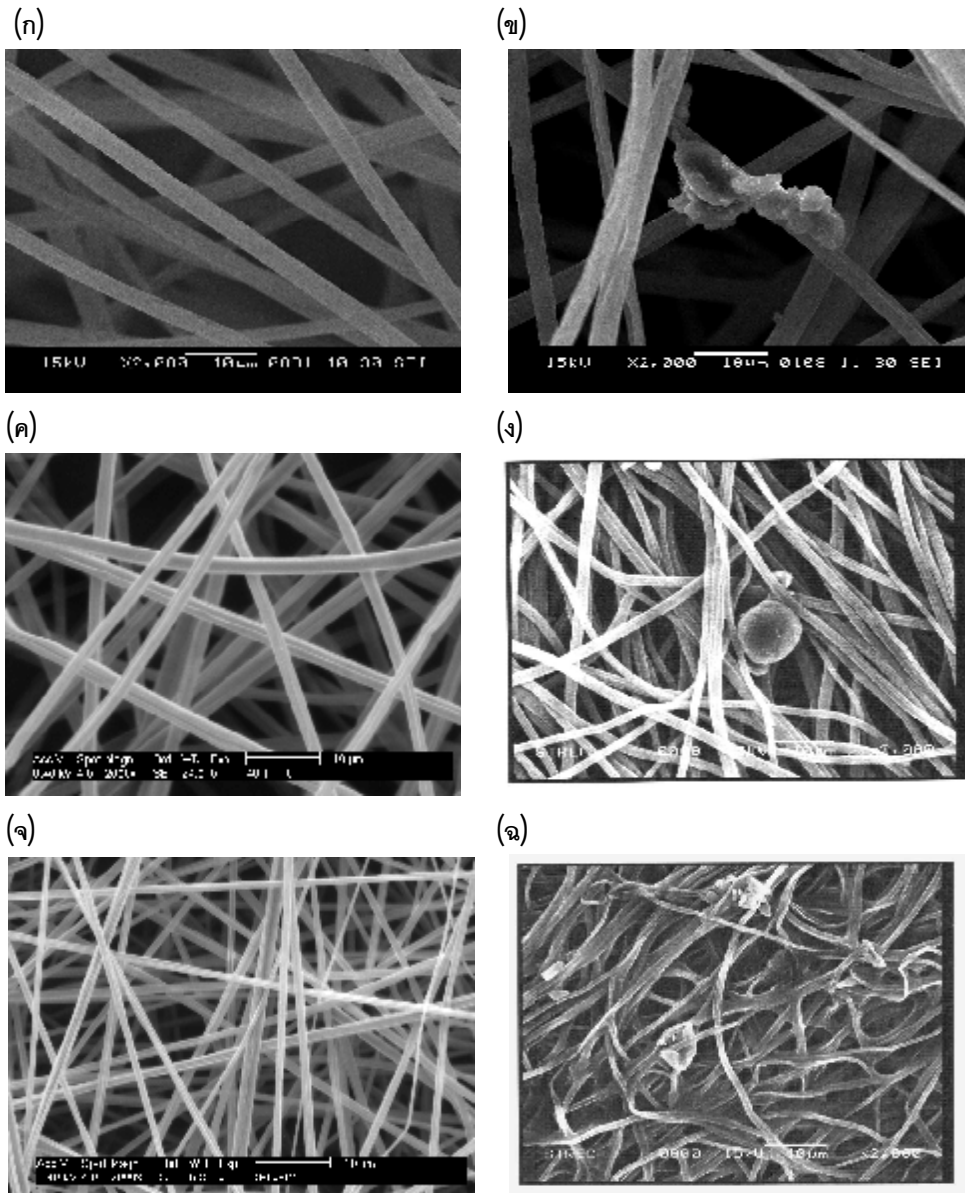
นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลของสัดส่วน PS/PSMA ที่มีต่อค่าความจุเอนไซม์และค่าแอกทิวิตี พบว่าการใช้วัสดุค้ำจุนชนิด PS/PSMA แม้จะสามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงกว่า รวมถึงให้ค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักเอนไซม์ที่ตรึงสูงกว่าการใช้วัสดุชนิด PS (1:0 PS/PSMA) แต่ไม่ส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเปสที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุน จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เชื่อว่า การที่ PS/PSMA ซึ่งมีสัดส่วนของ PSMA สูงสามารถตรึงรูปเอนไซม์ได้ดีกว่า รวมถึงส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนน้อยกว่าอาจเกี่ยวข้องกับความชอบน้ำของเส้นใยและความสามารถในการเกิดพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า contact angle (ตารางที่ 4.5) จะเห็นได้ว่าเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA มีค่า water contact angle เท่ากับ 84° ซึ่งน้อยกว่าของเส้นใยที่เตรียมจาก 4:1 และ 1:0 PS/PSMA ดังนั้นจึงมีความชอบน้ำมากกว่าทำให้สามารถดูดซับสารละลายเอนไซม์ได้ดีกว่า และส่งผลให้ค่าความจุเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.5 ค่า water contact angle ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงก่อนและหลังตรึงเอนไซม์

อัตราส่วนของ PS/PSMA	ค่า water contact angle	
	ก่อนตรึงเอนไซม์	หลังตรึงเอนไซม์
1:0	114°	112°
4:1	92°	90°
1:1	84°	84°

อย่างไรก็ดีเมื่อปริมาณ PSMA สูงขึ้นย่อมเป็นไปได้ว่าโอกาสที่เอนไซม์จะเกิดพันธะโควาเลนต์กับวัสดุค้ำจุนมากขึ้นและอาจส่งผลให้ conformation ของเอนไซม์เปลี่ยนไป แต่จากค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเปสที่ถูกตรึงบน 1:1 PS/PSMA ที่ใกล้เคียงกับกรณีที่ตรึงบน 1:0 PS/PSMA และ 4:1 PS/PSMA ทำให้สรุปได้ว่า conformation ของไลเปสที่ถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนดังกล่าวไม่แตกต่างกันมากนัก

จากการตรวจสอบสัณฐานวิทยาเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โพรสปีน PS/PSMA โดยเปรียบเทียบภาพ SEM ของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โพรสปีนก่อนและหลังตรึงรูปบนวัสดุค้ำจุนปริมาณ 20 mg (รูปที่ 4.14) พบว่าเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โพรสปีนทั้งก่อนและหลังตรึงรูปด้วย 1:0 และ 4:1 PS/PSMA มีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน แต่ในกรณีของ 1:1 PS/PSMA หลังตรึงรูปเส้นใยมีลักษณะคล้ายถูกหลอมละลายติดกัน นอกจากนี้ยังพบลักษณะที่เชื่อได้ว่าน่าจะเป็นอนุภาคนาโนไฮโดรเจลเกาะติดอยู่บนแผ่นเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โพรสปีนแต่ในปริมาณน้อยมาก



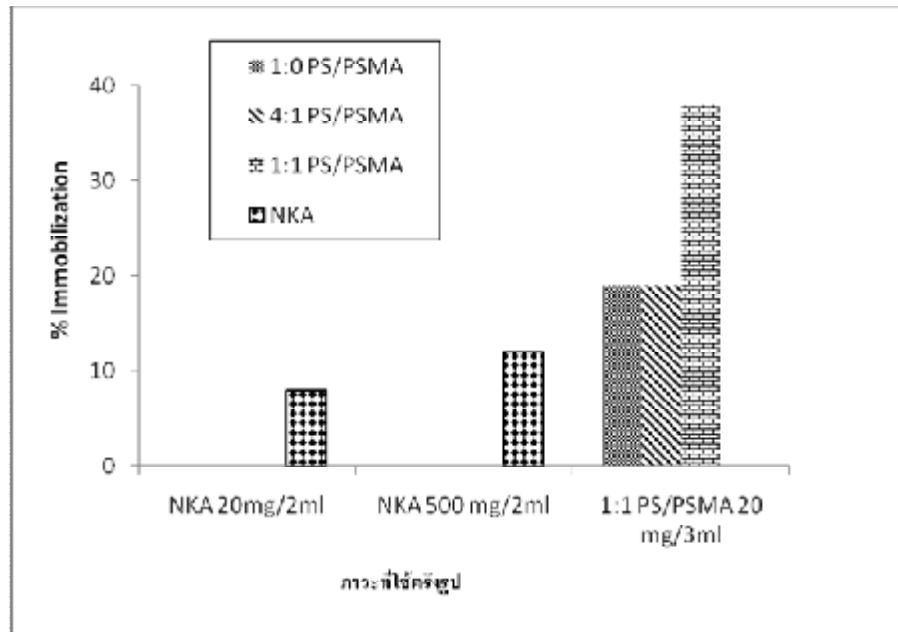
รูปที่ 4.14 ภาพ SEM ของเส้นใยก่อน (ซ้าย) และหลัง (ขวา) ตรึงรูปของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โพรสปีน (ก-ข) 1:0 (ค-ง) 4:1 และ (จ-ฉ) 1:1 PS/PSMA ตามลำดับ

ในการศึกษาข้างได้ทดลองนำวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA (PS bead) มาตรึงรูปไลเพสเพื่อทดสอบประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์แบบ เมื่อพิจารณาค่าในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.15 จะเห็นว่าปริมาณไลเพสที่ตรึงได้บน NKA มีค่าน้อยกว่ากรณีที่ใช้ PS/PSMA อย่างเห็นได้ชัดเมื่อภาวะที่ใช้ในการตรึงรูปใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองตรึงรูปบน NKA ด้วยสัดส่วนเส้นใยต่อสารละลายไลเพสที่สูงขึ้น (500 mg/2ml) พบว่าสามารถเพิ่มค่า % immobilization ให้สูงขึ้นได้ ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปได้ในทิศทางตรงกันข้ามกับกรณีของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์แบบ เมื่อพิจารณาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปบน NKA และ PS/PSMA (รูปที่ 4.16) พบว่า 1:1 PS/PSMA มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนที่สูงกว่า แต่มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักเอนไซม์ไลเพสที่ต่ำกว่า จึงสรุปได้ว่าการใช้ NKA ซึ่งเป็น PS bead มาตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพส่งผลต่อการสูญเสียแอกทิวิตีของเอนไซม์น้อยกว่ากรณีของเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์แบบ PS/PSMA

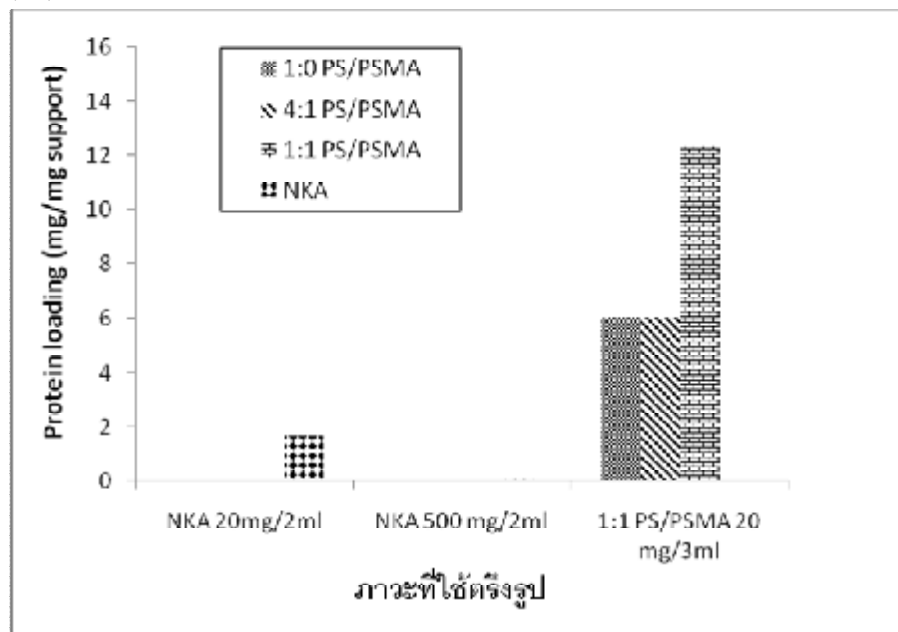
ตารางที่ 4.6 % immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์แบบ PS/PSMA และ NKA

วัสดุค้ำจุน	น้ำหนักวัสดุค้ำจุนต่อปริมาณสารละลายไลเพส	% immobilization	ปริมาณโปรตีน ($\mu\text{g}/\text{mg}$ support)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพส (U/mg lipase)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุน (U/mg support)
NKA	20mg/2ml	8%	1.68 ± 0.082	0.248 ± 0.023	0.0039 ± 0.0003
NKA	500mg/2ml	12%	0.106 ± 0.033	5.424 ± 1.53	0.0050 ± 0.0001
1:1 PS/PSMA ที่ปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์	10mg/2ml	68%	37.19 ± 1.295	0.048 ± 0.0002	0.013 ± 0.0006

(ก)

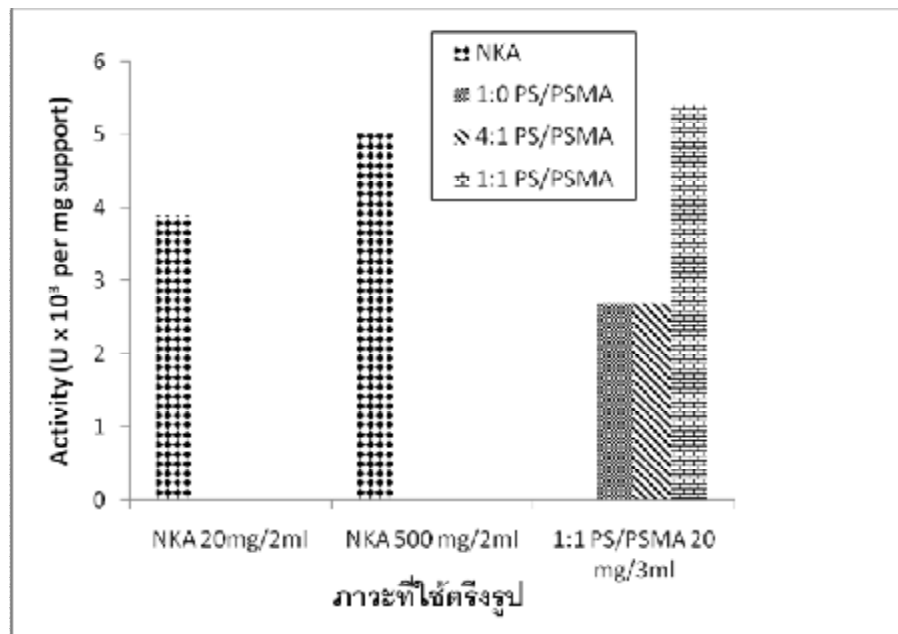


(ข)

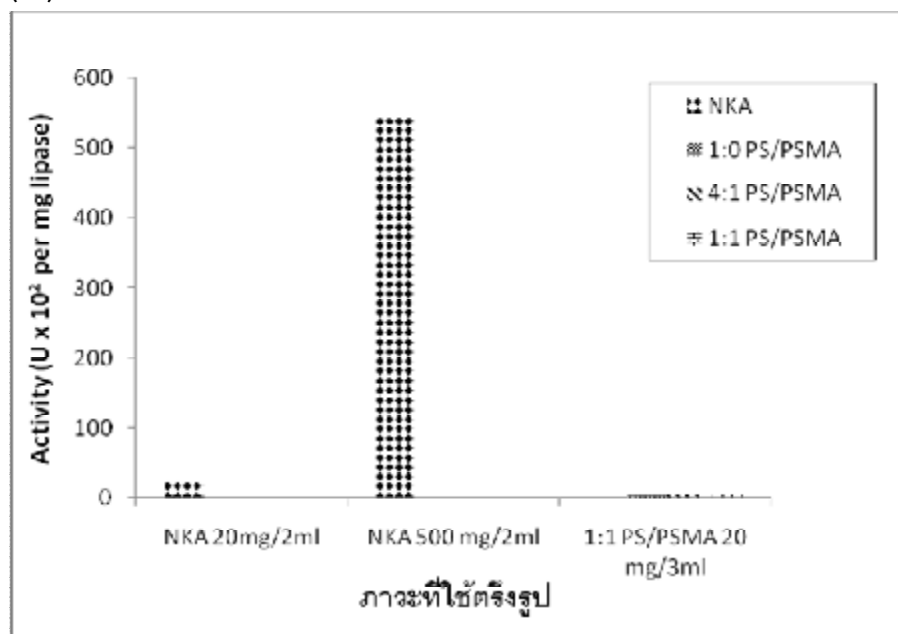


รูปที่ 4.15 (ก) % Immobilization และ (ข) protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้โครงรูปไลเฟสบน NKA และ 1:1 PS/PSMA

(ก)



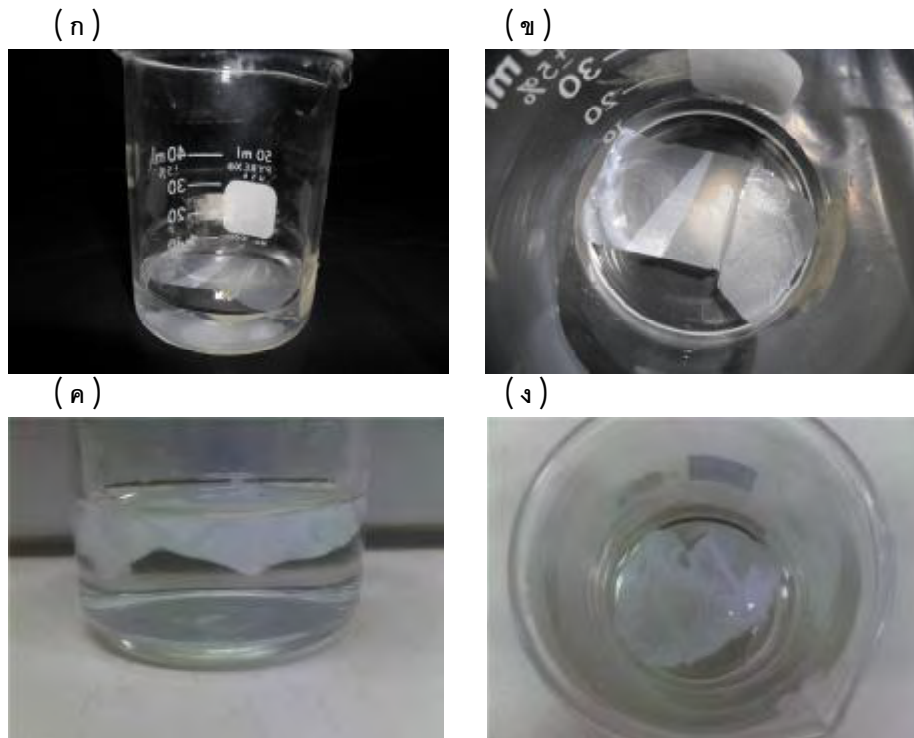
(ข)



รูปที่ 4.16 (ก) แอกทีวิตีต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป และ (ข) แอกทีวิตีต่อมิลลิกรัมไลเปส ที่ถูกตรึงรูปที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเปสบน NKA และ PS/PSMA

4.2.2 ปรับสภาพเส้นใยด้วยแอลกอฮอล์ก่อนใช้เส้นใยในการตรึงรูป

จากข้อมูลในหัวข้อ 4.2.1 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบนเส้นใยอเล็กโทรสับของ 1:1 PS/PSMA มีค่าปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนมากที่สุด จึงเลือกวัสดุค้ำจุนดังกล่าวมาศึกษาอิทธิพลของการปรับสภาพต่อประสิทธิภาพของการตรึงรูปเอนไซม์ ซึ่งเมื่อทดลองปรับสภาพด้วยวิธีการที่ระบุในหัวข้อ 3.2.4 พบว่าเส้นใยบนฝืนอเล็กโทรสับมีการกระจายตัวคล้ายก้อนสำลีที่เปียกน้ำ (รูปที่ 4.17)



รูปที่ 4.17 ฝืนเส้นใยอเล็กโทรสับ PS/PSMA ของ 1:1 PS/PSMA (ก,ข) ก่อนการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์ เมื่อเทียบกับ (ค,ง) หลังการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์

การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยฝืนเส้นใยที่ปรับสภาพให้ค่าปริมาณโปรตีนคือ $37.19 \pm 1.3 \text{ ug/mg support}$ ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้ฝืนเส้นใยอเล็กโทรสับที่ไม่ได้ปรับสภาพถึง 2.9 เท่า (ตารางที่ 4.6) และมีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสคือ $0.048 \pm 0.002 \text{ U/mg lipase}$ ซึ่งไม่แตกต่างจากกรณีที่ใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพมากนัก ส่วนค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนคือ $0.013 \pm 0.0006 \text{ U/mg support}$ ซึ่งมีค่าแตกต่างกับกรณีที่ใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพค่อนข้างมาก (ตารางที่ 4.4) เพื่อตรวจสอบว่ายังมีแอลกอฮอล์ตกค้างอยู่ในเส้นใยอเล็กโทรสับหรือไม่ จึงทดลองนำน้ำล้างเส้นใยมาทดลองเติมด้วยสารละลายไลเพส

ความเข้มข้น 2mg/ml ปริมาณ 1 ml แล้วทำการหาค่าแอกทิวิตีตามวิธีในหัวข้อ 3.3.2 เปรียบเทียบกับการนำน้ำกลั่นที่มีการเติมสารละลายไลเพสที่ความเข้มข้นและปริมาตรเดียวกันกับน้ำล้างเส้นใย จากค่าแอกทิวิตีของน้ำล้างครั้งที่ 6 (0.00084 U/mg lipase) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าแอกทิวิตีของน้ำกลั่น (0.00076 U/mg lipase) ทำให้เชื่อมั่นได้ว่าไม่มีแอลกอฮอล์หลงเหลือบนเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพ

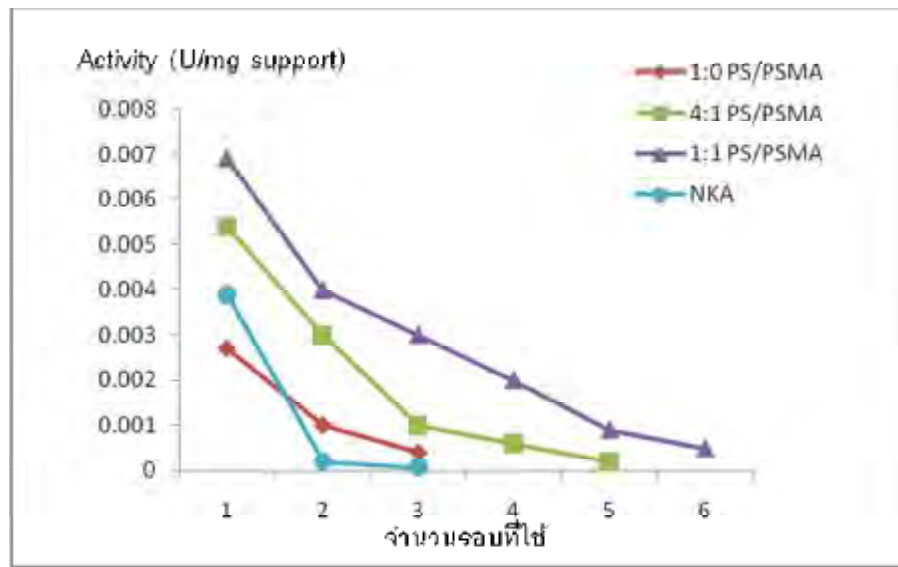
4.3 การทดสอบความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ

การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปที่นำกลับมาใช้ซ้ำตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.3.3 ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.18 แสดงให้เห็นว่าไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิลิกโทรสปีน 1:1 PS/PSMA มีการนำกลับมาใช้ซ้ำได้มากที่สุดคือจำนวน 6 ครั้ง รองลงมาคือ 4:1 PS/PSMA มีการนำกลับมาใช้ซ้ำได้จำนวน 5 ครั้ง และสุดท้ายคือ 1:0 PS/PSMA นำกลับมาใช้ซ้ำเพียง 3 ครั้ง ส่วน NKA เมื่อนำมาทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้น พบว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้เพียง 3 ครั้งเท่ากับไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิลิกโทรสปีน 1:0 PS/PSMA

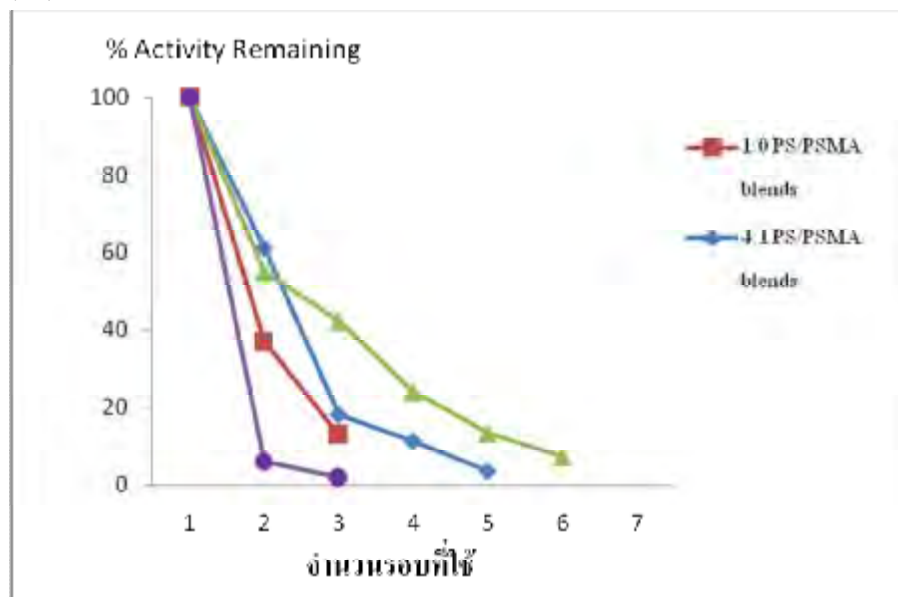
ตารางที่ 4.7 ค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนของเส้นใยอิลิกโทรสปีน PS/PSMA และ NKA ในแต่ละรอบของการใช้ซ้ำ

จำนวนครั้งที่ใช้	แอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป (U/mg support) บนวัสดุค้ำจุนชนิด			
	1:0 PS/PSMA	4:1 PS/PSMA	1:1 PS/PSMA	NKA
1	0.0027±0.00004	0.0054±0.0007	0.0069±0.0005	0.0039±0.0003
2	0.001±0.0001	0.003±0.0004	0.004±0.0004	0.0002±0.00001
3	0.0004±0.00004	0.003±0.0004	0.003±0.0002	0.00007±0.00001
4	-	0.0006±0.00002	0.002±0.00004	-
5	-	0.0002±0.00004	0.0009±0.00004	-
6	-	-	0.0005±0.00006	-

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.18 (ก) ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป และ (ข) % ค่าแอกทิวิตีคงเหลือของไลเพส ตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กโทรสปิน PS/PSMA (20mg/3ml) และ NKA (20mg/2ml) ในแต่ละรอบของการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซ้ำ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

- ภาวะที่ใช้ในการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ ศักย์ไฟฟ้า ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ และชนิดของตัวทำละลาย มีผลโดยตรงต่อสัณฐานวิทยาและขนาดของเส้นใย PS/PSMA ที่เตรียมได้

- ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยในการศึกษานี้พิจารณาจากภาวะที่เส้นใยที่ได้มีลักษณะเรียบและไม่มีปม รวมถึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กที่สุด ทั้งนี้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์จาก 1:0 PS/PSMA 4:1 PS/PSMA และ 1:1 PS/PSMA คือเมื่อใช้ ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) เป็น 8:10:20 6:11:15 และ 8:10:12 ตามลำดับ โดยตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับ 4:1 PS/PSMA คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วนผสมเป็น 2:1 สำหรับ 1:1 PS/PSMA และ 1:0 PS/PSMA นั้น ตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วนผสมเป็น 1:1

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่ไม่ได้ปรับสภาพชนิด 1:1 PS/PSMA ให้ค่าความจุเอนไซม์และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงกว่าเมื่อใช้วัสดุค้ำจุนชนิด 4:1 PS/PSMA และ 1:0 PS/PSMA ตามลำดับ

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ที่มีปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์มีค่าความจุเอนไซม์มากกว่าที่เตรียมจากฝืนเส้นใยที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพถึง 2.7 เท่า โดยไม่ส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA มีค่าความจุเอนไซม์ที่ต่ำกว่าและมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ใกล้เคียงกับที่เตรียมจากฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์- โทรสปัน PS/PSMA อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่าแอกทิวิตีต่อปริมาณไลเพสของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่า กรณีที่ใช้ NKA ซึ่งเป็น PS bead นั้นมี

ค่าสูงกว่าการใช้ฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์- สปัน PS (1:0 PS/PSMA) จึงสรุปได้ว่ารูปร่างของวัสดุค้ำจุนส่งผลโดยส่งต่อ conformation ของเอนไซม์

- เอนไซม์ที่เตรียมที่เตรียมจากฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์ 1:1 PS/PSMA และ 4:1 PS/PSMA สามารถนำมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากที่สุดคือจำนวน 6 และ 5 ครั้ง ตามลำดับ

- เอนไซม์ที่เตรียมที่เตรียมจากวัสดุชนิด PS สามารถนำมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้น้อยที่สุด ทั้งกรณีที่เป็นอนุภาคทรงกลมและฝืนเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณไลเปสที่ตรึงได้บนวัสดุค้ำจุนด้วยการปรับเปลี่ยนตัวแปรต่างๆ เช่น

- ภาวะที่เหมาะสมสำหรับตรึงรูปไลเปสบนฝืนอิเล็กทรอนิกส์ ได้แก่ สัดส่วนที่เหมาะสมของน้ำหนักรวบรวมต่อปริมาตรสารละลายไลเปส ความเข้มข้นของสารละลายไลเปส เป็นต้น เพื่อสามารถเตรียมเอนไซม์ที่ตรึงรูปได้ในปริมาณมากพอสำหรับใช้ทดสอบกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

- สัณฐานวิทยาของฝืนอิเล็กทรอนิกส์ เช่น รูปทรงของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่ใหญ่ขึ้น เป็นต้น

5.2.2 ศึกษาอิทธิพลด้านโครงสร้างเคมีของซัพสเตรทที่มีผลต่อความสามารถในการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของไลเปสที่ตรึงรูปที่เตรียมได้

รายการอ้างอิง

- [1] Small and Strong Materials Group. สารละลายเกี่ยวกับ Electrospinning. [ออนไลน์]. 2550. แหล่งที่มา : <http://www.nano.kku.ac.th/ssmg/?q=node/34> [2554, มกราคม 17]
- [2] ปราณี อานเป็รื่อง. เอนไซม์ทางอาหาร. 2547. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- [3] ผศ.ดร.อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย. ไบโอดีเซล. [ออนไลน์]. 2549. แหล่งที่มา : <http://www.vcharkarn.com/varticle/409/1/n/60760/2> [2554, มกราคม 17]
- [4] Pabai.F., Kermasha.S., and Morin. A., 1995. "Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*". World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11: 889-877
- [5] Namal Senanayake S.P.J., Shahidi.F., 2002. "Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology". Food Chemistry. 77:115-123
- [6] Weber.N., Weitkamp.P., and Mukherjee.K.D. 2001. "Fatty Acid Steryl, Stanyl, and Steroid Esters by Esterification and Transesterification in Vacuo Using *Candida rugosa* Lipase as Catalyst" J. Agric. Food Chem. 49:67-71
- [7] Schmidt, R. D., and Verger, R. 1998. "Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications". Angewandte Chemie (International ed. in English). 37,12 : 1608-1633.
- [8] Jaeger, K. E., Reetz, T. M. 1998. "Microbial lipases from versatile tools for biotechnology". Trends Biotechnology. 16 : 396-403.
- [9] Villeneuve.P., Muderhwa. J. M., Graille. J., and Haas. M. J.. 2000. "Review : Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches". Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 9 : 113-148.
- [10] Jia.V, Zhu.V, Vugrinovich.B., Kataphinan.W., Reneker. D. H., and Wang P. 2002. "Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts". Biotechnology Progress. 18: 1027-1032.
- [11] Nair. S., Kim. J., Crawford. B., and Kim. S.H. 2007. "Improve biocatalytic activity of enzyme-loaded nanofibers by dispersing entangle nanofibers structure". Biomacromolecules. 8: 1266-1270.

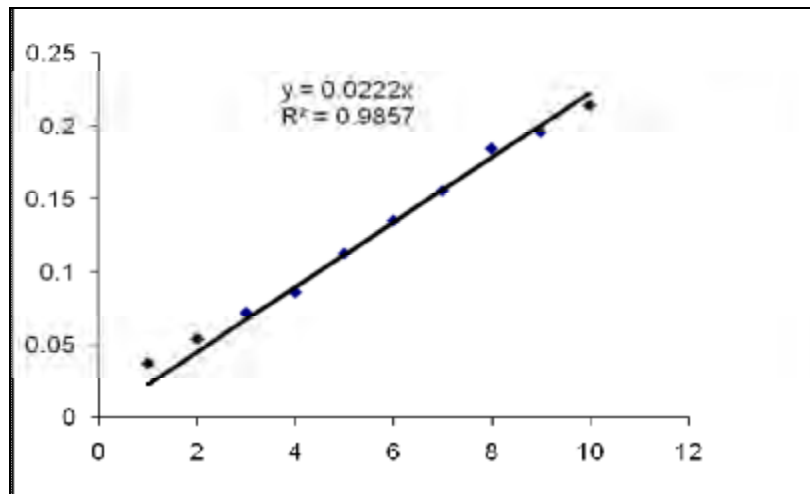
- [12] Tang. C., Ye. S., and Liu. H. 2007. "Electrospinning of poly(styrene-co-maleic anhydride) (SMA) and water-swelling behavior of crosslinked/hydrolyzed SMA hydrogel nanofibers". Polymer. 48: 4482-4491.
- [13] Ignatova. M., Stoilova O., Manolova. N., Mita. D.G., Diano. N., Nicolucci. C., and Rashkov. I. 2009. "Electrospun microfibrinous poly(styrene-alt-maleic anhydride)/poly(styrene-co-maleic anhydride) mats tailored for enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors". European Polymer Journal. 45: 2494-2504.
- [14] จิรัชญา ทวนทัย และ ปนัดดา ศรีไทย. 2551. การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนพอลิสไตรีนนาโนไฟเบอร์. โครงการวิจัยระดับปริญญาตรี ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [15] วันภิเชก จุฑาทักดี. 2551. การตรึงรูปไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa* เพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

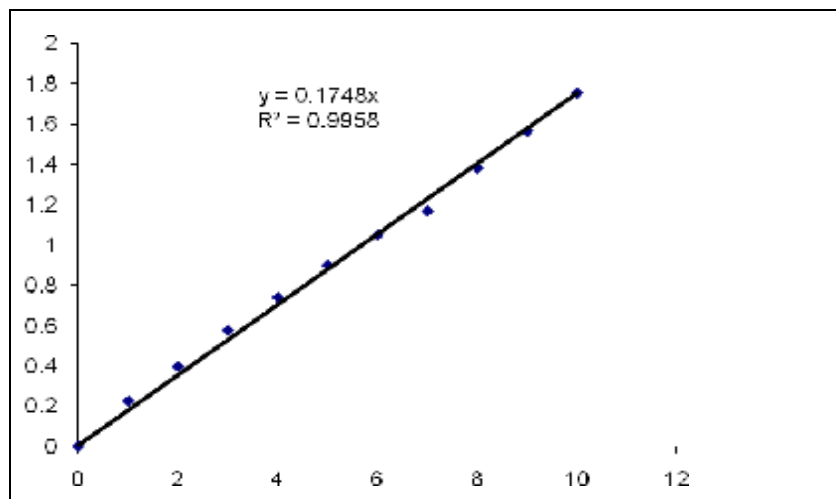
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม



รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม

2. กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟินอลที่ปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม



รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม

ภาคผนวก ข

ข้อมูลปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตี

ตารางที่ ข-1 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน

1:0 PS/PSMA ที่ตัดเป็นวงกลม น้ำหนัก 10 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	76.186	4.805	1.652	0.676	-0.375	-1.727
ตัวอย่างที่ 2	76.186	5.105	1.502	0.526	-0.300	-1.201

ตารางที่ ข-2 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน

4:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นวงกลม น้ำหนัก 10 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	78.529	4.354	1.502	0.976	-0.075	-0.601
ตัวอย่างที่ 2	78.529	4.354	1.502	0.901	-0.075	-0.901

ตารางที่ ข-3 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน

1:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นวงกลม น้ำหนัก 10 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	76.186	4.655	0.976	0.225	-0.225	-1.051
ตัวอย่างที่ 2	76.186	4.204	1.502	0.375	-0.150	-1.051

ตารางที่ ข-4 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:0 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 10 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	77.027	4.655	1.952	0.676	0	-1.877
ตัวอย่างที่ 2	77.027	4.805	1.426	0.751	0.300	-0.375

ตารางที่ ข-5 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
4:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 10 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	78.529	4.805	1.201	0.602	-0.450	-1.201
ตัวอย่างที่ 2	78.529	4.655	1.652	0.405	-0.150	-0.826

ตารางที่ ข-6 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 10 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	77.027	4.204	1.351	0.450	-0.526	-0.901
ตัวอย่างที่ 2	77.027	4.054	1.426	0.676	-0.150	-0.901

ตารางที่ ข-7 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:0 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 20 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	53.634	4.955	1.802	0.976	-0.075	-0.526
ตัวอย่างที่ 2	53.634	4.955	1.724	0.976	-0.075	-0.300
ตัวอย่างที่ 3	53.634	4.655	1.652	1.426	0	-0.526
ตัวอย่างที่ 4	53.634	4.655	1.877	1.126	0.075	-0.375
ตัวอย่างที่ 5	53.634	5.105	1.652	0.826	0	-0.225

ตารางที่ ข-8 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
4:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 20 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	54.595	3.904	1.276	0.751	0	-1.126
ตัวอย่างที่ 2	54.595	4.204	1.201	0.601	-0.375	-0.676
ตัวอย่างที่ 3	54.595	4.054	1.201	0.526	0.075	-0.526
ตัวอย่างที่ 4	54.595	4.054	1.502	0.450	-0.300	-0.450
ตัวอย่างที่ 5	54.595	4.204	1.051	0.601	-0.075	-0.601

ตารางที่ ข-9 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 20 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	52.943	3.754	1.051	0.751	0.751	-0.976
ตัวอย่างที่ 2	52.943	3.604	1.276	0.601	0.751	-0.676
ตัวอย่างที่ 3	52.943	3.453	1.351	0.901	-0.450	-0.526
ตัวอย่างที่ 4	52.943	3.754	1.051	0.751	-0.225	-0.526
ตัวอย่างที่ 5	52.943	4.204	0.976	0.150	-0.300	-0.526

ตารางที่ ข-10 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
NKA น้ำหนัก 20 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	53.844	4.955	1.051	-0.826	-1.727	-1.802
ตัวอย่างที่ 2	53.844	4.655	1.502	-1.276	-1.276	-1.502
ตัวอย่างที่ 3	53.844	4.505	1.802	-0.150	-0.601	-2.402
ตัวอย่างที่ 4	53.844	4.805	1.767	-0.300	-0.526	-1.276
ตัวอย่างที่ 5	53.844	4.354	1.502	0.375	-0.225	-2.890

ตารางที่ ข-11 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:0 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 50 mg (16.6/1)

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	52.733	5.255	1.877	1.126	0	-1.802
ตัวอย่างที่ 2	52.733	5.556	1.802	0.751	-1.051	-1.952
ตัวอย่างที่ 3	52.733	5.105	1.802	0.976	0.375	-3.979
ตัวอย่างที่ 4	52.733	5.405	1.727	0.976	0.150	-0.300

ตารางที่ ข-12 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
4:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 50 mg (16.6/1)

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	47.748	5.105	0.601	-0.075	-1.126	-1.201
ตัวอย่างที่ 2	47.748	4.655	0.976	0.300	-0.450	-1.727
ตัวอย่างที่ 3	47.748	4.505	1.276	0.150	-0.826	-2.628
ตัวอย่างที่ 4	47.748	4.505	1.502	0.150	-0.750	-0.826

ตารางที่ ข-13 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 50 mg (16.6/1)

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	53.123	3.153	0.751	0.075	-1.051	-1.351
ตัวอย่างที่ 2	53.123	3.153	0.976	0.150	-0.225	-1.201
ตัวอย่างที่ 3	53.123	3.453	0.901	0.075	-0.526	-3.529
ตัวอย่างที่ 4	53.123	3.754	0.450	0.150	-0.526	-1.952
ตัวอย่างที่ 5	53.123	2.853	0.826	0.225	-0.450	-1.727

ตารางที่ ข-14 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:0 PS/PSMA ที่ตัดเป็นทีตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 50 mg (6.6/1)

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	61.351	3.153	0.526	-0.450	-1.351	-3.003
ตัวอย่างที่ 2	61.351	3.754	0.450	-0.676	-1.126	-2.327
ตัวอย่างที่ 3	61.351	3.003	0.225	-0.676	-1.426	-3.228
ตัวอย่างที่ 4	61.351	2.703	0.375	-0.225	-0.826	-1.502

ตารางที่ ข-15 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
4:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นทีตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 50 mg (6.6/1)

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	65.135	2.402	0.450	0.075	-0.901	-2.477
ตัวอย่างที่ 2	65.135	2.252	0.676	0.225	-0.601	-1.426
ตัวอย่างที่ 3	65.135	2.102	0.450	0.450	-0.075	-1.276
ตัวอย่างที่ 4	65.135	2.402	0.526	0	-0.450	-1.727

ตารางที่ ข-16 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน
1:1 PS/PSMA ที่ตัดเป็นทีตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 50 mg (6.6/1)

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	63.904	1.652	0.225	-0.450	-1.051	-1.802
ตัวอย่างที่ 2	63.904	1.351	0.375	-0.150	-0.826	-2.177
ตัวอย่างที่ 3	63.904	1.502	0.375	-0.375	-0.901	-1.276
ตัวอย่างที่ 4	63.904	1.652	0.300	-0.300	-1.126	-2.177

ตารางที่ ข-17 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน

1:1 PS/PSMA ที่ปรับสภาพด้วยสารละลายแอลกอฮอล์

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	27.237	1.051	0.450	1.426	-1.802	-2.477
ตัวอย่างที่ 2	27.237	2.252	0.601	0.075	-0.676	-1.727
ตัวอย่างที่ 3	27.237	2.102	0.976	0.075	-0.826	-2.778
ตัวอย่างที่ 4	27.237	2.853	-4.354	-3.753	-3.153	-5.256
ตัวอย่างที่ 5	27.237	2.703	0.300	0.150	-0.751	-2.703

ตารางที่ ข-18 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.0222x$ ของเอนไซม์ตรีงรูปบน

NKA น้ำหนัก 500 mg

จำนวนตัวอย่าง	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ					
	สารละลาย ไลเพส	น้ำล้าง ครั้งที่ 1	น้ำล้าง ครั้งที่ 2	น้ำล้าง ครั้งที่ 3	น้ำล้าง ครั้งที่ 4	น้ำล้าง ครั้งที่ 5
ตัวอย่างที่ 1	53.784	3.904	0.826	0.826	0	-0.375
ตัวอย่างที่ 2	53.784	4.505	1.577	-0.300	-0.375	-0.676
ตัวอย่างที่ 3	53.784	4.505	0.976	0.601	-0.225	-0.751
ตัวอย่างที่ 4	53.784	4.054	1.126	0.601	-0.225	-0.901
ตัวอย่างที่ 5	53.784	4.805	1.051	-0.075	-0.526	-1.276

ตารางที่ ข-19 ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ $y = 0.1748x$

วัสดุค้ำจุน	น้ำหนักเส้นใยต่อ ปริมาณสารละลาย ไลเพส	ค่า y ที่ได้จากการแทนค่าในสมการ				
		ตัวอย่าง ที่1	ตัวอย่าง ที่2	ตัวอย่าง ที่3	ตัวอย่าง ที่4	ตัวอย่าง ที่5
1:0 PS/PSMA	ตัดเป็นวงกลม 10mg/1.5ml	3.804	3.812	-	-	-
4:1 PS/PSMA		9.087	9.172	-	-	-
1:1 PS/PSMA		10.688	11.032	-	-	-
1:0 PS/PSMA	ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ 10mg/1.5ml	3.760	3.829	-	-	-
4:1 PS/PSMA		8.924	8.400	-	-	-
1:1 PS/PSMA		10.622	10.297	-	-	-
1:0 PS/PSMA	20mg/3ml	4.588	4.577	4.580	4.455	4.630
4:1 PS/PSMA		10.564	7.761	8.524	9.716	8.181
1:1 PS/PSMA		10.793	11.241	11.928	11.165	12.729
1:0 PS/PSMA	50mg/3ml	3.293	3.408	3.236	3.274	-
4:1 PS/PSMA		2.925	2.967	2.859	2.860	-
1:1 PS/PSMA		10.364	11.079	10.488	10.593	10.641
1:0 PS/PSMA	50mg/7.5ml	3.257	3.284	3.244	3.263	-
4:1 PS/PSMA		3.095	2.847	3.017	2.958	-
1:1 PS/PSMA		10.545	9.811	10.059	10.831	-
1:1 PS/PSMA ที่ปรับ สภาพด้วยแอลกอฮอล์	10mg/2ml	10.851	11.728	11.384	11.184	10.517
NKA	20mg/2ml	6.112	6.855	7.141	5.988	6.198
NKA	500mg/2ml	8.474	8.707	8.101	8.276	8.267

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรุ่งอรุณ พัดเย็นชื่น เกิดเมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ.2526 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2547 จากนั้น เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคการศึกษาต้น ปีการศึกษา พ.ศ.2551 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา พ.ศ.2553 รวมระยะเวลาในการศึกษา 3 ปี