

การสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสிடเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์
ด้วยไลเพสจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย



นาย ธนธร วิทิตศานต์

ศูนย์วิทยพัทยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SYNTHESIS OF SUGAR FATTY ACID ESTER AND METHYL ESTER
BY LIPASE FROM YEAST ISOLATED IN THAILAND



Mr. Tanathron Vitisant

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Botany

Department of Botany

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การสังเคราะห์ซูการ์แพดตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์
ด้วยไลเพสจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

โดย

นาย ธนธร วิทิตศานต์

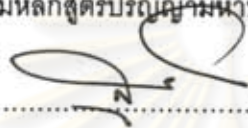
สาขาวิชา

พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณี จุฬาลักษณ์านุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณี จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาวิรินทร์ตระกูล)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมภูษ วิภูวนานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. วรกันต์ บุรพาธนะ)

ธนธร วิทิตศานต์ : การสังเคราะห์ซูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์
ด้วยไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย. (SYNTHESIS OF SUGAR FATTY
ACID ESTER AND METHYL ESTER BY LIPASE FROM YEAST ISOLATED IN
THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล, 113 หน้า.

จากยีสต์ทั้งสิ้น 49 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากตัวอย่างที่ปนเปื้อนน้ำมันในบริเวณต่างๆ บน
เกาะสีชัง พบว่ามีไลโปไลติกยีสต์ 17 ไอโซเลต โดยยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 มีความสามารถในการ
เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 2.304 ± 0.104 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็น
ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 17.84 ± 0.79 และ
 25.27 ± 1.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากยีสต์
SRY14-3 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำมันเมล็ดฝ้าย 1.44 เปอร์เซ็นต์โดย
น้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัด 1.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร น้ำตาลซูโครส 1.40
เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อ
ปริมาตรและแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา
เซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็น
เวลา 4 วัน โดยมีค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสสูงสุดเท่ากับ 4.85 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไลเปสที่ได้มี
สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 โดย
สามารถคงตัวที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และในช่วงความเป็นกรดต่าง
ระหว่าง 3-9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไลเปสมาประยุกต์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์
ซูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์พบว่าน้ำตาลฟรักโทสและกรดปาล์มมิติกเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสม
ที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.95 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเร่ง
ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 88.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้น้ำมันปาล์มและเมทานอล
เป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 95 ยูนิตต่อน้ำมัน 3 กรัม อัตราส่วนโดย
โมลของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:7.5 ปริมาณน้ำเท่ากับ 50.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อ
ปริมาตรน้ำมัน และปริมาณซิลิกาเจลเท่ากับ 16.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที โดยกำจัดกลีเซอรอลในชั่วโมงที่ 12
และทำปฏิกิริยาในสภาวะเดิมจนครบ 24 ชั่วโมง

ภาควิชา..... พฤษศาสตร์.....

ปีการศึกษา..... 2553.....

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ธนธร วิทิตศานต์
25/9

5172305823 : MAJOR BOTANY

KEYWORDS : Lipase / Isolation / Production / Sugar fatty acid ester / Biodiesel

TANATHORN VITISANT : SYNTHESIS OF SUGAR FATTY ACID ESTER AND METHYL ESTER BY LIPASE FROM YEAST ISOLATED IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, 113 pp.

Seventeen out of forty-nine yeast isolates obtained from oil contaminated soil samples collected from Sichang Island, Chonburi Province, were lipolytic. The isolate SRY14-3 exhibited the highest hydrolysis activity of 2.30 ± 0.10 Unit/ml. In addition, the percentage of products from esterification and transesterification reaction are 17.84 ± 0.79 and $25.27 \pm 1.31\%$, respectively. This research investigated the optimum condition for lipase production from the isolate SRY14-3. The maximum hydrolysis activity at 4.85 ± 0.15 Unit/mL was obtained when cultured in a medium containing 1.44 % (w/v) cotton seed oil, 1.17 % (w/v) yeast extract, 1.40 % (w/v) sucrose, 1 % (w/v) potassium dihydrogen phosphate and 0.1 % (w/v) magnesium sulphate with initial at pH 5.2 at 30°C , 200 rpm for 4 days. Furthermore, some characterizations of obtained lipase were determined. The optimal pH value and temperature for lipase activity were at 6.0 and 37°C , respectively. The lipase was stable at 70°C for 30 minutes and a wide pH range of 3-9 for 24 hours. This crude enzyme was applied in esterification reaction between fructose and palmitic acid. Sugar fatty acid ester conversion was $5.95 \pm 0.96\%$ while the transesterification reaction between palm oil and methanol showed the methyl ester conversion of 88.92%. It was obtained when optimum conditions of the crude lipase consisted of enzyme amount of 95 Unit/oil 3 g, methanol substrate molar ratio of 1:7.5, water content of 50.7 % (v/v_{oil}) and silica gel amount of 16.6 % (w/w_{oil}) at 40°C , 600 rpm for 24 hours with glycerol elimination at 12 hours before further incubation for another 12 hours.

Department : Botany

Student's Signature

TANATHORN VITISANT

Academic Year : 2010

Advisor's Signature

Warawut Chulalaknanukul

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล อาจารย์ ดร. ชมภูษช วิภูพานนท์ และ ดร. วรกันต์ บุรพาธนะ ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือด้วยดีจากเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ตลอดจน สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือ ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ สำหรับความรู้และประสบการณ์รูปแบบต่างๆ ตลอดจน ทุนสนับสนุนการวิจัย สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือทั้งหมดในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ รุ่นพี่ รุ่นน้อง ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยทุกๆ ท่าน ที่ช่วยเหลือในการทำงานวิจัย และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้า จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาว อ้อยใจ ลิ้มปัญญาเลิศ ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนทางการเงิน และกำลังใจ คอยห่วงใยข้าพเจ้าเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขั้นตอนการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เอนไซม์ไลเปส.....	4
2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส.....	4
2.3 ความจำเพาะของไลเปส.....	5
2.4 แหล่งของไลเปส.....	6
2.5 การผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	8
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส.....	10
2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเปสในทางอุตสาหกรรม.....	10
2.8 ชูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์.....	12
2.9 ไบโอดีเซล.....	13
2.10 น้ำมันปาล์ม.....	14
2.11 การใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล.....	14
2.12 วิธีการพื้นที่ผิวผลตอบ.....	16
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
วัตถุประสงค์.....	21
สารเคมี.....	22
วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 การคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเพส.....	23
3.1.1 การเก็บตัวอย่าง.....	23
3.1.2 การแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์.....	23
3.1.3 การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิ.....	23
3.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสจากยีสต์ที่ คัดเลือก.....	24
3.2.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเพส.....	24
3.2.2 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส....	24
3.2.3 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริเฟเคชัน ของไลเพส.....	25
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริเฟเคชันของ ไลเพส.....	25
3.2.5 การวัดปริมาณโปรตีน.....	25
3.3 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์ผลิตไลเพสสูง.....	26
3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส.....	26
3.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลเพส.....	26
3.4.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างต่อการผลิตไลเพส.....	26
3.4.3 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำต่อการผลิตไลเพส.....	27
3.4.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเพส.....	27
3.4.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลเพส.....	27
3.4.6 การหาความเข้มข้นของสารชักนำ แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส.....	28
3.5 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก.....	28

3.5.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ ไลเพส.....	28
3.5.2 การศึกษาความคงตัวของไลเพสที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ.....	29
3.5.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส.....	29
3.5.4 การศึกษาความคงตัวของไลเพสที่อุณหภูมิต่าง.....	29
3.6 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากไลเพสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก.....	29
3.6.1 การสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์.....	29
3.6.1.1 ศึกษาชนิดสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์.....	29
3.6.1.2 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์ระหว่างไลเพสจาก SRY 14-3 และ Novozyme 435.....	30
3.6.2 การผลิตเมทิลเอสเทอร์.....	31
3.6.2.1 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์.....	31
3.6.2.2 การศึกษาแนวทางการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากสภาวะที่เหมาะสม.....	31
3.7 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography:HPLC).....	32
3.8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	33
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล.....	34
4.1 การคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเพส.....	34
4.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสจากยีสต์ที่คัดเลือก.....	40
4.3 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์ผลิตไลเพสสูง.....	43
4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส.....	45
4.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลเพส.....	45
4.4.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่อการผลิตไลเพส.....	46

	หน้า
4.4.3 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำต่อการผลิตไลเพส.....	47
4.4.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเพส.....	50
4.4.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลเพส.....	52
4.4.6 การหาความเข้มข้นของสารชักนำ แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส.....	54
4.5 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเพสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก.....	66
4.6 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากไลเพสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก.....	68
4.6.1 การสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอซิดเอสเทอร์.....	68
4.6.2 การผลิตเมทิลเอสเทอร์.....	72
4.6.2.1 ศึกษาค่าปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์.....	72
4.6.2.2.การศึกษาแนวทางการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิล เอสเทอร์จากสภาวะที่เหมาะสม.....	83
4.6.2.2.1 การศึกษารูปแบบการเติมเมทานอล.....	83
4.6.2.2.2 ผลของการกำจัดกลีเซอรอลต่อเปอร์เซ็นต์การ เปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์.....	85
4.6.2.2.3 ผลขององค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันต่อ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์.....	86
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	88
รายการอ้างอิง.....	89
ภาคผนวก.....	100
ภาคผนวก ก.....	101
ภาคผนวก ข.....	103
ภาคผนวก ค.....	104
ภาคผนวก ง.....	109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	<p>ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส โดยทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ ที่เร่งด้วยไลเพส โดยมีไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นนั้น สามารถเกิดได้ทั้งในภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solution) และไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา (non- aqueous solution).....</p>	5
2.2	ตัวอย่างยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเพสได้.....	7
2.3	การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสและไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล.....	14
3.1	ช่วงของค่าระดับปัจจัยทั้ง 3 ที่ทำการทดลอง.....	28
3.2	ช่วงของค่าระดับปัจจัยทั้ง 4 ที่ทำการทดลอง.....	31
4.1	จำนวนยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ.....	35
4.2	การเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ของไลเพสที่คัดเลือก.....	41
4.3	ผลการทดสอบด้วย API 20 C AUX ของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3.....	44
4.4	องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน 12 ชนิด.....	49
4.5	ผลการทดลองในการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง.....	55
4.6	การประมาณผลกระทบจากปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของค่าแยกทิวิตี.....	56
4.7	การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองของค่าแยกทิวิตี.....	56
4.8	การประมาณผลกระทบจากปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของค่าการเจริญ.....	59
4.9	การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองของค่าการเจริญ.....	59
4.10	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุง.....	65
4.11	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของการสังเคราะห์ซูการ์แพคตีแอสิดเอสเทอร์จากน้ำตาลและกรดไขมันชนิดต่างๆ ด้วยไลเพส SRY14-3.....	69
4.12	ค่าสถิติของปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของชนิดน้ำตาลและกรดไขมัน.....	70
4.13	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ (%conversion) ของการทดลอง.....	73
4.14	การประมาณผลกระทบจากปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์.....	74

ตารางที่		หน้า
4.15	การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองของค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์.....	74
4.16	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เมื่อมีการกำจัดกลีเซอรอล.....	86
4.17	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันชนิดต่างๆ.....	87
ง-1	ข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่ ง-1.....	111



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	รูปสามมิติของผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว.....	17
2.2	เส้นโครงร่างของผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว.....	17
4.1	บริเวณที่เก็บตัวอย่างบนเกาะสี่ซัง.....	34
4.2	ภาพ A แสดงการผลิตไลเพสของยีสต์จึงเกิดการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ภาพ B แสดงยีสต์ที่ไม่สามารถผลิตไลเพสจึงการไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต.....	34
4.3	ลักษณะโคโลนีของยีสต์ผลิตไลเพสทั้ง 17 ไอโซเลต.....	38
4.4	ค่าแอกทิวิตีของไลเพสจากยีสต์ 17 ไอโซเลต หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเพส ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 4 วัน.....	42
4.5	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของไลเพสจากยีสต์ 17 ไอโซเลต.....	42
4.6	ลักษณะโคโลนีบนอาหารกึ่งแข็งและรูปร่างยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3.....	43
4.7	ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการเจริญของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	45
4.8	ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการเจริญของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ.....	46
4.9	ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการเจริญของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำมันแตกต่างกันต่างๆ.....	48
4.10	แสดงค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการเจริญของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันต่างๆ.....	50
4.11	ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการเจริญของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันต่างๆ.....	53
4.12	รูปแบบของส่วนตกค้างของตัวแปรตามเป็นแอกทิวิตี A ค่าการกระจายแบบปกติ B ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง C ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย.....	57

ภาพที่	หน้า	
4.13	รูปแบบของส่วนตกค้างของตัวแปรตามเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร A ค่าการกระจายแบบปกติ B ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง C ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย.....	60
4.14	อันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายกับยีสต์สกัดต่อค่าแอกทิวิตี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (B).....	62
4.15	อันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายกับน้ำตาลซูโครสต่อค่าแอกทิวิตี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (B).....	63
4.16	อันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของยีสต์สกัดกับน้ำตาลซูโครสต่อค่าแอกทิวิตี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	64
4.17	คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงตัวของไลเพสที่อุณหภูมิต่างๆ.....	67
4.18	ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงตัวของไลเพสที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ.....	67
4.19	อิทธิพลของชนิดน้ำตาลและชนิดของกรดไขมันต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์.....	70
4.20	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอซิดเอสเทอร์เมื่อใช้ไลเพสจากยีสต์ SRY14-3 และ ไลเพสจาก Novozyme 435 เป็นตัวเร่ง.....	71
4.21	รูปแบบของส่วนตกค้างของเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ A ค่าการกระจายแบบปกติ B ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง C ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย.....	75
4.22	อิทธิพลหลักทั้ง 4 ปัจจัยต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์.....	76
4.23	อันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลกับปริมาณเอนไซม์ โดยกำหนดปริมาณน้ำและปริมาณซิลิกาเจลอยู่ที่ระดับกลาง.....	77
4.24	อันตรกิริยาระหว่างปริมาณน้ำกับปริมาณเอนไซม์โดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณซิลิกาเจลไว้ที่ระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์.....	78

ภาพที่	หน้า	
4.25	<p>อันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับปริมาณเอนไซม์ โดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณน้ำอยู่ที่ระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์.....</p>	79
4.26	<p>อันตรกิริยาระหว่างปริมาณน้ำกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลโดยกำหนดปริมาณเอนไซม์และปริมาณซิลิกาเจลไว้ที่ระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์.....</p>	80
4.27	<p>อันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลโดยกำหนดปริมาณเอนไซม์และปริมาณน้ำอยู่ในระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์.....</p>	81
4.28	<p>อันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับปริมาณน้ำโดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณเอนไซม์ไว้ที่ค่ากลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์.....</p>	82
4.29	<p>เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เมื่อแปรผันจำนวนครั้งของการเติมเมทานอล.....</p>	85
ค-1	<p>กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม.....</p>	104
ค-2	<p>กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.0</p>	106
ค-3	<p>กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.0</p>	106
ค-4	<p>กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 8.0</p>	106
ค-5	<p>กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 9.0</p>	107
ค-6	<p>กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 10.0</p>	107
ค-7	<p>กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม.....</p>	108
ง-1	<p>โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เร่งด้วยไลเปส.....</p>	111

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolases มีรหัสเป็น EC.3.1.1.3 ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (triacylglycerol) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยาจะเกิดที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสัปดาห์กับชั้นน้ำ (oil-water interface) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis reaction) ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันและทรานเอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิลหรือโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์กับหมู่ไฮดรอกซิลได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) (Gupta และคณะ, 2007)

เนื่องจากไลเปสสามารถพบได้ทั้งใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความคงตัวต่ำกว่าจุลินทรีย์ รวมถึงความซับซ้อนในการสกัดเพื่อนำมาใช้ ด้วยเหตุนี้ไลเปสจากแหล่งทั้งสองจึงยังไม่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แตกต่างกับไลเปสจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ที่มีความหลากหลาย สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาออกเซลล์ เติบโตได้รวดเร็ว ขยายปริมาณการผลิตง่าย ใช้สับซึบเสตรท์ได้หลากหลาย และยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรม (Pendey และคณะ, 1999) ในปัจจุบันมีผู้ค้นพบยีสต์ที่สามารถผลิตไลเปสแล้วหลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม *Candida Spp.*, *Geotrichum*, *Trichosporon* และ *Yarrowia lipolytica* เป็นต้น

ปัจจุบันการผลิตไลเปสจากยีสต์นิยมผลิตในอาหารเหลว (submerge culture) เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสได้ง่ายและมีประสิทธิภาพกว่าการผลิตด้วยวิธีอื่น โดยปัจจัยดังกล่าวสามารถแบ่งได้เป็นปัจจัยทางกายภาพ เช่น ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโต เป็นต้น และปัจจัยทางด้านชีวเคมี (biochemical parameters) เช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ เป็นต้น (Gupta และคณะ, 2007; Sharma และคณะ, 2001) เนื่องด้วยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสนั้นมีจำนวนมาก การออกแบบการทดลอง (design and analysis of experiment : DOE) ซึ่งเป็นเทคนิคทางสถิติ จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสม ทั้งนี้ในการทดลองทั่วไปมักเป็นการศึกษาที่ละปัจจัย (one factor method) ซึ่งต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งยังไม่เหมาะต่อการอธิบายผลของอันตรกิริยา (Interaction effect)

ระหว่างปัจจัยได้ การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบ (Response Surface Methods and Designs) เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนามาจากวิธีแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) ทำให้สามารถอธิบายอันตรกิริยาของแต่ละปัจจัยและค่าที่เหมาะสมของปัจจัยจากความสัมพันธ์ของตัวแปรได้ อีกทั้งยังมีความแม่นยำสูง ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายน้อย จึงเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์มากขึ้นในปัจจุบัน

เนื่องด้วยไลเพสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลาย จึงมีการนำเอนไซม์ไลเพสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น น้ำยาซักล้าง อาหาร เครื่องสำอาง เชื้อเพลิงชีวภาพ และยา เป็นต้น ซึ่งหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่ไลเพสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้คือ ชูการ์แพตตี แอซิดเอสเทอร์ ด้วยคุณสมบัติที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น และสามารถย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งนี้การผลิตชูการ์แพตตีเอสเทอร์ส่วนใหญ่ผลิตผ่านกระบวนการเคมีซึ่งจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูง ใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษสูง มีการเจือปนของสีที่ไม่ต้องการ และมีความจำเพาะต่อบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาต่ำ กระบวนการผลิตทางชีวภาพโดยใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจึงก้าวเข้ามามีบทบาทสำคัญในการแก้ปัญหาดังกล่าวซึ่งมีข้อได้เปรียบทั้งด้านพลังงาน ความจำเพาะต่อบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา ความซับซ้อนของกระบวนการผลิตที่น้อยกว่า รวมถึงการยอมรับของผู้บริโภค (Khaled และคณะ, 1991)

อีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไลเพสมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ได้คือ การผลิตเมทิลเอสเทอร์ นับเป็นกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงทดแทนด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่น่าสนใจยิ่งในปัจจุบัน ประโยชน์ที่ได้มีหลายประการ เช่น ผลผลิตที่ได้มีความบริสุทธิ์ กระบวนการผลิตไม่มีผลผลิตข้างเคียงที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ระดับมลพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตทางเคมีแบบดั้งเดิม (Shu และ Jei, 2009)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเพสสูงจากบริเวณต่างๆ บนเกาะสีชัง และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยอาศัยการออกแบบการทดลองวิธีพื้นที่ผิวตอบ รวมถึงศึกษาคุณสมบัติการทำงานของไลเพสเบื้องต้น และการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตชูการ์แพตตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์ เพื่อนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ทำการคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเพสเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตชูการ์แพตตีแอซิดเอสเทอร์ และเมทิลเอสเทอร์

ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมเอกสารสำหรับการวิจัย
2. คัดเลือกยีสต์ผลิตไลเปสจากตัวอย่าง
3. ทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเบื้องต้น
4. หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากยีสต์ที่คัดเลือก
5. ศึกษาคุณสมบัติของไลเปสเบื้องต้น
6. ศึกษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์คาร์พेटตีแอซิดเอสเทอร์และไบโอดีเซล
7. วิเคราะห์ สรุปผลงานวิจัย เขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พบยีสต์ผลิตไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์คาร์พेटตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ international Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นอีกเช่น เอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (acyl glycerol hydrolase) ไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Triacyl glycerol hydrolase) นอกจากนี้คณะกรรมการเอนไซม์ (Enzyme Commission; EC) ได้กำหนดการตั้งชื่อเอนไซม์ (nomenclature) โดยได้จำแนกเอนไซม์ออกเป็นพวกต่างๆ (classification) ตามชนิดปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) รหัสดังกล่าวแบ่งเป็นประกอบด้วยตัวเลขสี่ชุด แต่ละชุดแยกออกจากกันโดยจุด ตัวเลขชุดแรกบ่งบอกถึงพวก (class) ที่เอนไซม์นั้นถูกจัดไว้ ซึ่งมีหกพวก ส่วนตัวเลขชุดที่สองและชุดที่สามของรหัสเอนไซม์ จะบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง สำหรับตัวเลขชุดที่สี่จะช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาค้ำยกันออกจากกันซึ่งเอนไซม์ไลเปสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ ที่บ่งบอกปฏิกิริยา ดังนี้

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

2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) กรดไขมัน (fatty acid) และ กลีเซอรอล (glycerol) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis reaction) ได้แก่ เอสเทอริฟิเคชัน (esterification) และ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาประเภทแอซิโดไลซิส (acidolysis) อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification) แอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) และ อะมิโนไลซิส (aminolysis) อีกด้วย (ตารางที่ 2.1) (Villeneuve และคณะ, 2000)

ตารางที่ 2.1 ปฏิกริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเปส โดยทั้งปฏิกริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกริยาการสังเคราะห์ต่างๆ ที่เร่งด้วยไลเปส โดยมีไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นนั้น สามารถเกิดได้ทั้งในภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solution) และไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปฏิกริยา (non-aqueous solution)

ปฏิกริยา	ภาพแบบการเกิดปฏิกริยา
ไฮโดรไลซิส	$R_1\text{-COO-R}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons R_1\text{-COOH} + R_2\text{-OH}$
เอสเทอร์ฟิเคชัน	$R_1\text{-COOH} + R_2\text{-OH} \rightleftharpoons R_1\text{-COO-R}_2 + \text{H}_2\text{O}$
แอซิโดไลซิส	$R_1\text{COO-R}_2 + R_3\text{C-OH} \rightleftharpoons R_3\text{-COO-R}_2 + R_1\text{-COOH}$
อินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน	$R_1\text{-COO-R}_2 + R_3\text{-COO-R}_4 \rightleftharpoons R_3\text{-COO-R}_2 + R_1\text{-COO-R}_4$
ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน หรือแอลกอฮอล์ไลซิส	$R_1\text{-COO-R}_2 + R_3\text{-OH} \rightleftharpoons R_1\text{COO-R}_3 + R_2\text{-OH}$
อะมิโนไลซิส	$R_1\text{-COO-R}_2 + R_3\text{-NH}_3 \rightleftharpoons R_1\text{-CONH-R}_3 + R_2\text{-OH}$

2.3 ความจำเพาะของไลเปส

Macrae (1983) จำแนกไลเปสโดยแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่หนึ่ง ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3 specific lipase) ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันอิสระ และ 1,2-ไดกลีเซอไรด์ หรือ 2,3-ไดกลีเซอไรด์ ได้ 2-โมโนกลีเซอไรด์ เนื่องจากกลีเซอไรด์ที่ได้มักไม่เสถียร หากให้เวลาในการย่อยนานขึ้นก็จะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1-โมโนกลีเซอไรด์ หรือ 3-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ถ้าให้ปฏิกริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะทำให้ได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ไลเปสในกลุ่มนี้ได้จาก *Aspergillus niger* *Mucor javanicus* *Rhizopus arrhizus* และไลเปสจากรำข้าว

กลุ่มที่สอง ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เข้าทำปฏิกริยา (Non-specific lipase) ปฏิกริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการย่อยสลายได้ทุกตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ และสามารถที่จะไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลได้อย่างสมบูรณ์ ไลเปสในกลุ่มนี้ได้จาก *Candida cylindracea* *Corynebacterium acnes* *Staphylococcus aureus* และไลเปสจากตับอ่อนสุกร

กลุ่มที่สาม ไลเปสที่มีความจำเพาะกับชนิดของกรดไขมัน (fatty acid-specific lipase) ไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่แสดงสมบัตินี้ แต่มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geotrichum candidum* ที่ผลิตไลเปสที่ไฮโดรไลซ์กลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายโมเลกุลยาวซึ่งประกอบด้วยพันธะคู่ที่เป็น cis-form ในตำแหน่งที่ 9 ได้ดี ส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) หรือชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่ไม่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ไม่ดีนัก

2.4 แหล่งของไลเปส

เอนไซม์ไลเปสผลิตได้จากทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์ไลเปสสร้างขึ้นที่ตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) ในพืชพบได้ในถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถแยกได้จากทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่เนื่องจากไลเปสจากจุลินทรีย์มีความเสถียร (stability) สูง ความสามารถในการคัดเลือกสารตั้งต้น (selectivity) ดี และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity) หลายชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจและมีการนำไปประยุกต์ใช้สูงที่สุด (Cardenas และคณะ, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เติบโตเติบโตง่าย วัฏจักรชีวิตไม่ซับซ้อน มักผลิตไลเปสชนิดปล่อยออกมา นอกเซลล์ (extracellular lipase) ซึ่งง่ายและสะดวกต่อการแยกและนำไปใช้ประโยชน์ (Kademi และคณะ, 2003) ซึ่งได้แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ที่สามารถผลิตไลเปสได้แสดงดังตารางที่ 2.2 ไลเปสจากยีสต์ *C. rugosa* เป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรมมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องมาจากยีสต์ชนิดนี้ผลิตไลเปสที่มีสมบัติที่ดี มีแอกทิวิตีสูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์อื่นๆ (Redondo และคณะ, 1995) เช่น ในประเทศญี่ปุ่นมีบริษัทผู้ผลิตทำอุตสาหกรรมผลิตกรดไขมันจากเมล็ดละหุ่งโดยใช้ไลเปสจาก *C. rugosa* มาตั้งแต่ปี 1985 (Macrae และ Hammond, 1985) นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกลิ่นในนมและครีมจากนม โดยพบว่าไลเปสจาก *C. rugosa* เป็นไลเปสที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ที่สุด เนื่องมาจากสมบัติในการสร้างกลิ่นที่มีความเฉพาะสูง (Pandey และคณะ, 1999)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้

สกุล	ชนิด	อ้างอิง	
<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>	Wang และคณะ, 1995 Frense และคณะ, 1996 Yee และคณะ, 1995 Brocca และคณะ, 1998 Xie และคณะ, 1998	
	<i>C. tropicalis</i>	Takahashi และคณะ, 1998	
	<i>C. antarctica</i>	Weber และคณะ, 1999 Jaeger และ Reetz, 1999 Arroyo และคณะ, 1999	
	<i>C. cylindracea</i>	Kamiya และ Gotto, 1998 Helisto และ Korpela, 1998	
	<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe และคณะ, 1996	
	<i>C. deformans</i>	Lacointe และคณะ, 1996	
	<i>C. curvata</i>	Ghosh และคณะ, 1996	
	<i>C. valida</i>	Ghosh และคณะ, 1996	
	<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Merek และ Bednasski, 1996 Pignede และคณะ, 2000
		<i>Rhodotorula</i>	<i>Rho. glutinis</i> <i>Rho. pilimornae</i>
	<i>Pichia</i>	<i>Pi. bispora</i>	Hou, 1994
		<i>Pi. maxicana</i>	Hou, 1994
		<i>Pi. sivicola</i>	Sugihara และคณะ, 1995
<i>Pi. xylosa</i> <i>Pi. burtonii</i>		Sugihara และคณะ, 1995 Sugihara และคณะ, 1995	
<i>Saccharomyces</i>	<i>Sa. lipolytica</i>	Tahoun และคณะ, 1985	
	<i>Sa. crataegenesis</i>	Hou, 1994	
<i>Torulospora</i>	<i>Torulospora globora</i>	Hou, 1994	
<i>Trichosporon</i>	<i>Trichosporon</i> <i>asteroides</i>	Dharmsthiti และ Ammaranond, 1997	

ที่มา : Sharma และคณะ (2001)

2.5 การผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งในอาหารเหลว (submerge culture) และบนอาหารแข็ง (solid state) Pandey และคณะ (1999) เสนอว่า การผลิตไลเปสบนอาหารแข็งมีข้อดีกว่าการผลิตในอาหารเหลวอยู่หลายประการ เช่น จุลินทรีย์สามารถเติบโตได้ง่าย เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่า นอกจากนี้ยังสามารถแยกเอนไซม์ออกมาได้ง่ายกว่าและทำให้เกิดของเสียน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่เป็นการผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะผลิตจากเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นเพราะสามารถควบคุมสภาพการเลี้ยง สารอาหาร และ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสในอาหารเหลวทำได้ง่ายกว่า ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน สภาพความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการเติบโตของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (Elibol และ Ozer, 2001)

2.5.1 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

ธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญทั้งในการเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์ นอกจากชนิดของคาร์บอนแล้วปริมาณคาร์บอนก็มีผลต่อการเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ด้วยเช่นกัน ฉะนั้นการเลือกชนิดและปริมาณที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ Papaparaskevas และคณะ (1992) รายงานว่า น้ำตาลฟรักโทส และน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* และพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร จะให้ปริมาณไลเปสสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรักโทสถึง 12 เท่า

จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้เอง จำเป็นต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำ เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งสารเหนี่ยวนำนี้อาจเป็นสารชนิดเดียวหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนได้ Essamri และ Deyris (1998) รายงานว่ากิจกรรมของไลเปสเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำมันเป็นสารเหนี่ยวนำจากการเติมน้ำมันชนิดต่างๆ ลงในอาหารสำหรับการผลิตไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่าทั้งการเติบโตของ *R. oryzae* และกิจกรรมไลเปสที่ผลิตได้ มีปริมาณมากกว่าในอาหารที่ไม่เติมน้ำมันถึง 3 เท่า Fadilo และ Osman (2002) รายงานว่า *C. rugosa* สามารถผลิตไลเปสได้ในปริมาณมากเมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน

2.5.2 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ เพราะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ในโตรเจนแตกต่างกัน บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนในสภาพของสารอนินทรีย์ ขณะที่บางชนิดใช้ในโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ ดังนั้นในการผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณสูงจึงต้องเลือกใช้ไนโตรเจนที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ Izumi และคณะ (1990) ได้ผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KW1 โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโตน 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยีสต์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้การใช้ยูเรียและแอมโมเนียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ กลับมีผลการยับยั้งการผลิตไลเปส (Sztajer และ Bryjak, 1989) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์มักจะผลิตไลเปสได้ดีเมื่อมีแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษา Papaparaskevas และคณะ 1992 กลับพบว่า *R. glutinis* ใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตซึ่งเป็นอนินทรีย์ในการผลิตไลเปสได้ดีกว่า

2.5.3 อิทธิพลของอิออนของโลหะ

อิออนของโลหะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการผลิตไลเปส เนื่องจากอิออนช่วยรักษาสสมดุลภายในเซลล์ และทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์อีกหลายชนิด จึงช่วยเซลล์มีการเติบโตเติบโตอย่างปกติ Janssen และคณะ (1994) รายงานว่ากิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในอาหารที่เติมอิออนของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) เหล็ก (Fe^{2+}) และ แคลเซียม (Ca^{2+}) Kok และคณะ (1995) รายงานว่าเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* BD 413 สามารถผลิตไลเปสได้มากขึ้นเมื่อเติมอิออนของแมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง (Cu^{2+}) และโคบอลต์ (Co^{2+})

2.5.4 อิทธิพลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่าง

อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมแตกต่างกันไป Song และคณะ (2001) รายงานว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากยีสต์ *C. rugosa* คือ 30 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ Kamini และคณะ (2000) รายงานว่าการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Cryptococcus* sp. S2 มีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส และ 5.6 ตามลำดับ

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไลเพส

ลักษณะการทำงาน และความคงตัวของไลเพสมีผลมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.6.1 ค่าความเป็นกรดต่าง

ไลเพสจากยีสต์ส่วนใหญ่จะมีช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในสภาวะที่เป็นกลาง เช่น *Arxulaadeninivorans* C. *Cylindracea* C. *rugosa* DMS 2031 และ *Geotrichum candidum* ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมประมาณ 6.8-7.0 แต่ก็มีไลเพสจากยีสต์บางชนิดที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด เช่น *Kluyveromyces lactis* มีช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 2.0-7.5 (Oishi และคณะ, 1999) และ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 มีช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 1.9-7.2 (Kakugawa และคณะ, 2002) และไลเพสจากยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างอ่อน คือ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.2 ส่วนความคงตัวของไลเพส พบว่าไลเพสจากยีสต์ส่วนใหญ่มีความคงตัวในช่วงค่าความเป็นกรดต่างที่กว้างคือประมาณ 3.0-10.0 (Dharmsthiti และ Ammaranond, 1997)

2.6.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเกี่ยวข้องกับการทำงานของไลเพสโดยตรง ทั้งนี้ไลเพสที่ได้จากยีสต์ต่างชนิดกันก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกันไป เช่น ยีสต์ *Arxulaadeninivorans* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส (Boer และคณะ, 2005) ยีสต์ *C. rugosa* DMS 2031 มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 35-40 องศาเซลเซียส (Benjamin และ Pandey, 2001) ยีสต์ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 75 องศาเซลเซียส (Kakugawa และคณะ, 2002) ยีสต์ *Y. lipolytica* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (Ota และคณะ, 1982) เป็นต้น

2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเพสในทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับไขมัน น้ำมัน อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตสารเคมีและยา อุตสาหกรรมกระดาษ เครื่องสำอางค์ (Kazlauskas และ Bornscheuer, 1998) ไลเพสยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการย่อยสลายขยะไขมัน (Masse และคณะ, 2001) และ สารโพลียูรีเทน (Takamoto และคณะ, 2001)

2.7.1 อุตสาหกรรมอาหาร

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น ในอุตสาหกรรมนม นิยมใช้เป็นอย่างมากในการไฮโดรไลซ์ไขมันนม ผลิตรสเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตชีส ใช้ในปฏิกิริยาไลโปไลซิสไขมันเนยและครีม กรดไขมันอิสระเองก็ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลิ่นต่างๆ เช่น กลิ่นของเอสเทอร์ แลคโตน เมทิลคีโตน และเบต้าคีโต-แอซิด เป็นต้น (Wong, 1995)

2.7.2 อุตสาหกรรมสารเคมีอินทรีย์ (oleochemistry industry)

ในอุตสาหกรรมนี้ไลเปสใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะซึ่งไม่สามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีหรือทดแทนวิธีทางเคมีซึ่งอาจมีต้นทุนการผลิตสูงหรือผลิตได้ยาก ตัวอย่างเช่น ในอุตสาหกรรมยาเพื่อใช้ผลิตหรือปรับปรุงสารปฏิชีวนะ อุตสาหกรรมเคมีเกษตร ใช้ผลิตยากำจัดศัตรูพืช เป็นต้น (Pandey และคณะ, 1999)

2.7.3 อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสารทำความสะอาด

ไลเปสถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาดโดยเป็นองค์ประกอบของผงซักฟอก อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอส (proteases) เพื่อใช้ขจัดคราบไขมันที่เลอะบนเสื้อผ้า นอกจากนี้ไลเปสยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สำหรับผลิตภัณฑ์สบู่ และยาสระผมอีกด้วย (Schmidt และ Verger, 1998)

2.7.4 อุตสาหกรรมกระดาษ

ไลโปไลติกเอนไซม์มีความสำคัญในการย่อยเพื่อขจัดสารที่เรียกว่า "pitch" ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในเนื้อไม้ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมัน ที่จะมีส่วนในการรบกวนการผลิตกระดาษ และช่วยขจัดคราบไขมันที่ติดมากับกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษรีไซเคิล ทำให้ไม่เกิดการสะสมสารเหนียวที่จะรบกวนการผลิตขึ้นด้วย (Jaeger และ Reetz, 1998)

2.7.5 กระบวนการจัดการขยะและสารพิษ

ไลเปสมีประโยชน์ในการช่วยย่อยกำจัดไขมันที่ปนเปื้อนมาในขยะ ช่วยบำบัดน้ำเสีย หรือน้ำธรรมชาติที่มีการปนเปื้อนของไขมัน นอกจากนี้ยังช่วยบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และก๊าซพิษได้ด้วย (Pandey และคณะ, 1999)

2.7.6 อุตสาหกรรมอื่นๆ

ไลเพส สามารถนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น เซลลูเลส เพคตินเนส และโปรตีเอส เพื่อใช้ฟอกสีในอุตสาหกรรมเส้นใยผ้า และยังมีการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของไบโอเซ็นเซอร์ ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ใช้ในกระบวนการฟอกหนังสัตว์ ใช้ในการทำมาสะอาดพื้นผิวแข็งๆ การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว การสังเคราะห์สารโพลีเมอร์ ผลิตพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ ใช้เป็นส่วนหนึ่งในอุตสาหกรรมน้ำมันหล่อลื่น และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางด้วย (Schmidt และ Verger, 1998)

2.8 ชูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์

ชูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์ (sugar fatty acid ester) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของกรดไขมันกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของน้ำตาลผ่านกระบวนการเอสเทอร์ฟิเคชันได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารลดแรงตึงผิวกลุ่มชูการ์เอสเทอร์ ในปี 2552 มูลค่าการตลาดโลกของสารกลุ่มชูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์มีปริมาณสูงถึง 43,000 ล้านบาท และมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยต่อปี 3 เปอร์เซ็นต์ ในทุกๆ ปี (Krishnaswamy และคณะ, 2008) ด้วยคุณสมบัติที่เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น และสามารถย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ จึงทำให้ชูการ์แฟตตีเอสเทอร์ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งสินค้าอุปโภคบริโภคทั่วไปเช่น ครีมบำรุงผิว แชมพู ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดขนมปังกรอบ หรือแม้ในสินค้าอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสีและสารเคลือบผิว อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมพลาสติก และอุตสาหกรรมงานหล่อลื่นและรักษาโลหะ เป็นต้น (Shu และ Jei, 2009) โดยสารตั้งต้นทั้งหมดในกระบวนการผลิตล้วนเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรทั้งสิ้น ซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพด้านแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญในภูมิภาค จึงเป็นการสร้างโอกาสที่มีต่อการเพิ่มขีดความสามารถด้านการผลิตเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ผลิตภัณฑ์และสร้างคุณค่าเพิ่มผลผลิตทางด้านเกษตรกรรม

ปัจจุบันการผลิตชูการ์แฟตตีเอสเทอร์ส่วนใหญ่ผลิตผ่านกระบวนการทางเคมีซึ่งจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูง ใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษสูง มีการเจือปนของสีที่ไม่ต้องการ และมีความจำเพาะต่อบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาต่ำ กระบวนการผลิตทางชีวภาพโดยใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจึงก้าวเข้ามามีบทบาทสำคัญในการแก้ปัญหาดังกล่าวซึ่งมีข้อได้เปรียบทั้งด้านพลังงาน ความจำเพาะต่อบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา ความซับซ้อนของกระบวนการผลิตที่น้อยกว่า รวมถึงการยอมรับของผู้บริโภค (Kennedy และคณะ, 2006)

2.9 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล หมายถึง เชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ โดยผ่านกระบวนการทางเคมีเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างไขมันให้เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล และสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลโดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเครื่องยนต์ (Branwal และ Sharma, 2005) ไบโอดีเซล จึงเป็นคำรวมที่ใช้เรียกลักษณะเอสเทอร์ ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงทดแทนจากพืช ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงล้วนๆ หรือใช้ผสมกับน้ำมันดีเซล เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลก็ได้ (Pinto และคณะ, 2005)

ปัญหาวิกฤตการณ์ราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อภาวะเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ ความต้องการใช้น้ำมันดีเซลมีสูง เนื่องจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีความสำคัญต่อการคมนาคมขนส่ง ดังนั้นการใช้พลังงานทดแทนเช่น ไบโอดีเซล จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเป็นพลังงานทดแทนทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลในปัจจุบัน เนื่องจากการใช้ไบโอดีเซลทดแทนน้ำมันดีเซลมีประโยชน์หลายด้านทั้งด้านสิ่งแวดล้อม ช่วยลดมลพิษทางอากาศ ซึ่งเป็นผลจากการเผาไหม้เครื่องยนต์ เนื่องจากองค์ประกอบของไบโอดีเซลไม่มีธาตุกำมะถัน แต่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จึงช่วยเรื่องการเผาไหม้ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ด้านสมรรถนะเครื่องยนต์ ช่วยเพิ่มดัชนีการหล่อลื่นให้กับน้ำมันดีเซล ในกรณีใช้ผสม ในด้านเศรษฐศาสตร์ ช่วยเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตทางการเกษตรที่เหลือจากการบริโภค ลดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศ เพราะไบโอดีเซลจัดเป็นพลังงานชนิดหมุนเวียนจากพืชที่สามารถปลูกทดแทนขึ้นได้ในประเทศ และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศได้บางส่วน (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน นับเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด เนื่องจากจะช่วยลดความหนืดของน้ำมันพืชได้ และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพดีเมื่อทดลองใช้ในเครื่องยนต์ การใช้ไลเปสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมีข้อดีกว่าการใช้กรดและด่างหลายประการ กล่าวคือ ปัญหาจากการใช้กรดหรือด่างทำให้มีการแยกกลีเซอรอล และทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ยากขึ้น เนื่องจากมีตัวเร่งเคมีเหล่านั้นปะปนอยู่ การใช้กรดเร่งปฏิกิริยามีข้อเสียที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยายาวนาน และใช้อุณหภูมิสูง การใช้ด่างเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาอาจทำให้มีสบู่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา saponification ที่อาจเกิดขึ้นร่วมด้วย ทำให้ได้ผลผลิตเอสเทอร์เกิดได้น้อยกว่าที่ควรเนื่องจากมีปฏิกิริยาข้างเคียงรบกวน และการแยกเอสเทอร์กับกลีเซอรอลออกจากกันเป็นไปได้ยากอีกด้วย (Köse และคณะ, 2002) จากผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาทำให้ต้องใช้น้ำมันพืชชนิดบริสุทธิ์ซึ่งมีกรดไขมันอิสระในปริมาณต่ำๆ ในการเป็นสารตั้ง

ต้น ซึ่งมีผลในการเพิ่มต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลให้สูงขึ้นตามไปด้วย การใช้เอนไซม์ไลเพสสามารถแก้ปัญหาของการใช้กรดและด่างเป็นตัวเร่งได้ โดยไลเพสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพซึ่งมีความจำเพาะมากกว่า ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะสูง แยกกลีเซอรอลออกได้ง่าย บริสุทธิ์กว่าการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่ง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้มีกรดไขมันอิสระสูง เร่งปฏิกิริยาได้ทั้งในระบบที่มีน้ำและไม่มีน้ำ ข้อดีของการใช้ไลเพสเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมีที่เป็นต่างแสดงสรุปได้ดังตารางที่ 2.3 (Fukuda และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นด่าง และไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล

	กระบวนการที่ใช้ด่างเร่ง	กระบวนการที่ใช้ไลเพสเร่ง
อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
กรดไขมันอิสระที่อยู่ในวัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์สบู่	เมทิลเอสเทอร์
น้ำที่อยู่ในวัตถุดิบ	รบกวนปฏิกิริยา	ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา
ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	สูงกว่า
การเก็บกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	ไม่มี
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ถูก	ค่อนข้างแพง

2.10 น้ำมันปาล์ม

โดยทั่วไป แหล่งน้ำมันพืชของประเทศไทยมาจากพืชน้ำมันหลักที่ทำการเพาะปลูกอยู่ในประเทศทั้งหมด 7 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ทานตะวัน ละหุ่ง และงา ในจำนวนพืช 7 ชนิดนี้ ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีรายงานปริมาณผลิตผลในแต่ละปีสูงที่สุด โดยในปี 2549 ประเทศไทยมีการผลิตปาล์มน้ำมันกว่า 6 ล้านตัน รองลงมาได้แก่ มะพร้าว ซึ่งมีการผลิตประมาณ 1.5 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) จากการผลิตปาล์มน้ำมันได้ในปริมาณมากในประเทศ การมีต้นทุนการผลิตและราคาต่ำกว่าน้ำมันชนิดอื่นทำให้น้ำมันปาล์มมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง ต่อการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทย

2.11 การใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

งานวิจัยจำนวนมากทำการศึกษาการใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการผลิต ศึกษาการใช้สารตั้งต้นชนิดต่างๆ

ที่ภาวะต่างๆ กัน พบว่าการใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน สามารถให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เป็นน้ำมันพืชที่ผ่านกระบวนการกำจัดยางออก (degum) เนื่องจากฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ที่ปนอยู่ในยางสามารถยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ (Nielson และคณะ, 2008; Watanabe และคณะ, 2002) โดยรูปแบบการใช้ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยามีดังนี้

2.11.1 ไลเปสอิสระ (free lipase)

ไลเปสอิสระชนิดผงที่ผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น (freeze dry) สามารถนำมาใช้การผลิตไบโอดีเซลได้ การใช้ไลเปสในรูปแบบนี้ต้องมีความระมัดระวังสูง เนื่องจากฝุ่นผงของเอนไซม์สามารถทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ได้เมื่อสูดดม โดยข้อดีของการใช้ไลเปสในรูปแบบนี้คือ เหมาะกับกระบวนการผลิตที่ไม่ต้องการให้มีของแข็งเจือปน และมีต้นทุนการผลิตที่ถูกลงกว่าไลเปสตรังรูป แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันราคาของไลเปสอิสระยังสูงกว่าราคาของสารเคมีที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลอยู่ ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนและแข่งขันกับการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การนำไลเปสกลับมาใช้ซ้ำจึงมีความจำเป็น

2.11.2 ไลเปสตรังรูป (immobilized lipase)

การใช้ไลเปสตรังรูปในระดับอุตสาหกรรมมีการพัฒนาขึ้นมากจากเทคโนโลยีใหม่ๆ ในปัจจุบัน และได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อเปลี่ยนคุณสมบัติการละลายของไตรกลีเซอไรด์ ใช้ในกระบวนการผลิตเนยเทียม (margarine) (Osório และคณะ, 2006) ข้อดีของการใช้ไลเปสตรังรูปคือ มีขั้นตอนการแยกไลเปสเพื่อนำกลับมาใช้ซ้ำที่ง่าย โดยในกระบวนการผลิตแบบกะ (batch production) การแยกไลเปสสามารถใช้การกรองแยก (filtration) แบบง่ายได้ และไลเปสตรังรูปยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบเบดบรรจุได้ง่ายเช่นเดียวกัน โดยการตรึงรูปไลเปสยังสามารถช่วยเพิ่มเสถียรและระยะเวลาของการใช้งานไลเปสได้ ทำให้ไลเปสสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการที่ต้องการให้น้ำปริมาณน้อยได้ โนวัวไซม์ 435 เป็นไลเปส ที่ถูกตรึงรูปบนวัสดุประเภทอะครีลิกเรซิน ซึ่งมีรูพรุนขนาดใหญ่ (macroporous acrylic resin) ไลเปสจากจุลินทรีย์ *C. antarctica* มีบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) คล้ายรูปกรวยที่มีฝาปิดเล็กๆ เป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่ง และชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เข้าทำปฏิกิริยา (Pleiss และคณะ, 1998) โนวัวไซม์ 435 เป็นไลเปสที่ใช้ในการสังเคราะห์เอสเทอร์และไขมันสายสั้นๆ นอกจากนี้ โนวัวไซม์ 435 ยังจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอสเตอเรส (esterase) ที่ผลิตเอสเทอร์เฉพาะ ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ที่กระบวนการ

ผลิตใช้อุณหภูมิต่ำและโนโวไซม์ 435 สามารถใช้ซ้ำในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันจากปฏิกิริยาที่มีกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระรวมได้ โดยเมื่อใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาในระดับต่ำประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส ผลพลอยได้จากปฏิกิริยาจะเกิดในระดับต่ำ ทำให้การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์เป็นไปได้ง่ายขึ้นและลดราคาต้นทุน (Novozymes, 2008; Villeneuve และคณะ, 2000)

2.12 วิธีการพื้นที่ผิวผลตอบ (Response Surface Methodology, RSM) (ปารเมศ, 2545)

วิธีการพื้นที่ผิวผลตอบเป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหาโดยที่ผลตอบของเราสนใจขึ้นอยู่กับหลายตัวแปร และเรามีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบนี้ ตัวอย่างเช่น นักวิทยาศาสตร์ต้องการหาระดับของอุณหภูมิ (X_1) และความเป็นกรดต่าง (X_2) ที่จะส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งผลของการผลิตเอนไซม์นี้เป็นฟังก์ชันของระดับของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่าง กล่าวคือ

$$Y = f(X_1, X_2) + \epsilon$$

โดยที่ ϵ คือค่าความผิดพลาดของผลตอบ y ที่เป็นผลมาจากการทดลอง ถ้าเรากำหนดว่า $E(y) = f(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้น เราสามารถเขียนสมการพื้นที่ผิวได้คือ

$$\eta = f(X_1, X_2)$$

ซึ่งเราจะเรียกว่า “พื้นที่ผิวตอบ (Response Surface)”

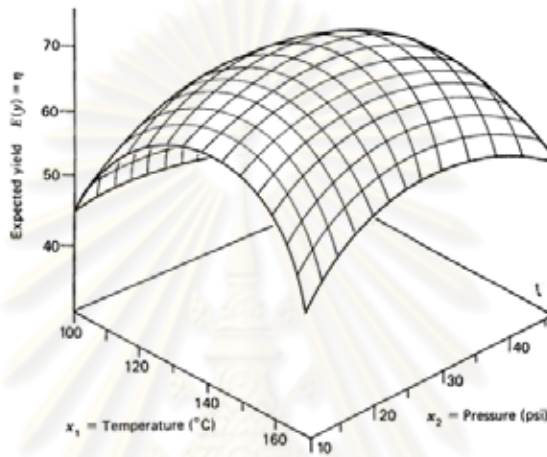
โดยมากแล้วเราจะแสดงพื้นที่ผิวตอบในรูปแบบของกราฟฟิก ตัวอย่างในภาพที่ 2.1 โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้เรามองรูปร่างของพื้นที่ผิวตอบได้ดียิ่งขึ้น โดยมากแล้วเราจะพล็อตเส้นโครงร่าง (Contour Plot) ของพื้นที่ผิวตอบดังแสดงในภาพที่ 2.2 ในสมการสร้างเส้นโครงร่างเช่นนี้ เส้นที่มีค่าของผลตอบคงที่จะถูกวาดอยู่บนระนาบ X_1 และ X_2 เส้นโครงร่างแต่ละเส้นจะมีความสูงของพื้นที่ผิวตอบที่เท่ากันค่าหนึ่ง

ในปัญหาเกี่ยวกับพื้นที่ผิวตอบส่วนมาก เราจะไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบและตัวแปรอิสระ ดังนั้น ขั้นตอนแรกก็คือ เราจะต้องหาตัวประมาณที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง y และเซตของตัวแปรอิสระ ซึ่งตามปกติแล้วเราจะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังต่ำๆ ที่อยู่ภายใต้อาณาเขตบางส่วนของตัวแปรอิสระ ถ้าแบบจำลองของผลตอบมีความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้นกับตัวแปรอิสระ ฟังก์ชันที่จะใช้ในการประมาณความสัมพันธ์นี้ก็คือแบบจำลองกำลังหนึ่ง

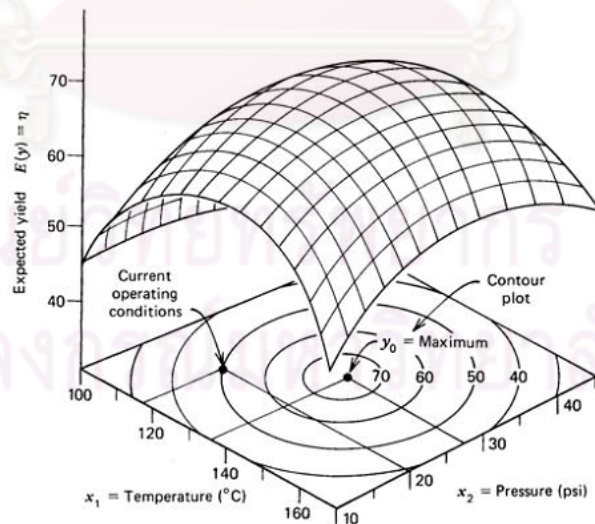
$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \epsilon$$

แต่ถ้ามีส่วนโค้งเข้ามาเกี่ยวข้องกับระบบ เราจะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังสูงขึ้น เช่น พหุนามกำลังสอง

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{\substack{j=1 \\ j < i}}^k \beta_{ji} X_i X_j + \varepsilon$$



ภาพที่ 2.1 รูปสามมิติของผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว



ภาพที่ 2.2 เส้นโครงร่างของผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zheng และคณะ (2008) ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณโรงงานสกัดน้ำมัน เพื่อนำมาคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้อาหารที่ผสมไตรโบริวไทรีน 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วสังเกตูโซเนสที่เกิดขึ้น จากนั้นได้ทำการคัดเลือกโคโลนี ที่สามารถสร้างโซเนสได้กว้างที่สุดไปทำการจำแนก พบว่าเป็น *Rhodotorula mucilaginosa*

Kumar และ Gupta (2008) ทำการคัดแยกยีสต์จำนวน 15 ไอโซเลต จากกากของเสียของโรงงานผลิตน้ำมันปิโตรเลียมพบว่า *Trichosporon ashii* มีการสร้างโซเนสที่สูงสุดบนอาหารที่ผสมไตรโบริวไทรีน 1 เปอร์เซ็นต์

Yao และ Tain (2006) ใช้วิธีการและการออกแบบพื้นที่ผิวตอบในการหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัย 3 ชนิดได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง แป้งถั่วเหลืองและ K_2HPO_4 ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Candida sp.* 99-125 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมคือ น้ำมันถั่วเหลือง 4.187 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แป้งถั่วเหลือง 5.840 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร K_2HPO_4 0.284 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Rekha และคณะ (2006) ได้หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus carneus* โดยออกแบบการทดลองแบบวิธีพื้นที่ผิวตอบศึกษาปัจจัย 5 ปัจจัยได้แก่ น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำตาลกลูโคส เปปโตน อัตราการเขย่า และระยะเวลาการบ่ม พบว่าค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสคือ น้ำมันดอกทานตะวัน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร น้ำตาลกลูโคส 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปปโตน 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที ระยะเวลาการบ่ม 96 ชั่วโมง ซึ่งสามารถเพิ่มการผลิตไลเปสได้ถึง 1.8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะเดิม

Roberta และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกได้จากประเทศบราซิลจำนวนทั้งสิ้น 29 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ *Pseudozyma hubeiensis* สามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด เมื่อนำยีสต์ดังกล่าวมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 14 ลิตร พบว่าสามารถผลิตไลเปสได้มากกว่าการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ถึง 3.2 เท่า โดยไลเปสจากยีสต์มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่างที่ 7.0

Rajendran และ Thangavelu (2009) ทำการหาค่าที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากยีสต์ *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233 จากปัจจัยดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำมันเมล็ดถั่วลิสง เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และเฟอร์ริคคลอไรด์ โดยอาศัยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบ พบว่าค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส คือ กลูโคส 19.604 กรัมต่อลิตร น้ำมันเมล็ดถั่วลิสง

13.065 กรัมต่อลิตร เปปโติน 7.473 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.962 กรัมต่อลิตร และ เฟอร์ริคคลอไรด์ 0.0019 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากค่าที่เหมาะสมดังกล่าวสามารถเพิ่มการผลิตไลเพส จากเดิมได้ถึง 1.64 เท่า

Khaled และคณะ (1991) ได้ทำการสังเคราะห์ชูการ์แพคตีแอสิดเอสเทอร์ด้วยไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* โดยใช้น้ำตาลฟรักโทส และกรดโอเลอิกเป็นสารตั้งต้น ในระบบตัวทำละลาย 2-เมทิล-2-บิวทานอล (2-methyl-2-butanol) พบว่าได้ผลผลิตมากถึง 83 เปอร์เซ็นต์

Patil และคณะ (1991) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการสังเคราะห์ชูการ์แพคตีแอสิดเอสเทอร์ด้วยไลเพสจาก *C. antarctica* ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ ไพริดีน (pyridine) และ ไดเมทิลฟอมาไมด์ (dimethylformamide) โดยใช้น้ำตาลซูโครสและไตรคลอโรเอทิลบิวทาโนเอท (trichloroethyl butanoate) เป็นสารตั้งต้น พบว่าตัวทำละลายไดเมทิลฟอมาไมด์ สามารถให้ผลผลิตถึง 56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ไพริดีนสามารถผลิตผลผลิตได้เพียง 26 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

Oguntimein และคณะ (1993) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ชูการ์แพคตีแอสิดเอสเทอร์ด้วยไลเพสจาก *Mucor miehei* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและกรดสเตียริกเป็นสารตั้งต้น ในระบบตัวทำละลายอินทรีย์เฮปเทน (heptanes) พบว่าได้ผลผลิตเพียง 9.32 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากตัวทำละลายดังกล่าวละลายน้ำตาลกลูโคสได้น้อย

Nelson และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างไตรกลีเซอไรด์จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ไขสัตว์ น้ำมันเมล็ดเรพ น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะกอก กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ พบว่าไลเพสจาก *M. miehei* สามารถเร่งปฏิกิริยาที่ใช้แอลกอฮอล์ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และไอโซบิวทานอล ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด ขณะที่ไลเพสจาก *C. antarctica* สามารถเร่งปฏิกิริยาที่ใช้แอลกอฮอล์ ได้แก่ ไอโซโพรพานอล และ 2-บิวทานอล ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด โดยทั้งสองปฏิกิริยาให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

Shimada และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเพสจาก *C. antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันเมล็ดเรพกับเมทานอล โดยใช้วิธีการเติมเมทานอลแบบเป็นขั้น (stepwise addition) ในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลถึง 98.4 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาเสถียรภาพของไลเพสที่ใช้ พบว่าไลเพสจาก *C. antarctica* สามารถใช้ซ้ำในปฏิกิริยาได้มากกว่า 50 รอบ ในระยะเวลา 100 วัน และได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

Dossat, Combes และ Marty (1999) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์แบบเบดบรรจุ โดยใช้ Lipozyme RM IM (ไลเปสจาก *R. miehei*) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างน้ำมันเมล็ดทานตะวันที่มีโอเลอิกสูง กับบิวทานอล โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายในปฏิกิริยา พบว่ากลีเซอรอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมมีผลต่อการทำปฏิกิริยา โดยกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะถูกดูดซับไว้บนผิววัสดุที่ตรึงไลเปส ทำให้ไลเปสสูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงแก้ไขโดยการเพิ่มขั้นตอนการล้างตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยเทอร์เชียรีบิวทานอล ภายหลังการทำปฏิกิริยา เพื่อล้างกลีเซอรอลออกจากผิววัสดุที่ตรึงไลเปส ทำให้ไลเปสไม่สูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง

Wang และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ Novozym 435 (ไลเปสจาก *C. antarctica*) และ Lipozyme TL IM (ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosa*) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันระหว่างส่วนที่เหลือจากการกลั่นน้ำมันถั่วเหลืองให้บริสุทธิ์ (soybean deodorizer distillate) ซึ่งมีกรดไขมันอิสระปนอยู่มาก กับเมทานอล พบว่า การใช้เทอร์เชียรีบิวทานอลเป็นตัวทำละลายในระบบ สามารถช่วยยับยั้งการเสียประสิทธิภาพของไลเปสอันเนื่องมาจากเมทานอลและกลีเซอรอลได้ พบว่า ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ถึง 120 รอบ (60 วัน) โดยไม่ถูกยับยั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper)	(Whatman, Germany)
คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Model: Apollo Silica 5U, length 250 mm, i.d. 4.6 mm)	(Alltech Associates. Inc., U.S.A)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)	(Barnstead, U.S.A)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	(Vision Scientific Co.,Ltd)
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)	(Shimadzu, Japan)
เครื่องชั่งแบบละเอียด (digital balance)	(Satorius, Germany)
เครื่องทำแห้งแบบเย็น (lyophilizer)	(Heto Power Dry LL3000, Denmark)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	(Ta Chang Medical instrument, Taiwan)
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (centrifuge)	(Hettich Zentrifugen, Germany)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge)	(Heto, Denmark)
เครื่องผสมแบบหมุน (rotary mixer)	(Fine PCR, Korea)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	(Model 250, Denver Instrument)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Spectrophotometer)	(ANTHOS Zenyth 200, U.S.A)
ชุดกรองสารแบบสุญญากาศ (suction flask, Buchner funnel)	(GAST, U.S.A.)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	(Clean model, Lab service Ltd)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	(Mammert Germany)
แผ่นโครมาโทกราฟีชนิดอะลูมิเนียม ซิลิกา เจล 60 F ₂₅₄	(Merck, Germany)
หลอดรังสีอัลตราไวโอเล็ต (uv lamp)	(Sylvania, Japan)

สารเคมี

กรดฟอร์มิก (formic acid)	(Scharlau, Spain)
กรดปาล์มิติก (palmitic acid)	(Fluka, Switzerland)
กัมอาระบิก (gum arabic)	(Fluka, Switzerland)
กรดแอสติติก (acetic acid)	(Labscan, Thailand)
กรดโอเลอิก (oleic acid)	(Fluka, Switzerland)
คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Scharlau, Spain)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	(Scharlau, Spain)
เดกโตรส (dextrose)	(Fisher scientific, UK)
ไตรตอน เอกซ์-100 (triton X-100)	(Scharlau, Spain)
เทอร์เชียรีบิวทานอล (tert-butanol)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	(มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	(Fluka, Switzerland)
น้ำตาลไซโลส (xylose)	(Fluka, Switzerland)
น้ำตาลซูโครส (sucrose)	(Fluka, Switzerland)
น้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol)	(Fluka, Switzerland)
น้ำตาลฟรุคโทส (fructose)	(Fluka, Switzerland)
โนโวไซม์ 435 (Novozym 435)	(Novo Nordisk, Denmark)
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	(Merck, Germany)
เปปโตน (peptone)	(Scharlau, Spain)
พารา-ไนโตรฟินอล (<i>p</i> -nitrophenol, <i>p</i> NP)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตต (<i>p</i> -nitrophenyl palmitate, <i>p</i> NPP)	(Sigma, U.S.A.)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Merck, Germany)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	(Merck, Germany)
เมทานอล (methanol)	(Labscan, Thailand)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	(Merck, Germany)
โรดามีน บี (rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	(Carlo Erba, Milan, Italy)
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)
เอทิลแอสีเตต (ethyl acetate)	(Labscan, Thailand)
อีโคเซน (Eicosane)	(Aldrich, Germany)
เฮกเซน (hexane)	(Labscan, Thailand)
เฮปเทน (Heptane)	(Labscan, Thailand)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเปส

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างที่ปนเปื้อนน้ำมันตามบริเวณต่างๆ ของเกาะสี่ซังจำนวน 4 บริเวณได้แก่ ท่าบน ท่าล่าง ท่าเรือประมง และอู่ต่อเรือ จำนวนทั้งสิ้น 14 ตัวอย่างโดยเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่ใหม่และสะอาด แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.1.2 การแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่างๆ มาทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับดูดสารละลายเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ Streptomycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกและแยกโคโลนีของยีสต์ให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YMA ที่เตรียมใหม่เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.1.3 การคัดเลือกชั้นปฐมภูมิ

นำยีสต์ที่คัดเลือกมาทดสอบการผลิตไลเปส โดยทำมาเลี้ยงบนอาหาร YMA ที่ผสมโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเติบโตและคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร

3.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเปสจากยีสต์ที่คัดเลือก

3.2.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM (ภาคผนวก ก) เพื่อเป็นหัวเชื้อ (seed) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงอาหารเหลวสูตร Lipase production (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (Kamini และคณะ, 2000) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที นำสารละลายไลเปสมาวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตตเป็นสารตั้งต้น (ภาคผนวก ค) สำหรับการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthetic reaction) ได้นำสารละลายไลเปสมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งด้วยความเย็น (freeze dryer, lyophilizer) ก่อนที่จะนำไปทดสอบการเร่งปฏิกิริยา

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเปส

ทำการวัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรีโดยใช้สารตั้งต้นเป็นพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต วิธีการวัดดัดแปลงจากวิธีของ Maia และคณะ (2000) สารละลาย A ซึ่งประกอบด้วย 0.71 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต ละลายใน 2-โพรพานอล สารละลาย B ประกอบด้วย 0.4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไตรตอนเอ็กซ์-100 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร กัมอาร์บิก ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 1:9 เติมสารละลายไลเปสที่ต้องการวัด 40 ไมโครลิตร ลงในสารละลายผสม 180 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

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

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไลเปส

ทำการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของไลเปสในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร โดยมีสารตั้งต้นคือน้ำมันปาล์มและเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 โมล ผสมกับไลเปสที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยความเย็น 10 มิลลิกรัมโปรตีน น้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร แบ่งการเติมเมทานอลเป็นสามครั้งๆ ละ 1 โมล ทุก 8 ชั่วโมง (Shimada และคณะ, 2002) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างชั้นบนไปทำการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของไลเปส

ทำการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของไลเปสในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย กรดโอเลอิก (oleic acid) และ 1-โดเดคานอล (dodecanol) เป็นสารตั้งต้นในอัตราส่วน 1:1 โมล ผสมกับไลเปสที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยความเย็น 10 มิลลิกรัมโปรตีน น้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร และตัวทำละลายเฮกเซน 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดโอเลอิกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง โดยเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันคิดจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดโอเลอิกที่เวลา 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากวิธีการของ In และคณะ 2007)

3.2.5 การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนวัดด้วยวิธี micro Lowry's assay (Held และ Hurley, 2001) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายมาตรฐานโปรตีนได้แก่ โบวีนซีรัมอัลบูมิน ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร และ สารละลาย A และ B ซึ่งผสมกันในอัตราส่วน 50:1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย C 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มต่ออีก 30 นาที แล้วจึงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร รายละเอียดการเตรียมสาร และกราฟมาตรฐานและการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ ข ค ตามลำดับ

3.3 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์ผลิตไลเปสสูง

ทำการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ผลิตไลเปสโดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งได้ใช้การทดสอบด้วยวิธีการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดตรวจสอบ API 20C AUX

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส

3.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร Lipase production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 20 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำเชื้อ 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายไลเปสส่วนบนมาวัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากนั้นวัดค่าการเติบโตของเซลล์ โดยการดูส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงทิ้ง จากนั้นทำการล้างตะกอนเซลล์ด้วยไซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วดูส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 รอบ จากนั้นจึงเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ด้วยไซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวัดการเจริญของเซลล์ด้วยวิธีวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรีที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้น

3.4.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร Lipase production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 1 2 3 5 7 9 และ 11 โดยปรับเป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริก และ ปรับเป็นด่างด้วยไซเดียมไฮดรอกไซด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายไลเปสมาวัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและวัดการเติบโตของเซลล์ตามข้อ 3.4.1

3.4.3 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนียวนำต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร Lipase production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแทนที่น้ำมันปาล์มด้วยน้ำมันชนิดต่างๆ จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันงา น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายไลเปสมาวัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและวัดการเจริญของเซลล์ตามข้อ 3.4.1

3.4.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร Lipase production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำมันเมล็ดฝ้ายเป็นสารชักนำและแทนที่ยีสต์สกัดด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ทริปโตน น้ำแช่ข้าวโพด ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และกากถั่วเหลือง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายไลเปสมาวัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและวัดการเติบโตของเซลล์ตามข้อ 3.4.1

3.4.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร Lipase production ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ใช้น้ำมันเมล็ดฝ้ายเป็นสารชักนำและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเพิ่มแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ กากน้ำตาล ซูโครส กลูโคส และไซโลส ความเข้มข้น 1

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายไลเพสมาวัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและวัดการเติบโตของเซลล์ตามข้อ 3.4.1

3.4.6 การหาความเข้มข้นของสารชักนำ แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

ทำการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง(Response Surface Methodology) แบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) โดยใช้โปรแกรม Minitab 15 (Minitab, United States) ทำการเลือกปัจจัยมีผลต่อการผลิตไลเพสทั้ง 3 ชนิด ดังนี้ น้ำมันเมล็ดฝ้าย ยีสต์สกัด และน้ำตาลซูโครส เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไลเพส ซึ่งกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาดังตารางที่ 3.1 ทั้งนี้ได้กำหนดปัจจัยควบคุมดังนี้ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นของไดโพลเทสเซียมฟอสเฟต ปริมาตรของอาหาร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เวลา 4 วัน ทำให้ได้การทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง ประกอบด้วย จุดกึ่งกลาง(Center point) 6 จุด จุดขอบ (Axial point) จำนวน 6 จุด และ Factorial point จำนวน 8 จุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังนั้นจึงทำการทดลองทั้งหมดทั้งสิ้น 60 การทดลอง

ตารางที่ 3.1 ช่วงของค่าระดับปัจจัยทั้ง 3 ที่ทำการทดลอง

ปัจจัย	รหัส	ระดับ				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
น้ำมันเมล็ดฝ้าย (%w/v)	X_1	0.25	0.7	1.35	2.0	2.44
ยีสต์สกัด (%w/v)	X_2	0.32	0.5	0.75	1.0	1.17
น้ำตาลซูโครส (%w/v)	X_3	0.25	0.7	1.35	2.0	2.44

3.5 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

3.5.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

ทำการบ่มไลเพสกับพารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตทในบัฟเฟอร์ (buffer) ชนิดต่างๆ ดังนี้ ที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5-6 ใช้ 0.1 M Citrate acids-Sodium citrate buffer ค่าความเป็น

กรดต่างที่ 7-8 ใช้ 0.1 M Sodium Phosphate buffer และค่าความเป็นกรดต่างที่ 9-10 ใช้ 0.1 M Glycine/NaOH อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตรฐานของแต่ละชนิดของบัฟเฟอร์ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.5.2 การศึกษาความคงตัวของไลเพสที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

ทำการบ่มไลเพสในบัฟเฟอร์ที่มีช่วงความเป็นกรดต่างดังต่อไปนี้ 3-11 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไลเพสมาบ่มกับพารา-ไนโตรฟินิลปาล์มมิเตทในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตรฐานและนำข้อมูลหาค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.5.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

ทำการบ่มไลเพสกับพารา-ไนโตรฟินิลปาล์มมิเตทในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 25 37 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตรฐานและนำข้อมูลหาค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.5.4 การศึกษาความคงตัวของไลเพสที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการบ่มไลเพสที่อุณหภูมิต่างๆ ดังต่อไปนี้ 50 60 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำสารละลายไลเพสมาบ่มกับพารา-ไนโตรฟินิลปาล์มมิเตทในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 30 นาที แล้วเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นกับกราฟมาตรฐานและนำข้อมูลหาค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.6 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากไลเพสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก

3.6.1 การสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์

3.6.1.1 ศึกษาชนิดสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์

3.6.1.1.1 ออกแบบการทดลองเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกชนิดของน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ ไฮโลส กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส ซอร์บิทอล และกรดไขมัน 3 ชนิด ได้แก่ กรดปาล์มมิติก

กรดโอเลอิก กรดไขมันปาล์ม ในการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์ใช้การออกแบบเชิงแฟก-
ทอเรียล (factorial experiment) จำนวน 3 ชั้น ซึ่งจะมีจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 45 การทดลอง

3.6.1.1.2 ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร
ระหว่างน้ำตาลและกรดไขมันในอัตราส่วนโมล 1 ต่อ 1 ในตัวทำละลายเทอร์เชียรีบิวทานอล
5 มิลลิลิตร โดยใช้ไลเพสความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักของน้ำตาล นำมาบ่มที่
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (In
และคณะ, 2007)

3.6.1.1.3 เก็บตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เวลาเริ่มต้นและ 24 ชั่วโมง นำไป
ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร
ไปวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่เหลือหรือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.6.1.2 เปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิด-
เอสเทอร์ระหว่างไลเพสจาก SRY 14-3 และ Novozyme 435

3.6.1.2.1 ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร
ระหว่างน้ำตาลและกรดไขมันที่เหมาะสมจากข้อ 6.1.1.1 ในอัตราส่วนโมล 1 ต่อ 1 ในตัวทำละลาย
เทอร์เชียรีบิวทานอล 5 มิลลิลิตร โดยใช้ไลเพสจาก SRY14-3 และ Novozyme 435 ความเข้มข้น
15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักของน้ำตาล นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บั่นกวน
ด้วยความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.1.2.2 เก็บตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่เวลาเริ่มต้นและ 24 ชั่วโมง นำไป
ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร
ไปวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่เหลือหรือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี
ของเหลวแบบสมรรถนะสูง

3.6.1.3 คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงผลของปฏิกิริยา (% convesion)
แสดงในสมการ (In และคณะ, 2007)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงผลของปฏิกิริยา} = \frac{\text{ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระชั่วโมงที่เริ่มต้น} - \text{ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระชั่วโมงที่ 24}}{\text{ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระชั่วโมงที่เริ่มต้น}} \times 100$$

3.6.2 การผลิตเมทิลเอสเทอร์

3.6.2.1 ศึกษาค่าปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชันในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีพินที่ผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางเพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยเลือกปัจจัยมีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ทั้งสิ้น 4 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล ปริมาณน้ำในระบบ และปริมาณซิลิกาเจล (สารดูดซับน้ำ) ทั้งนี้ได้กำหนดปัจจัยควบคุมดังนี้ การเติมเมทานอลเป็นสามครั้งทุก 8 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวน 600 รอบต่อนาที เวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาดังตารางที่ 3.2 ทำให้ได้การทดลองทั้งหมด 31 การทดลอง ประกอบด้วย จุดกึ่งกลาง (Center point) 7 จุด จุดขอบ (Axial point) จำนวน 8 จุด และ Factorial point จำนวน 16 จุด และทำการทดลองซ้ำ 2 ซ้ำ ดังนั้นจึงทำการทดลองทั้งหมดทั้งสิ้น 62 การทดลอง แล้วทำการตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ตารางที่ 3.2 ช่วงของค่าระดับปัจจัยทั้ง 4 ที่ทำการทดลอง

ปัจจัย	รหัส	ระดับ				
		- α	-1	0	+1	+ α
1. ปริมาณเอนไซม์ (Unit)	X_1	35	50	65	80	95
2. อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล	X_2	1:1.5	1:3	1:4.5	1:6	1:7.5
3. ปริมาณน้ำ (%v/v _{oil})	X_3	22.2	29.6	37.0	44.5	51.9
4. ปริมาณซิลิกาเจล (%w/w _{oil})	X_4	3.3	6.6	10.0	13.3	16.6

3.6.2.2 การศึกษาแนวทางการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากสภาวะที่เหมาะสม

3.6.2.2.1 การศึกษารูปแบบการเติมเมทานอล

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชันในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2.1 โดยแบ่งรูปแบบการเติมเมทานอลออกเป็น 5 รูปแบบ ดังนี้ เติมเมทานอลครั้งเดียวในตอนเริ่มต้นปฏิกิริยาและ แบ่งการเติมเมทานอลเป็น 3, 4, 5, และ 6 ครั้ง โดยแต่ละครั้งมีจำนวนโมลและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่เท่ากัน เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการเก็บตัวอย่างนำไปปั่น

เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.6.2.2.2 ผลของการกำจัดกลีเซอรอลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2.1 ทำการเก็บสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง มาทำการกำจัดกลีเซอรอลออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 รอบ แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนบนที่ได้มาทำปฏิกิริยาซ้ำในสภาวะเดิมอีกครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากปฏิกิริยาผ่านไป 12 ชั่วโมง ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.6.2.2.3 ผลขององค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.2.1 โดยใช้น้ำมันชนิดต่างๆ ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกันดังนี้ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดสบู่ดำ น้ำมันคาโนลา น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง ทำการกำจัดกลีเซอรอลออกในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นนำสารละลายส่วนบนที่ได้มาทำปฏิกิริยาซ้ำในสภาวะเดิมอีกครั้งจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปตรวจสอบปริมาณการเกิดเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.7 การตรวจสอบการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography:HPLC)

3.7.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยละลายในเฮกเซน เพื่อให้เจือจาง และไอโคเซน (eicosane) เป็น internal standard จากนั้นฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.7.2 การเตรียมเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-20A series, Japan)

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับ mobile phase คือ สารเอ ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอสทิล อะซิเตต : กรดฟอร์มิก (85 : 10 : 10 : 0.1 v/v) สารบี ประกอบด้วย เฮกเซน : กรดฟอร์มิก (100 : 0.2 v/v), อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร ต่อ นาที โดยใช้ Apollo Silica Column 5U 250×4.6 mm 5um เครื่องตรวจสอบ (detector) สำหรับ HPLC คือ ELSD นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ (%conversion) โดยใช้สมการการคำนวณดังต่อไปนี้ (Chulalaksananukul และคณะ, 2002)

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

เมื่อ	%Conversion	คือ	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์
	[FAME]	คือ	ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน (มิลลิโมลาร์)
	[TAG]	คือ	ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ (มิลลิโมลาร์)
	[1, 3 DAG]	คือ	ความเข้มข้นของ 1, 3 ไดกลีเซอไรด์ (มิลลิโมลาร์)
	[1, 2 DAG]	คือ	ความเข้มข้นของ 1, 2 ไดกลีเซอไรด์ (มิลลิโมลาร์)
	[MAG]	คือ	ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์ (มิลลิโมลาร์)
	[FFA]	คือ	ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ (มิลลิโมลาร์)

3.8 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

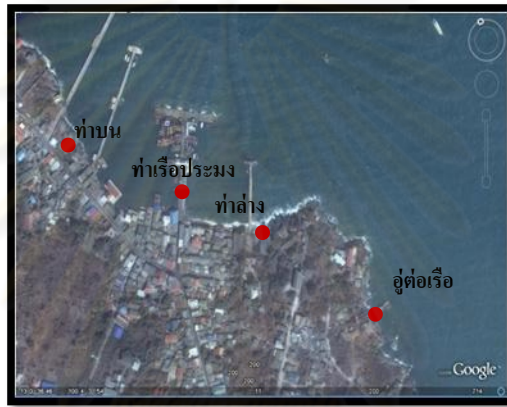
การทดสอบค่าทางสถิติในงานวิจัยนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab statistical software version 15 (Minitab, United States) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในการตัดสินใจที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

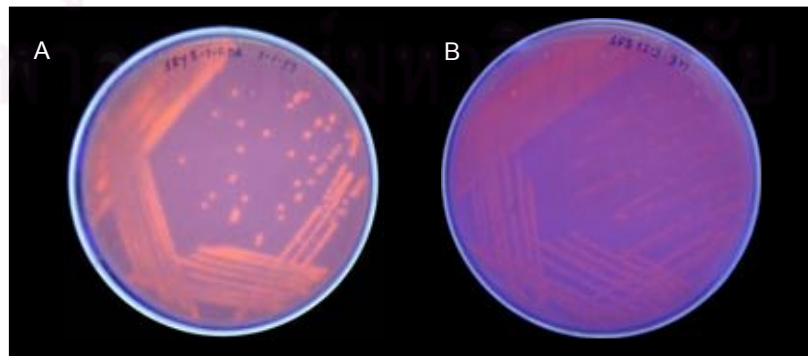
4.1 การคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเปส

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณต่างๆ บนเกาะสีชังจำนวน (ภาพที่ 4.1) ทั้งหมด 14 ตัวอย่าง โดยวิธีทำเป็นสารละลายเจือจางลดความเข้มข้นลงตามลำดับบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YMA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งสิ้น 49 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างบนเกาะสีชัง

จากการนำยีสต์ที่คัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ผสมเติมโรดามิน บี โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบ ซึ่งหากยีสต์ที่คัดเลือกสามารถผลิตไลเปสได้โคโลนีของยีสต์จะเรืองแสงสีแดง ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.2) จากผลการทดลองพบว่ามียีสต์เพียง 17 ไอโซเลต (ภาพที่) ที่สามารถผลิตไลเปสได้ แสดงดังตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.2 ภาพ A แสดงการผลิตไลเปสของยีสต์จึงเกิดการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต
ภาพ B แสดงยีสต์ที่ไม่สามารถผลิตไลเปสจึงการไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 4.1 ยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ

บริเวณ	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่คัดเลือก	รหัสของยีสต์ที่คัดเลือก	ลักษณะโคโลนี	โรดามีน บี
ท่าล่าง	น้ำทะเล	2	SRY1-1	สีขาว กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูน ผิวค่อนข้างมัน	-
			SRY1-2	สีขาว โคโลนีแบน ขอบคล้ายเส้นใย ผิวด้าน	-
ทรายหยาบ		4	SRY2-1	สีเนื้อ ขอบคล้ายเส้นใย ตรงกลางนูน ผิวมัน	+
			SRY2-2	สีขาว นูนมาก ขอบเรียบ ผิวด้าน	+
			SRY2-3	สีขาว กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูน ผิวมัน	-
			SRY2-4	สีขาว กลม นูนไม่มาก ผิวมัน	-
ทรายละเอียด		3	SRY3-1	สีเนื้อ แบนเรียบ ขอบคล้ายเส้นใย ผิวด้าน	+
			SRY3-2	สีขาว กลม นูนไม่มาก ผิวมัน	-
			SRY3-3	สีขาว โคโลนีเล็ก นูนมาก ขอบเรียบ ผิวมัน	+
ทรายบริเวณใต้ถุน		4	SRY4-1	สีส้มอ่อน ขอบเรียบ ผิวมันเยิ้ม	-
			SRY4-2	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน ขอบเรียบ ผิวมัน	-
			SRY4-3	สีขาว ขอบไม่เรียบ ตรงกลางนูน ผิวมันเงา	+
			SRY4-4	สีขาว ขอบเรียบนูน ตรงกลางนูน ผิวมัน	+
ท่าบน	ทราย	3	SRY5-1	สีขาว ขอบไม่เรียบและนูน ตรงกลางนูน ผิวด้าน	+
			SRY5-2	สีส้มอ่อน ขอบเรียบ ผิวมันเยิ้ม	-
			SRY5-3	สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวมัน	-
ทราย		2	SRY6-1	สีขาว โคโลนีใหญ่ ขอบเรียบ ผิวมันเยิ้ม	-
			SRY6-2	สีแดงอ่อน ขอบเรียบ ผิวเงา	+

ตารางที่ 4.1 ยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ (ต่อ)

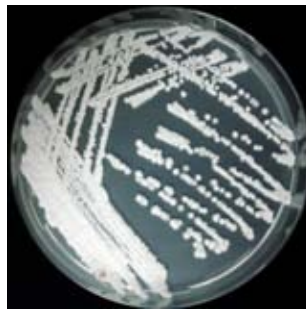
บริเวณ	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่คัดเลือก	รหัสของยีสต์ที่คัดเลือก	ลักษณะโคโลนี	โรตามิน บี
ท่าเรือประมง	ใบตอง	3	SRY7-1	สีขาว ขอบคล้ายเส้นใย ตรงกลางนูน ผิวค่อนข้างเงา	+
			SRY7-2	สีขาว โคโลนีเล็ก ตรงกลางขุ่น ขอบเรียบ ผิวมัน	-
			SRY7-3	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน ขอบเรียบ ผิวมัน	-
น้ำทะเล		2	SRY8-1	สีขาว โคโลนีเล็ก ขอบเรียบ ผิวมัน	-
			SRY8-2	สีขาว โคโลนีเล็ก ขอบเรียบ ผิวมัน	-
ยาง		3	SRY9-1	สีขาว โคโลนีแบน ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน	-
			SRY9-2	สีส้มอ่อน ขอบเรียบ ผิวมันเงา	-
			SRY9-3	สีขาว โคโลนีนูน ขอบเรียบ ผิวด้าน	-
คราบน้ำมัน		4	SRY10-1	สีขาว โคโลนีใหญ่ ขอบเรียบและนูน ผิวมัน	+
			SRY10-2	สีขาว โคโลนีเล็ก ขอบเรียบ ผิวมัน	-
			SRY10-3	สีขาว ขอบเรียบ ผิวมัน	-
			SRY10-4	สีขาว ขอบเรียบ ตรงกลางขุ่น ผิวมัน	-
อุ้ต้อเรือ	ดินใต้ท้องเรือ	7	SRY11-1	สีชมพูอ่อน ขอบคล้ายเส้นใย ตรงกลางนูน มัน	+
			SRY11-2	สีส้มอ่อน ขอบเรียบ ผิวมันเยิ้ม	-
			SRY11-3	สีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน	-
			SRY11-4	สีขาว ขอบเรียบ ตรงกลางนูน ผิวมันเงา	+
			SRY11-5	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน ขอบเรียบ ผิวมันเงา	-
			SRY11-6	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน ขอบเรียบ ผิวมันเงา	-
			SRY11-7	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน ขอบไม่เรียบ ผิวมันเงา	-

ตารางที่ 4.1 ยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ (ต่อ)

บริเวณ	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่คัดเลือก	รหัสของยีสต์ที่คัดเลือก	ลักษณะโคโลนี	โรดามิน บี
ดิน		6	SRY12-1	สีขาว โคโลนีแบนเรียบ ขอบคล้ายเส้นใย ผิวด้าน	+
			SRY12-2	สีขาว โคโลนีใหญ่ ขอบ เรียบและนูน ผิวผิวมัน	+
			SRY12-3	สีส้มอ่อน ขอบเรียบ ผิว มันเยิ้ม	-
			SRY12-4	สีแดงเข้ม ขอบเรียบ นูน ผิวมันเงา	-
			SRY12-5	สีขาว โคโลนีเล็ก ขอบ เรียบ ผิวมัน	-
			SRY12-6	สีขาว โคโลนีเล็ก ขอบ เรียบ ผิวมัน	-
ดินบนถังน้ำมัน		2	SRY13-1	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน มาก ขอบเรียบ ผิวมัน	+
			SRY13-2	สีขาว โคโลนีใหญ่ ขุนตรง กลาง ขอบเรียบ ผิวมัน	-
โฟมเป็นน้ำมัน		3	SRY14-1	สีขาว โคโลนีเล็ก ขอบ เรียบ ผิวมัน	-
			SRY14-2	สีขาว โคโลนีเล็ก นูน มาก ขอบเรียบ ผิวมัน	+
			SRY14-3	สีชมพู ขอบคล้ายเส้นใย ตรงกลางนูน ผิวค่อนข้าง มัน	+
รวม		49			17



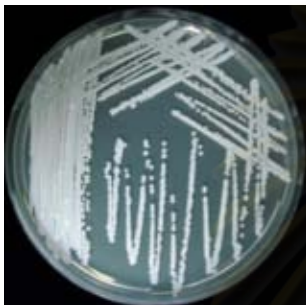
SRY2-1



SRY2-2



SRY3-1



SRY3-3



SRY4-3



SRY4-4



SRY5-1



SRY6-2



SRY7-1



SRY10-1



SRY11-1



SRY11-4

ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ผลิตไลเปสทั้ง 17 ไอโซเลต



ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ผลิตไลเปสทั้ง 17 ไอโซเลต (ต่อ)

เมื่อพิจารณาแหล่งตัวอย่างพบว่ายีสต์ที่ผลิตไลเปสสูง 2 อันดับแรก มาจากตัวอย่างบริเวณคู่อู่อเรือ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างจากบริเวณคู่อู่อเรือมีการปนเปื้อนของน้ำมันที่ไหลจากเครื่องยนต์สะสมอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งยีสต์ผลิตไลเปสสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ (Amund และ Adebisi, 1991; Okpokwasili และ James, 1995) ในขณะที่บริเวณท่าขน ท่าล่าง และท่าเรือประมง แม้ว่าจะเป็นที่อยู่อาศัยของชุมชน แต่ตัวอย่างที่เก็บอยู่บริเวณชายหาดซึ่งถูกระบายน้ำทะเลอย่างต่อเนื่อง จึงไม่เกิดการสะสมของน้ำมันมากเพียงพอที่จะชักนำให้ยีสต์ผลิตไลเปสสูงอาศัยอยู่ได้ ทำให้พบแต่ยีสต์ที่ผลิตไลเปสต่ำหรือไม่มีการผลิตไลเปสเลย ดังนั้นการกำหนดจุดเก็บตัวอย่างจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเปส ซึ่งการเลือกจุดเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมควรเป็นบริเวณที่มีการสะสมของน้ำมันอย่างสม่ำเสมอและเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามการคัดเลือกยีสต์จากสภาวะต่างๆ จะมีโอกาสในการคัดเลือกยีสต์ที่หลากหลายแตกต่างกัน คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสก็อาจจะมีความแตกต่างกันไป จึงมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป

การคัดเลือกยีสต์ผลิตไลเปสมีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่ยิมนำมาใช้คือ การใช้ไตรบิวไทรีน (tributyrin) เป็นสารตั้งต้น โดยสังเกตจากการสร้างวงใสรอบโคโลนีเพื่อวัดความสามารถในการ

ผลิตไลเปส แต่เนื่องจากไตรโบริวไทรินเป็นสารตั้งต้นจำพวกคาร์บอนสายสั้นซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบทรูไลเปส (true lipases) เพราะสารตั้งต้นจำพวกคาร์บอนสายสั้นก็สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เอสเทอร์เอส (esterase) ได้ด้วยเช่นกัน (Kouker และ Jaeger, 1987) กล่าวคือ เอสเทอร์เอสจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจำพวกที่มีสายคาร์บอนสายสั้น (คาร์บอนน้อยกว่า 10) เช่น ไตรโบริวไทริน ส่วนไลเปสจะเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจำพวกที่มีสายคาร์บอนสายยาว (คาร์บอนมากกว่าหรือเท่ากับ 10) เช่น ไตรโอบเลอิน (triolein) งานวิจัยนี้จึงเลือกน้ำมันปาล์มมาเป็นสารตั้งต้นเนื่องจากน้ำมันปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันที่มีสายยาวทั้งชนิดอิ่มตัว และไม่อิ่มตัวในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน จึงเหมาะที่จะนำมาเป็นสารตั้งต้นในการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสในชั้นปฐมภูมิได้ดี นอกจากการเลือกใช้สารตั้งต้นที่เหมาะสมกับการเข้าทำปฏิกิริยาของไลเปสแล้ว การใช้สารที่เป็นสีเข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการพิจารณาถึงความสามารถการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสได้ดียิ่งขึ้น สีที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้คือ โรดามีน บี ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีคุณสมบัติสามารถเรืองแสงได้ (fluorescence dye) ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร สีโรดามีน บีเมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง พบว่าไม่ได้เป็นสาเหตุในการยับยั้งการเจริญของเชื้อและมีความเสถียรเมื่อมีสภาวะความเป็นกรดต่างเปลี่ยนแปลง

4.2 การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเปสจากยีสต์ที่คัดเลือก

เนื่องจากไลเปสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลาย ได้แก่ ปฏิกิริยาย่อยสลาย (ไฮโดรไลซิส) และปฏิกิริยาสังเคราะห์ (เอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน) ซึ่งทั้งสองปฏิกิริยาดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กัน กล่าวคือ ไลเปสบางชนิดมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสูงแต่มีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่ำ (Wu และคณะ, 1996) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทั้งสามปฏิกิริยาจากไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก

ผลการตรวจวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทั้งสามปฏิกิริยาจากไลเปสของยีสต์ผลิตไลเปสทั้ง 17 ไอโซเลต พบว่ายีสต์เพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทั้งสาม ได้แก่ ยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 และ SRY11-1 โดยยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทั้งสามสูงสุด คือมีค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 2.30 ± 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เฮอร์เซ็นการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 18.20 ± 1.95 และ 25.27 ± 1.31 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ยีสต์ไอโซเลต SRY11-1 มีค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 0.93 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

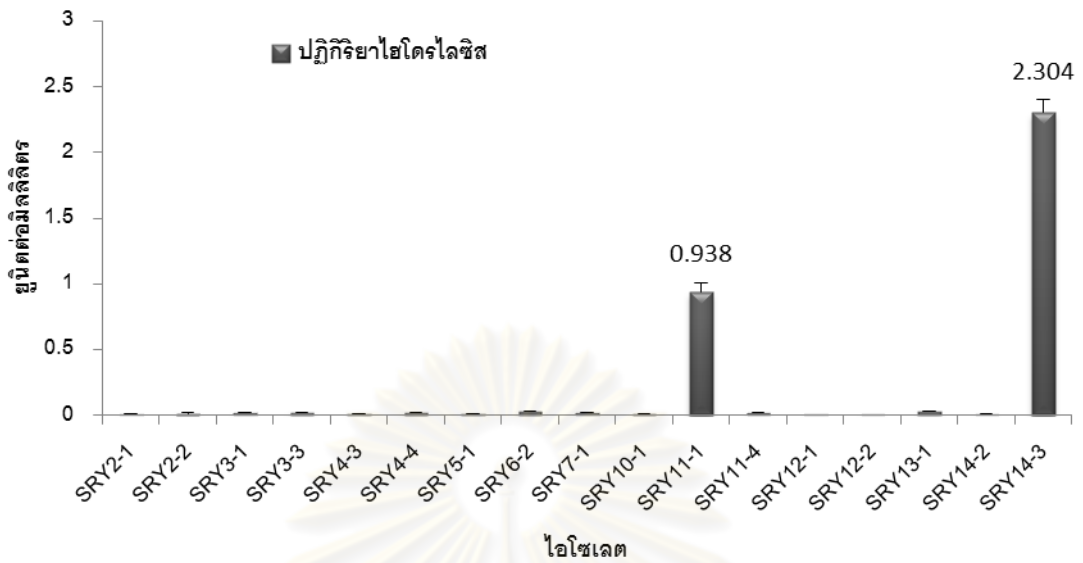
เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 15.14 ± 1.43 และ 17.84 ± 0.79 ตามลำดับ จากผลการเปรียบเทียบดังกล่าวจึงคัดเลือกยีสต์ ไอโซเลต SRY14-3 ไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.2 การเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ของไลเปสที่คัดเลือก

ลำดับที่	ไอโซเลต	ไฮโดรไลซิส (U/mL)	เอสเทอร์ฟิเคชัน (%conversion)	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (% conversion)
1	SRY2-1	0.0011±0.0065	0*	0
2	SRY2-2	0.0160±0.0011	0	0
3	SRY3-1	0.0200±0.0014	0	0
4	SRY3-3	0.0220±0.0027	0	0
5	SRY4-3	0.0133±0.0006	0	0
6	SRY4-4	0.0230±0.001	0	0
7	SRY5-1	0.0143±0.0005	0	0
8	SRY6-2	0.0290±0.002	0	0
9	SRY7-1	0.0190±0.002	0	0
10	SRY10-1	0.0129±0.0016	0	0
11	SRY11-1	0.9380±0.071	15.14±1.43	17.84±0.79
12	SRY11-4	0.0180±0.0012	0	0
13	SRY12-1	0.0005±0.00002	0	0
14	SRY12-2	0.0004±0.00006	0	0
15	SRY13-1	0.0326±0.004	0	0
16	SRY14-2	0.0076±0.0002	0	0
17	SRY14-3	2.3040±0.104	18.2±1.95	25.27±1.31

* ไม่สามารถวัดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.4 ค่าแอกทิวิตีของไอโอดีนจากยีสต์ 17 ไอโซเลต หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไโอดีน ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเป็นเวลา 4 วัน (ยูนิต: ไมโครโมลของพาราไนโตรฟินอลที่ปล่อยออกมาในปฏิริยาต่อนาที)

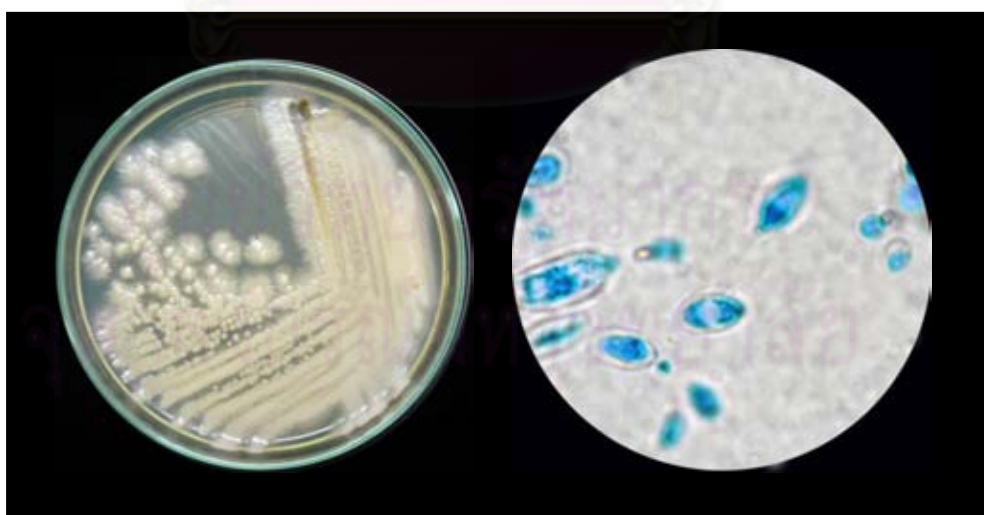


ภาพที่ 4.5 เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันของไอโอดีนจากยีสต์ 17 ไอโซเลต

4.3 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์ผลิตไลเพสสูง

จากการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ไอโซเลต SRY 14-3 โดยใช้วิธีการดูลักษณะรูปร่างทางกล้องจุลทรรศน์ การทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ API 20C AUX พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกชนิดของยีสต์ SRY14-3 ได้ (ภาพที่ 4.6 และ ตารางที่ 4.3) แต่จากลักษณะเด่นของยีสต์ SRY14-3 คือเมื่อบ่มเชื้อเป็นระยะเวลาานานโคโลนีจะเป็นสีดำ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเด่นในกลุ่มแบคทีเรีย (Black yeast) ที่ลักษณะโคโลนีจะเป็นสีดำ เนื่องจากมีการสร้างเมลานินขึ้น โดยยีสต์กลุ่มนี้ประกอบด้วย สกุล *Moniliella* ของไฟลัม Basidiomycota และ ในสกุล *Aureobasidium*, *Hormonema*, *Hortaea*, *Cladosporium* และ *Exophiala* ของไฟลัม Ascomycota

เมื่อพิจารณาจากแหล่งตัวอย่างที่พบยีสต์ SRY14-3 ที่เป็นโคมเปื้อนคราบน้ำมัน พบว่าสภาพแวดล้อมดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั่วไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า โดย Shirakawa และคณะ (2002) รายงานว่า *Cladosporium* และ *Aureobasidium* สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีเกลือสูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ Iwatsu และ Udogawa (1988) ที่พบเชื้อ *Aureobasium pullulans* ในน้ำทะเล และพบ *Cladosporium sp.* จากตัวอย่างดินและซากไม้เก่าแก่ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อราในกลุ่มแบคทีเรีย น่าจะเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์ทั่วไป



ภาพที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีบนอาหารกึ่งแข็ง YMA และรูปร่างยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบด้วย API 20 C AUX ของยีสต์ไฮโซเลต SRY14-3

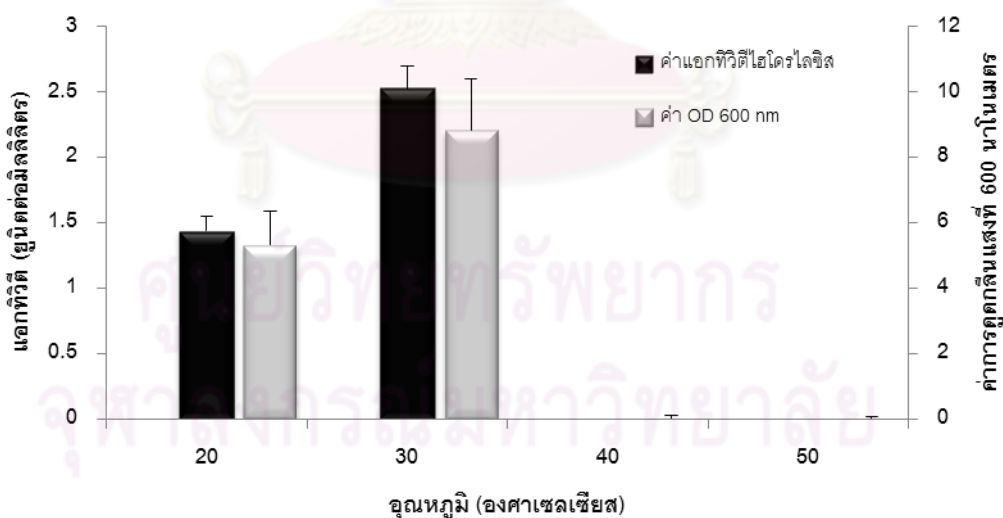
Active ingredient	result	Active ingredient	result
D-glucose	+	Methyl- α D-Glucopyranoside	-
Glycerol	-	N-Acetyl-Glucosamine	-
Calcium 2 Keto-Gluconate	-	D-cellobiose	-
L-Arabinose	+	D-Lactose	+
D-Xylose	+	D-Maltose	+
Adonitol	-	D-Saccharose	+
Xylose	+	D-Trehalose	+
D-Galactose	-	D-Melezitose	+
Inositol	-	D-Raffinose	+
D-sorbitol	-		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

4.4.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไลเพส

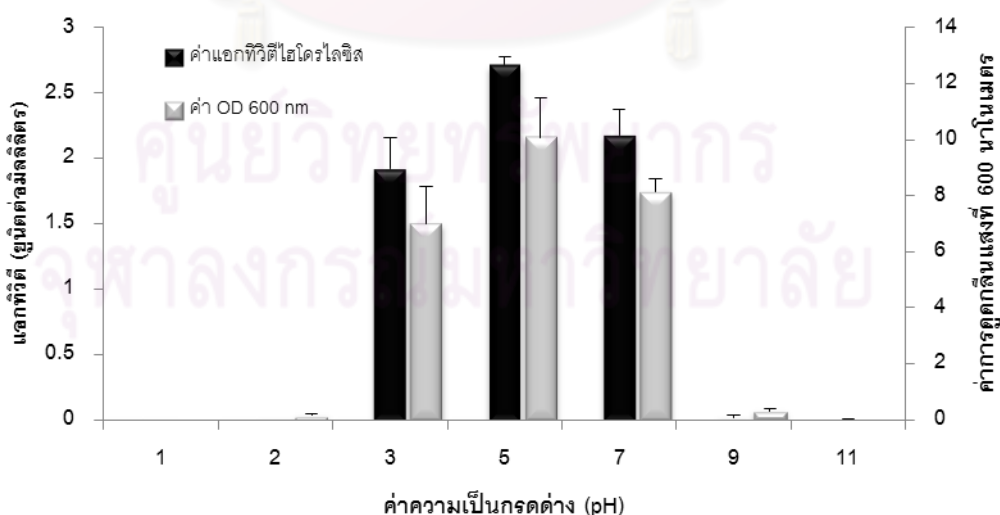
เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเติบโตและการผลิตไลเพสของยีสต์ SRY14-3 จึงทำการบ่มยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำมาวัดค่าแอกทีวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และค่า OD600 ของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าแอกทีวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.52 ± 0.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 สูงสุดที่ 8.83 ± 1.55 โดยค่าแอกทีวิตีและค่า OD600 ร่องลงมาพบที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่า 1.44 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 5.33 ± 1.03 ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่สามารถตรวจพบค่าแอกทีวิตีและค่า OD600 ของยีสต์ (ภาพที่ 4.7) โดย Song และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของยีสต์ *C. rugosa* พบว่ามีอุณหภูมิเหมาะสมที่ 30 องศาเซลเซียส Walter และคณะ (2005) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจาก *Metarhizium anisopliae* พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 32 องศาเซลเซียส Kumar และ Gupta (2008) ได้รายงานว่ายีสต์ผลิตไลเพสส่วนใหญ่มีช่วงการเติบโตและการผลิตไลเพสที่เหมาะสมที่ระหว่างอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.7 ค่าแอกทีวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ที่อุณหภูมิต่างๆ

4.4.2 การศึกษามูลของค่าความเป็นกรดต่างต่อการผลิตไลเพส

ค่าความเป็นกรดต่างเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเติบโตและการปลดปล่อยไลเพสของยีสต์ เพื่อศึกษาค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ทำการบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ กัน ดังนี้ 1, 2, 3, 5, 7, 9 และ 11 บ่มเป็นเวลา 4 วันแล้วนำมาวัดค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและค่าการเติบโตที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 มีค่าแอกทิวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.71 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 สูงสุดที่ 10.08 ± 1.41 โดยที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 และ 3.0 มีค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 รองลงมาตามลำดับ คือที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 2.37 ± 0.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 ที่ 8.14 ± 0.98 ส่วนที่ค่าความเป็นกรดต่าง 3.0 มีค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 1.92 ± 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 ที่ 7.02 ± 1.30 ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่าง 2.0 และ 9.0 พบค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 น้อยมาก ทั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 ที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 1.0 และ 11.0 ได้ (ภาพที่ 4.8) จากการศึกษาของ Song และคณะ (2001) พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *C. rugosa* คือ 6.5 Kamini และคณะ (2000) ได้ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Cryptococcus* sp พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.6 Pabai และคณะ (1996) รายงานว่ายีสต์ผลิตไลเพสส่วนใหญ่จะมีช่วงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสเท่ากับ 4-7



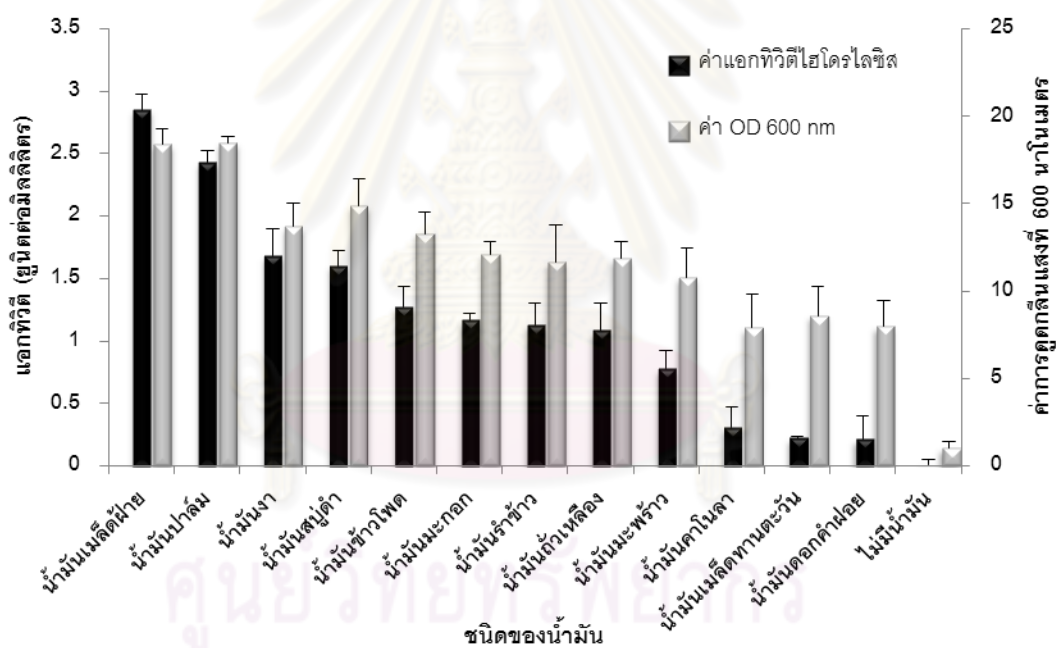
ภาพที่ 4.8 แสดงค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของยีสต์โอโซเลต SRY14-3 ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

4.4.3 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนียวนำต่อการผลิตไลเปส

การผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จำเป็นต้องอาศัยสารเหนียวนำ (inducer) เพื่อช่วยให้เกิดสังเคราะห์เอนไซม์ขึ้น โดยสารเหนียวนำที่นิยมใช้ในการผลิตไลเปสได้แก่ น้ำมันชนิดต่างๆ ซึ่งนอกจากจะมีคุณสมบัติเหนียวนำแล้วยังคงเป็นแหล่งคาร์บอนให้จุลินทรีย์อีกด้วย ทั้งนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีความจำเพาะต่อสารเหนียวนำที่แตกต่างกันไป และเพื่อที่จะศึกษาสารเหนียวนำที่เหมาะสมจึงทำการบ่มยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ กัน ทั้งสิ้น 12 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของน้ำมันตามค่าแอกทิวิตีของไลเปสได้ 3 กลุ่ม (ภาพที่ 4.9 และตารางที่ 4.4) คือ กลุ่มที่ 1 สามารถเหนียวนำให้มีค่าแอกทิวิตีมากกว่า 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 มากกว่า 18 ซึ่งประกอบด้วย น้ำมันเมล็ดฝ้าย (2.85 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 18.37 ± 0.94) และน้ำมันปาล์ม (2.43 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 18.47 ± 0.40) กลุ่มที่ 2 สามารถเหนียวนำให้มีค่าแอกทิวิตีระหว่าง 1-2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 อยู่ระหว่าง 11-15 ประกอบด้วย น้ำมันงา (1.68 ± 0.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 13.68 ± 1.32) น้ำมันสบู่ดำ (1.60 ± 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 14.87 ± 1.55) น้ำมันข้าวโพด (1.27 ± 0.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 13.29 ± 1.22) น้ำมันมะกอก (1.16 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 12.08 ± 0.74) น้ำมันรำข้าว (1.12 ± 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 11.65 ± 2.11) และน้ำมันถั่วเหลือง (1.08 ± 0.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 11.87 ± 0.99) กลุ่มที่ 3 สามารถเหนียวนำให้มีค่าแอกทิวิตีระหว่าง 0-1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 อยู่ระหว่าง 7-10 ประกอบด้วยประกอบด้วย น้ำมันมะพร้าว (0.77 ± 0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 10.79 ± 1.70) น้ำมันคาโนลา (0.30 ± 0.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 7.89 ± 1.93) น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (0.22 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 8.61 ± 1.66) และน้ำมันดอกคำฝอย (0.21 ± 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีค่า OD600 เท่ากับ 7.97 ± 1.51)

จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 ไปเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระในน้ำมันชนิดต่างๆ (Pakorn และคณะ, 2008) พบว่า ค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดปาล์มิติกในน้ำมันแต่ละชนิด คือ น้ำมันกลุ่มที่ 1 จะมีปริมาณของกรดปาล์มิติกมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่ 2 และ 3 มีปริมาณของกรดปาล์มิติกอยู่ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และ น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กรดปาล์มิติกมีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสและการเติบโตจากยีสต์ SRY14-3 กล่าวคือ น้ำมันที่มีปริมาณของกรดปาล์มิติกสูงจะเหนียวนำให้ยีสต์ผลิตไลเปสออกมามาก (ส่งผลให้มีค่าแอกทิวิตี

สูง) จึงสามารถย่อยโมเลกุลของน้ำมันให้อยู่ในรูปของแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มีปริมาณมาก ยีสต์จึงสามารถนำแหล่งคาร์บอนดังกล่าวไปใช้ในการเติบโตส่งผลให้มีความการเติบโตสูง ขณะที่น้ำมันที่มีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวจะเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตไลเปสน้อย (ส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีต่ำ) จึงทำให้แหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มีน้อย ส่งผลให้ยีสต์มีความการเติบโตน้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saoussen และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองหาอิทธิพลของน้ำมันต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Y. lipolytica* ซึ่งในการทดลองได้ใช้น้ำมันทั้งหมด 10 ชนิด พบว่าน้ำมันกลุ่มที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดโอเลอิก แอซิด สูงจะสามารถเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตไลเปสได้สูงขึ้นด้วย และได้เสนอสมมติฐานไว้ว่าบริเวณผนังเซลล์ของยีสต์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันแตกต่างกันไป Fickers และคณะ (2005) ได้สรุปว่ายีสต์ *Y. lipolytica* มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันได้มากกว่า 1 ชนิด



ภาพที่ 4.9 ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำมันแตกต่างกันต่างๆ

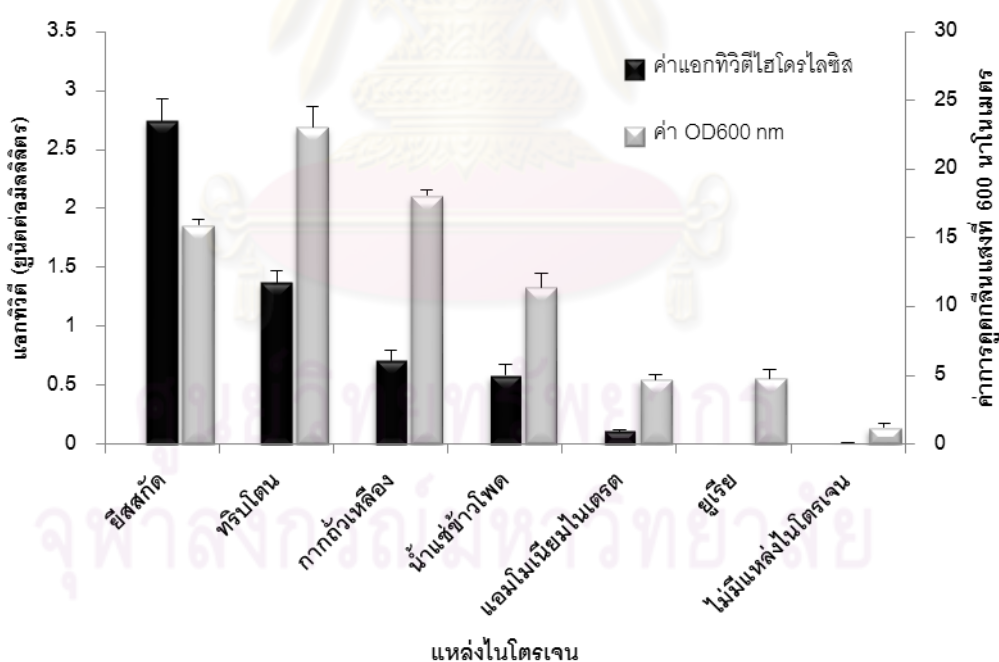
ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน 12 ชนิด

Oil / Free fatty acid (เปอร์เซ็นต์)	Lauric acid (12:0)	Myristic acid (14:0)	Palmitic acid (16:0)	Stearic acid (18:0)	Arachidic acid (20:0)	Behenic acid (22:0)	Palmitoleic acid (16:1)	Oleic acid (18:1)	Linoleic acid (18:2)	Linolenic acid (18:3)	Activity (U/mL)	OD 600 nm
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	0	0	24.4	2.2	0	0	0.4	17.2	55	0.3	2.85±0.12	18.37±0.94
น้ำมันปาล์ม	0.59	0.96	38.67	3.32	0.23	0.02	0.11	45.45	10.87	0.2	2.43±0.09	18.47±0.40
น้ำมันงา	0	0	9.28	4.77	0.47	0.14	0.03	35.49	49.54	0.31	1.68±0.21	13.68±1.32
น้ำมันสบู่ดำ	0	0.38	16	8	0	0	1	42	33	0.8	1.60±0.12	14.87±1.55
น้ำมันข้าวโพด	0	0.02	13.17	2.46	0.37	0.13	0.11	35.19	47.97	0.61	1.27±0.16	13.29±1.22
น้ำมันมะกอก	0.03	0.02	11.37	2.58	0.21	0.01	0.63	80.46	4.17	0.56	1.16±0.05	12.08±0.74
น้ำมันรำข้าว	0.01	0.41	20.01	1.7	0.57	0.18	0.09	41.7	34.26	1.1	1.12±0.17	11.65±2.11
น้ำมันถั่วเหลือง	0.01	0.04	10.7	3.02	0.11	0.19	0.02	24.02	56.58	5.35	1.08±0.21	11.87±0.99
น้ำมันมะพร้าว	64.44	20.45	7.71	1.73	0.04	0	0.09	4.61	0.96	0	0.77±0.14	10.79±1.70
น้ำมันคาโนลา	0.06	0.07	4.65	1.64	0.93	0.26	0.13	65.93	21.16	5.16	0.30±0.16	7.89±1.93
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	0	0.08	6.59	3.14	0.15	0.43	0.09	22.43	66.2	0.92	0.22±0.01	8.61±1.66
น้ำมันดอกคำฝอย	0.02	0.11	6.44	2.2	0.2	0.15	0.06	14.13	76.57	0.15	0.21±0.18	7.97±1.51

ศูนย์วิจัยชีววิทยาการ
จุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.4 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเปส

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์ ทั้งนี้จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันไป ดังนั้นในการผลิตไลเปสจำเป็นต้องเลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จึงทำการทดลองคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อยีสต์ที่คัดเลือก โดยเลือกแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด ทรีปโตน กากถั่วเหลือง และน้ำแช่ข้าวโพด ส่วนแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรีย จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มของแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์มีค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ คือ แหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์มีค่าแอกทิวิตีระหว่าง 0.5-3.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 ระหว่าง 11-23 ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนในรูปของ สารอนินทรีย์มีค่าแอกทิวิตีระหว่าง 0-0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่า OD600 ระหว่าง 4-5 เท่านั้น (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของยีสต์ไอโซเลต SR14-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันต่างๆ

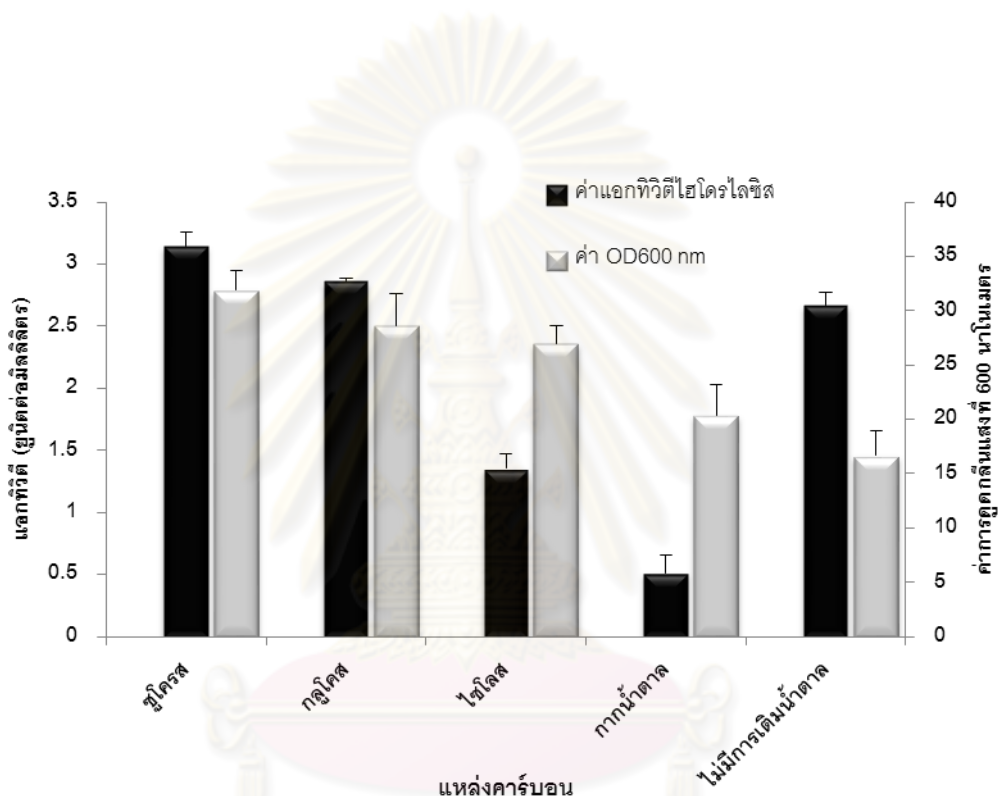
ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีค่าแอกทิวิตีสูงสุดคือ 2.75 ± 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ค่า OD600 15.95 ± 0.42) ในขณะที่ทริปโตเนมมีค่า OD600 สูงสุดคือ 23.06 ± 1.52 (แอกทิวิตี 1.37 ± 0.09) ส่วนกากถั่วเหลืองและน้ำแช่ข้าวโพดซึ่งเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรมีค่าแอกทิวิตี 0.71 ± 0.08 และ 0.58 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า OD600 เท่ากับ 18.08 ± 0.43 และ 11.43 ± 0.97 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาจะพบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีค่า OD600 สูงแต่กลับมีค่าแอกทิวิตีต่ำทั้งนี้เนื่องจากชนิดของกรดอะมิโนในแหล่งไนโตรเจนทั้งสองอาจไม่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตไลเปส เนื่องจากในกากถั่วเหลืองจะมีปริมาณของ ซีสทีน (Cystine) และ เมทไทโอนีน (Methionine) ในปริมาณที่ต่ำมาก แม้ว่ากรดอะมิโนทั้งสองชนิดจะไม่พบในบริเวณเร่งของไลเปส แต่อาจส่งผลต่อการสังเคราะห์โครงสร้างของไลเปสในส่วนอื่น ขณะที่น้ำแช่ข้าวโพดมีปริมาณของเซอริน (serine) ต่ำ (Cardinal และ Hedrick, 1948) ซึ่งเซอรินเป็นกรดอะมิโนที่พบในบริเวณเร่งของไลเปส (Kazlauskas, 1994) จึงมีผลต่อการผลิตไลเปสของยีสต์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณไนโตรเจนโดยมวลในแต่ละแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลอง มีปริมาณที่แตกต่างกันกล่าวคือ ปริมาณไนโตรเจนโดยมวลในยีสต์สกัดและทริปโตเนมจะมีปริมาณสูงกว่ากากถั่วเหลืองและน้ำแช่ข้าวโพด หากแต่ในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เท่ากัน โดยไม่ได้คำนึงถึงปริมาณของไนโตรเจนในแต่ละแหล่ง ดังนั้นการที่กากถั่วเหลืองและน้ำแช่ข้าวโพดมีค่าแอกทิวิตีต่ำกว่ายีสต์สกัดและทริปโตเนม อาจเกิดจากปริมาณของไนโตรเจนที่น้อยกว่าด้วย ฉะนั้นในการเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงควรคำนึงถึง ความหลากหลายของกรดอะมิโน ปริมาณของไนโตรเจนโดยมวล และราคาของแหล่งไนโตรเจน เป็นสำคัญ ขณะที่แอมโมเนียมไนเตรตและยูเรียซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์มีค่าแอกทิวิตี 0.11 ± 0.01 และ 0.002 ± 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า OD600 เท่ากับ 4.71 ± 0.31 และ 4.81 ± 0.60 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Venkateshwarlu และ Reddy (1993) ที่รายงานว่ายีสต์สกัดมีความเหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Emericella rugulosa* *Humicola* sp. *T. lanuginosus* และ *Chrysosporium* โดย Heravi และคณะ (2008) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสมากกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์มีองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายกว่า

4.4.5 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลเพส

แหล่งคาร์บอนเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมการเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นการเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญต่อการผลิตไลเพส โดยการทดลองได้คัดเลือกแหล่งคาร์บอน ดังนี้ ชูโครส (น้ำตาลโมเลกุลคู่) กลูโคส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมี 6 คาร์บอน) ไชโลส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมี 5 คาร์บอน) และกากน้ำตาล (วัตถุดิบแหล่งทิ้งทางการเกษตร) จากผลการทดลองพบว่า น้ำตาลชูโครสมีค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 สูงสุดเท่ากับ 3.14 ± 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 31.88 ± 1.75 ตามลำดับ โดยน้ำตาลกลูโคสมีค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 รองลงมาเท่ากับ 2.86 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 28.65 ± 2.96 ตามลำดับ ขณะที่ไชโลสมีค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 เท่ากับ 1.35 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 27.01 ± 1.60 ตามลำดับ ส่วนกากน้ำตาลมีค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 น้อยสุดเท่ากับ 0.51 ± 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 20.37 ± 2.31 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11) ซึ่งสอดคล้องกับ Sailas และ Ashok (1996) ที่รายงานว่าเชื้อยีสต์ *C. rugosa* สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ในการเติบโตและการผลิตไลเพสได้ดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโพลีแซคคาไรด์

เมื่อเปรียบเทียบค่า OD600 ของยีสต์พบว่าในอาหารที่มีการเสริมแหล่งคาร์บอนมีค่าสูงกว่าอาหารที่ไม่มีการเสริมแหล่งคาร์บอน (ชุดควบคุมไม่มีการเติมน้ำตาล) คืออาหารที่เสริมแหล่งคาร์บอนจะมีค่า OD600 ระหว่าง 20.37-31.88 ขณะที่อาหารที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอนมีค่า OD600 ที่ 16.65 ± 0.95 ซึ่งอาจจะเกิดจากอาหารที่มีการเสริมแหล่งคาร์บอน (น้ำตาล) เป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ง่ายและเร็วกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมัน (Tsuji-saka และคณะ, 1973) ยีสต์จึงเลือกที่จะใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลในช่วงแรกของการเติบโตส่งผลให้มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว เมื่อแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลหมดจึงใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำมันซึ่งยีสต์จำเป็นต้องผลิตไลเพสออกมาช่วย ส่งผลปริมาณไลเพสในอาหารสูงขึ้นจากจำนวนเซลล์ที่มากขึ้นในช่วงแรกของการเติบโตเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอน ในระยะเวลาการบ่มที่เท่ากัน ขณะที่อาหารที่เสริมไชโลสและกากน้ำตาลแม้ว่าจะให้ค่า OD600 ที่สูงกว่าอาหารที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอนแต่กลับมีค่าแอกทิวิตีต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเกิดจากยีสต์ SRY14-3 เลือกใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลไชโลสก่อนจึงส่งผลให้มีการผลิตไลเพสน้อย ส่วนกากน้ำตาลนั้นเนื่องจากเป็นวัตถุดิบทิ้งทางการเกษตรจึงอาจมีการปนเปื้อนของสารยับยั้งการเติบโตและการทำงานของไลเพส เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) ไฮดรอกซิลเมทิล เฟอฟูรอล

(hydroxymethyl furfural) และธาตุโลหะหนัก เช่น ทองแดง สังกะสี (John และคณะ, 1979) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bundit (1999) ที่พบว่าทองแดงไอออน (Cu^{2+}) มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปส นอกจากนี้กากน้ำตาลยังส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดมากขึ้นทำให้เชื้อสัมผัสกับโมเลกุลของน้ำมันได้ยากขึ้นส่งผลให้เนื้อมันให้ผลิตไลเปสน้อยลงด้วย (Potumarthi และคณะ, 2008)



ภาพที่ 4.11 ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ของยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันต่างๆ

ดังนั้นการเสริมแหล่งคาร์บอนที่มีชนิดและปริมาณที่เหมาะสมจึงมีส่วนเสริมให้ยีสต์มีการผลิตไลเปสเพิ่มขึ้นจากปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการเติบโตนั่นเอง อย่างไรก็ตาม ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตไลเปสของยีสต์ยังคงเป็นชนิดของคาร์บอนเหนื้อมัน (น้ำมัน) มากกว่าแหล่งคาร์บอนเสริม (น้ำตาล) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Dalmau และคณะ (2000) ที่รายงานว่าอิทธิพลของน้ำมันต่อการผลิตไลเปสจาก *C. rugosa* มีมากกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล

4.4.6 การหาความเข้มข้นของสารซักน้ำ แล่งไนโตรเจน และแล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

หลังจากการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไลเพสข้างต้นแล้ว ทำให้ทราบชนิดของแล่งคาร์บอนเหี่ยวน้ำ แล่งไนโตรเจน และแล่งคาร์บอนเสริม ซึ่งได้แก่ น้ำมันเมล็ดฝ้าย ยีสต์สกัด และน้ำตาลซูโครส แต่ปัจจัยสำคัญต่อมาหลังจากทราบชนิดของแต่ละปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเพสแล้วคือความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในอาหาร (Lotti และ Alberghina, 2000) เหตุนี้จึงได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันเมล็ดฝ้าย ยีสต์สกัด และน้ำตาลซูโครส โดยอาศัยหลักการพื้นที่ผิวตอบ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตไลเพสของยีสต์

การทดลองได้ทำการทดลองแบบสุ่มโดยใช้โปรแกรม Minitab ช่วยในการกำหนดลำดับการทดลอง ทำการเก็บค่าผลของตัวแปรตาม (แอกทิวิตีและค่า OD600) แสดงไว้ในตารางที่ 4.5 จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์เชิงสถิติ โดยใช้แบบจำลองการถดถอยของพื้นที่ผิวตอบสนอง (สมการที่ 1) เพื่อนำไปใช้ทำนายค่าของแอกทิวิตี ซึ่งจะได้ค่าประมาณของสัมประสิทธิ์ของแต่ละปัจจัยรวมถึงอันตรกิริยาระหว่างปัจจัยทั้งหมด จากนั้นจึงนำสมการที่ได้ไปใช้ในการทำนายค่าของแอกทิวิตีและค่า OD600 เพื่อค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

สมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

เมื่อ Y คือค่าแอกทิวิตี X_1 คือ ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้าย X_2 คือ ความเข้มข้นของยีสต์สกัด X_3 คือความเข้มข้นของซูโครส

จากวิเคราะห์ค่าตัวแปรตามแอกทิวิตี พบว่าสมการมีค่า $R^2 = 97.82$ เปอร์เซนต์ และมีค่า $R\text{-Sq}(\text{adj}) = 97.33$ เปอร์เซนต์ ถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่น่าพึงพอใจ สำหรับการทดลองนี้ได้กำหนดค่าระดับนัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$ เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.5 ค่า P-Value ของ Regression เท่ากับ 0.000 ซึ่งตกอยู่ในพื้นที่วิกฤต สรุปว่าฟังก์ชันในเชิงถดถอยสามารถยอมรับได้ และมีอย่างน้อยที่สุดของตัวแปรถดถอย X_1 , X_2 และ X_3 หนึ่งตัวจะมีผลอย่างน้อยสำคัญต่อแบบจำลองของสมการทางคณิตศาสตร์ จากนั้นทำการพิจารณาค่า P-Value ของเทอม Square เท่ากับ 0.000 และเทอม Interaction เท่ากับ 0.000 ซึ่งน้อยกว่าค่า α แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่ผิวผลตอบสนองจึงสามารถใช้แบบจำลองกำลังสองได้

ค่า P-Value ของ Lack-of-Fit มีค่าเท่ากับ 0.596 ซึ่งมากกว่าค่า α จึงสามารถสรุปว่า สมการมีความพอเพียง จากข้อมูลดังกล่าวจึงสามารถเขียนสมการสำหรับการทำนายค่าแอกทิวิตีที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha=0.05$ โดยใช้ข้อมูลตัวแปรธรรมชาติ ด้วยการพิจารณาค่า P-Value ของแต่ละปัจจัยที่มีค่าต่ำกว่า 0.05 มาเขียนสมการได้ดังนี้ (ตารางที่ 4.6 และ 4.7)

$$Y = 3.90 + 0.96X_2 - 1.16X_1^2 - 0.15X_2^2 - 0.80X_3^2 + 0.25X_1X_2 + 0.11X_1X_3 + 0.10X_2X_3$$

ตารางที่ 4.5 ผลการทดลองในการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

การทดลองที่	น้ำมันเมล็ดฝ้าย (%w/v, level)	ยีสต์สกัด (%w/v, level)	ซูโครส (%w/v, level)	แอกทิวิตี (U/mL)	ค่า OD600 nm
1	0.70 (-1)	0.50 (-1)	0.70 (-1)	1.64±0.16	14.03±1.86
2	2.00 (+1)	0.50 (-1)	0.70 (-1)	0.56±0.19	8.13±1.09
3	0.70 (-1)	1.00 (+1)	0.70 (-1)	2.68±0.12	12.34±0.74
4	2.00 (+1)	1.00 (+1)	0.70 (-1)	3.08±0.10	12.16±1.91
5	0.70 (-1)	0.50 (-1)	2.00 (+1)	0.72±0.09	24.44±1.47
6	2.00 (+1)	0.50 (-1)	2.00 (+1)	0.58±0.10	24.54±1.09
7	0.70 (-1)	1.00 (+1)	2.00 (+1)	2.64±0.14	22.32±0.50
8	2.00 (+1)	1.00 (+1)	2.00(+1)	3.03±0.15	20.54±1.39
9	0.25 ($-\alpha$)	0.75 (0)	1.35 (0)	0.52±0.15	16.28±0.86
10	2.44 ($+\alpha$)	0.75 (0)	1.35 (0)	0.44±0.14	14.42±0.87
11	1.35 (0)	0.32 ($-\alpha$)	1.35 (0)	1.78±0.09	18.59±0.61
12	1.35 (0)	1.17 ($+\alpha$)	1.35 (0)	4.92±0.26	19.23±0.73
13	1.35 (0)	0.75 (0)	0.25 ($-\alpha$)	1.37±0.10	12.72±0.12
14	1.35 (0)	0.75 (0)	2.44 ($+\alpha$)	1.62±0.08	23.37±2.34
15	1.35 (0)	0.75 (0)	1.35 (0)	3.93±0.24	26.66±1.39
16	1.35 (0)	0.75 (0)	1.35 (0)	3.71±0.29	26.01±1.06
17	1.35 (0)	0.75 (0)	1.35 (0)	3.78±0.31	24.43±1.57
18	1.35 (0)	0.75 (0)	1.35 (0)	3.91±0.11	25.78±1.65
19	1.35 (0)	0.75 (0)	1.35 (0)	4.18±0.09	24.75±1.13
20	1.35 (0)	0.75 (0)	1.35(0)	3.93±0.17	25.78±1.03

ตารางที่ 4.6 การประมาณผลกระทบบจากปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของค่าแอกทิวิตี

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3.90311	0.05556	70.254	0.000
oil	-0.04073	0.03686	-1.105	0.275
yeast	0.96777	0.03686	26.255	0.000
sucrose	-0.04245	0.03686	-1.152	0.255
oil*oil	-1.16469	0.03588	-32.458	0.000
yeast*yeast	-0.15061	0.03588	-4.197	0.000
sucrose*sucrose	-0.80474	0.03588	-22.427	0.000
oil*yeast	0.25107	0.04816	5.213	0.000
oil*sucrose	0.11580	0.04816	2.405	0.020
yeast*sucrose	0.10241	0.04816	2.126	0.039

S = 0.235939 PRESS = 4.19920

R-Sq = 97.82% R-Sq(pred) = 96.58% R-Sq(adj) = 97.33%

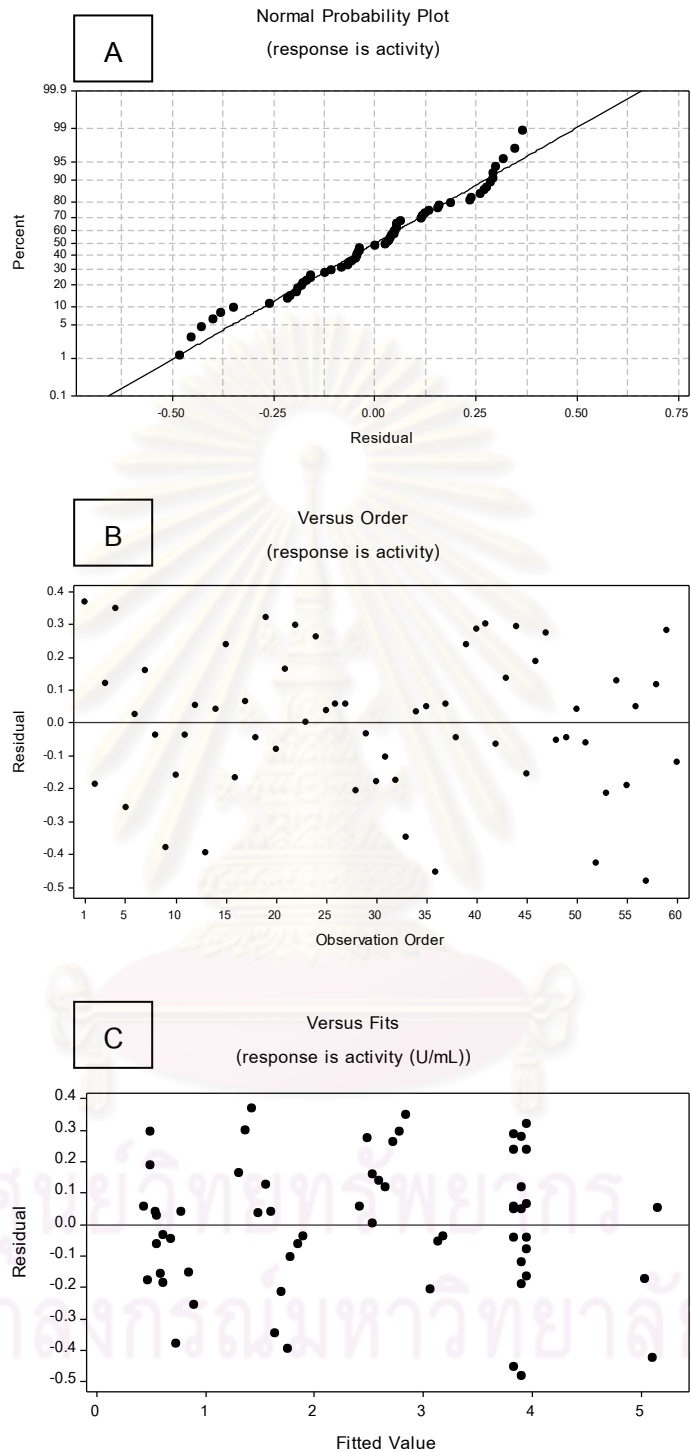
ตารางที่ 4.7 การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองของค่าแอกทิวิตี

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	120.015	120.0145	13.3349	239.55	0.000
Linear	3	38.514	38.5141	12.8380	230.62	0.000
Square	3	79.414	79.4140	26.4713	475.53	0.000
Interaction	3	2.086	2.0865	0.6955	12.49	0.000
Residual Error	48	2.672	2.6720	0.0557		
Lack-of-Fit	33	1.788	1.7883	0.0542	0.92	0.596
Pure Error	15	0.884	0.8837	0.0589		
Total	59	122.827				

แต่เนื่องจากในการทดลองนี้ไม่ได้ใช้วิธีการบล็อกเพื่อกำจัดตัวแปรควบคุม จึงควรนำปัจจัยทั้งหมดมาคำนวณในสมการ เพื่อให้ได้การทำนายแอกทิวิตีที่แม่นยำขึ้น ดังนั้นจึงได้สมการใหม่ดังนี้

$$\text{Activity} = 3.90 - 0.04X_1 + 0.96X_2 - 0.04245X_3 - 1.16X_1^2 - 0.15X_2^2 - 0.80X_3^2 + 0.25X_1X_2 + 0.11X_1X_3 + 0.10X_2X_3$$

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองโดยทำการพิจารณารูปแบบของค่าส่วนตกค้างพบว่า ค่าการกระจายแบบปกติ (Normal Probability Plot) ภาพระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง (Versus Order) พบว่าส่วนตกค้างมีการกระจายตัวอย่างเป็นอิสระไม่ขึ้นอยู่กับการทดลอง และภาพระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย (Versus Fits) พบว่ามีการกระจายตัวของส่วนตกค้างที่สม่ำเสมอทั้งทางด้านบวกและลบ จึงสรุปได้ว่าการทดลองมีความถูกต้องและเชื่อถือได้ (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 รูปแบบของส่วนตกค้างของตัวแปรตามเป็นเอกพหุคูณ A ค่าการกระจายแบบปกติ B ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง C ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย

เมื่อวิเคราะห์ตัวแปรตามเป็นค่า OD600 พบว่ามีค่า $R^2 = 92.05$ เปอร์เซ็นต์ และมีค่า $R\text{-Sq}(\text{adj}) = 90.23$ เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่น่าพึงพอใจ P-Value ของ Regression เท่ากับ 0.000 ซึ่งตกอยู่ในพื้นที่วิกฤต สรุปว่าฟังก์ชันในเชิงถดถอยสามารถยอมรับได้ จากนั้นทำการพิจารณาค่า P-Value ของเทอม Square เท่ากับ 0.000 และเทอม Interaction เท่ากับ 0.014 แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่มีผลตอบ จากค่า P-Value ของ Lack-of-Fit มีค่าเท่ากับ 0.059 ซึ่งมากกว่าค่า α จึงสามารถสรุปว่าสมการมีความพอเพียง (ตารางที่ 4.8 และ 4.9) และจากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง (ภาพที่ 4.13) สามารถสรุปว่าการทดลองนี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ทำให้สามารถสร้างสมการทำนายค่า OD600 ได้ดังนี้

$$\text{Growth} = -30.71 + 17.76X_1 + 59.97X_2 - 27.09X_3 - 8.50X_1^2 - 37.32X_2^2 - 6.24X_3^2 + 2.94X_1X_2 + 1.29X_1X_3 - 6.49X_2X_3$$

เมื่อ X_1 คือ ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้าย X_2 คือ ความเข้มข้นของยีสต์สกัด X_3 คือความเข้มข้นของซูโครส

ตารางที่ 4.8 การประมาณผลกระทบจากปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

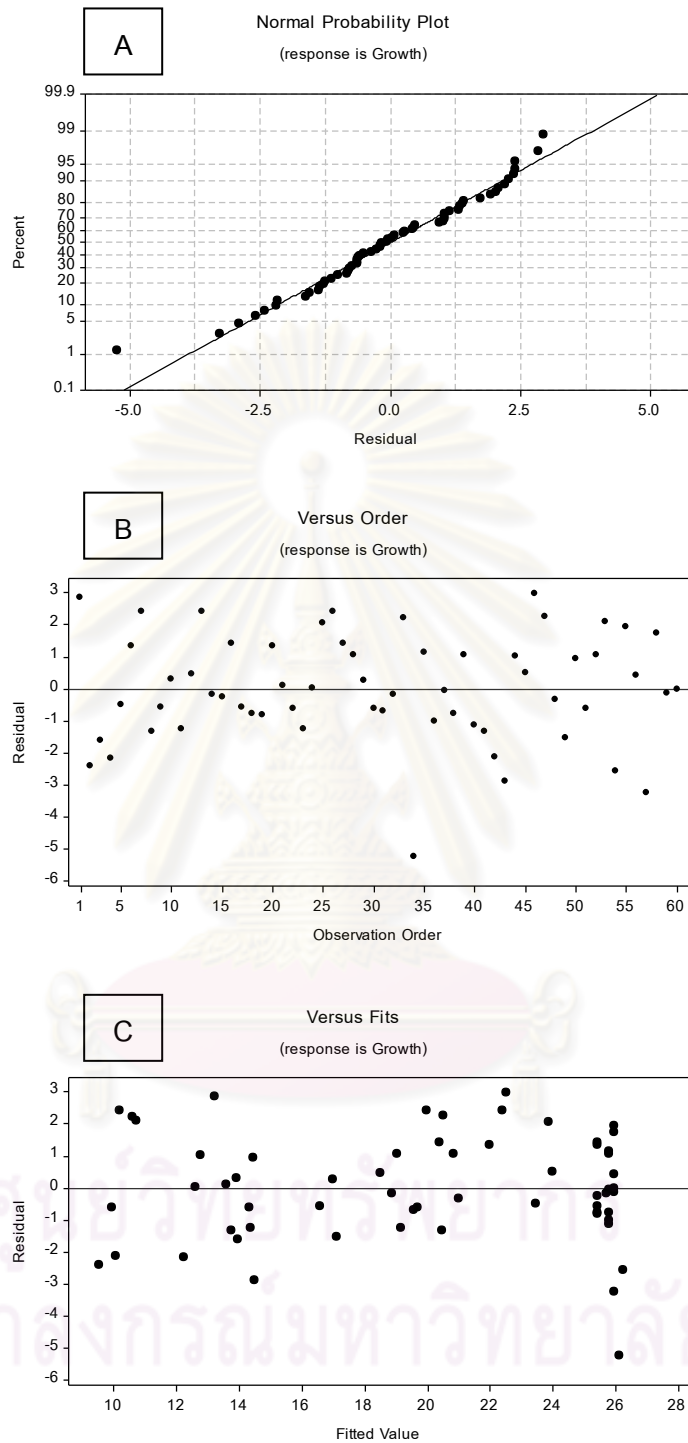
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-30.7137	4.8527	-6.329	0.000
oil	17.7617	2.7899	6.367	0.000
yeast	59.9791	8.0891	7.415	0.000
sucrose	27.0903	2.7899	9.710	0.000
oil*oil	-8.5012	0.6600	-12.881	0.000
yeast*yeast	-37.3203	4.4615	-8.365	0.000
sucrose*sucrose	-6.2460	0.6600	-9.464	0.000
oil*yeast	2.9487	2.3031	1.280	0.207
oil*sucrose	1.2998	0.8858	1.467	0.149
yeast*sucrose	-6.4974	2.3031	-2.821	0.007

S = 1.83347 PRESS = 269.235

R-Sq = 92.05% R-Sq(pred) = 86.73% R-Sq(adj) = 90.23%

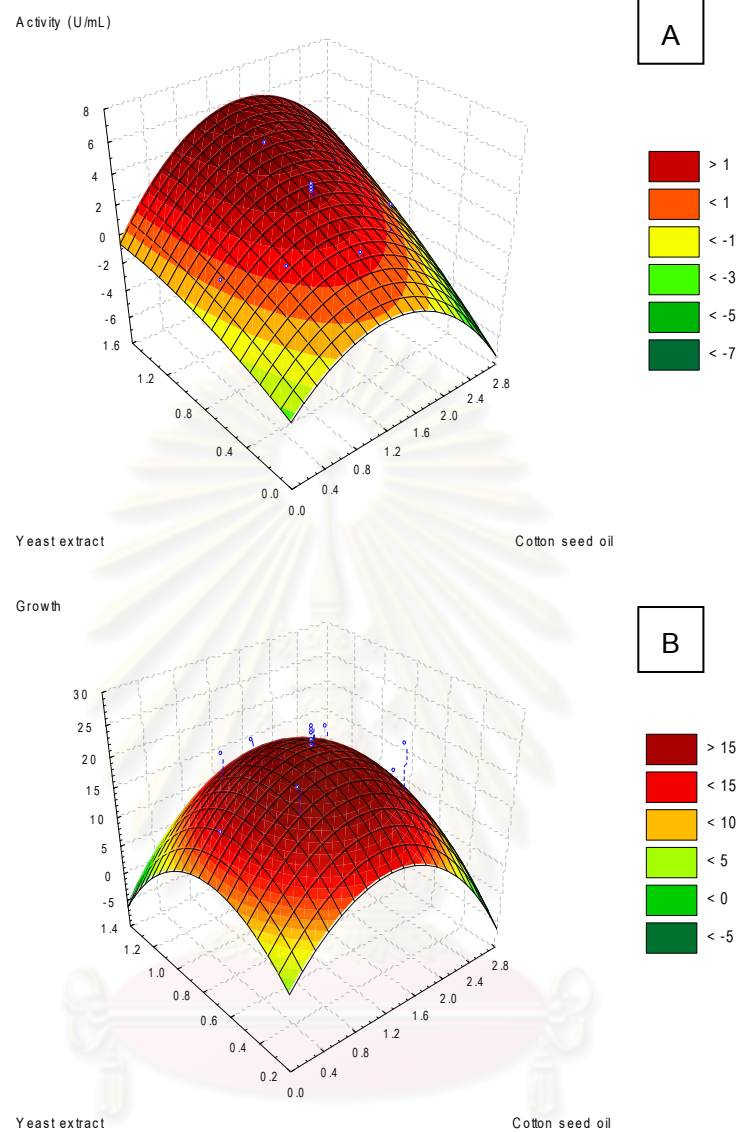
ตารางที่ 4.9 การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	1864.69	1864.687	207.187	61.63	0.000
Linear	3	902.11	429.626	143.209	42.60	0.000
Square	3	923.07	923.069	307.690	91.53	0.000
Interaction	3	39.50	39.503	13.168	3.92	0.014
Residual Error	48	161.36	161.357	3.362		
Lack-of-Fit	33	133.13	133.131	4.034	2.14	0.059
Pure Error	15	28.23	28.226	1.882		
Total	59	2029.08				

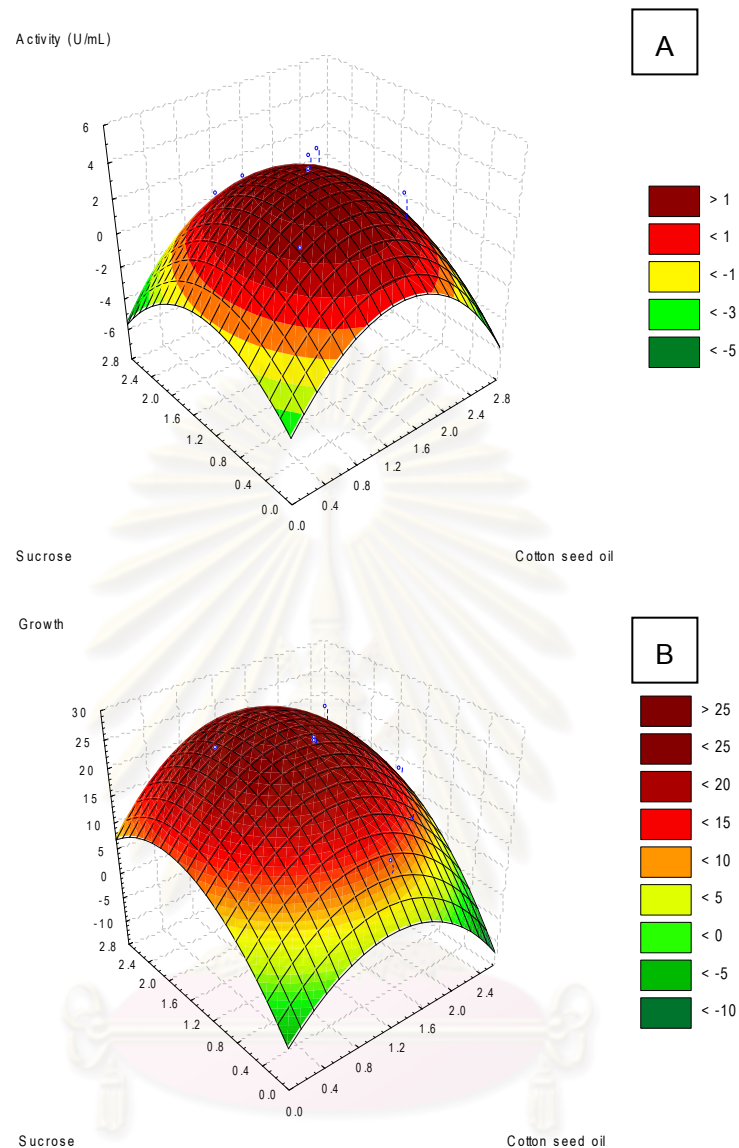


ภาพที่ 4.13 รูปแบบของส่วนตกค้างของตัวแปรตามเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร A ค่าการกระจายแบบปกติ B ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง C ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย

เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายกับยีสต์สกัด โดยคงปัจจัยของซูโครสไว้ที่ระดับกลาง (level 0) พบว่าค่าแอกทิวิตีจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดอยู่ที่ระดับสูงและความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายอยู่ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.14) ในขณะที่ค่า OD600 ของยีสต์จะมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดและน้ำมันเมล็ดฝ้ายอยู่ในระดับกลาง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำแม้ว่าจะมีปริมาณมากขึ้นแต่กลับให้ค่าแอกทิวิตีและค่า OD600 ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจะไปขัดขวางการละลายของออกซิเจน ทำให้ค่าออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen concentration) ในอาหารมีค่าน้อยลง ยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเติบโตจึงเติบโตได้น้อยลงส่งผลให้ผลิตไลเพสออกสู่อาหารน้อยลงด้วย (Alonso และคณะ, 2005) เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดพบว่าเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดสูงขึ้นค่าแอกทิวิตีจะสูงขึ้นในทิศทางเดียวกันในขณะที่ค่าการจะเติบโตจะมีค่าน้อยลง ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์โปรตีน (เอนไซม์) เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนที่มากพอยีสต์จึงสามารถที่จะผลิตไลเพสออกสู่อาหารเลี้ยงได้มากขึ้นด้วย แต่การเติบโต (การแบ่งเซลล์) ของยีสต์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว หากแต่สัมพันธ์กับปริมาณของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำ (น้ำมัน) ที่เหมาะสมด้วยกล่าวคือแม้ว่าในอาหารจะมีปริมาณยีสต์สกัดและน้ำมันสูงหากแต่น้ำมันที่มีปริมาณมากนั้นจะไปขัดขวางการละลายของออกซิเจนมากกว่าที่จะไปใช้ในการเติบโตส่งผลให้ค่า OD600 มีค่าน้อยลง เช่นเดียวกันหากมีปริมาณของยีสต์สกัดสูงแต่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำต่ำการเติบโตก็จะมีค่าน้อยลงเช่นกัน เนื่องจากแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rani และ Panneerselvam (2009) ได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจากเชื้อรา 5 ชนิดได้แก่ *Aspergillus fumigatus* *A. terreus* *Penicillium chrysogenum* *P. funiculosum* และ *Fusarium moniliforme* โดยทดลองความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าแอกทิวิตีมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันมีค่ามากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Walter และคณะ (2005) ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของน้ำมันถั่วเหลืองเกิน 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะส่งผลให้เชื้อ *Metarhizium anisopliae* ผลิตไลเพสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ Gordillo และคณะ (1997) รายงานว่าความเข้มข้นของโอเลอิคแอซิดที่มากกว่า 2 กรัมต่อลิตร จะส่งผลให้ *C. rugosa* ผลิตไลเพสน้อยลง

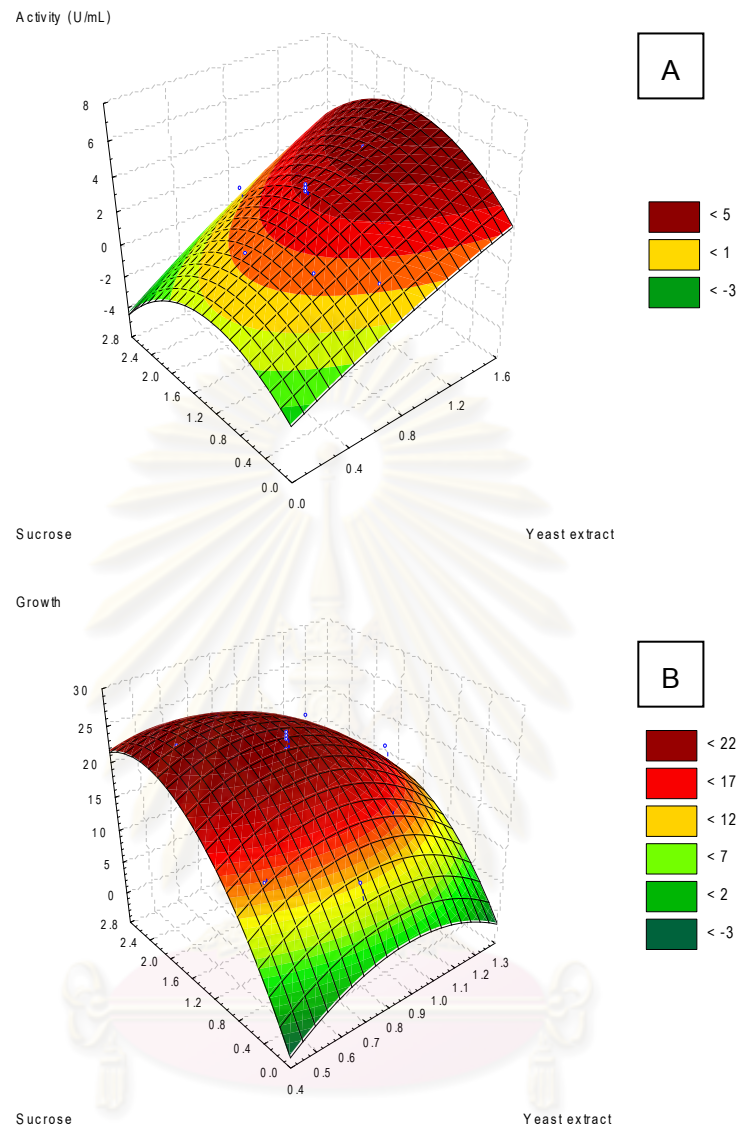


ภาพที่ 4.14 อันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายกับยีสต์สกัดต่อ ค่า
 แอทิวิตี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (B)



ภาพที่ 4.15 อันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายกับน้ำตาลซูโครสต่อค่าแอกทิวิตี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (B)

จากการพิจารณาอันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายกับน้ำตาลซูโครสโดยกำหนดให้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดไว้ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.15) พบว่าค่าแอกทิวิตีจะมีค่าสูงสุดเมื่อปริมาณซูโครสกับน้ำมันเมล็ดฝ้ายอยู่ในระดับกลาง และค่า OD600 จะมีค่าสูงสุดเมื่อปริมาณซูโครสอยู่ในระดับสูงและน้ำมันเมล็ดฝ้ายอยู่ในระดับกลาง จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าปริมาณซูโครสที่สูงจะส่งผลให้ยีสต์มีการผลิตไลเพสน้อยลงเนื่องจากยีสต์จะใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครสซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าแหล่งคาร์บอนจากน้ำมัน ทำให้ยีสต์มีการเติบโตสูงแต่มีการผลิตไลเพสต่ำ



ภาพที่ 4.16 อันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของยีสต์สกัดกับน้ำตาลซูโครสต่อค่าแอกทิวิตี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (B)

เมื่อพิจารณาอันตรกิริยาระหว่างปัจจัยความเข้มข้นของยีสต์สกัดกับน้ำตาลซูโครส โดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายไว้ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.16) พบว่าค่าแอกทิวิตีมีค่าสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดอยู่ในระดับสูงและน้ำตาลซูโครสอยู่ในระดับกลาง ส่วนค่า OD600 จะสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของซูโครสอยู่ในระดับสูงและยีสต์สกัดอยู่ในระดับกลาง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีสต์สกัดมีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสสูงกว่าน้ำตาลซูโครส กล่าวคือแม้ว่าจะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสในระดับต่ำแต่ถ้ามีปริมาณยีสต์สกัดในระดับสูงค่าแอกทิวิตีก็จะอยู่ในระดับสูง ในขณะที่ถ้ามีปริมาณน้ำตาลซูโครสในระดับสูงแต่มีปริมาณยีสต์สกัดอยู่ในระดับต่ำค่าแอกทิวิตีก็จะอยู่ในระดับต่ำ เนื่องจากปริมาณซูโครสที่สูงขึ้นจะทำให้ยีสต์ใช้

แหล่งคาร์บอนจากซูโครสมากกว่าแหล่งน้ำมันจึงไม่จำเป็นต้องผลิตไลเพสออกมาย่อย ส่งผลให้ไลเพสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้อย

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยฟังก์ชัน Response Optimizer ทำให้ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของทั้งสามปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไลเพสดังนี้ ความเข้มข้นของน้ำมันเมล็ดฝ้ายเท่ากับ 1.4494 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 1.1704 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 1.4052 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีค่าการทำนายแอกทิวิตีไว้ที่เท่ากับ 5.1425 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากได้ค่าปัจจัยที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการพิสูจน์ค่าเพื่อยืนยันผลของค่าการทำนาย ซึ่งได้ทำการทดลองทั้งสิ้น 7 ซ้ำ พบว่ามีค่าแอกทิวิตี 4.85 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่าการทำนาย 5.68 เปอร์เซ็นต์

จากขั้นตอนทั้งหมดของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของยีสต์ SRY14-3 พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตไลเพสได้มากถึง 2.1 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดิม (Lipase Production) แสดงในตารางที่ 4.10 Açikela และคณะ (2010) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจาก *Rhizopus delemar* โดยใช้การวางแผนการทดลองด้วยพื้นที่ผิวตอบ ทำการเลือกศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล ยีสต์สกัด น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และทวีน 80 พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตไลเพสจากเดิมได้ถึง 3.14 เท่า Dong และคณะ (2008) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของเชื้อ *Rhizopus chinensis* โดยใช้การวางแผนการทดลองด้วยพื้นที่ผิวตอบพบว่าสามารถเพิ่มการผลิตไลเพสได้ 93.4 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chien และคณะ (2006) ที่ได้ใช้การวางแผนการทดลองด้วยพื้นที่ผิวตอบในการหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัย 5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตไลเพสของเชื้อ *Burkholderia* sp. ซึ่งสามารถเพิ่มการผลิตไลเพสได้สูงถึง 5 เท่าของอาหารสูตรเดิม

ตารางที่ 4.10 แสดงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดั้งเดิมและสูตรปรับปรุง

สูตรอาหาร	องค์ประกอบ	แอกทิวิตี
Lipase Production	น้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	2.30 ± 0.104 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
Lipase Production สูตรปรับปรุง	น้ำมันเมล็ดฝ้าย 1.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัด 1.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซูโครส 1.40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	4.85 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

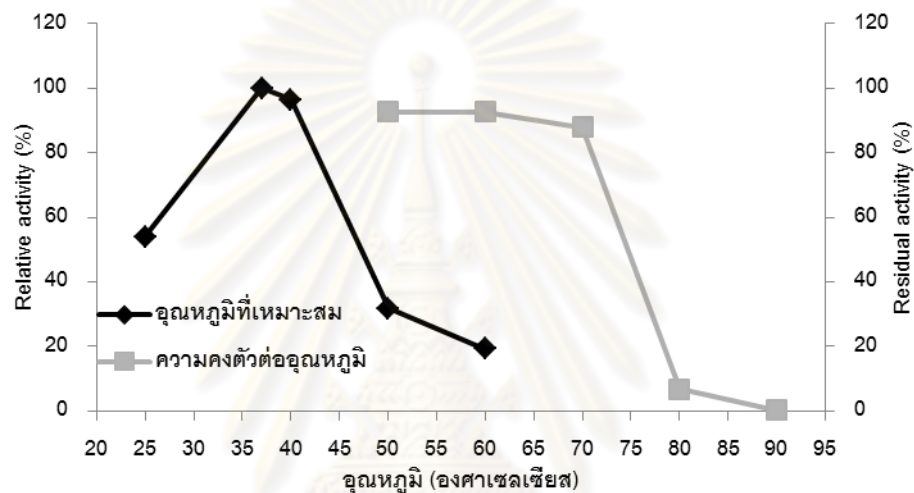
4.5 การศึกษาสมบัติบางประการของไลเพสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก

อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากมีส่งผลโดยตรงกับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมแตกต่างกันไป แม้ว่าจะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันหากแต่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างกัน ก็อาจจะมีช่วงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกันได้เช่นกัน ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาค้นหาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสที่ผลิตจากยีสต์ SRY14-3 รวมถึงศึกษาค่าความคงตัวที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ ด้วย

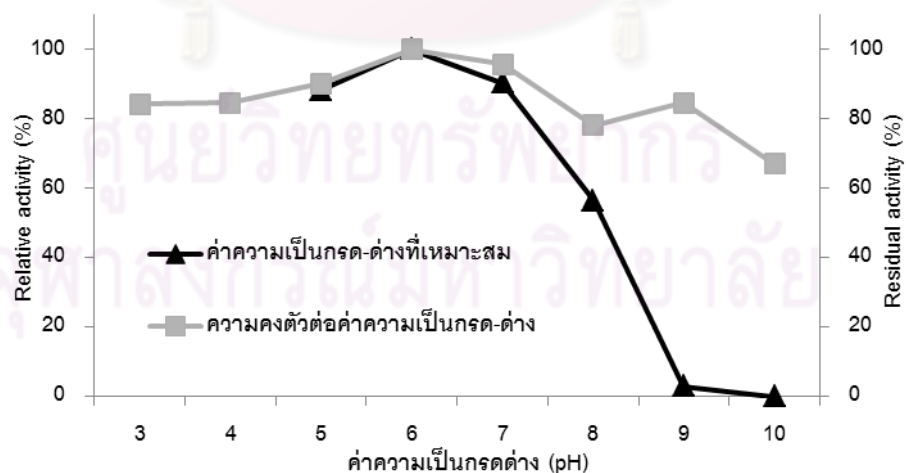
จากผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสจากยีสต์ SRY14-3 อยู่ในช่วง 37-40 องศาเซลเซียส โดยจะมีค่าแอกทิวิตีเหลือเพียง 53.90 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีค่าแอกทิวิตีเหลือ 31.70 และ 19.20 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานพบว่ามีความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในช่วง 5-7 แต่จะมีค่าแอกทิวิตีสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0 โดยมีค่าแอกทิวิตีเหลือ 56.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 และมีค่าแอกทิวิตีเพียง 2.88 เมื่อปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 ในขณะที่ไม่สามารถตรวจสอบค่าแอกทิวิตีได้เมื่อปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรดต่าง 10.0 (ภาพที่ 4.17 และ 4.18) Benjamin และ Pandey (2001) ได้ศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของไลเพสจาก *C. rugosa* พบว่ามีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 35-40 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7.8 Ota และคณะ (1982) รายงานว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสจาก *Y. lipolytica* คือ 37 องศาเซลเซียส และ 8.2 ตามลำดับ Dharmsthiti และ Ammaranond (1997) พบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสจาก *Trichosporonasteroides* คือ 50 องศาเซลเซียส และ 5.0 ตามลำดับ Zhenming Chi และคณะ (2009) ทำการศึกษา *Aureobasidium pullulans* พบว่าเอนไซม์ไลเพสที่ได้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และไม่พบแอกทิวิตีเมื่อปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำปฏิกิริยา

เมื่อทดสอบความคงตัวของไลเพสต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างพบว่า ไลเพสจากยีสต์ SRY14-3 สามารถคงตัวได้ที่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยจะมีค่าแอกทิวิตีเหลือเพียง 6.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการทำปฏิกิริยา และไม่สามารถตรวจพบค่าแอกทิวิตีได้ เมื่อปฏิกิริยาที่

อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสก่อนการทำปฏิกิริยา ส่วนความคงตัวของค่าความเป็นกรดต่างพบว่าไลเพสจากยีสต์ SRY14-3 สามารถคงตัวในช่วงความเป็นกรดต่างระหว่าง 3-9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะมีค่าแอกทิวิตีลดลงเหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 10 (ภาพที่ 4.15 และ 4.16) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าไลเพสจากยีสต์มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส และที่ความเป็นกรดต่าง 3.0-10.0 (Dharmsthiti และ Ammaranond, 1997; Tsujisaka และคณะ, 1973)



ภาพที่ 4.17 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงตัวของไลเพสที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 4.18 ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและความคงตัวของไลเพสที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

4.6 การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ที่คัดเลือก

4.6.1 การสังเคราะห์ชูการ์แพตตีแอสิตเอสเทอร์

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไลเปสจากยีสต์ SRY14-3 สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ จึงได้นำมาประยุกต์ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชูการ์แพตตีแอสิตเอสเทอร์ ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลและโมเลกุลของกรดไขมันอิสระ จัดเป็นสารลดแรงตึงชนิดหนึ่งที่ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยได้ออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลเพื่อคัดเลือกชนิดของน้ำตาลกรดไขมันอิสระที่เหมาะสม

ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 4.11) เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าการทดลองมีค่า $R-Sq = 94.01\%$ (ตารางที่ 4.12) ซึ่งเป็นค่าที่น่าพอใจ จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลของปัจจัยหลักได้แก่ น้ำตาลและกรดไขมันอิสระพบว่าทั้งสองปัจจัยมีค่า P-value เท่ากับ 0.000 และ 0.032 ตามลำดับซึ่งน้อยกว่าค่า α แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลแต่ละชนิดส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับผลของกรดไขมันอิสระที่แสดงให้เห็นว่ามีกรดไขมันอิสระแต่ละชนิดให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ค่า P-value ของอันตรกิริยาระหว่างน้ำตาลและกรดไขมันอิสระมีค่าเท่ากับ 0.493 ซึ่งมากกว่าค่า α แสดงให้เห็นว่าผลของอันตรกิริยาไม่ส่งผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

ดังนั้นเมื่อพิจารณากราฟอิทธิพลหลัก (ภาพที่ 4.19) พบว่าน้ำตาลและกรดไขมันอิสระที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ชูการ์แพตตีแอสิตเอสเทอร์ด้วยไลเปสจาก SRY14-3 คือ น้ำตาลฟรักโทสและกรดปาล์มิติก ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.95 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์ชูการ์แพตตีแอสิตเอสเทอร์ปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่งคือความสามารถในการละลายของสารตั้งต้นในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่ออ้างอิงความสามารถในการละลายของน้ำตาลที่นำมาทดลองในตัวทำละลายเทอร์เชียรีบิวทานอล กับการทดลองของ In และคณะ (2007) พบว่าน้ำตาลฟรักโทสสามารถละลายได้ในตัวทำละลายสูงสุด (15.6 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นที่นำมาทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ In และคณะ (2007) ที่ได้ศึกษาความสามารถในการละลายของน้ำตาลในตัวทำละลายเทอร์เชียรีบิวทานอลในการสังเคราะห์ชูการ์แพตตีแอสิตเอสเทอร์ด้วยไลเปสจาก *C. antarctica* พบว่าน้ำตาลไซลิทอล (xylitol) เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นน้ำตาลที่สามารถละลายในตัวทำละลายได้สูงสุดส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สูงด้วย กล่าวคือ น้ำตาลไซลิทอลสามารถละลายในตัวทำละลายได้ 17.5 กรัมต่อลิตร (เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 98 %) น้ำตาลฟรักโทสละลายได้ 15.6 กรัมต่อลิตร (เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 90 %) น้ำตาล

ซอร์บิทอลละลายได้ 10.6 กรัมต่อลิตร (เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 83 %) น้ำตาลกลูโคสละลายได้ 2.3 กรัมต่อลิตร (เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 52 %) น้ำตาลไซโลสละลายได้ 1.5 กรัมต่อลิตร (เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 41 %) และน้ำตาลซูโครสละลายได้ 1.1 กรัมต่อลิตร(เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ 35 %)

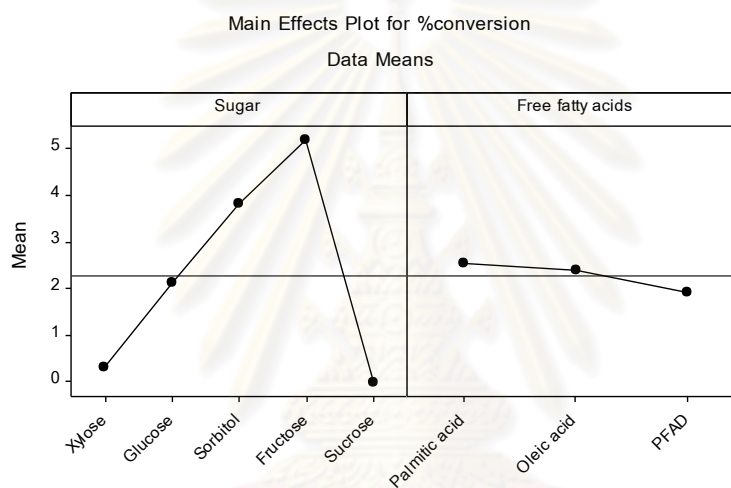
ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสิตเอสเทอร์จากน้ำตาลและกรดไขมันชนิดต่างๆ ด้วยไลเพส SRY14-3

การทดลองที่	ชนิดน้ำตาล	ชนิดกรดไขมัน	เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์
1	Xylose	Palmitic acid	0.21±0.24
2	Xylose	Oleic acid	0.54±0.54
3	Xylose	PFAD	0.22±0.19
4	Glucose	Palmitic acid	2.31±0.54
5	Glucose	Oleic acid	2.27±0.53
6	Glucose	PFAD	1.77±0.27
7	Sorbitol	Palmitic acid	4.19±0.50
8	Sorbitol	Oleic acid	4.10±1.22
9	Sorbitol	PFAD	3.13±0.73
10	Fructose	Palmitic acid	5.95±0.96
11	Fructose	Oleic acid	5.06±0.57
12	Fructose	PFAD	4.52±1.12
13	Sucrose	Palmitic acid	0
14	Sucrose	Oleic acid	0
15	Sucrose	PFAD	0

ตารางที่ 4.12 ค่าสถิติของปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของชนิดน้ำตาลและกรดไขมัน

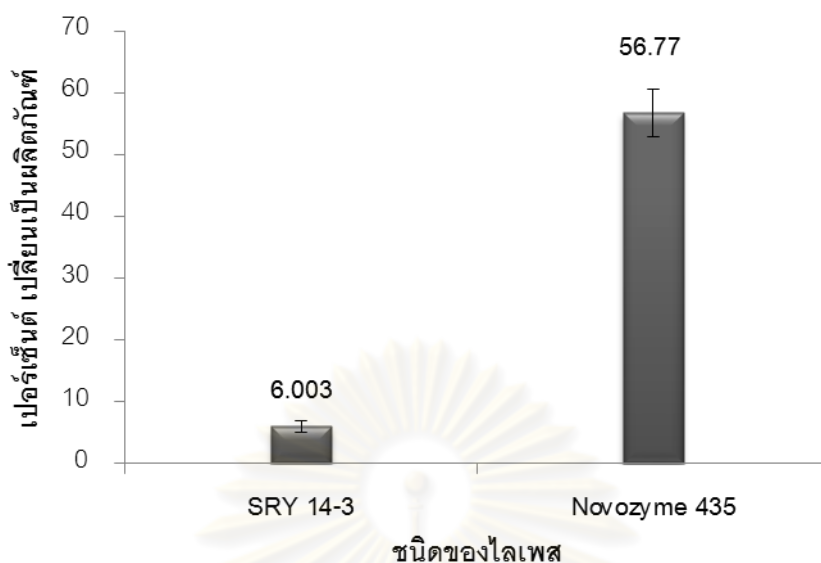
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Sugar	4	178.207	178.207	44.552	113.84	0.000
Free fatty acids	2	3.021	3.021	1.511	3.86	0.032
Sugar*Free fatty acids	8	2.971	2.971	0.371	0.95	0.493
Error	30	11.740	11.740	0.391		
Total	44	195.939				

S = 0.625575 R-Sq = 94.01เปอร์เซ็นต์ R-Sq(adj) = 91.21เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.19 อิทธิพลของชนิดน้ำตาลและชนิดของกรดไขมันต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

จากนั้นได้ทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์-แพตตีแอซิดเอสเทอร์ระหว่างน้ำตาลฟรักโทสกับกรดปาล์มิติกด้วยไลเปสจาก SRY14-3 และไลเปสทางการค้า(Novozyme 435) พบว่าไลเปสจาก SRY14-3 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.003 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไลเปสจาก Novozyme 435 มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สูงถึง 56.77 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอซิดเอสเทอร์เมื่อใช้ไลเปสจากยีสต์ SRY14-3 และ ไลเปสจาก Novozyme 435 เป็นตัวเร่ง

ซึ่งผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไลเปสจาก SRY14-3 ไม่มีความเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอซิดเอสเทอร์ แม้ว่าการทดลองเบื้องต้นพบว่าไลเปสจาก SRY14-3 สามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ก็ตาม เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ทดสอบขั้นต้น (สารตั้งต้นเป็นโอเลอิก แอซิด และ 1-โดดีคานอล) เป็นโมเลกุลไม่มีขั้วทำให้สารตั้งต้นทั้งสองสามารถละลายเข้ากันได้ดี ซึ่งแตกต่างกับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่มีน้ำตาลและกรดไขมันเป็นสารตั้งต้น เพราะสารตั้งต้นทั้งสองชนิดไม่สามารถละลายเข้ากันได้จึงจำเป็นต้องอาศัยตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติที่สามารถละลายได้ทั้งโมเลกุลที่มีขั้ว (น้ำตาล) และโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (กรดไขมัน) ซึ่งตัวทำละลายประเภทนี้มักมีความเป็นพิษสูง จึงไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เลือกเทอเทียรียิวทานอล มาเป็นตัวทำละลายเพราะไม่มีความเป็นพิษ และสามารถละลายสารตั้งต้นทั้งสองได้ดี (In และคณะ, 2001) แต่จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไลเปสจาก SRY14-3 ไม่เหมาะสมต่อตัวทำละลายดังกล่าว โดย Alexander (1997) ได้เสนอสมมุติฐานเกี่ยวกับประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาที่ด้อยลงเมื่อเอนไซม์อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนี้

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อรูปร่างของบริเวณเร่ง
2. ถ้าเอนไซม์ถูกทำให้แห้งด้วยความเย็นจะสามารถคืนโครงสร้างได้อย่างปกติเมื่อละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แต่หากนำมาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อาจจะทำให้โครงสร้างเอนไซม์คืนตัวไม่ปกติ
3. สารตั้งต้นละลายได้น้อยลงหากใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่เหมาะสม
4. ทำให้สภาวะทรานซิชันสเตต (Transition state) ไม่คงตัว
5. ส่งผลเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับตัว

ทำละลายบัพเฟอร์ ขณะที่ Ku และ Hang (1995) ทำการสังเคราะห์ซูการ์แพตตีแอสซิสเอสเทอร์ด้วย ไลเพสจาก *Byssochlamys fulva* โดยใช้น้ำตาล ฟรักโทส และกรดลิโนเลอิกเป็นสารตั้งต้นระบบตัวทำละลาย *tert*-butanol พบว่าได้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากถึง 71.30 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าแม้จะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มาจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ก็จะมีความสามารถในการทำงานในตัวทำละลายชนิดเดียวกันแตกต่างกันไป ด้วยเหตุนี้การเลือกชนิดของตัวทำละลายจะต้องมีความเหมาะสมกับชนิดไลเพสที่แตกต่างกัน

4.6.2 การผลิตเมทิลเอสเทอร์

4.6.2.1 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไลเพสจาก SRY14-3 มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชัน ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ งานวิจัยส่วนนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยาไลเพสจากยีสต์ SRY 14-3 ในระบบปราศจากตัวทำละลาย

ออกแบบการทดลองใช้หลักการพินที่ผิวตอบเพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัย 4 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล ปริมาณน้ำ และปริมาณซิลิกาเจล โดยกำหนดปัจจัยเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไว้ที่ 24 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงในตาราง 4.13 เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์เชิงสถิติ พบว่ามีค่า $R^2 = 91.73$ เปอร์เซ็นต์ และมีค่า $R\text{-Sq}(\text{adj}) = 89.03$ เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่น่าพึงพอใจ จากนั้นพิจารณาค่า P-Value ของ Regression เท่ากับ 0.000 ซึ่งตกอยู่ในพื้นที่วิกฤต สรุปว่าฟังก์ชันในเชิงถดถอยสามารถยอมรับได้ จากนั้นทำการพิจารณาค่า P-Value ของเทอม Square เท่ากับ 0.000 และเทอม Interaction เท่ากับ 0.000 แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่ผิวผลตอบ เมื่อพิจารณาค่า P-Value ของ Lack-of-Fit มีค่าเท่ากับ 0.954 ซึ่งมากกว่าค่า α จึงสามารถสรุปว่าสมการมีความพอเพียง (ตารางที่ 4.14 และ 4.15) และจากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองโดยพิจารณาการกระจายตัวของค่าส่วนตกค้าง พบว่ามีการกระจายตัวแบบปกติ มีความเป็นอิสระต่อกัน และมีค่าเสถียรในระดับน่าพอใจ (ภาพที่ 4.21) จึงสามารถสรุปว่าการทดลองนี้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ทำให้สามารถสร้างสมการทำนายเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ (%Conversion methyl ester) ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \% \text{Conversion methyl ester} = & 44.73 + 1.27X_1 + 11.23X_2 + 0.48X_3 + 0.93X_4 - 2.60X_1^2 \\ & - 1.74X_2^2 - 2.65X_3^2 + 0.0037X_4 + 5.55X_1X_2 + 1.40X_1X_3 \\ & - 4.20X_1X_4 + 4.20X_2X_3 + 2.45X_2X_4 - 0.95X_3X_4 \end{aligned}$$

เมื่อ X_1 คือ ปริมาณเอนไซม์ไลเพส (ยูนิต) X_2 คือ ปริมาณเมทานอล (โมลโคโรลิตร) X_3 คือ ปริมาณน้ำ (มิลลิลิตร) และ X_4 คือ ปริมาณซิลิกาเจล (กรัม)

ตารางที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ (%conversion) ของการทดลอง

การทดลองที่ *	ปริมาณเอนไซม์ (Unit)	อัตราส่วนโดย โมลของ น้ำมันปาล์ม ต่อเมทานอล	ปริมาณน้ำ (%v/voil)	ปริมาณ ซิลิกาเจล (%w/woil)	%Conversion
1	50	1:3	29.6	6.6	35.54±1.37
2	80	1:3	29.6	6.6	27.90±1.10
3	50	1:6	29.6	6.6	30.91±2.32
4	80	1:6	29.6	6.6	43.27±1.00
5	50	1:3	44.5	6.6	29.41±1.17
6	80	1:3	44.5	6.6	19.95±0.36
7	50	1:6	44.5	6.6	48.05±0.22
8	80	1:6	44.5	6.6	60.78±1.68
9	50	1:3	29.6	13.3	30.58±1.06
10	80	1:3	29.6	13.3	21.69±1.00
11	50	1:6	29.6	13.3	46.26±0.59
12	80	1:6	29.6	13.3	51.51±0.87
13	50	1:3	44.5	13.3	25.88±1.40
14	80	1:3	44.5	13.3	19.73±1.63
15	50	1:6	44.5	13.3	41.65±2.48
16	80	1:6	44.5	13.3	68.04±0.83
17	35	1:4.5	37.0	10.0	33.16±0.87
18	95	1:4.5	37.0	10.0	36.17±0.26
19	65	1:1.5	37.0	10.0	15.62±1.19
20	65	1:7.5	37.0	10.0	60.54±0.81
21	65	1:4.5	22.2	10.0	37.97±0.40
22	65	1:4.5	51.9	10.0	30.91±1.44
23	65	1:4.5	37.0	3.3	41.84±1.49
24	65	1:4.5	37.0	16.6	48.32±0.59
25	65	1:4.5	37.0	10.0	46.31±1.35
26	65	1:4.5	37.0	10.0	38.08±0.55
27	65	1:4.5	37.0	10.0	47.10±0.82
28	65	1:4.5	37.0	10.0	49.23±0.48
29	65	1:4.5	37.0	10.0	36.37±0.57
30	65	1:4.5	37.0	10.0	47.29±1.96
31	65	1:4.5	37.0	10.0	48.75±1.37

* เดิมเมทานอลเป็นสามครั้งทุก 8 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวน 600 รอบต่อ

นาที เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.14 การประมาณผลกระทบบจากปัจจัยหลักและอันตรกิริยาร่วมของค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์

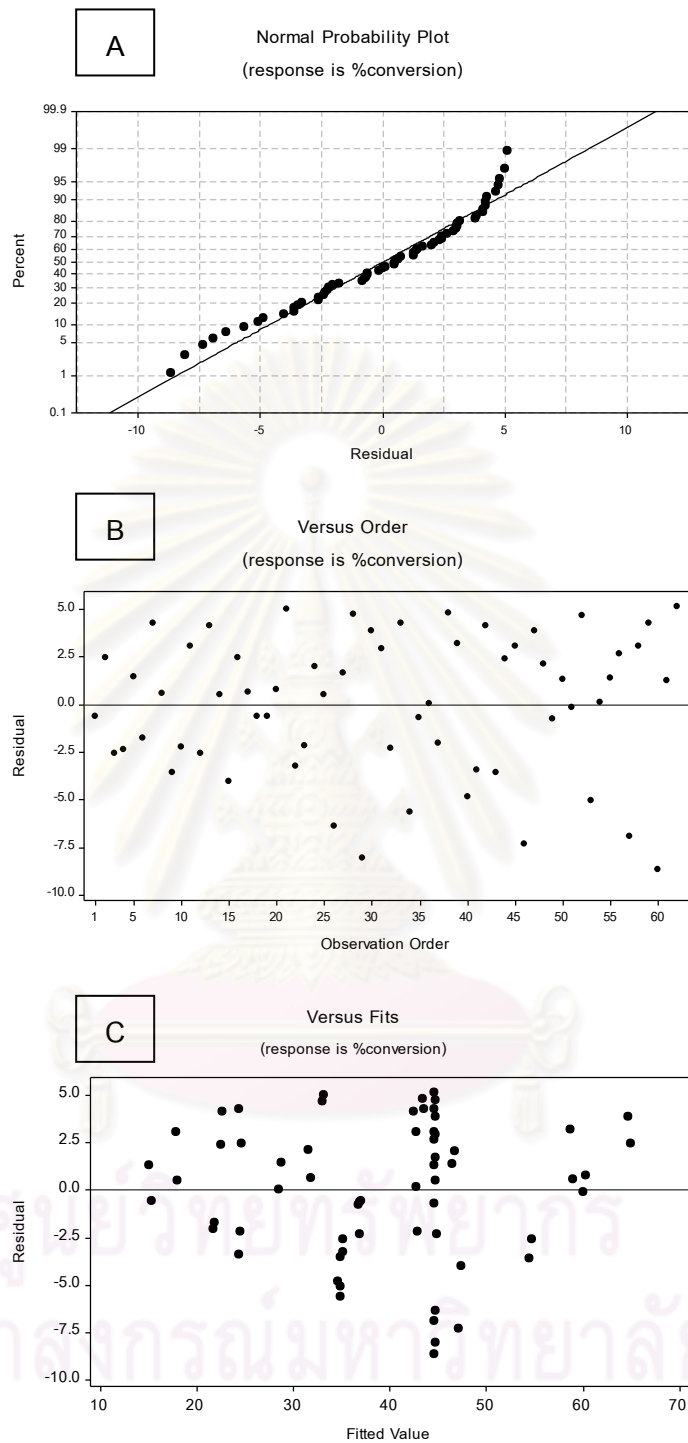
Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	44.7371	1.1143	40.147	0.000
enzyme	1.2754	0.6018	2.119	0.039
methanol	11.2346	0.6018	18.668	0.000
water	0.4879	0.6018	0.811	0.422
silica gel	0.9367	0.6018	1.556	0.126
enzyme*enzyme	-2.6006	0.5513	-4.717	0.000
methanol*methanol	-1.7456	0.5513	-3.166	0.003
water*water	-2.6563	0.5513	-4.818	0.000
silica gel*silica gel	0.0037	0.5513	0.007	0.995
enzyme*methanol	5.5544	0.7371	7.536	0.000
enzyme*water	1.4025	0.7371	1.903	0.063
enzyme*silica gel	0.5381	0.7371	0.730	0.469
methanol*water	4.2062	0.7371	5.707	0.000
methanol*silica gel	2.4594	0.7371	3.337	0.002
water*silica gel	-0.9562	0.7371	-1.297	0.201

S = 4.16945 PRESS = 1368.06

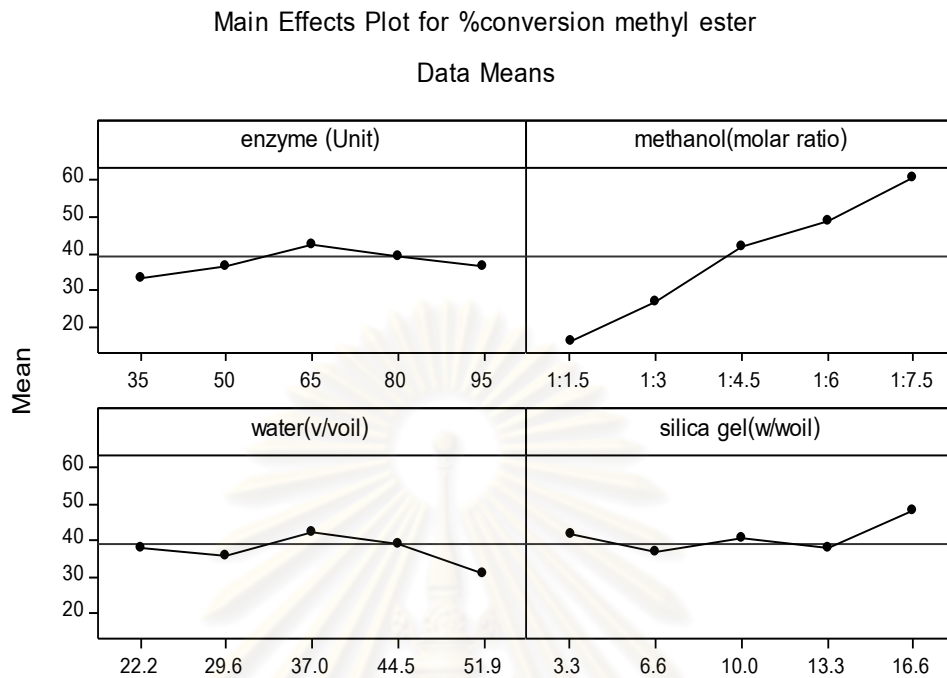
R-Sq = 91.73 เปอร์เซนต์ R-Sq(pred) = 85.85 เปอร์เซนต์ R-Sq(adj) = 89.03 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.15 การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองของค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	8865.03	8865.03	633.22	36.42	0.000
Linear	4	6189.98	6189.98	1547.50	89.02	0.000
Square	4	826.63	826.63	206.66	11.89	0.000
Interaction	6	1848.42	1848.42	308.07	17.72	0.000
Residual Error	46	799.68	799.68	17.38		
Lack-of-Fit	34	460.20	460.20	13.54	0.48	0.954
Pure Error	12	339.48	339.48	28.29		
Total	61	9665.51				

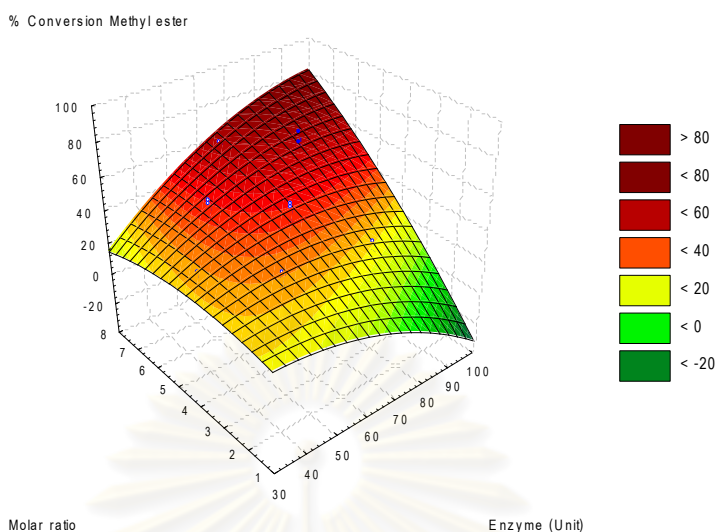


ภาพที่ 4.21 รูปแบบของส่วนตกค้างของเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ A ค่าการกระจายแบบปกติ B ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับลำดับการทดลอง C ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนตกค้างกับค่าทำนาย



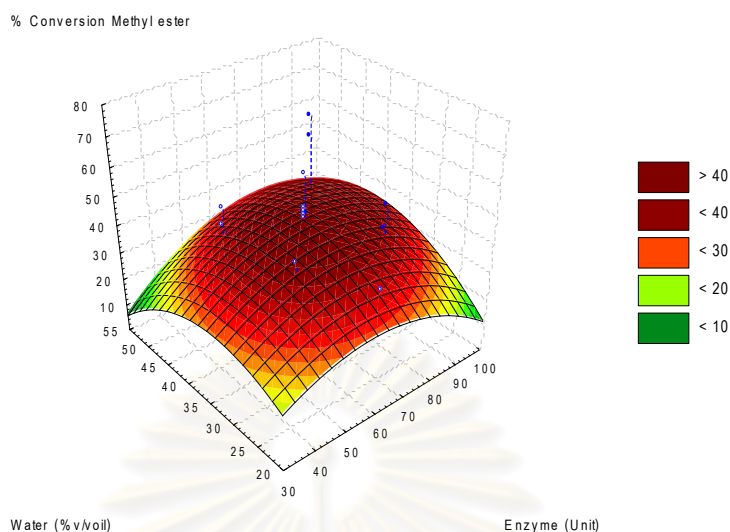
ภาพที่ 4.22 อิทธิพลหลักทั้ง 4 ปัจจัยต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาทำการวาดกราฟของอิทธิพลหลักทั้ง 4 ปัจจัย (ภาพที่ 4.22) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงเมื่อมีปริมาณเอนไซม์สูงกว่า 65 ยูนิต ส่วนปริมาณน้ำพบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จะลดลงเมื่อปริมาณน้ำอยู่ในระดับสูง (51.9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรน้ำมัน) แต่เมื่อพิจารณาจากค่าทางสถิติ (ตารางที่ 4.12 P-value = 0.422 ซึ่งมากกว่าค่า α) จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับปริมาณซิลิกาเจลจะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ แม้ภาพอิทธิพลหลักจะแสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณซิลิกาเจลที่ 16.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มีค่าสูงขึ้น แต่ค่าทางสถิติแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (P-value = 0.126 ซึ่งมากกว่าค่า α) ในขณะที่ปริมาณเมทานอลเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด โดยสังเกตได้จากความชันของภาพอิทธิพลหลัก ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จะสูงขึ้นเมื่อปริมาณของเมทานอลสูงขึ้นและมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่อัตราส่วนต่อโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็น 1:7.5 ซึ่งหากจะพิจารณาแต่อิทธิพลหลักจะพบว่ามีเพียงปริมาณเอนไซม์และปริมาณเมทานอลเท่านั้นที่ส่งผลเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์



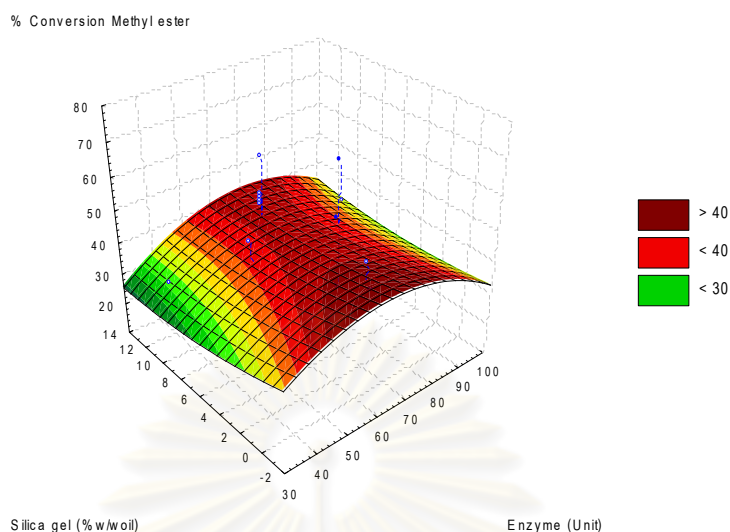
ภาพที่ 4.23 อันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลกับปริมาณเอนไซม์ โดยกำหนดปริมาณน้ำและปริมาณซิลิกาเจลอยู่ที่ระดับกลาง

เมื่อพิจารณาภาพอันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลกับปริมาณเอนไซม์ โดยกำหนดปริมาณน้ำและปริมาณซิลิกาเจลอยู่ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.23) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลมากกว่าปริมาณเอนไซม์ สังเกตได้จากภาพแม้ว่าปริมาณเอนไซม์จะมีปริมาณน้อย แต่ถ้ามีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลสูง ก็จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงขึ้นได้ หรือหากปริมาณเอนไซม์สูง แต่มีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่ำ ก็จะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ต่ำ นอกจากนี้ผลการทดลองได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไลเปสยังคงสามารถทำงานได้แม้จะมีความเข้มข้นของเมทานอลสูง (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:7.5) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้าพบว่าไลเปสส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาน้อยลงอย่างมากเมื่ออัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลมากกว่า 1:6 (Yuji และคณะ, 2002)



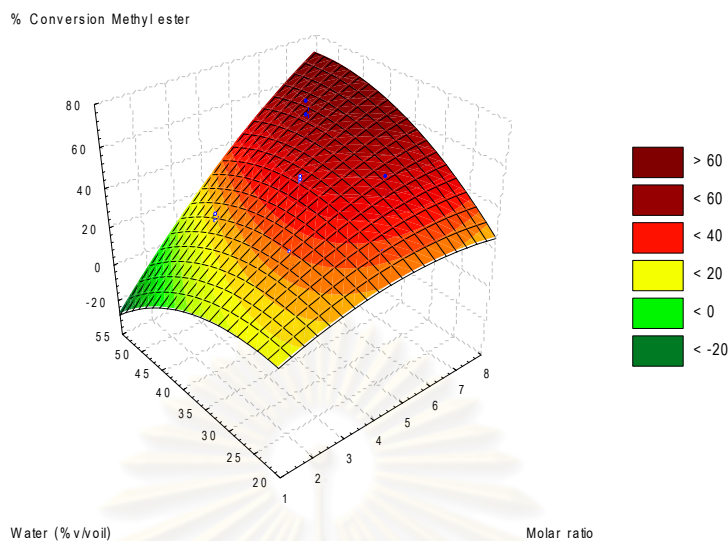
ภาพที่ 4.24 อันตรกิริยาระหว่างปริมาณน้ำกับปริมาณเอนไซม์โดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณซิลิกาเจลไว้ที่ระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

พิจารณาภาพอันตรกิริยาระหว่างปริมาณน้ำกับปริมาณเอนไซม์โดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณซิลิกาเจลไว้ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.24) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเมื่อปริมาณน้ำและเอนไซม์อยู่ในระดับกลางคือแม้ว่ามีปริมาณเอนไซม์สูงแต่หากมีปริมาณน้ำน้อยหรือมากเกินไปจะส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำที่เหมาะสมจะทำให้เอนไซม์ซึ่งอยู่ในสภาวะแห้งคืนสภาพร่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา (Mittelbach, 1990) แต่หากมีปริมาณน้ำมากเกินไปจะส่งผลให้เมทิลเอสเทอร์เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสย้อนกลับมาเป็นกรดไขมันอิสระได้ (Shimada และคณะ, 2002)



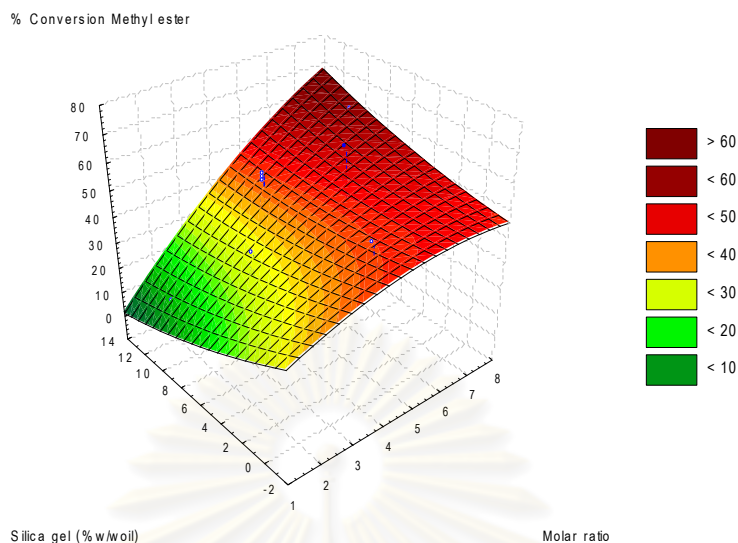
ภาพที่ 4.25 อันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับปริมาณเอนไซม์ โดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณน้ำอยู่ที่ระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

จากภาพอันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับปริมาณเอนไซม์ โดยกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณน้ำอยู่ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.25) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มีค่าสูงสุดเมื่อปริมาณเอนไซม์อยู่ระดับกลาง และปริมาณซิลิกาเจลอยู่ในระดับต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณซิลิกาเจลที่สูงขึ้นจะขัดขวางโอกาสสัมผัสระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง ส่วนปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นแล้วส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดลง อาจจะเป็นเนื่องจากเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพแห้งจำเป็นต้องการโมเลกุลของน้ำเพื่อคืนสภาพว่าง ซึ่งเหมือนคุณสมบัติของซิลิกาเจลที่สามารถดูดซับโมเลกุลน้ำ ทำให้เกิดการแย่งโมเลกุลของน้ำในระบบ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถคืนสภาพได้ทั้งหมดเมื่อมีทั้งปริมาณของเอนไซม์และซิลิกาเจลที่สูงในสภาพที่มีน้ำอยู่อย่างจำกัด (Wei และคณะ, 2005)



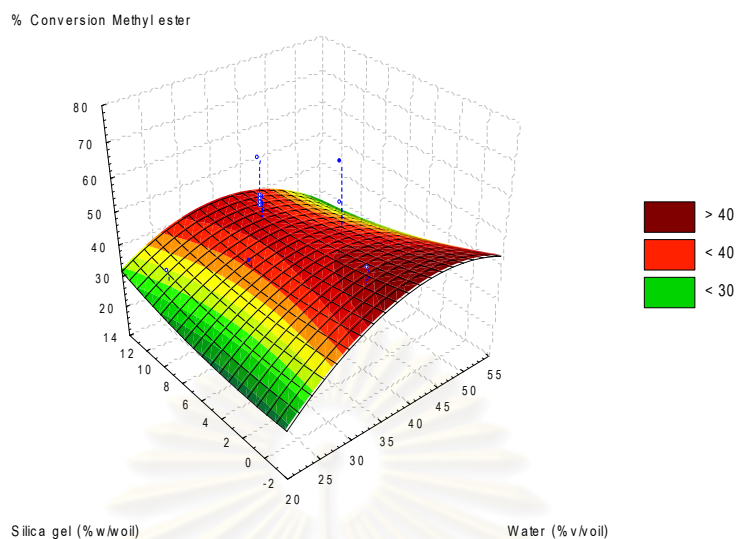
ภาพที่ 4.26 อันตรกิริยาระหว่างปริมาณน้ำกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล โดยกำหนดปริมาณเอนไซม์และปริมาณซิลิกาเจลไว้ที่ระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

ภาพอันตรกิริยาระหว่างปริมาณน้ำกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล โดยกำหนดปริมาณเอนไซม์และปริมาณซิลิกาเจลไว้ที่ระดับกลาง (ภาพที่ 4.26) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จะขึ้นอยู่กับอิทธิพลของค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็นหลัก คือปริมาณน้ำที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์น้อยมากเมื่อมีค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลสูงกว่า 1:6 แต่จะส่งผลมากขึ้นเมื่อค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลน้อยกว่า 1:6 ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำที่สูงขึ้นจะไปเจือจางปริมาณเมทานอลในปฏิกิริยา (Shah และ Gupta, 2007) แต่ปริมาณน้ำที่สูงขึ้นจะส่งผลดีเมื่อปริมาณเมทานอลในปฏิกิริยามีค่าสูงเนื่องจากจะไปช่วยละลายโมเลกุลของเมทานอลไม่ละลาย ซึ่งโมเลกุลของเมทานอลดังกล่าวจะไปทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ (Shimada และคณะ, 2002)



ภาพที่ 4.27 อันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลโดยกำหนดปริมาณเอนไซม์และปริมาณน้ำอยู่ในระดับกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

ภาพอันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลโดยกำหนดปริมาณเอนไซม์และปริมาณน้ำอยู่ในระดับกลาง (ภาพที่ 4.27) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จะขึ้นอยู่กับอิทธิพลของค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเป็นหลัก คือเมื่อค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลมีค่าสูงกว่า 1:6 ปริมาณซิลิกาเจลที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์น้อยมาก แต่ปริมาณซิลิกาเจลจะมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มากขึ้นเมื่อค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลมีค่าน้อยกว่า 1:6 เนื่องจากคุณสมบัติของซิลิกาเจลจะสามารถดูดซับโมเลกุลของเมทานอลเอาไว้ได้ (Wei และคณะ, 2005) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณซิลิกาเจลจะส่งผลให้ปริมาณเมทานอลในระบบมีน้อยลง แต่การเพิ่มปริมาณซิลิกาเจลจะส่งผลดีเมื่อมีปริมาณเมทานอลสูงเนื่องจากจะไปช่วยดูดซับโมเลกุลเมทานอลที่ไม่ละลายในปฏิกิริยา จึงลดความเสียหายของเอนไซม์จากการทำลายของโมเลกุลเมทานอลไม่ละลาย



ภาพที่ 4.28 อันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับปริมาณน้ำโดยกำหนดกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณเอนไซม์ไว้ที่ค่ากลางต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

เมื่อพิจารณาภาพอันตรกิริยาระหว่างปริมาณซิลิกาเจลกับปริมาณน้ำ โดยกำหนดกำหนดค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลและปริมาณเอนไซม์ไว้ที่ค่ากลาง (ภาพที่ 4.28) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มีค่าสูงสุดเมื่อปริมาณน้ำอยู่ระดับกลางและปริมาณซิลิกาเจลอยู่ในระดับต่ำ คือการเพิ่มขึ้นของปริมาณซิลิกาเจลจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มีค่าลดลง เนื่องจากคุณสมบัติของซิลิกาเจลในการดูดซับโมเลกุลของน้ำซึ่งหากมีปริมาณมากเกินไปจะดูดซับโมเลกุลของน้ำและเมทานอลในปฏิกิริยาทำให้มีปริมาณน้ำและเมทานอลในระบบมีน้อย ซึ่งหากมีปริมาณน้ำที่น้อยเกินไปจะส่งผลต่อรูปร่างของเอนไซม์ที่อยู่ในสภาวะแห้งอาจจะไม่สามารถคืนรูปได้ทั้งหมด แต่หากมีปริมาณน้ำมากเกินไปจะทำไปเจือจางปริมาณเมทานอลในปฏิกิริยา ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาน้อยลง

จากภาพอิทธิพลหลักก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำและซิลิกาเจลไม่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์นั้น เมื่อมาพิจารณาภาพอันตรกิริยาทั้งหมดทำให้ทราบว่าทั้งปัจจัยของปริมาณน้ำและปริมาณซิลิกาเจลส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งขัดแย้งกับภาพแสดงอิทธิพลหลัก ดังนั้นในการทดลองจึงไม่สามารถตัดตัวแปรของปริมาณน้ำและซิลิกาเจลออกได้ จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยฟังก์ชัน Response Optimizer ทำให้ได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของทั้งสี่ปัจจัยที่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ดังนี้ ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 95 ยูนิต อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมัน

ปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:7.5 ปริมาณน้ำเท่ากับ 50.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรน้ำมัน และปริมาณซิลิกาเจลเท่ากับ 16.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน โดยมีค่าการทำนาย เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ไว้ที่ 97.49 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้ค่าปัจจัยที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการพิสูจน์ค่าเพื่อยืนยันผลของค่าการทำนาย ซึ่งได้ทำการทดลองทั้งสิ้น 5 ซ้ำ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ 69.57 ± 1.09 ซึ่งต่ำกว่าค่าการทำนายถึง 28.63 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยที่ผ่านมา Nelson และคณะ (1996) รายงานว่าไลเพสจาก *C. antarctica* สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ ขณะที่จะมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์เหลือเพียง 19.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยาในระบบที่ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์ Boutur และ คณะ (1995) ใช้ไลเพสจาก *C. deformans* เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ในระบบปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ 58 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Okumura และคณะ (1979) รายงานว่าไลเพสจาก *G. candidum* มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ 62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ในระบบที่ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าจะพบว่าไลเพสจากยีสต์ SRY14-3 มีศักยภาพในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ในระบบที่ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อย่างยิ่ง

4.6.2.2. การศึกษาแนวทางการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์จากสภาวะที่เหมาะสม

4.6.2.2.1 การศึกษารูปแบบการเติมเมทานอล

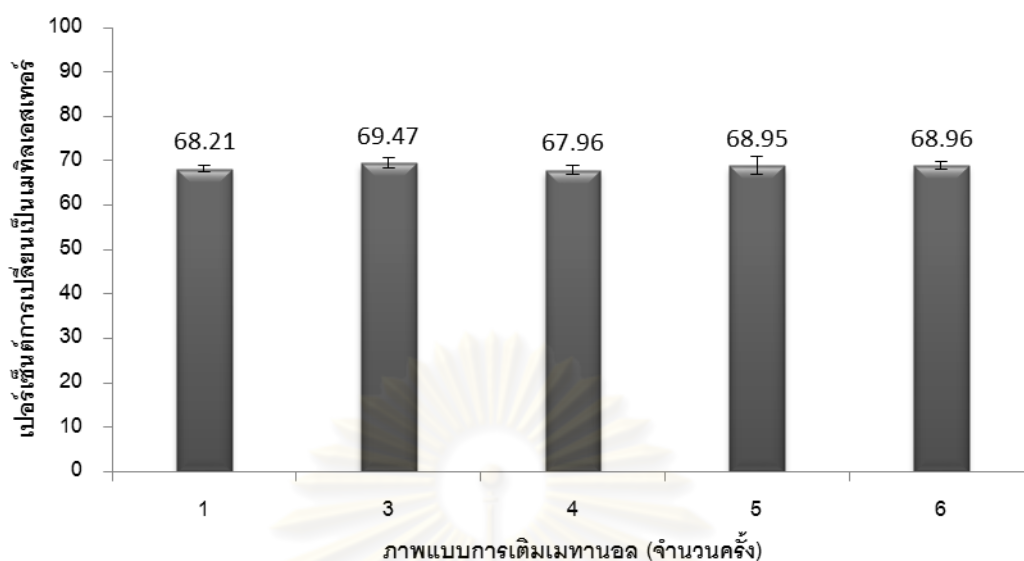
จากเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ต่ำกว่าค่าการทำนายมาก จึงได้ศึกษาแนวทางที่จะเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ โดยจากรายงานก่อนหน้าพบว่า ในปฏิกิริยาที่มีปริมาณเมทานอลสูงนั้นจะเกิดโมเลกุลเมทานอลที่ไม่ละลายจำนวนมากขึ้น ซึ่งเมทานอลประเภทจะทำลายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างมาก (Watanabe และคณะ, 2002) ซึ่งการแก้ไขปัญหาในส่วนนี้ส่วนใหญ่มักนิยมใช้การแบ่งเติมเมทานอลออกเป็นระยะเพื่อลดผลกระทบระหว่างเมทานอลต่อเอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสียสภาพน้อยลง โดยจากสภาวะที่เหมาะสมพบว่าค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลสูงถึง 1:7.5 การแบ่งเติมเมทานอลเพียง 3 ครั้ง (ครั้งละ 2.5 มิล) อาจทำให้ปริมาณเมทานอลต่อครั้งมีปริมาณสูงส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพได้

การทดลองนี้จึงศึกษารูปแบบการเติมเมทานอลที่เหมาะสมโดยคาดว่าจะสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้

ผลการทดลองพบว่าการเติมเมทานอลเพียงครั้งเดียวตอนเริ่มต้นปฏิกริยามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 68.21 ± 0.65 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อแบ่งการเติมเมทานอลเป็น 3, 4, 5 และ 6 ครั้งในระยะเวลาและปริมาณที่เท่ากันพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 69.47 ± 1.14 , 67.96 ± 0.90 , 68.95 ± 1.97 และ 68.96 ± 0.84 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.29) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นรูปแบบการเติมเมทานอลทั้งห้าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และรูปแบบการเติมเมทานอลไม่สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้

จากผลการทดลองพบว่าไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ SRY14-3 สามารถทำงานได้ในปฏิกริยาที่มีเมทานอลสูงมากได้ (ครั้งละ 7.5 โมล) ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Kamini และคณะ (2000) ที่ใช้ไลเปสจาก *Cryptococcus* sp. S-2 ในการเร่งปฏิกริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ โดยเติมเมทานอลที่อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:4 เพียงครั้งเดียวในตอนเริ่มปฏิกริยา บ่มปฏิกริยา 120 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 80.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้งานวิจัยส่วนใหญ่มักแก้ปัญหาโครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายด้วยเมทานอล โดยการใช้แอลกอฮอล์ชนิดอื่นเช่น เอทานอล โพรพานอล บิวทอล มาทดแทนเนื่องจากแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนสูงขึ้นไปจะสามารถละลายกับน้ำมันได้มากขึ้นเกิดโมเลกุลแอลกอฮอล์ที่ไม่ละลายน้ำน้อยลงจึงไม่ส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์มากนัก แต่เมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจของปัจจุบันจะพบว่าเมทานอลยังคงเป็นแอลกอฮอล์ที่มีความเป็นไปได้ทางเศรษฐกิจมากที่สุด (Abigor และคณะ, 2000; Nouredдини และคณะ, 2005)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.29 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์เมื่อแปรผันจำนวนครั้งของการเติมเมทานอล

4.6.2.2.2 ผลของการกำจัดกลีเซอรอลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์

อีกหนึ่งปัจจัยหลักที่มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยไลเพสคือ ปริมาณกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของกลีเซอรอลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ โดยกำจัดกลีเซอรอลออกจากปฏิกิริยาด้วยการปั่นเหวี่ยงแล้วทำการล้างสารละลายส่วนบนด้วยน้ำกลั่นเพื่อเป็นการกำจัดกลีเซอรอลออกจากสารละลายจากนั้นจึงทดลองนำสารละลายที่ได้มาทำปฏิกิริยาซ้ำในสภาวะเดิม จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์มีค่าเท่า 62.45 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 12 ก่อนกำจัดกลีเซอรอล และเพิ่มขึ้นเป็น 88.92 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 24 หลังการกำจัดกลีเซอรอลในชั่วโมงที่ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ไม่มีการกำจัดกลีเซอรอล) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 68.84 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.16) แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงเป็นเมทิลเอสเทอร์ ทั้งนี้เนื่องจากโมเลกุลของกลีเซอรอลจะขัดขวางการจับตัวของสารตั้งต้น ณ บริเวณเร่งปฏิกิริยาของไลเพสจึงเกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง (Yuanyuan และคณะ, 2003; Dossat และคณะ, 1999)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในตารางที่ 4.16 พบว่าเมื่อมีการกำจัดกลีเซอรอลออก ปริมาณของ 1,3-DAG และ 1,2-DAG จะลดลงเล็กน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณในขั้นตอนก่อนการกำจัดกลีเซอรอล แสดงให้เห็นว่าไลเพสจากยีสต์ SRY14-3 ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งในโมเลกุลของน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่รายงานว่าไลเพสจากยีสต์ส่วนใหญ่จะไม่มี ความจำเพาะต่อตำแหน่งในโมเลกุลของน้ำมัน (Macrae และคณะ, 1983)

ตารางที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เมื่อมีการกำจัดกลีเซอรอล

องค์ประกอบในปฏิกิริยา	ชั่วโมงที่ 0 (mM)	ชั่วโมงที่ 12 (ก่อนกำจัดกลี เซอรอล, mM)	ชั่วโมงที่ 24 (หลังกำจัดกลี เซอรอล, mM)	ชั่วโมงที่ 24 (ไม่มีการกำจัดกลี เซอรอล, mM)
FAME	0	16.76	30.98	21.96
FFA	9.50	1.4	0.1	1.29
TAG	0	3.342	3.5	3.24
1,3-DAG	0.207	0.17	0	0.18
1,2-DAG	0.127	0.871	0.03	1.01
MAG	0.24	0.45	0	0.45
%conversion methyl ester	0 %	62.45%	88.92%	68.84%

4.6.2.2.3 ผลของชนิดของกรดไขมันในน้ำมันต่อเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์

เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันของไลเปสจากยีสต์ SRY14-3 จึงเลือกใช้น้ำมันชนิดต่างๆ ที่มีอัตราส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวแตกต่างกันไป มาเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกรดไขมัน (parkon และคณะ, 2008) สามารถแบ่งน้ำมันออกได้เป็น 3 รูปแบบ (ตารางที่ 4.17) คือ รูปแบบที่ 1 มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันงา น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันคาโนลา น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันดอกคำฝอย รูปแบบที่ 2 มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวใกล้เคียงกับกรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ น้ำมันปาล์ม และรูปแบบที่ 3 มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัว ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันในรูปแบบที่ 1 และ 2 จะมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ระหว่าง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งหมดในน้ำมัน ขณะที่น้ำมันมะพร้าวมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เพียง 33.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมดในน้ำมัน (94.37 เปอร์เซ็นต์) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่าการปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยไลเปสจาก SRY14-3 มีความจำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว และจำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดเท่านั้น

ตารางที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันชนิดต่างๆ

ชนิดน้ำมัน	กรดไขมันอิ่มตัว	กรดไขมันไม่อิ่มตัว	เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์*
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	26.6	72.9	82.79 %
น้ำมันงา	14.66	85.37	90.19%
น้ำมันสบู่ดำ	24.38	76.8	90.92%
น้ำมันข้าวโพด	16.15	83.88	85.12%
น้ำมันมะกอก	14.22	85.82	88.15%
น้ำมันรำข้าว	22.88	77.15	83.68%
น้ำมันถั่วเหลือง	14.07	85.97	89.15%
น้ำมันคาโนลา	7.61	92.38	89.72%
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	10.39	89.64	89.03%
น้ำมันดอกคำฝอย	9.12	90.91	90.23%
น้ำมันปาล์ม	43.79	56.63	86.16%
น้ำมันมะพร้าว	94.37	5.66	33.04%

* สภาวะของปฏิกิริยาปริมาณแอนไฮม์เท่ากับ 95 ยูนิต (10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน) อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:7.5 ปริมาณน้ำเท่ากับ 50.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรน้ำมัน และปริมาณซิลิกาเจลเท่ากับ 16.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที กำจัดกลีเซอรอลในชั่วโมงที่ 12 และทำปฏิกิริยาในสภาวะเดิมจนครบ 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณต่างๆ บนเกาะสี่ซึ่งจำนวนทั้งสิ้น 14 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งสิ้น 49 ไอโซเลต โดยพบว่ามียีสต์เพียง 17 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตไลเพสได้ โดยยีสต์ไอโซเลต SRY14-3 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 2.304 ± 0.104 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเท่ากับ 17.84 ± 0.79 และ 25.27 ± 1.31 ตามลำดับ เมื่อนำยีสต์ SRY 14-3 มาทำการจัดจำแนกสปีชีส์พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกได้ด้วย การทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบ API 20C AUX

จากนั้นได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำมันเมล็ดฝ้าย 1.44 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัด 1.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร น้ำตาลซูโครส 1.40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โฟแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน โดยจะได้ค่าแอกทิวิตีไฮโดรไลซิสสูงสุดเท่ากับ 4.85 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้น 2.1 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดิม

ไลเพสมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 โดยสามารถคงตัวที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และช่วงความเป็นกรดต่างระหว่าง 3-9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อทดลองนำไลเพสมาเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชุกการ์แพตตีแอสิดเอสเทอร์พบว่า น้ำตาลฟรักโทสและปาล์มมิติกแอสิดเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.95 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้สูงถึง 88.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำน้ำมันปาล์มและเมทานอลเป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 95 ยูนิตต่อน้ำมัน 3 กรัม อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอลเท่ากับ 1:7.5 ปริมาณน้ำเท่ากับ 50.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรน้ำมัน และปริมาณซิลิกาเจลเท่ากับ 16.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำมัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที โดยกำจัดกลีเซอรอลในชั่วโมงที่ 12 และทำปฏิกิริยาในสภาวะเดิมจนครบ 24 ชั่วโมง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. สถิติการเกษตรของประเทศ
ไทย ปี 2549[online]. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/>[17
มีนาคม 2551

คณะกรรมการกิจการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล.
พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : แปลน พรินท์ติ้ง.

ปารเมศ ชูติมา. 2545. การออกแบบการทดลองทางวิศวกรรม. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ภาษาอังกฤษ

Abigor, R. D., Uadia, P. O., Foglia, T. A., Haas, M. J., Jones, K. C., Okpefa, E., Obibuzor,
J. U., and Bafor, M. E. 2000. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from
some Nigerian lauric oils. Biochemical Society Transactions. 28: 979–981.

Açıkela, Ü., Ersana, M., and Sag Açıkela, Y. 2010. Optimization of critical medium
components using response surface methodology for lipase production by
Rhizopus delemar. Food and Bioproducts Processing. 88: 31-39.

Alexander, M. K. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water?.
Trends in Biotechnology. 15: 97-101.

Alonso, F. O. M., Oliveira, E. B. L., Dellamora-Ortiz, G. M., and Pereira-Meirelles, F. V.
2005. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen
levels. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 22: 9–18.

Amund, O. O., and Adebisi, A. G. 1991. Effect of viscosity on the biodegradability of
automotive lubricating oils. TribolIntern 24: 235–237.

Benjamin, S., and Pandey, A. 2001. Isolation and characterization of three distinct forms
of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. Brazilian
Archives of Biology and Technology. 44: 213-221

Boer, E., Bode, R., Gellissen, G., and Kunze, G. 2005. An extracellular lipase from the
dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: molecular cloning of the ALIP1 gene and
characterization of the purified recombinant enzyme. Yeast. 22 : 523-535

- Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S. H. 2002. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends in Biotechnology. 20: 433–437.
- Boutur, O., Dubreucq, E., and Galzy, P. 1995. Factors influencing ester synthesis catalysed in aqueous media by the lipase from *candida deformans* (zach) langeron and Guerra. Journal of Biotechnology. 42: 23-33
- Bundit. B. 1999. Effect of metal ions, inhibitors and denaturants on extracellular lipases from three thermophile isolates and their clones. Chaing Mai Journal of Science. 26:1-11
- Branwal, B. K., and Sharma, M. P. 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Renewable & Sustainable Energy. 9 : 363-378.
- Cardenas, F., de Castro, M. S., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, j. V., Valmaseda, M., Elson, S. W., and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipase: catalytic activity in reactions in organic media. Enzyme and Microbial Technology. 28 : 145-154.
- Cardinal, E., and Hedrick, L. 1948. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. The Journal of Biological Chemistry. 172:609-612
- Chien-Hung, L., Wei-Bin, L., and Jo-Shu, C. 2006. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. By response surface methodology. Process Biochemistry. 41, 9: 1940-1944.
- Chulalaksananukul, S., Chulalaksananukul, W., Rodriquez, P.L., and Combes, D. 2002. Long-term continuous synthesis of geranyl acetate in a column reactor with an immobilized lipase. Thai Journal of Agricultural Science 35: 9-16.
- Dalmau, E., Montesinos, J. L., Lotti, M., and Casas, C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme and Microbial Technology 26: 657- 663.
- Dharmstithi, S., and Ammaranond, P. 1997. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). Biotechnology and Applied Biochemistry. 26: 111-116.

- Dong, W., Yan, X., and Tianyu, S. 2008. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. Biochemical Engineering Journal.41: 30-37
- Dossat, V., Combes, D., and Marty, A. 1999. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. Enzyme and Microbial Technology 25: 194-200.
- Elibol, M., and Ozer, D. 2001. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochemistry. 36, 4: 325-329
- Essamri, M., and Deyris, V. 1998. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. Journal of Biotechnology. 60: 97-103
- Fadilo, S. G., and Osman, E. 2002. Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by *Candida rugosa*. Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences. 26: 249 – 254.
- Fickers, P. H., Benetti, Y. W., Marty, A., Mauersberger S., Smit, M.S., and Nicaud, J. M. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential. Applications FEMS Yeast Research. 5: 527–543
- Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. Review - Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92,5: 405-416.
- Gordillo, L., Valero, M. A., Lafuente, F., Solà, J., and Valdman, B. 1997. Improvement of lipase productivity in fermentation processes using a structured mathematical model. Journal of Biotechnology.52: 207–218.
- Gupta, N., Shai, V., and Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. Process Biochemistry. 42, 2: 518–526.
- Held, P., and Hurley, J. 2001. Determination of Total Protein by the Lowry Method Using the Biotek Instrument's ELx808 Microplate Reader. BioTek instruments.

- Heravi, K.M., Eftekhari, F., Yakhchali, B., and Tabandeh, F. 2008. Isolation and identification of a lipase producing *Bacillus* sp. from soil. Pakistan Journal of Biological Sciences.11: 740- 745.
- Izumi, T., Nakamura, K., and Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agricultural Biology and Chemistry. 54: 1253-1258
- In S. Y., Sang J. P., and Hyon H. Y. 2007. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. Journal of Industrial and Engineering Chemistry.13 : 1-16.
- Iwatsu, T., and Udogawa, S. 1988. *Hortaea werneckii* isolated from sea water. Japanese Journal of Medical Mycology.29: 142-5.
- Janssen, P. H., Colin, R. M., and Hugh, W. M. 1994. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. FEMS Microbiology Letters. 120 : 195-200
- Jaeger, K. E., and Reetz, T. M. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnology. 16 : 396-403.
- John, M. L., Coy, C., and Brooks, R. 1979. Amino acid and fatty acid composition of cane molasses. Journal of the Science of Food and Agriculture . 30:429-432
- Kademi, A., Lee, B., and Houde, A. 2003. A production of heterologous microbial lipases by yeasts. Indian Journal of Biotechnology. 2,3 : 346-355.
- Kakugawa, K., Masahiro, T., Kunihiro, I., Keiko, M., Shozo, M., Yuki, M., Osamu, S., and Tokichi, M. 2002. Isolation of Yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11, Novel Producer of Mannosylerythritol Lipid. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 66: 188-191
- Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process Biochemistry. 36 : 317-324.
- Kazlauskas, R.J. 1994. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases:prospects for predicting and engineering catalytic properties. Trends in Biotechnology. 12:464-472.

- Kazlauskas, R. J., and Bornscheuer, U. T. 1998. Biotransformations with lipases. In Biotechnology and Biotransformations with Lipases. Vol. 8. 37-192.
- Kennedy, J. F., Harish, K., Parmjit, S. P., Satwinder, S. M., Rita, G., Anupama, P., and Sukhwinder K. 2006. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 81: 866–876
- Khaled, N., Montet, D., Pina, M., and Graille, J. 1991. Fructose oleate synthesis in a fixed bed catalyst bed reactor. Biotechnology Letters. 13: 167–172.
- Köse, Ö., Tüter, M., and Ayse Aksoy, H. 2002. Immobilized *Candida Antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. Bioresource technology. 83 : 125-129.
- Kouker, G., and Jaeger, K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology. 53: 211-213.
- Kok, R. G., van, J. J., Nugteren, R., Vosman, B., and Hellingwerf, K.J. 1995. Characterization of lipase-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: identification of a periplasmic lipase chaperone essential for the production of extracellular lipase. The Journal of Bacteriology. 177: 3295-3307
- Krishnaswamy, M., Subbuchettiar, G., Thiengungal, K. R., and Panchaksharam, S. 2008. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current Scienc. 94 : 405-416.
- Ku, M. A., and Hang, Y. D. 1995. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssochlamys fulva*. Biotechnology Letters. 17: 1081–1084.
- Kumar, S. S., and Gupta, R. 2008. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. Process Biochemistry 43: 1054-1060
- Lotti, M., and Alberghina, L. 2000. *Candida rugosa* lipase: from molecular evolution analysis to the design of a synthetic gene. Protein Engineering in Industrial Biotechnology. 2: 63-74.
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification oils and fats. Journal of American oil Chemists' Society. 60 : 291-294.

- Macrae, A. R., and Hammond, R. C. 1985. Present and future applications of lipases. Biotechnology Genetic and Engineering Review. 3: 193-217.
- Maia, M.M.D., Heasley, A., Camargo de Morais, M.M., Melo, E.H.M., Morais, Jr. M.A., Ledingham, W.M., and Lima Filho, J.L. 2000. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology. 76 : 23-27.
- Masse, L., Kennedy, K. J., and Chou, S. P. 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 79: 629-635.
- Mittelbach., M. 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. Journal of the American Oil Chemists' Society.67: 168–170.
- Nelson, L. A., Foglia, T. A., and Marmer W. N. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. Journal of the American Oil Chemists' Society.73: 1191-1195,
- Nielson, P.M., Brask, J., and Fjerbaek, L. 2008. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. European Journal of Lipid Science and Technology. 110: 692-700.
- Noureddini, H., Gao, X., and Philkana, R.S. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technology. 96: 769-777
- Novozymes. 2008. PRODUCTS & SOLUTIONS: NOVOZYM® 435 [online]. แหล่งที่มา: <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Oils+and+fa+ts/Oil+based+specialties/Novozym+435/Novozym+435.htm> [17 มีนาคม 2551]
- Oguntimein, G.B., Oguntimein, H.E., and Rolf, D.S. 1993. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvent. Biotechnology Letters. 15 : 175–180
- Oishi, H., Morimoto, T., Watanabe, Y., and Tamai, Y. 1999. Purification and Characterization of Phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and Cloning of Phospholipase B gene. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.63: 68-76
- Okumura, S., Iwai, M., and Tsujisaka, Y. 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. Biochimica et Biophysica Acta. 575: 156-65

- Okpokwasili G. C., and James W.A. 1995. Microbial contamination of kerosene, gasoline, and crude oil and their spoilage potentials. Material u Organismen 29:147–15
- Osório, N.M., Fonseca, M.M.R., and Ferreira-Dias, S. 2006. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors. European Journal of Lipid Science and Technology. 108: 545–553.
- Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., and Minoda, Y. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. Agricultural Biology and Chemistry 46: 2885–2893
- Pabai, F., Kermasha, S., and Morin, A. 1996. Use of continuous culture to screen for lipase-producing microorganisms and interesterification of butterfat by lipase isolates. Canadian Journal of Microbiology. 42: 446-452.
- Pakorn, W., Chutima, K., Kingkaew, P., Supalak, T., Weerasak, T., Warawut, C., and Tikamporn, Y. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. Biomass and Bioenergy. 32, 2: 1279-1286.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnology and Applied Biochemistry. 29,2 :119-131.
- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D., and Macris B. J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotechnology Letters. 14, 5: 397-402.
- Patil, D. R., Rethwisch, D. G., and Dordick, J. S. 1991. Enzymatic synthesis of sucrose containing linear polyester in nearly anhydrous organic media. Biotechnology and Bioengineering. 37: 639–646.
- Pinto, A. C., Guarieiro, L. L. N., Rezende, M. J. C., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A., Pereira, P. A. P., and Andrade, J. B. 2005. Biodiesel: An Overview. Journal of the Brazilian Chemical Society. 16 : 1313-1330.
- Pleiss, J., Fischer, M., and Schmid, R.D. 1998. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. Chemistry and Physics of Lipids. 93: 67-80.

- Potumarthi, R., Subhakar, C., Vanajakshi, J., and Jetty, A. 2008. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa*-MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium. Applied Biochemistry and Biotechnology.151: 700-710
- Rajendran, A., and Thangavelu, V. 2009. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. LWT - Food Science and Technology. 42:985-992
- Rani, C., and Panneerselvam, A. 2009. Influence of environmental and nutritional parameters on lipase production. Agricultural and Biological Science. 4: 145-150.
- Redondo, O., Herrero, A., Bello, J. F., Roig, M. G., Calvo, M. V., Plou, F. J., and Burguillo, F. J. 1995. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid *p*-nitrophenyl esters in mixed micells with triton X-100. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1243 : 15-24.
- Rekha, K., Saurabh, S., Jasmine, I., and Saxena, R.K. 2006. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 40:121-126
- Roberta, B., Alexandre, M., Fuentesfriaa, E., Leonardo, B., Michaela, S., Patricia, V., Augusto, S., and Marilene, H. V. 2010. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. Bioresource Technology. 101:268-275
- Sailas, B., and Ashok, P. 1996. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. Bioresource Technology. 55 : 167-170
- Saoussen, T., Atef, A., Néjib, C., Frederic, W., Philippe, T., and Héla, K. 2009. An Enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* . Applied Biochemistry and Biotechnology.160, 5: 1371-1385.
- Schmidt, R. D., and Verger, R. 1998. Lipase: Interfacial enzymes with attractive applications. Angewandte Chemie (International ed. in English). 37 : 1608-1633.

- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., and Schmid, R. D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochimica et biophysica acta, L. Lipids and lipid metabolism. 1214 : 43-53.
- Shah, S., and Gupta, M. N. 2007. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. Process Biochemistry.42: 409–414
- Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances. 19: 627–662.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., and Tominaga, Y. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76: 789-793.
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel reduction and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17 : 133-142.
- Shirakawa, M. A., Gaylarde, C. C., Gaylarde, P. M., John, V., and Gambale, W. 2002. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. FEMS Microbiol Ecology. 39:165-73.
- Shu, W. C., and Jee F. S. 2009. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. New Biotechnology. 09 : 512-520.
- Song, Q. X., Lin, J. P., Rong, Y. P., and Wei, D.Z. 2001. Studies on lipase production from *Candida rugosa*. Chinese Journal of Biotechnology. 171: 101-104.
- Sztajer, H., and Bryjak, M. 1989. Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase. Bioprocess and Biosystems Engineering. 4, 6: 257-259
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H., and Kobayashi, S. 2001. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. Chemistry Letter. 6 : 492-493.
- Tsujiyama, Y., Iwai, M., Fukumoto, J., and Okamoto, Y. 1973. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum*. Agricultural Biology and Chemistry. 37: 837–842

- Venkateshwarlu, N., and Reddy, S. M. 1993. Production of lipase by five thermophilic fungi. Indian Journal of Microbiology. 33, 2: 119-124.
- 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.
- Walter, O., Sydney, M., Augusto, S., and Marilene, H. 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Process Biochemistry. 40:321-326
- Wang, L., Du, W., Liu, D, Li, L., and Dai, N. 2006. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 43: 29-32.
- Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y. 2002. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 17: 151-155.
- Wei, D., Yuan-Yuan, X., De-Hua, L., and Ze-Bo, L. 2005. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.37: 68-71
- Wong, D. W. S. 1995. Food Enzyme Structure and Mechanism. New York : Chapman & Hall.
- Wu, X. Y., Jääskeläinen, S., and Linko, Y. Y. 1996. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. Enzyme Microbial Technology. 19: 226-231.
- Yao, Q. H., and Tian, W. T. 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 43:9-14
- Yuanyuan, X., Wei, D., Dehua, L., and Jing, Z. 2003. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. Biotechnology Letters. 25: 1239-1241

- Yuji, S., Yomi, W., Akio, S., and Yoshio, T. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.17: 133-142
- Zheng, C. , Zhou, J., Wang, J., Wang, J., and Qu, B. 2008. Isolation and characterization of a nitrobenzene degrading yeast strain from activated sludge. Journal of Hazardous Materials. 160:194-199
- Zhenming, C., Fang, W., Zhe, C., Lixi, Y., Guanglei, L., and Tong, Z. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. Applied Microbiology and Biotechnology. 82: 793-804.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง YM (YM Agar)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5	กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	10	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว YM (YM Broth)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5	กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	10	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. YMA + Rhodamine B

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5	กรัม
เปปโตเน (Peptone)	5	กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	10	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1	ลิตร
วุ้นผง (Agar powder)	20	กรัม
โรดามีนบี (Rhodamine B)	0.001เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)	
น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	1เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร)	

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวสูตร Lipase production medium

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)	1เปอร์เซ็นต์	(น้ำหนักโดยปริมาตร)

ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 5.3 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

1.1. สารละลายไบยูเรต (Biuret reagent)

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

1.2. สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)

สารละลายฟอลินฟีนอลรีเอเจนท์	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

2. สารละลายตรวจวัดค่าแอกทิวิตีของไลเปส

2.1. สารละลาย A

พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตต (<i>p</i> -nitrophenyl palmitate)	6	มิลลิกรัม
2-โพรพานอล (2-propanol)	10	มิลลิลิตร

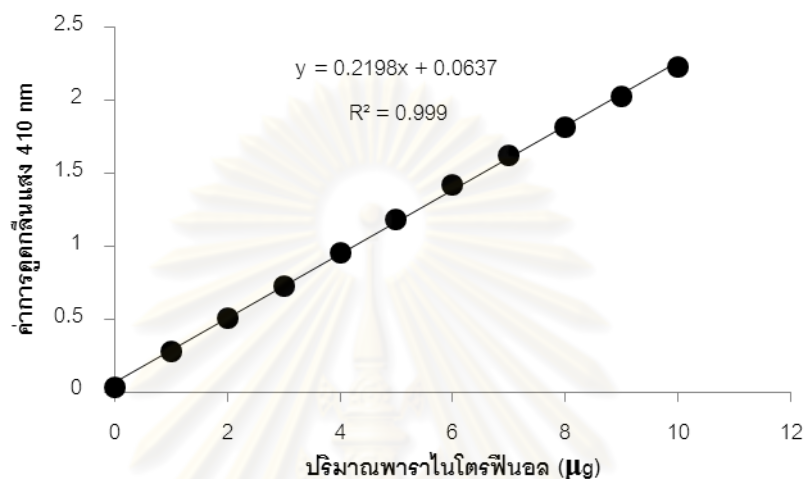
2.2. สารละลาย B

ไตรตอน เอกซ์-100 (Triton x-100)	0.8	กรัม
กัม อาระบิก (Gum Arabic)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ภาพมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟินอลที่ปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม



ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟินอล

1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟินอล 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย
2. ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟินอล จากข้อ 1 น้ำกลั่น และ 0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นต่าง 7 ลงใน well microplate ตามตารางด้านล่าง

พาราไนโตรฟินอล (ไมโครกรัม)	พาราไนโตรฟินอล	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
		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

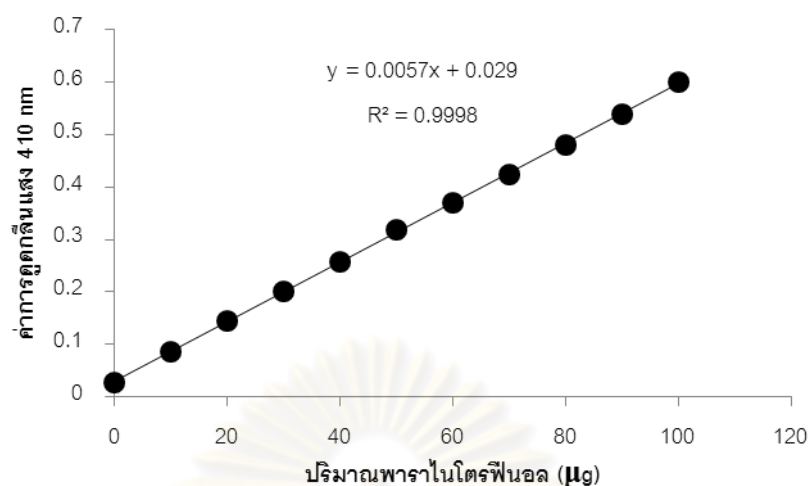
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm
- ค่าที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพาราไนโตรฟินอลและค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm

การตรวจสอบค่า Lipase activity ในสารตัวอย่าง

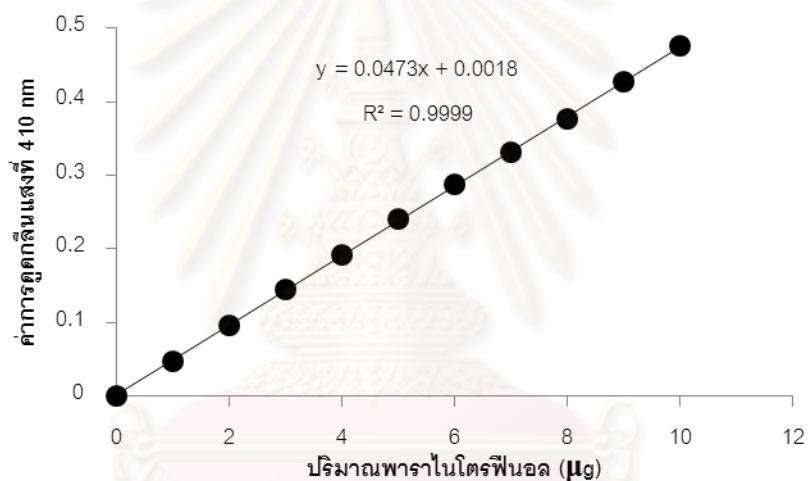
- เตรียมสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วยพาราไนโตรฟินิลปาล์มมีเทต 180 มิลลิกรัม ละลายใน isopropanol 30 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย triton X-100 0.8 เปอร์เซ็นต์ และ gum arabic 0.2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่น
- จากนั้นเปิดสารละลายต่างๆลงใน well microplate ตามตารางด้านล่าง ดังนี้

สารละลาย	ความเข้มข้น สุดท้าย (มิลลิโมลาร์)	ทดลอง	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
			ควบคุม (ไม่เติมสารตั้งต้น)	ควบคุม (ไม่เติมไลเปส)
สารละลาย A				
pNPP 180 มก.	0.7152	9	0	9
2-propanol 30 มล.				
สารละลาย B				
triton X-100 0.8%		81	81	81
gum arabic 0.2%				
0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7	50	50	50	50
น้ำกลั่น		40	49	60
สารตัวอย่าง		20	20	0
ปริมาตรรวมทั้งหมด		200	200	200

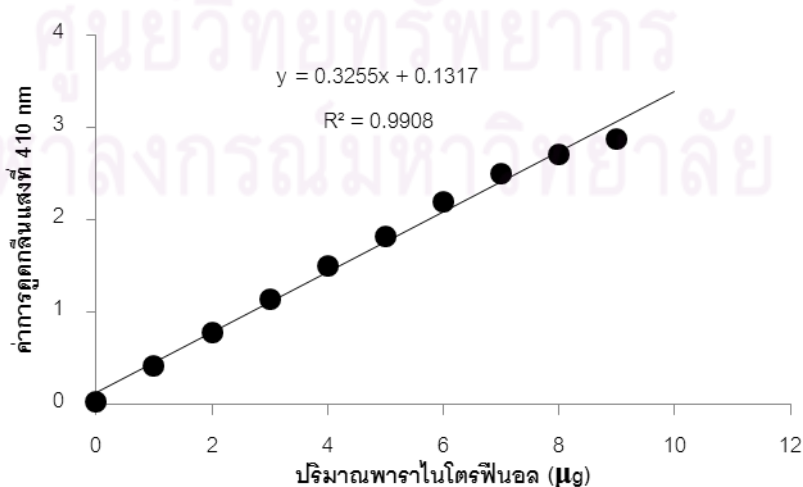
- ป่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟินอลต่อไป



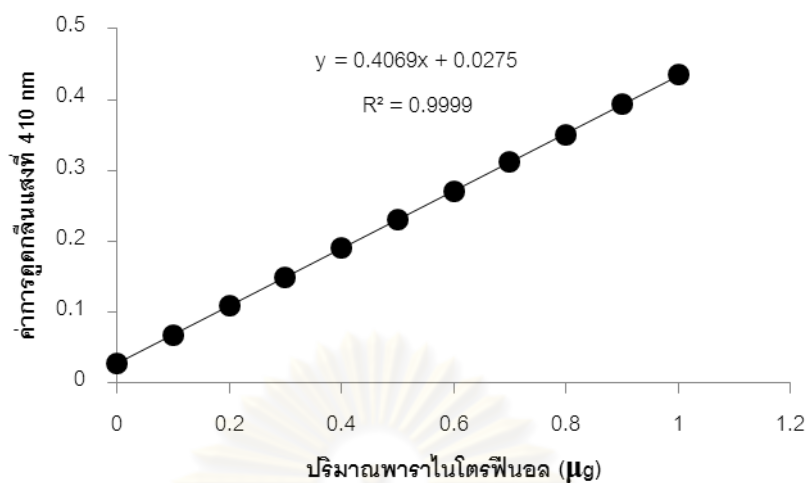
ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.0



ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.0



ภาพที่ ค-4 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 8.0



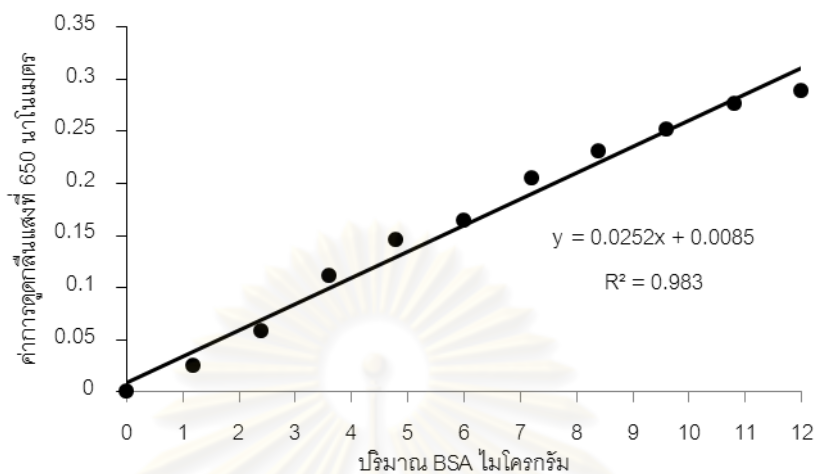
ภาพที่ ค-5 กราฟมาตรฐานของพาราไทรเฟนอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 9.0



ภาพที่ ค-6 กราฟมาตรฐานของพาราไทรเฟนอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 10.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ภาพมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม



ภาพที่ ค-7 กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม

วิธีการทำภาพมาตรฐานโปรตีน BSA

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานในข้อ 1 ลงใน well ของ microplate ให้ได้ปริมาณ 0, 1, 2.5, 5, 10 ไมโครกรัมต่อ well ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น โดยให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละ well เป็น 100 ไมโครลิตร
3. เติมสารละลาย Biuret reagent 200 ไมโครลิตร
4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที
5. เติมสารละลาย folin&ciocalteu reagent จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อ well ผสมให้เข้ากันทันทีโดยการ repeated pipeting
6. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี 30 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm โดยมี blank เป็นหลอดที่มีน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว
8. สร้างภาพมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA (ug) กับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm

ภาคผนวก ง

การคำนวณ

1. การคำนวณค่าแอกทิวิตี

วิธีคำนวณทำโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดตามวิธีในหัวข้อ 2.2 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากภาพมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล ตามสมการดังนี้

$$Y = 0.1849X + 0.0523$$

โดยทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะทำให้ได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณของพาราไนโตรฟินอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา จากนั้นทำการเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัมเป็นไมโครโมลโดยการหารด้วยมวลโมเลกุลของพาราไนโตรฟินอล ซึ่งเท่ากับ 139.11 แล้วหารด้วยปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ในการวัด ปรับหน่วยให้เป็นต่อมิลลิลิตร เช่นในกรณีที่ใช้สารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรในการวัด ก็ทำการหารด้วย 20 และคูณด้วย 1000 จะได้หน่วยเป็นไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และสุดท้ายหารด้วยเวลาที่ใช้เกิดปฏิกิริยา 30 นาที จะได้หน่วยสุดท้ายเป็นหน่วย ไมโครโมล ต่อมิลลิลิตร ต่อนาที หรือหน่วยยูนิตนั่นเอง

2. การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

วิธีคำนวณทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดตามวิธีในหัวข้อ 2.3 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากภาพมาตรฐานของ BSA ตามสมการดังนี้

$$Y = 0.0288 + 0.0329$$

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

3. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ทำได้โดยแทนค่าที่ได้จากฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในสมการ

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

เมื่อ %conversion คือ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

[FAME] คือ ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากโครมาโทแกรม

[TAG] คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

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

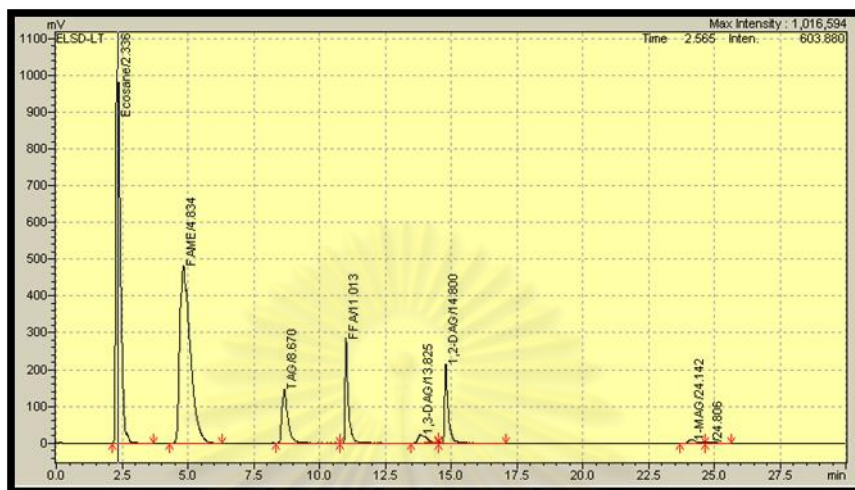
[1,2 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1,2 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[MAG] คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างการคำนวณ จากการทดลองเรื่องการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไลเปส



ภาพที่ ง-1 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทานอลที่เร่งด้วยไลเปส

ตารางที่ ง-1 ข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่ ง-1

พีคลำดับที่	ชื่อสาร	รีเทนชัน ไทม์ (นาที)	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	พื้นที่ใต้ภาพ
1	Ecosane	2.324	-	7762968
2	FAME	4.892	12.623	5740251
3	TAG	7.246	0.536	1569705
4	FFA	8.880	5.496	4725132
5	1,3 DAG	10.908	0.166	293984
6	1,2 DAG	11.674	0.171	267959
7	MAG	20.15	0.096	24462

แทนค่าความเข้มข้นจากตารางที่ ง-1 ในสมการ

$$\begin{aligned} \% \text{conversion} &= \frac{12.623 \times 100}{3(0.536) + 2(0.166) + 2(0.171) + 0.096 + 5.496 + 12.623} \\ &= 61.58 \end{aligned}$$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ คือ 61.58 เปอร์เซ็นต์

4. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล

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

โดยที่ Y คือน้ำหนักของเมทานอล

A คือ น้ำหนักของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์จากการชั่ง

B คือ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล

MW_{PO} คือน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ เท่ากับ 980 กรัม

MW_{MeOH} คือ น้ำหนักโมเลกุลของเมทานอล เท่ากับ 32.04 กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ กำหนดให้อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จากนั้นชั่งน้ำมันปาล์ม 3 กรัม คิดเป็นปริมาตรประมาณ 2.68 มิลลิลิตร

$$\text{ดังนั้น } Y = \frac{(3)(3)(32.04)}{980} = 0.294 \text{ กรัม}$$

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

เมื่อ Z คือ ปริมาตรของเมทานอล

Y คือ น้ำหนักเมทานอล

D คือ ค่าความหนาแน่นของเมทานอลเท่ากับ 791 กรัมต่อลิตร

$$\text{จะได้ } Z = \frac{(0.298)(1000)}{791} = 0.376 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$= 376 \text{ ไมโครลิตร}$$

7. การหาปริมาตรน้ำมันปาล์ม

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

D คือ ความหนาแน่นของน้ำมันปาล์ม (0.89 กรัมต่อมิลลิลิตร)

M คือ มวลน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม (3 กรัม)

V คือ ปริมาตรของน้ำมันปาล์ม

$$\text{ดังนั้น } V = \frac{3}{0.89} = 3.37 \text{ มิลลิลิตร}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ธนธร วิทิตสานต์ เกิดวันที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2527 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2548 จากนั้นเข้าศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2553



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย