การตรึงรูปไลเพสจากยีสต์ *Candida rugosa* เพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

นางสาว วันภิเษก จุฑาภักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* FOR BIODIESEL PRODUCTION BY TRANSESTERIFICATION

Miss Vanpisek Jutapuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงไลเพสจากยีสต์ *Candida rugosa* เพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
โดย	นางสาว วันภิเษก จุฑาภักดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์)

…… กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

…… กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

นางสาว วันภิเษก จุฑาภักดิ์ : การตรึงรูปไลเพสจากยีสต์ *Candida rugosa* เพื่อผลิตไบโอดีเซลโดยทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* FOR BIODIESEL PRODUCTION BY TRANSESTERIFICATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ. ทิฆัมพร ยงวณิชย์, 105 หน้า.

จากการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพสเพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มจากยีสต์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. rugosa C. lipolytica, Y. lipolytica, C. tropicalis* และ *C. thailandica* พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *C. rugosa* สามารถผลิตไลเพสที่มีสมบัติเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดีที่สุด โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ คือ ที่อัตราส่วนโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด 57.80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือ ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูงสุด 98 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการตรึงรูปไลเพสชนิดหยาบลงบนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ macroporous 5 ชนิด ด้วยวิธีดูดซับในภาวะที่ใช้เฮปเทน ได้แก่ ชนิด AB-8 H103 NKA-9 NKA และ D4020 ผลที่ได้ NKA-9 ให้ผลการเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 1:1 อัตราส่วนโดย โมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:4 ปริมาณน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด 75.11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไลเพสตรึงรูปบน H103 ให้ผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงที่สุด ภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 ปริมาณน้ำ 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูงสุด 97.74 เปอร์เซ็นต์ หลังปฏิกิริยาสิ้นสุดนำไลเพสตรึงรูปมากรองและล้างด้วยเฮปเทน พบว่าสามารถนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซ้ำได้อีก 2 ครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 31.88 และ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในส่วนของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้อีก 1 ครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ 28.37 เปอร์เซ็นต์

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2551..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4872457923: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : LIPASE / *C.rugosa* / IMMOBILIZATION

VANPISEK JUTAPUK: IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* FOR BIODIESEL PRODUCTION BY TRANSESTERIFICATION. ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., COADVISOR: ASSOC. PROF. TIKAMPORN YONGVANICH, 105 pp.

The lipase-producing yeast were selected from 5 strains, namely, *C. rugosa, C. lipolytica, Y. lipolytica, C. tropicalis* and *C. thailandica*. The results showed that *C. rugosa* exhibited the highest specific activity and catalyzed transesterification and hydrolysis of palm oil in non-solvent media. The optimum conditions for transesterification of free lipase were as follows: one to three molar ratio of palm oil to methanol, 20 mg of enzyme, 120% (volume/oil volume) of water content at 40 °C for 48 hours. The highest percent conversion of obtained methyl ester was 57.80. The optimum conditions for hydrolysis of free lipase were as follows: 5 mg of enzyme, 160% (volume/oil volume) of water content at 40 °C for 24 hours with 97.74 % of free fatty acids was obtained. Lipase from *C. rugosa* was immobilized by adsorption on hydrophobic macroporous resins AB-8, H103, NKA-9, NKA and D4020 in the presence of heptane. The results showed that immobilized lipase on NKA-9 could catalyze transesterification better than the others. The optimum conditions were as follows: weight ratio of lipase powder to resins equals to 1:1, 1 to 4 molar ratio of palm oil to methanol, 40% water content (volume/oil volume) at 30 °C for 24 hours yielding the obtained conversion to methyl ester 75.11%. For hydrolysis, immobilized lipase on H103 showed highest activities. The optimum conditions were 1: 2 weight ratio of lipase powder to resins, 120% (volume/oil volume) water content at 40 °C for 24 hours with 97.74% obtained free fatty acids. Finally, immobilized lipase washed by heptane could be reused twice in transesterification and one time in hydrolysis. The methyl ester retained were 31.88 and 9.42 percent and the free fatty acid conversion were 28.37 percent, respectively.

Field of Study : BIOTECHNOLOGY Student's Signature .....
Academic Year : 2008 Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬ้าลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ทิฆัมพร ยงวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว ที่กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่ให้ทุนดำเนินการวิจัย และ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย แก่งานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือด้วยดีจากเจ้าหน้าที่ทุกๆท่าน ตลอดจน สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในห้องปฏิบัติการทุกๆท่าน ด้วยความซาบซึ้งใจ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย รวมถึงให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อน สำหรับการสนับสนุน ความรัก และความห่วงใยที่มีให้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3

ขั้นตอนการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

เอนไซม์ไลเพส..... 4

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส..... 4

ความจำเพาะของไลเพส..... 6

แหล่งของไลเพส..... 7

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเพสในอุตสาหกรรม..... 9

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส..... 10

กรดไขมัน..... 11

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน..... 12

ไบโอดีเซล..... 12

น้ำมันปาล์ม..... 14

การตรึงเอนไซม์..... 15

ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ..... 15

ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูป..... 16

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป..... 16

การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับทางภาพ..... 19

หน้า

ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์..... 20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 24
วัสดุอุปกรณ์ในการทดลอง..... 24
สารเคมีในการทดลอง..... 25
วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 26
1. การคัดเลือกยีสต์ที่มีสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเพส..... 26
2. การเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยไลเพสจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์..... 26
3. การตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ในภาวะที่ไม่มีน้ำบนตัวค้ำจุนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ macroporous..... 28
4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป..... 30
5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป..... 33
6. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซิสด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง..... 36
7. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซิสด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง..... 37
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 38
1. ผลการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส..... 38
2. การเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยไลเพสจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์..... 39
2.1. ผลการหาค่าไลเพสแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีนของสารละลายไลเพสที่ได้จากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์..... 39
2.2. การทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพส..... 40
3. การตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ในภาวะที่ไม่มีน้ำบนตัวค้ำจุนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ macroporous..... 41
3.1. แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสจาก *C. rugosa* ที่ใช้ในการตรึงรูป..... 41

หน้า

3.2. การตรึงรูปไลเพสด้วยวิธีการดูดซับในภาวะที่ไม่ใช้น้ำและเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปแต่ละชนิด..... 42
4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป..... 45
4.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระ..... 45
4.1.1. ผลของปริมาณเอนไซม์..... 45
4.1.2. ผลของปริมาณน้ำ..... 46
4.1.3. ผลของอุณหภูมิ..... 47
4.1.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารละลายไลเพสอิสระ..... 48
4.2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปชนิด H103..... 49
4.2.1. อัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน..... 49
4.2.2. ผลของปริมาณน้ำ..... 50
4.2.3. ผลของอุณหภูมิ..... 51
4.2.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูป..... 52
4.2.5. การนำไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซ้ำ..... 53
5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป..... 54
5.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ..... 54
5.1.1. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล..... 54
5.1.2. ผลของปริมาณเอนไซม์..... 55
5.1.3. ผลของปริมาณน้ำ..... 56
5.1.4. ผลของอุณหภูมิ..... 57
5.1.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสารละลายไลเพสอิสระ..... 58

หน้า

5.2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9..... 59
5.2.1. อัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน..... 59
5.2.2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล..... 60
5.2.3. ผลของปริมาณน้ำ..... 61
5.2.4. ผลของอุณหภูมิ..... 62
5.2.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป.. 63
5.2.6. การนำไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริ-ฟิเคชันซ้ำ..... 64
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 66
1. ผลการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสและเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน..... 66
2. ผลการตรึงไลเพสชนิดหยาบจาก *C.rugosa* เพื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม..... 67
3. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป..... 68
3.1. ผลของปริมาณเอนไซม์..... 68
3.2. ผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยา..... 69
3.3. ผลของอุณหภูมิ..... 70
3.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา..... 71
4. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป..... 71
4.1. ผลของปริมาณเอนไซม์..... 71
4.2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล..... 72
4.3. ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา..... 72
4.4. ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา..... 73
4.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา..... 74
5. ผลการนำไลเพสตรึงรูปกลับมาเร่งปฏิกิริยา..... 75
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 76

หน้า

รายการอ้างอิง..... 78
ภาคผนวก..... 84
ภาคผนวก ก..... 85
ภาคผนวก ข..... 87
ภาคผนวก ค..... 88
ภาคผนวก ง..... 92
ภาคผนวก จ..... 99
ภาคผนวก ฉ..... 101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเพสได้.....	7
2.2	การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส และไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล.....	14
2.3	แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ.....	18
4.1	ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพสของยีสต์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารโรดามีน บี.....	39
4.2	ไลเพสแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะ ที่วัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีดูดซับน้ำออกแล้วของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	40
4.3	ผลการวิเคราะห์การเกิดขึ้นของเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งด้วยสารละลายไลเพสของยีสต์ 5 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง.....	41
4.4	ไลเพสแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และ แอกทิวิตีจำเพาะ ของสารละลายเอนไซม์ไลเพสชนิดหยาบและชนิดที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธีทำแห้งแบบเย็นแล้ว....	42
4.5	ไลเพสแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป 5 ชนิด.....	42
ง-1	ข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่ ง-1.....	94
ง-2	ข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่ ง-2.....	96
จ-1	สมบัติของตัวค้ำจุนเรซินแบบมีรูพรุนชนิด macroporous ทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในงานวิจัย.....	99
ฉ-1	การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เวลาต่างๆ โดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C.rugosa*.....	101
ฉ-2	การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เวลาต่างๆ โดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C.rugosa*.....	102
ฉ-3	การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เวลาต่างๆ โดยไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9.....	103
ฉ-4	การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เวลาต่างๆ โดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103.....	104

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส โดยทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ ที่เร่งด้วยไลเพส โดยมีไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นนั้น สามารถเกิดได้ทั้งในภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solution) และไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา (non- aqueous solution).....	5
2.2	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์.....	10
2.3	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์.....	12
2.4	วิธีการตรึงรูปเอนไซม์.....	17
4.1	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ตรึงรูปชนิดต่างๆ และเอนไซม์อิสระในปริมาณที่เท่ากัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	43
4.2	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิดต่างๆ และเอนไซม์อิสระในปริมาณที่เท่ากัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	44
4.3	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบที่ปริมาณต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	46
4.4	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบที่ปริมาณน้ำต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	47
4.5	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบที่อุณหภูมิต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	48
4.6	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยใช้สารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa*.....	49

ภาพที่ หน้า

4.7 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 50

4.8 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 51

4.9 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 52

4.10 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103..... 53

4.11 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ในแต่ละรอบของการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำ..... 54

4.12 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 55

4.13 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่ปริมาณเอนไซม์ต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 56

4.14 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 57

4.15 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง..... 58

4.16 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยใช้สารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa*..... 59

ภาพที่		หน้า
4.17	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	60
4.18	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง.....	61
4.19	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่ปริมาณน้ำต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง	62
4.20	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อุณหภูมิต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง...	63
4.21	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยใช้ไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	64
4.22	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ในแต่ละรอบของการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำ..	65
ค-1	กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอลปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม.....	88
ค-2	กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม.....	91
ง-1	โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล ที่เร่งด้วยไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9..	94
ง-2	โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ที่เร่งด้วยไลเพสตรึงรูปชนิด H103.....	96
จ-1	ภาพวัสดุค้ำจุนจุนเรซินแบบมีรูพรุนชนิด macroporous ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการตรึงไลเพส.....	100

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol-ester hydrolase) หรือ เอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (acylglycerol hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ได้กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์ (Brockerhoff และ Jensen, 1974) นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) คือไบโอดีเซล (biodiesel) (Fukuda และคณะ, 2001) อีกด้วย

เนื่องจากไลเพสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลาย จึงมีการนำเอนไซม์ไลเพสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น น้ำยาซักล้าง อาหาร เครื่องสำอาง เชื้อเพลิงชีวภาพ ยา และใช้ขจัดเศษไขมันออกจากวัตถุดิบผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง เป็นต้น (Posorske, 1984) เอนไซม์ไลเพสสามารถผลิตได้จากทั้ง สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ แต่ไลเพสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเพสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็ว และเลี้ยงง่ายกว่า นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรม และสามารถปรับภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ จึงมีการเลือกใช้ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์มากกว่าแหล่งอื่น โดยเฉพาะไลเพสจากยีสต์เนื่องจากเจริญเติบโตง่ายและการเก็บรักษายีสต์ไม่ยุ่งยากเท่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย ในปัจจุบันมีผู้ค้นพบยีสต์ที่สามารถผลิตไลเพสแล้วหลายกลุ่ม เช่นกลุ่ม *Candida Spp. Geotrichum Trichosporon Yarrowia lipolytica* เป็นต้น (Vakhlu และ Kour, 2006)

การผลิตกรดไขมันอิสระจากไตรกลีเซอไรด์ในอุตสาหกรรมด้วยวิธีทางเคมี โดยทั่วไปใช้วิธีที่ไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ใช้ไอน้ำในการแยกกรดไขมันออกมาโดยผ่านคอลัมน์ วิธีดังกล่าวจะต้องใช้แรงดันและพลังงานสูงมาก ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองเนื่องจากมีต้นทุนด้านพลังงานสูง การใช้เอนไซม์ไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งชีวภาพในกระบวนการผลิต เป็นวิธีการผลิตกรดไขมันจากไตรกลีเซอ-

ไรด์ที่ใช้พลังงานต่ำกว่า จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดแทน เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว (Kimura และคณะ, 1983) ส่วนการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้ไลเพสเป็นตัวกระตุ้น นับเป็นกระบวนการผลิตเชื้อเพลิงทดแทนโดยวิถีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่น่าสนใจยิ่งในปัจจุบัน ประโยชน์ที่ได้มีหลายประการ เช่น ผลผลิตที่ได้มีความบริสุทธิ์ กระบวนการผลิตไม่มีผลผลิตข้างเคียงที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ระดับมลพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตทางเคมีแบบดั้งเดิม เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ไลเพสยังคงมีปัญหาด้านราคาที่ค่อนข้างสูง (Jaeger และ Eggert, 2002) การพัฒนาเอนไซม์ให้อยู่ในรูปตรึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้ราคาของเอนไซม์ลดลงในกระบวนการผลิต เนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปนี้ทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้หลายๆครั้ง มีการทดลองนำไลเพสจากเชื้อแบคทีเรีย รา ยีสต์ มาตรึงในวัตถุค้ำจุนที่มีรูพรุน เมื่อนำไลเพสตรึงรูปนี้มาใช้ซ้ำหลายครั้ง และให้ผลผลิตสูงอีกด้วย (Hsu และคณะ, 2002) ดังนั้นการใช้ไลเพสตรึงรูปนี้จึงเป็นวิธีที่นำมาใช้อย่างแพร่หลาย และนำไปสู่การวิจัยเพื่อพัฒนา ปรับปรุงกระบวนการในแบบต่างๆ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการตรึงไลเพสจากยีสต์ โดยคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสจาก 5 สายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา และตรึงไลเพสจากยีสต์ที่คัดเลือกนั้น โดยศึกษาตัวค้ำจุนและวิธีการตรึงที่มีความเหมาะสมสอดคล้อง ตรวจสอบภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรึง และภาวะที่ดีที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสตรึงรูปที่ได้ และความสามารถในการนำมาใช้ซ้ำ เพื่อให้ได้ไลเพสตรึงรูปที่มีสมบัติที่ดีขึ้น สะดวกในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *C. rugosa* เพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมเอกสารสำหรับการวิจัย
2. คัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเพส
3. แยกไลเพส และทดสอบสมบัติเบื้องต้นในการเกิดปฏิกิริยา
4. ตรึงรูปไลเพส ทดสอบปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
5. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป และการนำไลเพสตรึงรูปไปใช้ซ้ำ
6. วิเคราะห์ สรุปผลงานวิจัย เขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถตรึงไลเพสที่แยกได้จาก *C. rugosa* เพื่อนำไปใช้ผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ไลเพส

เอนไซม์ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ international Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นอีกเช่น เอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (acyl glycerol hydrolase) ไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดร-เลส (Triacyl glycerol hydrolase) นอกจากนี้คณะกรรมการเอนไซม์ (Enzyme Comission; EC) ได้กำหนดการตั้งชื่อเอนไซม์ (nomenclature) โดยได้จำแนกเอนไซม์ออกเป็นพวกต่างๆ (classification) ตามชนิดปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) รหัสดังกล่าวแบ่งเป็นประกอบด้วยตัวเลขสี่ชุด แต่ละชุดแยกออกจากกันโดยจุด ตัวเลขชุดแรกบ่งบอกถึงพวก (class) ที่เอนไซม์นั้นถูกจัดไว้ ซึ่งมีหกพวก ส่วนตัวเลขชุดที่สองและชุดที่สามของรหัสเอนไซม์ จะบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง สำหรับตัวเลขชุดที่สี่จะช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคล้ายกันออกจากกันซึ่งเอนไซม์ไลเพสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ ที่บ่งบอกปฏิกิริยาดังนี้

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

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

ไลเพสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) กรดไขมัน (fatty acid) และ กลีเซอรอล (glycerol) นอกจากนี้ไลเพสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาที่เป็นปฏิกิริยา-

การสังเคราะห์ (synthesis reaction) ได้แก่ เอสเทอริฟิเคชัน (esterification) และ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาประเภทแอซิโดไลซิส (acidolysis) อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification) แอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) และ อะมิโนไลซิส (aminolysis) อีกด้วย

<u>ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส</u>

<u>ไฮโดรไลซิส</u>

$$R_1\text{-}COO\text{-}R_2 + H_2O \longleftrightarrow R_1\text{-}COOH + R_2\text{-}OH$$

<u>เอสเทอริฟิเคชัน</u>

$$R_1\text{-}COOH + R_2\text{-}OH \longleftrightarrow R_1\text{-}COO\text{-}R_2 + H_2O$$

<u>แอซิโดไลซิส</u>

$$R_1COO\text{-}R_2 + R_3C\text{-}OH \longleftrightarrow R_3\text{-}COO\text{-}R_2 + R_1\text{-}COOH$$

<u>อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน</u>

$$R_1\text{-}COO\text{-}R_2 + R_3\text{-}COO\text{-}R_4 \longleftrightarrow R_3\text{-}COO\text{-}R_2 + R_1\text{-}COO\text{-}R_4$$

<u>แอลกอฮอล์ไลซิส</u>

$$R_1\text{-}COO\text{-}R_2 + R_3\text{-}OH \longleftrightarrow R_1COO\text{-}R_3 + R_3\text{-}OH$$

<u>อะมิโนไลซิส</u>

$$R_1\text{-}COO\text{-}R_2 + R_3\text{-}NH_3 \longleftrightarrow R_1\text{-}CONH\text{-}R_3 + R_2\text{-}OH$$

รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส โดยทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ ที่เร่งด้วยไลเพส โดยมีไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นนั้น สามารถเกิดได้ทั้งในภาวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ (aqueous solution) และไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา (non-aqueous solution) (Villeneuve และคณะ, 2000)

ความจำเพาะของไลเพส

Macrae (1983) จำแนกไลเพสโดยแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่หนึ่ง ไลเพสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 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 แต่ถ้าให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะทำให้ได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ไลเพสในกลุ่มนี้ได้จาก *Aspergillus niger* *Mucor javanicus* *Rhizopus arrhizus* และไลเพสจากรำข้าว

กลุ่มที่สอง ไลเพสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เข้าทำปฏิกิริยา (Non-specific lipase) ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการย่อยสลายได้ทุกตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ และสามารถที่จะไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลได้อย่างสมบูรณ์ ไลเพสในกลุ่มนี้ได้จาก *Candida cylindracea* *Corrynebacterium acnes* *Staphylococcus aureus* และไลเพสจากตับอ่อนสุกร

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

แหล่งของไลเพส

เอนไซม์ไลเพสผลิตได้จากทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์ไลเพสสร้างขึ้นที่ตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) ในพืชพบได้ในถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ไลเพสจากจุลินทรีย์สามารถแยกได้จากทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่เนื่องจากไลเพสจากจุลินทรีย์มีความเสถียรสูง (stability) ความสามารถในการคัดเลือกสารตั้งต้นดี (selectivity) และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (substrate specificity) จึงเป็นที่น่าสนใจและมีการนำไปประยุกต์ใช้สูงที่สุด (Cardenas และคณะ, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเพสจากยีสต์ เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตง่าย วิธีเก็บรักษาไม่ซับซ้อน มักผลิตไลเพสชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular lipase) ซึ่งง่ายและสะดวกต่อการแยกและนำไปใช้ (Kademi และคณะ, 2003) ซึ่งได้แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ที่สามารถผลิตไลเพสได้ แสดงดังตารางที่ 2.1

ไลเพสจากยีสต์ *C. rugosa* เป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรมมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องมาจากยีสต์ชนิดนี้ผลิตไลเพสที่มีสมบัติที่ดี มีแอกทิวิตีสูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์อื่นๆ (Redondo และคณะ, 1995) เช่น ในประเทศญี่ปุ่นมีบริษัทผู้ผลิตทำอุตสาหกรรมผลิตกรดไขมันจากเมล็ดละหุ่งโดยใช้ไลเพสจาก *C. rugosa* มาตั้งแต่ปี 1985 (Macrae และ Hammond, 1985) นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกลิ่นในนมและครีมจากนม โดยพบว่าไลเพสจาก *C. rugosa* เป็นไลเพสที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ที่สุด เนื่องมาจากสมบัติในการสร้างกลิ่นที่มีความเฉพาะสูง (Pandey และคณะ, 1999)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเพสได้

สกุล	ชนิด	อ้างอิง
Candida	*C. rugosa*	Wang และคณะ, 1995
		Frense และคณะ, 1996
		Yee และคณะ, 1995
		Brocca และคณะ, 1998
		Xie และคณะ, 1998
	C. tropicalis	Takahashi และคณะ, 1998

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

สกุล	ชนิด	อ้างอิง
	C. antarctica	Weber และคณะ, 1999
		Jaeger และ Reetz, 1999
		Arroyo และคณะ, 1999
	C. cylindracea	Kamiya และ Gotto, 1998
		Helisto และ Korpela, 1998
	C. parapsilosis	Lacointe และคณะ, 1996
	C. deformans	Lacointe และคณะ, 1996
	C. curvata	Ghosh และคณะ, 1996
	C. valida	Ghosh และคณะ, 1996
Yarrowia	*Y. lipolytica*	Merek และ Bednasski, 1996
		Pignede และคณะ, 2000
Rhodotorula	*Rho. glutinis*	Papaparaskevas และคณะ, 1992
	Rho. pilimornae	Tahoun และคณะ, 1985
Pichia	*Pi. bispora*	Hou, 1994
	Pi. maxicana	Hou, 1994
	Pi. sivicola	Sugihara และคณะ, 1995
	Pi. xylosa	Sugihara และคณะ, 1995
	Pi. burtonii	Sugihara และคณะ, 1995
Saccharomyces	*Sa. lipolytica*	Tahoun และคณะ, 1985
	Sa. crataegenesis	Hou, 1994
Torulospora	*Torulospora globora*	Hou, 1994
	Trichosporon	Dharmsthiti และ Ammaranond,
Trichosporon	*asteroides*	1997

ที่มา : Sharma และคณะ (2001)

ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเพสในทางอุตสาหกรรม

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

อุตสาหกรรมอาหาร

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น ในอุตสาหกรรมนม นิยมใช้เป็นอย่างมากในการไฮโดรไลซ์ไขมันนม ผลิตกลิ่นรสเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตชีส ใช้ในปฏิกิริยาไลโปไลซิสไขมันเนยและครีม กรดไขมันอิสระเองก็ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลิ่นต่างๆ เช่นกลิ่นของเอสเทอร์ แลคโตน เมทิลคีโตน และเบต้าคีโต-แอซิด เป็นต้น (Wong, 1995)

อุตสาหกรรมสารเคมีอินทรีย์ (oleochemistry industry)

ในอุตสาหกรรมนี้ไลเพสใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะซึ่งไม่สามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมีหรือทดแทนวิธีทางเคมีซึ่งอาจมีต้นทุนการผลิตสูงหรือผลิตได้ยาก ยกตัวอย่างเช่นในอุตสาหกรรมยาเพื่อใช้ผลิตหรือปรับปรุงสารแอนตี้ไบโอติก อุตสาหกรรมเคมีเกษตร ใช้ผลิตยากำจัดศัตรูพืช เป็นต้น (Pandey และคณะ,1999)

อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสารทำความสะอาด

ไลเพสถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาดโดยเป็นองค์ประกอบของผงซักฟอก อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอส (proteases) เพื่อใช้ขจัดคราบไขมันที่เลอะบนเสื้อผ้า นอกจากนี้ไลเพสยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สำหรับผลิตภัณฑ์สบู่และยาสระผมอีกด้วย (Schmidt และ Verger, 1998)

อุตสาหกรรมกระดาษ

ไลโปไลติกเอนไซม์มีความสำคัญในการย่อยเพื่อขจัดสารที่เรียกว่า “pitch” ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในเนื้อไม้ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมัน ที่จะมีผลในการรบกวนการผลิตกระดาษ

และช่วยขจัดคราบไขมันที่ติดมากับกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษรีไซเคิล ทำให้ไม่เกิดการสร้างสารเหนียวที่จะรบกวนการผลิตขึ้นด้วย (Jaeger และ Reetz, 1998)

กระบวนการจัดการขยะและสารพิษ

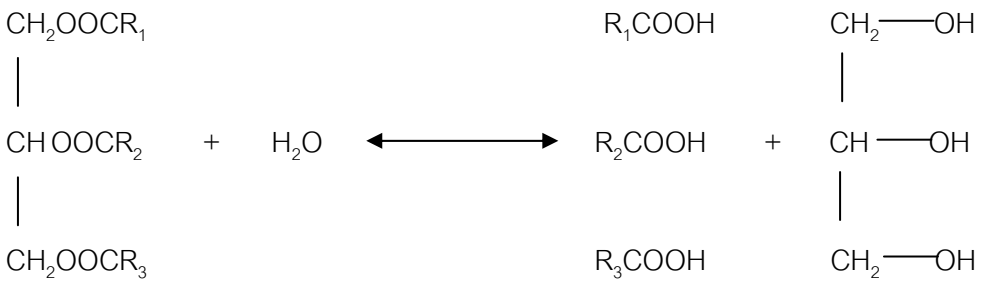
ไลเพสมีประโยชน์ในการช่วยย่อยกำจัดไขมันที่ปนเปื้อนมาในขยะ ช่วยบำบัดน้ำเสียหรือน้ำธรรมชาติที่มีการปนเปื้อนของไขมัน นอกจากนี้ยังช่วยบำบัดดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน และกำจัดพิษได้ด้วย (Pandey และคณะ, 1999)

อุตสาหกรรมอื่นๆ

ไลเพส สามารถนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น เซลลูเลส เพคทิเนส และโปรตีเอส เพื่อใช้ฟอกสีในอุตสาหกรรมเส้นใยผ้า และยังมีการนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของไบโอเซ็นเซอร์ ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ใช้ในกระบวนการฟอกหนังสัตว์ ใช้ในการทำความสะอาดพื้นผิวแข็งๆ การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว การสังเคราะห์สารโพลีเมอร์ ผลิตพลาสติกชนิดย่อยสลายได้ ใช้เป็นส่วนหนึ่งในอุตสาหกรรมน้ำมันหล่อลื่น และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางด้วย (Schmidt และ Verger, 1998)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส เป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ด้วยน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญเป็นกรดไขมัน และ กลีเซอรอล (Brockerhoff และ Jensen, 1974) ปฏิกิริยาแสดงดังรูป 2.2



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์

กรดไขมัน

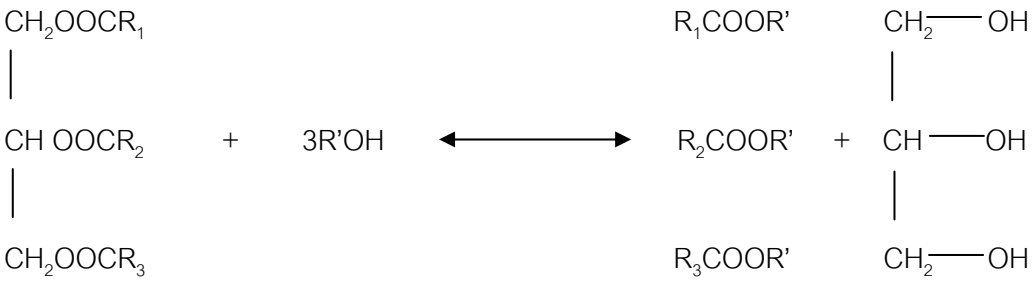
กรดไขมัน มีสูตรโมเลกุลเป็น R-COOH ซึ่งประกอบด้วย R- คือหมู่อัลคิล (alkyl) มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และ COOH คือ หมู่คาร์บอกซิลมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ดังนั้นจึงทำให้กรดไขมันละลายได้ทั้งในน้ำ และน้ำมันหรือหรือตัวทำละลายอินทรีย์

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขมันและน้ำมัน เป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งในระบบการผลิตในอุตสาหกรรมหลายด้าน ผลิตภัณฑ์ซึ่งได้แก่กรดไขมัน และกลีเซอรอล เป็นวัตถุดิบพื้นฐานที่สำคัญที่มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ในทุกๆปีมีการผลิตกรดไขมันจากกระบวนการนี้สูงถึง 1.6 ล้านตันต่อปีทั่วโลก (Pronk และคณะ, 1988) โดยกรดไขมันอิสระนั้นใช้เป็นองค์ประกอบสำหรับการผลิตสาร oleochemicals เช่น fatty alcohols fatty amides และ fatty esters เป็นต้น ซึ่ง oleochemicals เหล่านี้จะใช้ผลิตเป็น สาร antiblock agents plastisizers และ emulsifiers นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในกระบวนการผลิต สบู่ ผงซักฟอก แชมพูสระผม น้ำมันหล่อลื่น และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์อีกด้วย (Sulaiman และคณะ, 2003)

ปัจจุบันการผลิตกรดไขมันอิสระจากไตรกลีเซอไรด์ในอุตสาหกรรมมีวิธีการหลักๆอยู่สามวิธีด้วยกันได้แก่ วิธี high pressure stream splitting, alkaline hydrolysis และ enzymatic hydrolysis วิธีแรกเป็นวิธีที่ต้องใช้พลังงาน และความดันสูง (โดยทั่วไปใช้ 250 องศาเซลเซียส, 70 บาร์) ส่วนวิธีที่สองที่ใช้เบสในการไฮโดรไลซิสก็เป็นวิธีที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายด้านพลังงานสูง และอาจเกิดสบู่ในปฏิกิริยา ส่วนวิธีการใช้เอนไซม์ไลเพสเป็นตัวเร่งชีวภาพในกระบวนการผลิต เป็นวิธีการผลิตกรดไขมันจากไตรกลีเซอไรด์ที่ใช้ภาวะในการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง (โดยทั่วไปใช้ประมาณ 35 องศาเซลเซียส และความดันปกติ) ซึ่งช่วยในการประหยัดพลังงานมากกว่าสองวิธีข้างต้น การใช้เอนไซม์ไลเพสมาเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดแทน เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (Ramachandra Murty และคณะ, 1983)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์และแอลกอฮอล์เช่น เมทานอล หรือเอทานอล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอัลคิลเอสเทอร์ (akyl ester) ของกรดไขมัน หรือไบโอ-ดีเซล (biodiesel) และกลีเซอรอล เป็นผลิตภัณฑ์ร่วมจากปฏิกิริยา (รูปที่ 2.3) ตัวเร่งของปฏิกิริยามีทั้งที่เป็นเคมี ได้แก่ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เป็นต้น และตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด เช่นกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) หรือกรดไฮโดรคลอริก (HCL) เป็นต้น (Noureddini และ Zhu, 1997) นอกจากนี้ยังมีตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ได้แก่การใช้เอนไซม์ไลเพสได้อีกด้วย (Du และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ (Fukuda และคณะ, 2001)

ไบโอดีเซล

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

ปัญหาวิกฤตการณ์ราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อภาวะเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศ ความต้องการใช้น้ำมันดีเซลมีสูง เนื่องจากน้ำมันดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่มีความสำคัญต่อการคมนาคมขนส่ง ดังนั้นการใช้พลังงานทดแทนเช่น ไบโอดีเซล จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเป็นพลังงานทดแทนทางเลือกใหม่สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลในปัจจุบัน เนื่องจากการใช้ไบโอ-ดีเซลทดแทนน้ำมันดีเซลมีประโยชน์หลายด้านทั้งด้านสิ่งแวดล้อมช่วยลดมลพิษทางอากาศซึ่งเป็นผลจากการเผาไหม้เครื่องยนต์ เนื่องจากองค์ประกอบของไบโอดีเซลไม่มีธาตุกำมะถัน แต่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% โดยน้ำหนัก จึงช่วยเรื่องการเผาไหม้ได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ด้านสมรรถนะเครื่องยนต์ ช่วยเพิ่มดัชนีการหล่อลื่นให้กับน้ำมันดีเซล ในกรณีใช้ผสม ในด้านเศรษฐศาสตร์ ช่วยเพิ่มมูลค่าให้ผลผลิตทางการเกษตรที่เหลือจากการบริโภค ลดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศ เพราะไบโอดีเซลจัดเป็นพลังงานชนิดหมุนเวียนจากพืชที่สามารถปลูกทดแทนขึ้นได้ในประเทศ และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศได้บางส่วน (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน นับเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการผลิตไบโอดีเซลมากที่สุด เนื่องจากช่วยลดความหนืดของน้ำมันพืชได้ และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพดีเมื่อทดลองใช้ในเครื่องยนต์ การใช้ไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมีข้อดีกว่าการใช้กรดและด่างหลายประการ กล่าวคือ ปัญหาจากการใช้กรดหรือเบสทำให้มีการแยกกลีเซอรอล และทำให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ยากขึ้น เนื่องจากมีตัวเร่งเคมีเหล่านั้นปะปนอยู่ การใช้กรดเร่งปฏิกิริยามีข้อเสียที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยายาวนาน และใช้อุณหภูมิสูง การใช้เบสเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาอาจทำให้มีสบู่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา saponification ที่อาจเกิดขึ้นร่วมด้วย ทำให้ได้ผลผลิตเอสเทอร์เกิดได้น้อยกว่าที่ควรเนื่องจากมีปฏิกิริยาข้างเคียงรบกวน และการแยกเอสเทอร์กับกลีเซอรอลออกจากกันเป็นไปได้ยากอีกด้วย (Köse และคณะ, 2002) จากผลข้างเคียงที่เกิดสบู่ขึ้นในปฏิกิริยาทำให้ต้องใช้น้ำมันพืชชนิดบริสุทธิ์ซึ่งมีกรดไขมันอิสระในปริมาณต่ำๆในการเป็นสารตั้งต้น ซึ่งมีผลในการเพิ่มต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลให้สูงขึ้นตามไปด้วย การใช้เอนไซม์ไลเพสสามารถแก้ปัญหาของการใช้กรดและเบสเป็นตัวเร่งได้ โดยไลเพสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพซึ่งมีความจำเพาะมากกว่า ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะสูง แยกกลีเซอรอลออกได้ง่าย บริสุทธิ์กว่าการใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่ง สามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้มีกรดไขมันอิสระสูง เร่งปฏิกิริยาได้ทั้งในระบบที่มีน้ำและไม่มีน้ำ ข้อดีของการใช้ไลเพสเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมีที่เป็นเบสแสดงสรุปได้ดังตารางที่ 2.2 (Fukuda และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบผลของการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส และไลเพสซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล

	กระบวนการที่ใช้เบสเร่ง	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

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 การมีต้นทุนการผลิตและราคาต่ำกว่าน้ำมันชนิดอื่น ทำให้น้ำมันปาล์มมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง ต่อการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลในประเทศไทย

แม้ว่าการใช้เอนไซม์ไลเพสในการเร่งปฏิกิริยาทั้งไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจะมีข้อดีหลายประการ แต่ก็ยังคงประสบปัญหาทางด้านราคาของเอนไซม์ที่มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นการนำเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ (enzyme immobilization) จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญที่จะนำมาแก้ปัญหาดังกล่าว เนื่องจากการใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์จะสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้โดยง่าย และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีก ช่วยลดต้นทุนด้านราคาของเอนไซม์ได้ (Lee และคณะ, 2006)

การตรึงเอนไซม์ (Kenedy และ Cabral, 1983)

การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization) หมายถึง การจำกัดเขตเอนไซม์ให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดให้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) แต่ยังคงสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic activity) เหมือนเดิม

ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ

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

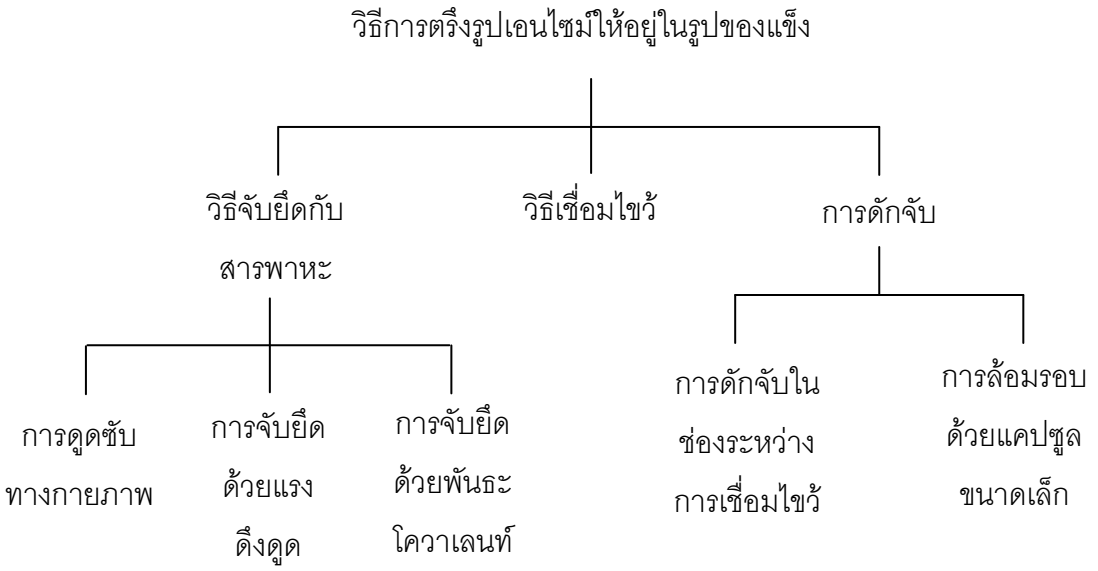
ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูป

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

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

1. มีโอกาสเพิ่มแอกทิวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม
2. ใช้กับระบบเอนไซม์หลายชนิด ในลักษณะ in vitro ได้
3. สามารถนำมาใช้ซ้ำ และใช้เกิดปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องได้ ใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ได้
4. ใช้ภาวการณ์ทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวค้ำจุนและวิธีการตรึงรูป
5. ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวค้ำจุนและลักษณะสารตั้งต้น
6. เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ให้อยู่ในรูปของแข็งสามารถแบ่งประเภทตาม Chibata (1978) แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิธีการตรึงรูปเอนไซม์

แม้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์จะมีวิธีการเตรียมได้หลายวิธี แต่ไม่มีวิธีการเตรียมใดที่จะสามารถนำมาใช้กับเอนไซม์ได้ทุกชนิดและทุกกรณี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทางด้านองค์ประกอบของโครงสร้างและสมบัติทางเคมี รวมทั้งความแตกต่างของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ วิธีการตรึงเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น จะต้องทำการทดลองเพื่อให้ได้วิธีที่ให้ประสิทธิภาพในการตรึงที่ดี รักษาแอกทิวิตีของเอนไซม์ไว้ได้มากที่สุดและมีความคงตัวระหว่างการใช้งาน พร้อมทั้งต้องเป็นวิธีที่สะดวกและมีต้นทุนต่ำ ซึ่งได้เปรียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีต่างๆ ดังตารางที่ 2.3

ตาราง 2.3 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ (Kennedy และ Cabral, 1987)

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

การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption)

วิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยการจับไว้ที่ผิวของสารพาหะที่เป็นของแข็งจัดว่าเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด และเป็นวิธีที่ใช้ตรึงเอนไซม์เป็นครั้งแรกในปี 1916 โดย Nelson และ Griffin ซึ่งได้ทำการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทสด้วยการให้จับไว้บนผิวของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ หลักการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือการใช้แรงวันเดอร์วาลส์ (Van der Waals) วิธีการในทางปฏิบัตินั้นจะผสมเอนไซม์เข้ากับสารพาหะหรือตัวค้ำจุนในภาวะที่เหมาะสม เมื่อเอนไซม์ถูกตรึงไว้ได้มากที่สุดจึงทำการแยกเอนไซม์ตรึงออกจากสารละลายทั้งหมดด้วยการปั่นเหวี่ยงตกตะตอนหรือการกรอง

เนื่องจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ไม่มีสารที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ดังนั้น จึงทำให้การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยมากหรือไม่มีเลย ความสามารถในการดูดติดของเอนไซม์จากการตรึงด้วยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับพีเอช ตัวทำละลาย ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์-ตัวค้ำจุน และอุณหภูมิ การควบคุมภาวะต่างๆเหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการดูดติดเอนไซม์ได้ดี และรักษาแอกทิวิตีของเอนไซม์ไว้ได้ แม้ว่าเอนไซม์จะถูกจับไว้ด้วยแรงดึงดูดที่ค่อนข้างอ่อน เช่นพันธะไฮโดรเจน แรงวันเดอร์วาลส์ หรือแรงไฮโดรโฟบิกก็ตาม

ปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่จะมีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่จะถูกดูดติดไว้บนผิวของตัวค้ำจุน ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ของตัวค้ำจุนในระหว่างกระบวนการตรึง กัมมันตภาพของเอนไซม์ตรึงจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้สูงขึ้นจนกระทั่งถึงจุดอิ่มตัว หลังจากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงจะลดลงแม้ว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จะเพิ่มมากขึ้น เวลาและอุณหภูมิในกระบวนการตรึงจะมีความสำคัญต่อการดูดติดของเอนไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้ตัวค้ำจุนที่มีรูพรุน ทั้งนี้เนื่องจากในตัวค้ำจุนชนิดนี้จะมีการแพร่กระจาย (diffusion) สูง

ข้อบกพร่องที่สำคัญในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ แรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนเป็นแรงอย่างอ่อนจึงทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวค้ำจุนในระหว่างกระบวนการใช้งาน การเปลี่ยนแปลงภาวะของการทดลอง เช่น พีเอช ความเข้มข้นไอออนในสารละลาย อุณหภูมิ และชนิดของตัวทำละลายจะทำให้เอนไซม์ที่ตรึงอยู่นั้นหลุดออกจากสารพาหะ นั่นคือทำให้การใช้เอนไซม์ตรึงด้วยวิธีนี้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นไปในช่วงเวลาที่จำกัด

ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ ตัวค้ำจุน (หรือตัวพยุง) และวิธีที่ทำให้เอนไซม์ถูกจับด้วยตัวค้ำจุน สารที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนนั้นมีความสำคัญมากต่อแอกทิวิตีและความคงตัวของเอนไซม์ ไม่มีตัวค้ำจุนชนิดใดที่สามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกรูปแบบ แต่อย่างไรก็ตามตัวค้ำจุนที่ดีโดยทั่วไปควรมีลักษณะ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึด มีการซึมผ่านได้ของสาร ไม่ละลายน้ำ เสถียรต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระทบ มีรูปร่างและขนาดที่พอเหมาะ มีความต้านทานต่อการเจริญของจุลินทรีย์ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

การตรึงไลเพสด้วยวิธีการดูดซับนิยมตรึงลงบนตัวค้ำจุนชนิดมีสมบัติไม่ชอบน้ำซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีรูพรุน เนื่องจากไลเพสเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ (hydrophilic) แต่ก็มีพื้นที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) รอบๆบริเวณเร่ง (active site) จากสมบัติดังกล่าว ทำให้การเข้าจับของไลเพสกับตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็งที่มีพื้นผิวที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ หรือการดูดซับ ที่บริเวณดังกล่าว ซึ่งเป็นรูปแบบที่โปรตีนชนิดอื่นๆ ไม่สามารถเข้าจับได้ ทำให้ไลเพสที่ตรึงอยู่นั้นมีสมบัติของบริเวณเร่งเป็นแบบเปิด (open form) ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีความพร้อมต่อการเร่งปฏิกิริยามากกว่า (Roberto และคณะ, 1998) เป็นตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์มีรูพรุนจะทำให้สารเหล่านี้มีพื้นที่ผิวมากขึ้นเมื่อเทียบในปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนักกับสารที่ไม่มีรูพรุน ดังนั้นสารที่มีรูพรุนจะสามารถจับเอนไซม์ไว้ได้มากซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้การประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมได้ผลดี อย่างไรก็ตามสารที่มีรูพรุนจะมีข้อเสียเนื่องจากพื้นที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงได้นั้นจะต้องมีขนาดรูพรุนใหญ่พอสำหรับโมเลกุลของสารตั้งต้นที่จะผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยาและในขณะเดียวกันจะต้องให้สารผลิตภัณฑ์ผ่านออกไปได้โดยสะดวก ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาที่เกิดจากการแพร่กระจายของสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ ส่วนตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์จะมีข้อได้เปรียบในการใช้ทางอุตสาหกรรม เมื่อเทียบกับตัวค้ำจุนที่เป็นอนินทรีย์ ดังนั้นเอนไซม์ตรึงที่ผลิตขึ้นในทางการค้าส่วนมากจะใช้พาหะเป็นสารอินทรีย์ สารอินทรีย์มีกลุ่มฟังชันนัลจำนวนมากจึงทำให้ สามารถตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์ก็มีข้อเสียทั้งนี้เนื่องจากสมบัติทางกายภาพบางประการของมันซึ่งทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยสารประเภทนี้มีการสูญเสียความเสถียรได้ง่ายเมื่อได้รับผลกระทบจากความร้อน สารเคมี จุลินทรีย์ เป็นต้น (Chibata, 1978)

มีรายงานหลายฉบับที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น

Kimura และคณะ (1983) ได้ทดลองทำการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *C. cylindracea* ด้วยวิธีดูดซับลงบนตัวค้ำจุนชนิด celite เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอก พบว่า ได้เปอร์เซ็นต์ไฮโดรไลซิส 96.9 เปอร์เซ็นต์ ในการนำไปใช้ครั้งแรก และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกสองครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 76.9 และ 38.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Mustranta และคณะ (1993) ได้ทำการวิจัยเรื่องการตรึงไลเพสจาก *C. cylindracea* ด้วยวิธีดูดซับลงบนตัวค้ำจุนชนิดเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบ และไดอะตอมมาเซียสเอิร์ต โดยเปรียบเทียบการใช้สารตัวกลางในการตรึงระหว่างบัฟเฟอร์และเฮกเซน แล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และเอสเทอริฟิเคชัน ผลที่ได้พบว่าการตรึงไลเพสจาก *C.cylindracea* ด้วยวิธีดูดซับโดยใช้เฮกเซนเป็นสารตัวกลางทำให้แอกทิวิตีของเอนไซม์สูงกว่าการใช้บัฟเฟอร์ และตัวค้ำจุนชนิด เรซินแลกเปลี่ยนประจุลบเป็นตัวค้ำจุนที่มีความเหมาะสมกว่า ไดอะตอมมาเซียสเอิร์ต จากการนำไปทดสอบปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของลอริกแอซิด กับเมทานอล ได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เมทิลลอเรตเท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่วิธีที่ใช้บัฟเฟอร์ได้ 30 เปอร์เซ็นต์

Minovska และคณะ (2005) ศึกษาการตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ลงบนตัวค้ำจุนชนิด Al_2O_3 ด้วยวิธีการดูดซับแล้วตามด้วยการตกตะกอนด้วยอะซิโตน ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์ นำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกสามครั้ง และตรึงบนตัวค้ำจุนชนิด Amberlite IRC-50 ด้วยวิธีดูดซับด้วยแรงไอออนิก นำไปใช้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ 99 เปอร์เซ็นต์ และใช้ซ้ำได้ถึง 16 ครั้ง โดยได้ผลิตภัณฑ์ลดลงเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

Gao และคณะ (2006) ได้ทำการตรึงไลเพสจาก *Candida sp.* 99-125 ด้วยวิธีดูดซับบนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ macroporous 5 ชนิด ได้แก่ชนิด NKA NKA-9 AB-8 H103 และ D4020 ผลที่ได้พบว่าเร-ซินชนิดไม่มีขั้ว NKA เป็นตัวค้ำจุนที่ดีที่สุด และวิธีการตรึงโดยใช้สารตัวกลางเป็นเฮปเทน เป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีที่ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารตัวกลาง โดยมีไลโปไลติกแอกทิวิตีสูงขึ้นกว่า 4.07 เท่า สมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลของไลเพสตรึงรูปดังกล่าวโดยวิธีการเติมเมทานอลแบบสามขั้น พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงถึง 97.3 เปอร์เซ็นต์ โดยภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปเกิดปฏิกิริยาคือ อัตราส่วนของน้ำหนักเอนไซม์ชนิดหยาบต่อตัวค้ำจุนเป็น 1.92:1 และปริมาณน้ำ

ในปฏิกิริยา 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง 7.4 ไลเพสตรึงรูปที่ได้สามารถนำไปใช้ซ้ำได้ 19 ครั้ง โดยที่อัตราการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ยังคงเหลือ 70.2 เปอร์เซ็นต์

Oh และคณะ (2007) ศึกษาการตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ลงบนตัวค้ำจุนชนิด polymicrospheres ด้วยวิธีเชื่อมขวาง พบว่าไลเพสตรึงรูปที่ได้มีความเสถียรและคงทนต่ออุณหภูมิสูง และความเป็นกรด-เบสมากขึ้นมากกว่าไลเพสอิสระ และเมื่อนำไลเพสตรึงรูปไปวิเคราะห์หาค่าแอกทิวิตีโดยให้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไอโซออกเทนที่ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันมะกอก พบว่าเมื่อมาใช้ซ้ำห้าครั้งแล้ว แอกทิวิตีของเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Lee และคณะ (2007) ศึกษาการตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ร่วมกับไลเพสจาก *R. oryzae* เพื่อนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซลเมื่อใช้ไลเพสตรึงรูปดังกล่าวเร่งปฏิกิริยาได้แก่ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นกวน 300 รอบต่อนาที เมทานอลในปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ 3 มิลลิโมล โดยแบ่งเติมทุกๆ 1.5 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง และเมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำอีก 5 ครั้งได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลเหลือถึง 80 เปอร์เซ็นต์

Shao และคณะ (2008) ได้ทำการตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ลงบนไคโตซาน เพื่อนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล พบว่าเมื่อศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา ที่ภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่มีอัตราส่วนของสารตั้งต้นโดยใช้เมทานอล 1:4 ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 6 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 45 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ 63.6 เปอร์เซ็นต์

Zhou และคณะ (2009) ศึกษาการตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ลงบนซิลิกาชนิดมีรูพรุนชนิด mesoporous ที่มีรูปร่างต่างกันสองชนิดคือ ชนิดที่มีรูปร่างกลม และแบบเป็นแท่ง ด้วยวิธีการดูดซับ เพื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรบิวไทริน พบว่าตัวค้ำจุนที่มีลักษณะรูปกลมสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีกว่ารูปแท่งโดยได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ ในการนำไปใช้ครั้งแรก 74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รูปทรงแท่งเกิดเพียง 66 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไลเพสตรึง

รูปที่ได้ยังสามารถนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้อีกกว่า 10 ครั้ง โดยคงได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 74 เป็น 60 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

การตรึงไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. ลงบนตัวค้ำจุนที่เป็นเรซินชนิดที่มีรูพรุนแบบ macroporous ด้วยวิธีการดูดซับเป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีที่เหมาะสม ง่าย สะดวก และต้นทุนต่ำ ช่วยรักษาแอกทิวิตีของไลเพสไว้ได้ เนื่องจากภาวะในการตรึงที่ไม่รุนแรง ทำให้ได้ไลเพสตรึงรูปที่มีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ได้ในหลายๆด้านและในหลากหลายปฏิกิริยาทั้งไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์อื่นๆ อีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการตรึงไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ *C. rugosa* ลงบนตัวค้ำจุนเรซินชนิดมีรูพรุน เพื่อนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper) (Whatman)

คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Alltech Associates. Inc., U.S.A)
(Model: Apollo Silica 5U, length 250 mm, i.d. 4.6 mm)

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Barnstead, U.S.A)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator) (Vision Scientific Co.,Ltd)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Shimadzu, Japan)
(High performance liquid chromatography, HPLC)

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-เบส (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)

หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต (uv lamp) (Sylvania, Japan)

ถุงเยื่อเลือกผ่านชนิดเซลลูโลสช่วงน้ำหนักโมเลกุล 12,000-14,000 (Cellusep T4, U.S.A)
(regenerated cellulose tubular membrane)

วัสดุค้ำจุน macroporous resins (supports) (Nankai University, China)

สารเคมี

กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)	(RIEDEL-DE-HAEN, Germany)
กรดฟอร์มิก (Formic acid)	(Scharlau, Spain)
กัมอาระบิก (gum arabic)	(Fluka, Switzerland)
กรดแอซีติก (acetic acid)	(Labscan, Thailand)
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Scharlau, Spain)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (K_2HPO_4)	(Scharlau, Spain)
เดกโตรส (Dextrose)	(Fisher scientific, UK)
ไตรตอน เอกซ์-100 (triton X-100)	(Scharlau, Spain)
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	(มรกต อินดัสตรีส์ จำกัด, ประเทศไทย)
โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin = BSA)	(Merck, Germany)
เปปโตน (peptone)	(Scharlau, Spain)
ผงดูดซับน้ำ (aquacide I)	(Calbiochem, Germany)
พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol, *p*NP)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเทต (*p*-nitrophenyl palmitate, *p*NPP)	(Sigma, U.S.A.)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Merck, Germany)
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 5H_2O$)	(Merck, Germany)
เมทานอล (methanol)	(Labscan, Thailand)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	(Merck, Germany)
โรดามีน บี (rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)
สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	(Carlo Erba, Milan, Italy)
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Hi media, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Hi media, India)
เอทิลแอซีเทต (ethyl acetate)	(Labscan, Thailand)
อิโคเซน (Eicosane)	(Aldrich, Germany)
เฮกเซน (hexane)	(Labscan, Thailand)
เฮปเทน (Heptane)	(Labscan, Thailand)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การคัดเลือกยีสต์ที่มีสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเพส

ทดสอบสมบัติในการผลิตไลเพสของเชื้อยีสต์ห้าสายพันธุ์ ได้แก่ *Candida rugosa* จากหน่วยวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ คณะวิทยาสาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *Yarrowia lipolytica Candida lipolytica Candida tropicalis Candida thailandica* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยการ streak เชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งชนิด YM ที่ผสมด้วยโรดามีน บี 0.001 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) และน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) (ดัดแปลงจากวิธีของ Schmidt-Dannart และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญ และการเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตไลเพส

2. การเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยไลเพสจากยีสต์ทั้ง 5 ชนิด

2.1. การเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเพส

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YM (ภาคผนวก ก) เพื่อเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ทำการถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร production (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมน้ำมันปาล์มปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นสารชักนำการผลิตไลเพส (Kamini และคณะ, 2000) นำไปเลี้ยงต่อในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองสารละลายเอนไซม์ไลเพสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 อีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไลเพสดังกล่าวไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการใช้ผงดูดซับน้ำร่วมกับถุงเยื่อเลือกผ่าน ที่ตัดช่วงน้ำหนักโมเลกุล 12,000-14,000 ไลเพสที่อยู่ภายในถุงจะมีความเข้มข้นขึ้น จากนั้นนำสารละลายไลเพสที่เข้มข้นขึ้นดังกล่าวมาทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนและ

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยวัดแอกทิวิตีด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทตเป็นสารตั้งต้น

2.2. การวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพส

การวัดแอกทิวิตีของสารละลายไลเพสทำโดยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี โดยใช้สารตั้งต้นเป็นพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทต วิธีการวัดดัดแปลงจากวิธีของ Maia และคณะ (2000) เพื่อให้เหมาะต่อการวัดในปริมาณน้อย ดังต่อไปนี้

สารที่ใช้ในปฏิกิริยาได้แก่ สารละลาย A ซึ่งประกอบด้วย 0.71 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทต ละลายใน 2-โพรพานอล สารละลาย B ประกอบด้วย 0.4 เปอร์เซ็นต์ ไตรตอนเอ็กซ์-100 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กัมอาระบิก ผสมสารละลาย A 1 ส่วนต่อ สารละลาย B ส่วน เป็นสารละลายผสมเพื่อใช้ในการวัด ปฏิกิริยาทำโดยเติมสารละลายตัวอย่างเอนไซม์ไลเพสที่ต้องการวัด 20 ไมโครลิตร ลงในสารละลายผสม 180 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต (U) ของแอกทิวิตีของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทตไปเป็นพาราไนโตรฟีนอลต่อนาที ขั้นตอนการเตรียมสารและกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล รวมทั้งการคำนวณแสดงอย่างละเอียดในภาคผนวกที่ ข ค ง ตามลำดับ

2.3. การวัดปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณโปรตีนวัดโดยใช้วิธี micro lowry's assay (Held และ Hurley, 2001) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้สารละลายมาตรฐานโปรตีนได้แก่ โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

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 แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร รายละเอียดการเตรียมสาร และกราฟมาตรฐานและการคำนวณแสดงในภาคผนวกที่ ข ค ง ตามลำดับ

2.4. การทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพส

ทำการทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสที่ได้จากน้ำสารละลายไลเพสของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่ได้จากหัวข้อ 2.1 มาทำการทดสอบ โดยทำปฏิกิริยาในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม (3.37 มิลลิลิตร) สารละลายเอนไซม์ไลเพส 10.5 มิลลิกรัมโปรตีน และ เมทานอล 365 ไมโครลิตร (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3) ซึ่งแบ่งเติมลงในปฏิกิริยาสามครั้งทุก 8 ชั่วโมง (Shimada และคณะ, 2002) ปรับปริมาตรในทุกขวดปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7 ภาวะที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเบื้องต้น ได้แก่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการวิเคราะห์การเกิดขึ้นของเมทิล-เอสเทอร์จากปฏิกิริยา ด้วยโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง เพื่อเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสูงสุดไปตรึงรูปต่อไป

3. การตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ด้วยวิธีดูดซับในภาวะที่ไม่มีน้ำ (adsorption in non aqueous media method) **บนตัวค้ำจุนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ** macroporous (Gao **และคณะ**, 2006)

3.1. การเตรียมตัวค้ำจุนและไลเพสสำหรับการตรึง

การเตรียมตัวค้ำจุนทำโดยล้างตัวค้ำจุนทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ AB-8 H103 NKA-9 NKA และ D4020 ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อตัวค้ำจุน 1 กรัม กรองตัวค้ำจุนด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ จากนั้นทำให้แห้งด้วยการเก็บในโถดูดความชื้นอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการตรึง ภาพวัสดุค้ำจุนแสดงในภาคผนวก จ ส่วนการเตรียมเอนไซม์เพื่อใช้ในการตรึงทำโดยเลี้ยง *C. rugosa* ในอาหารเหลว YM เพื่อเป็นหัวเชื้อ บ่มเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ทำการถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลวสูตร production นำไปเลี้ยงต่อในเครื่องเขย่าควบคุมความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงทำการเก็บเอนไซม์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองสารละลายเอนไซม์ไลเพสที่ได้จากการปั่น

เหวี่ยงด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไลเพสดังกล่าวไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเย็นได้เป็นเอนไซม์ไลเพสแบบแห้งสำหรับนำไปใช้ตรึงต่อไป

3.2. วิธีตรึงเอนไซม์ไลเพส

วิธีตรึงใช้วิธีของ Gao และคณะ (2002) โดยทำในหลอดแก้วฝาเกลียวสำหรับตรึงขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้เอนไซม์ไลเพสแห้ง 0.48 กรัม (14 มิลลิกรัมโปรตีน) ผสมเข้ากับตัวค้ำจุนแต่ละชนิดชนิดละ 1 กรัมเติมเฮปเทน ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดเพื่อเป็นสารตัวกลางในการตรึง ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศา-เซลเซียส จากนั้นทำการแยกไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ ล้างไลเพสตรึงรูปที่ได้ด้วยเฮปเทน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นทำแห้งโดยเก็บในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดแอกทิวิตีของไลเพสตรึงรูปด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทตเป็นสารตั้งต้น ตามข้อ 2.2 และนำไปทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อเลือกไลเพสตรึงรูปบนตัวค้ำจุนชนิดที่เร่งปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระและเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดไปศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาต่อไป

3.3. การเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปแต่ละชนิด

ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปแต่ละชนิด ทำในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ไลเพสตรึงรูป 1 กรัม ในกรณีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเติมน้ำลงในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ส่วนปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันทดสอบทั้งในภาวะที่ไม่เติมน้ำและเติมน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศา-เซลเซียส ปั่นกวนที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างชั้นบนจากการปั่นเหวี่ยงไปทำการวิเคราะห์การเกิดขึ้นของกรดไขมันอิสระ และเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา ด้วยโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง เพื่อเลือกไลเพสตรึงรูปที่เร่งปฏิกิริยาให้ผลิตภัณฑ์สูงที่สุดไปศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาต่อไป

4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป

4.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระ

4.1.1. ผลของปริมาณเอนไซม์

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม และสารละลายเอนไซม์ไลเพสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 7 ปริมาณ 5 10 15 และ 20 มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7 เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโคร-มาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.1.2. ผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม และปริมาณสารละลายเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 5 มิลลิกรัมโปรตีน (1.5 มิลลิลิตร) เติมน้ำในปฏิกิริยาปริมาตร 40 80 120 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) ตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโคร-มาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.1.3. ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ปริมาณสารละลายเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 5 มิลลิกรัมโปรตีน เติมน้ำในปฏิกิริยาปริมาตร 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) ใช้อุณหภูมิต่างๆกันในการเกิดปฏิกิริยาได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ความเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจาก

ปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.1.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม สารละลายเอนไซม์ไลเพส 5 มิลลิกรัมโปรตีน เติมน้ำในปฏิกิริยา 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) ใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ไปตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโท-กราฟฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปชนิด H103

4.2.1. ผลของอัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยใช้ไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนต่างๆกัน ได้แก่ 0.25:1 0.5:1 0.75:1 และ 1:1 กรัม ปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปทำการตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.2.2. ผลของปริมาณน้ำ

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยใช้ปริมาณน้ำในการเกิดปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ ปริมาณน้ำ 40 80 120 160 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรน้ำมัน ปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนระหว่างไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 กรัม ปริมาณ 1 กรัม ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปทำการตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.2.3. ผลของอุณหภูมิ

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆกัน ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนระหว่างไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 กรัม ปริมาณ 1 กรัม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรน้ำมัน เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.2.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนเท่ากับ 0.5:1 กรัม ปริมาณ 1 กรัม น้ำในปฏิกิริยาปริมาตร 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับไปตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.2.5. การนำไลเพสตรึงรูป H103 ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซ้ำ

นำไลเพสตรึงรูป H103 ที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแล้วในภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา (ตามข้อ 8.2.4) กลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซ้ำ โดยทำการกรองเก็บไลเพสตรึงรูปจากปฏิกิริยา ด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ ล้างด้วยเฮปเทนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยเก็บในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไลเพสตรึงรูปดังกล่าวไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ภาวะเดิมอีกครั้ง เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันจากปฏิกิริยาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง นำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ของน้ำมันปาล์มในปฏิกิริยา

5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป

5.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ

5.1.1. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเพสเบื้องต้น 10.5 มิลลิกรัมโปรตีน (3 มิลลิลิตร) และใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 เติมเมทานอลด้วยวิธีแบ่งเติมสามครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปั่นกวนที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

5.1.2. ผลของปริมาณเอนไซม์

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม และสารละลายเอนไซม์ไลเพส 5 10 15 และ 20 มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7 เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.1.3. ผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม และปริมาณสารละลายเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 20 มิลลิกรัมโปรตีน (5.7 มิลลิลิตร) เติมน้ำในปฏิกิริยาปริมาตร 0 40 80 120 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) ตามลำดับ เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.1.4. ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ปริมาณสารละลายเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 20 มิลลิกรัมโปรตีน เติมน้ำในปฏิกิริยาปริมาตร 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) ใช้อุณหภูมิต่างๆกันในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ ความเร็วในการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างจากปฏิกิริยาที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.1.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม สารละลายเอนไซม์ไลเพส 20 มิลลิกรัมโปรตีน เติมน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) ใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ไปตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9

5.2.1. ผลของอัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไลเพสตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนต่างๆกัน ได้แก่ 0.25:1 0.5:1 0.75:1 และ 1:1 กรัม ปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปทำการตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.2.2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 เติมเมทานอลแบบแบ่งเติมสามครั้ง ทุก 8 ชั่วโมงปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน 1:1 ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวนที่ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปทำการตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.2.3. ผลของปริมาณน้ำ

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ปริมาณน้ำในการเกิดปฏิกิริยาที่ปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ ปริมาณน้ำ 20 40 80 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1: 4 เติมเมทา-นอลแบบแบ่งเติมสามครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนระหว่างไลเพสต่อตัวค้ำจุน 1:1 กรัม ปริมาณ 1 กรัม ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และปั่นกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ไปทำการตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.2.4. ผลของอุณหภูมิ

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆกัน ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1: 4 เติมเมทานอลแบบแบ่งเติมสามครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนระหว่างไลเพสต่อตัวค้ำจุน 1:1 กรัม ปริมาณ 1 กรัม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรน้ำมัน เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.2.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 3 กรัม อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:4 เติมเมทานอลแบบแบ่งเติมสามครั้ง ทุก 8 ชั่วโมง ไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนเท่ากับ 1:1 กรัม ปริมาณ 1 กรัม น้ำในปฏิกิริยาปริมาตร 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน) อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ไปตรวจสอบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

5.2.6. การนำไลเพสตรึงรูป NKA-9 ไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซ้ำ

นำไลเพสตรึงรูป NKA-9 ที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแล้วในภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา (ตามข้อ 8.2.4) กลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซ้ำ โดยทำการกรองเก็บไลเพสตรึงรูปจากปฏิกิริยา ด้วยวิธีการกรองแบบสุญญากาศ ล้างด้วยเฮปเทนปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยเก็บในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไลเพสตรึงรูปดังกล่าวไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ภาวะเดิมอีกครั้ง เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันจากปฏิกิริยาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง นำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำ จนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ของน้ำมันปาล์มในปฏิกิริยา

6. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซิสด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากปฏิกิริยาทำละลายให้เจือจางลง 10 เท่า ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 1 ไมโครลิตร ด้วยหลอดคาร์ปิลลารี จุดลงบนแผ่นโครมาโท-กราฟี โดยแบ่งเลนการจุดตามแนวกว้างของแผ่นให้มีระยะห่างของแต่ละเลน 1 เซนติเมตร นำแผ่นโครมาโทกราฟีที่จุดตัวอย่างแล้วจุ่มลงในแท็งค์สารละลายอิ่มตัวที่ประกอบด้วยสารละลายของเฮกเซน : เอทิลแอซีเทต : กรดแอซีติก ในอัตราส่วน 90 : 10 : 2 โดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Samukawa และคณะ, 2000) รอจนสารละลายดังกล่าวเคลื่อนที่จนห่างจากระยะขอบบนของแผ่นโครมาโทกราฟี 1 นิ้ว จึงนำออกจากแท็งค์ แล้วนำไปพ่นด้วยสารละลายผสมระหว่าง กรด

ซัลฟิวริก และ เมทานอล ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำการอบแผ่นโครมาโทกราฟีด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟี โดยเทียบค่า R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงจุดกึ่งกลางของแถบสีที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่จุดสารถึงระยะทางที่สารละลายเคลื่อนได้บนแผ่นโครมาโทกราฟี หากแถบสีที่ปรากฏเป็นสารเดียวกันย่อมมีค่า R_f เท่ากัน วัดได้โดยเทียบระยะจากสารมาตรฐาน

7. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซิสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

7.1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากปฏิกิริยาไปปั่นเหวี่ยงตกตะตอน ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลให้ตกลงมาอยู่ในชั้นล่าง เตรียมตัวอย่างโดยทำละลายในเฮกเซน เพื่อทำเจือจาง ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 ไมโครลิตร เติม internal standard ได้แก่ อิโคเซนปริมาตร 10 ไมโครลิตร กรองและฉีดตัวอย่างลงในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร การคำนวณแสดงในภาคผนวก ง

7.2. การเตรียมเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

เตรียมสาร 2 ชนิด สำหรับเป็นเฟสเคลื่อนที่ คือ สาร A ประกอบด้วย เฮกเซน : ไอโซโพรพานอล : เอทิลแอซีเทต : กรดฟอร์มิก ปริมาณ 85:10:10:0.1 โดยปริมาตร สาร B ประกอบด้วย เฮกเซน : กรดฟอร์มิก ปริมาณ 100: 0.2 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร ต่อนาที โดยใช้เครื่องตรวจสอบ ชนิด ELSD (Evaporative light scattering detector)

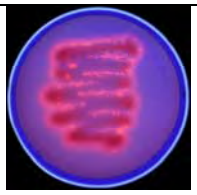
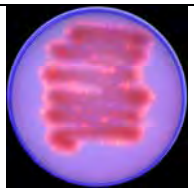
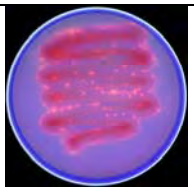
บทที่ 4

ผลการทดลอง

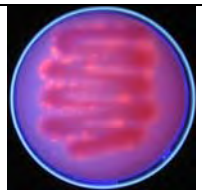
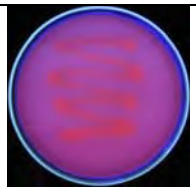
1. ผลการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส

การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสจากเชื้อยีสต์ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida rugosa Yarrowia lipolytica Candida lipolytica Candida tropicalis* และ *Candida thailandica* ทำโดยสังเกตการเรืองแสงของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารโรดามีน บี เป็นเวลา 3 วัน ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพสของยีสต์แต่ละสายพันธุ์บนอาหารโรดามีน บี

สายพันธุ์	รูปยีสต์บนอาหาร YM	ผลเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี	รูปยีสต์บนอาหารโรดามีน บี
Candida rugosa		+	
Yarrowia lipolytica		+	
Candida lipolytica		+	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Candida tropicalis		+	
Candida thailandica		-	

หมายเหตุ เครื่องหมาย + ในตารางหมายถึง เรืองแสงบนอาหาร โรดามีน บี และ – คือไม่เรืองแสงบนอาหาร โรดามีน บี

2. การเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยไลเพสจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

2.1. ผลการหาค่าไลเพสแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีนของสารละลายไลเพสที่ได้จากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

ทำการเตรียมหัวเชื้อและเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเพสในอาหารเหลวสูตร production ที่เติมน้ำมันปาล์มเป็นสารชักนำ ทำการเก็บเอนไซม์ไลเพสชนิดปล่อยออกมานอกเซลล์ จากนั้นทำให้สารละลายเอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีใช้ถุงเยื่อเลือกผ่านขนาดน้ำหนักโมเลกุล 12,000-14,000 ร่วมกับผงดูดซับน้ำ เลือกดูดเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ภายในถุง ไปทำการตรวจวัดไฮโดรไลติกแอกทิวิตีของสารละลายไลเพสโดยใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทตเป็นสารตั้งต้น และหาปริมาณโปรตีน นำไปคำนวณหาค่าแอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสแต่ละชนิดได้ดังตารางที่ 4.2 พบว่า สารละลายไลเพสจาก *C. rugosa* มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 16.476 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นจึงนำสารละลายไลเพสไปทดสอบคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริทรานส์เอสเทอริฟิเคชันอีกครั้ง

ตารางที่ 4.2 ไลเพสแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกทิวิตีจำเพาะ ที่วัดได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีดูดซับน้ำออกแล้วของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์ยีสต์	ไลเพสแอกทิวิตี (ยูนิต/มล.)	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)
C. rugosa	7.216±0.031	0.438±0.008	16.476
Y. lipolytica	0.023±0.009	0.785±0.009	0.030
C. lipolytica	0.001±0.005	0.480±0.006	0.022
C. tropicalis	0.007±0.013	0.778±0.023	0.009
C. thailandica	0±0.0026	1.181±0.010	0

*1 หน่วยยูนิตของไลเพสแอกทิวิตี หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อปลดปล่อยกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยา 1 ไมโครโมลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที

2.2. การทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพส

การทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ทำโดยเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มโดยใช้สารละลายไลเพสของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยใช้ปริมาณสารละลายเอนไซม์จากยีสต์แต่ละสายพันธุ์เท่ากันคือ 3.5 มิลลิกรัมโปรตีน ปรับปริมาตรรวมของปฏิกิริยาทั้งหมดให้เท่ากันด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7 เติมเมทานอลลงในปฏิกิริยาด้วยวิธีแบ่งเติมสามครั้ง เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์การเกิดขึ้นของเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าสารละลายไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ *C. rugosa* เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้สูงที่สุด ได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 22.15 และ 35.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ที่เหลืออีก 4 สายพันธุ์ ไม่พบการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์การเกิดขึ้นของเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งด้วยสารละลายไลเพสของยีสต์ 5 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

สายพันธุ์ยีสต์	% เมทิลเอสเทอร์	
	ที่ 24 ชั่วโมง	ที่ 48 ชั่วโมง
C. rugosa	22.15	35.93
Y. lipolytica	0	0
C. lipolytica	0	0
C. tropicalis	0	0
C. thailandica	0	0

3. การตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ด้วยวิธีดูดซับในภาวะที่ไม่มีน้ำ บนตัวค้ำจุนเรซินชนิดมีรูพรุนแบบ macroporous

3.1. แอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสจาก *C. rugosa* ที่ใช้ในการตรึงรูป

เอนไซม์ไลเพสจาก *C. rugosa* สำหรับนำไปตรึงรูป เตรียมโดย ทำการเตรียมหัวเชื้อ และถ่ายเลี้ยงในอาหารสูตร production จากนั้นเก็บสารละลายเอนไซม์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงตกตะกอน นำสารละลายเอนไซม์ดังกล่าวมาแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเย็น เพื่อเปลี่ยนสารละลายเอนไซม์ ให้เป็นผงเอนไซม์แห้ง วัดแอกทิวิตีของไลเพส และหาปริมาณโปรตีน โดยทำการละลายผงเอนไซม์แห้งให้มีความเข้มข้นขึ้นจากเดิม 10 เท่า ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7 ค่าแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และ แอกทิวิตีจำเพาะของไลเพสที่ใช้สำหรับตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ไลเพสแอกทิวิตี ปริมาณโปรตีน และ แอกทิวิตีจำเพาะ ของสารละลายเอนไซม์ไลเพสชนิดหยาบและชนิดที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธีทำแห้งแบบเย็นแล้ว

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	ไลเพสแอกทิวิตี (ยูนิต/มล.)	แอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)
ไลเพสชนิดหยาบก่อนการทำแห้ง	0.36±0.07	1.43±0.15	3.97
ไลเพสชนิดหยาบหลังการทำแห้ง	3.58±0.19	10.12±1.33	2.83

*1 หน่วยยูนิตของไลเพสแอกทิวิตี หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อปลดปล่อยกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยา 1 ไมโครโมลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที

3.2. การตรึงรูปไลเพสด้วยวิธีการดูดซับในภาวะที่ไม่ใช้น้ำและเปรียบเทียบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและ ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปแต่ละชนิด

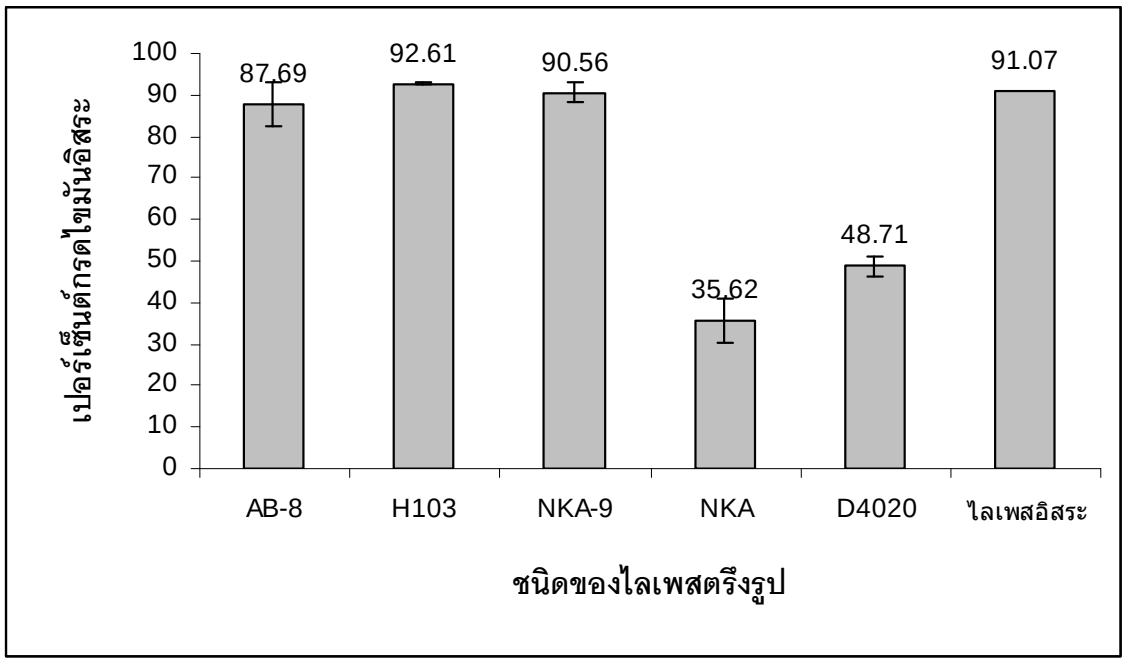
การตรึงรูปไลเพสจาก *C. rugosa* ด้วยวิธีการดูดซับในภาวะที่ไม่ใช้น้ำเป็นสารตัวกลาง การหาแอกทิวิตีของไลเพสตรึงรูปแต่ละชนิด ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทต เป็นสารตั้งต้น ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ไลเพสแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป 5 ชนิด

ชนิดของเอนไซม์ตรึงรูป	ไลเพสแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต/กรัม)
AB-8	0.343±0.015
H103	0.097±0.009
NKA	0.267±0.049
NKA-9	0.188±0.072
D4020	0.270±0.009

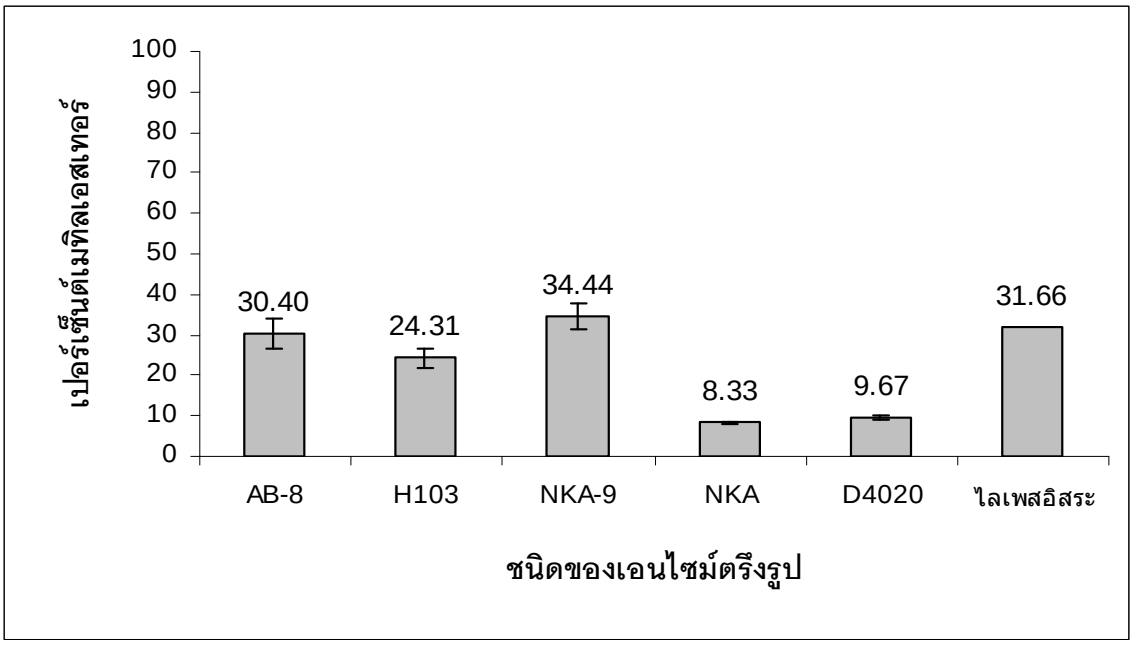
*1 หน่วยยูนิตของไลเพสแอกทิวิตี หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องใช้เพื่อปลดปล่อยกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยา 1 ไมโครโมลต่อเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 1 นาที

จากนั้นนำไลเพสตรึงรูปดังกล่าวไปทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่าไลเพสตรึงรูปบนตัวค้ำจุนชนิด H103 มีสมบัติเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาได้สูงที่สุดเท่ากับ 92.61 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ได้ 90.56 เปอร์เซ็นต์ และ AB-8 D4020 NKA ตามลำดับ โดยเมื่อเทียบกับผลจากปฏิกิริยาที่เร่งด้วยสารละลายไลเพสอิสระในปริมาณที่เท่ากันแล้ว กล่าวได้ว่าไลเพสตรึงรูปชนิด H103 มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของไลเพสอิสระ จึงเลือกไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ไปศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มต่อไป



รูปที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ตรึงรูปชนิดต่างๆ และเอนไซม์อิสระในปริมาณที่เท่ากัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากนั้นทำการทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิดต่างๆ โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง พบว่า ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ไม่มีการเติมน้ำลงในปฏิกิริยาไม่ตรวจพบการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์เลย ในขณะที่ปฏิกิริยาที่มีการเติมน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.2 ไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 มีสมบัติเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาได้สูงที่สุดเท่ากับ 34.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นไลเพสตรึงรูปชนิด AB-8 ได้ 30.40 เปอร์เซ็นต์ และ H103 D4020 NKA ตามลำดับ โดยเมื่อเทียบกับผลจากปฏิกิริยาที่เร่งด้วยสารละลายไลเพสอิสระในปริมาณที่เท่ากันแล้ว กล่าวได้ว่า ไล-เพสตรึงรูปชนิด NKA-9 มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงสุดเมื่อเทียบกับไลเพสอิสระ จึงเลือกไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ไปศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มต่อไป



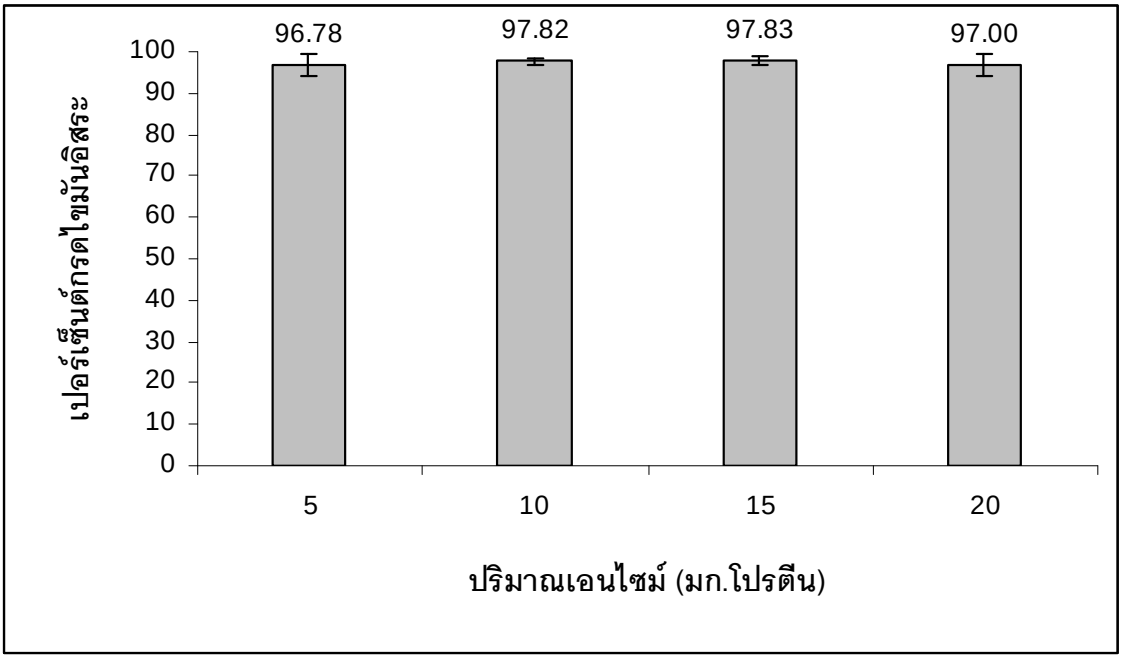
รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิดต่างๆ และเอนไซม์อิสระในปริมาณที่เท่ากัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป

4.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระ

4.1.1. ผลของปริมาณเอนไซม์

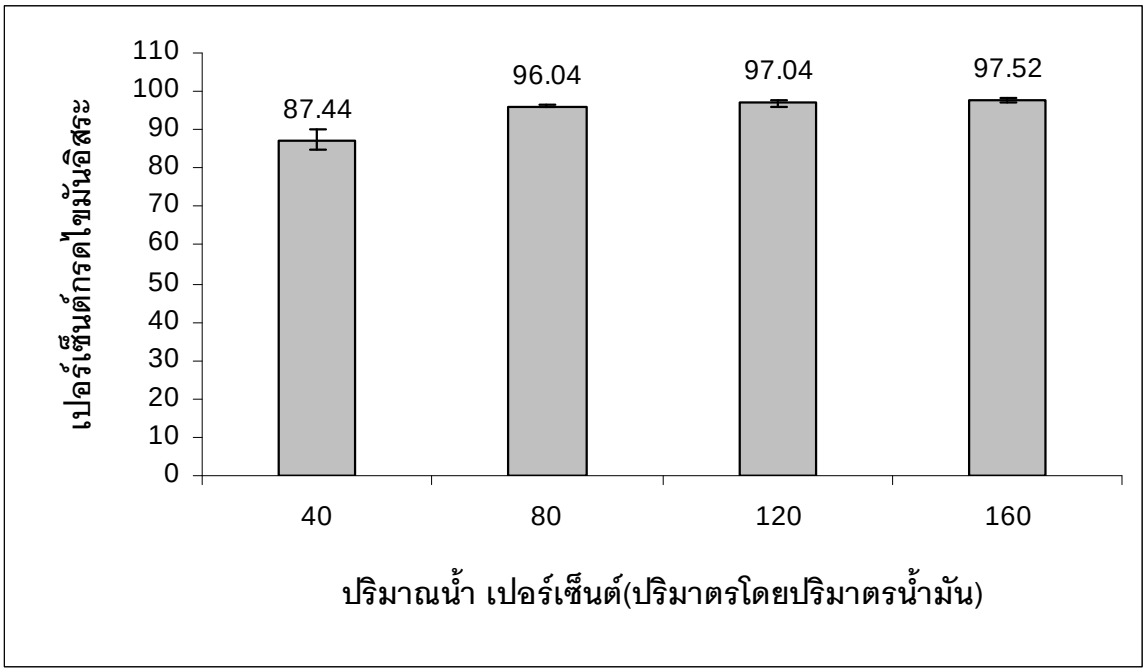
การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำโดยใช้สารละลายเอนไซม์ไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa* ที่เข้มข้นขึ้น 10 เท่าจากข้อ 3.1 ปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ 5 10 15 และ 20 มิลลิกรัมโปรตีน นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม จากการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณสารละลายเอนไซม์จาก 5-20 มิลลิกรัมโปรตีน ให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกปริมาณสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยา 96.78 เปอร์เซ็นต์ ไปทดสอบผลของปริมาณน้ำต่อไป



รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบที่ปริมาณต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.1.2. ผลของปริมาณน้ำ

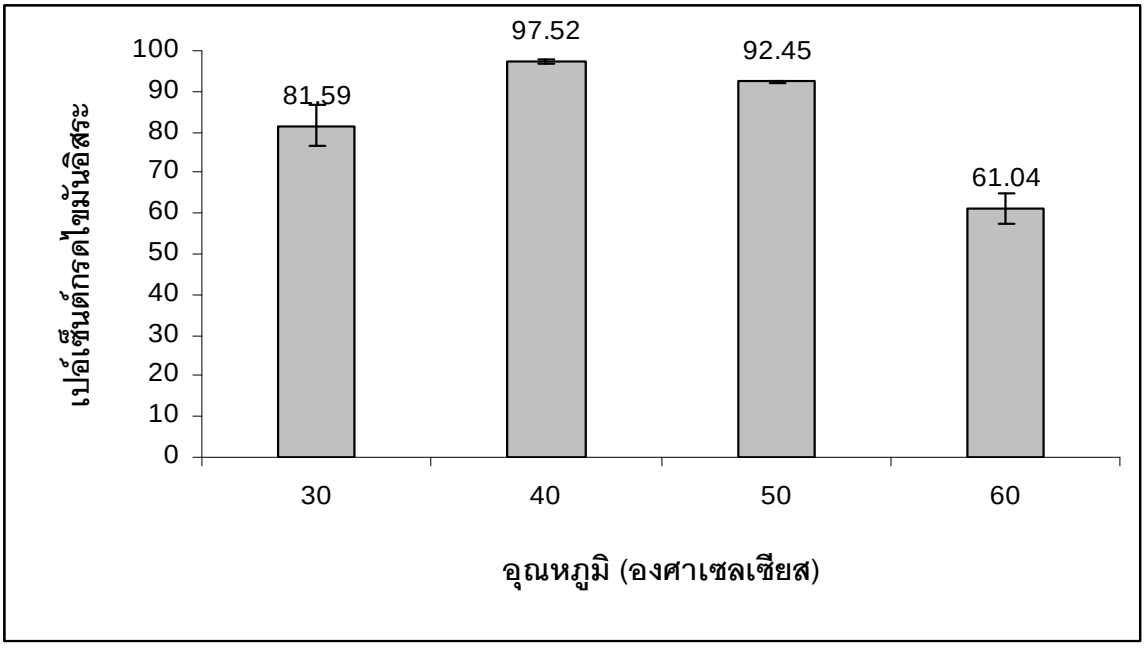
การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำโดยใช้ปริมาณน้ำต่างๆกัน ได้แก่ 40 80 120 และ 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม จากการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณน้ำให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำจาก 40-160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณน้ำ 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยา 97.52 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ไปทดสอบผลของอุณหภูมิต่อไป



รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบที่ปริมาณน้ำต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.1.3. ผลของอุณหภูมิ

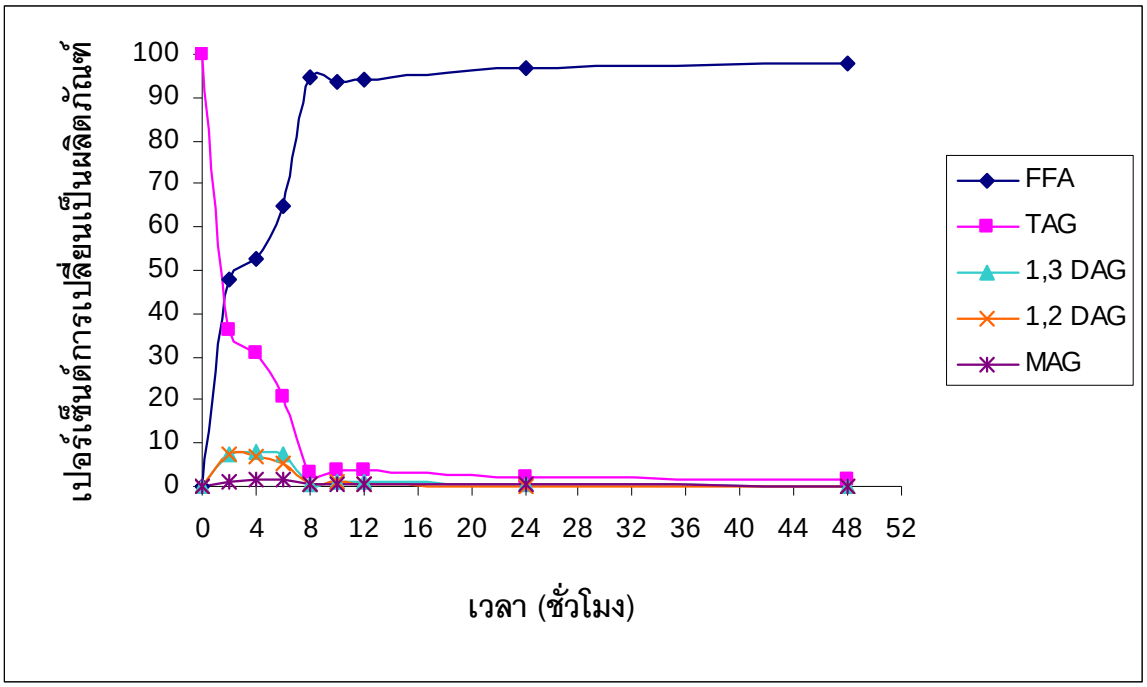
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำโดยใช้อุณหภูมิต่างๆกัน ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม จากการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาที่สุดคือ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระ 97.52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นและลง 10 องศาเซลเซียส เป็น 50 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีการลดลงของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระเล็กน้อย แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกเป็น 60 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้ผลของเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระลดลงอย่างมาก



รูปที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบที่อุณหภูมิต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง

4.1.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารละลายไลเพสอิสระ

การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำโดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตามภาวะที่เหมาะสม ดังได้ทำการทดลองมาแล้วข้างต้น เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่า ที่เวลา 0-8 ชั่วโมงแรกของการเกิดปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยามีการลดลงอย่างรวดเร็ว จนเกือบหมดที่เวลา 8 ชั่วโมง พร้อมกับมีการเกิดขึ้นของ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เพิ่มมากขึ้น หลัง 8 ชั่วโมงของการเกิดปฏิกิริยา พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระในปฏิกิริยา และการลดลงของสารตั้งต้นอย่างช้าๆ จนได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูงสุด 98.05 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง



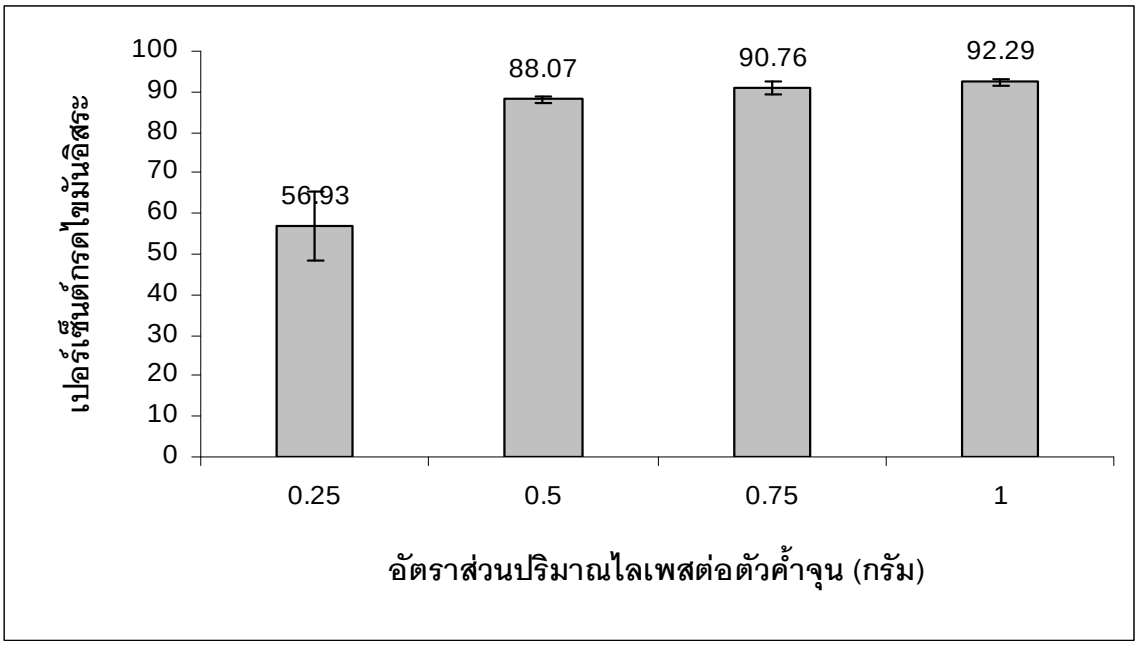
รูปที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยใช้สารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa* โดย FFA คือ กรดไขมันอิสระ TAG คือ ไตรกลีเซอไรด์ 1,3 DAG คือ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ 1.2 DAG คือ 1,2 ไดกลีเซอไรด์ และ MAG คือ โมโนกลีเซอไรด์ จากปฏิกิริยา

4.2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปชนิด H103

4.2.1. อัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน

การศึกษาผลของอัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน ต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำโดยใช้ผงไลเพสแห้งจาก *C. rugosa* ปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ 0.25 0.5 0.75 และ 1 กรัมของผงแห้ง คิดเป็นปริมาณโปรตีน 7 14 21 29 มิลลิกรัมโปรตีน ที่ตรึงรูปกับตัวค้ำจุนชนิด H103 ปริมาณ 1 กรัม นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนตั้งแต่ 0.25-1 กรัม ให้ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระที่อัตราส่วน 0.5-1 นั้นมีความใกล้เคียงกัน

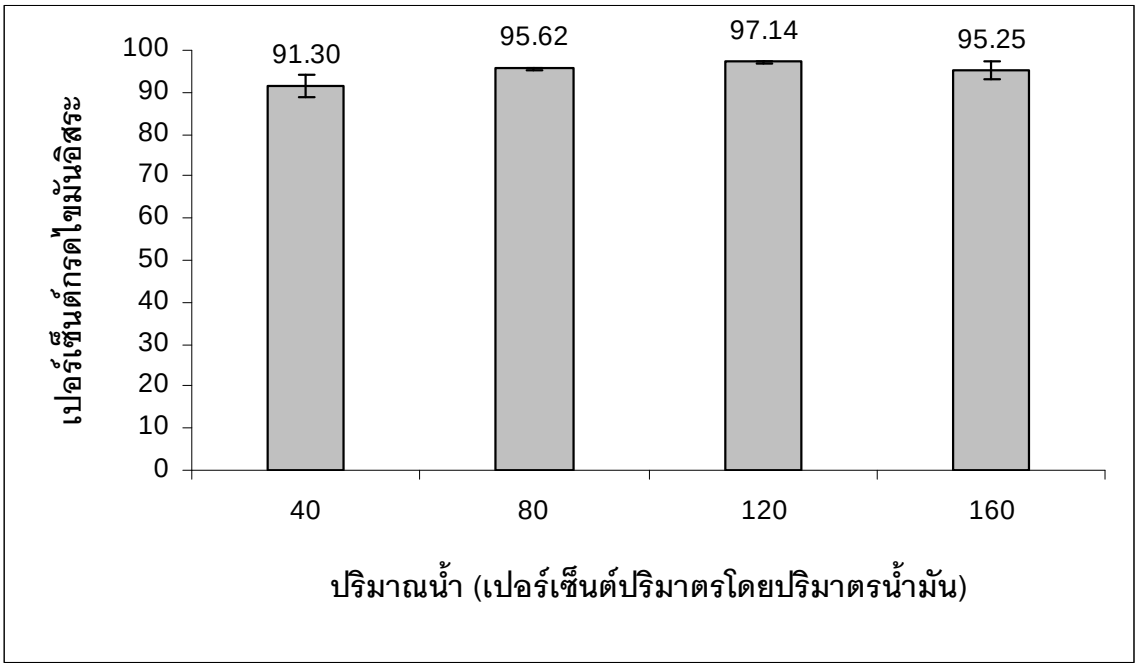
มาก ดังนั้นจึงเลือกที่อัตราส่วนไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 กรัม ที่ให้เปอร์เซ็นการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระ 88.07 เปอร์เซ็นต์ ไปทำการศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อไป



รูปที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.2.2. ผลของปริมาณน้ำ

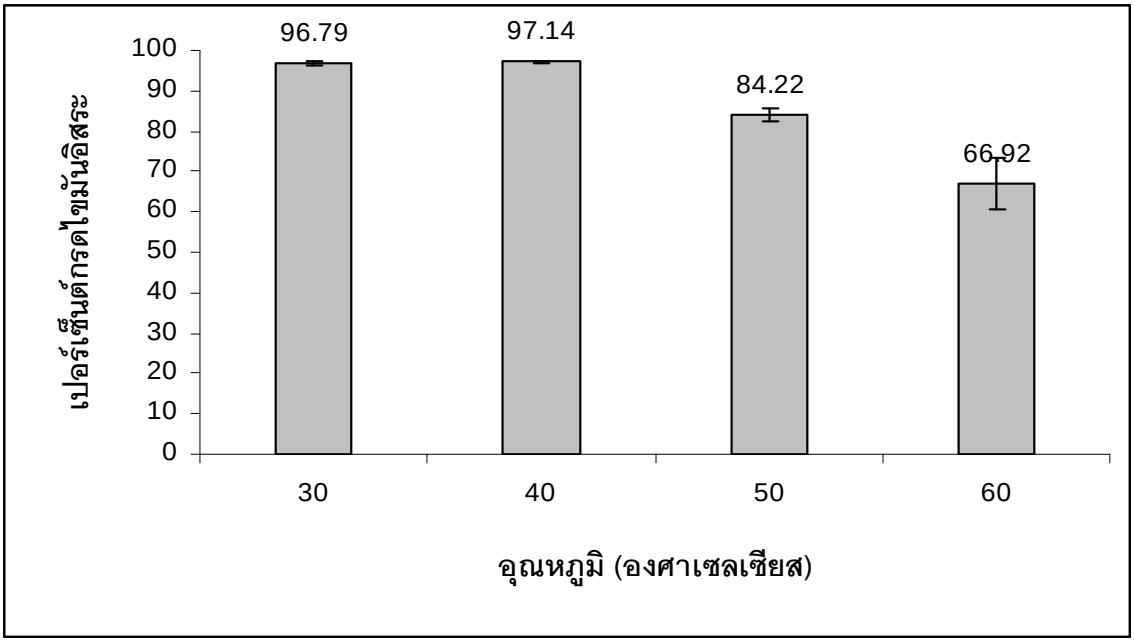
การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูป ทำโดยใช้ ปริมาณน้ำต่างๆกัน ได้แก่ 40 80 120 และ 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณน้ำจาก 40-120 เปอร์เซ็นต์ให้ผลการเกิดปฏิกิริยามากขึ้นตามลำดับ และลดลงในปริมาณน้ำที่มากขึ้นเป็น 160 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ ไปศึกษาผลของอุณหภูมิต่อไป



รูปที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.2.3. ผลของอุณหภูมิ

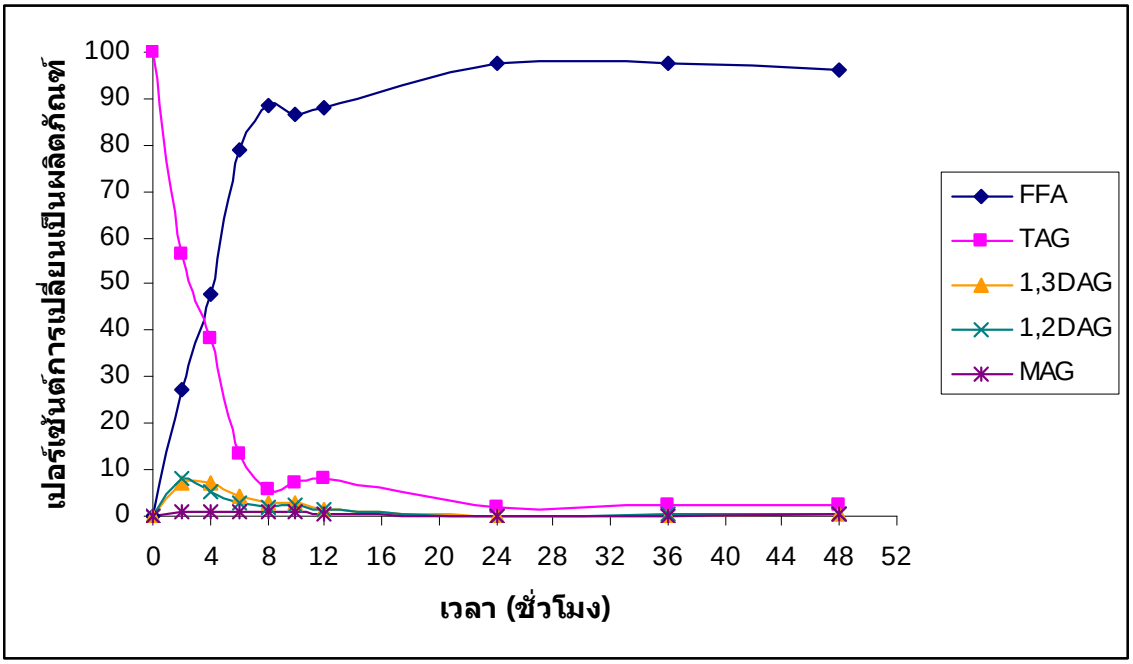
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูป ทำโดยใช้ อุณหภูมิต่างๆกัน ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.9 พบว่าที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 97.14 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียส ได้ค่าการเปลี่ยนแปลงเป็นกรดไขมันอิสระลดต่ำลงเล็กน้อยเท่ากับ 96.79 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่ามีเปอร์เซ็นการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระลดต่ำลงชัดเจนตามลำดับ



รูปที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง

4.2.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูป

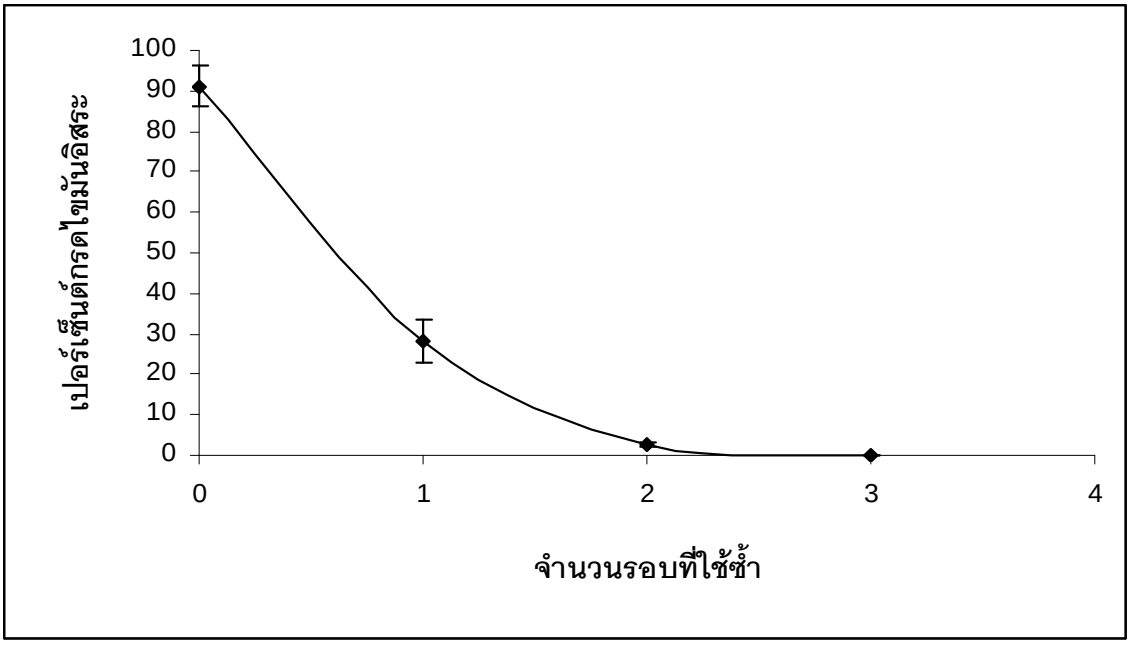
การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูป ทำโดยทดสอบการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มตามภาวะที่เหมาะสม ดังได้ทำการทดลองมาแล้วข้างต้น ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.10 พบว่า ที่เวลา 0-8 ชั่วโมงแรกของการเกิดปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยามีการลดลงอย่างรวดเร็ว จนเกือบหมดที่เวลา 8 ชั่วโมง พร้อมกับมีการเกิดขึ้นของ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เพิ่มมากขึ้น หลัง 8 ชั่วโมงของการเกิดปฏิกิริยา พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระในปฏิกิริยา และการลดลงของของสารตั้งต้นอย่างช้าๆ จนได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูงสุด 97.74 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง จากนั้นปฏิกิริยาจึงเริ่มลดลงเล็กน้อยจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการผันกลับของปฏิกิริยาบางส่วน



รูปที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103 โดย FFA คือ กรดไขมันอิสระ TAG คือ ไตรกลีเซอไรด์ 1,3 DAG คือ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ 1.2 DAG คือ 1,2 ไดกลีเซอไรด์ และ MAG คือ โมโนกลีเซอไรด์ จากปฏิกิริยา

4.2.5. การนำไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซ้ำ

การนำไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแล้วมาทดสอบสมบัติในการนำกลับเร่งปฏิกิริยาซ้ำ ทำโดย นำไลเพสตรึงรูปไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสตามภาวะที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากนั้นทำการกรองเก็บไลเพสตรึงรูปที่เร่งปฏิกิริยาสิ้นสุดไปแล้วด้วยการกรองแบบสุญญากาศ ล้างไลเพสตรึงรูปดังกล่าวด้วยเฮปเทน เพื่อขจัดสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่เกาะติดอยู่ให้หลุดไป จากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในโถดูดความชื้น รอให้แห้ง 12 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเร่งปฏิกิริยาแบบเดิมซ้ำอีกครั้ง เช่นนี้ต่อเนื่องไป ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.11 ไลเพสตรึงรูปชนิด H103 สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้อีก 1 ครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระจากการใช้ทั้งสองครั้งเท่ากับ 91.21 และ 28.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ในแต่ละรอบของการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำ

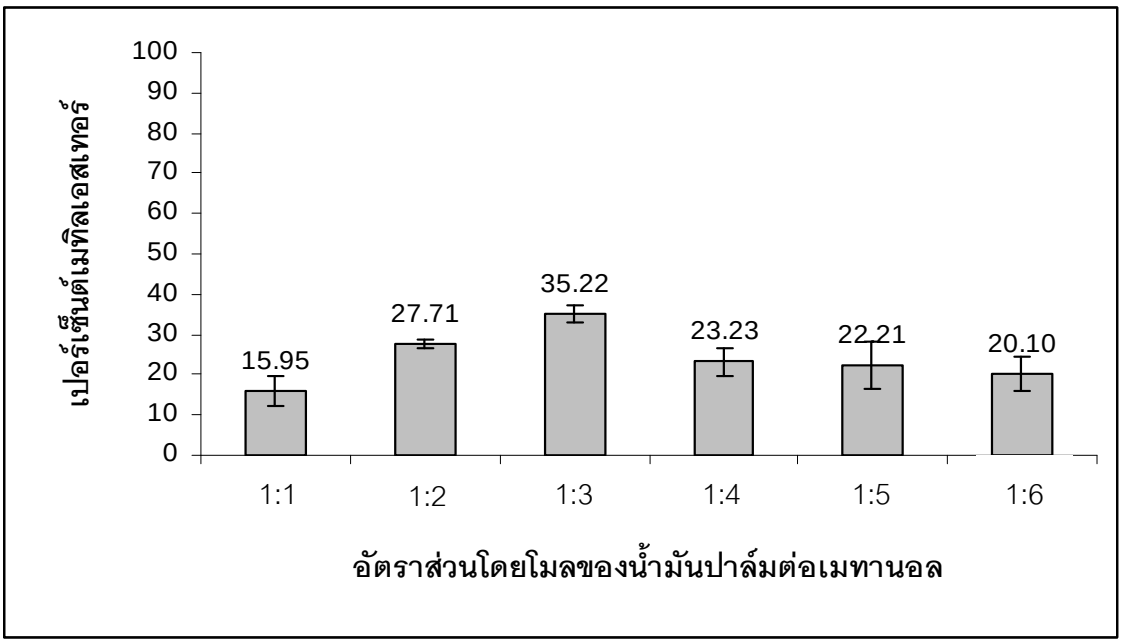
5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป

5.1. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ

5.1.1. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล

การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล ต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่างๆกันได้แก่ 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเกิดขึ้นของเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.12 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่ให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดได้แก่ที่ 1:3 ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 35.22 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มหรือลดอัตราส่วนลงจาก 1:3 ลงไป จะได้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดน้อยลงตามการเพิ่มหรือ

ลดเมทานอลลงไปตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลไปศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อไป

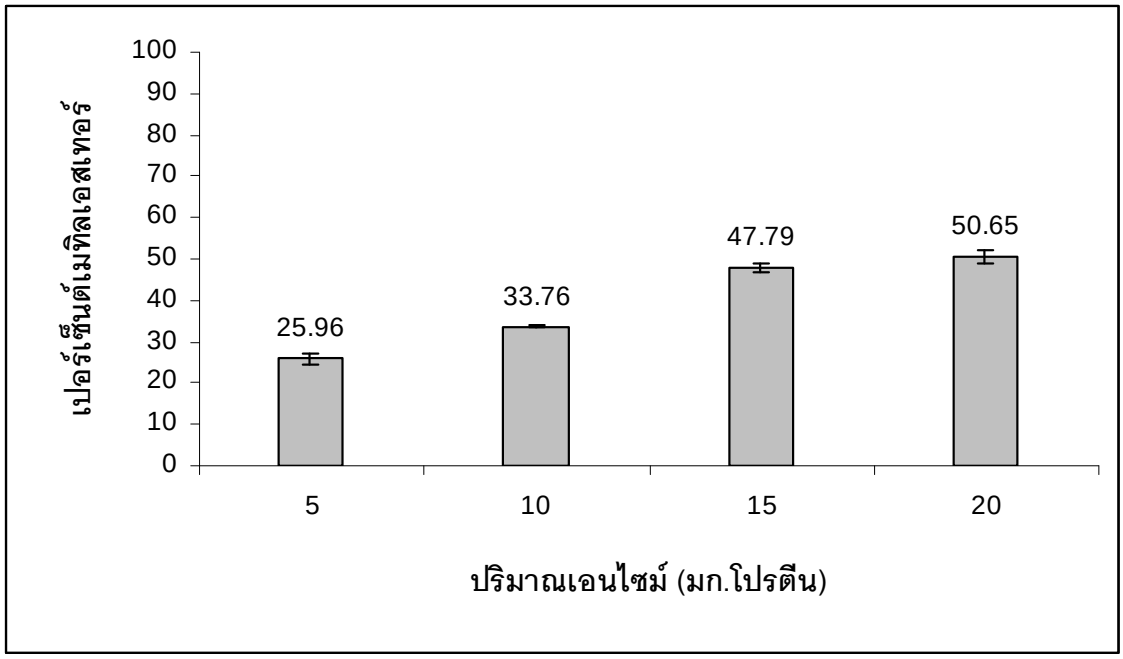


รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.1.2. ผลของปริมาณเอนไซม์

การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำโดยใช้สารละลายเอนไซม์ไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa* ที่เข้มข้นขึ้น 10 เท่าจากข้อ 3.1 ปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ 5 10 15 และ 20 มิลลิกรัมโปรตีน นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ปรับปริมาตรของปฏิกิริยาให้เท่ากันด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 7 ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.13 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณสารละลายเอนไซม์จาก 5-20 มิลลิกรัมโปรตีน ให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย โดยปริมาณสารละลายเอนไซม์ 20 มิลลิกรัม

โปรตีน ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอส-เทอร์จากปฏิกิริยาได้สูงที่สุด 50.65 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกปริมาณเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมโปรตีน ไปทดสอบผลของปริมาณน้ำต่อไป

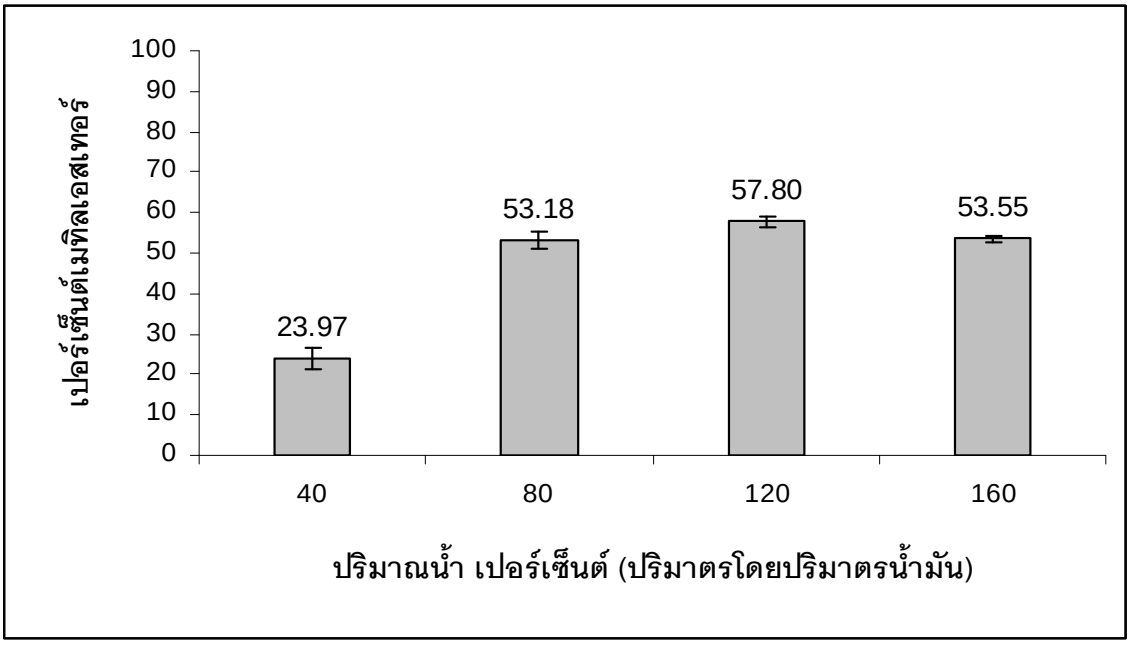


รูปที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่ปริมาณเอนไซม์ต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.1.3. ผลของปริมาณน้ำ

การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำโดยใช้ ปริมาณน้ำต่างๆกัน ได้แก่ 40 80 120 และ 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.14 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณน้ำให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำจาก 40-120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) และจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำเป็น 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณน้ำ 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์

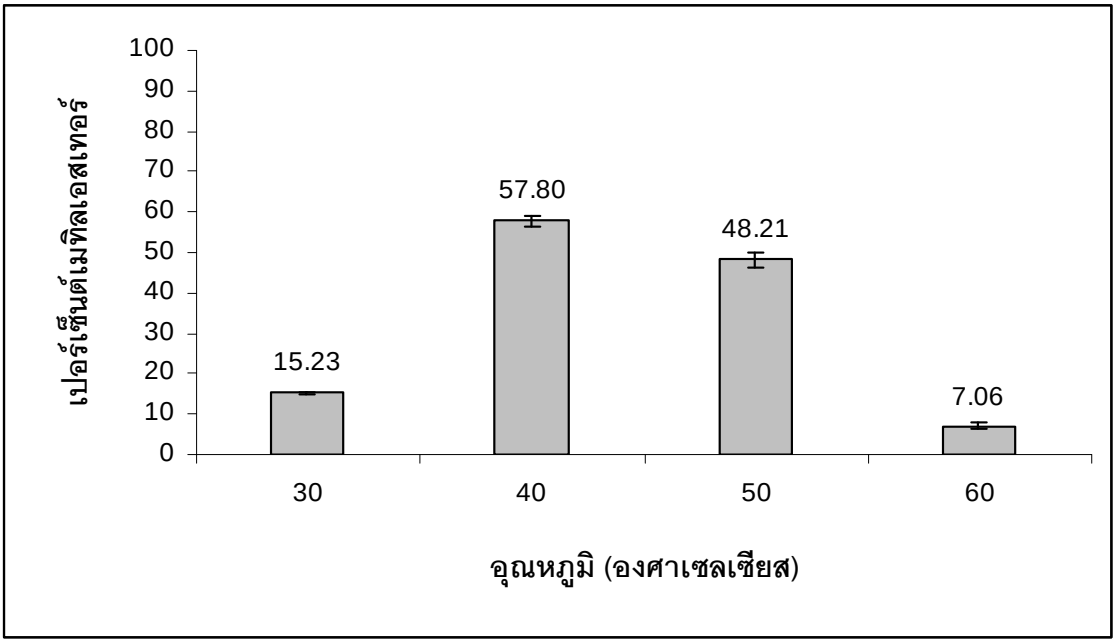
เมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา 57.80 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ไปทดสอบผลของอุณหภูมิต่อไป



รูปที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.1.4. ผลของอุณหภูมิ

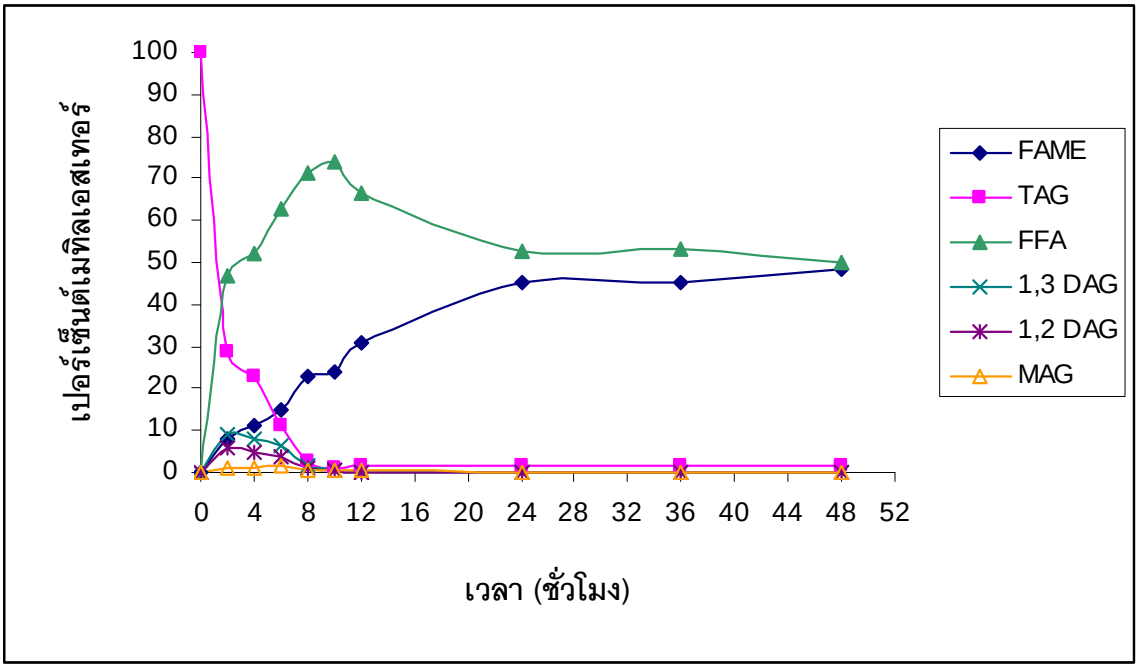
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำโดยใช้ อุณหภูมิต่างๆกัน ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.15 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาที่สุดคือ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ 57.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์รองลงมาเท่ากับ 48.21 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นที่ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งให้ผลของการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ต่ำลงมาก



รูปที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบ ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง

5.1.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสารละลายไลเพสอิสระ

การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำโดยเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ตามภาวะที่เหมาะสม ดังได้ทำการทดลองมาแล้วข้างต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.16 พบว่า ที่เวลา 0-10 ชั่วโมงแรกของการเกิดปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยามีการลดลงอย่างรวดเร็ว จนเกือบหมดที่ชั่วโมงที่ 10 พร้อมกับมีการเกิดขึ้นของเมทิลเอส-เทอร์ กรดไขมัน ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกรดไขมันอิสระที่เวลา 10 ชั่วโมงมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นถึง 73.91 เปอร์เซ็นต์ หลัง 10 ชั่วโมงของการเกิดปฏิกิริยา พบว่ามีกรดไขมันอิสระในปฏิกิริยามีปริมาณลดลง และพบการเพิ่มขึ้นของเมทิลเอสเทอร์ขึ้นแทนอย่างสม่ำเสมอ จนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมง จะมีการเพิ่มขึ้นของเมทิลเอสเทอร์และการลดลงของกรดไขมันอิสระอย่างช้าๆ จนได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง



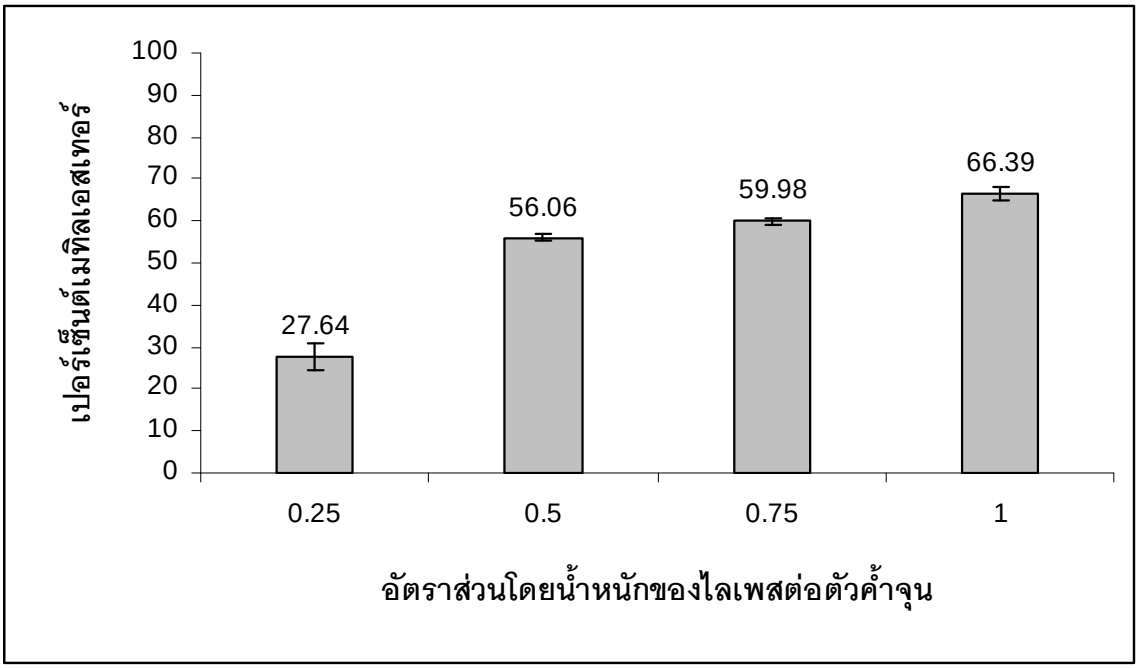
รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยใช้สารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa* โดย FAME คือ เมทิลเอสเทอร์ TAG คือ ไตรกลีเซอไรด์ FFA คือ กรดไขมันอิสระ 1,3 DAG คือ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ 1.2 DAG คือ 1,2 ไดกลีเซอไรด์ และ MAG คือ โมโนกลีเซอไรด์ จากปฏิกิริยา

5.2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9

5.2.1. อัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน

การศึกษาผลของอัตราส่วนของปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุน ต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ทำโดยใช้ผงไลเพสแห้งจาก *C. rugosa* ปริมาณต่างๆกัน ได้แก่ 0.25 0.5 0.75 และ 1 กรัมของผงแห้ง คิดเป็นปริมาณโปรตีน 7 14 21 29 มิลลิกรัมโปรตีน ที่ตรึงรูปกับตัวค้ำจุนชนิด NKA-9 ปริมาณ 1 กรัม นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนตั้งแต่ 0.25-1 กรัม ให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกที่อัตราส่วนไลเพสต่อตัว

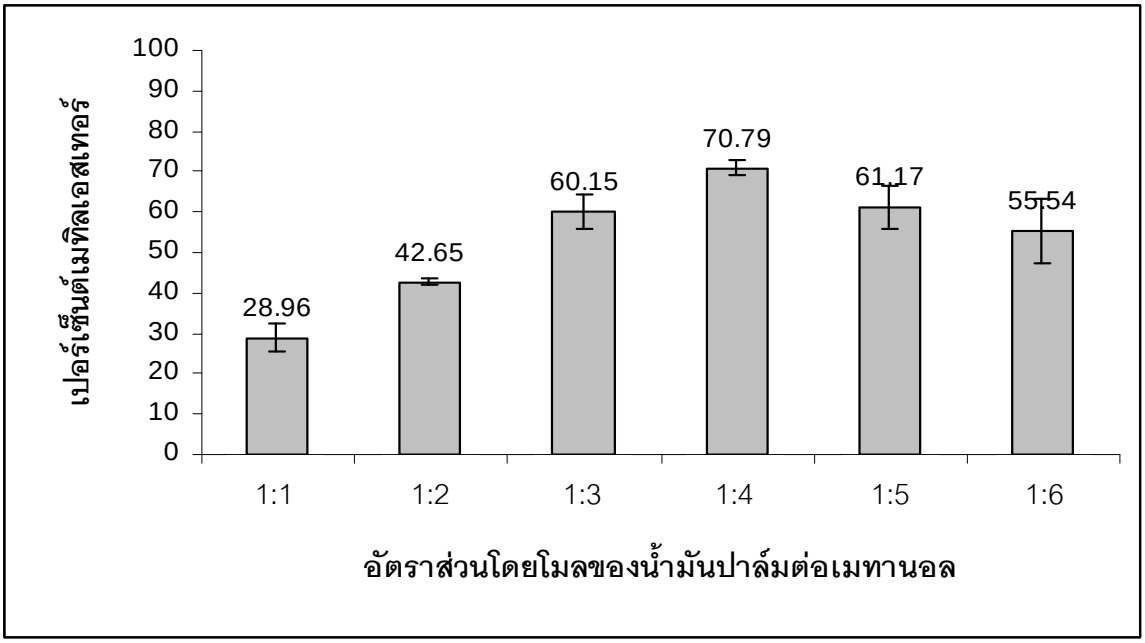
ค้ำจุน 1:1 กรัม ที่ให้เปอร์เซ็นการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ 66.39 เปอร์เซ็นต์ ไปทำการศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้นต่อไป



รูปที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.2.2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล

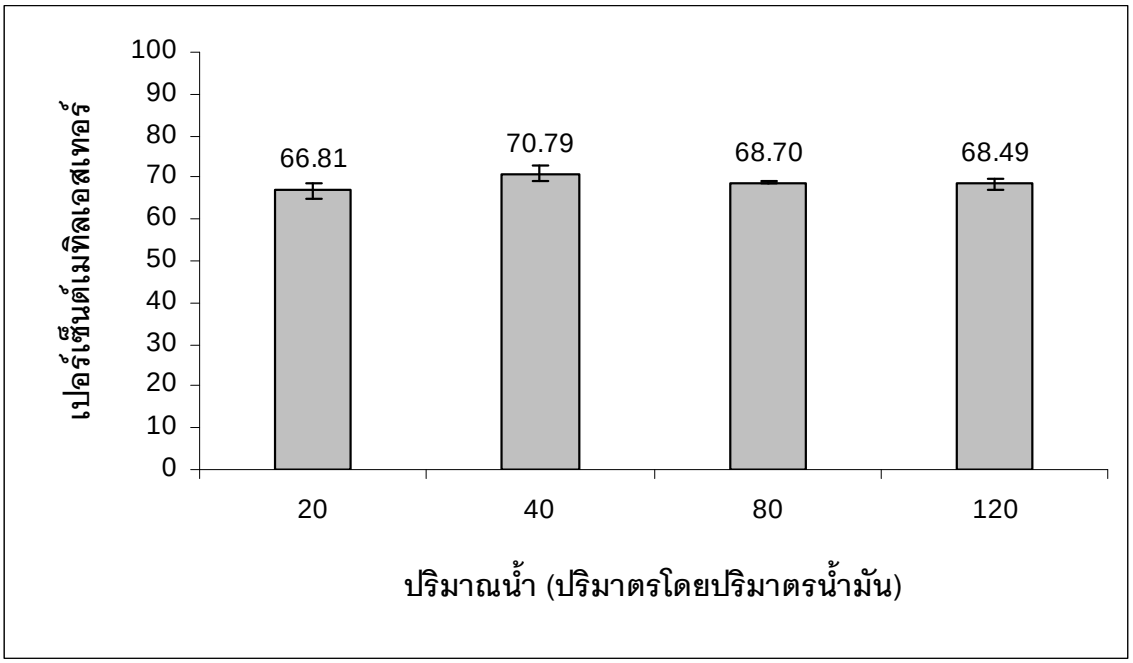
การศึกษาผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล ต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป ทำโดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่างๆกันได้แก่ 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.18 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลที่ให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดได้แก่ที่ 1:4 ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 70.79 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:4 ไปศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อไป



รูปที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง

5.2.3. ผลของปริมาณน้ำ

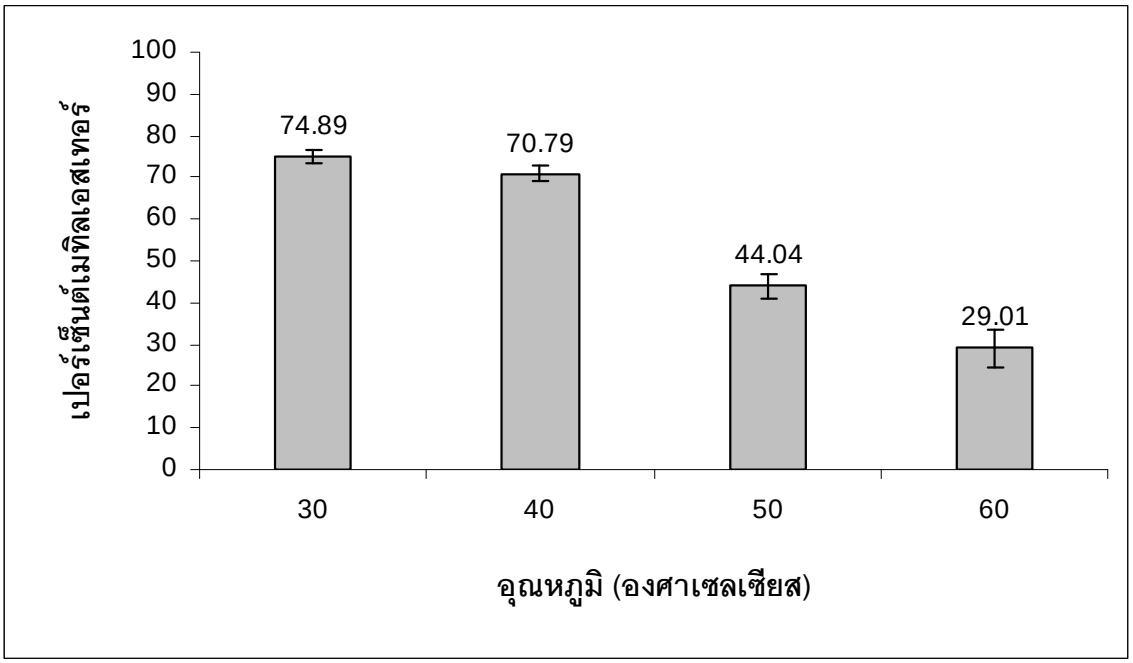
การศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป ทำโดยใช้ ปริมาณน้ำต่างๆกัน ได้แก่ 40 80 120 และ 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา ด้วยเครื่องโครมาโท-กราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.19 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณน้ำให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำจาก 20-40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) และจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำเป็น 80 และ 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา 70.79 เปอร์เซ็นต์ ไปทดสอบผลของอุณหภูมิต่อไป



รูปที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่ปริมาณน้ำต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.2.4. ผลของอุณหภูมิ

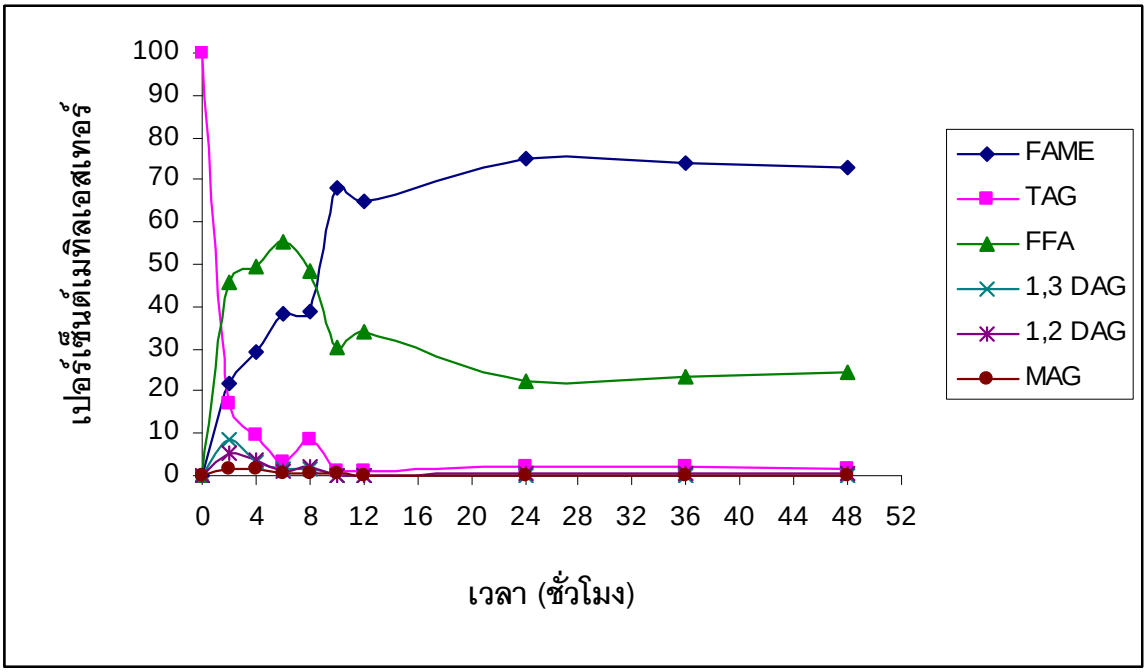
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป ทำโดยใช้อุณหภูมิต่างๆกัน ได้แก่ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส นำไปทดสอบเปรียบเทียบผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันน้ำมันปาล์ม ทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.19 พบว่า ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 30 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดเท่ากับ 74.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดต่ำลงเล็กน้อยเท่ากับ 70.79 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่ามีเปอร์เซ็นการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ลดต่ำลงเป็น 44.04 และ 29.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปที่อุณหภูมิต่างๆกัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง

5.2.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป

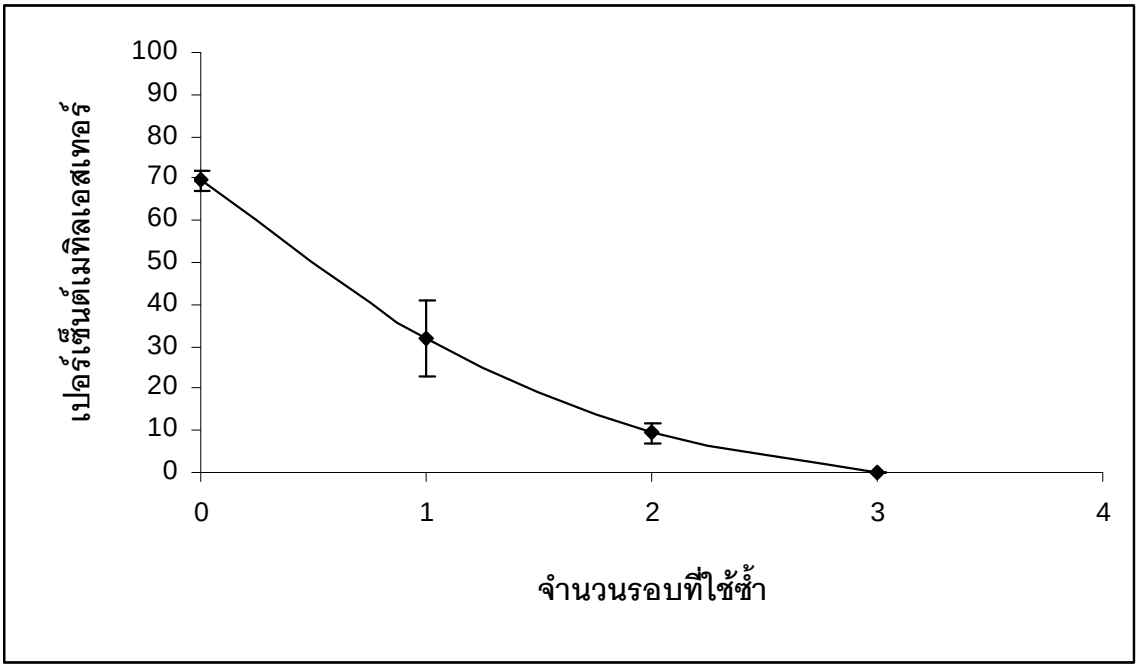
การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป ทำโดยเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม ตามภาวะที่เหมาะสมดังได้ทำการทดลองมาแล้วข้างต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.21 พบว่า ที่เวลา 0-6 ชั่วโมงแรกของการเกิดปฏิกิริยาไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยามีการลดลงอย่างรวดเร็ว จนเกือบหมดที่เวลา 6 ชั่วโมง พร้อมกับมีการเกิดขึ้นของ กรดไขมันอิสระสูงถึง 55.35 เปอร์เซ็นต์ หลังชั่วโมงที่ 6 ของการเกิดปฏิกิริยา พบว่ามีการลดลงของกรดไขมันอิสระในปฏิกิริยาเรื่อยๆ จนถึงที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงที่สุด 75.11 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปฏิกิริยาจึงเริ่มลดลงเล็กน้อยจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการผันกลับของปฏิกิริยาบางส่วน



รูปที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ โดยใช้ไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดย FAME คือ เมทิลเอสเทอร์ TAG คือ ไตรกลีเซอไรด์ FFA คือ กรดไขมันอิสระ 1,3 DAG คือ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ 1.2 DAG คือ 1,2 ไดกลีเซอไรด์ และ MAG คือ โมโนกลีเซอไรด์ จากปฏิกิริยา

5.2.6. การนำไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันซ้ำ

การนำไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ที่ผ่านการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริ-ฟิเคชันแล้ว มาทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ ทำโดย นำไลเพสตรึงรูปไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มตามภาวะที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง ไปทำการวิเคราะห์ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง จากนั้นทำการกรองเก็บไลเพสตรึงรูปที่เร่งปฏิกิริยาสิ้นสุดไปแล้วด้วยการกรองแบบสุญญากาศ ล้างไลเพสตรึงรูปดังกล่าวด้วยเฮปเทน เพื่อขจัดสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่เกาะติดอยู่ให้หลุดไป จากนั้นเก็บไลเพสตรึงรูปในโถดูดความชื้น รอให้แห้ง 12 ชั่วโมง จึงนำกลับมาเร่งปฏิกิริยาแบบเดิมซ้ำอีกครั้ง เช่นนี้ต่อเนื่องไป ผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.22 พบว่า ไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้อีก 2 ครั้ง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากการใช้ทั้งสามครั้งเท่ากับ 69.44, 31.88 และ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.22 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตริงรูปชนิด NKA-9 ในแต่ละรอบของการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1. ผลของการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส และเหมาะสมต่อการใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสได้ในเบื้องต้นจากยีสต์ทั้งหมดที่มีอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ *C. rugosa Y. lipolytica C. lipolytica C. tropicalis* และ *C. thailandica* เลือกใช้วิธีสังเกตการเรืองแสงของสารโรดามีน บี ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร โดยมีการเติมน้ำมันปาล์มให้เป็นสารตั้งต้น ซึ่งในส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มจะมีกรดไขมันที่มีคาร์บอนสายยาวเป็นองค์ประกอบอยู่มากจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตไลเพสได้ (Ma และ Hanna, 1999) เนื่องจากไลเพสเป็นไลโปไลติกเอนไซม์ จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจำพวกที่มีคาร์บอนสายยาว (คาร์บอนมากกว่าหรือเท่ากับ 10) ส่วนโรดามีน บี เป็นสีย้อมที่มีสมบัติเรืองแสงได้ (fluorescence dye) เมื่อไลเพสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ ซึ่งเข้าจับกับโรดามีน บี เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจะมีสมบัติในการเรืองแสงสีส้มรอบโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพส โดยจะสังเกตเห็นการเรืองแสงดังกล่าวภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต (Kouker และ Jaeger, 1978) ในงานวิจัยนี้พบว่าจากยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบมี 4 สายพันธุ์ที่พบการเรืองแสงบนอาหารกึ่งแข็ง YM ที่เติมน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตรผสมด้วยโรดามีน บี 0.001 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตไลเพส ได้แก่สายพันธุ์ *C. rugosa Y. lipolytica C. lipolytica C. tropicalis* ส่วนในสายพันธุ์ *C. thailandica* ไม่พบการเรืองแสงซึ่งแสดงถึงการไม่ผลิตไลเพส จากนั้นทำการหาค่าไลเพสแอกทิวิตีและปริมาณโปรตีนต่อไป

การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา จากสารละลายเอนไซม์ไลเพสที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อจากการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวสูตร production ซึ่งใช้น้ำมันปาล์มซึ่งมีราคาถูกและผลิตได้มากในประเทศเป็นตัวชักนำให้มีการผลิตไลเพส ทำโดยการวัดค่าแอกทิวิตี ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรีซึ่งเป็นวิธีการวัดเชิงปริมาณที่รวดเร็วและง่าย ซึ่งนิยมนำมาใช้วัดการทำงานของไลเพสได้ โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl ester) มาเป็นสารตั้งต้น เช่น พารา

ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเทต เปรียบเทียบค่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส ได้จากการปล่อยกรดไขมันออกมาจากสารตั้งต้น โดยการวัดสีของผลิตภัณฑ์ร่วม พาราไนโตรฟีนอล ซึ่งมีสีเหลือง ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (Maia และคณะ, 2000) ผลที่ได้พบว่า เชื้อยีสต์ *C. rugosa* มีแอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุด แต่เนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยต้องการไลเพสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้ จึงต้องทำการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังกล่าวต่อไป เนื่องจากความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลติกกับการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของไลเพสนั้นไม่สอดคล้องตามกัน (Wu และคณะ, 1996)

การศึกษาผลของการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มด้วยไลเพสชนิดหยาบ ด้วยวิธีการเติมเมทานอลแบบแบ่งเติมทุก 8 ชั่วโมง เพื่อลดความรุนแรงของเมทานอลที่จะมีผลต่อการเสื่อมสภาพของไลเพส (Du และคณะ, 2005) พบว่าสารละลายไลเพสจากยีสต์สายพันธุ์ *C. rugosa* มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้เพียงชนิดเดียว ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 35.93 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่า *C. rugosa* เป็นยีสต์ที่ผลิตไลเพสที่มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลาย (Mustranta และคณะ, 1993) ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้ไลเพสจาก *C. rugosa* ในรูปแบบของเอนไซม์ตรึงรูป ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากความคุ้มค่าในการนำมาใช้ประโยชน์นั่นเอง

5.2. ผลการตรึงไลเพสชนิดหยาบจาก *C. rugosa* เพื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม

การนำเอนไซม์ไลเพสไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆและในอุตสาหกรรมโดยส่วนมาก จะนิยมใช้เอนไซม์ในรูปแบบเอนไซม์ตรึงรูป เนื่องจากมีสมบัติที่ดีกว่า ทนทานกว่า แยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย และประหยัดเนื่องจากสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ ไลเพสโดยทั่วไปจะเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณชั้นระหว่างน้ำมันกับน้ำ การเลือกวิธีการในการตรึงให้เหมาะสมและการเลือกชนิดของตัวค้ำจุน มีอิทธิพลเป็นอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสตรึงรูปนั้นๆ เนื่องจากลักษณะของบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของไลเพสจาก *C. rugosa* นั้นมีลักษณะแคบ ดังนั้นการเลือกใช้วิธีตรึงโดยใช้พันธะโคเวเลนซ์ ซึ่งต้องใช้สารตัวกลางในการสร้างพันธะที่มีความรุนแรงและอาจเข้าสร้างพันธะบังบริเวณเร่งของไลเพสได้ ทำให้การเข้าจับของสารตั้งต้นเพื่อทำปฏิกิริยาเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ไม่ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะตรึงรูปไลเพสชนิดหยาบจาก

C. rugosa ด้วยวิธีการดูดซับ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด และไม่รุนแรง และเลือกใช้ตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงเป็นเรซินแบบมีรูพรุนชนิด macroporous ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ชนิดไฮโดรโฟบิก จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ชนิด AB-8, H103, NKA-9, NKA และ D4020 ส่วนวิธีการตรึงด้วยการดูดซับนั้นจะใช้วิธีการที่ไม่ใช้น้ำแต่ใช้เฮปเทนเป็นสารตัวกลางแทน ซึ่งจากการทดลองของ Gao และคณะ ในปี 2006 พบว่าการใช้เฮปเทนเป็นสารตัวกลางในการตรึงแทนการใช้บัฟเฟอร์ตามปกติจะช่วยให้ไลเพสตรึงรูปมีแอกทิวิตีสูงกว่าถึง 4 เท่า จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าหลังการตรึงรูปไลเพสด้วยวิธีดูดซับโดยใช้สารตัวกลางเป็นเฮปเทน แล้วนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าไลเพสตรึงรูปบนตัวค้ำจุนชนิด H103 เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุด โดยที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง ให้ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระได้สูงที่สุด 92.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ไลเพสตรึงรูปบนตัวค้ำจุนชนิด NKA-9 เร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สุดที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง ให้ผลการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์สูงถึง 34.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงสุดเมื่อเทียบกับไลเพสอิสระในปริมาณที่เท่ากันเร่งได้ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยทั่วไปแล้วเป็นที่รู้กันดีว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยาของไลเพสซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นไลโปฟิลิก (lipophilic domains) และส่วนนี้สามารถปรับเปลี่ยนรูปแบบให้เป็นทั้งรูปแบบโครงสร้างที่เปิดและรูปแบบปิด การเข้าจับระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ของไลเพสกับสารตั้งต้น หรือตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) จะช่วยยึดโครงสร้างให้อยู่ในรูปที่พร้อมเร่ง (active) มากขึ้น และช่วยเพิ่มแอกทิวิตีของเอนไซม์ได้ (Gao และคณะ, 2006) ดังนั้นการใช้สารตัวกลางที่มีความเป็นขั้วต่ำเช่นเฮปเทน (log P = 4.0) ส่วนที่เป็นไลโปฟิลิกของไลเพสจะทำปฏิกิริยากับเฮปเทน ซึ่งเป็นผลให้เกิดการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติ (conformational change) ของไลเพสให้อยู่ในรูปที่พร้อมเร่งปฏิกิริยามากขึ้น มีผลให้สารตั้งต้นสามารถเข้าจับกับบริเวณเร่งของไลเพสตรึงรูปที่ได้อย่างอิสระมากขึ้น ส่งผลให้ไลเพสตรึงรูปดังกล่าวเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นด้วย

5.3. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป

5.3.1. ผลของปริมาณเอนไซม์

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม โดยควบคุมปัจจัยอื่นให้เท่ากันทุกประการ ผลการทดลองในส่วนของไลเพสอิสระพบว่า เมื่อ

เพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นจาก 5 มิลลิกรัมโปรตีนจนถึง 20 มิลลิกรัมโปรตีน พบว่า ผลการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์กรดไขมันอิสระมากน้อยต่างกันเพียงเล็กน้อย ส่วนการศึกษาถึงผลของปริมาณเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสตรึงรูปชนิด H103 โดยการทดลองได้ศึกษาการใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.25:1 0.5:1 0.75:1 และ 1:1 กรัม พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุนขึ้นจาก 0.25:1 ถึง 1:1 กรัม มีผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้นของกรดไขมันอิสระในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นตามด้วย โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เพียงเล็กน้อยเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์จากอัตราส่วน 0.5:1 ถึง 1:1 ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 สำหรับทำการทดสอบปัจจัยอื่นๆต่อไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์เพียงเล็กน้อยก็มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kimura และคณะ (1983) ที่ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปจาก *C. rugosa* ที่พบว่าไลเพสในปริมาณที่เล็กน้อยให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระใกล้เคียงร้อยเปอร์เซ็นต์

5.3.2 ผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยา

น้ำเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส เนื่องจากไลเพสจะเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณชั้นน้ำต่อน้ำมัน (oil-water interphase) การศึกษาเรื่องผลของปริมาณน้ำต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระ และไลเพสตรึงรูป ผลจากการทดลองพบว่าการเร่งด้วยไลเพสอิสระเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในปฏิกิริยาจาก 40 ถึง 160 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ทำให้มีกรดไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ตามลำดับ ในส่วนของไลเพสตรึงรูป พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในปฏิกิริยา จาก 40 ถึง 120 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถตรวจวัดค่าเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระได้เพิ่มขึ้น ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำให้มากขึ้นอีกเป็น 160 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ผลผลิตกรดไขมันลดลง จากผลการทดลองดังกล่าวจะสังเกตเห็นว่าปริมาณน้ำในปริมาณมากให้ผลการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีกว่าน้ำในปริมาณน้อยๆ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lu และคณะ (2009) ที่ศึกษาผลปริมาณน้ำต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสตรึงรูป *Candida* sp.99-125 ซึ่งพบว่า การเติมน้ำลงในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในปริมาณ 20-100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ให้ผลของปฏิกิริยาดีกว่าการเติมน้ำในปริมาณน้อยๆที่ต่ำกว่านั้นหรือการไม่เติมน้ำเลย โดยได้อธิบายถึงผลของการทดลองนี้ไว้ว่า เนื่องจาก น้ำจัดเป็นสารตั้งต้นอย่างหนึ่งของปฏิกิริยา ดังนั้นน้ำในปริมาณที่น้อยเกินไปจึงไม่สามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีได้ นอกจากนี้น้ำปริมาณที่มากเกินพอในปฏิกิริยายังช่วยละลายกลีเซอรอลผลผลิตร่วมจากปฏิกิริยาที่

อาจเข้าจับกับไลเพสตรึงรูป ซึ่งก่อให้เกิดผลยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ การใช้น้ำในปริมาณมากนั้นช่วยลดความหนืดของปฏิกิริยาช่วยให้การปั่นกวนเป็นไปได้ง่ายขึ้น ทำให้พื้นที่การเกิดปฏิกิริยาได้มีสูงขึ้นด้วย ในกรณีของปฏิกิริยาที่ไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ใดๆเข้าช่วย รวมถึงสมบัติของไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ที่ชอบอยู่ในชั้นน้ำมากกว่าชั้นน้ำมัน ปริมาณน้ำที่มาก ย่อมส่งผลต่อการกระจายตัวที่มากขึ้น เพิ่มโอกาสในการสัมผัสกันระหว่างไลเพสกับน้ำมัน จึงช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีกว่าการใช้ปริมาณน้ำน้อยๆ

5.3.3. ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งเสียสภาพได้ การศึกษาเรื่องผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ผลการทดลองพบว่า ไลเพสอิสระเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูง 97.52 เปอร์เซ็นต์ ที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระลดลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเสื่อมสภาพเนื่องจากความร้อนจากอุณหภูมิที่สูงเกินไป ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปที่จะเร่งปฏิกิริยาให้ดำเนินไปข้างหน้าได้ ในไลเพสตรึงรูปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาที่สุดได้แก่ 40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับไลเพสอิสระ ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูง 97.14 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 30 องศาเซลเซียสก็ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระสูงใกล้เคียงกันเท่ากับ 96.79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ 84.22 และ 66.92 เปอร์เซ็นต์ สังเกตได้ว่าหลังการตรึงรูปไลเพสมีแนวโน้มเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิกว้างขึ้น ในบางครั้งพบว่าเอนไซม์ตรึงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานแตกต่างจากเอนไซม์อิสระ โดยทั่วไปการตรึงรูปเอนไซม์จะมีผลให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่สุดของไลเพสตรึงรูปสูงกว่าไลเพสอิสระ แต่ในบางกรณีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ตรึงจะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระและบางกรณีจะมีค่าเท่ากัน (Chibata, 1978) ในกรณีของไลเพสจาก *C. rugosa* มีการรายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส (Minovska และคณะ, 2005)

5.3.4. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในไลเพสอิสระเลือกใช้ภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาที่ผ่านมา ซึ่งคือ ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 160 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ส่วนในไลเพสตรึงรูปใช้ภาวะที่เหมาะสมที่สุดได้แก่ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุนชนิด H103 0.5:1 ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆเช่นเดียวกับของไลเพสอิสระ ผลการทดลองพบว่า ไลเพสอิสระให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ 98.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไลเพสตรึงรูปให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 97.74 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่จนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง จากกราฟที่ 4.9 กับ 4.22 จะเห็นว่าลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูปเป็นแบบเดียวกันคือจะมีการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเกิดปฏิกิริยาและจะค่อยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นน้อยลงและช้าลง จนคงที่ โดยมีข้อสังเกตว่าในไลเพสอิสระจะมีอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงกว่าในไลเพสตรึงรูป Kimura และคณะ (1983) ได้อธิบายเรื่องนี้ไว้ว่า เอนไซม์ตรึงจะมีความเป็นอิสระน้อยกว่าเมื่อไม่ถูกตรึง ดังนั้นจึงอาจทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ตรึงช้ากว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ อย่างไรก็ตามในกรณีไลเพสตรึงรูปบนตัวค้ำจุนชนิด H103 มีความต่างของอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับไลเพสอิสระแค่ในช่วงต้นของการเกิดปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 24 ชั่วโมงไลเพสทั้งอิสระและตรึงรูปให้ผลการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระต่างกันเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

5.4. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูป

5.4.1. ผลของปริมาณเอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์จึงเป็นปัจจัยสำคัญ ผลการทดลองในส่วนของไลเพสอิสระพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นจาก 5 มิลลิกรัมโปรตีนจนถึง 20 มิลลิกรัมโปรตีน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณ

เอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับผลในส่วนของไลเพสตรึงรูป ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาณไลเพสต่อตัวค้ำจุนจาก 0.25:1 กรัม จนถึง 1:1 กรัม จะมีผลให้ได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ ตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ โดยได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุดที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 1:1 เท่ากับ 66.39 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2009) ที่พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ลงในปฏิกิริยามากขึ้น ก็มีผลให้ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เพิ่มสูงขึ้นตาม โดยที่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้นเรื่อยๆจนถึงจุดอิ่มตัว อัตราการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์จะมีการเพิ่มขึ้นช้าลง

5.4.2. ผลของอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล

ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เมทานอล สามารถทำให้ไลเพสเสื่อมสภาพ และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ การศึกษาเรื่องอัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้นต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพส ใช้อัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้นเท่ากับ 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 และ 1:6 โดยควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้เท่ากัน พบว่า อัตราส่วนโดยโมลที่เหมาะสมที่สุดคือที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:3 แต่ผลในส่วนของไลเพสตรึงรูปได้ผลต่างออกไปคือให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:4 ซึ่งสอดคล้องกับ ว่าไลเพสที่ตรึงรูปแล้ว มีสมบัติต้านทานความเป็นพิษของเมทานอลได้มากขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการดูดซับไลเพสไว้ภายในรูพรุนของตัวค้ำจุน ซึ่งลดการสัมผัสระหว่างเมทานอลกับเอนไซม์ไลเพสได้มากกว่าการใช้ไลเพสอิสระ โดยการที่สามารถใช้เมทานอลในปริมาณที่มากขึ้น (มากเกินพอ) ก็ส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยามากขึ้นด้วย (Noureddini และคณะ, 2005)

5.4.3. ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา

การศึกษาเรื่องผลของปริมาณน้ำในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ปริมาณน้ำเติมลงในปฏิกิริยาที่ปริมาตรต่างๆกัน โดยควบคุมอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล ปริมาณเอนไซม์ และอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา ในกรณีของไลเพสอิสระปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาที่สุดคือ 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) และเนื่องมากจากการทดสอบสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูป พบว่าปฏิกิริยา

ที่ไม่มีการเติมน้ำในปฏิกิริยาเลย จะไม่มีการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยา ดังนั้นในไลเพสตรึงรูปจึงทำการทดสอบผลของการเติมน้ำจาก 20-120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) พบว่า ที่ปริมาณน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) ไลเพสตรึงรูป NKA-9 จะเร่งปฏิกิริยาให้ผลการเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงที่สุด จะเห็นได้ว่าน้ำมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของไลเพสจาก *C. rugosa* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ Lu และคณะ ได้อธิบายอิทธิพลของน้ำต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันไว้ว่า เนื่องจากกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสจาก *C. rugosa* ที่ใช้ในการทดลองนั้น ในขั้นตอนแรกจะไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมัน จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดไขมันดังกล่าวกับเมทานอลที่เติมลงในปฏิกิริยา จนได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เมื่อสังเกตจากโครมาโทแกรมจากผลการทดลองปัจจัยเรื่องเวลาในการเกิดปฏิกิริยา พบว่าสอดคล้องกับเหตุผลดังกล่าว ซึ่งจะวิจารณ์เพิ่มเติมอย่างละเอียดในหัวข้อเวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่อไป

5.4.4. ผลของอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา

อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งเสียสภาพได้ จากการทดลองเรื่องผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูปจากยีสต์ *C. rugosa* โดยควบคุมปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา ผลการทดลองพบว่า ไลเพสอิสระเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูง 57.80 เปอร์เซ็นต์ รองมาเป็นที่ 50 องศาเซลเซียสได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 48.21 เปอร์เซ็นต์ แต่ในไลเพสตรึงรูปเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงถึง 74.89 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามที่ 40 องศาเซลเซียสก็ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกับที่ 30 องศาเซลเซียสเท่ากับ 70.36 เปอร์เซ็นต์ จะสังเกตได้ว่าการตรึงรูปไลเพสเพื่อใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในงานวิจัยนี้ มีผลให้สามารถนำไปใช้ได้กับช่วงอุณหภูมิที่กว้างขึ้น สอดคล้องกับผลในกรณีของการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งเป็นไปตามที่ Chibata (1978) วิเคราะห์ว่า โดยทั่วไปการตรึงรูปเอนไซม์จะมีผลให้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่สุดของไลเพสตรึงรูปสูงกว่าไลเพสอิสระ แต่ในบางกรณีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ตรึงจะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระและบางกรณีจะมีค่าเท่ากัน Minovska และคณะ (2005) กล่าวถึงข้อดีของการเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิต่ำของไลเพส เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เนื่องจาก เป็นการประหยัดอย่างหนึ่ง ช่วยให้ใช้พลังงานความร้อนน้อยลง และยังช่วยรักษาเสถียรภาพของแอกทิวิตีของไลเพสนั้นไว้ได้มากกว่า

5.4.5. เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ในไลเพสอิสระเลือกใช้ภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาที่ผ่านมา ซึ่งคือ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 ปริมาณเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 2 4 6 8 10 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ส่วนในไลเพสตรึงรูปใช้ภาวะที่เหมาะสมที่สุดได้แก่ ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล 1:4 อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุนชนิด NKA-9 1:1 ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เช่นเดียวกับของไลเพสอิสระ ผลการทดลองพบว่าไลเพสอิสระให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นเมทิลเอสเทอร์ 48.29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไลเพสตรึงรูปให้ผลในการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ 75.11 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่จนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมงในการเกิดปฏิกิริยา จากกราฟที่ 4.10 กับ 4.21 จะเห็นว่าลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของไลเพสอิสระและไลเพสตรึงรูปเป็นแบบเดียวกันคือ ในช่วงแรกของปฏิกิริยาจะพบปริมาณของกรดไขมันอิสระสูงขึ้นมาก ไตรกลีเซอไรด์ลดลงมากจนเกือบหมด และมีการเกิดเมทิลเอสเทอร์อย่างช้าๆ เมื่อเวลาผ่านไปพบว่า กรดไขมันอิสระมีปริมาณลดน้อยลง ในขณะเดียวกันก็มีเมทิลเอสเทอร์เกิดมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lu และคณะ (2009) ที่พบว่าการเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของไลเพสจาก *Candida* sp. 99-125 ในปฏิกิริยาที่มีการเติมน้ำลงในปฏิกิริยาในปริมาณที่เหมาะสม จะให้ผลของผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ที่สูงกว่าการไม่เติมน้ำเลย เนื่องจากกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ *Candida* sp.99-125 ดังกล่าว ที่เวลาในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ พบว่าไลเพสจากเชื้อยีสต์ดังกล่าวจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระก่อน จากนั้นกรดไขมันอิสระที่ได้รวมกับเมทานอลที่เติมลงในปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ตามที่วิเคราะห์ผลได้ ซึ่งมีลักษณะกลไกที่เหมือนกับเชื้อยีสต์ *C. rugosa* ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแม้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของไลเพสจะไม่มีความสัมพันธ์กันโดยตรง แต่เป็นไปได้ที่จะมีความสอดคล้องต่อเนื่องกัน ซึ่งทำให้ไลเพสที่มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลติกได้สูงเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้สูงตามไปด้วยได้ จากปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องกัน

5.5. ผลการนำไลเพสตรึงรูปกลับมาเร่งปฏิกิริยาซ้ำ

ผลของการนำไลเพสตรึงรูปกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำพบว่า การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้สองครั้งจากการใช้ครั้งแรก ได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากการใช้ทั้งสามครั้งเท่ากับ 69.44, 31.88 และ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผลของการเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เร่งโดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103 สามารถนำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำได้หนึ่งครั้งจากการใช้ครั้งแรก ได้เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระจากการใช้ทั้งสองครั้งเท่ากับ 91.21 และ 28.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ตรึงจะมีเสถียรภาพสูงกว่าเมื่ออยู่ในรูปอิสระ เทคนิคการตรึงเอนไซม์จะมีผลต่อเสถียรภาพในทางเคมี และการเปลี่ยนสภาพธรรมชาติทางกายภาพ (Chibata, 1978) เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยการดูดติด จะเตรียมได้ง่าย ประหยัด และใช้ภาวะที่ไม่รุนแรง แต่เอนไซม์ที่ตรึงไว้จะหลุดออกจากตัวค้ำจุนได้ง่ายในระหว่างการใช้งานในภาวะที่มีการให้ความร้อน การปั่นกวน การเปลี่ยนแปลงพีเอช และความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์ตรึงด้วยวิธีดังกล่าวจะมีแรงยึดที่ไม่เหนียวแน่นบนตัวค้ำจุนตรึง เอนไซม์ตรึงจะถูกทำให้หลุดออกจากตัวค้ำจุนได้เมื่อมีการสึกกร่อนของตัวค้ำจุน หรือมีการสลายของพันธะระหว่างเอนไซม์กับพาหะ นั่นคือ เอนไซม์ตรึงดังกล่าวจะมีกัมมันตภาพสูงในช่วงแรกของการใช้งานและจะลดลงตามระยะเวลาของการนำไปใช้งาน แต่ตัวค้ำจุนที่ผ่านการตรึงด้วยวิธีการดูดซับนั้นสามารถนำกลับมาใช้งานอีกได้ง่ายไม่ว่าจะเป็นตัวค้ำจุนที่เป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ (Kenedy และ Cabral, 1983)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

เชื้อยีสต์ *C. rugosa* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสที่มีสมบัติเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ดีที่สุดจากยีสต์ 5 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ มีแอกทิวิตีจำเพาะหลังการทำให้เข้มข้นด้วยการทำแห้งแบบเย็น เท่ากับ 2.83 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระจาก *C. rugosa* คือ ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 วิธีเติมเมทานอลใช้วิธีแบ่งเติมสามครั้งทุก 8 ชั่วโมง ใช้ปริมาณเอนไซม์ 20 มิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 40 องศาเซลเซียส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์สูงสุดคือ 48 ชั่วโมง ได้ 57.80 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ากลไกในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันก่อน จากนั้นจึงเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันและเมทานอลให้ได้เมทิลเอสเทอร์ต่อ ส่วนภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสอิสระโดยใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสารตั้งต้น คือ ที่ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 160 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน อุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยา 40 องศาเซลเซียส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระสูงสุดคือที่ 24 ชั่วโมง ได้ 97.74 เปอร์เซ็นต์

การตรึงไลเพสจาก *C. rugosa* ด้วยวิธีดูดซับในภาวะที่ใช้เฮปเทนเป็นสารตัวกลาง พบว่าไลเพสตรึงรูปบนตัวค้ำจุนชนิด NKA-9 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันให้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด ส่วนปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เป็นสารตั้งต้นไลเพสตรึงรูปชนิด H103 เร่งปฏิกิริยาให้ผลผลิตเป็นกรดไขมันอิสระได้สูงที่สุด ภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 คือ ใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุนเท่ากับ 1:1 อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:4 ใช้วิธีการเติมเมทานอลแบบแบ่งเติมสามครั้งทุก 8 ชั่วโมง ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 40 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์สูงที่สุดคือที่ 24 ชั่วโมง ได้ 75.11 เปอร์เซ็นต์ หลังการเกิดปฏิกิริยาทำการกรองแยกไลเพสแล้วล้างด้วยเฮปเทน ทำแห้ง แล้วจึงนำมาเร่งปฏิกิริยา

อีก พบว่าไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเค-ชันได้อีกสองครั้ง ส่วนภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ได้แก่ ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุน 0.5:1 ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 120 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรน้ำมัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ให้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันได้สูงที่สุดคือที่เวลา 24 ชั่วโมง ได้กรดไขมันอิสระ 97.74 เปอร์เซ็นต์ และหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาทำการกรองแยกไลเพสแล้วล้างด้วยเฮปเทน ทำแห้ง แล้วนำกลับมาเร่งปฏิกิริยาอีก พบว่าไลเพสตรึงรูป H103 สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้อีกหนึ่งครั้ง

การปรับปรุงเพื่อให้ไลเพสจาก *C. rugosa* เร่งปฏิกิริยาให้ผลการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอาจทำได้โดยพัฒนาทางด้านปริมาณโดยการศึกษาภาวะในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. rugosa* ที่เหมาะสมที่ให้แอกทิวิตีจำเพาะสูงที่สุดต่อไป เนื่องจากหากแอกทิวิตีจำเพาะเริ่มต้นของเอนไซม์สูงขึ้น ทำให้มีความสะดวกและเหมาะสมต่อการนำไปตรึงรูปด้วยวิธีต่างๆมากขึ้น หรือในกรณีพัฒนาด้านคุณภาพของไลเพสที่ผลิตได้ อาจทำได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์เข้าปรับปรุงพันธุกรรมของ *C. rugosa* ให้ผลิตไลเพสที่มีสมบัติที่ดีขึ้น เช่นมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากขึ้น เร่งปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น ดีขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์สูงขึ้นต่อไป

รายการอ้างอิง

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

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

Branwal, B. K., and Sharma, M. P. 2005. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. Renewable & Sustainable Energy Reviews 9 : 363-378.

Brockerhoff, H., and Jensen, R. G. 1974. Lipolytic enzyme. New York : Academic Press,

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.

Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., and Wang, X. 2009. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energy Conversion and Management. 50 : 668-673.

Chibata, I. 1978. Immobilized Enzyme (Research and Development). New York : John Wiley and Sons,

Du, W., Xu, Y., and Liu, D. 2003. Lipase catalysed transesterification of soyabean oil for biodiesel production during continuous batch operation. Biotechnology ang Applied Biochemistry. 38 : 103-106.

Du, W., Xu, Y. Y., Liu, D. H., and Li, Z. B. 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.

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.

Gao, Y., Tan, T.W., Nie, K.L., and Wang, F. 2006. Immobilization of Lipase on Macroporous Resin and Its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous Media. Chinese Journal of Biotechnology, 22,1 : 114-118.

Held, P., and Hurley, J. 2001. Determination of Total Protein by the Lowry Method Using the Biotek Instrument's ELx808 Microplate Reader. BioTek instruments.

Hsu, A., Jones, K., Foglia, T. A., and Marmer, W. N. 2002. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl ester of restaurant grease as biodiesel. Biotechnology and Applied Biochemistry. 36 : 181-186.

Jaeger, K. E., and Eggert, T. 2002. Lipase for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology 13 : 390-397.

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

Kademi, A., Lee, B., and Houde, A. 2003. A production of heterologous microbial lipases by yeasts. Indian Journal of Biotechnology. 2,3 : 346-355.

Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* spp. S-2. Process Biochemistry. 36 : 317-324.

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

Kennedy, J. F., and Cabral, J. M. S. 1983. Solid Phase Biochemistry. Wiley. New York.

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

Kimura, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K., Nihira, T., and Fukui, S. 1983. Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 17 : 107-112.

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.

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

Lee, J. H., Lee, D. H., Lim, J. S., Um, B. H., Park, C., Kang, S. W., and Kim, S. W. 2007. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. Journal of Biotechnology. 131,2 : 123-127.

Lu, J., Chen, Y., Wang, F., and Tan, T. 2009. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp.99125 in organic solvent system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 56 : 122-125.

Ma, F. R., and Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresouece Technology. 70 : 1-15.

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

Minovska, V., Winkelhausen, E., and Kuzmanova, S. 2004. Lipase immobilized by diferrent techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. Journal of Serbian Chemists' Society. 70,4 : 609-624.

Mustranta, A., Forssell, P., and Poutanen, K. 1993. Application of Immobilized Lipase to Transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. Enzyme Microbial Technology. 15 : 133-139.

Noureddini, H., and Zhu, D. 1997. Kinetics of transesterification of soybean oil. Journal of American oil Chemists' Society. 74,11 : 1457-1463.

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.

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

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

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.

Posorske, L. H. 1984. Industrial-scale application of enzyme to fat and oils industry. Journal of the American Oil Chemists' Society 61 : 1758-1760.

Pronk, W., Kerkhof, P. J. A., Helden, C. V., and Reit, K. V. 1988. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in hydrophilic membrane reactor. Biotechnology and Bioengineering. 32 : 512-518.

Ramachandra Murty V., Jayadev Bhat, and Muniswaran P. K. A. 2002. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A Review. Biotechnology Bioprocess Engineering. 7 : 57-66.

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

Roberto, F. L., Pilar, A., Pilar, S., Gloria, F., and José, M. G. 1998. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. Chemistry and Physics of Lipids. 93 : 185-197.

Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H. 2000. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. Journal of Bioscience and Bioengineering. 90 : 180-183.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stöcklein, W., Menge, U., and Schmid, R. D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. Bichemica et biophysica acta, L. Lipids and lipid metabolism. 1214 : 43-53.

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

Shao, P., Meng, X., He, J., and Sun, P. 2008. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. Food and Bioproducts Processing. 86 : 283-289.

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., 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.

Sulaiman, A.Z., Masitah, H., Ramachandran, K.B. 2003. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. Process Biochemistry. 38 : 1155-1163.

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

Vakhlu, J., and Kour, A. 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology 9,1 : 1-21.

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.

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 and Microbial Technology. 19 : 226-231.

Zhou, G., Chen, Y., and Yang, S. 2009. Comparative studies on catalytic properties of immobilized *Candida rugosa* lipase in ordered mesoporous rod-like silica and visicle-like silica. Microporous and Mesoporous Materials. 119 : 223-229.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง YM (YM Agar)

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

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลว YM (YM Broth)

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

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. YM Broth + Rhodamine B

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5 กรัม
เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	10 กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1 ลิตร
วุ้นผง (Agar powder)	20 กรัม

โรดามีนบี (Rhodamine B) 0.001% (น้ำหนักโดยปริมาตร)

น้ำมันปาล์ม (Palm oil) 1% (น้ำหนักโดยปริมาตร)

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. **อาหารเหลวสูตร** production (Lipase production medium)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	10 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1 กรัม

น้ำมันปาล์ม (Palm oil) 1% (น้ำหนักโดยปริมาตร)

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 5.3 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดปริมาณโปรตีน

1.1. สารละลายไบยูเรต (Biuret reagent)

1% คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.5 มิลลิลิตร
2% โซเดียมโพแทสเซียสทาร์เทรต ($KNaC_4H_4O_6$)	0.5 มิลลิลิตร
2% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M NaOH)	50 มิลลิลิตร

1.2. สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent)

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

2. สารละลายตรวจวัดค่าแอคทิวิตี้ของไลเพส

2.1. สารละลาย A

พาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทต (*p*-nitrophenyl palmitate)	6 มิลลิกรัม
2- โพรพานอล (2-propanol)	10 มิลลิลิตร

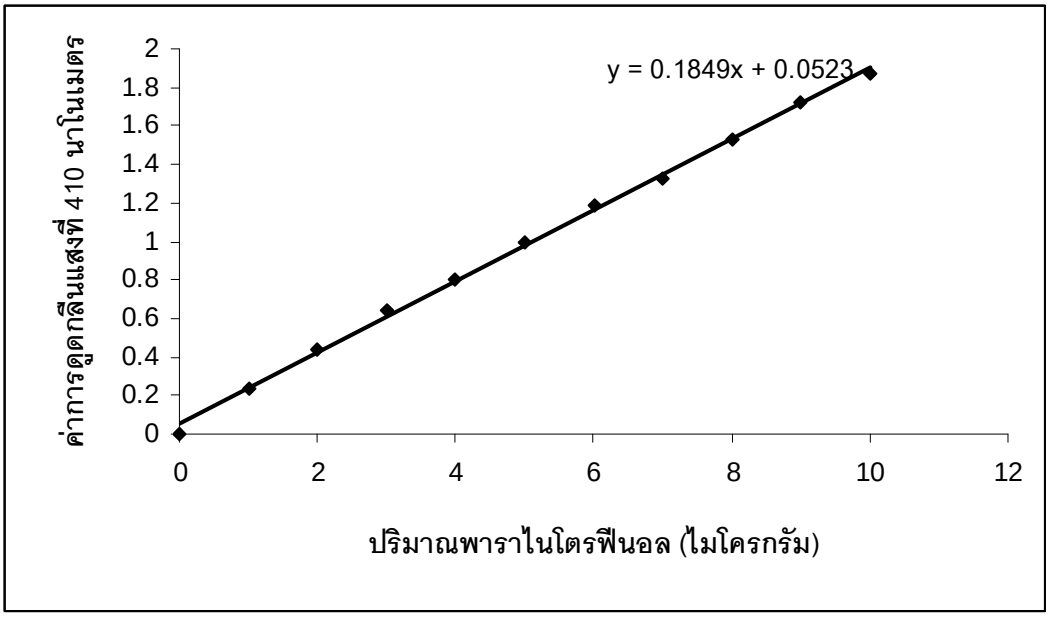
2.2. สารละลาย B

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

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอลปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟีนอล

1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย
2. ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟีนอล จากข้อ 1 น้ำกลั่น และ 0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 7 ลงใน well microplate ตามตารางด้านล่าง

3.

พาราไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	พาราไนโตรฟีนอล	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

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm
5. ค่าที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพาราไนโตรฟีนอลและค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm

การตรวจสอบค่า Lipase activity ในสารตัวอย่าง

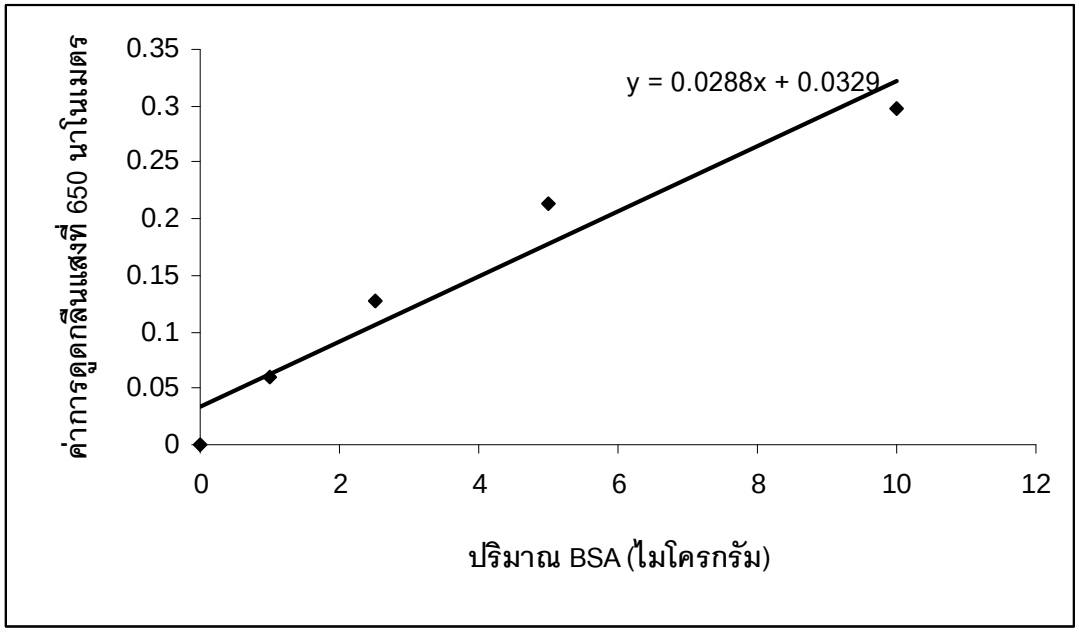
1. เตรียมสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วยพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทต180 มิลลิกรัม ละลายใน isopropanol 30 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย triton X-100 0.8% และ gum arabic 0.2% ละลายในน้ำกลั่น

3. จากนั้นปิเปตสารละลายต่างๆลงใน well microplate ตามตารางด้านล่าง ดังนี้

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

4. บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานพารา ไนโตรฟีนอลต่อไป

2. กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม

วิธีการทำกราฟมาตรฐานโปรตีน 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. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA(ug) กับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm

ภาคผนวก ง

การคำนวณ

1. การคำนวณค่าแอคทิวิตี้

วิธีคำนวณทำโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดตามวิธีในหัวข้อ 2.2 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ตามสมการดังนี้

$$Y = 0.1849X+0.0523$$

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

2. การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

วิธีคำนวณทำได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดตามวิธีในหัวข้อ 2.3 มาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ BSA ตามสมการดังนี้

$$Y = 0.0288+0.0329$$

โดยทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะทำให้ได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัม เปลี่ยนหน่วยไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม โดยคูณด้วย 1000 เปลี่ยนหน่วยให้เป็นมิลลิลิตรโดยการหารด้วยปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ แล้วปรับให้เป็นหน่วยมิลลิลิตร จะได้หน่วยสุดท้ายเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะ (specific activity)

ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของไลเพสหาได้จาก การนำค่าแอคทิวิตี้ของไลเพสหารด้วยปริมาณโปรตีน จะได้หน่วยสุดท้ายเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังสมการ

$$\text{Specific activity : units/mg} = \frac{\text{Total activity : units}}{\text{Total protein : mg}}$$

4. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ทำได้โดยแทนค่าที่ได้จากฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในสมการ

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

เมื่อ %conversion คือ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

[FAME] คือ ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันจากโครมาโทแกรม

[TAG] คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

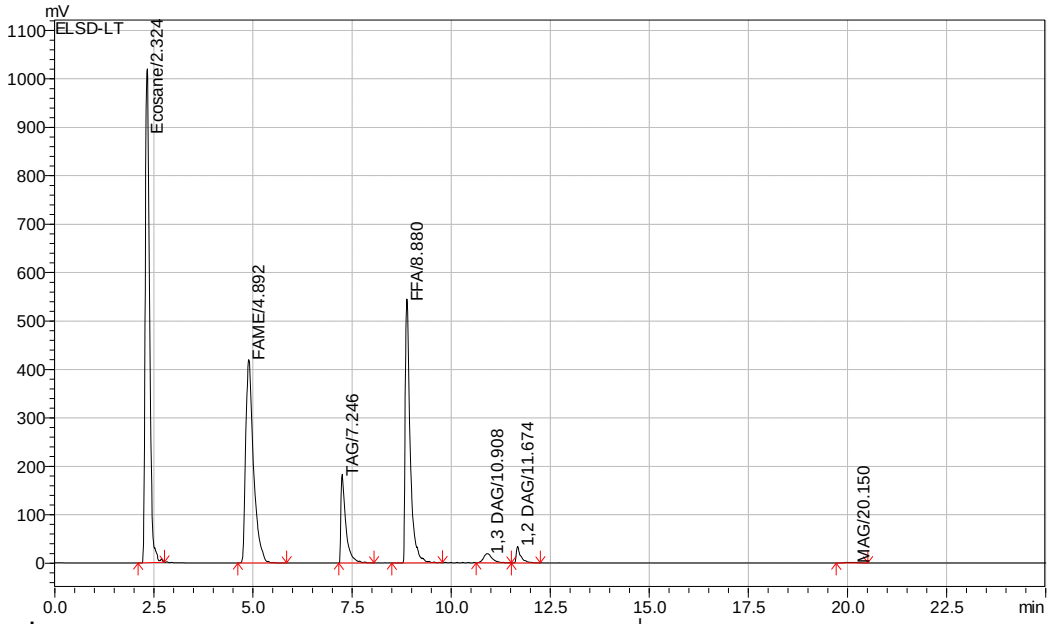
[1,3 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1,3 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

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

[MAG] คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

ตัวอย่างการคำนวณ จากการทดลองเรื่องการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุนเท่ากับ 1:1 และใช้อัตราส่วนโดยโมลของสารตั้งต้นเท่ากับ 1:5 ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 50 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง



รูปที่ ง-1 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทานอล ที่เร่งด้วยไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9

ตารางที่ ง-1 ข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่ ง-1

พีคลำดับที่	ชื่อสาร	รีเทนชัน ไทม์ (นาที)	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ
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

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

$$= 61.58$$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ คือ 61.58 เปอร์เซ็นต์

5. การคำนวณเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระทำได้โดยแทนค่าที่ได้จากฉีดตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในสมการ

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

เมื่อ %conversion คือ เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

[TAG] คือ ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

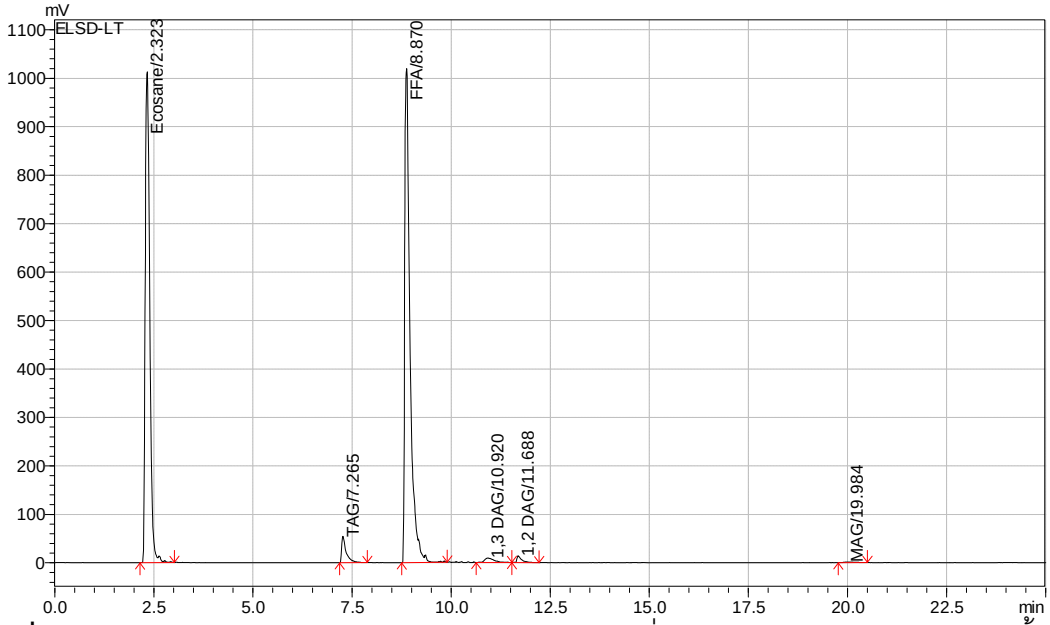
[1,3 DAG] คือ ความเข้มข้นของ 1,3 ไดกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

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

[MAG] คือ ความเข้มข้นของโมโนกลีเซอไรด์จากโครมาโทแกรม

[FFA] คือ ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระจากโครมาโทแกรม

ตัวอย่างการคำนวณ จากการทดลองเรื่องการเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปชนิด H103 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไลเพสต่อตัวค้ำจุนเท่ากับ 0.5:1 และ ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 50 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรของน้ำมัน อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในเกิดปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง



รูปที่ ง-2 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ที่เร่งด้วยไลเพสตรึงรูปชนิด H103

ตารางที่ ง-2 ข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่ ง-2

พีคลำดับที่	ชื่อสาร	รีเทนชัน ไทม์ (นาที)	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ
1	Ecosane	2.323	-	8083811
2	TAG	7.265	0.182	431424
3	FFA	8.870	11.785	9433666
4	1,3 DAG	10.920	0.086	161777
5	1,2 DAG	11.688	0.070	122282
6	MAG	19.984	0.098	27578

แทนค่าความเข้มข้นจากตารางที่ ง-1 ในสมการ

$$\%\text{conversion} = \frac{11.785 \times 100}{3(0.182) + 2(0.086) + 2(0.070) + 0.098 + 11.785}$$

$$= 92.50$$

ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ คือ 92.50 เปอร์เซ็นต์

6. การคำนวณอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล

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

โดยที่ Y คือน้ำหนักของเมทานอล

A คือ น้ำหนักของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์จากการชั่ง

B คือ อัตราส่วนโดยโมลของเมทานอล

MW_{PO} คือน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ เท่ากับ 980 กรัม

MW_{MeOH} คือ น้ำหนักโมเลกุลของเมทานอล เท่ากับ 32.04 กรัม

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u> กำหนดให้อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 จากนั้นชั่งน้ำมันปาล์ม 3 กรัม คิดเป็นปริมาตรประมาณ 2.68 มิลลิลิตร

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

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

เมื่อ Z คือ ปริมาตรของเมทานอล

Y คือ น้ำหนักเมทานอล

D คือ ค่าความหนาแน่นของเมทานอลเท่ากับ 791 กรัมต่อลิตร

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

$= 376$ ไมโครลิตร

7. การหาปริมาตรน้ำมันปาล์ม

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

D คือ ความหนาแน่นของน้ำมันปาล์ม (0.89 กรัมต่อมิลลิลิตร)

M คือ มวลน้ำหนักของน้ำมันปาล์ม (3 กรัม)

V คือ ปริมาตรของน้ำมันปาล์ม

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

น้ำมันปาล์ม 3 กรัม มีปริมาตร 3.37 มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

วัสดุค้ำจุนสำหรับตรึงเอนไซม์

วัสดุค้ำจุนสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเพสในที่นี้มี 5 ชนิด เป็นตัวค้ำจุนเรซินแบบมีรูพรุนชนิด macroporous ได้แก่ AB-8, H103, NKA, NKA-9, D4020 มีคุณสมบัติดังตารางที่ จ-1 และภาพแสดงในรูปที่ จ-1

ตารางที่ จ-1 คุณสมบัติของตัวค้ำจุนเรซินแบบมีรูพรุนชนิด macroporous ทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในงานวิจัย (Gao และคณะ, 2006)

ชนิดของตัวค้ำจุน	คุณสมบัติความมีขั้ว	พื้นที่จำเพาะ (ตร.ม./กรัม)	เส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน (นาโนเมตร)
AB-8	มีขั้วอย่างอ่อน	480-520	13-14
H103	ไม่มีขั้ว	1000-1100	8.5-9.5
NKA-9	มีขั้ว	250-290	15.5-16.5
NKA	ไม่มีขั้ว	570-590	20-22
D4020	ไม่มีขั้ว	540-580	10-10.5

AB-8

H103

NKA

NKA-9 D4020

รูปที่ จ-1 ภาพวัสดุค้ำจุนจุนเรซินแบบมีรูพรุนชนิด macroporous ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการตรึงไลเพส

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูล

ตารางที่ ฉ-1 การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เวลาต่างๆ โดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C.rugosa*

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์	เปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ	เปอร์เซ็นต์ 1,3 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์ 1,2 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์โมโนกลีเซอไรด์
0	0	100	0	0	0	0
2	8.15	28.73	46.96	8.84	6.1	1.21
4	10.95	22.61	52.24	7.87	5	1.32
6	15.02	11.15	62.61	6.24	3.56	1.41
8	22.71	2.54	71.44	1.58	1.09	0.64
10	24.08	1.06	73.91	0.31	0.32	0.32
12	31.08	1.4	66.59	0.23	0.26	0.46
24	45.25	1.66	52.81	0.1	0.18	0
36	45.21	1.48	53.09	0.038	0.181	0
48	48.29	1.58	49.86	0.09	0.19	0

ตารางที่ ฉ-2 การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เวลาต่างๆ โดยสารละลายไลเพสชนิดหยาบจาก *C.rugosa*

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ	เปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์ 1,3 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์ 1,2 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์โมโนกลีเซอไรด์
0	0	100	0	0	0
2	47.98	36.32	7.34	7.27	1.09
4	52.54	30.98	8.11	6.84	1.53
6	64.66	20.57	7.67	5.49	1.61
8	94.55	3.45	0.632	0.594	0.776
10	93.44	3.59	1.21	1.08	0.691
12	94.12	3.692	0.888	0.639	0.662
24	96.96	2.1	0.338	0.169	0.633
48	98.05	1.81	0.033	0.114	0

ตารางที่ ฉ-3 การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่เวลาต่างๆ โดยไลเพสตรึงรูปชนิด NKA-9

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์	เปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ	เปอร์เซ็นต์ 1,3 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์ 1,2 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์โมโนกลีเซอไรด์
0	0	100	0	0	0	0
2	21.99	17.15	45.59	8.31	5.26	1.71
4	29.21	9.8	49.28	3.26	3.7	1.49
6	38.39	3.01	55.35	1.51	1.11	0.63
8	38.72	8.71	48.27	1.76	1.96	0.59
10	67.83	0.98	30.57	0.12	0.19	0.32
12	64.77	1.07	33.81	0.12	0.22	0
24	75.11	2.24	22.19	0.09	0.37	0
36	73.7	2.35	23.4	0.12	0.43	0
48	73.13	1.76	24.52	0.16	0.43	0

ตารางที่ ฉ-4 การทดลองเรื่องการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เวลาต่างๆ โดยไลเพสตรึงรูปชนิด H103

เวลาในการเกิดปฏิกิริยา	เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ	เปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์ 1,3 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์ 1,2 ไดกลีเซอไรด์	เปอร์เซ็นต์โมโนกลีเซอไรด์
0	0	100	0	0	0
2	27.05	56.43	7.19	8.25	1.09
4	47.87	38.43	7.34	5.28	1.07
6	78.87	13.17	4.18	2.71	1.06
8	88.59	5.61	2.8	1.91	1.09
10	86.54	7.2	2.88	2.27	1.15
12	88.15	8.03	1.64	1.56	0.609
24	97.74	2.07	0	0.19	0
36	97.48	2.2	0	0.32	0
48	96.33	2.37	0.34	0.4	0.56

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วันภิเษก จุฑาภักดิ์ เกิดวันที่ 28 เมษายน พ.ศ. 2526 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2547 จากนั้นเข้าศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษาถัดมา และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2552