รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตรึงเอนไซม์ไลเพสบนนาโนไฟเบอร์ของอิเลคโตรสปันพอลิสไตรีนเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

โดย ผศ. ดร. มัณฑนา โอภาประกาสิต และคณะ

มีนาคม 2554

สัญญาเลขที่ MRG5280089

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตรึงเอนไซม์ไลเพสบนนาโนไฟเบอร์ของอิเลคโตรสปันพอลิสไตรีนเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

คณะวิจัย	สังกัด
1. ผศ. ดร. มัณฑนา โอภาประกาสิต	ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล	ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. รศ. ดร. นพวรรณ ชนัญพานิช	ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากหน่วยงานและบุคคลดังต่อไปนี้

- สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยที่ให้การสนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่
- หน่วยวิจัย Biofuels by Biocatalysts Research Unit คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการตรึงรูปเอนไซม์
- ศูนย์วิจัย Integrated Nano Science Research Center คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือสำหรับการอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเตรียมผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน
- รองศาสตราจารย์ ดร. นพวรรณ ชนัญพานิช และ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล นักวิจัยอาวุโสที่ให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ จนทำให้งานวิจัยนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ตามที่วางไว้

สารบัญ

หน้าที่

บทคัดย่อ (ไทย)	**3**
Abstract	**4**
Executive summary	**5**
เนื้อหางานวิจัย	
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา	**6**
2. วัตถุประสงค์ของโครงการ	**6**
3. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	
3.1 การศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยด้วยวิธีอิเล็กโทรสปันจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีน (PS) และพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PSMA)	**7**
3.2 การเตรียมผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA สำหรับใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์	**7**
3.3 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ไม่ได้ปรับสภาพ	**8**
3.4 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์	**8**
3.5 การวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปและประสิทธิภาพของการตรึงรูป	**9**
4. ผลการทดลอง	
4.1 อิทธิพลของภาวะที่ใช้ในการอิเล็กโทรสปินนิงต่อสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้	**12**
4.2 การตรึงเอนไซม์ไลเพสบนเส้นใยนาโนที่เตรียมได้จากวิธีอิเล็กโทรสปินนิง	**20**
4.3 การทดสอบความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ	**25**
4.4 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ	**26**
5. สรุปผลการทดลอง	**27**
6. Output ที่ได้จากโครงการ	**27**
ภาคผนวก	

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการตรึงรูปไลเพสบนผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA ชนิดของตัวทำละลายและภาวะที่ใช้ในการอิเล็กโทรสปินนิงมีผลโดยตรงต่อสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้ ภาวะในการเตรียมเส้นใยสามารถควบคุมด้วยการปรับ ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) ทั้งนี้พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปันจากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PS ต่อ PSMA ที่ 1:0, 4:1 และ 1:1 คือ 8:10:20, 6:11:15 และ 8:10:12 ตามลำดับ ตัวทำลายที่เหมาะสมสำหรับ 1:0 และ 1:1 PS/PSMA คือตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วน 1:1 ส่วนตัวทำลายที่เหมาะสมสำหรับ 4:1 PS/PSMA คือ 2:1 DMF:THF เส้นใยที่เตรียมได้ด้วยภาวะดังกล่าวมีลักษณะเรียบและไม่เกิดเป็นปม รวมถึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด

เมื่อนำเส้นใยที่เตรียมจากภาวะดังกล่าวไปตรึงรูปเอนไซม์ พบว่าการใช้ผืนเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปดีที่สุด โดยมีค่าความจุเอนไซม์และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป (U/mg support) สูงกว่าการใช้ 4:1 PS/PSMA และ 1:0 PS/PSMA ตามลำดับ นอกจากนี้การปรับสภาพเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA ด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำไปตรึงรูปยังสามารถเพิ่มค่าความจุเอนไซม์ได้ 2.9 เท่า โดยมีแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ใกล้เคียงกับการใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพ จากการตรวจสอบความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบน 1:1 PS/PSMA สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง ในขณะนี้เอนไซม์ตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กโทรสปันจาก PS/PSMA ที่มีสัดส่วนของ PSMA น้อยกว่าร้อยละ 50 สามารถใช้ซ้ำได้น้อยครั้งกว่า นอกจากนี้ยังได้ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA ซึ่งเป็น PS bead เพื่อเปรียบเทียบกับของผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปทรงที่แตกต่างกันของวัสดุค้ำจุนมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการตรึงรูป ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบน NKA มีค่าความจุเอนไซม์ที่ต่ำกว่าแต่มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสของเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงกว่ากรณีที่ใช้เส้นใยอิเล็กโทรสปัน

Abstract

This research is aimed to study efficiencies of lipase immobilization on PS/PSMA e-spun mats. Solvents and conditions utilized in electro-spinning process have influences on morphology of the obtained fibers. E-spinning process is controlled by adjusting voltage (kV): needle to collector distance (cm): concentration of polymer solution (%w/w). It is found that the suitable conditions for e-spinning 1:0 PS/PSMA, 4:1 PS/PSMA and 1:1 PS/PSMA are 8:10:20, 6:11:15 and 8:10:12, respectively. While a suitable solvent for preparing 1:0 และ 1:1 PS/PSMA is mixed solvent of DMF and THF at mixing ratio of 1:1, the solvent for 4:1 PS/PSMA is 2:1 DMF:THF.

When using the e-spun PS/PSMA mat as supporting materials for immobilizing enzyme, It is found that 1:1 PS/PSMA e-spun mat provides the highest immobilization efficiency. Protein loading and hydrolysis activity (U/mg support) of enzyme immobilized on 1:1 PS/PSMA e-spun mat are higher than those on 4:1 PS/PSMA and 1:0 PS/PSMA, respectively. Moreover, pre-treatment of 1:1 PS/PSMA e-spun mat with alcohol, before using in enzyme immobilization, can improve the protein loading by ~2.9x without effecting enzyme activity. From the re-usability test with hydrolysis reaction, while immobilized enzyme on 1:1 PS/PSMA is possibly re-used for 6 times, the lipase on e-spun PS/PSMA with PSMA content less than 50% can be re-used much less. In addition, the study on efficiency of lipase immobilization on commercial support as NKA (PS bead) is conducted in order to compare with that of e-spun mat. Results show that shape (form) of the supporting materials has an influence on the immobilization efficiency. Immobilized enzyme of NKA has lower protein loading but much higher activity (U/mg lipase) than that of e-spun mats.

Keyword: enzyme immobilization, lipase, e-spun fibers, PS, PSMA

Executive summary

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพส เนื่องจากไลเพสสามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้มีประสิทธิภาพ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งปฏิกิริยาจำพวกสารเคมี การใช้เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรตมากกว่า ใช้ภาวะของปฏิกิริยาที่รุนแรงน้อยกว่า อีกทั้งเหมาะสำหรับการใช้งานด้านเทคโนโลยีสะอาด แต่หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะไม่สามารถนำเอนไซม์กลับคืนมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นการตรึงรูปเอนไซม์จึงมีความสำคัญ เพราะสามารถลดต้นทุนการใช้งานเอนไซม์ที่โดยทั่วไปมีราคาที่สูงกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีมาก ด้วยการทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้มากครั้งขึ้น

รูปแบบการตรึงรูปที่เลือกใช้คือการยึดติดไลเพสบนวัสดุค้ำจุนชนิดเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง PS และ PSMA ที่อัตราส่วนต่างๆ เมื่อนำผืนเส้นใยที่เตรียมจากเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิงไปทดลองตรึงรูปไลเพสโดยปรับเปลี่ยนชนิดของ PS/PSMA พบว่า 1:1 PS/PSMA ให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปดีที่สุด โดยมีค่าความจุเอนไซม์และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป (U/mg support) สูงกว่าการใช้ 4:1 PS/PSMA และ 1:0 PS/PSMA ตามลำดับ นอกจากนี้การปรับสภาพเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA ด้วยแอลกอฮอล์ก่อนนำไปตรึงรูปยังสามารถเพิ่มค่าความจุเอนไซม์ได้ 2.9 เท่า โดยยังคงมีแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ใกล้เคียงกับการใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพ จากการตรวจสอบความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำเพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบน 1:1 PS/PSMA สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง ในขณะนี้เอนไซม์ตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กโทรสปันจาก PS/PSMA ที่มีสัดส่วนของ PSMA น้อยกว่าร้อยละ 50 สามารถใช้ซ้ำได้น้อยครั้งกว่า นอกจากนี้ยังได้ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA ซึ่งเป็น PS bead เพื่อเปรียบเทียบกับของผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูปทรงที่แตกต่างกันของวัสดุค้ำจุนมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการตรึงรูป ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบน NKA มีค่าความจุเอนไซม์ที่ต่ำกว่าแต่มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสของเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงกว่ากรณีที่ใช้เส้นใยอิเล็กโทรสปัน

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถขยายผลต่อโดยนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ซับสเตรตอื่นๆ เช่น น้ำมันปาล์ม

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันปัญหาที่ทั่วโลกกำลังเผชิญอยู่คือราคาน้ำมันที่แพงและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากปริมาณเชื้อเพลิงฟอสซิลคงเหลือที่ลดลง ไบโอดีเซลนับเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจสำหรับเป็นแหล่งพลังงานทดแทน เนื่องจากผลิตได้โดยนำน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางธรรมชาติที่เกิดทดแทนใหม่ได้มาเปลี่ยนโครงสร้างเคมีด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้ในปฏิกิริยาดังกล่าวคือกรดหรือด่างเนื่องจากหาได้ง่ายและราคาถูก แต่ข้อเสียคือขั้นตอนการแยกกลีเซอรอลและผลิตภัณฑ์พลอยได้อื่นเพื่อได้ไบโอดีเซลที่บริสุทธิ์นั้นยุ่งยาก อีกทั้งก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและเสียค่าใช้จ่ายและเวลามากขึ้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไลเพสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส-เอสเทอริฟิเคชัน อย่างไรก็ดีด้วยราคาที่สูงของเอนไซม์จึงเป็นข้อจำกัดหลักในการลงทุน ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะตรึงรูปเอนไซม์บนตัวค้ำจุน (support) เพื่อให้สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้

การตรึงรูปเอนไซม์สามารถทำได้โดยกระบวนการดูดซับทางกายภาพหรือทางเคมี ซึ่งการเลือกวิธีการตรึงรูปรวมถึงชนิดและรูปแบบของตัวค้ำจุนมีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการใช้งานของเอนไซน์ตรึงรูปดังกล่าว ดังนั้นการพิจารณาคัดเลือกรูปแบบที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้คือ ให้ความจุเอนไซม์ที่สูง แอกทิวิตีของเอนไซม์ต่อปฏิกิริยาควรไม่เปลี่ยนไปมากนัก สามารถกักเก็บเอนไซม์ได้ดีเพื่อสามารถใช้ซ้ำได้ สารที่ต้องการให้เกิดปฏิกิริยาสามารถซึมและแพร่ผ่านได้ง่าย ตัวค้ำจุนที่ดีนั้นควรมีพื้นที่ผิวและ/หรือมีความพรุนตัวมากเพื่อเพิ่มความจุเอนไซม์ และมีเสถียรภาพในภาวะที่ใช้งาน (อุณหภูมิ ความดัน สารเคมีในปฏิกิริยา อัตราไหลของซับสเตรตฯ) ตลอดจนสามารถกักเก็บเอนไซม์ได้ดีและใช้ซ้ำได้ นอกจากนี้กระบวนการแยกเอนไซม์ตรึงรูปจาก reactor ต้องไม่ยุ่งยากและไม่ซับซ้อน

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อเตรียมไลเพสตรึงรูปทั้งด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพและด้วยวิธีทางเคมีให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้ โดยวัสดุค้ำจุนที่เลือกใช้นั้นเตรียมโดยเทคนิคอิเล็กโทรสปินนิงจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีนกับพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ เนื่องจากหมู่แอนไฮไดรด์ของโคพอลิเมอร์สามารถเกิดพันธะกับหมู่เอมีนของไลเพสได้โดยตรงและยังสามารถช่วยเพิ่มความเป็นไฮโดรฟิลิกให้กับวัสดุที่เตรียมได้อีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมสมบัติดังกล่าวให้เหมาะสมโดยทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนผสมระหว่างพอลิเมอร์ทั้งสองชนิด

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 ศึกษาอิทธิพลของภาวะที่ใช้ในการเตรียมผืนเส้นใยด้วยวิธีอิเล็กโทรสปินนิงต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้จากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีนและพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ที่อัตราส่วนต่างๆ

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสบนผืนเส้นใยที่เตรียมได้โดยตรวจสอบปริมาณความจุเอนไซม์และแอกทิวิตี

2.3 ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงรูปไลเพสบนวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด PS bead (NKA) เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน

3. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยด้วยวิธีอิเล็กโทรสปันจากพอลิเมอร์ผสมระหว่างพอลิสไตรีน (PS) และพอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์ (PSMA)

3.1.1 เตรียมสารละลายของพอลิเมอร์ผสมที่มีอัตราส่วนของ PS:PSMA ต่างๆ ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) และเตตระไฮโดรฟูราน (THF) ดังกำหนดในตารางที่ 1

3.1.2 บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ลงในกระบอกฉีดยาที่มีเข็มเบอร์ 22 ติดอยู่ แล้วนำไปติดตั้งบน syringe pump ที่ตั้งค่าอัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3.1.3 ตั้งฉากรับที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอล์ยให้ห่างจากปลายเข็มตามระยะที่กำหนด (ตารางที่ 1) แล้วจึงเชื่อมต่อกับเครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้า

3.1.4 เริ่มปั่นเส้นใยโดยเปิดสวิทซ์เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้าพร้อมปรับค่าศักย์ไฟฟ้าตามที่กำหนด (ตารางที่ 1)

3.1.5 ปิดสวิทซ์เครื่องกำเนิดศักย์ไฟฟ้าหลังจากทดลองฉีดเป็นเวลา 2 นาที นำอลูมิเนียมฟอล์ยออกจากฉากรับผึ่งให้ตัวทำละลายระเหยออกให้หมด แล้วเก็บเส้นใยที่ได้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อวิเคราะห์สัณฐานวิทยาด้วย SEM ต่อไป

ตารางที่ 1 ภาวะที่ใช้ในการเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA ในตัวทำละลายผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

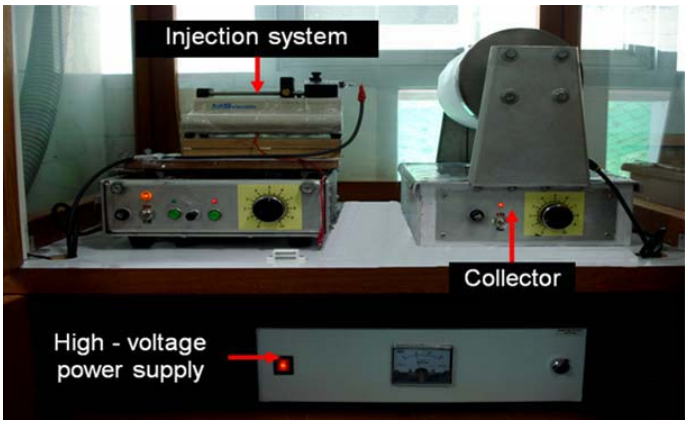
อัตราส่วนระหว่าง PS:PSMA	อัตราส่วนระหว่าง DMF/THF	ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ผสม (%w/w)	ค่าศักย์ไฟฟ้า (kV)	ระยะห่างระหว่างฉากรับกับปลายเข็ม(cm)
1:0	1:1	20	8	10
1:1	1:1	10-15	6 - 10	10
4:1	1:1 2:1	10-15 15	6 - 10 6	10 10-12

3.2 การเตรียมผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA สำหรับใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

3.2.1 ติดตั้งเข็มฉีดยาที่บรรจุสารละลายพอลิเมอร์ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมกับ syringe pump ซึ่งวางอยู่บนแท่นที่สามารถควบคุมการเคลื่อนที่ไปกลับในแนวแกน x ด้วยความเร็วคงที่ ทั้งนี้ตั้งค่าการเคลื่อนที่ในแนวแกน x ของแท่นวาง syringe pump เป็น 7.5 เซนติเมตร

3.2.2 วางลูกกลิ้ง (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นอุปกรณ์รับและม้วนเก็บเส้นใยให้ห่างจากปลายเข็มฉีดยาตามระยะที่เหมาะสม

3.2.3 ฉีดเส้นใยต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ด้วยค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม จากนั้นนำผืนเส้นใยไปตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและขนาดของเส้นใยด้วย SEM และใช้ตรึงรูปเอนไซม์



รูปที่ 1 อุปกรณ์สำหรับเตรียมผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันเพื่อใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

3.3 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ไม่ได้ปรับสภาพ

3.3.1 เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเพสความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 จากนั้นกรองสารละลายไลเพสด้วย syringe filters ขนาด 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร ตามลำดับ

3.3.2 ตัดเส้นใยที่ได้เป็นรูปแบบที่ต้องการศึกษา 2 แบบดังนี้ ตัดเป็นวงกลมรัศมีประมาณ 5 เซนติเมตร และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ พร้อมบันทึกน้ำหนักเส้นใยที่ใช้

3.3.3 บรรจุเส้นใยที่ตัดลงบีกเกอร์ที่มีสารละลายไลเพสที่กรองแล้วปริมาตรที่กำหนด จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่อง wave platform shaker (ความเร็ว 8 รอบต่อนาที) แล้วเขย่าต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

3.3.4 ล้างวัสดุค้ำจุนหลังตรึงรูปด้วยบัฟเฟอร์จำนวน 5 ครั้ง กรองน้ำล้างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 เก็บน้ำล้างไว้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีน (protein loading)

3.3.5 เก็บไลเพสตรึงรูปไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccators) เพื่อวัดค่าแอกทิวิตีและทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.3.6 เตรียมไลเพสตรึงรูปจำนวนไม่น้อยกว่า 5 ตัวอย่างต่อชนิดของเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA

3.4 การตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์

3.4.1 ตัดผืนเส้นใยเป็นวงกลมรัศมีประมาณ 5 เซนติเมตร พร้อมบันทึกน้ำหนักเส้นใย แล้วแช่ลงในสารละลายเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 บันทึกน้ำหนักเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

3.4.3 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเก็บเส้นใยไว้ในบัฟเฟอร์เพื่อนำมาใช้ในการตรึงรูป

3.4.4 บรรจุเส้นใยที่ผ่านการปรับสภาพแล้วลงบีกเกอร์ที่มีสารละลายไลเพสที่กรองแล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง wave platform shaker (ความเร็ว 8 รอบต่อนาที) จากนั้นเขย่าต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

3.4.5 ล้างวัสดุค้ำจุนหลังตรึงรูปด้วยบัฟเฟอร์จำนวน 5 ครั้ง กรองน้ำล้างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 แล้วเก็บน้ำล้างไว้ในตู้เย็นเพื่อวิเคราะห์ค่าความจุเอนไซม์ (protein loading)

3.4.6 เก็บไลเพสตรึงรูปไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccators) เพื่อวัดค่าแอกทิวิตีและทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.4.7 เตรียมไลเพสตรึงรูปจำนวนไม่น้อยกว่า 5 ตัวอย่าง ด้วยเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ปรับสภาพ

3.5 การวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปและประสิทธิภาพของการตรึงรูป

3.5.1 การหาค่าความจุเอนไซม์ (protein loading)

3.5.1.1 สร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของน้ำกลั่น
- ปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาตร 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ไมโครลิตรลงใน well ของ microplate จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในแต่ละ well โดยให้ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละ well เป็น 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- หลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย folin&ciocalteu reagent จำนวน 20 ไมโครลิตร
- บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดสี 30 นาที แล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm ด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
- สร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน x เป็นความเข้มข้นของ BSA (µg/100µL) และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 nm จากนั้นหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตราฐาน ซึ่งสามารถแสดงได้ด้วยสมการที่ 1

$$Y = 0.0222X \qquad (1)$$

3.5.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่บนวัสดุค้ำจุนหลังผ่านการตรึงรูป

วิเคราะห์โดยนำน้ำล้างที่ได้จากข้อ 3.3.4 และ 3.4.5 รวมถึงสารละลายไลเพสก่อนการตรึงรูปมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยขั้นตอนดังนี้

- ปิเปตสารละลายไลเพสหรือน้ำล้างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน well ของ microplate จากนั้นเติมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- หลังบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย folin&ciocalteu reagent 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มต่ออีก 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร
- คำนวนปริมาณโปรตีนของสารละลายไลเพสก่อนการตรึงรูป (A) ด้วยสมการที่ 2

$$A = [X \bullet V \bullet 1000] / [100] \quad (\mu g) \qquad (2)$$

เมื่อ X คือ ค่าที่คำนวณได้เมื่อแทนค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 650 นาโนเมตร ในสมการที่ 1
V คือ ปริมาตรของสารละลายไลเพสที่ใช้ในการตรึงรูป (mL)

- คำนวณปริมาณโปรตีนในน้ำล้าง (B) ด้วยสมการที่ 3

$$B = [X \bullet V \bullet 1000] / 100 \quad (\mu g) \qquad (3)$$

เมื่อ X คือค่าที่คำนวณได้เมื่อแทนค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 650 นาโนเมตร ในสมการที่ 1
V คือปริมาตรของน้ำล้างแต่ละครั้ง (mL)

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

$$\text{Protein loading } (\mu g/mg \text{ support}) = (A - \Sigma B) / W \qquad (4)$$

$$\% \text{ Immobilization} = (A - \Sigma B) / A \qquad (5)$$

เมื่อ ΣB คือ ผลรวมของปริมาณโปรตีนในน้ำล้างแต่ละครั้ง
W คือ น้ำหนัก (mg) ของวัสดุค้ำจุนที่ใช้

3.5.2 การหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ (activity)

3.5.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟีนอล

- เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอล 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย
- ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟีนอล น้ำกลั่น และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตามสัดส่วนที่แสดงในตารางที่ 2 ลงใน well ของ microplate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm
- สร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน x เป็นปริมาณของพาราไนโตรฟีนอล (µg) และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm จากนั้นหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถแสดงได้ค่าสมการที่ (6)

$$Y = 0.1748X \qquad (6)$$

ตารางที่ 2 สัดส่วนของสารละลายพาราไนโตรฟีนอล น้ำกลั่นและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

พาราไนโตรฟีนอล (ไมโครกรัม)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	พาราไนโตรฟีนอล	0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 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

3.5.2.2 การวิเคราะห์ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

- เตรียมสารละลาย A ซึ่งประกอบด้วยพาราไนโตรฟีนิลปาล์มมิเทต180 มิลลิกรัม ละลายใน isopropanol 30 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลาย B ซึ่งประกอบด้วย triton X-100 0.8% และ gum arabic 0.2% ละลายในน้ำกลั่น
- จากนั้นปิเปตสารละลายต่างๆ ลงใน well ของ microplate ตามสัดส่วนที่ระบุในตารางที่ 3
- หลังบ่ม 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm
- ทำการทดลองซ้ำไม่น้อยกว่า 3 ตัวอย่างในแต่ละชุดตัวอย่าง

ตารางที่ 3 สัดส่วนของสารละลายชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เพื่อหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

ตัวอย่าง	ปริมาณสารตัวอย่าง	สารละลาย A	สารละลาย B	0.2 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7	น้ำกลั่น	ปริมาตรรวม (µL)
เอนไซม์อิสระ	30 µL	9	81	50	30	200
เอนไซม์ตรึงรูป	4 mg	90	810	500	600	2000
Blank	30 µL	9	81	50	30	200

- คำนวณค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปด้วยสมการที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสของเอนไซม์อิสระ (U/mg lipase)

= X / [(139.11) • 60 • 30] **(7)**

เมื่อ U คือ ปริมาณพาราไนโตรฟีนอล (µmol) ที่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต่อเวลา 1 นาที
X คือ ค่าที่คำนวณได้เมื่อแทนค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 410 นาโนเมตร ในสมการที่ 6

แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสของเอนไซม์ตรึงรูป (U/mg lipase)

= X / [(139.11) • 30 • C] **(8)**

เมื่อ C คือ ค่าความจุเอนไซม์ที่ได้จากสมการที่ 4 คูณด้วย 4 แล้วหารด้วย BSA equivalent

- คำนวณค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยสมการที่ 9

แอกทิวิตีต่อน้ำหนักของเอนไซม์ตรึงรูป (U/mg support)

= X / [(139.11) • 30 • 4] **(9)**

3.5.3 การทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.5.3.1 นำเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการวัดค่าแอกทิวิตีแล้วมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนสีของสารละลายหมดไป จากนั้นบรรจุลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 30 มิลลิลิตร ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 3.5.2.2

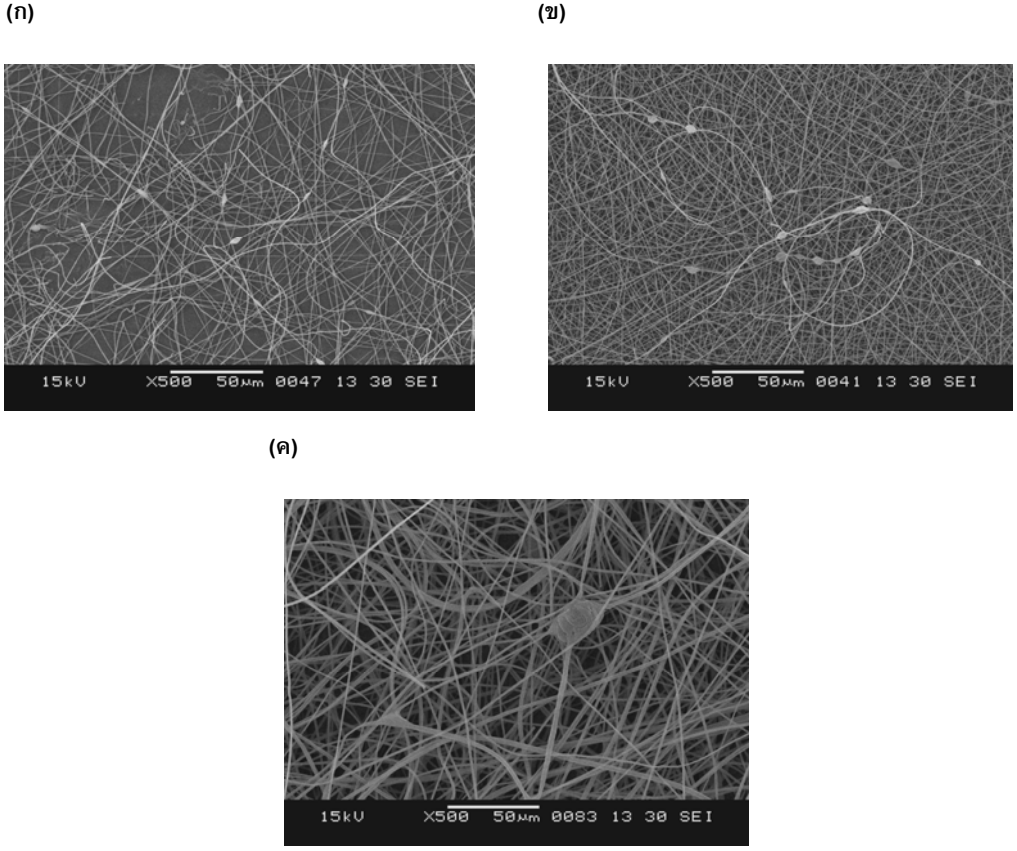
3.5.3.2 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 3.5.3.1 จนกว่าค่าแอกทิวิตีที่ได้จะมีค่าต่ำจนไม่สามารถวัดได้

4. ผลการทดลอง

4.1 อิทธิพลของภาวะที่ใช้ในการอิเล็กโทรสปินนิงต่อสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้

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

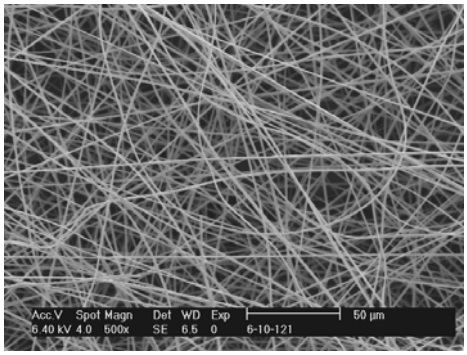
เมื่อพิจารณารูป SEM ของเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วน 1:1 (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ต่างๆ (รูปที่ 2-4) จะเห็นได้ว่าภาวะที่เลือกใช้มีผลโดยตรงต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยที่เตรียมได้ กรณีที่ใช้ความเข้มข้นเป็น 10% (w/w) เส้นใยมีลักษณะเป็นของปมเกิดขึ้นเมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 6 ถึง 10 kV (รูปที่ 2) ทั้งนี้เมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ พบว่าจำนวนเส้นใยที่มีลักษณะของปมมีจำนวนลดลงด้วย แต่เมื่อพยายามทดลองโดยเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้าให้ $>$ 10 kV พบว่าไม่สามารถเตรียมเส้นใยได้เนื่องจากอุปกรณ์เกิดการช๊อตขึ้น



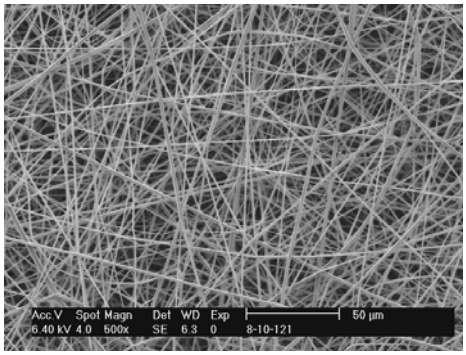
รูปที่ 2 เส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 10% (w/w) และศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 12% (w/w) รูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยที่เตรียมได้มีลักษณะเรียบและไม่มีปมเกิดขึ้นทั้งที่ใช้ความต่างศักย์ 6, 8 และ 10 kV แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 15% (w/w) พบว่าที่ความต่างศักย์ 6 kV และ 10 kV เท่านั้นที่เส้นใยมีลักษณะเรียบไม่มีปมเกิดขึ้น แต่เส้นใยที่ได้จะมีขนาดไม่สม่ำเสมอตลอดความยาว (รูปที่ 4) อีกทั้งยังพบว่าขนาดของเส้นใยมีแนวโน้มใหญ่ขึ้นเมื่อปรับเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายจาก 12% เป็น 15% (w/w)

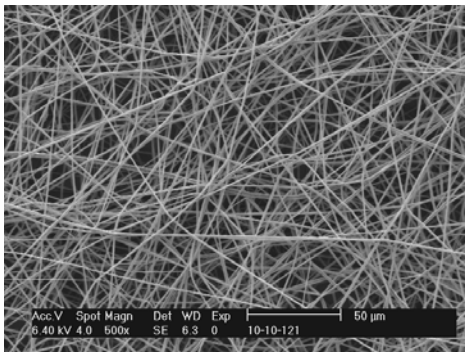
(ก)



(ข)

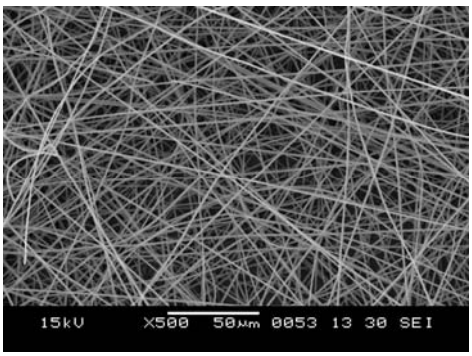


(ค)

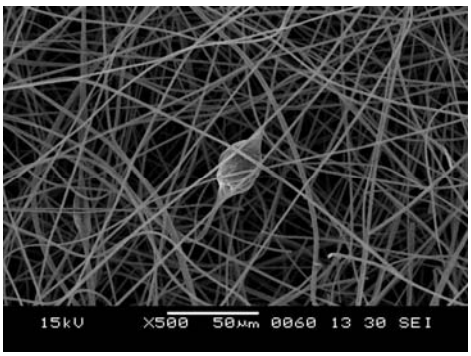


รูปที่ 3 เส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 12% (w/w) และศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

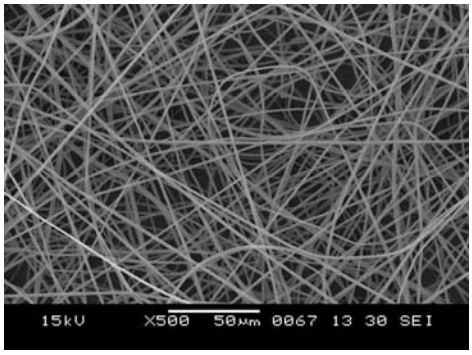
(ก)



(ข)



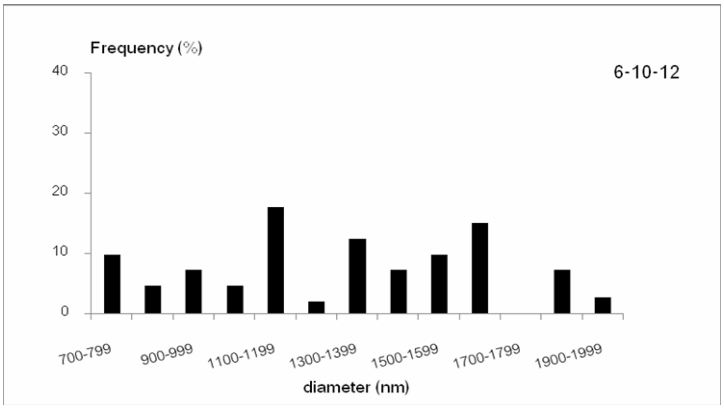
(ค)



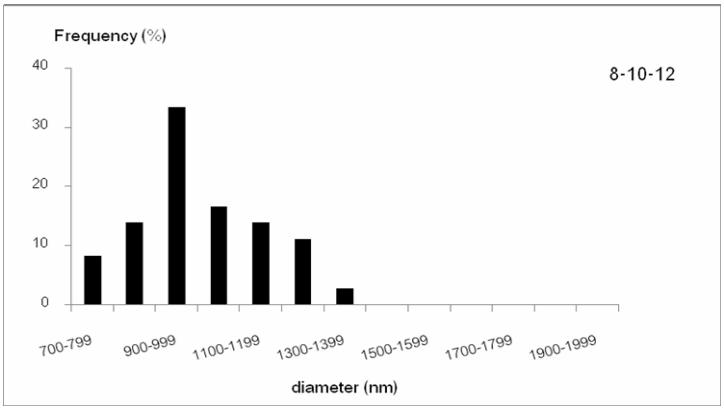
รูปที่ 4 เส้นใยอิเล็กโทรสปันที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA ด้วยความเข้มข้น 15% (w/w) และศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยดังที่ได้กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 1:1 PS/PSMA ที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปันให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กและมีความสม่ำเสมอตลอดความยาวโดยไม่เกิดเป็น bead fiber คือ 12% (w/w) เมื่อนำข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยซึ่งวิเคราะห์จากภาพ SEM ที่ถ่ายด้วยกำลังขยาย 500 ในตำแหน่งที่ต่างกันอย่างน้อย 3 จุด (จำนวนไม่น้อยกว่า 100 เส้น) มาสร้างเป็นเป็นกราฟซึ่งแสดงร้อยละของความถี่ที่พบเส้นใยแต่ละขนาด พบว่าศักย์ไฟฟ้ามีผลต่อขนาดและการกระจายตัวของเส้นใยบนผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA (12% w/w) โดยเส้นใยที่เตรียมได้ที่ 6 kV (รูปที่ 5 (ก) จะมีการกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าเส้นใยที่เตรียมได้ที่ 8kV และ 10 kV (รูปที่ 5(ข)) และ(ค))

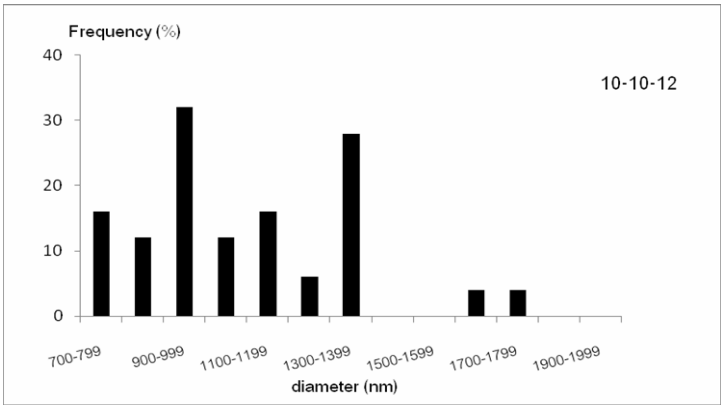
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 5 ร้อยละความถี่ที่สัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 1:1 PS/PSMA เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) คือ (ก) 6:10:12 (ข) 8:10:12 และ (ค) 10:10:12 ตามลำดับ

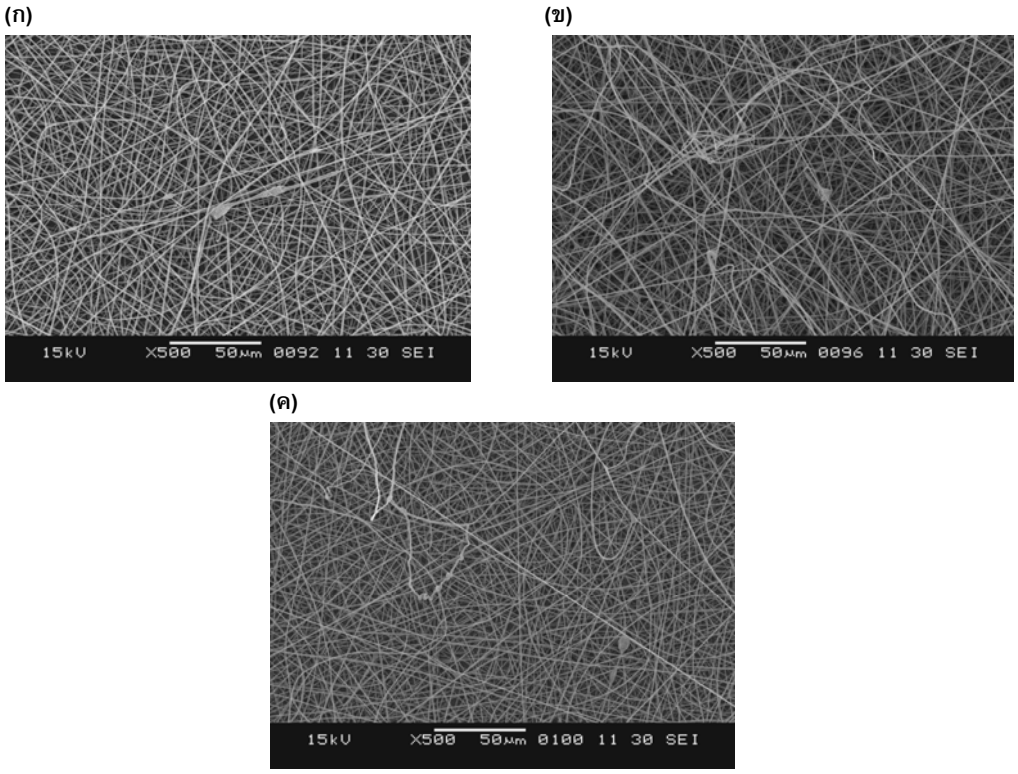
นอกจากนี้ค่าในตารางที่ 4 ยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าจาก 6 kV จนถึง 8 kV เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยจะลดลง แต่เมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าเป็น 10 kV เส้นใยมีแนวโน้มว่ามีขนาดใหญ่ขึ้น จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมในการปั่นเส้นใย 1:1 PS/PSMA คือ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 12% โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF:THF ที่อัตราส่วน 1:1 ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้คือ 8 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับคือ 10 cm เนื่องจากให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด คือ 1.01 μm

ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใย 1:1 PS/PSMA ที่เตรียมจากความเข้มข้น 12% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับเป็น 10 cm และศักย์ไฟฟ้าต่างๆ

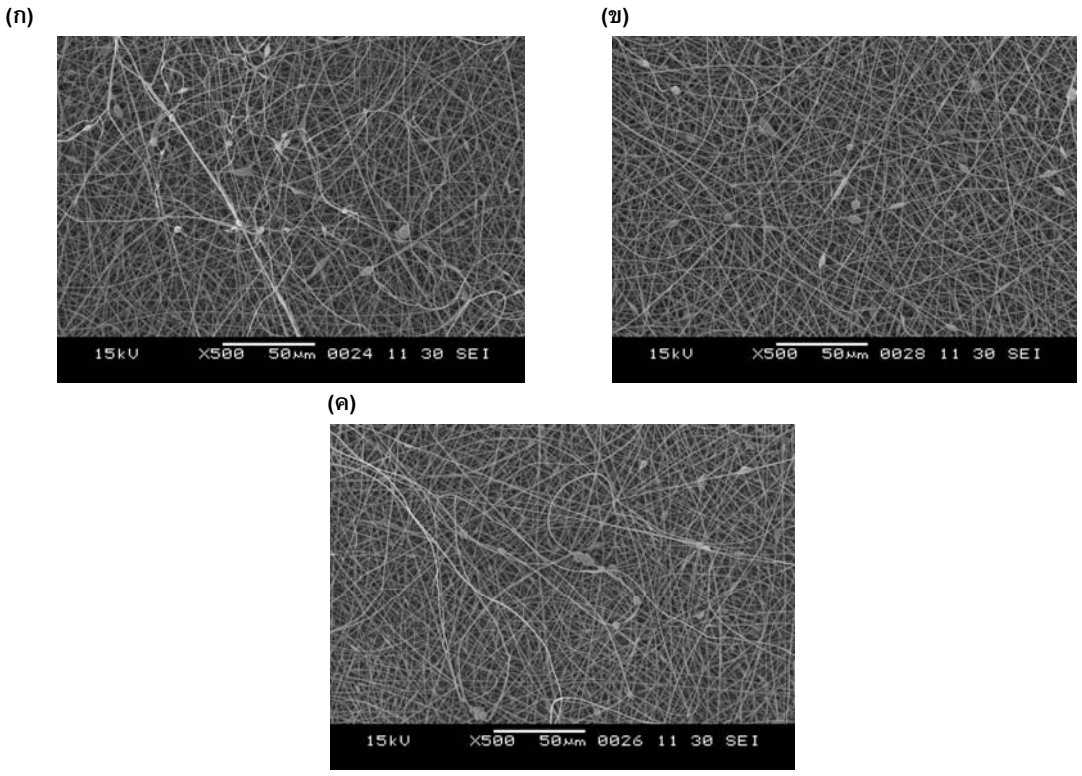
ศักย์ไฟฟ้า (kV)	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย ± SD (μm)
6	1.20 ± 0.29
7	1.04 ± 0.23
8	1.01± 0.16
9	1.05 ± 0.21
10	1.13 ± 0.29

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

จากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ที่มีต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย 4:1 PS/PSMA (รูปที่ 6-8) ที่เตรียมโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วน 1:1 (w/w) และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm พบว่ากรณีที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น



รูปที่ 6 เส้นใยอิเล็กโทรสปัน 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 10% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

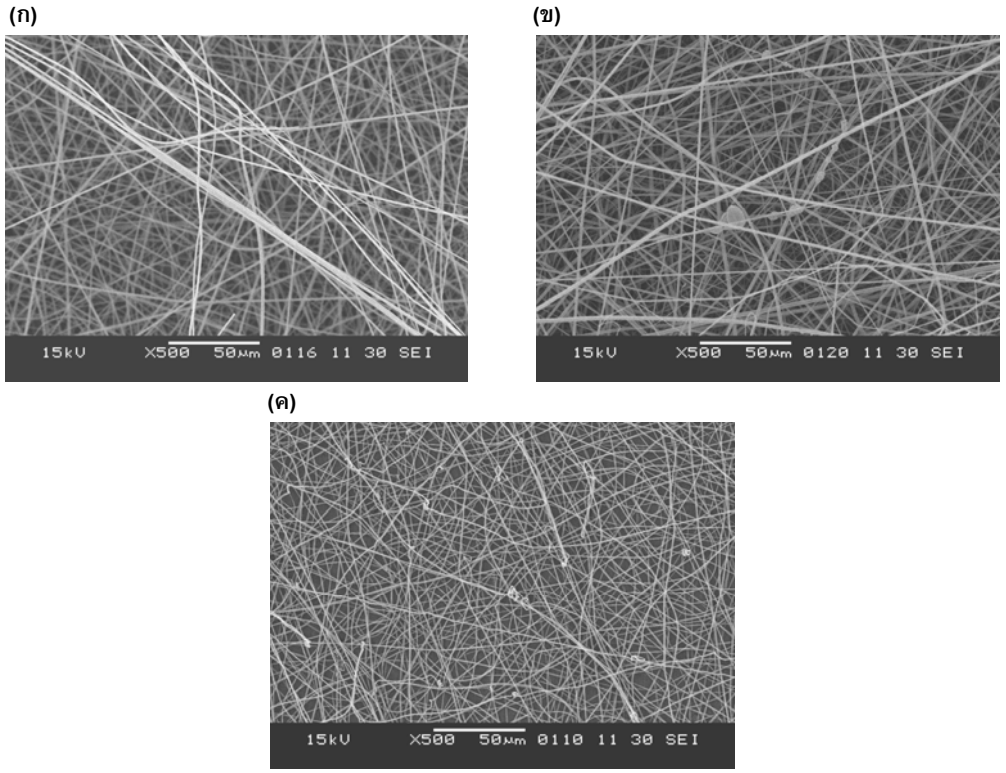


รูปที่ 7 เส้นใยอิเล็กโทรสปัน 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 12% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และค่าศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

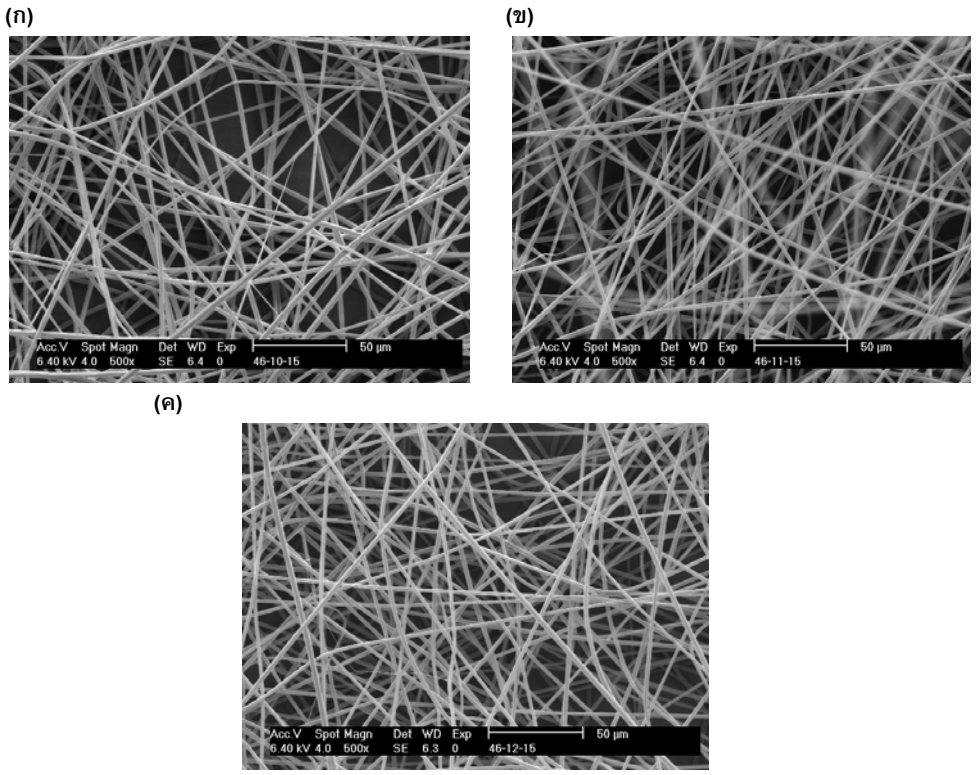
10% และ 12% (w/w) เส้นใยจะเกิดลักษณะเป็นปมขึ้น (bead fiber) เมื่อความต่างศักย์ที่ใช้คือ 6, 8, 10 kV (รูปที่ 6-7)

เมื่อเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 15% w/w รูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยมีลักษณะที่เรียบไม่มีปมเกิดขึ้นเฉพาะเมื่อเลือกใช้ศักย์ไฟฟ้า 6 kV แต่เส้นใยที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปลี่ยนไปใช้ตัวทำละลายผสม DMF:THF ที่อัตราส่วนเป็น 2:1 (w/w) พบว่าเส้นใยที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่สม่ำเสมอมากกว่า แต่มีขนาดเส้นที่ใหญ่กว่าเส้นใยที่ได้จากการใช้สัดส่วนของ DMF:THF เป็น 1:1 (w/w) (รูปที่ 8(ก) และ รูปที่ 9(ก)) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ DMF กลับส่งผลให้เส้นใยมีแนวโน้มที่จะใหญ่ขึ้น ดังนั้นจึงทดลองเพิ่มระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ เมื่อพิจารณารูปที่ 10 และตารางที่ 5 พบว่าไม่เพียงแค่ศักย์ไฟฟ้าแต่ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับก็มีผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยอิเล็กโทรสปัน โดยขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยจะมีค่าลดลงเมื่อระยะห่างมีค่าเพิ่มขึ้น เพราะลำของสารละลายพอลิเมอร์ที่ถูกแรงไฟฟ้าขับออกมามีเวลาในการยืดตัวก่อนตกกระทบบนฉากรับได้นานขึ้น

จากการทดลองข้างต้นทำให้เลือกใช้ภาวะในการเตรียมเส้นใย 4:1 PS/PSMA เพื่อใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ คือ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ 15% โดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF:THF ที่อัตราส่วน 2:1 ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับคือ 11 cm เนื่องจากให้เส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด คือ 1.86 µm

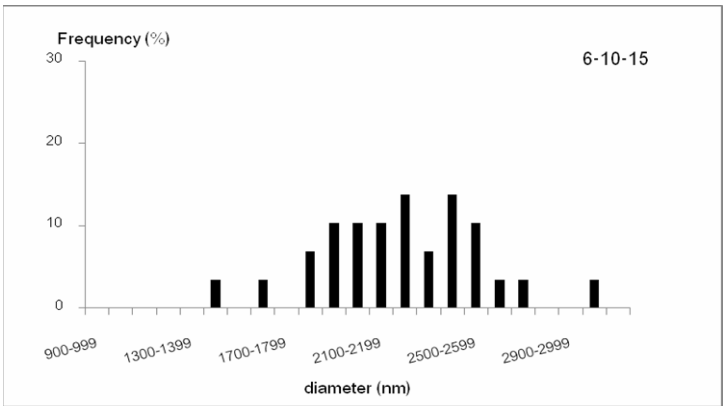


รูปที่ 8 เส้นใยอิเล็กโทรสปัน 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 15% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ 10 cm และค่าศักย์ไฟฟ้า (ก) 6 kV (ข) 8 kV และ (ค) 10 kV ตามลำดับ

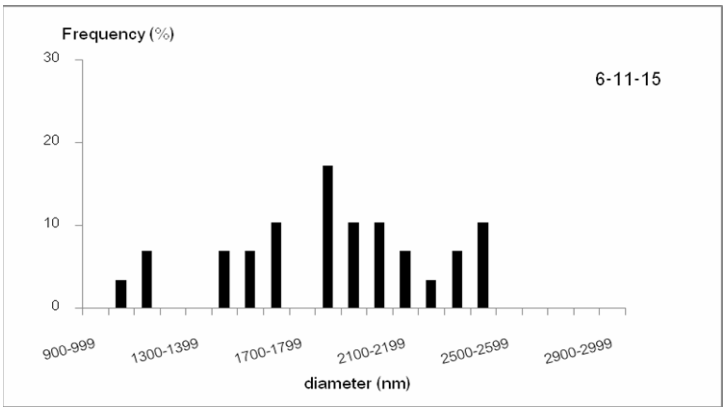


รูปที่ 9 เส้นใยอิเล็กโทรสปัน 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 15% (w/w) อัตราส่วนของ DMF:THF เป็น 2:1 (w/w) ที่ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับเป็น (ก) 10 cm (ข) 11 cm และ (ค) 12 cm ตามลำดับ

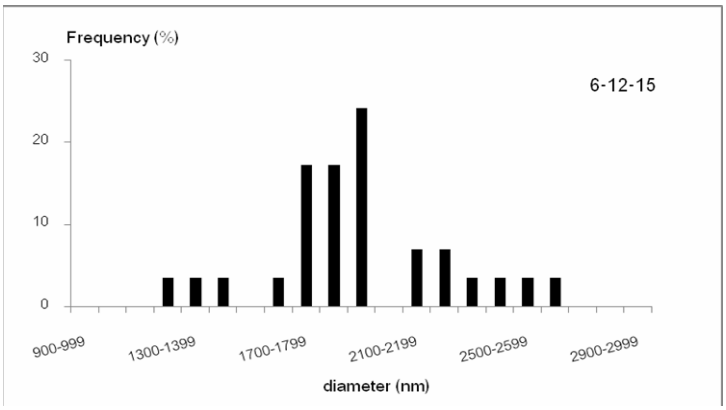
(ก)



(ข)



(ค)



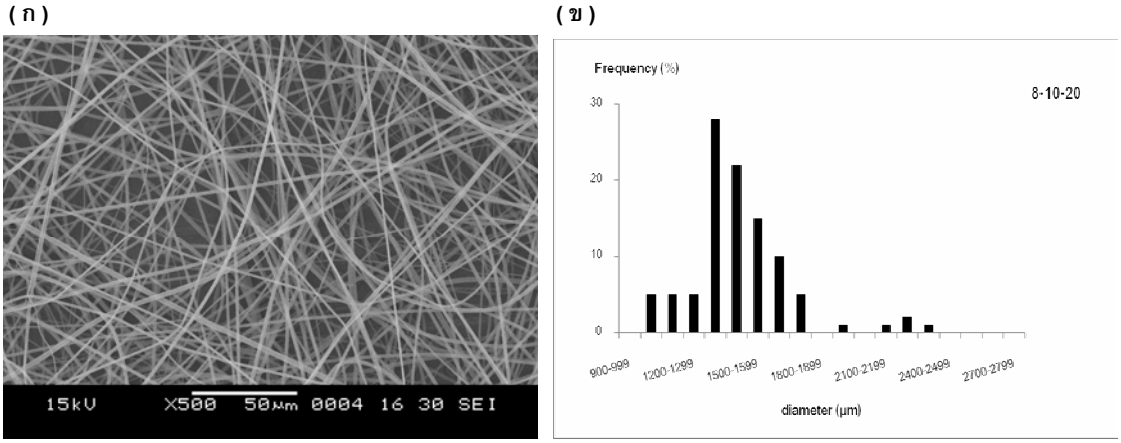
รูปที่ 10 ร้อยละความถี่ที่สัมพันธ์กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 4:1 PS/PSMA เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm):ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) เป็น (ก) 6:10:15 (ข) 6:11:15 และ (ค) 6:12:15

ตารางที่ 5 เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ 4:1 PS/PSMA ที่เตรียมจากความเข้มข้น 15% (w/w) ในตัวทำละลายผสม DMF:THF เป็น 2:1 ที่ศักย์ไฟฟ้า 6 kV และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับต่างๆ

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

4.1.3 พอลิสไตรีน (1:0 PS/PSMA)

การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใย 1:0 PS/PSMA ด้วยตัวทำละลายผสม DMF:THF ที่อัตราส่วน 1:1 ดำเนินการโดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้น 10 – 20 %w/w และภาวะที่ใช้ในการฉีด คือ ศักย์ไฟฟ้าในช่วง 4 – 10 kV และระยะห่างระหว่างฉากรับและปลายเข็มในช่วง 8 – 20 เซนติเมตร เมื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยาด้วย SEM พบว่าภาวะที่เส้นใยที่เตรียมได้มีลักษณะเรียบและไม่เกิดเป็นปม คือ (1) 8 kV: 20%: 10 cm (2) 6 kV: 20%: 10 cm และ (3) 6 kV: 20%: 15 cm ซึ่งเมื่อตรวจสอบเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยพบว่าเส้นใยที่เตรียมได้จากภาวะที่ 1 มีขนาดเล็กกว่าอีกสองภาวะ ดังนั้นจึงเลือกภาวะที่ 1 เป็นภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยจาก 1:0 PS/PSMA เส้นใยที่เตรียมได้มีลักษณะดัง รูปที่ 11(ก) และมีการกระจายตัวของขนาดเส้นใยดังรูปที่ 11(ข) ทั้งนี้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยที่เตรียมได้คือ 1.47± 0.23 μm



รูปที่ 11 (ก) รูปจาก SEM และ (ข) การกระจายตัวของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย 1:0 PS/PSMA ที่เตรียมด้วยความเข้มข้น 20% (w/w) ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ10 cm ที่ศักย์ไฟฟ้า 8 kV

4.2 การตรึงเอนไซม์ไลเพสบนเส้นใยนาโนที่เตรียมได้จากวิธีอิเล็กโทรสปินนิง

หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเส้นใยจาก PS/PSMA ในแต่ละอัตราส่วนของพอลิเมอร์ผสมแล้ว จึงทำการฉีดเส้นใยแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ฉากรับที่เป็นลูกกลิ้งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 cm ยาว 57 cm ผืนเส้นใยที่ได้มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 12 และความหนาของผืนเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 และ 4:1 PS/PSMA คือ 30 μm ส่วนความหนาของผืนเส้นใยที่เตรียมจาก 1:0 PS/PSMA คือ 50 μm ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าหากใช้ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์มากขึ้น ความหนาของผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่เตรียมได้ก็เพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน

รูปที่ 12 ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่เตรียมได้ (57 cm x 97.3 cm) จากการฉีดเส้นใยต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.2.1 การตรึงรูปไลเพสโดยใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพ

การศึกษาเพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมของการใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันในการตรึงรูปเอนไซม์ได้ดำเนินการโดยตัดผืนเส้นใยเป็น 2 ลักษณะ คือ เป็นชิ้นเดียวที่มีรูปร่างเป็นวงกลมรัศมีประมาณ 5 cm และเป็นชิ้นเล็กๆ รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยม เมื่อทดลองนำเส้นใยรูปแบบดังกล่าวน้ำหนัก 10 mg โดยประมาณไปตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3 ด้วยสารละลายไลเพสความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 1.5 ml ค่าในตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของ PS ต่อ PSMA ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการตรึงรูปเอนไซม์บนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน ทั้งนี้พบว่าปริมาณโปรตีนที่ติดอยู่บนเส้นใย 1:1 PS/PSMA มีค่ามากกว่ากรณีที่ใช้เส้นใยชนิด 4:1 และ 1:0 PS/PSMA อย่างไรก็ตามรูปแบบที่เลือกใช้ไม่ได้ส่งผลต่อ % immobilization ค่าความจุเอนไซม์ และค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้มากนัก เพื่อให้สามารถศึกษาประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงรูปในงานด้านต่างๆ การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปได้ในปริมาณมากๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากผลการศึกษาในเบื้องต้นที่พบว่ารูปแบบของผืนเส้นใยที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปที่ใกล้เคียงกับแบบที่ตัดเป็นชิ้นใหญ่ชิ้นเดียว ดังนั้นในการศึกษาต่อๆ มาจึงเลือกใช้รูปแบบของผืนเส้นใยแบบชิ้นเล็กๆ เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่ใช้ในการตรึงรูปได้อย่างไม่ยุ่งยาก

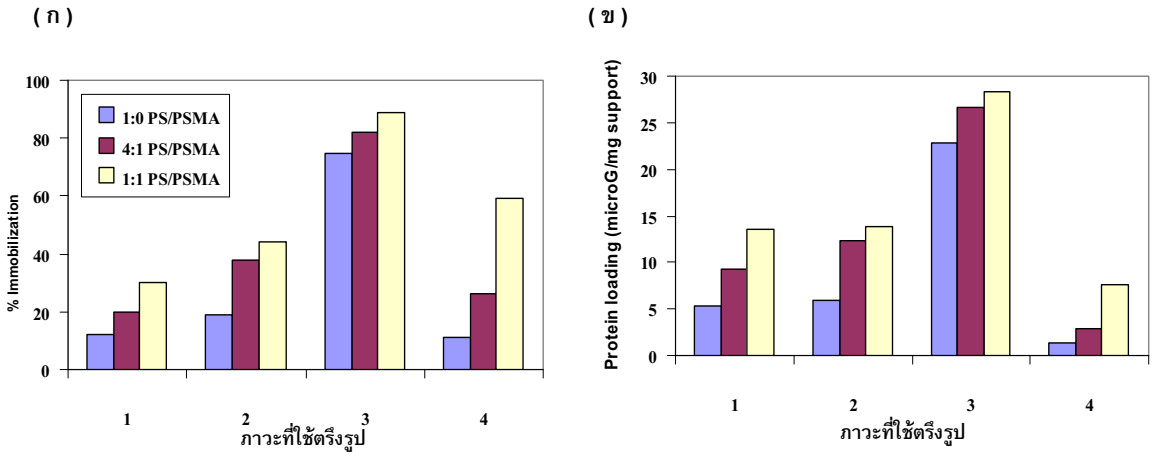
ตารางที่ 6 % immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวีตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใย PS/PSMA โดยเลือกใช้รูปแบบการตัดผืนเส้นใยต่างกัน

PS/PSMA	รูปแบบของเส้นใย	Immobilization %	ปริมาณโปรตีน (µg/mg support)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพส (U/mg lipase)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุน (U/mg support)
1:0	ตัดเป็นวงกลม ~ 10 mg	10	4.58 ± 0.031	0.076 ± 0.0006	0.0023±0.000003
4:1		19	8.88 ± 0.077	0.097 ± 0.0002	0.0055±0.000036
1:1		28	12.87± 0.993	0.077 ± 0.0077	0.0065±0.00015
1:0	ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนัก ~ 10 mg	12	5.28 ± 0.104	0.066 ± 0.0022	0.0023±0.000029
4:1		20	9.30 ± 0.554	0.088 ± 0.0015	0.0052±0.00022
1:1		30	13.57 ± 0.177	0.071 ± 0.0006	0.0063±0.00032

ตารางที่ 7 แสดงค่า % immobilization ค่า protein loading และค่าแอกทิวีตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้จากการทดลองปรับเพิ่มน้ำหนักของเส้นใยและปริมาตรของสารละลายไลเพสที่ใช้ในการตรึงรูป เมื่อนำค่า % immobilization และค่า protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้เตรียมมาแสดงเป็นกราฟรูปที่ 13 สังเกตได้ว่าภาวะที่ 1 2 และ 3 ซึ่งเลือกใช้สัดส่วนน้ำหนักวัสดุค้ำจุนต่อปริมาตรสารละลายไลเพสเป็น 6.6/1 การใช้ปริมาณของวัสดุค้ำจุนมากขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพของการตรึงรูปสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อทดลองใช้สัดส่วนเป็น 16.6/1

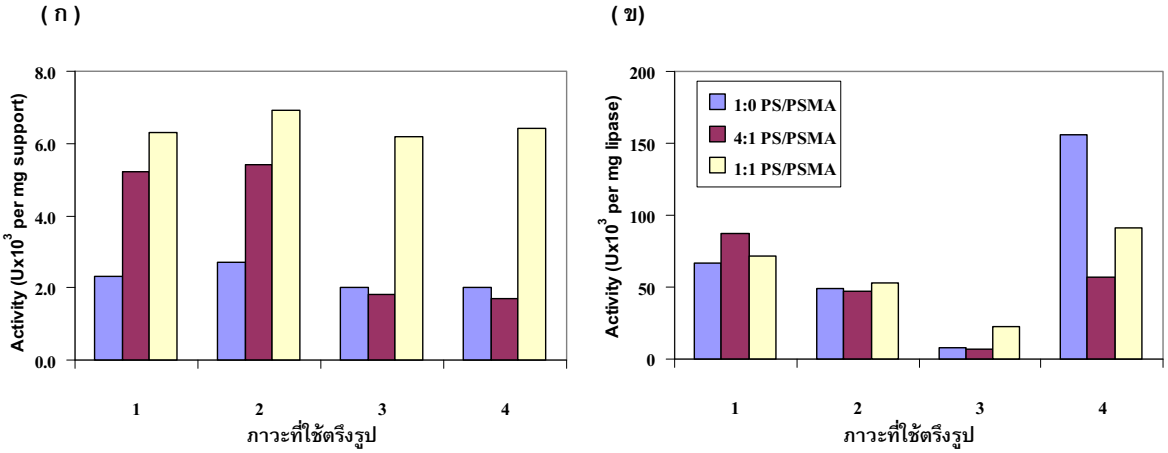
ตารางที่ 7 % immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวีตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบนเส้นใย PS/PSMA เมื่อปรับสัดส่วนของน้ำหนักเส้นใยและปริมาตรสารละลายไลเพส

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



รูปที่ 13 (ก) % Immobilization และ (ข) protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเพสบนเส้นใยอิเล็กโทรสปันตามตารางที่ 7

(ภาวะที่ 4) สังเกตได้ชัดว่าปริมาณไลเพสที่ตรึงได้มีค่าน้อยกว่ากรณีที่ใช้ 6.6/1 (ภาวะที่ 3) อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าหากใช้สัดส่วนของเส้นใยต่อสารละลายไลเพสมากเกินไปจะส่งผลให้เอนไซม์มีไม่เพียงพอให้เส้นใยอิเล็กโทรสปันดูดซับได้อย่างทั่วถึง เมื่อพิจาราณาแนวโน้มของค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ (รูปที่ 14(ก)) เปรียบเทียบกับแนวโน้มของปริมาณไลเพสที่ถูกตรึงได้บนวัสดุค้ำจุน (รูปที่ 13) พบว่าเอนไซม์ตรึงรูป (ไลเพส + วัสดุค้ำจุน) ที่เตรียมได้จากภาวะทั้ง 4 มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไม่แตกต่างกันแม้ว่าปริมาณไลเพสที่ถูกตรึงจะแตกต่างกันก็ตาม



รูปที่ 14 (ก) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป และ (ข) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมไลเพสที่ถูกตรึงรูปที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเพสบน PS/PSMA ตามตารางที่ 7

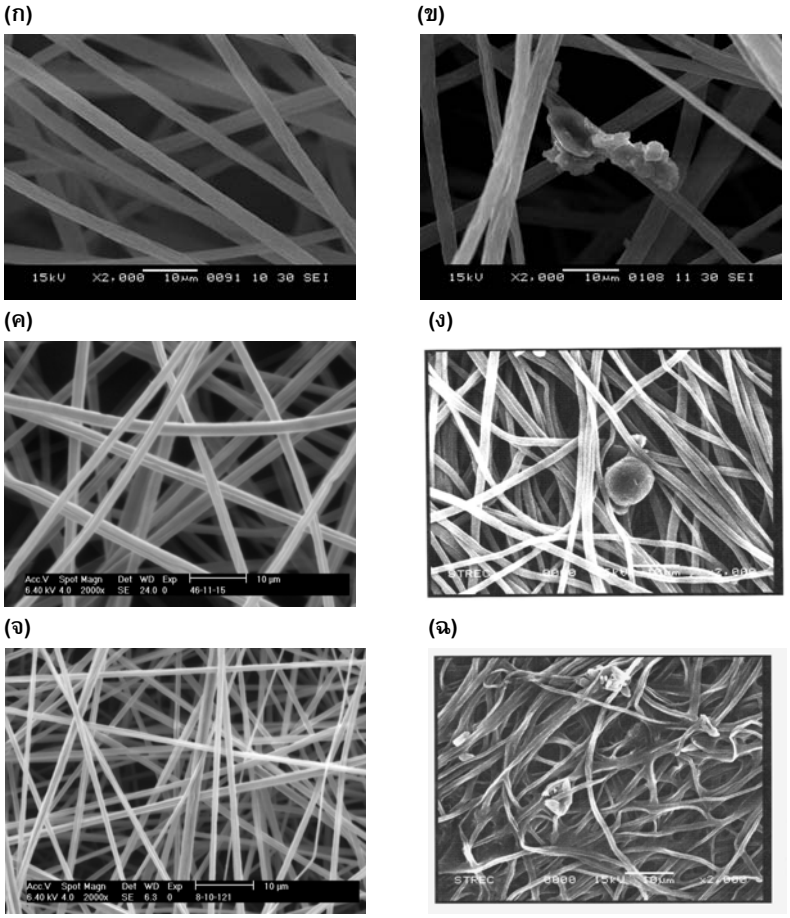
เมื่อพิจารณาผลของสัดส่วน PS/PSMA ที่มีต่อค่าความจุเอนไซม์และค่าแอกทิวิตี พบว่าการใช้วัสดุค้ำจุนชนิด PS/PSMA แม้ว่าสามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงกว่า รวมถึงให้ค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงกว่าการใช้วัสดุชนิด PS (1:0 PS/PSMA) แต่ไม่ส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสที่ตรึงบนวัสดุค้ำจุน จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เชื่อว่า การที่ PS/PSMA ซึ่งมีสัดส่วนของ PSMA สูงสามารถตรึงรูปเอนไซม์ได้ดีกว่า รวมถึงส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนน้อยกว่าอาจเกี่ยวข้องกับความชอบน้ำของเส้นใยและความสามารถในการเกิดพันธะโควาเลนท์กับเอนไซม์ ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า contact angle (ตารางที่ 8) จะเห็นได้ว่าเส้นใยที่เตรียมจาก 1:1 PS/PSMA มีค่า water contact angle เท่ากับ 84° ซึ่งน้อยกว่าของเส้นใยที่เตรียมจาก 4:1 และ 1:0 PS/PSMA ดังนั้นจึงมีความชอบน้ำมากกว่าทำให้สามารถดูดซับสารละลายเอนไซม์ได้ดีกว่า

และส่งผลให้ค่าความจุเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ดีเมื่อปริมาณ PSMA สูงขึ้นย่อมเป็นไปได้ว่าโอกาสที่เอนไซม์จะเกิดพันธะโควาเลนท์กับวัสดุค้ำจุนมากขึ้นและอาจส่งผลให้ conformation ของเอนไซม์เปลี่ยนไป แต่จากค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสที่ถูกตรึงบน 1:1 PS/PSMA ที่ใกล้เคียงกับกรณีที่ตรึงบน 1:0 PS/PSMA และ 4:1 PS/PSMA ทำให้สรุปได้ว่า conformation ของไลเพสที่ถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนดังกล่าวไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 8 water contact angle ของเส้นใยอิเล็กโทรสปันทั้งก่อนและหลังตรึงเอนไซม์

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

จากการตรวจสอบสัณฐานวิทยาเส้นใย PS/PSMA ก่อนและหลังตรึงรูป รูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่าเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:0 และ 4:1 PS/PSMA ทั้งก่อนและหลังตรึงรูปมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน แต่ในกรณีของ 1:1 PS/PSMA หลังตรึงรูปเส้นใยมีลักษณะคล้ายถูกหลอมละลายติดกัน นอกจากนี้ยังพบลักษณะที่เชื่อได้ว่าน่าจะเป็นเอนไซม์ไลเพสเกาะติดอยู่บนแผ่นเส้นใยอิเล็กโทรสปันแต่ในปริมาณน้อย

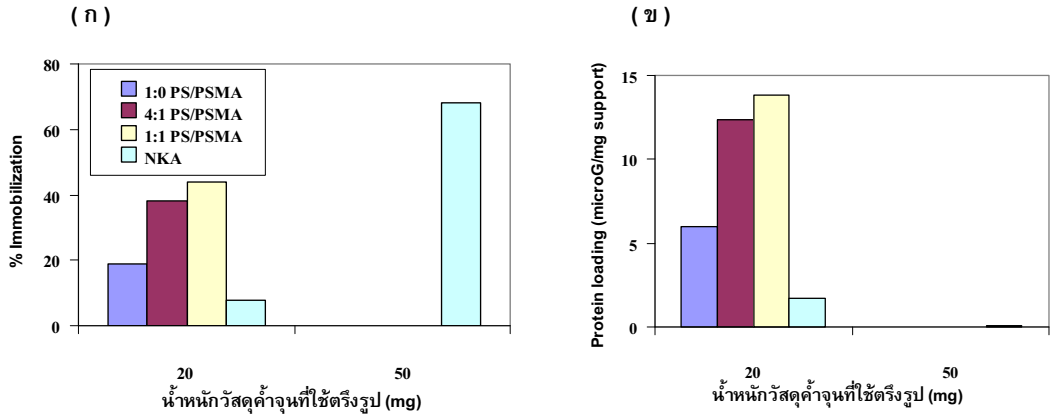


รูปที่ 15 ภาพ SEM ของเส้นใยก่อน (ซ้าย) และหลังตรึงรูป (ขวา) ของ PS/PSMA ชนิด (ก-ข) 1:0 (ค-ง) 4:1 และ (จ-ฉ) 1:1 ตามลำดับ

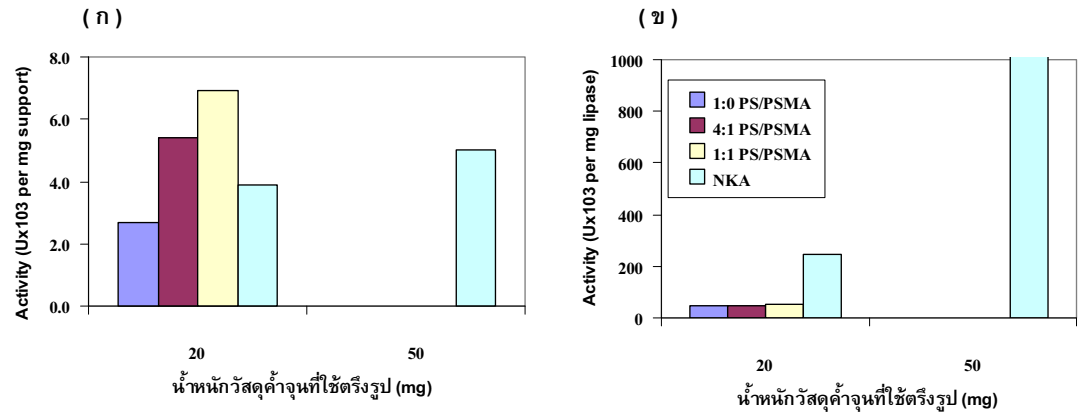
การศึกษานี้ยังทดลองนำวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA (PS bead) มาตรึงรูปไลเพสเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเส้นใยอิเล็กโทรสปัน เมื่อพิจารณาค่าในตารางที่ 9 และรูปที่ 16 จะเห็นว่าปริมาณไลเพสที่ตรึงได้บน NKA มีค่าน้อยกว่ากรณีที่ใช้ PS/PSMA อย่างเห็นได้ชัดเมื่อภาวะที่ใช้ในการตรึงรูปใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ดีเมื่อทดลองตรึงรูปบน NKA ด้วยสัดส่วนเส้นใยต่อสารละลายไลเพสที่สูงขึ้น (500 mg/2ml) พบว่าสามารถเพิ่มค่า % immobilization ให้สูงขึ้นได้ ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามกับกรณีของเส้นใยอิเล็กโทรสปัน เมื่อพิจารณาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปบน NKA และ PS/PSMA (รูปที่ 17) พบว่า 1:1 PS/PSMA มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนที่สูงกว่า แต่มีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักเอนไซม์ไลเพสที่ด้อยกว่า จึงสรุปได้ว่าการใช้ NKA ซึ่งเป็น PS bead มาตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพส่งผลต่อการสูญเสียแอกทิวิตีของเอนไซม์น้อยกว่ากรณีของเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA

ตารางที่ 9 % immobilization ปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปบน NKA

วัสดุค้ำจุน	น้ำหนักวัสดุค้ำจุนต่อ ส.ล.ล ไลเพส	% immobilization	ปริมาณโปรตีน (µg/mg support)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพส (U/mg lipase)	แอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุน (U/mg support)
NKA	20mg/2ml	8	1.68 ± 0.082	0.248 ± 0.023	0.0039 ± 0.0003
NKA	500mg/2ml	12	0.106 ± 0.033	5.424 ± 1.53	0.0050 ± 0.0001



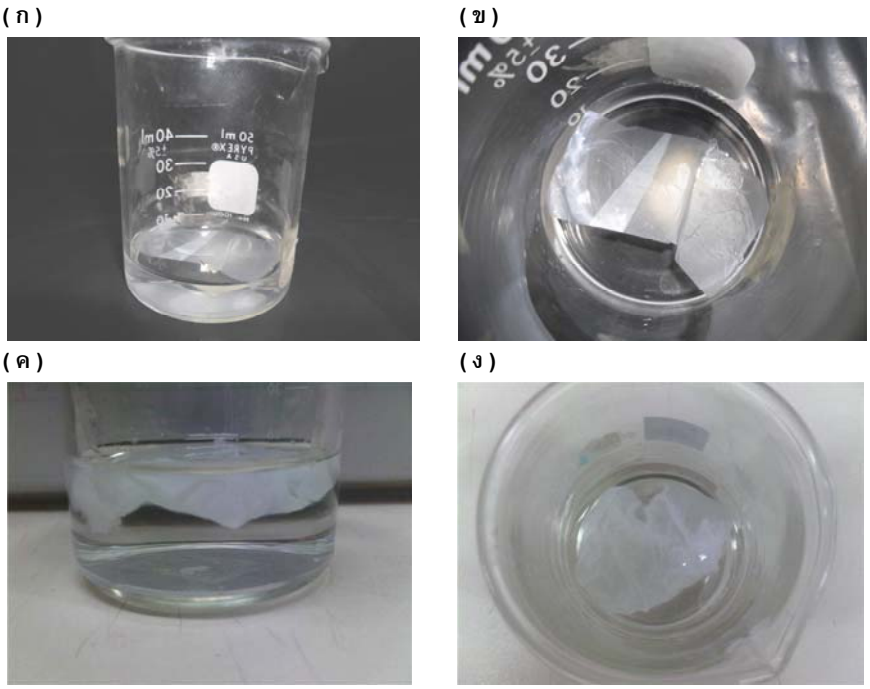
รูปที่ 16 (ก) % Immobilization และ (ข) protein loading ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเพสบน NKA และ PS/PSMA



รูปที่ 17 (ก) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ตรึงรูป และ (ข) แอกทิวิตีต่อมิลลิกรัมไลเพสที่ถูกตรึงรูป ที่สัมพันธ์กับภาวะที่ใช้ตรึงรูปไลเพสบน NKA และ PS/PSMA

4.2.2 การตรึงรูปไลเพสโดยใช้เส้นใยที่ปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์

จากข้อมูลในหัวข้อ 4.2.1 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กโทรสปันของ 1:1 PS/PSMA มีค่าปริมาณโปรตีนและค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนมากที่สุด จึงเลือกวัสดุค้ำจุนดังกล่าวมาศึกษาอิทธิพลของการปรับสภาพต่อประสิทธิภาพของการตรึงรูปเอนไซม์ ซึ่งเมื่อทดลองปรับสภาพด้วยวิธีการที่ระบุในหัวข้อ 3.4 พบว่าเส้นใยบนผืนอิเล็กโทรสปันมีการกระจายตัวคล้ายก้อนสำลีที่เปียกน้ำ (รูปที่ 18)

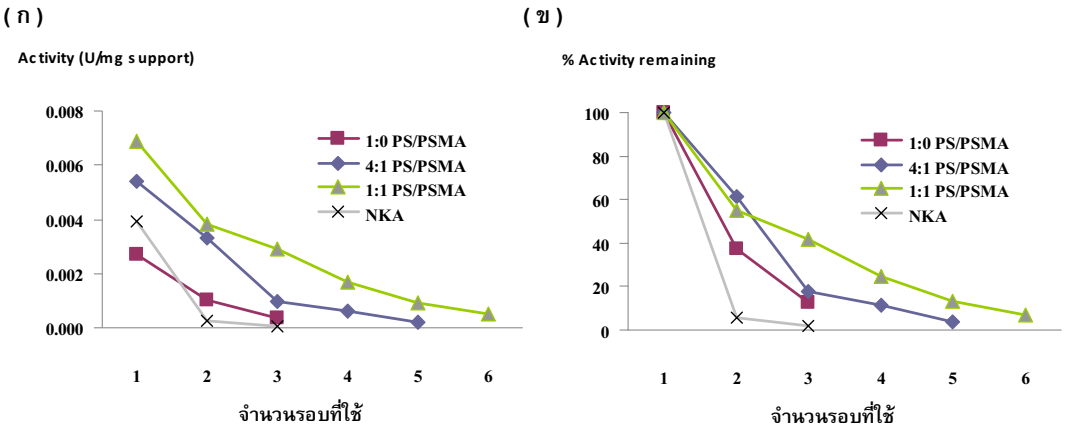


รูปที่ 18 ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA (ก, ข) ก่อนการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์ และ (ค, ง) หลังการปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์

การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยผืนเส้นใยที่ปรับสภาพให้ค่าปริมาณโปรตีนคือ 37.19 ± 1.3 ug/mg support ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ไม่ได้ปรับสภาพถึง 2.9 เท่า และมีค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักไลเพสคือ 0.048 ± 0.002 U/mg lipase ซึ่งไม่แตกต่างจากกรณีที่ใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพมากนัก ส่วนค่าแอกทิวิตีต่อน้ำหนักวัสดุค้ำจุนคือ 0.013±0.0006 U/mg support ซึ่งมีค่าแตกต่างกับกรณีที่ใช้เส้นใยที่ไม่ได้ปรับสภาพค่อนข้างมาก (ตารางที่ 7)

4.3 การทดสอบความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ

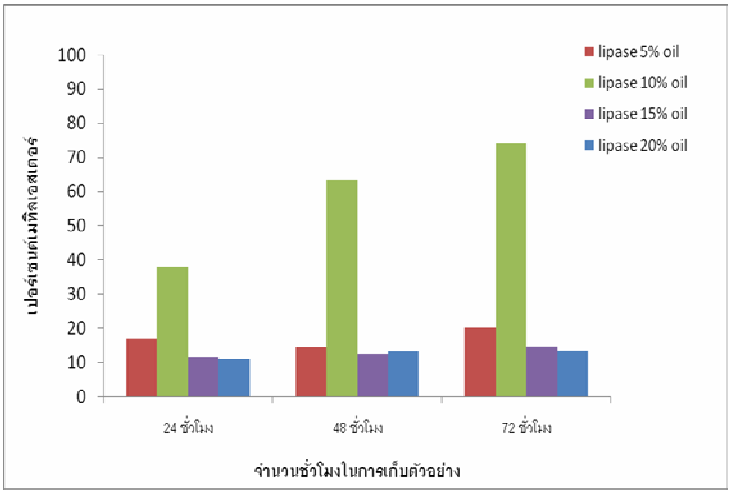
การทดสอบความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสตรึงรูปที่นำกลับมาใช้ซ้ำตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.5.3 รูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA มีการนำกลับมาใช้ซ้ำได้มากที่สุดคือจำนวน 6 ครั้ง รองลงมาคือ 4:1 PS/PSMA มีการนำกลับมาใช้ซ้ำได้จำนวน 5 ครั้ง และสุดท้ายคือ 1:0 PS/PSMA นำกลับมาใช้ซ้ำเพียง 3 ครั้ง ส่วน NKA เมื่อนำมาทดสอบการนำกลับมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้น พบว่าสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้เพียง 3 ครั้งเท่ากับไลเพสตรึงรูปบนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:0 PS/PSMA



รูปที่ 19 (ก) ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป และ (ข) % แอกทิวิตีคงเหลือ ของไลเพสตรึงรูปที่เตรียมด้วยเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA และ NKA ในแต่ละรอบของการใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

4.4 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ

จากการทดสอบความสามารถในเตรียมไบโอดีเซลที่ 40 °C ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไลเพสอิสระ โดยใช้ปริมาณผงไลเพสเป็น 5, 15 และ 20% ของน้ำหนักน้ำมันปาล์ม (2g) อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลเท่ากับ 1:3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 24 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วย HPLC แสดงในรูปที่ 20 เมื่อใช้ไลเพสอิสระที่ 10% ของน้ำมันปาล์ม เวลา 72 ชั่วโมง มีสมบัติเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาได้สูงที่สุดเท่ากับ 74.01% ส่วนไลเพสอิสระที่ 5, 15 และ 20% มีสมบัติเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มได้ต้อยกว่า การทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องใช้ไลเพสอิสระ ~ 200 mg ในการทดสอบประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล ดังนั้นหากต้องการทดสอบประสิทธิภาพการสังเคราะห์ไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ตรึงรูป จึงจำเป็นต้องหาแนวทางการเพิ่มปริมาณเส้นใยที่ใช้สำหรับตรึงรูปให้ได้มากพอก่อน



รูปที่ 20 เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่ใช้ไลเพสอิสระเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปริมาณที่ต่างๆกัน ด้วยเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5. สรุปผลการทดลอง

- ภาวะที่ใช้ในการเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปัน ได้แก่ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ ศักย์ไฟฟ้า ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ และชนิดของตัวทำละลาย มีผลโดยตรงต่อสัณฐานวิทยาและขนาดของเส้นใย PS/PSMA ที่เตรียมได้

- ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปันจาก 1:0 PS/PSMA 4:1 PS/PSMA และ 1:1 PS/PSMA คือ เมื่อใช้ศักย์ไฟฟ้า (kV): ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับ (cm): ความเข้มข้นของสารละลาย (%w/w) เป็น 8:10:20 8:10:12 และ 6:11:15 ตามลำดับ โดยตัวทำลายที่เหมาะสมสำหรับ 4:1 PS/PSMA คือ ตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และ THF ที่อัตราส่วนผสมเป็น 2:1 สำหรับ 1:1 PS/PSMA และ 1:0 PS/PSMA นั้น ตัวทำละลายที่เหมาะสมคือตัวทำละลายผสมระหว่าง DMF และTHF ที่อัตราส่วนผสมเป็น 1:1

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

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปันที่ปรับสภาพด้วยแอลกอฮอล์มีค่าความจุเอนไซม์มากกว่าที่เตรียมจากผืนเส้นใยที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพถึง 2.9 เท่า โดยไม่ส่งผลต่อค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากวัสดุค้ำจุนทางการค้าชนิด NKA มีค่าความจุเอนไซม์ที่ต่ำกว่าและมีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ใกล้เคียงกับที่เตรียมจากผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS/PSMA อย่างไรก็ดีเมื่อพิจารณาค่าแอกทิวิตีต่อปริมาณไลเพสของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่า กรณีที่ใช้ NKA ซึ่งเป็น PS bead นั้นมีค่าสูงกว่าการใช้ผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน PS (1:0 PS/PSMA) จึงสรุปได้ว่ารูปร่างของวัสดุค้ำจุนส่งผลโดยส่งต่อ conformation ของเอนไซม์

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน 1:1 PS/PSMA และ 4:1 PS/PSMA สามารถนำมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้มากที่สุดคือ จำนวน 6 และ 5 ครั้ง ตามลำดับ

- เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมจากวัสดุชนิด PS สามารถนำมาใช้ซ้ำด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้น้อยที่สุด ทั้งกรณีที่เป็นอนุภาคทรงกลมและผืนเส้นใยอิเล็กโทรสปัน

6. Output ที่ได้จากโครงการ

- การนำเสนอผลงานและตีพิมพ์ในเอกสารการประชุมวิชาการ PACCON 2010 (Jan 21-23) ในหัวข้อ Preparation of electrospun fiber from polystyrene and poly (styrene-co-maleic anhydride) blends for lipase immobilization (เอกสารแนบ 1 ในภาคผนวก)

- การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ 6th MPSGC (Dec 13-15, 2010) ในหัวข้อ Electrospun Fibers Derived From Polystyrene/Poly (Styrene-co-Maleic Anhydride) Blends And Their Use In Lipase Immobilization (เอกสารแนบ 2 ในภาคผนวก)

- วิทยานิพนธ์ระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ประยุกต์และเทคโนโลยีสิ่งทอ 2553 ของนางสาวรุ่งอรุณ พัดเย็นชื่น ในหัวข้อเรื่อง การเตรียมเส้นใยอิเล็กโทรสปันจากพอลิเมอร์ผสมพอลิสไตรีน/พอลิสไตรีนโคมาเลอิกแอนไฮไดรด์สำหรับการตรึงไลเพส

ภาคผนวก

Preparation of electrospun fiber from polystyrene and poly (styrene-co-maleic anhydride) blends for lipase immobilization

R. Pudyenchuen[1], N. Chanunpanich[2], W. Chulalaksananukul[3], P. Opaprakasit[4], M. Opaprakasit[1,*]

[1]Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand
[2]Department of Industrial Chemistry, Faculty of *Applied Science*,
King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 10800 Thailand
[3]Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand
[4]School of Bio-Chemical Engineering and Technology, Sirindhorn International Institute of Technology (SIIT),
Thammasat University, Pathumthani, 12121 Thailand

*E-mail: mantana.o@chula.ac.th, Tel: +66-2-2185559

Abstract: This study is aimed to develop an enzyme lipase catalyst system by immobilizing the enzyme on supporting materials. Feasibility of using spun fibers prepared via electrospinning of polystyrene/poly (styrene-co-maleic anhydride) blends as supporting materials for the lipase immobilization has been investigated. Effects of preparation conditions on morphology of the electrospun mats are investigated. It can be concluded from SEM results that types of solvent (DMF:THF at 1:1 and 2:1 weight ratio), concentration of polymer solution (10-15 %w/w), electrical potential (6-10 kV) and the distance between tip and collector (10-12 cm) significantly impose an influence on fiber appearance and their average diameter. It was found that the suitable conditions for e-spining PS/PSMA blend (1:1 weight ratio) are 8kV, 12%w/w in DMF mixed with THF at 1:1 weight ratio, and working distance at 10 cm. For PS/PSMA 4:1 blend, the optimal conditions are 6kV, 15% w/w in DMF mixed with THF at 2:1 and at the distance of 11 cm. These optimum conditions are defined as the spun fibers have bead-free structures and the smallest diameter. The study on the efficiency of lipase immobilization on the e-spun mats obtained at these optimal conditions is on-going and will be further discussed in separate communication.

Introduction

Utilization of enzymes as bio-catalysts has many advantages over chemical catalysts in many reactions. However, their high cost limits the use of enzymes in industrial scale process. Immobilization of enzyme [1-9] on supporting materials has been reported as a feasible and economically efficient approach for commercial use of the chemical, as the material's reusability results in a reduction of production cost. Therefore, various enzyme immobilization techniques have been researched for specific applications. Typically, high surface to mass ratio is a major property to generate high performance supporting materials. This can be achieved by reducing their dimensions to submicron scale. Electrospinning technique has recently proved as a potential process for producing polymeric nanofibers, which are suitable for use as supporting materials for enzyme immobilization [6-9].

Therefore, the main objective of this study is to develop an enzyme lipase catalyst system for use in production process of biodiesel by immobilizing the enzyme on electrospun nanofiber supporting materials produced from polystyrene/poly (styrene-co-maleic anhydride) blends. Effects of blend ratios and electrospinning conditions, i.e. type of solvents, concentrations, electrical potential and working distance, on morphology of the electrospun mats have been investigated. In addition, measurements of immobilization efficiency of the enzyme on the electrospun mats are ongoing.

Materials and Methods

Materials: Poly (styrene-alt-maleic anhydride) (PSMA, Mw 350,000) and polystyrene (PS, Mw 280,000) were supplied by Aldrich. Solvents, i.e. dimethylformamide (DMF) and tetrahydrofuran (THF), were obtained from Lab Scan. *Candida rugosa* lipase was purchased from Sigma-aldrich. Potassium dihydrogen phosphate (Carlo Erba), sodium hydroxide (Ajax Finechem) and tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Scharlau Chemie S. A.) were used in an enzyme immobilization process.

Preparation of electrospun fibers: Polymer solutions at various concentrations and different weight ratios of PS/PSMA were prepared in a mixed solvent of DMF and THF (Table 1). Electrospinning of a polymer solution was conducted at a flow rate of 1 ml/h using voltages and distances from needle tip to collector (screen covered with aluminum foil) as summarized in Table 1.

Table 1: Electrospinning conditions of PS/PSMA blend solutions prepared in mixed solvents at various concentrations.

PS:PSMA weight ratio	DMF/THF weight ratio	Conc* (%w/w)	Voltage (kV)	Tip-to-collector distance (cm)
1:1	1:1	10-15	6 - 10	10
4:1	1:1 2:1	10-15 15	6 - 10 6	10 10-12

Characterisations: Morphology of the electrospun fibers was examined by a scanning electron microscope (SEM) (JEOL, JSM-6480LV). The average diameters were calculated from approximately 100 fibers observed in SEM images (2000X).

Results and Discussion

Effects of polymer concentration and an electrical potential on morphology of fibers prepared from PS/PSMA blend at 1:1 weight ratio are revealed in Figure 1 - 3. SEM images in Figure 1 obviously present that bead structures are obtained when a 10%w/w solution was spun with 6 - 10 kV. Figure 2 shows that bead-free fibers are successfully obtained when the e-spinning was performed in the range of 6 - 10 kV with the concentration of 12%w/w. Diameters of the e-spun fibers monitored from these images are plotted as histograms of the diameter distribution (Figure 2) and the average values are summarized in Table 2.

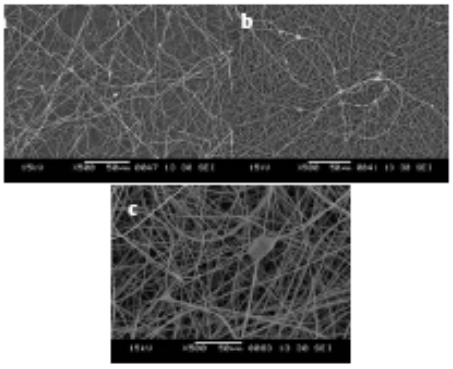


Figure 1. SEM images of fibers prepared from 10%w/w solutions of PS/PSMA blend (1:1) fabricated at (a) 6, (b) 8, and (c) 10 kV in a mixed DMF:THF (1:1) solvent.

It is clearly seen from these plots that the distribution is narrower when the spinning process was carried out at 8-10 kV (Figure 2b and 2c), compared to that prepared at 6 kV (Figure 2a). Results in Table 2 indicate that the increase in electrical potential from 6 to 8 kV results in a decrease in the average diameter of the fibers. However, upon increasing the potential further up to 10 kV, the resulting spun-fibers are thicker. It is observed from Figure 3 that fibers with bead-free structure are obtained only at 6 and 10 kV when the concentration of 15%w/w solution was employed.

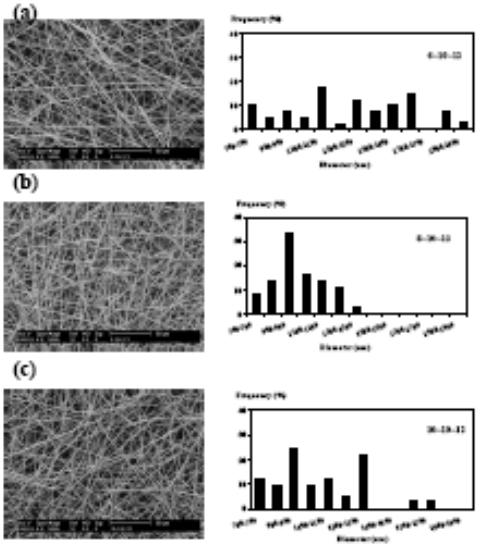


Figure 2. SEM images and diameter distribution of fibers prepared from 12%w/w solutions of PS/PSMA blend (1:1) fabricated at (a) 6, (b) 8, and (c) 10 kV in a mixed DMF:THF (1:1) solvent.

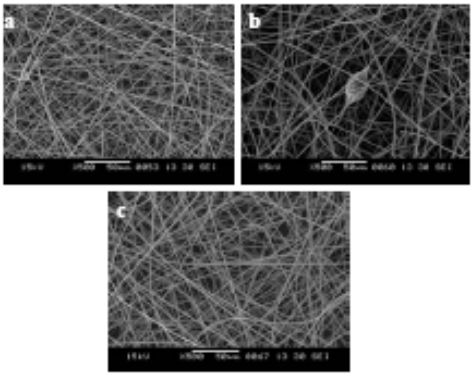


Figure 3. SEM images of fibers prepared from 15%w/w solutions of PS/PSMA blend (1:1) fabricated at (a) 6, (b) 8, and (c) 10 kV in a mixed DMF:THF (1:1) solvent.

Table 2: Average diameter of e-spun fibers obtained at 10 cm (distance of tip to collector) from PS/PSMA (1:1) blend solutions at a concentration of 12 %w/w.

Voltage (kV)	diameter ± SD (μm)
6	1.20 ± 0.29
7	1.04 ± 0.23
8	1.01 ± 0.16
9	1.05 ± 0.21
10	1.13 ± 0.29

For PS/PSMA blend at a 4:1 weight ratio, fibers with bead-free structure are not possibly obtained from solutions of DMF: THF (1:1) solvent at the concentration of 10 %w/w (Figure 4) in mixed solvent of, similar to what observed in the 1:1 PS/PSMA blend. However, production of bead-free fibers is feasible at 15%w/w concentration only when an electrical potential of 6 kV was applied (Figure 5a). E-spinning of the 4:1 PS/PSMA blend was also conducted with 2:1 DMF/THF mixed solvent. As evidenced in Figure 5a and 6a, the use of weight ratio of DMF/THF at 2:1 seems to provide much narrow diameter distribution than at 1:1 when similar spinning conditions and solution concentration were employed.

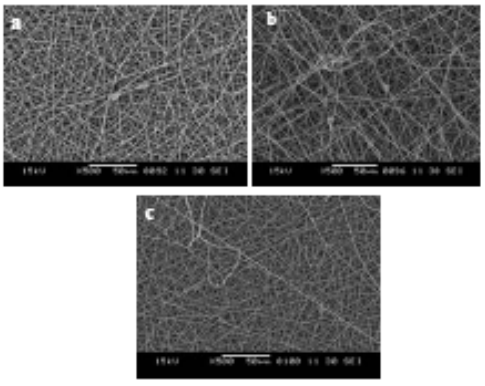


Figure 4. SEM images of fibers prepared from 10%w/w solutions of PS/PSMA blend (4:1) fabricated at (a) 6, (b) 8, and (c) 10 kV in a mixed DMF:THF (1:1) solvent.

Not only the electrical potential but a tip-to-collector distance also play significant role in morphology of the e-spun fibers. This can be verified by the distribution plots presented in Figure 6 and value of fibers average diameter (Table 3) which indicate that the thinner fibers are typically received by increasing the distance between need tip and collector.

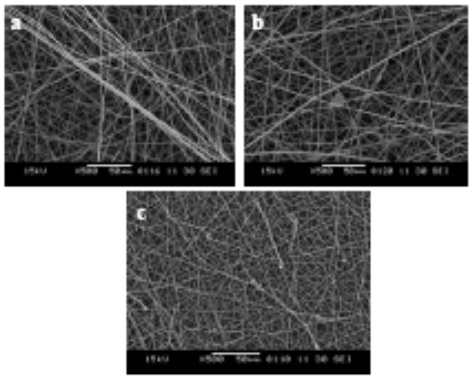


Figure 5. SEM images of fibers prepared from 15%w/w solutions of PS/PSMA blend (4:1) fabricated at (a) 6, (b) 8, and (c) 10 kV in mixed DMF:THF (1:1) solvent.

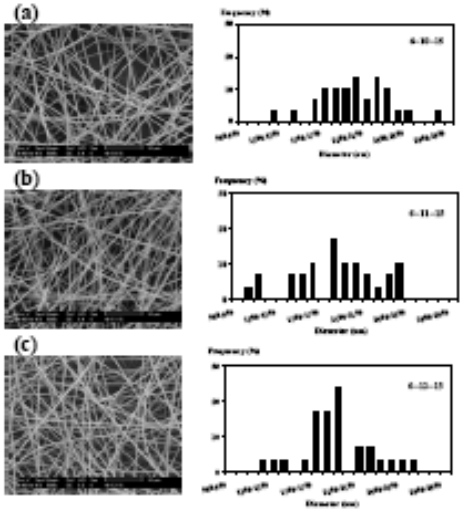


Figure 6. SEM images and diameter distribution of fibers prepared from 15%w/w solutions of PS/PSMA (4:1) fabricated at 6 kV using tip-to-collector distance at (a) 10, (b) 11 and (c) 12 cm.

Table 3: Average diameter of e-spun fibers obtained at 6kV from PS/PSMA (4:1) blend solution in 2:1 mixed DMF: THF at a concentration of 15%w/w.

Tip-to-collector distance (cm)	Diameter ± SD (μm)
8	2.08 ± 0.46
9	2.01 ± 0.39
10	2.03 ± 0.34
11	1.86 ± 0.38
12	1.93 ± 0.32

The preparation of e-spun fiber mat for use in lipase immobilization was carried out using a rotating steel cylinder (diameter x length: 30 cm x 57 cm) as a collector. The spinning was performed continuously for 2 hours. 3x3 cm^2 pieces cut from the electrospun mats were incubated at room temperature in 1ml lipase solution (2mg/ml) for 30 min and further kept overnight at 4°C. Subsequently, the samples were washed with phosphate buffer (pH 6.5) until no leaching of lipase was observed. Lipase contents of the remaining solution after immobilization and the washing solutions were measured and employed in the calculation of the amount of lipase immobilized on the electrospun fibers. Lipase concentration in these solutions was determined by measuring protein loading (BSA equivalent) according to Lowry method on a UV-vis spectrophotometer (Anthos Zenyth 200 rt). Study on effect of blend composition used in preparation of the fibers on the amount of immobilized enzyme is currently undergoing, and will be discussed further.

Conclusions

Electrospun fibers with bead-free structure are successfully fabricated from PS/PSMA blends with 1:1 and 4:1 weight ratio. Fibers with average diameter of 1.01 ± 0.16 • m were obtained from 1:1 PS/PSMA blend at 8 kV, 12%w/w solution in mixed DMF:THF (1:1) solvent and the distance from tip to collector of 10 cm. The corresponding fibers obtained from 4:1 blend show average diameter of 1.86 ± 0.38 • m with the following preparation conditions; 6 kV, 15%w/w in DMF mixed with THF at 2:1 weight ratio and the distance of 11 cm. Since high surface area is one of the most important properties required for supporting materials in enzyme immobilization application, the spun mats with smallest diameter prepared at these optimum conditions have been utilized in the immobilization of enzyme lipase. Efficiency of the immobilization process is under currently investigation.

Acknowledgement

The authors thank the Thailand Research Fund (granted no. MRG5280089) for financial support.

References

[1] Y. Wang and Y.-L. Hsieh, *J. Membr. Sci.* **309** (2008), pp. 73 – 81.
[2] Z. G. Wang, L. S. Wan, Z. M. Liu, X. J. Huang and Z. K. Xu, *J. Mol. Catal.B: Enzym.* **56** (2009), pp. 189-195.
[3] H. Filippusson, and W. E. Hornby, *Biochem. J.* **120** (1970), pp. 215–219.
[4] J. D. Page, R. Derango and A. E. Huang, *Colloids. Surf. A: Physico. Eng.* **132** (1998), pp. 193-201.
[5] V. V. Kuznetsov and S. V. Sheremet'ev, *J. Anal. Chem.* **62** (2007), pp. 270–278.
[6] S. Nair, J. Kim, B. Crawford and H. S. Kim, *Biomacromolecules*. **8** (2007), pp. 1266-1270.
[7] H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, H. D. Reeneker and P. Wang, *Biotechnol. Prog.* **18** (2002), pp. 1027-1032.
[8] M. Ignatova, O. Stoilova, N. Manolova, D. G. Mita, N. Diano, C. Nicolucci and I. Rashkov, *Eur. Polym. J.* **45** (2009), pp. 2494-2504.
[9] C. Tand, S. Ye and H. Liu, *Polymer*. **48** (2007), pp. 4482-4491.

Hosted by

UNIVERSITY OF MALAYA
The Leader in Research & Innovation

In collaboration with

Chulalongkorn University
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Pillar of the Kingdom

NUS National University of Singapore

Supported by

Faculty of Science, University of Malaya

and

MOSTI

ips

KUALA LUMPUR 2010
MPSGC
CU UM NUS
6th

The 6th Mathematics and Physical Sciences Graduate Congress 2010

(MPSGC 2010)

Faculty of Science
University of Malaya, Kuala Lumpur

13th ~ 15th December 2010

Program Book & Abstract

small strain of 5% in graphene reverses the charge transfer between Au clusters and graphene, and reduces the reaction barrier of the catalyzed CO oxidation from around 3.0 eV (without strain) to less than 0.2 eV. These findings provide new opportunities for future development of graphene-based nanocatalysis.

Following that, we will also report a study on strain-engineered adsorption of metal atoms on graphene and hydrogen storage capabilities of metal-decorated graphene by using first-principles approach based on density functional theory. We show that an applied strain not only stabilizes the supported metal atoms and prevents them from clustering, but further increases the hydrogen storage capacity. Specifically, a tensile strain of 10% in graphene increases the adsorption energy of Li (Ti) atom by around 75% (71%) and the gravimetric density of hydrogen storage up to 15.4 wt% (9.5 wt%), with a binding energy of ~ 0.2 eV/H_2.

Keywords: Graphene, strain, nanocatalysis, hydrogen storage, DFT.

Electrospun Fibers Derived from Polystyrene/ Poly (Styrene-co-Maleic Anhydride) Blends and Their Use in Lipase Immobilization

R. Pudyenchuen[a,b], N. Chanunpanich[c], W. Chulalaksananukul[d], P. Opaprakasit[e] and M. Opaprakasit[a,b]*

[a]*Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok,10330 Thailand*
[b]*Research Unit of Advanced Ceramic and Polymeric Material, National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*
[c]*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 10800 Thailand*
[d]*Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand*
[e]*School of Bio-Chemical Engineering and Technology, Sirindhorn International Institute of Technology (SIIT), Thammasat University, Pathum Thani, 12121 Thailand*
**Corresponding authorl: mantana.o@chula.ac.th, Tel: +662-218-5559*

Abstract. This study is aimed to investigate feasibility of using electrospun fibers derived from polystyrene/poly (styrene-co-maleic anhydride), PS/PSMA, blends as supporting materials for the lipase immobilization. Suitable spun conditions for the electrospinning of PS/PSMA blends are first examined by inquiring the fiber morphology and average diameter from SEM images. It was found that the optimal conditions, i.e. the conditions where fibers with bead-free structures and the smallest diameter are obtained, in terms of electrical voltage/concentration of polymer solution/distance between tip and collector, for fabricating PS:PSMA blends at 1:0 1:1 and 4:1 weight ratios are 8 kV/20%/10 cm, 8kV/12%/10 cm and 6kV/15%/11 cm, respectively. The average diameters of corresponding fibers at the optimum condition are 1.35+0.40, 1.01+0.16 and 1.86+0.16 μm, respectively. The resulting fibers are then used in the lipase immobilization, and their immobilization efficiency is examined by measuring protein contents of the remaining lipase solution. Without pre-treatment applied on the electrospun mats, the protein loading of the immobilized lipase is in the range of 5-12 μg per mg of support. It is observed that enhancement in immobilization efficiency is possible by pre-treatments of the electrospun mats with alcohols. In addition, the hydrolytic activity of the immobilized enzymes is under investigation and will be further discussed.

Keywords: Electrospinning , Lipase immobilization, nanofiber, enzyme