ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญา

วิศวกรรมเคมี	วิศวกรรมเคมี
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การดัดแปลงพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟนเพื่อตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์สำหรับผลิตไบโอดีเซล

Modification of Poly(arylene ether sulfone) for Lipase Covalent Immobilization for Biodiesel Production

นามผู้วิจัย นางสาวชนนิกานต์ ตันสุริยวงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทิยา หาญศุภลักษณ์, Ph.D.)

กรรมการ ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานพ เจริญไชยตระกูล, Ph.D.)

กรรมการ ....

(อาจารย์นฤมล วงศ์ธนาสุนทร, D.Eng)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์ไพศาล คงคาฉุยฉาย, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.............. **เดือน**...................... **พ.ศ.** ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การดัดแปลงพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟนเพื่อตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ สำหรับผลิตไบโอดีเซล

Modidfication of Poly(arylene ether sulfone) for Lipase Covalent Immobilization for Biodiesel Production

โดย

นางสาวชนนิกานต์ ตันสุริยวงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
พ.ศ. 2550

ชนนิกานต์ ตันสุริยวงศ์ 2550: การดัดแปลงพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟนเพื่อตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์สำหรับผลิตไบโอดีเซล ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทิยา หาญศุภลักษณ์, Ph.D. 111 หน้า

การทดลองนี้ศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างของพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟน 2 ชนิด ให้มีหมู่เอมีน เพื่อนำไปตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไลเปส ได้แก่ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ อุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ อุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ และยืนยันการกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด และอะตอมมิกฟอร์สไมโครสโคปี นอกจากนี้ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่อพีเอชและอุณหภูมิ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว ไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในการผลิตไบโอดีเซลเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ จากผลการทดลองการตรึงไลเปสบนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนด้วยพันธะโควาเลนท์ จะให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุดเท่ากับ 97.45 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรึงเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นไอออนเท่ากับ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพต่อพีเอชและอุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อิสระ และเมื่อนำเมมเบรนที่มีเอนไซม์เกาะอยู่มาปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ พบว่าได้ค่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 11.15 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระจะให้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 9.13 เปอร์เซ็นต์

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Chonnikan Tansuriyavong 2007: Modidfication of Poly(arylene ether sulfone) for Lipase Covalent Immobilization for Biodiesel Production. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Nanthiya Hansupalak, Ph.D. 111 pages.

The aim of this research was to study 2 kinds of Poly(arylene ether sulfone) modified with amine group used to immobilize lipase with covalent bond. The amined polymer was activated with glutaraldehyde. The effects of glutaraldehyde concentration and activated time were investigated. Also, the effect of temperature on lipase activity, and the effects of temperature and pH on immobilized lipase were studied. And the distribution of enzyme on membrane surface was confirmed with Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy. In addition, The stability of immobilized enzyme on pH and temperature were investigated. Finally, The immobilized lipase obtained from the optimal conditions was characterized and used as a catalyst compared with free enzyme in the transesterification reaction for biodiesel production. From this experiment, it was found that the immobilized lipase on amined polyphenylsulfone gave the highest activity yield of 97.45 % with the glutaraldehyde concentration is 0.075 %w/v and activated for 2 hours at 30 oC, then immobilized with lipase concentration 140 mg/ml in phosphate buffer solution that have ionic strength 0.05 M, pH 7 at 37 oC for 3 hours. The stability on pH and temperature were found to increase with immobilization. When the 5% weight immobilized lipase was used as a catalyst for biodiesel production from jatropha oil, the methyl ester content obtained was 11.15 %. In the case of using free lipase, the methyl ester content production was 9.13 %.

____________________ ____________________ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและความกรุณาจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทิยา หาญศุภลักษณ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้ความดูแลเอาใจใส่และให้คำปรึกษาแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์อย่างดียิ่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานพ เจริญไชยตระกูล กรรมการวิชาเอก อาจารย์ ดร.นฤมล วงศ์ธนาสุนทร กรรมการวิชารอง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงฤดี ฉายสุวรรณ ผู้แทนบัณฑิต ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

งานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากหน่วยงานดังต่อไปนี้ โครงการพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ADB) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และโครงการทุนสนับสนุนของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จรัญ ฉัตรมานพ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านคำแนะนำและเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ และคุณดุษฎี รัตนพระ ที่ให้คำแนะนำเรื่องการตรึงเอนไซม์ การผลิตไบโอดีเซลและการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ขอขอบคุณ ครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ น้อง ๆ วิศวกรรมเคมี และบุคคลรอบข้างทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และความรู้สึกที่ดีตลอดมา รวมถึงคำแนะนำและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

ประโยชน์อันใดอันจะเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่าน ที่เมตตาอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำต่างๆ จนถึงปัจจุบัน

ชนนิกานต์ ตันสุริยวงศ์

เมษายน 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	49
อุปกรณ์	49
วิธีการ	51
ผลและวิจารณ์	60
สรุปและข้อเสนอแนะ	89
สรุป	89
ข้อเสนอแนะ	89
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	91
ภาคผนวก	97

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ	9
2	องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันสบู่ดำ	9
3	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล	10
4	เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	14
5	ผลประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมของไบโอดีเซล เปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม	15
6	คุณสมบัติของไลเปสจากจุลินทรีย์	19
7	คุณสมบัติทั่วไปของพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) และพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ (PPSU)	35
8	ลักษณะของแผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) ที่เตรียมจากตัวทำละลาย ต่างๆ โดยอุณหภูมิและระยะเวลาการทำปฏิกิริยาคือ 120 องศาเซลเซียส และ 24 ชั่วโมง	62
9	ลักษณะของแผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) ที่เตรียมจากตัวทำละลายไนโตรเบนซีน	63
10	ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจนด้วยเครื่องอิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์	64
11	ลักษณะของแผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) ที่เตรียมจากตัวทำละลายไนโตรเบนซีน ที่ระยะเวลาทำปฏิกิริยาและอุณหภูมิต่างๆ	65
12	การละลายเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยารีดักชั่นตามวิธีที่ 1 ที่ระยะเวลาต่างๆ ในไดเมทิลอะเซทามายด์	67
13	ลักษณะของเมมเบรนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่นที่ใช้ไฮดราซีนไฮเดรตเป็นรีดิวซิ่งเอเจนต์	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

14	ปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (IEC) ของพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) และเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ทั้ง 3 สภาวะ	70
15	ค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ได้จากเอเอฟเอ็ม	77

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1	ก. ต้น ข. ใบ ค. ดอก ง. ผล และ จ. เมล็ดของสบู่ดำ	5
2	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	14
3	โครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดในคะตะไลติกไทรแอดของไลเปส	20
4	กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาในบริเวณเร่งของไลเปส	21
5	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	23
6	ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น	23
7	ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส	24
8	ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส	24
9	ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส	24
10	ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น	24
11	โครงสร้างทางเคมีของพอลิซัลโฟน และมอนอเมอร์ 4,4’ ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟนและบิสฟีนอล เอ	33
12	โครงสร้างทางเคมีของพอลิฟีนิลซัลโฟน และมอนอเมอร์ 4,4’ ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟนและไบฟีนอล	34
13	แผนผังการทำปฏิกิริยารีดักชั่นของเมมเบรนขนาด 2 x 2 เซ็นติเมตร โดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรต โดยได้มีการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของสารละลายไฮดราซีนไฮเดรต และความหนาของเมมเบรนที่ใช้	54
14	โครงสร้างของพอลิซัลโฟน (PSU) และไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU)	60
15	โครงสร้างของพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) และไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU)	61
16	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่ไนโตรให้กลายเป็นหมู่เอมีนโดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรต	71
17	โครงสร้างของไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) และเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU)	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (◆) และต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (■) โดยระยะเวลาที่ใช้กระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์คือ 1 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 55 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น	73
19	การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์โดยใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง	73
20	ภาพ SEM ของ ก. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน ข. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์แล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ง. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส จ. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ในที่นี้กำหนดให้สภาวะที่ใช้ตรึงไลเปสเหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส)	76
21	ภาพ AFM แบบสามมิติและแบบด้านบน (Top views) ของ ก. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน ข. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์แล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ง. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส จ. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ในที่นี้กำหนดให้สภาวะที่ใช้ตรึงไลเปสเหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส)	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ผลของระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ต่อสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (◆) และต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (■) โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 55 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น	80
23	ผลของอุณหภูมิขณะวัดกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป โดย (■) และ (◆) คือวัดที่ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 2 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น	81
24	ผลของพีเอชต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 2 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น	82
25	ผลของอุณหภูมิต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 2 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น	83
26	การเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (▲) และเอนไซม์อิสระ (◆) ที่พีเอชที่ใช้บ่มต่างๆ เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น ลูกศรแสดงถึงแกนแนวดิ่ง (แกน y) ที่ใช้แสดงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

27 การเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (▲) และเอนไซม์อิสระ (◆) ที่อุณหภูมิที่ใช้บ่มต่างๆ เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น ลูกศรแสดงถึงแกนแนวดิ่ง (แกน y) ที่ใช้แสดงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ 86

28 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น โดยสภาวะของการทำปฏิกิริยาที่ใช้คือ อัตราส่วนของปริมาณแผ่นเมมเบรนที่มีเอนไซม์เกาะอยู่ต่อน้ำหนักน้ำมันมีค่าเป็น 1ต่อ 20 อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 88

ภาพผนวกที่

ก1 เอฟทีไออาร์ของ ก. พอลิฟีนิลซัลโฟน ข. ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน และ ค. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน 98

ข1 เอ็นเอ็มอาร์ของ ก. ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน และ ข. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน 99

ค1 กราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร 100

ค2 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีนของ BSA ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร 103

จ1 โครมาโตแกรมของ ก. สารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยเอนไซม์อิสระ อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำครั้งที่ 1 ข. ทำซ้ำครั้งที่ 2 และ ค. ทำซ้ำครั้งที่ 3 108

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

จ2 โครมาโตแกรมของ ก. สารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยเอนไซม์ตรึงรูป อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำครั้งที่ 1 ข. ทำซ้ำครั้งที่ 2 และ ค. ทำซ้ำครั้งที่ 3 110

การดัดแปลงพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟนเพื่อตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์สำหรับผลิตไบโอดีเซล

Modidfication of Poly(arylene ether sulfone) for Lipase Covalent Immobilization for Biodiesel Production

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ต้องนำเข้าพลังงานจากต่างประเทศโดยเฉพาะน้ำมัน เพื่อรองรับความต้องการใช้ที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ ปี นับเป็นมูลค่าเงินตราที่ต้องสูญเสียให้ต่างประเทศปีละกว่าสามแสนล้านบาท (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545) แหล่งพลังงานที่ค้นพบในประเทศ ไม่ว่าจะเป็นก๊าซธรรมชาติและลิกไนต์ ก็ยังไม่เพียงพอกับความต้องการ การแสวงหาแหล่งพลังงานในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้าน้ำมันจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการขาดดุลเงินตราต่างประเทศ การหาแหล่งพลังงานมาทดแทนการใช้น้ำมันดีเซลนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากน้ำมันดีเซลนั้นมีสัดส่วนการใช้ถึงประมาณร้อยละ 44 ของปริมาณการใช้น้ำมันสำเร็จรูป (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545) จึงได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบภายในประเทศ เช่น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ น้ำมันพืชใช้แล้ว ฯลฯ มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใช้แทนน้ำมันดีเซล

ไบโอดีเซล (biodiesel) หมายถึง น้ำมันเชื้อเพลิงที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลได้ มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากและสามารถใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลทุกชนิด ได้จากการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ที่มีกรดไขมัน (ไตรกลีเซอไรด์, triglyceride) มาผ่านกระบวนการทางเคมีกับแอลกอฮอล์โดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้เอสเทอร์ (ester) และกลีเซอรอล (glycerol) เรียกปฏิกิริยาที่เกิดว่า ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าน้ำมันดีเซลที่ได้จากปิโตรเลียมเนื่องจากมีออกซิเจนสูงกว่า ทำให้เกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ ให้ก๊าซคาร์บอนมอนออกไซด์ (carbon monoxide) น้อยกว่า ไม่เกิดซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) และให้เขม่าคาร์บอนน้อยกว่า (กล้าณรงค์, 2546)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้ (reversible reaction) ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้ได้สัดส่วนของผลผลิต (yield) และผลิตภัณฑ์ (product) ตามต้องการ เนื่องจากอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ต่อไตรกลีเซอไรด์ที่เหมาะสมจากเลขดุลมวล (stoichiometry) จะเท่ากับ 3 ต่อ 1 ทั้งนี้เพื่อให้สมดุลเปลี่ยนไปในทางที่ให้ผลผลิตของเอสเทอร์มากที่สุดต้องใช้แอลกอฮอล์มากกว่า 3 ส่วน และตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้จะเป็นเบส กรด หรือเอนไซม์ก็ได้ แต่ในทางอุตสาหกรรมมักนิยมใช้เบสเนื่องจากทำงานได้เร็วกว่ากรดแต่จะทำให้กรดไขมันอิสระถูกเปลี่ยนเป็นสบู่โดยปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชั่น (sponification) ทำให้ได้เอสเทอร์น้อยลงและมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล (กล้าณรงค์, 2546) ดังนั้นไลเปส (lipase) จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยา เนื่องจากไลเปสมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมัน แต่ไลเปสมีจุดด้อยคือมีราคาที่แพงกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส จึงมีแนวคิดที่จะนำไลเปสมาตรึงไว้บนพอลิเมอร์สังเคราะห์เพื่อที่จะสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลาย ๆ รอบ

พอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟนเป็นเทอร์โมพลาสติกพอลิเมอร์ที่มีลักษณะโปร่งใส แข็งเหนียว ทนต่อกรดและเบสได้ดี และมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (T_g) สูง คือ ประมาณ 190-220 องศาเซลเซียส แล้วแต่ชนิดของพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟน

โครงการวิจัยนี้จึงให้ความสนใจในการศึกษาการดัดแปลงพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟน และการตรึงไลเปสบนพอลิเมอร์ดังกล่าวด้วยพันธะโควาเลนท์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นจากน้ำมันสบู่ดำ โดยทำการศึกษาในระดับปฏิบัติการ เพื่อนำไปสู่การใช้งานจริงในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการดัดแปลงพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟน

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* บนพอลิเมอร์ดัดแปลงด้วยพันธะโควาเลนท์ และเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่ออุณหภูมิและพีเอช

3. ศึกษาเบื้องต้นการใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการผลิตไบโอดีเซล ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

การตรวจเอกสาร

สบู่ดำ

1. ถิ่นกำเนิด

สบู่ดำ (*Jatropha curas* Linn.) พืชน้ำมันที่กำลังเป็นที่สนใจของผู้คนทั้งในและต่างประเทศในขณะนี้นั้น นักพฤกษศาสตร์จัดกลุ่มไว้เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาเขตร้อน เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae วงศ์เดียวกับยางพารา ละหุ่ง และมันสำปะหลัง มีน้ำยางสีขาวใส ลื่นเป็นฟอง มีคุณสมบัติคล้ายสบู่อยู่ในทุกส่วนของลำต้น (สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่, 2550)

2. ประวัติและความสำคัญ

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) มีชื่อเรียกว่า physic nut, purging nut และมีชื่อเรียกแตกต่างไปตามแหล่งปลูกภาคต่างๆ ของประเทศไทย คือ มะหุ่งฮั้ว (ภาคเหนือ) หมักเยา หรือสีหลอด (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) สบู่ดำ (ภาคกลาง) และหงษ์เทศ (ภาคใต้) ซึ่ง “สบู่” นี้เป็นภาษาโปรตุเกส หมายถึง ต้นไม้ชนิดหนึ่งที่ใช้น้ำมันจากเมล็ดมาเป็นส่วนผสมในการทำสบู่ สำหรับชำระล้างร่างกายและซักล้างเสื้อผ้า ของใช้ มีบันทึกไว้ว่าค้นพบโดย พ่อค้าชาวโปรตุเกสที่เดินเรือไปทวีปอเมริกากลาง และนำเข้ามาในทวีปเอเชีย และแพร่มายังประเทศไทยสมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลาย ราว 300 ปีก่อน โดยมีการแนะนำให้ผู้คนสมัยนั้นปลูกและพ่อค้ารับซื้อเมล็ดไปทำสบู่

ในทวีปแอฟริกา สมัยก่อนปลูกกันมากที่แหลม Verde ในที่ดินที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์และเป็นแนวเขตรั้วบ้าน คอกสัตว์ หรือบริเวณหลุมฝังศพ เพื่อกันสัตว์ไม่ให้เข้าไปคุ้ยเขี่ย สำหรับในประเทศไทยมีรายงานว่า เคยมีการปลูกเป็นรั้วบ้าน ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้โดยผู้เฒ่าผู้แก่ใช้ยางใส ๆ ที่หักออกจากก้านใบ หรือส่วนยอดใช้ทาแผลสด โดยเฉพาะแผลที่ปากให้เด็กๆ ที่เป็นโรคปากนกกระจอก หรือใช้กวาดลิ้นเด็กที่เป็นฝ้าขาว และใช้เนื้อในเมล็ดสีขาวเสียบไม้ จุดแทนเทียนไข ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 เนื่องจากขาดแคลนน้ำมันก๊าดที่ใช้จุดตะเกียง (สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่, 2550)

3. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สบู่ดำ เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 2 – 7 เมตร มีอายุไม่น้อยกว่า 20 ปี จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพารา สบู่แดง ปัตตาเวีย มะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน เป็นต้น มีชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อสามัญ คือ : *Jatropha curcas* L. และ Physic nut ตามลำดับ

ก.

ข.

ค.

ง.

จ.

ภาพที่ 1 ก. ต้น ข. ใบ ค. ดอก ง. ผล และ จ. เมล็ดของสบู่ดำ
ที่มา: สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550)

ลำต้นของต้นสบู่ดำมีลักษณะเรียบ มีเปลือกสีเทา-น้ำตาล ลำต้นเกลี้ยง อวบน้ำ เป็นไม้เนื้ออ่อน ไม่มีแก่น หักง่าย มีน้ำยางสีขาวใส ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่ กว้างหรือค่อนข้างกลม จัดเรียงแบบสลับ โคนใบเว้ารูปหัวใจ ปลายใบแหลม ขอบใบหยักเว้า 3-5 หยัก ต้นและใบของต้นสบู่ดำแสดงดังภาพที่1ก. และ ข. ตามลำดับ ส่วนดอก มีช่อดอกแบบ Panicle หรือ panicle cyme ประกอบด้วยดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อดอกเดียวกัน ดอกทั้ง 2 ชนิด มีกลีบรอง และกลีบดอก อย่างละ 5 กลีบ ดอกตัวผู้มีเกสรเรียงเป็นวง 2 วง วงละ 5 อัน ดอกตัวเมียมีรังไข่ ก้านเกสรตัว

เมียมี 6 แฉก ดอกมีขนาดเล็กสีเขียวแกมเหลือง มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ดอกจะออกเป็นช่อที่บริเวณซอกใบหรือปลายยอด ในช่อดอกเดียวกันมีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมีย (อัตราดอกตัวผู้ : ดอกตัวเมียเท่ากับ 6-7 : 1) ดอกแต่ละช่อบานไม่พร้อมกัน มีช่อดอกประมาณ 15-30 ช่อต่อต้น แต่ละช่อดอกมีดอกย่อย 70-120 ดอก แต่จะติดผลเพียง 8-14 ผล ส่วนผลของสบู่ดำ ที่เกิดจากช่อดอกเดียวกันจะสุกแก่ไม่พร้อมกัน ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่มีสีเหลืองคล้ายลูกจันทน์ ผลมีลักษณะกลมรีเล็กน้อย ผลมีขนาดปานกลาง กว้าง 2 – 3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลมี 3 พูๆ ละ 1 เมล็ด เมื่อสุกแก่ผลจะปริแตก ผลสด 1 กิโลกรัม มีจำนวน 85-90 ผล และเมล็ดมีลักษณะเป็นรูปกลมรี เปลือกนอกสีดำ เนื้อในสีขาว มีสารพิษ (curcin) หากบริโภคจะเกิดอาการอาเจียนและท้องเสีย เมล็ดกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 70 กรัม เมล็ด 1 กิโลกรัม มีประมาณ 1,300-1,500 เมล็ด ดอก ผล และเมล็ดของต้นสบู่ดำ แสดงดังภาพที่ 1 ค. ง. และ จ. ตามลำดับ (สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่, 2550)

4. พื้นที่สำหรับการปลูกสบู่ดำ

สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550) สภาพพื้นที่ปลูกที่เหมาะสมของสบู่ดำ ควรเป็นดินร่วน มีธาตุอาหาร อุดมสมบูรณ์ มีความเป็นกรดเล็กน้อย เช่นเดียวกับพืชไร่ทั่ว ๆ ไป แต่มีข้อควรระวัง คือ สบู่ดำเป็นพืชที่ไม่ทนต่อดินมีน้ำขัง ดังนั้น พื้นที่ที่เหมาะสมจึงต้องเป็นที่ลาดเทมีการระบายน้ำดี อาจเป็นที่ราบเชิงเขา ถ้าเป็นที่ราบลุ่มควรทำทางระบายน้ำ แต่จะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต หรือในกรณีที่นาดอน เมื่อปรับที่นามาใช้เป็นที่ไร่สำหรับปลูกสบู่ดำ ต้องมีการทะลายคันนาออก ให้ระบายน้ำได้เป็นอย่างดี

ในสภาพพื้นที่ดินที่ไม่เหมาะสมต่อการปลูกพืช ยังพบสบู่ดำสามารถเจริญเติบโตอยู่รอดได้ เช่น ดินด่าง (alkaline soil) ดินเค็ม (saline soil) ดินทราย (sandy soil) หรือดินที่มีหินมาก (stony soil) หรือแม้แต่ในสภาพพื้นที่ที่มีปริมาณฝนตกน้อยปีละ 200 มิลลิเมตร ซึ่งพบว่าสบู่ดำ ถูกนำไปปลูกในที่ต่าง ๆ ทั่วโลก แต่ที่พบมีการปรับตัวได้ดีมักอยู่ในเขตร้อน (tropics) ในพื้นที่ดินที่มีการระบายน้ำและอากาศดี ในแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ ที่มีฝนตกระหว่าง 300-1,000 มิลลิเมตรต่อปี แต่ถ้าเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีปริมาณฝนตกมากกว่า 1,000 มิลลิเมตรต่อปี เกษตรกรในประเทศต่าง ๆ จะใช้พื้นที่ไปปลูกพืชเศรษฐกิจที่มีผลตอบแทนดีกว่า

ส่วนการเตรียมพื้นที่ดินปลูกสบู่ดำ ควรมีการเตรียมดิน โดยการไถพรวนในสภาพไร่ เพื่อให้ดินโปร่งมีการระบายน้ำและอากาศได้ดี และเป็นการกำจัดวัชพืช ไม่ให้มาแข่งขัน แย่งน้ำ อากาศ ธาตุอาหารและแสงแดด เมื่อต้นสบู่ดำยังเล็กอยู่ สำหรับในพื้นที่ลาดเอียง หรือที่ตามภูเขาที่มีหินมาก ไม่สามารถไถ-พรวน ได้ตามปกติ การขุดหลุมปลูก มีปริมาตร 30 x 30 x 30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ก็เพียงพอต่อการย้ายกล้าสบู่ดำมาปลูก ทั้ง 2 วิธีการของการเตรียมดินดังกล่าว ควรมีการพรวนดินกำจัดวัชพืชรอบ ๆ ต้นสบู่ดำเสมอ โดยเฉพาะในฤดูฝน เนื่องจากสบู่ดำเป็นไม้พุ่มขนาดกลาง มีอายุยาวนานกว่า 25 ปี   การเตรียมดินก่อนปลูกจึงควรมีการวางแผน โดยในระยะแรก ควรทำการหว่านปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ก่อนการไถ-พรวน หรือใส่รองก้นหลุมในกรณีขุดหลุมปลูก เพื่อให้ต้นสบู่ดำมีโอกาสเจริญเติบโตดีในช่วงปีแรก ในปีต่อ ๆ มา อาจมีการพรวนดินระหว่างแถว เพื่อกำจัดวัชพืช ตามความเหมาะสมต่อไป เกษตรกรสามารถเก็บเกี่ยวสบู่ดำได้ภายในปีแรก โดยสบู่ดำจะเริ่มให้ผลผลิตที่อายุประมาณ 6 เดือน นับจากวันปลูก

5. พิษวิทยาของสบู่ดำ

สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550) จากการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลของสถาบันการแพทย์แผนไทยพบว่าทุกส่วนของสบู่ดำมีความเป็นพิษ ซึ่งส่วนใหญ่พบกับสัตว์ทดลอง ดังนี้

5.1 ใบ มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อและฆ่าพยาธิโดยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Staphylococcus, Bacilius และ Mcrococous

5.2 ยาง (sap) ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าไข่พยาธิไส้เดือนและพยาธิปากขอ และยับยั้งการเจริญของลูกน้ำยุง และยางจะมีความเป็นพิษสูงมากต่อหนูถีบจักรเมื่อเข้าทางปากหรือฉีดเข้าร่องท้อง

5.3 กิ่งก้าน หรือส่วนต้น พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง cytopathic effect ของเชื้อ HV โดยมีพิษต่ำ

5.4 ผล ทดสอบกับปลาคาร์พ พบว่าพิษของ phorbol ester ทำให้ปลาเจริญเติบโตช้าลง มีมูกในอุจจาระและไม่กินอาหาร แต่ถ้าหยุดให้ phorbol ester ปลาจะกลับมาเจริญเป็นปกติ ได้ทดสอบกับตัวอ่อนในครรภ์ของหนู พบว่าผลสบู่ดำทำให้หนูแท้งได้

5.5 เมล็ด สารพิษในเมล็ดคือ curcin มีฤทธิ์กับหนู พบว่าสารพิษ curcin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน แต่ในทางกลับกันพบว่าในเมล็ดสบู่ดำ มีสารบางชนิด ซึ่ง มีฤทธิ์เป็น tumor promoter กล่าวคือไม่เป็นสารก่อมะเร็ง แต่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ที่มียีนผิดปกติเนื่องจากของสารก่อมะเร็งแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและอาจพัฒนาเจริญเป็นก้อนมะเร็งได้ นอกจากนี้พิษเฉียบพลันของเมล็ดสบู่ดำคือ พิษกับหนู เมื่อให้ทางปากในหนูถีบจักร พบว่าทำให้หนูตาย เนื่องจากการคั่งในหลอดเลือด และ/หรือ เลือดออกในลำไส้ใหญ่ ปอด พิษกับลูกไก่ พบว่าเมื่อนำเมล็ดมาผสมอาหารให้ลูกไก่กิน ทำให้ลูกไก่โตช้า ตับและไตโต พิษในสัตว์ เช่น แกะ แพะ ทำให้ท้องเสีย ขาดน้ำ ไม่กินอาหาร และมีเลือดออกในอวัยวะภายใน เช่น กระเพาะอาหาร ปอด ไต หัวใจผิดปกติ มีเลือดออกหลายแห่งในร่างกาย พิษที่พบในเด็กที่รับประทานเมล็ดสบู่ดำได้แก่ อาการกระสับกระส่าย คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน และขาดน้ำ พิษที่พบในผู้ใหญ่ กรณีที่เป็นสายพันธุ์ที่มีสารเป็นพิษสูง หากรับประทานเพียงแค่ 3 เมล็ด ก็เป็นอันตรายแก่ระบบทางเดินอาหาร แต่บางพันธุ์รับประทานถึง 50 เมล็ดก็ไม่เป็นอันตราย

5.6 ราก ฤทธิ์ต้านอักเสบ ผงรากเมื่อทาบนใบหูของหนูถีบจักร จะช่วยต้านอักเสบ จากการถูกสาร TPA ได้ และสารสกัดด้วยเมธานอลของผงราก เมื่อให้ทางปากจะต้านอักเสบของอุ้งเท้าหนูที่ได้รับสาร carrageenan

6. การสกัดน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำ

สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550) สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง เมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมัน 30 – 35 เปอร์เซ็นต์ วิธีการสกัดแยกน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำที่นิยมทำกันมากคือ ใช้วิธีการบีบอัด (pressing) จะได้น้ำมันประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำมันตกค้างในกาก 10-15 เปอร์เซ็นต์ อาจใช้เครื่องอัดแบบไฮโดรลิค (hydraulic press) หรือเครื่องอัดแบบสกรู (screw press) การแยกด้วยวิธีนี้จะได้น้ำมันปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแรงอัดที่ใช้ ถ้าใช้แรงอัดสูงจะได้น้ำมันมาก แต่น้ำมันที่ได้จะมีคุณภาพลดลง เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นจะไปเร่งปฏิกิริยาเคมีบางอย่าง ทำให้น้ำมันเสื่อมเสียได้เร็วขึ้น ดังนั้นการบีบอัดอาจทำได้ 2 แบบ คือ การบีบอัดโดยใช้แรงดันสูง เพื่อให้ได้น้ำมันมาก หรือการบีบอัดแบบ pre-press โดยบีบด้วยแรงดันต่ำก่อน แล้วจึงสกัดน้ำมันที่เหลือในกากต่อด้วยสารทำละลาย

7. สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ

สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550) น้ำมันสบู่ดำจะมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวปนเหลือง ใสและยังคงใสที่อุณหภูมิต่ำ และมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ และองค์ประกอบกรดไขมัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ

คุณสมบัติ และ องค์ประกอบ	ค่าที่วิเคราะห์ได้
ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, % as oleic acid)	197.13
ค่าสปอนนิฟิเคชั่น (Saponification value)	197.13
ค่าไอโอดีน (Iodine value)	97.08
ดัชนีหักเห (Refractive index) ที่ 25 องศาเซลเซียส	1.4670
ความหนืด (Viscosity) ที่ 25 องศาเซลเซียส (cp)	45.68

ที่มา : สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันสบู่ดำ

องค์ประกอบกรดไขมัน	ค่าที่วิเคราะห์ได้ (เปอร์เซ็นต์)
กรดปาลมิติก (Palmitic acid, C 16:0)	16.17
กรดสเตียริก (Stearic acid, C18:0)	5.11
ผลรวมกรดไขมันอิ่มตัว (Total saturated fatty acid)	21.28
กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18:1)	44.88
กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2)	33.83
ผลรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Total unsaturated fatty acid)	78.71

ที่มา : สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550)

ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล (biodiesel) หมายถึง น้ำมันเชื้อเพลิงที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมดีเซลได้ มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก แสดงดังตารางที่ 3 และสามารถใช้ได้กับเครื่องยนต์ดีเซลทุกชนิด ได้จากการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ที่มีกรดไขมัน (ไตรกลีเซอไรด์, triglyceride) มาผ่านกระบวนการทางเคมีกับแอลกอฮอล์โดยใช้กรด เบส หรือไลเปส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้เอสเทอร์ (ester) และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์ (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล

Methyl ester	Kinematic viscosity (mm^2/s)	Cetane Number	Lower heating value (MJ/l)	Cloud point (°C)	Flash point (°C)	Density (g/l)	Sulfur content (wt%)
Peanut[a]	4.9 (37.8 °C)	54	33.6	5	176	0.883	-
Soybean[a]	4.5 (37.8 °C)	45	33.5	1	178	0.885	-
Soybean[b]	4.0 (40.0 °C)	45.7-46	32.7	-	-	0.880 (15 °C)	-
Babassu[a]	3.6 (37.8 °C)	63	31.8	4	127	0.879	-
Palm[a]	5.7 (37.8 °C)	62	33.5	13	164	0.880	-
Palm[b]	4.3-4.5 (40 °C)	64.3-70	32.4	-	-	0.872-0.877 (15 °C)	-
Sunflower[a]	4.6 (37.8 °C)	49	33.5	1	183	0.860	-
Tallow[a]	-	-	-	12	96	-	-
Rapeseed[b]	4.2 (40 °C)	51-59.7	32.8	-	-	0.882	-
Used rapeseed[c]	9.48 (30 °C)	53	36.7	-	192	0.895	0.002
Used corn oil[c]	6.23 (30 °C)	63.9	42.3	-	166	0.884	0.0013

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Methyl ester	Kinematic Viscosity (mm^2/s)	Cetane Number	Lower heating value (MJ/l)	Cloud point (^oC)	Flash point (^oC)	Density (g/l)	Sulfur content (wt%)
Diesel fuel[b]	1.2-3.5 (40 ^oC)	51	35.5	-	-	0.830-0.840 (15 ^oC)	-
JIS-2D[c] (gas oil)	2.8 (30 ^oC)	58	42.7	-	59	0.883	0.05

หมายเหตุ [a]Srivastava and Prasad (2000)

[b]Varese and Varese (1996)

[c]Yamane *et al*. (2001)

ที่มา: Fukuda (2001)

1. กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

วิธีการทั่วๆ ไปที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 4 วิธี (Ma and Hanna, 1999) ดังนี้

1.1 การใช้โดยตรงและการผสม (Direct use and blending) เป็นการใช้น้ำมันพืชโดยตรง หรือใช้น้ำมันพืชผสมกับน้ำมันดีเซล พบว่าวิธีนี้ส่งผลเสียต่อเครื่องยนต์ดีเซลทั้งทางตรงและทางอ้อม กล่าวคือ น้ำมันที่ใช้มีความหนืดสูง มีส่วนประกอบของกรดและกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) เกิดยางเหนียวขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่น (polymerization) เนื่องจากการเก็บและการเผาไหม้ มีการตกตะกอนของคาร์บอน และสุดท้ายมันจะทำให้น้ำมันหล่อลื่นข้นเหนียวขึ้น

1.2 ไมโครอิมัลชั่น (Microemulsion) คือ คอลลอยด์ที่อยู่ในสภาวะสมดุลย์ของระบบที่มีน้ำกับน้ำมัน มีขนาดอนุภาคอยู่ระหว่าง 1-150 นาโนเมตร จึงจำเป็นที่จะต้องมีการเติมสารลดแรงตึงผิว

(surfactant) เพื่อช่วยให้เกิดความคงตัว วิธีนี้ช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืด แต่มีข้อเสียตรงที่เกิดการตกตะกอนของคาร์บอนมาก น้ำมันหล่อลื่นข้นเหนียวขึ้น และยังทำให้เกิดการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

1.3 แตกสลายด้วยความร้อน (Thermal cracking or pyrolysis) เป็นกระบวนการเปลี่ยนสารหนึ่งๆ ไปเป็นสารตัวอื่นโดยใช้ความร้อนอย่างเดียว หรือความร้อนร่วมกับตัวเร่งปฏิกิริยาเข้าช่วย ซึ่งจะไปทำลายพันธะเคมีในไขมันจนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง และในการให้ความร้อนจะต้องมีอากาศหรือออกซิเจนเข้าร่วมด้วย วิธีนี้มีข้อเสียคือ มีกลไกของปฏิกิริยาที่หลากหลายซึ่งจะยุ่งยากในการทำงาน เครื่องมือมีราคาแพง และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกกำจัดออกไป ทำให้ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีคุณค่าต่ำ คือ มักจะใช้เป็นการผลิตก๊าซโซลีนมากกว่าน้ำมันดีเซล

1.4 ทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ของไขมันสัตว์หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ เพื่อผลิตสารประกอบเอสเทอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาเป็นไปดังภาพที่ 6 โดยจำเป็นต้องมีตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลผลิต เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้ และการเติมแอลกอฮอล์มากเกินพอ มักจะใช้เพื่อบังคับให้ปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ และแอลกอฮอล์ที่ใช้จะเป็นแอลกอฮอล์โมเลกุลตรงที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 โมเลกุลที่ตำแหน่งแรก (primary) หรือตำแหน่งที่สอง (secondary) มีจำนวนคาร์บอนอยู่ในช่วง 1-8 อะตอม ได้แก่ เมธานอล (methanol) เอธานอล (ethanol) โพรพานอล (propanol) บิวทานอล (butanol) และเอมิลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมธานอลและเอธานอลใช้มากที่สุดเนื่องจากราคาถูก หาง่าย และมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพที่เหมาะสม เนื่องจากมีความเป็นโพลาร์ (polar) และสายโมเลกุลสั้น ทำให้สามารถทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์และตัวเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามแอลกอฮอล์ที่ใช้จะมีผลเสียต่อผลผลิตที่ได้ด้วยเช่นกัน เช่น การใช้ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida Antarctica* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของเมธานอลกับไตรกลีเซอไรด์ ทำให้สัดส่วนของผลผลิต (yield) ต่ำกว่าการใช้เอธานอล เนื่องจากเมธานอลจะทำให้เอนไซม์ดังกล่าวสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ไป เพราะความมีขั้วที่มีมากกว่าเอธานอลนั่นเอง (Madras, 2004) แต่ก็มีไลเปสอีกชนิดที่สามารถทนต่อเมธานอลได้ดีคือไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* และยังให้ผลของกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงสุด และสัดส่วนของผลผลิตของอัลคิลเอสเทอร์ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นสูงสุดด้วย (Noureddini, 2004)

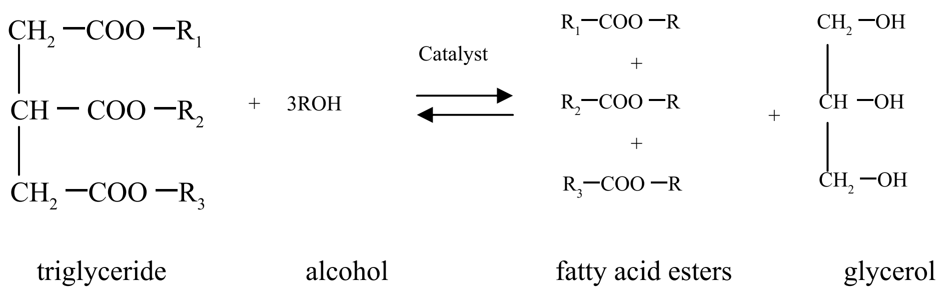
นอกจากนี้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นสามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาได้ทั้ง 3 ชนิด (Fukuda *et al.*, 2001) ดังนี้

1.4.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด (acid-catalyzed) กรดที่ใช้ได้แก่ กรดซัลฟุริก (sulfuric acid) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และกรดซัลโฟนิก (sulfonic acid) ถึงแม้ว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าการใช้เบส แต่ก็เหมาะสมกับกลีเซอไรด์ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระและปริมาณน้ำสูง ๆ

1.4.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส (alkali-catalyzed) เบสที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) คาร์บอเนต (carbonate) และอัลคอกไซด์ (alkoxide) ต่างๆ เช่น โซเดียมเมทอกไซด์ (sodium methoxide) โซเดียมเอทอกไซด์ (sodium ethoxide) โซเดียมโพรพอกไซด์ (sodium propoxide) และ โซเดียมบิวทอกไซด์ (sodium butoxide) ข้อดีของตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสคือสามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดถึง 4,000 เท่า และมักนิยมใช้ในทางการค้ามากกว่า

1.4.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเอนไซม์ (enzyme-catalyzed) ในการใช้กรดและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีข้อจำกัดมากมาย เช่น ต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง เปลืองพลังงาน ยุ่งยากต่อการแยกกลีเซอรอลออกจากผลิตภัณฑ์ และจำเป็นที่จะต้องบำบัดน้ำเสียหลังจากใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบสอีกด้วย จึงมีการเปลี่ยนมาใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อดีหลายประการเช่น ปฏิกิริยาไม่รุนแรงเนื่องจากเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ ง่ายต่อการแยกกลีเซอรอลออกจากผลิตภัณฑ์ ปริมาณน้ำในวัตถุดิบไม่ส่งผลต่อการเกิดผลิตภุณฑ์ ไม่มีกระบวนล้างที่ยุ่งยาก ได้สัดส่วนผลิตภัณฑ์ที่สูง แต่มีข้อจำกัดตรงที่ต้องใช้ต้นทุนสูง ข้อเปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังตารางที่ 4

นอกจากนี้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นยังสามารถเกิดขึ้นได้โดยปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้เมธานอลในสภาวะเหนือวิกฤต (supercritical methanol) โดยต้องกระทำที่อุณหภูมิและความดันสูง (Demirbas, 2002 , 2005; Madras *et al.*,2004; Han *et al.*, 2005)



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ไลเปสและเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

รายละเอียด	ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส	ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเอนไซม์
อุณหภูมิในปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
กรดไขมันอิสระ	สบู่	เมทิลเอสเทอร์
น้ำในองค์ประกอบ	สบู่	เมทิลเอสเทอร์
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ธรรมดา	สูงกว่า
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ล้างซ้ำหลายครั้ง	ไม่ต้องล้าง
ต้นทุนในการผลิต	ราคาถูก	ราคาแพงกว่า

ที่มา: Fukuda (2001)

2. ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซลในเครื่องยนต์

การใช้ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ มีประโยชน์หลายด้าน (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545) คือ

2.1 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซลด้านสิ่งแวดล้อม การใช้ไบโอดีเซลสามารถลดมลพิษทางอากาศได้มากขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการเผาไหม้ในเครื่องยนต์ และสามารถลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจก เพราะผลิตจากพืช นอกจากนี้การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว ช่วยลดการนำน้ำมันที่ใช้แล้วไป ประกอบอาหารซ้ำ และยังช่วยป้องกันมิให้นำน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว ซึ่งมีส่วนผสม

ของสารไดออกซินที่เป็นสารก่อมะเร็งไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ ผลประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมของการใช้น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม แสดงดังตารางที่ 5

2.2 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซลด้านสมรรถนะเครื่องยนต์ ในการผสมไบโอดีเซลในระดับร้อยละ 1-2 สามารถช่วยเพิ่มดัชนีการหล่อลื่นให้กับน้ำมันดีเซล จากผลการทดลองของสถาบันวิจัยและเทคโนโลยีของ ปตท. จำกัด (มหาชน) พบว่าการเติมไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ใช้แล้วและน้ำมันมะพร้าวในอัตราร้อยละ 0.5 สามารถเพิ่มดัชนีการหล่อลื่นได้ถึง 2 เท่า นอกจากนี้การใช้ไบโอดีเซลจะช่วยให้ประสิทธิภาพการเผาไหม้ดีขึ้น เนื่องจากในไบโอดีเซลมีออกซิเจนผสมอยู่ประมาณร้อยละ 10 ทำให้การผสมระหว่างอากาศกับน้ำมันมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและเป็นการเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรของอากาศต่อน้ำมันได้เป็นอย่างดี จึงทำให้การเผาไหม้ดีขึ้นและถึงแม้ว่าค่าความร้อนของไบโอดีเซลจะต่ำกว่าน้ำมันดีเซลประมาณร้อยละ 10 แต่ข้อด้อยนี้ไม่มีผลกระทบต่อการใช้งาน เพราะการใช้ไบโอดีเซลทำให้การเผาไหม้ดีขึ้น จึงทำให้กำลังเครื่องยนต์ไม่ลดลง

ตารางที่ 5 ผลประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อมของไบโอดีเซล เปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซลจากปิโตรเลียม

ผลกระทบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
ไฮโดรคาร์บอนที่เผาไหม้ไม่หมด (ลดลง)	-93
คาร์บอนมอนอกไซด์ (ลดลง)	-50
ฝุ่นผง (ลดลง)	-30
กำมะถัน (ลดลง)	-100
คาร์บอนไดออกไซด์ (ลดลง)	-80
ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (ลดลง)	-100

ที่มา: สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่ (2550)

2.3 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซลด้านเศรษฐศาสตร์ ในการใช้ไบโอดีเซล จะเป็นการช่วยสร้างงานในชนบท ด้วยการสร้างตลาดพลังงานไว้รองรับผลผลิตทางการเกษตรที่เหลือจากการบริโภค และยังช่วยลดการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศได้บางส่วน

2.4 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซลด้านการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงในประเทศ ซึ่งประเทศไทยมีสัดส่วนการใช้น้ำมันดีเซลสูงกว่าน้ำมันเบนซินมาก ตลาดน้ำมันดีเซลในประเทศไทยมีมูลค่ามากกว่าน้ำมันเบนซินกว่า 2 เท่า และในอนาคตมีแนวโน้มที่ โรงกลั่นอาจจะผลิตน้ำมันดีเซลไม่เพียงพอต่อการใช้ภายในประเทศ ดังนั้นการใช้ไบโอดีเซลจึงช่วยลดความไม่สมดุลของการผลิตของโรงกลั่นได้ และการผสมน้ำมันไบโอดีเซลในอัตราส่วนร้อยละ 1-2 สามารถเพิ่มความหล่อลื่นในน้ำมันดีเซลได้ โดยเฉพาะกรณีที่จะมีการลดปริมาณกำมะถันในน้ำมันดีเซล

2.5 ประโยชน์ของการใช้ไบโอดีเซลด้านความมั่นคง การใช้น้ำมันไบโอดีเซลที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศถือเป็นการเสริมสร้างความมั่นคงและเสถียรภาพทางด้านพลังงานของประเทศ

3. แนวโน้มของอุตสาหกรรมไบโอดีเซลในต่างประเทศ

คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร (2545) ไบโอดีเซล นับเป็นพลังงานที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่สามารถทดแทนน้ำมันดีเซลที่ได้จากปิโตรเลียม อุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลเกิดขึ้นในประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ ประเทศในสหภาพยุโรปที่มีอุตสาหกรรมผลิตไบโอดีเซลมีจำนวน 11 ประเทศ ประเทศที่ผลิตไบโอดีเซลมากที่สุดเป็นอันดับที่ 1 คือ ประเทศเยอรมนีซึ่งมีกำลังผลิตประมาณ 1 ล้านตันต่อปี มีการใช้ไบโอดีเซลสูตร 100 เปอร์เซ็นต์ในรถยนต์ทดแทนน้ำมันดีเซล และใช้ในเตาผิงเพื่อให้ความอบอุ่นในบ้านพักอาศัยเพราะมีมลพิษต่ำมาก ประเทศที่มีกำลังการผลิตไบโอดีเซลรองลงไป ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส อิตาลี และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

สถานภาพการผลิตไบโอดีเซลของทั่วโลก การผลักดันการใช้ไบโอดีเซลอย่างจริงจังในสหภาพยุโรป มีเหตุผลหนึ่งมาจากนโยบายการเกษตรร่วม (Common Agricultural Policy : CAP 1992) ซึ่งมีการกำหนดพื้นที่การเพาะปลูกพืชที่ไม่ใช้ทำเป็นอาหาร เช่น เมล็ดเรพ เมล็ดดอกทานตะวัน บีตรูต และข้าวสาลี จึงมีการปลูกพืชเหล่านี้เพื่อผลิตเป็นไบโอดีเซลได้มากขึ้น

สถานภาพการผลิตไบโอดีเซลของประเทศเยอรมนี อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืชและอุตสาหกรรมการแปรรูปน้ำมันพืชในประเทศเยอรมนีมีมานานกว่า 10 ปีแล้ว และโดยเฉพาะในช่วง 2-3 ปีนี้ อุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลมีอัตราการเจริญเติบโตสูงมาก ปัจจุบันประเทศเยอรมนีมี

โรงงานผลิตไบโอดีเซลทั้งหมด 14 โรง และกำลังก่อสร้างอีก 6 โรง และจะมีกำลังการผลิตไบโอดีเซลรวมประมาณ 1 ล้านตันต่อปี ภายในปี พ.ศ. 2545 ส่วนทางด้านการจำหน่ายไบโอดีเซลสำหรับยานยนต์ ในประเทศเยอรมนีมีอัตราสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมา สถานีบริการที่จำหน่ายไบโอดีเซลในประเทศเยอรมนีมีมากกว่า 1,400 แห่ง และจะขยายเพิ่มอีกกว่า 1,000 แห่ง ในระยะเวลาอันใกล้

สถานภาพการผลิตไบโอดีเซลของประเทศฝรั่งเศสและสหภาพยุโรป ประเทศฝรั่งเศสมีการพัฒนาไบโอดีเซลควบคู่ไปกับการพัฒนาโครงการเอธานอล ปัจจุบันมีพื้นที่เพาะปลูกพืชไร่สำหรับผลิตไบโอดีเซลตามนโยบาย Common Agricultural Policy กว่า 370,000 เฮกตาร์ (2.3 ล้านไร่) และมีผลผลิตกว่า 330,000 ตันต่อปี ส่วนในด้านการใช้งาน ในประเทศฝรั่งเศสมีการใช้ไบโอดีเซลผสมสัดส่วนร้อยละ 5 ในน้ำมันดีเซล สำหรับรถประจำทางกว่า 4,000 คัน ใช้ไบโอดีเซลผสมสัดส่วนร้อยละ 30 เพื่อลดมลภาวะ ส่วนแนวโน้มของตลาดไบโอดีเซลในสหภาพยุโรปจะมีการขยายตัวอีกมาก ในอนาคตภายในปี พ.ศ. 2548 จะมีการบังคับให้ใช้เชื้อเพลิงทดแทนในภาคขนส่งคิดเป็นจำนวนร้อยละ 2 ของเชื้อเพลิงทั้งหมด ซึ่งจะทำให้มีความจำเป็นต้องใช้พื้นที่เพาะปลูกพืชไร่สำหรับไบโอดีเซลและเอธานอลรวมประมาณ 4.5 ล้านไร่ จะมีการผลิตเอธานอล 538,000 ตันต่อปี และการผลิตไบโอดีเซล 630,000 ตันต่อปี นอกจากนี้ภายในปี 2553 สัดส่วนการใช้เชื้อเพลิงทดแทนจะขยายเป็นร้อยละ 5.75 ซึ่งจะมีการผลิตเอธานอล 1.37 ล้านตันต่อปี และผลิตไบโอดีเซล 1.79 ล้านตันต่อปี

สถานภาพการผลิตไบโอดีเซลของประเทศสหรัฐอเมริกา อุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซลในประเทศอเมริกายังไม่พัฒนาเท่าเทียมกับสหภาพยุโรป แต่มีศักยภาพสูงมาก ปัจจุบันประเทศสหรัฐอเมริกามีโรงงานผลิตไบโอดีเซลทั้งหมด 12 โรงงาน โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันใช้แล้วเป็นวัตถุดิบ มีกำลังการผลิตรวมปีละ 230,000 ตันโดยประมาณ ในอนาคตประเทศสหรัฐอเมริกาจะมีการขยายการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นอีก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมลรัฐที่มีการปลูกถั่วเหลืองมาก เช่น มลรัฐมินนิโซตา ได้กำหนดให้ผสมไบโอดีเซลในน้ำมันดีเซลด้วยสัดส่วนร้อยละ 2 ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ในอนาคตจะมีการออกกฎหมายกำหนดสัดส่วนของน้ำมันเชื้อเพลิงให้มีการผสมไบโอดีเซลในน้ำมันเชื้อเพลิงภาคขนส่งทั่วประเทศ

เอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของไฮโดรเลส (hydrolases) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมัน มีชื่อตามระบบ (systematic name) ว่า ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัส (code or number name) ว่า EC 3.1.1.3 ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไป ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์

1. แหล่งของไลเปส

ปวีณา (2547) ไลเปสที่ได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรั่ม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูง และสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย ส่วนไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วย โดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugora* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphycoccus*

2. คุณสมบัติของไลเปสจากจุลินทรีย์

Reed (1975) ไลเปสที่มาจากจุลินทรีย์ที่ต่างสายพันธุ์กัน จะมีความหลากหลาย (diversity) ของการดำรงชีวิต ซึ่งนั่นก็คือ สภาวะที่เหมาะสมของค่าพีเอช (pH) อุณหภูมิ (temperature) และค่าความร้อนที่ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (heat inactivation) จะมีความแตกต่างกันไป คุณสมบัติของไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 6

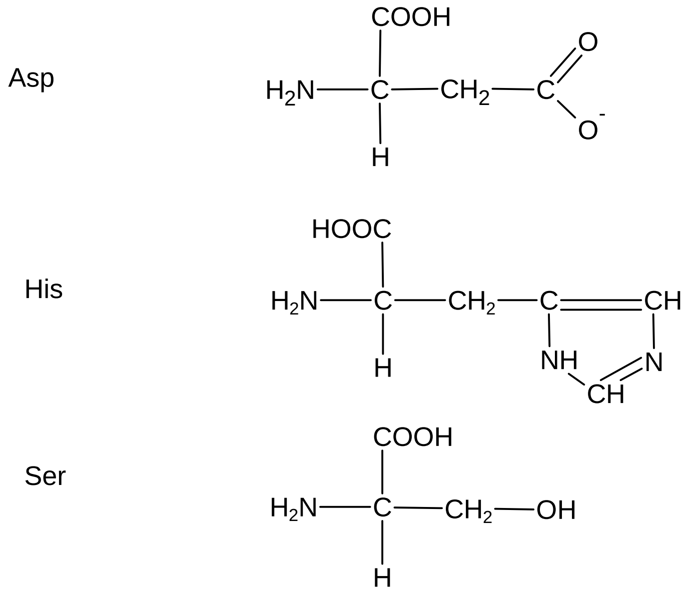
ตารางที่ 6 คุณสมบัติของไลเปสจากจุลินทรีย์

แหล่งของไลเปส	สภาวะที่เหมาะสมของค่าพีเอช	สภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความร้อนที่ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (heat inactivation) เวลา (นาที) : อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Penicillium chrysogenun	6.2 - 6.8	37	-
Penicillium roqueforti	8.0	37	10 : 50
Pseudomonas fragi	7.0 - 7.2	32	15 : 72
Rhizopus delemar	5.6	35	15 : 50
Aspergillus niger	5.6	25	15 : 45
Staphylococcus aureus	8.5	45	30 : 70
Geotrichum candidum	8.2	37	15 : 60
Achromobacter lipolyticum	7.0	37	40 : 99

หมายเหตุ ค่าความร้อนที่ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ของ *Penicillium chrysogenun* ไม่ได้หาค่าไว้
ที่มา: Reed (1975)

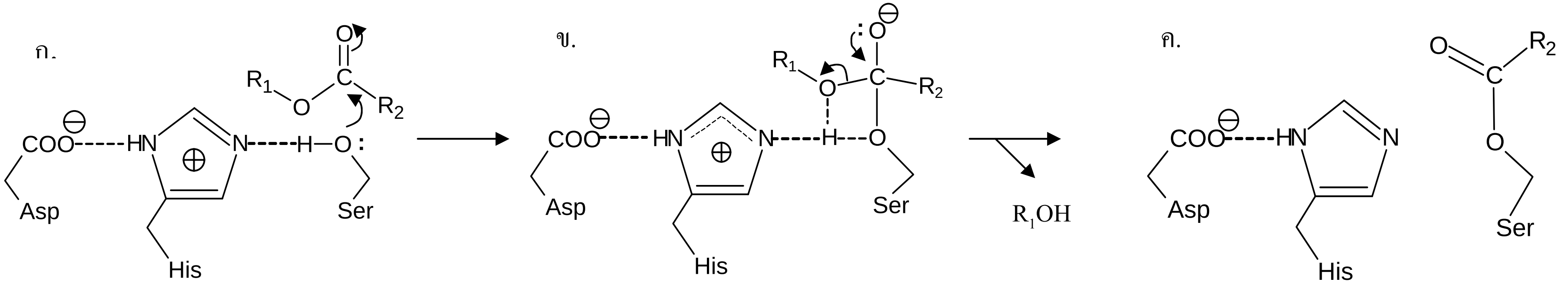
3. โครงสร้างและบริเวณเร่งของไลเปส

Wong (1995) โครงสร้างของไลเปสจะประกอบด้วย บริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic areas) มากกว่าบริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic areas) และยังมีส่วนที่เป็นฝาเปิดปิด เรียกว่า ลิด (lid) ซึ่งภายในลิดจะมีบริเวณเร่งของเอนไซม์อยู่ ลิดจะทำหน้าที่เปิดปิดให้ซับสเตรตของเอนไซม์เข้ามาทำปฏิกิริยาและออกไป ภายในลิดจะเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เมื่อซับเสตรตที่เป็นไขมันซึ่งมีความไม่ชอบน้ำสูงเข้ามาใกล้ๆ ลิด จะทำให้ฝาลิดสามารถเปิดออกได้ด้วยแรงดึงดูดของบริเวณที่ไม่ชอบน้ำทำให้ซับสเตรตเข้าไปในลิดได้ และจะไปจับกับบริเวณเร่งภายในลิด จากนั้นก็ทำปฏิกิริยาได้ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ส่วนบริเวณเร่ง (active site) ของไลเปส ประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) 3 ตัว ที่เรียงอยู่ใกล้กัน เรียกว่า คะตะไลติก ไทรแอด (catalytic triad) ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 3 นี้ได้แก่ กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ใช้สัญลักษณ์ Asp ตัวต่อมาคือ ฮิสทิดีน (histidine) ใช้สัญลักษณ์ His และตัวสุดท้ายคือ เซรีน (serine) ใช้สัญลักษณ์ Ser โดยโครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 3 แสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งบริเวณคะตะไลติก ไทรแอด นี้เป็นบริเวณที่เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตที่เกิดขึ้นในบริเวณเร่ง ส่วนกลไกการเข้าทำปฏิกิริยาให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์นั้นจะกล่าวในหัวข้อต่อไป

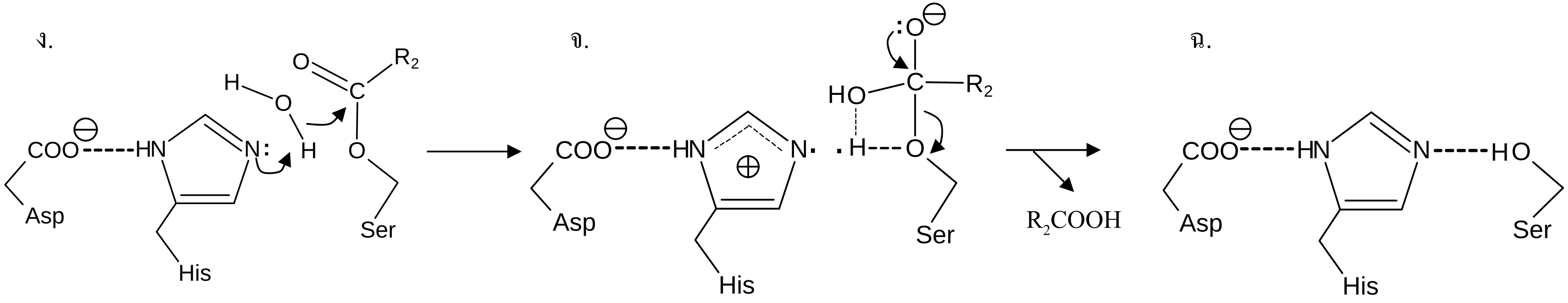


ภาพที่ 3 โครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดในคะตะไลติกไทรแอดของไลเปส
ที่มา: มนตรี (2542)

ปฏิกิริยาเติมหมู่เอซิล (Acylation)



ปฏิกิริยาสลายหมู่เอซิล (Deacylation)



ภาพที่ 4 กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาในบริเวณเร่งของไลเปส

ที่มา: ปราณี (2547) และ Wong (1995)

4. กลไกการเข้าทำปฏิกิริยาในบริเวณเร่งของไลเปส

ปราณี (2547); Wong (1995) จากภาพที่ 4 จะเห็นว่า กรดอะมิโนซีรีน (serine) ในบริเวณเร่งของไลเปส จะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนคู่ (nucleophile) และกรดอะมิโนฮิสทิดีน (histidine) หรือหมู่อิมิดาโซล จะทำหน้าที่เป็นตัวโปรโตเนต (protonate) หรือ เจนเนอรัลเบส (general base) จะสังเกตุเห็นได้ว่ากรดอะมิโนทั้ง 3 ตัวในคะตะไลติก ไทรแอด จะมีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงในระหว่างการเร่งการสลายตัวของซับสเตรต แต่เมื่อได้ผลผลิตของปฏิกิริยาแล้ว กรดอะมิโนเหล่านี้ก็จะกลับคืนสู่สภาพเดิม พร้อมที่จะจับกับซับสเตรตตัวใหม่ต่อไป กลไกการทำปฏิกิริยาของไลเปส เริ่มด้วยหมู่อิมิดาโซลของฮิสทิดีน จะทำหน้าที่เป็นตัวโปรโตเนต คือแยกโปรตรอนจากหมู่ไฮดรอกซีลของซีรีน และซีรีนจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนคู่ โดยออกซิเจนของซีรีนจะไปปะทะกับหมู่คาร์บอนิล (-C0-) ของซับสเตรต ทำให้ได้ผลผลิต R_1OH หลุดออกไปก่อน และมีส่วนที่เหลือเป็นเอซิลเอนไซม์ (acyl-enzyme) ตามรูป ค. ดังนั้นเรียกขั้นตอนจาก ก. ถึง ค. ว่า ปฏิกิริยาเติมหมู่เอซิล (Acylation) คือการเติมหมู่เอซิลของซับสเตรตให้กับเอนไซม์ จากนั้นแล้วเอซิลเอนไซม์ จะเข้าสู่ขั้นตอนของปฏิกิริยาสลายหมู่เอซิล (Deacylation) เพื่อแยกหมู่เอซิลออกไปจากเอนไซม์ โดยเริ่มจากหมู่อิมิดาโซลของฮิสทิดีน ที่ทำหน้าที่เป็นเจนเนอรัลเบสที่จะแยกโปรตรอน (H^+) จากโมเลกุลของน้ำ ทำให้เกิดการกระตุ้นให้ประจุของไฮดรอกซีล (OH^-) ไปปะทะกับหมู่คาร์บอนิลของเอซิลเอนไซม์ (รูป ง.) ผลที่ได้ทำให้เกิดการหลุดของผลผลิตตัวที่ 2 คือ R_2COOH และหลังจากนั้น อนุมูลของเอนไซม์จะกลับสู่สภาพเดิม (รูป จ. และ ฉ.)

5. การทำงานของไลเปส

เอนไซม์จากจุลินทรีย์ถูกแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม (Wong, 1995) ดังนี้

กลุ่มที่1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์กลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นอินเตอร์มีเดียท (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomanas fluorescens*

กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1, 3-specific lipase) บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไฮโดรไลส์ไตรกลีเซอไรด์ ได้กรดไขมันอิสระ และ 1, 2- หรือ 2, 3- ไดกลีเซอไรด์ และได้ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่เนื่องจาก กลีเซอไรด์ที่ได้นี้มักไม่เสถียร ถ้าให้เวลาในการย่อยนานขึ้นก็จะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 1, 3- ไดกลีเซอไรด์ และ 1- หรือ 3- โมโนกลีเซอไรด์ แต่ถ้าให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะได้กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างของไลเปสกลุ่มนี้ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* fluorescens, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, และไลเปสจากรำข้าว

กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวกความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลแต่ถ้ามีไดเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง

6. ปฏิกิริยาของไลเปส

ปฏิกิริยาของไลเปสมี 4 ปฏิกิริยา (Villeneuve *et al*., 2000) ดังนี้

6.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) คือ ปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ

$$R_1\text{-}\underset{\underset{O}{||}}{C}\text{-}OR_2 \;+\; H_2O \longrightarrow R_1\text{-}\underset{\underset{O}{||}}{C}\text{-}OH + \;R_2\text{-}OH$$

ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

6.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) หรือ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Ester synthesis) คือ ปฏิกิริยาสร้างพันธะเอสเทอร์กลับคืนมาเป็นไตรกลีเซอไรด์

$$R_1\text{-}\underset{\underset{O}{||}}{C}\text{-}OH \;+\; R_2\text{-}OH \longrightarrow R_1\text{-}\underset{\underset{O}{||}}{C}\text{-}OR_2 \;+\; H_2O$$

ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น

6.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (Transesterification) คือ ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ข้ามชนิดของกรดไขมัน ซึ่งประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 3 ปฏิกิริยาคือ

6.3.1 ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส (Acidolysis)

$$R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_2 + R_3-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OH \longrightarrow R_3-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_2 + R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OH$$

ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส

6.3.2 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis)

$$R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_2 + R_3-OH \longrightarrow R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_3 + R_2-OH$$

ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส

6.3.3 ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (Aminolysis)

$$R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_2 + R_3-NH_2 \longrightarrow R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-NHR_3 + R_2-OH$$

ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส

6.4 ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น (Inter-esterification) คือ ปฏิกิริยาสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จากการแลกเปลี่ยนกรดไขมัน

$$R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_2 + R_3-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_4 \longrightarrow R_3-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_2 + R_1-\underset{\underset{O}{||}}{C}-OR_4$$

ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น

เอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) (ปราณี, 2547)

1. ขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ

เอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดมากมาย (ปราณี, 2547) คือ

1.1 เอนไซม์อิสระไม่เสถียร

1.2 เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)

1.3 เอนไซม์อิสระใน *in vitro* ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้

1.4 เอนไซม์อิสระ ถ้าจะให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

1.5 เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในสารละลายของซับสเตรตและผลผลิต ทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน จะเกิดการปนเปื้อนในลักษณะสารปนเปื้อนโปรตีน (proteineous contaminants) โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิและพีเอชของโปรตีนชนิดนั้น จะแยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มเติม กล่าวคือผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง

1.6 เอนไซม์อิสระ มีสภาวะทำปฏิกิริยาจำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออุตสาหกรรมที่ต้องใช้เอนไซม์นั้นๆ

1.7 เอนไซม์อิสระ ส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลานในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้งานกับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆ เช่น ฟลูอิไดซ์เบด (fluidized bed), เบดบรรจุ (packed bed) ในระบบต่อเนื่องได้

1.8 เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

1.9 เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์ก่อน

1.10 เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูดหายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดของเอนไซม์อิสระเหล่านี้ จึงเป็นทางออกที่นำไปสู่การแก้ปัญหาโดยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ อย่างไรก็ตาม ผลกระทบที่เกิดจากเอนไซม์ตรึงรูปก็มีด้วยเช่นกัน

2. ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูป

ปราณี (2547) กิจกรรมเอนไซม์อาจถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วยและนอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปอาจมีปัญหากับซับสเตรตที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือซับสเตรตที่มีลักษณะแขวนลอยด้านการถ่ายเทมวลกับเอนไซม์ตรึงรูปซึ่งเป็นแคทาลิสต์แข็ง

3. ข้อดีของเอนไซม์ตรึงรูป

ข้อดีของเอนไซม์ตรึงรูป คือ สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงขึ้น และยังสามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชที่กว้างขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ (free enzyme) (Gonchar and Auslender 1996; Bayramoglu *et al.*, 2002) มีโอกาสเพิ่ม activity และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ถ้าวิธีที่ใช้เหมาะสม สามารถใช้ซ้ำได้ และใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพยุง (supporter) และลักษณะของซับสเตรต (substrate) เอนไซม์ที่นำมาตรึงไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนกับเอนไซม์บริสุทธิ์ และสุดท้ายราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์อิสระ (ปราณี, 2547)

4. พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ มีทั้งพอลิเมอร์ธรรมชาติเช่น ไคโตซาน (chitosan) เซลลูโลส (cellulose) เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์เช่น พอลิเอไมด์ (polyamide) พอลิโพรไพลีน (polypropylene) พอลิสไตรีน (polystyrene) พอลิเอธิลีน (polyethylene) พอลิเมทิลเมทาอะคริเลต (poly(methyl methacrylate), PMMA) และ พอลิเอทธิลีนไนมีน (polyethylenimine) เป็นต้น การใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ ถึงแม้ว่าจะมีราคาที่สูงกว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติ แต่ก็มีข้อดี (Bryjak and Kolarz, 1998) ดังนี้

4.1 ทนทานต่ออุณหภูมิและพีเอชที่รุนแรงและทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพได้ดี

4.2 คุณสมบัติของความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำ (hydrophilic-hydrophobic) สามารถปรับให้ตรงกับความต้องการได้โดยการเลือกโคมอโนเมอร์ (co-monomer) ที่เหมาะสมขณะทำการสังเคราะห์

4.3 สัณฐานวิทยา (morphology) สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการเลือกชนิดและสารเฉื่อย (inert diluents) ขณะทำการสังเคราะห์

4.4 การปรับสภาพผิว (surface modifications) สามารถทำได้ด้วยการเติมหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive groups)

5. วิธีการตรึงรูป

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ (ปราณี, 2547) คือ การเชื่อมกับตัวพยุง การเชื่อมขวาง และการห่อหุ้ม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

5.1 วิธีการเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier binding method) การตรึงเอนไซม์ด้วยการเชื่อมกับตัวพยุง สามารถกระทำได้ 3 วิธีคือ วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method) วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (Ionic binding method) และวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent binding method)

5.1.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method) คือ การดูดซับของเอนไซม์บนพื้นผิวภายนอกของตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ วิธีการตรึงรูปวิธีนี้จะไม่มีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมีเกิดขึ้น และแรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อนมาก ดังนั้นการนำตัวพยุงกลับมาใช้ซ้ำสามารถทำได้ง่าย เหมาะกับตัวพยุงราคาแพง ซึ่งพันธะที่เกิดขึ้นในวิธีนี้จะเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงวานเดอวาลล์ (van der waals force) และไฮโดรโฟรบิกอินเทอร์แอคชั่น (hydrophobic interaction) และวิธีนี้อาจมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์บ้างเล็กน้อยในลักษณะของการหมุนตัวของเอนไซม์เพื่อจับกับซับสเตรต (stereospecific effect) การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพยุงที่ใช้ตรึง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทิ้งไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกตัวด้วยการเหวี่ยงหรือการกรอง ตัวอย่างตัวพยุงที่นิยมใช้ตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ เบนโทไนต์ (bentonite), เจลแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate gel), ถ่านกัมมันต์ (activated carbon), แก้วพรุน (porous glass), โคลนกรด (acid clay), คาโอลิไนต์ (kaolinite), อะลูมินา (alumina) และพอลิเมอร์ธรรมชาติ อาทิ แป้ง กลูเทน คอลลาเจน

5.1.2. วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (Ionic binding method) คือการเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำโดยใช้พันธะไอออนิก ตัวอย่างตัวพยุงที่นิยมใช้ตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ สารที่มีอนุมูลแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange residue) เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เป็นต้น ซึ่งอนุมูลประจุในตัวพยุงและในเอนไซม์ต้องต่างกัน เช่น เอนไซม์มีอนุมูลประจุบวก (anionic residue) เช่น กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และตัวพยุงมีอนุมูลประจุลบ (cationic residue) เช่น DEAE-cellulose และ DEAE-sephadex เป็นต้น

5.1.3. วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent binding method) คือการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ วิธีนี้มีผู้นำมาศึกษามากที่สุด การตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนท์สามารถทำได้ 7 วิธีย่อยๆ ดังนี้

ก. วิธีไดอะโซ (Diazo method) คือการสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์และตัวพยุงที่มีอนุพันธ์ไดอะโซเนียม ($-N^+=N$) เรียกกระบวนการนี้ว่า ไดอะโซไทเซชั่น (diazotization) เช่น ตัวพยุงที่มี aromatic amino group ($R-Y-NH_2$) ดังปฏิกิริยา

$$\text{R-Y-NH}_2 \xrightarrow{\text{NaNO}_2\text{ / HCl}} (\text{R-Y-N}^{+}\equiv\text{N})\text{Cl}^{-} \xrightarrow{\text{Enzyme}} \text{R-Y-N=N-enzyme}$$

เอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะโควาเลนท์โดยวิธีนี้ได้แก่ เอนไซม์ที่มีหมู่อะมิโนอิสระมีหมู่อิมิดาโซลหรือหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซิล

ข. วิธีการเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide binding method) คือ การเชื่อมระหว่างโมเลกุลเอนไซม์และตัวพยุง ด้วยพันธะเปปไทด์สังเคราะห์ (-CO-NH-) ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ

1) ตัวพยุงมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ถูกทำให้เป็นอนุพันธ์ที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อนุพันธ์ของ acid azide , คลอไรด์ม ไอโซไซยาเนต เป็นต้น แล้วเชื่อมกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ตัวพยุงถูกทำให้เป็นอนุพันธ์คลอไรด์ ดังนี้

$$\text{R-COOH} \xrightarrow{\text{SOCl}_2} \text{R-COCl} \xrightarrow{\text{NH}_2\text{-enzyme}} \text{R-CONH-enzyme}$$

2) ใช้สารควบแน่น ได้แก่ คาร์โบไดอิไมด์ (carbodiimide) , Woodward's reagent K เป็นตัวกลางสร้างพันธะเปปไทด์ เมื่อพันธะเปปไทด์เกิดขึ้นแล้ว สารควบแน่นจะถูกปล่อยกลับคืนมาดังเดิม

ค. วิธีการเติมหมู่อัลคิล (Alkylation method) คือการเชื่อมพันธะโควาเลนท์ระหว่างหมู่ อะมิโน ฟีนอลิก หรือซัลไฟดริล ของเอนไซม์กับหมู่เฮไลด์ (halide) ของตัวพยุงแบบ alkylation ดังปฏิกิริยา

$$\text{Cellulose-OH} \xrightarrow[\text{BrCH}_2\text{COOH, dioxane}]{\text{BrCH}_2\text{COBr}} \text{Cellulose-OCOCH}_2\text{Br} \xrightarrow{\text{Enzyme}}$$

$$\xrightarrow{\text{alkylation}} \text{Cellulose-OCOCH}_2\text{-enzyme}$$

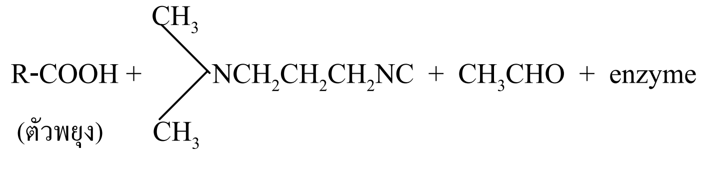
ง. วิธีการเชื่อมพันธะด้วยสารมีหน้าที่คู่ (Bifunctional reagents binding method) การเชื่อมขวางระหว่างตัวพยุง และเอนไซม์ ด้วยสารเชื่อมขวาง (cross-linkers) ซึ่งจะเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของตัวพยุงกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ สารเชื่อมขวางอาจเป็นพวกสารมีหน้าที่คู่ (bifunctional reagents) หรือมีหมู่ 2 หมู่ทำหน้าที่เดียวกัน ตัวอย่างสารมีหน้าที่คู่ที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น กลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งมีหมู่อัลดีไฮด์ 2 หมู่ ที่สามารถเชื่อมกับหมู่อะมิโนของตัวพยุงกับเอนไซม์ ด้วยวิธีการสร้างชิฟเบส (Schiff base) ดังปฏิกิริยา

$$\text{Carrier-NH}_2 + \text{OHC-(CH}_2)_3\text{-CHO} + \text{H}_2\text{N-enzyme} \xrightarrow{-2\,H_2O}$$

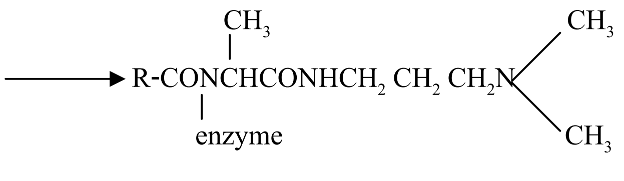
$$\longrightarrow \text{Carrier-N=CH-(CH}_2)_3\text{-CH=N-enzyme}$$

Schiff base

จ. วิธีการเชื่อมกับตัวพยุงด้วยปฏิกิริยาอูจิ (Ugi reaction binding method) เป็นวิธีผสมของการทำให้สารประกอบในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยหมู่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น ไอโซไซยาไนด์ (isocyanide, R_4), อัลดีไฮด์ (aldehyde, R_1), คีโตน (ketone, R_2), คาร์บอกซิล (carboxyl, R_5), เอมีน (amine, R_3) ทั้งนี้ตัวพยุงและเอนไซม์ต้องมีหมู่ไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้อย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ เพื่อทำให้เกิด N-substituted amide (R_4-NH-CO-CR_1R_2-NR_3-CO-R_5) ทั้งนี้ตัวพยุงต้องเป็นตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างวิธีการเชื่อมกับตัวพยุงด้วยปฏิกิริยาอูจิ โดยที่ตัวพยุงมีหมู่คาร์บอกซิล (R-COOH) ดังปฏิกิริยา



(3-dimethylaminopropylisocyanide)



สมการข้างต้นนี้ ตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำมีหมู่คาร์บอกซิล (R_5) ผสมรวมกับสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีหมู่อะมิโน (R_3, H_2N-enzyme) จากนั้นเติมอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde (R_1,CH_3CHO) และ 3-dimethylaminopropylisocyanide (R_4) กวนสารละลายทั้งหมดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่พีเอช 6.5 ซึ่งปรับโดยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 นอร์มอล (0.5N HCl) จะได้เอนไซม์ตรึงรูปในลักษณะ N-substituted amide

ฉ. วิธีการเชื่อมพันธะโดยการแลกเปลี่ยนหมู่ไทออล (thiol, -SH) เป็นไดซัลไฟด์ (disulfide) ซึ่งเป็นวิธีการตรึงรูปแบบแลกเปลี่ยนหมู่ไทออลของเอนไซม์และตัวพยุง ซึ่งการตรึงรูปวิธีนี้ค่อนข้างจำกัดกับเอนไซม์ยูริเอส เท่านั้น (มีหมู่ไทออล) แต่ปัจจุบันก็มีการศึกษากับเอนไซม์ที่ไม่มีหมู่ไทออล เช่น แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งต้องเติมหมู่ไทออล (thiolation) ให้กับเอนไซม์ก่อน

ช. วิธีการเชื่อมพันธะกับตัวพยุงด้วยวิธีอื่นๆ ได้แก่

1) การใช้แป้งไดอัลดีไฮด์ (dialdehyde starch, OHC-starch-CHO) ซึ่งเป็นตัวพยุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ 2 หมู่ สามารถใช้เป็นตัวพยุงในการจับกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์แบบปฏิกิริยาชิฟเบส ได้แก่ การตรึงรูปปาเปน

2) การใช้พอลี (4-ฟอร์มิล-เมทอกซีฟีนอล) เมทาอะคริเลต (poly(4-formyl-methoxyphenol) methacrylate) เป็นตัวพยุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ที่ไวต่อปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของเอนไซม์เช่นเดียว กับ ข้อ ก.

3) วิธีการสร้างพันธะกัวอะนิดีน (Guanidine)

4) วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ร่วมกับโคแฟกเตอร์

5.2 วิธีการเชื่อมขวาง (Cross-linking method) การทำเอนไซม์ตรึงรูปวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับวิธีการสร้างพันธะโควาเลนท์ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุง เอนไซม์จะถูกตรึงรูปอยู่ได้โดยการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ โดยอาศัยสารเชื่อมขวางทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุลหรือมากกว่า (bi-or multifunctional reagents) หรือ เรียกสารเชื่อม

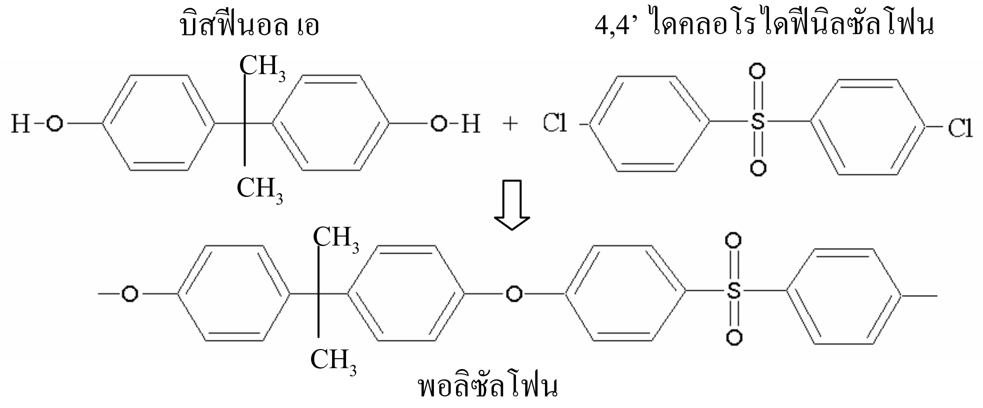
ขวาง (cross-linkers) ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ละลายน้ำได้น้อยลง ตัวอย่างสารเชื่อมขวางได้แก่ กลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) อนุพันธ์ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate derivative) อนุพันธ์ไอโซไซยาเนต (isocyanate derivative) และ ไบซ์ไดอะโซเบนซิดีน (bisdiazobenzidine) เป็นต้น และเนื่องจากวิธีนี้ก่อให้เกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ ฉะนั้นจะมีผลต่อโครงรูปสามมิติ และกิจกรรมเอนไซม์ได้ง่าย

5.3 วิธีการห่อหุ้ม (Entrapping method) เป็นวิธีการตรึงรูปแบบรวมเอนไซม์อิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์ หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้มีสารซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมี โดยที่การตรึงจะไม่มีการเชื่อมพันธะเคมีใด ๆ ระหว่างเอนไซม์และพอลิเมอร์ หรือแผ่นเมมเบรนที่ล้อมรอบ ดังนั้น จึงสามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิดรวมทั้งเซลล์ และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ทั้งที่มีขนาดและคุณสมบัติแตกต่างกันก็ตาม การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับการตรึงเอนไซม์ที่ใช้พันธะทางเคมี

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟนที่ใช้ในงานวิจัย

1. พอลิซัลโฟน (Polysulfone, PSU)

พอลิซัลโฟน (Polysulfone) เป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างที่สร้างขึ้นจากมอนอเมอร์ของ 4,4' ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟน (4,4'-dichlorodiphenylsulfone) และบิสฟีนอล เอ (bisphenol A)



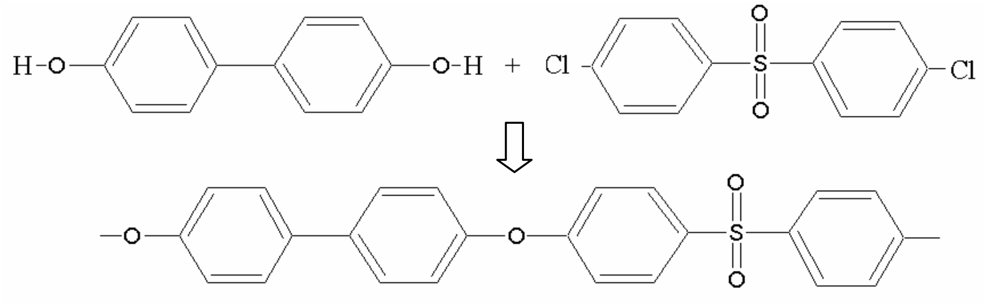
ภาพที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของพอลิซัลโฟน และมอนอเมอร์ 4,4' ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟนและบิสฟีนอล เอ

พอลิซัลโฟนที่ผู้วิจัยใช้ในการทดลองนี้ มีชื่อทางการค้าว่า พอลิซัลโฟนยูเดล(Polysulfone, UDEL) หรือใช้สัญลักษณ์ย่อว่า พอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) มีโครงสร้างทางเคมี แสดงดังภาพที่ 11 เป็นเทอร์โมพลาสติกพอลิเมอร์ที่มีลักษณะโปร่งใสและมีความแข็ง เหนียว มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามจำนวน (number average molecular weight, M_n) เท่ากับ 26,000 และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามน้ำหนัก (weight average molecular weight, M_w) เท่ากับ 56,000 ซึ่งมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (glass transition temperature, T_g) ประมาณ 190 องศาเซลเซียส

2. พอลิฟีนิลซัลโฟน (Polyphenylsulfone, PPSU)

พอลิฟีนิลซัลโฟน (Polyphenylsulfone) เป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างที่สร้างขึ้นจากมอนอเมอร์ของ 4,4' ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟน (4,4'-dichlorodiphenylsulfone) และไบฟีนอล (biphenol)

ไบฟีนอล 4,4’ ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟน



พอลิฟีนิลซัลโฟน

ภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของพอลิฟีนิลซัลโฟน และมอนอเมอร์ 4,4’ ไดคลอโรไดฟีนิลซัลโฟน และไบฟีนอล

พอลิฟีนิลซัลโฟนที่ผู้วิจัยใช้ในการทดลองนี้ มีชื่อทางการค้าว่า พอลิฟีนิลซัลโฟน เรเดลอาร์ (Polyphenylsulfone, RADEL R) หรือใช้สัญลักษณ์ย่อว่า พีพอลิซัลโฟนยูเดล (PPSU) มีโครงสร้างทางเคมี แสดงดังภาพที่ 12 และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามจำนวน (number average molecular weight, M_n) เท่ากับ 24,000 และมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามน้ำหนัก (weight average molecular weight, M_w) เท่ากับ 63,000 ซึ่งมีอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (glass transition temperature, T_g) ประมาณ 220 องศาเซลเซียส พอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ เป็นเทอร์โมพลาสติกพอลิเมอร์ที่มีลักษณะโปร่งใสและมีความแข็ง เหนียว ซึ่งพอลิเมอร์ดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากบริษัทโซลเวย์แอดวานซ์พอลิเมอร์ (Solvay Advanced Polymers) ประเทศสหรัฐอเมริกา คุณสมบัติทั่วไปของพอลิซัลโฟนยูเดล และพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทั่วไปของพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) และพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ (PPSU)

คุณสมบัติ	ระดับ	
	PSU	PPSU
Thermal stability/heat resistance	1	1
Flammability/heat release	2	1
Impact resistance	2	1
Dimensional stability	1	1
Hydrolytic stability	1	1
Withstands steam sterilization	1	1
Withstands steam sterilization with morpholine	3	1
Chemical resistance-organics	3	2
Acid resistance	1	1
Base resistance	1	1
Biocompatibility	1	1
Transparency	1	1
Colorability	1	1
Processability	1	1

หมายเหตุ ระดับ 1 คือ คาดว่าแสดงผลออกมาได้ดีหรือส่งผลดีต่อการประยุกต์ใช้อย่างสูงสุด
ระดับ 2 คือ เพียงพอสำหรับการประยุกต์ใช้ต่างๆ ที่ต้องการแต่ยังมีข้อจำกัด
ระดับ 3 คือ มีข้อจำกัดหรือ คาดว่าประสิทธิภาพต่ำ

ที่มา: http://www.solvay.com (2550)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการเติมหมู่เอมีนให้กับพอลิเมอร์

สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา (เลขที่ 6,878,803) ระบุวิธีการเติมหมู่ไนโตร (Nitrating) และหมู่เอมีน (Aminating) บนเอริลพอลิเมอร์ โดยการละลายเอริลพอลิเมอร์ในกรดซัลฟุริกเข้มข้นควรทำที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง 5 องศาเซลเซียส แล้วเติมกรดไนตริก ควรทำที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5 ถึง 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นให้กวนสารตลอดการทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตกตะกอนและล้างตะกอนหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งกรดที่เกินหลุดออกจนหมด ส่วนการเตรียมอะมิเนตเอริลพอลิเมอร์ต่อ (Aminated aryl polymer) ทำได้โดยนำไนเตรตเอริลพอลิเมอร์ไปละลายในสารละลายอะโปรติกโพลาร์ (Aprotic polar solvent) และทำการรีดิวซิ่ง (Reducing) โดยรีดิวซิ่งเอเจนต์ (Reducing agent) สารละลายอะโปรติกโพลาร์ (Aprotic polar solvent) ที่สามารถเลือกใช้ได้ ได้แก่ ไดเมทิลฟอร์มเอมายด์ (Dimethylformamide, DMF) ไดเมทิลอะเซตเอมายด์ (Dimethylacetamide, DMAc) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide, DMSO) หรือ เมทิลไพโรลิโดน (N-methylpyrrolidone, NMP) รีดิวซิ่ง เอเจนต์ (Reducing agent) ได้แก่ โซเดียมไดไทโอไนต์ (Sodium dithionite) (Na.sub.2 S.sub.2 O.sub.4) ปฏิกิริยารีดักชั่นเกิดที่อุณหภูมิ 60 ถึง 180 องศาเซลเซียส

Ghosh *et al.* (2000) ศึกษาการสังเคราะห์ การจำแนกคุณลักษณะ และคุณสมบัติของไนเตรตพอลิซัลโฟน เมมเบรน (Nitrated polysulfone membranes) โดยละลายพอลิซัลโฟนใน 1,2 ไดคลอโรอีเทน (1,2 dichloro ethane) ให้มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เติมกรดไนตริกเข้มข้น ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ตกตะกอนในเฮกเซน (Hexane) ได้เป็นไนเตรตพอลิซัลโฟน ล้างด้วยอะซิโตน และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ นำพอลิเมอร์ที่ได้ไปทำเป็นแผ่นเมมเบรน โดยละลายพอลิเมอร์ 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในสารละลายผสมของ 1,4 ไดออกเซน (1,4 dioxane) และไดเมทิลอะซิเตต (Dimethylacetate, DMAc) นำสารละลายไปกรองและแผ่ออกเป็นแผ่นบนกระจกเรียบที่สะอาด หลังจากสารละลายระเหย ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 40 เปอร์เซ็นต์ นำเมมเบรนที่ได้ไปวิเคราะห์ พบว่า ไนเตรตพอลิซัลโฟนเมมเบรนเป็นตัวแยกที่มีความสามารถสูง สำหรับพอลิวาเลนซ์ แอนไอออนิก อิเล็กทรอไลต์ (Polyvalent anionic electrolyte)

Son *et al.* (2002) ได้ศึกษาการวิเคราะห์คุณสมบัติของพอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟน หรือเรียกสั้นๆว่าพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) ที่ถูกปรับปรุงด้วยการเติมหมู่เอมีนด้วยวิธีการแลกเปลี่ยน

ประจุลบ โดยการปรับปรุงพื้นผิวนี้จะเริ่มจากนำพีเอสเอฟ มาทำปฏิกริยาไนเตรชั่น (เติมหมู่ไนโตรจะเข้าไปเกาะกับวงเฟนนิล (Phynyl ring)) ด้วยการเติมกรดไนตริกและกรดซัลฟูริก (HNO_3/HSO_4) ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำ เกิดปฏิกริยารีดักส์ชั่น (Reduction reaction) โดยเติมทินทูคลอไรด์ในเอธานอล เพื่อเปลี่ยนจากหมู่ไนโตรให้เป็นหมู่เอมีน ซึ่งเรียกผลิตภัณฑ์นี้สั้นๆ ว่าเป็น 1°-APSU ซึ่งมีการตรวจสอบยืนยันโครงสร้างด้วยเอฟทีไออาร์ พบว่าไม่ปรากฏแบนด์ ที่แสดงถึงการมีหมู่ไนโตร (1532 cm^{-1}) แต่จะพบแบนด์ที่มีจุดยอดอยู่ที่ 3372 และ 3461 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงมีหมู่เอมีนเท่านั้น จากนั้นการวิเคราะห์ด้วยเอช-เอ็นเอ็มอาร์ สเปคโตรสโคพี (H-NMR Spectroscopy) พบว่ามีแบนด์ที่แสดงถึงโปรตอนของหมู่เอมีน และยังพบว่าหมู่เอมีนนี้จะเข้าเกาะวงเฟนนิลที่ตำแหน่งเมต้า (Meta position) นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยดิฟเฟอเรนเชียล สแกนนิ่ง แคโลริเมททรี่ (ดีเอสซี) (Differential Scanning Calorimetry) พบว่าค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (T_g) ของ 1°-APSU มีค่า 170 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าของพีเอสเอฟ (183 องศาเซลเซียส) เนื่องจากการเติมหมู่เอมีน ทำให้โครงสร้างของพอลิเมอร์ไม่สมมาตร และการวิเคราะห์ด้วยเทอร์มอกราวิเมททริก (Thermogravimetric analysis) พบว่าการเติมหมู่เอมีนทำให้ความสามารถของพอลิเมอร์ที่ทนต่อความร้อนและออกซิเจน (Thermooxidative stability) มีค่าลดลง โดยพบว่ามีการลดลงของน้ำหนักไป 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ 446 องศาเซลเซียส นั่นแสดงถึงหมู่เอมีนจะไปทำให้การสลายตัว (Degradation) เกิดได้ง่ายขึ้น สำหรับความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange capacity) ของ 1°-APSU ที่วัดด้วยวิธีไตเตรชั่น (Potentiometric titration) เท่ากับ 2.24 meq /g นอกจากนี้การวิเคราะห์หาจำนวนหมู่เอมีนต่อ 1 เมอร์ของพอลิเมอร์ด้วยอิเลเมนทอลอะนาไลซิส (Elemental Analysis, EA) พบว่าในแต่ละ 1 เมอร์จะมีหมู่เอมีนจำนวน 2 หมู่โดยเฉลี่ย

Pugazhenthi and Kumar (2004) ศึกษาการนำแผ่นเมมเบรนเอนไซม์ไปใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของน้ำมันโอลีฟ (Olive Oil) เมื่อตรึงเอนไซม์บนแผ่นพอลิเมอร์ที่ผ่านการปรับปรุงคุณสมบัติแล้ว เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปสบนแผ่นเมมเบนแล้วจะนำแผ่นเมมเบรนไปใช้ในเครื่อง Biphatic Enzyme Membrane Reactor (EMR) พอลิเมอร์ที่นำมาใช้คือ Poly(methacrylate-ethylene glycol dimethacrylate) หรือ PMMA-EGDM โดยจะเกิดพันธะโควาเลนซ์ขึ้นระหว่างเอนไซม์และเมมเบรนจาก Active Bridge Molecules จากการทดลองพบว่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Activity) จะขึ้นกับความชอบน้ำของแผ่นเมมเบรน (Hydrophylic) จึงได้ทำการปรับปรุงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ โดยวิธีการเติมก๊าซ NO_X (ผสมระหว่าง NO และ NO_2) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ลงบนเรซินพอลิเมอร์ ที่บรรจุในถังสำหรับปฏิกิริยาไนเตรชั่นและเข้าเตาอบ

ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเสื่อมสภาพ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะได้แผ่นเมมเบรนที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ เรียกว่า ไนเตรตเมมเบรน (Nitrated Membrane) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับไฮดราซีนไฮเดรต 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น จากหมู่ไนโตรไปเป็นหมู่เอมีนบนแผ่นพอลิเมอร์ เรียกว่าเอมีเนตเมมเบรน (Aminated Membrane) จากการทดลองสรุปได้ว่า เมื่อตรึงเอนไซม์บนแผ่นเมมเบรนจะทำให้เอนไซม์มีความคงตัวสูงขึ้น และสามารถทำปฏิกิริยาได้มากกว่า 50 ชั่วโมงเป็นระยะเวลามากกว่า 25 วัน โดยความสามารถในการทำงานไม่เปลี่ยนแปลง (ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์) และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกตรึงสูงขึ้น 39 เปอร์เซ็นต์

Chowdhury *et al.* (2001) ศึกษาคุณสมบัติของพอลิซัลโฟนที่ผ่านการปรับปรุงโดยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น (Ultrafiltration, UF) โดยใช้ก๊าซ NO_X (ผสมระหว่าง NO และ NO_2) ขั้นตอนการปรับปรุงเมนเบรนเริ่มจาก ไล่ก๊าซภายในขวดแก้ว (บรรจุเมม- เบรนเรียบร้อย) โดยให้ความร้อนให้ก๊าซขยายตัว และถูกปล่อยออกผ่านหลอดที่ต่อเข้ากับขวดแก้ว หลังจากเข้าสู่สมดุล (โดยเก็บไว้ในเตาเผาเพื่อรักษาอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา) ให้นำหลอดที่ต่อกับขวดแก้วออก แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปล่อยก๊าซ NO_X เข้าขวดแก้วที่ความดัน 1.0133×10^5 Pa แล้วเข้าเตาอบที่ 100 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยา) หลังจากเกิดปฏิกิริยาไนเตรชั่นสมบรูณ์ ปล่อยให้ขวดแก้วเย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำแผ่นเมมเบรนออก เรียกเมมเบรนนี้ว่า ไนเตรตเมมเบรน (Nitrated Membrane) การเติมหมู่เอมีน (Amination) ทำได้โดย ให้ไนเตรตเมมเบรนทำปฏิกิริยากับไฮดราซีนไฮเดรต ปริมาณ 50 มิลลิลิตร 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่นก่อนการนำไปวัดค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุ โดยพบว่ามีเอมีน 2 หมู่ที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ต่อหนึ่งเมอร์ของพอลิเมอร์

Sinha *et al.* (2003) ศึกษาการทำ nitration ของ พอลิเมททิลเมทาครายเลท- (Poly(Methyl Methacrylate)Ethylene Glycol Dimethylacrylate) หรือ พีเอ็มเอ็มเอ-อีจีดีเอ็ม (PMMA-EGDM) ในที่นี้เรียกสั้นๆว่าเรซิน 1 (resin 1) ด้วยการให้ทำปฏิกิริยากับก๊าซ NO_x ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ได้พอลิเมอร์ที่มีหมู่ไนโตรเกาะอยู่ที่หมู่เมธิล (Methyl group) ซึ่งเกาะอยู่กับคาร์บอนอะตอมของสายโซ่หลัก เรียกสั้นๆว่าเรซิน 2 (Resin 2) จากนั้นนำเรซิน 2 นี้มาทำปฏิกริยาแอมมิเนชั่น (Amination) เพื่อเปลี่ยนจากหมู่ไนโตรให้เป็นหมู่เอมีนโดยเติมไฮดราซีนไฮเดรต (Hydrazine hydrate) และปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมง ได้พอลิเมอร์ที่มีหมู่เอมีนซึ่งเรียกสั้นๆว่าเรซิน 3 (Resin 3) ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของเรซิน 2 และเรซิน 3 ด้วย

ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด (Fourier Transform Infrared) หรือเรียกว่าเอฟทีไออาร์ (FTIR) คือ สำหรับเรซิน 2 จะพบแบนด์ (Band) ที่มีจุดยอด (Peak) อยู่ที่ 1400 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงการมีหมู่ไนโตร เท่านั้น และสำหรับเรซิน 3 จะพบว่าแบนด์ที่มีจุดยอดอยู่ที่ 3200 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึงมีหมู่เอมีนเท่านั้น และไม่พบแบนด์ที่แสดงถึงการมีตัวตนของหมู่ไนโตร (1400 cm^{-1})

Gancarz *et al.* (2003) ศึกษาเทคนิคการทำพลาสมา (Plasma) ซึ่งเป็นวิธีที่เกี่ยวกับไบโอเมดิคอล (Biomedical) เทคนิคนี้ได้เสนอว่าสารจำนวนมากที่เข้าไปทำปฏิกิริยาที่ผิวด้านบนวัสดุ จะส่งผลทำให้ลักษณะพื้นผิวทั้งหมดเกิดการเปลี่ยนแปลงและมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยามากขึ้น หลังจากทำการบำบัด (Treatment) เราไม่สามารถที่จะทำนายกลุ่มที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นจึงต้องใช้เครื่อง เอฟทีไออาร์เอทีอาร์ เอ็กพีเอสสเปคโทรสโครปี และการวัดมุมสัมผัส เพื่อดูการปรากฏของหมู่เอมีนและความมีขั้ว วิธีการทดลองขั้นแรก คือ การทำแผ่นพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) โดยการนำพอลิซัลโฟนมาเจือจางในสารละลายคลอโรฟอร์ม 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากนั้นเทลงไปในผิวกระจกเรียบนำไปอบ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จะได้แผ่นพอลิซัลโฟนยูเดล ซึ่งมีความหนา 50 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 78 มิลลิเมตร ขั้นตอนต่อมา คือ การทำพลาสมาทรีทเมนต์ (plasma treatment) เทคนิคนี้จะใช้ความถี่ในการสั่น 125 เฮิร์ต โดยการนำแผ่นพอลิซัลโฟนยูเดล ติดตั้งเข้ากับเครื่องมือ จากนั้นจะทำการปล่อยก๊าซเข้าไปทำปฏิกิริยาบนผิวแผ่นพอลิซัลโฟนยูเดล โดยการทดลองนี้จะทำการปล่อยก๊าซจำนวน 6 ชนิดเปรียบเทียบกัน ได้แก่ แอมโมเนีย (Ammonia gas) เอ็นบิวทิลเอมีน (n-Butyl amine) แอลลีลเอมีน (Allylamine) แอมโมเนียกับก๊าซอาร์กอน (Ammonia gas and Argon) เอ็นบิวทิลเอมีนกับก๊าซอาร์กอน (n-Butyl amine and Argon) และแอลลีลเอมีนกับก๊าซอาร์กอน (Allylamine and Argon) โดยตำแหน่งที่เอมีนเกาะบนผิวของแผ่นพอลิซัลโฟนยูเดล สามารถอยู่ในตำแหน่งที่หลากหลาย ผลที่ทำการวิเคราะห์จะอยู่ในรูปของแรงตึงผิว ซึ่งแบ่งเป็นสองแบบ คือ แรงตึงผิวเนื่องจากความมีขั้ว และแรงตึงผิวเนื่องจากการกระจายตัว พอลิซัลโฟนยูเดลที่ศึกษาค่อนข้างจะเป็นไฮโดรโฟบิกพอลิเมอร์ มีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 45.9 mN/m ประกอบด้วยส่วนแรงตึงผิวเนื่องจากความมีขั้ว 0.9 mN/m และแรงตึงผิวเนื่องจากการกระจายตัว 45 mN/m เอ็นบิวทิลเอมีนพลาสมาจะทำให้ผิวของพอลิเมอร์มีความเป็นไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวจะมีค่าลดลง แรงตึงผิวเนื่องจากความมีขั้วจะมีค่าเพิ่มขึ้น 7 – 13 เท่า เมื่อเทียบกับพอลิซัลโฟนยูเดล เอ็นบิวทิลเอมีน อาร์กอนพลาสมาจะเกิดแรงตึงผิวเนื่องจากความมีขั้วมีค่าสูงที่สุดในการทดลอง ซึ่งผลรวมของแรงตึงผิวเท่ากับ 72.3 mN/m แสดงถึงความเป็นไฮโดรฟิลิกมากเพราะค่าแรงตึงผิวมีค่าสูงกว่า 70 mN/m ส่วนแอลลีลเอมีนพลาสมา ที่ระยะทางระหว่างพลาสมากับตัวอย่างที่ทดสอบ 46 และ 65 มิลลิเมตร จะมีค่าใกล้เคียงกับเอ็นบิวทิลเอมีน

อาร์กอนพลาสมา ส่วนแอลลีลเอมีน อาร์กอนพลาสมา ผลของแรงตึงผิวจะเกิดเนื่องจากความมีขั้วซึ่งมีค่ามากที่สุดในการทดลอง ส่วนค่าแรงตึงผิวเนื่องจากการกระจายตัวจะมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองในส่วนของเอ็นบิวทิลเอมีนพลาสมา ทำให้ค่าแรงตึงผิวรวมมีค่ามากกว่า 70 mN/m ซึ่งแบ่งเป็นแรงตึงผิวเนื่องจากความมีขั้วกับแรงตึงผิวเนื่องจากการกระจายตัวในค่าที่เท่าๆกัน ต่อมาทำการวิเคราะห์ด้วยเอ็กพีเอส (XPS) ซึ่งใช้วิเคราะห์องค์ประกอบของผิวของตัวอย่างพอลิซัลโฟนยูเดลที่มีการปรับปรุงแล้ว ในการตรวจสอบกับพอลิซัลโฟนยูเดลดังเดิมจะพบคาร์บอน ออกซิเจนและซัลเฟอร์ การตรวจพบไนโตรเจนบนผิวที่ประกอบด้วยพลาสมา พบว่าไนโตรเจนจะมีค่าลดลงกรณีที่พลาสมาประกอบด้วยอาร์กอนและที่ระยะทาง ระหว่างพลาสมากับตัวอย่างที่ทดสอบเพิ่มขึ้นในกรณีแอลลีลเอมีนพลาสมา และแอลลีลเอมีน อาร์กอนพลาสมาจะพบว่า เปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนจะมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับซึ่งเป็นค่าที่มากที่สุด ส่วนเปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์ จากการตรวจพบของทุกพลาสมาที่ทดลองจะมีค่าเปอร์เซ็นต์ซัลเฟอร์ต่ำกว่าพอลิซัลโฟนยูเดล ในกรณีของแอลลีลเอมีน อาร์กอนพลาสมา จะไม่พบเปอร์เซ็นต์ของซัลเฟอร์อยู่เลย เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจนของทุกพลาสมาที่ระยะระหว่างพลาสมากับตัวอย่างที่ทดสอบสั้นๆ จะมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับพอลิซัลโฟนยูเดล แต่จะมีค่าเพิ่มขึ้นสำหรับทุกๆพลาสมาที่ระยะทางทดสอบห่างๆ ยกเว้นแอลลีลเอมีนอาร์กอนพลาสมา จะมีเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับพอลิซัลโฟนยูเดล ซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับระยะทาง ส่วนเปอร์เซ็นต์คาร์บอนจะมีค่าเปลี่ยนแปลงจากพอลิซัลโฟนยูเดลเพียงเล็กน้อยสำหรับทุกพลาสมา จากพลังงานพันธะตามรายงาน -C-C- เท่ากับ 284.5 eV, C-S , C-N เท่ากับ 285.6 eV, C-O , C=N เท่ากับ 286.6 eV, C=O , O=C-NH เท่ากับ 287.8 eV, C ≡ N เท่ากับ 288.5 eV เพื่อนำมาตรวจสอบหาค่า e^V / relative fraction (เปอร์เซ็นต์) ของทุกพลาสมาจะพบว่าค่า e^V / relative fraction (เปอร์เซ็นต์) ของ C-C จะมีค่าสูงใกล้เคียงกันทุกพลาสมา ค่า e^V / relative fraction (เปอร์เซ็นต์) ของ C-N จะมีค่าคงที่สม่ำเสมอ ไม่ขึ้นกับระยะทางที่ทดสอบ ส่วนค่า e^V / relative fraction (เปอร์เซ็นต์) ของ C=N ของแอลลีลเอมีนพลาสมาจะมีค่าสูงที่สุด และค่า e^V / relative fraction (เปอร์เซ็นต์) ของ C=O , C ≡ N ของแอมโมเนียพลาสมาจะมีค่าสูงที่สุด ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าถ้ามีการพบ C-N , C=N , C ≡ N ในค่าที่สูงจะแสดงว่าพอลิเมอร์มีความเป็นไฮโดรฟิลิกสูง แต่สำหรับรายงานนี้จะสนใจความสัมพันธ์ของพันธะ C-N มากกว่าซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับเอมีนที่ผิวของพอลิเมอร์ได้

Lauwiner *et al.* (1998) ศึกษาการทำปฏิกิริยารีดักชั่นของสารประกอบไนโตรอะโรมาติก (Aromatic Nitro Compounds) โดยใช้ไฮดราซินไฮเดรต (Hydrazine Hydrate) และมีไอรอน

ออกไซด์ไฮดรอกไซด์ (Iron Oxide Hydroxide) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการทดลองจากสารเริ่มต้นเป็นไนโตรเบนซีนที่มีหมู่ต่างๆมาเกาะ (Monosubstituted Nitrobenzene) ปริมาณ 10 มิลลิโมลในเอธานอล หรือน้ำ 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยา ระหว่างการให้ความร้อนจะกำจัดสารละลายออกด้วยไอของไนโตรเจน จากนั้นเติมตัวเร่งปฏิกิริยา และไฮดราซีน ไฮเดรต ตามเลขการดุลมวล (Stoichiometric) (ประมาณ 15 mmol) หลังจากทำปฏิกิริยาจะกรองตัวเร่งออก และนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้เอมีน ตัวอย่างจากการทดลองพบว่า จากสารตั้งต้นเป็นไนโตรเบนซีน ใช้อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาเป็น 65 องศาเซลเซียส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น อะนิลีน โดยมีค่าสัดส่วนผลได้ (Yield) 98 เปอร์เซ็นต์ จากสารตั้งต้นเป็น 2-nitrotoluene ใช้อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาเป็น 60 องศาเซลเซียส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 2-methylaniline โดยมีค่า สัดส่วนผลได้ 97 เปอร์เซ็นต์ และจากสารตั้งต้นเป็น 3-chloronitrobenzene ใช้อุณหภูมิการทำปฏิกิริยาเป็น 55 องศาเซลเซียส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 3-chloroaniline โดยมีค่าสัดส่วนผลได้ 99 เปอร์เซ็นต์

Jayaswal *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองเตรียมเรซิน PS-DVB ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ โดยการสังเคราะห์พอลิเมอร์ และตกตะกอนโดยใช้วุ้นเป็น Stabilizer และโทลูอีนเป็นตัวทำให้เกิดรูพรุน (Porogen) แล้วจึงทำการเติมหมู่ไนโตรที่พอลิเมอร์ โดยใช้ NO_x ทำปฏิกิริยาในสถานะก๊าซ ซึ่งคือก๊าซผสมระหว่างไนตริกออกไซด์ (NO) และ ไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO_2) พันธะโควาเลนท์ระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน นำไปวิเคราะห์ได้โดยใช้ modified Laissagne spot test, Fourier Transform Infrared (FTIR) และ Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) จากนั้นเปลี่ยนหมู่ไนโตรให้เป็นหมู่เอมีนโดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรต จะได้เป็นเรซินแลกเปลี่ยนประจุที่มีสมบัติเป็นเบสอ่อนซึ่งสามารถใช้ทำการแลกเปลี่ยนประจุได้ครั้งเดียวเนื่องจากไม่สามารถนำมารีเจนเนอเรตได้ โดยวิธีการตามมาตรฐาน ASTM ปกติ ส่วนคลอโรเอทิลเลท PS-DVB เรซิน (Chloroethylated PS-DVB resin) สามารถเตรียมได้โดยทำปฏิกิริยากับเรซินที่มีหมู่อะมิโนด้วยไดคลอโรอีเทน ซึ่งสองโมเลกุลสุดท้ายในแต่ละเมอร์จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนทั้งหมด ได้เป็นเรซินแลกเปลี่ยนประจุที่มีสมบัติเป็นเบสแก่ที่รีเจนเนอเรตได้ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาควอเตอร์ไนซ์ (Quarternization) ด้วยเทอร์เทียรี่เอมีน (tertiary (Trimethyl and Triethyl) amine) และ ไตรฟีนิลฟอสฟีน (Triphenyl phosphine) พบว่า gegen ion มีผลต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุของเรซิน ซึ่งระหว่างการทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นทำให้ตัวแปรนี้มีผลต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุมากที่สุด และพบว่าสำหรับ gegen ion ทุกชนิด ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุเพิ่มขึ้นในช่วงแรกเป็นเวลาสั้นๆในปฏิกิริยาไนเตรชั่น โดยมีค่ามากที่สุดประมาณ 5 meq/g

เรซินชื้น ที่ค่าความชื้นประมาณ 69 เปอร์เซ็นต์ (หรือ 15.48 meq/g เรซินแห้ง) และมีค่าลดลงเล็กน้อยในช่วงเวลาส่วนใหญ่ของปฏิกิริยาไนเตรชั่น มีผลให้มีการเสื่อมสภาพเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับคลอโรเมทิลเลทเรซิน (Choromethylated resin) ที่ใช้ในทางการค้า ซึ่งมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุที่ 1.68 meq/g ของเรซินชื้น ที่ค่าความชื้น 43.53 เปอร์เซ็นต์ (หรือ 2.97 meq/g เรซินแห้ง) พบว่าเรซินที่มีไตรฟีนิลฟอสฟีน (Triphenyl phosphine) เป็น gegen ion ให้ค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุสูงที่สุด โดยที่เรซินที่มีไตรเมทิล (Trimethyl) ให้ค่าต่ำที่สุด และเมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange capacity (IEC)) โดยวิธีวิเคราะห์โดยการไตเตรต (Titration method) และ วิธีการวิเคราะห์โดยน้ำหนัก (Gravimetric method) พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าใกล้เคียงกัน

Daly *et al.* (1988) ได้ทำการทดลองเพื่อทำการสังเคราะห์โคพอลิเมอร์ในการปลูกถ่ายพันธะเปปไทด์ (Peptide grafts) ซึ่งเป็นนอร์มอลคาร์บอกซ์ซีแอนไฮไดรด์ (N-carboxyanhydride) โดยการสังเคราะห์ดังกล่าวต้องใช้พอลิเมอร์ที่ตัวเริ่มต้นให้หมู่เอมีนแทนที่ ซึ่งเลือกใช้พอลิอะริลีนอีเทอร์ซัลโฟน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพอลิเมอร์ ให้มีการเติมหมู่ไนโตรแก่พอลิเมอร์ก่อน แต่เนื่องจากตัวทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นที่ใช้กันโดยทั่วไปซึ่งก็คือ กรดผสมระหว่างกรดไนตริกและซัลฟุริก มีแนวโน้มที่จะทำให้พอลิเมอร์แบบควบแน่นเสื่อมสภาพได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นกับพอลิอะลีนอีเทอร์ซัลโฟน โดยใช้สารผสมระหว่างแอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium nitrate, AN) และไตรฟลูออโรอะซิติก แอนไฮไดรด์ (Trifluoroacetic anhydride, TFAA) จะได้ไนเตรตพอลิอะลีนอีเทอร์ซัลโฟน ซึ่งพอลิเมอร์ที่มีความต้านทานต่อปฏิกิริยารีดักชั่นอย่างน่าสังเกต เนื่องจากไม่ว่าจะทำการทดลองใช้ตัวทำปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไดไธโอไนด์ (Dodiumdithionie) , โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride) , ลิเธียมอะลูมินัมไฮไดรด์ (Lithium luminum hydride) , พาลาเดียม (Palladium) และโซเดียม โบโรไฮไดรด์ (Sodium borohydride) หรือแม้แต่การทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น (hydrogenation) ที่ความดันต่ำ ก็ไม่สามารถพบหมู่เอมีนติดเลย แต่ไนเตรตพอลิเมอร์นี้กลับเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นกับ สแตนนัส คลอไรด์ (Stannous chloride) เตตระบิวทิลแอมโมเนียม คลอไรด์ (Tetrabutyl ammonium chloride) และกรดไฮโดรคลอริก โดยมีรีฟลักซ์เตตระไฮโดรฟูรัน(Tetrahydrofuran) ได้เป็นเอมีนพอลิอะลีนอีเทอร์ซัลโฟน ซึ่งมีจำนวนการแทนที่ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำมีค่าเป็นหนึ่ง แต่กลับพบว่ามีการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลพอลิเมอร์เล็กน้อยในขั้นตอนของการทำปฏิกิริยารีดักชั่น ซึ่งการตัดสายโซของพอลิเมอร์อาจเกิดจากตัวกลางที่มีฤทธิ์เป็นกรด

Botvay *et al.* (1999) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการปรับปรุงพอลิซัลโฟน 2 ชนิด คือ พอลิอีเทอร์ซัลโฟน (polyethersulfone, PES) หรือ Victrex และ พอลิซัลโฟน (polysulfone, PSU) หรือยูเดล (Udel) จากโครงสร้างโมเลกุลพอลิเมอร์ชนิด PSU น่าจะมีความเป็น อิเล็กโทรฟิลิกมากกว่า ตรงหมู่ไบฟีนอล (Bisphenol) ดังนั้น PSU จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาการเติมอิเล็กตรอนได้หลายชนิด เช่น ปฏิกิริยาการเติมหมู่ซัลโฟนเนต (Sulfonation) ปฏิกิริยาโบรมีเนชั่น (Bromination) ฮาโลเมทิลเลชั่น (Halomethylation) และไนเตรชั่น (Nitration) แต่สำหรับ PES จะเกิดปฏิกิริยาได้ยากกว่า ซึ่งมีเพียงปฏิกิริยาโบรมิเนชั่นเท่านั้นที่ Botvay และคณะสามารถสังเคราะห์ได้ และเนื่องจากปฏิกิริยาไนเตรชั่น โดยใช้กรดไนตริก (HNO_3) หรือ กรดผสมระหว่างกรดไนตรัสและกรดซัลฟุริก ($HNO_2 + H_2SO_4$) กับสารประกอบอะโรเมติกส์โดยกรดผสมจะทำให้พอลิเมอร์เสื่อมสภาพได้ จึงได้ทำปฏิกิริยาโดยใช้วิธีที่รุนแรงต่อพอลิเมอร์น้อยกว่า โดยใช้สารผสมระหว่าง แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium nitrate, AN) และไตรฟลูออโรอะซิติก แอนไฮไดรด์ (Trifluoroacetic anhydride, TFAA) จะได้ไนตรัสประจุ (NO_2^+) โดยประจุชนิดนี้จะเกิดปฏิกิริยาแทนที่ในพอลิเมอร์ชนิด พอลิสไตรลีน (polystyrene) พอลิฟีนิลออกไซด์ (polyphenyl oxide) พอลิคาร์บอเนต (polycarbonate) และ พอลิซัลโฟน (polysulfone) ชนิดยูเดล (Udel) โดยพบว่าหมู่จะเข้าไปแทนที่ในตำแหน่งออร์โธ (ortho) ในหมู่ไบฟีนอลได้ 2 ตำแหน่งต่อหนึ่งหน่วยซ้ำ เมื่อทำการยืนยันโดย NMR และ Degree of Substitution (DS) จะได้ว่าจำนวนการแทนที่ต่อหนึ่งหน่วยซ้ำมีค่ามากสุดคือหนึ่งตำแหน่ง

จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาในข้างต้นพบประเด็นที่น่าสนใจคือ

1. เมื่อพอลิเมอร์ผ่านการปรับปรุงแล้วจะสามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายขึ้น (Jayaswal *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2002; Pugazhenthi and Kumar 2004; Hill *et al.*, 2006)

2. พอลิอะรีลีนอีเทอร์ซัลโฟน มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน จึงเหมาะสมที่จะใช้ในงานที่ต้องการความร้อนสูงๆ (Hill *et al.*, 2006) พอลิซัลโฟนมีสายโซ่หลัก (Backbone) ที่มีความเสถียรและสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ และการเติมหมู่ไนโตรจะทำให้วงฟีนิล (Phenyl ring) มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไฟล์ (Nucleophile) อีกทั้งยังทำให้มีพอลิเมอร์มีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่นเพิ่มขึ้น (Ghosal *et al.*, 2003)

3. การเติมหมู่เอมีนเข้าไปที่พอลิเมอร์ต้องเริ่มต้นจากกระบวนการไนเตรชั่น (ใช้กรดไนตริกและกรดซัลฟุริกหรือใช้ก๊าซ NO_X) ซึ่งเป็นการเติมหมู่ไนโตรจากนั้นถูกรีดิวซ์เพื่อให้กลายเป็น

หมู่เอมีนด้วยสารอื่นๆ เช่น ไฮดราซีนไฮเดรต หรือเติม ทินทูคลอไรด์ในเอธานอล (สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา 6,878,803; Lauwiner *et al*., 1998 ; Ghosh *et al*., 2000; Jayaswal *et al*., 2000; Chowdhury *et al*., 2001; Sinha *et al*., 2002; Son *et al*., 2002; Gancarz *et al*., 2003; Pugazhenthi and Kumar 2004)

4. การทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นกับตัวกลางที่มีฤทธิ์เป็นกรด จะทำให้พอลิซัลโฟน (polysulfone, PSU) เสื่อมสภาพเนื่องจากการตัดสายโซ่ของพอลิเมอร์ (Daly *et al*., 1988; Botvay *et al*., 1999)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาวิธีการเติมหมู่เอมีนให้กับพอลิฟีนิลซัลโฟน ด้วยวิธีที่เหมาะสมและศึกษาวิธีตรวจสอบพอลิเมอร์ เพื่อจะนำพอลิเมอร์ที่มีหมู่เอมีนไปตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ แล้วนำไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

วิธีการผลิตเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับเป็นวิธีการที่ง่ายที่สุด ราคาถูก แต่เอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุงได้ง่ายเนื่องจากมีแรงกระทำระหว่างโมลกุลที่อ่อน (Chaplin and Bucke, 1990) ซึ่ง Murray *et al.* (1996) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บนพอลิเมอร์ 2 ชนิดคือพอลิสไตรีนลาเทกซ์ (polystyrene latex) และโลเดนซิทีพอลิเอธิลีน (low density polyethylene, LDPE) ที่มีรูพรุน โดยวิธีการดูดซับบนพื้นผิวของตัวพยุงด้วยแรงแวนเดอวาล์ว (Van der Waals) และน้ำมันพืชที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นคือ น้ำมันดอกทานตะวัน ผลที่ได้คือ เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากโลเดนซิทีพอลิเอธิลีน มีความทนทานสูง และมีประสิทธิภาพการทำงานอยู่ระหว่าง 80-90 เปอร์เซ็นต์ และมีศักยภาพในการนำกลับมาใช้ใหม่ที่ดี เนื่องจากประสิทธิภาพการทำงานลดลงไปเพียงแค่ 35 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้ไปได้ 5 ครั้ง ส่วนเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากพอลิสไตรีนลาเทกซ์ มีประสิทธิภาพการทำงานที่ต่ำกว่า

วิธีการผลิตเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีการห่อหุ้มในเจล หรือเส้นใย เป็นวิธีที่สะดวกสบายสำหรับกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ มีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก ราคาค่าใช้จ่ายปานกลาง และเอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุงได้ง่ายเนื่องจากแรงกระทำระหว่างโมลกุลที่อ่อน (Chaplin and Bucke, 1990) ซึ่ง Noureddini *et al.* (2004) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepasia* โดยวิธีการห่อหุ้มแบบโซลเจล (sol-gel) ในพอลิเมอร์ที่เตรียมโดย การทำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชั่นแบบพอลิคอนเดนเซชั่น (polycondensation) ระหว่างไฮโดรไลซ์เตตระเมทอกซีไซเลน (hydrolyzed tetramethoxysilane, TMOS) กับไอโซ-บิวทิลไตรเมทอกซีไซเลน (*iso*-butyltrimethoxysilane, *iso*-BTMS) และใช้น้ำมันถั่วเหลืองในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ผลที่ได้คือเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์อิสระ และยังมีความแข็งแรง คงทน สามารถใช้ซ้ำได้ถึง 11 ครั้ง โดยที่กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงแค่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยโมล

วิธีการผลิตเอนไซม์ตรึงรูปอีกวิธีหนึ่งและเป็นที่นิยมกันมากได้แก่ การตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์ เนื่องจากวิธีนี้มีแรงกระทำระหว่างตัวพยุงกับเอนไซม์ที่แข็งแรงมาก ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุงได้ยาก แต่จะมีการเตรียมที่ยุ่งยากและราคาสูง (Chaplin and Bucke, 1990) และพันธะโควาเลนท์ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปแข็งแรงขึ้น ทนต่ออุณหภูมิและพีเอชที่

รุนแรงได้มากขึ้น และความมีเสถียรภาพเหล่านี้จะส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงแค่เล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเวลาผ่านไปนานๆ หรือเมื่อมีการนำกลับมาใช้ซ้ำ (Huckel *et al.*, 1996)

Hwang *et al.* (2004) ได้ศึกษาเสถียรภาพการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus stearothermophilus* L1 บนซิลิกาเจล โดยเปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ กับการตรึงไลเปสด้วยการดูดซับในการตรึงด้วยการดูดซับ คือ นำซิลิกาเจลไปแช่ในสารละลายไลเปสที่มีความเข้มข้น 0.53 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร แล้วคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็กรองแล้วล้างด้วย 10 มิลลิโมลฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 10) ส่วนในการตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์ จะใช้กลูทารอลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะระหว่างซิลิกาเจลกับไลเปส ทำได้โดยนำซิลิกาเจลมากระตุ้น (activate) ด้วยสารละลายกลูทารอลดีไฮด์ก่อน คือแช่ซิลิกาเจลลงใน 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกลูทารอลดีไฮด์ ใน 0.1 โมลฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) แล้วคนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปตรึงเอนไซม์เช่นเดียวกับการดูดซับ พบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ให้เสถียรภาพที่สูงกว่าการตรึงด้วยการดูดซับ กล่าวคือ ในการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์จะมีปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในสารละลายน้อยกว่า

ตัวพยุงที่เหมาะสมกับการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ จะต้องประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) เช่น หมู่อะมิโน (amino) หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl) เป็นต้น หมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ห้ามจับกับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ซึ่งสามารถป้องกันได้ด้วยการผสมสารละลายเอนไซม์ด้วยตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่เหมาะสมก่อนนำไปตรึงบนตัวพยุง โดยปกติแล้วหมู่ฟังก์ชันบนตัวพยุงจะถูกกระตุ้น (activate) โดยสารจำพวก ไซยาโนเจนโบรไมด์ (cyanogenbromide) คาร์โบดีไมด์ (carbodiimide) และกลูทารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นต้น (Shuler and Kargi, 2002) ซึ่ง Bayramoglu *et al.* (2002) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บนเยื่อแผ่นเมมเบรนที่ผลิตจากพอลิทูไฮดรอกซีเมทาอะคิเลท-โค-เมทาอะคริลามิโด-ฟีนิลอะลานิล (poly(2-hydroxymethacrylate-co-methacrylamido-phenylalanine), pHEMA-MAPA) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันคือ หมู่คาร์บอกซิล ที่ถูกกระตุ้นด้วยคาร์โบดีไมด์ แล้วนำไปตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ ผลที่ได้คือเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพที่จะทำงานในช่วงที่อุณหภูมิและพีเอชกว้างขึ้น และยังทำให้ประสิทธิภาพการใช้งานซ้ำเป็นไปด้วยดีคือ มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลงเพียงแค่ 37 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้งานไปแล้ว 20 ครั้ง

Juang *et al.* (2001) ได้ทำการตรึงเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) บนไคโตซานเพื่อนำไปดูดซับตัวถูกละลาย ทำได้โดยการนำไคโตซานซึ่งมีหมู่เอมีนอยู่แล้วมากระตุ้นด้วยกลูทารอลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้กลูทารอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง (crosslink agent) ระหว่างไคโตซานกับเอนไซม์ พบว่า ความเข้มข้นของกลูทารอลดีไฮด์มีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่นำไปใช้ในการดูดซับตัวถูกละลาย กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของกลูทารอลดีไฮด์ไม่พอดีกับจำนวนหมู่เอมีนบนไคโตซาน ทำให้มีกลูทารอลดีไฮด์หลงเหลืออยู่ในระบบ กลูทารอลดีไฮด์ที่หลงเหลืออยู่นี้จะทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายเอง ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการดูดซับตัวถูกละลายลดลง

Amorim *et al.* (2003) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซาน ซึ่งไคโตซานที่ใช้จะมาจาก 2 แหล่งคือ ไคโตซานที่ผลิตเอง และไคโตซานทางการค้า ซึ่งการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานนี้จะใช้กลูทารอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางระหว่างไลเปสกับไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนท์ ทำได้โดยการนำไคโตซานที่ทำเป็นแผ่นฟิล์มแล้วมาแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรกลูทารอลดีไฮด์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วจึงค่อยนำมาแช่ในสารละลายไลเปสที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 8 ตลอดทั้งคืน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังจากที่ใช้ซ้ำเป็นจำนวน 4 ครั้ง มีค่าอยู่ที่ 47 เปอร์เซ็นต์ และ 42 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น ของไคโตซานที่ผลิตเอง และไคโตซานทางการค้า ตามลำดับ

Magnan *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษากิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนเซรามิกเมมเบรน (ceramic membrane) เพื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของบิวทิลอะซิเตด (butyl acetate) และปฏิกิริยาการสังเคราะห์บิวทิลลอเรท (butyl laurate) โดยพอลิเมอร์ที่ใช้ทำเมมเบรนคือส่วนผสมระหว่างเจลาติน (gelatine) กับพอลิเอทธิลีนไนมีน (polyethylenimine) และสารเชื่อมขวางที่ใช้คือ กลูทารอลดีไฮด์ ซึ่งจะเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับเมมเบรนด้วยพันธะโควาเลนท์ พบว่ามีประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของบิวทิลอะซิเตด และปฏิกิริยาการสังเคราะห์บิวทิลลอเรทที่ดีมาก

ต่อมาเมื่อเอนไซม์ไลเปสถูกตรึงบนตัวพยุงที่เหมาะสมดีแล้ว ก็จะนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นต่อไป ซึ่ง Desai et al. (2005) ได้ศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์บนไคโตซาน ในการตรึงไลเปสจะใช้กลูทารอลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะโควาเลนท์ระหว่างไลเปสกับไคโตซาน ซึ่งพบว่า

สภาวะที่ทำการตรึงไลเปสได้มากที่สุดคือ ใช้ปริมาณไลเปส 6 มิลลิกรัมต่อเม็ดไคโตซาน 100 มิลลิกรัม และ 0.02 เปอร์เซ็นต์กลูทารอลดีไฮด์ ที่พีเอช 7 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเมื่อนำไลเปสอิสระ และไลเปสที่ตรึงแล้วไปวัดเสถียรภาพที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ พบว่าไลเปสที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์มีเสถียรภาพทางความร้อนที่สูงกว่าเอนไซม์อิสระที่ทุกๆ อุณหภูมิ ในส่วนค่าพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ก็ได้ถูกทดสอบ พบว่าทั้งไลเปสอิสระและไลเปสที่ตรึงแล้วมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงสุดที่ค่าพีเอชเดียวกันคือ พีเอช 9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์เมื่อทำการตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์ นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบนำไลเปสที่ตรึงแล้วมาใช้ซ้ำโดยการใช้น้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรต พบว่าเมื่อมีการใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงแค่ 50 เปอรเซ็นต์เท่านั้น สุดท้ายศึกษาปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสโดยใช้น้ำมันซาลิคอเนีย (salicornia oil) โดยเมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำมัน 0.5 มิลลิโมล กับ น้ำ 1.0 มิลลิลิตร และไลเปสอิสระ 0.125 กรัม เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับไลเปสที่ตรึงแล้ว 20 กรัม พบว่าที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมธานอล เท่ากับ 1:3 และใช้ตัวทำละลายคือเฮกเซน ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 45 เปอรเซ็นต์ และ 55 เปอรเซ็นต์ สำหรับไลเปสอิสระ และไลเปสที่ตรึงแล้วตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 น้ำมันสบู่ดำ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิศวกรรมชีวกระบวนการ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผงจาก *Pseudomonas fluorescens* : EnzOS grade Fluka, USA.

1.3 พอลิซัลโฟน (Polysulfone, UDEL) จาก Sigma Aldrich, USA. และพอลิฟีนิลซัลโฟน (Polyphenylsulfone, RADEL R-5500) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Solvay ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. อุปกรณ์

2.1 อิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์ (Elemental Analyzer , EA): model EA-2000, Perkin Elmer อิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์: CHNS/O analyzer model PE-2400 อิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์: model CHN 2000, Leco.

2.2 ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด หรือ เอฟทีไออาร์ (Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrophotometer)): model FTIR spectrum GX, Perkin Elmer.

2.3 นิวเคลียร์แมกแนติกเรโซแนนซ์ หรือเอ็นเอ็มอาร์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR): model Avance 300, Bruker, Switzerland.

2.4 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM): model S-2500, Hitachi, Japan.

2.5 อะตอมมิกฟอร์สไมโครสโคปี (Atomic Force Microscopy, AFM): model NSG 01, NT-MDT, Russia.

2.6 สเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ (Spectrophotometer): model Anthelie Advanced, Secoman, France.

2.7 ก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography): Column DB-WAX, Model GC 2010, Shimadzu, Japan.

3. สารเคมี

3.1 ไนโตรเบนซีน (Nitrobenzene): Synthesis grade, Panreac, Spain.

3.2 กรดซัลฟุริก (Sulfuric acid 96 เปอร์เซ็นต์): Analysis grade, J.T. Baker, USA.

3.3 กรดไนตริก (Nitric acid 65 เปอร์เซ็นต์): Analysis grade, Merck, Germany.

3.4 เมธานอล (Methanol): Analysis grade, Carlo Erba Reagenti, Italy.

3.5 เอธานอล (Ethanol): Analysis grade, Merck, Germany.

3.6 ไดเมทิลอะเซทามายด์ หรือ ดีเอ็มเอซี (N,N-Dimethylacetamide , DMAc) : Analysis grade, Carlo Erba Reagenti, Italy.

3.7 ไดเมทิลฟอร์มเอมายด์ (N,N- Dimethylformamide, DMF): Analysis grade, Fluka, USA.

3.8 ทินทูคลอไรด์ (Tin (II) chloride Anhydrous): Analysis grade, Merck, Germany.

3.9 คลอโรฟอร์ม (Chloroform): Analysis grade, BDH, England.

3.10 เมทิลไพโรลิโดน (1-Methyl-2-pyrrolidone, NMP): Analysis grade, Fluka, USA.

3.11 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO): Analysis grade, Riedel-deHaen, Germany.

3.12 ไฮดราซีนไฮเดรต (Hydrazine hydrate): Analysis grade, Carlo Erba Reagenti, Italy.

3.13 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid fuming): Analysis grade, Merck, Germany.

3.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide , NaOH Solution): Analysis grade, Merck, Germany.

3.15 กลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์: Analysis grade, Fluka, USA.

3.16 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทรฟอสเฟต (KH_2PO_4): Analysis grade, Riedel-deHaen, Germany.

3.17 ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทรฟอสเฟต (K_2HPO_4): Analysis grade, Riedel-deHaen, Germany.

3.18 *p*-Nitrophenyl palmitate (pNPP): Analysis grade, Fluka, USA.

3.19 *p*-Nitrophenol (pNP): Analysis grade, Sigma , USA.

3.20 2-โพรพานอล: Analysis grade, J.T Baker, USA.

3.21 Triton X-100 : General purpose grade, Fisher, UK.

3.22 Gum arabic: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia.

3.23 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) : Analysis grade, Merck, Germany.

3.24 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$): Analysis grade, Merck, Germany.

3.25 โซเดียมคาร์บอเนต: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia.

3.26 Coomassie brilliant blue G-250: Analysis grade, Fluka, USA.

3.27 กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia.

3.28 สารมาตรฐานโปรตีน BSA (bovine serum albumin): Analysis grade, Fluka, USA.

3.29 สารมาตรฐาน (Methyl heptadecanoate): Analysis grade, Fluka, USA.

3.30 n-Heptane: Analysis grade, Labscan, Ireland.

วิธีการ

1. การดัดแปลงพอลิเมอร์

1.1 การทำปฏิกิริยาไนเตรชั่น

วิธีที่ 1 ละลายพอลิซัลโฟนยูเดลในกรดซัลฟุริกเข้มข้นที่ 0-2 องศาเซลเซียสโดยประมาณในขวดสามคอขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเมื่ออุณหภูมิของสารละลายอยู่ระหว่าง 5-10 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยานาน 3.5 ชั่วโมง ตกตะกอนด้วยเมธานอล ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อบที่ 60 องศาเซลเซียสภายใต้สุญญากาศ (สิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา 6,878,803) พอลิซัลโฟนที่ได้จากปฏิกิริยาไนเตรชั่นนี้ เรียกว่า ไนเตรตพอลิซัลโฟน (Nitrated Polysulfone, NPSU) การทำพอลิเมอร์ที่ได้ให้เป็นแผ่นเมมเบรน ทำได้โดย

ละลายพอลิเมอร์ในไดเมทิลอะเซทามายด์ (ดีเอ็มเอซี) แล้วเทลงบนแม่พิมพ์ อบจนแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

วิธีที่ 2 ละลายพอลิซัลโฟนยูเดล ด้วยดีเอ็มเอซีในขวด 3 คอขนาด 250 มิลลิลิตร 2 กรัม ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์เป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อละลายหมด เพิ่มอุณหภูมิเป็น 120 องศาเซลเซียส จากนั้นหยดกรดผสม (กรดกรดซัลฟุริก 96 เปอร์เซ็นต์ และกรดไนตริก 65เปอร์เซ็นต์)ปริมาตรอย่างละ 1.25 มิลลิลิตร ลงไปด้วยกรวยหยด ทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง กวนสารละลายพอลิเมอร์ตลอดเวลา เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทิ้งให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิ ตกตะกอนด้วยเมธานอล และล้างตะกอนด้วยสารละลายเมธานอล 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อบที่ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ (Son *et al*., 2002) สามารถทำเป็นแผ่นเมมเบรนด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีที่ 1

วิธีที่ 3 ใช้วิธีสังเคราะห์เดียวกันกับวิธีที่ 2 ข้างต้น แต่ใช้ไนโตรเบนซีนเป็นตัวทำละลายแทนดีเอ็มเอซี โดยอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาคือ 55 องศาเซลเซียส (ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1 และ 2 ชั่วโมง) และ 120 องศาเซลเซียส (ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1, 2, 5, 10, 15, 20 และ 24 ชั่วโมง) สามารถทำเป็นแผ่นเมมเบรนด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีที่ 1

วิธีที่ 4 ใช้วิธีสังเคราะห์เดียวกันกับวิธีที่ 3 ข้างต้น แต่ใช้พอลิฟีนิลซัลโฟน เรเดลอาร์ โดยอุณหภูมิที่ใช้คือ 55 องศาเซลเซียส (ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1 ชั่วโมง) และ 120 องศาเซลเซียส (ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1, 2 และ 24 ชั่วโมง) เรียกพอลิเมอร์ที่ได้ว่า ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (nitrated polyphenylsulfone, NPPSU) สามารถทำเป็นแผ่นเมมเบรนด้วยวิธีเดียวกันกับวิธีที่ 1

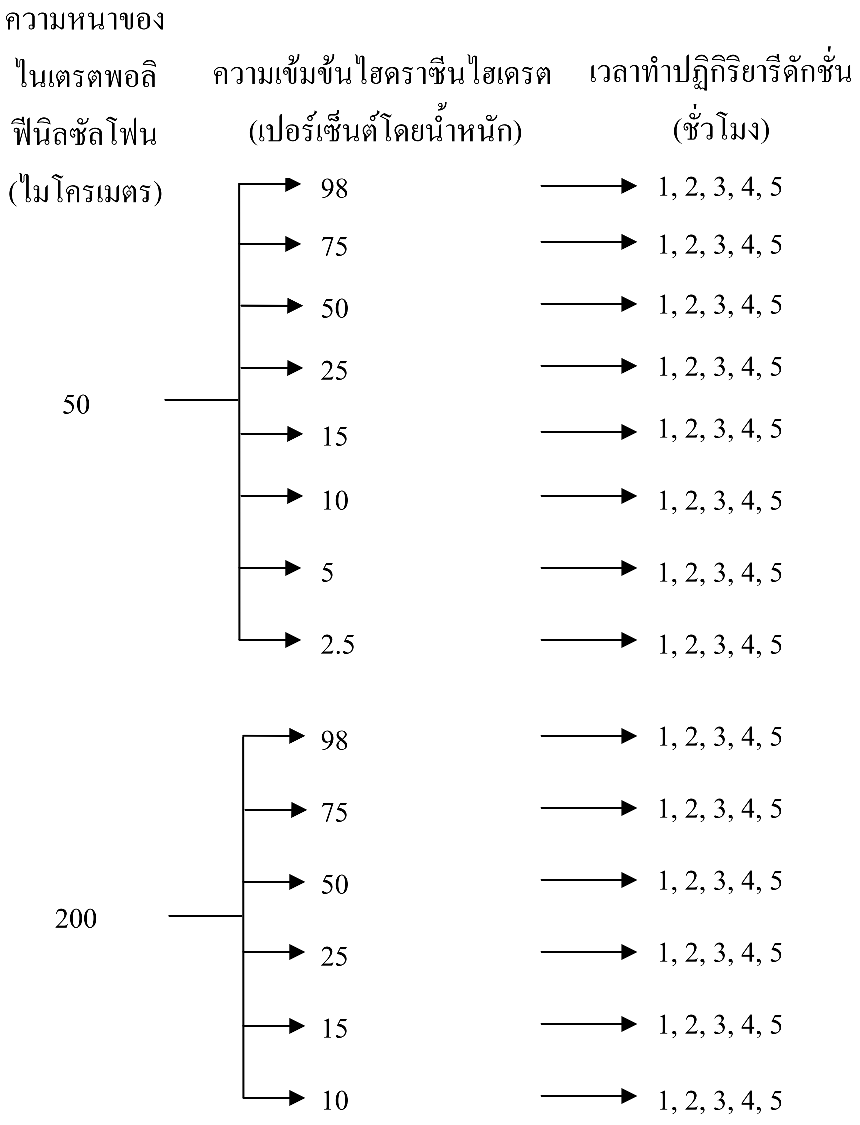
1.2 การเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ในการทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นบนพอลิฟีนิลซัลโฟน

ทำการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์โดยเพิ่มปริมาณพอลิฟีนิลซัลโฟน เรเดลอาร์ เป็น 30 กรัม ละลายในไนโตรเบนซีนให้ได้ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1 โดยเลือกวิธีที่ให้เมมเบรนที่เหนียว และในการหยดกรดผสม (กรดซัลฟุริกและกรดไนตริก) ให้ใช้ปริมาตรกรดอย่างละ 18.75 มิลลิลิตร ทำพอลิเมอร์ที่ได้ให้เป็นแผ่นเมมเบรน (ดูข้อ 1.1 วิธีที่ 1)

1.3 การทำปฏิกิริยารีดักชั่นบนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน

วิธีที่1 ละลายไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน 2 กรัม ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มเอมายด์ 23 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม 3 คอขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ใบกวนภายใต้สภาวะไนโตรเจนจนพอลิเมอร์ละลายหมด ละลายทินทูคลอไรด์ 1.18 กรัม ลงในเอธานอล 11.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กภายใต้สภาวะไนโตรเจน และหยดลงในสารละลายพอลิเมอร์ด้วยกรวยหยด ทำปฏิกิริยากันที่ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้ใบกวนกวนตลอดเวลา ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่ใช้มีดังนี้ 15 30 และ 45 นาที รวมทั้ง 1 และ 3 ชั่วโมง เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ทิ้งไว้ให้เย็น ตกตะกอนด้วยสารละลายอะซีดิกเมธานอล (กรดไฮโดรคลอริก 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในเมธานอล) โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารละลายตลอดเวลาขณะตกตะกอน ล้างตะกอนด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร น้ำปราศจากประจุ (deionize water) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง 0.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมธานอล ตามลำดับ อบตะกอนที่ได้ในตู้อบสุญญากาศที่ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และทำเป็นแผ่นเมมเบรน (ตามข้อ 1.1) จะได้พอลิเมอร์ที่มีหมู่เอมีน เรียกว่า เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (Amined Polyphenylsulfone, APPSU)

วิธีที่ 2 แช่แผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน ขนาดกว้างยาว 2 × 2 เซนติเมตร (หนา 50 และ 200 ไมโครเมตร) ในสารละลายไฮดราซีนไฮเดรต 40 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (98, 75, 50, 25, 15, 10, 5 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิคงที่ 50 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ กัน (1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างแผ่นเมมเบรนที่ได้ด้วยน้ำปราศจากประจุ 3 ครั้ง อบให้แห้ง ภาพที่ 13 แสดงแผนภาพรายละเอียดของสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยารีดักชั่นด้วยไฮดราซีนไฮเดรต



ภาพที่ 13 แผนผังการทำปฏิกิริยารีดักชั่นของเมมเบรนขนาด 2 x 2 เซ็นติเมตร โดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรต โดยได้มีการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของสารละลายไฮดราซีนไฮเดรต และความหนาของเมมเบรนที่ใช้

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) และเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU)

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุ ด้วยอิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์ (Elemental Analyzer, EA)

หาปริมาณธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และไนโตรเจน (N) บนพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ โดยค่าที่ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ ซึ่งใช้ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange Capacity, IEC)

แช่เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนเมมเบรน ขนาด 1×1 เซนติเมตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้ว นำเมมเบรนออกจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นดูดสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้แช่เมมเบรนออกมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำปราศจากประจุ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมอินดิเคเตอร์ 3 หยด (ฟีนอฟทาลีน) เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลาร์

2.3 การวิเคราะห์หมู่ไนโตรและหมู่เอมีน ด้วยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด หรือเอฟทีไออาร์ (Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrophotometer)) และนิวเคลียร์แมกแนติกเรโซแนนซ์ หรือเอ็นเอ็มอาร์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

การวิเคราะห์ด้วยเอฟทีไออาร์ เพื่อหาหมู่ฟังก์ชั่นทั้งสองบนพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งถือเป็นการวิเคราะห์แบบคุณภาพวิเคราะห์ โดยใช้ด้วยตัวอย่างพอลิเมอร์ที่เป็นแผ่นฟิล์ม

การวิเคราะห์ด้วยเอ็มเอ็มอาร์ เพื่อหาหมู่ฟังก์ชั่นทั้งสองบนพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งถือเป็นการวิเคราะห์แบบปริมาณวิเคราะห์ โดยเลือกวิเคราะห์แบบโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (H-NMR) ด้วยการใช้ตัวทำละลายคือ DMSO-d_6

3. การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์บนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน

3.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ต่อการตรึง

ตัดเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนเมมเบรน ให้มีขนาดกว้างยาว 1×1 เซนติเมตร มาตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ โดยนำแผ่นเมมเบรนมากระตุ้นโดยการแช่ในสารละลายกลูตาอัลดี

ไฮด์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้คือ 0 0.05 0.075 0.1 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดเวลา กรองเอาเมมเบรนออก แล้วล้างเมมเบรนด้วยน้ำปราศจากไอออน ซับให้แห้ง แล้วเริ่มทำการตรึงเอนไซม์โดยแช่แผ่นดังกล่าวในสารละลายเอนไซม์ไลเปสเข้มข้น 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นไอออน (Ionic Strength) 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา กรองเอาเมมเบรน ออกแล้วล้างเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงที่ได้จากการกรอง และน้ำล้างเมมเบรน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ไม่เกาะบนเมมเบรน และนำเมมเบรนที่ตรึงเอนไซม์แล้วไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป นำผลที่ได้ไปคำนวณค่าสัดส่วนของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะบนพอลิเมอร์ (Protein coupling yield) และสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (Activity yield) (ดูภาคผนวก ง สำหรับนิยามและวิธีคำนวณ)

3.2 การวิเคราะห์ภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM)

ทำการส่องดูภาพบนพื้นผิวพอลิเมอร์หลังจากตรึงเอนไซม์ เพื่อดูการกระจายตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ที่กำลังขยาย 80 เท่า โดยทำการเคลือบพื้นผิวด้วยส่วนผสมของแพลตตินัม (platinum) และพาราเดียม (palladium) ก่อนการส่อง และทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง คือ เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ (ที่มีและไม่มีเอนไซม์ตรึงบนแผ่น) เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ที่มีและไม่มีเอนไซม์ตรึงบนแผ่น) และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ที่มีเอนไซม์ตรึงบนแผ่น)

3.3 การวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิว ด้วยอะตอมมิกฟอร์สไมโครสโคปี (Atomic Force Microscopy, AFM)

ทำการวิเคราะห์ความขรุขระบนพื้นผิวของพอลิเมอร์หลังจากตรึงเอนไซม์ เพื่อยืนยัน

การมีอยู่จริงและการกระจายตัวของเอนไซม์ไลเปสบนพื้นผิว โดยใช้เครื่องอะตอมมิกฟอร์สไมโครสโคปี ซึ่งใช้โหมด (mode) ของ Tapping mode หรือ dynamic force microscopy ใช้ทิป (tip) ทำจากซิลิกา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นาโนเมตร ใช้ความถี่เรโซแนนซ์ (Resonant frequency) เท่ากับ 115-190 กิโลเฮิร์ต และค่าคงที่ของแรง (Force constant) เท่ากับ 2.5 – 10 นิวตันต่อเมตร โดยทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง (เตรียมด้วยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ในข้อ 3.2)

3.4 ศึกษาผลของระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ต่อการตรึง

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1 โดยใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงที่สุด โดยในการศึกษาครั้งนี้ ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้คือ 0, 1, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง หลังจากตรึงเสร็จ วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ไม่เกาะบนเมมเบรน ค่ากิจกรรมเอนไซม์

3.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1 โดยใช้ความเข้มข้นและระยะของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด (ข้อ 3.1 และ 3.4 ตามลำดับ) แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ (37 และ 55 องศาเซลเซียส)

3.6 ศึกษาผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1 โดยใช้ความเข้มข้นและระยะของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด (ข้อ 3.1 และ 3.4 ตามลำดับ) ค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ไลเปสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้นไอออนคงที่ที่ 0.05 โมลาร์) ที่ใช้ตรึงคือ 5, 6, 7, 8, และ 9 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาในข้อ 3.5

3.7 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.1 โดยใช้ความเข้มข้นและระยะของกลูตาอัลดีไฮด์และพีเอชที่ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด (ข้อ 3.1, 3.4 และ 3.6 ตามลำดับ) โดยใน

ที่นี้ได้เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ตรึงเอนไซม์ คือ 30, 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาในข้อ 3.5

4. ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่ออุณหภูมิและพีเอช

4.1 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่ออุณหภูมิ

ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่เหมาะสม (หัวข้อที่ 3) แล้วนำมาบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นไอออน 0.05 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

4.2 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่อพีเอช

ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่เหมาะสม แล้วนำมาบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นไอออน 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิคงที่ 50 องศาเซลเซียสและที่ค่าพีเอช 5, 6, 7, 8 และ 9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

5. เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระในการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นนี้ (ดุษฎี, 2549) ลำดับการเติมสารตั้งต้นและตัวเร่งปฏิกิริยา (เอนไซม์ตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3 หรือ เอนไซม์อิสระ) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็นดังนี้ เติมตัวเร่งปฏิกิริยา (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันสบู่ดำ) น้ำปราศจากประจุ (20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันสบู่ดำ) น้ำมันสบู่ดำ (4 – 5 กรัม โดยประมาณ) และเมธานอล (อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3) เขย่าขวดรูปชมพู่ด้วยมือก่อนเติมสารตัวถัดไป เมื่อเติมครบแล้ว ทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา แยกน้ำมันออกจากเอนไซม์ตรึงรูป เพื่อนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดน้ำมันตัวอย่าง (ไบโอดีเซล) ที่อยู่ชั้นบนสุดมาวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทรกราฟี หมายเหตุ

ในการเปรียบเทียบนี้ จะใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้ มาจากการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ทางอ้อม ด้วยวิธี Bradford

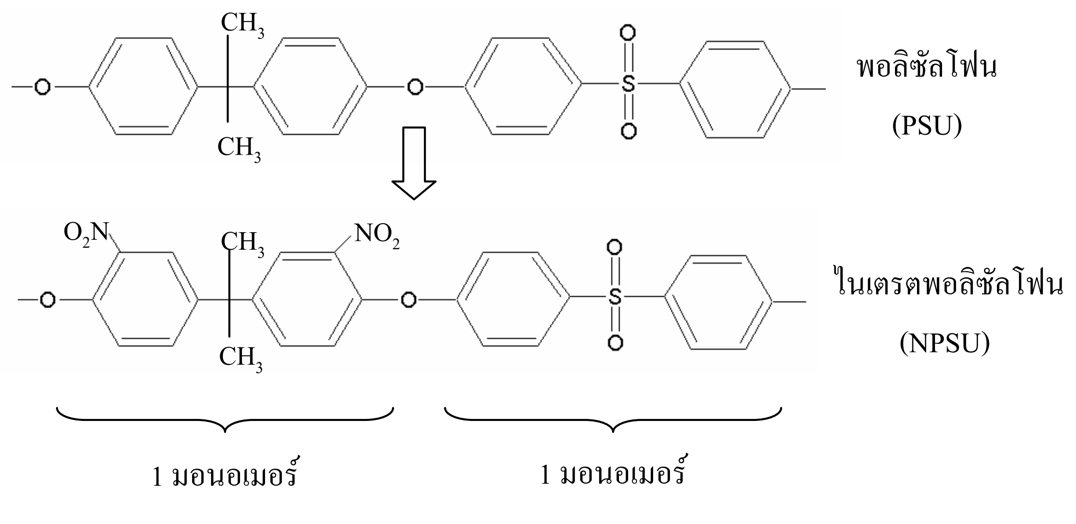
ผลและวิจารณ์

ในงานวิจัยนี้มุ่งดัดแปลงโครงสร้างของพอลิอะรีลีนอีเทอร์ซัลโฟน ด้วยการเติมหมู่เอมีน ซึ่งจะนำไปใช้ตรึงไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์ เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่หนึ่งเป็นการดัดแปลงพอลิเมอร์ และส่วนที่สองเป็นส่วนการตรึงเอนไซม์

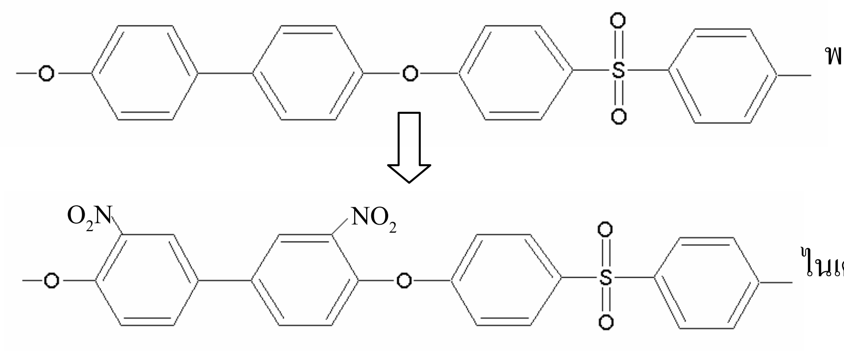
1. การดัดแปลงพอลิเมอร์

1.1 การทำปฏิกิริยาไนเตรชั่น

ปฏิกิริยาไนเตรชั่นของพอลิซัลโฟน (PSU) คือการเติมหมู่ไนโตรลงไปบนพอลิเมอร์ ซึ่งถ้านับจากหมู่อีเทอร์ที่เชื่อมระหว่าง 2 มอนอเมอร์ หมู่ไนโตรจะอยู่ที่ตำแหน่งออร์โท (ortho) ดังนั้นจำนวนหมู่ที่ได้ต่อ 1 เมอร์ จึงมีค่าเป็น 2 (Son *et al.*, 2002) โครงสร้างของพอลิซัลโฟน (PSU) และไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) แสดงดังภาพที่ 14 สำหรับปฏิกิริยาไนเตรชั่นของพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) ก็เป็นไปในลักษณะเดียวกัน (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 โครงสร้างของพอลิซัลโฟน (PSU) และไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU)



ภาพที่ 15 โครงสร้างของพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) และไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU)

1.1.1 ผลของการใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้นเป็นตัวทำละลายพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU)

วิธีการเติมหมู่ไนโตร ตามสิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา 6,878,803 (ข้อ 1.1 วิธีที่ 1) ซึ่งได้อธิบายไว้สำหรับเอริลพอลิเมอร์ (aryl polymer) จำพวกพอลิอีเทอร์ซัลโฟน (polyether sulfone, PES) พอลิอีเทอร์อีเทอร์ซัลโฟน (polyether ether sulfone, PEES) พอลิอีเทอร์คีโตน (polyether ketone, PEK) พอลิอีเทอร์อีเทอร์คีโตน (polyether ether ketone, PEEK) และพอลิอีเทอร์อีเทอร์คีโตนคีโตน (polyether ether ketone ketone, PEEKK) โดยจากการทดลอง พบว่า เวลาที่ใช้ในการละลายพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) ที่มีลักษณะเริ่มต้นเป็นเม็ด (pellet) นานถึง 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 0 – 2 องศาเซลเซียส โดยที่ยังไม่สามารถละลายพอลิเมอร์ทั้งหมดได้ ดังนั้นจึงได้นำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวเท่านั้นมาทำปฏิกิริยาไนเตรชั่น โดยแผ่นเมมเบรนที่ได้มีความเปราะมาก ซึ่งไม่ตรงตามจุดประสงค์การใช้งานที่อาจมีการกระแทกเกิดขึ้น จึงต้องการความเหนียว แม้ว่าสิทธิบัตรดังกล่าวได้ระบุไว้ว่าใช้กับเอริลพอลิเมอร์แต่พอลิเมอร์ประเภทนี้มีหลากหลายชนิด รวมไปถึงความแตกต่างในการทนต่อกรดด้วย โดยพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) นี้พบว่ามีหมู่อัลคิล ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถในการทดกรดต่ำกว่าพอลิอะรีลีนอีเทอร์ซัลโฟนประเภทอื่น จึงก่อให้เกิดการตัดขาดของสายโซ่พอลิเมอร์ (Daly *et al.,* 1988; Botvay *et al.,* 1999)

1.1.2 ผลของตัวทำละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาไนเตรชั่นบนพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU)

ตารางที่ 8 แสดงถึงลักษณะของเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟน(NPSU) ซึ่งเตรียมจากตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ ไนโตรเบนซีนและดีเอ็มเอซี ดังที่ได้อธิบายในข้อ 1.1 วิธีที่ 2

และ 3 ตามลำดับ โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาการทำปฏิกิริยาเดียวกัน (120 องศาเซลเซียส และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ)

ตารางที่ 8 ลักษณะของแผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) ที่เตรียมจากตัวทำละลายต่างๆ โดยอุณหภูมิและระยะเวลาการทำปฏิกิริยาคือ 120 องศาเซลเซียส และ 24 ชั่วโมง

ชนิดของตัวทำละลาย	ลักษณะของแผ่นเมมเบรน(NPSU)
ไนโตรเบนซีน	เปราะมาก
ดีเอ็มเอซี	เหนียว

จากตารางที่ 8 พบว่า การใช้ดีเอ็มเอซีเป็นตัวทำละลายจะให้ แผ่นเมมเบรนที่มีลักษณะเหนียวและใส ตาราง 10 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณของธาตุคาร์บอน (C) ธาตุไฮโดรเจน (H) และธาตุไนโตรเจน (N) ด้วยเครื่องอิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์ (หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์) โดยใช้แผ่นเมมเบรนพอลิซัลโฟน และไนเตรตพอลิซัลโฟนที่เตรียมได้จากดีเอ็มเอซีนี้ นอกจากนี้ตารางดังกล่าวได้แสดงปริมาณธาตุเหล่านั้นในหน่วยของจำนวนอะตอมต่อ 1 เมอร์ไว้ด้วย ผลจากการวิเคราะห์นี้พบว่า ไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) มีจำนวนอะตอมไนโตรเจนต่อ 1 เมอร์ มากกว่าพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งยืนยันถึงการมีหมู่ไนโตรบนพอลิเมอร์นั่นเอง การพบว่ามีไนโตรเจนในพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) ที่ยังไม่ผ่านการทำไนเตรชั่นนี้ เป็นความผิดพลาดของเครื่องอะลิเมนทอลอะนาไลเซอร์ที่ใช้วัดในครั้งนี้

หากปฏิกิริยาไนเตรชั่นเกิดสมบูรณ์ ต้องได้ไนโตรเจนจำนวน 2 อะตอมต่อ1 เมอร์ แต่จากการวิเคราะห์พบว่าไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) มีไนโตรเจนเพียง 0.14 อะตอม ต่อ 1 เมอร์ จึงบ่งบอกถึงการเกิดปฏิกิริยาไนเตรชั่นที่ไม่สมบูรณ์ โดยคาดว่ามาจากการรวมตัวของพอลิเมอร์เป็นก้อนใหญ่เมื่อหยดกรดผสมลงไป โดยปฏิกิริยาไนเตรชั่นอาจเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณผิวนอกของก้อนพอลิเมอร์นี้เท่านั้น ทำให้ได้ปริมาณหมู่ไนโตรบนพอลิเมอร์ต่ำ จากการทดลองนี้จึงอาจกล่าวได้ว่าตัวทำละลาย ดีเอ็มเอซีไม่เหมาะสม ในทางตรงข้ามเมื่อใช้ไนโตรเบนซีนเป็นตัวทำละลาย ไม่พบการรวมตัวของพอลิเมอร์เป็นก้อนขณะหยดกรด ซึ่งการละลายที่ดีนี้ ทำให้พอลิเมอร์สัมผัสกับกรดได้ดีนั่นเอง แต่เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานี้อาจยังรุนแรง จึงทำให้สายโซ่ถูกตัดขาดได้ง่าย และได้เมมเบรนที่เปราะมาก (ตารางที่ 8) ดังนั้นถ้าสามารถหาสภาวะที่

เหมาะสม เช่นอุณหภูมิ เวลาที่ทำปฏิกิริยา และชนิดของพอลิซัลโฟน เป็นต้น อาจทำให้ได้แผ่นเมมเบรนที่เหนียว และมีปริมาณหมู่ไนโตรบนพอลิเมอร์มากขึ้น

จำนวนคาร์บอนและไฮโดรเจนที่วัดได้ของไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) พบว่ามีค่ามากกว่าที่คำนวณได้จากทฤษฎี ซึ่งในความเป็นจริง ขณะที่เกิดปฏิกิริยา จะไม่มีการสูญเสียธาตุคาร์บอน แต่มีการสูญเสียไฮโดรเจนเนื่องจากการแทนที่ของหมู่ไนโตร ค่าที่มากขึ้นนี้อาจมีสาเหตุจากการตกค้างของตัวทำละลายดีเอ็มเอซีในแผ่นเมมเบรนตัวอย่าง

1.1.3 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นบนพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) ที่ใช้ไนโตรเบนซีนเป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 9 แสดงลักษณะเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) (ข้อ 1.1 วิธีที่ 3) ที่ใช้อุณหภูมิและระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ โดยได้พบว่าเมมเบรนที่ได้จากสภาวะเหล่านี้มีความเปราะมากทั้งสิ้น แม้ว่าจะลดอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียสและใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ซึ่งงานวิจัยของ Ghosh และคณะ (Ghosh *et al.*, 2000) สามารถได้แผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟนโดยทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นบนพอลิซัลโฟนในตัวทำละลาย 1,2-ไดคลอโรอีเทน (1,2-dichloro ethane) ที่ 55 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสภาวะที่อุณหภูมิและเวลานี้ไม่รุนแรง อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้สภาวะดังกล่าวยังถือว่ารุนแรงเพราะให้เมมเบรนที่มีความเปราะมาก ซึ่งคาดว่ามาจากการถูกตัดของสายโซ่พอลิเมอร์บริเวณที่เป็นหมู่อัลคิลด้วยตัวกลางที่มีฤทธิ์เป็นกรด (Daly *et al.*, 1988; Botvay *et al.*, 1999)

ตารางที่ 9 ลักษณะของแผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) ที่เตรียมจากตัวทำละลายไนโตรเบนซีน

อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	ลักษณะของแผ่นเมมเบรน (NPSU)
120	1, 2, 5, 10, 15, 20, 24	เปราะมาก
55	1, 2	เปราะมาก

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจนด้วยเครื่องอิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์

พอลิเมอร์	มวลโมเลกุล (ต่อ 1 เมอร์)	อิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์ (เปอร์เซนต์ ต่อ 1 เมอร์)			จำนวนอะตอม (อะตอม ต่อ 1 เมอร์)		
		C	H	N	C	H	N
PSU	442	73.64(73.30)*	4.16(4.98)*	0.12(0.00)*	27.12(27.00)*	18.39(22.00)*	0.04(0.00)*
NPSU	532	71.85(60.90)*	5.77(3.76)*	0.37(5.26[1])*	31.85(27.00)*	30.70(20.00)*	0.14(2.00[1])*
PPSU	400	70.78(72.00)*	4.39(4.00)*	0.00(0.00)*	23.59(24.00)*	17.57(16.00)*	0.00(0.00)*
NPPSU	490	58.76(58.78)*	3.82(2.86)*	4.78(5.71[1])*	24.00(24.00)*	18.73(14.00)*	1.67(2.00[1])*
NPPSU (Scale up)		56.80(58.78)*	3.37(2.86)*	5.89(5.71[1])*	23.19(24.00)*	16.53(14.00)*	2.05(2.00[1])*

หมายเหตุ 1 เป็นจำนวนอะตอมของไนโตรเจนเทียบกับ1 เมอร์ ตามปฏิกิริยาเคมี (Son , 2002)

(...)* ตัวเลขในวงเล็บ คือ ค่าที่คำนวณได้ตามทฤษฎี (กรณีเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์)

1.1.4 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นบนพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ (PPSU)

ภาพที่ 11 และ 12 แสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) และพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเลอาร์ (PPSU) ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ชัดเจนว่าพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเลอาร์ไม่มีโครงสร้างที่เป็นอะลิฟาติก นอกจากนี้ค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่น (T_g) มีค่าสูงกว่าพอลิซัลโฟนยูเดล

ตารางที่ 11 แสดงลักษณะเมมเบรนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน ที่เตรียมจากวิธีในข้อ 1.1 วิธีที่ 4 โดยทำที่ 55 และ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ได้พบว่าไนโตรเบนซีนเป็นตัวทำละลายที่ดี เนื่องจากไม่ เกิดการรวมตัวกันของพอลิเมอร์ขณะหยดกรดเพื่อทำปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ แผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) มีความเปราะมาก ซึ่งบ่งบอกถึงสภาวะดังกล่าวมีความรุนแรงสำหรับพอลิซัลโฟนที่ไม่มีหมู่อัลคิลนี้ แต่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และระยะเวลา การทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง จะให้แผ่นเมมเบรนเหนียวและใส

ตารางที่ 11 ลักษณะของแผ่นเมมเบรนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) ที่เตรียมจากตัวทำละลายไนโตรเบนซีน ที่ระยะเวลาทำปฏิกิริยาและอุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)	ลักษณะของแผ่นเมมเบรน (NPPSU)
120	1, 2, 24	เปราะมาก
55	1	เหนียว

สภาวะอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากตารางที่ 9 และตารางที่ 11 ตามลำดับ พบว่า การสังเคราะห์พอลิเมอร์ที่มีหมู่ไนโตรจากพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) ได้แผ่นเมมเบรนมีความเปราะมาก ในขณะที่สังเคราะห์จากพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ (PPSU) ได้แผ่นเมมเบรนเหนียว ซึ่งแสดงว่าพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ มีความสามารถในการทนกรดได้สูงกว่า ทั้งนี้เป็นเพราะความแตกต่างของโครงสร้าง (ไม่มีอะลิฟา

ติก) ของพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ นั่นเองที่ทำให้พอลิเมอร์เสื่อมสภาพไปได้น้อยกว่าพอลิซัลโฟนยูเดล

จากตารางที่ 10 พบว่าจำนวนอะตอมต่อ 1 เมอร์ ของไนโตรเจนในไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) มีค่าเป็น 1.67 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (มีค่าเท่ากับ 2) ในขณะที่ไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPSU) ซึ่งเตรียมจากการใช้ตัวทำละลายดีเอ็มเอซี มีปริมาณไนโตรเจนเพียง 0.14 อะตอมต่อ 1 เมอร์

ด้วยเหตุผลข้างต้น พอลิเมอร์ชนิดพอลิฟีนิลซัลโฟนเรเดลอาร์ (PPSU) จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปทำปฏิกิริยาไนเตรชั่น มากกว่าพอลิซัลโฟนยูเดล (PSU) โดยอุณหภูมิและระยะเวลาการทำปฏิริยาที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ (หมายเหตุ จำนวนอะตอมของไฮโดรเจนที่วัดได้ของพอลิซัลโฟนยูเดล (PPSU) และไนเตรตพอลิซัลโฟน (NPPSU) มีค่ามากกว่าค่าที่คำนวณได้จากทฤษฎีเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือวัด)

1.2 ผลของการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ในการทำปฏิกิริยาไนเตรชั่นบนพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU)

เนื่องจากปริมาณพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มีค่าไม่เพียงพอที่จะใช้ทดสอบหาสภาวะการตรึงเอนไซม์และการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง (ปริมาณพอลิเมอร์เริ่มต้นคือ 2 กรัม) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ โดยได้เพิ่มปริมาณพอลิเมอร์พอลิฟีนิลซัลโฟน ตัวทำละลายไนโตรเบนซีนและกรดผสม เป็น 15 เท่า แล้วดำเนินการไนเตรชั่นตามวิธีในข้อ 1.1 วิธีที่ 4 ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถให้แผ่นเมมเบรนที่เหนียว ใส และมีปริมาณหมู่ไนโตรสูง โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์นี้ประสบผลสำเร็จ สามารถให้แผ่นเมมเบรน ที่เหนียวและใสได้ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องอิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์ พบว่ามีจำนวนอะตอมของไนโตรเจนถึง 2.05 อะตอมต่อ 1 เมอร์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทฤษฎี (ตารางที่ 10)

เมื่อพิจารณาส่วนของการวิเคราะห์หมู่ไนโตร ด้วยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด หรือเอฟทีไออาร์ สำหรับไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) แบนด์ของหมู่ไนโตรพบที่ตำแหน่ง 1350.79 และ1533.48 เซ็นติเมตร$^{-1}$ สำหรับโครงสร้างที่สมมาตร (Symmetry) และไม่สมมาตร

(Asymmetry) ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ ก1) ซึ่งแสดงถึงการมีอยู่จริงของหมู่ไนโตร ส่วนการวิเคราะห์ด้วยนิวเคลียร์แมกแนติกเรโซแนนซ์ หรือเอ็นเอ็มอาร์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ภาพที่ได้แสดงในภาพผนวกที่ ข1

1.3 การทำปฏิกิริยารีดักชั่นบนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU)

1.3.1 การทำปฏิกิริยารีดักชั่นบนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) ตามวิธีที่ 1 (Son *et al.*, 2002)

วิธีการทำปฏิกิริยารีดักชั่นตามวิธีที่ 1 ได้อธิบายไว้ในส่วนของวิธีการข้อ 1.3 วิธีที่ 1 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) ให้เป็นเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) โดยใช้เอธานอล/ทินทูคลอไรด์เป็นรีดิวซิ่งเอเจนต์ โดยในการทำปฏิกิริยารีดักชั่นนี้ ได้มีการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาดังนี้ 15, 30, 45, 60 และ 180 นาที ในการทำเป็นแผ่นเมมเบรนด้วยการใช้ตัวทำละลายไดเมทิลอะเซทามายด์ พบว่า เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ที่ได้จากปฏิกิริยารีดักชั่นนี้ ที่อุณหภูมิต่างๆ ละลายในตัวทำละลายดังกล่าวได้น้อยมาก (ตารางที่ 12) นอกจากนี้จากผลการทดลอง จะเห็นว่าเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยารีดักชั่นเพียงแค่ 15 นาที พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ก็ไม่ละลายในตัวทำละลายดีเอ็มเอซี นอกจากนี้ได้มีการทดสอบต่อไปด้วยการละลายเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ที่ได้จากปฏิกิริยารีดักชั่นนี้ในตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่างๆ 5 ชนิด คือ คลอโรฟอร์ม, เมทิลไพโรลิโดน, ไดเมทิลฟอร์มเอมายด์, ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และ เมธานอล แต่ก็พบว่าไม่เกิดการละลายที่เป็นนัยสำคัญ จึงทำให้ไม่สามารถทำให้เป็นแผ่นเมมเบรนที่จะนำไปใช้ตรึงเอนไซม์ต่อไปได้ ดังนั้นจำเป็นต้องหาวิธีทำปฏิกิริยารีดักชั่นใหม่ (ดูหัวข้อต่อไป)

ตารางที่ 12 การละลายเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยารีดักชั่นตามวิธีที่ 1 ที่ระยะเวลาต่างๆ ในไดเมทิลอะเซทามายด์

ระยะเวลาการทำปฏิกิริยารีดักชั่น (นาที)	ผลการละลาย
15, 30, 45, 60, 180	ละลายได้น้อยมาก

1.3.2 การทำปฏิกิริยารีดักชั่นบนไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) ตามวิธีที่ 2 โดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรตเป็นรีดิวซิ่งเอเจนต์

ปฏิกิริยานี้เป็นการใช้สารละลายไฮดราซีนไฮเดรตเป็นตัวรีดิวซิ่งเอเจนต์ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อแผ่นเมมเบรนสัมผัสกับสารละลายดังกล่าวโดยไม่ต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถให้หมู่เอมีนมาก จึงได้ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายไฮดราซีนไฮเดรต ระยะเวลาที่ใช้แช่ และความหนาของแผ่นเมมเบรน เนื่องจากสารละลายไฮดราซีนไฮเดรตมีอันตรายที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นกำหนดให้อุณหภูมิของการเกิดปฏิกิริยานี้คงที่ที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าที่นิยมใช้ (Chowdhury *et al*., 2000; Jayaswal *et al*., 2001; Sinha *et al*., 2003Pugazhenthi and Kumar 2004) ลักษณะของแผ่นเมมเบรนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่นนี้ แสดงในตารางที่ 13 สำหรับแผ่นเมมเบรนที่หนา 50 และ 200 ไมโครเมตร

จากตารางที่ 13 พบว่า สำหรับแผ่นเมมเบรนที่หนา 50 ไมโครเมตรนั้น ที่ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่เวลา 1-5 ชั่วโมง แผ่นเมมเบรนทั้งแผ่นละลายในสารละลายไฮดราซีนไฮเดรตจนเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อลดความเข้มข้นลงมาเป็น 75 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่าไม่เกิดการละลายของแผ่นเมมเบรนที่เวลาการแช่ 1 ชั่วโมง แต่แผ่นเมมเบรนมีความเปราะโดยแตกได้อย่างง่ายเมื่อกระทบกับแท่งแก้วขณะล้าง เมื่อเพิ่มระยะเวลาการแช่ที่ความเข้มข้นทั้งสองนี้ จะพบว่าแผ่นเมมเบรนแตกเป็นชิ้นเล็กๆ โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลามากขึ้นจะเห็นการละลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อลดความเข้มข้นเป็น 25เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก หรือต่ำกว่า แผ่นเมมเบรนไม่ละลายภายใน 5 ชั่วโมง แต่แผ่นเมมเบรนยังคงแตกง่ายเมื่อออกแรงบิด อย่างไรก็ตามได้พบว่าสภาวะที่ไม่รุนแรงในช่วง 5 ชั่วโมงและสามารถให้แผ่นเมมเบรนที่มีขนาดเท่ากับขนาดก่อนแช่และไม่แตกเมื่อออกแรงบิดด้วยมือ (ในที่นี้เรียกว่า แผ่นมีความเหนียว) คือช่วงความเข้มข้นของไฮดราซีนไฮเดรต 2.5 – 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เวลา 5 ชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ช่วงระยะเวลาที่ให้แผ่นที่มีสมบัติเหล่านี้จะเป็น 1 – 4 ชั่วโมง

สำหรับแผ่นเมมเบรนที่หนา 200 ไมโครเมตรนั้น พบว่ายังคงละลายในสารละลายไฮดราซีนไฮเดรตที่เข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในระยะเวลา 1- 5 ชั่วโมงนี้ แต่พบว่าแผ่นเมมเบรนที่หนามากขึ้นนี้สามารถทนสารละลายไฮดราซีนไฮเดรตได้มากขึ้นด้วยกล่าวคือ ไม่พบการละลายของแผ่นเมมเบรนเมื่อแช่ที่มีความเข้มข้น 75 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อใช้ระยะเวลาในการแช่ต่ำกว่า 4 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ

ตารางที่ 13 ลักษณะของเมมเบรนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่นที่ใช้ไฮดราซีนไฮเดรตเป็นรีดิวซิ่งเอเจนต์

<table>
<tr><th>ความหนาเมมเบรน (ไมโครเมตร)</th><th>เวลาทำปฏิกิริยา (ช่วโมง) / ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)</th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th></tr>
<tr><td rowspan="8">50</td><td>98</td><td colspan="5">ละลาย</td></tr>
<tr><td>75</td><td>เปราะ2</td><td colspan="4">ละลาย</td></tr>
<tr><td>50</td><td>เปราะ2</td><td colspan="4">ละลาย</td></tr>
<tr><td>25</td><td colspan="3">เปราะ1</td><td colspan="2">เปราะ2</td></tr>
<tr><td>15</td><td colspan="4">เหนียว</td><td>เปราะ1</td></tr>
<tr><td>10</td><td colspan="5" rowspan="3">เหนียว</td></tr>
<tr><td>5</td></tr>
<tr><td>2.5</td></tr>
<tr><td rowspan="6">200</td><td>98</td><td colspan="5">ละลาย</td></tr>
<tr><td>75</td><td colspan="3">เปราะ2</td><td colspan="2">ละลาย</td></tr>
<tr><td>50</td><td colspan="4">เปราะ2</td><td>ละลาย</td></tr>
<tr><td>25</td><td>เหนียว</td><td colspan="3">เปราะ1</td><td>เปราะ2</td></tr>
<tr><td>15</td><td colspan="5" rowspan="2">เหนียว</td></tr>
<tr><td>10</td></tr>
</table>

หมายเหตุ 1. “ละลาย” คือ แผ่นเมมเบรน (บางส่วนหรือทั้งหมด) ละลายในสารละลายไฮดราซีนไฮเดรต เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ขนาดของแผ่นเมมเบรนเล็กลงกว่าขนาดก่อนแช่

2. ตัวเลขหลัง “เปราะ” แสดงถึงระดับความเปราะ โดยเลข 2 แสดงถึงแผ่นเมมเบรนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่น แต่แตกหักเสียหายในขั้นตอนการล้าง และเลข 1 แสดงถึงแผ่นเมมเบรนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่นและขั้นตอนการล้าง โดยไม่เกิดการแตกหัก แต่แผ่นสามารถแตกได้อย่างง่ายดายเมื่อถูกบิดด้วยมือ (นั่นคือ เปราะ1 แข็งแรงกว่า เปราะ2)

3. ในที่นี้ “เหนียว” หมายถึงแผ่นเมมเบรนไม่แตกเมื่อถูกบิดด้วยมือ

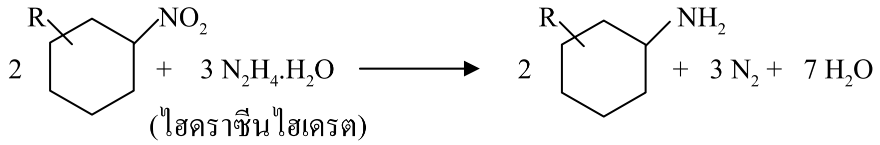
นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะ (ความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่) ที่แผ่นเมมเบรนยังคงเหนียว และมีขนาดเท่ากับก่อนแช่ มีช่วงที่กว้างกว่าเมื่อเทียบกับการใช้แผ่นเมมเบรนที่หนาเพียง 50 ไมโครเมตร นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (IEC) ของแผ่นเมมเบรนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่นโดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรต (ตาราง 14) ได้แสดงให้เห็นว่า แผ่นเมมเบรนที่ผ่านปฏิกิริยารีดักชั่นด้วยไฮดราซีนไฮเดรตเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ระยะเวลาการแช่ 5 ชั่วโมง มีค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุสูงสุด คือ 0.93 มิลลิอีควิวาเลนซ์ต่อกรัม ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น เป็น 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ด้วยเวลาที่ใช้น้อยคือ 1 ชั่วโมง จะทำให้ค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุต่ำกว่า และที่ระยะเวลาการแช่เท่ากันคือ 5 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่สูงกว่าก็จะให้ค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุที่สูงกว่า เนื่องจากค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุที่มีค่ามาก หมายถึงการมีปริมาณหมู่เอมีนที่มากขึ้นด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สภาวะที่ให้ปริมาณหมู่เอมีนสูงที่สุดที่ควรใช้ในปฏิกิริยารีดักชั่นนี้ คือใช้สารละลายไฮดราซีนไฮเดรต 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ระยะเวลา 5 ชั่วโมง

นอกจากนี้ปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุของพอลิเมอร์ที่ไม่มีหมู่เอมีน คือพอลิฟีนิลซัลโฟน และไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน จะเห็นว่ามีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิอีควิวาเลนซ์ต่อกรัม ซึ่งแท้จริงแล้วควรมีค่าเป็นศูนย์ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากความผิดพลาดจากการวัด เพราะมีอยู่ 1 ใน 3 ครั้งที่ให้ค่าไม่เป็นศูนย์แต่ใกล้เคียงมาก ดังนั้นเมื่อนำมาเฉลี่ยแล้วจึงมีค่ามากกว่าศูนย์เล็กน้อยนั่นเอง

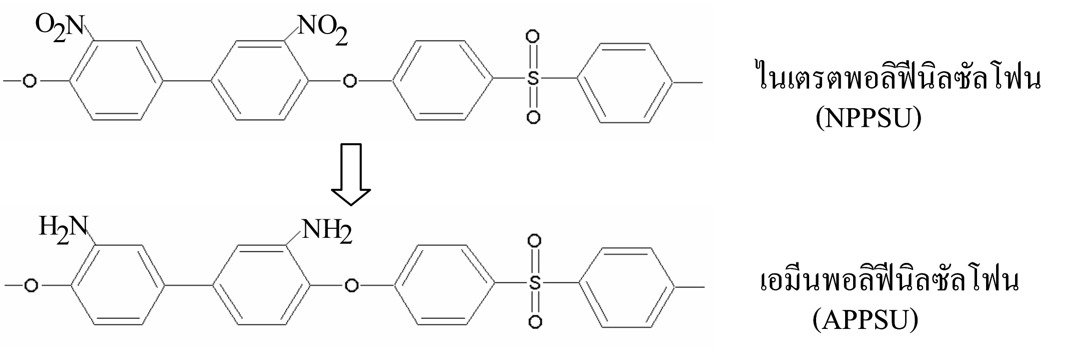
ตารางที่ 14 ปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (IEC) ของพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) และเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ทั้ง 3 สภาวะ

สภาวะของการทดลอง	ปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (meq/g)
PPSU	0.01
NPPSU	0.01
APPSU : 25 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง	0.76
APPSU : 15 เปอร์เซ็นต์ 5 ชั่วโมง	0.93
APPSU : 10 เปอร์เซ็นต์ 5 ชั่วโมง	0.10

การทำปฏิกิริยารีดักชั่นโดยใช้สารละลายไฮดราซีนไฮเดรตเพื่อเปลี่ยนหมู่ไนโตรให้กลายเป็นหมู่เอมีน ได้มีผู้ศึกษาไว้มากมายทั้งที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Lauwiner *et al.*, 1998) และไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา (Chowdhury *et al.*, 2001; Jayaswal *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2003; Pugazhenthi and Kumar 2004) ซึ่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่ไนโตรให้กลายเป็นหมู่เอมีนโดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรตในงานวิจัยนี้เป็นแบบไม่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา โดยภาพที่ 16 และ 17 แสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเล็กที่มีวงเบนซีน และของไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) ก่อนและหลังปฏิกิริยารีดักชั่น ตามลำดับ



ภาพที่ 16 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนหมู่ไนโตรให้กลายเป็นหมู่เอมีนโดยใช้ไฮดราซีนไฮเดรต



ภาพที่ 17 โครงสร้างของไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) และเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU)

เมื่อพิจารณาส่วนของการวิเคราะห์หมู่เอมีน ด้วยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด หรือเอฟทีไออาร์ แบนด์ของหมู่เอมีนบนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ควรจะพบที่ตำแหน่ง 3350-3550 และ 3250-3450 เซ็นติเมตร$^{-1}$ สำหรับโครงสร้างที่สมมาตร (Symmetry) และไม่สมมาตร (Asymmetry) ตามลำดับ แต่กลับมองไม่เห็นแบนด์เหล่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) เนื่องจากโดนบดบัง (ภาพผนวกที่ ก1) ส่วนการวิเคราะห์ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ หรือเอ็นเอ็มอาร์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) เมื่อนำภาพของไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน (NPPSU) มาเปรียบเทียบกับเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) (ภาพผนวกที่ ข1)

พบว่า ภาพทั้งสองไม่แตกต่างกันมากนัก กล่าวคือ เมื่อพอลิเมอร์มีการเปลี่ยนหมู่ไนโตรเป็นหมู่เอมีนแล้ว ภาพที่ควรจะเป็นมี 2 ลักษณะคือ (1) ต้องเกิดจุดยอดจุดใหม่ขึ้นมาเนื่องจากมีโปรตรอนเพิ่มมาจากตำแหน่งของหมู่เอมีน และ (2) ต้องเกิดการเลื่อนของจุดยอดเก่าเนื่องจากสภาวะของตำแหน่งเดิมเปลี่ยนไปจากการมีหมู่เอมีนมาแทนที่หมู่ไนโตร แต่ภาพที่ได้กลับไม่เห็นเป็นเช่นนั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณหมู่เอมีนที่เกิดขึ้นบนพอลิเมอร์มีไม่มากพอที่จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจากค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุ (ตารางที่ 14) ก็เห็นเป็นเช่นนั้น เนื่องจากมีค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุที่ต่ำ

2. ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์บนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ดัดแปลงโครงสร้าง

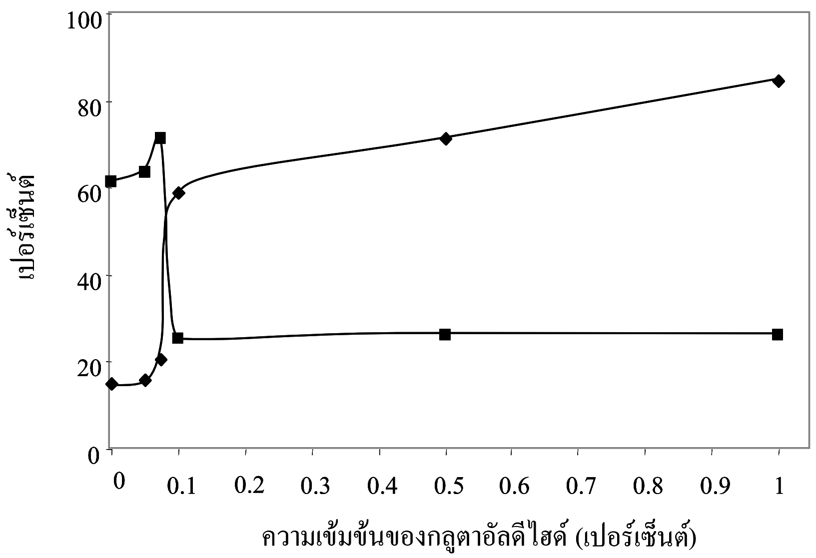
2.1 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ต่อการตรึง

อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปบนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ได้แสดงในภาพที่ 18 โดยความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้อยู่ในช่วง 0 - 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในที่นี้สัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ คืออัตราส่วนของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะบนแผ่นเมมเบรนต่อปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ใช้ในการตรึง และสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป คืออัตราส่วนของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ ซึ่งค่ากิจกรรมทั้งสองจะวัดที่อุณหภูมิเดียวกัน ตามวิธีของ Winkler และ Struckmann (Winkler and Struckmann, 1979) (ดูภาคผนวก ค และ ง)

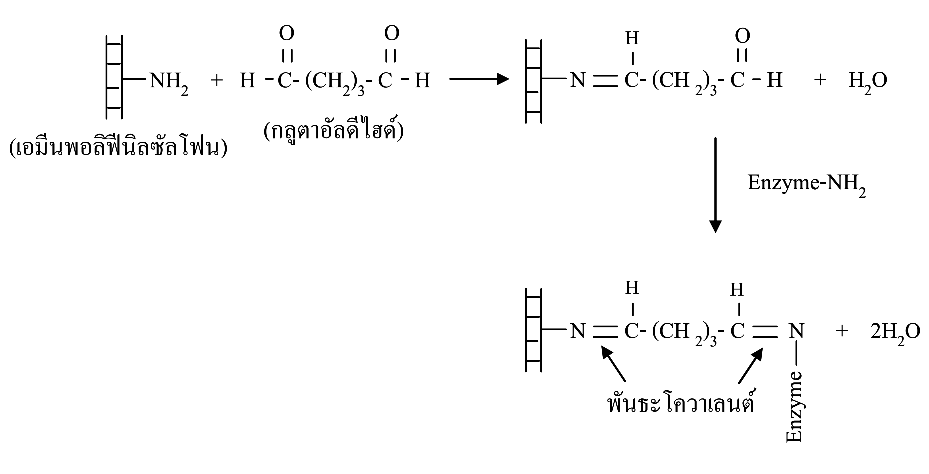
จากการทดลองพบว่า เมื่อไม่กระตุ้นเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนเมมเบรนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ (ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เป็น 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะมีค่าต่ำสุด คือ 15.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งที่สภาวะนี้การยึดเกาะเป็นแบบดูดซับ (adsorption) นั่นเอง และเมื่อกระตุ้นเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนเมมเบรนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่เข้มข้นสูงขึ้น (0.05 - 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จะเห็นว่าสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะมีค่าเพิ่มมากขึ้น

กลูตาอัลดีไฮด์ ทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมขวาง โดยปลายทั้งสองข้างมีหมู่อัลดีไฮด์ ซึ่งหมู่อัลดีไฮด์ที่ปลายข้างหนึ่งจะทำพันธะโควาเลนท์กับหมู่เอมีนของเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน

เมมเบรน และหมู่อัลดีไฮด์ที่ปลายอีกข้างหนึ่งจะจับกับหมู่เอมีนของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์เช่นกัน แสดงดังภาพที่ 19 ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เพื่อใช้กระตุ้นแผ่นเมมเบรน จะทำให้มีปริมาณกลูตาอัลดีไฮด์บนแผ่นมากขึ้นนั่นเอง จึงส่งผลให้สามารถจับกับเอนไซม์ได้มากขึ้น



ภาพที่ 18 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลูตาอัลดีไฮด์ต่อสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (◆) และต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (■) โดยระยะเวลาที่ใช้กระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์คือ 1 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 55 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น



ภาพที่ 19 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์โดยใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง

จากภาพที่ 18 ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้กระตุ้นแผ่นสามารถเพิ่มสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปได้ด้วย โดยพบว่าค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์จรึงรูปเพิ่มจาก 61.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ เป็น 63.38 และ 71.22 เปอร์เซ็นต์เมื่อกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 0.05 และ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ และสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าลดลงประมาณ 3 เท่าที่ความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปนั้นมาจากการที่มีปริมาณเอนไซม์เกาะอยู่บนเมมเบรนมากขึ้นนั่นเอง แต่เมื่อกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรหรือมากกว่า จะทำให้สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าลดลงประมาณ 3 เท่า ซึ่งตรงข้ามกับสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะที่เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ นั่นอาจเป็นสาเหตุจากการที่เมื่อมีปริมาณเอนไซม์เกาะบนเมมเบรนหนาแน่นเกินไป ทำให้ส่งผลต่อการแพร่ของซับสเตรตที่ทำได้ยากขึ้น ดังนั้นจึงได้ว่าค่าความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมคือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยจะให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 71.22 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Desai และคณะ (Desai, 2005) ซึ่งเคยศึกษาความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีผลต่อการตรึงไลเปสบนเม็ดไคโตซาน และพบว่าค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.02 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่พบในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับสิ่งที่ดุษฎีได้รายงานไว้ในการศึกษาการตรึงไลเปสบนเม็ดไคโตซาน ซึ่งค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ดุษฎี, 2549)

2.2 ผลการวิเคราะห์ภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM)

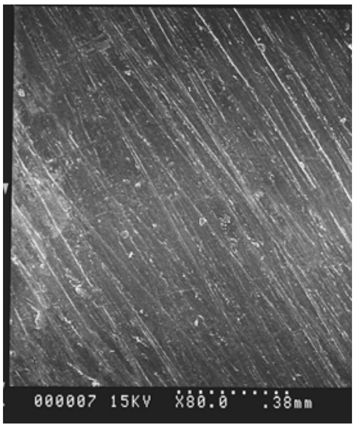
ภาพที่ 20 ก. ถึง จ. แสดงผลการส่องดูภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ซึ่งใช้กำลังขยายคงที่ที่ 80 เท่า ของ 5 ตัวอย่าง ต่อไปนี้ (1) เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (2) เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (3) เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์แล้วตรึงเอนไซม์ไลเปสที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (4) เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปสที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

และ (5) เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปสที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เนื่องจากตัวอย่างที่ 2 เป็นแผ่นเมมเบรนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน ที่เพิ่งผ่านการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์และไม่ได้อบแห้งก่อนนำมาถ่าย SEM ในขณะที่ตัวอย่างที่ 1 นั้นเป็นแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการอบแห้งแล้ว จึงทำให้ภาพที่ 20 ก. และ ข. แตกต่างกันเล็กน้อย ซึ่งในความเป็นจริงถ้ามีการอบแห้งตัวอย่างที่ 2 และด้วยกำลังขยายเพียง 80 ทั้งสองภาพนี้ไม่ควรแตกต่างกัน (พื้นผิวเรียบ) เนื่องจากโมเลกุลของกลูตาอัลดีไฮด์มีขนาดเล็ก ภาพที่ 20 ค. ถึง จ. เป็นการแสดงถึงการกระจายตัวของเอนไซม์บนแผ่นเมมเบรน โดยใช้สภาวะการตรึงเหมือนกัน (พีเอช 7 และ 30 องศาเซลเซียส) โดยภาพที่ 20 ค. เป็นการยึดเกาะของเอนไซม์แบบดูดซับ เพราะไม่มีการกระตุ้นแผ่นเมมเบรนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ก่อนนำไปตรึงเอนไซม์ ในขณะที่ภาพที่ 20 ง. และ จ. เป็นการยึดเกาะแบบพันธะโควาเลนท์โดยกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่เข้มข้น 0.075 และ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ดังนั้นเห็นได้ว่าปริมาณเอนไซม์ที่ยึดเกาะบนแผ่นเมมเบรนด้วยการดูดซับนั้นจะต่ำกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ยึดเกาะบนแผ่นเมมเบรนด้วยพันธะโควาเลนท์ ซึ่งสอดคล้องกับสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะในภาพที่ 18 ซึ่งมีค่าต่ำสุดที่สภาวะการตรึงแบบดูดซับนี้ นอกจากนี้การกระตุ้นแผ่นเมมเบรนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์จะสามารถเพิ่มสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะได้ โดยพบว่าค่าดังกล่าวที่ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าสูงกว่าที่ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งตรงกับภาพที่ถ่ายด้วย SEM นี้ (ภาพที่ 20 ง. และ จ.)

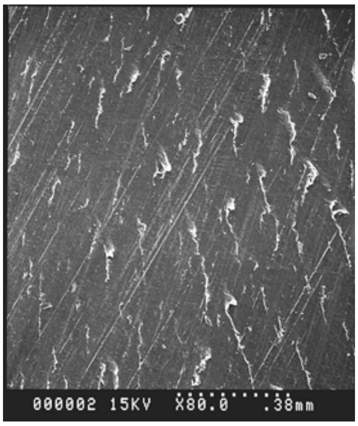
นอกจากนี้ยังพบว่าในภาพที่ 20 ง) ความหนาแน่นของเอนไซม์ที่เกาะบนแผ่นเมมเบรน ต่ำกว่าความหนาแน่นของเอนไซม์ในภาพที่ 20 จ. ซึ่งน่าจะเป็นหลักฐานที่อธิบายถึงการมีค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงที่สุด และเมื่อกระตุ้นแผ่นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อเทียบกับที่ 1เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภาพทั้งสองนี้อาจแสดงหลักฐานของการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์ด้วยกัน ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

ก.

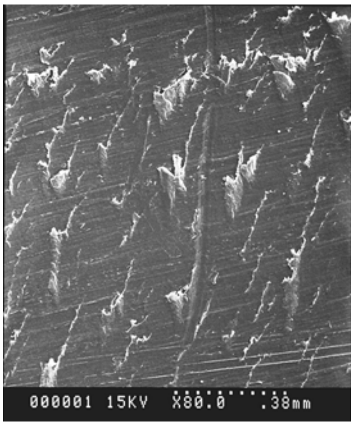


ข.

ค.



ง.



จ.

ภาพที่ 20 ภาพ SEM ของ ก. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน ข. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์แล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ง. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส จ. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ในที่นี้กำหนดให้สภาวะที่ใช้ตรึงไลเปสเหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส)

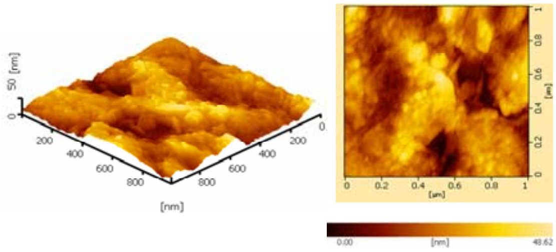
2.3 ผลการวิเคราะห์ความขรุขระของพื้นผิว ด้วยอะตอมมิกฟอร์สไมโครสโคปี หรือเอเอฟเอ็ม (Atomic Force Microscopy, AFM)

ภาพที่ 21 แสดงภาพพื้นผิวของ 5 ตัวอย่าง ซึ่งเตรียมวิธีเดียวกันกับตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ด้วย SEM ที่ได้อธิบายก่อนหน้านี้ การวิเคราะห์พื้นผิวด้วยเอเอฟเอ็ม เป็นการยืนยันด้วยค่าความขรุขระเฉลี่ย (RMS (Root Mean Square) Roughness) ถึงการมีเอนไซม์บนผิว ซึ่งจะทำให้ความขรุขระของพื้นผิวเมมเบรนเปลี่ยนไป โดยได้สรุปความขรุขระเฉลี่ยไว้ของตัวอย่างทั้ง 5 ในตารางที่ 15

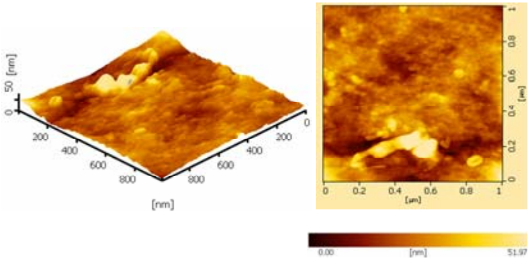
ตารางที่ 15 ค่าความขรุขระเฉลี่ยที่ได้จากเอเอฟเอ็ม

ชนิดตัวอย่าง	ค่าความขรุขระเฉลี่ย (นาโนเมตร)
(1) APPSU	8.608
(2) APPSU + 0.075 เปอร์เซ็นต์ กลูตาอัลดีไฮด์	8.754
(3) APPSU + เอนไซม์	9.157
(4) APPSU + 0.075 เปอร์เซ็นต์ กลูตาอัลดีไฮด์ + เอนไซม์	9.574
(5) APPSU + 1 เปอร์เซ็นต์ กลูตาอัลดีไฮด์ + เอนไซม์	10.35

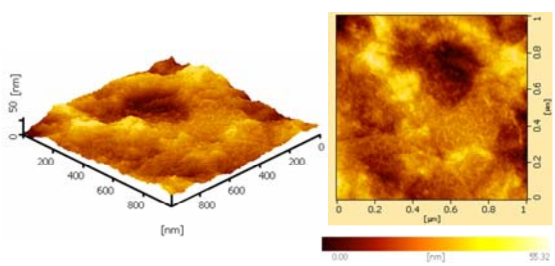
จากภาพ AFM ทั้ง 5 ภาพและตารางที่ 15 พบว่า ค่าความขรุขระเฉลี่ยของตัวอย่างที่ 1 และ 2 มีค่าใกล้เคียงกัน และค่าความขรุขระเฉลี่ยของการยึดเกาะด้วยพันธะโควาเลนท์จะมีค่าสูงกว่าค่าความขรุขระเฉลี่ยเมื่อยึดเกาะแบบดูดซับ และสูงกว่ามากเมื่อเทียบกับแผ่นเมมเบรนที่ไม่ผ่านการตรึงเอนไซม์ ซึ่งแสดงถึงการมีเอนไซม์บนแผ่นเมมเบรนนั่นเอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการส่องภาพ SEM (ภาพที่ 20) และผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อการตรึง (ภาพที่ 18) และให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ Saal (Saal *et al*., 2002) Blasi (Blasi *et al*., 2005) และ Cusma (Cusma *et al*., 2006) คือจะให้ค่าความขรุขระเฉลี่ยที่สูงขึ้นเมื่อพอลิเมอร์ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีใดๆ และจะสูงขึ้นอีกเมื่อนำไปตรึงเอนไซม์



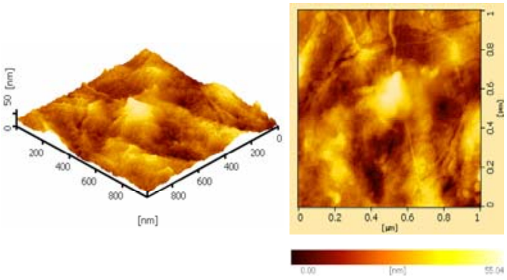
ก.



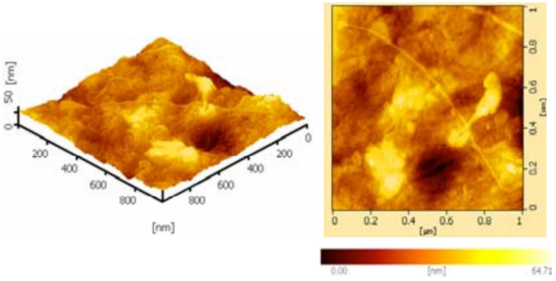
ข.



ค.



ง.



จ.

ภาพที่ 21 ภาพ AFM แบบสามมิติและแบบด้านบน (Top views) ของ ก. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน ข. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์แล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ง. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส จ. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วตรึงเอนไซม์ไลเปส ในที่นี้กำหนดให้สภาวะที่ใช้ตรึงไลเปสเหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส)

2.4 ผลของระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ต่อการตรึง

อิทธิพลของระยะเวลาการกระต้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปบนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน (APPSU) ได้แสดงในภาพที่ 22 โดยระยะเวลาการกระตุ้นที่ใช้มีตั้งแต่ 0 ถึง 4 ชั่วโมง และกำหนดให้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์คงที่ที่ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วตรึงเอนไซม์ที่พีเอช 7 และ 30 องศาเซลเซียส รวมทั้งวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่ 55 องศาเซลเซียส

จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่าสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปในช่วงเวลา 0-4 ชั่วโมง คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ในช่วงแรก (0-2 ชั่วโมง โดยประมาณ) มีการเพิ่มขึ้นจนถึงค่าสูงสุด จากนั้นค่าทั้งสองจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการกระตุ้นต่อไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้อาจอธิบายได้ว่า ที่ระยะเวลาการกระตุ้นต่ำนั้น การเพิ่มระยะเวลากระตุ้นเป็นการเพิ่มปริมาณกลูตาอัลดีไฮด์ที่เกาะบนแผ่น ซึ่งทำให้บริเวณที่ใช้จับเอนไซม์มีมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อให้เวลาการกระตุ้นมากเกินไป จะทำให้หมู่อัลดีไฮด์อีกหนึ่งหมู่ที่เหลือทางด้านปลายสามารถจับกับหมู่เอมีนของเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนแทนการจับกับเอนไซม์ จึงทำให้บริเวณบนแผ่นเมมเบรนที่ใช้กับจับเอนไซม์ลดลง ส่งผลให้มีเอนไซม์มาเกาะได้น้อยลง ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้เลือกระยะเวลาการกระตุ้นที่ 2 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมที่สูง

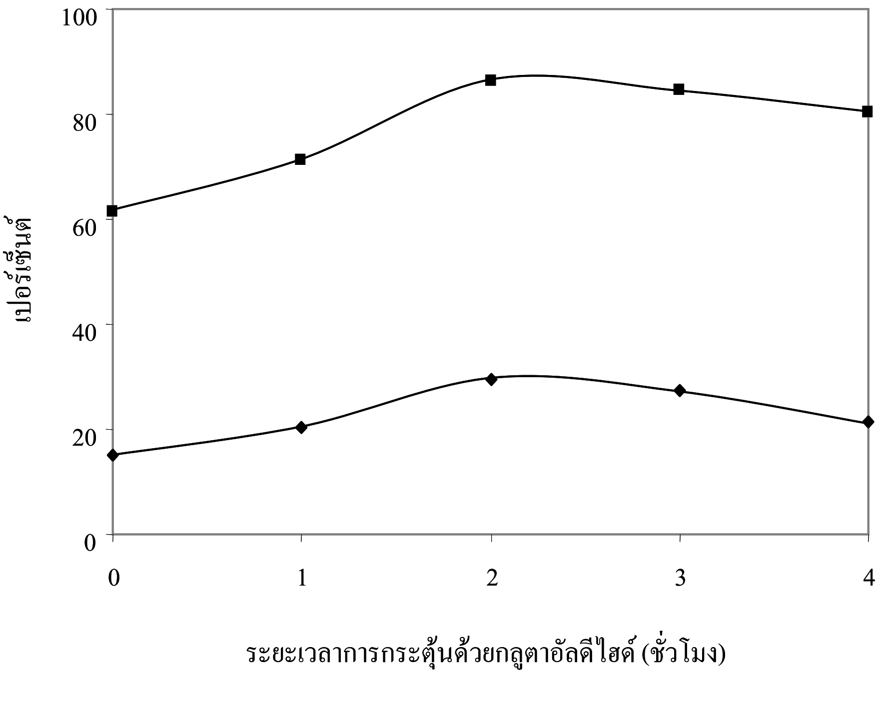
2.5 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป

ภาพที่ 23 คล้ายกับภาพที่ 22 โดยเป็นการเปรียบเทียบค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่วัดที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาการกระตุ้นเดียวกัน (ดูภาคผนวก ค เกี่ยวกับวิธีการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์) โดยในการทดลองนี้ได้กระตุ้นเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนเมมเบรนที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์คงที่ที่ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาตรึงเอนไซม์ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

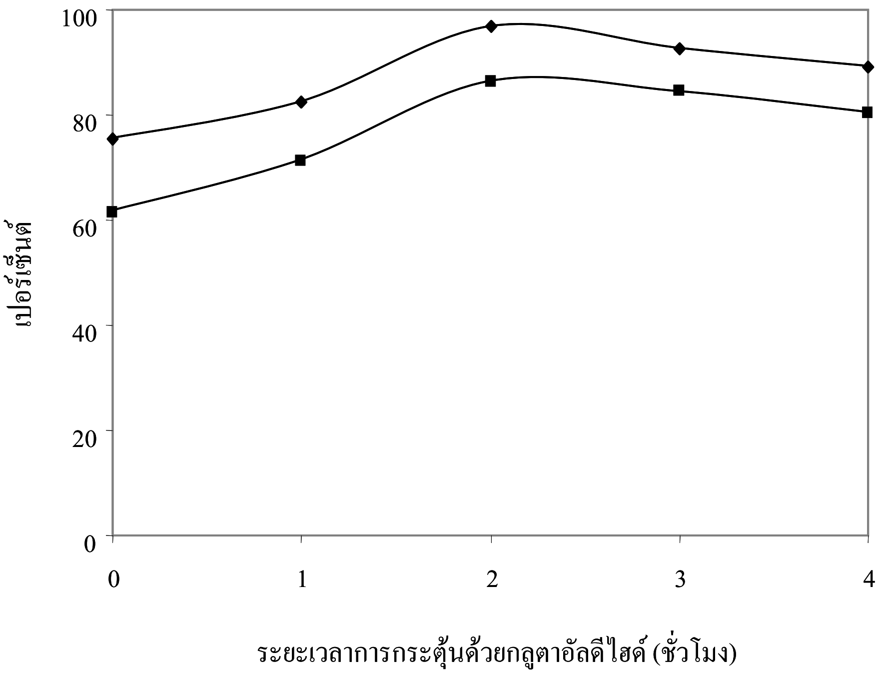
จากการทดลองพบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะมีค่าสูงกว่าการวัดที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปก็ยังคงสูงกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 23 ซึ่งมีสาเหตุจากที่อุณหภูมิ 55 องศา

เซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (denature) ได้ ซึ่งWinkler และ Struckmann (Winkler and Struckmann, 1979) ได้แนะนำว่าควรวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนี้ นอกจากนี้ Reed ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas* คือ 32 องศาเซลเซียส (Reed, 1975)

นอกจากนี้จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่วัดที่ 37 และ 55 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลากระตุ้นต่างๆ มีลักษณะคล้ายกัน โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มจาก 0 เป็น 2 ชั่วโมงโดยประมาณ จากนั้นมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการกระตุ้นต่อไป



ภาพที่ 22 ผลของระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลูตาอัลดีไฮด์ต่อสัดส่วนปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (◆) และต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (■) โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 55 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น



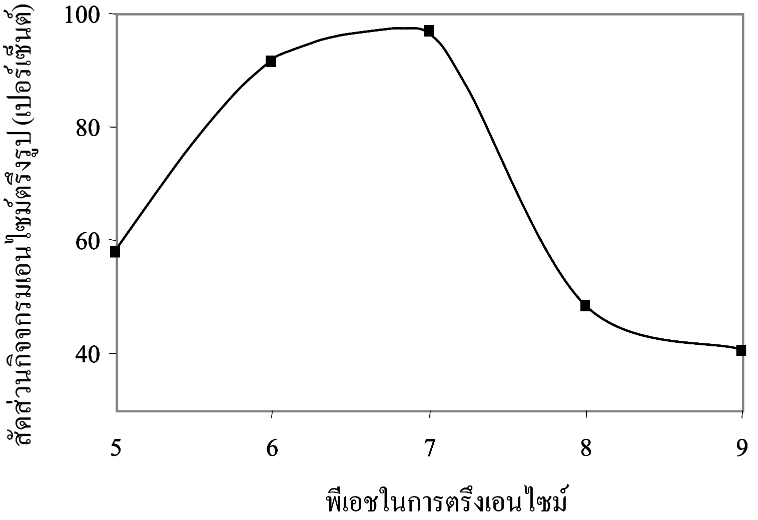
ภาพที่ 23 ผลของอุณหภูมิขณะวัดกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป โดย (■) และ (◆) คือวัดที่ 37 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 2 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น

2.6 ผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์

เมื่อกระตุ้นเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาตรึงเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ กัน (พีเอช 5-9) ที่อุณหภูมิคงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปเนื่องจากการเปลี่ยนค่าพีเอช แสดงดังภาพที่ 24 (ในที่นี้สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปคืออัตราส่วนของกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปต่อกิจกรรมเอนไซม์อิสระ ซึ่งค่าทั้งสองวัดที่ 37 องศาเซลเซียสเหมือนกัน)

จากภาพที่ 24 พบว่าค่าพีเอชที่ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุดก็คือ พีเอช 7 และค่าเท่ากับ 96.75 เปอร์เซ็นต์ และสาเหตุที่พีเอช 5, 6, 8 และ 9 ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์

ตรึงรูปต่ำกว่า เนื่องมาจากเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติจากพีเอชที่ไม่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Reed (Reed, 1975) ที่ว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas* คือ พีเอช 7 – 7.2



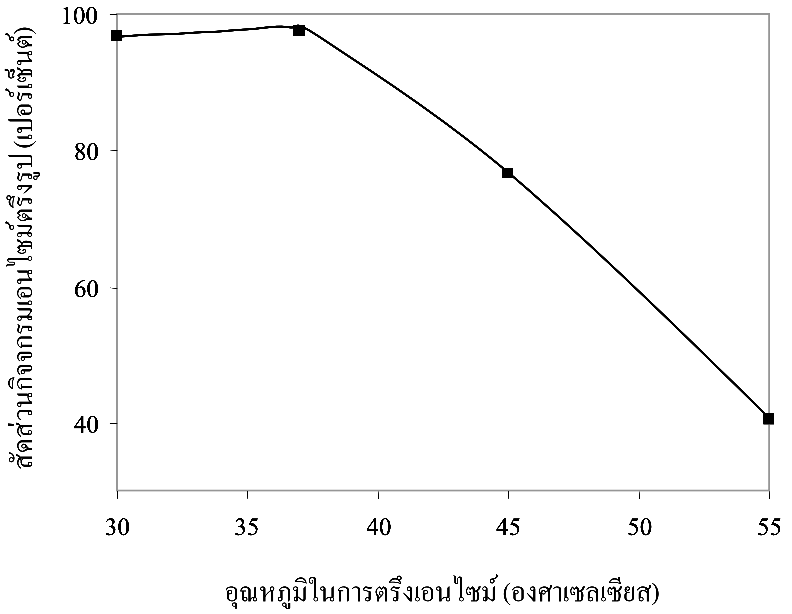
ภาพที่ 24 ผลของพีเอชต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 2 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น

2.7 ผลของอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์

ในการทดลองนี้สภาวะการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์และสภาวะการตรึงเอนไซม์เหมือนกับการศึกษาผลของพีเอชต่อการตรึง แต่อุณหภูมิที่ใช้ตรึงมีค่าอยู่ในช่วง 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส และกำหนดให้พีเอช คงที่ที่ 7 โดยการเปลี่ยนแปลงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปแสดงดังภาพที่ 25

จากภาพที่ 25 พบว่าเมื่อตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะให้ค่าสัดส่วนกิจกรรเอนไซม์ตรึงรูปมากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ส่วนการตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส จะให้ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปลดลง แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การตรึงเอนไซม์ไลเปสที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas* คือ 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Reed (Reed, 1975) ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas* คือ 32 องศาเซลเซียส



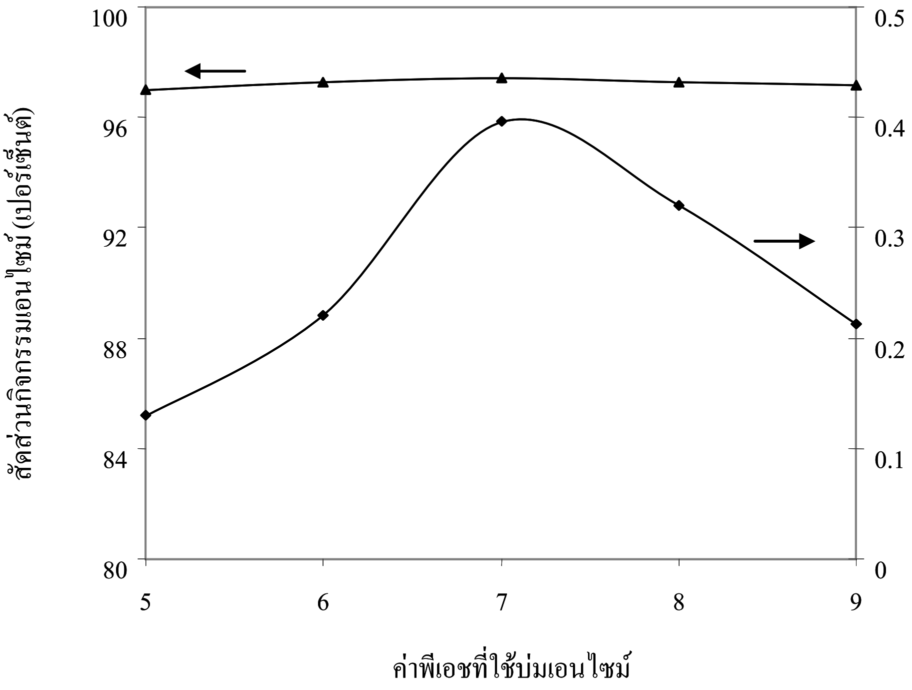
ภาพที่ 25 ผลของอุณหภูมิต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป โดยความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้คือ 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เวลา 2 ชั่วโมง สภาวะที่ใช้ตรึงเอนไซม์จะถูกกำหนดให้เหมือนกัน (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส และเส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนดังกล่าวเท่านั้น

3. ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่ออุณหภูมิและพีเอช

3.1 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่อพีเอช

เนื่องจากงานวิจัยนี้ มุ่งที่จะตรึงเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งมีบทความอ้างว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยานี้ที่ใช้

ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคือ 50 องศาเซลเซียส (ดุษฎี, 2549) ดังนั้นการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปนี้ จึงทำโดยตรึงเอนไซม์ไลเปสที่สภาวะที่เหมาะสม (ที่กล่าวมาข้างต้น) แล้วนำมาบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆ (5 ถึง 9) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพที่ 26 แสดงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่ค่าพีเอชต่างๆ (ซึ่งในที่นี้สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปก็คือ อัตราส่วนของกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการบ่มต่อกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ไม่ผ่านการบ่ม และสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์อิสระคืออัตราส่วนของกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ผ่านการบ่มต่อกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ไม่ผ่านการบ่ม)



ภาพที่ 26 การเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (▲) และเอนไซม์อิสระ(◆) ที่พีเอชที่ใช้บ่มต่างๆ เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น ลูกศรแสดงถึงแกนแนวดิ่ง (แกน y) ที่ใช้แสดงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์

จากภาพที่ 26 พบว่าสำหรับเอนไซม์ตรึงรูป ที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 5 ถึง 9 ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าค่อนข้างคงที่ โดยพบว่ามีค่าสูงสุดอยู่ที่พีเอชประมาณ 7 นั่นคือที่พีเอช 5, 6, 8 และ 9 เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติจากพีเอชที่ไม่เหมาะสมไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจากการวัดปริมาณเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บ่มเอนไซม์ตรึงรูปหลังจากครบกำหนดเวลาบ่มแล้ว พบว่า

ไม่พบปริมาณเอนไซม์หลุดออกมาเป็นนัยสำคัญ ดังนั้นการลดลงของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปจึงน่าจะเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติเท่านั้น

นอกจากนี้ที่พีเอชของการบ่มเหล่านี้ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อิสระในทำนองเดียวกันกับเอนไซม์ตรึงรูป โดยพบค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์อิสระสูงที่สุดที่พีเอชประมาณ 7 เช่นเดียวกัน ส่วนค่าสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อิสระที่ต่ำมากนี้ แสดงถึงการลดลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระที่ผ่านการบ่ม เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ไม่ผ่านการบ่ม ในขณะที่ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าสูงกว่า 90เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบ่งบอกถึงการลดลงที่ไม่มากนักของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการบ่ม เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ไม่ผ่านการบ่ม นั่นแสดงว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีความเสถียร หรือทนต่อพีเอชได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ

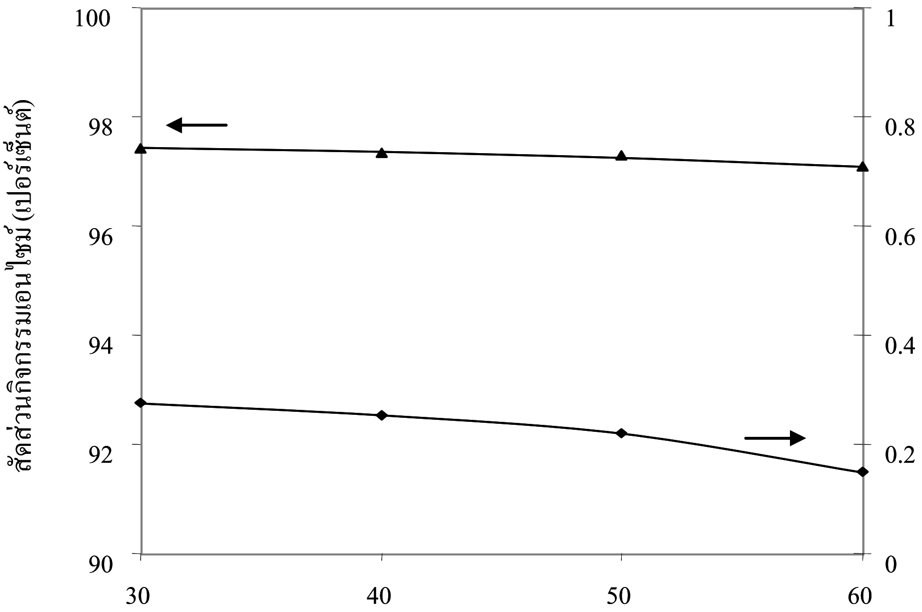
3.2 ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่ออุณหภูมิ

เนื่องจากงานวิจัยนี้ มุ่งที่จะตรึงเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งมีค่าพีเอชของระบบประมาณ 6 ดังนั้นการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปนี้ จึงทำโดยตรึงเอนไซม์ไลเปสที่สภาวะที่เหมาะสม (ที่กล่าวมาข้างต้น) แล้วนำมาบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 6 ที่อุณหภูมิต่างๆ (30 ถึง 60 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพที่ 27 แสดงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิต่างๆ

จากภาพที่ 27 พบว่าที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าสูงสุดอยู่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์จะเสียสภาพธรรมชาติ และจากการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ที่หลุดออกมาขณะบ่มนี้ พบว่าไม่มีการหลุดของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการลดลงของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์นี้เกิดเนื่องจากการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ มากกว่าที่จะเกิดเนื่องจากพันธะที่ยึดระหว่างเอนไซม์กันเอง และระหว่างเอนไซม์กับพอลิเมอร์ถูกทำลาย

ที่อุณหภูมิของการบ่มเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อิสระในทำนองเดียวกันกับเอนไซม์ตรึงรูป โดยมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศา

เซลเซียส ส่วนค่าสัดส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อิสระที่ต่ำมากนี้ แสดงถึงการลดลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระที่ผ่านการบ่ม เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ไม่ผ่านการบ่ม ในขณะที่ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ซึ่งบ่งบอกถึงการลดลงที่ไม่มากนักของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการบ่ม เมื่อเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์อิสระที่ไม่ผ่านการบ่ม นั่นแสดงว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีความเสถียร หรือทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ



ภาพที่ 27 การเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (▲) และเอนไซม์อิสระ(◆) ที่อุณหภูมิที่ใช้บ่มต่างๆ เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น ลูกศรแสดงถึงแกนแนวดิ่ง (แกน y) ที่ใช้แสดงค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์

4. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระในการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น

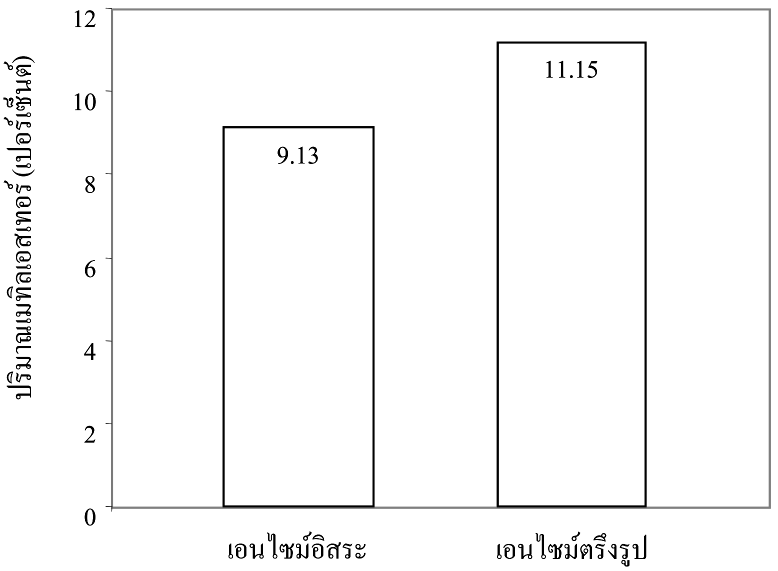
ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและอิสระ จะกระทำที่สภาวะ (อัตราส่วนน้ำมันต่อเมธานอล, ปริมาณน้ำเมื่อเทียบกับน้ำหนักน้ำมัน, ความเร็วรอบที่เขย่า, อุณหภูมิ และเวลาของการทำปฏิกิริยา) ที่ถือว่าดีที่สุด ที่ดุษฎีได้รายงานไว้ ซึ่งใช้ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ตรึงด้วยพันธะ

โควาเลนท์บนเม็ดไคโตซาน (ดุษฎี, 2549) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของน้ำหนักของแผ่นเมมเบรนที่มีเอนไซม์เกาะต่อน้ำหนักของน้ำมันสบู่ดำจาก 1 ต่อ 1 (สภาวะที่ดีที่สุดของดุษฎี) เป็น 1 ต่อ 20 เนื่องด้วยลักษณะของแผ่นเมมเบรนที่บางและเรียบ จึงทำให้เกิดการยึดติดกันของแผ่นขณะทำปฏิกิริยาได้ดี ซึ่งจะส่งผลต่อการลดลงของปริมาณเอนไซม์ที่จะทำงานได้ (ในขณะที่งานของดุษฎีได้ใช้เม็ดกลมไคโตซาน ดังนั้นการยึดติดกันของเม็ดจึงเกิดน้อยกว่า) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนแผ่นให้มากขึ้น อาจไม่ได้เป็นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ทำงานได้ในสัดส่วนเดียวกัน ดังนั้นการลดจำนวนแผ่นอาจเป็นทางเลือกที่ดีกว่า นอกจากนี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นที่ใช้เอนไซม์อิสระ จึงได้ใช้ปริมาณของเอนไซม์อิสระที่มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเอนไซม์ที่เกาะอยู่บนแผ่นเมมเบรนที่ใช้งานข้างต้น

ภาพที่ 28 แสดงถึงปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นที่ใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตรึงรูป มีค่าสูงกว่าเมื่อใช้เอนไซม์อิสระ แม้ว่าก่อนเริ่มทำปฏิกิริยาจะใช้ปริมาณเอนไซม์ทั้งสองรูปแบบที่เท่ากัน แต่เนื่องจากขณะทำปฏิกิริยา แผ่นเมมเบรนได้ยึดติดกันอย่างง่ายดาย โดยไม่หลุดออกจากกันตลอดระยะเวลาการทำปฏิกิริยา จึงทำให้ซับสเตรต (ในที่นี้คือ น้ำมันสบู่ดำ) ไม่สามารถเข้าไปถึงบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ และไม่เกิดการทำปฏิกิริยาเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้ การยึดติดกันของแผ่นเมมเบรนนี้จึงแสดงให้เห็นว่าจำนวนเอนไซม์ที่ทำงานได้บนแผ่นเมมเบรนนี้มีค่าน้อยกว่าปริมาณเอนไซม์อิสระที่ทำงานได้ ซึ่งขัดแย้งกับค่าเมทิลเอสเทอร์จากการใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีค่าสูง โดยคาดว่ามีสาเหตุจากเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปต่ออุณหภูมิและพีเอชที่สูงกว่าเอนไซม์อิสระนั่นเอง

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการทดลองนี้กับงานวิจัยของดุษฎี (ดุษฎี, 2549) ที่ใช้ปริมาณเม็ดไคโตซานที่มีเอนไซม์ไลเปสเกาะอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น ที่สภาวะเดียวกัน พบว่าได้ค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จากเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปเท่ากับ 32.68 และ 25.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สาเหตุที่งานวิจัยของดุษฎีได้ค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์มากกว่านั้น เพราะว่าใช้ปริมาณเม็ดไคโตซานที่มีเอนไซม์เกาะในปริมาณมาก คือ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน และในแต่ละเม็ด ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะมีค่าสูงกว่าเนื่องจากในทุกเมอร์ของไคโตซานจะมีหมู่เอมีน และความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงมีค่าเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่งานวิจัยนี้ใช้เพียง 0.014 เปอร์เซ็นต์โดย

น้ำหนักต่อปริมาตร (หมายเหตุในการศึกษาของดุษฎี จะเห็นการลดลงของเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากเอนไซม์ตรึงรูป เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ)



ภาพที่ 28 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น โดยสภาวะของการทำปฏิกิริยาที่ใช้คือ อัตราส่วนของปริมาณแผ่นเมมเบรนที่มีเอนไซม์เกาะอยู่ต่อน้ำหนักน้ำมันมีค่าเป็น 1ต่อ 20 อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสบนพอลิเมอร์ด้วยพันธะโควาเลนท์ ซึ่งถือเป็นพันธะที่แข็งแรงมาก โดยเอนไซม์ที่ตรึงรูปนี้จะนำไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นแทนการใช้เอนไซม์อิสระ ซึ่งมีราคาแพง เนื่องด้วยพอลิฟีนิลซัลโฟน (PPSU) มีคุณสมบัติเหนียว ทนกรดและเบสได้ดี และยังมีค่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชั่นสูง จึงเหมาะที่จะใช้ตรึงไลเปสแล้วนำไปใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น และเนื่องจากไม่มีโครงสร้างทางเคมีที่เป็นอะลิฟาติก จึงทำให้เหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้กับปฏิกิริยาไนเตรชั่นที่ใช้ไนโตรเบนซีนเป็นตัวทำละลาย และสภาวะที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส และ 1 ชั่วโมง โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยอิเลเมนทอลอะนาไลเซอร์ ได้พบว่ามีหมู่ไนโตรประมาณ 2 หมู่ต่อ 1 เมอร์ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎี และในปฏิกิริยารีดักชั่นด้วยไฮดราซีนไฮเดรตจำเป็นต้องใช้แผ่นเมมเบรนที่มีความหนา 200 ไมโครเมตร ซึ่งจะทำให้ทนต่อไอดราซีนที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักระยะเวลาการทำปฏิกิริยาเป็น 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ค่าปริมาณการแลกเปลี่ยนประจุสูงสุด

ในการศึกษาสภาวะที่ดีที่สุดของการตรึงเอนไซม์นั้นพบว่า ต้องกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการตรึงไลเปสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 นาน 18 ชั่วโมง โดยเอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพสูงกว่าเอนไซม์อิสระ และคาดว่าเป็นสาเหตุของค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ที่สูงกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ งานวิจัยนี้น่าจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อแก้ปัญหาของการยึดติดกันของแผ่นเมมเบรนขณะทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น และอาจช่วยเพิ่มค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเตอร์ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาตัวแปรอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน ด้วยพันธะโควาเลนท์เพิ่มเติม เช่น ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึง และความเข้มข้นของประจุ เป็นต้น

2. ควรศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปส ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติที่ผลิตขึ้นเอง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต

3. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยเอนไซม์ตรึงรูปบนเอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟนและเอนไซม์อิสระ

4. ควรศึกษาลักษณะรูปร่างของเอนไซม์ตรึงรูปในรูปแบบอื่น เช่น รูปร่างกลม เพื่อจะใช้งานได้ดีกว่ารูปร่างแบบแผ่น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, สมพร อิศวิลานนท์ และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. **การศึกษาสถานภาพวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอดีเซล**. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพ.

คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. **พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล**. พิมพ์ครั้งแรก. บริษัท แปลน พริ้นติ้ง จำกัด, กรุงเทพ.

ดุษฎี รัตนพระ. 2549. **การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปลื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่4. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ.

ปวีณา อร่ามรัตนา. 2547. **การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันดิบโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกมารทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และ มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. **ชีวเคมี**. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพ.

สารสนเทศเกษตร กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชไร่. 2550. **สบู่ดำ**. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/fieldcrops/phinut/index.htm, 11 มกราคม 2550.

Amorim, R. V. S., E. S. Melo, M. G. C. Cunha, W. M. Ledingham and G. M. C. Takaki. 2003. Chitosan from Syncephalastrum racemosum used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**. 89: 35-39.

Bayramoglu, G., Y. Kacar, A. Denizli and M. Y. Arica. 2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. **Journal of Food Engineering**. 52: 367-374.

Blasi, L., L. Longo, P. P. Pompa, L. Manna, G. Ciccarella, G. Vasapollo, R. Cingolani, R. Rinaldi, A. Rizzello, R. Acierno, C. Storelli and M. Maffia. 2005. Formation and characterization of glutamate dehydrogenase monolayers on silicon supports. **Biosensors and Bioelectronics**. 21: 30-40.

Botvay, A., A. Máthé and L. Pöppl. 1999. Nitration of polyethersulfone by ammonium nitrate and trifluoroacetic anhydride. **Polymer**. 40: 4965-4970.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protien utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254.

Bryjak, J. and B. N. Kolarz. 1998. Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers. **Process Biochemistry**. 33: 409-417.

Chaplin, M. F. and C. Bucke. 1990. **Enzyme technology**. Cambridge University.

Chowdhury, S. R., P. Kumar, P.K. Bhattacharya and A. Kumar. 2001. Separation characteristics of modified polysulfone ultrafiltration membrane using NO_x. **Separation and Purification Technology**. 24: 271-282.

Cui. 2005. **Method for nitrating and aminating an aryl polymer**. U.S. Patent 6, 878, 803.

Cusma, A., A. Curulli, D. Zane, S. Kaciulis and G. Padeletti. 2006. Feasibility of enzyme biosensors based on gold nanowires. **Materials Science and Engineering**. (Article in press).

Daly, W.H., S. Lee and C. Rungaroonthaikul. 1988. Modification of Condensation Polymers. ACS SYMPOSIUM SERIES. **Chemical Reactions on Polymers**. 364:4-23.

Demirbas, A. 2002. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. **Energy Conversion and Management**. 43: 2349–2356.

Demirbas, A. 2005. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**. 31: 466–487.

Desai, P. D., A. M. Dave and S. Devi. 2005. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food Chemistry**. (Article in press).

Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 92: 405-416.

Gancarz, I., J. Bryjak, G. Pozniak and W. Tylus. 2003. Plasma modified polymers as a support for exzyme immobilization II. Amines plasma. **European Polymer Journal**. 39: 2217-2224.

Ghosh, A. K., V. Ramachandhran, M. S. Hanra and B. M. Misra. 2000. Synthesis, Characterization and Performance of Nitrated Polysulfone Membranes. **Pure and Applied Chemistry**. A37(6): 591-608.

Gonchar, A. M. and V. L. Auslender. 1996. Immobilization of bacterial proteases on water-solved polymer by means of electron beam. **Radiation Physics and Chemistry**. 48: 795-797.

Han, H., W. Cao and J. Zhang. 2005. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO2 as co-solvent. **Process Biochemistry**. 40: 3148–3151.

Hill, M. L., Y. S. Kim, B. R. Einsla and J. E. McGrath. 2006. Zirconium hydrogen phosphate/disulfonated poly(arylene ether sulfone) copolymer composite membranes for proton exchange membrane fuel cells. **Journal of Membrane Science**. 283: 102-108.

Huckel, M., H. J. Writh and M. T. W. Hearn. 1996. Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. 31: 165-179.

Hwang, S., K. T. Lee, J. W. Park, B. R. Min, S. Haam, I. S. Ahn and J. K. Jung. 2004. Stability analysis of Bacillus stearothermophilus L1 lipase immobilizedon surface-modified silica gels. **Biochemical Engineering Journal**. 17: 85-90.

Jayaswal N., S. Sinha and A. Kumar. 2001. Effect of chemical modifications upon exchange capacity of aminated macroporous styrene-divinyl benzene (PS-DVB) copolymer anion exchange resin. **Journal of Applied Polymer Science**. 79: 1735-1748.

Juang, R. S., F. C. Wu and R. L. Tseng. 2001. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresourse Technology**. 80: 187-193.

Lauwiner, M., P. Rys and J. Wissmann. 1998. Reduction of aromatic nitro compounds with hydrazine hydrate in the presence of an iron oxide hydroxide catalyst. I. The reduction of monosobstituted nitrobenzenes with hydrazine hydrate in presence of ferrihydrite. **Applied Catalysis A: General**. 172: 141-148.

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

Madras, G., C. Kolluru and R. Kumar. 2004. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. **Fuel**. 83: 2029-2033.

Magnan, E., I. Catarino, D. P. Jeanjean, L. P. Belloy and M. P. Belleville. 2004. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. **Journal of membrane Science**. 241: 161-166.

Murray, M., D. Rooney, M. V. Neikerk, A. Montenegro and L. R. Weatherley. 1997. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. **Process Biochemistry**. 32: 479-486.

Noureddini, H., X. Gao and R. S. Philkana. 2004. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**. (Article in press).

Pugazhenthi, G. and A. Kumar. 2004. Enzyme membrane reactor for hydrolysis of olive oil using lipase immobilized on modified PMMA composite membrane. **Journal of Membrane Science**. 228: 187-197.

Reed, G. 1975. **Enzymes in Food Processing**. Academic Press. Second edition.

Saal, K., V. Sammelselg, A. Lohmus, E. Kuusk, G. Raidaru, T. Rinken and A. Rinken. 2002. Characterization of glucose oxidase immobilization onto mica carrier by atomic force microscopy and kinetic studies. **Biomolecular Engineering**. 19: 195-199.

Shuler, M. L. and F. Kargi. 2002. Second edition. **Bioprocess Engineering**. Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Enineering Sciences.

Sinha, S., N. Jayaswal and A. Kumar. 2003. Preparation of High Capacity Weak Base Poly(methyl methacrylate)-Ethylene Glycol Dimethylacrylate Copolymer Anion Exchange Resin by Modification Using NO_X. **Journal of Applied Polymer Science**. 89: 1991-1999.

Solvay Advanced Polymers. 2550. **polysulfone and polyphenylsulfone**. Available Source: http://www.solvay.com, January 11, 2550.

Son, W. K., H. Y. Song, S. H. Kim, H. J. Kim and W. G. Kim. 2002. Synthesis and Properties of Amine-Containing Poly(arylene ether sulfone) as an Anion-Exchange Matrix. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**. 40: 4281-4287.

Villeneuve, P., J. M. Muderhwa, J. Graille and M. J. Haas. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. 9: 113-148.

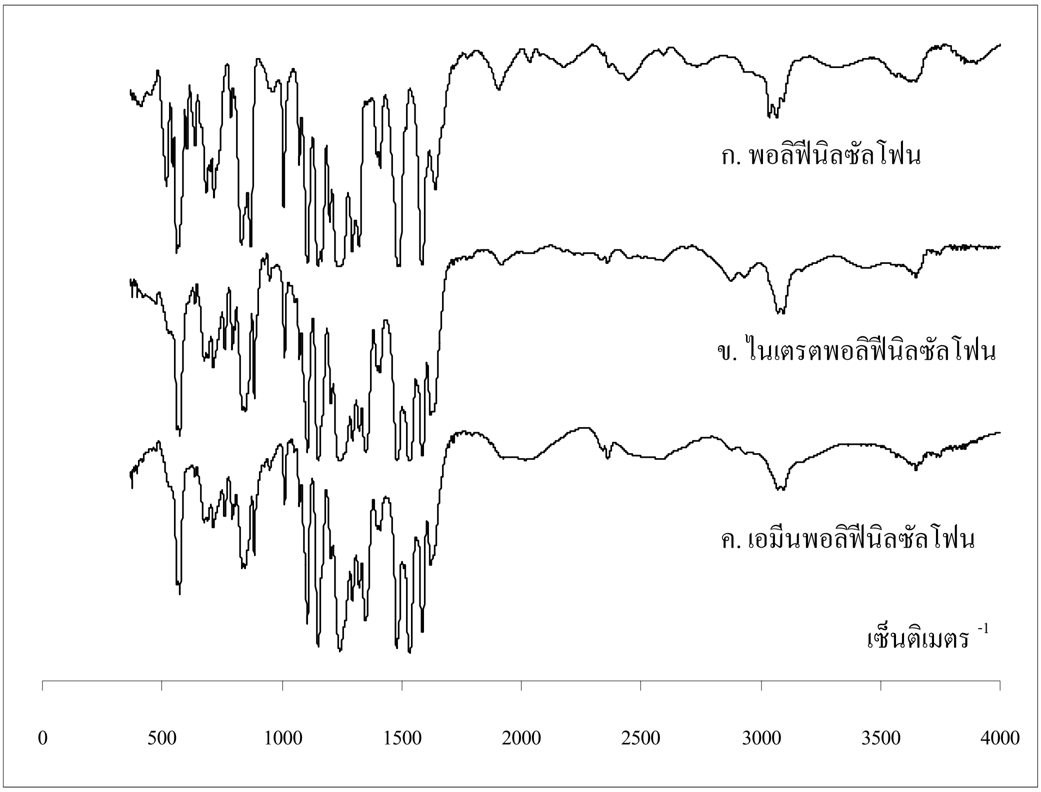
Winkler,U.K. and M. Stuckmann. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. **Journal of Bacteriology**. 138: 663-670.

Wong, D. W. S. 1995. **Food Enzyme: Structure and Mechanism**. Chapman & Hall.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

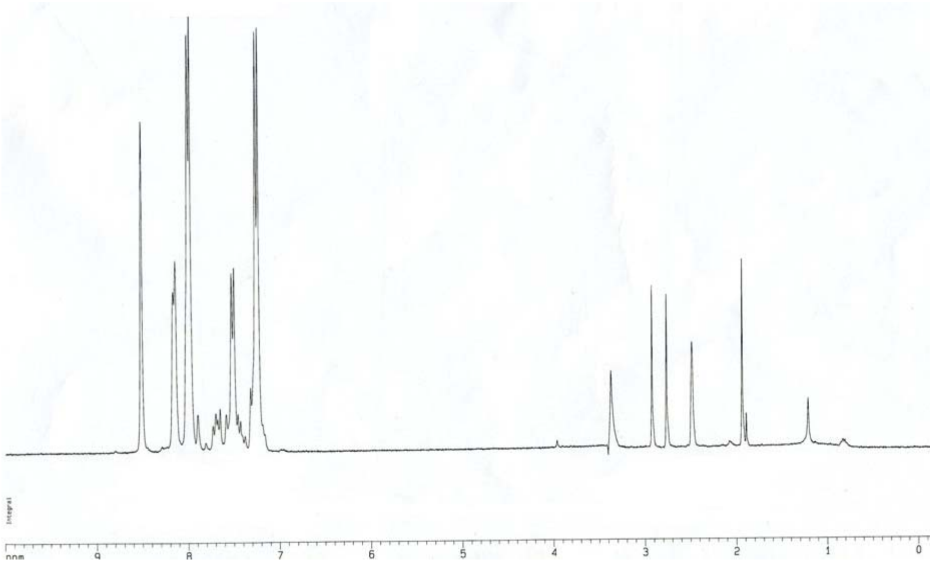
ภาพฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด หรือเอฟทีไออาร์ (FTIR)



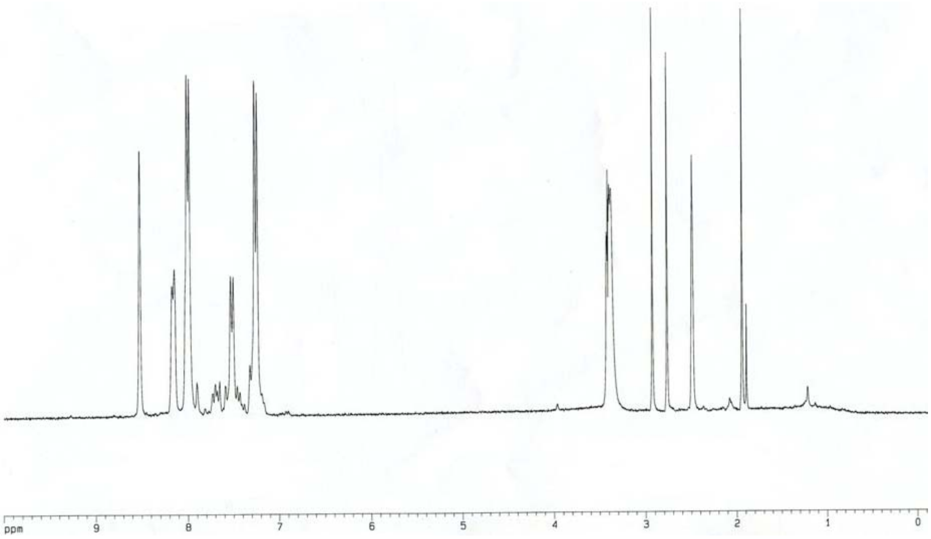
ภาพผนวกที่ ก1 เอฟทีไออาร์ของ ก. พอลิฟีนิลซัลโฟน ข. ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน และ ค. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน

ภาคผนวก ข

ภาพนิวเคลียร์แมกแนติกเรโซแนนซ์ หรือเอ็นเอ็มอาร์ (NMR)



ก.



ข.

ภาพผนวกที่ ข1 เอ็นเอ็มอาร์ของ ก. ไนเตรตพอลิฟีนิลซัลโฟน และ ข. เอมีนพอลิฟีนิลซัลโฟน

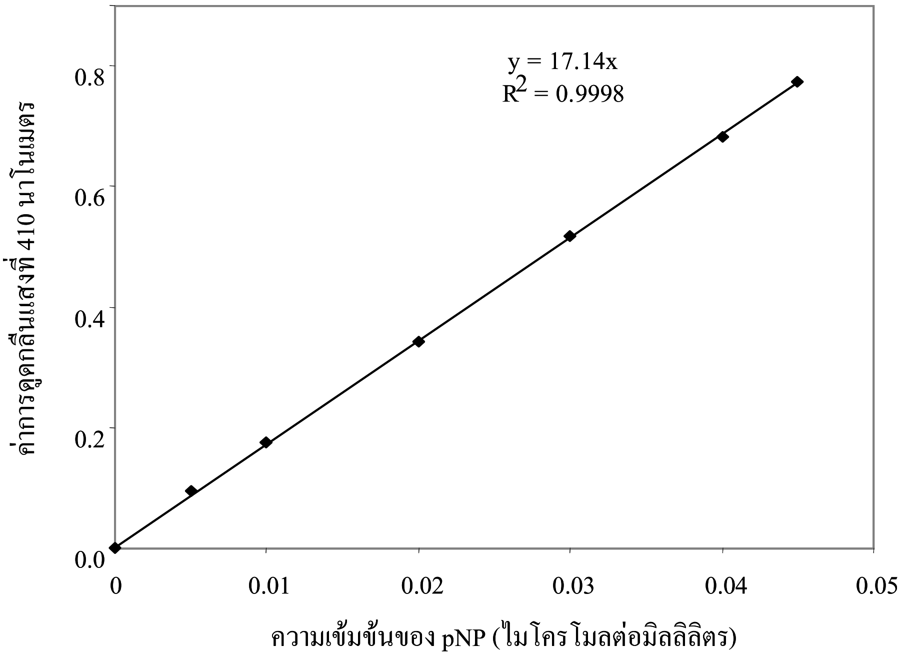
ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์เอนไซม์

1. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป Winkler and Struckmann (1979)

1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

เจือจางสารละลาย *p*-nitrophenol (pNP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-0.045 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ได้ผลดังภาพผนวกที่ ค1



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

1.2 วิธีการเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

1.2.1 ละลาย *p*-nitrophenoyl palmitate 30 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอล ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร

1.2.2 ละลาย Triton-x 100 ปริมาณ 0.4 กรัม และ Gum arabic 0.1 กรัม ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

1.2.3 ละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาณ 211.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 1000 มิลลิลิตร

1.3 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

1.3.1 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อิสระ ให้เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ในที่นี้ใช้ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์อิสระ คือ 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3.2 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป ให้เตรียมสารละลายเอนไซม์ตรึงรูปที่ถูกตรึงลงบนแผ่นเมมเบรน ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 1 เซนติเมตร จำนวน 1 แผ่น

1.3.3 เติมสารละลายในข้อ 1.2.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายในข้อ 1.2.2 ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน ในกรณีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อิสระให้เติมสารละลายเอนไซม์อิสระที่เตรียมไว้จากข้อ 1.3.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิตร ส่วนในกรณีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป ให้เติมเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมไว้จากข้อ 1.3.2 จากนั้นเขย่าให้เข้ากันอีกรอบ แล้วนำหลอดทดลองดังกล่าวไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3.4 เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายในข้อ 1.2.3 ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 5 นาที

1.3.5 หาปริมาณ *p*-nitrophenol โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย *p*-nitrophenyl palmitate แล้วให้ *p*-nitrophenol เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะทดสอบ

2. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ไลเปส Bradford (1976)

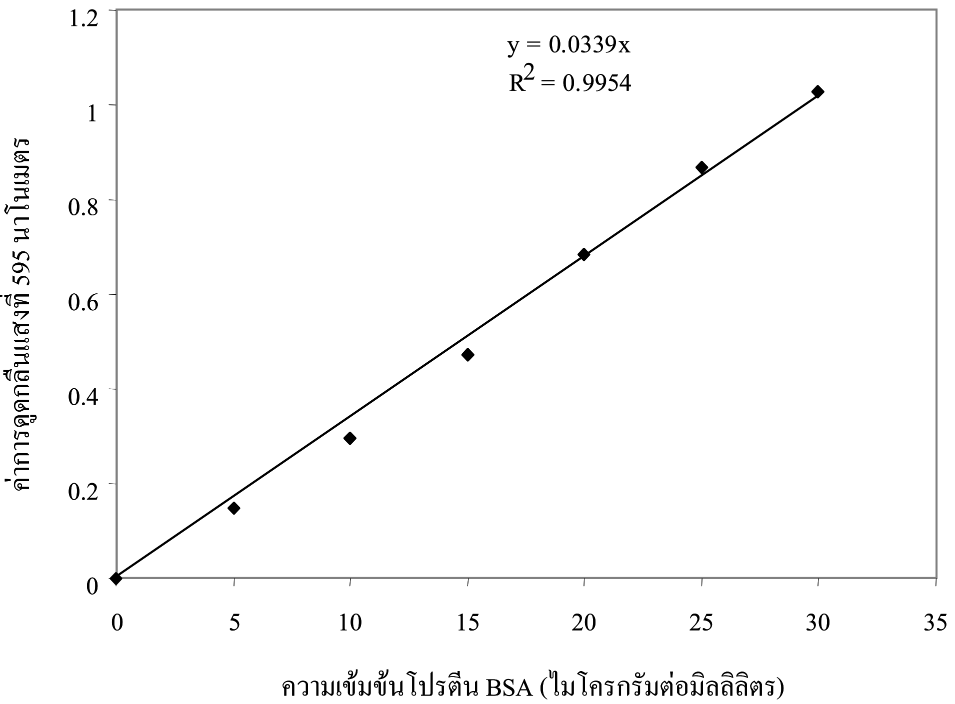
2.1 วิธีการเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1.1 สารละลายสี เตรียมโดยละลายสารสี Coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัม ในเอธานอล (99.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (85 เปอร์เซ็นต์) ลงไป 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41

2.1.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมสารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 50 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ซึ่งแสดงดังภาพผนวกที่ ค2

2.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสมและสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงในหลอดทดลอง 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายสี 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างอยู่ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนเพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนของตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีนของ BSA ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

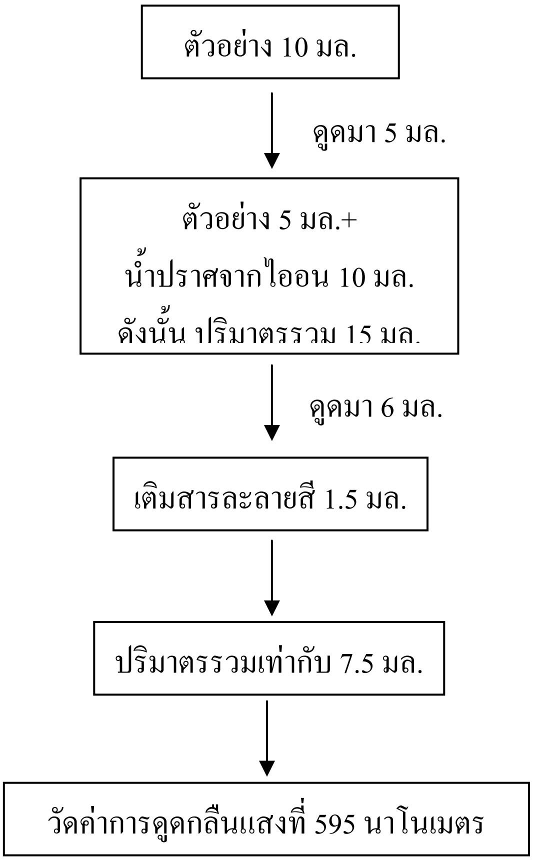
3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ชั่งน้ำมันที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวด Vial สำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน ในที่นี้คือ เมทิลเฮปตะเดคาโนต (Methyl heptadecanoate) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟและคำนวณปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ภาคผนวก ง

การคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณโปรตีน



จากแผนภาพข้างต้น หลังจากนำตัวอย่างที่มีปริมาตรรวม 7.5 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรแล้ว จะได้ว่า

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)} = \frac{15(\text{มล.}) \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร} \times 10(\text{มล.})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA} \times 5(\text{มล.})}$$

2. การคำนวณสัดส่วนของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะบนพอลิเมอร์ (Protein coupling yield)

สัดส่วนของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะบนพอลิเมอร์ (เปอร์เซ็นต์) = $[(P_0 - P_f)/P_0] \times 100$

โดย P_0 และ P_f คือ ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึงและหลังตรึง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

3. การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์อิสระและกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป

3.1 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์อิสระ

สารละลาย *p*-nitrophenyl palmitate 0.2 มล.
+ สารละลาย Triton-X-100 และ gum arabic 1.8 มล.

↓

เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล.

↓

เติมตัวหยุดปฏิกิริยา 2.9 มล.

↓

ปริมาตรรวมสารละลายทั้งหมด 5 มล.

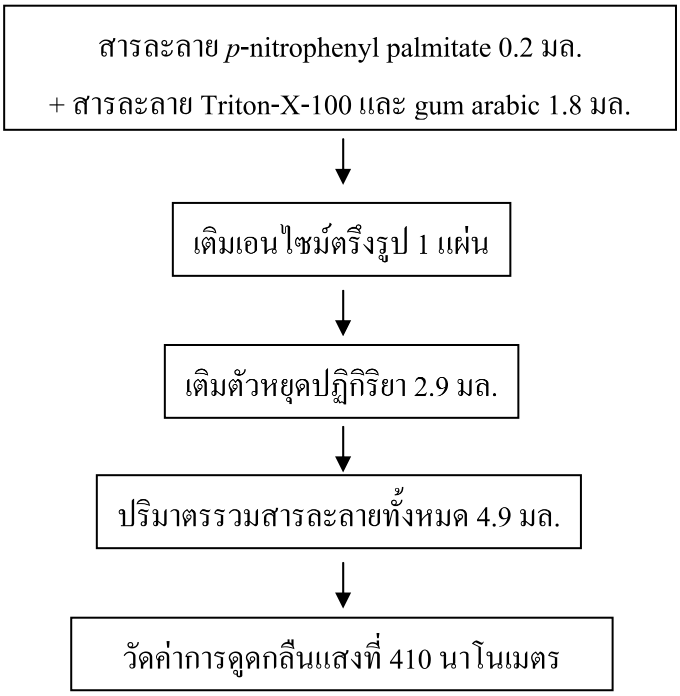
↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

จากแผนภาพข้างต้น หลังจากนำตัวอย่างที่มีปริมาตรสาร 5 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรแล้ว จะได้ว่า

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์อิสระ (หน่วยต่อกรัมโปรตีน)} = \frac{\dfrac{5(\text{มล.}) \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน } p\text{-nitrophenol}}}{(\text{15 นาที})(\text{ปริมาณโปรตีนที่ติดบนเมมเบรน, กรัม})}$$

3.2 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป



จากแผนภาพข้างต้น หลังจากนำตัวอย่างที่มีปริมาตรสาร 4.9 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรแล้ว จะได้ว่า

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (หน่วยต่อกรัมโปรตีน)} = \frac{\dfrac{4.9(\text{ml}) \times \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน } p\text{-nitrophenol}}}{(\text{15 นาที})(\text{ปริมาณโปรตีนที่ติดบนเมมเบรน, กรัม})}$$

4. การคำนวณสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (Activity yield)

สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (เปอร์เซ็นต์) = $[U_{imm}/U_{free}] \times 100$

โดย U_{imm} และ U_{free} คือ กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ (หน่วยต่อกรัมโปรตีน) ตามลำดับ

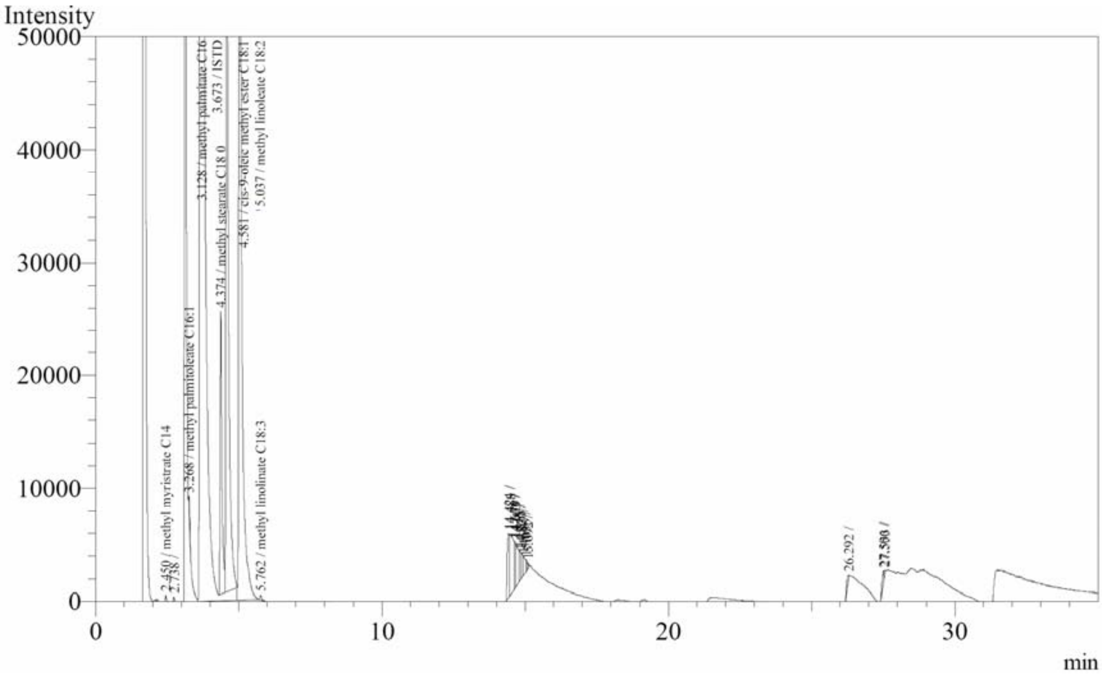
5. การคำนวณปริมาณเมทิลเอสเทอร์

$$\text{ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (เปอร์เซ็นต์)} = \left(\frac{\Sigma A - A_{EI}}{A_{EI}} \right) \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100$$

โดย ΣA คือ พื้นที่ใต้กราฟของเมทิลเอสเทอร์ตั้งแต่ C14 ถึง C24:1 และ A_{EI} คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน (Methyl heptadecanoate) ส่วน C_{EI} คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) V_{EI} คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน (มิลลิลิตร) และ m คือ น้ำหนักของน้ำมันที่ต้องการวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

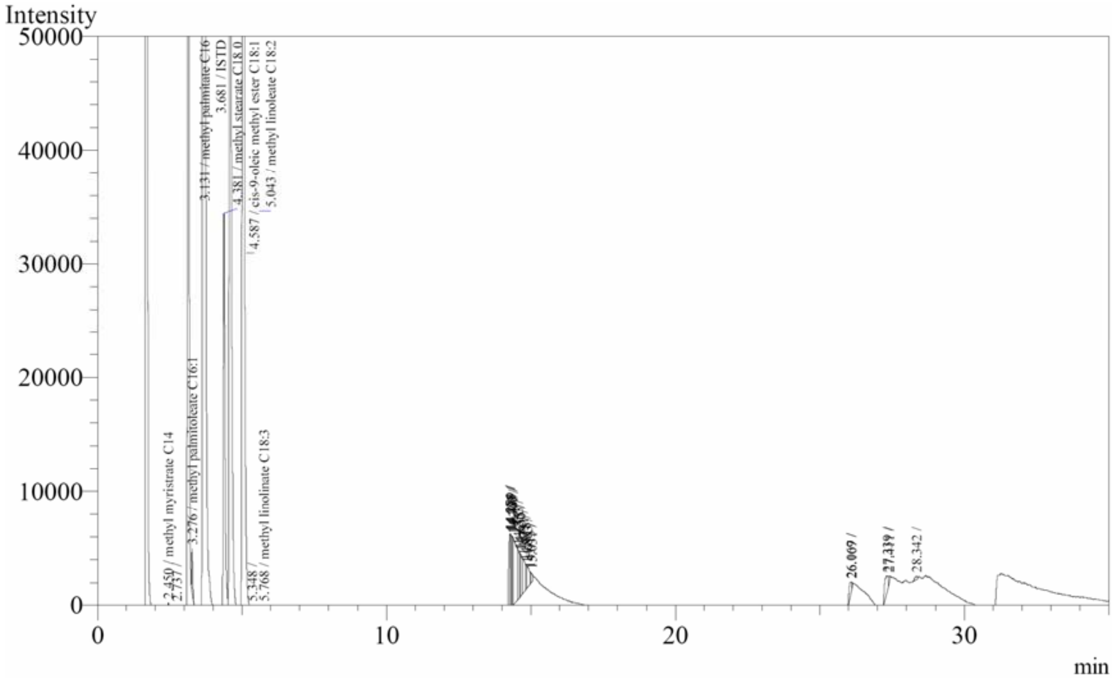
ภาคผนวก จ

โครมาโตแกรมของปริมาณเมทิลเอสเทอร์

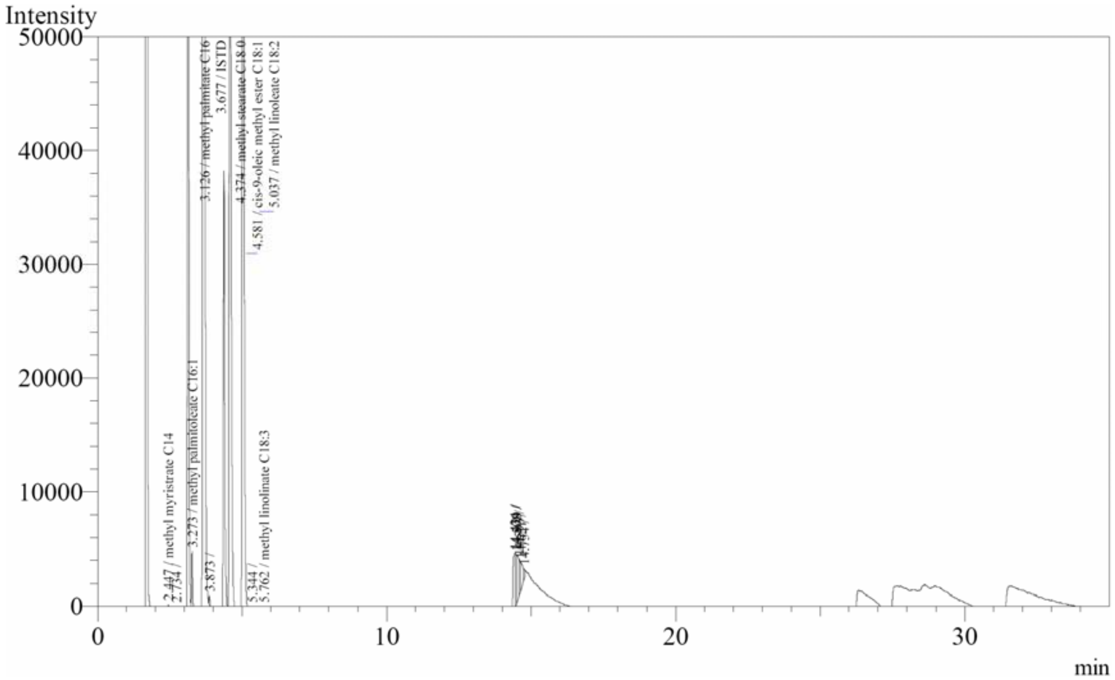


ก.

ภาพผนวกที่ จ1 โครมาโตแกรมของ ก. สารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยเอนไซม์อิสระ อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำครั้งที่ 1 ข. ทำซ้ำครั้งที่ 2 และ ค. ทำซ้ำครั้งที่ 3

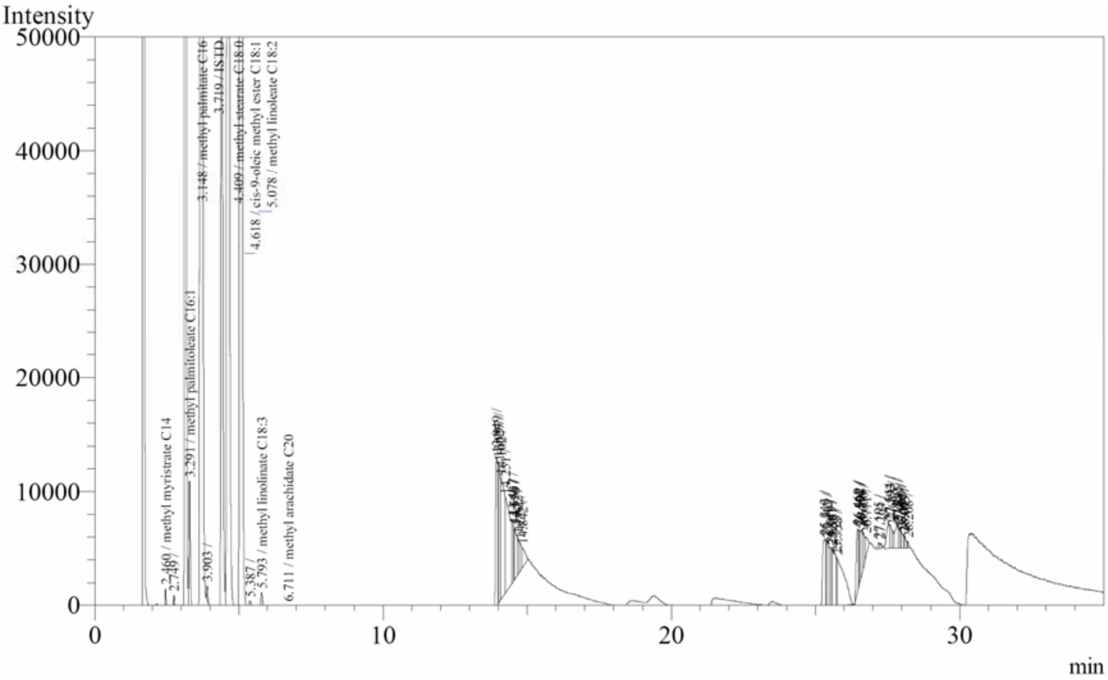


ข.



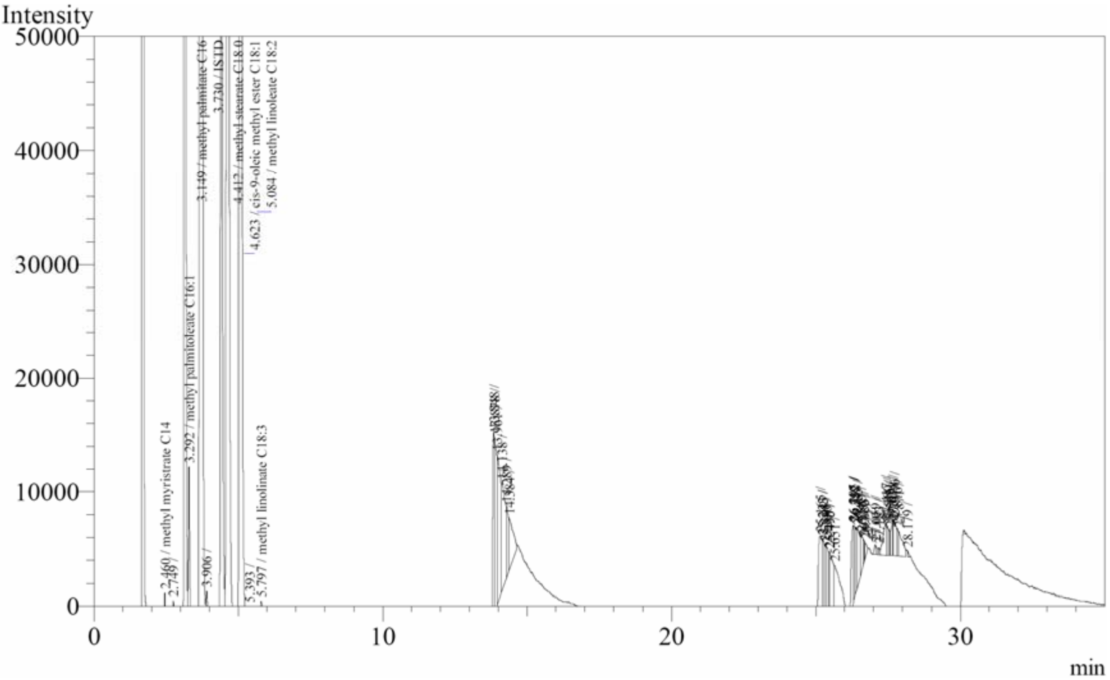
ค.

ภาพผนวกที่ จ1 (ต่อ)

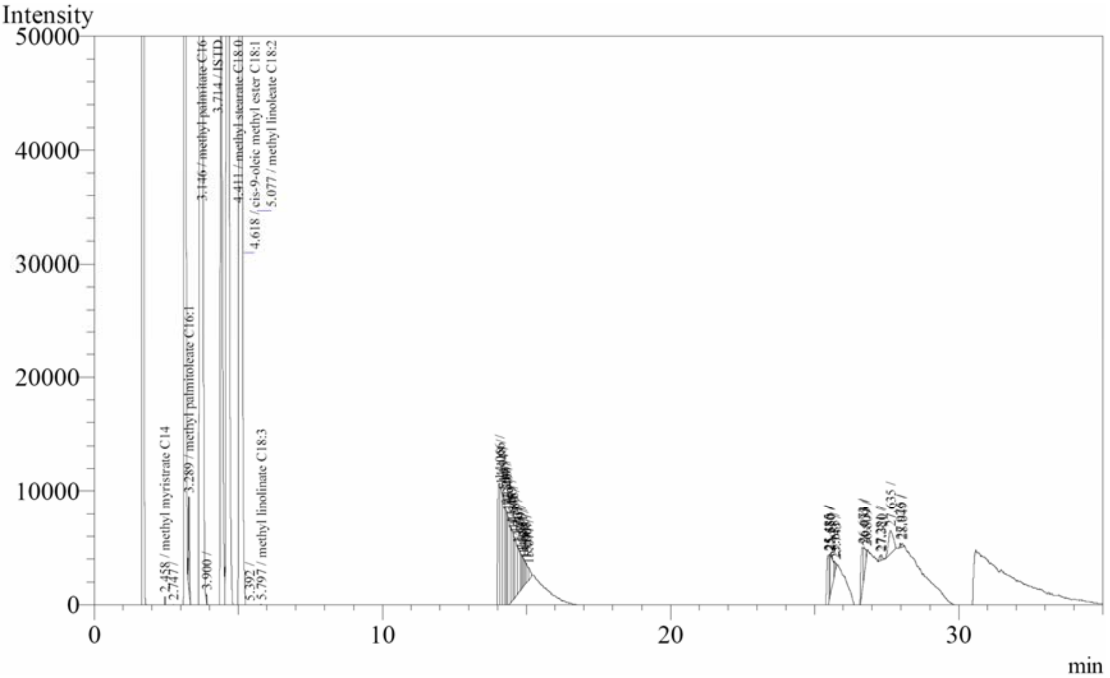


ก.

ภาพผนวกที่ จ2 โครมาโตแกรมของ ก. สารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นด้วยเอนไซม์ตรึงรูป อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมธานอลเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำครั้งที่ 1 ข. ทำซ้ำครั้งที่ 2 และ ค. ทำซ้ำครั้งที่ 3



ข.



ค.

ภาพผนวกที่ จ2 (ต่อ)