



วิทยานิพนธ์

การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมัน
เมล็ดทานตะวัน

Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* for Biodiesel
Production from Sunflower Oil

นางสาวดุขฎิ รัตนพระ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2549



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
ปริญญา

วิศวกรรมเคมี

สาขา

วิศวกรรมเคมี

ภาควิชา

เรื่อง การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน

Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* for Biodiesel Production from Sunflower Oil

นามผู้วิจัย นางสาวศุภฎี รัตนพระ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์อรรถศักดิ์ จารีย์, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์มณฑล ชานตคมวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีรรัตน์ มั่งเจริญ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 4 เดือน เมษายน พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน

Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* for Biodiesel Production from
Sunflower Oil

โดย

นางสาวดุษฎี รัตนพระ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1429-2

คุณฤๅ รัตนพระ 2549: การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจาก
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน ปริญญาวិชากรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ประชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ,
Ph.D. 114 หน้า
ISBN 974-16-1429-2

การทดลองนี้ศึกษาการตรึงไลเปสบนโคโคซาน และซีไลท์ ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เปรียบเทียบ
กับการตรึงไลเปสบนโซเดียมอัลจินเตและโคโคซานด้วยวิธีการห่อหุ้ม โดยเฉพาะการตรึงไลเปสบนโคโคซาน
แบบดูดซับทางกายภาพ จะศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการตรึง ได้แก่ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ และพีเอช จากนั้น
ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ นำเอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสมไปศึกษาคุณสมบัติและ
ไปเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

การตรึงไลเปสบนโคโคซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ
856.76 หน่วยต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7 ส่วน
ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนซีไลท์ มีค่าเท่ากับ 753.39 หน่วยต่อกรัม ขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูก
ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจินเตและโคโคซานมีค่าเท่ากับ 778.21 และ 651.42 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ
โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระเท่ากับ 2,136 หน่วยต่อกรัม จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโคโคซานแบบดูดซับ
ทางกายภาพไปศึกษาคุณสมบัติ พบว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมลดลงเพียง 11
เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 วัน โดยกิจกรรมลดลงเพียง 8 เปอร์เซ็นต์และ
เมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันเมล็ดทานตะวันกับเมทานอล พบว่า
สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ คือ อัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณ
เอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน มีน้ำในปฏิกิริยา 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เมื่อทำ
ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเมทิลเอส
เทอร์ 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะเดียวกัน จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 33
เปอร์เซ็นต์

คุณฤๅ รัตนพระ
ลายมือชื่อนิติ



ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๒๓ / ๕.๑ / ๔๙

Dussadee Rattanapra 2006: Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* for Biodiesel Production from Sunflower Oil. Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Associate Professor Penjit Srinophakun, Ph.D. 114 pages.
ISBN 974-16-1429-2

The aim of this research was to study the immobilized lipase on three supporting materials, namely, chitosan, celite and sodium alginate. The lipase was immobilized on chitosan and celite using physical adsorption, whereas it was immobilized on sodium alginate and chitosan by an entrapment method. In the study of immobilized lipase on chitosan by physical adsorption, the effects of glutaraldehyde concentration and pH were investigated. In addition, the effect of temperature on lipase activity was studied. The immobilized lipase obtained from the optimal conditions was then characterized and used as a catalyst in the transesterification reaction for biodiesel production.

From this experiment, it was found that the immobilized lipase on chitosan by physical adsorption gave the highest activity of 856.76 unit/g at 37°C when the glutaraldehyde concentration and pH were 0.05 % and 7, respectively. And, the activity of immobilized lipase on celite by physical adsorption was 753.39 unit/g. The activities of the immobilized lipase on sodium alginate and chitosan by entrapment were determined to be 778.21 and 651.42 unit/g, respectively. The activity of free lipase was also found to be 2,136 unit/g. From the study of the immobilized lipase on chitosan by physical adsorption, it was found that the immobilized lipase was stable and active within the temperature range of 30 to 50°C, the activity was decreased only by 11 %. In addition, the activity of the immobilized lipase which were kept at 4°C for 30 was decreased by 8%. When the immobilized lipase was used as a catalyst for biodiesel production from sunflower oil and methanol, the highest methyl ester content obtained was 25 % when using the molar ratio of oil to methanol of 1:3, 100% weight of immobilized lipase, water content of 20% by weight, at 50°C and stirring rate 200 rpm for 24 hours. In the case of using free lipase as a catalyst, the methyl ester production was 33 %.

ดุษฎี รattanapra
Student's signature


Thesis Advisor's signature

28 / 5.11. / 49

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและความกรุณาจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้ความดูแลเอาใจใส่และให้คำปรึกษาแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์อย่างดียิ่ง อาจารย์ ดร.อรรถศักดิ์ จารีย์ กรรมการวิชาเอก อาจารย์ ดร.มณฑล ฐานุตตมวงศ์ กรรมการวิชาการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน อาจารย์ผู้แทนบัณฑิต ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ทุนการศึกษาในระดับปริญญาโท ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ณัฏฐภัทร จินดา อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางกระบวนการเคมีและฟิสิกส์ ที่ให้คำแนะนำในการทดลองและความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้ยังให้ความอนุเคราะห์ สารเคมีหลายชนิดสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ขอขอบคุณ คุณกิตติพล กสิภาร ที่กรุณาให้คำแนะนำเรื่องไบโอดีเซลและการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ขอขอบคุณ ครอบครัว เพื่อนๆ น้องๆ วิศวกรเคมี และบุคคลรอบข้างทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และความรู้สึกที่ดีตลอดมา

ประโยชน์อันใดอันจะเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่าน ที่เมตตาอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำต่างๆ จนถึงปัจจุบัน

ศุภณัฐ รัตนพระ
กุมภาพันธ์ 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
ไขมันและน้ำมัน	4
ไบโอดีเซล	7
ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน	14
เอนไซม์ไลเปส	15
การตรึงเอนไซม์ไลเปส	22
การใช้โคโคซานเป็นตัวพุงสำหรับตรึงเอนไซม์	32
ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง	36
อุปกรณ์และวิธีการ	40
อุปกรณ์	40
วิธีการ	44
ผลและวิจารณ์	53
สรุป	78
ข้อเสนอแนะ	80
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	81

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์	89
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	94
ภาคผนวก ค การคำนวณกิจกรรมของไลเปส	95
ภาคผนวก ง การคำนวณปริมาณเมทิลเอสเทอร์	98
ภาคผนวก จ ลักษณะโครมาโตแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการ วิเคราะห์ด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป	6
2	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช	7
3	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล	8
4	การเปรียบเทียบการใช้เบสอะลคาลีสต์และเอนไซม์อะลคาลีสต์ในการผลิตไบโอดีเซล	15
5	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า	18
ตารางผนวกที่		
ก1	วิธีการเตรียมสารละลาย p-nitrophenol (pNP) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	89
ก2	วิธีการเตรียมสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	91

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์	4
2	โครงสร้างโมเลกุลของไดกลีเซอไรด์และโมนอกลิเซอไรด์	5
3	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	10
4	ขั้นตอนต่อเนื่องของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน	11
5	ปฏิกิริยาสaponifiเคชันจากกรดไขมันอิสระ	11
6	ปฏิกิริยาสaponifiเคชันจากเอสเทอร์	11
7	ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน	12
8	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์	12
9	ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิสของไตรกลีเซอไรด์	13
10	ปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส (hydrolysis) และการสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) ของเอนไซม์ไลเปส (EC.3.1.1.3)	16
11	รูปของเอนไซม์	25
12	วิธีการตรึงเอนไซม์	26
13	โครงสร้างทางเคมีของไคติน	33
14	โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	33
15	ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อประสิทธิภาพการตรึง ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	55
16	ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	55
17	ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	56
18	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	57
19	ผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพการตรึง ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ผลของพีเอชต่อปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	58
21	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7	59
22	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนซีไลท์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ	61
23	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน	62
24	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต	63
25	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ	64
26	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ	65
27	การจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเมื่อใช้ตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำในการตรึงเอนไซม์	66
28	เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวพุงและวิธีการตรึงต่าง ๆ กัน	67
29	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึง	68
30	ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึง	70
31	ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 มีน้ำในปฏิกิริยา 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้ปริมาณตัวทำละลาย 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 บ่มที่ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)	72
33	ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ และน้ำร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ต่อ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันหรือ เฮกเซน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน หรือน้ำและเฮกเซนอย่างละ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน หรือน้ำและเฮกเซนอย่างละ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ที่ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)	73
34	ผลของปริมาณน้ำต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมัน ต่อ เมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)	74
35	ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันและใช้ ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง)	75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
36	ผลการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพกับเอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (ใช้เอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 และใช้น้ำปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)	76
37	ผลการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต และเอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (ใช้เอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 และใช้น้ำปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)	77
ภาพผนวกที่		
ก1	กราฟมาตรฐานของ <i>p</i> -nitrophenol	90
ก2	กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีนของ BSA	92
ง1	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง	99
จ1	โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	101

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
จ2 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	102
จ3 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปีโตรเลียมอีเทอร์ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของ น้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	103
จ4 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย เฮกเซน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	104
จ5 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย โทลูอิน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	105

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
จ6 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย เฮกเซน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันและปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณ เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	106
จ7 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เมื่อ ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณ เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	107
จ8 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมัน ต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	108
จ9 โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณน้ำ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมัน ต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับ ทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศา เซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	109

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า	
จ10	โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	110
จ11	โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	111
จ12	โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	112
จ13	โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	113
จ14	โครมาโตรแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วยปริมาณเอนไซม์อิสระ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)	114

การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ด ทานตะวัน

Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* for Biodiesel Production from Sunflower Oil

คำนำ

จากสถานการณ์ปัจจุบัน ประเทศไทยมีความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในปริมาณมาก โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลใช้มากถึง 43 ล้านลิตรต่อวัน คิดเป็น 46.6% ของปริมาณน้ำมันที่ใช้ภายในประเทศ (<http://www.doeb.go.th/dbd/knowledge/bio-diesel2.htm>) มีสัดส่วนการใช้สูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ ในขณะที่พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่ได้จากซากฟอสซิล (fossil fuel) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญมีเหลืออยู่อย่างจำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอีกไม่ช้านี้ ประกอบกับราคาน้ำมันได้มีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและความต้องการลดมลพิษเพื่อให้สิ่งแวดล้อมดีขึ้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบภายในประเทศ เช่น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ น้ำมันพืชใช้แล้ว ฯลฯ มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใช้แทนน้ำมันดีเซล

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ หรือไขมันสัตว์เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซล (Ma and Hanna, 1999) การผลิตไบโอดีเซลมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้โดยตรงและการผสม (direct use and blending) ไมโครอิมัลชัน (microemulsions) ไพโรไลซิส (pyrolysis) ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) และผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกริยาในรูปแบบอื่น ๆ (other forms of catalysis) (Khan, 2002)

ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หรือแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ผลิตไบโอดีเซล เกิดจากการทำปฏิกริยาระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์ โดยมีตัวเร่งปฏิกริยา จะได้เอสเทอร์ (ester) หรือไบโอดีเซล และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ ตัวเร่งปฏิกริยาที่ใช้ได้แก่ กรด เบส และเอนไซม์ เบสจะตะลิตต์จะเร่งปฏิกริยาได้เร็ว โดยมีรายงานว่าใช้เวลาในการทำปฏิกริยาเพียง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Encinar et al., 2002) แต่เบสจะตะลิตต์มีข้อเสียคือจะทำให้กรดไขมันอิสระในน้ำมันถูกเปลี่ยนเป็นสบู่โดยปฏิกริยาสaponification) ทำให้ได้เอสเทอร์น้อยลงและมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล (Ma and Hanna, 1999; Nouredini et al.,

2004) ส่วนกรดอะตอมจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยามากกว่า (3-4 ชั่วโมง) และอุณหภูมิสูงกว่า (100 องศาเซลเซียส) (Encinar et al., 2002) ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยา

ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase มีชื่อในระบบ systematic name ว่า glycerol ester hydrolase หรือ triacylglycerol acyl ester hydrolase (EC 3.1.1.3) (Chowdary et al., 2000) เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน โดยทำให้พันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลน้ำมันแตกออกอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบที่มีน้ำน้อย (microaqueous) หรือในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยปฏิกิริยาผันกลับได้นี้มี 2 ปฏิกิริยา คือปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันและปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน (esterification) (ณ กัญภัทร, 2547) ถึงแม้ไลเปสจะมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเอนไซม์ทั่วไป ก็สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ที่อุณหภูมิและความดันปกติ (โดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา) มีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูงมาก จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่น (by products) ที่ไม่ต้องการน้อยมาก ซึ่งทำให้สะดวกในการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสารลดต่ำลง แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเอนไซม์จะมีข้อดีหลายประการ แต่การนำเอนไซม์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมก็มีข้อจำกัดเนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่มีความเสถียรต่ำ และเอนไซม์บริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้หลาย ๆ รอบ ในรูปเอนไซม์ที่ถูกตรึง (ผ่องผกา, 2537)

เอนไซม์ที่ถูกตรึงหมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนด หรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalyst) (ปราณี, 2535) วิธีการตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปของแข็ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีหลัก คือ วิธีการจับยึด ซึ่งแบ่งเป็น วิธีเชื่อมไขว้ (crosslinking method) วิธีดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption method) วิธียึดจับด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding method) วิธียึดจับด้วยพันธะโลหะ (metal linking method) และวิธียึดจับด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method) วิธีการตรึงเอนไซม์อีกวิธีหนึ่ง ได้แก่ วิธีการห่อหุ้ม แบ่งเป็น วิธีการห่อหุ้มด้วยเจล (gel entrapment method) วิธีการห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber entrapment) และวิธีห่อหุ้มด้วยแคปซูล (microencapsulation) (Kennedy and Cabral, 1987) สำหรับวิธีที่นิยมนำมาตรึงเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ วิธีการดูดซับทางกายภาพ และ วิธีการห่อหุ้มด้วยเจล นอกจากนี้เอนไซม์และวิธีการตรึงเอนไซม์จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงเอนไซม์แล้ว ตัวพุงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่สุดในการกระบวนการตรึงเอนไซม์ ไคโตซานเป็นตัวพุงที่ในปัจจุบันได้รับความสนใจนำมาใช้ในการตรึงไลเปส เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ ซึ่ง

เป็นโครงสร้างแข็งของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกแมลง กุ้ง ปู ปลาหมึก มีคุณสมบัติในการดูดซับและจับตรึงที่ดี นอกจากนี้ไคโตซานยังมีราคาไม่แพงและไม่เป็นพิษ (Pereira et al., 2003)

โครงการวิจัยนี้จึงให้ความสนใจในการศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน โดยกระบวนการทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยทำการศึกษาในระดับปฏิบัติการ เพื่อนำไปสู่การใช้งานจริงในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens*
2. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง
3. ศึกษาการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

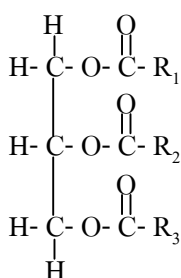
การตรวจเอกสาร

1. ไขมันและน้ำมัน

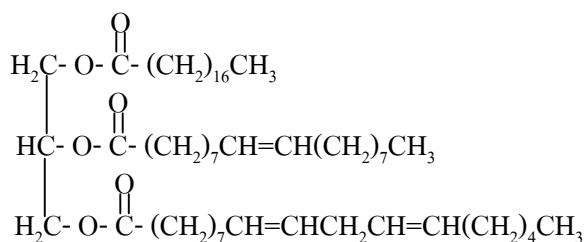
ไขมันและน้ำมันที่พบในสัตว์และพืช เป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) 90 – 98 % มีไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) อยู่เพียงเล็กน้อย นอกจากนั้นยังมี กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) อยู่ 1 – 5 % ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ฟอสฟาไทด์ (phosphatides) โทคอปฟีรอล (tocopherols) คาร์โรทีน (carotenes) ซัลเฟอร์ (sulphur) และ น้ำอีกเล็กน้อย (Srivastava and Prasad, 2000)

1.1 ไตรกลีเซอไรด์

ไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุล และ กลีเซอรอล 1 โมเลกุล โครงสร้างทั่วไปของไตรกลีเซอไรด์ และตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ แสดงดังภาพที่ 1 (Srivastava and Prasad, 2000) ในน้ำมันพืชไตรกลีเซอไรด์ตามธรรมชาติจะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ที่อุณหภูมิห้องจะมีสถานะเป็นของเหลว ซึ่งต่างจากไขมันจากสัตว์ ที่จะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสูง และจะมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง (Ma and Hanna, 1999)



ไตรกลีเซอไรด์

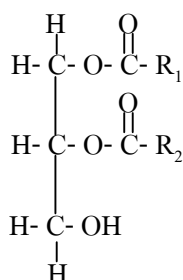


ตัวอย่างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

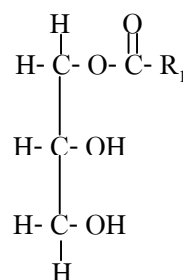
ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

1.2 ไคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์

ไคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุลตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนกลีเซอไรด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลเหลืออยู่ 2 หมู่ กลีเซอไรด์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติแต่จะพบในไขมันที่เกิดการไฮโดรไลซิสไม่สมบูรณ์



1,2- ไคกลีเซอไรด์



1- โมโนกลีเซอไรด์

ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของไคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์

ที่มา: อาภัสสร (2537)

1.3 กรดไขมัน

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ส่วนมากมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 4-24 ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลปลายอีกข้างหนึ่งมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของนอนโพลาร์ไฮโดรคาร์บอนทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ และเป็นสายโซ่ยาวที่อิ่มตัว หรือไม่อิ่มตัว

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์จะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 16 และ 18 พบได้มากที่สุด กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ (C16-C18) ละลายน้ำไม่ได้ แต่เกลือของมันสามารถสร้างไมเซลล์ในน้ำได้และไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (อาภัสสร, 2537) โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไปแสดงดังตารางที่ 1 และ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมันทั่วไป

Fatty acid	Structure name	Structure	Formula
Lauric	Dodecanoic	12:0	$C_{12}H_{24}O_2$
Myristic	Tetradecanoic	14:0	$C_{14}H_{28}O_2$
Plamitic	Hexadecanoic	16:0	$C_{16}H_{32}O_2$
Stearic	Octadecanoic	18:0	$C_{18}H_{36}O_2$
Arachidic	Elcosanoic	20:0	$C_{20}H_{40}O_2$
Behenic	Docosanoic	22:0	$C_{22}H_{44}O_2$
Lignoceric	Tetracosanoic	24:0	$C_{24}H_{48}O_2$
Oleic	<i>cis</i> -9-Octadecenoic	18:1	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleic	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecadienoic	18:2	$C_{18}H_{32}O_2$
Linolenic	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-Octadecatrienoic	18:3	$C_{18}H_{30}O_2$
Erueic	<i>cis</i> -13-Docosenoic	22:1	$C_{22}H_{42}O_2$

ที่มา: Srivastava and Prasad (2000)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพืช

Vegetable oil	Fatty acid composition, wt %								
	16:0	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	22:1	18:2	18:3
Corn	12	2	Tr	0	0	25	0	6	Tr
Cottonseed	28	1	0	0	0	13	0	58	0
Crambe	2	1	2	1	1	19	59	9	7
Linseed	5	2	0	0	0	20	0	18	55
Peanut	11	2	1	2	1	48	0	32	1
Rapeseed	3	1	0	0	0	64	0	22	8
Safflower	9	2	0	0	0	12	0	78	0
H.O.Safflower	5	2	Tr	0	0	79	0	13	0
Sesame	13	4	0	0	0	53	0	30	0
Soya bean	12	3	0	0	0	23	0	55	6
sunflower	6	3	0	0	0	17	0	74	0

Tr = traces

ที่มา: Srivastava and Prasad (2000)

2. ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ แอลคิลเอสเทอร์ (alkyl esters) ของกรดไขมันสายโซ่ยาวที่พบในน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ โดยคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงของไบโอดีเซล คือ มีความหนืดใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและมีความคงตัว ความหนืดเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน จุดวาบไฟของไบโอดีเซลมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง นอกจากนั้นแล้วไบโอดีเซลยังมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 10 -11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นผลทำให้การเผาไหม้ในเครื่องยนต์สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซล (Srivastava and Prasad, 2000) คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของไบโอดีเซลแสดง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันไบโอดีเซล

Vegetable oil 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
Diesel fuel ^b	1.2-3.5 (40°C)	51	35.5	-	-	0.830-0.840 (15°C)	-
JIS-2D ^c (gas oil)	2.8 (30°C)	58	42.7	-	59	0.883	0.05

ที่มา: ^aSrivastava and Prasad (2000)

^bVarese and Varese (1996)

^cYamane et al. (2001)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่นิยมในปัจจุบัน คือ การนำน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์รวมทั้งน้ำมันใช้แล้วจากการปรุงอาหาร มาเข้ากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (transesterification process) โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล และตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูง เพื่อเปลี่ยนให้เป็น เมทิลเอสเทอร์ เอทิลเอสเทอร์ หรือ แอลคิลเอสเทอร์อื่น ๆ และได้กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้

2.1 กระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Khan, 2002)

สำหรับวิธีการที่ใช้ผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันมีหลายวิธี ทั้งที่เป็นแบบง่าย เช่น การผสมโดยตรง และจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และแบบยากที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบันคือ การทำปฏิกิริยากับเมทานอลที่สภาวะเหนือวิกฤต ดังนั้นกระบวนการผลิตไบโอดีเซลอาจแบ่งได้ดังนี้

2.1.1 การใช้โดยตรงและการผสม (direct use and blending)

เป็นการนำน้ำมันพืชบริสุทธิ์ไปใช้โดยตรงกับเครื่องยนต์ หรือการนำน้ำมันพืชผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้ ซึ่งอาจก่อปัญหาและผลกระทบกับเครื่องยนต์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว แม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถใช้งานได้กับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูง มีปริมาณกรดไขมันอิสระและยางเหนียวที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและพอลิเมอร์เซชัน ในระหว่างการเก็บรักษา (Fukuda et al., 2001) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน ของน้ำมันพืช ต่อ น้ำมันดีเซล ในอัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

2.1.2 ไมโครอิมัลชัน (microemulsions)

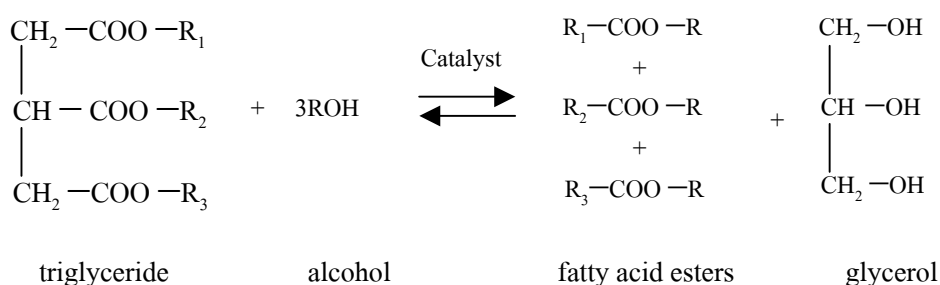
ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่กระจายตัวอยู่ในสภาวะสมดุล ซึ่งเกิดจากการก่อรูปขึ้นเองจากของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายกัน เนื่องจากในน้ำมันพืชบริสุทธิ์จะมีความหนืดสูง ไมโครอิมัลชันจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืดได้โดยการใช้ตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายคลึงกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

2.1.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermal cracking or pyrolysis)

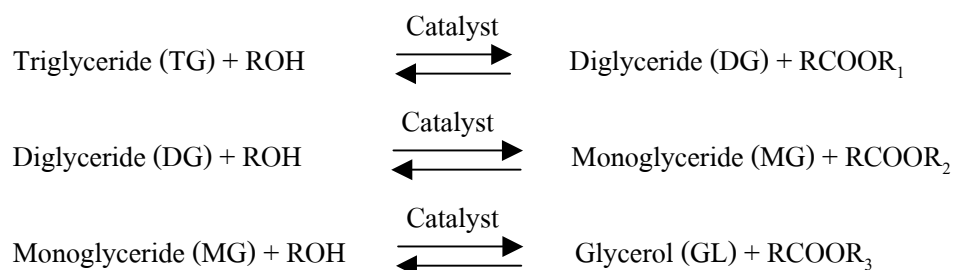
ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่นโดยอาศัยความร้อน เช่น ความร้อนที่ไม่ใช้อากาศหรือออกซิเจน ในช่วงอุณหภูมิ 450 – 850 องศาเซลเซียส ไขมันจะถูกไพโรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลง โดยตัวเร่งปฏิกิริยา ที่ใช้ ได้แก่ SiO_2 หรือ Al_2O_3 แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ออกซิเจนถูกดึงออกมาจากสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมได้ นอกจากนี้กระบวนการนี้มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนแก๊สโซลีนมากกว่าไบโอดีเซล

2.1.4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification or alcoholysis)

ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาของไขมันกับแอลกอฮอล์เพื่อเปลี่ยนรูปให้เป็นสารประกอบเอสเทอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาทั่วไปแสดงดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนต่อเนื่องในการทำปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาเป็นแบบย้อนกลับ เริ่มจากไตรกลีเซอไรด์ถูกเปลี่ยนให้เป็นไดกลีเซอไรด์ จากนั้นไดกลีเซอไรด์จะถูกเปลี่ยนต่อเป็นโมโนกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์จะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอล ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์หนึ่งโมเลกุล (Fukuda et al., 2001) การเติมแอลกอฮอล์ที่มากเกินไปจะใช้เพื่อเป็นการบังคับปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยสัดส่วนโมลของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของ แอลกอฮอล์ ต่อ ไขมัน คือ 3:1 หรือสามารถเพิ่มอัตราส่วนเป็น 6:1 เพื่อเพิ่มผลผลิต ตัวเร่งที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนี้มีทั้งสารละลายกรด สารละลายเบส และเอนไซม์ไลเปส แอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพลพานอล บิวทานอล และเอมีลแอลกอฮอล์



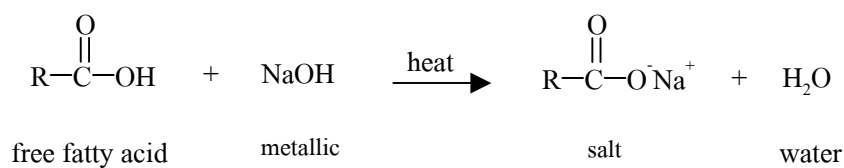
ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์



ภาพที่ 4 ขั้นตอนต่อเนื่องของการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

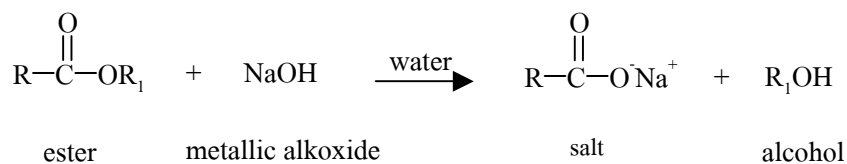
ก. ปฏิกิริยาสaponification (saponification)

ปฏิกิริยาสaponification เป็นปฏิกิริยาที่สร้างสบู่ขึ้น เกิดจากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระกับสารละลายเบสโดยมีความร้อนในปฏิกิริยา หรือ เอสเทอร์กับสารละลายเบสโดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา ดังภาพที่ 5 และ 6 ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาสaponification จากกรดไขมันอิสระ

หรือ

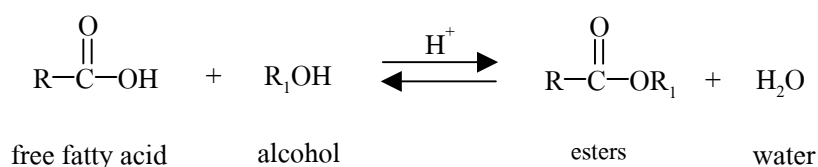


ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาสaponification จากเอสเทอร์

จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นว่า การใช้สารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยา กล่าวคือ ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้เป็นแอลคิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลได้ แต่กลับทำให้เกิดสบู่ขึ้นซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการ และทำให้ต้องกำจัดสบู่เหล่านั้นออกอีกด้วย

ข. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification)

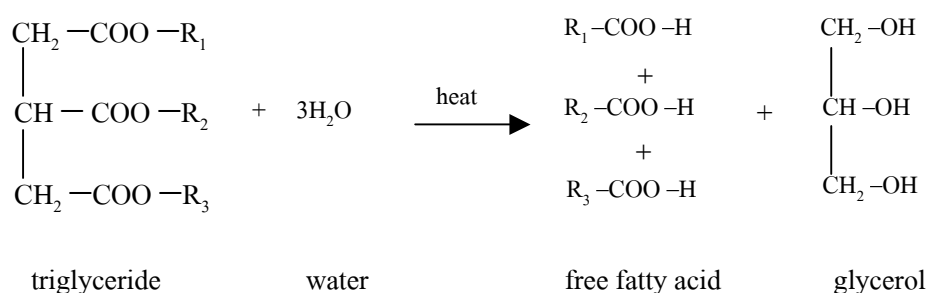
ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเกิดจากสารตั้งต้นคือกรดไขมันอิสระและแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์คือเอสเทอร์ ดังภาพที่ 7 ปฏิกิริยานี้สามารถเกิดได้โดยใช้กรดแก่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก และกรดไฮโดรคลอริก



ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

ค. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

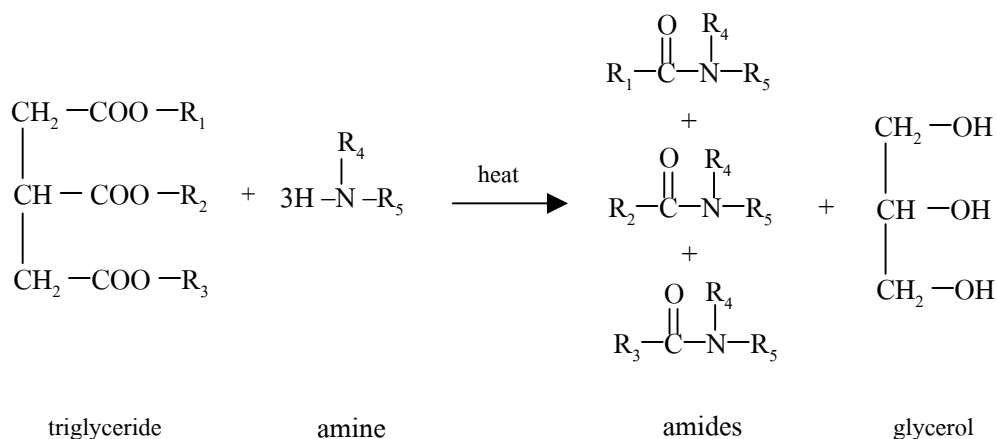
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอไรด์กับน้ำที่อุณหภูมิและความดันสูง ได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์

ง. ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis)

ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิสเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกลีเซอไรด์กับเอมีนได้เอไมด์และกลีเซอรอล จากนั้นเอสเทอร์จะเกิดจากการเติมหมู่นิวคลีโอฟิลิก ซึ่งไปแทนที่ที่เอซิลคาร์บอนอะตอมของเอไมด์ ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิสของไตรกลีเซอไรด์

2.1.5 ผลิตโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบอื่นๆ

ก. ปฏิกิริยาที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalysts)

ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ใช้ปกติ คือ ไลเปส แต่ต้องควบคุมสถานะให้ดีเพื่อรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์

ข. ปฏิกิริยาเมทานอลเหนือวิกฤต (supercritical methanol)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้โดยปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยาและใช้เมทานอลในสถานะเหนือวิกฤตโดยต้องกระทำที่อุณหภูมิ และความดันสูง

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเป็นวิธีที่นิยมนำมาผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก อุณหภูมิและความดันที่ใช้ต่ำ ราคาต้นทุนต่ำเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ (Schuchardt et al., 1998)

3. ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันเพื่อผลิตเมทิลเอสเทอร์ แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (chemical catalyst) และ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (enzymatic catalyst) (Fukuda et al., 2001)

3.1 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี

3.1.1 กรดอะตอมลิติก

กรดที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลโฟนิก การใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาจะใช้เวลาาน (3-4 ชั่วโมง) และอุณหภูมิสูง (100 องศาเซลเซียส) (Encinar et al., 2002) แต่จะเหมาะสมกับกลีเซอรอลที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระ และปริมาณน้ำสูง (Fukuda et al., 2001)

3.1.2 เบสอะตอมลิติก

เบสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น เบสอะตอมลิติก สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่ากรดอะตอมลิติก 4000 เท่า เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน (Fukuda et al., 2001) และมีรายงานว่า เบสอะตอมลิติก สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สมบูรณ์โดยใช้เวลาเพียง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Encinar et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตาม เบสอะตอมลิติก มีข้อเสียคือ ในน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาซาปอนิฟิเคชันระหว่างกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์กลายเป็นสบู่ ทำให้มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล

3.2 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ

การใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ถึงแม้จะเวลานานในการทำปฏิกิริยา แต่มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่กำจัดยาก ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน เพราะใช้อุณหภูมิที่ต่ำในการทำปฏิกิริยา มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยาสูง ดังตารางที่ 4 เอนไซม์ที่นำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ส่วนมากมีต้นทุนในการผลิตสูงและมีคุณสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ทั่วไป คือไม่เสถียร ดังนั้น จึงมีการพัฒนาการนำเอนไซม์ไลเปสกลับมาใช้ได้หลาย ๆ รอบ โดยการจับตรึงบนตัวพวยง (Immobilization)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบการใช้เบสคะตะลิสต์และเอนไซม์คะตะลิสต์ในการผลิตไบโอดีเซล

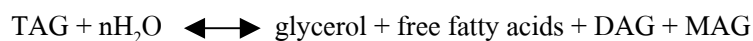
รายละเอียด	เบสคะตะลิสต์	เอนไซม์คะตะลิสต์
อุณหภูมิในปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
กรดไขมันอิสระ	สูง	เมทิลเอสเทอร์
น้ำในองค์ประกอบ	สูง	เมทิลเอสเทอร์
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ธรรมดา	สูงกว่า
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ล้างซ้ำหลายครั้ง	ไม่ต้องล้าง
ต้นทุนในการผลิต	ราคาถูก	ราคาแพงกว่า

ที่มา: Fukuda et al. (2001)

4. เอนไซม์ไลเปส (ณัฏฐภัทร, 2547)

เอนไซม์ไลเปสถูกจัดเป็นเอนไซม์ประเภท triacylglycerol acylhydrolases ตาม The International Union of Biochemistry (IUB) system มีรหัส เป็น EC.3.1.1.3 ไลเปสที่แท้จริง (true lipase) ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (triacylglycerol) ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันอิสระ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และ กลีเซอรอล (ภาพที่10) ปฏิกิริยาการย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบที่มีน้ำน้อย (microaqueous) หรือในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์

(organic solvent) โดยปฏิกิริยาผันกลับได้นี้มี 2 ปฏิกิริยา คือ ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน และ เอสเทอร์ฟิเคชัน



TAG = ไตรกลีเซอรอล
 DAG = ไดเอซิลกลีเซอรอล
 MAG = โมโนเอซิลกลีเซอรอล

ภาพที่ 10 ปฏิกิริยาย่อยสลาย (hydrolysis) และ การสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) ของ เอนไซม์ไลเปส (EC.3.1.1.3)

ที่มา: Jaeger and Reetz (1998)

4.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเมตาบอลิซึม (metabolism) ของไขมันซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต จึงพบในทั้ง สัตว์ พืช และจุลินทรีย์

4.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (animal lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากตับ (pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลไขมัน ในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อ (tissue lipases) นี้มีบทบาทและความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคและในทางการแพทย์ จึงมีความพยายามเสาะหาแหล่งเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งใหม่ ๆ อยู่ตลอดเวลา พบว่าไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล *Canine* เป็นแหล่งของไลเปสที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) คล้ายกับของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์สายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ *Sus scrofa* (หมู), *Bos taurus* (วัว) และโดยเฉพาะใน *Homo sapiens* (มนุษย์) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจไลเปสจากสัตว์ตระกูล *Canine* มากขึ้นเนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้

แมลงเป็นแหล่งของไลเปสอีกแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* ซึ่งผลิตไลเปสชนิดใหม่ที่ทำงาน ได้ดีในพีเอชเป็นกลาง (neutral lipase) ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารทดแทนของ pregastric lipase ที่ถูกใช้เป็นยารักษาภาวะน้ำหนักเกิน (obesity) และ การทำงานผิดปกติของกระบวนการย่อยและสังเคราะห์สารต่าง ๆ (metabolic disorder) ในมนุษย์

4.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช (plant lipases)

ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูง และมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจุลินทรีย์ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจเพื่อนำไลเปสจากแหล่งนี้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

ผลปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้า เป็นแหล่งสำคัญของไลเปส รายงานว่าโดยธรรมชาติเมล็ดพืช (seed) สะสมไขมันไว้ใน lipid-bodies และ glyoxysomes อันเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปสด้วย ขณะที่ไลเปสของเมล็ดธัญพืช (grain lipase) พบได้ในรำ (bran) เช่น รำข้าวสาลี และ รำข้าวเจ้า

Carica papaya latex (CPL) หรือยางมะละกอ ซึ่งทราบกันว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteases) ได้แก่ papain และ thiol protease อื่น ๆ อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ. 1999 Mangos และคณะ พบไลเปสในยางมะละกอด้วย นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ไลเปสในพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) ที่มีราคาไม่แพง ซึ่ง Mohamed et al. (2000) รายงานว่าพบเอนไซม์ไลเปสใน *Avena fatua* สูงถึง 93.9 หน่วยต่อกรัม

4.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (microbial lipases)

เนื่องจากไลเปสจากพืชถูกพบในเนื้อเยื่อที่ใหพลังงาน (energy tissue) ส่วนไลเปสจากสัตว์ มักเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเมตาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism) ได้แก่ กระบวนการย่อยสลายไขมัน การดูดซึมไขมัน และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (lipoprotein metabolism) ทำให้เกิดความซับซ้อนในการสกัดยังเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้แหล่งไลเปสทั้งสองจึงยังไม่ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย ต่างกับจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เป็นแหล่งของไลเปส ที่ถูกนำไปใช้อย่างมากมายในอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ไลเปสจากแหล่งนี้มีคุณสมบัติเฉพาะที่

สำคัญ 4 ประการ คือ (1) มีความคงทนต่อตัวทำลายอินทรีย์ (2) ในการทำงานไม่ต้องการ cofactors (3) มีความจำเพาะต่อสับสเตรตหลายชนิด และ (4) มี enantioselectivity สูง

จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสพบได้ในแหล่งต่าง ๆ ทางธรรมชาติ เช่น ในน้ำเสียหรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหรือไขมัน เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารที่เน่าเสีย กองปุ๋ยคอก (compost heaps) ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ถูกใช้ในทางการค้า 129 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อรา 53 สายพันธุ์ ยีสต์ 23 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 53 สายพันธุ์ สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังกล่าวแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ทางการค้า

Bacteria	Fungi	Yeast
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Absida corymbifera</i>	<i>Candida</i> sp.
<i>A. lipolyticus</i>	<i>A. byalospora</i>	<i>C. antarcea</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Asperfillus</i> sp.	<i>C. auricularia</i>
<i>A. calocoaceticus</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>C. curvata</i>
<i>A. pseudoalcaligenes</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>C. cylindracea</i>
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>C. lipolitica</i>
<i>A. denitrificans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. deformans</i>
<i>Amylomyces rouxii</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>C. foliorum</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>A. niger</i>	<i>C. humicula</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. rugosa</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Chaetomium thermophile</i>	<i>C. tsukubaensis</i>
<i>B. laterosporus</i>	<i>Coelomyceles</i>	<i>Pichia miso</i>
<i>B. sphereicus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Proteus</i> sp.
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>F. solari</i>	<i>S. fragilis</i>
<i>B. thaiminolyticus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>S. fibuligera</i>
<i>B. thermocatenulatus</i>	<i>Glomus versiforme</i>	<i>S. lipolytica</i>
<i>B. thermoleovocans</i>	<i>Hansenula anomala</i>	<i>S. cerevisae</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Schizosaccharomycespombe</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Bacteria	Fungi	Yeast
<i>Chromobacterium sp.</i>	<i>H. insulens</i>	<i>Sporotrichum hermophile</i>
<i>C. chokolatum</i>	<i>H. lanuginosa</i>	<i>Talaromyces thermophilus</i>
<i>C. viscosum</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	<i>Thielavia minor</i>
<i>Corynebacterium arborescens</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Torula thermophila</i>
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Mucor javanicus</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Mucor lipolyticus</i>	
<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>Mucor miehei</i>	
<i>F. ferruginem</i>	<i>Mucor pusillus</i>	
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Nocardia amarae</i>	
<i>Leishmania donovani</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	
<i>Malbrancheae pulcella</i>	<i>P. camembertii</i>	
<i>Micrococcus freudenreichii</i>	<i>P. cyclopium</i>	
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>P. roquefortii</i>	
<i>Myxococcus xantus</i>	<i>P. candidum</i>	
<i>Propionimibacterium acnes</i>	<i>P. citrinum</i>	
<i>P. granulosum</i>	<i>P. simplicissimum</i>	
<i>Protaminobacter alboflavus</i>	<i>P. solitum</i>	
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>P. urticae</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Phycomyces nitens</i>	
<i>P. cepacia</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>	
<i>P. fluorescen</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	
<i>P. fragi</i>	<i>Rchinensis</i>	
<i>P. pseudoalcligens</i>	<i>R.. delemar</i>	
<i>P. stutzeri</i>	<i>R.. japonicus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>R. oligospora</i>	
<i>S. hyicus</i>	<i>R. niveus</i>	
<i>S. wameri</i>	<i>R. nodosus</i>	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Bacteria	Fungi	Yeast
<i>S. xylosum</i>	<i>R. oryzae</i>	
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>R. nigricans</i>	
<i>S. lactis</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	
<i>S. coelicolor</i>	<i>R. pilimonate</i>	
<i>S. fradiae</i>	<i>R. glutinus</i>	
<i>S. panayensis</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>	
<i>Rhodococcus rubra</i>	<i>sphaeroides</i>	

ที่มา: Godtfredsen (1990); Pandey et al. (1999); Mayordomo et al. (2000)

ก. เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์

ไลเปสที่ใช้กันแพร่หลายในทางการค้าส่วนใหญ่ได้จากเชื้อรา ได้แก่ *Mucor javanicus*, *Humicola launginosa*, *Rhizopus sp.*, *Geotrichum sp.* และ ยีสต์ ได้แก่ *Candida lipolytica*, *C. antarctica*, *C. rugosa* และ *C. cylindracea* เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งนี้มักนิยมใช้ในการ resolution ของ secondary alcohol esters

ข. เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

ไลเปสจากแบคทีเรียมีความสำคัญที่สุดในตลาดเอนไซม์และการวิจัยทางด้านเอนไซม์ เนื่องจากไม่เพียงสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ๆ แต่ยังมีความทนต่อความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และตัวทำละลายอินทรีย์ และยังมีคุณสมบัติ regioselectivity และ chiral selectivity ที่เด่นชัดด้วย เอนไซม์จากแหล่งนี้มี 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

กลุ่มที่ 1 มี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas alcligenes* เอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 258 โมเลกุล ส่วนชนิดที่สองเป็น

เอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas glumae* และ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 320 โมเลกุล

กลุ่มที่ 2 ได้แก่เอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas fluorescens* และ *enterobacterium*, *Serratia marcescens* เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ากลุ่มแรก และมีขนาดและลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึง (sequence homology) เล็กน้อย ยกเว้น ส่วนที่เป็น N-terminal และ ลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับบริเวณเร่งชีวิต (active site serine)

กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้แก่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus sp.* และ *Staphylococcus* เอนไซม์ในกลุ่มที่ 3 นี้มี กรดอะมิโน alanine (Ala) เป็นกรดอะมิโนตัวแรกใน consensus pentapeptide sequence (Gly-X-Ser-X-Gly) แทนที่จะเป็น glycine (Gly) แบบเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ (Lee et al., 2001)

4.2 ความจำเพาะของไลเปส (เชดคักดี, 2535)

ผลการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ของไลเปสต่อกรดไขมันตำแหน่งที่ 1 ในโมเลกุลของสารตั้งต้นที่ถูกไฮโดรไลส์ ทำให้สามารถจำแนกไลเปสได้เป็น 3 กลุ่ม (Macrae, 1983)

กลุ่มที่หนึ่ง คือไลเปสที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1, 3-specific lipase) ซึ่งไฮโดรไลส์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้กรดไขมันอิสระและ 1, 2- หรือ 2, 3-ไดเอซิลกลีเซอรอล และได้ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่เนื่องจากเอซิลกลีเซอรอลที่ได้นี้มักไม่เสถียร ถ้าให้เวลาในการย่อยนานขึ้นก็จะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 1, 3- ไดเอซิลกลีเซอรอลและ 1- หรือ 3- โมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่ถ้าให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างของไลเปสกลุ่มนี้ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, และไลเปสจากรำข้าว

กลุ่มที่สอง คือไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของเอซิลกลีเซอรอล (non-specific lipase) สามารถที่จะไฮโดรไลส์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล แต่อาจพบไดเอซิลกลีเซอรอลและโมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นสาร intermediate ในปฏิกิริยา ตัวอย่างของไลเปสในกลุ่มนี้ เช่น ไลเปส *Candida cylindracea* *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และไลเปสจากตับอ่อนสุกร

กลุ่มที่สาม คือไลเปสที่มีความจำเพาะกับชนิดของกรดไขมัน (fatty acid-specific lipase) ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ยังไม่แสดงคุณสมบัตินี้ แต่มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geotrichum candidum* ที่ผลิตไลเปสที่ไฮโดรไลส์เอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันสายโมเลกุลยาวซึ่งประกอบด้วยพันธะคู่ที่เป็น cis-form ในตำแหน่งที่ 9 ส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัวหรือชนิดไม่อิ่มตัวไม่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 จะถูกไฮโดรไลส์ได้อย่างช้า ๆ

5. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ที่ถูกตรึง (immobilized enzymes) หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนด หรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์ เปลี่ยนจากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) (ปราณี, 2535)

5.1 ที่มา (ปราณี, 2535)

วิวัฒนาการของการศึกษาวิจัยด้านการเตรียมและการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงมาใช้เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับ แม้ว่าในปัจจุบันเราจะยังไม่สามารถหาสูตรสำเร็จที่ระบุให้ชัดเจนว่าเอนไซม์ชนิดหนึ่งจะตรึงรูปด้วยวิธีใดก็ตาม แต่ก็มีหลักฐานและผลงานวิจัยพอที่จะชี้ให้เห็นได้ว่าควรใช้วิธีใด ส่วนประสิทธิภาพและความเหมาะสมของการใช้งานก็เป็นกรณี ๆ ไป อย่างไรก็ตาม วิวัฒนาการเรื่องการศึกษาเอนไซม์ที่ถูกตรึง เกิดขึ้นเป็นลำดับจนปัจจุบันนี้ก็ด้วยเหตุผลที่สืบเนื่องมาจากการใช้เอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดบางประการดังนี้

5.1.1 เอนไซม์อิสระไม่เสถียร

5.1.2 เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)

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

5.1.4 เอนไซม์อิสระถ้าจะให้มีความคงตัวสูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

5.1.5 เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในการละลายของสับสเตรทและผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะปนเปื้อนในลักษณะ *proteineous contaminants* โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พิเศษของโปรตีนชนิดนั้น แยกออกได้ ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง

5.1.6 เอนไซม์อิสระ ส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในการละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะ *solid catalyst* ไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆ เช่น *fluidized bed* และ *packed bed* ในระบบต่อเนื่อง (*continuous*) ได้ อาจจะใช้ได้กับ *stirred tank* และ *ultrafiltration membrane* ได้ (กรณีของ *ultrafiltration membrane* จัดเป็นรูปหนึ่งของเอนไซม์ตรึงรูป)

5.1.7 เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

5.1.8 เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ (*intracellular enzymes*) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัด และทำบริสุทธิ์ก่อน

5.1.9 เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูด หายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระที่กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นทางออกที่นำไปสู่การแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมาใช้ ด้วยวิธีการต่าง ๆ และแก้ปัญหาไปตามลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่ได้ ถ้าหากแก้ได้หมดก็นับว่าได้ประสบผลสำเร็จยิ่ง อย่างไรก็ตามในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปก็อาจมีบ้าง ได้แก่ แอคติวิตีอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพวยงมีผลให้โครงรูปสามมิติ (*conformation*) เปลี่ยนไปและอาจมีผลต่อหมู่ที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย มีปัญหากับสับสเตรทที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือมีลักษณะแขวนลอย (*suspension*) ด้านการถ่ายเทมวล (*mass transfer*) และชนิดของตัวพวยงอาจจะมีผลกระทบต่อผลผลิต เช่น ปนเปื้อน หรือทำปฏิกิริยากับผลผลิต

5.2 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป (ปราณี, 2535)

5.2.1 มีโอกาสเพิ่มแอกติวิตี และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม

5.2.2 ใช้ระบบ multi-enzymes ในลักษณะ in vitro ได้

5.2.3 ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่องได้

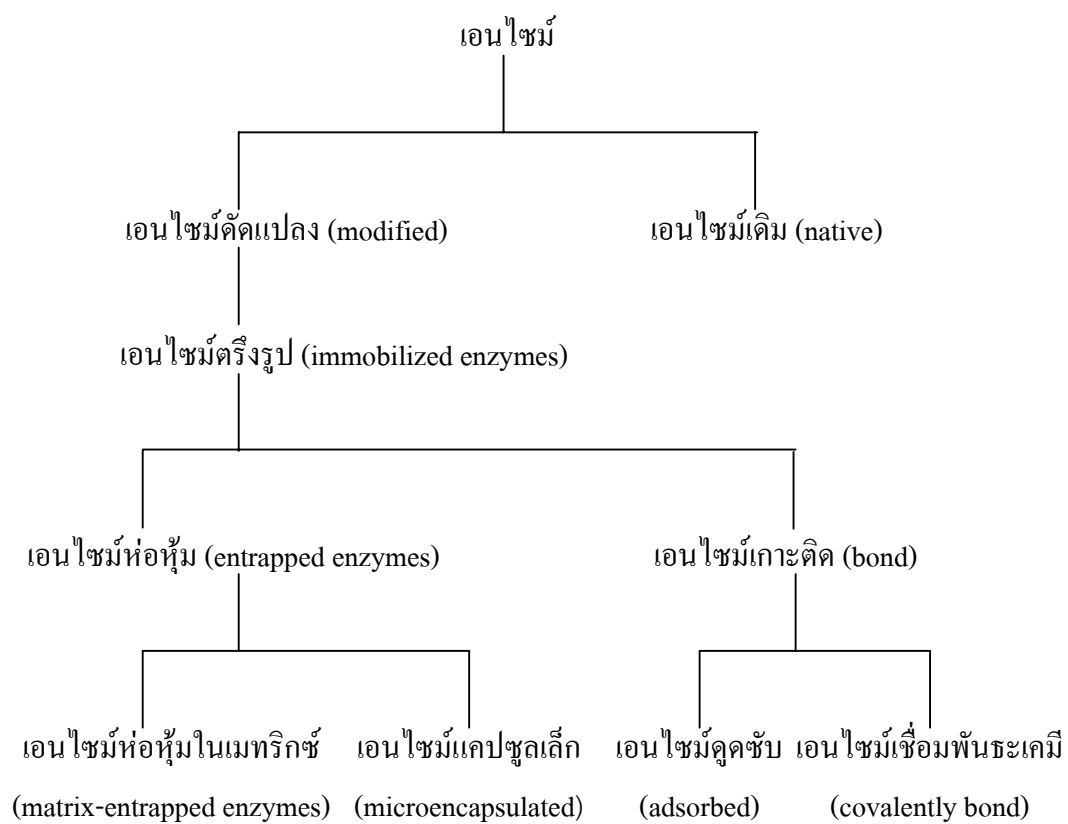
5.2.4 ใช้ภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์เดิมได้
ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวพุงและวิธีการตรึงรูป

5.2.5 ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพุง
และลักษณะสัปดาห์เสตรต

5.2.6 เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือน
เอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป

5.3 ชนิดหรือรูป (form) ของเอนไซม์ (ปราณี, 2535)

เอนไซม์โดยทั่วไปมี 2 รูป คือ เอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์เดิม (native enzymes) และ
เอนไซม์ดัดแปลง (modified enzymes) ในกรณีของเอนไซม์ดัดแปลงสามารถทำได้หลายวิธี การทำ
เอนไซม์ที่ถูกตรึง ก็จัดเป็นวิธีหนึ่งของเอนไซม์ดัดแปลง ซึ่งสามารถสรุปเป็นแผนภาพรวมได้ดังภาพ
ที่ 11

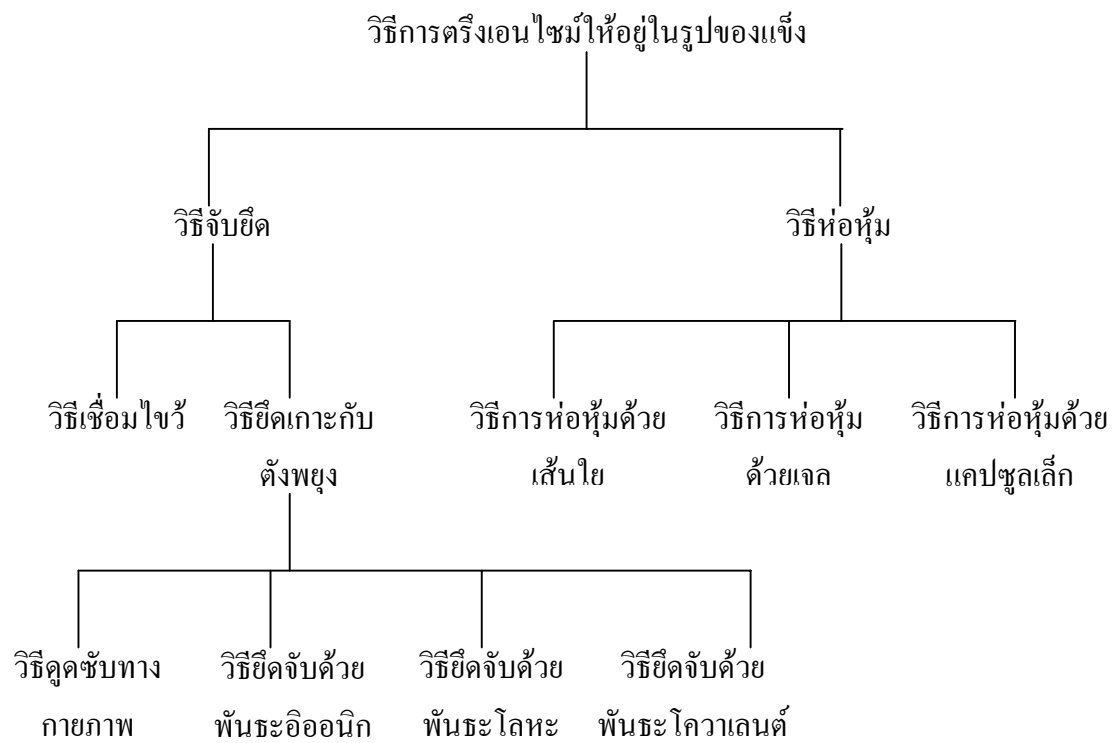


ภาพที่ 11 รูปของเอนไซม์

ที่มา: ปราณี (2535)

5.4 วิธีการตรึงเอ็นไซม์ (ผ่องผกา, 2537)

การตรึงเอ็นไซม์มีหลายแบบ ตามวิธีของ Kennedy and Cabral (1987)



ภาพที่ 12 วิธีการตรึงเอ็นไซม์

ที่มา: Kennedy and Cabral (1987)

5.4.1 การเชื่อมไขว้ (crosslinking method)

การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเหมือนกับการสร้างพันธะโควาเลนต์ แต่ไม่ต้องใช้ตัวพวงที่เป็นของแข็ง เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ได้โดยการสร้างพันธะเชื่อมไขว้ภายใน และระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์จับกันเป็นก้อนสามมิติ ซึ่งทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำ สารเชื่อมไขว้ที่จะใช้จะมีกลุ่มฟังก์ชันตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งสารเชื่อมไขว้นี้จะจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ สารเชื่อมไขว้ได้แก่อะลิฟาติกไดเอมีน (aliphatic diamines) ไดเมทิลอะดิพิเมท (dimethyladipimate) ไดเมทิลซับเบอริมิเอท (dimethyl suberimidate) และกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งสารนี้เป็นตัวที่นิยมใช้มากที่สุด ปฏิบัติการเชื่อมไขว้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเชื่อมไขว้ที่ใช้ โดยสารเหล่านี้จะมีหมู่ต่าง ๆ ที่ใช้จับโมเลกุลของเอนไซม์ คือ สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่คาร์บอนิล จับกับ แอล-ไลซีนของเอนไซม์ (เกิดการจับแบบ Schiff's base) สารเชื่อมไขว้ที่มีโคอะโซ จับกับแอล-ไลซีน แอล-ฮิสติดีน แอล-ไทโรซีน แอล-อาร์จินีน หรือ แอล-ซิสเทอีน (เกิดการจับกันด้วยพันธะโคอะโซ) สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล จับกับ primary amino group (เกิดการจับกันด้วยพันธะเปปไทด์) สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่อัลคิลไฮดรอกซิลจับกับ หมู่นิวคลีโอไฟล์ (เกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน) และหมู่ไฮดรอกซิลอะเซทาไมด์ จับกับ แอล-ซิสเทอีน (เกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน) การเชื่อมไขว้ระหว่างเอนไซม์กับกลูตาอัลดีไฮด์นั้นมีความเสถียรมากและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ ถึงแม้ว่าอุณหภูมิและพีเอชเปลี่ยนแปลงไปมากก็ตาม เนื่องจากเกิดการจับกันแบบ Schiff's base เกิดพันธะ aldimine ซึ่งมีความแข็งแรงมาก นอกจากนั้นการเชื่อมไขว้ยังเกิดจากปฏิกิริยาหมู่เอมิโนของเอนไซม์ จับตรงพันธะ ethylenic double bond ของ α,β -unsaturated oligomers ของ กลูตาอัลดีไฮด์

สถานะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้เอนไซม์ที่ถูกเชื่อมไขว้และไม่ละลายน้ำ โดยที่ไม่สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ขึ้นอยู่กับความสมดุลขององค์ประกอบต่าง ๆ คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเชื่อมไขว้ พีเอช ความเข้มข้นของอิออนในสารละลาย (ionic strength) อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เมื่อเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำลงในสารละลายของสารเชื่อมไขว้ ในระยะแรกจะได้โพลิเมอร์ที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์มากขึ้นจะเกิดโพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและไม่ละลายน้ำ ความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมในการตรึงอยู่ในช่วง 50-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้เกิดขึ้นได้เร็วมากเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอชใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริกของเอนไซม์นั้น ๆ

ธรรมชาติของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำโดยที่เอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนไลซีน เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูงทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำได้ง่ายขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาออลดีไฮด์ทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงเพิ่มขึ้นด้วยโดยจะเพิ่มจนถึงจุด ๆ หนึ่งแล้วจะลดลง อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูตาออลดีไฮด์กับความเข้มข้นของโปรตีนมักอยู่ในช่วง 10-100 โดยน้ำหนัก โดยความเข้มข้นของกลูตาออลดีไฮด์ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จะอยู่ในช่วง 0.3 – 0.6 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือ สามารถใช้สารเชื่อมโยงเพียงชนิดเดียว ตรึงภายในขั้นตอนเดียวและปฏิกิริยาการเชื่อมโยงเกิดได้ง่าย ส่วนข้อบกพร่องนั้น คือ มีความยากในการเลือกใช้สภาวะที่ใช้และควบคุมปฏิกิริยาการเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ขนาดของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำที่มีขนาดใหญ่และเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่สูง นอกจากนั้น เมื่อนำไปใช้งาน ยังเกิดปัญหาเรื่องการไหลเนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้มีลักษณะเป็นเจล

5.4.2 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (physical-adsorption method)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ พันธะที่ใช้จะเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงวานเดอร์วาลส์ (van der waals force) และ ไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพุงที่เป็นของแข็ง การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพุงที่ใช้ตรึง ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม ทิ้งไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกจากตัวพุงด้วยการเหวี่ยงหรือการกรอง

ความสามารถในการดูดซับเอนไซม์บนตัวพุง ขึ้นอยู่กับ พีเอช ธรรมชาติของตัวพุง ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์กับพหุ และอุณหภูมิที่ใช้ นอกจากนี้ยังต้องอาศัยธรรมชาติของเอนไซม์และตัวพุง เช่น พื้นที่ผิวของตัวพุง อัตราส่วนของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกจับบนตัวพุง และกิจกรรมของเอนไซม์หลังถูกจับ การควบคุมสภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการตรึงเอนไซม์ได้ดี และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังคงมีอยู่สูง ปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพุง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพุงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จนถึงจุดอิ่มตัวถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีกก็ไม่ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงเพิ่มขึ้น

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ มีการเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของโมเลกุลเอนไซม์ หรือ บริเวณเร่ง (active site) น้อยมาก การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แรงที่ใช้เป็นแรงอ่อน ดังนั้นสามารถแยกเอนไซม์ออกจากตัวพุงได้ โดยอาศัยสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีผลต่อความแข็งแรงของแรงยึดระหว่างโปรตีนกับตัวพุง ปัจจัยที่มีผลต่อแรงยึดได้แก่ พีเอช ความเข้มข้นของอออนในสารละลาย และอุณหภูมิ ดังนั้นการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้ไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เป็นพิเศษเพื่อที่จะให้มีผลกระทบต่อเอนไซม์น้อยที่สุดเพื่อลดการสูญเสียเอนไซม์

ตัวพุงที่ใช้ดูดซับ (adsorbant) ที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งได้แก่ เซลลูโลส activated carbon คอกลาเจน ถ่าน (charcoal) คอนคานาวาลิน เอ (concanavalin A) เป็นต้น และตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ DEAE-Sephadex อะลูมินา แก้ว ไฮดรอกซีลาพาไทท์ (hydroxylapatite) และ ซิลิกา เป็นต้น

ส่วนการจับที่อาศัยพันธะไฮโดรโฟบิก ตัวพุงที่ใช้จะมีส่วนที่ไม่มีขั้วโดยเฉพาะกลุ่มที่เป็นอะโรมาติกซึ่งกลุ่มนี้จะมีความสามารถจับกับเอนไซม์ โดยอาศัยไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน กับโปรตีนที่มีส่วนที่เหลือ (residues) คือ ทริปโตเฟน ไทโรซีน และ ไอโซลูซีน

5.4.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent-binding method)

เป็นการตรึงเอนไซม์โดยมีการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ทำได้ยากกว่าวิธีอื่น ๆ เนื่องจากปฏิกิริยาก่อนข้างซับซ้อนและรุนแรง การจับกันนี้อาศัยโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีนที่มีต่อตัวพุง สิ่งสำคัญในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ คือ กรดอะมิโนที่มีผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ต้องไม่เกี่ยวข้องกับ การจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์กับตัวพุง ซึ่งควบคุมได้ยากและโดยทั่วไปเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึง แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ตัวยับยั้งแบบแข่งขันหรือสับสเตรตเข้าไปจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณเร่ง ทำให้ป้องกันบริเวณนี้จากการเกิดพันธะกับตัวพุง ตัวพุงชนิดนี้จะมีกลุ่มฟังก์ชันจำนวนมาก ทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ด้วยปฏิกิริยาหลายชนิด ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์โดยวิธีโควาเลนต์ คือ 1. กลุ่มฟังก์ชันของโปรตีนที่เหมาะสมต่อการสร้างพันธะโควาเลนต์ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง 2. ชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดจากการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง และ 3. ตัวพุงที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่เหมาะสมต่อการจับกับเอนไซม์

5.4.4 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม (entrapment method)

วิธีนี้เป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ภายในช่องว่างของตาข่ายโพลิเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารบางตัวผ่านเข้าออกได้ (semipermeable membrane) โดยจะยอมให้มีการแพร่เข้าออกของโมเลกุลสับสเตรตและผลิตภัณฑ์

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่การตรึงจะไม่มี การเชื่อมพันธะเคมีใด ๆ ระหว่างเอนไซม์และโพลิเมอร์ หรือแผ่นเมมเบรนที่ล้อมรอบ ดังนั้น จึงสามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิดรวมทั้งเซลล์ และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ทั้งที่มีขนาดและคุณสมบัติแตกต่างกันก็ตาม การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับการตรึงเอนไซม์ที่ใช้พันธะทางเคมีการตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้ม สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ

ก. การห่อหุ้มภายในเจล (gel-entrapment method)

วิธีนี้เป็นการทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปอยู่ในช่องตาข่ายของโพลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตาข่ายโพลิเมอร์นี้เตรียมได้จาก สารเริ่มต้น (precursor) ที่เป็น โมโนเมอร์ โอลิโกเมอร์ หรือ โพลิเมอร์ แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลาย ด้วยการเปลี่ยนตัวแปรของการละลาย ซึ่งได้แก่ ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอ็อกซิเจน และพีเอช เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้

การห่อหุ้มโดยใช้เจล ที่เกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นโมโนเมอร์ เป็นการตรึงเอนไซม์โดยใช้เจลโพลิอะคริลาไมด์ ที่ได้จากการบวนการโพลิเมอไรเซชัน โดยใช้อะคริลาไมด์เป็นโมโนเมอร์ และสารเชื่อมไขว้ที่ใช้จับโมโนเมอร์ โดยทั่วไปจะเป็น N,N -methylene bisacrylamide (bis) ปฏิกิริยานี้เกิดได้เมื่อไม่มีออกซิเจน และใช้อุณหภูมิต่ำ (10-25 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างกระบวนการตรึง ปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันนี้จะใช้ $K_2S_2O_8$ หรือ riboflavin เป็นตัวเริ่มต้น และ β -dimethylamino propionitrile (DMAPN) หรือ เป็นตัวเร่ง ข้อเสียของวิธีนี้ คือ เจลชนิดนี้ไม่มีความคงทนต่อแรงกล ทำให้โครงร่างตาข่ายเปิดออก ซึ่งผลให้เอนไซม์หลุดออกจากเจลได้ แต่อย่างไรก็ตาม สามารถแก้ไขข้อบกพร่องนี้ได้ โดยการทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ที่เหมาะสม

การห่อหุ้มด้วยเจลที่เกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์ การเตรียมโพลิเมอร์จากสารเริ่มต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์ จะให้ผลดีกว่าการใช้โมโนเมอร์ เนื่องจาก ขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าของโมโนเมอร์ ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้อยกว่า ความร้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันเกิดขึ้นน้อย เนื่องจากเกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้อยนั่นเอง อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันของสารตั้งต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์จำเป็นต้องใช้สารที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น กลุ่มอีพอกซี คาร์บอนิล หรือไอโซไซยาเนต ซึ่งกลุ่มเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ ดังนั้นการตรึงด้วยวิธีนี้จะมีทั้งการห่อหุ้มเอนไซม์และเกิดพันธะโควาเลนต์

การห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยโพลิเมอร์ ที่มีโมเลกุลเป็นลูกโซ่ยาว เป็นการตรึงเอนไซม์โดยการเติมเอนไซม์ลงในโพลิเมอร์ธรรมชาติ โพลิเมอร์ที่นิยมใช้คือ โปรตีน (คอลลาเจน และเจลาติน) และโพลิแซ็กคาไรด์ (อะการ์ แคลเซียมอัลจิเนต แคลปา-คาร์ราจีแนน และ ไคโตซาน)

โซเดียมอัลจิเนตเป็นโพลิแอนไอออนที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์มากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสามารถทำการทดลองได้ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เอนไซม์ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนสำหรับไอออนที่ใช้จับนั้นนิยมใช้ แคลเซียมคลอไรด์ ทำให้เกิดเจล แคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในเมตเจล ซึ่งวิธีนี้ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรง และทำได้รวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อบกพร่องคือ ในการใช้เมตเจลแคลเซียมอัลจิเนต ในสารละลายที่ประกอบด้วยสารที่ใช้จับแคลเซียม (calcium-chelating agent) เช่น ฟอสเฟต เป็นต้น และไอออนบวก (Mg^{2+} หรือ K^+) ซึ่งสารเหล่านี้จะทำให้เมตเจลแตก สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวนี้ได้โดยเติมไอออนที่มีประจุสูงอื่น ๆ เช่น Ba^{2+} และ Al^{3+} เพื่อเป็นไอออนที่ใช้จับกับอัลจิเนตร่วมกับแคลเซียม

ข. การห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber-entrapment)

เป็นการตรึงเอนไซม์ไว้ในโพรงขนาดเล็กของเส้นใยสังเคราะห์ ซึ่งทำได้โดยละลายโพลิเมอร์ที่ใช้ทำเป็นเจล ที่นิยมใช้คือ เซลลูโลสไตรอะซีเตท (cellulose triacetate) ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ (คลอโรฟอร์ม เมทิลีนคลอไรด์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์) แล้วผสมสารละลายเอนไซม์ลงไป นำอิมัลชันที่ได้นี้ผ่านเครื่อง extruder ลงในของเหลวที่ทำให้อิมัลชันเกิดการจับตัวกันเป็นของแข็ง ซึ่งของเหลวที่ใช้ตกตะกอนนี้มักเป็น โทลูอิน หรือ ปีโตรเลียมอีเธอร์ วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ เส้นใยที่ได้สามารถทนกรดอ่อน และด่างอ่อนได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็มีข้อบกพร่องคือสับสเตรตที่มีโมเลกุลเล็ก เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปได้ เนื่องจากการตรึงทำให้เกิดการปิด

กั้นการเข้าออก นอกจากนั้นเอนไซม์อาจถูกทำลายด้วยตัวทำลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวทำลายของ โพลีเมอร์ และสารที่ใช้ตกตะกอน

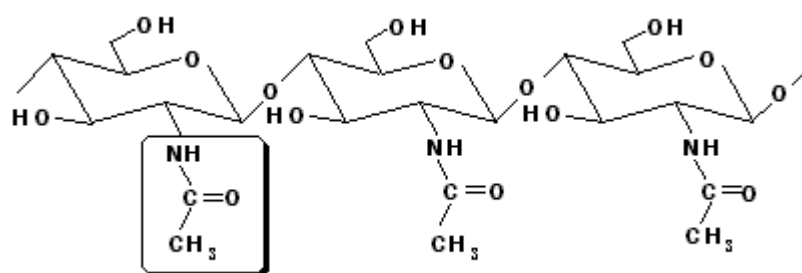
ก. การตรึงเอนไซม์ด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (microencapsulation)

เป็นการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็กที่เตรียมได้จากโพลีเมอร์ที่เป็น สารอินทรีย์ ซึ่งโพลีเมอร์นี้จะมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ที่สามารถปล่อยให้สับสเตรตและผลิตภัณฑ์ผ่านได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อให้สับสเตรตสัมผัสกับเอนไซม์ได้ และสามารถตรึง เอนไซม์ได้หลายชนิดพร้อม ๆ กัน ในขั้นตอนเดียว โดยไม่จำกัดว่าเอนไซม์นั้นจะผ่านการตรึงด้วยวิธี อื่นมาก่อนหรือไม่ ข้อบกพร่องของวิธีนี้คือ ไม่สามารถใช้สำหรับกรณีที่ใช้สับสเตรตที่มีน้ำหนัก โมเลกุลสูง เอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึง และเอนไซม์อาจเข้าไปอยู่ใน ผนังของเยื่อโพลีเมอร์ได้

6. การใช้ไคโตซานเป็นตัวพองสำหรับตรึงเอนไซม์ (ประภัศร, 2548)

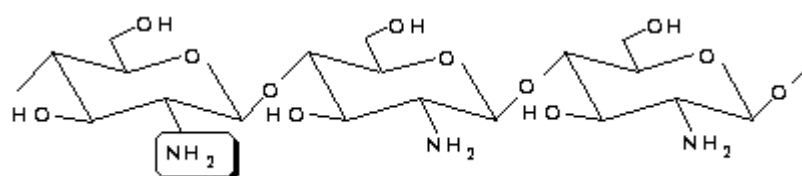
ไคโตซานเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติ ที่มีมากที่สุดในโลก รองจากเซลลูโลส (cellulose) ถูก ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส ที่มีธาตุไนโตรเจนเกาะอยู่ ภายในโมเลกุล ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่ acetyl ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine (เรียกว่า deacetylation คือ เปลี่ยนน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine เป็น glucosamine) ออกตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป และมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน โครงสร้างทางเคมีของไคตินและ ไคโตซานแสดงดังภาพที่ 13 และ 14

ไคโตซานสามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิด ได้แก่ สารละลายอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดไพรูวิก กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก และกรดซิตริก นอกจากนี้ ยังสามารถละลายในกรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง และกรดเปอร์คลอริก ละลายได้น้อยใน กรดฟอสฟอริก แต่ไม่ละลายในกรดซัลฟูริก



ภาพที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

ที่มา: ประภัสสร (2548)



ภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา: ประภัสสร (2548)

ปกติแล้วไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ในสายโพลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่ acetyl (หรือเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation) นี้มีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไคโตซาน ซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสายยาวและสารละลายที่มีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นต้น ดังนั้นการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation และน้ำหนักโมเลกุล

Hung et al. (2003) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บนไคโตซานโดยใช้คาร์บอไดมายด์ (carbodiimide) ในการกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลของไคโตซาน และเชื่อมไขว้หมู่อะมิโนของไคโตซานด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ ซึ่งได้แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลอง โดยการทดลองแรก ทำการกระตุ้นด้วยคาร์บอไดมายด์ และเชื่อมไขว้ด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ พร้อมกันก่อนนำไปตรึงไลเปส การทดลองที่สอง ทำการเชื่อมไขว้หมู่อะมิโนของไคโตซานด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ แล้วนำไปตรึงไลเปส จากนั้นทำการกระตุ้นด้วยคาร์บอไดมายด์ แล้วนำไปตรึงไลเปสอีกครั้ง และการทดลองที่สาม ทำการกระตุ้นด้วยคาร์บอไดมายด์ แล้วนำไปตรึงไลเปส จากนั้นเชื่อมไขว้หมู่อะมิโนของไคโตซานด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ แล้วจึงนำไปตรึงไลเปส โดยความเข้มข้นของคาร์บอไดมายด์ และกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้ คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ และ 0.0025 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สภาวะที่ใช้ในการตรึง คือ ความเข้มข้นของไลเปสเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจากทดลองพบว่า การทดลองที่สาม ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 13.8 หน่วยต่อกรัมไคโตซาน โดยในวิธีที่หนึ่งและสอง จะให้ค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.7 และ 10.1 หน่วยต่อกรัมไคโตซาน ตามลำดับ เมื่อใช้คาร์บอไดมายด์กระตุ้นเพียงอย่างเดียว จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4.3 หน่วยต่อกรัมไคโตซาน และเมื่อใช้กลูตาอัลดีไฮด์เชื่อมไขว้เพียงอย่างเดียว ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเท่ากับ 6.98 หน่วยต่อกรัมไคโตซาน

Juang et al. (2001) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ acid phosphatase บนไคโตซานโดยใช้กลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 5000 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสภาวะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 377 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการตรึง 18 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 6 ไมโครโมลต่อนาที

Pereira et al. (2003) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* และไลเปส porcine pancreas บนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ โดยใช้ไคโตซานทั้งชนิดแผ่น และชนิดเม็ด ที่สภาวะการทดลอง คือ อัตราส่วนระหว่างไคโตซานต่อไลเปสเท่ากับ 1:0.25 และใช้เวลาในการตรึง 3 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ไคโตซานชนิดเม็ดในการตรึงไลเปสทั้ง 2 ชนิด จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเมื่อใช้ไคโตซานชนิดแผ่น โดยไลเปสจาก *Candida rugosa* จะได้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 42.7 หน่วยต่อมิลลิกรัม ส่วนไลเปสจาก porcine pancreas ได้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 42.6 หน่วยต่อมิลลิกรัม

Chiou and Wu (2004) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บนไคโตซาน โดยใช้ที่คาร์บอนไดออกไซด์ในการกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลของไคโตซาน เนื่องจากโครงสร้างของไคโตซานประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวน 2 หมู่ เมื่อใช้ที่คาร์บอนไดออกไซด์กระตุ้นจะทำให้เอนไซม์สามารถจับยึดบนไคโตซานเพิ่มขึ้น ที่สภาวะการตรึง คือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 6 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 3.28 หน่วยต่อกรัมไคโตซาน และเมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปทดสอบความคงตัวต่อพีเอชและอุณหภูมิ พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวที่พีเอช ตั้งแต่ 3-7 และอุณหภูมิตั้งแต่ 25-40 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนั้นสามารถเก็บเอนไซม์ที่ถูกตรึงได้นาน 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Khare and Nakajima (2000) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus japonicus* บน celite แบบดูดซับทางกายภาพ โดยใช้ อัตราส่วนระหว่างซีไลท์ต่อไลเปสเท่ากับ 5:1 เวลาในการตรึง 1 ชั่วโมง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงลดลงเหลือ 18.6 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ

Betigeri and Neau (2002) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยวิธีการห่อหุ้มด้วย พอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ โพลีเอทิลีนไกลคอล ไคโตซาน และอะกาโรส ก่อนการตรึงได้ทดสอบความคงตัวของเม็ดพอลิเมอร์ที่พีเอชที่ใช้ในการตรึง คือ พีเอช 7.2 สำหรับโพลีเอทิลีนไกลคอลและไคโตซาน สำหรับอะกาโรสทดสอบที่พีเอช 7.4 พบว่าอะกาโรสไม่มีความคงตัวที่พีเอชที่ทดสอบ ดังนั้นจึงทำการตรึงไลเปสด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลและไคโตซาน พบว่าที่สภาวะการตรึง คือ ใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 240 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ส่วนไลเปสที่ถูกห่อหุ้มด้วยไคโตซาน จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1150 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 42 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ

Minovska et al. (2005) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล ที่ความเข้มข้นของโพลีเอทิลีนไกลคอล 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 54 หน่วยต่อกรัมของอัลจินต

7. ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

7.1 ปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

โดยปกติเมื่อปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้น อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์สูงเกินกว่าระดับที่เร่งปฏิกิริยาพอดีกับสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ดังนั้นจึงต้องศึกษาปริมาณของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมและไม่เกิดการสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น (เชิดศักดิ์, 2535)

Shah et al. (2004) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันสบูดำ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ที่ตรึงบนซิลิกา ซึ่งเป็นตัวพองที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ เปรียบเทียบกับเมื่อใช้เอนไซม์อิสระ พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนซิลิกา ที่พีเอช 7.8 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเอทานอล คือ 1:4 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 50 มิลลิกรัม บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง พบว่า จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ 71 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ถ้าใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงมากกว่านี้ พบว่า ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ลดลง เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้สารละลายในปฏิกิริยามีความหนืดสูง การถ่ายเทมวลลดลง และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะเดียวกัน แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน คือ 10, 50, 75, และ 100 มิลลิกรัม พบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์อิสระ 50 และ 70 มิลลิกรัม จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 100 มิลลิกรัมพบว่าปริมาณเอทิลเอสเทอร์กลับลดลง ซึ่งเกิดจากสาเหตุเดียวกับที่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ ที่ปริมาณเอนไซม์อิสระ 50 มิลลิกรัม คือ 62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

7.2 ตัวทำละลายอินทรีย์

เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันและเมทานอล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น เอนไซม์ไลเปสอาจสูญเสียกิจกรรมได้หากสัมผัสโดยตรงกับเมทานอล ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จะช่วยให้เมทานอลสามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ดี ลดการสัมผัสระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับเมทานอลได้ นอกจากนี้การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมันมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้น้ำ เพราะไขมันและน้ำมันสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี ในขณะที่เอนไซม์ไม่ละลายซึ่งช่วยให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลผลิตเพื่อนำกลับ

มาใช้ใหม่ได้ง่าย ตัวทำละลายอินทรีย์จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เช่นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือช่วยให้เกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์จากกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์หรือเปปไทด์จากกรดอะมิโน (เชดส์คัล, 2535)

Soumanou et al. (2003) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันเมล็ดทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงบนโพลิโพรไพลีน (polypropylene, EP100) ซึ่งเป็นตัวพองที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยใช้สภาวะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7 พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.3 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยา ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมัน ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน ไชโครเฮกเซน n-heptane ไอโซออกเทน อะซีโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่า เฮกเซน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเฮกเซน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ดี และนอกจากนี้ยังไม่มีผลกระทบต่อ conformation ของเอนไซม์

Desai et al. (2005) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันใน salicornia oil โดยใช้เอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic ที่ตรึงบนไคโตซานที่จับยึดกับกลูตาอัลดีไฮด์ โดยมีสภาวะการตรึง คือ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7 ใช้เวลาในการตรึงนาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาที่ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 20 กรัม มีน้ำในปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซน และอะซีโตน พบว่า เฮกเซน จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 44.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์อิสระ 0.125 กรัม ที่สภาวะเดียวกัน จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 55.3 เปอร์เซ็นต์

7.3 ปริมาณน้ำ

น้ำเป็นปัจจัยที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องจากน้ำจะเข้าร่วมทั้งทางตรงและทางอ้อมกับพันธะต่าง ๆ ของเอนไซม์ เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) และแรงวานเดอร์วาลส์ (van der waal force) ซึ่งจะทำให้เอนไซม์คงสภาพธรรมชาติและรูปแบบการเร่งปฏิกิริยาอยู่ได้ ถ้ามีการกำจัดน้ำ

ออกโดยสิ้นเชิงจะทำให้เกิดการบิดทำลายของ (conformation) อย่างรุนแรงและเกิดการหยุดยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แต่จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีสารประกอบเอสเทอร์เป็นสารตั้งต้นในสถานะของระบบที่มีน้ำน้อยมาก (micro-aqueous system) จะก่อให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตรงกันข้ามหรือผันกลับกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส การเกิดปฏิกิริยานี้อธิบายได้ว่าเป็นเพราะ net free energy ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมีค่าเท่ากับศูนย์ ในขณะที่ค่านี้ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะสูงกว่าศูนย์ การต้องการ net free energy มากกว่าศูนย์ทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดขึ้นได้ที่สภาวะดังกล่าว จึงเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ง่ายกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะสมดุล (เชิดศักดิ์, 2535)

Noureddini et al. (2005) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในน้ำมันถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas capacia* ที่ตรึงโดยการห่อหุ้มด้วย hydrophobic sol-gel เมื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาที่ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเอทานอล 1:15.2 ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 3 กรัม บ่มที่ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณน้ำในการทำปฏิกิริยาในช่วงระหว่าง 0-2 กรัม พบว่า ที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 0.3 กรัม จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 65 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาดำกว่า 0.3 กรัม ปริมาณเอสเทอร์จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากจะทำให้เกิดการบิดทำลาย conformation ของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสียสภาพมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และเมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาสูงมากเกินไป น้ำที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส มีผลให้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ลดลงเช่นกัน

7.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไลเปส อุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ ซึ่งถ้าอุณหภูมิที่ใช้ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำ เช่นเดียวกันหากอุณหภูมิที่ใช้สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม เอนไซม์อาจเสียสภาพ เนื่องจากสูญเสียหน้าที่จำเป็นไป (Iso et al., 2001)

Iso et al. (2001) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันเมล็ดทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงบน Toyonite 200-M ซึ่งเป็นตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ที่สภาวะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7 ใช้เวลาในการตรึง 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อโพรพานอล 1:3 ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 2.84 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณโพรฟิลโอลิเอทสูงสุด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 10 ชั่วโมง และเมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์อิสระ 0.1 กรัม ที่สภาวะเดียวกัน จะได้ปริมาณโพรฟิลโอลิเอทเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 น้ำมันเมล็ดทานตะวัน ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก บริษัทนาครจำกัด

1.2 เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผงจาก *Pseudomonas fluorescens* EnzOS grade Fluka, Switzerland

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

2.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer): model Anthelie Advanced, Secoman, France

2.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ: model SBD 50 – Cold, Heto, Denmark

2.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter): model 420A, Orion, Thermo orion, USA

2.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

3.1 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี: model CP3800, Variance, France

carrier gas: He

column: SPTM-2560, 100 m x 0.25 mm ID

oven: อุณหภูมิ 245 องศาเซลเซียส

detector: FID, อุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส

injector: split 20:1

3.2 เครื่องเขย่า (orbital shaker): model SK2-DO, CTL

3.3 เครื่องเขย่าแบบปรับอุณหภูมิได้ (incubator shaker): BINDER, Germany

3.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง: model BL210S, Sartorius, Goettingen, Germany

3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge): model PLC-012, GEMMY, Taiwan

3.6 เครื่องผสม (vortex mexer): model KMC-1300V, VISION, Korea

3.7 ขวด vial ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

3.8 Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร หัวเข็มขนาด 18 และ 23 G

3.9 Microsyringe ขนาด 10 ไมโครลิตร

4. วัสดุและสารเคมีสำหรับเตรียม

4.1 ไซโตซานชนิดแผ่น, food grade

4.2 โซเดียมอัลจิเนต, food grade

4.3 ซีลิต 545 (celite 545): Analysis grade, Merck, Germany

4.4 กรดอะซีติก: Analysis grade, Carlo Erba Reagenti, Italy

4.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์: Analysis grade, Merck, Germany

4.6 เอทานอล: Analysis grade, Merck, Germany

4.7 โซเดียมคลอไรด์: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia

4.8 กลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์: Analysis grade, Fluka, Switzerland

4.9 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2): Analysis grade, Carlo Erba Reagenti, Italy

4.10 โซเดียมไตรฟอสเฟต: Analysis grade, Aldrich, Germany

4.11 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4): Analysis grade, Ajax
Fine chem, Australia

4.12 ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K_2HPO_4): Analysis grade, Ajax
Fine chem, Australia

5. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

5.1 4-Nitrophenyl palmitate: Analysis grade, Fluka, Switzerland

5.2 2-โพรพานอล: Analysis grade, J.T Baker, USA

5.3 Triton X-100 : General purpose grade, Fisher, UK

5.4 Gum arabic: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia

5.5 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต: Analysis grade, Merck, Germany

5.6 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต: Analysis grade, Merck, Germany

5.7 โซเดียมคาร์บอเนต: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia

6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

6.1 Coomassie brilliant blue G-250: Analysis grade, Sigma, USA

6.2 กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์: Analysis grade, J.T Baker, USA

6.3 สารมาตรฐานโปรตีน BSA (bovine serum albumin): Analysis grade, Fluka, Switzerland

7. สารเคมีสำหรับผลิตและวิเคราะห์เมทิลเอสเทอร์

7.1 เมทานอล :Analysis grade, Merck, Germany

7.2 เฮกเซน: Analysis grade, J.T. Baker, USA

7.3 ปีโตรเลียมอีเทอร์: Analysis grade, J.T. Baker, USA

7.4 โทลูอิน: Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia

7.5 N- methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA): Analysis grade, Fluka, Switzerland

7.6 สารมาตรฐานภายใน, methyl capylate: Analysis grade, Fluka, Switzerland

7.7 n-Heptane: Analysis grade, Labscan, Ireland

วิธีการ

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโคซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

1.1 การเตรียมโคโคซานชนิดเม็ดมีรูพรุน

ชั่งแผ่นโคโคซาน 2 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข้มนิตยา ที่มีหัวเข็มขนาด 18 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 มิลลิเมตร) แล้วกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายผสมที่เตรียมจาก โซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 กรัม เอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 125 มิลลิลิตร จะได้โคโคซานที่มีลักษณะเป็นเม็ดมีรูพรุน

1.2 วิธีการตรึงเอนไซม์

โดยชั่งโคโคซานที่เตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 ปริมาณ 2 กรัม เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมโดยชั่งเอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยนำไปผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บส่วนใส ที่ได้วัดปริมาตรทั้งหมด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีในภาคผนวก ก ข้อที่ 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 10.1 ชั่งน้ำหนักโคโคซานที่ผ่านการตรึงเอนไซม์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 10.2 นำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์ ประสิทธิภาพการตรึง (immobilization efficiency) โดยวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ในสารละลายก่อนการตรึงและกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากการตรึง และปริมาณโปรตีนที่ขึ้นเกาะ (protein loading yield) โดยวัดปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนการตรึงและปริมาณเอนไซม์หลังจากการตรึง โดยรายละเอียดการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก ข้อที่ 2

1.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ที่มีต่อการตรึง

ซังโคโตซานที่เตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 ปริมาณ 2 กรัม เติมกลูตาอัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.025 0.05 0.1 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ที่ อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา กรองแยกเอา เม็ดโคโตซาน เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมโดยซังเอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยนำไปผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสที่ได้วัดปริมาตรทั้งหมด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งน้ำหนักโคโตซานที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ นำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์ ประสิทธิภาพการตรึง และ ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

1.4 ศึกษาผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 1.3 ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 (ทำการปรับพีเอชโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอชต่าง ๆ ในการละลายเอนไซม์ไลเปส) โดยใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 1.3 เก็บส่วนใสที่ได้วัดปริมาตรทั้งหมด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งน้ำหนักโคโตซานที่ผ่านการตรึงเอนไซม์และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์ นำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์ ประสิทธิภาพการตรึง และ ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

1.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.3 และ 1.4 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ แต่ใช้อุณหภูมิระหว่างวิเคราะห์กิจกรรมที่ 30, 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์

2. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนซีไลท์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

ซังผงซีไลท์ 0.5 กรัม เติมเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้สักครู่ เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมโดยซังเอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยการกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสที่ได้วัดปริมาตรทั้งหมด และซังน้ำหนักโคโคซานที่ผ่านการตรึงเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 10.2 แต่ใช้อุณหภูมิระหว่างวิเคราะห์กิจกรรมที่ 30, 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีในภาคผนวก ก ข้อที่ 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 10.1 โดยใช้อุณหภูมิในการวิเคราะห์ที่เหมาะสม แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์ ประสิทธิภาพการตรึง และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

3. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโคโคซาน

ซังแผ่นโคโคซาน 1.5 กรัม ทำละลายในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จำนวน 80 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผสมสารละลายโคโคซาน 30 กรัม กับสารละลายเอนไซม์ไลเปส 2 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันจากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข็มฉีดยาที่มีหัวเข็มขนาด 23 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.74 มิลลิเมตร) แล้วกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.136 โมลาร์ (โดยละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต 10 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้มีค่า 7.2 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

นำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 10.2 แต่ใช้อุณหภูมิระหว่างวิเคราะห์กิจกรรมที่ 30, 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

4. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (ปวีณา, 2547)

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (โดยชั่งผงโซเดียมอัลจิเนต 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร) เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันจากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข็มฉีดยา ที่มีหัวเข็มขนาด 23 G (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.74 มิลลิเมตร) แล้วกดหัวของหลอดหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จึงสามารถนำออกมาใช้งานได้

นำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 10.2 แต่ใช้อุณหภูมิระหว่างวิเคราะห์กิจกรรมที่ 30, 37, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

5. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อิสระ

5.1 ศึกษาอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

โดยนำเอนไซม์ไลเปสละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 10.1 แต่ใช้อุณหภูมิระหว่างวิเคราะห์กิจกรรมที่ 30, 40, 45 และ 55 องศาเซลเซียส นำผลที่ได้มาคำนวณ กิจกรรมของเอนไซม์

5.2 ศึกษาพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

โดยนำเอนไซม์ไลเปสละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 5, 6, 7, 8 และ 9 จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 10.1 โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ในการวิเคราะห์กิจกรรม นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

6. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

6.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อิสระ

โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 10.1 โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

6.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการที่เหมาะสม บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 10.2 โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 1.5 นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

7. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์

7.1 ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์อิสระ

โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 10.1 โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 เมื่อเวลาผ่านไป 30 และ 40 วัน ตามลำดับ นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

7.2 ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึง

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการที่เหมาะสม เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 10.2 โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 1.5 เมื่อเวลาผ่านไป 30 และ 40 วัน ตามลำดับ นำผลที่ได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

8. ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง

8.1 ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการที่เหมาะสม ปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 25, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกตัวอย่างออกจากเอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที คัดตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

8.2 ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ต่าง ๆ คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน และ โทลูอิน ปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน และปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกตัวอย่างออกจากเอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที คัดตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

8.3 ศึกษาผลของปริมาณน้ำต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ปริมาณน้ำ ต่าง ๆ กัน คือ 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน และปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกตัวอย่างออกจากเอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

8.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา ต่าง ๆ กัน คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจากข้อ 8.3 และปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกตัวอย่างออกจากเอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ดูดตัวอย่างน้ำมันชั้นบนสุดมาวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

9. เปรียบเทียบผลของเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่าง ๆ ต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่าง ๆ มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 8 นำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

10. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ละลายน้ำและเอนไซม์ที่ถูกตรึง

10.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ละลายน้ำ (Winkler and Stuckmann, 1979)

10.1.1 ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน 2-โพรพานอล ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10.1.2 ละลาย Triton-X-100 ปริมาณ 0.4 กรัม และ gum arabic 0.1 กรัม ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

10.1.3 ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาณ 211.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

10.1.4 เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

10.1.5 เติมสารละลายจากข้อ 10.1.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายจากข้อ 10.1.2 ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายจากข้อ 10.1.3 ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที

10.1.6 หาปริมาณ *p*-nitrophenol โดยนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 0.005-0.045 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

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

10.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

10.2.1 ชั่งเอนไซม์ที่ถูกตรึง ปริมาณ 0.2 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

10.2.2 เติมสารละลายจากข้อ 10.1.1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายจากข้อ 10.1.2 ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ที่ถูกตรึงนำไปอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10.2.3 เมื่อครบเวลา ดูดสารละลายตัวอย่างจากหลอดทดสอบ 0.2 มิลลิลิตร เติมในหลอดทดสอบที่มีสารละลายจากข้อ 10.1.3 เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที

10.2.4 หาปริมาณ *p*-nitrophenol โดยนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ความเข้มข้น 0.005- 0.045 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

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

ผลและวิจารณ์

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตเมทิลเอสเทอร์หรือไบโอดีเซล โดยการทดลองประกอบด้วย การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซาน และซีไลต์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยไคโตซานและโซเดียมอัลจิเนต โดยเฉพาะวิธีการตรึงไคโตซานแบบดูดซับทางกายภาพ ได้ทำการศึกษาผลของกลูตาอัลดีไฮด์ และพีเอช ที่มีต่อการตรึง เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงในแต่ละวิธี โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดไปทดสอบคุณสมบัติ ได้แก่ ความคงตัวต่ออุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ นอกจากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสมไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยศึกษาตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ชนิดของตัวทำละลาย และอุณหภูมิ เปรียบเทียบปริมาณเมทิลเอสเทอร์ระหว่างการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงและเอนไซม์อิสระ

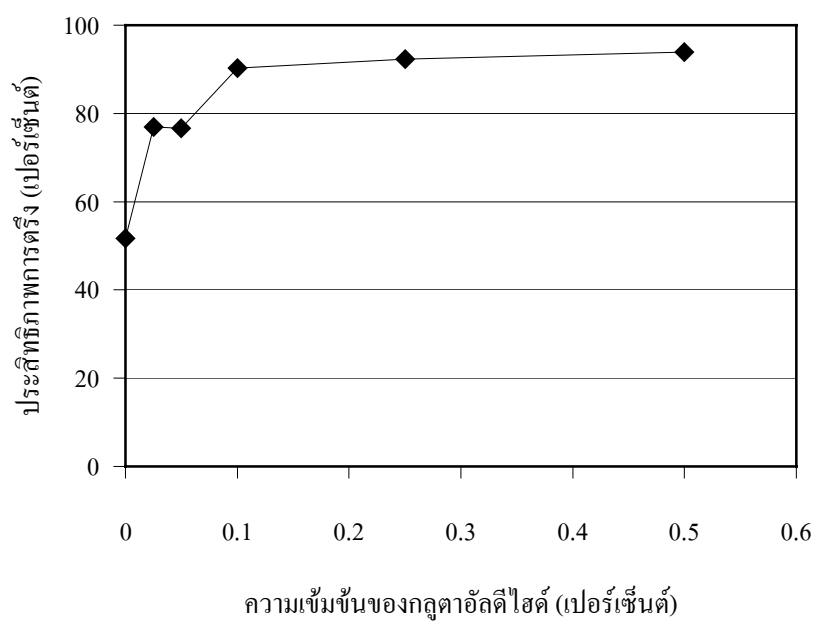
1. ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

1.1 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ต่อการตรึง

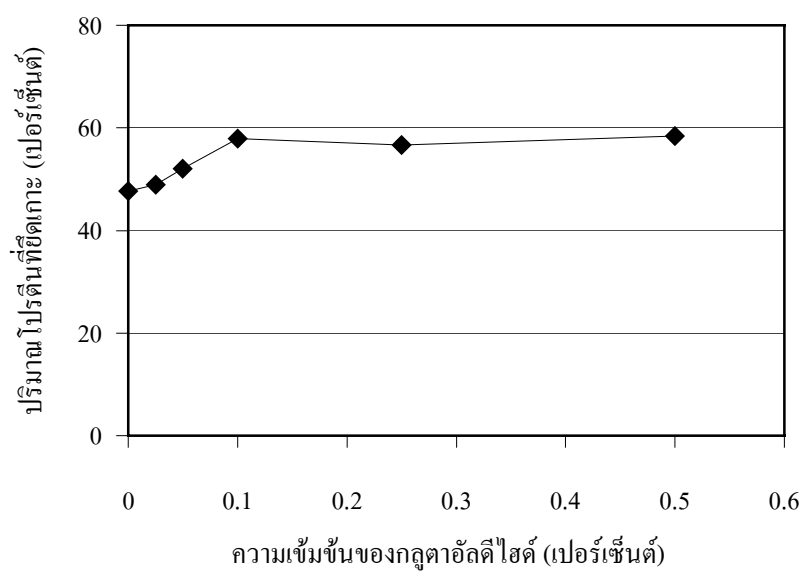
เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ โดยไม่ใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้ และใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไขว้ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 8 พบว่ากลูตาอัลดีไฮด์มีผลต่อการตรึงเอนไซม์และที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่าง ๆ กันมีผลต่อการตรึงเอนไซม์เช่นกัน โดยที่ประสิทธิภาพการตรึงเมื่อไม่ใช้กลูตาอัลดีไฮด์มีค่าเท่ากับ 51.69 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์สูงขึ้น ซึ่งแนวโน้มดังกล่าวจะสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (ภาพที่ 16) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์สูงสุด คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ประสิทธิภาพการตรึงเท่ากับ 93.91 เปอร์เซ็นต์ แต่มีปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเพียง 58.37 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น กลูตาอัลดีไฮด์จะไปจับยึดกับไคโตซาน และขณะเดียวกันกลูตาอัลดีไฮด์อาจไปจับกับเอนไซม์ในลักษณะที่ไม่เหมาะสม มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไป ดังนั้นสารละลายที่เหลือจากการตรึงจึงมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ทั้ง ๆ ที่อาจมีปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่ในสารละลายสูงในรูปที่เสถียรภาพ ดังผลของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะซึ่งต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) ส่งผลให้ประสิทธิภาพ

ภาพการตรึงสูงกว่าปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ สำหรับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเมื่อไม่ใช้กลูตาอัลดีไฮด์มีค่าต่ำ (ภาพที่ 17) แต่เมื่อใช้กลูตาอัลดีไฮด์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็จะเพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 297.48 หน่วยต่อกรัม อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เพิ่มขึ้นเป็น 0.1, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก็กลับลดลงเป็น 170.94, 162.43, 169.60 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ

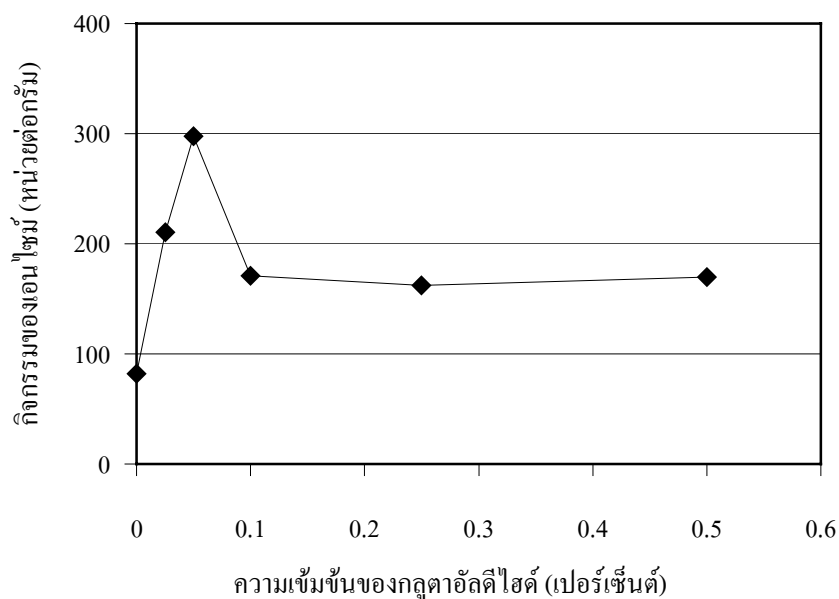
จากผลการทดลองอาจจะอธิบายได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เพิ่มจาก 0.05 เป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ทั้งนี้เพราะที่ระดับการเชื่อมโยงระหว่างไคโตซานกับเอนไซม์มากขึ้น โมเลกุลของเอนไซม์อยู่เบียดชิดกัน ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายมวลลดลง สับสเตรตไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ ส่วนในช่วงความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะสอดคล้องกับประสิทธิภาพการตรึงและปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ ซึ่งอาจแสดงว่าที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ กลูตาอัลดีไฮด์ในสารละลายอาจมีมากเกินไปสำหรับการเชื่อมโยงกับไคโตซาน และกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหลืออาจไปจับกับเอนไซม์ เนื่องจากกลูตาอัลดีไฮด์สามารถจับในส่วนของหมู่อะมิโนของไคโตซาน ซึ่งปลายของเอนไซม์ก็เป็นหมู่อะมิโนเช่นเดียวกัน และสาเหตุที่กลูตาอัลดีไฮด์เลือกจับกับไคโตซานก่อนไปจับกับเอนไซม์ อาจเป็นเพราะว่าหมู่อะมิโนบนโมเลกุลของไคโตซานที่ใช้จับกลูตาอัลดีไฮด์มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยามากกว่าหมู่อะมิโนของเอนไซม์ โดยความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีผลต่อการตรึงนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Desai et al. (2005) ซึ่งรายงานว่ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic บนไคโตซาน คือ 0.02 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเท่ากับ 6.67 มิลลิกรัมต่อกรัมของตัวพุง



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นของกลูตาไธโอนต่อประสิทธิภาพการตรึง ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 16 ผลของความเข้มข้นของกลูตาไธโอนต่อปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศา



ภาพที่ 17 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่พีเอช 8 และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

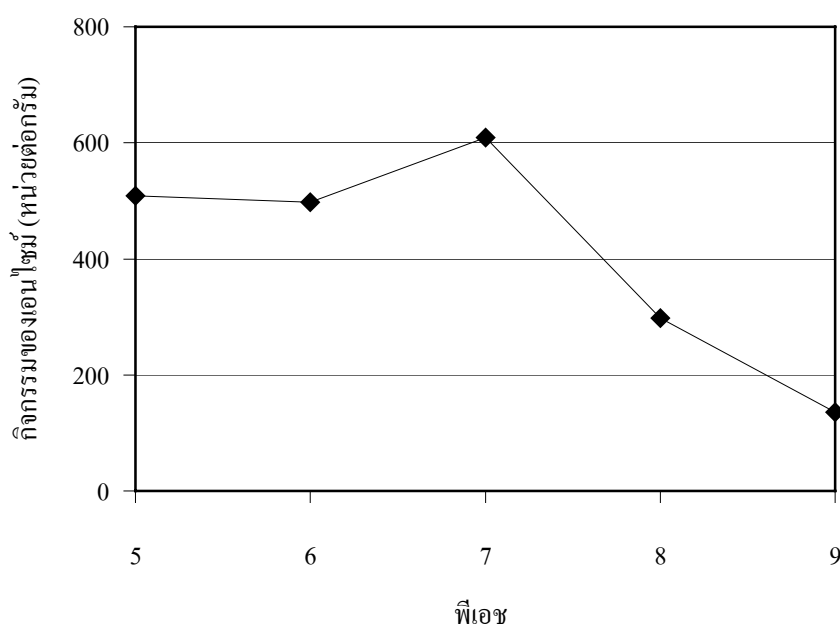
1.2 ผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์

เนื่องจากในกระบวนการตรึงเอนไซม์ พีเอชมีผลต่อการยึดเกาะของเอนไซม์ และจากการศึกษาความคงตัวของเม็ดโคลิโดซานต่อพีเอช พบว่าเม็ดโคลิโดซานที่เตรียมตามวิธีในข้อ 1.1 จะคงตัวที่พีเอช 7, 8, และ 9 เมื่อพีเอชต่ำกว่า 7 โคลิโดซานจะละลาย แต่เมื่อใช้กลูตาอัลดีไฮด์กระตุ้นเม็ดโคลิโดซานก่อนนำไปทดสอบในช่วงพีเอชต่าง ๆ พบว่า เม็ดโคลิโดซานจะมีความคงตัวเพิ่มขึ้น และจะคงตัวที่พีเอช 5, 6, 7, 8 และ 9 ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ โดยใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสม ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ คือ 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

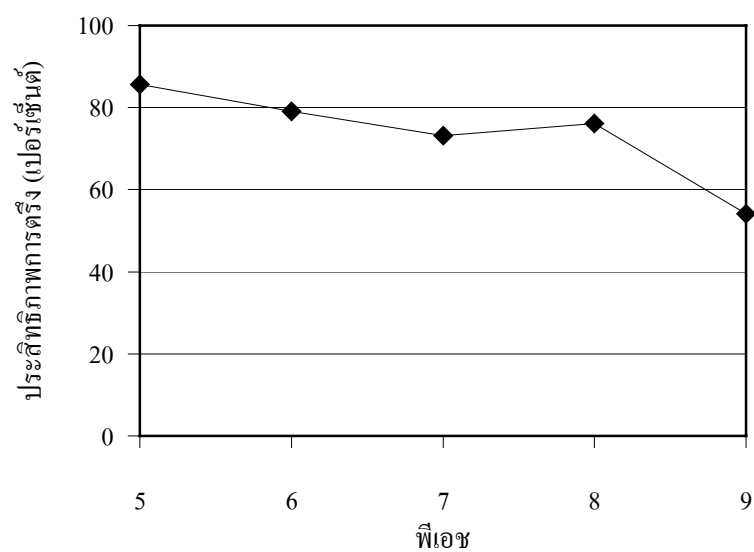
ผลของพีเอชที่มีต่อการตรึง พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชช่วงระหว่าง 5 - 7 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูง (ภาพที่ 18) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโดยทั่วไป โคลิโดซานเป็นตัวพุงที่เป็นโพลิแคทไอออนิก (polycationic) โดยมีค่าไอโซอิเล็กตริกพอยท์ (isoelectric point) เท่ากับ 5.4 (Chiou and Wu, 2004) ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงจะอยู่ในช่วงของพีเอชที่เป็นกรด ซึ่งประจุบวกที่อยู่ในสารละลายรอบ ๆ โคลิโดซานจะเหนี่ยวนำเอนไซม์เข้ามายึดจับกับโคลิโดซานได้ดี แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการตรึงกลับลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มจาก 5 เป็น 7 (ภาพที่ 19) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ที่พีเอชใกล้เคียงกับ 7 เอนไซม์อิสระมีกิจกรรมสูงมาก จึงทำให้คล้ายกับ

ว่าประสิทธิภาพการตรึงลดลง โดยพีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ พีเอช 7 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 609.61 หน่วยต่อกรัม ประสิทธิภาพการตรึง 73.18 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเท่ากับ 60.64 เปอร์เซ็นต์

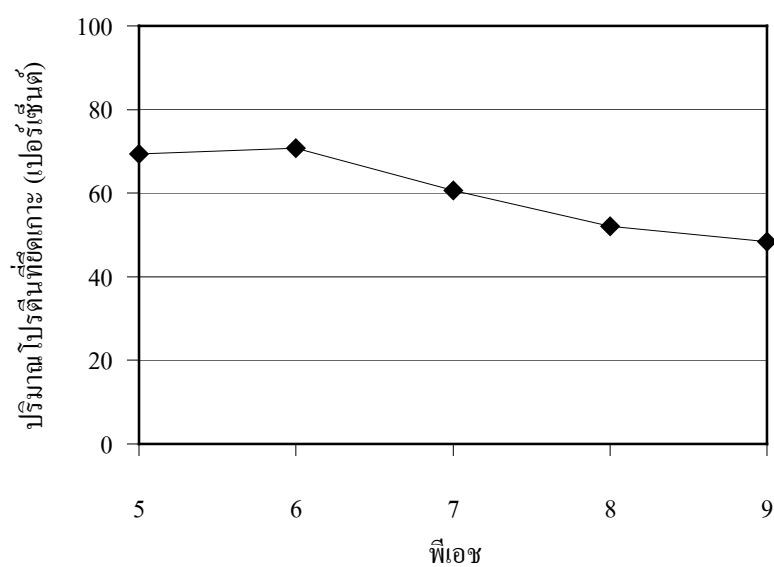
เมื่อพีเอชสูงขึ้นจาก 7 เป็น 8 เอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลง ซึ่งส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง จึงเหมือนกับค่าประสิทธิภาพการตรึงเพิ่มขึ้น และเมื่อพีเอชสูงขึ้นเป็น 8 และ 9 ทำให้เอนไซม์เสถียรภาพ ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์และประสิทธิภาพการตรึงจึงลดลงมาก สำหรับค่าปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะนั้นพบว่ามีค่าลดลงเมื่อพีเอชมากกว่า 6 (ภาพที่ 20) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่พีเอชมากกว่า 6 ทำให้โคโตซานเป็นกลาง เอนไซม์จึงเกาะได้น้อยลง แต่เอนไซม์ที่เกาะได้น้อยนั้นก็กลับมีกิจกรรมสูงที่พีเอช 6-7 โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Desai et al. (2005) ซึ่งรายงานว่าที่พีเอช 7 ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic บนโคโตซาน



ภาพที่ 18 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



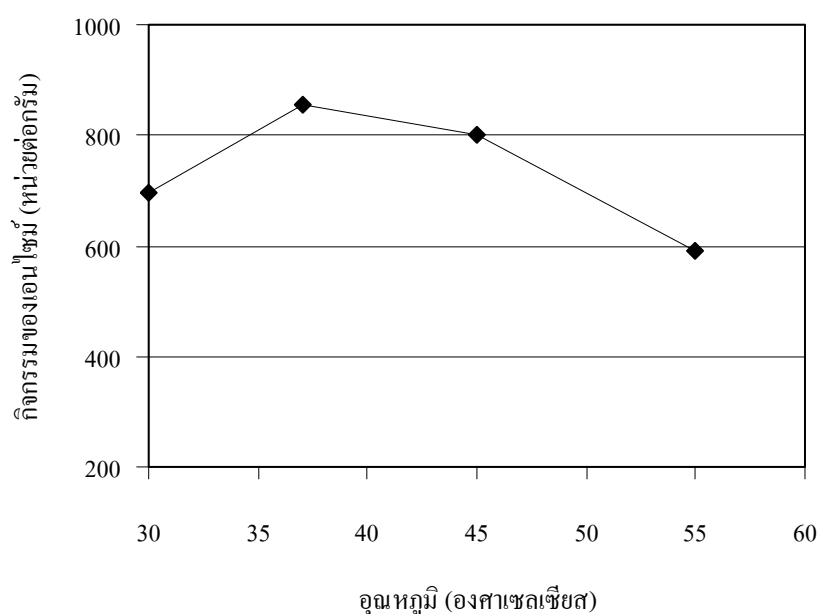
ภาพที่ 19 ผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพการตรึง ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 20 ผลของพีเอชต่อปริมาณโปรตีนที่ปลดปล่อย ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

1.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

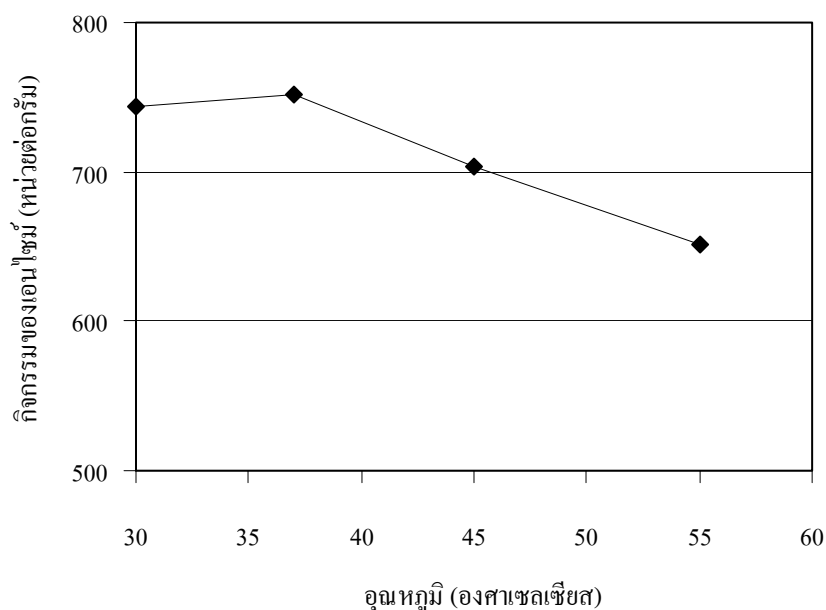
ศึกษาโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสม คือ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช 7 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส บ่มนาน 15 นาที จากการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 21) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 856.76 หน่วยต่อกรัม และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 801.96 และ 590.15 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าอุณหภูมิมีผลต่อค่า k ตามสมการของ Arrhenius แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์อาจเกิดการเสียสภาพด้วยความร้อน โดยผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับ Juang et al. (2001) ที่ตรึงเอนไซม์ acid phosphatase บนโพลิโทซานที่จับยึดกับกลูตาอัลดีไฮด์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 7

2. ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนซีไลต์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนซีไลต์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ ซึ่งทำการตรึงที่พีเอช 7 และ อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 752.39 หน่วยต่อกรัม (ภาพที่ 22) โดยใช้อุณหภูมิในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพการตรึงและปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะมีค่าเท่ากับ 36.1 และ 41.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ การตรึงเอนไซม์บนไลโคซานแบบดูดซับทางกายภาพข้างต้น ซึ่งสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกันว่า เมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์อาจเกิดการเสียสภาพเนื่องจากความร้อน แต่เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิช่วงตั้งแต่ 37-55 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนซีไลต์จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง จาก 750 เป็น 650 หน่วยต่อกรัม ซึ่งลดลงน้อยกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไลโคซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ (850-600 หน่วยต่อกรัม) (ภาพที่ 21) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้นไลโคซานเกิดการขยายตัวทำให้เอนไซม์หลุดออกมา ในขณะที่ซีไลต์เป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่มีความคงตัวสูง ดังนั้นเอนไซม์จึงเกาะได้ดีกว่า และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จึงไม่หลุดออกมา โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Ferrer et al. (2002) ที่ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนซีไลต์ ที่พีเอช 7 และมีการเติมอะซีโตนขณะตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 1100 หน่วยต่อกรัม

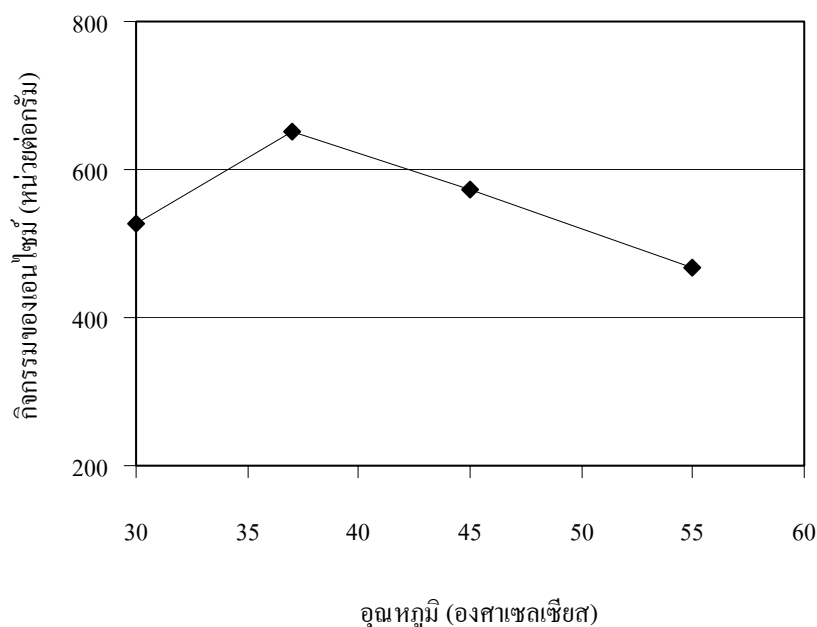


ภาพที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนซีไลต์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

3. ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน

ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 651.42 หน่วยต่อกรัม (ภาพที่ 23) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คือ 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 45 และ 55 องศาเซลเซียส หรือ ลดลงเป็น 30 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลงเท่ากับ 572.43, 466.90 และ 528.10 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการตรึงเอนไซม์บนไคโตซานและซีไลต์แบบดูดซับทางกายภาพข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 37-55 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยไคโตซานมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงน้อยกว่า (650-450 หน่วยต่อกรัม) เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ (850-600 หน่วยต่อกรัม) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการห่อหุ้มเอนไซม์จะทนอุณหภูมิได้มากกว่าวิธีการตรึงเอนไซม์โดยการดูดซับทางกายภาพ เนื่องจากเอนไซม์ถูกห่อหุ้มไว้ ไม่ได้สัมผัสกับความร้อนโดยตรงเหมือนวิธีการดูดซับทางกายภาพ แต่อย่างไรก็ตามไคโตซานยังคงมีความคงตัวต่ออุณหภูมิต่ำกว่าซีไลต์ ดังค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงมีค่าน้อยกว่า (750-650 หน่วยต่อกรัม) และผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับการทดลองของ Betigeri et al. (2002) ที่

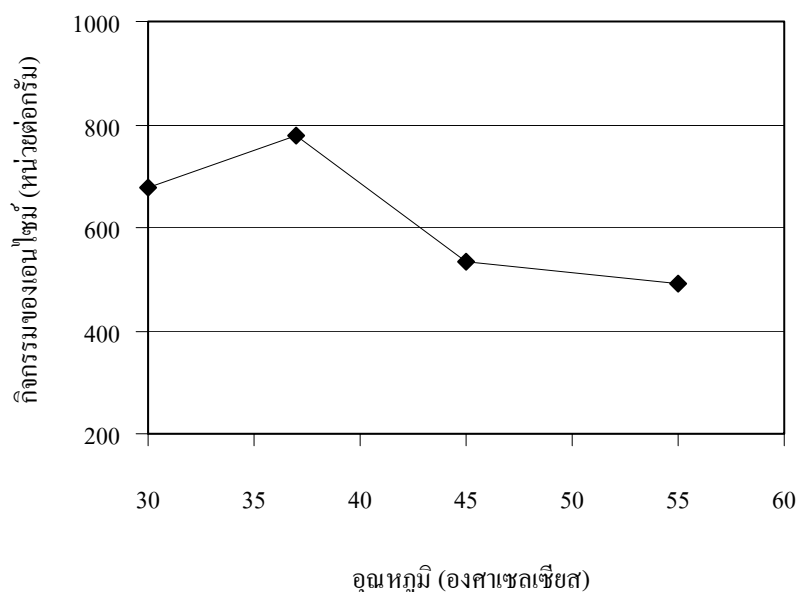
ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 1110 หน่วยต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 23 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน

4. ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตตามวิธีของ ปวีณา (2547) ซึ่งใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายเอนไซม์ไลเปสเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร และอัตราส่วนระหว่างอัลจิเนตต่อไลเปส 1:0.5 พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 778.21 หน่วยต่อกรัม (ภาพที่ 24) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ คือ 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 45 และ 55 องศาเซลเซียส หรือ ลดลงเป็น 30 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลงเป็น 535.54, 492.77 และ 678.72 หน่วยต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการตรึงเอนไซม์โดยการห่อหุ้มด้วยไคโตซานข้างต้น แต่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิช่วงระหว่าง 37-55 องศาเซลเซียส สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมอัลจิเนตมีการขยายตัวมากกว่าไคโตซาน ทำให้เอนไซม์หลุดออกมามากกว่า นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับการทดลองของ Betigeri et al. (2002) ที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต เมื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 240 หน่วยต่อมิลลิลิตร

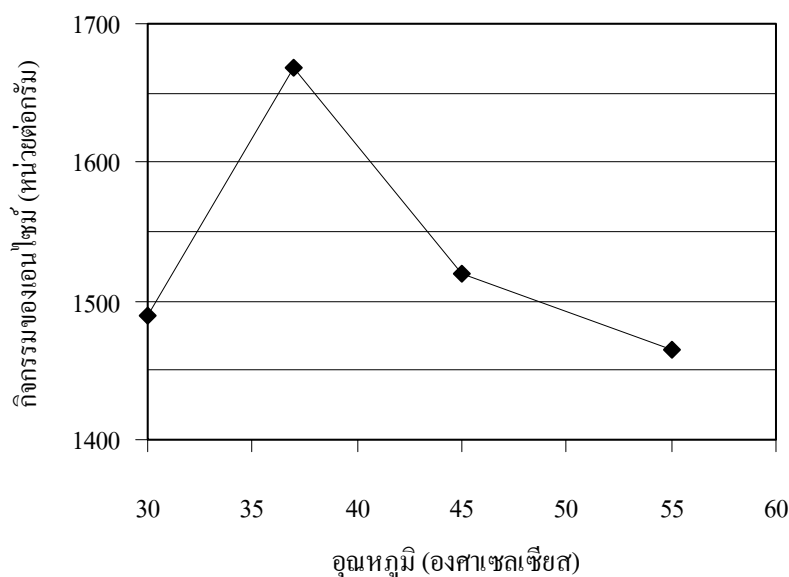


ภาพที่ 24 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

5. ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อิสระ

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ

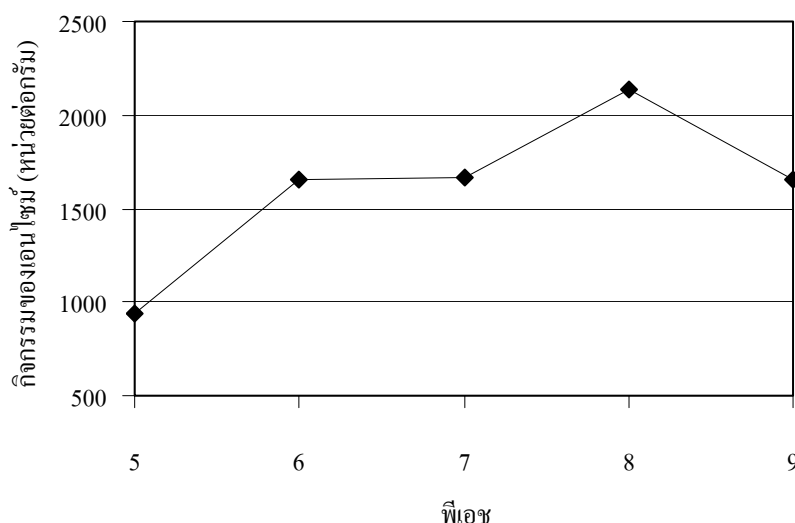
ศึกษาโดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส บ่มนาน 15 นาที พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 25) และจะมีค่าสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1668 หน่วยต่อกรัม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เป็น 45 และ 55 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่าลดลง จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีรายงานว่า เอนไซม์จากเชื้อ *Candida rugosa* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส (Chiou et al., 2004) ในขณะที่เอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus* GK 8 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Dosanjh and Kaur, 2002)



ภาพที่ 25 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ

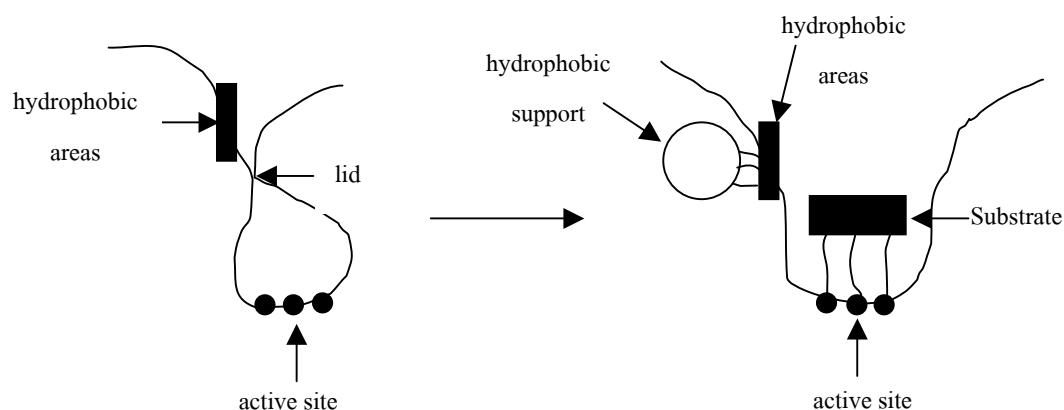
5.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ

เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไลเปส โดยใช้พีเอชต่าง ๆ กัน คือ 5-7 ที่อุณหภูมิในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อพีเอชสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะมีค่ามากขึ้น (ภาพที่ 26) ที่พีเอช 8 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 2136 หน่วยต่อกรัม โดยมีค่าใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมจริงของเอนไซม์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2200 หน่วยต่อกรัม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Chiou et al. (2004) ที่รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของสารละลายเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* คือ พีเอช 8



ภาพที่ 26 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ

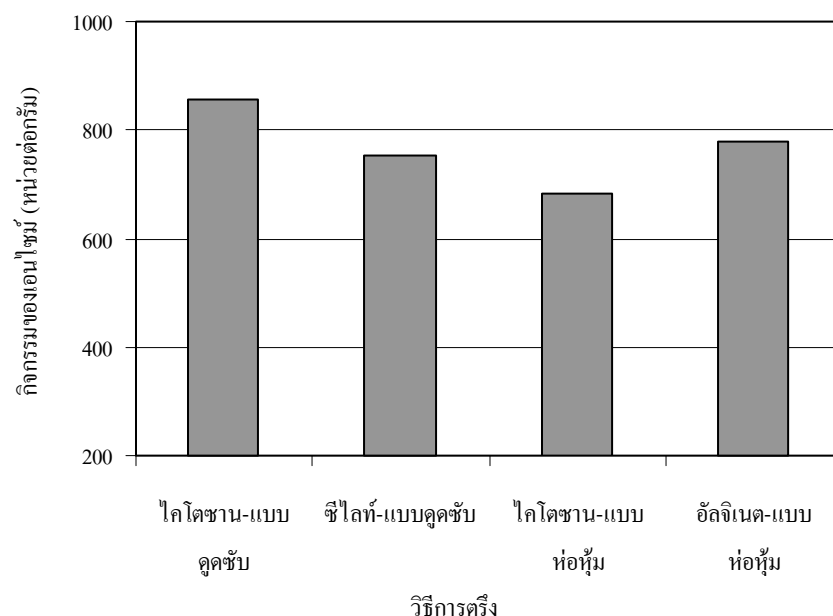
จากการศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนไคโตซาน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าต่ำกว่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อาจจะสันนิษฐานสาเหตุได้หลายประการ ประการแรกอาจเกิดเนื่องจากไคโตซานซึ่งเป็นตัวพุงที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ทำให้ในขณะตรึงอาจจะไปดึงน้ำออกจากเอนไซม์ มีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (denature) โครงสร้างสามมิติเปลี่ยนไป ซึ่งจะส่งผลต่อบริเวณเร่ง (active site) ที่ใช้ในการจับสับสเตรต ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดน้อยลง (Villeneuve et al., 2000) ประการที่สองจะเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของไลเปส (ภาพที่ 27) โครงสร้างของไลเปสจะประกอบด้วย บริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic areas) และ บริเวณที่ชอบน้ำ (hydrophilic areas) แต่จะมีบริเวณที่ไม่ชอบน้ำมากกว่า ซึ่งบริเวณนี้จะอยู่รอบ ๆ บริเวณเร่ง และในบริเวณเร่งนี้จะมีส่วนที่เรียกว่า ลิด (lid) ปกคลุมอยู่ทำให้สับสเตรตไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ ดังนั้นหากใช้ตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งจะไปจับกับบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของเอนไซม์ เรียกบริเวณผิวสัมผัสนี้ว่า hydrophobic interfaces ซึ่งจะส่งผลทำให้ ลิด ที่ปกคลุมบริเวณเร่งนั้นเปิดออกทำให้สับสเตรตสามารถเข้าไปจับกับเอนไซม์ได้ และมีผลให้กิจกรรมมีค่าสูงขึ้น (Fernandez et al., 1998) แต่ไคโตซานที่ใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ดังนั้นจึงไม่เกิดกลไกดังกล่าว ประการสุดท้าย อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ขณะตรึง ได้แก่ พีเอช ความเข้มข้นของอออนในสารละลาย และอุณหภูมิ ต้องควบคุมให้เหมาะสม ซึ่งจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์



ภาพที่ 27 การจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเมื่อใช้ตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำในการตรึงเอนไซม์

ที่มา: Saxena et al. (2005)

อย่างไรก็ตามตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะมีราคาที่สูงแพง (Khare et al., 2000) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นที่จะปรับปรุงการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ จากการทดลองเมื่อเปลี่ยนตัวพุงจากไคโตซานเป็นซีไลท์ซึ่งเป็นตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยใช้วิธีการตรึงเช่นเดียวกัน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าไม่แตกต่างกัน และแม้เปลี่ยนวิธีการตรึงเป็นการห่อหุ้มด้วยไคโตซานและโซเดียมอัลจิเนต ค่ากิจกรรมก็ไม่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 28) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ วิธีการตรึงเอนไซม์แบบห่อหุ้มเป็นการผสมระหว่างสารละลายของตัวพุงและเอนไซม์เข้าด้วยกัน ซึ่งอาจจะทำให้เนื้อสารของตัวพุงบางส่วนแทรกเข้าไปเกาะตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ มีผลให้ค่ากิจกรรมลดลง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือก เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพในการนำไปทดสอบความคงตัวต่อสภาพแวดล้อม และการเก็บรักษา เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวพวยงและวิธีการตรึงต่าง ๆ กัน

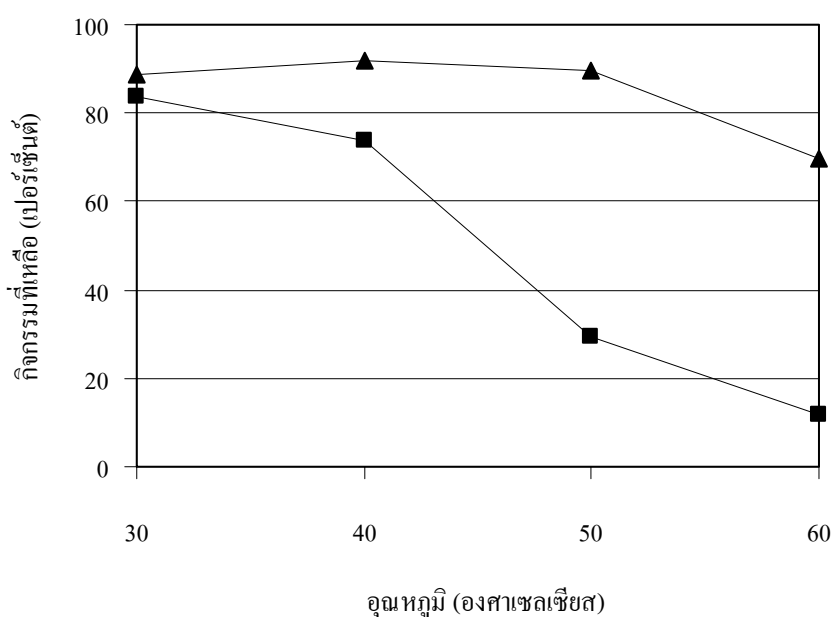
6. ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

6.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อิสระ

ศึกษาโดยการนำสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ พีเอช 8 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 30, 40, 50, และ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง (ภาพที่ 29) ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงไม่มากนัก โดยยังมีกิจกรรมเหลืออยู่ 83.78 และ 73.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จนกระทั่งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือเพียง 29.5 และ 11.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

6.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงเข้าไปในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, และ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงน้อยมาก (ภาพที่ 29) โดยมีกิจกรรมเหลืออยู่ 88.52, 91.72 และ 89.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จนกระทั่งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือ 69.71 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานจาก Desai et al. (2005) ที่ศึกษาอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic ที่ถูกตรึงโดยใช้ไคโตซานจับกับกลูตาอัลดีไฮด์ โดยบ่มเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 40-60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 75 และ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส จะไม่เหลือกิจกรรมของ



ภาพที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึง

—▲— เอนไซม์ที่ถูกตรึง
—■— เอนไซม์อิสระ

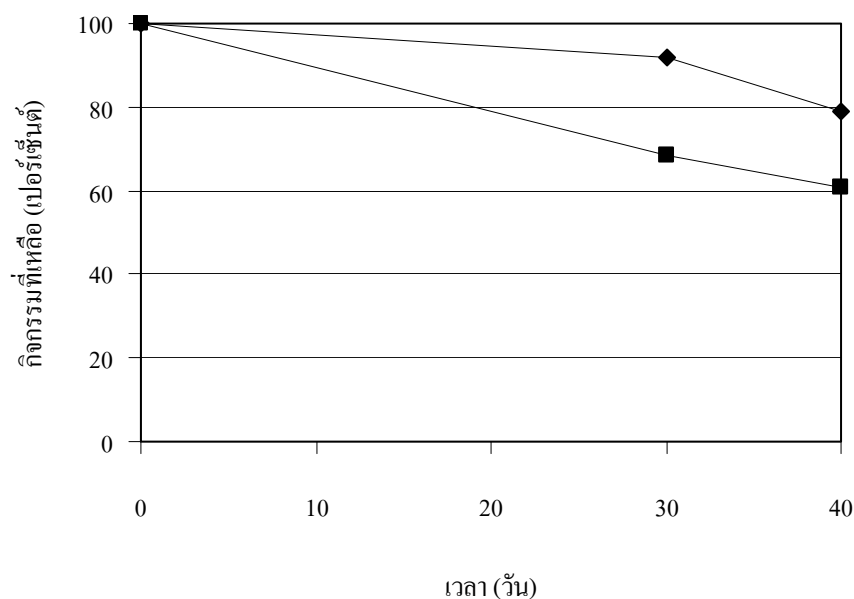
7. ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์

7.1 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์อิสระ

ศึกษาโดยเก็บสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 40 วัน พบว่า เมื่อเก็บเอนไซม์นาน 30 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 68.61 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บเอนไซม์นานขึ้นเป็น 40 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 60.95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 30) มีรายงานการเก็บเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ 30 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่ง เวลาผ่านไป 30 วัน กิจกรรมของเอนไซม์จะเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ (Chiou et al., 2004) นอกจากนี้ Desai et al. (2005) ได้เก็บเอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 1 วัน โดยมีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ 35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 5 เปอร์เซ็นต์

7.2 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึง

ศึกษาโดยเก็บเอนไซม์ที่ถูกตรึงในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 40 วัน พบว่า เมื่อเก็บเอนไซม์นาน 30 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ 91.72 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บเอนไซม์นานขึ้นเป็น 40 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 78.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 30) มีรายงานของ Desai et al. (2005) ที่เก็บเอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic ที่ถูกตรึงโดยใช้ไคโตซานจับกับกลูตาอัลดีไฮด์ ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่ง เวลาผ่านไป 4 วัน จะไม่เหลือกิจกรรมของเอนไซม์



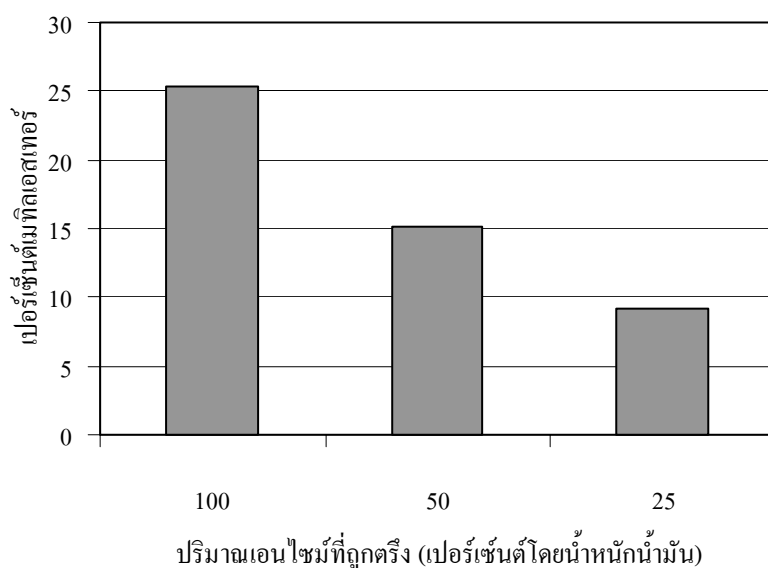
ภาพที่ 30 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึง

—◆— เอนไซม์ที่ไม่ถูกตรึง
—■— เอนไซม์อิสระ

8. ผลการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานแบบดูดซับ

8.1 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ศึกษาโดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 25, 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยปรับอัตราส่วนของน้ำมันต่อเมทานอลเป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงมากขึ้น ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ก็จะเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 31) ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ 9.16 และ 15.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็น 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ซึ่งเป็นปริมาณที่ท่วมน้ำมันพอดี จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 25.28 เปอร์เซ็นต์

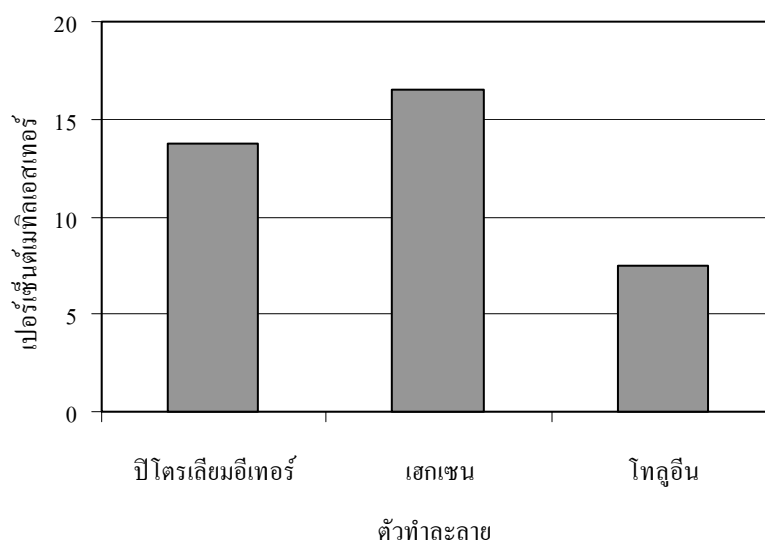


ภาพที่ 31 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 มีน้ำในปฏิกิริยา 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

8.2 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

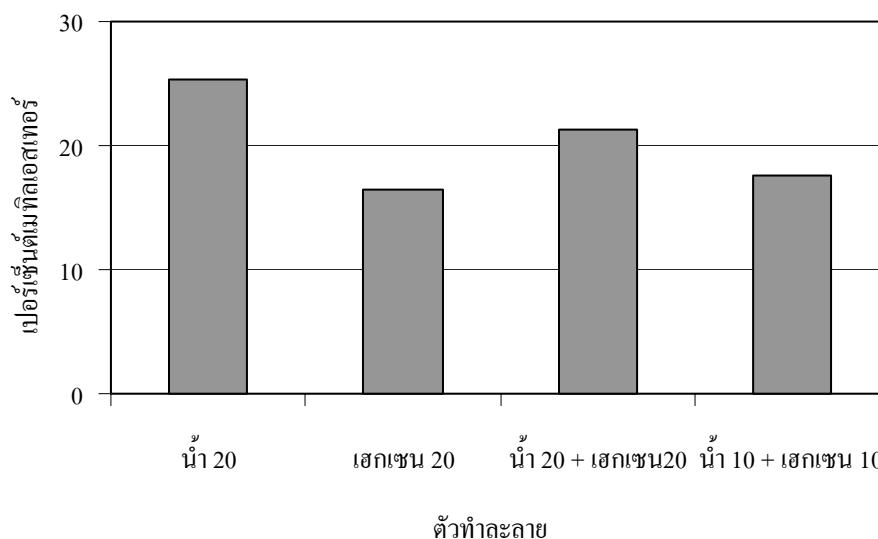
เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันและเมทานอล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น เอนไซม์ไลเปสอาจสูญเสียกิจกรรมได้หากสัมผัสโดยตรงกับเมทานอล ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จะช่วยให้เมทานอลสามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ดี ลดการสัมผัสระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับเมทานอลได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน โทลูอิน ปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา ใช้อัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า เฮกเซนและปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงและมีค่าแตกต่างกันไม่มากนัก (ภาพที่ 32) คือ 16.48 และ 13.75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโทลูอิน จะให้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ลดลงเป็น 7.51 ทั้งนี้เพราะเฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic solvents) ทำให้ไม่ก่อให้เกิดการแยกน้ำที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาออกจากเอนไซม์ แต่ตัวทำละลายชนิดที่ชอบน้ำสูงขึ้น (hydrophilic solvents) เช่น โทลูอิน จะไปดึงน้ำที่จำเป็นต่อเอนไซม์ให้หลุดออกไปทำให้เอนไซม์นั้นถูกยับยั้งได้ ซึ่ง

ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Soumanou et al. (2003) ที่ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงบน polypropylene พบว่าเฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน



ภาพที่ 32 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้ปริมาณตัวทำละลาย 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 บ่มที่ ความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศา เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

แต่อย่างไรก็ตามผลการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันให้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ต่ำกว่าการใช้น้ำ ดังนั้นจึงทดลองทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยมีน้ำและเฮกเซนร่วมในปฏิกิริยาอย่างละ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน พบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้มีค่าไม่แตกต่างจากเมื่อใช้น้ำเพียงอย่างเดียว ต่อมาจึงทำการลดปริมาณน้ำและเฮกเซนในปฏิกิริยาให้เหลืออย่างละ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน แต่กลับพบว่าปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้มีค่าต่ำกว่าในกรณีที่มีน้ำในปฏิกิริยาเพียงอย่างเดียว แสดงว่าน้ำมีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันมากกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ (ภาพที่ 33) ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงทำการทดสอบหาปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

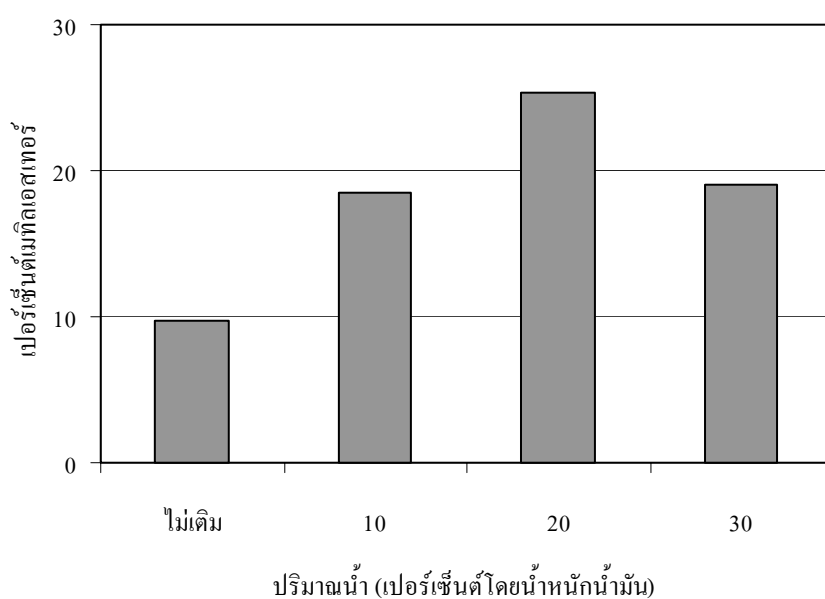


ภาพที่ 33 ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ และน้ำร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันหรือ เฮกเซน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันหรือ น้ำและเฮกเซนอย่างละ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน หรือน้ำและเฮกเซนอย่างละ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ที่ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

8.3 ผลของปริมาณน้ำต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

จากการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจินตของ ปวีณา (2547) พบว่าปริมาณน้ำมีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ปริมาณน้ำต่าง ๆ กันคือ 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นจาก 18.43 เป็น 25.28 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 34) แต่เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นเป็น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะลดลงเหลือ 19.02 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้น้ำเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ถ้าปริมาณน้ำในปฏิกิริยานี้น้อย จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพ เกิดการบิดทำลายของ conformation อย่างรุนแรงและเกิดการหยุดยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ เป็น

ผลให้ปริมาณเอสเทอร์ลดลง แต่หากปริมาณน้ำในปฏิกิริยามากเกิน น้ำส่วนที่เหลือจากปฏิกิริยาจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน มีผลทำให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลง (เชิดศักดิ์, 2535) ผลของปริมาณน้ำต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ ปวีณา (2547) โดยปริมาณน้ำที่ให้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน



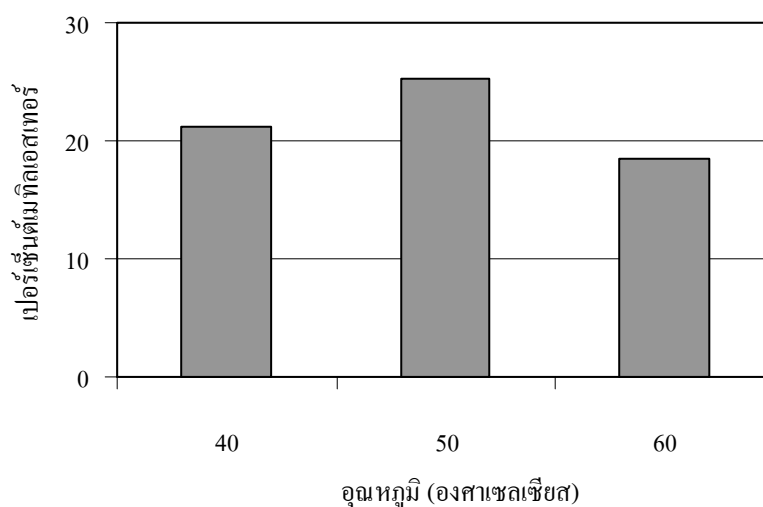
ภาพที่ 34 ผลของปริมาณน้ำต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

8.4 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส จะได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ไม่แตกต่างกันมากนัก คือ 21.24 และ 25.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 35) แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์จะลดลงเป็น 18.51 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากที่

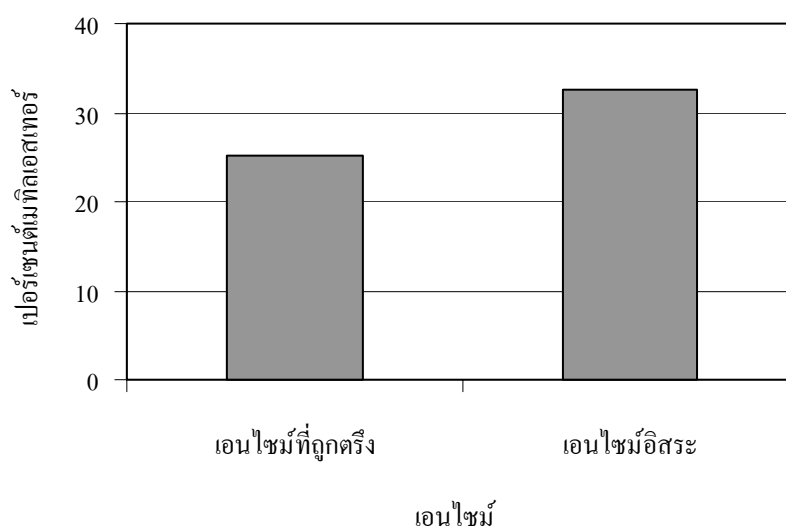
อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายและสูญเสียกิจกรรมไปบางส่วน ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เต็มที่ จึงทำให้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ลดลง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ปวีณา (2547) ที่ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต โดยปรับอัตราส่วนโมลาร์ของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 31 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ Desai et al. (2005) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของ saliconia oil โดยใช้เอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic ที่ตรึงบนไลโคซานที่จับยึดกับกลูตาอัลดีไฮด์ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 20 กรัม อัตราส่วนโมลาร์ของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 และใช้น้ำ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จะได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 44.7 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 35 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเมทิลเอสเทอร์ (ใช้อัตราส่วน โดย โมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมันและใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง)

จากการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ตรึงบนไลโคซานและจับยึดกับกลูตาอัลดีไฮด์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จะได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 25.28 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เมื่อใช้เอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะดังกล่าวจะได้ เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 32.68 (ภาพที่ 36)

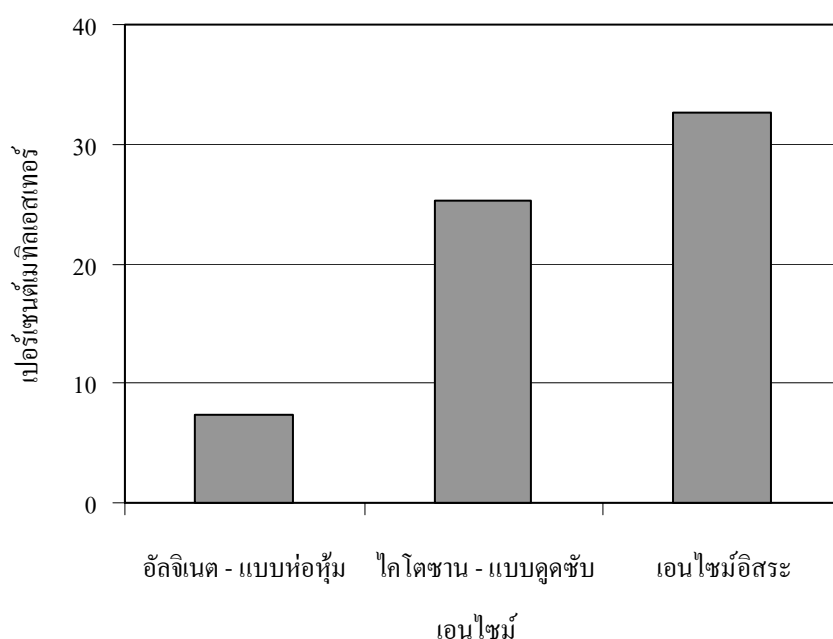


ภาพที่ 36 ผลการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพกับเอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (ใช้เอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมันอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 และใช้น้ำปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

9. ผลของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีต่าง ๆ

จากผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจินเตให้ผลใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ ดังนั้นจึงได้นำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดังกล่าวมาศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพิ่มเติม โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสมจากวิธีการในข้อ 8 คือ ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน ปรับอัตราส่วนโมลของน้ำมันต่อเมทานอล เป็น 1:3 และใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จะได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 7.34 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 37) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่าจะได้ค่าต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต ทำให้สับสเตรคแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยากับแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์ซึ่งมีโซเดียมอัลจิเนตหุ้มไว้ได้ยากกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ ซึ่งเป็นการตรึงที่นำเอนไซม์ไปจับยึดบนตัวพวยงด้วยแรงต่าง ๆ สับสเตรคจึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ง่าย



ภาพที่ 37 ผลการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต และเอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 และใช้น้ำปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง)

สรุป

1. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

1.1 การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7 จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 856.76 หน่วยต่อกรัม ประสิทธิภาพการตรึง 76 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ 60.64 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.2 การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนซีไลต์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 752.39 หน่วยต่อกรัม ประสิทธิภาพการตรึง 36.1 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ 41.53 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 651.42 หน่วยต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.4 การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจินेट พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 778.21 หน่วยต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่าวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานด้วยการดูดซับทางกายภาพ ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7 จะเป็นวิธีการตรึงที่ดีที่สุด เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าวิธีอื่น ๆ

2. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึง มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส โดยยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ 89.73 เปอร์เซ็นต์

3. การเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึง

ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีกิจกรรมเหลืออยู่ 91.72 เปอร์เซ็นต์

4. การนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันเมล็ดทานตะวันและเมทานอล พบว่า ที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน มีน้ำในปฏิกิริยา 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 25.28 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเอนไซม์อิสระไปใช้ในการผลิตไบโอดีเซลที่สภาวะการทดลองเดียวกัน จะได้เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 32.68 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาตัวแปรอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโตซานแบบดูดซับเพิ่มเติม เช่น ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงและความเข้มข้นของอออน และการนำกลับมาใช้ใหม่
2. ควรศึกษาจลนพลศาสตร์ในการตรึงเอนไซม์ บนตัวพุงต่าง ๆ เพื่อให้มีความเข้าใจกลไกในการตรึง ทำให้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพในการตรึงได้
3. ควรศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปส ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติที่ผลิตขึ้นเอง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. ทดลองปลูกทานตะวัน(จอมทอง) จ.เชียงใหม่. แหล่งที่มา:

http://www.moac.go.th/people/html/msg_type1_1213.htm, 24 มีนาคม 2548.

กระทรวงพลังงาน. 2548. การผลิตและการใช้ไบโอดีเซล. แหล่งที่มา:

<http://www.dede.go.th/renew/biodiesel/usebio.html>, 24 มีนาคม 2548.

เชิดศักดิ์ เมธาธิในสุวรรณย์. 2535. การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณัฏฐภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. 24 (3): 21-31.

บริษัทไทยพลังงานชีวภาพ. 2545. พลังงานของประเทศไทย. แหล่งที่มา:

<http://www.thaibiodiesel.com>, 24 มีนาคม 2548.

ประภัสสร สุรวฒนาวรรณ. ไคติน-ไคโตซาน. <http://www.gpo.or.th/rdi/html/chitin.html>, 4 เมษายน 2548.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปวีณา อร่ามรัตนา. 2547. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันดิบโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ป๊วย อุ๋นใจ. 2544. ไบโอดีเซล เชื้อเพลิงชีวภาพแห่งยุคสมัย. แหล่งที่มา

: <http://update.se-ed.com/168/biodiesel.htm>, 15 มีนาคม 2548.

ผ่องผกา ขงพานิชกุล. 2537. การตรึงเอนไซม์และการศึกษาคุณสมบัติของ β - xylosidase จากเชื้อรา ASPERGILLUS FUMIGATUS FRESENIUS รหัส 4-4S-IF. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิสมัย เจนวนิชปัญญกุล. 2544. ไบโอดีเซล: พลังงานทางเลือก. แหล่งที่มา:

http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=90&i2=10000, 25 มีนาคม 2548.

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน. 2546. ดีเซลจากพืช ทางเลือกใหม่ของพลังงาน. แหล่งที่มา: <http://www.doeb.go.th/dbd/knowledge/bio-diiesel2.htm>, 15 มีนาคม 2548.

อาภัสสรฯ ชมิคท์. 2537. เทคนิคที่สำคัญทางชีวเคมี. หน้า 32-56. โรงพิมพ์สหมิตรพรินติ้ง.

Alsarra, I.A., S.S. Betigeri., H. Zhang., B.A. Evans. and S.H. Neau. 2002. Molecular weight degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**. 23: 3637-3644.

Betigeri, S.S. and S.H. Neau. 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**. 23: 3627-3636.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protien utilizing the principle of Protein- dyeing binding. **Anal.Biochem**. 72: 248-254.

Chowdary, G.V., M.N. Ramesh and S.G. Prapulla. 2000. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* : a multivariate analysis. **Process Biochemistry**. 36: 331-339.

Chen, J.W. and W.T. Wu. 2003. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. **Biomaterials**. **J. Biosci. Bioeng**. 95: 466-469.

- Chiou, S.H. and W.T. Wu. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**. 25: 197-204.
- Chowdary, G.V., M.N. Ramesh and S.G. Prapulla. 2000. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* : a multivariate analysis. **Process Biochemistry**. 36: 331-339.
- 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)**.
- Dosanjh, N.S. and J. Kaur. 2002. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus sp.*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 36: 7-12.
- Dossat, V., D. Combes and A. Marty. 2001. Lipase-catalyzed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme Microb Technol.** 30: 90-94.
- Encinar, J.M., J.F. Gonzalez., J.J. Rodriguez and A. Tejedor. 2002. Biodiesel fuels vegetable oils: transesterification of cynara cardunculus L. oils with ethanol. **Energy & Fuels**. 16: 443-450.
- Fernandez-Lafuente, R., P. Armisen., P. Sabuquillo., G. Fernandez-Lorente and J.M. Guisan. 1998. Immobilization of lipase by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**. 93: 185-197.
- Ferrer, M., F.J. Plou., G.F. Fuentes., M.A. Cruces., L. Andersen., O. Kirk., M. Christensen and A. Ballesteros. 2002. Effect of the immobilization method of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on sucrose acrylation. **Biocat. and Biotransf.** 20(1): 63-71.
- Hung, T.C., R. Giridhar., S.H. Chiou and W.T. Wu. 2003. Binary immobilization *Candida rugosa* lipase on chitosan. **J. Molec. Cat.** 26: 69-78.

- Fukuda, H., A. Kondo and H. Noda. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 405-416.
- Fukunaga, K., N. Minamijima., Y. Sugimura., Z. Zhang and K. Nakao. 1996. Immobilization of organic solvent-soluble lipase in nonaqueous conditions and properties of the immobilized enzymes. **Biotechnology.** 52: 81-88.
- Godtfresen, S.E. **Microbial Lipase** , pp. 255-274. In C.T.K. William M. Fogarty. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, 2 ed. Elsevier Science Publisher LTD., New York. 1990.
- Ibrahim, A.A., S.S. Betigeri., H. Zhang., B.A. Evans and S.H. Neau. 2002. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials.** 23: 3637-3644.
- Iso, M., B. Chen., T. Kudo and S. Shrestha. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **J. Molecul. Catalys.** 16: 53-58.
- Jaeger, K-E. and T.M. Reetz. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.** 16: 396-403
- Juang, R.S., F.C. Wu and R. Tseng. 2001. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Biores Technol.** 80: 187-193.
- Keehom, W., S. Kim., K. Kim., H.W. Park and S. Moon. 2004. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry (Article in Press)**.
- Kennedy, R.J. and J.M.S. Cabral. 1987. **Enzyme immobilization**, pp. 349-402. In J.F. Kenedy (ed.). **Biotechnology.** 7a.: Enzyme Technology. Fed. Repub. Of Germany. Weinheim.

Khan, A.K. 2002. Research into Biodiesel Kinetics & Catalyst Development. Available Source:

<http://www.cheque.uq.edu.au/ugrad/chee4001/CHEE400102/>

Adam_Khan_Thesis.pdf. March 26, 2005.

Khare, S.K. and M. Nakajima. 1999. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. **Food Chemistry**. 68: 153-157.

Lee, D-W., H.-W.Kim., K-W. Lee., B-C. Kim., E-A. Choe., H-S. Lee., D-S. Kim and Y-R. Pyun. 2001. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **Enzyme Microb Technol.** 29: 363-371.

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

Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **JAOCs**. 60: 291-294.

Mangos, T.J., K.C. Jones and T.A. Folia. 1999. Lipase-catalyzed synthesis of structured low-calorie triacylglycerols. **J. Am. Oil. Chem. Soc.** 76: 1127-1132.

Mayordomo, I., F. Randez-Gil and J.A. Prieto. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **J.Agric. Food Chem.** 48: 105-109.

Minovska, V., E. Winkelhausen and S. Kuzmanova. 2005. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **J.Serb.Chem.Soc.** 70: 609-624.

Mohamed, M.A., T.M. Mohamed., S.A. Mohamed and A.S. Fahmy. 2000. Distribution of lipase in the Gramineae Partial purification and Characterization of esterase from *Avena fatua*. **Biores. Technol.** 73: 227-234.

- Noureddini, H., X. Gao and R.S. Philkana. 2004. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Biores Technol.** 96: 769-777.
- Pandey, A., S. Benjamin., C.R. Soccol., P. Nigam., N. Krieger and V.T. Soccol. 1999. The realm of microbial lipase in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 29: 119-131.
- Pereira, E.B., G.M. Zanin and H.F. Castro. 2003. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Braz. J. Chem. Eng.** 20.
- Saxena, R.K., P.K. Ghosh., W.S. Davidson., S. Bradoo and R. Gulati. Available source: [http: // www.ias.ac.in/currsci/jul10/articlis18.htm](http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articlis18.htm) March 24, 2005.
- Schuchardt, U., R. Sercheli and R.M. Vargas. 1998. Transesterification of Vegetable Oil: a Review. **J. Braz.Chem. Soc.** 9(1): 199-210.
- Shah, S., S. Sharma and M.N. Gupta. 2004. Biodiesel preparationby Lipase- catalyzed transesterification of jatropha oil. **Energy & Fuels.** 18: 154-159.
- Shieh, C.J., H.F. Liao and C.C. Lee. 2002. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Biores Technol.** 88: 103-106.
- Soumanou, M.M. and U.T. Bornscheuer. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Emzyme Microb Technol.** 33: 97-103.
- Srivastava, A. and R. Prasad. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. Renewable and Sustainable **Energy Reviews.** 4: 111-133.
- Varese, R. and M. Varese. 1996. Methyl ester biodiesel: opportunity or necessity. **J. Americ. Oil Chem. Soci.** 7: 816-824.

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.

J. Molec. Catal. B. Eaz. 9: 113-148.

Winkler,U.K. and M.J. Stuckmann. 1979. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*.

J. Bacterial. 138: 663-670.

Yamane, K., A. Ueta and Y. Shimamoto. 2001. Influence of physical and chemical properties of biodiesel fuel on injection, combustion and exhaust emission characteristic in a DI-CI engine. pp. 402-409.

Symposium on Diagnostic and Modeling of Combustion in Internal Combustion Engines. Nagoya.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

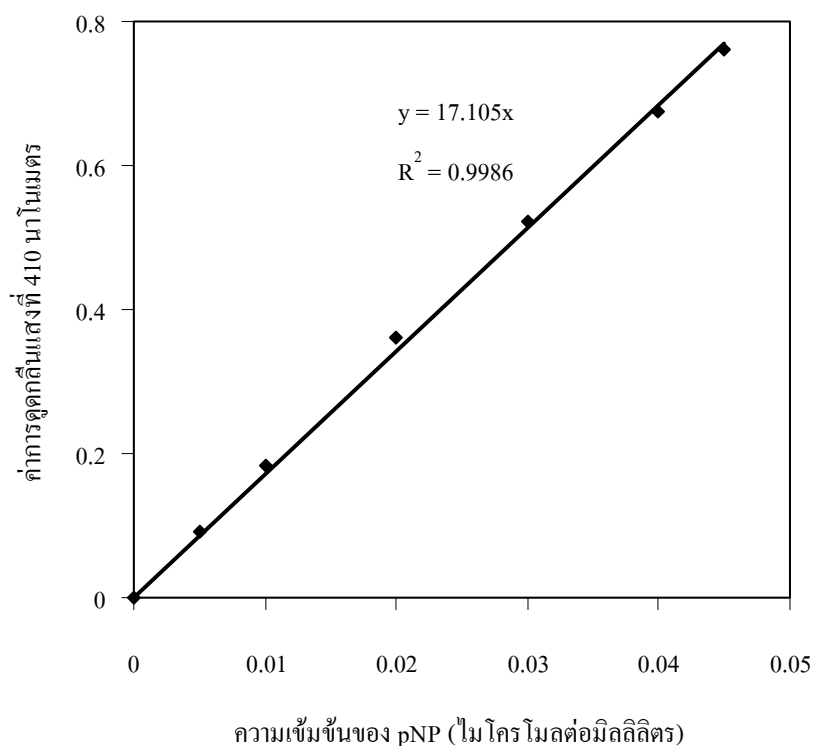
1. การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

1.1 เจือจางสารละลาย *p*-nitrophenol (pNP) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8 ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-0.045 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก1 วิธีการเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol (pNP) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	pNP (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)	สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)	pNP (0.25 ไมโครโมลต่อ มิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)
1	0.000	0	5
2	0.005	0.1	4.9
3	0.010	0.2	4.8
4	0.020	0.4	4.6
5	0.030	0.6	4.4
6	0.040	0.8	4.2
7	0.045	0.9	4.1

1.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปเขียนกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีของ Bradford (1976)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายสี เตรียมโดยละลายสารสี Coomassie brilliant blue G-250 100

มิลลิกรัม ในเอทานอล (99.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (85 เปอร์เซ็นต์) ลงไป 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41

2.1.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมสารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum

albumin) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 50 มิลลิกรัม ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่น เพื่อชะฟองที่เกิดขึ้น เมื่อชะฟองหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก2 วิธีการเตรียมสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	สารละลายโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายโปรตีน (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ไมโครลิตร)
1	0	2000	0
2	5	1980	20
3	10	1960	40
4	15	1940	60
5	20	1920	80
6	25	1900	100
7	30	1880	120

2.2 วิธีวิเคราะห์

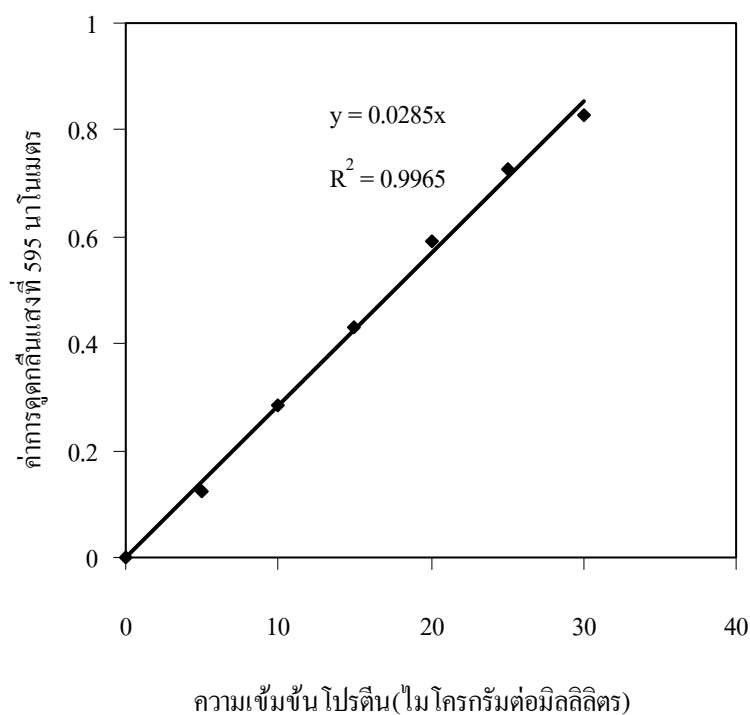
2.2.1 ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมและสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร

2.2.2 เติมสารละลายสีลงในหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที

2.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2.2.4 นำค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนเพื่อหาความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีนของ BSA

3. การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์

3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

3.1.1 ชั่งตัวอย่างน้ำมันไบโอดีเซล ในขวด vial ขนาด 1 มิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

3.1.2 เติมสารละลายมาตรฐานภายใน (methyl caprylate) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.1.3 เติมสารละลาย MSTFA ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 นาที

3.1.4 เติมสารละลาย n-heptane ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บสารตัวอย่างที่เตรียมแล้วที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี

ตั้งค่าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ให้มีสภาวะการทำงานดังนี้

3.2.1 ปรับอัตราการไหลของ carrier gas (He) ให้มีความดันคงที่ 42 psi เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเพิ่มความดันด้วยอัตรา 10 psi ต่อนาที จนได้ความดัน 80 psi คงที่เป็นเวลา 1 นาที

3.2.2 ปรับอุณหภูมิของเตาอบ (oven) เป็น 140 องศาเซลเซียส คงที่นาน 5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียส จนได้อุณหภูมิ 245 องศาเซลเซียส

3.2.3 ปรับอุณหภูมิของ detector (FID) เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส

3.2.4 ปรับอุณหภูมิของ injector เท่ากับ 260 องศาเซลเซียส

3.2.5 ปรับ split ratio เท่ากับ 20:1

3.2.6 จากนั้นฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

1.1 สารละลาย A: ชั่ง ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K_2HPO_4) 8.71 กรัม ใน น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย B: ชั่ง โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4) 6.80 กรัม ใน น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

1.3 ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ปรับพีเอชให้ได้ตามต้องการ

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8

2.1 สารละลาย A: ชั่ง โมโนเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 3.45 กรัม ใน น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย B: ชั่ง ไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 4.45 กรัม ใน น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร

2.3 ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 8

ภาคผนวก ค

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส1. การคำนวณกิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไลเปส (Winkler and Stuckmann, 1979)

ตัวอย่างการคำนวณ

เอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม + บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร



ปิเปตมา 0.01 มิลลิลิตร + บัฟเฟอร์ 1.99 มิลลิลิตร



ปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร + ซับสเตรต 2 มิลลิลิตร



บ่มนาน 15 นาที



เติมตัวหยุดปฏิกิริยา 2.9 มิลลิลิตร

$$\text{กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไลเปส (หน่วยต่อกรัม)} = \frac{A_{410}}{\text{ความชัน}} \times \frac{5}{0.1} \times \frac{1.99}{0.01} \times \frac{1}{15} \times \frac{10}{0.05}$$

โดย

 A_{410} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรความชัน = ความชันของกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = 2.9+2+0.1 = 5 มิลลิลิตร

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 0.1

อัตราเร่งเชิงมุม = 1.99/0.01 = 200

เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 15 นาที

ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ไลเปส = 10 มิลลิลิตร

น้ำหนักของเอนไซม์ไลเปส = 0.05 กรัม

2. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวพวยง 1 กรัม + เอนไซม์ไลเปส 0.05 กรัม + บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร



เอนไซม์ที่ถูกตรึง 1 กรัม



เอนไซม์ที่ถูกตรึง 0.2 กรัม + ซับสเตรต 2 มิลลิลิตร



บ่มนาน 15 นาที



ปิเปตสารละลายมา 0.2 มิลลิลิตร + เดิมตัวหยุดปฏิกิริยา 2.9 มิลลิลิตร

$$\text{กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไลเปส} = \frac{A_{410}}{\text{ความเข้มข้น}} \times \frac{3.1}{0.2} \times \frac{2}{0.2} \times \frac{1}{15} \times \frac{10}{\text{น้ำหนักของไลเปสบนตัวพวยง}}$$

(หน่วยต่อกรัม)

โดย

A_{410} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ความเข้มข้น = ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = $2.9 + 0.2 = 3.1$ มิลลิลิตร

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 0.2

อัตราเร่ง = $2/0.2 = 10$

เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 15 นาที

ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ตรึง = 10 มิลลิลิตร

น้ำหนักของไลเปสบนตัวพวยง = $[(0.05 \times 0.2)/1] \times \text{เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนที่สกัด}$

3. การคำนวณประสิทธิภาพการตรึง (Minovska et al., 2005)

$$\text{ประสิทธิภาพการตรึง (เปอร์เซ็นต์)} = [(E_0V_0 - E_fV_f)/V_0E_0] \times 100$$

โดย

E_0 = กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

E_f = กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์หลังตรึง (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_0 = ปริมาตรของสารละลายก่อนตรึง (มิลลิลิตร)

V_f = ปริมาตรของสารละลายหลังตรึง (มิลลิลิตร)

4. การคำนวณปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (Hung et al., 2003)

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (เปอร์เซ็นต์)} = [(P_0 - P_f)/P_0] \times 100$$

โดย

P_0 = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

P_f = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์หลังตรึง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง

การคำนวณปริมาณเมทิลเอสเทอร์

การคำนวณปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี โดยใช้วิธีแบบ internal standard (methyl caprylate, C8:0) ตามมาตรฐาน EN ISO 5508

$$\text{เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์} = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{W} \times 100$$

โดย

$\sum A$ = ผลรวมของพื้นที่ใต้กราฟตั้ง C8:0 ถึง C18:2

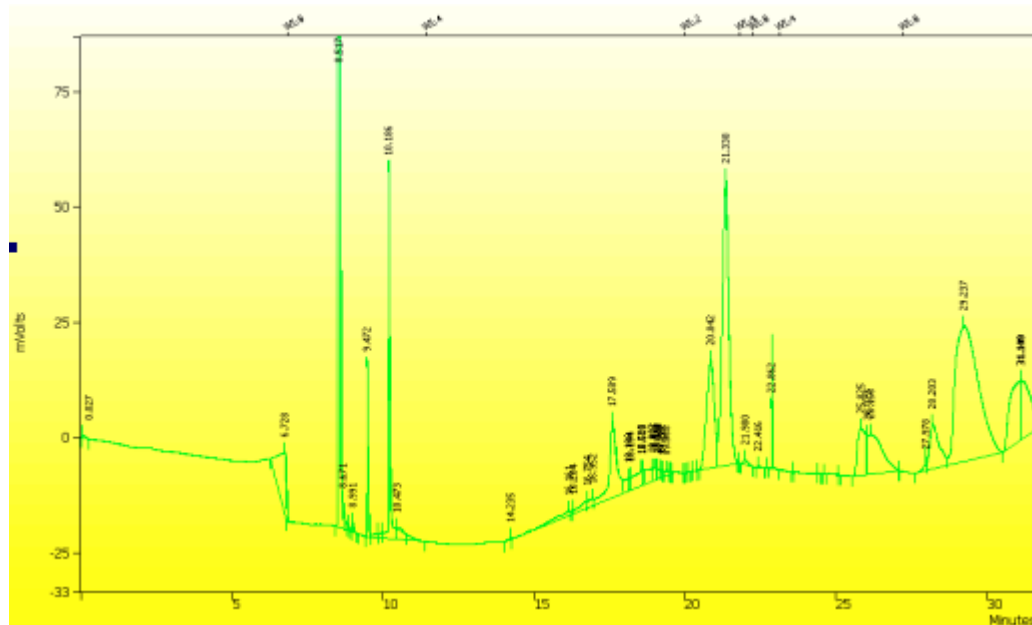
A_{EI} = พื้นที่ใต้กราฟของ C8:0

C_{EI} = ความเข้มข้นของ C8:0 ที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

V_{EI} = ปริมาตร C8:0 ที่ใช้ (ไมโครลิตร)

W = น้ำหนักไบโอดีเซล (มิลลิกรัม)

ตัวอย่างการคำนวณ



4	0.0338	8.671	0.000	3214	TS	0.0
5	0.0349	8.991	0.000	3320	TS	0.0
6	0.9334	9.472	0.000	88809	BV	0.0
7	2.7995	10.186	0.000	266367	VB	1.8
8	0.0543	10.473	0.000	5166	TS	0.0
9	0.0258	14.235	0.000	2451	BV	17.9
10	0.4375	16.161	0.000	41625	VV	0.0
11	0.0650	16.284	0.000	6180	VV	0.0
12	0.3223	16.754	0.000	30670	VV	0.0
13	0.1931	16.952	0.000	18371	VV	0.0
14	3.0331	17.589	0.000	288590	VV	15.9
15	0.2749	18.108	0.000	26158	VV	0.0
16	0.1430	18.194	0.000	13608	VV	0.0
17	0.7087	18.569	0.000	67435	VV	0.0
18	0.1473	18.605	0.000	14017	VV	0.0
19	0.4844	18.902	0.000	46094	VV	0.0
20	0.1834	18.996	0.000	17449	VV	0.0
21	0.0786	19.038	0.000	7477	VV	0.0
22	0.1072	19.102	0.000	10204	VV	0.0
23	0.0801	19.202	0.000	7617	VV	0.0
24	0.0207	19.278	0.000	1967	VV	0.0
25	0.0876	19.388	0.000	8332	VV	0.0
26	4.3781	20.842	0.000	416570	BV	17.2
27	9.9655	21.338	0.000	948197	VB	13.9
28	0.1180	21.980	0.000	11229	BB	7.1
29	0.0154	22.416	0.000	1464	BB	5.5
30	0.0876	22.862	0.000	8332	VB	0.4
31	2.0461	25.825	0.000	194684	BV	17.9
32	0.1347	26.023	0.000	12818	VV	17.9
33	3.0096	26.158	0.000	286361	VV	69.0
34	0.1251	27.978	0.000	11902	BV	15.5
35	2.2461	28.203	0.000	213714	VV	23.4
36	16.4361	29.237	0.000	1563855	VP	55.8
37	3.5633	31.109	0.000	339041	FV	0.0

ภาพผนวกที่ 1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง

เมทิลเอสเทอร์	RT	พื้นที่ใต้กราฟ
C8:0	9.465	88809
C16:0	17.589	288590
C18:0	20.842	416570
C18:1	21.338	948197

จากสูตรการคำนวณเมทิลเอสเทอร์

$$\sum A = 88809 + 288590 + 416570 + 948197 = 1742166$$

$$A_{EI} = 88809$$

$$C_{EI} = 10.2 \text{ (มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร)}$$

$$V_{EI} = 50 \text{ (ไมโครลิตร)}$$

$$W = 50.5 \text{ (มิลลิกรัม)}$$

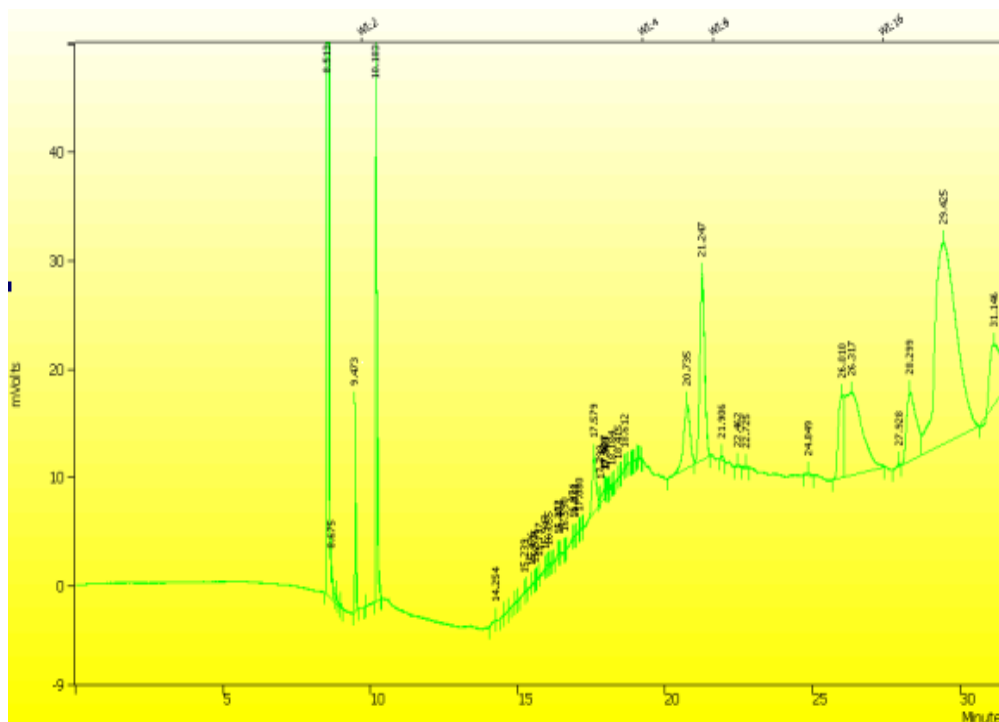
ดังนั้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์เมทิลเอสเทอร์} = \frac{(1742166 - 88809) \times 10.2 \times 50 \times 100}{88809 \times 1000 \times 50.5}$$

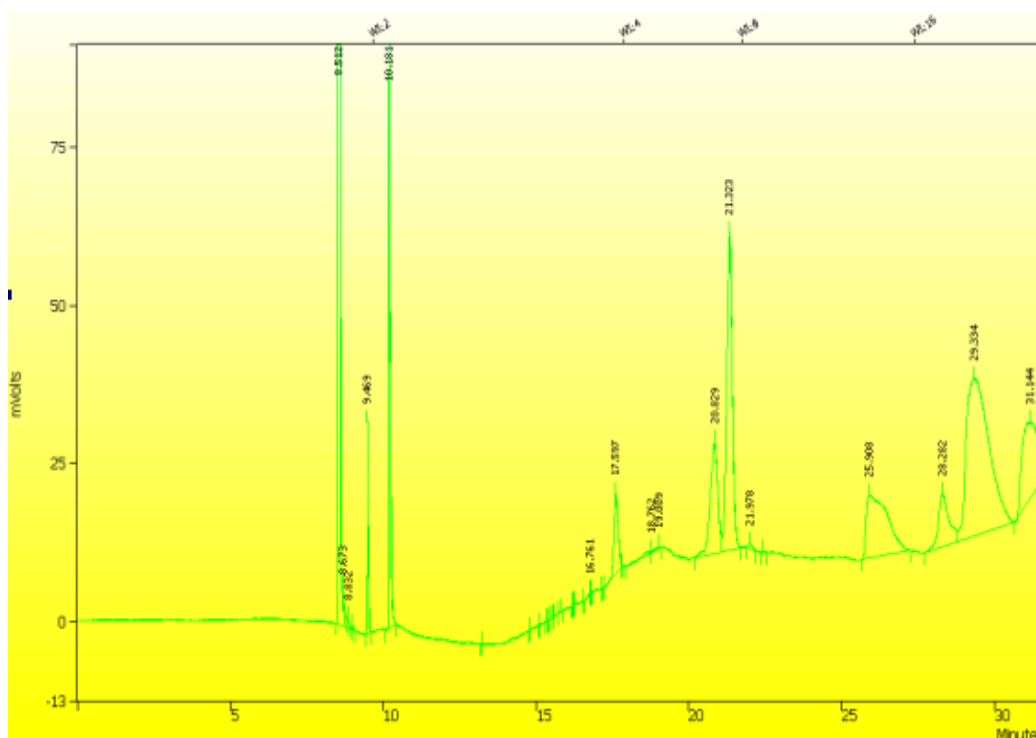
$$= 18.80$$

ภาคผนวก จ

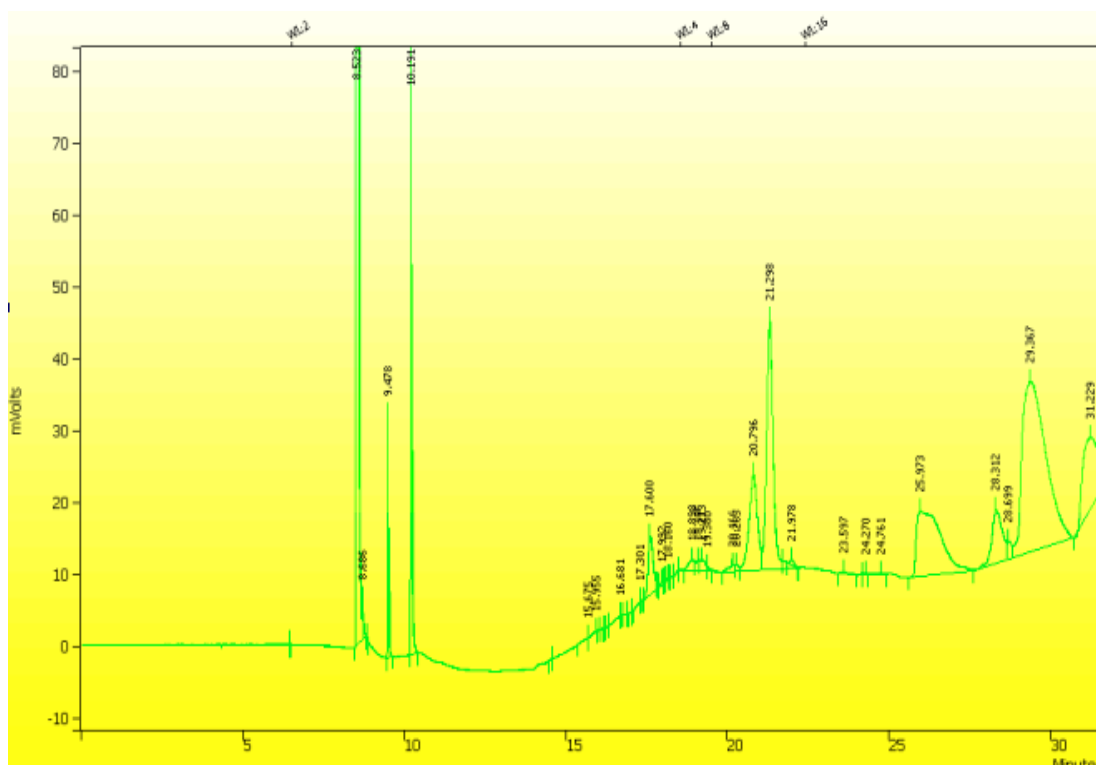
ลักษณะโครมาโตแกรมของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี



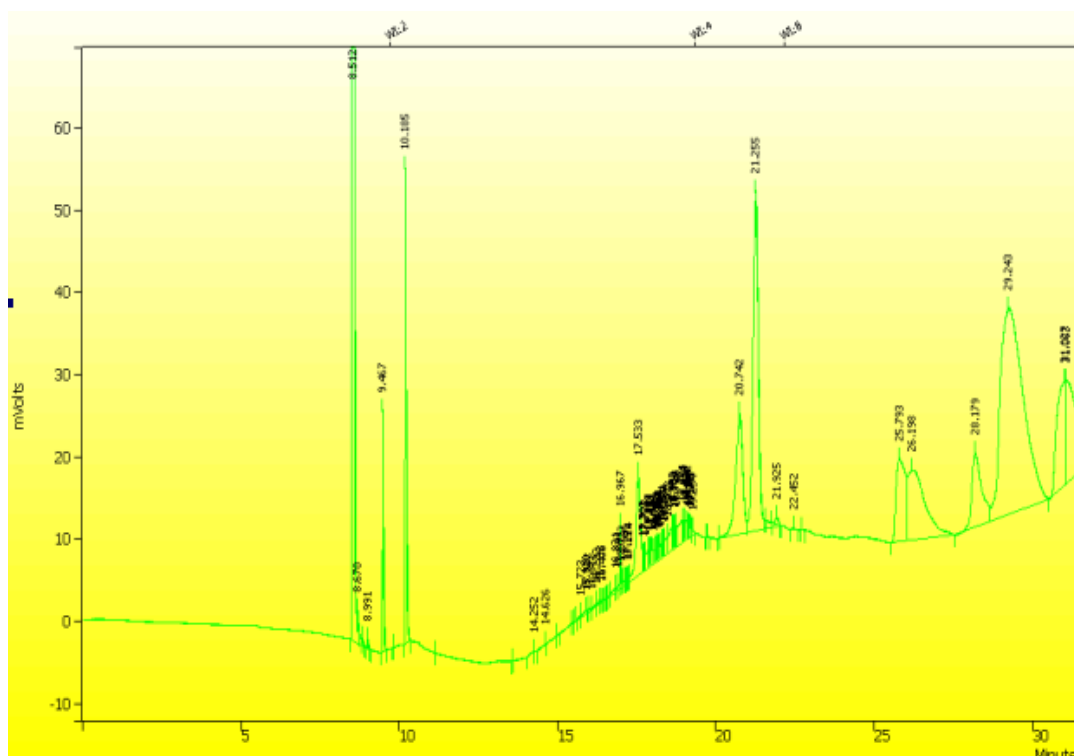
ภาพผนวกที่ จ1 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซาด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



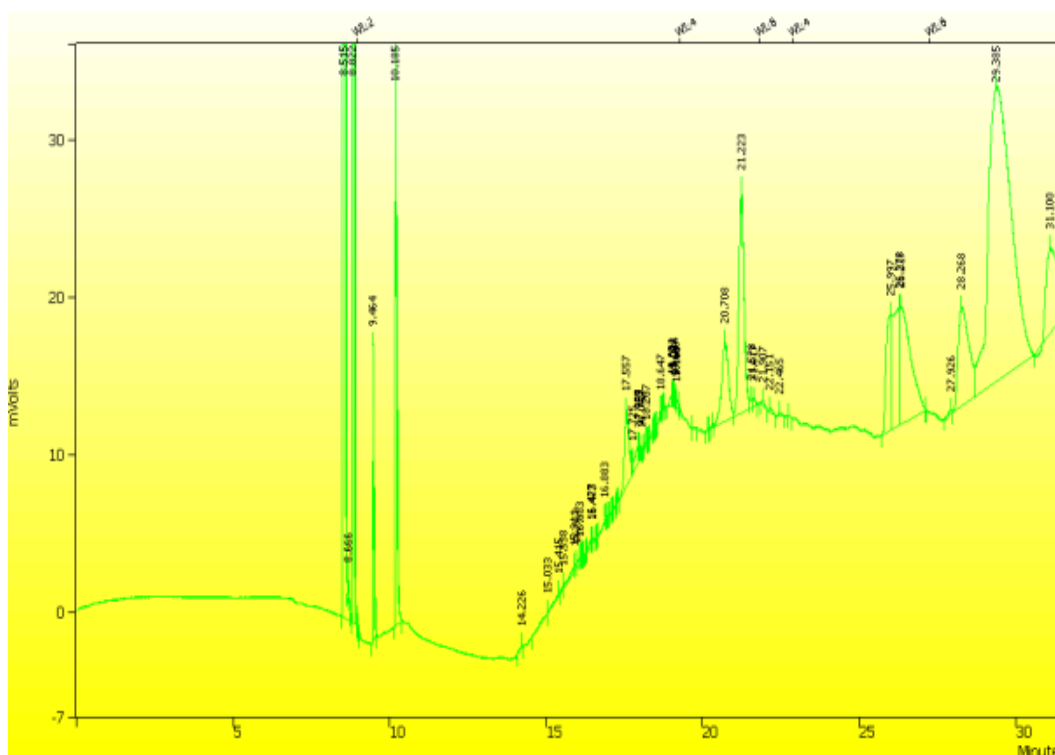
ภาพผนวกที่ ๑2 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



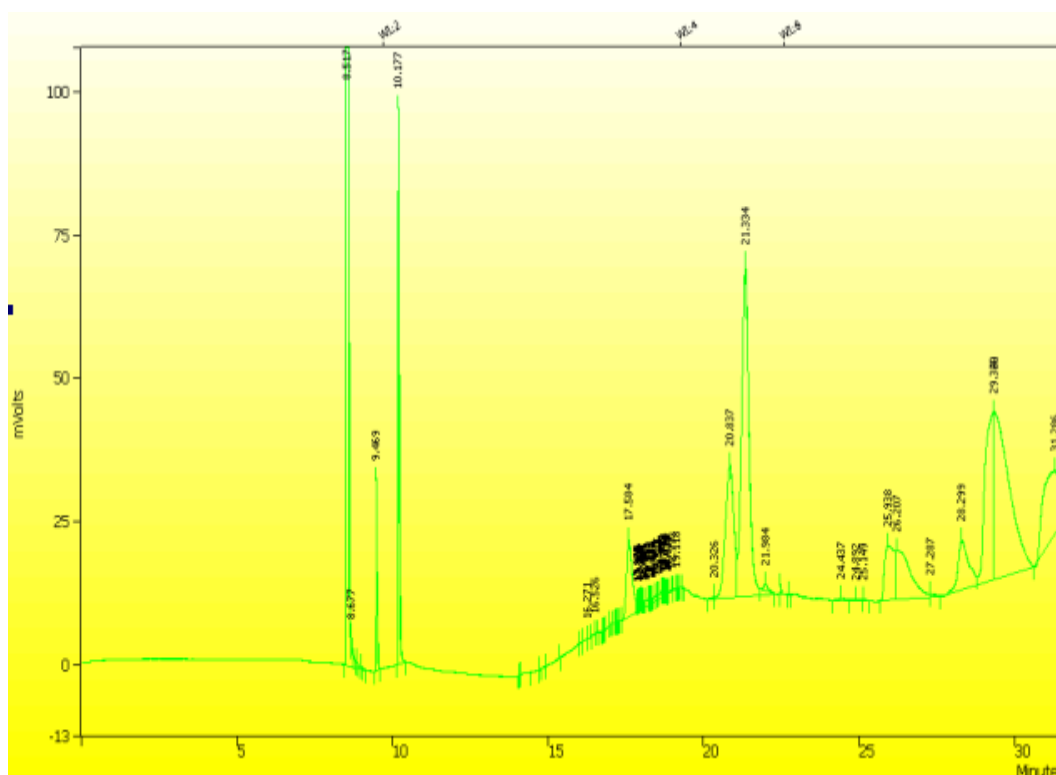
ภาพผนวกที่ จ3 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วย
 ปีโตรเลียมอีเทอร์ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมัน
 ต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกาย
 ภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว
 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

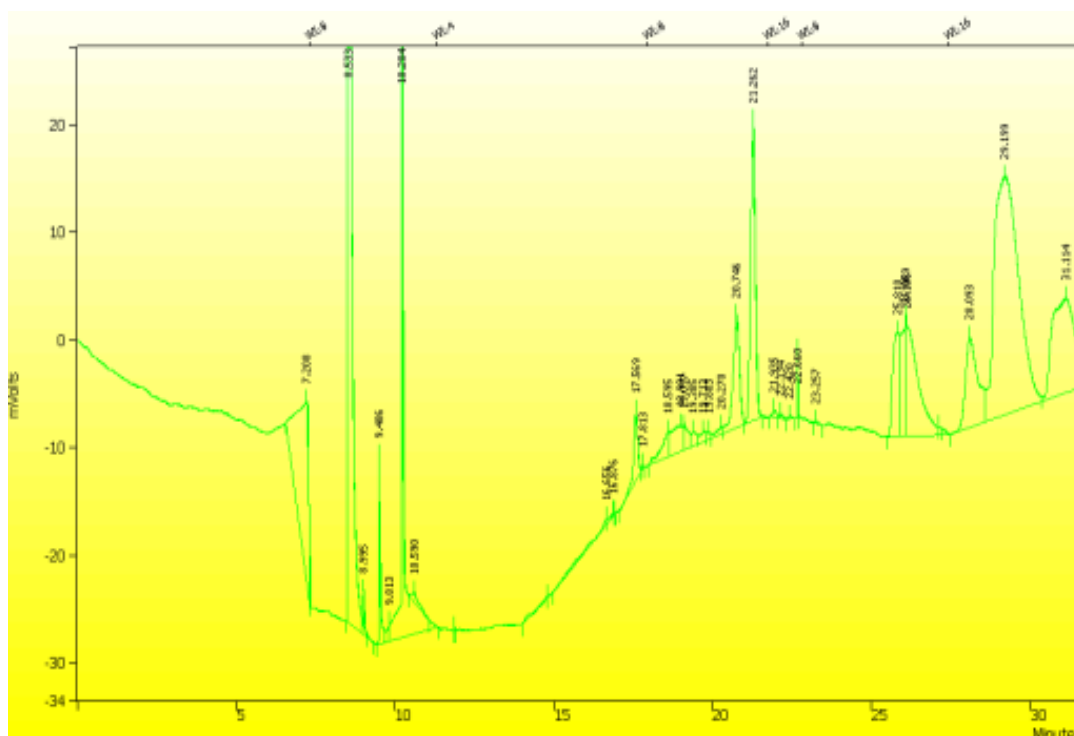


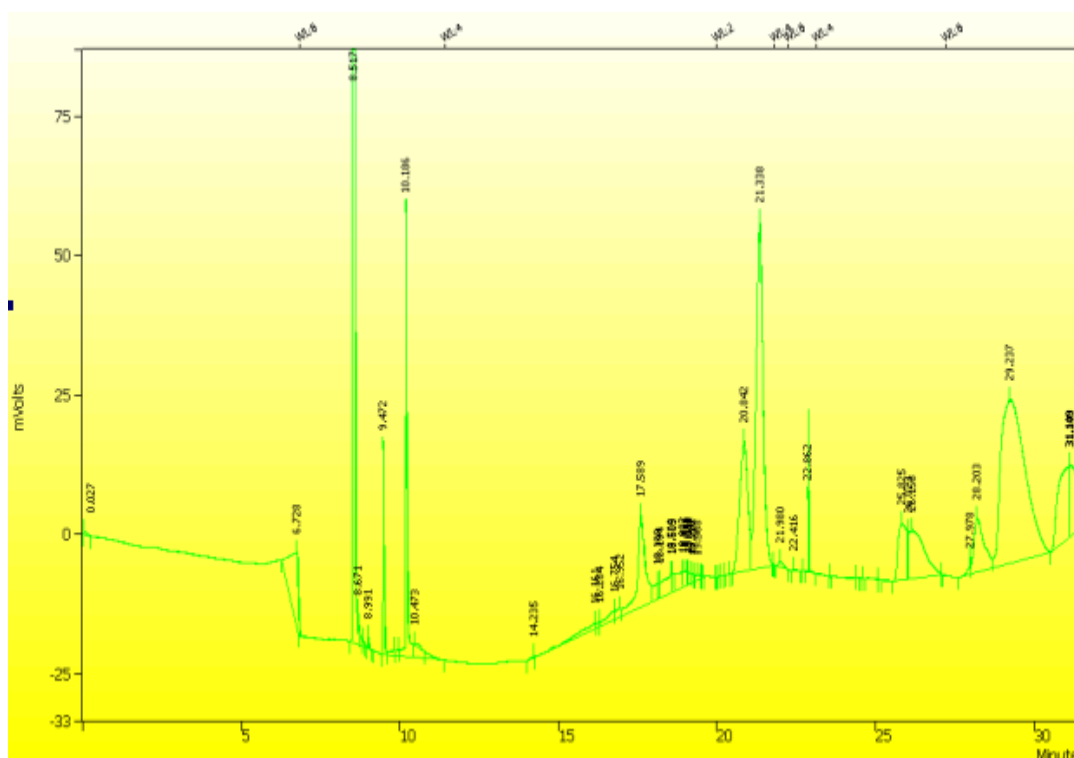
ภาพผนวกที่ จ4 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย
 เฮกเซน 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล
 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโคโคซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100
 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อ
 นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



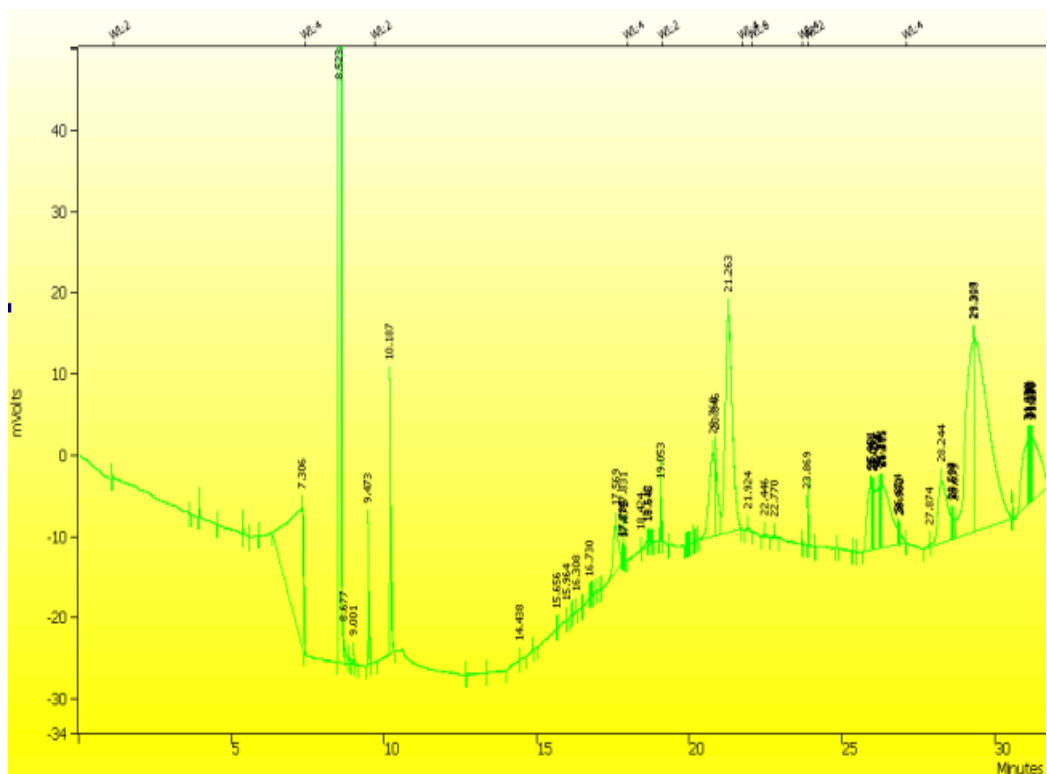
ภาพผนวกที่ จ5 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ด้วย โทลูอิน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไลโดซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



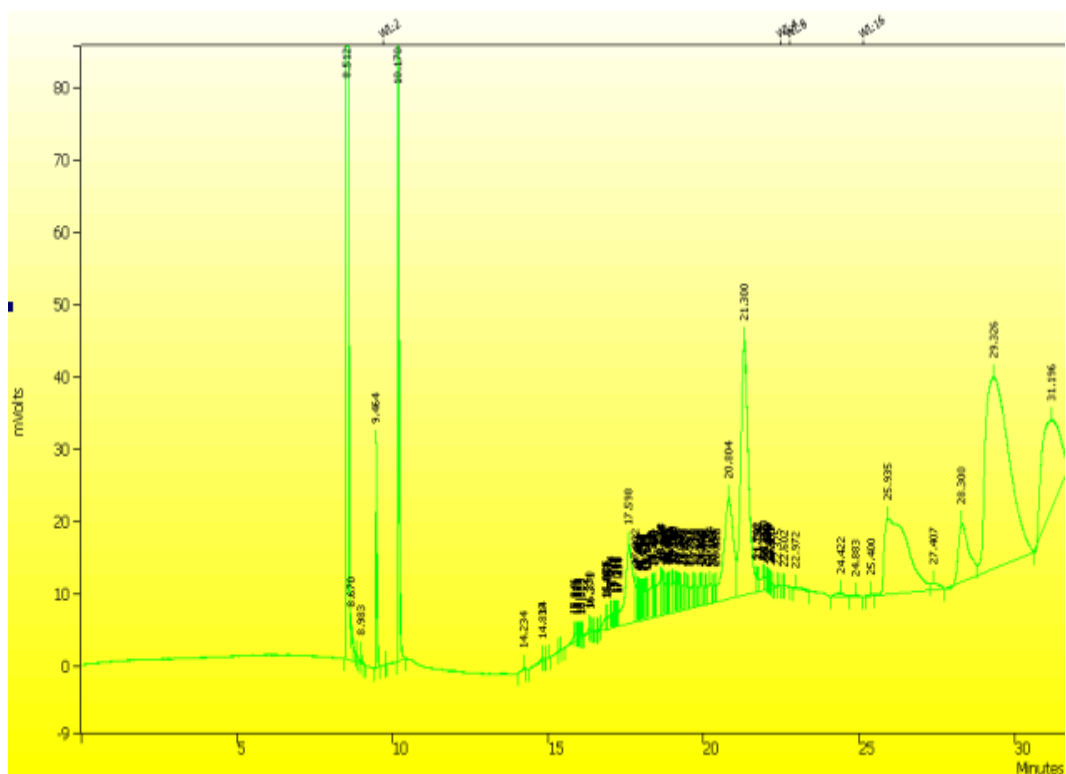




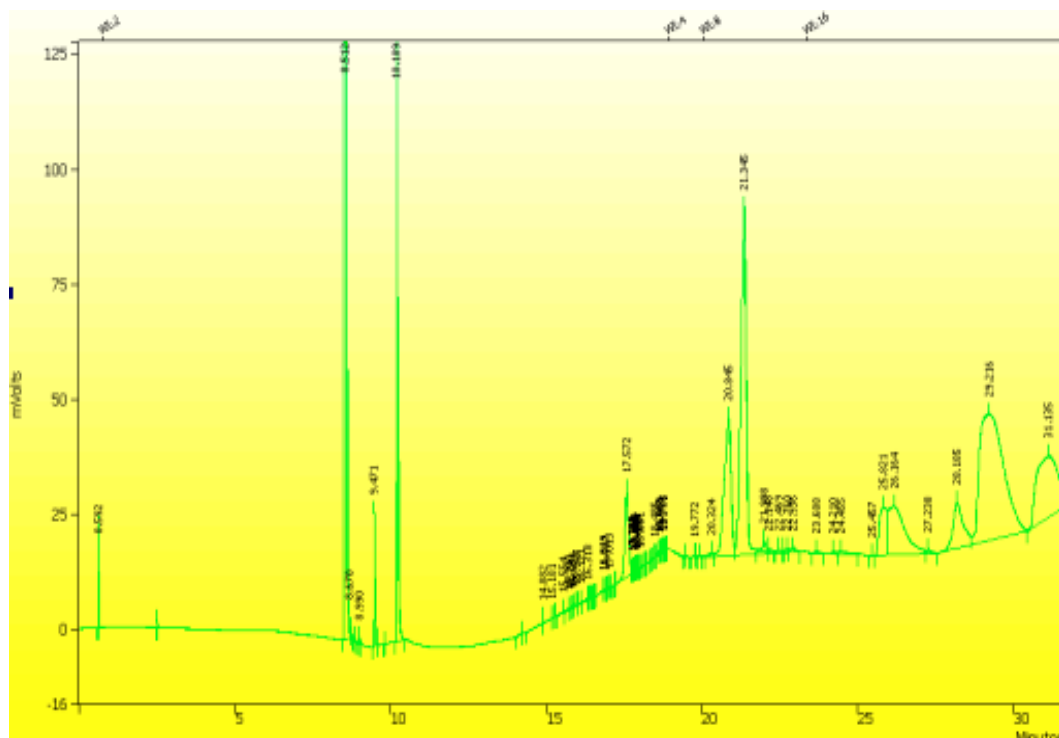
ภาพผนวกที่ ๖8 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโคโคซานแบบดูดซับ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



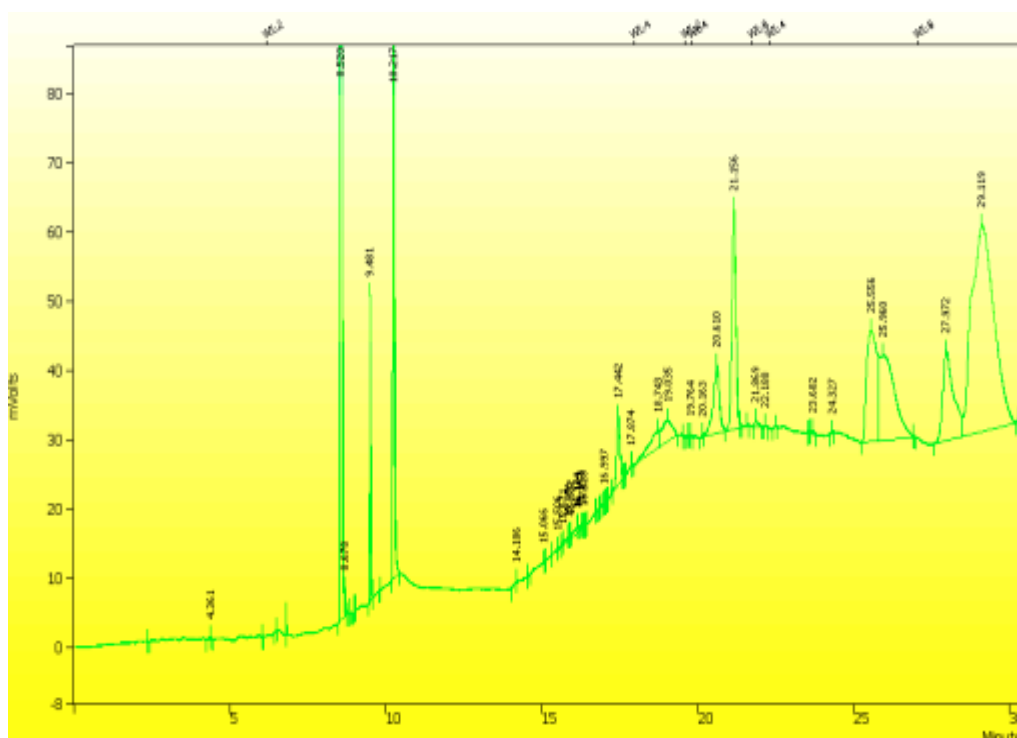
ภาพผนวกที่ ๑๑๐ โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย
 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3
 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานแบบดูดซับ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
 น้ำมัน ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อ
 นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพผนวกที่ ๑11 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนโคโตซานแบบคูลซัพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก น้ำมัน ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

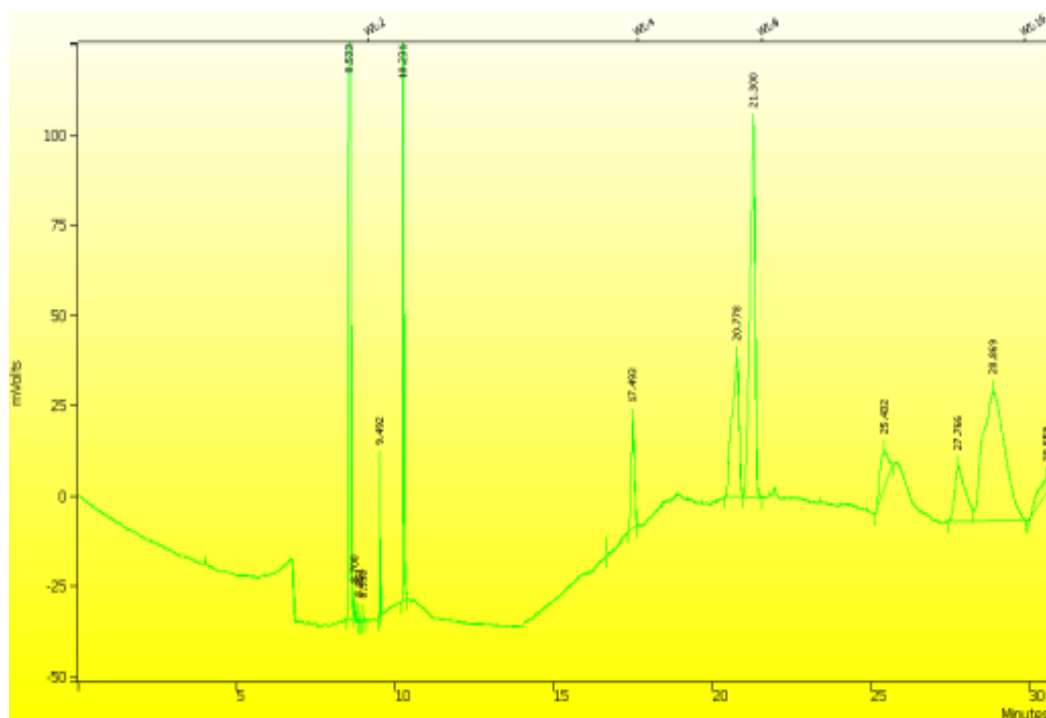


ภาพผนวกที่ จ12 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานแบบดูดซับ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก น้ำมัน ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพผนวกที่ ๑13 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย

ปริมาณเอโนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต 100 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)



ภาพผนวกที่ จ14 โครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ด้วย ปริมาณเอโนไซม์อิสระ 100 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน (อัตราส่วนโดยโมลของ น้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)