



รายงานวิจัย

การหาวัสดุค้ำจุนราคาถูกลำหรับตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสชอบอุณหภูมิสูงและ
ทนตัวทำละลายอินทรีย์จาก *Acinetobacter baylyi* เพื่อประยุกต์ใช้
ในการผลิตไบโอดีเซล

Screening of low-cost supporters for immobilization of
a thermophilic-solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*
for the application in biodiesel production

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา เจริญพานิช
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย งบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ 2557

กิติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การหาวัสดุค้ำจุนราคาถูกสำหรับตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสขอบอุณหภูมิสูงและทนตัวทำลายอินทรีย์จาก *Acinetobacter baylyi* เพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล” สำเร็จลงด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 จากงบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย
มิถุนายน 2557

บทคัดย่อ

การตรึงไนโตรเจนเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในราคาประหยัด เอนไซม์ไลเปสเป็นหนึ่งในตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมแต่เอนไซม์ไลเปสที่มีขายทางการค้ายังคงมีราคาสูง งานวิจัยนี้สนใจที่จะหาวัสดุค้ำจุนราคาถูกสำหรับตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสขอบอุณหภูมิต่ำและมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตจาก *Acinetobacter baylyi* (ABL) โดยได้เลือกวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ชั่งข้าวโพด แกลบข้าวสาร หยวกกล้วย ทางต้นปาล์มทางกระรอก (*Wodyetia bifurcate* A.K.) กากมะพร้าว กิ่งไทรยอดทอง (*Ficus microcarpa* L.f.) และกิ่งระกำ (*Salacca wallichiana*) และเศษอาหาร จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกไข่ เปลือกกุ้งแช่แข็ง (*Penaeus merguensis*) เปลือกปูทะเล (*Scylla serrata*) และเปลือกหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) โดยพิจารณาจากปริมาณที่หาค่าคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปส ผลการทดลองพบว่ากิ่งระกำและเปลือกไข่ ขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ให้ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด จึงเลือกมาใช้เป็นวัสดุค้ำจุนสำหรับตรึงเอนไซม์ต่อไป เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส ABL โดยวิธีการดูดซับบนกิ่งระกำพบว่า การใช้บัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์และมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ตรึงเอนไซม์ไลเปส ABL ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาทีด้วยความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส ABL บนกิ่งระกำ ขณะที่การตรึงบนเปลือกไข่มีสภาวะที่เหมาะสมคือบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์และมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาทีด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ตรึงไลเปส ABL บนกิ่งระกำพบว่าเอนไซม์ตรึงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าของเอนไซม์ไลเปส ABL ในรูปอิสระแต่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่สูงขึ้น การทดสอบความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มพบว่า มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Novozyme 435 และที่น่าสนใจคือเอนไซม์ไลเปส ABL ที่ตรึงบนกิ่งระกำมีความเสถียรในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่เอนไซม์ไลเปส ABL ที่ตรึงบนเปลือกไข่ไม่มีความเสถียรในการเก็บรักษา ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำกิ่งระกำมาเป็นวัสดุค้ำจุนราคาถูกสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปสต่อไป

คำสำคัญ การตรึงเอนไซม์ไลเปส, การตรึงโดยวิธีดูดซับ, *Acinetobacter baylyi*, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร, เศษอาหาร

Abstract

Enzyme immobilization is an often used technique to improve enzyme efficiency and cost reduction. Lipase is one of widespread used biocatalysts for industry but a commercial lipase is still expensive. This study aims to find a low cost support for immobilization of *Acinetobacter baylyi* lipase (ABL), a novel thermophilic and solvent-stable lipase. Seven agricultural waste residues (corn cob, rice hulls, banana stalk, *Wodyetia bifurcate* A.K. Irvine leaves, coconut husks, *Ficus microcarpa* L.f. stems and *Salacca wallichiana* stems) and four food scraps (egg, Banana shrimp (*Penaeus merguensis*), Mangrove crab (*Scylla serrata*), and Asian green mussel (*Perna viridis*) shells) were evaluated for their abundances, morphological characteristics, and immobilization efficiency. Among them, *Salacca wallichiana* stems and egg shells with the size average ~ 0.1 mm were selected for further optimization of immobilization condition due to the highest immobilization efficiency. Optimum condition for immobilization of ABL on *Salacca wallichiana* stems via adsorption method was pH 7.0, 10 mM ionic strength, 0.1 mg/ml enzyme loading at 30°C for 90 min and 250 rpm while ABL was adsorbed on egg shells under the condition: pH 6.0, 10 mM ionic strength, 0.3 mg/ml protein loading at 10°C for 150 min and 300 rpm. ABL immobilized on *Salacca wallichiana* stems has a lower optimum temperature compared to the suspended enzyme and showed remarkable solvent stability. Reusability for palm oil hydrolysis of both immobilized ABL was comparable to that for commercial lipase, Novozyme 435. Interestingly, ABL immobilized on *Salacca wallichiana* stems showed improved storage stability at room temperature (25-32°C) while those on egg shells were not stable. This study showed that *Salacca wallichiana* stems can be used as an alternative support for lipase immobilization.

Keywords: lipase immobilization, adsorption, *Acinetobacter baylyi*, agricultural waste, food scraps

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	13
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	14
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	16
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
2.1.1 เอนไซม์ไลเปส	17
2.1.2 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส	17
2.1.3 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	18
2.1.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส	20
2.1.5 เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ <i>Acinetobacter baylyi</i>	22
2.1.6 การตรึงเอนไซม์	23
2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย	25
3 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	26
3.1 <i>Acinetobacter baylyi</i> และสภาวะการเพาะเลี้ยง	26
3.2 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i>	26
3.3 การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสและการวัดปริมาณโปรตีน	26
3.3.1 การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส	26
3.3.2 การวัดปริมาณโปรตีน	27
3.4 การเตรียมตัวค้ำจุนทางการค้า	27
3.5 การเตรียมตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางธรรมชาติ	28
3.5.1 การเตรียมตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	28
3.5.2 การเตรียมตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหาร	30

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
3	ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)
3.6	การคัดเลือกตัวค้ำจุนทางการค้าและตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุธรรมชาติที่เหมาะสมในการตรึง เอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> 31
3.7	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนทางการค้า และตัวค้ำจุนธรรมชาติ 31
3.7.1	ผลของความเร็วในการกวนที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 31
3.7.2	ผลของค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 31
3.7.3	ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 31
3.7.4	ผลของความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 32
3.7.5	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์ 32
3.8	การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 32
3.9	การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงที่เตรียมได้ 32
3.9.1	การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึง 32
3.9.2	การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึง 32
3.9.3	การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์ 33
3.9.4	การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิฟิเคชัน 33
3.10	การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงที่เตรียมได้ 33
3.10.1	ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึง 33
3.10.2	ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อความเสถียรของเอนไซม์ตรึง 34
3.10.3	การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ 34
4	ผลการวิจัย 35
4.1	การคัดเลือกตัวค้ำจุนทางการค้าที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> 35
4.2	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนทางการค้า XAD7HP 35
4.2.1	ผลของค่าความเร็วในการกวนที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 35
4.2.2	ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ 37
4.2.3	ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 37
4.2.4	ผลของความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่อการตรึงเอนไซม์ 38
4.2.5	ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ 38

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย (ต่อ)	
4.3 การคัดเลือกตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางธรรมชาติที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i>	39
4.3.1 การคัดเลือกตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์	39
4.3.2 การคัดเลือกตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์	41
4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้ำ	42
4.4.1 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้ำที่ความเร็วในการกวนต่างกัน	42
4.4.2 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้ำโดยใช้ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ต่างกัน	43
4.4.3 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้ำโดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกัน	43
4.4.4 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้ำโดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่างกัน	44
4.4.5 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้ำโดยใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิในการตรึงต่างกัน	45
4.4.6 ปริมาณของเอนไซม์ตรึงไลเปสบนกึ่งระก้ำที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา	46
4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่	46
4.5.1 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่ที่ความเร็วในการกวนต่างกัน	46
4.5.2 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่โดยใช้ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ต่างกัน	47
4.5.3 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่โดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกัน	48
4.5.4 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่โดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่างกัน	48
4.5.5 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่โดยใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิในการตรึงต่างกัน	49
4.5.6 ปริมาณของเอนไซม์ตรึงไลเปสบนเปลือกไข่ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา	50
4.6 การทดสอบความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงเทียบกับเอนไซม์อิสระ	50
4.6.1 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์อิสระ	50
4.6.2 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP	50
4.6.3 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนกึ่งระก้ำ	52
4.6.4 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่	53
4.7 การนำเอนไซม์ตรึงไลเปสกลับมาใช้ซ้ำ	54
4.7.1 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงไลเปสทางการค้า Novozyme 435	54
4.7.2 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP	55
4.7.3 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนกึ่งระก้ำ	55
4.7.4 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่	56

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย (ต่อ)	
4.8 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ด้วย กลีโองจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	56
4.9 การศึกษาคูณลักษณะเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> เมื่อตรึงบนกิ่งระกำ	60
4.9.1 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึง	61
4.9.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึง	61
4.9.3 ความเสถียรของเอนไซม์ตรึงต่อตัวทำละลายอินทรีย์	61
4.9.4 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ตรึง	63
5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	64
6 สรุปผลการวิจัย	70
บรรณานุกรม	71
ภาคผนวก	
1 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล	77
2 การหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ	78
3 กราฟมาตรฐานของโบวินซีรัมอัลบูมิน	79
4 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ของสารมาตรฐานในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ที่เร่งโดยเอนไซม์ตรึงไลเพส	80
ประวัติและผลงานของผู้วิจัย	81
ผลงานที่เกิดจากโครงการวิจัย	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 จุลินทรีย์ที่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้	20
2 สมบัติของตัวค้ำจุนทางการค้าประเภทไฮโดรโฟบิก	28
3 แสดงลักษณะของตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่พร้อมใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i>	29
4 แสดงลักษณะของตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารที่พร้อมใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i>	30
5 แอคติวิตีและประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ต่างกัน	40
6 แอคติวิตีและประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารต่างกัน	41
7 การเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนทั้งสามชนิด	66
8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงไลเปสจาก <i>A. baylyi</i> เทียบกับเอนไซม์ในรูปอิสระและเอนไซม์ตรึงไลเปสทางการค้า Novozyme 435	69

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ปฏิกริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์	14
2 ตัวอย่างโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>P. aeruginosa</i>	18
3 ปฏิกริยาต่างๆ ที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไลเพส	19
4 ภาพรวมขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในโครงการ	22
5 ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์และร้อยละการโพลดีปรีตีนของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกดูดซับบนตัวค้ำจุนทางการค้า 5 ชนิด	36
6 ผลของความเร็วในการกวนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล	36
7 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล	37
8 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล	37
9 ผลของความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนประเภท XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล	38
10 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล	39
11 ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์และร้อยละการโพลดีปรีตีนของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงด้วยตัวค้ำจุนกึ่งระกำและกากมะพร้าวที่มีขนาดต่างกัน	40
12 ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์และร้อยละการโพลดีปรีตีนของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงด้วยตัวค้ำจุนเปลือกไข่และเปลือกกุ้งที่มีขนาดต่างกัน	42
13 ผลของค่าความเร็วในการกวนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสของ <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ	43
14 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ	44
15 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ	44
16 ผลของความเข้มข้นโปรตีนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ	45
17 ผลของเวลาและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ	45
18 ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเพสที่ตรึงบนกึ่งระกำที่ปริมาณต่างกัน	46
19 ผลของค่าความเร็วในการกวนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่	47
20 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่	47
21 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่	48
22 ผลของความเข้มข้นโปรตีนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่	49

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่	49
24 ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบนเปลือกไข่ที่ปริมาณต่างกัน	50
25 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ในรูปอิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	51
26 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ในรูปอิสระที่อุณหภูมิห้อง	51
27 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	51
28 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่อุณหภูมิห้อง	52
29 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	52
30 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ที่อุณหภูมิห้อง	53
31 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	53
32 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ที่อุณหภูมิห้อง	54
33 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเพสทางการค้า Novozyme 435 กลับมาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์ม	54
34 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์ม	55
35 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์มซ้ำ	55
36 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่กลับมาใช้ซ้ำ	56
37 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของกากมะพร้าว กิ่งไทรยอดทอด หยวกกล้วย ช้างข้าวโพด แกลบข้าวสาร และทางตันปาล์ม ก่อนมีการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i>	57
38 ลักษณะทางกายภาพของกิ่งระกำหลังการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	58
39 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเปลือกกุ้งเปลือกไข่ เปลือกปูทะเล และเปลือกหอยแมลงภู่ ก่อนมีการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i>	59

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
40 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกปูทะเลที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	59
41 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไขหลังการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	60
42 ผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบนกิ่งระกำเทียบกับของเอนไซม์ไลเพสอิสระ	61
43 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบนกิ่งระกำเทียบกับของเอนไซม์อิสระ	62
44 ความเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์ของเอนไซม์ไลเพสจาก <i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบนกิ่งระกำเทียบกับของเอนไซม์อิสระ	62

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

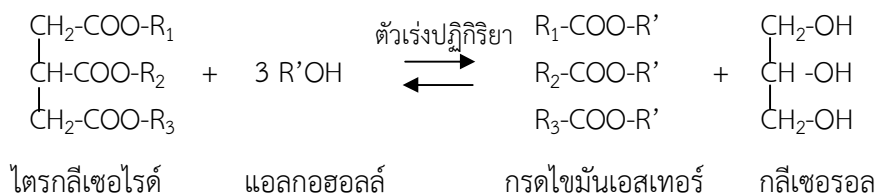
%	=	ร้อยละ
°C	=	องศาเซลเซียส
EC	=	Enzyme committee
HPLC	=	โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High performance liquid chromatography)
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าพีเอช

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไบโอดีเซล หรือ กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (Fatty acid methyl ester) เป็นอนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification; ภาพที่ 1) ของไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) และเมทานอล (methanol) ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น ด่าง (alkali-catalysis) หรือการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ไลเปส แต่จากข้อจำกัดของการใช้ด่างในการเร่งปฏิกิริยาที่ต้องใช้พลังงานจำนวนมาก รวมทั้งการแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันออกจากไบโอดีเซลที่ทำได้ยาก และก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีสถานะเป็นต่างซึ่งต้องการกระบวนการที่จำเพาะในการบำบัด ทำให้การผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบันหันมาสนใจที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามากขึ้น (Fukuda et al., 2001)



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ (Fukuda et al., 2001)

เอนไซม์ไลเปส (Lipase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acyl-hydrolase, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่สามารถผลิตได้ทั้งในเซลล์ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในรูปของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) และเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ได้เป็นไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) กรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) ในสถานะที่มีน้ำและไขมันในบรรดาแหล่งผลิตของเอนไซม์ไลเปสทั้งหมด จุลินทรีย์จัดเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความน่าสนใจมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา (catalytic activity) ที่หลากหลาย ที่ทำให้ได้ปริมาณของผลิตภัณฑ์อัลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) สูงและมีความจำเพาะที่สามารถแยกผลิตภัณฑ์ร่วมที่เป็นกลีเซอรอล ออกได้ง่าย และบริสุทธิ์กว่าการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา รวมทั้งยังสามารถดัดแปลงหรือปรับปรุงทางพันธุกรรมได้ และการเลี้ยงเจริญนั้นไม่ต้องขึ้นกับฤดูกาล โดยใช้เวลาในการเลี้ยงเจริญที่สั้นในอาหารเลี้ยงที่มีราคาไม่แพง จากอดีตจนถึงปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร และนม ทางเภสัชกรรม การผลิตสารซักฟอก อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การสังเคราะห์สารเคมี และที่สำคัญคือใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst) ในการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel) ผ่านปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Arpigny and Gaeger, 1999; Hasan et al., 2006) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้ว่าน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นจะมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงก็ตาม ในจำนวนเอนไซม์ไลเปสที่มีการ

ประยุกต์ใช้หลากหลาย สมบัติที่พึงประสงค์ของนักวิจัยและภาคอุตสาหกรรมคือ ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงและในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (Haki and Rakshit, 2003)

ไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงดีเซลอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ผลิตได้จากน้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์ โดยมีข้อดีเหนือกว่าเชื้อเพลิงดีเซลทั่วไปตรงที่ให้ควันและมลภาวะน้อยกว่า มีเลขซีเทนสูงกว่า มีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ (carbon monoxide) และไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ที่ได้จากการเผาผลาญของน้ำมันต่ำกว่าเชื้อเพลิงดีเซลทั่วไป รวมทั้งสามารถสลายทางชีวภาพได้และช่วยในการหล่อลื่นที่ไม่ส่งพิษต่อเครื่องยนต์ จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้เชื้อเพลิงดีเซลทั่วไปมาก (Kaieda et al., 2001; Van Gerpen, 2005) สำหรับประเทศไทยมีน้ำมันที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตรที่สามารถนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลได้หลายชนิด เช่น น้ำมันปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ละหุ่ง และน้ำมันงา เป็นต้น สำหรับปาล์มจัดเป็นพืชที่ให้ผลผลิตน้ำมันดิบต่อไร่สูงสุดในบรรดาพืชน้ำมันทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังไม่มี การนำน้ำมันจากพืชมาผลิตเพื่อใช้เป็นพลังงานในเชิงพาณิชย์เท่าไรนัก มีเพียงการนำน้ำมันพืชดิบมาผสมกับน้ำมันดีเซลหรือน้ำมันก๊าดเพื่อใช้แทนน้ำมันดีเซล และจำหน่ายกันในบางท้องถิ่น เช่น อำเภอบางคนที จังหวัดสมุทรสงคราม และอำเภอบ้านลาด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เป็นต้น (คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะสามารถใช้น้ำมันพืช หรือน้ำมันจากไขมันสัตว์เป็นเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ได้โดยตรง แต่ปัญหาที่ตามมาและพบได้บ่อยคือ ความหนืดของน้ำมันที่ส่งผลต่อการทำงานของเครื่องยนต์ ด้วยเหตุนี้ การปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำมันโดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำมันพืชหรือน้ำมันจากไขมันสัตว์กับแอลกอฮอล์ เพื่อให้ได้เป็นไบโอดีเซลที่มีคุณภาพสูงขึ้นจึงมีความน่าสนใจ ดังเช่นในรายงานของ Abigor และคณะ (2000) ที่นำเอนไซม์ไลเปสจาก PS30 มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันในเมล็ดปาล์ม (Palm kernel oil) และน้ำมันมะพร้าว โดยพบว่าสามารถลดความหนืดของน้ำมันทั้งสองได้ถึงร้อยละ 70 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีของ Pischinger และคณะ (1982) ที่สรุปว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันช่วยลดความหนืดของน้ำมันพืชได้ และช่วยให้น้ำมันจากพืชเหล่านี้มีความลื่นไหลในเครื่องยนต์ดีเซลมากขึ้น แต่ทั้งนี้ การผลิตไบโอดีเซลผ่านปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยายังมีข้อจำกัดตรงที่ โดยทั่วไปปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน มักเกิดในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยการลดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา (activity) หรือทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (denaturation) รวมทั้งปัญหาในเรื่องของราคาของเอนไซม์ไลเปสที่ค่อนข้างสูงจึงไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้สำหรับการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นการพัฒนาเอนไซม์ไลเปสให้อยู่ในรูปที่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้โดยยังสามารถใช้เร่งปฏิกิริยาการผลิตได้อย่างต่อเนื่องซึ่งคืออยู่ในรูปของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (immobilized lipase) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

เทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ ถูกนำมาใช้เพื่อให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง และในจำนวนเทคนิคการตรึงรูปทั้งหมด การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับ (adsorption method) หรือการดักจับ (entrapment) นั้นเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้สูงที่สุด เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายและใช้ราคาไม่สูง (Petkar et al., 2006) ดังเช่นการทดลองของ Iso และคณะ (2001) ที่นำเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus* และ *Candida rugosa* มาตรึงรูปโดยการดูดซับบนวัสดุค้ำจุน toyonite 200-M แล้วทดสอบการผลิตไบโอดีเซลในสถานะที่ไม่มีน้ำ พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *P. fluorescens* สามารถผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันได้สูงสุด และไม่พบปัญหาในการแยกไลเปส

ออกมารวมถึงประสิทธิภาพการทำงานที่ไม่ลดลงมากนักเมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ หลักการตรึงรูปเอนไซม์มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์ สมบัติของตัวค้ำจุนที่เหมาะสมที่อาจได้มาจากธรรมชาติ หรือสังเคราะห์ขึ้น สารตั้งต้นของปฏิกิริยา และเป้าหมายในการใช้ประโยชน์ สำหรับการใส่เอนไซม์ไลเพสในประเทศไทย มักจะใช้ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูปทางการค้าซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศในราคาที่สูง รวมทั้งยังประสบปัญหาในเรื่องของความเสถียรของเอนไซม์ เมื่อใช้ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสำหรับการผลิตไบโอดีเซล ในงานวิจัยก่อนหน้านักวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้คัดแยกแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและเอนไซม์ยังคงมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ จากตะกอนทะเลบริเวณใกล้สะพานปลาอ่างศิลา และทำการจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Acinetobacter baylyi* ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่กำลังได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรม สิ่งแวดล้อม และเทคโนโลยีชีวภาพ (Snellman and Colwell, 2004) เอนไซม์ไลเพสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ยังคงรักษาความเสถียรได้มากกว่าร้อยละ 60 เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทานอล และเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นานถึง 12 ชั่วโมง และสามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ผลิตกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (ไบโอดีเซล) ได้ร้อยละการเปลี่ยน (% conversion) ที่ 31.64 เมื่อทำปฏิกิริยาได้ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รวมทั้งแสดงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับน้ำมันธรรมชาติหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำมันที่มีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น น้ำมันรำข้าว และน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น (Uttatree et al., 2010) อย่างไรก็ตาม การเตรียมเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของต้นทุนการผลิต เนื่องจากวัสดุค้ำจุน (supporters) ที่ใช้ตรึงรูปนั้นยังจะต้องมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศหรือมีการสังเคราะห์เองด้วยปฏิกิริยาทางเคมีที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อนและใช้ต้นทุนในการดำเนินการสูง ด้วยเหตุนี้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ตรึงรูป งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งเป้าไปที่การคัดเลือกวัสดุค้ำจุนที่มีราคาถูกซึ่งหาได้จากธรรมชาติ หรือเป็นวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* โดยจะมีการหาวิธีที่เหมาะสมในการตรึงรูป การใช้สารสนับสนุนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงรูป การทดสอบผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลา และการปั่นกวาระหว่างการตรึงรูป และการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเพสที่อยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูปที่ผลิตได้ เพื่อนำมาทดลองใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาวัสดุค้ำจุนที่มีราคาถูก สำหรับนำมาใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสของอุณหภูมิสูงและทนตัวทำละลายอินทรีย์จาก *Acinetobacter baylyi*

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

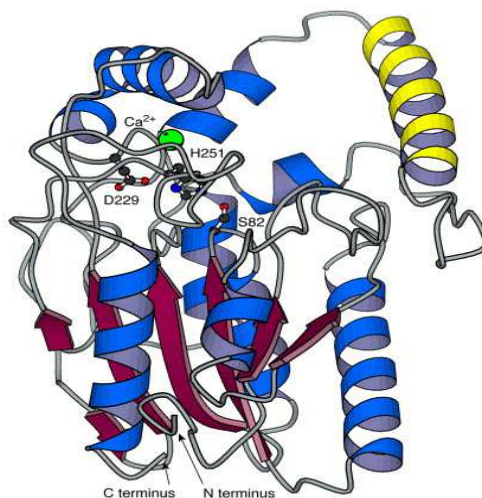
2.1.1 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (triacylglycerol hydrolase) หรือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) มีรหัสตามระบบ International Union of Biochemistry คือ EC 3.1.1.3 จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ (Han et al., 2003; Jaeger et al., 1994; Sharma et al., 2001) สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเคมีในสถานะที่มีน้ำ เช่น การสลายพันธะไกลโคซิด (glycosyl bond) ในคาร์โบไฮเดรต พันธะเพปไทด์ (peptide bond) ในโปรตีน และพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในลิพิด เป็นต้น (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547) ส่วนใหญ่สามารถพบเอนไซม์ไลเปสได้ในธรรมชาติ ได้แก่ ในมนุษย์ สัตว์ แบคทีเรีย ยีสต์ รา และพืช (Buchho et al., 2005)

ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์โดยทั่วไปนั้นเป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 100-300 ตัว ซึ่งมีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger and Reetz, 1998) โดยเทคนิค X-ray crystallography และ NMR spectroscopy พบว่าเอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไปจะมีมวลโมเลกุลประมาณ 20 ถึง 60 กิโลดาลตัน (Walsh, 2002) และที่บริเวณแอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์มีสายโพลีเพปไทด์ทำหน้าที่เป็นฝาเปิดปิดบริเวณเร่งของเอนไซม์เอาไว้ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสับสเตรทได้ ซึ่งสายโพลีเพปไทด์นี้จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเป็นจำนวนมาก และมีการขดตัวเป็นเกลียวเวียนขวา (α -helix) ซึ่งบริเวณฝาดังนี้จะเปิดออกเมื่อมีการสัมผัสบริเวณผิวร่วมระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (water-lipid interface) โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic triad) จะมีกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ฮิสทีดีน (histidine) และแอสพาติก (aspartic acid) เป็นองค์ประกอบ โดยกรดอะมิโนแอสพาติกและฮิสทีดีนจะช่วยในการทำงานของเซอรีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ดังแสดงในภาพที่ 2 (Kamini et al., 2000)

2.1.2 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ปฏิกิริยาหลัก คือ ปฏิกิริยาการสลายพันธะเอสเทอร์และปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Gandhi, 1997) ที่สามารถแบ่งปฏิกิริยาทั้งสองออกได้เป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) ที่ประกอบด้วยปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส (acidolysis) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcohololysis) ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (interesterification) และปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis) ดังแสดงในภาพที่ 3 (Yamane, 1987)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเพสจาก *P. aeruginosa* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray crystallography โดยจะมีฝาเปิดปิดบริเวณเร่งของเอนไซม์เป็นเกลียวเวียนขวาสี่เหลี่ยม (Jaeger and Reetz, 1998)

2.1.3 แหล่งของเอนไซม์ไลเพส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

ปัจจุบันในกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ มีการนำเอนไซม์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตเพิ่มมากขึ้นซึ่งจากสถิติการซื้อขายเอนไซม์ทั้งหมดพบว่ามีกำลังซื้อประมาณ 1 พันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Fariha et al., 2006) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มการใช้เอนไซม์รวมทั้งเอนไซม์ไลเพสในภาคอุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี และเอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์ก็เป็นเอนไซม์ที่ต้องการสูงเนื่องจากมีข้อได้เปรียบเหนือกว่าเอนไซม์ไลเพสจากพืชและสัตว์ ตรงที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้เร็วและเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ และการเพาะเลี้ยงไม่ต้องขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ รวมทั้งประหยัดพื้นที่ในการผลิต อีกทั้งปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้ก็สูงกว่าที่ได้จากพืชและสัตว์อีกด้วย (Macrae and Hammond, 1985) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังมีความหลากหลายทางคุณลักษณะเฉพาะสูง โดยทั่วไปเอนไซม์ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีคุณลักษณะเฉพาะที่สำคัญ 4 ประการ คือ (1) มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (2) ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactor) ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา (3) มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด และ (4) มีการคัดเลือกโครงสร้างแบบอีนานทิโอเมอร์ (enantioselectivity) สูง อีกทั้งยังสามารถปรับปรุงให้มีการผลิตและความเสถียรของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้ (Jaeger and Reetz, 1998; Ibrahim et al., 2008; Fang et al., 2009)

จุลินทรีย์ที่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสได้สรุปในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าในช่วงสิบปีที่ผ่านมานี้นักวิจัยจำนวนมากให้ความสนใจเอนไซม์ไลเพสที่สกัดได้จากแบคทีเรีย และมีการนำมาใช้ผลิตทางการค้ามากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและให้เอนไซม์ที่มีความเสถียรต่อค่าพีเอช ทนอุณหภูมิสูง รวมทั้งในแบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสมบัติในการคัดเลือกโครงสร้างเรซิโอและโครงสร้างไครอลที่เด่นชัดอีกด้วย (Hasan et al., 2006)

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

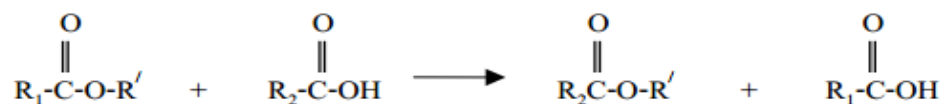


2. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน



3. ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน

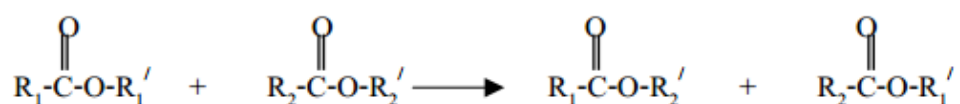
3.1 ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส



3.2 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส



3.3 ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน



3.4 ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาต่างๆ ที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปส (Yamane, 1987)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่เคยมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

จุลินทรีย์ที่พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้	
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Penicilium cyclopium</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicilium simplicissimum</i>
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus thermocatenulotus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Chromobacterium viscosum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptomyces flavogriseus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Trichosporon laibacchii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>LactoBacillus plantarum</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Pichia burtonii</i>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Candida cylindracea</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.

(ที่มา: Hasan et al., 2006)

2.1.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง (Walsh, 2002; Uhlig and Linsmaier-Bednar, 1998) ในหลายด้าน ได้แก่ กระบวนการทางเคมี (chemical processes) การตรวจวิเคราะห์ การรักษาทางการแพทย์ (medical treatment) และการแปรรูปอาหาร (food processing) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) เป็นต้น ซึ่งได้เคยมีรายงานถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในด้านต่างๆ ดังนี้

2.1.4.1 การย่อยสลายไขมัน

ไลเปสจะสามารถย่อยสลายไขมัน หรือน้ำมันให้ได้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในการใช้ประโยชน์ของอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสบู่ โดยการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* (Hoq et al., 1985) เป็นต้น

2.1.4.2 อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันและปิโตรเลียม

การผลิตน้ำมันและปิโตรเลียมมีการสูญเสียพลังงานจำนวนมาก ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส กลีเซอโรไลซิส และแอลกอฮอล์ไลซิส เมื่อกระบวนการเสร็จสิ้นแล้วจะได้น้ำมันที่ไม่มีความเสถียรและไม่บริสุทธิ์ที่

จำเป็นต้องผ่านการกลั่นทำให้เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น ในปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเปลี่ยนรูปน้ำมันคุณภาพต่ำให้กลายเป็นน้ำมันหรือไขมันคุณภาพสูง เช่น การผลิตโคโคบัตเตอร์ (cocoa butter) จากส่วนสกัดที่เหลือจากน้ำมันปาล์ม เป็นต้น (Hasan et al., 2006)

2.1.4.3 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ในกระบวนการผลิตเครื่องหนังจะมีขั้นตอนการกำจัดไขมันและโปรตีนที่เสียรูปที่ติดอยู่บริเวณหนังและขนออก ซึ่งการกำจัดไขมันและโปรตีนออกจากหนังสัตว์โดยวิธีการทางเคมีจะมีประสิทธิภาพต่ำ (Seitz, 1974) แต่ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับเอนไซม์โปรติเอสในการกำจัดไขมันออกจากหนังสัตว์ (Figurin et al., 1990; Christner et al., 1991; Gandhi, 1997)

2.1.4.4 อุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก

เอนไซม์ไลเปสถูกใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของสารซักฟอกที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารซักฟอกในการขจัดคราบไขมันที่ฝังแน่นในเนื้อผ้าออกได้รวมทั้งใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาล้างทำความสะอาดเครื่องหนังและน้ำยาทำความสะอาดอื่นๆ อีกด้วย (Hasan et al., 2006)

2.1.4.5 อุตสาหกรรมการสังเคราะห์โพลีเอสเตอร์ธรรมชาติ

เอนไซม์ไลเปสสามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตสารประกอบที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ เช่น บิวทิลโอเลเอท (1-butylolate) ที่สังเคราะห์ได้โดยตรงจากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของบิวทานอล (butanol) และกรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งใช้เติมลงไปนํ้ามันดีเซลของประเทศเม็กซิโก เพื่อลดความหนืดของนํ้ามันดีเซล เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังสามารถนำมาเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อสังเคราะห์โพลีเอสเตอร์ (polyester) ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้อีกด้วย (Hasan et al., 2006)

2.1.4.6 อุตสาหกรรมอาหาร

การใช้เอนไซม์ไลเปสสามารถทำให้เกิดอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างต่อเนื่องและครบวงจรในปริมาณและคุณภาพสูง เช่น เอนไซม์ไลเปสทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ จึงช่วยในการลดความหนืด ในการสกัดสำหรับกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร โปรตีน เอนไซม์ช่วยในการตกตะกอนโปรตีน ย่อยสลายโปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมเนยแข็ง ลดความขุ่นในเบียร์ ไวน์ จะเห็นได้ว่า ไรการนำเอนไซม์มาใช้ 2 ลักษณะคือ ใช้ในกระบวนการแปรรูปและใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนั้นมาจาก 3 แหล่ง คือ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยการเลือกใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหารมีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องคำนึงถึง เช่น ความจำเพาะต่อปฏิกิริยา ค่าพีเอช อุณหภูมิ หาได้ง่าย และต้องมีราคาไม่สูงมาก (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547)

2.1.4.7 ทางเภสัชกรรมและด้านการแพทย์

เนื่องจากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุชีวภาพ ซึ่งทั้งสามองค์ประกอบนี้จะมีการนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย ได้มีความพยายามหาสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยการใช้สมบัติการคัดเลือกการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (selective esterification) ของเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการทำบริสุทธิ์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid หรือ PUFA) เช่น การทำบริสุทธิ์กรดโคโคซาอีแคโนอิก (docosahecaenoic acid; DHA) และกรดอีโคซาเพนเทนอิก (ecosapentaenoic acid; EPA)

จากน้ำมันปลาทูน่า ซึ่งมีบทบาทในการพัฒนาสมองและระบบประสาทสำหรับการมองเห็นของเด็กทารกในครรภ์ มารดา (Lawson and Hughes, 1988) และในทางการแพทย์นั้นจะใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาการติดตาม ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในเซรัมหรือการติดตามความผิดปกติของตับอ่อนได้เช่นกัน รวมทั้งใช้เป็นส่วประกอบของ ยาช่วยย่อยหรือยาที่ใช้รักษาโรคกระเพาะอีกด้วย (Hasan et al., 2006)

2.1.4.8 การประยุกต์ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

นิยมใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นแอคติเวทเตสสลัดจ์ (activated sludge) และใช้ในกระบวนการ บำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจนซึ่งจะใช้ในการกำจัดคราบไขมันที่ตกตะกอนอยู่ในแทงก์และยับยั้งการส่งถ่าย ออกซิเจนในน้ำเสีย (Kuo and Gardner, 2002)

2.1.4.9 การผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลคือเชื้อเพลิงทางเลือกสำหรับเครื่องยนต์ดีเซลจากปิโตรเลียมและเป็นการย่อยสลาย พลังงานหมุนเวียนและไม่เป็นพิษ ไบโอดีเซลคือ โมโนอัลคิล เอสเทอร์ (mono alkyl ester) ที่ได้จากกรดไขมันสาย ยาว ไบโอดีเซลที่ใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลและระบบทำความร้อนนั้นสามารถรองรับต่อความต้องการพลังงานในขณะที่ ราคา น้ำมันปิโตรเลียมเพิ่มสูงขึ้น ไบโอดีเซลสามารถผลิตจากน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมัน ดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันเมล็ดฝ้ายและสบู่ดำ ไขมันสัตว์ สหรัยและน้ำมันพืชที่ใช้แล้ว เป็นต้น โดยการ เร่งด้วยสารเคมี (chemocatalysis) เร่งด้วยอุณหภูมิ (thermocatalysis) และเร่งด้วยตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalysis) ต่อมาได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Chen et al., 2009; Dizge et al., 2009; Raita, Champreda and Laosiripojana, 2010) ซึ่งเอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซลนั้นมักมาจากแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas cepacia* (Li and Yan, 2008) ไบโอดีเซลต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นไมโครเอควิค (microaqueous) เพราะน้ำจะไม่ช่วยทำให้ เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน แต่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแทน ทำให้การผลิตไบโอดีเซลได้ผลผลิต น้อยถ้ามีน้ำในสัดส่วนที่มากเกินไป ดังนั้นจึงได้มีการใช้เอนไซม์ตรีงไลเปสมาทำงานในสภาวะที่ไม่มีตัวทำละลาย (Xu et al., 2009; Wang and Zhang, 2009) และได้มีการศึกษาการเข้ากันของสารและการปรับปรุงปฏิกิริยา เมทาโนไลซิส สำหรับผลิตไบโอดีเซล แต่เมทานอลสามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและยังทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ซึ่ง จะลดการผลิตไบโอดีเซลจึงมีการใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น เอโทนิเอก ลดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับเมทา นอล แต่ไปเพิ่มปฏิสัมพันธ์กับไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งกลุ่ฤทธิ์นี้สามารถปรับปรุงผลผลิตของไบโอดีเซลให้เพิ่มขึ้นได้ สำหรับกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลจะถูกแปลงเป็น 1,3 โพรเพนไดออล (1,3- propanediol) ซึ่งเป็นโมโนเมอร์สำหรับการสังเคราะห์โพลีเมอร์ใหม่ เช่น โพลีเมทิลีน เทเรพทาเลท (polymethylene terephthalate) โดยแบคทีเรียที่สามารถแปลงกลีเซอรอลเป็น 1,3 โพรเพนไดออลได้นั้นได้มี รายงานใน *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter* และ *Lactobacillus* เป็นต้น (Xu et al., 2009)

2.1.5 เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ *Acinetobacter baylyi*

ในปี พ.ศ. 2553 ทีมวิจัยของห้องปฏิบัติการชีวเคมีสิ่งแวดล้อมและจุลินทรีย์บำบัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียทนเบนซีน (benzene) จากตะกอนทะเลบริเวณ สะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี และทำการจำแนกสายพันธุ์เป็น *Acinetobacter baylyi* ซึ่งเป็นสายพันธุ์

แบคทีเรียที่ได้รับความนิยมนำมาประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรม สิ่งแวดล้อม และเทคโนโลยีชีวภาพ (Snellman and Colwell, 2004) *A. baylyi* ที่คัดแยกได้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 4.41 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้น 16,142 เท่า เมื่อมีการเติมตัวเหนี่ยวนำ Tween80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยง (Uttatree and Charoenpanich, 2011) เมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปส 21.89 เท่าด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นเกลืออิมตัวร้อยละ 60-70 และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบคัดกรองขนาด Sephadex G75 พบเอนไซม์ไลเปสน้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์โดยประมาณ 30 กิโลดาลตัน และแสดงกิจกรรมสูงสุดของสับสเตรทพาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 8.0 เอนไซม์ไลเปสมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 6.0-9.0 และมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดโดยเฉพาะเบนซีนและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) เอนไซม์ไลเปสยังคงรักษาความเสถียรได้มากกว่าร้อยละ 60 เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีตัวทำละลายเดคเคน (decane) เฮกเซน (hexane) อะซีโตนไนไตรล์ (acetonitrile) และแอลกอฮอล์สายสั้น เช่นเมทานอล และเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นานถึง 12 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ในสภาวะที่มี Fe^{2+} , Mn^{2+} , EDTA, SDS และ Triton X-100 ขณะที่ PMSF Na^+ และ Mg^{2+} เพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ สำหรับความจำเพาะต่อสับสเตรทนั้น เอนไซม์ชอบที่จะสลายกรดไขมันที่มีความยาวของสายคาร์บอนระหว่าง 8-12 อะตอม นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ของกรดไขมัน (ไบโอดีเซล) ได้ร้อยละการเปลี่ยน (% conversion) ที่ 31.64 เมื่อทำปฏิกิริยาได้ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รวมทั้งแสดงความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับน้ำมันธรรมชาติหลายชนิด โดยเฉพาะน้ำมันที่มีองค์ประกอบเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเช่น น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันงา และน้ำมันมะพร้าว เป็นต้น (Uttatree et al., 2010)

2.1.6 การตรึงเอนไซม์ (Ramachandra et al., 2002 และ จิตติมา เจริญพานิช, 2553)

การตรึงรูปเอนไซม์นั้นเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ.1953 แต่ได้มีการนำมาใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมในปี ค.ศ.1969 ซึ่งมีการนำเอนไซม์ตรึงมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ยา และสารเคมี เป็นต้น และถึงแม้ว่าในปัจจุบันการใช้เอนไซม์ไลเปสจะมีไม่ถึงร้อยละ 3 ของเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้นทั้งหมดในโลก แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการเปลี่ยนไขมันและน้ำมันก็กำลังเป็นที่สนใจในปัจจุบัน และการใช้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปตรึงก็จะมีประสิทธิภาพและความคุ้มค่ามากกว่าการใช้เอนไซม์ในรูปอิสระ โดยการตรึงเอนไซม์ไลเปสเป็นการเพิ่มความเสถียรในการพัฒนานำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ซึ่งเคยมีรายงานพบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปนั้นสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้สูงประมาณ 20 ครั้ง และการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปก็เป็นการลดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ แต่ข้อด้อยหลักของเอนไซม์ตรึงรูปคือ อาจมีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ไปบางส่วนและมีข้อจำกัดในเรื่องการแพร่ผ่านของสับสเตรท และอาจจะมีเอนไซม์รั่วหรือหลุดออกจากตัวค้ำจุนได้ ในปัจจุบันการตรึงเอนไซม์สามารถทำได้หลายรูปแบบดังนี้

2.1.6.1 การตรึงเอนไซม์แบบดูดซับ (adsorption)

การตรึงเอนไซม์แบบดูดซับเป็นวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ที่ง่ายที่สุดโดยจะเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวค้ำจุนกับเอนไซม์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะดูดซับกันด้วยแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) โดยที่ไม่มีสารเคมีไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตัวค้ำจุนและเอนไซม์ ซึ่งข้อดีคือ มีราคาถูก และเป็นวิธีที่ง่ายและ

รวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือเอนไซม์อาจจะหลุดออกจากตัวค้ำจุน และตัวค้ำจุนอาจจะทำให้เกิดการจับกันอย่างไม่จำเพาะได้ ตัวค้ำจุนที่นิยมนำมาตรึงเอนไซม์แบบดูดซับนี้มีทั้งสารอนินทรีย์ เช่น แอคติเวทเตทคาร์บอน (activated carbon) และซิลิกา (silica) หรือ สารอินทรีย์ คือวัสดุธรรมชาติ หรือ โพลีเมอร์ที่สังเคราะห์จากธรรมชาติ

2.1.6.2 การตรึงเอนไซม์แบบยึดจับด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding)

การตรึงเอนไซม์แบบยึดจับด้วยพันธะไอออนิกเป็นวิธีการตรึงเอนไซม์โดยอาศัยแรงทางไฟฟ้า คือ พันธะไอออนิกและพันธะไฮโดรเจนระหว่างประจุที่ต่างกันของตัวค้ำจุนกับเอนไซม์ ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียคล้ายกับการตรึงแบบการดูดซับ แต่การจับกันด้วยแรงทางประจุนั้นจะมีความแข็งแรงกว่าการตรึงแบบดูดซับแต่น้อยกว่าการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยทั่วไปตัวค้ำจุนที่นิยมมาตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ DEAE-cellulose หรือ DEAE-Sephadex เป็นต้น

2.1.6.3 การตรึงเอนไซม์แบบยึดจับด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding)

การตรึงเอนไซม์แบบนี้อาศัยพื้นฐานโครงสร้างที่มีการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนบางตัวบนผิวของเอนไซม์และตัวค้ำจุน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วตัวค้ำจุนจะต้องมีการกระตุ้นด้วยสารที่จำเพาะ ที่ทำให้หมู่ฟังก์ชันมีความเป็นอิเล็กโตรฟิลิก (electrophilic) มากๆ ในขณะที่หมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนบนผิวเอนไซม์มีความเป็นนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic) มากๆ เช่นกัน ซึ่งข้อดีของการตรึงเอนไซม์แบบโควาเลนต์นั้นมีความแข็งแรงมากและการตรึงมีความเสถียร ส่วนข้อเสียนี้เป็นวิธีที่มีราคาแพงและได้ผลผลิตต่ำ

2.1.6.4 การตรึงเอนไซม์แบบเชื่อมข้าม (cross-linking)

การตรึงเอนไซม์แบบนี้ตัวค้ำจุนจะมีความเป็นอิสระสูง ส่วนเอนไซม์นั้นจะมีการเชื่อมต่อระหว่างกันเอง โดยการเกิดพันธะนั้นก็เกิดจากการใช้สารเคมีช่วยเช่น กลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) แต่ข้อเสียของการตรึงแบบเชื่อมข้ามคือจะให้ผลผลิตในการตรึงต่ำมากอีกทั้งความเสถียรก็ต่ำเช่นกัน

2.1.6.5 การตรึงเอนไซม์แบบดักเก็บ (entrapment)

วิธีนี้เป็นการตรึงรูปเอนไซม์โดยกับเก็บเอนไซม์อิสระไว้ในรูพรุนของตัวค้ำจุน โดยตัวค้ำจุนนั้นอาจจะมาจากการสังเคราะห์โพลีเมอร์จากสารเคมี หรือแอคติเวทเตท คาร์บอน ซึ่งข้อเสียของการตรึงด้วยวิธีดักเก็บนั้นตัวค้ำจุนจะเป็นตัวขัดขวางการขนส่งมวล (mass transfer) หรือยากต่อการเข้าถึงของสับสเตรท

2.1.6.6 การตรึงเอนไซม์แบบกักเก็บ (encapsulation)

การกักเก็บเอนไซม์นั้นตัวค้ำจุนที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน ซึ่งปกติแล้วแคปซูลขนาดเล็กที่ใช้กักเก็บเอนไซม์จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-100 ไมโครเมตร ทำให้โปรตีนขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าออกแคปซูลได้ แต่สับสเตรทขนาดเล็กและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะสามารถผ่านเยื่อเลือกผ่านได้อิสระ แต่มีข้อเสียคือมีปัญหาในเรื่องการแพร่ของสับสเตรท ส่วนข้อดีคือสามารถตรึงร่วมกันได้ระหว่างเอนไซม์หรือเซลล์ที่ต่างกัน การเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์นั้นจะต้องอยู่บนพื้นฐานของกระบวนการจำเพาะสำหรับการเร่ง และประกอบกับตัวแปรของกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด ประสิทธิภาพของการใช้เอนไซม์ การเสื่อมและวิธีการนำกลับมาใช้ใหม่ ค่าใช้จ่ายในการตรึง ความเป็นพิษของสารเคมี และสมบัติของเอนไซม์ไลเฟส

2.2 ขอบเขตของการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยตลอดโครงการวิจัยนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก คือ (1) การคัดเลือกวัสดุค้ำจุนราคาถูกลงที่เหมาะสมจะนำมาตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* (2) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวัสดุค้ำจุนที่คัดเลือกได้และวัสดุค้ำจุนที่มีขายทางการค้า (ใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบ) และ (3) การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะและความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมได้ รวมทั้งการทดลองใช้เอนไซม์ตรึงไลเปสที่เตรียมได้เร่งในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถสรุปแผนงานตลอดโครงการได้ดังภาพที่ 4

การคัดเลือกวัสดุค้ำจุนราคาถูกลงที่เหมาะสมจะนำมาตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi*



การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ด้วยวัสดุค้ำจุนที่คัดเลือกได้และวัสดุค้ำจุนที่มีขายทางการค้า



การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะและความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมได้จากวัสดุค้ำจุนที่คัดเลือกได้และวัสดุค้ำจุนที่มีขายทางการค้า



การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เตรียมได้กับของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่มีขายทางการค้า

ภาพที่ 4 ภาพรวมขอบเขตของการดำเนินการวิจัยในโครงการ

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 *Acinetobacter baylyi* และสภาวะการเพาะเลี้ยง

แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในครั้งนี่คือ *Acinetobacter baylyi* ที่คัดแยกได้จากตะกอนทะเลบริเวณใกล้สะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ (Uttatree et al., 2010) สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว LB เจือจาง 5 เท่า (0.2 x Luria-Bertani broth ที่ประกอบด้วย Bacto-tryptone ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) NaCl ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ Yeast extract ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ค่าพีเอช 7.2) และมี Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (Uttatree and Charoenpanich, 2011)

3.2 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi*

เลี้ยงเชื้อเจริญตามสภาวะในการเลี้ยงที่อธิบายมาในหัวข้อ 3.1 ทำการปั่นแยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายเอนไซม์อยู่ (เรียกส่วนใสที่ได้ว่า สารละลายเอนไซม์ไลเปสตั้งต้น) ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการกรองสารละลายเอนไซม์ตั้งต้นที่ได้ด้วยเมมเบรนขนาดคัดกรอง 0.45 ไมโครเมตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีที่จะอธิบายต่อไป

3.3 การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสและการวัดปริมาณโปรตีน

3.3.1 การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจะใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรพารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate; *p*-NPP) ที่ให้ผลิตภัณฑ์คือ พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol; *p*-NP) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยการติดตามการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงอย่างต่อเนื่องภายในเวลา 5 นาที เทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล (ภาคผนวกที่ 1) ทำปฏิกิริยาโดยใช้ *p*-NPP ความเข้มข้น 16.5 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในไอโซโพรพานอล (isopropanol) และผสมกับบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ค่าพีเอช 8.0 ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 ส่วน บ่มสารผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเปิดสารผสม 180 ไมโครลิตร ลงไมโครเพลตรีดเดออร์ที่มีสารละลายเอนไซม์ไลเปส 20 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ *p*-NPP เป็น *p*-NP 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการวิเคราะห์ (Pencreac'h and Baratii, 1996) ทุกการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้งและแสดงในรูปค่าเฉลี่ยพร้อมส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สำหรับการศึกษาการนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรีงจะใช้การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเพสจากปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการสลายน้ำมันปาล์มด้วยการไทเทรต โดยนำเอนไซม์ไลเพสตรีงรูป 0.1 กรัม มาใส่ลงในสารละลายสารตั้งต้นที่ประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 5 มิลลิลิตรที่ละลายในกัมอะราบิก (Gum arabic) ร้อยละ 0.4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ Tris-HCl ค่าพีเอช 8.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่าความเร็วในการกวนที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์หาค่าแอกติวิตีด้วยวิธีการไทเทรตกับ 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติฟีนอล์ฟทาลีนจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีชมพู (Yan et al., 2007) กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ปล่อยกรดไขมัน 1 ไมโครโมลต่อเวลา 1 นาที วิธีการคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์แสดงในภาคผนวกที่ 2

3.3.2 การวัดปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนดำเนินการโดยวิธีของ Bradford โดยการผสมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรกับสารแบรดฟอร์ด (Bradford reagent; BioRad) ปริมาตร 245 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรและคำนวณเทียบความเข้มข้นโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบรินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) ในภาคผนวกที่ 3 ซึ่งจะวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์และปริมาณของโปรตีนในน้ำล้างหลังจากการตรีง หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ติดอยู่บนตัวค้ำจุน

3.4 การเตรียมตัวค้ำจุนทางการค้า

การทดลองนี้จะทำการตรีงรูปเอนไซม์ไลเพสโดยวิธีการดูดซับ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่อาศัยการจับกันระหว่างเอนไซม์และตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็งด้วยการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) แรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic Interaction) หรือ แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ประเภทของตัวค้ำจุนที่เหมาะสมสำหรับการตรีงเอนไซม์ไลเพส คือตัวค้ำจุนประเภทไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เนื่องจากตัวค้ำจุนประเภทนี้จะไม่ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสที่เกิดจากการดูดซับกลีเซอรอลไว้บนผิวของตัวค้ำจุน (Wang et al., 2006) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกตัวค้ำจุนไฮโดรโฟบิกที่มีขายทางการค้าจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ XAD-2, XAD-4, XAD-7HP, FXP66 และตัวค้ำจุน Sephadex G-75 ที่ทำจากวัสดุที่ต่างกัน และมีขนาดและพื้นผิวที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) มาทดสอบการตรีงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ในสถานะที่มีและไม่มีกรกระตุ้นด้วยเมทานอล (สำหรับการกระตุ้นตัวค้ำจุนด้วยเมทานอลจะทำกับตัวค้ำจุนทุกชนิด ยกเว้น Sephadex G-75) ในการกระตุ้นจะเติมเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อตัวค้ำจุน 1 กรัม ทำการกวนที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกำจัดเมทานอลออกโดยการล้างตัวค้ำจุนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 8.0 ด้วยความเร็ว 350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นในสถานะเดิม นำตัวค้ำจุนที่ผ่านการกระตุ้นมากรองผ่านกระดาษกรองแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรีงรูปเอนไซม์ สำหรับตัวค้ำจุนที่ไม่มีกรกระตุ้นด้วยเมทานอลนั้นสามารถนำมาใช้ในการตรีงรูปเอนไซม์ไลเพสในสถานะที่เหมาะสมต่อการตรีงที่จะกล่าวต่อไป

ตารางที่ 2 สมบัติของตัวค้ำจุนทางการค้าประเภทไฮโดรโฟบิก

ตัวค้ำจุน	ชนิดของเมทริกซ์	พื้นที่ผิว (ตารางเมตรต่อกรัม)	ขนาดรูพรุน (อังสตรอม)	ขนาดของอนุภาค (ไมครอน)
XAD-2	PolystyreneDVB	300	90	650
XAD-4	PolystyreneDVB	750	100	640
XAD-7HP	Aliphatic ester	500	450	560
FPX66	Macroreticular aromatic polymer (Formophenolic)	200	600	700
Sephadex G-75	Dextran with epichlorohydrin	550	400	20-300

3.5 การเตรียมตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางธรรมชาติ

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกวัสดุเหลือทิ้งทางธรรมชาติจำนวน 2 กลุ่มมาทำการศึกษา ได้แก่

1) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จำนวน 7 ชนิด คือ ชั่งข้าวโพด, แกลบข้าวสาร, กิ่งไทรยอดทอง (*Ficus microcarpa* L.f.), หยวกกล้วย, ทางต้นปาล์มทางกระรอก (*Wodywtia bifurcate* A. K. Irvine), กิ่งระกำ (*Salacca wallichiana*) และกากมะพร้าว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงสีข้าวในจังหวัดลพบุรี ไร่ข้าวโพด จังหวัดราชบุรี และจากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี

2) เศษอาหาร จำนวน 4 ชนิด คือ เปลือกไข่ เปลือกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) เปลือกปูทะเล (*Scylla serrata*) และเปลือกหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านค้าบริเวณรอบมหาวิทยาลัยบูรพา และตลาดหนองมน

โดยมีการเตรียมตัวค้ำจุนที่ทั้ง 2 ประเภท โดยวิธีต่างกันดังนี้

3.5.1 การเตรียมตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

การเตรียมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเริ่มดำเนินการโดยทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมากับวัสดุด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำไปอบแห้งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แล้วนำมาผึ่งให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 อาทิตย์ ทำการบดด้วยครกหินและทำให้มีขนาดเล็กลงด้วยการปั่น จากนั้นนำไปคัดแยกขนาดด้วยการร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาดคัดกรอง 0.1 และ 0.5 มิลลิเมตร นำวัสดุค้ำจุนที่ผ่านการคัดแยกขนาดแล้วมาพรีทรีท (pretreatment) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มอล เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินออก ปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยการล้างกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และน้ำกลั่น ตามลำดับ ขณะล้างจะกวนที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แบ่งมากระตุ้นด้วยเมทานอลจำนวนหนึ่งแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาเตรียมรูปเอนไซม์ในลำดับต่อไป ลักษณะของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้แสดงดังตารางที่ 3









ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่พร้อมใช้ในการตรึงไนโตรเจนจาก *A. baylyi*

ชนิด	ขนาด 0.1 มิลลิเมตร	ขนาด 0.5 มิลลิเมตร
กาก มะพร้าว		
กิ่งระกำ		
แกลบ ข้าวสาร		
ซัง ข้าวโพด		
กิ่งไทร ยอดทอง		
หยวก กล้วย		

3.5.2 การเตรียมตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหาร

นำเศษอาหารที่คัดเลือกมาทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกด้วยน้ำสะอาด จากนั้นแช่ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำปราศจากไอออน 1 ครั้ง และนำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที เทน้ำกลั่นออก จากนั้นผึ่งให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะได้ตัวอย่างที่มีลักษณะของแข็งแห้งกรอบ ทำการคัดแยกขนาดโดยการบดด้วยครกและร่อนด้วยตะแกรงร่อนแบ่งเป็นสองขนาดตามขนาดของตะแกรงร่อนคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 และ 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาพริทด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินออก ปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และตามด้วยน้ำกลั่น โดยการกวนที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองแล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแบ่งมากระตุ้นด้วยเมทานอลก่อนนำมาตรึงรูปแอนไฮม์ในลำดับต่อไป ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารที่พร้อมใช้ในการตรึงแอนไฮม์ไลเฟสจาก *A. baylyi*

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะของตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารที่พร้อมใช้ในการตรึงแอนไฮม์ไลเฟสจาก *A. baylyi*

ชนิด	ขนาด 0.1 มิลลิเมตร	ขนาด 0.5 มิลลิเมตร
เปลือกกุ้ง แซบวีย		
เปลือกไข่		
เปลือกปู ทะเล		
เปลือก หอยแมลงภู		

3.6 การคัดเลือกตัวค้ำจุนทางการค้าและตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดูธรรมชาติที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi*

นำตัวค้ำจุนที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.5 ไปตรึงกับเอนไซม์ไลเปสของ *A. baylyi* ในอัตราส่วนตัวค้ำจุน 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วัดค่าแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนตามวิธีในหัวข้อ 3.3 และนำมาคำนวณหาค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ (% relative activity) และค่าแอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) รวมทั้งร้อยละการโหลดโปรตีน (% protein loading) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการตรึง (immobilization efficiency) ดังสมการข้างล่างนี้ เพื่อหาชนิดตัวค้ำจุนที่ให้ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมาทำการทดสอบต่อไป

$$\text{ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ (ไมโครโมล/นาที่/กรัมของตัวค้ำจุน)} = \frac{\text{ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป}}{\text{ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ใช้}}$$

เลือกตัวค้ำจุนที่ให้ค่าประสิทธิภาพในการตรึงสูงที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนทางการค้าและตัวค้ำจุนธรรมชาติ

ทำการศึกษาผลของปัจจัยที่คาดว่าจะส่งผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ ความเร็วในการกวน ค่าพีเอช และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ ซึ่งจะดำเนินการทดลองโดยกำหนดร้อยละการโหลดโปรตีนให้อยู่ในช่วงร้อยละ 60-90 และค่าประสิทธิภาพในการตรึงให้อยู่ในช่วงร้อยละ 90-95 ดำเนินการทดลองดังนี้

3.7.1 ผลของความเร็วในการกวนที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

ความเร็วที่ใช้ในการกวนขณะตรึงเอนไซม์ไลเปสที่นำมาศึกษาคือที่ความเร็ว 200, 250, 300, 350 และ 400 รอบต่อนาที โดยจะใช้อัตราส่วนตัวค้ำจุนทางการค้าหรือตัวค้ำจุนทางธรรมชาติ 1 กรัมต่อเอนไซม์ไลเปส 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปหาร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงเพื่อเลือกค่าความเร็วที่เหมาะสมที่สุดมาทำการทดลองต่อไป

3.7.2 ผลของค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่ละลายในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกันระหว่าง 4.0 และ 11.0 บัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ อะซิเตท (acetate) ค่าพีเอช 4.0-5.0, ฟอสเฟต (phosphate) ค่าพีเอช 6.0-8.0, Tris-HCl ค่าพีเอช 8.0-9.0 และคาร์บอเนต (carbonate) ค่าพีเอช 10.0-11.0 นำไปเขย่าที่ความเร็วที่เหมาะสมที่หาได้จากข้อ 3.7.1 ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง คำนวณค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึง เพื่อเลือกค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.7.3 ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

เมื่อได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์แล้ว ทำการทดสอบผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ ซึ่งตัวค้ำจุนทางการค้าจะใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ค่าพีเอช 8.0 สำหรับกิงระกำและเปลือกไข่ จะใช้

บัฟเฟอร์ Tris-HCl ค่าพีเอช 7.0 และบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ค่าพีเอช 6.0 ตามลำดับ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ นำไปคำนวณร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ตรงเพื่อเลือกความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมาทำการทดลองต่อไป

3.7.4 ผลของความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

การทดสอบความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ตรงที่เหมาะสมจะใช้โปรตีนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชและความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.7.2 และ 3.7.3) นำไปคำนวณค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ตรงเพื่อเลือกความเข้มข้นโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดมาทำการทดลองต่อไป

3.7.5 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์

ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ศึกษาคือ ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส นำไปคำนวณร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ตรงเพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์

3.8 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) นั้นจะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนรุ่น Leo1450VP ที่ต่อเข้ากับตัวให้กำเนิดพลังงานแสง (energy dispersive spectroscopy; EDS) โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ดังนี้คือ ความดัน 1.3×10^{-2} Pa และความละเอียด < 10 นาโนเมตร ที่กำลังไฟฟ้าเท่ากับ 15 กิโลวัตต์

3.9 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เตรียมได้

นำเอนไซม์ที่ตรงไลเปสที่ได้จากหัวข้อ 3.7 มาศึกษาคุณลักษณะเฉพาะ โดยการทำให้ซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ดังนี้

3.9.1 การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ตรง

การหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ตรงที่เตรียมได้ จะทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ตรง เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ค่าพีเอชต่างกัน ตั้งแต่ 3.0 ถึง 13.0 และรายงานผลการทดลองเป็นค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ โดยใช้ผลของค่าพีเอชที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดเป็นชุดเปรียบเทียบ คือ ร้อยละ 100 ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ อะซิเตท (acetate, pH 3.0-5.0) ฟอสเฟต (phosphate, pH 6.0-7.0) ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 7.0-9.0) และคาร์บอเนต (carbonate, pH 10.0-13.0)

3.9.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ตรง

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ตรงจะทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 20-80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า

ที่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา (ค่าพีเอชเท่ากับ 9.0) และรายงานผลการทดลองเป็นค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ โดยใช้ผลของค่าแอกติวิตีสู่สูงที่สุดเป็นชุดเปรียบเทียบ คือ ร้อยละ 100

3.9.3 การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์

ผสมเอนไซม์ตรึงไลเพสที่เตรียมได้กับตัวทำละลายอินทรีย์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหย (evaporation) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเพสที่เหลืออยู่ (residual activity) จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 9.0 โดยการเปรียบเทียบค่าแอกติวิตีกับชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมตัวทำละลายอินทรีย์

3.9.4 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน

ผสมน้ำมันปาล์ม 1 กรัมกับเอนไซม์ตรึงไลเพส ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และเติมเมทานอลลงไปให้อัตราส่วนโมล (mol ratio) เท่ากับ 1:3 (ความเข้มข้นร้อยละ 3 ปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมสารละลายให้เกิดปฏิกิริยาด้วยการกวนที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (high-performance liquid chromatography) รุ่น LC-20A (Shimadzu Corp., Kyoto) ที่ประกอบด้วยคอลัมน์ Apollo Silica 5U (250 mm x 4.6 mm x 5 μm) ของ Alltech (Deerfield, IL, USA) และตัวตรวจรับ ELSD-LT Evaporative Light Scattering Detector (Shimadzu Corp., Kyoto) ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) 2 ระบบคือ เฟส A ประกอบด้วยเฮกเซน (hexane) โพรพานอล (2-propanol) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) และกรดฟอร์มิก (formic acid) ในอัตราส่วน 80:10:10:0.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเฟส B คือ เฮกเซนและกรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 100:0.05 ปริมาตรต่อปริมาตร ใช้อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใส่ในระบบ (injection volume) เท่ากับ 20 มิลลิลิตร จะใช้การชะของเฟสเคลื่อนที่แบบเกรเดียนต์เส้นตรง (linear elution gradient) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเฟส A จากร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 98 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในเวลา 20 นาที และผสมเฟสเคลื่อนที่ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายคือ เฟส A:B เท่ากับ 98:2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในเวลา 3 นาที และกลับสู่สถานะเริ่มต้นโดยการผ่านเฟสเคลื่อนที่ A:B เท่ากับ 1:99 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เข้าสู่คอลัมน์เป็นเวลา 15 นาที รายงานประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเป็นค่าร้อยละการเปลี่ยนสับสเตรทน้ำมันปาล์มเป็นเมทิลเอสเทอร์ (% conversion) ซึ่งหมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methyl ester; FAME) หรือไบโอดีเซลที่เกิดขึ้นกับปริมาณกลีเซอไรด์ (glyceride) ที่เหลือในปฏิกิริยา (แสดงวิธีคำนวณในภาคผนวกที่ 4)

3.10 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงที่เตรียมได้

3.10.1 ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึง

เมื่อเตรียมเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปในสถานะที่เหมาะสมต่อการตรึงแล้ว จะทำการทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาต่อจำนวนกรัมของเอนไซม์ตรึงที่ใช้ โดยจะใช้เอนไซม์ไลเพสตรึงรูปที่เตรียมได้ปริมาณ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 กรัม บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ค่าพีเอช 8.0 ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส ด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองส่วนใสออกมาวัดแอกติวิตีของ เอนไซม์ไลเปสด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสับสเตรท p-NPP ตามที่ได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อ 3.3 เลือกร้อยละของ เอนไซม์ที่เตรียมไว้และให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุดมาทำการทดลองต่อไป

3.10.2 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่เตรียม

แบ่งเก็บเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง 25-32 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างกันและติดตามค่าแอกติวิตีคงเหลือ (residual activity) โดยเทียบค่าแอกติวิตีเริ่มต้นเท่ากับ ร้อยละ 100 เปรียบเทียบค่าแอกติวิตีที่ได้กับของเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้จากวัสดุค้ำจุนที่มีขายทางการค้า และเอนไซม์ไลเปสในรูปอิสระ

3.10.3 การนำเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้มาทดสอบการใช้ซ้ำ

นำเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้มาทดสอบการใช้ซ้ำโดยดูจากประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์มไปเป็นกรดไขมันอิสระ ด้วยวิธีการไทเทรตกับ 50 มิลลิโมลาร์ NaOH และใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ตามวิธีในหัวข้อ 3.3 เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นทำการแยกเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้ออกจากสับสเตรทด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองและล้างด้วยอะซีโตน 1 ครั้ง เพื่อกำจัดไขมันออก ตามด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 7.0 และน้ำกลั่นตามลำดับ นำมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในรอบต่อไป และติดตามค่าแอกติวิตีคงเหลือโดยเทียบค่าแอกติวิตีของการใช้ในรอบที่ 1 เป็นร้อยละ 100 เปรียบเทียบความเป็นไปได้ในการใช้ซ้ำเป็นจำนวนรอบของการใช้เทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้ทางการค้า Novozyme 435 และเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่เตรียมด้วยวัสดุค้ำจุนที่มีขายทางการค้า

บทที่ 4

ผลการวิจัย

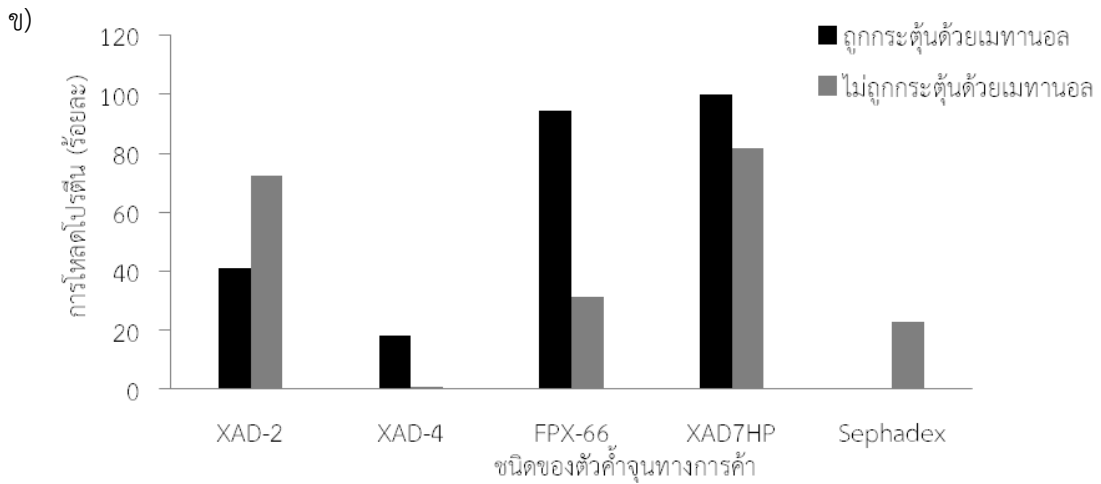
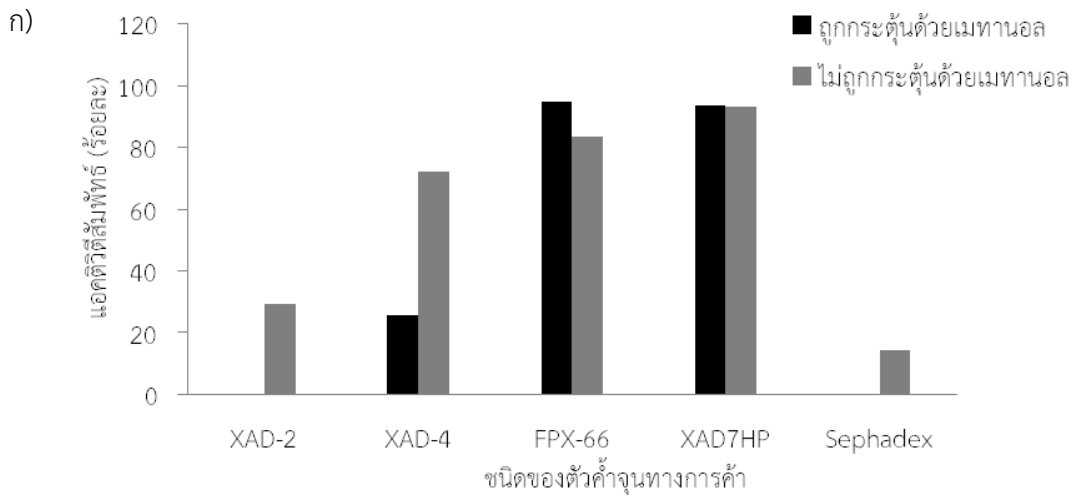
4.1 การคัดเลือกตัวค้ำจุนทางการค้าที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi*

ตัวค้ำจุนทางการค้าที่นำมาทดสอบมีทั้งสิ้น 5 ชนิด ได้แก่ XAD-2, XAD-4, FPX-66, XAD7HP และ Sephadex G-75 ที่ทำการแยกเป็น 2 กลุ่มทดสอบคือ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเมทานอลและกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเมทานอล ผลการทดลองพบว่าการกระตุ้นตัวค้ำจุนด้วยเมทานอลทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปสลดลง ยกเว้นกับตัวค้ำจุน FPX-66 และ XAD7HP โดยพบค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลเท่ากับ 93.65 ซึ่งให้ค่าที่สูงใกล้เคียงกับการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวค้ำจุน FPX-66 ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล ที่มีร้อยละของแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 94.98 ดังแสดงในภาพที่ 5ก แต่เมื่อพิจารณาจากค่าร้อยละการไหลดโพรตีน (ภาพที่ 5ข) พบว่า XAD7HP ให้ค่าร้อยละการไหลดโพรตีนสูงสุดเท่ากับ 99.85 ซึ่งสูงกว่าที่ได้ในของ FPX-66 ที่ให้ค่าร้อยละการไหลดโพรตีนเท่ากับ 94.98 ขณะที่ตัวค้ำจุนทางการค้าอีก 3 ชนิดให้ค่าร้อยละการไหลดโพรตีนและแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ต่ำกว่า ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า XAD7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นตัวค้ำจุนทางการค้าสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* และเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเอนไซม์ต่อไป

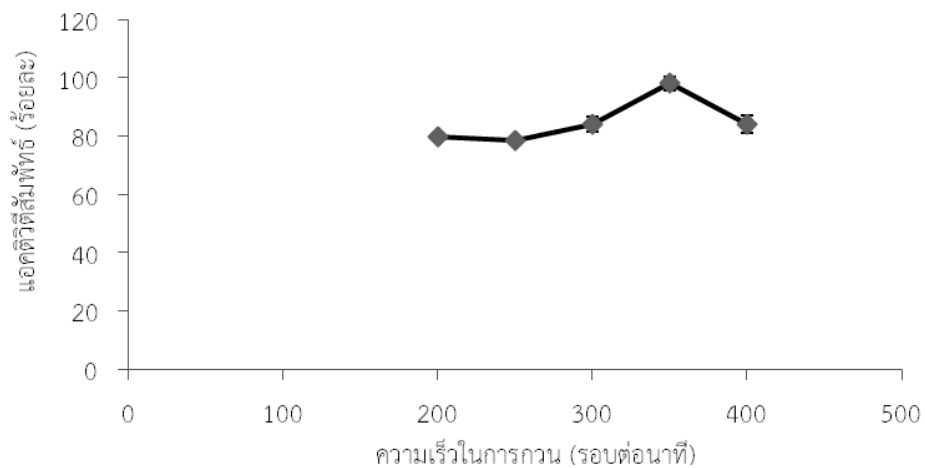
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนทางการค้า XAD7HP

4.2.1 ผลของค่าความเร็วในการกวนที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

นำตัวค้ำจุนทางการค้า XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลมาทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* โดยพิจารณาค่าความเร็วในการกวนขณะตรึงเอนไซม์เป็นพารามิเตอร์แรก ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนขณะตรึง เอนไซม์ตรึงไลเปสจะมีค่าแอกติวิตีเพิ่มขึ้น และให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุดที่ค่าความเร็วในการกวนเท่ากับ 350 รอบต่อนาที คือเท่ากับร้อยละ 93.16 แต่เมื่อเพิ่มค่าความเร็วในการกวนมากขึ้น จะส่งผลให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงไลเปสมีค่าลดลงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 6



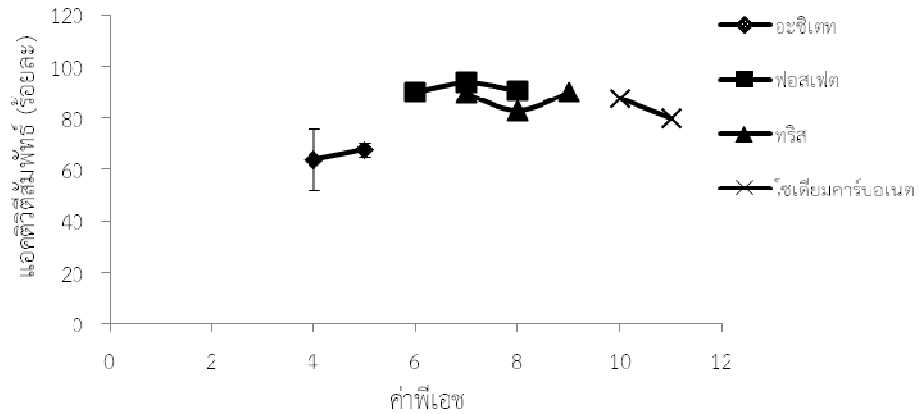
ภาพที่ 5 ค่าแอคทีวิตีสัมพัทธ์ (ก) และร้อยละการไหลคโพรตีน (ข) ของเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกดูดซับบนตัวค้ำจุนทางการค้า 5 ชนิด



ภาพที่ 6 ผลของความเร็วในการกววนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล

4.2.2 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์

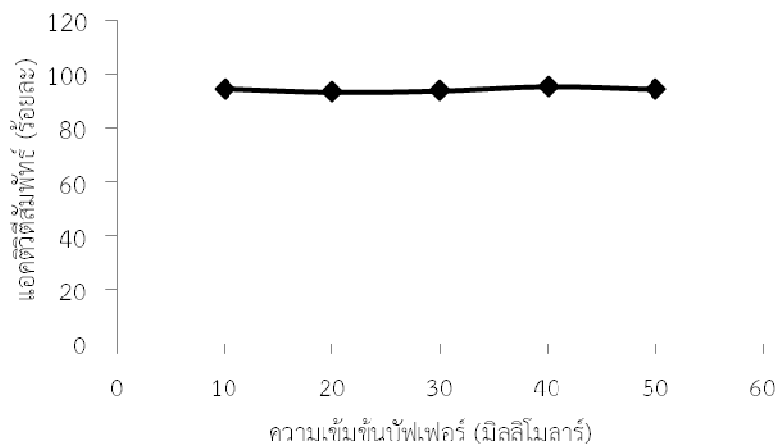
การหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* โดยใช้ความเร็ว 350 รอบต่อนาที พบว่าเอนไซม์ตรึงไลเปสถูกดูดซับและเร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางค่อนข้างไปทางด่าง (ค่าพีเอช 6-10) โดยให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดที่สุดเมื่อทำการตรึงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 โดยมีแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 93.65 ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล

4.2.3 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

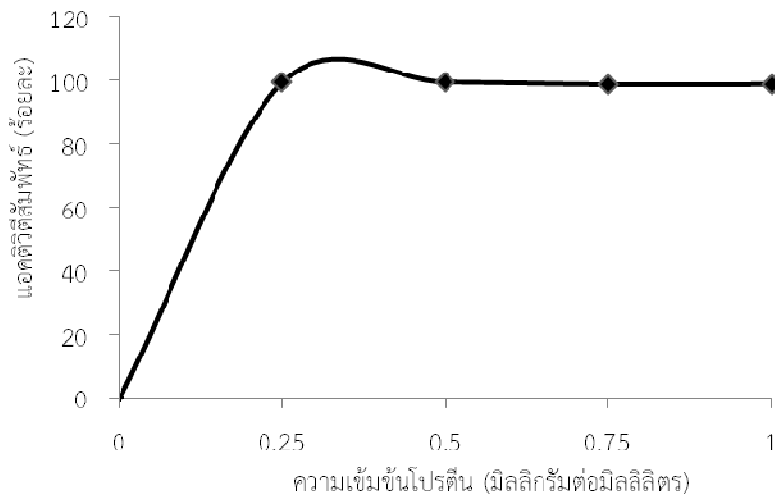
เมื่อได้ชนิดและค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวค้ำจุน XAD-7HP แล้วจะนำมาหาความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรึง จากภาพที่ 8 พบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่างๆ ให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไม่ต่างกันมาก โดยที่ความเข้มข้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดที่สุดเท่ากับร้อยละ 95.52



ภาพที่ 8 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล

4.2.4 ผลของความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่อการตรึงเอนไซม์

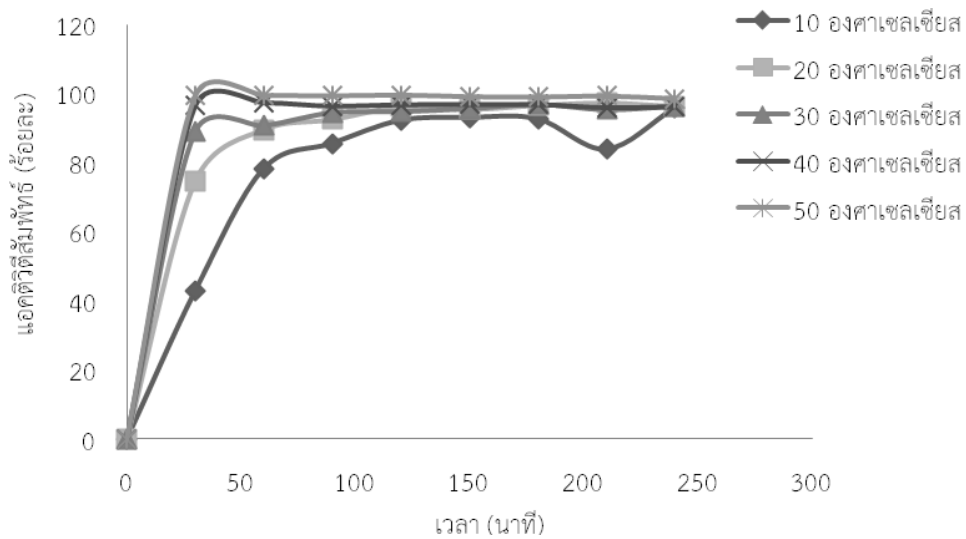
นำสภาวะที่หาได้จากหัวข้อที่ 4.2.1 ถึง 4.2.3 มาใช้เพื่อหาความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึง ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงและให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด (ร้อยละ 95.55) ที่ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจะเริ่มคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนมากกว่า 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนประเภท XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล

4.2.5 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์

การติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงไลเพสที่อุณหภูมิและเวลาต่างกันพบว่า เอนไซม์ตรึงจะมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ ที่เวลา 60 นาที ในทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา ยกเว้นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสที่จะมีค่าแอกติวิตีคงที่ ที่เวลา 120 นาที ดังแสดงในภาพที่ 10 และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงที่เตรียมได้ในสภาวะต่างกันพบว่า การตรึงที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่าที่ใกล้เคียงกันซึ่งไม่แตกต่างจากค่าแอกติวิตีที่ได้จากการตรึงที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์จึงเลือกการตรึงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลต่อไป



ภาพที่ 10 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล

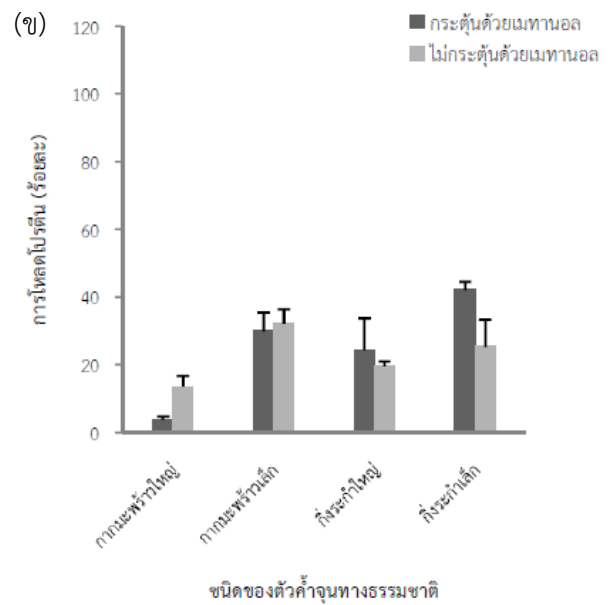
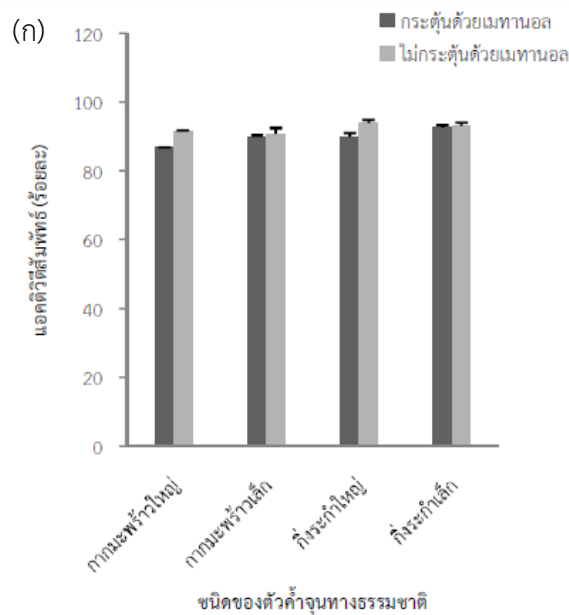
4.3 การคัดเลือกตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางธรรมชาติที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi*

4.3.1 การคัดเลือกตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์

การตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ด้วยตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้น เมื่อเทียบค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุนแต่ละชนิด (ตารางที่ 5) พบว่าตัวค้ำจุนทางธรรมชาติที่มีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* คือ กิ่งระกำขนาด 0.5 มิลลิเมตรที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล โดยให้ค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์สูงสุดเท่ากับ 93.81 และมีร้อยละการโพลด์โปรตีนเท่ากับ 25.41 ขณะที่ตัวค้ำจุนกิ่งระกำขนาดเล็กที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลนั้นให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์และร้อยละการโพลด์โปรตีนเท่ากับ 92.49 และ 42.16 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่น้อยกว่าของกิ่งระกำขนาดใหญ่เล็กน้อย ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 11 ขณะที่กากมะพร้าวทั้ง 2 ขนาดให้ค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ต่ำกว่าเล็กน้อยอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 80-90 ถึงแม้ว่าเมื่อพิจารณาค่าร้อยละการโพลด์โปรตีนและแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงที่สูงควรที่จะเลือกกิ่งระกำขนาดเล็กเป็นตัวค้ำจุนทางธรรมชาติที่จะนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป แต่เนื่องจากความเบาและความสามารถในการดูดน้ำสูงของกิ่งระกำขนาดเล็ก ที่อาจจะส่งผลต่อการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงในสภาวะจริง ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้เลือกกิ่งระกำขนาดใหญ่ที่ไม่มีกรกระตุ้นด้วยเมทานอลมาใช้ในการศึกษาต่อไปแทนการใช้กิ่งระกำขนาดเล็กที่ต้องมีการกระตุ้นด้วยเมทานอล

ตารางที่ 5 แอคติวิตีและประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ต่างกัน

ชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นตัวค้ำจุน	แอคติวิตีต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส pNPP (หน่วย/กรัมของตัวค้ำจุน)	แอคติวิตีต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิน้ำมันปาล์ม (หน่วย/กรัมของตัวค้ำจุน)	การปลดโปรตีน (ร้อยละ)	ประสิทธิภาพการตรึง (ร้อยละ)
ซังข้าวโพด	1.85	0.13	95.24	85.57
แกลบข้าวสาร	1.97	1.81	96.55	68.96
กิ่งไทรยอดทอง	0.34	0.28	25.46	40.24
หยวกกล้วย	1.71	0.45	42.57	30.36
เปลือกต้นปาล์ม	2.69	0.11	31.62	12.44
กากมะพร้าว	4.72	0.48	33.25	89.75
กิ่งระกำ	4.50	3.32	42.16	96.49



ภาพที่ 11 ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (ก) และร้อยละการปลดโปรตีน (ข) ของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงด้วยตัวค้ำจุนกิ่งระกำและกากมะพร้าวที่มีขนาดต่างกัน

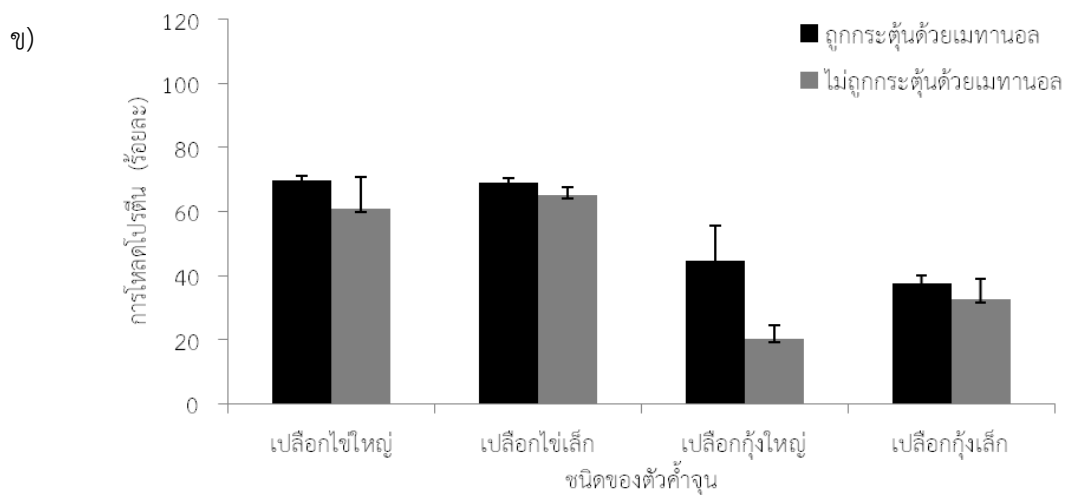
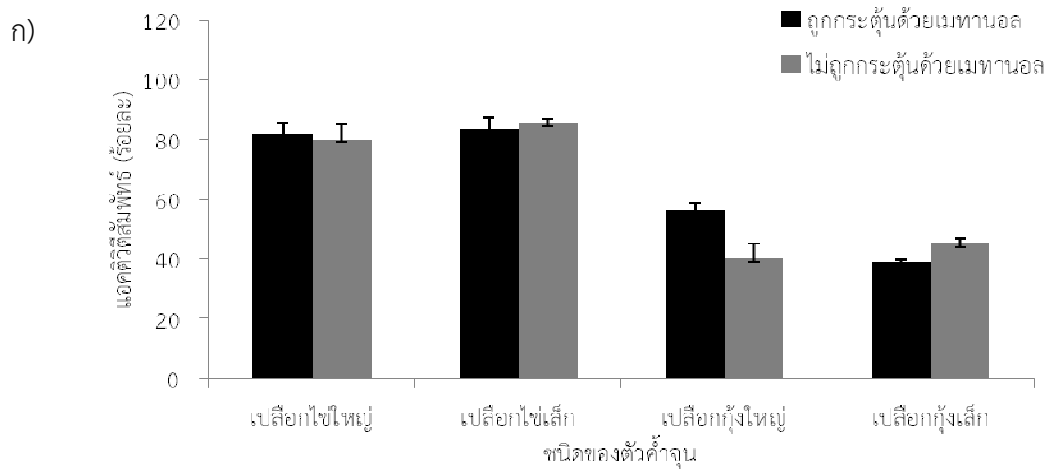
สำหรับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่นที่นำมาทำการทดสอบ ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 โดยพบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเพสบนกึ่งไทรยอดทอง หยวกกล้วย และเปลือกต้นปาล์มให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงและร้อยละการไหลดโปรตีนที่ต่ำ รวมทั้งให้เอนไซม์ตรึงที่ได้ยังมีแอกติวิตีของเอนไซม์ต่ำอีกด้วย ขณะที่การใช้ซังข้าวโพดและแกลบข้าวสารเป็นตัวค้ำจุนในการตรึงเอนไซม์นั้น แม้จะให้ค่าร้อยละการไหลดโปรตีนที่สูงกว่าการใช้กากมะพร้าวและกึ่งระกำ รวมทั้งยังให้ค่าประสิทธิภาพในการตรึงที่ใกล้เคียงกับการใช้กากมะพร้าวและกึ่งระกำเป็นตัวค้ำจุน แต่ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงที่ได้ก็มีค่าที่ต่ำกว่าการใช้กึ่งระกำเป็นตัวค้ำจุน เมื่อประกอบการความนิยมในการนำแกลบข้าวสาร ซังข้าวโพด และกากมะพร้าวมาใช้เป็นมวลชีวภาพในการเปลี่ยนรูปเป็นพลังงานทดแทน และการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นที่หลากหลาย ทำให้ผู้วิจัยเลือกใช้กึ่งระกำเป็นวัสดุค้ำจุนธรรมชาติที่เหมาะสมจะนำมาพัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ต่อไป

4.3.2 การคัดเลือกตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์

จากเศษอาหาร 4 ชนิดที่นำมาทดสอบเป็นตัวค้ำจุนสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* โดยแยกขนาดออกเป็นสองขนาดคือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร (ขนาดเล็ก) และ 0.5 มิลลิเมตร (ขนาดใหญ่) และแยกตัวค้ำจุนที่ใช้ทดสอบเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ทำการทรีตด้วยกรดไฮโดรคลอริกและเมทานอล กับกลุ่มที่ทำการทรีตด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพียงอย่างเดียว พบว่าเมื่อทำการตรึงเอนไซม์และทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงที่เตรียมได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 และพบว่าตัวค้ำจุนที่มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ต่อไปคือ เปลือกไข่เล็กที่ทำการทรีตด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งให้ค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์เท่ากับ 85.46 และให้ค่าร้อยละการไหลดโปรตีนเท่ากับ 65.11 ดังแสดงในภาพที่ 12 ขณะที่ตัวค้ำจุนเศษอาหารชนิดอื่นไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* เพราะไม่ให้ประสิทธิภาพในการตรึง แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึง และร้อยละการไหลดโปรตีนที่สูง

ตารางที่ 6 แอกติวิตีและประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนที่เป็นเศษอาหารต่างกัน

ชนิดของเศษอาหารที่นำมาใช้เป็นตัวค้ำจุน	แอกติวิตีต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส pNPP (หน่วย/กรัมของตัวค้ำจุน)	แอกติวิตีต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิน้ำมันปาล์ม (หน่วย/กรัมของตัวค้ำจุน)	การไหลดโปรตีน (ร้อยละ)	ประสิทธิภาพการตรึง (ร้อยละ)
เปลือกไข่	3.28	2.05	65.11	83.54
เปลือกกุ้ง	1.25	0.79	35.78	45.64
เปลือกหอยแมลงภู่	1.01	0.23	43.21	30.85
เปลือกปูทะเล	2.59	1.98	55.21	59.68



ภาพที่ 12 ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (ก) และร้อยละการลดโปรตีน (ข) ของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงด้วยตัวค้ำจุนเปลือกไข่และเปลือกกึ่งที่มีขนาดต่างกัน

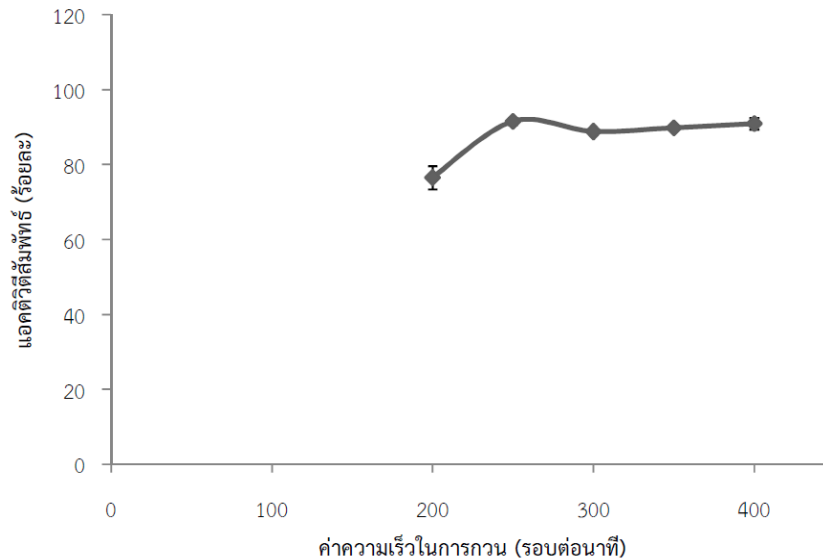
4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ

ทำการศึกษาผลของปัจจัยที่คาดว่าจะส่งผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ ได้แก่ ค่าความเร็วในการกวน ค่าพีเอชและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ ซึ่งจะดำเนินการทดลองโดยกำหนดร้อยละโปรตีนให้อยู่ในช่วง 60-90 และค่าประสิทธิภาพในการตรึงให้อยู่ในช่วงร้อยละ 90-95 ได้ผลการทดลองดังนี้

4.4.1 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำที่ความเร็วในการกวนต่างกัน

เมื่อใช้กึ่งระกำขนาดใหญ่ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เป็นตัวค้ำจุนในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ค่าความเร็วในการกวนต่างกัน พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วในการกวน โอกาสในการดูดซับเอนไซม์กับตัวค้ำจุนจะเพิ่มขึ้นและที่ค่าความเร็วในการกวนที่ 250 รอบต่อนาที จะให้ค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 93.03 ดังแสดงในภาพที่ 13 และเมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที จะพบค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ลดลงและเกือบคงที่จนถึงความเร็ว 400 รอบต่อนาที (ร้อยละ 88.79 ถึง ร้อยละ

91.03) ด้วยเหตุนี้จึงเลือกที่ความเร็วในการกววน 250 รอบต่อนาที เป็นความเร็วที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำขนาดใหญ่ที่จะนำมาทดลองต่อไป



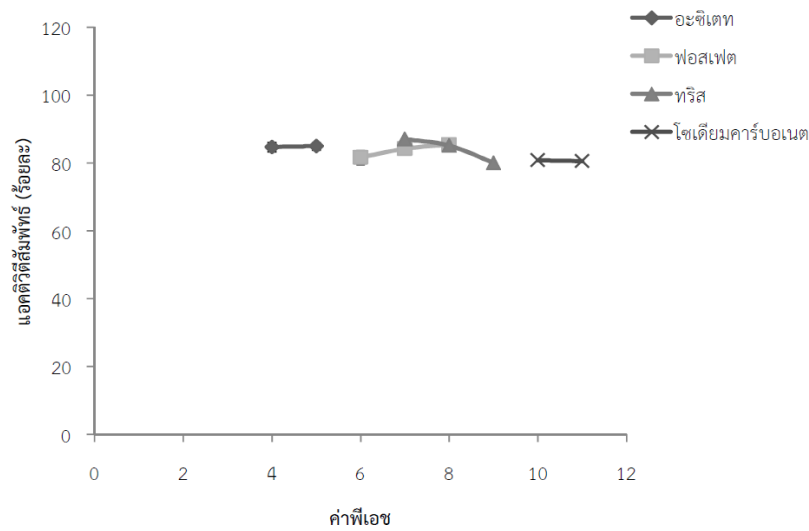
ภาพที่ 13 ผลของค่าความเร็วในการกววนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสของ *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำ

4.4.2 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำโดยใช้ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ต่างกัน

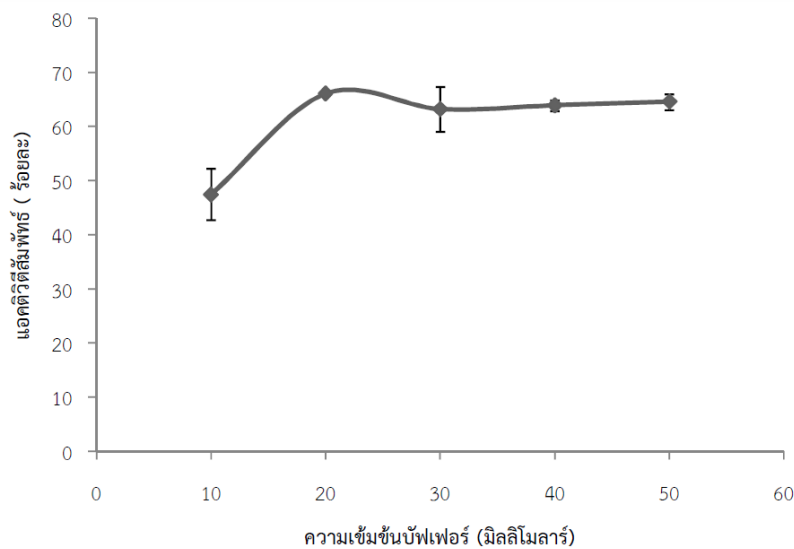
เมื่อนำกึ่งระกำขนาดใหญ่ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร มาตรึงเอนไซม์ไลเพสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกันตั้งแต่ 4 ถึง 11 ที่ความเร็วในการกววนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที จากภาพที่ 14 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไลเพสถูกดูดซับและเร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนค่อนข้างไปทางกลางระหว่างค่าพีเอช 4.0 และ 8.0 (ให้ค่าร้อยละ 84.73 ถึง ร้อยละ 85.44) โดยให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 87.05 เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ค่าพีเอช 7.0 ขณะที่ในช่วงค่าพีเอชเป็นเบสแก่ระหว่าง 9.0 และ 11.0 นั้นเอนไซม์ไลเพสถูกดูดซับบนตัวค้ำจุนได้ลดลง (ประมาณร้อยละ 80.77 ถึง ร้อยละ 80.49) จากผลการทดลองจึงเลือกค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ของบัฟเฟอร์ทริสมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ต่อไป

4.4.3 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำโดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกัน

การตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกำขนาดใหญ่ประมาณ 0.5 มิลลิเมตร โดยใช้บัฟเฟอร์ค่าพีเอช 7.0 ที่มีความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 50 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราเร็วในการกววน 250 รอบต่อนาที พบว่าค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จนถึงความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์สูงสุดเท่ากับร้อยละ 66.09 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ไปจนถึง 30 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์มีค่าลดลง (ร้อยละ 63.25) และมีค่าต่ำต่อเนื่องถึงที่ความเข้มข้นบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในภาพที่ 15 ด้วยเหตุนี้จึงเลือกความเข้มข้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ มาทำการทดลองต่อไป



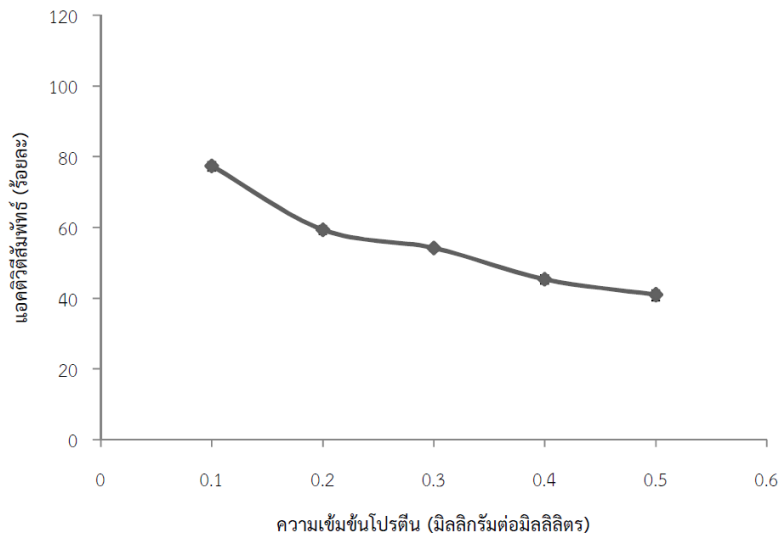
ภาพที่ 14 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกิ่งระกำ



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกิ่งระกำ

4.4.4 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกิ่งระกำโดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่างกัน

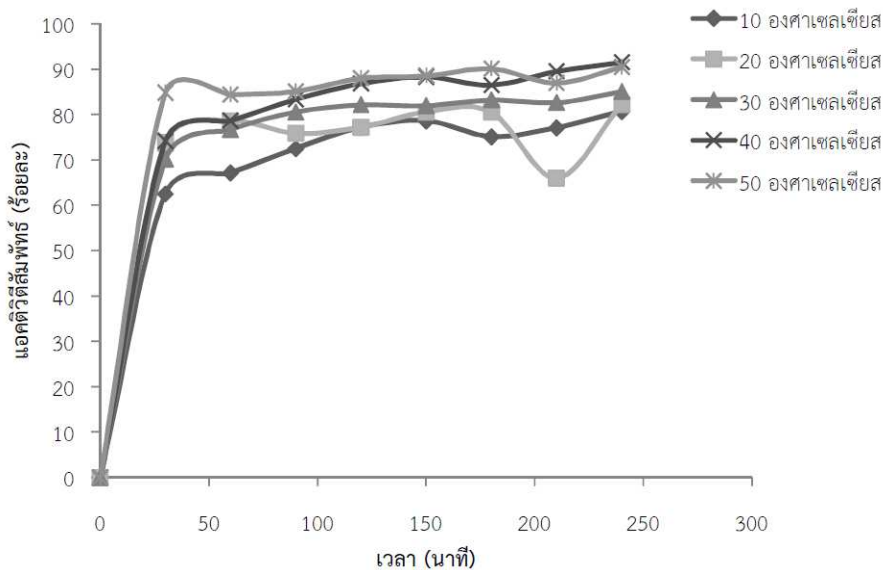
การใช้กิ่งระกำขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เป็นตัวค้ำจุนในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* โดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนในการตรึงแตกต่างกันตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 7.0 ด้วยความเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที พบว่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 77.39 เมื่อใช้ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ไลเปส 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภาพที่ 16 และจะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นโปรตีนที่ใช้ในการตรึงที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกิ่งระกำต่อไป



ภาพที่ 16 ผลของความเข้มข้นโปรตีนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกาย

4.4.5 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระกายโดยใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิในการตรึงต่างกัน

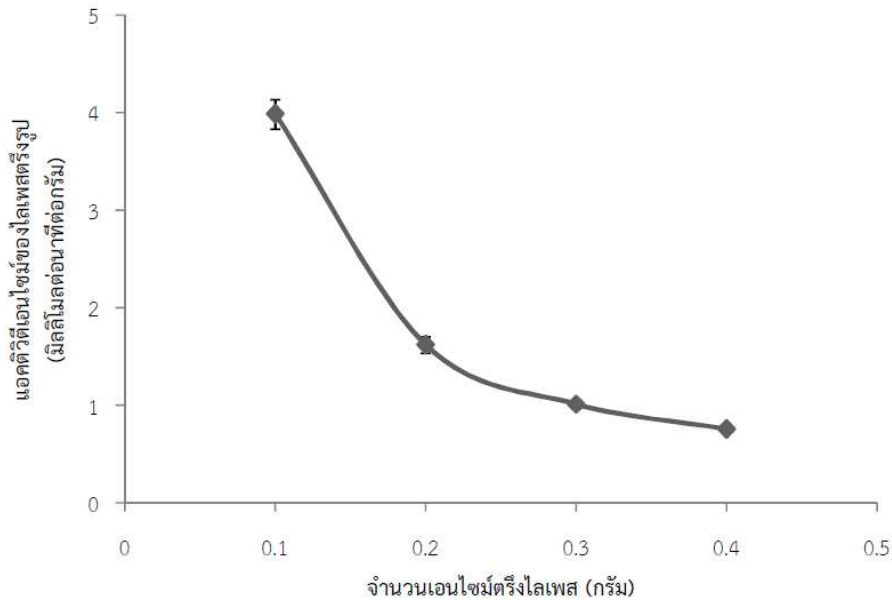
การติดตามเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์มีค่าเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ ที่เวลา 90 นาที ในทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึง พบว่าการตรึงที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่าที่ใกล้เคียงกันซึ่งไม่แตกต่างจากค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ได้จากการตรึงที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส มากนักแต่ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่าแกว่งมากกว่า ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการสูญเสียแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์จึงเลือกการตรึงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกายขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร



ภาพที่ 17 ผลของเวลาและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนกึ่งระกาย

4.4.6 ปริมาณของเอนไซม์ตรีงไลเพสบกึ่งระก่ำที่เหมำะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา

เมื่อนำเอนไซม์ตรีงไลเพสบกึ่งระก่ำขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนกรัมในการใช้เอนไซม์ตรีงไลเพสบกึ่งระก่ำในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท pNPP จะให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์มีปริมาณลดลงประมาณร้อยละ 80 จากค่าแอกติวิตีเริ่มต้นคือ 4.0 มิลลิโมลต่อ นาทีต่อกรัม เป็น 0.75 มิลลิโมลต่อ นาทีต่อกรัม (ภาพที่ 18) ดังนั้นจึงเลือกจำนวนกรัมของเอนไซม์ตรีงไลเพสบกึ่งระก่ำที่จะนำมาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรีงเท่ากับ 0.1 กรัม



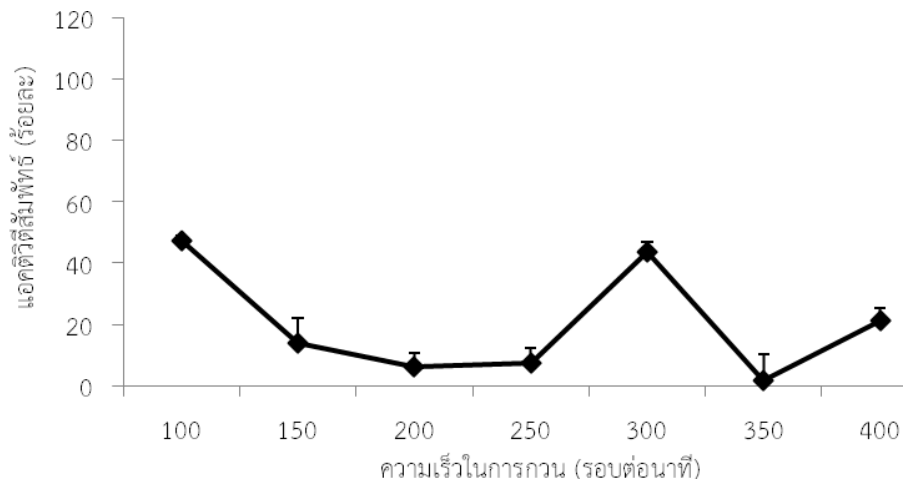
ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสที่ตรีงบกึ่งระก่ำที่ปริมาณต่างกัน

4.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรีงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่

เมื่อนำเปลือกไข่ที่ถูกทรีตด้วยกรดไฮโดรคลอริกมาทำการศึกษาค่าความเร็ในการกวบนเป็นปัจจัยแรก จากผลการทดลอง (ภาพที่ 19) พบว่าการเพิ่มความเร็ในการกวบนขณะตรีงส่งผลให้เอนไซม์ตรีงมีค่าแอกติวิตีลดลง ยกเว้นที่ความเร็เท่ากับ 300 รอบต่อนาที ที่ดูเหมือนค่าแอกติวิตีจะเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาจากค่าแอกติวิตีของเอนไซม์หลังการตรีงพบว่าที่ค่าความเร็ในการกวบนเท่ากับ 100 รอบต่อนาทีให้ค่าแอกติวิตีที่สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 47.24 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอกติวิตีที่ได้ที่ความเร็ในการกวบน 300 รอบต่อนาที มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 43.68 จึงเลือกความเร็ในการกวบนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที มาใช้ในการทดลองต่อไป

4.5.1 การตรีงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่ที่ความเร็ในการกวบนต่างกัน

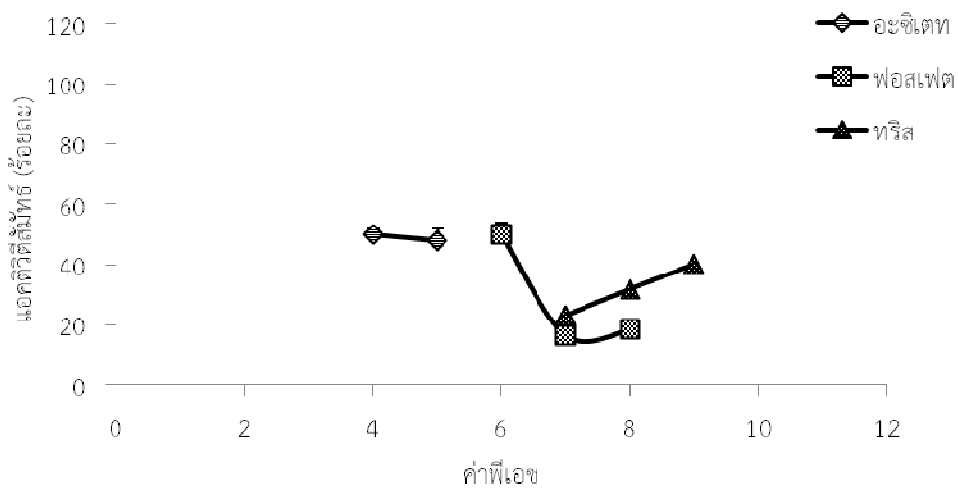
เมื่อนำเปลือกไข่ขนาดเล็กที่ผ่านการทรีตด้วยกรดไฮโดรคลอริกมาทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรีงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* โดยเริ่มศึกษาค่าความเร็ในการกวบนเป็นปัจจัยแรก จากผลการทดลอง (ภาพที่ 19) พบว่าการเพิ่มความเร็ในการกวบนขณะตรีงส่งผลให้เอนไซม์ตรีงมีค่าแอกติวิตีลดลง ยกเว้นที่ความเร็เท่ากับ 300 รอบต่อนาที ที่ดูเหมือนค่าแอกติวิตีจะเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาจากค่าแอกติวิตีของเอนไซม์หลังการตรีงพบว่าที่ค่าความเร็ในการกวบนเท่ากับ 100 รอบต่อนาทีให้ค่าแอกติวิตีที่สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 47.24 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอกติวิตีที่ได้ที่ความเร็ในการกวบน 300 รอบต่อนาที มีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 43.68 จึงเลือกความเร็ในการกวบนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที มาใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 19 ผลของค่าความเร็วในการกวนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุณเปลือกไข่

4.5.2 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุณเปลือกไข่โดยใช้ค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ต่างกัน

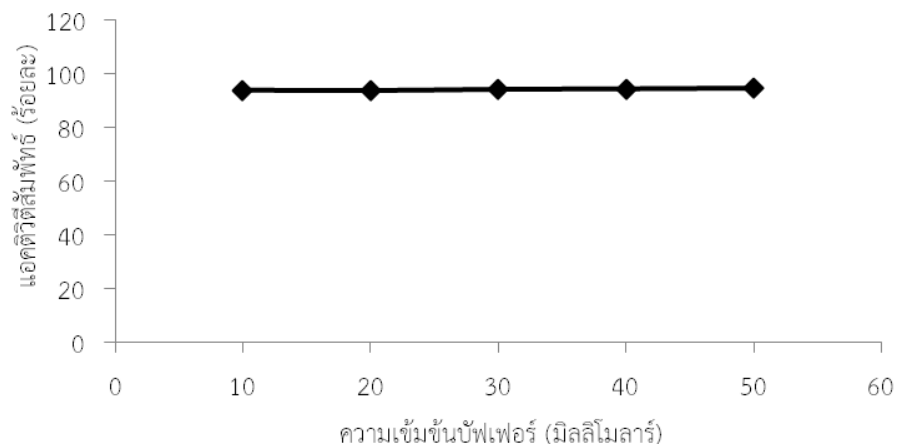
นำเปลือกไข่เล็กที่ทำกรรทรีทด้วยกรดไฮโดรคลอริกมาทดสอบค่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงที่ความเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 20 พบว่าเอนไซม์ตรึงแสดงค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ใกล้เคียงกันในช่วงค่าพีเอชเป็นกรดและมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 ซึ่งให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 50.10 จากนั้นค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงจะมีค่าลดลงตามการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชที่ใช้ในการตรึง ด้วยเหตุนี้จึงเลือกค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ฟอสเฟตเท่ากับ 6.0 มาทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 20 ผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุณเปลือกไข่

4.5.3 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่โดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกัน

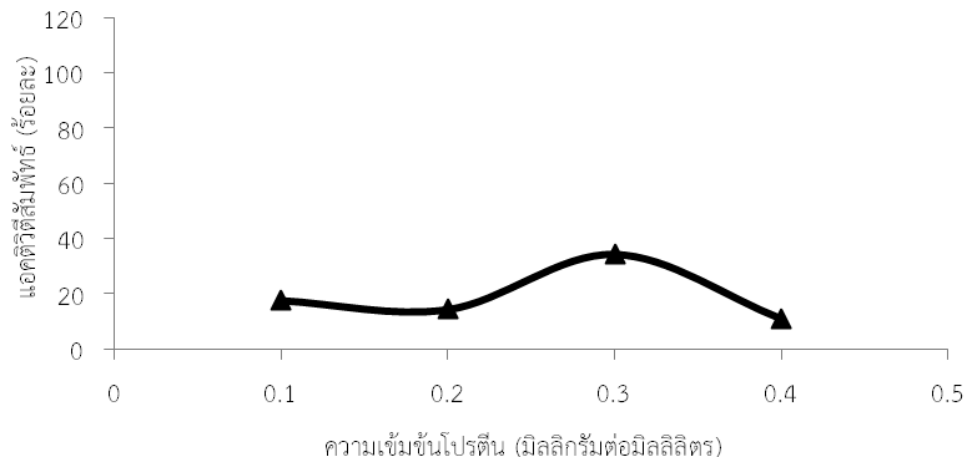
เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงคือค่าความเร็วในการกวน 100 รอบต่อนาที ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 6.0 ปัจจัยต่อมาที่ทำการศึกษาคือความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรึง โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ขึ้นเรื่อยๆจะทำให้ปริมาณแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ จากค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ร้อยละ 93.75 ถึงร้อยละ 94.33 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นบัฟเฟอร์จาก 10 ถึง 40 มิลลิโมลาร์ โดยที่ค่าความเข้มข้นบัฟเฟอร์เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์นั้นจะมีค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงสูงที่สุดคือเท่ากับ 94.60 ดังแสดงในภาพที่ 21 จึงเลือกความเข้มข้นนี้มาทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 21 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่

4.5.4 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่โดยใช้ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ต่างกัน

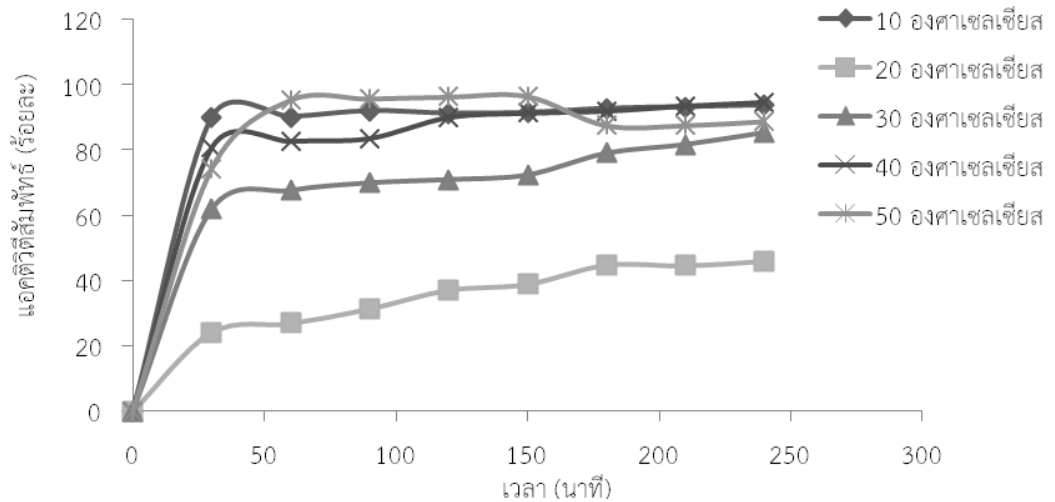
นำสภาวะที่เหมาะสมจากหัวข้อที่ 4.5.3 มาใช้ในการหาค่าความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการตรึง พบว่าค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นโปรตีนจาก 0.1 ถึง 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่สูงสุดคือร้อยละ 34.23 เมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์จะมีค่าลดลง ดังแสดงในภาพที่ 22 แสดงให้เห็นว่าในการตรึงเอนไซม์ไลเพสบนตัวค้ำจุนจากเปลือกไข่ควรใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 22 ผลของความเข้มข้นโปรตีนต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่

4.5.5 การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนกึ่งระก้าโดยใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิในการตรึงต่างกัน

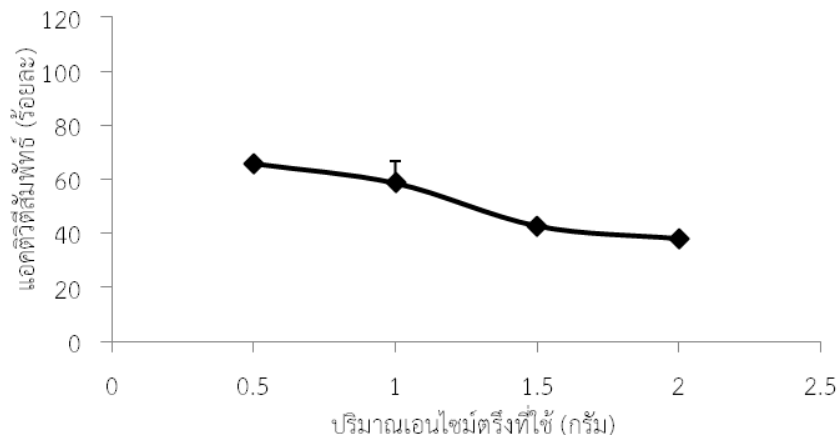
เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ที่แตกต่างกัน จากภาพที่ 23 จะเห็นได้ว่า ค่าร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงที่ได้เมื่อทำการตรึงที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีความคงที่ของค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เลย ขณะที่ ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียสนั้น แอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เริ่มมีค่าคงที่เมื่อใช้เวลาในการตรึงผ่านไป 60 ถึง 120 นาที ตามลำดับ สำหรับที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์มีแนวโน้มคงที่ตั้งแต่ช่วงเวลา 90 นาทีเป็นต้นไป ดังนั้นเพื่อลดปัญหาเรื่องการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงจึงเลือกทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนเปลือกไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที



ภาพที่ 23 ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ต่อการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนเปลือกไข่

4.5.6 ปริมาณของเอนไซม์ตรึงไลเปสบนเปลือกไข่ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนเปลือกไข่แล้วจะทำการศึกษากำหนดปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรท p-NPP จากภาพที่ 24 พบว่าปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยามากที่สุดคือ 0.5 กรัม โดยให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 65.91 และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ตรึงที่ใช้ในปฏิกิริยาพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลง



ภาพที่ 24 ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนเปลือกไข่ที่ปริมาณต่างกัน

4.6 การทดสอบความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงเทียบกับเอนไซม์อิสระ

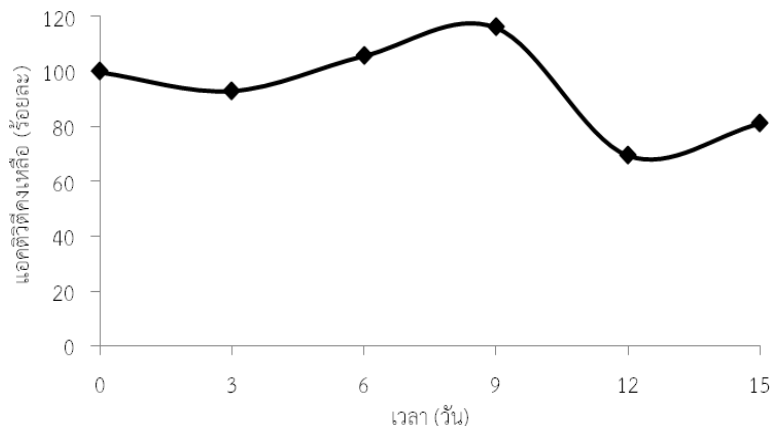
การทดสอบความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP บนเปลือกไข่ และบนกึ่งระก้า เทียบกับของเอนไซม์ในรูปอิสระได้ผลการทดลองดังนี้

4.6.1 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์อิสระ

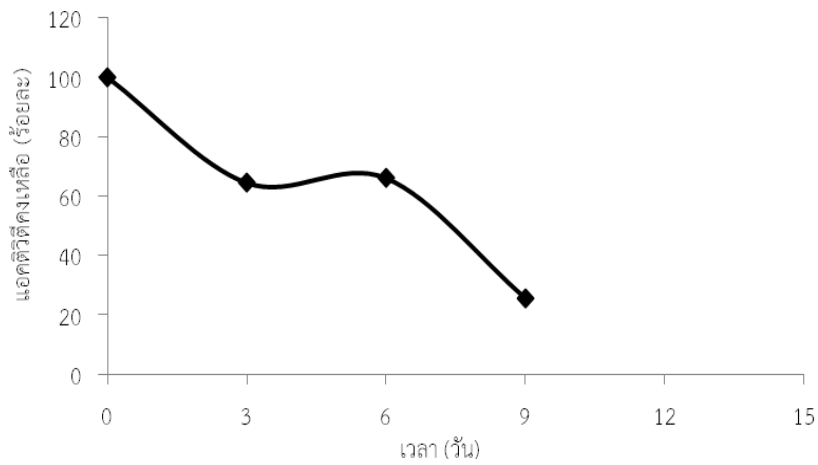
การเก็บรักษาเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไลเปสในรูปอิสระยังคงรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ได้เป็นเวลานาน 15 วัน ดังแสดงในภาพที่ 25 ขณะที่ ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* จะสูญเสียแอกติวิตีตามเวลาโดยมีค่าแอกติวิตีต่ำกว่าครึ่งเมื่อเวลาผ่านไป 6 วัน (ภาพที่ 26)

4.6.2 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP

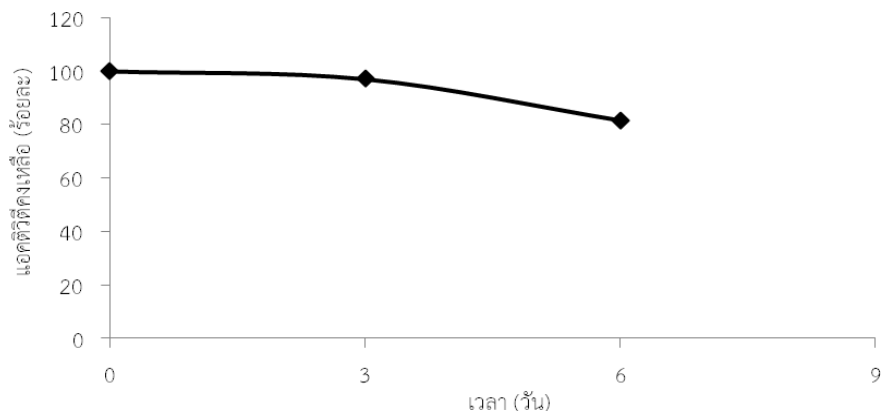
การศึกษาค่าความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนตัวค้ำจุนทางการค้า XAD7HP เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงเหลือแอกติวิตีมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อเวลาผ่านไป 6 วัน (ภาพที่ 27) ขณะที่ ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) พบแอกติวิตีคงเหลือมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อผ่านไป 9 วัน และเหลือแอกติวิตีเพียงร้อยละ 15.47 เมื่อเก็บรักษาไป 12 วัน ดังแสดงในภาพที่ 28



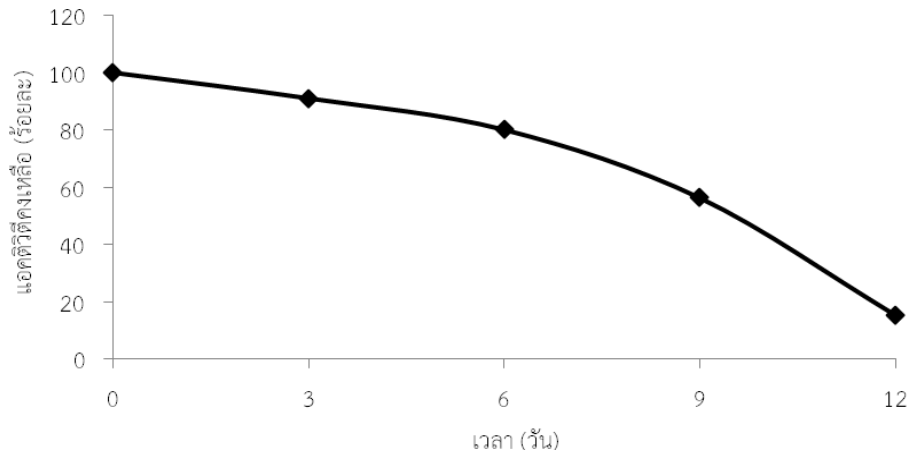
ภาพที่ 25 ความเสถียรในการเก็บรักษาแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ในรูปอิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 26 ความเสถียรในการเก็บรักษาแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ในรูปอิสระที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส)



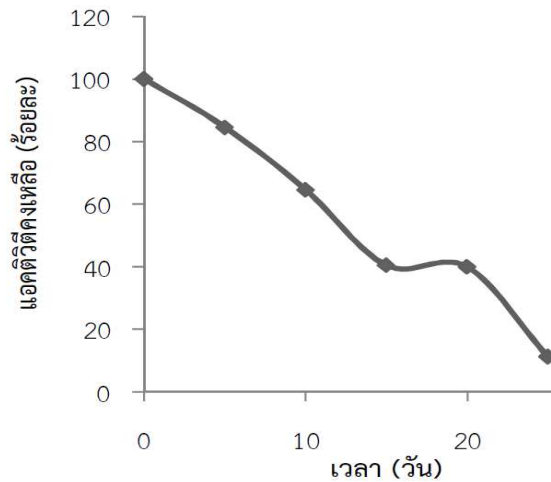
ภาพที่ 27 ความเสถียรในการเก็บรักษาแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



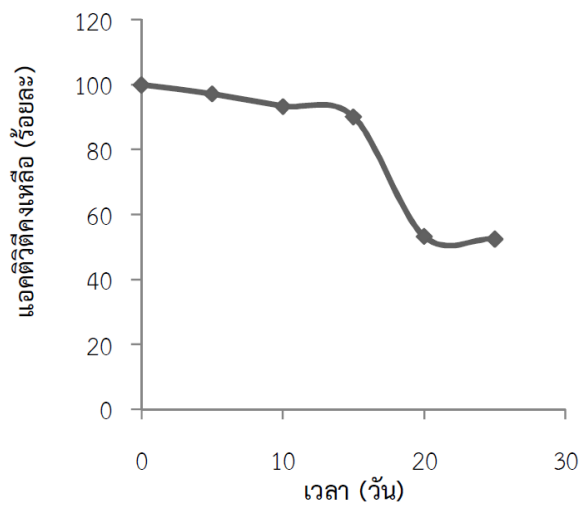
ภาพที่ 28 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส)

4.6.3 ความเสถียรในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำ

เมื่อนำเอนไซม์ตรึงไลเพสบนตัวค้ำจุนกิ่งระกำมาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วันพบว่าเอนไซม์ตรึงมีแอกติวิตีคิงเหลือลดลงอย่างต่อเนื่องและลดต่ำสุดถึงร้อยละ 11.34 หลังจากเก็บรักษานาน 25 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) พบว่าเอนไซม์ไลเพสตรึงบนกิ่งระกำสามารถรักษาแอกติวิตีคิงเหลือของเอนไซม์ไลเพสได้ดีถึง 15 วัน โดยเหลือแอกติวิตีคิงเหลือร้อยละ 90.17 และยังมีแอกติวิตีคิงเหลือมากกว่าร้อยละ 50 หลังจากเก็บรักษานาน 25 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ดังภาพที่ 29 และภาพที่ 30



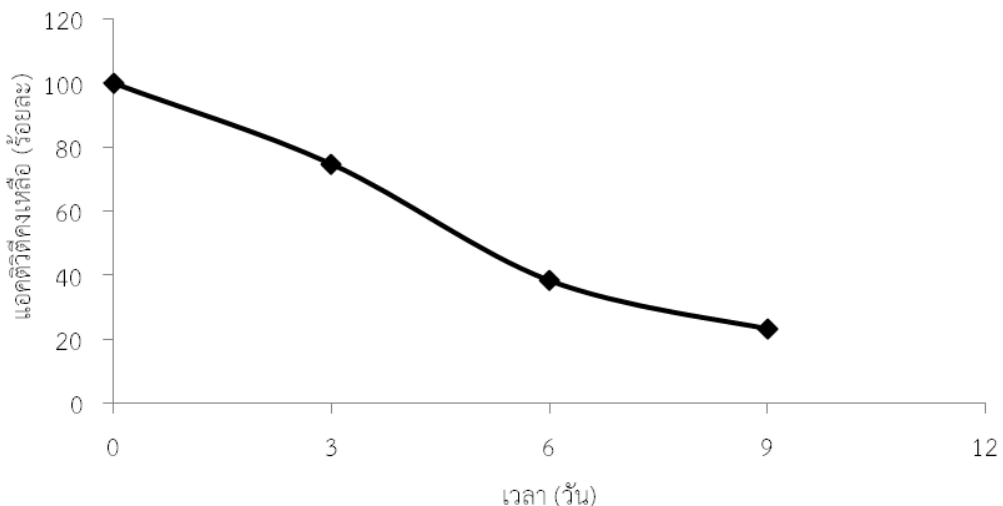
ภาพที่ 29 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



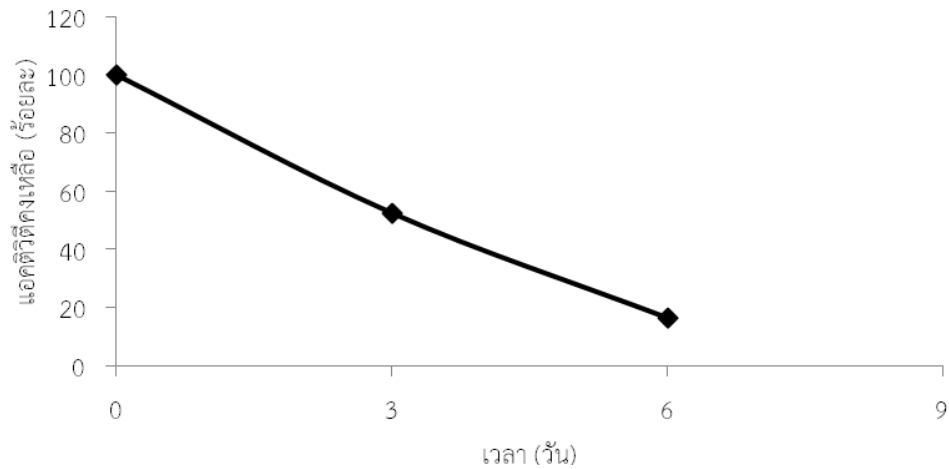
ภาพที่ 30 ความเสถียรในการเก็บรักษาแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส)

4.6.4 ความเสถียรในการเก็บรักษาของแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่

เมื่อนำแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ขนาด 0.1 มิลลิเมตร ที่ทำการทรีทต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกตามสภาวะที่เหมาะสมและมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) พบแนวโน้มการลดลงของค่าแอกติวิตีอย่างต่อเนื่อง โดยมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 50 ในวันที่ 6 และวันที่ 3 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าวตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 31 และ ภาพที่ 32 ตามลำดับ



ภาพที่ 31 ความเสถียรในการเก็บรักษาแอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



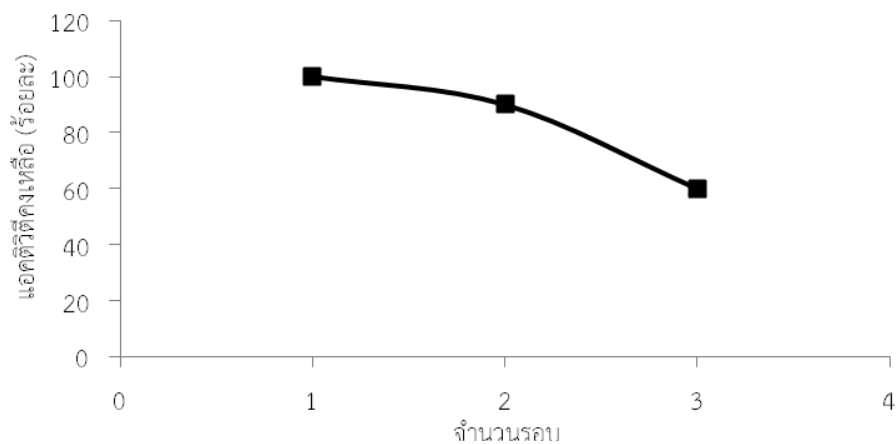
ภาพที่ 32 ความเสถียรในการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่ ที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส)

4.7 การนำเอนไซม์ตรึงไลเปสกลับมาใช้ซ้ำ

การศึกษาความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงไลเปสที่เตรียมได้โดยวิธีการดูดซับบนตัวค้ำจุ้นทางการค้า XAD7HP และตัวค้ำจุ้นธรรมชาติคือ กิ่งระกำและเปลือกไข่ มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์ม เทียบกับเอนไซม์ตรึงไลเปสที่มีขายทางการค้า Novozyme 435 ให้ผลการทดลองดังนี้

4.7.1 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงไลเปสทางการค้า Novozyme 435

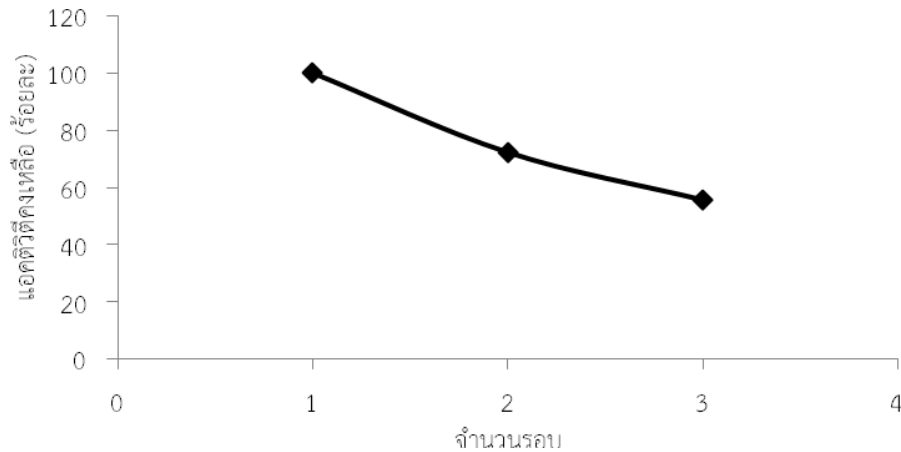
การนำกลับมาใช้ซ้ำของ Novozyme 435 พบค่าแอสิดอะซิติกลดลงแต่ยังคงเหลือแอสิดอะซิติกมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำในรอบที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 33



ภาพที่ 33 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสทางการค้า Novozyme 435 กลับมาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์ม

4.7.2 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP

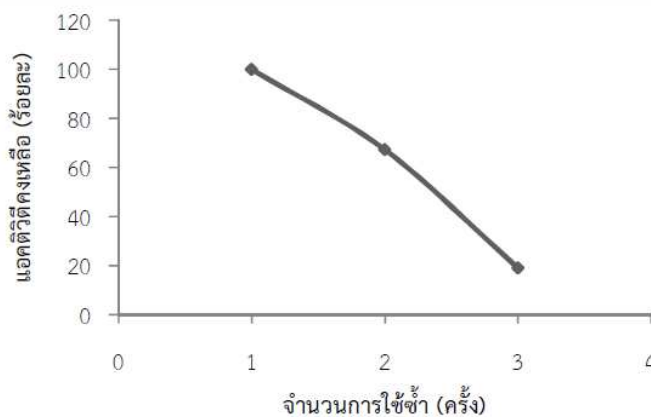
การศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงไลเปสบนตัวค้ำจุน XAD7HP ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 34 ซึ่งให้ค่าแอกติวิตีมากกว่าร้อยละ 50 ในรอบที่ 3 ของการใช้ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในของ Novozyme 435



ภาพที่ 34 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP มาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์ม

4.7.3 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำ

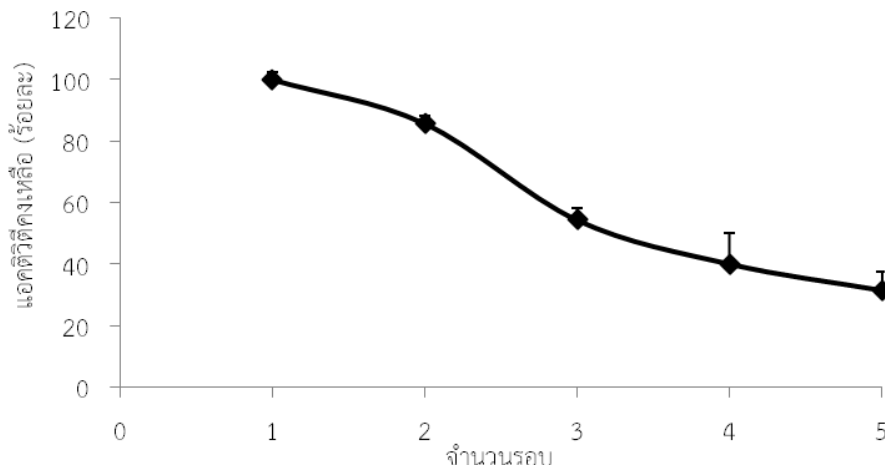
เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับน้ำมันปาล์มและทดลองใช้ซ้ำพบว่าเอนไซม์ตรึงไลเปสบนกิ่งระกำ จะให้ค่าแอกติวิตีคงเหลือในระดับที่ใกล้เคียงกับของเอนไซม์ตรึง Novozyme 435 และของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวค้ำจุนทางการค้า XAD7HP คือร้อยละ 67.31 เมื่อใช้ซ้ำ 2 ครั้ง ดังแสดงในภาพที่ 35



ภาพที่ 35 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนกิ่งระกำกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำมันปาล์มซ้ำ

4.7.4 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่

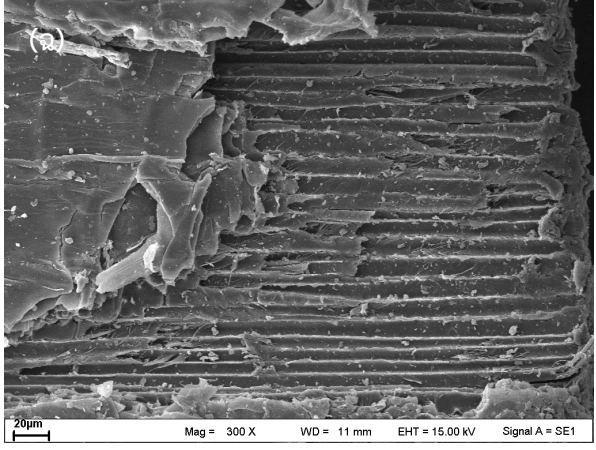
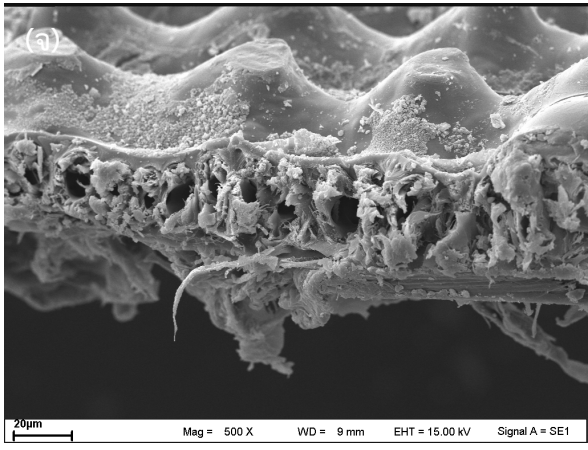
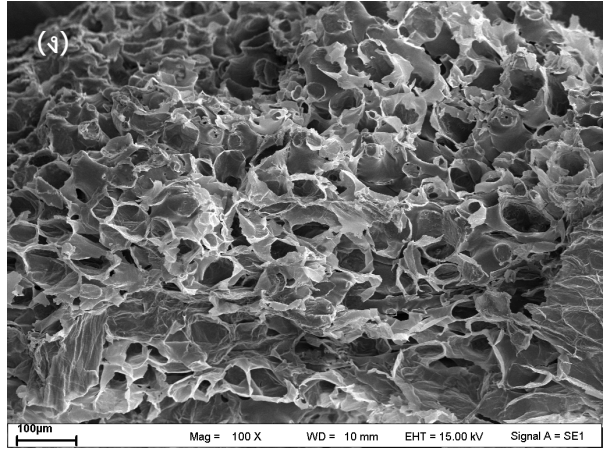
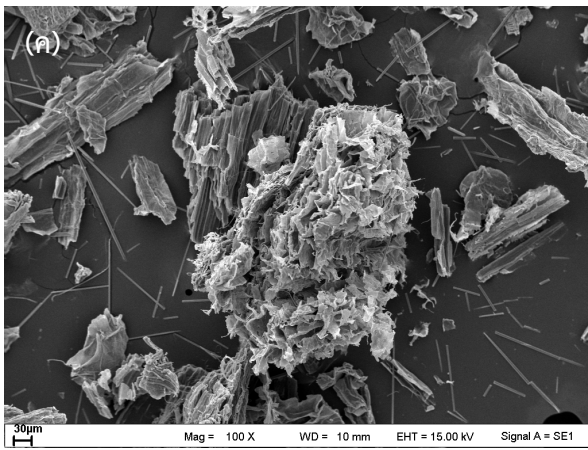
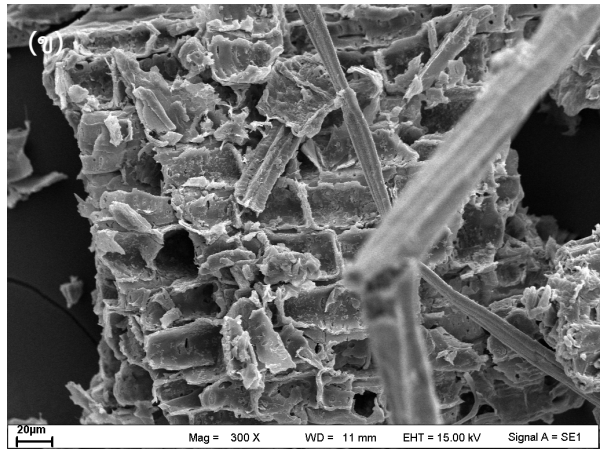
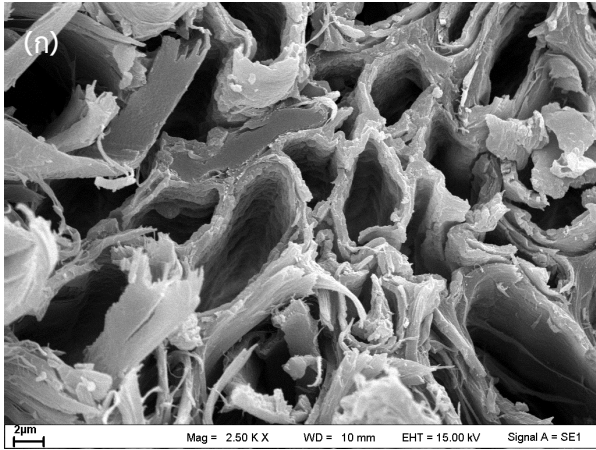
แอกติวิตีที่ใช้ในการสลายน้ำมันปาล์มเป็นกรดไขมันของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนเปลือกไข่จะมีค่าลดลงในทุกกรอบของการใช้ โดยเหลือแอกติวิตีเพียงร้อยละ 54.28 เมื่อผ่านการใช้ซ้ำไป 3 รอบ และจะมีค่าแอกติวิตีลดลงเรื่อยๆ จนเหลือเพียงร้อยละ 31.43 ในรอบที่ 5 ของการใช้ซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 36



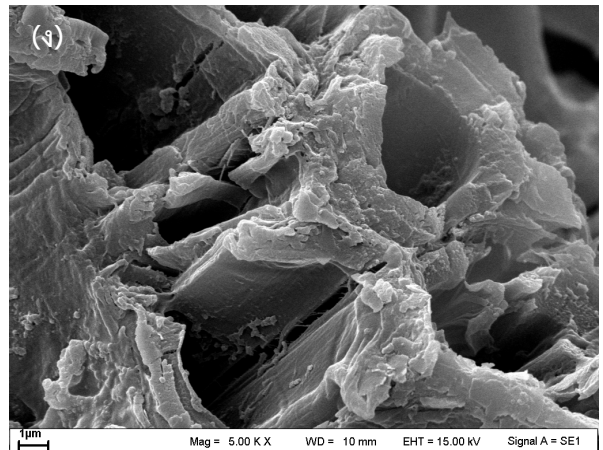
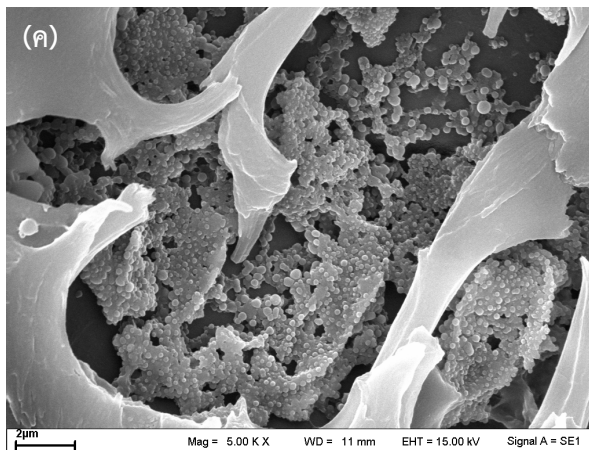
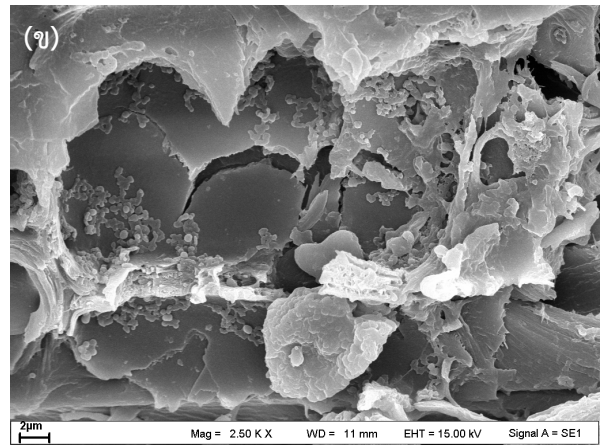
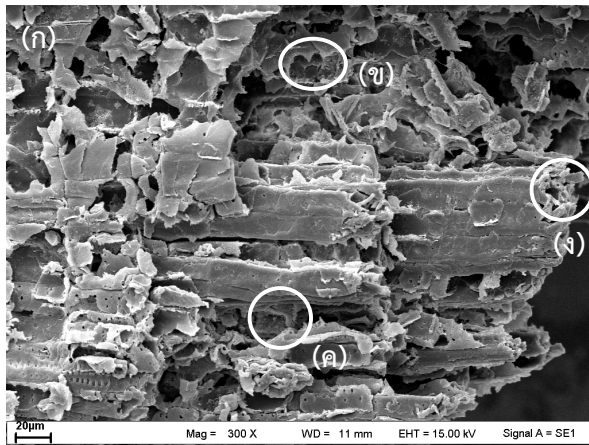
ภาพที่ 36 การทดสอบความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรึงบนเปลือกไข่กลับมาใช้ซ้ำ

4.8 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวค้ำจุนที่เตรียมได้ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

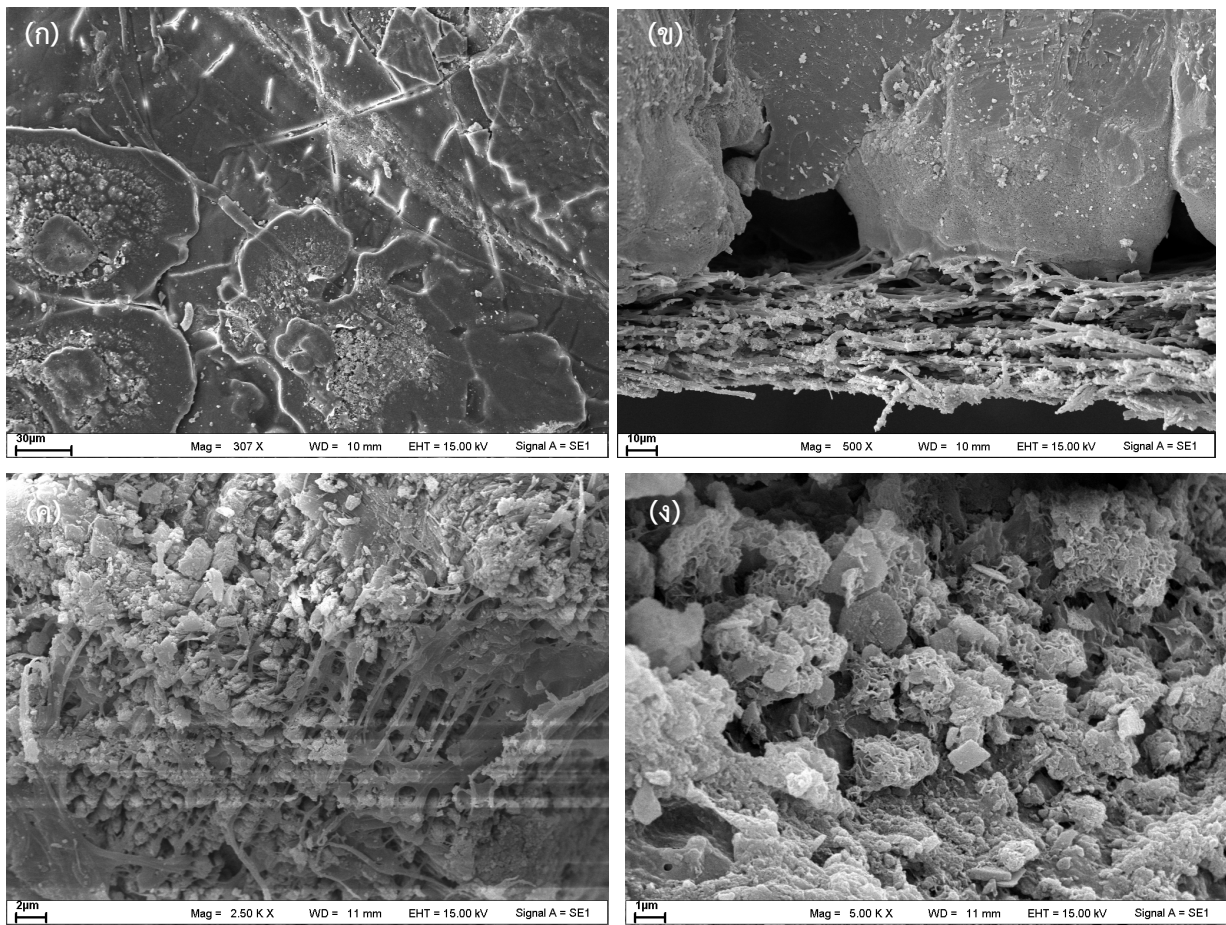
เมื่อนำตัวค้ำจุนที่เตรียมได้ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* มาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) รุ่น Leo1450VP ที่ต่อเข้ากับตัวให้กำเนิดพลังงานแสง (energy dispersive spectroscopy; EDS) โดยกำหนดค่าพารามิเตอร์ในการวิเคราะห์ดังนี้คือ ความดัน 1.3×10^{-2} Pa และความละเอียด < 10 นาโนเมตร ที่กำลังไฟฟ้าเท่ากับ 15 กิโลวัตต์ พบว่าตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทุกชนิด ยกเว้นกิ่งระกำ มีลักษณะเป็นตาข่ายรูพรุนที่กว้างแต่แคบและมีการยึดเกาะของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนกิ่งระกำกระจายอย่างทั่วถึง ดังแสดงในภาพที่ 37 สำหรับกิ่งระกำนั้นมีตาข่ายรูพรุนที่กว้างและมีความลึกมากกว่า (ภาพที่ 38) ขณะที่ตัวค้ำจุนที่เป็นเปลือกกุ้งและเปลือกหอยแมลงภู่มิมีลักษณะรูพรุนที่เหมาะสมต่อการนำไปตรึงเอนไซม์ (ภาพที่ 39) แต่พบว่าเปลือกปูทะเลนั้นมีลักษณะทางกายภาพบางส่วนที่สามารถดูดซับเอนไซม์ไลเปสไว้บนพื้นผิวได้ (ภาพที่ 40) ขณะที่เปลือกไข่ที่มีเยื่อเมมเบรนติดอยู่ มีลักษณะเป็นตาข่ายร่างแหของเยื่อเมมเบรนที่สามารถเก็บกักเอนไซม์ไว้ได้ ดังแสดงในภาพที่ 41



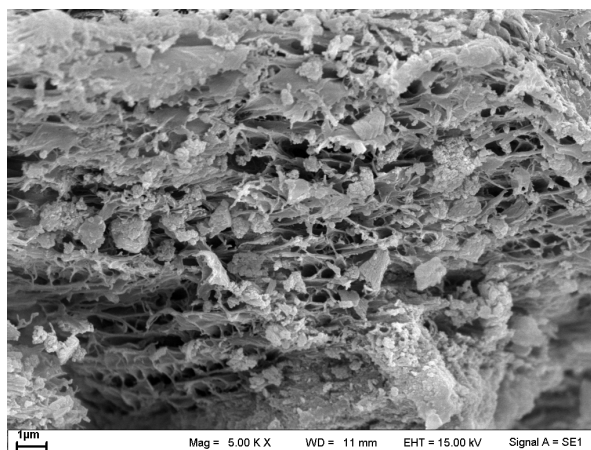
ภาพที่ 37 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (ก) กากมะพร้าว (กำลังขยาย 2.5 KX) (ข) กิ่งไทรยอดทอด (กำลังขยาย 300X) (ค) หยกกล้วย (กำลังขยาย 100X) (ง) ชิงข้าวโพด (กำลังขยาย 100X) (จ) แกลบข้าวสาร (กำลังขยาย 500X) และ (ฉ) ทางต้นปาล์ม (กำลังขยาย 300X) ก่อนมีการตรึงเอ็นไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi*



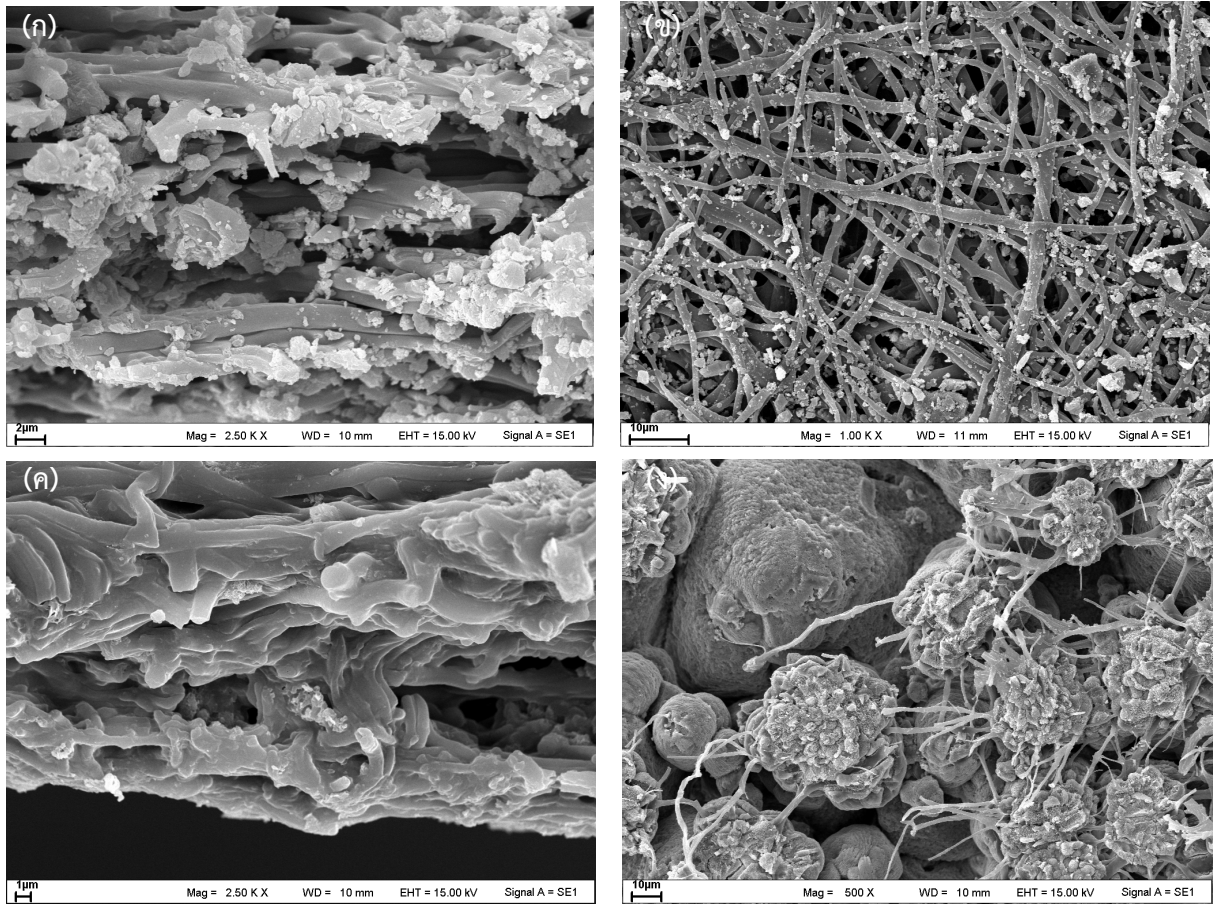
ภาพที่ 38 ลักษณะทางกายภาพของกึ่งระก้ำหลังการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) กึ่งระก้ำที่มีเอนไซม์ดูดซับบนพื้นผิว (กำลังขยาย 300X) และ (ข) ถึง (ง) แสดงการดูดซับของเอนไซม์ไลเพสบนกึ่งระก้ำอย่างทั่วถึง (กำลังขยาย 2.5 K - 5KX)



ภาพที่ 39 การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ (ก) เปลือกกุ้ง (กำลังขยาย 307X) (ข) เปลือกไข่ (กำลังขยาย 500X) (ค) เปลือกปูทะเล (กำลังขยาย 2.5 KX) และ (ง) เปลือกหอยแมลงภู (กำลังขยาย 5.0 KX) ก่อนมีการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi*



ภาพที่ 40 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกปูทะเลที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (กำลังขยาย 5.0 KX)



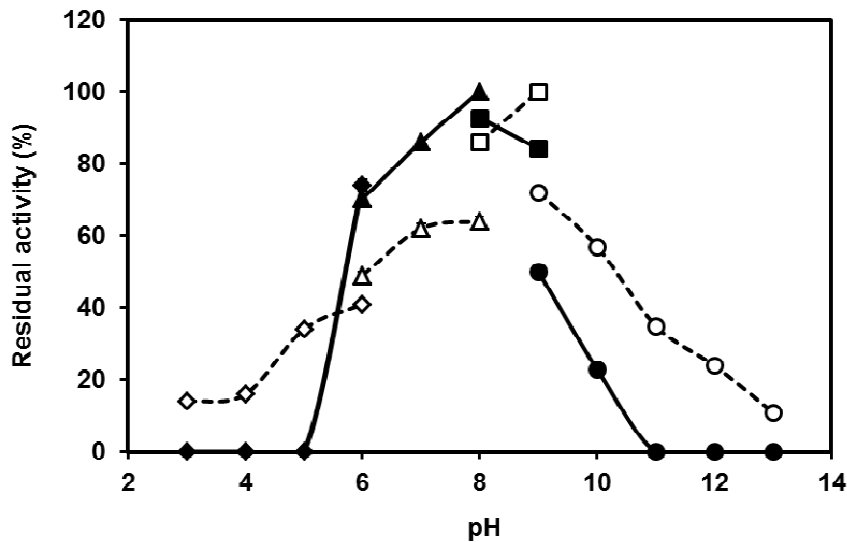
ภาพที่ 41 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่หลังการตรึงเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* เมื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รูป (ก) ถึง (ง) แสดงการดูดซับของเอนไซม์ไลเพสบนพื้นผิวเปลือกไข่ที่ตำแหน่งและกำลังขยายต่างกัน (กำลังขยาย 2.5KX, 1.0 KX, 2.5 KX และ 500X ตามลำดับ)

4.9 การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* เมื่อตรึงบนกิ่งระกำ

จากการทดสอบความเสถียรในการเก็บรักษาและความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงไลเพสที่เตรียมได้กลับมาใช้ซ้ำพบว่า เอนไซม์ตรึงไลเพสบนกิ่งระกำมีความเสถียรสูงสุด จึงนำมาทดสอบคุณลักษณะเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยาได้แก่ ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ความเสถียรในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันสับสเตรทน้ำมันปาล์มเป็นไบโอดีเซล ผลการทดลองแสดงดังนี้

4.9.1 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรีง

ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* เมื่อตรีงบนกึ่งระก้าคือ 9.0 (ภาพที่ 42) โดยเอนไซม์ตรีงจะค่อยๆ มีแอกติวิตีสูงขึ้นที่ค่าพีเอชจาก 5.0 ถึง 8.0 และมีแอกติวิตีสูงที่สุดที่ค่าพีเอช 9.0 ก่อนที่แอกติวิตีจะค่อยๆ ลดลง จนไม่มีแอกติวิตีที่ค่าพีเอชมากกว่า 13.0



ภาพที่ 42 ผลของค่าพีเอชต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรีงบนกึ่งระก้า (เส้นประ) เทียบกับของเอนไซม์ไลเปสอิสระ (เส้นทึบ) เมื่อทำการบ่มปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าพีเอชต่างกันที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและใช้ p-NPP เป็นสับสเตรท ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ อะซิเตท (ค่าพีเอช 3.0-5.0, สัญลักษณ์ข้าวหลามตัด) ฟอสเฟต (ค่าพีเอช 6.0-7.0, สัญลักษณ์สามเหลี่ยม) ทริสไฮโดรคลอไรด์ (ค่าพีเอช 7.0-9.0, สัญลักษณ์สี่เหลี่ยม) และคาร์บอเนต (ค่าพีเอช 9.0-13.0, สัญลักษณ์วงกลม) แสดงผลการทดลองด้วยค่าแอกติวิตีคงเหลือโดยเทียบที่ค่าพีเอชเท่ากับ 9.0 (ค่าแอกติวิตีสูงที่สุด) เป็นร้อยละ 100

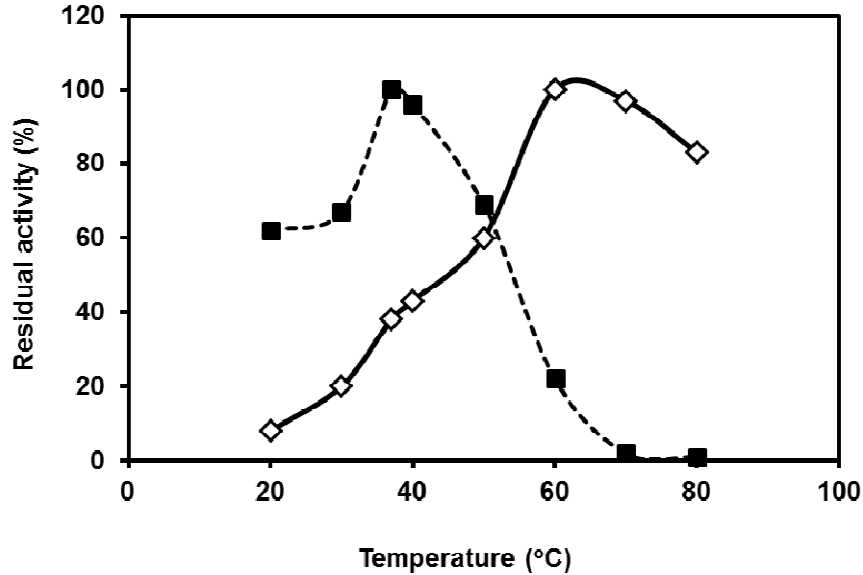
4.9.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรีง

เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ตรีงที่อุณหภูมิต่างกันพบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรีงบนกึ่งระก้ามีค่าแอกติวิตีเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและแสดงค่าแอกติวิตีสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นแอกติวิตีจะค่อยๆ มีค่าลดลงจนไม่แสดงค่าแอกติวิตีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับของเอนไซม์อิสระที่แสดงแอกติวิตีสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 43

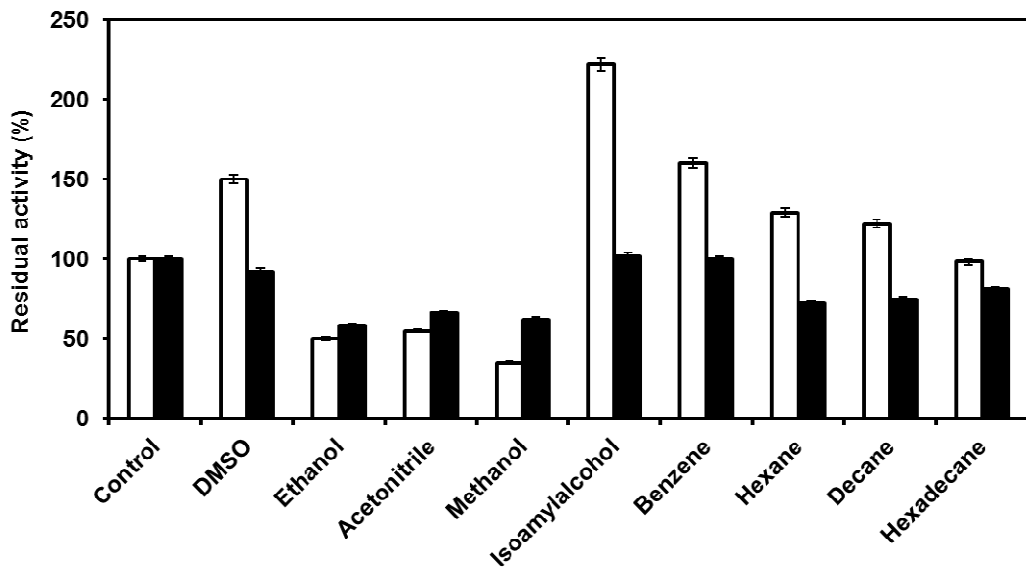
4.9.3 ความเสถียรของเอนไซม์ตรีงต่อตัวทำละลายอินทรีย์

เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ถูกตรีงบนกึ่งระก้าและเอนไซม์ไลเปสในรูปอิสระในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างกัน ความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์ให้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 44 จะเห็นว่า การตรีงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนกึ่งระก้าสามารถเพิ่มความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ของเอนไซม์ได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด

โดยเฉพาะในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว แต่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วยกเว้น DMSO นั้นพบว่าการตรึงเอนไซม์ทำให้เกิดการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ไปเล็กน้อย เมื่อเทียบกับค่าแอกติวิตีของเอนไซม์อิสระ



ภาพที่ 43 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนกิ่งระกำ (เส้นประ) เทียบกับของเอนไซม์อิสระ (เส้นทึบ) แสดงผลการทดลองด้วยค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอกติวิตีที่มีค่าสูงที่สุดเป็นร้อยละ 100



ภาพที่ 44 ความเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์ของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนกิ่งระกำ (แท่งสีขาว) เทียบกับของเอนไซม์อิสระ (แท่งสีดำ) แสดงผลการทดลองด้วยค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์โดยเทียบค่าแอกติวิตีของชุดควบคุมที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นร้อยละ 100

4.9.4 การทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของเอนไซม์ตรีง

เมื่อนำเอนไซม์ตรีงไลเพสที่เตรียมได้มาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตไบโอดีเซลตามวิธีที่อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 3.9 พบว่า เอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ตรีงบนกิ่งระก้านั้นไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันได้ โดยเอนไซม์ตรีงจะเกิดการจับตัวเป็นก้อนแข็งและตกตะกอนอยู่ในปฏิกิริยาทุกครั้งแม้จะมีการปรับสภาวะในปฏิกิริยา การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และการเติมเมทานอลในปฏิกิริยาแล้วก็ตาม

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การใช้เอนไซม์ไลเปสในรูปอิสระเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารตั้งต้นที่เป็นไขมันหรือน้ำมันให้เป็นไขมันอิสระ และกลีเซอรอล พบว่าเอนไซม์ไลเปสในรูปอิสระมีความเสถียรในการทำงานค่อนข้างต่ำและไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำหรือกลับคืนสู่สภาพพร้อมใช้งานใหม่ได้หลังจากใช้งานแล้ว (Wang et al., 2006) ด้วยเหตุนี้จึงแก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการตรึงรูปเอนไซม์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มความเสถียรและการทำงานของเอนไซม์ให้สูงขึ้น เช่น สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการผลิตได้ (Hilal et al., 2006; Salis et al., 2003; Naby et al., 1998) การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับอาศัยการจับกันระหว่างเอนไซม์และตัวค้ำจุนที่ไม่ละลายน้ำ (จิตติมา เจริญพานิช, 2553) และการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวค้ำจุนไฮโดรโฟบิกก็เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคานิยมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสมากกว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Petkar et al., 2006) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายและใช้ค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่เนื่องจากการตรึงเอนไซม์ในปัจจุบันนั้นมีการใช้วัสดุค้ำจุนทางการค้าที่มีราคาแพงที่ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเอนไซม์ตรึงมีราคาสูงตามไปด้วย งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะค้นหาวัสดุค้ำจุนราคาถูกสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปสชอบอุณหภูมิสูงและทนตัวทำละลายอินทรีย์จาก *Acinetobacter baylyi* (Uttatree et al., 2010) เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งวัสดุค้ำจุนที่สนใจนำมาศึกษานี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชังข้าวโพด, แกลบข้าวสาร, กิ่งไทรยอดทอง (*Ficus microcarpa* L.f.), หยวกกล้วย, ทางต้นปาล์มหางกระรอก (*Wodywtia bifurcate* A. K. Irvine), กิ่งระกำ (*Salacca wallichiana*) และกากมะพร้าว และวัสดุที่เป็นเศษอาหาร ได้แก่ เปลือกไข่ เปลือกกุ้งแช่แข็ง เปลือกปูทะเล และเปลือกหอยแมลงภู่ โดยมีหลักในการเลือกวัสดุมาศึกษาด้วยการพิจารณาจาก ปริมาณที่เหลือทิ้ง สมบัติไม่ชอบน้ำ และมีลักษณะเป็นรูพรุน และเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงที่ได้กับเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนวัสดุค้ำจุนทางการค้าและเอนไซม์ไลเปสที่มีขายทางการค้า Novozyme 435 ต่อไป

การทดลองเริ่มจากการตัวค้ำจุนทางการค้าที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* (Uttatree et al., 2010) โดยวิธีการดูดซับ ซึ่งจะใช้ตัวค้ำจุนทางการค้า 5 ชนิดที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก ได้แก่ XAD-2, XAD-4, FPX-66, XAD7HP และ Sephadex G-75 ที่ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเมทานอล ในการทดสอบเพื่อผลิตเอนไซม์ตรึงไลเปสที่จะใช้เป็นชุดข้อมูลเปรียบเทียบของตัวค้ำจุนที่มีขายทางการค้า ผลการทดลองพบว่า XAD7HP และ FPX66 ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลเป็นตัวค้ำจุนทางการค้าที่ให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงสูง แต่การดูดซับปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงที่อยู่บนตัวค้ำจุน XAD7HP นั้นมีค่าที่ต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขนาดพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของ XAD7HP ที่กว้างพอสำหรับการตรึงเอนไซม์และดักเก็บเอนไซม์ไว้ในรูพรุนทำให้เพิ่มความสามารถในการที่เอนไซม์ไลเปสจะดูดซับบนตัวค้ำจุนและสัมผัสกับสับสเตรทและน้ำในปฏิกิริยาซึ่งจะช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เร็วกว่าการใช้ตัวค้ำจุนชนิดอื่นที่มีขนาดเล็กกว่า (Bosley and Clayton, 1994; Palomo et al., 2002) และเมื่อพิจารณาถึงแมทริกซ์ของตัวค้ำจุน XAD-7HP ซึ่งเป็นโพลีอะคริลิก เมื่อเทียบกับแมทริกซ์ของตัวค้ำจุนชนิดอื่นแล้ว พบว่าโพลีอะคริลิกเป็นตัวค้ำจุนที่มีรูพรุนและมีการกระจายของรูพรุนอย่างสม่ำเสมอ มีพื้นที่ผิวสูง เป็นอนุภาคที่ไม่มีประจุแต่มีขั้วปานกลางจึงสามารถดูดซับสารที่ไม่มีประจุได้เป็นจำนวนมาก (Lee et al.,

1988; Yu et al., 2009) และเนื่องจากพื้นที่ผิวของเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (Kamini et al., 2000) ทำให้ XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลสามารถแสดงสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิกได้มากขึ้น และจับกับเอนไซม์ได้เป็นจำนวนมาก จากเหตุผลเหล่านี้จึงเลือก XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลเป็นตัวค้ำจุนที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* มากกว่าตัวค้ำจุนชนิดอื่น

การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทุกชนิด ยกเว้นการตรึงเอนไซม์บนหยวกกล้วย และทางต้นปาล์มให้ประสิทธิภาพในการตรึงที่สูง และให้ค่าร้อยละการไหลดโปรตีนระหว่าง ร้อยละ 33 และร้อยละ 97 โดยในจำนวนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้งหมด ก็จะทำให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงและประสิทธิภาพในการตรึงสูงที่สุด ขณะที่เอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนกากมะพร้าวให้แอกติวิตีต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส สับสเตรท p-NPP สูงเท่ากับ 4.72 หน่วยต่อกรัมของตัวค้ำจุน แต่มีค่าร้อยละการไหลดโปรตีนเพียงร้อยละ 33 และให้ค่าประสิทธิภาพในการตรึงในระดับปานกลาง คือเท่ากับร้อยละ 90 แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงไลเปสที่สูงขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการดูดซับของเอนไซม์กับผิวของกากมะพร้าวที่สูงกว่าการดูดซับบนวัสดุอื่น สำหรับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนซังข้าวโพดและแกลบข้าวสารนั้นจะแสดงแอกติวิตีของเอนไซม์และค่าประสิทธิภาพในการตรึงที่ต่ำกว่า แม้จะมีค่าร้อยละการไหลดโปรตีนสูงก็ตาม นอกจากนี้ซังข้าวโพดและแกลบข้าวสารมักนิยมนะมาใช้เป็นมวลชีวภาพในการผลิตพลังงานทดแทนอยู่แล้ว (Chaiprasert, 2011) จึงทำให้วัสดุทั้งสองชนิดไม่น่าสนใจสำหรับการตรึงเอนไซม์

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้โดยเทคนิค SEM พบว่ากากมะพร้าว และกิ่งระกำมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยรูพรุนจำนวนมาก ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวภายในจำนวนมากเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบการดูดซับของเอนไซม์บนพื้นผิวและภายในรูพรุนของวัสดุอีกด้วย เมื่อพิจารณาเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนภายในกิ่งระกำเทียบกับกากมะพร้าวจะพบว่ามีความกว้างของรูพรุนที่มากกว่า ซึ่งบ่งบอกถึงอัตราการดูดซับเอนไซม์บนอนุภาคของวัสดุที่ดีกว่าอีกด้วย (Bosley and Clayton, 1994) ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าของกากมะพร้าวส่งผลให้พื้นผิวภายนอกของแมทริกส์ที่เอนไซม์จะเข้าไปดูดซับระหว่างการตรึงที่จะส่งผลให้มีโอกาสที่สับสเตรทและเอนไซม์จะเจอกันง่ายขึ้น รวมถึงเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าอีกด้วย แต่ความกว้างของรูพรุนก็ส่งผลเสียเนื่องจากทำให้เกิดการจำกัดการแพร่ของสับสเตรทและการสะสมของผลิตภัณฑ์ได้น้อยเช่นกัน จึงมักถูกยับยั้งการทำงานได้จากการสะสมของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ภายในรูพรุนได้ (Bosley and Clayton, 1994; Palomo et al., 2002) ด้วยเหตุนี้กิ่งระกำจึงมีลักษณะที่น่าสนใจในการนำมาเป็นตัวค้ำจุนในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ได้ดีกว่ากากมะพร้าวนั่นเอง

สำหรับผลการทดลองตรึงเอนไซม์ด้วยวัสดุค้ำจุนทางธรรมชาติที่เป็นเศษอาหารนั้น พบว่าเปลือกไข่ขนาดเล็กให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงสูงที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากเปลือกไข่นั้นเป็นวัสดุที่ประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่มีรูพรุนและส่วนที่มีรูพรุนตรงกลางขนาดใหญ่เปิดอยู่ โดยมีธาตุคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ (Tsai et al., 2005) ทำให้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนผิวของเปลือกไข่สามารถเข้าจับในส่วนที่มีรูพรุนได้ และในส่วนเยื่อหุ้มของเปลือกไข่นั้นมีลักษณะเป็นเมมเบรนกึ่งเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) เส้นใยที่ไม่ละลายน้ำและมีพื้นที่ผิวสูง จึงสามารถดูดซับเอนไซม์ได้ดีกว่าเปลือกกุ้ง เปลือกหอยแมลงภู่ และเปลือกปูทะเล (Suyama et al., 1994; Ishikawa and Suyama, 1998; Allen et al., 2000; Gota and Suyama, 2000; Ishikawa et al., 2002; Koumanova et al., 2002)

เมื่อได้ตัวค้ำจุนทางการค้าและตัวค้ำจุนที่เป็นวัสดูธรรมชาติที่เหมาะสมในการตรึงไนโตรเจนจาก *A. baylyi* แล้ว จึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงไนโตรเจนบนวัสดูดังกล่าว โดยศึกษาปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อแอกติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์ขณะตรึง ได้แก่ ค่าความเร็วในการกวน ค่าพีเอชและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึง เป็นต้น (ตารางที่ 7) ปัจจัยแรกที่ทำการศึกษาคือ ค่าความเร็วในการกวนที่ส่งผลต่อการตรึงรูปเอนไซม์ จากภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าการใช้ความเร็วในการกวนเท่ากับ 350 รอบต่อนาที สามารถทำให้เอนไซม์ตรึงไลเปสแสดงแอกติวิตีได้สูงที่สุด อาจกล่าวได้ว่าที่ค่าความเร็วในการกวนนี้ ส่งผลให้เอนไซม์กระจายตัวและถูกตรึงเข้าไปข้างในรูพรุนของ XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลได้ดีที่สุด สำหรับการตรึงบนตัวค้ำจุนที่เป็นเปลือกไข่นั้นพบว่าเอนไซม์ตรึงให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์สูงที่สุดเมื่อทำการตรึงที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ขณะที่ของตัวค้ำจุนที่เป็นกิ่งระกำพบว่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จะให้แอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสูงที่สุด ซึ่งสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกัน แต่เมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนสูงขึ้นเอนไซม์อาจจะถูกแรงเหวี่ยงดึงเอาเอนไซม์ออกจากรูพรุนหรือพื้นผิวเอนไซม์ ประกอบกับฟองอากาศที่เกิดจากการเขย่าที่ความเร็วสูงอาจส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์ได้

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* บนตัวค้ำจุนทั้งสามชนิด

ปัจจัยทางกายภาพ	ชนิดของตัวค้ำจุนที่ใช้ตรึงเอนไซม์		
	XAD7HP	กิ่งระกำ	เปลือกไข่
ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	350	250	300
ชนิดและค่าพีเอชของบัฟเฟอร์	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 7.0	ทริสไฮโดรคลอไรด์ ค่าพีเอช 7.0	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าพีเอช 6.0
ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)	40	10	10
ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0.25	0.1	0.3
อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ (องศาเซลเซียส/นาที)	20/120	30/90	10/150

สำหรับผลของค่าพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ พบว่าในตัวค้ำจุน XAD-7HP กราฟที่ได้มีลักษณะเป็นรูปประฆังคว่ำ โดยค่าพีเอชที่ 7.0 ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จะให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงสูงที่สุด ขณะที่ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ตรึงบนเปลือกไข่และกิ่งระกำจะมีค่าสูงสุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีไอ (isoelectric point; pI) ของเอนไซม์และส่งผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนที่บริเวณผิวของเอนไซม์ที่เหนี่ยวนำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำจุนเพิ่มขึ้นด้วย (Lei et al., 2009) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จะมีค่าพีไอประมาณ 6.0 (Uppenberget al., 1994) ขณะที่ตัวค้ำจุนทางการค้า XAD-7HP จะมีค่าพีไอเท่ากับ 6.2 (Dominguez et al., 2011) และในตัวค้ำจุนกลุ่มลิกโนเซลลูโลสจะมีค่าพีไออยู่ประมาณ 2 (Pino et al., 2006) เมื่อค่าพีเอชของระบบเอนไซม์เท่ากับ 6.0 และ 7.0 จึงส่งผลให้ประจุสุทธิของเอนไซม์ไลเปสและตัวค้ำจุนทางการค้า XAD-7HP จะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ทำให้เกิดการจับกันด้วยแรงไฮโดรโฟบิกมากขึ้น ส่วนตัวค้ำจุนทางธรรมชาติจะแสดงประจุเป็นลบทุกค่าพีเอชที่ทำการทดลองอาจส่งผลให้เกิดการจับอย่างหลวมๆ กับเอนไซม์ได้ แต่เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะ

ที่เป็นต่างอ่อน (Uttatree et al., 2010) ดังนั้นเมื่อเอนไซม์อยู่ในสถานะที่มีค่าพีเอชเป็นกรดอ่อนถึงกลาง อาจส่งผลให้การแตกตัวของกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์ลดน้อยลง และทำให้ประจุสุทธิของเอนไซม์มีค่าเข้าใกล้ศูนย์มากขึ้น จึงทำให้สามารถยึดเกาะกับตัวค้ำจุนได้มากขึ้น สำหรับค่าพีเอชในช่วงที่เป็นกรดหรือด่างเกินไป จะส่งผลให้การตรึงรูปเอนไซม์และการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไหลพลดลง ทั้งนี้เนื่องจากอาจเกิดการเสียสภาพหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์

เมื่อทำการศึกษาค่าผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเอนไซม์ ซึ่งบอกถึงความแรงไอออนที่มีต่อการตรึงเอนไซม์ไหลพลนั้นพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำจุน XAD7HP กิ่งระกำ และเปลือกไซ้ นั้น ทำให้เอนไซม์ตรึงมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ไม่แตกต่างกันมาก โดยที่ความเข้มข้นสูงจะให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงด้วย ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากเมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ (ความแรงไอออน) เพิ่มขึ้น จะทำให้แรงไฮโดรโฟบิกและแรงทางประจุไฟฟ้าที่ยึดเอนไซม์กับตัวค้ำจุนมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้าหากเพิ่มความแรงไอออนมากขึ้นไปอีก อาจส่งผลให้เอนไซม์แตกตัวและแสดงประจุได้เพิ่มขึ้น จึงทำให้แรงไฮโดรโฟบิกและแรงทางประจุไฟฟ้าที่ยึดเอนไซม์ไว้กับตัวค้ำจุนมีความแรงลดลงได้ (Bastida et al., 1998)

ปัจจัยต่อมาที่ทำการศึกษาคือ ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงจะเห็นว่า ความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงไหลพลสูงขึ้น และจะมีค่าสูงที่สุดเมื่อใช้เอนไซม์ไหลพลที่ระดับความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และเมื่อความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นค่าที่ได้ก็จะคงที่ สำหรับในตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไหลพลที่ใช้ตรึงรูปจะส่งผลให้สเตริกฮินแดนซ์ (steric hindrance) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์ดีขึ้น จึงทำให้การแพร่ของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ที่เกิดภายในโมเลกุลของเอนไซม์ดีขึ้น และเนื่องจากพื้นที่ผิวของตัวค้ำจุนที่ใช้ยึดเกาะและเร่งปฏิกิริยามีบริเวณที่จำกัดจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นค่าหนึ่งเท่านั้น เพื่อให้เกิดการยึดเกาะและเร่งปฏิกิริยาอย่างมีประสิทธิภาพ (Jiang et al., 2008; Chang et al., 2008; Lei et al., 2009) ด้วยเหตุนี้ การเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนของเอนไซม์จาก 0.5 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จึงไม่ส่งผลให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงเพิ่มขึ้นได้ ขณะที่การตรึงกับเปลือกไซ้พบว่าการใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นจะให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไปอีกจะทำให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงลดลง ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลมาจากบริเวณพื้นที่ผิวของตัวค้ำจุนที่ใช้ยึดเกาะมีบริเวณที่จำกัดจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นค่าหนึ่งเท่านั้น เพื่อให้เกิดการยึดเกาะและเร่งปฏิกิริยาอย่างมีประสิทธิภาพ (Jiang et al., 2008; Chang et al., 2008; Lei et al., 2009) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ก็จะไม่ส่งผลต่อการตรึงรูปและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเพราะบริเวณพื้นที่ผิวที่ถูกจับนั้นถูกจับจนหมดจนไม่สามารถจับเอนไซม์ที่ใส่เพิ่มขึ้นมาได้อีก ส่งผลให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงมีค่าคงที่นั่นเอง ซึ่งสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกันกับผลการตรึงเอนไซม์บนกิ่งระกำ

เมื่อทดสอบผลของเวลาและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์ไหลพลจาก *A. baylyi* ด้วยวัสดุค้ำจุน XAD7-HP กิ่งระกำ และเปลือกไซ้ พบว่าการเพิ่มเวลาในการตรึงเอนไซม์จะส่งผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันในทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ และเมื่อเพิ่มเวลาในการตรึงเอนไซม์อย่างต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จะเห็นว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงไหลพลมีค่าคงที่ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากข้อจำกัดในเรื่องพื้นที่ผิวของวัสดุค้ำจุนที่ใช้ตนเอง สำหรับอุณหภูมิที่สูงเชื่อว่าส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่จำกัดในโครงสร้าง

ธรรมชาติของเอนไซม์ที่มีผลต่อความสามารถในการตรึงรูปเอนไซม์นั้น พบว่าไม่สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ได้เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงอยู่แล้ว (Uttatree et al., 2010) แต่เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตที่ต้องมีการใช้ความร้อนในระบบจึงทำการเลือกตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาที สำหรับตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล และทำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที และอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เวลา 150 นาที สำหรับตัวค้ำจุนที่เป็นกิ่งระกำใหญ่ และเปลือกไข่ ตามลำดับต่อไป

การหาปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนกิ่งระกำและเปลือกไข่ ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรท p-NPP พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ตรึงมากขึ้นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณสับสเตรทที่ใช้ในปฏิกิริยาที่ไม่เพียงพอกับปริมาณเอนไซม์ตรึงที่เพิ่มขึ้น สำหรับการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ตรึงไลเปสเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง (25 ถึง 30 องศาเซลเซียส) เทียบกับของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ในรูปอิสระ พบว่า การตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำจุนทางการค้า XAD7HP สามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้เล็กน้อย ขณะที่การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวค้ำจุนกิ่งระกำใหญ่สามารถเพิ่มความเสถียรในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 15 วัน โดยยังคงเหลือแอกติวิตีอยู่มากกว่าครึ่งเมื่อเทียบกับเอนไซม์ไลเปสจาก *A. baylyi* ในรูปอิสระและเอนไซม์ตรึงไลเปสบนตัวค้ำจุน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางธรรมชาติของเอนไซม์หลังการตรึงที่สามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้ (จิตติมา เจริญพานิช, 2553) สำหรับความเสถียรที่ลดลงเมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงไลเปสของกิ่งระกำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนี้ อาจเป็นเพราะลักษณะของกิ่งระกำที่สามารถดูดน้ำได้เยอะ เมื่อเจอความเย็นอาจเกิดการหดตัวจับเป็นก้อนทำให้สับสเตรทไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับการตรึงเอนไซม์บนเปลือกไข่ไม่มีความเสถียรในการเก็บรักษาที่ทั้งสองอุณหภูมิ ซึ่งเมื่อแก้ไขโดยทำการตรึงเอนไซม์ร่วมกับสารเชื่อมข้ามกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) แล้วพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงมีค่าลดลง แม้จะใช้ปริมาณของกลูตารัลดีไฮด์ที่ต่ำเพียงร้อยละ 0.01 ก็ตาม ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับการใช้กลูตารัลดีไฮด์เชื่อมข้ามขณะตรึงเอนไซม์บนกิ่งระกำ ที่เป็นอย่างนี้อาจเนื่องมาจากกลูตารัลดีไฮด์ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสารเชื่อมข้ามในการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนวัสดุดังกล่าว และยังส่งผลกระทบต่อปริมาตร (steric hindrance) ของเอนไซม์ทำให้สับสเตรทเข้าจับกับเอนไซม์ได้ยากขึ้นอีกด้วย (Alkorta et al., 1995) ซึ่งเคยมีรายงานที่คล้ายกันในการตรึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) บนกากมะพร้าว (Dey et al., 2002)

สำหรับความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงไลเปสกลับมาใช้ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตรทน้ำมันปาล์มนั้น พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนตัวค้ำจุน XAD7HP และบนเปลือกไข่ มีประสิทธิภาพในระดับที่ใกล้เคียงกับ Novozyme 435 ดังสรุปในตารางที่ 8 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเยื่อหุ้มตรงบริเวณเปลือกไข่สามารถดูดซับเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง ขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนกิ่งระกำนั้นมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่ำกว่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในตัวค้ำจุนกิ่งระกำ เอนไซม์ไลเปสอาจถูกตรึงได้แค่ในรูพรุนหรือบนพื้นผิวของเอนไซม์ด้วยแรงยึดเหนี่ยวที่อ่อนกว่าแรงไฮโดรโฟบิกที่พบในเอนไซม์ไลเปสทางการค้า Novozyme 435 และเอนไซม์ไลเปสตรึงบน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล ทำให้เวลานำเอนไซม์ตรึงไลเปสบนตัวค้ำจุนกิ่งระกำไปทำปฏิกิริยาค้ำกับสับสเตรท เอนไซม์ไลเปสอาจหลุดออกจากพื้นผิวของตัวค้ำจุนได้ง่าย และอีกปัจจัยหนึ่งคือ ตัวค้ำจุนกิ่งระกำนั้นอาจมีพื้นผิวในการตรึงเอนไซม์น้อยทำให้เอนไซม์ที่ใส่ลงไประหว่างการตรึงบนตัวค้ำจุนน้อย แต่เอนไซม์ไลเปสทาง

การค้า Novozyme 435 และเอนไซม์ไลเพสตรังบน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอล เป็นตัวค้าจุนที่มีรูปพรุน และมีพื้นที่ผิวสูงสามารถที่จะรับการใส่เอนไซม์ลงไปบนตัวค้าจุนได้มาก (Brigida et al., 2007) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์ไลเพสทางการค้า Novozyme 435 และเอนไซม์ไลเพสตรังบน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลสามารถนำมาใช้ซ้ำได้ด้วยจำนวนรอบที่สูงกว่าของเอนไซม์ไลเพสตรังบนตัวค้าจุนกึ่งระกำ ส่วนการที่เอนไซม์ไลเพสตรังบน XAD-7HP ที่ถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลให้ประสิทธิภาพในการทำงานใกล้เคียงกับเอนไซม์ไลเพสทางการค้า Novozyme 435 นั้นอาจเนื่องจากตัวค้าจุนที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเพสเป็นตัวค้าจุนชนิดเดียวกันคือ โพลีอะคริลิก (Lee et al., 1988; Yu et al., 2009) จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงไลเพสจาก *A. baylyi* เทียบกับเอนไซม์ในรูปอิสระและเอนไซม์ตรึงไลเพสทางการค้า Novozyme 435

ประสิทธิภาพของเอนไซม์	เอนไซม์ไลเพส					
	<i>A. baylyi</i> อิสระ	<i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบน XAD7HP	<i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบน กึ่งระกำ	<i>A. baylyi</i> ที่ตรึงบน เปลือกไข่	Novozyme 435	
ความเสถียรในการเก็บรักษาที่ให้ แอกติวิตีคงเหลือมากกว่าครึ่ง (วัน)	25°C	3	9	>30	3	>30
	4°C	3	7	15	5	>30
การนำกลับมาใช้ซ้ำที่ให้แอกติวิตี คงเหลือมากกว่าครึ่ง (จำนวนรอบ)	-	3	2	3	3	3

การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ไลเพสจาก *A. baylyi* ที่ตรึงบนกึ่งระกำพบว่า เอนไซม์ตรึงมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 9.0 แต่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาต่ำลงไปเป็น 37 องศาเซลเซียส จากเดิมในรูปอิสระที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตรึงเอนไซม์ส่งผลให้เอนไซม์อยู่ในโครงสร้างที่เป็นโครงสร้างเปิดมากขึ้น จึงทำให้มีค่าแอกติวิตีที่ต่ำลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Cowan and Fernandez-Lafuente, 2011) สำหรับความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ตรึงนั้นอาจเนื่องมาจากการตรึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์เล็กน้อยที่ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้ อย่างไรก็ตามแม้เอนไซม์ตรึงที่เตรียมได้จะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิฟิเคชันผลิตภัณฑ์โอดีเซลจากน้ำมันปาล์มได้ แต่ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสับสเตอร์น้ำมันปาล์มก็มีความเป็นไปได้ที่จะนำเอนไซม์ตรึงมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการกระบวนการสลายน้ำมัน และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเศษอาหาร เช่น กึ่งระกำและเปลือกไข่ นำมาใช้ซ้ำเป็นตัวค้าจุนในการตรึงเอนไซม์ เป็นการลดขยะอีกทางหนึ่งด้วย

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การหาวัสดุค้ำจุนราคาถูกสำหรับตรึงรูปเอนไซม์ไลเพสชอบอุณหภูมิสูงและมีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตจาก *Acinetobacter baylyi* (ABL) จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ชั่งข้าวโพด แกลบข้าวสาร หยวกกล้วย ทางต้นปาล์มทางกระรอก (*Wodyetia bifurcate* A.K.) กากมะพร้าว กิ่งไทรยอดทอง (*Ficus microcarpa* L.f.) และกิ่งระกำ (*Salacca wallichiana*) และเศษอาหาร จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกไข่ เปลือกกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) เปลือกปูทะเล (*Scylla serrata*) และเปลือกหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) พบว่ากิ่งระกำและเปลือกไข่ ขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ให้ประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ไลเพสสูงที่สุด เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพส ABL โดยวิธีการดูดซับบนกิ่งระกำพบว่าการใช้บัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์และมีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ตรึงเอนไซม์ไลเพส ABL ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาทีด้วยความเร็วในการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพส ABL บนกิ่งระกำ ขณะที่การตรึงบนเปลือกไข่มีสภาวะที่เหมาะสมคือบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์และมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาทีด้วยความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที การศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ตรึงไลเพส ABL บนกิ่งระกำพบว่าเอนไซม์ตรึงมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ต่ำกว่าของเอนไซม์ไลเพส ABL ในรูปอิสระแต่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่สูงขึ้น การทดสอบความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มพบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับของเอนไซม์ไลเพสตรึงรูปทางการค้า Novozyme 435 และที่น่าสนใจคือเอนไซม์ไลเพส ABL ที่ตรึงบนกิ่งระกำมีความเสถียรในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-32 องศาเซลเซียส) เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่เอนไซม์ไลเพส ABL ที่ตรึงบนเปลือกไข่ไม่มีความเสถียรในการเก็บรักษา ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำกิ่งระกำมาเป็นวัสดุค้ำจุนราคาถูกสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเพสต่อไป

บรรณานุกรม

- คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. *พลังงานทดแทน เอทานอลและไบโอดีเซล*. จิตติมา เจริญพานิช. 2553. *เอนไซม์วิทยา*. โอ. เอส. พรินดีง เอ้าส์. กรุงเทพฯ.
- ปราณี อานเป็รื่อง. 2547. *เอนไซม์ทางอาหาร*. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- Abigor, R.D., Uadia, P.O., Foglia, T.A., Haas, M.J., Jones, K.C., Okpefa, E., Obibuzor, J.U., and Bafor, M.E. 2000. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oil. *Biochemical Society Transaction*. 28: 979-981.
- Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L. 1995. Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 141-146.
- Allen S.J., Wolki M., Ulbig P., Healy M. 2000. The use of egg shell membrane as an adsorbent for the treatment of coloured waste effluents. Do, D.D. (Ed.), *Adsorption Science and Technology*. World Scientific. Singapore. 5: 46-50.
- Arpigny, J.L., and Gaeger, K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*. 343: 177-183.
- Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernández-Lafuente R., Huguet J., Guisán J.M. 1998. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology*. 58: 486-493.
- Bradford M.M. 1976. Bradford assay for protein quantification. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bosley J.A., Clayton J.C. 1994. Blueprint for a lipase support use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnology and Bioenergy*. 43: 934-938.
- Brigida A.I.S., Pinheiro A.D.T., Ferreira A.L.O., Pinto G.A.S., Gonçalves L.R.B. 2007. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 136: 67-80.
- Buchho K., Kasche V., Bornsheuer U.T. 2005. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Chaiprasert, P. 2011. Biogas production from agricultural wastes in Thailand. *Journal of Sustainable Energy and Environmental*. Special Issue: 63-65.
- Chang S.W., Shaw J.F., Yang K.H., Chang S.F., Shieh C.J. 2008. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly (α -glutamic acid) by RSM. *Bioresource Technology*. 99: 2800-2805.
- Chen W.H., Chen C.H., Chang C.M.J., Chiu Y.H., Hsiang D. 2009. Supercritical carbon dioxide extraction of triglycerides from *Jatropha curcas* L. seeds. *Journal of Supercritical Fluids*. 51: 174-180.

- Christner J., Pfeiderer E., Taeger T. 1991. *Enzyme-Aided Soaking Process for Skins and Hide*, United Kingdom Patent 2233665.
- Cowan D.A., Fernandez-Lafuente R. 2011. Enhancing the functional properties of the thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 49: 326-346.
- Dey G., Nagpal V., Banerjee R. 2002. Immobilization of α -amylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 102-103: 303-313.
- Dizge N., Aydiner C., Imer D.Y., Bayramoglu M., Tanriseven A., Keskinler B. 2009. Biodiesel production from sunflower, soybean and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*. 100: 1983-1991.
- Domínguez J.R., González T., Palo P., Correa E.M.C. 2011. Removal of common pharmaceuticals present in surface waters by Amberlite XAD-7 acrylic-ester-resin: Influence of pH and presence of other drugs. *Desalination*. 269: 231-238.
- Fang L., Li W., Zhou Y., Liu C.C. 2009. A single-use, disposable iridium-modified electrochemical biosensor for fructosyl valine for the glycosylated hemoglobin detection. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 137: 235-238.
- Fariha H., Amer A.S., Abdul H. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235-255.
- Figurin Y.V., Shestakova I.S., Mironova T.F., Shtein I.V., Arends I.M. 1990. *Method of processing Hides and Skinc*. Union of the Soviet Socialists Republic patent.
- Fukada, H., Kondo, A., and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92 (5): 405-416.
- Gandhi N.N. (1997). Applications of lipase. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 74: 621-634.
- Gerpen, van J. 2005. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*. 86: 1097-1107.
- Gota M., Suyama K. 2000. Occlusion of transition metal ions by new adsorbents synthesized from plant polyphenols and animal fibrous proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86: 1021-1038.
- Haki, G.D., and Rakshit, S.K. 2003. Development in industrially important thermostable enzyme: a review. *Bioresources Technology*. 89: 17-34.
- Han, S., Back, J., Yoon, M., Shin, P., Cheong, C., Sung, M., Hong, S., Chung, I., and Has, Y. 2003. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter species* SY-01. *Biochimie*. 85: 501-510.

- Hasan, F., Shah, A. A., and Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 235–251
- Hilal N., Kochkodan V., Nigmatullin R., Goncharuk V., Khatib L.A. 2006. Lipase immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: comparison of various approaches to membrane preparation. *Journal of Membrane Science*. 268: 198-207.
- Hoq M.M., Yamane T., Shimizu S. 1985. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 62: 1016-1021.
- Ibrahim N.A.B., Guo Z., Xu X. 2008. Enzymatic interesterification of palm stearin and coconut oil by a dual lipase system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85: 37-45
- Ishikawa S.I., Suyama K. 1998. Recovery and refining of Au by gold-cyanide ion biosorption using animal fibrous proteins. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 70-72: 719–728.
- Ishikawa S.I., Suyama K., Arihara K., Itoh M. 2002. Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. *Bioresource Technology*. 81(3): 201-6.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B*. 16: 53-58.
- Jaeger, K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. 1994. Bacterial lipase. *FEMES Microbiology Reviews*. 15(1): 29-63.
- Jaeger K.E, Reetz M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnology*. 16: 396–403.
- Jiang Y., Guo C., Xia H., Mahmood I., Liu C., Liu H. 2008. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 58: 103-109.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., and Fukuda, H. 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipase in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 91: 12-15.
- Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*. 36: 317-324.
- Koumanova B., Peeva P., Stephen J.A., Gallagher K.A., Healy M.G. 2002. Biosorption from aqueous solutions by eggshell membranes and *Rhizopus oryzae*: Equilibrium and kinetic studies. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*. 77: 539–545.
- Kuo T.M, Gardner H. 2002. *Lipid Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc.

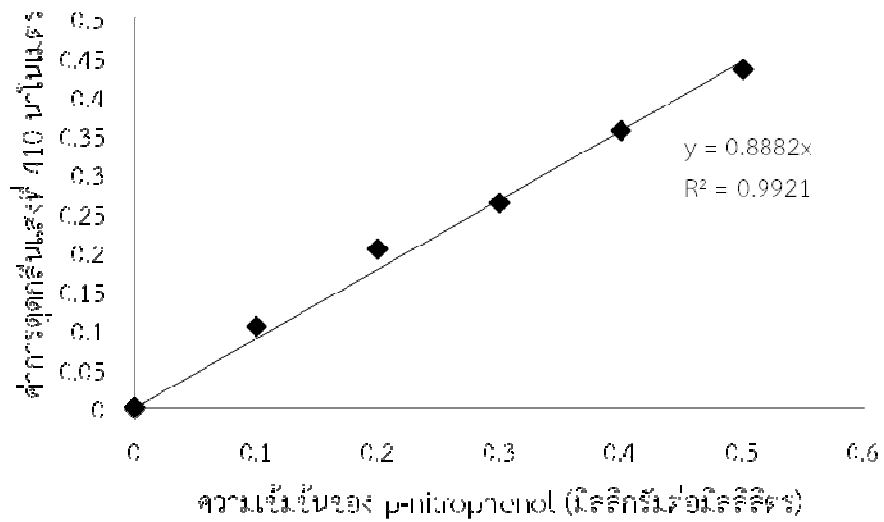
- Lawson L.D, Hughes B.G. 1988. Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 52: 328-35.
- Lee D.W., Eum C.H., Lee I.H., Jeon S.J. 1988. Adsorption behavior of 8-hydroxyquinoline and its derivatives on Amberlite XAD resins, and adsorption of metal metal ions by using chelating agent-impregnated resins. *Analytical Sciences*. 4: 505.
- Lei J., Bai Y., Li Y., Yi L., Yang Y., Xi C. 2009. Study on immobilized of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *Journal of Magnetic Materials*. 321: 252-258.
- Li Q., Yan Y. 2008. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. *Applied Energy*. 87: 3148-3154.
- Macrae A.R, Hammond R.C. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotechnology*. 3: 193-217.
- Naby M.A.A., Ismail A.M.S., Ahmed S.A., Fattah A.F.A. 1998. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresource Technology*. 64: 205-210.
- Palomo J.M., Gloria M., Gloria F.-L., Cesar M., Roberto F.-L., Guisán J.M. 2002. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 19: 279-286.
- Pencreac'h G., Baratii J.C. 1996. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme Microbial Technology*. 18: 417-422.
- Petkar, M. Lali, A., Caimi, P., and Daminati, M. 2006. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 39: 83-90.
- Pino G.H., Mesquita L.M.S., Torem M.L., Pinto G.A.S. 2006. Biosorption of cadmium by green coconut shell powder. *Minerals Engineering*. 19: 380-387.
- Pischinger, G.M., Falcon, A.M., Siekmann, R.W., and Fernandes, F.R. 1982. Methyl esters of plant oils as diesel fuels, either straight or in blends. Vegetable Oil Fuels. ASAE Publication 4-82. *American Society of Agricultural and Engineering*. St. Joseph, MI, USA. 198-208.
- Raita M., Champreda V., Laosiripojana. L. 2010. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system. *Process Biochemistry*. 45: 829-834.
- Ramachandra R., Jayadev B., Muniswaran P.K.A. 2002. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnology and Bioprocess*. 7: 57-66.
- Salis A., Sanjust E., Solinas V., Monduzzi M. 2003. Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*. 24: 75-82.

- Seitz E.W. 1974. Industrial applications of microbial lipases: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 51: 12-16.
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology*. 19: 627-662.
- Snellman, E. A., and Colwell, R. R. 2004. *Acinetobacter* lipase: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 31: 391-400.
- Suyama K., Fukazawa Y., Umetsu Y. 1994. A new biomaterial hen egg shell membrane, to eliminate heavy metal ion from their dilute waste solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 45: 871-879
- Tsai W.T., Yang J.M., Lai C.W., Cheng Y.H., Lin C.C., Yeh C.W. 2005. Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource Technology*. 97(3): 488-493.
- Uhlig H., Linsmaier-Bednar E.M. 1998. *Industrial Enzyme and Their Applications*. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones A. 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*. 2: 293-308.
- Uttatree S., Charoenpanich J. 2011. Nutritional requirements and physical factors affecting the production of organic solvent-stable lipase by *Acinetobacter baylyi*. *Chiang Mai University Journal of Natural Science*. 10: 115-131.
- Uttatree, S., Winayanuwattikun, P., and Charoenpanich, J. 2010. Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162: 1362-1376.
- Walsh G. 2002. *Proteins Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Wang L., Du W., Liu D.H., Li L.L., Dai N.M. 2006. Lipase-catalysed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 43: 29-31.
- Wang Y., Zhang L. 2009. Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62: 91-96.
- Xu Y., Liu H., Du W., Sun Y., Ou X., Liu D. 2009. Integrated production of biodiesel and 1,3-propanediol with lipase catalysed transesterification and fermentation. *Biotechnology*. 39: 1335-1341.

- Yamane T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. *Journal of American Oil Chemist's Society*. 64: 1657-1662.
- Yan G., Yang G., Xu L., Yan Y. 2007. Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 49: 28-35.
- Yu Q., Zhang R., Deng S., Huang J., Yu G. 2009. Sorption of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate on activated carbons and resin: Kinetic and isotherm study. *Water Research*. 43: 1150-1158.

ภาคผนวกที่ 1

กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล



แอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย) คำนวณตามวิธีของ Hung S. Y, Ku C. Y and Chang C. M, 2003 ซึ่งใช้สูตร

(ความชัน x ปริมาตร x จำนวนเท่าของการเจือจาง)

$$\frac{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ความต่างของเวลาที่เกิดปฏิกิริยา} \times \text{ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้วัด)}}{\text{โปรตีนรวม}}$$

แอกติวิตีรวม (หน่วย) = แอกติวิตีของเอนไซม์ x ปริมาตรของเอนไซม์ทั้งหมด

แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม) =
$$\frac{\text{แอกติวิตีรวม}}{\text{โปรตีนรวม}}$$

ภาคผนวกที่ 2

การหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

$$\text{ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{แอกติวิตีรวมของตัวอย่าง} \times 100}{\text{แอกติวิตีรวมของตัวเริ่มต้น}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ความเข้มข้นโปรตีนของตัวอย่าง} \times 100}{\text{ความเข้มข้นโปรตีนของตัวเริ่มต้น}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ (ไมโครโมล/นาที่/กรัมของตัวค้ำจุน)} = \frac{\text{ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงไลเพส}}{\text{จำนวนกรัมของเอนไซม์ตรึงไลเพสที่ใช้}}$$

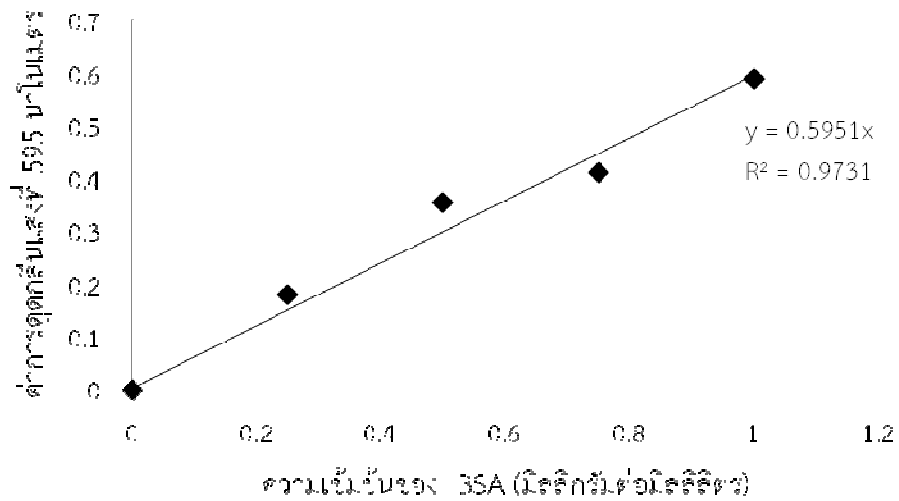
แอกติวิตีของเอนไซม์ไลเพสที่ได้จากการไทเทรต

$$\frac{1000 \times (\text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ตัวอย่าง} - \text{ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ควบคุม}) \times \text{นอร์มอล}}{4 \text{ มิลลิลิตร} \times 15 \text{ นาที}}$$

$$1 \text{ หน่วย} = \text{มิลลิโมลของกรดไขมัน} / \text{ปริมาตรของเอนไซม์ตัวอย่าง} / \text{นาที}$$

ภาคผนวกที่ 3

กราฟมาตรฐานของโบวินซีรัมอัลบูมิน

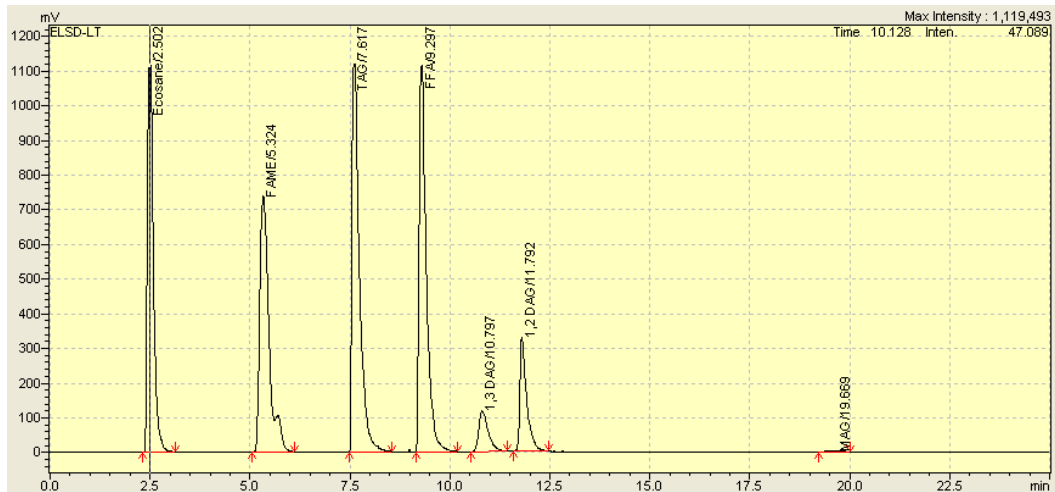


$$\text{ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาณของเอนไซม์}}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน BSA}}$$

$$\text{โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)} = \text{ความเข้มข้นโปรตีน} \times \text{ปริมาณของเอนไซม์ทั้งหมด}$$

ภาคผนวกที่ 4

ตัวอย่างผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ของสารมาตรฐานในปฏิกิริยา ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งโดยเอนไซม์ตรึงไลเปส



เรียงลำดับการออกของสารจากซ้ายไปขวาเป็น Eicosane, Fatty acid methyl ester (FAME หรือ Biodiesel), Triglyceride (TAG), Free fatty acid (FFA), 1,3 Diglyceride (1,3 DAG), 1,2 Diglyceride (1,2 DAG) และ Monoglyceride (MAG)

คำนวณ % conversion จาก

FAME

$$\{FAME + FFA + (TAG \times 3) + (1,3 \text{ DAG} \times 2) + (1,2 \text{ DAG} \times 2) + MAG\}$$

เมื่อ	FAME	=	ความเข้มข้นของเมทิลเอสเทอร์
	FFA	=	ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระ
	TAG	=	ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์
	DAG	=	ความเข้มข้นของไดกลีเซอไรด์
	MAG	=	ความเข้มข้นของโมนอกลิเซอไรด์