

การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออก
นอกเซลล์จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ
Debaryomyces nepalensis BS1

PARTIAL CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR
LIPASE FROM *Wickerhamiella* sp. BN1 AND
Debaryomyces nepalensis BS1



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2565
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PARTIAL CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR
LIPASE FROM *Wickerhamiella* sp. BN1 AND
Debaryomyces nepalensis BS1



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2022
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสชนิดหลังออกนอกเซลล์จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *Debaryomyces nepalensis* BS1

ชื่อนักศึกษา นางสาวฉัตรปวีณ์ งอกขึ้น รหัสนักศึกษา 62050579
นางสาวญาณวดี ชุมนาค รหัสนักศึกษา 62050589

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2565
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วิมลมาศ บุญมี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ประธานกรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสชนิดหลังออกนอกเซลล์จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>Debaryomyces nepalensis</i> BS1
ชื่อนักศึกษา	นางสาวฉัตรปวีณ์ งอกขึ้น รหัสนักศึกษา 62050579 นางสาวญาณวดี ชุมนาค รหัสนักศึกษา 62050589
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลมาศ บุญมี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ ไอโซ-บิวทานอล และ เอ็น-บิวทานอล ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ตามลำดับ และเพื่อศึกษาผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 โดยทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีการไทเทรต และใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 มีระดับความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส คือ ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.1100 ± 0.040 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 78.2 ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 สามารถถูกกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้มีค่าสูงสุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่ ร้อยละ 10.0 โดยปริมาตร โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 5.5000 ± 0.200 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 175.5 ผลการศึกษาผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 พบว่า EDTA มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 คาดว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 อาจเป็นเมทัลโลเอนไซม์ และไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 คือ แคลเซียมไอออน

และ ซิงค์ (II) ไอออน โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 2.9000 ± 0.100 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ

2.3333±0.153 ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 127.9 และ 102.9 ตามลำดับ ส่วนไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 คือ แคลเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออน โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 4.4000±0.100 ยูนิ ตต่อมิลลิลิตร และ 3.6667±0.153 ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 132.0 และ 110.0 ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ได้

คำสำคัญ : เอนไซม์ไลเปส, เอ็น-บิวทานอล, ไอออนโลหะ, ไอโซ-บิวทานอล, *D. nepalensis* BS1, EDTA, *Wickerhamiella* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Partial characterization of extracellular lipase from <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 and <i>Debaryomyces nepalensis</i> BS1		
Students	Miss Chatpawee	Ngokkun	Student ID 62050579
	Miss Yannawadee	Chumnak	Student ID 62050589
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
School	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2022		
Advisor	Dr.Wimonmat Boonmee		
Co-advisor	Asst.Prof.Dr.Somphit Sornyotha		

Abstract

The objective of this special project was to study the optimum concentration of iso-butanol and n-butanol for lipase activity from *Wickerhamiella* sp. BN1 and *Debaryomyces nepalensis* BS1, respectively, and the effect of EDTA and metal ion on lipase activity from *Wickerhamiella* sp. BN1 and *D. nepalensis* BS1. The lipase activity was measured by titration using olive oil as the substrate. The maximum activity of lipase from *Wickerhamiella* sp. BN1 was 2.1100 ± 0.040 U/ml. (78.2% relative activity) at 2.5 percent by volume of iso-butanol and the maximum activity of lipase from *D. nepalensis* BS1 was 5.5000 ± 0.200 U/ml. (175.5% relative activity) at 10.0 percent by volume of n-butanol. Lipases from *Wickerhamiella* sp. BN1 and *D. nepalensis* BS1 were inactive in the presence of 5 mM of EDTA indicating that lipases from *Wickerhamiella* sp. BN1 and *D. nepalensis* BS1 are metalloenzymes. The presence of calcium ion (Ca^{2+}) and zinc ion (Zn^{2+}) activated lipase activity from *Wickerhamiella* sp. BN1 up to 2.9000 ± 0.100 U/ml. (127.9% relative activity) and 2.3333 ± 0.153 (102.9% relative activity), respectively, and the presence of calcium ion (Ca^{2+}) and magnesium ion (Mg^{2+}) activated lipase activity from *D. nepalensis* BS1 up to 4.4000 ± 0.100 U/ml. (132.0% relative activity) and 4.4000 ± 0.100 (110.0% relative activity), respectively. This study demonstrated the properties of lipases from *Wickerhamiella* sp. BN1 and *D. nepalensis* BS1 for application in biodiesel production.

Keywords : *Debaryomyces nepalensis* BS1, EDTA, iso-butanol, lipase, metal ion, n-butanol, *Wickerhamiella* sp. BN1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุก ๆ ท่าน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วิมลมาศ บุญมี และ ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการให้แก่ผู้ทำการวิจัย โดยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังช่วยตรวจทานโครงการพิเศษฉบับนี้ให้แก่ผู้วิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จได้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการตรวจสอบโครงการพิเศษฉบับนี้ อีกทั้งยังให้ข้อเสนอแนะ และปรับปรุงให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณความช่วยเหลือจากนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้ช่วยแนะนำเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือในงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการทดลอง ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินการทดลองจนสำเร็จลงได้ คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจผู้วิจัย ซึ่งเป็นแรงผลักดันที่สำคัญที่ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จได้อย่างสมบูรณ์

ฉัตรปวีณ์ งามชื่น
ญาณวดี ชูมนาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ณ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	3
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ลิขิต.....	5
2.2 กรดไขมัน.....	6
2.2.1 กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid)	6
2.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)	7
2.3 ก्लीเซอรอล.....	7
2.4 น้ำมันมะกอก.....	8
2.5 ไบโอดีเซล.....	10
2.6 เอนไซม์ไลเปส.....	10
2.7 การจัดจำแนกประเภทของเอนไซม์ไลเปส.....	13
2.7.1 การจำแนกตามลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปส.....	14
2.7.2 การจำแนกโดยอ้างอิงจากความจำเพาะ.....	14
2.7.3 การจำแนกตามแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	15
2.8 ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไลเปส.....	16
2.8.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis).....	16
2.8.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Esterification).....	16
2.8.3 ปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification).....	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปส.....	17
2.10 <i>Wickerhamiella</i> sp.....	20
2.11 <i>Debaryomyces nepalensis</i>	21
2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและการทำงานของเอนไซม์ไลเปส.....	22
2.12.1 สัปดาห์.....	22
2.12.2 พีเอช.....	22
2.12.3 อุณหภูมิ.....	23
2.12.4 ตัวทำลายอินทรีย์.....	23
2.12.5 ไอออนของโลหะ.....	24
2.12.6 สารเคมี.....	24
2.13 บิวทานอล.....	24
2.14 กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก.....	25
2.15 ไอออนโลหะ.....	26
2.15.1 โลหะคลาส A (Class A metal ions).....	28
2.15.2 โลหะคลาส B (Class B metal ions).....	28
2.16 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส.....	28
2.17 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรม.....	29
2.17.1 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหาร.....	29
2.17.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสทางการแพทย์.....	30
2.17.3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมกระดาษ.....	30
2.17.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมผงซักฟอก.....	30
2.17.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล.....	31
2.17.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมสิ่งทอ.....	31
2.17.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง.....	31
2.17.8 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง.....	31
2.17.9 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการบำบัดน้ำเสีย.....	32
2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	35
3.1 เครื่องมือ.....	35
3.2 อุปกรณ์.....	36
3.3 สารเคมี.....	36
3.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	38
3.5 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์.....	38
3.6 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	39
3.6.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	39
3.6.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	39
3.7 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	40
3.7.1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	40
3.7.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	40
3.8 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน.....	41
3.9 การศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	41
3.9.1 การศึกษาความเข้มข้นของไอโซบิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	41
3.9.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	42
3.10 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	42
3.10.1 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	42
3.10.2 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.11 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (metal ion) ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	44
3.11.1 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (metal ion) ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	44
3.11.2 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (metal ion) ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	44
3.12 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (สมการที่ 1).....	45
3.13 การคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) (สมการที่ 2).....	45
3.14 การคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (สมการที่ 3).....	45
3.15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	45
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	46
4.1 การศึกษาความเข้มข้นของไอโซบิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	46
4.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	48
4.3 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	50
4.4 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	52
4.5 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (metal ion) ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	54
4.6 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (metal ion) ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	56
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	60
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	60
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	60
เอกสารอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค.....	92
ภาคผนวก ง.....	94
ภาคผนวก จ.....	97
ภาคผนวก ฉ.....	98
ภาคผนวก ช.....	101
ภาคผนวก ซ.....	113
ภาคผนวก ฌ.....	138
ภาคผนวก ญ.....	139



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (Extra virgin olive oil).....	9
2.2 สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	18
4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับไอโซ-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น.....	46
4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับเอ็น-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับความเข้มข้น.....	48
4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น.....	51
4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น.....	52
4.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับไอออนโลหะทั้งหมด 7 ชนิด.....	55
4.6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับไอออนโลหะทั้งหมด 7 ชนิด.....	57
ข.1 การเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ที่พีเอชต่าง ๆ.....	86
ข.2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) ที่พีเอชต่าง ๆ.....	87
ง.1 ค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ และบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้บนอาหารแข็งที่มี Tributyrin ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	95
ง.2 ค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ และบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้บนอาหารแข็งที่มี Tributyrin ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	96
ฉ.1 ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1 ในอาหารเลี้ยง YM broth ภายใต้สภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	98

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่าจะกรณีใด 24 ชั่วโมงลิขสิทธิ์ทั้งหมดให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างถึงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีนำไป

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ฉ.2 ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ali medium และ ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bussamara medium เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	99
ฉ.3 ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ali medium และ ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bussamara medium เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 72 ชั่วโมง.....	100
ช.1 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	101
ช.2 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	103
ช.3 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	105
ช.4 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	107
ช.5 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1.....	109
ช.6 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	111
ช.1 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 1.....	114
ช.2 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 2.....	115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ช.3 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 3.....	116
ช.4 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 1.....	117
ช.5 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 2.....	118
ช.6 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 3.....	119
ช.7 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 1.....	120
ช.8 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 2.....	121
ช.9 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 3.....	122
ช.10 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 1.....	123
ช.11 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 2.....	124

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ช.12 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 3.....	125
ช.13 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 1.....	126
ช.14 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 2.....	128
ช.15 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ครั้งที่ 3.....	130
ช.16 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 1.....	132
ช.17 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 2.....	134
ช.18 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์และกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ครั้งที่ 3.....	136
ณ.1 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสเมื่อทำการ เพาะเลี้ยง <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ในอาหาร Ali medium และ <i>D. nepalensis</i> BS1 ใน อาหาร Bussamara medium เพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง.....	138

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
๓.๑ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ เอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	139
๓.๒ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่ เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	139
๓.๓ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการศึกษาชนิดของไอออนโลหะที่ เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 และ <i>D. nepalensis</i> BS1.....	140
๓.๔ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 เมื่อทดสอบ กับไอโซ-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01.....	140
๓.๕ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 เมื่อทดสอบกับเอ็น- บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01.....	140
๓.๖ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 เมื่อทดสอบ กับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01.....	141
๓.๗ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 เมื่อทดสอบกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	141
๓.๘ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 เมื่อทดสอบ กับไอออนโลหะชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01.....	141
๓.๙ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 เมื่อทดสอบกับ ไอออนโลหะชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01.....	142

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แผนภาพจำลองการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส.....	12
2.2 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเปส.....	12
2.3 การเปิดของฝาปิด (Lid) ที่ปิดกั้นบริเวณเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสเมื่อเจอซับสเตรท.....	13
2.4 การจัดจำแนกประเภทของเอนไซม์ไลเปส.....	13
2.5 ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไลเปส.....	17
2.6 (a) <i>Wickerhamiella slavikovae</i> (b) <i>Wickerhamiella goesii</i>	20
2.7 <i>Debaryomyces nepalensis</i>	22
2.8 โครงสร้างของไอโซเมอร์ของบิวทานอล.....	25
2.9 โครงสร้างโมเลกุลของกรดเททรีนไดเอมีนเตตระอะซิติก หรือ EDTA.....	26
2.10 ธาตุโลหะหรือกรดลิวิสที่ถูกจำแนกตามทฤษฎีของลิวิส โดยแบ่งเป็น สีดำ : โลหะคลาส A, สีเทาอ่อน : โลหะคลาส B, สีเทาเข้ม : โลหะที่อยู่ได้ทั้งสองคลาส.....	27
ค.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร.....	92
ง.1 บริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Tributyrin plate agar ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	94
ง.2 บริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Tributyrin plate agar ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	94
จ.1 เซลล์ยีสต์ <i>Wickerhamiella</i> sp. BN1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) กำลังขยายรวม 1000 เท่า.....	97
จ.2 เซลล์ยีสต์ <i>D. nepalensis</i> BS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) กำลังขยายรวม 1000 เท่า.....	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DMFA	ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (Dimethylformamide)
DMSO	ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide)
DTT	ไดคลอโรไดฟีนิลไตรคลอโรอีเทน (Dichlorodiphenyl trichloroethane)
EDTA	กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid)
MUFA	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid)
PMSF	ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsulfonylfluoride)
PUFA	กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polysaturated fatty acid)
pNPP	พารา-ไนโตรฟีนิล ปาไมเตท (p-nitrophenyl palmitate)
U/ml.	ยูนิตต่อมิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย สับสเตรทให้เป็นกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ ทดสอบ (Kumar และคณะ, 2017)
VOC	สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile organic Compounds)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolases E.C.3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (Hydrolase) ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ให้ไตรเอซิลกลีเซอรอลกลายเป็นกรดไขมันอิสระ ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Esterification) และปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification) (Singh et al., 2013; Sindhu et al., 2021) เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์นั้นจะมีความสำคัญและได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างมาก เนื่องจากมีความคงทนและสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลากหลาย (Hou and Shimada, 2009) ในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้พัฒนากระบวนการผลิตอาหารเพื่อให้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ในการผลิตชีส ได้นำเอนไซม์ไลเปสมาย่อยไขมันในนมเพื่อให้ชีสมีรสชาติที่เข้มข้น มีความขมต่ำ และป้องกันกลิ่นเหม็นหืน หรืออาจนำมาใช้ร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เพื่อปรับปรุงรสชาติของชีสให้ดีขึ้นและมีความขมที่ต่ำลง (Singh and Kumar, 2019) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย ทั้งในอุตสาหกรรมยา ผงซักฟอก กระดาษ สิ่งทอ เครื่องสำอาง และน้ำมันไบโอดีเซล (Yao et al., 2022) ซึ่งการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล เป็นการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลแทนการใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยานั้นมีข้อดีในการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง (Mild condition) และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (ปกรณ, 2554) ซึ่งการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์กำลังเป็นที่ต้องการในตลาดโลก ซึ่งคาดว่าตลาดในการซื้อขายเอนไซม์ชนิดนี้จะสามารถขยายตัวต่อไปในอีก 5 ปีข้างหน้า (Yao et al., 2022) นอกจากนี้ เอนไซม์ไลเปสที่มีความทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์กำลังเป็นที่ต้องการอย่างมาก เนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่ใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยานั้นมีความเกี่ยวข้องกับตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่มักจะไมทำงานหรือมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ แม้จะมีการรายงานเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดจะสามารถทนตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ก็ยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ส่งผลให้การค้นหาเอนไซม์ไลเปสตัวใหม่ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงแม้จะอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก (Xie et al., 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสมีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ซึ่งยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เนื่องจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้ง่ายและสามารถเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนั้นเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์ยังให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่าง ๆ (ปฐมปรีชญ์, 2552) การค้นพบยีสต์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถคัดแยกได้จากทั้งในน้ำทิ้งของโรงอาหาร หรือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีไขมันปนเปื้อน และประเทศไทยยังเป็นประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นจึงมีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายไขมันสูง (กฤษมาวดี, 2557) จากงานวิจัยของ วริศรา และคณะ (2560) ได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *Debaryomyces nepalensis* BS1 ซึ่งเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ยังไม่เคยมีการรายงานความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมาก่อน ต่อมาธนทิญา และคณะ (2564) ได้ทำการศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 มีความสามารถในการทนไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ได้มากที่สุด ส่วนเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 มีความสามารถในการทนต่อเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ได้มากที่สุด ซึ่งบิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์สายสั้นที่ใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซล ดังนั้นจึงสามารถนำเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 มาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาแทนตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีได้ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง และลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (Fukuda et al., 2001; Bronscheuer and Soumanou, 2003)

นอกจากเอนไซม์ไลเปสที่มีความสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์แล้ว เอนไซม์ไลเปสที่สามารถทนต่อโลหะหนักหรือเอนไซม์ไลเปสที่ต้องการไอออนโลหะในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ก็กำลังเป็นที่ต้องการอย่างมาก เนื่องด้วยการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมยังมีปัญหาในเรื่องการเร่งปฏิกิริยาที่ช้ากว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ดังนั้นจึงมีการค้นหาวิธีที่ช่วยปรับปรุงให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงขึ้น ซึ่งการนำเอนไซม์ไลเปสมาทดสอบกับไอออนโลหะก็เป็นหนึ่งในวิธีที่ช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ให้สูงขึ้น (Katiyar and Ali, 2013) และในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ และ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง มักจะมีโลหะหนักอยู่ในกระบวนการผลิต ดังนั้นการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้จึงต้องสนใจข้อมูลกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อทดสอบด้วย EDTA และไอออนโลหะ (Ahmed et al., 2022) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าโลหะคลอไรด์ (Metal chloride) มีคุณสมบัติเป็นกรดในนิยามของลิวอิสและเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาวิวิธพันธุ์ (Heterogeneous catalysts) ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) ใน

กระบวนการผลิตไบโอดีเซล โลหะคลอไรด์จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้ร่วมกับเอนไซม์ไลเปส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยา (Khan and Fatima, 2016) ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงมี

จุดประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ไอโซ-บิวทานอล และเอ็น-บิวทานอล ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ตามลำดับ และเพื่อศึกษาผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 โดยทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีการไทเทรต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ไอโซ-บิวทานอล และเอ็น-บิวทานอล ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ตามลำดับ

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1.3.1 การกระตุ้น การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์บนอาหารแข็ง Tributyrin plate agar ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Cross-streak technique) และเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร YM Broth (Bataiche et al., 2014; Pantelides et al., 2015)

1.3.2 ทำการเตรียม stock glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตร ของเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 (Bergman, 2001)

1.3.3 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Ali medium (Ali et al., 2010) และการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Bussamara medium (Bussamara et al., 2010)

1.3.4 ทำการศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลและเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสม ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ตามลำดับ โดยกำหนดไว้ที่ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยปริมาตร (นนทิญา และคณะ, 2564)

1.3.5 ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ EDTA ได้แก่ ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 (Esakkiraj et al., 2014)

1.3.6 ทำการศึกษาผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โพแทสเซียม (Potassium), แมกนีเซียม (Magnesium), แบเรียม (Barium), แคลเซียม (Calcium), แมงกานีส (Manganese) ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสังกะสี (Zinc) โดยใช้ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 (Gururaj et al., 2016)

1.3.7 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ตามวิธีของ Kumar et al. (2017) การตรวจวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951) และการคำนวณกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงความสามารถของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

1.4.2 ทราบถึงอิทธิพลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

1.4.3 ทราบถึงแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ในการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิพิด

ลิพิด (Lipid) เป็นส่วนประกอบพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต เช่นเดียวกับโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต มีบทบาทสำคัญต่อเซลล์เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด อีกทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานสำรองของเซลล์ และเป็นสารตัวกลางในวิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathway) (Wynn, 2011; McDonald et al., 2011; Oresič, 2009) โมเลกุลของลิพิดประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน และในลิพิดบางตัวอาจประกอบด้วย ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน กำมะถัน หรือองค์ประกอบอื่น ๆ (Valenzuela and Valenzuela, 2013) มีคุณสมบัติเป็นสารไม่มีขั้ว (Non-polar) จึงไม่ละลายในน้ำ (Hydrophobic) แต่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมือนกัน แต่ลิพิดบางชนิดเช่น ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) จะมีโครงสร้างที่มีทั้งส่วนที่ไม่มีขั้ว (Non-polar) และมีขั้ว (Polar) ในโมเลกุลเดียวกัน เรียกว่า แอมฟิฟิล (Amphiphile) (Tian et al., 2019) ลิพิดมีส่วนส่งเสริมให้เกิดการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายสายพันธุ์ โดยมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโต เช่น การผลิตฮอร์โมน การพัฒนาสมอง การส่งเสริมการดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมันและการซ่อมแซมรักษาเนื้อเยื่อและอวัยวะส่วนต่าง ๆ โดยที่ความต้องการลิพิดจะสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามอายุและสภาพร่างกายของแต่ละบุคคล ลิพิดที่พบในอาหารมากที่สุด ได้แก่ ไขมันและน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นสารประกอบเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก มีโครงสร้างที่เกิดจากการสร้างพันธะระหว่างกรดไขมัน (Fatty acid) กับกลีเซอรอล (Glycerol) ความแตกต่างระหว่างไขมันและน้ำมัน คือ ไขมันจะมีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง ส่วนน้ำมันจะมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง นอกจากไตรเอซิลกลีเซอรอลแล้ว องค์ประกอบในไขมันและน้ำมันยังมี ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล ฟอสโฟลิพิด สเตอรอล และสารประกอบอื่น ๆ อีกมากมาย (Lee et al., 2012; Valenzuela and Valenzuela, 2013; Jimenez-Lopez et al., 2020) การจำแนกประเภทของลิพิดสามารถจำแนกได้เป็น 8 ประเภท ตามระบบของ Lipid maps ซึ่งใช้เกณฑ์ในการจำแนกจากการดูหน่วยโครงสร้างพื้นฐานของลิพิด หรือ building blocks หน่วยโครงสร้างพื้นฐานของลิพิดมีอยู่ 2 ชนิด คือ กลุ่มคีโตเอซิล (Ketoacyl groups) และกลุ่มไอโซพรีน (Isoprene groups) (Fahy et al., 2011) กลุ่มคีโตเอซิล จะมีลิพิดที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดไขมัน (Fatty acid), กลีเซอรอลลิพิด (Glycerolipids), กลีเซอรอลฟอสโฟลิพิด (Glycerophospholipids), สฟิงโกลิพิด (Sphingolipids), แซคคาโรลิพิด (Saccharolipids) และ โพลีคีไทด์ (Polyketides) ส่วนกลุ่มไอโซพรีน (Isoprene groups) จะมีลิพิดที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ สเตียรอยด์ลิพิด (Sterol lipids) และฟีนอลลิพิด (Phenol lipid) (Fahy et al., 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กรดไขมัน

กรดไขมัน (Fatty acid) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน ที่เกิดจากคาร์บอนตั้งแต่สี่อะตอมขึ้นไปมาต่อกับหมู่คาร์บอกซิล (พันทิพา, 2547; Fahy et al., 2005) สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 4 อะตอม เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) ที่มีคาร์บอน 2 อะตอม กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม จะไม่จัดว่าเป็นกรดไขมัน เนื่องจากมีความสามารถในการละลายในน้ำ ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วและจุดหลอมเหลวของกรดไขมัน จะขึ้นอยู่กับจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุล ยิ่งจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลสูง จุดหลอมเหลวของกรดไขมันก็ยิ่งมากขึ้น (Kuipers et al., 2012; Valenzuela and Valenzuela, 2013)

การจำแนกกรดไขมันตามโครงสร้างทางเคมี สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด ดังต่อไปนี้

2.2.1 กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนเป็นพันธะเดี่ยวทั้งหมด (Single bond) กรดไขมันอิ่มตัวจะมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวที่สูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังนั้น ไขมันจึงมีจุดหลอมเหลว และจุดเดือดสูงกว่าน้ำมัน เพราะไขมันประกอบด้วยกรดไขมันชนิดอิ่มตัว มากกว่าในน้ำมันตัวอย่างกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติ คือ กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) รองลงมา คือ กรดสเตียริก (Stearic acid) และจากงานวิจัยของ Ratnayake and Galli (2009) กล่าวว่ากรดไขมันอิ่มตัวสามารถแบ่งตามความยาวของสายโซ่คาร์บอนอะตอมได้ 4 ประเภท ดังนี้

1) **กรดไขมันสายสั้น** คือ อะตอมของคาร์บอนอยู่ระหว่าง 3 ถึง 7 อะตอม เช่น กรดบิวทิริก (Butyric acid) มีอะตอมคาร์บอน 4 อะตอม และกรดคาโปรอิก (Caproic acid) มีอะตอมคาร์บอน 6 อะตอม กรดไขมันในกลุ่มนี้สามารถพบได้ในไขมันนม แต่ไม่สามารถพบได้ในน้ำมันพืชทั่วไป

2) **กรดไขมันสายปานกลาง** คือ อะตอมคาร์บอนอยู่ระหว่าง 8 ถึง 13 อะตอม เช่น กรดคาพริก (Capric acid) มีอะตอมคาร์บอน 10 อะตอม และกรดลอริก (Lauric acid) มีอะตอมคาร์บอน 12 อะตอม กรดไขมันในกลุ่มนี้สามารถพบได้ในไขมันนม, น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันในเมล็ดปาล์ม

3) **กรดไขมันสายยาว** มีจำนวนอะตอมของคาร์บอนอยู่ระหว่าง 14 ถึง 20 อะตอม เช่น กรดปาล์มิติก (Palmitic acid) มีอะตอมคาร์บอน 16 อะตอม และกรดสเตียริก (Stearic acid) มีอะตอมคาร์บอน 18 อะตอม กรดไขมันในกลุ่มนี้สามารถพบได้ในน้ำมันปาล์ม, น้ำมันเมล็ดฝ้าย, น้ำมันหมู และไขวัว กรดปาล์มิติก สามารถพบได้มากกว่ากรดสเตียริก

4) **กรดไขมันสายยาวมาก** มีจำนวนอะตอมคาร์บอนตั้งแต่ 21 อะตอมขึ้นไป เช่น กรดเบฮีนิก (Behenic acid) มีอะตอมคาร์บอน 22 อะตอม และกรดลิโนเลอิก (Lignoceric acid) มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีด้วยพันธะคู่ (Double bond) ระหว่างอะตอมของคาร์บอน เกิดกลิ่นเหม็นที่ง่ายเมื่อสัมผัสกับออกซิเจน และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันตรงตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมัน กลายเป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ (Peroxide) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียรและจะสลายตัวต่อไปกลายเป็นกรดไขมันและแอลดีไฮด์ (Aldehyde) ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกระเหยได้ง่ายและมีกลิ่นเหม็น มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ยาวหรือมีจำนวนอะตอมของคาร์บอนสูง กรดไขมันไม่อิ่มตัวส่วนใหญ่มักมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากว่ามีกรดไขมันบางชนิดที่ร่างกายสัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีพันธะคู่ของคาร์บอนเพียงหนึ่งตำแหน่งในโครงสร้างโมเลกุล และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) หมายถึง กรดไขมันที่มีพันธะคู่ของคาร์บอนหลายตำแหน่งในโครงสร้างโมเลกุล (ศศิพันธ์ และคณะ, 2546, 2547; อัจฉรา และคณะ, 2556; Patricia et al., 2020)

กรดไขมันที่พบในธรรมชาติมักมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 2 อะตอมขึ้นไป (เอกสิทธิ์, 2555) กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนสูงนั้นมีอยู่น้อย แต่ในสมองของสัตว์มีกระดูกสันหลังจะมีกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนสูงอยู่เป็นจำนวนมาก รวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมนุษย์ (Kuipers et al., 2012; Valenzuela and Valenzuela, 2013)

2.3 กลีเซอรอล

กลีเซอรอล (Glycerol) หรือ กลีเซอริน (Glycerine) เป็นสารให้ความหนืดที่ไม่มีสี (Colorless) ไม่มีกลิ่น และให้ความหวาน (Hua et al., 2010) เป็นสารประกอบประเภทพอลิออล (Polyol) ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลสามหมู่ (Trihydric alcohol) (Jackson, 2017) มีคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถดูดซับความชื้นจากอากาศ (Hygroscopic) สามารถพบได้ในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันและไขมัน ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วงร้อยละ 9 ถึง 13.5 แม้ว่าค่าว่ากลีเซอรอลและกลีเซอรินมักใช้สลับกันได้ แต่ค่าจำกัดความของสองค่านี้มีความแตกต่างกัน เนื่องจากกลีเซอรอลเป็นค่าที่ใช้สำหรับเรียกสารประกอบที่มีความบริสุทธิ์ ในขณะที่กลีเซอรินจะใช้สำหรับอ้างถึงสารละลายในทางการค้าของกลีเซอรอล (Yeong et al., 2012) กลีเซอรอลได้ถูกนำมาใช้สร้างรสชาติและสีให้แก่อาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารดูดความชื้น (Humectant), สารเติมแต่งที่ใส่ลงในกระบวนการผลิตพลาสติก (Plasticizer), สารให้ความนุ่มลื่น (Emollient), สารให้ความหวาน (Sweetener) และสารเติมเต็ม (Filler) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้นำกลีเซอรอลมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด เช่น ยาสีฟัน, น้ำยาบ้วนปาก, ผลิตภัณฑ์ดูแลผิว, ผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม และสบู่ ในอุตสาหกรรมยา กลีเซอรอลถือเป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ยาหลายชนิด เช่น ยาแก้ไอ, ยาลดเสมหะ และยารักษาโรคหัวใจ ในทางการแพทย์ได้นำมาใช้ในการลดความดันในลูกตาเพื่อรักษาโรคต้อหินและอาการ

บวมในสมอง นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังใช้เพื่อรักษาความยืดหยุ่นของผ้าและกระดาษแก้ว และกระดาษคุณภาพพิเศษที่มีความยืดหยุ่นและทนทาน เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นสารป้องกันการ

แข็งตัว (Wurzel, 2005) ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์รองที่ได้จากปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification) ระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับเมทานอลและมีต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ส่วนผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากปฏิกิริยา คือ เมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) หรือน้ำมันไบโอดีเซล ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล เพื่อที่จะทำให้น้ำมันไบโอดีเซลมีความบริสุทธิ์สูง จึงต้องมีการกำจัดกลีเซอรอลออกจากน้ำมันไบโอดีเซลให้ได้มากที่สุด (สุดปรารณา และคณะ, 2018) โดยพื้นฐานแล้วกลีเซอรอลไม่สามารถละลายในน้ำมันไบโอดีเซล ดังนั้นจึงสามารถกำจัดกลีเซอรอลส่วนใหญ่ออกได้โดยการตกตะกอนหรือการหมุนเหวี่ยง แต่กลีเซอรอลอิสระอาจยังคงหลงเหลืออยู่ในปริมาณเล็กน้อยในน้ำมันไบโอดีเซล เชื้อเพลิงที่มีกลีเซอรอลอิสระมากเกินไปมักจะทำให้เกิดปัญหาการเผาไหม้ในเครื่องยนต์ ดังนั้นขั้นตอนในการกำจัดกลีเซอรอลออกจากน้ำมันไบโอดีเซลจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยการเลือกกระบวนการที่นำมาใช้ในการกำจัดกลีเซอรอลออกจากน้ำมันไบโอดีเซลจะต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพในการแยกกลีเซอรอลออกจากน้ำมันไบโอดีเซลและต้นทุนของกระบวนการที่ใช้ (Garpen and Knothe, 2010)

2.4 น้ำมันมะกอก

น้ำมันมะกอก (Olive oil) เป็นน้ำมันที่สกัดจากผลของต้นมะกอก (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Olea Europaea* L.) แหล่งของน้ำมันมะกอกส่วนใหญ่มาจากประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน น้ำมันมะกอกได้ถูกนำมาใช้ประกอบในอาหารสำหรับชาวเมดิเตอร์เรเนียน น้ำมันมะกอกคุณภาพดีจะมีกลิ่นหอมละมุน และค่อนข้างมีความโดดเด่นกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น เนื่องจากเป็นน้ำมันที่สามารถบริโภคได้แม้ไม่ผ่านกระบวนการกำจัดสารปนเปื้อนออกจากน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดพืช (Refining) (Kiritsakit, A. and Markakis, 1987) องค์ประกอบของน้ำมันมะกอกส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลและสารประกอบหลายชนิด และยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid) อยู่ในระดับสูง โดยเฉพาะกรดโอเลอิก (Oleic acid) สูงถึงร้อยละ 80 ซึ่งถือว่ามีความค่าทางโภชนาการมากกว่าไขมันและน้ำมันที่บริโภคได้ชนิดอื่น ๆ ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) ในระดับสูง (เสริมสกุล, 2545) น้ำมันมะกอกถูกแบ่งเป็น 6 ประเภทหลัก ตามกระบวนการผลิตและกลิ่นรสของ ได้แก่ น้ำมันมะกอกเวอร์จิน (Virgin olive oils), น้ำมันมะกอกแบบผ่านกรรมวิธี (Refined olive oil), น้ำมันมะกอกที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอกเวอร์จินและน้ำมันมะกอกแบบผ่านกรรมวิธี (Olive Oil), น้ำมันกากมะกอกดิบ (Crude olive pomace oil), น้ำมันกากมะกอกแบบผ่านกรรมวิธี (Refined olive pomace oil) และ น้ำมันกากมะกอก (Olive pomace oil) ซึ่งน้ำมันมะกอกเวอร์จินเป็นกลุ่มที่มีความน่าสนใจที่สุดเนื่องจากมีคุณสมบัติและกลิ่นรสที่ดี น้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการประกอบอาหาร และมีสรรพคุณที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ โดยสรรพคุณเหล่านี้สัมพันธ์กับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในน้ำมันมะกอก เอกสารนี้บริสุทธิ์ องค์ประกอบของน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ได้แสดงในตารางที่ 2.1 (Jiménez-López et al., 2020) เนื่องจากน้ำมันมะกอกมีกรดโอเลอิกสูง เมื่อบริโภคน้ำมันมะกอก ภายในหลอดเลือดจึงมีกรด

โอเลอิก ทำให้ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ (Schwingshackl and Hoffmann, 2012)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (Extra virgin olive oil)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น	องค์ประกอบ	ความเข้มข้น
Fatty acids (%)		Diacylglycerols (%)	1-2.8
Myristic acid: (C _{14:0})	0.05	Tocopherols (mg/kg)	
Palmitic acid: (C _{16:0})	9.4–19.5	α-Tocopherol	10.2–208
Palmitoleic acid (C _{16:1})	0.6–3.2	β-Tocopherol	0.75–1.05
Heptadecanoic acid (C _{17:0})	0.07–0.13	γ-Tocopherol	0.7–2.1
Heptadecenoic acid (C _{17:1})	0.17–0.24	Carbohydrates (mg/kg)	
Stearic acid (C _{18:0})	1.4–3.0	Squalene	200–8260
Oleic acid (C _{18:1})	63.1–79.7	Pigments (mg/kg)	
Linoleic acid (C _{18:2})	6.6–14.8	Total chlorophylls (mg/kg)	0.15–61.96
α-Linolenic acid (C _{18:3})	0.46–0.69	Pheophytin-a (mg/kg)	0.08–0.49
Arachidic acid (C _{20:0})	0.3–0.4	Total carotenoids (mg/kg)	0.53–31.51
Eicosenoic acid (C _{20:1})	0.2–0.3	β-Carotene (mg/kg)	0.15–0.67
Docosanoic acid (C _{22:0})	0.09–0.12	Lutein (mg/kg)	0.65–3.60
Lignoceric acid (C _{24:0})	0.04–0.05	Total chlorophylls (mg/kg)	0.15–61.96
MUFA	65.2–80.8	Other Compounds	
PUFA	7.0-15.5	Lutein (mg/kg)	0.65–3.60
Other lipids		Total phenolic compounds	213–450
Diacylglycerols (%)	1-2.8	(mg/kg)	
Monoacylglycerols (%)	0.25	Triterpene dialcohols	0.9–2.8
Total sterol content	1000-3040	(% of total sterols)	
(mg/kg)		β-Sitosterol (mg/kg)	530.2–2638.6

ที่มา : Jimenez-Lopez et al., 2020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล เป็นสารประกอบโมโนอัลคิลเอสเทอร์ (Mono-alkyl ester) ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification) ระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอล กับ แอลกอฮอล์ และมีตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดหรือเบส จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ และผลพลอยได้เป็นกลีเซอรอล (จักรพงษ์ และ วิสฤกษ์, 2555) โดยในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากการใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยานั้นจะเกิดปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง (Mild condition) และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้ปฏิกิริยาทางเคมี (ปกรณ์, 2554) แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งยังมีข้อเสียในแง่ของต้นทุนการผลิตที่สูง และยังมีประสิทธิภาพของโครงสร้างต่ำทำให้เสถียรภาพได้ง่าย จึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีที่จะเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์ไลเปส เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม (Hwang et al., 2013) ไบโอดีเซลเป็นพลังงานทดแทนปิโตรเลียม เนื่องจากวิกฤตเศรษฐกิจ ทำให้ราคาน้ำมันเชื้อเพลิงมีราคาสูงขึ้น และในอนาคตปิโตรเลียมก็จะค่อย ๆ หมดไปจากโลกนี้ และยังมีปัญหาสิ่งแวดล้อมที่มาจากการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพตามมา ไบโอดีเซลเป็นพลังงานหมุนเวียนที่สามารถนำมาใช้แทนพลังงานเชื้อเพลิงได้ ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกที่สะอาด ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ให้ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์น้อยกว่าน้ำมันดีเซล จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนในอนาคต (ประชาสันติ และคณะ, 2548) แต่การนำไบโอดีเซลมาใช้ยังมีข้อจำกัดอยู่ เช่น ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ หรืออาจทำให้อายุการใช้งานของเครื่องยนต์สั้นลง สามารถแก้ไขโดยการเปลี่ยนโครงสร้างของน้ำมันให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล โดยการทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และ บิวทานอล (Fukuda et al., 2001; Bronscheuer and Soumanou, 2003)

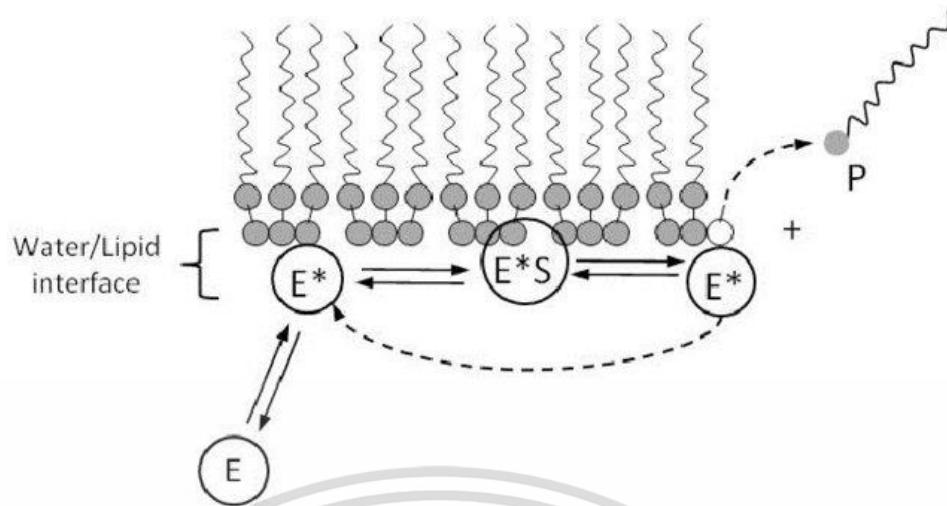
2.6 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase) หรือชื่อตามระบบ International Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (Triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ E.C.3.1.1.3 (มาริษา, 2560) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ตรงพันธะเอสเทอร์ของไตรเอซิลกลีเซอรอล ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน ตรงบริเวณระหว่างผิวน้ำกับน้ำมันดังแสดงในรูปที่ 2.1 เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยอาหาร เช่นเดียวกับเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์โปรตีเอส โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ไลเปสสามารถสร้างได้จากพืช สัตว์ รวมถึงจุลินทรีย์ ในมนุษย์เอนไซม์ไลเปสสามารถสร้างได้จากอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร มักผลิตในตับอ่อนและกระเพาะอาหารซึ่งช่วยในการย่อยไขมัน เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ในคลาสไฮโดรเลส (Hydrolase) (Hou and Shimada, 2009; Sindhur et al., 2021) ซึ่งเอกสารนี้เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายของพันธะโดยการทำให้ปฏิกิริยากับน้ำที่หน้าหลักโดยทั่วไปไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสส่วนใหญ่คือการย่อยอาหารจากชิ้นใหญ่ให้เล็กลงในระบบย่อยอาหารของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น เอนไซม์โปรตีเอสย่อยโปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า จนกระทั่งได้เป็นกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุด และเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยลิพิด (ไตรเอซิลกลีเซอรอล) ให้กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Alcántara et al., 2011) นอกจากนี้ เอนไซม์ไลเปสยังเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (Esterification) และปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification) และปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (Aminolysis) ทำให้เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพในทางอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก (Schmid and Verger, 1998; Joseph et al., 2008; Singh et al., 2013) โครงสร้างเอนไซม์ไลเปสจะแบ่งออกเป็น 2 โดเมน คือ N-terminal domain และ C-terminal domain โดย N-terminal domain จะมีรูปร่างกลม (Globular) ที่ประกอบด้วยเพปไทด์ที่เป็นแผ่นเบต้า (β -Sheets) ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic core) ที่ตรงบริเวณศูนย์กลางของโดเมนปลายเอ็น และเพปไทด์สายเกลียว (α -Helices) ที่ล้อมรอบแผ่นเบต้าเพื่อปกป้องโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำด้านในและทำให้เอนไซม์มีความเสถียร ซึ่งการมีโครงสร้างนี้ทำให้เอนไซม์ไลเปสถูกจัดอยู่ในกลุ่ม α/β Hydrolase fold โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยา (Active site) ของเอนไซม์ไลเปสจะอยู่ภายในโดเมนปลายเอ็นนี้ ซึ่งโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปสแสดงในรูป 2.2 (Sami et al., 2015)

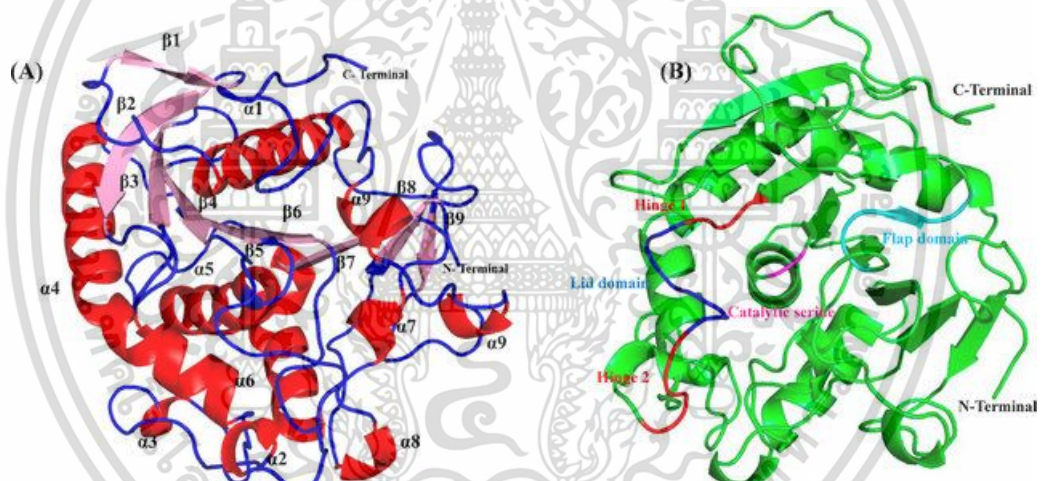
บริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 3 ตัว (Catalytic triad) ได้แก่ เซอรีน (Serine, Ser), ฮิสทีดีน (Histidine, His), กลูตามีน (Glutamine, Glu) หรือกรดแอสพาทิก (Aspartic acid, Asp) จะเป็นบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) หรือเป็นบริเวณที่พันธะของไตรเอซิลกลีเซอรอลถูกทำลาย โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะมีฝาปิด (Lid) ที่เป็นสายเพปไทด์รูปร่างเกลียว มาปิดกั้นบริเวณเร่งปฏิกิริยา ซึ่งฝาดังกล่าวจะเปิดออกเมื่อเกิดการกระตุ้นจากสับสเตรท (Substrate) เพื่อให้โมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสเกิดการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ ดังแสดงในรูป 2.3 (มารีษา, 2560; ยุทธนา, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แผนภาพจำลองการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

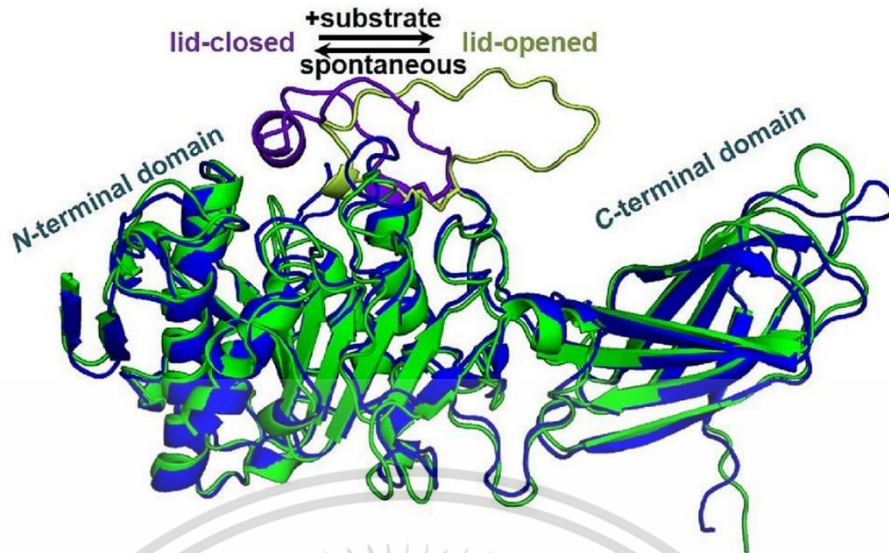
ที่มา : Rosell and Ray, 2016



รูปที่ 2.2 โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Ali et al., 2018

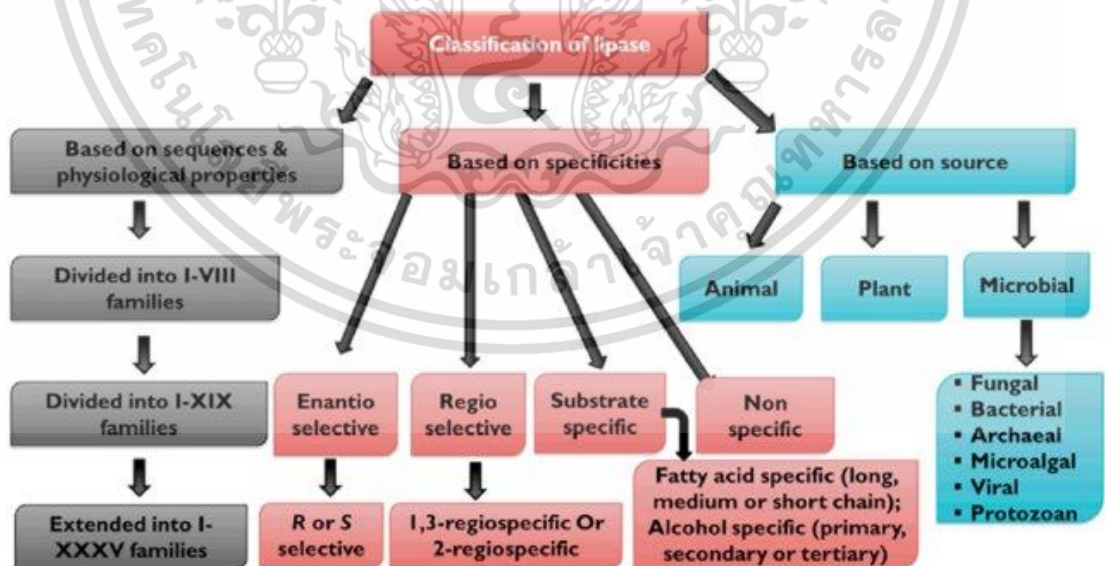
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การเปิดของฝาปิด (Lid) ที่ปิดกั้นบริเวณเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสเมื่อเจอซับสเตรท
ที่มา : Sharath et al., 2020

2.7 การจัดจำแนกประเภทของเอนไซม์ไลเปส

ประเภทของเอนไซม์ไลเปสมีเกณฑ์ในการจำแนก 3 เกณฑ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งได้แก่ การจำแนกตามลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปส หรือการจำแนกโดยอ้างอิงจากความจำเพาะ และยัง สามารถการจำแนกได้ตามแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสอีกด้วย (Verma et al., 2021)



รูปที่ 2.4 การจัดจำแนกประเภทของเอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้... ที่มา : Verma et al., 2021... อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า... ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 การจำแนกตามลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปส ในระยะแรก Arpigny and Jaeger (1999) ได้เสนอการการจำแนกเอนไซม์ที่ย่อยไขมัน (Lipolytic enzymes) ให้แบ่งออกเป็น 8 วงศ์ (Family) ตามลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสและคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ถ้าหากลำดับกรดอะมิโนตรงของเอนไซม์ตัวอย่างมีบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) ใกล้เคียงกับวงศ์ใด เอนไซม์ตัวอย่างก็จะถูกจัดอยู่ในวงศ์นั้น จากนั้นเมื่อเริ่มมีการศึกษาการจำแนกเอนไซม์ไลเปสมากขึ้น จึงมีจำนวนของวงศ์เพิ่มขึ้น โดย Hausmann and Jaeger (2010) ได้แบ่งกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสออกเป็น 19 วงศ์ โดยอิงตามความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ (Phylogenetic criteria) ลำดับกรดอะมิโนตรงบริเวณอนุรักษ์ (Conserved region) และบทบาททางชีววิทยา (Biological functions) ในปัจจุบัน Kovacic et al. (2019) ได้เสนอการจำแนกเอนไซม์ไลเปสที่ครอบคลุมมากขึ้น โดยอ้างอิงจากการจัดจำแนกเดิมของ Arpigny และ Jaeger จึงจำแนกเอนไซม์ไลเปสได้เป็น 39 กลุ่ม โดยแบ่งเอนไซม์ไลเปสเป็น 35 วงศ์ กับเอนไซม์ไลเปสที่แท้จริงอีก 11 วงศ์ย่อย (Subfamilies) (Verma et al., 2021)

2.7.2 การจำแนกโดยอ้างอิงจากความจำเพาะ การจำแนกเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะ มีเกณฑ์ในการจำแนกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกหลายวิธี ซึ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรทมีความสำคัญต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก (Verma et al., 2021) จึงต้องมีการจัดหมวดหมู่ให้ชัดเจน เพื่อการนำไปใช้ที่ถูกต้องและเกิดประโยชน์สูงสุด

1) ประเภทของเอนไซม์ไลเปสแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล (Regioselective lipases or regiospecific lipases) การแบ่งเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล จะดูจากความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในการเลือกตำแหน่งที่จะเร่งปฏิกิริยาบนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Chandler, 2001) ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (1, 3-Regiospecific lipase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสที่จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเฉพาะคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของกลีเซอรอลเท่านั้น ซึ่งจะได้กรดไขมันอิสระ (Free fatty acids), 1,2 (2,3)-ไดเอซิลกลีเซอรอล (1,2 (2,3)- Diacylglycerols) และ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล (2-Monoacylglycerols) (Verma et al., 2021) และ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 2 บนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (2-Regiospecific lipases) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสที่จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเฉพาะคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 บนโมเลกุลของกลีเซอรอลเท่านั้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรอล (1,3-Diacylglycerol) เอนไซม์กลุ่มนี้หายากมาก และเคยมีรายงานว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์กรดโอเลอิกและกรดลิโนเลอิก ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ (Verma et al., 2021 อ้างอิงจาก Yan et al., 2016; Utama et al., 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ประเภทของเอนไซม์ไลเปสแบ่งตามความจำเพาะต่อสับสเตรท เอนไซม์ไลเปสที่มาจากจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีคุณสมบัติความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งเอนไซม์ไลเปสเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่จำเพาะต่อกรดไขมัน หรือจำเพาะต่อแอลกอฮอล์ เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid specific lipases) เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อกรดไขมันขึ้นอยู่กับความยาวของสายโซ่ (Meghwanshi and Vashishtha, 2018) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus cereus* จะสามารถไฮโดรไลซ์กรดไขมันสายสั้น (C4:0) จนถึงกรดไขมันสายกลาง (C12:0) (Gao et al., 2020) หรือ เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium citrinum* S3, *Aspergillus niger* MJ1, *A. oryzae* MJ2, *Bacillus coughing* YM, *Geotrichum candidum* S9 และ *Candida lipolytica* S11 พบว่ามีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันสายสั้นมาก (Utama et al., 2019) และเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อแอลกอฮอล์ (Alcohol specific lipases) จะมีแอลกอฮอล์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเลือกทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไลเปส โดยเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่กว้างทำให้สามารถเลือกใช้สับสเตรทได้หลากหลาย ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรทขึ้นอยู่กับโครงสร้างโมเลกุลของแอลกอฮอล์ โดยเอนไซม์ไลเปสสามารถเลือกตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาตรงพันธะเอสเทอร์ของแอลกอฮอล์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ (Verma et al., 2021) เช่น เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Candida antarctica* สามารถเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่เอซิล (Acylation) ของแอลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิ (Secondary alcohols) และโมเลกุลเชิงซ้อนได้ (Cha et al., 2019)

3) ประเภทของเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้มีความทนและสามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor meihei* ที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากมาย ตั้งแต่อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง จนถึงการผลิตไบโอดีเซล เอนไซม์กลุ่มนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (Esterification) เพื่อสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยมีกลีเซอรอลและกรดไขมันเป็นสับสเตรท ในสภาวะที่มีน้ำน้อย (Verma et al., 2021)

4) ประเภทของเอนไซม์ไลเปสที่แบ่งตามความจำเพาะต่อโครงสร้างสามมิติของสับสเตรท (Enantioselective lipases) เป็นการแยกเอนไซม์ไลเปสโดยดูจากการเลือกไฮโดรไลซ์เฉพาะโมเลกุลที่เป็นเอแนนทิโอเมอร์ (Enantiomer) ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ไลเปสเท่านั้น แม้ว่าสับสเตรทจะเป็นชนิดเดียวกัน มีสูตรโมเลกุลเหมือนกัน แต่ถ้ามีการเรียงตัวในโครงสร้างสามมิติที่ต่างกัน หรือไม่ใช่เอแนนทิโอเมอร์ชนิดเดียวกัน ก็ไม่สามารถใช้เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้เร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ทั้งหมด ซึ่งการแยกประเภทของเอนไซม์ไลเปสแบบนี้มีประโยชน์ต่อการนำไปเลือกใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และอาหาร (Verma et al., 2021 อ้างอิงจาก Sarmah et al., 2017)

2.7.3 การจำแนกตามแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปสจากแหล่งผลิตที่แตกต่างจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่แตกต่างกันไป (Luna et al., 2016) เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถผลิตได้จากสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ การผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยจุลินทรีย์

ได้รับความนิยมน้อยมาก เนื่องจาก (Chandra et al., 2020) เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงทน มีความจำเพาะต่อสับเตรทที่หลากหลายและมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสอื่น นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ยังต้องคำนึงถึงการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะต้องเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนต่ำ เช่น ฟางข้าว รำข้าว หรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรอื่น ๆ เพื่อให้ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสต่ำลง (Szymczak et al., 2021)

2.8 ปฏิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไลเปส

จากงานวิจัยของ Ghanem (2007) พบว่าปฏิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไลเปสมีอยู่ 3 ปฏิริยาหลัก ที่เป็นที่รู้จักและถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ได้แก่

2.8.1 ปฏิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) จึงมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิริยาการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลด้วยน้ำให้กลายเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล (วีระ, 2555)

2.8.2 ปฏิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Esterification) เป็นปฏิริยาย้อนกลับของปฏิริยาไฮโดรไลซิส เพื่อรักษาสสมดุลของน้ำในระบบ โดยจะเร่งปฏิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ ได้เป็นสารประกอบเอสเทอร์และน้ำขึ้นมา (วีระ, 2555)

2.8.3 ปฏิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (Transesterification) ปฏิริยานี้ได้ถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

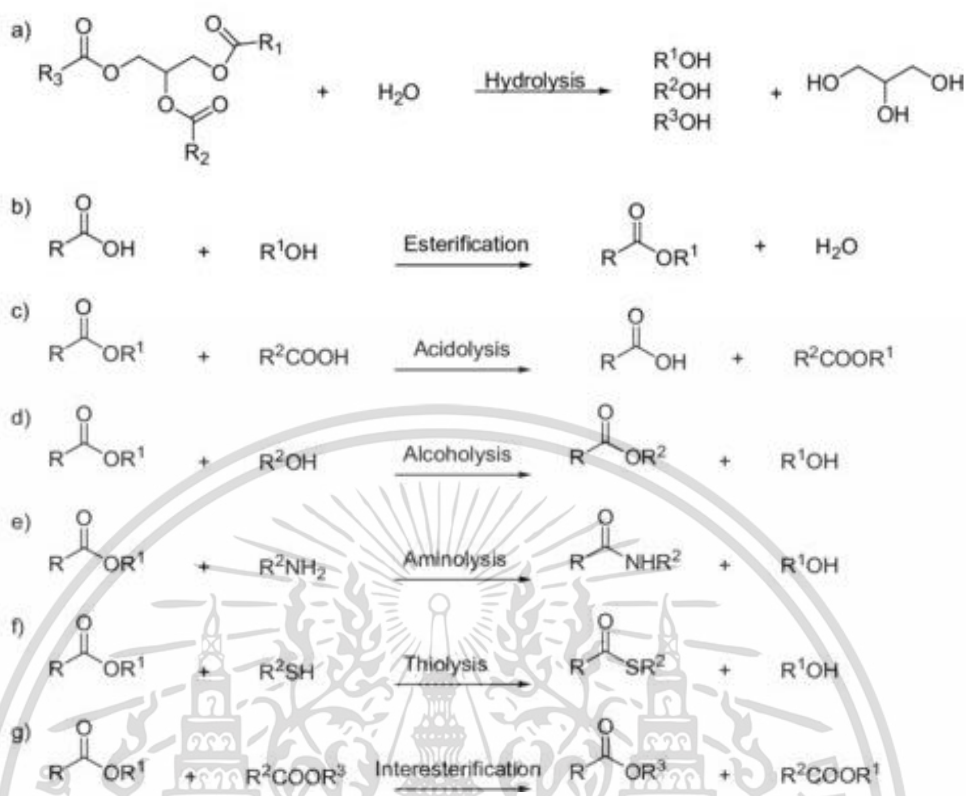
1) **ปฏิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis)** เป็นปฏิริยาการย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างหมู่เอสเทอร์ของกรดไขมัน กับแอลกอฮอล์ ได้เป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นปฏิริยาชนิดย้อนกลับได้ (Reversible reaction) (จารุวัลย์ และคณะ, 2547)

2) **ปฏิริยาเอซิโดไลซิส (Acidolysis)** เป็นปฏิริยาการย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารประกอบเอสเทอร์ (เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล) กับกรดไขมัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนหมู่เอซิล (Acyl groups) (Karabulut et al., 2009)

3) **ปฏิริยาอะมิโนไลซิส (Aminolysis)** เป็นปฏิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารประกอบเอมีน (Amine) กับสารประกอบเอสเทอร์ ไปเป็น แอลกอฮอล์ และสารประกอบเอไมด์ (Amide) (Couturier et al., 2009)

4) **ปฏิริยาไทโอไลซิส (Thiolysis)** เป็นปฏิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารประกอบไทออล (thiol) กับสารประกอบเอสเทอร์ไปเป็น แอลกอฮอล์ และสารประกอบไทโอเอสเทอร์ (Thioester) (Saima et al., 2019)

5) **ปฏิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification)** เป็นปฏิริยาการย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างสารประกอบเอสเทอร์ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของกรดไขมัน หรือทำให้กรดไขมันแต่ละชนิดในโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลมีการกระจายตัว (Hidalgo and Zamora, 2016)



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับเอโนไซม์ไลเปส
ที่มา : Ramos-Sánchez et al., 2015

2.9 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปส

ในปี 1935 David Kirsh นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดา ค้นพบว่า *Aspergillus flavus* และ *Penicillium oxalicum* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอโนไซม์ไลเปสได้เป็นครั้งแรก (Verma et al., 2021 อ้างอิงจาก Kirsh, 1935) เอโนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรียและฟังไจได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากเอโนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ค่อนข้างมีความเสถียร มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่กว้าง และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายปฏิกิริยา ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง (Hou and Shimada, 2009) เอโนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและรุนแรง จะมีคุณสมบัติพิเศษที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอโนไซม์ไลเปส (Verma et al., 2021) จุลินทรีย์ที่ผลิตเอโนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จะผลิตเอโนไซม์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถแยกเชื้อแล้วได้เชื้อที่มีความบริสุทธิ์สูงและเหมาะสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Yao et al., 2021) เอโนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบไกลโคโพรตีน (Glycoprotein) แต่เอโนไซม์ไลเปสจากเอ็กซาร์นี้แบคทีเรียที่ผลิตแล้วส่งออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular bacterial lipases) บางตัวก็เป็นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบลิโปโปรตีน (Lipoprotein) โดยเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ (Non-specific in substrate) และมีบางชนิดที่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ (Thermostable) (Ghosh et al., 1996) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* sp., และ *Burkholderia* sp. (Bharathi and Rajalakshmi, 2019; Priyanka et al., 2019) ในส่วนของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากฟังไจ จะมีคุณสมบัติพิเศษหลายอย่าง เช่น มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ (Thermal stability), มีความเสถียรต่อกรดต่าง (pH stability), มีความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity) และมีกิจกรรมในตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ (Activity in organic solvent) ที่สามารถนำมาใช้ปรับปรุงหรือเพิ่มประสิทธิภาพให้เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ผลผลิตก็จะเพิ่มมากขึ้น ในด้านการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากฟังไจจะได้รับความสนใจมากกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียเนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากฟังไจเพิ่มมากขึ้น (Ghosh et al., 1996) ตัวอย่างฟังไจที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรม กลุ่มราเส้นใย เช่น *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae* และ *Aspergillus niger* กลุ่มยีสต์ เอนไซม์จากยีสต์สกุล *Candida* จะได้รับความนิยมและถูกนำมาใช้มากที่สุด โดยเฉพาะ *Candida antarctica* และ *Candida rugosa* (Sarmah et al., 2017)

เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ถูกนำมาประยุกต์ใช้มากมาย ทั้งในอุตสาหกรรมเคมี, อุตสาหกรรมยา และการผลิตไบโอดีเซล โดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp. เป็นยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สายพันธุ์อื่น และเป็นยีสต์ที่มีการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี โครงสร้างเคมี และคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยามากที่สุด สายพันธุ์ของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสแสดงในตารางที่ 2.2 (Bharathi and Rajalakshmi, 2019)

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Liu et al., 2008
<i>Candida antarctica</i>	Arroyo et al., 1999
	Jaeger and Reetz, 1998
	Weber et al., 1999
<i>C. curvata</i>	Ghosh et al., 1996
<i>C. cylindracea</i>	Kamiya and Gotto, 1998
	Helisto and Korpela, 1998
<i>C. deformans</i>	Lecointe et al., 1996
<i>C. parapsilosis</i>	Lecointe et al., 1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (ต่อ)

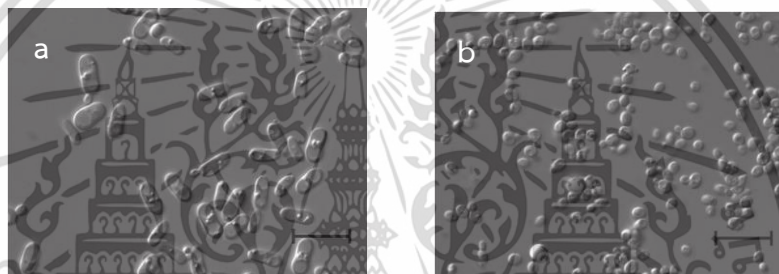
สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง
<i>C. tropicalis</i>	Takahashi et al., 1998
<i>C. valida</i>	Ghosh et al., 1996
<i>C. utilis</i>	Moftah et al., 2011
<i>Cryptococcus sp.</i>	Thirunavukarasu et al., 2016
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	วริศรา et al., 2560
<i>Pichia bispora</i>	Hou, 1994
<i>Pi. burtonii</i>	Sugihara et al., 1995
<i>Pi. mexicana</i>	Hou, 1994
<i>Pi. silvicola</i>	Sugihara et al., 1995
<i>Pi. xylosa</i>	Sugihara et al., 1995
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Papaparaskevas et al., 1992
<i>Rho. mucilaginosa</i>	Li et al., 2022
<i>Rho. pilimornae</i>	Tahoun et al., 1985
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ciafardini et al., 2006
<i>S. crataegenesis</i>	Hou, 1994
<i>S. lipolytica</i>	Tahoun et al., 1985
<i>Torulaspota globosa</i>	Hou, 1994
<i>Trichosporon asteroides</i>	Dharmsthiti and Ammaranond, 1997
<i>Trichosporon asahii</i>	Kumar and Gupta, 2008
<i>Wickerhamiella sp.</i>	วริศรา และคณะ, 2560
<i>Williopsis californica</i>	Ciafardini et al., 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Amaral et al., 2007
	Barrera-Rivera and Martínez-Richa. 2017
	Dominguez et al., 2003
	Fickers และคณะ, 2006
	Lopes et al., 2007
<i>Yamadazyma terventina</i>	Ciafardini et al., 2013

ที่มา : Sharma et al., 2001; Rekha et al., 2012; Thakur, 2012; นนทินญา และคณะ, 2564

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 *Wickerhamiella* sp.

ยีสต์ *Wickerhamiella* sp. จัดอยู่ในไฟลัมแอสโคไมซีตัส (Ascomycetous) พบครั้งแรกในปี 1973 โดย Walt และ Liebenberg ซึ่ง *Wickerhamiella* sp. เคยถูกจัดอยู่ในสปีชีส์ *Torulopsis domercqii* และเป็นยีสต์ที่อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae แต่เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ไม่สอดคล้องกับยีสต์ในวงศ์ Saccharomycetaceae จึงถูกจัดจำแนกใหม่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Wickerhamiella* sp. เป็นยีสต์ที่มีเซลล์ขนาดเล็ก มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding) และมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (Ascospore) โดยแอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นทรงรียาวหรือทรงไข่ ผนังสปอร์จะมีรอยหยัก ในหนึ่งแอสคัส (Ascus) จะมีแค่หนึ่งแอสโคสปอร์ (Walt and Liebenberg, 1973) ตัวอย่างสปีชีส์ของยีสต์ที่อยู่ในสกุลนี้ เช่น *Wickerhamiella slavikova* และ *W. goesii* ดังในรูปที่ 2.6 (Hagler et al., 2013)



รูปที่ 2.6 (a) *Wickerhamiella slavikova* (b) *Wickerhamiella goesii*

ที่มา : Hagler et al., 2013

ในปัจจุบันยีสต์ในสกุล *Wickerhamiella* มีมากกว่า 40 สปีชีส์ ในฐานข้อมูลของ Mycobank บทบาทในระบบนิเวศของ *Wickerhamiella* sp. ยังไม่มีรายงานผลการศึกษาที่ชัดเจน โดยส่วนใหญ่แล้ว ยีสต์ในสกุล *Wickerhamiella* สามารถแยกได้จากดอกไม้ แมลง ผลไม้ โรงบ่มไวน์ หรือโรงกลั่นสุรา แต่บางสปีชีส์สามารถแยกได้จากมนุษย์ โดยส่วนใหญ่จะพบในพื้นที่เขตร้อน หรือบริเวณทวีปเอเชีย แต่บางสปีชีส์อาจมีการกระจายไปตามพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก (Belloch et al., 2020) สามารถแสดงลำดับอนุกรมวิธานของยีสต์ *Wickerhamiella* sp. ได้ดังนี้ (จุฑามณี และคณะ, 2563)

Domain Eukarya

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Saccharomycetes

Order Saccharomycetales

Family Trichomonascaceae

Genus *Wickerhamiella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 *Debaryomyces nepalensis*

เชื้อยีสต์ *Debaryomyces nepalensis* เป็นยีสต์ที่ถูกจัดอยู่ในไฟลัมแอสโคมัซซีตัส (Ascomycetous) ไม่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Non-pathogenic) แต่เป็นเชื้อยีสต์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร (Foodborne Yeast) แยกได้ครั้งแรกจากแอปเปิ้ลที่เน่าเสีย มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคตินไลเอส (Pectin lyase) และเพคเตทไลเอส (Pectate lyase) (Gummadi and Kumar, 2006) สามารถดำรงชีวิตอยู่ในอาหารที่มีเพคตินเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเดี่ยว และสามารถทนต่อแรงดันออสโมติก (Osmotolerant yeast) ได้ด้วยการผลิตสารประกอบพอลิแอล (Kumar and Gummadi, 2009) สามารถอยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูงได้ (Halotolerant yeast) และเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร มีช่วง pH ในการเจริญเติบโตที่กว้าง โดยในสภาวะที่ไม่มีเกลือ จะสามารถเจริญได้ในช่วง pH ตั้งแต่ 3.0-11.0 แต่ในสภาวะที่มีเกลือ จะสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช ตั้งแต่ 3.0-9.0 (Kumar et al., 2008) และสามารถเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 8-42 องศาเซลเซียส (Gummadi and Kumar, 2008)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ *D. nepalensis* จะเป็นเซลล์ขนาดเล็ก รูปร่างกลม รี ดังแสดงในรูปที่ 2.7 มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding) และมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (Ascospore) มีผนังสปอร์เป็นทรงกลมผนังขรุขระ (นภาพร และคณะ, 2563) *D. nepalensis* สามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งน้ำตาลเฮกโซส (Hexoses) และน้ำตาลเพนโตส (Pentoses) ยังสามารถสร้างสารที่มีมูลค่าได้ เช่น อะราบิทอล, ไซลิทอล และเอทานอล (Gummadi and Kumar, 2006; Kumar and Gummadi, 2011; Kumdam et al., 2012) สามารถแสดงลำดับอนุกรมวิธานของยีสต์ *D. nepalensis* ได้ดังนี้ (นภาพร และคณะ, 2563)

Domain Eukarya

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Saccharomycetes

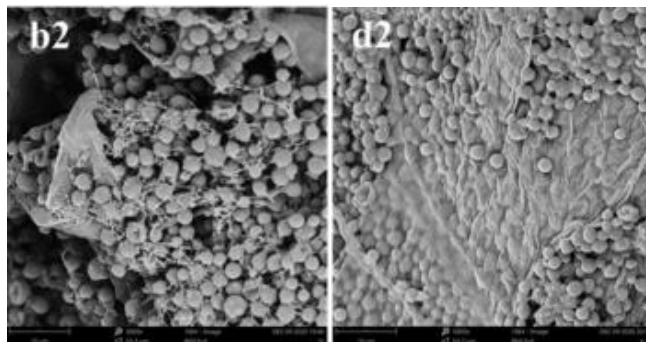
Order Saccharomycetales

Family Trichomonascaceae

Genus *Debaryomyces*

Species *Debaryomyces nepalensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 *Debaryomyces nepalensis*

ที่มา : Lei et al., 2022

2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

จากรายงานของ Yao et al. (2021) ได้รายงานว่าความคงตัวและประสิทธิภาพในการการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ ตัวทำละลายอินทรีย์ ไอออนของโลหะ และสารลดแรงตึงผิว เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์ ก็จะมีปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

2.12.1 สับสเตรท ความจำเพาะของสับสเตรทเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุลของเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างของตำแหน่งกัมมันต์ (Active site) ของเอนไซม์ โครงสร้างของสับสเตรท และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการจับกันระหว่างสับสเตรทกับตำแหน่งกัมมันต์ของเอนไซม์ และปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้น แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปสและโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปสที่มีหลากหลายแบบ ทำให้เอนไซม์ไลเปสแต่ละตัวแสดงความจำเพาะของสับสเตรทที่แตกต่างกัน (Yao et al., 2021) ยกตัวอย่าง เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Geobacillus stearothermophilus* AH22 แสดงกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาได้สูงต่อสับสเตรทพวกเมทิลเอสเทอร์สายสั้น (Ekinici et al., 2015) เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. จะมีความจำเพาะต่อไตรโอเลอิน (Triolein) (Sivaramakrishnan and Incharoensakdi, 2016)

2.12.2 พีเอช เอนไซม์ไลเปสจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกันไปตามแหล่งที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น เอนไซม์ไลเปสจากปลากระพงหัวทอง (*Sparus aurata*) จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 8.5 (Nolasco et al., 2010) เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas monteilli* จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 6 (Abdel-Hamied et al., 2017) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากแบคทีเรียทนร้อน จะทำงานได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นกลางจนถึงด่าง เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. มีความคงตัวอยู่ที่ช่วงพีเอช 5.5-7.2 และมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 5.6 (Sugihara et al., 1991) เอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากยีสต์ *Candida rugosa* ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปส คือ 7.5 (Jarjes et al., 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูผู้สอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.3 อุณหภูมิ เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมการนำไปใช้งาน โดยเอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิสูง ก็จะสามารถแยกได้จากจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้จะเหมาะกับการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น สารประกอบทางเภสัชกรรม และเครื่องสำอาง เนื่องจากมีความคงตัวต่อความร้อนและมีความทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (Kumar et al., 2020 อ้างอิงจาก Ranjan et al., 2018) ยกตัวอย่างเช่น *Geobacillus* sp. ที่แยกได้จากดินบริเวณน้ำพุร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ จะมีประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เนื่องจากเมื่อผงซักฟอกในน้ำเย็น เอนไซม์ไลเปสก็จะสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kumar et al., 2020 อ้างอิงจาก Joseph et al., 2008) ยกตัวอย่างเช่น *Micrococcus roseus* ที่แยกได้จากดินบริเวณธารน้ำแข็ง Gangotri บนเทือกเขาหิมาลัยทางทิศตะวันตก ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 10–15 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวอยู่ได้ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส (Joseph et al., 2011)

2.12.4 ตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์หมู่เอสเทอร์และการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ได้ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา โดยการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยาจะต้องมีตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) มาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา (พัชรนันท์, 2557) ดังนั้นตัวทำละลายอินทรีย์จึงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยทางเคมีที่ส่งผลกระทบต่อผลกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยแต่ละปฏิกิริยาจะต้องการชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อส่งผลกระทบต่อผลกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสในข้อนี้ ถือเป็นคุณสมบัติสำคัญที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารเคมี และการผลิตไบโอดีเซล (Yao et al., 2021) จากงานวิจัยของ Uttatree et al. (2010) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter baylyi* มีความทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดได้สูง โดยเฉพาะเบนซีน (Benzene) และไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Isoamyl alcohol) นอกจากนี้ เอนไซม์ไลเปส L-19 และเอนไซม์ไลเปส L-43a ที่ได้จาก *Rhizopus* sp. 19 และ *Rhizopus* sp. 43a ตามลำดับ ได้แสดงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่สูงกว่าร้อยละ 90 เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile), อะซิโตน (Acetone) และ เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว ได้แก่ เอทานอล (Ethanol) และ ไอ-โพรพานอล (i-Propanol) จะส่งผลให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสลดลงถึงร้อยละ 40 (Hernández-Rodríguez et al., 2009) และจากงานวิจัยของนนทิญา และคณะ (2563) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 มีความสามารถในการทนไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ได้มากที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 89 และ *D. nepalensis* BS1 มีความสามารถในการทนเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ได้มากที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 133 วัตถุประสงค์ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ไลเปสจะมีความสามารถในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ปัจจัยที่ทำให้เอนไซม์ไลเปสทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้แตกต่างกันนั้นมีผลจากค่า $\log P$ ค่าคงตัวไดอิเล็กทริก ไดโพลโมเมนต์ การจับกับไฮโดรเจน และความสามารถในการเกิดโพลารซ์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากค่า $\log P$ แล้ว ความมีขี้ของตัวทำละลาย ความสามารถในการเสียดสภาพ ความไม่ชอบน้ำ และค่าดัชนีโพลารซ์ ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดความเสถียรและศักยภาพในการเร่งปฏิกิริยา (Kumar et al., 2016)

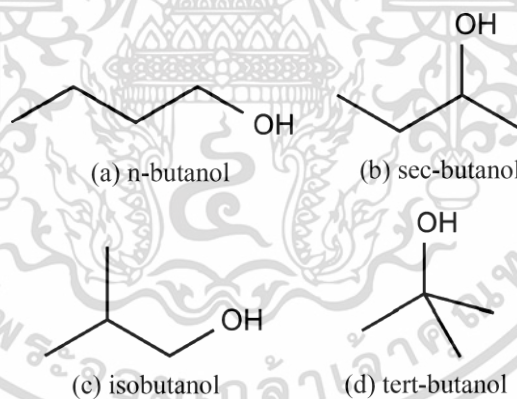
2.12.5 ไอออนของโลหะ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามชนิดไอออนของโลหะ โดยไอออนของโลหะจะส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้แตกต่างกันไปตามปฏิกิริยาและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (Acikel et al., 2011) ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงเมื่อมีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ส่วนในปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงเมื่อมีโครเมียมไอออน (Cr^{2+}) และโคบอลต์ไอออน (Co^{2+}) (Katiya and Ali, 2013) โดยส่วนมากการศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) จะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมีค่าสูงขึ้น (Katiya and Ali, 2013; Ma et al., 2006; Sharon et al., 1998)

2.12.6 สารเคมี สารเคมีบางชนิดส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เช่น กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติก (Ethylene diamine tetra-acetic acid; EDTA) ที่ส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ไม่สามารถทำงานได้ (Sharon et al., 1998) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอีกด้วย เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus ubonensis* SL-4 จะสามารถทนต่อ ทวิน 20 (Tween-20), ทวิน 40 (Tween-40), ทวิน 60 (Tween-60), ทวิน 80 (Tween-80), ไทรตัน X-100 (Triton X-100), และซีทีวีไตรเมทิล แอมโมเนียม โบรไมด์ (Cetyl trimethyl ammonium bromide) และจะไม่ทนต่อไดไธอริทอล (Dithiothreitol), เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (β -Mercaptoethanol) และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) (Yang et al., 2016)

2.13 บิวทานอล

บิวทานอล (Butanol) หรือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl alcohol) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล คือ $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 74.12 กรัมต่อโมล เป็นสารไม่มีสี ติดไฟได้ สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าละลายในน้ำ สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอร์ระเหยของบิวทานอลก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ เช่น เกิดการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระคายเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูก หากสูดดมไอระเหยของบิวทานอลมากอาจก่อให้เกิดการเสพติดได้ (สุไหงลา, 2559) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์สี เป็นสารให้กลิ่น และสังเคราะห์ยาง และสามารถเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพน้ำมันเชื้อเพลิง บิวทานอลเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันเบนซินที่เป็นที่ต้องการมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล เนื่องจากมีการที่มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับน้ำมันทำให้ผสมกับน้ำมันได้ดีกว่า ค่าพลังงานและจุดเดือดสูงกว่า มีการดูดความชื้นที่ต่ำกว่า และความผันผวนที่ต่ำกว่า สามารถขนส่งตามท่อส่งน้ำมันและไม่มีปัญหาเกี่ยวกับเครื่องยนต์เนื่องจากไม่มีการกัดกร่อน (Kumar and Spivey, 2017; ชนิกา และคณะ, 2555) ไอโซเมอร์ของบิวทานอลมีอยู่ 4 ไอโซเมอร์ ได้แก่ เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol), เซค-บิวทานอล (sec-Butanol), ไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) และ เติร์ต-บิวทานอล (tert-Butanol) โดยโครงสร้างของไอโซเมอร์ของบิวทานอลทั้ง 4 ไอโซเมอร์ ได้แสดงในรูปที่ 2.8 (Mack et al, 2016) ในส่วนของความเกี่ยวข้องของบิวทานอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า ไอโซ-บิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เอสเทอร์ เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสที่สังเคราะห์ได้จาก *Staphylococcus epidermidis* KX781317 ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Patel et al., 2018) และยังมีการศึกษาการสังเคราะห์บิวทิลไอโซบิวทีเรต (Butyl isobutyrate) โดยใช้เอ็น-บิวทานอลเป็นสารตั้งต้นร่วมกับกรดไอโซบิวทีริก (Butyric acid) และมีเอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Rahim et al., 2008)



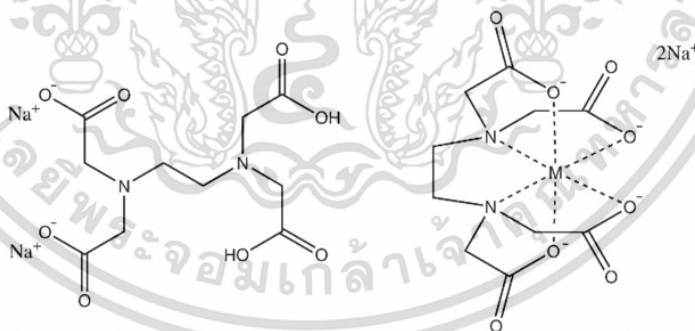
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของไอโซเมอร์ของบิวทานอล

ที่มา : Mack et al, 2016

2.14 กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก

กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก (Ethylenediaminetetraacetic acid) หรือชื่อย่อคือ EDTA มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{10}H_{16}N_2O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 292.25 กรัมต่อโมล โครงสร้างของ EDTA แสดงดังในรูปที่ 2.9 มีคุณสมบัติที่สามารถจับกับธาตุประจุบวกได้โดยจับผ่านหมู่คาร์บอกซิเลตทั้ง 4 ตัวและหมู่เอมีนอีก 2 กลุ่ม เรียกว่า สารคีเลต (Chelating agent) เป็นของแข็งที่มีคุณสมบัติละลาย

น้ำได้ ไม่มีสี (Mohammadi et al., 2013) เป็นกรดโพลีอะมิโนคาร์บอกซิลิก (Polyaminocarboxylic acid) (Crisponi and Nurchi, 2016) ซึ่งกรดโพลีอะมิโนคาร์บอกซิลิกเป็นลิแกนด์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มมัลติเดนเทต คีเลติง ลิแกนด์ (Multidentate chelating ligands) โดย EDTA เป็นกรดโพลีอะมิโนคาร์บอกซิลิกที่ถูกนำมาใช้มากที่สุด ทั้งในด้านเคมีและด้านอื่นๆ (Michela Salvatore and Salvatore, 2015) EDTA เป็นสารอินทรีย์ที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์หลายชนิดต้องการไอออนโลหะในการเกิดกิจกรรม จัดเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive inhibitor) (Blanco and Blanco, 2022) ผลของ EDTA ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ EDTA สามารถกระตุ้นหรือไม่ส่งผลยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์มีการรายงานน้อยมาก (Ghori et al., 2011) ส่วนใหญ่ EDTA จะไปยับยั้งการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากกว่า เนื่องจาก EDTA เป็นสารคีเลต จึงสามารถไปจับกับไอออนของโลหะที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ได้ ยกตัวอย่างเช่น การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter haemolyticus* เมื่อมี EDTA อยู่ในปฏิกิริยา พบว่า เอนไซม์ไลเปสจะไม่ทำงานเมื่อมี EDTA และจะสามารถทำงานได้เมื่อเติมแบเรียมคลอไรด์เท่านั้น จึงทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *A. haemolyticus* เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุล ที่เรียกว่า เมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme) (Jagtap and Chopade, 2015) เมื่อเอนไซม์ไลเปสไม่สามารถทำงานได้ อาจแก้ไขได้ด้วยการเติมไอออนโลหะที่มีจำนวนประจุเท่ากับสอง เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) รวมถึงแบเรียมไอออน (Ba^{2+}) เพื่อให้ไอออนโลหะแก่เอนไซม์ไลเปส ทำให้เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ (Boral and Fox, 1997)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างโมเลกุลของกรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก หรือ EDTA

ที่มา : Zhao et al., 2016

2.15 ไอออนโลหะ

ไอออนโลหะ (Metal ion) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโครงสร้างและหน้าที่ของชีวโมเลกุลต่างๆ (Leszczynski, 2014) มีคุณสมบัติในการสร้างพันธะกับธาตุที่ให้อิเล็กตรอน ยกตัวอย่างเช่น ซัลเฟอร์, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส รวมถึงสารประกอบที่ตัวมีออกซิเจนบางชนิด (Jennings et al.,

1997) ความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เอนไซม์ในกลุ่มเมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme) มีไอออนโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ (Cofactor) ที่จะเข้ามาจับที่บริเวณเร่ง (Active site) (Plaunt et al., 2017) ไอออนโลหะได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ โดยมุ่งเน้นที่ความเสถียรและการมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้น (Gohara and Cera, 2016) ในการพัฒนาการผลิตไบโอดีเซลได้มีการนำวิธีการต่าง ๆ มาใช้ทดสอบเอนไซม์ไลเปสเพื่อให้เอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมที่สูงขึ้น ซึ่งรวมถึงการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสกับไอออนโลหะ โดยในงานวิจัยของ Katiya and Ali (2013) ได้รายงาน bahwa ไอออนโลหะหลายชนิดได้ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เช่นเดียวกับปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ แต่ยังคงมีความแตกต่างของกิจกรรมที่เกิดที่จะไม่ได้อยู่ระดับเดียวกันหรือเหมือนกันทั้งหมด จึงไม่สามารถนำผลของไอออนโลหะต่อเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไปคาดการณ์ผลของไอออนโลหะต่อเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์

ธาตุโลหะทั้งหมดเป็นธาตุที่มีประจุบวก สามารถเป็นตัวรับอิเล็กตรอน จึงมีคุณสมบัติเป็นกรดตามทฤษฎีของลิวอิส หรือเรียกว่า กรดลิวอิส (Lewis acids) การจำแนกโลหะหรือกรดลิวอิสตามทฤษฎีของลิวอิส ดังแสดงในรูปที่ 2.10 จะสามารถบ่งบอกถึงรูปแบบของพันธะเมื่อโลหะเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Duffus, 2016) สามารถจำแนกได้ดังนี้

Class A																		Class B																		Borderline																		18																	
1	H																	2																	He																	18																			
Li		Be														B		C		N		O		F		Ne																																													
Na		Mg		3			4			5			6			7			8			9			10			11			12			Al		Si		P		S		Cl		Ar																											
K		Ca		Sc		Ti		V		Cr		Mn		Fe(III) Fe(II)		Co		Ni		Cu(II) Cu(I)		Zn		Ga		Ge		As		Se		Br		Kr																																					
Rb		Sr		Y		Zr		Nb		Mo		Tc		Ru		Rh		Pd		Ag		Cd		In		Sn		Sb		Te		I		Xe																																					
Cs		Ba		*		Hf		Ta		W		Re		Os		Ir		Pt		Au		Hg		Tl		Pb(IV) Pb(II)		Bi		Po		At		Rn																																					
Fr		Ra		#		Rf		Db		Sg		Bh		Hs		Mt		110																																																					
* lanthanide		La		Ce		Pr		Nd		Pm		Sm		Eu		Gd		Tb		Dy		Ho		Er		Tm		Yb		Lu																																									
# actinide		Ac		Th		Pa		U		Np		Pu		Am		Cm		Bk		Cf		Es		Fm		Md		No		Lr																																									

รูปที่ 2.10 ธาตุโลหะหรือกรดลิวอิสที่ถูกจำแนกตามทฤษฎีของลิวอิส โดยแบ่งเป็น สีดำ: โลหะคลาส A, สีเทาอ่อน: โลหะคลาส B, สีเทาเข้ม: โลหะที่อยู่ได้ทั้งสองคลาส

ที่มา : Duffus, 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.15.1 โลหะคลาส A (Class A metal ions) เป็นกลุ่มของโลหะหนัก (Hard metal ions or hard Lewis acid) มีคุณสมบัติเป็นนอนโพลารไรซ์ (Nonpolarizable) เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับที่มีลิแกนด์ที่เป็นนอนโพลารไรซ์เหมือนกัน โดยเฉพาะออกซิเจน และพันธะในสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพันธะไอออนิก ยกตัวอย่างเช่น โซเดียม (Na^{2+}) โพแทสเซียม (K^+) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) แคลเซียม (Ca^{2+}) (Duffus, 2016)

2.15.2 โลหะคลาส B (Class B metal ions) เป็นกลุ่มของโลหะเบา (Soft metal ions or soft Lewis acid) ชอบที่จะสร้างพันธะกับลิแกนด์ที่หมุนระนาบของแสงโพลารไรซ์ได้ โดยพันธะที่เกิดขึ้นจะเป็นพันธะโควาเลนต์ ยกตัวอย่างเช่น แคดเมียม (Cd^{2+}) เงิน (Ag^{2+}) พรอท (Hg^{2+}) (Duffus, 2016)

นอกจากนี้ยังมีธาตุโลหะที่สามารถจัดอยู่ได้ทั้งโลหะคลาส A และคลาส B ยกตัวอย่างเช่น สังกะสี (Zn^{2+}) วาเนเดียม (V^{2+}) และธาตุบางตัวที่มีเลขออกซิเดชันต่างกันก็ถูกจัดจำแนกไม่เหมือนกัน เช่น ในกรณีของธาตุทองแดง (Cu) ถ้าธาตุทองแดงมีเลขออกซิเดชันเป็น 1 หรือ Cu (I) จะจัดอยู่ในคลาส B ถ้าธาตุทองแดงมีเลขออกซิเดชันเป็น 2 หรือ Cu (II) จะสามารถอยู่ได้ทั้ง 2 คลาส หรือในกรณีของธาตุตะกั่ว (Pb) ถ้าธาตุตะกั่วมีเลขออกซิเดชันเป็น 2 หรือ Pb (II) จะจัดอยู่ในคลาส B แต่ถ้าธาตุตะกั่วมีเลขออกซิเดชันเป็น 4 หรือ Pb (IV) จะสามารถอยู่ได้ทั้ง 2 คลาส และยังมีกรณีของธาตุเหล็ก ถ้าธาตุเหล็กมีเลขออกซิเดชันเป็น 2 หรือ Fe (II) จะสามารถอยู่ได้ทั้ง 2 คลาส แต่ถ้าธาตุเหล็กมีเลขออกซิเดชันเป็น 3 หรือ Fe (III) จะจัดอยู่ในคลาส A (Duffus, 2016)

2.16 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เป็นวิธีที่ทำให้ทราบถึงความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในการใช้สับสเตรทหรือการผลิตสารผลิตภัณฑ์ออกมา หรือเป็นการติดตามกรดไขมันอิสระหรือกลีเซอรอลที่ถูกปล่อยออกมาจากไตรเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยวิธีการทดสอบทางเคมีและฟิสิกส์ (Physical and Chemical Methods) ที่ใช้ในการติดตามผลจะต้องเลือกให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ยกตัวอย่างเช่น การไทเทรต (Titrimetry), สเปกโตรสโคปี (Spectroscopy), โฟโตเมตรี (Photometry), การวิเคราะห์การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorimetry), โครมาโตกราฟี (Chromatography), การวัดค่าความขุ่น (Turbidimetry) (Chandra et al., 2020) สับสเตรทที่ใช้ตรวจจับกิจกรรมของไลเปสของวิธีทดสอบทางเคมีและฟิสิกส์ที่นิยมใช้ คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล และน้ำมันมะกอก (Sri Kaja et al., 2018) โดยทั่วไปแล้วน้ำมันมะกอกจะนิยมใช้เป็นสับสเตรท เนื่องจากน้ำมันมะกอกมีกรดโอเลอิกมากกว่า 70% มีราคาไม่แพงและมีจำหน่ายทั่วไป (Vorderwülbecke et al., 1992) การไทเทรตเป็นวิธีที่ต้องใช้สับสเตรท บัฟเฟอร์ และเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ โดยต้องควบคุมอุณหภูมิและ pH ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ และหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเอทานอล

ความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นจึงเติมอินดิเคเตอร์ ก่อนจะถูกไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานในกลุ่มอัลคาลีนที่ทราบความเข้มข้น วิธีไทเทรตเป็นวิธีที่ง่ายและให้ผลลัพธ์เร็ว แม้ว่าจะมีข้อผิดพลาด

บางอย่างที่อาจให้ผลมีความแม่นยำต่ำกว่าวิธีการวัดความเข้มของสี (Colorimetric method) แต่ก็ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งวิธีการวัดความเข้มของสีเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง เชื่อถือได้ และมีความละเอียดมากขึ้น แต่ต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะและขั้นตอนที่ซับซ้อนมากกว่าการไทเทรต (Yao et al., 2021) สับสเตรทที่ใช้ในการไทเทรตส่วนใหญ่ใช้น้ำมันมะกอก เนื่องจากหาซื้อได้ง่าย ให้ผลลัพธ์ที่มีความถูกต้องและมีมาตรฐาน (Chandra et al., 2020 อ้างอิงจาก Prim et al., 2003; Singh and Mukhopadhyay, 2011)

2.17 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรม

เอนไซม์ไลเปสมีคุณค่าทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่หลากหลายและสามารถผลิตได้จำนวนมาก ซึ่งทำให้ได้รับความสนใจอย่างมากในกลุ่มอุตสาหกรรม (Hasan et al., 2006) ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ทั้งในการผลิตอาหาร, อุตสาหกรรมยาและการแพทย์, อุตสาหกรรมผงซักฟอก, อุตสาหกรรมกระดาษ, การผลิตเชื้อเพลิงไบโอดีเซล, อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Yao et al., 2021)

2.17.1 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหาร

เอนไซม์ไลเปสเป็นส่วนสำคัญของอุตสาหกรรมอาหารสมัยใหม่ การใช้เอนไซม์เพื่อปรับปรุงกระบวนการทางเคมีแบบดั้งเดิมของการผลิตอาหารได้รับการพัฒนาขึ้นในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา ทุกวันนี้เอนไซม์ทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปส มักใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย ตั้งแต่ผลไม้ อาหารอบ และการหมักผัก (Pandey et al., 1999) เอนไซม์ไลเปสใช้เพื่อเพิ่มรสชาติและปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยปฏิกิริยาอินเทอร์ฟิเคชันหรือปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น (Reetz, 2002) เอนไซม์ไลเปสสามารถใช้เพื่อกลั่นน้ำมันโดยการขจัดกรดไขมันอิสระ วิธีนี้อาจใช้เพื่อเปลี่ยนแปลงน้ำมันคุณภาพต่ำเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น ในอุตสาหกรรมนม เอนไซม์ไลเปสจะย่อยไขมันนมซึ่งสามารถปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์นมได้และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (Konkit and Kim, 2016) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จาก *Lactobacillus plantarum* ได้นำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารที่เกี่ยวข้องกับเนยแข็ง (Esteban-Torres et al., 2015 อ้างอิงจาก Yao et al., 2021) นอกจากการปรับปรุงรสชาติแล้ว เอนไซม์ไลเปสยังใช้สำหรับการแปรรูปอาหารอื่น ๆ เช่น เนื้อสัตว์, ผัก, ผลไม้, ปลาการ์ปรมควัน, ผลิตภัณฑ์จากนม, อาหารอบ และเบียร์ (Farahat et al., 1990; Nagodawithana and Reed, 1993) เอนไซม์ไลเปสใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมนมสำหรับการไฮโดรไลซ์ไขมันนม ตัวอย่างการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ ได้แก่ การเพิ่มรสชาติของเนยแข็ง เร่งการสุกของเนยแข็ง ทำผลิตภัณฑ์คล้ายเนยแข็ง และการสลายไขมันเนยและครีม (Ghosh et al., 1996) ในงานวิจัยของ Zinjarde (2014) พบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Yarrowia lipolytica* มีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงรสชาติและเนื้อสัมผัสของเนยแข็ง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจะไฮโดรไลซ์ไขมัน

นม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันหลายชนิด ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก, กรดไมริสติก, กรดปาล์มิติก, กรด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปาล์มโตนี, กรดบิวทาโนอิก, และกรดโอเลอิก ซึ่งกรดไขมันแต่ละชนิดก็จะส่งผลให้เนยแข็งมีรสชาติที่แตกต่างกันออกไป จนกลายเป็นรสชาติเฉพาะของเนยแข็งแต่ละชนิด

ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ เอนไซม์ไลเปสสามารถสร้างสารลดแรงตึงผิวผ่านการไฮโดรไลซ์ไขมันภายในเซลล์ (Endogenous lipids) กระบวนการนี้จะช่วยลดต้นทุนการผลิต การจัดเก็บ และการขนส่ง จะไม่พบเอนไซม์ไลเปสในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายเนื่องจากเอนไซม์จะเสถียรระหว่าง การอบ และเอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้ง่าย ส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่มากขึ้น (Gerits et al., 2014) เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงเนื้อสัมผัส รสชาติและความสวยงามของขนมปังและขนมอบอื่น ๆ โดยพบว่าไลเปสจาก *Bacillus subtilis* มีบทบาทสำคัญในการผลิตขนมปัง (Sangeetha et al., 2011; Ray, 2012) ตัวอย่างการใช้ไลเปสในอุตสาหกรรมเบเกอรี่อื่น ๆ เช่น ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา การปรับความนุ่ม และการปรับปริมาณของขนมปัง (Ray, 2012)

2.17.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสทางการแพทย์ เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนช่วยในการเผาผลาญไขมัน และสามารถผลิตสารตัวกลางที่ใช้ในการผลิตยา เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Yao et al., 2021) ระดับเอนไซม์ไลเปสในเลือดสามารถใช้วินิจฉัยเพื่อตรวจหาภาวะต่าง ๆ เช่น โรคตับอ่อนอักเสบเฉียบพลัน (Frossard et al., 2001) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตยา เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* สามารถสังเคราะห์โลวาสแตติน (Lovastatin) ซึ่งเป็นยาที่ลดระดับคอเลสเตอรอล (Sharma and Kanwar, 2014) เอนไซม์ไลเปสที่แยกได้จากหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Galleria mellonella*) พบว่ามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) H37Rv นอกจากนี้ เอนไซม์ไลเปสยังถูกใช้เพื่อรักษาโรคกระเพาะอาหารและลำไส้, ภาวะอาหารไม่ย่อย, อาการทางผิวหนังของภาวะแพ้อาหาร เป็นต้น (Hasan et al., 2006)

2.17.3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมกระดาษ สำหรับการคัดแยกกระดาษเสีย เอนไซม์ไลเปสสามารถเพิ่มอัตราการผลิตเยื่อกระดาษ สามารถเพิ่มความขาวและความเข้มของเนื้อกระดาษได้ ซึ่งช่วยลดการใช้สารเคมี ช่วยยืดอายุอุปกรณ์ ลดระดับมลพิษของน้ำเสีย และยังประหยัดพลังงานและเวลา (Hasan et al., 2006) เเรซินและน้ำมันในอุตสาหกรรมกระดาษเป็นอุปสรรคต่อการทำความสะอาดและบำรุงรักษาเครื่องจักร การสะสมของเรซินจะลดประสิทธิภาพในการทำให้เยื่อกระดาษบริสุทธิ์ สามารถใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อขจัดสารประกอบเอสเทอร์ออกจากเยื่อกระดาษเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของเยื่อกระดาษได้ ซึ่งจะช่วยให้ปรับปรุงคุณภาพและกำลังการผลิต (Horchani et al., 2012 อ้างอิงจาก Yao et al., 2021) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังใช้เพื่อการขจัดหมึกและการฟอกสีในกระดาษได้ (Srivastava and Singh, 2015; Singh et al., 2016)

2.17.4 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เอนไซม์ไลเปสสามารถย่อยสลายได้ และไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตราย ไม่มีผลกระทบต่อกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

และก็ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ และยังมีฤทธิ์ในการย่อยสลายคราบไขมันบนผ้าแห้งหรือผ้าในน้ำยาซักผ้า เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถไฮโดรไลซ์ไขมันที่อยู่บนเสื้อผ้า โดยเอนไซม์ไลเปสใน

ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ซักฟอกจะมีความเสถียรต่อการเสียดสีที่มาจากสารลดแรงตึงผิวและความร้อน ทำให้เอนไซม์ไลเปสไม่เสียดสีและสามารถทำงานได้ในขณะซักผ้า (Hasan et al., 2006) มีรายงานว่าไลเปสที่ได้จาก *Aspergillus niger* สามารถทำงานได้ดีในการล้างด้วยน้ำอุณหภูมิปกติและเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารเติมแต่งในผงซักฟอก (Unni et al., 2016 อ้างอิงจาก Yao et al., 2021)

2.17.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล กระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกโดยใช้ไขมันและไขมันจากธรรมชาตินี้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากสารตั้งต้นเหล่านี้ปราศจากสารประกอบไนโตรเจนและกำมะถัน กระบวนการนี้จะช่วยลดผลกระทบจากภาวะเรือนกระจกและมลพิษทางอากาศที่เกิดจากเชื้อเพลิงฟอสซิลได้ (Li et al., 2010) ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล เอนไซม์ไลเปสถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้สารตั้งต้นคือลิพิด และแอลกอฮอล์สายสั้นเพื่อผลิตสารประกอบเอสเทอร์และกลีเซอรอล (Mehta et al., 2021)

2.17.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้เพื่อขจัดสารหล่อลื่น เพื่อให้ผ้าดูดซับสีย้อมได้ดีขึ้นในกระบวนการย้อมสี นอกจากนี้ยังช่วยลดรอยแตกและรอยยับของผ้าเดนิม โดยมีการใช้เอนไซม์ไลเปสร่วมกับอัลฟาอะไมเลสในการลอกแป้งของการผลิตผ้าเดนิมและผ้าฝ้าย เพื่อให้ผ้าดูดซับสีหรือสารเคมีได้สม่ำเสมอ ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ผ้าโพลีเอสเตอร์ที่ได้จากการนำเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้ในการผลิตมีข้อดีที่สำคัญ ได้แก่ มีความนุ่ม มีความแข็งแรงสูง ไม่เป็นคราบง่าย และมีความยืดหยุ่น และเนื้อผ้ามีรอยยับน้อย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการทำให้ผ้าโพลีเอสเตอร์มีความไวต่อกระบวนการปรับปรุงในขั้นตอนสุดท้าย (Hasan et al., 2006)

2.17.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง การขจัดคราบไขมันเป็นขั้นตอนสำคัญในการแปรรูปวัตถุดิบที่มีไขมัน เช่น หนังสัตว์ขนาดเล็กและหนังจากโค โดยวิธีทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว ซึ่งสามารถก่อปัญหาสิ่งแวดล้อม เช่น การปล่อยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (VOC) ในสิ่งแวดล้อม จากปัญหาทางสิ่งแวดล้อมของการใช้สารเคมีในการขจัดคราบไขมัน จึงได้สนใจนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ขจัดไขมันออกจากหนังแทน โดยข้อดีของการใช้เอนไซม์ไลเปสคือ หนังมีสีสม่ำเสมอและมีลักษณะสะอาดกว่า และเอนไซม์ไลเปสยังช่วยปรับปรุงการผลิตหนังกันน้ำสำหรับทำเบาะรถยนต์ทำให้เกิดฝ้าน้อยลง (Hasan et al., 2006)

2.17.8 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การคัดแยกเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและน้ำหอมส่วนใหญ่พิจารณาจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในสารลดแรงตึงผิวและการสร้างกลิ่นหอมซึ่งเป็นส่วนผสมหลักในเครื่องสำอางและน้ำหอม โดยโมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอลจะเตรียมได้โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ของกลีเซอรอลที่เร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปส โดยโมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอลจะใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในเครื่องสำอาง (Pandey et al., 1999) เอนไซม์ไลเปสถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางรวมถึงไอโซโพรพิลพาล์มิเตตและ 2-เอทิลเฮกซิลพาล์มิเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อเผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตต ซึ่งใช้เป็นสารทำให้ผิวเนียนในผลิตภัณฑ์ดูแลผิว เช่น ผิวและครีมกันแดดและน้ำมันอาบน้ำ (Adetunji and Olaniran, 2021)

2.17.9 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการบำบัดน้ำเสีย เอนไซม์ไลเปสถูกใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียแบบใช้ตะกอนเร่งและระบบบำบัดน้ำเสียแบบใช้ออกซิเจนอื่น ๆ ซึ่งจะต้องกำจัดไขมันชั้นบาง ๆ ออกจากพื้นผิวของถังเติมอากาศอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถขนส่งออกซิเจนได้ น้ำเสียที่เต็มไปด้วยไขมันนี้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* สามารถย่อยสิ่งสกปรกที่เป็นไขมันง่าย เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การกำจัดเศษอาหาร ของเสียจากนม และไขมันจากขนสัตว์ มูลสัตว์ และการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันที่ใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (Hasan et al., 2006; Chandra et al., 2020)

2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยของ Barbosa et al. (2012) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ITP-001 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งคัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมในพื้นที่ที่มีการสำรวจแหล่งปิโตรเลียมในประเทศบราซิล จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสโดยการทดสอบกับไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะสูงขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโคบอลต์ไอออน (Co^{2+}), ไอเอิร์น (III) ไอออน (Fe^{3+}), แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}), แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) และซิงค์ (II) ไอออน (Zn^{2+}) แต่กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งด้วยคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสโดยการทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ พบว่า นอกจากโพรพิลีน ตัวทำละลายอินทรีย์ทุกชนิดที่ใช้ทดสอบในการทดลองนี้ ได้แก่ ไอโซ-โพรพานอล (iso-Propanol), เอทานอล (Ethanol), เมทานอล (Methanol), อะซีโตน (Acetone) และอะซีโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) ล้วนเป็นตัวยับยั้งที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าต่ำลง โดยเฉพาะเอทานอล ไอโซโพรพานอล และอะซีโตน ที่ยิ่งมีความเข้มข้นสูงจะลดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ประมาณร้อยละ 30, ร้อยละ 20 และร้อยละ 12 ตามลำดับ และยังพบว่าเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์สูงขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะต่ำลง ยกเว้นในกรณีของโพรพิลีน

Gururaj et al. (2016) ได้รายงานผลการทดสอบเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จาก *Acinetobacter* sp. AU07 กับไอออนของโลหะ 6 ชนิด ได้แก่ ซิงค์ (II) ไอออน (Zn^{2+}), แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}), แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), นิกเกิลไอออน (Ag^{2+}), ไอเอิร์น (III) ไอออน (Fe^{3+}) และแมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) เพื่อศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า ไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบจะลดประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ยิ่งใช้ความเข้มข้นสูง ค่า

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสก็ยิ่งลดลง ซึ่งกิจกรรมที่ลดลงของเอนไซม์ไลเปสเมื่อมีไอออนโลหะแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter* sp. AU07 ไม่ต้องการไอออนโลหะเป็นโคแฟกเตอร์

สำหรับการเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ ยังได้ทดสอบเอนไซม์ไลเปสกับ ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF), ไดคลอโรไดฟีนิลไตรคลอโรอีเทน (DTT) และ EDTA พบว่า PMSF สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึงร้อยละ 88 เมื่อใช้ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ส่วน DTT และ EDTA มีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้เพียงเล็กน้อย ผลลัพธ์เหล่านี้ทำให้ทราบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter* sp. AU07 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ที่มีเซอรีน (Serine) เป็นองค์ประกอบ และไม่จัดเป็นเมทัลโลเอนไซม์ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีไอออนโลหะในการเร่งปฏิกิริยา

Hafez et al. (2020) ได้ทำการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Candida catenulata* ซึ่งเป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (Ascomycetous yeast) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 5.5 โดยได้ค่าคงที่มีคาเอลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten constant) หรือค่า K_m เท่ากับ 0.271 มิลลิโมลาร์ มีความเร็วสูงสุด (maximum velocity) ของการทำงานของเอนไซม์ หรือค่า V_{max} เท่ากับ 14.94 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบเอนไซม์ไลเปสกับไอออนโลหะ พบว่า โซเดียมไอออน (Na^{2+}), โพแทสเซียมไอออน (K^+), แบเรียมไอออน (Ba^{2+}) และไอเอิร์น (II) ไอออน (Fe^{2+}) จะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลง ส่วนเมอคิวรีไอออน (Hg^{2+}) จะลดกิจกรรมของเอนไซม์ลงอย่างมาก ในขณะที่ซิงค์ (II) ไอออน (Zn^{2+}) จะส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้น และยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะลดลงเมื่อทดสอบด้วย EDTA และ 2-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จึงสามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ *C. catenulate* จัดอยู่ในกลุ่มเมทัลโลเอนไซม์

ในงานวิจัยของ Kartiya and Ali (2013) ได้ทำการศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Candida rugosa* ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ โดยนำเอนไซม์ไลเปสมาทดสอบกับไอออนโลหะชนิดต่างๆ ได้แก่ โซเดียมไอออน (Na^{2+}), โพแทสเซียมไอออน (K^+), แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), แบเรียมไอออน (Ba^{2+}), โครเมียมไอออน (Cr^{2+}) ไอเอิร์น (II) ไอออน (Fe^{2+}), โคบอลต์ไอออน (Co^{2+}), คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) และนิกเกิลไอออน (Ni^{2+}) พบว่า ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะสูงสุดเมื่อทดสอบกับไอออนของแคลเซียม และในปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะสูงสุดเมื่อทดสอบกับไอออนของโครเมียม และไอออนของโคบอลต์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ 2 ปฏิกิริยา ได้แก่ ปฏิกิริยามาเทนไธซิส และปฏิกิริยาเอทาโนไลซิส ซึ่งพบว่า เมื่อทดสอบเอนไซม์ไลเปสด้วยไอออนของโคบอลต์ จะส่งผลให้พลังงานกระตุ้น (Activation energy) ของปฏิกิริยามาเทนไธซิส และปฏิกิริยาเอทาโนไลซิส ลดลงจาก 10.16 และ 10.24 กิโลแคลอรีต่อโมล เป็น 5.41 และ 7.55 กิโลแคลอรีต่อโมล ตามลำดับ ดังนั้นโคบอลต์ไอออน และโครเมียมไอออน อาจถูกพิจารณาในการนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลเพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งช่วยให้กระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีระยะเวลาสั้นลงได้

Kakugawa et al. (2000) ได้ทำการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถสังเคราะห์ไกลโคลิพิดได้ เอนไซม์ไลเปส

ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสของ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 อยู่ที่ประมาณ 49 กิโลดาลตัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด คือ 79 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์จะเสถียรที่สุดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 1.9–7.2 และกิจกรรมของเอนไซม์จะเสถียรที่สุดที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 7.1 เอนไซม์ไลเปสของ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 จะมีความจำเพาะกับสับสเตรทเป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอม ในศึกษาความทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสของ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะถูกกระตุ้นเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ ไอโซ-บิวทานอล, ไซลีน, เบนซีน และโทลูอีน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 แต่กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งเมื่ออยู่ในเมทานอล คลอโรฟอร์ม หรือ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (DMSO) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของไอออนโลหะและสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า แมงกานีสไอออน, แคลเซียมไอออน, แบเรียมไอออน, ซิงค์ (II) ไอออน, แมกนีเซียมไอออน และ EDTA ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ในทางตรงกันข้าม ไอเอิร์น (II) ไอออน และอลูมิเนียมไอออน มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเล็กน้อย ที่ร้อยละ 19 ของการยับยั้ง และไอเอิร์น (III) ไอออนจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอย่างมาก ที่ร้อยละ 46 ของการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 กล้องจุลทรรศน์ 2 กระบอกตา รุ่น CX23 บริษัท โอลิมปัส (ประเทศไทย) จำกัด, ประเทศไทย
- 3.1.2 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy
- 3.1.3 เครื่องดูดสาร (Micropipette) บริษัท Vivantis Technologies, USA
- 3.1.4 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง บริษัท AND รุ่น GF-800, Japan
- 3.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TE214S บริษัท Sartorius Weiging Technology, Germany
- 3.1.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85/11, Japan
- 3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Microcentrifuge) บริษัท HERMLE Labortechnik Gmbh, Germany
- 3.1.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy
- 3.1.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH Meter) บริษัท METTLER TOLEDO รุ่น S220, Switzerland
- 3.1.10 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท SHIMADZU รุ่น UV-1800 240V, Japan
- 3.1.11 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) บริษัท Shanghai Hasuc Instrument Manufacture Co, Ltd รุ่น HSYC-21125, China
- 3.1.12 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท Ontherm scientific Ltd, New Zealand
- 3.1.13 ตู้ลามินาร์ (Laminar Air Flow Cabinet) บริษัท Dwyer Instrument, USA
- 3.1.14 ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Binder, Germany
- 3.1.15 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) บริษัท Memmert, Germany
- 3.1.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Memmert, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 กระจกปิดสไลด์ (Cover slip) บริษัท Gerhard Menzel, Germany
- 3.2.2 กระจกบอทวงสารขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.2.3 ขวดบรรจุอาหาร (Duran) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 125 มิลลิลิตร
- 3.2.5 จานเพาะเชื้อ
- 3.2.6 จุกยาง
- 3.2.7 ซ้อนตักสาร
- 3.2.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.9 ทิปสำหรับเครื่องดูดสาร (Micropipette Tip) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร
- 3.2.10 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.2.11 แท่งแก้วคนสาร
- 3.2.12 บิวเรตต์ (Burette)
- 3.2.13 ปีกเกอร์ขนาด 50, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.2.14 ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.2.15 ไมโครปิเปต ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร และ 50-200 ไมโครลิตร
- 3.2.16 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.2.17 สไลด์สำหรับเตรียมตัวอย่างส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Yancheng Xingfu Glass Instrument Factory, China
- 3.2.18 หลอดฝาแคป
- 3.2.19 หลอดฝาเกลียว
- 3.2.20 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) บริษัท Extragen, USA
- 3.2.21 Eppendorf Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.2.22 Ocular micrometer

3.3 สารเคมี

3.3.1 Agar ห้างหุ้นส่วนจำกัด พัฒนาสินเอ็นเตอร์ไพรส์, ประเทศไทย

3.3.2 Barium chloride dihydrate ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. ออสเตรเลีย
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของบริษัทผู้จำหน่ายซึ่งมีอยู่ภายใต้เงื่อนไขการจำหน่ายการค้า
 ไม่ว่าการ Australia ลีน อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.3 Bovine serum albumin (BSA) บริษัท SIGMA-AIDRICH, Switzerland
- 3.3.4 Calcium chloride (CaCl_2) บริษัท SIGMA-AIDRICH, Switzerland
- 3.3.5 Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.3.6 Copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.3.7 Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy
- 3.3.8 Ethyl alcohol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95 โดยปริมาตร บริษัท แอลเพียว, ประเทศไทย
- 3.3.9 Ethylene diamine tetra-acetic acid ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท คิว เคมีคอล จำกัด, New Zealand
- 3.3.10 Folin-Ciocalteu บริษัท LOBA CHEMIE PVT, India
- 3.3.11 Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) บริษัท Fluka BioChemika, Switzerland
- 3.3.12 Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd, Australia
- 3.3.13 Glyceryl Tributyrate ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_6$) บริษัท Sigma Aldrich, Switzerland
- 3.3.14 Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) บริษัท คิว เคมีคอล จำกัด, New Zealand
- 3.3.15 Magnesium Sulphate Heptahydrate (MgSO_4) บริษัท CARLO ERBA REAGENTS Quality, France
- 3.3.16 Manganese chloride monohydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) บริษัท คิว เคมีคอล จำกัด, New Zealand
- 3.3.17 Malt extract (MEA) บริษัท Sisco Research Laboratories, India
- 3.3.18 Olive oil ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}$) บริษัท My choice, ประเทศไทย
- 3.3.19 Peptone บริษัท Sisco Research Laboratories, India
- 3.3.20 Phenolphthalein indicator บริษัท LOBA CHEMIE PVT. LTD, Japan
- 3.3.21 Potassium chloride (KCl) บริษัท คิว เคมีคอล จำกัด, New Zealand
- 3.3.22 Sodium carbonate (Na_2CO_3) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.3.23 tri-Sodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.3.24 Sodium hydroxide (NaOH) บริษัท Honeywell Fluka, Germany
- 3.3.25 Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.26 Sodium potassium tartrate tetrahydrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Sisco Research Laboratories, India
- 3.3.27 Yeast extract บริษัท CTI and Science, Japan
- 3.3.28 Yeast malt broth บริษัท Titan Biotech Ltd, India
- 3.3.29 Zinc chloride (ZnCl_2) บริษัท คิว เคมีคอล จำกัด, New Zealand

3.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

เชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ที่ใช้ในโครงการงานพิเศษนี้ได้รับมาจากงานวิจัยของวริศรา และคณะ (2560) ที่ได้ทำการคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากแหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย เริ่มแรกให้ทำการกระตุ้นเชื้อยีสต์โดยการนำยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ที่เก็บอยู่ในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปผสมด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อยีสต์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหาร YM broth (Pantelides et al., 2015) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (จุฑามณี และคณะ, 2563; นภาพร และคณะ, 2563; นนทिया และคณะ, 2564) จากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยทำการถ่ายเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tributyrin plate agar (Bataiche et al., 2014) ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Cross-Streak Technique) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จากนั้นทำการสังเกตและวัดขนาดของโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น (จุฑามณี และคณะ, 2563; นนทिया และคณะ, 2564) ทำการเลือกโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่มีโซนใสมากเลี้ยงบนอาหารแข็ง Tributyrin plate agar (Bataiche et al., 2014) ด้วยเทคนิคการขีดเชื้อแบบง่าย (Simple streak) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ลงในอาหาร YM broth (Pantelides et al., 2015) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร และทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (นนทिया และคณะ, 2564)

3.5 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

ทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ตามวิธีของ Bergman (2001) โดยการเตรียมกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร แล้วนำไปแช่เชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เลี้ยงอยู่ในอาหาร YM broth (Pantelides et al., 2015) ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.8 มาถ่ายลงในกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร ในอัตราส่วน 1:1 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับร้อยละ 40 โดยปริมาตร แล้วแบ่งใส่ Eppendorf Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ

D. nepalensis BS1

ได้ทำตามงานวิจัยของนนทิญา และคณะ (2564) ดังนี้

3.6.1 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

ทำการถ่ายเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 จากอาหาร YM broth (Pantelides et al., 2015) ที่เตรียมได้จากการทดลองข้อที่ 3.4 โดยให้มีค่าความขุ่นของเชื้อ (Optical density) อยู่ที่ประมาณ 1.0-1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Ali medium (Ali et al., 2010) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำการแยกตะกอนของเซลล์ออก (จุฑามณี และคณะ, 2563) จากนั้นเก็บส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอนไซม์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปทดสอบกิจกรรมแล้วเปรียบเทียบว่า ระหว่างการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือ 72 ชั่วโมง วิธีใดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้มากกว่า แล้วเลือกวิธีที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มากกว่ามาใช้ในการทดสอบผลของความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) และผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และทำการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีของ Kumar et al. (2017) และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951)

3.6.2 การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ทำการถ่ายเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1 จากอาหาร YM broth (Pantelides et al., 2015) ที่เตรียมได้จากการทดลองข้อที่ 3.4 โดยให้มีค่าความขุ่นของเชื้อ (Optical density) อยู่ที่ประมาณ 1.0-1.5 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Bussamara medium (Bussamara et al., 2010) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการเพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนของเซลล์ออก (นภาพร และคณะ, 2563) จากนั้นเก็บส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอนไซม์ที่เก็บเกี่ยวได้ไปทดสอบ

กิจกรรมแล้วเปรียบเทียบกับ ระหว่างการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือ 72 ชั่วโมง วิธีใดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้มากกว่า แล้วเลือกวิธีที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มากกว่ามาใช้ในการทดสอบผลของความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) และผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และทำการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีของ Kumar et al. (2017) และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951)

3.7 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

ได้ทำตามงานวิจัยของนนทิญา และคณะ (2564) ดังนี้

3.7.1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

ทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยทำการผสมน้ำมันมะกอก 3 กรัม และซีเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.1) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อที่ 3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอช เท่ากับ 11 ชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เอนไซม์เสียสภาพและทำขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar และคณะ, 2017) กับกิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

3.7.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยทำการผสมน้ำมันมะกอก 3 กรัม และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.2) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) ทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อที่ 3.6.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอช เท่ากับ 11 ชุดควบคุม (Control) จะ

ใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพและทำขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar และคณะ, 2017) กับกิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

3.8 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

ขั้นตอนในการตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้อ้างอิงจากงานวิจัยของนนทิญา และคณะ (2564) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยนำสารละลายส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (Alkaline copper) ปริมาตร 2,500 ไมโครลิตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.3) จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.6) ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสีได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สำหรับการทำแบลนด์ (Blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายส่วนใส (เอนไซม์) และใช้โปรตีน Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานแทนสารละลายส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.7) และทำตามขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ดังสมการที่ 3 (หัวข้อที่ 3.14)

3.9 การศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

3.9.1 การศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

ทำการศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) โดยนำไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ปริมาตร 0, 75, 150, 225 และ 300 ไมโครลิตร ผสมกับซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 3, 2.925, 2.850, 2.775 และ 2.700 มิลลิลิตร ตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยปริมาตร (นนทิญา และคณะ, 2564) และน้ำมันมะกอก 3 กรัม ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ

3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยุดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอชเท่ากับ 11 ในส่วนของชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพ และทำขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar และคณะ, 2017) กับกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

3.9.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ทำการศึกษาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) โดยนำเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ปริมาตร 0, 75, 150, 225 และ 300 ไมโครลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 3, 2.925, 2.850, 2.775 และ 2.700 มิลลิลิตร ตามลำดับ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยปริมาตร (นนทิญา และคณะ, 2564) และน้ำมันมะกอก 3 กรัม ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.6.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยุดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอชเท่ากับ 11 ในส่วนของชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพ และทำขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) กับกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

3.10 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

3.10.1 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

ทำการศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการผสมน้ำมันมะกอก 3 กรัม กับซิเตรตบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 3.000, 2.985, 2.970, 2.955 และ 2.940 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.8) ที่ปริมาตร 0, 15, 30, 45 และ 60 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิโมลาร์ (Esakkiraj et al., 2014) ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยุดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอช เท่ากับ 11 ในส่วนของชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพและทำตามขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) กับกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

หมายเหตุ น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ในการทดลองนี้ จะใช้น้ำปราศจากไอออนในการเตรียมทั้งหมด

3.10.2 การศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ทำการศึกษาผลของ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการผสมน้ำมันมะกอก 3 กรัม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 3.000, 2.985, 2.970, 2.955 และ 2.940 มิลลิตร และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.8) ที่ปริมาตร 0, 15, 30, 45 และ 60 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 มิลลิโมลาร์ (Esakkiraj et al., 2014) ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.6.2 ปริมาตร 1 มิลลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยุดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอช เท่ากับ 11 ในส่วนของชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพและทำตามขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) กับกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

หมายเหตุ น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ในการทดลองนี้ จะใช้น้ำปราศจากไอออนในการเตรียมทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (Metal ion) ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

3.11.1 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (Metal ion) ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

ทำการศึกษาคผลของชนิดของไอออนโลหะ (Metal ion) โดยการผสมน้ำมันมะกอก 3 กรัม กับซิเตรตบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 2.700 มิลลิลิตร และสารละลายของสารประกอบคลอไรด์ของโลหะ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2), ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl_2), แบเรียมคลอไรด์ (BaCl_2), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2) และแมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.9 – ข.14) ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ (Gururaj et al., 2016) ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยุดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.4) จนกระทั่งได้ค่าพีเอช เท่ากับ 11 ในส่วนของชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพและทำตามขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) กับกิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

หมายเหตุ น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ในการทดลองนี้ จะใช้น้ำปราศจากไอออนในการเตรียมทั้งหมด

3.11.2 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ (Metal ion) ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ทำการศึกษาคผลของชนิดของไอออนโลหะ (Metal ion) โดยการผสมน้ำมันมะกอก 3 กรัม ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 2.700 มิลลิลิตร และสารละลายของสารประกอบคลอไรด์ของโลหะ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2), ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl_2), แบเรียมคลอไรด์ (BaCl_2), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2) และแมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.9 – ข.14) ที่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ (Gururaj et al., 2016) ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) จากนั้นทำการเติมส่วนใส (เอนไซม์) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.6.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน จากนั้นหยดสารละลายฟีนอล์ฟทาไลน์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จำนวน 2 หยด และนำไปไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.5) จนกระทั่งได้ค่าพีเอช เท่ากับ 11 ในส่วนของชุดควบคุม (Control) จะใช้ส่วนใส (เอนไซม์) ที่นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอนไซม์เสียสภาพ และทำตามขั้นตอนอื่น ๆ เหมือนในตัวอย่าง และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) กับกิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity) ดังสมการที่ 1 (หัวข้อที่ 3.12) และ 2 (หัวข้อที่ 3.13) ตามลำดับ

หมายเหตุ น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ในการทดลองนี้ จะใช้น้ำปราศจากไอออนในการเตรียมทั้งหมด

3.12 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (สมการที่ 1)

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ NaOH (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ NaOH (โมลาร์)} \times 1000 \times \text{Dilution factor}}{30}$$

1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ (Kumar et al., 2017)

30 หมายถึง เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรท คือ 30 นาที

3.13 การคำนวณค่ากิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity) (สมการที่ 2)

$$\text{ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของชุดตัวอย่าง (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times 100}{\text{กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของชุดควบคุม (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}$$

3.14 การคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (สมการที่ 3)

$$\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

3.15 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การประมวลผลข้อมูล และการวิเคราะห์ทางสถิติโดยซอฟต์แวร์ IBM SPSS Statistic เวอร์ชัน 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

จากงานวิจัยของนนทิญา และคณะ (2564) ที่ได้ทำการศึกษานิตของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 พบว่า ไอโซ-บิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 2.111 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่ใช้ คือ ร้อยละ 5.0 โดยปริมาตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยปริมาตร โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท บ่มภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) และกิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ) ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ตารางที่ 4.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับไอโซ-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ ไอโซ-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพันธ์ (ร้อยละ)
0.0	2.6000±0.100 ^a	100.0
2.5	2.0333±0.115 ^b	78.2
5.0	1.8333±0.115 ^b	70.5
7.5	1.2000±0.100 ^c	46.2
10.0	0.8667±0.153 ^c	33.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยปริมาตร พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 2.6367 ± 0.049 , 2.1100 ± 0.040 , 1.9133 ± 0.038 , 1.3467 ± 0.050 และ 1.0533 ± 0.057 ยูนิต์ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 100.0, ร้อยละ 78.2, ร้อยละ 70.5, ร้อยละ 46.2 และร้อยละ 33.3 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 มีความสามารถในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ในทุกระดับความเข้มข้น และเมื่อระดับความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลสูงขึ้น จะส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยทำให้มีค่าลดลงตามระดับความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล ตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของเอนไซม์ไลเปสและตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ปรับปรุงและพัฒนาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลและการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์ได้ (Yao et al., 2021) ผลการทดลองของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสตามความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทดสอบที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยของ Barbosa et al. (2012) ที่ได้ทำการทดสอบเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ITP-001 กับตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ไอโซโพรพานอล, เอทานอล, เมทานอล, อะซีโตน, อะซีโตนไนไตรล์ และไพรีดีน และกำหนดระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ร้อยละ 10, ร้อยละ 20 และร้อยละ 30 โดยปริมาตร ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ใช้ไขมันมะกอกเป็นสับสเตรท โดยบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 80 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที พบว่าเมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยไอโซ-โพรพานอล, เอทานอล, เมทานอล, อะซีโตน และอะซีโตนไนไตรล์ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทดสอบ แต่ก็ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ตัวไหนในการทดสอบนี้สามารถยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ อาจเนื่องมาจากความสามารถในการซึมเข้าสู่โครงสร้างภายในของเอนไซม์ไลเปสของตัวทำละลายอินทรีย์ต่ำกว่าตัวทำละลายที่เป็นน้ำ บิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mattson et al. (1970) ที่ได้ทำการศึกษาระบบยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้แอลกอฮอล์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากตับอ่อนของหนู โดยใช้สับสเตรทเป็นกรดโอเลอิก ผลการทดสอบพบว่าแอลกอฮอล์สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถดูดซับสับสเตรทได้ ทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่างเอนไซม์ไลเปสและสับสเตรท และเมื่อความยาวของสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนยาวขึ้น ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะยังมีค่าลดลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการทดสอบเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้จากน้ำมันตัดกลิ้งแร่ที่เน่าเสีย กับตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด

8 ตัว ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล, อะซีโตน, คลอโรฟอร์ม, เอ็น-เฮกเซน และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMFA) โดยใช้ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถทน

ต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทดสอบได้ทั้งหมด 6 ตัว ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล, อะซีโตน, คลอโรฟอร์ม, เอ็น-เฮกเซน และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) แต่ไม่สามารถพบบิวทานอล และไอโซ-โพรพานอล ซึ่งทั้งบิวทานอล และไอโซ-โพรพานอล ก็เป็นแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนยาวกว่า เมทานอล และเอทานอล จึงทำให้ผลการทดสอบเอนไซม์ไลเปสกับเมทานอล และเอทานอล มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าบิวทานอล และไอโซ-โพรพานอล (Karadzic et al., 2006)

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

จากงานวิจัยของนนทิญา และคณะ (2564) ที่ได้ทำการศึกษานิตของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 พบว่า เอ็น-บิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 3.822 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่ใช้ คือ ร้อยละ 5.0 โดยปริมาตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาค่าความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยปริมาตร โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท บ่มภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) และกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

D. nepalensis BS1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับเอ็น-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ เอ็น-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
0.0	3.1333±0.058 ^a	100.0
2.5	3.7333±0.058 ^b	119.1
5.0	4.4667±0.153 ^c	142.6
7.5	5.1333±0.153 ^d	163.8
10.0	5.5000±0.200 ^d	175.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 โดยปริมาตร พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 3.1333 ± 0.058 , 3.7333 ± 0.058 , 5.1333 ± 0.153 , 5.5000 ± 0.200 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 100.0, ร้อยละ 119.1, ร้อยละ 142.6, ร้อยละ 163.8 และร้อยละ 175.5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 สามารถถูกกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ด้วยเอ็น-บิวทานอลในทุกระดับความเข้มข้น และเมื่อระดับความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลสูงขึ้น จะส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยทำให้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล โดยเอ็น-บิวทานอลเป็นไอโซเมอร์ของบิวทานอล มีโครงสร้างสายไฮโดรคาร์บอนแบบโซ่ตรง และมีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งสุดท้าย โดยเอ็น-บิวทานอลมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นพลังเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์มากกว่าแอลกอฮอล์ที่มีสายไฮโดรคาร์บอนสั้นด้วยกัน (Jin et al., 2011) ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ โดยในงานวิจัยของ Sun et al. (2015) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Yarrowia lipolytica* โดยบ่มเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านขั้นตอนการตรึงรูปแล้วกับตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมด 6 ตัว ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล, อะซิโตน, คลอโรฟอร์ม, เอ็น-เฮกเซน, เอ็น-เฮปเทน และเติร์ต-บิวทานอล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใช้สับสเตรทเป็นพารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรต (p-nitrophenyl laurate) พบว่า เมื่อบ่มเอนไซม์ไลเปสกับเติร์ต-บิวทานอล จะได้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 156.6 ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของชุดควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ นอกจากเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Yarrowia lipolytica* ที่มีความสามารถในการทนต่อเติร์ต-บิวทานอลแล้ว ยังมีเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ที่สามารถทนต่อเติร์ต-บิวทานอลเช่นกัน เติร์ต-บิวทานอลจึงถือเป็นตัวเลือกที่ดีในการนำมาใช้เป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากเติร์ต-บิวทานอลไม่ใช่สับสเตรทของเอนไซม์ไลเปสและสามารถกำจัดออกได้ง่าย โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* ได้มีการนำมาศึกษาในการใช้ผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดฝ้ายโดยใช้เติร์ต-บิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสามารถถูกยับยั้งได้โดยเมทานอล จึงแก้ปัญหานี้โดยการเติมเติร์ต-บิวทานอลในปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส เนื่องจากเติร์ต-บิวทานอลสามารถละลายได้ทั้งเมทานอลและกลีเซอรอล นอกจากจะไม่ใช่สับสเตรทของเอนไซม์ไลเปสแล้ว เติร์ต-บิวทานอลยังไม่เป็นสารพิษและมีราคาถูก เหมาะแก่การนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Royon et al., 2007) เอ็น-บิวทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่มีขั้ว (polar solvent) โดยในงานวิจัยของ Hernández-Rodríguez et al. (2009) ได้กล่าวว่า เอนไซม์ไลเปสที่มีความสามารถใน

การทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่มีขั้วอาจจะช่วยให้สับสเตรทที่มีขั้วถูกนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสได้ จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่มีขั้ว ทั้งหมด 7

ชนิด ได้แก่ ไอโซ-โพพานอล, เอทานอล, ไอโซ-เอมิล แอลกอฮอล์, เตตราไฮโดรพิวแรน, เอทิล อะซีเตท, อะซีโตน และอะซีโตนไตรท์ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อราที่ทนต่ออุณหภูมิสูง 6 สายพันธุ์ ในสกุล *Rhizopus* และเชื้อราที่ชอบเจริญในอุณหภูมิสูง 1 สายพันธุ์ ในสกุล *Rhizomucor* ผลิตโดยใช้กระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จาก *Rhizopus* spp. สองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 19 และสายพันธุ์ 43a จะสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่มีขี้ผึ้งได้ เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม และตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวยังสามารถให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้นอีกด้วย

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

จากรายงานของ Dharmsthiti et al. (1998) ได้รายงานว่า EDTA จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จาก *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 โดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกยับยั้งการทำงานจะจัดเป็นเมทัลโลเอนไซม์ แต่ก็มีรายงานว่า EDTA จะไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus stearothermophilus* L1 ซึ่งจัดเป็นเซอร์รินเอนไซม์ (Kim et al., 1998) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, และ 10.0 มิลลิโมลาร์ โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท บ่มภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) และกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
0.0	2.4667±0.208 ^a	100.0
2.5	2.0667±0.152 ^{ab}	83.8
5.0	1.6667±0.058 ^{bc}	67.6
7.5	1.4000±0.100 ^c	56.8
10.0	0.8000±0.100 ^d	32.4

จากตารางที่ 4.3 ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 2.4667±0.208, 2.0667±0.152, 1.6667±0.058, 1.4000±0.100 และ 0.8000±0.100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ ร้อยละ 100.0, ร้อยละ 83.8, ร้อยละ 67.6, ร้อยละ 56.8 และร้อยละ 32.4 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 มีความสามารถในการทนต่อ EDTA ในทุกระดับความเข้มข้น และเมื่อระดับความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้น จะส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยทำให้มีค่าลดลงตามระดับความเข้มข้นของ EDTA ที่สูงขึ้นอีกด้วย ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 อาจจัดเป็นเมทัลโลเอนไซม์ ผลการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสตามความเข้มข้นของ EDTA ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับในรายงานของ Joseph and Ramteke (2013) ที่ได้ทำการทดสอบเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus sphaericus* MTCC 7526 กับ EDTA ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ บ่ม 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ ร้อยละ 92.47, ร้อยละ 71.25, และ ร้อยละ 46.98 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้น จะส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยทำให้มีค่าลดลง แต่ในรายงานของ Paitaid et al. (2021) ที่ได้ทำการทดสอบเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* ST11 กับ EDTA ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ โดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์อยู่ที่ ร้อยละ 101.9±5.2 ซึ่งกิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย และที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์อยู่ที่ ร้อยละ 92.3±1.6 ซึ่งทั้งสองความเข้มข้นไม่ได้ลดกิจกรรมลงอย่างมีนัยสำคัญ และบอกเป็นนัยว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* ST11 นั้นเป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องการโลหะ และในรายงานของ Ghori et al. (2011) ได้ศึกษาผลของ EDTA ต่อไลเปสที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. พบว่า EDTA ยับยั้ง

กิจกรรมการย่อยลิพิด อย่างมาก อย่างไรก็ตาม มีรายงานที่ขัดแย้งกันเกี่ยวกับผลกระทบของ EDTA ในบางกรณี EDTA มีผลกระทบหรือไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ในขณะที่กรณีอื่น ๆ จะแสดงผลในการยับยั้ง การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอย่างรุนแรงในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ต้องการไอออนโลหะในการเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากเมื่อมี EDTA อยู่ในปฏิกิริยา EDTA จะไปจับไอออนโลหะที่มีประจุบวก ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

4.4 การศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

EDTA เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการศึกษาว่าสารลดแรงตึงผิวมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอย่างมีนัยสำคัญ เพราะเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จะทำงานเมื่ออยู่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ (Yao et al., 2021) EDTA มีการศึกษาว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อาจเนื่องมาจากความสามารถในการคีเลตของสาร ด้วยเหตุนี้จึงรบกวนการจับกับสับสเตรทของเอนไซม์ (Enujiugha et al., 2004) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, และ 10.0 มิลลิโมลาร์ โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท บ่มภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เวลา 30 นาที จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) และกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

D. nepalensis BS1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
0.0	4.0667±0.058 ^a	100.0
2.5	3.5333±0.208 ^b	86.9
5.0	3.0000±0.100 ^b	73.8
7.5	1.9000±0.100 ^c	46.7
10.0	0.8667±0.058 ^d	21.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้น 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 4.0667 ± 0.058 , 3.5333 ± 0.208 , 3.0000 ± 0.100 , 1.9000 ± 0.100 และ 0.8667 ± 0.058 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 100.0, ร้อยละ 86.9, ร้อยละ 73.8, ร้อยละ 46.7 และร้อยละ 21.3 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 มีความสามารถในการทนต่อ EDTA ในทุกระดับความเข้มข้น และเมื่อระดับความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้น จะส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยทำให้มีค่าลดลงตามระดับความเข้มข้นของ EDTA ที่สูงขึ้นอีกด้วย ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 อาจจัดเป็นเมทัลโลเอนไซม์ จากรายงานของ Almeida et al. (2018) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida viswanathii* โดยใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้น 2 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ มีค่ากิจกรรมกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 71.0 และที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีค่ากิจกรรมกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 61.1 แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมลดลงตามความเข้มข้นของ EDTA ที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gururaj et al. (2016) ที่ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter* sp. AU107 โดยใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้น 2, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ มีค่ากิจกรรมน้อยกว่าชุดควบคุมเพียงเล็กน้อย และมีค่ากิจกรรมลดลงตามความเข้มข้นของ EDTA ที่เพิ่มขึ้น นอกจากเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์แล้ว เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากพืชก็มีการศึกษาว่า EDTA สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้เช่นกัน จากรายงานของ Al-Haidari et al. (2021) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สกัดจากเมล็ดทานตะวันงอก โดยการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ดังนี้ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่ากิจกรรมสัมพันธ์ลดลงตามความเข้มข้นของ EDTA โดยที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลงถึง 86.2% ดังนั้น EDTA จึงแสดงผลยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ผลการยับยั้งของ EDTA ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารคีเลตต่อเอนไซม์ไลเปสยังมีรายงานในเมล็ดพืชหลายชนิด เช่น ถั่วแอฟริกัน ถั่วลันเตา แตงโมขาว และจากในรายงานของ Haque et al. (2005) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากรำข้าว โดยนำมาทดสอบกับ EDTA ที่มีความเข้มข้น 1, 5, 10, 200 และ 500 มิลลิโมลาร์ โดยเติมลงในสารละลายของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการไตอะไลซ์แล้ว และบ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ ร้อยละ 47.38, ร้อยละ 35.00, ร้อยละ 27.43, ร้อยละ 13.42 และร้อยละ 5.32 ตามลำดับ จะเห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงทีละน้อยเมื่อความเข้มข้นของ EDTA เพิ่มขึ้น และเอนไซม์ไลเปสจะสูญเสียกิจกรรมเกือบทั้งหมดเมื่อมี EDTA 500 มิลลิโมลาร์ จากผลลัพธ์นี้สรุปได้ว่า EDTA สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากรำข้าวได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

จากรายงานของ Yao et al. (2021) ได้รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะเปลี่ยนไปตามไอออนของโลหะที่ใช้ทดสอบ ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia ubonensis* SL-4 สามารถถูกกระตุ้นการทำงานเมื่อทำงานร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์และแมงกานีสคลอไรด์แต่จะถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทำงานร่วมกับแมกนีเซียมคลอไรด์, โคบอลต์คลอไรด์, คอปเปอร์คลอไรด์, เลดคลอไรด์, อะลูมิเนียมคลอไรด์ และไอเอิร์น (II) คลอไรด์ (Yang et al., 2016) และเอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter* sp. AU07 เมื่อทดสอบด้วยซิงค์ (II) คลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์, ซิลเวอร์คลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter* sp. AU07 ไม่ต้องการไอออนโลหะในการเร่งปฏิกิริยา (Gururaj et al., 2016) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *Wickerhamiella* sp. BN1 โดยไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบจะใช้โลหะที่อยู่ในรูปเกลือของโลหะ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2), ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl_2), แบเรียมคลอไรด์ (BaCl_2), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2) และแมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2) ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท บ่มภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 4.8 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) และกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5 โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับไอออนโลหะทั้งหมด 7 ชนิด

ไอออนโลหะ	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
ไม่เติมไอออนโลหะ	2.2667±0.153 ^{bc}	100.0
แคลเซียมคลอไรด์	2.9000±0.100 ^d	127.9
ซิงค์ (II) คลอไรด์	2.3333±0.153 ^c	102.9
แบเรียมคลอไรด์	1.9333±0.153 ^{abc}	85.3
โพแทสเซียมคลอไรด์	1.8000±0.100 ^{ab}	79.4
แมกนีเซียมคลอไรด์	2.1000±0.200 ^{abc}	92.6
แมงกานีสคลอไรด์	1.7333±0.153 ^a	76.5

จากตารางที่ 4.5 ได้ทำการศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *Wickerhamiella* sp. BN1 โดยไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, แบเรียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 2.9000±0.100, 2.3333±0.153, 1.9333±0.153, 1.8000±0.100, 2.1000±0.200 และ 1.7333±0.153 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.2667±0.153 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ ร้อยละ 127.9, ร้อยละ 102.9, ร้อยละ 85.3, ร้อยละ 79.4, ร้อยละ 92.6 และ ร้อยละ 76.5 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แคลเซียมคลอไรด์ และซิงค์ (II) คลอไรด์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *Wickerhamiella* sp. BN1 ส่วนแบเรียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *Wickerhamiella* sp. BN1 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสต่ำกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของชุดควบคุม และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าร้อยละ 100 แคลเซียมคลอไรด์สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 2.9000±0.100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ เท่ากับ ร้อยละ 127.9 แคลเซียมคลอไรด์เป็นไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Yang et al. (2015) ได้รายงานว่ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. R0-14 เมื่อถูกบ่มกับสับสเตรทในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยสับสเตรทที่ใช้คือ พารา-ไนโตรฟินิล เอสเทอร์ (p-nitrophenyl esters) สามารถถูกกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้เมื่อทดสอบกับ แคลเซียมคลอไรด์, สตรอนเทียมคลอไรด์ และแบเรียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์, แต่ถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทดสอบด้วยคอปเปอร์คลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, ไม่ว่ากร

แมกนีเซียมคลอไรด์ และนิกเกิลคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกัน หรือในงานวิจัยของ Özdemir et al. (2021) ได้รายงานว่ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263 ได้มีการทดสอบกับไอออนโลหะทั้งหมด 4 ตัว ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่า มีเพียงแคลเซียมคลอไรด์ที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263 นอกจากแคลเซียมคลอไรด์แล้ว ซิงค์ (II) คลอไรด์ก็ยังสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Wickerhamiella* sp. BN1 สูงกว่าชุดควบคุม คือ 2.3333 ± 0.153 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ เท่ากับ ร้อยละ 102.9 ซิงค์คลอไรด์มีการรายงานว่ให้ผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิด ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Aeribacillus pallidus* ได้นำมาทดสอบกับไอออนโลหะ ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ คอปเปอร์คลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ โดยทดสอบทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ พบว่า ซิงค์ (II) คลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ เป็นไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. pallidus* ได้ (Ktata et al., 2019) การที่ไอออนโลหะอย่างเช่น แคลเซียมคลอไรด์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ เป็นเพราะไอออนโลหะอาจทำให้เอนไซม์ไลเปสมีโครงสร้างที่มีความเสถียรมากขึ้น (Xie et al., 2015) นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้พบว่า แบริยมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Wickerhamiella* sp. BN1 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในชุดควบคุม เนื่องจากไอออนโลหะกลุ่มนี้อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้โดยการจับกับหมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH group) เป็นการรบกวนบริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากหมู่ซัลไฟไฮดริลจะอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปส (Will, 1960)

4.6 การศึกษาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

การนำไอออนโลหะมาควบคุมกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ เป็นหนึ่งในวิธีที่ถูกนำมาใช้เพื่อพัฒนาการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน (Gohara and Cera, 2016) จากรายงานของ Karadzic et al. (2006) ได้มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยนำมาทดสอบด้วยไอออนโลหะทั้งหมด 6 ตัว ซึ่งจะใช้โลหะที่อยู่ในรูปเกลือของโลหะ ได้แก่ คอปเปอร์คลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ และใช้พารา-ไนโตรฟีนิล ปาลมิเตต (p-Nitrophenyl palmitate) เป็นสับสเตรท พบว่า เอนไซม์เอกลาเรนีไลเปสจาก *P. aeruginosa* ถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอย่างรุนแรงเมื่อทดสอบกับ ซิงค์ (II) คลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์, และคอปเปอร์คลอไรด์ และถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเล็กน้อย

เมื่อทดสอบกับแคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ ดังนั้นเอนไซม์ไลเปส จาก *P. aeruginosa* จึงไม่จัดเป็นเมทัลโลเอนไซม์ เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีไอออนของโลหะในการเร่งปฏิกิริยา และในงานวิจัยของ Almeida et al. (2018) ได้ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จาก *Candida viswanathii* กับไอออนโลหะ พบว่า แคลเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งชนิดที่ผ่านการตรึงรูป (Immobilized enzyme) และชนิดที่ไม่ผ่านการตรึงรูป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *D. nepalensis* BS1 โดยไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบจะใช้โลหะที่อยู่ในรูปเกลือของโลหะ (Metal chloride) ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2), ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl_2), แบเรียมคลอไรด์ (BaCl_2), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2) และแมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2) ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท บ่มภายใต้สภาวะการทดลองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kumar et al., 2017) และกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6 โดยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ) ได้มาจากการทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ตารางที่ 4.6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์

D. nepalensis BS1 เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสไปบ่มร่วมกับไอออนโลหะทั้งหมด 7 ชนิด

ไอออนโลหะ	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
ไม่เติมไอออนโลหะ	3.3333±0.058 ^d	100.0
แคลเซียมคลอไรด์	4.4000±0.100 ^e	132.0
ซิงค์ (II) คลอไรด์	2.8333±0.153 ^d	85.0
แบเรียมคลอไรด์	1.3000±0.200 ^a	39.0
โพแทสเซียมคลอไรด์	1.6000±0.100 ^{ab}	48.0
แมกนีเซียมคลอไรด์	3.6667±0.153 ^c	110.0
แมงกานีสคลอไรด์	1.9333±0.153 ^b	58.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.6 ได้ทำการศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *D. nepalensis* BS1 โดยไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, แบเรียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 4.4000 ± 0.100 , 2.8333 ± 0.153 , 1.3000 ± 0.200 , 1.6000 ± 0.100 , 3.6667 ± 0.153 และ 1.9333 ± 0.153 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.3333 ± 0.058 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 132.0, ร้อยละ 85.0, ร้อยละ 39.0, ร้อยละ 48.0, ร้อยละ 110.0 และ ร้อยละ 58.0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *D. nepalensis* BS1 ส่วนซิงค์ (II) คลอไรด์, แบเรียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์ และแมงกานีสคลอไรด์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของ *D. nepalensis* BS1 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสต่ำกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของชุดควบคุม และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ต่ำกว่าร้อยละ 100 แคลเซียมคลอไรด์สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 4.4000 ± 0.100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 132.0 รองลงมาคือ แมกนีเซียมคลอไรด์ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 3.6667 ± 0.153 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ เท่ากับ ร้อยละ 110.0 แคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มักถูกนำมาใช้ปรับปรุงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Yao et al. 2022; Katiyar and Ali, 2013) ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Wang et al. (2012) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter calcoaceticus* โดยได้นำมาทดสอบกับไอออนโลหะทั้งหมด 10 ชนิด ซึ่งไอออนโลหะเหล่านี้อยู่ในรูปเกลือของโลหะ (Metal chloride) ได้แก่ ซิงค์คลอไรด์, คอปเปอร์คลอไรด์, แมงกานีสคลอไรด์, อะลูมิเนียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์, แบเรียมคลอไรด์, แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ โดยใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และใช้สับสเตรทเป็นพารา-ไนโตรฟีนิล ปามีเตต (p-Nitrophenyl palmitate) พบว่า แมกนีเซียมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ เป็นไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *A. calcoaceticus* ให้สูงขึ้นได้ แต่ซิงค์ (II) คลอไรด์, คอปเปอร์คลอไรด์, แมงกานีสคลอไรด์, อะลูมิเนียมคลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์ และแบเรียมคลอไรด์ เป็นไอออนโลหะที่ไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสซึ่งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าต่ำลงได้ และในงานวิจัยของ Gao et al. (2018) ได้ทำการทดสอบผลกระทบของไอออนโลหะต่อเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จาก *Paenibacillus pasadenensis* CS0611 โดยได้เลือกไอออนโลหะมาทั้งหมด 8 ตัว ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์, คอปเปอร์คลอไรด์, ซิงค์ (II) คลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์, โคบอลต์คลอไรด์, แมงกานีสคลอไรด์ และไอเอิร์น (III) คลอไรด์ โดยใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 2 มิลลิโมลาร์ พบว่า แคลเซียมคลอไรด์สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด โดยมีค่ากิจกรรม

สัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 208 รองลงมาคือ แมงกานีสคลอไรด์ ค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 146 และคอปเปอร์คลอไรด์ ค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 116 แต่ในทางตรงกันข้าม ซิงค์ (II) คลอไรด์, ไอเอิร์น (II) คลอไรด์, โคบอลต์คลอไรด์, แมงกานีสคลอไรด์ และไอเอิร์น (III) คลอไรด์ เป็นไอออนโลหะที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *P. pasadenensis* CS0611 โดยเฉพาะไอเอิร์น (III) คลอไรด์ ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุด โดยให้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ ร้อยละ 39 ในงานวิจัยของ Xie et al. (2015) ได้อธิบายสาเหตุที่ไอออนโลหะสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ เป็นเพราะไอออนโลหะอาจทำให้เอนไซม์ไลเปสมีโครงสร้างที่มีความเสถียรมากขึ้น และนอกจากไอออนโลหะที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *D. nepalensis* BS1 ในงานวิจัยนี้ยังพบว่า ซิงค์คลอไรด์, แบริยมคลอไรด์, โพแทสเซียมคลอไรด์, และแมงกานีสคลอไรด์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *D. nepalensis* BS1 โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในชุดควบคุม เนื่องจากไอออนโลหะกลุ่มนี้อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้โดยการจับกับหมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH group) เป็นการรบกวนบริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากหมู่ซัลไฟไฮดริลจะอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปส (Will, 1960)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) และเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ตามลำดับ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 จะลดลงตามความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เพิ่มขึ้น ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นในอุตสาหกรรมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ในกระบวนการผลิต อย่างเช่น การผลิตไบโอดีเซล จึงแนะนำให้ใช้เอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ร่วมกับไอโซ-บิวทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 แนะนำให้ใช้ร่วมกับเอ็น-บิวทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 10.0 โดยปริมาตร เพื่อเพิ่มความเสถียรของโครงสร้างเอนไซม์ไลเปสเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงขึ้น

จากการศึกษาผลของ EDTA และไอออนโลหะชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 พบว่า EDTA มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทั้งยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 จึงคาดว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 อาจจัดเป็นเมทัลโลเอนไซม์ โดยเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 จะถูกกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ และซิงค์ (II) คลอไรด์ ส่วนเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 จะถูกกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ โดยเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ทั้งสองตัวนี้จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ จึงแนะนำให้ใช้เอนไซม์ไลเปสร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา และแก้ไขปัญหาการเสถียรภาพของโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการวัดความเข้มของสี (Colorimetric method) เพื่อให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้มีความแม่นยำสูง เนื่องจากเป็นการตรวจวัดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) แทนวิธีการไทเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่การศึกษานิตของสารลดแรงตึงผิวชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 เพื่อเป็นการหาชนิดของ

สารลดแรงตึงผิวที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เช่น ทวิน 20 (Tween 20), ทวิน 40 (Tween 40), ไทรทัน เอ็กซ์-100 (Triton X-100), โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate), ไดไธโอธรีทอล (Dithiothreitol), ซิติวไตรเมทิล แอมโมเนียม โบรไมด์ (Cetyl trimethyl ammonium bromide) เป็นต้น

5.2.3 ควรทำการศึกษาความเข้มข้นของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 เพื่อเป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

5.2.4 ควรทำการศึกษาการใช้สับสเตรทที่มาจากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ชั่งข้าวโพด กาบมะพร้าว เปลือกข้าวโพด และเปลือกถั่วลิสง เป็นต้น ในการนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ไลเปส จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 เพื่อลดต้นทุนในการผลิตในอุตสาหกรรม

5.2.5 ควรทำการศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1 ให้บริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มความจำเพาะต่อสับสเตรทในการเร่งปฏิกิริยาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กุสุมาวดี ฐานเจริญ. 2557. ความหลากหลายของยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันในน้ำทิ้งโรงอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.
- จักรพงษ์ ไชยบุรี และวิสกฤษ สิงห์อินทร์. 2555. การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา SrO และ KF/SrO. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณวารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 15(3): 141-147.
- จารุวัลย์ โพธิ์ไพบูลย์, ดวงกมล อยู่เจริญ และบุรุษกร คชฤทธิ์. 2547. การผลิตไบโอดีเซลจากปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จุฑามณี เทพชู, นาฏนรินทร์ อุทิศ และรังสิมันต์ ชวลิตสมบัติ. 2563. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ไอโซเลท BN1 โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชนิกา อื้อพานิช ชมภูษุช วิรุณานนท์ และวรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกุล. 2555. ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 22(3): 703-709.
- นนทิญา รัตนาศน์พิทักษ์, พลอยวรัย ทุมเชียงเข้ม และวรรณภา อะเวลา. 2564. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *Debaryomyces nepalensis* BS1 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นภาพร ทองสุวรรณ, วิมลมาลย์ ศรีจันทร์ไชย และสิริวรรณ บัวแย้มเจริญ. 2563. การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ไอโซเลท BS1 โดยการใช้ไขมันประกอบอาหารเหลือทิ้งเป็นสับสเตรท. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปกรณ วิษยานุวัตติคุณ. 2554. เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล. วารสารวิจัยพลังงาน. 8(2): 61-75.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- บุริมปรัชญ์ ศรีหมาน. 2552. การผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันที่มีอีสต์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พัชรนันท์ อมรัตน์พันธ์. 2557. การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูง. มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พนทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547. หลักการอาหารสัตว์: หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์. เล่มที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- มาริษา อัดถาพงศ์. 2560. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์. งานวิจัยสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยพะเยา.
- ยุทธนา เสนประดิษฐ์. 2560. การสังเคราะห์bisimacrocyclic SFTI-1 inhibitor และอนุพันธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- วริศรา ฮาบเจริญ, กรกนก จุฑาพงศ์ และกรรณิการ์ ชัดดร. 2560. การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสหรือไลเปสจากแหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย. โครงการพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วีระ ปิยธีรวงศ์. 2555. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสสำหรับการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว. วารสาร วิทยาศาสตร์บูรพา. 17(1): 192-197.
- ศศิพันธ์ วงศ์สุทธาวาส และสุวิทย์ ธีรพันธุ์วัฒน์. 2546. อิทธิพลของปริมาณและสัดส่วนไขมันกับน้ำมันถั่วเหลืองในอาหารต่อการสะสมไขมันภายในซากไก่เนื้อ. 596-604. ในการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตร. ขอนแก่น.
- สุดปรารถนา ธีราติ, ปวีณา พลัดพราว, ยรรยง สุขคล้าย, วีรินทร์ดา อัมมานะ และจุไรวัลย์ รัตนะพิสิฐ. 2018. การแยกกลีเซอรอลออกจากไบโอดีเซลโดยใช้เทคโนโลยีเมมเบรน. วารสารวิศวกรรมศาสตร์ ราชวมงคลธัญบุรี. 37-46.
- สุไฮลา สาและ. 2559. การผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoconium* sp. ด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบปซ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีประยุกต์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เสริมสกุล พจนการุณ. 2545. ผลของพันธุ์ที่แตกต่างกันต่อปริมาณธาตุอาหารในใบมะกอกน้ำมัน. วารสารเกษตร. 18(2). 100-109.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัจฉรา นิยมเดชา, สุรเสน ศรีริگانนท์ และมงคล คงเสน. 2556. การใช้กรดไขมันโอเมก้าในการเพิ่มสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซากของสุกร. Princess of Naradhiwas University Journal. 5(4): 122-131.

เอกสิทธิ์ อ่อนสอาด. 2555. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี ภายภาพในระหว่างการแปรรูปอาหาร. เอกสารประกอบการสอนสาขาเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

Abdel-Hamied, M. R., Akram, A. A., Salha, G. and Fatma, M. 2017. Characterization and optimization of lipase activity produced by *Pseudomonas monteilli* 2403-ky120354 isolated from ground beef. African Journal of Biotechnology. 16(2): 96-105.

Adetunji, A. I. and Olaniran, A. O. 2021. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. Saudi Journal of Biological Sciences. 28(1): 669-679.

Ahmed, S. F., Abdallah, R. Z. and Siam, R. 2022. Evaluation of a thermophilic, psychrostable, and heavy metal-resistant Red Sea brine pool esterase. Marine Drugs. 20(5): 274.

Alcántara, A. R., Hernaiz, M.-J. and Sinisterra, J.-V. 2011. Biocatalyzed production of Fine Chemicals. Comprehensive Biotechnology, 309-331.

Al-Haidari, Dh. M. A., Alsaadawi, S. I. and Khudhair, H. S. 2021. Determination the Optimum Conditions of the Activity and Stability of Lipase Extracted from Sunflower Germinated Seeds. Iraqi Journal of Science. 62(2): 431-440.

Ali, S., Khan, F. I., Chen, W., Rahaman, A. and Wang, Y. 2018. Open and closed states of MRLIP1 DAG lipase revealed by molecular dynamics simulation. Molecular Simulation. 44(18): 1520-1528.

Ali, S., Rafi, H. and Ikram-ul-Haq. 2010. Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and parameter significance analysis by Plackett Burman design. Engineering in Life Sciences. 10: 465-473.

Almeida, A. F., Terrasan, C. R., Terrone, C. C., Tauk-Tornisielo, S. M. and Carmona, E. C. 2018. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. Process Biochemistry. 65: 71-80.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์. Process Biochemistry. 65: 71-80. ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Amaral, P. F., de Almeida, A. P., Peixoto, T., Rocha-Leão, M. H., Coutinho, J. A. and Coelho, M. A. 2006. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(3): 339-344.
- Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal*. 343(1): 177-183.
- Arroyo, M., Sánchez-Montero, J. M. and Sinisterra, J. V. 1999. Thermal stabilization of immobilized lipase b from *Candida Antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in Organic Media. *Enzyme and Microbial Technology*. 24(1-2): 3-12.
- Açikel, Ü., Erşan, M. and Açikel, Y. S. 2011. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. Delemar*. *Turkish Journal of Biology*. 35: 35-44.
- Baral, A. and Fox, P. F. 1997. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas tolaasii*. *Food Chemistry*. 58(1-2): 33-38.
- Barbosa, J. M., Souza, R. L., Melo, C. M., Fricks, A. T., Soares, C. M. and Lima, Á. S. 2012. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001. *Química Nova*. 35(6): 1173-1178.
- Bataiche, I., chaouche, N.K., Destain, J., Lejeune, A. and Thonart, P. 2014. Screening of *Candida boidinii* from Chemlal spent olive characterized by higher alkaline-cold adapted lipase production. *African Journal of Biotechnology*. 13(11): 1287-1294.
- Belloch, C., Pelaez, A. I., Sánchez, J. and Kurtzman, C. P. 2020. *Wickerhamiella verensis* F.A. sp. nov. a novel yeast species isolated from subsoil groundwater contaminated with hydrocarbons and from a human infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(4): 2420-2425.
- Bergman, L. W. 2001. Growth and maintenance of yeast. *Two-Hybrid Systems*. 177: 9-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bharathi, D. and Rajalakshmi, G. 2019. Microbial Lipases: An Overview of Screening, Production and Purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 22: 101368.
- Blanco, A. and Blanco, G. 2022. *Medical biochemistry*. 2nd edition. Academic Press.
- Boral, A. and Fox, P. 1997. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas tolaassi*. *Fd Chemistry*. 58: 33-38.
- Bronscheuer, U. and Soumanou, M. M. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. 33: 97-103.
- Bussamara, R., Fuentesfria, M.A., Oliveira, S.E., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A. and Vainstein, H.M. 2010. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*. 101: 268-275.
- Cha, H. J., Park, J. B., and Park, S. 2019. Esterification of secondary alcohols and multi-hydroxyl compounds by *Candida Antarctica* lipase B and Subtilisin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 24(1): 41-47.
- Chandler, I. C. 2001. Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 78(7): 737-742.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R. and Arora, P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. 19(169): 1-42.
- Ciafardini, G., Zullo, B., Cioccia, G. and Irice, A. 2006. Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *International Journal of Food Microbiology*. 107(1): 27-32.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., Antonielli, L., Corte, L., Roscini, L. and Cardinali, G. 2013. *Yamadazyma Terventina* sp. nov. a yeast species of the YAMADAZYMA clade from Italian olive oils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63(1): 372-376.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Couturier, L., Taupin, D. and Yverghaux, F. 2009. Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56(1): 29-33.
- Crisponi, G. and Nurchi, V. M. 2016. Chelating agents as therapeutic compounds-basic principles. *Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication*. 35-61.
- Dharmsthiti, S. and Ammaranond, P. 1997. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (*Trichosporon asteroides*). *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 26: 111-116.
- Dharmsthiti, S., Pratuangdejkul, J., Theeragool, G. and Luchai, S. 1998. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP900. *Journal of general and applied microbiology*. 44: 139-145.
- Domínguez, A., Costas, M., Longo, L. A. and Sanromán, A. 2003. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. 25: 1225-1229.
- Duffus, J. H. 2016. heavy metals a meaningless term. *IUPAC Standards Online*. 74(5): 793-807.
- Ekinci, A. P., Dinçer, B., Baltaş, N. and Adıgüzel, A. 2015. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 31(2): 325-331.
- Enujiugha, N.V., Thani, A.F., Sanni, M.T. and Abigor, D.R. 2004. Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Food Chemistry*. 88: 405-410.
- Esakkiraj, P., Prabakaran, G., Maruthiah, T., Immanuel, G. and Palavesam, A. 2014. Purification and characterization of halophilic alkaline lipase from *Halobacillus* sp. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 86(2): 309-314.
- Esteban-Torres, M., Mancheño, J. M., De Las Rivas, B., and Muñoz, R. 2015. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT Food Sci. Technol.*

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 60 ที่ 246-252. สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M. and Subramaniam, S. 2011. Lipid classification, structures and Tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1811(11): 637-647.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L. and Dennis, E. A. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 46(5): 839-861.
- Farahat, S. M., Rabie, A. M. and Farag, A. A. 1990. Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains. *Food Chemistry*. 36(3): 169-180.
- Flammer, J., Mozaffarieh, M. and Bebie, H. 2012. Lipids. *Basic Sciences in Ophthalmology*, 209-215.
- Frossard, J. L., Hadengue, A. and Pastor, C. M. 2001. New serum markers for the detection of severe acute pancreatitis in humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 164(1): 162-170.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by tranesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng*. 92: 405-416.
- Gao, K., Chu, W., Sun, J. and Mao, X. 2020. Identification of an alkaline lipase capable of better enrichment of EPA than DHA due to fatty acids selectivity and regioselectivity. *Food Chemistry*. 330: 1-9.
- Gao, J., Ou, X., Xu, P., Zong, M. and Lou, W. 2018. Cloning, overexpression, and characterization of a novel organic Solvent-tolerant lipase from *Paenibacillus pasadenensis* CS0611. *Chinese Journal of Catalysis*. 39: 937-945.
- Garpen, J. V. and Knothe, G. 2010. *Biodiesel Handbook*. 2nd edition. AOCS Press.
- Gerits, L. R., Pareyt, B., Decamps, K. and Delcour, J. A. 2014. Lipases and their functionality in the production of wheat-based Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(5): 978-989.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ghanem, A. 2007. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure enriched compounds. *Tetrahedron*. 63(8): 1721-1754.
- Ghori, M. I., Iqbal, M. J. and Hameed, A. 2011. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(1): 22-29.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. and Davidson, S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Science Progress*. 79(9): 119-157.
- Gohara, D. W. and Cera, E. D. 2016. Molecular Mechanisms of Enzyme Activation by Monovalent Cations. *Journal of Biological Chemistry*. 291(40): 20840-20848
- Gummadi, S. N. and Kumar, D. S. 2006. Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: A statistical approach. *Biochemical Engineering Journal*. 30(2): 130-137.
- Gummadi, S. N. and Kumar, D. S. 2006. Pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis* isolated from Apple. *Research Journal of Microbiology*. 1(2): 152-159.
- Gummadi, S. N. and Kumar, S. 2008. Effects of temperature and salts on growth of halotolerant *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. *American Journal of Food Technology*. 3(6): 354-360.
- Gururaj, P., Ramalingam, S., Nandhini Devi, G. and Gautam, P. 2016. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(3): 647-657.
- Hagler, A. N., Ribeiro, J. R., Pinotti, T., Brandão, L. R., Pimenta, R. S., Lins, U., Lee, C. F., Hsieh, C. W., Lachance, M. A. and Rosa, C. A. 2013. *Wickerhamiella Slavikovae* sp. nov. and *Wickerhamiella goesii* sp. nov., two yeast species Isolated from natural substrates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 3099-3103.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Haque, Z.M., Absar, N. and Jalil, A.M. 2005. Effects of Physical and Chemical Treatments on the Enzymatic Activities of Rice Bran Lipases. *Pak. J. Sci.* 48(6): 402-406.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. 2006. Industrial application of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology.* 39: 235-251.
- Hafez, R. M., Tahany M. A., Abdel-Rahman, Abed, N. N., Mostafa, E. E. and Atef, A. 2020. Purification and characterization of the virulent factor lipase extracted from *Candida catenulate*. *Plant Archives.* 20(2): 7069-7079.
- Hausmann, S. and Jaeger, K. E. 2010. Lipolytic enzymes from bacteria. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* 1099-1126.
- Helisto, P. and Korpela, T. 1998. Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkonate esters method. *Enzyme and Microbial Technology.* 23: 113-117.
- Hernández-Rodríguez, B., Córdova, J., Bárzana, E. and Favela-Torres, E. 2009. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 61(3-4): 136-142.
- Hidalgo, F. J. and Zamora, R. 2016. Triacylglycerols: Structures and properties. *Encyclopedia of Food and Health.* 351-356.
- Horchani, H., Aissa, I., Ouertani, S., Zarai, Z., Gargouri, Y. and Sayari, A. 2012. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 76: 125-132.
- Hou, C. T. 1994. pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 13: 242-248.
- Hou, C. T. and Shimada, Y. 2009. Lipases. *Encyclopedia of Microbiology.* 385-392.
- Hua, T. C., Liu, B. L. and Zhang, H. 2010. Protective agents and additives for freeze-drying of pharmaceutical products. *Freeze-Drying of Pharmaceutical and Food Products.* 170-186.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hwang, H. T., Qi, F., Yuan, C., Zhao, X., Ramkrishna, D., Liu, D. and Varma, A. 2013. Lipase-Catalyzed Process for Biodiesel Production: Protein Engineering and Lipase Production. *Biotechnology and Bioengineering*. 111(4): 639-653.
- Jackson, R. S. 2017. *Wine tasting: A professional handbook*. 3rd edition. Academic Press.
- Jaeger, K. and Reetz, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16(9): 396-403.
- Jagtap, S. C. and Chopade, B. A. 2015. Purification and characterization of lipase from *Acinetobacter haemolyticus* TA 106 isolated from human skin. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 31(1): 7-13.
- Jarjes, Z. A., Samian, M. R. and Ghani, S. A. 2012. Bio-electrode in mechanistic study of lipoxygenase with fatty acids from cooking palm oil. *The Open Electrochemistry Journal*. 4(1): 13-19.
- Jennings, W., Mittlefehldt, E. and Stremple, P. P. 1997. In *Analytical Gas Chromatography*. Academic Press.
- Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-Lopes, C., Gallardo-Gomez, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A. and Simal-Gandara, J. 2020. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods*. 9(8): 1-31.
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Lee, C. F. and Ji, J. 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15(8): 4080-4106.
- Joseph, B. and Ramteke, W.P. 2013. Extracellular solvent stable cold-active lipase from psychrotrophic *Bacillus sphaericus* MTCC 7526: partial purification and characterization. *Ann. Microbiol.* 63: 363-370.
- Joseph, B., Ramteke, P. W. and Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*. 26(5): 457-470.
- Joseph, B., Upadhyaya, S. and Ramteke, P. 2011. Production of cold-active bacterial lipases through semisolid state fermentation using oil cakes. *Enzyme Research*, 2011. 1-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kakugawa, K., shobayashi, M., suzuki, O. and miyakawa, T. 2002. Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66(5): 978-985.
- Kamiya, N and Gotto, M. 1998. Preparation of surfactant coated lipases utilizing the molecular imprinting technique. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85: 237-239.
- Karabulut, I., Durmaz, G. and Hayaloglu, A. A. 2009. Fatty acid selectivity of lipases during acidolysis reaction between oleic acid and monoacid triacylglycerols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(21): 10466-10470.
- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L. I. and Fujiwara N. 2006. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Putrid Mineral Cutting Oil as Component of Metalworking Fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102(2): 82-89.
- Katiyar, M. and Ali, A. 2013. Effect of metal ions on the hydrolytic and transesterification activities of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Oleo Science*. 62(11): 919-924.
- Khan, A. M. and Fatima, N. 2016. Biodiesel synthesis via metal oxides and metal chlorides catalysis from marine alga *Melanothamnus afaqhusainii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 24: 388-393.
- Kim, H.K., Park, S.Y., Lee, J.K. and Oh, T.K. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotech. Biochem*. 62(1): 66-71.
- Konkit, M. and Kim, W. 2016. Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. *Journal of Dairy Science*. 99(7): 4999-5007.
- Kiritsakit, A. and Markakis, P. 1987. Olive oil. *Department of food Science and Human Nutrition*. 48824.
- Kirsh, D. 1935. Lipase production by *Penicillium Oxalicum* and *Aspergillus flavus*.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร Botanical Gazette. 97(2): 321-333 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kovacic, F., Babic, N., Krauss, U. and Jaeger, K. E. 2019. Classification of lipolytic enzymes from bacteria. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*. 255-289.
- Ktata, A., Krayem, N., Aloulou, A., Bezzine, S., Sayari, A., Chamkha, M. and Karray, A. 2019. Purification, biochemical and molecular study of lipase producing from a newly thermoalkaliphilic *Aeribacillus pallidus* for oily wastewater treatment. *Journal of Biochemistry*. 167: 89-99.
- Kuipers, R. S., Luxwolda, M. F., Offringa, P. J., Rudi Boersma, E., Dijck-Brouwer, D. A. J. and Muskiet, F. A. J. 2012. Fetal intrauterine whole body linoleic, arachidonic and docosahexaenoic acid contents and accretion rates. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 86(1-2): 13-20.
- Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S.S. and Arora, P.A. 2016. Lipase catalysis in organic Solvents: Advantages and applications. *Biological Procedures Online*. 18(2): 1-11.
- Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S. and Kumar, R. 2020. A broad temperature active lipase purified from a psychrotrophic bacterium of Sikkim Himalaya with potential application in detergent formulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8: 1-16.
- Kumar, S. S. and Gupta, R. 2008. An extracellular lipase from *Trichosporon Asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry*. 43(10): 1054-1060.
- Kumar, N. and Spivey, J. J. 2017. Direct conversion of syngas to chemicals using heterogeneous catalysts. *Encyclopedia of Sustainable Technologies*. 605-610.
- Kumar, P.P., Jansi, R.S., Kumar, P.S., Christhudas, I.V.S.N., Raj, J.P., Vijayakumar, A., Agastian, P. and Ignacimuthu, S. 2017. Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. *Loyola Lipase-1*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12: 241-247.
- Kumar, S. and Gummadi, S. N. 2009. Osmotic adaptation in halotolerant yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: Role of Osmolytes and Cation

- Kumar, S. and Gummadi, S. N. 2011. Metabolism of glucose and xylose as single and mixed feed in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: Production of industrially important metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(5): 1405-1415.
- Kumar, S., Lal, P. and Gummadi, S. N. 2008. Growth of halotolerant food spoiling yeast *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 under the influence of pH and salt. *Current Microbiology*. 57(6): 598-602.
- Kumdam, H. B., Murthy, S. N. and Gummadi, S. N. 2012. A statistical approach to optimize xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. *Food and Nutrition Sciences*. 3(8): 1027-1036.
- Lecointe, C., Dubreucq, E. and Galzy, P. 1996. Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnology Letters*. 18(8): 869-874.
- Lee, Y. Y., Tang, T. K and Lai, O. M. 2012. Health benefits, enzymatic production, and application of medium and long-chain triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review. *Journal of Food Science*. 77(8): 137-144.
- Lei, X., Deng, B., Ruan, C., Deng, L. and Zeng, K. 2022. Phenylethanol as a quorum sensing molecule to promote biofilm formation of the antagonistic yeast *Debaryomyces nepalensis* for the control of black spot rot on jujube. *Postharvest Biology and Technology*. 185, 111788.
- Leszczynski, M. K. S. J. 2014. Reference module in chemistry, Molecular Sciences and chemical engineering. Elsevier.
- Liu, D., Ma, L., Shi, Y., Wang, A., and Liu, C. 2019. Molecular diagnosis and source tracing of an infection of *Aureobasidium pullulans*. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 13(12): 1174-1179.
- Li, Q. and Yan, Y., 2010. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. *Applied Energy*. 87: 3148-3154.
- Li, Z., Li, C., Cheng, P. and Yu, G. 2022. *Rhodotorula mucilaginosa*-alternative sources of natural carotenoids, lipids, and enzymes for industrial use. *Heliyon*.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร (11) วนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lopes, M., Gomes, N., Gonçalves, C., Coelho, M. A. Z., Mota, M. and Belo, I. 2007. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. Letters in Applied Microbiology. 46(2). 255-260.
- Lowry, O.H., Rosebrongh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.
- Luna, C., Luna, D., Calero, J., Bautista, F. M., Romero, A. A., Posadillo, A. and Verdugo-Escamilla, C. 2016. Biochemical catalytic production of biodiesel. Handbook of Biofuels Production. 165-199.
- Ma, J., Zhang, Z., Wang, B., Kong, X., Wang, Y., Cao, S. and Feng, Y. 2006. Overexpression and characterization of a lipase from bacillus subtilis. Protein Expression and Purification. 45(1): 22-29.
- Mack, J. H., Schuler, D., Butt, R. H. and Dibble, R. W. 2016. Experimental investigation of butanol isomer combustion in homogeneous charge compression ignition (HCCI) engines. Applied Energy. 165: 612-626.
- Mattson, F. H., Volpenhein, R. A. and Benjamin, L. 1970. Inhibition of Lipolysis by Normal Alcohols. The journal of biological chemistry. 245(20): 5335-5340.
- McDonald, P., Edwards, R. A., D., G. J. F., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. and Wilkinson, R. G. 2022. Animal nutrition. 7th edition. Pearson.
- Meghwanshi, G. K. and Vashishtha, A. 2018. Biotechnology of fungal lipases. Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspectives. 383-411.
- Mehta, A., Guleria, S., Sharma, R. and Gupta, R. 2021. The lipases and their applications with emphasis on food industry. Microbial Biotechnology in Food and Health. 143-164.
- Michela Salvatore, M. and Salvatore, F. 2015. Understanding complexometric titrations of metal cations with aminopolycarboxylic acids (EDTA and analogs) within the frame of the notion of reactions between groups of chemical species. World Journal of Chemical Education. 3(1): 5-21.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Moftah, O. A., Grbavčić, S., Žuža, M., Luković, N., Bezbradica, D., and Knežević-Jugović, Z. 2011. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(2): 348-364.
- Mohammadi, Z., Shalavi, S. and Jafarzadeh, H. 2013. Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics. *European Journal of Dentistry*. 7(S01): S135-S142.
- Nagodawithana, T. and Reed, G. 1993. *Enzymes in Food Processing*. 3rd edition. Academic Press.
- Nolasco, H., Moyano-López, F. and Vega-Villasante, F. 2010. Partial characterization of pyloric-duodenal lipase of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 37(1): 43-52.
- Orešič, M. 2009. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 19(11): 816-824.
- Özdemir, F. I., Tülek, A., and Erdogan, D. 2021. Identification and heterologous production of a lipase from *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T and tailoring its N-terminal by a His-tag epitope. *Protein J*. 40: 436-447.
- Paitaid, P., Buatong, J., Phongpaichit, S. and H-kittikun, A. 2021. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase Produced by *Aspergillus oryzae* ST11 as a Potential Catalyst for an Organic Synthesis. *Trends in Sciences*. 18(21): 45.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 29: 119-131.
- Pantelides, I.S., Christou, O., Tsolakidou, M.D., Tsaltas, D. and Ioannou, N. 2015. Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black Aspergilli on grapes. *Biological Control*. 88: 46-53.
- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B. J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*. 14: 397-402.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 14: 397-402 ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Patel, U., Chauhan, K. and Gupte, S. 2018. Synthesis, characterization and application of lipase-conjugated citric acid-coated magnetic nanoparticles for ester synthesis using waste frying oil. *3 Biotech.* 8(4).
- Patricia, M., Devers, D.O., Warren, M. and Brown, N.D. 2020. Fatty acid profiling. *Textbook of Natural Medicine.* 5: 127-133.
- Plaunt, A. J., de Lourdes Betancourt-Mendiola, M. and Smith, B. D. 2017. Biomolecule recognition using transition metal ions and hydrogen bonding. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II.* 575-591.
- Prim, N., Sánchez, M., Ruiz, C., Javier Pastor, F. I. and Diaz, P. 2003. Use of methylumbelliferyl derivative substrates for lipase activity characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 22(5-6): 339-346.
- Priyanka, P., Kinsella, G., Henahan, G. T. and Ryan, B. J. 2019. Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. *Protein Expression and Purification.* 153: 121-130.
- Rahim, M. Z. A., Lee, P. M. and Lee, K. H. 2008. Butyl acetate synthesis using immobilized lipase in calcium alginate beads. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences.* 12(3): 575-585.
- Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema, M., Ricardo, M. C. J., Cordova, J. and Patrick, F. 2015. Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques.* 5(2): 1-9.
- Ranjan, R., Yadav, M. K., Suneja, G. and Sharma, R. 2018. Discovery of a diverse set of esterases from hot spring microbial mat and sea sediment metagenomes. *International Journal of Biological Macromolecules.* 119: 572-581.
- Ratnayake, W. M. N. and Galli, C. 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 55(1-3): 8-43.
- Ray, A. 2012. Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology.* 2: 33-37.
- Reetz, M.T. 2002. Lipases as Practical Biocatalysts. *Current Opinion in Chemical*

เอกสารนี้เป็นเอกสาร Biology 6: 145-150. ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Devi, P.J., Kumar, V.H.T. and Kekuda, T.R.P. 2012. Ascorbic acid, Total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*. 1(2): 303-310.
- Rosell, C. M. and Ray, R. C. 2016. *Microbial enzyme technology in food applications*. CRC Press.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G. and Locatelli, S. 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*. 98: 648-653.
- Saima, Lavekar, A. G., Kumar, S., Rastogi, S. K. and Sinha, A. K. 2019. Biocatalysis for C–S bond formation: Porcine pancreatic lipase (PPL) catalysed thiolysis/hydrothiolation reactions in sole water. *Synthetic Communications*. 49(16): 2029-2043.
- Sami, A. J., Jabba, B., Ahmad, N., Nazir, M. T. and Shakoori, A. R. 2015. In silico Analysis of Structure-function Relationship of a Neutral Lipase from *Tribolium castaneum*. *Proceedings of Pakistan Congress of Zoology*. 15: 1-16.
- Sangeetha, R., Arulpandi, I. and Geetha, A. 2011. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. *Research Journal of Microbiology*. 6: 1-24.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V. and Sumana, C. 2017. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*. 34(1): 5-28.
- Schmid, R. D. and Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 37(12): 1608-1633.
- Schwingshackl, L. and Hoffmann, G. 2012. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: Synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses. *Nutrients*. 4(12): 1989-2007.
- Sharath, A. K., Haque, N. and Prabhu, N. P. 2020. Spontaneous lid closure and substrate-induced lid opening dynamics of human pancreatic lipase-related protein 2: A computational study. *Journal of Molecular Structure*. 1217:

เอกสารนี้เป็นเอกสาร 128365.ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipase. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.
- Sharma, S. and Kanwar, S. S. 2014. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, 2014. 1-15.
- Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H. I. and Kato, Y. 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in Castor Oil Hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20(5): 304-307.
- Sindhu, R., Shiburaj, S., Sabu, A., Fernandes, P., Singhal, R., Mathew, G. M., Nair, I. C., Jayachandran, K., Vidya, J., Vandenberghe, L. P., Deniz, I., Madhavan, A., Binod, P., Sukumaran, R. K., Kumar, S. S., Anusree, M., Nagavekar, N., Soumya, M., Jayakumar, A., ... Pandey, A. 2021. Enzyme technology in food processing: Recent developments and future prospects. *Innovative Food Processing Technologies*. 191-215.
- Singh, A. K. and Mukhopadhyay, M. 2011. Overview of fungal lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(2): 486-520.
- Singh, P. and Kumar, S. 2019. Microbial enzyme in food biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology*. 19-28.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6. 174-180
- Singh, S. P., Thumar, J. T., Gohel, S. D., Kikani, B., Shukla, R., Sharma, A. and Dangar, K. 2013. Actinomycetes from marine habitats and their enzymatic potential. *Marine Enzymes for Biocatalysis*. 191-214.
- Sivaramakrishnan, R. and Incharoensakdi, A. 2016. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. for methyl ester production from algal oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 121(5): 517-522.
- Sri Kaja, B., Lumor, S., Besong, S., Taylor, B. and Ozbay, G. 2018. Investigating enzyme activity of immobilized candida rugosa lipase. *Journal of Food Quality*, 2018.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Srivastava, N., Singh, P. 2015. Degradation of toxic pollutants from pulp & paper mill effluent. *Discovery* 40, 221-227.
- Sugihara, A., Scnoo, T., Enoki, A., Shimada, Y., Nagao, T. and Tominaga, Y. 1995. Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 277-81.
- Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. 1991. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. *The Journal of Biochemistry*. 109(2): 211-216.
- Sun, J., Chen, Y., Sheng, J. and Sun, M. 2015. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase on Macroporous Resin Using Different Methods: Characterization of the Biocatalysts in Hydrolysis Reaction. *BioMed Research International*.
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M. and Frać, M. 2021. Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. *Agriculture*. 11(6): 540.
- Tahoun, M. K., E-Kady, I. and Wahba, A. 1985. Production of lipases from microorganisms. *Microbiology Letters*. 28: 133-9.
- Takahashi, S., Ueda, M., Atomi, H., Beer, H. D., Borncheuer, U. T., Schmid. R. D. and Tanka, A. 1998. Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*. 86: 164-168.
- Thakur, S. 2012. Lipases, its sources, properties and applications: A Review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*. 3(7): 1-29.
- Tian, J., Deng, H., Huang, M., Liu, R., Yi, Y. and Dong, X. 2019. Electrospun nanofibers for food and Food Packaging Technology. *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*. 455-516.
- Thirunavukarasu, K., Purushothaman, S., Sridevi, J., Aarthy, M., Gowthaman, M. K., Nakajima-Kambe, T. and Kamini, N. R. 2016. Degradation of poly (butylene succinate) and poly (butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 110: 99-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Unni, K. N., Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., and Benjamin, S. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* strain BUP2, a novel bacterium inhabiting the rumen of Malabari goat, produces an efficient lipase. *Biologia*. 71: 378-387.
- Utama, Q. D., Sitanggang, A. B., Adawiyah, D. R. and Hariyadi, P. 2019. Lipase-catalyzed interesterification for the synthesis of medium-long-medium (MLM) structured lipids. *Food Technology and Biotechnology*. 57(3): 305-318.
- 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(5): 1362-1376.
- Valenzuela, R. and Valenzuela, A. 2013. Overview about lipid structure. *Lipid Metabolism*.
- Verma, S., Meghwanshi, G. K. and Kumar, R. 2021. Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*. 182: 23-36.
- Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. and Erdmann, H. 1992. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(8): 631-639.
- Walt, J. P. and Liebenberg, N. V. 1973. The yeast genus *Wickerhamiella* gen. nov. (Ascomycetes). *Antonie Leeuwenhoek*. 39: 121-1288.
- Wang, H., Zhong, S., Ma, H., Zhang, J and Qi, W. 2012. Screening and characterization of a novel alkaline lipase from *Acinetobacter calcoaceticus* 1-7 isolated from bohai bay in china for detergent formulation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 148-156.
- Weber, N., Weitkamp, P. and Mukherjee, K. D. 2001. Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in vacuo using lipases from *Rizomucor miehei*, *Candida antarctica* and *Carica papaya*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(11): 5210-5216.
- Wills, E. D. 1960. The relation of metals and -SH groups to the activity of pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 40: 481-490.
- Wurzel, K. A. 2005. Glycerol. In *Encyclopedia of toxicology*. 2nd ed. Academic Press.

เอกสารนี้ Wynn, S. 2011. Lipids, fatty acids. *Comprehensive Biotechnology* 1: 41-52. ยখনด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Xie, C., Wu, B., Qin, S. and He, B. 2015. A lipase with broad solvent stability from *Burkholderia cepacia* RQ3: Isolation, characteristics and application for chiral resolution of 1-Phenylethanol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39(1): 59-66.
- Yan, Q., Duan, X., Liu, Y., Jiang, Z. and Yang, S. 2016. Expression and characterization of a novel 1,3-regioselective cold-adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis. *Biotechnology for Biofuels*. 9(1).
- Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H. and Yan, Y. 2016. A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 126: 76-89.
- Yang, W., Xu, L., Zhang, H. and Yan, Y. 2015. Characterizing lipr from *Pseudomonas* sp. R0-14 and applying in enrichment of polyunsaturated fatty acids from algal oil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(11): 1880-1893.
- Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W. and Wang, T. 2021. A valuable product of microbial cell factories: Microbial lipase. *Frontiers in Microbiology*. 12: 1-16.
- Yeong, S. K., Idris, Z. and Hassan, H. A. 2012. Palm oleochemicals in non-food applications. *Palm Oil*. 587-624.
- Zhao, Y., Ren, Y., Wang, X., Xiao, P., Tian, E., Wang, X. and Li, J. 2016. An initial study of EDTA complex based draw solutes in forward osmosis process. *Desalination*. 378: 28-36.
- Zinjarde, S. S. 2014. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry*. 152: 1-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.1 อาหาร YM medium (Pantelides และคณะ, 2015)

Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทใส่ขวดรูปชมพู่แล้วปิดฝาด้วยจุกสำลี โดยมีกระดาษหุ้มสำลีอีกที เพื่อป้องกันไอน้ำไปทำให้สำลีเปียก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.2 อาหาร Tributyrin plate agar (Bataiche และคณะ, 2014)

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Tributyrin	10.0	มิลลิลิตรต่อลิตร
Agar	20.0	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทใส่ขวดรูปชมพู่แล้วปิดฝาด้วยจุกสำลี โดยมีกระดาษหุ้มสำลีอีกที เพื่อป้องกันไอน้ำไปทำให้สำลีเปียก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.3 อาหาร Ali medium (Ali และคณะ, 2010)

Yeast Extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	5.0	กรัมต่อลิตร
Olive oil	10.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทใส่ขวดรูปชมพู่แล้วปิดฝาด้วยจุกสำลี โดยมีกระดาษหุ้มสำลีอีกที เพื่อป้องกันไอน้ำไปทำให้สำลีเปียก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.4 อาหาร Bussamara medium (Bussamara และคณะ, 2010)

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	2.0	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄	0.1	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัมต่อลิตร
Olive oil	10.0	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทใส่ขวดรูปชมพู่แล้วปิดฝาด้วยจุกสำลี โดยมีกระดาษหุ้มสำลีอีกที เพื่อป้องกันไอน้ำไปทำให้สำลีเปียก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ข.1 สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 4.8

สารละลาย ก : สารละลายของกรดซิตริก ($M_w = 192.1$ กรัม/โมล) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
(ทำการละลาย $C_6H_8O_7$ 19.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของโซเดียมซิเตรต ($M_w = 258.1$ กรัม/โมล) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
(ทำการละลาย $C_6H_5Na_3O_7$ 25.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ทำการเตรียมสารละลาย ก X มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข Y มิลลิลิตร ปรับปริมาณให้ได้
100 มิลลิลิตร (Gomori, 1955)

ตาราง ข.1 การเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citrate buffer) ที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช	สารละลาย ก (มิลลิลิตร)	สารละลาย ข (มิลลิลิตร)
3	46.5	3.5
3.2	43.7	6.3
3.4	40.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.6	25.0	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0
5.4	16.0	34.0
5.6	13.7	36.3
5.8	11.8	38.2
6.0	9.5	41.5
6.2	7.2	42.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ที่มา : Gomori, 1955

ข.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ($M_w = 156.0$ กรัม/โมล)

ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ทำการละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของไดโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ($M_w = 178.0$ กรัม/โมล)

ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ทำการละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ทำการเตรียมสารละลาย ก X มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข Y มิลลิลิตร ปรับปริมาณให้ได้ 200 มิลลิลิตร (Gomori, 1955)

ตาราง ข.2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) ที่พีเอชต่าง

พีเอช	สารละลาย ก (มิลลิลิตร)	สารละลาย ข (มิลลิลิตร)
6.0	87.8	12.3
6.1	85.0	15.0
6.2	81.5	18.5
6.3	77.5	22.5
6.4	73.5	26.5
6.5	68.5	31.5
6.6	62.5	37.5
6.7	56.5	43.5
6.8	51.0	49.0
6.9	45.0	55.0
7.0	39.0	61.0
7.1	33.0	67.0
7.2	23.0	72.0
7.3	23.0	77.0
7.4	19.0	81.0
7.5	16.0	84.0
7.6	13.0	87.0

ที่มา : Gomori, 1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (Alkali copper)

นำสารละลาย ก ผสมกับ สารละลาย ข (เตรียมเมื่อต้องการใช้) โดยใช้ปริมาตร

สารละลาย ก	50	มิลลิลิตร
สารละลาย ข	1	มิลลิลิตร

โดยการเตรียมสารละลาย ก และ สารละลาย ข เตรียมได้ดังนี้

สารละลาย ก

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20.0 กรัม

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 1000 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH , Mw = 4.0 กรัม/โมล) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Mw = 106.0 กรัม/โมล) ปริมาณ 20.0 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 5.0 กรัม

โซเดียมโพแตสเซียมทาร์ทเรตเตตระไฮเดรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 10.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำโซเดียมโพแตสเซียมทาร์ทเรตเตตระไฮเดรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Mw = 282.2 กรัม/โมล) 10.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Mw = 249.7 กรัม/โมล) 5.0 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์ทเรต (Lowry และคณะ, 1951)

ข.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH , Mw = 4.0 กรัม/โมล) ที่ชั่งได้มาค่อย ๆ ละลายในน้ำกลั่น ปริมาณหนึ่งก่อน จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร (อารี, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 การเตรียม Phenolphthalein ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร

Phenolphthalein	1.0	กรัม
เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นำ Phenolphthalein 1.0 กรัม มาละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อละลายแล้วให้นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร (ณัฐวุฒิ, 2561)

ข.6 สารละลาย Folin-Clocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

นำสารละลาย Folin-Clocalteu มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมเมื่อต้องการใช้) (อารี, 2559)

ข.7 สารละลายมาตรฐานโปรตีนความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Bovine serum albumin (BSA)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่งน้ำหนัก Bovine serum albumin (BSA) 0.1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้มีความเข้มข้นของโปรตีน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (อารี, 2559)

ข.8 สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

EDTA disodium dihydrate	18.6	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	80	มิลลิลิตร
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)		

นำ EDTA disodium dihydrate หรือ disodium EDTA \cdot 2H₂O (C₁₀H₁₄N₂O₂ \cdot 2Na \cdot 2H₂O, Mw = 372.2 กรัม/โมล) 18.6 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วยเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นิศรา, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.9 สารละลายแบเรียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

แบเรียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1.2	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	100	มิลลิลิตร

นำแบเรียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mw = 244.3 กรัม/โมล) 1.2 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ข.10 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)	0.6	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	100	มิลลิลิตร

นำแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2 , Mw = 111.0 กรัม/โมล) 0.6 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ข.11 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

แมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1.0	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	100	มิลลิลิตร

นำแมกนีเซียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mw = 95.2 กรัม/โมล) 1.0 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ข.12 สารละลายแมงกานีสคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

แมงกานีสคลอไรด์ โมโนไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.6	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	100	มิลลิลิตร

นำแมงกานีสคลอไรด์ โมโนไฮเดรต ($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Mw = 143.4 กรัม/โมล) 1.6 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.13 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.4	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	100	มิลลิลิตร

นำโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, Mw = 74.6 กรัม/โมล) 0.4 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ข.14 สารละลายซิงค์ (II) คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl ₂)	0.7	กรัม
น้ำปราศจากไอออน (Deionize water)	100	มิลลิลิตร

นำซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl₂, Mw = 136.3 กรัม/โมล) 0.7 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 80 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้ละลาย แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

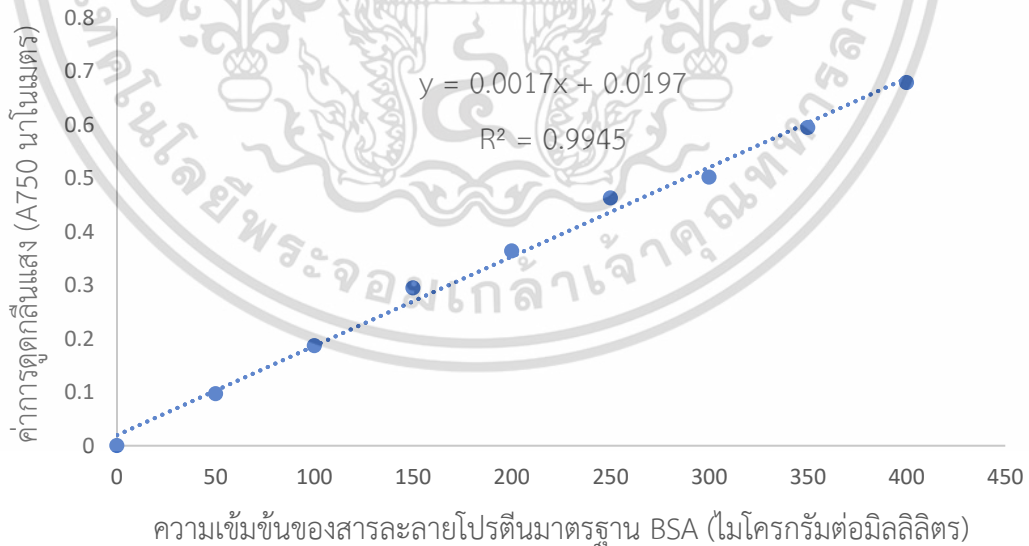
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

ค.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.7) ปิเปตสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.3) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) และบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.6) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ ค.1



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2 การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้สูตรดังนี้

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{ปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ NaOH (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ NaOH (โมลาร์)} \times 1000 \times \text{Dilution factor}}{30}$$

30

1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ (Kumar และคณะ, 2017)

30 หมายถึง เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรท คือ 30 นาที

ค.3 การคำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของชุดตัวอย่าง (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} \times 100}{\text{กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของชุดควบคุม (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}$$

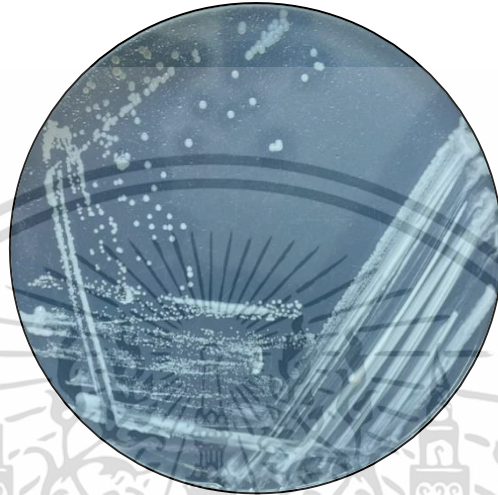
ค.4 การคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

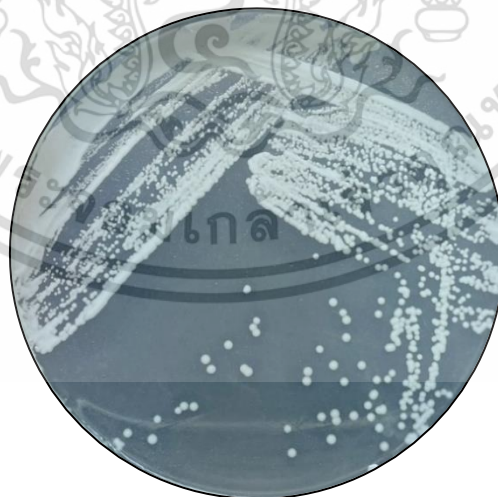
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

บริเวณไทรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส *Wickerhamiella* sp. BN1 และ
D. nepalensis BS1 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส



รูปที่ ง.1 บริเวณไทรอบโคโลนีของยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Tributyrin plate agar (Bataiche และคณะ, 2014) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



รูปที่ ง.2 บริเวณไทรอบโคโลนีของยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Tributyrin plate agar (Bataiche และคณะ, 2014) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ผู้ที่ฝ่าฝืนมีเหตุที่เปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.1 ค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ และบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้บนอาหารแข็งที่มี Tributyrin (Bataiche และคณะ, 2014) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ (มิลลิเมตร)			เส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์และบริเวณใสรอบโคโลนีของเซลล์ (มิลลิเมตร)			บริเวณใสรอบโคโลนีของเซลล์ (มิลลิเมตร)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
	1	ND	1.0	1.4	ND	1.2	3.7	ND	0.2
	ND	1.2	1.5	ND	1.4	4.5	ND	0.2	3.0
	ND	1.5	1.7	ND	1.8	3.8	ND	0.3	2.3
เฉลี่ย	ND	1.2	1.5	ND	1.5	4.0	ND	0.2	2.5
S.D.	ND	0.3	0.2	ND	0.3	0.4	ND	0.1	0.4
2	ND	0.9	1.2	ND	0.9	4.2	ND	ND	3.0
	ND	1.3	1.8	ND	1.3	3.5	ND	ND	2.3
	ND	1.0	1.4	ND	1.0	4.0	ND	ND	2.6
เฉลี่ย	ND	1.1	1.5	ND	1.1	3.9	ND	ND	2.6
S.D.	ND	0.2	0.3	ND	0.2	0.4	ND	ND	0.4
3	ND	0.6	1.1	ND	0.6	3.2	ND	ND	2.1
	ND	0.8	1.3	ND	0.8	5.0	ND	ND	3.7
	ND	0.4	1.0	ND	0.4	3.6	ND	ND	2.6
เฉลี่ย	ND	0.6	1.1	ND	0.6	3.9	ND	ND	2.8
S.D.	ND	0.2	0.2	ND	0.2	0.9	ND	ND	0.8

หมายเหตุ: ND = Not detected

ตารางที่ ง.2 ค่าของเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ และบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้บนอาหารแข็งที่มี Tributyrin

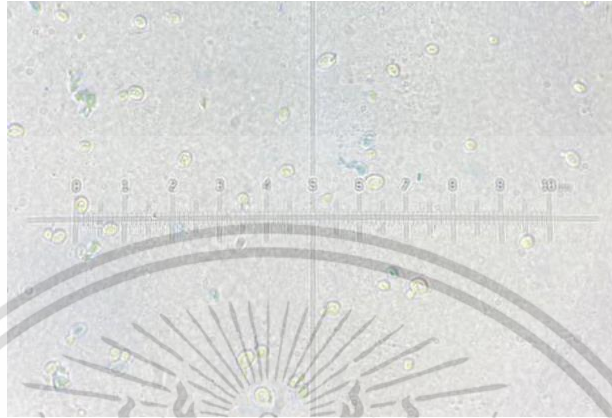
(Bataiche และคณะ, 2014) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

เพลท	เส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ (มิลลิเมตร)			เส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์และบริเวณใสรอบโคโลนีของเซลล์ (มิลลิเมตร)			บริเวณใสรอบโคโลนีของเซลล์ (มิลลิเมตร)		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
	1	ND	ND	1.2	ND	ND	1.5	ND	ND
	ND	ND	0.7	ND	ND	1.2	ND	ND	0.5
	ND	ND	0.6	ND	ND	0.8	ND	ND	0.2
เฉลี่ย	ND	ND	0.8	ND	ND	1.2	ND	ND	0.3
S.D.	ND	ND	0.3	ND	ND	0.4	ND	ND	0.2
2	ND	ND	1.1	ND	ND	1.6	ND	ND	0.5
	ND	ND	1.1	ND	ND	1.3	ND	ND	0.2
	ND	ND	1.3	ND	ND	1.8	ND	ND	0.5
เฉลี่ย	ND	ND	1.2	ND	ND	1.6	ND	ND	0.4
S.D.	ND	ND	0.1	ND	ND	0.3	ND	ND	0.2
3	ND	ND	1.3	ND	ND	1.9	ND	ND	0.6
	ND	ND	0.9	ND	ND	1.4	ND	ND	0.5
	ND	ND	0.5	ND	ND	0.8	ND	ND	0.3
เฉลี่ย	ND	ND	0.9	ND	ND	1.4	ND	ND	0.5
S.D.	ND	ND	0.4	ND	ND	0.6	ND	ND	0.2

หมายเหตุ: ND = Not detected

ภาคผนวก จ

ลักษณะของยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1



รูปที่ จ.1 เซลล์ยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) กำลังขยายรวม 1000 เท่า



รูปที่ จ.2 เซลล์ยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) กำลังขยายรวม 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ลักษณะความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

ตารางที่ ฉ.1 ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1
ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (Pantelides และคณะ, 2015) ภายใต้สภาวะเขย่า 150
รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	ลักษณะความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	
<i>D. nepalensis</i> BS1	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑.2 ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ali medium (Ali และคณะ, 2010) และลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bussamara medium (Bussamara และคณะ, 2010) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	ลักษณะความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	
<i>D. nepalensis</i> BS1	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓.3 ลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ali medium (Ali และคณะ, 2010) และลักษณะความขุ่นของเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bussamara medium (Bussamara และคณะ, 2010) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	ลักษณะความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	
<i>D. nepalensis</i> BS1	



หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ตารางที่ ข.1 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1

ความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) (ร้อยละโดยปริมาตร)	ลักษณะ
0.0	
2.5	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (iso-Butanol) (ร้อยละโดยปริมาตร)	ลักษณะ
5.0	
7.5	
10.0	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ ข.2 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) (ร้อยละโดยปริมาตร)	ลักษณะ
0.0	
2.5	
5.0	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) (ร้อยละโดยปริมาตร)	ลักษณะ
7.5	
10.0	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสม
ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella sp.* BN1

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ลักษณะ
0.0	
2.5	
5.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสม
ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella sp.* BN1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ลักษณะ
7.5	
10.0	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสม
ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ลักษณะ
0.0	
2.5	
5.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสม
ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ลักษณะ
7.5	
10.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อ
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella sp.* BN1

ชนิดของไอออนโลหะ	ลักษณะ
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂)	
ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl ₂)	
แบเรียมคลอไรด์ (BaCl ₂)	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




ตารางที่ ข.5 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อ
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *Wickerhamiella sp.* BN1 (ต่อ)

ชนิดของไอออนโลหะ	ลักษณะ
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂)	
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl ₂)	

หมายเหตุ : ฟลากลัแรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลากลัควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อ
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ชนิดของไอออนโลหะ	ลักษณะ
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂)	
ซิงค์ (II) คลอไรด์ (ZnCl ₂)	
แบเรียมคลอไรด์ (BaCl ₂)	

หมายเหตุ : ฟลาสก์แรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาสก์ควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 ลักษณะสีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 โดยทำการทดสอบชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อ
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อยีสต์ *D. nepalensis* BS1 (ต่อ)

ชนิดของไอออนโลหะ	ลักษณะ
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂)	
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl ₂)	

หมายเหตุ : ฟลาस्कแรก (ด้านซ้าย) เป็นฟลาस्कควบคุมไม่มีการเติมส่วนใส (เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ

ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมสัมพัทธ์
ของเอนไซม์ไลเปส



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ซ.1 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ ไอโซ-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	11.0	11.9	12.0	15.3	15.5	15.9	4.0	2.6	100.0
เฉลี่ย		11.6			15.6				
S.D.		0.6			0.3				
2.5	11.4	11.5	12.2	15.2	14.9	14.8	3.2	2.1	80.0
เฉลี่ย		11.7			14.9				
S.D.		0.4			0.2				
5.0	11.2	12.0	11.3	14.2	14.3	14.7	2.9	1.9	72.5
เฉลี่ย		11.5			14.4				
S.D.		0.4			0.3				
7.5	11.0	11.1	10.5	12.7	13.1	13.0	2.0	1.3	50.0
เฉลี่ย		10.9			12.9				
S.D.		0.3			0.2				
10.0	10.3	10.1	10.6	12.2	11.8	11.4	1.5	1.0	37.5
เฉลี่ย		10.3			11.8				
S.D.		0.3			0.4				

ตารางที่ ซ.2 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้
จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ ไอโซ-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ ของชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	11.3	11.6	12.3	15.5	15.7	16.1	4.1	2.7	100.0
เฉลี่ย		11.7			15.8				
S.D.		0.5			0.3				
2.5	11.6	11.7	12.5	15.4	14.9	14.7	3.1	2.1	75.6
เฉลี่ย		11.9			15.0				
S.D.		0.5			0.4				
5.0	11.0	11.9	11.2	14.4	14.5	14.	2.9	1.9	70.7
เฉลี่ย		11.4			14.3				
S.D.		0.5			0.3				
7.5	11.2	11.3	11.0	12.8	13.0	13.3	1.8	1.2	43.9
เฉลี่ย		11.2			13.0				
S.D.		0.2			0.3				
10.0	10.5	10.3	10.9	12.5	11.6	11.1	1.1	0.7	26.8
เฉลี่ย		10.6			11.7				
S.D.		0.3			0.7				

ตารางที่ ซ.3 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้
จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ ไอโซ-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	11.2	11.8	12.0	15.2	15.4	15.8	3.8	2.5	100.0
เฉลี่ย		11.7			15.5				
S.D.		0.4			0.3				
2.5	11.5	11.8	12.3	15.0	14.7	14.5	2.8	1.9	73.7
เฉลี่ย		11.9			14.7				
S.D.		0.4			0.3				
5.0	11.0	11.6	11.1	13.1	13.7	14.2	2.5	1.7	65.8
เฉลี่ย		11.2			13.7				
S.D.		0.3			0.6				
7.5	11.4	11.6	10.7	12.5	12.8	13.0	1.6	1.1	42.1
เฉลี่ย		11.2			12.8				
S.D.		0.5			0.3				
10	10.6	10.4	11.0	12.4	11.9	11.7	1.3	0.9	34.2
เฉลี่ย		10.7			12.0				
S.D.		0.3			0.4				

ตารางที่ ซ.4 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ เอ็น-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	11.2	11.4	12.1	15.7	16.3	16.7	4.6	3.1	100.0
เฉลี่ย		11.6			16.2				
S.D.		0.5			0.5				
2.5	11.0	11.1	11.7	16.7	17.6	16.4	5.6	3.7	121.7
เฉลี่ย		11.3			16.9				
S.D.		0.4			0.6				
5.0	11.5	10.8	10.4	17.8	17.7	17.3	6.7	4.5	145.7
เฉลี่ย		10.9			17.6				
S.D.		0.6			0.3				
7.5	10.7	10.2	10.6	18.0	18.2	18.3	7.7	5.1	167.4
เฉลี่ย		10.5			18.2				
S.D.		0.3			0.2				
10	10.1	10.3	10.4	18.5	18.7	18.4	8.2	5.5	178.3
เฉลี่ย		10.3			18.5				
S.D.		0.2			0.2				

ตารางที่ ๕.5 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ เอ็น-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)					ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	11.6	11.9	12.4	16.4	16.8	17.1	4.8	3.2	100.0
เฉลี่ย		12.0			16.8				
S.D.		0.4			0.4				
2.5	11.4	11.7	12.0	17.4	17.9	17.0	5.7	3.8	118.8
เฉลี่ย		11.7			17.4				
S.D.		0.3			0.5				
5.0	11.7	11.1	10.9	18.2	18.1	17.9	6.9	4.6	143.8
เฉลี่ย		11.2			18.1				
S.D.		0.4			0.2				
7.5	11.0	10.5	10.9	18.5	18.7	18.8	7.9	5.3	164.6
เฉลี่ย		10.8			18.7				
S.D.		0.3			0.2				
10	10.4	10.6	10.8	19.0	19.4	19.3	8.6	5.7	179.2
เฉลี่ย		10.6			19.2				
S.D.		0.2			0.2				

ตารางที่ ซ.6 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก
ยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ เอ็น-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	11.3	11.6	12.3	15.7	16.6	16.8	4.7	3.1	100.0
เฉลี่ย		11.7			16.4				
S.D.		0.5			0.6				
2.5	11.2	11.4	11.9	16.7	17.7	16.5	5.5	3.7	117.0
เฉลี่ย		11.5			17.0				
S.D.		0.4			0.6				
5.0	11.6	11.0	10.9	17.9	17.6	17.3	6.4	4.3	136.2
เฉลี่ย		11.2			17.6				
S.D.		0.4			0.3				
7.5	10.6	10.1	10.3	17.6	17.9	18.0	7.5	5.0	159.6
เฉลี่ย		10.3			17.8				
S.D.		0.3			0.2				
10	10.0	10.1	10.2	18.0	18.3	18.1	8.0	5.3	170.2
เฉลี่ย		10.1			18.1				
S.D.		0.1			0.2				

ตารางที่ ๗.7 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)					ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
		1	2	3	4	5			
0.0	15.7	15.3	15.6	19.1	18.8	19.0	3.5	2.3	100.0
เฉลี่ย		15.5			19.0				
S.D.		0.2			0.2				
2.5	15.0	14.8	14.5	17.6	17.8	18.2	3.1	2.1	88.6
เฉลี่ย		14.8			17.9				
S.D.		0.3			0.3				
5.0	14.6	15.2	14.0	17.0	17.1	16.8	2.4	1.6	68.6
เฉลี่ย		14.6			17.0				
S.D.		0.6			0.2				
7.5	13.4	14.6	14.1	16.3	16.0	16.1	2.1	1.4	60.0
เฉลี่ย		14.0			16.1				
S.D.		0.6			0.2				
10	13.2	13.9	13.5	15.2	14.3	14.7	1.2	0.8	34.3
เฉลี่ย		13.5			14.7				
S.D.		0.4			0.5				

ตารางที่ ๗.8 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)					ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
		1	2	3	4	5			
0.0	15.5	15.3	15.6	19.3	19.6	19.5	4.0	2.7	100.0
เฉลี่ย		15.5			19.5				
S.D.		0.2			0.2				
2.5	14.8	14.6	14.2	17.4	17.7	18.3	3.3	2.2	82.5
เฉลี่ย		14.5			17.8				
S.D.		0.3			0.5				
5.0	14.2	14.5	14.1	16.7	17.0	16.9	2.6	1.7	65.0
เฉลี่ย		14.3			16.9				
S.D.		0.2			0.2				
7.5	13.6	14.4	14.2	16.4	16.2	16.3	2.2	1.5	55.0
เฉลี่ย		14.1			16.3				
S.D.		0.4			0.1				
10	13.1	13.3	13.0	15.0	14.0	14.4	1.4	0.9	35.0
เฉลี่ย		13.1			14.5				
S.D.		0.2			0.5				

ตารางที่ ๗.9 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)					ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
		1	2	3	4	5			
0.0	15.5	15.2	15.3	19.0	18.8	18.9	3.6	2.4	100.0
เฉลี่ย		15.3			18.9				
S.D.		0.2			0.1				
2.5	14.9	14.7	14.6	17.2	17.8	17.9	2.9	1.9	80.6
เฉลี่ย		14.7			17.6				
S.D.		0.2			0.4				
5.0	14.2	14.5	14.3	16.8	16.6	17.1	2.5	1.7	69.4
เฉลี่ย		14.3			16.8				
S.D.		0.2			0.3				
7.5	13.9	14.3	14.0	16.1	15.9	16.0	1.9	1.3	52.8
เฉลี่ย		14.1			16.0				
S.D.		0.2			0.1				
10	13.0	13.7	13.4	14.8	14.0	14.6	1.1	0.7	30.6
เฉลี่ย		13.4			14.5				
S.D.		0.4			0.4				

ตารางที่ ซ.10 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)					ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
		1	2	3	4	5			
0.0	18.0	18.1	19.2	24.3	23.5	25.8	6.1	4.1	100.0
เฉลี่ย		18.4			24.5				
S.D.		0.7			1.2				
2.5	17.4	17.6	17.2	22.1	23.3	21.9	5.0	3.3	81.9
เฉลี่ย		17.4			22.4				
S.D.		0.2			0.8				
5.0	17.5	16.3	16.8	21.8	21.5	21.0	4.5	3.0	73.8
เฉลี่ย		16.9			21.4				
S.D.		0.6			0.4				
7.5	16.4	16.2	16.2	19.3	18.2	19.5	2.7	1.8	44.3
เฉลี่ย		16.3			19.0				
S.D.		0.1			0.7				
10	15.1	15.7	15.7	16.6	16.7	17.4	1.4	0.9	22.9
เฉลี่ย		15.5			16.9				
S.D.		0.3			0.4				

ตารางที่ ซ.11 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)					ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
		1	2	3	4	5			
0.0	18.1	18.3	19.0	24.2	23.8	25.6	6.0	4.0	100.0
เฉลี่ย		18.5			24.5				
S.D.		0.5			0.9				
2.5	17.2	17.3	17.0	22.7	23.0	22.0	5.4	3.6	90.0
เฉลี่ย		17.2			22.6				
S.D.		0.2			0.5				
5.0	17.4	16.2	16.5	21.7	21.4	21.0	4.7	3.1	78.3
เฉลี่ย		16.7			21.4				
S.D.		0.6			0.4				
7.5	16.2	16.0	16.1	19.2	18.7	19.3	3.0	2.0	50.0
เฉลี่ย		16.1			19.1				
S.D.		0.1			0.3				
10	15.3	15.8	15.9	16.8	16.9	17.2	1.3	0.9	21.7
เฉลี่ย		15.7			17.0				
S.D.		0.3			0.2				

ตารางที่ ซ.12 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 ครั้งที่ 3

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)						ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
		1	2	3	4	5	6			
0.0	18.2	18.3	18.9	24.5	24.0	25.5	6.2	4.1	100.0	
เฉลี่ย		18.5			24.7					
S.D.		0.4			0.8					
2.5	17.5	17.7	17.3	22.9	23.4	22.5	5.5	3.7	88.7	
เฉลี่ย		17.5			23.0					
S.D.		0.2			0.5					
5.0	17.3	16.5	16.9	21.5	21.3	21.1	4.4	2.9	71.0	
เฉลี่ย		16.9			21.3					
S.D.		0.4			0.2					
7.5	16.3	16.3	16.2	19.2	18.9	19.4	2.9	1.9	46.8	
เฉลี่ย		16.3			19.2					
S.D.		0.1			0.3					
10	15.5	15.7	15.6	16.5	16.6	17.2	1.2	0.8	19.4	
เฉลี่ย		15.6			16.8					
S.D.		0.1			0.4					

ตารางที่ ข.13 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 1

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)							
ไม่เติมไอออนโลหะ	12.4	12.5	13.9	16.8	15.9	16.1	3.9	2.3	100
เฉลี่ย		12.9			16.3				
S.D.		0.8			0.5				
แคลเซียมคลอไรด์	12.3	11.9	11.8	16.1	16.6	16.2	4.3	2.9	110.3
เฉลี่ย		12.0			16.3				
S.D.		0.3			0.3				
ซิงค์ (II) คลอไรด์	11.3	11.9	12.0	15.0	15.4	15.9	3.5	2.3	89.7
เฉลี่ย		11.9			15.4				
S.D.		0.2			0.5				
แบเรียมคลอไรด์	12.8	11.7	12.1	15.3	14.4	15.7	2.9	1.9	74.4
เฉลี่ย		12.2			15.1				
S.D.		0.6			0.7				
โพแทสเซียมคลอไรด์	12.2	12.1	12.5	14.7	15.7	14.6	2.7	1.8	69.2
เฉลี่ย		12.3			15.0				
S.D.		0.2			0.6				

ตารางที่ ข.13 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ตัวอย่าง - ควบคุม		กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)						
แมกนีเซียมคลอไรด์	11.7	11.8	12.1	15.1	14.8	14.7	3.1	2.1	79.5
เฉลี่ย		11.7			14.8				
S.D.		0.4			0.2				
แมงกานีสคลอไรด์	12.1	12.7	12.4	15.3	15.1	14.6	2.6	1.7	66.7
เฉลี่ย		12.4			15.0				
S.D.		0.3			0.4				

ตารางที่ ข.14 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 2

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)							
ไม่เติมไอออนโลหะ	13.1	13.0	12.6	16.9	17.3	16.7	4.1	2.7	100.0
เฉลี่ย		12.9			17.0				
S.D.		0.3			0.3				
แคลเซียมคลอไรด์	11.9	12.0	11.7	16.3	16.5	16.4	4.5	3.0	109.8
เฉลี่ย		11.9			16.4				
S.D.		0.2			0.1				
ซิงค์ (II) คลอไรด์	11.5	11.7	11.9	15.2	15.5	15.8	3.8	2.5	92.7
เฉลี่ย		11.7			15.5				
S.D.		0.2			0.3				
แบเรียมคลอไรด์	11.9	12.1	12.2	14.8	15.4	15.4	3.1	2.1	75.6
เฉลี่ย		12.1			15.2				
S.D.		0.2			0.3				
โพแทสเซียมคลอไรด์	12.3	12.7	12.4	15.4	15.2	15.6	2.9	1.9	70.7
เฉลี่ย		12.5			15.4				
S.D.		0.2			0.2				

ตารางที่ ซ.14 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ตัวอย่าง - ควบคุม				กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)							
แมกนีเซียมคลอไรด์	11.9	11.3	11.7	15.0	15.3	14.9	3.5	2.3	85.4
เฉลี่ย		11.6			15.1				
S.D.		0.3			0.2				
แมงกานีสคลอไรด์	12.5	12.3	12.2	14.9	15.5	15.2	2.9	1.9	70.7
เฉลี่ย		12.3			15.2				
S.D.		0.2			0.3				

ตารางที่ ข.15 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 3

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง			
ไม่เติมไอออนโลหะ	13.1	12.7	13.5	16.5	16.9	16.6	3.6	2.4	100.0
เฉลี่ย		13.1			16.7				
S.D.		0.4			0.2				
แคลเซียมคลอไรด์	12.4	12.1	11.9	16.5	16.1	16.4	4.2	2.8	116.7
เฉลี่ย		12.1			16.3				
S.D.		0.3			0.2				
ซิงค์ (II) คลอไรด์	12.3	12.5	12.0	15.4	15.5	15.8	3.3	2.2	91.7
เฉลี่ย		12.3			15.6				
S.D.		0.3			0.2				
แบเรียมคลอไรด์	12.7	12.5	12.6	15.4	15.0	15.5	2.7	1.8	75.0
เฉลี่ย		12.6			15.3				
S.D.		0.1			0.3				
โพแทสเซียมคลอไรด์	12.4	12.7	12.9	14.9	15.3	15.5	2.5	1.7	69.4
เฉลี่ย		12.7			15.2				
S.D.		0.3			0.3				

ตารางที่ ข.15 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

Wickerhamiella sp. BN1 ครั้งที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง	ตัวอย่าง			
แมกนีเซียมคลอไรด์	11.8	12.1	11.9	14.5	14.9	15.0	2.9	1.9	80.6
เฉลี่ย		11.9			14.8				
S.D.		0.2			0.3				
แมงกานีสคลอไรด์	12.6	12.9	12.5	15.4	14.9	15.0	2.4	1.6	66.7
เฉลี่ย		12.7			15.1				
S.D.		0.2			0.3				

ตารางที่ ข.16 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

D. nepalensis BS1 ครั้งที่ 1

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)							
ไม่เติมไอออนโลหะ	17.2	17.3	16.9	22.5	22.4	21.8	5.1	3.4	100
	เฉลี่ย	17.1			22.2				
	S.D.	0.2			0.4				
แคลเซียมคลอไรด์	16.7	16.1	16.2	23.4	22.5	22.7	6.6	4.4	129.4
	เฉลี่ย	16.3			22.9				
	S.D.	0.3			0.5				
ซิงค์ (II) คลอไรด์	16.5	16.6	16.7	22.1	22.8	21.3	5.5	3.7	107.8
	เฉลี่ย	16.6			22.1				
	S.D.	0.4			0.8				
แบเรียมคลอไรด์	16.4	15.5	15.9	17.9	17.6	18.1	2.0	1.3	39.2
	เฉลี่ย	15.9			17.9				
	S.D.	0.5			0.3				
โพแทสเซียมคลอไรด์	16.9	16.2	16.5	19.0	19.1	18.6	2.4	1.6	47.1
	เฉลี่ย	16.5			18.9				
	S.D.	0.4			0.3				

ตารางที่ ข.16 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

D. nepalensis BS1 ครั้งที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของ Metal ion	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ตัวอย่าง - ควบคุม		กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)			
แมกนีเซียมคลอไรด์	15.3	15.6	15.4	20.1	19.5	19.2	4.2	2.8	82.4
เฉลี่ย		15.4			19.6				
S.D.		0.4			0.5				
แมงกานีสคลอไรด์	16.7	16.7	16.9	19.4	20.0	19.8	2.9	1.9	56.9
เฉลี่ย		16.8			19.7				
S.D.		0.1			0.3				

ตารางที่ ข.17 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

D. nepalensis BS1 ครั้งที่ 2

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ตัวอย่าง - ควบคุม		กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)						
ไม่เติมไอออนโลหะ	17.2	17.4	17.0	22.3	22.1	21.9	4.9	3.3	100.0
เฉลี่ย		17.2				22.1			
S.D.		0.2				0.2			
แคลเซียมคลอไรด์	16.5	16.0	16.1	22.9	22.6	22.7	6.5	4.3	132.7
เฉลี่ย		16.2				22.7			
S.D.		0.3				0.2			
ซิงค์ (II) คลอไรด์	16.9	16.1	16.6	21.7	21.8	21.9	5.3	3.5	108.2
เฉลี่ย		16.5				21.8			
S.D.		0.4				0.1			
แบเรียมคลอไรด์	16.4	15.8	16.0	17.8	17.6	18.0	1.7	1.1	34.7
เฉลี่ย		16.1				17.8			
S.D.		0.3				0.2			
โพแทสเซียมคลอไรด์	17.0	16.9	16.7	19.3	19.1	19.0	2.2	1.5	44.9
เฉลี่ย		16.9				19.1			
S.D.		0.2				0.2			

ตารางที่ ข.17 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

D. nepalensis BS1 ครั้งที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของ Metal ion	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)							
แมกนีเซียมคลอไรด์	15.4	15.6	15.2	19.1	19.5	19.6	4.0	2.7	81.6
เฉลี่ย		15.4			19.4				
S.D.		0.2			0.3				
แมงกานีสคลอไรด์	16.5	16.9	17.0	19.5	19.7	19.2	2.7	1.8	55.1
เฉลี่ย		16.8			19.5				
S.D.		0.3			0.3				

ตารางที่ ข.18 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

D. nepalensis BS1 ครั้งที่ 3

ชนิดของไอออนโลหะ	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ				ตัวอย่าง - ควบคุม	กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)							
ไม่เติมไอออนโลหะ	16.8	17.4	17.3	22.1	22.6	22.4	5.2	3.5	100.0
	เฉลี่ย	17.2			22.4				
	S.D.	0.3			0.3				
แคลเซียมคลอไรด์	16.0	16.4	16.5	23.3	22.8	22.9	6.7	4.5	128.8
	เฉลี่ย	16.3			23.0				
	S.D.	0.3			0.3				
ซิงค์ (II) คลอไรด์	16.5	16.9	16.6	22.6	22.1	22.4	5.7	3.8	109.6
	เฉลี่ย	16.7			22.4				
	S.D.	0.2			0.3				
แบเรียมคลอไรด์	15.9	16.1	15.7	18.3	17.8	18.2	2.2	1.5	42.3
	เฉลี่ย	15.9			18.1				
	S.D.	0.2			0.3				
โพแทสเซียมคลอไรด์	16.4	16.3	16.7	19.3	18.9	19.1	2.6	1.7	50.0
	เฉลี่ย	16.5			19.1				
	S.D.	0.2			0.2				

ตารางที่ ข.18 ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการหาชนิดของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากยีสต์

D. nepalensis BS1 ครั้งที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของ Metal ion	ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ของ		ตัวอย่าง - ควบคุม		กิจกรรมเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	ชุดควบคุม (มิลลิลิตร)		ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)						
แมกนีเซียมคลอไรด์	15.5	15.0	15.8	20.2	19.8	19.6	4.5	3.0	86.5
เฉลี่ย		15.4			19.9				
S.D.		0.4			0.3				
แมงกานีสคลอไรด์	16.6	16.9	17.0	19.8	19.7	20.2	3.1	2.1	59.6
เฉลี่ย		16.8			19.9				
S.D.		0.2			0.4				

ภาคผนวก ฅ

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

ตารางที่ ฅ.1 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Wickerhamiella* sp. BN1 ในอาหาร Ali medium (Ali และคณะ, 2010) และ *D. nepalensis* BS1 ในอาหาร Bussamara medium (Bussamara และคณะ, 2010) เพาะเลี้ยงที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์	เวลาที่ใช้ในการบ่ม	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	48	0.778±0.139	0.739±0.015	1.052±0.188
	72	4.956±0.336	2.619±0.031	1.892±0.128
<i>D. nepalensis</i> BS1	48	1.044±0.139	1.925±0.026	0.543±0.072
	72	5.622±0.102	4.398±0.012	1.278±0.023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ญ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ญ.1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของ ไอโซ-บิวทานอล ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และเอ็น-บิวทานอลที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	Factor	5.649	4	1.412	100.881	0.000
	Error	0.140	10	0.014		
	Total	5.789	14			
<i>D. nepalensis</i> BS1	Factor	11.403	4	2.851	152.714	0.000
	Error	0.187	10	0.019		
	Total	11.589	14			

ตารางที่ ญ.2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของ EDTA ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	Factor	4.864	4	1.126	67.556	0.000
	Error	0.180	10	0.018		
	Total	5.044	14			
<i>D. nepalensis</i> BS1	Factor	19.949	4	4.987	356.238	0.000
	Error	0.140	10	0.014		
	Total	20.089	14			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓ การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เมื่อทำการศึกษานิตของไอออนโลหะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 และ *D. nepalensis* BS1

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
<i>Wickerhamiella</i> sp. BN1	Factor	2.866	6	0.478	21.804	0.000
	Error	0.307	14	0.022		
	Total	3.172	20			
<i>D. nepalensis</i> BS1	Factor	24.545	6	4.091	25.742	0.000
	Error	2.225	14	0.159		
	Total	26.770	20			

ตารางที่ ๔ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 เมื่อทดสอบกับไอโซ-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ความเข้มข้นของไอโซ-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)		
ชุดการทดลอง	N	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0.0	3	2.6000±0.100 ^a
2.5	3	2.0333±0.115 ^b
5.0	3	1.8333±0.115 ^b
7.5	3	1.2000±0.100 ^c
10.0	3	0.8667±0.153 ^c

ตารางที่ ๕ การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 เมื่อทดสอบกับเอ็น-บิวทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ความเข้มข้นของเอ็น-บิวทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)		
ชุดการทดลอง	N	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0.0	3	3.1333±0.058 ^a
2.5	3	3.7333±0.058 ^b
5.0	3	4.4667±0.153 ^c
7.5	3	5.1333±0.153 ^d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุย. 5.5000±0.200^d ระเบียบข้อดำเนินการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ญ.6 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 เมื่อทดสอบกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)		
ชุดการทดลอง	N	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0.0	3	2.4667±0.208 ^a
2.5	3	2.0667±0.152 ^{ab}
5.0	3	1.6667±0.058 ^{bc}
7.5	3	1.4000±0.100 ^c
10.0	3	0.8000±0.100 ^d

ตารางที่ ญ.7 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 เมื่อทดสอบกับ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)		
ชุดการทดลอง	N	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
0.0	3	4.0667±0.058 ^a
2.5	3	3.5333±0.208 ^b
5.0	3	3.0000±0.100 ^b
7.5	3	1.9000±0.100 ^c
10.0	3	0.8667±0.058 ^d

ตารางที่ ญ.8 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Wickerhamiella* sp. BN1 เมื่อทดสอบกับไอออนโลหะชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ชนิดของไอออนโลหะ		
ชุดการทดลอง	N	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ไม่เติมไอออนโลหะ	3	2.2667±0.153 ^{bc}
แคลเซียมคลอไรด์	3	2.9000±0.100 ^d
ซิงค์ (II) คลอไรด์	3	2.3333±0.153 ^c
แบเรียมคลอไรด์	3	1.9333±0.153 ^{abc}
โพแทสเซียมคลอไรด์	3	1.8000±0.100 ^{ab}
แมกนีเซียมคลอไรด์	3	2.1000±0.200 ^{abc}
แมงกานีสคลอไรด์	3	1.7333±0.153 ^a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๙.9 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *D. nepalensis* BS1 เมื่อทดสอบกับไอออนโลหะชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ชนิดของไอออนโลหะ		
ชุดการทดลอง	N	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิเมตร)
ไม่เติมไอออนโลหะ	3	3.3333±0.058 ^d
แคลเซียมคลอไรด์	3	4.4000±0.100 ^e
ซิงค์ (II) คลอไรด์	3	2.8333±0.153 ^d
แบเรียมคลอไรด์	3	1.3000±0.200 ^a
โพแทสเซียมคลอไรด์	3	1.6000±0.100 ^{ab}
แมกนีเซียมคลอไรด์	3	3.6667±0.153 ^c
แมงกานีสคลอไรด์	3	1.9333±0.153 ^b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

