

การตรึงเอ็นไซม์ไลเปสเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสุญุดำ



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.๒๕๕๐

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Immobilization of lipase for biodiesel production from Jatropha oil

Miss Kanuengnata Jumpa

Miss Piyanart Lorprayoon

**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Special Project
for the Degree of Bachelor of Science**

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การตรึงเอ็นไซม์ไลเปสเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบูดำ
นักศึกษา คณิงฉัฐ จุมปา รหัส 47050112
 ปิยนาด ลอประยูร รหัส 47050142
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.มารีสา จาคูพรพิพัฒน์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร
 บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ ผศ.ดร.มารีสา จาคูพรพิพัฒน์	
กรรมการ ดร.จิตภา ทิน้อย	

..... นวพล วรรณ

(รศ. ดร. นวพลวรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ		
นักศึกษา	กนิงณัฐ จุมปลา	รหัสนักศึกษา	47050112
	ปิยนาด ลอประยูร	รหัสนักศึกษา	47050142
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.มาริสตา	จาตุพรพิพัฒน์	

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป (ในซีไลท์) และเอนไซม์อิสระของ *Candida rugosa* ต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันสบู่ดำและเมทานอล โดยทดสอบอิทธิพลของปริมาณน้ำสุทธิและความเข้มข้นเมทานอล ในสภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูป 1.25 กรัม อุณหภูมิปฏิกิริยาที่ 40 องศาเซลเซียส และความเร็วการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์ และสัดส่วนโมลเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำ 4:1 ให้ผลผลิตกรดไขมันอิสระชนิดกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกสูงสุดถึงร้อยละ 5.32 และ 4.88 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปให้ผลผลิตกรดไขมันอิสระมากกว่า และมีประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้ง

Special Project Title Immobilization of lipase for biodiesel production from *Jatropha* oil

Name Kanuengnata Jumpa 47050112

Piyanart Lorprayoon 47050142

Program Biotechnology

Department Applied of Biology

Academic Year 2007

Special Project Advisor Assisst. Prof. Aree Rittiboon

Assisst. Prof. Dr. Marisa Jatupornpipat

Abstract

The transesterification of *Jatropha* oil by enzymatic reaction of lipase from *Candida rugosa* was studied for the optimization of immobilized form (with celite) and free enzyme methods. The influences of total water amount and methanol content were testified by using 1.25 g of immobilized lipase, 40°C of reaction temperature and 200 rpm of shaking speed for 24 hrs. The result showed that 5% enzyme (w/v) and the ratio of methanol and *Jatropha* of 4 to 1 gave the maximum free fatty acids at 5.32% and 4.88% of oleic acid and palmitic acid, respectively. In comparison to the free fatty acid production with lipase that was immobilized with celite and free one method, the former presented the higher amount and performance of reuse than the latter.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยการให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยจาก ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ และ ผศ.ดร.มารีสา จาคุพรพิพัฒน์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ ขอขอบพระคุณบริษัทไทย-เบฟเวอร์เรท จำกัด มหาชน ที่กรุณาอนุเคราะห์ซีโกลด์ซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างมาก ขอบพระคุณบิดามารดา ขอบคุณ แนนหยก เบนซ์ สอง ที่คอยเกื้อหนุนซึ่งกันและกันตลอดมา

ผู้จัดทำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ	2
1.5.1 การเตรียมรูปเอนไซม์ไลเปส	2
1.5.2 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระ	2
1.5.3 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ของเอนไซม์ตรีงรูป	2
1.5.4 การเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรีงรูป	3
1.5.5 การนำเอนไซม์ตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 เชื้อเพลิงดีเซลทางเลือกใหม่	4
2.1.1 สมบัติทางเชื้อเพลิงของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์	4
2.2 สบู่ดำ	5
2.2.1 การสกัดน้ำมันสบู่ดำ	6
2.2.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ	6
2.2.3 การใช้ประโยชน์จากน้ำมันสบู่ดำ	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.3 กลีเซอรอล	7
2.4 การนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล	8
2.4.1 การผสมน้ำมันพืชกับน้ำมันดีเซล	8
2.4.2 การทำเป็นของผสมไมโครอิมัลชัน	8
2.4.3 การสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อน	8
2.4.4 ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน	8
2.5 ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน	9
2.5.1 การใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	9
2.5.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	10
2.5.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา	10
2.6 ตัวแปรที่มีผลต่อปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน	11
2.6.1 ความชื้นและกรดไขมันอิสระ	11
2.6.2 ชนิดและร้อยละของตัวเร่งปฏิกิริยา	11
2.6.3 อัตราส่วนโดยมวลระหว่างกับน้ำมัน	12
2.6.4 อุณหภูมิ	12
2.6.5 เวลา	12
2.7 เอนไซม์ไลเปส	12
2.7.1 แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	13
2.7.2 ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรต	13
2.7.3 ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid specificity)	14
2.7.4 อีแนนทิโอซีเลกทิวิตี (Enantioselectivity)	15
2.7.5 ลักษณะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์	16
2.7.6 กลไกการเร่งปฏิกิริยาตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์	19
2.7.7 การทำงานของไลเปส	20
2.8 ซีไลต์	20
2.9 เอนไซม์ครึ่งรูป	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.9.1 ข้อควรคำนึงในการผลิตเอนไซม์ตรีงรูป	21
2.9.2 ผลกระทบของเอนไซม์ตรีงรูป	21
2.9.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรีงรูป	21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	23
3.1 สารเคมี	23
3.2 การตรีงรูปเอนไซม์ไลเปส	23
3.3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระ	24
3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ของเอนไซม์ตรีงรูป	24
3.4.2 การหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทราน- เอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป	24
3.4.3 การเปรียบเทียบปริมาณไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรีงรูป	24
3.4.4 การนำเอนไซม์ตรีงกลับมาใช้	25
3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
4.1 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูป	26
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของ เอนไซม์ตรีงรูป	26
4.2.1 การหาปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทราน- เอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป	27
4.2.2 การหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป	28
4.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรีงรูป	29
4.4 การนำเอนไซม์ตรีงกลับมาใช้	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก ก	38
ภาคผนวก ข	43
ภาคผนวก ค	44



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติและค่าความร้อนของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล	5
2.2 เปรียบเทียบกรดอะมิโนหน่วยเร่งใน α/β -hydrolases 11 ชนิด	18
4.1 ผลของปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเกิดปริมาณกรดไขมันอิสระ เมื่อใช้ปริมาณน้ำร้อยละ 0, 2.5, 5 และ 7.5 ของน้ำหนักเอนไซม์ และมีอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำเท่ากับ 3:1	28
4.2 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำในการเกิดปริมาณกรดไขมัน อิสระของน้ำมันสบู่ดำ เมื่อใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำ 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 โมล โดยมีปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์	29
4.3 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป	30
4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นก่อนการหมักครั้งที่ 2	31
4.5 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการหมัก ทั้ง 2 ครั้ง	32
ตารางภาคผนวกที่	
1 แสดงการผสมกันระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ให้ได้ค่ากรดต่างตามที่ต้องการ	38
2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของเอนไซม์ก่อนการตรึงรูป (เอนไซม์อิสระ)	39
3 ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตสารละลาย มาตรฐานปฏิกิริยาโพแทสเซียมไฮโครเจนพาทาเลต	41
4 ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตกรดไขมันอิสระ	41

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิบัติการทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน	9
2.2 ปฏิบัติการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	14
2.3 ปฏิบัติการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ โดยไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	14
4.1 ลักษณะของเอนไซม์ตรีงูรูปบนซีไลด์	27
รูปภาคผนวกที่	
1 กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราโนโตรฟินอลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1000, 1500, 2000, และ 2500 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันราคาน้ำมันในตลาดโลกได้ปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อันเป็นผลมาจากทรัพยากรด้านปิโตรเลียมที่กำลังเหลือน้อยลงทุกที ทำให้มีการมองหาพลังงานแหล่งใหม่ขึ้นทดแทนซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ น้ำมันหรือผลผลิตที่ได้มาจากทรัพยากรทางการเกษตร ซึ่งมีหลายอย่างด้วยกันที่สามารถนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซล ในที่นี้จะมุ่งศึกษาสบู่ดำ (physic nuts) ซึ่งเป็นต้นไม้ที่เกษตรกรของไทยได้นำผลมาทำเป็นน้ำมันแทนน้ำมันดีเซล สามารถใช้ได้กับเครื่องจักรทางการเกษตรที่มีกำลังรอบต่ำ เป็นการประหยัดต้นทุนการผลิต แต่สบู่ดำเป็นน้ำมันที่มีความหนืดสูง จึงมีปัญหาหากจะนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลทั่วไป

ในโครงการนี้จึงหาทางลดความหนืดของสบู่ดำโดยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันหรือแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) ซึ่งเกิดจากไขมันหรือน้ำมันทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไบโอดีเซลหรือแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) และกลีเซอรอล (Fukada, 2001)

ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันได้แก่ กรด เบส และเอนไซม์ เมื่อใช้เร่งเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่ากรดแต่จะทำให้กรดไขมันอิสระถูกเปลี่ยนเป็นสบู่โดยปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (saponification) ทำให้ได้เอสเทอร์น้อยลงและมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล (Ma, 1999 และ Noureddini, 2005) ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยา แต่มีจุดด้อยคือมีราคาแพงกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส จึงมีแนวคิดที่จะหันมาใช้การตรึงรูปเอนไซม์

ดังนั้นในโครงการพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยการห่อหุ้มด้วยซิลิเกตเนื่องจากหาได้ทั่วไป พร้อมมีการศึกษาว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยการดูดซับโดยซิลิเกตจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด (Noureddini และคณะ, 2005) รวมถึงศึกษาการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปใช้เร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ

1.2 วัตถุประสงค์

1. การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยซิลิเกตกับเอนไซม์อิสระ
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ในปฏิกิริยาทราน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอสเทอร์ฟิเคชัน

3. เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำโดยการใช้เอนไซม์ตรีงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ

1. เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างเอนไซม์ตรีงรูปที่ได้จากการตรีงรูปด้วยซีไลต์และเอนไซม์อิสระ

2. หาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรีงรูปในน้ำมันสบู่ดำ โดยทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ คือ

- 1) อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำ
- 2) ปริมาณน้ำที่ใช้ในปฏิกิริยา
- 3) วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น
- 4) ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ตรีงรูป โดยคำนึงถึงการนำเอนไซม์ตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน
2. เพื่อนำสภาวะที่เหมาะสมนี้ไปผลิตไบโอดีเซลต่อไปได้
3. สามารถนำไปวิจัยในขั้นสูงต่อไปได้

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินการ

1.5.1 การตรีงรูปเอนไซม์ไลเปส (Shuo - Fen Chang และคณะ, 2007)

ชั่งเอนไซม์ไลเปสหนัก 0.1- 0.5 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมล 3 มิลลิลิตร ผสมกับซีไลต์ 1 กรัม เติมอะซีโตน 15 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน โดยนำไปเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองและล้างด้วยเฮกเซน 2 ครั้ง เพื่อเอาเอนไซม์อิสระออก ทำให้แห้งโดยนำไปไว้ในเครื่องดูดความชื้น (desicator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์จากการทำแห้ง (Shweta และ Munishwar, 2007) จากนั้นนำเอนไซม์ตรีงรูปที่แห้งแล้วเก็บในตู้เย็น

1.5.2 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระ

นำเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (Hoshiro และคณะ, 1992)

1.5.3 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป

ในการทดลองใช้น้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอลในอัตราส่วน 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำร้อยละ 0, 2.5, 5 และ 7.5 โดยน้ำหนัก เอนไซม์ตรีงรูป 1.25 กรัม บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยก่อนการเริ่มทำปฏิกิริยานั้น ต้องนำน้ำมันสบู่ดำ น้ำ และเอนไซม์ตรีงรูปใน อัตราส่วนต่าง ๆ มาเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อน จึงเติมเมทานอลในอัตราส่วนต่าง ๆ ลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยา เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำ น้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ หาปริมาณกรดไขมันอิสระ

1.5.4 การเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระและ เอนไซม์ตรีงรูป

ชั่งเอนไซม์ตรีงรูป 1.25 กรัม และชั่งเอนไซม์อิสระในปริมาณที่ให้กิจกรรมเท่ากับกับ จำนวนเอนไซม์ตรีงรูป นำสถานะที่เหมาะสม ในการทดลองที่ 3.4.1 และ 3.4.2 มาใช้ โดยบ่มที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระ ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด

1.5.5 การนำเอนไซม์ตรีงรูปกลับมาใช้ใหม่

เมื่อแยกเอนไซม์ตรีงรูปออกจากน้ำมันแล้ว นำเอนไซม์มาล้างเอาน้ำมันออกและทำ ให้แห้งในเครื่องดูดความชื้น นำเอนไซม์ที่แห้งแล้วมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ นำเอนไซม์ที่แห้ง มาชั่งน้ำมันสบู่ดำในสถานะที่เหมาะสม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เพื่อแยกน้ำมันและเอนไซม์ออกจากกัน นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้แห้งและ วิเคราะห์หาค่ากิจกรรมที่เหลือ

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เชื้อเพลิงดีเซลทางเลือกใหม่

เชื้อเพลิงดีเซลทางเลือกใหม่ต้องได้รับการยอมรับทางเทคนิค ได้รับการยอมรับทางด้านสิ่งแวดล้อม สามารถแข่งขันได้ในทางเศรษฐศาสตร์ จากความต้องการข้างต้น ไตรกลีเซอไรด์ (น้ำมันพืช/ไขมันสัตว์) และอนุพันธ์น่าจะใช้แทนน้ำมันดีเซลได้ น้ำมันพืชได้จากหลายแหล่งและสร้างใหม่ได้ มีซัลเฟอร์ในปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งต่างจากน้ำมันดีเซลที่ได้จากไฮโดรคาร์บอน ลดการทำลายสิ่งแวดล้อมจากกรดซัลฟูริก ยิ่งไปกว่านั้นน้ำมันพืชใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศในการสังเคราะห์ ซึ่งลดการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศ การใช้ไขมันพืช เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดทานตะวัน น้ำมันถั่วลิสง และน้ำมันมะกอกเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลมีมานานเกือบ 9 ทศวรรษแล้ว เนื่องมาจากการลดลงอย่างรวดเร็วของปริมาณน้ำมันดิบ

การใช้ไขมันพืชแทนน้ำมันดีเซลได้รับการส่งเสริมให้ใช้ในหลายประเทศ เนื่องจากสภาพภูมิอากาศและดินที่ต่างกัน ทำให้ในแต่ละประเทศกำลังมองหาน้ำมันพืชที่แตกต่างกันในการใช้เป็นเชื้อเพลิงน้ำมันดีเซล เช่น น้ำมันถั่วเหลืองในอเมริกา น้ำมันเรพซิด เมล็ดทานตะวันในยุโรป น้ำมันปาล์มในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และน้ำมันมะพร้าวในฟิลิปปินส์ ซึ่งกำลังพิจารณาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำมันดีเซล (อนวัช, 2547)

2.1.1 สมบัติทางเชื้อเพลิงของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์

สมบัติในทางเชื้อเพลิงของน้ำมันพืชและไขมันสัตว์สรุปสาระสำคัญได้ดังนี้ (กัญญา และสุกัญญา, 2544)

1. ค่าความร้อนของน้ำมันพืชมีค่าประมาณร้อยละ 8.3 – 58 ของน้ำมันดีเซล
2. น้ำมันพืชและไขมันสัตว์มีค่าความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซลเป็น 10 เท่าตัว ถ้าอุณหภูมิค่าลงน้ำมันพืชจะยังมีความหนืดสูงขึ้นจนเกิดเป็นไข เช่น น้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว การที่น้ำมันพืชมีความหนืดสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้หัวฉีดน้ำมันเป็นฝอยได้ยาก และเป็นอุปสรรคต่อการป้อนน้ำมันเชื้อเพลิงเข้าสู่ห้องเผาและการสันดาปจะไม่สมบูรณ์
3. น้ำมันพืชมีคุณสมบัติที่ระเหยตัวได้น้อยมาก ทำให้เมื่อป้อนเข้าสู่ห้องเผาจะจุดระเบิดได้ช้ากว่า และมีกาคาร์บอนหลงเหลือหลังการเผาไหม้มากกว่าน้ำมันดีเซลซึ่งตารางที่ 2.1 แสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติและค่าความร้อนของน้ำมันพืชต่าง ๆ เปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล

ตารางที่ 2.1 สมบัติและค่าความร้อนของน้ำมันพืชต่าง ๆ เปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล

น้ำมัน	ความถ่วงจำเพาะ(ที่21°C) (กรัมต่อมิลลิเมตร)	ความหนืด (ที่ 21°C) เซนติพอยส์	ค่าความร้อน (กิโลจูลต่อกิโลกรัม)
ถั่วเหลือง	0.918	57.5	39,350
ทานตะวัน	0.918	60.0	39,490
มะพร้าว	0.915	51.9	37,540
ถั่วลิสง	0.914	67.1	39,470
ปาล์ม	0.989	88.6	39,550
เมล็ดในปาล์ม	0.904	66.3	39,720
เมล็ดสบู่ดำ	0.915	36.9 (ที่ 38°C)	39,000
เมล็ดคยงพารา	0.924	27.05 (ที่ 40°C)	39,000
น้ำมันดีเซล	0.845	3.8	46,800

ที่มา : (พิสมัย, 2544)

2.2 สบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง น้ำมันที่ได้จากเมล็ดสบู่ดำสามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลที่เกษตรกรใช้อยู่ได้โดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค ใช้ปลูกเป็นแนวรั้วเพื่อป้องกันสัตว์เลื้อยเข้าทำลายผลผลิต เนื่องจากมีสารพิษ Hydrocyanic มีกลิ่นเหม็นเขียว สบู่ดำจึงเป็นพืชที่นำให้ความสนใจเป็นอย่างยิ่งในสภาวะที่ราคาน้ำมันดีเซลมีราคาสูงอย่างในปัจจุบัน สบู่ดำมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha Curcas* อยู่ในวงศ์ไม้ยางพารา ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ ชาวโปรตุเกสนำเข้ามาปลูกในประเทศไทย ในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา เพื่อนำมาบีบน้ำมันสำหรับทำสบู่ ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น ภาคเหนือเรียกว่ามะหุ้งฮั่ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามะเขากหรือสีหลอด ภาคใต้เรียกว่ามาเคาะ (นิรนาม, 2549)

ต้นสบู่ดำเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง ความสูง 2 - 7 เมตร อายุยืน ไม่น้อยกว่า 20 ปี ลำต้นและยอดคล้ายมะม่วง แต่ไม่มีขน ลำต้นเกลี้ยงเกลากำมือหักได้ง่ายเพราะเนื้อไม้ไม่มีแก่น ใบหยักคล้ายใบมะม่วงแต่หยักตื้นกว่า มี 4 หยัก ดอกสบู่ดำเป็นช่อกระจุกที่ข้อส่วนปลายยอด ขนาดเล็กสี

เหลือง มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ผลมีลักษณะเป็นพู่ โดยส่วนมากจะมี 3 พู่ สีเขียวอ่อน เวลาสุกแก่จัดจะมีสีเือกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลืออายุของผลสบู่ดำตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ ประมาณ 60 – 90 วัน

2.2.1 การสกัดน้ำมันสบู่ดำ

วิธีการสกัดแยกน้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำที่นิยมทำกันมากคือใช้วิธีการบีบอัด (pressing) จะได้น้ำมันประมาณร้อยละ 25 - 30 มีน้ำมันตกค้างในกากร้อยละ 10 - 15 อาจใช้เครื่องอัดแบบไฮดรอลิก (hydraulic press) หรือเครื่องอัดแบบสกรู (screw press) จะได้น้ำมันประมาณการแยกด้วยวิธีนี้จะได้น้ำมันปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับแรงอัดที่ใช้ ถ้าใช้แรงอัดสูงจะได้น้ำมันมาก แต่น้ำมันที่ได้จะมีคุณภาพลดลง เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นจะไปเร่งปฏิกิริยาเคมีบางอย่าง ทำให้น้ำมันเสื่อมเสียได้เร็วขึ้น ดังนั้นการบีบอัดอาจทำได้ 2 แบบ คือ การบีบอัดโดยใช้แรงดันสูง เพื่อให้ได้น้ำมันมาก หรือการบีบอัดแบบ pre-press โดยบีบด้วยแรงดันต่ำก่อน แล้วจึงสกัดน้ำมันที่เหลือในกากต่อด้วยสารทำละลาย (สุปรียา, 2547)

2.2.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันสบู่ดำ

น้ำมันสบู่ดำจะมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวปนเหลือง ใส และยังคงใสที่อุณหภูมิค่า มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ องค์ประกอบของกรดไขมัน (รพีพันธุ์ และคณะ, 2525) ดังนี้

ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, %as oleic acid)	4.80
ค่าสaponนิฟิเคชัน (Saponification value)	197.13
ค่าไอโอดีน (Iodine value, Wijs)	97.08
ดัชนีหักเห (Refractive index) ที่ 25 องศาเซลเซียส	1.4670
ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity) ที่ 25 องศาเซลเซียส	0.9136
ความหนืด (Viscosity) ที่ 25 องศาเซลเซียส (Gardner) (cp)	45.68

องค์ประกอบของกรดไขมัน

Palmitic acid (C 16:0)	16.17
Stearic acid (C18:0)	5.11
Total saturated fatty acid	21.28
Oleic acid (C18:1)	44.88
Linoleic acid (C18:2)	33.83
Total unsaturated fatty acid	78.71

2.2.3 การใช้ประโยชน์จากน้ำมันสบู่ดำ

ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 ประเทศไทยเกิดการขาดแคลนน้ำมันก๊าดสำหรับจุดตะเกียง เกษตรกรทางภาคอีสานได้นำเมล็ดสบู่ดำมาตำให้ละเอียด ใช้จุดให้แสงสว่างแทนเทียนไข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้เป็นอย่างดี หรือมีการนำเอากากของเมล็ดที่สกัดน้ำมันออกแล้วมาใส่ในกระบอกไม้ไผ่ ใช้น้ำมันเทียนไขได้ดีเช่นกัน น้ำมันสบู่ดำจะมีลักษณะใสที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งจะทำให้สามารถใช้น้ำมันได้ในประเทศที่มีอากาศหนาวเย็น และมีค่าไอโอดีนสูงจึงมีคุณสมบัติเป็นน้ำมันกึ่งแข็ง คือมีคุณสมบัติในการแข็งเร็ว จึงอาจมีการนำไปใช้เป็นน้ำมันทาสี น้ำมันชักเงาได้ และในหลายประเทศมีการนำไปใช้ทำสบู่ แต่กระบวนการผลิตยังใช้ต้นทุนสูงเนื่องจากต้องมีการผสมกับไขมันจากสัตว์ น้ำมันอื่น ๆ และกลิ่นหอม เพื่อให้ได้สบู่ที่มีคุณภาพสูง รวมทั้งการนำไปใช้ทำเทียนไข

น้ำมันสบู่ดำมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลแต่จะมีความหนืดมากกว่า รพีพันธุ์ และคณะ, 2525 ได้มีการนำน้ำมันสบู่ดำมาทดลองกับเครื่องยนต์ โดยนำน้ำมันสบู่ดำมาทดลองเดินเครื่องยนต์คู่โบดำดีเซล 1 สูบ แบบลูกสูบนอนระบบ 4 จังหวะ ปริมาตรกระบอกสูบ 400 ซีซี 7 แรงม้า /2200 รอบต่อนาที พบว่าเครื่องยนต์เดินเป็นปกติสม่ำเสมอไม่มีการดับ การสิ้นเปลืองน้ำมันน้อยกว่าการใช้น้ำมันดีเซลเล็กน้อย และนำน้ำมันสบู่ดำทดสอบร่วมกับแก๊สหุงต้ม ทดลองเดินเครื่องกับเครื่องยนต์ดีเซล พบว่าเมื่อใช้แก๊สหุงต้มด้วยจะช่วยให้เครื่องยนต์ประหยัดน้ำมันสบู่ดำได้เฉลี่ยร้อยละ 77.1

2.3 กลิเซอรอล

กลิเซอรอลหรือกลิเซอริน มีจุดหลอมเหลว 17.8 องศาเซลเซียส และจุดเดือด 290 องศาเซลเซียส สามารถติดไฟได้ เป็นสารประเภท trihydric alcohol เนื่องจากสูตรโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซิลละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ และละลายได้บ้างในตัวทำละลายอื่น ๆ ยกเว้นสารจำพวกไฮโดรคาร์บอน กลิเซอรอลมีลักษณะใส ไม่มีสี ไม่มีพิษ หนืด ก่อนข้างคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชัน ทำให้สามารถเก็บรักษาได้โดยไม่มีกลิ่น รส สี ได้ยาวนาน กลิเซอรอลที่จะนำไปจำหน่ายต้องผ่านการทำให้เป็นกลาง ซึ่งในการผลิตดีเซลชีวภาพโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา กลิเซอรอลที่ได้สามารถทำให้เป็นกลางโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอสฟอริก หรือโซเดียมคลอไรด์ สำหรับสีของกลิเซอรอลสามารถขจัดออกได้โดยการกรองผ่านถ่าน (Ma , 1999)

กลิเซอรอลสามารถทำปฏิกิริยาเคมีและให้สารอนุพันธ์หลายชนิด จึงมักนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เมื่อถูกทำให้เย็นจะมีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลว แต่ไม่แข็งตัว กลิเซอรอลสามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ จึงมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับองค์ประกอบในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และเนื่องจากเป็นสารมีความหนืดสูงจึงมักใช้เป็น thickening agent หรือ bodying agent หรือสารเพิ่ม body สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลว และผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นเจล กลิเซอรอลจะมีรสหวานเล็กน้อย ไม่มีกลิ่นรุนแรง สามารถใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลได้ กลิเซอรอลส่วนใหญ่ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอางจะเป็นตัวทำละลาย

และเป็นสารดูดความชื้น โมโนกลีเซอไรด์ที่ได้จากกลีเซอรอลถูกใช้ให้เป็นสารอิมัลชันและสารเพิ่มความคงตัวในผลิตภัณฑ์ประเภทการนึ่ง น้ำสลัด และลูกหวาด ในผลิตภัณฑ์ยาสูบ บุหรี่ จะใช้กลีเซอรอลเพื่อรักษาความชื้นให้กับใบยาสูบและใช้เป็นส่วนผสมในไส้กรอง ในอุตสาหกรรมยาใช้กลีเซอรอลเป็นสารให้ความหวานและเป็นสารให้ความนุ่ม ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางใช้เป็นสารอิมัลชัน (เฉลิมพร, 2549)

2.4 การนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาใช้ในเครื่องยนต์ดีเซล

ในการนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ดีเซลสามารถเตรียมได้ 4 วิธี คือ (Schuchardt และคณะ, 1998)

2.4.1 การผสมน้ำมันพืชกับน้ำมันดีเซล

เป็นการนำเอาน้ำมันพืชผสมกับน้ำมันดีเซลโดยตรงหรือผสมกับตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น เอทานอล ในอัตราส่วนโดยมวลต่าง ๆ เพื่อให้ความหนืดของน้ำมันพืชลดลง สามารถผสมน้ำมันพืชได้ตั้งแต่ร้อยละ 10 ขึ้นไป ตามความเหมาะสมของน้ำมันพืชที่ใช้ แต่ถ้าผสมมากเกินไปจะมีข้อเสียคือ การกลายเป็นไอต่ำ เกิดเขม่าบนหัวฉีดของเครื่องยนต์

2.4.2 การทำเป็นของผสมไมโครอิมัลชัน

การทำไมโครอิมัลชัน เป็นการกระจายอนุภาคของเหลวที่แขวนลอยอยู่ในตัวกลางของเหลวอีกชนิดหนึ่งอย่างสมดุล ด้วยการผสมน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่สั้น เช่น เมทานอลหรือเอทานอลซึ่งของเหลวทั้งสองชนิดไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แต่จะกระจายตัวอยู่ได้ด้วยสารลดแรงตึงผิว วิธีนี้สามารถปรับปรุงลักษณะที่เป็นละอองฝอยจากหัวฉีด เนื่องจากตัวทำละลายมีจุดเดือดต่ำเมื่อเทียบกับน้ำมันพืช พบว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันพืชที่ผสมเมทานอลจะได้เชื้อเพลิงที่มีสมบัติใกล้เคียงน้ำมันดีเซล (บัวชุม, 2548)

2.4.3 การสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อน

การสลายน้ำมันพืชด้วยความร้อนเป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่นๆ มากกว่าหนึ่งสาร โดยให้ความร้อนเพียงอย่างเดียวหรือมีตัวเร่งปฏิกิริยาช่วย เพื่อให้ น้ำมันพืชที่มีโมเลกุลใหญ่แตกเป็นโมเลกุลที่เล็กลง โดยมีสารกึ่งตัวเร่งปฏิกิริยาเร่งปฏิกิริยาต่างชนิดกัน ส่วนตัวเร่งปฏิกิริยาไม่มีแก๊สออกซิเจนหรืออากาศ การเปลี่ยนแปลงจะสลับซับซ้อนและเกิดเป็นสารได้หลายชนิดพร้อมกัน

2.4.4 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

เป็นกระบวนการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันหรือไขมันสัตว์เป็นสารประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 การใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เบสที่ใช้กัน ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมเมทอกไซด์ โซเดียมเอไมด์ โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น พบว่าโซเดียมเมทอกไซด์มีประสิทธิภาพมากกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพราะข้อสมมติฐานที่ว่าน้ำเกิดขึ้นเล็กน้อยระหว่างการผสม โซเดียมไฮดรอกไซด์กับเมทานอล แต่กลับนำเสนอผลที่ตรงกันข้าม คือในระหว่างการผสมโซเดียมไฮดรอกไซด์และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีราคาถูก จะมีน้ำเกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งจะเกิดการกัดกร่อนน้อยกว่ากรด และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม

2.5.3 การใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ไฮโดรไลติกส์เอนไซม์ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ แต่ในกระบวนการทรานเอสเทอร์ฟิเคชันยังใช้เอนไซม์กันไม่แพร่หลาย ปัจจัยที่ศึกษาโดยทั่วไป เช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของเอนไซม์ ปัจจัยเหล่านี้ต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตามเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาและปริมาณผลผลิตที่ได้ยังด้อยกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส (Schuchardt และคณะ, 1998)

สังเคราะห์เอสเทอร์มีหลายกระบวนการ แต่ที่นิยมที่สุดคือการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลและก่อปัญหาต่อเครื่องยนต์น้อยที่สุด เอสเทอร์ที่ได้เรียกตามชนิดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ เช่น เมทิลเอสเทอร์ เอทิลเอสเทอร์ เป็นต้น ตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์และโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้เอสเทอร์เป็นผลิตภัณฑ์แล้ว ยังได้กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์

นอกจากนี้การใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน สามารถทำปฏิกิริยาที่ความดันสูง โดยไม่ต้องใช้ตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอลเช่นกัน

ส่วนการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเกิดทรานเอสเทอร์ฟิเคชันยังไม่เป็นที่นิยม โดยมีปัจจัยที่ศึกษากันโดยทั่วไป เช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ และชนิดของเอนไซม์ ซึ่งต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม แต่ข้อดีของการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก็คือ เป็นปฏิกิริยาที่สามารถควบคุมได้ เกิดในสภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่เหลือสารพิษในของเสียที่ได้จากปฏิกิริยา สามารถแยกกลีเซอรอลซึ่งเป็นส่วนของผลพลอยได้ ออกได้ ง่ายกว่า และถ้าเอนไซม์ตรึงรูปในการทำปฏิกิริยาก็สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันและไขมันตามธรรมชาติเป็นกระบวนการที่นิยมที่สุดในการผลิตไบโอดีเซล วัตถุประสงค์ของกระบวนการนี้ก็คือการลดความหนืดของน้ำมัน

หรือไขมันลง แม้ว่าวิธีไมโครอิมัลชันและวิธีการผสมน้ำมันด้วยตัวทำละลายสามารถลดความหนืดลงได้แต่ยังเกิดปัญหาในเรื่องประสิทธิภาพกับเครื่องยนต์และการเกิดคราบคาร์บอน ส่วนวิธีไพโรไลซิสนั้นจะผลิตก๊าซโซลีนออกมามากกว่าน้ำมันดีเซลชีวภาพ ปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันสามารถอธิบายการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้คือ ในตอนแรกไตรกลีเซอไรด์จะถูกทำให้เป็นโคกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ จากนั้นในขั้นสุดท้ายโมโนกลีเซอไรด์ก็จะถูกทำให้กลายเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน อันดับของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับสถานะของปฏิกิริยา การใช้ค่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล ก่อให้เกิดผลกระทบหลายประการ เช่น เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง แยกกลีเซอรอลและเกลือของค่าออกได้ยาก แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสทำให้แก้ปัญหาเหล่านี้ได้ การเกิดปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสโดยการใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ ในเฮกเซน พบว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นร้อยละ 77.8 จากการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในมุมมองทางเศรษฐศาสตร์ ในการผลิตไบโอดีเซลระดับอุตสาหกรรม ระบบที่ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ดีกว่าระบบที่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ (Ma และคณะ, 1999)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ก่อให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียง และไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งแตกต่างจากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซล (Mohamed และ Uwe, 2003)

2.6 ตัวแปรที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน

2.6.1 ความชื้นและกรดไขมันอิสระ

สมบัติของสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ควรมีค่ากรดต่ำกว่า 1 และสารตั้งต้นไม่ควรมีน้ำเจือปน ถ้าค่ากรดมากกว่า 1 จะต้องใช้เบสมากขึ้น เพราะต้องใช้ในการทำปฏิกิริยาและสะเทินกรดไขมันอิสระ น้ำและเบสเป็นสาเหตุทำให้เกิดสบู่ สบู่ที่เกิดขึ้นทำให้น้ำมันมีความหนืดสูงขึ้น เกิดเป็นเจลและทำให้การแยกชั้นของกลีเซอรอลยากขึ้น (ธนาทิพย์, 2547)

2.6.2 ชนิดและร้อยละของตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถใช้ได้ทั้งเบส กรด และเอนไซม์ ในการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เบสที่ใช้โดยทั่วไปคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมเมทอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมเมทอกไซด์ แต่ถ้าน้ำมันมีปริมาณกรดไขมันอิสระอยู่สูงควรใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟอนิกของสารอินทรีย์ หรือ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก

ปริมาณโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในช่วงร้อยละ 1 - 5 โดยน้ำหนัก ทำให้อัตราส่วนของน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามถ้าปริมาณโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มากกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก กลับทำให้อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเบสมากเกินไปจะทำให้เกิดอิมัลชันจนกระทั่งก่อตัวเป็นเจล และเกิดปัญหาในการแยกชั้นกลีเซอรอลออกจากเอสเทอร์ ทำให้ปริมาณเอสเทอร์ลดลง

2.6.3 อัตราส่วนโดยมวลระหว่างกับน้ำมัน

อัตราส่วนโดยโมลระหว่างเอทานอลกับน้ำมันเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด ผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเอทานอลกับน้ำมัน จากการทำมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ต้องการแอลกอฮอล์ 3 โมล และไตรกลีเซอไรด์ 1 โมล เพื่อให้ได้เอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมล กับกลีเซอรอล 1 โมล เพื่อให้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเข้าสู่สมดุลต้องใช้แอลกอฮอล์มากเกินไปเพื่อผลักดันให้เกิดปฏิกิริยาไปข้างหน้า ซึ่งการใช้อัตราส่วนโดยโมลสูงกว่า 3 โมลของแอลกอฮอล์ จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์มากขึ้น หากมีอัตราส่วนโดยโมลระหว่างเอทานอลกับน้ำมันสูง ๆ จะมีผลต่อการแยกชั้น เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์มากทำให้มีน้ำอยู่ในปฏิกิริยามากตามไปด้วย ไม่ว่าจะเป็นน้ำที่มีอยู่ในแอลกอฮอล์อยู่แล้วหรือน้ำที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา ซึ่งน้ำจะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ หรือผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ และเกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันตามมา ทำให้ได้เกลือของกรดไขมันหรือสบู่ขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ลดลง และเกิดการแยกชั้นยากขึ้นด้วย (ธนาทิพย์, 2547)

2.6.4 อุณหภูมิ

สำหรับผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ มักใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาใกล้จุดเดือดของแอลกอฮอล์ที่ใช้ เอทานอลมีจุดเดือดอยู่ที่ 78 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศ ดังนั้นอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไม่ควรเกินจุดเดือดของแอลกอฮอล์มากนัก ผลของการเปลี่ยนแปลงปรากฏว่าปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างรวดเร็ว เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลเร็วขึ้น

2.6.5 เวลา

อัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ได้สูงในช่วง 10 นาทีแรก ต่อจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (John, 1998)

2.7 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolase, EC. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งมีกรดไขมันสายยาวเป็นเอกลสารนี้เป็นเอกลสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบได้ผลผลิต คือ กรดไขมันอิสระ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล การเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสับสเตรตกับชั้นน้ำ (oil - water interface) นอกจากนี้ ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้ โดยเร่งการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระ

2.7.1 แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในสัตว์พบในน้ำนมและตับอ่อน ส่วนพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอก เช่น เมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง เป็นต้น ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความคงตัวต่ำกว่าจุลินทรีย์ ไลเปสจากจุลินทรีย์จะพบทั้งที่สร้างอยู่ในเซลล์และขับออกมานอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือ เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย ไม่ต้องการพื้นที่มากในการเลี้ยง ไม่ขึ้นกับฤดูกาล และนอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น เอนไซม์มีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) เอนไซม์ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (co - factors) เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นน้อย (broad substrate specificity) ประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมายในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ (organic synthesis) ใช้เติมในผงซักฟอกเพื่อช่วยประสิทธิภาพการซักล้าง เพิ่มรสชาติในอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ และในอนาคตอาจมีการนำมาใช้เพื่อการบำบัดน้ำเสีย ตลอดจนนำมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซล (อัจฉรา, 2546)

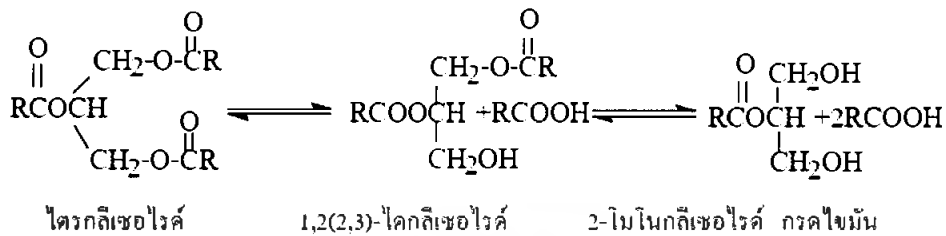
2.7.2 ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรต

เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสับสเตรต สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.7.2.1 ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (position specificity) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1. ไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1- และ 3- บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1, 3 - specific lipases) ไลเปสในกลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาการตัดกรดไขมันเฉพาะตำแหน่งที่อยู่ ค้านนอกของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้กรดไขมันอิสระ 1, 2(2, 3)-ไคกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่เนื่องจากโมเลกุลของ 1, 2 (2, 3)-ไคกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ไม่คงตัว ถ้าปล่อยให้ปฏิกิริยาเกิดต่อไป จะเกิดการย้ายกรดไขมัน (acyl migration) จากตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้เป็น 1, 3-ไคกลีเซอไรด์ และ 1-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อน (Brockerhoff, 1968), *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993), *Mucor javanicus* M, *Rhizomucor miehei*

(Lipozyme IM20), *Aspergillus niger* A, *Rhizopus javanicus* F ปฏิกริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้ แสดงไว้ใน รูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ปฏิกริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Macrae, 1983)

2. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (non-specific lipases) ไลเปสในกลุ่มนี้ สามารถตัดกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้ทั้งสามตำแหน่ง โดยไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมัน เมื่อมีการย่อยสลายสมบูรณ์ จะได้กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida rugosa*, *Pseudomonas* sp.P (Ghazali และคณะ, 1995), *Chromobacterium viscosum* (Tanaka และคณะ, 1992), *Corynebacterium acnes* ปฏิกริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้ แสดงไว้ในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ปฏิกริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ โดยไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

2.7.3 ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid specificity)

ไลเปสในแหล่งต่าง ๆ จะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน โดยจะสามารถเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายกรดไขมันชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยอัตราเร็วสูง ๆ ซึ่งบางชนิดมีความจำเพาะต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C8) เช่น ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* แยกได้เป็นไลเปส A และ B (pI 4.96 และ 4.15 น้ำหนักโมเลกุล 27,000 และ 36,000 ตามลำดับ) โดยไลเปส A แสดงความสามารถที่สูงในการย่อยสลายไตรบิวทีลิน (tributylin (C4)) ในขณะที่ไลเปส B ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมัน C8 และ C10 และทั้งสองตัวไลเปส A และ B ย่อยสลายน้ำมันมะกอกได้ดีเหมือนกัน ซึ่งน้ำมันมะกอกมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวคือ C18:1 ไลเปสจาก *Bacillus* sp. เป็นไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูง (thermostable lipase) โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไลเปสจะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายยาวกว่า C12 ได้ต่ำ (ไตรลอริน (trilaurin) C12:0, ไตรไมริสทิน (trimyristin) C14:0, ไตรปาล์มมิติน (tripalmitin) C16:0 และไตรสเตียรีน (tristearin) C18:0) และจะทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้นที่ 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลให้ไตรกลีเซอไรด์เหล่านี้เป็นของเหลว (Sugihara และคณะ, 1991) ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายยาวที่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 (cis - 9 double bond) ถ้าเป็นกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสช้าลง ไลเปสจาก *Aspergillus niger* สามารถไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ที่ทำการทดสอบยกเว้นพวกที่มีกรดไขมันสายสั้น (tributylin C4:0) (Macris และคณะ, 1996) ไลเปสจาก *Aspergillus niger* ย่อยสลายไตรโอเลอิน (triolein) ซึ่งมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง (C18:1) ได้ดีกว่าไตรสเตียรีนที่มีกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดสเตียริก (stearic acid C18:0) ไลเปสจาก *Aspergillus* sp. (Lipase 8901) สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกและน้ำมันถั่วเหลืองได้อย่างรวดเร็ว ในน้ำมันทั้งสองชนิดนี้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณมาก ส่วนน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันหมูจะแข็งตัวได้ง่าย เพราะมีกรดไขมันอิ่มตัวในปริมาณสูง แก้ไขโดยละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จะสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ที่ 37 องศาเซลเซียส (Fu และคณะ, 1995) ใช้ไลเปสจาก *Candida rugosa* ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไขมันวัวและน้ำมันหมูที่ละลายในไอโซออกเทนทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 24 ชั่วโมง ย่อยสลายได้ร้อยละ 94 และ 96 ตามลำดับ (Virto และคณะ, 1991)

2.7.4 อีแนนทิโอซีเลกทิวิตี (Enantioselectivity)

อีแนนทิโอเมอร์ (enantiomers) เป็นโมเลกุลของสารประกอบที่เป็นภาพในกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน แต่ไม่สามารถวางทับภาพในกระจกเงาได้สนิท อีแนนทิโอเมอร์จะมีเป็นคู่ ๆ และมีคุณสมบัติหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้ แต่ละอีแนนทิโอเมอร์ที่เป็นสเตอริโอไอโซเมอร์ (มีสูตรโครงสร้างเหมือนกัน อะตอมต่าง ๆ ค่อกันในลักษณะเดียวกัน แต่แตกต่างกันในวิธีการจัดตัวของอะตอมแบบ 3 มิติ) ซึ่งกันและกัน จะมีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนกัน ยกเว้นการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ จะหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์เป็นองศาที่เท่ากัน แต่หมุนในทิศทางตรงข้าม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน โดยขณะที่อีแนนทิโอเมอร์หนึ่งหมุนไปทางขวา (+ หรือ dextrorotatory) ตามเข็มนาฬิกา อีกอีแนนทิโอเมอร์หนึ่งจะหมุนไปทางซ้าย (- หรือ levorotatory) ทวนเข็มนาฬิกา ในคู่อีแนนทิโอเมอร์แต่ละอีแนนทิโอเมอร์ จะมีคอนฟิกูเรชันหรือการจัดหมู่อะตอมกลับกัน ถ้าอีแนนทิโอเมอร์หนึ่งเป็น R (rectus, ขวา, ตามเข็มนาฬิกา) อีกอีแนนทิโอเมอร์หนึ่งจะเป็น S (sinister, ซ้าย, ทวนเข็มนาฬิกา) (ราไฟ, 2535) การใช้สารรูปที่บริสุทธิ์หรือการใช้เพียงรูปใดรูปหนึ่ง ก่อให้เกิดผลที่ตีรวมทั้งเกิดผลข้างเคียงน้อย ตัวอย่างเช่น สารไอบิวโพรเฟน (Ibuprofen) [2-(4-isobutylphenyl) propionic acid] ใช้เป็นยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory) ที่มีอยู่ในรูป S(+)-ibuprofen ให้ผลการรักษาที่ดีกว่า R(-)-ibuprofen ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการจำแนกสารให้อยู่ในรูปใดรูปหนึ่ง อาจทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการตกผลึกหรือโครมาโตกราฟี เป็นต้น (Tsai และ Wei, 1994) มีการค้นพบเอนไซม์ไลเปส u3648 เป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อสารที่เป็นอีแนนทิโอเมอร์ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง จึงนำมาใช้แยกสารให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น เช่น จากการทดลองของ Mustranta ใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่าง (อาร์, เอส)-ไอบิวโพรเฟน ((R,S)-ibuprofen) กับเอมีลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol [CH₃(CH₂)₃CH₂OH]) ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นไฮโดรโฟบิก เช่น ดีเคน ไอโซออกเทน เฮปเทน และเฮกเซน พบว่าสารตั้งต้นที่อยู่ในรูปเอส(-)-ไอบิวโพรเฟน (S(+)-ibuprofen) หายไปเหลือเพียงรูปอาร์(-)-ไอบิวโพรเฟน (R(-)-ibuprofen) แสดงว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* มีความจำเพาะกับอีแนนทิโอเมอร์ในรูปแบบเอส(+)-ไอบิวโพรเฟน ซึ่งอาร์(-)-ไอบิวโพรเฟนสามารถแยกออกจากเอส(+)-ไอบิวโพรเฟนเอสเทอร์ได้โดยอาศัยความสามารถในการละลายที่แตกต่างกันของเอสเทอร์และกรด

2.7.5 ลักษณะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

บริเวณเร่ง (active site หรือ catalytic site) เป็นบริเวณที่มีการรวมกันของหมู่ R ของกรดอะมิโนซึ่งอยู่ในเปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายก็ได้ หมู่ R เหล่านี้มาอยู่ใกล้กันเนื่องจากเอนไซม์มีการโค้งงออย่างจำเพาะ เพื่อให้มีคอนฟอร์เมชันพร้อมที่จะเร่งปฏิกิริยาได้ สับสเตรตจะเข้าไปจับที่บริเวณนี้ กรดอะมิโนใดในโมเลกุลเอนไซม์ที่หมู่ R เข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสับสเตรตเรียก กรดอะมิโนนั้นว่าหน่วยเร่ง (catalytic residue) ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) มีฮิส 57 (His 57) และเซอร์ 195 (Ser195) เป็นหน่วยเร่ง บริเวณเร่งมีลักษณะเป็นแอ่ง (cleft) เล็ก ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรเอนไซม์ทั้งโมเลกุลมีสามมิติ มิได้เป็นจุด เป็นเส้น หรือเป็นระนาบ การจัดตัวของอะตอมต่าง ๆ ที่เป็นบริเวณเร่งมีผลอย่างมากต่อการรวมตัวระหว่างเอนไซม์และสับสเตรต ปัจจัยที่มีผลทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงขึ้นมาก คือ

1. การวางตัวในตำแหน่งที่ถูกต้องของ โมเลกุลของสับสเตรต สับสเตรตต้องเข้ามาอยู่ใกล้ (proximity) และหมุนตัวในทิศทางที่เหมาะสม (orientation) เข้าหาหน่วยเร่งของโมเลกุลเอนไซม์ จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานหอดสมุคกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ได้เข้าสู่สภาวะทรานซิชันง่ายขึ้น ปฏิกริยาเกิดได้เร็วขึ้น

2. เมื่อมีการรวมตัวระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต เป็นเอนไซม์ - สับสเตรต คอมเพล็กซ์ คอมเพล็กซ์นี้ จะต้องไม่อยู่ตัว (unstable) เพื่อที่จะสลายกลายเป็นผลิตภัณฑ์

3. บริเวณเร่งของเอนไซม์บางชนิด จะมีหมู่ที่ให้โปรตอนหรือหมู่ที่สามารถรับโปรตอน เป็นการช่วยให้ปฏิกริยาเกิดขึ้นได้เร็ว เนื่องจากการเร่งปฏิกริยาจากความเป็นกรดความเป็นเบส (acidbase catalysis) เข้ามาช่วยด้วยอีกแรงหนึ่ง

4. เมื่อสับสเตรตเข้าไปจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์แล้ว ทำให้คอนฟอร์เมชันของเอนไซม์ เปลี่ยนไป เกิดความเครียด (strain) และการบิดเบี้ยว (distortion) ภายในโมเลกุลเอนไซม์และ สับสเตรตเข้าสู่สภาวะทรานซิชันได้เร็ว ปฏิกริยาก็เกิดเร็วตามไปด้วย

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา ได้มีการค้นพบโครงสร้างที่เป็นผลึก (crystallographer structure) ของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ โดยใช้รังสีเอ็กซ์ (x-ray) เช่น ไลเปสจาก *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, Human pancreas, *Pseudomonas glumae* และไลเปสจาก *Geotrichum candidum* เป็นต้น ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนและขนาดของไลเปสจะต่างกัน เช่น ไลเปสจาก *Candida cylindracea* และ *Geotrichum candidum* (lipase I) มีความเหมือนกัน (identity) คิดเป็นร้อยละ 45 (Svendson, 1994) ส่วนขนาดของไลเปสจะต่างกันโดยมีขนาดตั้งแต่ 22 ถึง 60 กิโลดาลตัน พบว่าไลเปสทุกชนิดมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลในรูปแบบเดียวกัน คือ รูปแบบที่เรียกว่าแอลฟา/เบต้า-ไฮโดรเลส โฟลด์ (α / β -hydrolase fold) ซึ่งประกอบไปด้วยแกนกลางที่เป็นแผ่นพับเบต้าแบบขนานกัน (parallel β -sheets) เป็นส่วนใหญ่ล้อมรอบด้วยเกลียวแอลฟา (α -helices) การจัดเรียงตัวแบบนี้ทำให้เกิดการเรียงตัวกันของกรดอะมิโน 3 ตัว เป็นเครื่องมือในการเร่งปฏิกริยา (catalytic machinery) ที่เรียกว่า catalytic triad ที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยที่บริเวณเร่ง (active site) จะประกอบด้วย Ser, His และ Glu หรือ Asp พบว่าการเรียงลำดับของกรดอะมิโนบริเวณเร่งของไลเปสเป็น ---Ser---Asp---His--- ตัวอย่างเช่น การศึกษาโครงสร้างจาก *Geotrichum candidum* พบว่ามีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนบริเวณเร่งเป็น Ser217, Glu354, His463 (Schrag และคณะ, 1991) Winkler และคณะ ค.ศ.1990 รายงานว่าโครงสร้างของไลเปสจากตับอ่อนของคนเป็นไกลโคโปรตีน มีกรดอะมิโน 449 ตัวที่บริเวณเร่งมีกรดอะมิโน Ser152, Asp176 และ His263 เป็นต้น จากการศึกษาโครงสร้างของไลเปสพบว่า บริเวณเร่งมีกรดอะมิโนเรียงตัวเป็นรูปร่างเกลียว (α -helix) ปกคลุมอยู่เรียกว่า ฝาปิด (lid หรือ flap) ซึ่งฝานี้จะเปิดออกเมื่อเกิดการกระตุ้นที่บริเวณผิวสัมผัส (interfacial activation) เพื่อให้บริเวณเร่งที่อยู่ลึกเข้าไปในโมเลกุลเอนไซม์สัมผัสกับสับสเตรต องค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโน โครงสร้างของไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ จะมีความต่างกันในด้านจำนวนและการจัดเรียงตำแหน่งของกรดอะมิโน จากตารางที่ 2.2 จะมิลำดับกรดอะมิโนที่สอดคล้องกันที่บริเวณเร่งใน

ไลเปสส่วนใหญ่ คือ Ser, His และ Asp หรือ Glu นอกจากนี้กรดอะมิโนที่สอดคล้องกันก็ยังมีพบในเอนไซม์เอสเทอร์ด้วย ส่วนกรดอะมิโนที่อยู่ในออกซีแอนไอออน (oxyanion pocket) จะสร้างพันธะไฮโดรเจนสองพันธะจากหมู่เอมีด u3604 (N-H) เพื่อรักษาสถานะทรานสิชันแบบเตตระฮีดรัลเอาไว้

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบกรดอะมิโนหน่วยเร่งใน α/β -hydrolases 11 ชนิด

Lipase or esterase	Nucleophilic Ser	Catalytic His	Catalytic Asp/Glu	Oxyanion pocket
1. <i>Pseudomonas glumae</i>	-Ser87-	-His285-	-Asp263-	-Ala18-X-Gln88-
2. <i>Rhizomucor miehei</i>	-Ser144-	-His257-	-Asp203-	-Ser82-X-Leu145-
3. <i>Humicola lanuginosa</i>	-Ser146-	-His258-	-Asp201-	-Ser83-X-Leu147-
4. <i>Penicillium camembertii</i>	-Ser145-	-His259-	-Asp199-	-Ser84-X-Leu146-
5. <i>Rhizopus delemar</i>	-Ser145-	-His257-	-Asp204-	-Thr83-X-Leu146-
6. <i>Fusarium solani cutinase</i>	-Ser120-	-His188-	-Asp175-	-Ser42-X-Gln121-
7. <i>Humanpancreas</i>	-Ser152-	-His263-	-Asp176-	-Phe77-X-Leu153-
8. <i>Candida antarctica</i>	-Ser105-	-His224-	-Asp187-	-Thr40-X-Gln106-
9. <i>Candida rugosa</i>	-Ser209-	-His449-	-Glu341-	-Gly124-X-Ala210-
10. <i>Geotrichum candidum</i>	-Ser217-	-His463-	-Glu354-	-Ala132-X-Ala218-
11. <i>Torpedo californica</i> acetylcholinesterase	-Ser200-	-His440-	-Glu327-	-Gly119-X-Ala201-

ที่มา : (Kazlauskas, 1994)

หมายเหตุ : X คือกรดอะมิโนชนิดใด ๆ

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไตรกลีเซอไรด์ให้ กรดไขมัน และกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ โดยจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างลิปิดกับน้ำ ไลเปสจะมีบริเวณเร่งที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสามตัว Ser, His และ Asp หรือ Glu เป็นเอกลักษณ์ที่เหมือนกับเอนไซม์เซอรัรีนไคโมทริปซิน (serine proteinases) Blow และคณะ ค.ศ.1969 ทำการศึกษาเอนไซม์ไคโมทริปซินเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอมีด (พันธะเปปไทด์) และพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ His57, Ser195 และ Asp102 เป็นหน่วยเร่งปฏิกิริยาแบ่งเป็นปฏิกิริยาเอคิลเลชันของโมเลกุลเอนไซม์ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอมีน จากนั้นเป็นปฏิกิริยาดีเอคิลเลชัน (deacylation) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดตามมาทีหลัง แต่ไลเปสจะมีกรดอะมิโนบางส่วนเรียงตัวเป็นเกลียวที่เรียกว่าฝาปิด (lid) ปิดบริเวณเร่งเอาไว้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสภาพแวดล้อมมีลักษณะไม่มีขั้ว (nonpolar) เพิ่มขึ้นฝาปิดจะเคลื่อนออกไป เปิดเผยบริเวณเร่งออกมาให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรต เหตุที่สามารถทราบว่าเป็นบริเวณเร่งมีกรดอะมิโน Ser ก็โดยให้ทำปฏิกิริยากับตัวยับยั้ง ตัวยับยั้งจับกับโมเลกุลเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์อย่างหนาแน่น ทำให้เอนไซม์หมดความว่องไว

2.7.6 กลไกการเร่งปฏิกิริยาตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์

Kazlauskas ค.ศ.1994 ได้อธิบายกลไกการเร่งปฏิกิริยาตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ Ser 209, His 449 และ Glu341 เป็นหน่วยเร่งปฏิกิริยา แบ่งเป็นปฏิกิริยาเอซิเลชันของโมเลกุลเอนไซม์ให้ผลิตภัณฑ์แรกเป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นเป็นปฏิกิริยาดีเอซิเลชัน (deacylation) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดตามมาที่หลัง เอนไซม์ไลเปสที่บริเวณเร่งมีกรดอะมิโนเซอร์รีน Ser เช่นเดียวกับเอนไซม์โคโมทรูปซิน ไฮโดรเจนอะตอมของหมู่ไฮดรอกซิลจาก Ser จะเกิดพันธะไฮโดรเจนเชื่อมกับหมู่อิมิดาซอล (imidazole) ของ His และกับกรดอะมิโนประเภทแอสพาร์ต (Asp ใน *Rhizomucor miehei* lipase และ Human pancreatic lipase; Glu ใน *Geotrichum candidum* lipase และ *Candida rugosa* lipase) การเชื่อมต่อกันของ (Asp, Glu)-His ในเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มความเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilicity) ให้กับส่วนทำปฏิกิริยา Ser มากขึ้น ในสภาพแวดล้อมของไลเปสที่เป็นไมเซลล์ (micelles) หรืออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยปกติโครงสร้างโปรตีนของไลเปสจะมีการจัดเรียงตัวโดยสร้างส่วนที่จะยึดจับกับสับสเตรต มีกรดอะมิโนเรียงตัวเป็นเกลียว (α -helical) เรียกว่าฝาปิด (lid หรือ flap) ส่วนนี้จะปกคลุมบริเวณเร่งของเอนไซม์ ป้องกันการเข้าถึงของสับสเตรต ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่ในสภาพที่เป็นไมเซลล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ ฝานี้จะเปิดออกเปิดเผยบริเวณเร่ง (catalytic triad) ที่มี Ser, His และ Asp หรือ Glu อยู่ในส่วนล่างของแอ่งที่ล้อมรอบโดยกรดอะมิโนที่มีลักษณะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic canyon) ภายหลังจากที่ฝาเปิดออก จะมีการปรับปรุงโครงสร้างใหม่ของส่วนเบต้า 5 ลูป (β 5 loop) ในกรณีที่ฝาปิดยังปิดอยู่จะดึงคู่กันด้วยแรงอ่อน ๆ กับเบต้า 5 ลูปเมื่อฝาเปิดออกแล้ว การติดต่อกันจะถูกตัดขาด และเบต้า 5 ลูปจะพับม้วนลงสู่ใจกลางของโมเลกุลโปรตีน จะเกิดบริเวณที่เป็นอิเล็กโทรฟิลิก (electrophilic) ใกล้เคียง ๆ กับบริเวณเร่ง Ser เพื่อให้เกิดเป็นออกซิแอนไอออน ซึ่งจะช่วยรักษาสถานะทรานสิชันในระหว่างเร่งปฏิกิริยา หลังจากฝาปิดและเบต้า 5 ลูปเคลื่อนไหวยกออกไป บริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิกที่มีบริเวณเร่งอยู่จะถูกเปิดเผยออก จากลักษณะที่เป็นไฮโดรโฟบิกนี้จะช่วยดึงคู่สับสเตรตลิปิดให้เข้ามาใกล้ เพื่อเกิดเป็นสารประกอบเอนไซม์-สับสเตรต โดยเกิดขึ้นตอนเอซิติเลชันและดีเอซิติเลชันเหมือนกับที่เกิดกับเอนไซม์โคโมทรูปซิน ซึ่ง Semeriva และคณะ ค.ศ.1974 ศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพาราไนโตรฟีนิลอะซิเตต (*p*-nitrophenyl acetate) โดยพอร์ซันแพนครีติกไลเปส (porcine pancreatic lipase) ได้ใช้ ไตรเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Tritium คือ ไอโซโทปกัมมันตรังสีของไฮโดรเจนมีเลขมวลเท่ากับ 3 ประกอบด้วย 2 นิวตรอน 1 โปรตอน [^3H]) ติดไปกับที่เกิดจากปฏิกิริยา เอสเทอร์ฟิเคชันของพาราไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) กับพาราไนโตรฟีนีลอะซิเตต [^3H] กรดอะซิติก พบสารตัวกลาง [^3H] อะซิลไลเปส (acetyl lipase) ที่เกิดใน ชั้นเอ-ซิเลชัน (acylation)

2.7.7 การทำงานของไลเปส

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำในการทำปฏิกิริยา ผลลัพธ์สุดท้ายของการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ จะได้กลีเซอรอล และกรดไขมัน

2. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส คือ การสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน ปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำน้อย ๆ และผลลัพธ์สุดท้ายที่ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์

3. ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาการสับเปลี่ยนหมู่จากสารชนิดหนึ่งไปยังสารอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสารเคมีประเภทเดียวกัน เช่น การแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างโมโนเอสเทอร์หรือโพลีเอสเทอร์ การแลกเปลี่ยนหมู่ของแอลกอฮอล์ในกรดไขมันเอสเทอร์

2.8 ซีไลต์

โคอะตอมมัส เอิร์ธ หรือที่รู้จักว่า ดิอี ทีเอสเอส โคอะโคไมท์ โคอะไฮโดร ทีชอว์ และ ซีไลต์ หรือที่รู้จักในภาษาไทยคือ ดินเบา เป็นดินที่เกิดจากซากอะตอมในแหล่งอะตอม เป็นดินขุยเบา เนื้อพรุน มีลักษณะคล้ายขอสัก มีปฏิกิริยาทางเคมีที่เชิงซ้ำ เป็นตัวนำความร้อนที่ไม่ดี จึงมีประโยชน์เป็นส่วนผสมในการทำกระดาษเพื่อให้เนื้อกระดาษเนียน เป็นฉนวน และเป็นสารที่ใช้ในการกรองได้ดี เช่น การกรองน้ำตาลและสารกรองอื่น ๆ ดินชนิดนี้ใช้ขัดภาชนะโลหะได้ดี เพราะมีซิลิกาขนาดละเอียดมากอยู่ในเนื้อ นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวดูดซับหรือฉนวนในระเบิดโคนาไมต์ด้วย ส่วนประกอบทางเคมีของซีไลต์ประกอบด้วย ซิลิการ้อยละ 86 โซเดียมร้อยละ 5 แมกนีเซียมร้อยละ 3 และเหล็กร้อยละ 2

การเลือกใช้ซีไลต์ในการตรึงรูปเอนไซม์ เนื่องจากซีไลต์มีคุณสมบัติเป็นตัวกลางที่ให้ออกฤทธิ์ของการทำปฏิกิริยาสูงกว่าการใช้น้ำเป็นตัวกลาง และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า

2.9 เอนไซม์ตรึงรูป

การนำเอนไซม์มาใช้ในวงการอุตสาหกรรมทั่ว ๆ ไปจะอยู่ในรูปของเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำมาใช้ได้ไปอีกลักษณะหนึ่ง คือใช้ในแบบของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายมาเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้น้อยมาก โดยการนำเอาเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดหรือจัดไว้ หรือนำมาจับยึดไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำ หรือทำให้โมเลกุลเอนไซม์จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น

เอนไซม์ตรึงรูปนี้เมื่อใช้งานแล้ว สามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้งจนกว่ากิจกรรมของเอนไซม์หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงรูปก่อนข้างจะมีเสถียรภาพที่ดีกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ สามารถใช้งานในระบบที่มีเอนไซม์หลาย ๆ ตัวได้ และใช้ได้ทั้งในลักษณะแบบต่อเนื่องหรือเป็นครั้งคราว เอนไซม์ที่จะนำมาตรึงรูปไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์มากนัก ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ สำหรับเครื่องปฏิกรณ์ที่จะใช้กับเอนไซม์ตรึงรูปก็ไม่มีปัญหา เพราะสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมได้ขึ้นอยู่กับรูปแบบของการตรึงรูป และสารที่เป็นสับสเตรต

2.9.1 ข้อควรคำนึงในการผลิตเอนไซม์ตรึงรูป

ในการผลิตเอนไซม์ตรึงรูป มีข้อควรคำนึงดังนี้คือ

1. ความปลอดภัย เนื่องจากการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปบางครั้งจะใช้สารเคมีที่มีความจำเป็นพิษสูงหรือมีอันตรายความระมัดระวัง
2. กรรมวิธีที่ใช้ในการเตรียมควรเป็นอย่างง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน
3. ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูป ประสิทธิภาพจะต้องไม่ลดลงหรือเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม
4. ประหยัดค่าใช้จ่าย ในการผลิตเอนไซม์ตรึงรูป จะต้องไม่มีราคาสูงเกินไป

(อารี, 2550)

2.9.2 ผลกระทบของเอนไซม์ตรึงรูป

1. กิจกรรมอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพวงมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย
2. มีปัญหาเกี่ยวกับสับสเตรตที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือสับสเตรตมีลักษณะแขวนลอย (suspension) (ปราณี, 2547)

2.9.3 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูปมีประโยชน์หลายประการด้วยกัน เช่น

1. สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ได้อีก เป็นการลดปริมาณการใช้เอนไซม์และลดค่าใช้จ่าย
2. สามารถใช้กับกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องอย่างได้ผล เช่นเดียวกับการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดยืนที่ ๒ ในกระบวนการ

3. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีเอนไซม์ปนออกมา ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์
คุณภาพคงที่

4. สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการควบคุมอัตโนมัติ
จะทำได้ง่ายและช่วยลดค่าแรง

5. ช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น

6. สามารถใช้เอนไซม์ได้หลายชนิดในกระบวนการหมัก

7. ใช้ประโยชน์ได้ดีในทางอุตสาหกรรมและการแพทย์

8. ช่วยลดปัญหาการกำจัดของเสียจากกระบวนการผลิต

ถึงแม้ว่าการใช้เอนไซม์ตรึงรูปจะมีประโยชน์มากกว่าการใช้เอนไซม์โดยทั่วไป แต่
มีข้อเสียคือ เมื่อเอนไซม์มาตรึงกับสารพยาง (support material) เอนไซม์อาจสูญเสียประสิทธิภาพได้
เอนไซม์ตรึงรูปบางชนิดไม่มีความเสถียรเมื่อเก็บไว้เป็นนาน ๆ เนื่องจากประสิทธิภาพการตรึงต่ำ
และบางชนิดไม่สามารถย่อยสลายสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ ได้ นอกจากนี้กระบวนการผลิตอาจ
ยุ่งยากและซับซ้อนกว่าเดิม เช่น กระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องอาจจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน
มากขึ้น (อารี, 2550)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี

1. น้ำมันสบู่ดำที่ผ่านการกรองเอาสิ่งปนเปื้อนออก
2. เมทานอล
3. เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* บริษัท ชิกมา จำกัด
4. โซเดียมคาร์บอเนต
5. เฮกเซน
6. ซีไลต์ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทย-เบฟเวอร์เรท จำกัด มหาชน
7. พาราไนโตรฟีนิลปาล์มิเตรต (*p* - nitrophenyl palmitate (*p*-NPP))
8. 2 - โพรพานอล (2 - propanol)
9. ไทรตอน เอ็กซ์-100 (Triton x-100)
10. กัมอาราบิก
11. โซเดียมคาร์บอเนต
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์
13. โปแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาลด
14. ฟีนอลทาลีน
15. สารวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธีการ Bradford

3.2 การเตรียมเอนไซม์ไลเปส (Shuo-Fen และคณะ, 2007)

3.2.1 ชั่งเอนไซม์ไลเปสหนัก 0.1- 0.5 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.05 โมล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3.2.2 นำเอนไซม์ไลเปสผสมกับซีไลต์ 1 กรัม เติมอะซีโตน 15 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน ในสถานะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที

3.2.3 เมื่อครบกำหนดกรองล้างด้วยเฮกเซน 1 ครั้ง และน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อเอาเอนไซม์อิสระ ออก

3.2.4 ทำให้แห้งด้วยในเครื่องดูดความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการสูญเสีย กิจกรรมของเอนไซม์จากการทำแห้ง (Shweta และ Munishwar, 2007) จากนั้นนำเอนไซม์เตรียมรูปที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แห้งแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระ

ชั่งผงเอนไซม์ไลเปสหนัก 12.5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเอนไซม์ไลเปสที่ตรีงรูปหนัก 0.075 กรัม นำเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (Hoshiro และคณะ, 1992)

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริเฟเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป

ก่อนการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริเฟเคชัน นำน้ำมันสบูดำที่ใช้ในการทดลองมาหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในตอนต้น ก่อนเริ่มต้นปฏิกิริยา และบันทึกผล

3.4.1 การหาปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริเฟเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป

ชั่งเอนไซม์ตรีงรูปหนัก 1.25 กรัมลงในแต่ฟลาสก์ เดิมเมทานอลต่อน้ำมันสบูดำในอัตราส่วน 3:1 โมล น้ำปริมาณร้อยละ 0 , 2.5 , 5 และ 7.5 ของน้ำหนักเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเดิม เมทานอลลงไปตามสัดส่วน เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เพื่อแยกน้ำมัน กลีเซอรอล และเอนไซม์ตรีงออกจากกัน นำน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น

3.4.2 การหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริเฟเคชันของเอนไซม์ตรีงรูป

ชั่งเอนไซม์ตรีงรูปหนัก 1.25 กรัมลงในแต่ฟลาสก์ เดิมเมทานอลต่อน้ำมันสบูดำในอัตราส่วน 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 โมล เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.4.1 ลงในแต่ละฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเดิมเมทานอลลงไปตามสัดส่วน เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เพื่อแยกน้ำมัน กลีเซอรอล และเอนไซม์ตรีงออกจากกัน นำน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น

3.4.3 การเปรียบเทียบปริมาณไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูป

ชั่งเอนไซม์ตรีงรูป 1.25 กรัมและชั่งเอนไซม์อิสระในปริมาณที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่เท่ากับจำนวนของเอนไซม์ตรีงรูป นำสภาวะที่เหมาะสม ในการทดลองที่ 3.4.1 และ 3.4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาใช้ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกน้ำมัน กลีเซอรอล และ เอนไซม์ออกจากกัน นำน้ำมันที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบ ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด

3.4.4 การนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้

เมื่อแยกเอนไซม์ตรึงออกจากน้ำมัน นำเอนไซม์มาล้างเอาน้ำมันออกและทำให้แห้งใน เครื่องดูดความชื้น นำเอนไซม์ที่แห้งมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ นำเอนไซม์ที่แห้ง มาข่อยน้ำมันสปู่ค่าในสภาวะที่เหมาะสม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เพื่อแยกน้ำมัน กลีเซอรอล และเอนไซม์ออกจากกัน นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้แห้งและวิเคราะห์ หาค่ากิจกรรมที่เหลือ

3.4.5 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

จากการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระโดยใช้ข่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลปาล์มิ-
เตรต เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ
มีค่าเท่ากับ 66,008.742 ยูนิต/มล ซึ่งนับว่าสูงมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระทั่วไป เนื่องจากเอนไซม์
ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อทราบค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระที่
ใช้ในการทดลองนี้แล้ว จึงหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงรูปในซีไลต์ เพื่อเปรียบเทียบค่า
กิจกรรมระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป ทำให้ทราบว่าวิธีการตรึงรูปนั้นมี
ประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใด โดยสังเกตจากกิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ตรึงรูป

การนำเอนไซม์อิสระมาตรึงรูปบนซีไลต์ แล้วหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัดค่าการ
ดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ซึ่งได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 38,736.017 ยูนิต/มล. เมื่อคิดใน
รูปร้อยละของผลได้ของเอนไซม์ตรึงรูปโดยเทียบกับเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงมีค่าร้อยละ 58.68
ของเอนไซม์อิสระ แต่ในทางปฏิบัติแล้วมีทางเป็นไปได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่บน
ซีไลต์นั้นอาจจะมีค่าที่ไม่ได้เป็นไปตามนี้ เนื่องจากการสูญเสียไปของกิจกรรมเอนไซม์จาก
ผลกระทบของเฮกเซนที่ใช้ในการล้างเอนไซม์ที่ไม่ได้ถูกตรึงรูปออก จึงอาจทำให้ค่ากิจกรรมของ
เอนไซม์ตรึงรูปมีค่าลดลง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพการมีขั้วสูงสามารถละลายน้ำได้มาก เมื่อ
นำมาทดลองการเกิดปฏิกิริยาจะเข้าไปกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ไปดึง
น้ำออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลง ความสามารถในการ
เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงลดลง (พิชญ, 2541)

เมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงรูปมาทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้น จนครบ 24 ชั่วโมง จะ
ได้เอนไซม์ตรึงที่มีลักษณะเป็นผงสีส้มดังรูปที่ 4.1

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ิฟิเคชันของเอนไซม์ตรึงรูป

ปริมาณกรดไขมันอิสระของน้ำมันสนุดำเริ่มต้น พบว่ามีปริมาณของกรดโอเลอิกร้อยละ
4.96 และกรดปาล์มิติกร้อยละ 4.46 เนื่องจากปกติแล้วน้ำมันสนุดำเป็นน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระ
อยู่มาก จึงสามารถนำมาใช้ในเครื่องยนต์ทางการเกษตรได้ทันที (สุปรีชา, 2547)



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเอนไซม์ตรีงรูปบนซีไลต์

4.2.1 การหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเกิดการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของ เอนไซม์ตรีงรูป

เมื่อนำเอนไซม์ตรีงรูปมาขย่น้ำมันสบู่ดำ ที่มีอัตราส่วนของน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอล 3:1 โมล ที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 0, 2.5, 5 และ 7.5 ของน้ำหนักเอนไซม์ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์ จะให้ปริมาณของกรดไขมันอิสระชนิดโอเลอิกและปาล์มมิติกในปริมาณมากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากปริมาณน้ำร้อยละ 0, 2.5 และ 7.5 ดังตารางที่ 4.1 ฉะนั้นจึงเลือกปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์ในการดำเนินการทดลองขั้นต่อไป เพื่อหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสม

ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน เห็นได้ชัดว่าเมื่อไม่ใช้น้ำในปฏิกิริยาจะเกิดปริมาณกรดไขมันอิสระน้อยกว่าเมื่อเติมน้ำลงไป ในปริมาณร้อยละ 2.5 และ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์ การเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของสับสเตรตและชั้นน้ำ มีผลให้ได้ผลิตภัณฑ์และอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ ในการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน เกิดได้จากสภาวะสมดุลระหว่างปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Noureddini, 2005 และ Kaieda และคณะ, 2001) ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ถ้ามีปริมาณน้ำไม่มากพอที่จะแยกเอนไซม์ออกจากตัวทำละลาย เอนไซม์อาจถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติโดยตัวทำละลาย จึงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ลดลง ถ้ามีปริมาณน้ำเพียงพอ ความหนาของชั้นน้ำที่อยู่รอบโมเลกุลเอนไซม์เพียงพอในการทำให้เอนไซม์เสถียร มีความยืดหยุ่นของโมเลกุลเอนไซม์สูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อปริมาณน้ำมากกว่าค่าที่เหมาะสม น้ำส่วนเกินจะมีผลต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในทางอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำงานของเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์ลดลง (พิชญ, 2541) ทำให้เกิดปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงดังตารางที่ 4.1 ที่ปริมาณน้ำร้อยละ 7.5 จะให้กรดไขมันอิสระน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเกิดปริมาณกรดไขมันอิสระ เมื่อใช้ปริมาณน้ำร้อยละ 0, 2.5, 5 และ 7.5 ของน้ำหนักเอนไซม์ และมีอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่อัตราส่วน 3:1

ปริมาณน้ำร้อยละ	ปริมาณกรดไขมันอิสระ	
	กรดโอเลอิก (%)	กรดปาล์มมิติก (%)
0	5.06 ^c	4.65 ^c
2.5	6.17 ^b	5.61 ^b
5.0	7.07 ^a	6.46 ^a
7.5	2.95 ^d	2.72 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรหลังตัวเลขในแถวสดมภ์ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2.2 การหาปริมาณเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ครึ่งรูป

เมื่อนำเอนไซม์ครึ่งรูปมาขย่น้ำมันสบู่อัตราส่วนที่มีอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่อัตราส่วน 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 โมล ปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วน โมลเมทานอลต่อน้ำมันที่สามารถเกิดร้อยละของปริมาณกรดไขมันอิสระของกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกได้สูงสุดนั้นคืออัตราส่วน โมลของเมทานอลต่อน้ำมันที่ 4:1 จะพบว่ามีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระได้จากตารางที่ 4.2 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.2) จากที่ไม่ใส่เมทานอลหรือที่ปริมาณเมทานอลเป็นศูนย์นั้น จะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดไขมันอิสระ ถ้าอัตราส่วน โมลที่มากกว่า 4:1 ปริมาณกรดไขมันอิสระจึงลดลงอย่างต่อเนื่อง ปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากเกินไปจะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (Noureddini, 2005) เมื่อปริมาณเมทานอลเพิ่มมากขึ้น ความเป็นพิษต่อเอนไซม์ก็ยิ่งเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จึงทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดน้อยลง สังเกตได้จากปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ลดลง

ตารางที่ 4.2 ผลของอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำในการเกิดปริมาณกรดไขมันอิสระของน้ำมันสบู่ดำ เมื่อใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำ 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 โมล โดยมีปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์

อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมันสบู่ดำ	ปริมาณกรดไขมันอิสระ	
	กรดโอเลอิก(%)	กรดปาล์มมิติก(%)
0:1	1.02 ^d	0.96 ^d
3:1	1.85 ^c	1.72 ^c
5:1	3.97 ^b	3.66 ^b
4:1	5.32 ^a	4.88 ^a
6:1	3.73 ^{bc}	3.43 ^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

การเปรียบเทียบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป โดยการใช้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เท่ากันมาเปรียบเทียบระหว่างการทำงานของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง เพื่อศึกษาว่าเอนไซม์ชนิดใดสามารถให้ผลิตภัณฑ์มากกว่า โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองแบบ ภายใต้สภาวะการทดลองเป็นการนำเอนไซม์อิสระมาตรึงรูปโดยใช้ซีไลต์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับสีของสารละลายแบรดฟอร์ด ซึ่งเป็นสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ทำให้เราไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนที่มีอยู่บนซีไลต์ได้ โดยใช้อัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำมัน 4:1 ปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปให้ปริมาณกรดไขมันอิสระทั้งกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกในปริมาณหรือร้อยละ 7.57 และ 6.91 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเอนไซม์อิสระ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพหรือความสามารถในการเปลี่ยนน้ำมันสบู่ดำให้กลายเป็นกรดไขมันอิสระได้นั้น เอนไซม์ตรึงรูปมีความสามารถมากกว่าเอนไซม์อิสระที่ค่ากิจกรรมเดียวกัน อาจเป็นเพราะในสภาวะการทดลองมีผลกระทบต่อการทำงานหรือบริเวณเร่งของเอนไซม์อิสระ เนื่องจากความร้อนไปทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์จนไม่สามารถทำงานได้ดั้งเดิม ความร้อนจะทำลายโครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิ และโครงสร้างจตุรภูมิของเอนไซม์ (Sugihara, 1991) ทั้งนี้แรงเหวี่ยงจากการเขย่าที่อาจสร้างความกระทบกระเทือนต่อเอนไซม์เอง อีกทั้งความเป็นพิษของเมทานอลที่มีโอกาสสัมผัสต่อบริเวณการเอ็กซาร์นี้ เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำงานของเอนไซม์อิสระมากกว่าเอนไซม์ตรึง (Lilin และคณะ, 2006) นอกจากนี้การดูดซับเอนไซม์บนพาหะตรึง สามารถป้องกันการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (Gorman, 1992)

เหตุที่เอนไซม์อิสระมีความสามารถในการย่อยน้ำมันสบู่ดำ และให้ปริมาณกรดไขมันอิสระได้น้อยกว่าเอนไซม์ตรึงรูป อาจเนื่องมาจากความสามารถในการแพร่กระจายและการละลายได้น้อยของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มักจะเกาะกลุ่มรวมกันเป็นก้อน มีผลให้เอนไซม์แสดงค่ากิจกรรมต่ำหรือไม่มีเลย การตรึงเอนไซม์ไว้บนพาหะตรึงที่มีรูพรุน โดยทำให้โมเลกุลของเอนไซม์กระจายทั่วผิวของพาหะตรึงเป็นการปรับปรุงให้เอนไซม์ทำงานในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้น การใช้เอนไซม์ตรึงให้ผลดีใน ด้านการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยตัวทำละลายอินทรีย์ ป้องกันการคลายตัวของเอนไซม์จากพาหะตรึง และลดการเกาะเป็นก้อนของเอนไซม์ โครงสร้างที่เหมาะสมของโมเลกุล เอนไซม์เมื่อถูกตรึงกับพาหะตรึงแล้วจะยึดติดแน่น ต่อต้านการบิดเบี้ยวผิดปกติหรือการคลายตัวของเอนไซม์ที่ทำให้สูญเสียกิจกรรม การตรึงเอนไซม์จะช่วยยึดดึงน้ำให้อยู่กับโมเลกุลเอนไซม์ ซึ่งน้ำจำนวนนี้มีความสำคัญในการรักษาสภาพธรรมชาติ และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเอาไว้ (พิชญ, 2541)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณกรดไขมันอิสระ	
	กรดโอเลอิก(%)	กรดปาล์มมิติก(%)
เอนไซม์อิสระ	5.55	5.07
เอนไซม์ตรึงรูป	7.57	6.91

4.4 การนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้

หลังจากการหมักครั้งที่ 1 นำเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการใช้แล้วมาล้างและทำให้แห้ง ก่อนนำกลับเข้าสู่กระบวนการหมักอีกครั้ง ซึ่งจากการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการนำไปใช้ครั้งที่ 2 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผ่านการหมักครั้งที่ 1 เท่ากับ 13,020.211 ยูนิต/มล. หรือคิดเป็นร้อยละ 33.61 ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นในการหมักครั้งแรก พบว่าหลังการหมักครั้งแรกค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงไปถึงร้อยละ 66.39 ในการหมักครั้งที่ 2 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น มีปริมาณกรดไขมันอิสระทั้งสองชนิดลดลงเกือบร้อยละ 50 ของการหมักครั้งแรก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะในการทดลอง จึงทำให้มีเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไป หรือมีเอนไซม์บางส่วนหลุดออกมาจากตัวตรึงรูปหรือก็คือซีไลต์นั่นเอง ทำให้ค่ากิจกรรมที่เหลือที่วัดได้นั้นลดลงไปอย่าง

มาก เมื่อพิจารณาจากค่ากิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ตรีงรูปแล้วมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอนไซม์ตรีง รูปนี้ไปใช้ในการหมักครั้งต่อไป

หลังจากการหมักครั้งที่ 2 นำเอนไซม์ที่ผ่านการใช้แล้วมาล้างและทำให้แห้งอีกครั้งเพื่อหาค่ากิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผ่านการหมักครั้งที่ 2 เท่ากับ 315.883 ยูนิต/มล. คิดเป็นร้อยละ 0.82 ของค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูปเริ่มต้น

จากการเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปที่ผ่านการหมักครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปลดลงไปอย่างมากถึงร้อยละ 99.18 การพิจารณาจากค่ากิจกรรมที่เหลือจากการหมักครั้งที่ 2 พบว่าไม่สมควรที่จะนำไปผ่านกระบวนการหมักครั้งต่อไปอีก เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลือไม่มาก ความสามารถในการย่อยน้ำมันสูงค่าอาจไม่ได้ผลดังเดิม จากรายงานการทดลองตรีงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ด้วยวิธีคูคซับบนซีไลต์ และคูโอไลต์ (duolite) เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันมะกอกในตุ๊กกลางที่เป็นน้ำ พบว่าเอนไซม์ที่ตรีงบนซีไลต์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 21 เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ แต่การตรีงบนคูโอไลต์ มีกิจกรรมสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 1 และเมื่อนำเอนไซม์ตรีงบนซีไลต์และคูโอไลต์ มาใช้ใหม่ 3 ครั้ง ในเวลา 69 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมลดลงอย่างมาก โดยมีค่าเหลือเพียงร้อยละ 38 และ 1.6 ตามลำดับ (Kimura และคณะ, 1996)

ตารางที่ 4.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นก่อนการหมักครั้งที่ 2

การหมักครั้งที่	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น (ยูนิต/มล.)	ปริมาณกรดไขมันอิสระ	
		กรดโอเลอิก (%)	กรดปาล์มมิติก (%)
1	38,736.017	5.32	4.88
2	13,020.211	2.65	2.45

4.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูป

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูปที่ผ่านการหมักทั้ง 2 ครั้ง พบว่าปริมาณกรดไขมันอิสระของเอนไซม์ตรีงรูปมีกรดโอเลอิกและกรดปาล์มมิติกร้อยละ 7.93 และ 7.33 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 ดังนั้นการใช้เอนไซม์ตรีงรูปมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ

ในการใช้เอนไซม์อิสระ อาจก่อให้เกิดปัญหาเอนไซม์ไม่ละลาย และเกาะกันเป็นก้อน ทำให้การกระจายของเอนไซม์ไม่สม่ำเสมอ ก่อให้เกิดการด้านการแพร่ของสับสเตรตในการเข้าไปยังบริเวณภายในและภายนอกของเอนไซม์มีผลทำให้ได้ค่ากิจกรรมต่ำ การแก้ไขปัญหานี้สามารถทำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้โดยการตรึงเอนไซม์ไว้บนพาหะตรึง (Dordick, 1989) การตรึงทำให้กระจายเอนไซม์ได้ในเนื้อที่กว้าง ป้องกันการทำลายจากตัวทำลายอินทรีย์ได้ และยังสามารถแยกเอนไซม์ในรูปเอนไซม์ตรึงเพื่อนำไปใช้ใหม่ได้ (Malcata, 1990)

Malcata และคณะ พบว่าการตรึงเอนไซม์จะช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส รวมถึงความเสถียรต่อความร้อนและสารเคมี การเลือกพาหะตรึงสำหรับเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญ พาหะตรึงที่ดีต้องมีโครงสร้างภายใน (internal structure) ที่ดี มีพื้นที่ผิวมาก สามารถเกาะกับเอนไซม์ได้ดี มีความเป็นรูพรุนสูง มีขนาดการกระจายของรูพรุนที่เหมาะสม มีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่เหมาะสม เพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดและทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตสูงสุด นอกจากนี้ยังต้องมีความเสถียรต่อความร้อน และราคาไม่แพง การเลือกใช้พาหะตรึง นอกจากต้องคำนึงถึงคุณสมบัติทางเคมีในด้านกลุ่มฟังก์ชันและความเสถียรแล้ว ควรพิจารณาถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ด้วย เช่น ควรมีรูปร่างและขนาดที่เหมาะสมสำหรับการใช้งาน มีพื้นที่ผิว มากเพื่อใช้ในการจับยึด มีอายุการใช้งานนาน สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และมีราคาถูก

Horiuti และ Imamura ค.ศ. 1978 ได้ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* บนปาล์มมิทอล เซลลูโลส (palmitoyl cellulose) และทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันมะกอก โดยใช้เอนไซม์อิสระ 12 ยูนิตในการตรึง จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 0.27 มิลลิโมลกรดไขมันต่อชั่วโมง ซึ่งเท่ากับการใช้เอนไซม์อิสระ 240 ยูนิตทำการเร่งปฏิกิริยา เห็นได้ว่าเอนไซม์ตรึงมีกิจกรรมเป็น 20 เท่าของเอนไซม์อิสระในสถานะอิมัลชัน (น้ำมันมะกอก - น้ำ) ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสเอนไซม์จะดูดซับกับพาหะตรึงแบบ hydrophobic interaction โดยเป็นการดูดซับระหว่างพาหะตรึงกับโมเลกุลเอนไซม์ด้านอื่น ๆ ที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการหมักทั้ง 2 ครั้ง

ชนิดของเอนไซม์	ปริมาณกรดไขมันอิสระ	
	กรดโอเลอิก(%)	กรดปาล์มมิติก(%)
เอนไซม์อิสระ	5.55	5.07
เอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ครั้ง	7.97	7.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองโดยการใช้น้ำมันโซลิดที่ผ่านการตรึงรูปบนซีไลต์มาทดสอบการข่อยน้ำมันสบู่ดำในสถานะที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันและเมทานอล พบว่า

1. เมื่อตรึงรูปเอนไซม์อิสระบนซีไลต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปเท่ากับ 38,736.017 ยูนิต/มล. หรือคิดเป็นร้อยละ 58.68 ของเอนไซม์อิสระ
2. ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันสบู่ดำและเมทานอล คือที่ปริมาณน้ำร้อยละ 5 ของน้ำหนักเอนไซม์ จะให้ปริมาณกรดไขมันอิสระมากที่สุด
3. เมื่อหาอัตราส่วน โมลระหว่างน้ำมันสบู่ดำต่อเมทานอล พบว่าที่อัตราส่วน 4:1 โมล จะให้ปริมาณของกรดไขมันอิสระมากที่สุด
4. จากการเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากการใช้น้ำมันอิสระและเอนไซม์ตรึงรูปที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เท่ากันนั้น เอนไซม์ตรึงรูปจะให้ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้นมากกว่าเอนไซม์อิสระ
5. เมื่อนำเอนไซม์ตรึงมาใช้ในกระบวนการหมักครั้งที่ 2 พบว่าปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้ลดลงเกือบร้อยละ 50 ของการหมักครั้งแรก และเมื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการนำไปใช้ครั้งที่ 3 พบว่าค่ากิจกรรมลดลงมาก จึงไม่สมควรนำไปใช้ครั้งต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ก่อนทำการตรึงรูปเอนไซม์ ควรหาอัตราส่วนของซีไลต์และเอนไซม์ว่าที่อัตราส่วนเท่าใดจะให้ประสิทธิภาพในการตรึงมากที่สุด
2. ในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ ควรหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการตรึงมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา บุญเกียรติ และสุกัญญา มากมี. 2544. ไบโอดีเซล. *วารสารวิทยาศาสตร์* เล่ม3 (พฤษภาคม-มิถุนายน 2544) หน้า 257-280.
- เฉลิมพร ณ พัทลุง. 2549. ไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดคางพาราและการประยุกต์ใช้งาน. โครงการพิเศษวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเครื่องกล บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นิรนาม. 2549. ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร จังหวัดชัยนาท (จักรกลเกษตร). [Online]. Available : <http://www.crma.ac.th>.
- ธนาทิพย์ อัสวผดุงสิทธิ์. 2547. การสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มเมล็ดในและเอทานอลด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บัวห่ม อุดมทรัพย์. 2548. การศึกษาการสังเคราะห์เอทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มดิบและไขปาล์มสเตียรินด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปราณี อานเป็ร้อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิชญ รัตนรักษ์. 2541. การทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger* บนขี้เถ้าแกลบในตัวทำละลายอินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- พิสมัย เจนวนิชปัญญากุล. 2544. ไบโอดีเซล: พลังงานทางเลือก. [Online]. Available : [http:// www.tistr.or.th](http://www.tistr.or.th).
- รพีพันธุ์ ภาสบุตร, สุขสันต์ สุทธิผลไพบุลย์, วีระศักดิ์ อนันบุตร, มาลี ประภาวัต, วิไล กาญจนภูมิ, ไพจิตร จันทรวงศ์ และ อรวรรณ หวังดิษฐรม. 2525. เติบโตด้วยน้ำมัน "สบู่ดำ". หน้า 43.
- রাইফ সিরিনগুল. 2535. কেমিওথেরীয়েংদন. পিম্পক্রুংতী 10. মহাবিদ্যালয়রামকামহেং. নুনা 119-158.
- สุปรียา สุขเกษม. 2547. การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ: น้ำมันสบู่ดำ. [Online]. Available:[http:// www.doa.go.th](http://www.doa.go.th).
- อาภาณี เหลืองนฤมิตชัย. 2550. ไบโอดีเซล. วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [Online]. Available: <http://www.eduzoncs.com>.

- อารี ฤทธิบุรณ์. 2548. ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์. ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อนวัช ดุรงค์ภินนท์. 2547. การสังเคราะห์น้ำมันดีเซลชีวภาพในเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อ. วิทยานิพนธ์ สาขาวิศวกรรมปิโตรเคมี บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Blow D. M., Birktoft J. J. and Hartley B. S., 1969. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*. 221: 337-340.
- Brockerhoff H. 1968. Substrate specificity of pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*. 159: 296-303.
- Dordick J. S. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 194-211.
- Fu X., Zhu X., Gao K. and Duan J. 1995. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *JAOCS*. 72: 527-531.
- Fukada H., Kondo A., and Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. and Bioeng.* 92: 405-416.
- Ghazali H. M., Hamidah S. and Man Y. B. C. 1995. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. *JAOCS*. 72: 633-639.
- Gorman L. A. S. and Dordick J. S. 1992. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. and Bioeng.* 39: 392-397
- Horiuti Y. and Imamura S. 1978. Stimulation of *Chromobacterium* lipase activity and prevention of its adsorption to palmitoyl cellulose by hydrophobic binding of fatty acids. *J. Biochem.* 83: 1381-1385.
- Kazlauskas R. J. 1994. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases : prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends in Biotechnol.* 12: 464-472.
- Kimura Y., Anaka A., Sonomoto K., Nihira, T. and Fukui S. 1983. Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. *J. App. Microb. Biotechnol.* 17:107-112.
- Lesuisse E., Schanck K. and Colson C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216: 155-160.
- Ma F., Hanna M. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour. Techno* 70:1-15.

- Macrae A. R. 1983. Lipase-catalyzed inter esterification of oils and fats. *JAOCS*. 60:291-294.
- Macris J. B., Kourentzi E. and Hatzinikolaou D. G. 1996. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 31: 807-812.
- Malcata F. X., Reyes H. R., Garcia H. S., Hill C. G. and Amundson C. H. 1990. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *JAOCS*. 67: 890-910.
- Masaru K., Taichi S., Takeshi M., Kazuhiro B., Akhiko K., Yuji S., Hideo N., Fumiki N., Koutaro O. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water containing system without organic solvent. *J. Biosci. and Bioeng.* 88 (6): 627-631.
- Mohamed M.S., Uwe T. B. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 97-103.
- Mustranta A. 1992. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *App. Microb. Biotechnol.* 38: 61-66.
- Noureddini H., Gao X., Philkana R S. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour Technol.* 96:769-77.
- Schrag J. D., Li Y., Wu S. and Cygler M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature.* 351: 761-764.
- Schuchardt U., Sercheli R. and Vargas R.M. 1998. Transesterification of vegetable oil : a review. *J. Braz-chem.Soc.* 9: 199-200.
- Semeriva M., Chapus C., Lapierre C.B. and Desnuelle P. 1974. On the transient formation of an acetyl enzyme intermediate during the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate by pancreatic lipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 808-813.
- Shuo F.C., Shu W.C., Yue H.Y., Chwen J.S. 2007. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Appl. Clay Sci.* 37: 67-73.
- Shweta S., Munishwar N.G. 2007. Lipase catalyzed preparation of biobiesel from *Jatropha* oil in solvent free system. *Process Biochem.* 42: 49-414.
- Sugihara A., Tani T. and Tominaga Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J. Biochem* 109:211-216.
- Svendsen A. 1994. Sequence comparisons within the lipase family. In, Lipases: their structure, biochemistry and application, Edited by Woolley, P. and Petersen, S.B., Cambridge,

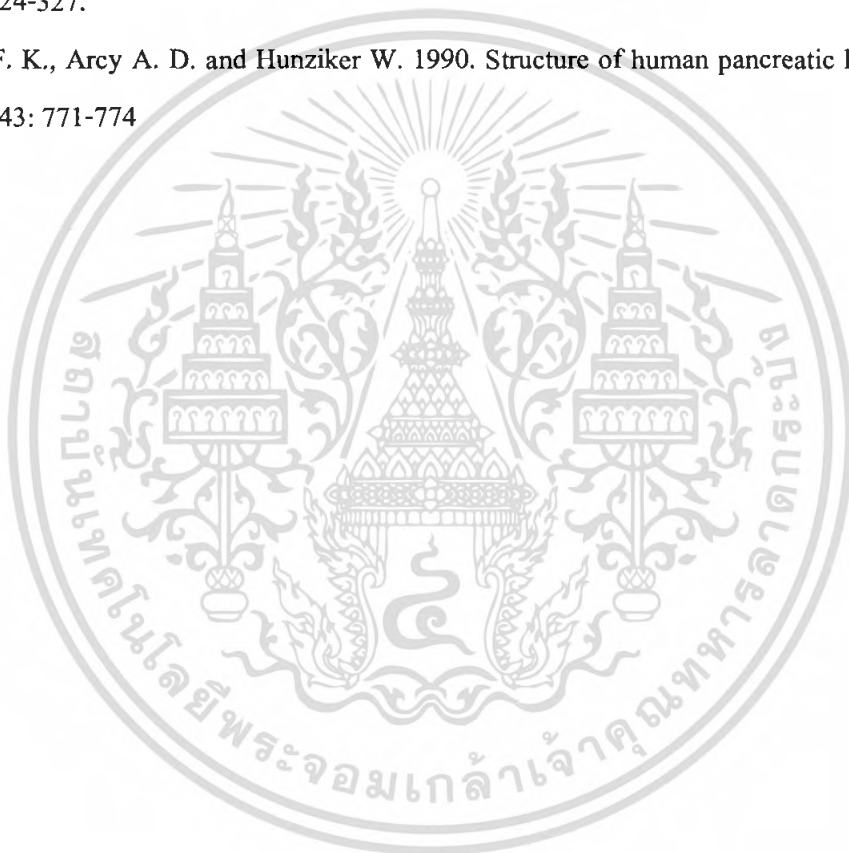
Cambridge University Press, pp. 1-21.

Tanaka Y., Hiran J. and Funada T. 1992. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *JAOCS*. 69: 1210-1214.

Tsai S.W. and Wei H.J. 1994. Enantioselective esterification of racemic naproxen by lipases in organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 328-333.

Virto M. D., Lascaray J. M., Solozabal R. and Renobales M. D. 1991. Enzymic hydrolysis of animal fats in organic solvents at temperatures below their melting points. *JAOC* . 68: 324-327.

Winkler F. K., Arcy A. D. and Hunziker W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*. 343: 771-774



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Stoll and Blanchard, 1990)

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้ค่ากรดต่างที่ต้องการ

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย NaH_2PO_4 27.8 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัมหรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย ก (x) ผสมกับสารละลาย ข (y) เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร (อารี, 2548)

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงการผสมกันระหว่างสารละลาย ก และสารละลาย ข ให้ได้ค่ากรดต่างตามที่ต้องการ

X	Y	ค่ากรดต่าง	X	Y	ค่ากรดต่าง
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

2. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Hoshiro และคณะ, 1992)

การเตรียมสารละลาย :

สารละลาย A : ละลายพาราไนโตรฟีนิลปลัลมิเตรท (p-NPP) 30 มิลลิกรัม ใน 2-โพรพานอลให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลายไตรคอนเอ็กซ์-100 400 มิลลิกรัม และกัมอาราบิก 100 มิลลิกรัม ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่ค่ากรดต่าง 8 ให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

สารละลาย C : ละลาย โซเดียมคาร์บอเนต 211.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ที่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย D (เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 90 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้) นำไปป่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนิล

กำหนด : ยูนิทของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยา การย่อยสลายพาราไนโตรฟีนิลปลัลมิเตรทให้พาราไนโตรฟีนิล 1 ไมโครโมล ในสภาวะที่ทดสอบ

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของเอนไซม์ก่อนการตรึงรูป (เอนไซม์อิสระ)

ค่าการเจือจาง	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1000x	2.222	2.190	2.194	2.202
3000x	0.847	0.866	0.851	0.854
4500x	0.690	0.662	0.678	0.677
6000x	0.530	0.461	0.530	0.507

สูตรการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{พาราไนโตรฟีนิล (}\mu\text{g/ml)} \times \text{ค่าการเจือจาง (unit/ml.)}}{\text{มวลโมเลกุลของพาราไนโตรฟีนิล} \times \text{เวลาที่ป่ม} \times \text{ปริมาณเอนไซม์(ml)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายพาราไนโตรฟีนอลให้พาราไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมล ในสถานะที่ทดสอบ

การคำนวณ

นำค่าเฉลี่ยที่ $6,000x$ ไปแทนค่าสมการของกราฟมาตรฐานพาราไนโตรฟีนอล (แสดงในภาคผนวก ข) ผลปรากฏว่ามีปริมาณพาราไนโตรฟีนอลเท่ากับ 2290.5454 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระโดยนำไปแทนในสูตรข้างต้น

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ} &= \frac{2290.545 (\mu\text{g/ml.}) \times 6000}{139.1 \times 15 \times 0.1(\text{ml.})} \\ &= 66,008.742 \quad \text{ยูนิต/มล.} \end{aligned}$$

3. การหาปริมาณกรดไขมันอิสระ (อนวัช, 2547)

การหาปริมาณกรดไขมันอิสระตามวิธี American Oil Chemists' Society.ca 5a-40 (AOCS.ca 5a-40)

3.1 สารเคมีที่ใช้

1. เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล (0.1 N NaOH)
2. สารมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต 0.1 นอร์มอล

(0.1 N KHP)

3. เตรียมเอทานอลที่เป็นกลาง (Neutere ethanol) นำเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่สะอาดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่แห้ง เดิมพีนอลล์ฟาทาลีน 4 หยด ให้ความร้อนแล้วทำการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีชมพู

4. หาค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยการไทเทรตด้วยสารมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต

น้ำหนักโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร

น้ำหนักสารมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต 2.020 กรัม ใน

สารละลาย 100 มิลลิลิตร

ไทเทรตสารมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต 10 มิลลิลิตร ด้วย

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

ดวงเอทานอลที่เป็นกลาง 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำมันอยู่ 56.4 กรัม พร้อมกับเติมฟีนอล์ฟทาลีน 2 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีชมพู บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไป

ตัวอย่างการคำนวณ

การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตสารละลาย

มาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลด

ครั้งที่	ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มล.)
1	9.50
2	9.60
3	9.50
เฉลี่ย	9.53

การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

$$\text{mol NaOH} = \text{mol KHP}$$

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

$$M_1 (9.53) = (0.1)(10)$$

$$M_1 = 0.105$$

ดังนั้นความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 0.105 N

การหาปริมาณกรดไขมันอิสระ

น้ำหนักของน้ำมันสุญค่าที่ใช้หาปริมาณกรดไขมันอิสระ 20 กรัม

ตารางภาคผนวกที่ 4 ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรตกรดไขมันอิสระ

ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการไทเทรต (มล.)	ปริมาณกรดไขมันอิสระ	
	กรดโอเลอิก(%)	กรดปาล์มมิติก(%)
60.0	9.76	8.86
63.6	10.34	9.39
61.5	10.01	9.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระ ดังสมการ

$$\text{ปริมาณกรดโอเลอิก, \%} = \frac{VxNx28.2}{M}$$

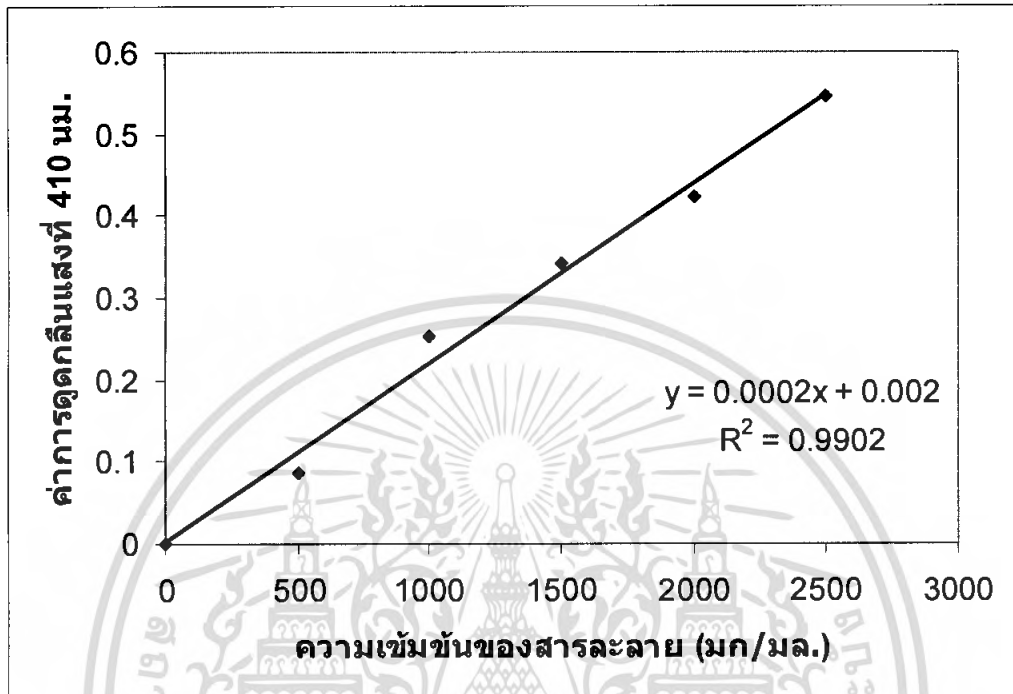
$$\text{ปริมาณกรดปาล์มมิติก, \%} = \frac{VxNx25.6}{M}$$

- เมื่อ V คือ ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
 N คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)
 M คือ น้ำหนักของตัวอย่างน้ำมัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



รูปภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราโนโดรเฟนอลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1000, 1500, 2000, และ 2500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณของน้ำที่ใช้
ในปฏิกริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันในรูปของกรดไขมันอิสระ โอเลอิกและ
ปาล์มมิติก ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

กรดโอเลอิก

WATER	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
7.5%	3	2.9500			
0%	3		5.0600		
2.5%	3			6.1667	
5%	3				7.0667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

กรดปาล์มมิติก

WATER	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
7.5%	3	2.7233			
0%	3		4.6500		
2.5%	3			5.6100	
5%	3				6.4567
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้