การผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

Biodiesel production by transesterification using free enzyme and immobilized enzyme

นภาทิพย์ ปรางทอง[1] สุภาพร บุญสาน[1] ตริตาภรณ์ กาญจนากร[1] สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา[2] และ ปิยาภรณ์ สุภัคดำรงกุล[1*]

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Napathip Prangthong[1], Supaporn Boonsarn[1], Tritaporn Kanjanakorn[1], Sureeporn Homvisasevongsa[2] and Piyaporn Supakdamrongkul[1*]

Division of Biological Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samutprakarn 10540

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสและการผลิตไบโอดีเซลจากแบคทีเรีย จำนวน 3 ไอโซเลต คือ GS-4, WWSC-2 และ HCUC9-2 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด เพื่อนำไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสำหรับการผลิตไบโอดีเซล สำหรับการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต GS-4, WWSC-2 คือ พีเอช 7 สำหรับ HCUC9-2 คือ พีเอช 9 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต GS-4 และ WWSC-2 มีเสถียรภาพในช่วงพีเอช 6-8 สำหรับ HCUC9-2 มีเสถียรภาพในช่วงพีเอช 7-9 รวมทั้งอุณหภูมิในช่วง 40-50 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อมีสารลดแรงตึงผิว แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเมทานอลและเฮกเซนจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย จากการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้และน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้ว โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ในอัตราส่วนโดยโมลระหว่างน้ำมันปาล์มต่อเมทานอล คือ 1:5 และมีการเติมเป็นช่วง (น้ำมันปาล์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:1) ที่เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมง มีการเติมสารลดแรงตึงผิว Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และมีเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย (1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 7 (1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสัมผัส 24 ชั่วโมง จะส่งผลให้เกิดเมทิลเอสเทอร์ โดยพบการมีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานบน TLC chromatography และเมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ในสภาวะเดียวกัน พบว่าไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์เนื่องจากไม่พบการมีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานบน TLC chromatography

คำสำคัญ: การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ กิจกรรมเอนไซม์ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ไบโอดีเซล

Corresponding author: junejungko@gmail.com

Abstract

The focus of this study was on characterization of an extracellular lipase and optimization of biodiesel production from three bacterial isolates GS-4, WWSC-2 and HCUC9-2 that exhibited the highest lipase activity. The lipase enzymes from isolates GS-4 and WWSC-2 and HCUC9-2 were used for biodiesel production through the chemical reaction transesterification. The optimum pH and temperature for the enzyme activity of isolates GS-4 and WWSC-2 were pH 7 and 45°C and isolate HCUC9-2 were pH 9 and 45°C, respectively. The lipase enzymes from isolates GS-4 and WWSC-2 isolates were stable in the pH ranging from 6-8 and at 40-50 and 40-45°C for 1 hour and the lipase enzymes from isolate HCUC9-2 was stable in the pH ranging from 7-9 and at 40-50°C for 1 hour, respectively. Higher activity was observed in the presence of surfactant and the enzyme activity was a little inactive toward methanol and hexane. Study on the production of biodiesel from palm oil and used palm oil to produce methyl ester was investigated. The conditions in the production of methyl ester were optimized as follow; mole ratio of palm oil and methanol 1: 5, feed of methanol was carried out step by step (approximately 1:1 in a molar ration of methanol to oil) at 3, 6 and 9 hours, surfactants (0.01% Tween 80) and hexane as solvent (1:1 by weight per volume), 0.1 M phosphate buffer solution pH 7 (1:2 by weight per volume) at 45°C for 24 hours. The results showed that free lipases from all isolates could catalyze transesterification. Methyl ester was detectable in TLC plate. On the contrary, immobilized enzyme from isolates GS-4, WWSC-2 and HCUC9-2 also catalyze transesterification with non of methyl ester was presented in TLC plate.

Keywords: Characterization, Enzyme activity, Transesterification, Biodiesel

บทนำ

ไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันดีเซลที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีสมบัติในการเผาไหม้ที่ดีไม่ต่างจากน้ำมันดีเซล การผลิตไบโอดีเซลเกิดจากปฏิกิริยาเคมีเรียกว่าทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากกรดไขมันในน้ำมันที่ได้จากพืช ไขมันจากสัตว์ กับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอทานอล เมทานอล และบิวทานอล และมีด่างหรือกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลผลิตเป็นอัลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) หรือไบโอดีเซล และผลิตภัณฑ์พลอยได้เป็นกลีเซอรอล [1] ทั้งนี้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในกระบวนการดังกล่าวทำให้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องด้วยต้องใช้อุณหภูมิสูงเพื่อทำให้การผลิตไบโอดีเซลได้อย่างรวดเร็ว และต้องใช้พลังงานสูงเพื่อให้ผลผลิตสูง นอกจากนี้การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีโดยเฉพาะตัวเร่งที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะมีข้อเสีย ได้แก่ ใช้ต้นทุนในการผลิตสูง เนื่องจากต้องใช้พลังงานความร้อน (60-70 องศาเซลเซียส) ในการเกิดปฏิกิริยา เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ยาก และในสภาวะที่ใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาส่วนประกอบที่เป็นกรดไขมันอิสระและน้ำจะรบกวนการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยอาจเกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (saponification) ร่วมด้วย ซึ่งจะได้สารผลิตภัณฑ์เป็นสบู่ [2] จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพมาใช้แทนตัวเร่งทางเคมี เช่น เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซล

ปัจจุบันจึงมีการค้นคว้าวิจัยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหลายประการ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์

ชนิดหนึ่งที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ โดยเฉพาะจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย รา และยีสต์ การผลิตไบโอดีเซลโดยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพนับเป็นกระบวนการใหม่ที่เป็นที่สนใจอย่างยิ่ง วิธีการนี้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมไม่ต้องใช้พลังงานมากเนื่องจากเกิดขึ้นในสภาวะอุณหภูมิปกติทั่วไป ส่วนกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันไม่สร้างปัญหาใด ๆ ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นจะอยู่ในรูปเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ จึงสามารถแยกออกมาจากไบโอดีเซลได้ง่าย และสามารถใช้ประโยชน์ต่อไปโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งแตกต่างจากกระบวนการผลิตโดยการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ประโยชน์ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ในกระบวนการที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเพื่อการผลิตไบโอดีเซล ยังสามารถรักษาสภาพของวิตามินอีที่มีอยู่ในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันปาล์มที่มีอยู่ในปริมาณสูงไม่สูญสลาย ซึ่งสามารถแยกออกมาใช้ประโยชน์ได้และมีมูลค่าสูง ในขณะที่สารเหล่านี้ถูกทำลายโดยความร้อนในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ไบโอดีเซลยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมในเรื่องของมลพิษทางอากาศเพราะเป็นเชื้อเพลิงสะอาด สามารถลดการปล่อยก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะโลกร้อน เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์และไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น และที่สำคัญไบโอดีเซลเป็นเชื้อเพลิงที่ปราศจากก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ [3] อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในการผลิตไบโอดีเซลยังมีประเด็นที่ต้องทดลองวิจัยและพัฒนาอีกมากมาย เช่น จะทำอย่างไรให้เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้ได้ผลผลิตสูงสุด ทำอย่างไรให้ราคาของเอนไซม์ลดลงจนเป็นที่พอใจที่จะสามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ และการพัฒนากระบวนการผลิตจากการเร่งปฏิกิริยาชีวภาพอย่างประหยัดด้วยต้นทุนที่สามารถแข่งขันกับกระบวนการทางเคมีหรือวิธีอื่น ๆ ได้

ไลเปสถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1856 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Claude Bernard โดยเอนไซม์นี้พบในสารที่ขับออกจากตับ (pancreatic juice) ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) โดยมีชื่อเรียกตามระบบ systematic name ว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสหรือตามระบบตัวเลข (code or number system) คือ EC 3.1.1.3 [4] จัดอยู่ในกลุ่มของ carboxylic ester hydrolases ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ hydrolysis และ synthesis ของ long-chain acylglycerols เอนไซม์ไลเปสมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติและผลิตออกมาภายนอกเซลล์จากแบคทีเรีย เอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด การผลิตสารเคมี การทำกระดาษ อุตสาหกรรมรมยา และการผลิตไบโอดีเซล [5]

เอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความคงตัวต่ำกว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีความคงตัวสูงกว่าและสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเร็ว การควบคุมการผลิตทำได้ง่าย และคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังมีคุณสมบัติที่คงทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด ทั้งนี้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นพบได้ทั้งเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์และขับออกนอกเซลล์ [6] ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อยหรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้ถูกสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำไลเปสให้บริสุทธิ์ [7] ด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรท จึงมีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งเป็นหนึ่งในพลังงานทดแทนทางเลือกยุคใหม่ที่สังเคราะห์ได้จากไขมันสัตว์และพืชน้ำมันชนิดต่าง ๆ เช่น ดอกทานตะวัน ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน มะพร้าวน้ำมันคาโนล่า และเมล็ดสบู่ดำ รวมทั้ง

แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เมทานอล เอทานอล และบิวทานอล เป็นต้น โดยใช้ปฏิกิริยาเคมีที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน และมีการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งมีความสามารถในการทำปฏิกิริยาที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ไม่รุนแรง และที่อุณหภูมิไม่สูงมากนัก [8]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4, WWSC-2 และ HCUC9-2 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง ผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิลได้ ซึ่งการผลิตไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน จะทำการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้และน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้ว และนำผลผลิตที่คาดว่าจะเป็นไบโอดีเซลมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography: TLC)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารละลายโปรตีน

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่เติมน้ำมันมะกอกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 60 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว นำเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธี dialysis และนำตัวอย่างสารละลายโปรตีนมาทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

ทำการวัดกิจกรรมของไลเปสตามวิธี photometric assay [9] โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) เป็นสับสเตรท และทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 หน่วย (ยูนิต) มีค่าเท่ากับ *p*-nitrophenol ถูกผลิตออกมาในปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ได้ทำการวิเคราะห์

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

3.1 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 4-10 ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ substrate solution ที่มีการเตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 4-10 ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที เติม substrate solution ที่มีบัฟเฟอร์ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ substrate solution ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับบัฟเฟอร์ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเติม substrate solution ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารลดแรงตึงผิว 10 ไมโครลิตร และเติม substrate solution ที่มีบัฟเฟอร์ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 940 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3.6 ผลของปริมาตรเมทานอลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เตรียมเมทานอลปริมาตรต่าง ๆ ได้แก่ 150, 200, 250, 300 และ 350 ไมโครลิตร ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 150 ไมโครลิตร กับเมทานอลที่ปริมาตรต่าง ๆ และเติม substrate solution ที่มีบัฟเฟอร์ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 700, 650, 600, 550 และ 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3.7 ผลของปริมาตรเฮกเซนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เตรียมเฮกเซนปริมาตรต่าง ๆ ได้แก่ 250, 500, 750, 1,000 และ 1,250 ไมโครลิตร ผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 75 ไมโครลิตร กับเฮกเซนที่ปริมาตรต่าง ๆ และเติม substrate solution ที่มีบัฟเฟอร์ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดจากการทดลองที่ 3.1 ปริมาตร 1,175, 925, 675, 425 และ 175 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่า OD_{410} ในแต่ละชุดการทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

4. การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยไคโตซาน [10]

4.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ

ชั่งไคโตซาน หนัก 0.2 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข็มฉีดยาที่มีหัวเข็มขนาด 24G (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 0.55 มิลลิเมตร) ทำการกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายผสมได้ไคโตซานที่มีลักษณะเป็นเม็ดมีรูพรุน จากนั้นชั่งเม็ดไคโตซาน หนัก 2

กรัม และเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (เตรียมโดยเจือจางเอนไซม์ไลเปสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยนำไปผ่านการกรองด้วยผ้าขาว ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

4.2 วิธีการห่อหุ้ม

ชั่งไคโตซาน หนัก 0.1874 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเตรียมสารละลายเอนไซม์ ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นผสมไคโตซาน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลายเอนไซม์ไลเปส ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกวนผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข็มฉีดยาที่มีหัวเข็มขนาด 24G และกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายโซเดียมไตรโพลิฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.136 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

5. การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต

ทำการเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปสลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และผสมเข้าให้กัน นำสารละลายผสมใสในหลอดเข็มฉีดยา แล้วกดให้ของเหลวหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที จึงนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป

6. การผลิตไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) จากเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปโดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้และน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้ว [ดัดแปลงจาก พุฒิพัฒน์ [11]; เกศกนก และศิริพร [12]

ใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปต่อการผลิตไบโอดีเซล โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:5 โมลต่อโมล และมีการเติมเมทานอลเป็นช่วง (น้ำมันปาล์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:1) ที่เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมง เติมเฮกเซน 1:1 โดยน้ำหนัก เติมสารลดแรงตึงผิว Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 อัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลาสัมผัส 24 ชั่วโมง นำผลผลิตที่คาดว่าจะเป็นไบโอดีเซลมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) โดยเทคนิค TLC จะใช้ระบบตัวทำละลาย คือ ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 และใช้ Pet's reagent เป็นรีเอเจนต์ทดสอบ

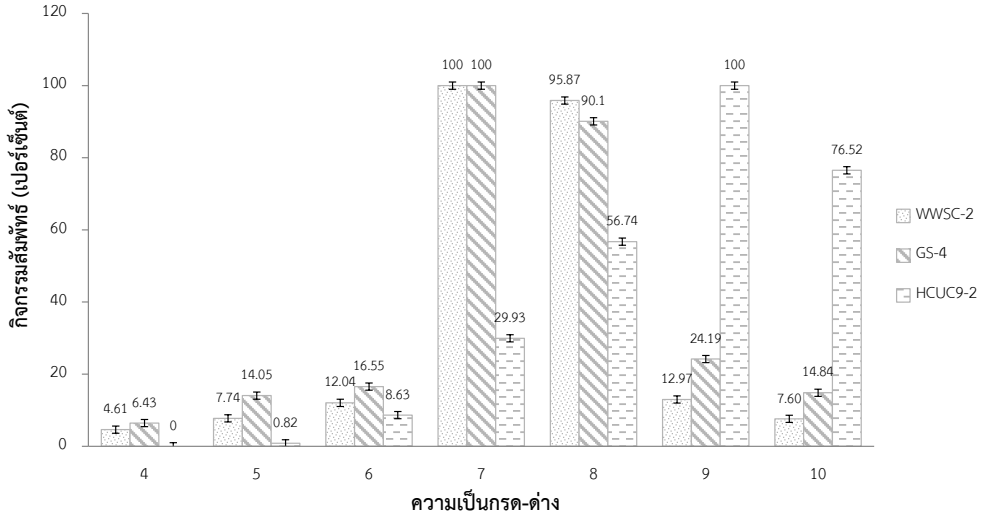
ผลการวิจัย

1. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

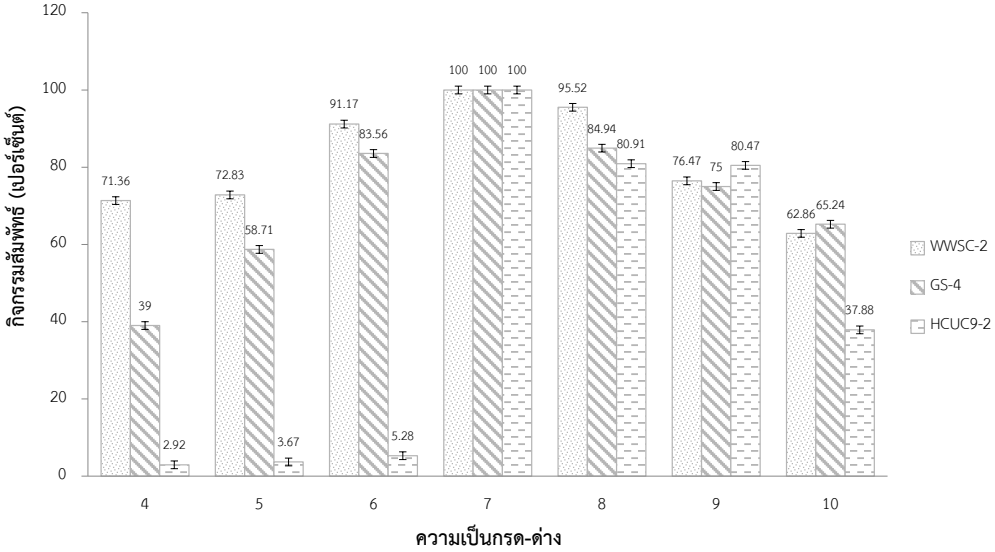
1.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 4-10 พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 และ GS-4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าพีเอช 7 และเอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงพีเอช 6-8 ตามลำดับ โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงอยู่ในช่วง 91.17-100.00 เปอร์เซ็นต์ และ 83.56-100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเอนไซม์ไลเปสจาก

แบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าพีเอช 9 และเอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงพีเอช 7-9 โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงอยู่ในช่วง 80.47-100.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1 และ 2)



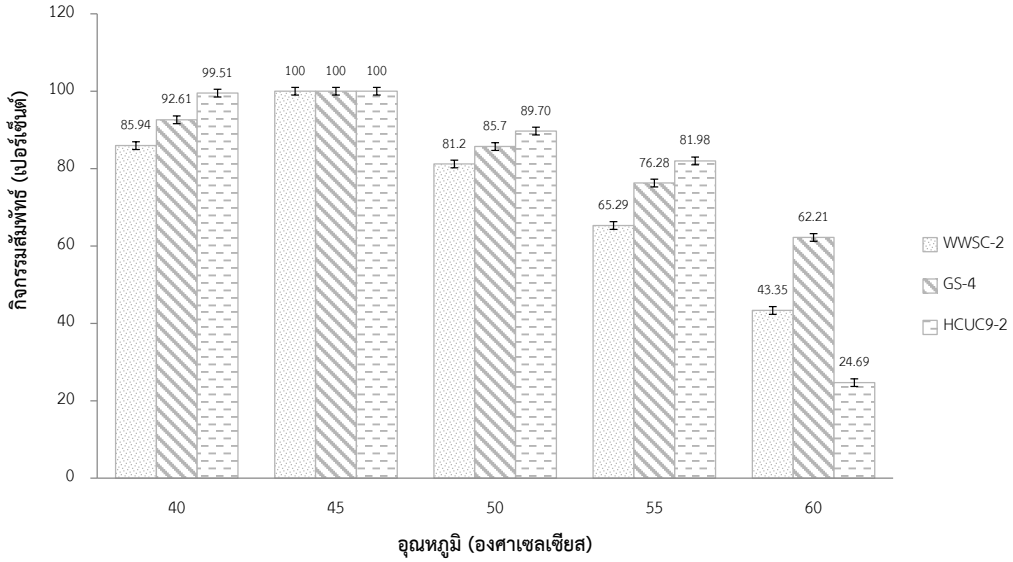
ภาพที่ 1 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์



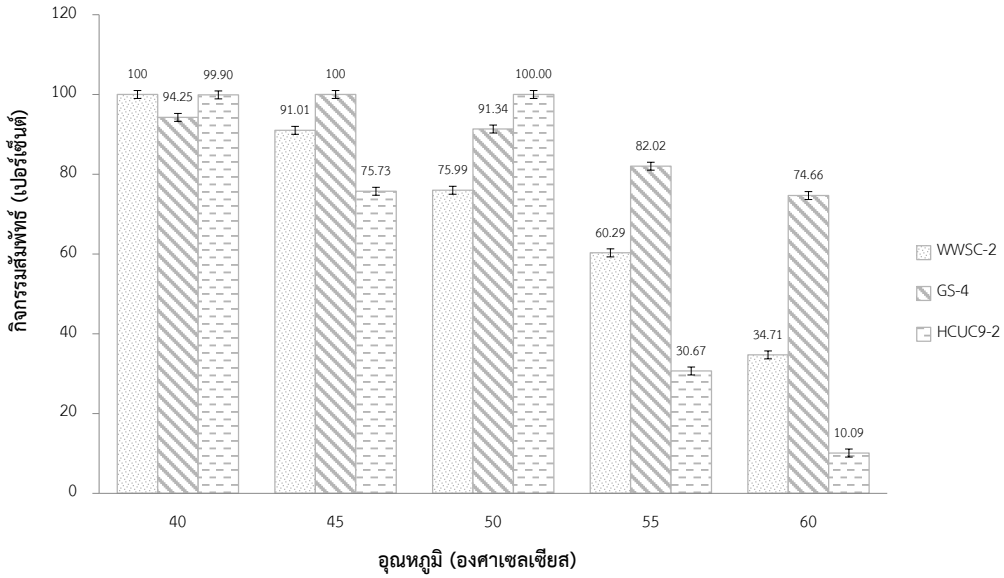
ภาพที่ 2 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์

1.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิช่วง 40-60 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุด รองลงมาคือ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3) และพบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิช่วง 40-45 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเอนไซม์ไลเปสยังมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงอยู่ในช่วง 91.01-100.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4 พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุด รองลงมาคือ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3) และพบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิช่วง 40-50 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ไลเปสยังมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงอยู่ในช่วง 91.34-100.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) และเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุด รองลงมาคือ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3) และพบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิช่วง 40-50 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ไลเปสยังมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงอยู่ในช่วง 75.73-100.00 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์



ภาพที่ 4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์

1.3 ผลของปริมาณเมทานอลที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาผลของปริมาณเมทานอลที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยทำการศึกษาปริมาณของเมทานอลที่ปริมาตร 150-350 ไมโครลิตร พบว่าปริมาตรเมทานอลที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสลดลง และยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 มีเสถียรภาพต่อเมทานอลสูงเป็นอันดับแรก รองลงมาคือ เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4 และ WWSC-2 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของปริมาณเมทานอลที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2

ปริมาตรเมทานอล (ไมโครลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	WWSC-2	GS-4	HCUC9-2
150	100.00±0.12	100.00±0.04	100.00±0.60
200	64.90±0.03	94.42±0.02	98.57±0.02
250	61.45±0.02	83.44±0.11	89.37±0.11
300	56.20±0.08	77.38±0.04	78.51±0.05
350	55.65±0.10	74.33±0.05	64.11±0.03

1.4 ผลของปริมาณเฮกเซนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาผลของปริมาตรเฮกเซนที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยทำการศึกษาปริมาตรของเฮกเซนที่ 250-1,250 ไมโครลิตร พบว่าปริมาตรเฮกเซนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสลดลง และยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนสูงเป็นอันดับแรก รองลงมาคือ เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4 และ HCUC9-2 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของปริมาณเฮกเซนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 และ GS-4

ปริมาตรเฮกเซน (ไมโครลิตร)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	WWSC-2	GS-4	HCUC9-2
250	100.00±0.02	100.00±0.07	100.00±0.08
500	98.72±0.08	95.96±0.02	88.49±0.12
750	91.18±0.12	86.36±0.19	54.13±0.23
1,000	87.01±0.04	80.97±0.03	25.48±0.75
1,250	77.32±0.62	60.72±0.01	19.51±0.96

1.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยสารลดแรงตึงผิวที่ทำการศึกษา คือ Triton X-100 และ Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิด ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น โดย Tween 80 ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการเติม Triton X-100 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2

สารลดแรงตึงผิว	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]		
	WWSC-2	GS-4	HCUC9-2
ชุดควบคุม[a]	100.00±0.05	100.00±0.01	100.00±0.03
Triton X-100	100.07±0.14	119.69±0.32	105.60±0.12
Tween 80	106.72±0.08	122.01±0.01	114.05±0.05

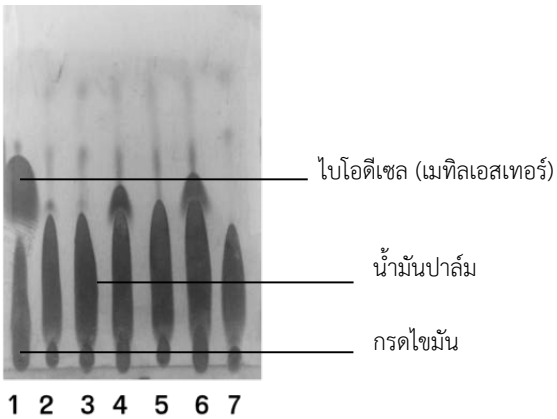
[a] ชุดควบคุม คือ สารผสมที่ไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

2. การผลิตไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันจากเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปโดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้และน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้ว

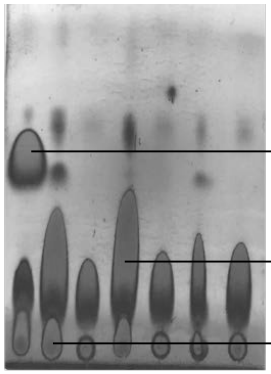
ในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากแบคทีเรียไอโซเลต จำนวน 3 ไอโซเลตคือ GS-4, WWSC-2 และ HCUC9-2 [12, 13] โดยในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้และน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้วนั้น ผลจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในการผลิตไบโอดีเซลได้ สังเกตได้จากตำแหน่งจุดของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 ตรงกับจุดของเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีโดยสภาวะที่เหมาะสม และผลจากการตรวจสอบเมทิลเอสเทอร์ด้วยเทคนิค TLC (ภาพที่ 5 และ 6)

จากการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ (ภาพที่ 7) และพบว่าเม็ดไคโตซานของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพมีการเปลี่ยนสภาพจากเม็ดเป็นลักษณะคล้ายวุ้นเหลว ทั้งนี้อาจเกิดจากประสิทธิภาพการตรึงรูปเอนไซม์ที่ยังไม่สมบูรณ์ และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเอนไซม์ เช่น สารละลายที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ การเตรียมสารละลายของตัวพยุง และวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ เป็นต้น สำหรับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยวิธีการห่อหุ้มไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ (ภาพที่ 8) เนื่องด้วยปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสมีปริมาณน้อย คือ 5.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตเมทิลเอสเทอร์ และพบว่าเม็ดไคโตซานของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยวิธีการห่อหุ้มยังคงขนาดเดิมและมีสีขาวขึ้น



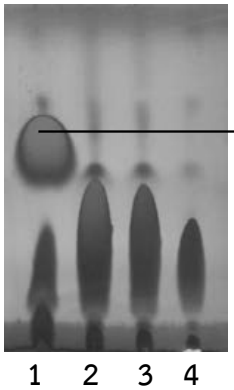
หมายเลข 1 คือ ไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี
หมายเลข 2 คือ ผลจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4
หมายเลข 3 คือ ชุดควบคุมที่ GS-4
หมายเลข 4 คือ ผลจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2
หมายเลข 5 คือ ชุดควบคุมที่ WWSC-2
หมายเลข 6 คือ ผลจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2
หมายเลข 7 คือ ชุดควบคุมที่ HCUC9-2

ภาพที่ 5 ผลการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้ของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4, WWSC-2 และ HCUC9-2 เปรียบเทียบกับไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)



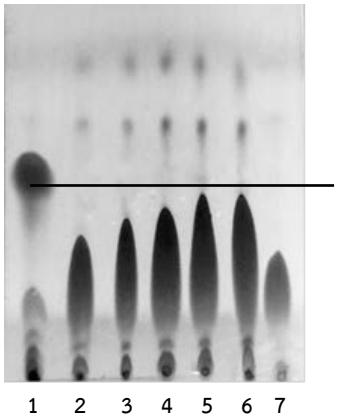
หมายเลข 1 คือ ไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี
หมายเลข 2 คือ ผลจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4
หมายเลข 3 คือ ชุดควบคุมที่ GS-4
หมายเลข 4 คือ ผลจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2
หมายเลข 5 คือ ชุดควบคุมที่ WWSC-2
หมายเลข 6 คือ ผลจากเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2
หมายเลข 7 คือ ชุดควบคุมที่ HCUC9-2

ภาพที่ 6 ผลการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้แล้วของเอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4, WWSC-2 และ HCUC9-2 เปรียบเทียบกับไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)



หมายเลข 1 คือ ไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี
หมายเลข 2 คือ เอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2
หมายเลข 3 คือ เอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 ผสมกับเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC 9-2 ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ
หมายเลข 4 คือ เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC 9-2 ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกาย ภาพ

ภาพที่ 7 ผลของการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เปรียบเทียบกับไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)



หมายเลข 1 คือ ไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี
หมายเลข 2 คือ เอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4
หมายเลข 3 คือ เอนไซม์ไลเปสอิสระจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2
หมายเลข 4 คือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยไคโตซานจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4
หมายเลข 5 คือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยไคโตซานจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2
หมายเลข 6 คือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยโซเดียมอัลจิเนตจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4
หมายเลข 7 คือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยโซเดียมอัลจิเนตจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2

ภาพที่ 8 ผลของการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต GS-4 และ WWSC-2 ด้วยวิธีการห่อหุ้ม เปรียบเทียบกับไบโอดีเซล (เมทิลเอสเทอร์) ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยศึกษาที่ช่วงพีเอช 4-10 พบว่าไอโซเลต WWSC-2 และ GS-4 เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 7 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และไอโซเลต HCUC9-2 เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 9 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Dharmsthiti และ Luchai [14] ที่ได้ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จาก *Bacillus* sp. THL 027 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 7 แต่ไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Lee และ Rhee [15] ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นจะมีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่กว้าง เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* putida 3SK มีเสถียรภาพในช่วงพีเอช 4.0-10.0

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่ากิจกรรมสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับกับการทดลองของ Joshi และ Khare [16] ซึ่งรายงานถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* ทำงานได้ดีอยู่ในช่วง 40 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต WWSC-2 มีเสถียรภาพอยู่ในช่วง 40-45 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต GS-4 และ HCUC9-2 มีเสถียรภาพอยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 โดยสารลดแรงตึงผิวที่นำมาทดสอบ คือ Triton X-100 และ Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองพบว่า สารลดแรงตึงผิวส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงขึ้นโดยสอดคล้องกับการทดลองของ Patel และคณะ [17] ซึ่งรายงานว่า Triton X-100 สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. DMVR46 ได้ แต่จากการรายงานวิจัยของ Park และคณะ [18] พบว่า SDS และ Triton X-100 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Acinetobacter baumannii* BD5 ลดลง

การศึกษาผลของปริมาณสารละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ เมทานอลและเฮกเซน ที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต GS-4, WWSC-2 และ HCUC9-2 พบว่าปริมาตรของเมทานอลและเฮกเซนที่เพิ่มขึ้น มีผลให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงแต่ลดลงไม่มากนัก โดยพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 มีเสถียรภาพต่อเมทานอลสูงเป็นอันดับแรก รองลงมาคือ เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4 และ WWSC-2 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ ปกรณ์ [19] โดยพบว่าปริมาตรเมทานอลที่เพิ่มขึ้นมากจะมีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ และมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมื่อศึกษาถึงผลของเฮกเซน พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนสูงเป็นอันดับแรก รองลงมาคือ เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต GS-4 และ HCUC9-2 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของดุษฎี [10] พบว่าเฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เมื่อเติมเฮกเซนลงในปฏิกิริยาจะไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างของเอนไซม์ แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อเติมเฮกเซนลงไปในปริมาณที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงแต่ลดลงในปริมาณที่น้อย

จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเบื้องต้น โดยใช้เอนไซม์ไลเปสไอโซเลต WWSC-2, GS-4 และ HCUC9-2 ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในสภาวะที่ประกอบด้วย น้ำมันปาล์มที่ยังไม่ผ่านการใช้หรือน้ำมันปาล์มที่ผ่านการใช้ต่อเมทานอล อัตราส่วน 1:5 โมลต่อโมล เฮกเซน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารลดแรงตึงผิว Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เวลาสัมผัส 24 ชั่วโมง โดยมีการเติมเมทานอลเป็นช่วง ๆ ที่เวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาทดสอบด้วยเทคนิค TLC ซึ่งพบการมีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานบน TLC ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ali และคณะ [20] ได้มีการใช้น้ำมันปรุงอาหารที่ใช้แล้ว (WCO) เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ ไลเปสอิสระ โดยมีการศึกษาปัจจัยทั้ง 4 ข้อ ได้แก่ ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน (โมลต่อโมล) ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ และความเร็วในการหมุน จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการให้ผลผลิตไบโอดีเซล (FAME) ให้ผลผลิตสูงสุดถึง 86 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 44.2 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างเมทานอลต่อน้ำมัน 3.05:1 โมลต่อโมล ปริมาณเอนไซม์ไลเปส 0.782 กรัม และความเร็วในการหมุน 170 รอบต่อนาที เวลาในการสัมผัสนาน 24 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อยืนยันความถูกต้องของแบบจำลองการใช้น้ำมันปรุงอาหารที่ใช้แล้ว (WCO) ในการผลิตไบโอดีเซล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลลงได้ และช่วยลดการใช้น้ำมันที่บริโภคแล้วได้โดยการนำมาผลิตไบโอดีเซล ดังนั้นการศึกษาในปัจจุบันจึงมีศักยภาพในทางปฏิบัติที่ดีในการทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลด้วยเชื้อเพลิงทดแทน (ไบโอดีเซล)

ในการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยวิธีห่อหุ้มจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 พบว่า ไม่มีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่นำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยามีความเข้มข้นของเอนไซม์น้อย (3.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งอาจไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้

อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปยังคงสภาพความเป็นเม็ดและมีสีขาวขึ้น และเมื่อนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพจากแบคทีเรียไอโซเลต HCUC9-2 มาทำการศึกษาพบว่า เกิดเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นการยืนยันถึงการเกิดเมทิลเอสเทอร์จากการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปไม่คงสภาพความเป็นเม็ดและมีสภาพเป็นวุ้นเหลว จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเบื้องต้น โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต WWSC-2 และ GS-4 พบว่า ไม่มีอยู่ของหมู่เมทิลเอสเทอร์ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่นำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยามีความเข้มข้นของเอนไซม์น้อย (5.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งอาจไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปยังคงสภาพความเป็นเม็ดและมีสีขาวขึ้น

ทั้งนี้ข้อเสนอแนะสำคัญในการพัฒนางานวิจัยทางด้านเอนไซม์ คือ การศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสกับสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมากยิ่งขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ เช่น ชนิดของตัวพยุง ขนาดของเม็ดและความเข้มข้นของเอนไซม์ และเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ ในด้านการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสำหรับผลิตเมทิลเอสเทอร์ คือ การศึกษาน้ำมันชนิดต่าง ๆ ที่ใช้เป็นสับสเตรทในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อทดสอบหาชนิดของน้ำมันที่ดีที่สุดในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ การคัดเลือกเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน การประยุกต์ใช้น้ำมันที่ผ่านการใช้แล้วมากกว่า 1 ครั้ง และแหล่งของน้ำมันแต่ละชนิด เช่น น้ำมันที่ใช้แล้วจากครัวเรือนหรือน้ำมันที่ใช้แล้วจากโรงงานอุตสาหกรรม ในการใช้เป็นสับสเตรทสำหรับผลิตเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนและนำของเสียกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์ รวมทั้งการวิเคราะห์ตัวอย่างจากปฏิกิริยาการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometry เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Luque R, Lovett JC, Clancy J, Campelo JM, Romero AA. Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. Energ Environl Sci 2010;3:1706-21.
2. Bharathiraja M, Chakravarthy R, Ranjith KD, Yuvaraj J, Jayamuthunagai PS. Biodiesel production using chemical and biological methods - a review of process, catalyst, acyl acceptor, source and process variables. J Renew Sustain Ener 2014;38:368-82.
3. Lu J, Vecchi G, Reichler T. 2007. Expansion of the hadley cell under global warming. Geophys Res Lett 2007;34:L06805.
4. Sarkar P, Yamasaki S, Basak S, Bera A, Bag PK. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. Process Biochem 2012;47:858-66.
5. Zheng J, Xu L, Liu Y, Zhang X, Yan Y. Lipase-coated K_2SO_4 micro-crystals: preparation, characterization, and application in biodiesel production using various oil feedstocks. Bioresour Technol 2012;110:224-31.
6. ปวีณา อร่ามรัตนา. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันดิบโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2548.

7. ณกัญภัทร จินดา. เอนไซม์ไลเปส: แหล่งและประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 2547;24(3):20-34.
8. ยุวเรศ เพ็งเจริญ, ผกาวดี แก้วกันเนตร. 2550. ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ: ทางเลือกใหม่ของการผลิตไบโอดีเซล. วารสารศูนย์บริการวิชาการ 2550;15(4):7-11.
9. Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. J Bacteriol 1991;173:4836-41.
10. ดุษฎี รัตนพระ. การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2549.
11. พุฒิพัฒน์ เบญจปรีชาพัฒน์. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนมอนต์มอริลโลไนต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ; 2555.
12. เกศกนก บุตดี, ศิริพร ยมรัตน์. การผลิตไบโอดีเซลโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์อิสระ. โครงงานพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. สมุทรปราการ; 2559.
13. กรพินธุ์ อำมาตยนู, ปาริฉัตร ฐากูรบุตร. การตรึงเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียและการประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. โครงงานพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. สมุทรปราการ; 2559.
14. Dharmsthiti S, Luchai S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. FEMS Microbiol Lett 1999;179:241-46.
15. Lee SY, Rhee JS. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas* putida 3SK. Enzyme Microb Technol 1993;15:617-23.
16. Joshi C, Khare SK. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled jatropha seed cake. Biocatal Agric Biotechnol 2012;2:32-7.
17. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science 2014;6190:1396-1401.
18. Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 2009;324:1068-71.
19. ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ. เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล. วารสารวิจัยพลังงาน 2554;8(2):61-72.
20. Ali CH, Qureshi AS, Mbadinga SM, Liu JF, Yang SZ, Mu BZ. Biodiesel production from waste cooking oil using onsite produced purified lipase from *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH-1: central composite design approach. Renew Energ 2017;109:93-100.