



การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Rhodotorula mucilagenosa* และการตรึงเซลล์
เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม

**Lipase Production by *Rhodotorula mucilagenosa* and Whole-Cell Immobilization
for Production of Palm Oil Biodiesel**

เอ็ม นูย์เลิร์ต

Aem Nuylert

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University**

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Rhodotorula mucilagenosa* และการตรึงเซลล์เพื่อใช้
ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นายเอ็ม น้อยเลิศ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรี)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณ หันพงษ์กิตติกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณ ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดย *Rhodotorula mucilagenosa* และการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นายเอ็ม น้อยเลิศ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

การหาสภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* โดยใช้แบบแผนการทดลองทางสถิติ Taguchi method ในการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสและปัจจัยที่ส่งผลการนำตัวเซลล์ยีสต์ไปเร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ซึ่งปัจจัยของน้ำมันปาล์ม แอมโมเนียมไนเตรทและกัมอะราบิก เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ยีสต์และส่งเสริมให้ตัวเซลล์ยีสต์มีการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเมื่อนำทั้ง 3 ปัจจัย มาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) พบว่า น้ำมันปาล์มเข้มข้น 2.10 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรท 0.20 เปอร์เซ็นต์ และกัมอะราบิก 0.45 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์สูงสุด เท่ากับ 41.50 หน่วยต่อกรัมเซลล์แห้ง โดยให้ปริมาณเซลล์แห้ง เท่ากับ 6.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นค่ากิจกรรมทั้งหมดของตัวเซลล์เท่ากับ 272.72 หน่วยต่อลิตร โดยเลี้ยงเซลล์ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ พบว่า ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นเป็น 92.98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดิมจาก 84.0 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะในการทำปฏิกิริยาเดียวกัน โดยเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ โอเลอิกเมทิลเอสเทอร์, ปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์, ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์และสเตียริกเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 40.12, 37.86, 11.11 และ 4.83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมเพื่อมาใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์แบบดูดซับโดยอาศัยการเลี้ยงร่วมในสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่า ฟองน้ำจากเส้นใยเซลลูโลสให้ปริมาณเซลล์ในการยึดเกาะสูงสุดและสามารถเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ โดยตัดให้มีรูปร่างขนาด $0.25 \times 0.5 \times 0.5$

เซนติเมตร มาเลี้ยงรวมในพลาสติกขนาด 500 มิลลิเมตรที่บรรจุอาหาร 200 มิลลิเมตร ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุพุงเท่ากับ 14.77 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุงและ 5.92 ยูนิต์ต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพุง ตามลำดับ เมื่อนำวัสดุที่ผ่านการตรึงเซลล์ดังกล่าวมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์ม พบว่า สภาวะที่มีน้ำมันปาล์มอัตราส่วนโมลต่อเมทานอล 1:12 เป็นสับสเตรท จะต้องใช้ปริมาณวัสดุที่ถูกตรึงเท่ากับ 2.0 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ในสภาวะที่มีน้ำในระบบ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ 16.50 เปอร์เซ็นต์

Thesis Title Lipase Production by *Rhodotorula mucilagenosa* and Whole-Cell Immobilization for Production of Palm Oil Biodiesel

Author Mr. Aem Nuylert

Major Program Biotechnology

Academic 2011

ABSTRACT

Rhodotorula mucilagenosa P11189 isolated from oil-contaminated soil was effectively used as the methanol-tolerant, whole-cell lipase for the synthesis of fatty acid methyl ester (FAME) *via* transesterification reaction with palm oil and methanol as substrates. Statistically-based experimental designs with the combination of Taguchi experimental design and response surface methodology were applied to systemically enhance the production of the whole-cell lipase or cell bound lipase (CBL) from *Rhodotorula mucilagenosa* P11189. The impact of four factors including carbon source, nitrogen source, surfactant and pH on production of CBL were evaluated using Taguchi design. Palm oil, NH_4NO_3 and gum arabic showed favorable conditions for CBL activity and transesterification synthetic activity. After analysis with screened by Taguchi design, concentrations of palm oil, NH_4NO_3 and gum arabic were selected for Central Composite Design (CCD). Maximal CBL activity of 41.50 U/g DCW and biomass concentration of 6.57 g/L (total CBL activity yield = 272.72 U/L) were obtained at 60 h of growth in the cultivation medium containing palm oil 2.1%, NH_4NO_3 0.2%, and gum arabic 0.45% with initial pH 5.0 at temperature of 30 ± 2 °C under shaking speed of 200 rpm. The optimized cells increased the synthesis of fatty acid methyl ester from 84.0% to 92.98% yield compared to cells cultivated in the initial medium, when the transesterification reaction was carried out for 72 h in the presence of palm oil and methanol (1:9 mole ratio). Major compositions of biodiesel were 40.12% oleic acid methyl ester, 37.86 % palmitic acid methyl ester, 11.11 % linoleic acid methyl ester and 4.83 % stearic acid methyl ester.

The co-immobilized cells with different biomass support particles (BSPs) were cultivated in 500 ml flasks containing 200 ml of optimized medium. The highest hydrolysis activity of immobilized cells was obtained in 3M cellulose sponge. Moreover, co-immobilization with 0.25×0.5×0.5 cm of 3M cellulose sponge 0.6 g yielded high cell contents of 14.77 mg dry cell/g BSPs with high hydrolysis activity of 5.92 U/g dry cell in BSPs. The maximum methyl ester production of 16.50 % was achieved, when the refined palm oil transesterification was carried out in the presence of refined palm oil and methanol at the mole ratio of 1:12 with 10% water (addition of 10 % phosphate buffer pH 7.0). The reaction was catalyzed using 2.0 g/g substrate of *Rhodotorula mucilagenosa* immobilized in 3M cellulose sponge (1.394 U of lipase activity) under vigorous shaking at 35 °C for 72 h.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(3)
ABSTRACT.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES.....	(9)
LIST OF FIGURES.....	(11)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	38
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ.....	39
วัสดุ อุปกรณ์.....	39
วิธีการวิเคราะห์.....	41
วิธีการทดลอง.....	45
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	53
1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	53
2. การคัดเลือกวัสดุพุงที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับ.....	77
3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์แบบดูดซับ.....	82
4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในการผลิตเมทิลเอสเทอร์.....	87
5. การนำเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลชีวภาพ...	92
4. สรุปผลการทดลอง.....	94
เอกสารอ้างอิง.....	96
ภาคผนวก.....	106
ภาคผนวก ก.....	107
ภาคผนวก ข.....	110
ประวัติผู้เขียน.....	117

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Comparison of biodiesel production between alkali-catalysis process and lipase catalysis process.....	5
2	The advantages and disadvantages of using lipases in transesterification....	7
3	Parameters and their levels employed in the Taguchi's experimental design.	32
4	L ₉ (3 ⁴) orthogonal array of Taguchi experimental design.....	32
5	Analysis of the results of the L ₉ (3 ⁴) orthogonal test.....	33
6	The Central Composite Design of independent variables.....	35
7	Factor and their levels employed in the Taguchi's experimental design for cell-bound lipase by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	46
8	L ₉ (3 ⁴) orthogonal array of Taguchi experimental design lipase production by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	46
9	The coded levels and real values of the independent variables in the response surface methodology.....	47
10	The Central Composite Design of the significant variables	47
11	L ₉ (3 ⁴) orthogonal array and results of Taguchi experimental design lipase production by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	54
12	Analysis of variance (ANOVA) for total cell bound lipase (CBL) production by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	57
13	Analysis of the results of Taguchi experimental design lipase production by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	59
14	The Central Composition Design of the significant variables (in coded levels), along with the responses (DCW, CBL yield and FAME).....	64
15	Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear, quadratic and cubic model of DCW, CBL yield and FAME	65
16	Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for DCW by cell cultures of <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	69

LIST OF TABLES (CONTINUE)

Table		Page
17	Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for CBL yield by cell cultures of <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	70
18	Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for percent FAME conversion by cell cultures of <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	71
19	Effect of different biomass support particle (BSP) for immobilization of whole cell of <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	79
20	Comparison of cultivation for cell concentration and hydrolysis activity.....	86
21	Qualitative compositions of fatty acid methyl ester in biodiesel.....	93

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The transesterification reactions of triglyceride with alcohol to FAME and glycerol.....	4
2	Comparison of lipase production processes for methanolysis with extracellular (a) and intracellular lipases (b).....	6
3	Schematic diagram of ROL maturation and localization in <i>Rhizopus oryzae</i> cells. Cleavage of pro-region	27
4	Schematic diagram of packed-bed reactor (PBR) system.....	28
5	Microscopic photographs of ultrasonication of reaction mixture on methanolysis reaction.....	29
6	Contribution of four factors on hydrolysis activity and methanolysis activity by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> in a submerged culture using Taguchi experimental design.....	62
7	Three dimension surface and contour diagram plots of DCW (g/L) as the function of palm oil and NH_4NO_3 (A) (gum arabic was kept constant at the optimum point), as the function of palm oil and gum arabic (B) (NH_4NO_3 was kept constant at the optimum point) and as the function of NH_4NO_3 and gum arabic (C) (palm oil was kept constant at the optimum point).....	72
8	Three dimension surface and contour diagram plots of CBL (U/L) as the function of palm oil and NH_4NO_3 (A) (gum arabic was kept constant at the optimum point), as the function of palm oil and gum arabic (B) (NH_4NO_3 was kept constant at the optimum point) and as the function of NH_4NO_3 and gum arabic (C) (palm oil was kept constant at the optimum point).....	73
9	Three dimension surface and contour diagram plots of FAME as the function of palm oil and NH_4NO_3 (A) (gum arabic was kept constant at the optimum point), as the function of palm oil and gum arabic (B) (NH_4NO_3 was kept constant at the optimum point) and as the function of NH_4NO_3 and gum arabic (C) (palm oil was kept constant at the optimum point).....	74

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure		Page
10	Effect of shaking speed on cell growth by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	76
11	Effect of shaking speed on cell bound lipase production by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	76
12	Methyl ester production by transesterification of catalyzed by <i>Rhodotorula mucilagenosa</i> cells cultivated in the optimal medium and IMY medium with lipase activity of 8.024 and 3.064 U/g substrate, respectively in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.....	77
13	Optical stereo (a) and optical microscopy 400x (b) of 1: sugarcane bagasse, 2: palm decanter and 3: Corn cobs.....	80
14	Optical stereo (a) and optical microscopy 400x (b) of 1: 3M Cellulose sponge, 2: poly(vinyl alcohol) chamois and 3: 3M polyurethane sponges.....	81
15	Effect of 3M Cellulose sponge size on cell concentration and hydrolysis activity.....	83
16	Effect of Poly(vinyl alcohol) Chamois size on cell concentration and hydrolysis activity.....	83
17	Effect of 3M Cellulose sponge containing on cell concentration and hydrolysis activity.....	84
18	Effect of 3M Poly(vinyl alcohol) Chamois containing on cell concentration and hydrolysis activity.....	85
19	Effect of amount of immobilized yeast cells in 3M cellulose sponge on methyl ester production.....	87
20	Effect of water on methyl ester production by transesterification catalyzed by immobilized yeast cells.....	89
21	Effect of temperature on methyl ester production by transesterification catalyzed by immobilized yeast cells.....	90
22	Effect of mole ratio of palm oil and methanol on methyl ester production by transesterification catalyzed by immobilized yeast cells.....	91
23	Standard curve of standard solution protein BSA analysis by Lowry method	111

LIST OF FIGURES (CONTINUE)

Figure		Page
24	Standard curve of dry cell weight between protein concentration.....	112
25	Retention time of standard glyceride and methyl esters.....	115

บทที่ 1

บทนำ

บทนำสั้นเรื่อง

จากสถานการณ์ปัจจุบันประเทศไทยมีความต้องการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงในปริมาณมาก โดยเฉพาะน้ำมันดีเซลใช้มากถึง 43 ล้านลิตรต่อวัน คิดเป็น 46.6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำมันที่ใช้ภายในประเทศ (<http://www.doeb.go.th/dbd/knowledge/bio-diesel2.htm>) มีสัดส่วนการใช้สูงกว่าน้ำมันเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ ในขณะที่พลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียมที่ได้จากซากฟอสซิล (fossil fuel) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญมีเหลืออยู่อย่างจำกัดและคาดว่าจะหมดไปในอีกไม่ช้านี้ ประกอบกับราคาน้ำมันได้มีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและความต้องการลดมลพิษเพื่อให้สิ่งแวดล้อมดีขึ้น จึงได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบภายในประเทศ เช่น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ น้ำมันพืชใช้แล้ว ฯลฯ มาผลิตเป็นไบโอดีเซลใช้แทนน้ำมันดีเซล การผลิตไบโอดีเซลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเชื้อเพลิงที่ใช้สำหรับเครื่องยนต์ โดยนำน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์มาทำปฏิกิริยาเคมีด้วยแอลกอฮอล์ที่เรียกว่า ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งอาจจะเป็นสารเคมีที่เป็นกรด (เอซิดคอะตะลิสต์) หรือสารเคมีที่เป็นเบส (อัลคาไลคอะตะลิสต์) แต่ปฏิกิริยาเคมีมีข้อจำกัดในการใช้เบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากหากใช้น้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ที่มีปริมาณของกรดไขมันอิสระมากและมีน้ำในปฏิกิริยาจะส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันได้เป็นผลิตภัณฑ์พวกสบู่ ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการทำบริสุทธิ์ไบโอดีเซลและการบำบัดน้ำเสียที่เกิดจากการทำบริสุทธิ์ อีกทั้งการนำกลีเซอรอลออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก จึงมีการนำเอนไซม์ไลเปสเข้ามาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าได้ผลดีกว่าเพราะได้ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์ในปริมาณสูงและนำกลีเซอรอลกลับคืนมาได้ง่าย ไม่เกิดปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันจากการที่มีกรดไขมันอยู่ในน้ำมันหรือไขมัน แต่กรดไขมันสามารถเปลี่ยนเป็นอัลคิลเอสเทอร์ได้อย่างสมบูรณ์ สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิห้อง จึงทำให้ประหยัดพลังงาน แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ค่อนข้างที่จะมีต้นทุนในการผลิตสูง เพราะต้องผ่านขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และผ่านการตรึงก่อนนำมาใช้ จึงทำให้มีการศึกษาหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะที่ตัวเซลล์ (cell bound lipase; CBL) และนำตัวเซลล์ไปเร่งปฏิกิริยาแทนการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ จะช่วยลดต้นทุนและขั้นตอนการผลิตไบโอดีเซลให้น้อยลง

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส นั้น มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ และในปัจจุบันในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มีการนำยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร สารซักฟอก ยารักษาโรค เครื่องสำอาง สิ่งทอ ฯลฯ เนื่องจากยีสต์เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนั้นเอนไซม์ไลเปสที่ยีสต์ผลิตได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาการสังเคราะห์ต่างๆ ซึ่งจากการคัดแยกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* เป็นยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะบริเวณผิวเซลล์ จึงทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากตัวเซลล์ในการเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ (whole cell biocatalyst) ในการผลิตไบโอดีเซล แทนการใช้กรดหรือด่าง อีกทั้งยีสต์ดังกล่าวยังสามารถทนต่อปริมาณเมทานอลในอัตราส่วนโมลระหว่างน้ำมันปาล์มกับเมทานอลค่อนข้างสูง เท่ากับ 1:6 (Srimhan *et al.*, 2011) ส่งผลทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นไบโอดีเซลมากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ยีสต์ และศึกษาการนำตัวเซลล์ยีสต์ดังกล่าวมาตรึงบนวัสดุตรึงที่เหมาะสมและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล ซึ่งสามารถขยายขนาดของกำลังการผลิตในอุตสาหกรรมได้ง่ายและสามารถลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

การตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมัน (Palm Oil)

ประเทศไทยมีการนำเข้าและส่งออกน้ำมันปาล์มในรูปของน้ำมันปาล์มดิบ การส่งออกน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของน้ำมันเมล็ดในปาล์มชนิดดิบและไขปาล์มสเตียร์นิน (palm stearin) ถึงแม้ว่าปาล์มน้ำมันจะมีพื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ แต่เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ปลูกขึ้นเพื่อเป็นอาหารเท่านั้น ไม่มีปริมาณมากพอที่จะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไบโอดีเซล ในขณะนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้มียุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมัน ส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมัน โดยขยายพื้นที่เพาะปลูกอีก 4 ล้านไร่ ภายในปี พ.ศ. 2552 เพื่อป้องกันการผลิตไบโอดีเซลตามแผนปฏิบัติการไบโอดีเซลของยุทธศาสตร์พลังงานทดแทนที่มีเป้าหมายความต้องการไบโอดีเซล 8.5 ล้านลิตรต่อวัน ภายในปี พ.ศ. 2555

ทะลายปาล์มสดประกอบด้วยผลปาล์มจำนวนมากเกาะติดอยู่บนก้านทะลาย น้ำมันเป็นส่วนที่ได้จากผลปาล์ม ซึ่งผลปาล์มน้ำมันจะให้น้ำมัน 2 ชนิด คือน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม น้ำมันปาล์มเป็นส่วนที่สกัดได้จากส่วนเปลือกนอกของผลปาล์ม ขณะที่น้ำมันเมล็ดในปาล์ม

สกัดได้จากเมล็ดในของผลปาล์ม โดยทั่วไปแล้วทะลายปาล์มสดมีน้ำมันปาล์มอยู่ในปริมาณ 20-21 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการผลิตในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มของประเทศ โดยเฉลี่ยแล้วปัจจุบันสามารถสกัดน้ำมันออกได้เพียง 17 เปอร์เซ็นต์ จากทะลายปาล์มสด สำหรับเมล็ดในปาล์มมีน้ำมันอยู่ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ทะลายปาล์มสด หรือมีอยู่ในปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดในปาล์ม

น้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม มีคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกันอย่างมาก โดยน้ำมันปาล์มมีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 16 ตัว (กรดปาล์มมิติก, palmitic acid) เป็นองค์ประกอบหลัก 44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำมันเมล็ดในปาล์มจะมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับน้ำมันมะพร้าว กล่าวคือ มีกรดไขมันที่มีคาร์บอน 12 ตัว (กรดลอริก, lauric acid) เป็นองค์ประกอบหลัก 50.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันเมล็ดในปาล์มมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวถึง 78.82 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 48.05 และ 51.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีลักษณะเป็นของเหลวปะปนอยู่กับของแข็งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำน้ำมันปาล์มมาบรรจุขวดจำหน่ายเพื่อใช้ในการประกอบอาหาร จะต้องทำให้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ โดยการกำจัดกรด กำจัดสี และกลิ่นก่อน จากนั้นจึงทำการแยกส่วนของเหลวและของแข็งออกจากกัน ส่วนที่เป็นของเหลวที่แยกออกมาเรียกว่า น้ำมันปาล์มโอลีน สำหรับส่วนที่เป็นของแข็งเรียกว่า ปาล์มสเตียรีนหรือโซสเตียรีน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการทำเนยเทียม ครีมเทียมและสบู่ โดยทั่วไปแล้ว น้ำมันปาล์มโอลีน และปาล์มสเตียรีน มีปริมาณเป็นสัดส่วนระหว่าง 65-70 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 30-35 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตของแต่ละโรงงาน

2. ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ น้ำมันเชื้อเพลิงที่ผลิตจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ โดยผ่านกระบวนการที่ทำให้โมเลกุลเล็กลง ให้อยู่ในรูปของเอทิลเอสเทอร์ (Ethyl esters) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (Methyl esters) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยตรง

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน เพื่อให้ได้เป็นอัลคิลเอสเทอร์ สามารถทำได้โดยอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิด

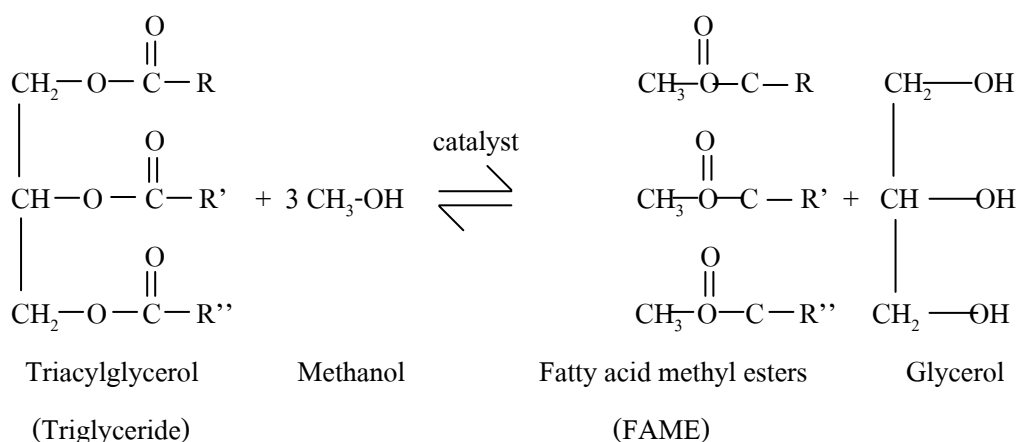
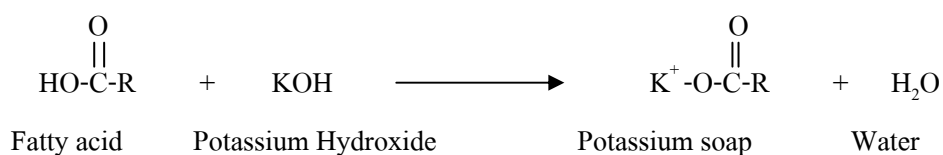


Figure 1. The transesterification reactions of triglyceride with alcohol to FAME and glycerol.

1. ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นเบส

เบสที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน เช่น NaOH, KOH, carbonates และ alkoxides (sodium methoxide, sodium ethoxide, sodium propoxide, sodium butoxide) สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เร็ว ใช้มากในทางการค้า แต่หากในปฏิกิริยาที่มีน้ำและกรดไขมันอิสระจากน้ำมันก็จะเป็นสาเหตุที่ทำให้กรดไขมันส่วนหนึ่งกลายเป็นสบู่ได้ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชัน (Wright *et al.*, 1944) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน จะต้องใช้แอลกอฮอล์ 3 โมลต่อไตรกลีเซอไรด์ 1 โมลได้เป็นกรดไขมัน 3 โมลกับกลีเซอรอล 1 โมล ดังสมการ



2. ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด

กรดที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน เช่น sulfuric, phosphoric, hydrochloric, organic acids เกิดปฏิกิริยาช้ากว่าใช้ต่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันภายใต้สภาวะกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเหมาะสำหรับวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนสารต่างๆ เช่น sulphur olive oil หรือ น้ำมันใช้แล้ว (Aksoy *et al.*, 1988) ซึ่งการใช้กรดจะไปเพิ่มการเกิดเอสเทอร์ของกรดไขมันอิสระได้

3. ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ไลเปส

การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เบสและกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาหลายประการ เช่น อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาสามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง เก็บเกี่ยวกลีเซอรอลได้ง่าย และการมีน้ำในปฏิกิริยาจะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสะปอนิฟิเคชัน โดย Table 1 ได้เปรียบเทียบการผลิตไบโอดีเซลที่ใช้ไลเปสกับการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งในการทำปฏิกิริยา แต่ต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก่อนข้างสูง เนื่องจากในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไลเปสที่เป็น extracellular enzyme จำเป็นต้องมีการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ ซึ่งกระบวนการทำบริสุทธิ์ก่อนข้างที่จะซับซ้อนและยุ่งยาก นอกจากนี้เอนไซม์โดยทั่วไปมักไม่คงตัวและค่าใช้จ่ายที่มีราคาแพง จึงได้มีการศึกษาการนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) มาใช้โดยตรงที่เรียกว่า whole cell biocatalyst (Kondo *et al.*, 2000) เพื่อลดขั้นตอนในการเตรียมเอนไซม์ดังแสดง Figure 2 (Fukuda *et al.*, 2001)

Table 1. Comparison of biodiesel production between alkali-catalysis process and *Rhizopus oryzae* lipase catalysis process.

Variables	Alkali catalysis	Acid catalysis	Lipase catalysis
Reaction temperature (°C)	60–70	55–80	30–40
Free fatty acid in raw materials	Saponified products	Esters	Methyl esters
Water in raw materials	Interference with reaction	Interference	No influence
Yields of methyl esters	Normal	Normal	Higher
Recovery of glycerol	Difficult	Difficult	Easy
Purification of methyl esters	Repeated washing	Repeated	None
Production cost of catalyst	Inexpensive	Inexpensive	Relatively
Reaction time	Short	Short (9 h)	Long (36 h)

Source: Fukuda *et al.*, (2001)

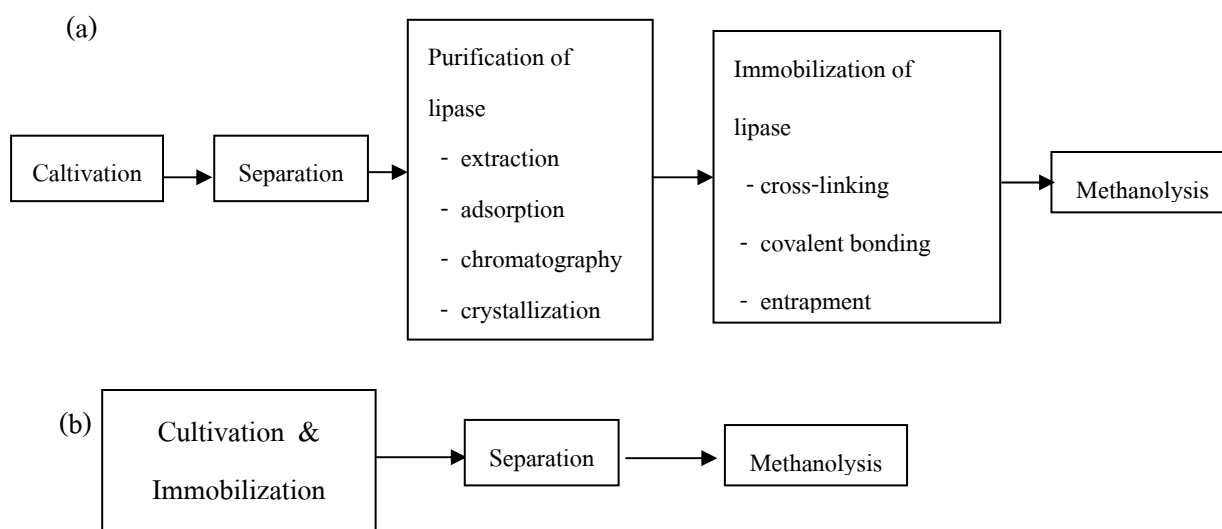


Figure 2. Comparison of lipase production processes for methanolysis with extracellular (a) and intracellular lipases (b).

Source: Fukuda *et al.*, (2001)

การใช้ประโยชน์จาก whole cell biocatalyst ควรทำให้อยู่ในรูปแบบที่สะดวกต่อการนำไปใช้ โดยการนำเซลล์มาตรึง เช่น การตรึงเซลล์ในของแข็งและเมื่อผ่านการตรึงแล้วก็ยังสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์ทางเคมีทั่วไปได้ วิธีการตรึงเซลล์มีหลากหลายวิธีด้วยกัน อย่างเช่นการตรึงเซลล์ด้วย biomass support particles (BSPs) ซึ่งวิธีนี้ถูกพัฒนาโดย Atkinson และคณะ (อ้างโดย Fukuda *et al.*, 2001) ข้อดีของการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้ whole cell biocatalyst ที่ตรึงรูปแล้วเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตเมทิลเอสเทอร์วิธีอื่นๆ คือ

- ไม่ต้องเติมสารเคมีในปฏิกิริยา เช่น NaOH
- มีการถ่ายเทมวลของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ภายในตัวตรึง
- สามารถนำตัวเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้อีก
- ตัวเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์มีความทนทานและทนต่อแรงเฉือนทางกล
- สามารถเพิ่มขนาดการผลิตได้ง่าย
- ต้นทุนการผลิตต่ำเมื่อเทียบกับวิธีอื่น

Table 2. The advantages and disadvantages of using lipases in transesterification.

Advantages	Disadvantages
Biocompatible, biodegradable and environmental acceptability	Loss of some initial activity due to the volume of the oil molecule
Lipases catalyze more specific reactions than chemical catalysts, and hence produce purer products	The immobilized lipase is deactivated by lower alcohols such as methanol and ethanol
There is the possibility of regeneration and reuse of the immobilized residue, because it can be left in the reactor if the reactive flow is maintained	The number of support enzymes is not uniform
The use of enzymes in the reactors allows the use of high concentrations of them and that allows for longer activation of the lipases	The production of commercial enzymes is still prohibitively costly, although the potential costs are being reduced
Immobilization of the lipase could protect it from the solvent that could be used in the reaction and that will prevent all enzyme particles getting together	The activity of the lipase is relatively lower than that of chemical catalysts
Separation of the product will be easier using this catalyst, producing a product of very high purity with less or no downstream operations	–
A greater thermal stability of the enzyme due to the native state in which they are used	–

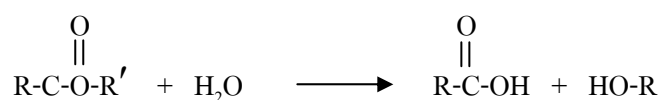
Source: Chen and Wu, (2003); Fukuda *et al.*, (2001, 2007); Marchetti *et al.*, (2007)

3. การผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.1 เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolase, glycerol ester hydrolase)

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ ปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Hydrolysis) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ (Synthesis of ester) และปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification)

1. Hydrolysis of ester

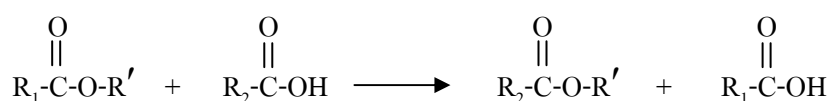


2. Synthesis of ester

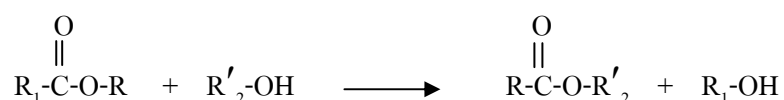


3. Transesterification

3.1 Acidolysis



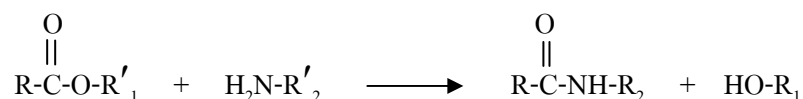
3.2 Alcoholysis



3.3 Interesterification



3.4 Aminolysis



เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไลต์กลีเซอรอล กรดไขมันและ partial glycerides ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้ โดยทั่วไปไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันโมเลกุลยาว (long chain fatty acid) จะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ไลเปส

สามารถที่จะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอลบน โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ตรงผิวร่วมระหว่างส่วนที่ไม่ละลายน้ำของสับสเตรทและส่วนที่ละลายน้ำได้ มีการแบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม (Macrae, 1983) ดังนี้

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์พวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นอินเตอร์มีเดียทในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1, 2, (2, 3) ไดกลีเซอไรด์และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1, 2, (2, 3) ไดกลีเซอไรด์และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ นั้นเป็นพวกไม่คงตัว ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอ จะมีการย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ 1, 3 ไดกลีเซอไรด์และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และในพวก *Rhizopus*

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวก เช่น *Geotrichum candidum* ที่ย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี *cis* double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มี double bond ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

3.2 ปัจจัยการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (factor of lipase production)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งในอาหารเหลว (submerge culture) และบนอาหารแข็ง (solid state) ซึ่ง Pandey และคณะ (1999) รายงานว่า การผลิตไลเปสของเชื้อราบนอาหารแข็งมีข้อดีกว่าการผลิตในอาหารเหลวหลายประการ ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญได้ง่าย เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณ (yield) และความเข้มข้นสูงกว่าการผลิตในอาหารเหลว นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคในกระบวนการแยกและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า และทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตามปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่เป็นการผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะเป็นการผลิตจากรา ยีสต์และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นเพราะสามารถปรับสภาพการเลี้ยงสารอาหารและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสในอาหารเหลวทำได้ง่ายกว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อ

การผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (Elibol และ Ozer, 2001)

3.2.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นแหล่งสำคัญในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์เอนไซม์จากจุลินทรีย์ นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วปริมาณของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์เช่นกัน การเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตเอนไซม์ (Stanbury *et al.*, 1995) Sugihara และคณะ (1991) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลเปส พบว่า *Bacillus sp.* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับ Lee และคณะ (1993) ที่สามารถผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* S1K WI ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนได้สูงถึง 7,395 U/mg protein นอกจากน้ำมันมะกอกแล้ว Papaparaskevas และคณะ (1992) พบว่า น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* และพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรุกโตสถึง 12 เท่า อย่างไรก็ตาม Jinda (2004) ได้เติมน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas sp.* KLB1 เพื่อผลิตไลเปส พบว่า การใช้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณไลเปสสูงถึง 68.54 U/mg

จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้เอง จำเป็นต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำ (inducer) เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งสารเหนี่ยวนำอาจเป็นชนิดเดียวหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก็ได้ ดังเช่น Janssen และคณะ (1994) ทำการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ Wai 28A 45 ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าต้องทำในอาหารที่มีไขมันอิ่มตัว

Essamri และคณะ (1998) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำมันเป็นสารเหนี่ยวนำจากการเติมน้ำมันชนิดต่างๆ ลงในอาหารสำหรับการผลิตไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่า การเจริญของ *Rhizopus oryzae* และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้มีปริมาณที่มากกว่าในอาหารที่ไม่เติมน้ำมันถึง 3 เท่า เช่นเดียวกับรายงานของ Sharon และคณะ (1998) ที่พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 สามารถผลิตไลเปสได้มากขึ้นเมื่อเติมน้ำมัน

ละหุ่ง (castor oil) 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยง ส่วน Vanot และคณะ (2001) พบว่า *Penicillium cyclopium* สามารถผลิตไลเปสได้มากถึง 45 U/ml ในอาหารที่มี corn steep liquor และน้ำมันมะกอกอย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ขณะที่การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปส ในอาหารที่มีน้ำมันชนิดต่างๆ เป็นสารเหนียวร่วมกับน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ของ Rathi และคณะ (2001) พบว่าน้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นสารเหนียวนำ ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไลเปสจาก *Bukhoderia cepacia* นอกจากนี้ Maia และคณะ (2001) ศึกษาผลของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันงา triolein น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันปาล์ม babassu และน้ำมันมะกอก มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Fusarium solani* พบว่า น้ำมันงามีผลทำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดรองลงมาคือ triolein น้ำมันข้าวโพดและ น้ำมันมะกอก ส่วนอาหารที่เติมน้ำมันมะพร้าวให้กิจกรรมไลเปสที่ต่ำที่สุด จากผลการทดลองใน รายงานต่างๆ ข้างต้นจะเห็นว่า น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสต่างกันในการ ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจากการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า แม้ว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แต่มีความสามารถในการใช้น้ำมันแต่ละชนิดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ สมบัติทางกายภาพและเคมี (physico-chemical properties) ของน้ำมันแต่ละชนิด

3.2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยถูกนำไปใช้ใน กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ ไนโตรเจนแตกต่างกัน บางชนิดสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแบบของสารอินทรีย์ได้ดี ดังนั้นในการ ผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณสูงสุดจึงต้องเลือกใช้ไนโตรเจนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Boze *et al.*, 1995)

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอาหารเชิงซ้อน (complex media) ได้ถูกนำมาใช้ในอาหาร ผลิตไลเปสมากขึ้น เช่น corn steep liquor และกากถั่วเหลือง เนื่องจากช่วยในการกระตุ้นให้มีการ ผลิตไลเปส แต่กิจกรรมที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ยังน้อยกว่าการใช้เปปโตนเป็นแหล่ง ไนโตรเจน ดังเช่น Izumi และคณะ (1990) ได้ผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจาก *Pseudomonas sp.* KW1 โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และยีสต์ สกัด (yeast extract) 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นอกจากนี้การใช้ยูเรียและแอมโมเนียซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่ง ไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ (มักนิยมใช้ในอาหารผลิตเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการ) กลับมีผล ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส (Sztajer และ Maliszewaka, 1989) โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ผลิต เอนไซม์ไลเปสในอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี แต่จากการศึกษา

ของ Papaparaskevas และคณะ (1992) กลับพบว่า *Rhodotorula glutinis* ใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ในการผลิตไลเปสได้ดีกว่า

3.2.3 ผลของไอออนของโลหะ

Janssen และคณะ (1994) รายงานว่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus sp.* ที่ชอบอุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้นอีกหลายเท่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมแมกนีเซียม (Mg^{2+}) เหล็ก (Fe^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) เช่นเดียวกับ Kok และคณะ (1995) รายงานว่า *Acinetobacter calcoaceticus* BD 413 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้นเมื่อเติมไอออนของแมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง และโคบอลต์

3.2.4 ผลของความเป็นกรดต่าง

Rhati และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia cepacia* ในอาหารที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ที่พีเอช 7 ได้มากกว่าที่พีเอช 10 เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนมากมักมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานใกล้เคียงกับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นๆ แต่ Wahab และคณะ (1999) พบว่าไลเปสจาก *Pseudomonas fragi* CRDA 037 สามารถทำงานได้ดีในพีเอชช่วง 9.5-10.0 และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่ที่พีเอชช่วงเดียวกันจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อาจแตกต่างกันไปจากค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิต นอกจากนี้ไลเปสจากจุลินทรีย์ยังมีช่วงของค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน และเมื่อค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเปลี่ยนแปลงจะมีผลทำให้สภาพโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปด้วย การเปลี่ยนแปลงของช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เอนไซม์ยังคงกิจกรรมไว้ได้ เป็นช่วงที่แสดงความคงตัว (stable) ของเอนไซม์ เช่น ไลเปสจาก *Pseudomonas mendocina* 3121-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชและอุณหภูมิจึง 60 องศาเซลเซียส แต่มีความคงทนต่อค่าพีเอชในช่วง 6.3-10.3 ที่อุณหภูมิต่ำ 20 องศาเซลเซียส (Surinenaite et al., 2002)

3.2.5 อุณหภูมิและการให้อากาศ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสที่แตกต่างกัน เช่น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ H1 (Handelsman and Shoham, 1994) มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ 60 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.0 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 398 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็น 55 องศาเซลเซียสและพีเอชที่เหมาะสมเป็น 7.2 ตามลำดับ (Kim *et al.*, 1994) ในบางครั้งการผลิตไลเปสมีผลกระทบโดยการให้อากาศ เช่น การจำกัดการให้ออกซิเจนแก่ *Pseudomonas aeruginosa* EF 2 ทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลง (Gilbert *et al.*, 1991)

ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ไลเปสขึ้นกับหลายปัจจัยจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด นั่นคือ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน อีออน ของโลหะ พีเอช แม้กระทั่งอุณหภูมิและอาจรวมถึงปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (ถ้าเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ) ไปพร้อมๆ กัน ซึ่งนอกจากจะผลิตเอนไซม์จากเซลล์อิสระแล้วยังมีการผลิตจากเซลล์ที่ตรึงบนวัสดุต่างๆ เพื่อเพิ่มจำนวนการใช้จุลินทรีย์ให้มากขึ้น เช่น Ellaiyah และคณะ (2004) ได้ผลิตไลเปสจาก *Aspergillus niger* ที่ตรึงในอัลจินेट (alginate) พบว่า ได้เอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมมากกว่าการผลิตจากเซลล์อิสระและสามารถใช้เซลล์ที่ถูกตรึงซ้ำได้ถึง 3 ครั้งโดยมีกิจกรรมลดลงเพียงเล็กน้อย

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส

3.3.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน แต่เอนไซม์อาจจะไม่คงตัวที่ระดับที่อุณหภูมิที่มีกิจกรรมสูงสุด เช่น *Humicola lanuginosa* No.3 ผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยยังคงมีกิจกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง (Omar *et al.*, 1987) และไลเปสจาก *Bacillus thermocatenuatus* มีกิจกรรมสูงที่สุดที่ 60-70 องศาเซลเซียส แต่คงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Schmidt-Dannert *et al.*, 1994)

3.3.2 พีเอช

ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงส่วนใหญ่มีกิจกรรมสูงที่สุดก่อนไปทางพีเอชที่เป็นกรด เช่น *Aeromonas sobria* LP 004 และ *Pseudomonas cepacia* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อ

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 6.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 5.5-6.5 ที่ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (พงศธราริน โลห์ตระกูล, 2538; Sugihara *et al.*, 1992) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่มีความคงตัวในพีเอชช่วงกว้าง เช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. 398 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4-11 เมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Kim *et al.*, 1994) ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4-10 ภายในระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง (Iizumi *et al.*, 1990)

3.3.3 ไอออนของโลหะ และ reagents ต่างๆ

โดยทั่วไปไอออนของโลหะ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , Li^{+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปส เช่น Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} และ Co^{2+} มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ได้เล็กน้อยประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Ba^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของไลเปสได้ถึง 32 เปอร์เซ็นต์ (Handelsman and Shoham, 1994) Ca^{2+} มีผลต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 เพิ่มขึ้นจาก 23.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 59.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Omar *et al.*, 1987) ส่วนใน *Aeromonas sobria* LP 004 พบว่า Ca^{2+} ช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (พงศธราริน โลห์ตระกูล, 2538)

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนต่อการส่งเสริมการทำงานของไลเปสไว้ 3 ประการ คือ แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้น ช่วยเพิ่มการดูดซึมของไลเปสที่ oil-water interface และช่วยขจัดครดไขมันออกจาก oil-water interface ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น บางครั้งมีรายงานว่าไอออนของโลหะไม่มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไลเปส เช่น Sugihara และคณะ (1991) พบว่า Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} และ Ba^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. และพบว่า Ca^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi *et al.*, 1990) แต่ไลเปสส่วนใหญ่ถูกยับยั้งด้วยไอออนของโลหะหนัก พวก Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} เช่น *Humicola lanuginosa* (Omar *et al.*, 1987) *Bacillus* sp. (Sugihara *et al.*, 1991) และ *Flavobacterium odoratum* (Labuschagne *et al.*, 1997) ในบางครั้งพบว่าสารจับโลหะ (metal chelating agent) เช่น EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ไม่มีผลต่อไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. (Sugihara *et al.*, 1991), *Pseudomonas cepacia* (Sugihara *et al.*, 1992) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไลเปสเหล่านี้ไม่ใช่ metalloenzyme แต่ Muderhwa และ Ratamahenina (1985) พบว่า EDTA และ pCMB (parachloromercuribenzoate) ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Candida deformans* CBS 2701 ซึ่งสอดคล้องกับ Yamamoto และ Fujiwara (1988) ซึ่งพบว่า EDTA และ pCMB ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp.

3.3.4 ลักษณะของสับสเตรท (Physical state of substrate)

การทำงานของไลเปสจะเกิดขึ้นเมื่อไลเปสถูกดูดซับที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ (oil-water interface) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของไลเปสที่ถูกดูดซับไว้ และขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทด้วย ถ้าพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทมีมากขึ้น การทำงานของไลเปสจะดีขึ้นด้วย (Shahani, 1975)

3.3.5 ตัวทำละลายอินทรีย์

Sugihara และคณะ (1991) พบว่า อะซิโตน 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ช่วยเพิ่มกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของอะซิโตนมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องจากที่อะซิโตนเข้มข้นต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ทำให้พื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทมีมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น โดยปราศจากการเสียดสภาพของโปรตีน ส่วนอะซิโตนที่ความเข้มข้นมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้เอนไซม์เสียดสภาพและสูญเสียกิจกรรม ส่วนเฮกเซนยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 5-100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในเชื้อ *Pseudomonas cepacia* การเติม dimethylsulfoxide หรือ อะซิโตน 0-35 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่เบนซีนและเฮกเซนมีผลยับยั้ง (Sugihara et al., 1992)

3.3.6 Emulsifying agent

Sodium taurocholate เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เอสและเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Handelsman and Shoham, 1994) แต่อิมัลซิฟายเออร์ไม่ได้ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสเสมอไป Watanabe และคณะ (1977) พบว่า ทั้งสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) และเกลือน้ำดีจะยับยั้งกิจกรรมของไลเปสชอบด่างที่ผลิตโดย *Pseudomonas fragi* และ *Pseudomonas nitroreducens* nov. var. *thermotolerans*

4. การตรึงเซลล์ (Immobilized cell)

เอนไซม์สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่จุลินทรีย์เป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากใช้ต้นทุนการผลิตที่ต่ำ สภาพที่ใช้ในการผลิตไม่ขึ้นกับท่าเล ที่ตั้งและฤดูกาล ใช้ระยะเวลาสั้น ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อยและสามารถผลิตได้ในปริมาณมากๆ ได้ ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นแล้วปลดปล่อยออกจากเซลล์ไปสู่

อาหารเลี้ยงเชื้อและเอนไซม์ที่อยู่ภายในตัวเซลล์ (intracellular enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยังคงอยู่ภายในตัวเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ การนำเอนไซม์ภายในเซลล์มาใช้นั้นจำเป็นต้องมีการสกัดเอนไซม์ออกจากตัวเซลล์ก่อน แต่ในบางครั้งวิธีการสกัดทำให้เอนไซม์เสียความคงตัวและต้องใช้ต้นทุนในการผลิตและการทำบริสุทธิ์ที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงได้มีการนำตัวเซลล์ (whole cell biocatalyst) มาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาแทน

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง (Immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่งและสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยจุลินทรีย์อาจอยู่ในสภาพที่เซลล์กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (บุษบา ยงสมิทธิ์, 2540) การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้มีการศึกษามานานแล้ว โดยในปี ค.ศ. 1823 Schuetzbach ได้มีการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว (Quick vinegar) ด้วยฟิล์มเชื้อที่ติดบนเศษไม้

เปรียบเทียบข้อดีกับข้อเสียของวิธีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

บุษบา ยงสมิทธิ์ (2540) กล่าวว่า เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่างเมื่อเทียบกับตัวเร่งวิธีอื่นๆ คือ

- ปฏิกริยาภายใต้สภาวะปกติและใช้พลังงานต่อปฏิกริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงข้อเสียคือ ต้องการ โคเฟกเตอร์ต่างในการเกิดปฏิกริยา
- ปัจจุบันการหมักเป็นระบบของตัวเร่งทางชีวภาพ แต่การหมักมักใช้สารอาหารที่มีราคาแพงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ ในระหว่างการหมักการควบคุมแบบต่อเนื่องจะทำให้ยากและหลังจากการหมักสิ้นสุดยังแยกผลผลิตที่ต้องการออกได้ยาก การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถควบคุมปฏิกริยาได้ง่าย สะดวก ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์กลุ่มอื่นสามารถแยกผลผลิตได้ง่าย เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้นอกจากนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงในสภาพของเซลล์ระยะพักต้องการพลังงานเพื่อความอยู่รอดเท่านั้น เป็นการเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่าการหมัก
- สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ และทำการศึกษาดังปฏิกริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกริยาได้ง่ายสามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์และอาจสูญเสียความสามารถในระหว่างการตรึงได้

วิธีการตรึงเซลล์แบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ คือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method)

1. การยึดด้วยตัวนำ หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble carrier) ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

Adsorption method เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงแวนเดอวาลส์ (van der waals force) และไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) โดยอาศัยหลักการธรรมชาติทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexamine ซึ่งรวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนเกิดการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช, ionic strength, การไหลของน้ำ, การเกิดฟองอากาศและเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์ แต่อาจปรับปรุงแรงดูดซับให้สูงขึ้นได้โดยการทำ cross-linking หลังการดูดซับและในทางปฏิบัติอาจนำข้อเสียนี้มาใช้ประโยชน์ desorption เซลล์ที่หมดความสามารถออกไป แล้วดูดซับเซลล์ใหม่เข้ามาแทนที่ นอกจากนี้การตรึงด้วยวิธีนี้ยังมีข้อเสียประการหนึ่ง คือ อัตราการดูดซับเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่ก็อาจแก้ไขได้โดยใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับตัวอย่างสารที่ใช้เป็นตัวดูดซับเซลล์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ (อนุพันธ์ของเซลลูโลส เด็กซ์แทรน และอะการโรส) โพรตีน (เจลาตินและอัลบูมิน) โพลีเมอร์สังเคราะห์ (โพลีไวนิลคลอไรด์ และ ion-exchange resin เช่น DEAE-sephadex, DEAE cellulose) และสารอนินทรีย์ (อิฐ ทรายและ porous glass) เป็นต้น

Covalent binding method เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากได้ผลดีแต่ไม่นิยมในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารเคมีซึ่งมักเป็นพิษ จึงอาจทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์ถูกทำลายได้ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ เป็นการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับ activated support โดยสารที่ใช้เป็นตัวยึดจับนั้นสามารถเชื่อมต่อกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบของผิวเซลล์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ซัลโฟนิล หมู่ไฮดรอกซิล หรือหมู่ฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดี คือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดีและมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่มีข้อเสีย คือ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นปฏิกิริยาที่ค่อนข้างรุนแรงเนื่องจากการสร้างพันธะโควาเลนต์ตามปกติจำเป็นต้องใช้สารตัวนำที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมีซึ่งมักจะมีความเป็นพิษและอาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียว และเอนไซม์ที่ต้องการเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายใน

เซลล์ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเตรียม สารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ด้วยวิธีนี้ เช่น activated porous silica bead, borosilicate glass, zirconia ceramic, agarose bead และสารเคมีที่ใช้ในการทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ เช่น aminopropyltriethoxysilane, glutaraldehyde, isocyanate และ carbodiimide เป็นต้น

2. การเชื่อมแบบไขว้ หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์ให้เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent เช่น glutaraldehyde และ toluene diisocyanate เป็นต้น การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากวิธีอื่นๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเจลหรือใน semipermeable membrane ต่างเป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นการตรึงวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับกรณีที่ต้องการใช้ปฏิกิริยาเชิงเดี่ยว (single reaction) เท่านั้น

3. การห่อหุ้ม การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

Microencapsulation หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ไว้ใน semipermeable membrane เช่น คอลโลอิดียน (collodian) หรือซิลิโคน (silicone) ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สับสเตรทหรือผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรมและอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์จึงมีข้อจำกัด นิยมใช้ในด้านการศึกษาและการวิเคราะห์เท่านั้น

Lattice type หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในช่องว่างสามมิติในเจลของพอลิเมอร์ การตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มโดยทั่วไปจะหมายถึงแบบ lattice type ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิดในขณะที่วิธีอื่นมีข้อเสียเปรียบมากกว่า สารที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้ม ได้แก่ สารพวก biochemically inert hydrogel โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดรูปร่างสามมิติที่มีลักษณะเป็นรูพรุน และกลไกการเกิดเจลนั้นมีหลายแบบ คือ

Covalent binding เช่น การโพลีเมอไรซ์ของโพลีอะคริลาไมด์

Ionic forces เช่น แคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate)

Precipitation โดย ฟิเอช อุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย เช่น คอลลาเจน (collagen) คาร์ราจีแนน (carragenan) และ โพลีสไตรีน (polystyrene)

การคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้ม Tanaka และคณะ (1977) ได้สรุปหลักการพิจารณาไว้ดังนี้ คือ

1. สมบัติในการละลายควรละลายได้ง่าย การผสมเซลล์กับสาร โพลิเมอร์ควรทำได้ง่าย และสารที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว

2. สมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลได้ด้วยวิธีการง่ายๆ ภายใต้อุณหภูมิปกติและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หรือเซลล์

3. สมบัติของเจล เจลที่ได้ควรมีความแข็งแรงและความคงตัวสูงและรูที่อยู่ภายในเจลควรมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ออกมาได้ แต่ซับซ้อนและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

การคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีรายละเอียดบางอย่างแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ

1. สมบัติทางกล (mechanical properties) เช่น ความคงตัว
2. สมบัติทางฟิสิกส์ เช่น ลักษณะเป็นเม็ด หรือเป็นแผ่น หรือติดตามผนังภายในภาชนะ
3. ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ความทนต่อสภาพทางฟิสิกส์ สารเคมี และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์
4. ความชอบน้ำ (hydrophilicity)
5. ความซึมซาบ (permeability)
6. ราคาและการยอมรับ

5. ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

5.1 ปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

โดยปกติเมื่อปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้น อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์สูงเกินกว่าระดับที่เร่งปฏิกิริยาพอดีกับสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ดังนั้นจึงต้องศึกษาปริมาณของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมและไม่เกิดการสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น (เชิดศักดิ์ เมธาธิในศวรรย์, 2535) Shah และคณะ (2004) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในน้ำมันสบู่ดำโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ที่ตรึงบนซีไลท์ ซึ่งเป็นตัวพวยงที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ เปรียบเทียบกับเมื่อใช้เอนไซม์อิสระ พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนซีไลท์ ที่พีเอช 7.8 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเอทานอล คือ 1:4 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 50 มิลลิกรัม บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง พบว่า จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ 71 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ถ้าใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงมากกว่านี้ พบว่า ปริมาณเอทิลเอสเทอร์

ลดลง เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้สารละลายในปฏิกิริยามีความหนืดสูง การถ่ายเทมวลลดลง และเมื่อใช้เอนไซม์อิสระในการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะเดียวกัน แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน คือ 10, 50, 75, และ 100 มิลลิกรัม พบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์อิสระ 50 และ 70 มิลลิกรัม จะได้ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 100 มิลลิกรัมพบว่าปริมาณเอทิลเอสเทอร์กลับลดลง ซึ่งเกิดจากสาเหตุเดียวกับที่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึง ปริมาณเอทิลเอสเทอร์ ที่ปริมาณเอนไซม์อิสระ 50 มิลลิกรัม คือ 62 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

5.2 ตัวทำละลายอินทรีย์

เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันและเมทานอล โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานั้น เอนไซม์ไลเปสอาจสูญเสียกิจกรรมได้หากสัมผัสโดยตรงกับเมทานอล ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์จะช่วยให้เมทานอลสามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ดี ลดการสัมผัสระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับเมทานอลได้ นอกจากนี้การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมันมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ น้ำ เพราะไขมันและน้ำมันสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี ในขณะที่เอนไซม์ไม่ละลาย ซึ่งช่วยให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลผลิตเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย ตัวทำละลายอินทรีย์จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือช่วยให้เกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์จากกรดคาร์บอกซิลิกกับแอลกอฮอล์หรือเปปไทด์จากกรดอะมิโน (เชดคักคี่ เมธาธาในสวรรค์, 2535) Soumanou และคณะ (2003) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในน้ำมันเมล็ดทานตะวัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงบนโพลีโพรไพลีน (polypropylene, EP100) ซึ่งเป็นตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ โดยใช้สภาวะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7 พบว่าได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.3 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำมัน ไม่มีน้ำในปฏิกิริยา บ่มที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน ไชโครเฮกเซน n-heptane ไอโซออกเทน อะซีโตน และปีโตรเลียมอีเทอร์ พบว่า เฮกเซน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด คือ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเฮกเซน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายเข้ากับน้ำมันได้ดี และนอกจากนี้ยังไม่มีผลกระทบต่อ conformation ของเอนไซม์ Desai และคณะ (2005) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันใน salicornia oil โดยใช้เอนไซม์ไลเปส porcine pancreatic ที่ตรึงบนไลโดซานที่จับยึดกับกลูตาอัลดีไฮด์ โดยมีสภาวะการตรึง คือ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์

0.02 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7 ใช้เวลาในการตรึงนาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:3 ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 20 กรัม มีน้ำในปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซนและอะซีโตน พบว่า เฮกเซน จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 44.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์อิสระ 0.125 กรัม ที่สภาวะเดียวกัน จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 55.3 เปอร์เซ็นต์

5.3 ปริมาณน้ำ

น้ำเป็นปัจจัยที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เนื่องจากน้ำจะเข้าร่วมทั้งทางตรงและทางอ้อมกับพันธะต่าง ๆ ของเอนไซม์ เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) และแรงวานเดอร์วาลส์ (van der waal force) ซึ่งจะทำให้เอนไซม์คงสภาพธรรมชาติและรูปแบบการเร่งปฏิกิริยาอยู่ได้ ถ้ามีการกำจัดน้ำออกโดยสิ้นเชิงจะทำให้เกิดการบิดทำลายของ (conformation) อย่างรุนแรงและเกิดการหยุดยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แต่จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีสารประกอบเอสเทอร์เป็นสารตั้งต้นในสภาวะของระบบที่มีน้ำน้อยมาก (micro-aqueous system) จะก่อให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตรงกันข้ามหรือผันกลับกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสการเกิดปฏิกิริยานี้อธิบายได้ว่าเป็นเพราะ net free energy ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันมีค่าเท่ากับศูนย์ ในขณะที่ค่านี้ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะสูงกว่าศูนย์ การต้องการ net free energy มากกว่าศูนย์ทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดขึ้นได้ที่สภาวะดังกล่าว จึงเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันได้ง่ายกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะสมดุล (เชดส์คัลด์ เมธาธไนสวรรย์, 2535) Nouredдини และคณะ (2005) ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในน้ำมันถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas capacia* ที่ตรึงโดยการห่อหุ้มด้วย hydrophobic sol-gel เมื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อเมทานอล 1:15.2 ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 3.0 กรัม บ่มที่ความเร็วรอบ 700 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณน้ำในการทำปฏิกิริยาในช่วงระหว่าง 0-2 กรัม พบว่า ที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 0.3 กรัม จะได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเท่ากับ 65 โมลเปอร์เซ็นต์ เมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาดำกว่า 0.3 กรัม ปริมาณเอสเทอร์จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากจะทำให้เกิดการบิดทำลาย conformation ของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสียสภาพมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และเมื่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยาสูงมากเกินไป น้ำที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส มีผลให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ลดลงเช่นกัน

5.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันโดยใช้ไลเปส อุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ ซึ่งถ้าอุณหภูมิที่ใช้ต่ำกว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะต่ำ เช่นเดียวกันหากอุณหภูมิที่ใช้สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมเอนไซม์อาจเสียสภาพ เนื่องจากสูญเสียหน้าที่จำเป็นไป โดยได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันในน้ำมันเมล็ดทานตะวันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ที่ตรึงบน Toyonite 200-M ซึ่งเป็นตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ที่สภาวะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7 ใช้เวลาในการตรึง 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่อัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันต่อโพรพานอล 1:3 ใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึง 2.84 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณโพรพิลโกลิเอทสูงสุด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 10 ชั่วโมง และเมื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์อิสระ 0.1 กรัม ที่สภาวะเดียวกัน จะได้ปริมาณโพรพิลโกลิเอทเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (Iso *et al.*, 2001)

6. ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa*

ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งดิน แหล่งน้ำ ตะกอนดิน และโคลนนี้จะมีรูปร่างกลมรี สีแดง สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ ไม่มีการสร้างเส้นใย (Barnett *et al.*, 2000) เจริญเฉพาะที่มีออกซิเจน (obligate aerobic yeast) ยีสต์ *Rhodotorula* เป็นจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์คาโรทีนอยด์ องค์ประกอบของคาโรทีนอยด์ที่ *Rhodotorula* สังเคราะห์และสะสมส่วนใหญ่เป็นบีตา-คาโรทีน โทรูลิน (torulene) และ โทรูลาโรดิน (torularhodin) ซึ่งจากการศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตของ Aksu และ Eren (2005) พบว่า การเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้อัตราการเจริญเติบโต (μ) และการผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุดที่สุดเป็น 0.249 ต่อชั่วโมง และ 0.72 mg g⁻¹ h⁻¹ ตามลำดับ

นอกจากนี้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อีกด้วย โดยการออกแบบอาหารที่มีการเติมน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นตัวกระตุ้นซึ่ง *Rhodotorula mucilagenosa* MTCC-8737 นำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมน้ำมันเป็นตัวกระตุ้นต่างชนิดกัน ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันดอกทานตะวัน พบว่า การผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารที่มีน้ำมันต่างชนิดจะให้ค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสที่แตกต่างกันโดยน้ำมันถั่วเหลืองให้ค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสที่สูงที่สุดเป็น 29 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Chennupati *et*

al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ด้วยกากน้ำตาลในระบบถังหมักแบบ Stirred tank reactor เมื่อมีอัตราการให้อากาศของถังเป็น 2 vvm, อัตราการกวน 200 rpm ที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จะให้ค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสสูงสุดเป็น 72 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (Potumarth *et al.*, 2008)

Srimhan และคณะ (2011) ได้คัดแยกยีสต์จากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสนำมาผลิตเป็นไบโอดีเซลในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*PNC₁₆) เป็นสับสเตรท และวิธี two-phase emulsion โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 0.092 ± 0.005 และ 2.534 ± 0.044 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 51.26 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* มาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการสร้างเมทิลเอสเทอร์ โดยพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จะลดลง โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำนักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 48.34 เปอร์เซ็นต์ จึงนำปริมาณน้ำดังกล่าวมาศึกษาผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} , 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ในการเร่งปฏิกิริยาของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล อัตราส่วนโมล 1:3 และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำนักสับสเตรท คิดเป็นปริมาณน้ำในระบบ 11.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 1.267 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรทในการเร่งปฏิกิริยา สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด 48.32 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้ปริมาณเซลล์ 0.5×10^{10} , 1×10^9 , 0.5×10^9 , 1×10^8 และ 1×10^7 เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.634, 0.126, 0.063, 0.012 และ 0.0012 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพียง 21.62, 1.38, 0.46, 0.48 และ 0.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเซลล์มากขึ้นก็คือการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันนั่นเอง

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1.394 ยูนิต์ต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน มีสับสเตรท คือ น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วน

1:3 (โมล:โมล) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก สับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2), 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อ เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 45 และ 37 องศาเซลเซียส ได้เมทิลเอสเทอร์ 8.38 และ 41.59 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิห้อง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด คือ 48.17 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปปฏิกิริยาเคมีจะทำงานได้ดีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาของ เอนไซม์ แต่เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนมักไม่ค่อยคงตัวต่อความร้อนทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ได้ดีแตกต่างกัน จากนั้นนำสถานะดังกล่าวมาศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยเติม สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก สับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เกิดขึ้นเพียง 35.10 และ 36.42 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทำ ปฏิกิริยาที่พีเอช 6.5 และได้ปริมาณสูงที่สุดที่พีเอช 7.0 คือ 49.28 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเติมสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชสูงกว่า 7.0 ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้จากการศึกษาผลของชนิดแอลกอฮอล์ต่อการผลิตอัลคิลเอสเทอร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิต เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วนโมล 1:3 โดยแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการศึกษามี 5 ชนิด ดังนี้ เมทานอล, เอทานอล, โพรพานอล, 1-บิวทานอล และ 2-บิวทานอล ปรับปริมาณน้ำให้เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า การใช้เมทานอลทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์สูงที่สุด 49.28 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นเอทานอลซึ่ง ให้ปริมาณอัลคิลเอสเทอร์ 3.19 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ 1-บิวทานอลและ 2-บิวทานอล สามารถ ผลิตอัลคิลเอสเทอร์ได้ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง และไม่พบการ ผลิตอัลคิลเอสเทอร์เลยเมื่อใช้โพรพานอล ซึ่งเมื่อนำเมทานอลมาศึกษาผลของอัตราส่วนโมลต่อ การผลิตเมทิลเอสเทอร์ ในอัตราส่วนโมล 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 ปรับให้มีสถานะที่เหมาะสมข้างต้น พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วน โมลของเมทานอลที่เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ สามารถผลิต เมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 (โมล:โมล) มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 48.19, 60.46, 73.11 และ 83.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการใช้เซลล์ยีสต์ซ้ำในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามาใช้ซ้ำอีกครั้ง เพื่อทำปฏิกิริยาทรานส์ เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้สับสเตรทที่มีส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและ น้ำมันปาล์มใช้แล้ว ต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:6 พบว่า ผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์จากการทำ

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้ว เป็นสับสเตรท เท่ากับ 59.31, 36.39 และ 55.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าเซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาได้ แต่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง ซึ่งเห็นได้จากปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่ลดลงจากที่ใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในครั้งแรก โดยผลผลิตของเมทิลเอสเทอร์เมื่อใช้เซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในครั้งแรก ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์, น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นสับสเตรท เท่ากับ 83.63, 62.34 และ 66.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ปริมปรัชญ์ ศรีหมาน, 2551)

7. การใช้ตัวเซลล์จุลินทรีย์ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตไบโอดีเซล

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาเร่งปฏิกิริยาเพื่อผลิตไบโอดีเซล มีทั้งเอนไซม์ไลเปสจากภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นแล้วปลดปล่อยออกจากเซลล์ไปสู่อาหารเลี้ยงเชื้อและเอนไซม์ที่อยู่ภายในตัวเซลล์ (intracellular enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยังคงอยู่ภายในตัวเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ การนำเอนไซม์ภายในเซลล์มาใช้จำเป็นต้องวิธีการสกัดเอนไซม์ออกจากตัวเซลล์ก่อน แต่ในบางครั้งวิธีการสกัดทำให้เอนไซม์เสียความคงตัว และต้องใช้ต้นทุนในการผลิตและการทำบริสุทธิ์ที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงได้มีการนำตัวเซลล์ (whole cell biocatalyst) มาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาแทน จึงได้รับความสนใจและได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย (Devanesan *et al.*, 2007; Kaieda *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2001; Tamalampundi *et al.*, 2008; Fukuda *et al.*, 2008) ซึ่งมีศักยภาพต่อการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม ทำให้ลดต้นทุนในการเตรียมเอนไซม์มาใช้เร่งปฏิกิริยา การนำจุลินทรีย์มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันต้องเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะบริเวณผิวเซลล์หรือเซลล์เมมเบรน ได้แก่ แบคทีเรีย *Pseudomonas sp.* (Devanesan *et al.*, 2007; Foidl *et al.*, 1996; Mohamed and Uwe, 2003; Yong and Shiyi, 2007) เชื้อรา *Mucor miehei* (Du *et al.*, 2004), *Rhizopus oryzae* (Hama *et al.*, 2004) การนำตัวเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาใช้นำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องหาวิธีการต่างๆ ในการเลี้ยงเซลล์ วิธีการตรึงเซลล์ และกระบวนการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งต้องมีการทำในปริมาณมากๆ จึงจำเป็นต้องใช้ Bioreactor มาขยายขนาดกระบวนการผลิต โดยได้ทำการศึกษาการเลือกใช้ Bioreactor ของการผลิตไบโอดีเซลตั้งแต่การเลี้ยงเซลล์ การตรึงเซลล์ และการเกิดปฏิกิริยาเมทานอลไลซิส สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโดยการขยายกำลังการผลิตต่อไปได้

Hama และคณะ (2006) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ โดยลักษณะของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เป็นโปรตีนที่มีความแตกต่างกันของ 2 โมเลกุล คือ โปรตีนขนาด 34 kDa (ROL34) และ ขนาด 31 kDa (ROL31) โดยโปรตีนทั้งสองจะเป็นตัวบ่งบอกตำแหน่งของเอนไซม์ว่าจะต้องไปอยู่ในตำแหน่งใดของเซลล์ ได้แก่ เซลล์เมมเบรน (cell membrane) เซลล์ผนังเซลล์ (cell wall) หรือนอกเซลล์ (extracellular) โดยโปรตีนขนาด 34 kDa (ROL34) เป็นโปรตีนที่ติดอยู่บริเวณผนังเซลล์ (cell wall) ส่วนโปรตีนขนาด 31 kDa อยู่ใน ส่วนเซลล์เมมเบรน (cell membrane) และผนังเซลล์ (cell wall) บางส่วน (ดัง Figure 3) ปริมาณของโปรตีนในแต่ละส่วนขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเลี้ยงและลักษณะการตรึงหรือไม่ตรึงเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่า การเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงบน polyurethane foam (Biomass Support Particle, BSPs) จะให้โปรตีน ROL34 แต่ไม่ให้โปรตีน ROL31 kDa ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนบริเวณผนังเซลล์ (cell wall) จะพบเฉพาะ โปรตีน ROL34 หลังจากการเลี้ยงเซลล์แล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมงและพบ ROL31 kDa ในเมมเบรนตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเซลล์แบบตรึงเซลล์ ส่วนการเลี้ยงเซลล์แบบอิสระจะพบทั้งโปรตีน ROL34 และ ROL31 kDa ในอาหารตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การเลี้ยงเซลล์ราโดยการเติมน้ำมันเป็นตัวกระตุ้นจะให้ลักษณะของโปรตีนที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของน้ำมัน โดยพบว่าน้ำมันมะกอกที่เติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์จะเป็นตัวกระตุ้นที่ดีที่สุดเพื่อให้เซลล์ผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งการเติมน้ำมันมะกอกจะเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์ผลิตโปรตีนชนิด ROL34 ออกมาติดที่บริเวณผนังเซลล์ (cell wall) เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและเมทานอลไลซิสของตัวเซลล์เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาขั้นต้น Fukuda และคณะ (2007) ได้พยายามที่จะนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งมีข้อดีหลายประการทั้งในแง่ของการลงทุนและการนำกลับมาใช้ของเซลล์ที่ถูกตรึงได้หลายครั้งกว่าการใช้ตัวเอนไซม์ แต่การนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องหาวิธีการต่างๆ ในการเลี้ยงเซลล์ วิธีการตรึงเซลล์และกระบวนการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งต้องมีการทำในปริมาณมากๆ จึงจำเป็นต้องใช้ Bioreactor มาขยายขนาดกระบวนการผลิต โดยได้ทำการศึกษาคือการใช้ Bioreactor ของการผลิตไบโอดีเซลตั้งแต่การเลี้ยงเซลล์ การตรึงเซลล์ และการเกิดปฏิกิริยามethanolไลซิส สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโดยการขยายกำลังการผลิตต่อไปได้ ดังนี้

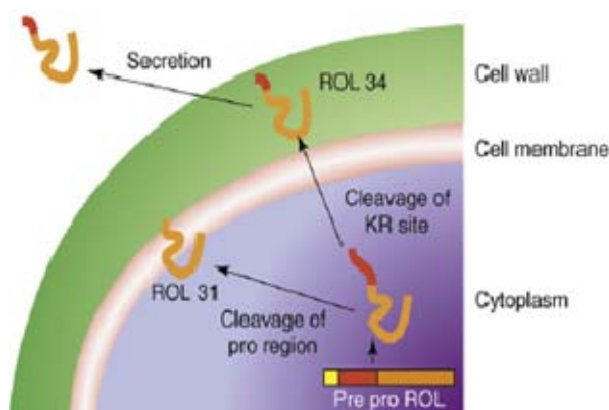


Figure 3. Schematic diagram of ROL maturation and localization in *Rhizopus oryzae* cells.

Cleavage of pro-region from the precursor lipase Pre-pro ROL gives rise to two lipases. ROL 31 locates to the cell membrane, whereas ROL 34 is transported to the cell wall, from where it can be secreted.

Source: Hama *et al.*, (2006)

7.1 การเลี้ยงและการตรึงเซลล์

เชื้อรา *Rhizopus oryzae* IFO 4697 ซึ่งพบว่าเชื่อดังกล่าวสามารถสร้างเส้นใยและผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3-positional specificity lipase สามารถนำเซลล์มาตรึงแบบคูดซับบนวัสดุตัวพอง (Biomass Support Particle) ซึ่งเป็น Polyurethane foam โดยรูปทรงจำนวน 50 รู ต่อ 1 นิ้ว

สำหรับวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized cell culture) Oda และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาโดยอาศัยการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการใส่วัสดุตัวพอง ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์โดยการเลี้ยงร่วมกับการให้เซลล์เจริญเติบโต ภายในถัง 20 ลิตร ของ air-lift bioreactor ควบคุมอัตราการให้อากาศเป็น 2.5 vvm ค่าพีเอชเท่ากับ 7.00 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการตรึงเซลล์โดยใช้ระบบ Air-lift reactor จะทำให้การเจริญของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เจริญบนวัสดุตัวพองได้ดีกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบเขย่าและยังให้กิจกรรมการเกิดปฏิกิริยาเมทานอลไลซิสที่สูงกว่า นอกจากนี้การเลี้ยงโดยใช้ Air-lift reactor สามารถลดระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ได้

7.2 การทำปฏิกิริยาเมทานอลไลซิส (Methanolysis reaction)

สำหรับการทำปฏิกิริยาเมทานอลไลซิส (Methanolysis reaction) Fukuda และคณะ (2007) ศึกษาการปฏิกิริยาในระบบ packed-bed reactor (PBR) system โดยบรรจุชิ้นโพรที่ผ่านการตรึงเซลล์จากการศึกษาของ Oda และคณะ (2005) ข้างต้น จำนวน 1000 ชิ้น ลงในคอลัมน์ ซึ่งน้ำมันถั่วเหลือง 96.5 g กับ เมทานอล 3.5 กรัม (1 โมลาร์ สมมูลกับ 96.5 กรัม ของน้ำมันถั่วเหลือง) และ 5.0 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่น ในการทำปฏิกิริยาใน packed-bed reactor (PBR) จะทำให้น้ำมันเป็นโมเลกุลเล็กโดยใช้เครื่อง ultrasonic (150 oscillations/min, amplitude 70 mm) รอบละ 5 นาที ดัง Figure 4

หลักการทำงานของ packed-bed reactor (PBR) system เป็นระบบที่ให้สับสเตรทไหลผ่านวัสดุที่แข็งหรือวัสดุที่ถูกตรึงบรรจุในคอลัมน์เพื่อให้ทำปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจะขึ้นกับเวลาที่สารไหลไปในคอลัมน์ซึ่งขึ้นกับปริมาตร (ความยาวและพื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์) และอัตราการไหลของปฏิกิริยาข้อดีของ Pack-bed reactor คือ อัตราการเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนสับสเตรทจะเร็วใช้ต้นทุนต่ำและเป็นระบบที่สามารถทำการผลิตแบบต่อเนื่องได้ปัจจัยที่ทำการศึกษาในการเกิดปฏิกิริยาในระบบ Pack-bed reactor (Fukuda *et al.*, 2007)

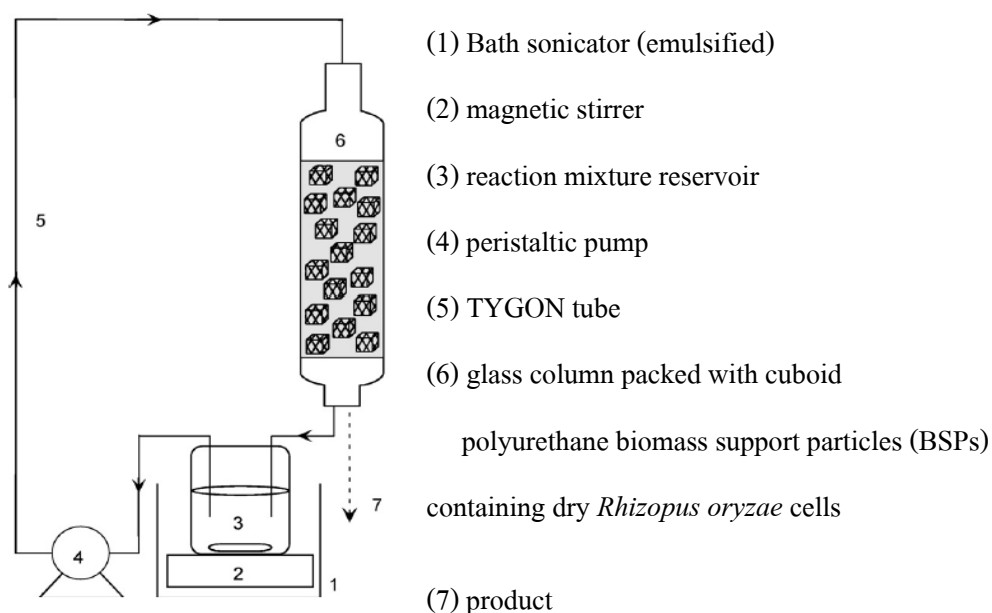


Figure 4. Schematic diagram of packed-bed reactor (PBR) system.

Source: Fukuda *et al.*, (2007)

7.2.1 ผลของขนาดและรูปร่างของวัสดุตัวพอง (Biomass Support Particle)

จากการศึกษาผลของขนาดของวัสดุตัวพอง BSPs ของ 2 ขนาด คือ $6 \times 6 \times 3$ และ $6 \times 6 \times 6$ มิลลิเมตร ที่ถูกตรึงด้วย *Rhizopus oryzae* มาทำปฏิกิริยามะทานอลไลซิส ใน screw-capped bottle พบว่า เมื่อนำมาสร้างกราฟระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยากับปริมาณทั้งหมดของตัวพองที่ถูกตรึงด้วยเซลล์ จะให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยจะเกิดเมทานอลไลซิสเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนของตัวพอง และรูปร่างขนาด $6 \times 6 \times 3$ จะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูงกว่าเมื่อปริมาณของตัวพองที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเท่ากัน เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ลักษณะการเจริญจะเกิดเฉพาะบริเวณผิวหน้า ก้อนโฟมที่มีขนาดเล็กกว่า ($6 \times 6 \times 3$) จึงมีพื้นที่ผิวที่มากกว่าในการที่เชื้อราจะเจริญเติบโต

7.2.2 ผลของการทำให้น้ำมันเป็นอิมัลชัน (emulsification) ต่อการเกิดปฏิกิริยา

จากการทำให้อิมัลชันของน้ำมันโดยเครื่อง Ultrasonicate พบว่า ทำให้น้ำมันมีขนาดหยดที่เล็กลง จากประมาณ 100 ไมครอน เหลือ 5 ไมครอน (ดังแสดงใน Figure 5) ซึ่งการให้น้ำมันมีอนุภาคที่เล็กลง สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างตัวเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมากขึ้น ลักษณะการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจะทำงานระหว่างชั้น hydrophobic และ hydrophilic การทำให้อนุภาคน้ำมันเล็กลงจึงเป็นการเพิ่มโอกาสให้เอนไซม์กับสับสเตรทเข้าทำปฏิกิริยากันได้เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยามะทานอลไลซิส ซึ่งทำให้เพิ่มปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ได้

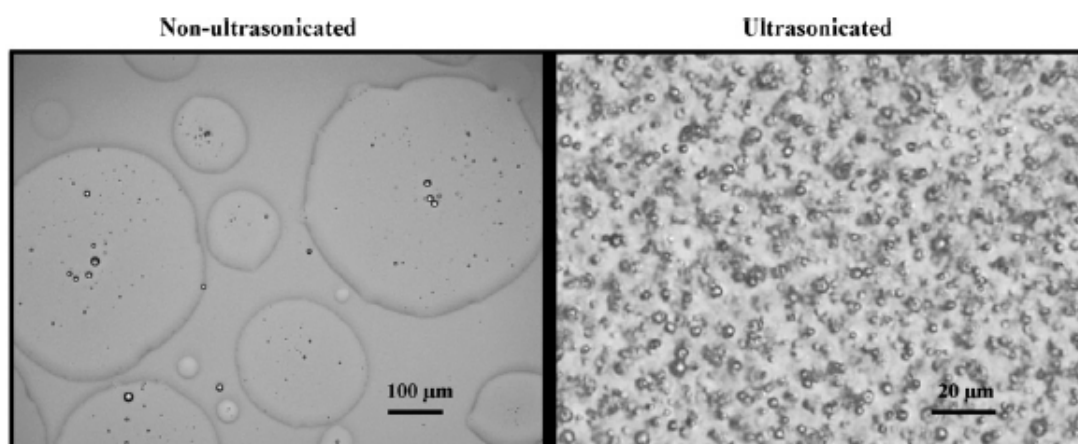


Figure 5. Microscopic photographs of ultrasonication of reaction mixture on methanolysis reaction.

Source: Fukuda *et al.*, (2007)

7.2.3 ผลของอัตราการไหลของน้ำมันในระบบ Pack-bed reactor

จากการศึกษาผลของการเพิ่มอัตราการไหลของน้ำมันผสมต่อการเกิดปฏิกิริยาในระบบ Pack-bed reactor พบว่า การเพิ่มอัตราการไหลเป็น 55 ลิตร/ชั่วโมง ทำให้ปริมาณของเมทานอลไลซิสเพิ่มเป็น 90.9 เปอร์เซ็นต์ในรอบแรกของการทำปฏิกิริยา แต่เมื่อทำปฏิกิริยาจนถึงรอบที่ 5 พบว่าที่ความเร็ว 55 ลิตร/ชั่วโมง จะให้ค่าปริมาณของเมทานอลไลซิสลดลงเป็น 63.3 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ น่าจะเกิดมาจากการใช้ความเร็วที่สูงจะทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงหลุดออก ซึ่งสังเกตได้จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาพบว่ามีค่าที่ลดลง ส่วนที่อัตราการไหลช้า คือ 5 ลิตร/ชั่วโมง เมื่อทำปฏิกิริยารอบที่ 5 พบว่าให้ค่าปริมาณของเมทานอลไลซิสลดลงเช่นกัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากการสะสมของเมทานอลในระบบที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา เพราะที่อัตราเร็วช้าๆ การเปลี่ยนเมทานอลไปเป็นเมทานอลไลซิสก็เกิดช้า ทำให้เหลือเมทานอลมากเกินไปส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ไปเสียสภาพ

7.2.4 ศึกษาจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาในระบบ PBR

จากการศึกษาการนำเซลล์ที่ถูกตรึงนำกลับมาใช้ใหม่ของสองกระบวนการที่แตกต่างกัน คือ การทำปฏิกิริยาแบบเขย่าในหลอดทดลอง จะให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์มากกว่าการทำปฏิกิริยาแบบ PBR แต่เมื่อทำปฏิกิริยาในรอบถัดไปพบว่า ปฏิกิริยาแบบเขย่าในหลอดทดลองจะให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ลดต่ำลง ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาโดยการเขย่าในหลอดทดลองอาจจะทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงนั้นหลุดออกมาได้ ทำให้สูญเสียเซลล์ไปในการทำปฏิกิริยาในแต่ละรอบ ซึ่งถ้าหากเป็นการทำปฏิกิริยาในระบบ PBR จะให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ที่คงที่ประมาณ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 10 ของปฏิกิริยา ดังนั้นการตรึงเซลล์จึงสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง

8. วิธีการออกแบบการทดลองในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

8.1 การทดลองแบบดั้งเดิมหรือแบบทีละปัจจัย (One factor at a time; OFAT)

การทดลองแบบดั้งเดิมเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ (factor) โดยกำหนดให้ปัจจัยอื่นๆ คงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนระดับของปัจจัยที่ศึกษาและเมื่อให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้ว จึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยตัวที่สอง และทำอย่างนี้ไปเรื่อย ๆ จนครบทุกปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งวิธีการทดลองนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ เนื่องจากมีข้อดี คือ ขั้นตอนการทดลองไม่ยุ่งยาก แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ก็มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทราบผลของปัจจัยที่มีร่วมกันได้ รวมทั้งใช้เวลานานหาก

ทำการศึกษาหลายปัจจัย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากวิธีการดังกล่าวอาจจะให้ผลการทดลองได้ไม่ดีที่สุด (Giesbrecht and Gumpertz, 2004; Box, 2006)

8.2 การทดลองทางสถิติ (Experimental design)

การทดลองทางสถิติเป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจ โดยใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ เพื่อให้ได้การทดลองที่มีความครอบคลุม รวมทั้งลดระยะเวลาและทรัพยากรในการทดลอง ตัวอย่าง เช่น การทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial) เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาได้ในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังทราบผลของปัจจัยที่มีผลร่วมกัน (interaction) (Box *et al.*, 2005) แต่การทดลองแบบแฟคทอเรียลจะมีชุดการทดลองเป็นจำนวนมากหากมีระดับของปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายระดับ ดังนั้นจึงนิยมทำการทดลองเพียงสองระดับเท่านั้น

8.2.1 วิธีการทาากูชิ (Taguchi Method)

แนวความคิดของการออกแบบแผนการทดลองแบบอื่นที่นอกเหนือจากการออกแบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสมบูรณ์ (Full Factorial Design) และการออกแบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลบางส่วน (Fractional Factorial Design) ที่ได้รับการยอมรับในเวลาต่อมา คือ แนวคิดของ Dr. Genichi Taguchi นักวิศวกรชาวญี่ปุ่น ผู้ที่ได้เสนอปรัชญาในการออกแบบทางวิศวกรรม เพื่อมีความประสิทธิภาพที่ว่า ผลิตภัณฑ์ควรจะออกแบบเพื่อให้ได้ผลในการทำงานที่ดีและมีความผันแปรน้อยที่สุดต่อผลการดำเนินงาน ซึ่งแน่นอนว่าถ้าสามารถทำได้ตามแนวคิดนี้ก็จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความน่าเชื่อถือ ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการทางทาากูชิไปใช้อย่างแพร่หลายในภาคอุตสาหกรรมเพื่อปรับปรุงทางด้านคุณภาพ วิธีการทางทาากูชิได้ให้ความสำคัญกับการออกแบบที่ทำให้สภาวะของกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต้องมีคุณภาพสูง ด้วยค่าใช้จ่ายในการพัฒนาและการผลิตที่ต่ำ นอกจากนี้วิธีการทางทาากูชิยังเป็นการทดลองที่สามารถศึกษาปัจจัยหลาย ๆ ปัจจัยพร้อมกัน โดยมีวิธีการคำนวณที่ไม่ยุ่งยาก และใช้จำนวนการทดลองน้อยกว่าการออกแบบแผนการทดลองแบบอื่น ๆ เช่น การออกแบบแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสมบูรณ์ (Full Factorial Design) โดยการใช้เครื่องมือที่เรียกว่า ออกทอกอนอล อะเรย์ (Orthogonal Array) โดยกำหนดให้ ปัจจัยที่ควบคุมได้ เป็น Outer Array และ ปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้เป็น Inner Array เช่น ถ้ามีปัจจัยที่ศึกษา 4 ปัจจัย มี 3 ระดับ ดังนั้นได้ ออกทอกอนอล อะเรย์ (Orthogonal Array) ใช้ L9 ดังแสดงใน Table 3 สามารถออกแบบการทดลองได้ 9 ชุดการทดลอง ดังแสดงใน Table 4

Table 3. Parameters and their levels employed in the Taguchi's experimental design.

		Number of Parameters											
Number of Level		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	2	L4	L4	L8	L8	L8	L8	L12	L12	L12	L12	L16	L1
	3	L9	L9	L9	L18	L18	L18	L18	L27	L27	L27	L27	L27
	4	L16	L16	L16	L16	L32	L32	L32	L32	L32			
	5	L25	L25	L25	L25	L25	L50	L50	L50	L50	L50	L50	

Table 4. $L_9(3^4)$ orthogonal array of Taguchi experimental design.

Experiment	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Response
1	1	1	1	1	Y1
2	1	2	2	2	Y2
3	1	3	3	3	Y3
4	2	1	2	3	Y4
5	2	2	3	1	Y5
6	2	3	1	2	Y6
7	3	1	3	2	Y7
8	3	2	2	3	Y8
9	3	3	1	1	Y9

สำหรับการหาอิทธิพลของระดับต่างๆ ในแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองที่สนใจ สามารถคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยในแต่ละระดับที่มีอยู่ในชุดการทดลอง (Mean of one factor at level, $ML_{F,i}$) เช่น หากสนใจว่าระดับใดของปัจจัย B ที่เหมาะสม สามารถคำนวณได้ ดังนี้

$$ML_{B,1} = \frac{Y1+Y4+Y7}{3}$$

$$ML_{B,2} = \frac{Y_2 + Y_5 + Y_8}{3}$$

$$ML_{B,3} = \frac{Y_3 + Y_6 + Y_9}{3}$$

ค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละระดับของแต่ละปัจจัย สามารถแจกแจงดัง Table 5

Table 5. Analysis of the results of the L9 (3^4) orthogonal test.

Level	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
K ₁	ML _{A,1}	ML _{B,1}	ML _{C,1}	ML _{D,1}
K ₂	ML _{A,2}	ML _{B,2}	ML _{C,2}	ML _{D,1}
K ₃	ML _{A,3}	ML _{B,3}	ML _{C,3}	ML _{D,1}
R = max (k_i) - min (k_j)	R _A	R _B	R _C	R _D
Rank

ผลต่างของค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของระดับ (R) ในแต่ละปัจจัย สามารถนำมาอธิบายถึงอิทธิพลของปัจจัยนั้นๆ ได้ กล่าวคือ หากค่า R มีค่ามากแสดงว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อค่าตอบสนองที่เราสนใจนั้นมากและสามารถจัดอันดับความสำคัญในแต่ละปัจจัยได้

8.2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) เป็นการทดลองเพื่อหาสถานะที่เหมาะสมที่สุดของผลตอบสนองซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติในการวางแผนการทดลอง และมีการประยุกต์ใช้ RSM อย่างกว้างขวางในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และด้านอุตสาหกรรม (Khuri and Cornell, 1987) นอกจากนี้วิธี RSM มีแผนการทดลองที่นิยมใช้อยู่ 2 แผนการทดลอง คือ

1. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-วิลสัน (Box–Wilson Experimental Design)

2. แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบ็นเคน (Box–Behnken Design)

ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะแผนการทดลองแบบ บ็อกซ์-วิลสัน เนื่องจากการทดลองดังกล่าวมีการใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และสามารถแก้ปัญหาของการออกแบบ 3^n factorial designs ในการศึกษาปัจจัยที่มากกว่า 2 ตัวแปรเชิงปริมาณ และให้ผลการทดลองที่ครอบคลุมมากกว่าแผนการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบ็นเกิน ซึ่งต้องทำการทดลองค่อนข้างมากในการออกแบบ 3^n factorial designs (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544) ดังนั้นเพื่อจะลดจำนวนถึงทดลอง Box and Wilson (1951) คิดค้นแผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ซึ่งพัฒนาจากแผนการทดลองแบบแฟกเทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2^n factorial design) อย่างไรก็ตามแผนการทดลองแบบ CCD จึงเพิ่มระดับการทดลองแฟกเทอเรียลที่จุดศูนย์กลาง (center) และแนวแกน (axial) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง ($+1$) และระดับสูงสุด ($+\alpha$) (Cochran and Cox, 1957) เพื่อสามารถสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้น โค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสองได้ และในการวางแผนการทดลอง CCD มีจำนวนการทดลองเท่ากับ $2^n + (2n+6)$ สำหรับการทดลองที่มีปัจจัยหรือตัวแปรต้น 4 ตัวแปร ดังแสดงใน Table 6 มีจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 30 การทดลอง เปรียบเทียบกับ 3^n factorial designs มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 81 ชุดทดลอง สำหรับรหัสของปัจจัยหรือตัวแปรอิสระในการวางแผนการทดลองสามารถคำนวณจากสมการ

$$x_i = (X_i - X_{cp}) / \Delta X_i$$

- x_i คือ รหัสที่ใช้ในการวางแผนการทดลองแบบ CCD
- X_i คือ ค่าจริงของระดับปัจจัยในการทดลอง
- X_{cp} คือ ค่าจริงของระดับกลางของปัจจัยในการทดลอง
- ΔX_i คือ ผลต่างของระดับปัจจัย

Table 6. The Central Composite Design of independent variables.

Run	Independent variables			
	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

Source: Song *et al.*, (2007)

การคำนวณผลความคลาดเคลื่อนผลรวมของกำลังสอง (Sum square) ความเบี่ยงเบนความคลาดเคลื่อนของผลรวมกำลังสอง (Mean square) และความมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value) โดยใช้ ANOVA ผลรวมกำลังสองทั้งหมดคำนวณได้จากสมการ (Sum Square total, SS_{to})

$$SS_{to} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}, (Df = N-1)$$

y_i คือ ผลการตอบสนองที่ได้แต่ละชุดจากทดลอง

N คือ จำนวนการทดลองทั้งหมด

ผลรวมกำลังสองของเชิงเส้นตรง (Sum square regression linear, SS_{rl}) เชิงเส้นโค้ง (Sum square regression quadratic, SS_{rq}) และผลรวมกัน (Sum square regression interaction, SS_{ri}) ของรูปแบบความสัมพันธ์ลำดับที่สอง คำนวณได้ดังนี้

$$SS_{rl} = \sum_{i=1}^n b_i g_i \quad (Df = n)$$

b_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

g คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมของเชิงเส้นตรง

โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

n คือ จำนวนปัจจัย

$$SS_{rq} = \sum_{i=1}^n b_{ii} g_i^2 \quad (Df = n)$$

b_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นโค้ง โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

g_i คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมของเชิงเส้นโค้ง

โดย i คือ ลำดับของตัวแปร

n คือ จำนวนปัจจัยหรือตัวแปรในการศึกษา

$$SS_{ri} = \sum_{i,j=1}^n b_{ij} g_i g_j \quad (Df = m \frac{(m-1)}{2})$$

b_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีผลร่วมกันโค้ง โดย i และ j คือ

ลำดับของตัวแปร

$g_i g_j$ คือ ผลรวมของค่าตอบสนองคูณกับเมตริก X' ในเทอมที่มีผลร่วมกัน

โดย i และ j คือ ลำดับของตัวแปร

m คือ จำนวนตัวแปรที่มีผลร่วมกัน

ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Sum Square regression, SSR) คำนวณได้

$$\text{จาก } SSR = SSr_l + SSr_q + SSr_i$$

ผลรวมความคลาดเคลื่อนกำลังสองของการทดลอง (Sum Square error, SSE) คำนวณได้

$$\text{จาก } SSE = SSto - SSR$$

คำนวณความเบี่ยงเบนกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Mean square regression, MSr) คำนวณได้จาก

$$MSr = \frac{SSr}{Df_{SSr}}$$

SSr คือ ผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

Df_{SSr} คือ องศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย

คำนวณความเบี่ยงเบนของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Mean square error, MSE)

$$\text{คำนวณได้จาก } MSE = \frac{SSE}{Df_{SSE}}$$

SSE คือ ความคลาดเคลื่อนกำลังสองของการทดลอง

Df_{SSE} คือ องศาอิสระของผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนกำลังสองในการทดลอง

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p-value) ของสมการพหุนามกำลังสองหรือรูปแบบสมการถดถอยคำนวณได้จากสมการ

$$F = \frac{MSr}{MSe}$$

จากผลการคำนวณความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสมการพหุนามกำลังสองโดยสมการข้างต้นสามารถคำนวณค่า F-value เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value) โดยเทียบค่าที่ได้จากการคำนวณโดยสมการกับค่าที่ได้จากการตารางแจกแจง F ซึ่งกำหนดค่าองศาอิสระ (degree of freedom) เท่ากับจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของรูปแบบสมการถดถอย (Df_1) และจำนวนองศาอิสระของผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนกำลังสอง (Df_2) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544) โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นหากค่า F-value ที่ได้จากการคำนวณ

มากกว่าค่า F-value จากตาราง F แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (Y) และ ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษาสามารถอธิบายด้วยความสัมพันธ์ลำดับที่สอง (quadratic model)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะที่ผนังเซลล์ (cell bound) ของเซลล์ ยีสต์โดยวางแผนการทดลองทางสถิติ เพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน
2. ศึกษาสภาวะการตรึงเซลล์ยีสต์และสภาวะที่เหมาะสมในการนำเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงไปผลิตไบโอดีเซล

ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งแหล่งอาหาร อัตราการให้อากาศ และระยะเวลาในการเลี้ยง เพื่อนำสภาวะต่างๆ มาเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์ จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงไปหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอดีเซลและนำไปประยุกต์ใช้ในระบบการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

น้ำมันปาล์มโอเลอินทางการค้าตรามรกต ผลิตโดย บริษัท มรกตอินดัสตรีส์ จำกัด (มหาชน) มีค่าสaponนิไฟเคชั่น เท่ากับ 193.90 ± 3.67 ซึ่งจากการวิเคราะห์กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) พบว่า มีกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาเป็นกรดปาล์มมิติกและกรดลิโนเลอิก เท่ากับ 43.68, 36.50 และ 10.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. จุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่คัดแยกจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันในโรงงานผลิตน้ำมันปาล์ม ผ่านการทดสอบกิจกรรมในการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากภาคเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ปฐมนิพนธ์ ศรีหมาน, 2551) โดยเก็บรักษาในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ

3.1 Chloramphenicol	Sigma/Analyzed/Germany
3.2 D-Glucose	Ajax Finechem/Analyzed/Australia
3.3 Sodium chloride	Labscan/nalyzed/Thailand
3.4 Malt extract	Himedia/Analyzed/India
3.5 Peptone water	Himedia/Analyzed/India
3.6 Yeast extract	Himedia/Analyzed/India
3.7 Rhodamine	Himedia/Analytical/India
3.8 Gum arabic	Fluka/Analytical/France
3.9 กรดไขมันโอเลอิก	Nacalai/ Analytical/Japan

3.10 <i>p</i> -nitrophenyl palmitate (<i>p</i> PNC ₁₆)	Sigma/Analytical/Germany
3.11 Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	Merck/Analytical/Germany
3.12 Hydrochloric acid (HCl)	Lab scan/Analytical/Thailand
3.13 Sodium hydroxide (NaOH)	Merck/Analytical/Germany
3.14 Potassium chloride (KCl)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.15 Phenol	Fisher Scientific/Analytical/England
3.16 Potassium dihydrogen orthophosphate (KH ₂ PO ₄)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.17 Calcium chloride hexahydrate (CaCl ₂ .6H ₂ O)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.18 Magnesium sulphate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.19 Sodium carbonate anhydrous (Na ₂ CO ₃)	Lab scan/Analytical/Thailand
3.20 Copper sulphate pentahydrate (CuSO ₄ .5H ₂ O)	Lab scan/Analytical/Thailand
3.21 Amonium nitrite (NH ₄ NO ₃)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.22 Ferrous sulfate hepta hydrate (FeSO ₄ .7H ₂ O)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.23 Calcium chloride (CaCl ₂ .2H ₂ O)	Ajex Finechem/Analytical/Australia
3.24 Maganese II sulphate 4-hydrate (MnSO ₄ .4H ₂ O)	Ajex Finechem/Analytical/Australia

4. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทดลอง

อุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต/ ประเทศ
4.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Mettler Toledo, USA
4.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorious, USA
4.3 Vortex mixer	Labnet, USA
4.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach, Germany
4.5 ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Scientific promotion, USA
4.6 หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Tomy Seiko, Japan
4.7 พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettler Toledo, USA
4.8 ไมโครปิเปตขนาด 10-100 ไมโครลิตร	Labmate, USA
4.9 ไมโครปิเปตขนาด 1000ไมโครลิตร	Gilson, France
4.10 เครื่องเขย่ารุ่น 3017	Gesellschaft, Germany
4.11 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000	Hitachi, Japan

4.12 Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization

Detection analyzer (TLC/FID) รุ่น latroscan MK-5 Latron laboratories, Japan

4.13 เครื่องปั่นผสม (Homogenizer) รุ่น T25 basic Ika, Japan

วิธีการวิเคราะห์

1. พีเอช วัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช รุ่น Metter Toledo 320

2. การนับจำนวนยีสต์

นำตัวอย่างที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หยดลงบน counting chamber ของฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) นับจำนวนยีสต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound light microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า แล้วคำนวณเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตรจากสูตร

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูง} \\ &= 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \\ &= 0.1 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm}^3\text{)} \end{aligned}$$

$$\text{จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์ยีสต์ที่นับได้} \times \text{dilution factor}$$

$$\text{จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตร} = \text{เซลล์ยีสต์ที่นับได้} \times 10^4 \times \text{dilution factor}$$

3. การหาปริมาณเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์และสารละลายส่วนใสออกจากกัน นำเซลล์ยีสต์ที่ได้มาล้างด้วยอะซิโตนเพื่อเอาส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันออก หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งแล้วนำสารละลายส่วนใสออก นำตะกอนเซลล์ที่ได้เป็นอบที่ 105 องศาเซลเซียส วัดปริมาณเซลล์โดยการชั่งน้ำหนักจนได้ค่าน้ำหนักที่คงที่

4. การหาปริมาณเซลล์แห้งในวัสดุพองหลังจากตรึงเซลล์ยีสต์

สำหรับการหาปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุพอง (Biomass support particles; BSPs) ทำได้โดยอาศัยการวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่อยู่ในวัสดุพอง แล้วนำค่าโปรตีนที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับปริมาณเซลล์แห้ง ซึ่งการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่ถูกตรึงบนวัสดุพอง ทำโดยชั่งวัสดุที่ถูกตรึงเซลล์แล้วใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0.2 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์หลุดจากวัสดุพอง

โดยนำไปสั่นสะเทือนในอ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic bath) สองรอบรอบละ 30 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยจุ่มในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปต้มอีกครั้งและจุ่มในอ่างน้ำแข็งแบบเดิม จากนั้นคัดสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) แล้วนำค่าโปรตีนที่ได้มาหาปริมาณเซลล์แห้ง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับปริมาณเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 2.2)

5. การวิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

5.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มที่ละลายในไอโซออกเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมส่วนใสของเชื้อยีสต์ที่ได้จากการหมักเหียงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมอย่างรวดเร็วทิ้งให้แยกชั้น

5.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธี cupric acetate method (Ghosh *et al.*, 2005) โดยคัดสารละลายส่วนบนในปฏิกิริยาจากข้อ 5.1 มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมกันอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น นำส่วนของไอโซออกเทนไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปกรดปาล์มมิติก

5.3 การคำนวณกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติกปริมาณ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา}}$$

$$\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์} = \text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} \times \text{ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร}$$

(Extracellular lipase activity, U/L)

6. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจากตัวเซลล์ (cell bound lipase activity; CBL)

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) เช่นเดียวกับข้อ 5 แต่ส่วนผสมในปฏิกิริยาจะเป็นตัวเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาตร 1 มิลลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันตามวิธีการข้อ 5.2 โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จากตัวเซลล์ หมายถึง ปริมาณของตัวเซลล์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

$$\text{กิจกรรมของตัวเซลล์} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลาในการทำปฏิกิริยา} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}}$$

(U/mg dry cell weight)

$$\text{กิจกรรมทั้งหมดของตัวเซลล์} = \text{กิจกรรมของตัวเซลล์} \times \text{ปริมาณเซลล์ทั้งหมดในอาหาร 1 ลิตร}$$

(cell-bound lipase activity yield, U/L) (U/mg dry cell weight) (mg dry cell weight/L)

7. การวิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเซลล์ที่ถูกตรึงรูป

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) เช่นเดียวกับข้อ 6 แต่ส่วนผสมในปฏิกิริยาจะเป็นเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการตรึงและทำแห้งในเดซิเคเตอร์แบบสูญญากาศเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยทำการซังวัสดุพุง (Biomass support particles; BSPs) ที่ผ่านการตรึง ปริมาตร 0.2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันตามวิธีการข้อ 5.2 โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จากตัวเซลล์ที่ถูกตรึง หมายถึง ปริมาณของตัวเซลล์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา

1 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

$$\text{กิจกรรมของตัวเซลล์ที่ถูกตรึง} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟ} \times \text{เวลาในการทำปฏิกิริยา} \times \text{เซลล์แห้งในวัสดุขุขุย}}$$

(U/g dry cell weight in BSPs)

8. การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบจากปฏิกิริยามетаโนไลซิสของน้ำมันปาล์ม

การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบจากปฏิกิริยามетаโนไลซิสได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ ด้วย Thin Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID analyzer (Freedman *et al.*, 1984) มีดังนี้

- เตรียม quartz rods (silica gel powder coated Chromarod S-III) โดยแช่ในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทำ blank scan ด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกนอัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาทีและอัตราการไหลของอากาศ 2,000 มิลลิลิตรต่อนาที

- หยอดสารละลายไตรกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน: ไดเอทิลอีเทอร์: กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 50: 20: 0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน: เบนซีน ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร

- นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาสแกนภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan ซึ่งจะคำนวณปริมาณของหึ่งค์ประกอบแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้ peak เปรียบเทียบกับ peak ทั้งหมด

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกปัจจัยขององค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์

Rhodotorula mucilagenosa

1.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์

เตรียมยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* จาก stock culture มาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Yeast-Malt (YM) 100 มิลลิลิตร พีเอช 5.0 นำไปบ่มโดยวางบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อจากนั้น นำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มาเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า เพื่อนับจำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นด้วย haemocytometer เพื่อใช้ในการคำนวณและเจือจางให้ได้ปริมาณยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร เพื่อนำมาเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการศึกษาปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเซลล์

1.2 คัดเลือกปัจจัยขององค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1 โดยคำนวณปริมาตรที่ใช้ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1×10^6 ลงใน พลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Isolation medium for yeast (IMY) 200 มิลลิลิตร พีเอช 5.0 ซึ่งอาหาร IMY ในแต่ละพลาสติกจะมีองค์ประกอบต่างๆ ตามแผนการทดลองแบบ Taguchi method (ดัดแปลงจาก Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009) (Design Expert software version 7.1.6, Stat-Ease Inc., USA) โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา 4 ปัจจัย (L_9 (3^4)) ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่ง ไนโตรเจน สารลดแรงตึงผิวและพีเอชเริ่มต้นของอาหาร ซึ่งมีระดับของการศึกษาในแต่ละปัจจัย เป็นชนิดขององค์ประกอบของอาหาร ดังแสดงใน Table 7 และ 8 ตามลำดับ นำไปเลี้ยงโดยเขย่า ด้วยเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปหมუნเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์และ สารละลายส่วนใสออกจากกัน แล้วนำส่วนใสและเซลล์ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของ เอนไซม์ไลเปสตามวิธีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระด้วยวิธี two-phase emulsion method ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 5 และ 6

Table 7. Factors and their levels employed in the Taguchi's experimental design for cell-bound lipase by *Rhodotorula mucilagenosa*.

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
Carbon source (2%)	Palm oil	Coconut oil	Soybean oil
Nitrogen source (0.4%)	NH ₄ NO ₃	Tryptone	Peptone
Surfactant (0.2%)	Gum arabic	Tween 80	Triton-X 100
Initial pH	4	5	6

Table 8. L₉ (3⁴) orthogonal array of Taguchi experimental design lipase production by *Rhodotorula mucilagenosa*.

Run	A:Carbon (2%)	B:Nitrogen (0.4%)	C : initial pH	D : Surfactant (0.2%)
1	2	1	2	3
2	1	1	1	1
3	3	3	2	1
4	2	3	1	2
5	1	3	3	3
6	3	1	3	2
7	2	2	3	1
8	3	2	1	3
9	1	2	2	2

1.3 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของปัจจัยที่คัดเลือก

นำชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและชนิดสารลดแรงตึงผิวที่คัดเลือกมาศึกษาปริมาณที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) ในการวิเคราะห์หาปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งมีการกำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุด เป็น 5 ระดับ ดังแสดงใน Table 9 นำไปเลี้ยงโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 5 และ 6

Table 9. The coded levels and real values of the independent variables in the response surface methodology.

Variable	Parameter (% w/v)	Level coding				
		-1.68	-1	0	1	+1.68
X ₁	Palm oil	0.32	1	2	3	3.68
X ₂	NH ₄ NO ₃	0.1	0.2	0.35	0.5	0.6
X ₃	Gum arabic	0.2	0.3	0.45	0.6	0.7

Table 10. The Central Composite Design of the significant variables (in coded level).

Run	X ₁	X ₂	X ₃
1	1	1	1
2	0	0	0
3	1	-1	1
4	-1	1	-1
5	1.68	0	0
6	0	-1.68	0
7	1	-1	-1
8	-1.68	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	-1	1	1
12	0	0	-1.68
13	0	0	1.68
14	1	1	-1
15	0	0	0
16	0	0	0

Table 10. (cont.)

Run	X ₁	X ₂	X ₃
17	0	1.68	0
18	-1	-1	-1
19	-1	-1	1
20	0	0	0

1.4 ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำยีสต์ที่เตรียมไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหาร IMY broth อยู่ 200 มิลลิลิตร ตามปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง วิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 5 และ 6

1.5 การศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ยีสต์ในอาหารที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำยีสต์ที่เตรียมไว้มานับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า คำนวณให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหาร IMY broth อยู่ 200 มิลลิลิตร ตามสถานะและปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมดังข้อ 1.4 เป็นเวลา 180 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 และ 180 ชั่วโมง โดยในทุกๆ 12 ชั่วโมง ที่เก็บตัวอย่างยีสต์จะเก็บครั้งละ 2 มิลลิลิตรจากฟลาสก์โดยตัวอย่างที่เก็บมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาใช้นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วย haemocytometer นำจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้มาเขียนกราฟของการเจริญ (Growth curve) ระหว่างจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้กับเวลาโดยใช้แกนตั้งเป็นจำนวนเซลล์ยีสต์และแกนนอนเป็นช่วงเวลา ส่วนตัวอย่างที่เก็บมาอีก 1 มิลลิลิตร นำไปหมუნเหียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์และสารละลายส่วนใสออกจากกัน แล้วนำส่วนใสและเซลล์ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสตามวิธี two-phase emulsion method ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 5 และ 6

2. การคัดเลือกวัสดุพุงที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับ

2.1 การเตรียมวัสดุพุง

นำวัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ชานอ้อย (Sugarcane bagasse) ชั่งข้าวโพด (Corn cobs) และตะกอนดินดีแคนเตอร์จากโรงงานอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน (Palm decanter cake) มาสับหยาบด้วยมีด นำมาบดละเอียดและอบที่ 60 องศาเซลเซียส 2 วัน นำมาคัดขนาดด้วยตะแกรงร่อน คัดเอาอนุภาคที่ผ่านตะแกรงขนาด 35 mesh (ดัดแปลงจาก Santos *et al.*, 2008) และเปรียบเทียบกับวัสดุสังเคราะห์ ได้แก่ ฟองน้ำ 3M จากเส้นใยเซลลูโลส (3M cellulose sponge) ฟองน้ำโพลียูรีเทน (3M Polyurethane sponges) และผ้าพีวีเอชามัวร์ (Poly (vinyl alcohol) Chamois) มาตัดให้มีลักษณะเป็นลูกบาศก์ขนาดต่างๆ มาใช้ในการทำการตรึงเซลล์ตามข้อ 2.2

2.2 การตรึงเซลล์จุลินทรีย์

ชั่งวัสดุพุงที่ผ่านการเตรียม ใส่ลงในพลาสติก 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 5 กรัม สำหรับวัสดุธรรมชาติและเติม 50 อนุภาคสำหรับวัสดุสังเคราะห์ที่ตัดเป็นชิ้น เติมอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ IMY ที่เหมาะสมจากข้อ 1.4 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที วางทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส (ข้อ 1.5) หลังจากนั้นกรองเซลล์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง กำจัดน้ำมันด้วยเฮกเซนและไล่น้ำด้วยอะซิโตน นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องเตอบแบบสุญญากาศประมาณ 3 ชั่วโมง

2.3 การศึกษาลักษณะเซลล์ที่ถูกตรึงและวัดขนาดของรูพรุนของวัสดุตรึง

นำวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรและวัสดุสังเคราะห์ที่ผ่านการตรึงเซลล์ตามข้อ 2.2 มาศึกษาลักษณะภายนอก โดยการนำชิ้นและวัสดุเป็นผงมาส่องด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) โดยตรงที่กำลังขยาย 45 เท่า พร้อมทั้งนำวัสดุสังเคราะห์มาวัดขนาดของรูพรุนด้วยกล้องจุลทรรศน์ (compound light microscope) โดยทำ wet mount วัสดุสังเคราะห์ที่ตัดขวางด้วยมีดผ่าตัด (scalpel) ตัดให้เป็นแผ่นบางหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร วางบนแผ่นสไลด์ นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ทำการวัดขนาดรูพรุนโดยการนับช่องของ ocular micrometer หรือ eyepiece micrometer และนำจำนวนช่องที่นับได้ไปคำนวณหาความกว้างของรูพรุน โดยวัดช่องของ ocular micrometer เท่ากับกิโลครอนเมื่อเทียบกับ stage micrometer ที่กำลังขยาย 400 เท่า

2.4 การคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

นำเซลล์ที่ถูกตรึงมาคัดเลือกโดยหากิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปส โดยซึ่งวัสดุวัสดุธรรมชาติที่ผ่านการตรึงชนิดละ 0.3 กรัม และวัสดุสังเคราะห์ชนิดละ 0.2 กรัม ลงในสารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มที่ละลายในไอโซออกเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร หากิจกรรมไฮโดรไลซิสด้วยวิธี two-phase emulsion method ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 5 พร้อมหาปริมาณน้ำหนักเซลล์ที่ถูกตรึง ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 โดยรายงานเป็นมิลลิกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพวงหนึ่งกรัมที่ได้จากการเทียบปริมาณโปรตีน

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์แบบดูดซับ

3.1 ผลของขนาดของตัวพวง

นำวัสดุที่ผ่านการคัดเลือกทั้งวัสดุที่ได้จากธรรมชาติและที่สังเคราะห์มาคัดเลือกหาขนาดที่เหมาะสม โดยวัสดุที่ได้จากธรรมชาติคัดเลือกจะใช้ตะแกรงร่อนมาตรฐานซึ่งวัสดุที่นำมา ร่อนได้ผ่านการบดเป็นผงละเอียดแล้ว ส่วนวัสดุที่สังเคราะห์จะอาศัยการตัดเป็นชิ้นขนาดต่างๆ นำมาซึ่งใส่ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 3 กรัม สำหรับวัสดุธรรมชาติ และเติม 50 อนุภาคสำหรับวัสดุสังเคราะห์ที่ตัดเป็นชิ้น ทำการตรึงเซลล์และวิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึง เช่นเดียวกับข้อ 2.3

3.2 ผลของปริมาณตัวพวงที่เหมาะสมต่อปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำวัสดุที่ผ่านการคัดขนาดที่เหมาะสมในข้อ 3.1 มาทำการศึกษาลงอัตราส่วนของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อวัสดุพวง โดยซึ่งน้ำหนักของวัสดุ 2, 3, 4, และ 5 เท่า ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 200 มิลลิลิตร ทำการตรึงเซลล์และวิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึง เช่นเดียวกับข้อ 2.3

3.3 ผลของการตรึงเซลล์แบบดูดซับโดยการเลี้ยงซ้ำในอาหารใหม่ (Repeated cultivation)

นำวัสดุที่ผ่านการคัดขนาดที่เหมาะสมในข้อ 3.1 และอัตราส่วนของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อวัสดุพวงที่เหมาะสมในข้อ 3.2 มาทำการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการเลี้ยงร่วม โดยการเติมเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองเซลล์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วถ่ายวัสดุที่ผ่านการตรึงดังกล่าวลงในอาหารสูตรใหม่ ทำการเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองเซลล์ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง กำจัดน้ำมันด้วยเฮกเซนและไล่น้ำด้วยอะซิโตน นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิห้องด้วยเคซิเคเตอร์แบบ

สูญญากาศประมาณ 3 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์กิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึง เช่นเดียวกับข้อ 2.3

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในการผลิตเมทิลเอสเทอร์

นำเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการตรึงในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3 มาทำการศึกษาต่อการผลิตไบโอดีเซล ได้แก่

4.1 ศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ตรึงรูปต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

ใช้เซลล์ตรึงรูป 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม ต่อสับสเตรท 3 กรัม โดยเตรียมสับสเตรท คือ ชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 3.0 กรัม กับเมทานอล 0.324 กรัม โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:6 (โมล : โมล) ใส่ใน screw-capped bottle ขนาด 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท นำไปเขย่าด้วยเครื่อง 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไครกลีเซอไรด์ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID เลือกความเข้มข้นของเซลล์ตรึงรูปที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

4.2 ผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในปริมาณต่างๆ ดังนี้ 2, 5, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารตั้งต้น ลงใน screw-capped bottle ขนาด 10 มิลลิลิตร ชั่งวัสดุปฏิกิริยาที่ถูกตรึงเซลล์โดยกำหนดให้การทำปฏิกิริยามาทาโนไลซิสด้วยน้ำมันปาล์ม 3 กรัม ต่อความเข้มข้นของเซลล์ตรึงรูปดังข้อ 4.1 นำไปเขย่าด้วยเครื่อง 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไครกลีเซอไรด์ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID เลือกปริมาณน้ำที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

เตรียมสับสเตรทเช่นเดียวกับข้อ 4.1-4.2 ทำปฏิกิริยามาทาโนไลซิสที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไครกลีเซอไรด์ ไคกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และ

กรดไขมันด้วย TLC/FID เลือกอุณหภูมิที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

4.4 ศึกษาอัตราส่วนโมลของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

ทำปฏิกิริยามะทาโนไลซิสกับเมทานอลโดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล เท่ากับ 1:3, 1:4, 1:6, 1:9, และ 1:12 (โมล : โมล) ปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสมจากข้อ 4.1 และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.3 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์และกรดไขมันด้วย TLC/FID เลือกอัตราส่วน โมลที่สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุดเพื่อทำการทดลองในข้อต่อไป

5. การนำเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันดีเซลชีวภาพ

5.1 การเตรียมเมทิลเอสเทอร์ให้มีความบริสุทธิ์

นำเมทิลเอสเทอร์ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม ปริมาณ 0.5 กรัม มาผ่านคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 60 (Silica gel 60) ปริมาณ 5 กรัม บรรจุในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำเมทิลเอสเทอร์ที่ผ่านคอลัมน์ไประเหยเมทานอลส่วนเกินออกโดยการกลั่นด้วยเครื่อง Rotary evaporator เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของไบโอดีเซล ก่อนนำไปหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์เทียบกับกราฟมาตรฐานและทดสอบคุณสมบัติด้านเชื้อเพลิง

5.2 การหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์

ทำกราฟมาตรฐานของเมทิลเอสเทอร์มาตรฐานโดยการชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำมาเปรียบเทียบกับเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ในข้อ 5.1 โดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ ด้วยเครื่อง Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (GC-FID) โดยใช้คอลัมน์ชนิด Select Biodiesel for Fame, length 30 m., 320 μm ID, 0.25 μm film thickness สภาวะที่ใช้ คือ ที่อัตราไหลแก๊สพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะคู่อบ มีอุณหภูมิเริ่มต้น 210 องศาเซลเซียส คงที่ 12 นาที และเพิ่มอุณหภูมิ ในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส คงที่ 8 นาที ตรวจวัดสัญญาณของสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization (Jham *et al.*, 1982) ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟของ peak ซึ่งนำมาหาปริมาณเมทิลเอสเทอร์ในตัวอย่างได้ โดยการเทียบจากพื้นที่ใต้กราฟของ peak เมทิลเอสเทอร์มาตรฐานที่ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนในแต่ละความเข้มข้น

บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa*

1.1 คัดเลือกปัจจัยขององค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์

Rhodotorula mucilagenosa

การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ (Intracellular) และเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular) โดยใช้แบบแผนการทดลองแบบ Taguchi method (ดัดแปลงจาก Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009) โดยมีปัจจัยที่ทำการศึกษา 4 ปัจจัย ($L_9 (3^4)$) ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารลดแรงตึงผิวและฟิเอชเริ่มต้นของอาหาร ซึ่งมีระดับของการศึกษาในแต่ละปัจจัยเป็นชนิดขององค์ประกอบของอาหาร คือ แหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ทริปโตน (Tryptone) และเปปโตน (Peptone) ผลของฟิเอชอาหารเริ่มต้น ได้แก่ ฟิเอช 4, 5 และ 6 และสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ Tween 80, Triton X-100 และกัมอะราบิก เมื่อออกแบบการทดลองโดยใช้แบบแผนการทดลองทางสถิติดังกล่าว สามารถออกแบบทั้งหมดได้ 9 ชุดการทดลอง ดังแสดงใน Table 8 พบว่า การผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์นอกตัวเซลล์ (Extracellular) อยู่ในช่วง 664.9-1223.9 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสในตัวเซลล์ (Intracellular) ซึ่งมีค่ากิจกรรมอยู่ในช่วง 50-177 ยูนิตต่อลิตร โดยมีปริมาณเซลล์แห้งตั้งแต่ 5.30-11.23 กรัมต่อลิตร ซึ่งชุดการทดลองที่มีน้ำมันมะพร้าว (ชุดการทดลองที่ 3, 4 และ 6) เป็นองค์ประกอบของอาหารจะให้ปริมาณเซลล์ค่อนข้างน้อยอยู่ในช่วงปริมาณ 5.30-6.30 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์น้อยไปด้วย คืออยู่ในช่วง 50-88 ยูนิตต่อลิตร ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ (ชุดการทดลองที่ 2) จะให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสตัวเซลล์ของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เท่ากับ 176.9 ± 2.33 ยูนิตต่อลิตร โดยมีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 9.43 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 11

Table 11. L₉ (3⁴) orthogonal array and results of Taguchi experimental design lipase production by *Rhodotorula mucilagenosa*.

Run	Parameter				Number of yeast cell (Log cell/ml)	Biomass (g/L)	Extra. yield (U/L)	Y ₁ ^a ; CBL activity yield (U/L)	Y ₂ ^b ; Synthetic activity (% conversion)
	A	B	C	D					
1	Soy.	NH ₄ NO ₃	5	Gum	8.35±0.22	9.63±0.46	1223.86±56.86	145.9±9.66	33.92±1.67
2	Soy.	Peptone	6	Tween80	8.43±0.12	9.43±0.25	1166.04±32.02	176.9±2.33	11.89±0.85
3	Coconut	Peptone	5	Triton-X	8.32±0.22	6.30±0.15	893.80±14.07	88.3±10.02	0.00±0.00
4	Coconut	Tryptone	6	Gum	8.23±0.06	5.83±0.23	737.21±20.14	49.9±5.68	19.20±2.45
5	Palm	NH ₄ NO ₃	6	Triton-X	8.34±0.02	11.23±0.07	669.75±17.89	57.2±2.22	0.00±0.00
6	Coconut	NH ₄ NO ₃	4	Tween80	8.24±0.34	5.30±0.22	999.81±25.26	73.6±1.78	15.69±1.26
7	Soy.	Tryptone	4	Triton-X	8.21±0.11	8.36±0.14	896.21±12.47	99.5±4.87	0.00±0.00
8	Palm	Tryptone	5	Tween80	8.40±0.03	8.23±0.27	664.93±15.55	57.6±3.73	15.19±1.45
9	Palm	Peptone	4	Gum	8.42±0.08	7.70±0.07	715.52±26.33	83.1±2.75	35.59±0.87
C	Glucose	NH ₄ NO ₃	5	Tween80	8.76±0.06	15.60±1.07	63.34±6.53	5.77±0.75	0.00±0.00

^aLipase activity was determined based on the hydrolysis of palm oil at pH 7.0, 30 °C.

^bPalm oil and methanol (1:6 mole ratio) were used as substrates. All values were analyzed in triplicates.

เมื่อนำค่าปริมาณเซลล์แห้ง (Biomass) และค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ (CBL activity yield) มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance : ANOVA) พบว่า สูตรอาหารที่ออกแบบทั้ง 9 ชุดการทดลองจะให้ปริมาณเซลล์แห้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และยังพบว่าค่าปริมาณเซลล์แห้งมีความแปรปรวนของข้อมูลค่อนข้างสูง โดยมีค่า R^2 ค่อนข้างต่ำ ($R^2 = 55.65\%$) ซึ่งเป็นผลมาจากค่าปริมาณเซลล์แห้งอาจมีน้ำหนักมาจากองค์ประกอบอาหาร ได้แก่ น้ำมันและสารลดแรงตึงผิวที่สามารถเคลือบผิวเซลล์ ถึงแม้จะมีขั้นตอนการล้างด้วยอะซิโตนเพื่อเอาส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันออกแล้วก็ตาม นอกจากนี้ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ยังมีความสามารถในการสะสมไขมันในตัวเซลล์ยีสต์ ซึ่งถ้าเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน การสะสมไขมันของตัวเซลล์ก็มีความแตกต่างกันเช่นกัน (Karatay and Donmez, 2010) ส่งผลทำให้ค่าปริมาณเซลล์แห้งมีความแปรปรวน ซึ่งสังเกตจากการนับเซลล์ยีสต์ด้วยวิธีนับตรงด้วย hemacytometer พบว่า จำนวนเซลล์ยีสต์ในอาหารที่มีน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ปริมาณเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 8.20-8.43 Log เซลล์/มิลลิลิตร (Table 11) ซึ่งไม่ความสัมพันธ์กับค่าปริมาณเซลล์แห้งที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกัน ดังนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการวิเคราะห์เป็นน้ำหนักขององค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงที่เป็นปัจจัยในการรบกวนการวิเคราะห์นั่นเอง ส่วนการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยวัดจากค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของตัวเซลล์ (CBL activity yield) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลหลักต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 95 และมากกว่าร้อยละ 90 ตามลำดับ ส่วนชนิดของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของตัวเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงใน Table 12 ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ชนิดของน้ำมันมีผลอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ซึ่งน้ำมันจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้เอง จำเป็นต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำ (Inducer) เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งสารเหนี่ยวนำนี้อาจเป็นสารชนิดเดียวหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก็ได้ จาก Table 11 พบว่า ในสูตรอาหารที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบจะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์เพิ่มขึ้นกว่า 10 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งสอดคล้อง

กับรายงานวิจัยของ Essamri และคณะ (1998) พบว่า ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำมันเป็นสารเหนียวน้ำ จากการเติมน้ำมันชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่าทั้งการเจริญของ *Rhizopus oryzae* และกิจกรรมไลเปสที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำมันถึง 3 เท่า เช่นเดียวกับ Vanot และคณะ (2001) พบว่า *Penicillium cyclopium* สามารถผลิตไลเปสได้มากถึง 45 หน่วยต่อมิลลิเมตร ในอาหารที่มี corn steep นอกจากนี้ผลงานวิจัยของ Saad และคณะ (2005) รายงานว่า น้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ มีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปสของ *Fusarium oxysporum* เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่เติมน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน จากรายงานต่าง ๆ ข้างต้นจะเห็นว่า น้ำมันพืชแต่ละชนิดมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสต่างกันทั้งนี้อาจเนื่องจากคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันพืชและขึ้นอยู่กับแหล่งและชนิดของจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษา (Maia et al., 2001) เพราะจุลินทรีย์แต่ละท้องถิ่นมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและปริมาณได้แตกต่างกัน จะเห็นได้จากการคำนวณหาชนิดน้ำมัน (ปัจจัย A) ชนิดแหล่งไนโตรเจน (ปัจจัย B) ผลระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหาร (ปัจจัย C) และชนิดของสารลดแรงตึงผิว (ปัจจัย D) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ ดังแสดงใน Table 13 ซึ่งพบว่า ค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองให้กิจกรรมไฮโดรไลซิสตัวเซลล์สูงสุดเฉลี่ย 140.8 หน่วยต่อลิตร ในขณะที่อาหารที่มีองค์ประกอบน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าวให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของเอนไซม์เฉลี่ย 70.6 และ 66.0 หน่วยต่อลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานงานวิจัยของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* MTCC-8737 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับงานวิจัยที่นำมาศึกษา พบว่า ผลของการเติมน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันดอกทานตะวัน จะกระตุ้นให้ *Rhodotorula mucilagenosa* MTCC-8737 ให้ค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสที่แตกต่างกันในอาหารที่มีน้ำมันต่างชนิดกัน โดยน้ำมันถั่วเหลืองให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสที่สูงสุดเป็น 29,000 หน่วยต่อลิตร (Chennupati et al., 2009)

Table 12. Analysis of variance (ANOVA) for total cell bound lipase (CBL) production by *Rhodotorula mucilagenosa*.

Source	df	Activity yield				Biomass				FAME			
		Sum of Squares	Mean Square	F- Value	<i>P</i> > F	Sum of Squares	Mean Square	F- Value	<i>P</i> > F	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	<i>P</i> > F
Model	6	14532.51	2422.09	20.75046	0.0467	12.59	2.1	0.42	0.8276	1401.37	233.56	5.7	0.1567
A-Carbon	2	10539.87	5269.93	45.14851	0.0217	5.28	2.64	0.53	0.6554	44.06	22.03	0.54	0.6503
B-Nitrogen	2	3327.82	1663.91	14.25501	0.0656	2.79	1.39	0.28	0.7827	45.32	22.66	0.55	0.6439
D-Surfactant	2	664.83	332.41	2.847856	0.2599	4.53	2.27	0.45	0.6889	1311.99	655.99	16.01	0.0588
Residual	2	233.45	116.72			10.03	5.02			81.93	40.97		
Cor Total	8	14765.96				22.63				1483.3			
		$R^2 = 98.42\%$				$R^2 = 55.65\%$				$R^2 = 94.48\%$			

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิซสูงสุดคือ เปปโตน เกลี้ย 116.1 ยูนิตต่อลิตร รองลงมาเป็นแอมโมเนียมไนเตรทและทริปโตนเกลี้ย 92.2 และ 69.0 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์แตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดใช้ในโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี เช่น Izumi และคณะ (1990) ได้ผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจาก *Pseudomonas sp.* KW1 โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และยีสต์สกัด (yeast extract) 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แต่จากการศึกษาของ Papaparaskevas และคณะ (1992) กลับพบว่า *Rhodotorula glutinis* ใช้แอมโมเนียมฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ในการผลิตไลเปสได้ดีกว่า เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้พบว่ายีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์คือ แอมโมเนียมไนเตรทซึ่งให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิซของตัวเซลล์ค่อนข้างสูงสามารถใช้แทนเปปโตนได้ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบราคาแล้วเปปโตนจะมีราคาสูงกว่าแอมโมเนียมไนเตรท โดยมีราคาเท่ากับ 5 บาทต่อกรัมและ 0.96 บาทต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนอิทธิพลของพีเอชเริ่มต้นอาหารที่ 4, 5 และ 6 เป็นช่วงระดับพีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิซของตัวเซลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) จึงให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน เกลี้ย 85.4, 97.3 และ 94.7 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารลดแรงตึงผิว Tween 80 ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิซสูงสุด เกลี้ย 102.7 ยูนิตต่อลิตร รองลงมาเป็น กัมอะราบิกและ Triton X-100 ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิซ เกลี้ย 93.0 และ 81.7 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 13 ซึ่งการเติมสารลดแรงตึงผิวในอาหาร จะทำให้เซลล์จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์มากขึ้น (Lin *et al.*, 1995; Berto *et al.*, 1997; Dominguez *et al.*, 2003) โดย Tween 80 เป็นสารประกอบของพอลิเอทออกซิเลตซอร์บิแทน (polyethoxylated sorbitan) และกรดโอเลอิก (oleic acid) มีผลต่อโครงสร้างผนังเซลล์เมมเบรนของเซลล์จุลินทรีย์ให้มีการจัดเรียงตัวแบบหลวมขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการขนส่งสารออกมานอกเซลล์เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งพบว่า Tween 80 สามารถเป็นตัวกระตุ้นในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเซลล์จุลินทรีย์ได้อีกด้วย (Acikel *et al.*, 2010)

Table 13. Analysis of the results of Taguchi experimental design lipase production by *Rhodotorula mucilagenosa*.

	Y1; CBL activity yield (U/L)				Y2; Transesterification synthetic activity (% conversion)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁ ^a	66.0	116.1	85.4	93.0	16.93	15.83	17.09	29.57
K ₂	70.6	69.0	97.3	102.7	11.63	11.46	16.37	14.26
K ₃	140.8	92.2	94.7	81.7	15.27	16.54	10.36	0.00
R ^b	74.8	47.1	11.9	21.0	5.3	5.08	6.73	29.57
Optimal level	A3	B1	C2	D2	A1	B3	C1	D1

^a $k_i = (\sum \text{the value of one factor at level } i)/3$.

^b $R = \max(k_i) - \min(k_i)$ of one factor.

เมื่อนำตัวเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงในสูตรอาหาร โดยออกแบบการทดลองแบบ Taguchi method ทั้ง 9 สูตร มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์ม โดยใช้ในอัตราส่วนระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล 1:6 มีปริมาณน้ำคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ต่อกรัมซบสเตรท ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วสูง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อาหารทั้ง 9 สูตรให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.15$) โดยชุดการทดลองที่มีกัมมะราบิกจะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 9, 1 และ 4 ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 35.59 ± 0.87 , 33.92 ± 1.67 และ 19.20 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 11 ในขณะที่อาหารที่มี Triton X-100 เป็นองค์ประกอบ พบว่า ไม่มีกิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ส่วนอาหารที่มีองค์ประกอบเป็น Tween 80 จะให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์อยู่ในช่วง 12-16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์เป็นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ในสภาวะที่ไม่มีหรือมีปริมาณน้ำน้อยมากในระบบของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งมีความแตกต่างจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่มีน้ำในระบบ จะเห็นได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์อิทธิพลของปัจจัย (Contribution) ทั้ง 4 ปัจจัย ซึ่งอิทธิพลของกิจกรรมไฮโดรไลซิสของตัวเซลล์มาจากปัจจัยแหล่งคาร์บอนเป็นหลัก รองลงมาเป็นแหล่งไนโตรเจน ฟิเอชเริ่มต้นของอาหารและสารลดแรงตึงผิว เท่ากับ 71.38, 22.54, 1.58 และ 4.50 ตามลำดับ ในขณะที่กิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของตัวเซลล์ ปัจจัยของสารลดแรงตึงผิวมีอิทธิพลมากที่สุด เท่ากับ 68.78 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น

ปัจจัยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและฟิโอสเริ่มต้นของอาหาร คิดเป็น 15.6, 15.55 และ 2.85 ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 6 ดังนั้นการจะหาชนิดของแหล่งน้ำมัน แหล่งไนโตรเจนหรือชนิดของสารลดแรงตึงผิว ต้องคำนึงถึงลักษณะของตัวเซลล์ที่จะนำไปใช้ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดของสารลดแรงตึงผิว เพราะจะส่งผลต่อลักษณะความเป็นไฮโดรโฟบิกของผิวเซลล์ (Surface-displayed) ถ้าหากเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงมีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำมาก ตัวเซลล์ยีสต์ที่มีเอนไซม์ไลเปสที่ผิวเซลล์ก็สามารถละลายหรือมีโอกาสในการเข้าทำปฏิกิริยาในน้ำมันเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นระบบที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง ซึ่งการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงค่าไฮโดรฟิลิก/ไลโปฟิลิกบาลานซ์ (Hydrophilic/Liophilic Balance: HLB) ค่า HLB เป็นค่าที่ใช้อธิบายสมบัติเฉพาะตัวของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ขึ้นกับโครงสร้างของส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ เป็นเลขจำนวนเต็มไม่มีหน่วยถ้ามีค่า HLB ต่ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ชอบละลายในน้ำมันมากกว่าน้ำ ถ้ามีค่า HLB สูง เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ชอบละลายในน้ำมากกว่าน้ำมัน ซึ่งค่า HLB ของกัมอะราบิกมีค่าต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ Tween 80 และ Triton X-100 โดยมีค่าเท่ากับ 11.9, 13.0 และ 15.0 ตามลำดับ (วรรณิ อุโพบูรณ์, 2547) แสดงว่า กัมอะราบิกเป็นสารที่สามารถละลายในระบบน้ำมันได้ดี เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีองค์ประกอบของกัมอะราบิก เซลล์ก็สามารถดูดซับสารลดแรงตึงผิวดังกล่าวส่งผลให้บริเวณผิวเซลล์ยีสต์มีความเป็นไฮโดรโฟบิกมากขึ้น ทำให้สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันได้มากขึ้นจึงทำให้ได้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเมื่อเทียบกับสารลดแรงตึงผิวอื่นที่เติมลงในอาหาร ในขณะที่ Triton X-100 มีค่า HLB สูงสุด เมื่อเซลล์ยีสต์ดูดซับทำให้เซลล์มีความเป็นไฮโดรโฟบิกน้อย เมื่อนำมาเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันกลับไม่เกิดปฏิกิริยา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hama และคณะ (2010) ทำการศึกษาเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะที่ตัวเซลล์ จะมีกิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นในระบบที่มีเฮกเซนเป็นตัวทำลาย เมื่อนำเซลล์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* แช่ในสารลดแรงตึงผิวได้แก่ Tween 20, Tween 60 และ Tween 80 พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถดูดซับสารลดแรงตึงผิว Tween 20 ได้มากที่สุด ส่งผลให้ตัวเซลล์มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงสุด ทำให้ได้เมทิลเอสเทอร์ 96.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่มีการแช่สารลดแรงตึงผิวให้เมทิลเอสเทอร์ 72.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารลดแรงตึงผิวทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารที่มีองค์ประกอบเป็นสารลดแรงตึงผิว

ต่างชนิดกัน ก็ทำให้เซลล์มีความเป็นไฮโดรโฟบิกที่แตกต่างกันส่งผลทำให้ได้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้สารลดแรงตึงจะมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์แล้ว องค์ประกอบกรดไขมันของฟอสโฟลิพิดที่อยู่บริเวณเซลล์เมมเบรนยังมีผลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ด้วย โดยองค์ประกอบของกรดไขมันของฟอสโฟลิพิดสามารถควบคุมหรือกำหนดชนิดของกรดไขมันของฟอสโฟลิพิดได้ ซึ่งอาศัยการเติมน้ำมันชนิดต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง Hama และคณะ (2004) พบว่า การเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ได้แก่ กรดโอเลอิกหรือลิโนเลอิก ส่งผลให้กิจกรรมสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของตัวเซลล์มากกว่าการเติมกรดไขมันอิ่มตัว แต่ความคงตัวของเอนไซม์บนตัวเซลล์จะต่ำกว่าอาหารที่เติมกรดไขมันอิ่มตัวของกรดปาล์มมิติก ซึ่งจากผลการทดลอง Table 13 พบว่า ตัวเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองจะให้กิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ที่ใกล้เคียงกันกับการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำปาล์ม มีค่าเฉลี่ยของกิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ระดับปัจจัย เท่ากับ 15.27 และ 16.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าน้ำมันถั่วเหลืองจะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าน้ำมันปาล์ม แต่เซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในน้ำมันปาล์มก็ยังให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่สูงกว่าเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีน้ำมันปาล์มทำให้เซลล์เมมเบรนขนส่งสารที่เป็นน้ำมันปาล์มในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำมันที่ต่างชนิดกันกับการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zeng และคณะ (2006) พบว่า เซลล์ *Rhizopus oryzae* ที่เลี้ยงในน้ำมันพืชชนิดเดียวกันกับน้ำมันพืชที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่สูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำมันต่างชนิดกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการเตรียมเซลล์ *Rhizopus oryzae* โดยการนำไปแช่ในน้ำมันถั่วเหลืองตามสภาวะที่กำหนดสามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (initial reaction rate) เร็วขึ้น ซึ่งการเตรียมเซลล์ *Rhizopus oryzae* ในน้ำมันถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะเร่งปฏิกิริยาเมทานอลไลซิสของน้ำมันถั่วเหลืองเร็วขึ้นและสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเตรียมเซลล์ โดยจะให้ผลผลิตเป็นเมทิลเอสเทอร์ มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์โดยใช้เวลาเพียง 30 นาที เมื่อเทียบกับชุดควบคุมแล้วที่ต้องใช้เวลามากกว่า 4 ชั่วโมง ซึ่งการเตรียมเซลล์โดยการนำไปสัมผัสกับน้ำมันที่จะผลิตเป็นไบโอดีเซลตามระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันจะช่วยให้เซลล์เพิ่มการถ่ายโอนมวลของสารในการทำปฏิกิริยาดังขึ้นทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้นด้วย

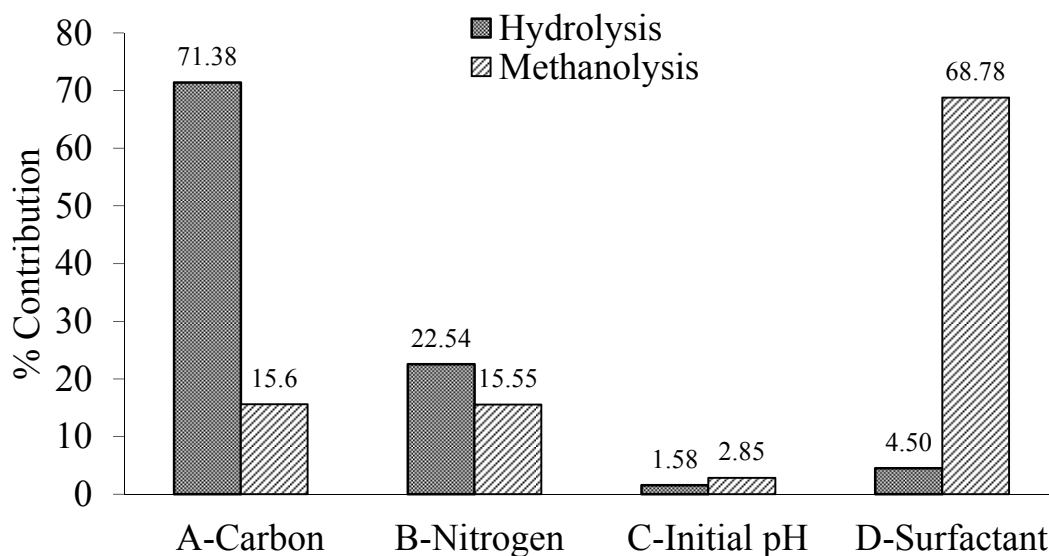


Figure 6. Contribution of four factors on hydrolysis activity and methanolysis activity by *Rhodotorula mucilagenosa* in a submerged culture using Taguchi experimental design.

ดังนั้นจากการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติเบื้องต้นด้วย Taguchi method สามารถคัดเลือกชนิดของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอโนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์เพื่อนำเซลล์ไปเร่งปฏิกิริยาทรานส์เทอริฟิเคชัน โดยใช้ Table 13 ของเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งได้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันปาล์ม (A1) แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรท (B3) พืชอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5 (C2) และสารลดแรงตึงผิวเป็นกัมอะราบิก (D1) เพื่อนำไปศึกษาในระดับที่เหมาะสมของปัจจัยเหล่านี้ต่อการผลิตเอโนไซม์ของตัวเซลล์และกิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ต่อไป

1.2 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

จากการศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ และการนำเซลล์ไปผลิตเมทิลเอสเทอร์ของยีสต์สายพันธุ์ *Rhodotorula mucilagenosa* P11I89 โดย ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) ในการวิเคราะห์ข้อมูลและดูความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย โดยใช้ Design Expert software (trial version 7.1.5, Stat-Ease Inc., USA) ทำการทดลองกับอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรและนำไปเลี้ยงโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม (0.32, 1.0, 2.0, 3.0 และ 3.68 เปอร์เซ็นต์, w/v) แอมโมเนียมไนเตรท (0.10, 0.20, 0.35, 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์, w/v) และความเข้มข้นของกัมอะราบิก (0.20, 0.30, 0.45, 0.60 และ 0.70 เปอร์เซ็นต์, w/v) สามารถออกแบบชุดการทดลองได้ทั้งหมด 20 ชุดการทดลอง พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์อยู่ระหว่าง 6.03-11.19 กรัมต่อลิตร ค่าผลผลิตของกิจกรรมไฮโดรไลซิซของตัวเซลล์อยู่ระหว่าง 72.28-262.36 ยูนิตต่อลิตร และกิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มอยู่ระหว่าง 8.53-76.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน Table 14 โดยชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 18 ให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ ปริมาณเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ และค่ากิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด ตามลำดับ ในชุดการทดลองที่มีน้ำมันปาล์ม 3.68 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แอมโมเนียมไนเตรท 0.60 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และกัมอะราบิก 0.70 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (ชุดการทดลองที่ 1) ให้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ส่วนชุดการทดลองที่ 2 ที่ให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์สูงสุด ประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แอมโมเนียมไนเตรท 0.35 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ กัมอะราบิก 0.45 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 18 เซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงที่มีองค์ประกอบของน้ำมันปาล์ม 0.32 เปอร์เซ็นต์ (w/v) แอมโมเนียมไนเตรท 0.10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ กัมอะราบิก 0.20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีความสามารถในการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์สูงสุด

Table 14. The Central Composition Design of the significant variables (in coded levels), along with the responses (DCW, CBL yield and FAME) by cell cultures of *Rhodotorula mucilagenosa*.

Run	X ₁	X ₂	X ₃	DCW (g/L)		CBL yield (U/L)		FAME (% conversion)	
				Actual	Predicted	Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	1	1	1	12.27	11.19	95.40	149.91	25.52	26.52
2	0	0	0	10.84	8.45	262.36	243.51	63.00	63.47
3	1	-1	1	10.76	9.23	170.57	134.19	45.98	49.57
4	-1	1	-1	6.27	6.58	109.86	144.81	62.39	50.80
5	1.68	0	0	8.49	7.27	95.40	90.33	21.58	23.72
6	0	-1.68	0	9.91	9.77	155.39	204.92	52.73	61.77
7	1	-1	-1	7.47	7.59	124.31	124.61	62.31	50.59
8	-1.68	0	0	5.91	6.76	92.51	100.29	16.90	25.83
9	0	0	0	8.84	8.45	247.90	243.51	62.00	63.47
10	0	0	0	8.49	8.45	252.24	243.51	68.00	63.47
11	-1	1	1	11.64	10.78	102.63	100.91	8.53	12.25
12	0	0	-1.68	6.93	6.03	103.72	123.83	51.45	68.64
13	0	0	1.68	10.36	10.90	108.41	95.23	41.56	35.66
14	1	1	-1	7.20	6.99	90.34	79.98	30.67	27.30
15	0	0	0	8.44	8.45	218.99	243.51	57.46	63.47
16	0	0	0	7.87	8.45	237.79	243.51	65.29	63.47
17	0	1.68	0	11.02	10.74	229.84	184.14	26.25	28.74
18	-1	-1	-1	7.51	7.38	241.40	185.47	76.37	67.38
19	-1	-1	1	9.56	9.02	72.28	81.22	33.21	28.59
20	0	0	0	8.44	8.45	242.12	243.51	67.50	63.47

DCW, Dry cell weight; CBL, Cell bound lipase activity yield; FAME, Fatty acid methyl ester

Table 15. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear, quadratic and cubic model of DCW, CBL yield and FAME by cell cultures of *Rhodotorula mucilagenosa*.

Model	DCW (g/L)						CBL yield (U/L)						FAME (%conversion)					
	SS ^a	Df ^b	MS ^c	F-value	<i>p</i> -value	R ²	SS ^a	Df ^b	MS ^c	F-value	<i>p</i> -value	R ²	SS ^a	Df ^b	MS ^c	F-value	<i>p</i> -value	R ²
Linear	38.73	3	12.91	8.66	0.0012	0.62	1656.3	3	552.1	37.69	0.0004	0.01	2682.3	3	894.11	2.92	0.0662	0.35
Quadratic	10.80	3	3.60	3.73	0.0494	0.85	67746	3	22582	12.92	0.0069	0.83	3177.4	3	1059.16	10.71	0.0018	0.86
Cubic	3.94	4	0.99	1.03	0.4611	0.91	14028	4	3507	0.048	0.8353	0.98	605.24	4	151.31	2.37	0.1657	0.94
					Aliased						Aliased						Aliased	

^aSS, Sum of square.

^bDf, Degree of freedom.

^cMs, Mean square.

DCW, Dry cell weight

CBL, Cell bound lipase activity yield

FAME, Fatty acid methyl ester

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA ดังแสดงใน Table 15 โดยคำนวณจากโปรแกรม Design expert v.7.15 พบว่าสมการเชิงเส้นตรง (linear model) ที่ทำนายการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ R^2 มีค่าเท่ากับ 0.62 และ 0.01 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า R^2 ค่อนข้างต่ำทำให้สมการเชิงเส้นตรงไม่มีความน่าเชื่อถือในการทำนายผลการทดลองและสมการเชิงเส้นตรงยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรที่มีผลร่วมกันได้ ในขณะที่สมการพหุนามกำลังสอง (quadratic model) ที่ใช้การทำนายการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสมการพหุนามกำลังสาม (cubic model) ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ ซึ่งการวิเคราะห์ทางสถิติโดยสมการพหุนามกำลังสามไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของค่าตอบสนองและตัวแปรได้ เนื่องจากชุดการทดลองไม่เพียงพอในการคำนวณสัมประสิทธิ์ของสมการพหุนามกำลังสาม จึงให้ผลการทดลองที่ผิดพลาดเมื่อนำสมการพหุนามกำลังสามใช้ในการทำนายของปัจจัยที่เหมาะสมต่อค่าสนองตอบ (Kumar *et al.*, 2009; Tarangini *et al.*, 2009) ส่วนการนำเซลล์ที่เลี้ยงได้ 96 ชั่วโมง ไปทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ซิเฟเคชันเพื่อสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันปาล์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:6 พบว่า ปัจจัยของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์มีผลต่อการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งสมการเชิงเส้นตรง (linear model) และสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic model) แต่ R^2 ของสมการเชิงเส้นตรงไม่มีความน่าเชื่อถือในการทำนายผลการทดลอง ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสมการที่มีลำดับสูงสุด คือ สมการพหุนามกำลังสองเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์และการนำเซลล์ไปสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม (X_1) แอมโมเนียมไนเตรท (X_2) และกัมอะราบิก (X_3) ซึ่งสมการพหุนามกำลังสองเป็นสมการที่ทำนายน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ

$$Y_{DCW(g/L)} = 9.31 + 2.07X_1 - 31.68X_2 - 1.14X_3 - 0.33X_1X_2 + 0.77X_1X_3 + 28.40X_2X_3 - 0.05X_1^2 + 28.80X_2^2 + 0.17X_3^2 \dots\dots\dots(1)$$

สูตรอาหารที่ทำการศึกษาให้ปริมาณเซลล์แห้งที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสมการที่ทำนายมีความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.85 โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ได้แก่ ความเข้มข้นของกัมอะราบิกส่วนน้ำมันปาล์มมีอิทธิพลต่อปริมาณเซลล์แห้งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ($p = 0.08$) ดังแสดงใน Table 16 ส่วน Figure 7 (A-C) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรหรือน้ำหนักเซลล์แห้งกับตัวแปรอิสระต่างๆ 2 ตัวแปร ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทกับ กัมอะราบิกเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณเซลล์แห้งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ($p = 0.0959$) โดยพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ทั้งแอมโมเนียมไนเตรทและกัมอะราบิกที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด เท่ากับ 0.50 และ 0.60 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ จะให้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 10.30 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Figure 7B ซึ่งปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากตัวเซลล์จุลินทรีย์มีความสามารถในการดูดซับสารลดแรงตึงผิวมาเคลือบบริเวณผิวเซลล์ คือ กัมอะราบิกในอาหารที่ใช้เลี้ยง สังเกตจากการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นกัมอะราบิกทำให้ค่าปริมาณเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการเพิ่มความเข้มข้นไฮโดรโฟบิกของตัวเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ผ่านการการดัดแปลงพันธุกรรมให้ตัวเซลล์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะที่ตัวเซลล์ (cell bound lipase) เพื่อใช้เป็นตัวเร่งในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ พบว่า เมื่อนำเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* แช่ใน Tween 20 จะทำให้ตัวเซลล์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุด ซึ่งมาจากความสามารถในการดูดซับ Tween 20 เท่ากับ 0.783 g/g DCW (Hama *et al.*, 2010) ดังนั้น ค่าปริมาณเซลล์แห้งที่เพิ่มสูงขึ้นอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการดูดซับสารลดแรงตึงผิวของเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกัมอะราบิก ส่วนสมการพหุนามกำลังสองที่ทำนายการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ คือ

$$Y_{\text{CBL(U/L)}} = -178.70 + 124.02 X_1 + 218.55 X_2 + 1258.02 X_3 - 6.63 X_1 X_2 + 189.72 X_1 X_3 + 670.55 X_2 X_3 - 52.51 X_1^2 - 783.72 X_2^2 - 2143.72 X_3^2 \dots\dots\dots(2)$$

สูตรอาหารที่ทำการศึกษาทั้ง 20 สูตรอาหารให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสมการที่ทำนายมีค่าความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.84 โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.10$) เป็นปัจจัยที่มีผลร่วมกัน คือ ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มกับกัมอะราบิก ($p = 0.0653$) ดังแสดงใน Table 17 ส่วน Figure 8 (A-C) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรหรือปริมาณการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์กับตัวแปรอิสระต่างๆ 2 ตัวแปร โดยเฉพาะความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มกับกัมอะราบิก (Figure 8B) แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของกัมอะราบิกทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ลดลง ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของกัมอะราบิกจะทำให้เซลล์มีการดูดซับ กัมอะราบิกมาเคลือบที่ผิวเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้ไปบดบังการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ (cell bound) ในการเจอกับสับสเตรทเพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งปริมาณที่เหมาะสมของน้ำมันปาล์มและกัมอะราบิกต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.37-0.45 และ 1.70-2.22 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงได้ทั้ง 20 ชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง มาทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อดูปริมาณการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ได้สมการที่ทำนายการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ดังสมการ

$$Y_{\text{FAME}(\%)} = 39.55 + 29.85X_1 + 159.11X_2 - 29.77X_3 - 11.20X_1X_2 + 62.95X_1X_3 + 2.66X_2X_3 - 13.72X_1^2 - 91.40X_2^2 - 181.13X_3^2 \dots \dots \dots (3)$$

ซึ่งสมการจะให้ปริมาณการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากการเร่งปฏิกิริยาของตัวเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่เลี้ยงในสูตรอาหารทั้ง 20 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสมการที่ทำนายมีค่าความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.87 โดยปัจจัยของอาหารที่มีผลต่อตัวเซลล์ยีสต์เมื่อนำไปเร่งในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ได้แก่ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทและกัมอะราบิก ดังแสดงใน Table 18

ปริมาณเอนไซม์ที่ตัวเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้ จะส่งผลกระทบต่ออัตราการสังเคราะห์ผลิตเมทิลเอสเทอร์ กล่าวคือ เมื่อการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งสังเกตได้จาก Figure 9 ลักษณะพื้นผิวของกราฟที่ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุดเป็นช่วงที่ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มและกัมอะราบิกอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.37-0.45 และ 1.70-2.22 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับความเข้มข้นที่ต้องใช้ต่อการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์จุลินทรีย์ ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์กับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการนำเซลล์ไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จึงเป็นอาหารที่ถูกทำนายออกมาให้มีปริมาณในแต่ละองค์ประกอบที่เหมือนกันประกอบด้วย น้ำมันปาล์ม 2.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v), NH_4NO_3 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ กัมอะราบิก 0.45 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และมีองค์ประกอบอื่น คือ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v), KH_2PO_4 0.47 เปอร์เซ็นต์ (w/v), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.03 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 5.0 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดิมซึ่งมีปริมาณของสามองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม NH_4NO_3 และกัมอะราบิกที่แตกต่างกันเท่ากับ 2.0 เปอร์เซ็นต์, 0.47 เปอร์เซ็นต์ และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย NH_4NO_3 และกัมอะราบิกเป็นองค์ประกอบที่มีการปรับให้เดิมในปริมาณที่ลดลงจากสูตรอาหารเดิม โดยปกติแล้วการเพิ่มปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรทมากเกินไปจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดที่สูงขึ้น ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไลเปสของตัวเซลล์จุลินทรีย์ได้ (Griffin, 1994) ส่วนการลดความเข้มข้นของ กัมอะราบิกอาจมีผลทำให้เซลล์จุลินทรีย์ดูดซับ กัมอะราบิกเคลือบที่ผิวเซลล์ลดลง ส่งผลทำให้เอนไซม์ไลเปสที่ผิวเซลล์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น

จากสมการที่ 3 และ 4 สามารถทำนายการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์และปริมาณการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 231.39 ยูนิตต่อลิตรและ 66.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการทดลอง พบว่า ค่าที่ได้จากการทดลองของกิจกรรมไฮโดรไลซิสของตัวเซลล์มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนาย เท่ากับ 234.17 ± 9.47 ยูนิตต่อลิตร และให้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 8.93 ± 0.12 กรัมต่อลิตร ส่วนกิจกรรมการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มมีค่ามากกว่าที่สมการทำนาย เท่ากับ 81.21 ± 3.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สัดส่วนระหว่างน้ำมันต่อเมทานอล 1

ต่อ 6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสและปริมาณการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์เพิ่มขึ้น 1.56 และ 1.66 เท่าของสูตรอาหารเดิม (จาก 152.38 หน่วยต่อลิตร และ 48.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) สำหรับวิธี RSM และวางแผนทดลองแบบ CCD เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติมาช่วยในการคำนวณผลตอบแทนที่เหมาะสมที่สุด ปัจจุบันมีการประยุกต์นำวิธี RSM มาใช้กันอย่างกว้างขวางในงานด้านอุตสาหกรรม (Myers, 1995)

Table 16. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for DCW by cell cultures of *Rhodotorula mucilagenosa*.

Factors	Coefficient estimate	Standard error	Sum of square	Df ^a	Mean square	F-value	<i>P-value</i> <i>Prob>F</i>
<i>Model</i>	9.315	0.40	52.9300	9	5.88	6.09	0.0046
X_1 (Palm oil)	2.077	0.27	3.6400	1	3.64	3.76	0.0811
X_2 (NH_4NO_3)	-31.676	0.27	1.1500	1	1.15	1.19	0.3015
X_3 (Gum arabic)	-1.136	0.27	33.9500	1	33.95	35.13	0.0001
X_1X_2	0.333	0.35	0.0200	1	0.02	0.02	0.8885
X_1X_3	0.778	0.35	0.1100	1	0.11	0.11	0.744
X_2X_3	28.395	0.35	3.2700	1	3.27	3.38	0.0959
X_1^2	-0.507	0.26	3.7000	1	3.70	3.83	0.0788
X_2^2	28.805	0.26	6.0500	1	6.05	6.26	0.0313
X_3^2	0.171	0.26	0.0002	1	0.00	0.00	0.9884
<i>Residual</i>			9.66	10	0.97		
$R^2 = 0.85$							

^aDf, degree of freedom.

The bold values indicate the significance at or above the 95.0% confidence level.

DCW, Dry cell weight.

Table 17. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for CBL yield by cell cultures of *Rhodotorula mucilagenosa*.

Factors	Coefficient estimate	Standard error	Sum of square	Df ^a	Mean square	F-value	<i>P</i> -value <i>Prob>F</i>
<i>Model</i>	-178.699	15.86	77710.97	9	8634.55	5.710	0.0059
X_1 (Palm oil)	124.0208	10.52	121.12	1	121.12	0.080	0.7830
X_2 (NH_4NO_3)	218.5536	10.52	530.56	1	530.56	0.350	0.5668
X_3 (Gum arabic)	1258.027	10.52	1004.67	1	1004.67	0.660	0.4341
X_1X_2	-6.62523	13.75	7.9	1	7.9	0.005	0.9438
X_1X_3	189.7225	13.75	6479.03	1	6479.03	4.280	0.0653
X_2X_3	670.5535	13.75	1821.05	1	1821.05	1.200	0.2982
X_1^2	-52.5138	10.24	39741.99	1	39741.99	26.280	0.0004
X_2^2	-783.722	10.24	4481.17	1	4481.17	2.960	0.1159
X_3^2	-2143.72	10.24	33527.63	1	33527.63	22.170	0.0008
<i>Residual</i>			15125.37	10	1512.54		
$R^2 = 0.84$							

^aDf, degree of freedom.

The bold values indicate the significance at or above the 95.0% confidence level.

CBL, Cell bound lipase activity yield

Table 18. Analysis of variance (ANOVA) for response surface quadratic model for percent FAME conversion by cell cultures of *Rhodotorula mucilagenosa*.

Factors	Coefficient estimate	Standard error	Sum of square	Df ^a	Mean square	F-value	<i>P</i> -value <i>Prob>F</i>
<i>Model</i>	39.56	4.06	6595.69	9	732.85	7.4100	0.0022
X_1 (Palm oil)	29.85	2.69	4.86	1	4.86	0.0490	0.8289
X_2 (NH_4NO_3)	159.11	2.69	1340.51	1	1340.51	13.5500	0.0042
X_3 (Gum arabic)	-29.78	2.69	1336.96	1	1336.96	13.5200	0.0043
X_1X_2	-11.19	3.52	22.55	1	22.55	0.2300	0.6433
X_1X_3	62.95	3.52	713.29	1	713.29	7.2100	0.0229
X_2X_3	2.67	3.52	0.029	1	0.029	0.0003	0.9867
X_1^2	-13.72	2.62	2710.82	1	2710.82	27.4100	0.0004
X_2^2	-291.40	2.62	619.51	1	619.51	6.2600	0.0313
X_3^2	-181.13	2.62	239.36	1	239.36	2.4200	0.1508
<i>Residual</i>				10	98.9		
$R^2 = 0.87$							

^aDf, degree of freedom.

The bold values indicate the significance at or above the 95.0% confidence level.

FAME, Fatty acid methyl ester

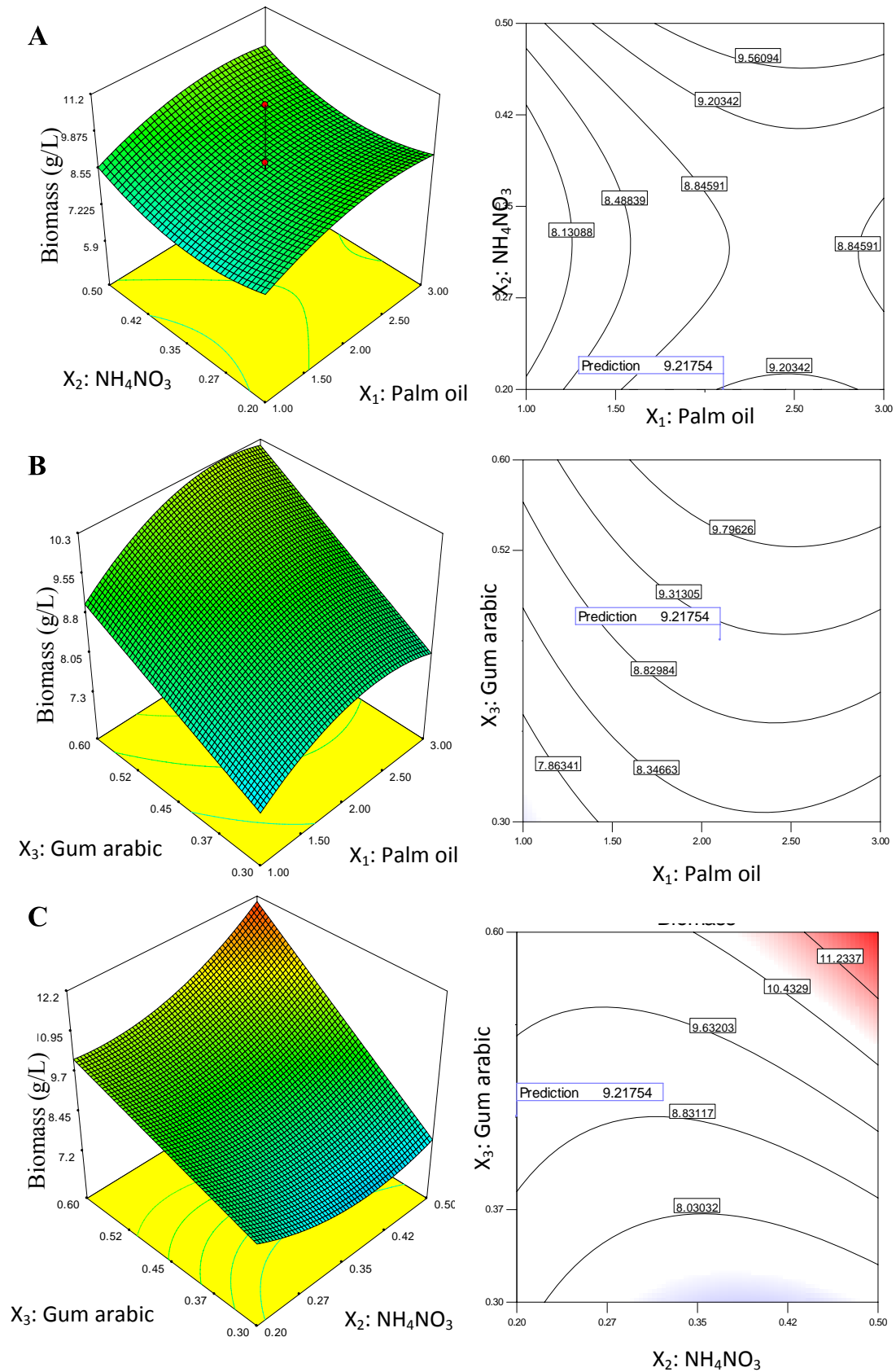


Figure 7. Three dimension surface and contour diagram plots of DCW (g/L) as the function of palm oil and NH_4NO_3 (A) (gum arabic was kept constant at the optimum point), as the function of palm oil and กัมอะราบิก(B) (NH_4NO_3 was kept constant at the optimum point) and as the function of NH_4NO_3 and gum arabic (C) (palm oil was kept constant at the optimum point).

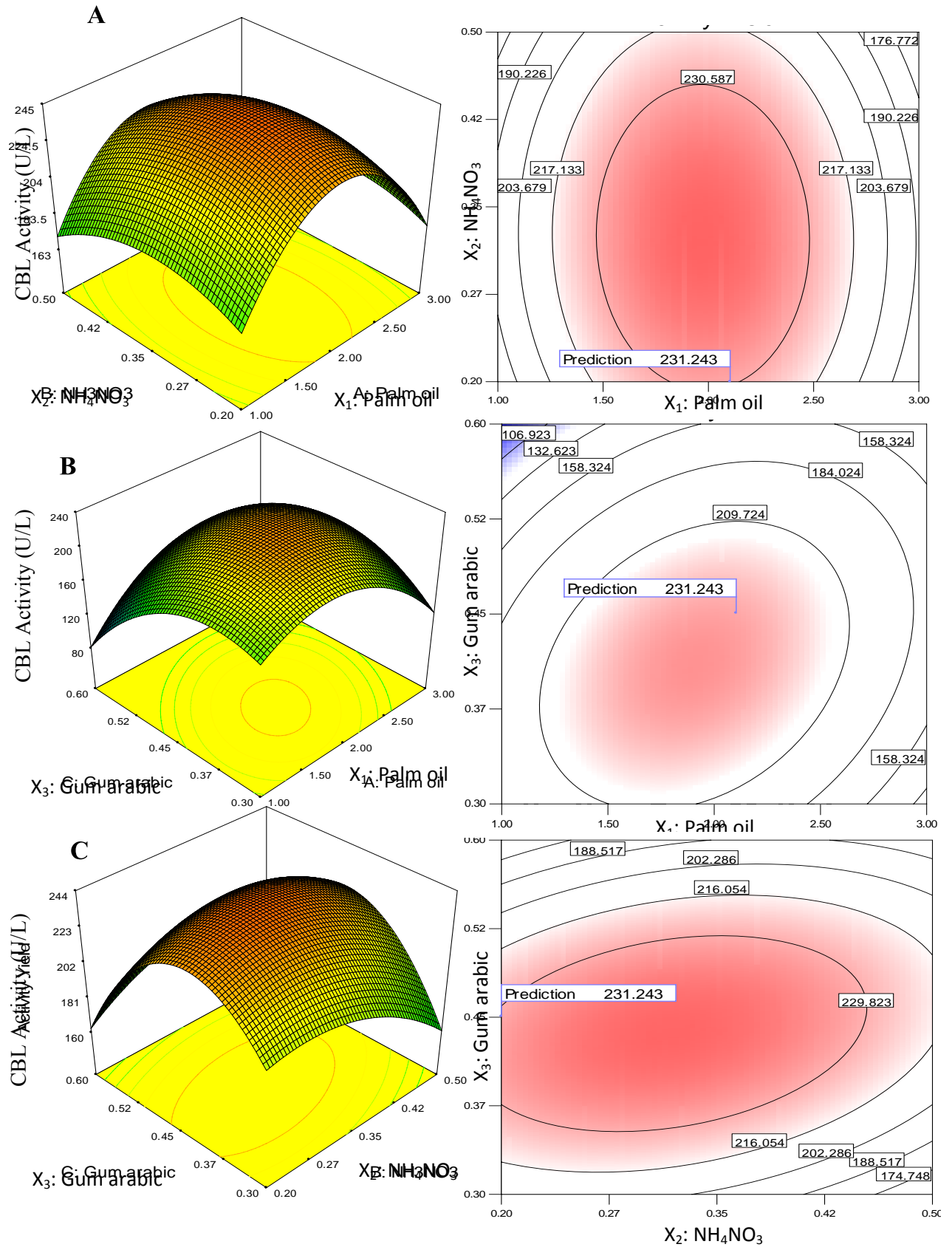


Figure 8. Three dimension surface and contour diagram plots of CBL (U/L) as the function of palm oil and NH_4NO_3 (A) (gum arabic was kept constant at the optimum point), as the function of palm oil and gum arabic (B) (NH_4NO_3 was kept constant at the optimum point) and as the function of NH_4NO_3 and gum arabic (C) (palm oil was kept constant at the optimum point).

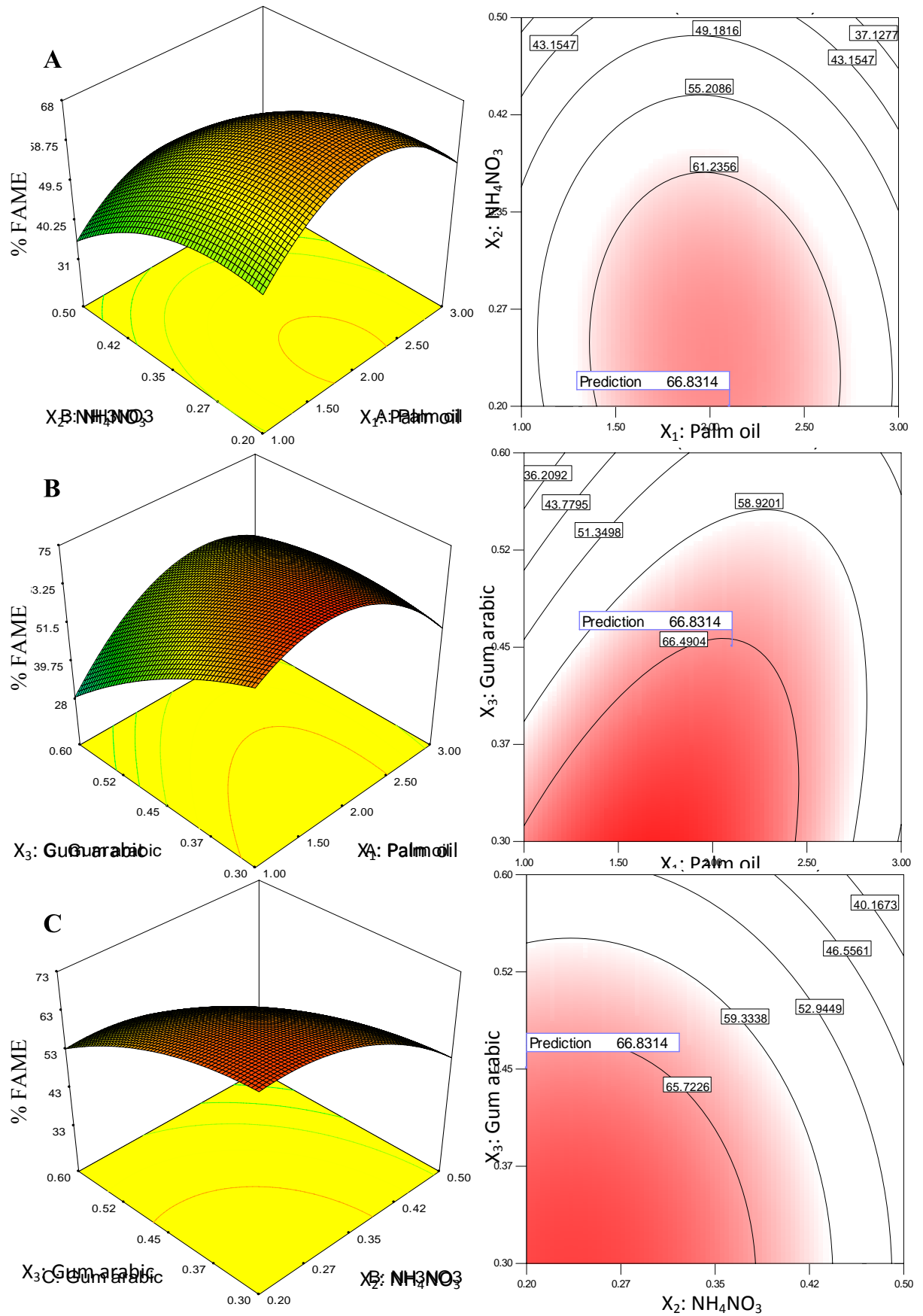


Figure 9. Three dimension surface and contour diagram plots of FAME as the function of palm oil and NH_4NO_3 (A) (gum arabic was kept constant at the optimum point), as the function of palm oil and กัมมะระพริก(B) (NH_4NO_3 was kept constant at the optimum point) and as the function of NH_4NO_3 and gum arabic (C) (palm oil was kept constant at the optimum point).

1.3 ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสและศึกษาอัตราการเจริญของเซลล์ยีสต์ในอาหารที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไลเปส

เมื่อได้สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมแล้ว (optimized medium) นำมาศึกษาผลของอัตราการให้อากาศ ซึ่งทำการเตรียมเซลล์ยีสต์เริ่มต้นด้วย haemocytometer โดยเจือจางตัวอย่างประมาณ 100 เท่า จำนวนให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยมีอาหาร optimized medium อยู่ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 และ 180 ชั่วโมง โดยในทุกๆ 12 ชั่วโมง ที่เก็บตัวอย่างยีสต์หาปริมาณน้ำหนักแห้งและเขียนกราฟของการเจริญ (Growth curve) เทียบกับระยะเวลาต่างๆ พร้อมทั้งวัดกิจกรรมของตัวเซลล์ ซึ่งพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 150 รอบต่อนาที เป็น 200 รอบต่อนาที จะทำให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณเซลล์แห้งต่ำสุด ส่งผลให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์น้อยที่สุดเช่นเดียวกัน ส่วนที่ความเร็วรอบ 200 และ 250 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณเซลล์แห้งไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์สูงกว่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ซึ่งมีค่ากิจกรรม เท่ากับ 272.72 ยูนิตต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการให้อากาศโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบสูงเกินไป จะทำให้เกิดแรงเฉือนที่ไปรบกวนการผลิตเอนไซม์ของตัวเซลล์ ส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ของตัวเซลล์ลดต่ำลง ดังแสดงใน Figure 10 และ 11 ตามลำดับ โดยปกติแล้วจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของเซลล์ยีสต์ในสูตรอาหารเดิม (IMY medium) เพื่อนำมาเร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเพื่อผลิตเมทิลเอสเทอร์ พบว่า ต้องเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง และนำเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงมาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในปริมาณ เท่ากับ 1×10^{10} ต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 3.064 ยูนิต จะให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 83.29 เปอร์เซ็นต์ ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานาน 72 ชั่วโมง (Srimhan *et al.*, 2011) ในขณะที่อาหารสูตรใหม่ (optimized medium) ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์เพียง 60 ชั่วโมง ก็สามารถนำเซลล์มาทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในปริมาณที่เท่ากัน จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า เท่ากับ 8.024 ยูนิต และยังให้ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 48 ชั่วโมง ซึ่งลดลงจากสูตรอาหารเดิมที่ต้องใช้ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 12 ซึ่งยืนยันสมมติฐานของงานวิจัยนี้ว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์สามารถลดระยะเวลาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของการผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้

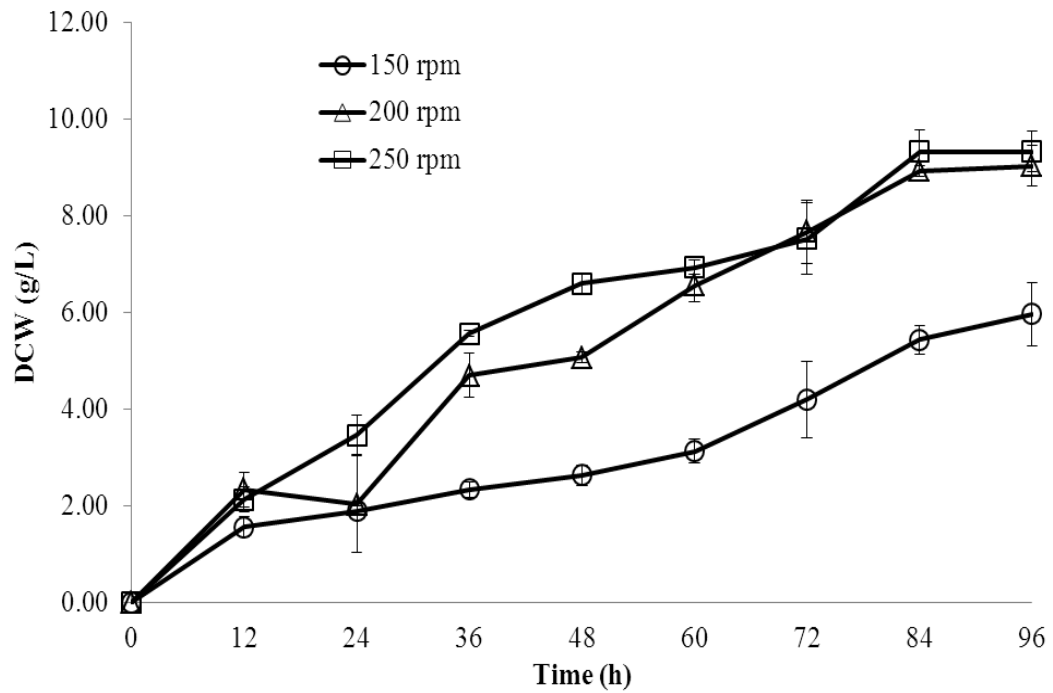


Figure 10. Effect of shaking speed on cell growth by *Rhodotorula mucilagenosa*.

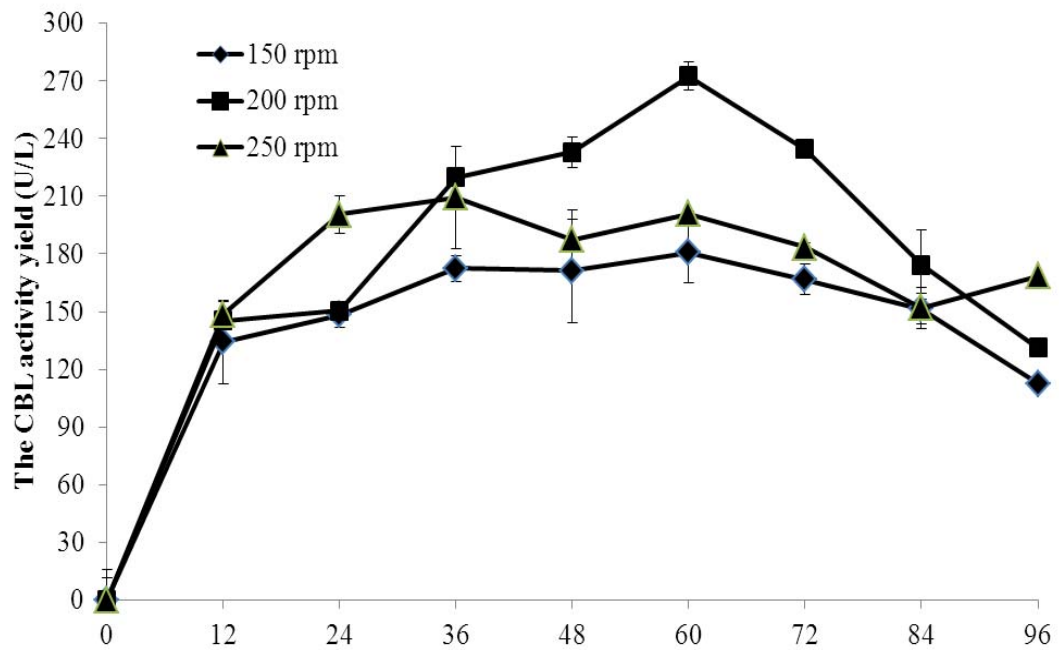


Figure 11. Effect of shaking speed on cell bound lipase production by *Rhodotorula mucilagenosa*.

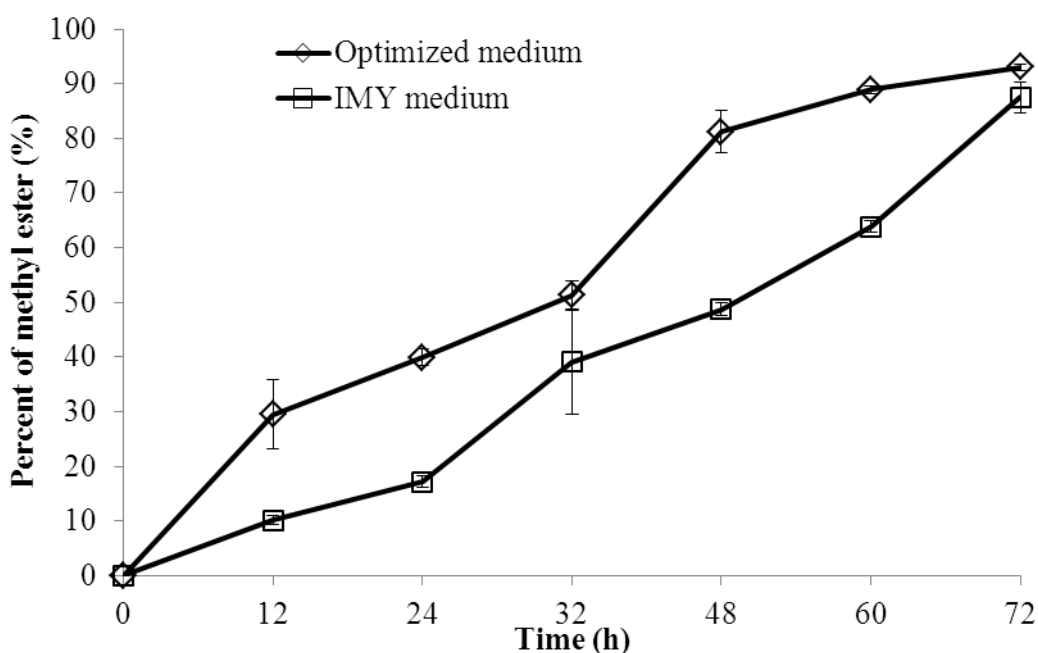


Figure 12. Methyl ester production by transesterification of catalyzed by *Rhodotorula mucilagenosa* cells cultivated in the optimal medium and IMY medium with lipase activity of 8.024 and 3.064 U/g substrate, respectively in the presence of palm oil and methanol with mole ratio 1:6 as substrates.

2. การคัดเลือกวัสดุฟองที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดซับ

จากการทดลองเพื่อคัดเลือกวัสดุฟองที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเกาะที่บริเวณตัวเซลล์ในอาหารตามสูตรใหม่ (optimized medium) โดยอาศัยการตรึงแบบวิธีการตรึงร่วมไปกับการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งการเตรียมวัสดุก่อนนำมาตรึงนั้นได้ผ่านการล้างและฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ก่อนถ่ายลงในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส สำหรับวัสดุที่นำมาคัดเลือก ประกอบไปด้วยวัสดุที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ ชานอ้อย ชังข้าวโพดและตะกอนดินคีนเตอร์จากโรงงานอุตสาหกรรม ปาล์มน้ำมัน และวัสดุทางการค้าที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลส ฟองน้ำโพลียูรีเทนและผ้าพีวีเอชาม้วส์ ซึ่งทำการเลี้ยงร่วม *Rhodotorula mucilagenosa* ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า วัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ชานอ้อย ชังข้าวโพดและตะกอนดินคีนเตอร์ให้ปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เท่ากับ 7.87, 7.31 และ 9.83

มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพอง (Table 19) ตามลำดับ ซึ่งวัสดุดังกล่าวได้เตรียมโดยการบดละเอียดและอบแห้งก่อนนำมาตรึง เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ของวัสดุดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า วัสดุจริงดังกล่าวนี้มีลักษณะผิวที่เป็นขรุขระ เซลล์จะกระจายตัวอยู่บริเวณดังกล่าวง่ายต่อการหลุดออกจากวัสดุพองเมื่อเข้าสู่กระบวนการล้าง ทำให้ปริมาณเซลล์คงเหลือในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับวัสดุชนิดอื่นๆ ซึ่งแตกต่างจาก 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสพบว่า ให้ปริมาณค่อนข้างสูง คือ 12.45 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพอง ส่งผลให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มสูงที่สุดเช่นกัน คือ 4.35 หน่วยต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพอง โดยลักษณะของฟองน้ำเส้นใยธรรมชาติดังกล่าวเป็นการอัดแน่นกันของเส้นใยทำให้มีลักษณะซ้อนทับกันเป็นร่างแห ดังแสดงใน Figure 14 (1a) ซึ่งเตรียมก่อนตรึงโดยทำการตัดให้ได้ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร ทำให้ได้ชิ้นที่มีลักษณะเหมือนลูกเต๋า เซลล์ยีสต์จึงสามารถแทรกตัวเข้าไปภายในของฟองน้ำเส้นใยธรรมชาติดังกล่าวได้จึงทำให้เซลล์คงเหลือมากกว่าวัสดุธรรมชาติอื่นๆ ในขณะที่วัสดุสังเคราะห์สามารถเตรียมให้มีลักษณะเดียวกันได้ โดยอาศัยการตัดให้ได้ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร ทำให้ได้ชิ้นที่มีลักษณะเหมือนลูกเต๋าเช่นเดียวกัน แต่เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์จะพบว่า วัสดุฟองน้ำโพลียูรีเทน จะมีช่องที่มีขนาดที่กว้างกว่าวัสดุผ้าพีวีเอชามัวร์ (Poly(vinyl alcohol) Chamois) ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่ต่ำที่สุด คือ 7.94 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพอง ส่งผลให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มต่ำเช่นกัน คือ 0.67 หน่วยต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพอง ซึ่งไม่แตกต่างกันกับวัสดุธรรมชาติที่มีลักษณะเป็นผงละเอียด (ชานอ้อย ช้างข้าวโพดและตะกอนดินดีแคนเตอร์) ดังแสดงใน Figure 13 ซึ่งค่าค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มจะสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ที่อยู่ในวัสดุพองแต่ละชนิด หากวัสดุชนิดใดสามารถตรึงเซลล์ให้อยู่ในวัสดุได้มาก ก็จะสามารถมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงเช่นกัน ดังแสดงใน Table 19 จึงทำการเลือกเอาวัสดุที่ให้กิจกรรมไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์มสูงสุด คือ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสและผ้าพีวีเอชามัวร์ มาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

Table 19. Effect of different biomass support particle (BSP) for immobilization of whole cell of *Rhodotorula mucilagenosa*.

Biomass support particle (BSP)	Protein cont. mg/g BSP	Cell cont. mg DCW/g BSP	Activity U/g DCW in BSP
3M Cellulose sponge	2.81±0.81 ^b	12.45±3.73 ^b	4.35±0.70 ^a
Poly(vinyl alcohol) Chamois	3.84±0.12 ^a	17.57±0.55 ^a	4.27±0.19 ^a
3M Polyurethane sponges	1.79±0.30 ^d	7.94±1.38 ^c	0.67±0.21 ^d
Poly(vinyl alcohol) sponge	3.42±0.14 ^a	15.65±0.64 ^{ab}	2.07±0.58 ^c
Sugarcane bagasse	1.72±0.19 ^d	7.87±0.90 ^c	0.56±0.02 ^d
Corn cobs	1.60±0.25 ^d	7.31±1.16 ^c	0.51±0.11 ^d
Palm decanter	2.15±1.14 ^{cd}	9.83±1.14 ^c	0.40±0.05 ^d

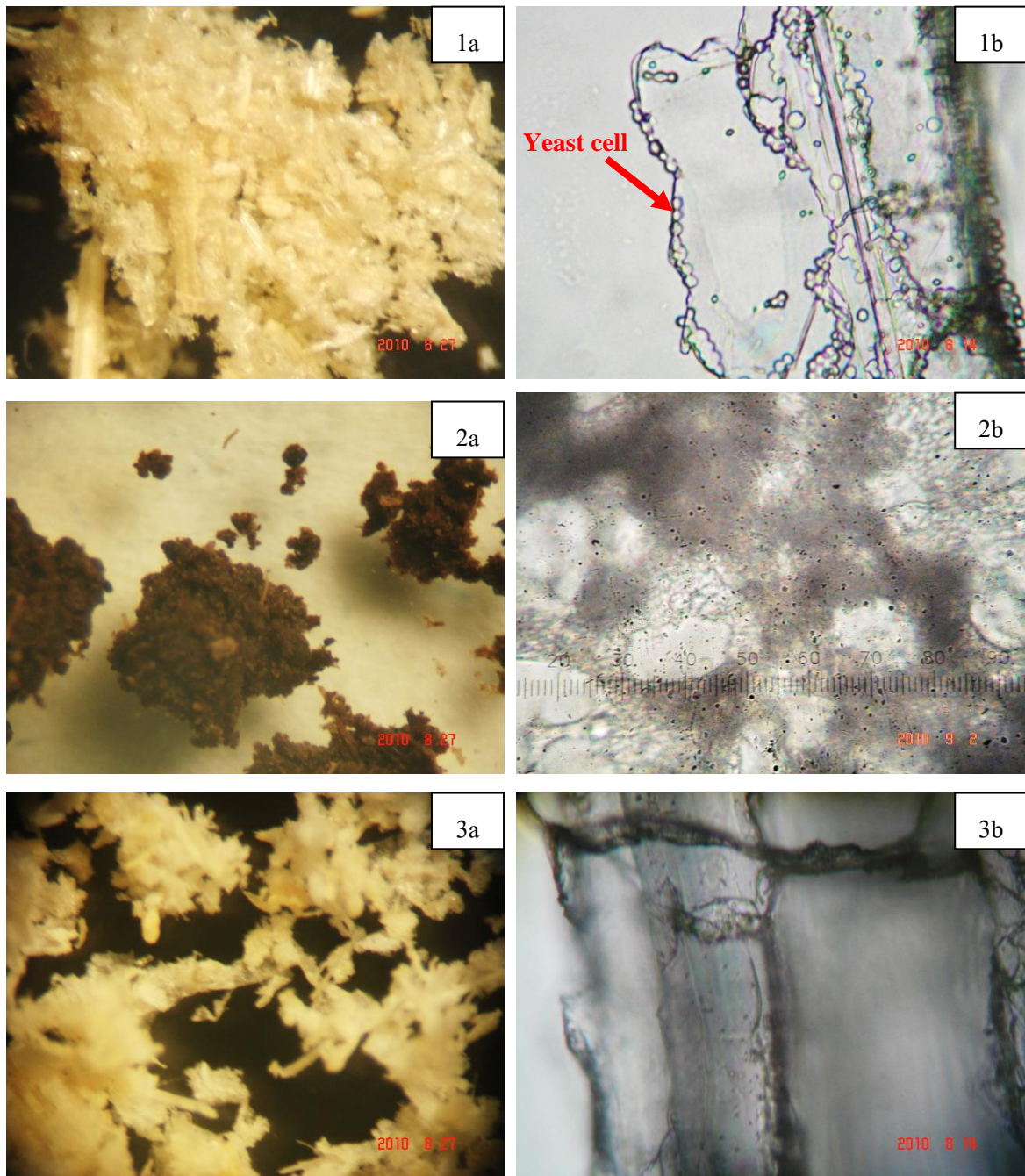


Figure 13. Stereo microscope ($\times 45$) (a) and compound light microscope ($\times 400$) (b) of 1: sugarcane bagasse, 2: palm decanter cake and 3: corn cobs.

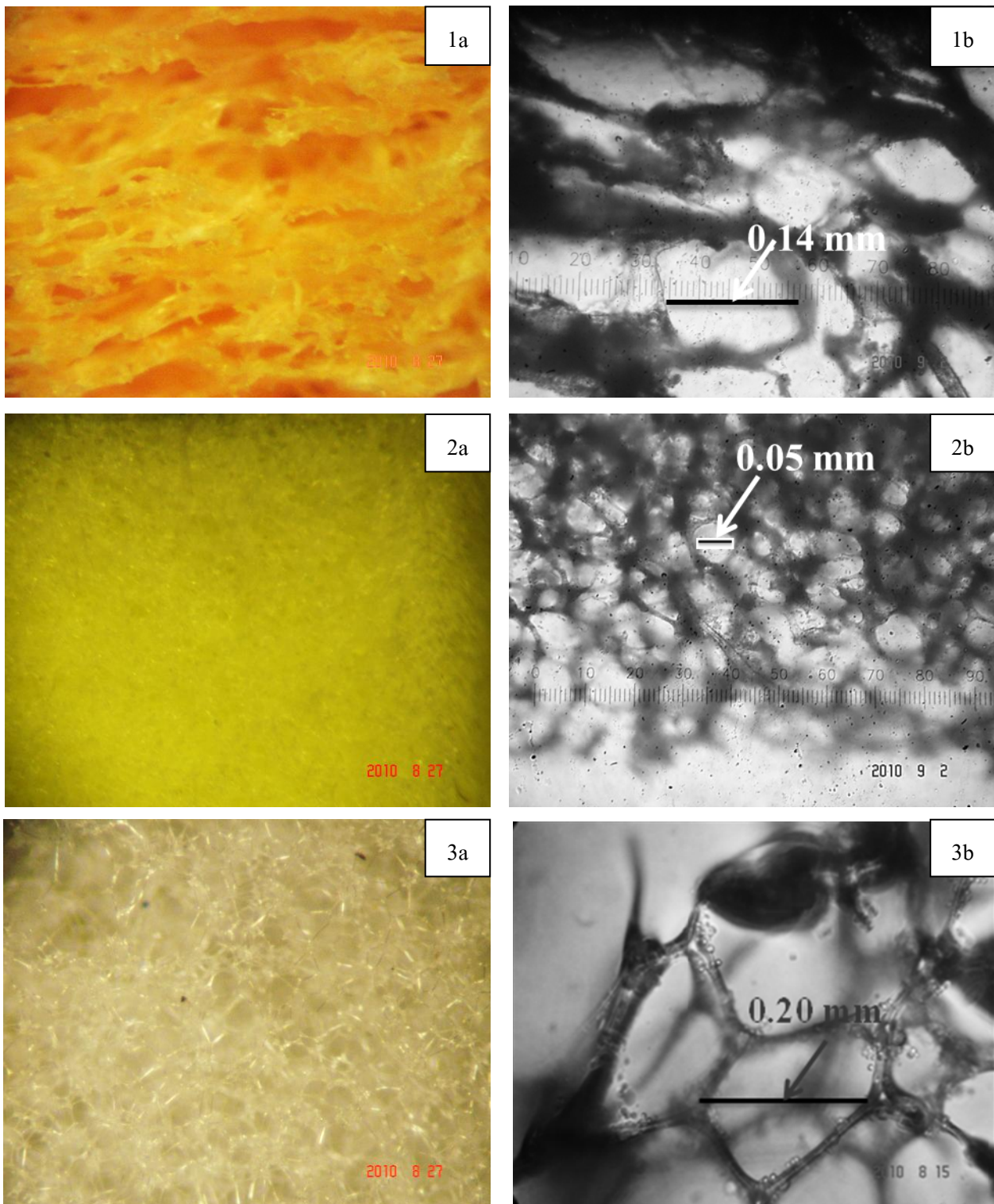


Figure 14. Stereo microscope ($\times 45$) (a) and compound light microscope ($\times 400$) (b) of 1: 3M cellulose sponge, 2: poly(vinyl alcohol) chamois and 3: 3M polyurethane sponges.

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์แบบดูดซับ

3.1 ผลของขนาดของตัวพุง

นำวัสดุที่ผ่านการคัดเลือกมาหาขนาดที่เหมาะสม โดยสำหรับ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลส ที่ขายทางการค้าจะมีลักษณะเป็นแผ่นที่มีความหนา 0.5 เซนติเมตร จึงทำการตัดโดยให้ความหนาที่เท่าเดิม แต่ตัดให้มีความกว้างที่แตกต่างกันไปคือ $1.0 \times 0.5 \times 0.5$, $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ และ $0.25 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร ส่วนผ้าพีวีเอชาม้วส์ จะมีลักษณะเป็นผ้าที่มีความหนา 0.1 เซนติเมตร จึงทำการตัดโดยให้มีความหนาและความยาวที่เท่าเดิม แต่ตัดให้มีความกว้างที่แตกต่างกันไปคือ $1.0 \times 0.5 \times 0.1$, $0.5 \times 0.5 \times 0.1$ และ $0.25 \times 0.5 \times 0.1$ เซนติเมตร โดยทำการชั่งวัสดุตั้งกล่าวอย่างละ 3.0 กรัม ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรและมีอาหารสูตรที่เหมาะสม 200 มิลลิลิตร ทำการตรึงเซลล์ดังวิธีการทดลองข้อ 2.1 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า วัสดุทั้งสองจะให้กิจกรรมการไฮโดรไลซิสและปริมาณเซลล์ในวัสดุเพิ่มขึ้นเมื่อลดขนาดของวัสดุตรึงให้เล็กลง โดย 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลส ขนาด $0.25 \times 0.5 \times 0.5$ เซนติเมตร ให้กิจกรรมการไฮโดรไลซิสและปริมาณเซลล์ในวัสดุเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 7.55 หน่วยต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพุง และ 9.92 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุง ตามลำดับ (Figure 15) ส่วนวัสดุสังเคราะห์ผ้าพีวีเอชาม้วส์ ขนาดเล็กสุด $0.25 \times 0.5 \times 0.1$ เซนติเมตร ให้กิจกรรมการไฮโดรไลซิสและปริมาณเซลล์ในวัสดุเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 4.21 หน่วยต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพุง และ 30.53 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุง ตามลำดับ (Figure 16) ทั้งนี้การลดขนาดของวัสดุพุงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ร่วม และยังเพิ่มพื้นที่ผิวในระหว่างการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Hama และคณะ (2007) โดยทำการศึกษาผลของขนาดของวัสดุตัวพุง 2 ขนาด คือ $6 \times 6 \times 3$ และ $6 \times 6 \times 6$ มิลลิเมตร ที่ถูกตรึงด้วย *Rhizopus oryzae* มาทำปฏิกิริยาเมทานอลไลซิสใน screw-capped bottle พบว่า วัสดุที่มีขนาดเล็ก ($6 \times 6 \times 3$ มิลลิเมตร) จะให้ปริมาณเซลล์แห้งในวัสดุพุงที่สูงกว่าวัสดุขนาด $6 \times 6 \times 6$ มิลลิเมตร ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยา เมทานอลไลซิสสูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณของตัวพุงที่เท่ากัน เนื่องจากเชื่อกันว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต ลักษณะการเจริญจะเกิดเฉพาะบริเวณผิวหน้า ก้อน โฟมที่มีขนาดเล็กกว่า ($6 \times 6 \times 3$) จึงมีพื้นที่ผิวที่มากกว่าในการที่เชื้อราจะเจริญเติบโต

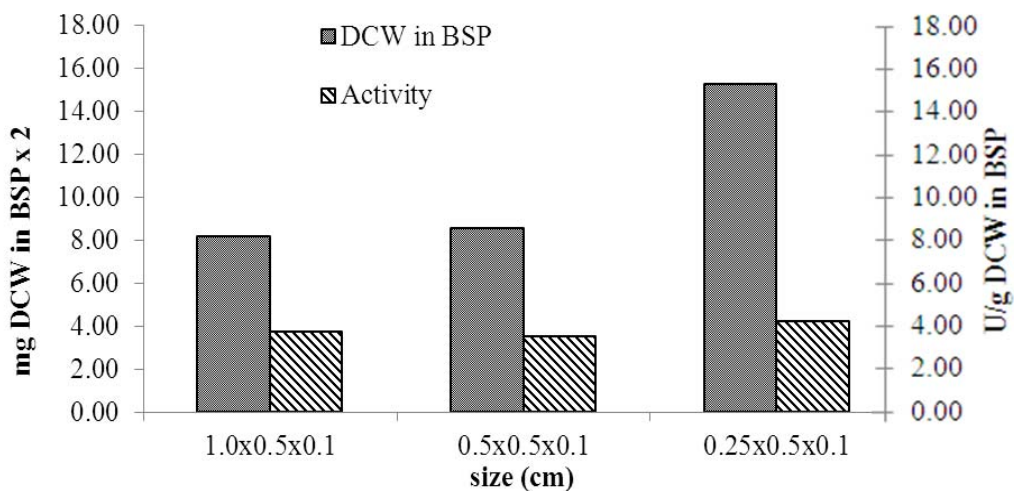


Figure 15. Effect of 3M Cellulose sponge size on cell concentration and hydrolysis activity.

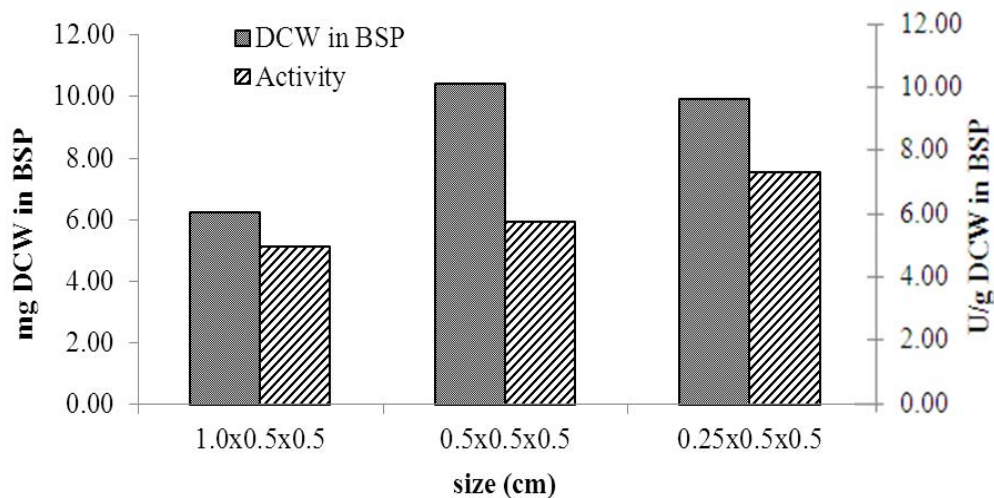


Figure 16. Effect of Poly (vinyl alcohol) Chamois size on cell concentration and hydrolysis activity.

3.2 ผลของปริมาณตัวพองที่เหมาะสมต่อปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำขนาดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.1 มาหาปริมาณที่เหมาะสมในการตรึง โดยซึ่งวัสดุให้มีปริมาณต่าง ๆ สำหรับ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสซึ่งให้น้ำหนักเท่ากับ 0.6, 1.2, 2.4 และ 3.0 กรัม ส่วนผ้าพีวีเอชามวส์ ซึ่งให้น้ำหนักเท่ากับ 1.6, 3.2, 4.8 และ 6.4 กรัม ลงใน ฟลาस्कขนาด 500

มิลลิลิตรและมีอาหารสูตรที่เหมาะสม 200 มิลลิลิตร ทำการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการทดลองข้อ 3.1 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณจะทำให้ปริมาณเซลล์ที่ตรึงลดลง ส่งผลให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสของ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสลดลง โดยพบว่า ปริมาณที่ 0.6 กรัม จะให้ทั้งปริมาณเซลล์และค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสสูงสุด เท่ากับ 20.56 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุงและ 5.92 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพุง ตามลำดับ (Figure 17) ส่วนในวัสดุผ้าพีวีเอชาม้วส์ การเพิ่มขึ้นของวัสดุส่งผลต่อปริมาณเซลล์ในวัสดุตรึงเช่นกัน จาก 16.0 มิลลิกรัม ถึง 8.5 มิลลิกรัม แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การลดลงของปริมาณเซลล์ไม่ได้ส่งผลต่อค่ากิจกรรมการไฮโดรไลซิสมากนัก จึงเลือกปริมาณ 3.2 กรัมเป็นปริมาณที่เหมาะสมของวัสดุผ้าพีวีเอชาม้วส์ (Figure 18) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของวัสดุพุงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณเซลล์ในวัสดุพุงลดลง โดยเฉพาะการเพิ่มขึ้นของฟองน้ำ 3M เส้นใยธรรมชาติ ที่มีน้ำหนักเบากว่าผ้าพีวีเอชาม้วส์ ทำให้จำนวนชิ้นของ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสมีปริมาณที่มากกว่า ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ในวัสดุพุงน้อยกว่า เพราะในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการตรึงเซลล์ หากวัสดุพุงที่มีจำนวนชิ้นมาก ก็จะทำให้อัตราการให้อากาศในระหว่างการเลี้ยงลดลง ส่งผลทำให้มีปริมาณเซลล์ลดลง เนื่องจากเซลล์ยีสต์ดังกล่าวเป็นยีสต์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต จึงเป็นการรบกวนระบบการให้อากาศนั่นเอง

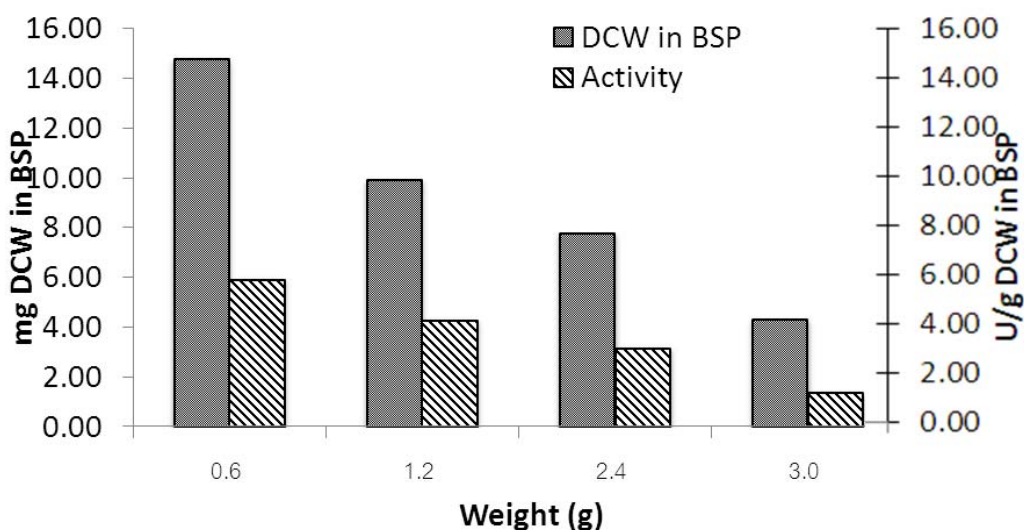


Figure 17. Effect of 3M Cellulose sponge containing on cell concentration and hydrolysis activity.

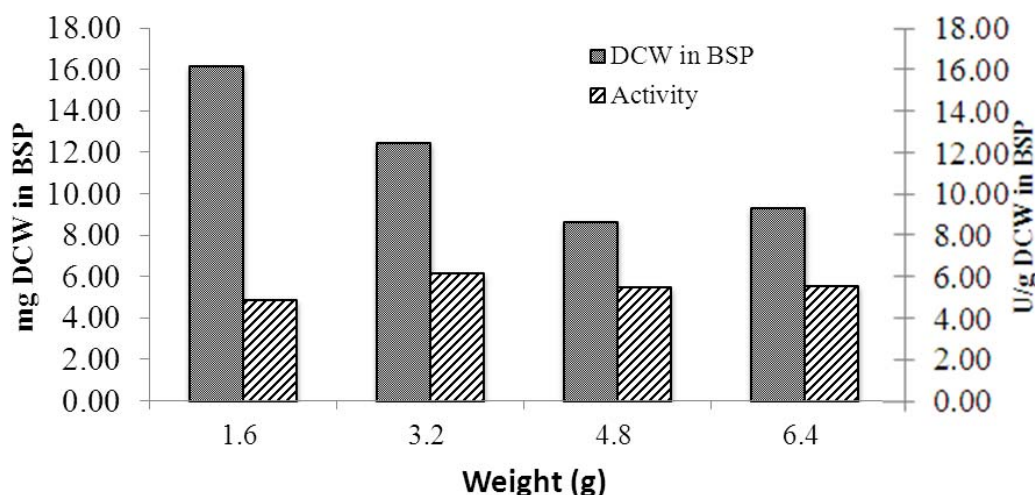


Figure 18. Effect of 3M Poly (vinyl alcohol) Chamois containing on cell concentration and hydrolysis activity.

3.3 ผลของการตรึงเซลล์แบบดูดซับโดยการเลี้ยงซ้ำในอาหารใหม่ (Repeated cultivation)

เมื่อได้ปริมาณของวัสดุที่เหมาะสม นำมาศึกษาถึงผลของการตรึงเซลล์แบบดูดซับโดยการเลี้ยงซ้ำในอาหารใหม่ พบว่า การตรึงเลี้ยงเซลล์เลี้ยงซ้ำในอาหารใหม่ของวัสดุ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสและผ้าพีวีเอชามัวร์ จะให้ปริมาณเซลล์ที่มากกว่าการตรึงเซลล์แบบเลี้ยงในอาหารแบบครั้งเดียว เท่ากับ 26.44 และ 23.65 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุงตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 2 เท่าของปริมาณการเลี้ยงเซลล์แบบครั้งเดียว แต่การตรึงเซลล์แบบเลี้ยงซ้ำในอาหารใหม่ของวัสดุ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสจะให้ค่ากิจกรรมของตัวเซลล์ที่ถูกตรึงมากกว่าตัวเซลล์ที่อยู่ในผ้าพีวีเอชามัวร์ นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนรอบในการเลี้ยงเซลล์ซ้ำ สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ในวัสดุพุงได้ โดยปริมาณเซลล์จะมีปริมาณที่คงที่เมื่อเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่รอบที่ 3 เป็นต้นไปและเมื่อนำ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสที่เลี้ยงในอาหารใหม่รอบที่ 3 ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 32.04 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุง เมื่อนำไปใช้เร่งในปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ จะให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์สูงสุด เท่ากับ 7.56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วัสดุผ้าพีวีเอชามัวร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารรอบที่ 3 มีปริมาณเซลล์ในวัสดุ เท่ากับ 27.37 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุง แต่เมื่อนำไปเร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ ดังแสดงใน Table 20 ซึ่งวัสดุผ้าพีวีเอชามัวร์ เป็นวัสดุที่ทำจากปฏิกิริยาทางเคมีของโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ผสมกับแป้งและฟอร์มัลิน โดยมีกรดทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดจะถูกกวนผสมอย่างแรง ทำให้สารละลายเกิดปฏิกิริยาและเกิดฟองจำนวนมาก ทำให้ได้โครงสร้างพอลิเมอร์แบบเปิดสามมิติที่

เชื่อมต่อกัน จึงทำให้เกิดเป็นรูพรุนแบบต่อเนื่อง (continuous pore structure) ลักษณะดังกล่าวนี้ทำให้สมบัติของ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์เปลี่ยนจากละลายน้ำได้เป็นไม่ละลายน้ำ แต่ทำให้เส้นใยพิวเอชามั้วส์เกิด capillary action เกิดการดูดซับอย่างรวดเร็ว และดูดซับได้ถึง 12-25 เท่าของน้ำหนักแห้ง (วรรณฤดี แก้วมีศรี, 2545) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเมื่อนำเซลล์ที่ถูกตรึงในเส้นใยพิวเอชามั้วส์ มาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของสับสเตรทที่เป็นน้ำมันกับเมทานอล วัสดุเส้นใยพิวเอชามั้วส์ จึงดูดซับสับสเตรทไว้ ทำให้ไม่เกิดการไหลเวียนของสับสเตรทในระหว่างการทำปฏิกิริยาแบบเขย่าและเมื่อวัสดุดูดซับก็ทำให้น้ำหนักของวัสดุเพิ่มขึ้น จึงทำให้การเคลื่อนที่ของวัสดุในระหว่างการทำปฏิกิริยาลดลงหรือไม่เคลื่อนที่ จึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเป็นผลิตภัณฑ์เมทิลเอสเทอร์ จึงเลือกนำวัสดุฟองน้ำ 3M เส้นใยธรรมชาติ ไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในการผลิตเมทิลเอสเทอร์

Table 20. Comparison of cultivation for cell concentration and hydrolysis activity.

Cultivation	Cell concentration mg DCW/g BSP	Hydrolytic activity of lipases (U/g DCW in BSP)	FAME (% conversion at 72h)
Non- repeated cultivation			
In 3M Cellulose sponge	14.77±1.97 ^b	7.54±0.93 ^{ab}	3.39±1.03 ^b
In Poly(vinyl alcohol) Chamois	14.95±1.08 ^b	5.48±0.86 ^b	0.00
Repeated cultivation			
In 3M Cellulose sponge			
nd 2	^b 26.44±1.61	^b 6.42±1.44	^a 5.38±1.32
rd 3	^a 32.04±1.61	^{ab} 6.52±1.04	^a 7.56±1.68
th 4	^a 34.04±2.11	^a 6.88±1.68	^a 7.87±0.68 ^a
In PVA Chamois			
nd 2	^b 23.65±3.61	^b 5.62±2.00	0.00
rd 3	^a 27.37±2.53	^a 5.86±1.27	0.00
th 4	^a 27.02±1.81	^a 5.78±0.85	0.00

4. สภาพที่เหมาะสมต่อการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในการผลิตเมทิลเอสเทอร์

4.1 ศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ที่ตรึงรูปต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง ภายใต้สภาวะการตรึงที่ให้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม คือ ทำการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสมเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองวัสดุตรึง 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสและนำวัสดุตรึงดังกล่าวถ่ายลงอาหารใหม่ จำนวน 3 รอบ เพื่อให้ปริมาณเซลล์ที่อยู่ในวัสดุฟองเพิ่มมากขึ้นและนำเซลล์ที่ถูกตรึงดังกล่าวมาศึกษาการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม ต่อสับสเตรท 3 กรัม โดยเตรียมสับสเตรท คือ ชั่งน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 3.0 กรัม กับ เมทานอล 0.324 กรัม โดยมีอัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลเท่ากับ 1:6 (โมล : โมล) ใส่ใน screw-capped bottle ขนาด 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ต่อจากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรทนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วสูง ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่า การใช้เซลล์ตรึงน้อยกว่า 2.0 กรัม จะไม่เกิดเมทิลเอสเทอร์ ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งปริมาณเซลล์ตรึง 2.0 กรัม จะมีปริมาณเซลล์ในวัสดุฟองเท่ากับ 65 มิลลิกรัมและมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1.394 ± 0.12 ยูนิต สามารถเปลี่ยนน้ำมันปาล์มไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ได้ประมาณ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน

Figure 19

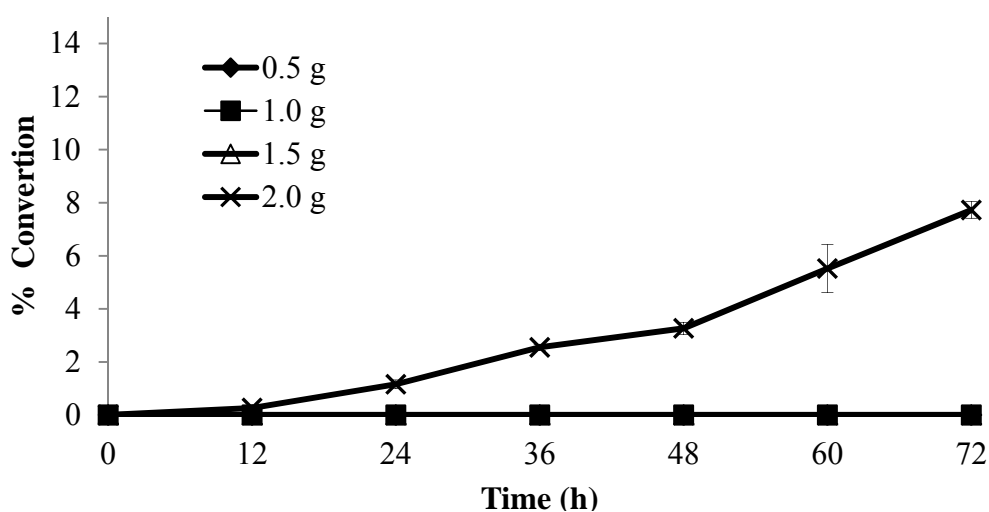


Figure 19. Effect of amount of yeast immobilized 3M cellulose sponge on methyl ester production. (reaction conditions: palm oil 3.0 g, methanol 0.324 g (mole ratio 1:6), water content 10.0%, 30°C, 1000 r/min, 72 h.).

4.2 ผลของปริมาณน้ำต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในปริมาณต่างๆ ดังนี้ 2, 5, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารตั้งต้น ความเข้มข้นของวัสดุเซลล์ตรึงใน 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลส 2.0 กรัม นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วสูง ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมันด้วย TLC/FID พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเมทิลเอสเทอร์ที่ได้จะลดลง (Figure 20) โดยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสับสเตรท สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงสุด 10.62 ± 0.82 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเติมน้ำในปฏิกิริยา 10 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมในการผลิตเมทิลเอสเทอร์มากที่สุด จากรูปแบบโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่ยังคงมีกิจกรรมอยู่น้ำมีผลทำให้กิจกรรมดำเนินไปได้และมีบทบาทในการควบคุมกิจกรรม ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (Foresti *et al.*, 2005) การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นระหว่างผิวสัมผัสของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic phase) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic phase) การมีพื้นที่สัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันมากขึ้นจะทำให้เอนไซม์เข้าไปจับกับสับสเตรทหรือน้ำมันได้ดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์มีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดี แต่สับสเตรทหรือน้ำมันที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่ละลายน้ำ เมื่อนำมาผสมเข้าด้วยกันภายในระบบก็จะมีสองส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำมัน (lipophilic phase) ประกอบด้วยเอซิลกลีเซอรอลกับกรดไขมัน และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic phase) ดังนั้นการเติมน้ำหรือการมีน้ำในระบบจะเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันให้มากขึ้น จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสเข้าไปจับกับสับสเตรทหรือน้ำมันได้ดีขึ้น (Hama *et al.*, 2007) ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสไม่จำเป็นต้องมีน้ำในปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามการควบคุมปริมาณน้ำก็ยังเป็นสิ่งสำคัญ ด้วยเหตุผลที่ว่า น้ำเปรียบเสมือนตัวหล่อลื่นที่ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ยังคงกิจกรรมอยู่ได้

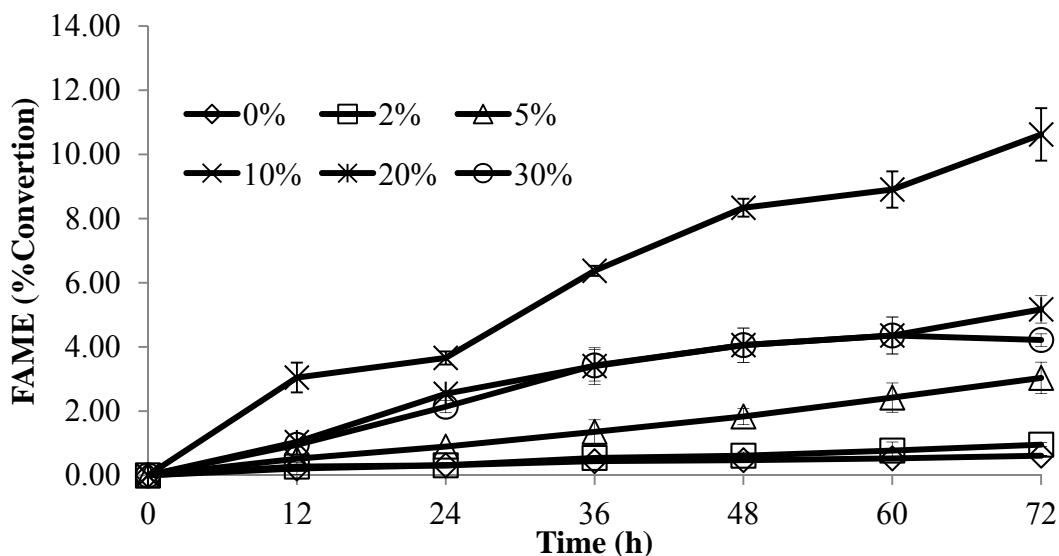


Figure 20. Effect of water content on methyl ester production by transesterification catalyzed by immobilized yeast cells (reaction conditions: immobilized yeast 2.0 g, palm oil 3.0 g, methanol 0.324 g (mole ratio 1:6), 30°C, 1000 r/min, 72 h.).

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์ โดยใช้ปริมาณวัสดุเซลล์ตรึงใน 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลส 2.0 กรัม มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1.394 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน มีสับสเตรท คือน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:6 (โมล : โมล) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้สูงที่สุด คือ 14.60 เปอร์เซ็นต์ (Figure 21) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวเซลล์ที่ไม่ถูกตรึง พบว่า ตัวเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุฟองน้ำสามารถคงทนกว่าการใช้เซลล์อิสระ ซึ่งเซลล์อิสระสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงว่าการตรึงสามารถเพิ่มความทนตัวของตัวเซลล์ในระหว่างการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยทั่วไปปฏิกิริยาเคมีจะทำงานได้ดีเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนมักไม่ค่อยคงตัวต่อความร้อนทำให้

เอนไซม์เสียสภาพ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานได้ดีแตกต่างกัน (สารโจน์ ศิริสันตนิกุล, 2538)

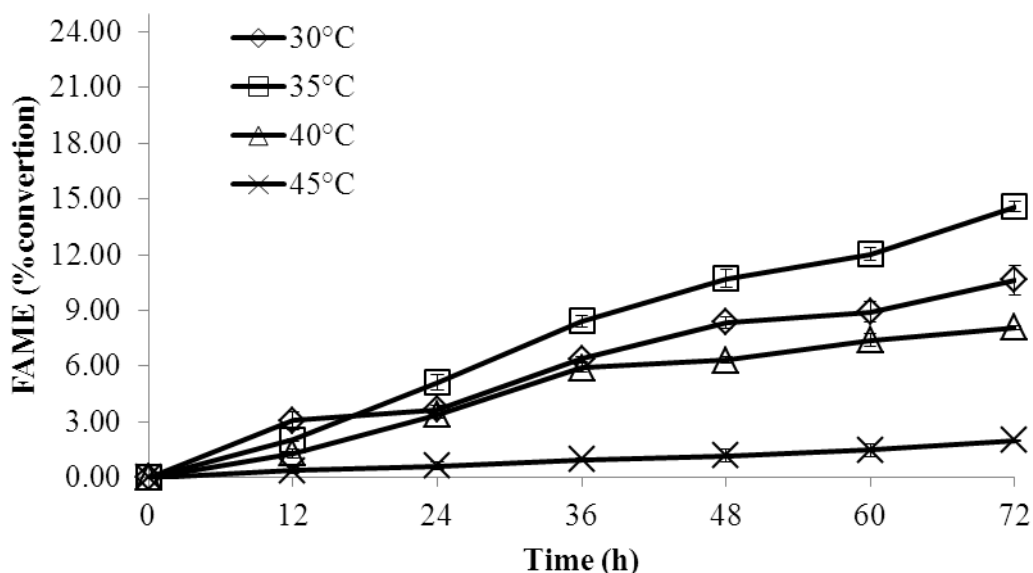


Figure 21. Effect of temperature on methyl ester production by transesterification catalyzed by immobilized yeast cells (reaction conditions: immobilized yeast 2.0 g, palm oil 3.0 g, methanol 0.324 g (mole ratio 1:6), water content 10.0%, 1000 r/min, 72 h.).

4.4 ศึกษาอัตราส่วนโมลของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์

การศึกษาผลของอัตราส่วนโมลต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลส 3M เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของสับสเตรทที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์และเมทานอล ในอัตราส่วน โมล 1:3, 1:6, 1:9, 1:12 และ 1:15 (โมล:โมล) ปรับให้มีปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักสับสเตรท โดยการละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วน โมลของเมทานอลที่เข้าทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอล 1:3, 1:6, 1:9, 1:12 และ 1:15 (โมล:โมล) มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ ที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 3.00, 15.00, 16.33, 17.20 และ 8.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 22) ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถทนเมทานอลได้มากกว่าการใช้เซลล์อิสระที่สามารถทนปริมาณของเมทานอลถึง 1:6

โมล (ปรีมปรีชญ์ ศรีหมาน, 2552) โดยส่วนใหญ่แล้วการศึกษาผลของเมทานอลต่อปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์หรือตัวเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะสามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ได้ดีที่อัตราส่วนโมลน้ำมันและเมทานอลเท่ากับ 1:4 แต่ในระบบที่ศึกษาถึงแม้จะมีการใช้อัตราส่วนน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ต่อเมทานอลที่สูงถึง 1:12 ก็ยังเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดี แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากยีสต์และการตรึงเซลล์ยีสต์ สามารถทนเมทานอลเพิ่มขึ้น จึงเป็นการดีในการผลิตเมทิลเอสเทอร์ เพราะฉะนั้นจะทำการเลือกอัตราส่วนโมล 1:12 ในการศึกษาปัจจัยต่อไป ซึ่งในทางทฤษฎีสมดุลมวลสารสัมพันธ์ของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันในการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ที่สมบูรณ์ ต้องมีอัตราส่วนโมลน้ำมันต่อแอลกอฮอล์อย่างน้อย 1 ต่อ 3 แต่ในทางปฏิบัติ พบว่าปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์สามารถผันกลับได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมเมทานอลมากขึ้นเพื่อให้สภาวะสมดุลเลื่อนเข้าใกล้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด แต่ถ้ามีปริมาณเมทานอลมากเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ (Ma and Hanna, 1999)

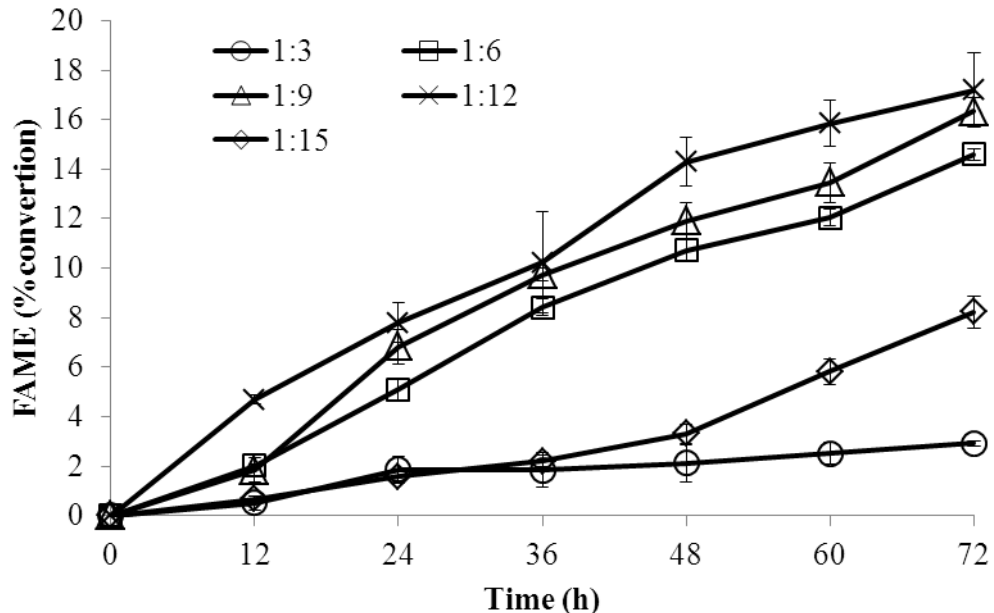


Figure 22. Effect of mole ratio of palm oil and methanol on methyl ester production by transesterification catalyzed by immobilized yeast cells (reaction conditions: immobilized yeast 2.0 g, palm oil 3.0 g, water content 10.0%, 35°C, 1000 r/min, 72 h.).

5. การนำเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์หาค่าประกอบของน้ำมันดีเซลชีวภาพ

จากการนำเมทิลเอสเทอร์ที่ผลิตได้จากตัวเซลล์ยีสต์ในอาหารที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า ให้ปริมาณเมทิลเอสเทอร์เท่ากับ 92.0 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำบริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล 60 แล้ว พบว่า สามารถผลิตไบโอดีเซลที่มีความบริสุทธิ์ 97.0 เปอร์เซ็นต์ ยังมีองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระ เท่ากับ 1.2, 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของเมทิลเอสเทอร์ในผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ โอลีกเมทิลเอสเทอร์ 40.12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น ปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์ 37.86 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ 11.11 เปอร์เซ็นต์ และสเตียริกเมทิลเอสเทอร์ซึ่งมีปริมาณ 4.83 เปอร์เซ็นต์ (Table 21) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Lovestead และคณะ (2010) ในการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชบริสุทธิ์ พบว่า น้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์มีเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักใกล้เคียงกัน คือ โอลีกเมทิลเอสเทอร์ 40.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์ 40.0 เปอร์เซ็นต์ ลิโนเลอิกเมทิลเอสเทอร์ 11.0 เปอร์เซ็นต์ และสเตียริกเมทิลเอสเทอร์ซึ่งมีปริมาณ 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าไอโอดีน (iodine value) และค่าความหนืด (viscosity) ที่ 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ 54.24, 4.85 เซนติสโตกส์ และยังให้ค่าจุดขุ่น (cloud point) และจุดไหลเท (pour point) เท่ากับ 10 และ 7 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นไบโอดีเซลที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้เซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ก็น่าจะมีคุณสมบัติทางเชื้อเพลิงที่ใกล้เคียงกันเพราะมีองค์ประกอบของเมทิลเอสเทอร์ที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำมันไบโอดีเซลของประเทศไทย (กรมธุรกิจพลังงาน, 2552) กำหนดให้ค่าไอโอดีน (iodine value) ไม่เกิน 120 และค่าความหนืด (viscosity) ที่ 40 องศาเซลเซียส ต้องไม่ต่ำกว่า 3.50 แต่ไม่เกิน 5.0 เซนติสโตกส์ ส่วนค่าจุดขุ่น (cloud point) และจุดไหลเท (pour point) เท่ากับ -15 ถึง 10 องศาเซลเซียส และ -35 ถึง 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นน้ำมันไบโอดีเซลที่ผลิตได้จึงมีความเหมาะสมต่อการใช้ในประเทศไทย ซึ่งไบโอดีเซลที่ผลิตจากน้ำมันพืชที่ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชเป็นสารประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันอยู่ในโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ถึงร้อยละ 94-96 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโมเลกุล ทำให้คุณสมบัติของน้ำมันมีคุณสมบัติทั้งทางเคมีและกายภาพเป็นไปตามกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นเมื่อนำน้ำมันพืชชนิดนั้นๆ มา

เป็นวัตถุดิบในการผลิต ไบโอดีเซลที่ผลิตได้จะมีคุณสมบัติตามกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบนั้นๆ ด้วย (พิศมัย เจนวนิชปัญญกุลและลลิตา อัจฉนโณ, 2549) โดยจะส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิง เช่น จุดขุ่น (cloud point) และจุดไหลเท (pour point) จะมีค่าสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับชนิดของเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบ กล่าวคือ หากเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเช่น กรดโอเลอิกหรือกรดลิโนเลอิก ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำก็จะทำให้ไบโอดีเซลที่ผลิตได้มีค่าความหนืด (viscosity) จุดขุ่น (cloud point) และจุดไหลเท (low-temperature flow) ต่ำตามไปด้วย ในทางตรงกันข้ามหากเป็นไบโอดีเซลที่เกิดจากกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง เช่น กรดปาล์มมิติกและสเตียริก ก็จะส่งผลให้ค่าความหนืด จุดขุ่นและจุดไหลเทของไบโอดีเซลที่ผลิตมีค่าสูงเช่นกัน ซึ่งจุดขุ่นและจุดไหลเทจะส่งผลกระทบต่อการใช้งานไบโอดีเซลในสภาพภูมิอากาศต่างๆ กล่าวคือ หากเป็นประเทศในเขตนานาก็ควรใช้ไบโอดีเซลที่มีค่าจุดขุ่นและจุดไหลเทต่ำ ส่วนในประเทศในเขตร้อนก็สามารถใช้ไบโอดีเซลก็สามารถใช้ไบโอดีเซลที่มีจุดขุ่นและจุดไหลเทที่สูงได้

Table 21. Qualitative compositions of fatty acid methyl ester in biodiesel.

Composition	Fatty acid methyl ester (%)
Caprylic acid methyl ester (C8:0)	0.008
Capric acid methyl ester (C10:0)	0.012
Lauric acid methyl ester (C12:0)	0.22
Myristic acid methyl ester (C14:0)	0.76
Palmitic acid methyl ester (C16:0)	37.86
Palmitoleic acid methyl ester (C16:1)	0.20
Stearic acid methyl ester (C18:0)	4.83
Oleic acid methyl ester (C18:1)	40.12
Linoleic acid methyl ester (C18:2)	11.11
Linolenic acid methyl ester (C18:3)	0.20
Arachidic acid methyl ester (C20:0)	0.43
Cis 11-Eicosenoic acid methyl ester (C20:1)	0.07
Behenic acid methyl ester (C22:0)	0.00
Erucic acid methyl ester (C22:1)	0.13
Lignoceric acid methyl ester (C24:0)	0.024

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Rhodotorula mucilagenosa* ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำตัวเซลล์ที่เลี้ยงได้ไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน โดยใช้แบบแผนการทดลองทางสถิติร่วมกันระหว่างแบบ Taguchi method และ Response surface method (RSM) ซึ่งแบบแผน Taguchi method เป็นตัวคัดเลือกชนิดของปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า น้ำมันปาล์ม แอมโมเนียมไนเตรทและกัมอะราบิกมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์ที่จะนำไปใช้เร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน เมื่อได้ปัจจัยดังกล่าวแล้วก็นำมาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้แบบแผนการทดลอง Central Composite Design (CCD) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มเข้มข้น 2.10 เปอร์เซ็นต์, แอมโมเนียมไนเตรท 0.20 เปอร์เซ็นต์ และกัมอะราบิก 0.45 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมไฮโดรไลซิสเอนไซม์ไลเปสของตัวเซลล์สูงสุดเท่ากับ 41.50 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้ง โดยให้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 6.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นค่ากิจกรรมทั้งหมดของตัวเซลล์เท่ากับ 272.72 ยูนิตต่อลิตร โดยเลี้ยงเซลล์ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งอาหารสูตรดังกล่าวสามารถลดระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์จากอาหารสูตรเดิมที่ต้องใช้ระยะ 96 ชั่วโมงและให้กิจกรรมของตัวเซลล์เพิ่มขึ้น 3.28 เท่าเมื่อเทียบจากอาหารสูตรเดิม ส่งผลให้เมื่อนำตัวเซลล์ที่เลี้ยงไปสังเคราะห์เมทิลเอสเทอร์ พบว่า ปริมาณเมทิลเอสเทอร์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 48 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารสูตรจะต้องใช้ระยะเวลามากกว่า 60 ชั่วโมงในสภาวะทำปฏิกิริยา

2. การคัดเลือกวัสดุที่นำมาตรึงเซลล์ยีสต์ โดยตรึงเซลล์แบบดูดซับซึ่งอาศัยการเลี้ยงร่วมไปกับการเจริญของเซลล์ยีสต์ในอาหารที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า วัสดุที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ได้แก่ 3M ฟองน้ำเส้นใยเซลลูโลสและผ้าพีวีเอชามัวร์ (poly(vinyl alcohol) chamois) สามารถให้เซลล์ต่อน้ำหนักวัสดุพุงมากกว่าวัสดุที่เป็นผงและมีพื้นผิวขรุขระ แต่มีเพียงวัสดุฟองน้ำจากเส้นใยเซลลูโลส เท่านั้นที่สามารถนำไปใช้เร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันได้ โดยตัดให้มีรูปร่างขนาด 0.25×0.5×0.5 เซนติเมตร มาเลี้ยงร่วมในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหาร 200 มิลลิลิตร ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ในวัสดุพุงเท่ากับ 14.77 มิลลิกรัมเซลล์แห้งต่อกรัมวัสดุพุงและ 5.92 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้งในวัสดุพุง ตามลำดับ เมื่อนำวัสดุที่ผ่านการตรึงเซลล์ดังกล่าวมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมทิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์ม พบว่า

สถานะที่มีน้ำมันปาล์มอัตราส่วน โมลต่อเมทานอล 1:12 เป็นสับสเตรท จะต้องใช้ปริมาณวัสดุที่ถูกต้องเท่ากับ 2.0 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ในสถานะที่มีน้ำในระบบ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าต่อเนื่อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเมทิลเอสเทอร์ 16.50 เปอร์เซ็นต์

3. ชนิดของเมทิลเอสเทอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน คือ โอลิอิกเมทิลเอสเทอร์, ปาล์มมิติกเมทิลเอสเทอร์, ลิโนลิกเมทิลเอสเทอร์และสเตียริกเมทิลเอสเทอร์ มีปริมาณเมทิลเอสเทอร์ เท่ากับ 40.12, 37.86, 11.11 และ 4.83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. หากต้องการนำเซลล์ที่เลี้ยงได้ไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องขยายขนาดในการเลี้ยงเซลล์ ซึ่งต้องศึกษาโดยการนำ Bioreactor มาใช้ในการเลี้ยงแทนการเลี้ยงเซลล์ในฟลากส์และให้อากาศแบบเขย่า ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณการเลี้ยงเซลล์ทำให้ได้เซลล์ในปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้

2. จากการคัดเลือกวัสดุที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ พบว่าวัสดุที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ตรึงเซลล์เพื่อนำไปใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ควรเป็นวัสดุที่มีรูพรุน คือ ฟองน้ำจากเส้นใยธรรมชาติ แต่ยังคงได้ปริมาณเซลล์ในวัสดุพวงก่อนข้างน้อย จึงอาจต้องคัดเลือกวัสดุใหม่เพื่อที่มีความเหมาะสม อีกทั้งเมื่อนำวัสดุที่ผ่านการตรึงเซลล์ไปเร่งในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่า วัสดุจะดูดซับสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยาไว้ ทำให้การเคลื่อนของสับสเตรทต่อการเข้าทำปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ยาก จึงต้องหาวัสดุที่เป็นรูพรุนและไม่มีการดูดซับ แต่ยอมให้สับสเตรทไหลผ่านได้ดี

3. หากได้เซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุที่เหมาะสมแล้ว จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการนำเซลล์ที่ถูกตรึงไปใช้เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งต้องใช้ Bioreactor ในการทำปฏิกิริยา เช่น ใช้ระบบแบบ Packed-Bed Reactor (PBR) โดยอาศัยการไหลของสับสเตรทผ่านเซลล์ที่ถูกตรึงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา แทนการทำปฏิกิริยาแบบเขย่าซึ่งทำได้เฉพาะในระบบห้องปฏิบัติการเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมธุรกิจพลังงาน. 2552. ประกาศกรมธุรกิจพลังงาน เรื่อง กำหนดลักษณะและคุณภาพของไบโอดีเซล ประเภทเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 98 ง: 43-45.
- กระทรวงพลังงาน. 2548. การผลิตและการใช้ไบโอดีเซล. แหล่งที่มา: <http://www.dede.go.th/renew/biodiesel/usebio.html>, 24 มีนาคม 2548.
- เจดศักดิ์ เมธาธิในสุวรรณย์. 2535. การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- บุษบา ยงสมิทธิ์. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. (ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 1) หน้า 125-130.
- ปวิมลปรีชญ์ ศรีหมาน. 2552. การผลิตอัลคิลเอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันที่มีเอนไซม์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พงษ์ชาริน โล่ห์ตระกูล. 2538. การผลิต การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aeromonas sobria* สายพันธุ์ LP 004. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล และลลิตา อัดนโถ. 2549. รอบรู้เรื่องราวไบโอดีเซล. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมุทรปราการ: พิมพ์นิจ.
- วรรณฤดี แก้วมีศรี. 2545. การสังเคราะห์ฟองน้ำพอลิไวนิลแอลกอฮอล์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- วรรณธิ อุ่ไพบูรณ์. 2547. การเลือกใช้สารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรม. ว. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 52: 38-40.

- วิภาวดี ประพัฒน์ไพโรจน์. 2546. การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากไขปลาล์มโดยใช้เอนไซม์ตรีงรูป.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Acikel, U., Ersan, M., Acikel, S. Y. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. Food Bioprod. Process. 88: 31-39.
- Aksoy, H. A., Kahraman, I., Karaosmanoglu, F. and Civelekoglu, H. 1988. Evaluation of Turkish sulphur olive oil as an alternative diesel fuel. J. Am. Oil Chem. Soc. 65: 936-938.
- Aksu, Z. And Eren, A. T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochem. 40: 2985-2991
- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification. 3rd Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Berto, P., Belingheri, L and Dehorter, B. 1997. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. Biotechnol Lett. 19: 533-536.
- Box, G. E. P., Hunter J. S. and Hunter, W. G. 2005. Statistics for Experimenters: Design Innovation and Discovery 2nd ed. John Wiley and Sons. New York.
- Boze, H., Moulin, G. and Galzy, P. 1995. Production of Microbial Biomass. In Biotechnology: Enzyme, Biomass, Food and Feed 2nd ed. Rehm, H. J., Reed, G., Puhler, A. and Stadler, P., 170-220. VCH, Weinheim.
- Chen, J. W. and Wu, W. T. 2003. Regeneration of immobilised *Candida antarctica* lipase for transesterification. J. Biosci. Bioeng. 95: 466-469.
- Chennupati, S., Potumarthi, R., Gopal Rao, M., Manga P. L., Sridevi, M. and Jetty, A. 2009. Multiple responses optimization and modeling of lipase production by *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737 using response surface methodology. Appl. Biochem. Biotechnol. 159: 317-329.

- Desai, P. D., Dave, A. M. and Devi, S. 2005. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chem.* 95: 193-199.
- Devanesan, M. G., Viruthagiri, T., and Sugumar, N. 2007. Transesterification of Jatropha oil using immobilised *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 2497-2501.
- Dominguez, A., Deive, F. J., Sanroman, M. A. and Longo, M. A. 2003. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78: 1166-1170.
- Du, W., Xu, Y., Liu, D. and Zeng, J. 2004. Comparative study on lipase-catalysed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 30: 125-129.
- Elibol, M. and Ozer, D. 2001. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.* 36: 325-329.
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Thaer Taleb, A. and Adimarayana, K. 2004. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 39: 525-528.
- Essamri, M., Valerie, D. and Louis, C. 1998. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. Biotechnol.* 60: 97-103.
- Foidl, N., Foidl, G., Sanchez, M., Mittelbach, M., Hackel, S. 1996. *Jatropha curcas L.* as a resource for the production of biofuel in Nicaragua. *Bioresour. Technol.* 58: 77-82.
- Fukuda, H., Hama, S., Tamalapudi, S. and Noda, H. 2008. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.* 26: 668-673.
- Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416.

- Fukuda, H., Yamaji, H., Kondo, A., Noda, H. and Hama, S. 2007. Enzymatic biodiesel fuel production using whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles. *J. Biotechnol.* 131: 23-31.
- Ghosh, M., Bhattacharyya, S. and Bhattacharyya, D. K. 2005. Production of lipase and phospholipase enzymes from *Pseudomonas sp.* and their action on phospholipids. *J. Oleo. Sci.* 54: 407-411.
- Giesbrecht, F. G. and Gumpertz, M. L. 2004. Planning, Construction, and Statistical Analysis of Comparative Experiments. John Wiley and Sons. New York.
- Gilbert, E. J., Cornish, A. and Jones, C. W. 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF 2. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2223-2229.
- Griffin, H. D. 1994. Physiology of Fungi. 2nd ed, Wiley-liss, New York.
- Hama, S., Numata, T., Tamalampudi, S., Yoshida, A., Noda, H., Kondo, A. and Fukuda, H. 2006. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 328-333.
- Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H. and Fukuda, H. 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochem. Eng. J.* 34: 273-278.
- Hama, S., Yamaji, H., Kaieda, M., Oda, M., Kondo, A. and Fukuda, H. 2004. Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. *J. Biochem. Eng.* 21: 155-160.

- Hama, S., Yoshida, A., Nakashima, K., Noda, H., Fukuda, H. and Kondo, A. 2010. Surfactant-modified yeast whole-cell biocatalyst displaying lipase on cell surface for enzymatic production of structured lipids in organic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 537-543.
- Handelsman, T. and Shoham, Y. 1994. Production and characterization of the extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 435-443.
- Iizum, T., Nakamura, K. and Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1253-1258.
- Iso, M., Chen, B. Kudo, T. and Shrestha, S. 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16: 53-58.
- Janssen, P. H., Monk, C. R. and Morgan, H. W. 1994. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 195-200.
- Jham, G. N., Teles, F. F. F. and Campos, L. G. 1982. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59: 132-133.
- Jinda, J. 2004. Characterization and Immobilization of Lipase from *Pseudomonas* sp. KLB1; Modification of Crude Palm Oil by Lipase Acidolysis Reaction. Dissertation of Doctor of Philosophy (Biotechnology). Kasetsart University.
- Karatay, S. E. and Donmez, G. 2010. Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresour. Technol.* 101: 7988-7990.
- Kaieda, M., Samukawa, T., Matsumoto, T., Ban, M., Kondo, A. and Shimada, Y. 1999. Biodiesel fuel production from plant oil catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 627-631.

- Khuri, A. I. and Cornell, J. A. 1987. Response Surface. Marcell Dekker. New York.
- Kim, E. K., Song, M. H., Kim, H. M. and Oh, T. K. 1994. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 961-962.
- Kok, R. G., Thor, J. J. V., Roodzant, I. M. N., Brouwer, M. B. W., Egmond, M. R., Nudel, C. B., Vosman, B. and Hellingwer, K. J. 1995. characterization of the extracellular lipase lip A of *Acinetobacter colcoacetivus* BD 413 and sequence analysis of the cloned structural gene. Mol. Microbiol. 15: 803-818.
- Kondo, A., Liu, Y., Furuta, M., Fujita, Y., Matsumoto, T. and Fukuda, H. 2000. Preparation of high activity whole cell biocatalyst by permeabilization of recombinant flocculent yeast with alcohol. Enzyme Microb. Technol. 27: 806-811.
- Labuschagne, R. B., Tonder A. and Litthauer, D. 1997. *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization. Enzyme Microb. Technol. 21: 52-58.
- Lee, Y. P., Chung, G. H. and Rhee, J. S. 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK WI lipase expressed in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 1169: 156-164.
- Li, L., Du, W. and Liu, D. 2007. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in *tert*-butanol system. Process Biochem. 42: 1481-1485.
- Lin, S. F., Chiou, C. M. and Tsai, Y. C. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Biotechnol Lett. 17: 959-962.
- Lovestead, T. M., Windom, B. C. and Bruno, T. J. 2010. Investigation of biofuels properties. Energ Fuel 24: 3665-3675.
- Macrae, A. R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 61: 1067-1071.

- Maia, M., Heasley, A., Camargo de Moraes, M. M., Melo, E. H. M., Moraes, M. A., Ledingham, W. M. and Filho, J. L. 2001. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresour. Technol.* 76: 23-27
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U. and Errazu, A. F. 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energ.* 11: 1300-1311.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fakuda, H. and Kondo, A. 2001. Yeast whole-cell biocatalysts constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase are applicable to biodiesel fuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 4-11.
- Mohamed, M.S., and Uwe, B. 2003. Improvement in lipase-catalysed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 97-103.
- Noureddini, H., Gao, X. and Philkana, R. S. 2004. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresour. Technol.* 96: 769-777.
- Oda, M., Kaieda, M., Hama, S., Yamaji, H., Kondo, A. and Izumoto, E. 2005. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *J. Biochem Eng.* 23: 45-51.
- Omar, I. C., Nishio, N. and Nagai, S. 1987. Production of thermostable lipase by *Humicola languinosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2145-2151.
- Onishi, K., Yoshida, Y. and Sekigushi, J. 1994. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 490-495.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipase in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 119-131

- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B. J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 14: 397-402.
- Potumarthi, R., Subhakar, C., Vanajakshi, J. and Jetty, A. 2008. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151: 700-710
- Rathi, P., Saxena, R. K. and Gupta, R. 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.* 17: 187-192
- Saad, M. M., Kansoh, L. A., and Gadaiiah, M. A. 2005. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. *Arab J. Biotechnol.* 8: 19-28.
- Santos, D. T., Sarrouh B. F., Rivaldi, J. D., Converti, A. and Silva, S. S. 2008. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *J. Food Eng.* 86: 542-548
- Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U. and Schmid, R. D., 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214: 43-53
- Shahani, K. M. 1975. Lipases and esterases. *In Enzymes in Food Processing*, ed. Reed, G. Academic Press. New York.
- Sharon, C., Furugon, S., Yamakido, T., Ogawa, H. and Kato, Y. 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 304-307.
- Song, X., Zhang, X., Kuang, C., Zhu, L. and Guo, N. 2007. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. *Process Biochem.* 42: 1391-1397.

- Soumanou, M. M. and Bornscheuer, U.T. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 97-103.
- Srimhan, P., Kongnum, K., Taweerodjanakarn, S. and Hongpattarakere, T. 2011. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. *Enzyme Microb. Technol.* 48: 293-298.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. and Hall S. J. 1995. *Principles of Fermentation Technology*. 2nd ed. Elsevier Science Ltd. Progamon, New York.
- Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J. Biochem.* 109: 211-216.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y. 1992. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* 112: 598-603.
- Surinenaite, B., Bendikiene, V., Juodka, B., Bachmatova, I. and Marcinkevichiene, L. 2002. Characterization and physicochemical properties of a lipase from *Pseudomonas mendocina* 3121-1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36: 47-55.
- Sztajer, H. and Maliszewaka, L. 1989. The effect of culture condition on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol. Lett.* 11: 895-898.
- Tamalampudi, S., Numata, T., Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Kondo, A., Noda, H. and Fukuda, H. 2008. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochem. Eng.* 39: 185-189.
- Vanot, G., Deyris, V., Guilhem, M., Phan Tan Luu, R. and Comeau, L. C. 2001. Optimal design for the maximization of *Penicillium cyclopium* lipase production. *Appl. Microb. Biotechnol.* 57: 342-345.

- Venil, C. K. and Lakshmanaperumalsamy, P. 2009. Taguchi experimental design for medium optimization for enhanced protease production by *Bacillus subtilis* HB04. (Online). Available <http://www.e-jst.teiath.gr.html> 4 July 2009
- Wahab, S. K., Bisakowski, B. And Morin, A. 1999. Characterization of partially purified extracellular lipase fraction from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. J. Am Oil Chem. Soc. 76: 1301-1308.
- Wang, Y. J., Sheu, J. Y., Wang, F. F. and Shaw, J. F. 1988. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotechnol. Bioeng. 31: 628-633.
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. 1997. Isolation and identification of alkaline lipase producing micororganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. Agric. Biol. Chem. 41: 1353-1358.
- Wright, H. J., Segur, J. B., Clark, H. V., Coburn, S. K., Langdon, E. E. and Dupuis, R. N. 1944. A report on ester interchange. J. Am. Oil Chem. Soc. 21: 145-148.
- Yamamoto, K. and Fujiwara, N. 1988. Purification and some properties of a castor oil hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. Agri. Biol. Chem. 52: 3015-3021.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. J. Am. Oil Chem. Soc. 64: 1657-1661.
- Zeng, J., Du, W., Liu, X., Liu, X. D. and Dai, L. 2006. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. J. Mol. Catal. B: Enzym. 43:15-18.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงยีสต์

1. อาหารสูตร Yeast extract-Malt extract broth (YM)

Yeast extract	3.0 กรัม
Malt extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Glucose	10.0 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร
pH 5.0	

เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 5.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารแข็งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมด และเติมผงวุ้น 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร Isolation medium for yeast (Koh *et al.*, 1983)

Palm oil	20.0 กรัม
NH ₄ NO ₃	4.0 กรัม
KH ₂ PO ₄	4.7 กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.3 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01 กรัม
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01 กรัม
Yeast extract	0.10 กรัม
กัมอะราบิก	10.0 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร
pH 5.0	

เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารแข็งเตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมด และเติมผงวุ้น 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) หลังจากปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Homogenizer) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 15 นาที นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

Palm oil	21.0 กรัม
NH ₄ NO ₃	2.0 กรัม
KH ₂ PO ₄	4.7 กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.3 กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01 กรัม
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01 กรัม
Yeast extract	0.10 กรัม
กัมอะราบิก	4.5 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร
pH 5.0	

เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากันเช่นเดียวกับอาหาร IMY ในข้อ 2

3. การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer

นำตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หยดลงบน counting chamber แล้วปิดด้วย cover slip นับเซลล์ยีสต์ในช่องสี่เหลี่ยมทั้ง 25 ช่อง ที่กำลังขยาย 400 เท่า ในการคำนวณจะนำจำนวนช่องสี่เหลี่ยม 25 ช่อง หารด้วยจำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ทั้งหมด จะได้จำนวนเซลล์ยีสต์โดยเฉลี่ยต่อช่อง ซึ่งมีปริมาตร 0.2×0.2×0.1 มิลลิเมตร จากนั้นจึงคำนวณปริมาณเซลล์ยีสต์ให้มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อ มิลลิลิตร

4. การเตรียมเซลล์ยีสต์ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน

สมมุติว่าต้องการศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ที่มีน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ 0.5 กรัม และเมทานอล 0.054 กรัม เป็นสับสเตรท อัตราส่วนโมล เท่ากับ 1:3 (โมล:โมล) โดยต้องการใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท และนับเซลล์ยีสต์ด้วย Haemocytometer ได้เท่ากับ 2.25×10^8 ดังนั้น

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักสับสเตรททั้งหมด} &= \text{น้ำหนักน้ำมันปาล์มบริสุทธิ์} + \text{น้ำหนักเมทานอล} \\ &= 0.5 \text{ กรัม} + 0.054 \text{ กรัม} \\ &= 0.554 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ต้องการใช้เซลล์ยีสต์ 1×10^{10} เซลล์ต่อกรัมสับสเตรท ดังนั้น

$$\begin{array}{lll} \text{น้ำหนักสับสเตรท 1 กรัม} & \text{ใช้เซลล์ยีสต์} & 1 \times 10^{10} \text{ เซลล์} \\ \text{น้ำหนักสับสเตรท 0.554 กรัม} & \text{ใช้เซลล์ยีสต์} & 5.54 \times 10^9 \text{ เซลล์} \end{array}$$

นับเซลล์ยีสต์ ได้เท่ากับ 2.25×10^8 ดังนั้น

จำนวนเซลล์	2.25 × 10 ⁸ เซลล์ ในอาหาร	1	มิลลิลิตร
จำนวนเซลล์	5.54 × 10 ⁹ เซลล์ ในอาหาร	5.54 × 10 ⁹	มิลลิลิตร
		2.25 × 10 ⁸	

แสดงว่า จะต้องปีปอาหารมาเท่ากับ 24.6 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและ การวิเคราะห์

1. การหาปริมาณเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ยีสต์และสารละลายส่วนใสออกจากกัน นำเซลล์ยีสต์ที่ได้มาล้างด้วยอะซิโตนเพื่อเอาส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันออก หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งแล้วนำสารละลายส่วนใสออก นำตะกอนเซลล์ที่ได้เป็นอบที่ 105 องศาเซลเซียส วัดปริมาณเซลล์โดยการชั่งน้ำหนัก จนได้ค่าน้ำหนักที่แน่นอน

2. การหาปริมาณเซลล์แห้งในวัสดุพยางค์หลังจากตรึงเซลล์ยีสต์

สำหรับการหาปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุพยางค์ ทำได้โดยอาศัยการวัดปริมาณโปรตีนของเซลล์ที่อยู่ในวัสดุพยางค์ แล้วนำค่าโปรตีนที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับปริมาณเซลล์แห้ง

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายด้วย Folin- ciocactus phenol สามารถวัดความเข้มข้น ของโปรตีนได้ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวกว่าวิธีไบยูเรต ประมาณ 60 เท่า โดยใช้การวัดความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

สารเคมี

1. สารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ใน sodium potassium tartrate 1.0 เปอร์เซ็นต์
3. สารละลาย alkali copper เตรียมโดยผสมสารละลาย (ในข้อ 1) 50 มิลลิลิตร กับ สารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร
4. สารละลาย Folin- ciocactus phenol reagen เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้
5. สารละลาย bovine albumin protein 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ใช้สารละลาย bovine albumin protein ที่มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คูณใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

2. เติมนสารละลาย alkali copper ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. เติมนสารละลาย Folin- ciocactus phenol reagen ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับโปรตีน

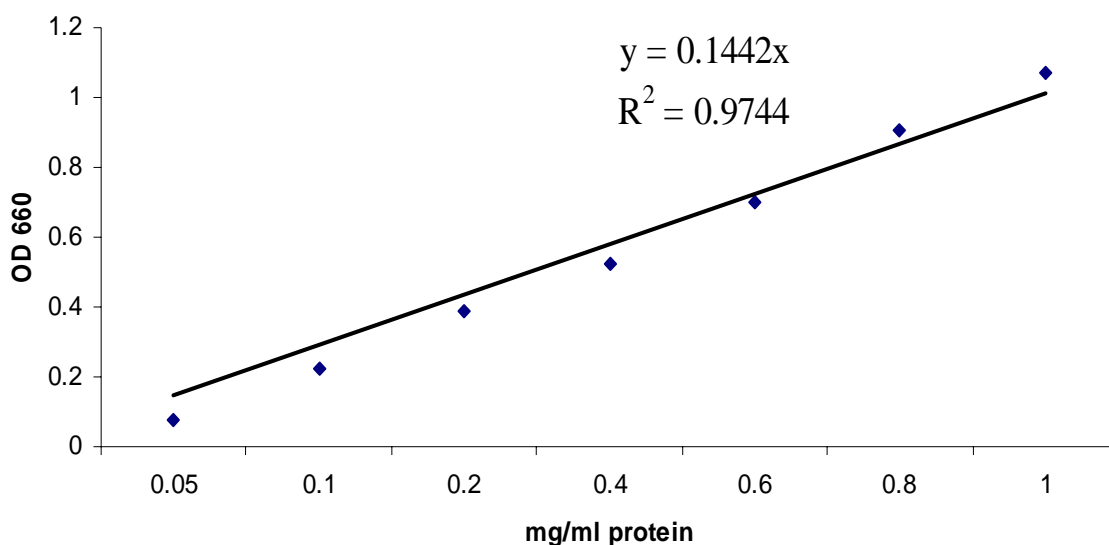


Figure 23. Standard curve of standard solution protein BSA analysis by Lowry method

2.2 การหาปริมาณเซลล์แห้งในวัสดุพุง

2.2.1 การเตรียมมาตรฐานของเซลล์แห้งโดยเทียบจากปริมาณโปรตีน

คู่ออาหารที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์ตามระยะเวลาที่เหมาะสม และทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม จากนั้นทำการหมუნเหวียงที่ 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที ล้างเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยอะซิโตน หมุนเหวียงอีกครั้ง ในการทำการทดลองในขั้นตอนนี้จะแบ่งเป็นสองชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองแรก นำไปหาปริมาณเซลล์แห้งโดยการอบที่ 105 องศาเซลเซียส และวัดปริมาณโดยการชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

ชุดการทดลองที่สอง นำเซลล์ที่ผ่านการหมუნเหวียงและล้างด้วยอะซิโตนแล้ว มาทำการสกัดโปรตีนและวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน (Fig. 1) ดังนี้

- เติมนสารละลายโซเดียมไฮโดรไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- นำไป sonicate สองรอบรอบละ 30 นาที

- หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยจุ่มในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปต้มใหม่และจุ่มในอ่างน้ำแข็งแบบเดิมอีกครั้ง
- คูณสารละลายส่วนในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ดังข้อ 2.1
- พล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แห้งกับปริมาณโปรตีนที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน (Figure 1) ดังแสดงใน Figure 2

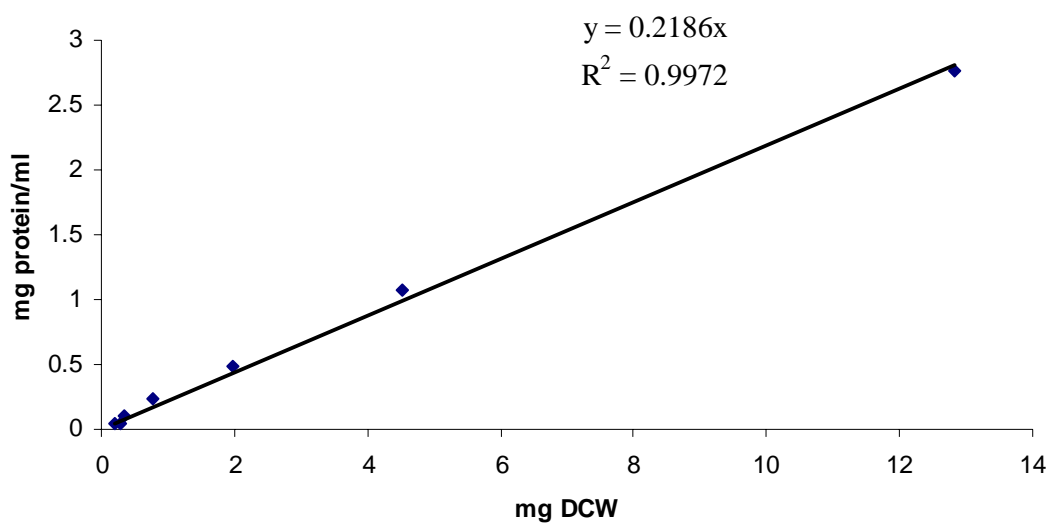


Figure 24. Standard curve of dry cell weight between protein concentration.

2.2.2 วิธีการสกัดโปรตีนในวัสดุพยาง

1. ชั่งวัสดุที่ถูกตรึงเซลล์แล้วใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0.2 กรัม
2. เติมสารละลายโซเดียมไฮโดรไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. นำไป sonicate สองรอบรอบละ 30 นาที
4. หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยจุ่มในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที นำไปต้มใหม่และจุ่มในอ่างน้ำแข็งแบบเดิมอีกครั้ง
5. คูณสารละลายส่วนในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ดังข้อ 2.1
6. นำค่าโปรตีนที่ได้ไปเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์แห้งกับปริมาณโปรตีน ดังแสดงใน Figure 2

3. การวิเคราะห์กิจกรรมไอโครไลซิสของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

3.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มที่ละลายในไอโซออกเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมส่วนของเชื้อยีสต์ที่ได้จากการหมუნเหวียงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมอย่างรวดเร็วทิ้งให้แยกชั้น

3.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธี cupric acetate method Ghosh และคณะ (2005) โดยดูดสารละลายส่วนบนในปฏิกิริยาจากข้อ 3.1 มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมกันอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น นำส่วนของไอโซออกเทนไปวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปกรดปาล์มมิติก

3.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา}}$$

4. การวิเคราะห์กิจกรรมไอโครไลซิสของเอนไซม์ไลเปสจากตัวเซลล์ (cell bound)

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) เช่นเดียวกับข้อ 3 แต่ส่วนผสมในปฏิกิริยาจะเป็นเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการหมუნเหวียงแยกเซลล์ด้วย

ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันตามวิธีการข้อ 3.2 โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จากตัวเซลล์ หมายถึง ปริมาณของตัวเซลล์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

$$\text{กิจกรรมของตัวเซลล์} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้ง}}$$

(U/g dry cell weight)

5. การวิเคราะห์กิจกรรมไอโคโรไลซิสของเซลล์ที่ถูกตรึงรูป

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993) เช่นเดียวกับข้อ 3 แต่ส่วนผสมในปฏิกิริยาจะเป็นเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการตรึงและทำแห้งในเดซิเคเตอร์แบบสูญญากาศเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยทำการชั่งวัสดุที่ผ่านการตรึงในปริมาณ 0.2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันตามวิธีการข้อ 3.2 โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จากตัวเซลล์ที่ถูกตรึง หมายถึง ปริมาณของตัวเซลล์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ทำปฏิกิริยาบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

$$\text{กิจกรรมของตัวเซลล์ที่ถูกตรึง} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{ระยะเวลา} \times \text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่อยู่ในวัสดุขุขง}}$$

(U/g dry cell weight in BSP)

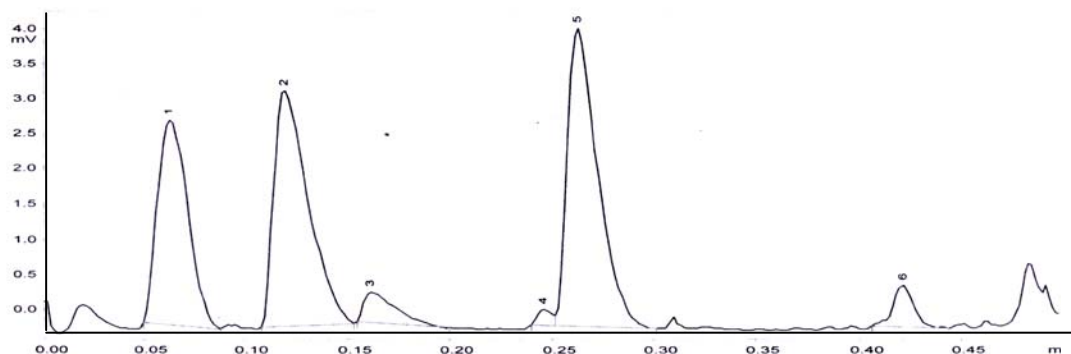
6. การวิเคราะห์หองค์ประกอบจากปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสของน้ำมันปาล์ม

การวิเคราะห์หองค์ประกอบจากปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสได้แก่ เมทิลเอสเทอร์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์ ด้วย Thin Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID) สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID analyzer (Freedman *et al.*, 1984) มีดังนี้

- เตรียม quartz rods (silica gel powder coated Chromarod S-III) โดยแช่ในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปทำ blank scan ด้วย TLC/FID analyzer ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกน อัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของอากาศ 2,000 มิลลิลิตรต่อนาที

- หยดสารละลายไตรกลีเซอไรด์และเมทิลเอสเทอร์มาตรฐาน quartz rods ประมาณ 1 ไมโครลิตร นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน: ไดเอทิลอีเทอร์: กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 50: 20: 0.3 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน: เบนซีน ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร

- นำ quartz rods ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาสแกนภายใต้สภาวะเดียวกันกับ blank scan ซึ่งจะคำนวณปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้ peak เปรียบเทียบกับ peak ทั้งหมด



Calculation Method: Percent

Peak No.	Ret.Time (min)	Pk.start (min)	Pk.End (min)	Area	Height (mV)	Area %	
1	0.063	0.050	0.088	1583	2.89	24.938	Methyl ester
2	0.120	0.108	0.153	2025	3.34	31.899	Triglyceride
3	0.162	0.155	0.200	242	0.45	3.807	Free fatty acid
4	0.246	0.234	0.255	153	0.23	2.86	1-3Diglyceride
5	0.263	0.252	0.302	2289	4.23	36.046	1-2Diglyceride
6	0.422	0.407	0.443	209	0.59	3.293	Mono-glyceride
				6500	11.72	100.00	

Figure 25. Retention time of standard glyceride and methyl esters.

7. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.21 กรัม
ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.61 กรัม
ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายเอ๋ม น้อยเลิศ	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5211020055	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ได้รับทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยีน้ำมันปาล์ม (POPTEC)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Aem Nuylert and Tipparat Hongpattarakere. 2010. Optimization for producing cell-bound lipase from *Rhodotorula mucilagenosa*. The 22th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology "TSB 2010: Biotechnology for Healthy Living" Thailand, October 20th-22nd 2010, pp 177. (Poster Presentation)