

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตและการประยุกต์ใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปส

Polyhydroxybutyrate and Its Application for Lipase Immobilization

นาริสา บินหะยี้ดิง¹ และกนกพร สังขรักษ์^{2*}Narisa Binhayeeding¹ and Kanokphorn Sangkharak^{2*}

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (Polyhydroxybutyrate, P(3HB)) เป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งผลิตได้จากเซลล์จุลินทรีย์หลายชนิด ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและพลังงานสำรองสำหรับจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินไป และสภาวะขาดแคลนสารอาหารบางชนิด เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ เช่น *Azotobacter* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Alcaligenes eutrophus* พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ และมีคุณสมบัติของการย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ จึงเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะทางการแพทย์ แต่ยังมีการวิจัยที่ใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในการตรึงเอนไซม์เพื่อผลิตพลังงานทดแทนอยู่น้อย จากการสำรวจข้อมูลและคุณสมบัติบางประการ พบว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความสามารถในการตรึงเอนไซม์ได้ บทความนี้จึงได้รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เทคนิคการตรึงเอนไซม์ การตรึงเอนไซม์ด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต และการประยุกต์ใช้ไลเปสที่ตรึงด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต สำหรับการผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้ ยังได้เสนอแนวทางการวิจัยในอนาคตที่เกี่ยวข้องกับการใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ด้วย

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เอนไซม์ตรึง ไลเปส ไบโอดีเซล

Abstract

Polyhydroxybutyrate (P(3HB)), is a biodegradable plastic, produced from a variety of microbial cells. It acts as a source of carbon and energy reserving for microorganisms when bacteria are cultivated in

¹ นิสิตบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

² รศ.ดร., สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

¹ Graduate Student, Ph.D. (Biotechnology), Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand

² Assoc. Prof. Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand

* Corresponding author: Tel: +66-76-609-634, E-mail address: skanokphorn@yahoo.com

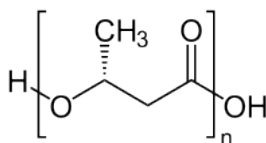
excess carbon sources and lack of some nutrients such as nitrogen and phosphorus. P(3HB) accumulating bacteria which can produce polyhydroxybutyrate such as *Azotobacter* sp. *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes eutrophus* are potential strains. Currently, P(3HB) has attracted interest as it can be used as a substitute for synthetic plastics and its features biodegradable. It is suitable for application in various fields, especially medical. However, only few research reports had been determined on the application of polyhydroxybutyrate for enzyme immobilization. Based on literature and the properties of P(3HB), it was found that polyhydroxybutyrate has the ability to immobilize enzymes. Therefore, the basic information of polyhydroxybutyrate, enzyme immobilization technique, enzyme immobilized with polyhydroxybutyrate and application of immobilized lipase on polyhydroxybutyrate for biodiesel production are reviewed in this article. In addition, future research related to polyhydroxybutyrate is also indicated.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, Immobilized Enzyme, Lipase, Biodiesel

1. ข้อมูลพื้นฐานของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

1.1 พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นอนุพันธ์ของพอลิไฮดรอกซีแอลคานอยด์ ซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์ประเภท แอลิแฟติก พอลิเอสเทอร์ (Aliphatic Polyester) มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ยาว (ภาพที่ 1) พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ.1926 โดยนักจุลชีววิทยาชาวฝรั่งเศสชื่อ มัวริซ เลอ โมเน (Maurice Lemoigne) จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* ปัจจุบันมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์และสะสมพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไว้ในเซลล์ เช่น *Azotobacter* sp. *Pseudomonas* sp. *Alcaligenes eutrophus* (หรือ *Cupriavidus necator*) และ *Alcaligenes latus* เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่สมดุล โดยอาศัยแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคสหรือสตาร์ช จึงเกิดการสะสมสารพลังงานในรูปพอลิเมอร์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานเมื่อขาดแคลนพลังงานจากแหล่งอื่นได้ [1]



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ที่มา : [1]

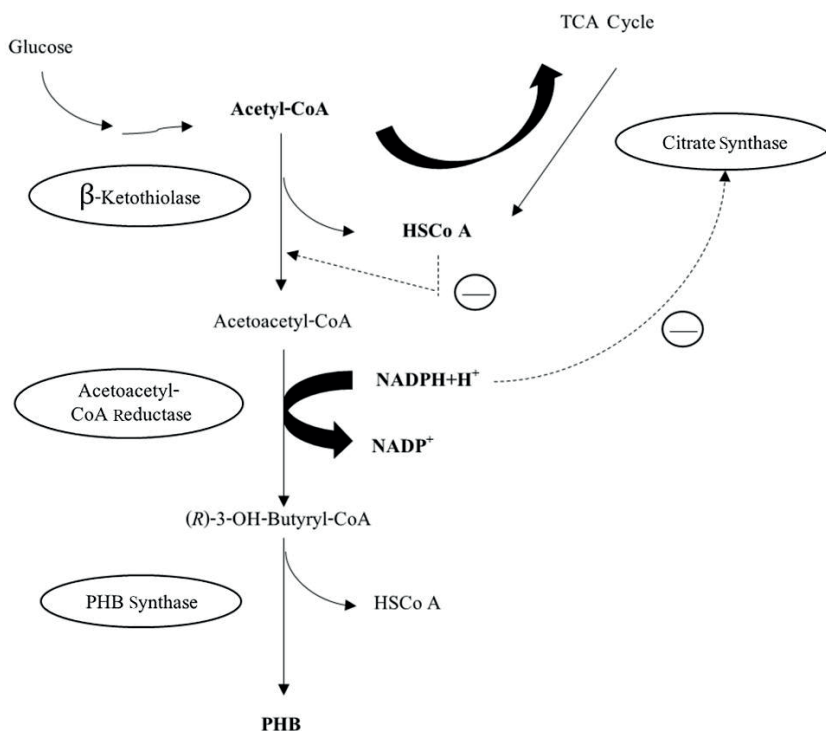
1.2 คุณสมบัติทั่วไปของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตไม่สามารถละลายน้ำและต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้ต่างจากพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ชนิดอื่น ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

สามารถต้านทานต่อรังสีอัลตราไวโอเลต และออกซิเจนสามารถแพร่ผ่านได้ดี โดยมีความต้านทานต่อกรด-ด่างต่ำ แต่ละลายได้ในคลอโรฟอร์มและสารประกอบคลอริเนเตดไฮโดรคาร์บอน พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความสามารถเข้ากันได้กับเซลล์หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต ทำให้สามารถนำไปใช้ผลิตพลาสติกที่ใช้ในทางการแพทย์ได้ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีจุดหลอมเหลว 180 องศาเซลเซียส และมีความทนต่อแรงดึง 40 MPa [2] ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์พอลิพรอพิลีน สามารถนำมาใช้ทำให้ถูกย่อยสลายในสภาวะที่ไม่ใช้อากาศได้ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพใกล้เคียงกับพอลิพรอพิลีนซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์

1.3 กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

วิธีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเกี่ยวข้องกับสารมัธยฐานในวัฏจักรเครบส์ โดยเริ่มต้นจากแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetyl-CoA) เปลี่ยนไปเป็นแอซิทิลแอซิติลโคเอนไซม์เอ (Acetoacetyl-CoA) และไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอ (Hydroxybutyryl-CoA) ด้วยการทำงานของเอนไซม์บีตา-คีโทไทโอเลส (β -ketothiolase) และแอซิทิลแอซิติลโคเอนไซม์เอรีดักเตส (Acetoacetyl-CoA Reductase) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization) ของไฮดรอกซีบิวทิริลโคเอนไซม์เอไปเป็นพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยเอนไซม์ฟิเอซบิซินทีเทส (PHB Synthetase) อย่างไรก็ตาม พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่เกิดขึ้นสามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ไฮดรอกซีบิวทิเรตดีไฮโดรจีเนส (Hydroxybutyrate Dehydrogenase) กระบวนการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 วิธีการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ที่มา : [3]

ปัจจุบันพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้รับความสนใจเนื่องจากสามารถใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ได้ และสามารถย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ จึงเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ โดยที่พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีคุณสมบัติทั่วไปที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง มีความยืดหยุ่น มีความหนาแน่นของ หมู่ฟังก์ชันสูง และมีองค์ประกอบของส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว นอกจากนี้ พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตยังไม่ละลายน้ำ และต้านทานต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ทำให้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตแตกต่างจากพลาสติกชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ชนิดอื่น ซึ่งสามารถละลายน้ำได้หรือมีความไวต่อความชื้น จึงมีการนำพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต มาใช้ตรึงเอนไซม์ในการผลิตไบโอดีเซล

2. ไลเปส

ไลเปส (Lipases, EC 3.1.1.3) หรือเรียกอีกชื่อว่า Glycerol Ester Hydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นโมเลกุลคาร์บอนของกรดไขมันที่ยาว เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล(Triacylglycerol) ได้ผลิตผลของปฏิกิริยาเป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ในขณะที่เดียวกันยังสามารถเร่งปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระเพื่อสังเคราะห์เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ด้วย

แหล่งผลิตไลเปสที่สำคัญ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสผลิตจากจุลินทรีย์ เนื่องจากผลิตได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และควบคุมการผลิตได้สะดวก

ไลเปสสามารถตรึงได้ง่ายโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Supports) เนื่องจากไลเปสมีส่วนของโอลิโกเปปไทด์ที่ไม่ชอบน้ำ ดังนั้น จึงสามารถจับกับตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำได้ดี โดยทั่วไปจึงมักตรึงไลเปสโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนตัวพุงชนิดต่าง ๆ และเอนไซม์ไลเปสยังสามารถตรึงด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตได้ดีกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น

ข้อดีของไลเปส

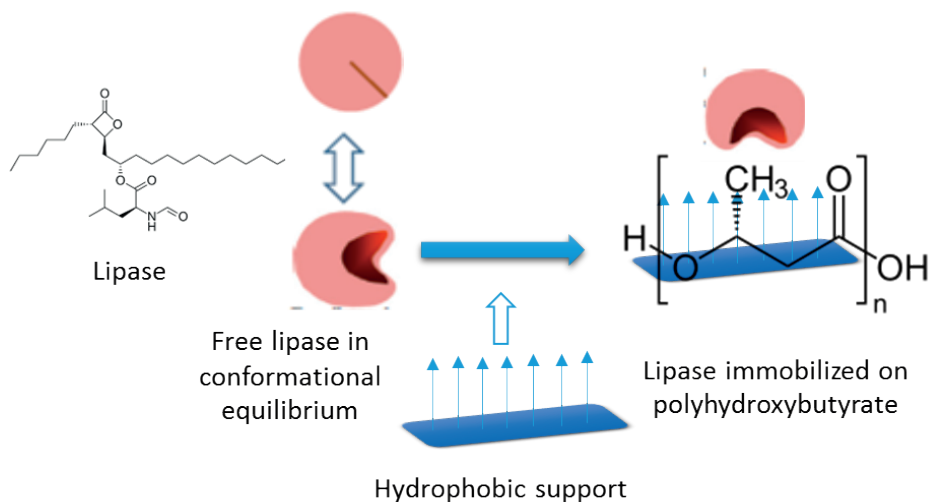
1. มีความคงตัวต่อสภาวะต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่างสูง อุณหภูมิสูง และตัวทำละลายอินทรีย์
2. สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายประเภท เช่น ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน กลีเซอโรไลซิส
3. มีความจำเพาะที่ดี ได้แก่ Regio-selectivity, Stereo-selectivity และ Fatty Acid Specificity
4. สามารถตรึงได้ง่าย ได้แก่ วิธีการดูดซับทางกายภาพ

ข้อเสียของไลเปส

1. ราคาแพง
2. มีขั้นตอนยุ่งยากในการทำบริสุทธิ์
3. ความเสถียรของเอนไซม์
4. ข้อจำกัดในการใช้ซ้ำเอนไซม์

3. การประยุกต์ใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

ปัจจุบันเทคนิคการตรึงเอนไซม์มีการพัฒนาก้าวหน้ามาก การใช้เอนไซม์ตรึงเป็นวิธีการแก้ปัญหาข้อจำกัดในการใช้เอนไซม์อิสระ เพราะเอนไซม์ตรึงสามารถทำปฏิกิริยาได้ทันที และการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ง่ายโดยการแยกเอนไซม์ตรึงออกมา ทำให้มีความยืดหยุ่นในกระบวนการผลิตแบบกะหรือแบบต่อเนื่องให้เหมาะสมได้ตามความต้องการ และเอนไซม์ตรึงยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้ ยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ การตรึงเอนไซม์สามารถทำได้ทั้งในตัวพวุงที่เป็นวัสดุอินทรีย์/อนินทรีย์โดยอาศัยเทคนิคการตรึงทั่วไป ได้แก่ วิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical Adsorption) วิธีเชื่อมไขว้ (Cross-linking) วิธีห่อหุ้ม (Entrapment) และวิธีห่อหุ้มในแคปซูล (Microencapsulation) ซึ่งมีความซับซ้อนของการตรึงแตกต่างกัน และเอนไซม์ตรึงที่ได้มีประสิทธิภาพการในการทำงานที่ต่างกัน การเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์จึงขึ้นอยู่กับความจำเพาะของปฏิกิริยา ตลอดจนข้อจำกัดของค่าใช้จ่ายและคุณสมบัติของเอนไซม์ตรึงที่ได้ [4] การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไปมักนิยมใช้วิธีการดูดซับทางกายภาพบนตัวพวุงชนิดต่าง ๆ เช่น การตรึงจุลินทรีย์ผลิตไลเปสสายพันธุ์ *Pseudozyma antarctica* type B บนตัวพวุง Lewatit VPOC 1600 ซึ่งมีองค์ประกอบของ Poly (methyl methacrylate-co-divinylbenzene) การตรึงจุลินทรีย์ผลิตไลเปสสายพันธุ์ *Mucor miehei* บนเรซินแลกเปลี่ยนประจุลบชนิดรูพรุน และยังมีการใช้ตัวพวุงอื่น ได้แก่ การใช้เปลือกไข่ ไพลไลซิลิเกต เบนโทไนต์ พอลิพรอพิลีน (PP) และ สไตรีนไดไวนิลเบนซีน [5] สำหรับปัญหาของการตรึงไลเปสในปัจจุบันคือตัวพวุงที่มีราคาแพง ดังนั้น การแสวงหาแหล่งของตัวพวุงชนิดใหม่ที่มีราคาถูก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อการพัฒนาวิธีการตรึงเอนไซม์ที่ยอมรับในอุตสาหกรรม และสามารถผลิตเอนไซม์ตรึงได้ในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้น การใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นตัวพวุงไลเปสจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตผลิตได้จากจุลินทรีย์ จึงผลิตได้ง่ายและรวดเร็ว ผลิตได้ปริมาณสูงและใช้พื้นที่น้อย ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพเป็นวิธีที่มีข้อดี ได้แก่ ง่ายและราคาถูก โดยการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนโมเลกุลของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตที่ไม่ชอบน้ำ หมู่ฟังก์ชันเมทิล ($-CH_3$) ของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตซึ่งไม่มีขั้ว จะมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ไลเปสในส่วนที่ไม่มีขั้ว แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การตรึงเอนไซม์ไลโปสด้วยพอลิไฮดรอกบิวทิเรตโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ
ที่มา : ดัดแปลงจาก [6]

สรุปปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

ก. ขนาดของตัวพยางค์

ขนาดของตัวพุงที่เหมาะสม คือ 75 - 90 ไมโครเมตร [2] พบว่าการตรึงเอนไซม์บนอนุภาคของพอลิไฮดรอกซีชีวติเรตขนาดเล็ก (75 - 90 ไมโครเมตร) มีกิจกรรมสูงกว่าการตรึงเอนไซม์บนอนุภาคของพอลิไฮดรอกซีชีวติเรตขนาดใหญ่ (750 - 1180 ไมโครเมตร) เนื่องจากอนุภาครีซขนาดใหญ่มิทธิพลของ Steric Effects ซึ่งแสดงว่าความไม่มีระเบียบของโครงสร้างภายในโมเลกุล จึงส่งผลต่อการจับกับซับสเตรต ทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพต่อยกกว่าการตรึงบนขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็ก โดยพื้นผิวที่มีขนาดเล็กเอนไซม์ตรึงสามารถเข้าถึงซับสเตรตได้ง่ายกว่า เอนไซม์ตรึงมีข้อดีมากกว่าเอนไซม์อิสระ เพราะควบคุมการทำงานได้ง่าย และสะดวกในการแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์

ข. สถานะของการตรึงเอ็นไซม์

การตรึงเอนไซม์ต้องทำในสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ เวลา ชนิดของตัวทำละลาย พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเพสด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต คือ พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถใช้เอนไซม์ตรึงในการผลิตเอทิลเอสเทอร์ได้จากน้ำมันปาล์ม ดังรายงานของ Silva และคณะ [7] ในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเพสด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเอนไซม์ตรึงมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน ได้แก่ พีเอช 8.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์อิสระสภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 8.0 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ตรึงสามารถทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างและทนความร้อนได้ดีกว่า เมื่อใช้เอนไซม์ไลเพสตรึง

ด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของการผลิตไบโอดีเซล ได้ผลผลิตเอทิลเอสเทอร์ 40.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเอทิลเอสเทอร์ [2]

4. การประยุกต์ใช้ไลเปสตรึงด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสำหรับการผลิตไบโอดีเซล

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยแอลกอฮอล์สามารถเร่งได้ด้วยวิธีทางเคมีและวิธีการทางชีวภาพที่ใช้เอนไซม์ไลเปส วิธีทางเคมีมักนิยมใช้ต่างหรือกรด การใช้ค่าสามารถเกิดได้รวดเร็วกว่าการใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเป็นที่นิยมนกว่าการใช้กรด อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตนี้ยังมีต้นทุนสูง ส่วนการใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาอาจมีน้ำเกิดขึ้นเป็นผลพลอยได้ ซึ่งมีผลเสียต่อการผลิตไบโอดีเซล ดังนั้น การผลิตไบโอดีเซลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจึงเป็นทางเลือกที่ดี และไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม การใช้เอนไซม์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยระดับของมลพิษที่เกิดขึ้นมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี นอกจากนี้ การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลยังได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้ค่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลยังไม่เป็นที่ยอมรับ เพราะเอนไซม์มีราคาแพง เนื่องจากผลผลิตของเอนไซม์ต่ำ ทำให้ได้ปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์มีความยุ่งยาก ความไม่เสถียรของเอนไซม์ และข้อจำกัดในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ นอกจากนี้ เอนไซม์ยังต้องการสภาวะที่เหมาะสมในการทำงาน จึงทำให้การควบคุมปฏิกิริยายุ่งยากกว่าวิธีทางเคมี

การศึกษาวิธีตรึงเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นวิธีการแก้ปัญหาและลดข้อจำกัดในการใช้เอนไซม์อิสระ โดยการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และเทคโนโลยีชีวภาพ และยังสามารถใช้ในการสังเคราะห์ไบโอดีเซล เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Mucor miehei* และ *Thermomyces lanuginose*

การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์มีข้อได้เปรียบดังนี้ ปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดได้ดีที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง และสามารถเก็บเกี่ยวกลีเซอรอลได้ง่าย แต่การผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสยังต้องใช้ต้นทุนสูง เมื่อเทียบกับกระบวนการทางเคมี เพราะเอนไซม์ยังคงมีราคาแพง ดังนั้น การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ จะทำให้ลดต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลได้ และสามารถพัฒนากระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องที่มีการควบคุมปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันและการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกันได้ง่าย

ปัจจุบันมีการวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ไลเปสตรึงด้วยวัสดุชนิดต่าง ๆ จำนวนมาก แต่ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอดีเซลจากไลเปสที่ตรึงด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตจำนวนน้อย ตัวอย่างเช่น การผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *P. antarctica* type B, *T. Lanuginosus*, *P. fluorescens* และ *G. thermocatenuatus* ที่ตรึง

ด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เป็นต้น การผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต สามารถให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระ ดังกรณีศึกษาของการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้น้ำมัน Babassu oil (*Orbignya* sp.) ที่มีตัวทำละลายเอทานอลในอัตราส่วนโมลต่อน้ำมันเท่ากับ 1 ต่อ 9 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้ผลผลิตไบโอดีเซลเท่ากับ 40.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง [2] เมื่อเทียบกับการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวัสดุสังเคราะห์ชนิดอื่นแล้ว การตรึงไลเปสด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสามารถให้ผลผลิตของไบโอดีเซลสูงถึง 98 % (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การผลิตไบโอดีเซลด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยวัสดุพืงที่แตกต่างกัน

วิธีการตรึง	ตัวพืง	ชนิดของน้ำมัน	ผลได้ (%)	อ้างอิง
วิธีดูดซับทางกายภาพ	พอลิพรอพิลีน	น้ำมันพืช	98.0	[5]
	พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต	น้ำมันบาบาสสุ	98.0	[2]
	แอกทูลเรล เอ็มพี 1000	น้ำมันสบู่ดำ	80.5	[8]
	เลวาทิต วีพี ไอซี 1600	น้ำมันสบู่ดำ	93.8	[8]
	เมโซฟอร์ส ซิลิกา ปีเอสเอ-15	น้ำมันคาโนล่า	98.0	[9]
วิธีเชื่อมไขว้	พี อี แอล อะกาโรส	น้ำมันคาโนล่า	70.0	[10]

5. อนาคตของการวิจัยการตรึงเอนไซม์ด้วยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต

การใช้พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตสำหรับการตรึงเอนไซม์นั้นยังมีข้อจำกัด เนื่องจากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตมีความเปราะ แตกหักง่าย ยืดหยุ่นและทนกรดได้น้อย มีความหนาแน่นสูง มีรูพรุนต่ำ และมีความไม่มีขั้วต่ำ จึงทำให้การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์และพอลิเมอร์มีประสิทธิภาพต่ำ การเพิ่มประสิทธิภาพของการยึดเกาะจึงควรใช้โคพอลิเมอร์ เช่น พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตโควาลอเรต ซึ่งมีองค์ประกอบของพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตและพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตวาลอเรต โดยโคพอลิเมอร์ชนิดนี้มีความหนาแน่นต่ำกว่าพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต มีรูพรุนสูง มีความไม่มีขั้วสูง จึงช่วยทำให้ยึดเกาะกับเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพดีขึ้น และสามารถใส่พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตชนิดอื่นผสมกับพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต เพื่อสังเคราะห์เป็นโคพอลิเมอร์ ซึ่งจะช่วยให้การใช้ประโยชน์จากพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรตในการตรึงเอนไซม์มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- [1] Luengo, J. M., B. García., A. Sandoval., G. Naharro., & Olivera, E. R.(2003). Bioplastics from Microorganisms. *Current Opinion Microbiology*, 6, 251-260.
- [2] Adriano, A.M., Pedro, C. O., Ana, M. V., Roberto, C. G., Raquel, de L., .C. G., & Heizir, F. de C. (2012). Evaluation of Immobilized Lipases on Poly-Hydroxybutyrate Beads to Catalyze Biodiesel Synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 503-511.

- [3] Kang, Z., Gao, C., Wang, Q., Liu, H., & Qi, Q.(2010).A Novel Strategy for Succinate and Polyhydroxybutyrate Co-production in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 101(19), 7675-7678.
- [4] Moreira, A. B. R., Perez, V. H., Zanin, G. M., & De Castro, H. F. (2007) . Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica-PVA Composite. *Energy and Fuels*, 21, 3689-3694.
- [5] Salis, A. , Pinna, M., Monduzzi, M. , & Solinas, V. (2008) . Comparison among Immobilized Lipase on Macroporous Polypropylene toward Biodiesel Synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54, 19-26.
- [6] Tacias-Pascacio, V.G., Virgen-Ortiz, J.J., Jimenez-Perez, M., Yates, M., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Evaluation of Different Lipase Biocatalysts in the Production of Biodiesel from used Cooking Oil: Critical Role of the Immobilization Support. *Fuel*, 200, 1-10.
- [7] Silva, N. C. A., Mirada, J. S., Bolina, I. C. A., Hirata, D. B., Castro, H. F., & Mendes, A. A. (2014). Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Poly-hydroxybutyrate Particles for the Production of Ethyl Esters from Macaw Palm Oils and Pineapple Flavor. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 139-149.
- [8] Joana, R., Veronique, P., Jerome, L., Eric, D., & Suzana, F. (2016). Biodiesel Production from Crude Jatropha Oil Catalyzed by Immobilized Lipase/ Acyltransferase from *Candida parapsilosis* in Aqueous Medium. *Bioresource Technology*, 218, 1224-1229.
- [9] Babaki, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Mohammadi, M., & Brask, J. (2015). Effect of Water, Organic Solvent and Adsorbent Contents on Production of Biodiesel Fuel from Canola Oil Catalyzed by Various Lipase Immobilized on Epoxy-Functionalized Silica as Low Cost Biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120, 93-99.
- [10] Lorena, S., Anders, I., & Lorena, W. (2015). Immobilization of *Alcaligenes* sp. Lipase as Catalyst for the Transsterification of Vegetable Oils to Produce Biodiesel. *Catalysis Today*, 259, 177-182.