# บทที่ 3

# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 1. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต

### 1.1 ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์

องค์ประกอบที่สำคัญในการตรึงเอนไซม์ คือ ชนิดของเอนไซม์และตัวพยุงที่ใช้ การคัดเลือกตัวพยุงที่ใช้ในการตรึงให้เหมาะสมจึงจัดเป็นปัจจัยหลักสำหรับการตรึงเอนไซม์ คุณสมบัติของตัวพยุงที่ดี คือ มีพื้นที่ผิวสำหรับยึดเกาะมาก มีคุณสมบัติในการคัดเลือกการซึมผ่านของสาร (permeability) และ มีลักษณะชอบน้ำ (hydrophilicity) แต่ไม่ละลายในน้ำ มีความคงตัวต่อสารเคมี แรงกล และความร้อน มีความแข็งแรง มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม สามารถป้องกันการทำลายจากจุลินทรีย์ได้ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kennedy and Cabral, 1987)

ตารางที่ 12 แสดงค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ไลเปส 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 มิลลิโมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะสูงสุดคือ 2.78 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 24.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 50 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ โดยภาพที่ 10 a, b และ c ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 50 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภาพที่ 10 d, e และ f ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และภาพที่ 10 g, h และ i ใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 200 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนต ทำให้ลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูปมีความคงรูปมากขึ้น โดยเอนไซม์ตรึงรูปจะมีลักษณะเป็นทรงกลมแต่พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปและกิจกรรมหลังการยึดเกาะลดลง (ตารางที่ 12) เนื่องจากความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ bead มีความหนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้การแพร่ของสับสเตรทเข้าไปภายในเอนไซม์ตรึงรูปลดลง ทำให้การสัมผัสกันระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งเกิดขึ้นได้ยาก ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ที่ 50 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ตรึงรูปมีรูปร่างที่ไม่เสถียร ลักษณะทางกายภาพนิ่ม

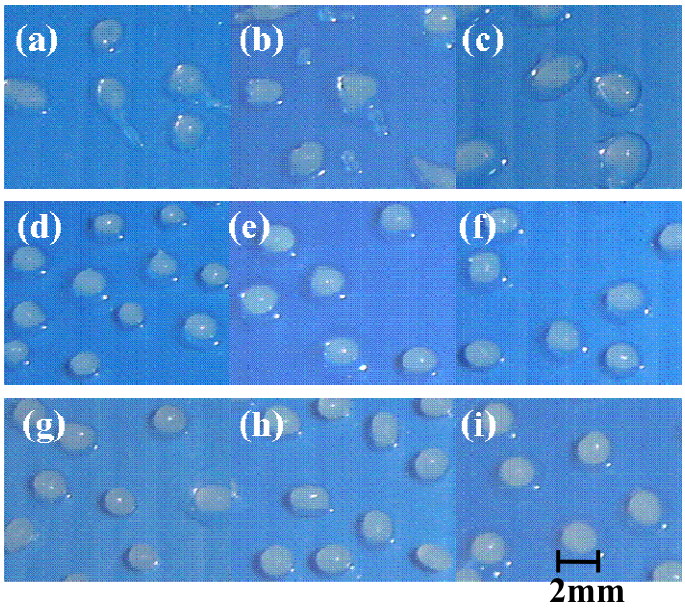
ไม่คงรูป เนื่องจากการเชื่อมกันระหว่างประจุบวกของแคลเซียมคลอไรด์และประจุลบของอัลจิเนตเกิดขึ้นได้น้อย ดังแสดงในภาพที่ 10 a, b และ c ทำให้ประสิทธิภาพในการยึดเกาะมีค่าลดลงตามไปด้วย (ตารางที่ 12) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เป็น 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้ลักษณะและสถานะของเอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัวมากขึ้น มีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์เกิน 100 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะลดลง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Seema และ Steven (2002) และ Zorica และคณะ (2002) ที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตจะทำให้กิจกรรมการย่อยสลายลดลง ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอ-ไรด์ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยอัลจิเนต

ตารางที่ 12 ผลของความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ

Table 12. Effects of alginate and $CaCl_2$ concentrations on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity of immobilized lipase.

| **Aginate (%)** | **$CaCl_2$ (mM)** | **Immobilized yield (%)** | **Immobilized lipase activity (U/ml)** | **Recovery of activity (%)** |
|---|---|---|---|---|
| 1.5 | 50 | $97.8 \pm 0.03^{a*}$ | $2.72 \pm 0.59^{a}$ | $21.2 \pm 1.82^{b}$ |
| | 100 | $99.6 \pm 0.02^{a}$ | $2.41 \pm 0.07^{ab}$ | $23.5 \pm 1.28^{a}$ |
| | 200 | $99.7 \pm 0.01^{a}$ | $1.85 \pm 0.23^{b}$ | $21.7 \pm 0.82^{b}$ |
| 2.0 | 50 | $98.6 \pm 0.01^{a}$ | $2.36 \pm 0.00^{ab}$ | $21.8 \pm 0.00^{b}$ |
| | 100 | $99.4 \pm 0.02^{a}$ | $2.78 \pm 0.28^{a}$ | $24.9 \pm 0.72^{a}$ |
| | 200 | $99.6 \pm 0.02^{a}$ | $2.46 \pm 0.31^{ab}$ | $19.9 \pm 0.62^{bc}$ |
| 2.5 | 50 | $98.9 \pm 0.02^{a}$ | $1.99 \pm 0.92^{ab}$ | $17.1 \pm 0.96^{c}$ |
| | 100 | $99.6 \pm 0.02^{a}$ | $2.24 \pm 0.29^{ab}$ | $18.5 \pm 0.48^{c}$ |
| | 200 | $99.5 \pm 0.03^{a}$ | $1.72 \pm 0.37^{b}$ | $13.4 \pm 0.40^{d}$ |

* Different letters in the same column within the same alginate concentration indicate significant different ($p < 0.05$)




ภาพที่ 10 ลักษณะของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยที่

ภาพ (a) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 50 มิลลิโมลาร์

ภาพ (b) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 50 มิลลิโมลาร์

ภาพ (c) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 2.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 50 มิลลิโมลาร์

ภาพ (d) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 มิลลิโมลาร์

ภาพ (e) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 มิลลิโมลาร์

ภาพ (f) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 2.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 100 มิลลิโมลาร์

ภาพ (g) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 200 มิลลิโมลาร์

ภาพ (h) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 200 มิลลิโมลาร์

ภาพ (i) คือความเข้มข้นของอัลจิเนต 2.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ 200 มิลลิโมลาร์

Figure 10. Characterization of beads ((a) 1.5 % of alginate and 50 mM of $CaCl_2$ concentration, (b) 2.0 % of alginate and 50 mM of $CaCl_2$ concentration and (c) 2.5 % of alginate and 50 mM of $CaCl_2$ concentration (d) 1.5 % of alginate and 100 mM of $CaCl_2$ concentration, (e) 2.0 % of alginate and 100 mM of $CaCl_2$ concentration and (f) 2.5 % of alginate and 100 mM of $CaCl_2$ concentration (g) 1.5 % of alginate and 200 mM of $CaCl_2$ concentration, (h) 2.0 % of alginate and 200 mM of $CaCl_2$ concentration and (i) 2.5 % of alginate and 200 mM of $CaCl_2$ concentration).

**1.2 ความเข้มข้นเอนไซม์**

ตารางที่ 13 แสดงผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าการตรึงเอนไซม์โดยเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสจาก 10 เป็น 30 และ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะทำให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นจาก 2.78 เป็น 8.11 และ 8.92 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้กิจกรรมหลังการยึดเกาะต่ำลง และเมื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส 10 และ 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะสูงคือ 99.4 และ 95.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสเป็น 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะที่ต่ำลงเพียง 84.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทั้งที่มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เนื่องจากตัวพยุงที่นำมาใช้มีความสามารถในการเก็บกักเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนได้จำกัด และตัวพยุงแต่ละตัวจะมีความสามารถในการดูดซับ หรือเก็บกักได้ไม่เท่ากันจึงทำให้เอนไซม์ส่วนที่เหลือที่ตัวพยุงไม่สามารถเก็บกักเอาไว้ได้หลุดออกมาภายนอกตัวพยุงและละลายอยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และเมื่อนำค่ากิจกรรมการย่อยสลายของสารละลายที่ได้ ไปคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ก็จะได้ค่าที่ต่ำซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kaewthong และคณะ (2004) ที่พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปส PS ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้ได้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบน Accurel EP100 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสูงขึ้นด้วย แต่ประสิทธิภาพในการตรึงลดลง ดังนั้นผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่าความเข้มข้นของอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ สามารถที่จะเก็บกักเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

**1.3 ขนาดของเอนไซม์ตรึงรูป**

ตารางที่ 14 แสดงผลของขนาดเอนไซม์ตรึงรูปต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และใช้เข็มขนาดต่างๆกันในการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าขนาดของปลายเข็มจะมีผลต่อขนาดของ bead ซึ่งปลายเข็มขนาด 24 G จะให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ bead ที่เล็กที่สุดคือ 2 มิลลิเมตร เมื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ พบว่าขนาดของเข็มที่ใช้ในการตรึงไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการยึดเกาะ แต่จะมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและกิจกรรมหลังการยึดเกาะ ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่วัดได้จากการตรึงเอนไซม์ที่ใช้ปลายเข็มขนาดเล็ก (24 G) จะให้

ค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปที่เล็กกว่าจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปกับสับสเตรทได้มากกว่า ทำให้การแพร่ของสับสเตรทเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ภายในตัวตรึงเกิดขึ้นได้ง่ายกว่า ส่งผลให้ได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ โดยผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Keehoon และคณะ (2004) ที่นำเอนไซม์ไลเปส *Candida rugosa* มาตรึงกับอัลจิเนต และพบว่าการเพิ่มขนาด beads ให้ใหญ่ขึ้นจะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง

ตารางที่ 13 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ไลเปสต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ

Table 13. Effects of enzyme concentration on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity of immobilized lipase.

| **Enzyme concentration (U/ml)** | **Immobilized yield (%)** | **Immobilized lipase activity (U/ml)** | **Recovery of activity (%)** |
|---|---|---|---|
| 10 | $99.4 \pm 0.02^{a*}$ | $2.78 \pm 0.28^{a}$ | $24.9 \pm 0.72^{a}$ |
| 30 | $95.2 \pm 0.39^{b}$ | $8.11 \pm 0.77^{b}$ | $22.2 \pm 0.43^{a}$ |
| 50 | $84.2 \pm 0.92^{c}$ | $8.92 \pm 0.83^{b}$ | $17.8 \pm 0.16^{b}$ |

* Different letters in the same column within the same indicate significant different ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 ผลของขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ

Table 14. Effects of bead size on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity of immobilized lipase.

| **Needle size (G)** | **Diameter of beads (mm)** | **Immobilized yield (%)** | **Immobilized lipase Activity (U/ml)** | **Recovery of activity (%)** |
|---|---|---|---|---|
| 24 G (0.55 x 25 mm) | 2 | $95.2 \pm 0.39^{a}$ | $8.11 \pm 0.77^{a}$ | $22.2 \pm 0.43^{a}$ |
| 20 G (0.90 x 25 mm) | 2.5 | $95.3 \pm 0.29^{a}$ | $5.19 \pm 0.71^{b}$ | $12.3 \pm 0.21^{b}$ |
| 18 G (1.20 x 25 mm) | 3 | $95.9 \pm 0.04^{a}$ | $5.27 \pm 0.03^{b}$ | $13.3 \pm 0.14^{b}$ |

* Different letters in the same column within the same indicate significant different ($p < 0.05$)

**2. การเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล**

**2.1 ผลของ 2-methyl-2-butanol ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส**

ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์จะพบว่าเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงระดับหนึ่งไขมันจะเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งซึ่งจะเป็นอุปสรรคในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการละลายสับสเตรทที่เป็นน้ำมันหรือไขมัน สามารถแก้ปัญหาในเรื่องการแข็งตัว การอุดตันและความหนืดของสับสเตรทได้ เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์สามารถละลายไขมันได้ซึ่งโมโนเอซิลกลีเซอรอลจัดเป็นไขมันด้วย แต่เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์จึงมีความสำคัญต่อการผลิตโมโนกลีเซอรอล ในงานวิจัยของ Damstrup และคณะ (2005) พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol มีหมู่ Functional groups ที่เป็น Tertiary alcohols ซึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปลี่ยน Ester ไปเป็น Free fatty acid ได้จึงทำให้เกิดเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้สูง

ภาพที่ 11 แสดงผลของการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซีสน้ำมันปาล์มโอลีอีนและกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในระบบที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้เพียง 14.07 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลลดลงเหลือ 15.61 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง โดยผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้เป็นไดเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ 25.19 และ 45.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yang และคณะ (2005) ที่ทำการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้ Novozym 435 กับน้ำมันดอกทานตะวันด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในสภาวะที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง และผลผลิตส่วนใหญ่คือไดเอซิลกลีเซอรอล (ประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์)

ภาพที่ 12 ทำการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยการกลีเซอโรไลซีสน้ำมันปาล์มโอลีอีนและกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ในระบบที่เติมตัวทำละลายอินทรีย์คือ 2-methyl-2-butanol ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 44.90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลถูกย่อยสลายหมด เมื่อทำปฏิกิริยา 9 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองของ Yang และคณะ (2005) ที่ทำการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้ Novozym 435 กับน้ำมันดอกทานตะวันด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในสภาวะที่เติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง และสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ในระบบแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol ได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 30 นาที

จากการเปรียบเทียบปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสที่ในสภาวะทีเติมและไม่ได้เติมตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol (ภาพที่ 13) พบว่าในระบบที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol จะให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในปริมาณที่สูงกว่าระบบที่ไม่ใช้ตัวทำละลายมาก ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol มีค่า log *P* อยู่ที่ 0.35 ซึ่งบ่งบอกว่าตัวทำละลายนี้มีขั้วเล็กน้อย จึงมีความสามารถเป็นทั้ง Hydrophobic และ Hydrophilic และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ดี เพราะโมโนเอซิลกลีเซอรอลมีคุณสมบัติเป็นสาร Emulsifier ที่มีขั้วอยู่เล็กน้อยเช่นกัน นอกจากคุณสมบัติของค่า log *P* ตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol ยังมีหมู่ Functional groups ที่เป็น Tertiary alcohols ซึ่งสามารถยับยั้งการทำให้เกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน Ester ไปเป็น Free fatty acid จึงทำให้เกิดเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้สูงขึ้น (Damstrup *et al*., 2005) และนอกจากนี้ยังพบว่าในระบบที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol เอนไซม์ตรึงรูปยังสามารถย่อยไตรเอซิลกลีเซอรอลได้เร็วกว่าในระบบที่ไม่ใช้ตัวทำละลาย

**2.2 การเติมกลีเซอรอลลงในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต**

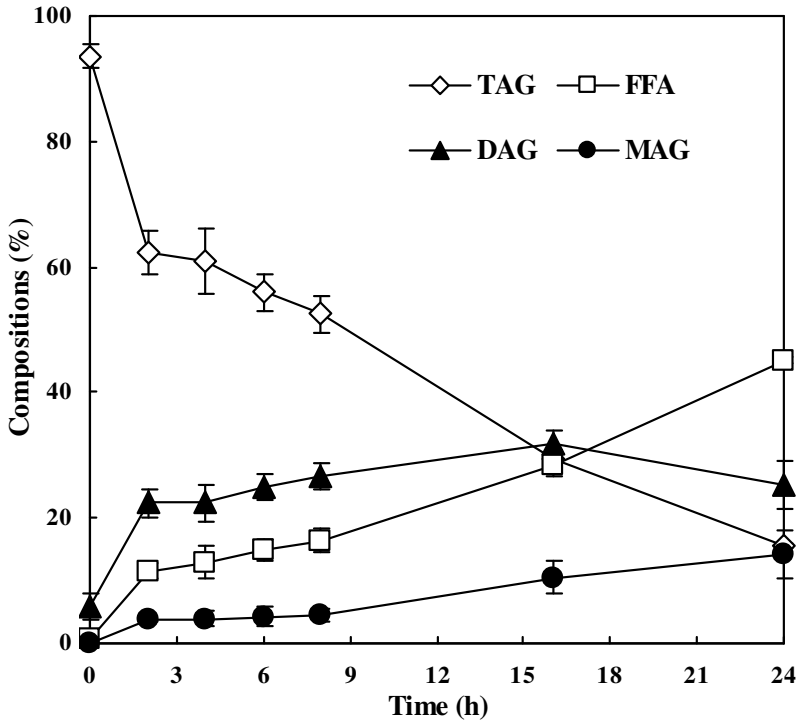
เนื่องจากในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส จะต้องใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นควบคู่กับน้ำมันปาล์มโอลีอีนเพื่อที่จะผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล และจากรายงานของ Yang และ Parkin (1994) พบว่าการเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส จะทำให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนตจึงมีการเติมกลีเซอรอลแทนปริมาณน้ำในการตรึง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ง่ายขึ้น

ภาพที่ 14 แสดงการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เติมกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในสารละลายตรึงรูป โดยใช้ระบบที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 48.22 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอลในสารละลายตรึงรูปที่ได้เพียง 44.90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12)

ภาพที่ 15 แสดงการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในระบบที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เติมกลีเซอรอลในระหว่างกระบวนการตรึงรูป 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 51.11 เปอร์เซ็นต์

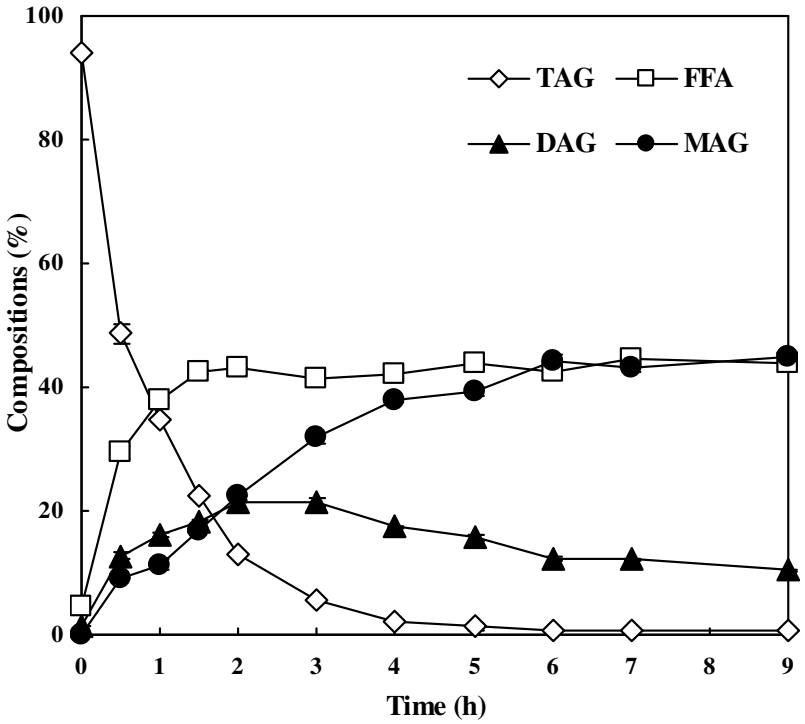
ภาพที่ 16 แสดงการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีการเติมกลีเซอรอลในระหว่างกระบวนการตรึงที่ 0, 40 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ได้คือ 45.63, 48.22 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในระบบที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีการเติมกลีเซอรอลในระหว่างกระบวนการ

ตรึงรูปเอนไซม์ จะเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสได้เร็วกว่า และได้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่สูงกว่า ซึ่งการเติมกลีเซอรอลในสารละลายตรึงรูปจะเป็นการลดปริมาณน้ำในเอนไซม์ตรึงรูป ทำให้ระบบสามารถเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสได้ดีกว่า โดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ไม่เติมกลีเซอรอลในสารละลายตรึงรูปจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และปฏิกิริยาจะหยุดที่ปริมาณไดเอซิล-กลีเซอรอลยังคงสูงอยู่ นอกจากนี้การเติมกลีเซอรอลลงในกระบวนการตรึง ทำให้กลีเซอรอลที่อยู่ในตัวของเอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำหน้าที่เป็น Precursor เพื่อช่วยเหนี่ยวนำให้ในระบบสามารถเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสได้เร็วขึ้น เมื่อปริมาณกลีเซอรอลในสารละลายตรึงรูปเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการเพิ่มสัดส่วนกลีเซอรอลในสารละลายตรึงรูปทำให้ความสามารถในการละลายของอัลจิเนตลดลง ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงสุดที่ใช้ได้คือ 70 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่มีการเติมกลีเซอรอล 70 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในสารละลายตรึงรูป



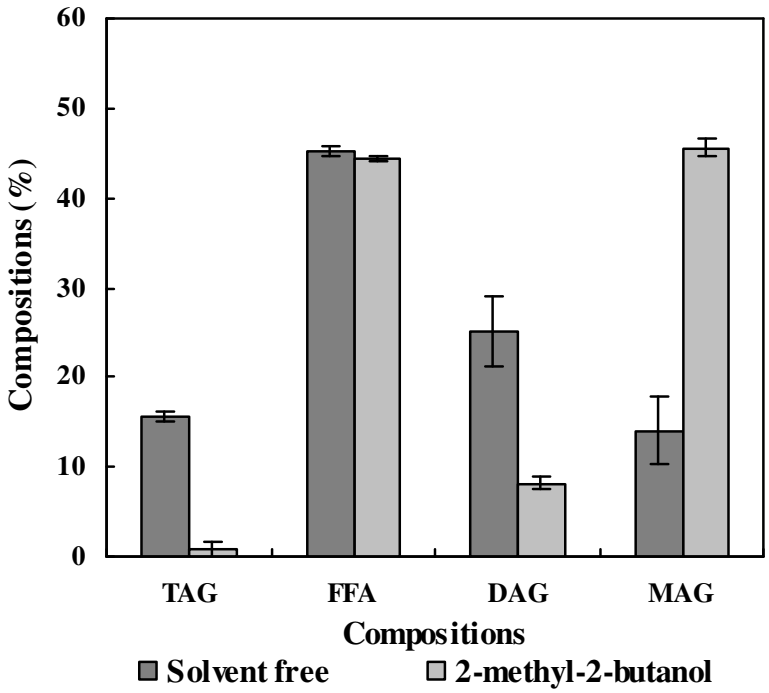

ภาพที่ 11 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Figure11. Glycerolysis of palm oil by immobilized lipase with alginate; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 10 % (w/w) of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 24 h.



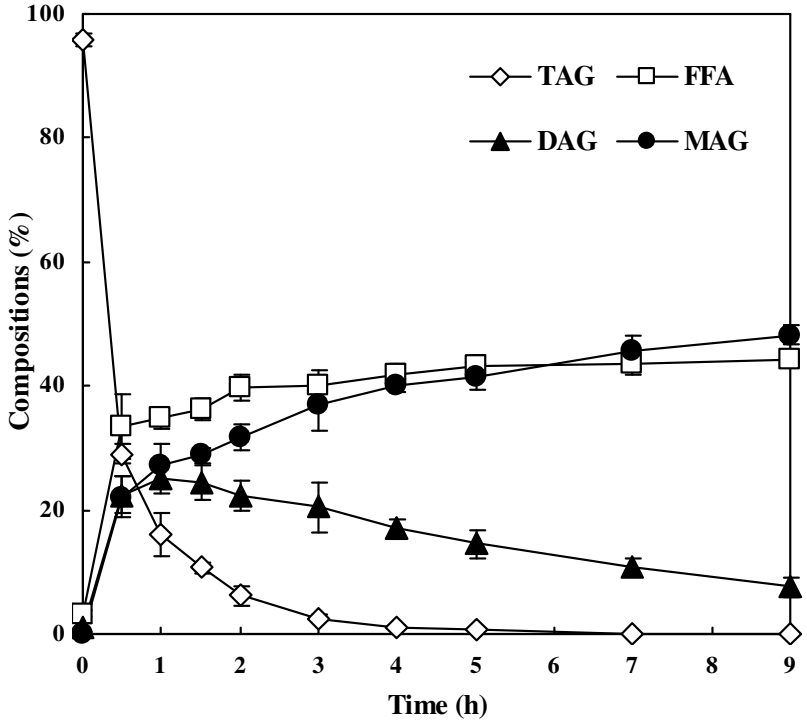

ภาพที่ 12 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตในระบบที่เติมตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Figure12. Glycerolysis of palm oil by immobilized lipase with alginate; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % (w/w) of the water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 9 h.



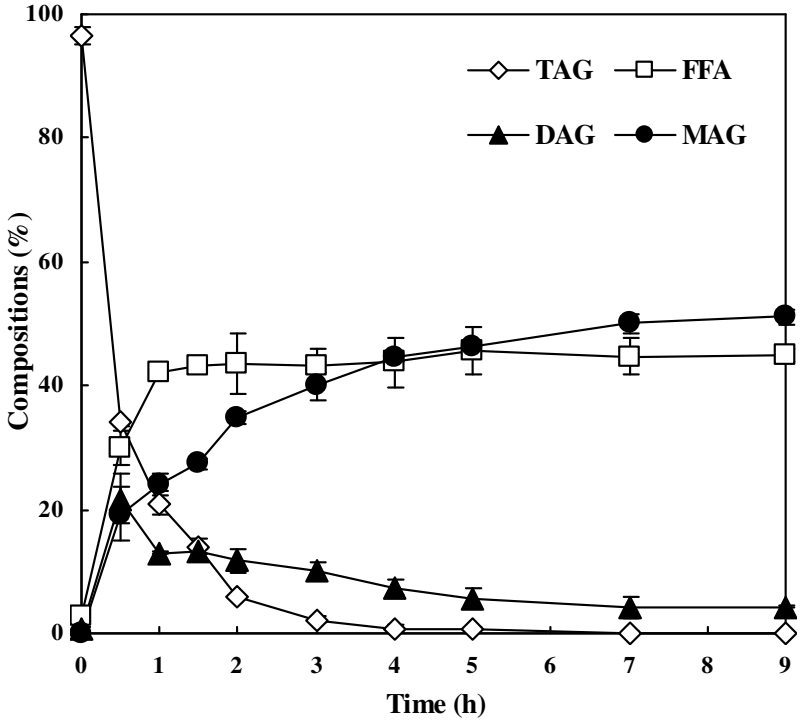

ภาพที่ 13 ผลของ 2-methyl-2-butanol ต่อปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส)

Figure13. Effect of 2-methyl-2-butanol on glycerolysis reaction by immobilized lipase; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % (w/w) of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C).



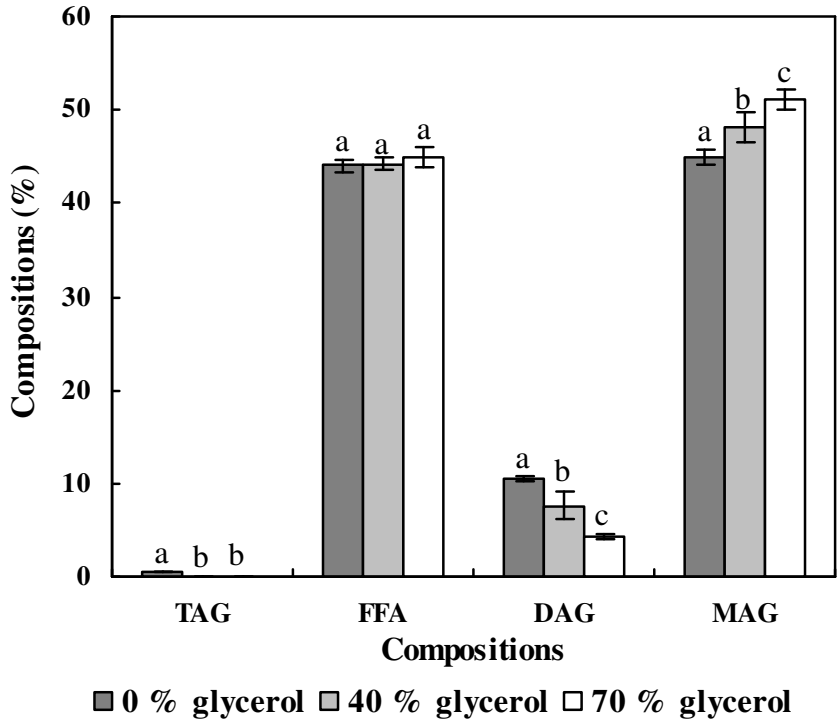

ภาพที่ 14 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตที่มีการเติมกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในสารละลายตรึงรูป โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Figure 14. Glycerolysis of palm oil by immobilized lipase with 40 % added glycerol (v/v); TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 9 h.




ภาพที่ 15 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตที่มีการเติมกลีเซอรอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในสารละลายตรึงรูป โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมล กลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Figure 15. Glycerolysis of palm oil by immobilized lipase with 70 % added glycerol (v/v); TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 9 h.




ภาพที่ 16 ผลของการเติมกลีเซอรอลในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสต่อปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

Figure 16. Effect of glycerol concentration in alginate gel beads on glycerolysis reaction; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of the water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 9 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)

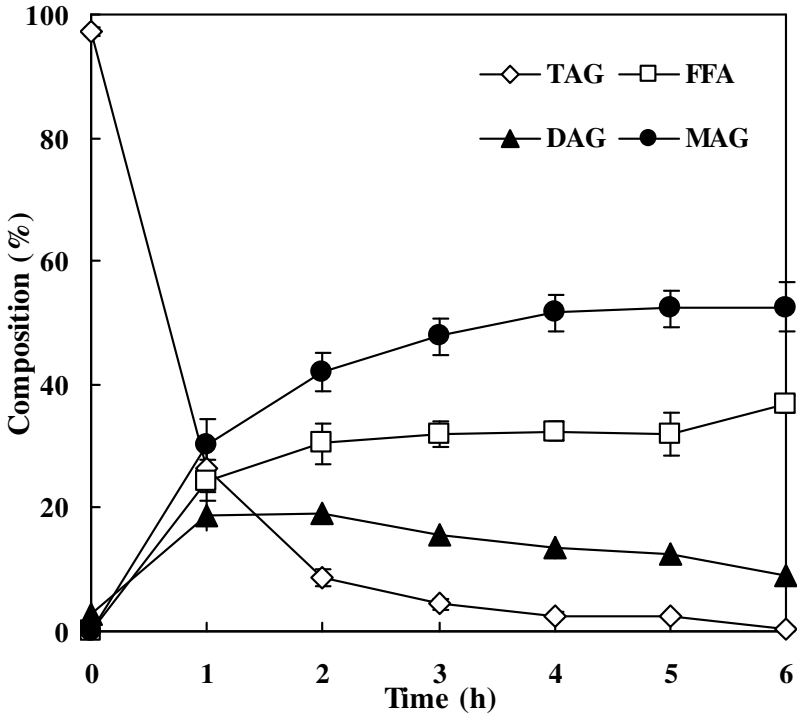
**2.3 การหุ้มเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซิลิเคต**

ในการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ใช้อัลจิเนตเป็นตัวพยุงไปใช้ในปฏิกิริยา จะพบว่ามีการรั่วของเอนไซม์ออกมาเนื่องจากขนาดรูพรุนของอัลจิเนตนั้นยังมีขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหุ้มผิวด้านนอกของเอนไซม์ตรึงรูปเพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ไลเปสรั่วออกมา โดยสารที่หุ้มต้องมีลักษณะที่สามารถยึดเกาะได้ดีกับอัลจิเนต และมีขนาดรูพรุนที่เล็กกว่าขนาดรูพรุนของอัลจิเนต ซึ่งพบว่าซิลิเคตมีคุณสมบัติดังกล่าว จึงเลือกใช้ซิลิเคตในกระบวนการหุ้ม โดยจะศึกษาผลของเอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มและไม่หุ้มมาใช้ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส และนำเอนไซม์ดังกล่าวมาใช้ซ้ำเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการหุ้ม โดยดูจากผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลของแต่ละปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังศึกษาค่ากิจกรรมการย่อยสลายทั้งก่อนและหลังทำปฏิกิริยาใช้ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบผลของการหุ้มเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปซิลิเคตโดยทดลองหุ้มที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง

ภาพที่ 17 แสดงการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในระบบที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เติมกลีเซอรอลในระหว่างกระบวนการตรึงรูป 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และหุ้มด้วยซิลิเคตเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 52.56 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลเหลือเพียง 0.46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง

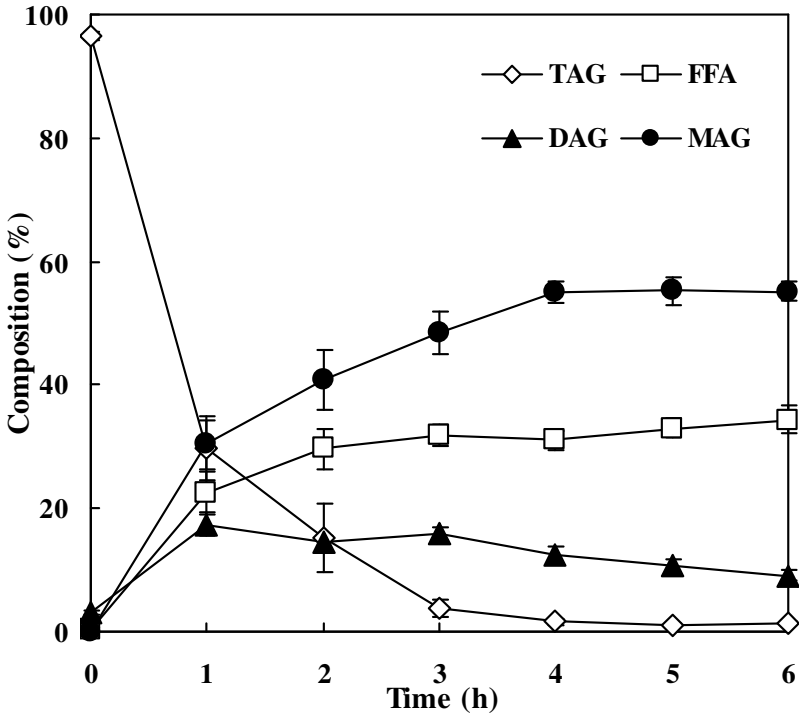
ภาพที่ 18 แสดงการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในระบบที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่เติมกลีเซอรอลในระหว่างกระบวนการตรึงรูป 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และหุ้มด้วยซิลิเคตเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 55.16 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลเหลือ 1.35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง

ภาพที่ 19 แสดงผลของปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคต พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่หุ้มด้วยซิลิเคตสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ดีกว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มด้วยซิลิเคต เนื่องจากซิลิเคตสามารถทำให้ขนาดรูพรุนภายนอกของตัวเอนไซม์ตรึงรูปมีขนาดเล็กลง ในการทำปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่หุ้มด้วยซิลิเคตเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตของโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดคือ 55.16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลต่อไป



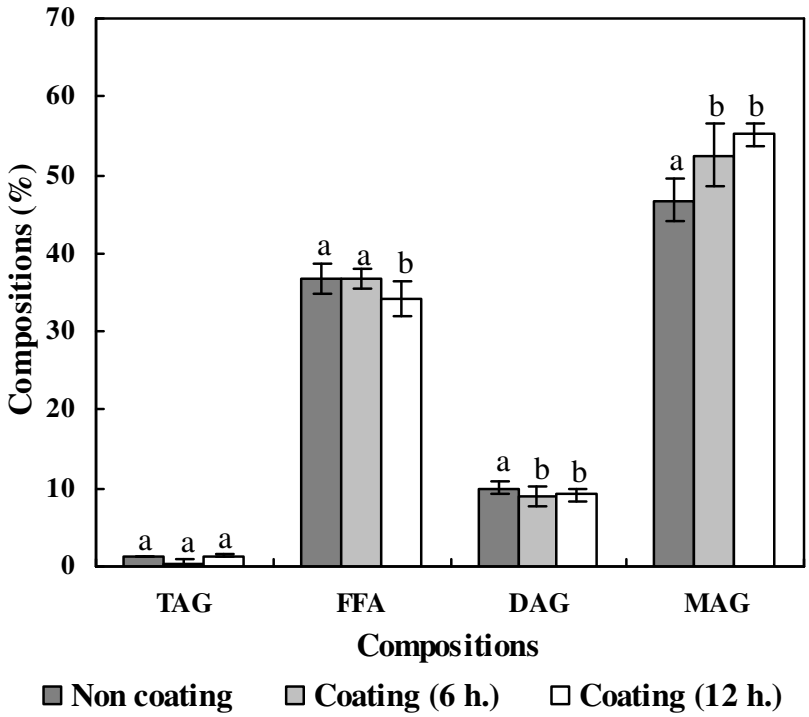

ภาพที่ 17 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่หุ้มด้วยซิลิเคตเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 17. Glycerolysis of palm oil by 6 h silicate coated beads; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.




ภาพที่ 18 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่หุ้มด้วยซิลิเคตเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 18. Glycerolysis of palm oil by silicate 12 h coated beads; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

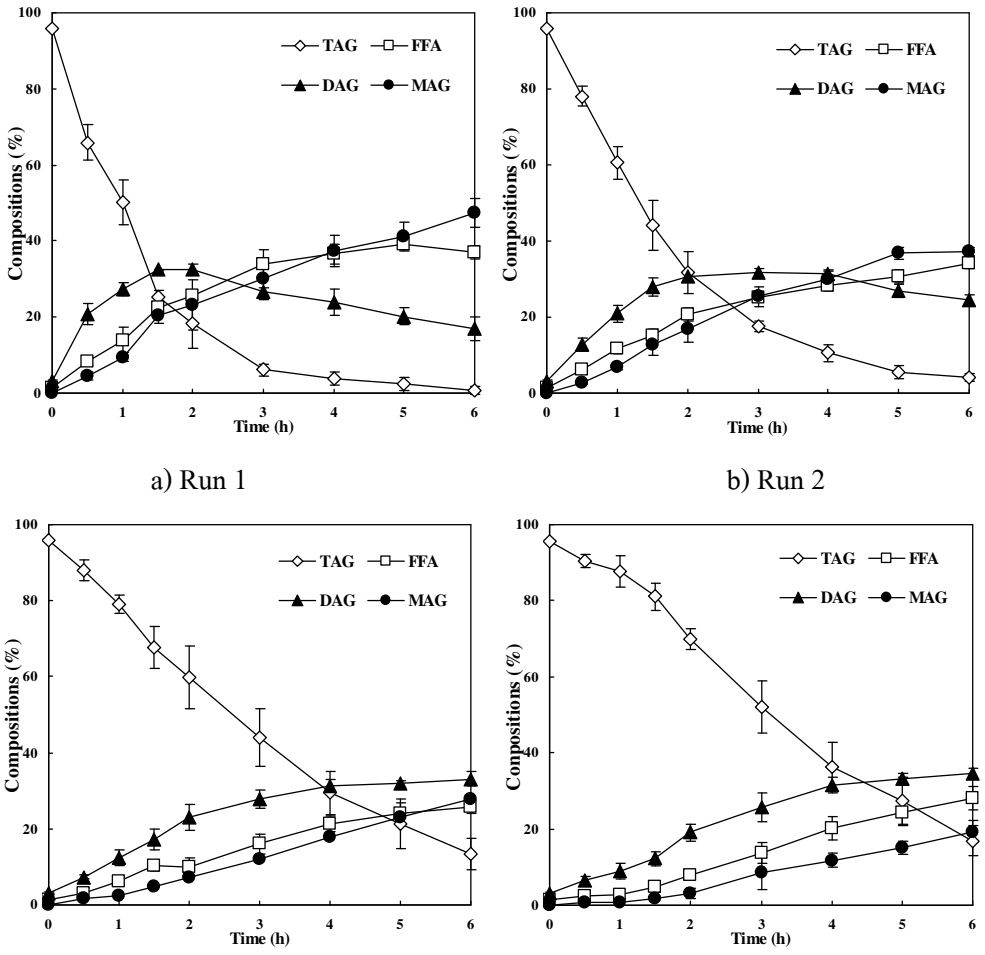



ภาพที่ 19 ผลของการหุ้มเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซิลิเคตต่อปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 19. Effect of silicate coated alginate gel beads on glycerolysis reaction; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)

ในการทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูปทำโดยนำเอนไซม์ตรึงรูปมาทำปฏิกิริยากลีเซอ-โรไลซีส 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วล้างด้วยสารละลาย Tris-HCl buffer 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แยกเอนไซม์ตรึงรูปด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ แล้วนำไปทำปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในระบบเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น ทำซ้ำเป็นจำนวน 4 ครั้ง เพื่อเปรียบเทียบความคงตัว

ภาพที่ 20 แสดงการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มโดยภาพที่ 20 a, b, c และ d เป็นปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของ Run 1, Run 2, Run 3 และ Run 4 ตามลำดับ พบว่าการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของ Run 1 โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 4 Run คือ 45.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใน Run 2, Run 3 และ Run 4 สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 37.4, 27.7 และ 19.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากใน Run 1 เอนไซม์ตรึงรูปที่นำมาใช้ยังมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายที่สูงอยู่จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด แต่เมื่อนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำเอนไซม์เกิดการสูญเสียกิจกรรมการย่อยสลายไปบางส่วน จึงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาใน Run หลังๆเกิดขึ้นได้น้อยลงโดยจะดูได้จากการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลใน Run ที่ 2, 3 และ 4 พบว่าไม่สามารถย่อยสลายได้หมดภายในชั่วโมงที่ 6 โดยยังพบปริมาณของไตรเอซิลกลีเซอรอลเหลืออยู่ 4.05, 13.4 และ 16.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไดเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำที่ Run ต่างๆ คือ Run 1, 2, 3 และ 4 จะได้ 16.9, 24.4, 33 และ 34.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ได้ในปฏิกิริยาของ Run 1, 2, 3 และ 4 คือ 37.1, 34.2, 25.9 และ 28.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีปริมาณกรดไขมันอิสระลดลงเนื่องจากเกิดการย่อยสลายไตรเอ-ซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอลลดน้อยลง

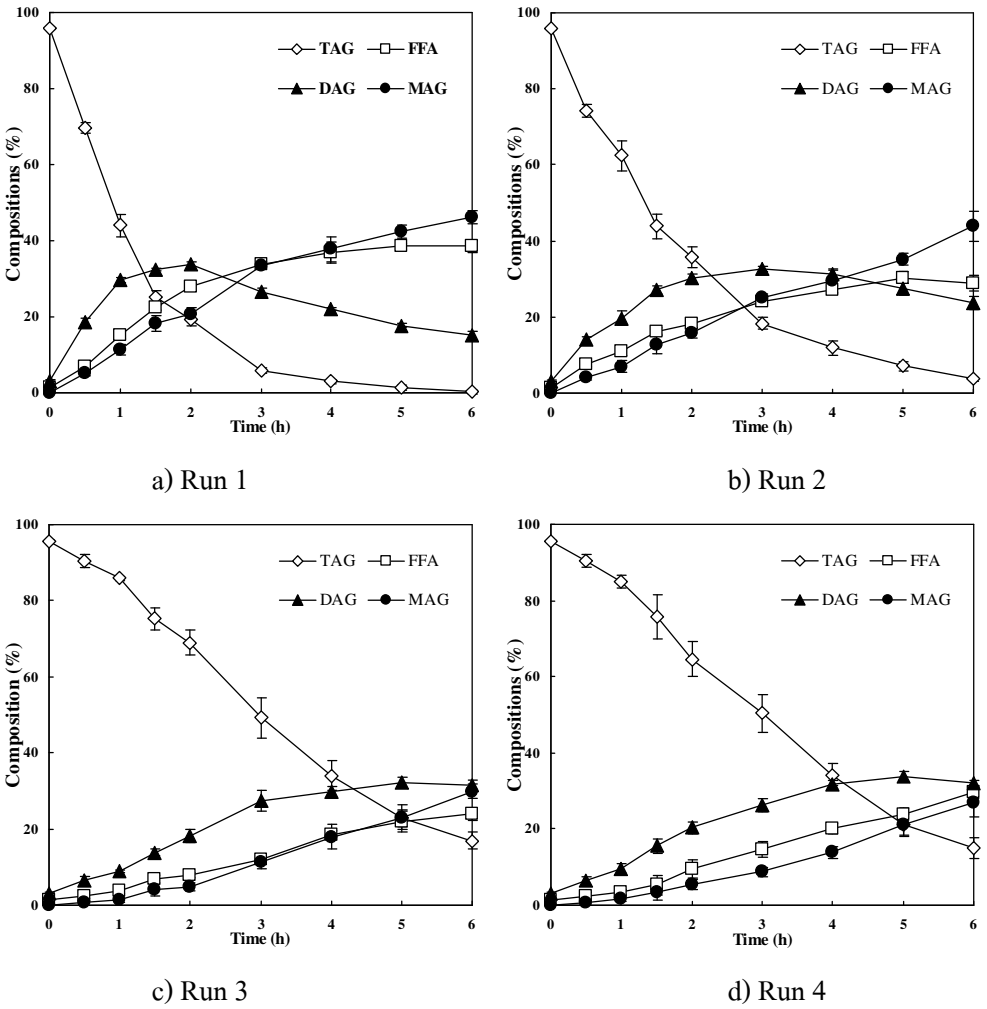



ภาพที่ 20 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มที่นำกลับมาใช้ซ้ำโดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 20. Reusability of immobilized lipase without silicate coating in glycerolysis reaction; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

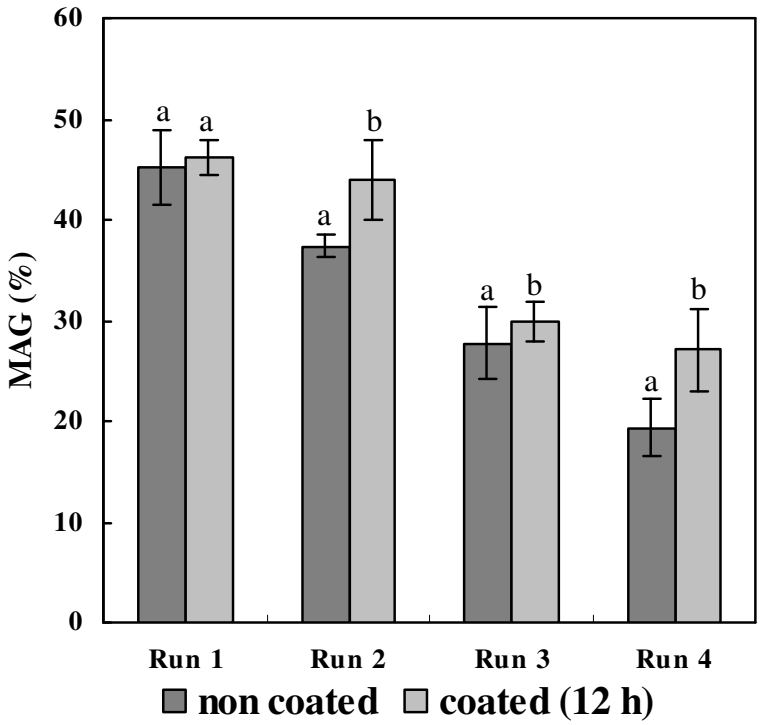
ภาพที่ 21 แสดงการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของเอนไซม์ที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยภาพที่ 21 a, b, c และ d เป็นการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของ Run 1, Run 2, Run 3 และ Run 4 ตามลำดับ พบว่าปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสจะเกิดขึ้นในแบบเดียวกับเอนไซม์ที่ไม่ได้ทำการหุ้มโดยใน Run ที่ 1 เอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตสามารถผลิตโมโนเอ-ซิลกลีเซอรอลได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 4 Run (ภาพที่ 4) คือ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใน Run 2, Run 3 และ Run 4 สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 43.9, 29.9 และ 27.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มด้วยซิลิเคต การย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอล ใน Run ที่ 2, 3 และ 4 ของเอนไซม์ตรึงรูปไม่สามารถย่อยหมดภายในชั่วโมงที่ 6 โดยเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา (6 ชั่วโมง) ยังพบปริมาณของไตรเอซิลกลีเซอรอลเหลืออยู่ 3.63, 16.94 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณไดเอซิลกลีเซอรอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ คือจะได้ 15.1, 23.6, 31.6 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ที่ Run 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ และยังพบว่าปริมาณของ Free fatty acid ที่ได้ในปฏิกิริยาของ Run 1, Run 2, Run 3 และ Run 4 ลดลง คือ 38.5, 28.9, 23.8 และ 29.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์เสียกิจกรรมการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอล

ภาพที่ 22 แสดงปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยการใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคต และไม่ได้ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส พบว่าการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลใน Run ที่ 1 จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกันระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มและหุ้ม โดยสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 45.2 และ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำใน Run ที่ 2, 3 และ 4 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้สูงกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านการหุ้มด้วยซิลิเคต และจากตารางที่ 15 แสดงการคำนวณการผลิตโมโน-เอซิลกลีเซอรอลในแบบ Relative yield (%) พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำที่ 4 เอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตยังมีค่า Relative yield (%) สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 58.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านการหุ้มด้วยซิลิเคตมีค่า Relative yield (%) ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 42.7 เปอร์เซ็นต์




รูปที่ 21 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปหุ้มด้วยซิลิเคตและนำกลับมาใช้ซ้ำโดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 21. Reusability of immobilized lipase with silicate coated by in glycerolysis reaction; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.




ภาพที่ 22 ผลของปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มและไม่หุ้มด้วยซิ-ลิเคตในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส 4 ซ้ำ ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 เติมน้ำในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 22.Effect of silicate coated and non coated beads on monoacylglycerol production. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol was, 10 % of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)

ตารางที่ 15 ผลของปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลและ Relative yield (%) ของเอนไซม์ตรึงรูปในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส 4 ซ้ำ

Table 15. Effects of repeated use of immobilized lipase on monoacylglycerol yield and relative yield (%) in glycerolysis reaction.

| | **Monoacylglycerol (%)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Run 1** | **Run 2** | **Run 3** | **Run 4** |
| **Alginate bead** | | | | |
| Yield (% ) | 45.2 | 37.4 | 27.7 | 19.3 |
| Relative yield (%) | 100 | 82.7 | 61.3 | 42.7 |
| **Silicate-coated alginate bead** | | | | |
| Yield (% ) | 46.2 | 43.9 | 29.9 | 27.1 |
| Relative yield (%) | 100 | 95.2 | 64.8 | 58.7 |

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มและไม่ได้หุ้มด้วยซิลิเคตในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าใน Run ที่ 1, 2 และ 3 อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลของเอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มและไม่ได้หุ้มด้วยซิลิเคตจะให้อัตราที่ใกล้เคียงกัน โดยในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้ทำการหุ้มจะได้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นคือ 0.26, 0.21, 0.13 และ 0.09 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ตามลำดับ และอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงรูปที่หุ้มของ Run ที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ 0.26, 0.22, 0.13 และ 0.12 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อคำนวณออกมาในรูปแบบ Relative initial rate (%) พบว่าใน Run ที่ 4 เอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มจะให้ Relative initial rate (%) ต่ำเพียง 33.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่หุ้มจะให้ Relative initial rate (%) ของ Run ที่ 4 ที่สูงกว่าคือ 44.7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการหุ้มด้วยซิลิเคตจะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัวสูงขึ้น

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาใน Run ที่ 4 นำเอนไซม์ตรึงรูปที่หุ้มและไม่หุ้มมาวัดค่ากิจกรรมการย่อยสลายและเปรียบเทียบค่ากิจกรรมก่อนทำปฏิกิริยาใน Run ที่ 1 และหลังทำปฏิกิริยาใน Run ที่ 4 ดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่หุ้มด้วยซิลิเคตสามารถที่จะรักษาค่ากิจกรรมการย่อยสลายได้สูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้หุ้มด้วยซิลิเคต คือหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสใน Run ที่ 4 เอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการหุ้มด้วยซิลิเคตยังคงมีกิจกรรมการย่อยสลายอยู่ 7.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อคิดเป็น Relative activity (%) ยังมีค่าอยู่ถึง 66.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่ได้ทำ

การหุ้มด้วยซิลิเคตเหลือค่ากิจกรรมการย่อยสลายอยู่ 4.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อคิดเป็น Relative activity (%) จะค่าอยู่เพียง 34.3 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการหุ้มเอนไซม์ตรึงรูปด้วยซิลิเคตสามารถคงกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปได้มากและนานกว่า

ตารางที่ 16 อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

Table 16. Initial rate of MAG production of immobilized lipase.

| | **Initial rate [mmol/h]** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Run 1** | **Run 2** | **Run 3** | **Run 4** |
| **Alginate bead** | | | | |
| Initial rate [mmol/h] | 0.26 | 0.21 | 0.13 | 0.09 |
| Relative initial rate (%) | 100 | 81.1 | 50.3 | 33.3 |
| **Silicate-coated alginate bead** | | | | |
| Initial rate [mmol/h] | 0.26 | 0.22 | 0.13 | 0.12 |
| Relative initial rate (%) | 100 | 84.0 | 50.6 | 44.7 |

ตารางที่ 17 ค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ตรึงรูปก่อนทำปฏิกิริยาและหลังทำปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส

Table 17. Comparison of immobilized lipase activity before and after glycerolysis reaction 4 times.

| | **Activity (U/ml)** | |
|---|---|---|
| | **Before** | **After** |
| **Alginate bead** | | |
| Activity (U/ml) | 14.3 | 4.88 |
| Relative activity (%) | 100 | 34.3 |
| **Silicate-coated alginate bead** | | |
| Activity (U/ml) | 11.5 | 7.65 |
| Relative activity (%) | 100 | 66.6 |

**3. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส**

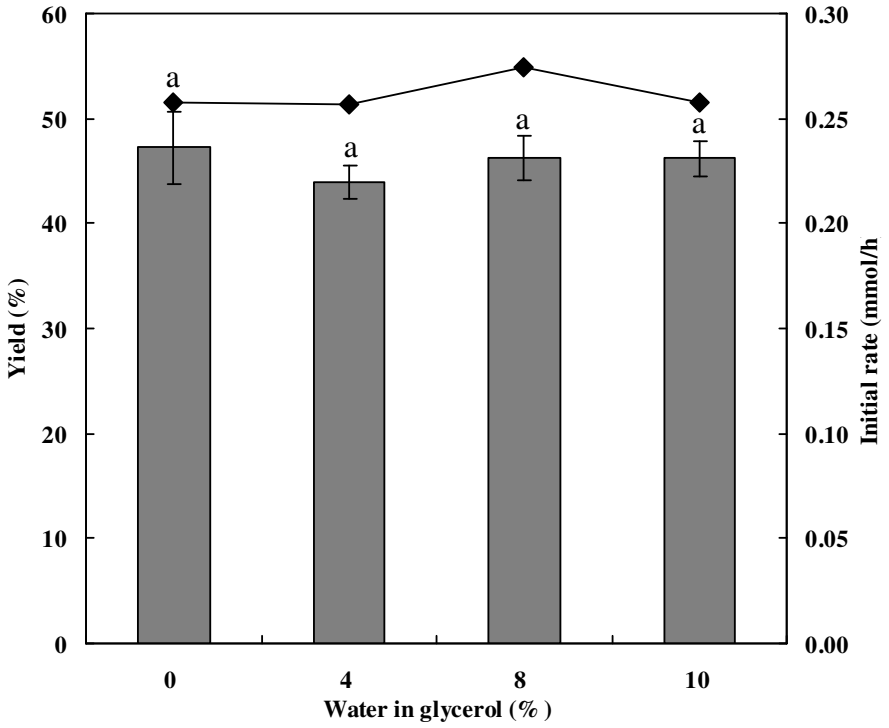
**3.1 ผลของการเติมปริมาณน้ำในกลีเซอรอล**

จากสมการการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไขมันของเอนไซม์ไลเปส (ภาพที่ 9 (1)) จะเห็นได้ว่าน้ำในปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลของปฏิกิริยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีน้ำเป็นสัดส่วนที่น้อยจะทำให้สมดุลย์ของปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบย้อนกลับ การย่อยสลายจะเกิดขึ้นต่ำแต่จะเกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์แทน Hass และคณะ (1994) อ้างโดย Bornscheuer (1995) พบว่าเอนไซม์ไลเปสแต่ละแหล่งต้องการปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในตัวทำละลายแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่ไม่แตกต่างกัน และหากสัดส่วนของน้ำไม่เหมาะสมระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาผลของการเติมปริมาณน้ำตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์ ในกลีเซอรอลในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ดังแสดงในภาพที่ 23 พบว่าน้ำที่เติมเข้าไปในระบบไม่มีผลต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลและอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น เนื่องจากตัวพยุงมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์แบบชอบน้ำ (Hydrophilic) ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีน้ำเป็นองค์ประกอบและในการดำเนินปฏิกิริยาสามารถที่จะใช้น้ำที่มีอยู่ภายในตัวของเอนไซม์ตรึงรูปได้อย่างเพียงพอ ดังนั้นในการเติมน้ำเพิ่มเข้าไป 4-10 เปอร์เซ็นต์ ในกลีเซอรอลจึงไม่มีผลต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยชุดการทดลองที่ไม่เติมน้ำลงในกลีเซอรอลจะให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด คือ 47.2 เปอร์เซ็นต์ และให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ 0.26 มิลลิโมลต่อชั่วโมง โดยการเติมน้ำในปฏิกิริยาจะส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลมากกว่าการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส และทำให้เกิดกรดไขมันอิสระขึ้นมาแทนการเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chang และ Rhee (1991) และ McNeill และคณะ (1991) ที่พบว่าปริมาณน้ำในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะกอกไม่ควรเกิน 8 เปอร์เซ็นต์ ถ้าปริมาณน้ำมากก็จะเกิดกรดไขมันอิสระมากขึ้นด้วย Kaewthong และคณะ (2004) พบว่า ที่ปริมาณน้ำ 4 เปอร์เซ็นต์ของกลีเซอรอลให้การผลิตต่ำ และที่ปริมาณน้ำ 6-12 เปอร์เซ็นต์ของกลีเซอรอล ให้การผลิตโมโนกลีเซอรอลไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่ปริมาณน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ ของกลีเซอรอลให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดคือ 32.30 เปอร์เซ็นต์

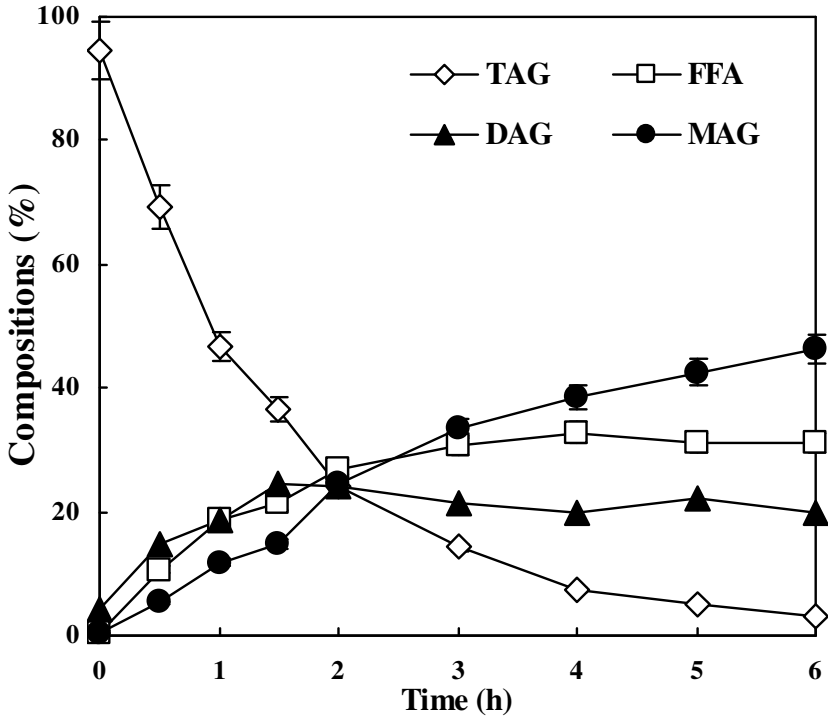
ผลของปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป พบว่าในปฏิกิริยาไม่จำเป็นต้องเติมน้ำเข้าไปในระบบ โดยสภาวะที่ใช้คือ สัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 50 beads ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม 30 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 24

พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 47.27 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกริยาลดลงเหลือ 2.23 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง




ภาพที่ 23 ผลของการเติมน้ำในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล (▭) และอัตราการผลิตโมโนเอซิล-กลีเซอรอลเริ่มต้น (-◆-) ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 โดยเติมน้ำในกลีเซอรอล 0-10 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 23. Effect of water addition on MAG production (▭) and initial rate (-◆-). The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol with various amounts of water content in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)




ภาพที่ 24 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสภาวะที่มีการเติมน้ำในระบบที่เหมาะสม โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol โดยใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 ไม่มีการเติมน้ำในกลีเซอรอล เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 24. Time course of Glycerolysis by immobilized lipase not using water in glycerol; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, without water addition in glycerol and mole ratio of glycerol to palm oil at 8:1. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

**3.2 ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม**

จากการศึกษาผลของสัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม ในการผลิตโมโนเอ-ซิลกลีเซอรอลซึ่งมีสัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 4:1 ถึง 12:1 ดังแสดงในภาพที่ 25 พบว่าเมื่อสัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้น จะทำให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มถึง 10:1 ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะเริ่มคงที่ และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่สัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 12:1 โดยเมื่อใช้สัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มโอลีอีนที่ 10:1 จะให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเท่ากับ 53.5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่สัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 25 พบว่าสัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มมากกว่า 10:1 พบว่าอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดลง โดยสัดส่วนของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 10:1 จะให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดคือ 0.31 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้สัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม เท่ากับ 10:1 ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลต่อไป

Kwon และคณะ (1995) นำเอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Rhizopus delemar* ที่ตรึงบนซิลิกาเจลมาผลิตโมโนหรือไดเอซิลกลีเซอรอลในเฮกเซน ที่ใช้สัดส่วนของปาลมิเตทกับกลีเซอรอลเท่ากับ 5:10 สามารถผลิตทั้งโมโนหรือไดเอซิลกลีเซอรอล 60 เปอร์เซ็นต์

McNeill และ Yamane (1991) พบว่าสัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลี-เซอรอลของกลีเซอรอลกับไขมันวัวคือ 5:1 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* และ *Chomobacterium viscosum* ซึ่งทำงานได้ดีที่สุดและสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 70 เปอร์เซ็นต์

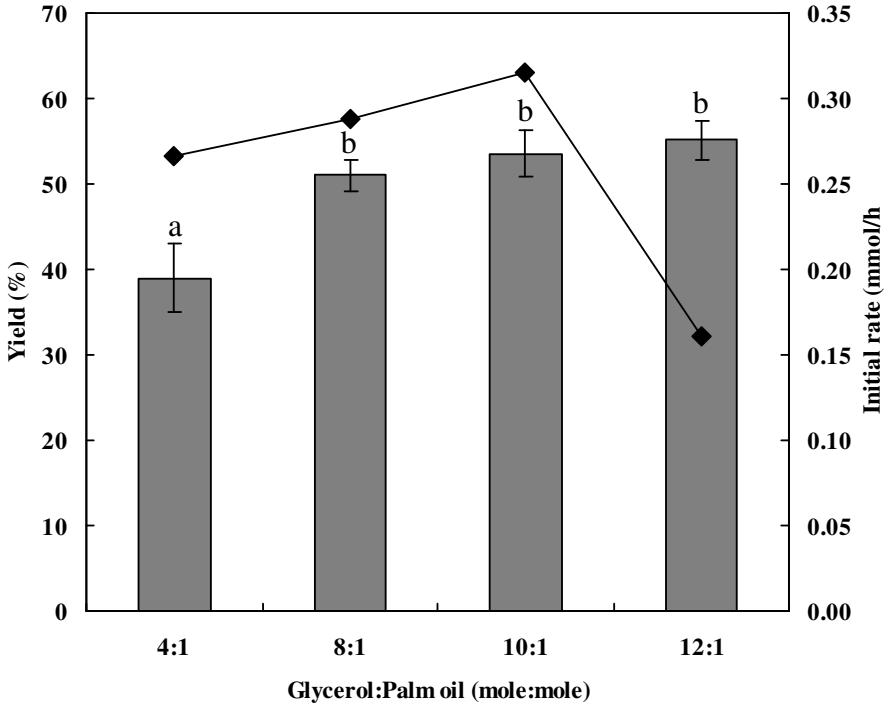
Tuter และคณะ (1999) ศึกษาปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์ม โดยใช้สัดส่วนของน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 1:2 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 66 และ 64 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์มตามลำดับ

โสภา พรหมดวง (2543) ศึกษาปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์มโดยใช้สัดส่วนของน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 1:3.7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดผงทางการค้า LP (*Chomobacterium viscosum*) ที่ตรึงรูปด้วยแอคคูเรล ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 42.5 เปอร์เซ็นต์

Kaewthong และคณะ (2004) ศึกษาปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์มโดยใช้สัดส่วนของน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 1:2.7 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดผงทางการค้า PS (*Pseudomonas* sp.) ที่ตรึงรูปด้วยแอคคูเรล ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 56.6 เปอร์เซ็นต์

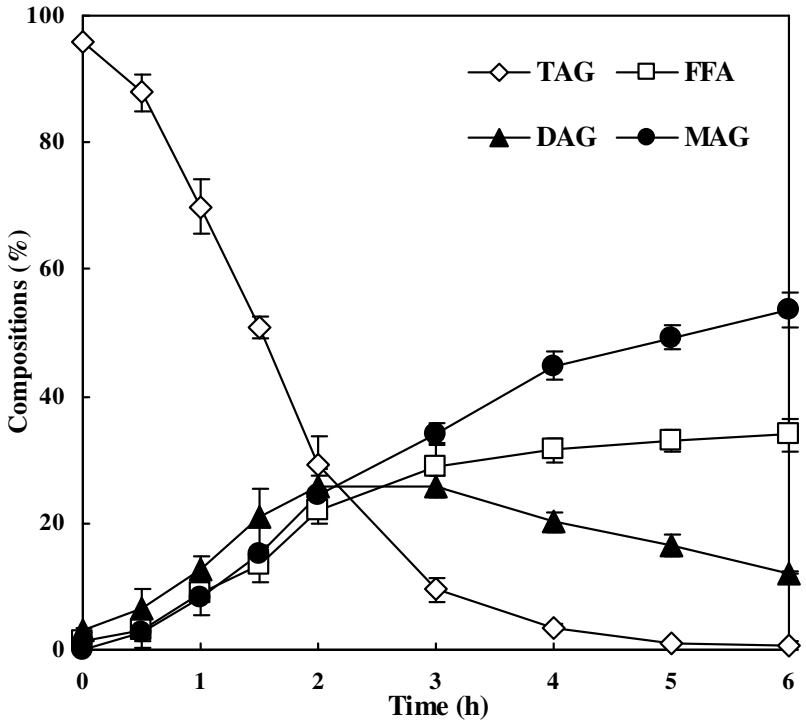
จะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ น้ำมัน ตัวพยุง และอุณหภูมิ ที่แตกต่างกันก็จะส่งผลให้สัดส่วนโมลระหว่างน้ำมันกับกลีเซอรอลต่างกันไปด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้สัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม เท่ากับ 10:1 เพื่อใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลต่อไป

ผลของสัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม ที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป พบว่าสัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมที่สุดคือ 10:1 โดยระบบของปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสที่ใช้คือ ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 50 beads ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม 30 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 26 พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 53.5 เปอร์เซ็นต์ และ พบว่าปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลถูกย่อยสลายหมดไปในเวลา 6 ชั่วโมง




ภาพที่ 25 ผลของสัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ( ■ ) และอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น ( ◆ ) ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยใช้ที่น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 8:1 และเอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 25. Effect of mole ratios of glycerol to palm oil on MAG production ( ■ ) and initial rate ( ◆ ). The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol with various amounts of mole ratio of glycerol to palm. The amount of immobilized lipase was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)



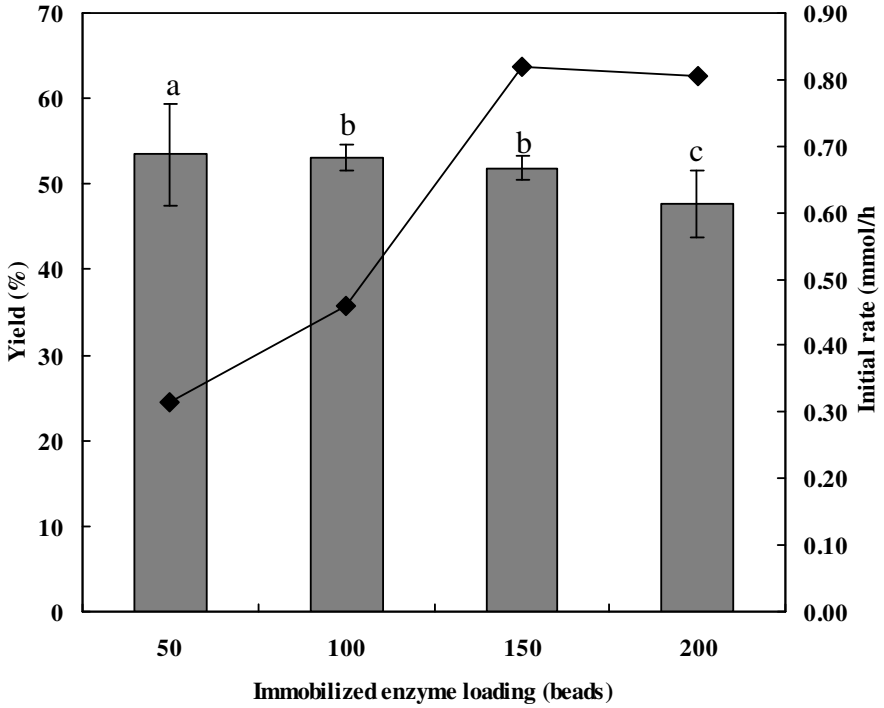

ภาพที่ 26 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสภาวะที่ใช้สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่เหมาะสม โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol โดยใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 เอนไซม์ตรึงรูป 50 beads (8.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 26. Time course of glycerolysis by immobilized lipase using the optimal mole ratios of glycerol to palm oil; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol with mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase used was 50 beads (8.11 U/ml). The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

**3.3 ผลของปริมาณเอนไซม์**

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปตั้งแต่ 50-200 beads ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 27 พบว่าเมื่อปริมาณของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเพิ่มขึ้น จะทำให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดต่ำลง เนื่องจากในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ตรึงรูป จะทำให้ปริมาณน้ำในระบบเพิ่มขึ้นด้วย เพราะตัวเอนไซม์ตรึงรูปจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงไม่ได้มีเพียงปฏิกิริยากลีเซอ-โรไลซีส แต่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสด้วย ทำให้โมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ได้ถูกย่อยสลายและทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มมากขึ้นโดยปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ 50, 100, 150 และ 200 beads ได้ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ 27.47, 34.61, 43.07 และ 46.22 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ 50 beadsให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดคือ 53.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะได้ผลต่างจากของ Kaewthong และคณะ (2004) ที่ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปต่อการผลิตโมโนกลีเซอรอล โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปตั้งแต่ 10-60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มโอลีอีน พบว่าเมื่อปริมาณของเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูป เพิ่มขึ้นการผลิต โมโนเอซิล-กลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้นด้วย และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูป 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มโอลีอีน พบว่าให้การผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูปที่ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันปาล์มโอลีอีนให้การผลิตโมโนกลีเซอรอล 54.38 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น ที่ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 27 พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นด้วย และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 150 beads พบว่าให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นสูงสุดคือ 0.82 มิลลิโมลต่อชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสูงขึ้นเป็น 200 beads พบว่าอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นเริ่มคงที่ ดังนั้นในการคัดเลือกจึงดูจากปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล และอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น ที่เหมาะสมที่สุดคือ ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ 150 beads ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากที่ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ 150 beads ให้ผลผลิตโมโมเอซิลกลี-เซอรอล 51.9 เปอร์เซ็นต์ และให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นสูงสุด

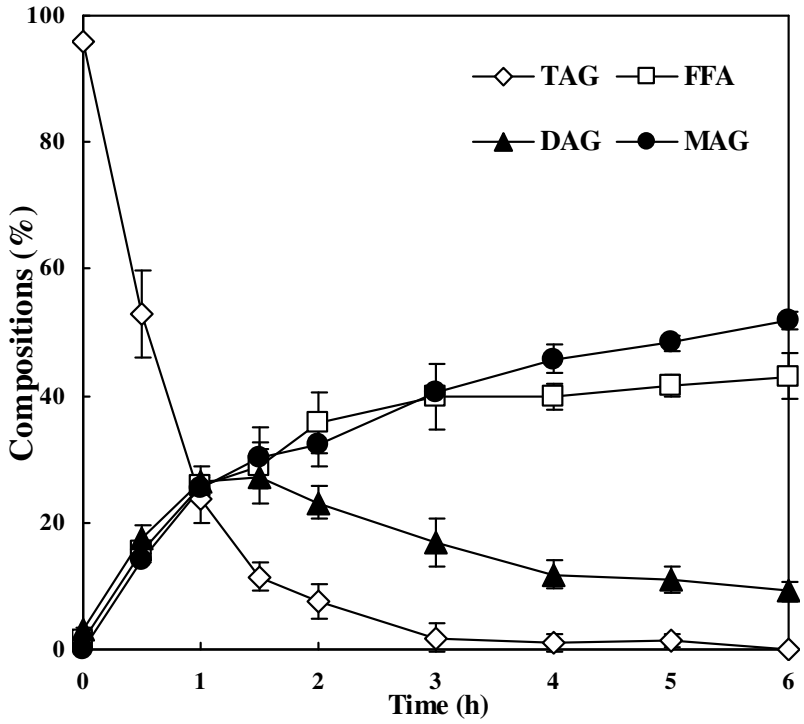



ภาพที่ 27 ผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล (■) และอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น (-◆-) ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 และศึกษาปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ 50-200 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 27. Effect of immobilized lipase loading on MAG production (■) and initial rate (-◆-). The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, and mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase was varied. The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)

ภาพที่ 28 แสดงผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิล-กลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป สภาวะที่ใช้คือปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ 150 beads สัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 10:1 ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม 30 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตโมโนเอ-ซิลกลีเซอรอลได้ 51.9 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกริยาถูกย่อยสลายจนหมดภายในเวลา 4 ชั่วโมง

Stevenson และคณะ (1993) ใช้เอนไซม์ไลเปส lipozyme 200 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยากับไขมันวัว 10 กรัม จะให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดที่ 47 เปอร์เซ็นต์ การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มากกว่านี้ไม่ได้ทำให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Kamlangdee และ Yamane (1996) ใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Chomobacterium viscosum* ที่ตรึงบนแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับ 6,000 ยูนิต ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสและใช้น้ำมันมะกอก 5 กรัม และกลีเซอรอล 2.6 กรัม สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ Tuter และคณะ (1999) พบว่าปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันทานตะวันเท่ากับ 500 ยูนิตต่อกรัมน้ำมัน ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล 53 เปอร์เซ็นต์ โสภา พรหมดวง (2543) ใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสชนิดผงทางการค้า LP (*Chomobacterium viscosum*) ที่ตรึงรูปด้วยแอคคูเรล ปริมาณ 15 ยูนิต สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 30.4 เปอร์เซ็นต์ การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันในแต่ละการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นผลจากชนิดและปริมาณเอนไซม์ตลอดจนสับสเตรท และสภาวะการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ทำให้ได้ผลผลิตของโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่แตกต่างกันด้วย



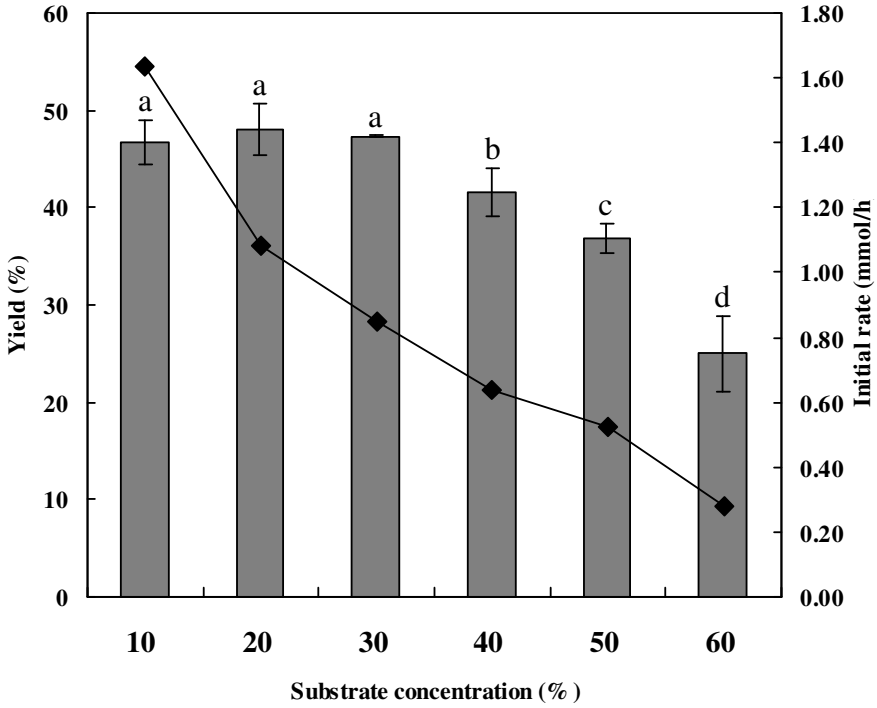

ภาพที่ 28 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสภาวะที่มีปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่เหมาะสม โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 30 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 เอนไซม์ตรึงรูป 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 28. Time course of glycerolysis by immobilized lipase using the optimal immobilized lipase loading; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 30 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase used was 150 beads. The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

**3.5 ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม**

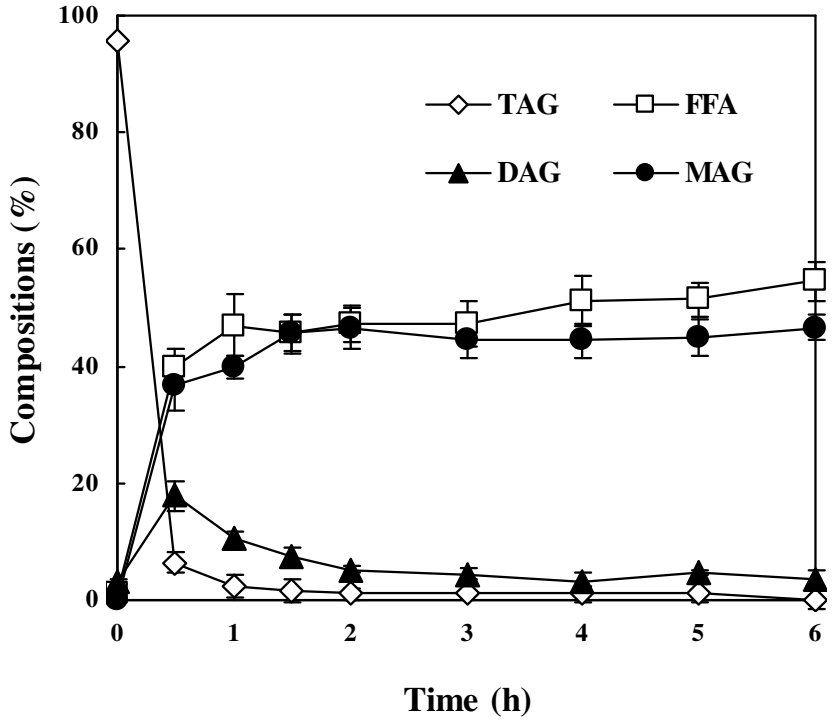
จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีน ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของปาล์มโอลีอีนตั้งแต่ 10-60 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังแสดงในภาพที่ 29 พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มต่ำที่ 10-40 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ ให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p$>0.05) จากการศึกษาอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นของปาล์มโอลีอีนต่างๆ พบว่าการลดความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม จะทำให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นสูงขึ้นด้วยซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีน 10 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 46.67 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 6 ชั่วโมง และให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นสูงสุดคือ 1.64 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Kaewthong และคณะ (2004) ศึกษาผลของความเข้มข้นของปาล์มโอลีอีนต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยทำการเปลี่ยนความเข้มข้นของปาล์มโอลีอีนตั้งแต่ 5-70 เปอร์เซ็นต์ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มลดลง จะทำให้ให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงขึ้น และพบว่าที่ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ในตัวทำละลายอินทรีย์ ให้การผลิตโมโนกลีเซอรอลสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 43.68 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีนเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีนเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลต่อไป

ภาพที่ 30 แสดงผลของความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีนที่เหมาะสมที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol สัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 10:1 ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 46.67 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยาถูกย่อยสลายจนหมด ภายใน 2 ชั่วโมง




ภาพที่ 29 ผลของความเข้มข้นของปาล์มโอลีอีนในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล (■) และอัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้น (–◆–) ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยศึกษาความเข้มข้นน้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 10-60 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 และปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 29. Effect of palm olein concentration on MAG production (■) and initial rate (–◆–). The reaction the concentration of palm oil in 2-methyl-2-butanol was varied using mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase 150 beads. The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)




ภาพที่ 30 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่เหมาะสม โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 10 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 เอนไซม์ตรึงรูป 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 30. Reaction of glycerolysis by immobilized lipase using the optimal palm olein concentration; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 10 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase was 150 beads. The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

**3.6 อุณหภูมิที่เหมาะสม**

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยทำการเปลี่ยนอุณหภูมิตั้งแต่ 25-45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 31 พบว่าอุณหภูมิที่ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดคือที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) และพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ต่ำกว่าที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากในระบบของปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตจะมีน้ำในปริมาณสูง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส PS (Kaewthong, 2004) ทำให้เอนไซม์ไลเปส PS ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสมากกว่าปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส ส่งผลให้โมโนเอซิลกลีเซอรอลถูกเอนไซม์ย่อยต่อไปเป็นกรดไขมันอิสระ และได้โมโนเอซิลกลีเซอรอลลดลง ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตคือที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) ที่ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล 46.67 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง

จากภาพที่ 31 พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นกว่าอุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) จะทำให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นลดลง เนื่องจากผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลถูกย่อยสลายเป็นกรดไขมันอิสระ จึงส่งผลให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นลดลง โดยที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) ให้อัตราการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเริ่มต้นสูงสุดคือ 1.66 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) ในการทดลองต่อไป

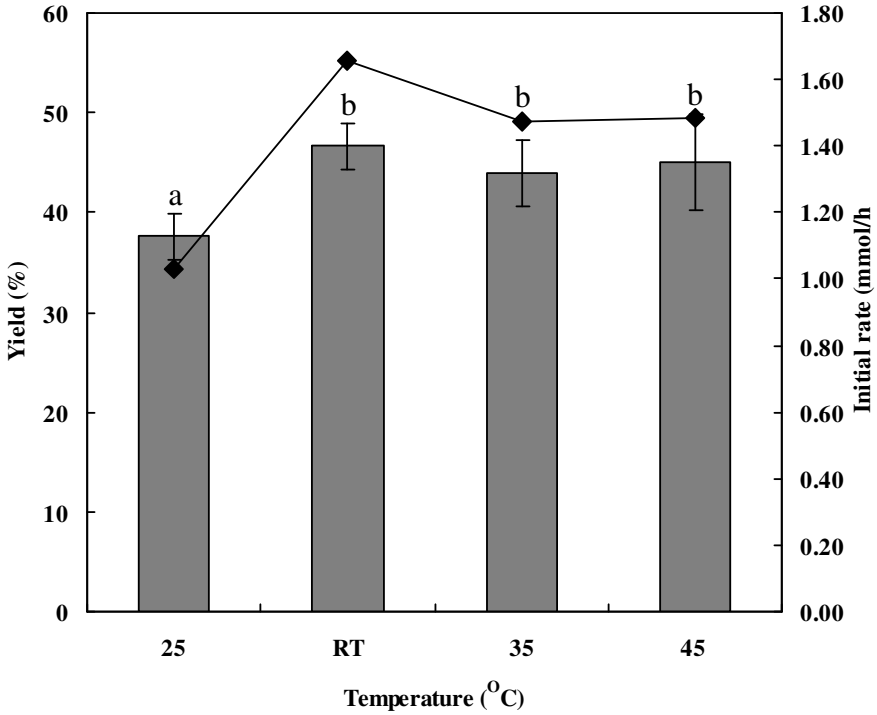
McNeill และคณะ (1991) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส จะขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันและน้ำมันจะอยู่ระหว่าง 30-46 องศาเซลเซียสสำหรับไขมันและน้ำมันในธรรมชาติ ได้แก่ ไขมันวัว, น้ำมันปาล์ม, ปาล์มสเตียริน ซึ่งจะให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 65-90 เปอร์เซ็นต์

McNeill และคณะ (1990) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกลีเซอโรไลซีสของไขมันวัว คือ 42 องศาเซลเซียส ผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 70 เปอร์เซนต์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseodomonas fluorescens* และ *Chromobacterium viscosum*

Thude และคณะ (1997) สังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการเกิดกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันละหุ่งและโกโก้บัตเตอร์ ที่อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดกลีเซอโรไลซิส 25 องศาเซลเซียส และตามด้วยอุณหภูมิเย็นที่ 7 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* (PCL) และ *Chromobacterium viscosum* (CVL) จะทำให้เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล 86 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

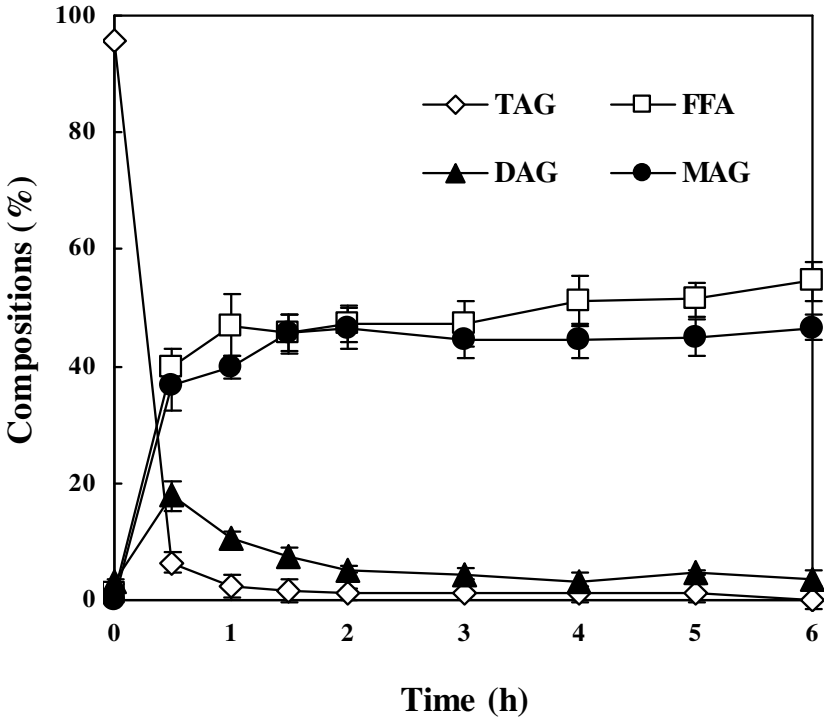
Tuter และคณะ (1999) ศึกษาปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์ม และน้ำมันเมล็ดปาล์ม โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* (ไลเปส D) พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดและสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 66 และ 64 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์ม ตามลำดับ

ภาพที่ 32 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) สัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 10:1 ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีน 10 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 46.67 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปรมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลในถูกย่อยสลายจนหมดภายในเวลา 2 ชั่วโมง




ภาพที่ 31 ผลของอุณหภูมิในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล (▇) และอัตราการผลิตโมโนเอซิล-กลีเซอรอลเริ่มต้น (◆) ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป โดยใช้ความเข้มข้นน้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 10 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่ 150 Beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง RT; อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส)

Figure 31. Effect of temperature on MAG production (▇) and initial rate (◆). The reaction contained 10 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol and mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase was 150 beads. The reaction was carried out at 500 rpm and various temperature for 6 h. RT; room temperature. Bars represent the standard deviation from three determinations. Different letters within the same product indicate significant differences ($p < 0.05$)




ภาพที่ 32 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปในสภาวะอุณหภูมิเหมาะสม โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 10 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 เอนไซม์ตรึงรูป 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Figure 32. Time course of glycerolysis by immobilized lipase using the optimal temperature; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 10 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol, mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase was 150 beads. The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

**4. การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตกลับมาใช้ใหม่**

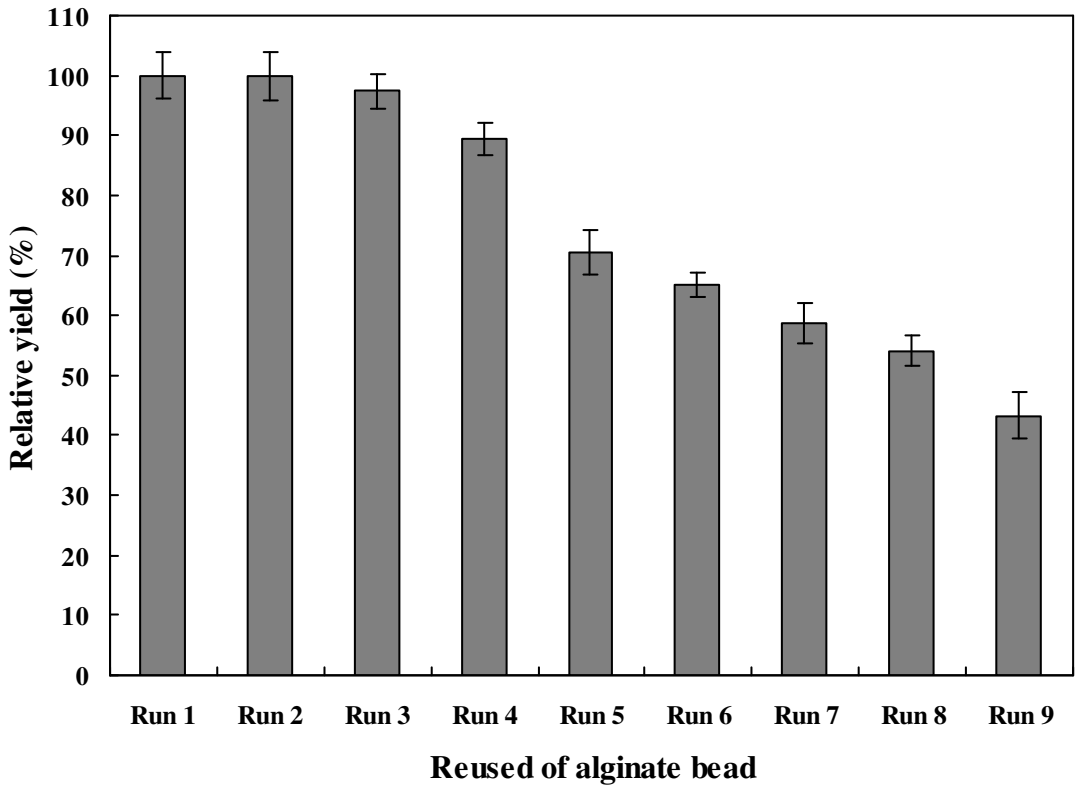
ภาพที่ 33 แสดงการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล คือไม่มีการเติมน้ำเพิ่มเข้าไปในระบบของปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส ใช้สัดส่วนโดยโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ 10:1 ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 150 beads ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม 10 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2-methyl-2-butanol เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองพบว่าสามารถนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตกลับมาใช้ซ้ำได้ถึง 8 ครั้ง โดยพิจารณาจากผลผลิตของโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ยังให้ผลผลิตสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตครั้งแรก ในการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในครั้งที่ 8 สามารถให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ 22.77 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 54.14 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในการผลิตครั้งแรก

Mojovic และคณะ (1993) พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP จาก *Rhizopus arrhizus* ที่ตรึงบนซีไลท์นำมาใช้ในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์ม เพื่อผลิตโกโก้บัตเตอร์สามารถนำมาใช้ได้ 4 ครั้ง และสูญเสียกิจกรรมไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

โสภา พรหมดวง (2543) สามารถใช้เอนไซม์ไลเปส LP จาก (*Chomobacterium viscosum*) ที่ตรึงบนแอคคูเรลมาใช้ซ้ำในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสได้ 3 ครั้ง โดยที่ยังเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ 0.18 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพยุง โดยผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 28 เปอร์เซ็นต์

Zorica และคณะ (2002) ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ด้วยอัลจิเนต โดยสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้มากกว่า 3 ครั้ง โดยที่ยังคงเหลือกิจกรรมการย่อยสลายอยู่ 83.3 เปอร์เซ็นต์

Keehon และคณะ (2005) ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ด้วยอัลจิเนตและหุ้มด้วยซิลิเคต โดยสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้มากกว่า 3 ครั้ง โดยที่ยังคงเหลือกิจกรรมการย่อยสลายอยู่ 87 เปอร์เซ็นต์




ภาพที่ 33 การนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในสภาวะของปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสที่เหมาะสม โดยที่ TAG คือ Triacylglycerol, FFA คือ Free fatty acid, DAG คือ Diacylglycerol และ MAG คือ Monoacylglycerol ในสภาวะที่ใช้น้ำมันปาล์มในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 10 เปอร์เซ็นต์ สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม 10:1 เอนไซม์ตรึงรูป 150 beads เขย่าที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (29-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

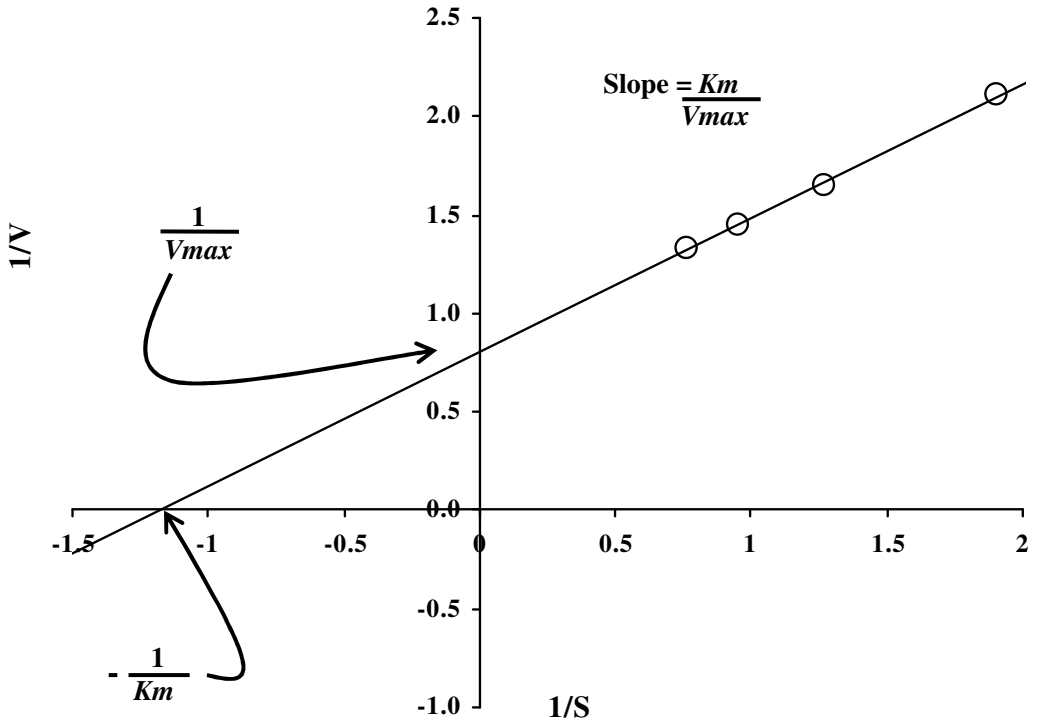
Figure33. Reusability of immobilized lipase in optimum glycerolysis reaction; TAG: Triacylglycerol, FFA: Free fatty acid, DAG: Diacylglycerol and MAG: Monoacylglycerol. The reaction contained 10 % of palm oil in 2-methyl-2-butanol and mole ratio of glycerol to palm oil at 10:1. The amount of immobilized lipase was 150 beads. The reaction was carried out at 500 rpm and room temperature (29-32 $^{O}$C) for 6 h.

**5. ศึกษาจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส**

ปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาถึงผลของกิจกรรมเอนไซม์ต่อความเข้มข้นของสับสเตรทคือค่า Michaelis-Menten constant ($K_m$) กับค่า maximum initial rate ($V_{max}$) ซึ่งได้มาจากการใช้วิธี double-reciprocal plot ค่า $K_m$ แสดงถึงสัมพรรคภาพต่อสับสเตรท (affinity) ของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ถ้าหากค่า $K_m$ ต่ำแสดงว่าเอนไซม์มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทสูง ส่วนค่า $V_{max}$ แสดงถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด ความแตกต่างทางด้านเคมีทางกายภาพหรือชนิดของสับสเตรท และความแตกต่างในด้านความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละแหล่งมีผลให้ค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของปฏิกิริยาแตกต่างกัน (Patel *et al*., 1995)

ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันในสารละลายอิมัลชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง พบว่า จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสับสเตรท (substrate inhibition) เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 3-5 น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากข้อจำกัดด้านการถ่ายโอนมวลสาร (mass transfer) ของสารต่างๆ ในปฏิกิริยา แต่ในปฏิกิริยาที่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือในระบบรีเวอร์สเฟสหากความเข้มข้นของสับสเตรทในปฏิกิริยาต่ำ เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายของเอนไซม์จะต่ำเนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์ถูกทำลายเมื่อสัมผัสโดยตรงกับตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทจะมีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์มากขึ้น เพราะบริเวณเร่งทั้งหมดของเอนไซม์จะจับกับสับสเตรท ทำให้สามารถป้องกันการถูกทำลายเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ และได้ผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรของถังปฏิกรณ์สูงขึ้น ( Patel *et al*., 1995)

ผลของการศึกษาจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสสำหรับน้ำมันปาล์มโอลีอีนและกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตโดยการนำอัตราการผลิตโมเอซิล-กลีเซอรอลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ของน้ำมันปาล์มที่ละลายในตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol (1.98-2.11 มิลลิโมลในสารละลายน้ำมัน 3.2 กรัม) มาวิเคราะห์หาค่าคงที่สำหรับเอนไซม์ ($K_m$) และค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ ($V_{max}$) โดยใช้วิธี Linewever-Burk plot จากภาพที่ 34 พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตจะให้ค่าคงที่สำหรับเอนไซม์คือ 0.85 มิลลิโมล และค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ต่อสับสเตรทคือ 1.25 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ในระบบของสารละลายน้ำมัน 3.2 กรัม




ภาพที่ 34 Lineweaver-Burk plot ของกระบวนการกลีเซอโรไลซีสด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

Figure 34. Lineweaver-Burk plot of glycerolysis reaction by immobilized lipase.

จากตารางที่ 18 แสดงให้เห็นว่าค่า $K_m$ และ $V_{max}$ จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ตัวพยุง สับสเตรท และสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ที่ได้สามารถนำไปใช้ในการเลือกใช้เอนไซม์และสับสเตรทในปฏิกิริยาที่เหมาะสมได้

ตารางที่ 18 แสดงค่า $V_{max}$ and $K_m$ ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

Table 18. Apparent $V_{max}$ and $K_m$ values for lipolytic reactions catalysed by immobilized lipase

| $V_{max}$ | $K_m$ | T (°C) | pH | Source of lipase | Support | Method of immobilization | Solvent or continuous phase | Subsrate | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.208-2.52* | 0.026-0.15''' | 25 | 9.0 | Pancreatic | SS | Cross-linking | W | TB | (Lieberman and Ollis, 1975) |
| 0.282* | 0.896''' | 25 | 9.0 | Pancreatic | PA | Covalent | W | TB | (Lieberman and Ollis, 1975) |
| n.a. | 2.5'' | 45 | 8.5 | Microbial | Agarose | Covalent | W | Olive oil | (Kilara, 1981) |
| n.a. | 2.5'' | 45 | 8.0 | Microbial | Agarose | Covalent | W | Butter oil | (Kilara, 1981) |
| 0.0434* | 2.5'' | 37 | 8.2 | Microbial | Agarose | Covalent | W | Olive oil | (Kilara *et al*., 1977) |
| 0.0306* | 6.0'' | 37 | 7.5 | Microbial | Agarose | Covalent | W | Butter oil | (Kilara *et al*., 1977) |
| 0.06476** | 141' | 35 | 7.0 | *Aspergillus niger* | PP | Adsorption | W | Butter oil | (Malcata *et al*., 1991) |
| n.a. | 20' | 35 | 7.5 | *Candida cylindracea* | Agarose | Covalent | W | Olive oil | (Tahoun, 1982) |
| n.a. | 50' | 35 | 7.5 | *C. cylindracea* | PA | Entrapment | W | Olive oil | (Tahoun, 1982) |
| 41.5*** | 0.043'' | 35 | 6.0 | *C. rugosa* | PEG | Entrapment | IO+10% W | Olive oil | (Kwon *et al*., 1987) |
| 62.5*** | 0.043'' | 35 | 6.0 | *C. rugosa* | PEG | Entrapment | IO+10% W | Olive oil | (Kwon *et al*., 1987) |
| 19.7-23.4*** | 1.6-3.9'' | 20-50 | n.a. | *Rhizopus arrhizus* | Mycelia | Cell binding | DIPE+0.07% W | Olive oil | (Bell *et al*., 1981) |
| 64.28-81.88*** | 9.2-13.2'' | 20-50 | n.a. | *R.arrhizus* | Mycelia | Cell binding | DIPE+0.17% W | Olive oil | (Bell *et al*., 1981) |
| 23.24-32.72*** | 4.4-6.9'' | 20-50 | n.a. | *R.arrhizus* | Mycelia | Cell binding | DIPE+0.37% W | Olive oil | (Bell *et al*., 1981) |
| 220* | 63.6' | 50 | 8.7 | *R. oryzae* | Alumina | Covalent | W | TB | (Neklyudov *et al*., 1981) |
| 160* | 2.62' | 50 | 8.7 | *R. oryzae* | Alumina | Covalent | W | TB+PVC | (Neklyudov *et al*., 1981) |
| n.a. | 0.50' | 35 | 8.5 | *Geotrichum candidum* | CMC | Covalent | W | Olive oil | (Kroll *et al*., 1980) |

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Table 18. (cont.)

| $V_{max}$ | $K_m$ | T ($^{o}$C) | pH | Source of lipase | Support | Method of immobilization | Solvent or continuous phase | Subsrate | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n.a. | 0.48’ | 35 | 8.5 | *G. candidum* | PABC | Covalent | W | Olive oil | (Kroll *et al*., 1980) |
| 0.6**** | 0.0266’’ | 37 | 7.0 | *Mucor javanicus* | DEAEC | Ion exchange | W | Olive oil | (Ogiso *et al*., 1972) |
| 182*** | 140’ | 30 | n.a. | *M. miehei* | Rasin | Ion exchange | Hexane | EB | (Welsh *et al*., 1990) |
| 58*** | 92’ | 30 | n.a. | *M. miehei* | Rasin | Ion exchange | Hexane | BB | (Welsh *et al*., 1990) |
| 3*** | 390’ | 30 | n.a. | *M. miehei* | Rasin | Ion exchange | Hexane | IA | (Welsh *et al*., 1990) |
| 32*** | 420’ | 30 | n.a. | *M. miehei* | Rasin | Ion exchange | Hexane | IB | (Welsh *et al*., 1990) |
| 430-1470*** | 2.6’’ | 37 | 5.5 | *Psudomonas* | MBBA | Entrapment | TMAC | SMPOE | (Karube *et al*., 1977) |

n.a.; not available

* µmol/(min mg $_{\text{immobilized protein}}$)

** µmol/(min $cm^2_{\text{support}}$)

*** µmol/(min g $_{\text{support}}$)

****µmol/(min ml $_{\text{support}}$)

’µmol/ml

” % w/v

”’ % v/v

BB: butyl butyrate

CMC: carboxymethylcellulose

DEAEC: DEAE-cellulose

DIPE: di-isopropyl ether

EB: ethyl butyrate

IA: isopentyl acetate

IB: isopentyl butyrate

IO: isooctane

MBBA: 4-methoxybenzilidene -4-n-butylaniline

PA: polyacrylamide

PABC: *p*-aminobenzylcellulose

PEG: polyethylene glycon

PP: polypropylene

PPG: polypropylene glycol

PVA: polyvinyl alcohol

SMPOE: sobitan monolaureate poly(oxyethylene)ether

SS: stainless steel

TB: tributyrin

TMAC: tetramethylammonium chloride, aqueous solution

W: water

ที่มา: Malcata และคณะ (1992)