บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

น้ำมันปาล์มโอลีอีน ชื่อทางการค้า "มรกต" ผลิตโดย บริษัทมรกตอินดัสตรี้ส์ จำกัด (มหาชน)

2. เอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผงคือ ไลเปส PS (*Pseudomonas* sp.) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Amano Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น

3. ตัวพยุง

- โซเดียมอัลจิเนต (Alginic acid sodium salt from brown algae) ผลิตโดย Fluka ประเทศญี่ปุ่น
- ซิลิเคต (Tetraethyl orthosilicate) ผลิตโดย Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน ปริมาณไตรเอซิล-กลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมัน เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ รายละเอียดในภาคผนวก ก

อุปกรณ์

- เครื่องกรองแบบสุญญากาศ ยี่ห้อ Tokyo Rikakikai รุ่น A-3S ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องเขย่า ยี่ห้อ GFL รุ่น 3005 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแยก ยี่ห้อ Centurion รุ่น Centurion 8000 ประเทศอังกฤษ
- เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Denver รุ่น 320 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000 ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500 ประเทศเยอรมัน
- เดสิเคเตอร์แบบสุญญากาศ ประเทศญี่ปุ่น
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350 ประเทศเยอรมัน

- Thin-Layer Chromatography/Frame Ionization Detection (TLC/FID) ยี่ห้อ Iatron รุ่น Iatroscan MK-5 ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องกวนแม่เหล็ก ยี่ห้อ Ika Labortechnik รุ่น RO 5 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องผสม (homoginizer) ยี่ห้อ Ika รุ่น T25 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องดูดแบบลูกกลิ้ง (peristaltic pump) ยี่ห้อ Chromatograph Atto รุ่น SJ-1211 ประเทศญี่ปุ่น

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

1.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สับสเตรทที่ใช้ คือ สารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มโอลีอีนที่ละลายในไอโซออกเทน 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส หรือสารละลายที่ได้จากการล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยา โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

1.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธี Cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยนำสารผสมในปฏิกิริยาจากข้อ 1.1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนมาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้นนำส่วนไอโซออกเทนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มมิติก

1.3 การคำนวนกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มมิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) พีเอช 7

1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อิสระ เพียงแต่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปแทนการใช้สารละลายเอนไซม์ โดยวิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล

การวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลดัดแปลงวิธีของ Rosu และคณะ (1997) สุ่มตัวอย่างก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส 5-10 มิลลิกรัม นำมาละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม 0.3 มิลลิลิตร เขย่าและปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 8,100 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอนไซม์ตรึงรูปออก ดูดส่วนใสข้างบนมาผสมกับน้ำ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปั่นเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 8,100 g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลออก ดูดส่วนล่างซึ่งเป็นส่วนของคลอโรฟอร์ม เก็บส่วนบนซึ่งเป็นน้ำสกัดอีก 2-3 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร นำไปทำให้เข้มข้นโดยผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที ก่อนการวิเคราะห์นำมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณ ไตรเอซิลกลีเซอรอล 1,3ไดเอซิลกลีเซอรอล 1,2ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระด้วย Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID analyzer) สำหรับขั้นตอนและสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer ดังแสดงในภาคผนวก ก

3. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (Replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s new Multiple - Range Test (DMRT)

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสกับโซเดียมอัลจิเนต

นำเอนไซม์ไลเปส PS ที่สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ มาศึกษาวิธีการและหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปกับโซเดียมอัลจิเนตดังนี้

ตรึงเอนไซม์ไลเปส PS ด้วยโซเดียมอัลจิเนต โดยดัดแปลงวิธีการของ Seema และคณะ (2002) เตรียมสารละลายไลเปสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ผสมเอนไซม์กับอัลจิเนต โดยใช้เอนไซม์ 2 มิลลิลิตร และโซเดียมอัลจิเนต 8 มิลลิลิตร หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 150 มิลลิลิตร ด้วย Syringe โดยใช้ความเร็วในการหยดคงที่ แล้วบ่มเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) 2 ครั้ง

วิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1 และคำนวณประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Immobilization yield) กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ (Recovery of activity)

ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Immobilization yield)(%)

$$= \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด} - \text{กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย} \times 100}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}}$$

กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ (%)

$$= \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์หลังตรึงรูป} \times 100}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์อิสระก่อนตรึง}}$$

1.1 ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตต่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

เตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองแบบ Factorial นำเอนไซม์ที่ตรึงได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะของเอนไซม์ และประสิทธิภาพการยึดเกาะ เลือกความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต และแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมเพื่อทำการทดลองต่อไป

1.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์สำหรับตรึงที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ตามความเข้มข้นข้อ 1.1 นำเอนไซม์ที่ตรึงได้มาวิเคราะห์

ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะของเอนไซม์ ประสิทธิภาพการยึดเกาะ เลือกความเข้มข้นของเอมไซม์ที่เหมาะสมเพื่อทำการทดลองต่อไป

1.3 ขนาดของเอนไซม์ตรึงรูป

ตรึงเอนไซม์ไลเปสที่สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 และ 1.2 โดยใช้ขนาดของรูของ Syringe คือ 18, 20 และ 24 gauge (ใช้ความเร็วในการหยดที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที) คัดเลือกขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป และประสิทธิภาพการยึดเกาะสูงสุด

2. การเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตเพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล

2.1 การใช้ตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol

ซึ่งเตรียมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 50 beads ทำปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในกลีเซอรอล 0.885 กรัม น้ำมันปาล์ม 1 กรัม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลของระบบที่เติมตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 2.2 กรัม กับระบบที่ไม่มีการเติมตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol

2.2 การเติมกลีเซอรอลในกระบวนการตรึงรูป

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ผสมกับอัลจิเนตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายเอนไซม์ตรึงรูปเท่ากับ 40 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) หยดสารละลายเอนไซม์ตรึงรูปลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มขนาดที่เหมาะสมจากข้อ 1.3 เปรียบเทียบปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ผลิตโดยเอนไซม์ตรึงรูปที่มีการเติมและไม่เติมกลีเซอรอล

2.3 การหุ้มเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยซิลิเคต (Silicate Coating) โดยดัดแปลงวิธีการของ Keehoon และคณะ (2004)

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ได้จากการตรึงที่สภาวะที่เหมาะสมในข้างต้นมาทำการหุ้มด้วยซิลิเคต โดยเติม Hexane ลงในเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 2 กรัม จนท่วม หลังจากนั้นเติมสารละลาย Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ข้ามคืน แยกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่หุ้มด้วยซิลิเคตออกด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส

นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ตรึงในสภาวะที่เหมาะสมข้างต้นมาศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

3.1 ผลของปริมาณน้ำในกลีเซอรอล

เตรียมเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูป 50 beads ทำปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในกลีเซอรอล 0.885 กรัม น้ำมันปาล์ม 1 กรัม เติมตัวทำละลาย 2-methyl-2-butanol 2.2 กรัม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เติมน้ำในกลีเซอรอลเท่ากับ 0, 4, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer คัดเลือกเอนไซม์ที่ให้ปริมาณโมโนเอซิกลีเซอรอลสูงสุด

3.2 ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ใช้ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 และใช้สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 4:1, 8:1, 10:1 และ 12:1 วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer คัดเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโมโนเอซิกลีเซอรอลสูงสุด

3.3 ผลของปริมาณเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ใช้ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มจากข้อ 3.2 และใช้ปริมาณของเอนไซม์ตรึงรูปที่ 50 100 150 และ 200 beads วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer คัดเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโมโนเอซิกลีเซอรอลสูงสุด

3.4 ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์ม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ใช้ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 ใช้สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มจากข้อ 3.2 และปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปจากข้อ 3.3 และใช้ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่ 10 20 30 40 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ในตัวทำละลาย วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer คัดเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโมโนเอซิกลีเซอรอลสูงสุด

3.5 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ใช้ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 ใช้สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มจากข้อ 3.2 ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปจากข้อ 3.3 และใช้ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มจากข้อ 3.4 และใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่อุณหภูมิห้อง 25 35 และ 45 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer คัดเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโมโนเอซิกลีเซอรอลสูงสุด

4. การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

ทำการทดลองผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยใช้ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในสภาวะที่เหมาะสม หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปครบ 6 ชั่วโมง แยกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปออกจากสารละลายมาล้างด้วย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเก็บไว้ใน Tris-HCl buffer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองต่อไป ทำซ้ำแบบนี้จนกว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดต่ำลงจากครั้งแรกของการทำปฏิกิริยา 50 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาในแต่ละครั้ง

5. ศึกษาจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกลีเซอโรไลซีส

ศึกษาผลของปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอลีอีนเริ่มต้นต่ออัตราการผลิตโมโน-เอซิลกลีเซอรอล และนำเอาจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องมาอธิบายความสัมพันธ์ โดยคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ที่แสดงถึงผลกระทบจากสภาวะต่างๆ ในการผลิต ดังนี้

สมการเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูป

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P + Q$$

โดยแสดงผลของความเข้มข้นสับสเตรทต่อปฏิกิริยาการย่อยสลาย ตามสมการของ Michaelis-Menten ได้ดังนี้

$$V_0 = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [S]}$$

[S]	คือ	ความเข้มข้นของสับสเตรท
E	คือ	เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป
ES	คือ	เอนไซม์จับกับสับสเตรท
P	คือ	ผลิตภัณฑ์
Q	คือ	กรดไขมัน
k_1, k_2, k_3	คือ	ค่าคงที่ของแต่ละปฏิกิริยาการย่อยสลาย
V_0	คือ	ความเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้น
V_{max}	คือ	ความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์
K_m	คือ	ค่าคงที่สำหรับเอนไซม์