การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

Hydrolysis of Palm Oil by Immobilized Lipase

วุฒิชัย พิชัยยุทธ์

Wuttichai Phichaiyut

เลขหมู่ QK898.E58 ว73 2540 ฉ.2
Order Key 29028
Bib Key 129782
21 ก.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2540

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ผู้เขียน นายวุฒิชัย พิชัยยุทธ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

ผู้เขียน นายวุฒิชัย พิชัยยุทธ์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2539

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปส (triacylglycerol ester hydrolase : EC 3.1.1.3) ทางการค้า 4 ชนิด จาก *Candida rugosa* (lipase OF), *Candida cylindracea*, *Pseudomonas* sp., และ *Pseudomonas* sp. (lipase PS) เพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีน พบว่าเอนไซม์ไลเปส OF จาก *Candida rugosa* มีค่ากิจกรรมจำเพาะในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงสุด (6,600 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) มีพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 7.5 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกตัวพยุงที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนตัวพยุง 4 ชนิด คือ แอคคูเรล ซีไลท์ ซิลิกาเจล และ ผงถ่าน พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงบน แอคคูเรลมีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์สูงสุด โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการตรึง 6 ชั่วโมง และ pretreatment แอคคูเรลด้วยเอทานอลก่อนการตรึงเอนไซม์ไลเปส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงได้มี กิจกรรมการยึดเกาะบนตัวพยุง 89 เปอร์เซนต์ โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพยุง มีอุณหภูมิและพีเอช ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเหมือนกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ โดยมีค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เท่ากับ 145 วัน

สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีน โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึง คือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณของเอนไซม์ 0.0125 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำมันปาล์ม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 20 เปอร์เซนต์ อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงถึง 92 เปอร์เซนต์ เมื่อย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชนิด Packed-Bed Column Reactor แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 82 เปอร์เซนต์ และสามารถนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ 12 ครั้ง จึงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งของ

กิจกรรมเริ่มต้น ส่วนแอคคูเรสที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 5 ครั้ง โดยให้กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงเท่ากับ 86 เปอร์เซนต์ และย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 92 เปอร์เซนต์

Thesis Title	Hydrolysis of Palm Oil by Immobilized Lipase
Author	Mr. Wuttichai Phichaiyut
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1996

ได้รับมอบ
2 1 ต.ค. 2539

Abstract

Four commercial lipases (triacylglycerol ester hydrolase : EC 3.1.1.3) from *Candida rugosa* (lipase OF), *Candida cylindracea*, *Pseudomonas* sp. (lipase PS) and *Pseudomonas* sp. were used for palm olein hydrolysis. Results indicated that lipase OF from *Candida rugosa* possessed the highest hydrolytic activity with specific lipase activity of 6,600 unit/mg protein. This enzyme had the optimum temperature and pH for hydrolytic activity on palm olein at 45 °C and 7.5, respectively. Immobilization of lipase OF by physical adsorption on accurel®, celite, silica gel and activated charcoal showed that the enzyme immobilized on accurel® had the highest binding activity. The optimal immobilization conditions were 0.1 mg / ml enzyme concentration, pH 7.5, 4 °C, 6 h of immobilization time and pretreatment of accurel® by ethanol before immobilization of lipase. Under these conditions, the immobilized enzyme retained 89 % of its original activity and 11,860 units/g accurel. The immobilized lipase had the same optimum temperature and pH as the free enzyme on hydrolysis of palm olein and had a half-life at 4 °C of 145 days.

Optimal conditions for hydrolysis of palm olein by immobilized lipase were observed in a reaction mixture containing 0.0125 g dry weight enzyme/g palm oil and 20 % (v/v) water at pH 7.5 and 45 °C after a reaction time of 24 h and a shaker speed of 300 rpm. The degree of hydrolysis was 92 %. In a packed bed reactor of immobilized lipase the degree of hydrolysis was 82 % after 24 h and the immobilized lipase lost 50 % of its activity after recycling 12 times. The used accurel® could be regenerated up to 5 times with 86 % binding activity and 92 % degree of hydrolysis.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โชคชัย วนภู กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร. ประภาพร อุทารพันธุ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนอุดหนุนในการทำวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ น้องๆ คุณมลฤดี สิทธิพันธุ์ และญาติๆ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนกำลังทรัพย์และกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

วุฒิชัย พิชัยยุทธ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบาญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	19
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	20
วัสดุ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการวิเคราะห์	21
วิธีการศึกษา	23
3 ผลและวิจารณ์	31
4 สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	77
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	82
ประวัติผู้เขียน	87

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม	4
2	ปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอีน	4
3	การตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบต่างๆ	17
4	การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ที่อุณหภูมิต่างๆ	45
5	ผลของระยะเวลาการไหลวนของน้ำมันปาล์มต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชนิด packed bed column reactor โดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง	64

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ชนิดของเอนไซม์ไลเปสตามแนวความคิดของMacrae (1983)	7
2	ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	9
3	การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์ตามวิธีของ Kennedy และ Cabral (1987)	10
4	ชุดถังปฏิกรณ์ชนิด Packed Bed Column Reactor และอุปกรณ์	30
5	ความสามารถของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่างๆ	32
6	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*	34
7	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*	35
8	ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*	37
9	ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*	38
10	การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* บนตัวพยุงชนิดต่างๆ	39
11	การ pretreatment ตัวพยุงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ	41
12	ผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*	43
13	ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* ต่อการตรึงเอนไซม์	44
14	ผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*	46
15	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	48
16	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	49
17	ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	51
18	ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	53
19	ความคงตัวในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	54
20	ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	56
21	ผลของพีเอชต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	57
22	ผลของปริมาณน้ำต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	59

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	60
24	ผลของระยะเวลาต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	62
25	ผลของอัตราเร็วของการเขย่าต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง	63
26	การนำเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงและแอคคูเรลกลับมาใช้ใหม่	66
ภาพภาคผนวก ก 1		78
ภาพภาคผนวก ก 2		80

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ตลอดระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา เป้าหมายการผลิตปาล์มน้ำมันของประเทศไทย มุ่งเน้นที่จะผลิตน้ำมันพืชให้เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ และลดการนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งในปัจจุบันการผลิตสามารถบรรลุเจตนารมณ์ที่วางไว้ อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันก็ยังคงประสบกับการไม่มีเสถียรภาพในส่วนของคุณภาพและราคา ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากอุตสาหกรรมนี้ยังขาดการวิจัยที่จะพัฒนาน้ำมันปาล์มไปสู่ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ นอกเหนือไปจากการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร น้ำมันปาล์มสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าเพิ่มโดยการใช้เทคโนโลยีทางด้านโอเลโอเคมี (oleochemistry) เช่น กรดไขมัน เมธิลเอสเทอร์ แฟตตี้แอลกอฮอล์ แฟตตี้เอมีน และกลีเซอรอล ซึ่งจำเป็นต้องใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายประเภท เช่น ยางรถยนต์ พลาสติก สิ่งทอ ยาและเครื่องสำอาง ผงซักฟอก และกระดาษ เป็นต้น ในปัจจุบันอุตสาหกรรมต่อเนื่องเหล่านี้กำลังอยู่ในภาวะขยายตัว ทำให้ประเทศผู้ประกอบการอุตสาหกรรมดังกล่าวมีการนำเข้าเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ ที่ประเทศไทยมีศักยภาพที่จะผลิตได้ปีหนึ่งๆ ไม่ต่ำกว่า 100 ล้านบาท (เทิดชัย วิรุฬพานิช, 2533) ซึ่งนับว่าเป็นโอกาสหรือช่องทางใหม่ที่น่าสนใจ อีกทั้งยังจะมีส่วนช่วยเกื้อหนุนให้อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีเสถียรภาพดียิ่งขึ้นด้วย

กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นเคมีภัณฑ์ที่มีการผลิตกันมากที่สุด เนื่องจากสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่กล่าวมาแล้วโดยได้จากการสกัดน้ำมันพืชและการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี ระยะแรกการผลิตในประเทศไทยใช้ไขมันวัว น้ำมันมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ แต่หลังจากปี 2523 มีการผลิตน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้น และสามารถกลั่นแยกส่วนได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด จึงทำให้มีการใช้น้ำมันปาล์มทดแทนในอุตสาหกรรมดังกล่าวมากขึ้น แต่กรดไขมันและกลีเซอรอลที่สกัดโดยกระบวนการทางเคมี จะมีสีเข้มและมีคุณภาพไม่ดี เนื่องจากต้องใช้สภาวะการสกัดที่อุณหภูมิสูงถึง 250 องศาเซลเซียส และใช้ความดัน 30 - 50 บรรยากาศ เป็นเวลานานถึง 2 ชั่วโมง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดต้องนำไปกลั่นใหม่เพื่อเอาสีและสิ่งเจือปนอื่นๆออก นอกจากนี้พบปัญหาที่เกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิสูง รวมทั้งกระบวนการในการสกัดต้องใช้พลังงานสูง จำเป็นต้องใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีความคงทนสูงซึ่งจะมีราคาสูงตามไปด้วย ทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มสูงขึ้น

การใช้เอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอล จะมีข้อดีว่าวิธีการสกัดทางเคมี เพราะการย่อยสลายโดยเอนไซม์สามารถเกิดขึ้นได้ที่ความดันบรรยากาศที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการน้อย แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระมีขีดจำกัดบางประการเช่น ความคงตัวของเอนไซม์ลดลง การใช้งานไม่ต่อเนื่องหรือใช้ได้ครั้งเดียว เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงในสารละลายของสับสเตรทและผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิและพีเอชของโปรตีนชนิดนั้น รวมทั้งเอนไซม์ที่ใช้มีปริมาณมาก จึงทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นด้วย

เพื่อแก้ปัญหาของการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ การควบคุมปฏิกิริยาทำได้แม่นยำกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ เพราะสามารถหยุดปฏิกิริยาได้ทันทีโดยเพียงแต่แยกเอาเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกมา มีความคล่องตัวในการผลิตคือสามารถใช้ได้ทั้งในการผลิตแบบกะหรือแบบต่อเนื่อง และสามารถปรับขนาดการผลิตให้เหมาะสมได้ตามต้องการ เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าเอนไซม์ที่อิสระ นอกจากนี้ยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้งทำให้ลดต้นทุนในการผลิตได้

การตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ การเพาะปลูกปาล์มน้ำมันมีมากในจังหวัดภาคใต้ของประเทศ เช่น ชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ สตูล และตรัง พันธุ์ที่ปลูกมากคือ *Elaeis guineensis* น้ำมันปาล์มจะมีส่วนประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน คุณภาพของดินบริเวณเพาะปลูก และภูมิอากาศ

น้ำมันจากปาล์มแบ่งได้เป็นสองชนิด คือ น้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ที่ได้จากส่วนเนื้อในเมล็ดปาล์ม และ น้ำมันปาล์ม (palm oil) ที่ได้จากส่วน mesocarp และเมื่อนำน้ำมันปาล์มไปแยกส่วนจะได้ส่วนที่เป็นของเหลวเรียกว่า ปาล์มโอเลอีน (palm olein) ซึ่งก็คือน้ำมันปาล์มที่ใช้กันทั่วไป ทั้งน้ำมันเมล็ดปาล์มและน้ำมันปาล์ม มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) จึงมีประโยชน์แตกต่างไปด้วย

น้ำมันจากผลปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ที่เหมาะสมในการนำไปทำผลิตภัณฑ์หลายอย่างในอุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ มีส่วนประกอบของกลีเซอไรด์โดยธรรมชาติที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) น้ำมันปาล์มมีจุดหลอมเหลวสูงไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ง่าย ไม่เหม็นหืนง่าย (สวนิต อ่อนรุ่งเรือง, 2535) อุตสาหกรรมอาหารที่ใช้น้ำมันปาล์ม ได้แก่ บะหมี่สำเร็จรูป นมข้นหวาน ขนมปัง ขนมขบเคี้ยว มาการีน ครีมเทียม รวมทั้งการใช้น้ำมันปาล์มในร้านอาหารที่มีการทอดทั้งหลาย เช่น พิซซ่า โดนัท ปาท่องโก๋ ฯลฯ ส่วนที่ไม่ได้ใช้ประกอบอาหารซึ่งน้อยกว่า 10 เปอร์เซนต์ ใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ และเทียนไข

2. กรดไขมัน

ในธรรมชาติกรดไขมันเกิดขึ้นในรูปที่เป็นองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์อยู่ในไขมันและน้ำมันที่พบในรูปของกรดไขมันอิสระมีน้อย

กรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) ที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำมันปาล์ม คือ กรดปาล์มิติก (palmitic) มีอยู่ 37.9 ถึง 47.7 เปอร์เซนต์ ซึ่งร่างกายจะเปลี่ยนกรดปาล์มิติกเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด monounsaturate คือ กรดปาล์มิโตเลอิก (palmitoleic) กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด monounsaturate ที่สำคัญคือ กรดโอเลอิก (oleic) 40.7 ถึง 43.9 เปอร์เซนต์ กรดไลโนลิอิก (linoleic) 10.4 ถึง 13.4 เปอร์เซนต์ กรดไลโนเลนิก (linolenic) 0.1 ถึง 0.6 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 2)

นอกจากส่วนที่เป็นกรดไขมันแล้วน้ำมันปาล์มยังมีส่วน unsaponifiable ซึ่งมีคาโรทีนอยด์ (carotenoid) และโทโคเฟอรอล (tocopherol) สูงด้วย ซึ่งเมื่อผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ แล้วปริมาณของคาโรทีนอยด์จะลดลง มีการศึกษาถึงวิธีการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อให้เกิดการสูญเสียส่วน unsaponifiable ให้น้อยที่สุด พบว่า ทั้งคาโรทีนอยด์ และ โทโคเฟอรอล จะอยู่ในส่วนของปาล์มโอเลอีน ซึ่งมีปริมาณของโทโคเฟอรอลประมาณ 800 ส่วนในล้านส่วน (Maclellan, 1983)

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม

คุณสมบัติ	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันเมล็ดปาล์ม
Iodine Value	43-59	14-20
Acid Value	15	20
Saponification Value	195-210	240-257
Unsaponification Matter (%)	1	1
Colour (Lovibone)	Y : 2.5R	10Y : 1R25
Total Saturated Fatty Acid (%)	48.05	78.82
Total Unsaturated Fatty Acid (%)	51.95	21.18

ที่มา: ไพจิตร จันทรวงศ์ (2530)

ตารางที่ 2 ปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอิน

กรดไขมัน	ปริมาณ (เปอร์เซนต์)
Lauric	0.1-1.1
Myristic	0.9-1.0
Palmitic	37.9-47.7
Stearic	4.0-4.8
Oleic	40.7-43.9
Linoleic	10.4-13.4
Linolenic	0.1-0.6

ที่มา: สวนิตร อ่อนรุ่งเรือง (2535)

3. กลีเซอไรด์

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) หรือไขมัน (neutral fat) เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 โมเลกุล เนื่องจากโมเลกุลของกลีเซอรอลมีตำแหน่งที่กรดไขมันจะเข้าไปเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) ได้ถึง 3 ตำแหน่ง ทำให้ได้ไตรเอซิล-กลีเซอรอลหลายชนิด ในธรรมชาติโมเลกุลของไขมันประกอบด้วยกรดไขมันชนิดเดียวกันทั้งหมดมีน้อยมาก ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันต่างชนิดกัน ทำให้มีไขมันต่างชนิดกันด้วย

โมโนและไดกลีเซอไรด์ เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุลตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนกลีเซอไรด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ และถ้าเป็นไดเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 1 หมู่ กลีเซอไรด์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะไม่พบในไขมันและน้ำมันพืชที่ได้จากธรรมชาติแต่จะพบในไขมันหรือน้ำมันที่เกิดการย่อยสลาย (hydrolysis) ที่ไม่สมบูรณ์

4. เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase, EC. 3.1.1.3, glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิด เช่น การย่อยสลาย การย้ายหมู่เอสเทอร์ (transesterification) (ซึ่งประกอบด้วย acidolysis alcoholysis ester-exchange และ aminolysis) และการสังเคราะห์หมู่เอสเทอร์ (synthesis of ester) เป็นต้น (Yamane, 1987) แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง ไลเปสจากตับอ่อน เป็นต้น

ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณสูงและมีความคงตัวดี จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Aspergillus niger* (Sugihara, *et al.*, 1988) *Pseudomonas fluorescens* (Kojima, *et al.*, 1994) *Candida rugosa* (Veeraragavan and Gibbs, 1989) เป็นต้น

เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมมากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร (Schwimmer, 1981) อุตสาหกรรมผงซักฟอก (Chaplin and Bucke, 1990) ยา (Kloosteman, *et al.*, 1988) เครื่องสำอาง (Macrae, 1983) เครื่องหนัง (Iwai and Tsujisaka, 1984 อ้างโดย Veeraragavan and Gibbs, 1989) และการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและบ้านเรือน (Okuda, *et al.*, 1991)

4.1 ชนิดของไลเปสจากจุลินทรีย์

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้คือ

กลุ่มที่หนึ่ง เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์พวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้น จะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบ ไดกลีเซอไรด์ และ โมโนกลีเซอไรด์ เป็นอินเตอร์มีเดียทในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea, Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

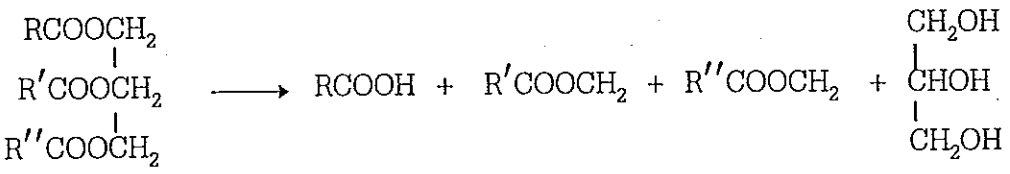
กลุ่มที่สอง เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เมื่อย่อยโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์จะได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดไขมัน 1, 2 (2, 3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ 1, 2 (2, 3) - ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ นั้นเป็นพวกที่ไม่คงตัว ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอ จะมีการเกิดการย้ายหมู่เอซิล ทำให้ได้ 1, 3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1 (3) โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และในพวก *Rhizopus* อีกหลายสายพันธุ์

กลุ่มที่สาม เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวก เช่น จาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ ที่กรดไขมันมี *cis* double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัว กับกรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่ไม่มี double bond ที่ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี (ภาพที่ 1)

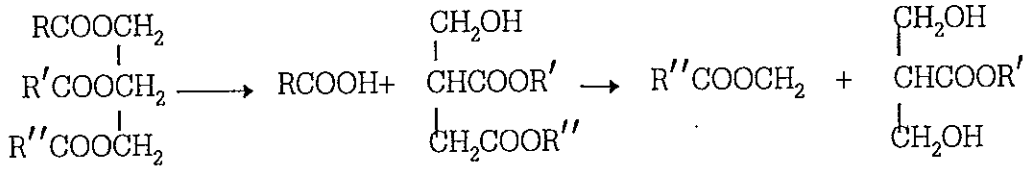
4.2 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ การย่อยสลาย การสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ ดังภาพที่ 2

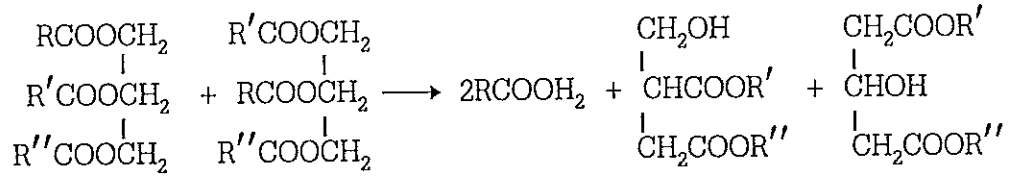
1. เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



2. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



3. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



ภาพที่ 1 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสตามแนวความคิดของ Macrae (1983)

ที่มา: Macrae (1983)

5. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำมัน

Brady และคณะ (1988) พบว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอคูเรล (accurel) ในการย่อยสลาย น้ำมันมะกอกในถังปฏิกรณ์ชนิด continuous stirred reactor สามารถผลิตกรดไขมันอิสระในรูปกรดโอเลอิกได้สูงถึง 1100 กิโลกรัมกรดไขมันต่อกิโลกรัมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

Morita และคณะ (1984) พบว่า การผลิตไตรกลีเซอไรด์ จาก 1,2 ไดกลีเซอไรด์และกรดไขมันอิสระเช่น ลัวริก (lauric) ปาล์มมิติก และสเตียริก (stearic) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มใน phosphatidylcholine ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย สามารถผลิตไตรกลีเซอไรด์ได้สูงสุดที่ พีเอช 5-9

Mojovic และคณะ (1994) พบว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus arrhisus* ที่ถูกตรึงบนซีไลท์ (celite) ในการเร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอสเทอร์ของน้ำมันปาล์มใน gas lift reactor สามารถผลิตกรดสเตียริกได้สูงถึง 7.28 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง

Kosuki และ Azuma (1994) พบว่าการผลิตไตรกลีเซอไรด์ จากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนอะคลีลิกเรซิน (acrylic resin) สามารถเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้มากถึง 95 เปอร์เซนต์ ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น ที่อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า

Gerald และ Yamane (1991) พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei* และ *Pennicillium camembertii* รวมกันในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของน้ำมัน จะผลิตไตรกลีเซอไรด์ 1,3 ไดกลีเซอไรด์ 1,2 ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และ กรดไขมัน ได้เท่ากับ 7.9 5.6 3.1 81.3 และ 2.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

Seong และ Ibrahim (1991) พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 มีการกวนในอัตราเร็ว 240 รอบต่อนาที และอัตราส่วนของน้ำมันปาล์มและน้ำเท่ากับ 70 ต่อ 30 สามารถผลิต 1,3 ไดกลีเซอไรด์ 1,2 (2,3) ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกรดไขมัน ได้เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง

1. Hydrolysis of ester

$$\text{R-COO-R'} + H_2O \rightarrow \text{R-COOH} + \text{HO-R'}$$

2. Synthesis of ester

$$\text{R-COOH} + \text{HO-R'} \rightarrow \text{R-COO-R'} + H_2O$$

3. Transesterification

3.1 Acidolysis

$$R_1\text{-COO-R'} + R_2\text{-COOH} \rightarrow R_2\text{-COO-R'} + R_1\text{-COOH}$$

3.2 Alcoholysis

$$\text{R-COO-}R_1\text{'} + \text{HO-}R'_2 \rightarrow \text{R-COO-}R_2\text{'} + \text{HO-}R'_1$$

3.3 Ester Exchange (Interesterification)

$$R_1\text{-COO-}R'_1 + R_2\text{-COO-}R'_2 \rightarrow R_1\text{-COO-}R'_2 + R_2\text{-COO-}R'_1$$

3.4 Aminolysis

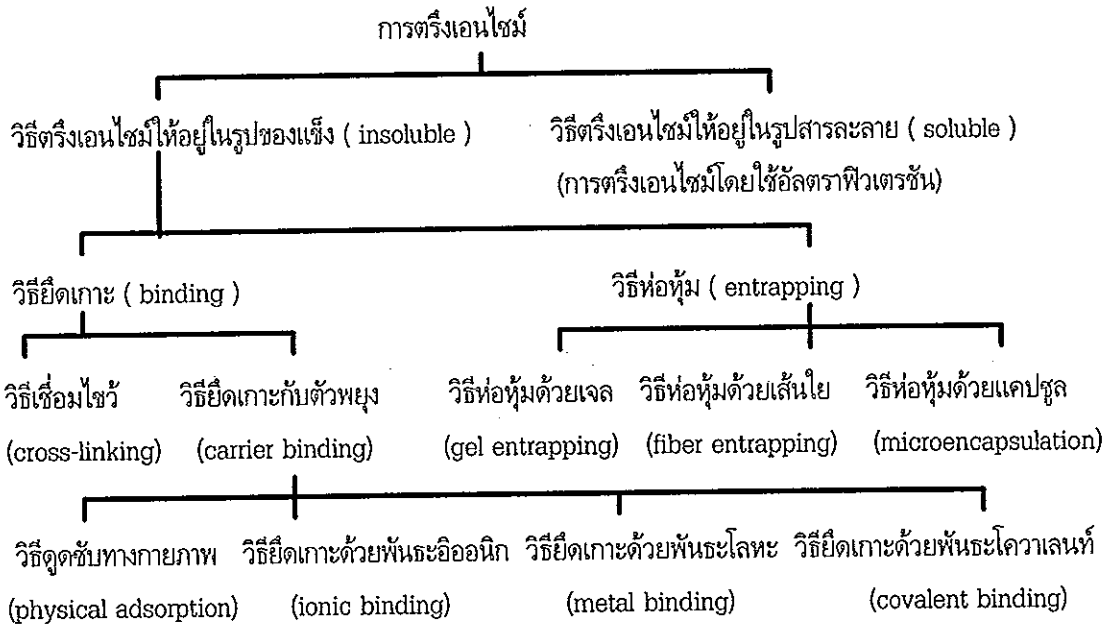
$$\text{R-COO-}R_1\text{'} + H_2N\text{-}R'_2 \rightarrow \text{R-CO-NH-}R_2\text{'} + \text{HO-}R_1$$

ภาพที่ 2 ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา: Yamane (1987)

6. การตรึงเอนไซม์

เอนไซม์ที่ถูกตรึง หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัดโดยที่เอนไซม์นั้นยังคงมีกิจกรรมอยู่ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้งและยังนำไปใช้ในระบบต่อเนื่อง การจัดแบ่งเอนไซม์ที่ถูกตรึง มีหลายแบบ โดยใช้วิธีของ Kennedy และ Cabral (1987) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์ตามวิธีของ Kennedy และ Cabral (1987)

ที่มา: Kennedy และ Cabral (1987)

6.1 วิธีการตรึงเอนไซม์

6.1.1 การเชื่อมไขว้ (Crosslinking Method)

การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเหมือนกับการสร้างพันธะโควาเลนท์ แต่ไม่ต้องใช้ตัวพยุงที่เป็นของแข็ง เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ได้โดยการสร้างพันธะเชื่อมไขว้ภายใน และระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์จับกันเป็นก้อนสามมิติ ซึ่งทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำ สารเชื่อมไขว้ที่ใช้จะมีกลุ่มฟังก์ชันตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งสารเชื่อมไขว้นี้จะจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ (Kennedy and Cabral, 1987) สารเชื่อมไขว้ได้แก่ อะลิฟาติกไดเอมีน (aliphatic diamines) ไดเมทิลอะดิพิเมท (dimethyladipimate) ไดเมทิลซับเบอริมิเดท (dimethyl suberimidate) และกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

ข้อดีของการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือสามารถใช้สารเชื่อมไขว้เพียงชนิดเดียวตรึงภายในขั้นตอนเดียวและปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้เกิดได้ง่าย ส่วนข้อบกพร่องนั้น คือ มีความยากในการเลือกใช้สภาวะที่ใช้และควบคุมปฏิกริยาการเชื่อมไขว้ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ขนาดของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำที่มีขนาดใหญ่และเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่สูง นอกจากนั้น เมื่อนำไปใช้งาน ยังเกิดปัญหาเรื่องการไหล เนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะมีลักษณะเป็นเจล (Kennedy and Cabral, 1987)

6.1.2 การยึดเกาะกับตัวพยุง (Support-Binding Method)

เป็นการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ เป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดและ สามารถแบ่งวิธีนี้ออกเป็น 4 แบบ คือ

6.1.2.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical-Adsorption Method)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้พันธะที่ใช้จะเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงวานเดอร์วาลล์ (VanderWaals force) และ hydrophobic interaction ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพยุงที่เป็นของแข็ง การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพยุงที่ใช้ตรึง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทิ้งไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกด้วยการเหวี่ยงหรือการกรอง (Kennedy and Cabral, 1987) ความสามารถในการดูดซับเอนไซม์บน ตัวพยุง ขึ้นอยู่กับพีเอช ธรรมชาติของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของอิออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์กับพาหะ และอุณหภูมิที่ใช้ นอกจากนี้ยังต้องอาศัยธรรมชาติของเอนไซม์และตัวพยุง เช่น พื้นที่ผิวของตัวพยุง อัตราส่วนของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกจับบนตัวพยุง และกิจกรรมของเอนไซม์หลังถูกจับ การควบคุมสภาวะต่างๆ เหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการตรึงเอนไซม์ได้ดี และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังคงมีอยู่สูง ปัจจัยหลักที่

มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพยุง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพยุง กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จนถึงจุดอิ่มตัว ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีก ก็ไม่ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงเพิ่มขึ้น (Bernath and Vankatasubramanian, 1986; Kennedy and Cabral, 1987)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ มีการเปลี่ยนโครงร่าง (conformation) ของโมเลกุลเอนไซม์หรือบริเวณแร่ง (active site) น้อยมาก การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ แรงที่ใช้เป็นแรงอ่อน ดังนั้นสามารถแยกเอนไซม์ออกจากตัวพยุงได้ โดยอาศัยสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อความแข็งแรงของแรงยึดระหว่างตัวพยุงกับโปรตีน ปัจจัยที่มีผลต่อแรงยึดได้แก่ พีเอช ความเข้มข้นของอิออนในสารละลาย และอุณหภูมิ ดังนั้นการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้ไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ เป็นพิเศษเพื่อที่จะให้มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์น้อยที่สุด

ตัวพยุงที่นิยมใช้ในวิธีนี้มี 2 ชนิด (Smith, 1985; Kierstan and Coughlan, 1991) คือ ตัวพยุงที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่ง ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose) ถ่านกัมมันต์ (actviated carbon) คอลลาเจล (collagen) ถ่าน (charcoal) คอนคานาวาลิน เอ (concanavalin A) เป็นต้น และตัวพยุงที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ DEAE-Sephadex อะลูมินา แก้ว ไฮดรอกซีลาพาไทท์ (hydroxylapatite) และ ซิลิกา เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถตรึงเอนไซม์โดยใช้ตัวพยุงที่มีสัมพรรคภาพ (affinity materials) ตัวพยุงเหล่านี้มีกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อการจับกับเอนไซม์ ซึ่งกลุ่มเหล่านี้จะจับกับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ เช่น concanavalin A-Sepharose ซึ่งประกอบด้วย concanavalin A จับกับ Sepharose 4B ด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ คอนคานาวาลินเอ เป็นโปรตีนเลคทิน (lectin) ซึ่งมีความสามารถในการทำปฏิกริยากับน้ำตาล ดี-แมนโนส ดี-กลูโคส และน้ำตาลอื่นๆ ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กัน คอนคานาวาลิน เอ มีประโยชน์ในการตรึงไกลโคโปรตีน หรือไกลโคเอนไซม์ เช่น อินเวอร์เทส (invertase) กลูโคอะมัยเลส (glucoseamylase) เซลโลไบเอส (cellobiase) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีน้ำตาลดังที่กล่าวแล้วเป็นองค์ประกอบ การตรึงเอนไซม์โดยใช้ตัวพยุงที่มีสารสัมพรรคภาพนี้จะมีความจำเพาะและไม่ทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไป ส่วนการจับที่อาศัย hydrophobic interaction ตัวพยุงที่ใช้จะมีส่วนที่ไม่มีขั้ว โดยเฉพาะกลุ่มที่เป็นอะโรมาติกซึ่งกลุ่มนี้จะมีความสามารถจับกับกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ คือ ทริปโตเฟน ไทโรซีน และไอโซลูซีน (Bernath and Vankatasubramanain, 1986) โดยอาศัย hydrophobic interaction

6.1.2.2 การตรึงด้วยพันธะอิออนิก (Ionic-Binding Method)

การตรึงเอนไซม์ด้วยแรงดึงดูดประจุเป็นวิธีที่ง่ายและมีใช้กันมานานการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้อาศัยหลักการดึงดูดประจุของเอนไซม์กับตัวพยุงที่มีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยน

อิออนได้ นอกจากนี้ยังมีแรงวานเดอร์วาลล์ ควบคู่ไปกับพันธะอิออนิก ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างการดูดซับทางกายภาพกับพันธะอิออนิกคือ ความแข็งแรงของพันธะที่ยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงซึ่งการจับกันด้วยพันธะอิออนิก มีความแข็งแรงกว่าแรงยึดจากการดูดซับทางกายภาพ นอกจากนี้รูปร่างของโมเลกุลของเอนไซม์ มีการเปลี่ยนแปลงไปน้อยมาก เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการตรึงไม่รุนแรงทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้มีกิจกรรมเหลืออยู่สูง (Kennedy and Cabral, 1987)

6.1.2.3 การตรึงด้วยพันธะโลหะ (Metal-Linking Method)

การตรึงด้วยวิธีนี้ใช้สารประกอบของโลหะทรานสิชัน ส่วนมากจะเป็นเกลือของโลหะไททาเนียม และเซอโคเนียม เนื่องจากออกไซด์ของโลหะเหล่านี้ไม่เป็นพิษ การตรึงนี้อาศัยหลักการคือใช้เกลือของโลหะทรานสิชันยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์และ ตัวพยุง ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีด้วยกัน 2 ขั้นตอน คือการกระตุ้นให้เกิดการจับกันของโลหะทรานสิชันกับตัวพยุง และการนำตัวพยุงที่มีลิแกนด์ของโลหะทรานสิชันจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ (Kierstan and Coughlan, 1991)

6.1.2.4 การตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent-Binding Method)

การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เป็นการตรึงเอนไซม์โดยมีการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ทำได้ยากกว่าวิธีอื่นๆ เนื่องจากปฏิกิริยาค่อนข้างซับซ้อนและรุนแรง การจับกันนี้อาศัยโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีนที่มีต่อตัวพยุง

6.1.3 การตรึงด้วยวิธีห่อหุ้ม (Entrapment Method)

เป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ภายในช่องว่างของตาข่ายโพลีเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเยื่อบางๆ ที่ยอมให้มีสารบางตัวผ่านเข้าออกได้ (semipermeable membrane) โดยจะยอมให้มีการแพร่เข้าออกของโมเลกุลสับสเตรทและผลิตภัณฑ์

6.1.3.1 การห่อหุ้มภายในเจล (Gel entrapment Method)

เป็นวิธีการที่ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปอยู่ในช่องตาข่ายของโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตาข่ายโพลิเมอร์นี้เตรียมได้จากสารเริ่มต้น (precursor) ที่เป็น โมโนเมอร์ โอลิโกเมอร์ หรือโพลีเมอร์ แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลาย ด้วยการเปลี่ยนตัวแปรของการละลาย ซึ่งได้แก่ ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออน และพีเอช เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้

6.1.3.2 การห่อหุ้มด้วยเส้นใย (Fiber-entrapment Method)

เป็นการตรึงเอนไซม์ไว้ในโพรงขนาดเล็กของเส้นใยสังเคราะห์ซึ่งทำได้โดยละลายโพลีเมอร์ที่ใช้ทำเป็นเจลที่นิยมใช้คือ เซลลูโลสไตรอะซีเตท (cellulose triacetate) ในตัวทำละลาย

อินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ (คลอโรฟอร์ม เมทิลีนคลอไรด์ คาร์บอนเตตราคลอไรด์) แล้วผสมสารละลายเอนไซม์ลงไปนำอีมัลชันที่ได้นี้ผ่านเครื่อง extruder ลงในของเหลวที่ทำให้อิมัลชันเกิดการจับตัวกันเป็นของแข็ง ซึ่งของเหลวที่ใช้ตกตะกอนนี้มักเป็น โทลูอีน หรือปิโตรเลียมอีเธอร์ วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ เส้นใยที่ได้สามารถทนกรดอ่อนและด่างอ่อนได้ ทนต่อความเข้มข้นของอิออนสูงๆ และตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็มีข้อบกพร่องคือ สับสเตรทที่มีโมเลกุลเล็กๆ เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปได้ เนื่องจากการตรึงทำให้เกิดการปิดกั้นการเข้าออก นอกจากนั้นเอนไซม์อาจถูกทำลายด้วย ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของโพลีเมอร์ และสารที่ใช้ตกตะกอน

6.1.3.3 การตรึงด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (Microencapsulation)

เป็นการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็กที่เตรียมได้จากโพลีเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์ซึ่งโพลีเมอร์นี้จะมีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ที่สามารถปล่อยให้สับสเตรทและผลิตภัณฑ์ผ่านได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อให้สับสเตรทสัมผัสกับเอนไซม์ได้ และสามารถตรึงเอนไซม์ได้หลายชนิดพร้อมๆ กันในขั้นตอนเดียว โดยไม่จำกัดว่าเอนไซม์นั้นจะผ่านการตรึงด้วยการใช้วิธีอื่นมาก่อนหรือไม่ ข้อบกพร่องของวิธีนี้คือ ไม่สามารถใช้สำหรับกรณีที่ใช้สับสเตรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึง และเอนไซม์อาจเข้าไปอยู่ในผนังของเยื่อโพลีเมอร์ได้

6.1.4 การตรึงโดยใช้อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

โดยทั่วไปวิธีนี้นิยมใช้เมื่อสับสเตรทของเอนไซม์เป็นของแข็ง เนื่องจากสารละลายเอนไซม์มีความสามารถในการเข้าไปจับกับสับสเตรทได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวพยุงที่เป็นของแข็ง การใช้วิธีนี้สามารถเลือกใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนต่างๆ กัน เพื่อให้เมมเบรนกักเอนไซม์และสับสเตรทอยู่ภายในและยอมให้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าผ่านออกจากกระบวนการได้ ข้อเสียของวิธีนี้คือ เอนไซม์จะเกาะบนผิวของเมมเบรนทำให้เกิด concentration polarization ซึ่งจะส่งผลให้สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์และลดอัตราเร็วของการไหลผ่านเมมเบรน ซึ่งบางครั้งสามารถลดปัญหาดังกล่าวนี้ได้โดยการเพิ่มการกวน หุ้มแผ่นเมมเบรนด้วยโปรตีน และใช้แผ่นเมมเบรนที่ยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ผ่านได้ (Bernath and Venkatasubramanian, 1986)

6.2 ตัวพยุงสำหรับการตรึงเอนไซม์

องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ ตัวพยุงและวิธีการที่ใช้ในการทำให้เอนไซม์ถูกจับด้วยตัวพยุง ตัวพยุงนี้เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในกระบวนการตรึงเอนไซม์การเลือกชนิดของตัวพยุงที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกตรึง อย่างไรก็ตาม

ไม่มีตัวพยุงชนิดไหนที่สามารถนำมาใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกวิธี โดยที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงสูง ลักษณะของตัวพยุงที่ดี โดยทั่วไปควรมีลักษณะดังนี้ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้ในการยึดเกาะ มีความสามารถในการยอมให้สารซึมผ่านได้ มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic character) มีความคงตัวต่อสารเคมี แรงกล (mechanic) และความร้อน มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์ และสามารถนำมาใช้ใหม่ได้

6.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถนำมาตรึงโดยวิธีการตรึงแบบต่างๆ ได้หลายวิธี (ตารางที่ 3) ขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ จึงอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีความแตกต่างกันไป จากรายงานการวิจัยถึงวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่นิยมทำกันมากและมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง มีดังนี้

Miller และคณะ (1990) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* ด้วยพันธะโควาเลนท์บนเม็ดแก้วขนาดเล็ก เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงสามารถทำปฏิกิริยาและมีความคงตัวดีกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระมากกว่า 2 เท่า

Huang และ Ju (1994) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* ด้วยวิธีการดูดซับบนแอคคูเรล พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ผ่านการทำให้แห้งสามารถทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสที่มีความชื้นมากกว่า นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่เก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะมีความเสถียรน้อยกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระถึง 3 เท่า

Malcata และคณะ (1991) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ด้วยวิธีดูดซับบนแผ่นเมมเบรนที่ทำจากแอคคูเรล เพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายไขมันเนยในถังปฏิกรณ์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงคือ 7.0 และมีค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเท่ากับ 20 วัน

Malcata และคณะ (1993) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger* ด้วยวิธีการดูดซับในท่อเล็กๆ ที่ทำจากแอคคูเรล เพื่อใช้ในการย่อยสลายไขมันเนย พบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงคือ 7.0 และ 40 องศาเซลเซียสตามลำดับ

Seong และ Ibrahim (1991) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida cylindracea* ด้วยวิธีการห่อหุ้มภายในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

พบว่า การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีค่าสูงสุด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยใช้ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเท่ากับ 30 เปอร์เซนต์

Belafi-Bako และคณะ (1994) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ด้วยวิธีดูดซับบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท พบว่า สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกในสภาวะการย่อยอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 50 ชั่วโมง ได้สูงถึง 85 เปอร์เซนต์

Virto และคณะ (1995) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ด้วยวิธีดูดซับบนแอคคูเรล เพื่อใช้ในการย่อยสลายไขมันจากสัตว์ พบว่า คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสภายหลังการตรึงยังคงมีคุณสมบัติเหมือนกันกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ

Hayashi และ Ikada (1990) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ด้วยพันธะโควาเลนท์บนเม็ด polyacrolein ในสภาวะที่มีและไม่มี oligoglycines ซึ่งใช้เป็นตัวช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว พบว่า การใช้ oligoglycines ในการเพิ่มพื้นที่ผิวของตัวพยุงจะส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสมีค่ากิจกรรมจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากมีพื้นที่ผิวให้เอนไซม์และตัวพยุงยึดเกาะได้มากขึ้น

Kosugi และคณะ (1992) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ด้วยวิธีการตรึงด้วยพันธะอิออนิกประจุบนเรซินโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมไขว้โมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสให้เกิดเป็นโครงสร้าง 3 มิติ เพื่อนำไปใช้ในการย่อยสลายไขมันวัว พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงสามารถย่อยสลายไขมันวัวได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทสูงๆ

Dimitriu และคณะ (1995) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสุกรในเม็ดเจลที่เตรียมจากไคโตแซน (chitosan) และแซนแทน (xanthan) พบว่า การตรึงเอนไซม์สามารถให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงถึง 95 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกในตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูงกว่าเอนไซม์อิสระ

ตารางที่ 3 การตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบต่าง ๆ

วิธีการตรึงเอนไซม์	ตัวพยุง	ปฏิกิริยาที่นำไปใช้	เอกสารอ้างอิง
การดูดซับ	อะคลีลิคเรซิน (acrylic resin)	เอสเทอริฟิเคชัน	Kosuki and Azuma, 1994
การดูดซับ	แอคคูเร่ล	การย่อยสลาย	Virto, *et al.*, 1994
การดูดซับ	ท่อที่ทำจากแอคคูเร่ล	การย่อยสลาย	Malcata, *et al.*, 1993
การดูดซับ	แอคคูเรล	การย่อยสลาย	Huang and Ju, 1994
การใช้แรงดึงดูดประจุ	ซีไลท์	การย้ายหมู่เอสเทอร์	Mustranta, *et al.*, 1993
การใช้แรงดึงดูดประจุ	เซฟาเดก (sephadex)	การย่อยสลาย	Yang and Rhee, 1992
การห่อหุ้ม	แคลเซียมอัลจิเนต	การย่อยสลาย	Seong and Ibrahim, 1991
การห่อหุ้ม	โพลีอิออนิคไฮโดรเจล (polyionic hydrogel)	การย่อยสลาย	Dimitriu, *et al.*, 1995
การเชื่อมไขว้	เม็ดแก้ว	การย่อยสลาย	Kuncova, *et al.*, 1994

6.4 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเพื่อแก้ปัญหาที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระทั้งในแง่ของการลดต้นทุนในการผลิต การเพิ่มประสิทธิภาพและความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ รวมถึงความสะดวกในการใช้งานและการนำเอาเอนไซม์ที่ถูกตรึงและตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่ สามารถที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวอันเกิดจากเอนไซม์ไลเปสอิสระได้ การนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกกตรึงไปใช้ประโยชน์ในระบบอุตสาหกรรมต่างๆ หรือใช้ในการวิจัยก็มีลักษณะของจุดหมายในการใช้ในปฏิกิริยาต่างๆ เช่นเดียวกันกับการใช้เอนไซม์อิสระ ทั้งในระบบอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอางค์ และเคมีภัณฑ์ สามารถที่จะใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงแทนเอนไซม์ไลเปสอิสระได้ทั้งสิ้น ตัวอย่างของการนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเพื่อใช้ทดแทนเอนไซม์ไลเปสอิสระในระบบอุตสาหกรรมเช่น

Mojovic และคณะ (1993) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* เพื่อใช้ในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่น ในการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มซึ่งมีราคาต่ำให้เป็น cocoa butter-like fats ที่มีราคาสูงกว่าเพื่อใช้ทดแทน cocoa butter ในอุตสาหกรรมอาหาร

Bjrkling และคณะ (1991) รายงานถึงการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจากเชื้อรา *Mucor meihei* ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ดี เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้บน anion-exchange resin พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงไม่สูญเสียประสิทธิภาพในการทำงาน และสามารถใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงนี้ในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยใช้ปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอสเทอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นานกว่า 1800 ชั่วโมง

นอกจากนี้แล้วยังมีแนวโน้มที่จะนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษมากขึ้นแทนที่การใช้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และลิกนินเนส (ligninase) เพียงอย่างเดียว ซึ่งขั้นตอนของการใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยในการทำความสะอาดส่วน drying cylinders และระบบปั๊มและท่อต่างๆ ซึ่งจะส่งผลให้การผลิตเยื่อกระดาษมีคุณภาพเพิ่มสูงขึ้น และเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทำความสะอาดก็สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง รวมถึงการลดการใช้กรด-ด่างเข้มข้นในการทำความสะอาด (นิยม กำลังดี, 2539)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีดูดซับทางกายภาพและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง
2. เพื่อศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม
3. เพื่อศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ผ่านการใช้ในกระบวนการกลับมาใช้ใหม่

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

น้ำมันปาล์มโอเลอีน ชื่อทางการค้า " แวว " ผลิตโดย บริษัท ยูไนเต็ด แฟต แอน ออยล์ จำกัด

2. เอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสชนิดผง 4 ชนิด จาก *Pseudomonas* sp. (Sigma ; code L 9518) *Candida cylindracea* (Sigma ; code L 8525) *Candida rugosa* (lipase OF) (Meito Sangyo, Japan) *Pseudomonas* sp. (lipase PS) (Amano Seiyaku, Japan)

3. ตัวพยุง

ตัวพยุง 4 ชนิดที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ คือ

ซีไลท์ (Celite 545 ขนาด 200 ไมโครเมตร ผลิตโดย Wako Pure Chemical Ltd., Japan)

แอคคูเรล (Accurel หรือ Polypropylene powder EP-100 ขนาด 200 ไมโครเมตร ผลิตโดย Enka AG Obernburg, Germany)

ซิลิกาเจล 60 (Silica gel 60 ขนาด 200 ไมโครเมตร ผลิตโดย Merck)

ผงถ่าน (Activated charcoal ผลิตโดย Fluka Chemical)

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน ค่ากรด (acid value) ค่าสปอนิฟิเคชัน (saponification) ปริมาณกรดไขมันอิสระ รายละเอียดดูในภาคผนวก ก

อุปกรณ์

เครื่องกรองสุญญากาศ รุ่น A-3S ของ Tokyo Rikakikai Co., Ltd.

เครื่องปั่นผสม (Homoginizer) รุ่น AM-8 ของ Nihonseiki Kaisha Co., Ltd.
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 3525-ICC ของ Lab-Line Co., Ltd.
เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20B ของ Hitachi Koki Co., Ltd.
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น W350 ของ Memmert
สเปกโตรโฟโตมีเตอร์ รุ่น U - 2000 ของ Hitachi Koki Co., Ltd.

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระดัดแปลงจากวิธีของ Seong และ Ibrahim (1991)

1.1 สับสเตรทที่ใช้คือ สารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มโอเลอีน สารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) ความเข้มข้น2 เปอร์เซนต์(ภาคผนวกข)และน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 10 ต่อ 45 ต่อ 45 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นผสมที่ความเร็วเท่ากับ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.2 วิธีการวิเคราะห์ ใช้สับสเตรทปริมาตร 2 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์) 2 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ไลเปส หรือสารละลายที่ได้จากการล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจะหยุดปฏิกิริยา โดยการเติมสารผสมระหว่างอะซีโตนและเอทานอล (อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งเตรียมเฉพาะก่อนใช้) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์จากนั้นเติม สารละลายฟีนอฟทาลีน (1 เปอร์เซนต์) จำนวน 3 หยด แล้วนำไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.05 โมลาร์) ส่วน blank ทำโดยเติมสารผสมระหว่าง อะซีโตนและเอทานอลก่อนเติมสารละลายเอนไซม์

1.3 การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

$$\text{หน่วยของเอนไซม์} = \frac{(M - Mo)}{\text{ความชัน}}$$

โดย

M = จำนวนโมลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง ซึ่งคำนวณได้จากปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่างคูณกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

Mo = จำนวนโมลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ blank ซึ่งคำนวณได้จากปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรทกับblankคูณกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

ความชัน = ความชันของกราฟมาตรฐานของกรดไขมันในรูปกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ก)

2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง ดัดแปลงจากวิธีของ Kosuki และคณะ (1990)

2.1 สับสเตรทที่ใช้คือ สารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มโอลิอิน สารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ และน้ำกลั่น เตรียมได้เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1.1

2.2 วิธีการวิเคราะห์ ชั่งเอนไซม์ที่ถูกตรึงหนัก 0.05 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีสับสเตรทปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแยกเอาเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงออกจากปฏิกิริยาโดยใช้การกรองผ่านแผ่นกรองโลหะขนาดช่อง 100 mesh แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยสารผสมระหว่างอะซิโตนและเอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.05 โมลาร์) ใช้สารละลายฟีนอฟทาลีน (1 เปอร์เซนต์) เป็นอินดิเคเตอร์

2.3 การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์เช่นเดียวกับการคำนวณในข้อ 1.3

3 การวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยการนำสารผสมที่ได้หลังจากการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ไปวิเคราะห์หาค่ากรด และ ค่าสปอนิฟิเคชัน ตามวิธีการของ IUPAC (1979) (ภาคผนวก ก) และคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มจากสูตร

เปอร์เซนต์การย่อยสลาย = $\frac{\text{ค่ากรด}}{\text{ค่าสปอนิฟิเคชัน}}$ x 100

4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

วิธีการศึกษา

ในขั้นตอนของการศึกษาจะวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) โดยกำหนดจำนวนซ้ำ (replication) 3 ซ้ำ ทำการทดลอง 2 ครั้ง และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple-range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ IRRISTAT Version 90-1

1. การคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปสและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่คัดเลือกได้

ในการทดลองใช้เอนไซม์ 4 ชนิดคือ เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. , *Candida cylindracea* , lipase OF และ lipase PS เตรียมสารละลายเอนไซม์ โดยละลายเอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิด 10 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน คำนวณเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ คัดเลือกเอนไซม์ที่มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุด

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ดังนี้

1.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 35, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

1.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่คัดเลือกได้โดยใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์) พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์) พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0

และ Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (0.2 โมลาร์) พีเอช 8.5 โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ข้อ 1.1) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์

1.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้บ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 35, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเอนไซม์ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ คำนวณกิจกรรมที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

1.4 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ ละลายในบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0 และ 8.5 (ตามที่ระบุไว้ในข้อ 1.2) บ่มเป็นเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 1.1) เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม คำนวณกิจกรรมที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

2. การคัดเลือกชนิดของตัวพยุงที่ใช้ตรึงเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 1) ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนตัวพยุง 4 ชนิดคือ ซีไลท์ แอคคูเรล ซิลิกาเจล และผงถ่าน โดยคัดเลือกตัวพยุงที่มีกิจกรรมการยึดเกาะ (binding activity) ของเอนไซม์บนตัวพยุงและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงสูงสุด มีวิธีการศึกษาดังนี้

ละลายเอนไซม์ น้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 1.2) 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปสที่เตรียมได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2,640 ยูนิต) ผสมกับตัวพยุงแต่ละชนิด 200 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนผสมที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ ล้างตัวพยุงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้และนำไปวัดปริมาตร และวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน ชั่งน้ำหนักตัวพยุงที่ผ่านการตรึงเอนไซม์แล้วทั้งหมด หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตัวพยุงที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ทั้งหมด วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม คำนวณเป็นกิจกรรมการยึดเกาะ เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงบนตัวพยุงจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขวดแก้วปิดสนิท ก่อนนำไปใช้ (ดัดแปลงจาก Montero และคณะ, 1993)

$$\text{กิจกรรมการยึดเกาะ} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่เติม}} \times 100$$

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพยุงที่คัดเลือกได้

ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนตัวพยุงที่คัดเลือกได้ เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีค่ากิจกรรมการยึดเกาะสูง ซึ่งจะส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีกิจกรรมสูงด้วยเช่นกัน ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

3.1 ผลของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการ pretreatment ตัวพยุงก่อนการตรึง

ทำการ pretreatment ตัวพยุงก่อนใช้ตรึงเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ อะซิโตน เมทานอล และ เอทานอล โดยการพรมตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ทั่วผิวของตัวพยุงที่มีน้ำหนักเท่ากับ 200 มิลลิกรัม นำส่วนผสมทั้งหมดไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ เติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนผสมที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ ล้างตัวพยุงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้นำไปวัดปริมาตร และวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน ชั่งน้ำหนักตัวพยุงที่ผ่านการตรึงเอนไซม์แล้วทั้งหมด หลังจากนั้นนำไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตัวพยุงที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ทั้งหมด วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยใช้อุณหภูมิและพีเอช ที่เหมาะสม และคำนวณเป็นกิจกรรมการยึดเกาะ (ดัดแปลงจาก Virto และคณะ, 1994)

3.2 ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ตามวิธีการตรึงข้อ 2 และใช้ตัวพยุงที่ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม (จากข้อ 3.1) โดยใช้ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์เท่ากับ 1, 6, 12, และ 24 ชั่วโมง นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ตามวิธีการตรึงข้อ 2 โดยใช้ตัวพยุงที่ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (จากข้อ 3.1) ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2) และความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.4 พีเอชในการตรึงเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ตามวิธีการตรึงข้อ 3.1 โดยใช้โดยใช้ตัวพยุงที่ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (จากข้อ 3.1) ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2) ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3) และให้พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายเอนไซม์เท่ากับ 4.5 และ 5.5 จากสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และพีเอชเท่ากับ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 จากสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และ พีเอช 8.5 จาก Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.5 อุณหภูมิในการตรึงเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ตามวิธีการตรึงข้อ 2 โดยใช้ตัวพยุงที่ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (จากข้อ 3.1) ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม (จากข้อ 3.2) และความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสม (จากข้อ 3.3) พีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 3.4) และอุณหภูมิ 4, 25 และ 30 องศาเซลเซียส นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. คุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

4.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามสภาวะที่เหมาะสม จากข้อ 3 (มีกิจกรรมเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพยุง) มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ แต่ใช้อุณหภูมิในการวิเคราะห์กิจกรรมที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์

4.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (จากข้อ 3) มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ แต่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 ในการวิเคราะห์โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (ข้อ 4.1) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์

4.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (จากข้อ 3) 0.05 กรัม เติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 4.2) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องและ

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ นำเอนไซม์ไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 ชั่วโมง วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และคำนวณเป็นกิจกรรมที่เหลืออยู่ ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์จะใช้พีเอชและอุณหภูมิ ในการวิเคราะห์จากข้อ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

4.4 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (จากข้อ 3) 0.05 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (ข้อ 4.1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงและทำให้แห้งเช่นเดียวกับข้อ 4.3 วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และคำนวณเป็นกิจกรรมที่เหลืออยู่

4.5 ความคงตัวในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึง

ศึกษาอายุการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในขวดแก้วที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเอนไซม์ทุกๆ 5 วัน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง พิจารณาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงลดลงจากเดิม 50 เปอร์เซนต์

5 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ประกอบด้วยสารผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (จากข้อ 4) กับน้ำมันปาล์มโอเลอีนในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 10 มิลลิลิตร และเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง 0.03 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองแยกเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยแผ่นกรองโลหะขนาด 100 mesh แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารผสมระหว่างอะซีโตนและเอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ล้างเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยไอโซออกเทน สารละลายบัฟเฟอร์ และน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในการทดลองชุดควบคุมใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตรแทนเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงด้วยปริมาณที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากัน

(366 ยูนิต)และใช้บัฟเฟอร์แทนเอนไซม์ คัดเลือกระดับอุณหภูมิที่ให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุด

5.2 ผลของพีเอชต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 5.1 แต่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ โดยใช้สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.5 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 5.1)

5.3 ผลของน้ำต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 5.1 แต่จะใช้อัตราส่วนของสารผสมระหว่างน้ำมันปาล์ม และสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 5.2) เท่ากับ 95 ต่อ 5, 90 ต่อ 10, 85 ต่อ 15, 80 ต่อ 20, 75 ต่อ 25 และ 70 ต่อ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) คัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสม ชุดควบคุมใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระความเข้มข้น 0.56, 0.28, 0.18, 0.14, 0.11, และ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ

5.4 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้อุณหภูมิ พีเอช อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มและสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (จากข้อ 5.3) และใช้ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเท่ากับ 0, 0.035, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 กรัม คัดเลือกปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่เหมาะสม ชุดควบคุมใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระความเข้มข้น 0.16, 0.23, 0.45, 0.68, 0.89 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

5.5 ผลของระยะเวลาต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้อุณหภูมิ พีเอช อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มและสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และใช้ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (จากข้อ 5.4) ใช้ระยะเวลาในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาและวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

5.6 ผลของอัตราเร็วของการเขย่าต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้อุณหภูมิ พีเอช อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มและสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ใช้ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และระยะเวลาในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (จากข้อ 5.5) โดยใช้อัตราเร็วของเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ความเร็วเท่ากับ 150 , 200, 250, 300 และ 350 รอบต่อนาที ในเวลาที่เหมาะสม คัดเลือกอัตราเร็วของการเขย่าที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา

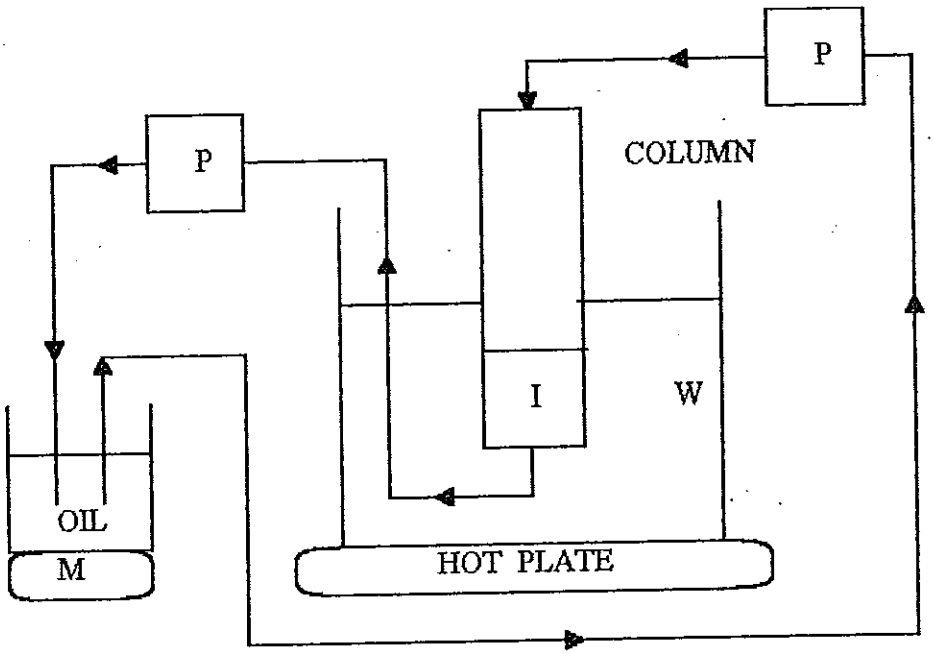
6. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชนิด Packed Bed Column Reactor

บรรจุเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงน้ำหนัก 0.5 กรัม (5,930 ยูนิต) ลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวเท่ากับ 1.5 และ 20 เซนติเมตรตามลำดับ บ่มในบิกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำ (ภาพที่ 4) ที่มีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (จากข้อ 5.1) โดยใช้ hot plate ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ปล่อยสารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มโอเลอีนและสารละลายบัพเฟอร์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ข้อ 5.3) ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลอย่างต่อเนื่องเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างของสารผสมที่ไหลออกจากคอลัมน์ 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารผสมระหว่างเอทานอลและอะซิโตนปริมาตร 20 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

7. การนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่

ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้อ 6 หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปครบตามเวลาที่เหมาะสม แยกเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงออกด้วยแผ่นกรองโลหะขนาด 100 mesh แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารผสมระหว่างเอทานอลและอะซิโตน นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงล้างด้วยไอโซออกเทนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายบัพเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม และน้ำกลั่น ตามลำดับเพื่อชะเอากรดไขมัน และกลีเซอไรด์ออก แล้วนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 8 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปย่อยสลายน้ำมันปาล์มในครั้งต่อไป ทำซ้ำแบบนี้จนกว่าการย่อยสลายลดลง 50 เปอร์เซนต์ วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในแต่ละครั้ง รวมทั้งเปอร์เซนต์ก่อนย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

ส่วนการนำแอคคูเรลกลับมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ใหม่ ทำได้โดยนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมากำจัดเอาเอนไซม์ไลเปสที่ยังยึดเกาะอยู่กับแอคคูเรล โดยนำไปแช่ในเอทานอลบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในอะซิโตนเช่นเดียวกันกับการแช่ในเอทานอลในอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ 100 มิลลิลิตรต่อกรัมเอนไซม์ที่ถูกตรึง นำไปกรองผ่านแผ่นกรองโลหะขนาด 100 mesh นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนการนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสในครั้งต่อไป วิเคราะห์กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์ และเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม



I = Immobilized Enzyme
W = Water
M = Magnetic Stirrer
P = Pump

ภาพที่ 4 ชุดถังปฏิกรณ์ชนิด Packed Bed Column Reactor และอุปกรณ์

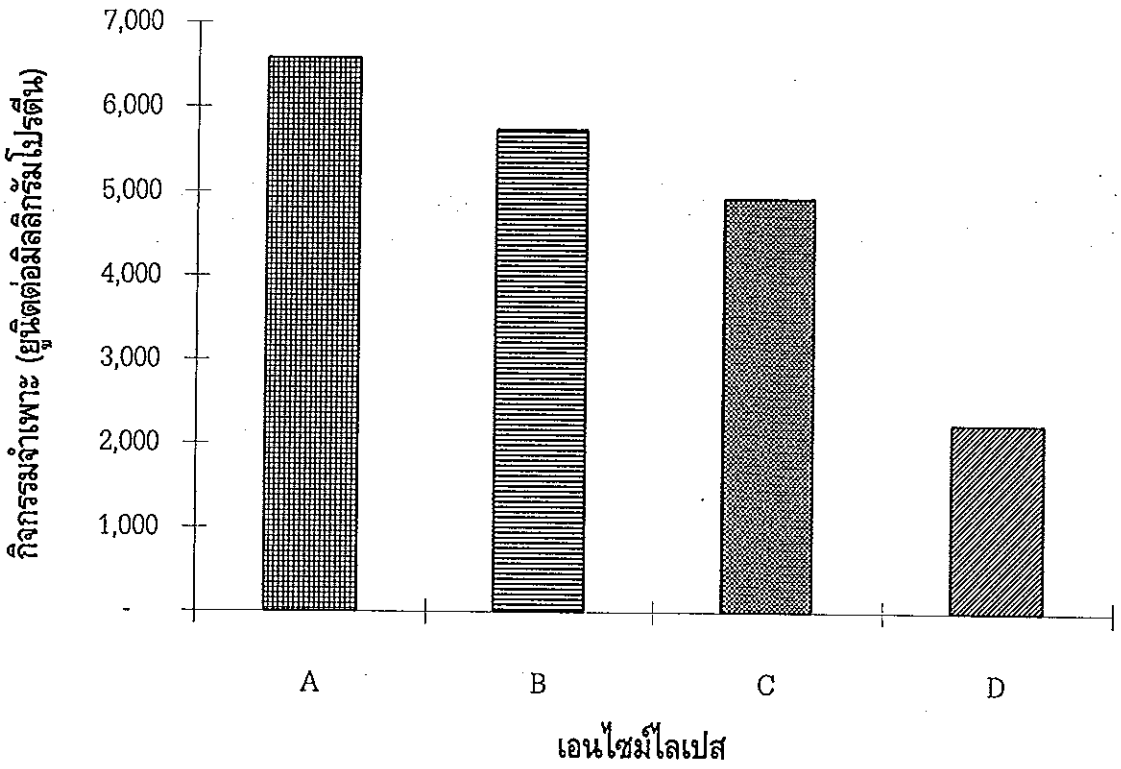
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปสและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่คัดเลือกได้

การคัดเลือกหาชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มจากเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 4 ชนิด คือ เอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea* , *C. rugosa* (lipase OF) , *Pseudomonas* sp. และ *Pseudomonas* sp. (lipase PS) โดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ผลการวิเคราะห์ พบว่า สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ซึ่งผลิตจาก *C. rugosa* มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 132 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณเป็นค่า กิจกรรมจำเพาะได้เท่ากับ 6,600 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งจะสูงที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา (ภาพที่ 5) แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายตำแหน่งต่างๆ บนโมเลกุลของไตรกลีเซอร์ไรด์ (Macrae , 1983 ; Kimura, *et al.*, 1983 ; Otero, *et al.*, 1990) ส่วนเอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea* แม้จะเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ แต่มีค่ากิจกรรมจำเพาะน้อยกว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างทางด้านสายพันธุ์ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปส PS และ เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลาย (Okumura, *et al.*, 1981) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาการย่อยสลายระหว่างที่มีการย่อยสลาย แต่เอนไซม์ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะจะไม่เกิดปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ไปพร้อมๆ กับการย่อยสลาย จึงทำให้มีการย่อยสลายได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสพวกที่ไม่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ (Ruckenstein and Wang, 1993)

การศึกษาถึงคุณสมบัติในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส OF เพื่อทราบถึงระดับของอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ รวมถึงความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส OF ต่ออุณหภูมิและ พีเอช พบว่า



ภาพที่ 5 ความสามารถของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ

สภาวะในการวิเคราะห์คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.2 สารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สับสเตรทที่ใช้คือน้ำมันปาล์มโอเลอีนในรูปสารผสม ระยะเวลาทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 นาที บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็วเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

A. เอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* (lipase OF)
B. เอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea*
C. เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. (lipase PS)
D. เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp.

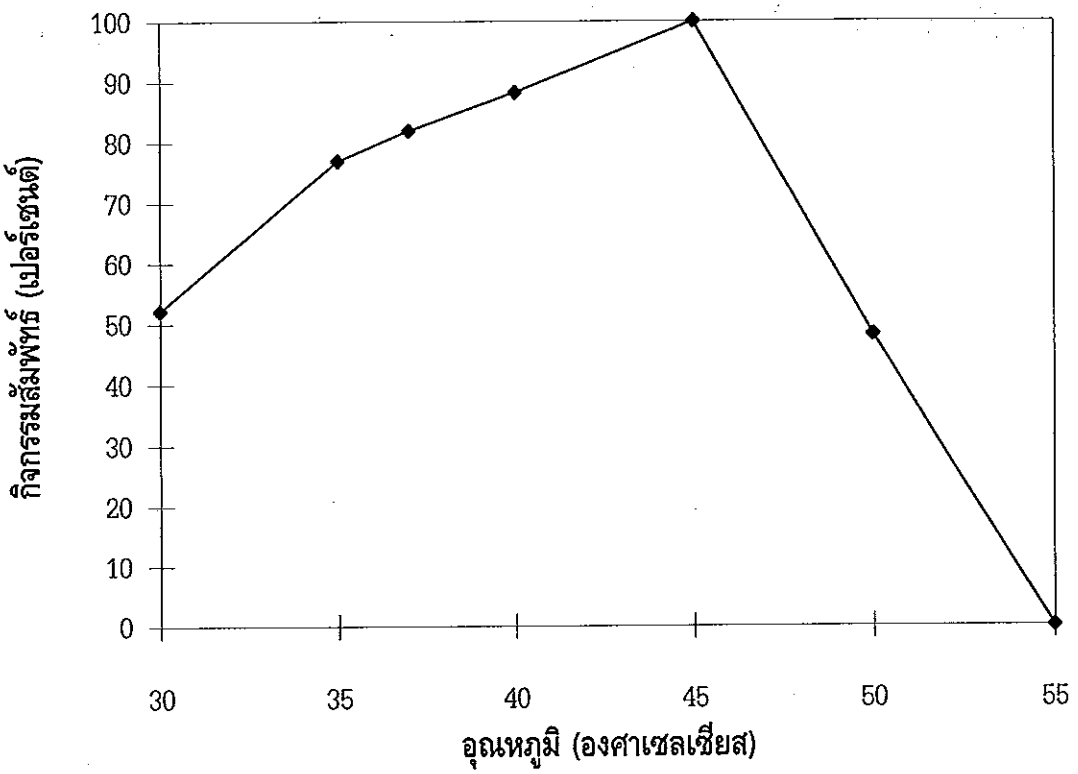
1.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้นด้วยและจะมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (171 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงและที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมด (ภาพที่ 6) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของน้ำมันปาล์มได้ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงเป็น 50 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของน้ำมันปาล์มลดลง (Linfield, *et al.*, 1984) ผลจากการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากการทดลองของ Virto และคณะ (1994) พบว่าเอนไซม์ไลเปส OF ที่ใช้ในการย่อยสลายไขมันวัวมีอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับ Montero และคณะ (1993) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ในการย่อยสลายน้ำมันมะกอก ที่พีเอช 7.5 นาน 1 ชั่วโมงคือ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Shaw และคณะ (1990) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ในการย่อยสลายโมเลกุลของ tributyrin oil ที่พีเอช 8.0 ด้วยอัตราเร็วของเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที คือ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาต่างกัน เช่น พีเอช ชนิดของสับสเตรท ระยะเวลา เป็นต้น

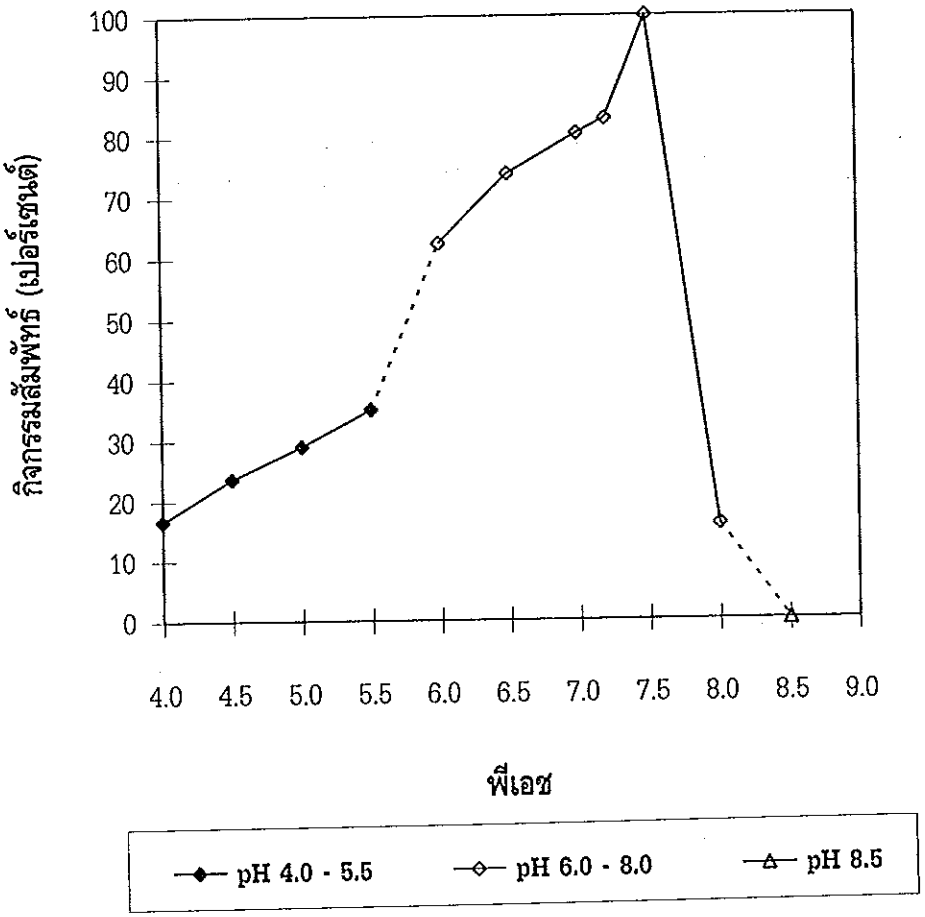
1.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เป็นผลของพีเอชต่อการแตกอิออนของ prototropic group ที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งจะมีผลไปสู่การเปลี่ยนแปลงการจับกับสับสเตรท หรือการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการทดลองในปฏิกิริยาต้องควบคุมพีเอชให้เหมาะสมที่สุด ที่ไม่ให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ กันตั้งแต่ 4.0 ถึง 8.5 พบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ก็เพิ่มสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7.5 (175 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อพีเอช สูงขึ้น พบว่า ที่พีเอช 8.0 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 16 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 7) ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Shaw และคณะ (1990) ซึ่งพบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* คือ 7.5 ในขณะที่ Montero และคณะ (1993) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันมะกอกของ



ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* สภาวะในการวิเคราะห์คือ พีเอช 7.2 สารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สับสเตรทที่ใช้คือน้ำมันปาล์มโอเลอีนในรูปสารผสม ระยะเวลาทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 นาที บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็วเท่ากับ 250 รอบต่อนาที



ภาพที่ 7 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* สภาวะในการวิเคราะห์คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สับสเตรทที่ใช้คือน้ำมันปาล์มโอเลอีนในรูปสารผสม ระยะเวลาทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 นาที บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็วเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

เอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* คือ 7.2 ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากสับสเตรทและปัจจัยอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แตกต่างกัน

1.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

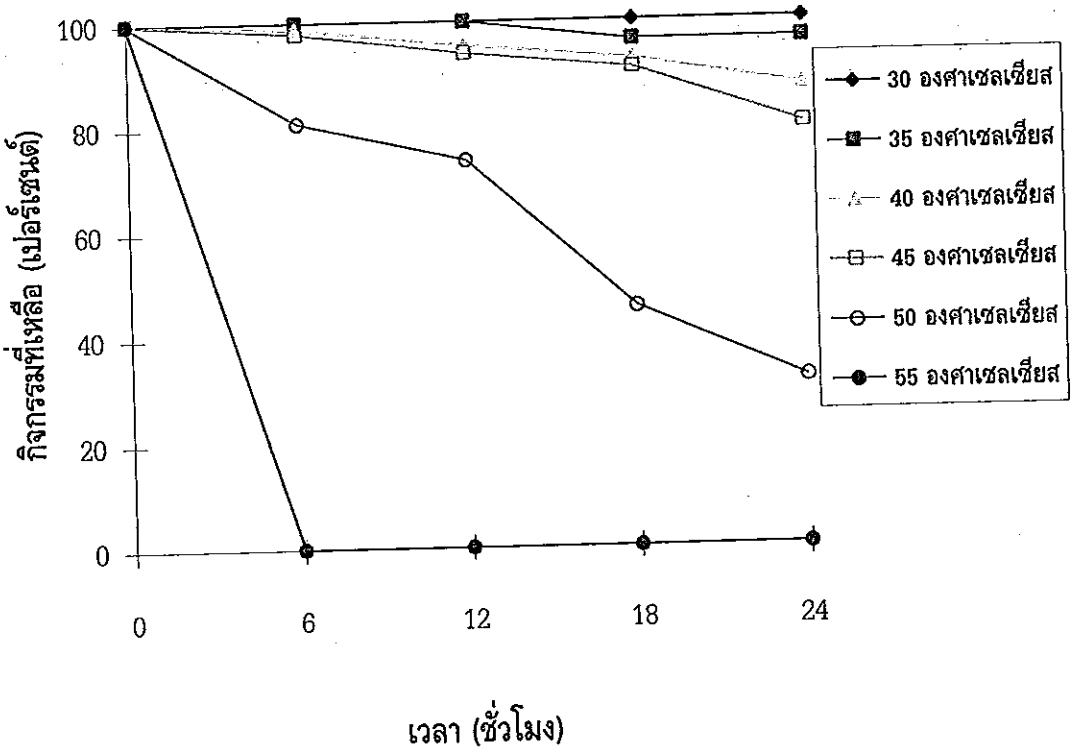
ทำการศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กันตั้งแต่ 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมที่เหลืออยู่เท่าเดิมคือ 100 เปอร์เซนต์ แต่ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่า 80 เปอร์เซนต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เป็น 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมที่เหลืออยู่เพียง 32 เปอร์เซนต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญสียกิจกรรมทั้งหมด เมื่อใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์เพียง 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 8) แสดงว่าเอนไซม์ไลเปส OF ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้เป็นเวลานานๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Montero และคณะ (1993) ที่พบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* มีความคงตัวต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 25 ถึง 37 องศาเซลเซียสได้ดี เมื่อบ่มเอนไซม์นาน 1 ชั่วโมง แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวลดลงโดยมีค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่เพียง 40 เปอร์เซนต์

1.4 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์

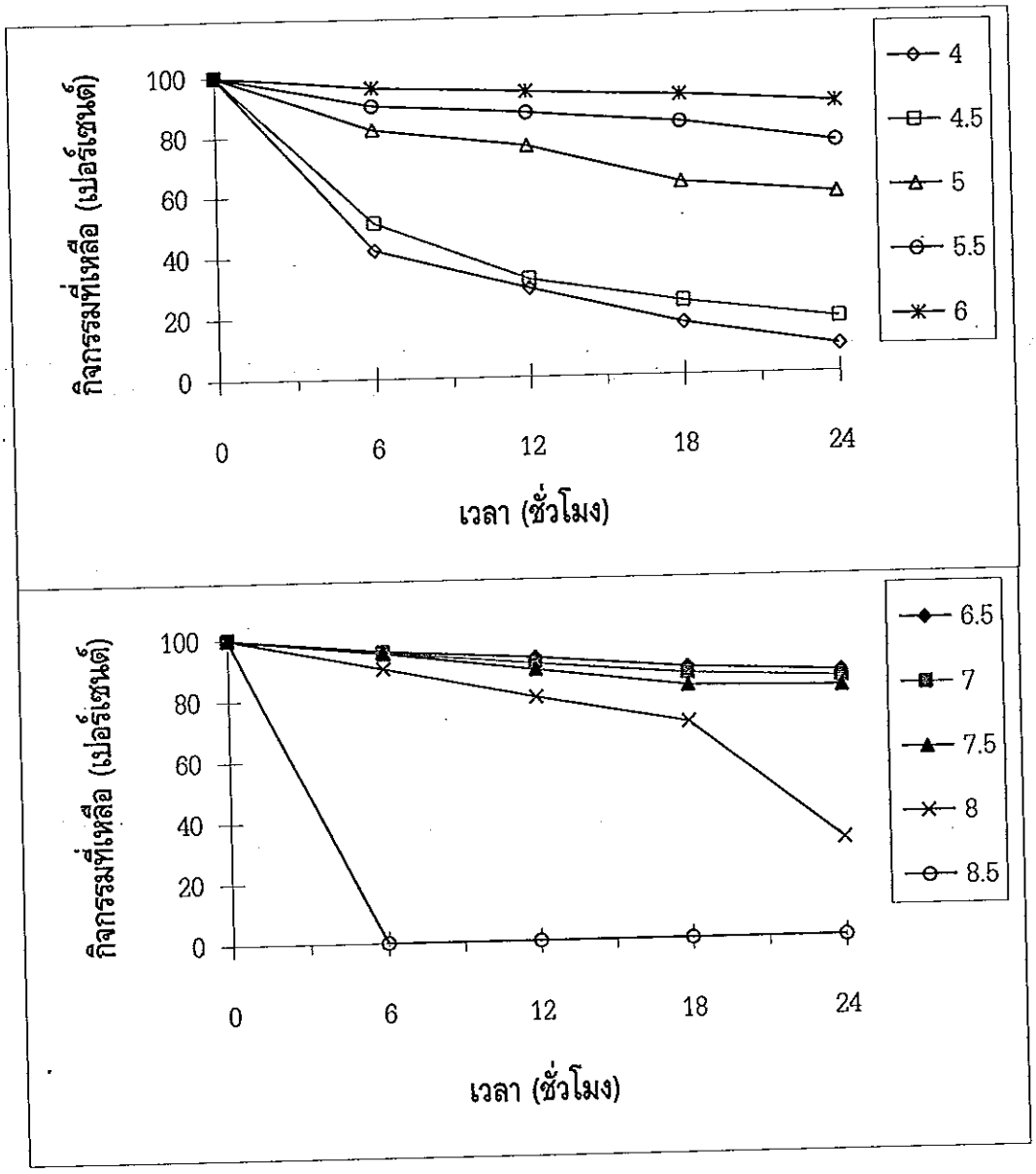
จากการบ่มเอนไซม์ที่พีเอช 4.0 ถึง 8.5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9) ในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 7.5 เอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชได้ดี โดยเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่า 80 เปอร์เซนต์ ส่วนในช่วงพีเอช 4.0-5.5 และ 8.0 เอนไซม์คงตัวต่อพีเอชได้น้อยกว่า และที่พีเอช 8.5 พบว่า เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมทั้งหมด เมื่อบ่มเพียง 6 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสถูกทำลายหรือถูกทำให้เปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติของโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ จึงทำให้ความสามารถในการย่อยสลายลดลง (Montero, *et al.*, 1993)

2. การคัดเลือกชนิดของตัวพยุงที่ใช้ตรึงเอนไซม์

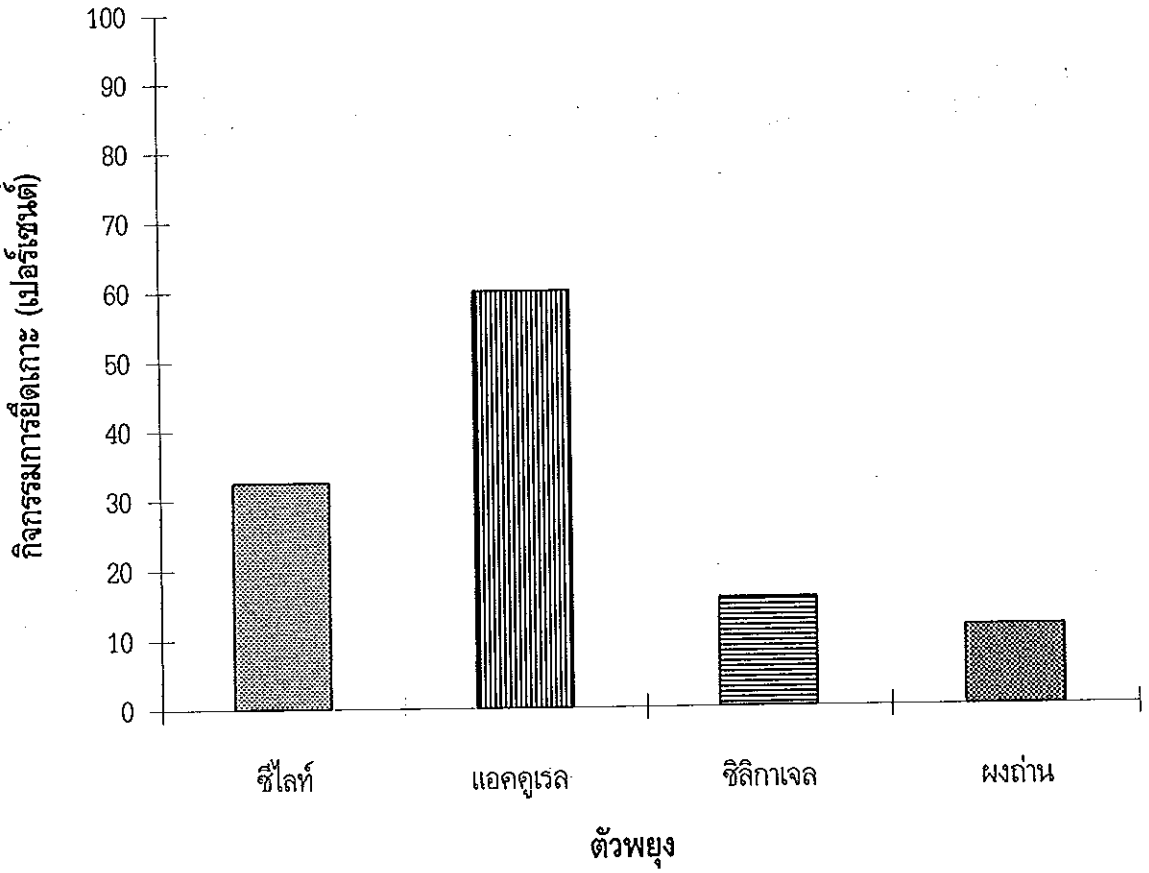
การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF โดยใช้ตัวพยุง 4 ชนิด คือ ซีไลท์ แอคคูเรล ซิลิกาเจล และ ผงถ่าน พบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนตัวพยุงแต่ละชนิด มีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์ แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 10 เอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรลมีค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 60 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เนื่องจากแอคคูเรลเป็นตัวพยุงที่มีรูพรุนขนาดเล็กๆ ที่สามารถบรรจุเอนไซม์ไว้ภายในได้ และมีกลุ่มของหมู่ฟังก์ชันที่สามารถจับกับเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่าตัวพยุงชนิดอื่นๆ เช่น



ภาพที่ 8 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นเท่ากับ 175 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.5 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีอัตราเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที



ภาพที่ 9 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*
สภาวะที่ใช้ในการศึกษาคือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นเท่ากับ 175 ยูนิตต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีอัตราเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที



ภาพที่ 10 การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* บนตัวพยุงชนิดต่าง ๆ มีสภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์คือ ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ (0.2 โมลาร์) พีเอช 7.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (2,640 ยูนิต) ผสมกับตัวพยุงหนัก 200 มิลลิกรัม ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

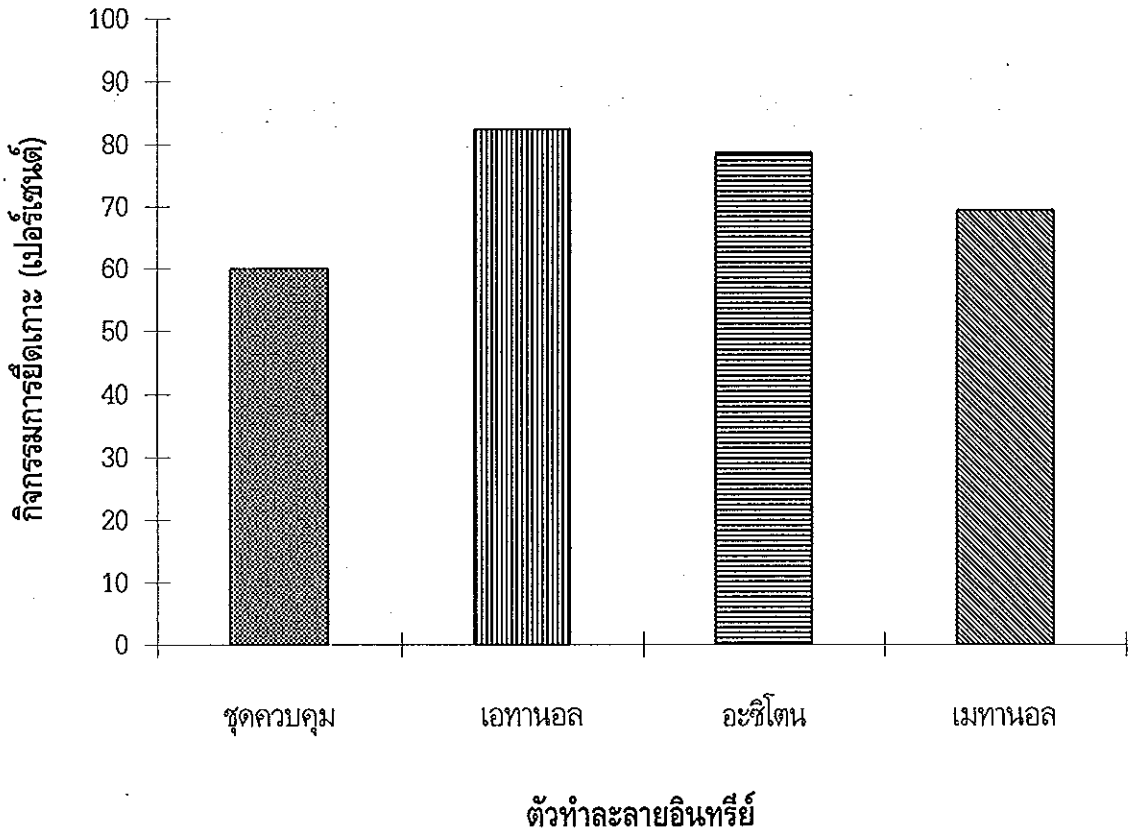
ซีไลท์ ผงถ่าน หรือแม้แต่แอคคูเรลชนิดที่ไม่มีรูพรุน (Brady, *et al.*, 1988)

ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kimura และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนแอคคูเรลซึ่งเป็นตัวพยุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงกว่าตัวพยุงชนิดอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากเวลาทำปฏิกิริยาจะไม่มีชั้นของน้ำมาบดบังตำแหน่งในการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท (Ruckenstein and Wang, 1993; Kang, *et al.*, 1988 ; Virto, *et al.*, 1994) และเนื่องจากแอคคูเรลเป็นตัวพยุงที่มีรูพรุนจำนวนมาก จะส่งผลให้มีพื้นที่ผิวที่จะยึดเกาะกับเอนไซม์ได้มาก และสามารถส่งเสริมให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้มากขึ้น (Al-Duri, *et al.*, 1995)

3. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพยุงที่คัดเลือกได้

3.1 ผลของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการ pretreatment ตัวพยุงก่อนการตรึง

การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล และ เอทานอล ในการ pretreatment แอคคูเรลก่อนที่จะเริ่มตรึงเอนไซม์ จะมีผลให้เอนไซม์เข้าไปยึดเกาะกับตัวพยุงได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลต่อเนื่องให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น (Montero *et al.*, 1993) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรลที่ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จะมีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรลที่ไม่ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนการตรึง (ภาพที่ 11) โดยเอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรลที่ pretreatment ด้วยเอทานอลมีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงที่สุดเท่ากับ 82 เปอร์เซนต์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานของ Brady และคณะ (1988) และรายงานของ Montero และคณะ (1993) พบว่า เอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการ preteatment แอคคูเรลก่อนการตรึงเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลจะช่วยทำให้โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเอนไซม์เข้ายึดเกาะกับตัวพยุงได้มากขึ้น ทั้งนี้น่าจะมีผลมาจากแอคคูเรลที่ใช้เป็นตัวพยุงในการตรึงเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวพยุงชนิดที่มีรูพรุน และมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ดังนั้นโอกาสที่เอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติเป็นโมโนเมอริคเอนไซม์ คือ เอนไซม์ที่หันเอาส่วนขั้วที่ชอบน้ำออกสู่ภายนอกของโมเลกุลเพื่อจับกับโมเลกุลของน้ำมีโอกาสน้อยที่จะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของตัวพยุง ถ้าตัวพยุงไม่ได้ผ่านการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ก่อน ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการ pretreatment ตัวพยุงก่อนการตรึงเอนไซม์ อาจจะส่งผลให้ตัวพยุงเปลี่ยนสภาพการมีขั้วเพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มคุณสมบัติการเปียกน้ำ (water wettability)



ภาพที่ 11 การ pretreatment ตัวพยุงด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ

ขั้นตอนในการ pretreatment ตัวพยุงก่อนการตรึงเอนไซม์ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พรมให้ทั่วผิวของแอคคูเรลซึ่งน้ำหนักเท่ากับ 200 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนนำแอคคูเรลไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

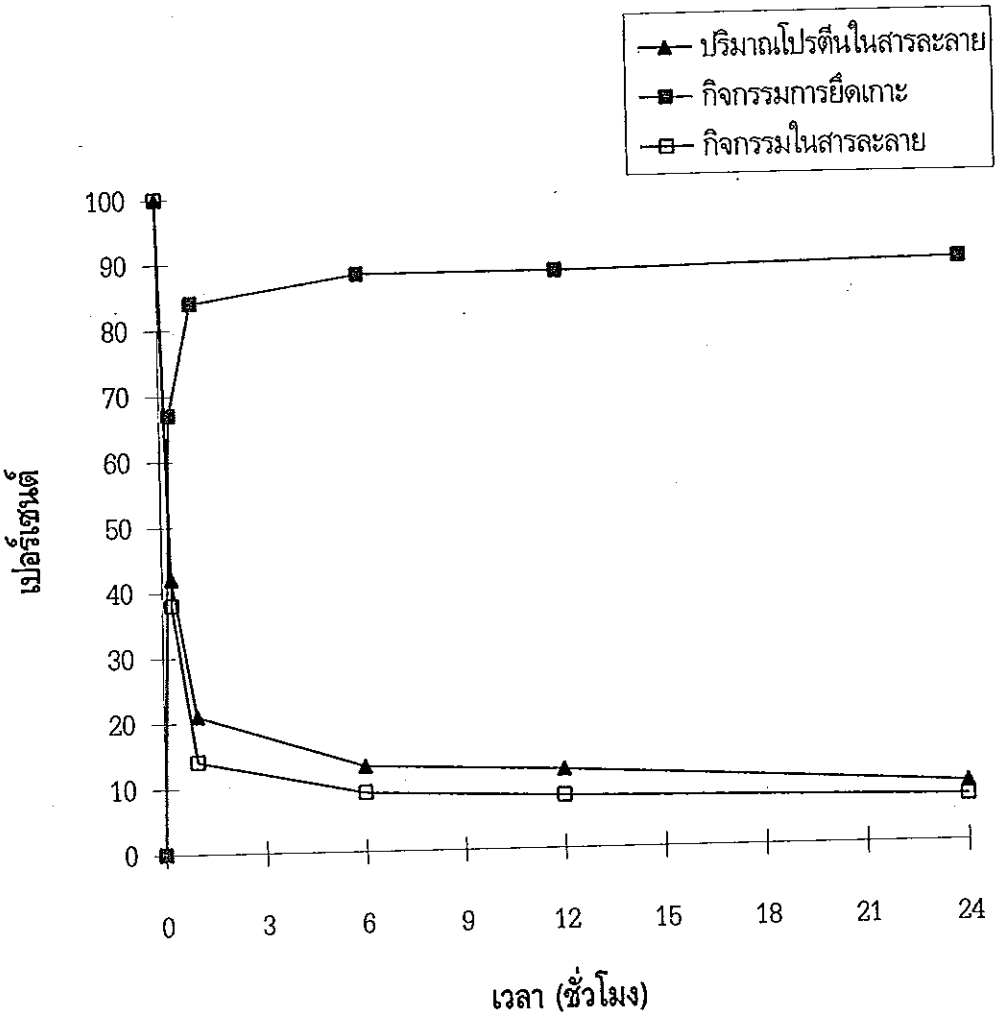
ของแอคคูเรล (Ruckenstein and Wang, 1993) โดยเฉพาะเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ส่งเสริมให้เกิดสภาพการมีชั้วได้ดี เมื่อเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ เมื่อคุณสมบัติของตัวพยุงพร้อมที่จะจับกับหมู่ที่ชอบน้ำของเอนไซม์ไลเปสภายหลังการ pretreatment ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เกิดเป็น hydrophobic-hydrophilic interaction ซึ่งเป็นการยึดเกาะกันระหว่างกลุ่มอะโรมาติกของตัวพยุงกับกลุ่มกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์คือ ทริปโตเฟน ไทโรซีน และไอโซลูซีน (Bernath and Vankatasubramanain, 1986)

3.2 ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์

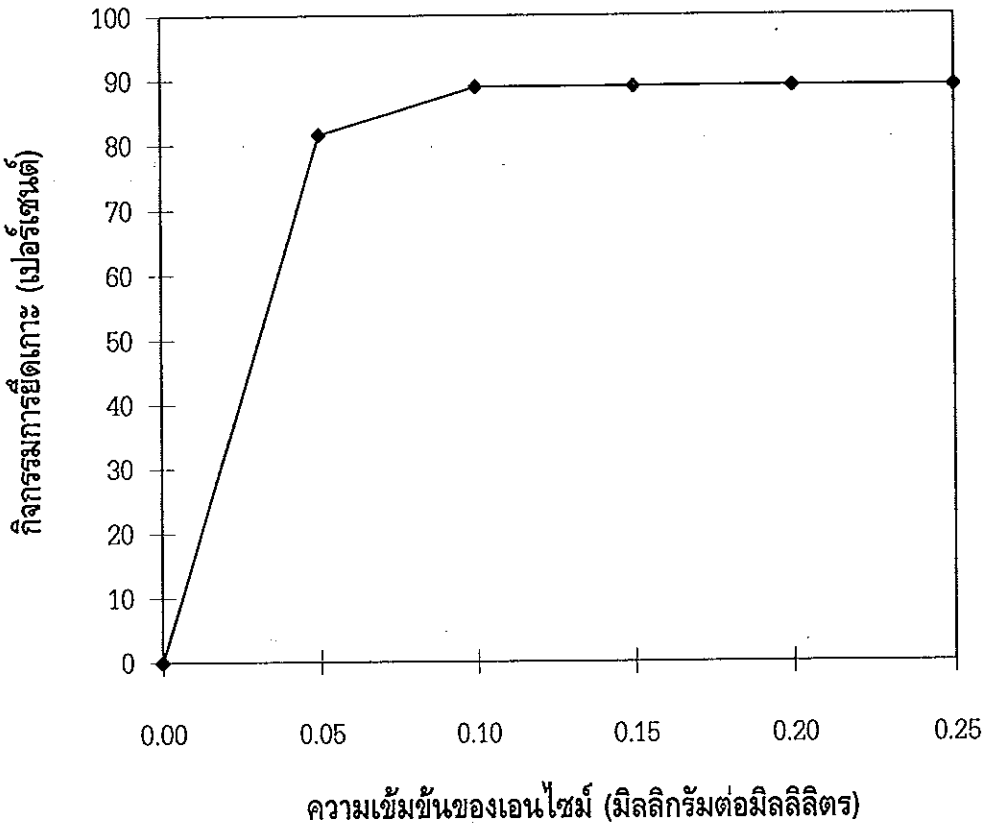
จากการตรึงเอนไซม์ที่ใช้ระยะเวลาในการตรึงที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 ถึง 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการตรึงเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ 6 ชั่วโมงแรกของการตรึงเอนไซม์ หลังจากนั้นเมื่อใช้ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 12 และ 24 ชั่วโมง กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากพื้นที่ผิวของแอคคูเรลมีจำกัด และอาจจะเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเข้ายึดเกาะกับแอคคูเรลในช่วงแรกของการตรึงเอนไซม์ได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นแม้จะใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์นานขึ้นก็ไม่ส่งผลให้เกิดการยึดเกาะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะสังเกตุได้จากปริมาณของเอนไซม์ในสารละลายที่เหลืออยู่ยังคงมีปริมาณเท่าเดิม ในขณะที่เวลาเพิ่มมากขึ้น

3.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์

เมื่อตรึงเอนไซม์โดยวิธีดูดซับบนแอคคูเรลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงก็เพิ่มขึ้นด้วย ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุง 89 เปอร์เซนต์ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้น กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 13) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางด้านสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพยุง กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อตัวพยุงดูดซับเอนไซม์จนถึงจุดอิ่มตัวแล้วแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีกก็ไม่ทำให้กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น (Bernath and Vankatasubramanain, 1986) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนแอคคูเรลคือ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการศึกษาของ Virto และคณะ



ภาพที่ 12 ผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* มีสภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์คือ ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ (0.2 โมลาร์) พีเอช 7.5) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (2,640 ยูนิต) ผสมกับแอคคูเรสที่ผ่านการ pretreatment ด้วยเอทานอล ก่อนการตรึงเอนไซม์น้ำหนัก 200 มิลลิกรัม ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* ต่อการตรึงเอนไซม์ มีสภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ คือ ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์) พีเอช 7.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับแอคคูเรลที่ผ่านการ pretreatment ด้วยเอทานอลก่อนการตรึงเอนไซม์น้ำหนัก 200 มิลลิกรัม ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

(1994) และ Montero และคณะ (1993) ซึ่งใช้เอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตรในการตรึงด้วยวิธีดูดซับบนแอคคูเรล โดยให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงเท่ากับ 91 เปอร์เซนต์ ซึ่งใกล้เคียงกันกับการทดลองครั้งนี้

3.4 พีเอชในการตรึงเอนไซม์

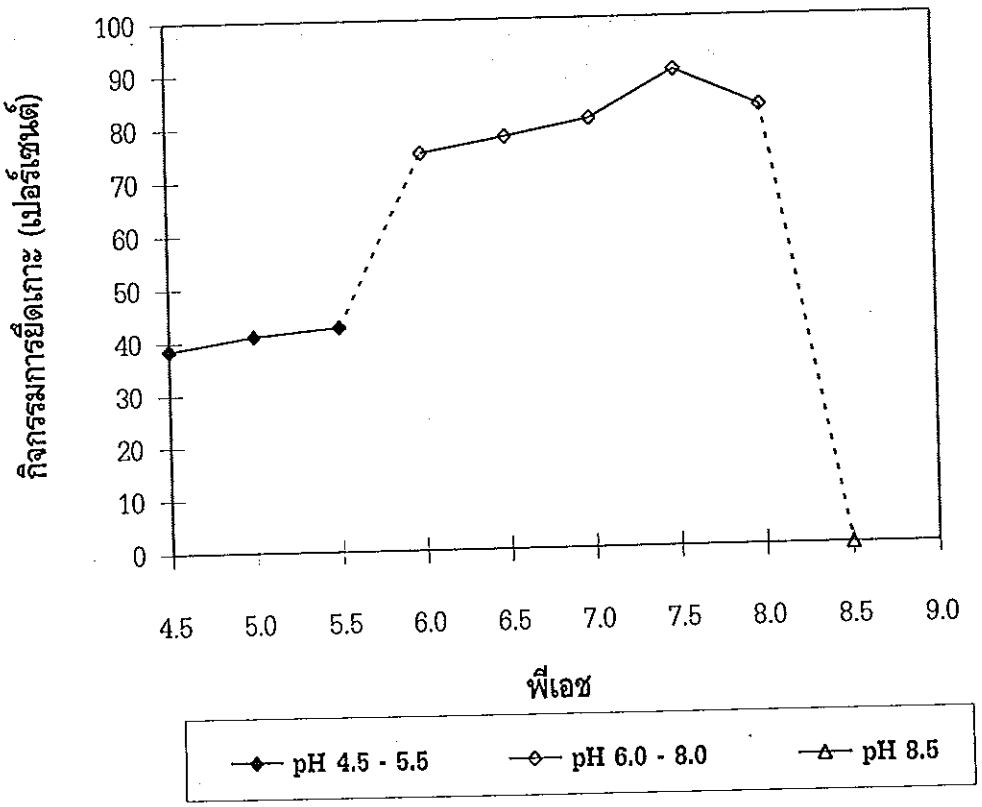
การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับบนตัวพยุงโดยใช้พีเอชต่างๆ กันตั้งแต่ 4.5 ถึง 8.5 พบว่าเมื่อพีเอชที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์สูงขึ้นจะทำให้กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงขึ้นด้วย การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ที่พีเอชเท่ากับ 7.5 จะให้กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงที่สุดเท่ากับ 89 เปอร์เซนต์ ที่พีเอช 8.5 พบว่าไม่มีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุง (ภาพที่ 14) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากที่พีเอช 8.5 มีผลให้เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 3 มิติ ทำให้การยึดเกาะบนตัวพยุงและการทำงานเกิดขึ้นไม่ได้ (Montero, *et al.*, 1993)

3.5 อุณหภูมิในการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 4 , 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เอนไซม์ที่ตรึงได้มีค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงสุดเท่ากับ 89 เปอร์เซนต์ และมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพยุง ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนแอคคูเรลควรเป็นอุณหภูมิที่ต่ำ

ตารางที่ 4 การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมการยึดเกาะ (เปอร์เซนต์)
4	89
25	74
30	73



ภาพที่ 14 ผลของพีเอชต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa*

มีสภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์คือ ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ 20 มิลลิลิตร (2,640 ยูนิต) ผสมกับแอคคูเรลที่ผ่านการ pretreatment ด้วยเอทานอลก่อนการตรึงเอนไซม์น้ำหนัก 200 มิลลิกรัม ด้วยอัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง

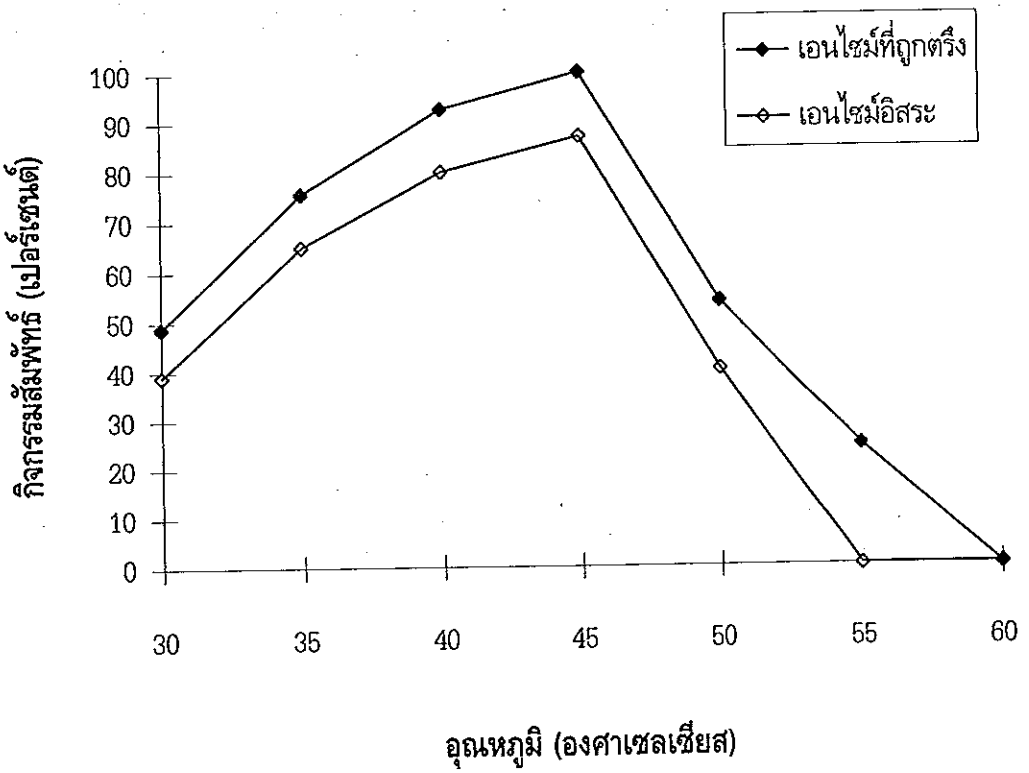
4. คุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

4.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

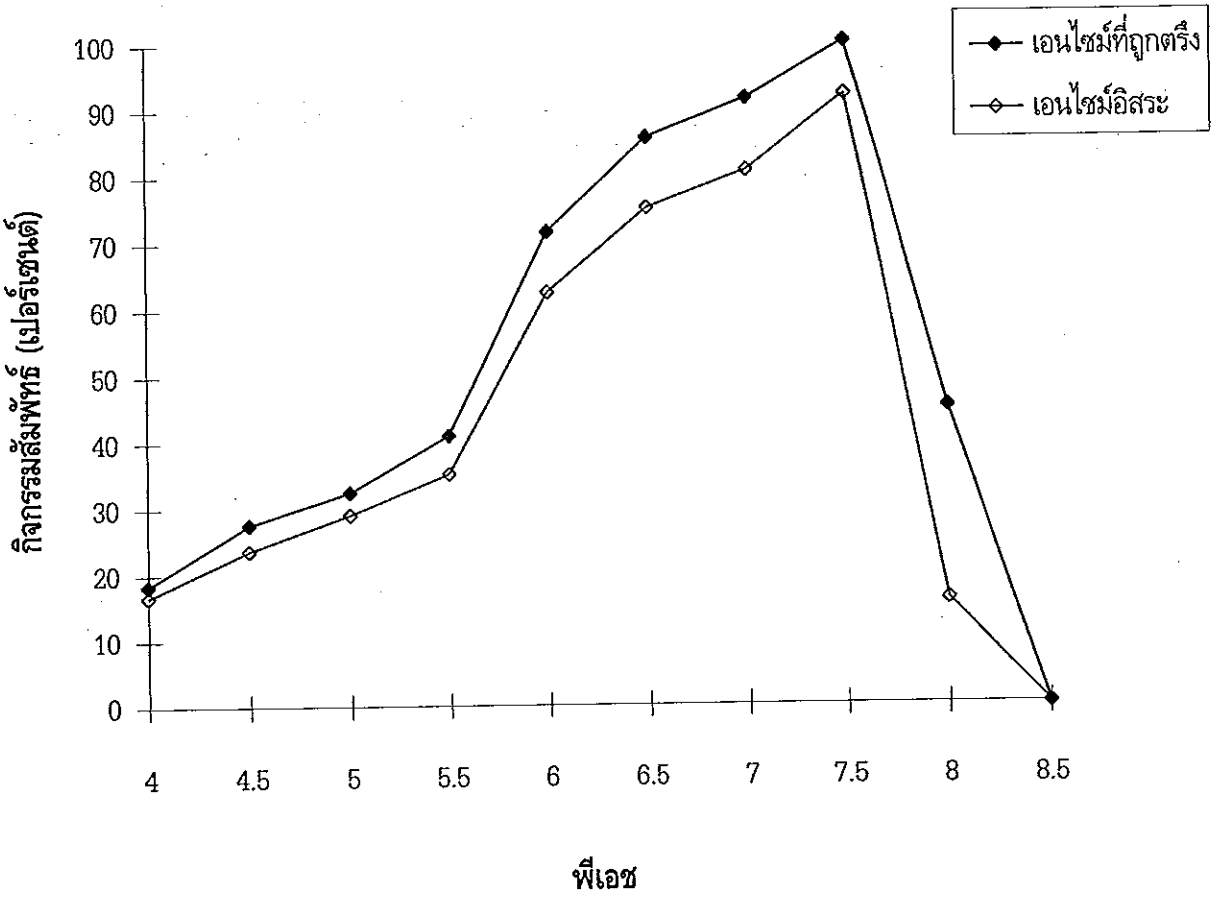
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในการย่อยสลายสับสเตรทที่อุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงก็เพิ่มขึ้นด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ถูกตรึงคือ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงสุด (ภาพที่ 15) และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลง โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีกิจกรรมสัมพัทธ์เพียง 24 เปอร์เซนต์ และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งจะให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 0 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและเอนไซม์ไลเปสอิสระมีค่าเท่ากันคือ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Montero และคณะ (1993) ที่รายงานว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลด้วยวิธีการดูดซับที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมไขว้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเปลี่ยนไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับ Ruckenstein และ Wang (1993) รายงานว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนโพลิเมอร์สังเคราะห์ทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงเพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสอิสระเท่ากับ 5 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนแอคคูเรลในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผลทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไปทำให้คุณสมบัติในการทำงานของเอนไซม์ยังคงเดิม (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

4.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในการย่อยสลายสับสเตรทที่พีเอช 4.0 ถึง 8.5 ผลแสดงดังภาพที่ 16 พบว่า เมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5 เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 8.0 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 45 เปอร์เซนต์ และเอนไซม์จะไม่มีกิจกรรมในการทำงานเลยที่พีเอช 8.5 ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงคือ 7.5 ซึ่งจะให้ผลเช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ ผลการทดลองนี้แตกต่างกับการศึกษาของ Montero และคณะ (1993) ซึ่งพบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนแอคคูเรลด้วยวิธีการดูดซับที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมไขว้ทำให้พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงแตกต่างกับเอนไซม์ไลเปส



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะในการวิเคราะห์คือ พีเอช 7.5. สับสเตรทที่ใช้คือน้ำมันปาล์มโอเลอีนในรูปสารผสม ใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง 0.05 กรัม ระยะเวลาทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 นาที บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็วเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

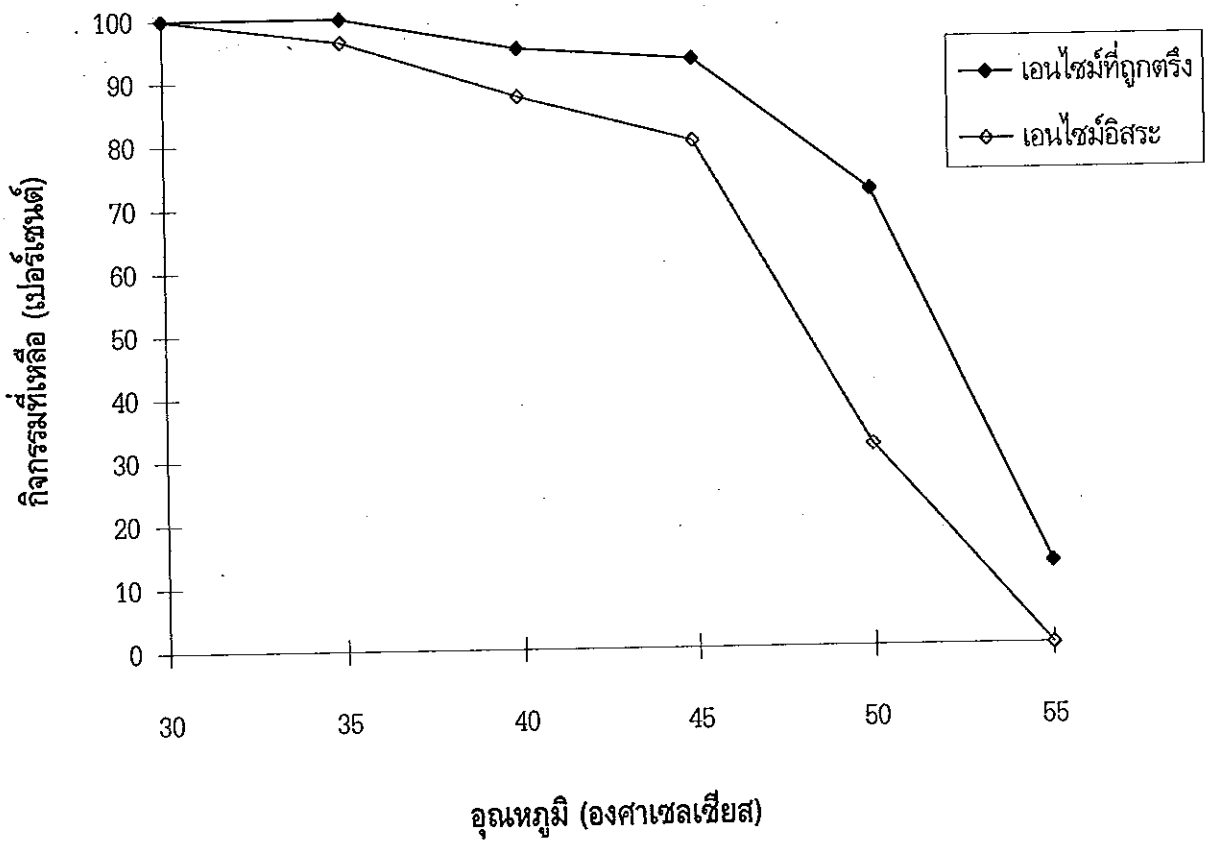


ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะในการวิเคราะห์คือ พีเอช 7.5. สับสเตรทที่ใช้คือน้ำมันปาล์มโอเลอีนในรูปสารผสม ใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง 0.05 กรัม ระยะเวลาทำปฏิกิริยาเท่ากับ 30 นาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราเร็วเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

อิสระ แต่สอดคล้องกับการทดลองของ Brady และคณะ (1988) ซึ่งพบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida* sp. ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนแอคคูเรลไม่ทำให้พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แตกต่างไปจากเอนไซม์ไลเปสอิสระ เช่นเดียวกันกับ Hayashi และ Ikada (1990) ที่รายงานว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนท์บนโพลีอะโครลีน (polyacrolein) ไม่ทำให้พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงแตกต่างกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ Shaw และคณะ (1990) ที่พบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยใช้โลหะทรานสิชันเป็นตัวเชื่อมกับไคตินไม่ทำให้พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงแตกต่างกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากวิธีการตรึงเอนไซม์ที่แตกต่างกันจะส่งผลให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงแตกต่างกันไป ซึ่งจะส่งผลให้คุณสมบัติในการทำงานของเอนไซม์แตกต่างกันด้วย

4.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนและมักไม่คงตัวต่อความร้อน ดังนั้นปฏิกิริยาของเอนไซม์จะไม่สามารถทำได้ที่อุณหภูมิสูง และถ้าหากว่าการตรึงเอนไซม์สามารถช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิแล้วก็จะช่วยเพิ่มศักยภาพของการนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี อุณหภูมิอาจทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวเพิ่มขึ้น ลดลง หรือไม่เปลี่ยนแปลงก็ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงมีความคงตัวต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30-55 องศาเซลเซียส ซึ่งดีกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ ดังแสดงในภาพที่ 17 การบ่มเอนไซม์ไลเปสทั้งสองรูปแบบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีกิจกรรมเหลืออยู่ 97 เปอร์เซนต์ แต่เอนไซม์ไลเปสอิสระมีกิจกรรมเหลืออยู่เพียง 72 เปอร์เซนต์ และพบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเอนไซม์นาน 24 ชั่วโมง เอนไซม์ไลเปสอิสระจะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมด แต่เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงยังมีกิจกรรมที่เหลืออยู่ 21 เปอร์เซนต์ ซึ่งจะให้ผลการทดลองสอดคล้องกันกับ Virto และคณะ (1994) ที่รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจะสามารถคงตัวต่ออุณหภูมิต่างๆ ได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ ส่วน Brady และคณะ (1988) พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงคงตัวต่ออุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ เช่นเดียวกับการรายงานของ Montero และคณะ (1993) พบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมที่เหลืออยู่ถึง 30 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสอิสระมีกิจกรรมที่เหลืออยู่เพียง 15 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนแอคคูเรลซึ่งเป็นตัวพยุงที่มีรูพรุนส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในมีความคงตัวต่อ



ภาพที่ 17 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพยุง พีเอช 7.5 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีอัตราเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที

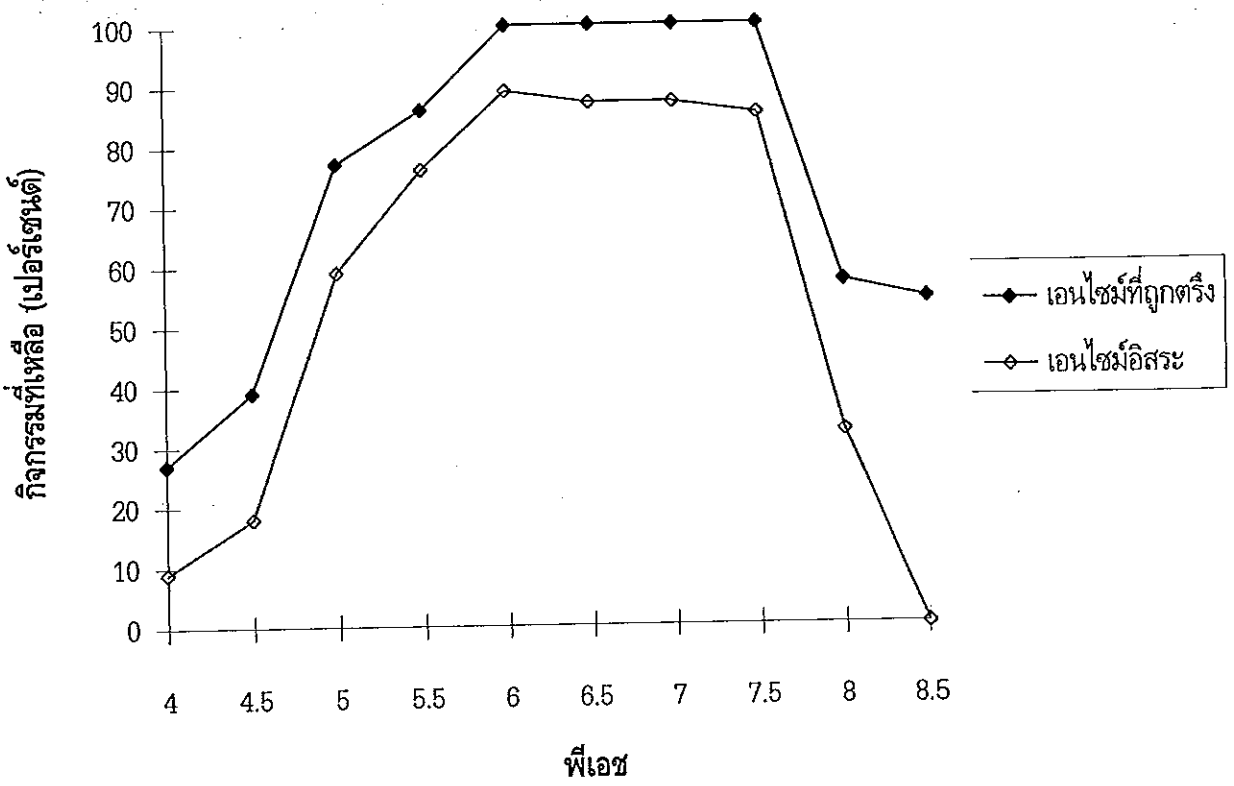
ความร้อนสูงกว่าเอนไซม์อิสระ เพราะรูพรุนของตัวพยุงจะช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์จากความร้อน โดยจะช่วยให้อุณหภูมิภายในรูพรุนของตัวพยุงต่ำกว่าอุณหภูมิภายนอก

4.4 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ที่ถูกตรึง

เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึง มีความคงตัวต่อพีเอชได้ดีในช่วง 6.0 ถึง 7.5 พบว่า แม้จะบ่มเอนไซม์นานถึง 24 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่เท่าเดิม ส่วนที่พีเอชสูงขึ้นเป็น 8.0 และ 8.5 เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เท่ากับ 57 และ 54 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อบ่มเอนไซม์นาน 24 ชั่วโมง ส่วนพีเอชที่เป็นกรดตั้งแต่ 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เท่ากับ 27, 39, 77 และ 86 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบความคงตัวต่อพีเอช 7.5 ของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ และเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงจะมีความคงตัวต่อพีเอชได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ ซึ่งสอดคล้องกันกับการรายงานของ Montero และคณะ (1993) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรียล มีความคงตัวต่อพีเอช 3.0 ถึง 10.0 ได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ และที่พีเอชสูงกว่า 8.0 เอนไซม์ไลเปสอิสระจะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมด

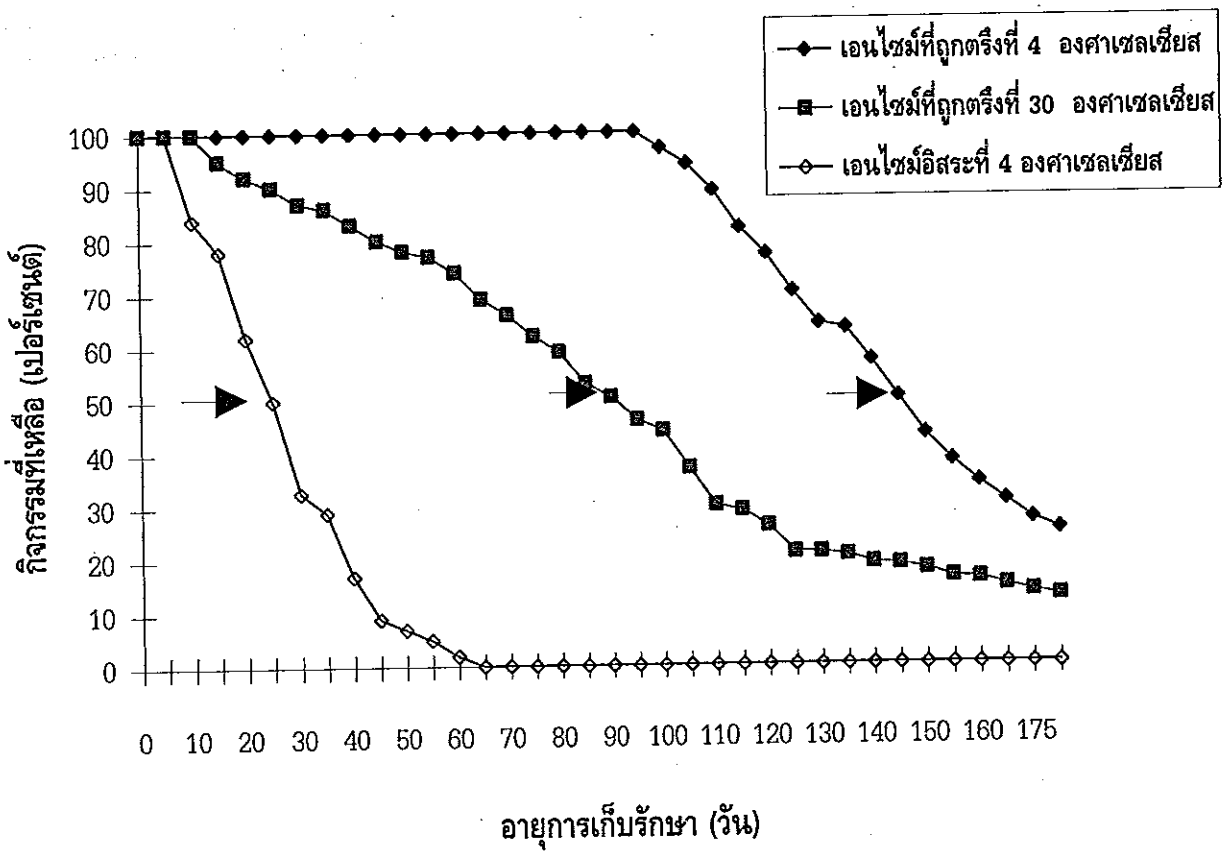
4.5 ความคงตัวในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึง

การศึกษาอายุการเก็บเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในสภาพแห้งในขวดแก้วที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงมีความคงตัวในการเก็บรักษาได้ดีเมื่อเก็บรักษานาน 100 วัน เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเท่าเดิมเท่าเดิม และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่ง หรือมีค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เท่ากับ 145 วัน ส่วนการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 90 วัน ในขณะที่เอนไซม์ไลเปส OF อิสระที่เก็บในรูปสารละลายความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.5 ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 25 วัน และตกตะกอนเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเท่ากับ 30 วัน ดังแสดงในภาพที่ 19 แสดงว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำสามารถที่จะยืดอายุการเก็บรักษาเอนไซม์ได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง Brady และคณะ (1988) รายงานว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนแอคคูเรสชนิด HDPE (high density polyethylene) จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงลดลงเพียง 10 เปอร์เซนต์ของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเริ่มต้นเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเท่ากับ 120 วัน ซึ่งเอนไซม์มีความคงตัวต่อการเก็บรักษาได้สูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่า การเก็บรักษาเอนไซม์เป็นเวลา 120 วัน กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงประมาณ 25 เปอร์เซนต์ อาจเป็นผลเนื่องจาก ชนิดของ แอคคูเรสที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์แตกต่างกัน (Gray, *et al.*, 1990)



ภาพที่ 18 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง

สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพยุง บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีอัตราเร็วของการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 19 ความคงตัวในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง เอนไซม์ไลเปสอิสระจะเก็บในรูปของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 ที่ 4 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจะเก็บในสภาพแห้ง ในขวดแก้วที่ปิดสนิท

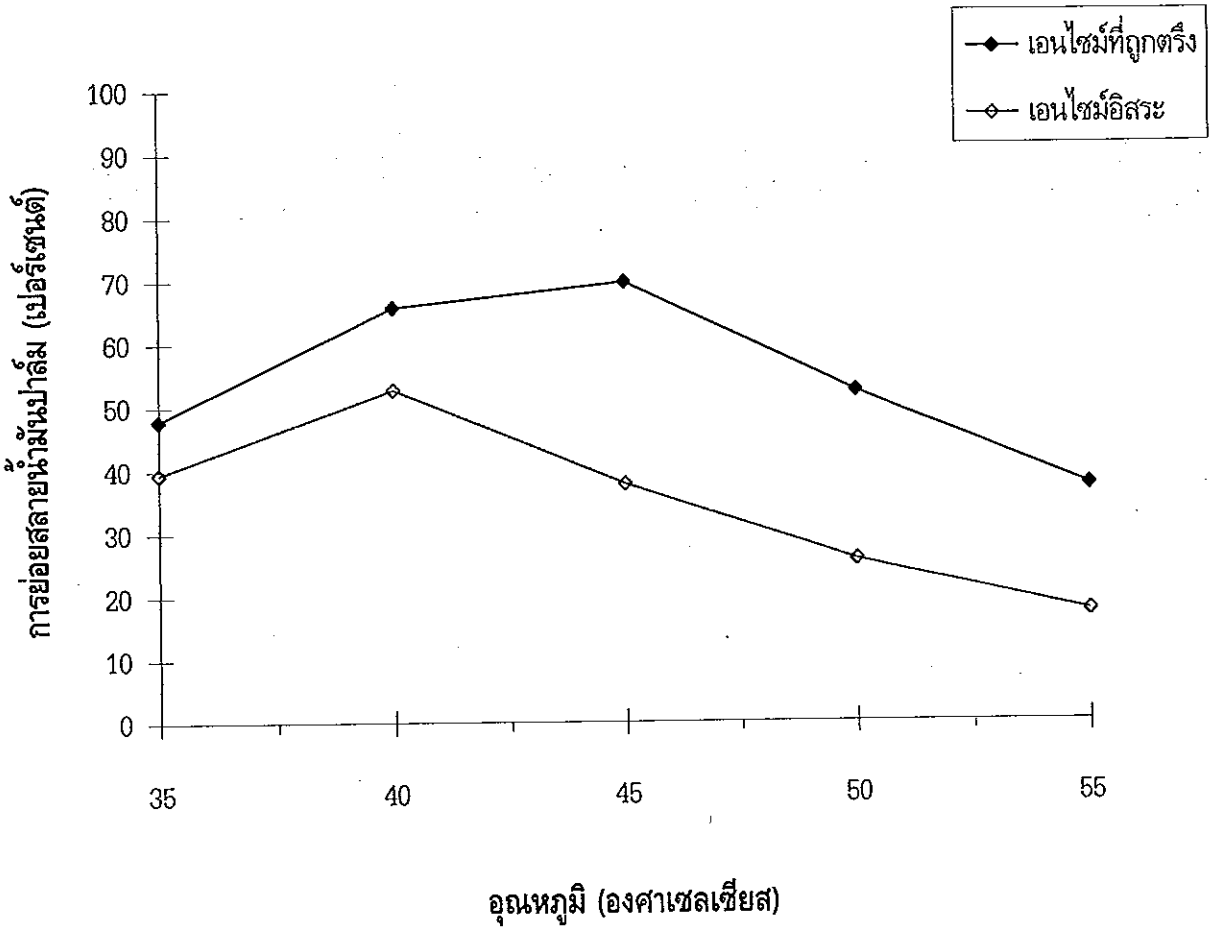
5. ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

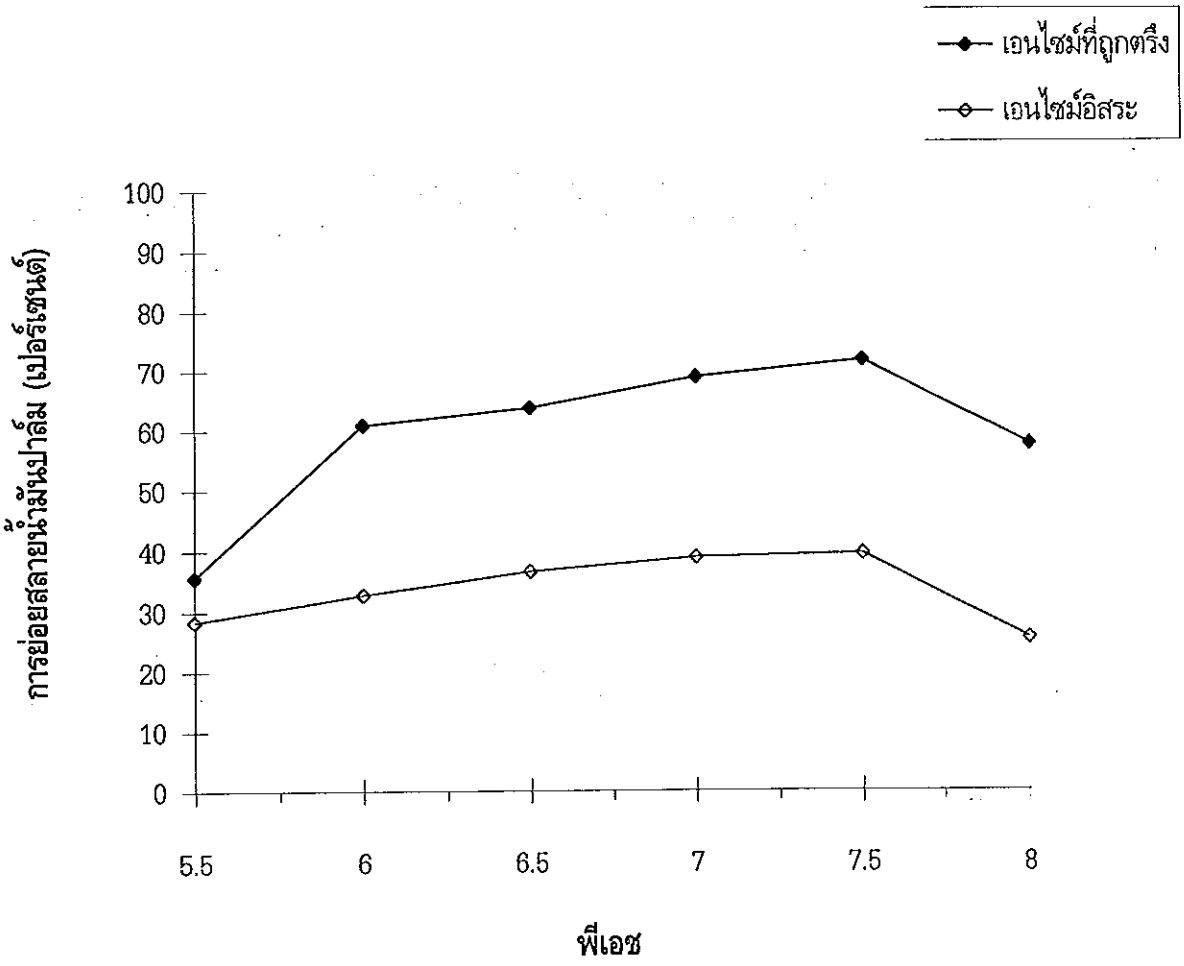
การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงที่อุณหภูมิ 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเพิ่มสูงขึ้น โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึง สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุดเท่ากับ 70 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 และ 55 องศาเซลเซียส การย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเกิดได้น้อยลง มีค่าเท่ากับ 52 และ 37 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แต่การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่าการย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 53 เปอร์เซนต์ ซึ่งต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (ภาพที่ 20) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Seong และ Ibrahim (1991) ที่พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ไลเปสอิสระย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Virto และคณะ (1994) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจาก *C.rugosa* ที่ถูกตรึงด้วยวิธีดูดซับบนแอคคูเรลที่สามารถย่อยสลายไขมันหมูได้ดีที่สุด (97 เปอร์เซนต์) ที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 24 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระสามารถย่อยสลายได้เพียง 30 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ จึงย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้มากกว่าเอนไซม์อิสระ

5.2 ผลของพีเอชต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึง ที่พีเอชเท่ากับ 5.5 ถึง 8.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าทั้งเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 21) โดยให้ค่าสูงสุดที่พีเอช 7.5 เท่ากับ 39 และ 72 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อพีเอชที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปสทั้งสองลักษณะจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปสทั้งสองรูปแบบดังที่ได้ศึกษาในข้อ 4.4 เนื่องจากพีเอชที่สูงขึ้นจะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์เกิดได้น้อยลง ทำให้เอนไซม์ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้น้อยลง



ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงเท่ากับ 0.03 กรัม เอนไซม์ไลเปส OF อิสระ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตรลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอินต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 70 ต่อ 30 อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เวลาทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 21 ผลของพีเอชต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะที่ใช้ในการศึกษา คือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงเท่ากับ 0.03 กรัม เอนไซม์ไลเปส OF อิสระ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตรลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอินต่อสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 70 ต่อ 30 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เวลาทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง

5.3 ผลของน้ำต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

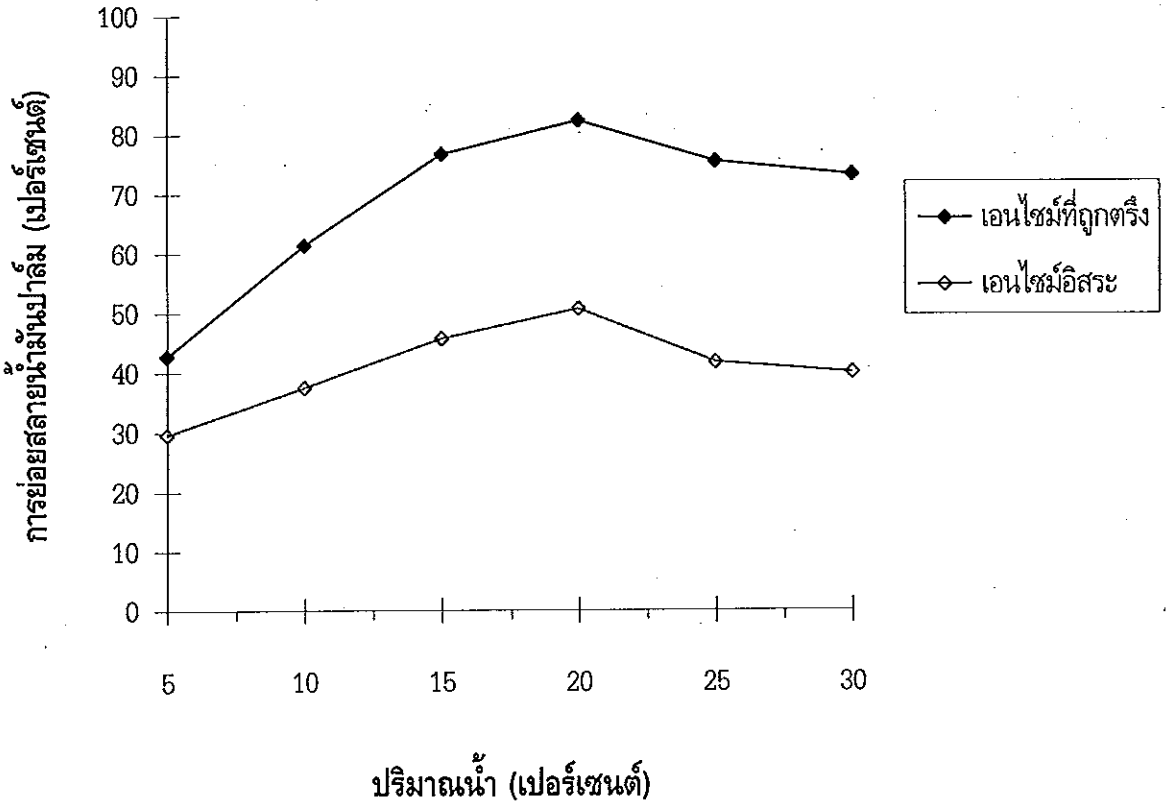
การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงที่ใช้ปริมาณของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.5 ในปฏิกิริยาแตกต่างกันคือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซนต์ พบว่า การใช้ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มสูงขึ้นด้วย เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและไลเปสอิสระ ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุดเท่ากับ 82 และ 51 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มมากกว่านี้ การย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเกิดได้น้อยลง โดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจะย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 75 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเท่ากับ 25 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 22) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากปริมาณของน้ำในปฏิกิริยาที่มีมากขึ้นจะส่งผลให้โอกาสที่เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับน้ำมันปาล์มเกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจากมีปริมาณที่ไม่สมดุลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ไลเปสและน้ำมันปาล์ม

5.4 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

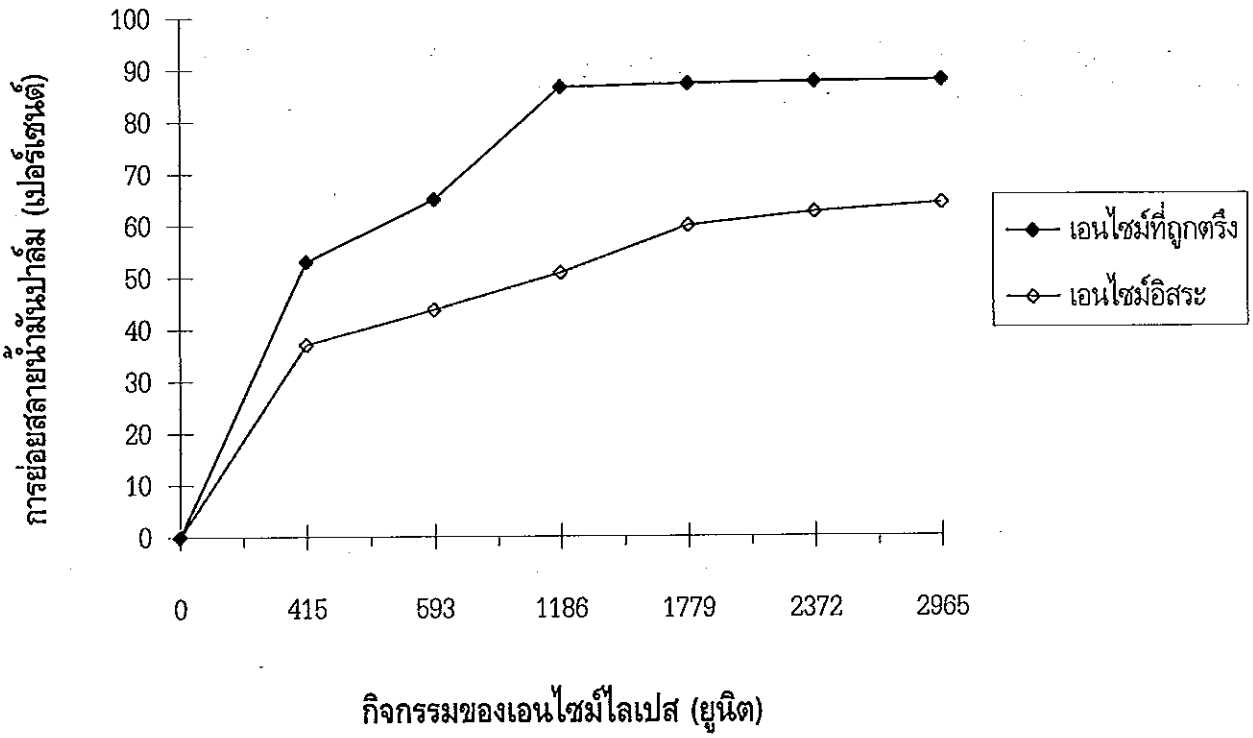
การใช้ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0 ถึง 0.25 กรัม (คิดเป็น 0 ถึง 0.0256 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำมันปาล์ม หรือ 0 ถึง 2,965 ยูนิต) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 และมีปริมาณน้ำเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์ พบว่าการใช้ปริมาณของเอนไซม์ที่สูงขึ้นส่งผลให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเกิดได้สูงขึ้นด้วย การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงมีค่าสูงสุดเท่ากับ 87 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้เอนไซม์เท่ากับ 0.0125 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำมันปาล์ม (เท่ากับ 148 ยูนิตต่อมิลลิลิตรน้ำมันปาล์ม) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์มากขึ้น พบว่า การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการใช้เอนไซม์อิสระ 1,186 ยูนิต (148 ยูนิตต่อมิลลิลิตรน้ำมันปาล์ม) สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 52 เปอร์เซนต์ (ภาพที่ 23) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาณของเอนไซม์ในปฏิกิริยา เท่ากับ 0.0125 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำมันปาล์ม เพราะปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มขึ้นไม่ส่งผลให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเกิดเพิ่มขึ้นมากนัก

5.5 ผลของเวลาต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

การย่อยสลายน้ำมันปาล์มภายใต้สภาวะต่างๆ ของปฏิกิริยาที่ได้จากการศึกษาในข้อ 5.1 ถึง 5.3 โดยใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกันคือ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสทั้งสองรูปแบบเกิดได้มากขึ้น ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ทำให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสเกิดได้



ภาพที่ 22 ผลของปริมาณน้ำต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะของการศึกษา คือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงที่ใช้ 0.03 กรัม เอนไซม์ไลเปส OF อิสระ ความเข้มข้น 0.56, 0.28, 0.18, 0.14, 0.11 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ใช้ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที เวลาทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 23 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง

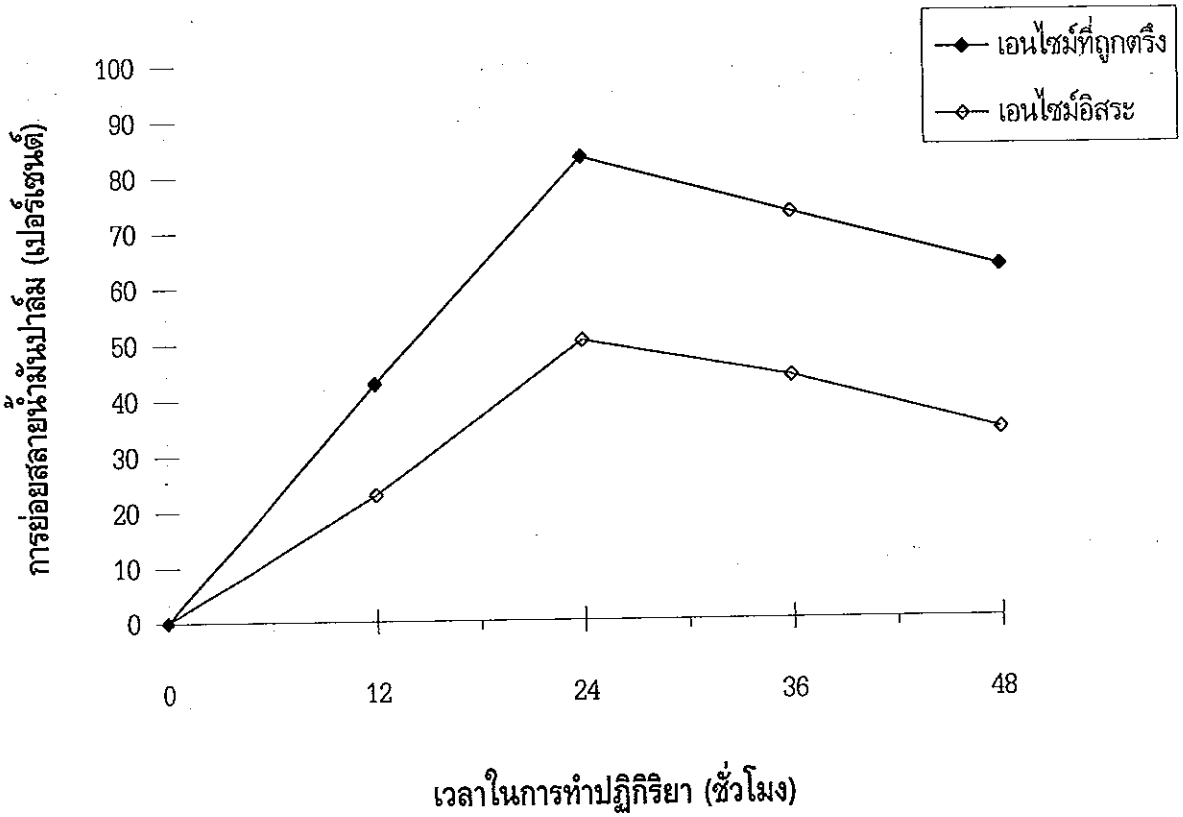
สภาวะของการศึกษา คือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึงใช้เท่ากับ 0, 415, 593, 1,186, 1,179, 2,372 และ 2,965 อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 80 ต่อ 20 อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง

สูงสุดคือ 24 ชั่วโมง ซึ่งสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ถึง 87 และ 53 เปอร์เซนต์ โดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง และเอนไซม์ไลเปสอิสระตามลำดับ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้น การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์จะลดลง (ภาพที่ 24) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากในการทำปฏิกิริยาที่ใช้เวลานานมากส่งผลให้เกิดปฏิกิริยารีเอสเทอริฟิเคชัน (reesterification) ของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม (Okumura, *et al.*,1981) เช่นเดียวกับการรายงานของ Seong และ Ibrahim (1991) ที่รายงานว่าการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงภายในแคลเซียมอัลจิเนตสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น และสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุดที่เวลาเท่ากับ 11 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นพบว่าการย่อยสลาย น้ำมันปาล์มจะลดลงอย่างรวดเร็วอันเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยารีเอสเทอริฟิเคชัน หรืออาจเป็นผลมาจากเอนไซม์ไลเปสคงตัวต่ออุณหภูมิสูงได้ไม่นาน จึงสูญเสียกิจกรรมในการทำงานไป

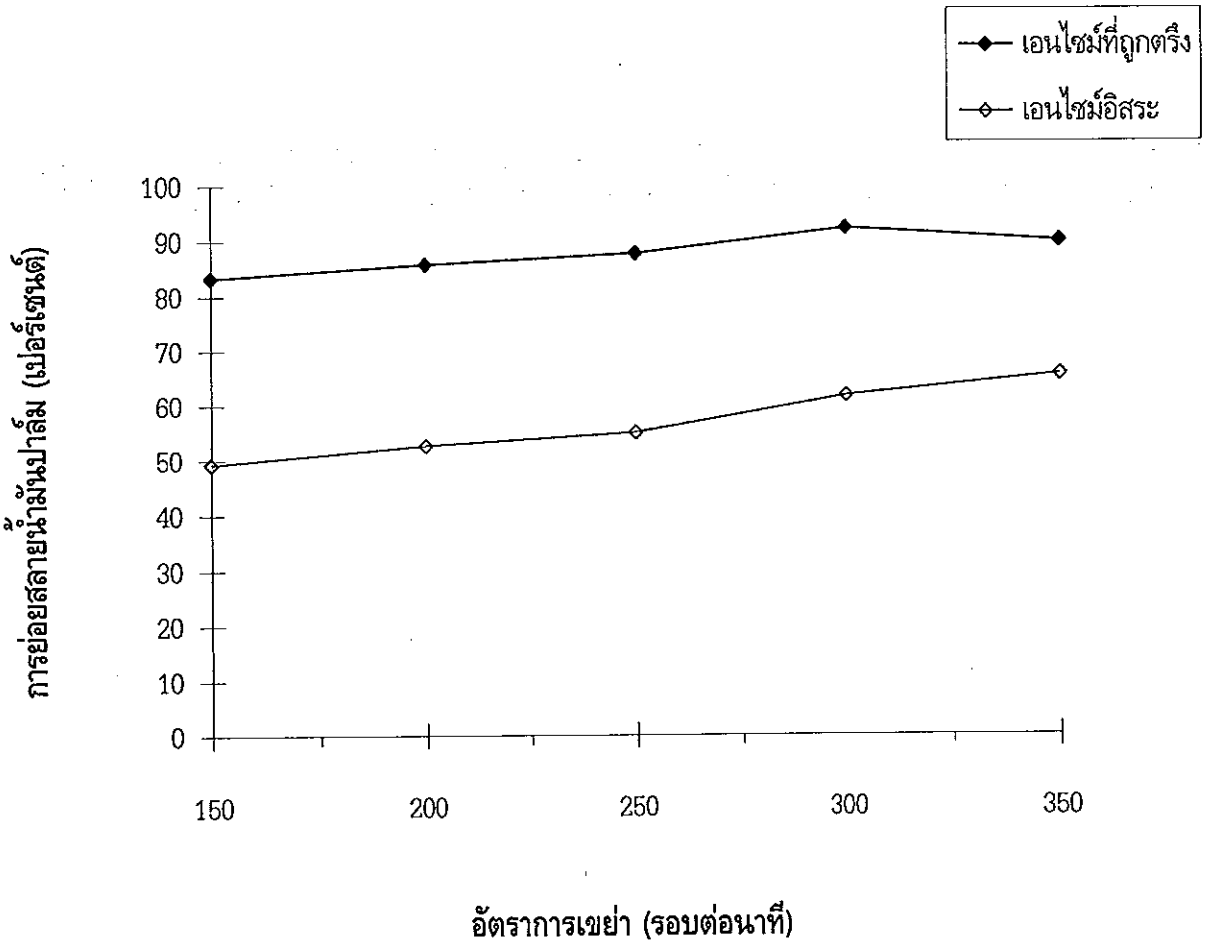
5.6 ผลของอัตราการเขย่าต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มมีน้ำและน้ำมันเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการย่อยสลายโดยเอนไซม์จะเกิดได้ดีก็ต่อเมื่อน้ำและน้ำมันผสมกันได้ดีด้วย การศึกษาถึงอัตราการเขย่าเพื่อให้น้ำและน้ำมันเกิดการผสมกันก็จะย่อมมีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์เช่นกัน การใช้อัตราการเขย่าที่มีความเร็วรอบที่แตกต่างกันตั้งแต่ 150 ถึง 350 รอบต่อนาที พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงและเอนไซม์ไลเปสอิสระสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุดเท่ากับ 92 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที แต่เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 350 รอบต่อนาที จะส่งผลให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มลดลงเหลือ 90 เปอร์เซนต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 25) ในทางตรงกันข้าม เอนไซม์ไลเปสอิสระสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าจาก 300 เป็น 350 รอบต่อนาที โดยย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ถึง 65 เปอร์เซนต์ เพิ่มจากเดิม 4 เปอร์เซนต์ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการเขย่าที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลให้เกิดการผสมเป็นเนื้อเดียวกันระหว่างน้ำและน้ำมันปาล์ม รวมถึงการสัมผัสของเอนไซม์และ น้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นไปจากเดิมมากนัก

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในการศึกษาครั้งนี้ คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 ปริมาณน้ำ 20 เปอร์เซนต์ ปริมาณเอนไซม์ 0.0125 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เท่ากับ 92 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 24 ผลของระยะเวลาต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง สภาวะของการศึกษา คือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึงใช้เท่ากับ 1,186 ยูนิต อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 80 ต่อ 20 อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 25 ผลของอัตราเร็วของการเขย่าต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึง

สภาวะของการศึกษา คือ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึงใช้เท่ากับ 1,186 ยูนิต อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอีนต่อสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.5 80 ต่อ 20 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง

6. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชนิด Packed Bed Column Reactor

การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในคอลัมน์ โดยใช้อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มต่อสารละลายฟอตเฟตบัพเฟอร์เท่ากับ 80 ต่อ 20 (% ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง มีค่ากิจกรรมทั้งหมดเท่ากับ 5930 ยูนิต ด้วยอัตราเร็วของการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจะย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มการไหลวนของน้ำมันปาล์ม โดยพบว่า การไหลวนของน้ำมันปาล์มผ่านคอลัมน์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา เท่ากับ 12 และ 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 43 และ 82 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) แต่ยังน้อยกว่าการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า ผลการทดลองนี้สอดคล้องกันกับ Brady และคณะ (1988) ที่พบว่า การย่อยสลายน้ำมันมะกอกในถังปฏิกรณ์ชนิดเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี่มีค่าน้อยกว่าการย่อยสลายในฟลาสก์ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการอัดตัวกันแน่นของ เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงภายในคอลัมน์ภายหลังการปล่อยน้ำมันลงสู่คอลัมน์เป็นระยะเวลานานๆ อันเป็นผลเนื่องจากขนาดของคอลัมน์ อัตราการไหล พื้นที่ว่างในคอลัมน์ส่วนบน ขนาดของอนุภาคของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง การแยกชั้นของส่วนที่เป็นน้ำและน้ำมัน

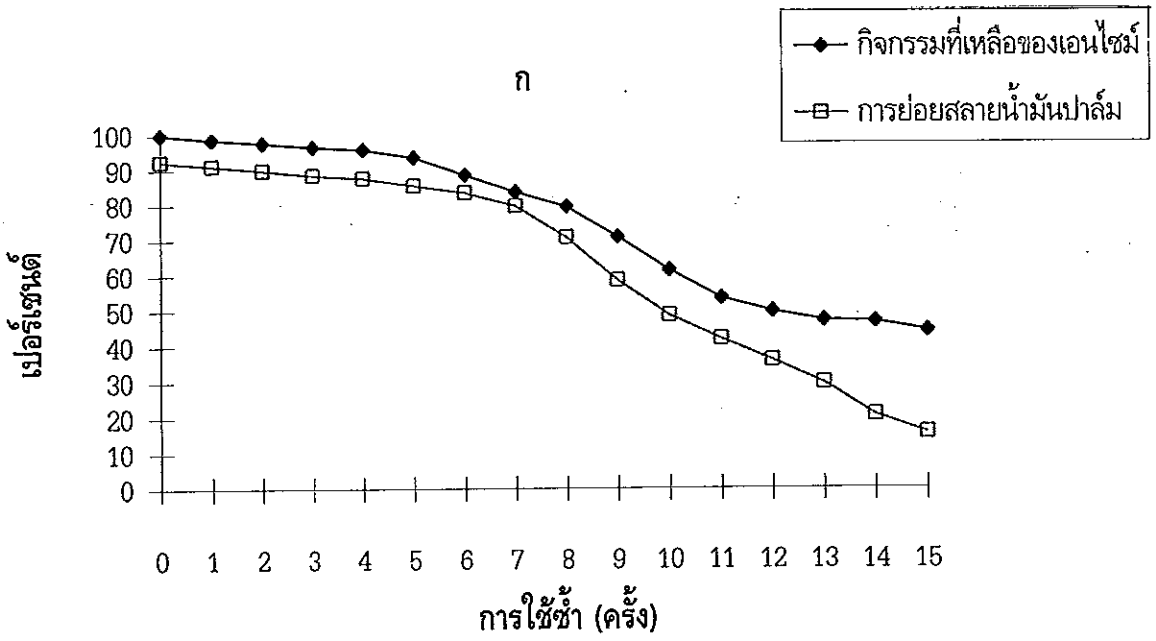
ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาการไหลวนของน้ำมันปาล์มต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชนิด packed bed column reactor โดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล

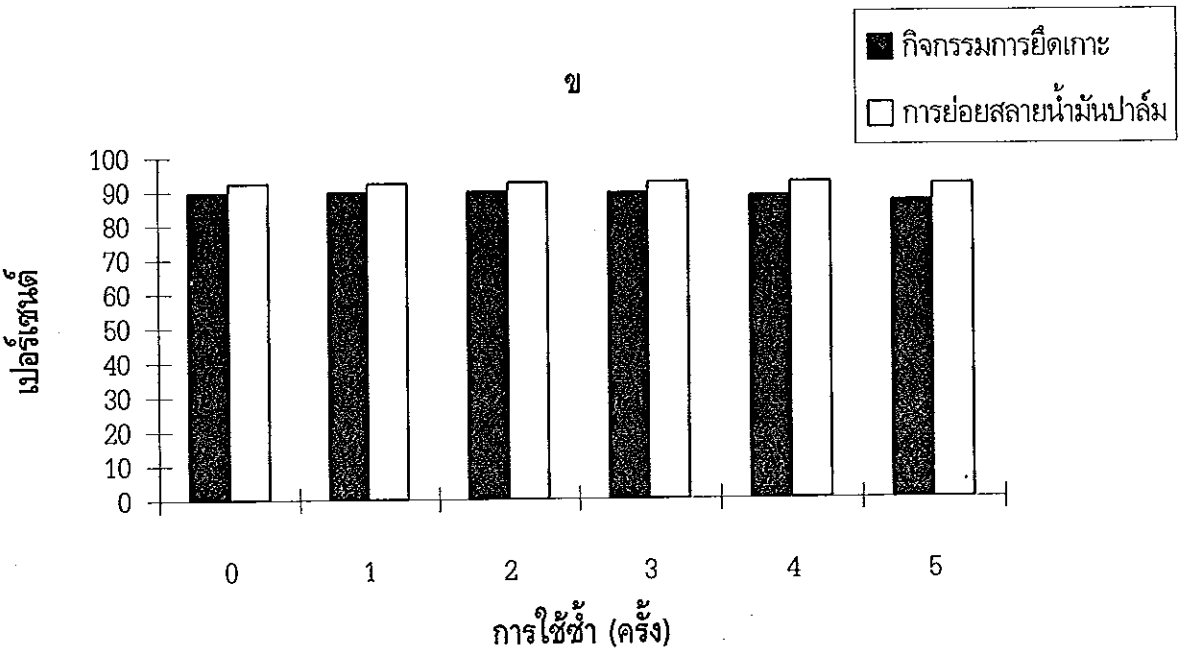
เวลา (ชั่วโมง)	การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม (เปอร์เซนต์)
0	0
12	43
24	82

7. การนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงและตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่

ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงและตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่ โดยการกรองเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงออกจากปฏิกิริยาโดยใช้แผ่นกรองโลหะที่มีขนาด 100 mesh ก่อนการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย หลังจากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปล้างด้วยไอโซออกเทน สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.5 และน้ำกลั่น ตามลำดับ เพื่อกำจัดเอากรดไขมันและกลีเซอรอลที่ติดอยู่ออกไป แล้วนำไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในครั้งต่อไป จากการศึกษา พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ผ่านการใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ถึง 12 ครั้ง (ภาพที่ 26) จึงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่งของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงเริ่มต้น และยังสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เท่ากับ 40 เปอร์เซนต์ ซึ่งให้ผลการทดลองที่ขัดแย้งกันกับการทดลองของ Ruckenstein และ Wang (1993) ที่พบว่า การนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลกลับมาใช้ใหม่มากกว่า 15 ครั้ง กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเท่าเดิม ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของการนำไปใช้ในสภาวะของปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ส่วนการนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ในการศึกษาข้อที่ 6 กลับมาใช้ใหม่จะทำได้ยาก เพราะเอนไซม์ที่บรรจุอยู่ในถังปฏิกรณ์จะอัดตัวกันแน่นหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำให้ยุ่งยากต่อการนำเอาเอนไซม์ออกมาล้างด้วยไอโซออกเทนเพื่อกำจัดกรดไขมันและกลีเซอรอลก่อนนำกลับไปใช้ใหม่

การนำแอคคูเรลที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ทำได้โดยกำจัดเอนไซม์ไลเปสที่ยึดเกาะอยู่กับแอคคูเรลออก โดยนำไปแช่ในเอทานอลบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในอะซิโตนเช่นเดียวกันกับการแช่ในเอทานอลในอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ 100 มิลลิลิตรต่อกรัมเอนไซม์ที่ถูกตรึง แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองโลหะก่อนนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ก่อนการนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสในครั้งต่อไป จากการศึกษา พบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนตัวแอคคูเรลที่นำกลับมาใช้ใหม่เป็นครั้งที่ 5 กิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงมีค่าเท่ากับ 86 เปอร์เซนต์ ซึ่งลดลงไปจากเดิมเพียง 3 เปอร์เซนต์ และย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้เท่ากับ 92 เปอร์เซนต์ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันกับการทดลองของ Virto และคณะ (1994) และ Montero และคณะ (1993) ที่พบว่า แอคคูเรลที่ใช้แล้วสามารถนำกลับมาตรึงเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่า 5 ครั้ง กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเหมือนเดิม ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากแอคคูเรลมีคุณสมบัติคงทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์และในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม





ภาพที่ 26 การนำเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงและแอคคูเรลกลับมาใช้ใหม่

(ก) การนำเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ใหม่ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

(ข) การนำแอคคูเรล กลับมาใช้ใหม่ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

บทที่ 4

สรุป

1. การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 4 ชนิด พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF จาก *C. rugosa* มีกิจกรรมจำเพาะในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงสุด มีค่าเท่ากับ 6,600 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรม คือ 45 องศาเซลเซียส และ 7.5 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส และในช่วงพีเอช 6.0 ถึง 7.5

3. การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนตัวพยุง 4 ชนิดคือแอคคูเรล ซีไลท์ ซิลิกาเจล และ ผงถ่าน พบว่า เอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรล มีค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูงสุด (60 เปอร์เซนต์)

4. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนแอคคูเรล พบว่า การ pretreatment แอคคูเรลด้วยเอทานอล แล้วนำไปตรึงเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.5 และ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ 6 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงเท่ากับ 89 เปอร์เซนต์ และมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพยุง

5. เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรม เท่ากับ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ แต่มีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชดีกว่า โดยเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.5เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีกิจกรรมที่เหลืออยู่มากกว่า 95 เปอร์เซนต์ และมีกิจกรรมที่เหลืออยู่ที่พีเอช 8.5 เท่ากับ 54 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงในสภาพแห้งภายในขวดแก้วที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 145 วัน ในขณะที่เอนไซม์อิสระเก็บรักษาในรูปสารละลายความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 7.5 มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 25 วัน ส่วนการเก็บรักษาเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 90 วัน

6. เมื่อใช้เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พบว่าปัจจัยที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มมีดังนี้ คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 ปริมาณของเอนไซม์ 0.0125 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำมันปาล์ม ปริมาณน้ำในปฏิกิริยา 20 เปอร์เซนต์ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

24 ชั่วโมง และอัตราการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ เอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 92 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าการใช้เอนไซม์ไลเปส OF อิสระ (52 เปอร์เซนต์)

7. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องชนิด packed bed column reactor ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีอัตราการไหลเข้าและออกของสารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มและสารละลายบัพเฟอร์ (อัตราส่วน 80 ต่อ 20) เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงน้ำหนัก 0.5 กรัม (5,930 ยูนิต) พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาในการไหลวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 82 เปอร์เซนต์

8. เอนไซม์ที่ถูกตรึงสามารถนำกลับมาใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มใหม่ได้ 12 ครั้ง จึงจะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงครึ่งหนึ่ง การนำตัวพยุงที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ในการตรึงเอนไซม์เป็นครั้งที่ 5 พบว่า มีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงลดลงไปจากเดิมเพียง 3 เปอร์เซนต์ และย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ 92 เปอร์เซนต์

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของการนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปใช้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการตรึงเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส เพื่อให้ได้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงที่มีกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงสูง มีความคงตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และมีความหลากหลายในการประยุกต์ใช้

2. การนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปใช้ในถังปฏิกรณ์ชนิดต่างๆ ควรมีการศึกษารายละเอียดทางด้านจลพลศาสตร์ของถังปฏิกรณ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงควบคู่กัน

3. ควรมีการศึกษาถึงการพัฒนาการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์แทนกระบวนการผลิตทางเคมี เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และประหยัดการใช้พลังงาน

เอกสารอ้างอิง

เทิดชัย วิรุฬพานิช. 2533. อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์จากน้ำมันปาล์ม. รายงานเศรษฐกิจ ประจำเดือนเมษายน, ธนาคารกรุงไทย จำกัด : 47-54.

นิยม กำลังดี. 2539. เอนไซม์ไลเปส : อนาคตที่เปลี่ยนแปลงในเชิงอุตสาหกรรม. ว. วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 24(3) : 158-163.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไพจิตร จันทรวงศ์. 2530. คู่มือการใช้ประโยชน์และตรวจสอบคุณภาพของพืชน้ำมันและน้ำมันพืช 52 ชนิด. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.

สวนิต อ่อนรุ่งเรือง. 2535. น้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์, 14(1) : 119-122.

Al-Duri, B., Robinson, E., McNerlan, S. and Bailie, P. 1995. Hydrolysis of edible oils by lipase immobilized on hydrophobic support : effect of internal support structure. J. Am. Oil Chem. Soc. 72(11) : 1351-1359.

Belafi-Bako, K., Dombi, A., Szabo, L. and Nagy, E. 1994. Triacylglycerol hydrolysis by lipase in a flat membrane bioreactor. Biotechnol. Tech. 8(9) : 671-674.

Bernath, F.R. and Venkatasubramanian, K. 1986. Methods of enzyme immobilization. *In* Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, pp.230-247, Tainer, J.M., ed. Washington, D.C : American Society for Microbiology.

Bjrkling, F., Godtfredsen, S.E. and Kirk, O. 1991. The future impact of industrial lipase. Tibtech. 9(2) : 360-363.

Brady, C., Metcalfe, L., Staboszewski, D. and Frak, D. 1988. Lipase immobilized on hydrophobic microporous support for the hydrolysis of fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 65(6) : 917-921.

Chaplin, M.F. and Bucke, C. 1990. Enzyme Technology. New York: Cambridge University Press.

Dimitriu, S., Chornet, E., Vidal, P.F. and Moresoli, C. 1995. Polyionic hydrogels as support for immobilization of lipase. Biotechnol. Tech. 9(11) : 833-836.

Gray, C.J., Narang, J.S., and Baker, S.A. 1990. Immobilization of lipase from *Candida cylindraceae* and its used in the synthesis of menthol esters by transesterification. Enzyme. Microb. Technol. 12(10) : 800-807.

Gerald, P.M. and Yamane, T. 1991. Future improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 68(1) : 6-10.

Hayashi, T. and Ikada, Y. 1990. Lipoprotein lipase immobilization on to polyacrolein microspheres. Biotechnol. Bioeng. 36(6) : 593-600.

Huang, F. C. and Ju, Y. H. 1994. Improve activity of a lipase by vacuum drying on to a hydrophobic microporous support. Biotechnol. Tech. 8(11) : 827-830.

IUPAC. 1979. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6th edition Part I. Paris : Pergamon Press.

Kang, S.T. and Rhee, J.S. 1988. Effect of water on hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in reverse phase system. Biotechnol. Lett. 10(3) : 341-346.

Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme immobilization, *In* Biotechnology. 7a : Enzyme Technology, pp. 349-402. Kennedy, J.F. ed. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH.

Kierstan, M.P. and Coughlan, M.P. 1991. Immobilization of proteins by noncovalant procedures, *In* Protein Immobilization Fundamentals and Application, pp. 13-71. Taylor, R.F. ed., New York : Marcel Dekker.

Kimura, Y., Tanaka, A., Somonoto, K., Nihira, T. and Fukui, S. 1983. Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol. 17(2) : 107-112.

Kloosteman, M., Meindersma, G.W., Mayer, M. and Meijer, E.M. 1988. Lipase kinetics : hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow-fiber mambrane reactor. Biotechnol. Bioeng. 38(7) : 727-732.

Kojima, Y., Yokoe, M. and Mase, T. 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK 102. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58(4) : 1564-1568.

Kosugi, Y., Azuma, Y. and Suzuki, H. 1992. Functional immobilization of lipase eliminating lipolysis product inhibition. Biotechnol. Bioeng. 40(4) : 369-374.

Kosuki, Y., Tanaka, H. and Tomizuka, N. 1990. Continuous hydrolysis of oil by immobilized lipase in a countercurrent reactor. Biotechnol. Bioeng. 36(4) : 617-622.

Kosuki, Y. and Azuma, N. 1994. Sythesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 71(12) : 1397-1403.

Kuncova, G., Maleterova, Y. and Lovecka, P. 1994. Hydrolysis of rapeseed oil by lipase immobilized on inorganic oxide supports. Biotechnol. Tech. 8(8) : 535-540.

Linfield, W., Barauskas, A.R. and Samuel, S.L. 1984. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. J. Am. Oil Chem. Soc. 61(2) : 191-195.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., and Randall, R.J. 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Maclellan, M. 1983. Palm Oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 60(2): 320-325.

Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 61(6) : 1067-1071.

Malcata, F.X., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1991. Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil. Biotechnol. Bioeng. 38(8) : 853-868.

Malcata, F.X., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1993. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor : part VI. Multiresponse analyses of temperature and pH effects. Biocatalysis. 8(3) : 201-228.

Miller, D.A., Blanch, H.W. and Prausnitz, J.M. 1990. Enzymatic interesterification of triglycerides in supercritical carbon dioxide, *In* Enzyme-Engineering-10 , pp. 523-528. Okada, H., Tanaka, A. and Blanch, H. eds. New York : Plenum Press.

Mojovic, L., Marincovic, S.S., Kukic, G., Bukaski, B. and Novakovic, V.G. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. Enzyme. Microb. Technol. 15(5) : 438-443.

Mojovic, L., Marincovic, S.S., Kukic, G., Bukaski, B. and Novakovic, V.G. 1994. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of palm oil midfraction in gas lift reactor. Enzyme. Microb. Technol. 16(2) : 159-162.

Montero, S., Blanco, A., Virto, D.M., Landata, C.L., Agud, I., Solozabal, R., Lascarry, M.L., Robobales, D.M., Lama, J.M., and Serra, L.J. 1993. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. Enzyme. Microb. Technol. 15(3) : 239-247.

Morita, S., Narita, H., Matoba, T. and Kito, M. 1984. Synthesis of triacylglycerol by lipase in phosphatidylcholine reverse micellar system. J. Am. Oil Chem. Soc. 61(10) : 1571-1574.

Mustranta, A., Forssell, P. and Poutanen, K. 1993. Applications of immobilized lipase to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. Enzyme. Microb. Technol. 15(2) : 133-139.

Okuda, S.I, Ito, K., Ozawa, H. and Izaki, K. 1991. Treatment of lipid-containing wastewater using bacteria which assimilate lipid. J. Ferment. Bioeng. 71(6) : 424-429.

Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. 1981. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agric. Biol. Chem. 45(1) : 180-189.

Otero, C., Pastor, E., Rua, M.L. and Ballesteros, A. 1990. Hydrolysis and synthesis of butyrylglycerols by lipases, *In* Enzyme-Engineering-10 , pp. 523-528. Okada, H., Tanaka, A. and Blanch, H. eds. New York : Plenum Press.

Ruckenstein, E. and Wang, X. 1993. Lipase immobilized on hydrophobic porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triacylglycerides. Biotechnol. Bioeng. 42(3) : 821-828.

Schwimmer, S. 1981. Source Book of Food Enzymology. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company, INC.

Shaw, J.F., Chang, R.C., Wang, F.F. and Wang, Y.J. 1990. Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. Biotechnol. Bioeng. 35(4) : 132-137.

Smith, J.E. 1985. Aspects of Microbiology II : Biotechnology Principles. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.

Seong, Y.L. and Ibrahim, C.O. 1991. Hydrolysis of palm oil by calcium-alginate entrapped lipase of *Candida cylindracea*. J. Biosci. 2(1) : 47-58.

Sugihara, A., Shimada, Y. and Tominaga, Y. 1988. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. Agric. Biol. Chem. 52(6) : 1591-1592.

Veeraragavan, K. and Gibbs, B.F. 1989. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. Biotechnol. Lett. 11(5) : 345-348.

Virto, D.M., Agud, I., Montero, S., Blanco, A., Solozabal, R., Lascaray, M.J., Llama, J.M., Serra, L.J., Landera, C.L. and Renobales, D.M. 1994. Hydrolysis of animal fat by immobilized *Candida rugosa* lipase. Enzyme. Microb. Technol. 16(1) : 61-65.

Virto, D.M., Agud, I., Montero, S., Blanco, A., Solozabal, R., Lascaray, M.J., Llama, J.M., Serra, L.J., Landera, C.L. and Renobales, D.M. 1995. Kinetic properties of soluble and immobilized *Candida rugosa* lipase. Appl. Biochem. Biotechnol. 50(2) : 127-136.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview. J. Am. Oil. Chem. Soc. 64(2) : 1657-1661.

Yang, D. and Rhee, J.S. 1992. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. Biotechnol. Bioeng. 40(6) : 748-752.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry, *et al.*, 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : 1% (w/v) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.H_2O$)

2. สารละลาย B : 2% (w/v) โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)

3. สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

4. สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)

5. Folin-Ciocalteau reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตรกับสารละาย D 49 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

2. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่า สารละลาย F

3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที

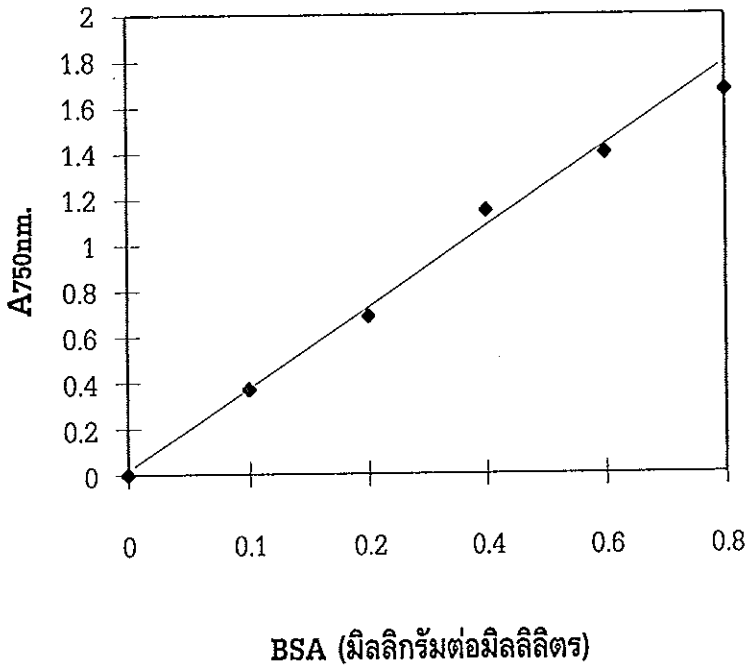
4. ใส่สารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดในข้อ 3.

5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer เป็น blank ทำตามขั้นตอน 3.-6.

7. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0.05-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามขั้นตอน 3 -6 โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่าง สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

8. นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในภาพภาคผนวก ก 1



ภาพภาคผนวก ก 1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน (BSA)

2. การวิเคราะห์ค่ากรดและปริมาณกรดไขมันอิสระ ตามวิธีของ IUPAC. (1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)
2. สารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้น 1เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข)
3. สารผสมระหว่างเอทานอล (95 เปอร์เซนต์) กับไดเอทิลอีเทอร์อัตราส่วน 1 ต่อ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 2 กรัม ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารผสมระหว่างเอทานอลกับไดเอทิลอีเทอร์ให้เป็นกลาง โดยการเติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 5 หยด และปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทีละหยด พร้อมทั้งเขย่าจนได้สารละลายเป็นสีชมพูถาวร

3. เติมสารผสมระหว่างเอทานอลกับไดเอทิลอีเทอร์ที่เป็นกลาง 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในสารผสม

4 ไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ขณะไตเตรทต้องเขย่าอย่างแรง จนกระทั่งได้สารละลายสีชมพูคงที่อยู่ประมาณ 1 นาที

5. คำนวณค่ากรดจากสูตร

$$\text{ค่ากรด} = \frac{\text{ปริมาณด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร) X ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล) X 56.1}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณกรดไขมันอิสระ*} = \frac{\text{ปริมาณด่างที่ใช้ (มิลลิลิตร) X ความเข้มข้นด่าง (นอร์มอล) X 25.6}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

* **หมายเหตุ** ปริมาณกรดไขมันอิสระคำนวณเป็นร้อยละในรูปของกรดปาล์มิติก

3. การเขียนกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)
2. สารละลายฟีนอฟทาลีนความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข)
3. สารผสมระหว่างเอทานอล (95 เปอร์เซนต์) กับไดเอทิลอีเทอร์อัตราส่วน 1 ต่อ 1

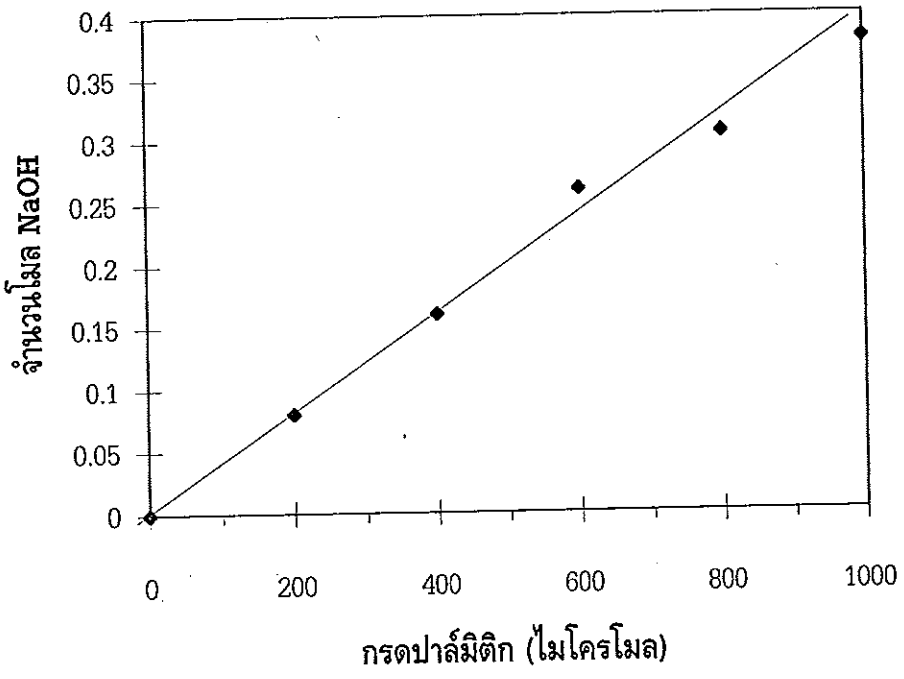
วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งกรดปาล์มิติกที่มีความบริสุทธิ์สูง (extra pure) 2.564 กรัม ละลายด้วยสารผสมระหว่างเอทานอลและไดเอธิลอีเทอร์ ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร (จะได้กรดปาล์มิติกเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)

2. นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารผสมให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2 หยด

3. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนได้สารละลายสีชมพูคงที่นานประมาณ 1 นาที

4. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนโมลของโซเดียมไฮดรอกไซด์และจำนวนโมลของกรดปาล์มิติก ดังแสดงในภาพภาคผนวก ก 2



ภาพภาคผนวก ก 2 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก

4. การวิเคราะห์ค่าสปอนิฟิเคชัน (saponification value) ตามวิธีของ IUPAC (1979)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.สารละลายแอลกอฮอลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)

3. สารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้น1 เปอร์เซนต์(ภาคผนวก ข)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักเท่ากับ 2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่สะอาดและแห้ง

2. เติมสารละลายแอลกอฮอลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต และเติมลูกแก้ว

3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่น รีฟลักซ์สารละลาย (ให้เดือดเบาๆ) นาน 1 ชั่วโมง

4. นำขวดใส่สารละลายออกจากอุปกรณ์ควบแน่นของชุดกลั่น

5. เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 5 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค

6. เตรียมและไตเตรท blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่ต้องใส่น้ำมันตัวอย่าง

7. คำนวณค่าสปอนิฟิเคชันจากสูตร

$$\text{ค่าสปอนิฟิเคชัน} = \frac{(B - A) \times N \times 56.1}{W}$$

โดย

B = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

A = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรทกับ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M citric acid ($C_6H_8O_7.H_2O$ 42.02 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M sodium citrate (trisodium citrate $2H_2O$, $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ 58.82 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) และไม่ควรใช้เกลือ sodium citrate ชนิดที่มี 5.5 H_2O

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
3.2	43.7	6.3
3.4	40.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.5	26.7	23.3
4.6	25.5	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0
5.4	16.0	34.0
5.5	14.8	35.2
5.6	13.7	36.3
5.8	11.8	38.2
6.0	9.5	40.5

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$ 35.61 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
6.0	87.7	12.3
6.1	85.0	15.0
6.2	81.5	18.5
6.3	77.5	22.5
6.4	73.5	26.5
6.5	68.5	31.5
6.6	62.5	37.5
6.7	56.5	43.5
6.8	51.0	49.0
6.9	45.0	55.0
7.0	39.0	61.0
7.1	33.0	67.0
7.2	28.0	72.0
7.3	23.0	77.0
7.4	19.0	81.0
7.5	16.0	84.0
7.6	13.0	87.0
7.7	10.5	90.5
7.8	8.5	91.5
7.9	7.0	93.0
8.0	5.3	94.7

3. การเตรียม Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B x มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.114 กรัมต่อลิตร

สารละลาย B : 0.2 M HCl

พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
8.1	26.2
8.2	22.9
8.3	19.9
8.4	17.2
8.5	14.7
8.6	12.4
8.7	10.3
8.8	8.5
8.9	7.0
9.0	5.7

4. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

วิธีเตรียม

เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

วิธีหาความเข้มข้นมาตรฐาน

ชั่งโซเดียมเทตราบอเรต (Borax : $Na_2B_4O_7.10H_2O$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2.0 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร เติมเมทิลเรด 3 หยด (ใช้เป็นอินดิเคเตอร์) นำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่เตรียมไว้ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติ สามารถคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริคได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนักของโซเดียมเทตราบอเรต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร)} \times 0.1907}$$

5. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

วิธีเตรียม

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ เอ อาร์ เกรด น้ำหนัก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล เก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขวดพลาสติก

การหาความเข้มข้นมาตรฐาน

นำโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลท (potassium acid phthalate : $KHC_8H_4O_4$) ไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักให้ได้แน่นอน 0.4 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปลอดคาร์บอนไดออกไซม์ (ต้มน้ำกลั่นเดือด 20 นาที) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้สารละลายฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณความเข้มข้นมาตราฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้จากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ = $\frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลท (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายด่างที่ใช้ไตเตรท x 0.2042}}$

5. การเตรียมสารละลายโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์

ชั่งโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ No. 2000 น้ำหนัก 20 กรัม ละลายในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 ลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กความเร็วเท่ากับ 1000 รอบต่อนาที จนกว่าจะละลายหมด นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเตรียมสับสเตรท

6. การเตรียมสารละลายแอลกอฮอลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยเอทานอล (95 เปอร์เซนต์) สารละลายที่ได้ควรจะมีสีเหลืองฟางหรือไม่มีสี สารละลายที่เตรียมได้จะทิ้งไว้ 5 วันก่อนนำไปใช้

7. การเตรียมสารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์

ชั่งฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ละลายในเอทานอล (95 เปอร์เซนต์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายวุฒิชัย พิชัยยุทธ์

วัน เดือน ปีเกิด 28 มกราคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2536

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาของสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)