



การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม
โดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป
Production of Monoacylglycerol from Glycerolysis of Palm Oil
by Immobilized Lipase

โสภา พรหมดวง

Sopa Prumduang

เลขหมู่	BK898.E58 ๘๙๔ ๒๕๔๒	๒.๒
Order Key	28819	
Bib Key	177593	
	10 ก.ค. 2543	

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนเอซัลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม
โดยเอ็นไซม์ไลเปสตรึงรูป
ผู้เขียน นางสาวโสภา พรหมดวง
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณ หันพงษ์กิตติกุล)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณ หันพงษ์กิตติกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐธรรมพ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐธรรมพ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันดินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(ดร. รพีพร โสคติพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. นพรัตน์ บำรุงรักษ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมัน
 ปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสตรังรูป

ผู้เขียน นางสาวโสภา พรหมดวง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

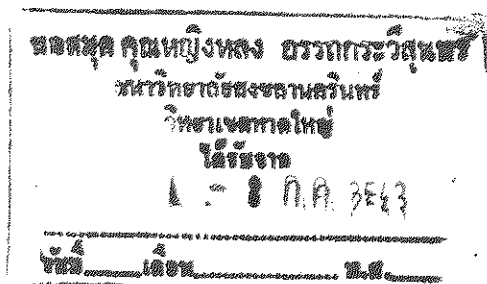
ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปส (triacylglycerol hydrolases : E.C. 3.1.1.3) ทางการค้า 5 ชนิด คือ ไลเปส LP (*Chromobacterium viscosum*), ไลเปส M (*Mucor javanicus*), ไลเปส PS (*Pseudomonas* sp.), ไลเปส AK (*Pseudomonas fluorescens*) และ ไลเปส D (*Rhizopus delemar*) เพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากปฏิกิริยาคลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP มีกิจกรรมจำเพาะการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงสุด (233.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เมื่อนำเอนไซม์นี้ไปใช้ในปฏิกิริยาคลีเซอโรไลซิสเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอนไซม์ไลเปส LP มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 6.5 และ 55 องศาเซลเซียส เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปส LP ด้วยวิธีดูดซับบนตัวพอง 6 ชนิด คือ แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมไพโรฟอสเฟต ซิลิกาเจล และแอกกูเรล พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP ที่ตรึงบนซิลิกาเจลและแอกกูเรลมีกิจกรรมเอนไซม์หลังการยัดเกาะสูงสุด คือ 82.81 เปอร์เซ็นต์ และ 80.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์ไลเปส LP ที่ตรึงบนตัวพองชนิดต่างๆ มาใช้ในปฏิกิริยาคลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงบนซิลิกาเจล และแอกกูเรลให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดเป็น 28.6 และ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส LP บนซิลิกาเจล คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซิลิกา 2.0 กรัม อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการตรึง 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP ที่ตรึงได้มีกิจกรรมเอนไซม์

หลังการยึดเกาะบนตัวพวยง 95.05 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงเท่ากับ 0.60 หน่วยต่อมิลลิกรัมตัวพวยง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป คือ ปริมาณของเอนไซม์ 15 หน่วย สัดส่วนโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 3.7 ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 8 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูปมาใช้เป็นครั้งที่ 3 ได้โมโนเอซิลกลีเซอรอลต่ำสุด 28 เปอร์เซ็นต์ และคงเหลือกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม 0.18 หน่วยต่อมิลลิกรัมตัวพวยง



Thesis Title Production of Monoacylglycerol from Glycerolysis of Palm Oil
 by Immobilized Lipase
Author Miss Sopa Prumduang
Major Program Biotechnology
Academic Year 1999

Abstract

Five commercial lipases (triacylglycerol hydrolases : E.C. 3.1.1.3) of lipase LP (*Chromobacterium viscosum*), lipase M (*Mucor javanicus*), lipase PS (*Pseudomonas* sp.), lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) and lipase D (*Rhizopus delemar*) were used for monoacylglycerol production from glycerolysis of palm oil. Lipase LP had the highest specific activity of 233.0 units/mg protein. When this lipase was used in the glycerolysis reaction, it provided the highest yield of 70% monoacylglycerol at 30 °C after 72 hours. Lipase LP had the optimum temperature and pH for hydrolytic activity of palm oil at 55 °C and 6.5 respectively. Immobilization of lipase by physical adsorption on calcium carbonate, calcium sulphate, calcium pyrophosphate, celite, silica gel and accurel showed that the enzyme immobilized on celite and accurel had the highest binding activity of 82.81 and 80.28% respectively. When lipase LP adsorbed on various supports was used for glycerolysis reaction of palm oil, celite and accurel were the best support with the highest glycerolytic activity of 28.6 and 27.5 % respectively at 30 °C after 72 hours. The optimal immobilized conditions were 2.5 mg/ml of enzyme concentration, 4-30 °C, 1 hour of immobilized time. Under these conditions, the immobilized enzyme retained 95.05% of its original activity and 0.60 units/mg celite.

Optimal conditions for glycerolysis reaction of palm oil by immobilized lipase LP were observed in a reaction mixture containing 15 units of immobilized enzyme, 3.7 molar ratio of glycerol to palm oil and 8% water content in glycerol at 40 °C for 24 hours and followed by 30 °C for 72 hours. The highest monoacylglycerol production was 80%. Reusability of immobilized enzyme was 3 times for glycerolysis reaction of palm oil and produced less than 28% monoacylglycerol. The immobilized lipase had hydrolytic activity of 0.18 units/mg celite.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนการทำวิจัยการค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และดร. รพีพร โสทธิพันธุ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัย ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ตลอดจนทุกท่านที่มีได้กล่าวมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจในการทำวิจัยและให้คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

โสภา พรหมดวง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
คำย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	42
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	43
วัสดุ	43
อุปกรณ์	44
วิธีการวิเคราะห์	44
วิธีการศึกษา	47
3. ผลและวิจารณ์	53
4. สรุป	83
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	93
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	93
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	103

สารบัญ (ต่อ)

ประวัติผู้เขียน

หน้า

107

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม	3
2. การจำแนกชนิดของการเรียงตัวของกรดไขมันในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันปาล์มตามคุณสมบัติความอิมัตว	5
3. ปริมาณและคุณสมบัติของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอิน	7
4. ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า	12
5. การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า	14
6. ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน	25
7. การสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน	33
8. เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมัน	35
9. กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในระบบ two-phase emulsion system ของไลเปสชนิดต่างๆ	54
10. ปริมาณสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ไลเปส 5 ชนิด	55
11. การตรึงเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ <i>Chromobacterium viscosum</i> บนตัวพยุงชนิดต่างๆ	63
12. ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ <i>Chromobacterium viscosum</i> ต่อการตรึงเอนไซม์กับซีไลท์	66
13. การตรึงเอนไซม์ไลเปส LP บนซีไลท์ที่อุณหภูมิต่างๆ	67
14. ผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส LP บนซีไลท์	69
15. ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป	72
16. การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่	82

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. โครงสร้างของเอซิทกลีเซอรอล	4
2. แนวทางการใช้ประโยชน์ของน้ำมันปาล์มและน้ำมันจากเมล็ดปาล์ม	9
3. การเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ของเอนไซม์ไลเปส	16
4. การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์	24
5. การผลิตโมโนเอซิทกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส	30
6. ผลของอุณหภูมิ (A) และพีเอช (B) ต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ <i>Chromobacterium viscosum</i>	57
7. แสดงความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ <i>Chromobacterium viscosum</i>	59
8. ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ <i>Chromobacterium viscosum</i> ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	60
9. ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ <i>Chromobacterium viscosum</i> ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	61
10. การผลิตโมโนเอซิทกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ที่ถูกตรึงบนตัวพียงชนิดต่างๆ	64
11. ผลของปริมาณเอนไซม์ LP ตรึงรูปต่อการผลิตโมโนเอซิทกลีเซอรอล	71
12. ผลของปริมาณน้ำในกลีเซอรอลต่อการผลิตโมโนเอซิทกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป	74
13. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโมโนเอซิทกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป	76
14. สารประกอบต่างๆ ที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	77

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15. ผลของระยะเวลาการบ่มต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมัน ปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP โครงรูป อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิ เป็น 30 องศาเซลเซียส (A) และ 25 องศาเซลเซียส (B) จนครบเวลา 120 ชั่วโมง	79
16. ผลของระยะเวลาการบ่มต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมัน ปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP โครงรูป อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิ เป็น 10 องศาเซลเซียส (A) และ 5 องศาเซลเซียส (B) จนครบเวลา 120 ชั่วโมง	80
ภาพภาคผนวก ก1	95
ภาพภาคผนวก ก2	97
ภาพภาคผนวก ก3	101

คำย่อ

AOT-RM	= sodium bis (2-ethylhexy) sulphosuccinate reverse micelles
DAG	= diacylglycerol
DHA	= docohexaenoic acid
EPA	= eicosapentaenoic acid
FFA	= free fatty acid
MAG	= monoacylglycerol
MCT	= medium-chain triglycerides
PEG	= polyethylene glycol
PVC	= polyvinylchloride
SME	= sulphonated methyl ester
TAG	= triacylglycerol

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย มีการปลูกกันมากในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศ อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันก็ยังประสบกับการไม่มีเสถียรภาพในส่วนของคุณภาพและราคา เนื่องจากรูปแบบการใช้ประโยชน์จากน้ำมันปาล์มภายในประเทศโดยส่วนใหญ่ใช้เพื่อการประกอบอาหารเพียงอย่างเดียว แต่ในปัจจุบันน้ำมันปาล์มสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าเพิ่ม โดยการใช้เทคโนโลยีทางด้านโอเลโอเคมี (oleochemistry) เช่น กรดไขมัน เมทิลเอสเทอร์ แฟตตีแอลกอฮอล์ แฟตตีเอมีน โมโนเอซิลกลีเซอรอลและกลีเซอรอล เป็นต้น ซึ่งจำเป็นต้องใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตในอุตสาหกรรมต่างๆอีกหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ ยางรถยนต์ พลาสติก ยาและเครื่องสำอาง ผงซักฟอกและกระดาษ เป็นต้น อุตสาหกรรมต่อเนื่องเหล่านี้กำลังอยู่ในภาวะการขยายตัว ทำให้ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมดังกล่าวมีการนำเข้าเคมีภัณฑ์เหล่านี้เป็นจำนวนมาก ทั้งๆ ที่ประเทศไทยมีศักยภาพที่จะผลิตได้ปีหนึ่งๆ ไม่ต่ำกว่า 100 ล้านบาท (เทิดชัย วิรุพพานิช, 2533) จึงนับว่าเป็นโอกาสหรือช่องทางใหม่ที่น่าสนใจในการผลิตสินค้าเพิ่มมูลค่าจากน้ำมันปาล์ม อีกทั้งยังจะมีส่วนช่วยเกื้อหนุนให้อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันมีเสถียรภาพดีขึ้นด้วย

การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลซึ่งใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมอาหาร และใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง เป็นต้น ได้จากการสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมีจากการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมัน ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (200-250 °ซ) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีสีเข้มและคุณภาพไม่ดี เกิดสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ จึงต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน และปฏิกิริยาไม่มีความจำเพาะเจาะจง ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่ำ การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตโมโนเอซิลกลี

เซอร์อลจากการกลีเซอโรไลด์ซึ่งของน้ำมันและไขมัน ปัจจุบันได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง เพราะวิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการย่อยสลายโดยใช้วิธีทางเคมี ฟิสิกส์ คือ เกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรงเกิดได้ด้วยความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ใช้ขนาดของถังปฏิกรณ์เล็กกว่า ทำให้ประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะเจาะจงสูง เกิดของเสียและวัสดุเหลือทิ้งน้อย แต่อย่างไรก็ตาม การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตทางการค้ายังมีน้อย เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องราคาของเอนไซม์ที่สูง อัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ และข้อจำกัดในด้านการละลายของน้ำมันในน้ำ ทำให้การควบคุมปฏิกิริยาทำได้ยาก ตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงรูปเอนไซม์ได้พัฒนาก้าวหน้าไปมาก เพื่อแก้ปัญหาการใช้เอนไซม์ไลเปสอิสระในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปมีข้อดีคือ การควบคุมปฏิกิริยาทำได้ง่ายกว่าการใช้เอนไซม์อิสระเพราะสามารถทำปฏิกิริยาได้ทันทีโดยเพียงแต่แยกเอาเอนไซม์ตรึงรูปออกมา มีความคล่องตัวในการผลิตคือสามารถใช้ได้ทั้งในการผลิตแบบกะหรือแบบต่อเนื่องและสามารถปรับการผลิตให้เหมาะสมได้ตามต้องการ เอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่จึงเป็นการลดต้นทุนการผลิตลงได้

การตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของภาคใต้รองจากยางพารา นิยมปลูกกันมากในจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ผลผลิตของปาล์มน้ำมันจะถูกนำไปแปรรูปเป็นน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีแนวโน้มการผลิตสูงขึ้นทุกๆปี กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมี 3 วิธี คือกระบวนการผลิตแบบใช้น้ำซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน กระบวนการผลิตแบบอย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม และกระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม ซึ่งจะได้น้ำมันปาล์ม 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ ถ้าได้จากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (palm kernel) เรียกว่าน้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ส่วนที่

ได้จาก mesocarp เรียกว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil) เมื่อนำน้ำมันปาล์มไปแยกส่วนและทำให้บริสุทธิ์จะได้ส่วนของของเหลว ที่เรียกว่าน้ำมันปาล์มโอเลอิน (palm olein) ซึ่งเป็นน้ำมันปาล์มที่ใช้กันทั่วไป และได้ส่วนของแข็งที่เรียกว่า ปาล์มสเตียร์น (palm stearin)

น้ำมันปาล์มมีส่วนประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน พื้นดินบริเวณเพาะปลูกและภูมิอากาศ น้ำมันเมล็ดปาล์มและน้ำมันปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน เช่น น้ำมันจากเมล็ดปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวสูง (78.82%) ในขณะที่น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 48.05 และ 51.95 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จึงนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม

	น้ำมันเมล็ดปาล์ม	น้ำมันปาล์ม
Iodine Value	14-20	43-59
Acid Value	20	15
Saponification Value	240-257	195-210
Unsaponification matter (%)	1	1
Colour(Lovibond)*	10Y:1R25	Y:2.5R
Total saturated fatty acid (%)	78.82	48.05
Total unsaturated fatty acid (%)	21.18	51.95

* :cell, 5 in.

ที่มา : คัดแปลงจากไพจิตร จันทรวงศ์ (2530)

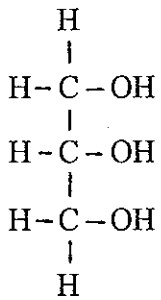
2. เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอลหรือไขมันเป็นกลางเป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์กลีเซอรอลดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อพบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เอซิลกลีเซอรอลแบ่งออกเป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล

(triacylglycerol, TAG) ไคเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol, DAG) และ โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol, MAG)

ตำแหน่งคาร์บอนอะตอม

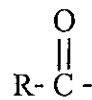
หมู่เอซิล



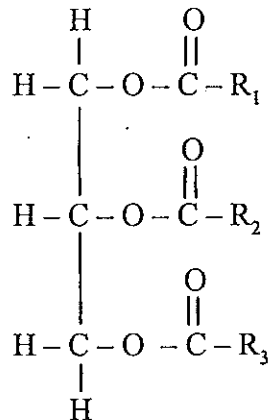
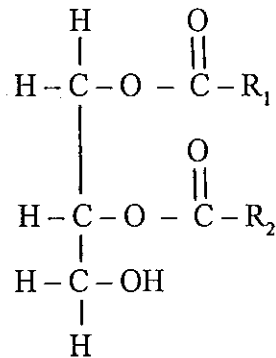
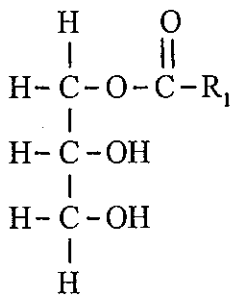
1 หรือ α

2 หรือ β

3 หรือ α'



กลีเซอรอล



1- โมโนเอซิลกลีเซอรอล

1,2- ไคเอซิลกลีเซอรอล

ไตรเอซิลกลีเซอรอล

ภาพที่ 1 โครงสร้างของเอซิลกลีเซอรอล

ที่มา : อภัสตรา ชมิดท์ (2537)

2.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์เป็นเอซิลกลีเซอรอลที่พบมากที่สุด ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอล ถ้าเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกันเรียกไตรเอซิลกลีเซอรอลธรรมดา (simple triacylglycerol) เช่น ไตรปาล์มิโตอิลกลีเซอรอล (tripalmitoyl glycerol) แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เรียกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลผสม (mixed triacylglycerol) เช่น 1-ปาล์มิโตอิลไดสเตอโรอิลกลีเซอรอล (1-palmitoyl distearoyl glycerol) (อากัสตรา ชมิคท์, 2537) ในน้ำมันปาล์มมีโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 2 ตำแหน่งมากที่สุดร้อยละ 48 รองลงมา คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว 2 ตำแหน่งร้อยละ 34.6 ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลมีผลโดยตรงกับการตกผลึกของน้ำมัน

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดของการเรียงตัวของกรดไขมันในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันปาล์มตามคุณสมบัติความอิ่มตัว

Triglyceride Type	Composition (%)
Trisaturated (GS ₃)	10.2
Disaturated (GS ₂ U)	48.0
Monosaturated (GSU ₂)	34.6
Triunsaturated (GU ₃)	6.8

ที่มา : Hui (1996)

2.2 โมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอล

โมโน-และไดเอซิลกลีเซอรอลเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุล ตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ เอซิลกลีเซอรอลทั้งสองชนิดนี้ไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติ แต่จะพบในไขมันที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสที่ไม่สมบูรณ์ โดย

จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการสังเคราะห์หรือคัดแปลงโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหรือน้ำมันโอเอซิลกลีเซอรอลใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยาและเครื่องสำอาง ชนิดต่างๆ (Howe-Grant, *et al.*, 1994 อ้างโดย Rosu, *et al.*, 1997)

3. กรดไขมัน (Fatty acid)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 4-24 อะตอม ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลปลายอีกข้างมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของนอนโพลาร์ไฮโดรคาร์บอน ไฮโดรคาร์บอนทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ และเป็นโซ่ยาวที่อิ่มตัว(ไม่มีพันธะคู่) หรือไม่อิ่มตัวคือมีพันธะคู่ หรือมีพันธะสาม (triple bond) 1 คู่หรือมากกว่า กรดไขมันแต่ละชนิดมีความยาวของสายโซ่ จำนวนและตำแหน่งของพันธะไม่อิ่มตัวแตกต่างกัน กรดไขมันที่พบในเซลล์พืชหรือสัตว์จะไม่พบในรูปอิสระแต่จะอยู่รวมกันเป็นลิปิดด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งถูกย่อยสลายได้โดยการใช้เอนไซม์หรือสารเคมี

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูงจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะ C16 และ C18 พบมากที่สุด และถ้าหากมีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ก็จะเป็นแบบนอนคอนจูเกต (nonconjugated double bond) (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) โดยมีคอนฟิเกอร์ชันแบบซิส กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ (C16-C18) ละลายน้ำไม่ได้ แต่เกล็ดของมันสามารถสร้างไมเซลล์ (micelles) ในน้ำได้ และไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) (อาภัสตราชมิตท์, 2537)

กรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำมันปลา คือ กรดปาล์มิติก มีอยู่ประมาณร้อยละ 37.9 ถึง 47.7 และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่พบมากได้แก่ กรดโอเลอิก มีอยู่ร้อยละ 40.7 ถึง 43.9 สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก (polyunsaturated fatty acid) ซึ่งได้แก่ กรดไลโนลิก มีร้อยละ 10.4 ถึง 13.4 และกรดแอลฟาไลโนลินิก มีร้อยละ 0.1 ถึง 0.6 (ตารางที่ 3) นอกจากส่วนที่เป็นกรดไขมันแล้ว น้ำมันปลายังมีส่วนที่ไม่สามารถ

เกิดสบู่ได้ ซึ่งได้แก่ คาโรทีนอยด์ (carotenoid) และโทโคเฟอรอล (tocopherol) สูง ซึ่งเมื่อผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณของคาโรทีนอยด์จะลดลง (MacLellan, 1983)

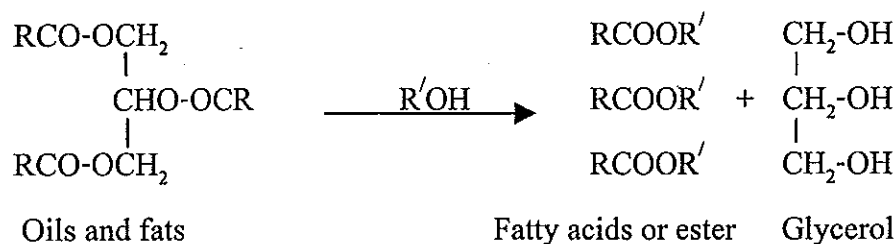
ตารางที่ 3 ปริมาณและคุณสมบัติของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอิน

กรดไขมัน	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)
ลอริก (Lauric)	44.2	0.1-1.1
ไมริสติก (Myristic)	52.0	0.9-1.4
ปาล์มิติก (Palmitic)	63.1	37.9-47.7
สเตียริก (Stearic)	69.6	4.0-4.8
โอเลอิก (Oleic)	13.4	40.7-43.9
ไลโนลิก (Linoleic)	-17.0	10.4-13.4
ไลโนเลนิก (Linolenic)	-17.0	0.1-0.6

ที่มา : MacLellan (1983)

4. โอเลโอเคมีจากน้ำมันปาล์ม

โอเลโอเคมี คือ สารเคมีที่ได้จากน้ำมันและไขมัน ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนที่สำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ซึ่งเดิมวัตถุดิบเหล่านี้ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ขั้นตอนการย่อยสลาย (hydrolysis) หรือการทำปฏิกิริยากับหมู่แอลกอฮอล์ (alcoholysis) ของน้ำมันและไขมันเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมโอเลโอเคมี ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กรดไขมัน หรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน ตามลำดับดังสมการ

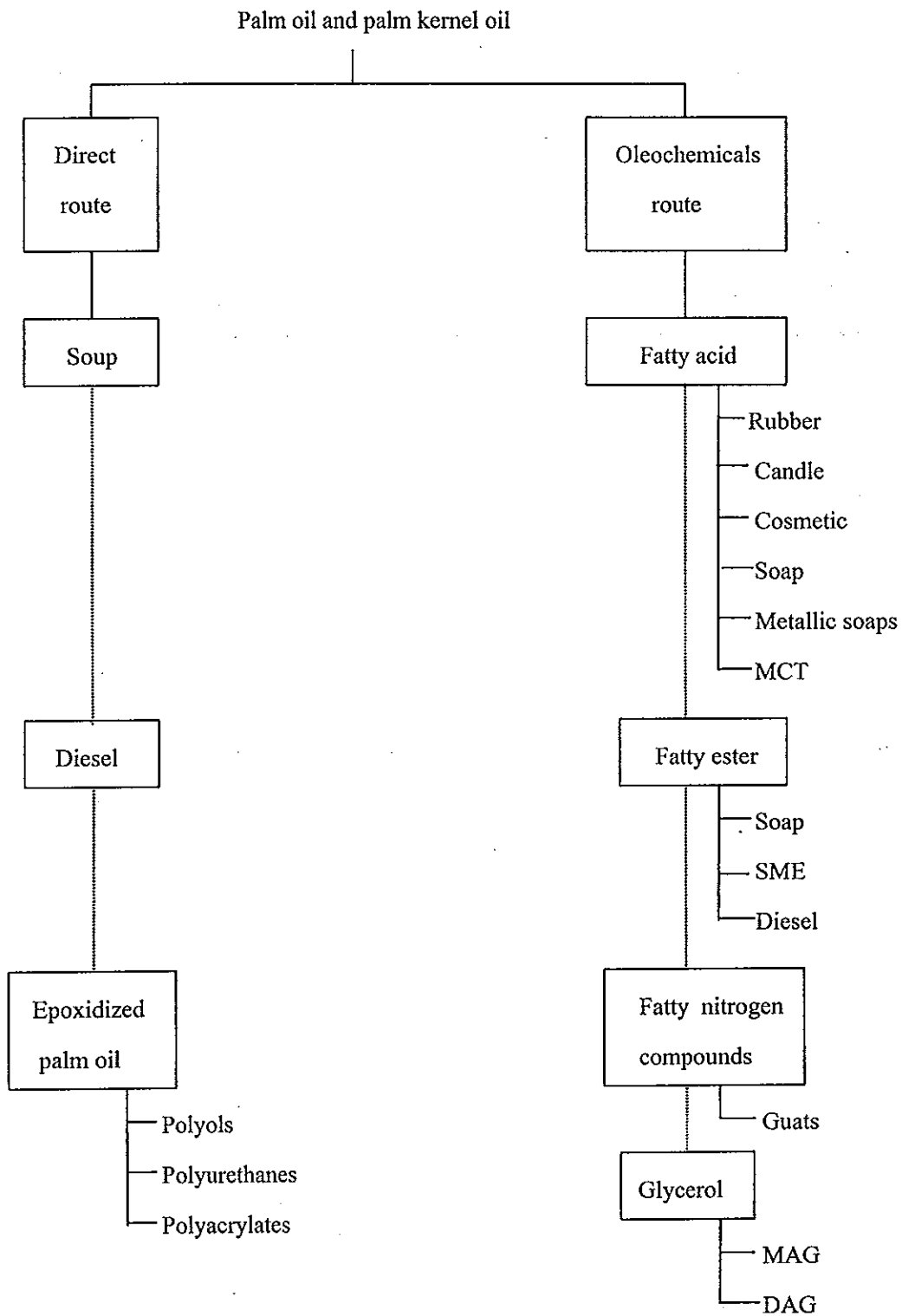


In hydrolysis, R/ = H., In alcoholysis, R/ = alkyl group.

กรดไขมัน หรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับการผลิต แพตตีแอลกอฮอล์ แพตตีเอสเทอร์ และสารประกอบแพตตีโนโตรเจน ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบ โดยตรงหรือนำไปดัดแปลงหมู่โครงสร้างเพื่อผลิตสารอนุพันธ์ที่สำคัญในอุตสาหกรรม ต่างๆ ได้มากมาย ดังตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 2 คาดว่าในปี ค.ศ. 2000 ประเทศในกลุ่มอาเซียนสามารถผลิต basic oleochemical ได้ถึงร้อยละ 35 ของโลกโดยวัตถุดิบหลักจะผลิต จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว (Hui, 1996)

4.1 การใช้ประโยชน์จากโมนอเอซิลกลีเซอรอล

โมนอเอซิลกลีเซอรอลมีใช้กันมากเพื่อเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรม อาหาร ยา และเครื่องสำอาง (Thude, *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ยาตีฟีน (Sonntag, 1982) Li และ Ward (1993) อธิบายว่าโมนอเอซิลกลีเซอรอลที่มี n-3-polyunsaturated fatty acid เป็นองค์ประกอบ เช่น eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) สามารถช่วยป้องกันโรคต่างๆ ในคน ส่วน monopentadecanoylglycerol ใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงรักษาเส้นผม (hair care additive) (Bornscheuer, 1995) ในอุตสาหกรรมยามีการใช้โมนอเอซิลกลีเซอรอลเป็น สารช่วยยึดเกาะในยาเม็ด และผสมในตัวยาที่ต้องการให้ออกฤทธิ์นาน (Jackson and King, 1997) ส่วนอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้โมนอเอซิลกลีเซอรอลเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ มาคารีน ผลิตภัณฑ์นม ลูกกวาด และเครื่องชูรส (Jackson and King, 1997) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีการใช้โมนอเอซิลกลีเซอรอลเป็น texturing agent เพื่อให้ครีมหรือโลชั่นมีความเข้มข้น และปรับปรุงความเหนียวของครีมหรือโลชั่น (Stevenson, *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ผสมในน้ำมัน สำหรับใช้ในเครื่องจักร เนื่องจากโมนอเอซิลกลีเซอรอลมีคุณสมบัติเป็นสารหล่อลื่น (lubricant) และคุณสมบัติเป็นพลาสติก (plasticizing) (Coteron, *et al.*, 1998)



ภาพที่ 2 แนวทางการใช้ประโยชน์ของน้ำมันปาล์มและน้ำมันจากเมล็ดปาล์ม

ที่มา : Hui (1996)

5. เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

เอนไซม์ไลเปส (E.C. 3.1.1.3) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไตรเอซิลไฮดรอลัส (triacylglycerol hydrolases) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ผลิตภัณฑ์เป็น ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันและกลีเซอรอล (Macrae, 1983) ปฏิกิริยาสามารถเกิดแบบย้อนกลับได้ขึ้นอยู่กับภาวะควบคุมสภาวะแวดล้อมของสารต่างๆในปฏิกิริยา

Shahani (1975) กล่าวว่าไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งในเอสเทอร์ส เนื่องจากนิยามของเอสเทอร์สเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ แต่ไลเปสเท่านั้นที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล ได้ดี (Kazlauskas and Bornscheuer, 1997) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบประเภทอื่นๆ ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิกเอสเทอร์ ซึ่งไม่ใช่เอซิลกลีเซอรอลทั้งที่มีในธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์โดยที่ปฏิกิริยาจะมีความจำเพาะเจาะจงกับโครงสร้างไอโซเมอร์ของสับสเตรทสูง (Malcata, *et al.*, 1992) จุดเด่นของไลเปสคือ มีสับสเตรทหลายชนิดและมีความจำเพาะเจาะจงสูง ในปัจจุบันนี้เอนไซม์ไลเปสจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ต่างๆ ทดแทนการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตสารที่สำคัญ ได้แก่ การสังเคราะห์ด้วยที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม การสังเคราะห์สารตัวกลางและการปรับปรุงโครงสร้างของไขมันธรรมชาติ ดังนั้นปัจจุบันไลเปสจึงนำมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางและยา เครื่องหนัง เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสสามารถเกิดปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันและไขมันเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่า เช่น cocoa butter, fatty acid ester และผลิตสารประกอบกลีเซอไรด์ เช่น ไดเอซิลกลีเซอรอลหรือโมโนเอซิลกลีเซอรอล (Berger, *et al.*, 1992 อ้างโดย Bornscheuer, 1995) รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียจากชุมชนและจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (Godtfredsen, 1993; Bosley, 1996)

5.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งอาจจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Balcalo, *et al.*, 1996) ไลเปสได้จากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอ กล้ามเนื้อ และซีรัม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย (Schwimmer, 1981) ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Malcata, *et al.*, 1992) สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยโดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 4 จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสถานะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* (Vereraragavan and Gibbs, 1989) สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* (Kazlauskas and Bornscheuer, 1997)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า

ชนิด	แหล่งที่มา	ชื่ออื่นๆ	บริษัทที่ผลิต ทางการค้า
Mammalian lipases			
PPL	Porcine pancreas		Amano, Sigma, Fluka, Sigma, Boehring Mannheim
CE (BSSL)	Pancreatic cholesterol esterase		Genzyme, Sigma
Fungal lipases			
CRL	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	Altus Biologics, Sangyo, Amano, Boehring Mannheim
CAL-A	<i>Candida antarctica A</i>		Boehring Mannheim, Novo Nordisk
CAL-B	<i>Candida antarctica B</i>		Boehring Mannheim, Sigma, Novo Nordisk
CLL	<i>Candida lipolytica</i>		Amano
GCL	<i>Geotrichum candidum</i>		
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces l.</i>	Boehring Mannheim, Novo Nordisk
PeamL	<i>Penicillium camembertii</i>	<i>P. cyclopium</i>	Amano
RJL	<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor miehei</i>	Boehring Mannheim, Amano, Novo Nordisk, Fluka
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>R. javanicus</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. niveus</i>	Amano, Fluka, Sigma, Seikagaku Kogyo Co.
ANL	<i>Aspergillus niger</i>		Amano
ProqL	<i>Penicillium roqueforti</i>		Amano

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิด	แหล่งที่มา	แหล่ง และชื่ออื่นๆ	บริษัทที่ผลิต ทางการค้า
Bacterial lipases			
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Altus Biologics, Amano, Boehringer Mannheim, Fluka, Sigma
PCL-AH	<i>Pseudomonas cepacia</i>		Amano
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Amano, Biocatalysts Ltd.
PfragiL	<i>Pseudomonas fragi</i>		Wako Pure Chemical
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i>		Sigma, Genzyme, Asahi
	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>	Chemical, Biocatalysts Ltd., Amano
BTL2	<i>Bacillus thermocatenuatas</i>		Boehringer Mannheim
	<i>Alcaligenes species</i>		Meito Sangyo

ที่มา : คัดแปลงจาก Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

5.2 การแบ่งกลุ่มไลเปสทางการค้า

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้าตามแหล่งของจุลินทรีย์บางครั้งพบว่าไลเปสบางชนิดมีโครงสร้างที่เหมือนกัน ดังนั้น Kazlauskas และ Bornscheuer (1997) เสนอว่าวิธีการที่ง่ายที่สุดในการแบ่งกลุ่มคือการแบ่งตามการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างโปรตีนของไลเปส ซึ่งมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังตารางที่ 5 คือ ไลเปสจากสัตว์ ไลเปสจากยีสต์ ราและไลเปสจากแบคทีเรีย สำหรับไลเปสจากยีสต์และราแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม *Candida rugosa* และกลุ่ม *Rhizomucor* ส่วนไลเปสจากแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มของ *Pseudomonas* และกลุ่ม *Staphylococcus* ไลเปสในกลุ่ม *Candida rugosa* (CRL), *Geotricum candidum* (GCL) และ pancreatic cholesterol esterase (CE) เป็น

เอนไซม์ที่มีโมเลกุลใหญ่ (60-65 kD) แต่ *Candida* lipase B มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (30-35 kD) ดังนั้นจึงไม่ได้จัดไว้ในกลุ่มนี้แม้ว่าจะเป็นไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Candida* ก็ตาม
ไลเปสในกลุ่ม *Rhizomucor* เป็นไลเปสที่ได้จากราหลายชนิด ได้แก่ *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Penicillium camembertii* (PcamL), *Humicola lanuginosa* (HLL) และ *Candida antarctica B* (CAL-B) สำหรับในกลุ่ม *Pseudomonas* เป็นไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* ทุกตัวรวมทั้งไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum*

ไลเปสบางตัวยังไม่ได้แบ่งกลุ่ม เนื่องจากยังไม่ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ได้แก่ ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger* (ANL) สำหรับไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica A* (CAL-A) แม้ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแต่มีลักษณะที่เหมือนกับไลเปสในแต่ละกลุ่มน้อยมากจึงจัดไว้ในกลุ่มนี้ (Hoegh, et al., 1995)

ตารางที่ 5 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

การแบ่งกลุ่ม	น้ำหนัก โมเลกุล	ตัวอย่าง
ไลเปสจากสัตว์	50 kD	PPL
ไลเปสจากยีสต์และรา		
<i>Candida rugosa</i>	59-65 kD	CRL, GCL, CE
<i>Rhizomucor</i>	29-42 kD	CAL-B, RML, ROL, PcamL, HLL
ไลเปสจากแบคทีเรีย		
<i>Pseudomonas</i>	30-35 kD	PCL, PFL, CVL
<i>Staphylococcus</i>	68-73 kD	BTL2
ยังไม่สามารถแบ่งกลุ่ม		ANL, CAL-A, CLL

ที่มา : Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

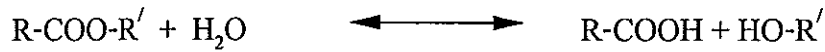
5.3 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon, *et al.*, 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีฟิเอนที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นค่าง (ฟิเอน 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท ปริมาณเกลือและชนิดของสารอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าฟิเอนที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Macalta, *et al.*, 1992) ส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีช่วงฟิเอนเป็นกรดพบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงฟิเอน 5.6 ถึง 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงฟิเอนที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gilbert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสับสเตรท เป็นไปได้ว่าสับสเตรททำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata, *et al.*, 1992)

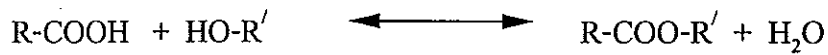
5.4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

Gandhi (1997) แบ่งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสไว้ 2 กลุ่มหลักคือ การย่อยสลายเอสเทอร์ (hydrolysis) และการสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis) ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชนิด คือ อะซิโดไลซิส (acidolysis) เอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) อินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (interesterification) และแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) สำหรับสำหรับสามปฏิกิริยาหลังนักวิจัยหลายท่านจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน โดยใช้ชื่อว่าทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification) อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) ได้จัดปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis) อยู่ในกลุ่มเดียวกับทรานเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยดังแสดงในภาพที่ 3

1. Hydrolysis of ester



2. Synthesis of ester



3. Transesterification

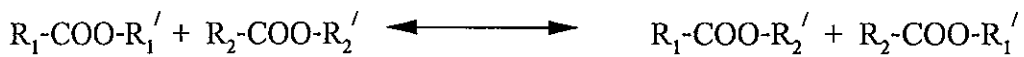
3.1 Acidolysis



3.2 Alcoholysis



3.3 Ester Exchange (Interesterification)



3.4 Aminolysis



ภาพที่ 3 การเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ของเอนไซม์ไลเปส
ที่มา : Yamane (1987)

5.5 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

Malcata และ คณะ (1992) แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้หลักในการพิจารณา 5 แบบ คือ

- 1) ความจำเพาะต่อกลุ่มของลิปิด
- 2) ความจำเพาะต่อตำแหน่งของเอซิดกลีเซอรอล
- 3) ความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน
- 4) ความจำเพาะต่อโครงสร้างสเตอริโอไอโซเมอร์ของสับสเตรท
- 5) หลายๆอย่างรวมกัน

เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มลิปิดตัวอย่างเห็นได้ชัดในพลาสมาของสัตว์ซึ่งประกอบด้วยไลเปสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเฉพาะ ไตรเอซิด-กลีเซอรอล ไคเอซิดกลีเซอรอล หรือโมโนเอซิดกลีเซอรอล ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* มีกิจกรรมต่อโมโนเอซิดกลีเซอรอลสูง แต่มีกิจกรรมต่อไตรเอซิดกลีเซอรอลและไตรเอซิดกลีเซอรอลต่ำมาก (Okumura, et al., 1980 อ้างโดย Malcata, et al., 1992)

การแบ่งความจำเพาะต่อตำแหน่งเอซิดกลีเซอรอลแบ่งได้ 3 แบบคือไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรเอซิดกลีเซอรอล (nonspecific) ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบนตำแหน่ง 1 และ 3 บนโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิดกลีเซอรอล (sn-1,3 specific) และไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่งที่ 2 บนโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิดกลีเซอรอล (sn-2 specific) ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรเอซิดกลีเซอรอลจะสามารถย่อยสลายพันธะเอสเตอร์ได้อย่างสมบูรณ์ การเร่งปฏิกิริยาจะไม่มี的反กลับ (nonreverse) ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับที่สูง แต่อาจพบไตรเอซิดกลีเซอรอล และโมโนเอซิดกลีเซอรอลเป็นอินเตอร์มีเดียทในปฏิกิริยาได้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, *C. rugosa* และ *Penicillium cylindracea* (Okumura, et al., 1981) สำหรับเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันส่วนใหญ่แล้วจะเป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่ง 1 และ 3 ซึ่งจะตัดไขมันตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโครงสร้างของไตรเอซิดกลีเซอรอลได้ดีกว่าตำแหน่งที่ 2 ทำให้

ได้ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งปัจจุบันนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่ การผลิต EPA และ DHA จากน้ำมันปลา ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อนและจากจุลินทรีย์พวก *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *Aspergillus niger* และ *Mucor miehei* (Li and Ward, 1993)

ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันพบในธรรมชาตินี้้อยมาก แต่พบว่าความจำเพาะยังขึ้นอยู่กับการควบคุมสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา ไลเปสโดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันสายสั้นที่ไม่อิ่มตัวน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันสายยาวที่อิ่มตัว อย่างไรก็ตาม Malcata และ คณะ (1992) รายงานว่าไลเปสบางชนิด เช่น ไลเปสจาก *Mucor miehei* มีความสามารถในการย่อยสลายกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน C4 และ C6 ได้สูงที่เอช 5.3 หรือ 8.0 ซึ่งมีประโยชน์ในการผลิตสารที่มีกลิ่นรสในเนยแข็งและไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน C8 ถึง C10 ได้ดีกว่ากรดไขมันตัวอื่น

6. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

การใช้เอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันในรูปเอนไซม์อิสระ แม้จะเป็นวิธีการที่ทำกันได้ง่ายและรวดเร็วก็ตาม แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในด้านราคา ความคงตัวของเอนไซม์ รูปแบบการใช้มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้งาน การแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก และสภาวะการเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะ(ปราณีอ่านเปรื่อง, 2535) ซึ่งการตรึงรูปเอนไซม์จะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวให้ลดลงได้ แต่อย่างไรก็ตามผลกระทบของการตรึงรูปเอนไซม์ก็อาจมีได้ เช่น แอคติวิตี้อาจจะลดลง เนื่องจากโครงสร้างสามมิติเปลี่ยนแปลงไป ปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ปัญหาการปนเปื้อนเนื่องจากตัวพุงหรือตัวพุงทำปฏิกิริยากับผลผลิต

6.1 ตัวพุงสำหรับการตรึงเอนไซม์

องค์ประกอบที่สำคัญในการตรึงเอนไซม์ คือ ชนิดของเอนไซม์และตัวพุงที่ใช้ การคัดเลือกตัวพุงที่ใช้ในการตรึงให้เหมาะสมจึงจัดเป็นปัจจัยหลักสำหรับการตรึงเอนไซม์ คุณสมบัติของตัวพุงที่ดี คือ มีพื้นที่ผิวสำหรับยึดเกาะมาก มีคุณสมบัติในการ

คัดเลือกการซึมผ่านของสาร (permeability) และมีลักษณะชอบน้ำ (hydrophilicity) แต่ไม่ละลายในน้ำ มีความคงตัวต่อสารเคมี แรงกล และความร้อน มีความแข็งแรง มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม สามารถป้องกันการทำลายจากจุลินทรีย์ได้ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kennedy and Cabral, 1987)

เมื่อแบ่งชนิดของตัวพุงตามลักษณะรูปร่างสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) และกลุ่มที่ไม่มีรูพรุน (non-porous) แต่เมื่อแบ่งตามลักษณะทางเคมีสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

ก) ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์ (organic carriers) ได้แก่ cellulose, agarose, starch, dextran, nylon, collagen, DEAE-cellulose, carrageenan, chitin, chitosan, silk, gelatin, albumin, polyamides และ polyacrylamide (Kennedy and Cabral, 1987)

ข) ตัวพุงที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic carriers) ที่นิยมใช้ได้แก่ attapulgite clays, bentonite, kieselgur, pumic stone, non-porous glass, controlled pore alumina และ controlled pore titania (Kennedy and Cabral, 1987)

หมู่ต่างๆบนตัวพุงมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะและกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ตัวพุงบางชนิดมีหมู่ต่างๆ ที่มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับบริเวณเร่งของเอนไซม์มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ตัวอย่างหมู่ต่างๆ บนตัวพุง ได้แก่

หมู่ไดอะโซเนียม (diazonium group)	$-N^+ = N$
หมู่ไอโซไซยาเนต (isocyanate group)	$-N-CO$
หมู่ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate group)	$-N-CS$
หมู่แฮโลเจนแอคทีฟ (active halide group)	$-Br, -I, -F, -Cl$
หมู่แอคทีฟไซยาโน (active cyano group)	$-C=N$
หมู่แอคทีฟอะมิโน (active amino group)	$-NH_2$
หมู่แอคทีฟคาร์บอกซิล (active carboxyl group)	$-COOH$
หมู่แอคทีฟไดซัลไฟด์ (active disulfide group)	$-S-S-$
หมู่แอคทีฟอัลดีไฮด์ (active aldehyde group)	$-CHO$

การย่อยสลายไขมันและน้ำมันในการคัดเลือกตัวพุง นอกจากพิจารณาที่กิจกรรมของเอนไซม์แล้ว ยังต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำไปใช้คือ ความเหมาะสมในด้านราคา ถึงปฏิกรณ์ที่ใช้ และความเสถียรต่อสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา เช่น อุณหภูมิ พีเอช และสารตัวกลางต่างๆในปฏิกิริยา

Kimura และคณะ (1983 อ้างโดย Wang and Ruckenstein, 1993) ตรีงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พบว่าการตรีงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น polypropylene, Celgard 2500 จะให้กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันมะกอกมากที่สุด

Brady และคณะ (1988) คัดเลือกตัวพุงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรีงเอนไซม์ไลเปสซึ่งได้แก่ celite, cellulose, ethyl cellulose, silica gel, kieselgur, clay, alumina, CPG-100, carbon, Accurel, Celgard 2500, Profax PP, microthene HDPE และอื่นๆ พบว่าการใช้ตัวพุงทุกชนิดในการตรีงให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง แต่ตัวพุงที่ให้กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์สูงสุดคือ Accurel กับ Celgard 2500

Suree และ Pawinee (1992) ตรีงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* บนตัวพุง 5 ชนิด คือ celite 545, dowex 50, silica gel, sephadex LH-20 และ sephadex LH-60 เพื่อย่อยสลายน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์มใน hexane พบว่าตัวพุงที่เหมาะสมที่สุดคือ celite 545 และ sephadex LH-60 สำหรับ dowex 50 ให้กิจกรรมการย่อยสลายต่ำเนื่องจากมีคุณสมบัติในการชอบน้ำมากที่สุด

Kosugi และ คณะ (1995) พบว่าการเติมตัวละลายอินทรีย์ที่มีขี้ เช่น เอทานอล หรือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ ลงไปร้อยละ 50 ในสารละลายไลเปส ที่มีค่า ionic strength ต่ำกว่า 0.1 มีผลช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ที่ถูกตรีงบน polypropylene และค่าเปอร์เซ็นต์การตรีง (immobilization ratio) สูงถึงร้อยละ

97

Cao และคณะ (1996) ตรีงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพุง 3 ชนิด คือ polyethylenimine, แอลจินเนท (alginate) และกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) พบว่าเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดลอริกมากกว่า 21 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ และมีกิจกรรมและความคงตัว 72 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้ต่อเนื่อง 10 วัน

Kawakami (1996) ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* โดยห่อหุ้มใน methyl-substituted organic silicates บนซีไลท์ 545 และ hyflo super-col พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีและคงตัวที่อุณหภูมิสูงที่ 65 องศาเซลเซียส

Yang และ Parkin (1994) ผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากไขมันเนย โดยปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของจากเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนตัวพุง 2 ชนิดคือ polyethyleneglycol-based และ polyethyleneglycol-based gel โดยวิธีห่อหุ้ม ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีที่ 35-40 องศาเซลเซียส ที่มีไขมันเนย 25 เปอร์เซ็นต์ละลายในบิวทานอล เอนไซม์ 5-10 มิลลิกรัม และกลีเซอรอล 0.10 มิลลิกรัมต่อปริมาตร ของสารละลาย สับสเตรท ปริมาณน้ำ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เวลา 72 ชั่วโมง

Rosu และคณะ (1997) ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันมะกอก นำกลับมาใช้ใหม่เพื่อลดต้นทุนการผลิต ตัวพุงที่นำมาตรึงได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และซีไลท์ พบว่า แคลเซียมคาร์บอเนต ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. ดีที่สุด ได้ผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 5 และ 80 เปอร์เซ็นต์, 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เป็นครั้งที่ 7 และ 10 ตามลำดับ

วุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) ตรึงเอนไซม์ไลเปส OF จาก *Candida rugosa* บนตัวพุง 4 ชนิด ได้แก่ แอควเรล ซีไลท์ ซิลิกาเจล และผงถ่าน พบว่าเอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอควเรลมีกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์สูงสุด 89 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 11,860 ยูนิตต่อกรัมตัวพุง

ฉัตรชัย สังข์ผุด (2542) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ OF โดยใช้วิธีการยึดเกาะกับตัวพุง 4 ชนิด คือ แอควเรล Ambertile XAD-4 DEAE-Sephadex A50 และ polyvinylchloride (PVC) พบว่าการยึดเกาะแบบแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเอนไซม์กับ DEAE-Sephadex A50 เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ โดยให้ค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะสูงสุด 97 เปอร์เซ็นต์

6.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจะแตกต่างกันโดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวพุง กรรมวิธีในการตรึง บางครั้งมีการเติมสารเชื่อมพันธะเพื่อเพิ่มความแข็งแรงในการยึดเกาะ ได้แก่ กลูตาราลดีไฮด์ แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยหลักที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์บนตัวพุงมีดังต่อไปนี้

6.2.1 การเตรียมตัวพุง

ตัวพุงบางชนิด โดยธรรมชาติแล้วอาจจะไม่มีหมู่ที่สามารถยึดเกาะกับหมู่ต่าง ๆ บนโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ได้ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะต่ำ ดังนั้นในขั้นตอนการ pretreatment เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการนำตัวพุงมาใช้ อย่างมีประสิทธิภาพการใช้ PVC ที่ pretreatment กับ alkyldiamine เพื่อให้เกิดหมู่อะมิโน จากนั้นเติมกลูตาราลดีไฮด์เพื่อช่วยเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ ก่อนที่จะนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส (Shaw, *et al.*, 1989) หรือการ pretreatment แอควเรลด้วยเอทานอลจะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง โดยการ pretreatment มีส่วนช่วยในการเพิ่มสภาพผิวของแอควเรล (Brady, *et al.*, 1988; Montero, *et al.*, 1993)

6.2.2 ระยะเวลาในการตรึง

เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์จะมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมการยึดเกาะและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ แต่เมื่อถึงจุดอิ่มตัวแม้จะเพิ่มระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายอย่างเช่น ชนิดของตัวพุง วิธีการตรึง สารเชื่อม และความเข้มข้นของเอนไซม์

6.2.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์

เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนหนึ่งหน่วยพื้นที่ของตัวพุง โดยกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะและกิจกรรมการย่อยสลายเอนไซม์บนตัวพุงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ให้สูงขึ้นจนถึงระดับอิ่มตัวก็ไม่

มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปส (Kang and Rhee, 1989; Kosugi, *et al.*, 1995)

6.2.4 ผลของพีเอชและ ionic strength

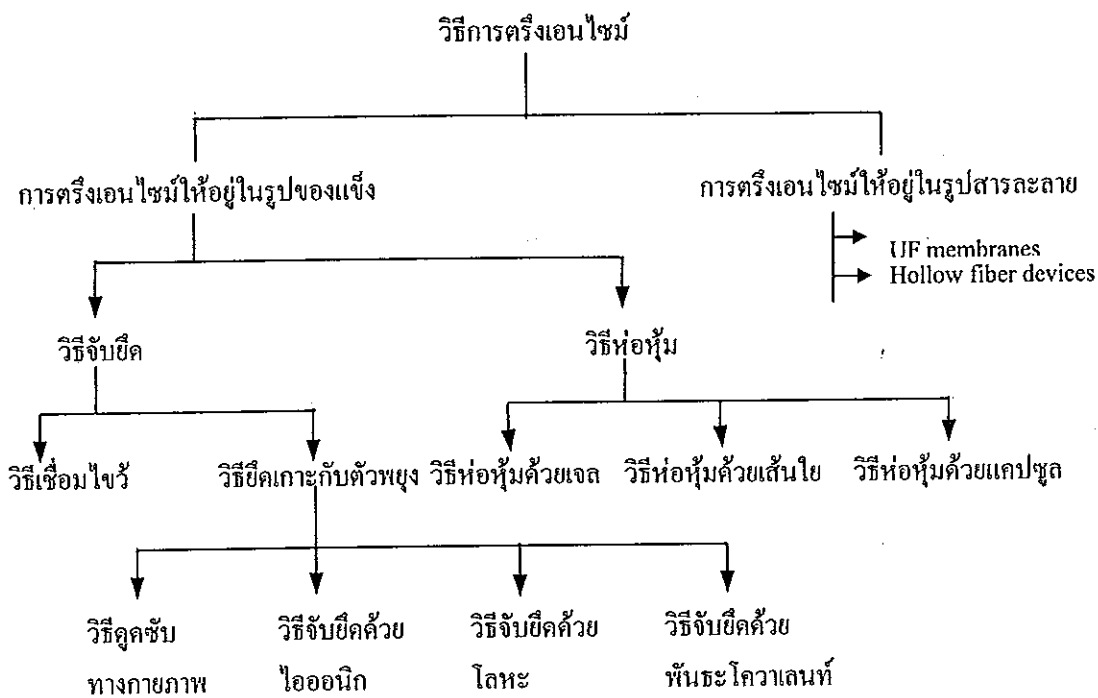
ค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อมในการตรึงเอนไซม์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช Suree และ Pawinee (1992) รายงานว่าค่าระดับพีเอชที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปส คือ ช่วงพีเอชเดียวกับระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละแหล่ง เช่น เอนไซม์ไลเปสจากดักอ้อน *Candida rugosa* และ *Rhizopus arrhizus* มีระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 8.5, 7.5 และ 5.5 ตามลำดับ แต่หลังจากตรึงรูปบนตัวพุงแล้วระดับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงหรืออาจไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Malcata, *et al.*, 1992) สำหรับค่าของ ionic strength ของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง ซึ่งถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ ionic strength สูงกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพุงจะต่ำ (Patel, *et al.*, 1995)

6.2.5 ผลของอุณหภูมิ

โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส โดยจะถูกยับยั้งกิจกรรมการทำงานเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากเอนไซม์สูญเสียสภาพ ยกเว้น thermophilic lipase เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* สามารถทนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (Malcata *et al.*, 1992) ดังนั้นในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจึงนิยมกระทำในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ เพราะที่ระดับอุณหภูมิต่ำเอนไซม์มีความคงตัวสูง ระดับอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์ประมาณ 4-10 องศาเซลเซียส

6.3 กรรมวิธีการรีงเอนไซม์

เอนไซม์รีงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้อยู่ในขอบเขตจำกัดอาจเชื่อมกับวัสดุหรือสารที่ใช้ยึดเกาะโดยที่เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมอยู่ สามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งและสะดวกต่อการใช้ในระบบต่อเนื่อง Kennedy และ Cabral (1987) ได้จัดแบ่งกรรมวิธีการรีงเอนไซม์ไว้ ดังภาพที่ 4 และตัวอย่างวิธีการรีงเอนไซม์ไลเปสแบบต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 6



ภาพที่ 4 การจำแนกวิธีการรีงเอนไซม์

ที่มา : Kennedy และ Cabral (1987)

ตารางที่ 6 ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพุง	สารตั้งต้น
Adsorption (แบบดูดซับ)	<i>Candida cylindracea</i>	Polypropylene	BFT
	<i>Aspergillus niger</i>	Polypropylene	ไขมันนม
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	NA	น้ำมันมะกอก
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Acrylic	ไขมันสัตว์
	<i>Rhizopus sp.</i>	PVC	น้ำมันทานตะวัน
	<i>Candida rugosa</i>	Sephadex	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida antarctica</i>	Synthetic resin	Tributylin
	<i>Mucor miehei</i>	Synthetic resin	Tributylin
	<i>Rhizopus sp.</i>	Celite	น้ำมันปาล์ม
	<i>Mucor miehei</i>	Duolite	ไตรเอซิลกลีเซอรอล
	<i>Humicola lanuginosus</i>	Ca-alginate	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Cellulose	น้ำมันถั่วเหลือง
	<i>Candida rugosa</i>	Sephadex	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Polypropylene	ไขมันนม
	<i>Mucor miehei</i>	Synthetic resin	น้ำมันเมล็ดสะฟู่
	<i>Aspergillus niger</i>	Polypropylene	ไขมันนม
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	NA	ไขมันวัว
	<i>Aspergillus niger</i>	Polypropylene	Butterfat
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Decylchloroacetate emulsion	Decylchloroacetate

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพุง	สารตั้งต้น
	<i>Candida rugosa</i>	Celite, glass	Phosphatidylcholine
	<i>Rhizopus delemar</i>	Polypropylene	
	<i>Rhizopus niveus</i>	Ambertite	
	<i>Candida rugosa</i>	Polypropylene	ไขมันวัว ไขมันหมู น้ำมันมะกอก น้ำมันมะกอก
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	CaCO ₃ Celite	น้ำมันมะกอก
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Celite	น้ำมันปลา
Covalent binding (แบบโควาเลนต์)	<i>Candida rugosa</i>	PEG	น้ำมันมะกอก
	<i>Humicola lanuginosa</i>	Ambertite, Diatom	น้ำมันมะกอก
	Porcine pancreas	Cellulose	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida cylindracea</i>	Sepharose	Tributyrin
	Porcine pancreas	EPSPS	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	PVC	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Chitin	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Agarose	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Chitosan	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Sepharose	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida rugosa</i>	Trisacyl Synthetic resin	น้ำมันมะกอก
	<i>Rhizopus sp.</i>	TAS	น้ำมันปลา

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพอง	สารตั้งต้น
Cross-linking (วิธีเชื่อมไขว้)	<i>Humicola lanuginosa</i>	Octry-Sepharose	น้ำมันมะกอก
	<i>Rhizopus</i> sp.	PTFE	น้ำมันทานตะวัน
	<i>Candida cylindracea</i>	PTFE, PVC	น้ำมันทานตะวัน
Entrapment (วิธีห่อหุ้ม)	<i>Humicola lanuginosa</i>	ENTP polyurethane	น้ำมันมะกอก
	<i>Rhizopus</i> sp.	PVC	น้ำมันทานตะวัน
	<i>Candida cylindracea</i>	ENT, ENTP	ไขมันนม
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	ENT, ENTP	ไขมันนม
	<i>Candida cylindracea</i>	Sodium alginate	Bytyl-butanoate
Containment (วิธีจำกัดขอบเขต)	<i>Candida rugosa</i>	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	<i>Rhizopus delemar</i>	BSP	น้ำมันมะกอก
		Polyurethane	ไขมันนม
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
		AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida cylindracea</i>	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida cylindracea</i>	Polyamide	น้ำมันมะกอก
Precipitation (ตกตะกอน)	Human milk	-	เอซิลกลีเซอรอล

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพอง	สารตั้งต้น
	<i>Candida rugosa</i>	-	น้ำมันมะกอก
	<i>Candida cylindracea</i>	-	น้ำมันปลาทูน่า
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	Anchovy oil
	<i>Candida cylindracea</i>	-	Menhaden oil
			Borage seed oil
Ion exchange (วิธีแลกเปลี่ยนประจุ)	<i>Rhizopus miehei</i>	Synthetic resin	Lesquerella Fendleri oil
หมายเหตุ :	AOT-RM	= sodium bis (2-ethylhexyl) sulphosuccinate reverse micelles	
	BFT	= bleachable fancy tallow	
	BSP	= biomass support particles	
	ENT	= cross-linkable resin prepolymer containing polyethylene glycol	
	ENTP	= cross-linkable resin prepolymer containing polyethylene glycol	
	EPSPS	= epoxypropylsilanized PartiSphere-5	
	NA	= not available	
	PEG	= polyethylene glycol	
	PTFE	= polytetrafluoroethylene	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Balcao และคณะ (1996)

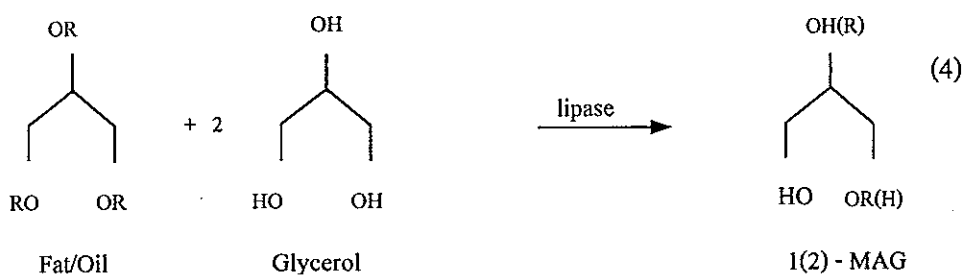
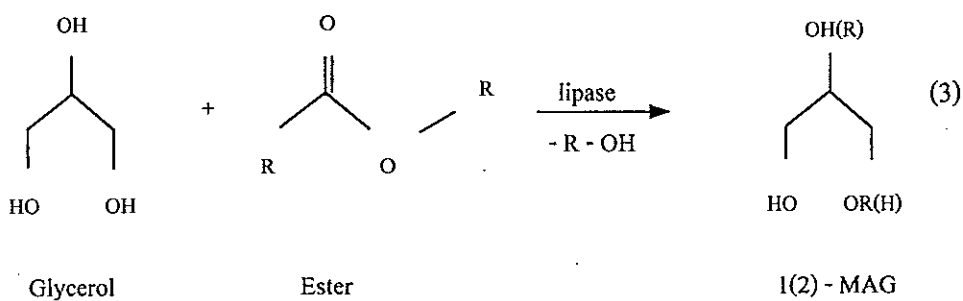
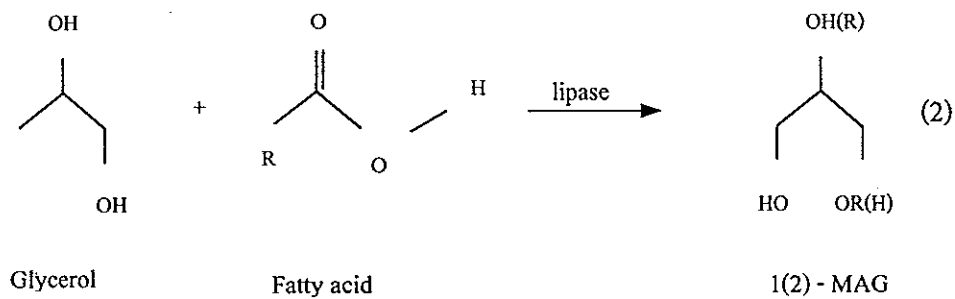
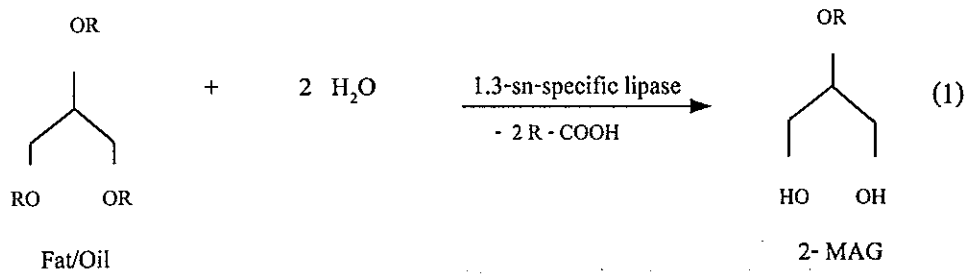
7. การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ในกระบวนการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ในระบบโรงงานอุตสาหกรรมจะผลิตโดยกระบวนการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมัน ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (200-250 °ซ) เกิดของเสียที่เป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เกิดสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ ได้ผลผลิตน้อย ผลิตภัณฑ์มีกรดและเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น (Kimura, *et al.*, 1983) จึงต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ในตอนหลังอีกครั้งหนึ่ง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน และปฏิกิริยาไม่มีความจำเพาะเจาะจง มีผลทำให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่ำ (Kosugi and Tomizuka, 1995) นอกจากนี้ยังได้สารประกอบอื่นๆ เช่น ketone และ hydrocarbon

การสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1) การย่อยสลายน้ำมันหรือไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 2) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมัน 3) ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของ fatty ester กับกลีเซอรอล และ 4) ปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมัน (ภาพที่ 5)

7.1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายของน้ำมันและไขมัน

ปฏิกิริยาการย่อยสลายแบบต่อเนื่องของไขมันและน้ำมันในการผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอลมีการทำในระดับอุตสาหกรรมมานาน โดยใช้อุณหภูมิและความดันสูง ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะในการย่อยไขมันหรือน้ำมันซึ่งเป็นวิธีการใหม่ในการผลิตกรดไขมันภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันในการย่อยสลายเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ให้ผลผลิตเป็น 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล (ภาพที่ 5 สมการที่ 1) แต่พบว่าวิธีนี้ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลน้อย เนื่องจากไตรเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล จะได้ กรดไขมันอิสระ 2 โมล และ โมโนเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล เพราะมีการยับยั้งการย้ายหมู่เอซิลจากตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 บน โมเลกุล ไตรเอซิลกลีเซอรอล และพบว่ามีการย้ายหมู่เอซิลเกิดขึ้นซ้ำ (Bornscheuer, 1995)



ภาพที่ 5 การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Bornscheuer (1995)

Flenk และ Spener (1990 อ้างโดย Bornscheuer, 1995) ย่อยน้ำมันละหุ่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 จากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* ให้โมโนเอซิลกลีเซอรอล 23 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมัน 66 เปอร์เซ็นต์

Millqvist และคณะ (1994) ศึกษาการสังเคราะห์ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรปาล์มิติน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus arrhizus* ที่ตรึงบนซีโลท์ ให้โมโนเอซิลกลีเซอรอล 97 เปอร์เซ็นต์ ในปฏิกิริยาที่มีเอธานอลเป็นตัวทำละลาย

7.2 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกลีเซอรอล

การค้นพบการรักษาความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาการย่อยสลาย คือ ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันหรือทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเอสเทอร์ การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกลีเซอรอล (ภาพที่ 5 สมการที่ 2, 3) การควบคุมสภาวะจำเป็นมากกว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายที่สำคัญคือต้องมีน้ำในปฏิกิริยาน้อย (Goldberg, et al., 1990) ตัวอย่างการสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันดังแสดงในตารางที่ 6

7.3 ปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิส

การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมันโดยใช้ค่าเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปฏิกิริยาจะต้องใช้อุณหภูมิสูง (220-260 °ซ) ทำให้โมโนเอซิลกลีเซอรอลมีสีดำและไหม้มีคุณภาพต่ำ ดังนั้นก่อนนำไปใช้ต้องมีการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง (Coteron, et al., 1998) ปัจจุบันจึงหันมาใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยากันมากขึ้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว ปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสมีข้อดีกว่าวิธีอื่นเนื่องจาก ไตรเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 3 โมล (ภาพที่ 5 สมการที่ 4) มีการศึกษาปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสครั้งแรกโดย Yamane และ คณะ (1986) ศึกษาเอนไซม์ไลเปสใน

ปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของน้ำมันชนิดต่างๆ มีการเติมสารละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาทำให้วิเคราะห์ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ยาก และในปีเดียวกัน Yamane และคณะศึกษาปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของน้ำมันข้าวโพดโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ในระบบกะไม่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 3.7 เปอร์เซ็นต์ เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล 20.4 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สำคัญของวิธีการนี้ คือ อุณหภูมิ มีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของน้ำมันและไขมันแต่ละชนิด เรียกว่า "critical temperature" (Tc) ซึ่งน้ำมันและไขมันแต่ละชนิดจะมีค่า Tc แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำมันและไขมันชนิดนั้น ๆ นอกจากนี้ ปริมาณน้ำ, สัดส่วนของไตรเอซิลกลีเซอรอลกับกลีเซอรอล รวมทั้งปริมาณและชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมยังช่วยเพิ่มปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้อีกด้วย (McNeill and Yamane, 1991)

Bornscheuer และคณะ (1994) เปรียบเทียบการสังเคราะห์โมโนลอริลกลีเซอรอล (monolaurylglycerol, MGL) ด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* โดยปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ 1) ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกลีเซอรอล โดยกรดลอริก (lauric acid) ใน bis-(2-ethylhexy) sulfosuccinate sodium salt (AOT)/isooctane 2) ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของกลีเซอรอลโดยไวนิลลอเรท (vinyl laurate) ทั้งสองปฏิกิริยาจะให้ผลผลิตของไดลอริลกลีเซอรอลมากกว่าโมโนลอริลกลีเซอรอล) ปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของไตรลอรีน (trilaurin) และ 4) ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของ protected glycerol , 1,2-*o*-isopropylidene glycerol พบว่าสองปฏิกิริยานี้จะให้ผลผลิตโมโนลอริลกลีเซอรอลมากกว่าไดลอริลกลีเซอรอล

ตารางที่ 7 การสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเตอร์ฟิเคชัน

ไลเปส	สับสเตรท	ผลผลิต
<i>Mucor miehei</i>	กรดโอเลอิก	1-MAG (max. 32%)
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus delemar</i> <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>	กรดโอเลอิก	1,(3)-MAG
<i>Penicillium camembertii</i>	กรดโอเลอิก	MAG (max. 74%)
<i>Penicillium</i> sp., Lipozyme	กรดโอเลอิก	MAG
<i>Rhizopus arrhizus</i>	กรดโอเลอิก	MAG(17.9-44.1%)
<i>Candida antarctica</i>	กรดโอเลอิก, ethylolate	MAG(7.2-68%)
<i>Rhizopus delemar</i>	กรดโอเลอิกและอื่นๆ	1-MAG, 50-60% conv.
Lipozyme	กรดโอเลอิก กรดสเตียริก	MAG, 30-70% conv.
Lipozyme	(S)-17-hydroxystearic acid	MAG (max. 84%)
<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Mucor miehei</i>	EPA, DHA	6.4-65% MAG
<i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	Solid FFA (เช่น C17)	MAG (max. 96%)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	C6-C18, C18:1	MAG
<i>Humicola lanuginosa</i>	C2-C20	MAG
<i>Candida rugosa</i>	กรดคาไพริก	MAG > 90%

max. : maximum, conv. : conversion

ที่มา : Bornscheuer (1995)

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโมนเอซิลกลีเซอรอลจากปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของไขมันและน้ำมันโดยเอนไซม์ไลเปส

8.1 ชนิดของเอนไซม์ไลเปส

McNeill และคณะ (1990) พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* และ *Pseudomonas fluorescens* ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของไขมันวัว ให้ปริมาณโมนเอซิลกลีเซอรอล 70 เปอร์เซ็นต์ และในปีต่อมาพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Geotrichum candidum*, *Penicillium camembertii* และ *Candida rogusa* ไม่สามารถผลิตโมนเอซิลกลีเซอรอลได้ แต่พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. camembertii* ร่วมกับ *Humicola lanuginosa* สามารถผลิตโมนเอซิลกลีเซอรอลได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ น้ำมันปาล์มและไขมันวัว

Stevenson และคณะ (1993) ศึกษาปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของไขมันวัวโดยใช้ ลิโปไซม์ (*Mucor miehei* ตรึงรูป) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้โมนเอซิลกลีเซอรอล สูงสุด 35 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อลดอุณหภูมิเป็น 42 องศาเซลเซียส ให้โมนเอซิลกลีเซอรอล เป็น 50 เปอร์เซ็นต์

Bornscheuer และ Yamane (1994) ศึกษากิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของไตรโกลิน (triolein) เพื่อผลิตโมนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* และ *Pseudomonas cepacia* ที่ถูกตรึงบนซีไลท์ และ sepharose พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนซีไลท์ จะมีกิจกรรมและความคงตัวสูงกว่า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากยีสต์และรา พบว่ามีเฉพาะเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Rhizopus delemar* เท่านั้นที่สามารถผลิตโมนเอซิลกลีเซอรอลได้

เอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดจะเหมาะสมกับไขมันแต่ละชนิดซึ่งมีการศึกษาของนักวิจัยหลายๆ ท่าน ดังสรุปในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมัน

สับสเตรท	ไลเปส	โมโนเอซิลกลีเซอรอล (%)	อ้างอิง
น้ำมันข้าวโพด	<i>P. fluorescens</i>	20.1	Yamane และคณะ(1986)
น้ำมันมะกอก	<i>C. viscosum</i>	80	Chang และ Rhee (1991)
น้ำมันมะกอก	<i>C. viscosum</i>	90	Kamlangdee และ Yamane (1996)
ไตรโกลิน	<i>C. viscosum</i>	96	Bornscheuer และ Yamane (1994)
ไขมันวัว	<i>Mucor miehei</i>	50	Stevenson และคณะ(1993)
ไขมันวัว	<i>P. fluorescens</i>	70	McNeill และคณะ (1990)
น้ำมันปลาทะเล	<i>Pseudomonas</i> sp.	42-53	Myrnes และคณะ (1995)
น้ำมันหมู	<i>P. fluorescens</i>	69	McNeill และคณะ (1991)
ปาล์มสเตียร์น	<i>P. fluorescens</i>	86	McNeill และคณะ (1991)
น้ำมันทานตะวัน	<i>Rhizopus delemar</i>	53	Tuter และคณะ (1998)

8.2 ปริมาณน้ำ

Chang และ Rhee (1991) ศึกษาปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันมะกอกในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ที่ถูกตรึงบน liposome เพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอล พบว่าปริมาณน้ำในปฏิกิริยาไม่ควรเกิน 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถ้าปริมาณน้ำมากจะเกิดการคั่งไขมันอิสระปริมาณมากด้วย Yamane และคณะ (1986 อ้างโดย Bornscheuer, 1995) เริ่มต้นศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันและไขมันตามธรรมชาติโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* ในการทดลองแบบกะไม่มีการเติม surfactant ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและมีปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 3.7 เปอร์เซ็นต์ ได้โมโนเอซิลกลีเซอรอล 20.4 เปอร์เซ็นต์ McNeill และคณะ (1991) พบว่าปริมาณน้ำในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของไขมันวัวสูงกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดลง

8.3 อุณหภูมิ

McNeill และคณะ (1991) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสเรียกว่า critical temperature (T_c) ซึ่งค่า T_c จะขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันและน้ำมันจะอยู่ระหว่าง 30-46 องศาเซลเซียสสำหรับไขมันและน้ำมันในธรรมชาติ ได้แก่ ไขมันวัว, น้ำมันปาล์ม, ปาล์มสเตียริน ซึ่งจะให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 65-90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำมันที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องได้แก่น้ำมันมะกอก จะมีค่า T_c เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส

McNeill และคณะ (1990) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกลีเซอโรไลซิสของไขมันวัวคือ 42 องศาเซลเซียส ผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 70 เปอร์เซ็นต์โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* และ *Chromobacterium viscosum*

Thude และคณะ (1997) สังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอไรด์จากการเกิดกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันละหุ่งและโกโก้บัตเตอร์ โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* (PCL) และ *Chromobacterium viscosum* (CVL) อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดกลีเซอโรไลซิส 25 องศาเซลเซียส และตามด้วยอุณหภูมิเย็น 7 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ไลเปส PCL และไลเปส CVL เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล 86 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

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

8.4 สถานะการเกิดปฏิกิริยา

Yang และคณะ (1993) ศึกษาปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของไขมันเนยในระบบ liquid-phase โดยเอนไซม์ไลเปส จาก *Pseudomonas* sp. บ่มปฏิกิริยาภายใต้สถานะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 2.5-4.8 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 0.33-0.44 กรัมต่อกรัมไขมันเนย ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 50-55 เปอร์เซ็นต์

Ohta และคณะ (1989) พบว่าการเพิ่มผลผลิตของโมนโอซิลกลีเซอรอลต้องทำให้เกิดปฏิกิริยาในสถานะ solid-phase โดยไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยา และผลผลิตถูกปลดปล่อยออกมาในรูปผลึก (crystallization) ถึง 70-99 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำมันและไขมันตามธรรมชาติ ได้แก่ ไขมันวัว, น้ำมันปาล์ม, ปาล์มสเตียร์น และ น้ำมันมะพร้าว

Stevenson และคณะ (1993) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของไขมันวัว ในสถานะ solid-phase ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Mucor miehei* ในระบบกะได้ผลผลิตของโมนโอซิลกลีเซอรอล 35 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระบบต่อเนื่องให้ผลผลิตของโมนโอซิลกลีเซอรอลน้อยมาก

Bornscheuer และ Yamane (1994) ศึกษากิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสไตรโกลิน ที่มีสถานะเป็น solid-phase พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* สามารถสังเคราะห์โมนโอซิลกลีเซอรอลได้มากที่สุด 96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* จะมีความคงตัวสูงเมื่อตรึงกับซีไลท์สามารถนำมาผลิตโมนโอซิลกลีเซอรอลได้ 41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เป็นเวลา 100 ชั่วโมง

8.5 สัดส่วนของน้ำมันหรือไขมันกับกลีเซอรอล

Kwon และคณะ (1995) นำเอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Rhizopus delemar* ถูกตรึงบนซิลิกาเจลผลิตโมนโอหรือไดเอซิลกลีเซอรอลในเฮกเซน เลือกลงสัดส่วนของปาล์มติดกับกลีเซอรอล 5:10 ให้ผลผลิตทั้งโมนโอหรือไดเอซิลกลีเซอรอล 60 เปอร์เซ็นต์

McNeill และ Yamane (1991) พบว่าสัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการผลิตโมนโอซิลกลีเซอรอลของกลีเซอรอลกับไขมันวัวคือ 1: 5 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* และ *Chromobacterium viscosum* ทำงานได้ดีที่สุดและให้ผลผลิตโมนโอซิลกลีเซอรอล 70 เปอร์เซ็นต์

Tuter และคณะ (1999) ศึกษาปฏิกิริยาไกลซีเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์ม โดยใช้สัดส่วนโมลของน้ำมันปาล์มต่อไกลซีเซอรอลเท่ากับ 1:2 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 66 และ 64 เปอร์เซ็นต์จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์ม ตามลำดับ

8.6 ระยะเวลาการบ่ม

McNeill และ Yamane (1990) พบว่าในปฏิกิริยาไกลซีเซอโรไลซีสของไขมันวัว โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* เมื่อลดอุณหภูมิจาก 50 องศาเซลเซียส (20 ชั่วโมง) เป็น 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งครบ 50 ชั่วโมงจะได้โมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงขึ้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์

Kamlangdeel และ Yamane (1996) ศึกษาปฏิกิริยาไกลซีเซอโรไลซีสของน้ำมันมะกอกโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียส ตามด้วย 5 องศาเซลเซียส จนครบ 72 ชั่วโมง เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล 90 เปอร์เซ็นต์

Stevenson และคณะ (1993) ใช้ลิโปโซมในปฏิกิริยาไกลซีเซอโรไลซีสของไขมันวัวเพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลพบว่าถ้าใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสตลอดปฏิกิริยา เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล 35 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิลงเป็น 42 องศาเซลเซียส จนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

9. เทคนิคการวัดปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล

9.1 แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)

แก๊สโครมาโตกราฟีเป็นรูปแบบหนึ่งของกระบวนการแยกสารทางโครมาโตกราฟีเกี่ยวข้องกับการแจกแจง (distribution) หรือ พาร์ทิชัน (partitioning) ของสารประกอบใดๆ ระหว่างวัฏภาค (phase) ที่แตกต่างกันสองวัฏภาค ซึ่งเป็นวัฏภาคที่เคลื่อนที่ (mobile phase) วัฏภาคหนึ่ง และวัฏภาคที่คงที่ (stationary phase) อีกวัฏภาคหนึ่ง ใน

ของผสมสารประกอบหลายๆ พาร์ทิชัน หรือแบ่งองค์ประกอบอยู่แตกต่างกันไประหว่าง ภูมิภาคสองภูมิภาค ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายสัมพัทธ์ (relative solubility) ในแต่ละภูมิภาค เมื่อสารประกอบในของผสมเคลื่อนที่ผ่านภูมิภาคคงที่ โดยมีภูมิภาคเคลื่อนที่นำไป มันจะถูกเหนี่ยวรั้งมากน้อยแตกต่างกันไป เนื่องจากความสามารถในการละลายที่ต่างกันและจะถูกแยกออกจากกัน สารใดที่มีความสามารถในการละลายใน ภูมิภาคคงที่มากกว่า ก็จะใช้เวลามากกว่า ในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ James และ Martin ผู้ให้กำเนิดเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีได้เป็นผู้ริเริ่มใช้แก๊สเฉื่อยเป็นภูมิภาคเคลื่อนที่หรือแก๊สพา (carrier gas) ในปี ค.ศ. 1952 ส่วนภูมิภาคของเหลวที่มีมวล โมเลกุลสูง ซึ่งอยู่ที่พื้นผิวที่ละเอียดของอนุภาคของสารแข็งรองรับ (solid support) แต่ ปัจจุบันนิยมเคลือบฉาบของเหลวที่เป็นภูมิภาคคงที่ไว้บนผนังด้านในของท่อคาพิลลารี (capillary tubing) ที่มีขนาดยาว (อาภัสสรฯ ชมิคท์, 2537)

Stevenson และคณะ (1993) ใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีในการแยกสารประกอบโมโนเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล และไตรเอซิลกลีเซอรอลออกจากกัน โดยเครื่อง Hewlett-Packard HP 5890 ใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็นตัวพา ใช้คอลัมน์ชนิด HP Ultra 1 ใช้อุณหภูมิ 340 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Millqvist และคณะ (1994) แยกสารประกอบไขมันโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้คอลัมน์ชนิด DB-1 ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งสามารถแยกสารประกอบกลีเซอไรด์ได้เช่น เอสเทอร์ กรดไขมัน โมโนเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล และไตรเอซิลกลีเซอรอล

9.2 โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography หรือ high pressure liquid chromatography, HPLC)

การแยกและการวิเคราะห์สารด้วยวิธีนี้อาศัยหลักของการดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน ขนาดหรือโครมาโตกราฟีแบบ reverse-phase วิธีนี้ใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก แต่มีความยาวบรรจุตัวกลางที่ทำด้วยแก้ว หรือพลาสติกที่เคลือบด้วยตัวทำละลายที่อยู่ กับที่เป็นชั้นบางๆ ส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระบบ ตัวทำละลายที่ถูกดันให้เข้าสู่ คอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลางอย่างแน่น สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ถูกดันไปใน

คอลัมน์ แล้วผ่านตัวทำละลายเคลื่อนที่ด้วยแรงดันสูง ถึง 10,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ซึ่งทำให้ลดเวลาการแยกและการวิเคราะห์สารอย่างมาก การตรวจสอบสารละลายที่ออก จากคอลัมน์ ทำได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต ครรชนหักเห (refractive index) หรือการวัดฟลูออเรสเซนซ์ (อาภัสตรา ชมิตท์, 2537)

Akoh และคณะ (1992) วิเคราะห์ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ผลิตโดยใช้ เอนไซม์ไลเปสโดยใช้เทคนิค HPLC โดยเครื่อง Varex ELSD II A mass detector ใช้ คอลัมน์ชนิด ODS C-18 ขนาด 25 ซม. x 4.6 มม. ตัวทำละลายที่ใช้ คือ อะซิโตน : อะซิ โตไนโตรล (50 : 50 ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ใช้แก๊ส ไนโตรเจน 60 มม. 21 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ความเร็ว 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถแยก สารประกอบไตรเอซิลกลีเซอรอล 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอลและ กรดไขมัน ได้อย่างสมบูรณ์

9.3 Thin layer Chromatography-Flame Ionization Detection (TLC/FID)

Thin layer Chromatography-Flame Ionization Detection (TLC/FID) เป็นการ แยกของผสมในสารละลาย เช่น แยกลิปิด ก่อนที่จะใช้วิธีแยกลิปิดชนิดต่างๆ ออกจาก กัน ต้องสกัดลิปิดออกมาก่อนโดยใช้สารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล แล้วนำมา แยกผ่านแท่งแก้วที่เคลือบบางๆ ด้วยตัวดูดซับ (adsorbent) เช่น ซิลิกาเจล หรือ อะลู มิना (alumina) แท่งแก้วที่ถูกเคลือบแล้วจะถูกปล่อยให้แห้งแล้วอบด้วยความร้อนที่ อุณหภูมิสูงและระยะเวลาที่กำหนดเรียกขบวนการนี้ว่า แอคติเวชัน (activation) เป็นการ กำจัดน้ำออกจากตัวดูดซับ เพื่อเพิ่มการดูดซับของตัวดูดซับ การแยกสารด้วยวิธีอาศัย หลักที่ว่า สารแต่ละชนิดมีอัตราการเคลื่อนที่บนตัวดูดซับไม่เท่ากัน สารบางชนิดจะถูก ดูดซับไว้ด้วยตัวดูดซับ ซึ่งเป็นส่วนคงที่ แต่บางชนิดจะถูกพาให้เคลื่อนที่ด้วยส่วน เคลื่อนที่ การแยกทำเหมือนกันกับโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ โดยให้ตัวทำละลายชะ จากข้างล่างขึ้นไปข้างบน รากฐานการแยกเกี่ยวข้องกับการดูดซับ โดยแรง Vander Waals พันธะไฮโดรเจน และการแลกเปลี่ยนประจุ นอกจากนี้ยังมีการแบ่งการละลายเข้า มาเกี่ยวข้องด้วย (อาภัสตรา ชมิตท์, 2537) การตรวจหาตำแหน่งของลิปิดที่แยกออกจาก กัน ใช้ hydrogen flame ionization detector

Tanaka และคณะ (1980) ศึกษาการวัดปริมาณของสารประกอบกลีเซอไรด์ เช่น 1-โมโนเอซิลกลีเซอรอล 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมัน 1,2-ไดเอซิลกลีเซอรอล 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรอล รวมทั้งไตรเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID ซึ่งแยกสารแต่ละชนิดด้วย Chromarod S-II ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล สารตัวทำละลายใช้สารผสมของ คลอโรฟอร์ม : อะซิโตน : กรดอะซิติก (100 : 1 : 1) นำ Chromarod S-II มาหาปริมาณสารประกอบกลีเซอไรด์โดยระบบอัตโนมัติโดย hydrogen flame ionization detector ค่าที่ได้จะแสดงในรูปเปอร์เซ็นต์ peak

Yamane และคณะ (1986) วัดปริมาณสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของไขมันโดย TLC/FID โดยใช้สารตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ เบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก (70 : 30 : 2) ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไฮโดรเจน 0.7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร, อัตราการไหลของแก๊สเท่ากับ 2,000 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาในการสแกนเท่ากับ 30 วินาทีต่อสแกน โดยระบบอัตโนมัติโดย hydrogen flame ionization detector ค่าที่ได้จะแสดงในรูปเปอร์เซ็นต์ peak พบว่าสามารถแยกสารประกอบพวกไตรเอซิลกลีเซอรอล 1,2-ไดเอซิลกลีเซอรอล 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรอล 1-โมโนเอซิลกลีเซอรอล 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันและกลีเซอรอลออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

วัตถุประสงค์

เพื่อตรึงเอนไซม์ไลเปสแล้วนำไปผลิต โมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์ม
โดยการกลีเซอโรไลซิส

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่าง ๆ
2. คัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เกิดปฏิกิริยาคลีเซอโรไลซิสและให้ผลผลิต โมโนเอ-
ซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด
3. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้
4. คัดเลือกตัวพวงที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้
5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปไปใช้ในปฏิกิริยาคลี-
เซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มและผลิต โมโนเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด
7. ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุดิบ

น้ำมันปาล์มโอเลอิน ชื่อทางการค้า “มรกต” ผลิตโดย บริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด (มหาชน)

2. เอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผง 5 ชนิด คือ ไลเปส LP (*Chromobacterium viscosum*) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Asahi Chemical ประเทศญี่ปุ่น ไลเปส M (*Mucor javanicus*), ไลเปส PS (*Pseudomonas* sp.), ไลเปส AK (*Pseudomonas fluorescens*) และ ไลเปส D (*Rhizopus delemar*) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Amano Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น

3. ตัวพยุง

แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3 , Softon 3200) ผลิตโดย Shiraishi Calcium Co. Ltd, Osaka ประเทศญี่ปุ่น

แคลเซียมซัลเฟต ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Type SF) ผลิตโดย Mutsumi Chemical Co. Ltd, Osaka ประเทศญี่ปุ่น

แคลเซียมไพโรฟอสเฟต ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, Type 504014 T) ผลิตโดย Taihei Chemical Industries Co. Ltd, Osaka ประเทศญี่ปุ่น

ซีโลท์ (Celite Hyflo super-Cel) ผลิตโดย Johns-Manville ประเทศญี่ปุ่น

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

แอคคูเรล (Accurel หรือ Polypropylene powder EP-100) ผลิตโดย Enka AG Obernberg ประเทศเยอรมัน

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน ค่าสaponification ฟังก์ชัน (saponification) ปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมัน รายละเอียดในภาคผนวก ก

อุปกรณ์

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

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 3525-ICC ของ Lab-Line Co., Ltd. ประเทศอังกฤษ

เครื่องหมุนเหวี่ยงแยก รุ่น Centurion 8000 ของ Centurion, Scientific Co., Ltd. ประเทศอังกฤษ

สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 ของ Hitachi Koki Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดพีเอช รุ่น 320 ของ Denver Instrument Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น BE 500 ของ Memmert Co., Ltd. ประเทศเยอรมัน

เตาเคเตอร์แบบสุญญากาศ ประเทศญี่ปุ่น

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น W350 ของ Memmert ประเทศเยอรมัน

Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection (TLC/FID) รุ่น Iatroscan MK-5 ของ Iatron Laboratories, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ใช้วิธี two-phase emulsion system ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

1.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม โอลีนที่ละลายในไอโซออกเทน

ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1.0 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจะหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บั่นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วทิ้งไว้ให้แยกชั้น

1.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระใช้วิธี cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยดูดสารละลายส่วนบนในปฏิกิริยาจากข้อ 1.1 มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร บั่นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วจึงให้แยกชั้น นำส่วนของไอโซออกเทนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ก)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปปาล์มิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป ทำการทดลองเช่นเดียวกับ การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอิสระ เพียงแต่ใช้เอนไซม์ตรังรูป 5 มิลลิกรัม แทนการใช้สารละลายเอนไซม์

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ใช้วิธีของ

Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล

การวิเคราะห์หาปริมาณ โมโนเอซิลกลีเซอรอลคัดแปลงวิธีของ Rosu และคณะ (1997) สุ่มตัวอย่างก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิส 5-10 มิลลิกรัม นำมาละลายในสารละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอล (1:1) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าและปั่นเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 8,100 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอินไซม์ที่รีงรูปออก ดูดส่วนใสข้างบนมาผสมกับน้ำ 0.1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วปั่นเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 8,100 g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกกลีเซอรอลออก ดูดส่วนล่างซึ่งเป็นส่วนของคลอโรฟอร์มเก็บในไมโครเซนตริฟิวต์ ส่วนบนเป็นน้ำสกัดอีก 2-3 ครั้งด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 0.1 มิลลิลิตร นำไปทำให้เข้มข้นโดยผ่านแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 10 นาที ก่อนการวิเคราะห์นำมาละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณ ไตรเอซิลกลีเซอรอล 1,3 ไดเอซิลกลีเซอรอล, 1,2 ไดเอซิลกลีเซอรอล, โมโนเอซิลกลีเซอรอล และ กรดไขมันอิสระด้วย Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FLD analyzer) สำหรับขั้นตอนและสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบกลีเซอไรด์ด้วย TLC/FLD analyzer มีดังนี้

แช่ quartz rods (Chromarod S-III) ในกรดบอริก (3% น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำ quartz rods ไปสแกนด้วย TLC/FID analyzer นำตัวอย่างที่เตรียมหยดบน quartz rods ประมาณ 1-3 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที นำ quartz rods ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย เบนซีน : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซิติก (70 : 30 : 2) จนสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร นำ quartz rods ไปอบแห้งที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ภายใต้สถานะที่มีอัตราการไหลของแก๊สไฮโดรเจน 160 มิลลิลิตรต่อนาที ของอากาศ 2,000 มิลลิลิตรต่อนาที และเวลาที่ใช้สแกนเท่ากับ 30 วินาทีต่อสแกน สแกนโดยระบบอัตโนมัติด้วย Iatroscan ผลการทดลองคำนวณได้จากพื้นที่ของ peak ซึ่งเปรียบเทียบในรูปเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ของแต่ละ peak

วิธีการศึกษา

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาก็จะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design , CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s new multiple - range test (DMRT)

1. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปส

ในการทดลองใช้เอนไซม์ 5 ชนิด คือ เอนไซม์ ไลเปส LP, ไลเปส M, ไลเปส PS, ไลเปส AK และ ไลเปส D เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปส โดยชั่งเอนไซม์ไลเปส ชนิดผงแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน คำนวณเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์

2. การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มเพื่อผลิต โมโนเอซิลกลีเซอรอล

การหาชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการเกิดกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม โดยพิจารณาจากปริมาณ โมโนเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยา ซึ่งมีขั้นตอนในการคัดเลือกดังนี้

ชั่งเอนไซม์ไลเปสชนิดผงแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 7,000 ยูนิต (ตามที่ระบุทางการค้า) ละลายในกลีเซอรอล 2.84 กรัม ที่มีน้ำ 4% เติมน้ำมันปาล์ม 13.07 กรัม (สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 2.0) ทำในสภาวะ solid-phase ไม่มีการเติมสารตัวทำละลายในปฏิกิริยา (McNeill, *et al.*, 1990) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ใช้ความเร็วในการปั่นสูง 600 รอบต่อนาที โดยใช้เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก สุ่มตัวอย่างที่ เวลา 0, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer

คัดเลือกเอนไซม์ที่ให้ปริมาณ โมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด นำมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ดังนี้

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการย่อยสลาย

วิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิห้อง(30 องศาเซลเซียส) และ อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กำหนดกิจกรรมเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)

$$\text{กิจกรรมสัมพัทธ์ (\%)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะใดสภาวะหนึ่ง}} \times 100$$

2.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการย่อยสลาย

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่คัดเลือกได้โดยใช้สารละลายซิงค์เพอร์ (0.1 โมลาร์) พีเอช 4.5, 5.0, 5.5 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์) พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ (ข้อ 2.1) กำหนดกิจกรรมเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์

2.3 ความคงตัวของอุณหภูมิของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้บ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเอนไซม์ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ กำหนดกิจกรรมที่ได้เป็น เปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

$$\text{กิจกรรมที่เหลือ (\%)} = \frac{\text{กิจกรรมที่ระยะเวลาใดเวลาหนึ่ง}}{\text{กิจกรรมที่ระยะเวลาเริ่มต้น}} \times 100$$

2.4 ความคงตัวของพีเอชของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ ละลายในบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 (ตามที่ระบุไว้ในข้อ 2.2) บ่มเป็นเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1) เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 2.1 และ 2.2) คำนวณกิจกรรมที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์กิจกรรมที่เหลือ

3. การตรึงเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับบนตัวพุง

ตรึงเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 2) ด้วยวิธีการยึดเกาะบนตัวพุง 6 ชนิด คือ ซีไลท์, แอคจูเรล, ซิลิกาเจล, แคลเซียมคาร์บอเนต, แคลเซียมซัลเฟตและแคลเซียมไพโรฟอสเฟต โดยดัดแปลงวิธีของ Rosu และคณะ (1997) เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ใช้สารละลายไลเปสที่เตรียมได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับตัวพุงแต่ละชนิด 2.0 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมอะซิโตน 20 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองระบบสุญญากาศ เก็บสารละลายที่ได้และนำไปวัดปริมาตรและวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือและปริมาณโปรตีน ล้างตัวพุงอีกครั้งด้วยสารละลายอะซิโตน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปทำแห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงทั้งหมด

วิเคราะห์หาประสิทธิภาพการยึดเกาะ (immobilization ratio) และกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ (activity yield) และวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 จำนวนในรูปกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ ประสิทธิภาพการยึดเกาะ และ นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ได้ไปใช้ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม โดยทดลองภายใต้สภาวะเดียวกับเอนไซม์อิสระ คัดเลือกตัวพุงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงสูงสุดและสามารถผลิต โมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด

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

(%)

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์หลังการยัดเกาะ} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่ถูกตรึง}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$$

(%)

4. สภาพที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนตัวพุงที่คัดเลือก

นำตัวพุงที่คัดเลือกได้ในข้อ 3 มาตรึงเอนไซม์ โดยศึกษาสภาพที่เหมาะสมต่อการตรึงดังต่อไปนี้

4.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์สำหรับการตรึงในอัตราความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรึงเอนไซม์บนตัวพุงที่คัดเลือกในข้อ 3 นำเอนไซม์ที่ตรึงได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 คัดเลือกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่น้อยที่สุดที่สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยัดเกาะสูงสุดสำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

4.2 อุณหภูมิในการตรึง

ตรึงเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 4.1 และควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการตรึง 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ 4, 25 และ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง คัดเลือกอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยัดเกาะสูงสุดใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ในขั้นต่อไป

4.3 ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ใช้สภาพที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 และ 4.2 แต่ใช้ระยะเวลาในการตรึงเท่ากับ 15, 30 นาที 1, 6 และ 12 ชั่วโมง คัดเลือกระยะเวลาที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์หลัง

การยืดเกาะสูงสุดและวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการยืดเกาะเพื่อคัดเลือกระยะเวลาต่ำที่สุดที่ใช้ในการจับกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพวง

5. ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม

นำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปในสถานะที่เหมาะสมในข้อ 4 ศึกษาปัจจัยต่างๆ ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิส เพื่อให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

5.1 ผลของปริมาณเอนไซม์

ศึกษาปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรังรูป (จากข้อ 4) เท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 หน่วย วิเคราะห์หาปริมาณ โมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วย TLC/FID analyzer

5.2 ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 และสัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 2.0, 2.5, 2.7, 3.7 และ 4.8 วิเคราะห์หาปริมาณ โมโนเอซิลกลีเซอรอลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

5.3 ผลของปริมาณน้ำในกลีเซอรอล

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 และสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มจากข้อ 5.2 แต่มีปริมาณน้ำในกลีเซอรอลเท่ากับ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์หาปริมาณ โมโนเอซิลกลีเซอรอล เช่นเดียวกับข้อ 5.1

5.4 ผลของอุณหภูมิ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 และสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มจากข้อ 5.2 และปริมาณน้ำในกลีเซอรอลที่เหมาะสมจากข้อ 5.3 แต่บ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

5.5 ผลของระยะเวลาในการบ่ม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 และสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มจากข้อ 5.2 ปริมาณน้ำในกลีเซอรอลที่เหมาะสมจากข้อ 5.3 และบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมจากข้อ 5.4 เป็นเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 30, 25, 10 และ 5 องศาเซลเซียส จนครบ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเช่นเดียวกับข้อ 5.1

6. การนำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปกลับมาใช้ใหม่

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5 หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไปครบเวลาที่เหมาะสม แยกเอนไซม์ไลเปสตรังรูปออกโดยนำสารละลายมาละลายด้วยอะซิโตน 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไปทำแห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 8 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในครั้งต่อไป ทำซ้ำแบบนี้จนกว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดลงต่ำสุด วิเคราะห์หากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป และปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลหลังสิ้นสุดปฏิกิริยาในแต่ละครั้ง

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปส

การคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ระบบ two-phase emulsion system จากเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 5 ชนิด คือ ไลเปส LP (*Chromobacterium viscosum*), ไลเปส PS (*Pseudomonas* sp), ไลเปส AK (*Pseudomonas fluorescens*), ไลเปส D (*Rhizopus delemar*) และไลเปส M (*Mucor javanicus*) ในขั้นต้นวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในไอโซออกเทน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าสารละลายเอนไซม์ไลเปส LP ซึ่งได้จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่นๆ โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 165.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีน 0.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ คิดเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะได้เท่ากับ 233.0 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายตำแหน่งต่างๆ บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Macrae, 1983 ; Kimura, et al., 1983 ; Otero, et al., 1990 ; Malcata, et al., 1992) ทำให้สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้สมบูรณ์ และปฏิกิริยาจะไม่เกิดแบบย้อนกลับ ทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันในปริมาณที่สูง (Okumura, et al., 1981) ส่วนเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* แม้จะเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ แต่มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มน้อยกว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างทางด้านสายพันธุ์ สำหรับไลเปส PS, D และ M ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ต่ำกว่าทั้งๆ ที่ใช้ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่เท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันในตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ทำให้เกิดการย่อยสลายที่ไม่สมบูรณ์ (Malcata, et al., 1992)

ตารางที่ 9 กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในระบบ two-phase emulsion system ของไลเปสชนิดต่างๆ

ชนิดของเอนไซม์	กิจกรรม (ยูนิต/มก.)	โปรตีน (มก./มก. เอนไซม์)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มก. โปรตีน)
ไลเปส LP (<i>C. viscosum</i>)	165.5	0.71	233.0
ไลเปส PS (<i>Pseudomonas sp.</i>)	7.5	0.04	186.1
ไลเปส AK (<i>P. fluorescens</i>)	7.0	0.18	39.0
ไลเปส D (<i>R. delemar</i>)	132.5	0.75	176.6
ไลเปส M (<i>M. javanicus</i>)	5.8	0.23	29.0

2. เอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล

การคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปส ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาไกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม สภาวะที่ใช้ศึกษา คือ เอนไซม์ไลเปสทางการค้า 7,000 ยูนิต (ระบุทางการค้า) ละลายในกลีเซอรอล 2.84 กรัม ที่มีน้ำ 4% เติมน้ำมันปาล์ม 13.07 กรัม (สัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 2.0) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 5 ชนิดดังกล่าวข้างต้น ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ McNeill และคณะ (1990) ซึ่งใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ในการกลีเซอโรไลซิสของไขมันวัว สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Bornscheuer และ Yamane (1994) ศึกษาปฏิกิริยาไกลีเซอโรไลซิสของไตรโกลินโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* พบว่าให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไลเปส PS, AK, D และ M ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ต่ำกว่าทั้งๆ ที่ใช้ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่เท่ากัน ดังนั้นจึงคัดเลือกไลเปส LP สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาเกลือโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ไลเปส 5 ชนิด

เอนไซม์	สารประกอบ (%)				
	TAG	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	FFA
ไลเปส LP	13	8	5	70	4
ไลเปส PS	14	11	14	48	12
ไลเปส AK	20	20	7	43	10
ไลเปส D	20	8	10	60	2
ไลเปส M	18	28	8	34	12

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

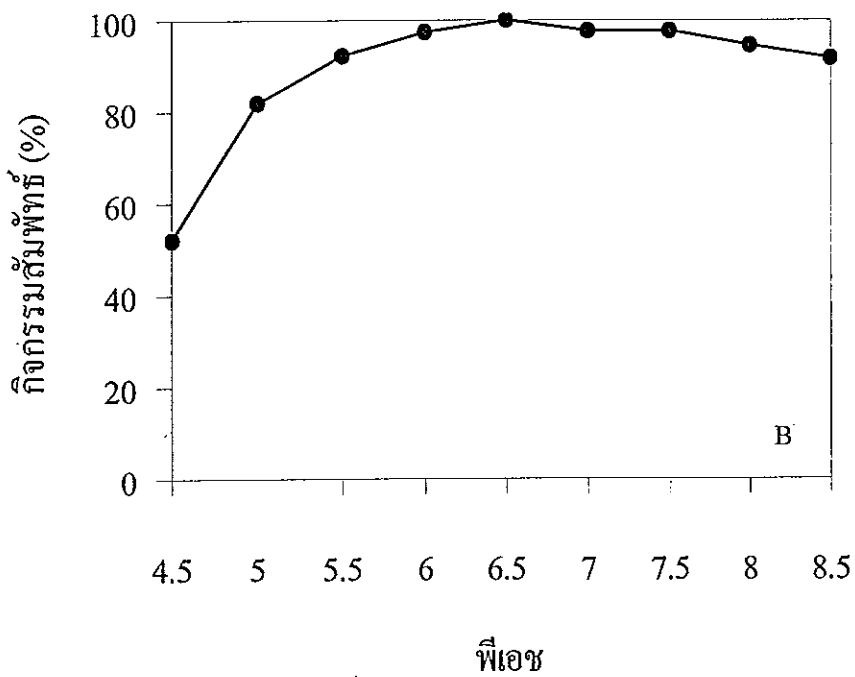
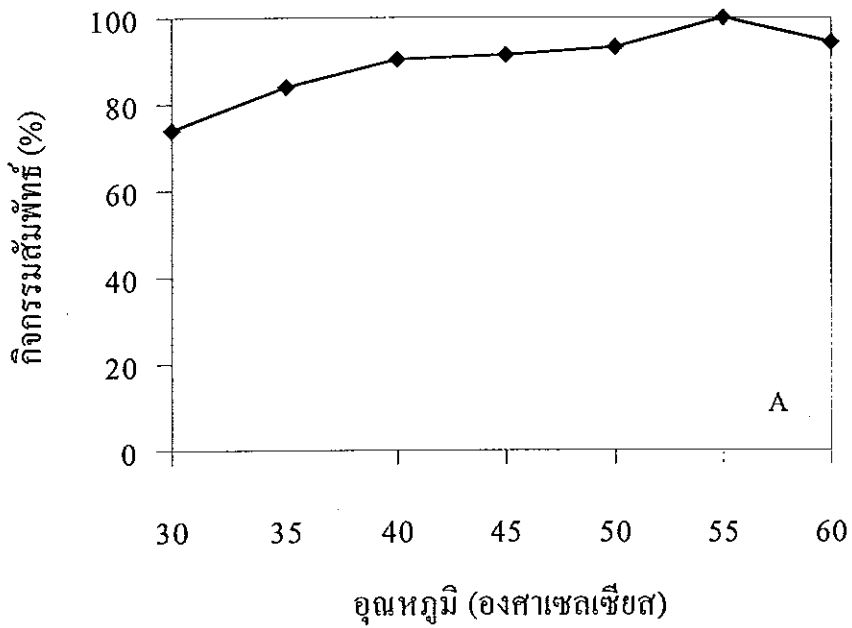
เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปส LP ที่ อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้นด้วยและมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (223.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 6A) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Castellar และคณะ (1996) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Prazeresb และคณะ (1992) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* เท่ากับ 35-42 องศาเซลเซียส ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากสับสเตรทที่ใช้ต่างกัน แต่จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

2.2 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์

ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เป็นผลของพีเอชต่อการแตกไอออนของ prototropic group ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างสามมิติซึ่งจะมีผลไปสู่การเปลี่ยนแปลงการจับกับซับสเตรท หรือการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการทดลองในปฏิกิริยาต้องควบคุมพีเอชให้เหมาะสมที่สุด เพื่อไม่เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปลาของสารละลายเอนไซม์ไลเปส LP ที่พีเอชต่างๆ กันตั้งแต่ 4.5 ถึง 8.5 พบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ก็เพิ่มสูงขึ้น และมีค่าสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 6.5 (247.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แต่เมื่อพีเอชสูงขึ้นกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 6B) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Sugiura และ Isobe (1974) อ้างโดย Castellar และคณะ (1996) พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* คือ 6.5 การศึกษาของ Prazeresb และคณะ (1992) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* คือ 7.0-7.5 แต่การทดลองของ Castellar และคณะ (1996) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* เท่ากับ 9.0 มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 5000 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาต่างกัน เช่น ชนิดของบัฟเฟอร์ ชนิดของซับสเตรท ระยะเวลา เป็นต้น

2.3 ความคงตัวของอุณหภูมิของเอนไซม์

การศึกษาคงตัวของอุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส LP โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กันตั้งแต่ 30 องศาเซลเซียสถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมการย่อยสลายเหลืออยู่เท่าเดิมคือ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยมีกิจกรรมการย่อยสลายเหลืออยู่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เป็น 45 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปส LP มีกิจกรรมการย่อยสลายเหลืออยู่เพียง 43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมการย่อยสลายเกือบทั้งหมด เมื่อใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 7)

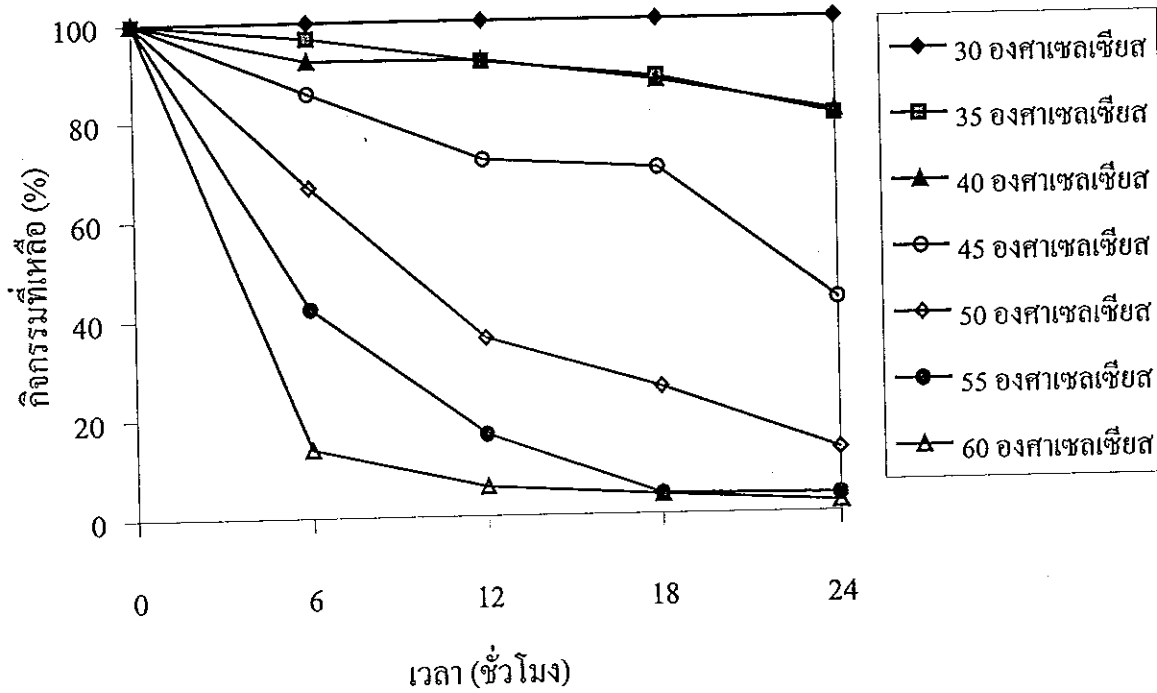


ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิ (A) และพีเอช (B) ต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปลาของ
เอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum*

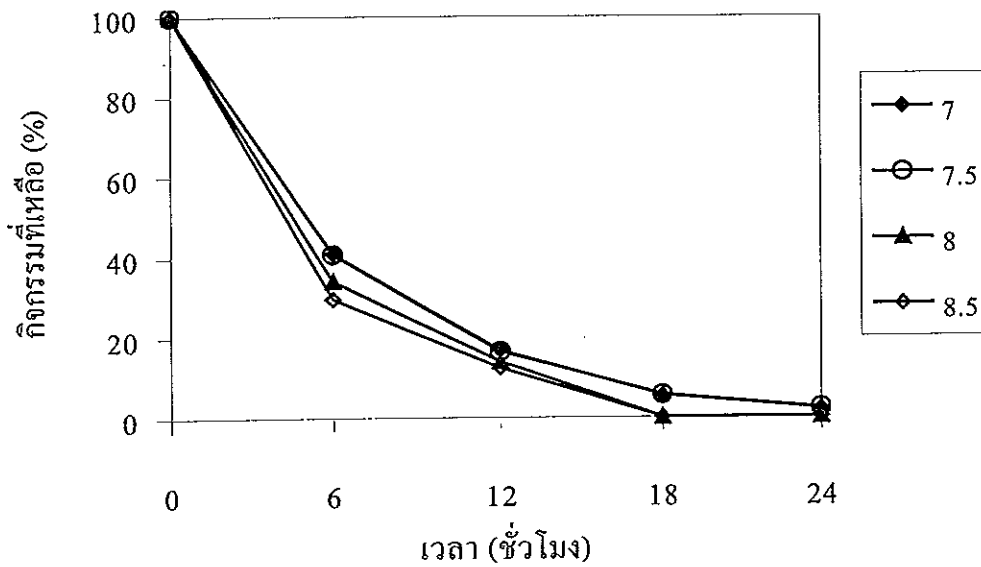
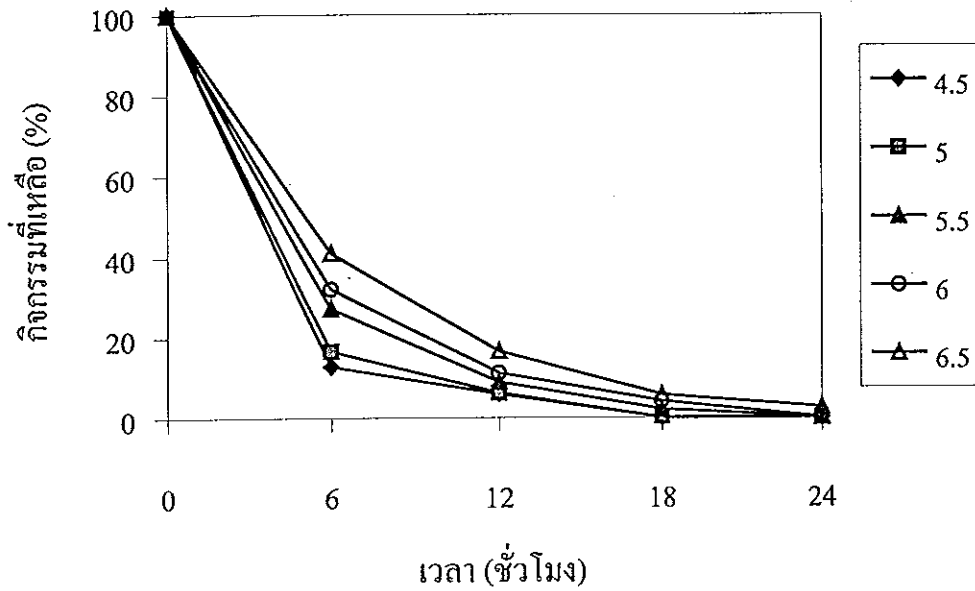
แสดงว่าเอนไซม์ไลเปส LP ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้เป็นเวลานาน การทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Sugiura และ Isobe (1974) อ้างโดย Castellar และคณะ (1995) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* มีความคงตัวสูงมาก ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 0.75 ชั่วโมง นอกจากนี้ Prazeresb และคณะ (1992) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* มีค่าครึ่งชีวิตที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ต่างสายพันธุ์กัน หรืออาจเป็นเพราะสภาวะที่ใช้ศึกษาต่างกัน เป็นต้น

2.4 ความคงตัวของเอนไซม์

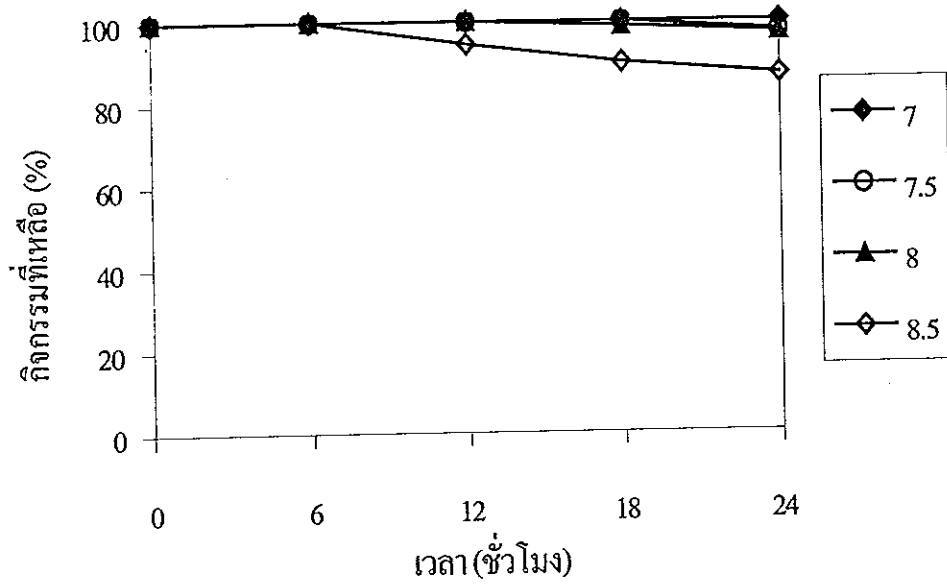
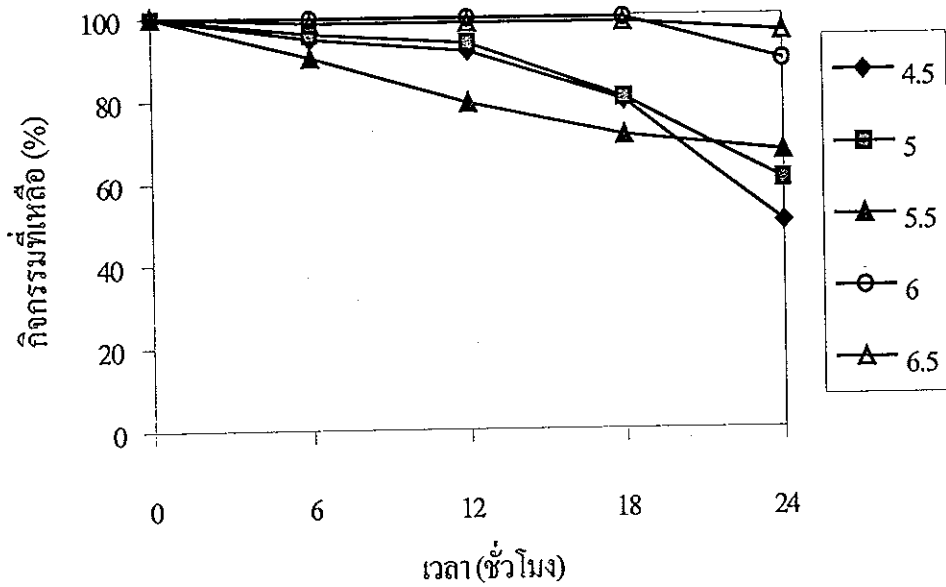
จากการบ่มเอนไซม์ไลเปส LP ที่พีเอช 4.5 ถึง 8.5 ที่อุณหภูมิ 30 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้นและเอนไซม์จะมีความคงตัวน้อยมากเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8) ในช่วงพีเอช 6.5-7.5 เอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชได้ดีโดยเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมการย่อยสลายเหลืออยู่มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 6 ชั่วโมง ส่วนในช่วงพีเอช 4.5-6.0 และ 8.0-8.5 เอนไซม์คงตัวต่อพีเอชได้น้อยกว่า และที่พีเอช 4.5 พบว่าเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมการย่อยสลายเกือบทั้งหมดเมื่อบ่มเพียง 12 ชั่วโมง และเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดบ่มนาน 24 ชั่วโมง ส่วนการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 9) พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวสูงเกือบทุกๆ พีเอช โดยเฉพาะที่พีเอช 6.5-8.5 เอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่พีเอช 4.5 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเอนไซม์ นาน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสถูกทำลายหรือถูกทำให้เปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติของโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ จึงทำให้ความสามารถในการย่อยสลายลดลง (Montero, et al., 1993) การทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Prazeresb และคณะ (1992) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* มีความคงตัวสูงที่สุดที่พีเอช 6-8 มีค่าครึ่งชีวิตที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ส่วนที่พีเอชมากกว่า 8.0 เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดที่พีเอช 4.0



ภาพที่ 7 ความคงตัวของอุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* สภาวะการศึกษา: วิเคราะห์กิจกรรมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.5



ภาพที่ 8 ความคงตัวของเชื้อของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* สภาวะการศึกษา : บ่มปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ กิจกรรมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 9 ความคงตัวของเชื้อของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* สภาวะการศึกษา : บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์กิจกรรมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3. การคัดเลือกชนิดของตัวพวงที่ใช้ตรึงไนโตรเจน

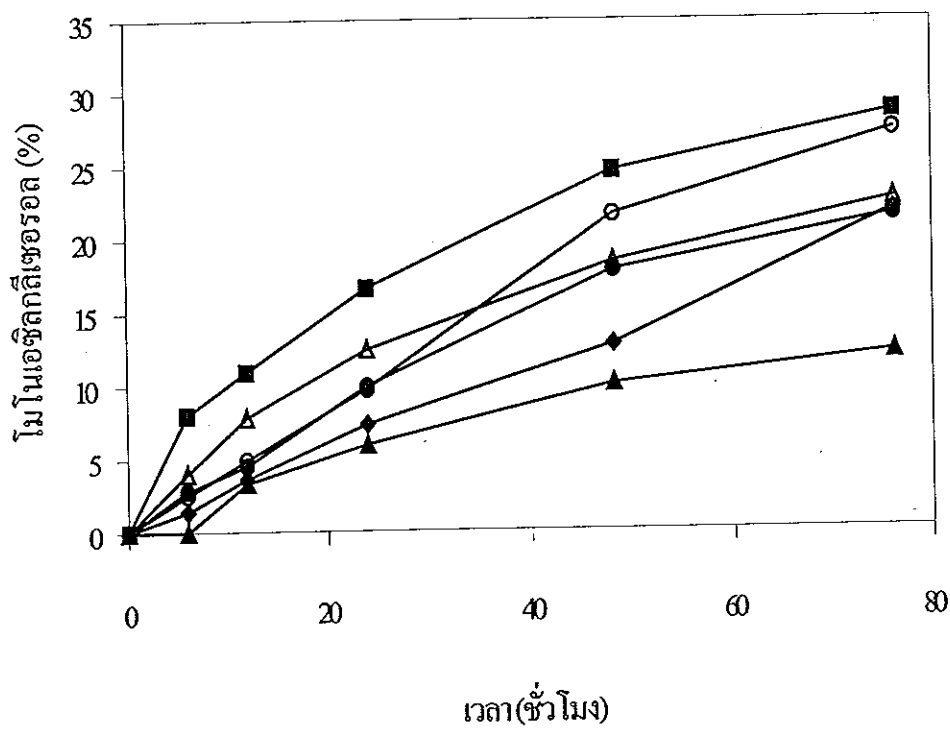
การศึกษาการตรึงไนโตรเจนไนโตรเจนไลเปส LP โดยใช้ตัวพวง 6 ชนิด คือ ซีไลท์ แอควูเรล ซิลิกาเจล แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมซัลเฟต และแคลเซียมไพโรฟอสเฟต ใช้ไนโตรเจนไลเปส LP 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับตัวพวง 2 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการตรึงไนโตรเจนไนโตรเจนไลเปส LP บนตัวพวงแต่ละชนิด มีกิจกรรมไนโตรเจนหลังจากยัดเกาะของไนโตรเจนแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 11 ไนโตรเจนที่ตรึงบนซีไลท์และแอควูเรลมีค่ากิจกรรมไนโตรเจนหลังจากยัดเกาะของไนโตรเจนสูงที่สุดเท่ากับ 82.81 และ 80.28 เปอร์เซ็นต์ และมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 0.46 และ 0.45 หน่วยต่อมิลลิกรัมตัวพวง ตามลำดับ ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตให้ค่ากิจกรรมไนโตรเจนหลังจากยัดเกาะต่ำสุด (14.93 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อนำไนโตรเจนไลเปส LP ที่ถูกตรึงบนตัวพวงชนิดต่างๆ มาใช้ในปฏิกิริยาไกลซีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยมีกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 10 หน่วย ภายใต้สภาวะเดียวกันกับการคัดเลือกไนโตรเจนไลเปสอิสระ พบว่าไนโตรเจนที่ตรึงบนซีไลท์มีอัตราการเกิดปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงที่สุด 28.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10) ไนโตรเจนที่ถูกตรึงบนแอควูเรลให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล 27.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไนโตรเจนที่ถูกตรึงบนแคลเซียมซัลเฟตให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลน้อยที่สุด 12.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 11) ซึ่งผลการทดลองแปรผันตรงกับการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม พบว่าซีไลท์เป็นตัวพวงที่เหมาะสมที่สุดในการตรึงไนโตรเจนไลเปส LP เพื่อใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ทั้งนี้เนื่องจากซีไลท์เป็นตัวพวงที่มีรูพรุนขนาดเล็กๆ ที่สามารถบรรจุไนโตรเจนไว้ภายในได้และมีกลุ่มของหมู่ฟังก์ชัน (สารประกอบทางเคมีของซีไลท์ประกอบด้วย : $86\%SiO_2$, $1\%CaO$, $7\%Al_2O_3$, $2\%Fe_2O_3$) ที่สามารถจับกับไนโตรเจนไลเปสได้ดีกว่าตัวพวงชนิดอื่นๆ (Rosu, et al., 1997) ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Bornscheuer และ Yamane (1994) พบว่าซีไลท์เป็นตัวพวงที่ดีที่สุดสำหรับตรึงไนโตรเจนไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* เพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล นอกจากนี้ Millqvist และคณะ (1994) ตรึงไนโตรเจนไลเปสจาก *Rhizopus arrhizus* บนซีไลท์เพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิสของไตรกลีเซอไรด์

ตารางที่ 11 การตรึงไนโตรเจนของไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* บนตัว
พืชนิกต่าง ๆ

ตัวพืชนิก	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ ^a (%)	กิจกรรมไนโตรเจน หลังการยึดเกาะ ^b (%)	กิจกรรมไนโตรเจนที่ถูกตรึง (มิลลิกรัม/มก.ตัวพืชนิก)	MAG (%)
ซีไลท์	81.46	82.81	0.46	28.6
แอกคูเรล	99.88	80.28	0.45	27.5
ซิลิกาเจล	91.33	44.80	0.26	21.5
แคลเซียมคาร์บอเนต	95.20	14.93	0.08	21.8
แคลเซียมซัลเฟต	91.39	52.86	0.30	12.1
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	87.07	64.05	0.36	22.6

$$^a \text{ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (\%)} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด} - \text{กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$$

$$^b \text{กิจกรรมไนโตรเจนหลังการยึดเกาะ (\%)} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของไนโตรเจนที่ถูกตรึง}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของไนโตรเจนอิสระ}} \times 100$$



ภาพที่ 10 การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซิสน้ำมันปาล์มโดย เอนไซม์ไลเปส LP ที่ถูกตรึงบนตัวพองชนิดต่างๆ ปริมาณ 10 ยูนิต : แคลเซียมคาร์บอเนต (◆), ซีไลต์ (■), แคลเซียมซัลเฟต (▲), แคลเซียมฟอสเฟต (△), แอกคูเรล (○) และซิงก้าเจล (●)

4. สภาพที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลโปสบนตัวพวงที่คัดเลือกได้

4.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์

การคัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ไลโปส LP ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรึงบนซีไลท์ โดยใช้สารละลายความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาใช้ในการขั้นตอนการตรึง ใช้ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร ตรึงกับซีไลท์ 2.0 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพวงก็เพิ่มขึ้นด้วย ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพวงเท่ากับ 94.9 เปอร์เซ็นต์ มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปลาเท่ากับ 0.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพวง เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์สูงขึ้นเป็น 3.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์ลดลงเป็น 55.7 และ 40.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพวง กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพวงจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อตัวพวงดูดซับเอนไซม์จนถึงจุดอิ่มตัวแล้วแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีกก็ไม่ทำให้กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น (Bernath and Vankatasubramanain, 1986) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลโปส LP ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับบนซีไลท์ คือ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (413.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งผลการทดลองแตกต่างกับ Rosu และคณะ (1997) เลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลโปสจาก *Chromobacterium viscosum* 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในการตรึงกับตัวพวง 2.0 กรัม นอกจากนี้ Kamlangdee และ Yamane (1996) ใช้เอนไซม์ไลโปสจาก *Chromobacterium viscosum* 40,000 ยูนิต ในสารละลาย 5 มิลลิลิตร ตรึงกับแคลเซียมคาร์บอเนต 2.0 กรัม ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงเท่ากับ 2.30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพวงโดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาต่างกัน เช่น วิธีการศึกษากิจกรรมการย่อยสลาย ชนิดของสับสเตรท เป็นต้น จึงทำให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

ตารางที่ 12 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* ต่อการตรึงเอนไซม์กับซีไลท์

ความเข้มข้นเอนไซม์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (%)	กิจกรรมเอนไซม์ หลังการยึดเกาะ (%)	กิจกรรมเอนไซม์ ที่ถูกตรึง (ยูนิต/ มก.ตัวพุง)
0.5	53.08	10.83	0.04
1.0	58.96	16.27	0.08
1.5	66.17	44.28	0.25
2.0	81.50	82.00	0.46
2.5	95.31	94.90	0.60
3.0	96.23	55.70	0.63
4.0	98.75	40.30	0.78

4.2 อุณหภูมิในการตรึงไนโตรเจน

เมื่อตรึงไนโตรเจนไลเปส LP บนซีไลท์ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 4, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการตรึงไนโตรเจนที่อุณหภูมิดังกล่าวให้ค่ากิจกรรมไนโตรเจนหลังการยึดเกาะของไนโตรเจนบนตัวพุงไม่แตกต่างกัน คือ 95.3, 95.0 และ 94.9 เปอร์เซ็นต์ และมีค่ากิจกรรมไนโตรเจนเท่ากับ 0.61, 0.60 และ 0.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุงตามลำดับ (ตารางที่ 13) ดังนั้นการตรึงไนโตรเจนไลเปส LP ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพสามารถทำได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการทดลองของ Kamlangdee และ Yamane (1996) ศึกษาการตรึงไนโตรเจนไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้ค่ากิจกรรมไนโตรเจนเท่ากับ 2.30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุง นอกจากนี้ Millqvist และคณะ (1994) ตรึงไนโตรเจนไลเปสจาก *Rhizopus arrhizus* บนซีไลท์ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล Bornscheuer และ Yamane (1994) ตรึงไนโตรเจนไลเปส จาก *Pseudomonas cepacia* บนซีไลท์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยาไกลิเซอโรไลซิส ได้ผลผลิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 การตรึงไนโตรเจนไลเปส LP บนซีไลท์ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°ซ)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (%)	กิจกรรมไนโตรเจน หลังการยึดเกาะ (%)	กิจกรรมไนโตรเจนที่ ถูกตรึง (ยูนิต/มก. ตัวพุง)
4	95.32	95.34	0.61
25	95.12	95.02	0.60
30	95.03	94.91	0.60

4.3 ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์

การศึกษหาเวลาที่เหมาะสมในการเกาะกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง ทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์ไลเปส LP ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับซีไลท์ 2.0 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจนถึง 12 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพการยึดเกาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการตรึงเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะชั่วโมงแรกของการตรึงเอนไซม์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 94.98 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นถึงแม้ว่าใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 6 และ 12 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการยึดเกาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 14) ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากพื้นที่ผิวของซีไลท์มีจำกัด และเป็นผลเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเข้ายึดเกาะกับซีไลท์ในช่วงแรกของการตรึงเอนไซม์อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นแม้จะใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์นานขึ้นก็ไม่ส่งผลให้เกิดการยึดเกาะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะสังเกตได้จากปริมาณเอนไซม์ในสารละลายที่เหลืออยู่ยังคงมีปริมาณเท่าเดิมในขณะที่เวลาเพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษา Kamlangdee และ Yamane (1996) ซึ่งพบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* บนแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด Bornscheuer และ Yamane (1994) ตรึงเอนไซม์ไลเปส จาก *Pseudomonas cepacia* บนซีไลท์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิส ได้ผลผลิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

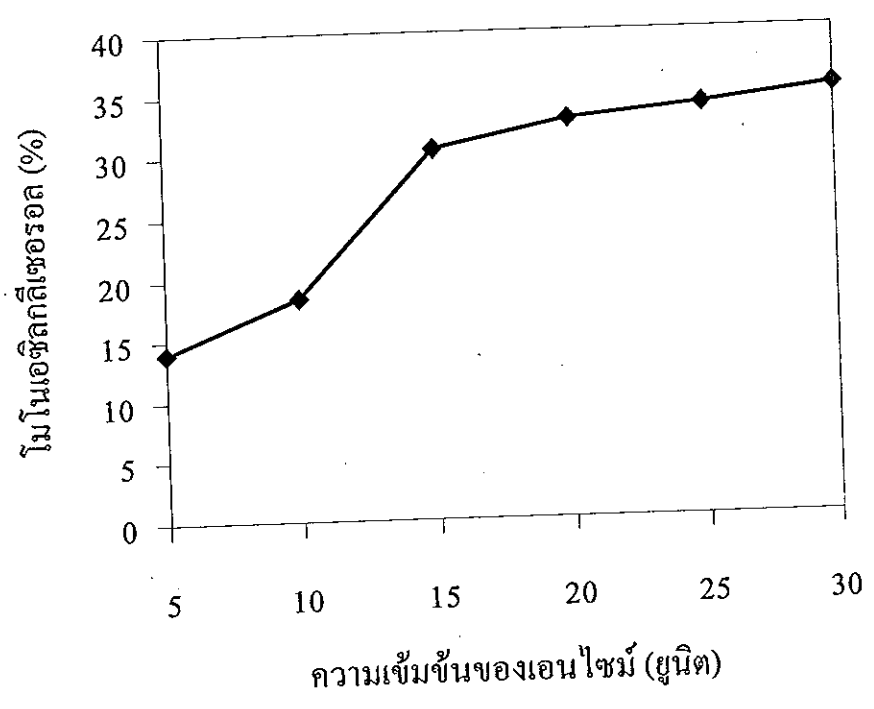
ตารางที่ 14 ผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส LP บนซีไลท์

เวลา	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (%)	กิจกรรมเอนไซม์ หลังการยึดเกาะ (%)	กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึง (ยูนิต/มก.ตัวพุง)
15 นาที	67.91	57.23	0.43
30 นาที	73.43	76.84	0.48
1 ชั่วโมง	94.98	95.05	0.60
6 ชั่วโมง	95.71	95.63	0.62
12 ชั่วโมง	95.69	95.40	0.62

5. ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม

5.1 ผลของปริมาณเอนไซม์

การใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส LP ที่ตรึงบนซีไลท์ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0 ถึง 30 ยูนิต ปริมาณน้ำมันปาล์ม 13.07 กรัม กลีเซอรอล 2.84 กรัมที่มีปริมาณน้ำ 4 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่สูงขึ้น ทำให้การย่อยน้ำมันปาล์มเกิดขึ้นได้สูงและส่งผลให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงขึ้นด้วย โมโนเอซิลกลีเซอรอลถูกผลิตสูงสุดเท่ากับ 30.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูป 15 ยูนิต (ภาพที่ 10) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากกว่า 15 ยูนิต พบว่าปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาณของเอนไซม์ตรึงรูปเท่ากับ 15 ยูนิต (ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูป 25 มิลลิกรัม) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการทดลองของ Stevenson และคณะ (1993) ซึ่งใช้เอนไซม์ไลเปส lipozyme 200 มิลลิกรัมทำปฏิกิริยากับไขมันวัว 10 กรัม จะให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงที่สุด 47 เปอร์เซ็นต์ การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มากกว่านี้ไม่ได้ทำให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Kamlangdee และ Yamane (1996) ใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ที่ถูกตรึงบนแคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับ 6,000 ยูนิต ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสและใช้น้ำมันมะกอก 5 กรัม และกลีเซอรอล 2.6 กรัม ได้โมโนเอซิลกลีเซอรอลมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ Tueter และคณะ (1998) พบว่าปริมาณเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันทานตะวันเท่ากับ 500 ยูนิตต่อกรัมไขมัน ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล 53 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันมากในการทดลองแต่ละการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นผลจากชนิดและปริมาณเอนไซม์ ตลอดจนขั้นตอนการปฏิบัติที่แตกต่างกันทำให้ได้ผลผลิตของโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ได้แตกต่างกันด้วย



ภาพที่ 11 ผลของปริมาณเออนไซม์ไลเปส LP ตรงรูปต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล

5.2 ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม

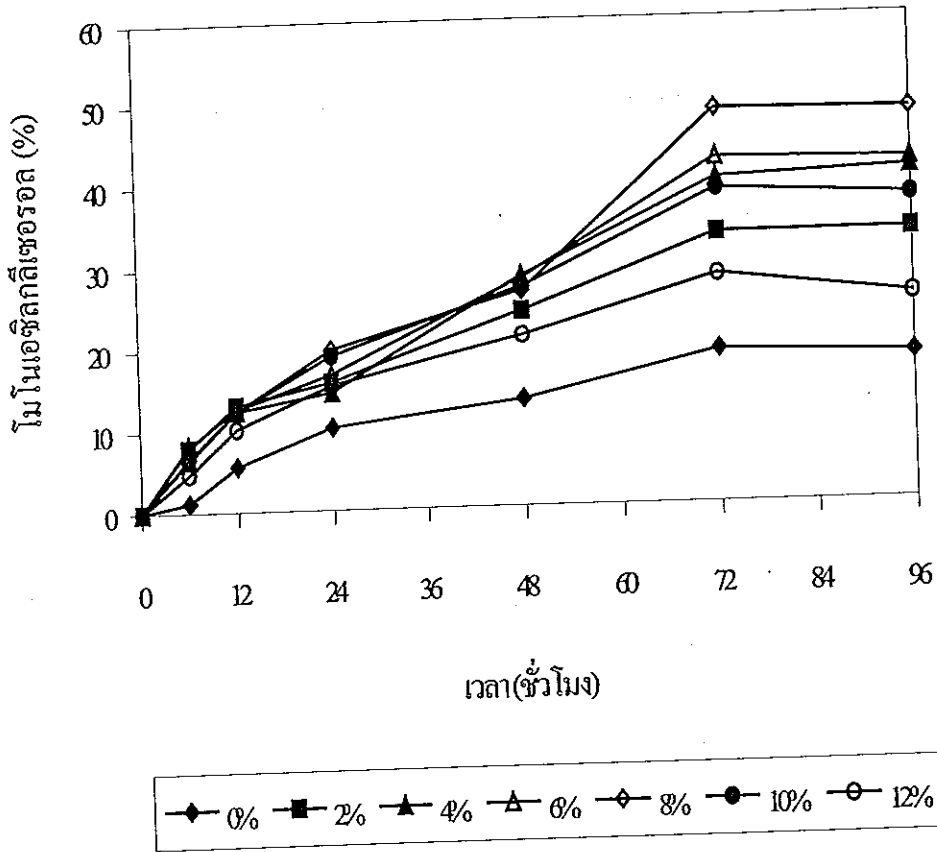
การศึกษาผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่ใช้ในปฏิกริยากลิเซอโรไลซิสโดยใช้สัดส่วน โมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 2.0 ถึง 4.8 ปริมาณเอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูป 15 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสัดส่วน โมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมคือ 3.7 ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 42.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) ถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลมากกว่านี้ก็ไม่ส่งผลให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นมากนัก พบว่าถ้าปริมาณกลีเซอรอลในปฏิกริยามากเกินไปจะทำให้ น้ำในปฏิกริยาเพิ่มมากขึ้นซึ่งจะส่งผลให้กรดไขมันถูกผลิตขึ้นมาแทน McNeill และ คณะ (1990) พบว่าสัดส่วน โมลของกลีเซอรอลต่อไขมันวัวที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลคือ 1.5 ถึง 2.5 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Stevenson และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่าสัดส่วน โมลของกลีเซอรอลต่อไขมันวัวมากกว่า 0.8 ไม่ส่งผลให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้นและยังมีกลีเซอรอลเหลืออยู่ในปฏิกริยาอีก Rosu และคณะ (1997) ใช้สัดส่วน โมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันมะกอกเท่ากับ 4.8 ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล 90 เปอร์เซ็นต์ Tuter และคณะ (1999) เลือกสัดส่วน โมลน้ำมันต่อกลีเซอเซอรอลเท่ากับ 1:2 เพื่อใช้ในปฏิกริยากลิเซอโรไลซิสน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar*

ตารางที่ 15 ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยเอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูป

กลีเซอรอล (กรัม)	น้ำมันปาล์ม (กรัม)	สัดส่วนโมล (กลีเซอรอล/น้ำมันปาล์ม)	โมโนเอซิลกลีเซอรอล (%)
1.47	7	2.0	30.4
1.84	7	2.5	37.1
1.98	7	2.7	28.7
2.84	7	3.7	42.5
3.53	7	4.8	25.1

5.3 ผลของปริมาณน้ำในกลีเซอรอล

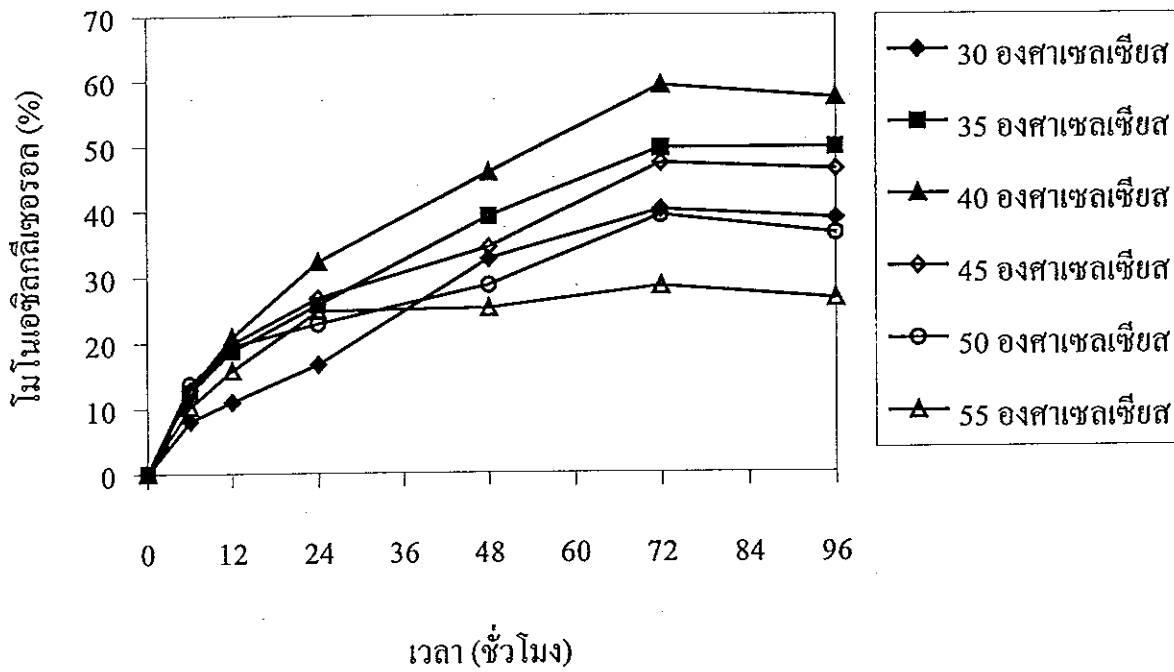
การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป 15 ยูนิต ที่มีสัดส่วนโมลกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 3.7 (กลีเซอรอล 2.84 กรัม น้ำมันปาล์ม 7.0 กรัม) และให้ปริมาณน้ำในกลีเซอรอลเท่ากับ 0 ถึง 12 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้น้ำในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจาก 2 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลให้การย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงขึ้นและปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงขึ้นด้วย ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 8 เปอร์เซ็นต์จะให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงที่สุดเท่ากับ 48.4 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ คือ 40.4 และ 42.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ปริมาณน้ำในกลีเซอรอลมากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดลง หรือไม่มีน้ำในปฏิกิริยาเลยเอนไซม์ก็ไม่สามารถย่อยน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ ถ้ามีปริมาณน้ำในปฏิกิริยามากจะส่งผลให้โอกาสเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ก็มีกรดไขมันแทนการเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันน้อย สอดคล้องกับการทดลองของ Chang และ Rhee (1991) พบว่าปริมาณน้ำในปฏิกิริยาไกลเซโรไลซิสของน้ำมันมะกอกไม่ควรเกิน 8 เปอร์เซ็นต์ ถ้าปริมาณน้ำมากเกิดกรดไขมันมากด้วย ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองของ McNeill และคณะ (1991) รายงานว่าปริมาณน้ำในกลีเซอรอลที่เหมาะสม เท่ากับ 3.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปฏิกิริยาไกลเซโรไลซิสของไขมันวัวและพบว่าถ้ามีปริมาณน้ำในกลีเซอรอลมากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันจะถูกผลิตขึ้นมามาก Bornscheuer และคณะ (1994) เลือกปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์ ในปฏิกิริยาไกลเซโรไลซิสของไตรโกลิน สำหรับการทดลองในขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 8 เปอร์เซ็นต์ ในปฏิกิริยาไกลเซโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม



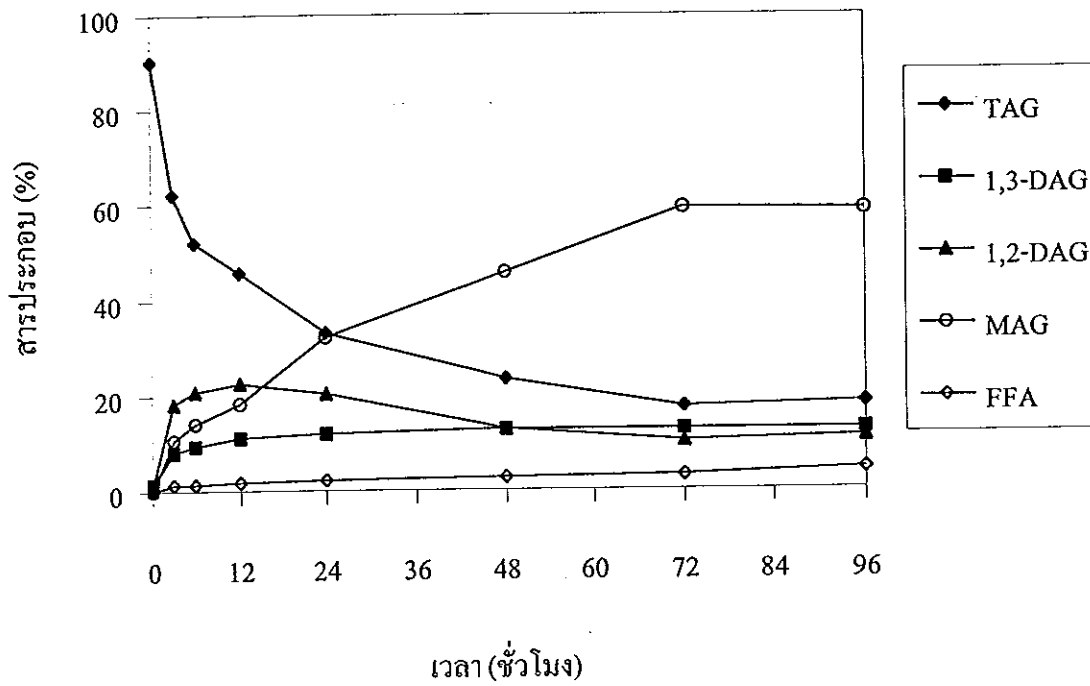
ภาพที่ 12 ผลของปริมาณน้ำในกลีเซอรอลต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูป

5.4 ผลของอุณหภูมิ

การผลิตโมนโอซิลกลีเซอรอลโดยเอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูป ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 55 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการย่อยสลายน้ำมันปาล์มจะเพิ่มสูงขึ้น และปริมาณโมนโอซิลกลีเซอรอลก็เพิ่มขึ้นด้วยโดยเอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูปสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มและให้ปริมาณโมนโอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 59.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 13) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เกิดโมนโอซิลกลีเซอรอลน้อยลงมีค่าเท่ากับ 47.2, 39.2 และ 28.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในช่วงแรกปฏิกิริยาไกลซีลจะอยู่ในรูปของเหลว (liquid-phase) แต่เมื่อปฏิกิริยาคำเนินไปสักระยะปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปของแข็ง (solid-phase) ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาจะเข้าสู่สถานะของแข็งหลังจากปฏิกิริยาคำเนินไปประมาณ 3 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียสปฏิกิริยาจะอยู่ในรูปของเหลวตลอดปฏิกิริยา อธิบายได้ว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมันปาล์มถูกย่อยเป็นกรดไขมันแล้วกรดไขมันจับกับกลีเซอรอลในปฏิกิริยาเกิดเป็นโมนโอซิลกลีเซอรอลซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลจึงทำให้ปฏิกิริยาอยู่ในรูปของแข็ง การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบในปฏิกิริยาไกลซีลของน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสแสดงดังภาพที่ 14 ในช่วงแรกของปฏิกิริยาจะมีโมนโอซิลกลีเซอรอลถูกผลิตมามาก แต่หลังจากปฏิกิริยาคำเนินไป 3 ชั่วโมง ปริมาณโมนโอซิลกลีเซอรอลจะลดลง แต่จะมี 1,2 ไดเอซิลกลีเซอรอลถูกผลิตขึ้นมาแทนแล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นโมนโอซิลกลีเซอรอล ส่วน 1,3 ไดเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยาจะถูกผลิตมาน้อยถึงแม้ว่าปฏิกิริยาจะเข้าสู่สถานะของแข็งแต่ก็ยังมีการผลิตโมนโอซิลกลีเซอรอลเกิดขึ้นสังเกตได้จากปริมาณโมนโอซิลกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Tuter และคณะ (1998) แสดงให้เห็นว่าการเกิดปฏิกิริยาไกลซีลของน้ำมันดอกทานตะวันสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* ที่ไม่ครึ่งรูป ให้ปริมาณโมนโอซิลกลีเซอรอล 53 เปอร์เซ็นต์ Tuter และคณะ (1999) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไกลซีลของน้ำมันปาล์มเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เกิดโมนโอซิลกลีเซอรอล 66 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus delemar* ที่ไม่ครึ่งรูป



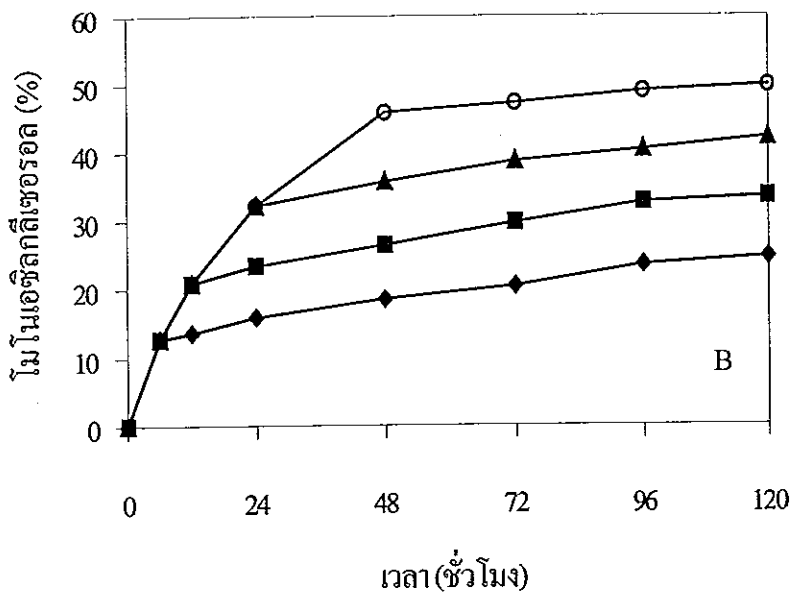
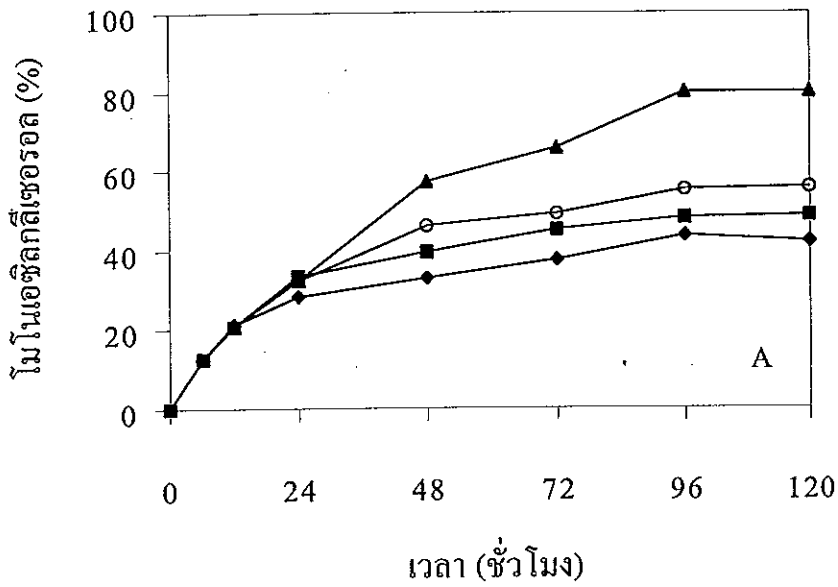
ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโมโนเอซิดกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์ม โดยเอ็นไซม์ไลเปส LP ทรงรูป



ภาพที่ 14 สารประกอบต่างๆ ที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดย เอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

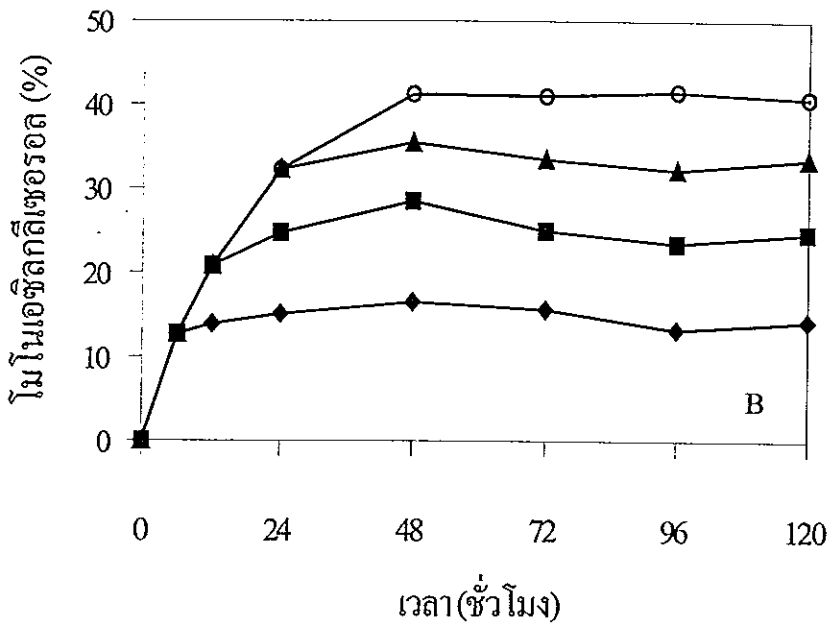
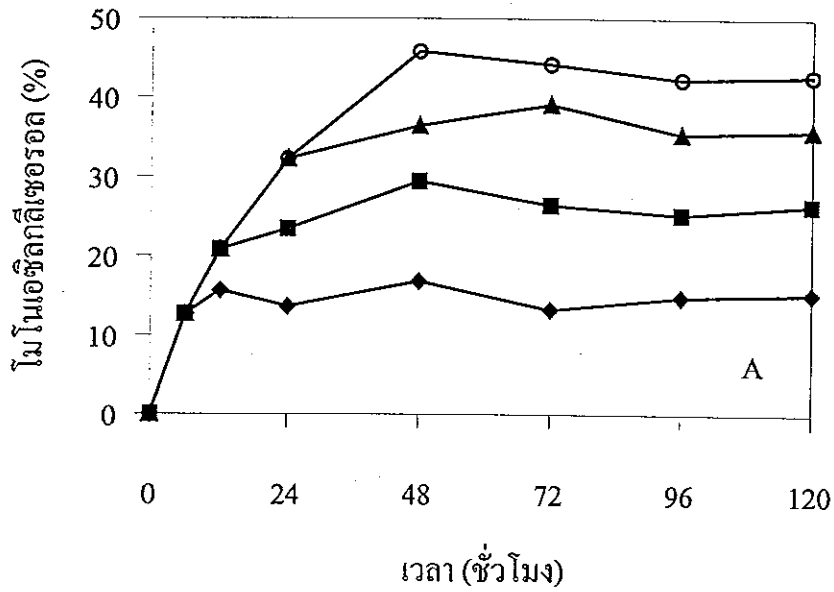
5.5 ผลของระยะเวลาการบ่ม

จากการทดลองผลของอุณหภูมิในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์มพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด แต่จากการทดลองของนักวิจัยหลายๆ ท่านพบว่าการใช้อุณหภูมิสูงตลอดการทดลองจะไม่ทำให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น หรือบางครั้งปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลลดลง เนื่องจากโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่ถูกผลิตขึ้นมาเปลี่ยนรูปไปเมื่ออุณหภูมิสูง ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองการเกิดปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ กัน ดังนี้ 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิเป็น 30, 25, 10 และ 5 องศาเซลเซียสจนครบเวลา 120 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 15-16 พบว่าการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วตามด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15A) แต่พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นของปฏิกิริยาเป็น 40 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิเป็น 25, 10 และ 5 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 120 ชั่วโมง จะเกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลน้อยกว่า (ภาพที่ 15B, 16A-B) การทดลองครั้งนี้ผลการทดลองอธิบายได้เช่นเดียวกับการทดลองของ McNeill และ คณะ (1990) รายงานว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสตลอดปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของไขมันวัวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* จะให้โมโนเอซิลกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียสจนครบเวลา 50 ชั่วโมง จะให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองของ Thude และคณะ (1997) พบว่าปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของน้ำมันจากเมล็ดการบูร โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสจนครบเวลา 160 ชั่วโมง เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอล 90 เปอร์เซ็นต์



◆ 6 ชั่วโมง ■ 12 ชั่วโมง ▲ 24 ชั่วโมง ○ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 15 ผลของระยะเวลาการบ่มต่อการผลิต โมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์ม โดยเอนไซม์ LP ตรึงรูป อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส (A) และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (B) จนครบเวลา 120 ชั่วโมง



◆ 6 ชั่วโมง ■ 12 ชั่วโมง ▲ 24 ชั่วโมง ○ 48 ชั่วโมง

ภาพที่ 16 ผลของระยะเวลาการบ่มต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากน้ำมันปาล์ม โดยเอนไซม์ LP ตรึงรูป อุณหภูมิเริ่มต้น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียส (A) และอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (B) จนครบเวลา 120 ชั่วโมง

6. การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่โดยการเติมสารละลายอะซิโตน 100 มิลลิลิตรลงในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 15 ยูนิต น้ำมันปาล์ม 7 กรัม กลีเซอรอล 2.84 กรัมที่มีน้ำ 8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ละลายสารผสมในปฏิกิริยาให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วกรองเอนไซม์ตรึงรูปออกจากปฏิกิริยา ล้างเอนไซม์อีก 2-3 ครั้งด้วยอะซิโตน แล้วนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปไปทำให้แห้งในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในครั้งต่อไป จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ผ่านการใช้ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซีสของน้ำมันปาล์มเมื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 3 ครั้ง (ตารางที่ 16) กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปส LP ตรึงรูปลดลงจาก 0.6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุงเป็น 0.18 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุงผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้เท่ากับ 28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากอาจเนื่องมาจากเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมระหว่างการแยกออกมาจากปฏิกิริยาหรือเอนไซม์หลุดออกจากตัวพุงเพราะเอนไซม์เกาะกับตัวพุงด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรง ซึ่งน่าจะมีการศึกษาในขั้นต่อไป การทดลองของ Mojovic และคณะ (1993) พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP จาก *Rhizopus arrhizus* ที่ตรึงบนซีไลท์นำมาใช้ในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตไกล์เซอไรด์สามารถนำมาใช้ได้ 4 ครั้งและสูญเสียกิจกรรมไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 16 การนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

จำนวนครั้ง ที่นำมาใช้	โมโนเอซิลกลีเซอรอล (%)	กิจกรรมเอนไซม์ที่เหลือ (ยูนิต/มก.ตัวพุง)
0	80	0.48
1	57	0.25
2	28	0.18
3	11	0.07
4	1.2	0

บทที่ 4

สรุป

1. การศึกษากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ทางการค้า 5 ชนิด พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP จากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุด 233.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน
2. การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 5 ชนิด เพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม พบว่าเอนไซม์ไลเปส LP สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส LP พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม คือ 55 องศาเซลเซียสและ 6.5 ตามลำดับ โดยเอนไซม์มีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส
4. การตรึงเอนไซม์ไลเปส LP โดยการดูดซับกับตัวพุง 6 ชนิด คือ แคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมฟอสเฟต ซิลิกา ซิลิกาเจล และแอกตูเรล พบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปส LP บนซิลิกาและแอกตูเรลให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 82.81 และ 80.28 เปอร์เซ็นต์ และมีค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 0.46 และ 0.45 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุงตามลำดับ และเมื่อนำเอนไซม์ไลเปส LP ที่ตรึงบนตัวพุงชนิดต่างๆ มาใช้ในปฏิกิริยาการกลีเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนซิลิกาให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 28.6 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
5. สภาพที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส LP บนซิลิกา คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการตรึง 1 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมการยึดเกาะสูงสุด 95.05 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงเท่ากับ 0.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุง

6. สภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูป คือ ปริมาณของเอนไซม์ 15 ยูนิต สัดส่วนโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มเท่ากับ 3.7 ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 8 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เกิดโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์
7. เอนไซม์ไลเปส LP ครึ่งรูป เมื่อนำมาใช้ในปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสของน้ำมันปาล์ม เป็นครั้งที่ 3 ให้โมโนเอซิลกลีเซอรอลต่ำสุด 28 เปอร์เซ็นต์ และคงเหลือกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม 0.18 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวพุง

เอกสารอ้างอิง

- ฉัตรชัย สังข์ผุด. 2542. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอินในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์.
- เทิดชัย วิรุฬพานิช. 2533. อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์จากน้ำมันปาล์ม. รายงานเศรษฐกิจ ประจำเดือน เมษายน. ธนาคารกรุงไทย จำกัด : 47-54.
- ปราณี อานเป็รื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ไพจิตร จันทรวงศ์. 2530. คู่มือการใช้ประโยชน์และตรวจสอบคุณภาพของพืชน้ำมันและ น้ำมันพืช 52 ชนิด. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- วุฒิชัย พิชัยยุทธ. 2540. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถุกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อาภัสสรฯ ชมิดท์. 2537. ลิพิด ใน ชีวเคมี. หน้า 187-217. กรุงเทพฯ. เค.ยู. เพลสส์.
- อาภัสสรฯ ชมิดท์. 2537. เทคนิคที่สำคัญทางชีวเคมี ใน คู่มือทางชีวเคมี. หน้า 32-56. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์สหมิตรพรินติ้ง.
- Akoh, C.C., Cooper, C. and Nwosu, C.U. 1992. Lipase G-catalyzed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC. JAOCS. 69 : 257-260.
- Balcao, V.M., Piava, A.L. and Malcata, F.X. 1996. Bioreactors with immobilized lipase: State of art. Enzyme Microb. Technol. 18 : 392-416.
- 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.
- Bosley, J.A. 1996. Turning lipase into industrial biocatalysts. Biochem. Soc. Trans. 25 : 174-178.

- Brady, C., Metcalfe, L., Staboszewski, D. and Frak, D. 1988. Lipase immobilized on hydrophobic microporous support for the hydrolysis of fat. *JAOCS*. 65 : 917-921.
- Bornscheuer, U.T. 1995. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 17 : 578-586.
- Bornscheuer, U.T., Stamatis, H., Xenakis, A., Yamane, T. and Kolisis, F.N. 1994. A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides. *Biotechnol. Letters*. 16 : 697-702.
- Bornscheuer, U.T. and Yamane, T. 1994. Activity and stability of lipase in the solid-phase glycerolysis of triolein. *Enzyme Microb. Technol.* 16 : 864-869.
- Cao, S.G., Yang, H., Ma, L. and Guo, S.Q. 1996. Enhancing enzymatic properties by the immobilization method. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59 : 7-14.
- Castella, M.R., Taipa, M.A. and Cabral, J.M.S. 1995. Kinetic and stability characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 61 : 299-313.
- Chang, P.S. and Rhee, J.S. 1991. Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobacterium viscosum* lipase immobilized on liposome in reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 38 : 1159-1165.
- Coteron, A., Martinez, M. and Aracil, J. 1998. Reaction of olive oil and glycerol over immobilized lipases. *JAOCS*. 75 : 657-660.
- Gandhi, N.N. 1997. Applications of lipase. *JAOCS*. 74 : 621-634.
- Gilbert, E.J. 1993. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* 15 : 634-636.
- Goldberg, M., Thomas, D. and Legoy, M.D. 1990. Water activity as a key parameter of synthesis reaction the example of lipase in biphasic (liquid solid) media. *Enzyme Microb. Technol.* 12 : 976-981.

- Godtfredsen, S.E. 1993. Lipases. *In* Enzyme in food Processing 3rd ed. (eds. T. Nagodawithana and G. Reed) pp. 205-219. California : Academic Press.
- Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T. and Hansen, M.T. 1995. Two lipases from *Candida antarctica*-cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can. J. Botan.* 73 : S869-S875.
- Hui, Y.H. 1996. Palm oil. *In* Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol II : Edible oil and fat : Oil and oilseeds, pp. 271-367. New York : John Wiley and Sons, INC.
- IUPAC. 1979. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 6th ed. Part I. Pp. 56-59. Paris : Pergamon Press.
- Jackson, M.A. and King, J.W. 1997. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. *JAOCS.* 72 : 103-106.
- Kamlangdee, N. and Yamane, T. 1996. Monoglyceride formation from fat by immobilized lipase. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 18 : 363-370.
- Kang, S.T. and Rhee, J.S. 1989. Effect of solvents on hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in reverse phase system. *Biotechnol. Letters.* 11 : 37-42.
- Kawakami, K. 1996. Enhancement of thermostability of lipase by the sol-gel entrapment into methyl 1-substituted organic silicates form on diatomaceous earth. *Biotechnol. Tech.* 10 : 491-494.
- Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T. 1997. Biotransformation with lipases. *In* Biotechnology (eds. H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P.J.M. Stadler and D.R. Kelly) Vol. VIII : Biotransformation, pp. 226. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Kenedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme Immobilization, pp.349-402. *In* J.F.Kennedy(ed.). Biotechnology. 7a : Enzyme Technology. Fed. Repub. Of Germany, Weinheim.

- Kimura, Y. and Tanaka, A., Somonato, K., Nihira, T. and Fukuki, S. 1983. Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 : 107-122.
- Kosugi, Y. and Tomizuka, N. 1995. Continuous lipolysis reactor with a loop connecting an immobilized lipase column and oil-water separator. *JAOCS.* 72 : 1329-1332.
- Kosugi, Y., Takahashi, K. and Lopez, C. 1995. Large-scale immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I and an application for sardine oil hydrolysis. *JAOCS.* 72 : 1281-1285.
- Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. 1986. A simple and rapid calorimetric method for determination of free fatty acid for lipase assay. *JAOCS.* 63 : 89-95.
- Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yeon, S.H. 1996. Synthesis of medium- chain glycerides by lipase in organic solvent. *JAOCS.* 73 : 1521-1525.
- Kwon, S.J., Han, J.J. and Rhee, J.S. 1995. Production and *in situ* separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipase in n-hexane. *Enzyme Microb. Technol.* 17 : 700-704.
- Lee, S.Y. and Rhee, J.S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.* 15 : 617-623.
- Li, Y. Z. and Ward, O.P. 1993. Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acids by microbial lipase in organic solvent. *JAOCS.* 70 : 745-748.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. *JAOCS.* 61 : 1067-1071.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1992. Kinetics and mechanisms of catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 14 : 426-446.

- Maclellan, M. 1983. Palm Oil. JAOCS. 60 : 320-325.
- McNeill, G.P., Shimizu, S. and Yamane, T. 1990. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield monoglycerol. JAOCS. 67 : 779-783.
- McNeill, G.P. and Yamane, T. 1991. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fat and oil. JAOCS. 68 : 6-10.
- McNeill, G.P., Shimizu, S. and Yamane, T. 1991. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. JAOCS. 68 : 1-5.
- Millqvist, A., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B. 1994. Lipase catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides. Enzyme Microb. Technol. 16 : 1042-1047.
- Mojovic, L., Marinkovic, S.S., Kukic, G. and Novakovic, G.V. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. Enzyme Microb. Technol. 15 : 438-443.
- Montero, S., Blanco, A., Virtro, 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 : 239-247.
- Mukherjee, K.D. 1990. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. Biocatalysis 3 : 277-293.
- Myrnes, B., Barstad, H., Olsen, R.L. and Elvevoll, E.O. 1995. Solvent-free enzymatic glycerolysis of marine oil. JAOCS. 72 : 1339-1344.
- Ohta, Y., Yamane, T. and Shimizu, S. 1989. Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase. Agric. Biol. Chem. 53 : 1885-1890.
- Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. 1981. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agric. Biol. Chem. 45 : 180-189.

- Otero, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1990. Influence of the support on the reaction course of tributyrin hydrolysis catalyzed by soluble and immobilized lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 23 :237-247.
- Patel, M.T., Nagarajan, R. and Kilara, A. 1995. Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of triglycerols in aerosol-ot/iso-octane reverse-micellar media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 22 : 1-14.
- Perin, D.D. and Dempsey, B. 1974. *Buffer for pH and Metal Ion Control*. London : Chapman and Hall.
- Prazeresb, D.M.F., Garcia, F.A.P. and Calbral, J.M.S. 1992. Kinetics and stability of a *Chromobacterium viscosum* lipase in reverse micellar and aqueous media. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 53 : 159-164.
- Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y. and Yamane, T. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *JAOCs.* 74 : 445-450.
- Schwimmer, S. 1981. *Source Book of Food Enzymology*. Westport Connecticut: The AVI Publishing Company, INC.
- Shahani, K.M. 1975. Lipase and esterase. *In Enzyme in Food Processing*. 2nd ed. (ed. G. Reed) pp. 181-217. New York : Academic Press.
- Shaw, J.F. and Wang, D.L. 1991. Lipase catalyzed ethanolysis and isopropanolysis of triglycerides with long-chain fatty acid. *Enzyme Microb. Technol.* 13 : 544-546.
- Shaw, J.F., Chang, R.C., Wang, F.F. and Wang Y. S. 1989. Lipolytic activity of a lipase immobilized on six selected supporting material. *Biotechnol. Bioeng.* 35 : 132-137.
- Sontag. 1982. *In Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Vol II : Edible oil and fat : Oil and oilseeds, pp. 134-144. New York : John wiley and sons, INC.

- Stevenson, D.E., Stanley, R.A. and Furneaux, R.H. 1993. Glycerolysis of tallow with immobilized lipase. *Biotechnol. Lett.* 15 : 1043-1048.
- Suree, P. and Pawinee, K. 1992. Immobilization of lipase on various supports and its activity in water poor media. *In Chem* 10-010. Chiang Mai University.
- Tanaka, M., Itoh, T. and Kancko, H. 1980. Quantitative determination of isomeric glycerides, free fatty acids and triglycerides by thin layer chromatography flame ionization detector system. *Lipids.* 15 : 872-875.
- Thude, S., Shukun, L., Said, M.B. and Bornscheuer, U.T. 1997. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglyceride by glycerolysis of camphor tree seed oil. *J. CA Section.* 99 : 246-250.
- Tuter, M., Arat, F., Dandik, L. and Aksoy, H.A. 1998. Solvent-free glycerolysis of sunflower oil and anchovy oil catalyzed by a 1,3-specific lipase. *Biotechnol. Lett.* 20 : 291-294.
- Tuter, M., Babah, B., Koese, O., Dural, S. and Aksoy, H.A. 1999. Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by a 1,3-specific lipase and fatty acid composition of glycerolysis product. *Biotechnol. Lett.* 21 : 245-248.
- Vercraragaran, K. and Gibbs, B.F. 1989. Detection and partial purification of two lipase from *Candida rugosa*. *Biotechnol Lett.* 11 : 345-348.
- Wang, X. and Ruckenstein, E. 1993. Lipase immobilized on hydrophobic porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerization and their activity in the hydrolysis of triglycerides. *Biotechnol. Bioeng.* 42 : 821-828.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry : An engineering overview. *JAOCS.* 64 : 1657-1661.
- Yamane, T., Mohammad, M.H., Itoh, S. and Shimizu, S. 1986. Glycerolysis of fat by lipase. *Jpn. Oil Chem. Soc.* 8 : 625-631.

Yang, B., Harper, W.J. and Parkin, K.L. 1993. Control of lipase-mediated glycerolysis reaction with butter oil in dual liquid phase media devoid of organic solvent. *J. Agric. Food Chem.* 41 : 1905-1909.

Yang, B. and Parkin, K.L. 1994. Monoacylglycerol production from butter oil by glycerolysis with a gel-entrapped microbial lipase in microaqueous media. *J. Food.Sci.*59 :47-52

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

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

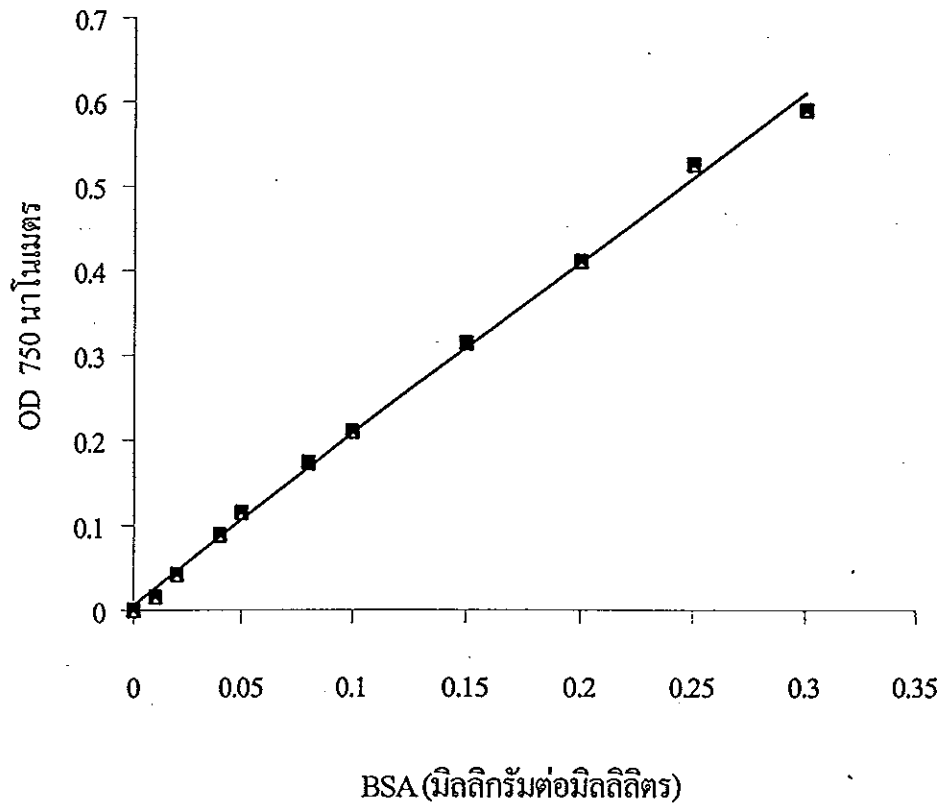
สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

1. สารละลาย A : 1% (W/V) คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
2. สารละลาย B : 2% (W/V) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
4. สารละลาย D : 4% (W/V) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
5. Folin-Ciocalteu reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตรกับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง
2. เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่าสารละลาย F
3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 1.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที
4. ใส่สารละลาย F 0.5 มิลลิลิตรลงไปในหลอดในข้อ 3
5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมตัวอย่าง เป็น blank โดยทำตามขั้นตอน 3-6

7. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0.01-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามขั้นตอน 3-6 โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์
8. นำข้อมูลมาเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่างการดูคลื่นแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในภาคผนวก ก 1



ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

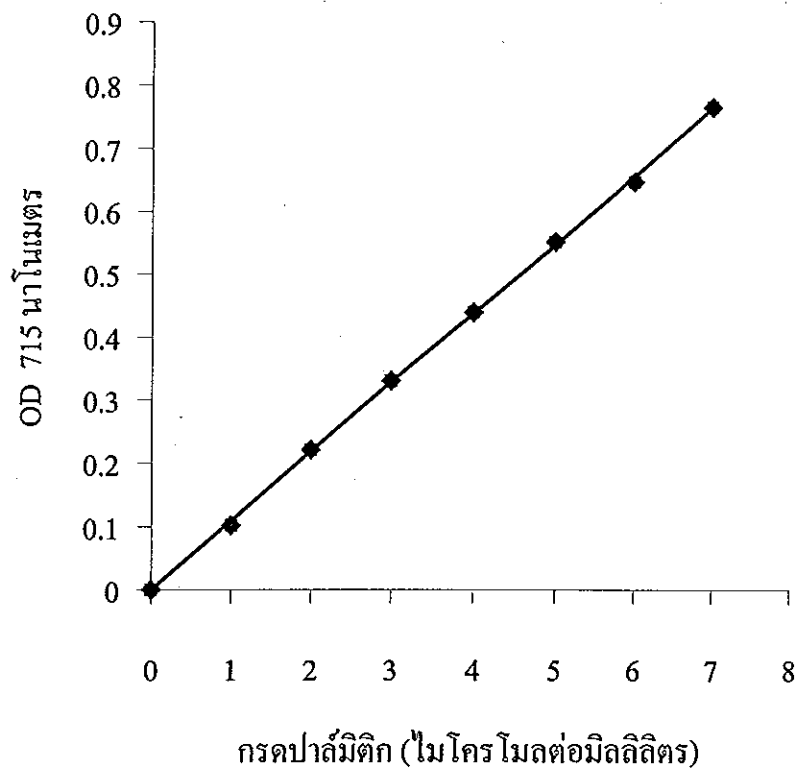
2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

สารละลาย cupric acetate-pyridine reagent เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($C_4H_6CuO_4 \cdot H_2O$) 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 โดยใช้ไพริดีน (pyridine) ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งปาล์มิติกที่มีความบริสุทธิ์สูง (extra pure) 0.2564 กรัม ละลายในไอโซออกเทน แชนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อช่วยในการละลาย เมื่อละลายหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร (จะได้กรดปาล์มิติกเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)
2. นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อที่ 1 ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้น
4. ดูดสารละลายชั้นบนวัดการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็น Blank
5. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มิติกดังแสดงในภาพผนวก ก 2



ภาพภาคผนวก ก3 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก

3. การวิเคราะห์ค่าสaponification value) ตามวิธีของ IUPAC (1979)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

1. สารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)
3. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักเท่ากับ 2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่แห้งและสะอาด
2. เติมสารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตและเติมลูกแก้ว
3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่น รีฟลักซ์สารละลาย (ให้เดือดเบาๆ) นาน 1 ชั่วโมง
4. นำขวดใส่สารละลายออกจากอุปกรณ์ควบแน่นของชุดกลั่น
5. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 5 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
6. เตรียมและไตเตรท blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าสaponification จากสูตร

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

โดย

B = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

A = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันปาล์ม

ค่าสaponification ของน้ำมันปาล์มเท่ากับ 200.18

ค่าสaponification คือ จำนวนมิลลิกรัมของ KOH ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดไขมันในน้ำมัน 1 กรัม

KOH มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 56.11

การคำนวณ

KOH	55.11	กรัม	เท่ากับ	1	โมล
KOH	200.17	มิลลิกรัม	เท่ากับ	$\frac{1 \times 200.17}{56.11 \times 1000} = 0.00357$	โมล
KOH	3.57	มิลลิโมล	ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดไขมัน	3.57	มิลลิโมล
กรดไขมัน	3	โมล	มาจากน้ำมันปาล์ม	1	โมล
กรดไขมัน	3.57	มิลลิโมล	มาจากน้ำมันปาล์ม	$\frac{1 \times 3.57}{3} = 1.19$	มิลลิโมล
น้ำมันปาล์ม	1.19	มิลลิโมล	เท่ากับ	1	กรัม
น้ำมันปาล์ม	1000	มิลลิโมล	เท่ากับ	$\frac{1 \times 1000}{1.19} = 840.33$	กรัม

ดังนั้นน้ำมันปาล์มมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 840.33 กรัม

4. การหาค่ามาตรฐานของสารประกอบกลีเซอไรด์

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

1. สารประกอบกลีเซอไรด์ (tripalmitin, triolein, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol, 1,3-dipalmitoyl-sn-glycerol, palmitic acid, oleic acid, 1-monopalmitoyl rac-glycerol, 1-monooleoly rac-glycerol) มาตรฐาน

2. 3 % กรดบอริก
3. คลอโรฟอร์ม
4. กรดอะซิติก
5. เบนซีน

วิธีการวิเคราะห์

1. ละลายสารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรด้วยคลอโรฟอร์ม และเจือจางเป็น 100 เท่า

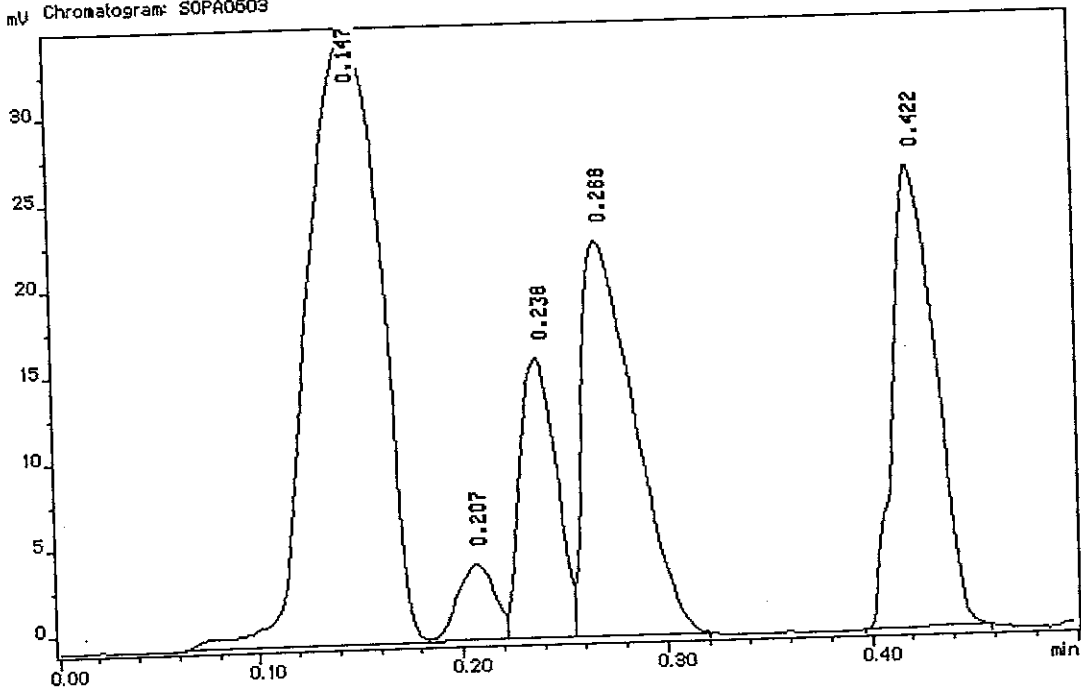
2. เตรียม quartz rod (Chromarod S-III) โดยแช่ใน 3% กรดบอริกเป็นเวลา 3 นาที อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที นำไปทำ blank scan ด้วย เครื่อง Iatroscan MK-5 ภายใต้สภาวะ 30 วินาทีต่อสแกน การไหลของอากาศเท่ากับ 2000 มิลลิลิตรต่อนาที การไหลของแก๊สไฮโดรเจนเท่ากับ 160 มิลลิลิตรต่อนาที

3. หยดสารละลายสารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน 1-3 ไมโครลิตรบน quartz rods นำไปแช่ในสารตัวทำละลายที่มีสารผสมระหว่าง เบนซีน : คลอโรฟอร์ม:กรดอะซิติก (70 : 30 : 2) จนกระทั่งความสูงของสารตัวทำละลายสูงประมาณ 10 เซนติเมตร

4. นำ quartz rod ไปอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที อีกครั้ง แล้วนำไปสแกนภายใต้สภาวะเดียวกับ blank scan

5. อ่านผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม ChromStar light ผลการทดลองจะแสดง ในรูปเปอร์เซ็นต์ peak ดังภาพ สนวนก ก3

mV Chromatogram: SOPA0603



TAG FFA 1,3-DAG 1,2-DAG MAG

Peak- No.	Ret.Time (min)	Pk.Start (min)	Pk.End (min)	Area	Height (mV)	Area%
1	0.147	0.063	0.183	45735	35.32	45.41
2	0.207	0.183	0.222	2965	4.43	2.94
3	0.238	0.222	0.255	10575	16.25	10.50
4	0.268	0.255	0.320	21131	23.06	20.98
5	0.422	0.397	0.458	20306	26.88	20.16
Totals:				100713	105.95	100.00

ภาพผนวก ก 3 ค่า Retention time ของสารประกอบกลีเซอไรด์มาตรฐาน

สารประกอบต่างๆ ในน้ำมันปาล์มโอเลอิน

สารประกอบ	ปริมาณ (%)
TAG	90.5
1,3-DAG	6.2
1,2-DAG	3.0
MAG	0
FFA	1.2
รวม	100

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

(Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.1 M citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$ 21.01 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)สารละลาย B : 0.1 M sodium citrate (trisodium citrate $2H_2O, Na_3C_3H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 29.41 กรัมในน้ำ 1 ลิตร) และไม่ควรรู้ใช้เกลือ 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 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

(Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมสารผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.1 M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.605
กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.1 M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.805
กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

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. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

วิธีเตรียม

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

วิธีการหาความเข้มข้นมาตรฐาน

ชั่งโซเดียมเตตราโบเรต (Borax : $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 2.0 กรัม ใส่ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร เติมเมทิลเรด 3 หยด (เป็นอินดิเคเตอร์) นำไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมไว้ ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู สามารถคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริกได้จากสูตร

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

4. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

วิธีเตรียม

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์น้ำหนัก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล เก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ในขวดพลาสติก

วิธีการหาความเข้มข้นมาตรฐาน

นำโพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acid phthalate : $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) ไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นโดยนำไปวางในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักให้ได้แน่นอน 0.4 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปลอดคาร์บอนไฮดรอกไซด์ ใช้สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์} = \frac{\text{น้ำหนักโพแทสเซียมอะซิเตต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรสารละลายที่ใช้ไตเตรท}}$$

5. การเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยเอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์) สารละลายที่ได้ควรจะมีสีเหลืองฟางหรือไม่ มีสี สารละลายที่เตรียมได้ทิ้งไว้ 5 วันก่อนนำไปใช้

6. การเตรียมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายในเอทานอล (95 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวโสภา พรหมดวง

วัน เดือน ปีเกิด 4 ธันวาคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุฬารัตนาวิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2538

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2539-2540 ผู้ช่วยวิจัยโครงการภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์