การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์
โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

Hydrolysis of Palm Olein in Organic Solvent by Immobilized Lipase

Order Key 21984
BIB Key ~~165590~~
161229/

เลขหมู่ QK898.E58
เลขทะเบียน ฉ 63 2542 ฉ. 2
11 ส.ค. 2542

ฉัตรชัย สังข์ผุด

Chatchai Sungpud

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป
ผู้เขียน	นายฉัตรชัย สังข์ผุด
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

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

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

คณะกรรมการสอบ

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

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

..................................กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

..................................กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

ผู้เขียน นายฉัตรชัย สังข์ผุด

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 5 ชนิดจาก *Candida rugosa* (ไลเปส OF), *Candida lipolytica* (ไลเปส L), *Pseudomonas* sp. (ไลเปส PS), *Pseudomonas fluorescens* (ไลเปส AK) และ *Rhizopus oryzae* (ไลเปส FAP-15) เพื่อย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ two-phase emulsion system พบว่า ไลเปส OF มีค่ากิจกรรมจำเพาะต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงสุด (209.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) โดยให้เปอร์เซนต์การย่อยสลายสูงกว่าร้อยละ 94 เมื่อตรึงไลเปส OF โดยใช้วิธีการยึดเกาะกับตัวพยุง 4 ชนิด คือ แอคคูเรล, Amberlite XAD-4, DEAE-Sephadex A50 และ polyvinylchloride (PVC) พบว่า การยึดเกาะแบบแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเอนไซม์กับ DEAE-Sephadex A50 เกิดการจับอย่างสมบูรณ์ โดยให้ค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะสูงสุดร้อยละ97 แม้ว่าการยึดเกาะแบบดูดซับทางกายภาพระหว่างเอนไซม์กับแอคคูเรลเกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ แต่มีกิจกรรมที่ยึดเกาะเพียงร้อยละ 20.5 สำหรับการยึดเกาะบน Amberlite XAD-4 และ PVC พบว่า เอนไซม์จับกับตัวพยุงมากกว่าร้อยละ 50 แต่มีกิจกรรมที่ยึดเกาะเพียงร้อยละ 0.63 และ 0.12 ตามลำดับ ระยะเวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการตรึงบนแอคคูเรล คือ 8 ชั่วโมง 25 องศาเซลเซียส และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงบน DEAE-Sephadex A50 คือ 24 ชั่วโมง 4 องศาเซลเซียส และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ไลเปส OF อิสระมีค่า K_m เท่ากับ 156 มิลลิโมลาร์ และอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) เป็น $3.3x10^4$ ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัม เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนแอคคูเรลทำให้ค่า K_m เพิ่มขึ้น 5 เท่า แต่ไม่มีผลต่อ V_{max} สำหรับการตรึงเอนไซม์บน DEAE-Sephadex A50 ทำให้ค่า K_m เพิ่มขึ้น 2 เท่า และค่า V_{ma}ลดลง 5 เท่า ไลเปส OF ตรึงรูปมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับไลเปสอิสระ (พีเอช 6.5-7.5 และ 35 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงที่กว้างและอุณหภูมิที่สูงกว่า

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป พบว่า ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมคือไอโซออกเทน ความเข้มข้นสูงสุดของน้ำมันปาล์มร้อยละ 60 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำกับสับสเตรทคือ 1:2 และความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่สูง (40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีผลให้เปอร์เซนต์การย่อยสลายลดลงเล็กน้อย

การผลิตกรดไขมันอย่างต่อเนื่องจากน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป ในถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์ (∅ 0.62x20 ซม.) โดยใช้เอนไซม์ประมาณ 1000 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า กรณีการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงกับแอคคูเรลขนาดเล็กกว่า 200 ไมโครเมตร คอลัมน์เกิดการอุดตัน เมื่อผสมเอนไซม์ตรึงรูปกับแอคคูเรลขนาดที่โตกว่า (1000-1500 ไมโครเมตร) ในอัตราส่วน 2:1 ก่อนบรรจุในคอลัมน์ แล้วป้อนสับสเตรท (น้ำมันปาล์มโอเลอีนร้อยละ 60 ในไอโซออกเทน) และบัฟเฟอร์ (100 มิลลิโมลาร์ tris/maleate buffer, พีเอช 7.0) อัตราส่วน 2:1 แยกผ่านปั๊ม 2 ตัว ด้วยอัตราการไหลรวม 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที โดยให้มีการไหลวนของบัฟเฟอร์ที่ใช้แล้วเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอล พบว่าคอลัมน์ที่บรรจุด้วยไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลมีอัตราการผลิตกรดไขมันมากกว่า 7,800 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่เวลา 300 ชั่วโมง และเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตในการทำงาน 1000 ชั่วโมง แต่การใช้ไลเปส OF ที่ตรึงกับ DEAE-Sephadex A50 เพื่อผลิตกรดไขมันภายใต้สภาวะเดียวกันเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่าอัตราการผลิตกรดไขมันลดลงจาก 8,000 ไมโครโมลต่อชั่วโมงเหลือ 3,500 ไมโครโมลต่อชั่วโมง และมีค่าครึ่งชีวิตในการทำงานเพียง 66 ชั่วโมง

Thesis Title Hydrolysis of Palm Olein in Organic Solvent by Immobilized Lipase

Author Mr. Chatchai Sungpud

Major Program Biotechnology

Academic Year 1998

Abstract

Five commercial lipases from *Candida rugosa* (lipase OF), *Candida lipolytica* (lipase L), *Pseudomonas* sp. (lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK) and *Rhizopus oryzae* (lipase FAP-15) were compared with respect to their ability to hydrolyze palm olein in organic solvent by two-phase emulsion system. Lipase OF showed the highest activity of palm olein hydrolysis with the specific activity of 209.1 U/mg protein and over 94 % degree of hydrolysis. Lipase OF was immobilized by adsorption on four supports including Accurel EP100, Amberlite XAD-4, DEAE-Sephadex A50 and polyvinylchloride (PVC). Adsorption on an anion-exchange resin DEAE-Sephadex A50 provided complete adsorption with the highest activity yield (97 %). While immobilized by physical adsorption on Accurel EP100 showed complete adsorption but the activity yield was retained 20.5 %. The adsorption on Amberlite XAD-4 and PVC provided over 50 % adsorption but the activity yields were 0.63 and 0.12 %, respectively. The optimal time, temperature and enzyme concentration for lipase OF adsorption on Accurel EP100 was 8 h, 25 $^{\circ}$C and 0.4 mg/ml, respectively. The optimal condition for adsorption on DEAE-Sephadex A50 was 24 h, 4°C and 0.4 mg/ml, respectively.

The native lipase OF had K_m 156 mM and maximum velocity (V_{max}) 3.3×10^4 μmol.min^{-1}. g^{-1}. The immobilized lipase on Accurel EP100 had 5 folds increased in

the K_m value but the V_{max} did not change. When immobilized lipase OF on DEAE-Sephadex A50 the K_m was increased 2 folds and V_{max} was decreased 5 folds. The native and the immobilized lipase OF on both supports showed optimal activities at the same pH and temperature (pH 6.5-7.5 and 35 ^{O}C). However, the immobilized lipase had the wider range of pH and temperature stability.

Studies on the optimization condition for hydrolysis of palm olein in two-phase emulsion system by immobilized lipase were examined. Results indicated that isooctane was the most suitable solvent. The maximum concentration of palm olein in isooctane was 60 % (w/v). The appropriate volume ratio of the aqueous phase (buffer) to solvent phase was 1:2. The high concentration of glycerol (40 mg/ml) had slightly effect on the degree of hydrolysis of palm olein.

The continuous production of fatty acid from palm olein was performed with the immobilized lipase OF (≈1000 U) in the packed bed column reactor (∅ 0.62x20 cm) at 35 °C. When performed with immobilized lipase on Accurel EP100 size < 200 μ the column was clogged. To solve the column clogging, the immobilized lipase on was mixed with the bigger size of Accurel EP100 (1000-1500 μ) in the ratio 2:1 before filling into the column. The substrate (60 % palm olein in isooctane) and the buffer (100 mM tris/maleate buffer, pH 7.0) were fed cocurrently with two pump in the ratio 2:1 at the overall flow rate of 0.06 ml/min. The buffer containing glycerol from the product mixture was recycled as loop to concentrate the glycerol. The column reactor containing lipase immobilized on Accurel EP100 had the production rate of fatty acids over 7,800 μmol/h at 300 h operation and it could be operated for the half life of 1000 h. On the otherhand, when lipase immobilized on DEAE-Sephadex A50 was used at the same condition for 100 h the production rate of fatty acids was decreased from 8,000 to 3,500 μmol/h and the half life of the enzyme was 66 h.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดการทำวิจัยการค้นคว้าและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการผู้แทนคณะ อุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัยเป็นเวลา 2 ปี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ที่ได้ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณเพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ตลอดจนทุกท่านที่มิได้กล่าวมา ณ. ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัย และให้คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ฉัตรชัย สังข์ผุด

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	38
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	39
วัสดุ	39
อุปกรณ์	40
วิธีการ	40
วิธีการวิเคราะห์	40
วิธีการทดลอง	42
3. ผลและวิจารณ์	55
4. สรุป	113
เอกสารอ้างอิง	115
ภาคผนวก	124
ภาคผนวก ก. วิธีการวิเคราะห์	124
ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมี	132
ประวัติผู้เขียน	138

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม	3
2.	การจำแนกชนิดการเรียงตัวของกรดไขมันในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอ-รอล ของน้ำมันปาล์มตามคุณสมบัติความอิ่มตัว	5
3.	ปริมาณและคุณสมบัติของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอีน	7
4.	ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า	12
5.	การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า	14
6.	ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในถังปฏิกรณ์แบบต่าง ๆ	30
7.	ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในระบบ two-phase emulsion system ของไลเปสแต่ละชนิด	56
8.	ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยไลเปส OF	64
9.	ผลความเข้มข้นของไลเปส OF ต่อการตรึงบนแอคคูเรลขนาด 200-400 ไมโครเมตร	70
10.	ผลความเข้มข้นของไลเปส OF ต่อการตรึงบนแอคคูเรลขนาดเล็กกว่า 200 ไมโครเมตร	71
11.	ผลความเข้มข้นของไลเปส OF ต่อการตรึงบน Amberlite XAD-4	73
12.	ผลความเข้มข้นของไลเปส OF ต่อการตรึงบน DEAE-Sephadex A50	74
13	ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบน PVC K66	75
14.	ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบน PVC K58	76
15.	ค่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนของไลเปส OF อิสระและตรึงรูป	84
16.	ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยไลเปส OF ตรึงรูป	93
17.	ผลของ AOT ต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออก-เทนของไลเปส OF ตรึงรูป	102

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	โครงสร้างของเอซิลกลีเซอรอล	4
2.	แนวทางการใช้ประโยชน์ของน้ำมันปาล์มและน้ำมันจากเมล็ดปาล์ม	9
3.	การเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเอนไซม์ไลเปส	16
4.	การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์	19
5.	ชุดถังปฏิกรณ์ชนิด Packed Bed Column Reactor และอุปกรณ์	53-54
6.	ความสามารถของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่า งๆ ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทน	57
7.	จลนพลศาสตร์ของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF	59
8.	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF	61
9.	ผลของพีเอชและชนิดของบัฟเฟอร์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF	63
10.	ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ	66
11.	ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ	68
12.	ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ตรึงต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม	78
13.	ผลของอุณหภูมิต่อการตรึงของเอนไซม์ไลเปส OF	79
14.	ผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF	81
15.	จลนพลศาสตร์ของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป	83
16.	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป	86
17.	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป	87
18.	ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป	89
19.	ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป	90
20.	การนำเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่	92
21.	ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ตรึงต่อระยะเวลาในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป	95

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22. ผลความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอเลอีนต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป	97
23. ผลของปริมาณน้ำต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป	99
24. ผลของกลีเซอรอลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป	100
25. การนำแอคคูเรลกลับมาใช้ใหม่	103
26. ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 20 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล	105
27. ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 40 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล	107
28. ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล (656 ยูนิต)	108
29. ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล (1007 ยูนิต)	109
30. ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 (1000 ยูนิต)	111
ภาพภาคผนวก ก1	126
ภาพภาคผนวก ก2	129
ภาพภาคผนวก ก3	131

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทยโดยได้รับการส่งเสริมให้ปลูกกันมากในพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศ การใช้ประโยชน์จากน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ใช้เพื่อการประกอบอาหารเพียงอย่างเดียว แต่น้ำมันปาล์มสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าเพิ่มโดยการใช้เทคโนโลยีทางด้านโอเลโอเคมี (oleochemistry) เช่น การผลิตกรดไขมัน เมธิลเอสเทอร์ แฟตตี้แอลกอฮอล์ แฟตตี้เอมีน และกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่จำเป็นต้องใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมยางรถยนต์ พลาสติก สิ่งทอ ยา เครื่องสำอางค์ ผงซักฟอก และกระดาษ ปัจจุบันอุตสาหกรรมเหล่านี้กำลังอยู่ในภาวะการขยายตัว ทำให้ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมดังกล่าวมีการนำเข้าเคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ เหล่านี้เป็นจำนวนมาก ทั้งๆ ที่ประเทศไทยมีศักยภาพที่จะผลิตได้ปีหนึ่งๆ ไม่ต่ำกว่า 100 ล้านบาท (เทิดชัย วิรุฬพานิช, 2533) ซึ่งนับว่าเป็นโอกาสหรือช่องทางใหม่ที่น่าสนใจในการผลิตสินค้าเพิ่มมูลค่าจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม อีกทั้งยังจะมีส่วนช่วยเกื้อหนุนให้อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีเสถียรภาพดียิ่งขึ้นด้วย

ปัจจุบันการใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอล ได้แก่ ไขมัน และน้ำมัน เพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอล ได้รับความสนใจศึกษากันอย่างกว้างขวางเพราะวิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่าการแยกสลายโดยวิธีทางเคมีกายภาพ คือ ปฏิกิริยามีความจำเพาะเจาะจงสูง เช่น จำเพาะต่อ ชนิดของสับสเตรท โครงสร้างเรจิโอไอโซเมอร์ และสเตอริโอไอโซเมอร์ ทำให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยและมีคุณภาพสูง รวมทั้งเกิดของเสียหรือวัสดุเหลือทิ้งน้อย ปฏิกิริยาไม่รุนแรง สามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ขนาดของถังปฏิกรณ์เล็กกว่าทำให้ประหยัดพลังงาน อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตทางการค้ายังมีน้อยทั้งนี้เนื่องจากข้อ

จำกัดในด้านราคาของเอนไซม์ที่สูง อัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาต่ำ และข้อจำกัดในด้านความหนืดและความสามารถในการละลายของน้ำมันในน้ำ ทำให้ควบคุมการผลิตได้ยาก ตลอดระยะเวลาช่วง 10 ปีที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงรูปเอนไซม์ได้รับการพัฒนาก้าวหน้าไปมาก ตลอดจนมีการนำตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้ในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดความหนืดและเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับน้ำมันทำให้การเร่งปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น การแยกผลิตภัณฑ์กระทำได้ง่ายกว่าและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถลดเวลาและขนาดถังปฏิกรณ์ให้เล็กลงได้ทำให้ประหยัดยิ่งขึ้น นอกจากนี้ผลการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มีส่วนช่วยในการป้องกันการปนเปื้อนเนื่องจากจุลินทรีย์ ป้องกันการยับยั้งปฏิกิริยาเนื่องจากความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ทำให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยสูง และเพิ่มขีดความสามารถในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นการเพิ่มแนวทางในการผลิตสินค้าเพิ่มมูลค่าจากน้ำมันปาล์มโดยวิธีการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งอย่างคุ้มค่า

ตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ปลูกกันมากทางภาคใต้ของไทยรองจากยางพารา นิยมปลูกกันมากในจังหวัดกระบี่ สุราษฎร์-ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ผลผลิตของปาล์มน้ำมันจะถูกนำไปแปรรูปเป็นน้ำมันปาล์มซึ่งมีแนวโน้มการผลิตสูงขึ้นทุกๆ ปี ประเทศที่มีการผลิตและส่งออกน้ำมันปาล์มเป็นอันดับหนึ่งของโลกคือมาเลเซีย รองลงมาคืออินโดนีเซียซึ่งประเทศเหล่านี้มีสภาพภูมิ-อากาศใกล้เคียงกับประเทศไทย

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมี 3 วิธี คือ กระบวนการผลิตแบบใช้ไอน้ำเป็นวิธีมาตรฐาน กระบวนการผลิตแบบย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม และกระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม ได้น้ำมันปาล์มแบ่ง 2 ชนิดใหญ่ๆ ถ้าได้จากเนื้อของผลปาล์ม (mesocarp) เรียกว่า น้ำมันปาล์ม (palm oil) ถ้าได้จากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (palm kernel) เรียกว่า น้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) เมื่อนำน้ำมันปาล์มไปแยก

ส่วนและทำให้บริสุทธิ์จะได้ส่วนที่เป็นของเหลวเรียกว่า น้ำมันปาล์มโอเลอีน (palm olein) ซึ่งเป็นน้ำมันปาล์มที่ใช้กันทั่วไป และส่วนที่เป็นไขเรียกว่า ปาล์มสเตียริน (palm stearin)

น้ำมันปาล์มมีส่วนประกอบของกรดไขมันและการจัดเรียงตัวของกรดไขมันในตำแหน่งที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน พื้นที่บริเวณเพาะปลูก และภูมิอากาศ ทั้งน้ำมันปาล์มและน้ำมันเมล็ดปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซนต์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 48.05 และ 51.95 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันจากเมล็ดปาล์มมีเปอร์เซนต์ของกรดไขมันอิ่มตัวสูงร้อยละ 78.82 (ตารางที่ 1) จึงส่งผลให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม

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

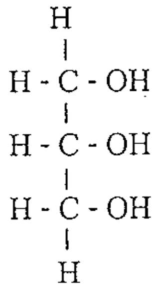
* : cell, $5^{1/4}$ in.

ที่มา : ดัดแปลงจาก ไพจิตร จันทรวงศ์ (2530)

2. เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) เป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อพบได้ทั่วไปในน้ำมันพืช

และ ไขมันสัตว์ เอซิลกลีเซอรอลแบ่งออกเป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และโมโนกลีเซอรอล (monoacylglycerol)



กลีเซอรอล

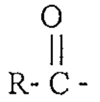
ตำแหน่งของคาร์บอนอะตอม

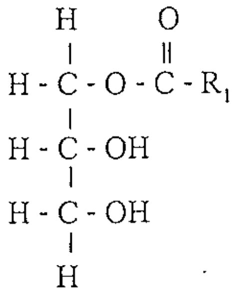
1 หรือ α

2 หรือ β

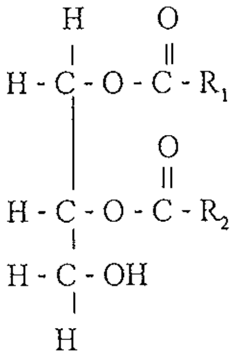
3 หรือ α'

หมู่เอซิล

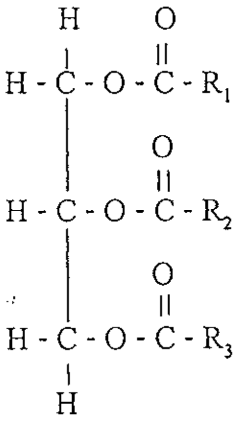




1-โมโนเอซิลกลีเซอรอล



1, 2-ไดเอซิลกลีเซอรอล



ไตรเอซิลกลีเซอรอล

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของเอซิลกลีเซอรอล

ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2537)

2.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอล หรือไตรกลีเซอไรด์

เป็นเอซิลกลีเซอรอลที่พบมากที่สุด ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอล ถ้าเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกันเรียกไตร-เอซิลกลีเซอรอลธรรมดา (simple triacylglycerol) เช่น ไตรปาลมิโตอิลกลีเซอรอล (tripalmitoyl glycerol) แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปเรียกว่า ไตรเอซิลกลีเซอรอลผสม (mixed triacylglycerol) เช่น 1-ปาลมิโตอิลไดสเตียโรอิล-กลีเซอรอล (1-palmitoyl distearoyl glycerol) ในน้ำมันปาล์มมีโมเลกุลของไตรเอซิลกลี-เซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 2 ตำแหน่งมากที่สุดร้อยละ 48 รองลงมา คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว 2 ตำแหน่งร้อยละ 34.6 ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลมีผลโดยตรงกับการตกผลึกของน้ำมัน

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดการเรียงตัวของกรดไขมันในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันปาล์มตามคุณสมบัติความอิ่มตัว

Triglyceride Types	Coposition (%)
Trisaturated (GS_3)	10.2
Disaturated (GS_2U)	48.0
Monosaturated (GSU_2)	34.6
Triunsaturated (GU_3)	6.8

ที่มา : Hui (1996)

2.2 โมโนกลีเซอรอล และไดเอซิลกลีเซอรอล

เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งหรือสองโมเลกุล ตามลำดับและมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ เอซิลกลีเซอรอลทั้งสองชนิดนี้ไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติ แต่จะพบในไขมันที่เกิดจากการไฮโดรไลสิสที่ไม่สมบูรณ์ โดยมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการสังเคราะห์หรือดัดแปลงโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

หรือนำโมโนกลีเซอรอลใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ (Bornscheuer and Yamane, 1994; Bornscheuer and Yamane, 1995; Kwon, *et al.*, 1995; Rosu, *et al.*, 1997)

3. กรดไขมัน (Fatty acids)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ที่ส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 4-24 อะตอม ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล ปลายอีกข้างมีลักษณะเป็นสายโซ่ยาวของนอนโพลาร์ไฮโดร-คาร์บอน ทำให้กรดไขมันมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ และเป็นสายโซ่ยาวที่อิ่มตัว (ไม่มีพันธะคู่) หรือไม่อิ่มตัวก็ได้ คือ มีพันธะคู่ 1 คู่หรือมากกว่า กรดไขมันแต่ละชนิดมี ความยาวของสายโซ่ ตำแหน่งและจำนวนของพันธะไม่อิ่มตัวแตกต่างกัน กรดไขมันที่พบในเซลล์พืชหรือสัตว์จะไม่พบในรูปกรดไขมันอิสระแต่จะอยู่รวมกับกลีเซอรอลด้วยพันธะโควาเลนต์เป็นเอซิลกลี-เซอรอล ซึ่งถูกย่อยสลายได้โดยการใช้เอนไซม์หรือวิธีการทางเคมี

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูงมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะ C_{16} และ C_{18} พบมากที่สุด และถ้าหากมีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ก็จะเป็นแบบนอนคอนจูเกต (nonconjugated double bond)(-CH=CH-CH_2-CH=CH-) โดยมีคอนฟิกุเรชันแบบซีส กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ (C_{16}- C_{18}) ไม่ละลายน้ำ แต่เกลือของมันสามารถสร้างไมเซลล์ (micelles)ในน้ำได้ และไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction)(อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

กรดไขมันชนิดอิ่มตัวที่มีปริมาณมากที่สุดในน้ำมันปาล์ม คือ กรดปาล์มิติกมีอยู่ร้อยละ 37.9 ถึง 47.7 และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่พบมากได้แก่ กรดโอเลอิก มีอยู่ร้อยละ 40.7 ถึง 43.9 สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก (polyunsaturated fatty acid) ซึ่งได้แก่ กรดไลโนลิอิก มีร้อยละ 10.4 ถึง 13.4 และกรดแอลฟาไลโนลินิก มีร้อยละ 0.1 ถึง 0.6 (ตารางที่ 3)

นอกจากส่วนที่เป็นกรดไขมันแล้ว น้ำมันปาล์มยังมีส่วนที่ไม่สามารถเกิดสบู่ได้ (unsaponifiable) ซึ่งได้แก่ คาโรทีนอยด์ (carotenoid) และโทโกเฟอรอล (tocopherol) สูง

ซึ่งเมื่อผ่านกรรมวิธีการทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณของคาโรทีนอยด์จะลดลง (Maclellan, 1983)

ตารางที่ 3 ปริมาณและคุณสมบัติของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอีน

กรดไขมัน	จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	ปริมาณ (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)
ลอริก (lauric)	44.2	0.1 - 1.1
ไมริสติก (myristic)	52	0.9 - 1.4
ปาลมิติก (palmitic)	63.1	37.9 - 47.7
สเตียริก (stearic)	69.6	4.0 - 4.8
โอลิอิก (oleic)	13.4	40.7 - 43.9
ไลโนลิอิก (linoleic)	-17	10.4 - 13.4
ไลโนเลนนิก (linolenic)	-17	0.1 - 0.6

ที่มา: Meclellan (1983)

4. โอเลโอเคมีจากน้ำมันปาล์ม

โอเลโอเคมี คือสารเคมีที่ได้จากไขมันและน้ำมันซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนที่สำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ซึ่งเดิมวัตถุดิบเหล่านี้ได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ขั้นตอนการย่อยสลาย (hydrolysis) หรือการทำปฏิกิริยากับหมู่แอลกอฮอล์ (alcoholysis) ของไขมันและน้ำมันเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญสำหรับอุตสากรรมโอเลโอเคมี ผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ กรดไขมัน หรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน ตามลำดับ ดังสมการ

$$\begin{array}{l} RCO\text{-}OCH_2 \\ \quad | \\ \quad CHO\text{-}OCR \\ \quad | \\ RCO\text{-}OCH_2 \end{array} \xrightarrow{R'OH} \begin{array}{ll} RCOOR' & CH_2\text{-}OH \\ RCOOR' & +\ CH_2\text{-}OH \\ RCOOR' & CH_2\text{-}OH \end{array}$$

Oils or fats — Fatty acids or esters — Glycerol

In hydrolysis, $R' = H$., In alcoholysis, R' = alkyl group.

กรดไขมัน หรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับการผลิตแฟตตี้แอลกอฮอล์ แฟตตี้เอสเทอร์ และสารประกอบแฟตตี้ไนโตรเจน ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบโดยตรงหรือนำไปดัดแปลงหมู่โครงสร้างเพื่อผลิตสารอนุพันธ์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย ตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 2 คาดว่าในปี คศ. 2000 ประเทศในกลุ่มอาเซียนสามารถผลิต basic oleochemical ได้ถึงร้อยละ 35 ของโลกโดยวัตถุดิบหลักจะผลิตจากน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว (Hui, 1996)

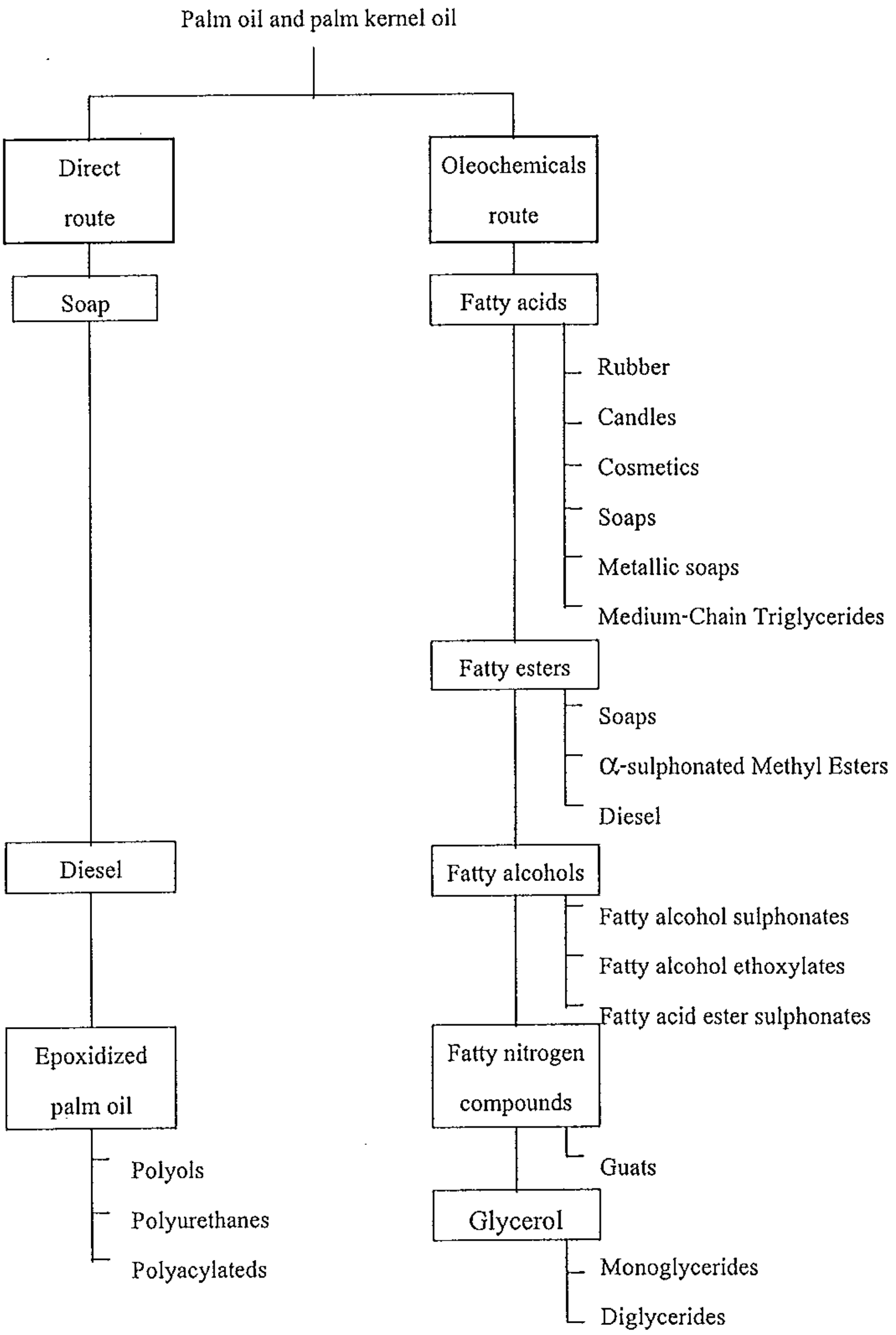
4.1 การใช้ประโยชน์จากกรดไขมัน

วิธีการที่ง่ายที่สุดในการผลิตกรดไขมันคือการใช้อุณหภูมิและความดันสูงในการแยกไขมันและน้ำมัน (fat splitting) สารผสมของกรดไขมันสามารถแยกให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น กรดไขมันที่แยกได้สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ยาง เทียนไข และเครื่องสำอางค์ได้โดยตรง

ในอุตสาหกรรมการผลิตยาง กรดไขมันจะถูกเติมลงไปในระหว่างขั้นตอนการผลิตเพื่อทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มความนุ่ม สารหล่อลื่น และทำหน้าที่ช่วยลดระยะเวลาในการให้ความร้อน โดยที่ความยาวของสายกรดไขมันไม่มีผลต่อการทำหน้าที่ดังกล่าว แต่กรดไขมันที่มีความอิ่มตัวสูงอาจมีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตได้ (Hui, 1996)

ในอุตสาหกรรมการผลิตเทียนไขได้มีการนำกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มมาใช้เพื่อเพิ่มคุณสมบัติในด้านความหดตัวทำให้ง่ายต่อการดึงออกจากเบ้า ซึ่งอัตราส่วนที่เหมาะสมของกรดไขมันที่ใช้คือ C_{16} ต่อ C_{18} ในอัตราส่วน 7:2 ดังนั้นจึงมีการนำน้ำมันปาล์มสเตียรีนมาใช้เนื่องจากมีปริมาณกรดปาล์มิติกสูง (Hui, 1996)

นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดไขมันในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์ ชนิดของกรดไขมันที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ กรดไมรีสติก กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก วัตถุประสงค์ของการนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มการเกิดฟอง เพิ่มความเป็นเงามัน และช่วยทำหน้าที่เป็นสารคอนดิชันเนอร์ (Hui, 1996)



ภาพที่ 2 แนวทางการใช้ประโยชน์ของน้ำมันปาล์มและน้ำมันจากเมล็ดปาล์ม

ที่มา : Hui (1996)

4.2 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล

กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมโอเลโอ-เคมี ถึงแม้ว่ากลีเซอรอลสามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมี แต่กลีเซอรอลที่แยกได้จากธรรมชาติปัจจุบันได้รับความสนใจจากผู้บริโภคมากกว่า

ในระหว่างกระบวนการผลิตกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกรดไขมันโดยวิธีการแยกไขมันหรือการทำปฏิกิริยากับหมู่แอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า sweet waters ประกอบด้วยน้ำและกลีเซอรอลประมาณร้อยละ 10 ถึง 30 ซึ่งต้องผ่านขั้นตอนการกลั่นหรือกรองผ่านตัวแลกเปลี่ยนประจุเพื่อทำให้บริสุทธิ์ สำหรับกลีเซอรอลที่ใช้ในทางด้านเภสัชกรรมต้องกำจัดสีออกโดยกรองผ่านถ่านกัมมันต์

กลีเซอรอลเป็นแอลกอฮอล์เชิงซ้อนมีการนำใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น เป็นตัวทำละลายตัวยาที่ใช้ในด้านเภสัชกรรม ใช้เติมเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำ (humectant) ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์ ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตวัตถุระเบิด ใช้ผลิตสารป้องกันการแข็งตัว (antifreeze) หรือใช้เป็นสารป้องกันการสูญเสียความร้อน (heat transfer agent) และใช้ในการผลิตโมโนกลีเซอรอล (Hui, 1996)

5. เอนไซม์ไลเปส (Lipases)

เอนไซม์ไลเปส (E.C.3.1.1.3) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์-ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolases) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโมเลกุลของเอซิลกลีเซอไรด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไข-มัน และกลีเซอรอล (Macrae, 1983) ปฏิกิริยาสามารถเกิดแบบย้อนกลับได้ขึ้นอยู่กับการควบคุมสภาวะแวดล้อมของสารต่างๆ ในปฏิกิริยา

Shahani (1975) กล่าวว่าไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งในเอสเทอเรส เนื่องจากนิยามของเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ แต่ไลเปสเท่านั้นที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอไรด์ได้ดี (Kazlauskas and Bornscheuer, 1997) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบประเภทอื่นๆ ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิกเอสเทอร์ ซึ่งไม่ใช่เอซิลกลีเซอไรด์ทั้งที่มีในธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์โดยที่ปฏิกิริยาจะมีความ

จำเพาะเจาะจงกับโครงสร้างไอโซเมอร์ของสับสเตรทสูง (Malcata, *et al.*, 1992) จุดเด่นของไลเปสคือ มีสับสเตรทหลายชนิดและมีความจำเพาะเจาะจงสูง ในปัจจุบันนี้เอนไซม์ไลเปสจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ต่างๆ ทดแทนการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อผลิตสารที่สำคัญได้แก่ การสังเคราะห์ตัวยาที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม การสังเคราะห์สารตัวกลางและการปรับปรุงโครงสร้างของไขมันจากธรรมชาติ ดังนั้นปัจจุบันไลเปสจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรม อาหารและยา ผงซักฟอก เครื่องสำอางค์ เครื่องหนัง รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียจากชุมชน และจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (Godtfredsen, 1993; Bosley, 1996)

5.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงทางพันธุกรรมซึ่งอาจจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Balcao, *et al.*, 1996) ไลเปสจากพืชได้แก่ ไลเปสจากเมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เลย์ ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม สำหรับไลเปสจากตับอ่อนนิยมนำมาใช้มากเนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถแยกสกัดออกมาได้ง่าย (Schwimmer, 1981) ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Malcata, *et al.*, 1992) สามารถผลิตได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยโดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 4 จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* (Vecraragavan and Gibbs, 1989) สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และแบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus* (Kazlauskas and Bormscheuer, 1997)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า

ชนิด	แหล่งที่มา	แหล่ง และชื่ออื่น ๆ
PPL	Porcine pancreas	
CE (BSSL)	Pancreatic cholesterol esterase	
CRL	*Candida rugosa*	*Candida cylindracea*
CAL-A	*Candida antarctica A*	
CAL-B	*Candida antarctica B*	
CLL	*Candida lipolytica*	
GCL	*Geotrichum candidum*	
HLL	*Humicola lanuginosa*	*Thermomyces l.*
PcamL	*Penicillium camembertii*	*Penicillium cyclopium*
RJL	*Rhizomucor javanicus*	*Mucor javanicus*
RML	*Rhizomucor miehei*	*Mucor miehei*
ROL	*Rhizopus oryzae*	*R. javanicus, R. delemar,* *R. niveus*
ANL	*Aspergillus niger*	
ProqL	*Penicillium roqueforti*	
PCL	*Pseudomonas cepacia*	*Burkholderia cepacia*
PCL-AH	*Pseudomonas cepacia*	
PFL	*Pseudomonas flourescens*	
PfragiL	*Pseudomonas fragi*	
CVL	*Chromobacterium viscosum* *Pseudomonas sp.*	*Pseudomonas glumae*
BTL2	*Bacillus thermocatenulatus* *Alcaligenes species*	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

5.2 การแบ่งกลุ่มไลเปสทางการค้า

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้าตามแหล่งของจุลินทรีย์บางครั้งพบว่าไลเปสบางชนิดมีโครงสร้างที่เหมือนกัน ดังนั้น Kazlauskas และ Bornscheuer (1997) เสนอว่าวิธีการที่ง่ายที่สุดในการแบ่งกลุ่มคือการแบ่งตามการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างโปรตีนของไลเปสซึ่งมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังตารางที่ 5 คือ ไลเปสจากสัตว์ ไลเปสจากยีสต์และรา และไลเปสจากแบคทีเรีย สำหรับไลเปสจากยีสต์และราแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม *Candida rugosa* และกลุ่ม *Rhizomucor* ส่วนไลเปสจากแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มของ *Pseudomonas* และกลุ่ม *Staphylococcus* ไลเปสในกลุ่ม *Candida rugosa* ได้แก่ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* (CRL), *Geotrichum candidum* (GCL) และ pancreatic cholesterol esterase (CE) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลใหญ่ (60-65 kD) ซึ่ง *Candida* lipase B ไม่ได้จัดไว้ในกลุ่มนี้แม้ว่าจะเป็นไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Candida* ก็ตาม

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

ไลเปสในกลุ่ม *Rhizomucor* เป็นไลเปสที่ได้จากราหลายชนิดได้แก่ *Rhizopus, Rhizomucor, Penicillium camembertti* (PcamL), *Humicola lanuginosa* (HLL) และ *Candida antarctica* B (CAL-B) เป็นไลเปสที่มีขนาดเล็ก (30-35 kD) สำหรับในกลุ่ม *Pseudomonas* เป็นไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* ทุกตัวรวมทั้งไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum* (CVL)

ตารางที่ 5 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

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

ที่มา : Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

5.3 คุณสมบัติด้านเคมีฟิสิกส์ของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon, *et al.,* 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท ปริมาณเกลือ และชนิดของสารอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ ซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Malcata, *et al.,* 1992) ส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกรดพบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6 ถึง 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง

100 องศาเซลเซียส (Gilbert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสับสเตรท เป็นไปได้ว่าสับสเตรททำหน้าที่เป็นตัวช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติ ซึ่งมีส่วนช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata, *et al.*, 1992)

5.4 การทำงานของไลเปส

Gandhi (1997) แบ่งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสไว้ 2 กลุ่มหลักคือ การย่อยสลายเอสเทอร์ (hydrolysis) และการสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis) ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชนิด คือ อะซิโดไลซิส (acidolysis) เอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) อินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น (interesterification) และแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) สำหรับสามปฏิกิริยาหลังนักวิจัยหลายท่านจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน โดยใช้ชื่อว่าทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) ได้จัดปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis) อยู่ในกลุ่มเดียวกับทรานเอสเทอริฟิเคชั่นด้วยดังแสดงในภาพที่ 3

เอนไซม์ไลเปสละลายในน้ำแต่สับสเตรทส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ การเร่งปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับสับสเตรท (oil-water interface) (Shahani, 1975) เมื่อมีการค้นพบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถคงตัวและทำงานได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Laane, 1987; Laane, *et al.,* 1987; Kang and Rhee, 1989a; Yang and Rhee, 1991; Fitzpatrick and Klibanov, 1991; Bornscheuer, *et al.,* 1993) จึงได้มีการนำเอาตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้ในการแก้ปัญหาเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวการสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมันทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น

1. Hydrolysis of ester

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

2. Synthesis of ester

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

3. Transesterification

3.1 Acidolysis

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

3.2 Alcoholysis

$$R\text{-}COO\text{-}R_1' + HO\text{-}R_2' \longleftrightarrow R\text{-}COO\text{-}R_2' + HO\text{-}R_1'$$

3.3 Ester Exchange (Interesterification)

$$R_1\text{-}COO\text{-}R_1' + R_2\text{-}COO\text{-}R_2' \longleftrightarrow R_1\text{-}COO\text{-}R_2' + R_2\text{-}COO\text{-}R_1'$$

3.4 Aminolysis

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

ภาพที่ 3 การเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Yamane (1987)

5.5 ความจำเพาะของไลเปส

Malcata และคณะ (1992) แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้หลักในการพิจารณา 5 แบบ คือ

1) ความจำเพาะต่อกลุ่มของลิพิด

2) ความจำเพาะต่อตำแหน่งของเอซิลกลีเซอรอล

3) ความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน

4) ความจำเพาะต่อโครงสร้างสเตอริโอไอโซเมอร์ของสับสเตรท

5) หลายๆ อย่างรวมกัน

เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มของลิพิด ตัวอย่างเห็นได้ชัดในพลาสมาของสัตว์ ซึ่งประกอบด้วยไลเปสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเฉพาะ ไตรกลีเซอ-ไรด์ ไดกลีเซอไรด์ หรือโมโนกลีเซอไรด์ ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* มีกิจกรรมต่อโมโนกลีเซอไรด์สูง แต่มีกิจกรรมต่อไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์ต่ำมาก (Okumura, *et al.*, 1980 อ้างโดย Malcata, *et al.*, 1992)

การแบ่งความจำเพาะต่อตำแหน่งของเอซิลกลีเซอรอลแบ่งได้ 3 แบบคือไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (nonspecific) ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่ง 1 และ 3 บนโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (sn-1,3 specific) และไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่งที่ 2 บนโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (sn-2 specific) ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์จะสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้สมบูรณ์ การเร่งปฏิกิริยาจะไม่มีการผันกลับ (nonreverse) ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอไรด์เป็นผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับที่สูง แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นอินเตอร์มีเดียทในปฏิกิริยาได้ (Okumura, *et al.*, 1981) ได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum, Pseudomonas fluorescens, Candida cylindracea, Geotrichum candidum, Candida rugosa* และ *Penicillium cylindracea* สำหรับเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันส่วนใหญ่แล้ว จะเป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่ง 1 และ 3 ซึ่งจะตัดไขมันตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ได้ดีกว่าตำแหน่งที่ 2 ทำให้ได้ 2-โมโนกลีเซอ-

ไรด์ ซึ่งปัจจุบันนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่การผลิต Eicosapentaenoic acid (EPA) และ Docosahexaenoic acid (DHA) จากน้ำมันปลา (Zuyi and Ward, 1993) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ไลเปสจากต้นอ่อน และจากจุลินทรีย์พวก *Rhizopus arrhizus, Aspergillus niger, Rhizopus delemar* และ *Mucor miehei*

ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันสูงพบในธรรมชาติน้อยมาก แต่พบว่าความจำเพาะยังขึ้นอยู่กับการควบคุมสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา ไลเปสโดยทั่วไปจะมีความจำเพาะการเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันสายสั้นที่ไม่อิ่มตัวได้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันสายยาวที่อิ่มตัว อย่างไรก็ตาม Malcata และคณะ (1992) รายงานว่าไลเปสบางชนิด เช่น ไลเปสจาก *Mucor miehei* มีความสามารถในการย่อยสลายกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน C_4 และ C_6 ได้สูงที่พีเอช 5.3 ซึ่งมีประโยชน์ในการผลิตสารให้กลิ่นรสในเนยแข็ง และไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน C_8 ถึง C_{10} ได้ดีกว่ากรดไขมันตัวอื่น

สำหรับไลเปสที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างสเตอริโอไอโซเมอร์ของสับสเตรทมีประโยชน์อย่างมากในการผลิตตัวยาและสารอินทรีย์ที่ต้องการความบริสุทธิ์สูงซึ่งปัจจุบันการผลิตสารต่างๆ เหล่านี้โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (biotransformation) โดยใช้ไลเปสกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง

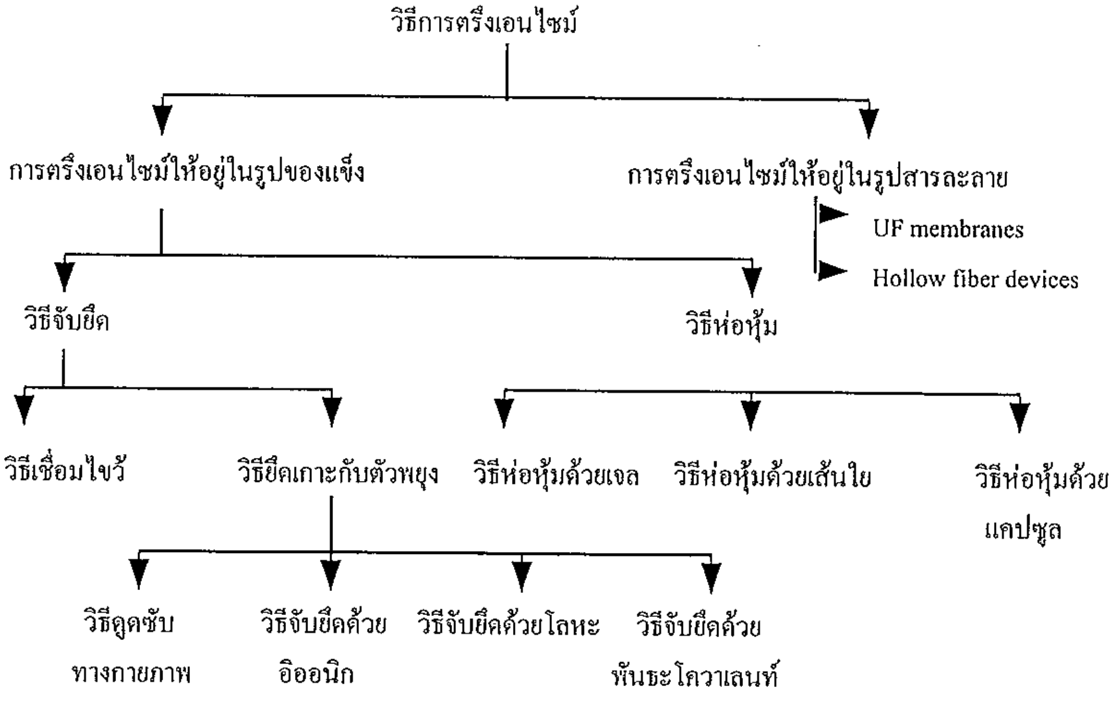
6. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสละลายน้ำได้ดี แต่สับสเตรทโดยทั่วไป เช่นไขมัน และน้ำมันไม่ละลายน้ำ ถึงแม้จะมีการนำตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารอิมัลซิฟายเออร์มาช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทก็ตาม แต่อิมัลชันที่เกิดขึ้นก็ยังมีความคงตัวต่ำ การใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ซึ่งเกิดปัญหาเกี่ยวกับการแยกเอนไซม์ที่เหลือออกจากผลิตภัณฑ์เพราะกระทำได้ยาก ส่งผลกระทบต่อคุณภาพ และมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ และปัญหาเกี่ยวกับต้นทุนการผลิตเพราะมีการใช้เอนไซม์เพียงครั้งเดียว ดังนั้นการตรึงเอนไซม์จะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ และยังสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่อง (Balcao, *et al.,* 1996) อย่างไรก็ตามผลกระทบของการตรึงรูปเอนไซม์ก็อาจมีได้

เช่น กิจกรรมอาจจะลดลงเนื่องจากโครงสร้างสามมิติเปลี่ยนแปลงไป ปัญหาเรื่องการถ่ายโอนมวลสาร ปัญหาการปนเปื้อนจากตัวพยุง หรือตัวพยุงทำปฏิกิริยากับผลผลิต (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

6.1 กรรมวิธีการตรึงไลเปส

เอนไซม์ที่ถูกตรึง หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัด อาจเชื่อมกับวัสดุหรือสารที่ใช้ยึดเกาะโดยที่เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมอยู่ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง และสะดวกต่อการใช้ในระบบต่อเนื่อง Kennedy และ Cabral (1987) ได้จัดแบ่งกรรมวิธีการตรึงเอนไซม์ได้ดังภาพที่ 4 ซึ่งแบ่งได้ 2 กลุ่มหลัก คือ การตรึงให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย กับการตรึงในรูปที่เป็นสารละลาย การตรึงให้อยู่ในรูปที่ไม่ละลายแบ่งออกเป็น การตรึงแบบจับยึด กับการตรึงวิธีห่อหุ้ม



ภาพที่ 4 การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์
ที่มา : Kennedy และ Cabral (1987)

Central Library
Prince of Songkhla University

การตรึงแบบจับยึด โดยเฉพาะวิธียึดเกาะกับตัวพยุงเป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส เป็นการตรึงโดยการเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ สามารถแบ่งออกเป็น 4 แบบ คือ

ก) วิธีดูดซับทางกายภาพ (physical-adsorption method)เป็นการจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน แรงวานเดอร์วาลล์ (vanderWaals force) และแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพยุงที่เป็นของแข็ง

ข) วิธีจับยึดด้วยพันธะอิออนิก (ionic-binding method) เป็นการตรึงเอนไซม์ด้วยแรงดึงดูดประจุ เป็นวิธีที่ง่ายและมีใช้กันมานาน วิธีนี้อาศัยหลักการดึงดูดประจุของเอนไซม์กับตัวพยุงที่มีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนอิออนได้ นอกจากนี้ยังมีแรงวานเดอร์วาลล์และพันธะอิออนิก

ค) วิธีจับยึดด้วยโลหะ (metal-binding method) เป็นการตรึงโดยอาศัยโลหะทรานสิชัน ส่วนมากจะเป็นเกลือของไททาเนียม และเซอโคเนียม เนื่องจากออกไซด์ของโลหะเหล่านี้ไม่มีพิษ หลักการตรึงมี 2 ขั้นตอนคือ การกระตุ้นให้เกิดการจับกันระหว่างโลหะทรานสิชันกับตัวพยุง และการนำตัวพยุงที่มีลิแกนด์ของโลหะทรานสิชันจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ (Kierstan and Coughlan, 1991)

ง) วิธีจับยึดด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent-binding method) เป็นการตรึงเอนไซม์โดยอาศัยการเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้กระทำได้ยาก เนื่องจากปฏิกิริยาซับซ้อนและรุนแรง แต่การเชื่อมพันธะมีความแข็งแรงสูง

การตรึงแบบห่อหุ้ม (entrapment method) เป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ภายในช่องว่างของตาข่าย หรือห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเยื่อบางๆ ที่ยอมให้สารบางตัวผ่านเข้าออกได้ โดยจะยอมให้มีการแพร่เข้าออกโมเลกุลของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ วิธีการห่อหุ้มด้วยเจล วิธีการห่อหุ้มด้วยเส้นใย และวิธีการห่อหุ้มด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (Kennedy and Cabral, 1987)

6.2 ตัวพยุงสำหรับการตรึงเอนไซม์

องค์ประกอบในการตรึงเอนไซม์คือ เอนไซม์ที่ใช้ ชนิดของตัวพยุงและกรรมวิธีที่ใช้ในการตรึง สำหรับปัจจัยหลักในการตรึงเอนไซม์ คือ การคัดเลือกตัวพยุงที่ใช้ในการตรึง อย่างไรก็ตามตัวพยุงแต่ละชนิดมีวิธีการตรึงที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป คุณสมบัติของตัวพยุงที่ดีคือมีพื้นที่ผิวสำหรับการยึดเกาะมาก มีคุณสมบัติในการคัดเลือกการซึมผ่านของสาร (permeability) มีลักษณะชอบน้ำ (hydrophilicity) แต่ไม่ละลายในน้ำ มีความคงตัวต่อสารเคมี แรงกล และความร้อน มีความแข็งแรง มีขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม สามารถปกป้องการทำลายจากจุลินทรีย์ได้ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Kennedy and Cabral, 1987)

เมื่อแบ่งชนิดของตังพยุงตามลักษณะรูปร่างสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) และกลุ่มที่ไม่มีรูพรุน (non-porous) แต่เมื่อแบ่งตามลักษณะทางเคมีสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

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

ข) ตัวพยุงที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic carriers) ที่นิยมใช้ได้แก่ attapulgite clays, bentonite, kieselgur, pumic stone, non-porous glass, controlled pore glass, carbon(charcoal), nikel oxide, colloidal silica, alumina, controlled pore alumina, และ controlled pore titania (Kennedy and cabral, 1987)

หมู่ต่างๆ บนตัวพยุงมีผลต่อกิจกรรมการยึดเกาะ และกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ตัวพยุงบางชนิดมีหมู่ต่างๆ ที่มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับบริเวณเร่งของเอนไซม์มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ตัวอย่างหมู่ต่างๆ บนตัวพยุงได้แก่

หมู่ไดอะโซเนียม (diazonium group)	$-N^{+}=N$
หมู่ไอโซไซยาเนท (isocyanate group)	-N-CO
หมู่ไอโซไทโอไซยาเนท (isothiocyanate group)	-N-CS

หมู่แอคทีพเฮไลด์ (active halide group)	-Br, -I, -F, -Cl
หมู่แอคทีพไซยาโน (active cyano group)	-C=N
หมู่แอคทีพอะมิโน (active amino group)	$-NH_2$
หมู่แอคทีคาร์บอกซิล (active carboxyl group)	-COOH
หมู่แอคทีพไดซัลไฟด์ (active disulfide group)	-S-S-
หมู่แอคทีพอัลดีไฮด์ (active aldehyde group)	-CHO

กรรมวิธีที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ภายหลังจากการคัดเลือกชนิดของตัวพยุงที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสของนักวิจัยหลายๆ ท่าน พอที่จะสรุปได้ว่า ตัวพยุงที่มีลักษณะไม่ชอบน้ำเป็นตัวพยุงที่เหมาะสมที่สุดในการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน (Brady, *et al.*, 1988; Wang and Ruckenstein, 1993; Kimura, *et al.*, 1993; Virto, *et al.*, 1994; Al-Duri, *et al.*, 1995) ในการคัดเลือกตัวพยุงนอกจากพิจารณาที่กิจกรรมของเอนไซม์แล้ว ยังต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำไปใช้คือ ความเหมาะสมในด้านราคา ความเสถียรต่อสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา เช่น อุณหภูมิ พีเอช และสารตัวกลางต่างๆ ในปฏิกิริยา นอกจากนั้นในการใช้งานแบบต่อเนื่องชนิดของตัวพยุงที่ใช้ต้องเหมาะสมกับถังปฏิกรณ์ที่ใช้เช่น ระบบถังกวน ระบบฟลูอิไดซ์เบด และระบบแพคเบด ซึ่งตัวพยุงที่ใช้จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

Kimura และคณะ (1983 อ้างโดย Wang and Ruckenatein, 1993) ตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพยุงหลายชนิดทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พบว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนตัวพยุงที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ให้กิจกรรมในการย่อยสลายน้ำมันมะกอกมากที่สุด

Brady และคณะ (1988) คัดเลือกตัวพยุงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสซึ่งได้แก่ Celite, Cellulose, Ethyl cellulose, Silica gel, Kieselguhr clay, Alumina, CPG-100, Carbon, Accurel, Celgard 2500, Profax PP, Microthene HDPE และอื่นๆ พบว่าผลการใช้ตัวพยุงทุกชนิดในการตรึงให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง แต่ตัวพยุงที่ให้กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์สูงสุดคือ Accurel และ Celgard 2500

Otero และคณะ (1990) แสดงให้เห็นว่าในการย่อยสลาย tributyrin โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงชนิดต่างๆ พบว่าระยะเวลาและเปอร์เซนต์ในการย่อยสลายจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในด้านความชอบน้ำของตัวพยุงที่ใช้

Lie และ Molin (1991 อ้างโดย Wang and Ruckenatein, 1993) ศึกษากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบน hydrophobic และ hydrophilic zeolite พบว่า การใช้ hydrophilic zeolite ในการตรึงเอนไซม์มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

Suree และ Pawinee (1992) ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก*Candida cylindracea* บนตัวพยุง 5 ชนิด คือ Celite 545, Dowex 50, Silica gel, Sephadex LH-20 และ Sephadex LH-60 เพื่อย่อยสลายน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์มในเฮกเซนพบว่าตัวพยุงที่เหมาะสมที่สุด คือ Celite 545 และ Sephadex LH-60 สำหรับ Dowex 50 ให้กิจกรรมการย่อยสลายต่ำเนื่องจากมีคุณสมบัติในการชอบน้ำมากที่สุด

6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจะแตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวพยุง กรรมวิธีในการตรึงบางครั้งมีการเติมสารเชื่อมพันธะเพื่อเพิ่มความแข็งแรงในการยึดเกาะซึ่งได้แก่กลูตาราลดีไฮด์ อย่างไรก็ตามปัจจัยหลักที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์บนตัวพยุงประกอบด้วย

6.3.1 การเตรียมตัวพยุง ตัวพยุงบางชนิด โดยธรรมชาติแล้วอาจจะไม่มีหมู่ที่สามารถยึดเกาะกับหมู่ต่างๆ บนโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ได้ทำให้กิจกรรม การยึดเกาะต่ำ ดังนั้นในขั้นตอนการ pretreatment เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากในการนำตัวพยุงมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การใช้ polyvinylchloride (PVC) ที่ pretreatment กับ alkyldiamine เพื่อให้เกิดหมู่อะมิโน จากนั้นเติมกลูตาราลดีไฮด์เพื่อช่วยเพิ่มกิจกรรมการยึดเกาะก่อนที่จะนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส (Shaw, *et al.,* 1989) หรือการ pretreatment แอคคูเรลด้วยเอทธานอล จะช่วยเพิ่มค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงโดยการ pretreatment มีส่วนช่วยในการเพิ่มสภาพความเป็นขั้วของแอค-

คูเรลทำให้กิจกรรมการยึดเกาะเพิ่มสูงขึ้น (Brady, *et al.*,1988; Montero, *et al.*,1993) Kosugi และคณะ (1995) ตรึงไลเปสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* Biotype I บนโพลีสไตรีนพบว่า ผลการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วคือเอทธานอล หรือไอโซโปรพิวแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนเข้มข้นร้อยละ 50 ช่วยเพิ่มกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ถูกตรึง และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะ โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วจะช่วยในการตกตะกอนของโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ และนอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มคุณสมบัติความชอบน้ำของตัวพยุงที่ใช้ ทำให้กิจกรรมการยึดเกาะเพิ่มขึ้น

6.3.2 ระยะเวลาในการตรึง เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์จะมีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมการยึดเกาะ และกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ แต่เมื่อถึงจุดอิ่มตัวแม้จะเพิ่มระยะเวลาในการตรึงก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมการยึดเกาะ ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายอย่าง เช่น ชนิดของตัวพยุง วิธีการตรึง สารเชื่อม และความเข้มข้นของเอนไซม์ (Montero, *et al.*, 1993; Bosley and Peilow, 1997)

6.3.3 ความเข้มข้นของเอนไซม์ เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนหนึ่งหน่วยพื้นที่ของตัวพยุง โดยกิจกรรมการยึดเกาะและกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์บนตัวพยุงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์จนถึงระดับอิ่มตัว หากเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อไปก็จะไม่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปส (Kang and Rhee, 1989a; Kosugi, *et al.*, 1995)

6.3.4 พีเอชและค่า ionic strength ค่าพีเอชของสภาวะแวดล้อมในการตรึงเอนไซม์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เพราะเอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช Suree และ Pawinee (1992) รายงานว่าระดับค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสคือช่วงพีเอชเดียวกับระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละแหล่ง เช่น ไลเปสจาก

ตับอ่อน *Candida rugosa, Rhizopus arrhizus* มีระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 8.5, 7.5 และ 5.5 ตามลำดับ แต่หลังจากตรึงรูปบนตัวพยุงแล้วระดับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรืออาจไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Malcata, *et al.*, 1992) สำหรับผลของค่า ionic strength ของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง ซึ่งถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ ionic strength สูงกิจกรรมการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงจะต่ำ (Patel, *et al.*, 1995)

6.3.5 ผลของอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส โดยจะถูกยับยั้งกิจกรรมเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เนื่องจากเอนไซม์สูญเสียสภาพ ยกเว้นไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้แก่เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* สามารถทนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (Malcata, *et al.*, 1992) โดยการเสียสภาพของเอนไซม์จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจึงมักนิยมกระทำในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ เพราะที่ระดับอุณหภูมิต่ำเอนไซม์มีความคงตัวสูง ระดับอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสประมาณ 4-10 องศาเซลเซียส

7. การผลิตกรดไขมันและกลีเซอไรด์โดยใช้เอนไซม์

ในกระบวนการผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้ระบบการแยกไขมัน (fat splitting) ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (250 ^{0}C, 60 bar) มีผลทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวถูกทำลาย กลายเป็นของเสียที่เป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เกิดสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ ซึ่งต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ในตอนหลังอีกครั้งหนึ่ง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน และปฏิกิริยาก็ไม่มีความจำเพาะเจาะจง มีผลทำให้ได้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่ำ (Kosugi and Tomizuka, 1995) นอกจากนี้ยังได้สารประกอบอื่นๆ เช่น คีโตนและไฮโดรคาร์บอน

การย่อยสลายไขมันโดยการใช้เอนไซม์ มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตกรดไขมัน และกลีเซอรอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่ สารทำความสะอาด ส่วนผสมเครื่อง

สำอางค์ ส่วนประกอบอาหาร สี และวัตถุระเบิด (Kosugi and Tomizuka, 1995) ปัจจุบันวิธีนี้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากปฏิกิริยาไม่รุนแรงใช้อุณหภูมิต่ำ ไม่ทำลายสารในปฏิกิริยา มีความจำเพาะเจาะจง ให้ผลิตภัณฑ์ที่คุณภาพสูง ใช้ถังปฏิกรณ์ขนาดเล็กกว่าและเกิดปัญหาการกัดกร่อนน้อย เอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะ (non-specific lipase)ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* (Montero, *et al.*, 1993)

เอนไซม์มีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดี แต่สับสเตรทหรือน้ำมันที่ใช้ทำปฏิกิริยาไม่ละลายน้ำ เมื่อผสมเข้าด้วยกันสารละลายที่ได้มีลักษณะเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำมัน (lipophillic phase) ประกอบด้วยเอซิลกลีเซอรอลกับกรดไขมัน และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophillic phase) ประกอบด้วยกลีเซอรอลและสารละลายเอนไซม์ ทำให้บริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิริยาคือบริเวณชั้นสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ดังนั้นการศึกษาส่วนใหญ่จึงเป็นการเพิ่มพื้นที่การสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับน้ำมัน ทำให้มีการพัฒนาระบบต่างๆ เพื่อช่วยให้การขนถ่ายมวลสารระหว่าง hydrophillic phase กับ lipophillic phase เกิดขึ้นได้มากที่สุด เช่น การใช้สารอิมัลซิฟายเออร์ สารลดแรงตึงผิว การเพิ่มอัตราการกวน การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือออกแบบถังปฏิกรณ์ให้มีประสิทธิภาพในการผสมที่สูง

Park (1988 อ้างโดย Malcata, *et al.*, 1992) ใช้เอนไซม์ไลเปส 2 แหล่งร่วมกัน คือใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium* sp. กับ *Rhizopus niveous.* และ *Penicillium* sp กับ *Rhizopus delemar* พบว่า จะมีอัตราการย่อยสลายดีกว่าการใช้ไลเปสเพียงชนิดเดียว

Omar และคณะ (1988) พบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Humicola langinosa* โดยอาศัยการดูดซับบน ion exchange resin ถ้าหากเติมกลูตาราลดีไฮด์ มีผลช่วยส่งเสริมให้การย่อยสลายมีประสิทธิ์ภาพเพิ่มขึ้น

Brady และคณะ (1988) รายงานว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลย่อยสลายน้ำมันมะกอกในถังปฏิกรณ์ชนิด continuous stirred tank reactor สามารถผลิตกรดไขมันอิสระในรูปกรดโอเลอิก ได้สูงถึง 1100 กิโลกรัมกรดไขมันต่อกิโลกรัมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง

Morita และคณะ (1984) รายงานว่า การผลิตไตรกลีเซอไรด์จาก 1,2ไดเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระเช่น ปาล์มมิติก และสเตรียริก โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงใน phosphatidylcholine reverse micelles ในการย่อยสลาย พบว่า สามารถผลิตไตรกลีเซอไรด์ได้สูงสุดที่พีเอชช่วง 5-9

Mojovic และคณะ (1994) รายงานว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus arrhisus* ที่ถูกตรึงบนซีไลท์ ในการเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันปาล์มใน gas lift reactor สามารถผลิตกรดสเตรียริกได้สูงถึง 7.28 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง

Kosugi และคณะ (1994) รายงานว่า การผลิตไตรกลีเซอไรด์จากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนอะคลีลิคเรซิน พบว่าสามารถเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้มากถึงร้อยละ 95 ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า

Gerald และคณะ (1991) พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei* และ *Pennicillium camembertii* รวมกันในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของน้ำมัน สามารถผลิตไตรกลีเซอไรด์ 1,3 ไดเอซิลกลีเซอรอล 1,2 ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมัน ได้ร้อยละ 7.9, 5.6, 3.1, 81.3 และ 2.0 ตามลำดับ

Seong และคณะ (1991) ย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 50 องสาเซลเซียส พีเอช 5.0 อัตราเร็วการกวน 240 รอบต่อนาที และอัตราส่วนของน้ำมันปาล์มและน้ำเท่ากับ 70 ต่อ 30

Slaughter และคณะ (1993) ย่อยสลายน้ำมันพืช โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ในถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์ พบว่า การผสมโดยใช้สนามไฟฟ้าแรงสูงเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันพืชได้มากกว่าร้อยละ 80 และประหยัดพลังงานได้สูงกว่าการผสมโดยใช้ถังปฏิกรณ์แบบกวนร้อยละ 40

Kaur และคณะ (1993) ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันรำข้าวโดยเอนไซม์ไลเปสจากข้าวโอ๊ตโดยใช้ระยะเวลาในการปั่นผสม (โฮโมจีไนซ์) 2.5 นาที ที่ระดับพีเอช 7.5 และอัตราส่วนผสมระหว่างสับสเตรทต่อเอนไซม์เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 2 กรัมเอนไซม์

พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำมันรำข้าวต่อสารอิมัลซิฟายเออร์ (โพลีไวนิลแอลกอฮอล์) คือ 0.5 ต่อ 1

Taylor และคณะ (1986) พบว่าการย่อยสลายไขมันสัตว์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* ที่ถูกตรึงบน microporous membrane ทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต 1-2 เดือน ในสภาพพีเอช 5.5-6.5 เมมเบรนสามารถล้างด้วยกรดหรือด่างเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์ใหม่โดยที่คุณสมบัติไม่เปลี่ยนแปลง

Kosugi และคณะ (1990) ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* บนเรซินแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้กลูตาราลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อม พบว่า กิจกรรมของเอน-ไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าเท่ากับร้อยละ 10 ถึง 70 และเมื่อนำไปย่อยสลายน้ำมันปาล์มในถังปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดส์เบด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือร้อยละ 70

Pronk และคณะ (1992) ศึกษาการย่อยสลายไขมันโดยตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ในถังปฏิกรณ์แบบเมมเบรน พบว่า ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียสมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.5-7.0 ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ กับเกลือโซเดียม ที่เหมาะสมคือ 10 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่า ในสภาวะที่เป็นกรดเอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์อิสระ แต่ถ้าพีเอชมากกว่า 7.0 จะมีผลทำให้เกิดอุดตันของเมมเบรน

Han และ Rhee (1985) ย่อยสลายน้ำมันมะกอกในระบบ reversed micelles โดยใช้ sodium *bis* (2-ethylhexy) sulphosuccinate (AOT) เป็นสารลดแรงตึงผิว พบว่า ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมคือไอโซออกเทน สารที่มีผลต่อการส่งเสริมการย่อยสลายคือไกลซีนและฮีสทิดีน สำหรับประจุ Cu^{2+} Hg^{2+} และ Fe^{3+} มีผลต่อการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส จาก *Candida rugosa*

Kang และ Rhee (1989b) ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยการดูดซับบน Sephadex LH-20 ในอัตราความเข้มข้น 720 ไมโครกรัมโปรตีนต่อกรัมเปียกของเจล พบว่า สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกเข้มข้นร้อยละ 60 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใน

ตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ที่พีเอช 7.0 นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายคือปริมาณน้ำภายในเจล (Kang and Rhee,1989a)

Petal และคณะ (1995) ใช้ AOT เป็นสารช่วยลดแรงตึงผิวในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ร้อยละ 60-98 โดยจะขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ ลักษณะทางเคมีกายภาพของสารตั้งต้นและปริมาณน้ำในปฏิกิริยา

Patel และคณะ (1996) ย่อยสลายไขมันนมเพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายที่ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (ไอโซออกเทน) พบว่า การเติมเลซิติน (lecitin) จะเกิดไมเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ป้องการถูกทำลายของเอนไซม์เนื่องจากความร้อน และจากการสัมผัสโดยตรงกับตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวอย่างการเลือกใช้ตัวพยุง กรรมวิธีการตรึงและชนิดของถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไขมันและน้ำมันเพื่อผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอลแสดงดังตารางที่ 6

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในตัวทำละลายอินทรีย์

8.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

เนื่องจากข้อจำกัดในด้านความสามารถในการละลายและความหนืดของน้ำมันและไขมัน และการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสเกิดที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ได้มีการนำสารอิมัลซิฟายเออร์มาใช้เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับน้ำมัน แต่ปัญหาที่ตามมาคือการแยกสารอิมัลซิฟายเออร์ออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเนื่องจากช่วยในการลดความหนืดและเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับน้ำมัน

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ได้แก่เฮปเทน (heptane), เฮกเซน (hexane), ไซโครเฮกเซน (cyclohexane), ออกเทน (octane), ไอโซออกเทน (isooctane), ไดไอโซโปรพิว-

ตารางที่ 6 ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในถังปฏิกรณ์แบบต่าง ๆ

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพยุง	สารตั้งต้น	ถังปฏิกรณ์
Adsorption (แบบดูดซับ)	*Candida cylindracea*	Polypropylene	BFT	FTMR PBR
	Aspergillus niger	Polypropylene	ไขมันนม	FSMR
	Thermomyces lanuginosus	NA	น้ำมันมะกอก	FSMR
	Thermomyces lanuginosus	Acylic	ไขมันสัตว์	FSMR
	Rhizopus sp.	PVC	น้ำมันทานตะวัน	FSMR
	Candida rugosa	Sephadex	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida antarctica	Synthetic resin	Tributyrin	BSTR
	Mucor miehei	Synthetic resin	Tributyrin	BSTR
	Rhizopus sp.	Celite	น้ำมันปาล์ม	BSTR
	Mucor miechei	Duolite	ไตรเอซิลกลี-เซอรอล	BSTR
	Humicola lanuginosa	Ca-alginate	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida rugosa	Cellulose	น้ำมันถั่วเหลือง	HFMR
	Candida rugosa	Sephadex	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida rugosa	Polypropylene	ไขมันนม	FSMR
	Mucor miehei	Synthetic resin	น้ำมันเมล็ดละหุ่ง	BSTR
	Aspergillus niger	Polypropylene	ไขมันนม	HFMR
	Thermomyces lanuginosus	NA	ไขมันวัว	FSMR
	Aspergillus niger	Polypropylene	ไขมันนม	HFMR
	Aspergillus niger	Polypropylene	Butterfat	HFMR
	Pseudomonas fluorescens	Decylchloroacetate emulsion	Decylchloro-acetate	BSTR

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพยุง	สารตั้งต้น	ถังปฏิกรณ์
	Candida rugosa *Rhizopus delemar* *Rhizopus niveus*	Celite, glass Polypropylene, Amberlite	Phosphati- dylcholine	BSTR
	Candida rugosa	Polypropylene	ไขวัว ไขมันหมู น้ำมันมะกอก	BSTR
Covalent binding (แบบโควาเลนท์)	*Candida rugosa*	PEG	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Humicola lanuginosa	Ambertite, Diatom	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Porcine pancreas	Cellulose	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida cylindracea	Sepharose	Tributyrin	BSTR
	Porcine pancreas	EPSPS	น้ำมันมะกอก	PBR
	Candida ruoasa	PVC	น้ำมันมะกอก	PBR
	Candida rugosa	Chitin	น้ำมันมะกอก	PBR
	Candida rugosa	Agarose	น้ำมันมะกอก	PBR
	Candida rugosa	Chitosan	น้ำมันมะกอก	PBR
	Candida rugosa	Sepharose	น้ำมันมะกอก	PBR
	Candida rugosa	Trisacyl Synthetic resin	น้ำมันมะกอก	PBR
	Rhizopus sp.	TAS	น้ำมันปาล์ม	BSTR
Cross-linking (วิธีเชื่อมไขว้)	*Humicola lanuginosa*	Octry-Sepharose	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Rhizopus sp.	PTFE	น้ำมันทานตะวัน	HFMR
	Candida cylindracea	PTFE, PVC	น้ำมันทานตะวัน	FSMR
Entrapment (วิธีห่อหุ้ม)	*Humicola lanuginosa*	ENTP Polyurethan	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Rhizopus sp.	PVC	น้ำมันทานตะวัน	FSMR
	Candida cylindracea	ENT, ENTP	ไขมันนม	BSTR
	Rhizopus arrhizus	ENT, ENTP	ไขมันนม	BSTR

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วิธีการตรึง	แหล่งเอนไซม์	ตัวพยุง	สารตั้งต้น	ถังปฏิกรณ์
	Candida cylindracea	Sodium alginate	Bytyl-butanoate	BSTR
Containment	*Candida rugosa*	AOT-RM	น้ำมันมะกอก	BSTR
(วิธีจำกัดขอบเขต)	*Rhizopus delemar*	BSP	น้ำมันมะกอก	CSTR
		Polyurethane	ไขมันนม	
	Candida rugosa	AOT-RM	น้ำมันมะกอก	RDRMR
	Chromobacterium viscosum	AOT-RM	น้ำมันมะกอก	CSTR
	Candida rugosa	AOT-RM	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida cylindracea	AOT-RM	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Pseudomonas fluorescens	AOT-RM	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida cylindracea	Polyamide	น้ำมันมะกอก	HFMR
Precipitation	Human milk	-	เอซิลกลีเซอรอล	BSTR
(ตกตะกอน)	*Candida rugosa*	-	น้ำมันมะกอก	BSTR
	Candida cylindracea	-	น้ำมันปลาทูน่า	BSTR
	Pseudomonas fluorescens	-	Anchovy oil Menhaden oil	BSTR
	Candida cylindracea	-	Borage seed oil	BSTR
Ion exchange (วิธีแลกเปลี่ยนประจุ)	*Rhizomucor miehei*	Synthetic resin	Lesquerella Fendleri oil	BSTR

หมายเหตุ :

AOT-RM	= sodium *bis* (2-ethylhexy) sulphosuccinate reverse micelles	FTMR	= flow-through membrane reactor
BFT	= bleachable fancy tallow	FSMR	= flat-sheet membrane reactor
BSP	= biomass support particles	HFMR	= hollow-fiber membrane reactor
BSTR	= batch stirred - tank reactor	PBR	= packed-bed reactor
ENT	= cross-linkable resin prepolymer containing polyethylene glycol	PTFE	= polytetrafluoroethylene
ENTP	= cross-linkable resin prepolymer containing polypropylene glycol	PVC	= polyvinylchloride
EPSPS	= epoxypropylsilanized PartiSphere-5	RDRM	= recycle dialysis reversed micellar reactor

ที่มา : ดัดแปลงจาก Balcao และคณะ (1996)

อีเทอร์ (diisopropyl ether), เบนซีน (benzene), อะซีโตน (acetone), อีทิลอีเทอร์ (ethyl ether) และไอโซโปรพานอล (isopropanol) (Han and Rhee, 1985) ผลกระทบของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อเอนไซม์มีหลายด้านได้แก่ มีความสามารถในการแย่งจับกับเอนไซม์อย่างจำเพาะเจาะจง แย่งกับเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรท ทำให้สารตัวกลางแตกตัว เปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของสารในปฏิกิริยา หรืออาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง α-helix ของเอนไซม์ (Malcata, *et al.*, 1992)

Kue และ Parkin (1996) กล่าวว่าเกณฑ์ที่ง่ายที่สุดในการคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับเป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือการพิจารณาจากค่าลอก-การิทึมของค่าสัมประสิทธิ์การแยกละลายระหว่างน้ำต่อออกทานอล (Log P) ของตัวทำละลายที่เลือกใช้ สำหรับกรณีของเอนไซม์ไลเปส Laana และคณะ (1987) พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Log P มากกว่า 4 เพราะมีค่าใกล้เคียงกับน้ำมัน มีกิจกรรมปานกลางเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Log P ในช่วง 2-4 และมีกิจกรรมต่ำมากเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Log P น้อยกว่า 2

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วต่ำและมีลักษณะสายโซ่เป็นสาขา (branched chain) และแบบวงแหวน (cyclic hydrocarbon) ให้กิจกรรมสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีสายโซ่ตรง (aliphatic chain hydrocarbon) เช่น Kang และ Rhee (1989a) แสดงให้เห็นว่าการใช้ไอโซออกเทน และไซโครเฮกเซน ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบน Sephadex LH-60 เท่ากับร้อยละ 100 และ 84.4 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ออกเทนและเฮกเซนซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 59.1 และ 52.2 ตามลำดับ

Kosugi และคณะ (1990) รายงานว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วโดยเฉพาะไอโซออกเทนจะให้กิจกรรมการย่อยสลายสูงสุด สำหรับตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมตัวได้กับน้ำเช่น เอทธานอล และเมทธานอลมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพราะไม่มีการสร้างไมเซลล์ในตัวทำละลายชนิดนี้ และตัวทำละลายชนิดนี้จะดึงน้ำออกจากสายโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยน

แปลงไป (Malcata, *et al.*,1992) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความไม่มีเป็นขั้วของตัวทำละลายที่ใช้

Virto และคณะ (1994) เปรียบเทียบผลของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ อัตราความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตรในปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันหมูโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่ถูกตรึง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ การใช้ไอโซออกเทน ซึ่งมีความเป็นขั้วต่ำสุดจะให้เปอร์เซนต์การย่อยสลายสูงสุดร้อยละ 90 ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง

8.2 สารละลายบัฟเฟอร์

การย่อยสลายไขมันและน้ำมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่าง เช่น กันการเลือกใช้ชนิดและองค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันจะให้ผลที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะนำผลการทดลองของนักวิจัยต่างๆ มาสรุปรวมกันได้ Patel และคณะ (1995) ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus javanicus* ย่อยสลายน้ำมันมะกอกในไอโซออกเทน โดยใช้ AOT เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งจะเกิดระบบรีเวอร์สไมเซลล์ พบว่า องค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกันมีผลทำให้ค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาแตกต่างกันโดยการใช้ tris/maleate เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ระดับพีเอช 7.0 จะให้ค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาสูงสุด โดยที่ค่าพีเอช และ ionic strength ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ (Haas, *et al.*, 1995)

Yang และ Rhee (1992) ย่อยสลายน้ำมันมะกอกในไอโซออกเทนโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 พบว่า ชนิด และค่า ionic strength ของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ต่างกัน ซึ่งผลการใช้ triethanolamine buffer จะมีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงกว่าการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ระหว่างขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันในระบบรีเวอร์สไมเซลล์ ประจุ และ ionic strength มีผลต่อการรักษาประจุไฟฟ้าบริเวณผิวรอบๆ ไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว ทำให้ค่าพีเอชของสิ่งแวดล้อมในปฏิกิริยาไม่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลต่อ

การป้องกันการสูญเสียน้ำของเอนไซม์ หรือการทำลายโครงสร้างบริเวณเร่งของเอนไซม์ (Patel, *et al.*, 1995)

8.3 สับสเตรท

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

ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันในสารละลายอิมัลชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง พบว่า จะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสับสเตรท (substrate inhibition) เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 3-5 น้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องมาจากข้อจำกัดด้านการถ่ายโอนมวลสาร (mass transfer) ของสารต่างๆ ในปฏิกิริยา แต่ในปฏิกิริยาที่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือระบบรีเวอร์สเฟส หากความเข้มข้นของสับสเตรทในปฏิกิริยาต่ำ เปอร์เซนต์การย่อยสลายของเอนไซม์จะต่ำเนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์ถูกทำลายเมื่อสัมผัสโดยตรงกับตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทจะมีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์มากขึ้น เพราะบริเวณเร่งทั้งหมดของเอนไซม์จะจับกับสับสเตรท ทำให้สามารถป้องกันการถูกทำลายเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ และได้ผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรของถังปฏิกรณ์สูงขึ้น (Kim and Rhee, 1993; Patel, *et al.*, 1995; Virto, *et al.*, 1994)

8.4 น้ำ

จากสมการการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไขมันของเอนไซม์ไลเปส จะเห็นได้ว่า น้ำเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของปฏิกิริยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหากมีน้ำเป็นสัดส่วนที่น้อยมีผลทำให้สมดุลย์ของปฏิกิริยาเกิดขึ้นแบบย้อนกลับ การย่อย

สลายจะเกิดขึ้นต่ำแต่จะเกิดการสังเคราะห์เอสเทอร์แทน Haas และคณะ (1994) พบว่าเอนไซม์ไลเปสแต่ละแหล่งต้องการปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในตัวทำละลายแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่ไม่แตกต่างกัน และหากสัดส่วนของน้ำไม่เหมาะสมระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้น

8.5 กลีเซอรอล

กลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ได้จาการย่อยสลายไขมันและน้ำมัน กลีเซอรอลเป็นสารที่ทำหน้าที่เพิ่มความคงตัวชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในการป้องกันการถูกทำลายของโปรตีนเนื่องจากความร้อน กลีเซอรอลช่วยในการเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันทำให้อายุการใช้งานของเอนไซม์สูงขึ้น (Yang and Rhee, 1991) ปัจจุบันจึงมีนักวิจัยหลายท่านนำกลีเซอรอลมาใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันโดยเอนไซม์ไลเปสอย่างกว้างขวาง คุณสมบัติของกลีเซอรอลคือสามารถละลายได้ในน้ำ หรือสารละลายบัฟเฟอร์ หรือสารละลายเอนไซม์ แต่ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ ไอโซออกเทน ทำให้แยกออกได้ง่าย (Brady, *et al.*, 1988)

8.6 สารเคมี

จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่านพบว่าองค์ประกอบทางเคมี หรือสารเคมีต่างๆ ในปฏิกิริยามีผลการส่งเสริมและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ด้าน เช่น ระดับความเข้มข้น หรือสภาวะในการทดลอง Han และ Rhee (1985) พบว่า Fe^{2+} Cu^{2+} และ Hg^{3+} เป็นตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ฮีสทิดีน และไกลซีน หรือกรดอะมิโนอื่นๆ จะช่วยรักษากิจกรรมของเอนไซม์ ทำหน้าที่ป้องกันการทำลายเอนไซม์ไลเปสโดยประจุของโลหะที่เป็นพิษ

โดยทั่วไปแคลเซียมไอออนและโซเดียมไอออนทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส โดยทำหน้าที่ดึงไขมันที่เกิดขึ้นระหว่างการกิดปฏิกิริยาย่อยสลายให้อยู่ในรูปโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำ Garcia และคณะ (1991) รายงานว่า โซเดียมไอออนช่วย

ในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่ได้จากตับอ่อน และ *Aspergillus wentii* แต่จะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Aspergillus niger*

กรดไขมันอิสระและแอลกอฮอล์ก็มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยกรดไขมันอิสระจะสะสมในบริเวณชั้นของไขมันและน้ำ ทำให้เกิดการขัดขวางโมเลกุลของเอนไซม์ในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำมัน สำหรับแอลกอฮอล์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะเข้าไปทำลายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โดยเฉพาะบริเวณเร่งของเอนไซม์ (Malcata, *et al.*, 1992)

8.7 สารลดแรงตึงผิว

ผลการเติมสารลดแรงตึงผิวในปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและน้ำมันในตัวทำละลายอินทรีย์จะมีการสร้างไมเซลล์เกิดขึ้น ซึ่งเรียกระบบนี้ว่ารีเวอร์สไมเซลล์ โดยที่รีเวอร์สไมเซลล์ หมายถึงสารละลายอิมัลชันของน้ำมัน (water-in-oil microemulsion) ซึ่งเป็นสารละลายไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวในตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์จะละลายในน้ำซึ่งอยู่ภายในไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิว ไมเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เอนไซม์ถูกทำลายเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยา และเป็นแหล่งสะสมของน้ำสำหรับเอนไซม์เพื่อนำมาใช้สำหรับเพิ่มความคงตัวภายในโครงสร้างของมัน โดยที่สับสเตรท (น้ำมัน) และผลิตภัณฑ์จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ช่วยในการเพิ่มพื้นผิวการสัมผัสสำหรับการเกิดปฏิกิริยา สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้ได้แก่ AOT และเลซิติน (Patel, *et al.,* 1995)

วัตถุประสงค์

1.คัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มในตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูงสุด

2.คัดเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปส และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

3.ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปไปใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในตัวทำละลายอินทรีย์

4.ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในตัวทำละลายอินทรีย์ในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

5.ศึกษาการนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

น้ำมันปาล์มโอเลอีนทางการค้าตรามรกต ผลิตโดยบริษัทมรกตอินดัสตรี้ส์ จำกัด (มหาชน)

2. เอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผง 5 ชนิดจากเชื้อ *Candida lipolytica* (Lipase L), *Pseudomonas* sp. (lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Rhizopus javanicus* (Lipase FAP-15) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Amano Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น และไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* (lipase OF) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Meito Sangyo ประเทศญี่ปุ่น

3. ตัวพยุง

แอคคูเรล (Accurel หรือ Polypropylene powder EP-100) ขนาดเล็กกว่า 200 200-400 และ 1000-1500ไมโครเมตร ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Akzo Nobel, Obernburg ประเทศเยอรมัน

Amberlite XAD-4 จากบริษัท Fluka Chemical Co.

DEAE-Sephadex A50 จากบริษัท Sigma Chemical Co.

Polyvinylchloride (PVC) จากบริษัท Vinythai Public Co.

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ปริมาณโปรตีน ค่าสปอ-นิฟิเคชัน (saponification) ปริมาณกรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล รายละเอียดดูในภาคผนวก ก

อุปกรณ์

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

เดสิกเคเตอร์แบบสุญญากาศ

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

เครื่องหมุนเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20B ของ Hitachi Koki Co., Ltd.

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

Packed Bed Reactor (PBR) แก้ว 2 ชั้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.61 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร

วิธีการ

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

ใช้วิธี two-phase emulsion method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Rhee (1993)

1.1 สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 1.0 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 500 รอบ

ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น

1.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้วิธี cupric acetate method (Kwon and Rhee, 1986) โดยดูดสารละลายส่วนบนในปฏิกิริยาจากข้อ 1.1 มาเจือจางกับไอโซออกเทน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้แยกชั้น นำส่วนของไอโซออกเทนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเปรียบเทียบ กับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ก)

1.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เพียงแต่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปแทนการใช้สารละลายเอนไซม์ โดยน้ำหนักของตัวพยุงที่เลือกใช้คือ แอคคูเรล Amberlite XAD-4 และ PVC ใช้ 2.0 มิลลิกรัม สำหรับ DEAE-Sephadex A50 ใช้ 10 มิลลิกรัม

3. การวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

การวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์ม จะวิเคราะห์โดยการนำสารผสมที่ได้หลังจากการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ไปวิเคราะห์หาปริมาณ

กรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1.2 และวิเคราะห์ค่าสปอนิฟิเคชันของน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ใช้ทดลองตามวิธีการวิเคราะห์ของ IUPAC (1979)(ภาคผนวก ก) คำนวณค่าเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มจากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์การย่อยสลาย} = \frac{\text{กรดไขมันที่ปลดปล่อย (ไมโครโมล)}}{\text{(ค่าสปอนิฟิเคชัน)(1000/56.1)(น.น. ตัวอย่าง, กรัม)}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล

การวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลที่ได้จากการย่อยสลายซึ่งละลายอยู่ในชั้นของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้วิธีของ Kosugi และคณะ (1995) ใช้สารตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมเมตาเปอริโอเดต 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมอาเซนเนต 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย chromotropic acid reagent 9 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอด นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาปริมาณกลีเซอรอลกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

5. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

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

วิธีการทดลอง

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized desigh : CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งมีจำนวนเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's new multiple-range test (DMRT)

1. การคัดเลือกแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการย่อยน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์

ชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม จะคัดเลือกจากเอนไซม์ 5 ชนิดคือ เอนไซม์ Lipase OF, Lipase AK, Lipase L, Lipase FAP-15 และ Lipase PS โดยจะพิจารณาจากค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) และเปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มซึ่งมีขั้นตอนในการคัดเลือกดังนี้

1.1 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะ

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสโดยชั่งเอนไซม์ไลเปส (ชนิดผง) แต่ละชนิดให้มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตามที่ระบุทางการค้า) ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที (3200 x *g*) เป็นเวลา 20 นาที เอาส่วนใสมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1 และปริมาณโปรตีนตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 5 คำนวณเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

1.2 การคัดเลือกเอนไซม์

ทดลองคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยใช้สารผสมในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.1 แต่จะเพิ่มปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละแหล่งในระดับที่เท่ากันคือจำนวน 10 ยูนิต (การทดลองข้อ 1.1) และใช้เวลาในการบ่ม 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาแล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 คัดเลือกเอนไซม์ที่ให้เปอร์เซนต์การย่อยสลายสูงสุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2. คุณสมบัติของเอนไซม์ที่คัดเลือก

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ดังนี้

2.1 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกซึ่งเตรียมในข้อ 1 มาศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยวัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 1 แต่จะแปรเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มที่ละลายในไอโซออกเทนเป็นร้อยละ 5, 10, 15 และ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial velocity, v) กับความเข้มข้นของน้ำมัน ([S])ในรูป Lineweaver-Burk plot วิเคราะห์ค่าอัตราเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยา (V_{max}) และค่า Michaelis constant (K_m) เพื่อศึกษาสัมพรรคภาพของเอนไซม์อิสระที่ผ่านการคัดเลือกต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์ม

7.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามข้อ 1 แต่เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการวิเคราะห์ดังนี้คือ อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) คัดเลือกอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

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

7.3 องค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์และพีเอชที่เหมาะสม

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้ตามข้อ 1 แต่เปลี่ยนชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเอนไซม์ และใช้เป็นสารผสมในการวิเคราะห์ ซึ่งมีทั้งหมด 4 ชนิด ดังนี้คือ

- citrate/phosphate buffer (0.1 โมลาร์) พีเอช 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.0
- sodium/phosphate buffer (0.1 โมลาร์) พีเอช 5.5, 6.5, 7.0 และ 7.5
- tris/maleate buffer (0.1 โมลาร์) พีเอช 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0

- tris/HCl buffer (0.1 โมลาร์) พีเอช 7.0, 7.5 และ 8.0

บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ข้อ 2.2) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ คัดเลือกชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และ พีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.4 ผลของแคลเซียมคลอไรด์

ทำการทดลองตามวิธีที่คัดเลือกในการทดลองข้อ 2.3 แต่จะเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่คัดเลือกเป็น 0, 10, 15 และ 30 มิลลิโมลาร์ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ คัดเลือกระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.5 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเอนไซม์ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 2.4 คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเปอร์เซนต์กิจกรรมที่เหลือ (residual activity)

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

2.6 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์

นำเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ละลายในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 4.5, 5.5, 6.0 และ 6.5 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 บ่มเป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16 และ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์หา

กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม (จากข้อ 2.2 และ 2.4 ตามลำดับ) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเปอร์เซนต์กิจกรรมที่เหลือ

3. การคัดเลือกชนิดของตัวพยุงที่ใช้ตรึงเอนไซม์

ตรึงเอนไซม์ไลเปสที่คัดเลือกได้ (จากข้อ 1) โดยวิธีการยึดเกาะบนตัวพยุง 4 ชนิด คือ แอคคูเรล Amberlite XAD-4 DEAE-Sephadex A50 และ PVC วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (bound protein) ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (immobilization ratio) และกิจกรรมที่ยึดเกาะ (activity yield) ของเอนไซม์บนตัวพยุงแต่ละชนิด คัดเลือกตัวพยุงชนิดที่มีกิจกรรมที่ยึดเกาะสูงสุด ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังต่อไปนี้

ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม/กรัมตัวพยุง) = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัม ของตัวพยุง

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

$$\text{กิจกรรมที่ยึดเกาะ (\%)} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ที่ถูกตรึง} \times 100}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}}$$

3.1 การตรึงเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับบนแอคคูเรล

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (ข้อ 2.3) 20 มิลลิลิตร ผสมกับแอคคูเรล 200 มิลลิกรัม ที่ผ่านการแช่ด้วยเอทธานอล ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนผสมทั้งหมดกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมดแล้ว วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ เพื่อคำนวณหาโปรตีนที่ยึด

เกาะและประสิทธิภาพการยึดเกาะ นำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไปทำแห้งในโถดูดความชื้นภายใต้ความดันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงทั้งหมด วิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 คำนวณในรูปของกิจกรรมการยึดเกาะ นำเอนไซม์ที่ถูกตรึงเก็บในภาชนะปิดสนิทเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป (Montero, *et al.*, 1993)

3.2 การตรึงเอนไซม์แบบแลกเปลี่ยนประจุบน Amberlite XAD-4

ชั่ง Amberlite XAD-4 400 มิลลิกรัม แช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ออก กรองแล้วทำแห้งในโถดูดความชื้นภายใต้ความดันที่อุณหภูมิห้อง เตรียมสาร ละลายเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นต่างกันเช่นเดียวกับข้อ 8.1 20 มิลลิลิตร เติมลงในตัวพยุงที่เตรียมไว้ เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นทำการทดลองและวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.1

3.3 การตรึงเอนไซม์แบบแลกเปลี่ยนประจุบน DEAE-Sephadex A50

แช่ DEAE-Sephadex A50 ในน้ำกลั่นเพื่อให้พองตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงกรองแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จากนั้นชั่งมา 10 กรัมผสมกับสารละลายไลเปสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเช่นเดียวกับข้อ 3.1 20 มิลลิลิตร เติมลงในตัวพยุงแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อยๆ คนเป็นระยะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1 นำเอนไซม์ที่ถูกตรึงแช่ในน้ำกลั่น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก Yang and Rhee, 1991)

3.4 การตรึงโดยวิธีการดูดซับบน PVC

เตรียมสารละลายไลเปสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันเช่นเดียวกับข้อ 3.1 20 มิลลิลิตร ผสมกับ PVC ที่ผ่านการแช่ด้วยเอทธานอลมาแล้ว (ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร) 500 มิลลิกรัม เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 25 0.2 มิลลิลิตร คนต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดลองและวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 3.1

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนตัวพยุงที่คัดเลือก

นำตัวพยุงที่คัดเลือกในข้อ 3 มาตรึงเอนไซม์ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงดังต่อไปนี้

4.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์สำหรับการตรึงในอัตราความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.025, 0.050 และ 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรึงเอนไซม์บนตัวพยุงที่คัดเลือกในข้อ 8 นำเอนไซม์ที่ตรึงได้มาย่อยสลายน้ำมันปาล์มตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 แต่ใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายเป็น 24 ชั่วโมง คัดเลือกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่น้อยที่สุดที่สามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สมบูรณ์สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

4.2 อุณหภูมิในการตรึง

ตรึงเอนไซม์ตามวิธีที่เหมาะสมที่คัดเลือกในข้อ 4.1 โดยควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการตรึง 2 ระดับคือ อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึง คำนวณในรูปค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ คัดเลือกอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ในขั้นต่อไป

4.3 ระยะเวลาการตรึง

ตรึงเอนไซม์ตามวิธีที่เหมาะสมในข้อ 4.2 แต่ใช้ระยะเวลาในการตรึงเท่ากับ 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะเพื่อคัดเลือกระยะเวลาต่ำสุดที่ใช้ในการจับกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง

5. คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

ตรึงเอนไซม์ไลเปสตามวิธีที่เหมาะสมในข้อ 4 แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้

5.1 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงที่คัดเลือก มาศึกษาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในไอโซออกเทนตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 แต่จะแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำมันเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.1 วัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่ปลดปล่อย เปรียบเทียบ กับชุดควบคุม (เอนไซม์อิสระ)

5.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงที่คัดเลือก มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ คัดเลือกอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

5.3 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงที่คัดเลือก มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 โดยใช้องค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทดลองที่ 2.3 แต่จะแปรเปลี่ยนระดับค่าพีเอชเป็น $\pm$ 0.5 และ $\pm$ 1.0 ของค่าพีเอชที่เหมาะสม (ข้อ 2.3) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นกิจกรรมสัมพัทธ์ คัดเลือกพีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

5.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงที่คัดเลือก มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4 แต่วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 และใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเปอร์เซนต์กิจกรรมที่เหลือ

5.5 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

นำเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงที่คัดเลือก มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5 แต่วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 และใช้อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเปอร์เซนต์กิจกรรมที่เหลือ

5.6 ความคงตัวต่อการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

ทำการทดลองย่อยสลายน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 10 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในข้อ 5.3 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงแรกดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์เปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 จากนั้นเติมสารละลายน้ำมันปาล์มเพิ่มอีก 1 มิลลิลิตร ครบเวลาทุกๆ 24 ชั่วโมงดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์และเติมเพิ่มลงไป 1 มิลลิลิตรจนกว่าเปอร์เซนต์การย่อยสลายลดลงครึ่งหนึ่งของเริ่มต้น

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์

ตรึงเอนไซม์บนตัวพยุงที่คัดเลือกตามสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 4 แล้วนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มาย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้ระบบ two-phase emulsion system โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

6.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

คัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิด คือ เฮกเซน เฮปเทน ไอโซออกเทน ไอโซบิวทิลอีเทอร์ บิวทิลแอลกอฮอล์ และ ไอโซโพรพานอล ใช้แทนไอโซออกเทน สำหรับละลายน้ำมันปาล์มในวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม (ข้อ 5.2) ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 คัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ผลในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้สูงสุด

6.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยสลาย

เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการตรึงบนตัวพยุงที่คัดเลือกในอัตราความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.050 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้น้ำหนักที่เท่ากันมาย่อยสลายน้ำมันปาล์ม ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2 โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม (ข้อ 6.1) และระยะเวลาในการย่อยสลาย 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของเอนไซม์กับระยะเวลาในการย่อยสลาย

6.3 ความเข้มข้นของน้ำมันในตัวทำละลายอินทรีย์

ทดลองตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม (ข้อ 6.1) แต่จะใช้ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มในตัวทำละลายอินทรีย์ที่คัดเลือกเป็นร้อยละ 10, 20, 30 และ 80 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเพิ่มปริมาณเอนไซม์จากเดิมเป็น 5 เท่า วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราห์ข้อ 3 เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

6.4 ผลของน้ำ

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 6.3 โดยจะแปรเปลี่ยนปริมาณของสารละลายบัฟเฟอร์ในสารผสมเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราห์ข้อ 3 เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

6.5 ผลของกลีเซอรอล

ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 6.4 ซึ่งจะเติมกลีเซอรอลในสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราความเข้มข้นร้อยละ 0, 10, 20, 30 และ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร วิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลายตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3

6.6 ผลของสารลดแรงตึงผิว

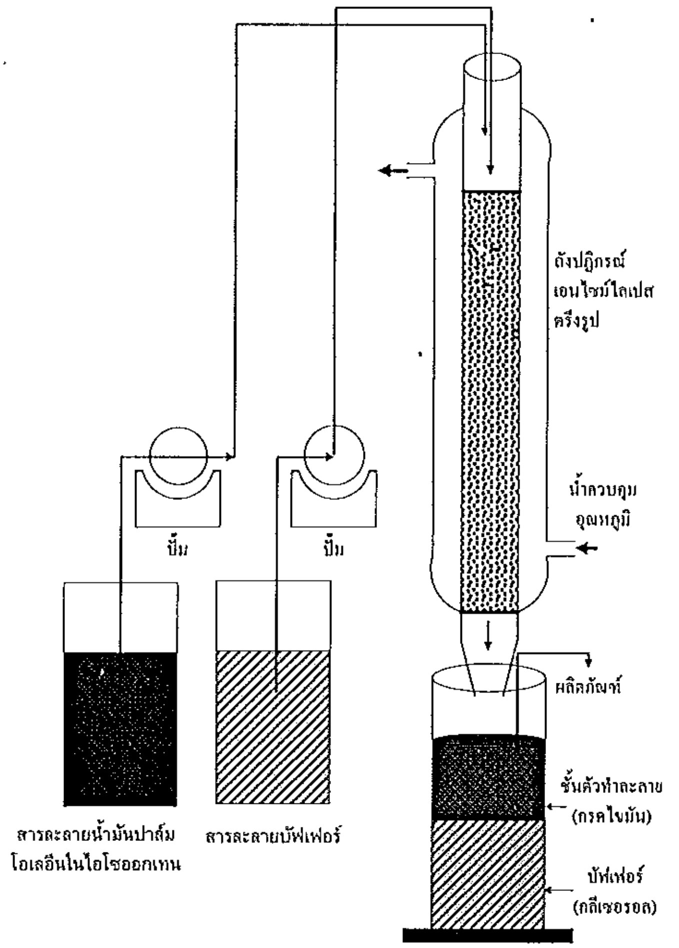
ทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 6.4 แต่จะเติม sodium *bis* (2-ethylhexy) sulphosuccinate (AOT) ในไอโซออกเทนที่ใช้ในการเตรียมสับสเตรทในระดับความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.5

7. การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่

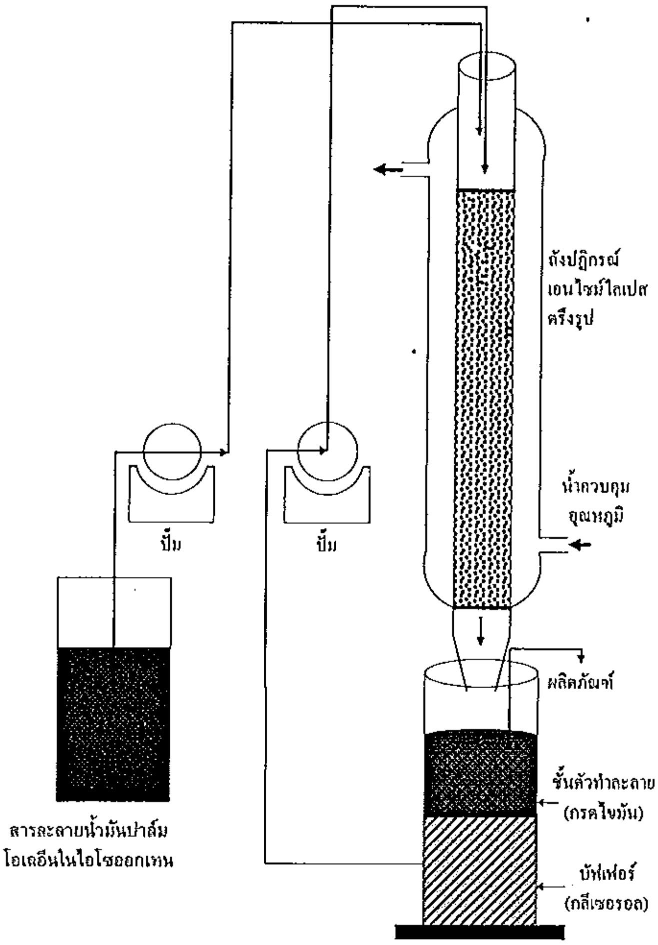
นำตัวพยุงและสารผสมที่ได้หลังจากการศึกษาในข้อที่ 6.5 ไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที กรองล้างกรดไขมันออกด้วยแอลกอฮอล์ แช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 นอร์มอล เป็นเวลา 2 นาที กรองล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่ากำจัดกรดได้หมด ทำแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวพยุงกลับไปตรึงเอนไซม์ใหม่

8. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

บรรจุเอนไซม์ที่ถูกตรึงในคอลัมน์แก้ว 2 ชั้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.61 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร รอบนอกบรรจุน้ำหล่อตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในการศึกษาข้อ 10.1 โดยป้อนสารละลายน้ำมันปาล์มที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม (จากข้อ 6.3 และ 6.4) จากด้านบนลงสู่ด้านล่างของคอลัมน์ (ภาพที่ 5.1) และให้มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้แล้วเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลดังภาพที่ 5.2 เก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์มาวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การย่อยสลาย และกลีเซอรอล ศึกษาครึ่งชีวิตของเอนไซม์ในคอลัมน์



ภาพที่ 5.1 ชุดถังปฏิกรณ์ชนิด Packed Bed Column Reactor และอุปกรณ์ (แบบที่ไม่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์)



ภาพที่ 5.2 ชุดถังปฏิกรณ์ชนิด Packed Bed Column Reactor และอุปกรณ์
(แบบที่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์)

บทที่ 3

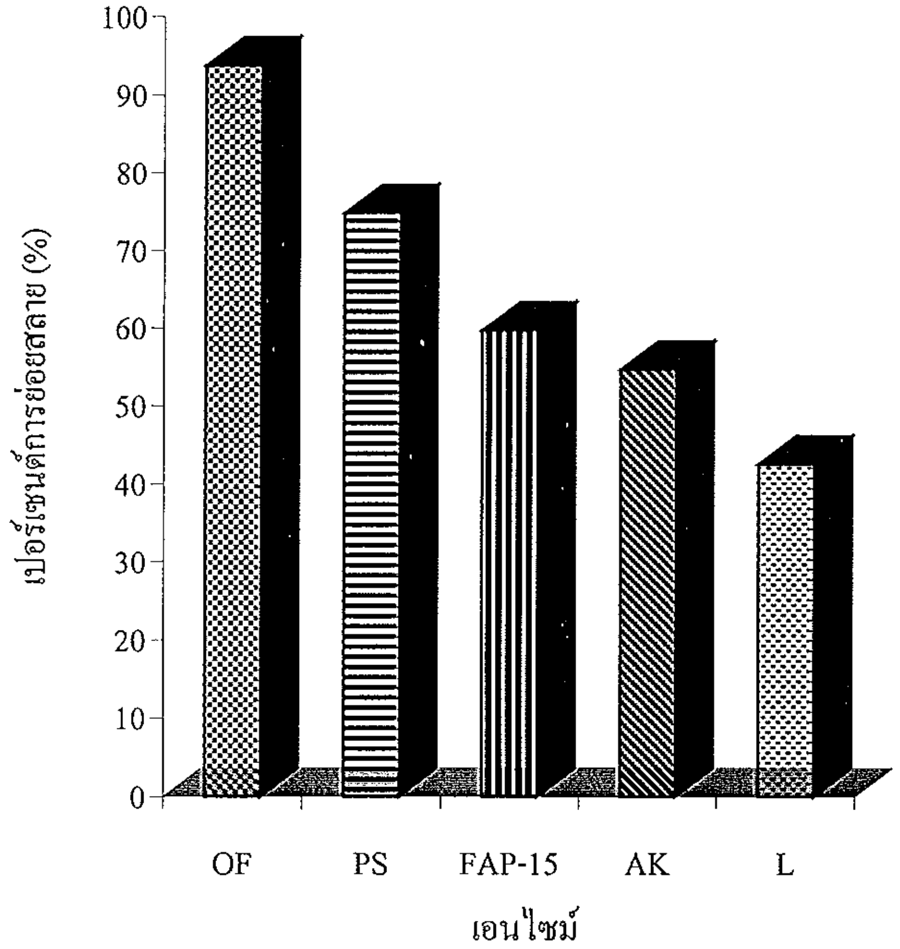
ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการย่อยน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์

การคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่มีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ระบบที่เรียกว่า two-phase emulsion system จากการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 5 ชนิดคือ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. (lipase PS) *C. lipolytica* (lipase L) *R. oryzae* (lipase FAP-15) *P. fluorescens* (lipase AK) และ *C. rugosa* (lipase OF) ในขั้นต้นวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ซึ่งได้จากเชื้อ *C. rugosa* มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 48.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.2 คำนวณเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะได้เท่ากับ 209.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ให้ค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา ไลเปส OF ยังได้รับคัดเลือกว่าเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในรูปของสารละลายอิมัลชัน โดยใช้โพลีไวนิล-แอลกอฮอล์เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ (วุฒิชัย พิชัยยุทธ์, 2540) จากนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสแต่ละแหล่งในจำนวนยูนิตที่เท่ากันคือ 10 ยูนิต มาย่อยสลายน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 10 ในไอโซออกเทน เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าไลเปส OF ให้กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสูงสุด (ร้อยละ 94) รองลงมาคือไลเปส PS (ร้อยละ 75) และไลเปส FAP-15 (ร้อยละ 60) ดังแสดงในภาพที่ 6 จากผลการทดลองนี้เอนไซม์ไลเปส OF ให้กิจกรรมการย่อยสลายสูงสุดอาจเป็นผลเนื่องมาจากคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Macrae, 1983; Kimura, *et al.*, 1983; Otero, *et al.*, 1990; Malcata, *et al.*, 1992) ทำให้สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้สมบูรณ์ และการเร่งปฏิกิริยาจะไม่เกิดแบบย้อนกลับ ทำให้ได้กรดไขมันในปริมาณที่สูง (Okumura, *et al.*, 1981) สำหรับไลเปส PS,

ตารางที่ 7 ความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในระบบ two-phase emulsion system ของไลเปสแต่ละชนิด

แหล่งของเอนไซม์	ชื่อทางการค้า	กิจกรรม (ยูนิต/มก.)	โปรตีน (มก./มก. เอนไซม์)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)
C. rugosa	OF	48.5	23.2	209.1
Pseudomonas sp.	PS	11.7	7.6	154.8
P. fluorescens	AK	16.6	13.7	121.5
C. lipolytica	L	6.9	20.0	124.1
R. oryzae	FAP-15	56.6	45.6	34.5



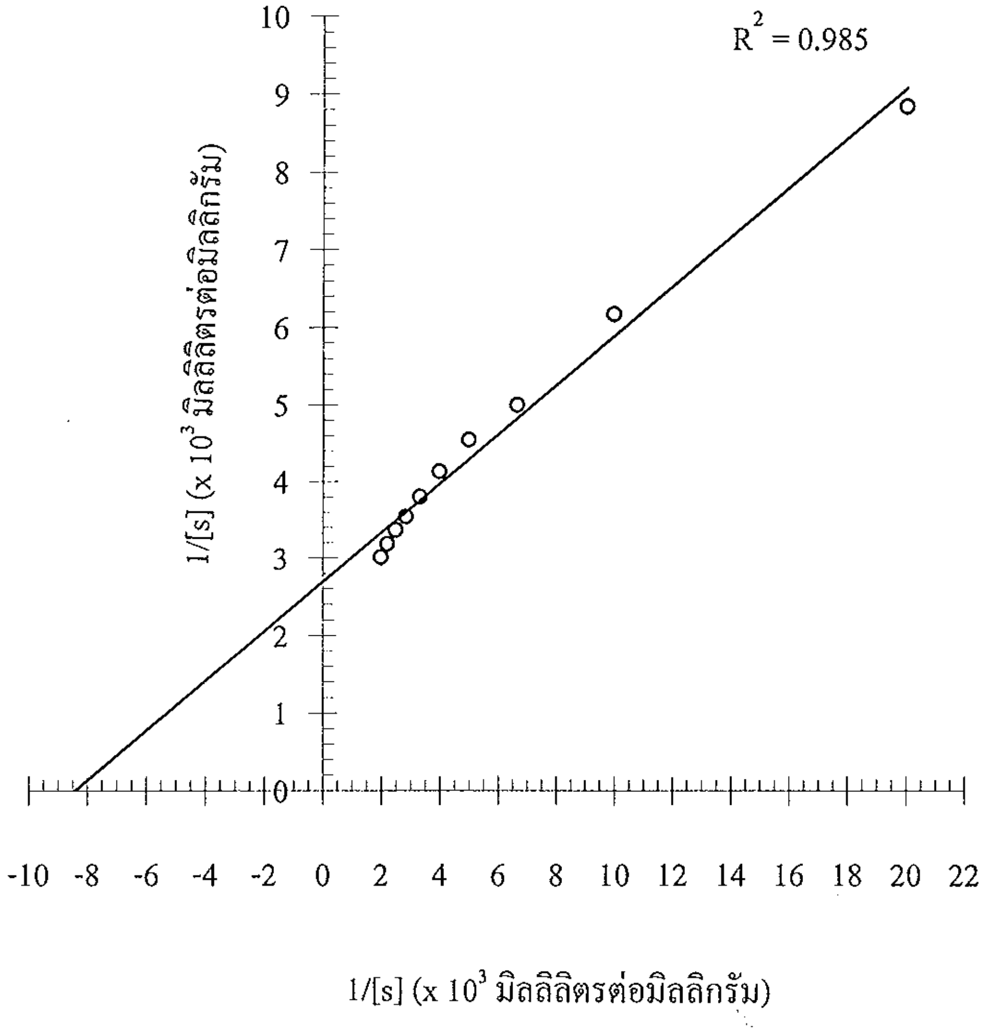
ภาพที่ 6 ความสามารถของเอนไซม์ไลเปสชนิดต่างๆ ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทน

FAP-15, L และ AK ย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ต่ำกว่าทั้งๆ ที่ใช้ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่เท่ากันทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันในตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ทำให้เกิดการย่อยสลายที่ไม่สมบูรณ์ (Malcata, *et al.*, 1992) นอกจากนี้จากข้อมูลของบริษัท Amano Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น ไลเปส FAP-15, L และ AK มีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายยาวและสายกลางมากกว่าสายสั้นในขณะที่ไลเปส PS สามารถย่อยสลายได้ดีทั้งสายสั้นและสายยาวจึงส่งผลให้ไลเปส PS ย่อยสลายได้ดีกว่าไลเปสตัวอื่นเมื่อเทียบกับไลเปสในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นจึงคัดเลือกไลเปส OF สำหรับการทดลองต่อไป

2. คุณสมบัติของเอนไซม์ที่คัดเลือก

2.1 จลพลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

จากการทดลองหาค่า K_m และ V_{max} ของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในไอโซออกเทนที่อุณหภูมิห้อง พีเอช 7.0 เมื่อนำผลการทดลองมาแสดงในรูปของ Lineweaver-Burk double reciprocal plot ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (v) กับความเข้มข้นของสับสเตรท ([S]) จะให้กราฟเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสหความสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.985 (ภาพที่ 7) จากกราฟคำนวณค่า K_m ที่จุดตัดของแกน x ได้เท่ากับ 133 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (156 มิลลิโมลาร์) และค่า V_{max} ที่จุดตัดแกน y ได้เท่ากับ 3.3×10^4 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมเอนไซม์ (142.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในขณะที่ Montero และคณะ (1992) รายงานค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการย่อยสลายสารละลายอิมัลชันของน้ำมันมะกอก โดยใช้วิธีการไทเตรทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 มีค่าเท่ากับ 18.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2,810 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้ ρ-nitrophenyl acetate (PNPA) เป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 2.7 มิลลิโมลาร์ และ 39.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ การที่เอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มีค่า K_m และ V_{max} แตกต่างกันนั้นเนื่องจากความ



ภาพที่ 7 จลนพลศาสตร์ของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทน

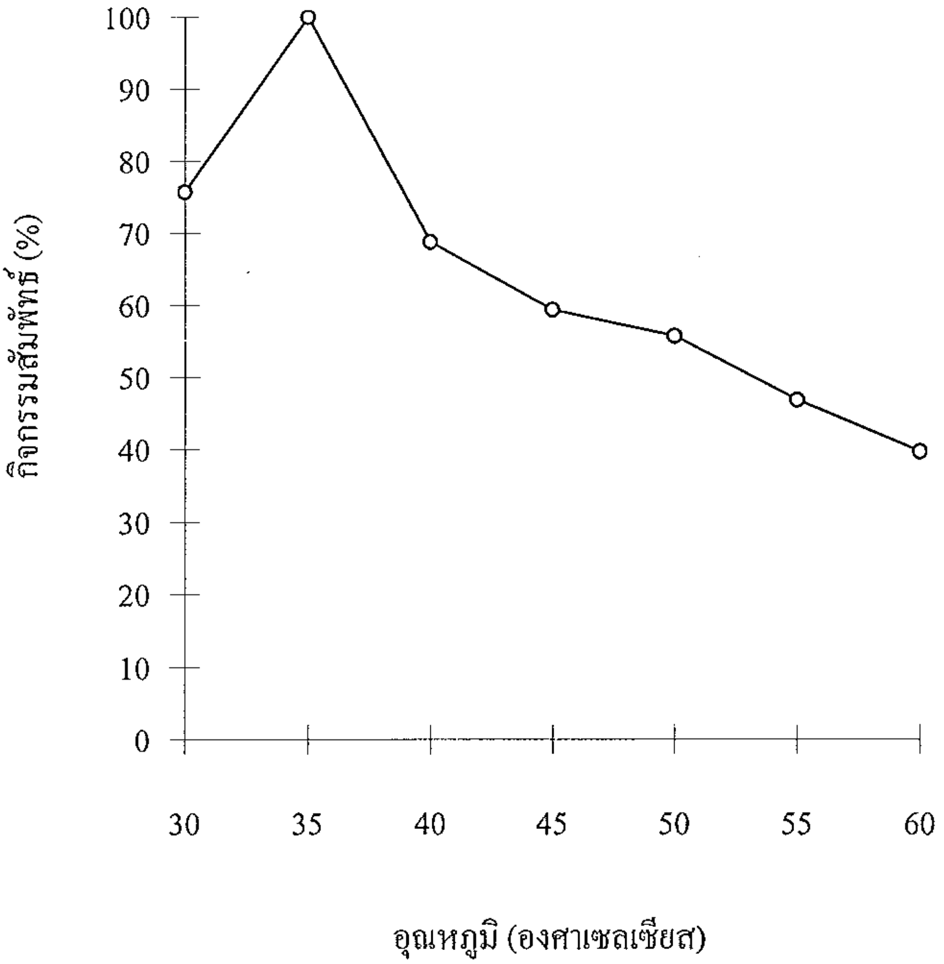
แตกต่างทางด้านเคมีกายภาพของสับสเตรทและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง (Patel, *et al.*, 1995)

2.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF คือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Khor และคณะ (1986) Han และ Rhee (1986) และ Montero และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* คือ 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว (Montero, *et al.*, 1993) อย่างไรก็ตาม Seong และ Omar (1991) และวุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในรูปสารละลายอิมัลชันของเอนไซม์ไลเปส OF คือ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Khor และคณะ (1986) ให้เหตุผลว่าการที่เอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสภาวะแวดล้อม และวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ สำหรับผลการทดลองที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียสกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปส OF ลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 50 เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* จะเริ่มสูญเสียสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Linfield, *et al.*, 1984)

2.3 องค์ประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์และพีเอชที่เหมาะสม

ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์หมายถึงผลของพีเอชที่มีต่อการแตกอิออน (ionization) ของหมู่โปรโตโทรปิค (prototropic group) ที่มีอยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งนำไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรท หรือการเร่งการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อการเกิดเอนไซม์สับสเตรทโค-แฟกเตอร์ ซึ่งจะนำไปสู่การจับกับเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปด้วย บางกรณีพีเอชอาจทำให้ผลผลิตต่ำเนื่องจากการแตกตัวอิออนของผลผลิต (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

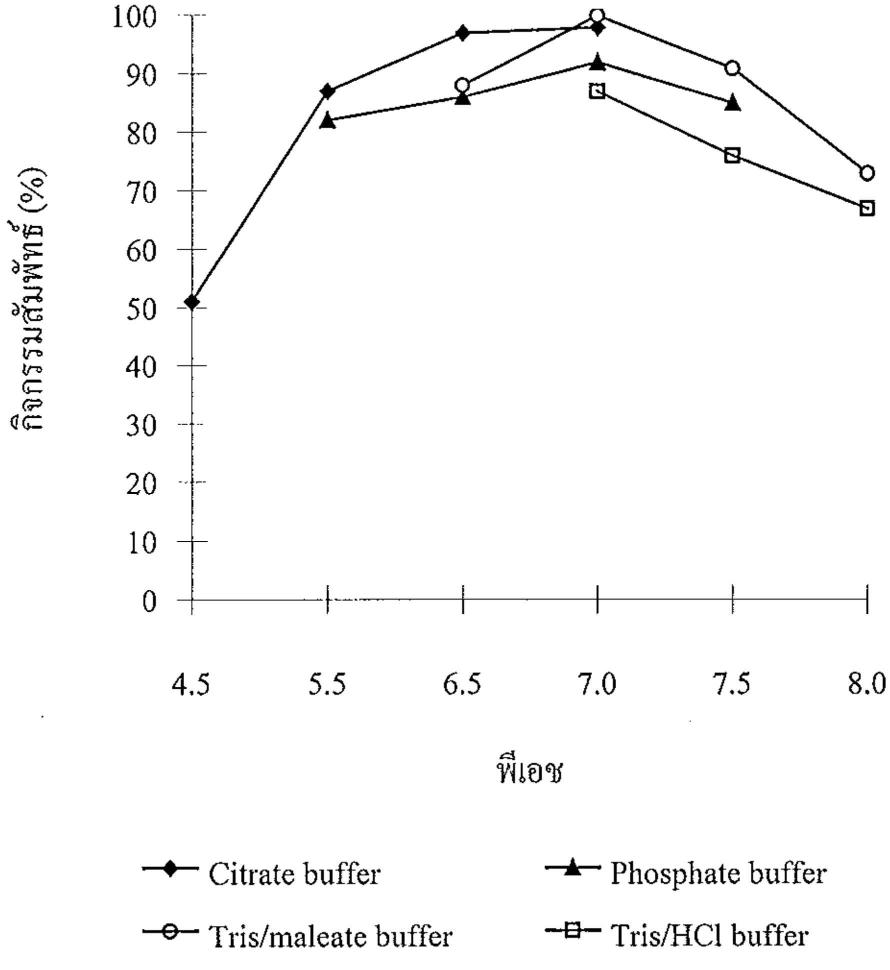


ภาพที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF

เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส OF โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 4 ชนิด คือ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ tris/maleate buffer และ tris/HCl buffer ที่ระดับพีเอชตั้งแต่ 4.5 ถึง 8.0 พบว่าที่ระดับค่าพีเอชเท่ากันผลการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกันจะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยที่การใช้ tris/maleate buffer จะให้ค่ากิจกรรมของไลเปส OF สูงสุด (ภาพที่ 9) เนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของสาระลายบัฟเฟอร์จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมบริเวณรอบๆ เอนไซม์ที่แตกต่างกัน Patel และคณะ (1995) พบว่าองค์ประกอบบัฟเฟอร์มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบรีเวอร์สไมเซลล์ที่แตกต่างกันเนื่องจากชนิดของประจุและค่า ionic strength สำหรับผลของพีเอชพบว่าเมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นกิจกรรมสัมพัทธ์ก็เพิ่มขึ้นด้วยซึ่งจะให้กราฟเป็นรูประฆังคว่ำโดยที่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.0 ในสารละลายบัฟเฟอร์ทุกชนิดที่ใช้ทดลอง และกิจกรรมสัมพัทธ์จะลดต่ำลงเมื่อพีเอชสูงกว่า 7.0 เช่นเดียวกับการทดลองของ Han และ Rhee (1986) และ Montero และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Candida rugosa* คือ พีเอช 7.1 และ 7.2 ตามลำดับ แต่ Linfield และคณะ (1984) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมของไลเปสจาก *Candida rugosa* คือ 6.3 นอกจากนี้ Khor และคณะ (1986) Shaw และคณะ (1990) และวุฒิชัย พิชัยุทธ์ (2540) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของไลเปส OF คือพีเอช 7.5 ความแตกต่างเหล่านี้เนื่องมาจากความแตกต่างของสภาวะที่ใช้ในการทดลองและวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทำให้พีเอชที่เหมาะสมมีค่าที่แตกต่างกัน

2.4 ผลของแคลเซียมคลอไรด์

การศึกษาผลของ Ca^{2+} โดยเติมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ กันลงในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ tris/maleate buffer พีเอช 7.0 ซึ่งเป็นสารละลาย บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปส OF ในระบบ two-phase emulsion system เพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 111 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ (ตารางที่ 8) แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มสูงกว่านี้กิจกรรมสัมพัทธ์จะลดต่ำลง การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์จากผลของการ



ภาพที่ 9 ผลของพีเอชและชนิดของบัฟเฟอร์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF

ตารางที่ 8 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยไลเปส OF

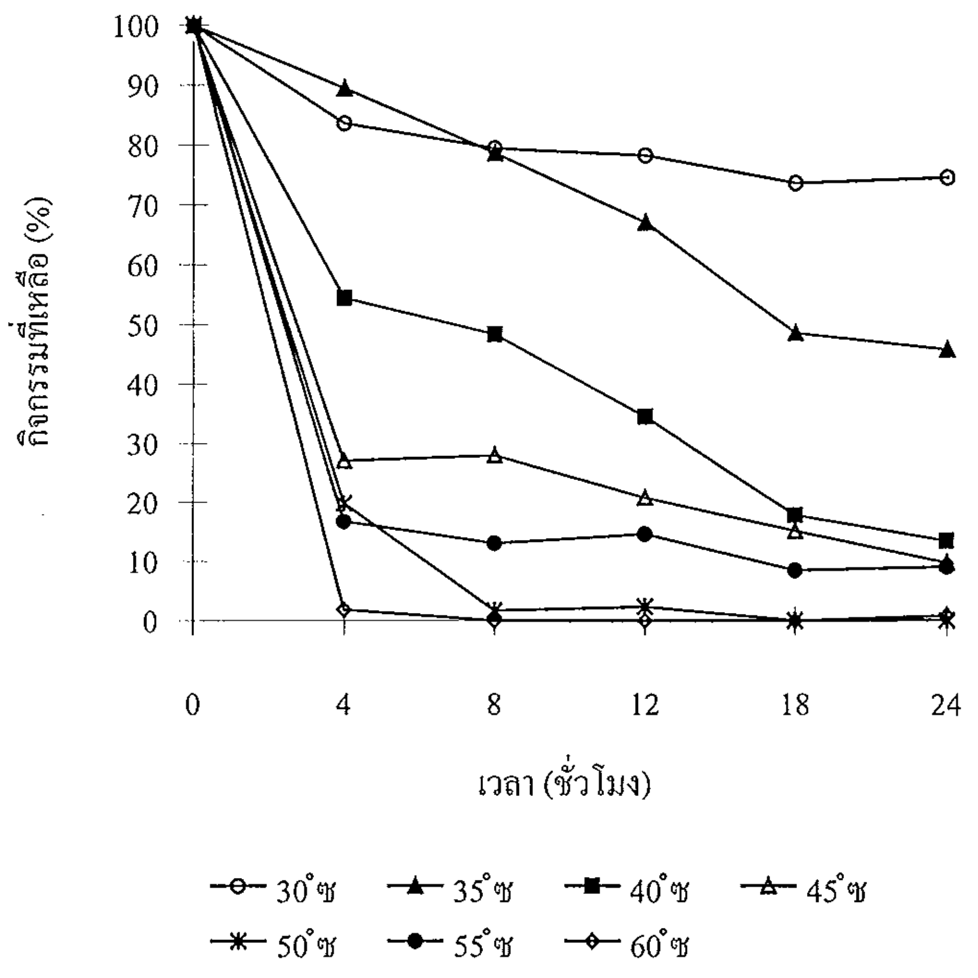
แคลเซียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%)
0	100.0
5	109.5
10	111.3
15	106.2
20	102.3
25	87.4
30	75.0

เติมแคลเซียมคลอไรด์อาจเป็นผลมาจาก Ca^{2+} ช่วยในการกำจัดกรดไขมันออกจากชั้นสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน โดยทำหน้าที่เป็นตัวตกตะกอนกรดไขมันให้เป็นเกลือแคลเซียม ซึ่งช่วยลดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเนื่องจากกรดไขมัน (Kundu, *et al*., 1987; Wang, *et al*., 1988)

2.5 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์

การศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ tris/maleate buffer พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิต่างๆ กันตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 75 ของกิจกรรมเริ่มต้น (ภาพที่ 10) กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพิ่มสูงขึ้น โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเป็น 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมที่เหลือร้อยละ 46 13.5 10 และ 9 ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ สำหรับที่ระดับอุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียสกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือน้อยกว่าร้อยละ 2 ของกิจกรรมเริ่มต้น ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมงของการบ่มซึ่งแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไลเปส OF มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงๆ ได้ต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Linfield และคณะ (1984) ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* จะสูญเสียสภาพธรรมชาติ และ Montero และคณะ (1993) พบว่าสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF มีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิ 25 ถึง 37 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วโดยสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเนื่องจากโครงสร้างระดับตติยภูมิเรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จะต้องจับกับสับสเตรทที่บริเวณจับและบริเวณเร่งของปฏิกิริยา แต่โครงสร้างของเอนไซม์ในระดับตติยภูมินี้จับกันด้วยแรงที่อ่อนมากซึ่งไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ด้วยเหตุนี้ถ้าโมเลกุลของสารในปฏิกิริยามีพลังงานมากเกินไป โครงสร้างตติยภูมิ



ภาพที่ 10 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ

เสียหายมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติและสูญเสียกิจกรรม (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

2.6 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์

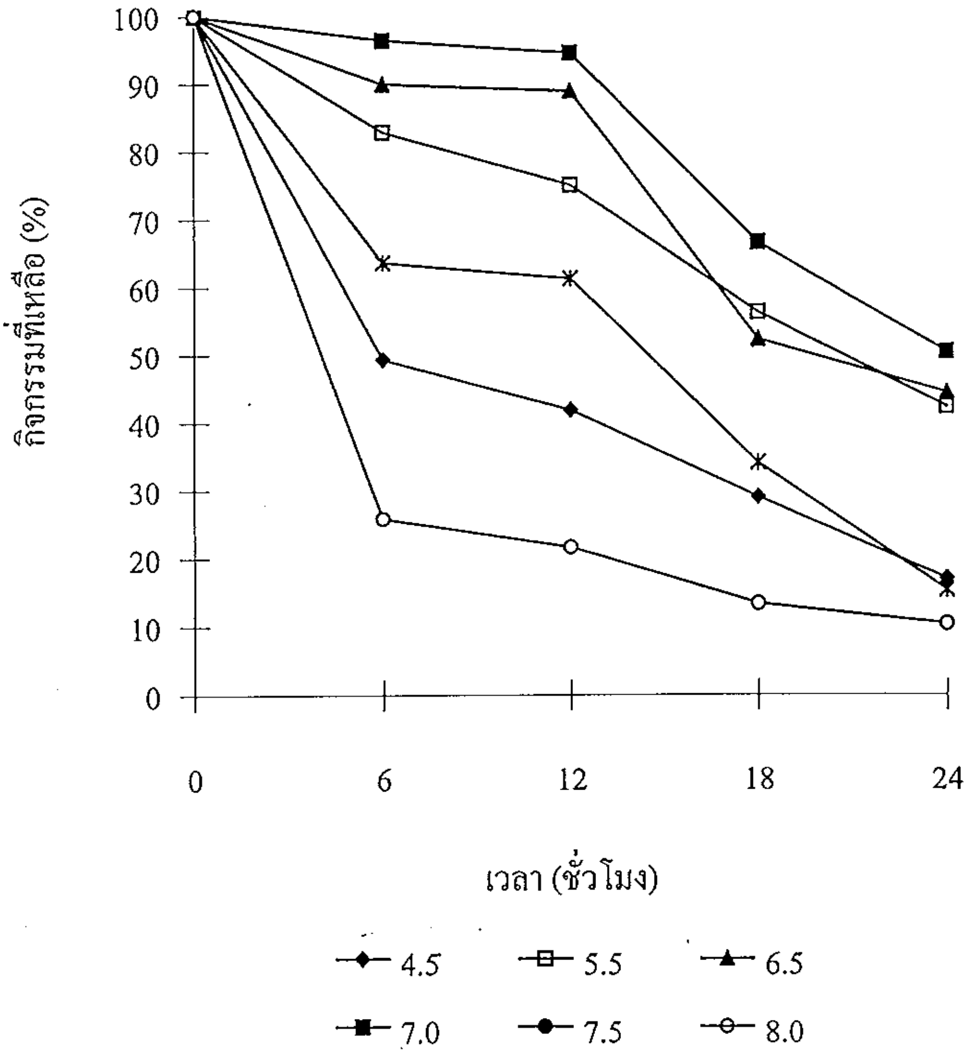
จากการบ่มเอนไซม์ไลเปส OF ที่อุณหภูมิห้องในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ และ tris/maleate buffer พีเอช 4.5 ถึง 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงตามระยะเวลาในการบ่มที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 11) และเอนไซม์มีความคงตัวสูงสุดในช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือพีเอช 6.5-7.5 โดยมีกิจกรรมที่เหลืออมากกว่าร้อย-ละ 50 ของกิจกรรมเริ่มต้น และในช่วงพีเอช 4.0-5.5 และ 8.0 เอนไซม์มีความคงตัวต่ำมากโดยมีกิจกรรมที่เหลือน้อยกว่าร้อยละ 20 ของกิจกรรมเริ่มต้น สอดคล้องกับผลการทดลองของวุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) ซึ่งพบว่าที่พีเอช 8.5 เอนไซม์ไลเปส OF สูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง Montero และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่าความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์จาก *Candida rugosa* ยังขึ้นอยู่กับชนิดขององค์ประกอบสารเคมีในสารละลายบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลคือ อุณหภูมิ ค่า ionic strength ความเข้มข้นของสับสเตรท หรือโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของสารปนเปื้อน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2538)

3. การคัดเลือกชนิดของตัวพยุงที่ใช้ตรึงเอนไซม์

การศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF โดยใช้ตัวพยุง 4 ชนิด คือ แอคคูเรล Amberlite XAD-4 DEAE-Sephadex A50 และ PVC พบว่า การตรึงเอนไซม์บนตัวพยุงที่แตกต่างกันให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะและกิจกรรมที่ยึดเกาะที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 9-14

3.1 การตรึงเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับบนแอคคูเรล

ผลการตรึงไลเปส OF โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนแอคคูเรลขนาดอนุภาคต่างกัน 2 ขนาดคือเล็กกว่า 200 และ 200-400 ไมโครเมตร โดยผสมกับสารละลาย



ภาพที่ 11 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ

เอนไซม์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การใช้แอคคูเรลทั้ง 2 ขนาดในการตรึงค่าประ-สิทธิภาพการยึดเกาะมีค่ามากกว่าร้อยละ 98 ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึง (ตารางที่ 9-10) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากแอคคูเรลมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำและมีลักษณะเป็นรูพรุนทำให้มีพื้นที่ผิวในการยึดเกาะกับเอนไซม์ได้มาก (Kimura, *et al.*, 1993; Al-Duri, *et al.*, 1995) แต่กิจกรรมที่ยึดเกาะมีค่าแตกต่างกันคือ เมื่อตรึงบนแอคคูเรลขนาด 200-400 ไมโครเมตร ไลเปสมีค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะร้อยละ 13.21-16.34 (ตารางที่ 9) แต่เมื่อตรึงบนแอคคูเรลขนาดเล็กกว่า 200 ไมโครเมตรกิจกรรมที่ยึดเกาะมีค่าสูงสุดร้อยละ 31.11 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ตรึงเป็น 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมที่ยึดเกาะลดลงเหลือร้อยละ 9.02 (ตารางที่ 10) กิจกรรมที่ยึดเกาะลดลงเกิดจากปัญหาการเคลื่อนที่ของสับสเตรทเข้าไปสู่บริเวณศูนย์กลางภายในรูพรุนเล็กๆ ของแอคคูเรลเพราะเมื่อตรึงโดยใช้เอนไซม์ในระดับความเข้มข้นต่ำเอนไซม์ส่วนใหญ่จะจับอยู่กับผิวภายนอกหรือบริเวณใกล้ๆ ผิวนอก ทำให้ลดปัญหาเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของสับสเตรท กิจกรรมที่ยึดเกาะของเอนไซม์จึงสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงโดยใช้เอนไซม์ในระดับความเข้มข้นที่สูง เพราะว่าเอนไซม์ส่วนหนึ่งจับอยู่ภายในรูพรุนของตัวพยุง และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของรูพรุนมีขนาดเล็กกว่าขนาดอนุภาค อิมัลชั่นของน้ำ-มัน ทำให้การเคลื่อนที่ของสับสเตรทจากภายนอกเข้าไปในรูพรุนเกิดได้ยาก กิจกรรมที่ยึดเกาะจึงมีค่าต่ำ (Bosley amd Peilow, 1997) นอกจากนี้ Virto และคณะ (1993) ตรึงไลเปส OF บนแอคคูเรลขนาด 200-400 ไมโครเมตร พบว่า กิจกรรมที่ยึดเกาะมีค่าเท่ากับร้อยละ 21 เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์ จากผลการทดลองนี้จึงคัดเลือกแอคคูเรลขนาดเล็กกว่า 200 ไมโครเมตรใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.2 การตรึงเอนไซม์แบบแลกเปลี่ยนประจุบน Amberlite XAD-4

ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพบน Amberlite XAD-4 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงจาก 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรประสิทธิภาพการยึดเกาะมีค่า

ตารางที่ 9 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบนแอคคูเรลขนาด 200-400 ไมโครเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนที่ยึดเกาะ[a] (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ[b] (%)	กิจกรรมที่ยึดเกาะ[c] (%)
0.20	1.96	98.13	14.15
0.40	7.16	98.69	14.84
0.60	9.27	98.21	14.91
0.80	11.87	98.90	16.34
1.00	20.53	98.91	16.33
1.50	31.48	98.50	13.91
2.00	41.42	98.37	13.67
2.50	45.01	98.52	13.21

หมายเหตุ :

[a]ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของตัวพยุง

[b]ประสิทธิภาพการยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด – กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$

[c]กิจกรรมที่ยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ตรึงรูป}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$

ตารางที่ 10 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบนแอคคูเรลขนาดเล็กกว่า 200 ไมโครเมตร

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนที่ยึดเกาะ[a] (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ[b] (%)	กิจกรรมที่ยึดเกาะ[c] (%)
0.20	1.30	97.80	31.11
0.40	1.97	98.80	20.51
0.60	3.30	99.09	16.51
0.80	5.98	98.57	12.10
1.00	14.61	98.89	12.64
1.50	20.97	98.56	9.79
2.00	28.43	98.20	9.47
2.50	28.33	98.19	9.02

หมายเหตุ :

[a]ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของตัวพยุง

[b]ประสิทธิภาพการยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด – กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$

[c]กิจกรรมที่ยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ตรึงรูป}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$

ลดลงจากร้อยละ 68.36 เหลือร้อยละ 57.63 ในขณะเดียวกันกิจกรรมของเอนไซม์ที่ยึดเกาะบนตัวพยุงลดลงจากร้อยละ 0.91 เหลือร้อยละ 0.07 (ตารางที่ 11) ซึ่งมีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมที่ยึดเกาะตัวพยุงชนิดอื่นๆ อาจเป็นไปได้ว่า Amberlite XAD-4 มีขนาดอนุภาคที่โตทำให้มีพื้นที่ผิวน้อยและลักษณะการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงมีลักษณะไปบดบังบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียไป Yang และ Rhee (1992) ตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บน Amberlite XAD-7 พบว่ากิจกรรมที่ยึดเกาะของเอนไซม์มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.3

3.3 การตรึงเอนไซม์แบบแลกเปลี่ยนประจุบน DEAE-Sephadex A50

การทดลองตรึงไลเปส OF แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-Sephadex A50 โดยใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.2 ถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์มีประสิทธิภาพการยึดเกาะกับตัวพยุงได้มากกว่าร้อยละ 95 ของกิจกรรมทั้งหมด (ตารางที่ 12) และมีกิจกรรมที่ยึดเกาะสูงกว่าร้อยละ 85 ของกิจกรรมเริ่มต้นในทุกระดับความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึง แสดงให้เห็นว่าการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน DEAE-Sephadex A50 สามารถใช้เอนไซม์ในระดับความเข้มข้นที่สูง โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่ไม่สูญเสีย แสดงว่าหมู่ของเอนไซม์ที่จับกับตัวพยุงไม่มีผลต่อการทำลายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Yang และ Rhee (1991) ซึ่งตรึงไลเปส OF บน DEAE-Sephadex A50 เช่นกัน พบว่า กิจกรรมที่ยึดเกาะของเอนไซม์มีค่าสูงกว่าร้อยละ 95 ของกิจกรรมเริ่มต้น ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงคัดเลือกใช้ DEAE-Sephadex A50 เป็นตัวพยุงที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์

3.4 การตรึงโดยวิธีการดูดซับบน PVC

การนำ PVC 2 ชนิด คือ PVC K58 และ PVC K66 มาใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้กลูตาราลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมมีผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14 พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF มีประสิทธิภาพการยึดเกาะโดยเฉลี่ยน้อยกว่าร้อยละ 50 แต่ค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะของเอนไซม์ที่ตรึงบน PVC

ตารางที่ 11 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบน Amberlite XAD-4

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนที่ยึดเกาะ[a] (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ[b] (%)	กิจกรรมที่ยึดเกาะ[c] (%)
0.20	0.24	68.36	0.91
0.40	0.44	59.81	0.63
0.60	1.14	59.57	0.45
0.80	1.28	61.28	0.32
1.00	8.04	66.86	0.33
1.50	11.57	56.76	0.20
2.00	15.86	56.28	0.15
2.50	18.84	57.63	0.07

หมายเหตุ :

[a]ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของตัวพยุง

[b]ประสิทธิภาพการยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด – กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$

[c]กิจกรรมที่ยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ตรึงรูป}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$

ตารางที่ 12 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบน DEAE-Sephadex A50

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนที่ยึดเกาะ[a] (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ[b] (%)	กิจกรรมที่ยึดเกาะ[c] (%)
0.20	0.01	97.16	97.81
0.40	0.02	96.97	99.24
0.60	0.03	97.60	89.31
0.80	0.05	97.83	86.06
1.00	0.40	96.91	91.02
1.50	0.50	97.44	93.80
2.00	0.66	97.04	99.57
2.50	0.71	96.82	89.03

หมายเหตุ :

[a]ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของตัวพยุง

[b]ประสิทธิภาพการยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด} - \text{กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$

[c]กิจกรรมที่ยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ตรึงรูป}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$

ตารางที่ 13 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบน PVC K66

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนที่ยึดเกาะ[a] (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ[b] (%)	กิจกรรมที่ยึดเกาะ[c] (%)
0.10	0.03	34.85	0.36
0.20	0.12	44.70	0.21
0.40	0.41	53.15	0.12
0.60	0.70	42.84	0.08
0.80	1.24	40.57	0.06
1.00	2.34	41.97	0.05
1.50	4.71	35.22	0.03
2.00	8.35	32.03	0.02

หมายเหตุ :

[a]ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของตัวพยุง

[b]ประสิทธิภาพการยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด – กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$

[c]กิจกรรมที่ยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ตรึงรูป}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$

ตารางที่ 14 ผลความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส OF ต่อการตรึงบน PVC K58

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนที่ยึดเกาะ[a] (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง)	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ[b] (%)	กิจกรรมที่ยึดเกาะ[c] (%)
0.10	0.06	50.09	0.29
0.20	0.15	52.46	0.16
0.40	0.41	46.26	0.08
0.60	0.77	41.67	0.06
0.80	1.24	34.13	0.05
1.00	2.34	31.76	0.04
1.50	4.71	30.81	0.03
2.00	8.35	37.62	0.02

หมายเหตุ :

[a]ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ = ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนัก 1 กรัมของตัวพยุง

[b]ประสิทธิภาพการยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด – กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย}}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}} \times 100$

[c]กิจกรรมที่ยึดเกาะ = $\frac{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ตรึงรูป}}{\text{กิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์อิสระ}} \times 100$

K58 และ PVC K66 ที่สูงสุดมีเพียงร้อยละ 0.29 และ 0.36 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึงบน PVC ทั้ง 2 ชนิดเป็น 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมที่ยึดเกาะของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 0.02 ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ของ PVC ส่งผลต่อการทำลายโครงสร้าง 3 มิติทำให้คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไป

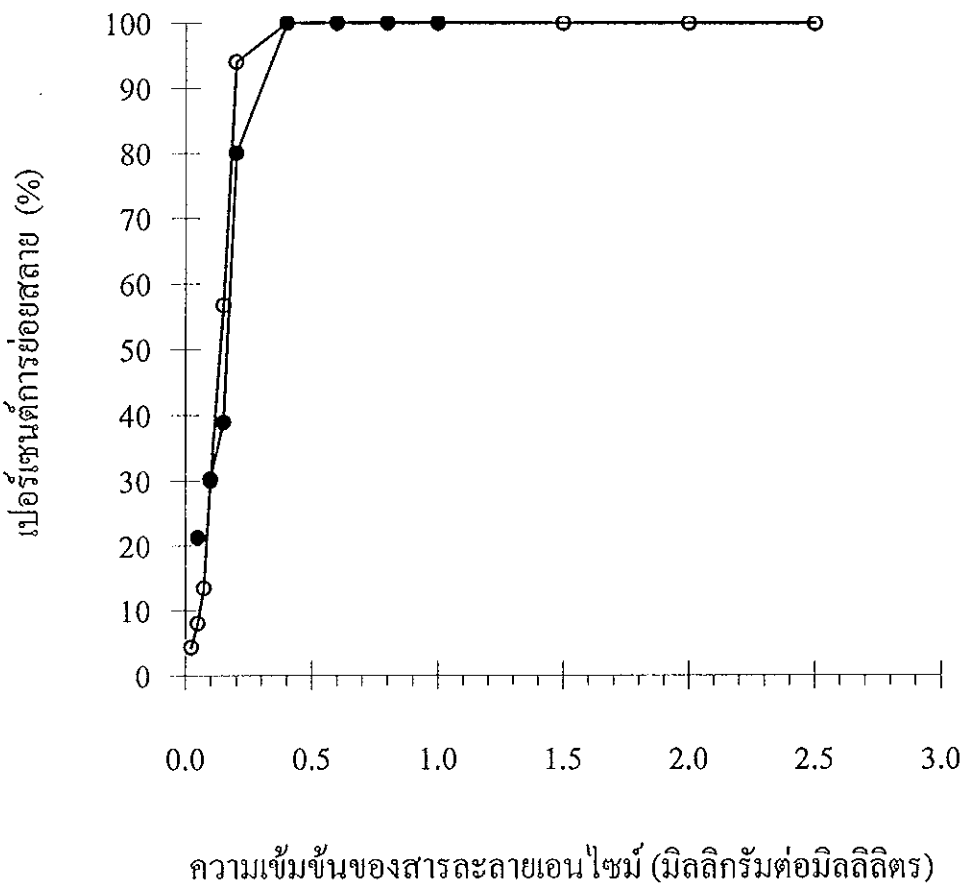
4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนตัวพยุงที่คัดเลือก

4.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์

การคัดเลือกระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 โดยใช้สารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาใช้ในขั้นตอนการตรึง แล้วนำเอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรล และDEAE-Sephadex A50 2 และ 10 มิลลิกรัม ตามลำดับไปย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทน เข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึง เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 12) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์มากกว่า 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับใช้ในการตรึงเอนไซม์เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

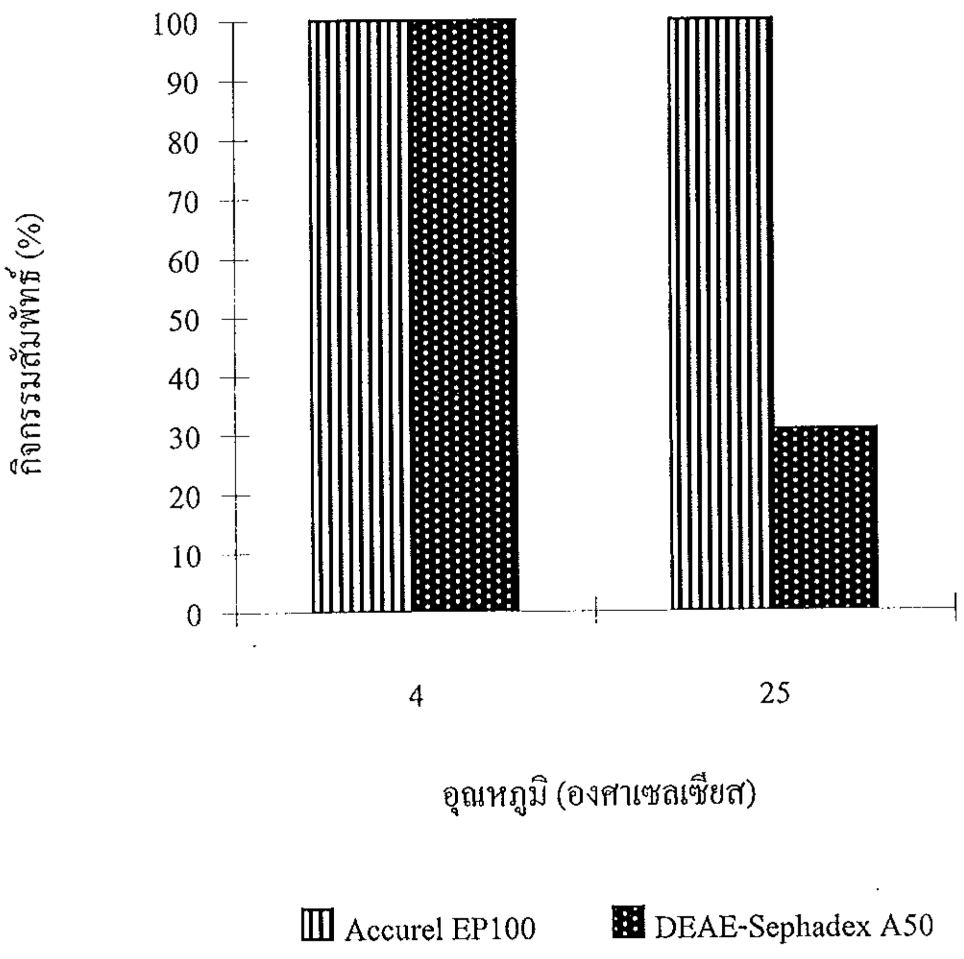
4.2 อุณหภูมิในการตรึง

การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนแอคคูเรลและ DEAE-Sephadex A50 ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การตรึงเอนไซม์บนแอคคูเรลที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากัน (ภาพที่ 13) เนื่องจากเอนไซม์จะเข้าไปจับอยู่ภายในรูพรุนอย่างรวดเร็ว (Montero, *et al.*, 1993) ทำให้สามารถป้องกันการเสียสภาพเนื่องจากความร้อนได้ดี แต่ในกรณีของ DEAE-Sephadex A50 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงเป็น 25 องศาเซลเซียส พบว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของ



ภาพที่ 12 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ตรึงต่อประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีน

สภาวะที่ใช้ในการตรึง : สารละลายเอนไซม์ 20 มิลลิลิตร และแอคคูเรล 200 มิลลิกรัม หรือ DEAE-Sephadex A50 10 กรัม (กิจกรรมของเอนไซม์ 48.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัม)



ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF

กิจกรรมที่ยึดเกาะลดลงเหลือร้อยละ 30.58 เมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 4 สำหรับตรึงเอนไซม์บน DEAE-Sephadex A50 และ 25 องศาเซลเซียสสำหรับตรึงเอนไซม์บนแอคคูเรล

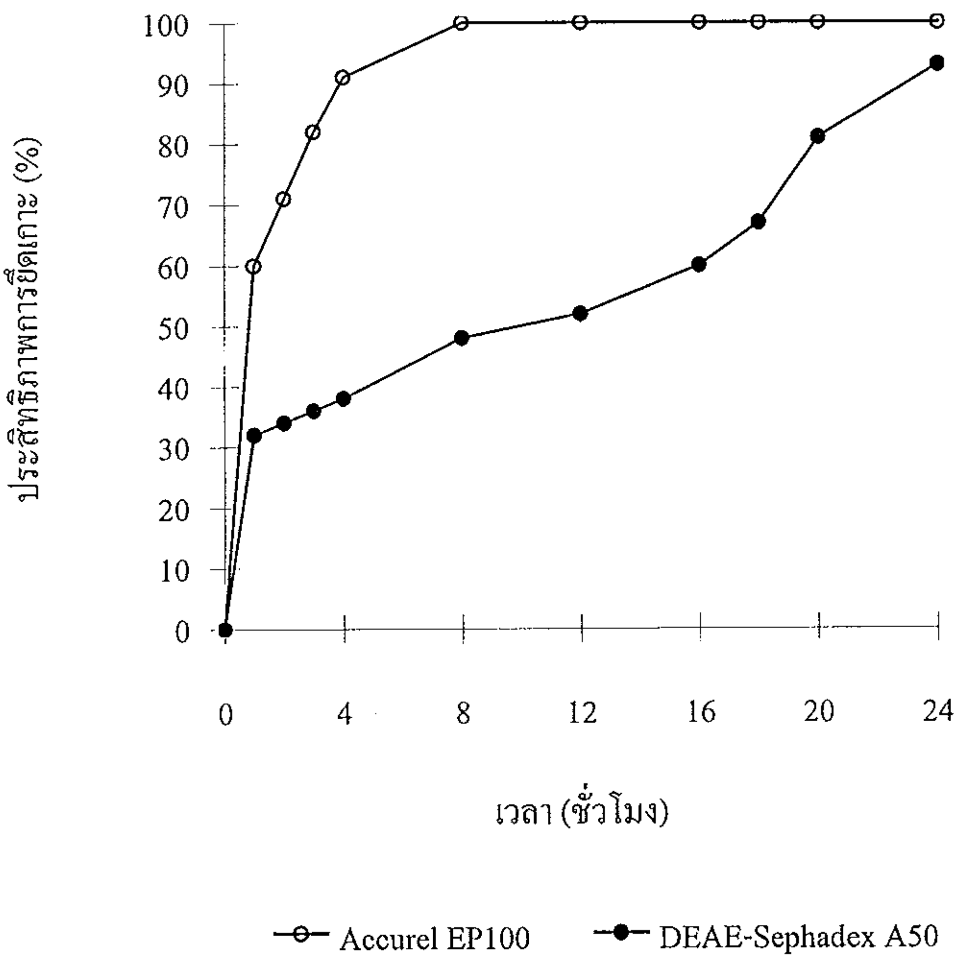
4.3 ระยะเวลาการตรึง

การศึกษาถึงระยะเวลาที่ใช้สำหรับการเกาะกันอย่างสมบูรณ์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง ทำการทดลองโดยใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับแอคคูเรล 200 มิลลิกรัมและ DEAE-Sephadex A50 10 กรัม ตามลำดับ บ่มบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF จับแอคคูเรลอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการบ่ม โดยจะจับกันอย่างสมบูรณ์เมื่อบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ภาพที่14) Montero และคณะ (1993) ตรึงเอนไซม์ไลเปส OF กับแอคคูเรลโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเท่ากับ 953 ยูนิต พบว่าหลังจากนาทีแรกของการบ่มร้อยละ 64 ของกิจกรรมทั้งหมดจะหายไปจากสารละลายและจะจับกันอย่างสมบูรณ์หลังจากใช้เวลาในการบ่มเพียง 30 นาที สำหรับระยะที่ใช้ในการจับกันระหว่างสารละลายเอนไซม์ไลเปส OF กับ DEAE-Sephadex A50 พบว่าประสิทธิภาพการยึดเกาะจะเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการบ่มซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์กับ DEAE-Sephadex A50 คือมากกว่า 24 ชั่วโมงซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับรายงานของ Yang และ Rhee (1991)

5. คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

5.1 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

จากการทดลองหาค่า K_m และ V_{max} ของไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลและ DEAE-Sephadex A50 ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในไอโซออกเทนระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เมื่อนำค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของสับสเตรทมาเขียนในรูป Lineweaver-Burk double reciprocal plot กราฟที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรงโดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.944 และ 0.992 สำหรับ



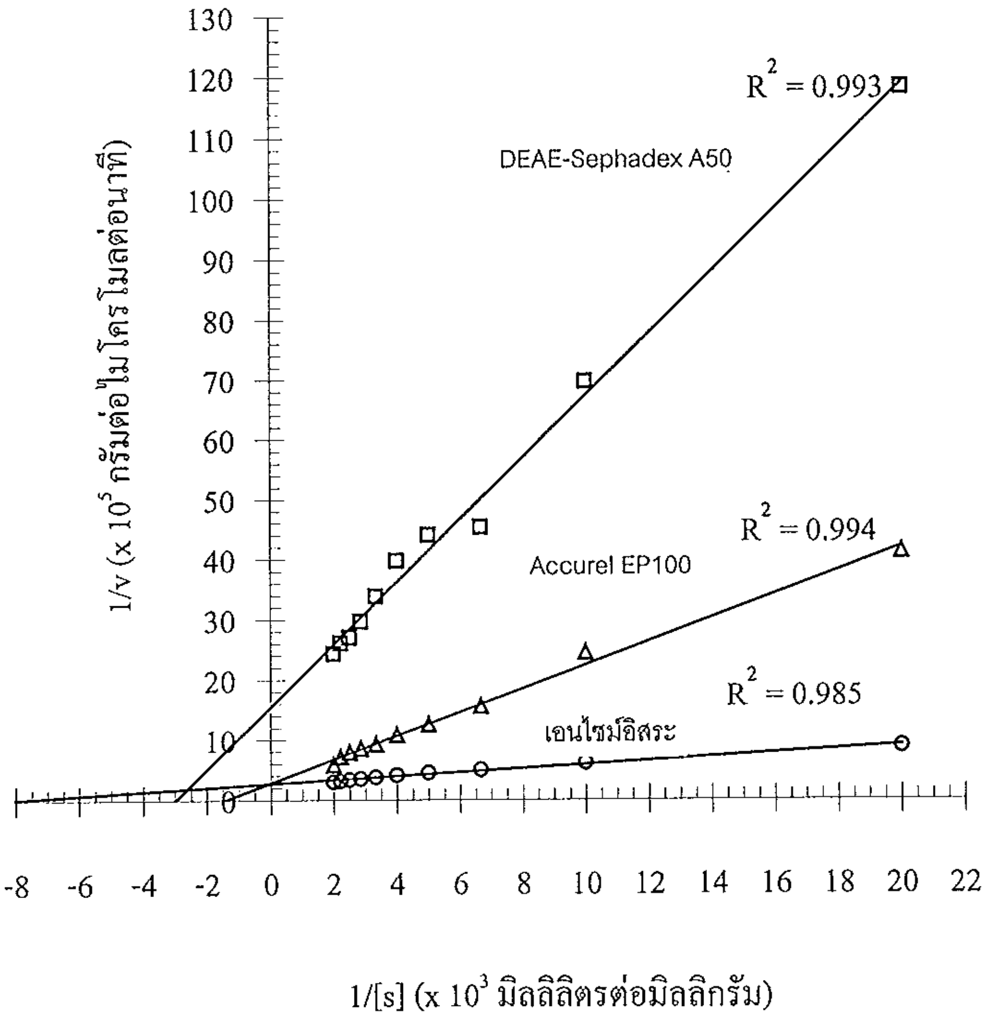
ภาพที่ 14 ผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF

ไลเปสที่ตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 ตามลำดับ (ภาพที่ 15) เมื่อใช้ค่าจุดตัดบนแกน x และ y ไปหาค่า K_m และ V_{max} พบว่า เอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรลและ DEAE-Sephadex A50 มีค่า K_m เท่ากับ 625 (733 มิลลิโมลาร์) และ 333 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (390 มิลลิโมลาร์) ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์อิสระมีค่า K_m เท่ากับ 133 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (156 มิลลิโมลาร์) แสดงว่า ไลเปสที่ตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 มีค่าสัมพรรคภาพต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนลดลง 5 และ 2 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ในระหว่างขั้นตอนการตรึงทำให้ความจำเพาะต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มลดต่ำลง และปัญหาข้อจำกัดเกี่ยวกับการถ่ายโอนมวลสารของสับสเตรทเข้าไปสู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ที่ถูกตรึง (Arica, *et al.*, 1998) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลค่าสัมพรรคภาพต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนลดต่ำมากเนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่จับอยู่ภายในบริเวณรูพรุน แต่ขนาดเม็ดอนุภาคของน้ำมันโดยเฉลี่ยมีขนาดโตกว่าขนาดช่องว่างโดยเฉลี่ยของรูพรุนทำให้เกิดปัญหาต่อการเคลื่อนที่ของสับสเตรทเข้าสู่บริเวณภายในรูพรุนของแอคคูเรลเกิดขึ้นได้ยาก (Montero, *et al.*, 1992; Virto, *et al.*, 1994)

สำหรับค่า V_{max} ของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 มีค่าเท่ากับ 3.3×10^4 และ 6.6×10^3 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมเอนไซม์ ในขณะที่เอนไซม์อิสระมีค่า V_{max} เท่ากับ 3.3×10^4 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมเอนไซม์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนแอคคูเรลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วหรือประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา แต่ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 มีค่า V_{max} ลดลง 5 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระซึ่งเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 มีความสามารถในการเกิดเอนไซม์สับสเตรทต่ำลง (Arica, *et al.*, 1998)

5.2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนของไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล DEAE-Sephadex A50 โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 60 องศา-



ภาพที่ 15 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและที่ถูกตรึงต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทน

ตารางที่ 15 ค่าจลนพลศาสตร์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนของไลเปส OF อิสระและตรึงรูป

ตัวพยุง	K_m (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	V_{max} (ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัม)
เอนไซม์อิสระ	133 (156 มิลลิโมลาร์)	3.3×10^4
Accurel EP100	625 (733 มิลลิโมลาร์)	3.3×10^4
DEAE-Sephadex A50	333 (390 มิลลิโมลาร์)	6.6×10^3

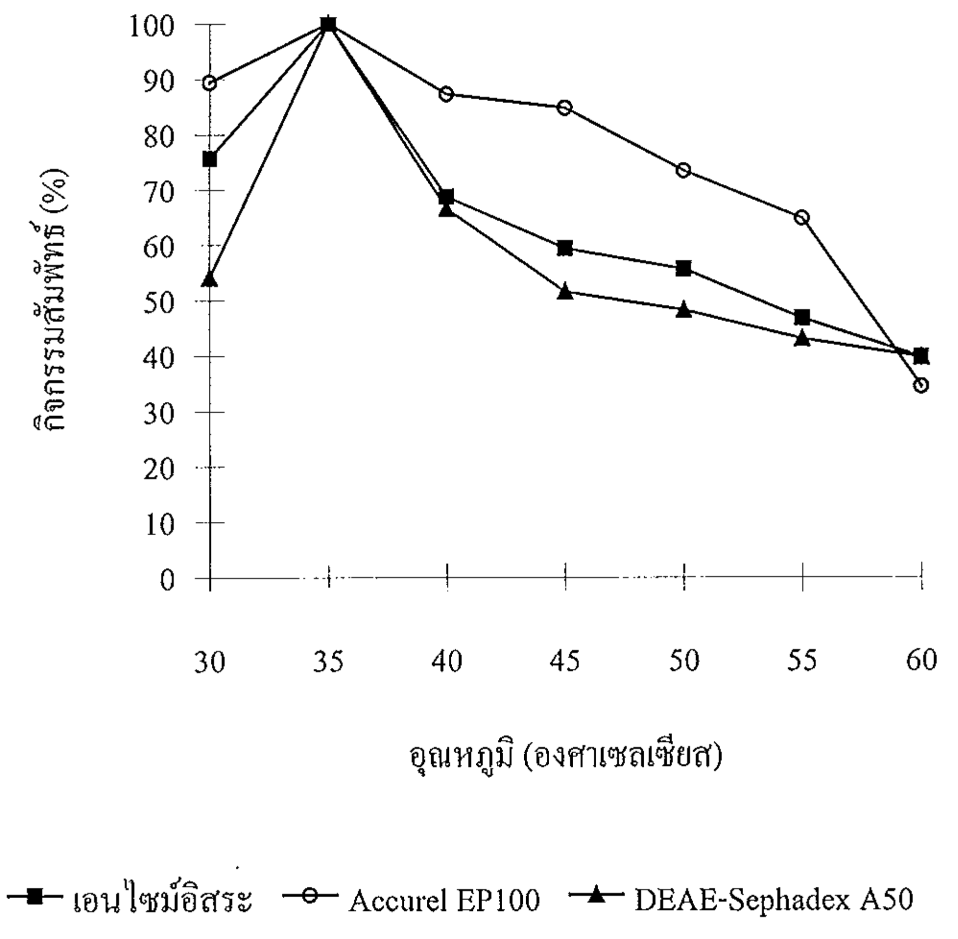
เซลเซียส พบว่า ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงทั้ง 2 ชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เหมือนกับเอนไซม์อิสระคือ 35 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 16) จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 85 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Montero และคณะ (1992) และวุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลคือ 45 องศาเซลเซียส เมื่อใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์มโอเลอีนเป็นสับสเตรท ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลสามารถเร่งปฏิกิริยาในช่วงอุณหภูมิสูง จึงสามารถช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของสับสเตรทเข้าสู่บริเวณภายในรูพรุนของตัวพยุงได้ดี (Seong and Omar, 1991)

5.3 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

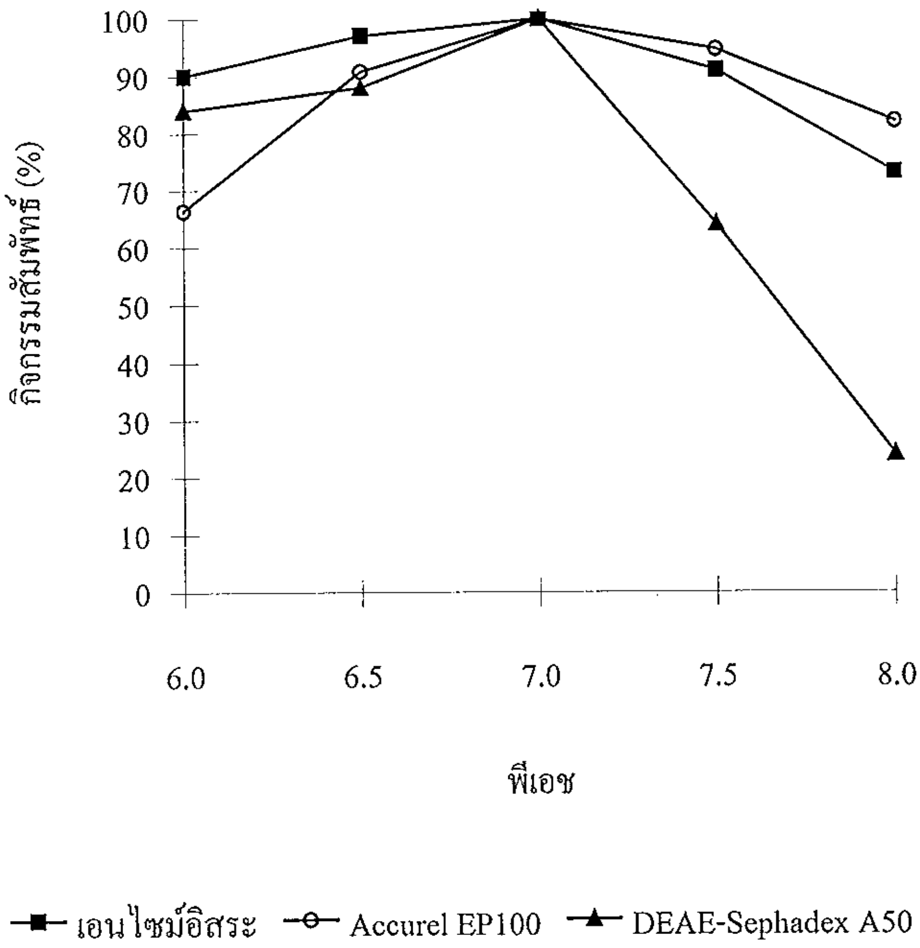
การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนของไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับพีเอชต่างกัน พบว่า ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงทั้งสองชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เหมือนกับเอนไซม์อิสระ คือพีเอช 7.0 (ภาพที่ 17) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Brady และคณะ (1988) และ Montero และคณะ (1992) ซึ่งตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนแอคคูเรล และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yang และ Rhee (1991) ซึ่งตรึงไลเปส OF บน DEAE-Sephadex A50 การที่พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงน่าจะเนื่องจากการตรึงโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพ และแบบแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำลายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์น้อย ทำให้คุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

5.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

โดยทั่วไปแล้วปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ จะทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เพราะต้องการพลังงานในการกระตุ้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เช่นเดียวกัน แต่เนื่องจาก



ภาพที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป



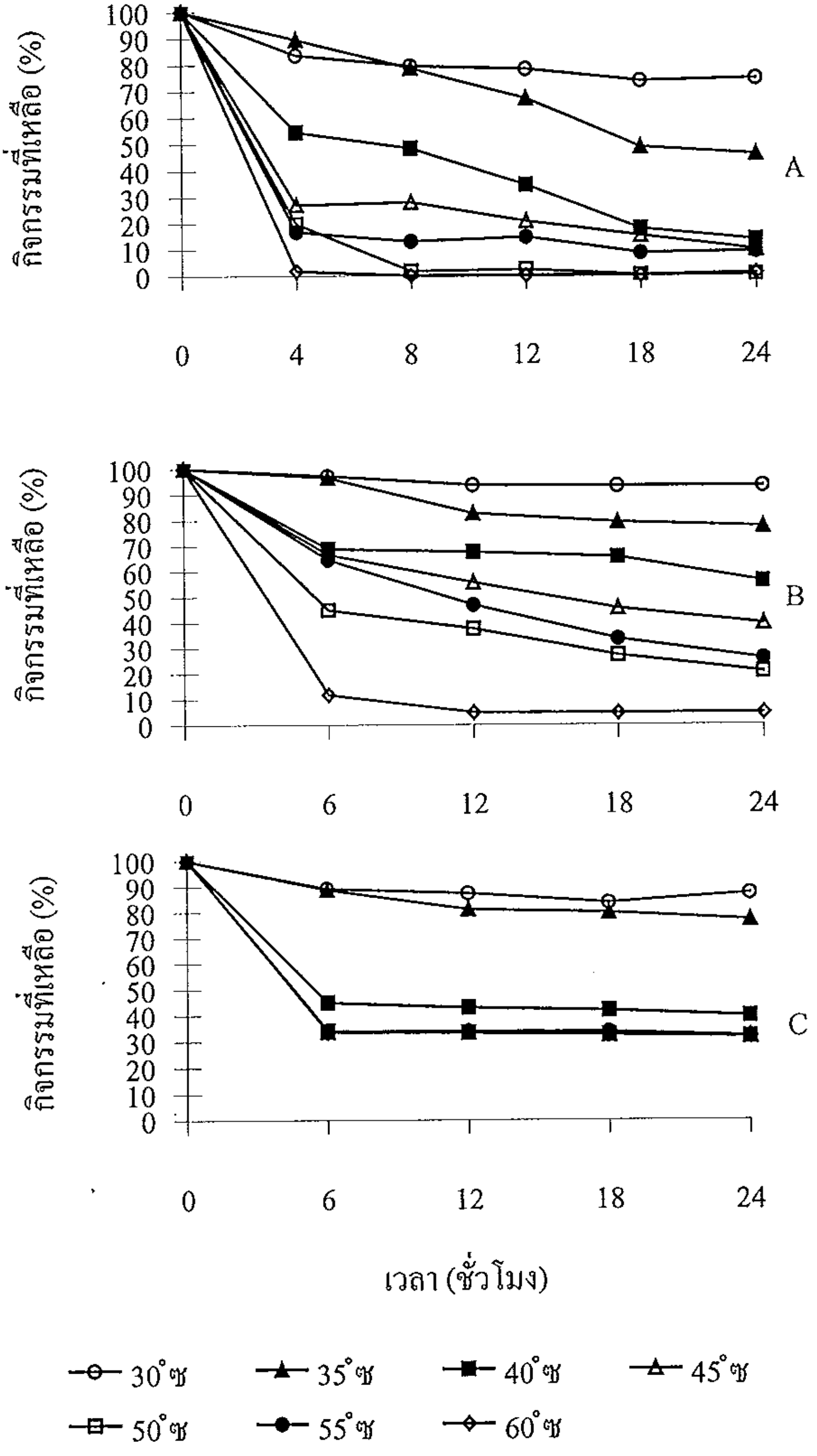
ภาพที่ 17 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนมักจะไม่ค่อยคงตัวต่อความร้อน ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามการตรึงเอนไซม์บางวิธีจะสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนได้ ทำให้เพิ่มแนวทางต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม

จากการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอคคูเรล และDEAE-Sephadex A50 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อิสระ (ภาพที่ 18) ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลมีความคงตัวต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 55 องศาเซียส โดยมี กิจกรรมที่เหลือเท่ากับร้อยละ 21 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะไลเปสอิสระสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อบ่มภายใต้สภาวะเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Brady และคณะ (1988) Montero และคณะ (1993) Virto และคณะ (1994) และวุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) การที่ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าไลเปสอิสระคงจะเนื่องจากโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของแอคคูเรลทำหน้าที่ช่วยในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในบริเวณรอบๆ ที่เอน-ไซม์เกาะอยู่ สำหรับไลเปส OF ที่ถูกบน DEAE-Sephadex A50 มีความคงตัวต่อความร้อนได้ดีกว่าไลเปสที่ตรึงบนแอคคูเรล โดยมีกิจกรรมที่เหลือมากกว่าร้อยละ 30 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

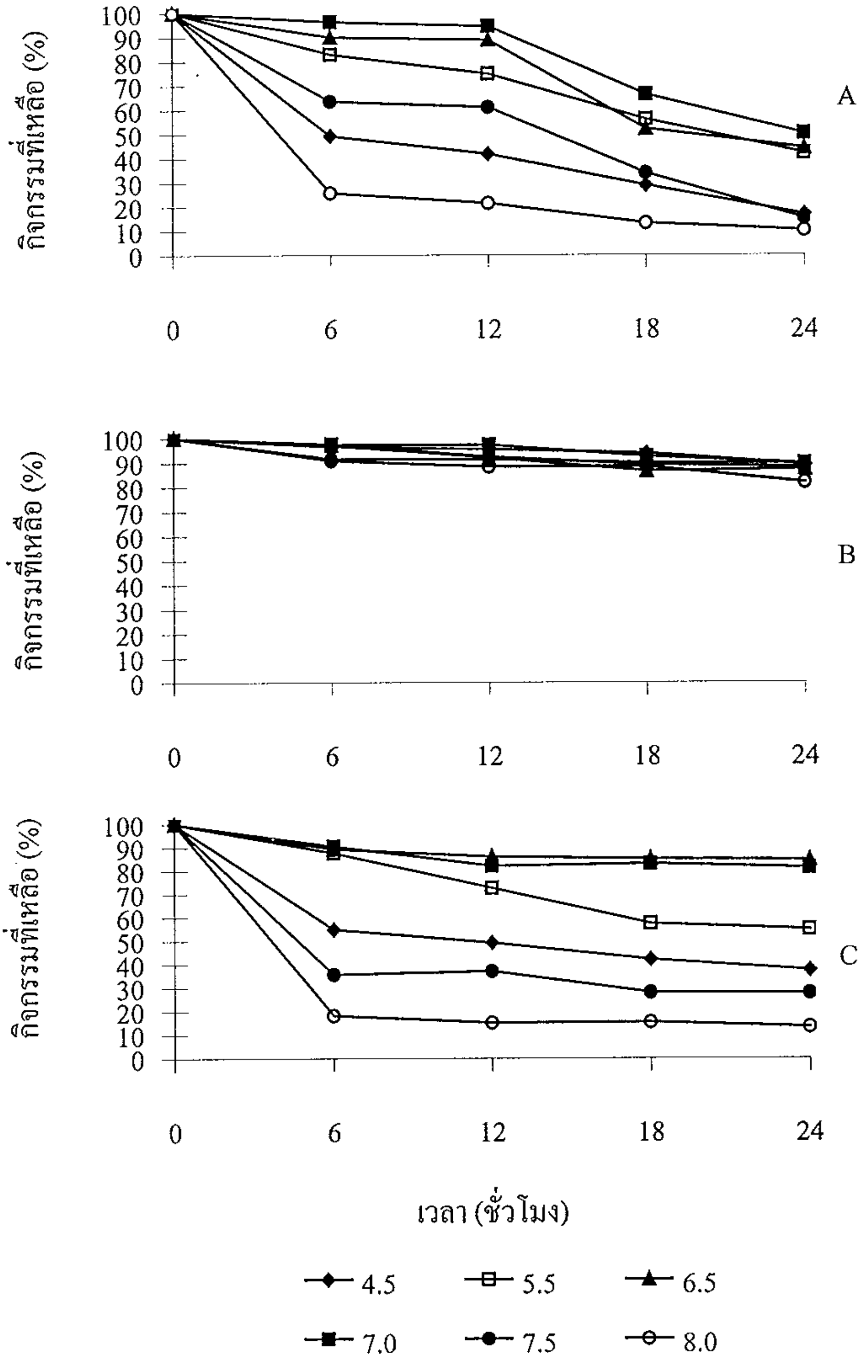
5.5 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอคคูเรลและ DEAE-Sephadex A50 โดยบ่มเอนไซม์ตรึงรูปในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชตั้งแต่ 4.5 ถึง 8.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ไลเปส OF ที่ตรึงบนตัวพยุงทั้ง 2 ชนิดมีความคงตัวต่อพีเอชสูงกว่าไลเปสอิสระในทุกระดับค่าของพีเอชที่ใช้ในการศึกษา (ภาพที่ 19) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลมีกิจกรรมที่เหลือมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ถึง 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่ง Montero และคณะ (1993) ตรึงไลเปส OF บนแอคคูเรลก็ให้ผลทำนองเดียวกัน เนื่องจากแอคคูเรลมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ และรวมตัวกันเป็นกลุ่มทำให้ความสามารถในการถ่ายโอนมวลสารจากบริเวณภายนอกเข้าไปสู่บริเวณรอบๆ ที่เอนไซม์เกาะอยู่เกิดขึ้นยากทำให้ลดการสูญเสียกิจกรรม สำหรับกรณีเอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 พบว่า



ภาพที่ 18 ความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป

(A = เอนไซม์อิสระ, B = Accurel EP100, C = DEAE-Sephadex A50)



ภาพที่ 19 ความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระและตรึงรูป

(A = เอนไซม์อิสระ, B = Accurel EP100, C = DEAE-Sephadex A50)

เอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจาก DEAE-Sephadex A50 มีคุณสมบัติชอบน้ำทำให้ความสามารถในการแพร่ของสารละลายบัฟเฟอร์ จากภายนอกเข้าสู่บริเวณรอบๆ ที่เอนไซม์เกาะอยู่เกิดขึ้นได้ง่าย ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมรอบๆ เอนไซม์เกิดเปลี่ยนแปลงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

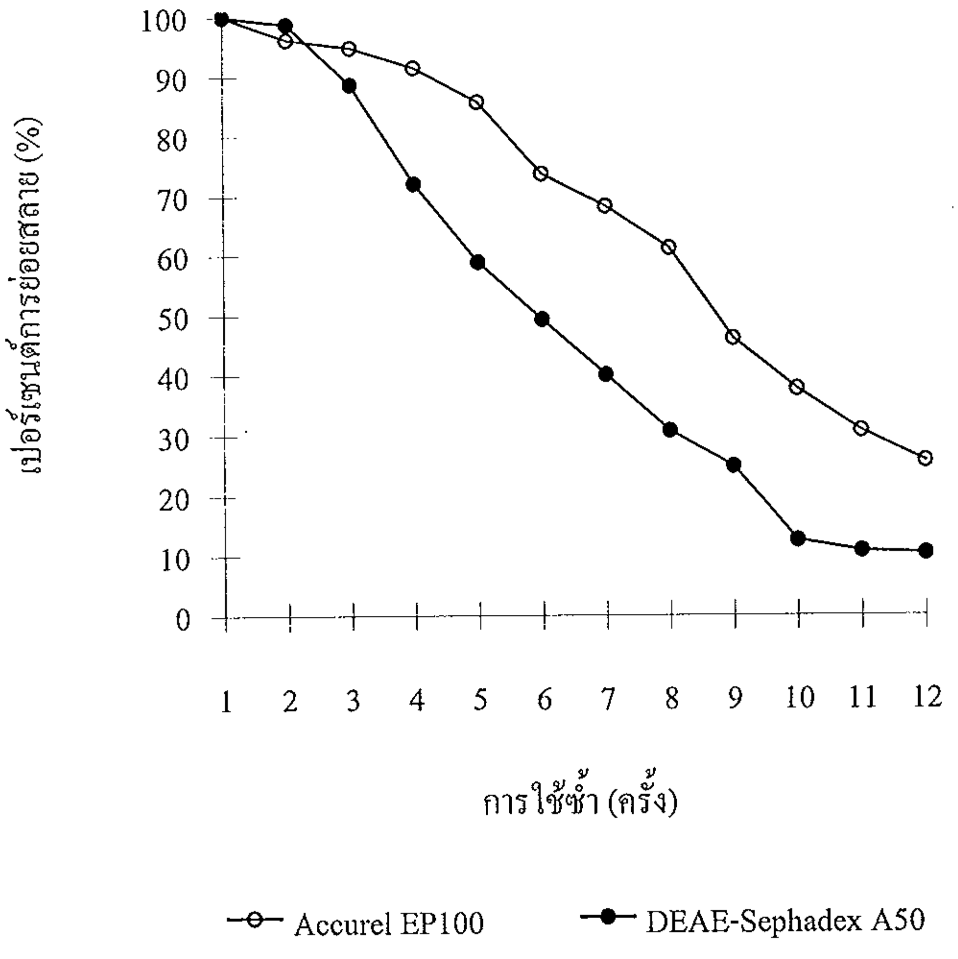
5.6 ความคงตัวต่อการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

การนำเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 มาย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ละลายในไอโซออกเทนเข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิห้องหลายๆ ครั้งโดยแยกผลิตภัณฑ์นำมาวัดเปอร์เซนต์การย่อยสลายที่เวลา 24 ชั่วโมงแล้วเติมสับสเตรทใหม่ลงไปในปริมาตรที่เท่าเดิม พบว่า ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอคคูเรลมีค่าครึ่งชีวิตในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 9 ครั้ง หรือ 216 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าไลเปส OF ที่ตรึงบน DEAE-Sephadex A50 คือมีค่าครึ่งชีวิตในการใช้งานเท่ากับ 6 ครั้ง หรือ 156 ชั่วโมง (ภาพที่ 20) ซึ่งเป็นไปได้ว่าแอคคูเรลมีความแข็งแรงมากกว่า DEAE-Sephadex A50 ทำให้เกิดการเสียสภาพได้ยากและเอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกตรึงอยู่ในบริเวณภายในรูพรุนทำให้มีความคงตัวที่สูงกว่า อายุการใช้งานจึงสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม วุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) ใช้ไลเปส OF ที่ตรึงบนแอคคูเรลย่อยสลายสารละลายอิมัลชันของน้ำมันปาล์มโอเลอีนในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตในการใช้งาน 12 ครั้ง

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์

6.1 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิด คือ ไอโซออกเทน เฮปเทน เฮกเซน ไฮโซโปรพิวอีเทอร์ ไฮโซโปรพานอล และบิวทิลแอลกอฮอล์ ที่ใช้ในการละลายน้ำมันปาล์มโอเลอีน ต่อประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปส ตรึงรูป พบว่า การย่อยสลายน้ำมันปาล์มเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ เฮปเทน เฮกเซน และไอโซโปรพิวอีเทอร์ พบว่า เปอร์เซนต์การย่อยสลายลดลง



ภาพที่ 20 การนำเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่

ตารางที่ 16 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยไลเปส OF ตรึงรูป

ตัวทำละลาย	Log P*	เปอร์เซนต์การย่อยสลาย (%)	
		ตัวพยุง	
		Accurel EP100	DEAE-Sephadex A50
ไอโซออกเทน	4.8	99.82	100
เฮปเทน	4.0	54.17	69.78
เฮกเซน	3.5	44.41	57.08
ไอโซโพรพิวอีเทอร์	1.9	12.50	33.85
ไอโซโพรพานอล	<1	0	0
บิวทิวแอลกอฮอล์	<1	0	0

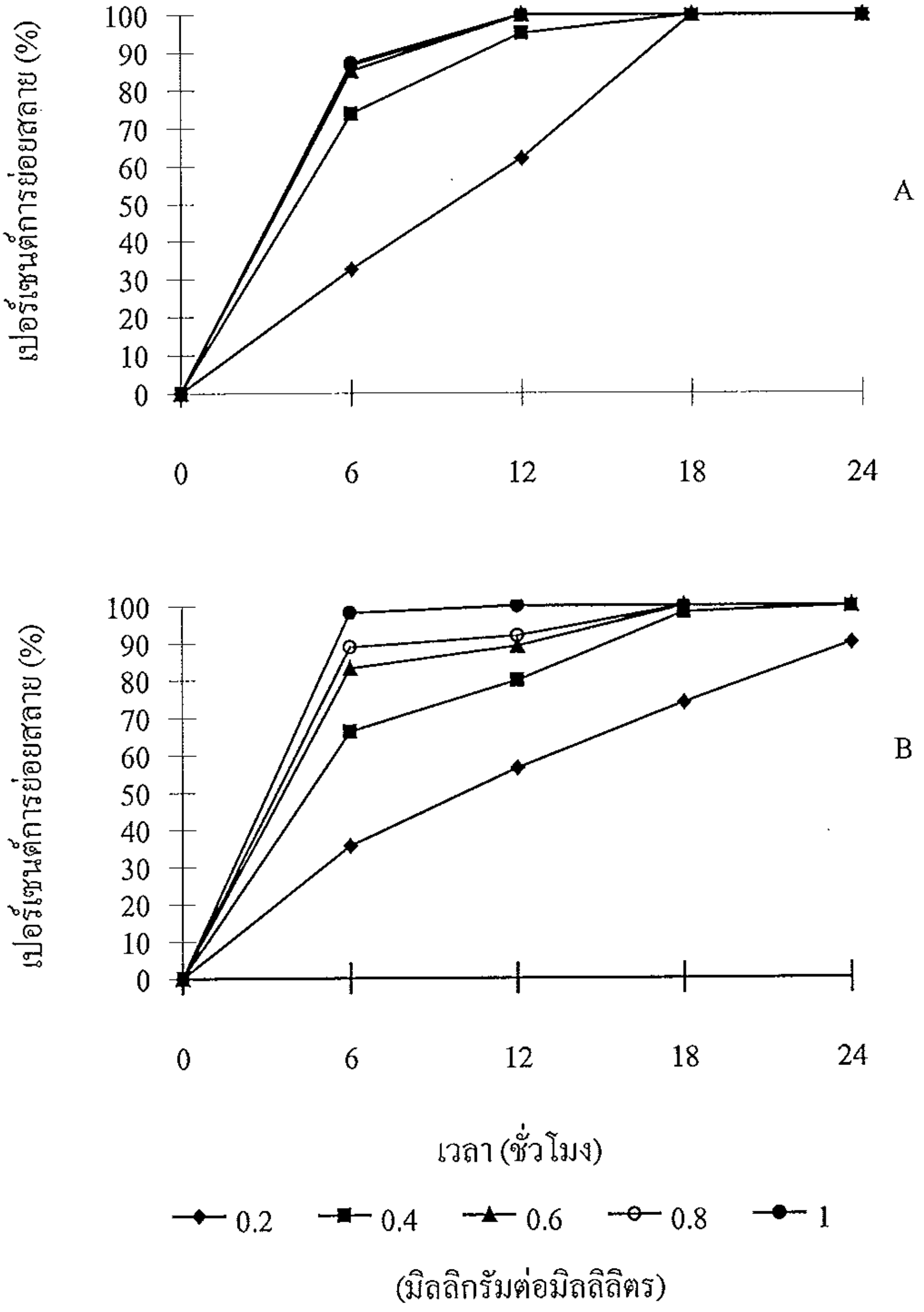
หมายเหตุ : * ค่า Log P ของตัวทำละลายอินทรีย์อ้างอิงจาก Laane และคณะ (1987)

เหลือร้อยละ 57.17 44.41 และ 12.50 สำหรับไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล และเหลือร้อยละ 69.78 57.08 และ 33.85 สำหรับไลเปสที่ถูกตรึงบน DEAE–Sephadex A50 ตามลำดับ ส่วนผลการใช้แอลกอฮอล์คือไอโซโปรพานอลและบิวทิลแอลกอฮอล์ พบว่าเอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ดี จะทำหน้าที่ดึงน้ำออกจากโครงสร้างของโปรตีนจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติทำให้โครงสร้าง α-helix ของไลเปสถูกทำลาย (Malcata, *et al.*, 1992)

จากผลการทดลองในตารางที่ 16 ไอโซออกเทนให้ค่าเปอร์เซนต์การย่อยสลายสูงสุด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติของค่า Log P ของไอโซออกเทนจากรายงานของ Laana และคณะ (1987) พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.8 ซึ่งมีค่าสูงและมีแนวโน้มใกล้เคียงกับค่า Log P ของน้ำมัน ทำให้น้ำมันปาล์มโอเลอีนมีความสามารถในการละลายในไอโซออกเทนได้ดี ส่งผลให้เกิดอิมัลชั่นได้ดีด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Kang และ Rhee (1989a) Yang และ Rhee (1991) Kim และ Rhee (1993) Hass และคณะ (1994) Virto และคณะ (1994) และ Yang และ Russell (1995)

6.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยสลาย

เมื่อตรึงไลเปส OF บนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 โดยใช้สารละลายเอนไซม์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.05 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเอนไซม์ที่ตรึงได้ 2 และ 10 มิลลิกรัม สำหรับเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลและ DEAE-Sphadex A50 ตามลำดับ มาย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายในไอโซออกเทน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนอย่างสมบูรณ์จะลดลงโดยเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึงทั้งสองชนิด (ภาพที่ 21) เมื่อใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส OF เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการตรึง เอนไซม์ตรึงรูปจะใช้เวลาในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนอย่างสมบูรณ์มากกว่า 24 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึงเป็น 1.0 มิลลิลิตร เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนอย่างสมบูรณ์ลดลงเหลือเพียง 6 ชั่วโมง แสดงว่าหากต้องการ



ภาพที่ 21 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ตรึงต่อระยะในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดย
เอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป (A=Accurel EP100, B=DEAE-Sephadex A50)
สภาวะที่ใช้ในการตรึง : สารละลายเอนไซม์ 20 มิลลิลิตร และแอคคูเรล 200 มิลลิกรัม
หรือ DEAE-Sephadex A50 10 กรัม (กิจกรรมของเอนไซม์ 48.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัม)

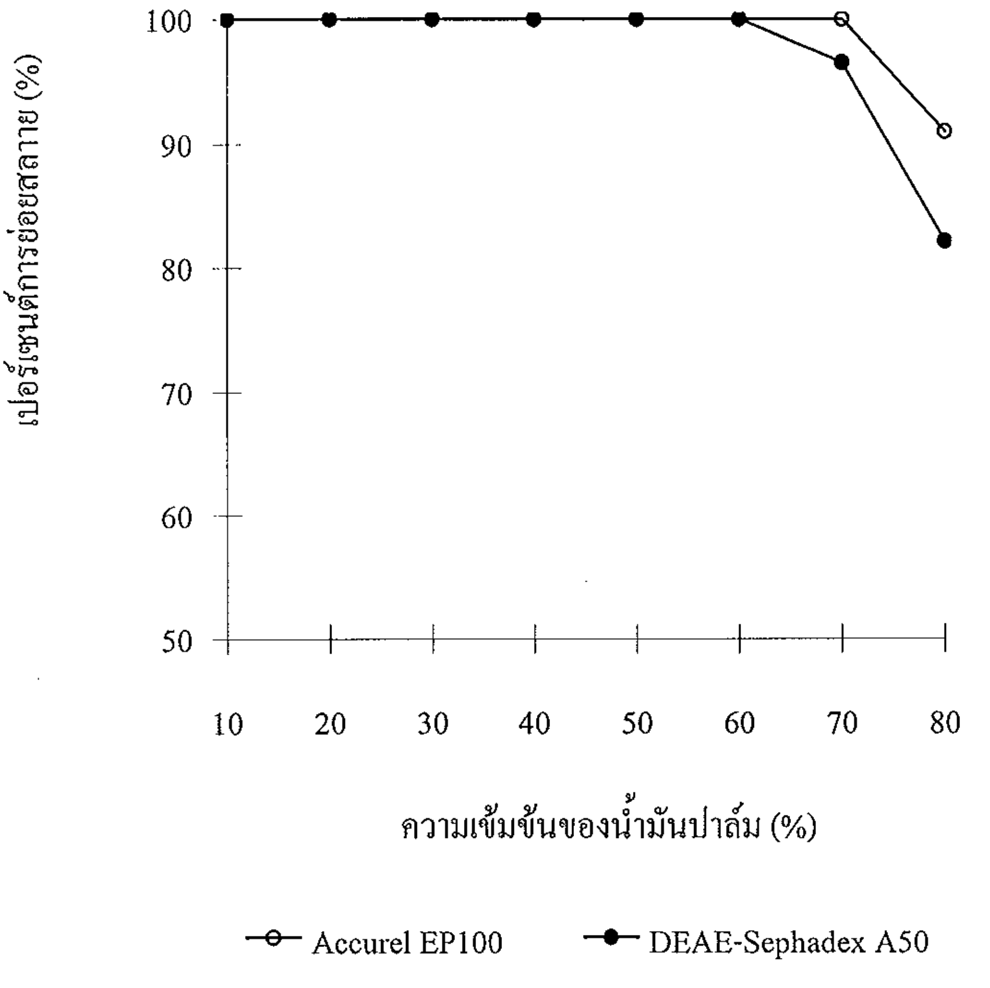
ลดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึง เนื่องจากตัวพยุงทั้งสองชนิดนี้สามารถตรึงไลเปสได้ในระดับความเข้มข้นที่สูง

6.3 ความเข้มข้นของน้ำมันในตัวทำละลายอินทรีย์

การเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนจากร้อยละ 10 ถึง 80 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วใช้เป็นสับสเตรทในปฏิกิริยาการย่อยสลาย พบว่าเมื่อใช้น้ำมันปาล์มความเข้มข้นร้อยละ 10 ถึง 60 การย่อยสลายเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 22) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มเป็นร้อยละ 70 การย่อยสลายเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์โดยลดลงเหลือร้อยละ 96.5 ทั้งนี้เนื่องจากสารผสมในปฏิกิริยาเกิดการแข็งตัวทำให้เกิดปัญหาต่อการผสม ซึ่งเกิดจากความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระที่สูงขึ้นโดยเฉพาะกรดปาล์มิติกซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ วุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) ซึ่งใช้ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลย่อยสลายสารละลายอิมัลชันของน้ำมันปาล์มโอเลอีน ความเข้มข้นสูงสุดของน้ำมันปาล์มที่ใช้ได้คือร้อยละ 10 เนื่องจากการใช้ระบบ two-phase emulsion system เอนไซม์ละลายอยู่ในส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ แต่สับสเตรทและผลิตภัณฑ์จะละลายอยู่ในส่วนของไอโซออกเทน (Kim and Rhee, 1993; Patel, *et al.*, 1995) ดังนั้นการใช้ไอโซออกเทนเป็นตัวทำละลายในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสามารถลดการยับยั้งปฏิกิริยาเนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ได้ นอกจากนี้ Virto และคณะ (1994) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทมีส่วนช่วยในการเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ เพราะบริเวณเร่งทั้งหมดของเอนไซม์จะจับกับสับสเตรท ทำให้สามารถป้องกันการถูกทำลายของเอนไซม์เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้

6.4 ผลของน้ำ

การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลและ DEAE-Sephadex A50 โดยเติมสารละลาย tris/maleate buffer เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในปฏิกิริยาการย่อยปริมาณที่แตกต่างกันคือ 0, 0.10, 0.20 0.30, 0.40 และ



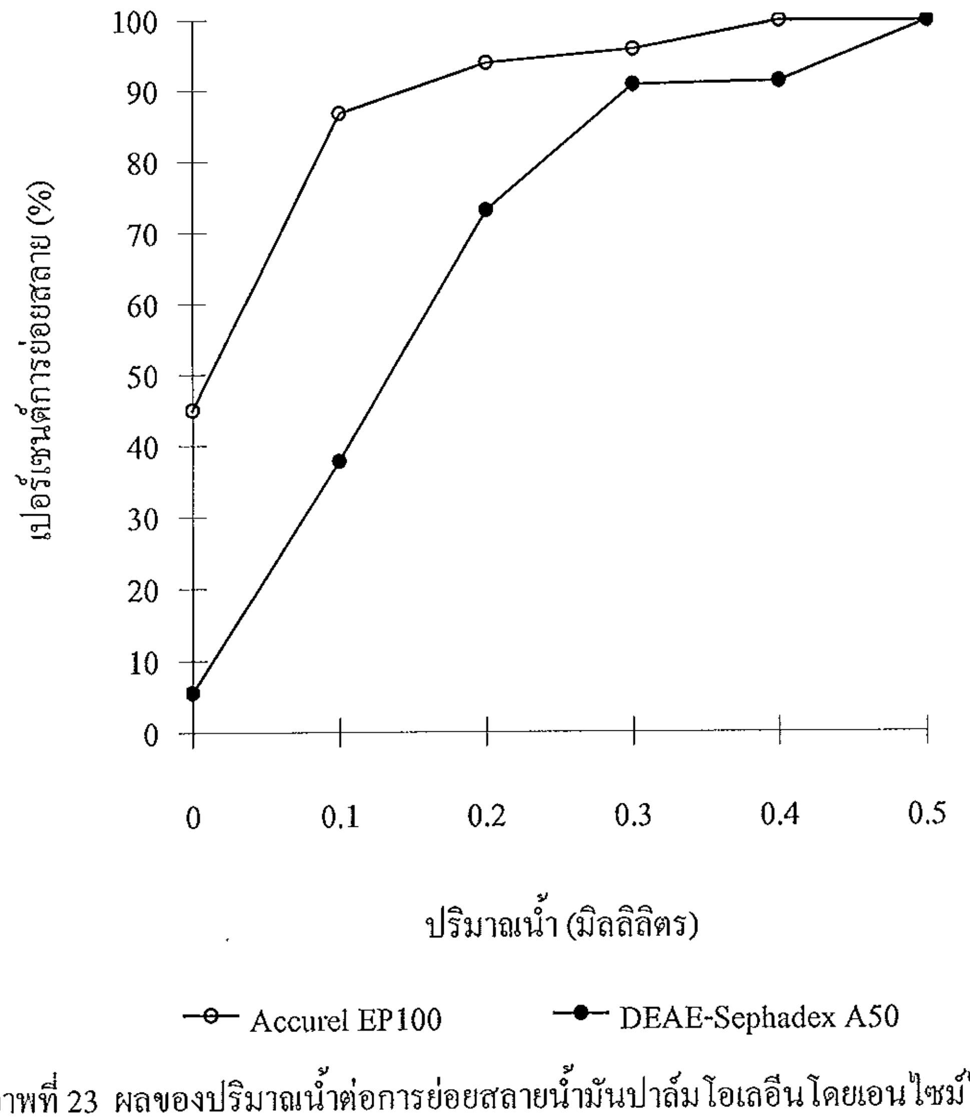
ภาพที่ 22 ผลความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอเลอีนต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป

สารผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ : น้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนเข้มข้นร้อยละ 10-80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, 100 mM. tris/maleate buffer พีเอช 7.0 0.5 มิลลิลิตร และเอนไซม์ตรึงรูป 2.0 มิลลิกรัม (แอคคูเรล) หรือ 10 มิลลิกรัม (DEAE-Sephadex A50)

0.50 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนระหว่างน้ำต่อสับสเตรทเท่ากับ 0, 1:10, 1:5, 3:10, 2:5 และ 1:2 ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มสัดส่วนของน้ำในปฏิกิริยา เปอร์เซนต์การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23) โดยที่สัดส่วนของปริมาณน้ำต่อสับสเตรทที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในไอโซออกเทนสำหรับเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงทั้งสองชนิดคือ 1:2 Yang และ Rhee (1991) ย่อยสลายน้ำมันมะกอกในไอโซออกเทนโดย ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 ในถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสัดส่วนของน้ำต่อสับสเตรทที่เหมาะสมเท่ากับ 0.28:1.0 จากผลการทดลองนี้สังเกตได้ว่าน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการเปลี่ยนแปลงสมดุลย์ของปฏิกิริยาการย่อยสลายในระบบ two-phase emulsion system เพราะหากปริมาณน้ำมีน้อยสมดุลย์ปฏิกิริยาจะเกิดแบบย้อนกลับ Hass และคณะ (1995) พบว่าไลเปสที่ถูกตรึงบนตัวพยุงแต่ละชนิดต้องการปริมาณน้ำต่อสับสเตรทที่เหมาะสมในสัดส่วนที่แตกต่างกัน และพบว่าถ้าใช้ปริมาณน้ำไม่เหมาะสมระยะเวลาที่ต้องใช้ในการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะเพิ่มขึ้น

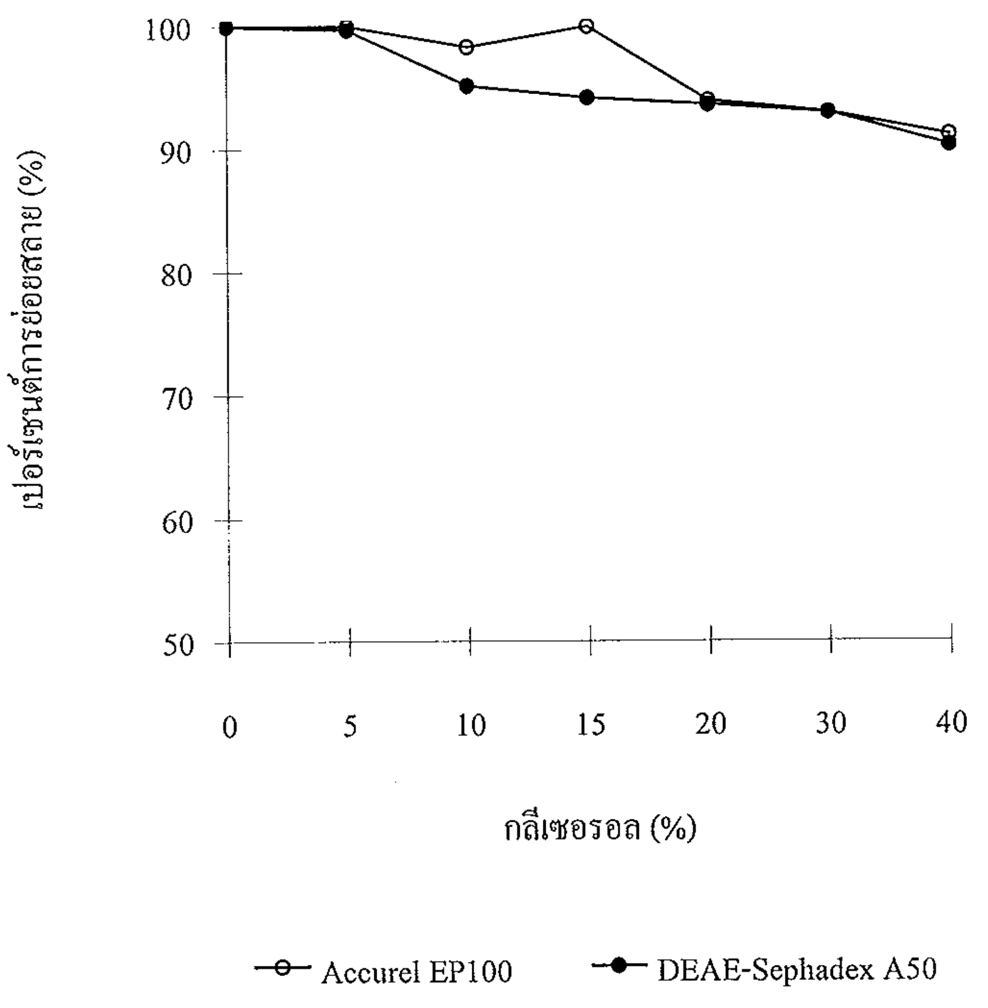
6.5 ผลของกลีเซอรอล

การศึกษาผลของกลีเซอรอลต่อความคงตัวและประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 โดยเติมกลีเซอรอลในสารละลาย tris/maleate buffer เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ก่อนผสมในปฏิกิริยาการย่อยสลายที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ำกว่าร้อยละ 30 ไม่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นร้อยละ 40 การย่อยสลายลดลงเหลือร้อยละ 90 (ภาพที่ 24) จากผลการทดลองนี้เห็นได้ว่าระดับความเข้นข้นของกลีเซอรอลที่สูงมากจะมีผลยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม Yang และ Rhee (1991) รายงานว่ากลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 15 ช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันเนื่องจากกลีเซอรอลเป็นสารที่ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีน



ภาพที่ 23 ผลของปริมาณน้ำต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป

สารผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ : น้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, 100 mM. tris/maleate buffer พีเอช 7.0 (น้ำ) ปริมาตรต่างๆ กัน และและเอนไซม์ตรึงรูป 2.0 มิลลิกรัม (แอคคูเรล) หรือ 10 มิลลิกรัม (DEAE-Sephadex A50)



ภาพที่ 24 ผลของกลีเซอรอลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป

สารผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ : น้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร, 100 mM. tris/maleate buffer พีเอช 7.0 ที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลเข้มข้นต่างๆ กันปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเอนไซม์ตรึงรูป 2.0 มิลลิกรัม (แอคคูเรล) หรือ 10 มิลลิกรัม (DEAE-Sephadex A50)

6.6 ผลของสารลดแรงตึงผิว

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในไอโซออกเทนของเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด โดยเติม AOT ในไอโซออกเทนที่ใช้ในการเตรียมสับสเตรทก่อนผสมในปฏิกิริยาการย่อยสลายเข้มข้น 0, 25, 50 และ 75 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลมีกิจกรรมในการย่อยสลายลดลงเมื่อเติม AOT โดยการย่อยสลายลดลงเหลือร้อยละ 17.5 เมื่อเติม AOT 25 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 17) สำหรับไลเปสที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 พบว่า การเติม AOT ในความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 50 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซนต์การย่อยสลายลดลงเหลือร้อยละ 82 แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทนสามารถเติม AOT เป็นสารช่วยลดแรงตึงผิวได้ ซึ่ง AOT มีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายแบบต่อเนื่องในคอลัมน์ เพราะสามารถช่วยลดปัญหาการถ่ายโอนมวลสาร และการอุดตันของสารในคอลัมน์ได้

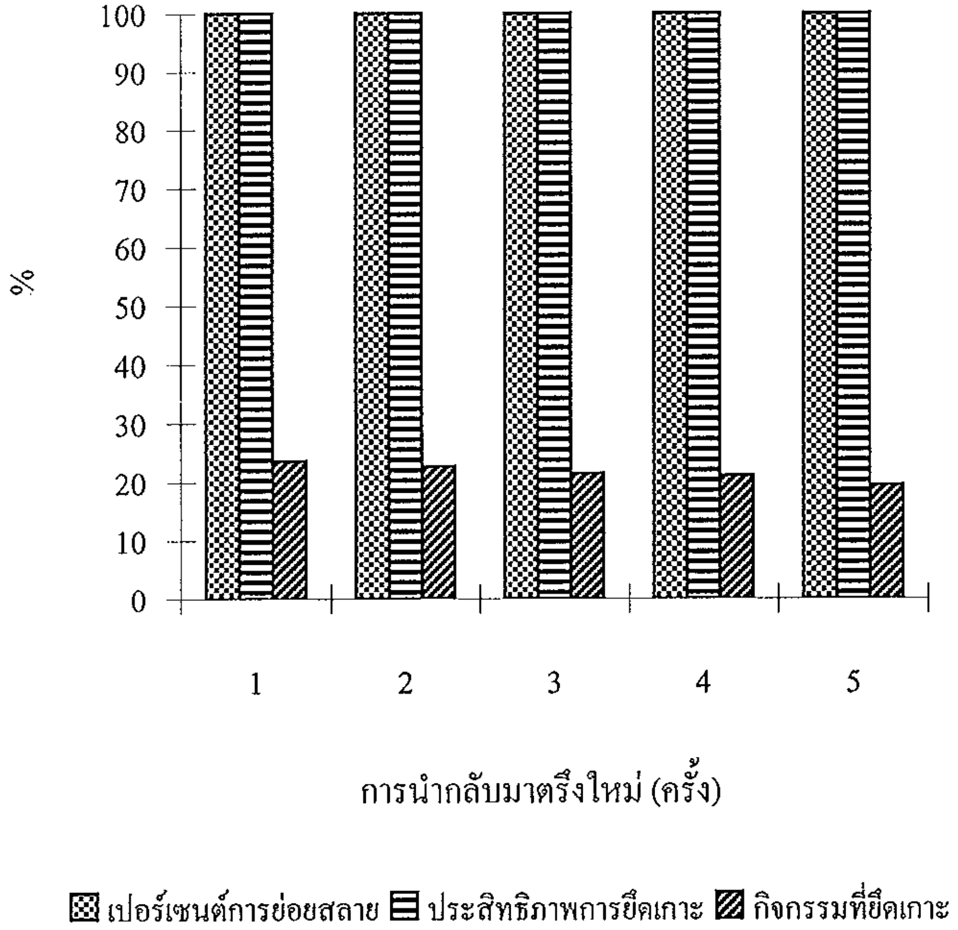
7. การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่

การนำแอคคูเรลที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ทำได้โดยการกำจัดกรดไขมัน และเอนไซม์ที่เกาะอยู่กับแอคคูเรลออก โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที กรอง และล้างกรดไขมันออกด้วยแอลกอฮอล์ จากนั้นแช่ในกรดเกลือเข้มข้น 6.0 นอร์มอล เป็นเวลา 2 นาที ล้างกรดออกจนหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวพยุงกลับมาตรึงเอนไซม์ใหม่ นำเอนไซม์ที่ตรึงได้ไปย่อยสลายน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า สามารถนำแอคคูเรลกลับมาตรึงเอนไซม์ใหม่ได้อย่างน้อย 5 ครั้ง โดยที่แอคคูเรลที่ใช้แล้วยังมีประสิทธิภาพการยึดเกาะกับเอนไซม์อย่างสมบูรณ์เมื่อตรึงโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำกลับมาใช้ใหม่ค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะลดลงจากร้อยละ 23.55 เหลือร้อยละ 19.42 เมื่อนำกลับมาตรึงใหม่ในครั้งที่ 5 (ภาพที่ 25) แต่การจับกันระหว่างเอนไซม์กับแอคคูเรลที่ใช้แล้วไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยเมื่อนำไลเปสตรึงรูปมาย่อยสลายน้ำมัน

ตารางที่ 17 ผลของ AOT ต่อกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออก-
เทน ของเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป

AOT (มิลลิโมลาร์)	เปอร์เซนต์การย่อยสลาย (%)	
	Accurel EP100	DEAE-Sephadex A50
0	100	100
25	17.5	100
50	15	82
75	15	49

หมายเหตุ : AOT = sodium *bis* (2-ethylhexy) sulphosuccinate



ภาพที่ 25 การนำแอคคูเรลกลับมาใช้ใหม่

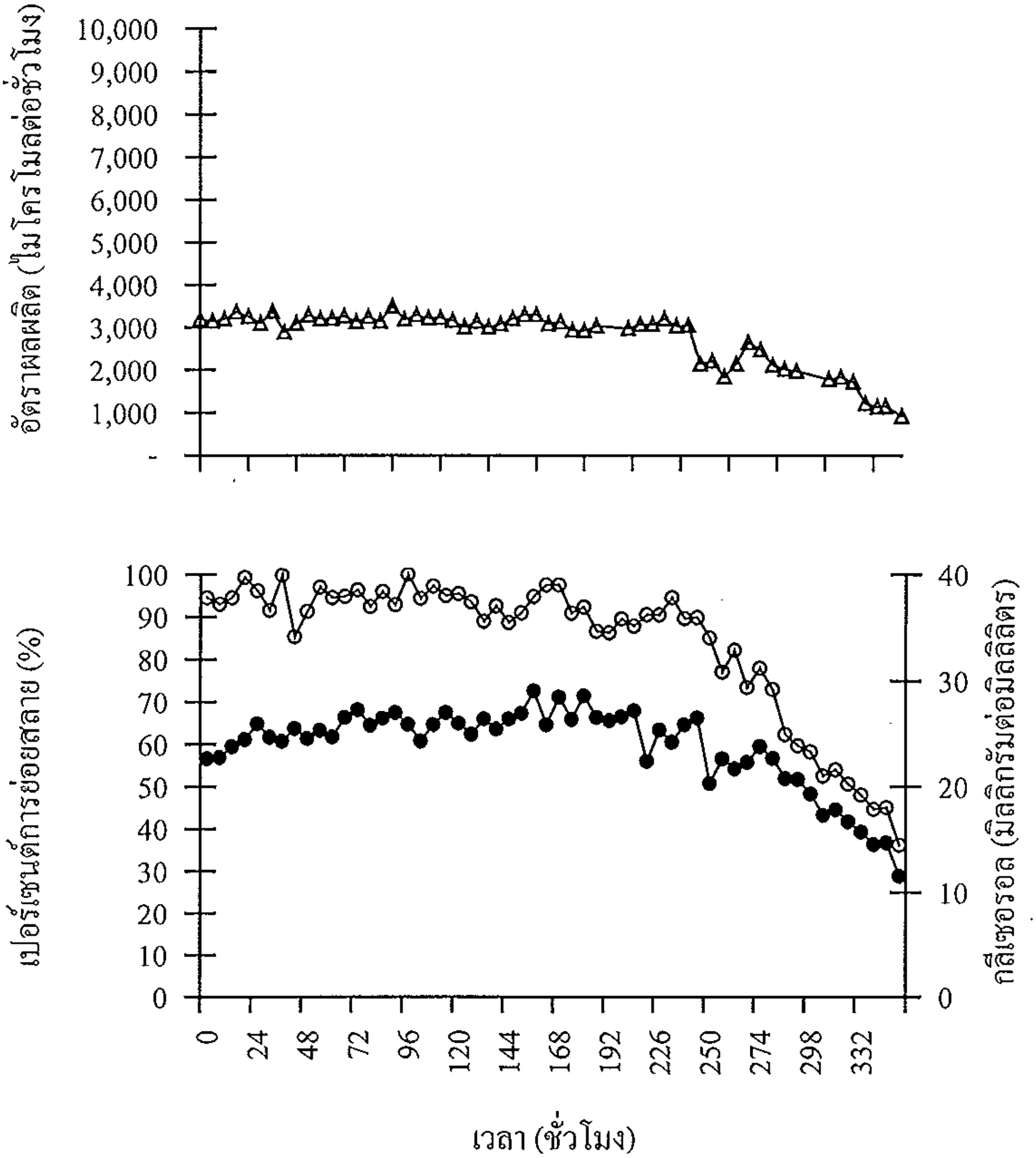
ปาล์มโอเลอีนที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ยังสามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Virto และคณะ (1994) Montero และคณะ (1993) และ วุฒิชัย พิชัยยุทธ์ (2540) อาจเนื่องจากแอคคูเรลมีความแข็งแรงสูง และมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ และ พีเอช ได้ดี

8. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

8.1 การใช้แอคคูเรลเป็นตัวพยุง

การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนอย่างต่อเนื่องในคอลัมน์โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลขนาดน้อยกว่า 200 ไมโครเมตร จำนวน 0.8 กรัม โดยเอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมทั้งหมดเท่ากับ 656 ยูนิต ควบคุมอุณหภูมิภายในคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส แล้วป้อนสับสเตรทซึ่งประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ tris/maleate buffer พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 แยกผ่านปั๊มแยก 2 ตัว ด้วยอัตราการไหลรวมเท่ากับ 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที (ภาพที่ 5.1) ผลการทดลองพบว่า เมื่อย่อยสลายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 250 ชั่วโมง เปอร์เซนต์การย่อยสลายยังมากกว่าร้อยละ 90 โดยมีอัตราการผลิตกรดไขมัน 3,000 ไมโครโมลต่อชั่วโมง และมีการปล่อยกลีเซอรอลออกมาในสารละลายบัฟเฟอร์ในระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 26) หลังจากนั้นกิจกรรมการย่อยสลายลดลงเหลือร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 300 ชั่วโมง (12 วัน) เป็นไปได้ว่าเอนไซม์บางส่วนหลุดออกมาพร้อมกับผลิตภัณฑ์ทำให้กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาลดต่ำลง นอกจากนั้นเอนไซม์ที่ถูกตรึงอัดตัวกันแน่นส่งผลให้อัตราการไหลลดลง

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอเลอีนเป็นร้อยละ 40 พบว่า คอลัมน์ที่บรรจุเอนไซม์ตรึงรูปเกิดการอุดตันและไม่สามารถทำงานได้ ในการทดลองขั้นต่อไปจึงแก้ปัญหาโดยการใช้เอนไซม์ตรึงรูปผสมกับแอคคูเรลขนาด 1000-1500 ไมโครเมตร ในอัตราส่วน 2:1 แล้วจึงบรรจุในคอลัมน์ ป้อนสับสเตรทคือน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนร้อยละ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ tris/maleate buffer พีเอช 7.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 2:1 ด้วยอัตราการ



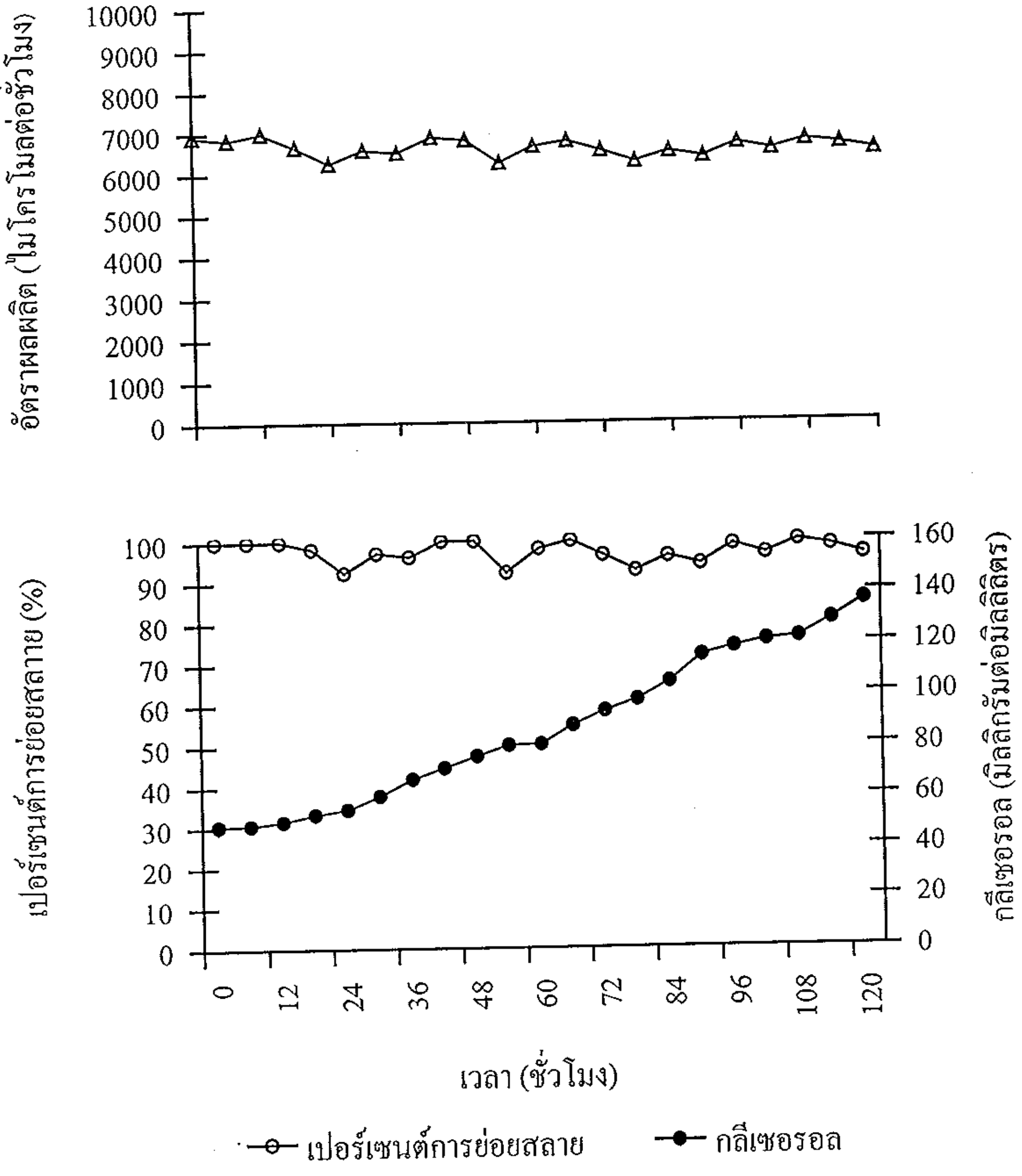
ภาพที่ 26 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 20 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลในถังปฏิกรณ์แบบที่ไม่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์

สภาวะที่ใช้ทดลอง : เอนไซม์ 656 ยูนิต อัตราการไหลรวม 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที

ไหลรวม 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที และเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลโดยควบคุมให้มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์กลับมาใช้ใหม่ดังภาพที่ 5.2 ผลการทดลองพบว่า เมื่อย่อยสลายแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) เปอร์เซนต์การย่อยสลายมีค่าสูงกว่าร้อยละ 95 อัตราการผลิตกรดไขมัน 6,500 ไมโครโมลต่อชั่วโมง (ภาพที่ 27) และในส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมีกลีเซอรอล พบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 139 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลา 120 ชั่วโมง โดยไม่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์

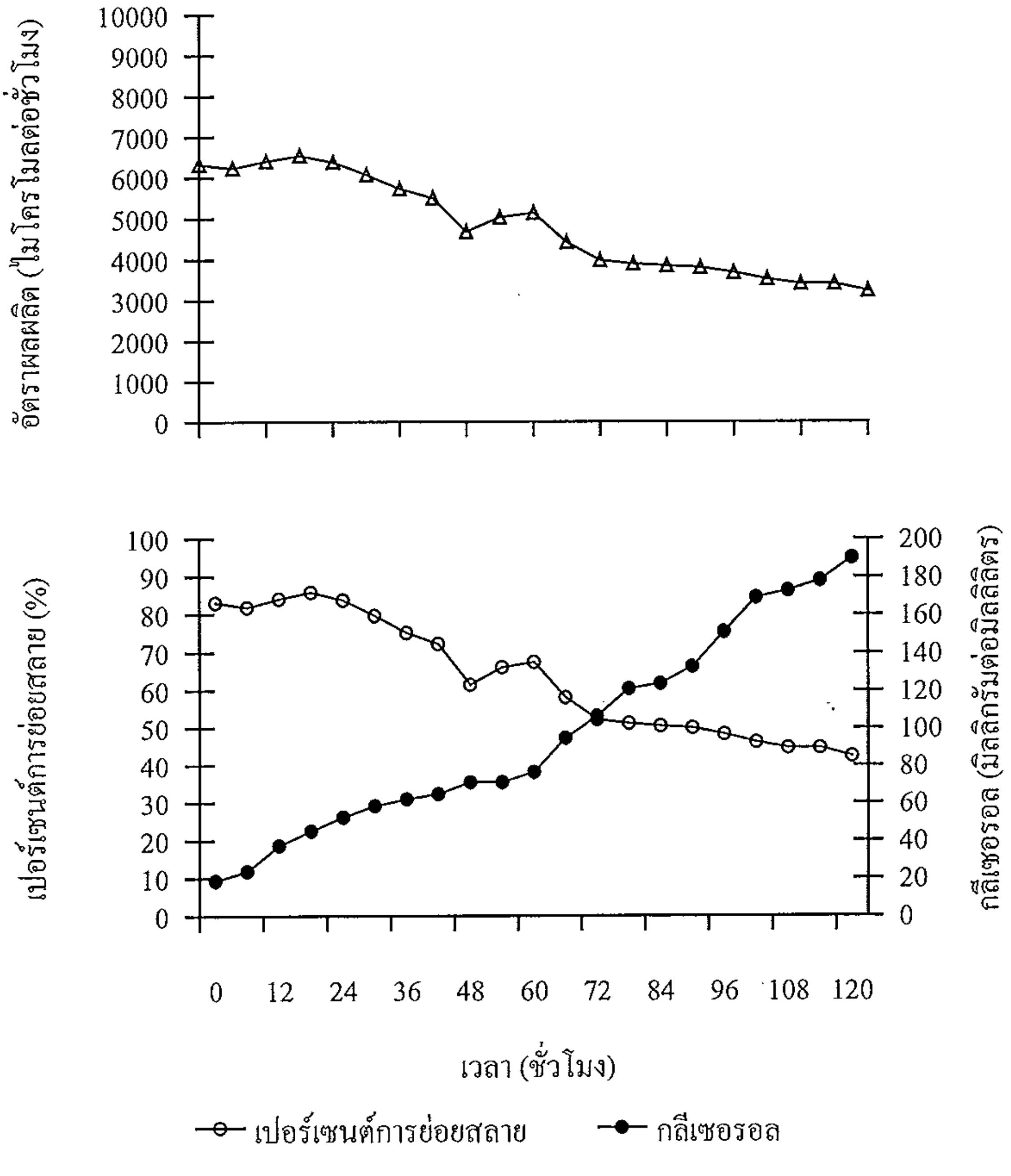
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มโอเลอีนในไอโซออกเทน เป็นร้อยละ 60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ป้อนผ่านคอลัมน์ที่มีเอนไซม์ตรึงรูปเท่ากันแต่ลดอัตราการป้อนสับสเตรทเป็น 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบว่า เมื่อเริ่มต้นการทำงานการย่อยสลายเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ (ร้อยละ 85) มีอัตราการผลิตกรดไขมันสูงสุด 6,500 ไมโคร-โมลต่อชั่วโมง เมื่อย่อยสลายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 120 ชั่วโมง เปอร์เซนต์การย่อยสลายลดต่ำลงเหลือร้อยละ 50 และมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 190 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 28)

ในการทดลองขั้นต่อไปจึงแก้ปัญหาโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการตรึงเป็น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมทั้งหมดเท่ากับ 1007 ยูนิต แล้วป้อนสับสเตรทและบัฟเฟอร์โดยใช้อัตราการไหลรวมเท่ากับ 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อย่อยสลายแบบต่อเนื่องเป็นเวลา 300, 500, 650, 812 และ 1000 ชั่วโมง ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้แล้วออกทั้งหมด แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่า ในช่วงแรกของการทำงานถึงระยะเวลา 300 ชั่วโมง น้ำมันปาล์มโอเลอีนถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ โดยมีอัตราการผลิตกรดไขมันสูงกว่า 7,800 ไมโครโมลต่อชั่วโมง และมีระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลในสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 426 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเปอร์เซนต์การย่อยสลายลดลงเหลือร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 1000 ชั่วโมง (42 วัน) (ภาพที่ 29) สังเกตได้ว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพิ่มสูงขึ้น เปอร์เซนต์การย่อยสลายจะลดลง แต่เมื่อเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ใหม่เปอร์เซนต์การย่อยสลายเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและค่อยๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มสูงขึ้น แต่อย่างไร



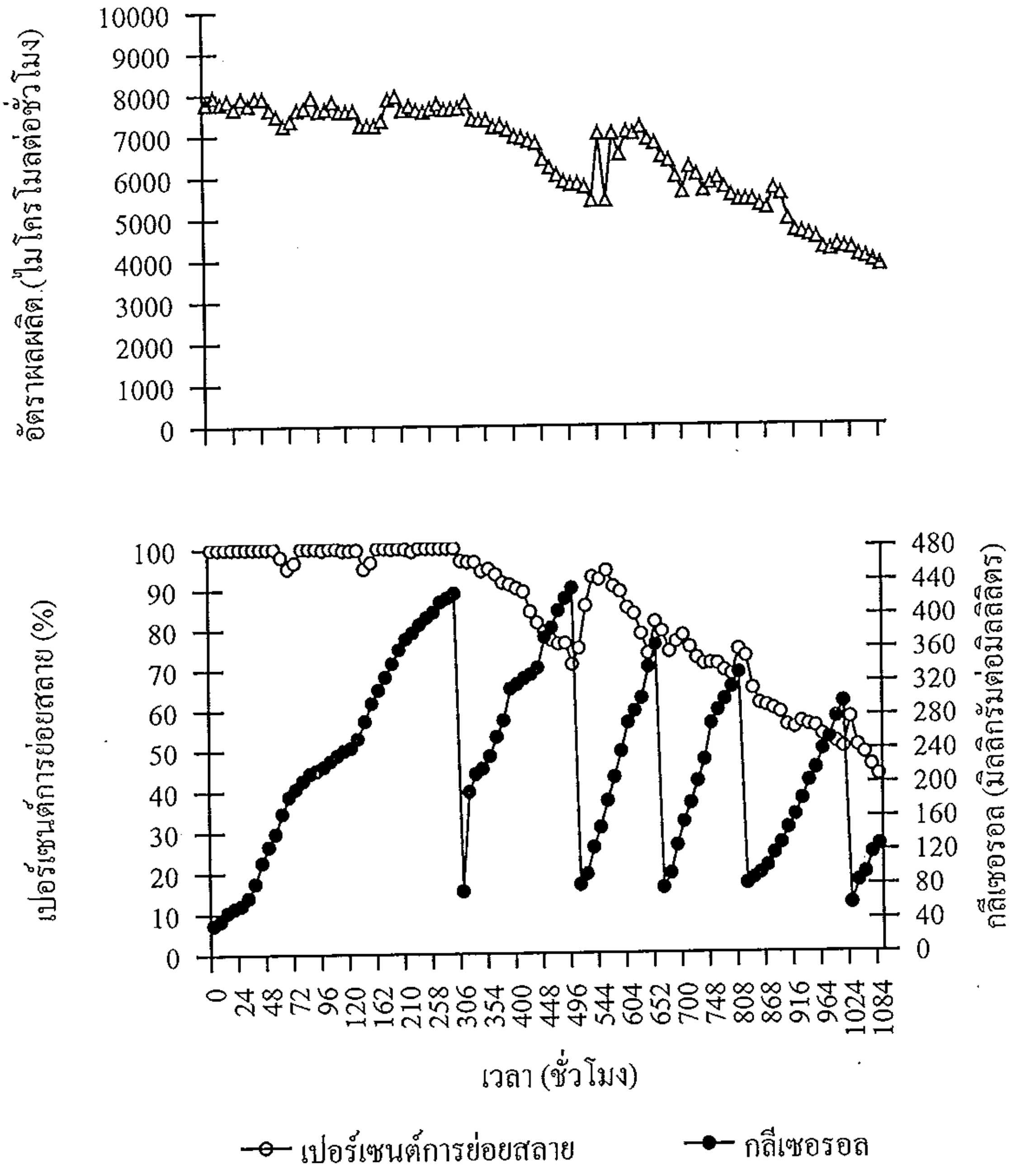
ภาพที่ 27 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 40 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลในถังปฏิกรณ์แบบที่ไม่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์

สภาวะที่ใช้ทดลอง : เอนไซม์ 656 ยูนิต อัตราการไหลรวม 0.08 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพที่ 28 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลในถังปฏิกรณ์แบบที่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์

สภาวะที่ใช้ทดลอง : เอนไซม์ 656 ยูนิต อัตราการไหลรวม 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที



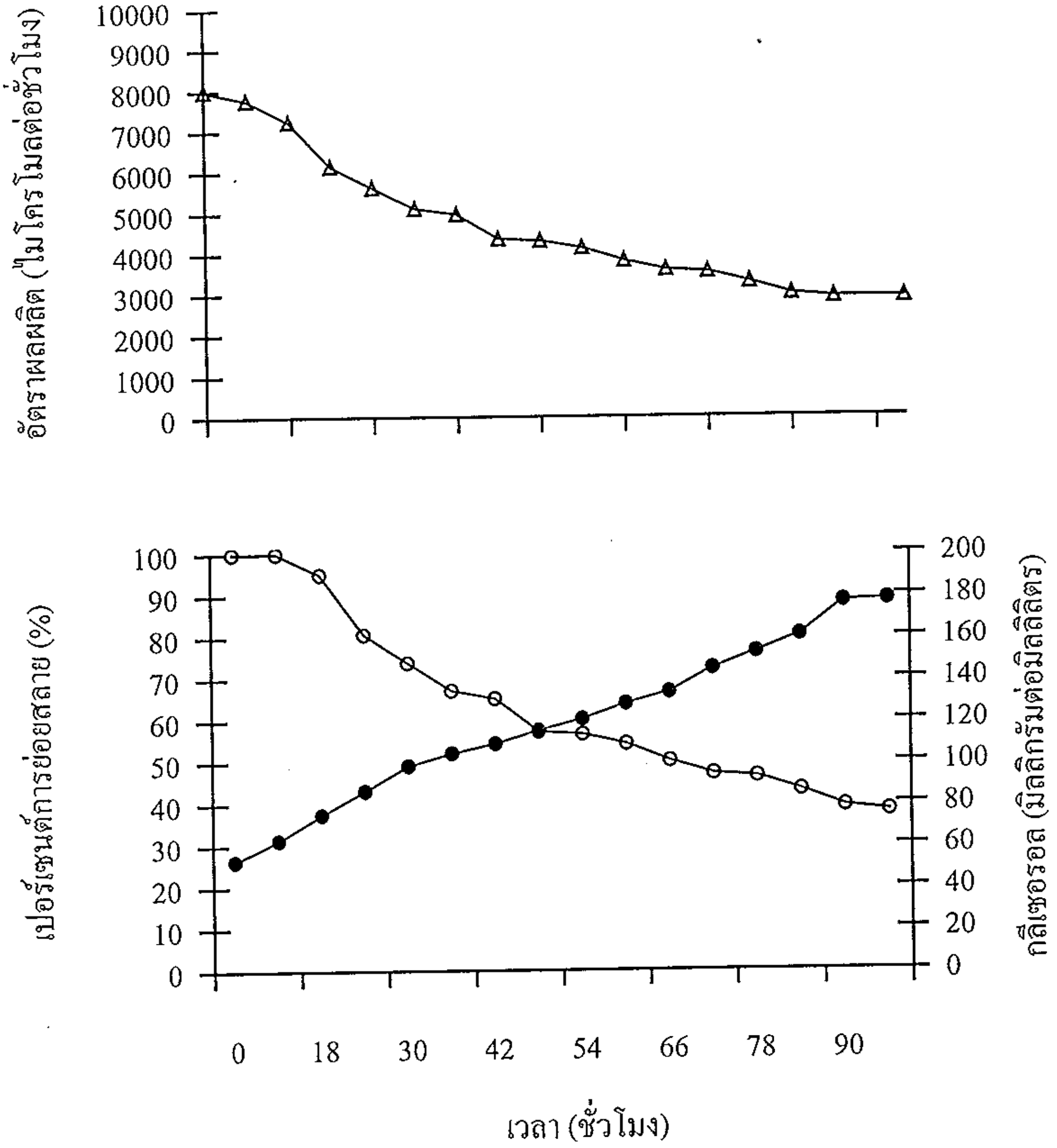
ภาพที่ 29 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลในถังปฏิกรณ์แบบที่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์

สภาวะที่ใช้ทดลอง : เอนไซม์ 1007 ยูนิต อัตราการไหลรวม 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที

ก็ตามพบว่ากลีเซอรอลเป็นตัวช่วยในการเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในภาพที่ 26 ซึ่งไม่มีการนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลวนกลับมาใช้ใหม่ เอนไซม์ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตในการใช้งานเพียง 300 ชั่วโมง แต่เมื่อมีการนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลวนกลับมาใช้ใหม่ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นเป็น 1000 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองของ Brady และคณะ (1988) ซึ่งย่อยสลายน้ำมันมะกอกอย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (∅ 2.5x26 ซม.) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida* ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรลจำนวน 10 กรัม ป้อนน้ำมันและบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 25 ต่อ 75 ด้วยอัตราการไหลรวม 17 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเติมกลีเซอรอลในบัฟเฟอร์ร้อยละ 20 และ 40 เอนไซม์มีครึ่งชีวิตในการทำงานสูงขึ้นจาก 110 ชั่วโมง (5 วัน) เป็น 220 (9 วัน) และ 1040 ชั่วโมง (43 วัน) ตามลำดับ

8.2 การใช้ DEAE-Sephadex A50 เป็นตัวพยุง

การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนอย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แบบคอลัมน์ดังภาพที่ 5.2 โดยบรรจุเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 ซึ่งใช้สารละลายเอนไซม์ในขั้นตอนการตรึงเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมทั้งหมดเท่ากับ 1000 ยูนิต ควบคุมอุณหภูมิภายในคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ป้อนสับสเตรทซึ่งประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอีนที่ละลายในไอโซออกเทนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลาย tris/maleate buffer เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ผ่านปั๊มแยก 2 ตัว ด้วยอัตราการไหลรวมเท่ากับ 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 100 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า อัตราการผลิตกรดไขมันลดลงจาก 8,000 เหลือ 3,500 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นเป็น 178 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเปอร์เซนต์การย่อยสลายค่อยๆ ลดลงเหลือร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 66 ชั่วโมง (3 วัน) (ภาพที่ 30) เนื่องจากเจลอัดตัวกันแน่นและปริมาตรของเอนไซม์ลดลง อาจเป็นเพราะว่าเจลซึ่งมีความแข็งแรงต่ำหรือถูกทำลายเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ และเมื่อใช้เป็นเวลานานอาจเกิดการหลุดของเอนไซม์ออกมาพร้อมกับผลิตภัณฑ์ กิจกรรมการย่อยสลายจึง



ภาพที่ 30 ผลการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนเข้มข้นร้อยละ 60 โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 ในถังปฏิกรณ์แบบที่มีการไหลวนของบัฟเฟอร์

สภาวะที่ใช้ทดลอง : เอนไซม์ 1000 ยูนิต อัตราการไหลรวม 0.06 มิลลิลิตรต่อนาที

ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งในการทดลองนี้ไม่สามารถลดอุณหภูมิภายในคอลัมน์ให้น้อยกว่า 35 องศาเซลเซียสได้ เพราะผลิตภัณฑ์หรือกรดไขมันในน้ำมันปาล์มจะเกิดการแข็งตัวก่อให้เกิดปัญหาการอุดตัน ในขณะที่ Yang และ Rhee (1992) ย่อยสลายน้ำมันมะกอกที่ละลายในไอโซออกเทนเข้มข้นร้อยละ 20 อย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (∅ 1.0 ซม.) โดยใช้เอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 จำนวน 0.2 กรัม ป้อนน้ำมันและบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1.0 ต่อ 0.28 ด้วยอัตราการไหลรวม 12.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเติมกลีเซอรอลในบัฟเฟอร์ร้อยละ 15 เอนไซม์มีครึ่งชีวิตในการทำงานเพิ่มสูงขึ้นจาก 220 เป็น 450 ชั่วโมง (19 วัน)

บทที่ 4

สรุป

1. การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสทางการค้า 4 ชนิด พบว่า เอนไซม์ไลเปส OF จาก *Candida rugosa* มีกิจกรรมจำเพาะ (209.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์สูงสุด

2. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส OF อิสระ พบว่า อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรม คือ 35 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ โดยเอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน

3. การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF โดยวิธีการยึดเกาะกับตัวพยุง 4 ชนิด คือ แอคคูเรล Amberlite XAD-4 DEAE-Sephadex A50 และ PVC พบว่าการตรึงบน DEAE-Sephadex A50 มีค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะสูงสุด (>85 %) และมีประสิทธิภาพการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับ DEAE-Sephadex A50 มากกว่าร้อยละ 95 รองลงมาคือ แอคคูเรล ขนาดเล็กกว่า 200 ไมโครเมตร มีค่ากิจกรรมที่ยึดเกาะสูงสุดเพียงร้อยละ 31.11ในขณะที่ประสิทธิภาพการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงสูงกว่าร้อยละ 98

4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนแอคคูเรล คือ ความ เข้มข้นของเอนไซม์ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการตรึง 8 ชั่วโมง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงบน DEAE-Sephadex A50 คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการตรึง 24 ชั่วโมง

5. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป พบว่า การตรึงเอนไซม์ไลเปส OF บนแอคคูเรลทำให้มีค่าสัมพรรคภาพต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์ลดลงโดยมีค่า K_m เพิ่มขึ้น 5 เท่า แต่ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา (V_{max}) สำหรับการตรึงเอนไซม์บน DEAE-Sephadex A50 ทำให้ค่า K_m เพิ่มขึ้น 2 เท่า และค่า V_{ma} ลดลง 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงรูปมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับเอนไซม์อิสระ แต่มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงที่

กว้างและอุณหภูมิที่สูงกว่า โดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 มีกิจกรรมที่เหลือร้อยละ 21 และ 31 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เอนไซม์อิสระจะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อบ่มภายใต้สภาวะเดียวกัน ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล และ DEAE-Sephadex A50 มีครึ่งชีวิตในการทำงาน 216 และ 156 ชั่วโมง ตามลำดับ

6. เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส OF ตรึงรูป พบว่า การใช้ไอโซออกเทนเป็นตัวทำละลายให้เปอร์เซนต์การย่อยสลายสูงสุด ระยะเวลาการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึง ความเข้มข้นของน้ำมันปาล์มสูงสุดร้อยละ 60 ยังคงให้เปอร์-เซนต์การย่อยสลายที่สมบูรณ์ สัดส่วนระหว่างน้ำต่อสับสเตรทคือ 1 ต่อ 2 ความเข้มข้นของกลีเซอรอลน้อยกว่าร้อยละ 30 ไม่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลาย และการเติม AOT มีผลยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนแอคคูเรล แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 เมื่อเติมในระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

7. การนำแอคคูเรลที่ใช้แล้วกลับมาตรึงเอนไซม์ พบว่า สามารถนำกลับมาตรึงใหม่ได้อย่างน้อย 5 ครั้ง โดยที่ประสิทธิภาพการยึดเกาะไม่เปลี่ยนแปลง แต่กิจกรรมที่ยึดเกาะลดลงจากเดิมร้อย 4 เมื่อนำกลับมาตรึงใหม่ในครั้งที่ 5

8. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนโดยเอนไซม์ไลเปส OF ที่ถูกตรึงบนแอคคู-เรล อย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชนิด packed bed column reactor แบบที่มีการไหลวนของสารละลายบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยผสมเอนไซม์ตรึงรูป 1007 ยูนิตกับแอคคูเรลขนาด 1000-1500 ไมโครเมตรในอัตราส่วน 2:1 ก่อนบรรจุ ป้อนสับสเตรทซึ่งประกอบด้วยน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 60 และบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 2:1 พบว่าการย่อยสลายอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 300 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตกรดไขมันมากกว่า 7,800 ไมโครโมลต่อชั่วโมง และเอนไซม์มีครึ่งชีวิต 1000 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบน DEAE-Sephadex A50 จำนวน 1000 ยูนิต ทดลองภายใต้สภาวะเดียวกันเป็นเวลา 100 ชั่วโมง พบว่าอัตราการผลิตกรดไขมันลดลงจาก 8,000 ไมโครโมลต่อชั่วโมงเหลือ 3,500 ไมโครโมลต่อชั่วโมง และเอนไซม์มีครึ่งชีวิตเพียง 66 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

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

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

วุฒิชัย พิชัยยุทธ์. 2540. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโดยเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. ลิพิด. ใน ชีวเคมี. หน้า 187-217. กรุงเทพฯ : เค.ยู. เพลส์.

Al-Duri, B., Robinson, E., McNerlan, S. and Bailie, P. 1995. Hydrolysis of edible oils by lipase immobilized on hydrophobic support : effect of internal support structure. JAOCS. 72 : 1351-1359.

Arica, M.Y., Alaeddinoglu, N.G. and Hasiici, V. 1998. Immobilization of glucoamylase onto activated pHEMA/EGDMA microspheres : properties and application to a pack-bed reactor. Enzyme Microb. Technol. 22 : 152-157.

Balcao, V.M.,Paiva, A.L. and Malcata, F.X. 1996. Bioreactors with immobilized lipase : State of art. Enzyme Microb. Technol. 18 : 392-416.

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.

Bornscheuer, U. T. and Yamane, T. 1995. Fatty acid vinyl esters as acylating agents : A new method for the enzymatic synthesis of monoacylglycerols. JAOCS. 72 : 193-197.

Bornscheuer, U.T., Herar, A., Kreye, L., Wendel, V., Capewell, A., Meyer, H.H., Scheper, T. and Kolisis, F.N. 1993. Factors affecting the lipase catalyzed transesterification reactions of 3-hydroxy esters in organic solvents. Tetrahedron : Asymmetry 4 : 1007-1016.

Bosley, J.A. 1996. Turning lipases into industrial biocatalysts. Biochem. Soc. Trans. 25 : 174-178.

Bosley, J.A. and Peilow, A.D. 1997. Immobilization of lipase on porous poly-propylene : reduction in esterification efficiency at low loading. JAOCS. 72 : 107-116.

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.

Fitzpatrick, P.A. and Klibanov, A.M. 1991. How can the solvent affect enantioselectivity ?. JAOCS. 113 : 3166-3171.

Gandhi, N.N. 1997. Applications of lipase. JAOCS. 74 : 621-634.

Garcia, H.S., Yang, B. and Parkin, K.L. 1995. Continuous reactor for enzymatic glycerolysis of butter oil in the absence of solvent. Food Res. Int. 28 : 605-609.

Geluk, M.A.,Norde, W.,Van Kalsbeek, H.K.A.I. and Van't Riet, K. 1992. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. Enzyme Microb. Technol. 14 : 748-754.

Gerald, P.M. and Yamane, T. 1991. Future improvements in the yield of mono-glycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oil. JAOCS. 68 : 6-10.

Gilbert, E.J. 1993. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. Enzyme Microb. Technol. 15 : 634-636.

Godtfredsen, S.E. 1993. Lipase. *In* Enzyme in Food Processing 3rd ed. (eds. T. Nagodawithana and G. Reed) pp. 205-219. California : Academic Press.

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

Han, D. and Rhee, J.S. 1985. Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reverse micelles. Biotechnol. Bioeng. 28 : 1250-1255.

Hass, M.J., Scott, K., Jun, W. and Janssen, G. 1994. Enzymatic phosphatidylcholine hydrolysis in organic solvents: an examination of selected commercially available lipase. JAOCS. 71 : 483-490.

Hass, M.J., Cichowicz, D.J., Jun, W. and Scott, K. 1995. The enzymatic hydrolysis of triglyceride-phospholipid mixtures in an organic solvent. JAOCS. 72 : 519-525.

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 Industriaal Oil and Fat Products. Vol. II : Edible oil and fat : Oil and oilseeds, pp. 271-376. 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.

Kang, S.T. and Rhee, J.S. 1989a. Effect of solvents on hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in reverse phase system. Biotechnol. Lett. 11 : 37-42.

Kang, S.T. and Rhee, J.S. 1989b. Characteristics of immobilized lipase catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. Biotechnol. Bioeng. 33 : 1469-1476.

Kaur, J., Ramamurthy, V. and Kothari, R.M. 1993. Characterization of AOT lipase for lipolysis of rice bran oil. Biotechnol. Lett. 15 : 257-262.

Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T. 1997. Biotransformations with lipases. *In* Biotechnology (eds. H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P.J.W. Stadler and D.R. Kelly) Vol. VIII : Biotransformation, pp. 226. Weinheim : VCH Verlagagesellscaft mbH.

Kenedy, J.F. and J.M.S. Cabral. 1987. Enzyme immobilization. *In* Biotechnology (ed. J.F. Kennedy) Vol. VIIa : Enzyme technology, pp. 349-402. Weinheim : VCH Verlagagesellscaft mbH.

Khor, H.T., Tan, N.H. and Chua, C.L. 1986. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. JAOCS. 63 : 538-540.

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

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

Kim, M.K. and Rhee, J.S. 1993. Lipid hydrolysis by *Pseudomonas putida* 3SK cultured in organic-aqueous two-phase system. Enzyme Microb. Technol. 15 : 612-616.

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

Kosugi, Y. and Azuma. N. 1994. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. JAOCS. 71 : 1397-1403.

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.

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.

Kundu, M., Basu, J., Guchhait, M. and Chakrabarti, P. 1987. Isolation and characterizatioon of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol. 133 : 149-153.

Kuo, S. and Parkin, K.L. 1996. Solvent polarity influences product selectivity of lipase-mediated esterification reactions in microaqueous media. JAOCS. 73 : 1427-1433.

Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. 1986. A simple and rapid calorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. JAOCS. 63 : 89-95.

Kwon, S.J., Han, J.J. and Rhee, J.S. 1995. Production and *in situ* separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in *n*-hexane. Enzyme Microb. Technol. 17 : 700-714.

Kwon, D.Y., Song, H.N. and Yoon, S.H. 1996. Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent. JAOCS. 73 : 1521-1525.

Laane, C. 1987. Medium-engineering for bio-organic synthesis. Biocatalysis 1 : 17-22.

Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Verger., C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng. 30 : 81-87.

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.

Linfield, W.M., O'Brien, D.J., Serota, S. and Barauskas, R.A. 1984. Lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. JAOCS. 61 : 1007-1011.

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

Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. JAOCS. 61 : 1067-1071.

Maclellan, M. 1983. Palm Oil. JAOCS. 60 : 320-325.

Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1992. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. Enzyme Microb. Technol. 14 : 426-446.

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

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

Morita, S., Narita, H., Matoba, T. and Kito, M. 1984. Synthesis of triacylglycerol by lipase in phosphatidylcholine reverse micellar system. JAOCS. 61 :1571-1574.

Mukherjee, K.D. 1990. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. Biocatalysis 3 : 277-293.

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

Omar, I.C., Hayashi, M. and Nagai, S. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No.3. Agric. Biol. Chem. 51 : 37-45.

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 lipases. Appl. Biochem. Biotechnol. 23 : 237-247.

Patel, M.T., Nagarajan, R. and Kilara, A. 1995. Characteristics of lipase-catalysed hydrolysis of triglycerols in aerosol-ot/iso-octane reverse-micellar media. Appl. Biochem. Biotechnol. 22 : 1-14.

Patel, M.T., Nagarajan, R. and Kilara, A. 1996. Hydrolysis of milk fat by lipase in solvent-free phospholipid reverse micellar media. J. Food Sci. 61 : 33-38.

Perrin, D.D. and Dempsey, B. 1974. Buffer for pH and Metal Ion Control. London : Chapman and Hall.

Pronk, W., Boswinkel, G. and Riet, K.L. 1992. Parameters influencing hydrolysis kinetics of lipase in a hydrophilic membrane bioreactor. Enzyme Microb. Technol. 14 : 214-220.

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.

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

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., Chang, R.C., Wang, F.F. and Wang, Y. S. 1989. Lipolytic activity of a lipase immobilized on six selected supporting materials. Biotechnol. Bioeng. 35 : 132-137.

Slaughter, J.C., Weatherley,L.R. and Wilkinson, A. 1993. Electrically enhanced enzymatic hydrolysis of vegetable oils using lipase from *Candida rugosa.* Enzyme Microb. Technol. 15 : 293-296.

Suree, P. and Pawinee, K. 1992. Immobilization of lipase on various supports and its activity in water poor media. Chiang Mai University. Chem. 09-009-1992.

Taylor, F., Penzer, C.C., Craig, J.C. and O'Brein, D.J. 1986. Continuous hydrolysis of tallow with immobilized lipase in a microporous membrane. Biotechnol. Bioeng. 28 : 1318-1322.

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

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

Wang, Y.J., Sheu, J.Y., Wang, F.F. and Shaw, J.F. 1988. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotechnol. Bioeng. 31 : 628-633.

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 triacylglycerides. Biotechnol. Bioeng. 42 : 821-828.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipid industry : An engineering overview. JAOCS. 64 : 1657-1661.

Yang, D. and Rhee, J.S. 1991. Stability of the lipase immobilized on DEAE-Sephadex for continuous lipid hydrolysis in organic solvent. Biotechnol. Lett. 13 : 553-558.

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

Zuyi, L. and Ward, O.P. 1993. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and *n*-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. JAOCS. 70 : 745-748.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

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

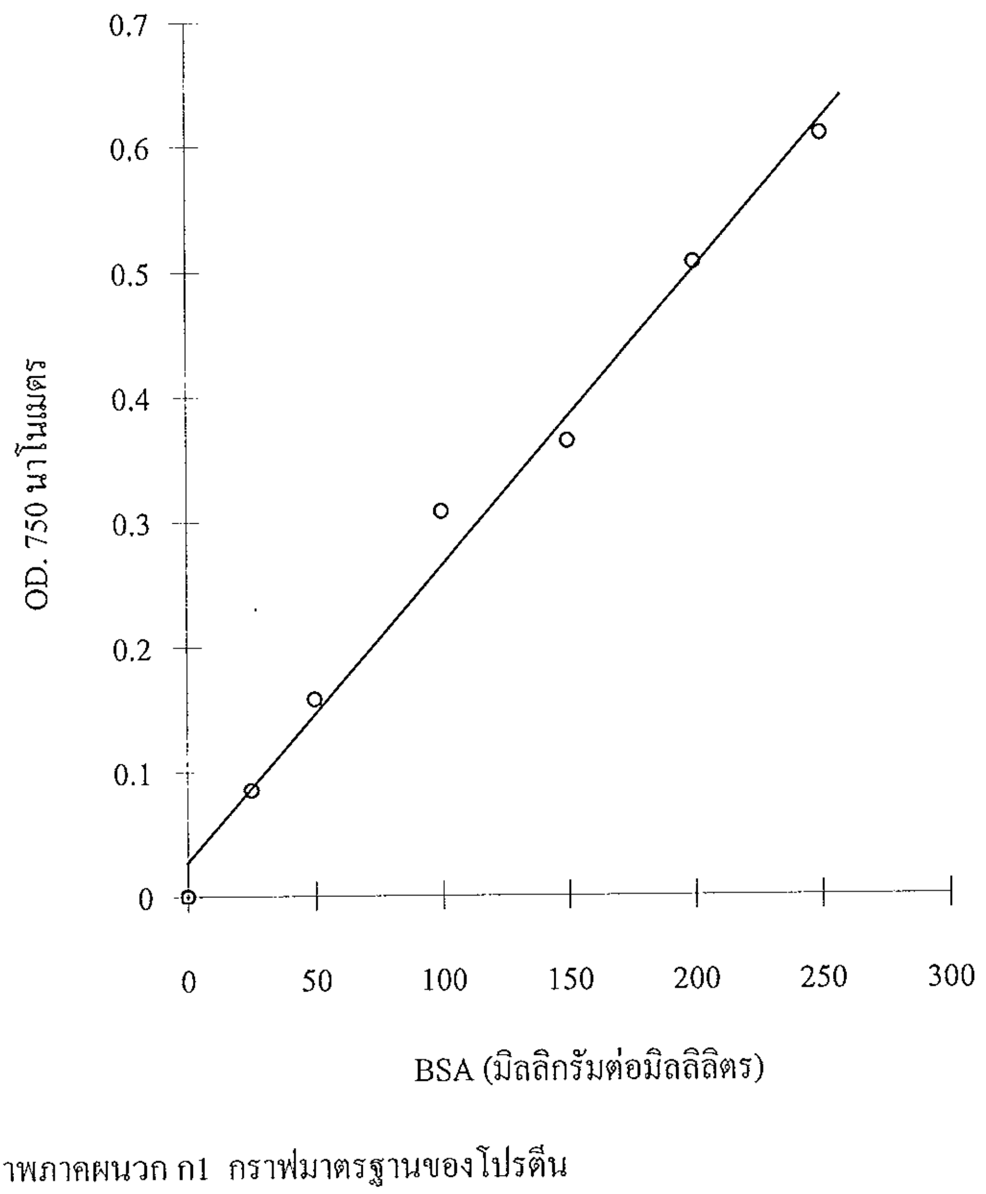
สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : 1% (W/V) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.H_2O$)
2. สารละลาย B : 2% (W/V) โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
4. สารละลาย D : 4% (W/V) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
5. Folin-Ciocalteau reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตรกับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง
2. เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่นเรียกว่าสารละลาย F
3. ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 นาที
4. ใส่สารละลาย F 0.25 มิลลิลิตรลงไปในหลอดในข้อ 3
5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมตัวอย่างเป็น blank โดยทำตามขั้นตอน 3-6
7. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0.05- 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามขั้นตอน 3-6 โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่าง สำหรับวิเคราะห์

8.นำข้อมูลมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับปริมาณโปรตีน (BSA) ดังแสดงในภาคผนวก ก 1



ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

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

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายแอลกอฮลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล (ภาคผนวก ข)
3. สารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข)

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักเท่ากับ 2 กรัม ใส่ในขวดกลั่นที่แห้งและสะอาด
2. เติมสารละลายแอลกอฮลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต และเติมลูกแก้ว
3. จัดเครื่องกลั่นพร้อมเปิดน้ำหล่อชุดควบแน่น รีฟลักซ์สารละลาย (ให้เดือดเบาๆ) นาน 1 ชั่วโมง
4. นำขวดใส่สารละลายออกจากอุปกรณ์ควบแน่นของชุดกลั่น
5. เติมฟีนอฟทาลีน 5 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค
6. เตรียมและไตเตรท blank เช่นเดียวกับตัวอย่าง
7. คำนวณค่าสปอนิฟิเคชันจากสูตร

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

โดย

B = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

A = ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรทกับ ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นสารละลายกรดไฮโดรคลอริค (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

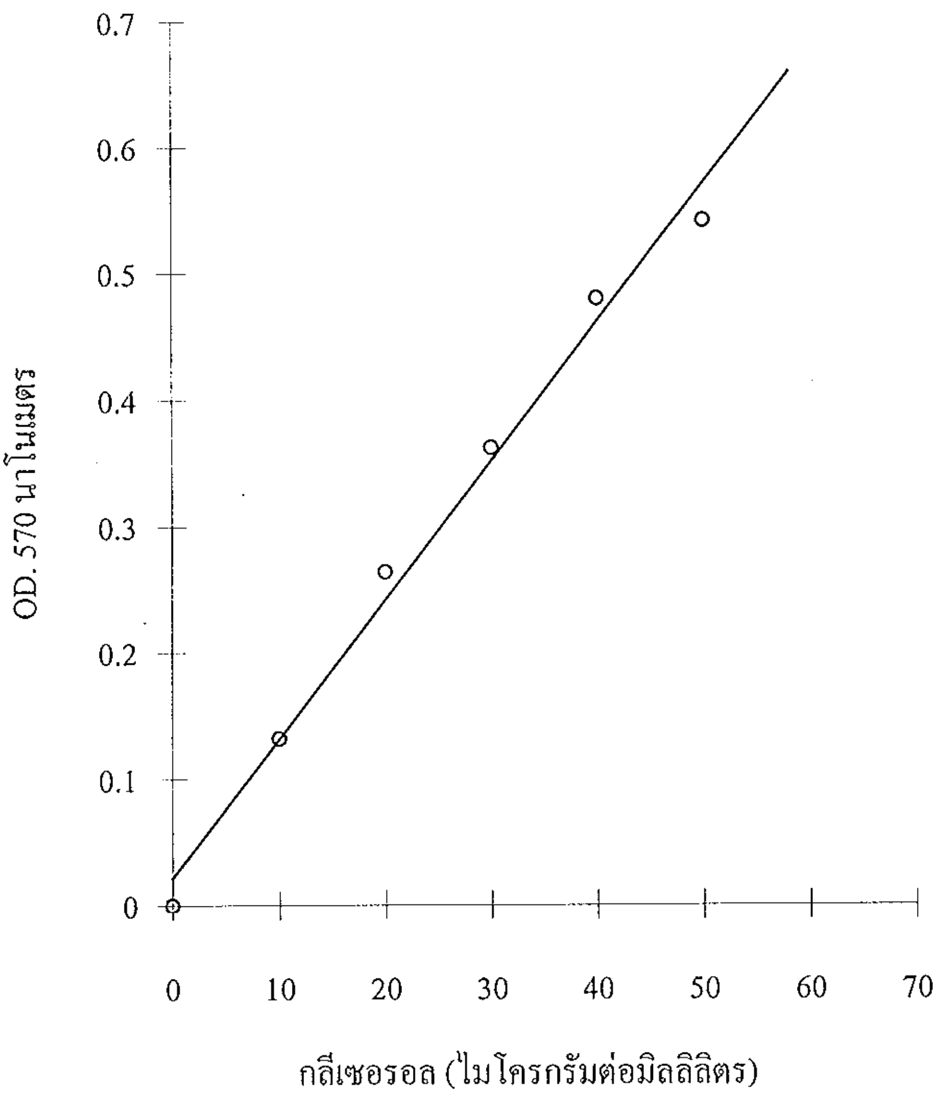
3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล (Kosugi, *et al.*, 1995)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายโพแทสเซียมเมตาเปอริโอเดต (KIO_4) เข้มข้น 0.0025 โมลาร์
2. สารละลายโซเดียมอาเซนเนต ($Na_2HA_5O_4 . 7H_2O$) เข้มข้น 0.5 โมลาร์
3. สารละลาย chromotropic acid reagent เตรียมโดยชั่ง chromotropic acid disodium salt ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2 . 2H_2O$) 110 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมกับกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 120 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมกลีเซอรอลในน้ำกลั่นเข้มข้น 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายโพแทสเซียมเมตาเปอริโอเดต 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาที
3. เติมสารละลายโซเดียมอาเซนเนต 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที
4. เติมสารละลาย chromotropic acid reagent 9 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอด นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที
5. ทำให้เย็นในอ่างน้ำ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร โดยใช้น้ำกลั่น
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ทำตามขั้นตอน 1-5
7. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลดังแสดงในภาพผนวก ก.2



ภาพภาคผนวก ก2 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารละลาย cupric acetate-pyridine reagent เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($C_4H_6CuO_4 .H_2O$) 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 โดยใช้ไพริดีน (pyridine) ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

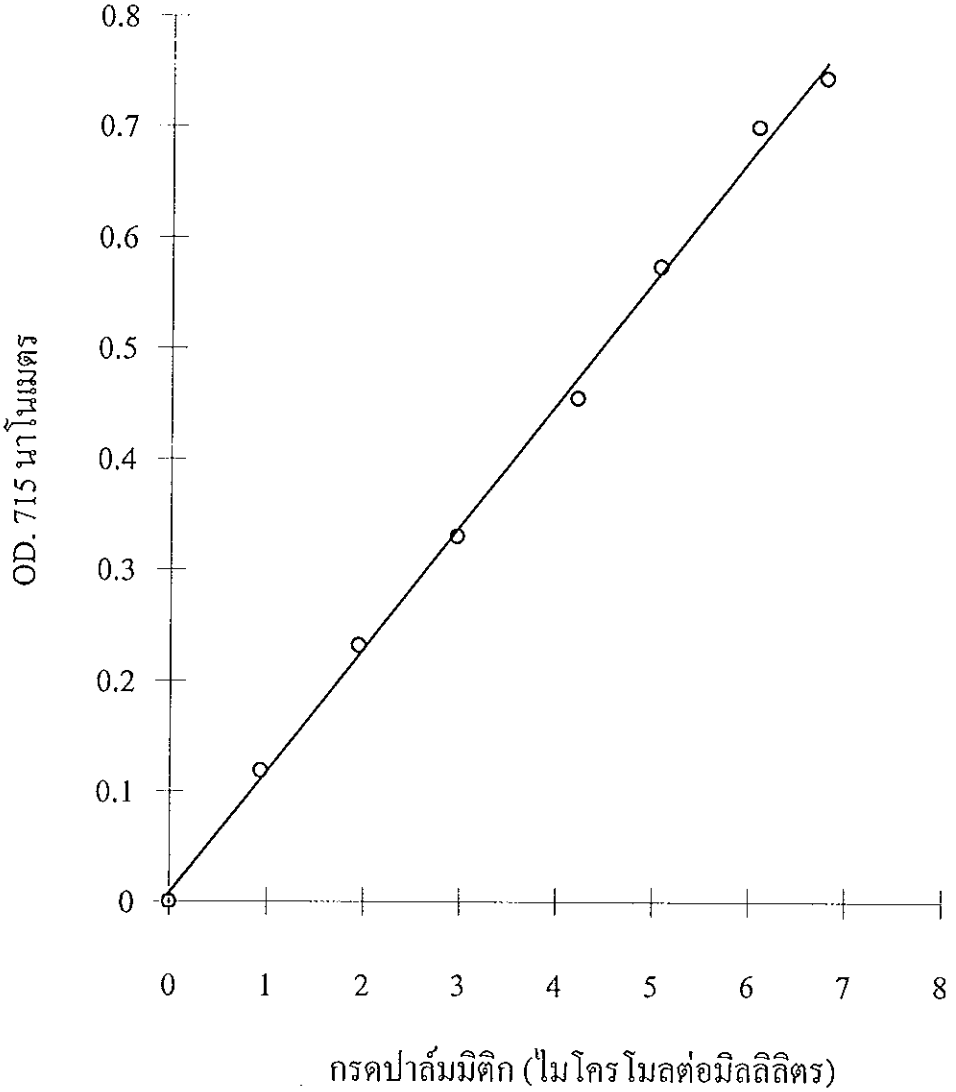
1. ชั่งกรดปาล์มิติกที่มีความบริสุทธิ์สูง (extra pure) 0.2564 กรัม ละลายในไอโซ-ออกเทน แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อช่วยในการละลาย เมื่อละลายหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตร (จะได้กรดปาล์มิติกเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)

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. ดูดสารละลายชั้นบนวัดการดูดกลั่นแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออก-เทน เป็น Blank

5. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตราฐานระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มิติกดังแสดงในภาพผนวก ก.3



ภาพภาคผนวก ก3 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

(Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับ สารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.2 M ciertic acid ($C_6H_8O_7.H_2O$ 42.02 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M sodium citrate (trisodium citrate $2H_2O$, $Na_3C_3H_5O_7.2H_2O$ 58.82 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) และไม่ควรใช้เกลือ sodium citrate ชนิดที่มี 5.5 H_2O

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

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

(Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

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

สารละลาย B : 0.2 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 36.61 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

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

3. การเตรียม Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B x มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

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

สารละลาย B : 0.2 M HCl

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

4. การเตรียม Tris/maleate, NaOH buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

(Perin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย B x มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A :0.2โมลาร์ Mono[tris(hydroxymethyl)-aminomethane] maleate ($C_4H_{11}NO_3 .C_4H_4O_4$)

สารละลาย B : 0.2 โมลาร์ NaOH

พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
5.2.	3.5
5.4	5.4
5.6	7.75
5.8	10.25
6.0	13.0
6.2	15.75
6.4	18.5
6.6	21.25
6.8	22.9
7.0	24.0
7.2	25.5
7.4	27.0
7.6	29.0
7.8	31.65
8.0	34.5
8.2	37.5
8.4	40.5
8.6	43.3

5. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดไฮโดรคลอริค ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

วิธีเตรียม

เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1 ลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

วิธีหาความเข้มข้นมาตรฐาน

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

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

6. การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

วิธีเตรียม

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ เอ อาร์เกรด น้ำหนัก 4 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล เก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขวดพลาสติก

การหาความเข้มข้นมาตรฐาน

นำโพแทสเซียมเอซิดพาทาเลท (Potassium acid phathalate : $KHC_8H_4O_4$) ไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นโดยโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักให้ได้แน่นอน 0.4 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปลอดคาร์บอนไดออกไซม์ (ต้มน้ำกลั่น 20 นาที) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ โดยใช้สารละลายฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณความเข้มข้นมาตราฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้จากสูตร

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

7. การเตรียมสารละลายแอลกอฮอลิคโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 นอร์-มอล

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

8. การเตรียมสารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์

ชั่งฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ละลายในเอทานอล (95 เปอร์เซนต์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายฉัตรชัย สังข์ผุด

วัน เดือน ปีเกิด 23 มกราคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล	2538

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนบัณฑิตศึกษาสำหรับผู้ที่มีผลการเรียนดีเด่น