บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย มีการปลูกกันมากในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศ อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันก็ยังประสบกับปัญหาขาดเสถียรภาพและปัญหาเรื่องราคาต่ำ เพราะรูปแบบการใช้ประโยชน์จากน้ำมันปาล์มภายในประเทศส่วนใหญ่ยังเพียงเพื่อใช้ในการประกอบอาหารเพียงอย่างเดียว ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเพื่อแปรรูปน้ำมันปาล์มโดยใช้เทคโนโลยีทางด้านโอลีโอเคมี (Oleochemistry) เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่าเพิ่ม เช่น กรดไขมัน เมทธิลเอสเทอร์ (Methyl esters) แฟตตี้แอลกอฮอล์ (Fatty alchohol) แฟตตี้เอมีน (Fatty amine) โมโนเอซิลกลีเซอรอล (Monoacylglycerol) และกลีเซอรอล (Glycerol) เป็นต้น ซึ่งจัดเป็นกลุ่มของสารวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่างๆต่อไปอีกหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ ยางรถยนต์ พลาสติก ยา และเครื่องสำอาง ผงซักฟอกและกระดาษ เป็นต้น อุตสาหกรรมต่อเนื่องเหล่านี้กำลังอยู่ในภาวะการขยายตัว ทำให้ผู้ประกอบการอุตสาหกรรมดังกล่าวมีการนำเข้าเคมีภัณฑ์เหล่านี้เป็นจำนวนมาก ทั้ง ๆ ที่ประเทศไทยมีศักยภาพที่จะผลิตได้ปีหนึ่ง ๆ ไม่ต่ำกว่า 100 ล้านบาท จึงนับว่าเป็นโอกาสหรือช่องทางใหม่ที่น่าสนใจในการผลิตสินค้าเพิ่มมูลค่าจากน้ำมันปาล์ม อีกทั้งยังจะมีส่วนช่วยเกื้อหนุนให้อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันให้มีเสถียรภาพดีขึ้นด้วย

โมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารลดแรงตึงผิวในอุตสาหกรรมอาหาร และนำมาใช้เป็นอิมัลซิไฟ-เออร์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ยา เครื่องสำอาง (Thude *et al*., 1997) ซึ่งสามารถสังเคราะห์โดยกระบวนการทางเคมีจากปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันและไขมัน ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (200-250 องศาเซลเซียส) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักมีสีเข้มและคุณภาพไม่ดี เกิดสีและกลิ่นไม่พึงประสงค์ จึงต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน และปฏิกิริยาไม่มีความจำเพาะเจาะจง ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่ำ (Borncheuer, 1995) การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากการกลีเซอโรไลซีสของน้ำมันและไขมัน ปัจจุบันได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง เพราะมีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการย่อยสลายโดยใช้วิธีทางเคมี ฟิสิกส์ ได้แก่ เกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง เกิดได้ที่ความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ใช้ขนาดของถังปฏิกรณ์ขนาดเล็กซึ่งประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง เกิดของเสียและวัสดุเหลือทิ้งน้อย (Yamane *et al*., 1986)

แต่อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อผลิตทางการค้ายังมีน้อย เนื่องจากราคาเอนไซม์ที่สูง อัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ และการละลายของน้ำมันในน้ำ ทำให้ควบคุมปฏิกิริยาได้ยาก ตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาเกี่ยวกับวิธีตรึงรูปเอนไซม์ได้พัฒนาก้าวหน้าไปมาก การนำเอาไลเปสตรึงรูปมาใช้จึงเป็นวิธีหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดในการใช้เอนไซม์อิสระดังกล่าว เพราะเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถทำปฏิกิริยาได้ทันที และทำให้บริสุทธิ์โดยเพียงแต่แยกเอาเอนไซม์ตรึงรูปออกมา ทำให้มีความคล่องตัวในการผลิต คือสามารถใช้ได้ทั้งในการผลิตแบบกะหรือแบบต่อเนื่อง และสามารถปรับการผลิตให้เหมาะสมได้ตามต้องการ และเอนไซม์ตรึงรูปยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้ยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตลงได้

การตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบห่อหุ้ม (Entrapment) เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมเนื่องจากการตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ทำให้โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงเนื่องจากเอนไซม์ไม่ได้ถูกยึดจับกับตัวพยุงแต่ถูกเก็บไว้ภายในช่องว่างของพอลิเมอร์ ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี และถ้าพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ในกระบวนการนั้นเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถดูดซับน้ำเอาไว้ได้ ก็จะทำให้เอนไซม์ไลเปสสามารถละลายและทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ดังนั้นการนำเอาอัลจิเนตที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาตรึงรูปเอนไซม์ไลเปส จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป อย่างไรก็ตามปัญหาในการนำเอาโซเดียมอัลจิเนตมาใช้ คือขนาดรูพรุนของอัลจิเนตจะมีขนาดใหญ่ซึ่งในระหว่างดำเนินปฏิกิริยาอาจทำให้เอนไซม์รั่วออกมาได้ ทำให้ต้องหาวิธีในการตรึงที่เหมาะสมและแก้ปัญหาการรั่วโดยใช้พอลิเมอร์หรือสารตัวอื่น ๆ มาหุ้มไว้ภายนอกซึ่งจะส่งผลให้รูพรุนของอัลจิเนตมีขนาดเล็กลง ทำให้ลดปัญหาการรั่วของเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้ภายในได้

การตรวจเอกสาร

1. ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของภาคใต้รองจากยางพารา นิยมปลูกกันมากในจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี ชุมพร สตูล และตรัง ผลผลิตของปาล์มน้ำมันจะถูกนำไปแปรรูปเป็นน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีแนวโน้มการผลิตสูงขึ้นทุกๆปี

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมี 3 วิธีคือ วิธีการแรกเป็นกระบวนการผลิตแบบใช้ไอน้ำซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน วิธีการที่สองเป็นกระบวนการผลิตแบบย่างผลปาล์มหรือหีบน้ำมันผสม และวิธีการที่สามเป็นกระบวนการผลิตแบบทอดผลปาล์ม ซึ่งจะได้น้ำมันปาล์ม 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ น้ำมันเมล็ดปาล์ม (palm kernel oil) ซึ่งได้จากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (palm kernel) และน้ำมันปาล์ม (palm oil) ซึ่งได้จาก mesocarp เมื่อนำน้ำมันปาล์มไปแยกส่วนและทำให้บริสุทธิ์จะได้ส่วน

ของของเหลว ที่เรียกว่าน้ำมันปาล์มโอลีอีน (palm olein) ซึ่งเป็นน้ำมันปาล์มที่ใช้กันทั่วไป และได้ส่วนของแข็งที่เรียกว่า ปาล์มสเตียริน (palm stearin)

น้ำมันปาล์มประกอบด้วยกรดไขมันที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน พื้นดินบริเวณเพาะปลูกและภูมิอากาศ น้ำมันเมล็ดปาล์มและน้ำมันปาล์มมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน (ตารางที่ 1) เช่น น้ำมันจากเมล็ดปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวสูง (78.82 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่น้ำมันปาล์มมีเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 48.05 และ 51.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันปาล์ม

Table 1. Chemical and physical properties of palm oil.

	Palm kernel oil	**Palm olein**
Iodine Value	14-20	43-59
Acid Value	20	15
Sponification Value	240-257	195-210
Unsponification matter (%)	1	1
Color (Lovibond)*	10Y:1R25	Y:2.5R
Total saturated fatty acid (%)	78.82	48.05
Total unsaturated fatty acid (%)	21.18	51.95

*:cell, 5 in.

ที่มา : ดัดแปลงจากไพจิตร จันทรวงศ์ (2530)

น้ำมันปาล์มโอลีอีนได้จากการผลิตโดยวิธีการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งมีองค์ประกอบ และคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันปาล์มโอลีอีนดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าน้ำมันปาล์มโอลีอีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 838.22 กรัม และกรดไขมันส่วนใหญ่ประกอบด้วย กรดโอลิอิก ปาล์มมิติก และ ลิโนลิอิก 38.42 28.65 และ 26.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 2 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำมันปาล์มโอลีอีน

Table 2. Composition and properties of palm olein.

Properties	
Sponification value	200.88
Iodine value	73.917
Acid value	0.566
MW	838.22
Fatty acid composition (%)	
Palmitic acid	28.65
Stearic acid	4.21
Oleic acid	38.42
Linolenic acid	1.51
Linoleic acid	26.53
Myristic acid	0.67

ที่มา : Kaewthong (2004)

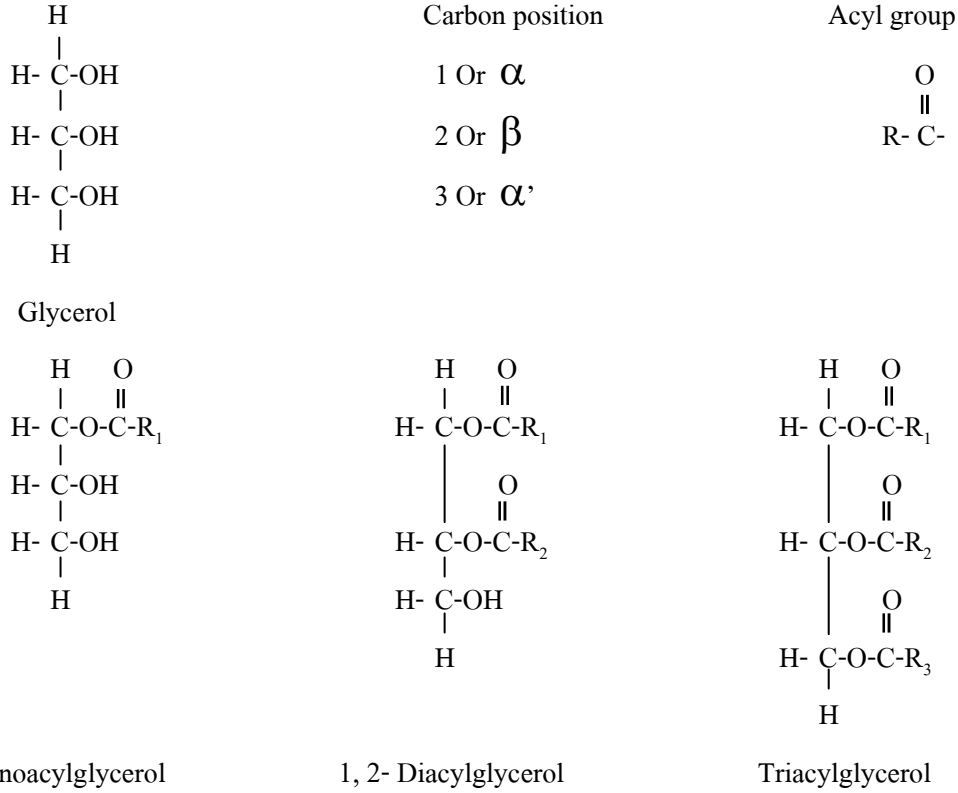
2. เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอลหรือไขมันมีคุณสมบัติเป็นกลาง เป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์กลีเซอรอล ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อพบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เอซิลกลีเซอรอลแบ่งออกเป็น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และ โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol)

2.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอล

ไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นเอซิลกลีเซอรอลที่พบมากที่สุด ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอล ถ้าเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกันเรียกไตรเอซิล-กลีเซอรอลธรรมดา (simple triacylglycerol) เช่น ไตรปาลมิโตอิลกลีเซอรอล (tripalmitoyl glycerol) แต่โดยทั่วไปประกอบด้วยกรดไขมันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เรียกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลผสม (mixed triglycerol) เช่น 1-ปาลมิโตอิลไดสเตียโรอิลกลีเซอรอล (1-palmitoyl distearoyl glycerol) (อาภัสสรา

ชมิดท์, 2537) ในน้ำมันปาล์มมีโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว 2 ตำแหน่งมากที่สุดคือ 48 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว 2 ตำแหน่ง 34.6 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเอซิลกลีเซอรอล

Figure 1. Structures of acylglycerol.

ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2537)

2.2 โมโน และ ไดเอซิลกลีเซอรอล

โมโน และ ไดเอซิลกลีเซอรอลเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันเพียงหนึ่งและสองโมเลกุลตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอก-ซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ เอซิลกลีเซอรอลทั้งสองชนิดนี้ไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติแต่จะพบในไขมันที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสที่ไม่สมบูรณ์ โดยจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในการสังเคราะห์หรือดัดแปลงโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือนำโมโนเอซิลกลีเซอรอลใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยาและเครื่องสำอาง ชนิดต่างๆ (Howe-Grant *et al*., 1994 อ้างโดย Rosu *et al*., 1997)

3. การใช้ประโยชน์จากโมโนเอซิลกลีเซอรอล

โมโนเอซิลกลีเซอรอลมีใช้กันมากเพื่อเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง (Thude *et al*., 1997) อุตสาหกรรมสิ่งทอ ยาสีฟัน (Sonntag, 1982)ในอุตสาหกรรมยามีการใช้โมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารยึดเกาะในยาเม็ด และผสมในตัวยาที่ต้องการให้ออกฤทธิ์นาน ส่วนอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้โมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี มาการีน ผลิตภัณฑ์นม ลูกกวาด และเครื่องชูรส (Jackson and King, 1997) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีการใช้โมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารเพิ่มเนื้อสัมผัส (texturing agent) เพื่อให้ครีมหรือโลชั่นมีความเข้มข้น และปรับปรุงความหนืดของครีมหรือโลชั่น (Stevenson *et al*., 1993) สำหรับโมโนเอซิลกลีเซอรอลที่มี n-3-polyunsaturated fatty acid เป็นองค์ประกอบ เช่น eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) สามารถช่วยป้องกันโรคต่างๆ เกี่ยวกับการไหลเวียนของโลหิต (Li and Ward, 1993) ส่วน monopentadecanoylglycerol พบว่ามีคุณสมบัติช่วยในการบำรุงรักษาเส้นผม (hair care additive) (Bornscheuer, 1995) และเนื่องจากโมโนเอซิลกลีเซอรอลมีคุณสมบัติเป็นสารหล่อลื่น (lubricant) และคุณสมบัติเป็นพลาสติก (plasticizing) จึงมีการผสมในน้ำมันสำหรับใช้ในเครื่องจักร (Coteron *et al*., 1998)

4. เอนไซม์ไลเปส (lipase)

เอนไซม์ไลเปส (E.C. 3.1.1.3) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (triacylglycerol hydrolases) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันและกลีเซอรอล (Macrae, 1983) ปฏิกิริยาสามารถเกิดแบบย้อนกลับได้ขึ้นอยู่กับการควบคุมสภาวะแวดล้อมต่างๆ

Shahani (1975) กล่าวว่าไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งในเอสเทอเรส ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ แต่ไลเปสเท่านั้นที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ดี (Kazlauskas and Bornscheuer, 1997) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบประเภทอื่นๆ ที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิกเอสเทอร์ ซึ่งไม่ใช่เอซิลกลีเซอรอลทั้งที่มีในธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ โดยปฏิกิริยามีความจำเพาะเจาะจงกับโครงสร้างไอโซเมอร์ของสับสเตรทสูง (Malcata *et al*.,1992) จุดเด่นของไลเปสคือ มีสับสเตรท หลายชนิดและมีความจำเพาะเจาะจงสูง ในปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ต่างๆ ทดแทนการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อผลิตสารที่สำคัญ ได้แก่ การสังเคราะห์ตัวยาที่ใช้ทางด้านเภสัชกรรม การสังเคราะห์สารตัวกลาง และการปรับปรุงโครงสร้าง

ของไขมันธรรมชาติ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และ เครื่องหนัง เป็นต้น

4.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสพบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไลเปสที่ได้จากส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เมล็ดละหุ่ง เมล็ดฝ้าย และจากธัญพืชพวกข้าวสาลี ข้าวไรย์และข้าวบาร์เลย์ เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์จะพบในเนื้อเยื่ออวัยวะ เช่น ตับอ่อน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม (Schwimmer, 1981) ไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Malcata *et al*., 1992) สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้ไลเปสที่ได้มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ทำให้ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตทางการค้า

Table 3. Sample of commercialized lipase.

Type	Source	Other name	Company
	Mammalian lipase		
PPL	Porcine pancreas		Amano, Sigma, Fluka, Boehring Mannhein
CE (BSSL)	Pancreatic cholesterol esterase		Genzyme, Sigma
	Fungal lipase		
CRL	*Candida rugosa*	*Candida cylindracea*	Altus Biologics, Sangyo, Amano, Boehring Mannheim
CAL-A	*Candida antarctica* A		Boehring Mannheim, Novo Nordisk
CAL-B	*Candida antarctica* B		Boehring Mannheim, Sigma, Novo Nordisk
CLL	*Candida lipolytica*		Amano
HLL	*Humicola lanuginosa*	Thermomyces l.	Boehring Mannheim, Novo Nordisk

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.)

Type	Source	Other name	Company
PFL	*Pseudomonas fluorescens*		Amano, Biocatalysts Ltd.
PfragiL	*Pseudomonas fragi*		Wako Pue Chemical
CVL	*Chromobacterium viscosum*		Sigma, Genzyme, Asahi
	Pseudomonas sp.	*Pseudomonas glumae*	Chemical, Biocatalysts Ltd., Amano
BTL2	*Bacillus thermocatenulatas*		Boehringer Mannheim
	Alcaligenes species		Meito Sangyo
ANL	*Aspergillus niger*		Amano
ProqL	*Penicillium roqueforti*		Amano
	Bacterial lipases		
PCL	*Pseudomonas cepacia*	*Burkholderia cepacia*	Altus Biologics, Amano, Boehringer Mannheim, Fluka, Sigma
PCL-AH	*Pseudomonas cepacia*		Amano

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

4.2 การแบ่งกลุ่มไลเปสทางการค้า

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า บางครั้งพบว่าไลเปสบางชนิดมีโครงสร้างที่เหมือนกัน ดังนั้น Kazlauskas และ Bornscheuer (1997) เสนอว่าวิธีการที่ง่ายที่สุดในการแบ่งกลุ่มคือการแบ่งตามการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างโปรตีนของไลเปส ซึ่งมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังตารางที่ 4 คือ ไลเปสจากสัตว์ ไลเปสจากยีสต์ รา และไลเปสจากแบคทีเรีย สำหรับไลเปสจากยีสต์และราแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม *Candida rugosa* และกลุ่ม *Rhizomucor* ส่วนไลเปสจากแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มของ *Pseudomonas* และกลุ่ม *Staphylococcus* ไลเปสในกลุ่ม *Candida rugosa* (CRL), *Geotricum candidum* (GCL) และ pancreatic cholesterol esterase (CE) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุล

ใหญ่ (60-65 KD) แต่ *Candida* lipase B มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (30-35 KD) ดังนั้นจึงไม่ได้จัดไว้ในกลุ่มนี้แม้ว่าจะเป็นไลเปสที่ได้จากยีสต์ *Candida* ก็ตาม

ไลเปสในกลุ่ม *Rhizomucor* เป็นไลเปสที่ได้จากราหลายชนิดได้แก่ *Rhizopus, Rhizomucor*, *Penicillium camembertii* (PcamL), *Humicola lanuginosa* (HLL) และ *Candida antarctica* B (CAL-B) สำหรับในกลุ่ม *Pseudomonas* เป็นไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* ทุกตัวรวมทั้งไลเปสจากเชื้อ *Chromobacterium viscosum*

ไลเปสบางชนิดยังไม่สามารถแบ่งกลุ่ม เนื่องจากยังไม่ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน ได้แก่ ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus niger* (ANL) สำหรับไลเปสจากเชื้อ *Candida antarctica* A (CAL-A) แม้ทราบการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแต่มีลักษณะที่เหมือนกับไลเปสในแต่ละกลุ่มน้อยมาก จึงจัดไว้ในกลุ่มนี้ (Kazlauskas and Bornscheuer, 1997)

ตารางที่ 4 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ไลเปสทางการค้า

Table 4. Group of lipase with corrupt officials.

Group	Molecular weight	Sample
Lipase from animal	50kD	PPL
Lipase from		
Candida rugosa	59-65 kD	CRL, GCL, CE
Rhizomucor	29-42 kD	CAL-B, RML, ROL, PcamL, HLL
Lipase from bacteria		
Pseudomonas	30-35 kD	PCL, PFL, CVL
Staphylococcus	68-73 kD	BTL2
None group		ANL, CAL-A, CLL

ที่มา : Kazlauskas และ Bornscheuer (1997)

4.3 คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายน้ำได้ดี แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon *et al*., 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท ปริมาณเกลือและชนิดของสารอิมัลซิฟายเออร์ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Macalta *et al*., 1992) ส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกรด พบมากในไลโซโซมในส่วนเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

หลายชนิด สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6 ถึง 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gibert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสับสเตรท เป็นไปได้ว่าสับสเตรททำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata *et al*.,1992)

4.4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

Gandhi (1997) แบ่งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสไว้ 2 กลุ่มหลักคือ การย่อยสลายเอสเทอร์ (hydrolysis) และการสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis) ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ เอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) อะซิโดไลซีส (acidolysis) อินเตอร์-เอสเทอริฟิเคชั่น (interesterification) และแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis) สำหรับสามปฏิกิริยาหลังนักวิจัยหลายท่านจัดรวมไว้ในกลุ่มเดียวกัน เรียกว่าทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) ได้จัดปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis) อยู่ในกลุ่มเดียวกับทรานเอสเทอริ-ฟิเคชั่นด้วยดังแสดงในภาพที่ 2

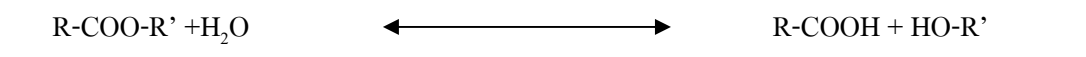
4.5 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

Malcata และคณะ (1992) แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้หลักในการพิจารณา 5 แบบ คือ

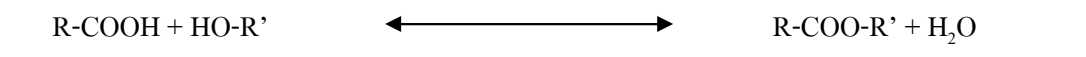
1. ความจำเพาะต่อกลุ่มของลิปิด
2. ความจำเพาะต่อตำแหน่งของเอซิลกลีเซอรอล
3. ความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน
4. ความจำเพาะต่อโครงสร้างสเตอริโอไอโซเมอร์ของสับสเตรท
5. หลายๆอย่างรวมกัน

เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มลิปิด ตัวอย่างเห็นได้ชัดในพลาสมาของสัตว์ซึ่งประกอบด้วย ไลเปสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเฉพาะ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลี-เซอรอล หรือโมโนเอซิลกลีเซอรอล ไลเปสจาก *Penicillium cyclopium* มีกิจกรรมต่อโมโนเอซิล-กลีเซอรอลสูง แต่มีกิจกรรมต่อไดเอซิลกลีเซอรอลและไตรเอซิลกลีเซอรอลต่ำมาก (Okumura *et al*., 1980 อ้างโดย Malcata *et al*., 1992)

1. Hydrolysis of ester

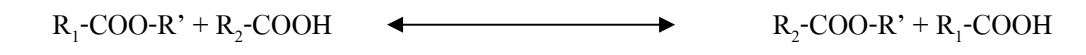


2. Synthesis of ester

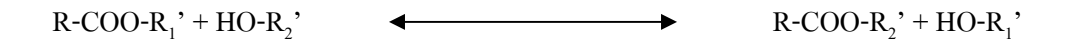


3. Transesterification

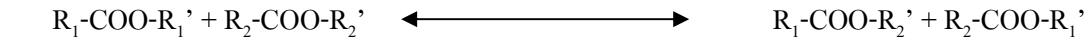
3.1 Acidolysis



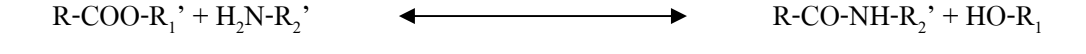
3.2 Alcoholysis



3.3 Ester Exchange (Interesterification)



3.4 Aminolysis



ภาพที่ 2 การเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ของเอนไซม์ไลเปส

Figure 2. Types of reaction catalyzed by lipase.

ที่มา: Yamane (1987)

การแบ่งความจำเพาะต่อตำแหน่งเอซิลกลีเซอรอลแบ่งได้ 3 แบบ คือไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (nonspecific) ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบนตำแหน่ง 1 และ 3 บนโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (sn-1,3 specific) และไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่งที่ 2 บนโครงสร้างโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (sn-2 specific) ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลจะสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้อย่างสมบูรณ์ การเร่งปฏิกิริยาจะไม่มีการผันกลับ (nonreverse) ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับที่สูง แต่อาจจะพบไดเอซิลกลีเซอรอล และโมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นอินเตอร์มีเดียท (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum, Pseudomonas fluorescens, Candida cylindracea, C. rugosa* และ *Penicillium cylindracea* (Okumura *et al*., 1981) สำหรับเอนไซม์ไลเปส ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันส่วนใหญ่แล้ว จะเป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันบริเวณตำแหน่ง 1 และ 3 ซึ่งจะตัดไขมันตรงตำแหน่งที่ 1 และ 3 ใน

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

ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันพบในธรรมชาติน้อยมาก แต่พบว่าความจำเพาะยังขึ้นอยู่กับการควบคุมสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา ไลเปสโดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันสายสั้นที่ไม่อิ่มตัวน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันสายยาวที่อิ่มตัว อย่างไรก็ตาม Malcata และคณะ (1992) รายงานว่าไลเปสบางชนิด เช่น ไลเปสจาก *Mucor miehei* มีความสามารถในการย่อยสลายกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน C_4 และ C_6 ได้สูงที่พีเอช 5.3 และ 8.0 ซึ่งมีประโยชน์ในการผลิตสารที่มีกลิ่นรสในเนยแข็ง และไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน C_8 ถึง C_{10} ได้ดีกว่ากรดไขมันตัวอื่น

4.6 เอนไซม์ไลเปส PS

เอนไซม์ไลเปส PS เป็นเอนไซม์ที่ผลิตในทางการค้าชนิดผง ซึ่งคัดแยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนไตรเอซิลกลีเซอรอลผลผลิตที่ได้ คือ ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ พีเอชที่เหมาะสมคือ พีเอชที่เป็นกลาง (พีเอช 7) มีความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

การนำเอนไซม์ไลเปส PS มาใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล พบว่าสามารถผลิตได้ในปริมาณสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาให้ต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤติ (Tc) ของของผสมในปฏิกิริยาเกิดเป็นของแข็งทำให้เกิดการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ดี และในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลแบบต่อเนื่อง โดยมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวละลายสับสเตรท พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์แบบ Continuous stirred-tank reactor (CSTR) และ Packed-bed reactor (PBR) โดยใช้เอนไซม์ไลเปส PS ตรึงรูป 1500 มิลลิกรัม อัตราการป้อนสับสเตรท 0.02 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเท่ากัน พบว่าให้การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเฉลี่ยเท่ากับ 25.94 และ 51.24 เปอร์เซ็นต์ ในถังปฏิกรณ์แบบ CSTR และ PBR ตามลำดับ ในช่วง 72 ชั่วโมง (Kaewthong, 2004)

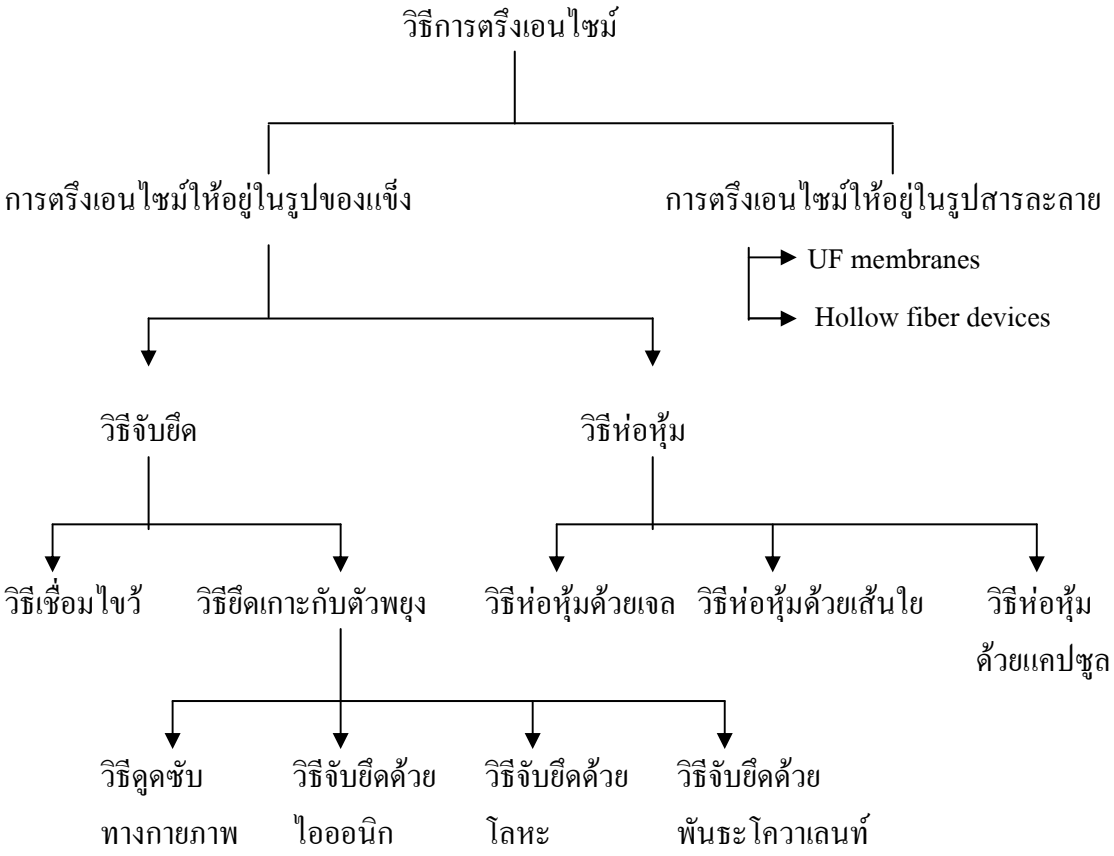
5. การตรึงเอนไซม์ไลเปส

การใช้เอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันในรูปเอนไซม์อิสระ แม้จะเป็นวิธีการที่ทำกันได้ง่ายและรวดเร็วก็ตาม แต่ก็มีข้อจำกัดในด้านราคา ความคงตัวของเอนไซม์รูปแบบการใช้มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง การแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก และสภาวะการเกิดปฏิกิริยามี

ความจำเพาะ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ซึ่งการตรึงรูปเอนไซม์จะสามารถแก้ปัญหาต่างๆให้ลดลงได้ แต่อย่างไรก็ตามผลกระทบของการตรึงรูปเอนไซม์ก็อาจมีได้ เช่น กิจกรรมอาจลดลง เนื่องจากโครงสร้างสามมิติเปลี่ยนแปลงไป ปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ปัญหาการปนเปื้อนเนื่องจากตัวพยุงหรือตัวพยุงทำปฏิกิริยากับผลผลิต

5.1 กรรมวิธีการตรึงเอนไซม์

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกทำให้อยู่ในขอบเขตจำกัดอาจเชื่อมกับวัสดุหรือสารที่ใช้ยึดเกาะโดยที่เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมอยู่ สามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งและสะดวกต่อการใช้ในระบบต่อเนื่อง Kennedy และ Cabral (1987) ได้จัดแบ่งกรรมวิธีการตรึงเอนไซม์ไว้ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การจำแนกวิธีการตรึงเอนไซม์

Figure 3. Method of enzyme immobilization.

ที่มา : Kennedy และ Cabral (1987)

ตารางที่ 5 วิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบต่างๆ

Table 5. Method for immobilized lipase.

Method of immobilization	**Source of lipase**	**Support or Barrier**	**Substrate**
Adsorption	*Candida cylindracea*	Polypropylene	BFT
	Aspergillus niger	Polypropylene	ไขมันนม
	Thermomyces lanugonosus	NA	น้ำมันมะกอก
	Thermomyces lanuginosus	Acrylic	ไขมันสัตว์
	Rhizopus sp.	PVC	น้ำมันทานตะวัน
	Candida rugosa	Sephadex	น้ำมันมะกอก
	Candida antarctica	Synthetic resin	Tributyrin
	Mucor miehei	Synthetic resin	Tributyrin
	Rhizopus sp.	Celite	น้ำมันปาล์ม
	Mucor miehei	Duolite	ไตรกลีเซอไรด์
	Humicola lanuginosus	Ca-alginate	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Cellulose	น้ำมันถั่วเหลือง
	Candida rugosa	Sephadex	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Polypropylene	ไขมันนม
	Mucor miehei	Synthetic resin	น้ำมันเมล็ดละหุ่ง
	Aspergillus niger	Polypropylene	ไขมันนม
	Thermomyces lanuginosus	NA	ไขมันวัว
	Aspergillus niger	Polypropylene	Butterfat
	Pseudomonas fluorescens	Decylchloroacetate emulsion	Decylchloacetate
	Candida rugosa	Celite, glass	Phosphatidylcholine
	Rhizopus delemar	Polypropylene	
	Rhizopus niveus	Amberlite	
	Candida rugosa	Polypropylene	ไขมันวัว ไขมันหมู น้ำมันมะกอก
	Chromobacterium viscosum	$CaCO_3$ Celite	น้ำมันมะกอก

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.)

Method of immobilization	**Source of lipase**	**Support or Barrier**	**Substrate**
	Rhizopus arrhizus	Celite	น้ำมันปาล์ม
Covalent binding	*Candida rugosa*	PEG	น้ำมันมะกอก
	Humicola lanuginosa	Amberlite,Diatom	น้ำมันมะกอก
	Porcine pancreas	Cellulose	น้ำมันมะกอก
	Candida cylindracea	Sepharose	Tributyrin
	Porcine pancreas	EPSPS	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	PVC	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Chitin	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Agarose	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Chitosan	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Sepharose	น้ำมันมะกอก
	Candida rugosa	Trisacyl Synthetic resin	น้ำมันมะกอก
	Rhizopus sp.	TAS	น้ำมันปาล์ม
Cross-linking	*Humicola lanuginosa*	Octry-Sepharose	น้ำมันมะกอก
	Rhizopus sp.	PTFE	น้ำมันทานตะวัน
	Candida cylindracea	PTFE, PVC	น้ำมันทานตะวัน
Entrapment	*Rhizopus* sp.	PVC	น้ำมันทานตะวัน
	Candida cylindracea	ENT, ENTP	ไขมันนม
	Rhizopus arrhizus	ENT, ENTP	ไขมันนม
	Candida cylindracea	Sodium alginate	Bytyl-butanoate
Containment	*Candida rugosa*	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	Rhizopus delemar	BSP	น้ำมันมะกอก
		Polyurethane	ไขมันนม
	Chromobacterium viscosum	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	Candida cylindracea	AOT-RM	น้ำมันมะกอก

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (cont.)

Method of immobilization	Source of lipase	Support or Barrier	Substrate
	Pseudomonas fluorescens	AOT-RM	น้ำมันมะกอก
	Candida cylindracea	Polyamide	น้ำมันมะกอก
Precipitation	Human milk	-	เอซิลกลีเซอรอล
	Candida rugosa	-	น้ำมันมะกอก
	Candida cylindracea	-	น้ำมันปลาทูน่า
	Pseudomonas fluorescens	-	Anchovy oil
			Menhaden oil
	Candida cylindracea	-	Borage seed oil
Ion exchange	*Rhizopus miehei*	Synthetic resin	Lesquerrella
			Fendleri oil

หมายเหตุ: AOT-RM = Sodium bis (2-ethylhexy) sulphosuccinate reverse micelles

BFT = bleachable fancy tallow

BSP = biomass support particles

ENT = cross-linkable resin prepolymer containg polyethylene glycol

ENTP = cross-linkable resin prepolymer containg polyethylene glycol

EPSPS = epoxypropylsilanized PartiSphere-5

NA = not available

PEG = polyethylene glycol

PTFE = polytetrafluoroethylene

ที่มา: ดัดแปลงจาก Balcao และคณะ (1996)

5.1.1 การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีแบบห่อหุ้ม (Entrapping method)

วิธีการห่อหุ้ม เป็นวิธีการตรึงรูปแบบรวมเอนไซม์อิสระ ไว้ในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้บ้าง (semipermeable membrane) ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ ห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย (lattice type) และห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (microcapsule type) ดังแสดงในภาพที่ 4 การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้แตกต่าง

จากวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ และวิธีเชื่อมขวาง กล่าวคือ เอนไซม์ไม่เชื่อมพันธะเคมีใดๆ กับสารห่อหุ้ม ดังนั้นวิธีนี้จึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย แม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดสารพอลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มนั้นต้องการภาวะที่รุนแรงมาก อาจจะมีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงต้องเลือกหาสภาวะที่มีผลกระทบน้อยที่สุด

1) วิธีห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่าย

การห่อหุ้มเอนไซม์ ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ ทำได้ในลักษณะที่ผสมเอนไซม์เข้ากับสารห่อหุ้มในขณะกำลังเกิดพอลิเมอร์ โมเลกุลของเอนไซม์จะถูกห่อหุ้มด้วยช่องตาข่ายอย่างสม่ำเสมอทุกช่องอย่างช้าๆ ตัวอย่างพอลิเมอร์และโมโนเมอร์ และสารเชื่อมขวางที่ใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์ คือ พอลิเมอร์ธรรมชาติ ได้แก่ แป้ง แป้งบุก (glucomannan polymer), ไคทินไคโทซาน อัลจิเนต คาร์ราจีแนน เป็นต้น พอลิเมอร์สังเคราะห์ (สร้างจากโมโนเมอร์และไดเมอร์) ได้แก่ พอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide), พอลิไวนีลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol), พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol), ไดเมทอะคริลเลต พอลิเมอร์ (dimethacrylate polymer) เป็นต้น สารเชื่อมขวางระหว่างสายพอลิเมอร์ ได้แก่ กลูทารัลดีไฮด์ และสารอื่นๆ ตามความเหมาะสมของชนิดพอลิเมอร์สังเคราะห์และพันธะเคมีที่เกี่ยวข้อง เพื่อสร้างช่องตาข่ายระหว่างสายตรงของพอลิเมอร์ จะได้ช่องตาข่ายที่สม่ำเสมอและคงตัว ส่วนพอลิเมอร์ธรรมชาติไม่นิยมใช้สารเชื่อมขวาง เนื่องจากการเกิดช่องตาข่าย (lattica) ในพอลิเมอร์ธรรมชาติเกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องใช้ตัวเชื่อมขวาง กล่าวคือ ช่องตาข่ายของสายพอลิเมอร์ธรรมชาติจะอยู่ในลักษณะช่องตาข่ายแบบกายภาพ ซึ่งเกิดจากสายสาขาของพอลิเมอร์ธรรมชาติจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบเกิดช่องตาข่ายขึ้นเอง ดังนั้นขนาดช่องตาข่ายจะขึ้นกับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ และจะขยายกว้างได้ถ้าลดความเข้มข้น และยังมีช่องตาข่ายที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนของน้ำกับโมเลกุลของพอลิเมอร์ อย่างไรก็ตาม ช่องตาข่ายทั้ง 2 แบบนี้ไม่แข็งแรงจึงต้องเติมสารเชื่อมขวาง ถ้าต้องการเพิ่มความแข็งแรงและความคงตัวของช่องตาข่ายในพอลิเมอร์

2) วิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก

เทคนิคการทำแคปซูลเล็กได้เริ่มขึ้นมาจาก บริษัท National Cash Register Co., USA. ได้นำมาใช้ทำกระดาษก๊อบปี้ไร้คาร์บอน (carbonless copy paper) ในปี ค.ศ. 1954 จากนั้นได้มีการนำมาพัฒนาดัดแปลงใช้ในอุตสาหกรรมประเภทอื่น ๆ เช่น ยา อาหาร เครื่องสำอาง สีย้อม เชื้อเพลิง เป็นต้น สำหรับการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์นั้นได้มีการพัฒนามาด้วยหลักการเดียวกันแต่กรรมวิธีจะต้องควบคุมให้ดี ป้องกันผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แคปซูลเล็กของเอนไซม์ที่ได้ริเริ่มทำกันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-100 ไมครอน กรรมวิธีการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์มีวิธีต่าง ๆ แบ่งตามลักษณะการเกิดพอลิเมอร์

ก. วิธีการเกิดพอลิเมอร์ระหว่างชั้น (Interfacial polymerization method)

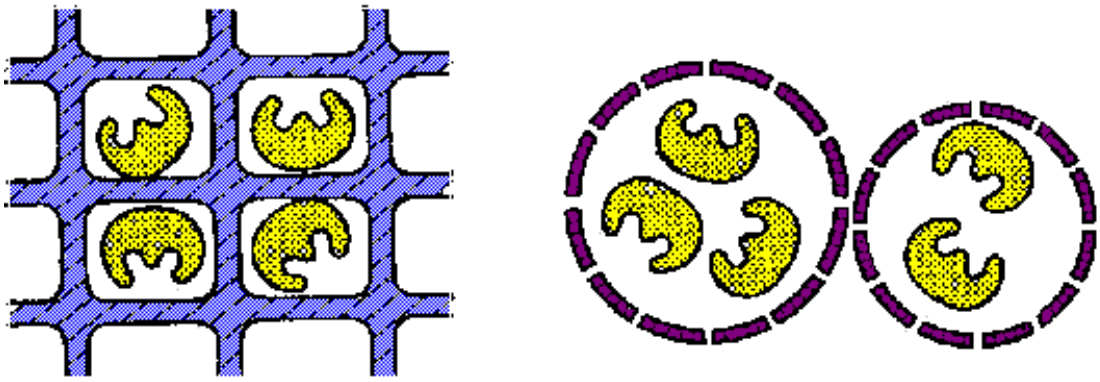
เป็นวิธีการห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยพอลิเมอร์ ซึ่งทำเป็นแผ่นบาง สารซึมผ่านได้บางส่วน การทำแคปซูลเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดพอลิเมอร์ที่เกิดจากโมโนเมอร์ต่างชนิดกัน 2 อย่าง คือ โมโนเมอร์ชอบน้ำ (hydrophilic monomers) และโมโนเมอร์ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic monomer) เกิดพอลิเมอร์ที่ระหว่างชั้น (interfacial polymerization)

ข. วิธีการทำแห้ง (Liquid drying method)

เป็นวิธีการทำแคปซูลเล็กของเอนไซม์ โดยการละลายสารพอลิเมอร์แล้วทำให้แห้ง ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกไป ขณะเกิดแคปซูลเล็กของเอนไซม์ ในกรรมวิธีการทำแคปซูลเล็กด้วยวิธีนี้ มีข้อควรพิจารณาคือ การควบคุมให้เกิดอิมัลชัน ครั้ง 2 หรือชั้นที่ 2 นั้นปกติทำได้ยาก จึงต้องเลือกสารลดแรงตรึงผิวที่จะรักษาความคงตัวของคอลลอยด์ให้เหมาะสม และในขั้นตอนที่ 3 ซึ่งจะแยกตัวทำละลายอินทรีย์ให้สมบูรณ์ทำได้ยาก เพราะอาจจะไปรวมกับสารลดแรงตึงผิวได้ดี

ค. วิธีแยกชั้น (Phase separation method)

วิธีนี้คล้ายกับวิธีทำแห้ง แต่การทำแคปซูลเล็กในลักษณะการแยกชั้นจะต้องควบคุมในช่วงของการทำแยกชั้นและการแทนที่ตัวทำละลาย โดยระวังไม่ให้ส่วนของพอลิเมอร์ตกตะกอนแยกออกมา รวมทั้งต้องแยกตัวทำละลายที่เหลือในพอลิเมอร์ออกให้หมด จึงจะได้แคปซูลที่คงตัว



ภาพที่ 4 แสดงการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีแบบห่อหุ้ม

Figure 4. Immobilized enzyme by entrapment method.

ที่มา : www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/entrap.htm 20/11/2006

5.2 ตัวพยุงสำหรับการตรึงเอนไซม์

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

เมื่อแบ่งชนิดของตัวพยุงตามลักษณะรูปร่างสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous) และกลุ่มที่ไม่มีรูพรุน (non-porous) แต่เมื่อแบ่งตามลักษณะทางเคมีสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มคือ

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

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

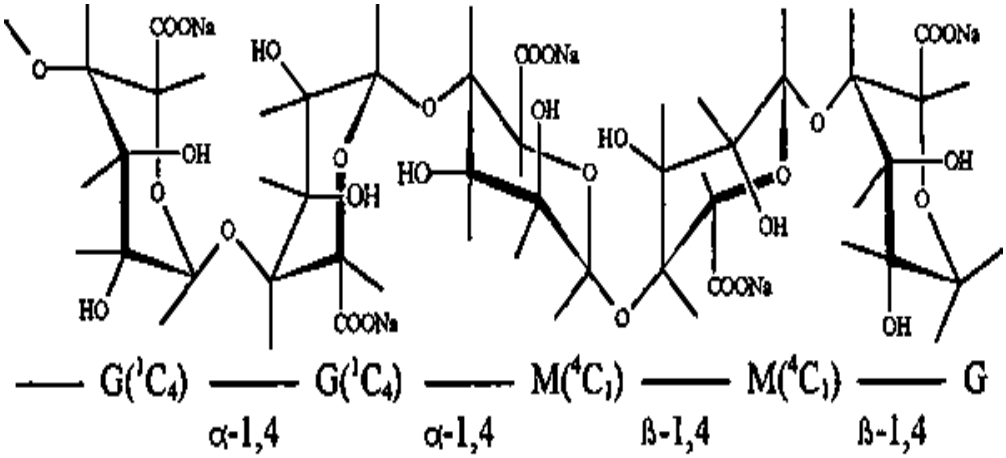
การย่อยสลายไขมันและน้ำมันในการคัดเลือกตัวพยุง นอกจากพิจารณาที่กิจกรรมของเอนไซม์แล้ว ยังต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำไปใช้คือ ความเหมาะสมในด้านราคาถังปฏิกรณ์ที่ใช้ และความเสถียรต่อสภาวะแวดล้อมในปฏิกิริยา เช่น อุณหภูมิ พีเอช และสารตัวกลางต่างๆในปฏิกิริยา

5.2.1 โซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate)

โซเดียมอัลจิเนต เป็นสารจำพวก โคพอลีเมอร์ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ของ 1,4'-linked β-D-mannuronic acid และ α-L-guluronic acid ซึ่งมีคุณสมบัติที่มีประจุเป็นลบ การใช้อัลจิเนตมาตรึงเอนไซม์ไลเปสเป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากวิธีการตรึงง่าย ไม่มีความเป็นพิษ ปฏิกิริยาในระหว่างการตรึงเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง และให้ผลในการตรึงเอนไซม์ที่สูง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าอัลจิเนตมีประจุเป็นลบ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ทำให้อัลจิเนตแข็งตัวมีประจุเป็นบวก จึงทำให้เกิดโครงร่างตาข่ายที่มีความแข็งแรง และทำให้เอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตมีความแข็งแรงตามไปด้วย ซึ่งองค์ประกอบและคุณสมบัติของโซเดียมอัลจิเนตแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงองค์ประกอบและคุณสมบัติของโซเดียมอัลจิเนต

Table 6. Composition and properties of sodium alginate**.**

<table>
<tr><td>Definition</td><td colspan="2">Sodium alginate is the sodium salt of alginic acid.</td></tr>
<tr><td>Chemical formula</td><td colspan="2">$(C_6H_7NaO_6)_n$</td></tr>
<tr><td>Structural formula</td><td colspan="2">Structural formula from Phillips, Wedlock and Williams: Gums and Stabilizers for the Food Industry 5 (1990) by permission of Oxford University Press.
 

The number and sequence of the Mannuronate and Glucuronate residues shown above vary in the naturally occurring alginate. The water molecules associated with the alginate molecule are not shown in the above structural formula.</td></tr>
<tr><td rowspan="2"></td><td>Structural unit:</td><td>198.11 (theoretical)</td></tr>
<tr><td></td><td>222 (actual average)</td></tr>
<tr><td></td><td>Macromolecule:</td><td>10,000 - 600,000 (typical average)</td></tr>
</table>

ที่มา **:** www.fao.org/docrep/W6355E/w6355e0x.htm 20/11/2006

5.2.2 ข้อดีข้อเสียของการใช้อัลจิเนตในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

1) ข้อดีของการใช้อัลจิเนตในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

- สามารถทำงานได้ทั้งปฏิกิริยาที่มีน้ำและไม่มีน้ำได้ (Keehoon *et al*., 2004)

- นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง และในปัจจุบันได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำหอม (Keehoon *et al*., 2004)

- การใช้อัลจิเนตจะเป็นวิธีที่ง่ายในกระบวนการตรึงเอนไซม์แบบห่อหุ้ม (Keehoon *et al*., 2004)

- กระบวนการตรึงเอนไซม์โดยใช้อัลจิเนตซึ่งอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดในระหว่างการตรึงจึงเป็นปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงและไม่มีความเป็นพิษ (Keehoon *et al*., 2004)

- อัลจิเนตเป็นโคพอลิเมอร์ที่เป็นประจุลบ เมื่อนำเอนไซม์มาตรึงด้วยวิธีห่อหุ้ม แล้วหยดลงใน Ca^{2+} ซึ่งมีประจุเป็นบวกจะทำให้เกิดการยึดจับกันระหว่างพันธะ ทำให้ได้โครงร่างตาข่ายที่แข็งแรงขึ้นภายใน และทำให้ได้เอนไซม์ตรึงรูปที่แข็งแรงขึ้นด้วย (Zorica *et al*., 2002)

- สามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องได้ เพื่อเป็นประโยชน์ในการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม (Peniche *et al*., 2004)

- เนื่องจากการตรึงโดยวิธีนี้ ทำให้ขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปมีขนาดใหญ่จึงแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้โดยง่าย (Peniche *et al*., 2004)

- ทนต่ออุณหภูมิสูงและพีเอชที่ไม่เหมาะสมได้ (Peniche *et al*., 2004)

- สามารถตรึงกับเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะต่ำได้ (Seema *et al*., 2002)

- สามารถทำปฏิกิริยาได้ในสารละลายอินทรีย์บางตัวที่ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ (Seema *et al*., 2002)

2) ข้อเสียของการใช้อัลจิเนตในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

- เนื่องจากขนาดของรูพรุนภายในเอนไซม์ตรึงรูปที่ตรึงด้วยอัลจิเนตจะมีขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายในหลุดออกมาได้ง่าย (Keehoon *et al*., 2004)

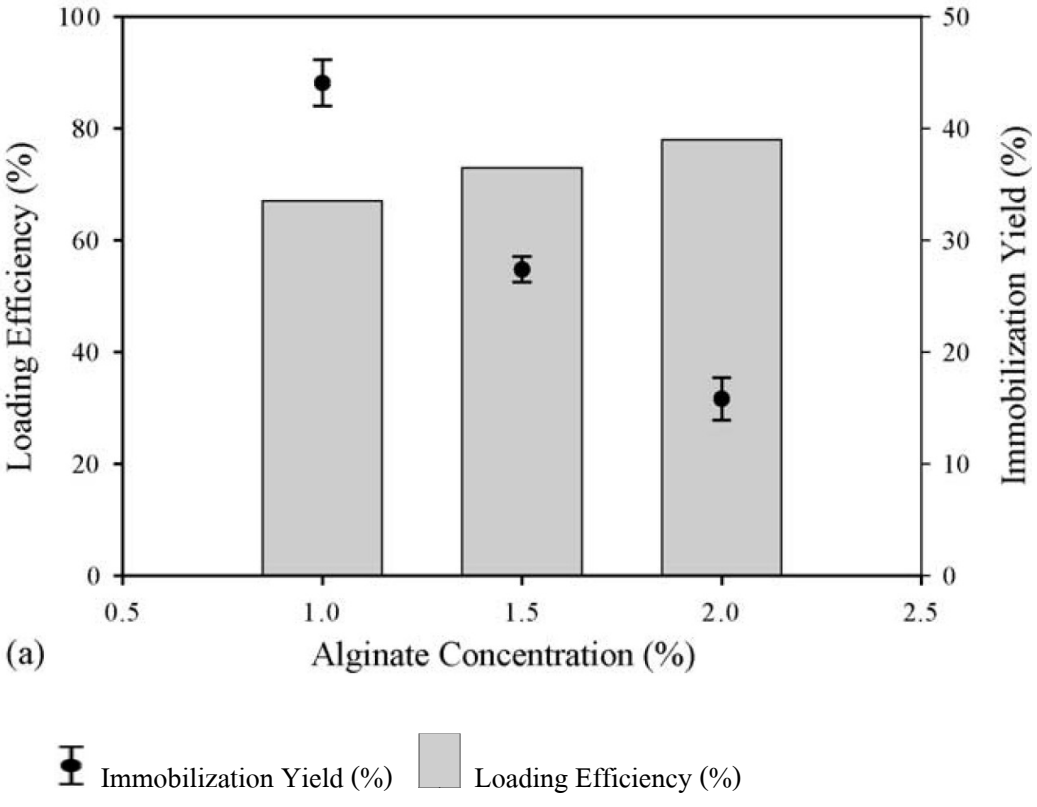
- การนำอัลจิเนตมาตรึงเอนไซม์ จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่เต็มที่ (Keehoon *et al*., 2004)

- ประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ เนื่องจากในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสับเตรทที่เป็นน้ำมันกับเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปจะสัมผัสกันได้ไม่เต็มที่ เพราะรอบนอกของเอนไซม์ตรึงรูปเป็นอนุพันธ์ของน้ำ (Goto *et al*., 2005)

5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต

5.3.1 ความเข้มข้นของอัลจิเนต

ความเข้มข้นของตัวพยุงมีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส จากงานวิจัยของ Keehom และคณะ (2004) พบว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตที่เหมาะสมในการนำมาตรึงเอนไซม์ไลเปส *Candida rugosa* แบบ Cross-linking คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไว้ภายในและจำนวนของเอนไซม์ตรึงรูปที่สูง รวมทั้งให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายและมีประสิทธิภาพการยึดเกาะที่สูงเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของอัลจิเนตเพิ่มขึ้น ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Loading Efficiency) ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย แต่กิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilization Yield) จะลดลงเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตจะทำให้ตาข่ายพอลิเมอร์มีความหนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้สับสเตรทแพร่ผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในได้ยากขึ้น ทำให้ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะลดลง



ภาพที่ 5 ผลของความเข้มข้นของอัลจิเนตในการตรึงเอนไซม์ไลเปส

Figure 5. Effects of alginate concentration on immobilization of lipase.

ที่มา: Keehoon และคณะ (2004)

จากตารางที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ใช้ตรึงเอนไซม์ไลเปส 2 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมการย่อยสลาย (Retained activity) สูงสุดเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นต่างๆของอัลจิเนต คือ 752.71 IUg^{-1} ส่วนประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Immobilization efficiency) จะให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 7 กิจกรรมและประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ

Table 7. Activity of alginate-immobilized lipase and immobilization efficiency at different alginate concentrations.

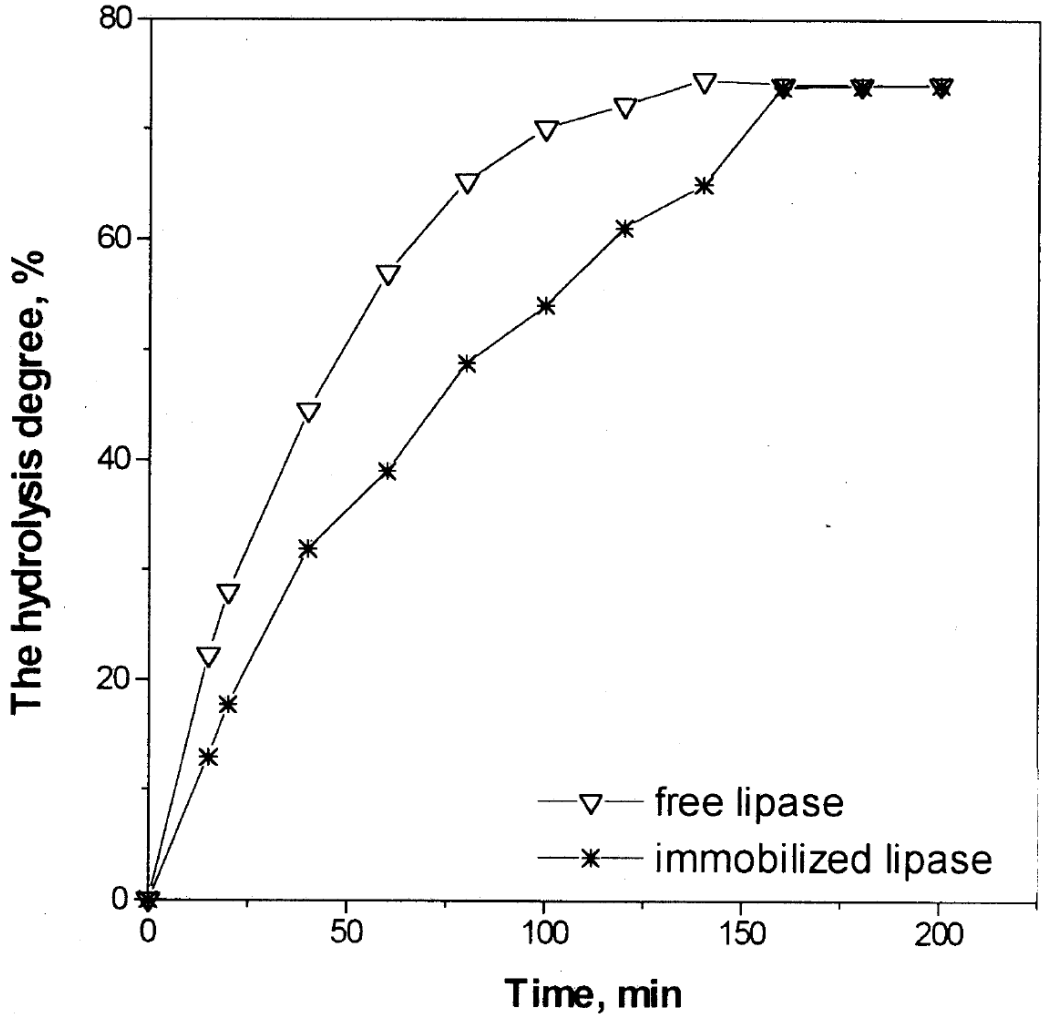
Alginate concentration (w/v)	**Activity of alginate-immobilized lipase (IU g^{-1})[a]**	**Retained activity (%)[b]**	**Immobilization efficiency (%)**
0	1003.71	100	-
2	752.71	74.99	98.2
4	578.31	57.61	99.0
6	526.89	52.49	98.7
8	225.81	22.49	99.0
10	125.45	12.49	99.2

[a] Activities of immobilized and free lipase were determined by a standard olive oil emulsion method

[b] The retained activity represents the percentage of activity corresponding to the free lipase used for the preparation of immobilized enzyme.

ที่มา: Zorica และคณะ (2002)

จากภาพที่ 6 แสดงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสอิสระ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.7 โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ 10 มิลลิกรัม และ 1 กรัม ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสได้เร็วกว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป แต่การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสสูงสุดของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป พบว่าจะมีค่าเท่ากัน คือ 74 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ไลเปสอิสระ

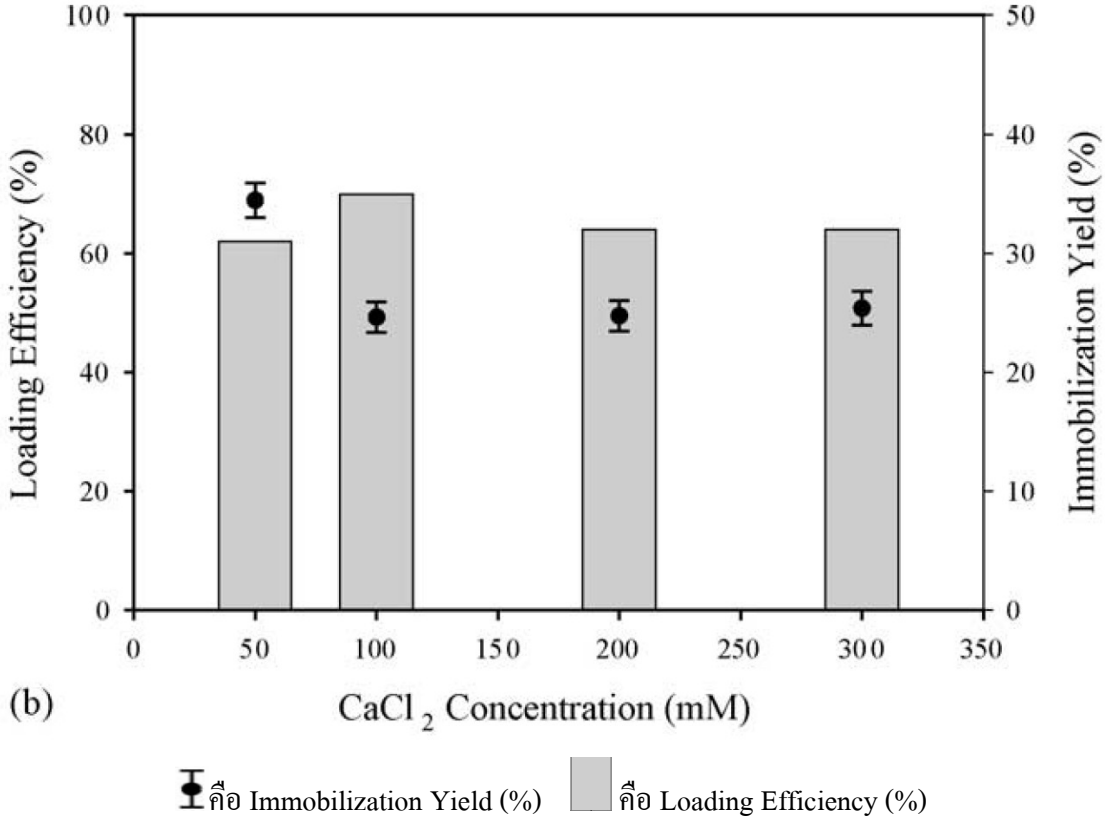
Figure 6. Time course of palm oil hydrolysis by alginate immobilized lipase and free lipase.

ที่มา: Zorica และคณะ (2002)

5.3.2 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

แคลเซียมคลอไรด์มีหน้าที่คือเป็นตัวที่ทำให้อัลจิเนตแข็งตัว เนื่องจากการยึดจับกันระหว่างประจุลบของอัลจิเนตกับประจุบวกของ Ca^{2+} และเกิดเป็นลักษณะของเม็ด beads ซึ่งจากภาพที่ 7 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์จาก 50 มิลลิโมลาร์ ถึง 300 มิลลิโมลาร์ จะมีผลต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Loading Efficiency) และกิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilization Yield) น้อยมาก เนื่องจากปริมาณของ Ca^{2+} ของแคลเซียมคลอไรด์มีเหลือเพียงพอต่อ

การสร้างตาข่ายพอลิเมอร์ ซึ่งความเข้มข้นส่วนใหญ่ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์จะอยู่ที่ 100 มิลลิโมลาร์ โดยจะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีความแข็งแรง มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายและประสิทธิภาพการยึดเกาะที่สูง (Keehoon *et al*., 2004)



ภาพที่ 7 ผลของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบ Cross-linking

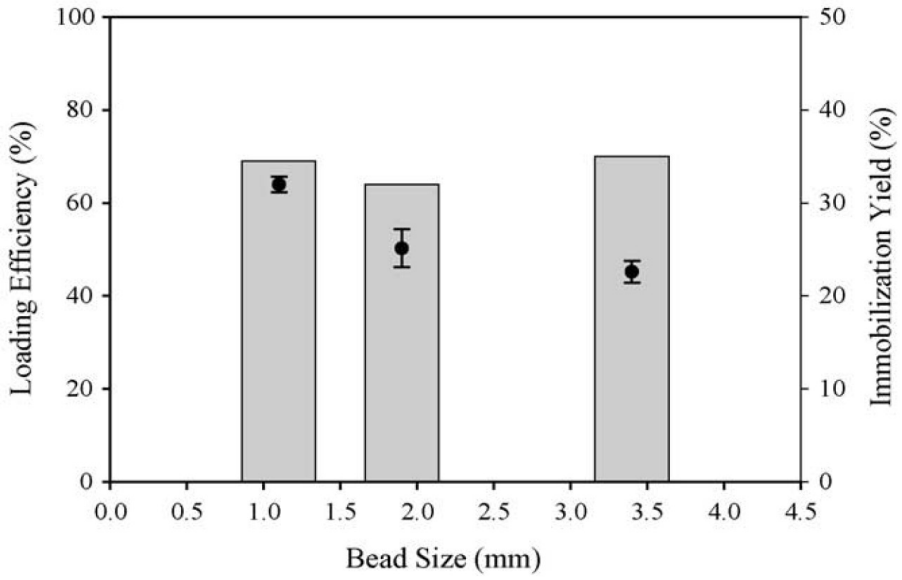
Figure 7. Effects of $CaCl_2$ concentration on immobilization of lipase by cross-linking.

ที่มา: Keehoon และคณะ (2004)

5.3.3 ขนาดของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

ขนาดของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญ เนื่องจากในการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ สับสเตรทจะต้องแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยาภายในตัวเอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ปฏิกิริยาจะเกิดได้ช้ากว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดเล็ก เพราะเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดเล็กจะทำให้สับสเตรทสามารถแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้เร็วกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ และนอกจากนี้พื้นที่ผิวสัมผัสของเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดเล็กจะมีมากกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ ในปริมาตรของเอนไซม์ตรึงรูปที่เท่ากัน ภาพที่ 8 แสดงผลของขนาดเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าเมื่อเพิ่มขนาดของ

เอนไซม์ตรึงรูปทำให้ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilization Yield) ลดลง ส่วนค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Loading Efficiency) พบว่าที่ขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปต่างๆจะไม่ส่งผลกระทบต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Keehoon *et al*., 2004)



ภาพที่ 8 ผลของขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Loading Efficiency) และค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilization Yield)

Figure 8. Effects of bead size on loading efficiency (bar) and immobilization yield (plot).

ที่มา: Keehoon และคณะ (2004)

ตารางที่ 8 แสดงผลของขนาดเข็มต่อขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนต ค่ากิจกรรมการย่อยสลาย และเปอร์เซ็นต์ของค่ากิจกรรมการย่อยสลาย พบว่าเมื่อเพิ่มขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป และค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะลดลง (Zorica *et al*., 2002)

ตารางที่ 8 ผลของขนาดเข็มต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง beads ค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและกิจกรรมหลังการยึดเกาะ

Table 8. Effects of needle size on alginate bead diameter, activity of alginate-immobilized lipase and retention of lipase activity.

Needle size (gauge)	**Alginate bead diameter (mm)**	**Activity of alginate-immobilized lipase ($IU\ g^{-1}$)[a]**	**Retained activity (%)[b]**
12	1.7±0.20	303.34	30.22
18	1.2±0.15	383.15	38.17
20	0.75±0.10	494.97	49.31
21	0.65±0.10	526.89	52.49

[a] Activities of immobilized and free lipase were determined by a standard olive oil emulsion method.

[b] The retained activity represents the percentage of activity corresponding to the free lipase used for the preparation of immobilized enzyme.

ที่มา: Zorica และคณะ (2002)

5.3.4 อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับอัลจิเนต

Zorica และคณะ (2002) พบว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อความเข้มข้นของอัลจิเนตจะส่งผลให้ได้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์สูงขึ้น แต่จะทำให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะและกิจกรรมหลังการยึดเกาะต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากอัลจิเนตมีความสามารถในการเก็บกักเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนไว้ในช่องว่างของตาข่ายที่สร้างขึ้นเท่านั้น ซึ่งตัวพยุงแต่ละตัวจะมีความสามารถในการดูดซับหรือเก็บกักได้ไม่เท่ากัน จึงทำให้เอนไซม์ส่วนที่เหลือที่ตัวพยุงไม่สามารถเก็บกักเอาไว้ได้หลุดออกมาภายนอกตัวพยุงและละลายอยู่ในสารละลาย ทำให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะต่ำลง โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับอัลจิเนตที่เหมาะสมคือ เอนไซม์ไลเปส 30 มิลลิกรัมโปรตีนและอัลจิเนต 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งจะได้ค่ากิจกรรมการย่อยสลาย และประสิทธิภาพการยึดเกาะสูง

5.4 ข้อจำกัดของการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต

ข้อจำกัดของการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต คือ ตาข่ายพอลิเมอร์ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ที่ได้จะมีขนาดใหญ่ทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายใน ซึ่งแนวทางการแก้ปัญหาคือการนำสารตัวอื่นมาหุ้มไว้ภายนอกของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะทำให้รูของเอนไซม์ตรึงรูปมีขนาดเล็กลง โดยสารที่นำมาหุ้มควรมีคุณสมบัติที่เป็นตาข่ายพอลิเมอร์เช่นกันแต่มีขนาดของช่องว่างเล็กกว่า ตัวอย่างสารที่นำมาหุ้มได้แก่ ไคโตแซนและซิลิเคต เป็นต้น

5.4.1 ผลของการหุ้มเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การตรึงด้วยอัลจิเนต เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม การใช้วิธีนี้กับเอนไซม์ยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ คือในระหว่างการนำไปใช้นั้นเอนไซม์ที่ตรึงไว้อยู่ภายในจะมีการรั่วออกมา ซึ่งเป็นผลให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง จากรายงานวิจัยของ Keehoon และคณะ (2004) พบว่าการนำสารพอลิเมอร์ไคโตแซนและซิลิเคตมาหุ้มไว้ภายนอก จะทำให้ขนาดของรูพรุนเล็กลง

จากตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปพบว่าเอนไซม์ที่ทำการหุ้มด้วยไคโตแซนและซิลิเคต มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้ทำการหุ้ม และยังพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ทำหุ้มด้วยซิลิเคต เมื่อนำกลับมาใช้ใหม่จะให้ประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยหลังทำปฏิกิริยาในครั้งที่ 3 เอนไซม์ตรึงรูปยังคงมีค่ากิจกรรมอยู่ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ของค่ากิจกรรมในครั้งแรก

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยอัลจิเนตที่ทำการหุ้มและไม่ได้หุ้มด้วยไคโตแซน และซิลิเคต ในการทดลองใช้ซ้ำ

Table 9. Average and relative activity of repeated use of alginate-immobilized lipase with and without chitosan and silicate coating.

	1st run	2st run	3st run
Alginate beads			
Average activity (mmol/(min g bead))	15.1±0.2	11.4±0.3	10.9±0.5
Relative activity (%)	100	75	72
Chitosan-coated alginate beads			
Average activity (mmol/(min g bead))	9.5±1.1	8.7±0.4	7.3±0.7
Relative activity (%)	100	92	77
Silicate-coated alginate beads			
Average activity (mmol/(min g bead))	13.0±1.3	12.6±0.9	11.3±0.7
Relative activity (%)	100	97	87

ที่มา: Keehoon และคณะ (2004)

6. การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ในกระบวนการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในระบบโรงงานอุตสาหกรรม จะผลิตโดยกระบวนการกลีเซอโรไลซีสน้ำมันและไขมันโดยวิธีทางเคมี ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูง (200-250 เซลเซียส) ทำให้เกิดของเสียที่เป็นมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เกิดสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์ ได้ผลผลิตน้อย ผลิตภัณฑ์มีกรดและเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้น (Kimura *et al*., 1983) จึงต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ในตอนหลังอีกครั้งหนึ่ง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน และปฏิกิริยาไม่มีความจำเพาะเจาะจง มีผลทำให้ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่ำ (Kosugi and Tomizuka, 1995) นอกจากนี้ยังได้สารประกอบอื่นๆ เช่น ketone และ hydrocarbon

นอกจากวิธีทางเคมีแล้วโมโนเอซิลกลีเซอรอลสามารถสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ไลเปส ซึ่งมีข้อดี คือ เกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง เกิดได้ที่ความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ใช้ขนาดของถังปฏิกรณ์เล็กกว่า ทำให้ประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง เกิดของเสียและวัสดุเหลือทิ้งน้อยและสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การย่อยสลายน้ำมันหรือไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 การใช้ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของกรดไขมัน ปฏิกิริยาทราน-

เอสเทอริฟิเคชั่นของ Fatty ester กับกลีเซอรอล และการใช้ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันและไขมันกับกลีเซอรอล (ภาพที่ 8)

6.1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายของน้ำมันและไขมัน

การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันในการย่อยสลายเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ให้ผลผลิตเป็น 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล (ภาพที่ 9 สมการที่ 1) แต่พบว่าวิธีนี้ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลน้อย เนื่องจากไตรเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล จะได้ กรดไขมันอิสระ 2 โมล และ โมโนเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล (Borncheuer, 1995) จากการย่อยน้ำมันละหุ่งโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 จากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* พบว่าสามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 23 เปอร์เซ็นต์ และกรดไขมัน 66 เปอร์เซ็นต์ (Flenk and Spener 1990 อ้างโดย Bornscheuer, 1995) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizopus arrhizus* ที่ตรึงบนซีไลท์ยังสามารถผลิต 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ 97 เปอร์เซ็นต์ จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไตรปาล์มิติน ที่มีเอธานอลเป็นตัวทำละลาย (Millqvist *et al*., 1994)

6.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกลีเซอรอล

การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของกรดไขมัน หรือเอสเทอร์ของกลีเซอรอล (ภาพที่ 9 สมการที่ 2, 3) การควบคุมสภาวะของปฏิกิริยามีความจำเป็นมากกว่าปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยสภาวะที่สำคัญคือ ต้องมีน้ำในปฏิกริยาน้อย (Borncheuer, 1995) ตัวอย่างการสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นดังแสดงในตารางที่ 10

6.3 ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส

การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากปฏิกริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมัน และ ไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยามีข้อดีกว่าวิธีอื่น เนื่องจากไตรเอซิลกลีเซอรอล 1 โมล ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 3 โมล (ภาพที่ 9 สมการที่ 4) พบว่าปัจจัยที่สำคัญของวิธีการนี้ คือ อุณหภูมิ จากการศึกษาพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของน้ำมันและไขมันแต่ละชนิดเรียกว่า “Critical temperature” (Tc) ซึ่งน้ำมันและไขมันแต่ละชนิดจะมีค่า Tc แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำมันและไขมันชนิดนั้นๆ นอกจากนี้ ปริมาณน้ำ สัดส่วนของไตรเอซิลกลีเซอรอลกับกลีเซอรอล รวมทั้งปริมาณและชนิดของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมยังช่วยเพิ่มปริมาณโมโนเอซิล-กลีเซอรอลได้อีกด้วย (McNeill and Yamane, 1991)

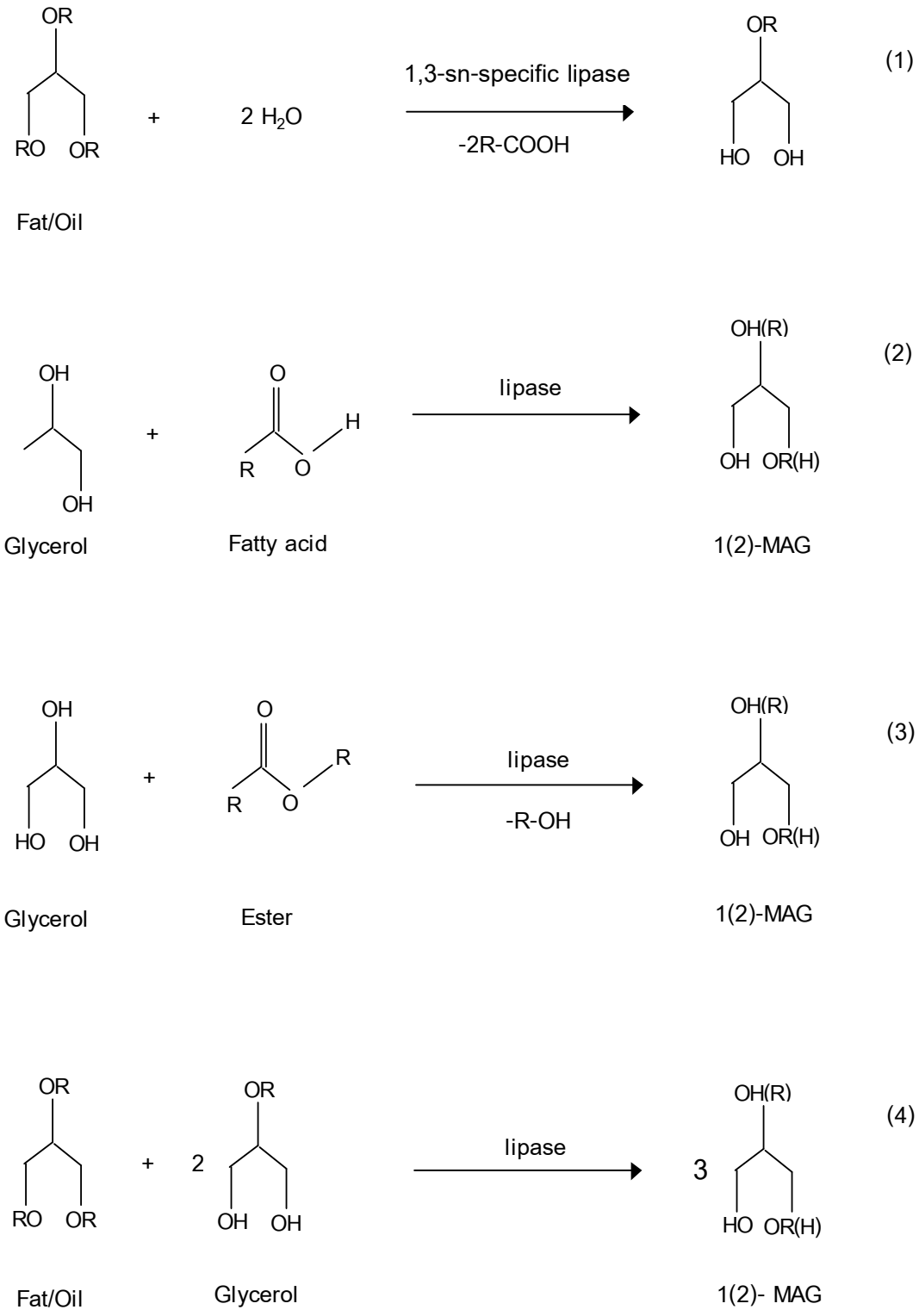
ตารางที่ 10 การสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปส

Table 10. Enzymatic monoacylglycerol production.

Lipase	Substrate	Product
Mucor miehei	Oleic acid	1-MAG (max. 32%)
Aspergillus niger, Rhizopus delemar, Geotrichum candidum, Penicillium cyclopium	Oleic acid	1,(3)-MAG
Penicillium camembertii	Oleic acid	MAG (max. 74%)
Penicillium sp., Lipozyme	Oleic acid	MAG
Rhizopus arrhizus	Oleic acid	MAG (17.9-44.1%)
Candida antarctica	Oleic acid, ethyloleate	MAG (7.2-68%)
Rhizopus delemar	Oleic acid and other	1-MAG, 50-60%conv.
Lipozyme	Oleic acid and Stearic acid	MAG, 30-70%conv.
Lipozyme	(S)-17-hydroxystearic acid	MAG (max. 84%)
Geotrichum candidum, Pseudomonas sp., *Mucor miehei*	EPA, DHA	MAG (6.4-65%)
Penicillium cyclopium, Rhizopus sp.	Solid FFA (C_{17})	MAG (max.96%)
Chromobacterium viscosum	C_6-C_{18}, $C_{18:1}$	MAG
Humicola lanuginosa	C_2-C_{20}	MAG
Candida rugosa		MAG>90%

max: maximum, conv.: conversion

ที่มา : Bornscheuer (1995)



ภาพที่ 9 การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

Figure 9. Enzymatic monoacylglycerol production.

ที่มา : Bornscheuer (1995)

Bornscheuer และ Yamane (1994) เปรียบเทียบการสังเคราะห์โมโนลัวริลกลีเซอรอล (monolaurylglycerol, MGL) ด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* โดยปฏิกิริยาต่างๆ ได้แก่ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของกลีเซอรอล โดยกรดลอริก (lauric acid) ใน bis-(2-ethylhexy) sulfosuccinate sodium salt (AOT)/isooctane ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นของกลีเซอรอลโดยไวนิลลัวเรท (vinyl laurate) ทั้งสองปฏิกิริยาจะให้ผลผลิตของไดลัวริลกลีเซอรอลมากกว่าโมโนลัวริลกลีเซอรอล สำหรับปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของไตรลัวริน (trilaurin) และ ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นของ protected glycerol, 1,2-o-isopropyllidene glycerol พบว่าสองปฏิกิริยานี้จะให้ผลผลิตโมโนลัวริลกลีเซอรอลมากกว่าไดลอริลกลีเซอรอล

6.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลจากปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของไขมันและน้ำมันโดยเอนไซม์ไลเปส

6.4.1 ชนิดของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดจะมีผลต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความจำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจากการทดลองของ Kaewthong และคณะ (2004) พบว่าเอนไซม์ไลเปส PS ที่ถูกตรึงรูปด้วย Accurel สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้ปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในระบบแบบต่อเนื่องได้ในปริมาณสูงถึง 14.34 เปอร์เซ็นต์ McNeill และคณะ (1990) พบว่า การใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscocum* และ *Pseudomonas fluorescens* ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสของไขมันวัว ให้ปริมาณโมโนเอซิลกลีเซอรอล 70 เปอร์เซ็นต์

เอนไซม์ไลเปสแต่ละชนิดจะเหมาะสมกับไขมันแตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาของนักวิจัยหลาย ๆ ท่าน ดังสรุปในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล

Table 11. Lipase for monoacylglycerol production.

Substrate	Lipase	Monoacylglycerol (%)	References
น้ำมันข้าวโพด	*Pseudomonas fluorescens*	20.1	(Yamane *et al*., 1986)
Olive oil	*Chromobacterium viscosum*	80	(Chang and Rhee, 1991)
Olive oil	*C. viscosum*	90	(Kamlangdee and Yamane, 1996)
Trioleic	*C. viscosum*	96	(Bornscheuer and Yamane, 1994)
ไขมันวัว	*Mucor miehei*	50	(Stevenson *et al*., 1993)
ไขมันวัว	*P. fluorescens*	70	(McNeill *et al*., 1990)
น้ำมันปลาทะเล	*Pseudomonas sp.*	42-53	(Myrnes *et al*., 1995)
น้ำมันหมู	*P. fluorescens*	69	(McNeill *et al*., 1991)
ปาล์มสเตียริน	*P. fluorescens*	86	(McNeill *et al*., 1991)
น้ำมันทานตะวัน	*Rhizopus delemar*	53	(Tuter *et al*., 1998)

ที่มา : โสภา พรหมดวง (2543)

6.4.2 ปริมาณน้ำ

น้ำจะมีผลต่อการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถละลายได้ดีในน้ำ และปริมาณน้ำที่ใช้จะมีผลต่อพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับสับสเตรท โดย Chang และ Rhee (1991) ศึกษาปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของน้ำมันมะกอกในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ที่ถูกตรึงบน liposome เพื่อผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล และไดเอซิลกลีเซอรอล พบว่า ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาไม่ควรเกิน 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถ้าปริมาณน้ำมากจะเกิดกรดไขมันอิสระปริมาณมากด้วย

6.4.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส เรียกว่า Critical temperature (Tc) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันและน้ำมัน สำหรับไขมันและน้ำมันในธรรมชาติ เช่น ไขมันวัว น้ำมันปาล์ม ปาล์มสเตียริน จะอยู่ระหว่าง 30-46 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 65-90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่น้ำมันที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องได้แก่ น้ำมันมะกอก จะมีค่า Tc เท่ากับ 10 องศาเซลเซียส (McNeill *et al*., 1991) จะให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ การควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาให้ต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤติ (Tc) โมโนเอซิลกลีเซอรอลจะเกิดเป็นของแข็งแยกตัวจากที่เป็นสภาวะของเหลว ทำให้ในปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวเกิดการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ดี

6.4.4 สภาวะการเกิดปฏิกิริยา

ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะใช้สภาวะในการดำเนินปฏิกิริยา 2 ลักษณะคือ ในสภาวะ Liquid-phase และ ในสภาวะ Solid – phase จากการศึกษาของ Yang และ Parkin (1994) พบว่าในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลในระบบ Liquid-phase โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. บ่มปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำในกลีเซอรอล 2.5 - 4.8 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 0.33-0.44 กรัมต่อกรัมไขมันเนย ให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล 50-55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าในกระบวนการผลิตในสภาวะ Solid – phase

จากการศึกษาของ Ohta และคณะ (1989) ยังพบว่าข้อดีของสภาวะ Solid – phase คือ สามารถผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยไม่มีการเติมตัวทำละลายสารอินทรีย์ในปฏิกิริยา และผลผลิตถูกปลดปล่อยออกมาในรูปผลึก (Crystallization) ถึง 70-99 เปอร์เซ็นต์

Bornscheuer และ Yamane (1994) ยังพบว่าในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสไตรโอลีนที่มีสภาวะเป็น Solid-phase เอนไซม์ไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* สามารถสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลได้มากที่สุด 96 เปอร์เซ็นต์

Stevenson และคณะ (1993) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยากลีเซอโรไลซิสของไขมันวัว ในสภาวะ Solid - phase ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Mucor miehei* ในระบบกะได้ผลผลิตของโมโนเอซิลกลีเซอรอล 35 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระบบต่อเนื่องได้ผลผลิตของโมโนเอซิลกลีเซอรอลน้อยมาก

6.4.5 สัดส่วนของน้ำมันหรือไขมันกับกลีเซอรอล

ผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม จะมีผลต่อปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากกลีเซอรอลที่เติมเข้าไปจะเป็นตัวรับกรดไขมันอิสระในกระบวนย่อยสลาย ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส เรียกปฏิกิริยานี้ว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Esterification)

การศึกษาผลของสัดส่วนกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์ม ที่ใช้ในปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส พบว่าสัดส่วนโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปาล์มที่เหมาะสมคือ 3.7 และให้ผลผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลสูงสุดคือ 42.5 เปอร์เซ็นต์ (โสภา พรหมดวง , 2543)

6.4.6 ตัวทำละลายอินทรีย์

การผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล ด้วยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีสน้ำมันปาล์มโอลีอีนและกลีเซอรอล พบว่าเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โมโนเอซิลกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ของผสมในปฏิกิริยากลายสภาพเป็นของแข็ง เนื่องจากจุดหลอมเหลวของโมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมันสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา จึงไม่สามารถทำการผลิตแบบต่อเนื่องได้ การแก้ปัญหาทำได้โดย 1). การเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาในการผลิตให้สูงกว่าจุดหลอมเหลวของโมโนเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมัน แต่ข้อจำกัดของการเพิ่มอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาให้สูงขึ้นจะทำให้ความคงตัวของเอนไซม์ลดลง 2). การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อละลายสับสเตรท สามารถลดความหนืดของน้ำมันและไขมัน และเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับน้ำมัน แต่มีข้อจำกัดในด้านความคงตัวของเอนไซม์เช่นกัน Damstrup และคณะ (2005) พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง เพราะตัวทำละลายอินทรีย์จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และการเพิ่มตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ความเข้มข้นของสับสเตรทลดลง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ เฮปเทน (heptane), เฮกเซน (hexane), ไซโครเฮกเซน (cyclohexane), ออกเทน (octane), ไอโซออกเทน (isooctane) ไดไอโซโปรพิวอีเทอร์ (diisopropyl ether), เบนซีน (benzene), อะซีโตน (acetone), อีทิลอีเทอร์ (ethyl ether) และ ไอโซโปรพานอล (isopropanol) (Damstrup *et al*., 2005)

Damstrup และคณะ (2005) พบว่าไลเปสทำงานได้ดีเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่าลอกการิทึมของค่าสัมประสิทธิ์การแยกละลายระหว่างออกทานอลและน้ำ (log *P*) มากกว่า 4 เพราะมีค่าใกล้เคียงกับน้ำมัน ทำงานได้ปานกลางเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log *P* ในช่วง 2-4 และทำงานได้ต่ำมากเมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log *P* น้อยกว่า 2 Yang และ Parkin (1994) สรุปว่าสามารถใช้ค่า log *P* ของตัวทำละลายอินทรีย์ในการพิจารณาคัดเลือกตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

Kwon และ Rhee (1989) พบว่าการใช้ไอโซออกเทน และ ไซโครเฮกเซน ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงบน Sephadex LH-60 เป็น 100 และ 84.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของการใช้ออกเทนและเฮกเซนพบว่ามีค่าเป็น 59.1 และ 52.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Yang และ Rhee (1991) พบว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีความคงตัวในเฮกเซนน้อยกว่าในไอโซออกเทน และยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระจาก *Candida rugosa* ในเฮกเซนมีกิจกรรมเพียง 15-30 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมในไอโซออกเทน นอกจากนี้ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย โดย Bellot และคณะ (2001) พบว่าเฮกเซนที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต
2. เพื่อศึกษาการเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยการหุ้ม
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต
4. เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนต

ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาความเข้มข้นของอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปและประสิทธิภาพการยึดเกาะสูงสุด หลังจากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไปทำการหุ้มด้วยซิลิเคตเพื่อลดปัญหาการรั่วของเอนไซม์ โดยจะศึกษาเวลาในการหุ้มเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่ให้ค่ากิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูปสูงที่สุด เมื่อได้เอนไซม์ตรึงรูปที่ผ่านการหุ้มแล้ว ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเอนไซม์ตรึงรูปไปใช้ในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยากลีเซอโรไลซีส จากนั้นทดลองนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อทดสอบความคงตัวและประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูป และศึกษาจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการกลีเซอโรไลซีสโดยเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้