



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การสังเคราะห์ไดอะซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

Synthesis of Diacylglycerol from Palm Oil Distillate

นามผู้วิจัย นางสาวสงศรี สันติสวัสดิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุทัย กลิ่นเกษร, ปร.ด. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์สิริ ชัยเสรี, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฏฐภัทร จินดา, ปร.ด. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณิ จิระภาคย์กุล, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสังเคราะห์ไดอะซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

Synthesis of Diacylglycerol from Palm Oil Distillate

โดย

นางสาวสงศรี สันติสวัสดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

พ.ศ. 2556

สงฺศรี สันติสวสฺตี 2556: การสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุทัย กลิ่นเกษร, ปร.ด. 93 หน้า

ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม (Palm oil distillate) เป็นผลผลิตพลอยได้หลักที่สำคัญจาก  
กระบวนการทำบริสุทธิ์ (Refining) น้ำมันปาล์ม ซึ่งมีปริมาณถึงร้อยละ 4 ของน้ำมันปาล์มดิบเริ่มต้น โดย  
ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมีกรดไขมันอิสระประมาณร้อยละ 80 ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นสารตั้ง  
ต้นในการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol, DAG) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้  
งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิ  
เคชันระหว่างของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มและกลีเซอรอล โดยใช้ไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* เป็น  
ตัวเร่งปฏิกิริยา โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ศึกษาอิทธิพลของ  
ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น ( $X_1$ : 0.75-2.25 โมล) ปริมาณเอนไซม์ ( $X_2$ : ร้อยละ 2.0-3.0  
โดยน้ำหนัก) และปริมาณสารดูดความชื้น หรือ molecular sieve ( $X_3$ : ร้อยละ 25-35 โดยน้ำหนัก) ต่อ  
ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ จากการศึกษา พบว่าสมการถดถอยที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ของตัว  
แปร และหาสภาวะที่เหมาะสม มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจของสมการถดถอย ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.87 แสดง  
ให้เห็นว่าสมการถดถอยดังกล่าวมีความเหมาะสมกับข้อมูลชุดนี้ และสามารถใช้นำมาทำนายปริมาณ DAG ที่  
สังเคราะห์ได้ค่อนข้างดี จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง  
พบว่าที่อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น 1.23 โมล ปริมาณสารดูดความชื้นร้อยละ 31.1 โดยน้ำหนัก และปริมาณ  
เอนไซม์ร้อยละ 2.32 โดยน้ำหนัก จะทำให้ได้ปริมาณ DAG มากที่สุด คือร้อยละ 44.9 โดยน้ำหนัก และ  
เมื่อนำ DAG ที่สังเคราะห์ได้ไปผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไฮ  
ดรอกไซด์ พบว่าปริมาณของ DAG เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก เมื่อนำ DAG หลังการทำบริสุทธิ์ไป  
วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน พบว่ามีกรดพาล์มิติกร้อยละ 71.5 โดยน้ำหนัก กรดโอเลอิกร้อยละ  
23.3 โดยน้ำหนัก กรดสเตียริกร้อยละ 4.2 โดยน้ำหนัก กรดไมริสติกร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนัก และกรด  
ลิโนเลนิกร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Songsri Santisawadi 2013: Synthesis of Diacylglycerol from Palm Oil Distillate. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Assistant Professor Utai Klinkesorn, Ph.D.  
93 pages.

Palm oil distillate, a co-product of the palm oil refining process, obtains 4% of initial crude palm oil. It has approximately 80% of free fatty acid. Therefore, palm oil distillate can be used as substrate for synthesis of DAG in order to add value to a co-product. The objective of this study was to investigate the optimum condition for DAG synthesis by lipase-catalyzed esterification of glycerol with palm oil distillate using lipase from *Rhizomucor miehei*. The effect of independent variables including substrate molar ratio (0.75 to 2.25 mol), enzyme concentration (2.0 to 3.0 wt%) and the amount of molecular sieve (25 to 35 wt%) on the DAG yield were determined using a three factors central composite design (CCD). Significant regression models which explain the effect of different levels of independent variables on DAG yield and optimum conditions were determined. The coefficient of determination values ( $R^2 = 0.87$ ) for the model indicated that response surface analysis could be a proper methodology for optimizing the DAG synthesis. A lack of fit analysis revealed a non-significant value for the model equation, indicating that the regression equation was adequate for predicting the conversion of DAG. The optimum conditions obtained from the response surface analysis was 1.23 mol for the molar ratio between fatty acid and glycerol, 31.1 wt% molecular sieve and 2.32 wt% enzyme. Alkaline neutralization of the esterification products yielded neutralization residues containing approximately 70% DAG. The fatty acid compositions of DAG are palmitic acid 71.5%, oleic acid 23.3%, stearic acid 4.2%, myristic acid 0.9% and linolenic acid 0.4%.

\_\_\_\_\_  
Student's signature

\_\_\_\_\_  
Thesis Advisor's signature

\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุทัย กลิ่นเกษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร. สิริ ชัยเสรี และ ผศ.ดร. ณัฏฐภัทร จินดา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ดร. สิริรุ่ง วงศ์สกุล ผู้ทรงคุณวุฒิ และ ดร. กนิษฐพร วังใน ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ให้คำปรึกษาในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ พร้อมข้อเสนอแนะในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และบุคลากรภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารที่คอยอำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานทั่วไป รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ และขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านปาล์ม น้ำมัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือในเรื่องวัสดุดิบ และการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2552

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ เป็นห่วงเป็นใย สนับสนุน เชื้อมนั่น เข้าใจ และอยู่เคียงข้างมาโดยตลอด และขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจเสมอมา ขอขอบคุณสำหรับทุกสิ่งทุกอย่างที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สงศรี สันติสวัสดิ์

มกราคม 2556

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	40
ผลและวิจารณ์	50
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	83
ภาคผนวก ก ภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์	84
ภาคผนวก ข โครมาโตแกรม กราฟมาตรฐาน และแผนภาพ	87
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	93

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม	7
2	องค์ประกอบกรดไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม	7
3	องค์ประกอบของแอสิดกลีเซอรอลในน้ำมันบริโภค (g/100g)	12
4	คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันไตรแอสิดกลีเซอรอล (TAG oil) และน้ำมันไดแอสิดกลีเซอรอล (DAG oil)	14
5	แผนการทดลองแบบ CCD ที่ใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ไดแอสิดกลีเซอรอล	47
6	องค์ประกอบไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	51
7	การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ (Significant test) ของปัจจัยต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ DAG ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01	58
8	ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่สภาวะการสังเคราะห์ต่างๆ กัน	60
9	ความน่าจะเป็น (p-value) ที่ได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูลจากการสังเคราะห์ DAG	61
10	ค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) และความน่าจะเป็น (p-value) ของพจน์ (Term) ต่างๆ ในสมการโพลีโนเมียลกำลังสอง	61
11	การทวนสอบความถูกต้องของสมการในการทำนายปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้	62
12	องค์ประกอบไขมันของสารผลิตภัณฑ์	67
13	องค์ประกอบกรดไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน และสารผลิตภัณฑ์หลังการทำบริสุทธิ์	68

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด	9
2 โครงสร้างของสฟิงโกไมอีลิน	10
3 ไชผึ้ง (Beeswax) (a) ไมริซิลพาล์มิเตต (Myricyl palmitate) (b) เซทิลพาล์มิเตต (Cetyl palmitate)	11
4 โครงสร้างโมเลกุลของไดเอซิลกลีเซอรอล (Structure of diacylglycerol) โดยที่ R คือหมู่เอซิล	13
5 กระบวนการเผาผลาญ TAG และ DAG ในร่างกาย	15
6 แผนภาพการสังเคราะห์ DAG	20
7 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design สำหรับ 3 ปัจจัย	36
8 กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ	50
9 ผลของ molecular sieve ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้	53
10 ผลของอัตราการกวนผสมต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้	54
11 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้	55
12 ผลของอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้	56
13 ผลของระยะเวลาต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้	57
14 แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ โดย A เป็นแผนภาพ คอนทัวร์ระหว่างปริมาณ molecular sieve (wt%) และอัตราส่วนโมล สารตั้งต้น (โมล) และ B เป็นแผนภาพคอนทัวร์ระหว่างปริมาณ molecular sieve (wt%) และปริมาณเอนไซม์ (wt%) และ C เป็นแผนภาพคอนทัวร์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ (wt%) และอัตราส่วน โมลสารตั้งต้น (โมล)	64

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า	
ก1	ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มก่อน (a) และหลัง (b) การทำบริสุทธิ์	85
ก2	DAG ที่สังเคราะห์ได้	85
ก3	DAG ที่สังเคราะห์ได้หลังจากการทำบริสุทธิ์ก่อน (a) และหลัง (b) การระเหยตัวทำละลาย	86
ข1	กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟินอล	88
ข2	โครมาโตแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน	88
ข3	โครมาโตแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของ DAG หลังจากการทำบริสุทธิ์	89
ข4	การแยกองค์ประกอบไขมันของ DAG โดย HPTLC โดยแถวที่ 1 (จากซ้ายไปขวา) คือสารมาตรฐานผสมโมโนเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระ และไตรเอซิลกลีเซอรอล (จากล่างขึ้นบน ตามลำดับ) ส่วนแถวที่ 2-5 คือตัวอย่าง DAG	89
ข5	แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ molecular sieve 38.4 wt% (A) และ 21.6 wt% (B)	90
ข6	แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น 2.76 (A) และ 0.24 (B)	91
ข7	แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ ปริมาณเอนไซม์ 3.34 wt% (A) และ 1.66 wt% (B)	92

## การสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

### Synthesis of Diacylglycerol from Palm Oil Distillate

#### คำนำ

ไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol, DAG) เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 2 โมเลกุล และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 1 หมู่ DAG มี 2 รูป คือ 1,2-(หรือ 2,3)-DAG และ 1,3-DAG ซึ่งในธรรมชาติจะพบในอัตราส่วน 3:7 (Kristensen *et al.*, 2005a) 1,3-DAG จะพบมากในน้ำมันบริโภค เนื่องจากเป็นรูปที่เสถียร ส่วน 1,2-DAG จะเปลี่ยนเป็น 1,3-DAG ในระหว่างกระบวนการผลิตซึ่งใช้อุณหภูมิสูงหรือในระหว่างการเก็บรักษา (Yasukawa and Katsuragi, 2004) DAG นิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ในปัจจุบัน พบว่าน้ำมันไดเอซิลกลีเซอรอล (DAG oil) สามารถนำไปใช้เป็นน้ำมันบริโภคได้เช่นเดียวกับน้ำมันทั่วไป (Shimizu *et al.*, 2004) อีกทั้ง DAG oil ยังมีผลดีต่อสุขภาพมากกว่าน้ำมันที่ใช้กันโดยทั่วไป หรือน้ำมันไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol oil, TAG oil) เนื่องจาก DAG oil ช่วยยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับไขมันที่มากเกินไปหลังจากการรับประทานอาหาร (Tomonobu *et al.*, 2006) นอกจากนี้การบริโภค DAG oil ยังช่วยยับยั้งการสะสมไขมันในร่างกายได้ดีกว่า TAG oil (Maki *et al.*, 2004) ดังนั้น DAG oil จึงช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคได้ โดยปกติน้ำมันที่ใช้กันทั่วไปมี DAG เป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อย (ประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก) แต่สำหรับ DAG oil ต้องมี DAG เป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 80

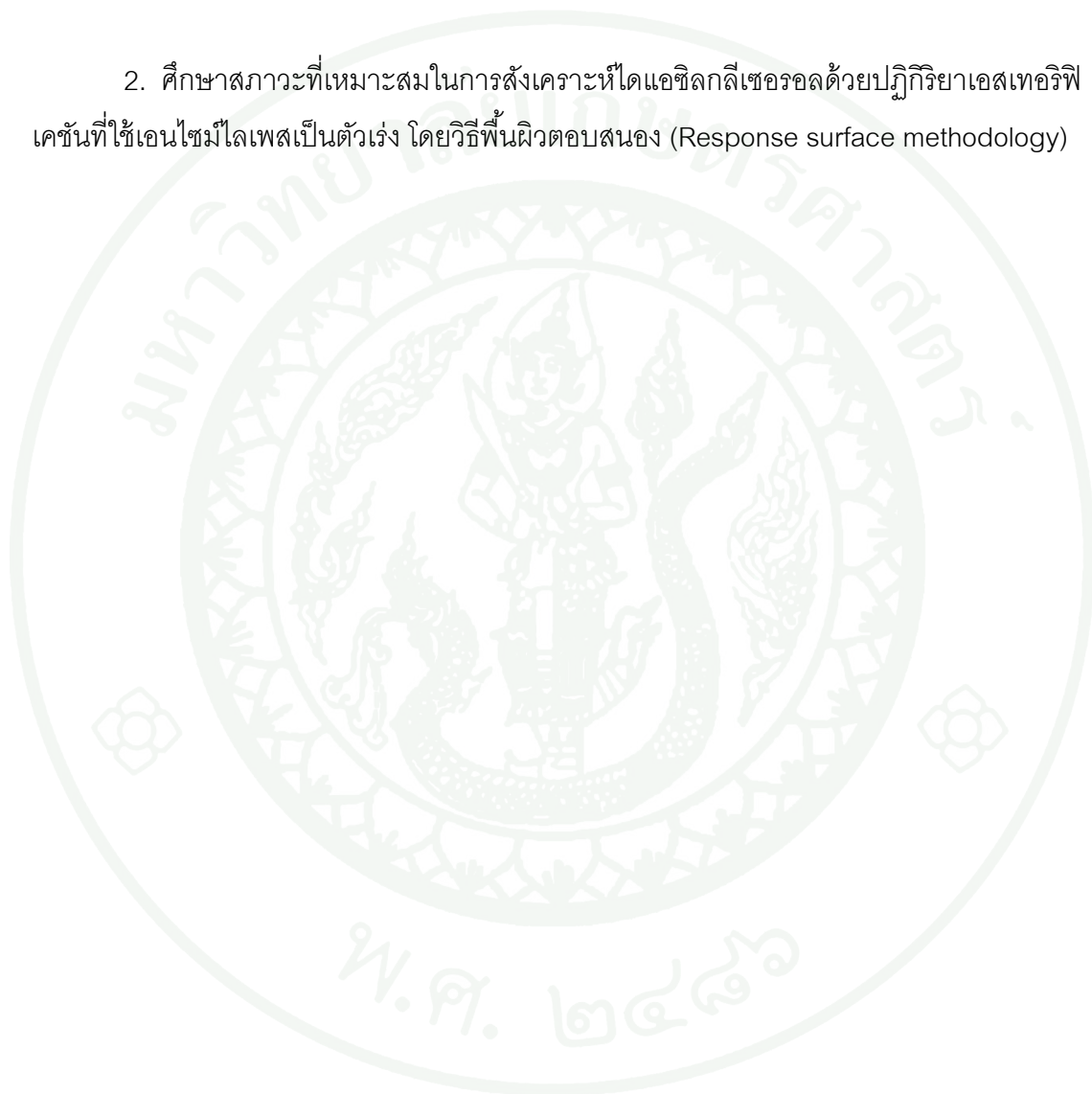
การสังเคราะห์ DAG สามารถทำได้หลายวิธี หรือใช้หลายวิธีร่วมกันได้ (Myrnes *et al.*, 1995; Plou *et al.*, 1996; Gunstone, 1999; Shimada *et al.*, 1999; Weber and Mukherjee, 2004; Kristensen *et al.*, 2005a, 2005b; Fregolente *et al.*, 2008; Tangkam *et al.*, 2008) ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์มักจะมีตัวเร่งทางเคมีหรือเอนไซม์ร่วมด้วย (Berger *et al.*, 1992; Li and Ward, 1993; Lo *et al.*, 2004a, 2004b; Negesha *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2005; Chong *et al.*, 2007; Tangkam *et al.*, 2008) ปฏิริยาที่ใช้เอนไซม์มีข้อดีมากกว่าปฏิริยาทางเคมี เนื่องจากสามารถทำปฏิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิห้อง และป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการได้ (Myrnes *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 2004b; Fregolente *et al.*, 2008) สำหรับเอนไซม์ที่ใช้กันมาก คือไลเปส (EC 3.1.1.3) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส เร่งปฏิริยา

ไฮโดรไลซิสสลายพันธะเอสเทอร์ในไขมันและน้ำมัน นอกจากนี้ยังเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ได้ด้วย (ณกัญภัทร และทรัพย์ทวี, 2549) ในงานวิจัยนี้ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ที่มีความจำเพาะเจาะจงที่พันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง 1 และ 3 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ คือ 1,3-DAG และ 1(3)-MAG ซึ่งเป็นรูปที่เสถียร และจะไม่มี 2-MAG และ 1,2-DAG เกิดขึ้น ดังนั้นจึงทำให้สังเคราะห์ 1,3-DAG ได้ปริมาณมากกว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ (Beger *et al.*, 1992; Li and Ward *et al.*, 1993) และเอนไซม์นี้ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง ดังนั้นเมื่อใช้ในปริมาณที่น้อยก็สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี และไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยา นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ยังเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่หาได้ง่าย และราคาไม่สูงมาก ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์โดยเฉพาะปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันมีหลายปัจจัย ได้แก่ สารช่วยกำจัดน้ำ อุณหภูมิ ความจำเพาะของเอนไซม์ แหล่งของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลา และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น เป็นต้น (Beger *et al.*, 1992; Li and ward, 1993; Lo *et al.*, 2004a, 2004b; Kristensen *et al.*, 2005a, 2005b; Chaiyaso *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2007; Fregolente *et al.*, 2008; Tangkam *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ DAG จากของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มยังมีน้อยมาก จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษา

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศ และเป็นพืชน้ำมันที่มีบทบาทสำคัญในธุรกิจน้ำมันพืชเพื่อการบริโภค น้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันที่มีการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น อุตสาหกรรมอาหารว่างและขนมขบเคี้ยว อุตสาหกรรมบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป เป็นต้น น้ำมันปาล์มดิบประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol, TAG) มากกว่าร้อยละ 90 และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid, FFA) ร้อยละ 2.4-4.5 (Lau *et al.*, 2005) กระบวนการทำให้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ (Refining) เพื่อให้เหมาะกับการบริโภค จะมีผลผลิตพลอยได้ที่สำคัญ คือของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม (Palm oil distillate) ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 4 ของน้ำมันปาล์มทั้งหมด (Chaiyaso *et al.*, 2006) โดยของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มจะมีกรดไขมันอิสระประมาณร้อยละ 80 (Chong *et al.*, 2007) ซึ่งของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมีการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นหรือใช้ร่วมในกระบวนการผลิตยา หรือนำมาสกัดสารไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) รวมทั้งยังนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสบู่ และน้ำมันไบโอดีเซลอีกด้วย และการนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ DAG ในงานวิจัยนี้จึงเป็นอีกแนวทางที่จะนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างสูงสุด

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology)



## การตรวจเอกสาร

### ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม

ผลปาล์มจะประกอบด้วยส่วนของชั้นเปลือก (Mesocarp) ในชั้นนี้จะมีน้ำมัน เรียกว่า น้ำมันปาล์ม (Palm oil) จากชั้นเปลือกจะมีกะลา (Shell) หุ้มเมล็ดในอยู่ ภายในเมล็ดจะมีน้ำมันอีก ชนิด เรียกว่าน้ำมันเมล็ดใน (Kernel oil) น้ำมันปาล์มมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง และมีบทบาทมาก ในอุตสาหกรรมอาหารทอด เนื่องจากมีราคาถูก และมีสมบัติคงตัวดีกว่าน้ำมันพืชอื่นๆ คือเกิด ออกซิเดชันกับอากาศเมื่อถูกความร้อน และมีกลิ่นหืนได้ค่อนข้างยาก

การแปรรูปขั้นต้นของปาล์มน้ำมัน ได้แก่ การสกัดหรือบีบเอาน้ำมันออกจากเปลือกผล ปาล์ม ซึ่งเรียกว่าน้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil-CPO) และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม (Crude palm kernel oil-CPKO) ซึ่งมีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีกระบวนการผลิตต่างกัน 3 แบบ คือ

1. กระบวนการสกัดน้ำมันแบบมาตรฐาน เริ่มจากการนำทะลายปาล์มมาอบด้วยไอน้ำ จากนั้นจึงนำทะลายปาล์มไปเข้าเครื่องแยกผลปาล์มออกจากทะลาย แล้วนำผลปาล์มไปย่อยด้วย เครื่องย่อย จากนั้นก็จะส่งเข้าเครื่องหีบ
2. กระบวนการสกัดน้ำมันแบบทอดผลปาล์ม ขั้นตอนการอบและแยกผลปาล์มออกจาก ทะลายจะเหมือนวิธีการแรก แต่ผลปาล์มที่แยกออกมาจะถูกนำไปทอดด้วยน้ำมันปาล์ม จากนั้น ปาล์มที่สุกแล้วจะถูกนำไปเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัดคู่
3. กระบวนการหีบน้ำมันผสม ใช้ผลปาล์มร่วงเป็นวัตถุดิบโดยนำผลปาล์มมาให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 180-200 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลปาล์มไปหีบน้ำมันด้วยเครื่องหีบ จะได้น้ำมันผสม ระหว่างน้ำมันจากเปลือกและเมล็ดใน (ผาสุข และคณะ, 2528)

น้ำมันดิบที่บีบแยกออกมาจะมีสารประกอบอื่นละลายออกมาเจือปนอยู่ด้วย ซึ่งสารเจือปน ต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อสี กลิ่น และรสชาติของน้ำมันปาล์ม สารเจือปนในน้ำมันดิบจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มไฮโดรไลติก (Hydrolytic) ประกอบด้วย ความชื้น สิ่งสกปรก กรดไขมันอิสระ กลีเซอไรด์ และเอนไซม์ต่างๆ
2. กลุ่มออกซิเดทีฟ (Oxidative) ประกอบด้วย เศษผงโลหะ สารออกซิเดชันต่างๆ เม็ดสี โทโคเฟอร์รอล (Tocopherols) และฟอสฟาไทด์ (Phosphatides)
3. สารที่เป็นตัวเร่งให้เกิดสารพิษ ได้แก่ สารประกอบพวกไนโตรเจน กำมะถัน และฮาโลเจน ตลอดจนฟอสฟาไทด์ และสารออกซิเดชันต่างๆ จึงต้องนำน้ำมันปาล์มมาผ่านการกลั่นให้บริสุทธิ์ (Refining process)

การกลั่นน้ำมันปาล์มให้บริสุทธิ์มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดกลิ่น รสชาติ และสีที่ไม่ต้องการ แต่ทั้งนี้ก็เพื่อรักษาสารที่มีประโยชน์ให้คงอยู่ ได้แก่ วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น การกลั่นน้ำมันปาล์มให้บริสุทธิ์มี 2 แบบ คือกระบวนการทางเคมี เริ่มด้วยการกำจัดสารเจือปนจำพวกกลุ่มออกซิเดทีฟ ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด หรือฟอสฟาไทด์ ด้วยกรดฟอสฟอริก ต่อจากนั้นก็ผ่านกระบวนการกำจัดกรดไขมันอิสระ เรียกว่ากระบวนการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระกลายเป็นโซสบู่ ซึ่งเป็นสารแขวนลอยและละลายน้ำได้ แล้วเหวี่ยงแยกโซสบู่ออกจากน้ำมัน และนำน้ำมันที่ได้จากการเหวี่ยงแยกมาล้างด้วยน้ำร้อนหลายๆ ครั้งเพื่อกำจัดโซสบู่ที่ยังคงเหลืออยู่ ก็จะได้น้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระไม่เกินร้อยละ 0.03 จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปไล่ความชื้นออกภายใต้สุญญากาศ แล้วนำไปฟอกสีด้วยดินฟอกสีที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เมื่อฟอกสีแล้วก็นำไปกรองเอาดินฟอกสีออก ต่อจากนั้นก็ผ่านกระบวนการกำจัดกลิ่น (Deodorization) ซึ่งเป็นการพ่นไอน้ำเข้าไปภายใต้สุญญากาศเพื่อแยกเอากรดที่หลงเหลืออยู่พร้อมทั้งแอลดีไฮด์ (Aldehydes) และคีโตน (Ketones) ซึ่งเป็นตัวทำให้น้ำมันเกิดกลิ่นหืนออก กระบวนการนี้สามารถฟอกสีน้ำมันได้ด้วย น้ำมันที่ผ่านกระบวนการนี้แล้วจะมีความบริสุทธิ์สามารถบริโภคได้ ส่วนกระบวนการทางกายภาพจะแตกต่างจากกระบวนการทางเคมีตรงขั้นตอนการกำจัดกรดไขมันอิสระ กระบวนการทางกายภาพจะกำจัดกรดไขมันอิสระในขั้นตอนการกำจัดกลิ่น โดยกระบวนการทางกายภาพเป็นกระบวนการที่นิยมใช้มากกว่ากระบวนการทางเคมี เนื่องจากใช้สารเคมีน้อยกว่า กระบวนการทางกายภาพเริ่มด้วยการกำจัดสิ่งเจือปนจำพวกกลุ่มออกซิเดทีฟ ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด หรือฟอสฟาไทด์ ด้วยกรดฟอสฟอริก สารเจือปนจะรวมตัวกันเป็นก้อน และฟอกสีน้ำมันด้วยดินฟอกประมาณร้อยละ 1-2 จากนั้นผ่านเข้าเครื่องกรอง แล้วกำจัดกรด (Deacidification) พร้อมๆ กับการกำจัดกลิ่น (Deodorization) โดยพ่นไอน้ำภายใต้

สูญญากาศที่อุณหภูมิสูงกว่า 220 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเอกรดไขมันอิสระและสารออกซิเดชัน เม็ดสี แอลดีไฮด์ และคีโตนออกจากน้ำมัน (Gibon *et al.*, 2007)

กระบวนการทางกายภาพมีข้อดีหลายประการ คือต้นทุนการผลิตต่อหน่วยจะต่ำกว่ากระบวนการทางเคมี เพราะใช้สารเคมีน้อย และสูญเสียน้ำมันน้อย แต่มีข้อเสีย คือจะสูญเสียวิตามินอี กระบวนการแบบนี้สามารถแยกเอกรดไขมันอิสระที่มีความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 95 ออกมาได้ ซึ่งจะนำไปแยกส่วนทำผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด และจะไม่มีน้ำเสียที่เกิดจากการล้างไซสบู (ผาสูข และคณะ, 2528; Cmolik and Pokorny, 2000)

### ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม (Palm oil distillate)

ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มเป็นส่วนที่ได้มาจากกระบวนการสุดท้ายของการกลั่นบริสุทธิ์ทางกายภาพ ซึ่งเป็นส่วนที่มีกรดไขมันอิสระปริมาณมาก องค์ประกอบของของเหลวผลกลั่นขึ้นกับชนิดของน้ำมัน กระบวนการทำบริสุทธิ์ และสภาวะในขั้นตอนการกำจัดกลิ่น การกลั่นน้ำมันปาล์มให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการทางกายภาพ ของเหลวผลกลั่นจะประกอบด้วยกรดไขมันอิสระเป็นหลัก (ร้อยละ 83-88) สารที่สaponify ไม่ได้ (Unsaponification matter) ร้อยละ 2-4 และน้ำมันร้อยละ 8-13 (Gibon *et al.*, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 1 และมีกรดพาล์มิติก (Palmitic acid) เป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในตารางที่ 2

### ลิพิด

ลิพิดเป็นกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่มีสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไม่มีขั้ว (Non-polar) และชนิดที่มีขั้ว (Polar) เล็กน้อย ยกเว้นกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถละลายได้ในน้ำ

#### องค์ประกอบที่สำคัญของลิพิด (Major lipid components)

1. กรดไขมัน (Fatty acids)

**ตารางที่ 1** คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

Properties	Palm oil distillate
Slip melting point (°C)	47.50
Free fatty acid (%)	83.80
Monoacylglycerols (MAG, %)	4.45
Diacylglycerols (DAG, %)	5.22
Triacylglycerols (TAG, %)	3.01
Total fatty components (%)	96.47
Iodine value (g I <sub>2</sub> /100 g oil)	64.30
Saponification value (mg KOH/g oil)	208.51
Unsaponification matter (%)	2.26

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Chua *et al.* (2007)

**ตารางที่ 2** องค์ประกอบกรดไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

Fatty acid	Content (%)
Oleic acid (C18:1)	36.48
Palmitic acid (C16:0)	50.00
Stearic acid (C18:0)	4.39
Linoleic acid (C18:2)	7.82
Myristic acid (C14:0)	1.31

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Posada *et al.* (2007)

กรดไขมันส่วนใหญ่ในธรรมชาติพบเป็นองค์ประกอบในไขมันหรือน้ำมัน ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันหรือไขมันจะเป็นตัวกำหนดสมบัติทางกายภาพ ความคงตัว และคุณค่าทางโภชนาการของน้ำมันหรือไขมัน โดยน้ำมันหรือไขมันที่พบในธรรมชาติจะมีปริมาณกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว รวมถึงองค์ประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างนี้สามารถนำมาใช้ในการแยกแยะแหล่งที่มาของน้ำมันหรือไขมันได้ การกระจายตัวของกรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอลจะส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพ ความคงตัวต่อการถูกออกซิไดซ์ และคุณค่าทางโภชนาการของไขมัน กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์สายตรงที่มีหมู่คาร์บอกซิล 1 หมู่ มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{RCOOH}$  โดย R- คือหมู่อัลคิลในโมเลกุลของกรดไขมัน และ  $-\text{COOH}$  คือหมู่คาร์บอกซิล โดยหมู่คาร์บอกซิลจะมีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก จึงทำให้กรดไขมันสามารถแตกตัวออกได้เป็นประจุลบ และหมู่ R- มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก ซึ่งละลายในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว จึงทำให้โมเลกุลของกรดไขมันมีทั้งส่วนที่ละลายได้ในน้ำและในน้ำมัน (นิธิยา, 2548; Gunstone, 2003)

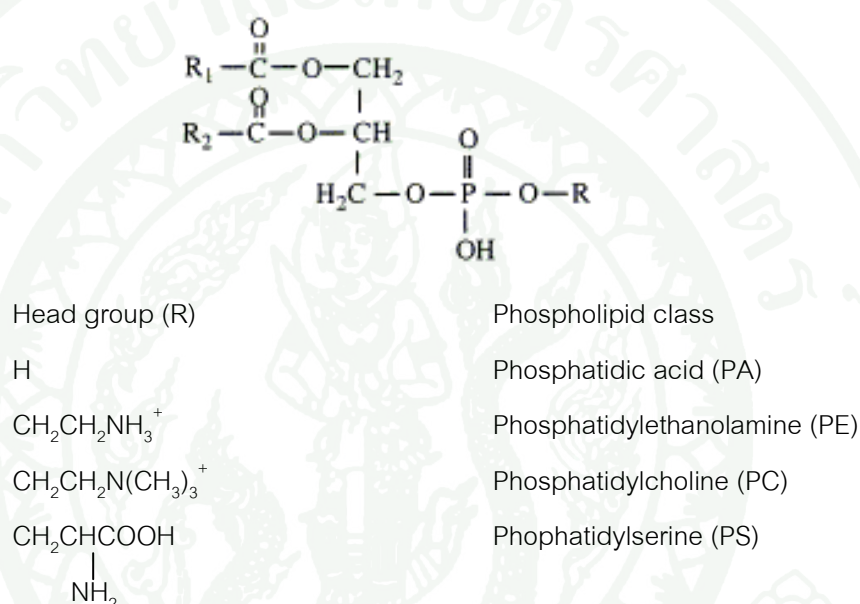
กรดไขมันสามารถแบ่งตามพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลของกรดไขมันได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือกรดไขมันที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว กรดไขมันอิ่มตัวเป็นกรดไขมันที่พันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลเป็นพันธะเดี่ยวทั้งหมด จึงไม่สามารถรับไฮโดรเจนอะตอมได้อีก ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ภายในโมเลกุลเพียงตำแหน่งเดียว (Monounsaturated fatty acids) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ภายในโมเลกุลมากกว่า 1 ตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acids)

## 2. แอซิลกลีเซอรอล (Acylglycerols)

แอซิลกลีเซอรอลจัดเป็นองค์ประกอบหลักของไขมันและน้ำมัน กลีเซอรอลสามารถทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับกรดไขมันได้ตั้งแต่ 1 ถึง 3 โมเลกุล โดยกรดไขมันแต่ละตัวสามารถเข้าทำปฏิกิริยาที่คาร์บอนตำแหน่งใดของกลีเซอรอลก็ได้ กลีเซอรอลที่ทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน 1, 2 และ 3 โมเลกุลจะเรียกว่า โมโน-, ได-, และไตรเอซิลกลีเซอรอล ตามลำดับ (Keefe, 2002) ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์จัดเป็นองค์ประกอบหลักของไขมันและน้ำมัน ส่วน โมโน- และไดเอซิลกลีเซอรอลจะพบปริมาณเล็กน้อยในไขมันและน้ำมัน

### 3. ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids)

ฟอสโฟลิพิดหรือฟอสโฟกลีเซอไรด์ประกอบด้วยกลีเซอรอล กรดไขมัน หมู่ฟอสเฟต และสารประกอบไนโตรเจน โดยส่วนใหญ่หมู่ฟอสเฟตจะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลกลีเซอรอล (ภาพที่ 1) ตัวอย่างสารประกอบในกลุ่มฟอสโฟลิพิด เช่น ฟอสฟาติดีลคอลลีน ฟอสฟาติดีลเซรีน และกลีเซอโรฟอสโฟลิพิด เป็นต้น

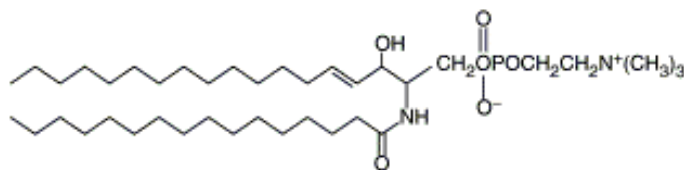


ภาพที่ 1 โครงสร้างของฟอสโฟลิพิด

ที่มา: Keefe (2002)

### 4. สฟิงโกลิพิด (Sphingolipids)

สฟิงโกลิพิดเป็นไขมันที่ประกอบด้วยสฟิงโกซีนเบส กรดไขมัน และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ฟอสเฟต และโมโนแซคคาไรด์ (Keefe, 2002) สารประกอบในกลุ่มนี้ที่พบได้แก่ สฟิงโกไมอีลิน (ภาพที่ 2) เซราไมด์ เป็นต้น ลิพิดในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อประสาท สฟิงโกลิพิดเป็นองค์ประกอบที่พบน้อยในไขมันอาหาร (McClements and Decker, 2007)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสฟิงโกไมอีลิน

ที่มา: Hannun and Luberto (2000)

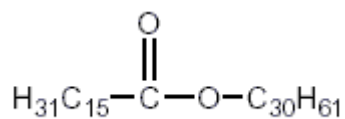
#### 5. สเตอรอล (Sterols)

สเตอรอลเป็นอนุพันธ์ของสเตอรอยด์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 3 สเตอรอลพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ สเตอรอลที่พบในพืช เรียกว่าไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) ส่วนสเตอรอลที่พบในสัตว์ เรียกว่าซัวโฮสเตอรอล (Zoosterol) สารประกอบสเตอรอลที่พบมากในไขมันจากสัตว์ ได้แก่ คอเลสเตอรอล (Cholesterol) ส่วนที่พบมากในไขมันจากพืช ได้แก่ เบตาไซโตสเตอรอล ( $\beta$ -Sitosterol) และสติกมาสเตอรอล (Stigmasterol) ส่วนคอเลสเตอรอลจะพบได้ปริมาณเล็กน้อยในไขมันจากพืช (McClements and Decker, 2007)

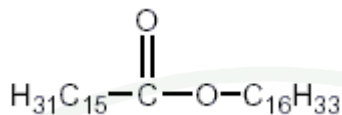
#### 6. แวกซ์ (Waxes)

เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ภาพที่ 3) ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำแวกซ์มาใช้ในการเคลือบที่ผิวของผลไม้ เพื่อลดการสูญเสียน้ำและยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา (McClements and Decker, 2007)

(a)



(b)



ภาพที่ 3 ไขผึ้ง (Beeswax) (a) ไมริซิลพาล์มิเตต (Myricyl palmitate)

(b) เซทิลพาล์มิเตต (Cetyl palmitate)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Regert *et al.* (2005)

#### 7. สารประกอบอื่นๆ (Miscellaneous)

สารประกอบอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบของไขมัน เช่น วิตามินที่ละลายในไขมัน ประกอบด้วย วิตามินเอ ดี อี และเค สารสี ได้แก่ แคโรทีนอยด์ และคลอโรฟิลล์ เป็นต้น

#### ไดเอซิลกลีเซอรอล (Diacylglycerol, DAG)

ไดเอซิลกลีเซอรอลเป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 2 โมเลกุล และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 1 หมู่ ทำให้สามารถละลายในน้ำได้ (Hydrophilic) และมีส่วนไฮโดรคาร์บอนที่ละลายได้ในไขมัน (Hydrophobic หรือ Lyophilic) จึงทำให้ไดเอซิลกลีเซอรอลมีสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ที่ดี ใช้เติมลงในเนยขาว (Shortening) และผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการให้เป็นอิมัลชันที่มีความคงตัวดี และทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการย่อย และดูดซึมไขมันและน้ำมันที่ลำไส้เล็ก (นิธิยา, 2548)

ไดเอซิลกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบรองที่พบในธรรมชาติของน้ำมันบริโภคทั่วไป ซึ่งปริมาณแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน (ตารางที่ 3) น้ำมันบริโภคทั่วไปมีไดเอซิลกลีเซอรอลประมาณร้อยละ 10 ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันและสภาวะในกระบวนการผลิต ไดเอซิลกลี

เซอรอลยังสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการอื่นๆ ได้ เช่น ใช้เป็นสารนำพาในการผลิตยา (Drug carriers) เป็นต้น (Yasukawa and Katsuragi, 2004; Lo *et al.*, 2008)

ไดเอซิลกลีเซอรอลมี 2 รูป คือ 1,2-(หรือ 2,3)-DAG และ 1,3-DAG (ภาพที่ 4) 1,2-DAG เป็นสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) (Metabolic intermediates) ส่วน 1,3-DAG จะเป็นรูปที่เสถียรพบมากในน้ำมันบริโภค เนื่องจากในระหว่างกระบวนการผลิตที่ใช้อุณหภูมิสูงหรือในระหว่างการเก็บรักษามีผลทำให้ 1,2-DAG เปลี่ยนไปเป็น 1,3-DAG ซึ่งน้ำมันบริโภคโดยทั่วไปจะมี 1,3-DAG เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 70 โดยน้ำหนักของไดเอซิลกลีเซอรอลทั้งหมด ซึ่งอัตราส่วนของ 1,3-DAG และ 1,2- หรือ 2,3-DAG คือประมาณ 6:3 (ตารางที่ 3)

น้ำมันไดเอซิลกลีเซอรอล หรือ DAG oil คือน้ำมันที่ประกอบด้วยไดเอซิลกลีเซอรอล ร้อยละ 80 หรือมากกว่า และมีไตรเอซิลกลีเซอรอลน้อยกว่าร้อยละ 20 และโมโนเอซิลกลีเซอรอลน้อยกว่าร้อยละ 3 นอกนั้นจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และอิมัลซิไฟเออร์เพื่อรักษาคุณภาพของน้ำมัน (Yasukawa and Katsuragi, 2004; Matsuo, 2005)

**ตารางที่ 3** องค์ประกอบเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมันบริโภค (g/100g)

Oil	TAG	DAG			MAG	Others
		Total DAG	1,2-DAG	1,3-DAG		
Soybean	97.9	1.0	ND	ND	0.0	1.1
Palm	93.1	5.8	ND	ND	<DL	1.1
Cotton seed	87.0	9.5	ND	ND	0.2	3.3
Corn	95.8	2.8	1.5	2.9	<DL	1.4
Safflower	96.0	2.1	1.2	2.7	<DL	1.9
Olive	93.3	5.5	ND	ND	0.2	2.3
DAG oil	17.3	81.4	28.4	53.0	1.2	ND

หมายเหตุ ND คือ not determined, <DL คือ below detected limit (<0.1g/100g)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Yasukawa and Katsuragi (2004)



1(3),2-Diacylglycerol

1,3-Diacylglycerol

**ภาพที่ 4** โครงสร้างโมเลกุลของไดเอซิลกลีเซอรอล (Structure of diacylglycerol)

โดยที่ R คือหมู่แอลคิล

ที่มา: Matsuo (2004)

### คุณสมบัติทางกายภาพของไดเอซิลกลีเซอรอล

คุณสมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมันมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อองค์ประกอบทางเคมี และหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลของไขมันและน้ำมันนั้นๆ นอกจากนี้คุณสมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมันยังส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไขมันในอาหาร อีกทั้งยังเป็นตัวที่ช่วยปกป้องแนวทางในการนำไขมันและน้ำมันนั้นๆ ไปใช้ประโยชน์อีกด้วย (Sikorski and Kolakowska, 2003)

#### 1. ความถ่วงจำเพาะ จุดหลอมเหลว และความหนืด

จากตารางที่ 4 พบว่าจุดหลอมเหลวของไดเอซิลกลีเซอรอลสูงกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอล แสดงว่าจุดหลอมเหลวสูงขึ้นเมื่อระดับการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชันลดลง โดยทั่วไปเมื่อองค์ประกอบของกรดไขมันเหมือนกัน จุดหลอมเหลวของ 1,3-DAG จะมีค่าสูงกว่า TAG ประมาณ 10 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ความถ่วงจำเพาะและความหนืดของไดเอซิลกลีเซอรอล และไตรเอซิลกลีเซอรอลก็แตกต่างกัน ความหนืดและความถ่วงจำเพาะของไดเอซิลกลีเซอรอลมีค่ามากกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากการจัดเรียงตัวของสายโซ่ของกรดไขมัน และพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิล (Nakajima *et al.*, 2004)

**ตารางที่ 4** คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG oil) และน้ำมันไดเอซิลกลีเซอรอล (DAG oil)

Properties	DAG oil	TAG oil
Specific gravity (g/ml at 20 °c)	0.926	0.914
Viscosity (mPa*s at 20 °c)	55.3	50.1
Melting point (°c)	-2.0	-24.0
Smoke point (°c)	220	250
Flash point (°c)	298	344
Fire point (°c)	320	354

**ที่มา:** ดัดแปลงจาก Nakajima *et al.* (2004)

## 2. อุณหภูมิเกิดควัน ติดไฟ และเผาไหม้

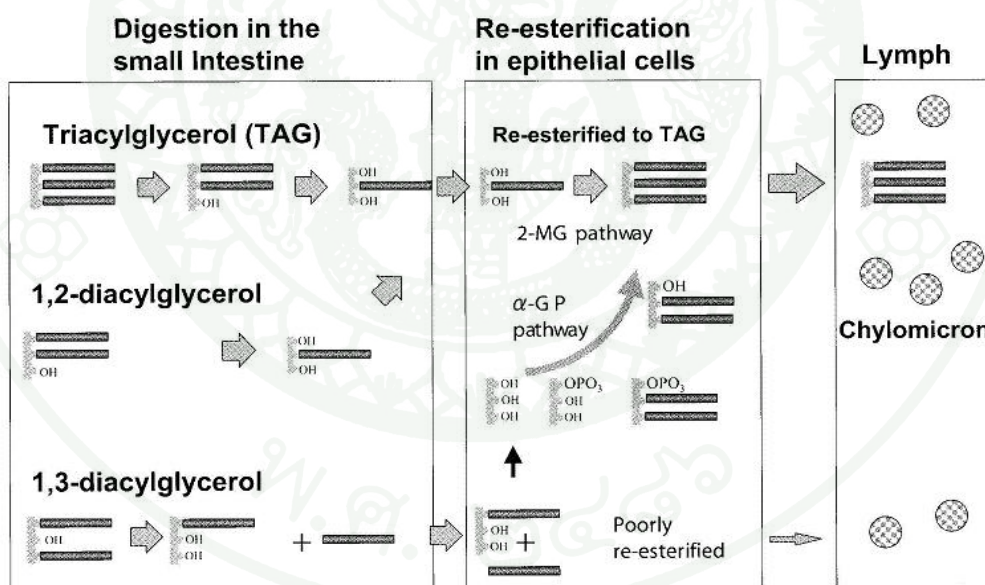
อุณหภูมิที่น้ำมันได้รับความร้อนจนเกิดควัน (Smoke point) อุณหภูมิที่น้ำมันกลายเป็นไอแล้วรวมตัวกับอากาศติดไฟ (Flash point) และอุณหภูมิที่น้ำมันเกิดการเผาไหม้ (Fire point) ของไตรเอซิลกลีเซอรอลมีค่าสูงกว่าไดเอซิลกลีเซอรอล (ตารางที่ 4) เนื่องจากอิทธิพลของพันธะไฮโดรเจนใน DAG จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง ทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลลดลง และการเคลื่อนไหวของโมเลกุลไดเอซิลกลีเซอรอลจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากไดเอซิลกลีเซอรอลมีมวลโมเลกุลที่ต่ำกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอล (Nakajima *et al.*, 2004)

## 3. การละลาย (Solubilization)

สารที่ชอบน้ำ (Hydrophilic substances) หรือสารที่มีขั้ว (Polar compounds) สามารถละลายได้ในน้ำมัน DAG เนื่องจากในโมเลกุลของ DAG มีส่วนที่ชอบน้ำเช่นกัน นอกจากนี้เมื่อใช้เป็นตัวทำละลาย น้ำมัน DAG ยังมีคุณสมบัติแตกต่างจากน้ำมัน TAG โดยคุณสมบัติในการเป็นตัวทำละลายของน้ำมัน DAG มีผลต่อการประยุกต์ใช้ในอาหาร ซึ่งจะส่งผลต่อการกักเก็บกลิ่นรสของอาหาร การเลือกใช้ไขมันซีฟเออร์ในอาหารที่เป็นไขมันชั้น และการละลายของสารที่มีคุณสมบัติในเชิงหน้าที่ (Functional substances) (Nakajima *et al.*, 2004)

## กระบวนการเผาผลาญ DAG และ TAG ในร่างกาย

กระบวนการเผาผลาญ TAG ในร่างกายจะเกิดที่ลำไส้เล็ก โดยเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน จะไฮโดรไลซ์ TAG ให้เป็น 1,2-DAG และ 2-monoacylglycerol (2-MAG) ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก ซึ่ง 2-MAG จะถูกสังเคราะห์เป็น TAG อีกครั้ง ในเนื้อเยื่อบุผิว (Epithelial cells) โดยวิถี 2-MAG และ chylomicron ซึ่งเป็นลิโปโปรตีน (Lipoprotein) ทำหน้าที่ขนส่งไขมันไปยังเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย โดยระบบน้ำเหลืองในรูปของ chylomicron triacylglycerol ส่วนกระบวนการเผาผลาญ 1,3-DAG ในร่างกาย เอนไซม์ไลเปสจะไฮโดรไลซ์ 1,3-DAG ให้เป็น 1-monoacylglycerol (1-MAG) และกรดไขมันอิสระ ตามลำดับ ซึ่ง 1-MAG จะถูกสังเคราะห์เป็น TAG ได้ไม่ดี และ 1-MAG จะถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็นกลีเซอรอล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นใน  $\alpha$ -GP pathway ทำให้เกิดการสังเคราะห์ TAG แต่จะสังเคราะห์ได้ในปริมาณน้อย (Matsuo, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กระบวนการเผาผลาญ TAG และ DAG ในร่างกาย

ที่มา: Matsuo (2004)

Tomonobu *et al.* (2006) ศึกษาผลของการลดระดับไขมันในร่างกายน้ำมัน DAG และ TAG พบว่ากลุ่มคนที่รับประทานอาหารที่มีน้ำมัน DAG มีค่า serum triacylglycerol ค่า serum remnant-like particle cholesterol และค่า chylomicron triacylglycerol concentrations ต่ำกว่ากลุ่มคนที่รับประทานอาหารที่มีน้ำมัน TAG นอกจากนี้ Nagao *et al.* (2000) ได้ศึกษาผลของน้ำมัน DAG ต่อการลดลงของระดับไขมันทั้งหมดในร่างกาย พบว่าไขมันทั้งหมดของกลุ่มคนที่รับประทานอาหารที่มีน้ำมัน DAG มีค่าลดลงมากกว่ากลุ่มที่รับประทานอาหารที่มีน้ำมัน TAG นอกจากนี้การบริโภคน้ำมัน DAG ยังช่วยยับยั้งการสะสมไขมันในร่างกายได้ดีกว่าน้ำมัน TAG ดังนั้นการบริโภคน้ำมัน DAG ในระยะยาว จะส่งผลทำให้น้ำหนักและไขมันในร่างกายลดลง อีกทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ ซึ่งจะส่งผลดีต่อสุขภาพมากกว่าการบริโภคน้ำมัน TAG (Maki *et al.*, 2004)

## การใช้ประโยชน์ DAG

### 1. น้ำมันทอด (Frying oil)

ผลจากการศึกษา พบว่าไขมันซึ่งประกอบด้วย DAG ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก และมีสารอื่นๆ เช่น สารสกัดจากพืช เป็นต้น เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย จะมีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันและไฮโดรไลซิส มีกลิ่นรสและลักษณะทางกายภาพที่ดี นอกจากนี้ไขมันซึ่งประกอบด้วย DAG ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก และกรดคาร์บอกซิลิกไม่ต่ำกว่า 70 พีพีเอ็ม จะคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันจากความร้อนหรือการไฮโดรไลซิสในระหว่างการเก็บรักษา (Sakai *et al.*, 2002a, 2002b) นั่นคือ DAG ที่มีองค์ประกอบเหมาะสม สามารถนำมาใช้เป็นน้ำมันทอดได้

จากการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าหลังจากปรุงอาหารสุกทันที คุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารที่ปรุงด้วยน้ำมัน DAG และน้ำมัน TAG ไม่แตกต่างกัน และเมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสหลังจากปรุงอาหารสุกแล้ว 30 นาที พบว่ามันฝรั่งที่ทอดด้วยน้ำมัน DAG มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ต่ำกว่ามันฝรั่งที่ทอดด้วยน้ำมัน TAG เล็กน้อย โดยปกติมันฝรั่งทอดจะดูดความชื้นได้ง่าย และอาหารที่ใช้ไขมัน DAG อาจดูดความชื้นได้มากกว่าอาหารที่ใช้ไขมัน TAG แต่เมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารอื่น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะใช้น้ำมัน DAG หรือน้ำมัน TAG (Nishide *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า น้ำมัน DAG มีคุณภาพเพียงพอที่จะใช้บริโภคในครัวเรือนแทนน้ำมัน TAG ได้

Mori and Watanabe (2000) ได้ศึกษา พบว่าอาหารทั่วไปที่อยู่ในกระบวนการปรุงมีการใช้ไขมัน DAG ที่มี DAG เป็นส่วนประกอบร้อยละ 0.5-85 และมีกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอน 2-10 อะตอม จะมีคุณลักษณะทางกายภาพที่ดี อีกทั้งยังช่วยยับยั้งการสะสมไขมันในร่างกายได้ด้วย

Mori *et al.* (1999b) มีการศึกษา พบว่ามันฝรั่ง ไข่ และโดนัท เมื่อนำมาทอดในน้ำมัน DAG ที่มี DAG เป็นองค์ประกอบร้อยละ 55-95 และประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวร้อยละ 55-93 พบว่าจะคงความกรอบได้นานมากขึ้น เช่นเดียวกับ Kudo *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาการทอดมันฝรั่งในน้ำมันที่มี DAG เป็นส่วนประกอบร้อยละ 15-50 พบว่าอาหารจะมีปริมาณน้ำน้อย มีเนื้อสัมผัสและรสชาติที่ดี และมีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา

## 2. อิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier)

อิมัลซิไฟเออร์เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (Food additive) ที่ช่วยทำให้อิมัลชัน (Emulsion) มีความคงตัว โดยการลดแรงตึงผิว (Surface tension) ระหว่างของเหลวชนิดหนึ่งที่ไม่ละลายในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งจะช่วยป้องกันอิมัลชันไม่ให้เกิดการแยกชั้น เนื่องจากโมเลกุลมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic)

อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsion) จะมีอนุภาคน้ำมันกระจายหรือแขวนลอยอยู่ในน้ำ ผลิตภัณฑ์อาหารอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ได้แก่ มายองเนส น้ำสลัด เป็นต้น Kawai and Konishi (2000) ได้ศึกษาการเติมน้ำมัน DAG ลงในผลิตภัณฑ์อาหารอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ซึ่งในเฟสของน้ำมันประกอบด้วย DAG มากกว่าร้อยละ 30 และไข่แดง ซึ่งมีสัดส่วนของไลโซฟอสโฟลิปิด (Lysophospholipids) ต่อฟอสโฟลิปิดทั้งหมด ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 15 พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารมีความคงตัวที่ดีในระหว่างการเก็บรักษา มีลักษณะปรากฏ รสชาติ และคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี

อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Water-in-oil emulsion) จะมีอนุภาคน้ำกระจายหรือแขวนลอยอยู่ในน้ำมัน ผลิตภัณฑ์อาหารอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ได้แก่ มายองเนส เป็นต้น Mori *et al.* (1999a) ได้ศึกษาการเติมน้ำมัน DAG ลงในผลิตภัณฑ์อาหารอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งในระบบอิมัลชันประกอบด้วย DAG ร้อยละ 40-95 และ TAG ร้อยละ 5-60 พบว่าเป็นระบบอิมัลชันที่มีความคงตัว และมีความสามารถในการกระจายตัวได้ดี ซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสมกับ

ผลิตภัณฑ์มากรีน ส่วนการศึกษาของ Masui and Yasunaga (2001) พบว่าผลิตภัณฑ์อาหาร อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ซึ่งในเฟสน้ำมันประกอบด้วย DAG ร้อยละ 35-95 ที่มีจุดหลอมเหลว 20 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า และ TAG ซึ่งประกอบด้วยกรดพาล์มติกร้อยละ 13-60 และกรดไขมันอื่นที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12 อะตอม (ร้อยละ 5 หรือน้อยกว่า) พบว่าผลิตภัณฑ์มีความคงตัว มีอายุการเก็บรักษานาน และให้ความรู้สึกในปาก (Mouth feel) ที่ดี

### ความคงตัวของน้ำมัน DAG

เมื่อเปรียบเทียบความคงตัวของน้ำมัน DAG และน้ำมัน TAG ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดไขมัน และปริมาณวิตามินอีที่เหมือนกัน พบว่า

#### 1. ความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชัน (Autoxidation stability)

ไขมันและน้ำมันที่มีองค์ประกอบกรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถเกิดออกซิเดชันได้จากการสัมผัสความร้อน แสง และสารที่ช่วยกระตุ้น เช่น โลหะหนัก Shimizu *et al.* (2004) ได้ศึกษาความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันของน้ำมัน TAG และน้ำมัน DAG ในการทอดมันฝรั่ง โดยวัดจาก oxidative stability index (OSI) ที่ 120 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำมัน DAG และน้ำมัน TAG มีค่า OSI เท่ากับ 3.2 และ 2.9 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนการศึกษาความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชัน พบว่าน้ำมัน DAG มีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าน้ำมัน TAG ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก DAG มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าน้ำมัน DAG มีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าหรือเท่ากับน้ำมัน TAG (Nakatsugawa *et al.*, 2001)

#### 2. ความคงตัวต่อความร้อน (Heating stability)

การเสื่อมเสียของน้ำมันโดยทั่วไปเกิดที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากการเกิดไฮโดรไลซิส และการเกิดออกซิเดชัน การทดสอบโดยการทอดแบบน้ำมันท่วม (Deep frying) ที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส พบว่าการเสื่อมเสียเนื่องจากความร้อนของน้ำมัน DAG ไม่แตกต่างจากน้ำมัน TAG ซึ่งวัดจากหลายค่า คือค่าแอนิซีน (p-Anisidine value, AnV) ค่าไอโอดีน (Iodine value, IV) กรดไขมันที่เกิดออกซิเดชันที่ไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether-insoluble oxidized

fatty acid) และโพลีเมอร์ของกรดไขมัน (Polymerized fatty acid) อีกทั้งยังสามารถคงคุณค่าทางโภชนาการไว้ได้เป็นอย่างดี (Shimizu *et al.*, 2004) ทำนองเดียวกัน Nakatsugawa *et al.* (2001) ได้ศึกษาความคงตัวของน้ำมัน TAG และน้ำมัน DAG ในการทอดมันฝรั่ง พบว่าการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำมัน DAG และน้ำมัน TAG ไม่แตกต่างกัน โดยวัดการเปลี่ยนแปลงจากค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value, PV) ค่ากรด (Acid value, AV) และค่าคาร์บอนิล (Carbonyl value, COV) แต่ช่วงการเหนี่ยวนำ (Induction period) ของการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งวัดโดยใช้ค่า PV ของน้ำมัน DAG มีค่ามากกว่าน้ำมัน TAG

สำหรับความคงตัวต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยการวัดค่ากรด พบว่าน้ำมัน DAG มีความคงตัวต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสต่ำกว่าน้ำมัน TAG ภายใต้สภาวะที่รุนแรง เนื่องจาก DAG มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ DAG จึงสามารถละลายน้ำได้มากกว่า TAG ซึ่งในระหว่างการทอดเมื่อวัดความชื้นพบว่า DAG มีความชื้นมากกว่า TAG ถึง 1.8 เท่า จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้น้ำมัน DAG เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของค่ากรด สามารถควบคุมได้โดยการเติมกรดอินทรีย์ (Organic acid) (Sakai *et al.*, 2002b; Shimizu *et al.*, 2004) เมื่อนำมาใช้ปรุงอาหารในครัวเรือน พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่ากรดในน้ำมัน DAG ไม่แตกต่างกับน้ำมัน TAG นอกจากนี้เมื่อทำการเก็บน้ำมัน DAG ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่าค่า AV ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Nishide *et al.*, 2004)

### การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอล

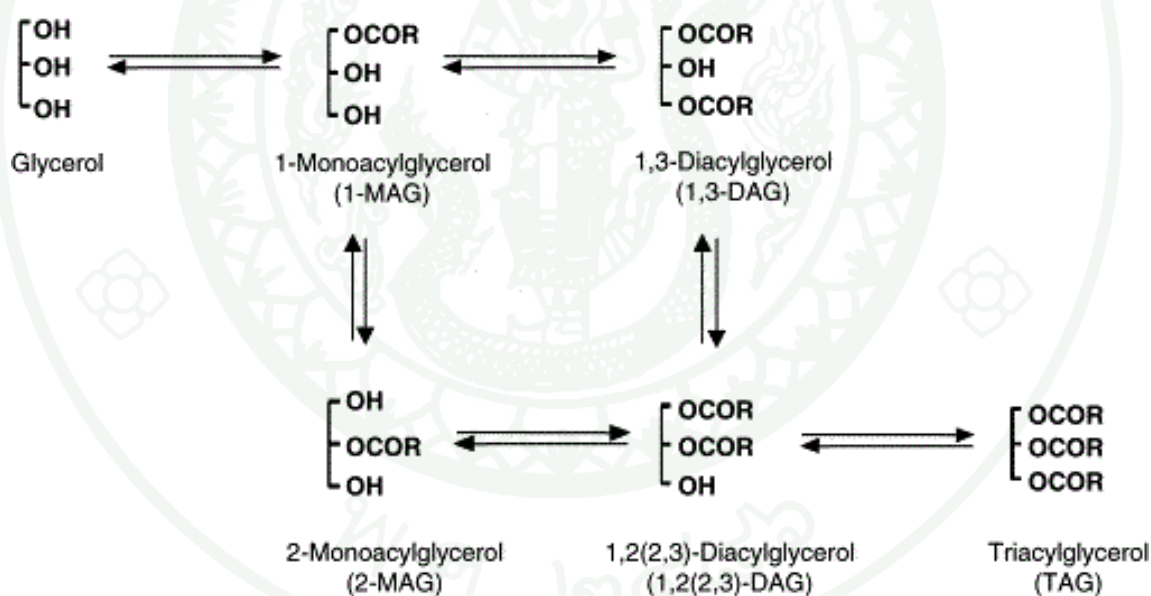
การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลสามารถทำได้หลายวิธี หรือใช้หลายวิธีร่วมกันได้ ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์มักจะมีตัวเร่งทางเคมีหรือเอนไซม์ร่วมด้วย ดังนี้

#### 1. ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification)

เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอลกอฮอล์ที่มีมากเกินพอกับกรดในสภาวะที่มีตัวทำละลาย แล้วเกิดผลิตภัณฑ์คือเอสเทอร์และน้ำ โดยส่วนมากจะมีตัวเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ กรด และเอนไซม์ เป็นต้น (Dufaure and Mouloungui, 2000) โดยทั่วไปไตรเอซิลกลีเซอรอลสังเคราะห์จากกรดไขมันและกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง ตัวอย่างกระบวนการ

สังเคราะห์ไตรแอสีกลีเซอรอล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันและกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเพสเป็นตัวเร่ง รวมไปถึงการเคลื่อนย้ายหมู่แอสีล แสดงดังภาพที่ 6

Berger *et al.* (1992) ได้ศึกษากระบวนการสังเคราะห์ไตรแอสีกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งมีเอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันและมีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1 และ 3 เป็นตัวเร่ง และใช้สารตั้งต้นที่มีตัวให้หมู่แอสีลที่แตกต่างกัน คือไวนิลเอสเทอร์ (Vinyl esters) กรดไขมัน (Fatty acids) และเมทิลเอสเทอร์ (Methyl esters) พบว่าเอนไซม์ไลเพสที่จำเพาะเจาะจงที่ตำแหน่ง 1 และ 3 จาก *Rhizomucor miehei* เป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูงและมีความจำเพาะเจาะจงที่เหมาะสม และปฏิกิริยาที่ใช้ไวนิลเอสเทอร์เป็นสารตั้งต้นมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วที่สุด และได้ผลิตภัณฑ์ คือไตรแอสีกลีเซอรอลมากกว่าร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังพบว่ากรดซัลฟิวริกบนซิลิกาเจลยังช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นด้วย



ภาพที่ 6 แผนภาพการสังเคราะห์ DAG

ที่มา: Watanabe *et al.* (2005)

Li and Ward (1993) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกลีเซอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอมิگا-3 (n-3 Polyunsaturated fatty acid) จากน้ำมันตับปลาสดในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ไลเพสจากแหล่งที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าผลิตภัณฑ์

หลักที่ได้คือ โมโน- และไดเอซิลกลีเซอรอล ทำนองเดียวกับ Chong *et al.* (2007) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มกับกลีเซอรอลในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยมีเอนไซม์ไลเปสจากรำข้าวเป็นตัวเร่ง ส่วน Lo *et al.* (2004b) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil distillate) โดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่ง พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ คือระยะเวลา อุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น และปริมาณสารดูดความชื้น

## 2. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

การสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอล สามารถทำได้โดยการไฮโดรไลซิสไตรเอซิลกลีเซอรอลบางส่วนโดยมีน้ำร่วมในปฏิกิริยา ไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAG) จะสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำเกิดกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คืออุณหภูมิและความดันสูง ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบผันกลับได้ ถ้าการทำปฏิกิริยาเกิดบางส่วนจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโมโน- และไดเอซิลกลีเซอรอล ดังนั้นการจะให้เกิดผลิตภัณฑ์ชนิดใดขึ้นกับการควบคุมปฏิกิริยา นอกจากนี้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสยังมีข้อดี คือเป็นกระบวนการที่มีเพียง 1 ขั้นตอน (Single step) โดยไม่ต้องเติมสารตั้งต้นอื่น เช่น กลีเซอรอล แต่ก็ต้องมีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยาให้เหมาะสม (Gunstone, 1999)

Plou *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์โมโนโอเลิลกลีเซอรอล (Mono-oleylglycerol) และไดโอเลิลกลีเซอรอล (Di-oleylglycerol) โดยการไฮโดรไลซิสไตรโอเลอิน (Triolein) ซึ่งใช้ไลเปสเป็นตัวเร่ง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ คือโมโนโอเลอินและไดโอเลอินร้อยละ 79 เช่นเดียวกับ Safari *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์โมโนโอเลิลกลีเซอรอลและไดโอเลิลกลีเซอรอล โดยไฮโดรไลซิสไตรโอเลอินที่ความเข้มข้นต่างๆ (4, 8, 12, 18 และ 24 มิลลิโมลาร์) พบว่าเมื่อความเข้มข้นไตรโอเลอินเพิ่มมากขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็จะมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสังเคราะห์โมโนเอซิลกลีเซอรอลโดยการไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์มในระบบไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) และใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ คือโมโนเอซิลกลีเซอรอลร้อยละ 80 (Holmberg and Osterberg, 1988)

## 3. ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Interesterification) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม

### 3.1 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเอสเทอร์และไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือน้ำมัน

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบเอสเทอร์และโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมัน เรียกว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) ซึ่งโดยทั่วไปสารตั้งต้นอาจจะเป็นน้ำมัน 2 ชนิด หรือเอสเทอร์ของกรดไขมันกับน้ำมัน สำหรับการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลจะเป็นปฏิกิริยาระหว่างโมโนเอซิลกลีเซอรอลและน้ำมัน ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโมโนเอซิลกลีเซอรอลกับน้ำมันคาโนลา และมีไลเพสเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ (20 hPa) ได้ผลิตภัณฑ์ คือไตรเอซิลกลีเซอรอลมากที่สุด คือมากกว่าร้อยละ 70 (Weber and Mukherjee, 2004)

### 3.2 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมัน

ปฏิกิริยาระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์ เรียกว่าแอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) ปฏิกิริยานี้นิยมใช้มากในอุตสาหกรรม เพราะทำให้เกิดเอสเทอร์ของกรดไขมันชนิดต่างๆ และเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว และยังสามารถใช้ผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอล และไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ด้วย ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับเมทานอล (Methanolysis) หรือกลีเซอรอล (Glycerolysis) เป็นต้น

Kristensen *et al.* (2005a) ได้ศึกษาการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาไกลเซโรไลซิสซึ่งมีไลเพสเป็นตัวเร่ง พบว่าสามารถสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้มากที่สุดประมาณร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ด้วย ทำนองเดียวกัน Kristensen *et al.* (2005b) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาไกลเซโรไลซิสซึ่งมีไลเพสเป็นตัวเร่ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือไม่มีการเติมน้ำในปฏิกิริยา อัตราส่วนสารตั้งต้นต่อกลีเซอรอล 2:1 โมล อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4-5 ชั่วโมง และความเข้มข้นไลเพสร้อยละ 5 ทำให้ได้ไตรเอซิลกลีเซอรอลร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก และเมื่อนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์จะได้น้ำมันที่มี DAG ร้อยละ 93 โดยน้ำหนัก

### 3.3 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมัน

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับกรดไขมัน เรียกว่าปฏิกิริยาแอซิโดไลซิส (Acidolysis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้ได้ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีโครงสร้างกรดไขมันเปลี่ยนแปลงไป (Esteban *et al.*, 2009)

Shimada *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษากการสังเคราะห์กลีเซอไรด์ที่โครงสร้างประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง โดยการทำปฏิกิริยา acidolysis ระหว่างน้ำมันโบราจ (Borage oil) กับกรดคาไพริก (Caprylic acid) โดยมีไลเพสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1 และ 3 เป็นตัวเร่ง พบว่ามีกรดคาไพริกไปอยู่ในโครงสร้างของกลีเซอไรด์ร้อยละ 50-55 โดยโมล แต่จะไม่พบกรดคาไพริกที่ตำแหน่งที่ 2 ในโครงสร้างของกลีเซอไรด์ เช่นเดียวกับ Kim *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษากการสังเคราะห์กลีเซอไรด์ที่โครงสร้างประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง โดยการทำปฏิกิริยาแอซิโดไลซิสระหว่างน้ำมันเพอริลลา (Perilla oil) กับกรดคาไพริก โดยมีไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* และ *Thermomyces lanuginosa* เป็นตัวเร่ง พบว่ามีกรดคาไพริกไปอยู่ในโครงสร้างของกลีเซอไรด์ร้อยละ 48.5 และ 51.4 โดยโมล ในปฏิกิริยาที่มี *Rhizomucor miehei* และ *Thermomyces lanuginosa* เป็นตัวเร่ง ตามลำดับ

### ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์ DAG

#### 1. ตัวทำละลาย

การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม จะช่วยให้สารตั้งต้นในระบบอยู่ในสถานะเดียวกัน หรือเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ซึ่งมี hydrolytic enzymes เช่น ไลเพส (Lipases) หรือเอสเทอเรส (Esterases) จำเป็นต้องมีการลดปริมาณน้ำในปฏิกิริยาโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แทน ตัวทำละลายอินทรีย์จะส่งผลต่อโมเลกุลของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาและความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายและชนิดของเอนไซม์ (Li and Ward, 1993; Chong *et al.*, 2007) หากใช้ตัวทำละลายที่เป็น aprotic หรือตัวทำละลายที่ไม่มีอะตอมของไฮโดรเจนชนิดที่มีความเป็นกรด ซึ่งไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ เช่น เฮกเซน แอซิโตน เป็นต้น จะไม่มีการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิล จาก 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรอลไปเป็น 1,2-(2,3)-ไดเอซิลกลีเซอรอล (Berger *et al.*, 1992) แต่การใช้ตัวทำละลายไม่ค่อยได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค Weber and Mukherjee (2004) ได้ทำการศึกษากการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอล

ภายใต้สภาวะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ตัวทำละลายและมีไพลเป็น ตัวเร่ง พบว่าสามารถสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลได้ร้อยละ 60-70

Nagesha *et al.* (2004) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันถั่วเหลืองในคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (Supercritical carbon dioxide, SC-CO<sub>2</sub>) พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือความดัน 122 บาร์ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส บิวทานอลเข้มข้น 1.2 โมลาร์ เอนไซม์เข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก และระยะเวลา 3 ชั่วโมง การใช้ SC-CO<sub>2</sub> จะไม่ส่งผลต่อความคงตัวของเอนไซม์โดยตรง แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงความดันก็อาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรม ความจำเพาะ และความคงตัวของเอนไซม์ทางอ้อมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพของคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต การเพิ่มความดันจะทำให้สารตั้งต้นละลายในเฟสของ SC-CO<sub>2</sub> เพิ่มขึ้น และละลายลดลงในเฟสของเอนไซม์ ซึ่งจะส่งผลให้สารตั้งต้นมีความเจือจาง ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้าลง เช่นเดียวกับการเพิ่มอุณหภูมิ และพบว่าการใช้ SC-CO<sub>2</sub> จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid ester) ร้อยละ 95 ใช้ระยะเวลา 3 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายจะใช้เวลา 7 ชั่วโมง

## 2. ระยะเวลา

ระยะเวลาเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ดังนั้นควรใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ปริมาณมาก เพื่อที่จะลดต้นทุนของกระบวนการผลิต เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณกรดไขมันที่ไม่ถูกเอสเทอร์ไฟด์จะลดลง ไดเอซิลกลีเซอรอลจะเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ และเมื่อระยะเวลานานขึ้นอีก อัตราการเพิ่มขึ้นของไดเอซิลกลีเซอรอลจะช้าลง (Lo *et al.*, 2004a, 2004b; Tangkam *et al.*, 2008)

## 3. อัตราส่วนสารตั้งต้น

อัตราส่วนสารตั้งต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะส่งผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ในปฏิกิริยาผันกลับได้ การใช้กลีเซอรอลในปริมาณมากจะไม่ส่งผลต่อองค์ประกอบของเอซิลกลีเซอรอล แต่การใช้กลีเซอรอลในปริมาณที่มากจะทำให้เกิดความหนืดสูง ซึ่งจะต้องใช้อุณหภูมิสูงเพื่อลดความหนืด และเพิ่มความสามารถในการละลายของกลีเซอรอลในเฟสของน้ำมัน (Kristensen *et al.*, 2005b)

การศึกษาการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้ของเหลวผลกลั่น (Distillate) เป็นสารตั้งต้น พบว่าอัตราส่วนโมลของกรดไขมันหรือของเหลวผลกลั่นต่อกลีเซอรอลที่เท่ากับ 2.5:1 ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ คือไดเอซิลกลีเซอรอลมากที่สุด ถ้าใช้ปริมาณของกรดไขมันในปฏิกิริยามากเกินไป ปริมาณของไดเอซิลกลีเซอรอลที่ผลิตได้จะลดลง (Lo *et al.*, 2004b; Tangkam *et al.*, 2008)

Nagesha *et al.* (2004) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันถั่วเหลืองและบิวทานอลในคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต พบว่าการลดลงของบิวทานอลทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดไขมันอิสระไปเป็นเอสเทอร์ได้น้อยลง และการลดอัตราส่วนโมลระหว่างกรดไขมันและบิวทานอลจาก 1:2 เป็น 1:5 ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ลดลง การเพิ่มแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเพียงอย่างเดียวจะยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

#### 4. ปริมาณน้ำ

ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไลเพสเป็นตัวเร่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และควบคุมโดยปริมาณน้ำ เนื่องจากน้ำเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ปริมาณน้ำมีบทบาทสำคัญในการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ปริมาณน้ำที่น้อยและเหมาะสมจะรักษากิจกรรมของเอนไซม์ แต่ถ้าปริมาณน้ำเพิ่มมากขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงและอัตราการสังเคราะห์จะค่อยๆ ลดลง เมื่อวอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ ) มากกว่า 0.07 ปริมาณเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ได้จะลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ดังนั้นจึงสามารถกำจัดน้ำได้โดยการเติมสารที่ช่วยกำจัดน้ำ เช่น molecular sieve และ silica gel เป็นต้น (Li and Ward, 1993; Lo *et al.*, 2004a, 2004b; Chaiyaso *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2007; Fregolemte *et al.*, 2008) จากการศึกษาผลของการเติม molecular sieve ตั้งแต่ร้อยละ 0-70 โดยน้ำหนัก ต่อการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลกลั่นน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve จนถึงร้อยละ 30 ปริมาณไดเอซิลกลีเซอรอลที่สังเคราะห์ได้เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve มากขึ้นอีก (มากกว่าร้อยละ 30) ปริมาณไดเอซิลกลีเซอรอลที่สังเคราะห์ได้มีค่าลดลง (Lo *et al.*, 2004a, 2004b)

#### 5. การกวนผสม

การกวนผสมส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา และอัตราการกำจัดน้ำเมื่อเติม molecular sieve จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ภายในโมเลกุลมากกว่า 1 ตำแหน่ง พบว่าเมื่อกวนผสมที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลจะมากกว่าที่ 175 และ 100 รอบต่อนาที แต่หลังจาก 24 ชั่วโมง อัตราการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ 175 และ 200 รอบต่อนาที จะไม่แตกต่างกัน และอัตราการสังเคราะห์จะแตกต่างกันเล็กน้อยที่ 100 และ 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้เนื่องมาจากอัตราการกวนผสมมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา และเมื่อไม่มีการเติม molecular sieve (0 และ 24 ชั่วโมง) ที่อัตราการกวนผสม 100 และ 175 รอบต่อนาที พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ แต่เมื่ออัตราการกวนผสมสูงและเติม molecular sieve หลังจากเกิดปฏิกิริยาไปแล้ว 24 ชั่วโมง น้ำจะถูกกำจัดไปอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าอัตราการกวนผสมมีอิทธิพลต่อการกำจัดน้ำโดยการเติม molecular sieve มากกว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไลเปสกับสารตั้งต้น (Medina *et al.*, 1999)

## 6. ชนิดและปริมาณตัวเร่ง

ตัวเร่งปฏิกิริยา คือสารที่เติมลงไปในปฏิกิริยาแล้วทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น หรือทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วสารนั้นยังคงแสดงสมบัติเดิม ซึ่งมีทั้งตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น โลหะ และตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ ถึงแม้ว่าการใช้เอนไซม์จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวเร่งทางเคมี แต่ปัจจุบันเทคโนโลยีการตรึงเอนไซม์ (Immobilization) ทำให้ลดต้นทุนลงได้มาก นอกจากนี้เอนไซม์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่าเคมี เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำ หรืออุณหภูมิห้อง และป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการได้ จึงทำให้นิยมใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยามากกว่าสารเคมี (Myrnes *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 2004b; Fregolente *et al.*, 2008)

### 6.1 เอนไซม์

เอนไซม์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และอาจจะมีส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนรวมอยู่ด้วย ดังนั้นเอนไซม์จึงมีโครงสร้างย่อยเป็นกรดแอมิโน (Amino acid) หลายชนิดมาต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวด้วยแขนที่เรียกว่าเพปไทด์ (Peptide bond) โมเลกุลของเอนไซม์ทั้งส่วนที่เป็น

โปรตีนและไม่ใช่โปรตีนรวมเรียกว่าโฮโลเอนไซม์ (Holoenzyme) ส่วนที่เป็นโปรตีน เรียกว่าอะโพอเอนไซม์ (Apoenzyme) ซึ่งจะหมดสภาพเมื่อได้รับความร้อน ส่วนประกอบที่มิใช่โปรตีนของเอนไซม์อาจจะเป็นกลุ่มพรอสทีติก (Prosthetic Group) โคเอนไซม์ (Co-enzyme) และวิตามิน (Vitamin) ซึ่งมักรวมเรียกว่า โคแฟคเตอร์ (Cofactors) ซึ่งอาจจะเป็นไอออนของโลหะ เช่น  $Mg^{+2}$   $Fe^{+2}$   $Cu^{+2}$   $K^+$   $Na^+$  หรือโมเลกุลของสารอินทรีย์ ซึ่งเรียกว่าโคเอนไซม์ เช่น NADP FAD FMN หรือ ATP โคแฟคเตอร์มักจะทนต่อความร้อนได้ ซึ่งเมื่อกำจัดโคแฟคเตอร์ออกไปแล้วจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) หมดไปหรือมีน้อยมาก (ทnung, 2522)

เอนไซม์เป็นสารเร่งปฏิกิริยา ซึ่งสามารถลดพลังงานที่ต้องการใช้ในปฏิกิริยา (Activation energy) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นหลายเท่า ทำให้สารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น และมีผลแม้ปริมาณเพียงเล็กน้อย ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  โมลาร์) อีกทั้งยังมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น (ทnung, 2522)

## 6.2 ความจำเพาะของเอนไซม์ (Enzyme specificity)

หมายถึงการที่เอนไซม์ชนิดเดียวสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เพียงปฏิกิริยาเดียวหรือในวงจำกัด เช่น proteolytic enzyme จะไม่ย่อย glycosyl หรือ ester bonds ของคาร์โบไฮเดรต หรือไขมัน จะย่อยเฉพาะ peptide bond ของโปรตีน แต่ก็ไม่ใช่ว่าเอนไซม์ชนิดเดียวจะย่อย peptide bond ทุกชนิดได้ enzyme specificity มีอยู่หลายแบบ เช่น

### (a) Stereochemical specificity

สารต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตมักจะมีอยู่ 2 รูป และเพียงรูปแบบเดียวที่มักจะเกิดขึ้นตามธรรมชาติ เช่น พวงน้ำตาล monosaccharide ส่วนมากจะเกิดขึ้นในรูปของ L-form เอนไซม์ส่วนใหญ่จะย่อยเพียงรูปเดียวของ stereoisomers เช่น เอนไซม์ lactic dehydrogenase จะย่อย L-lactic acid เท่านั้น ไม่ย่อย D-lactic acid

### (b) Low specificity

เอนไซม์เหล่านี้จะย่อย linkage เฉพาะอย่างเช่น lipase จะย่อยสลาย linkage ที่เป็นเอสเตอร์ระหว่างกรดและแอลกอฮอล์ ไม่ว่าจะเป็นสารเอสเตอร์ประเภทใด

(c) Group specificity

เอนไซม์ประเภทนี้จะมีความเฉพาะเจาะจงกับ functional group เช่น endopeptidase จะย่อย peptide bond ซึ่งปลายด้านหนึ่งมี carboxyl group อยู่

(d) Absolute specificity

เอนไซม์ชนิดนี้มีอยู่มากมาย เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเฉพาะสารตั้งต้น และย่อยเพียงปฏิกิริยาเดียว เช่น urease ย่อยเฉพาะ urea ให้เป็น  $\text{CO}_2$  และ  $\text{NH}_3$

### 6.3 หน่วยเอนไซม์ (Unit of enzyme)

ค่าที่แสดงปริมาณของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา เรียกว่าหน่วยของเอนไซม์ (Enzyme units) เอนไซม์ 1 หน่วย คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาในการเปลี่ยน 1 ไมโครโมลของสารตั้งต้น ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

### เอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (Glycerol-ester hydrolase, EC 3.1.1.3) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเตอร์ในไขมันและน้ำมัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล และทำหน้าที่ย่อยไขมันในร่างกายและไขมันที่พบทั่วไปนอกในร่างกาย จะพบไลเปสทั่วไปทั้งในเนื้อเยื่อและของเหลวตามส่วนต่างๆ ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ มีความสำคัญในการย่อยไขมันให้เป็นกรดไขมันอิสระ แล้วร่างกายจะดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอร์ฟิเคชัน และเอสเตอร์ฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อยหรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย ไลเปสยังมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของอาหาร หลังจากย่อยไขมันแล้ว กรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจะทำให้อาหารมีกลิ่น ถ้ามีมากจะทำให้อาหาร

เหม็นหืนได้ แต่ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการย่อยเกิดขึ้นอาจช่วยเสริมกลิ่นรสของอาหารบางชนิดได้ เช่น ซีส เป็นต้น (ทnung, 2522; ณกัณฐภัทร, 2547)

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสนี้มี 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะเจาะจง ตรงตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ และทำปฏิกิริยาแบบจำเพาะเจาะจงที่พันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง 1 และ 3 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเพสซึ่งสร้างพันธะเอสเทอร์กลับคืนมา เรียกว่าปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระ โดยทั่วไปไลเพสจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันและกลีเซอรอลจะเกิดในเฟสของน้ำมัน

เอนไซม์ที่มาจากต่างแหล่งกันก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น ความคงตัวต่อความร้อน และความเป็นกรดเบส กิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ เป็นต้น Xu (2000) ได้มีการศึกษาการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ไลเพสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าไลเพสตรึงรูป (Immobilized lipase) จาก *Rhizopus oryzae* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีสายโซ่ความยาวปานกลางและความยาวมาก แต่เอนไซม์ไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีสายสั้น แต่อย่างไรก็ตามความจำเพาะต่อกรดไขมันของไลเพสมีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันน้อยกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Adamczak and Bednarski, 2004)

Li and Ward *et al.* (1993) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกลีเซอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 (n-3 Polyunsaturated fatty acid) จากน้ำมันตับปลาสดในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ไลเพสจากแหล่งที่แตกต่างกันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเอนไซม์ไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงที่ตำแหน่ง 1 และ 3 มีอัตราการสังเคราะห์สูงที่สุด และได้ผลิตภัณฑ์ คือ 1-MAG และ 1,3-DAG ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Berger *et al.* (1992) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษากิจกรรมของไลเพสในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากแหล่งที่แตกต่างกัน พบว่าไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* มีกิจกรรมในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันสูงกว่าเอนไซม์ไลเพสจากตับอ่อนของหมู แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นอีก เช่น ชนิดสารตั้งต้น เป็นต้น (Kiran *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Adamczak and Bednarski (2004) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* และ *Yarrowia lipolytica* ภายหลังจาก

การนำเอนไซม์ไปตรึงรูป พบว่าคุณสมบัติของเอนไซม์ภายหลังการตรึงรูปใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ แต่เอนไซม์ตรึงรูปสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ภายใต้สภาวะที่รุนแรงกว่า และไลเพสจาก *Rhizomucor miehei* เร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าไลเพสจาก *Yarrowia lipolytica* เนื่องจากมีกิจกรรมสูงกว่า

### ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส

#### 1. อุณหภูมิและความเป็นกรดเบส

เอนไซม์จะทำงานหรือเร่งปฏิกิริยาได้อย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิต่ำ แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น เอนไซม์ก็จะเริ่มทำงานได้ดีขึ้น ทำให้ปฏิกิริยามีอัตราการเกิดที่เร็วขึ้นตามลำดับ โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น 10 องศาเซลเซียส ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มเป็น 2 เท่าของความเร็วปฏิกิริยาเดิม โดยทั่วไปเอนไซม์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะไม่ทำงาน รูปร่างของเอนไซม์ซึ่งเดิมอยู่ในลักษณะโปรตีนที่พับไปมาเป็นรูป globular form จะเริ่มคลายตัวออก ทำให้สูญเสียกิจกรรมไป แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นก็ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดเบส และระยะเวลาอีกด้วย

ความเป็นกรดเบสที่แตกต่างกันมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก ปริมาณ ความเข้มข้น และ/หรือประจุของกรดแอมิโนบางชนิดบนสายโปรตีนแตกต่างกัน สารบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดเบสใกล้เคียงกับค่า isoelectric point ของเอนไซม์จะมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อย่างมาก ความเป็นกรดเบสที่มากจะทำลายโปรตีน ซึ่งก็คือทำลายเอนไซม์นั่นเอง ความเป็นกรดเบสจะเป็นปัจจัยที่ควบคุมให้การทำงานของเอนไซม์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเอนไซม์จะไวต่อการเปลี่ยนความเป็นกรดเบสอย่างมาก เอนไซม์จะมีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.5-8 เป็นส่วนใหญ่ การทำให้สภาพการทำงานของเอนไซม์มีความเป็นกรดเบสที่ต้องการทำได้โดยการใส่สารบัฟเฟอร์ อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสม (Optimum pH) นี้จะเปลี่ยนไปตามชนิดของสารตั้งต้นที่เอนไซม์จะย่อย (ทnung, 2522)

อุณหภูมิและความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาของไลเพสค่อนข้างกว้าง แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไขมัน ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ สารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนมากไลเพสจะมีความเหมาะสมของกรดเบสอยู่ที่ประมาณ 8-9 เมื่อสภาวะเป็นกรด hydrolytic activity จะต่ำกว่า

ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส (Wu *et al.*, 1996) และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาของไลเพสอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิจะมีผลต่อปฏิกิริยาของไลเพสน้อย

Wu *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาหาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความคงตัวของไลเพสที่มาจาก *Rhizomucor miehei* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ hydrolytic activity คือ 50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ synthetic activity คือ 37 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียส จนถึง 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมเกือบทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมคือ 8 และภายใต้สภาวะเป็นกรด (pH 3-6) กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงมากกว่าร้อยละ 35 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ตรีงรูปจาก *Rhizomucor miehei* มีความคงตัวต่อความร้อนมากขึ้น ทำนองเดียวกับ Adamczak and Bednarski (2004) ได้ศึกษาพบว่าเอนไซม์ตรีงรูปจะมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดเบสมากกว่าเอนไซม์อิสระ (Free enzyme) ซึ่งเอนไซม์ตรีงรูปจะมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 50 เมื่อเก็บไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมในช่วง pH ที่กว้าง คือ 3-10 ส่วนไลเพสอิสระจะมีความว่องไวมากกว่า คือจะมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 50 เมื่อเก็บไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส และจะมีความคงตัวที่ pH 4-9

Tangkam *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลล้นน้ำมันพืช พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจากการสังเคราะห์จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากความหนืดจะลดลง ช่วยเพิ่มการละลายของสารตั้งต้น และเพิ่มสัมประสิทธิ์การแพร่ (Diffusion coefficients) ทำนองเดียวกับ Lo *et al.* (2004b) ซึ่งได้ศึกษาการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจากของเหลวผลล้นน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 65 องศาเซลเซียส อัตราการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอลจะเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์ด้วย โดยส่วนมากไลเพสตรีงรูปจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 30-62 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 70 องศาเซลเซียส อัตราการสังเคราะห์จะลดลง

## 2. ความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น และเมื่อถึงจุดจุดหนึ่งความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่ขึ้นกับปริมาณเอนไซม์อีกแล้ว Fregolente *et al.* (2008) ได้

ทำการศึกษากการสังเคราะห์โมโน- และไดแอซิดกลีเซอรอลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้ไลเปสในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2 เป็นร้อยละ 10 ปฏิกิริยาจะถึงจุดสมดุลเร็วขึ้น แต่จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระปริมาณมากขึ้น และได้มีการศึกษากการสังเคราะห์ไดแอซิดกลีเซอรอลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้ไลเปสปริมาณมาก (ประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก) ปริมาณไดแอซิดกลีเซอรอลที่สังเคราะห์ได้ไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากจะเกิดการผสมกันไม่ได้ดีของสารในปฏิกิริยา แต่อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเร็วขึ้น (Lo *et al.*, 2004a; Kristensen *et al.*, 2005b)

Watanabe *et al.* (2005b) ศึกษาการสังเคราะห์โมโนแอซิดกลีเซอรอลโดยเอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งมีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น (กรดไขมัน:กลีเซอรอล) 1:2 โมล ปริมาณน้ำร้อยละ 1 และปริมาณเอนไซม์ 200 ยูนิตต่อกรัมของสาร ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงถึงร้อยละ 95 และเกิดโมโนแอซิดกลีเซอรอลร้อยละ 90 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง Watanabe *et al.* (2002) ศึกษาการสังเคราะห์โมโนแอซิดกลีเซอรอลโดยเอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งมีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ คือ 200 ยูนิตต่อกรัมของสาร และอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อปริมาณเอนไซม์มากกว่า 100 ยูนิตต่อกรัมของสาร

### 3. ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ (E) และสารตั้งต้น (S) แสดงได้ดังสมการที่ 1 ถ้าปริมาณสารตั้งต้นมีน้อยทำให้ปริมาณของเอนไซม์ซึ่งมีอยู่หลายโมเลกุลไม่สามารถจะรวมตัวกับสารตั้งต้นได้ครบถ้วน เมื่อเพิ่มสารตั้งต้นลงไปโมเลกุลของเอนไซม์ที่เหลือก็จะสามารถทำปฏิกิริยาได้เต็มที่ เกิดเป็น ES complex และเกิดผลิตภัณฑ์มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มสารตั้งต้นในปริมาณที่สูงมาก ค่าความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เปลี่ยนเพราะโมเลกุลของเอนไซม์ทุกโมเลกุลได้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจนหมดแล้ว (ทนนง, 2522)



### 4. เกลือแคลเซียม

นอกจากชนิดของไขมัน ระดับความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิแล้ว พบว่าเกลือบางชนิด จะมีผลต่อปฏิกิริยาของไลเปสด้วย โดยเฉพาะเกลือของแคลเซียมจะช่วยเร่งปฏิกิริยา และช่วยทำให้เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงๆ ได้ดีขึ้น แคลเซียมไอออนช่วยให้โครงสร้างของเอนไซม์มีความคงตัว มีการศึกษาพบว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของไลเปสจากแบคทีเรียที่ทนร้อน (Thermophilic bacteria) และพบว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์ไลเปสที่ทนร้อน (Thermostable lipases) จาก *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp., *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *Geotrichum* sp., *Aeromonas sobria* และ *P. aeruginosa* มีความคงตัว (Sharma et al., 2001; Sifour et al., 2010) นอกจากนี้แคลเซียมไอออนสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระเกิดเป็นเกลือในรูปของสบู่ แล้วตกตะกอนจึงทำให้ความเข้มข้นของกรดไขมันอิสระมีน้อยลง แล้วทำให้เกิดการย่อยต่อไปได้อีก ผลของเกลือแคลเซียมจะมีมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับแหล่งของไลเปส แต่ไลเปสบางชนิดแคลเซียมไอออนก็ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา หรืออาจมีผลยับยั้งปฏิกิริยา

#### 5. แอคติวิตีของน้ำ (Water activity; $a_w$ )

คือปริมาณน้ำอิสระที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ค่า  $a_w$  สามารถหาได้จากอัตราส่วนของความดันไอน้ำต่อความดันไอของน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิและความดันเดียวกัน หรือวัดได้จากความชื้นสัมพัทธ์สมดุล (Mohsenin, 1996) เอนไซม์แต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณน้ำแตกต่างกัน เอนไซม์โดยทั่วไปจะยังคงมีกิจกรรมและสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีน้ำน้อยได้ และมีการศึกษาพบว่าไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ยังคงมีกิจกรรมสูงที่  $a_w$  ต่ำกว่า 0.01 (Valivety et al., 1992a) และ Valivety et al. (1992b) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าที่  $a_w$  เท่ากับ 0.12 ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ยังคงมีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 40 ของกิจกรรมที่สูงที่สุดของเอนไซม์ แต่ไลเปสจากแหล่งอื่นต้องการ  $a_w$  ที่สูงกว่าจึงจะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมที่สูง

#### วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

เป็นวิธีทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาแนวโน้มในการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง (Response) ต่อที่รืทเมนต์ (Treatment) ที่มีลักษณะเป็นอิทธิพลเชิงปริมาณ (Quantitative effects) เช่น ระดับความเข้มข้นของสาร อุณหภูมิ เวลา เป็นต้น ซึ่งจะมีการใช้แผนภาพคอนทัวร์

(Contour plot) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ที่เป็นที่สนใจของนักวิจัย ผลที่ตามมา คือนักวิจัยสามารถที่จะหาสูตรหรือสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) จากความสัมพันธ์เหล่านั้นได้เมื่อพิจารณาปัจจัยที่สนใจเหล่านั้นพร้อมๆ กัน โดยความรู้พื้นฐานที่ต้องใช้ คือการวางแผนการทดลอง (Experimental design) การวิเคราะห์สมการถดถอย (Regression analysis) และความรู้ในการใช้โปรแกรมสร้างแผนภาพคอนทัวร์ (อนุวัตร, 2549)

### 1. แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของวิธีการพื้นผิวตอบสนองสามารถแสดงได้ดังสมการ

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + E \quad (2)$$

โดยที่ Y คือ ค่าตอบสนอง (Response) ซึ่งเป็นตัวแปรตาม (Dependent variable)

$X_1, X_2, \dots, X_k$  คือ ตัวแปรที่สนใจ ซึ่งเป็นตัวแปรต้น (Independent variables)

E = error term ของความสัมพันธ์

ความสัมพันธ์ หรือฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านี้มักใช้สมการลำดับที่หนึ่ง (First order) หรือสมการลำดับที่สอง (Second order) หรือแบบจำลองโพลีโนเมียล (Polynomial model) เป็นตัวอธิบาย โดยวิธีการทางสถิติที่ใช้ คือวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (The least square method) เพื่อประมาณค่าของปัจจัย (Parameter) ต่างๆ

### 2. แผนภาพคอนทัวร์ (Contour plot)

แผนภาพคอนทัวร์เป็นอนุกรม (Series) ของเส้นหรือกราฟซึ่งมีค่าที่แน่นอนและคงที่สอดคล้องกับระดับของปัจจัยที่เปลี่ยนแปลงไป แผนภาพคอนทัวร์ที่สร้างเป็นแผนภาพ 3 มิติ เรียกว่าพื้นผิวตอบสนอง (Surface plot)

### 3. การดำเนินการวิธีพื้นผิวตอบสนอง

มีขั้นตอนหลักดังนี้ คือขั้นแรกทำการเลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้

ข้อมูลเพียงพอในการสร้างแผนภาพคอนทัวร์ เมื่อได้ข้อมูลจากการทดลองแล้วทำการสร้างสมการถดถอย (Regression equation) ที่ดีที่สุด และสร้างแผนภาพจากสมการที่หามาได้พร้อมทั้งหาสถานะที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ จากนั้นทำการทวนสอบเพื่อพิจารณาว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสมมากน้อยเพียงใด ในกรณีที่สมการมีความไม่เหมาะสมให้ทำการสร้างสมการใหม่ (Khuri and Mukhopadhyay, 2010)

#### 4. Central Composite Design (CCD)

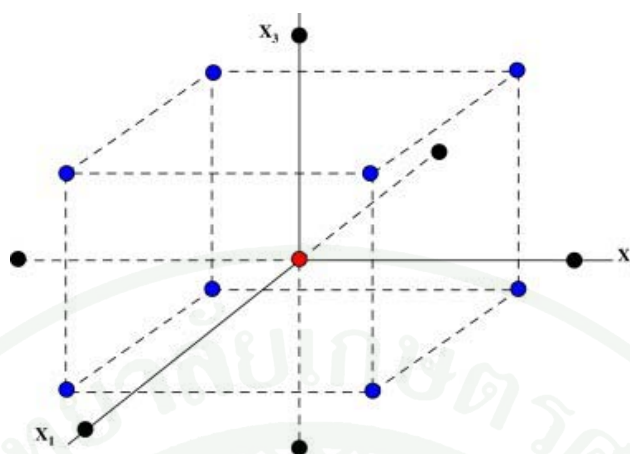
เป็นแผนการทดลองที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาวิธีการพื้นผิวตอบสนอง แผนการทดลองนี้เป็นแผนการทดลองที่เพิ่มการทดลองระหว่างระดับของปัจจัย โดยสิ่งทดลอง (Treatment combinations หรือ Design points) ที่ใช้ในการทดลอง จะประกอบด้วย

$2^k$  factorial points (เมื่อ  $k$  คือ จำนวนปัจจัยที่ศึกษา) ซึ่งจะใช้เพียง 1 ซ้ำ โดย  $2^k$  factorial points จะประกอบด้วยสิ่งทดลอง (Treatment combinations) ดังต่อไปนี้ คือ  $(-1, -1, \dots, -1), (1, -1, \dots, -1), \dots, (1, 1, \dots, -1), (1, 1, \dots, 1)$

$2k$  star point (เมื่อ  $k$  คือ จำนวนปัจจัยที่ศึกษา) ซึ่งจะใช้เพียง 1 ซ้ำ โดย  $2k$  star point จะประกอบด้วยสิ่งทดลอง (Treatment combinations) ดังต่อไปนี้ คือ  $(-\alpha, 0, \dots, 0), (\alpha, 0, \dots, 0), \dots, (0, 0, \dots, -\alpha), (0, 0, \dots, \alpha)$  เมื่อ  $\alpha = 2^{k/4}$

center point ซึ่งจะใช้  $c$  ซ้ำ คือ จะใช้กี่ซ้ำก็ได้ โดย center point จะมีสิ่งทดลอง (Treatment combinations) คือ  $(0, 0, \dots, 0)$

ตัวอย่างแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ที่มี 3 ปัจจัย ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งจะประกอบด้วยสิ่งทดลอง (Treatment combinations) ดังต่อไปนี้ คือ  $2^3$  factorial points ได้แก่  $(-1, -1, -1), (1, 1, 1), (-1, 1, 1), (1, -1, -1), (-1, 1, -1), (1, 1, -1), (-1, -1, 1), (1, -1, 1), 2(3)$  star points ได้แก่  $(0, 1.682, 0), (0, 0, 1.682), (0, 0, -1.682), (1.682, 0, 0), (0, -1.682, 0), (-1.682, 0, 0)$  และ center point คือ  $(0, 0, 0)$  (Mani et al., 2007)



ภาพที่ 7 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design สำหรับ 3 ปัจจัย

ที่มา: Cho and Zoh (2007)

#### 5. การใช้ประโยชน์ของเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

Kristensen *et al.* (2005b) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไดแอซิลกลีเซอรอลด้วยปฏิกิริยากลิเซอโรไลซิสระหว่างน้ำมันคาโนลา หรือน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน กับกลีเซอรอล โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ คือไม่มีการเติมน้ำ เติมกลีเซอรอลร้อยละ 5 ต่อสารตั้งต้น (อัตราส่วนโมลเท่ากับ 2) อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4-5 ชั่วโมง และไลเพสร้อยละ 5 เช่นเดียวกับ Lo *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไดแอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คืออุณหภูมิ 66.29 องศาเซลเซียส ไลเพสร้อยละ 5 อัตราส่วนโมลของกรดไขมันต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 2.14 และระยะเวลา 4.14 ชั่วโมง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. วัสดุดิบ

1.1 ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม (บริษัท น้ำมันพืชปทุม จำกัด, ปทุมธานี ประเทศไทย)

#### 2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับทำบริสุทธิ์ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

2.1.1 เฮกเซน (Hexane: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.2 สารเคมีสำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2.2.1 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

2.2.2 พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-Nitrophenol: Sigma-Aldrich Co Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.2.3 พารา-ไนโตรฟีนิลพาล์มิเตต (*p*-Nitrophenyl palmitate: Sigma-Aldrich Co Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.2.4 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate: Carlo Erba reagents Co Ltd., ฝรั่งเศส)

2.2.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate: Carlo Erba reagents Co Ltd., ฝรั่งเศส)

2.3 สารเคมีสำหรับสังเคราะห์ไดแอสิลกลีเซอรอล

2.3.1 ซิลิกาเจล 60 (Silica gel 60: Sigma-Aldrich Co Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.3.2 เอนไซม์ไลเปส (Lipase from *Rhizomucor miehei*: Sigma-Aldrich Co Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.3.3 กลีเซอรอล (Glycerol: Sigma-Aldrich Co Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.3.4 บิวทิลเมทิลอีเทอร์ (*tert*-Butyl methyl ether: Fluka Co Ltd., สวิสเซอร์แลนด์)

2.3.5 สารดูดความชื้น (Molecular sieves 3A: Fluka Co Ltd., สวิสเซอร์แลนด์)

2.3.6 ลิเทียมคลอไรด์ (Lithium chloride: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

#### 2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบแอซิลกลีเซอรอล

2.4.1 โมโน-, ได- และไตรแอซิลกลีเซอรอลมิกซ์ (Mono-, di- and triacylglycerol mix: Restek Co Ltd., สหรัฐอเมริกา)

2.4.2 กรดพาล์มิติก (Palmitic acid: Fluka Co Ltd., สวิสเซอร์แลนด์)

2.4.3 คลอโรฟอร์ม (Chloroform: HPLC grade, RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.4 เมทิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol: HPLC grade, RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.5 เมทิลแอซิเตต (Methyl acetate: Carlo Erba Co Ltd., ฝรั่งเศส)

2.4.6 ไอโซโพรพานอล (Isopropanol: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.7 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

2.4.8 เฮกเซน (Hexane: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.9 กรดกลacialแอซิติก (Glacial acetic acid: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.10 ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.11 คิวปริกแอซิเตต (Cupric acetate: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

2.4.12 กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.4.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

## 2.5 สารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยาไดเอซิลกลีเซอรอล

2.5.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

2.5.2 ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein: Ajax Finechem pty Co Ltd., ออสเตรเลีย)

2.5.3 เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

2.5.4 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether: RCI Lab scan Co Ltd., ประเทศไทย)

## 3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

### 3.1 อุปกรณ์สำหรับการทำปฏิกิริยาของเหลวผลล้นน้ำมันปาล์ม

3.1.1 บีมสูญญากาศ (Electric Aspirator: Jeio Tech Co Ltd., เกาหลี)

3.1.2 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter paper: Whatman International Co Ltd., อังกฤษ)

3.1.3 เครื่องอ่างไอน้ำ (Water bath: OB 14, Memmert GmbH+Co.KG., เยอรมัน)

### 3.2 อุปกรณ์สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.2.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer: Genesys 10-s, TherMo Electron Corporation., Madison, USA)

3.2.2 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (VX 100, Labnet International, Inc, USA)

### 3.3 อุปกรณ์สำหรับสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอล

3.3.1 เครื่องอ่างไอน้ำแบบเขย่า (Shaking water bath: Sv 1422, Memmert GmbH+Co.KG., เยอรมัน)

3.3.2 เครื่องกวนผสมสารแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) (Multistirrer 6, Velp scientifica, Italy)

### 3.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบแอซิลกลีเซอรอล

3.4.1 แผ่นแก้วโครมาโตกราฟีชนิดผิวเคลือบ (HPTLC plate: Camag, เยอรมัน)

3.4.2 แทงค์ (Tank: Camag, เยอรมัน)

3.4.3 เครื่องเตรียมสารลงบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบกึ่งอัตโนมัติ (Sample application bandwise: Linomat IV, Camag, เยอรมัน)

3.4.4 แผ่นให้ความร้อน (Plate heater: TLC Plate Heater III, Camag, เยอรมัน)

3.4.5 โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.4.6 เครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer: TLC Scanner 3, Camag, เยอรมัน)

3.4.7 เข็มฉีดยา (Syringe: Linomat syringe 6950014, Camag, เยอรมัน)

### 3.5 อุปกรณ์สำหรับการทำบริสุทธิ์ไดแอซิลกลีเซอรอล

3.5.1 เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบพาราเลล (Parallel evaporator: IP3S2400, Buchi Co Ltd., สวิตเซอร์แลนด์)

### 3.6 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในไดแอซิลกลีเซอรอล

3.6.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (Gas chromatography-flame ionization detector: Agilent Model 6890N, Agilent Technologies, Inc., สหรัฐอเมริกา)

### 3.7 อุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ

## วิธีการ

#### 1. การทำบริสุทธิ์ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

นำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม 200 กรัม เติมเฮกเซน 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในเครื่องอ์ไอน้ำอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนละลายเป็นเนื้อเดียวกันทั้งหมด แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที แล้วนำไปกรองทันที ล้างตะกอนด้วยเฮกเซนเย็น อุณหภูมิประมาณ 8 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควันประมาณ 1 ชั่วโมง เก็บ

ตะกอนที่ได้ไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) 1 คืน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (Chaiyaso *et al.*, 2006)

## 2. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Becker *et al.*, 1997)

### 2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ไลเปสปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-ไนโตรฟีนอลพาล์มิเตต (25 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กวนผสม 15 วินาที แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37, 45, 55, 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และรายงานค่าเป็นยูนิต (Unit) โดย 1 ยูนิต เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาในการปลดปล่อยพารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

### 2.2 ตรวจวัดกิจกรรมของไลเปส

นำไลเปสปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-ไนโตรฟีนอลพาล์มิเตต (25 มิลลิโมลาร์ในเอทานอล) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กวนผสม 15 วินาที แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐานทำโดยชั่งพารา-ไนโตรฟีนอล 0.01 กรัม นำมาละลายน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลให้มีความเข้มข้นช่วง 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลทุกความเข้มข้นมาความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร กวนผสมนาน 15 วินาที นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต

(100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนของสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และรายงานค่าเป็นยูนิท (Unit)

### 3. การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ไดแอกลิเซอรอล

#### 3.1 อิทธิพลของปริมาณ molecular sieve

นำกลีเซอรอล 0.92 กรัม (ดูดซับบนซิลิกาเจล 1 กรัม) และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 7.5 กรัม (อัตราส่วนโมลของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 3:1) มาปรับค่าวอเตอร์แอกติวิตีโดยใช้สารละลายเกลือลิเทียมคลอไรด์ ( $a_w = 0.11$ ) เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาเติมบิวทิลเมทิลอีเทอร์ 20 มิลลิลิตร กวนผสมนาน 30 นาที แล้วจึงเติมกลีเซอรอล และ molecular sieve หลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปริมาณ 2.36, 4.72, 7.09 และ 9.45 กรัม ตามลำดับ (ร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 โดยน้ำหนักสารปฏิกริยาทั้งหมด) และเริ่มปฏิกริยาโดยเติมไลเพส 1.08 กรัม (ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักสารปฏิกริยาทั้งหมด หรือ 42.71 ยูนิทต่อน้ำหนักของสารตั้งต้น คือกลีเซอรอล และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องอั้งไอน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 3.2 อิทธิพลของอัตราการกวนผสม

นำกลีเซอรอล 0.92 กรัม (ดูดซับบนซิลิกาเจล 1 กรัม) และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 7.5 กรัม (อัตราส่วนโมลของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 3:1) มาปรับค่าวอเตอร์แอกติวิตีโดยใช้สารละลายเกลือลิเทียมคลอไรด์ ( $a_w = 0.11$ ) เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาเติมบิวทิลเมทิลอีเทอร์ 20 มิลลิลิตร กวนผสมนาน 30 นาที แล้วจึงเติมกลีเซอรอล และ molecular sieve หลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปริมาณ 7.09 กรัม (ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักสารปฏิกริยาทั้งหมด) และเริ่มปฏิกริยาโดยเติมไลเพส 1.08 กรัม (ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักสารปฏิกริยาทั้งหมด หรือ 42.71 ยูนิทต่อน้ำหนักของสารตั้งต้น คือกลีเซอรอล และของเหลวผลกลั่น

น้ำมันปาล์ม) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องอั้งไอน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 50, 70, 90 และ 110 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.3 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์

นำกลีเซอรอล 0.92 กรัม (ดูดซับบนซิลิกาเจล 1 กรัม) และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 7.5 กรัม (อัตราส่วนโมลของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 3:1) มาปรับค่าวอเตอร์แอกติวิตี้โดยใช้สารละลายเกลือลิเทียมคลอไรด์ ( $a_w = 0.11$ ) เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาเติมบิวทิลเมทิลอีเทอร์ 20 มิลลิลิตร กวนผสมนาน 30 นาที แล้วจึงเติมกลีเซอรอล และ molecular sieve หลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปริมาณ 7.09 กรัม (ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักสารปฏิกิริยาทั้งหมด) และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมไลเพส 0.42, 1.08, 1.68 และ 2.38 กรัม ตามลำดับ (ร้อยละ 1, 2.5, 4 และ 5.5 โดยน้ำหนักสารปฏิกิริยาทั้งหมด หรือ 16.64, 42.71, 66.56 และ 94.29 ยูนิตต่อน้ำหนักของสารตั้งต้น คือกลีเซอรอล และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องอั้งไอน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4 อิทธิพลของอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น

นำกลีเซอรอล 0.92 กรัม (ดูดซับบนซิลิกาเจล 1 กรัม) และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม (อัตราส่วนของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 1, 2, 3 และ 4 โมล ตามลำดับ) มาปรับค่าวอเตอร์แอกติวิตี้โดยใช้สารละลายเกลือลิเทียมคลอไรด์ ( $a_w = 0.11$ ) เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาเติมบิวทิลเมทิลอีเทอร์ 6.8, 13.5, 20 และ 27 มิลลิลิตร ตามลำดับ กวนผสมนาน 30 นาที แล้วจึงเติมกลีเซอรอล และ molecular sieve หลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปริมาณ 7.09 กรัม ตามลำดับ (ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักสารปฏิกิริยาทั้งหมด) และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมไลเพส 1.08 กรัม ตามลำดับ (ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักสารปฏิกิริยาทั้งหมด หรือ 42.71 ยูนิตต่อน้ำหนักของสารตั้งต้น คือกลีเซอรอล และของเหลวผล

กลั่นน้ำมันปาล์ม) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5 อิทธิพลของระยะเวลา

นำกลีเซอรอล 0.92 กรัม (ดูดซับบนซิลิกาเจล 1 กรัม) และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน 7.5 กรัม (อัตราส่วนโมลของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มต่อกลีเซอรอลเท่ากับ 3:1) มาปรับค่าวอเตอร์แอกติวิตี้โดยใช้สารละลายเกลือลิเทียมคลอไรด์ ( $a_w = 0.11$ ) เป็นระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาเติมบิวทิลเมทิลอีเทอร์ 20 มิลลิลิตร กวนผสมนาน 30 นาที แล้วจึงเติมกลีเซอรอล และ molecular sieve หลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปริมาณ 7.09 กรัม (ร้อยละ 30 โดยน้ำหนักสารปฏิกิริยาทั้งหมด) และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมไลเพส 1.08 กรัม (ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักสารปฏิกิริยาทั้งหมด หรือ 42.71 ยูนิตต่อน้ำหนักของสารตั้งต้น คือกลีเซอรอล และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.6 แผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ไดแอสิลกลีเซอรอลโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยในการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นจะใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 13

## 4. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG

### 4.1 แผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

จากการทดลองที่ 3 พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG ได้แก่ ปริมาณ molecular sieve ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น ดังนั้นจึงเลือกปัจจัยทั้ง 3 นี้ไปศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง ในการพิจารณาช่วงของปัจจัยที่นำมาศึกษา พิจารณาจากช่วงของปัจจัยที่มีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลง ร่วมกับความเป็นไปได้ในการทดลอง โดยศึกษาช่วงปัจจัยต่างๆ ดังนี้ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น ( $X_1$ ) 0.75-1.5 โมล, ปริมาณเอนไซม์ ( $X_2$ ) ร้อยละ 2-3 โดยน้ำหนักสารปฏิกริยา และปริมาณ molecular sieve ( $X_3$ ) ร้อยละ 25-30 โดยน้ำหนักสารปฏิกริยา เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยเหล่านี้ร่วมกันจึงมีการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยกำหนดระดับของตัวแปรอิสระ 5 ระดับ ซึ่งมีรหัสของระดับ (Level code) ได้แก่  $-\alpha$ , -1, 0, 1 และ  $+\alpha$  เมื่อ -1, 0, 1 คือระดับต่ำ กลาง และสูงของปัจจัย ตามลำดับ ส่วน  $-\alpha$  และ  $+\alpha$  คือระดับที่ต่ำกว่าขอบเขตล่าง และสูงกว่าขอบเขตบนของช่วงที่ทำการศึกษา โดย  $\alpha$  จะมีค่าเท่ากับ  $2^{k/4}$  เมื่อ k คือจำนวนปัจจัยที่ศึกษา ดังนั้นในกรณีที่ปัจจัยที่ทำการศึกษามี 3 ปัจจัย ค่า  $-\alpha$  และ  $+\alpha$  จึงเท่ากับ -1.682 และ 1.682 ตามลำดับ จะได้หน่วยทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

จากตารางที่ 5 จะพบว่าในการทดลองจะประกอบด้วยสิ่งทดลองทั้งหมด 15 สิ่งทดลอง ซึ่งประกอบด้วยหน่วยทดลองที่เป็น factorial point, star point และ center point จำนวน 8, 6 และ 1 หน่วยทดลอง ตามลำดับ โดยตามแผนการทดลองมีการทำซ้ำหน่วยทดลองที่เป็น center point (0, 0, 0) 3 ซ้ำ ทำให้มีหน่วยทดลองทั้งหมด 17 หน่วย จากนั้นสังเคราะห์ DAG ตามสภาวะต่างๆ ดังตารางที่ 5 และวิเคราะห์หองศ์ประกอบ DAG ที่สังเคราะห์ได้จากแต่ละหน่วยทดลองในการทดลองมีการทำซ้ำจำนวน 2 ซ้ำ เมื่อได้ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดแล้ว นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์การถดถอย (Regression) เพื่อสร้างสมการที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ของชุดข้อมูล โดยสมการที่ใช้เป็นสมการพหุนามเมื่อยกกำลังสอง (Second degree polynomial equation) ซึ่งมีแบบจำลองดังนี้ คือ

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (3)$$

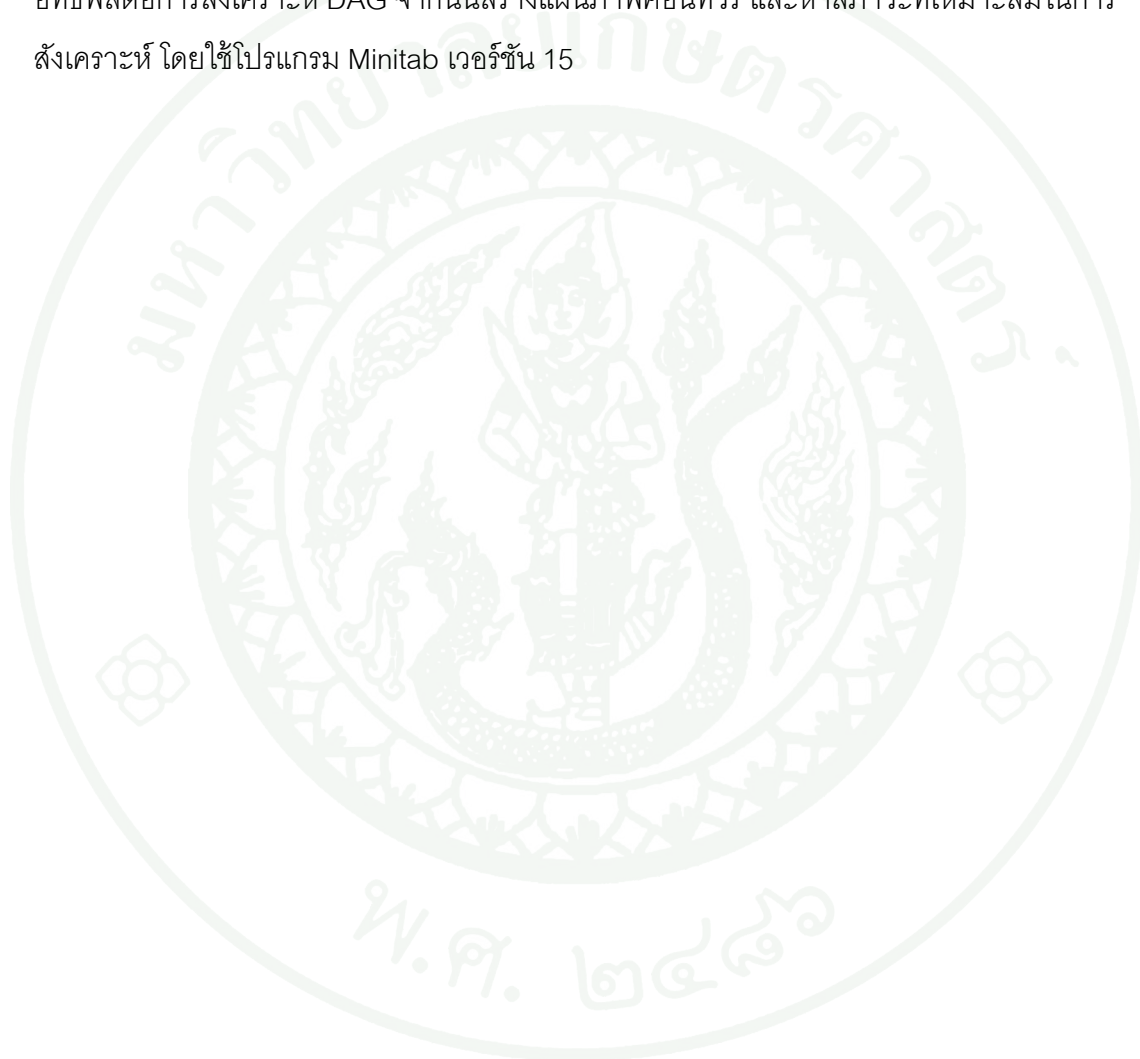
เมื่อ Y คือ ตัวแปรตาม

$b_0, b_1, b_2, b_3, b_{11}, b_{22}, \dots$  คือ สัมประสิทธิ์ของตัวแปร และ

$X_1, X_2, X_3$ 

คือ ค่าอัตราส่วนโมล ปริมาณเอนไซม์ และปริมาณ  
molecular sieve ตามลำดับ

จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อดูว่าสมการแสดงความสัมพันธ์ที่ได้มานั้นมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการอธิบายข้อมูลชุดนี้หรือไม่ และเพื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG จากนั้นสร้างแผนภาพคอนทัวร์ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชัน 15



ตารางที่ 5 แผนการทดลองแบบ CCD ที่ใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ไดแอสิลกลีเซอรอล

No.	Substrate ratio (mol)	Enzyme concentration (%w/w)	Molecular sieve (%w/w)
1	-1 (0.75)	-1 (2)	-1 (25)
2	1 (2.25)	-1 (2)	-1 (25)
3	-1 (0.75)	1 (3)	-1 (25)
4	1 (2.25)	1 (3)	-1 (25)
5	-1 (0.75)	-1 (2)	1 (35)
6	1 (2.25)	-1 (2)	1 (35)
7	-1 (0.75)	1 (3)	1 (35)
8	1 (2.25)	1 (3)	1 (35)
9	0 (1.5)	0 (2.5)	-1.68 (21.6)
10	0 (1.5)	0 (2.5)	1.68 (38.4)
11	0 (1.5)	-1.68 (1.66)	0 (30)
12	0 (1.5)	1.68 (3.34)	0 (30)
13	-1.68 (0.24)	0 (2.5)	0 (30)
14	1.68 (2.76)	0 (2.5)	0 (30)
15	0 (1.5)	0 (2.5)	0 (30)
16	0 (1.5)	0 (2.5)	0 (30)
17	0 (1.5)	0 (2.5)	0 (30)

หมายเหตุ ตัวเลขที่แสดงในตารางคือ รหัสของระดับ หรือ coded levels และ (\_\_\_) คือ ค่าจริง หรือ uncoded levels ตามลำดับ

#### 4.2 การทำบริสุทธิ์ DAG ที่สังเคราะห์ได้

นำสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร มาเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟีนอล์ฟทาลีน แล้วไทเทรตด้วย 0.5 นอร์มอล โซเดียมไฮ

ดรอกไซต์ จนถึงจุดยุติ เติมน้ำ:เอทานอล (1:1) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเขย่า และนำไปใส่กรวยแยก แล้วทิ้งไว้สักพักจนเกิดการแยกชั้น แล้วเก็บตัวอย่างที่อยู่ชั้นบนไประเหยตัวทำละลายโดยเครื่องระเหยแบบพาราเลล โดยใช้ความดัน 350 บาร์ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบแอซิลกลีเซอรอลในของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน และสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา

วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบางประสิทธิภาพสูง (High performance thin layer chromatography) ดัดแปลงจากวิธีการของ Olsen and Henderson (1989) โดยจุ่มเพลทลงในเฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์ (1:1) จนสารเคลื่อนที่ไปจนสุดเพลท จากนั้นนำเพลทขึ้นมาเป่าให้แห้งด้วยลมร้อน เพื่อระเหยตัวทำละลาย หยดสารมาตรฐานผสมแอซิลกลีเซอรอล (โมโน-, ได- และไตรแอซิลกลีเซอรอล) และหยดตัวอย่างลงบนเพลทด้วยเครื่องหยดสาร (Linomat IV, Camag) หลังจากนั้นเป่าให้แห้งด้วยลมร้อน แล้วนำไปจุ่มในเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย เมทิลเอซีเตต:ไอโซโพรพานอล:คลอโรฟอร์ม:เมทิลแอลกอฮอล์:ร้อยละ 0.25 โปแทสเซียมคลอไรด์ (12.5:12.5:12.5:5:4.5) ทิ้งให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทาง 4.5 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น จากนั้นนำเพลทขึ้นมาเป่าให้แห้งด้วยลมร้อน นำไปใส่ในโถดูดความชื้นซึ่งบรรจุโซเดียมไฮดรอกไซด์อยู่ภายในเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเพลทไปจุ่มในตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วย เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์:กรดกลูเซอิกแอซิดิก (40:10:1) ทิ้งให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนไปเป็นระยะทาง 9.5 เซนติเมตรจากจุดเริ่มต้น จากนั้นนำเพลทขึ้นมาเป่าให้แห้งด้วยลมร้อน แล้วนำไปจุ่มในร้อยละ 3 คิวบิกเอซีเตตในร้อยละ 8 กรดฟอสฟอริก เป็นเวลา 10 วินาที แล้วให้ความร้อนแก่เพลทที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เกิดแถบสีที่ชัดเจนขึ้น จากนั้นนำเพลทไปวิเคราะห์ผลด้วยการสแกนความหนาแน่น (Density) ของสารที่แยกได้ ที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร ประมวลผลที่ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป CATS 4

เปรียบเทียบระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่กับสารมาตรฐานภายใต้การวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน เพื่อบ่งชี้ชนิดของไขมัน แล้วหาพื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป CATS 4 คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟของแอซิลกลีเซอรอลแต่ละชนิดที่พบในตัวอย่างรายงานเป็นร้อยละของพื้นที่ทั้งหมด (% Peak area)

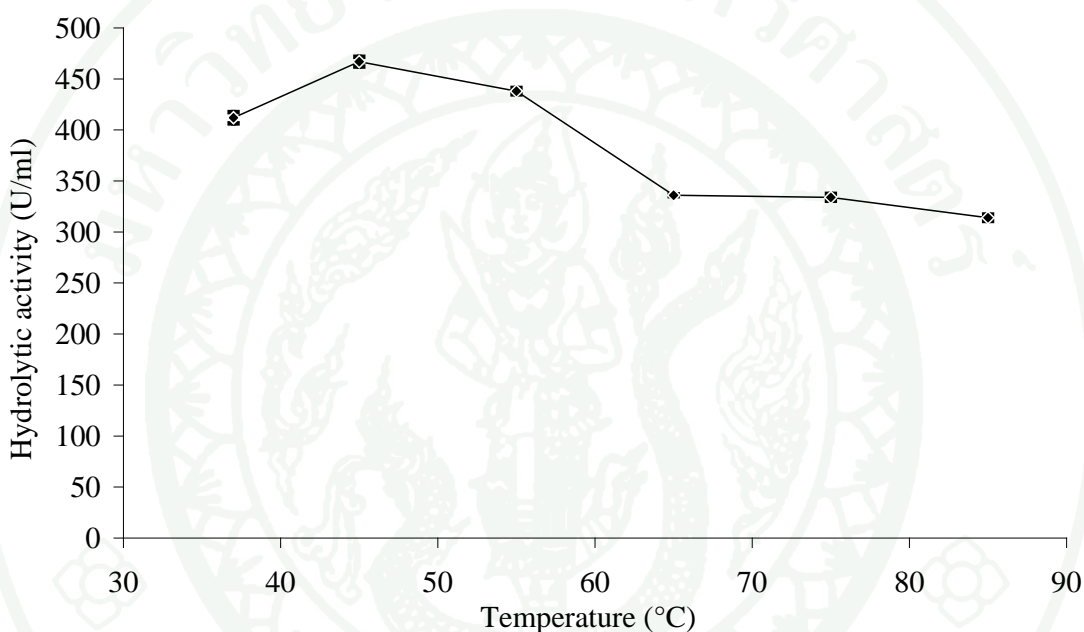
6. วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน และสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์

วิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชันดีเทคเตอร์ (Gas chromatography-flame ionization detector: Agilent Model 6890N, Agilent Technologies, Inc.) และใช้คอลัมน์ DB-wax (Length 30 m, ID 0.32 mm, Film 0.25  $\mu\text{m}$ , Temperature limit 20-260  $^{\circ}\text{C}$ ) โดยใช้แก๊สตัวพา (Carrier gas) คือฮีเลียม (Helium) อัตราการไหล 3 มิลลิลิตรต่อนาที และฉีดสารตัวอย่างแบบ split ratio 30:1 อุณหภูมิในส่วนที่ใช้บรรจุคอลัมน์ (Column oven) 250 องศาเซลเซียส และเครื่องตรวจจับ (Detector) 270 องศาเซลเซียส และตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นของตู้อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 2 นาที และรายงานเป็นร้อยละของพื้นที่ทั้งหมด (% Peak area)

## ผลและวิจารณ์

### 1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมไปใช้ในการสังเคราะห์ DAG ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากภาพที่ 8 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37, 45, 55, 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส มีค่า  $412 \pm 5.49$ ,  $467 \pm 4.77$ ,  $438 \pm 3.11$ ,  $336 \pm 0.83$ ,  $334 \pm 3.28$  และ  $314 \pm 3.15$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (1 มิลลิลิตร เท่ากับ 1.4 กรัม) ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ยกเว้นที่อุณหภูมิ 65 และ 75 องศาเซลเซียส ที่กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) จากการทดลองเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 45 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลง อาจเนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิแม้จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่ม แต่อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงรูปร่างของเอนไซม์ซึ่งเดิมอยู่ในลักษณะโปรตีนที่พับไปมาเป็นรูป globular form จะเริ่มคลายตัวออก ทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมไป (ทนนง, 2522; พัชรา, 2543) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ

เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 467 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

## 2. การทำบริสุทธิ์ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม

ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองนี้มีกรดไขมันอิสระเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 88.1 มีไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล และโมโนเอซิลกลีเซอรอลประมาณร้อยละ 3.5, 6.8 และ 2.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) เนื่องจากต้องการเพิ่มปริมาณกรดไขมันอิสระในของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มให้มีปริมาณสูงขึ้นเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ DAG จึงนำของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มมาทำบริสุทธิ์บางส่วน จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าการทำบริสุทธิ์บางส่วนของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มทำให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) จากประมาณร้อยละ 88.1 เป็นร้อยละ 93.5 ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Nwabueze and Okocha, 2008) ในการทำบริสุทธิ์บางส่วนนั้น ทำให้สารประกอบไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล และโมโนเอซิลกลีเซอรอลละลายและสูญเสียไปกับเฮกเซน

**ตารางที่ 6** องค์ประกอบไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม และของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

Composition	Palm oil distillate (%wt)	Purified palm oil distillate (%wt)
Monoacylglycerol (MAG)	2.05±0.65 <sup>a</sup>	1.59±1.2 <sup>b</sup>
Diacylglycerol (DAG)	6.80±0.83 <sup>a</sup>	3.50±1.06 <sup>b</sup>
Triacylglycerol (TAG)	3.45±0.78	-
Free fatty acid (FFA)	88.15±0.65 <sup>a</sup>	93.48±1.15 <sup>b</sup>

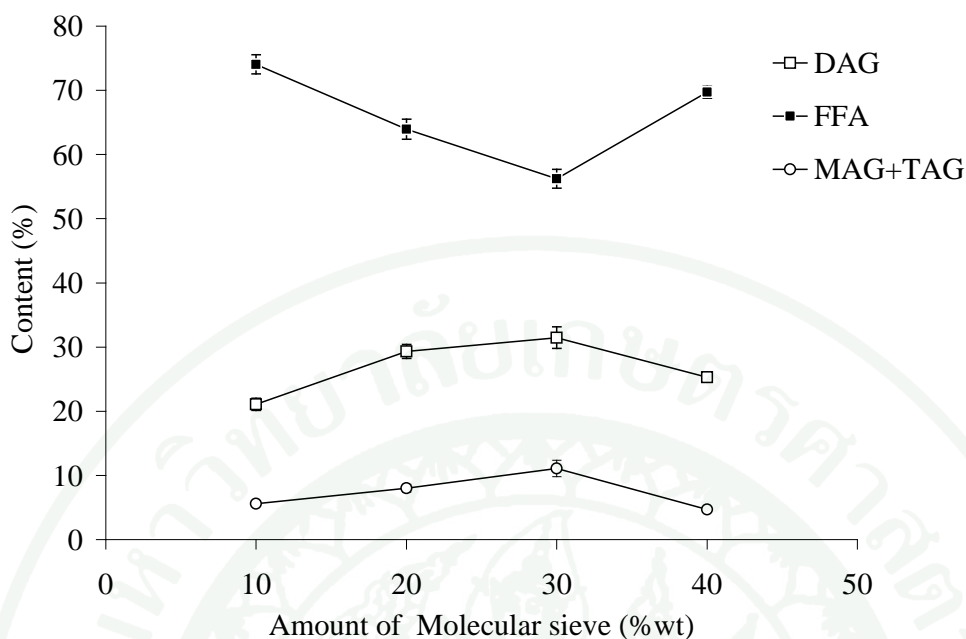
**หมายเหตุ** ตัวอักษร a-b ที่ต่างกันในแนวนอนแสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

### 3. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG

จากการศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณสารดูดความชื้น หรือ molecular sieve อัตราการกวนผสม ปริมาณเอนไซม์ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น และระยะเวลาที่ใช้ในการสังเคราะห์ DAG เพื่อคัดเลือกและหาช่วงของปัจจัยที่จะนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG ได้ผล ดังนี้

#### 3.1 ปริมาณ molecular sieve

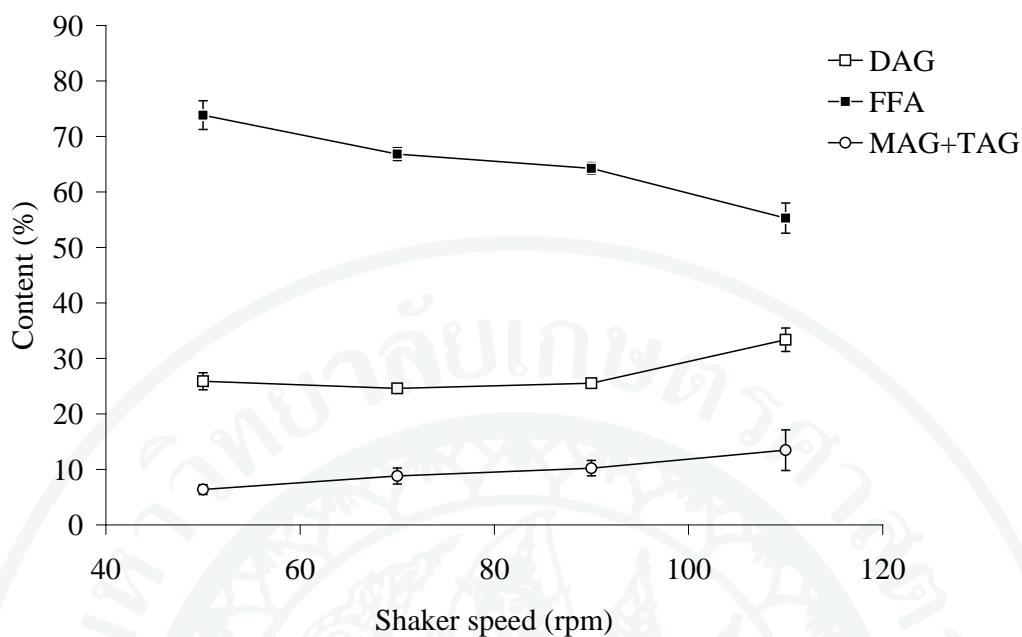
การศึกษาผลของปริมาณ molecular sieve ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 โดยน้ำหนัก) ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 9) แสดงให้เห็นว่าการใช้ปริมาณ molecular sieve ร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 โดยน้ำหนัก สามารถสังเคราะห์ DAG ได้ร้อยละ  $21.07 \pm 0.96$ ,  $29.33 \pm 1.08$ ,  $31.47 \pm 1.69$  และ  $25.28 \pm 0.75$  ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ปริมาณ molecular sieve ร้อยละ 30 มีค่าสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากที่ระดับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของกรดไขมันอิสระที่มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve จากร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 30 และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม molecular sieve เป็นร้อยละ 40 ทั้งนี้ปริมาณ molecular sieve ที่สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้สังเคราะห์ DAG ได้ลดลง เนื่องจากน้ำเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ซึ่งถ้ามีปริมาณน้ำมากเกินไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ คือเกิดไฮโดรไลซิสของกลีเซอไรด์ส่งผลทำให้อัตราการสังเคราะห์ลดลง ทำให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการเติม molecular sieve ซึ่งเป็นสารดูดความชื้นหรือน้ำ จะช่วยทำให้ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลในการสังเคราะห์เอสเทอร์ และป้องกันการเกิดไฮโดรไลซิสโดยช่วยกำจัดปริมาณน้ำที่เกินในระบบ ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดเพิ่มสูงขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการสังเคราะห์สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในระบบต้องมีปริมาณน้ำที่เหมาะสมเนื่องจากมีความจำเป็นต่อการรักษากิจกรรมของเอนไซม์ (Li and Ward, 1993; Gulati *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2004a, 2004b; Nagesha *et al.*, 2004; Chaiyaso *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2007; Fregolente *et al.*, 2008)



ภาพที่ 9 ผลของ molecular sieve ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

### 3.2 อัตราการกวนผสม

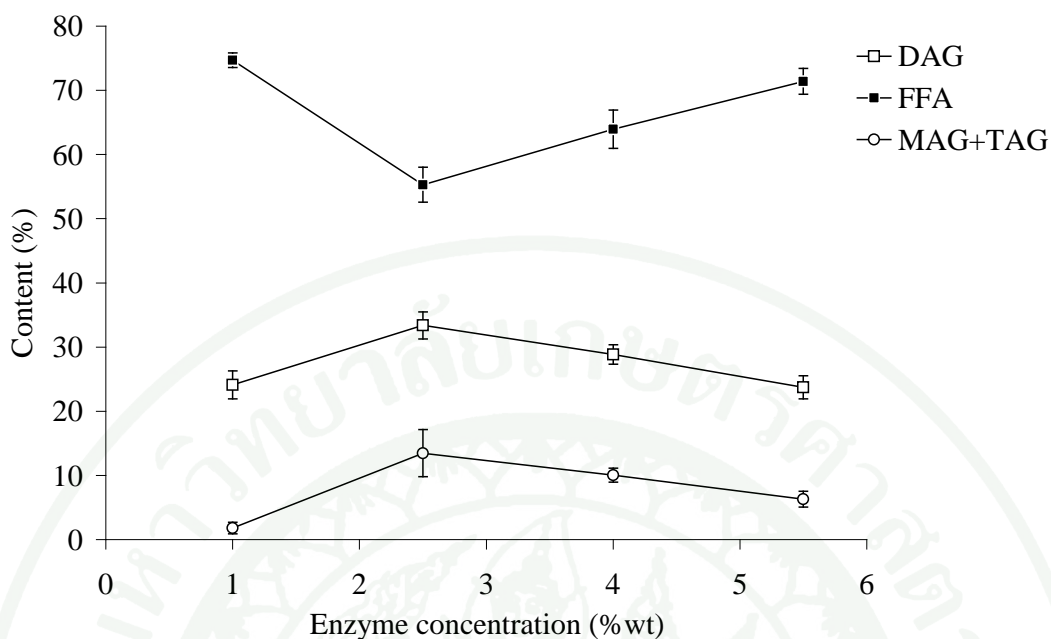
การศึกษาผลของอัตราการกวนผสม (50, 70, 90 และ 110 รอบต่อนาที) ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการใช้อัตราเร็วในการกวนผสมที่ 50, 70, 90 และ 110 รอบต่อนาที สามารถสังเคราะห์ DAG ได้ร้อยละ  $25.89 \pm 1.54$ ,  $24.59 \pm 0.58$ ,  $25.53 \pm 0.77$  และ  $33.38 \pm 2.11$  ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่อัตราเร็วในการกวนผสม 110 รอบต่อนาที มีค่าสูงที่สุด และแตกต่างจากอัตราเร็วอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) สอดคล้องกับปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการกวนผสม ทั้งนี้เนื่องจากอัตราการกวนผสมมีอิทธิพลต่อการกำจัดน้ำโดย molecular sieve ซึ่งเมื่ออัตราการกวนผสมเร็วขึ้นจะช่วยทำให้น้ำถูกกำจัดไปได้เร็วขึ้น ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้น นอกจากนี้อัตราเร็วในการกวนผสมยังมีอิทธิพลเล็กน้อยต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา โดยจะช่วยให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นเกิดได้เร็วขึ้น (Medina *et al.*, 1999)



ภาพที่ 10 ผลของอัตราการกวนผสมต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

### 3.3 ปริมาณเอนไซม์

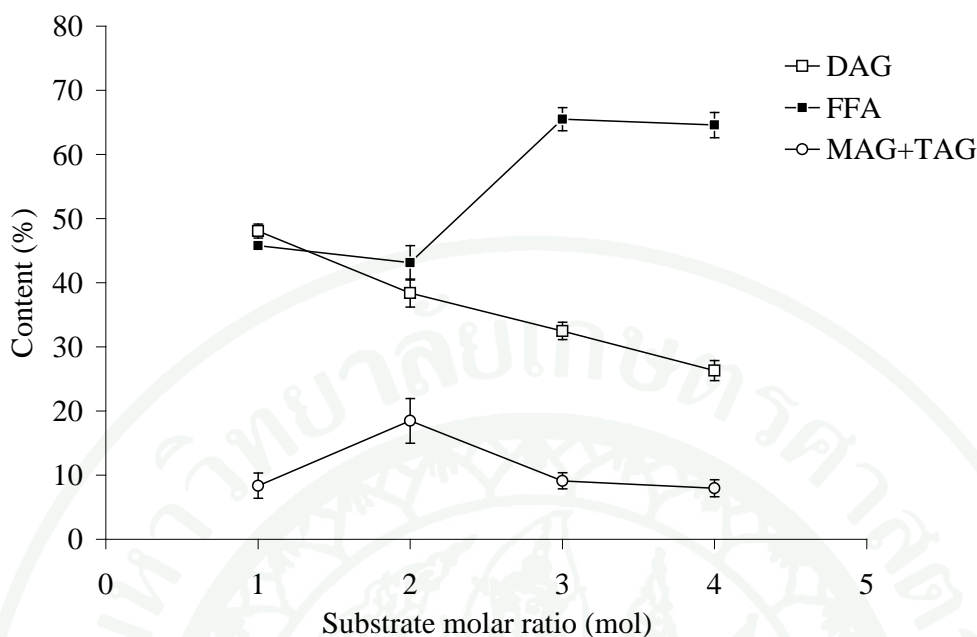
การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละ 1, 2.5, 4 และ 5.5 โดยน้ำหนัก) ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 11) แสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 1, 2.5, 4 และ 5.5 โดยน้ำหนัก สามารถสังเคราะห์ DAG ได้ร้อยละ  $24.11 \pm 2.16$ ,  $33.38 \pm 2.11$ ,  $28.86 \pm 1.52$  และ  $23.73 \pm 1.82$  ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 2.5 มีค่าสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากที่ระดับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็นร้อยละ 2.5 และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จากร้อยละ 2.5 เป็นร้อยละ 5.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะทำให้เกิดเอสเทอร์ฟิเคชันทำให้น้ำเกิดขึ้นในระบบ และเมื่อมีปริมาณน้ำสะสมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จึงทำให้เกิดการไฮโดรไลซิส ทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มสูงขึ้น และได้มีการศึกษา พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ DAG แต่ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น ปฏิกิริยาจะถึงจุดสมดุลเร็วขึ้น และจะส่งผลทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเกิดไฮโดรไลซิส (Kristensen *et al.*, 2005b; Fregolente *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ที่น้อยเกินไปก็อาจไม่เพียงพอต่อการเร่งปฏิกิริยาในเวลาที่กำหนด (Radazi *et al.*, 2011)



ภาพที่ 11 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

### 3.4 อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น

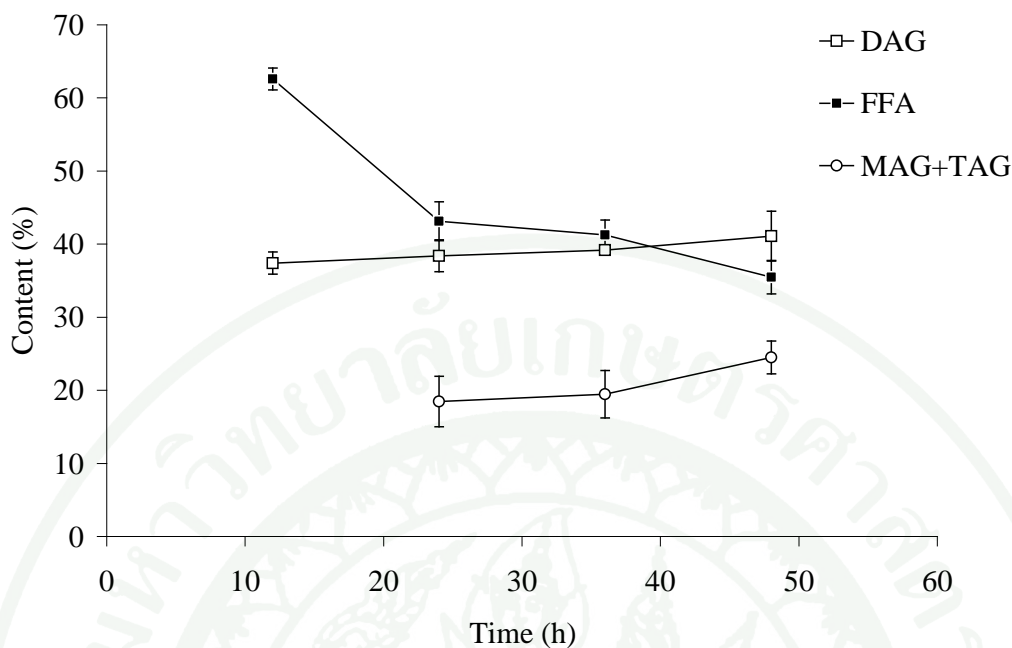
การศึกษาผลของอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น (1, 2, 3 และ 4 โมล) ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นที่ 1, 2, 3 และ 4 โมล สามารถสังเคราะห์ DAG ได้ร้อยละ  $48.06 \pm 1.08$ ,  $38.40 \pm 2.19$ ,  $32.48 \pm 1.36$  และ  $26.31 \pm 1.57$  ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่อัตราส่วนโมลเท่ากับ 1 มีค่าสูงที่สุด และแตกต่างจากระดับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโมล ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จะลดลง สอดคล้องกับปริมาณกรดไขมันอิสระซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนโมลเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากเมื่ออัตราส่วนโมลสูงปริมาณกรดไขมันในปฏิกิริยาอาจมีปริมาณที่มากเกินไปหรือไม่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ DAG (Lo *et al.*, 2004a, 2004b) และความเป็นกรดเบสหรือพีเอชของระบบจะลดลงเมื่ออัตราส่วนโมลสูงขึ้น จึงอาจส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ลดลง ซึ่งสภาวะความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ คือที่พีเอช 7 โดยภายใต้สภาวะกรดเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (Wu *et al.*, 1996)



ภาพที่ 12 ผลของอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

### 3.5 ระยะเวลา

การศึกษาผลของระยะเวลา (12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง) ต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 13 แสดงให้เห็นว่าระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงสามารถสังเคราะห์ DAG ได้ร้อยละ  $37.40 \pm 1.51$ ,  $38.40 \pm 2.19$ ,  $39.18 \pm 0.46$  และ  $41.10 \pm 3.41$  ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ระยะเวลา 12 และ 48 ชั่วโมง มีค่าแตกต่างกันในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมันอิสระซึ่งมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรใช้ระยะเวลาสั้นที่สุดที่ให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณมาก เพื่อที่จะลดต้นทุนของกระบวนการผลิต (Lo *et al.*, 2004a, 2004b) แต่ระยะเวลาที่สั้นเกินไปไปปฏิบัติอาจเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง (ภาพที่ 13) พบว่าที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จะไม่พบ MAG และ TAG ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG คือ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 ผลของระยะเวลาต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.01$ ) ได้แก่ ปริมาณ molecular sieve อัตราเร็วในการกวนผสม ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น (ตารางที่ 7)

จากการศึกษาก่อนหน้าในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ภายในโมเลกุลมากกว่า 1 ตำแหน่ง พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนผสมสูง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดเร็วในช่วงแรกและปฏิกิริยาจะถึงจุดสมดุลเร็วกว่าที่อัตราเร็วในการกวนผสมต่ำ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะไม่แตกต่างกันหรืออาจแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะเวลานานขึ้นอัตราการกวนผสมมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีอิทธิพลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา (Medina *et al.*, 1999)

ดังนั้นการเติม molecular sieve เอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นในปริมาณที่เหมาะสม จึงมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG มากกว่าอัตราการกวนผสม จึงเลือกปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย คือ ปริมาณ molecular sieve ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG โดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

**ตารางที่ 7** การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ (Significant test) ของปัจจัยต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ DAG ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

Factors	p-value
Molecular sieves	0.000
Shaker speed	0.000
Enzyme concentration	0.000
Substrate molar ratio	0.000
Time	0.048

#### 4. สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG

ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่สภาวะต่างๆ แสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งจากผลในตารางแสดงให้เห็นว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 32.66-46.89 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 39.5 ทั้งนี้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้มีความแตกต่างกันตามสภาวะที่ใช้ในการสังเคราะห์ จากการศึกษาของ Lo *et al.* (2007) ที่ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งมีไลเปสเป็นตัวเร่ง และมีกรดพาล์มิติก กรดโอเลอิก และกลีเซอรอล เป็นสารตั้งต้น พบว่าสังเคราะห์ DAG ได้ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 48 ซึ่งมีค่าสูงกว่า DAG ที่สังเคราะห์ได้จากการทดลองนี้เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์ คือ กรดพาล์มิติก และกรดโอเลอิก เป็นสารทางการค้า ดังนั้นจึงมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง แต่ของเหลว ผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดลองนี้ อาจยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ ซึ่งอาจส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ต่ำกว่า นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะในการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันจึงทำให้ DAG ที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณแตกต่างกัน

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสมการถดถอย (Regression) มีอย่างน้อย 1 พจน์ที่มีผลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และ พจน์ของเส้นตรง (Linear) กำลังสอง (Square) และอันตรกิริยาระหว่างตัวแปร (Interaction) มีอย่างน้อย 1 พจน์ที่มีผลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 9 และยังพบว่าสมการที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูลชุดนี้ เนื่องจากค่าความ

น่าจะเป็นของ lack of fit มีค่ามากกว่า 0.05 จึงยอมรับสมมติฐานในการทดสอบคือ “ไม่มี lack of fit” ซึ่งหมายถึงสมการที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล

จากตารางที่ 10 แสดงค่าสัมประสิทธิ์และความน่าจะเป็นของพจน์ต่างๆ ในสมการ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบถอยหลัง (Backward regression) ซึ่งตัวแปรที่ไม่มีผลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) จะถูกตัดออกจากสมการ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างสมการถดถอยเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต่างๆ กับค่าปริมาณ DAG ได้สมการดังนี้ คือ

$$Y = -112.76 + 58.015X_2 + 5.846X_3 - 4.693X_1^2 - 8.798X_2^2 - 0.059X_3^2 + 7.338X_1X_2 - 0.185X_1X_3 - 0.852X_2X_3 \quad R^2 = 0.87 \quad (4)$$

เมื่อ

Y คือ ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

$X_1, X_2, X_3$  คือ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น ปริมาณเอนไซม์ และปริมาณ molecular sieve ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์การถดถอย พบว่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) มีค่าเท่ากับ 0.87 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงให้เห็นว่าสมการสามารถนำไปใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ และใช้ทำนายปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ และจากตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าสัมประสิทธิ์ของทุกพจน์มีอิทธิพลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และพจน์ที่มีอิทธิพลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้มากที่สุด คืออิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ในเชิงเส้นตรง ตามด้วยอิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ในเชิงเส้นโค้ง อิทธิพลของอันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นและปริมาณเอนไซม์ อิทธิพลของปริมาณ molecular sieve ในเชิงเส้นตรง อิทธิพลของอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นในเชิงเส้นโค้ง อิทธิพลของอันตรกิริยาระหว่างปริมาณเอนไซม์และปริมาณ molecular sieve อิทธิพลของอันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นและปริมาณ molecular sieve และอิทธิพลของปริมาณ molecular sieve ในเชิงเส้นโค้ง ตามลำดับ

เมื่อทำการทวนสอบความถูกต้องของสมการที่ได้จากการทดลอง (Validation) โดยการนำสมการที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ DAG แล้วนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จริงจากการทดลอง (ตารางที่ 11) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณ DAG ที่

สังเคราะห์ได้จริงจากการทดลอง และจากการคำนวณมีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่าสมการที่ได้นั้นสามารถนำไปใช้งานได้

**ตารางที่ 8** ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่สภาวะการสังเคราะห์ต่างๆ

Independent variables			DAG Yield (%)	
Substrate molar ratio ( $X_1$ , mol)	Enzyme concentration ( $X_2$ , wt%)	Molecular sieve ( $X_3$ , wt%)	Experimental value*	Predicted value*
-1 (0.75)	-1 (2)	-1 (25)	38.03±0.25 <sup>d</sup>	39.65
1 (0.25)	-1 (2)	-1 (25)	35.17±0.34 <sup>b</sup>	33.61
-1 (0.75)	1 (3)	-1 (25)	37.14±1.11 <sup>cd</sup>	37.88
1 (0.25)	1 (3)	-1 (25)	41.62±0.05 <sup>f</sup>	42.85
-1 (0.75)	-1 (2)	1 (35)	45.00±0.29 <sup>i</sup>	44.29
1 (0.25)	-1 (2)	1 (35)	35.55±1.05 <sup>b</sup>	35.47
-1 (0.75)	1 (3)	1 (35)	32.66±2.18 <sup>a</sup>	34.00
1 (0.25)	1 (3)	1 (35)	36.40±0.44 <sup>bc</sup>	36.19
0 (1.5)	0 (2.5)	-1.68 (21.6)	42.22±0.38 <sup>fg</sup>	41.00
0 (1.5)	0 (2.5)	+1.68 (38.4)	40.19±0.42 <sup>e</sup>	39.29
0 (1.5)	-1.68 (1.66)	0 (30)	38.45±0.60 <sup>d</sup>	38.54
0 (1.5)	+1.68 (3.34)	0 (30)	39.83±0.35 <sup>e</sup>	37.66
+1.68 (2.76)	0 (2.5)	0 (30)	35.11±0.50 <sup>b</sup>	35.24
-1.68 (0.24)	0 (2.5)	0 (30)	40.25±0.82 <sup>e</sup>	38.47
0 (1.5)	0 (2.5)	0 (30)	43.09±1.04 <sup>gh</sup>	44.31
0 (1.5)	0 (2.5)	0 (30)	43.84±0.86 <sup>hi</sup>	44.31
0 (1.5)	0 (2.5)	0 (30)	46.89±0.50 <sup>j</sup>	44.31

**หมายเหตุ** ตัวเลขที่แสดงในตาราง คือรหัสของระดับ และ ค่าจริง ตามลำดับ

ตัวอักษร a-j ที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

\* แสดงความไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางที่ 9 ความน่าจะเป็น (p-value) ที่ได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูลจากการสังเคราะห์ DAG

Source of variances	p-value
Regression	0.000
Linear	0.000
Square	0.000
Interaction	0.000
Lack-of-fit	0.942

ตารางที่ 10 ค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) และค่าความน่าจะเป็น (p-value) ของพจน์ (term) ต่างๆ ในสมการพหุนามกำลังสอง

Terms	Coefficients	p-value
Constant	-112.760	0.000
$X_2$	58.015	0.000
$X_3$	5.846	0.000
$X_1^2$	-4.693	0.000
$X_2^2$	-8.798	0.000
$X_3^2$	-0.059	0.000
$X_1X_2$	7.338	0.000
$X_1X_3$	-0.185	0.004
$X_2X_3$	-0.852	0.000

หมายเหตุ  $X_1, X_2, X_3$  คือ อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น ปริมาณเอนไซม์ และปริมาณ molecular sieve ตามลำดับ

**ตารางที่ 11** การทดสอบความถูกต้องของสมการในการทำนายปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้

Independent variables			DAG Yield (%)	
Substrate molar ratio ( $X_1$ , mol)	Enzyme concentration ( $X_2$ , wt%)	Molecular sieve ( $X_3$ , wt%)	Experimental value*	Predicted value*
2	2.7	33	40.50±1.66 <sup>a</sup>	41.1
2.25	2.3	28	38.76±2.88 <sup>a</sup>	39.3
2.25	2.9	34	38.43±2.59 <sup>a</sup>	38

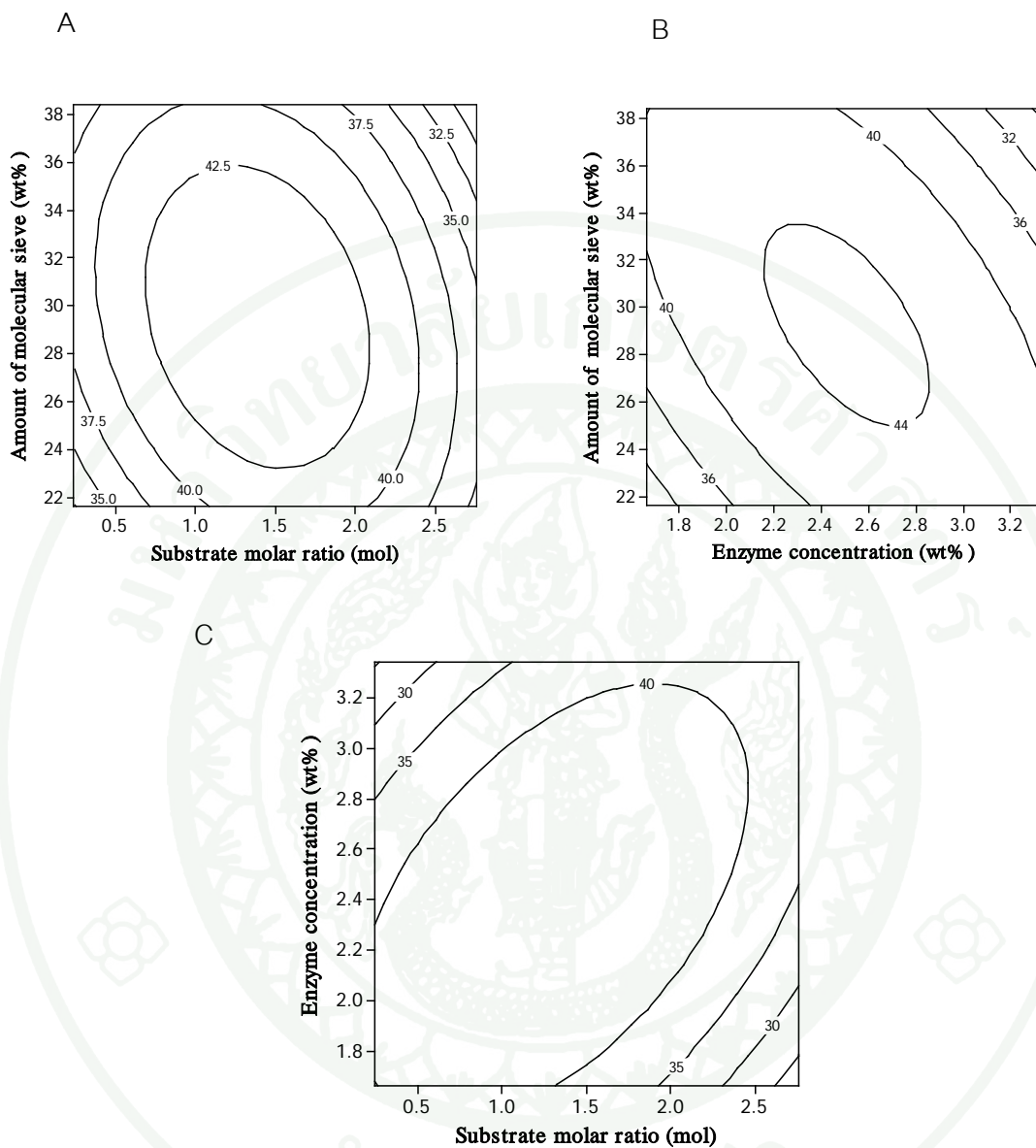
**หมายเหตุ** ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

\* แสดงความไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

เมื่อทำการสร้างแผนภาพคอนทัวร์เพื่อใช้ในการอธิบายอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ได้ แผนภาพคอนทัวร์ดังแสดงในภาพที่ 14 และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของตัวแปรอิสระแต่ละตัว พบว่า ทั้งปริมาณ molecular sieve ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น มีอิทธิพลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ จากผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย คือปริมาณ molecular sieve ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นอยู่ในระดับต่ำ ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จะมีค่าน้อย และเมื่อเพิ่มระดับของปัจจัยเหล่านี้ให้สูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้สูงขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มระดับของปัจจัยเหล่านี้ขึ้นอีกเรื่อยๆ ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้มีแนวโน้มคงที่ และลดลงในที่สุด ดังจะเห็นได้จากแผนภาพคอนทัวร์ (ภาพที่ 14) ซึ่งพบว่าในช่วงต้นเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve ให้สูงขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้เพิ่มสูงขึ้น หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ และเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve มากขึ้นอีก ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ก็จะลดต่ำลง (ภาพที่ 14A และ 14B) ทั้งนี้เนื่องมาจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และควบคุมโดยปริมาณน้ำในปฏิกิริยา molecular sieves มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำในปฏิกิริยา เนื่องจากน้ำเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา การเติม molecular sieve หรือสารที่ช่วยกำจัดน้ำ (Water removal agents) ในปริมาณที่เหมาะสม จะส่งผลทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดเพิ่มมากขึ้น ทำให้อัตราเร็วในการสังเคราะห์สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำที่เหมาะสมมีความจำเป็นต่อการรักษากิจกรรมของเอนไซม์ (Li and Ward, 1993;

Gulati *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2004a, 2004b; Nagesha *et al.*, 2004; Chaiyaso *et al.*, 2006; Chong *et al.*, 2007; Fregolente *et al.*, 2008) แต่เมื่อปริมาณน้ำมากเกินไปจะทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสของกลีเซอไรด์ส่งผลทำให้อัตราการสังเคราะห์ลดลง ดังกล่าวข้างต้น (หัวข้อ 3.1) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายวิธีในการกำจัดน้ำออกจากระบบ เช่น การลดความดัน เป็นต้น (Weber and Mukherjee, 2004; Lo *et al.*, 2008; Tangkam *et al.*, 2008)

ส่วนปริมาณเอนไซม์นั้น พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้สูงขึ้นจนถึงจุดหนึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นอีกปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ก็จะลดลง (ภาพที่ 14B และ 14C) การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น แต่ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปอาจส่งผลทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสของกลีเซอไรด์ จึงทำให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ลดลง และปริมาณกรดไขมัน (Free fatty acid) เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้า (Kristensen *et al.*, 2005b; Kim and Lee, 2006) ซึ่งได้ศึกษาการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและกลีเซอไรด์ที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ที่น้อยเกินไปก็อาจไม่เพียงพอต่อการเร่งปฏิกิริยาในเวลาจำกัด (Radazi *et al.*, 2011) และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นก็เช่นเดียวกัน พบว่าในช่วงอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นระดับต่ำ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นให้มากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้สูงขึ้น จนถึงจุดหนึ่งเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นมากขึ้นอีก ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จะลดลง (ภาพที่ 14A และ 14C) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณกรดไขมันในปฏิกิริยามีปริมาณที่มากเกินไปหรือไม่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ DAG (Lo *et al.*, 2004a, 2004b) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Kwon *et al.* (1995) ซึ่งได้ทดลองศึกษาการสังเคราะห์ mono- หรือ dipalmitoylglycerol โดยใช้เอนไซม์ไลเปส และจากการทดลอง พบว่าความเป็นกรดเบสในปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น จึงอาจส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ลดลง สภาวะความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์คือที่พีเอช 7 และภายใต้สภาวะกรดไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่า ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (Wu *et al.*, 1996)



ภาพที่ 14 แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ โดย A เป็นแผนภาพคอนทัวร์ระหว่างปริมาณ molecular sieve (wt%) และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น (โมล) และ B เป็นแผนภาพคอนทัวร์ระหว่างปริมาณ molecular sieve (wt%) และปริมาณเอนไซม์ (wt%) และ C เป็นแผนภาพคอนทัวร์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ (wt%) และอัตราส่วน โมลสารตั้งต้น (โมล)

นอกจากนี้จากสมการยังพบว่าอันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นและปริมาณ molecular sieve ปริมาณ molecular sieve และปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นและปริมาณเอนไซม์ มีอิทธิพลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) แสดงว่าการแสดงอิทธิพลของปัจจัยแต่ละปัจจัยต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่ออีกปัจจัยเปลี่ยนแปลงไป

จากภาพที่ 14A พบว่าที่อัตราส่วนโมลสารตั้งต้นระดับต่ำ (ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์ม ต่อกลิเซอรอล < 0.75 โมล) เมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้เพิ่มขึ้นจนถึงค่าสูงสุด และเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve ขึ้นไปอีก (> ร้อยละ 30) ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ลดลง ทำนองเดียวกันกับที่อัตราส่วนโมลสารตั้งต้นระดับสูง (> 2.25 โมล) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อเพิ่มปริมาณ molecular sieve ขึ้นไปอีก ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้จะลดลง แต่อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นได้ว่าการแสดงอิทธิพลของอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นที่ระดับของ molecular sieve ที่ต่างกัน และการแสดงอิทธิพลของ molecular sieve ที่ระดับอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นที่แตกต่างกันจะไม่มี ความแตกต่างกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นและปริมาณ molecular sieve มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG ค่อนข้างน้อย

อันตรกิริยาระหว่างปริมาณ molecular sieve และปริมาณเอนไซม์ (ภาพที่ 14B) แสดงให้เห็นว่าปริมาณ molecular sieve ในระดับต่ำ (< ร้อยละ 25) เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นไปอีกมากกว่าร้อยละ 2.5 พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ ในขณะที่ปริมาณ molecular sieve ในระดับสูง (> ร้อยละ 35) การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่ส่งผลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ จนกระทั่งเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มสูงมากกว่าร้อยละ 3.0 ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ลดลง และอันตรกิริยาระหว่างอัตราส่วนโมลสารตั้งต้นและปริมาณเอนไซม์ (ภาพที่ 14C) แสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วนโมลสารตั้งต้นในช่วงระดับต่ำ (< 0.75 โมล) การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่ส่งผลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ จนกระทั่งเพิ่มปริมาณเอนไซม์สูงขึ้นไปอีกมากกว่าร้อยละ 2.5 พบว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่อัตราส่วนโมลสารตั้งต้นในช่วงระดับสูง (> 2.25 โมล) พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในช่วงแรกส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้เพิ่มขึ้นจนถึง

ค่าสูงสุด จากนั้นเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 3.0 พบว่าปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ลดลง

เมื่อพิจารณาจากแผนภาพคอนทัวร์ทั้ง 3 ภาพ (ภาพที่ 14A, 14B, 14C) พบว่าควรใช้อัตราส่วนโมลของสารตั้งต้น ปริมาณเอนไซม์ และปริมาณ molecular sieve ระดับปานกลาง จึงจะทำให้สังเคราะห์ DAG ได้ในปริมาณที่สูง และจากการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้สังเคราะห์ DAG ได้ปริมาณสูงสุดโดยใช้โปรแกรม Minitab พบว่าสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณ DAG สูงสุด คือ ปริมาณ molecular sieve ร้อยละ 31.1 ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 2.32 และอัตราส่วนโมล 1.23 โมล ซึ่งจะทำได้ปริมาณ DAG สูงสุดร้อยละ 44.9

## 5. การทำบริสุทธิ์บางส่วน DAG

สารผลิตภัณฑ์ (Reaction product) ที่สังเคราะห์ได้ตามสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น นำมาผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการทำปฏิกิริยากับสารละลายไซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันและกรดไขมัน ได้ผลดังนี้

### 5.1 องค์ประกอบไขมัน

การวิเคราะห์องค์ประกอบไขมัน โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นบาง ประสิทธิภาพสูง พบว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลสามารถเคลื่อนที่บนแผ่นแก้วโครมาโตกราฟีได้ไกลสุด โดยมีค่า Retention factor เท่ากับร้อยละ 91 ตามด้วยกรดไขมันอิสระ ไดเอซิลกลีเซอรอล และโมโนเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 80, 64 และ 61 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) เนื่องจากตัวดูดซับบนแผ่นโครมาโตกราฟีมีความเป็นขั้ว ไตรเอซิลกลีเซอรอลซึ่งเป็นไตรเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 โมเลกุล จึงเป็นสารประกอบที่ไม่มีขั้ว จึงถูกดูดซับบนแผ่นโครมาโตกราฟีได้น้อยที่สุด และเคลื่อนที่ได้ไกลที่สุด ส่วนโมโนเอซิลกลีเซอรอลซึ่งเกิดจากกลีเซอรอลทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน 1 โมเลกุล และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ จึงเป็นสารประกอบที่แสดงความมีขั้วมากกว่าสารประกอบอื่น ดังนั้นจึงถูกดูดซับบนแผ่นโครมาโตกราฟีได้มากกว่า และเคลื่อนที่ได้น้อยที่สุด (Bilyk *et al.*, 1991; Hauck and Mack, 1996)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของสารผลิตภัณฑ์ และสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยกำจัดกรดไขมันอิสระออก พบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีปริมาณ DAG เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 70.04±3.10 และมีปริมาณกรดไขมันอิสระเหลืออยู่ร้อยละ 12.87±1.68 นอกจากนี้ในสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ยังประกอบด้วย MAG และ TAG ในปริมาณร้อยละ 3.44±0.10 และ 15.36±2.35 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ซึ่งในทางการค้ำน้ำมัน DAG ที่ใช้เป็นน้ำมันบริโภคทั่วไปจะมีปริมาณ DAG ประมาณร้อยละ 80 หรือมากกว่า และองค์ประกอบอื่นๆ คือ กรดไขมันอิสระ MAG และ TAG เพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น (Yasukawa and Katsuragi, 2004; Lo *et al.*, 2008) แต่อย่างไรก็ตามถ้าต้องการให้ DAG มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จะต้องมีการนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ หรือการกลั่นสุญญากาศ เป็นต้น (Beger *et al.*, 1992; Lo *et al.*, 2004b; Tangkam *et al.*, 2008)

**ตารางที่ 12** องค์ประกอบไขมันของสารผลิตภัณฑ์

Lipid classes	Retention factor ( $R_f$ ) x 100	Content (%)	
		Reaction product	Purified reaction product
TAG	91	5.70±0.10 <sup>a</sup>	15.36±2.35 <sup>b</sup>
DAG	64	56.50±1.08 <sup>a</sup>	70.04±3.10 <sup>b</sup>
MAG	61	3.45±0.18 <sup>a</sup>	3.44±0.10 <sup>a</sup>
FFA	80	38.76±2.72 <sup>a</sup>	12.87±1.68 <sup>b</sup>

**หมายเหตุ** ตัวอักษร a-b ที่ต่างกันในแนวนอนแสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

## 5.2 องค์ประกอบกรดไขมัน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน และสารผลิตภัณฑ์หลังจากการทำบริสุทธิ์ (DAG ร้อยละ 70) พบว่าสารผลิตภัณฑ์หลังจากการทำบริสุทธิ์ มีปริมาณกรดพาล์มิติกมากที่สุดประมาณร้อยละ 71.53±0.81 รองลงมา คือกรดโอเลอิก กรดสเตียริก กรดไมริสติก และกรดลิโนเลนิก ซึ่งพบในปริมาณร้อยละ

23.29±0.56, 4.20±0.12, 0.89±0.03 และ 0.39±0.01 ตามลำดับ โดยมีค่าแตกต่างกับ องค์ประกอบของกรดไขมันในของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนซึ่งใช้เป็น สารตั้งต้นในการสังเคราะห์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับ Posada *et al.* (2007) ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในของเหลวผลกลั่นน้ำมัน ปาล์ม พบว่ามีกรดพาล์มิติกและกรดโอเลอิกเป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีปริมาณร้อยละ 50.00 และ 36.48 ตามลำดับ แต่ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีปริมาณกรด พาล์มิติกเพิ่มสูงขึ้นมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากกรดพาล์มิติกเป็นกรดไขมันอิ่มตัว เมื่อผ่านกระบวนการ ทำบริสุทธิ์โดยการตกผลึกไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูงหรือมีความอิ่มตัวสูงโดยใช้อุณหภูมิต่ำ ทำให้ กรดพาล์มิติกซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว เกิดการแข็งตัวและแยกออกมาได้มากกว่ากรดไขมันอื่น (Chaiyaso, 2007)

**ตารางที่ 13** องค์ประกอบกรดไขมันของของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ บางส่วนและสารผลิตภัณฑ์หลังการทำบริสุทธิ์

Fatty acid	Content (%)	
	Purified palm oil distillate*	Purified reaction product*
Oleic acid	25.93±2.26	23.29±0.56
Palmitic acid	68.09±2.52	71.53±0.81
Stearic acid	4.80±0.30	4.20±0.12
Linolenic acid	0.40±0.04	0.39±0.01
Myristic acid	0.78±0.08	0.89±0.03

**หมายเหตุ** \* แสดงความไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน (กรดไขมันอิสระประมาณร้อยละ 94) กับกลีเซอรอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehei* ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ ได้แก่ ปริมาณ molecular sieve ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนโมลสารตั้งต้น โดยปัจจัยเหล่านี้ที่ระดับต่างๆ ส่งผลให้ปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG พบว่าเทคนิคพื้นผิวตอบสนองเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DAG และสมการถดถอยที่ได้จากการศึกษายังสามารถนำไปใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ รวมทั้งใช้ในการทำนายปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์ในการตัดสินใจ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.87 ซึ่งค่อนข้างสูง และจากการศึกษา พบว่าปัจจัยที่แสดงอิทธิพลต่อปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้มากที่สุด คือ ปริมาณเอนไซม์ และสภาวะที่ทำให้ได้ปริมาณ DAG สูงสุด คือ ปริมาณ molecular sieve ร้อยละ 31.1 ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 2.32 และอัตราส่วนโมล 1.23 โมล ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณ DAG ร้อยละ 44.9

การศึกษาองค์ประกอบไขมันของสารผลิตภัณฑ์ และสารผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน พบว่าการทำบริสุทธิ์สารผลิตภัณฑ์ทำให้ปริมาณ DAG เพิ่มสูงขึ้นเป็นประมาณร้อยละ 70 และปริมาณ FFA ลดน้อยลงเหลือประมาณร้อยละ 13 ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมัน พบว่ากรดพาล์มิติกและกรดโอเลอิกเป็นกรดไขมันหลักที่พบซึ่งมีปริมาณร้อยละ 72 และ 23 ตามลำดับ

### ข้อเสนอแนะ

หากต้องการสังเคราะห์ DAG ให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น อาจจะต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DAG เพิ่มเติม เช่น แหล่งและความจำเพาะของเอนไซม์ คุณภาพของสารตั้งต้น เป็นต้น นอกจากนี้การเพิ่มความบริสุทธิ์ และปริมาณกรดไขมันที่ไม่ถูกเอสเทอริไฟต์ในของเหลวผลล้นน้ำมันปาล์มก่อนนำมาสังเคราะห์ DAG น่าจะส่งผลให้สังเคราะห์ DAG ได้ในปริมาณมากขึ้น รวมถึงกระบวนการทำบริสุทธิ์ DAG ที่มีประสิทธิภาพด้วย

ในการจะนำ DAG ไปใช้ในอาหารต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เช่น คุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพ เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ณกัญภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งและประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม.

วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 24(3): 20-34.

\_\_\_\_\_ และ ทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2549. เอนไซม์ไลเปส: การผลิต และคุณสมบัติทางเคมี

กายภาพ. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 26(2): 114-131.

ทอง ภัคศรีพันธุ์. 2522. เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,  
กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนปนนท์. 2548. วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. โอ.เอส.พรีนติ้งเฮาส์,  
กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ผาสุข กุลละวณิชย์, สัณห์ชัย กลิ่นพิกุล, สุมณฑา กุลละวณิชย์, สุรเชษฐ ชีระมณี และ จาตุรงค์  
แช่ลี. 2528. ปาล์มน้ำมันและอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. มหาวิทยาลัย  
สงขลานครินทร์, หาดใหญ่.

พัชรา วีระกะลัส. 2543. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,  
กรุงเทพฯ.

อนุวัตร แจ่มชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. มหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Adamczak, M. and W. Bednarski. 2004. Enhance activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. **Process Biochemistry** 39: 1347-1361.
- Becker, P., I.A. Reesh, S. Markossian, G. Antranikian and H. Markl. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. **Appl Microbiol Biotechnol.** 48: 184-190.
- Beger, M., K. Laumen and M.P. Schneider. 1992. Enzymatic esterification of glycerol I. lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols. **JAACS.** 69(10): 955-960.
- Bilyk, A., G.J. Piazza, R.G. Bistline and M.J. Haas. 1991. Separation of cholesterol, and fatty acylglycerols, acids and amides by thin-layer chromatography. **Lipids** 26: 405-406.
- Chaiyaso, T. 2007. **Synthesis of sugar esters and fatty acid methyl esters from palm oil and palm fatty acid distillates by two bacterial lipases.** M.S. thesis, Prince of Songkla University.
- \_\_\_\_\_, A.H. Kittikun and W. Zimmermann. 2006. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 33: 338-342.
- Cho, I.H. and K.D. Zoh. 2007. Photocatalytic degradation of azo dye (*Reactive Red 120*) in TiO<sub>2</sub>/UV system: Optimization and modeling using a response surface methodology (RSM) based on the central composite design. **Dyes and Pigments** 75: 533-543.

- Chong, F.C., B.T. Tey, Z.M. Dom, K.H. Cheong, B. Satiawihardja, M.N. Ibrahim, R.A. Rahman, D.R.A. Biak and T.C. Ling. 2007. Rice bran lipase catalyzed esterification of palm oil fatty acid distillate and glycerol in organic solvent. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 12: 250-256.
- Chua, C.S.L., B.S. Baharin, Y.B.C. Man and C.P. Tan. 2007. Separation of squalene from palm fatty acid distillate using adsorption chromatography. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 109: 1083–1087.
- Cmolik, J. and J. Pokorny. 2000. Physical refining of edible oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 102(7): 472-486.
- Dufaure, C.L. and Z. Mouloungui. 2000. Catalysed or uncatalysed esterification reaction of oleic acid with 2-ethyl hexanol. **Applied Catalysis A: General** 204: 223–227.
- Esteban, L., M.D.M. Munio, A. Robles, E. Hita, M.J. Jimenez, P.A. Gonzalez, B. Camacho and E. Molina. 2009. Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. **Biochemical Engineering Journal** 44: 271–279.
- Fregolente, P.B.L., L.V. Fregolente, G.M.F. Pinto, B.C. Batistella, M.R. Wolf-Maciel and R.M. Filho. 2008. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. **Appl Biochem Biotechnol.** 146: 165-172.
- Gibon, V., W.D. Greyt and M. Kellens. 2007. Palm oil refining. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** 109: 315–335.

- Gulati, R., P. Arya, B. Malhotra, A.K. Prasad, R.K. Saxena, J. Kumar, A.C. Watterson and V.S. Parmar. 2003. Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6)-monostearate. **Arkivoc** (iii): 159-170.
- Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **J. Sci. Food Agric.** 79(12): 1535-1549.
- \_\_\_\_\_. 2003. Lipid chemistry—a personal view of some developments in the last 60 years. **Biochimica et Biophysica Acta** 1631: 207-217.
- Hannun, Y.A. and C. Luberto. 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. **Trends in Cell Biology** 10: 73-80.
- Hauck, H.E. and M. Mack. 1996. Sorbents and precoated layers in thin-layer chromatography, pp. 101-128. *In* J. Sherma and B. Fried, eds. **Handbook of Thin-Layer Chromatography**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Holmberg, K. and E. Osterberg. 1988. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. **JAOCS**. 65: 1544-1548.
- Karin, K.R., S.H. Krishna, C.V.S. Babu, N.G. Karanth and S. Divakar. 2000. An esterification method for determination of lipase activity. **Biotechnology Letters** 22: 1511-1514.
- Kawai, S. and Y. Konishi. 2000. **Acid Oil-in-Water Emulsified Composition**. PCT International Patent Application no. WO0078162.

- Keefee, S.F. 2002. Nomenclature and classification of lipids, pp. 1-40. *In* C.C. Akoh and D.B. Min, eds. **Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Khuri, A.I. and S. Mukhopadhyay. 2010. Response surface methodology. **Computational Statistics** 2(2): 128-149.
- Kim, I.H. and S.M. Lee. 2006. Synthesis of diacylglycerols containing CLA by lipase-catalyzed esterification. **J. Food Sci.** 71(7): 378-382.
- \_\_\_\_\_, H. Kim, K.T. Lee, S.H. Chung and S.N. Ko. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. **JAOCS.** 79: 363-367.
- Kristensen, J.B., X. Xu and H. Mu. 2005a. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. **JAOCS.** 82(5): 329-334.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2005b. Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis. **J. Agric. Food Chem.** 53: 7059-7066.
- Kudo, N., Y. Kameo and W. Mizuno. 2002. **Oil-Cooked or Baked Potatoes**. European Patent Application no. EP1203534.
- Kwon, S.J., J.J. Han and J.S. Rhee. 1995. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 700-704.

- Lau, H.L.N., C.W. Puah, Y.M. Choo, A.N. Ma and C.H. Chuah. 2005. Simultaneous quantification of free fatty acids, free sterols, squalene, and acylglycerol molecular species in palm oil by high-temperature gas chromatography-flame ionization detection. **JAOCS**. 40(5): 523-528.
- Li, Z.Y. and O.P. Ward. 1993. Food-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. **JAOCS**. 70(8): 745-748.
- Lo, S.K., B.S. Baharin, C.P. Tan and O.M. Lai. 2004a. Diacylglycerols from palm oil deodoriser distillate. Part 1-synthesis by lipase-catalysed esterification. **Food Sci Tech Int**. 10(3): 149-156.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2004b. Lipase-catalysed production and chemical composition of diacylglycerols from soybean oil deodoriser distillate. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**. 106: 218-224.
- \_\_\_\_\_, C.P. Tan, K. Long, M.S.A. Yusoff and O.M. Lai. 2008. Diacylglycerol oil-properties, processes and products: a review. **Food Bioprocess Technol**. 1: 223-233.
- \_\_\_\_\_, L.Z. Cheong, N. Arifin, C.P. Tan, K. Long, M.S.A. Yusoff and O.M. Lai. 2007. Diacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface-optimized process for diacylglycerol production by lipase-catalyzed esterification in a pilot packed-bed enzyme reactor. **J. Agric. Food Chem**. 55(14): 5595-5603.

- Maki, K.C., N. Matsuo and M.R. Dicklin. 2004. Clinical studies evaluating the benefits of diacylglycerol for managing excess adiposity, pp. 96-108. *In* Y. Katsuragi, Y. Takuji, N. Matsuo, B.D. Flickinger, I. Tokimitsu and M.G. Matlock, eds. **Diacylglycerol Oil**. AOCS Press, USA.
- Mani, S., S. Jaya and R. Vadivambal. 2007. Optimization of solvent extraction of *Moringa (Moringa oleifera)* seed kernel oil using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing** 85(4): 328-335.
- Masui, K. and K. Yasunaga. 2001. **Water-in-Oil Type Emulsified Fat and/or Oil Composition**. PCT International Patent Application no. WO0115542.
- Matsuo, M. 2004. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods. **Food Sci. Technol. Res.** 10(2): 103-110.
- Matsuo, N. 2005. Nutritional characteristics of diacylglycerol oil and its health benefits, pp. 685-698. *In* C.C. Akoh and O.M. Lai, eds. **Healthful Lipids**. AOCS Press, USA.
- McClements, D.J. and E.A. Decker. 2007. Lipids, pp. 155-216. *In* S. Damodaran, K.L. Parkin and O.R. Fennema, eds. **Food Chemistry**. 4<sup>th</sup> ed. CRC Press, London.
- Medina, A.R., L.E. Cerdan, A.G. Gimenez, B.C. Paez, M.J.I. Gonzalez and E.M. Grima. 1999. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **Journal of Biotechnology** 70: 379–391.
- Mohsenin, N.N. 1996. **Physical Properties of Plant and Animal Materials**. 2<sup>nd</sup> ed. Gordon and Breach Publishers, Canada.

- Mori, H. and T. Watanabe. 2000. **Food Containing Fat or Oil**. European Patent Application no. EP0970615.
- \_\_\_\_\_, H. Sakai, Y. Tanaka and T. Yasukawa. 1999a. **Fried Food and Shortening**. PCT International Patent Application no. WO9959424.
- \_\_\_\_\_, K. Masui, Y. Tanaka and T. Yasukawa. 1999b. **Water-in-Oil Emulsified Fat Composition**. PCT International Patent Application no. WO9959422.
- Myrnes, B., H. Barstad, R.L. Olsen and E.O. Elvevoll. 1995. Solvent-free enzymatic glycerolysis of marine oils. **JAACS**. 72(11): 1339-1344.
- Nagao, T., H. Watanabe, N. Goto, K. Onizawa, H. Taguchi, N. Matsuo, T. Yasukawa, R. Tsushima, H. Shimasaki and H. Itakura. 2000. Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. **J. Nutrition** 130: 792-797.
- Nagesha, G.K., B. Manohar and K.U. Sankar. 2004. Enzymatic esterification of free fatty acids of hydrolyzed soy deodorizer distillate in supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids** 32: 137-145.
- Nakajima, Y., J. Fukasawa and A. Shimada. 2004. Physicochemical properties of diacylglycerol, pp. 182-196. *In* Y. Katsuragi, Y. Takuji, N. Matsuo, B.D. Flickinger, I. Tokimitsu and M.G. Matlock, eds. **Diacylglycerol Oil**. AOCS Press, USA.
- Nakatsugawa, K., K. Ohashi and A. Shimada. 2001. Comparison of oxidation stability of diacylglycerol and triacylglycerol. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi** 48: 429-436.

- Nishide, T., M.M. Shimizu, T.R. Tiffany and H. Ogawa. 2004. Cooking oil: cooking properties and sensory evaluation, pp. 197-207. *In* Y. Katsuragi, Y. Takuji, N. Matsuo, B.D. Flickinger, I. Tokimitsu and M.G. Matlock, eds. **Diacylglycerol Oil**. AOCS Press, USA.
- Nwabueze, T.U. and K.S. Okocha. 2008. Extraction performances of polar and non-polar solvents on the physical and chemical indices of African breadfruit (*Treculia africana*) seed oil. **Afr. J. Food Sci.** 2: 119-125.
- Olsen, R.E. and R.J. Henderson. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 129: 189-197.
- Plou, F.J., M. Barandiarhn, M.V. Calvo, A. Ballesteros and E. Pastor. 1996. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 66-71.
- Posada, L.R., J. Shi, Y. Kakuda and S.J. Xue. 2007. Extraction of tocotrienols from palm fatty acid distillates using molecular distillation. **Separation and Purification Technology** 57: 220-229.
- Radazi, S.M., W.A.F. Mustafa, S.S. Othman and H.M. Noor. 2011. Green synthesis of butylacetate, a pineapple flavor via lipase-catalyzed reaction. **Engineering and Technology** 59: 677-680.
- Rapp, P. and S. Backhaus. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme Microb. Technol.** 14: 938-943.

- Regert, M., J. Langlois and S. Colinart. 2005. Characterisation of wax works of art by gas chromatographic procedures. *J. Chromatogr. A* 1091: 124-136.
- Safari, M., S. Karboune and S. Kermasha. 2009. Intermediate production of mono- and diolein by an immobilized lipase from *Candida Antarctica*. *Journal of Biotechnology* 7( 2): 67-74.
- Sakai, H., M. Ishibashi and J. Kohori. 2002a. **Fat Compositions**. European Patent Application no. EP1186648.
- \_\_\_\_\_, M. Katada and M. Ishibashi. 2002b. **Oil or Fat Composition**. European Patent Application no. EP1249173.
- Sharma, R., Y. Chisti and U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627–662.
- Shimada, Y., M. Suenaga, A. Sugihara, S. Nakai and Y. Tominaga. 1999. Continuous production of structured lipid containing gamma-linolenic and caprylic acids by immobilized *Rhizopus delemar* Lipase. *JAOCS*. 76: 189–193.
- Shimizu, M., J. Moriwaki, T. Nishide and Y. Nakajima. 2004. Thermal deterioration of diacylglycerol and triacylglycerol oils during deep-frying. *JAOCS*. 81: 571-576.
- Sifour, M., H.M. Saeed, T.I. Zaghoul, M.M. Berekaa and Y.R. Abdel-Fattah. 2010. Purification and properties of a lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Strain-5. *International Journal of Biological Chemistry* 4(4): 203-212.

- Sikorski, Z.E. and A. Kolakowska. 2003. **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. N.W. Corporate Blvd., New York.
- Tangkam, K., N. Weber and B. Wiege. 2008. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diglycerides from co-products of vegetable oil refining. **Grasasy Aceites** 59(3): 245-253.
- Tomonobu, K., T. Hase and I. Tokimitsu. 2006. Dietary diacylglycerol in a typical meal suppresses postprandial increases in serum lipid levels compared with dietary triacylglycerol. **Nutrition** 22: 128-135.
- Valivety, R.H., P.J. Halling and A.R. Macrae. 1992a. *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. **Federation of European Biochemical Societies** 301(3): 258-260.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, A.D. Peilow and A.R. Macrae. 1992b. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. **Enzymology** 1122(2): 143-146.
- Watanabe, T., M. Sugiura, M. Sato, N. Yamada and K. Nakanishi. 2005a. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry** 40: 637-643.
- \_\_\_\_\_, Y.Y. Sato, T. Nagao, S. Negishi, T. Terai, T. Kobayashi and Y. Shimada. 2005b. Production of MAG of CLA by esterification with dehydration at ordinary temperature using *Penicillium camembertii* lipase. **JAOCS**. 82(9): 619-623.
- \_\_\_\_\_, Y. Shimada, Y.Y. Sato, M. Kasai, T. Yamamoto, K. Tsutsumi, Y. Tominaga and A. Sugihara. 2002. Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* lipase. **JAOCS**. 79(9): 891-896.

Weber, N. and K.D. Mukherjee. 2004. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5347-5353.

Wu, X.Y., S. Jaaskelainen and Y.Y. Inko. 1996. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. *Appl Biochem Biotechnol.* 59: 145-158.

Xu, X. 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalysed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102: 287- 303.

Yasukawa, T. and Y. Katsuragi. 2004. Diacylglycerol, pp. 1-15. *In* Y. Katsuragi, Y. Takuji, N. Matsuo, B.D. Flickinger, I. Tokimitsu and M.G. Matlock, eds. *Diacylglycerol Oil*. AOCS Press, USA.



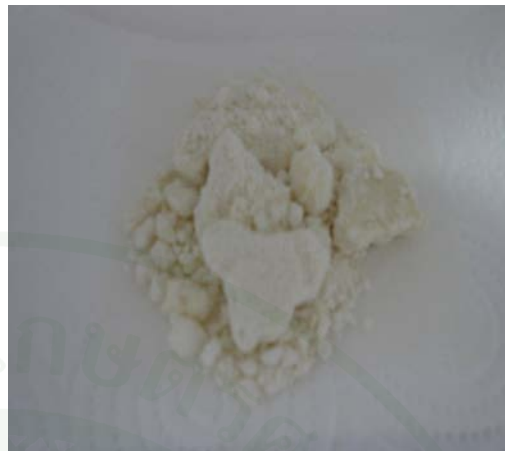


ภาคผนวก ก  
ภาพวัตถุสืบและผลิตภัณฑ์

a



b



ภาคผนวกที่ ก1 ของเหลวผลกลั่นน้ำมันปาล์มก่อน (a) และหลัง (b) การทำปฏิกิริยา



ภาคผนวกที่ ก2 DAG ที่สังเคราะห์ได้

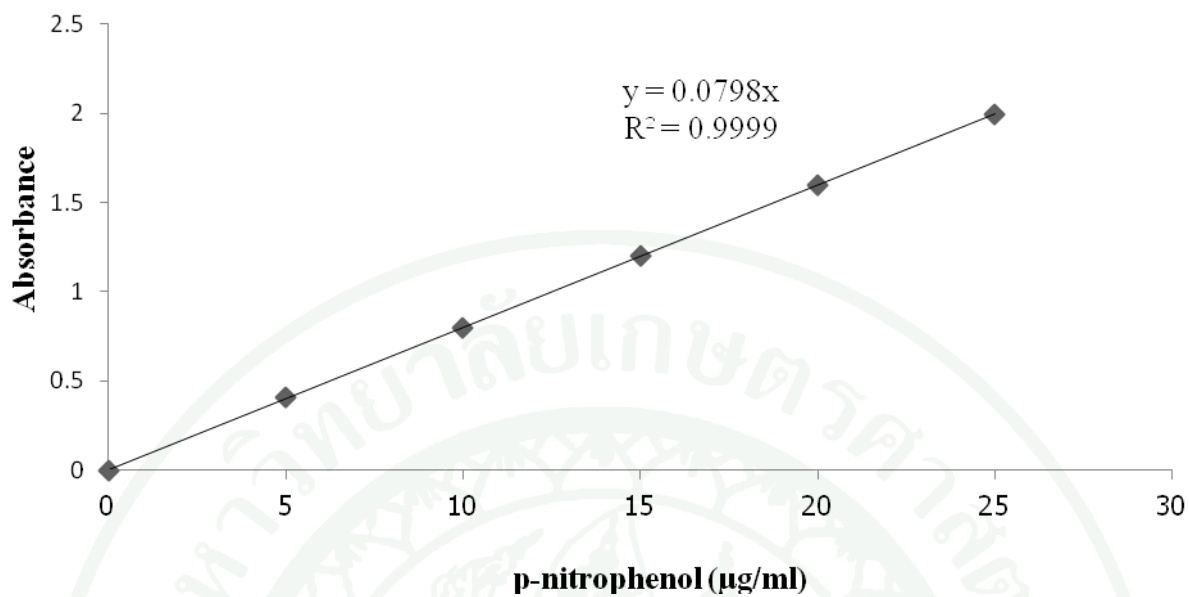
a

b

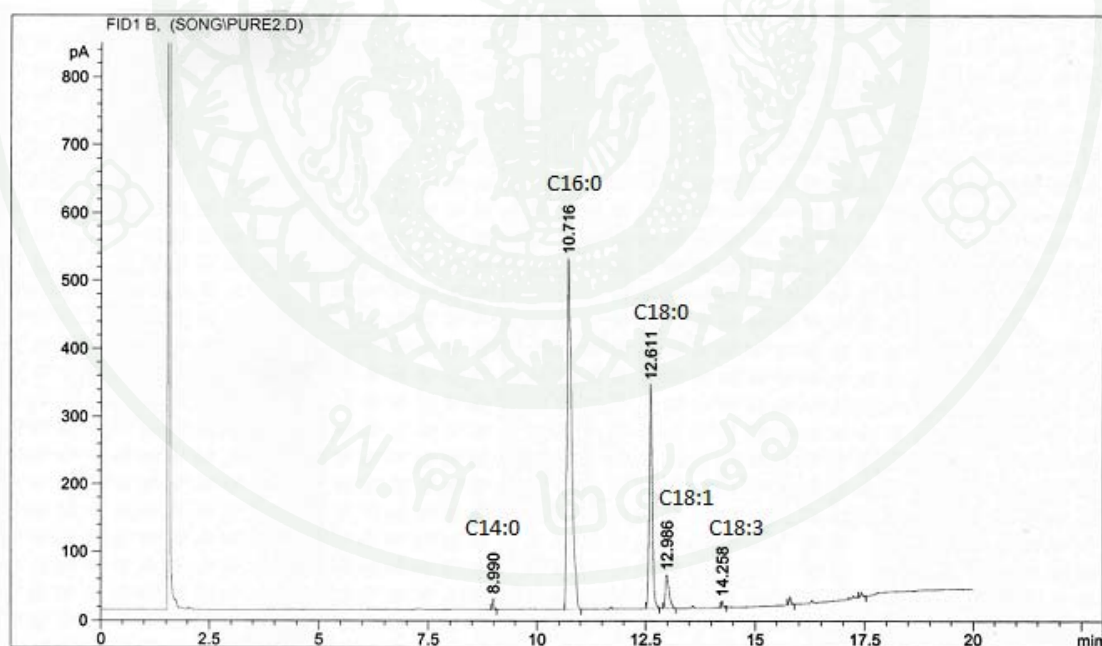


ภาคผนวกที่ ก3 DAG ที่สังเคราะห์ได้หลังจากการทำบริสุทธิ์ก่อน (a)  
และหลัง (b) การระเหยตัวทำละลาย

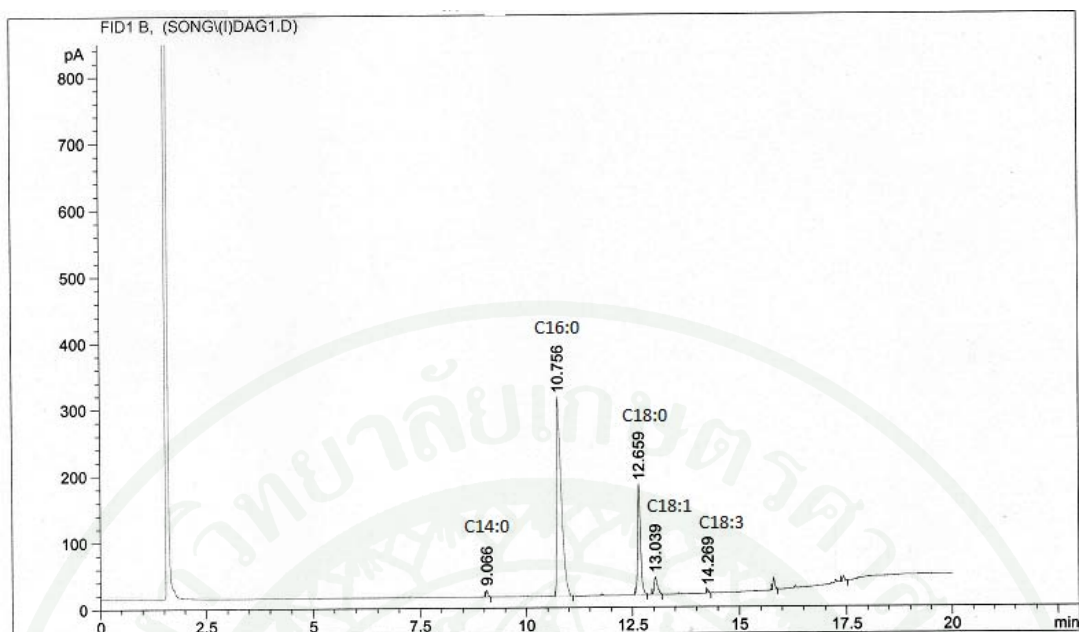




ภาคผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล



ภาคผนวกที่ ข2 โครมาโตแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของของเหลวผลัดน้ำมันปาล์มที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

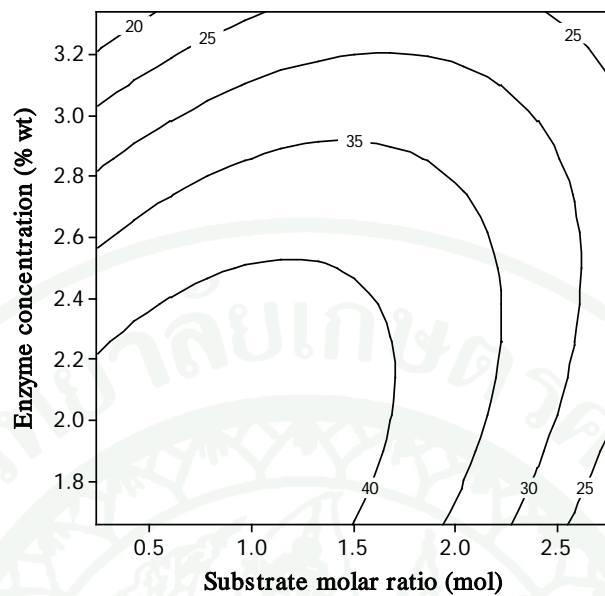


ภาคผนวกที่ ข3 โครมาโตแกรมของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของ DAG หลังจากการทำบริสุทธิ์

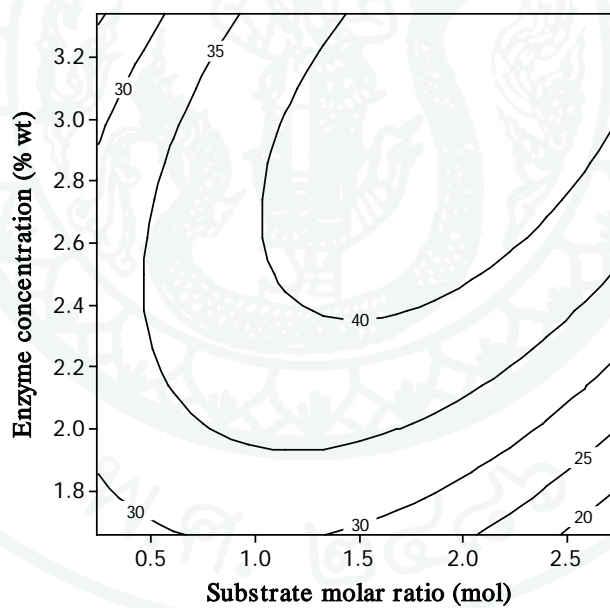


ภาคผนวกที่ ข4 การแยกองค์ประกอบไขมันของ DAG โดย HPTLC โดยแถวที่ 1 (จากซ้ายไปขวา) คือสารมาตรฐานผสมโมโนเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระ และไตรเอซิลกลีเซอรอล(จากล่างขึ้นบน ตามลำดับ) ส่วนแถวที่ 2-5 คือตัวอย่าง DAG

A

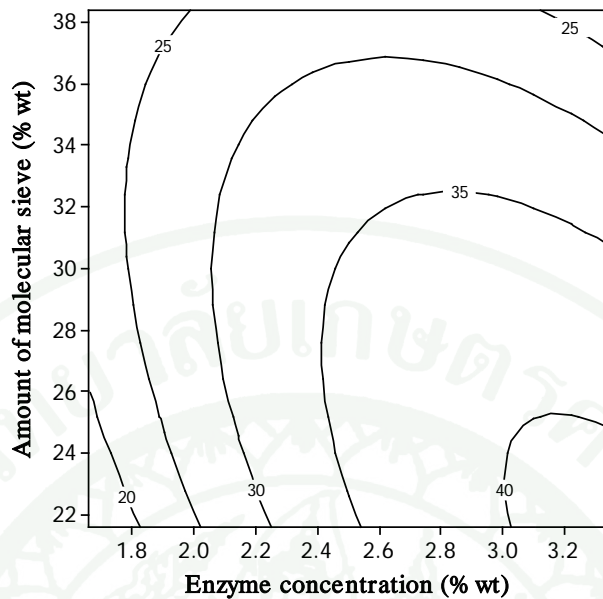


B

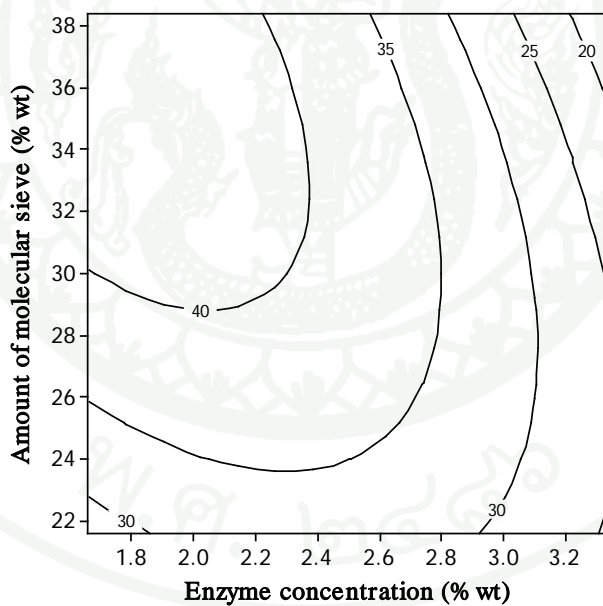


ภาพผนวกที่ ข5 แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้เมื่อเติม molecular sieve 38.4 % (A) และ 21.6% (B)

A

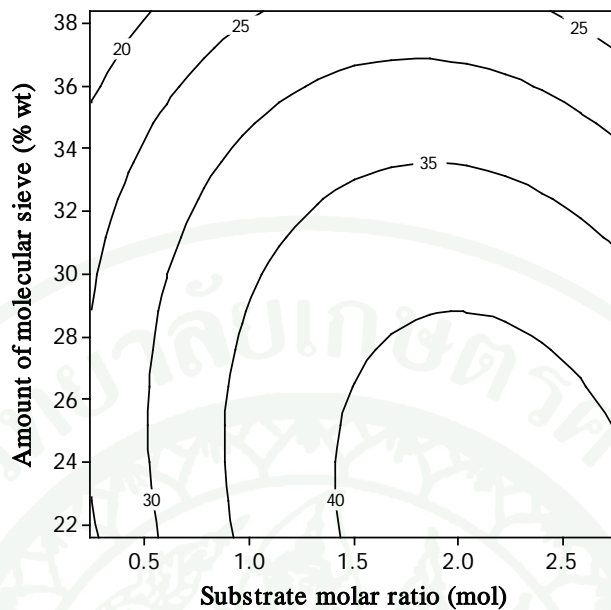


B

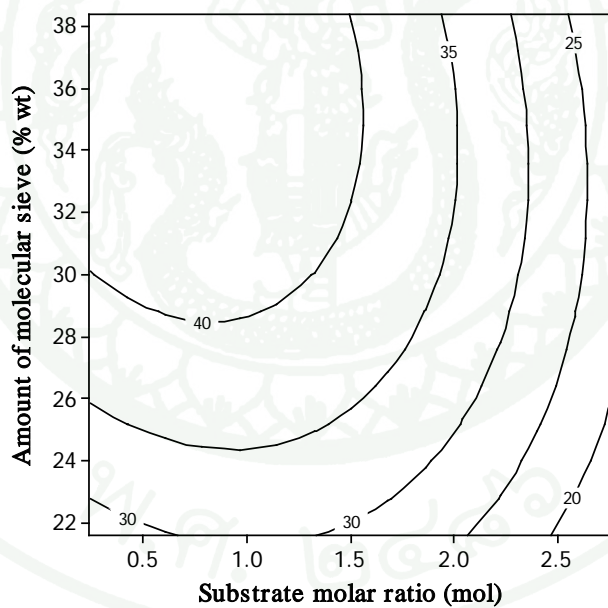


ภาพผนวกที่ ข6 แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่อัตราส่วนโมลสารตั้งต้น  
2.76 (A) และ 0.24 (B)

A



B



ภาพผนวกที่ ข7 แผนภาพคอนทัวร์ของปริมาณ DAG ที่สังเคราะห์ได้ที่ปริมาณเอนไซม์ 3.34%

(A) และ 1.66% (B)

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวสงศรี สันติสวัสดิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	10 เมษายน 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนดีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์