



รายงานการวิจัย เรื่อง

การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะด้วยกระบวนการอินเตอร์
เอสเตอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

PRODUCTION OF COCOA BUTTER ALTERNATIVES BY LIPASE-CATALYZED
INTERESTERIFICATION OF RAMBUTAN SEED FAT

โดย

ผศ.ดร.โสภาค สอนไว (Asst. Prof. Sopark Sonwai)
น.ส. ภาควรรณ ชัยขจรวัฒน์ (Pakawan Chaikajornwat)
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ 2557

ปีที่ดำเนินการเสร็จ 2559

ชื่อโครงการ การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะด้วยกระบวนการอินเตอร์-

เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ชื่อผู้วิจัย 1. โสภาค สอนไว (หัวหน้าโครงการ)

2. ภควรรณ ชัยขจรวัฒน์ (ผู้ร่วมวิจัย)

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557-2558

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยและพัฒนา (Research and Development)

สาขาวิชา อุตสาหกรรมเกษตร (วิศวกรรมอาหาร)

บทคัดย่อ

เนยโกโก้ คือ องค์ประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมผลิตช็อกโกแลต และขนมขบเคี้ยว แต่เนื่องจากราคาที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีการผันแปรทางด้านผลผลิต จึงได้มีการนำไขมันจากพืชชนิดอื่น มาดัดแปลงโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน เพื่อผลิตเป็นไขมัน ทดแทนเนยโกโก้ เงาะจัดเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความสำคัญมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย หลังจากกระบวนการผลิตเงาะกระป๋อง เมล็ดเงาะกลายเป็นของเหลือทิ้ง ซึ่งได้มีการรายงานไว้ว่าปริมาณไขมันที่อยู่ในเมล็ดเงาะมีประมาณ 14-41 %โดยน้ำหนัก และประมาณ 40.3%ขององค์ประกอบกรดไขมัน เป็นกรดโอเลอิก งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแนวทางในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ โดยทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ชนิดของ acyl donor อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ ทำปฏิกิริยาที่ 65°C ใช้เอนไซม์ชนิด sn-1,3 specific lipase ที่มีชื่อทางการค้าว่า LipozymeTM ผลิตจากเชื้อราชื่อ *Mucor miehei* แล้วทำการวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ในไขมันที่ได้จากปฏิกิริยา เพื่อเปรียบเทียบกับไตรกลีเซอไรด์หลักที่มีอยู่ในเนยโกโก้ คือ POP POST และ StOst ในปริมาณประมาณ 23 36 และ 21.0% ตามลำดับ พบว่าการทำปฏิกิริยาของไขมันต่อ acyl donor เป็น 1:3:3 (ไขมันเมล็ดเงาะ:กรดสเตียริก:กรดปาล์มติก) โดยน้ำหนัก ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 10% โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ 0.11 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ทำให้ได้ไขมันที่มีไตรกลีเซอไรด์ชนิด POP POST และ StOst ในปริมาณ 21 29 และ 16% ตามลำดับ จากนั้นจึงนำไขมันเมล็ดเงาะมาทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยสภาวะเหมาะสมดังกล่าวที่เลือกไว้ แล้วนำไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพด้วยการวิเคราะห์ค่าความเป็นของแข็งในรูปผลึก ช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลว และการตกผลึก และรูปร่างผลึก พบว่าไขมันเมล็ดเงาะหลังการดัดแปลงโครงสร้างมีคุณสมบัติทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปและมีลักษณะคล้ายคลึงกับเนยโกโก้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับไขมันเมล็ดเงาะที่ไม่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้าง จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้งานเป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBR

Research Title Production of cocoa butter alternatives by lipase-catalyzed interesterification of rambutan seed fat

Researcher 1. Sopark Sonwai (Project Leader)

2. Pakawan Chaikajornwat (Co-Researcher)

Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology,
Silpakorn University

Research Grant Fiscal Year 2014-2015

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of Completion 2016

Type of research Research and Development

Subject Agroindustry (Food Engineering)

Abstract

Cocoa butter (CB) is an important ingredient in the chocolate and related confectionery products. Due to high cost and fluctuations in supply and demand of CB, the transformation of low cost vegetable fats and oils to improve triglyceride structure through interesterification processes has been used to produce cocoa butter alternatives (CBA). Rambutans (*Nephelium lappaceum* L.) are economically important fruits of canning industry. After the rambutan flesh was utilized in the canning process, the rambutan seeds are discarded as waste. Previous studies reported that rambutan seeds possess a relatively high amount of fat with values between 14-41% by weight and around 40.3% of the fatty acid is oleic acid. The objective of this research was to investigate the possibility for the production of CBA from rambutan seed fats (RSF) using enzymatic interesterification. The effect of acyl donor source, substrate ratio (RSF:acyl donor), reaction time, enzyme amount and initial water activity of enzyme was studied. Reactions were carried out at 65°C and incubated with LipozymeTM, which is an immobilized *sn*-1,3 specific lipase from *Mucor miehei*. After each experiment, the triglyceride composition of the modified fat was analyzed and compared to that of CB, which contains mainly of POP (23%), POSt (36%) and StOSt (21%). It was found the most efficient source of acyl donor was free fatty acids (palmitic and stearic acids) in 1:1 weight ratio. The best conditions for the enzymatic interesterification of RSF were: substrate weight ratio of 1:6 for RSF and acyl donor, reaction time of 8 hours, immobilized lipase of 10% by weight of substrate and 0.11 for the initial water activity of enzyme. The triglyceride composition of the modified RSF was 21% for POP, 29% for POSt and 16% for StOSt. CBA was then produced from RSF by lipase-catalyzed interesterification using the optimum conditions listed above and the solid fat content (SFC), the thermal behavior during crystallization and melting and the crystal morphology of the CBA fat were studied and compared with those of CB. It was found that the crystallization and melting profiles of the CBA fat were very similar to CB. However, the fat exhibited slightly lower SFC at the temperatures below 20°C but higher SFC at the temperatures above 20°C. The crystal morphology of the fat was also different from CB. Consequently, the CBA fat produced could not be used as cocoa butter equivalent but instead has the potential for use as non-lauric cocoa butter replacer.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
	ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	4
	สมมติฐานการศึกษา	4
	ขอบเขตของการศึกษา	4
2	วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	8
	เงาะและไขมันเมล็ดเงาะ	8
	เนยโกโก้	14
	ไขมันทดแทนเนยโกโก้	17
	การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้	19
	ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน	21
	ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันหรือไขมันพืชด้วย	
	กระบวนการอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์	22
	เอนไซม์ไลเปส	32
	คุณสมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมัน	35
	คุณสมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมัน.....	38

การตกผลึก	39
เทคนิคการวิเคราะห์ที่โครมาโทกราฟีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด (High Performance Liquid Chromatography; HPLC).....	42
เทคนิคการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบของไขมัน (Thin layer chromatography; TLC)	48
เทคนิคการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงความร้อนของวัตถุ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)	49
เทคนิคการหาปริมาณไขมันที่เป็นของแข็งด้วยเครื่อง pulsed-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR).....	51
เทคนิคการวิเคราะห์ขนาดและการกระจายตัวของผลึกโดยใช้ภาพถ่ายจาก Polarized Light Microscopy (PLM).....	52
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	67
วัตถุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	67
การสกัดไขมันเมล็ดงา.....	69
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี.....	70
การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆต่อปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันของไขมันเมล็ดงากับ acyl donor ด้วยเอนไซม์ไลเปส.....	72
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	76
การคัดเลือกสภาวะในการดัดแปลงไขมันที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำไปผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์	76
การศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพของไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ผลิตขึ้นโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เลือกไว้.....	77
การวิเคราะห์ผล สรุปผล	77
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	81
การสกัดไขมันเมล็ดงา.....	81

หน้า

การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันของ ไขมันเมลิตเงาะกับ acyl donor ด้วยเอนไซม์ไลเปส	81
การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันเมลิตเงาะดัดแปลงจากการ ทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันสำหรับนำไปใช้ในการผลิต ไขมันทดแทนเนยโกโก้	93
การศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพ	93
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	111
รายการอ้างอิง	113
ภาคผนวก	120
ภาคผนวก ก กระบวนการเตรียมเมลิตเงาะและกระบวนการสกัด	121
ภาคผนวก ข การทำไขมันให้บริสุทธิ์ (purification)	125
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยเทคนิค Thin layer chromatography	127
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในไขมันเมลิตเงาะ	129
ภาคผนวก จ การเตรียมสารละลายเกลืออิมิตัว	132
ภาคผนวก ฉ การแยกกรดไขมันอิสระ	134
ภาคผนวก ช การศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของไขมันด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimeter	136
ภาคผนวก ซ การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะผลึกของไขมัน	138
ภาคผนวก ฌ การวัดค่าปริมาณความเป็นของแข็งในรูปผลึก (SFC)	140
ภาคผนวก ญ ตารางแสดงค่าร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จาก การทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันด้วย	142
ภาคผนวก ฎ ภาพถ่ายพฤติกรรมการตกผลึกของไขมันเมลิตเงาะจากกล้องจุลทรรศน์	146
ประวัติผู้วิจัย	148

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่เงาะ ปี 2549 – 2553	9
2	การบริโภคภายในประเทศและการส่งออกเงาะสดและผลิตภัณฑ์ปี 2549 – 2553 ...	9
3	ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในไขมันเมล็ดเงาะ	11
4	ปริมาณกรดไขมัน (%) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนยโกโก้จากแหล่งต่างๆ	15
5	ชนิดของไตรกลีเซอไรด์ (%) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนยโกโก้จากแหล่งต่างๆ	16
6	องค์ประกอบของกรดไขมันในเนยโกโก้ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมัน ปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน ..	23
7	องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ในโครงสร้างเนยโกโก้และน้ำมันปาล์มผสม น้ำมันถั่วเหลืองดัดแปลงที่ผ่านกระบวนการอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน	24
8	องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน mahua ไขมัน kokum และน้ำมันผสม	36
9	องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน ของการผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum ที่เวลาต่างกัน	27
10	ปริมาณของกรดไขมันของน้ำมันดัดแปลงที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ ริฟิเคชันที่ระยะเวลาต่างๆ	28
11	จุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดต่างๆ	36
12	จุดหลอมเหลวของไตรกลีเซอไรด์บางชนิด	37
13	ค่าสำหรับวิเคราะห์สมการ Avrami exponent	51
14	สมภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของชนิดของแหล่ง acyl donor	72
15	สมภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor	74
16	สมภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของของกรดปาล์มมิก ต่อกรดสเตียริก	74
17	สมภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา	75
18	สมภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้	75

ตารางที่		หน้า
19	สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์	76
20	องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum ด้วยการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55°C ด้วยเวลาแตกต่างกัน	79
21	ปริมาณ %SFC ของไขมันชนิดต่างๆที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	106
22	อุณหภูมิและเอนทาลปีในการหลอมเหลวของไขมันชนิดต่างๆ	108
23	อุณหภูมิและเอนทาลปีในการตกผลึกของไขมันชนิดต่างๆ	109
24	ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POSt และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะโดยใช้ acyl donor ต่างชนิดกัน	143
25	ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POSt และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์โดยมีอัตราส่วนของไขมันเมล็ดเงาะ : acyl donor ที่แตกต่างกัน	143
26	ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POSt และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะโดยมีอัตราส่วนของกรดปาล์มติก : กรดสเตียริก ที่แตกต่างกัน	144
27	ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POSt และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยระยะเวลาแตกต่างกัน	144
28	ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POSt และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน	145
29	ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POSt และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยความชื้นเริ่มต้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน	145

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เทอร์โมแกรมจากการวิเคราะห์ช่วงอุณหภูมิในการตกผลึกและการหลอมเหลว ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยเทคนิค DSC	12
2 พฤติกรรมการหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมันเมล็ดเงาะและเนยโกโก้	13
3 ค่า Solid fat content (%) ของไขมันเมล็ดเงาะ	14
4 สูตรโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ในเนยโกโก้ธรรมชาติ (POST)	15
5 กระบวนการผลิต Cocoa Butter Equivalents	18
6 ปฏิกริยาระหว่างกลีเซอไรด์กับกลีเซอไรด์หรือเอสเทอร์อื่นๆ	20
7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟิเคชัน	21
8 ปริมาณร้อยละของ POP POST และ StOST ที่ได้จากการดัดแปลงน้ำมันมะกอก : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก ที่สัดส่วนต่างๆ	25
9 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ของการผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum จากทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟิเคชัน	27
10 การเกิดปฏิกิริยา Alcoholysis	29
11 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Enzymatic transesterification ของ <i>Pentadesma butyracea</i> butter โดยใช้เอนไซม์ปริมาณต่างๆ	29
12 ปริมาณกรดสเตียริกที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟิเคชันของน้ำมัน มะพร้าวโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ	30
13 ปริมาณของกรดปาล์มติกและกรดสเตียริกที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ รีฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดชาโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ	31
14 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่มีค่า a_w เริ่มต้นต่างๆ หลังจากถูกใช้ ในแต่ละครั้ง	32
15 โลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	32
16 โลเปสที่ไม่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	33

ภาพที่		หน้า
17	กราฟความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลาย	40
18	การจัดเรียงตัวของโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์	42
19	ส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในปัจจุบัน.....	43
20	โครมาโตแกรมขององค์ประกอบไขมันจากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ NP-HPLC	44
21	โครมาโตแกรมขององค์ประกอบไขมันจากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ RP-HPLC.....	45
22	photodiode array ที่ใช้ใน LC Detector	47
23	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ของเนยโกโก้ด้วยเทคนิค HPLC	47
24	TLC plate ที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำมันงา (Sesame oil; SO) น้ำมันที่เหลืออยู่ (residual oil;RO) Methanol extract(ME) เพื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน TG FFA DG MG และPL.....	49
25	DSC melting curve ของไขมันนม หลังจาก tempering เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	50
26	รูปแบบการหลอมเหลวของเนยโกโก้จากการศึกษาด้วยเทคนิค DSC.....	50
27	กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงทิศทางเดียวและองค์ประกอบ	52
28	รูปภาพของผลึกน้ำมันเมล็ดมะม่วง น้ำมันปาล์มมิดแฟรกชั่นไขมันทดแทนเนยโกโก้ เนยโกโก้ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	53
29	เมล็ดงาก่อนลอกเปลือกหุ้มสีน้ำตาล/เทาออก และเมล็ดงาที่ลอกเปลือกหุ้มแล้ว เหลือแต่ส่วนสีเหลืองด้านใน	69
30	TLC plate ที่ทำการแยกไขมันส่วนต่างๆในไขมันเมล็ดงาดัดแปลงและ ไขมันเมล็ดงา.....	71
31	การวิเคราะห์ TLC เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันถั่วเหลือง (TG) ผสมกับ กรดโอเลอิก (FFA) ใช้เป็นตัวอย่างควบคุม(C).....	71
32	ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้ เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงาด้วย acyl donor ต่างชนิดกัน	82
33	ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้ เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงาต่อ acyl donor ที่สัดส่วนต่างๆ.....	84

ภาพที่	หน้า
34 ปริมาณของ POP และ StOst (%) ที่ได้จากการดัดแปลงน้ำมันมะกอก : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก	85
35 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้ เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะ: อัตราส่วนของกรดปาล์มติก : กรดสเตียริก ที่สัดส่วนต่างๆ.....	86
36 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้ เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะที่ระยะเวลาแตกต่างกัน	88
37 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้ เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ.....	90
38 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้ เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะที่มีปริมาณความเข้มข้นเริ่มต้นแตกต่างกัน	92
39 เทอร์โมแกรมของการหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมันชนิดต่างๆ	94
40 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกเนยโกโก้ ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า	101
41 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด Coberine ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า	102
42 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด Melarin ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า	103
43 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันเมล็ดเงาะ ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า	104
44 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 °C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า.....	105

ภาพที่		หน้า
45	ค่า %SFC ของไขมันชนิดต่างที่อุณหภูมิต่างๆ.....	106
46	Chromatogram ของ HPLC ที่ได้ของตัวอย่างไขมันชนิดต่างๆ.....	131
47	การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันเมล็ดเงาะ ตั้งแต่เวลา 0 – 120 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า	147

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เงาะ (rambutan) จัดเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความสำคัญมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งประเทศไทยเองจัดได้ว่าเป็นพื้นที่ที่ปลูกเงาะที่มากที่สุดและดีที่สุดในโลก สำหรับพันธุ์เงาะที่กำลังได้รับความนิยมมากที่สุดคือเงาะโรงเรียนหรือเงาะนาสาร ซึ่งมีคุณภาพดีกว่าเงาะพันธุ์อื่นๆ โดยปลูกที่อำเภอนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี ส่วนพันธุ์ที่ได้รับความนิยมรองลงมาคือพันธุ์สีชมพู ปลูกที่ จ.จันทบุรี พันธุ์อื่นที่ได้รับความนิยมน้อยลงมา ได้แก่ พันธุ์สีทอง พันธุ์เงาะม้ง และพันธุ์ตาวิ เป็นต้น โดยเงาะเป็นผลไม้ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในหมู่คนไทยและประเทศเพื่อนบ้านในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื้อเงาะนอกจากจะนิยมรับประทานสดๆแล้ว ยังนำไปผลิตเป็นเงาะกระป๋อง โดยในบางประเทศ เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ ได้มีการนำเมล็ดเงาะไปคั่วให้สุกแล้วนำมารับประทานเป็นของขบเคี้ยว (Solis-fuentes และคณะ, 2010) นอกจากนี้เมล็ดเงาะยังสามารถนำไปสกัดไขมัน ซึ่งไขมันที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น นำไปผลิตเทียนไข สบู่ หรือเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอดีเซล เป็นต้น (Morton, 1987; Zee, 1993) สำหรับในประเทศไทยแล้วเมล็ดเงาะถือเป็นของเหลือทิ้งที่มีได้นำไปใช้ประโยชน์ใดๆ ซึ่งในแต่ละปีในช่วง 6 ปีที่ผ่านมา ประเทศไทยผลิตเงาะได้ 0.3-0.5 ล้านตัน/ปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) โดยเงาะ 1 กิโลกรัม จะให้เมล็ด 70-80 กรัม หรือ 7-8% โดยน้ำหนัก (นัฐวี, 2551) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่ว่าเมล็ดเงาะสดมีความชื้นเฉลี่ย 34.3% (wet basis) (Solis-Fuentes และคณะ, 2010) และในการสกัดไขมันจากเมล็ดเงาะแห้งนั้นสามารถได้ yield สูงถึง 41.3%โดยน้ำหนักของเมล็ดเงาะแห้ง (Winayanuwattikun และคณะ, 2008) แสดงว่าเมล็ดเงาะที่เป็นเศษเหลือทิ้ง สามารถให้ไขมันได้ในปริมาณมากถึง 81,500-136,000 ตัน/ปี

เนยโกโก้ (cocoa butter) เป็นไขมันที่เป็นส่วนผสมหลักที่มีราคาแพงที่สุดของช็อคโกแลต เนยโกโก้ได้มาจากต้นโกโก้ และประกอบไปด้วยไตรกลีเซอไรด์ 3 ชนิดหลักๆ ด้วยกัน คือ POP POSt และ StOSt (เมื่อ P O และ St คือกรดไขมันชนิดปาล์มติก โอเลอิก และสเตียริก ตาม ลำดับ) (Xu, 2000) ในปัจจุบันเนยโกโก้มีราคาแพงและมีการผันแปรของปริมาณการผลิตแบบปีต่อปี เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพดินฟ้าอากาศและความไม่มั่นคงด้านสภาวะทางการเมืองของประเทศผู้ปลูกต้นโกโก้ จึงได้มีความพยายามในการเสาะแสวงหาพืชชนิดอื่นที่สามารถให้น้ำมันหรือไขมันที่มีองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ คุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพ และพฤติกรรมทางการตกผลึกที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับของเนยโกโก้มาผลิตเป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ (cocoa butter alternatives) ซึ่งได้มีการค้นพบว่าพืชอยู่ไม่กี่ชนิด เช่น sal, shea, elipe และ kokum เป็นต้น ที่ให้น้ำมันที่มีคุณสมบัติดังกล่าวใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ (Lipp และ Anklem, 1998) แต่อย่างไรก็ตามพืชเหล่านี้มีส่วนใหญ่เป็นพืชล้มลุก ปลูกได้เฉพาะบางพื้นที่ และให้ผลผลิตเป็นฤดูกาล นอกจากนี้บางชนิดยังให้ yield ในการสกัดน้ำมันต่ำอีกด้วย จึงทำให้ต้องมีการพิจารณาน้ำมันจากพืชชนิดที่หาได้ง่ายกว่า มีราคาถูก และยังให้ yield ในการสกัดน้ำมันที่สูงกว่า เช่น น้ำมันปาล์ม น้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว และน้ำมันมะพร้าว เป็นต้น มาใช้ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันเหล่านี้มีองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่ค่อนข้างแตกต่างจากของเนยโกโก้ ส่งผลให้มีคุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพ และพฤติกรรมทางการตกผลึกที่แตกต่างไปจากของเนยโกโก้ค่อนข้างมาก ทำให้มีข้อจำกัดในการนำมาผลิตเป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ เพราะเหตุนี้จึงได้มีการนำเอาน้ำมันเหล่านี้มาดัดแปลงองค์ประกอบของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันให้มีความใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ (นั่นคือให้มีปริมาณและสัดส่วนของไตรกลีเซอไรด์ชนิด POP POSt และ StOSt ใกล้เคียงกับของเนยโกโก้) ด้วยวิธีที่แตกต่างกันไป เช่น การตกผลึกแยกส่วน (Fractionation) และการทำอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน (Interesterification) ซึ่งมีทั้งแบบใช้ความร้อนสูงควบคู่กับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นสารเคมี (Chemical interesterification) และแบบที่ใช้ความร้อนปานกลางร่วมกับการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Enzymatic interesterification) เป็นต้น

การทำอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ นั้น เป็นการเปลี่ยนชนิดของกรดไขมัน (fatty acid chain) ที่จับอยู่กับกลีเซอรอลในตำแหน่งพันธะที่ 1 (sn-1) และ 3 (sn-3) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ด้วยการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ทำงานจำเพาะ (ชนิด sn-1,3 specific lipase) มาทำการตัดกรดไขมันชนิดที่ไม่ต้องการออกไปจากตำแหน่งพันธะที่ 1 และ 3 แล้วทำการต่อกรดไขมันชนิดที่ต้องการเข้าไปแทนที่ (Xu, 2000) โดยเอนไซม์ไลเปสที่ใช้นั้นส่วนใหญ่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* และ *Rhizopus delemar* เป็นต้น (Senanayake และ Shahidi, 2005) ซึ่งน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ นั้นควรเป็นน้ำมันที่มีกรดโอเลอิกในปริมาณสูง และกรดโอเลอิกนี้ควรจะต้องจับอยู่ที่ตำแหน่งพันธะที่ 2 (sn-2) เป็นส่วนใหญ่ ส่วนกรดไขมันที่ต้องการเข้ามาแทนที่ในตำแหน่งพันธะที่ 1 และ 3 นั้น ส่วนใหญ่จะเป็นกรดปาล์มติก และ/หรือ กรดสเตียริก ซึ่งอาจได้มาจาก acyl donor ในรูปแบบที่หลากหลาย เช่น กรดไขมันอิสระ (palmitic acid และ/หรือ stearic acid) หรือกรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ (เช่น ethyl stearate และ/หรือ methyl palmitate) สุดท้ายจะทำให้ได้ไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่มีปริมาณและสัดส่วนของ POP POSt และ StOSt ที่

ใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ โดย ณ ปัจจุบันนี้ การดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันหรือไขมันด้วยวิธีอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์เพื่อการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากภาคอุตสาหกรรม (Tchobo และคณะ, 2009) ทั้งนี้เป็นเพราะว่ากระบวนการดังกล่าวมีข้อดีที่เหนือกว่ากระบวนการอื่นๆ ในหลายๆ ด้าน เช่น เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานต่ำ มี by-products น้อย และเป็น green process เนื่องจากก่อให้เกิดของเสียที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในปริมาณต่ำ (Xu, 2000) ที่ผ่านมามีงานวิจัยหลายงานที่ได้ทำการศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันด้วยวิธีอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์กับน้ำมันหลายชนิดแตกต่างกันไป เช่น น้ำมันปาล์ม (Undurraga และคณะ, 2001; Yazdi and Alemzade, 2011) น้ำมันมะกอก (Ciftci และคณะ, 2009; Oh และคณะ, 2009) น้ำมันถั่วเหลือง (Abigor และคณะ, 2003) น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (Adhikari et al., 2010; Salas และคณะ, 2011) น้ำมันรำข้าว (Alim และคณะ, 2008) น้ำมันมะพร้าว (Rao และคณะ, 2001) และน้ำมันเมล็ดชา (Wang และคณะ, 2006; Zarringhalam et al., 2010) เป็นต้น โดยงานวิจัยเหล่านั้นได้ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ในระหว่างการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน เช่น ชนิดของแหล่ง acyl donor ที่ใช้อัตราส่วนของน้ำมันต่อ acyl donor ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ความชื้นหรือค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ เป็นต้น

ประเทศไทยในปัจจุบันได้สั่งสินค้าประเภทเนยโกโก้และไขมันทดแทนเนยโกโก้เข้ามาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไอศกรีม ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ลูกอม ลูกกวาด ขนมขบเคี้ยวและช็อกโกแลตในปริมาณมากต่อปี คิดเป็นมูลค่ามหาศาล ในสถานการณ์ปัจจุบันที่ราคาของเนยโกโก้เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องนั้น ย่อมทำให้ต้นทุนการผลิตสินค้าที่มีเนยโกโก้เป็นส่วนประกอบนั้นเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย เพื่อเป็นการลดต้นทุนดังกล่าวและเป็นการเพิ่มโอกาสรวมถึงความสามารถในการแข่งขัน เรามีความจำเป็นที่จะต้องเสาะหาแหล่งน้ำมันจากพืชที่มีอยู่ภายในประเทศที่มีศักยภาพสำหรับการนำมาดัดแปลงโครงสร้างเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ หรือใช้เป็น feed stock สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ไขมันชนิดอื่นๆ เช่น มาร์การีน shortening และผลิตภัณฑ์ประเภทสเปรด (spread) ซึ่งไขมันจากเมล็ดเงาะที่ยังไม่เคยมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ถือเป็นไขมันที่มีศักยภาพสูงสำหรับการนำมาดัดแปลงโครงสร้างเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ ทั้งนี้เนื่องจากว่าเป็นไขมันที่มีกรดโอเลอิกเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในปริมาณสูงถึง 55.25% (Winayanuwattikun และคณะ, 2008) และให้ปริมาณ yield ในการสกัดไขมันสูง ถ้าเราได้ทำการศึกษาถึงสถานะต่างๆ ที่มีผลต่อการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยวิธีอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบที่ใช้เอนไซม์ ให้มีความเข้าใจและได้ข้อสรุปของสถานะที่เหมาะสมได้ เราจะได้องค์ความรู้ใหม่สำหรับการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ขึ้นได้เองภายในประเทศในอนาคตเพื่อรองรับการเติบโตและการแข่งขันที่สูงขึ้นตลอดเวลาของอุตสาหกรรมการผลิตไอศกรีม ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ลูกอม ลูกกวาด ขนมขบเคี้ยวและช็อกโกแลต ซึ่งการนำเมล็ดเงาะที่เป็นของเหลือทิ้งในประเทศมาทำการสกัดไขมันเพื่อทำการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ได้เองในอนาคตนั้น นอกจากจะเป็นการลดปริมาณการนำเข้าไขมันทดแทนเนยโกโก้จากต่างประเทศแล้ว ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งอย่างมีประสิทธิภาพ ถือเป็นการเพิ่มมูลค่าสินค้าเพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตให้แก่ประเทศอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะทำการศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเจาด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส โดยจะทำการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อกระบวนการ คือ ชนิดของแหล่ง acyl donor อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor (อัตราส่วนของสารตั้งต้น หรือ substrates ratio) ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการดัดแปลงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ในไขมันเมล็ดเจาเพื่อทำการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ ในกลุ่ม non-lauric fat ซึ่งเมื่อดัดแปลงแล้วชนิดของไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่สามารถเป็นไปได้ ก็คือ cocoa butter equivalent (CBE) และ cocoa butter replacer (CBR) โดยถ้าหากไขมันเมล็ดเจาที่ดัดแปลงได้มีทั้งคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเหมือนกับเนยโกโก้ จะสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ทุกสัดส่วนในการผลิตช็อกโกแลต จะเรียกว่า CBE และหากมีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนหรือใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แต่คุณสมบัติทางเคมีบางส่วนคล้ายกับเนยโกโก้ก็จะสามารถนำมาใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBR (Lipp และ Anklem, 1998; Talbot, 1999)

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ คือ ชนิดของแหล่ง acyl donor อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ที่มีต่อกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันของไขมันเมล็ดเจาแบบใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านกายภาพ ค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึก พฤติกรรมการหลอมเหลว อุณหภูมิในการตกผลึกและการหลอมเหลว และรูปร่างผลึกของไขมันเมล็ดเจาที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เลือกไว้เปรียบเทียบกับของไขมันเมล็ดเจาที่ไม่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้าง เนยโกโก้ และตัวอย่างไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

1.3 สมมติฐานการศึกษา

ปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของแหล่ง acyl donor อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ที่นำมาทำการดัดแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

1.4.1 การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันของไขมันเมล็ดเจาแบบใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คือ

- ◆ ชนิดของแหล่ง acyl donor
- ◆ อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor

- ◇ ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา
- ◇ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้
- ◇ ค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์

1.4.2 การศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆของไขมันเมล็ดเงาะที่ผ่านการดัดแปลงด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะต่างๆ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเนยโกโก้และของไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิดที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด ทั้ง CBE และ CBR เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะด้วยวิธีอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส ซึ่งคุณสมบัติของไขมันที่จะทำการศึกษาคือ

- องค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ในไขมัน ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- ค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึก (solid fat content) และพฤติกรรมการหลอมเหลว ด้วยเทคนิค pulsed-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR)
- อุณหภูมิในการตกผลึกและอุณหภูมิในการหลอมเหลว ด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)
- กลไกในการตกผลึก (crystallization kinetics) ด้วยเทคนิค pulsed-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR)
- รูปร่างผลึก (crystal morphology) ด้วยเทคนิค Polarized-Light Microscopy (PLM)

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เงาะและน้ำมันเมล็ดเงาะ

เงาะ (rambutan) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Nephelium lappaceum* L. จัดอยู่ในพืชวงศ์ Sapindaceae เป็นผลไม้ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในหมู่คนไทย ประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นพื้นที่ที่ปลูกเงาะมากที่สุดและดีที่สุดในโลก พันธุ์ของเงาะที่มีการปลูกเป็นการค้าอย่างกว้างขวางในประเทศไทยมี 2 พันธุ์ ได้แก่

1. พันธุ์โรงเรียน เป็นเงาะที่มีคุณภาพดี เป็นที่ต้องการของตลาด มีราคาสูง ผิวสีแดงเข้ม โคนขนมีสีแดง ปลายขนมีสีเขียว เนื้อหนา แห้ง และล่อนออกจากเมล็ดได้ง่าย ตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี เมื่อขาดน้ำในช่วงผลอ่อน ผลจะแตกหรือหล่นได้มาก

2. พันธุ์สีชมพู เป็นพันธุ์ที่ปลูกง่าย มีการเจริญเติบโตดี ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพดินฟ้าอากาศ ให้ผลดกมีผิวและขนเป็นสีชมพูสด เนื้อหนา ฉ่ำน้ำ บอบช้ำง่าย ไม่ทนทานต่อการขนส่ง

สำหรับพันธุ์เงาะที่กำลังได้รับความนิยม คือ เงาะโรงเรียนหรือเงาะนาสาร ซึ่งได้รับความนิยมมากที่สุด มีคุณภาพดีกว่าพันธุ์อื่นๆ โดยปลูกที่อำเภอนาสาร สุราษฎร์ธานี ส่วนพันธุ์ที่ได้รับความนิยมรองลงมา คือ พันธุ์สีชมพู ปลูกที่จันทบุรี พันธุ์อื่นที่ได้รับความนิยมน้อยลงมาได้แก่ พันธุ์สีทอง พันธุ์เงาะม้ง และพันธุ์ตาวิ เป็นต้น (ปราณี, 2534)

สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2554 ของเงาะ ในด้านต่างๆ เป็นดังนี้

1. การผลิต ในปี 2554 คาดว่าจะมีพื้นที่ให้ผล 308,908 ไร่ ผลผลิต 345,976 ตัน พื้นที่ให้ผลลดลงจากปี 2553 ร้อยละ 7.94 ในขณะที่ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากปี 2553 ร้อยละ 2.44 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. การตลาด แบ่งเป็น

(1) *ความต้องการบริโภค* คาดว่าการบริโภคภายในประเทศเงาะสดและผลิตภัณฑ์จะมีปริมาณ 300,000 ตัน หรือลดลงจากปี 2553 ร้อยละ 8.71 จากการผลักดันให้มีการส่งออกเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 2)

(2) *การส่งออก* คาดว่าการส่งออกเงาะสดและผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมาว่าร้อยละ 50 หรือประมาณ 13,000 ตันสด โดยแยกเป็นเงาะสด 10,000 ตัน เงาะกระป๋อง 1,000 ตัน และเงาะสอได้สับปะรด 2,000 ตัน จากการเร่งผลักดันการส่งออกเช่น ตะวันออกกลาง และการค้าผ่านชายแดนกับประเทศเพื่อนบ้าน รวมทั้งการนำเทคโนโลยีการยืดอายุเงาะสดด้วยถุงพลาสติกเพื่อการส่งออกโดยทางเรือมาใช้จะช่วยลดต้นทุนการขนส่งและทำให้สามารถขยายตลาดส่งออกได้เพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 2)

(3) *ราคา* คาดว่าราคาที่เกษตรกรขายได้ ราคาขายส่งตลาดกรุงเทพฯ และราคาส่งออกจะใกล้เคียงกับปีที่ผ่านมา

ตารางที่ 1 เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่เงาะ ปี 2549 – 2553

ปี พ.ศ.	เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)
2549	458,336	436,474	952
2550	423,804	489,296	1,151
2551	396,987	404,053	1,018
2552	362,061	370,600	1,024
2553	335,538	337,721	1,007
อัตราเพิ่มร้อยละ	-7.51	-7.6	-0.05

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2553)

ตารางที่ 2 การบริโภคภายในประเทศและการส่งออกเงาะสดและผลิตภัณฑ์ ปี 2549 – 2553

ปี พ.ศ.	การบริโภคภายในประเทศ (ตัน)	การส่งออก	
		ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2549	428,166	9,160	314.81
2550	485,534	4,272	131.21
2551	397,489	6,564	126.84
2552	364,273	6,327	142.81
2553	328,634	9,087*	171.00*
อัตราเพิ่มร้อยละ	-7.84	3.84	-10.74

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2553)

หมายเหตุ: * เป็นการประมาณการ

3. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณการผลิตและการส่งออก

(1) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิต ในปี 2553 เนื้อที่ให้ผลและผลผลิตลดลง เนื่องจากในช่วงหลายปีที่ผ่านมาราคาที่เกษตรกรได้รับตกต่ำอย่างต่อเนื่อง และขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะในช่วงฤดูการ ทำให้เกษตรกรบางส่วนได้โค่นต้นเงาะทิ้ง และหันไปปลูกพืชอื่นที่ให้ราคาดีกว่า เช่น ยางพารา และปาล์มน้ำมัน สำหรับในปี 2554 คาดว่าสภาพภูมิอากาศจะเหมาะสมต่อการออกดอกและติดผลจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจากปี 2553 อาจจะทำให้ราคาที่เกษตรกรได้รับลดต่ำลงโดยเฉพาะในช่วงฤดูการ

(2) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อส่งออก ในปี 2553 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นจากปี 2552 อย่างไรก็ตามการแข่งค่าของเงินบาทไม่ส่งผลกระทบต่อส่งออก โดยเฉพาะเงาะสด เนื่องจากส่วนใหญ่การส่งออกเป็นการค้าขายผ่านชายแดนกับประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กัมพูชา มาเลเซีย สปป.ลาว และเวียดนาม ซึ่งจะใช้สกุลเงินบาทในการซื้อขาย ส่วนการแข่งค่าของเงินบาทได้ส่งผลกระทบกับการส่งออกเงาะบรรจุกระป๋องและเงาะสดใส่สับปะรดบรรจุกระป๋อง ซึ่งราคาในตลาดปลายทางมีราคาสูงขึ้น ทำให้ไม่สามารถแข่งขันกับผลไม้กระป๋องชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะจากจีนซึ่งมีราคาที่ถูกลงได้

จากตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าประเทศไทยเป็นผู้ผลิตเงาะได้ในปริมาณมากต่อปี โดยเฉพาะช่วงเดือนพฤษภาคมและมิถุนายนซึ่งเป็นช่วงที่ผลผลิตออกมากและสามารถส่งออกได้ปีละประมาณ 10-15 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Sirisompong และคณะ, 2011) ในประเทศไทยมีโรงงานอุตสาหกรรมหลักๆ ที่ใช้เงาะเป็นวัตถุดิบคือ โรงงานผลิตเงาะกระป๋อง และโรงงานผลิตเงาะยัดใส่สับปะรดในน้ำเชื่อมบรรจุกระป๋อง สำหรับเมล็ดเงาะซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานเหล่านี้ ส่วนใหญ่ยังมีนำไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมล็ดเงาะมีไขมันระหว่าง 14-41 %โดยน้ำหนักของเมล็ดเงาะ และปัจจุบันมีความต้องการน้ำมันและไขมันเพิ่มมากขึ้นเพื่อใช้สำหรับการบริโภคของมนุษย์และโรงงานอุตสาหกรรม จึงทำให้จำเป็นต้องทำการศึกษาแหล่งที่มาในการผลิตน้ำมันใหม่นี้ ดังนั้นในการสกัดไขมันจากเงาะ จึงไม่ได้มีประโยชน์แค่เฉพาะในการผลิตเทียน สบู่ แต่จะมีประโยชน์รวมไปถึงอุตสาหกรรมอาหารด้วย

งานวิจัยของ Solis-Fuentesc และคณะ (2010) ได้นำเมล็ดเงาะของประเทศเม็กซิโกมาทำการล้างและลอกเปลือกหุ้มสีน้ำตาล/เทาออก ให้เหลือแต่เนื้อเมล็ดสีเหลืองมาทำการบดและอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดไขมันด้วยชุดสกัด Soxhlet โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ทำการสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้ Rotavapour ภายใต้สภาวะสุญญากาศ ซึ่งSolis-Fuentesc และคณะ(2010) ได้นำวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของ Wesson method มาใช้ทำให้ได้ purified fat เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติและองค์ประกอบในไขมัน

จากการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีของไขมันเมล็ดเงาะพบว่ามีค่า refractive index เท่ากับ 1.468 free fatty acid ร้อยละ 1.99 saponification index เท่ากับ 186 และ iodine index เท่ากับ 47 และผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในไขมันจากเมล็ดเงาะแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบงานวิจัยที่มีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันจากแหล่งที่มาต่างกัน เพื่อแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการปลูกเงาะในบริเวณที่ต่างกันก็จะส่งผลต่อชนิดและปริมาณของกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในโครงสร้างด้วย

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่พบในไขมันเมล็ดเงาะ

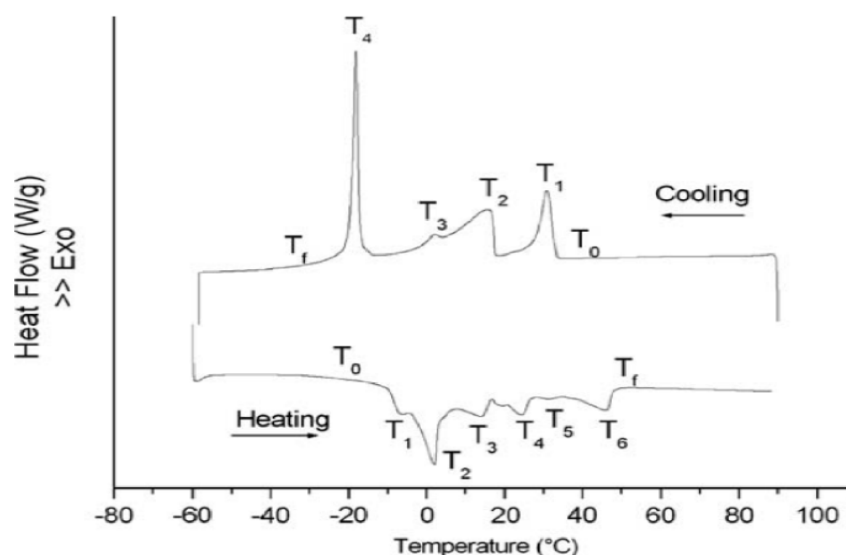
ชื่อกรดไขมัน	ชนิดกรดไขมัน	ปริมาณเป็นร้อยละ (โดยน้ำหนัก)	
		Solis-Fuentes และคณะ (2010)	Sirisompong และคณะ (2011)
Myristic acid	C14:0	-	0.02
Palmitic acid	C16:0	6.1	4.69
Palmitoleic acid	C16:1	1.5	0.49
Stearic acid	C18:0	7.1	7.03
Oleic acid	C18:1	40.3	36.79
Trans-9-Elaidic acid	C18:1 09t	-	0.03
Cis-9,12-Linoleic acid	C18:2 06	-	1.37
α -Linolenic acid	C18:3 03	-	6.48
Arachidic acid	C20:0	34.5	34.32
Gondoic acid	C20:1	6.3	-
Cis-11,14-Eicosadienoic acid	C20:2	-	0.04
Heneicosanoic acid	C21:0	-	0.05
Behenic acid	C22:0	2.9	3.1
Erucic acid	C22:1 09	-	0.66
Tricosanoic acid	C23:0	-	0.03
Lignoceric acid	C24:0	-	0.33

ที่มา: Solis-Fuentes และคณะ (2010); Sirisompong และคณะ (2011)

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่มีการรายงานไว้

คุณลักษณะทางกายภาพ เช่น พฤติกรรมการตกผลึกและการหลอมเหลวของไขมันเมล็ดเงาะ จากงานวิจัยของ Solis-Fuentes และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาการตกผลึกของไขมันเมล็ดเงาะด้วยเทคนิค DSC โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการทำลายผลึกทั้งหมดในตัวอย่าง จากนั้นทำให้เย็นลงจนถึง -80°C ด้วยอัตราเร็ว 10°C ต่อนาที อุณหภูมิที่เริ่มตกผลึก +33.6°C จากนั้นก็จะตกผลึกจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ -45.6°C การเกิดผลึกนั้นจะต้องคายพลัง

งานทั้งสิ้น 89 J/g ส่วนการหลอมเหลวของไขมันเมลิตเงาะโดยให้ความร้อนแก่ตัวอย่างจากอุณหภูมิ -80°C ด้วยอัตราเร็ว 10°C ต่อนาที จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 90°C พบว่าอุณหภูมิที่เริ่มหลอมเหลวคือ 14.5°C และไขมันหลอมเหลวจนหมดที่ 51.8°C โดยใช้พลังงาน 124.3 J/g ในการหลอมเหลวไขมันทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 เทอร์โมแกรมจากวิเคราะห์ช่วงอุณหภูมิในการตกผลึกและการหลอมเหลวของไขมันเมลิตเงาะด้วยเทคนิค DSC

ที่มา: Solis-Fuentesc และคณะ (2010)

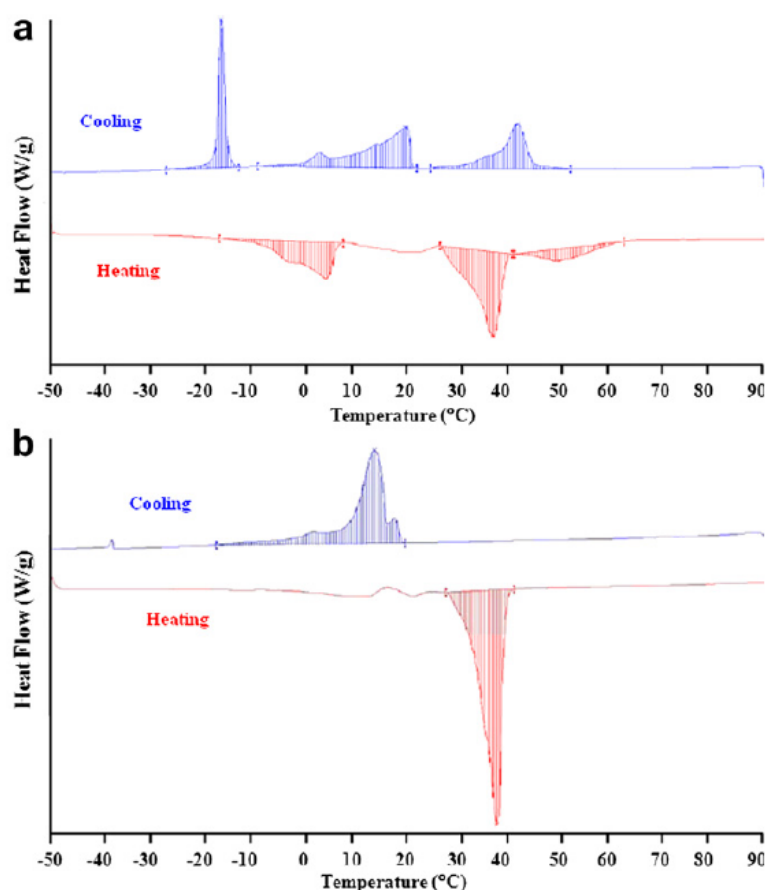
งานวิจัยของ Sirisompong และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์รูปแบบการหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมันเมลิตเงาะ โดยพบว่าช่วงอุณหภูมิของการหลอมเหลวมีสามช่วง คือ อุณหภูมิในการหลอมเหลวต่ำ ปานกลาง และสูง เนื่องจากไขมันเมลิตเงาะมีความหลากหลายขององค์ประกอบจึงมีช่วงอุณหภูมิของการหลอมเหลวกว้าง โดยอุณหภูมิที่มีความสามารถในการหลอมเหลวได้ดีของทั้งช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำ ปานกลาง และสูง คือ 4.2 37.4 และ 49.8°C ตามลำดับ จากเทอร์โมแกรมแสดงให้เห็นอุณหภูมิที่เริ่มหลอมเหลวคือ -4.5°C และไขมันหลอมเหลวจนหมดที่ 58.9°C และใช้พลังงาน 85.4 J/g ในการหลอมเหลวไขมันทั้งหมด ส่วนอุณหภูมิในการตกผลึกเริ่มที่ 37.8°C ตกผลึกจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ -14.8°C และคายพลังงานออกมา 92.1 J/g (ภาพที่ 2a)

ช่วงการหลอมเหลวของไขมันเมลิตเงาะที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ -15 ถึง 10 °C เกิดขึ้นเนื่องจากองค์ประกอบภายในโครงสร้างที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ช่วงการหลอมเหลวของไขมันเมลิตเงาะที่อุณหภูมิปานกลางประมาณ 28-40°C เกิดจากไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นกลุ่ม Disaturated ช่วงการหลอมเหลวของไขมันเมลิตเงาะที่อุณหภูมิสูงประมาณ 45-65°C เกิดจากองค์ประกอบภายในโครงสร้างที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวสายยาว

เมื่อนำเนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาดมาศึกษาช่วงอุณหภูมิในการหลอมเหลว และการตกผลึกในสภาวะเดียวกันกับไขมันเมลิตเงาะพบว่า thermogram ที่ได้มีช่วงการหลอมเหลวเพียงแค่

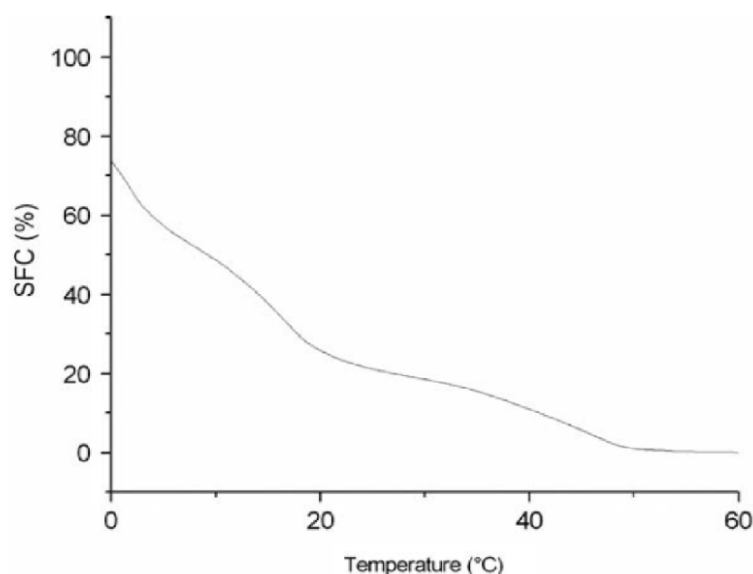
ฟิคเดียว และมีช่วงของการหลอมเหลวแคบแสดงให้เห็นว่ามีไตรกลีเซอไรด์เพียงไม่กี่ชนิดในโครงสร้าง อุณหภูมิที่สามารถหลอมเหลวและตกผลึกได้มากที่สุด คือ 36.25 และ 13.24°C ตามลำดับ (ภาพที่ 2b) จะสังเกตได้ว่าช่วงการหลอมเหลวช่วงที่สองของไขมันเมล็ดเงาะมีช่วงอุณหภูมิคล้ายคลึงกับเนยโกโก้ แสดงให้เห็นว่าส่วนหนึ่งของไขมันเมล็ดเงาะมีศักยภาพที่จะนำไปผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ (Cocoa butter replacer) สำหรับอุตสาหกรรม

ค่าที่ได้แสดงถึงจุดหลอมเหลวของไขมันเมล็ดเงาะที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง ซึ่งค่าที่ได้นั้นมีความแตกต่างอย่างเล็กน้อย กับงานวิจัยของ Solis-Fuentes และคณะ (2010) ที่ทำการศึกษาวงจรของอุณหภูมิในการหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมันเมล็ดเงาะเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงยากที่จะทำการเปรียบเทียบ thermal profile ของน้ำมันหรือไขมันจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน รวมทั้งยังมีวิธีเทคนิคการวิเคราะห์ทั้งทางคุณภาพและปริมาณที่แตกต่างกัน จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการตกผลึก (polymorphic form) ของไขมันเมล็ดเงาะ พบว่ามีรูปแบบผลึกเป็น Beta (β) 84.7% และ Beta-prime (β') 15.3% โดยน้ำหนัก ซึ่งมีแนวโน้มที่จะตกผลึกในรูปแบบ β สอดคล้องกับการเมื่อเปรียบเทียบกับของเนยโกโก้ที่กำหนดในท้องตลาดที่ศึกษาในสถานะเดียวกัน



ภาพที่ 2 พฤติกรรมการหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมันเมล็ดเงาะ (a) และเนยโกโก้ (b)
ที่มา: Sirisompong และคณะ (2011)

เมื่ออุณหภูมิมากขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึกไขมันเมลิตเงาะ (Solid fat content : %SFC) จะน้อยลงเนื่องจากไขมันละลาย (ภาพที่ 3) โดย Solis-Fuentesc และคณะ (2010) กล่าวว่าโครงสร้างที่ได้มีความคงตัว (consistency) มากกว่าไขมันสัตว์ ไขมันหมู น้ำมันปาล์ม แต่มีความคงตัวน้อยกว่าเนยโกโก้ และไขมันที่ผ่านกระบวนการ hydrogenation จากกราฟแสดงให้เห็นว่าไขมันเมลิตเงาะไม่สามารถละลายได้หมดที่อุณหภูมิ 30-40°C

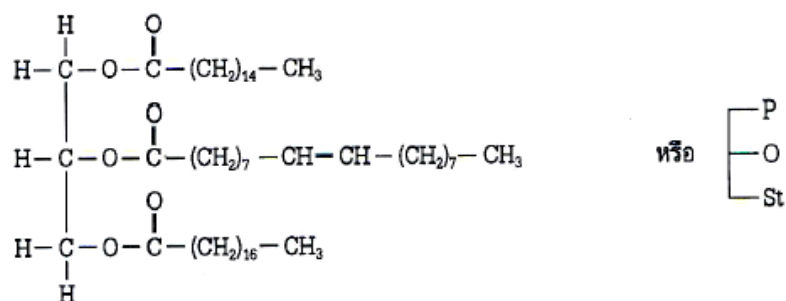


ภาพที่ 3 ค่า Solid fat content (%) ของไขมันเมลิตเงาะ
ที่มา: Solis-Fuentesc และคณะ (2010)

2.2 เนยโกโก้

ประเทศไทยในปัจจุบันได้สั่งสินค้าประเภทโกโก้เข้ามา เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต ไอศกรีม ลูกอม ลูกกวาดและช็อกโกแลต โดยองค์ประกอบที่สำคัญของช็อกโกแลตคือน้ำมันโกโก้ (Tchobo และคณะ, 2009) ซึ่งเนยโกโก้ (cocoa butter) เป็นไขมันที่เป็นส่วนผสมหลักที่มีราคาแพงที่สุดของช็อกโกแลต ประกอบไปด้วยไตรกลีเซอไรด์หลัก 3 ชนิด ในเนยโกโก้ คือ 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP) ร้อยละ 13-22.6, 1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoylglycerol (POST) ร้อยละ 35.8 – 41.4 (ดังแสดงในภาพที่ 4) และ 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (StOSt) ร้อยละ 22.8-31.3 (เมื่อ P, O และ St คือกรดไขมันชนิดปาล์มิติก, โอเลอิก และสเตียริก ตามลำดับ) (Chaiseri และ Dimick, 1989; Xu, 2000; Ciftci และคณะ, 2009) องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ในเนยโกโก้มีกรดโอเลอิกอยู่ในโครงสร้างตำแหน่งที่ 2 มากกว่า 70% (Xu, 2000) นอกจากนั้นยังประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ ร้อยละ 0.3 – 0.5, โมโนกลีเซอไรด์ ร้อยละ 0.1, กรดไขมันอิสระ ร้อยละ 1, สเตอรอล ร้อยละ 0.2, โทโคฟีรอล 150 ถึง 200 ส่วนในล้านส่วน, ฟอสโฟลิพิด ร้อยละ 0.05 – 0.13 และไกลโคลิพิด ร้อยละ 11.1 (Xu, 2000; ญัษฎาวรรณ, 2547) มีกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเนยโกโก้ คือ กรดปาล์มิติก 24.4%, กรดสเตียริก 33.6%, กรดโอเลอิก 37%, กรดลิโนเลอิก 3.4% และชนิดอื่น ๆ ประมาณ 1.6% ซึ่งเนยโกโก้นั้นมีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มิติกเป็น

1.3:1.0 (ณัฐยารรณ, 2547; Pinyaphong and Phutrakul, 2009) อย่างไรก็ตามปริมาณของไตรกลีเซอไรด์หรือกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเนยโกโก้ก็จะมีแตกต่างกันตามแหล่งที่ปลูกและสภาพภูมิอากาศด้วยดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ในเนยโกโก้ธรรมชาติ (POSt)

P คือ กรดปาล์มิติก O คือ กรดโอเลอิก St คือ กรดสเตียริก

ที่มา: ปราณี (2547)

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆ (%) ที่เป็นองค์ประกอบของเนยโกโก้จากแหล่งต่างๆ

Country of origin	Ecuador	Brazil	Ghana	Ivory Coast	Malaysia	Java
Palmitic acid	25.6	25.1	25.3	25.8	24.9	24.1
Stearic acid	36.0	33.3	37.6	36.9	37.4	37.3
Oleic acid	34.6	36.5	32.7	32.9	33.5	34.3
Linoleic acid	2.6	3.5	2.8	2.8	2.6	2.7
Linolenic acid	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Arachidic acid	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Behenic acid	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

ที่มา: Lipp และ Anklam (1997)

ตารางที่ 5 ชนิดของไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆ (%) ที่เป็นองค์ประกอบของเนยโกโก้จากแหล่งต่างๆ

Country of origin	Samoa	Ivory Coast	Ecuador	Malaysia	Ghana	Nigeria	Bahia
POL	0.8	0.6	0.7	0.6	0.6	0.8	1.1
MOO,MMP	0.3	0.2	0.3	0.5	0.2	0.2	0.2
PPL	1.6	1.9	1.9	1.5	1.9	1.9	1.7
OOO	0.2	0.8	0.8	0.8	0.5	0.4	0.9
StOL	0.5	0.9	0.8	0.7	0.4	0.8	1
POO	2.2	4.4	3.5	2.7	2.6	3.2	5.5
PLSt	2.8	3.6	2.8	2.8	3.2	3.4	3.4
PPO	16.4	15.9	15.3	13.8	15.2	14.8	14
StOO,PPP	3.7	6	4.8	3.8	4.5	5.1	8.4
StStL	2.1	1.8	1.5	2	2.1	1.9	2.1
PStO	38.3	36.6	36.3	36.6	37.3	37.4	34.6
OOA	1.6	1	1.2	1.6	1.4	1.2	1.5
PPSt	0.4	0.4	0.3	0.6	-	0.7	0.3
StStO	26.8	23.8	26.9	28.4	26.8	26.4	23.7
StStP	0.7	0.8	0.9	1	1.3	0.4	0.2
StOA	2.2	1.6	2.1	2.5	2.2	1.9	1.6

หมายเหตุ: P คือ กรดปาล์มติก O คือ กรดโอเลอิก St คือ กรดสเตียริก A คือ กรดอะราคิดิก

L คือ กรดลิโนเลอิก M คือ กรดไมริสติก

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Lipp และ Anklam (1997)

เนยโกโก้ (cocoa butter) เป็นไขมันธรรมชาติที่ได้มาจากเมล็ดโกโก้ (*Theobroma cocoa*) สามารถรับประทานได้ โดยนำเนยโกโก้ (cocoa nib) มาบีบอัดด้วยแรงไฮดรอลิก (hydraulic press) หรือบีบอัดด้วยเครื่อง expeller press และผ่านกรรมวิธีต่างๆ เพื่อผลิตเป็นเนยโกโก้ (Tchobo และคณะ, 2009) จะมีคุณสมบัติพิเศษกว่าไขมันชนิดอื่นคือ มีความคงตัวสูง มีความสามารถแข็งตัวได้ที่อุณหภูมิห้องปกติ (20°C) เริ่มละลายที่ 30°C และละลายได้หมดที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิของร่างกายเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเนยโกโก้มีราคาแพง ทำให้ในปัจจุบันมีการใช้ไขมันทดแทนเนยโกโก้ซึ่งผลิตได้จากไขมันและน้ำมันพืชแหล่งอื่นๆ เช่น palm oil, kokum butter และ shea butter เป็นต้น ทดแทนการใช้เนยโกโก้ที่ผลิตจากเมล็ดโกโก้เพื่อลดต้นทุนในการผลิต (Bernard, 1989; Talbot, 1999) โดยไขมันทดแทนเนยโกโก้จะเป็นไขมันที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ คุณสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิในการตกผลึกและจุดหลอม เหลวใกล้เคียงกับเนยโกโก้ (ณัฐยาบรรณ, 2547)

2.3 ไขมันทดแทนเนยโกโก้

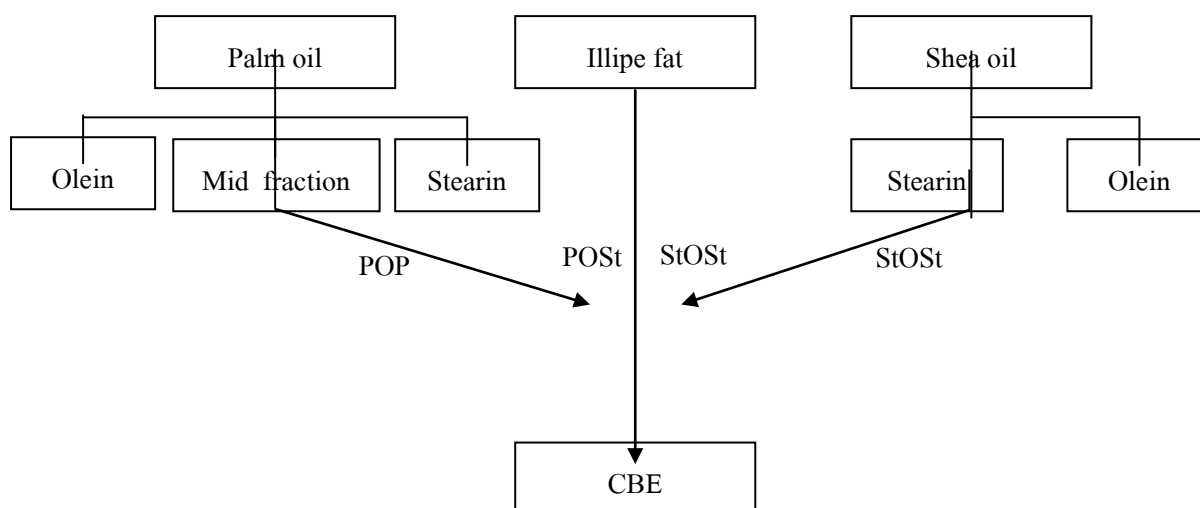
ไขมันทดแทนเนยโกโก้ (Cocoa butter alternatives : CBA) เป็นไขมันที่ใช้ทดแทนเนยโกโก้ในการผลิตช็อกโกแลต เป็นเนยที่มีลักษณะแข็ง (hard butter) และมีคุณสมบัติทางเคมีได้แก่ องค์ประกอบของกรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์และทางกายภาพใกล้เคียงกับเนยโกโก้ ส่งผลให้เกิดการหลอมเหลวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิร่างกายและความคงตัวสูง (Lipp และ Anklem, 1998) โดย Talbot (1999) กล่าวว่า การเลือกแหล่งชนิดของไขมันที่เหมาะสมในการผลิตเนยโกโก้เทียมต้องพิจารณาถึงเหตุผลดังต่อไปนี้

- ◆ ต้องเป็นไขมันที่มีช่วงของการหลอมเหลวที่คล้ายกับเนยโกโก้
- ◆ เป็นไขมันที่ประกอบด้วยชนิดของกรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ที่คล้ายกับเนยโกโก้
- ◆ เป็นไขมันที่เมื่อผสมกับไขมันของเนยโกโก้แล้วสามารถเข้ากันได้
- ◆ เป็นไขมันที่เมื่อผ่านกระบวนการผลิตเป็นช็อกโกแลตต้องมีลักษณะคล้ายกับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเนยโกโก้มาตรฐาน
- ◆ เป็นไขมันที่เมื่อทำการตกผลึกแล้วต้องมีโครงสร้างของผลึกเหมือนเนยโกโก้ในรูป β -form
- ◆ ลักษณะปรากฏและอายุในการเก็บรักษาโดยปราศจาก fat bloom ของผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตที่ประกอบด้วยเนยโกโก้เทียมต้องเหมือนกับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยใช้เนยโกโก้เป็นองค์ประกอบไขมันเพียงอย่างเดียว
- ◆ เป็นไขมันที่ทำให้เกิดความคงตัวของกลั่นที่ดีของผลิตภัณฑ์

2.3.1 ชนิดของไขมันทดแทนเนยโกโก้ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (สุวรรณ, 2543; Lipp และ Anklem, 1998) ดังนี้

1. Cocoa butter equivalents (CBE) เป็นไขมันพืชกลุ่ม non-lauric fat ที่มีคุณสมบัติและสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับเนยโกโก้และสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ทุกสัดส่วนในการผลิตช็อกโกแลตโดยไม่ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพของช็อกโกแลต ได้แก่ การหลอมเหลว คุณลักษณะการไหลเมื่อหลอมละลายและกระบวนการผลิตเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งกฎหมายของทวีปยุโรปอนุญาตให้มีการใช้ CBE ที่ผลิตจากไขมันพืชชนิดต่างๆ เพียง 6 ชนิดเท่านั้นคือ palm oil, illipé fat, sal fat kokum fat, shea oil และ mango kernel เป็นส่วนผสมของช็อกโกแลต (Stewart และ Kristott, 2004) ซึ่งโดยทั่วไปการผลิต CBE สามารถทำได้โดยการตกผลึกแยกส่วน (fractional crystallization) น้ำมันเนื้ปาเล็มหรือสังเคราะห์โดยตรงจากกลีเซอรอลและกรดไขมันที่เลือกแล้ว หรือจากการตกผลึกไขมันจาก Borneo tallow (หรือ Illipe fat) ด้วยอะซีโตน แต่จะมีการผลิตด้วยวิธีนี้น้อย เนื่องจากราคาแพงและไม่ค่อยมีผู้ผลิต ในปัจจุบันใช้วิธีการสังเคราะห์เข้ามาช่วยโดยนำมาดัดแปลงทางเอนไซม์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Tranesterification และ Interesterification โดยปกติการใช้ CBE จะใช้ไม่เกิน 5% ของน้ำหนักผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพื่อให้สอดคล้องกับกฎหมายด้านอาหารของทวีปยุโรปที่ยอมรับให้ผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตสามารถมีส่วนผสมที่เป็นไขมันจากพืชชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่เนยโกโก้ได้ไม่เกิน 5% โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่ถ้าใช้ CBE แทนเนยโกโก้เกินกว่า 5% หรือแทนทั้งหมดจะเรียกผลิตภัณฑ์ว่า supercoating

ตัวอย่างแผนภาพของการผลิต CBE จากน้ำมันจากพืชชนิดต่างๆ ได้แสดงไว้ในภาพที่ 5 โดยแผนภาพจะบ่งบอกให้ทราบถึงแหล่งที่มาของไตรกลีเซอไรด์ที่สำคัญทั้ง 3 ชนิดคือ POP POST และ StOSt ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนยโกโก้และ CBE



ภาพที่ 5 กระบวนการผลิต Cocoa butter equivalents
ที่มา: Talbot (1999)

2. Cocoa butter substitutes (CBS) เป็นไขมันพืชในกลุ่ม lauric fat ที่ได้จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าว โดยกระบวนการตกผลึกแยกส่วนและเติมไฮโดรเจนแล้วทำให้บริสุทธิ์ ทำให้ไขมันที่ได้มีความแข็ง ความรู้สึกเมื่อนำไปเคี้ยวและการปลดปล่อยกลิ่นคล้ายกับเนยโกโก้ เป็นไขมันที่มีกรดลอริกสูงและมีชนิดของไตรกลีเซอไรด์ต่างจากเนยโกโก้ ถ้านำไปผสมกับเนยโกโก้จะทำให้เกิดผลึกหลายโครงสร้างปนกันและจุดหลอมเหลวของส่วนผสมจะลดลงเนื่องจาก eutectic effect จึงไม่ควรใช้ผสมกับเนยโกโก้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แต่คุณสมบัติทางเคมีจะแตกต่างกันจึงสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ 100%

3. Cocoa butter replacers (CBR) เป็นไขมันพืชในกลุ่ม non-lauric fat ที่ได้จากน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันฝ้าย น้ำมันข้าวโพด น้ำมันถั่วลิสง และเมล็ดปาล์ม แล้วนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชั่น และการตกผลึกแยกส่วน การเติมไฮโดรเจนจะทำภายใต้สภาวะที่เลือกไว้เพื่อให้เกิด trans-acid ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มปริมาณของแข็ง ในน้ำมัน CBR ที่เตรียมโดยวิธีนี้จะมีการดปาล์มติด สเตียริก และโอเลอิกเช่นเดียวกับเนยโกโก้ แต่การจัดเรียงสาย hydrocarbon chain ของกรดไขมันโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์จะไม่เหมือนกับของเนยโกโก้จึงทำให้สมบัติทางกายภาพแตกต่างจากเนยโกโก้ ทำให้เมื่อผสมกันกับเนยโกโก้แล้วเมื่อตกผลึกจะเกิดผลึกหลายโครงสร้างปนกันและมีปรากฏการณ์ eutectics เกิดขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะไม่มีควมมันวาวและเกิด fat bloom มาก ไขมันในกลุ่มนี้จึงใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้เพียงเล็กน้อย

2.4 การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้มากมาย วิธีการผลิตก็มีแตกต่างกันไป เช่น กระบวนการอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน (Interesterification) ทั้งแบบเคมีและแบบใช้เอนไซม์ กระบวนการตกผลึกแยกลำดับส่วน (Fractionation) เป็นต้น จนกระทั่งสุดท้ายแล้วได้โครงสร้างที่มีคุณสมบัติต่างๆ คือ คุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ พฤติกรรมการตกผลึก และพฤติกรรมการหลอมเหลว ที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ จึงจะไม่ส่งผลทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติในด้านต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตเมื่อใช้ไขมันดังกล่าวในการผลิตแทนเนยโกโก้ หรือจะไม่ทำให้เกิดปัญหา non-compatibility เมื่อใช้ไขมันดังกล่าวร่วมกับเนยโกโก้ในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต

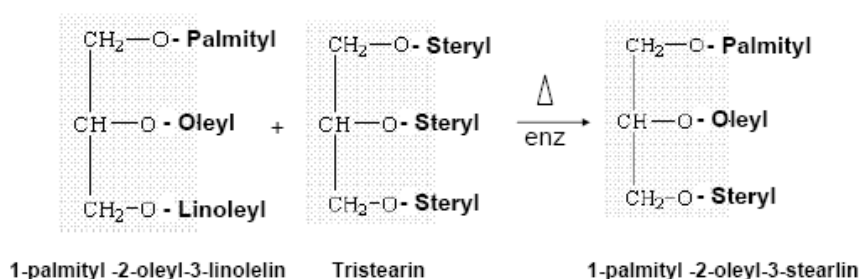
2.4.1 กระบวนการตกผลึกแยกลำดับส่วน (fractionation crystallization) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการตกผลึกไขมันเพียงบางส่วน หลังจากนั้นส่วนที่เป็นของเหลวจะถูกแยกออกจากส่วนที่เป็นผลึกไขมันแข็ง โดยขึ้นอยู่กับความแตกต่างของความสามารถในการละลายของไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นของแข็งในส่วนที่เป็นของเหลว ซึ่งเกี่ยวข้องกับขนาดโมเลกุลและระดับของความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน งานวิจัยของ Zaidul และคณะ (2006) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ Supercritical carbon dioxide (คาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต) ในการสกัดน้ำมันจากน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิและความดันเหมาะสมของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤต จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ทำการแยกไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายสั้น-ปานกลาง (C8-C14) และกรดไขมันสายยาว (C16-C18:2) ออกจากกันโดยกระบวนการ fractionation เพื่อให้เหลือกรดไขมันสายยาวอยู่มาก โดยทำการแยกกรดไขมันสายสั้นและสายยาวปานกลางออกจากโครงสร้าง เพื่อนำมาผลิตเป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด cocoa butter replacer (CBR)

2.4.2 กระบวนการอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน (interesterification) จัดเป็นปฏิกิริยา tranesterification ประเภทที่มีการแลกเปลี่ยนหมู่ acyl ในโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์จากตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง หรือรับหมู่ acyl มาจาก acyl donor เพื่อให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบได้เป็น triglyceride รูปแบบใหม่ (ภาพที่ 6) ซึ่งทำให้สมบัติทางเคมีและกายภาพของไขมันแตกต่างไปจากเดิมตามต้องการ จะเปลี่ยนแปลงมากขึ้นกับองค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของกรดไขมัน และสภาวะที่เหมาะสม ไขมันและน้ำมันที่ผ่านการอินเทอร์เอสเทอริฟายันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การใช้สารเคมี (chemical interesterification) และการใช้เอนไซม์ (enzymatic interesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการดัดแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันหรือไขมัน แล้วทำให้สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของไขมันและน้ำมันแตกต่างจากโครงสร้างเดิม

1. Chemical interesterification เป็นวิธีที่มีการใช้มานานแล้วในอุตสาหกรรมเพื่อดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันและไขมัน (Jeyarani และ Reddy, 2010) จะใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น sodium metal และ sodium alkoxide ซึ่งค่อนข้างจะไม่แพง (Yazdi และ Alemzadeh, 2011) และสามารถใช้ได้สะดวก แต่อย่างไรก็ตามจะพบว่ามีกรุ่มของ fatty acid groups ในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ กระบวนการยังต้องทำในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Kurashige และคณะ, 1993; Foglia และ Villeneuve, 1997)

2. Enzymatic interesterification จะใช้เอนไซม์ lipase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของ acyl groups ในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์มากกว่า (Foglia และ Ville- neuve, 1997; ญัฐยววรรณ, 2547) สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ให้มีรูปแบบของไตรกลีเซอไรด์ใหม่ตามต้องการอย่างรวดเร็ว

ซึ่งการใช้เอนไซม์ไลเปสนี้ช่วยให้มีปริมาณ by-products น้อยกว่าการใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานต่ำ เป็น green process เนื่องจากก่อให้เกิดของเสียที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมในปริมาณต่ำ ราคาถูกและยังสามารถควบคุมผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าด้วย (Xu, 2000) การใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งไตรกลีเซอไรด์ *sn*-1 และ *sn*-3 นั้น เอนไซม์จะไปทำลายพันธะของโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์เฉพาะตำแหน่งที่ 1 และ 3 โดยไม่เปลี่ยนกรดไขมันในตำแหน่ง *sn*-2 ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสชนิดไม่จำเพาะเจาะจงจะตัดแบบสุ่มทุกตำแหน่งของไตรกลีเซอไรด์ ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีชนิดของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ตามที่ต้องการน้อย (Yazdi และ Alemzadeh, 2011)



ภาพที่ 6 ปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอไรด์กับกลีเซอไรด์ หรือเอสเทอร์อื่น

ที่มา: อนรรฆอร (2553)

เนื่องจากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้สารเคมี แม้จะมีต้นทุนน้อย ราคาถูก แต่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนหมู่ acyl แบบสุ่มของกรดไขมันบนโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ รวมทั้งอาจมีสารเคมีเหลืออยู่หลังจากการทำปฏิกิริยา (Yazdi และ Alemzadeh, 2011) จึงส่งผลให้ปัจจุบันการดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันหรือไขมันด้วยวิธีอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์เพื่อการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากจากภาคอุตสาหกรรม (Tchobo และคณะ, 2009)

การทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน อาจไม่จำเป็นต้องใช้ acyl donor ก็ได้ แต่อาจเป็นกระบวนการที่ผสมน้ำมันสองชนิดเข้าด้วยกัน เนื่องจากไขมันหรือน้ำมันแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน บางชนิดมีกรดสเตียริกปริมาณมาก บางชนิดมีกรดปาล์มิติกปริมาณมาก เมื่อนำมาผสมกันแล้วทำปฏิกิริยาก็คouldเกิดการแลกเปลี่ยนกรดไขมันในโครงสร้างด้วยตัวเอง เช่น งานวิจัยของ Yazdi และ Alemzadeh (2009) ทำการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันปาล์มกับน้ำมันดอกทานตะวันด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ โดยที่น้ำมันปาล์มมีปริมาณกรดปาล์มิติกสูง ส่วนน้ำมันดอกทานตะวันมีกรดลิโนเลอิก ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 2 อัน (poly unsaturated fats) เมื่อผสมไขมันทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันจะทำให้ให้น้ำมันปาล์มมีปริมาณกรดไขมันไม่

อิ่มตัว (poly unsaturated fatty acid) มากขึ้น กรดไขมันดังกล่าวมีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ (De Martini Soares และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในทำนองเดียวกันนี้ เช่น การทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสของน้ำมันดอกทานตะวันที่มีปริมาณกรดโอเลอิกสูงกับน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (Adhikari และคณะ, 2009) น้ำมันปาล์มสเตอรินผสมกับน้ำมันรำข้าว (Reshma และคณะ, 2008) น้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชัน ผสมกับน้ำมันเมล็ดเรพ (rapeseed) และน้ำมันดอกทานตะวัน (Farmani และคณะ, 2007) เป็นต้น สุดท้ายแล้วไขมันดัดแปลงที่ได้ออกมาจะมีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปและสามารถนำไปใช้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

2.5 ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน

การดัดแปลงโครงสร้างไขมันเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของไตรกลีเซอไรด์ โดยอาศัยเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเอนไซม์ไลเปสพบได้อย่างกว้างขวางในธรรมชาติ และจะสามารถทำปฏิกิริยาได้ในระบบที่มีน้ำมันและน้ำ (heterogeneous) หรือเรียกกระบวนการนี้ว่า Lipase-catalyzed interesterification มีข้อดีคือสามารถควบคุมปฏิกิริยาได้โดยให้เฉพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง หลังจากเอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยา ไตรกลีเซอไรด์จะถูกไฮโดรไลต์ เป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล (Osborn และ Akoh, 2002) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสประกอบด้วย ปฏิกิริยา hydrolysis (การย่อยสลาย) และปฏิกิริยา esterification (การสังเคราะห์) ดังแสดงในภาพที่ 7 น้ำจะต้องถูกเคลื่อนย้ายออกจากปฏิกิริยา เพื่อลดการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis และเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยา esterification ดังนั้นหากมีปริมาณน้ำในระบบมากเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ อย่างไรก็ตาม น้ำก็ยังคงมีความสำคัญเพื่อที่จะรักษาความสมดุลในการปฏิกิริยา เนื่องจากสนับสนุนการทำงานของเอนไซม์ให้เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ แต่จะต้องรักษาความสมดุลของระบบไว้ด้วย (Silva และคณะ, 2011) จากนั้นไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในระบบจะทำปฏิกิริยาโดยจะมีการแลกเปลี่ยนหมู่ acyl กันเองระหว่างไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งก็คือการเกิดปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน (Gandhi, 1997)

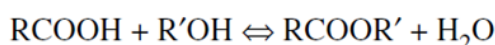
Hydrolysis:



Triglyceride

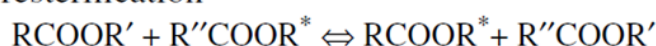
Free fatty acid Glycerol

Esterification



Free fatty acid Glycerol Triglyceride

Interesterification



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน

ที่มา: Gandhi (1997)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันหรือไขมันพืชด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์

2.6.1 ชนิดของ acyl donor

การเลือกใช้ acyl donor ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของไขมันแต่ละชนิด และปริมาณกรดไขมันที่มีอยู่ อย่างเช่น เนยโกโก้ มีปริมาณกรดปาล์มมิก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิกมาก ดังนั้น การผลิตไขมันดัดแปลงควรทำการเติม acyl donor ที่น้ำมันหรือไขมันชนิดนั้นมีปริมาณน้อยเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณกรดไขมันให้ใกล้เคียงกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น ไตรกลีเซอไรด์หลักในน้ำมันมะพร้าวมีปริมาณกรดลอริก กรดไมริสติก และกรดปาล์มมิกมาก จึงมีการเติม stearic acid methyl ester เพื่อเป็น acyl donor ให้กับการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน เป็นการเพิ่มปริมาณกรดสเตียริกกับโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความคงตัวมากขึ้น เป็นไขมันที่แข็งมากขึ้น ซึ่งกรดสเตียริกที่เติมลงไปซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีความจุดหลอมเหลวสูง จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีจุดหลอมเหลวสูงขึ้นด้วย (Rao และคณะ, 2001) การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันเมล็ดชาด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันด้วย methyl stearate และ methyl palmitate เนื่องจากน้ำมันเมล็ดชามีปริมาณกรดปาล์มมิกและกรดสเตียริก 8.26 และ 2.06% ตามลำดับ นับว่ามีปริมาณน้อยจึงต้องมีการเติม acyl donor ทั้งสองชนิด เมื่อทำการเติม acyl donor ที่ให้กรดปาล์มมิกและกรดสเตียริกลงไปแล้ว พบว่าในน้ำมันเมล็ดชามีปริมาณกรดปาล์มมิกและกรดสเตียริกเพิ่มขึ้นเป็น 31.43 และ 29.26 ตามลำดับ (Wang และคณะ, 2006) การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันมะกอก (Refined olive pomace oil) โดยเป็นการทำปฏิกิริยา acidolysis ของน้ำมันมะกอกกับ กรดปาล์มมิก และกรดสเตียริก เนื่องจากน้ำมันมะกอกมีปริมาณกรดปาล์มมิกและกรดสเตียริกเพียง 13.00 และ 3.00% ตามลำดับ และมีปริมาณ POP POST และ StOst 1.1 1.05 และ 1.2% ตามลำดับ ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยาแล้วมีปริมาณ POP POST และ StOst เพิ่มขึ้นเป็น 10.9 19.7 และ 11.2% ตามลำดับ (Ciftci และคณะ, 2009)

งานวิจัยก่อนหน้านี้มีทั้งที่เลือกใช้ acyl donor ที่เป็นกรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ของเมทิลหรือเอทิล (methyl ester หรือ ethyl ester) และกรดไขมันอิสระ อย่างไรก็ตามความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ acyl donor ขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันและสภาวะที่ทำการศึกษาค้นคว้าด้วย

2.6.2 ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

การทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน สารตั้งต้นที่ใช้ควรจะมีสัดส่วนที่เหมาะสม เพราะหากมีสัดส่วนไม่เหมาะสมจะส่งผลกระทบต่อสารตั้งต้นไม่ว่าจะเป็นน้ำมันหรือ acyl donor เหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยา ส่งผลให้ไขมันดัดแปลงที่ได้มีประสิทธิภาพที่ไม่ดีเนื่องจากมีปริมาณกรดไขมันอิสระเหลืออยู่ รวมทั้งยังส่งผลกระทบต่อปริมาณ yield ที่ได้อีกด้วย

Abigor และคณะ (2003) ทำการศึกษากการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันปาล์มที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ฟอกสี และขจัดกลิ่น (Refined, bleached and deodorized: RBD-PO) และน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (hydrogenated soybean oil: HSO) โดยสัดส่วนของน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันถั่วเหลืองโดยน้ำหนัก คือ 3:1 1.6:1 1:1 1:1.6 และ 1:3 ตามลำดับ เตรียมตัวอย่างจากสารตั้งต้นทั้งหมด 3 กรัม หลังจากให้ความร้อนไปแล้วเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 70 °C จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสตรังรูป (ผลิตจากเชื้อ *Rhizomucor miehei*) ลงไป 10% โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น ทำปฏิกิริยาต่อไปที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยการกวน

ปั่นด้วยความถี่ 200 rpm จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC) และวิเคราะห์โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ด้วยเทคนิค High performance chromatography (HPLC)

องค์ประกอบของกรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำมันปาล์มก่อนการดัดแปลงมีกรดโอเลอิก (C18:1) และ กรดปาล์มิติก (C16:0) เป็นกรดไขมันชนิดหลัก เนื่องจากมีปริมาณมากถึง 39.9% และ 45.8% ตามลำดับ ส่วนในน้ำมันถั่วเหลือง มีกรดไขมันหลัก คือ กรดสเตียริก มีมากถึง 83.9% และเนยโกโก้ ที่นำมาศึกษาที่มีปริมาณของกรดไขมัน ซึ่งประกอบด้วยกรดปาล์มิติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิก 25.2% 35.5% และ 35.2% ตามลำดับ ในน้ำมันที่ผ่านการดัดแปลงพบว่าที่สัดส่วนของน้ำ มันปาล์ม ต่อน้ำมันถั่วเหลือง 1.6 : 1 มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็ง เนื่องจากมีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็น องค์ประกอบถึง 1 ใน 4 ของกรดไขมันส่วนใหญ่ที่สนใจ รวมทั้งยังมีกรดโอเลอิกปริมาณมากที่สุด ดัง แสดงในตารางที่ 6 สอดคล้องกับเนยโกโก้ซึ่งจะต้องมีปริมาณกรดโอเลอิกปริมาณมากเช่นกัน อย่างไรก็ตาม กรดไขมันที่ศึกษาได้จะอยู่ตามตำแหน่งต่างๆบนโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ ต้องการปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่เหมือนกับเนยโกโก้ เพื่อเป็น หลักฐานในการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะทางเคมีที่คล้ายกับเนยโกโก้จริง

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของกรดไขมันในเนยโกโก้ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมัน ปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน

	FA (%) ^{b,c}				
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
PO	1.6	39.9	7.3	45.8	5.4
HSO	—	16.1	83.9	—	—
CB	0.7	25.2	35.5	35.2	3.2 ^a
B ₁ (3:1)	0.9 ^a	31.7 ^a	32.2 ^a	18.6 ^a	1.6 ^b
B ₂ (1.6:1)	0.9 ^a	32.2 ^b	38.5 ^b	23.8 ^b	2.3 ^c
B ₃ (1:1)	0.7 ^b	28.2 ^c	48.8 ^c	20.4 ^c	2.2 ^c
B ₄ (1:1.6)	0.6 ^b	25.5 ^d	58.8 ^d	13.8 ^d	1.3 ^d
B ₅ (1:3)	0.4 ^c	19.5 ^e	70.1 ^e	6.7 ^e	—

ที่มา: Abigor และคณะ (2003)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ในโครงสร้างเนยโกโก้และน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันถั่วเหลืองดัดแปลงที่ผ่านกระบวนการอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน

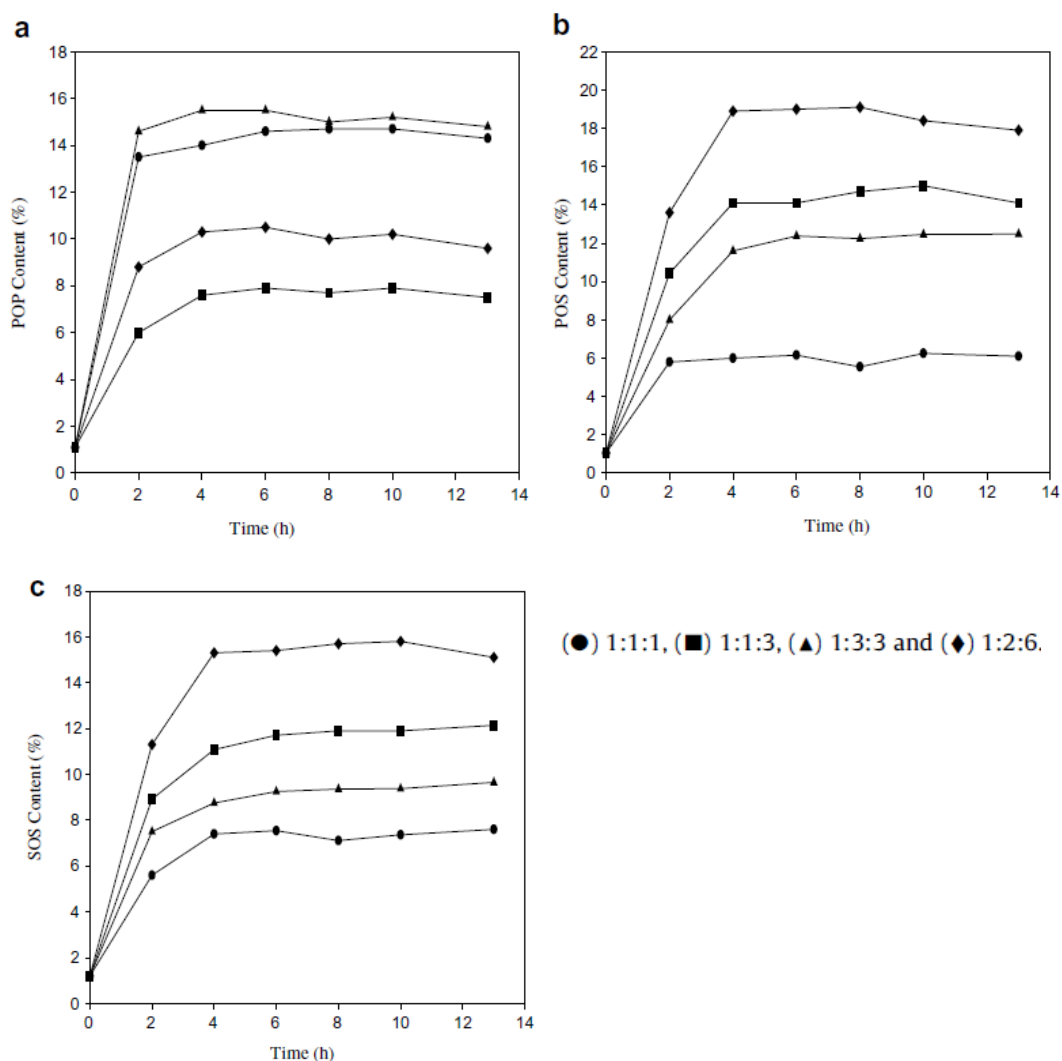
Sample ^a	RBD-PO/HSO Ratio ^b	TAG ^{c,d} (wt%)		
		POP	POS	SOS
B ₁	3:1	14 ^a	33 ^a	11 ^a
B ₂	1.6:1	11 ^a	39 ^b	23 ^b
B ₃	1:1	6 ^b	35 ^a	31 ^c
B ₄	1:1.6	3 ^c	30 ^c	37 ^d
B ₅	1:3	1 ^c	16 ^d	42 ^e
Cocoa butter	—	17	45	31

ที่มา: Abigor และคณะ (2003)

จากตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันถั่วเหลือง 1.6:1 ที่ผ่านการดัดแปลงจะมีปริมาณของ POP POST และ StOST เป็น 11 39 และ 23% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ POP POST และ StOST ของเนยโกโก้ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ 17 45 และ 31% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า น้ำมันปาล์มต่อน้ำมันถั่วเหลือง 1.6:1 เหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้

การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันมะกอก โดยทำปฏิกิริยา Lipase-catalyzed acidolysis ของน้ำมันมะกอกกับกรดปาล์มิติก และกรดสเตียริกที่มีอัตราส่วนโดยโมลของน้ำมันมะกอก:กรดปาล์มิติก: กรดสเตียริก คือ 1:1:1 1:1:3 1:3:3 และ 1:2:6 ปริมาณของ POP POST และ StOST มีปริมาณมากขึ้นจนกระทั่ง 4 ชั่วโมง ระยะเวลาหลังจากนั้นมีค่าคงที่ จากภาพที่ 8 พบว่าอัตราส่วนของสารตั้งต้น 1:2:6 มีปริมาณของ POS และ SOS มากที่สุด อัตราส่วนของสารตั้งต้น 1:3:3 มีปริมาณ POP มากที่สุด แต่เนื่องจากว่าการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ดี จะต้องทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนของไตรกลีเซอไรด์ที่สำคัญทั้ง 3 ชนิด นั่นคือ POP POST และ StOST ให้คล้ายกับเนยโกโก้มากที่สุด

น้ำมันมะกอกก่อนทำการดัดแปลงมีปริมาณ POP POST และ StOST เพียง 1.1 1.05 และ 1.2% ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเนยโกโก้ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ มี POP POST และ StOST 18.9 33.1 และ 24.7% ตามลำดับ น้ำมันมะกอกดัดแปลงที่อัตราส่วนสารตั้งต้น 1:1:3 ทำให้มีองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์เปลี่ยนแปลงไป คือ มีปริมาณ POP POST และ StOST เพิ่มขึ้น เป็น 7.6 14.1 และ 11% ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของ acyl donor เป็น 2 เท่าจากสัดส่วนเดิม 1:3 ไปเป็น 2:6 ในขณะที่ใช้น้ำมันมะกอกในปริมาณเท่าเดิม พบว่าให้ปริมาณ POP POST และ StOST ที่เหมาะสมยิ่งขึ้น คือ 10.5 19 และ 13.5% ตามลำดับ ทั้งนี้ Ciftci และคณะ (2009) ยังได้กล่าวไว้ว่า หากทำการทดลองต่อไปโดยใช้ปริมาณ acyl donor ที่สูงกว่าอัตราส่วนดังกล่าว เช่น 1:3:9 หรือ 1:4:12 อาจจะทำให้ได้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น แต่นั่นเป็นการเพิ่มต้นทุนให้กับอุตสาหกรรมในเชิงของเศรษฐกิจ



ภาพที่ 8 ปริมาณร้อยละของ POP (a) POST (b) และ StOST (c) ที่ได้จากการดัดแปลงน้ำมันมะกอก : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก ที่สัดส่วนต่างๆ
ที่มา: Ciftci และคณะ (2009)

2.6.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

งานวิจัยของ Jeyarani และ Reddy (2010) ทำการศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันผสมระหว่าง น้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum ด้วยปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน เพื่อดัดแปลงโครงสร้างให้คล้ายคลึงกับไขมันที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจีเนชันที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมอาหารหรือเบเกอรี่

ไขมัน kokum เป็นไขมันแข็งที่มีปริมาณกรดสเตียริกสูงประมาณ 62% และน้ำมัน mahua เป็นไขมันกึ่งของแข็ง ประมาณ 50% เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน mahua ไขมัน kokum และน้ำมันผสม

Fatty acids	kokum fat(K)	Mahua oil (M)	1:1 M: K blend
C14:0	0	0.2	0
C16:0	1.6	24.4	13.2
C18:0	62.0	25.5	44.1
C18:1	35.6	34.4	34.3
C18:2	0.4	15.0	7.7
C20:0	0	0.6	0
Σ SFA ^a	63.6	50.7	57.3
Σ USFA ^b	36.0	49.4	42.0
Slip melting point (°C)	43.0	31.0	36.5

ที่มา: Jeyarani และ Reddy (2010)

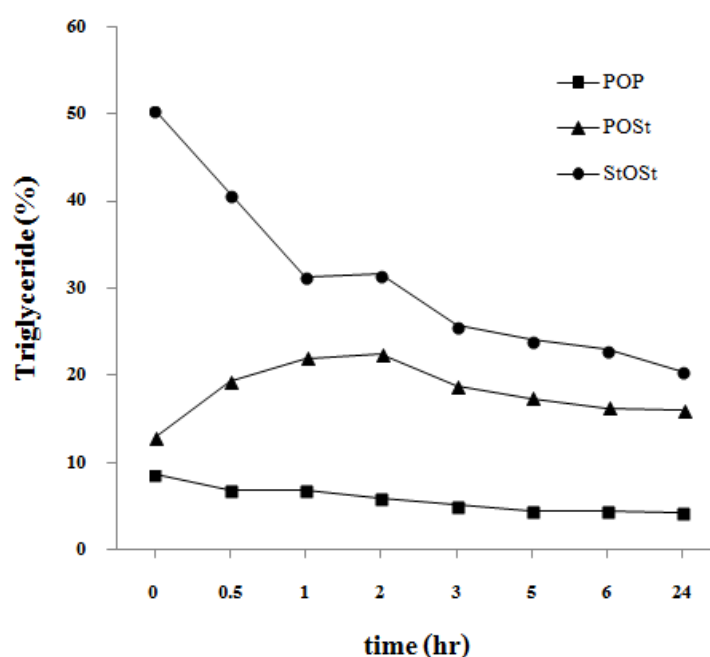
การผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum แล้วทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่เฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่ง *sn*-1,3 ซึ่งอยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) จากเชื้อ *Thermocycles lanuginosus* โดยมีส่วนผสมของน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum เป็นสัดส่วน 50:50 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 10 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ (Conical flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำมัน hexane 2 มิลลิลิตร และเอนไซม์ไลเปส 1 กรัม (10% ของน้ำหนักสารตั้งต้น) นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าสาร (orbital shaker) ที่มีน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°C ไหลวน ความเร็วรอบของการหมุน 200 rpm ทำการเก็บตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 30 นาที 1 2 3 5 6 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการทำปฏิกิริยาผ่านไปตามเวลาที่กำหนดจะทำการเก็บตัวอย่างแล้วค่อยๆเทตัวอย่างผ่าน anhydrous sodium sulphate เพื่อกำจัดเอนไซม์และความชื้นที่เหลืออยู่ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไประเหย hexane ออก

การใช้สารตั้งต้นในปริมาณที่เท่ากัน แต่ใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกันมีผลทำให้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน ส่งผลทำให้โครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์ก็มีปริมาณแตกต่างกันด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2 โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ที่สนใจ คือ POP, POST และ StOST จะเห็นได้ว่า StOST มีปริมาณลดลง เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้น ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง จะทำให้มีปริมาณ POST มากที่สุด คือ 22.4% ขององค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่สนใจ ในขณะที่ StOST และ POP ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้นแสดงว่าชั่วโมงที่ 2 เหมาะสมที่สุด หากต้องการนำไขมันผสมที่นำมาดัดแปลงมาผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ เพื่อที่จะเปรียบเทียบให้ง่ายขึ้น จึงนำข้อมูลบางส่วนจากตารางที่ 9 มาพล็อตเป็นกราฟ ดังภาพที่ 9

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน
ของการผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum ที่เวลาต่างกัน

Interesterified for	StStSt	PStSt	PPSt	StOSt	POSt	POP	POO	StOO	OOO	PLO/PPL
0 h	0.6	0	0.3	50.4	12.9	8.6	7.6	6.6	1.9	6.5
30 min	1	0.6	0.3	40.8	19.3	6.9	9.3	12.1	1.7	4.2
1 h	1.9	1.9	0.6	31.3	22	6.8	10.9	15.1	1.7	4.0
2 h	2.3	2.1	0.8	31.6	22.4	6	12	14.8	1.1	3.8
3 h	3.1	2.8	0.8	25.7	18.8	5.1	11.3	16.2	1.6	3.4
5 h	4.3	3.9	1.1	24.1	17.4	4.4	10.5	15.6	2.5	3.0
6 h	4.7	4.7	1.2	23	16.3	4.5	10	15	2.6	3.1
24 h	7.3	6.3	1.8	20.5	16	4.2	11.9	15.3	3.3	3.5

หมายเหตุ P คือ กรดปาล์มติก O คือ กรดโอเลอิก St คือ กรดสเตียริก L คือ กรดลิโนเลอิก
ที่มา: Jeyarani และ Reddy (2010)



ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ของการผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน
ที่มา: Jeyarani และ Reddy (2010)

งานวิจัยของ Pinyaphong และ Phutrakul (2009) ศึกษาผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากมะละกอ คือ *Carica papaya lipase* มาใช้ในการทำปฏิกิริยา สารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม

2 มิลลิโมล methyl stearate 4 มิลลิโมล *Carica papaya lipase* 0.5 กรัม ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45°C เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ 0 4 8 และ 24 ชั่วโมง

ในการศึกษานี้จะทำการเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดสเตียริก และกรดปาล์มิติก จากการเปรียบเทียบน้ำหนักร้อยละโดยโมลของกรดไขมันที่สำคัญในเนยโกโก้ คือ กรดปาล์มิติก 24.4%, กรดสเตียริก 33.6% และกรดโอเลอิก 37% ซึ่งปริมาณของกรดสเตียริก ต่อ กรดปาล์มิติก เป็นสัดส่วน 1.3 : 1.0 ดังนั้นปฏิกิริยาที่มีสัดส่วนของกรดไขมันคล้ายสัดส่วนดังกล่าวสามารถนำมาผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ได้

หลังจากทำปฏิกิริยานำน้ำมันดัดแปลงที่ได้ไปหาปริมาณกรดไขมัน เช่น กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก โดย gas chromatography ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาแล้ว 4 ชั่วโมง จะให้ปริมาณสัดส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มิติก เป็นสัดส่วน 1.3 : 1.0 จึงเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดไขมันของน้ำมันปาล์มดัดแปลงจากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันที่ระยะเวลาต่างๆ

reaction time (h)	Fatty acid (%)				ratio of S:P
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	
0	40.8	1.6	48.1	9.5	0.04 : 1
4	26.9	36.8	30.4	5.9	1.3 : 1
8	24.4	39.3	31.5	4.9	1.6 : 1
24	19.4	44.3	30.1	0.2	2.3 : 1

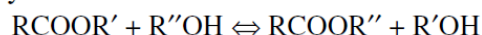
ที่มา: Pinyapong และ Phutrakul (2009)

จากงานวิจัยที่ได้ยกตัวอย่างมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เวลาเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันเพื่อผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ การใช้เวลาที่น้อยลงจะส่งผลทำให้ใช้ต้นทุนและพลังงานต่ำลง แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของไขมันที่ได้หลังจากดัดแปลงให้มีลักษณะทางเคมีและทางกายภาพตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการมากที่สุด

2.6.4 ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

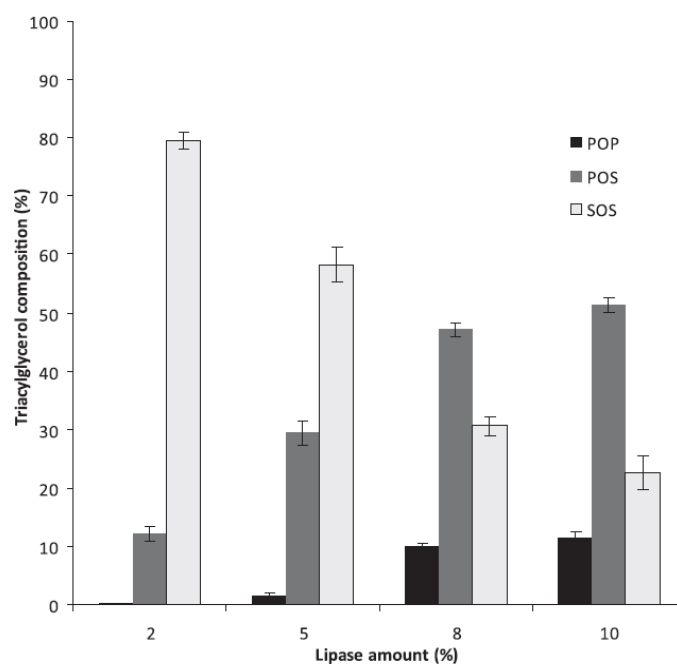
งานวิจัยของ Tchobo และคณะ (2009) ทำการศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBE จาก *Pentadesma butyacea* butter โดยใช้ ethyl palmitate ด้วยปฏิกิริยา Enzymatic transesterification ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาของ transesterification คือการเกิดปฏิกิริยาของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ แล้วแลกเปลี่ยนหมู่ acyl เพื่อให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์แบบใหม่ขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เป็น 2 5 8 และ 10% พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นก่อให้เกิดอัตราการทำปฏิกิริยา transesterification มากขึ้น (ภาพที่ 11) แต่เอนไซม์ 8% ขึ้นไปโดยน้ำหนักไม่มีผลกระทบต่อองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ แต่การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่น้อยจะเป็นการลดต้นทุนในการผลิต CBE

Alcoholysis



ภาพที่ 10 การเกิดปฏิกิริยา Alcoholysis

ที่มา: Gandhi (1997)

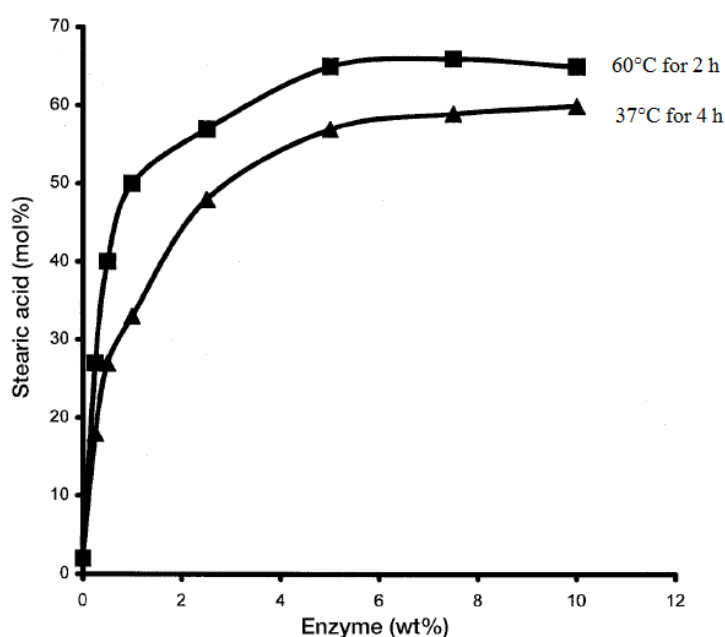


ภาพที่ 11 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Enzymatic transesterification ของ *Pentadesma butyracea* butter โดยใช้เอนไซม์ปริมาณต่างๆ

ที่มา: Tchobo และคณะ (2009)

การดัดแปลงโครงสร้างน้ำมันมะพร้าวด้วยปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยการเติมกรดสเตียริกลงไป เพื่อปรับปรุงให้น้ำมันมะพร้าวมีจุดหลอมเหลวสูงขึ้น เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการทำปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง หรือ 60°C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อัตราส่วน 1:6 โดยโมล ผลปรากฏว่าการใช้เอนไซม์ปริมาณ 5 8 และ 10% ส่งผลทำให้ปริมาณของกรดสเตียริกที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12)

ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชัน จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณองค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ หากใช้เอนไซม์ปริมาณมากขึ้นอาจส่งผลทำให้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์จึงต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตด้วย

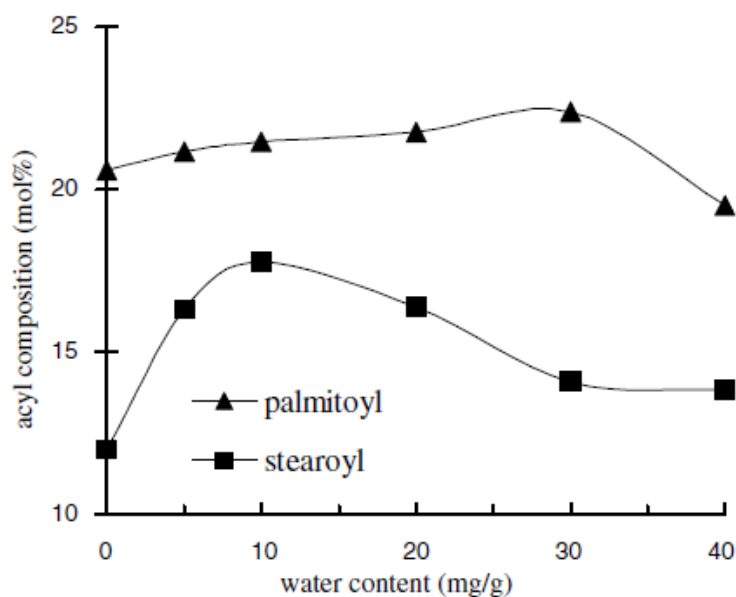


ภาพที่ 12 ปริมาณกรดสเตียริกที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันของน้ำมันมะพร้าวโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ

ที่มา: Rao และคณะ (2001)

2.6.5 ค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์

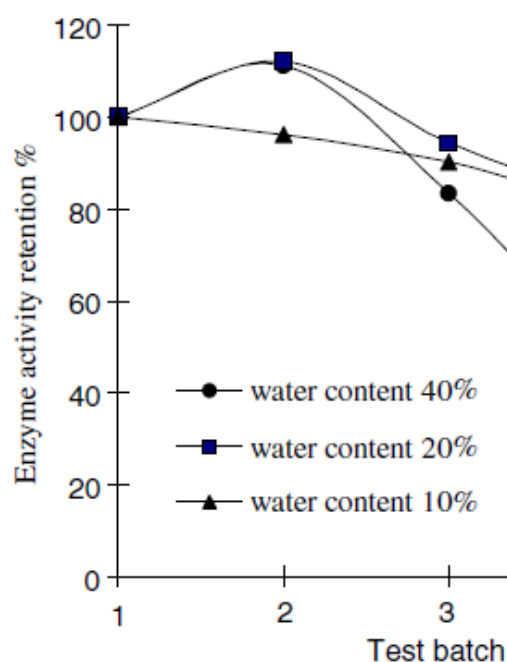
งานวิจัยของ Wang และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้โดยการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดชา และกรดไขมันในรูปของเอสเทอร์ (Fatty acid methyl esters) โดยสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย methyl stearate 1.2 กรัม methyl palmitate 5.24 กรัม และน้ำมันเมล็ดชา 2.24 กรัม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูป (จาก Porcine pancreas lipase) 1.2 กรัม ทำปฏิกิริยาโดยการกวนตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำการศึกษาผลของปริมาณน้ำของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา 5, 10, 20, 30 และ 40 mg/g ของสารตั้งต้น พบว่า ปริมาณน้ำเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ ปริมาณน้ำที่มากจะส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสไม่เสถียร และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด by-product เช่น ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ ในภาพที่ 13 ปริมาณน้ำเริ่มต้นในเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเกิดกรดปาล์มิติกและกรดสเตียริกในโครงสร้างแตกต่างกัน ยิ่งเอนไซม์มีปริมาณน้ำมากจะทำให้โครงสร้างของไขมันมีกรดปาล์มิติกมาก เอนไซม์ที่มีปริมาณน้ำ 30 mg/g ของสารตั้งต้น จะทำให้มีกรดปาล์มิติกมากที่สุด แต่การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีปริมาณน้ำ 10 และ 30 mg/g ของสารตั้งต้น ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณของกรดสเตียริกจะมีปริมาณมาก เมื่อเอนไซม์มีปริมาณน้ำ 10 mg/g ของสารตั้งต้น เพื่อหลีกเลี่ยง by-product ที่จะเกิดขึ้นจึงเลือกใช้เอนไซม์ที่มีปริมาณ a_w เริ่มต้น 10 mg/g ของสารตั้งต้นในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้



ภาพที่ 13 ปริมาณของกรดปาล์มิติกและกรดสเตียริกที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดชาโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ

ที่มา: Wang และคณะ (2006)

นอกจากนี้ Wang และคณะ (2006) ยังได้ทำการศึกษาผลของปริมาณ a_w เริ่มต้นในเอนไซม์ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส เมื่อนำมาใช้หลังจากทำปฏิกิริยา 5 ชั่วโมง เเคราะห์ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่ยังเหลืออยู่ของเอนไซม์ไลเปสตรงรูป เอนไซม์ไลเปสที่มีปริมาณ a_w เริ่มต้น 10% มีประสิทธิภาพ 83.5% หลังจากถูกใช้ไปแล้ว 5 ชั่วโมง แต่เอนไซม์ไลเปสที่มีปริมาณ a_w เริ่มต้น 40% สามารถรักษาประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไว้ได้เพียง 19.37% หลังจากถูกใช้ไปแล้ว 5 ชั่วโมงเช่นกัน (ภาพที่ 14) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณความชื้นเริ่มต้นของเอนไซม์ที่มากขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน ซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์



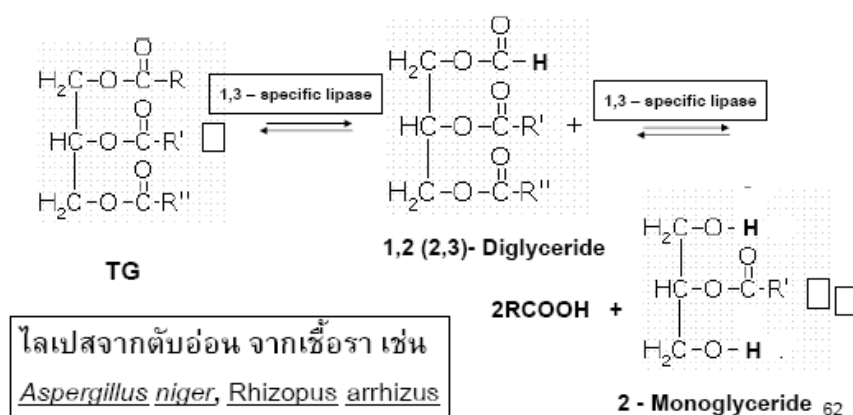
ภาพที่ 14 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่มีค่า a_w เริ่มต้นต่างๆ หลังจากถูกใช้ในแต่ละครั้ง
ที่มา: Wang และคณะ (2006)

2.7 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไขมันและน้ำมันในสภาวะที่มีน้ำ มีชื่อตามระบบว่ากลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) และมีชื่อตามรหัสคือ EC.3.1.1.3 พบทั้งในคน สัตว์ และในปัจจุบันมีการสกัดไลเปสจากจุลินทรีย์ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสนี้มี 2 ลักษณะใหญ่ๆดังนี้ (ปราณี, 2547)

1. ไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3 – specific lipase)

ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์
ที่มา: อนรรฆอร (2553)

2. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (non – specific lipase) ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์
ที่มา: อนุสรณ์ (2553)

โดยทั่วไปแล้วมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ (นิธิยา , 2548) ตัวอย่างเช่น

1. อุณหภูมิ เนื่องจากอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะแปรผันตามอุณหภูมิ และอุณหภูมิยังมีความคงตัวของเอนไซม์ หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และมีผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไปด้วย เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum pH) สำหรับเร่งปฏิกิริยาให้ได้ความเร็วสูงสุด และเอนไซม์จะสูญเสีย Activity มากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม

2. ความเข้มข้นของสารตั้งต้นของปฏิกิริยา ในปฏิกิริยาที่มีสารตั้งต้นเพียงชนิดเดียว เมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพิ่มขึ้น จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีความเร็วสูงสุด หากเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ และหากความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงเกินไปอาจจะไปยับยั้งอัตราเร็วของปฏิกิริยาให้ช้าลงได้

3. ความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่สภาวะความเข้มข้นของสารตั้งต้น pH อุณหภูมิ และบัฟเฟอร์ที่ใช้คงที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ต้องไม่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อยู่ด้วย

4. ค่าความเป็นกรดต่าง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายโปรตีนจะมีผลต่อประจุที่เกิดขึ้นบนโมเลกุลของโปรตีน จึงมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย โดยเฉพาะที่บริเวณ Active site ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สารตั้งต้นจะเข้ารวมตัวกับเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจึงมีค่า pH ที่เหมาะสม สำหรับเร่งปฏิกิริยาให้ได้ความเร็วสูงสุด เสมอ หากค่า pH ของสารละลายสูงหรือต่ำกว่าค่า pH ที่เหมาะสม จะทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าลง แต่มีเอนไซม์บางชนิดที่มีค่า pH ที่เหมาะสมเป็นช่วงกว้าง

5. ปริมาณน้ำ น้ำจะทำให้การทำงานของเอนไซม์เกิดได้ดี ดังนั้นจึงต้องทำงานในสภาวะที่สารละลายเป็นน้ำ

เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) ซึ่งจะได้ประโยชน์และคุ้มทุนเมื่อเทียบกับหน่วยกว่าเอนไซม์อิสระ (Pinyaphong และ Phutrakul, 2009; Undurraga และคณะ, 2001) เอนไซม์ตรึงรูปเป็นเอนไซม์

ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมข้ามพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ละลายเลย มีผลทำให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalyst) อาจเรียกได้หลายแบบ เช่น เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized Enzymes) เอนไซม์ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble enzymes) เอนไซม์ยึดรูป (fixed enzymes) (นิธิยา, 2549) ซึ่ง Kennedy และ Cabral (1987) ได้ให้ความหมายไว้ว่าเอนไซม์ที่ถูกจำกัดทางรูปร่างหรือทำให้จำเพาะอยู่เฉพาะบริเวณที่มีขอบเขตที่แน่นอนในช่องว่างร่วมกับการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้และใช้ได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสอิสระมีประสิทธิภาพการทำงานต่ำมากในการละลายสารอินทรีย์ ซึ่งเกิด closed lid ในโมเลกุลของเอนไซม์ที่ไม่มีผิว หน้าที่อยู่ระหว่างน้ำกับน้ำมัน ทำให้ substrate เข้าจับบริเวณ active site ได้ยาก จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากสำหรับการทำปฏิกิริยา (Maruyama และคณะ, 2000)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้เพื่อให้เกิดคุณค่าทางโภชนาการและลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ (Sharma และคณะ, 2001) ตัวอย่างเช่น Chong และคณะ (1992) ได้ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Mucor michei* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่มีความจำเพาะตำแหน่ง 1,3 ของน้ำมันปาล์มโอเลอิน ทำให้ได้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์หลักคือ POST, POP และ StOST และจุดหลอมเหลวคือ 38.4°C ซึ่งใกล้เคียงกับเนยโกโก้ Wang และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด cocoa butter equivalent จากน้ำมันเมล็ดชาผสมกับ methyl esters ด้วยกระบวนการอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมูพบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วมีปริมาณกรดไขมันใกล้เคียงกับเนยโกโก้ คือ Palmitoyl 31.43% (mol), Oleoyl 35.30% (mol), Stearoyl 29.26% (mol) Undurraga และคณะ (2001) ได้ผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จาก palm oil midfraction ที่ได้จากการทำ double fractionation ของน้ำมันปาล์ม ประกอบไปด้วย POP 73%, POST 13%, StOST 2% และไตรกลีเซอไรด์ชนิดอื่นๆ 12% ผสมกับ กรดสเตียริกและดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส (Novo lipase LipozymeTM) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตรึงรูปบนแผ่นเรซิน macroporous anionic exchange ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันในสถานะที่ไม่มีตัวทำละลายพบว่าเมื่อพิจารณารูปแบบการหลอมเหลวแล้ว น้ำมันปาล์มดัดแปรจะถูกละลายหมดที่อุณหภูมิประมาณ 32°C ในขณะที่ไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ผลิตได้จะมีช่วงการหลอมเหลวที่ประมาณ 23-39°C เมื่อเทียบจุดหลอมเหลวของเนยโกโก้จะอยู่ในช่วง 22-36°C ณัฐยาวรรณ (2547) ได้ศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันปาล์มผสมระหว่างปาล์มโอเลอินและปาล์มสเตียรีนในอัตราส่วน 40:60 โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า Lipozyme IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ในถังหมักแบบ Stirred Tank Fermentor ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเป็นสถานะที่เหมาะสมโดยไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ได้มีรูปแบบการหลอมเหลว จุดหลอมเหลว และปริมาณไขมันแข็งใกล้เคียงกับเนยโกโก้มากที่สุด โดยเนยโกโก้เทียมมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 37-40°C ในขณะที่เนยโกโก้มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 35-38°C Pinyaphong และ Phutrakul (2009) ผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันปาล์มร่วมกับ methyl stearate โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ (*Carica papaya*) (CPL) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ซึ่งเอนไซม์ *C. papa-*

ya มีศักยภาพเป็น biocatalyst ในการเปลี่ยนแปลงไขมัน เช่น การดัดแปลงไขมันนม และการสังเคราะห์โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ที่ใช้พลังงานต่ำ จึงคิดว่าจะสามารถใช้เป็น biocatalyst ราคาถูกสำหรับการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ได้ นอกจากนั้น Tchobo และคณะ (2009) ผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จาก *Pentadesma butyracea butte* ร่วมกับ ethyl pamate ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจากเชื้อ *Thermomyces lanuginose* งานวิจัยของ Khumolo และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษการดัดแปรโครงสร้างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันสกัดจากเมล็ด *strychnos madagascariensis* เมล็ด *trichelia emetica* และเมล็ด *ximenia caffra* โดยใช้เอนไซม์ lipase จากเชื้อ *Rhizomucor michiei* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ที่มีความจำเพาะของเอนไซม์ lipase ที่ตำแหน่ง 1,3 เพื่อช่วยในการรวมกันของ stearic acid และ palmitic acid พบว่า น้ำมันจาก *strychnos madagascariensis* และ *ximenia caffra* เมื่อถูกดัดแปรแล้วปริมาณของกรดปาล์มติก กรดสเตียริก และกรดโอเลอิกใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ แต่ น้ำมันจาก *trichelia emetic* ให้กรดโอเลอิกต่ำกว่าเนยโกโก้มาก ซึ่งน้ำมันจาก *strychnos madagas- cariensis* และ *ximenia caffra* เหมาะจะใช้ผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ เนื่องจากมีกรดโอเลอิกสูง Jeyarani และ Reddy (2010) ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันผสมระหว่าง mahua และ kokum ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส (Lipozyme TL IM) ที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1,3 ในการทำปฏิกิริยา Abigor และคณะ (2003) ได้ศึกษาการผลิต cocoa butter-like fats จากน้ำมันปาล์มที่ผ่านการฟอกสี ขจัดกลิ่นแล้ว (RBD-PO) ผสมกับน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านการทำ hydrogenation (HSO) ด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1.6:1 (ปาล์ม:ถั่วเหลือง) จะทำให้ไขมันทดแทนเนยโกโก้มีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีใกล้เคียงเนยโกโก้ และ Ciftci และคณะ (2009) ได้ศึกษาการผลิต cocoa butter-like fats จากน้ำมันมะกอกรวมกับกรดสเตียริกและกรดปาล์มมิก ด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป Lipozyme IM เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาด้วยเช่นกัน

2.8 คุณสมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมัน

คุณสมบัติทางกายภาพของไขมันและน้ำมันมีความสัมพันธ์โดยตรงกับองค์ประกอบทางเคมีในโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ของไขมันหรือน้ำมัน ใช้ในการจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดของไขมันหรือน้ำมัน รวมทั้งการนำไปใช้ประโยชน์ด้วย ตัวอย่างสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของไขมันหรือน้ำมัน ได้แก่

2.8.1 จุดหลอมเหลว (Melting point) หรืออุณหภูมิที่ทำให้ไขมันเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลวจนหมด ไขมันส่วนใหญ่มีจุดหลอมเหลวเป็นช่วงอุณหภูมิ อาจเป็นช่วงกว้างหรือแคบขึ้นอยู่กับชนิดของไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของไขมันหรือน้ำมันชนิดนั้น เช่น ไขมันที่ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ชนิดเดียวกันทั้งหมดจะมีจุดหลอมเหลวที่แน่นอน จุดหลอมเหลวของไขมันและน้ำมันจะสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับจุดหลอมเหลวของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล จุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลน้อยกว่า 10 อะตอม จะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อมีจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้นจะเป็นของแข็งมากขึ้น ดังนั้นจุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมันเพิ่มขึ้น และจุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะลดลงเมื่อมีจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน

เพิ่มขึ้น จุดหลอมเหลวของไตรกลีเซอไรด์บางชนิดแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งจะเห็นได้ว่าไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันชนิดเดียวกันเป็นองค์ประกอบ แต่มีการเรียงตัวที่ตำแหน่งที่ต่างกัน ก็มีผลทำให้จุดหลอมเหลวต่างกันด้วย (นิธิยา, 2548)

ตารางที่ 11 จุดหลอมเหลวของกรดไขมันชนิดต่างๆ

ชนิดของกรดไขมัน	จำนวนคาร์บอน : พันธะคู่	จุดหลอมเหลว(°C)
กรดไขมันชนิดอิ่มตัว		
กรดคาพริก	10:0	31.3-31.6
กรดลอริก	12:0	44.0-44.2
กรดไมริสติก	14:0	53.9-54.4
กรดปาล์มติก	16:0	62.7-63.1
กรดสเตียริก	18:0	69.6
กรดอะราคิติก	20:0	75.4-76.5
กรดปีฮีนิก	22:0	80.0-81.5
กรดลิโนเซริก	24:0	84.2-86.0
กรดซีโรติก	26:0	87.7-88.5
กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว		
กรดปาล์มิโตเลอิก	16:1	0-0.5
กรดโอเลอิก	18:1	10.5-16.0
กรดลิโนเลอิก	18:2	-5.0
กรดลิโนเลนิก	18:3	-11.0
กรดอะราคิโดนิก	18:4	-49.5

ที่มา: Hadziyev (1987), Mathews และ van Holde (1990) และ Coultate (1999) อ้างอิงใน นิธิยา รัตนูปนนท์ (2548)

ตารางที่ 12 จุดหลอมเหลวของไตรกลีเซอไรด์บางชนิด

ชนิดของไตรกลีเซอไรด์	จุดหลอมเหลว (°C)
Trisaturated	
Tristearin (StStSt)	73
Tripalmitin (PPP)	66
Stearo-dipalmitin (SPP)	62
Disaturated	
Palmito-oleo-palmitin (POP)	37
Palmito-oleo-stearin (POSt)	37
Oleo-dipalmitin (OPP)	34
Stearo-oleo-palmitin (StOP)	43
Stearo-oleo-stearin (StOSt)	43
Stearo-palmito-olein (StPO)	39
Diunsaturated	
Dioleopalmitin (OOP)	5
Dioleostearin (OOST)	-13
Triunsaturated	
Triolein (OOO)	5
Trilinolein (LLL)	-13

หมายเหตุ St = Stearic acid, P = Palmitic acid, O = Oleic acid, L = Linoleic acid
ที่มา: Stauffer (1996) อ้างอิงใน นิธิยา รัตนพานนท์ (2548)

2.8.2 การจัดเรียงตัวของรูปผลึก (Crystallization) เนื่องจากไขมันมีความแตกต่างจากน้ำมันกล่าวคือ เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องจึงมีการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผลึกซึ่งมีได้หลายรูปแบบ เรียกว่า polymorphism โดยรูปแบบผลึกที่พบส่วนใหญ่มี 3 รูปแบบ คือ α β' และ β ขนาดและจำนวนผลึกที่เกิดขึ้นขึ้นกับชนิดและอุณหภูมิของไขมันและน้ำมันกล่าวคือ ผลึกที่เกิดจากการลดอุณหภูมิของไขมันลงอย่างรวดเร็วจะมีโครงสร้างแตกต่างจากผลึกที่เกิดจากการลดอุณหภูมิของไขมันลงอย่างช้าๆ (นิธิยา, 2548)

2.8.3 การละลาย (Solubility) ไขมันและน้ำมันทุกชนิดไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายไขมัน ได้แก่ ปีโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน และเบนซีน เป็นต้น นอกจากนี้กรดไขมันยังมีการละลายในตัวทำละลายได้แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกกรดไขมันชนิดอื่นออกจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวได้ (นิธิยา, 2548)

2.9 คุณสมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมัน

คุณสมบัติทางเคมีของไขมันและน้ำมันแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ทำให้มีการเกิดปฏิกิริยากับสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ได้แก่

2.9.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ไขมันและน้ำมันบางชนิดจะถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยกรด ต่าง และเอนไซม์ การไฮโดรไลซ์ได้ด้วยด่าง เรียกว่า สaponification) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นเกลือของกรดไขมันเรียกว่า สบู่ ต่างที่ใช้นิยมในการไฮโดรไลซ์ไขมัน เช่นโซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอาจเกิดจากไขมันหรือน้ำมันได้รับความร้อนสูง เช่น ขณะทอดอาหารที่มีปริมาณน้ำในปริมาณมากไขมันจะถูกไฮโดรไลซ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล

ไขมันหรือน้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์แต่ละชนิด มักมีไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนประกอบในปริมาณค่อนข้างแน่นอน ดังนั้นจำนวนต่างที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขมันหรือน้ำมันจำนวนหนึ่งจึงมีค่าค่อนข้างแน่นอนและเป็นค่าเฉพาะ ซึ่งสามารถใช้บ่งชี้ถึงคุณสมบัติของไขมันหรือน้ำมันแต่ละชนิดได้ เรียกว่า ค่าสaponification (Saponification value; Spv) หรือจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซิสไขมันหรือน้ำมันอย่างสมบูรณ์จำนวน 1 กรัม ให้ได้เป็นสบู่และกลีเซอรอล ค่า Spv ใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุลของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในไขมันและน้ำมัน กล่าวคือ หากไขมันหรือน้ำมันมีค่า Spv สูง แสดงว่า กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จึงมีจำนวนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ต่อหน่วยน้ำหนักเป็นจำนวนมาก (นิธิยา, 2548)

2.9.2 ปฏิกิริยาฮาโลจีเนชัน (halogenation) เป็นปฏิกิริยาการเติมสารพวกฮาโลเจน (halogen) เข้าไปที่พันธะคู่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ สารฮาโลเจนที่นิยมใช้ได้แก่ ไอโอดีน ค่าที่ได้นั้นเรียกว่า ค่าไอโอดีน (Iodine value; Iv) หรือจำนวนกรัมของไอโอดีนที่เข้าทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ของกรดไขมันในไขมันหรือน้ำมันจำนวน 100 กรัม

ค่าไอโอดีนเป็นตัวบ่งชี้ว่า มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในไขมันหรือน้ำมันมากน้อยเพียงใด หรือเป็นการบอกความไม่อิ่มตัวของไขมันและน้ำมัน หากค่า Iv สูง แสดงว่าไขมันหรือน้ำมันชนิดนั้นมีความไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นกรดไขมันที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย ในทางตรงกันข้ามไขมันหรือน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะเกิดการหืนได้ง่าย (นิธิยา, 2548)

2.9.3 การหืน (rancidity) เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไขมันหรือน้ำมันหรือน้ำมัน ซึ่งทำให้ไขมันหรือน้ำมันเกิดกลิ่นที่ผิดปกติ และสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป การหืนเกิดขึ้นได้ 3 รูปแบบ คือ

2.9.3.1 ลิโพลีไลซิส (lipolysis) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เกิดการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปส กรด ต่าง ความร้อน หรือสารเคมี ซึ่งจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีผลต่อสุขภาพของไขมันและน้ำมัน โดยทำให้น้ำมันมีกลิ่นและรสชาติเปลี่ยนแปลงไป เช่น กรดไขมันอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (คาร์บอน 4-12 อะตอม) ซึ่งจะมีกลิ่นหืนมาก และเมื่อปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นจะมีผลให้ค่า smoke point หรืออุณหภูมิที่ไขมันหรือน้ำมันเกิดควัน

เมื่อได้รับความร้อนมีค่าต่ำลง ทำให้น้ำมันจะเกิดควันได้ง่ายขณะทอดอาหารสำหรับปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์ไลเปสและความชื้นจะเรียกว่า hydrolytic rancidity

ไขมันและน้ำมันบางชนิดไม่สามารถสังเกตการณ์เกิดไลโปไลซิสได้ด้วยการดมกลิ่นหรือการชิมรส จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์ทางเคมี โดยการตรวจหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นค่าที่ได้ว่า ค่าความเป็นกรด (Acid value; Av) หรือจำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทำกรดไขมันอิสระที่อยู่ในไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม เป็นกลาง ดังนั้นจึงนิยมใช้ค่า Av เป็นตัวบ่งชี้ ภาวะหรือระดับการหืนของไขมันหรือน้ำมัน กล่าวคือ หากค่า Av สูง แสดงว่ามีการเกิดกลิ่นหืนเนื่องจาก hydrolytic rancidity มาก วิธีการชะลอการเกิดกลิ่นหืนนี้ทำได้โดยการเก็บไขมันหรือน้ำมันที่อุณหภูมิต่ำ (นิธิยา, 2548)

2.9.3.2 ออกซิเดทีฟ แรนซิดิตี (oxidative rancidity) เป็นการหืนที่เกิดจากปฏิกิริยา autooxidation ที่พันธะคู่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนในอากาศ เกิดพันธะเปอร์ออกไซด์ที่หมู่แอลฟาเมทิลีน (α -methylene) การหืนแบบนี้สามารถเกิดได้ทั้งกับไขมันและน้ำมันเอง และกับอาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ปฏิกิริยานี้สามารถเร่งด้วยโลหะ ความร้อนและแสง

การเกิดกลิ่นหืนด้วยวิธีนี้จะทำให้เกิดกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวถูกทำลาย ทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ รวมทั้งสูญเสียวิตามินที่ละลายได้ในไขมันและน้ำมัน นอกจากนี้ยังสามารถเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลพอกซิเดส (lipoxidase) ได้อีกด้วย การตรวจวิเคราะห์การเกิด oxidative rancidity สามารถทำได้โดยการหาค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value; Pv) หรือการปริมาณสารเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในไขมันหรือน้ำมัน หรือจำนวนมิลลิกรัมของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.002 N ที่ใช้ในการไตเตรตไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม ถ้าค่า Pv สูง แสดงว่าไขมันหรือน้ำมันเกิด oxidative rancidity มาก และส่งผลให้ค่า Iv ที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง

วิธีการป้องกันสามารถทำได้โดยการเติมสารป้องกันการหืนลงไปในไขมันหรือน้ำมันหรืออาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันเป็นส่วนประกอบ (นิธิยา, 2548)

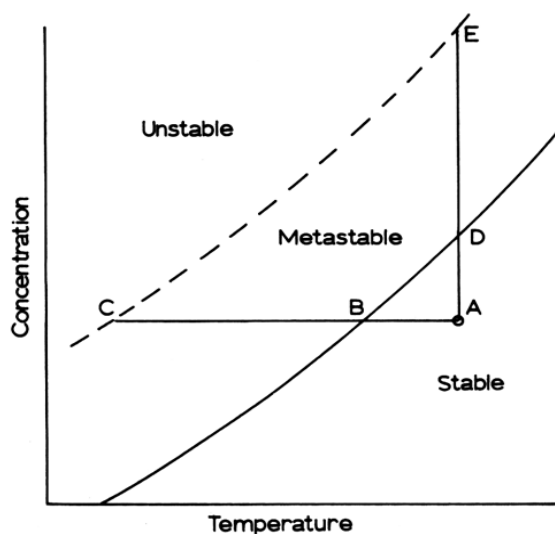
2.9.3.3 คีโตนิก แรนซิดิตี (ketonic rancidity) เป็นการหืนที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเอนไซม์ (enzymatic oxidation) กับโมเลกุลของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารพวกคีโตน ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (นิธิยา, 2548)

2.10 การตกผลึก (crystallization)

การตกผลึกของน้ำมันหรือไขมันสำหรับการบริโภคมีความสำคัญมากสำหรับการผลิตในอุตสาหกรรมอาหาร โดยความรู้ในเรื่องพฤติกรรมตกผลึก (crystallization behavior) ของน้ำมันสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารหลายๆ ชนิด เช่น ลูกอม ลูกกวาด ช็อกโกแลต มาร์การีน สเปรด และรวมถึงผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ต่าง ๆ (Gordon และ Rahman, 1991) การตกผลึกสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งกับสารละลาย ซึ่งจะประกอบไปด้วยตัวทำละลายและตัวถูกละลาย และกับ melt ซึ่งเป็นสารที่ถูกทำให้เย็นในสภาพของเหลวโดยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่าจุดหลอมเหลวของของสารนั้น (Myerson, 2002) การตกผลึกของสารละลายจะเกิดขึ้นได้เมื่อสารละลายนั้นมีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้น ณ จุดอิ่มตัว (saturation) ที่อุณหภูมิของการตกผลึก หรือเรียกว่ามีความเข้มข้นอิ่มตัว

ยิ่งยวด (supersaturation) นั้นเอง ส่วนการตกผลึกของ melt จะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิของการตกผลึกอยู่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของ melt (Mullin, 1993) การตกผลึกของน้ำมันหรือไขมันสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งกับน้ำมันหรือไขมันที่อยู่ในสภาพ melt และกับน้ำมันหรือไขมันที่อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวยิ่งยวดกับตัวทำละลาย อย่างไรก็ตามสารละลายที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวยิ่งยวดไม่จำเป็นต้องเกิดการตกผลึกเสมอไป ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นอิ่มตัวยิ่งยวดของสารละลายนั้นเป็นหลัก ดังแสดงไว้ในกราฟความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลาย หรือ saturation-supersaturation solubility diagram ในภาพที่ 17

เส้นทึบในภาพที่ 17 คือเส้น solubility curve ซึ่งจะแสดงค่าความเข้มข้น ณ จุดอิ่มตัวของสารละลายที่อุณหภูมิต่างๆ พื้นที่ใต้กราฟที่อยู่ต่ำกว่าเส้น solubility curve เรียกว่า stable zone ซึ่งเป็นพื้นที่ที่จะไม่เกิดการตกผลึกเพราะความเข้มข้นของสารละลายมีค่าต่ำกว่าจุดอิ่มตัว เส้นประในรูปแบ่งพื้นที่เหนือเส้น solubility curve ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่อยู่ระหว่างเส้น solubility curve และเส้นประเรียกว่า meta-stable zone ซึ่งการตกผลึกจะเกิดขึ้นได้ในพื้นที่นี้ก็ต่อเมื่อมีการใช้เทคนิค เช่นการล่อผลึก (crystal seeding) เข้าช่วย สำหรับพื้นที่เหนือเส้นประเรียกว่า unstable zone หรือ labile zone ซึ่งเป็นพื้นที่ที่การตกผลึกของสารละลายจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วด้วยตัวเอง (เรียกว่า spontaneous crystallization)



ภาพที่ 17 กราฟความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลาย
ที่มา: Timms (1994)

การตกผลึกของสารละลายใดๆ ที่อยู่ในสภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดนั้นจะเริ่มจากการสร้างจุดเริ่มต้นของการตกผลึกหรือที่เรียกว่านิวเคลียส ขึ้นมาก่อน โดยที่นิวเคลียสอาจประกอบไปด้วยโมเลกุลของตัวถูกละลายตั้งแต่ไม่กี่สิบโมเลกุลไปจนถึงเป็นจำนวนพันโมเลกุล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและธรรมชาติของสารละลาย (Mullin, 1993) หลังจากการสร้างนิวเคลียสให้มีขนาดเท่ากับขนาดวิกฤต (critical size) แล้วจึงจะเกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลตัวถูกละลายในสารละลายเข้ามาปะติดที่ผิวของนิวเคลียสเพื่อเกิดการโตเป็นผลึกที่สมบูรณ์ต่อไป กระบวนการสร้างนิวเคลียสหรือที่เรียกว่า nucleation process นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลักคือ primary nucleation และ

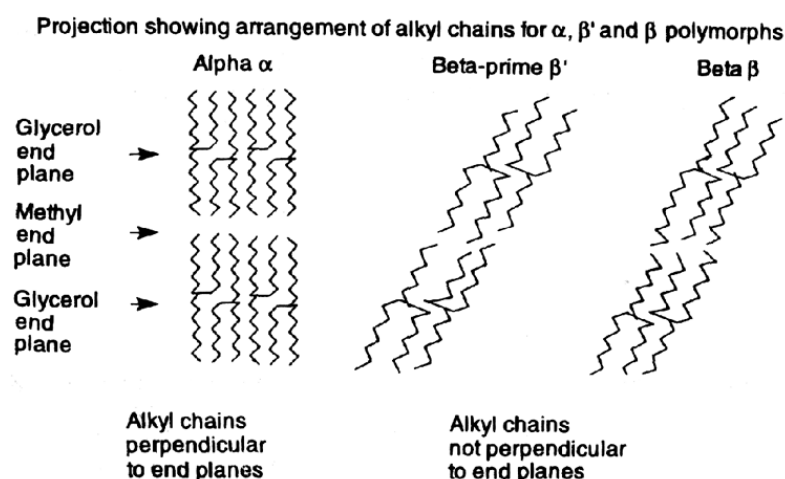
secondary nucleation โดย primary nucleation คือการสร้างนิวเคลียสขึ้นในระบบที่ยังไม่มีการตกผลึกเกิดขึ้นหรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการสร้างนิวเคลียสเพื่อการตกผลึกครั้งแรกของระบบ ซึ่ง primary nucleation สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 2 ประเภทคือ homogeneous nucleation สำหรับการตกผลึกของสารละลายที่เกิดขึ้นได้เองเมื่อสารละลายนั้นมีความเข้มข้นอิ่มตัวยิ่งยวดที่สูงมากจนเข้าสู่ labile zone (Mullin, 1993) และ heterogeneous nucleation สำหรับการตกผลึกของสารละลายในสภาวะที่มีสิ่งเจือปนหรือสิ่งแปลกปลอมในระบบ โดยการสร้างนิวเคลียสสำหรับการตกผลึกแบบนี้สามารถเกิดขึ้นได้ที่สภาวะอิ่มตัวยิ่งยวดที่ไม่สูงมากนักเนื่องจากว่าสิ่งเจือปนหรือสิ่งแปลกปลอมในระบบจะช่วยลดพลังงานที่ต้องการใช้ในการสร้างนิวเคลียสหรือ free energy for nucleation ลง ส่วน secondary nucleation นั้นคือการสร้างนิวเคลียสขึ้นในระบบที่มีผลึกของตัวถูกละลายเกิดขึ้นหรือปรากฏอยู่แล้ว ซึ่งการสร้างนิวเคลียสแบบนี้ไม่เป็นที่ต้องการสำหรับการตกผลึกทางอุตสาหกรรมอาหาร เช่นการผลิตน้ำตาลทรายหรือนมข้นหวานเป็นต้น เนื่องจากจะทำให้เกิดการกระจายตัวของขนาดผลึก (crystal size distribution) สูง หรือมีความสม่ำเสมอของขนาดผลึกต่ำนั่นเอง (Myerson, 2002)

สารบางชนิดสามารถตกผลึกได้หลายโครงสร้างผลึก (crystallographic structure) ขึ้นอยู่กับสภาวะของปัจจัยต่างๆ ที่ควบคุมการตกผลึก ความสามารถในการตกผลึกได้หลายโครงสร้างนี้เรียกว่า polymorphism โดยแต่ละโครงสร้างจะมีคุณสมบัติทางกายภาพเช่น จุดหลอมเหลว ความหนาแน่น ความแข็งที่แตกต่างกัน (Sato, 2001) น้ำมันและไขมันมีไตรกลีเซอไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งไตรกลีเซอไรด์มีคุณสมบัติ polymorphism โดยสามารถตกผลึกได้ถึง 3 โครงสร้างหลักคือ α β' และ β โดยแต่ละโครงสร้างมีลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลที่ต่างกันไปดังแสดงในภาพที่ 18

โครงสร้าง α มีโครงสร้างพื้นฐานของผลึกเป็นแบบ hexagonal นั่นคือจะมีการจัดเรียงตัวของสายกรดไขมัน (fatty acid chain) เป็นเส้นตรงและขนานกันไปในทิศทางที่ตั้งฉากกับระนาบเมทิล (methyl end plane) ที่อยู่ ณ ตำแหน่งหัวและท้ายสุดของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ โครงสร้าง α มีความเสถียรน้อยเนื่องจากสายของกรดไขมันมีการจับตัวกันแบบหลวมๆ โครงสร้าง β' มีโครงสร้างพื้นฐานของผลึกเป็นแบบ orthorhombic โดยสายของกรดไขมันจะมีการทำมุมเอียงกับระนาบเมทิล ซึ่งจะทำให้การจัดเรียงตัวของโมเลกุลทำได้อย่างแน่นหนาขึ้น โครงสร้าง β' จึงมีความเสถียรมากกว่าโครงสร้าง α รวมทั้งมีจุดหลอมเหลวและความหนาแน่นสูงกว่า (Kaneko, 2001) ส่วนโครงสร้าง β เป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรที่สุดและมีจุดหลอมเหลวสูงที่สุด มีโครงสร้างพื้นฐานของผลึกเป็นแบบ triclinic โดยสายกรดไขมันของโครงสร้างนี้มีการทำมุมเอียงกับระนาบเมทิลมากกว่าเมื่อเทียบกับโครงสร้าง β'

โดยทั่วไปแล้วน้ำมันจะตกผลึกลงในโครงสร้าง α ได้ง่ายที่สุด เนื่องจากใช้พลังงานในการตกผลึกน้อยที่สุด ขณะที่ β' ใช้พลังงานมากกว่า α ในการตกผลึก จึงทำให้ตกผลึกได้ยากกว่า α ส่วน β ใช้พลังงานในการตกผลึกสูงที่สุดจึงตกผลึกได้ยากที่สุด (Sato, 2001) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผลึกไขมันจะเกิดขึ้นตามเวลาเพื่อให้เกิดความเสถียรมากขึ้น โดยโครงสร้าง α จะเปลี่ยนไปเป็น β' และ β ในที่สุด แต่จะไม่สามารถเปลี่ยนโครงสร้างย้อนกลับได้ นอกเสียจากว่าจะ

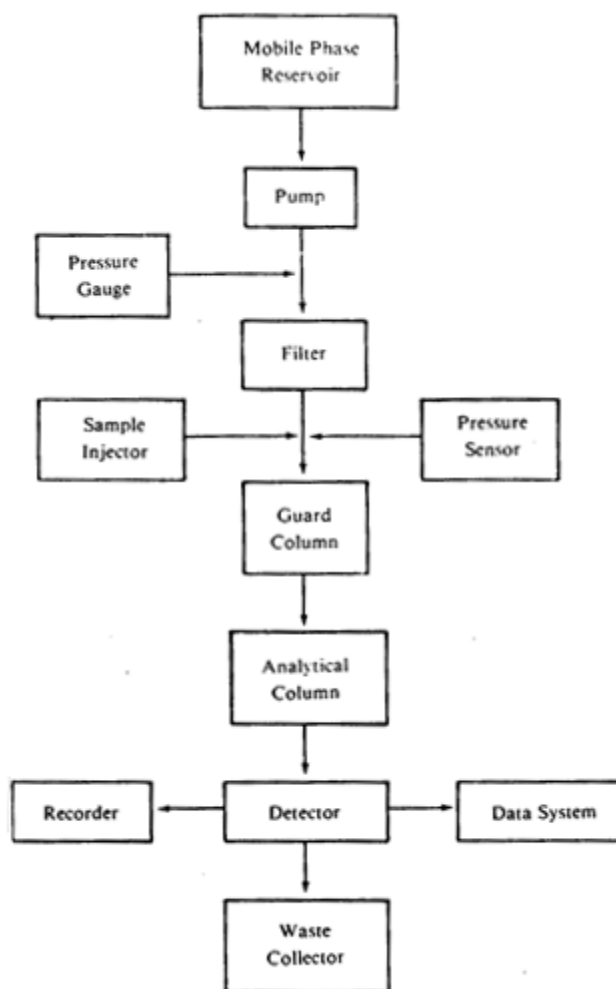
นำไขมันนั้นไปหลอมแล้วทำการตกผลึกใหม่ (Timms, 1995) ไขมันหลายชนิดเช่น เนยโกโก้ (cocoa butter) สามารถตกผลึกได้ทั้ง 3 โครงสร้าง (Beckett, 2000) แต่ไขมันบางชนิดสามารถตกผลึกได้เฉพาะโครงสร้าง α และ β' (Sato, 1999)



ภาพที่ 18 การจัดเรียงตัวของรูปแบบผลึกในโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์
ที่มา: Talbot (1999)

2.11 เทคนิคการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในไขมันหรือน้ำมัน (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

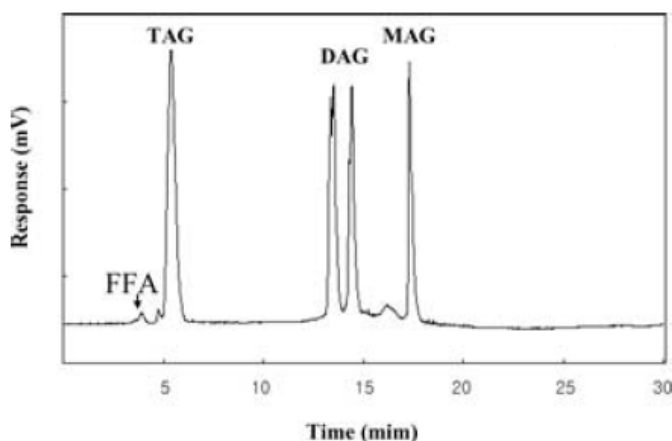
องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ในไขมันและน้ำมันจากพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบภายในโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ประกอบไปด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เช่น กรดโอเลอิก กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก เป็นต้น การศึกษาองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์นิยมใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แยกสารละลายผสมที่ประกอบด้วยสารหลายชนิดในคอลัมน์ปิด (closed column) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กๆ ที่มีรูพรุนขนาดเล็กในคอลัมน์ในช่วง 30-75 μm โดยส่วนใหญ่แล้วมี 2 ระบบของตัวทำละลายในการแยกคือ normal-phase (NP) และ reversed-phase (RP) ซึ่งนำมาใช้ในการวิเคราะห์ของเหลว โดยส่วนใหญ่แล้วการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์จะใช้ reversed-phase (RP) โดยทั่วไปแล้ว octadecylsilyl (C18) จะเป็นคอลัมน์แบบ RP ที่มีการใช้กันโดยทั่วไปในการแยกไตรกลีเซอไรด์ จะมีระบบตัวทำละลายมีขั้วมากกว่า stationary phase จากนั้นสารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนบนของคอลัมน์ แต่เนื่องจากคอลัมน์มีรูพรุนขนาดเล็กมาก จึงต้องอาศัยความดันจากปั๊มเพื่อที่จะทำให้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นแผนภาพองค์ประกอบของเครื่อง HPLC แสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 ส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในปัจจุบัน
ที่มา: แม้น และอมร (2535)

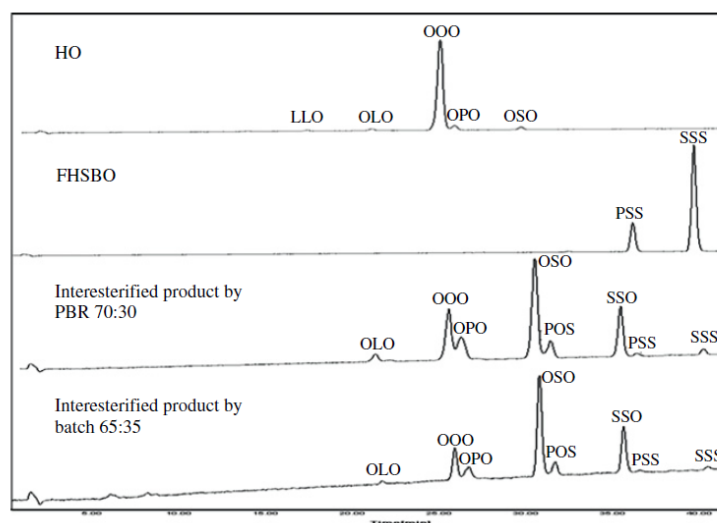
งานวิจัยของ Lee และคณะ(2007) ศึกษาเกี่ยวกับการดัดแปรโครงสร้างไขมันรำข้าว โดยนำน้ำมันรำข้าวมาผ่านกระบวนการ Lipase-catalyzed glycerolysis โดยส่วนที่ต้องการคือ โมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ หลังจากนั้นจึงนำมาทำการตกผลึกแยกส่วนโดยใช้ตัวทำละลาย หรือ Solvent fractionation เพื่อแยกส่วนที่ต้องการออกมาโดยศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ hexane และ acetone สิ่งที่ต้องการคือ โมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีความเข้มข้นมากกว่าไตรกลีเซอไรด์ เพราะฉะนั้นจึงสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีเข้มข้นกว่า นั่นก็คือ acetone หลังจากทำปฏิกิริยาตัวอย่างที่ได้นำไปศึกษาองค์ประกอบของโครงสร้างด้วยเทคนิค HPLC โดยคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นแบบ NP มีระบบตัวทำละลายที่ใช้ 2 ชนิด คือ Hexane และ methyl t-butyl ether ความสามารถในการแยกสารประกอบได้ เฟสเคลื่อนที่ควรจะมีความเหมาะสม มีช่วงตรงกันข้ามกับเฟสอยู่หนึ่ง ซึ่งกรณีของ NP-HPLC เฟสอยู่หนึ่งจะมีขั้ว เฟสเคลื่อนที่ที่จะ

ไม่มีขั้ว เมื่อสารประกอบที่มีสภาพเดียวกันกับเฟสเคลื่อนที่จะสามารถปรากฏออกมาก่อน หมายความว่าสารที่ออกมาก่อนสามารถละลายได้ดีใน hexane จึงเป็น กรดไขมันอิสระ ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งมีความไม่มีขั้วมากกว่าโมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ ส่วนโมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ มีความมีขั้วมากกว่าจึงปรากฏออกมาทีหลัง ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมขององค์ประกอบไขมันจากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ NP-HPLC
ที่มา: Lee และคณะ (2007)

งานวิจัยของ Adhikari และคณะ (2010) ศึกษาการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน โดยใช้เอนไซม์ไลเปสของการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันดอกทานตะวันที่มีกรดโอเลอิกปริมาณมาก และน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจิเนชัน จากนั้นทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันที่ดัดแปลงมาได้ด้วยเทคนิค HPLC คอลัมน์ หรือเฟสอยู่หนึ่งที่ใช้เป็น C18 ซึ่งไม่มีขั้ว เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เป็น acetonitrile และ isopropanol/hexane (2/1, v/v) สารประกอบที่สนใจในการทดลองนี้คือ ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งมีความไม่มีขั้ว จึงเป็นส่วนที่สามารถถูกดูดซับได้ดีในคอลัมน์ C18 เพราะมีสภาพขั้วเหมือนกัน รวมทั้งมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้น้อย จึงทำให้ไตรกลีเซอไรด์ออกมาทีหลังสุด (Adhikari และคณะ, 2010) ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมขององค์ประกอบไขมันจากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ RP-HPLC
ที่มา: Adhikari และคณะ (2010)

องค์ประกอบส่วนที่สำคัญใน HPLC ได้แก่

1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) เป็นขวดสำหรับตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ควรมีความจุประมาณ 1 ลิตร ขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น O_2 จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจน ซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่ บางชนิดได้ หรือแม้แต่เฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้น ยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหา (detector) ขณะทำการทดลองอยู่ การไล่แก๊สที่ละลายอยู่จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvents) ซึ่ง Mobile phase / Solvent หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

2. Column หรือ stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase แต่สำหรับ HPLC : Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ Column จึงเรียกว่า column thermostat

Column มี 2 ชนิดคือ

1. Analytical column มีความยาวประมาณ 10 - 30 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4 - 10 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ เช่น stainless steel polyethylene แก้ว PEEK เป็นต้น สำหรับส่วนที่เป็น packing material ที่บรรจุอยู่ภายใน ได้แก่ silica based resins gels bonded phases เป็นต้น

2. Guard column นิยมต่อระหว่างส่วน injector และส่วนของ analytical column ซึ่งจะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับสารตัวอย่างรวมทั้งตัวทำละลาย เพื่อช่วยยืด

อายุการใช้งานของ analytical column ส่วนที่เป็น packing material จะคล้ายคลึงกับ analytical column

3.ระบบของปั๊ม (pumping system) ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคนาโนขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลนี้จะมาก เมื่อใช้อนุภาคเล็กๆและคอลัมน์มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องเพิ่มความดันสูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ปั๊มชนิดนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

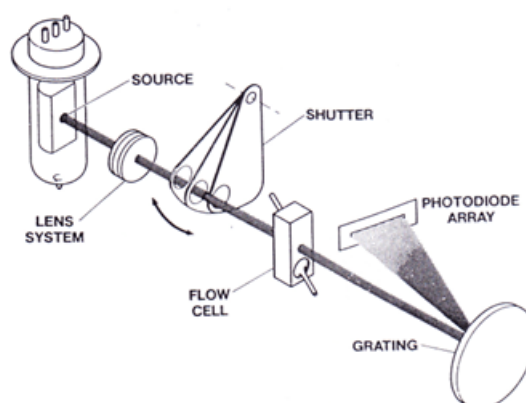
1. mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
2. pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
4. เครื่องตรวจวัด (detector)

สิ่งที่ต้องการสำหรับเครื่องตรวจวัดใน liquid chromatography สมัยใหม่ คือ ความไวของเครื่องซึ่งสามารถตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นเครื่องตรวจวัดควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

1. มีความไวสูง และให้สัญญาณการตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
2. ให้สัญญาณตอบรับ (response) ได้กับสารทุกชนิด
3. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
4. เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
5. ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพเชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง
6. ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
7. ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับ peak ที่ต้องการตรวจสอบ

ในการวิเคราะห์ที่ไตรกลีเซอไรด์ใช้ detector เป็น Photodiode Array Detector (PDA) หรือ Diode Array Detector เป็น detector ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน และวัดได้ตั้งแต่ 190-850 nm ซึ่งเป็น UV-VIS Detectors ชนิดหนึ่ง อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เครื่องชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางใน HPLC เพราะไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูง กับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

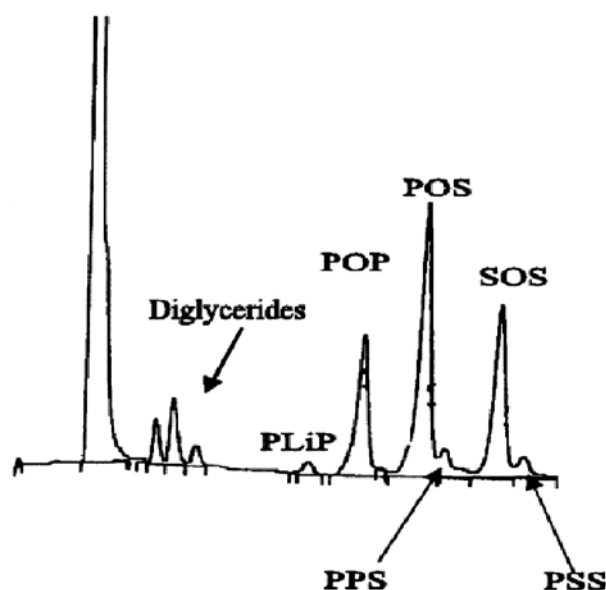
Photodiode Array Detector (PDA) จัดเป็น Solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายๆ ความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน มีลักษณะดังรูปที่ 22 ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง “Reverse Optics” คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow-through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครเมเตอร์หรือเกรตติง เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของโฟโตไดโอด เนื่องจากเครื่องดีเทคเตอร์นี้สามารถ scan UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมาก ดังนั้น การนำเอาเครื่องดีเทคเตอร์นี้มาใช้กับ HPLC จะทำให้ทราบข้อมูลของพีคต่างๆในยูวีสเปกตรัมที่อยู่ในโครมาโทแกรมได้ดี และข้อมูลต่างๆสามารถเก็บในคอมพิวเตอร์ ใช้ในการตรวจสอบสารประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่างว่าเป็นอะไรนั้น อาจนำไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่คิดว่าจะเป็นไปได้ (แมน และอมร, 2535)



ภาพที่ 22 photodiode array ที่ใช้ใน LC Detector
ที่มา: แม้น และอมร (2535)

การวิเคราะห์หาปริมาณไตรกลีเซอไรด์จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นชนิดของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ชนิดของคอลัมน์ อุณหภูมิของคอลัมน์ อัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็นต้น โดยควรเลือกตัวทำละลายที่ละลายตัวอย่างได้ดีและความมีขั้วตรงข้ามกับ stationary phase ที่ใช้ ในการวิเคราะห์ stationary phase คือ C18 ซึ่งเฟสคงที่ที่ไม่ชอบน้ำ เฟสเคลื่อนที่ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น acetonitrile เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วผลจากการวิเคราะห์ คือโครมาโตแกรมที่ได้ควรจะเกิดพีคที่เห็นชัดเจน และแยกออกจากกันอย่างชัดเจน จึงจะสามารถได้ผลการทดลองที่ถูกต้องมากที่สุด (แม้น และอมร, 2535)

การวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในเนยโกโก้หรือไขมันต่างๆ โดยทั่วไปจะใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) งานวิจัยของ Undurraga และคณะ (2001) ได้ทำการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในเนยโกโก้ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งได้แสดงไตรกลีเซอไรด์หลักที่มีในเนยโกโก้ คือ POP POS และ SOS บนโครมาโตแกรม ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ของเนยโกโก้ด้วยเทคนิค HPLC
ที่มา: Undurraga และคณะ (2001)

2.12 เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมัน (Thin layer chromatography; TLC)

TLC จะใช้แผ่นกระจก หรืออะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก เคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุนและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 5-40 ไมโครเมตร เฟสคงที่ที่นิยมใช้กันมากคือ silica gel, alumina, cellulose, polyamides และ ion-exchange resin การที่จะทำให้เฟสคงที่ยึดกับแผ่น และมี mechanical strength ดี จะต้องเติมตัวยึด (binder) เช่น เติม CaSO_4 เข้าไป 5-10% โดยน้ำหนัก

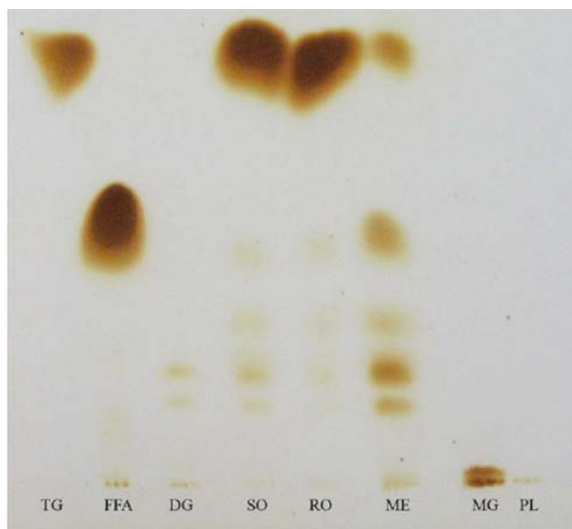
การเตรียมแผ่น TLC สามารถทำได้โดยใช้ผงที่เคลือบแผ่นกระจกใส่น้ำหรือตัวทำละลายให้เป็น slurry แล้วนำไปเคลือบบนแผ่น TLC ให้มีลักษณะเหมือนกันทั่วทั้งแผ่น โดยใช้เครื่องมือพิเศษคือ moving spreader สารละลายที่เป็น slurry จะผ่านลงมายังแผ่น TLC เคลือบเป็นฟิล์มบางๆ ความหนาสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยปรับเครื่องให้ความหนาตามต้องการ ซึ่งโดยทั่วไปที่ใช้ในทางวิเคราะห์ ความหนาจะอยู่ในช่วง 0.2-0.3 มม. หลังจากเคลือบแผ่น TLC แล้วนำไปทำให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปอบให้อีกครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิ 110°C ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ แผ่น TLC ที่เคลือบเรียบร้อยแล้วมีขายในท้องตลาดซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงแต่ได้รับความสะดวกมากกว่า และแผ่น TLC นั้นมีลักษณะเหมือนกับมากกว่า

เมื่อเตรียมแผ่น TLC เรียบร้อยแล้วก็จะเอาสารตัวอย่างใส่ลงไปในจุดบนแผ่น TLC โดยปกติแล้วปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้จะอยู่ในช่วง 10-100 μg ต่อจุดสำหรับงานด้านวิเคราะห์ แต่ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของจุดควรอยู่ระหว่าง 2-5 มม. การแยกจะเกิดขึ้นในขณะที่เราทำด้วยแก้วมีฝาปิดมิดชิด ภายในภาชนะแผ่น TLC จะถูกวางไว้ในลักษณะที่สอดคล้องกับการไหลของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแนวของกระดาษ ภาชนะที่ใช้จะต้องปิดแน่นไม่ให้อากาศเข้า เพื่อทำให้แน่ใจว่าแผ่น TLC และตัวทำละลายอยู่ในภาวะสมดุลกัน เพื่อที่จะให้ค่า R_f มีค่าคงที่เหมือนกันทุกครั้ง โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที สำหรับระยะทาง 10 ซม. ซึ่งทั้งนี้ จะขึ้นอยู่กับเฟสเคลื่อนที่และขนาดของอนุภาคของตัวดูดซับ (adsorbent)

การตรวจหาองค์ประกอบบนแผ่น TLC สารละลายที่ไวต่อปฏิกิริยาสามารถนำมาใช้ในการบอกตำแหน่งของสารที่แยกออกจากกันได้ กรดซัลฟูริกเข้มข้นสามารถนำมาใช้พ่นให้เป็นฝอยลงบนแผ่น silica ได้ และทำให้สารอินทรีย์เกิดเป็นสีดำ (charred) ซึ่งมองเห็นได้ชัดหลังให้ความร้อนกับแผ่น นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดสี เช่น ไอโอดีน หรืออาจใช้วิธีส่องแผ่น TLC ด้วยแสงยูวี สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์จะมองเห็นได้ หรือบางครั้งอาจผสมสารฟลูออเรสเซนซ์เข้าไปกับสารเคลือบแผ่น TLC และเมื่อส่องด้วยแสงยูวีจะเห็นเป็นจุดสีดำบนพื้นของฟลูออเรสเซนซ์ อย่างนี้เรียกว่าเกิด quenching effect (แมน และอมร, 2535)

Reshma และคณะ (2010) ศึกษาการสกัด การแยกกลีนินออกจากน้ำมันงาเพื่อประยุกต์ใช้ใน nutraceutical ซึ่งขั้นตอนหนึ่งจะเป็นการใช้ TLC เข้ามาช่วยในการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันงา น้ำมันงาที่สกัดด้วยเมทานอล และน้ำมันที่เหลืออยู่ (residual oil) เทียบกับสารมาตรฐาน (ไตรกลีเซอไรด์(TG) กรดไขมันอิสระ (FFA) ไดกลีเซอไรด์ (DG) โมโนกลีเซอไรด์ (MG) และ polar lipid (PL)) องค์ประกอบในไขมันที่แยกได้วิเคราะห์จากค่า R_f ของ Standard โดยพบว่าในน้ำมันงามีปริมาณไตรกลีเซอไรด์มากที่สุด แต่เมื่อนำไปสกัดที่สภาวะเวลา 100 นาที อุณหภูมิ

70 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis จึงเป็นที่มาของการเกิด FFA, DG, MG ในการสกัดด้วยเมทานอล (ภาพที่ 24)



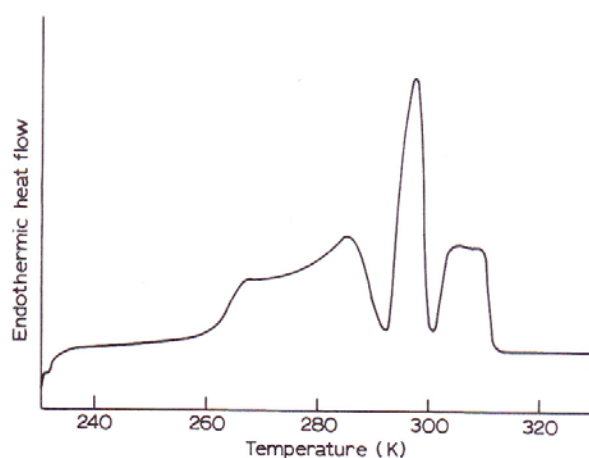
ภาพที่ 24 TLC plate ที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำมันงา (Sesame oil; SO), น้ำมันที่เหลืออยู่ (residual oil; RO), Methanol extract (ME) เพื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน TG, FFA, DG, MG และ PL

ที่มา: Reshma และคณะ (2010)

2.13 เทคนิคการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงความร้อนของวัตถุ (Differential Scanning Calorimetry; DSC)

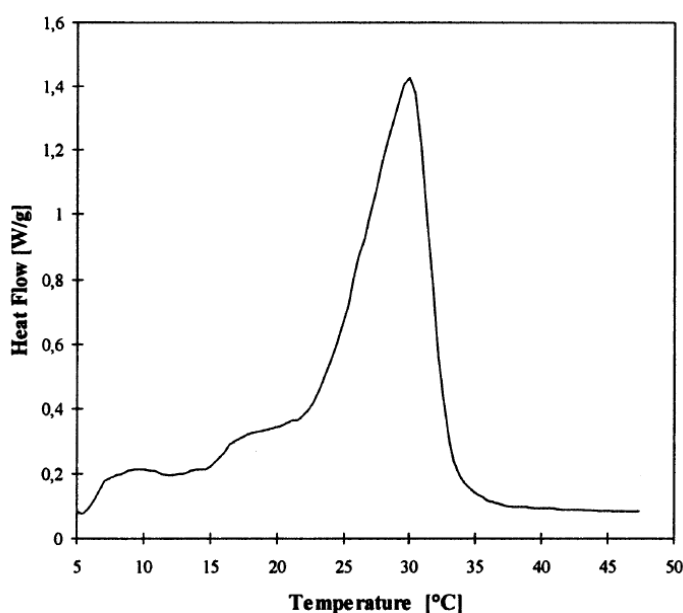
DSC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางความร้อนของตัวอย่าง เช่น การหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมัน จากการดูดหรือคายพลังงาน ขณะที่มีการให้ความร้อน (Heating) หรือทำให้เย็น (cooling) จะแสดงข้อมูลเป็น Thermogram ระหว่างอัตราการดูดหรือคายพลังงาน กับอุณหภูมิหรือเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างเช่น การช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลวของไขมันนม ดังภาพที่ 25 จากภาพไขมันนมมีช่วงการหลอมเหลว 3 ช่วง จึงมีพีคเกิดขึ้นสามพีค คือ ช่วงของไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูง (High melting), จุดหลอมเหลวปานกลาง (middle melting) และจุดหลอมเหลวต่ำ (low melting) ซึ่งจุดหลอมเหลวที่ต่างกันเกิดจากองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระในโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์

ข้อดีของเทคนิค DSC คือ พื้นที่ใต้พีค (peak) จะสัมพันธ์โดยตรงกับเอนทัลปี (enthalpy) หรือการเปลี่ยนแปลงความร้อนของตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความจุความร้อน (heat capacity) ความร้อนของการหลอมเหลวหรือเอนทัลปีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (Lidefelt, 2007)



ภาพที่ 25 DSC melting curve ของไขมันนม หลังจาก tempering เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์
ที่มา: Timms (1994)

พฤติกรรมการหลอมเหลวของไขมันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบภายในของโครงสร้างไขมัน ตัวอย่างเช่น เนยโกโก้จะมีการหลอมเหลวในช่วงอุณหภูมิที่แคบประมาณ 24-35°C สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิร่างกาย หากอุณหภูมิในการหลอมเหลวสูงกว่าอุณหภูมิภายในร่างกายจะส่งผลให้ไม่ละลายในปากและรู้สึกคล้ายชีสที่ต้องใช้แรงในการเคี้ยวมาก การติดตามดูพฤติกรรมการหลอมเหลวของเนยโกโก้ด้วยเทคนิค DSC ดังแสดงในภาพที่ 26



ภาพที่ 26 รูปแบบการหลอมเหลวของเนยโกโก้จากการศึกษาด้วยเทคนิค DSC
ที่มา: Undurraga และคณะ (2001)

2.14 เทคนิคการหาปริมาณไขมันที่เป็นของแข็งด้วยเครื่อง pulsed-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR)

p-NMR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดปริมาณไขมันที่เป็นของแข็ง (solid fat content; SFC) จะรายงานค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยเป็นตัวบ่งชี้ของช่วงพลาสติก (plastic range) ที่เป็นไปได้ของไขมัน หรือไขมันผสม และมีการใช้ในการควบคุมความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์

การวิเคราะห์ SFC นั้นสามารถทำได้หลักๆ 2 แบบ คือ การหาค่า SCF ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นช่วงของอุณหภูมิ) ซึ่งสามารถบอกได้ถึงพฤติกรรมของการหลอมเหลว ส่วนการหาค่า SFC อีกแบบคือการหาค่า SFC ที่อุณหภูมิตั้งที่เมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป โดยเป็นการศึกษาพฤติกรรมของการตกผลึกที่อุณหภูมิตั้งที่ ซึ่งสามารถอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวได้โดยใช้ แบบจำลองของ Avrami (Avrami's equation) (Avrami, 1939) จากการพล็อตกราฟของการตกผลึก หรือ crystallization curve ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า SFC และเวลา แล้วทำการ fit กราฟของการตกผลึก เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของการตกผลึกคือ Avrami rate constant และ Avrami exponent เปรียบเทียบกันระหว่างไขมันชนิดต่างๆ โดยมีรายละเอียดของสมการดังต่อไปนี้

$$X(t) = \left[\frac{SFC_t}{SFC_{max}} \right] = [1 - \exp(-Bt^k)] \quad (1)$$

เมื่อ X คือ Fraction of material transformed at time t during crystallization

SFC_t คือ Solid fat content at time t

SFC_{max} คือ Solid fat content attained after crystallization is complete

B คือ Avrami rate constant (unit = t^{-k})

k คือ Avrami exponent

ซึ่งค่า Avrami exponent ที่แตกต่างกันจะบอกให้ทราบถึงกลไกของการสร้างนิวเคลียสผลึกและการโตของผลึกที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ค่าสำหรับวิเคราะห์สมการ Avrami exponent (k , for various types of nucleation and

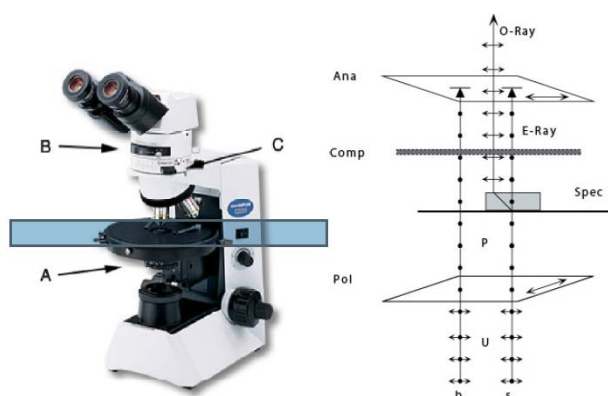
growth)	
Avrami exponent,	Types of nucleation & growth
$3 + 1 = 4$	Spherulitic growth from sporadic nuclei
$3 + 0 = 3$	Spherulitic growth from instantaneous nuclei
$2 + 1 = 3$	Disc-like growth from sporadic nuclei
$2 + 0 = 2$	Disc-like growth from instantaneous nuclei
$1 + 1 = 2$	Rod-like growth from sporadic nuclei
$1 + 0 = 1$	Rod-like growth from instantaneous nuclei

ที่มา: Avrami (1939)

2.15 เทคนิคการวิเคราะห์ขนาดและการกระจายตัวของผลึกโดยใช้ภาพถ่ายจาก Polarized Light Microscopy (PLM)

การใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงทิศทางเดียว (Polarized Light Microscopy) เป็นการประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบให้ภาพพื้นดำ (dark field microscopy) โดยการตัดแสงจากแหล่งกำเนิดแสงให้ลำแสงที่ส่องผ่านวัตถุมีเพียงทิศทางเดียว ซึ่งจะให้ภาพของวัตถุนบนพื้นสีดำ เป็นเทคนิคที่เพิ่มความคมชัดของการแสดงภาพ สามารถแยกความแตกต่างของภาพได้ดีกว่า และมีต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ โดยการแสดงภาพวัตถุด้วยแสงซึ่งไม่ถูกรวบรวมโดยเลนส์วัตถุ ทำให้เห็นวัตถุที่มีความสว่างบนพื้นสีดำ ซึ่งภาพพื้นสีดำจะปรากฏในทิศทางตรงข้ามกับภาพพื้นขาว โดยภาพพื้นขาวแสงจากภายนอกที่เกี่ยวข้องจะทำให้เห็นเงาทอดลงบนผิวของวัตถุหรือหากบางส่วนของพื้นผิวมีหลุมหรือรอยขีดข่วนจะทำให้การสะท้อนกลับของแสงต่ำลง ดังนั้นการที่ลักษณะพื้นผิวของวัตถุราบเรียบมากขึ้นจะทำให้เกิดเงาบนภาพพื้นขาว ในขณะที่ในภาพพื้นดำแสงจะสะท้อนออกจากด้านข้างของวัตถุที่มีความสว่าง (Wikipedia encyclopedia, 2011)

การเดินทางของแสงและองค์ประกอบของกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงทิศทางเดียวแบบพื้นดำแสดงดังภาพที่ 27 โดยประกอบไปด้วยส่วนของ Polarizer ที่ทำหน้าที่ในการทำให้แสงมีทิศทางเดียว โดยแสงเมื่อออกจากแหล่งกำเนิดแสงจะเดินทางผ่านแผ่นตัดแสงซึ่งจะตัดแสงบางส่วนออก จากนั้นเลนส์รวมแสงจะรวบรวมแสงที่เหลือส่องผ่านวัตถุ โดยแสงเกือบทั้งหมดทะลุวัตถุ มีบางส่วนที่เกิดการสะท้อนของจากวัตถุ แสงที่สะท้อนจะผ่านเลนส์วัตถุ ขณะที่แสงส่องผ่านโดยตรงจะไม่ผ่านเลนส์วัตถุและไม่รวบรวม จึงมีเฉพาะแสงสะท้อนเท่านั้นที่ทำให้เกิดภาพ เพื่อแสดงวัตถุนบนพื้นดำ แผ่นทึบแสงจะถูกวางไว้ใต้เลนส์รวมแสงมีเพียงแสงที่สะท้อนเข้าตา แสงจะถูกสะท้อนโดยอนุภาคบนสไลด์แทนการส่องผ่าน ในกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน แผ่นตัดแสง (occulting disk) จะถูกวางระหว่างแหล่งกำเนิดแสงและเลนส์รวมแสง โดยการปรับเพิ่มแสงจะช่วยให้เกิดผลที่ดีขึ้น และการหรี่ช่องกั้นแสงลงช่วยให้ภาพระหว่างวัตถุและพื้นหลังคมชัดขึ้น (Caprette, 2005)



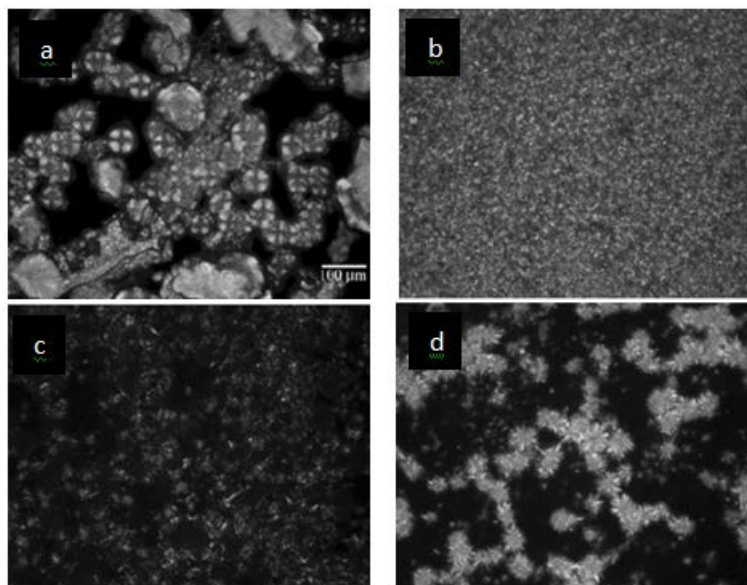
หมายเหตุ : A = Polarizer, B = Analyzer, C = Compensator

ภาพที่ 27 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงทิศทางเดียวและองค์ประกอบ

ที่มา : Microscopy Berkeley (2011)

งานวิจัยของ Sonwai และคณะ (2012) ได้ศึกษาผสมน้ำมันเมล็ดมะม่วงกับน้ำมันปาล์มมิดแฟรกชั่นเพื่อผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วจึงทำการศึกษารูปร่างของผลึกด้วยเทคนิค PLM เพื่อเปรียบเทียบรูปร่างผลึกของไขมันแต่ละชนิด

รูปร่างผลึกของไขมันแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในโครงสร้าง (Riberiro และคณะ, 2009) เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางเคมีของไขมัน จนกระทั่งมีคุณสมบัติตามที่ต้องการแล้ว ควรทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของไขมันด้วยเพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพโดยรวมของไขมันผลิตภัณฑ์ไขมันดัดแปลงดังกล่าว (Ahmadi และ Marangon, 2009) การเปรียบเทียบรูปร่างผลึกทำให้ทราบลักษณะทางกายภาพที่มองเห็นได้ของไขมันแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามผลึกที่ได้อาจจะสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมี ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 รูปภาพของผลึกไขมันเมล็ดมะม่วง(a) น้ำมันปาล์มมิดแฟรกชั่น (b) ไขมันทดแทนเนยโกโก้ (c) เนยโกโก้ (d) เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่มา: Sonwai และคณะ (2012)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบหลัก

3.1.1.1 เมล็ดเงาะสายพันธุ์โรงเรียน

จัดหาเมล็ดเงาะจากโรงงานแปรรูปเนื้อเงาะบรรจุกระป๋องบริษัท มาลีสามพราน จำกัด (มหาชน) อำเภอสสามพราน จังหวัดนครปฐม ที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงาน แล้วนำเมล็ดเงาะมาล้างและลอกเปลือกหุ้มสีน้ำตาล/เทาออกให้เหลือแต่ส่วนสีเหลืองด้านในที่มีลักษณะแข็งเปราะ มาเก็บใส่ถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน และปิดปากถุงอย่างแน่นหนา จากนั้นนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 °C เพื่อรอการนำไปอบแห้งแล้วสกัดน้ำมันต่อไป

3.1.1.2 เนยโกโก้ (Delfi DF 200, Pure prime deodorized) จากบริษัท ซีโน-แปซิฟิก เทรตติ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด

3.1.1.3 กรดไขมัน (stearic acid, palmitic acid, methyl palmitate และ methyl stearate) จากบริษัท Sigma Chemical Co.

3.1.1.4 เอนไซม์ไลเปส (LipozymeTM ผลิตจากเชื้อรา *Mucor miehei*) (Novo Laboratory Inc., Denmark)

3.1.1.5 ไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด Cocoa butter equivalent (CBE) มีชื่อทางการค้า Coberine ผลิตโดยบริษัท Lodens Croklaan

3.1.1.6 ไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด Cocoa butter substitute (CBS) มีชื่อทางการค้า Melarin-40 ตรา Fuji (Palmaju Edible Oil Sdn Bhd., Malaysia)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 เฮกเซน (Hexane, MacronTM chemicals., US)

3.1.2.2 อะซิโตน (Acetone, Fisher Scientific UK Limited., UK)

3.1.2.3 อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile, Fisher Scientific UK Limited., UK)

- 3.1.2.4 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether, MacronTM chemicals., US)
- 3.1.2.5 เอทานอล (Ethanol 95%(v/v))
- 3.1.2.6 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide $\geq$ 85% assay, Merck, UN 1813)
- 3.1.2.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide $\geq$ 99% assay, Merck, UN 1823)
- 3.1.2.8 โซเดียมซัลเฟต แอนไฮไดรรัส (Sodium sulphate anhydrous, Ajax Finechem Pty Ltd.)
- 3.1.2.9 ฟีนอล์ฟทาเลอิน อินดิเคเตอร์ (Phenolphthalein solution, Labchem, Asian pacific specialty chemicals limited.)
- 3.1.2.10 โพแทสเซียมอะซิเตด (Potassium acetate, Ajax Finechem Pty Ltd)
- 3.1.2.11 แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium chloride, Ajax Finechem Pty Ltd)
- 3.1.2.12 ลิเทียมคลอไรด์ (Lithium chloride dried, Ajax Finechem Pty Ltd)
- 3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์
 - 3.1.3.1 ตู้อบแบบสุญญากาศ (Vacuum dryer) (Vacuum oven VOS-300SD, Japan)
 - 3.1.3.2 เครื่องปั่นผสม (Waring Blender) (รุ่น Ultra Turrax T25 Basic บริษัท IKA, Germany)
 - 3.1.3.3 เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet Extraction, Tecator Soxtec HT6)
 - 3.1.3.4 เครื่อง rotary evaporator (Buchi Vac V-500, Switzerland)
 - 3.1.3.5 เครื่อง Hot Plate with Magnetic stirrer (CAT M6, Germany)
 - 3.1.3.6 เครื่อง water cooler (Eyela cool ACE CA-1100, Japan)
 - 3.1.3.7 เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ 2 ตำแหน่ง (บริษัท Sartorius, Germany)
 - 3.1.3.8 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น BP 221S, บริษัท Sartorius, Germany)
 - 3.1.3.9 ตู้เย็น Sanden intercool (Eliwall ID974, Thailand)
 - 3.1.3.10 TLC plates silica gel G Scored 10x20 cm, 250 micron(UniplateTM, Analtech)
 - 3.1.3.11 เครื่อง High-performance liquid chromatography-UV Detector (HPLC, Shimadzu SPD-M20A)
 - 3.1.3.12 คอลัมน์ reverse phase Inertsil[®] ODS-3 (5 ไมโครเมตร ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร จำนวน 2 column)(GL Sciences Inc., Japan)
 - 3.1.3.13 เครื่อง Differential Scanning calorimeter (DSC) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น DSC 8000
 - 3.1.3.14 เครื่อง Polarized Light Microscopy (PLM) (Olympus CH-2, Japan)

3.1.3.15 กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัลพร้อมชุด adapter สำหรับเชื่อมต่อเข้ากับ

PLM Olympus CAMEDIA digital camera (model NO. C-7070

Wide Zoom, 7.1 Megapixel, Japan)

3.1.3.16 เครื่อง Pulse-Nuclear Magnetic Resonance (p-NMR) ของบริษัท

BRUKER รุ่น the minispec mq20

3.1.3.17 Thermocouple

3.1.3.18 Water-jacketed beaker

3.1.3.19 ขวดแก้วเล็กสีชา ขนาด 4 และ 20 มิลลิตร (Vial)

3.1.3.20 Syringe (NIPPRO)

3.1.3.21 Syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.3.22 ถุงผ้า

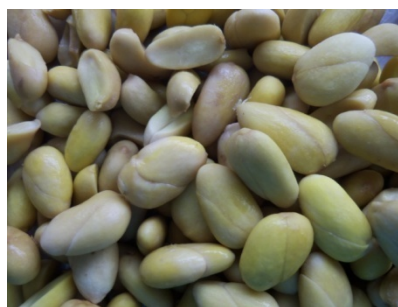
3.1.2.23 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 ซม.

3.1.3.24 อะลูมิเนียมฟอยล์

3.2 การสกัดไขมันเมล็ดเงาะ

ทำการสกัดไขมันจากเมล็ดเงาะโดยประยุกต์จากกรรมวิธีของ Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua(2004) ดังต่อไปนี้

3.2.1 นำเมล็ดเงาะที่แกะออกเหลือแต่เมล็ดสีเหลืองด้านใน (ภาพที่ 29) ไปอบแห้งในสภาวะสุญญากาศ ด้วยตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลานานประมาณ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความชื้นเหลืออยู่ไม่เกิน 10% (โดยน้ำหนักแห้ง)



ภาพที่ 29 เมล็ดเงาะก่อนลอกเปลือกหุ้มสีน้ำตาล/เทาออก (ซ้าย) และเมล็ดเงาะที่ลอกเปลือกหุ้มแล้วเหลือแต่ส่วนสีเหลืองด้านใน (ขวา)

3.2.2 นำไปบดหยาบและบดละเอียดให้เป็นผงด้วย KitchenAid blender ด้วยระดับความเร็วต่ำสุดและสูงสุดตามลำดับ แล้วเก็บใส่ภาชนะบรรจุแบบที่ป้องกันการสัมผัสกับอากาศอย่างมีประสิทธิภาพ (airtight containers) จากนั้นนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง (-18°C) เพื่อรอการนำไปสกัดไขมัน

3.2.3 นำผงเมล็ดเงาะไปทำการสกัดไขมันด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ *n*-hexane เป็นตัวทำละลาย ตามกรรมวิธีของ Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua (2004) ที่

อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลานานประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ดังแสดงในภาคผนวก ก

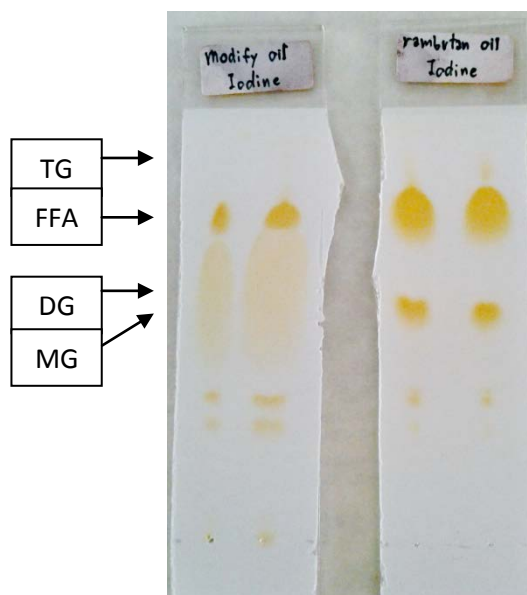
3.2.4 ไขมันที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Wesson method (Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua, 2003) ดังภาคผนวก ข แล้ววัดปริมาณ (โดยน้ำหนัก) ไขมันที่สกัดได้เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ของไขมันที่สกัดได้เทียบกับปริมาณของเมล็ดงาที่ตั้งต้น

3.2.5 กรองไขมันที่ได้ขณะร้อนด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1 ขนาดของรูกรอง เท่ากับ 11 ไมครอน) ในตู้อบสุญญากาศอุณหภูมิ 50°C เก็บไขมันที่ได้ให้พ้นจากอากาศและแสงแดด ที่อุณหภูมิ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

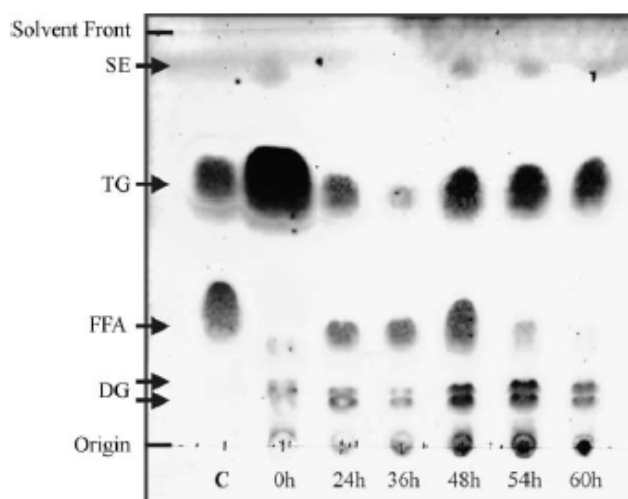
3.3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันโดยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) เพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ของไขมันเมล็ดงาก่อนและหลังการดัดแปลงเทียบกับไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์มาตรฐานที่ปรากฏขึ้นในแผ่น TLC จากวิธีในภาพผนวก ค

จากการศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยแผ่น TLC พบว่าองค์ประกอบของไขมันเมล็ดงาและไขมันเมล็ดงาดัดแปลงที่ทำการศึกษามีทั้งโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ แต่มีปริมาณแตกต่างกัน ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบที่มากที่สุด คือ Hexane ซึ่งไม่มีขั้ว ดังนั้นองค์ประกอบในไขมันที่ไม่มีขั้วจะสามารถละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วได้ดี ดังนั้นจึงสามารถเคลื่อนที่ไปได้มากจากระดับความมีขั้วที่แตกต่างกัน ทำให้ส่วนประกอบไขมันที่สามารถเคลื่อนที่ได้จากมากไปน้อยคือ ไขมันส่วนไตรกลีเซอไรด์ (TG) กรดไขมันอิสระ (FFA) ไดกลีเซอไรด์ (DG) และโมโนกลีเซอไรด์ (MG) ดังแสดงในภาพที่ 30 ภาพด้านขวา คือไขมันเมล็ดงาดัดแปลง ภาพด้านซ้ายคือ ไขมันเมล็ดงา หลังจากดัดแปลงโครงสร้างแล้วมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์น้อยลง มีปริมาณกรดไขมันอิสระมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด รวมทั้งโมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ก็มากกว่าเดิมเล็กน้อย ซึ่งตำแหน่งขององค์ประกอบไขมันที่ได้นั้นได้ทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแล้ว จากนั้นได้นำไขมันส่วนต่างๆ ไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเพื่อยืนยันอีกครั้งด้วยเทคนิค HPLC เพื่อที่จะได้ทราบ Retention time ขององค์ประกอบส่วนต่างๆ



ภาพที่ 30 TLC plate ที่ทำการแยกไขมันส่วนต่างๆในไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง (ซ้าย) และไขมันเมล็ดเงาะ (ขวา)

ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kahar และคณะ (2004) ทำการศึกษาสารบางชนิดในน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งจากการวิเคราะห์โดยใช้ TLC ตัวทำละลายที่ใช้ hexane : diethyl ether : acetic acid เป็นอัตราส่วน 80 : 30 : 1 (v/v) พบว่า องค์ประกอบของไขมันที่ถูกดูดซับโดยตัวทำละลายได้มากไปน้อย (ความสามารถในการเคลื่อนที่ไปกับตัวทำละลาย) คือไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และไดกลีเซอไรด์ ดังแสดงในภาพที่ 31



ภาพที่ 31 การวิเคราะห์ TLC เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันถั่วเหลือง (TG) ผสมกับ กรดโอเลอิก (FFA) ที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุม(C)

3.3.2 วิเคราะห์ชนิดและอัตราส่วนของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในไขมันที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) ทำการเปรียบเทียบไตรกลีเซอไรด์กับสารละลายมาตรฐาน OOO และ POP เพื่อให้ทราบ retention time ของไตรกลีเซอไรด์ที่สำคัญด้วยวิธีในภาคผนวก ง โดยทำการเตรียมตัวอย่างตามกรรมวิธีของ Ciftci และคณะ (2009) นอกจากนี้ยังได้ใช้ Retention time ของ POST และ StOST จากเนยโกโก้บริสุทธิ์เป็นตัวบ่งชี้หรือระบุตำแหน่งของ POP POST และ StOST ในไขมันเมล็ดเงาะที่ไม่ผ่านและผ่านการดัดแปลงโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน

3.4 การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆต่อปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันของไขมันเมล็ดเงาะกับ acyl donor ด้วยเอนไซม์ไลเปส

3.4.1 การศึกษาผลของชนิดของแหล่ง acyl donor

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ acyl donor ที่เป็นกรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ และที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ โดยทำการศึกษาปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของน้ำมันเมล็ดเงาะกับ acyl donor ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ methyl stearate (ให้กรดสเตียริก) methyl palmitate (ให้กรดปาล์มติก) stearic acid (ให้กรดสเตียริก) และ palmitic acid (ให้กรดปาล์มติก) ด้วยอัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor เป็น 1:2 (โดยมวล) ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของชนิดของแหล่ง acyl donor

สารตั้งต้น	อัตราส่วน (โดยมวล) ของ ไขมันเมล็ดเงาะ : acyl donor
rambutan seed fat + methyl palmitate	1:2
rambutan seed fat + methyl stearate	1:2
rambutan seed fat + palmitic acid	1:2
rambutan seed fat + stearic acid	1:2

ทุกการทดลองนั้นจะทำปฏิกิริยาที่ 65°C (Undurraga, 2001; Adhikari, 2009) เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง โดยจะชั่งมวลของ substrates คือ ไขมันเมล็ดเงาะกับ acyl donor ตามอัตราส่วนที่แสดงไว้ในตารางที่ 14 รวมกันเป็น 3 กรัม ใส่ลงในขวด vial (ขนาด 22ml) และใส่ magnetic bar แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 65°C เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์ในปริมาณ 10% (โดยน้ำหนัก) ของ substrates จากนั้นนำขวด vial ไปจุ่มใน water-jacketed beaker ที่มีน้ำร้อนอุณหภูมิ 65°C ไหลวน โดยอุปกรณ์ทั้งหมดนี้จะวางอยู่บน magnetic-stirrer plate ที่ปรับความเร็วรอบของการหมุนของ magnetic bar ไว้เป็น 200 rpm เอนไซม์ที่จะใช้เป็นเอนไซม์ไลเปส

ตรึงรูปมีชื่อทางการค้าว่า LipozymeTM ผลิตโดย Novo Laboratory Inc. (Copenhagen, Denmark) ซึ่งเป็นชนิด *sn*-1,3 specific lipase ผลิตจากเชื้อราชื่อ *Mucor miehei* โดยเอนไซม์ถูกตรึงบน macro-particulate ion exchange resin มีค่า a_w เริ่มต้นเป็น 0.11 ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยการเก็บเอนไซม์ไว้ข้ามคืนในเตาอบแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40°C แล้วนำไปเก็บไว้ในโถ desiccator ที่บรรจุสารละลายเกลืออิ่มตัว LiCl ด้วยวิธีตามภาคผนวก จ แล้วทำการเก็บเอนไซม์ไว้ในอุณหภูมิคงที่เป็นระยะเวลา 5 วัน หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (Tchobo และคณะ, 2009)

หลังจาก 8 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาผ่านไป นำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างหลังการเกิดปฏิกิริยาไปแยกเอนไซม์ออกอย่างรวดเร็วเนื่องจากไขมันจะแข็งตัวอย่างรวดเร็ว ด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman (Krishna De และคณะ, 2007) หลังจากนั้นนำไขมันไปแยกกรดไขมันอิสระ ดังแสดงในภาคผนวก ฉ เพื่อแยกโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ออกมาจากโมเลกุลเจอบนอื่นๆ ด้วยการทำให้เป็นกลาง (neutralization) เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระ ตามกรรมวิธีของ Lee และ Akoh (1998) หรือของ Alim และคณะ (2008) จากนั้นนำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงที่ผ่านการกำจัดกรดไขมันอิสระมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ด้วยเทคนิค HPLC ตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.3.2 แล้วทำการเลือกแหล่งของ acyl donor ที่ดีหรือเหมาะสมที่สุด โดยดูจากแหล่ง acyl donor ที่ให้ทั้ง POP POST และ StOSt

3.4.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor

3.4.2.1 อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor

ทำการศึกษาปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงา กับ acyl donor คือ กรดปาล์มิติกร่วมกับกรดสเตียริก (1:1) ด้วยอัตราส่วนของไขมันเมล็ดงา : acyl donor ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 15 ทำปฏิกิริยาที่ 65°C เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ใช้เอนไซม์ที่มีค่า a_w เริ่มต้นเป็น 0.11 ในปริมาณ 10% (โดยน้ำหนัก) ของสารตั้งต้น โดยจะทำการทดลองตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4.1 และเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วให้นำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างและผ่านการแยกกรดไขมันอิสระแล้วไปทำการวิเคราะห์คุณสมบัติด้วยเทคนิคเดียวกันกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.2 แล้วทำการเลือกอัตราส่วนของไขมันเมล็ดงา : acyl donor ที่เหมาะสมที่สุด โดยดูจากอัตราส่วนที่ให้ปริมาณรวมของ POP POST และ StOSt สูงที่สุด

3.4.2.2 อัตราส่วนของกรดปาล์มิติกต่อกรดสเตียริก

เมื่อทราบอัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor ที่เหมาะสมแล้ว ซึ่งจากผลการทดลองในหัวข้อ 3.4.2.1 พบว่า อัตราส่วนไขมันต่อ acyl donor 1:6 ให้ปริมาณรวมของ POP POST และ StOSt สูงสุด ดังนั้นจึงใช้อัตราส่วนนี้ทำการศึกษาอัตราส่วนของไขมันเมล็ดงา : กรดปาล์มิติก : กรดสเตียริก ดังแสดงในตารางที่ 16 โดยทำปฏิกิริยาที่ 65°C เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ใช้เอนไซม์ที่มีค่า a_w เริ่มต้นเป็น 0.11 ในปริมาณ 10% (โดยน้ำหนัก) ของสารตั้งต้น โดยจะทำการทดลองตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4.1 และเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วให้นำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างและผ่านการแยกกรดไขมันอิสระแล้วไปทำการวิเคราะห์คุณสมบัติด้วยเทคนิคเดียวกันกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.2 แล้วทำการเลือกอัตราส่วนของไขมันเมล็ดงา : กรดปาล์มิติก : กรดสเตียริก ที่เหมาะสมที่สุด โดยดูจากอัตราส่วนที่ให้ปริมาณรวมของ POP POST และ StOSt สูงที่สุด

ตารางที่ 15 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor

Acyl donor	อัตราส่วน (โดยมวล) ของ ไขมันเมล็ดงา : acyl donor
กรดปาล์มติก ร่วมกับ	1:1
กรดสเตียริก	1:2
(อัตราส่วนโดยมวลเป็น 1:1)	1:4
	1:6
	1:8
	1:10

ตารางที่ 16 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของกรดปาล์มติกต่อกรดสเตียริก

Acyl donor	อัตราส่วน (โดยมวล) ของ ไขมันเมล็ดงา : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก
กรดปาล์มติก ร่วมกับ	1:1:5
กรดสเตียริก	1:2:4
	1:4:2
	1:5:1

3.4.3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

ทำการศึกษาปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงากับ acyl donor ที่เป็กรดปาล์มติกร่วมกับกรดสเตียริก ด้วยระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 17 ทำปฏิกิริยาที่ 65°C ใช้เอนไซม์ที่มีค่า a_w เริ่มต้นเป็น 0.11 ในปริมาณ 10% (โดยน้ำหนัก) ของ substrates โดยใช้อัตราส่วนของไขมันเมล็ดงา : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก ที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.4.2.2 และทำการทดลองตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ได้ อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4.1 และเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วให้นำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างและ ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทำการวิเคราะห์คุณสมบัติ ด้วยเทคนิคเดียวกันกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.2 แล้วทำการเลือกระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่สุด โดยดูจากอัตราส่วนที่ให้ปริมาณ รวมของ POP POST และ StOST สูงที่สุด

ตารางที่ 17 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

Acyl donor	อัตราส่วน (โดยมวล) ของ ไขมันเมลิตเงาะ : acyl donor	ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)
กรดปาล์มติก ร่วมกับ กรดสเตียริก (อัตราส่วนโดยมวลเป็น 1:1)	1:6	0
		2
		4
		6
		8
		10
		12
		24
		48

3.4.4 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

ทำการศึกษาปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมลิตเงาะกับ acyl donor ที่เป็กรดปาล์มติกร่วมกับกรดสเตียริก ด้วยปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 18 โดยเอนไซม์ที่ใช้ที่มีค่า a_w เริ่มต้นเป็น 0.11 ทำปฏิกิริยาที่ 65°C เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้หัวข้อ 3.4.3 พบว่าเป็นระยะเวลาที่ให้ปริมาณรวมของ POP POST และ StOst สูงที่สุด ใช้อัตราส่วนของไขมันเมลิตเงาะ : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในหัวข้อ 3.4.2.2 โดยจะทำการทดลองตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4.1 และเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วให้นำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างและผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปทำการวิเคราะห์คุณสมบัติด้วยเทคนิคเดียวกันกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.2

ตารางที่ 18 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

Acyl donor	อัตราส่วน (โดยมวล) ของ ไขมันเมลิตเงาะ : acyl donor	ปริมาณเอนไซม์ (% โดยน้ำหนักของ substrates)
กรดปาล์มติก ร่วมกับ กรดสเตียริก (อัตราส่วนโดยมวลเป็น 1:1)	1:6	5
		8
		10
		12
		15

3.4.5 การศึกษาผลของความชื้นหรือค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์

ประสิทธิภาพในการทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแบบ biocatalyst ของเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับ interfacial interaction บนผิวเอนไซม์ซึ่งมีน้ำที่ถูกดูดซับไว้เป็นตัวควบคุมอีกทีหนึ่ง (Lopez-Giraldo และคณะ, 2007) ในหัวข้อนี้จะทำการศึกษาปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมลิตเจาะกับ acyl donor ที่เป็นการดปาล์มิตกร่วมกับกรดสเตียริก ด้วยเอนไซม์ที่มีค่า a_w เริ่มต้นที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 19 ซึ่งค่า a_w เริ่มต้นที่แตกต่างกันของเอนไซม์สามารถเตรียมได้โดยใช้สารละลายเกลืออิมิตัวที่อุณหภูมิ 25°C คือ LiCl ($a_w = 0.11$) CH₃COOK ($a_w = 0.23$) และ MgCl₂ ($a_w = 0.33$) ทำปฏิกิริยาที่ 65°C เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง ใช้เอนไซม์ในปริมาณ 10% (โดยน้ำหนัก) ของสารตั้งต้น โดยจะทำการทดลองตามขั้นตอนต่างๆ ตามที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.4.1 และเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้วให้นำไขมันที่ผ่านการดัดแปลงโครงสร้างและผ่านการกำจัดกรดไขมันอิสระแล้วไปทำการวิเคราะห์คุณสมบัติด้วยเทคนิคเดียวกันกับที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อ 3.3.2

ตารางที่ 19 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์

Acyl donor	อัตราส่วน (โดยมวล) ของ ไขมันเมลิตเจาะ : acyl donor	ค่า a_w เริ่มต้นของ เอนไซม์
กรดปาล์มิติก ร่วมกับ กรดสเตียริก (อัตราส่วนโดยมวลเป็น 1:1)	1:6	0.11 0.23 0.33

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้ในหัวข้อ 3.4 มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SAS (SAS,9.0) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (Duncan, 1995) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95% ($\alpha = 0.05$)

3.6 การคัดเลือกสภาวะในการดัดแปลงไขมันที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำไปผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ด้วยปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์

ทำการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราส่วนของไขมันเมลิตเจาะ : กรดปาล์มิติก : กรดสเตียริก เป็น 1 : 3 : 3 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมง โดยเลือกใช้เอนไซม์ที่มี a_w เริ่มต้น 0.11 ในปริมาณ 10% (โดยน้ำหนัก) ของสารตั้งต้น แล้วทำการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้โดยใช้สภาวะเหล่านี้ โดยดูจากการให้ปริมาณรวมของ POP POST และ StOST สูงที่สุด (ดูจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติในหัวข้อ 3.5 ประกอบ)

3.7 การศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพของไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ผลิตขึ้นโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เลือกไว้

ทำการศึกษาพฤติกรรมการตกผลึกเปรียบเทียบกับของเนยโกโก้และของไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด (Coberine และ Melarin) โดยมีขั้นตอนของการศึกษาดังต่อไปนี้

3.7.1 ศึกษาอุณหภูมิในการตกผลึกและอุณหภูมิในการหลอมเหลว (crystallization and melting curves) ด้วยเทคนิค Differential scanning calorimetry วิธีการทดลองแสดงในภาคผนวก ข เพื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิในการหลอมเหลว ตกผลึก อัตราการดูดความร้อน การคายความร้อนของไขมันชนิดต่างๆ

3.7.2 ศึกษารูปร่างผลึก (crystal morphology) ด้วยเทคนิค Polarized-Light Microscopy ในระหว่างการตกผลึกที่ 25°C ในสภาวะนิ่งของตัวอย่างไขมันเมล็ดเงาะ ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง เนยโกโก้ และไขมันทดแทนเนยโกโก้ (Coberine และ Melarin) ดังแสดงในภาคผนวก ข โดยกล้องถ่ายภาพแบบ digital ซึ่งมีกำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุเท่ากับ x10 และกำลังขยายของเลนส์ใกล้ตา x10

3.7.3 ศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึก (Solid fat content; %SFC) ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 15.0 17.5 20.0 22.5 25.0 27.5 30.0 32.5 35.0 40.0°C เตรียมตัวอย่างดังแสดงในภาคผนวก ฉ จากนั้นทำการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %SFC และอุณหภูมิ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของแข็งในรูปผลึกของไขมันแต่ละชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ และรวมถึงพฤติกรรมในการหลอมเหลวของไขมัน

3.8 การวิเคราะห์ผล สรุปผล

ทำการศึกษาลักษณะทางเคมี และทางกายภาพของเนยโกโก้ ไขมันเมล็ดเงาะก่อนและหลังดัดแปลง Melarin และ Coberine ที่ได้จากการทดลอง 3.3-3.7 มาสรุปผลว่าไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงควรจะนำมาผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิดใด เพื่อที่จะสามารถนำไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงที่ได้มาใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่เหมาะสมที่สุด โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งในทุกการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

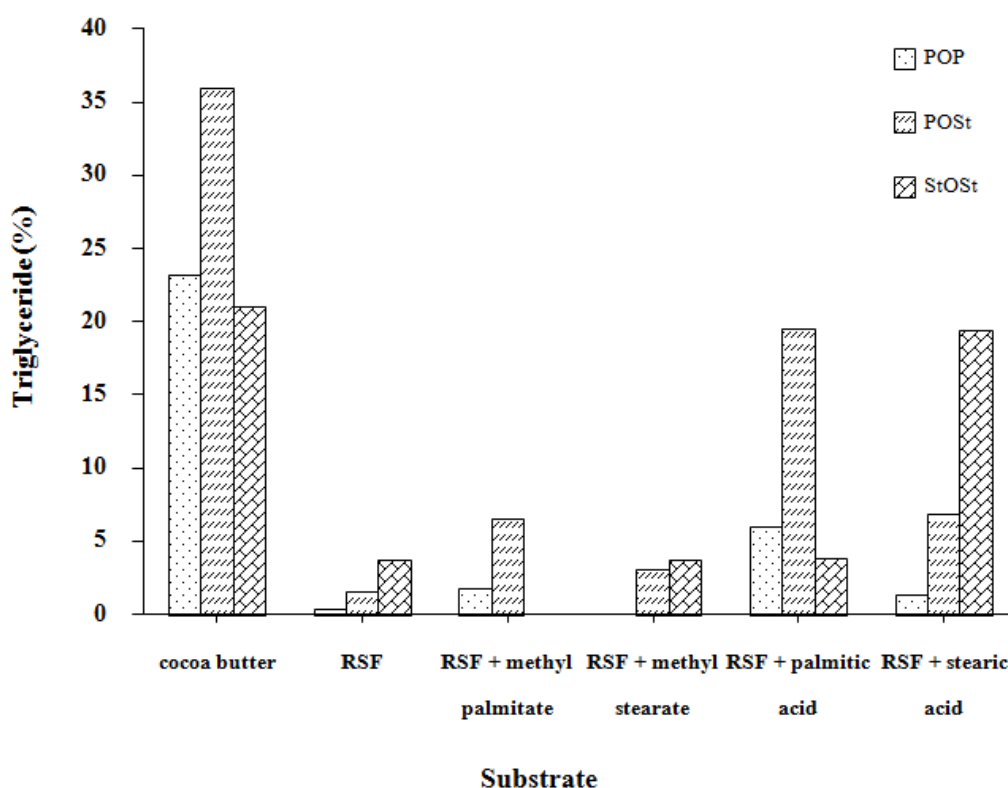
4.1 การสกัดไขมันเมล็ดเงาะ

เมื่อทำการสกัดไขมันเมล็ดเงาะด้วยวิธี Soxhlet extraction ตามกรรมวิธีของ Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua (2004) โดยตัวทำละลายที่เลือกใช้คือ hexane ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษาศักยภาพในการสกัดไขมันจากเมล็ดเงาะก็เลือกใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย (Solis-Fuentes และคณะ, 2010; Sirisompong และคณะ, 2011) ทั้งนี้เพราะว่า Hexane เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดไตรกลีเซอไรด์จากเมล็ดพืชที่มีน้ำมัน (Kuk และคณะ, 2005) หลังจากนั้นนำไขมันที่สกัดได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Wesson method (Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua, 2003) แล้วพบว่าเมล็ดเงาะโรงเรียนมีปริมาณไขมัน (crude fat) ร้อยละ 29.26 ± 2.09 (โดยน้ำหนักเมล็ดเงาะแห้ง) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานปริมาณไขมันที่สกัดได้จากเมล็ดเงาะดังนี้ Sirisompong และคณะ (2011) พบว่าการสกัดได้ปริมาณไขมันเมล็ดเงาะอยู่ในช่วง 18.86-35.74 กรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเมล็ดเงาะ (dry basis) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 31.19 กรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเมล็ดเงาะ นอกจากนี้ Solis-Fuentes และคณะ (2010) สามารถสกัดได้ปริมาณไขมันเมล็ดเงาะค่าเฉลี่ยประมาณ 33.4% ของน้ำหนักเงาะเมล็ดแห้ง และเมื่อนำไขมันจากเมล็ดเงาะที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันพบว่าประกอบไปด้วยกรดไขมันชนิดหลัก 3 ชนิดคือ กรดอะราคิติก (C_{20}) 42.5% กรดโอเลอิก ($C_{18:1}$) 33.1 % และกรดสเตียริก (C_{18}) 8.7%

4.2 การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันของไขมันเมล็ดเงาะกับ acyl donor ด้วยเอนไซม์ไลเปส

4.2.1 การศึกษาผลของชนิดของแหล่ง acyl donor

จากการเปรียบเทียบการใช้ acyl donor ที่เป็นกรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ (fatty acid methyl ester) และที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) พบว่าการใช้ acyl donor ที่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระจะให้ไตรกลีเซอไรด์ชนิด POP, POST และ StOST ซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์หลักที่มีอยู่ในเนยโกโก้ประมาณ 78-88% (Underaga และคณะ, 2001; Ciftci และคณะ, 2009) ในปริมาณที่สูงกว่าการใช้ acyl donor ที่เป็นกรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ ดังแสดงในภาพที่ 32 และตารางที่ 24 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ไตรกลีเซอไรด์ในภาคผนวก ญ



ภาพที่ 32 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชั่นแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงาด้วย acyl donor ต่างชนิดกัน

การดัดแปลงโครงสร้างไขมันเมล็ดงาด้วยการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชั่นโดยใช้เอนไซม์ไลเปส ซึ่งได้เลือกใช้เอนไซม์ไลเปสที่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่ง *sn*-1 และ *sn*-3 จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชั่นของไขมันเมล็ดงากับ acyl donor ที่ให้กรดปาล์มิติก (methyl palmitate และ palmitic acid) พบว่าไขมันเมล็ดงาดัดแปลงมีปริมาณ POP และ POST มากขึ้นกว่าไขมันเมล็ดงาก่อนดัดแปลง ส่วนการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟเคชั่นของไขมันเมล็ดงากับ acyl donor ที่ให้กรดสเตียริก (methyl stearate และ stearic acid) พบว่าไขมันเมล็ดงาดัดแปลงมีปริมาณ POST และ StOSt มากขึ้นกว่าไขมันเมล็ดงาก่อนดัดแปลง แสดงให้เห็นว่ากรดไขมันที่เติมลงไปสามารถเข้าไปแทนที่ไตรกลีเซอไรด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่เลือกใช้สามารถตัดกรดไขมันที่อยู่ในไตรกลีเซอไรด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 และมีการแทนที่ด้วยกรดสเตียริก และกรดปาล์มิติกที่เติมลงไปนั่นเอง

เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวกับการศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างไขมัน ได้มีการเลือกใช้ acyl donor ทั้งที่เป็นกรดไขมันอิสระ และกรดไขมันที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ จึงต้องทำการศึกษาชนิดของ acyl donor ที่เหมาะสมกับไขมันเมล็ดงา เนื่องจากน้ำมันหรือไขมันแต่ละชนิดอาจมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ acyl donor ได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Rao และคณะ (2001) ศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างน้ำมันมะพร้าวด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์รีฟ

เค ชัน ซึ่งในน้ำมันมะพร้าวกรดไขมันที่มีปริมาณมาก คือ กรดลอริก กรดไมริสติก และกรดปาล์มติก จึงทำการเติม Stearic acid methyl ester (ให้กรดสเตียริก) ลงไปในน้ำมันมะพร้าวเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแข็งและคงตัวมากขึ้นจากกรดสเตียริกที่เติมลงไปซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีจุดหลอม เหลวสูง งานวิจัยของ Ciftci และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันมะกอก (Refined olive pomace oil) โดยทำปฏิกิริยา acidolysis กับ กรดปาล์มติก และกรดสเตียริก เนื่องจากน้ำมันมะกอกมีปริมาณกรดปาล์มติกและกรดสเตียริก 13.00 และ 3.00% ตามลำดับ ซึ่งในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้กรดไขมันที่ต้องการ คือ กรดโอเลอิก กรดปาล์มติกและกรดสเตียริก แต่เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างแล้วมีปริมาณน้อย จึงต้องทำการเติมทั้งกรดปาล์มติกและกรดสเตียริก ลงไปจากที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องจากไขมันเมล็ดเงาะมีกรดปาล์มติก 6.1% และกรดสเตียริก 7.1% ซึ่งมีปริมาณน้อย (Solis-Fuentes และคณะ, 2010) จึงควรที่จะเติมทั้งกรดปาล์มติก และกรดสเตียริก ในโครงสร้างเพื่อให้โครงสร้างมีไตรกลีเซอไรด์ POP POST และ StOSt มากขึ้น

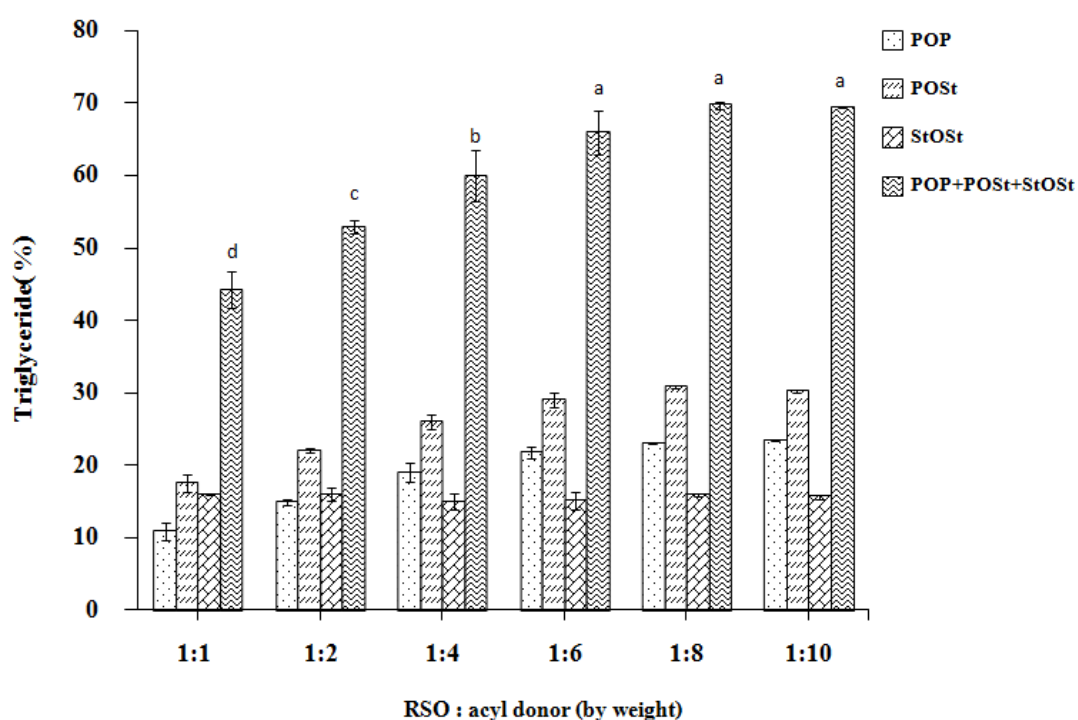
4.2.2 การศึกษาสัดส่วนของไขมันต่อ acyl donor

4.2.2.1 อัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor

จากการศึกษาสัดส่วนของสารตั้งต้น คือ ไขมันเมล็ดเงาะ: acyl donor โดยเลือกใช้ acyl donor จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ คือ กรดปาล์มติก และกรดสเตียริก ที่สัดส่วนต่างๆ คือ 1:1 1:2 1:4 1:6 1:8 และ 1:10 โดยน้ำหนัก (จากการเลือกใช้กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก เป็นอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก) ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 33 และตารางที่ 25 (ภาคผนวก ก) ซึ่งพบว่ามีปริมาณ POP และ POST เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อปริมาณ acyl donor เพิ่มขึ้นจาก 1:1 ไปเป็น 1:6 และที่อัตราส่วน 1:6 ไปเป็น 1:8 และ 1:10 นั้น ให้ปริมาณ POP และ POST สูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ปริมาณ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา อินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันที่อัตราส่วนต่างๆของไขมันเมล็ดเงาะ : acyl donor ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าปริมาณ acyl donor ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อปริมาณของ StOSt ส่วนปริมาณรวมของไตรกลีเซอไรด์หลักที่มีอยู่ในเนยโกโก้ คือ POP + POST + StOSt จากการทำปฏิกิริยาที่สัดส่วนของไขมันเมล็ดเงาะ: acyl donor 1:6 1:8 และ 1:10 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ค่าที่สูงกว่าที่สัดส่วน 1:1 1:2 และ 1:4 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สัดส่วน 1:6 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากเป็นใช้ acyl donor ในปริมาณน้อยที่สุด เพื่อเป็นการลดต้นทุน นอกจากนี้การใช้ acyl donor มากก็ทำให้เหลือปริมาณ acyl donor มากตามไปด้วย (Wang และคณะ, 2006) ซึ่งหลังจากทำปฏิกิริยาก็จะต้องทำการกำจัดกรดไขมันอิสระออก นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า กรดสเตียริกมีประสิทธิภาพในการเป็น acyl donor ที่ดีกว่ากรดปาล์มติก (Liu และคณะ, 2007) เมื่อเปรียบเทียบในสภาวะเดียวกัน สังเกตได้จากผลการทดลอง เมื่อมีการใช้ acyl donor มากขึ้น (ทุกอัตราส่วนมีปริมาณกรดปาล์มติก : กรดสเตียริก เป็น 1:1) ปริมาณของ POP จะมีค่ามากขึ้น แต่ปริมาณ acyl donor ที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อปริมาณ StOSt ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Ciftci และคณะ (2009) ที่ทำการศึกษาการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันมะกอก โดยทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันกับกรดปาล์มติก และกรดสเตียริกที่มีอัตราส่วนโดยมวลของ น้ำมันมะกอก:กรดปาล์มติก: กรดสเตียริก คือ 1:1:1 1:1:3 1:3:3 และ 1:2:6 โดยโมล สังเกตได้ว่าที่

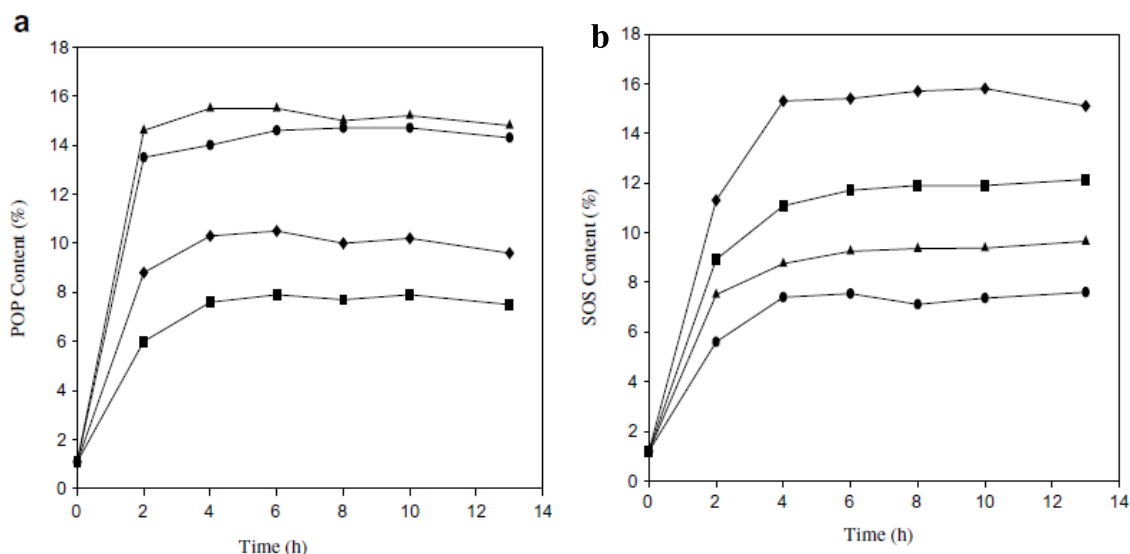
อัตราส่วน 1:1:1 โดยโมล ให้ปริมาณ POP มากกว่า StOSt ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง โดยมีปริมาณ POP และ StOSt ประมาณ 14% และ 7% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 34

การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะด้วยปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้อัตราส่วนไขมันเมล็ดเงาะ : acyl donor เป็นอัตราส่วน 1:6 โดยน้ำหนัก มีปริมาณของ POP POST และ StOSt เป็น 21.8 29.1 และ 15.1% ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับเนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาดที่นำมาศึกษาพบว่า มี POP POST และ StOSt 23.2 35.9 และ 21.0% ตามลำดับ จึงทำการเลือกสัดส่วนดังกล่าวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยอื่นต่อไป



ภาพที่ 33 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะต่อ acyl donor ที่สัดส่วนต่างๆ

* ตัวอักษร a,b,c ในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

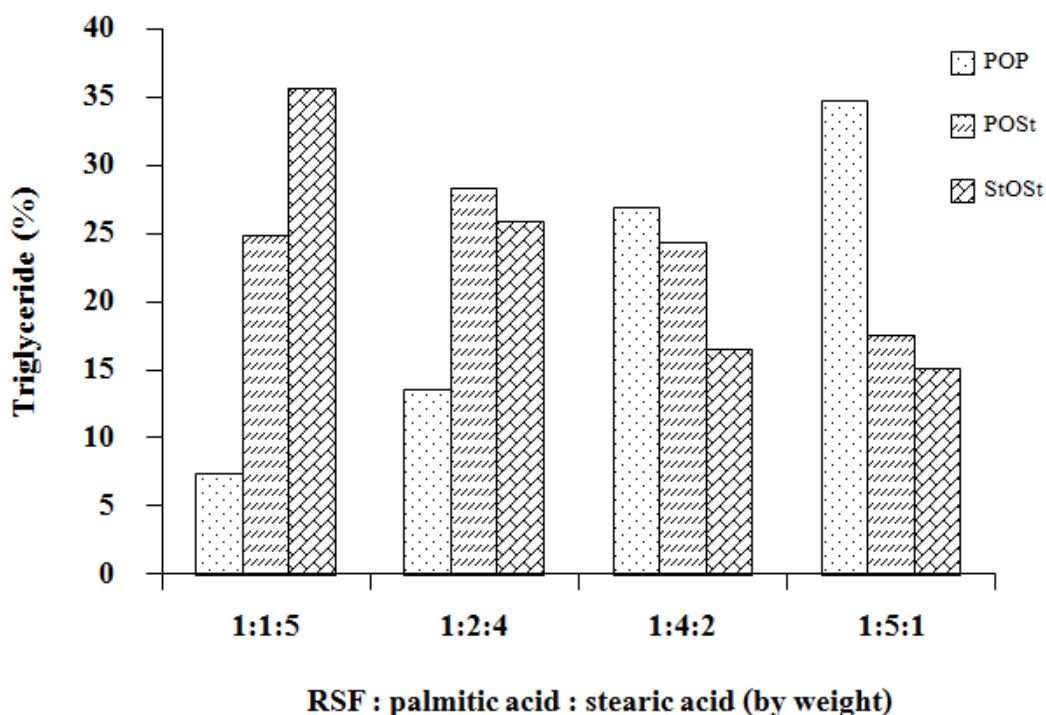


ภาพที่ 34 ปริมาณของ POP (a) และ StOSt (b) (%) ที่ได้จากการดัดแปลงน้ำมันมะกอก :
 กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก (●) 1:1:1, (■) 1:1:3, (▲) 1:3:3 and (◆) 1:2:6. รีก
 ที่มา: Ciftci และคณะ (2009)

4.2.2.2 อัตราส่วนของกรดปาล์มติกต่อกรดสเตียริก

การทำปฏิกิริยาโดยใช้ acyl donor ที่สัดส่วนต่างๆ ต้องคำนึงถึงธรรมชาติของสารตั้งต้นด้วย โดยจากการทดลองอัตราส่วนของไขมันต่อ acyl donor ที่เหมาะสม คือ 1:6 จึงทำการศึกษาผลของสัดส่วนของ acyl donor ที่สัดส่วนต่างๆ และได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 35 และตารางที่ 26 (ภาคผนวก ญ) ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นการแสดงให้เห็นอีกครั้งว่าถ้าหากใช้กรดสเตียริกปริมาณมาก จะส่งผลทำให้มี StOSt มาก แต่หากใช้กรดปาล์มติกมากก็จะส่งผลทำให้มี POP มาก เช่นเดียวกัน หมายความว่ากรดไขมันอิสระทั้งสองชนิดที่เติมลงไป สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยเข้าไปเชื่อมต่อกับไตรกลีเซอไรด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้ แต่จากการทดลองไขมันเมล็ดเงาะ:กรดปาล์มติก:กรดสเตียริก คือ 1:1:5 1:2:4 1:4:2 และ 1:5:1 ให้ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ต้องการในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม เนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาดที่นำมาศึกษามากที่สุด พบว่า มี POP POST และ StOSt 23.2 35.9 และ 21.0% ตามลำดับ (อัตราส่วนของ POP : POST : StOSt เป็น 0.65 : 1 : 0.58) ซึ่งอัตราส่วน 1:2:4 เป็นอัตราส่วนที่ดีกว่าอัตราส่วนอื่นๆ คือมีปริมาณ POP POST และ StOSt 13.5 28.3 และ 25.8% ตามลำดับ (ให้อัตราส่วนของ POP : POST : StOSt เป็น 0.48 : 1 : 0.91) จะเห็นได้ว่ามีสัดส่วนของ StOSt มากเกินไปจะส่งผลให้ไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ได้มีจุดหลอมเหลวสูงเกินไปละลายได้ยาก และยังมีอัตราส่วนที่ไม่ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนไขมันเมล็ดเงาะต่อ acyl donor 1:6 โดยที่ใช้กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก เป็น 1:1 (ไขมันเมล็ดเงาะ:กรดปาล์มติก:กรดสเตียริก เป็น 1:3:3) ซึ่งส่งผลทำให้มีปริมาณ POP POST และ StOSt 21.8 29.1 และ 15.1 ตามลำดับ (อัตราส่วนของ POP : POST : StOSt เป็น 0.75 : 1 : 0.52) ซึ่งการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะด้วยปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้ไขมันเมล็ดเงาะ:

กรดปาล์มติก:กรดสเตียริก ที่อัตราส่วน 1:3:3 มีความเหมาะสมที่สุด จึงทำการเลือกสัดส่วนดังกล่าว เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หีบจ่ายต่อไป



ภาพที่ 35 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะ : อัตราส่วนของกรดปาล์มติก : กรดสเตียริกที่สัดส่วนต่างๆ

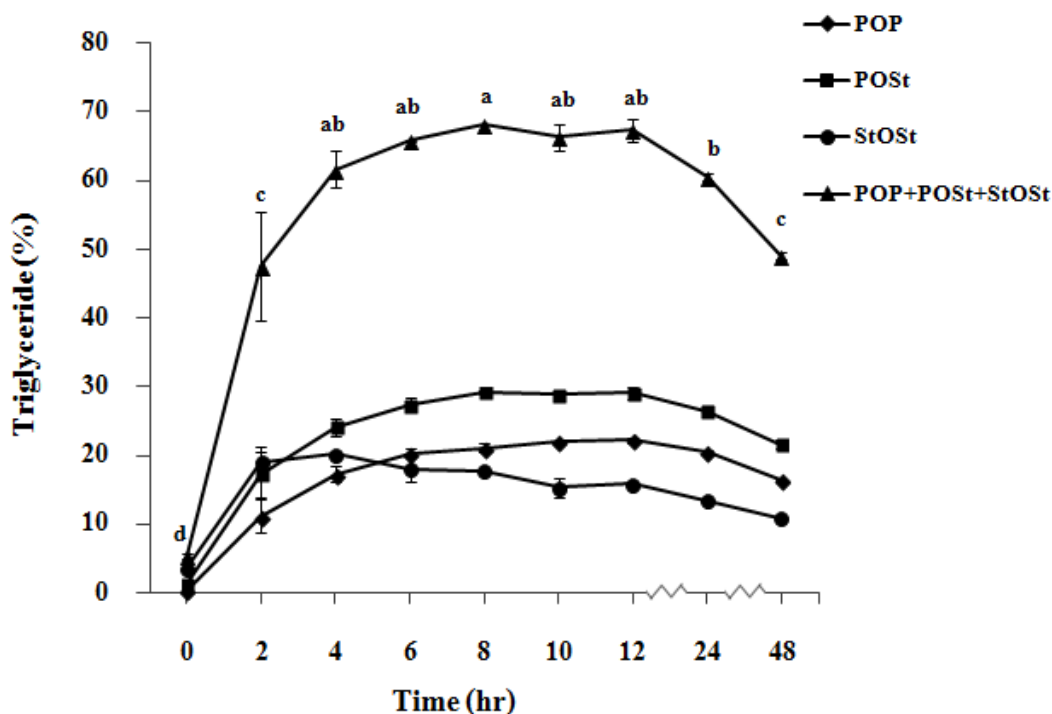
4.2.3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

จากผลการทดลองเมื่อระยะเวลามากขึ้นทำให้ได้ปริมาณ POP POST และ POP+POST+StOSt มากขึ้น จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 8 จะมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์สูงสุด หลังจาก 8 ชั่วโมง จะมีปริมาณ POP POST และ POP+POST+StOSt ลดลงเรื่อยๆ ส่วนระยะเวลาที่ทำให้ได้ปริมาณ StOSt มากที่สุด คือ 2 และ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ ดังแสดงในภาพที่ 36 และตารางที่ 27 (ภาคผนวก ก) นอกจากนี้พบว่าปริมาณของ POP+POST+StOSt ที่ระยะเวลา 4, 6, 8, 10, 12 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ปริมาณ POP และ POST ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 6 8 10 12 และ 24 ชั่วโมงมีค่ามากที่สุด และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนปริมาณของ StOSt ที่ได้ จากการทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลผลรวม POP + POST + StOSt แล้วพบว่าที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 6 และ 8 ชั่วโมง มีอัตราส่วนของ POP : POST : StOSt เป็น 0.74 : 1 : 0.66 และ 0.72 : 1 : 0.61 ตามลำดับ (โดยน้ำหนัก) ซึ่งมีความ

ใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ (0.65 : 1 : 0.58) มากกว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาอื่นๆ และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 6 และ 8 ชั่วโมงนั้น การทำปฏิกิริยาเป็นระยะ 6 ชั่วโมง แม้จะส่งผลทำให้มีปริมาณของ POP และ StOst มีมาก แต่ปริมาณของ POST ที่ได้มีค่าต่ำ ซึ่งปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ที่มีมากที่สุดในเนยโกโก้คือ POST จึงทำการเลือกระยะเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยอื่นต่อไป

การทำปฏิกิริยาเมื่อกรดไขมันถูกตัดออกจากไตรกลีเซอไรด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 แล้วอาจจะไม่กลับมาต่อในโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ เนื่องจากกรดสเตียริกมีความสามารถในการเป็น acyl donor ที่ด้อยประสิทธิภาพกว่ากรดปาล์มิติก ดังได้กล่าวไปแล้วในก่อนหน้านี้ (Liu และคณะ, 2007; Ciftci และคณะ, 2009) ดังนั้นขณะทำปฏิกิริยากรดสเตียริกจะมีความสามารถในการเข้าจับกับกลีเซอรอลได้น้อยกว่ากรดปาล์มิติก หรือกล่าวได้ว่าหากโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ที่ตำแหน่ง 1 และ 3 พร้อมสำหรับการทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน กรดปาล์มิติกจะสามารถแย่งจับได้ดีกว่ากรด สเตียริก ส่วนการทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลาในช่วงแรกในระบบมีกรดปาล์มิติกและกรดสเตียริกปริมาณมากจากที่เติมลงไป เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสจะทำการตัดกรดไขมันที่มีอยู่เดิมในโครงสร้างออก แล้วเติมกรดปาล์มิติกและกรดสเตียริกลงไป แต่เมื่อปฏิกิริยาดำเนินต่อไปทำให้ในระบบมีปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่ถูกตัดออกจากไตรกลีเซอไรด์มากขึ้น เอนไซม์ไลเปสก็จะทำการตัดกรดปาล์มิติกและกรดสเตียริกที่มีอยู่ในโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ออกแล้วอาจทำการต่อกรดไขมันชนิดต่างๆ ที่มีอยู่เดิมในโครงสร้างไขมันเมล์ดเงาจะกลับคืนไปในโครงสร้าง ส่งผลทำให้มีปริมาณ POP+POST+StOst น้อยลงเมื่อใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้น



ภาพที่ 36 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะที่ระยะในการทำปฏิกิริยาเวลาแตกต่างกัน

* ตัวอักษร a,b,c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ ทั้งปริมาณ POP POST และ StOST มีปริมาณลดน้อยลงเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น โดยเฉพาะ StOST นั้นมีการเริ่มลดลงของปริมาณ ก่อน POP และ POST จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจว่างานวิจัยที่ผ่านมาได้มีผลการทดลองคล้ายกันทำนองนี้หรือไม่ จึงทำการรวบรวมข้อมูลที่ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ ดังนี้

งานวิจัยที่ศึกษาผลของระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันของ Jeyarani และ Reddy (2010) โดยดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมัน mahua ผสมกับไขมัน kokum ซึ่ง kokum เป็นไขมันแข็งที่มีปริมาณกรดสเตียริกสูงประมาณ 62% และ mahua เป็นไขมันกึ่งของแข็งประมาณ 50% เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว เพื่อดัดแปลงโครงสร้างให้คล้ายคลึงกับไขมันที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจิเนชันที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร หรือเบเกอรี่ ทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้น้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum เป็นสัดส่วน 50:50 โดยน้ำหนัก ใช้เอนไซม์ไลเปสที่เฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่ง sn-1,3 ซึ่งอยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) จากเชื้อ *Thermocycles lanuginosus* 10% ของน้ำหนักสารตั้งต้น เติม hexane 2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 30 นาที, 1, 2, 3, 5, 6 และ 24 ชั่วโมง การใช้สารตั้งต้นในปริมาณที่เท่ากัน แต่ใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกันมีผลทำให้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน โดยทำให้ได้ไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆในปริมาณแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 20 ในที่นี้ไตรกลีเซอไรด์ที่สนใจ คือ POP POST และ StOST จะเห็นได้ว่า StOST มีปริมาณลดลง เมื่อระยะเวลาเพิ่มมากขึ้น

และที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง จะทำให้มีปริมาณ POST มากที่สุด คือ 22.4% ขององค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ ในขณะที่ StOSt และ POP ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มปฏิกิริยา ดังนั้นแสดงว่าที่ชั่วโมงที่ 2 เหมาะสมที่สุด ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้สำหรับงานวิจัยดังกล่าว

ตารางที่ 20 องค์ประกอบของไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการผสมน้ำมัน mahua และ ไขมัน kokum ด้วยการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟเคชั่นแบบใช้เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55°C ด้วยเวลาแตกต่างกัน

Time	StStSt	PStSt	PPSt	StOSt	POST	POP	POO	StOO	OOO	PLO/PPL
0 h	0.6	0	0.3	50.4	12.9	8.6	7.6	6.6	1.9	6.5
30 min	1	0.6	0.3	40.8	19.3	6.9	9.3	12.1	1.7	4.2
1 h	1.9	1.9	0.6	31.3	22	6.8	10.9	15.1	1.7	4
2 h	2.3	2.1	0.8	31.6	22.4	6	12	14.8	1.1	3.8
3 h	3.1	2.8	0.8	25.7	18.8	5.1	11.3	16.2	1.6	3.4
5 h	4.3	3.9	1.1	24.1	17.4	4.4	10.5	15.6	2.5	3
6 h	4.7	4.7	1.2	23	16.3	4.5	10	15	2.6	3.1
24 h	7.3	6.3	1.8	20.5	16	4.2	11.9	15.3	3.3	3.5

หมายเหตุ: P คือ กรดปาล์มติก O คือ กรดโอเลอิก St คือ กรดสเตียริก L คือ กรดลิโนเลอิก
ที่มา: Jeyarani และ Reddy (2010)

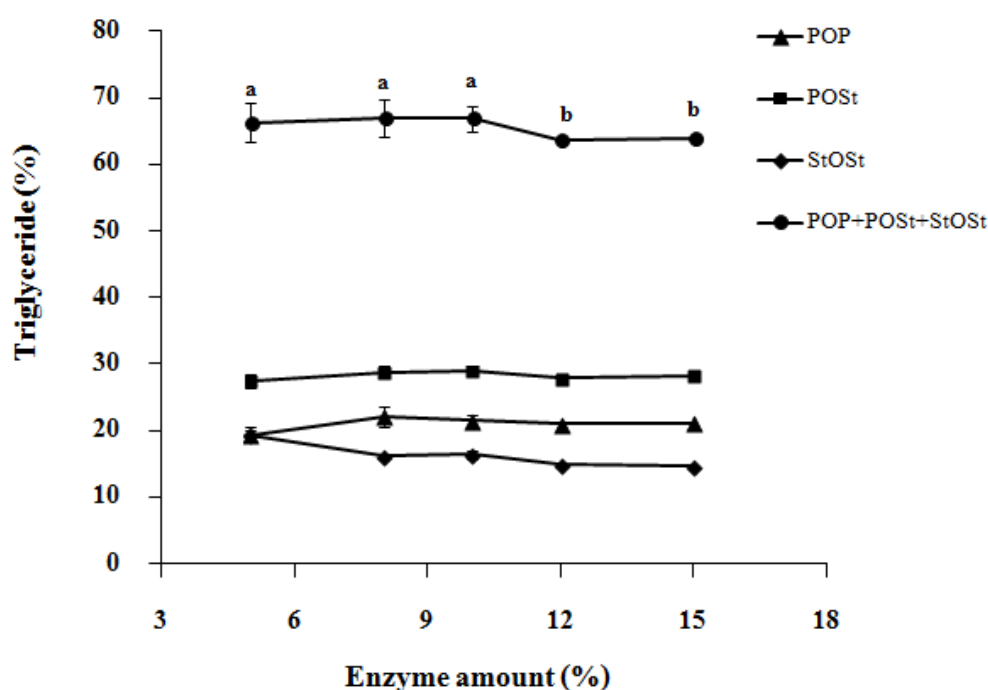
เมื่อระยะเวลามากขึ้นปริมาณของไตรกลีเซอไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นกรดไขมันอิ่มตัว (trisaturated) เช่น PStSt และ StStSt จะค่อยๆเพิ่มปริมาณขึ้นเป็น 6.3 และ 7.3% ตามลำดับ ในขณะที่ StOSt ค่อยๆลดลงจาก 50% จนกระทั่งเหลือ 20.5% ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการรายงานไว้ว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดไตรกลีเซอไรด์ที่มีจุดหลอมเหลวสูง นั่นก็คือไตรกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นจะมีกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ทุกตำแหน่ง หลังจากทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟเคชั่น (Long และคณะ, 2003)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่ามีผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการดัดแปลงไขมันเมลต์เงาะในงานวิจัยนี้ กล่าวคือ เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นส่งผลกระทบทำให้กรดไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์ที่ต้องการในโครงสร้างมีการเปลี่ยนแปลงไป

4.2.4 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้น จะยิ่งทำให้ไตรกลีเซอไรด์ถูกตัดโครงสร้างของกรดไขมันในตำแหน่งที่ 1 และ 3 มากขึ้น หลังจากนั้นจะมีการต่อกรดไขมันอิสระเข้าไปในโครงสร้างกลีเซอรอล แต่การที่กรดไขมันอิสระจะสามารถเข้าไปต่อในโครงสร้างได้นั้น ขึ้นอยู่กับสถานะที่ ทำปฏิกิริยาด้วย อย่างไรก็ตามการที่จะใช้เอนไซม์ปริมาณมากจะเป็นการเพิ่มต้นทุนกับอุตสาหกรรม จากปริมาณ

เอนไซม์ที่ทำการศึกษาคือ 5 8 10 12 และ 15% ได้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ POP+POST+StOSt ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 37 และตารางที่ 28 (ภาคผนวก ญ) สำหรับปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีปริมาณใกล้เคียงกัน จึงไม่ส่งผลได้อย่างเห็นได้ชัด จากผลการทดลองนี้ และจากงานวิจัยส่วนใหญ่ได้ใช้ปริมาณเอนไซม์ 10% ในการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชัน (Rao และคณะ, 2001; Chopra และคณะ, 2008; Adhikari และคณะ, 2009; Zarringhalami และคณะ, 2010; Chnadhapuram และ Sunkireddy, 2012) รวมทั้งจากงานวิจัยของ Jeyarani และ Reddy (2010) ได้กล่าวว่า ผู้จำหน่ายเอนไซม์ได้แนะนำให้ใช้เอนไซม์ประมาณ 6-10% (Novo Nordisk, Denmark) จึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 10% ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 37 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงาโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ต่างๆ

* ตัวอักษร a,b,c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

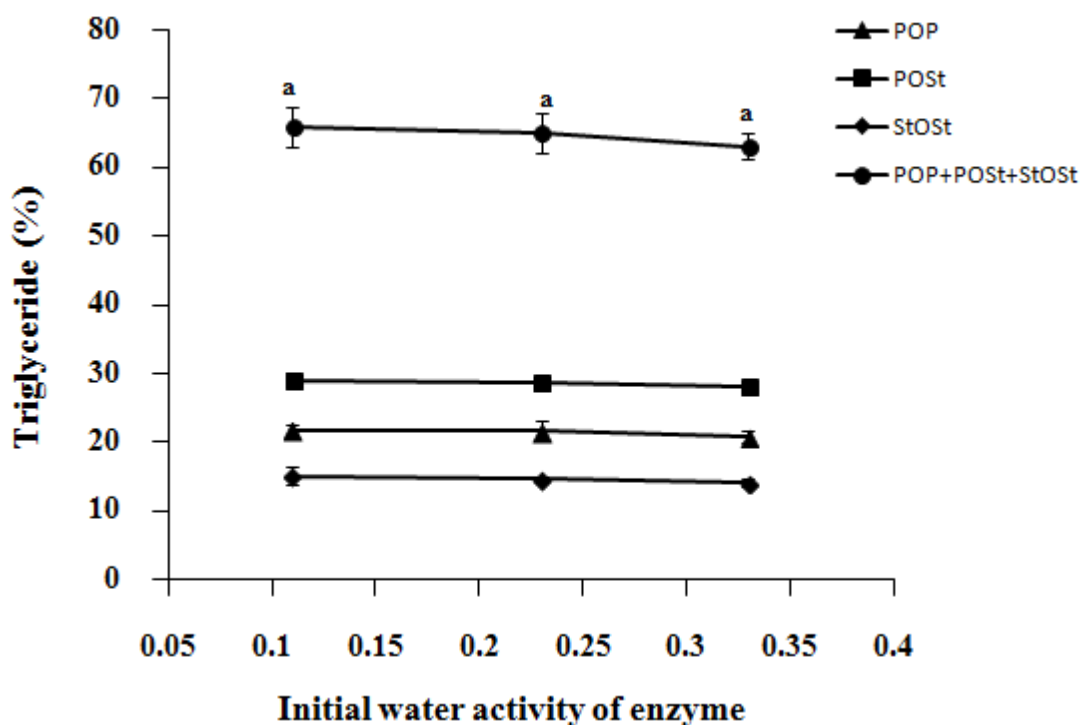
การใช้เอนไซม์มากส่งผลให้เกิดอัตราการแลกเปลี่ยนหมู่ acyl donor มากขึ้น ทำให้ไตรกลีเซอไรด์ที่ต้องการก็มีมากขึ้นด้วย (Tchobo และคณะ, 2009) ทั้งนี้การเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณเอนไซม์ ส่งผลทำให้มีปริมาณกรดไขมันอิสระต้องการเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% งานวิจัยของ Rao และคณะ (2001) ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันของน้ำมันมะพร้าวกับกรดสเตียริก ได้พบว่าหากใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 10% ปริมาณกรดสเตียริกที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในงานวิจัยนี้ การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดงาด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส 10%โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น มีปริมาณของ POP POST และ

StOst เป็น 21.6 29.0 และ 16.4% ตามลำดับ ซึ่งให้ปริมาณรวมของ POP+ POSt+StOst สูงที่สุดจึงทำการเลือกการใช้เอนไซม์ปริมาณดังกล่าวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยอื่นต่อไป

4.2.5 การศึกษาผลของความชื้นหรือค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์

ปฏิกิริยา Lipase-catalyzed เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา esterification และ hydrolysis (ปฏิกิริยาการผันกลับ) ซึ่งหลังจากเกิดปฏิกิริยา esterification จะได้น้ำออกมา จากนั้นน้ำจะถูกนำไปใช้ในการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยที่จะต้องมีความชื้นที่ไม่มากเกินไป หากปริมาณน้ำมากเกินไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis มากกว่า ส่งผลทำให้มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระมาก แต่อย่างไรก็ตามน้ำก็มีความจำเป็นในการทำให้เกิดปฏิกิริยา Lipase-catalyzed โดยค่า a_w ของเอนไซม์ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดความสมดุลระหว่างปฏิกิริยา esterification และ hydrolysis (Osborn และคณะ, 2002) จากภาพที่ 38 และตารางที่ 29 (ภาคผนวก ญ) แสดงให้เห็นว่า ค่า a_w ของเอนไซม์มากขึ้นส่งผลทำให้มีปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ต้องการน้อยลง แต่ผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติของ POP POSt StOst และ POP+POSt+StOst ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งจะเห็นว่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ที่ 0.11 ให้ปริมาณ POP+POSt+StOst มากที่สุด ดังนั้นค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมควรมีค่า a_w ต่ำที่สุดเพื่อที่จะรักษาความสมดุลระหว่างการทำปฏิกิริยาและทำให้เกิดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระน้อยที่สุด การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดงาด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ 0.11 ทำให้มีปริมาณของ POP POSt และ StOst เป็น 21.8 29.1 และ 15.1% ตามลำดับ ซึ่งให้ปริมาณรวมของ POP+POSt+StOst สูงที่สุด 66% จึงทำการเลือกการใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปัจจัยอื่นต่อไป



ภาพที่ 38 ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ชนิดต่างๆที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงาด้วยเอนไซม์ที่มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกัน * ตัวอักษร a,b,c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

งานวิจัยของ Tchobo และคณะ (2009) ก็ได้ทำการศึกษาผลของการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันด้วยเอนไซม์ไลเปสที่มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองการดัดแปลงไขมันเมล็ดงา ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวสรุปผลว่าการทำปฏิกิริยาที่มีค่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของเอนไซม์ต่ำจะทำให้เกิดปฏิกิริยาดีที่สุด

หลังจากที่เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยากับไขมัน โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์จะถูกไฮโดรไลต์เป็นโมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล (Osborn และ Akoh, 2002) โดยปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องคือ ปฏิกิริยา hydrolysis และ esterification โดยเมื่อทำปฏิกิริยา esterification จะได้ผลผลิตออกมาเป็นน้ำ ซึ่งน้ำที่ได้จะเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา Hydrolysis แต่หากในระบบมีปริมาณน้ำมากเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ อย่างไรก็ตาม น้ำก็ยังคงมีความสำคัญเพื่อที่จะรักษาปฏิกิริยา enzymatic เนื่องจากสนับสนุนการทำงานของเอนไซม์ให้เกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ แต่จะต้องรักษาความสมดุลของระบบไว้ด้วย (Silva และคณะ, 2011) จากนั้นไตรกลีเซอไรด์ที่มีอยู่ในระบบจะทำปฏิกิริยาโดยจะมีการแลกเปลี่ยนหมู่ acyl กันเองระหว่างไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งก็คือการเกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน (Gandhi, 1997) นั่นเอง

4.4 การคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไขมันเมลิตเจาะดัดแปลงจากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันสำหรับนำไปใช้ในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้

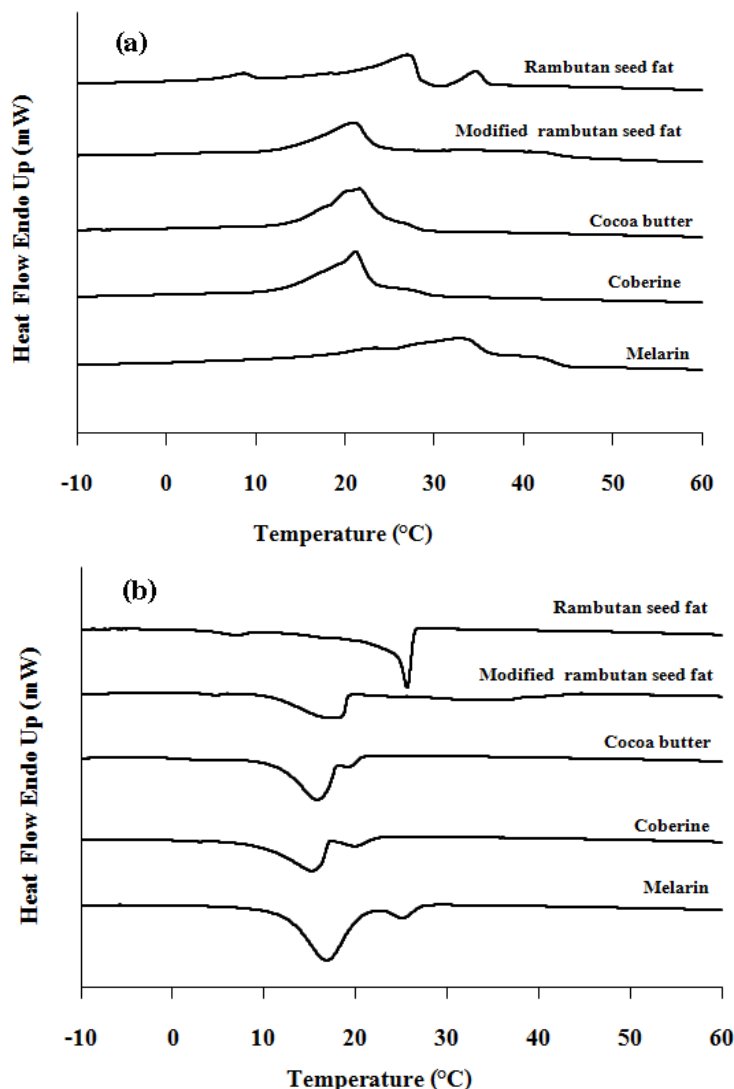
ทำการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับดัดแปลงโครงสร้างไขมันเมลิตเจาะด้วยเกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่เฉพาะเจาะจงกับไตรกลีเซอไรด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 นั้นจะเลือกสภาวะที่ทำให้มีปริมาณรวมของไตรกลีเซอไรด์ชนิด POP POST และ StOST สูงสุด และใกล้เคียงกับเนยโกโก้มากที่สุด ซึ่งพบว่า การเลือกใช้ acyl donor จากกรดไขมันอิสระ คือ กรดปาล์มติก และ กรดสเตียริก เป็นสัดส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และอัตราส่วนของไขมันเมลิตเจาะ : กรดปาล์มติก : กรดสเตียริก เป็น 1 : 3 : 3 โดยน้ำหนัก ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อราชื่อ *Mucor miehei* มีค่าความชื้นเริ่มต้น 0.11 ปริมาณ 10% โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ทำให้ได้ไขมันหลังทำปฏิกิริยาที่ผ่านการกำจัดกรดไขมันอิสระแล้วในปริมาณ 73% โดยน้ำหนักของน้ำมันตั้งต้นรวมกับ acyl donor จึงได้ทำการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ โดยใช้สภาวะดังกล่าว ซึ่งเมื่อทำการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้ด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวแล้ว พบว่า ไขมันดัดแปลงที่ได้มีปริมาณของ POP POST และ StOST ประมาณ 21 29 และ 16% ตามลำดับ และมีอัตราส่วนของ POP : POST : StOST เป็น 0.72 : 1 : 0.55 ซึ่งใกล้เคียงมากที่สุดกับเนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาดที่มี POP POST และ StOST 23.2 35.9 และ 21.0% ตามลำดับ และอัตราส่วนของ POP : POST : StOST เป็น 0.64 : 1 : 0.58 จากนั้นจึงได้นำไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ผลิตได้ไปทำการศึกษาคูณสมบัติทางด้านต่างๆ เปรียบเทียบกับเนยโกโก้ ไขมันทดแทนเนยโกโก้ 2 ชนิด คือ Coberine และ Melarin ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

4.5 การศึกษาองค์ประกอบทางกายภาพ

4.5.1 การศึกษาเส้นกราฟในการตกผลึกและการหลอมเหลว

ทำการศึกษาด้วยเทคนิค Differential scanning calorimetry ของไขมันเมลิตเจาะดัดแปลง ไขมันเมลิตเจาะ เนยโกโก้ ไขมันทดแทนเนยโกโก้ 2 ชนิด คือ Coberine และ Melarin พบว่า เนยโกโก้มีช่วงการหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิ 10-30°C ไขมันเมลิตเจาะก่อนและหลังดัดแปลง มีช่วงของการหลอมเหลวแตกต่างกัน ไขมันเมลิตเจาะก่อนการดัดแปลง จะมีช่วงอุณหภูมิของการหลอมเหลวหลายช่วง เนื่องจากมีชนิดไตรกลีเซอไรด์อยู่หลากหลายชนิดในโครงสร้าง เมื่อดัดแปลงโครงสร้างแล้วมีองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปและมีลักษณะของ melting thermogram คล้ายคลึงกับเนยโกโก้ และ Coberine แต่แตกต่างจากของ Melarin ส่วนช่วงอุณหภูมิของการตกผลึกของไขมันเมลิตเจาะเมื่อผ่านการดัดแปลงแล้วมี crystallization thermogram ที่เปลี่ยนแปลงไป มีความคล้าย คลึงกับของเนยโกโก้ และ Coberine เช่นกัน การที่ Melarin มีช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลวและการตกผลึกกว้าง เพราะมีองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่หลากหลายกว่าไขมันอื่นๆ ซึ่งไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่ดีควรจะมีช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลวและตกผลึกใกล้เคียงกับเนยโกโก้ เพื่อที่จะได้มีคุณสมบัติในการตกผลึกเหมือนกับของเนยโกโก้และสามารถละลายได้ที่อุณหภูมิร่างกายเมื่อรับประทานแล้วให้ความรู้สึกละลายได้ในปากเหมือนกับเนยโกโก้ จากภาพที่ 39 จะเห็นได้ว่าทั้งช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลวและการตกผลึกของไขมันเมลิตเจาะดัดแปลง

ใกล้เคียงกับของเนยโกโก้มาก จึงเป็นไปได้ว่าไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงจะสามารถนำไปใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ได้



ภาพที่ 39 เทอร์โมแกรมของการหลอมเหลว (a) และการตกผลึก (b) ของไขมันชนิดต่างๆ

4.5.2 การศึกษารูปร่างผลึก

การตกผลึกเป็นการจัดเรียงตัวภายในโครงสร้าง ซึ่งลักษณะการจัดเรียงตัวดังกล่าวเกิดจากพันธะทางเคมี และการจัดเรียงตัวของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้ไขมันแต่ละชนิดมีรูปร่างผลึกที่แตกต่างกัน (Riberiro และคณะ, 2009) จากการศึกษารูปร่างผลึกของเนยโกโก้ ไขมันทดแทนเนยโกโก้ (Coberine และ Melarin) ไขมันเมล็ดเงาะ ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง พบว่าเมื่อนำไขมันดังกล่าวไปทำการตกผลึกที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไขมันแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างผลึก จำนวน และขนาดเฉลี่ยของผลึกตามระยะเวลา จากการถ่ายภาพมาเฉพาะบางช่วงเวลาของการตกผลึกของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง Polarized Light Microscopy (PLM)

ภาพถ่ายของการผลึกของเนยโกโก้มีรูปแบบผลึกแบบทรงกลมหรือ spherulites ซึ่งเกิดจากผลึกรูปเข็มที่มีการเจริญเติบโตจากเส้นผ่านศูนย์กลางและเกิดการแตกแขนงจากจุดศูนย์กลางของ nuclei เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นผลึกจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการขยายขนาดจนกระทั่งกลายเป็นผลึกที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 40) ช่วงแรกของการตกผลึกของเนยโกโก้มีการกระจายของขนาดค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marty และ Marangoni (2009) ที่ทำการถ่ายผลึกของเนยโกโก้ที่อุณหภูมิ 20°C พบว่า การตกผลึกของเนยโกโก้ในสภาวะคงที่ จะให้ผลึกที่มีลักษณะไม่สม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกันในช่วงแรก เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้ จากนั้นเมื่อระยะเวลาการโตของผลึกผ่านไป 12 ชั่วโมง เนยโกโก้จึงมีลักษณะผลึกที่เป็นทรงกลมสมบูรณ์

ไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด Coberine มีรูปร่างผลึกเป็นแบบ spherulites เช่นเดียวกัน แต่เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลานานขึ้นจะเกิด imperfect spherulite (Sonwai และคณะ, 2012) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นผลึกที่มีรูปร่างไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 41) ไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิดนี้เป็น CBE ซึ่งจะต้องมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับเนยโกโก้และสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ทุกสัดส่วนในการผลิตช็อกโกแลต (Lipp และ Anklem, 1998) จึงทำให้มีลักษณะผลึกค่อนข้างคล้ายคลึงกับผลึกของเนยโกโก้มาก

ไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด Melarin เป็น CBR จากการศึกษารูปร่างผลึกดังแสดงในภาพที่ 42 ผลึกสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่เวลา 0.5 ชั่วโมง ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้รวดเร็วมากและอยู่ในลักษณะเกาะตัวกันหนาแน่นซ้อนทับกัน เรียกการจัดเรียงตัวแบบนี้ว่า granular เมื่อระยะเวลาเปลี่ยนแปลงไป พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของผลึก และขยายขนาดขึ้นเพียงเล็กน้อย ผลึกของ Melarin มีขนาดเล็ก จึงส่งผลทำให้ต้องใช้พลังงานมากในการหลอมเหลวเนื่องจากโครงสร้างของผลึกมีการจับตัวกันแน่น และด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้มีลักษณะทางกายภาพ ทั้งอุณหภูมิในการหลอมเหลวและอุณหภูมิในการตกผลึก แตกต่างจากเนยโกโก้

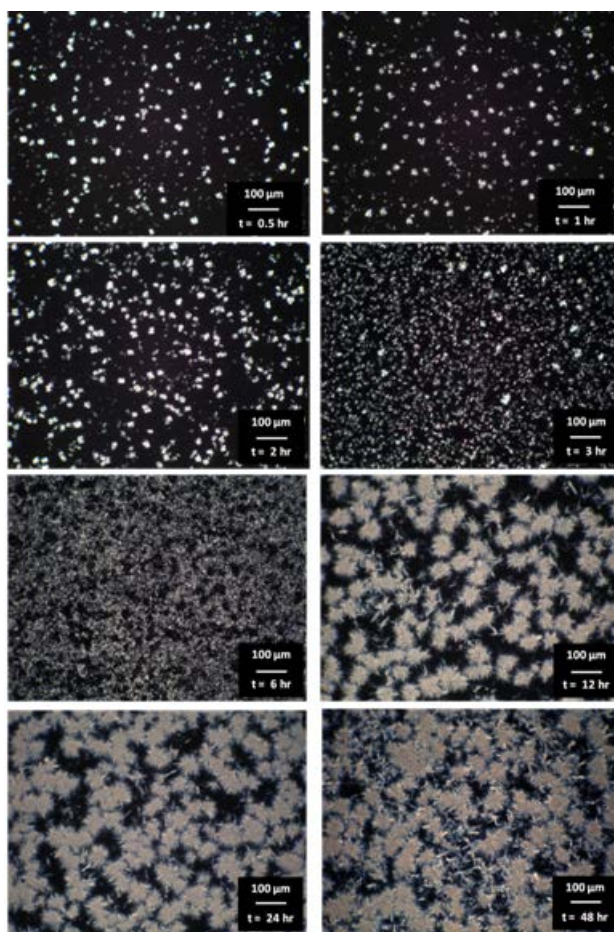
ไขมันเมล็ดเงาะช่วงระยะเวลาเริ่มแรกของการตกผลึกมีผลึกรูปเข็ม หรือเรียกว่า needle shape (Rincón-Cardonar และคณะ, 2013) หลังจากนั้นเริ่มเกิดการตกผลึกแบบทรงกลม ซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นตามเวลา จำนวนผลึกรูปเข็มมีขนาดเล็กลงและลดจำนวนลงจนกระทั่งเหลือน้อยมาก เนื่องจากเกิดการละลายและโมเลกุลไปตกผลึกกับผลึกทรงกลมที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจนกระทั่งผลึกรูปเข็มหายไปจนหมด เรียกกระบวนการนี้ว่า “Ostwald ripening” (ภาพที่ 43) เมื่อการตกผลึกดำเนินไปจนครบ 2 ชั่วโมง (การติดตามพฤติกรรมของการตกผลึกดังแสดงในภาคผนวก ก) พบว่าผลึกทรงกลมแสดงลักษณะเป็นกากบาท หรือเรียกว่า maltese cross (Sonwai และคณะ, 2012) ที่มีขนาดใหญ่เต็มที่ โดยการจับกลุ่มกันของไขมันบางส่วนเกิดจากคุณสมบัติทางกายภาพของไตรกลีเซอไรด์ และบางส่วนเกิดจากเฟสที่ต่างกันของไตรกลีเซอไรด์ในไขมัน ซึ่งปัจจัยหลักที่มีผลร่วมกันคือ การมีโครงสร้างของผลึกหลายรูปแบบและปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Sato, 2001; Koyano และ Sato, 2002)

ผลึกไขมันเมล็ดเงาะหลังจากการดัดแปลงโครงสร้าง จากรูปที่ 44 จะเห็นได้ว่าผลึกเกิดขึ้นรวดเร็วมากและอยู่ในลักษณะที่ซ้อนทับกัน ตั้งแต่ระยะเวลาที่ 0 ชั่วโมง ลักษณะเกาะตัวกันหนาแน่นมาก เรียกการจัดเรียงตัวแบบนี้ว่า granular หลังจากการดัดแปลงโครงสร้างแล้วทำให้โครงสร้างไขมันเมล็ดเงาะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์

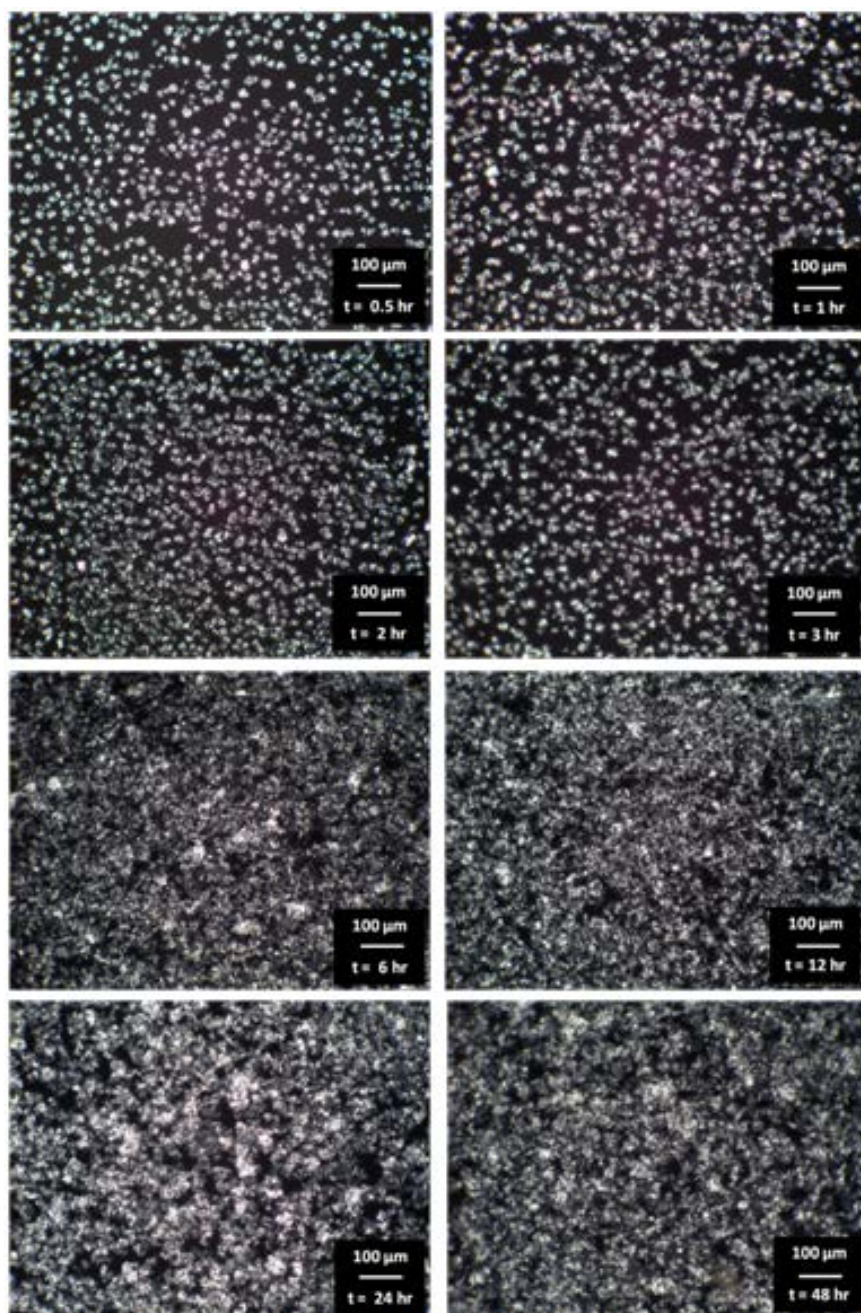
เปลี่ยนแปลงไป เมื่อมีการเติมกรดปาล์มติกและกรดสเตียริกลงไปซึ่งกรดไขมันทั้งสองชนิดเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง จึงทำให้ผลึกไขมันเมลิตเจาะดัดแปลงแข็งตัวได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้สภาวะในกระบวนการผลิตสามารถมีผลต่อขนาดของกลุ่มผลึกไขมัน (fat crystal clusters) โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบจากอุณหภูมิในการตกผลึกที่มีผลต่อขนาดของผลึกอธิบายได้โดย อัตราการเกิดนิวเคลียสที่แตกต่างกันโดยเกี่ยวกับสภาวะในกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน (Singh และคณะ, 2004) ที่อุณหภูมิการตกผลึกสูงหรืออัตราการทำเย็นที่ช้า อัตราการเกิดนิวเคลียสจะลดลง เนื่องจากการลดลงของนิวเคลียสมักจะเกิดขึ้นไปพร้อมกับการเพิ่มขึ้นในการโตของผลึก ดังนั้นขนาดของผลึกจะเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิการตกผลึกสูงกว่าและ/หรืออัตราการทำเย็นที่ช้า (Tang และ Marangoni, 2006)

รูปร่างผลึกที่ต่างกันมีผลต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากผลึกของเนยโกโก้มีลักษณะเป็นเม็ดกลม ขนาดใหญ่ ละลายได้ง่าย เพราะมีปฏิสัมพันธ์ที่ดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่สามารถดึงออกได้ง่ายกว่าผลึกของไขมันทดแทนเนยโกโก้ ไม่ว่าจะเป็น Coberine Melarin และ ไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมลิตเจาะ เนื่องจากมีการจับเกาะกันของโครงสร้างโมเลกุลที่หนาแน่น การที่โมเลกุลมีขนาดเล็กและอยู่ใกล้กันมาก ทำให้มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมาก จึงต้องใช้พลังงานในการแยกอนุภาคของไขมันทดแทนเนยโกโก้มากกว่า จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลอมละลายได้ยากกว่า

ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถนับจำนวนและวัดขนาดของผลึกที่แน่นอนได้ จากภาพถ่ายผลึกด้วยเทคนิค PLM เนื่องจากผลึกส่วนใหญ่มีขนาดค่อนข้างเล็ก มีการกระจายตัวของขนาดผลึกค่อนข้างมาก มีจำนวนผลึกมาก และมีการซ้อนทับกันของผลึก ซึ่งถือเป็นข้อด้วยของเทคนิคนี้ดังที่ Ghotra และคณะ (2002) ได้กล่าวไว้ว่าการใช้เทคนิค PLM จะมีความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากที่ไม่สามารถแสดงภาพผลึกทั้งภายใต้กล้องได้หรือการเกิด missing mass ในภาพที่แสดง แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคภาพถ่ายจาก PLM นั้นก็ยังเป็นที่นิยมเนื่องจากสามารถให้ภาพที่คมชัดการเตรียมตัวอย่างทำได้ง่ายและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก (Tang และ Marangoni, 2006)



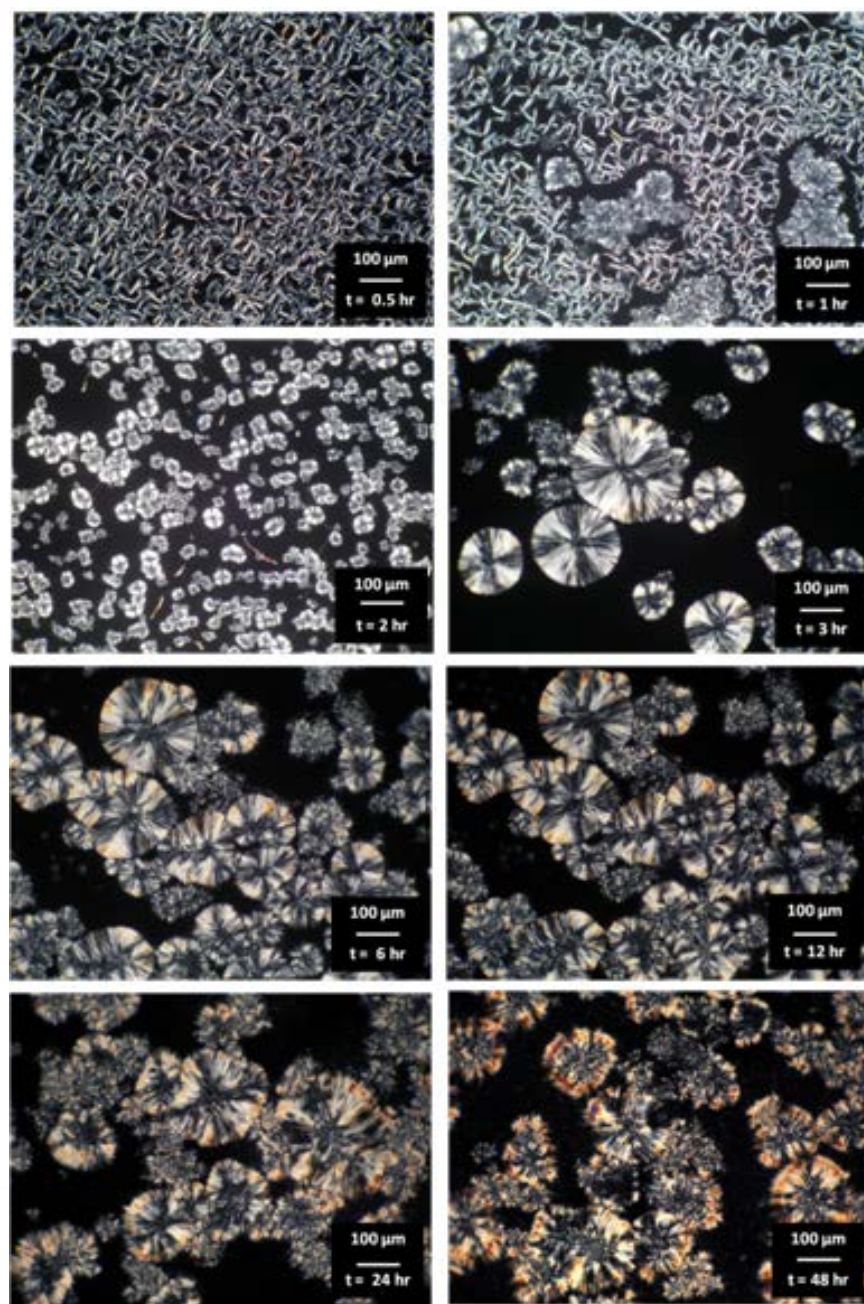
ภาพที่ 40 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกเนยโกโก้ ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า



ภาพที่ 41 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด Coberine ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า



ภาพที่ 42 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด Melarin ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า



ภาพที่ 43 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันเมลิตินตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า



ภาพที่ 44 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันเมลิตเจดัดแปลง ตั้งแต่เวลา 0.5-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า

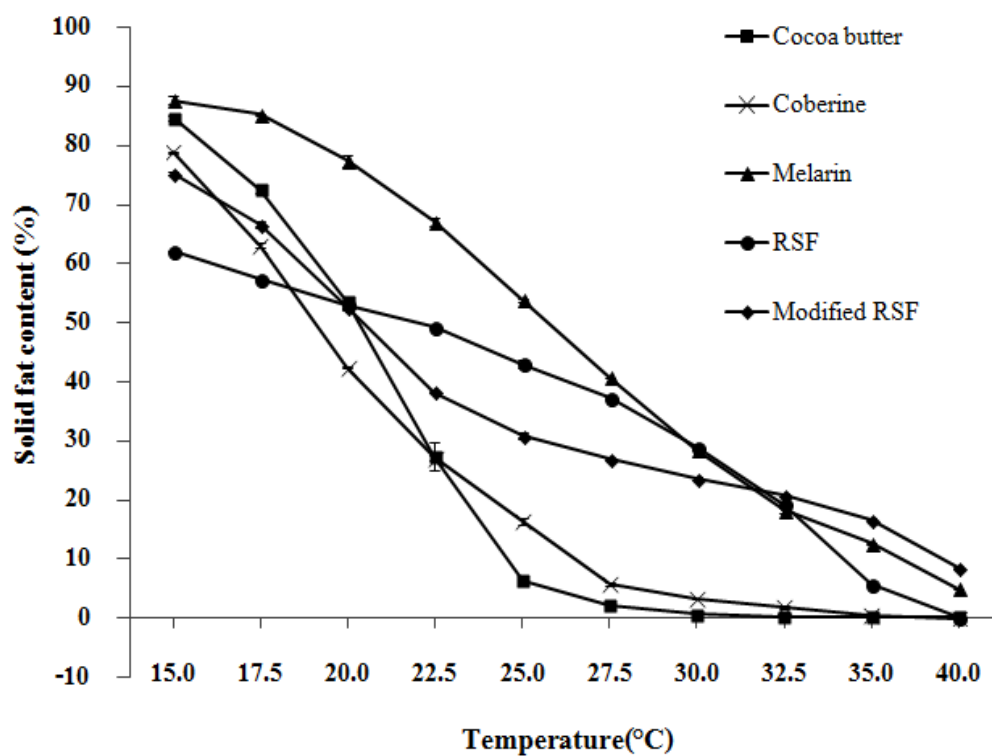
4.5.3 การศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึก (Solid fat content : %SFC)

ค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึกของไขมันหรือ %SFC จะมีค่าสูงที่อุณหภูมิต่ำ และมีค่าต่ำที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ปริมาณของแข็งในรูปผลึกของไขมันคงตัวอยู่ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ผลึกไขมันเหล่านั้นละลายมากขึ้น จากภาพที่ 45 จะเห็นได้ว่าไขมันเมลิตเจดัดแปลงแล้วมีปริมาณ %SFC แตกต่างจากก่อนที่ยังไม่ได้ดัดแปลง จึงส่งผลทำให้มีลักษณะ

ทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไป จากตารางที่ 21 ที่ช่วงอุณหภูมิ 30-40°C ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง และ Melarin มีปริมาณ %SFC ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 21 ปริมาณ %SFC ของไขมันชนิดต่างๆที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

อุณหภูมิ (°C)	Cocoa butter	Coberine	Melarin	RSF	Modified RSF
15.0	84.7±0.37	78.9±0.12	87.7±0.69	62.1±0.21	75.3±0.31
17.5	72.7±0.75	63.1±0.39	85.3±0.07	57.5±0.03	66.7±0.65
20.0	53.5±0.96	42.5±0.26	77.4±0.87	53.1±0.62	52.8±0.55
22.5	27.4±2.34	27.2±0.35	67.1±0.64	49.4±0.16	38.3±0.19
25.0	6.3±0.35	16.4±0.52	53.8±0.31	43.0±0.64	30.9±0.48
27.5	2.1±0.18	5.8±0.20	40.7±0.08	37.3±0.11	26.9±0.22
30.0	0.7±0.20	3.3±0.03	28.5±0.16	28.9±0.23	23.7±0.32
32.5	0.2±0.08	1.8±0.34	18.3±0.42	19.3±0.48	20.8±0.33
35.0	0.3±0.19	0.5±0.10	12.7±0.16	5.8±0.10	16.7±0.15
40.0	0.2±0.15	0.1±0.06	5.1±0.04	0.1±0.11	8.5±0.21



ภาพที่ 45 ค่า %SFC ของไขมันที่อุณหภูมิต่างๆ

เนยโกโก้ มีปริมาณ %SFC สูง ช่วงอุณหภูมิ 15°C จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณ SFC จะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง 30°C มีค่า SFC เข้าใกล้ 0% แสดงให้เห็นว่าปริมาณของแข็งในรูปผลึกของเนยโกโก้สามารถละลายจนกระทั่งเป็นของเหลวได้หมดที่อุณหภูมิสูงกว่า 30°C ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พิเศษของเนยโกโก้ ที่จะส่งผลทำให้ละลายได้หมดในปากหรืออุณหภูมิร่างกาย

ไขมันเมล็ดเงาะมีกรดไขมันอิ่มตัวชนิดกรดอะราคิติก ค่อนข้างสูงถึง 34.5% (Solis-Fuentes และคณะ 2010) รวมทั้งยังเป็นกรดไขมันสายยาว เนื่องจากทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลวเพิ่มขึ้น เมื่อขนาดของโมเลกุลใหญ่ขึ้นหรือมีจำนวนคาร์บอนมากขึ้น แต่หากกรดไขมันสองชนิดมีจำนวนคาร์บอนเท่ากัน โครงสร้างที่เป็นกรดไขมันอิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว (นิธิยา, 2549) ด้วยเหตุนี้ทำให้ไขมันเมล็ดเงาะมีค่า %SFC ที่สูง แต่เมื่อให้ความร้อนจนถึง 40 °C ค่า SFC ลดลงต่ำจนถึง 0.1% ถึงแม้ว่าจะมีกรดไขมันที่สายยาวและอิ่มตัวมากแต่การจัดเรียงตัวของไตรกลีเซอไรด์ ประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ด้วย จึงทำให้สามารถหลอมเหลวได้จนทำให้มีค่า SFC 0.1%

ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงมีโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์เปลี่ยนแปลงไป โดยที่หลังจากดัดแปลงโครงสร้างแล้วพบว่ามีค่า %SFC สูงขึ้นเข้าใกล้กับของเนยโกโก้ที่ 20°C และต่ำกว่าค่า %SFC ช่วงอุณหภูมิ 30-40°C ใกล้เคียงกับของ Melarin ซึ่งเป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBR ที่จำหน่ายในท้องตลาด การที่ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงมีปริมาณของ %SFC สูงก็เป็นผลเนื่องมาจากองค์ประกอบภายในของโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไปนั่นเอง

ไขมันที่มีปริมาณ SFC สูง จะต้องใช้พลังงานมากในการหลอมเหลว หรือทำให้ละลาย ซึ่งจะส่งผลทำให้ค่า enthalpy สูงตามไปด้วย ค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง (modified RSF) มีค่ามากกว่าค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวเนยโกโก้ แต่เมื่อดัดแปลงไขมันเมล็ดเงาะแล้วมีค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลวน้อยลง เนื่องจากในไขมันเมล็ดเงาะก่อนดัดแปลงมีกรดไขมันชนิดอะราคิติก ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวสายยาวอยู่กว่า 30% จึงทำให้ต้องใช้พลังงานมากกว่า

ค่า T_{onset} เป็นค่าที่บอกอุณหภูมิในการเริ่มละลาย และเริ่มตกผลึก ถ้าหากในโครงสร้างมีกรดไขมันอิ่มตัวมากจะเกิดการตกผลึกได้เร็ว สามารถตกผลึกได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้ามีกรดไขมันอิ่มตัวน้อยจะตกผลึกได้ช้า ในทำนองกลับกันหากในโครงสร้างมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณมาก จะหลอมเหลวได้เร็ว นอกจากนี้ปริมาณไขมันแข็งยังมีผลต่อค่า T_{end} ซึ่งใช้ในการบอกว่าตัวอย่างจะหลอมเหลวหมดที่อุณหภูมิเท่าใด ส่วน T_{peak} เป็นอุณหภูมิที่ไขมันส่วนใหญ่เกิดการละลายหรือตกผลึก

Melarin เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาดชนิดหนึ่ง จากภาพที่ 45 Melarin จะมีค่า %SFC สูง จึงส่งผลทำให้มีค่าพลังงานการหลอมเหลวสูงถึง 123.42 ± 4.92 J/g (ตารางที่ 22) ในทำนองเดียวกัน Coberine และ CB มีค่า SFC ต่ำ ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 27.5 - 40.0°C หมายความว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวไขมันแข็งมีการหลอมเหลวเกือบหมดแล้ว ซึ่งเห็นชัดเจนอีกว่า Coberine และ CB ต้องใช้ค่าพลังงานในการหลอมเหลวน้อย เพียงแค่ 71.16 และ 72.09 J/g ตามลำดับ ไขมันที่มีปริมาณของแข็งมากจะต้องใช้พลังงานในการหลอมเหลวมาก หมายความว่าค่า enthalpy จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC สอดคล้องกับค่า SFC ที่ได้จากเทคนิค p-NMR

อุณหภูมิที่ทำให้ไขมันหลอมเหลวหมด หรือ T_{end} ที่ได้จากเทคนิค DSC จะสอดคล้องกับการทดลองด้วยเทคนิค p-NMR เนื่องจากเมื่อทำการวัดค่า %SFC ของตัวอย่างแล้วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มมากขึ้น ค่า %SFC ก็จะต้องลดน้อยลง หากค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึกน้อยลงมาก แสดงว่าไขมันถูกละลายไปหมดแล้ว จนกระทั่งถึงศูนย์แสดงว่าไขมันละลายหมดแล้ว จากภาพที่ 45 และตารางที่ 22 เช่น เนยโกโก้มีค่า SFC ลดลงถึง 0% ที่อุณหภูมิประมาณ 30°C หมายความว่า เนยโกโก้ละลายหมดที่อุณหภูมิประมาณ 30°C สอดคล้องกับค่า T_{end} ซึ่งก็คืออุณหภูมิที่ตัวอย่างละลายได้หมด คือประมาณ 29.21°C (ตารางที่ 22) Coberine มีค่า %SFC ลดลงถึง 0% ที่อุณหภูมิประมาณ 35-40°C (ตารางที่ 21) หมายความว่า Coberine ละลายหมดที่อุณหภูมิ 35-40°C สอดคล้องกับค่า T_{end} ซึ่งก็คืออุณหภูมิที่ตัวอย่างละลายได้หมด คือประมาณ 37.43°C (ตารางที่ 22)

ส่วนไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงและ Melarin เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค p-NMR เพื่อหาปริมาณ SFC ของตัวอย่างจนถึงอุณหภูมิ 40°C พบว่าไขมันทั้งสองชนิดมีปริมาณ SFC ไม่ถึงศูนย์ หมายความว่าที่อุณหภูมิ 40°C (ภาพที่ 45) ยังไม่สามารถละลายได้หมด สอดคล้องกับผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DSC เนื่องจากไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงและ Melarin ซึ่งมีค่า T_{end} ก็คืออุณหภูมิที่ตัวอย่างละลายได้หมด คือประมาณ 47.32 และ 46.38°C ตามลำดับ (ตารางที่ 22) หมายความว่าไขมันจะสามารถละลายได้หมดที่อุณหภูมิดังกล่าว

ตารางที่ 22 อุณหภูมิและเอนทัลปีในการหลอมเหลวของไขมันชนิดต่างๆ

Fats	T_{onset}	T_{peak}	T_{end}	enthalpy (J/g)
CB	10.95±0.50	21.63±0.09	29.21±0.09	72.09±0.89
RSF	0.39±1.05	26.77±0.31	36.81±0.11	84.48±1.17
Modified RSF	8.83±0.21	21.01±0.22	47.32±0.13	81.63±0.38
Coberine	9.80±0.53	21.31±0.17	37.43±0.65	71.16±0.56
Melarin	3.32±1.52	32.83±0.08	46.38±2.08	123.42±4.92

การตกผลึก เป็นการศึกษาช่วงอุณหภูมิในการทำให้ไขมันกลายเป็นของแข็งที่เกิดการจัดเรียงตัวของโมเลกุล ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงมีค่าการคายพลังงานในการเกิดผลึกใกล้เคียงกับเนยโกโก้ (ตารางที่ 23) ค่าพลังงาน (enthalpy) ในการตกผลึกจะต้องมีค่าติดลบ เนื่องจากการคายพลังงาน ถ้าต้องใช้พลังงานมาก (ไม่คิดเครื่องหมาย) หมายความว่าไขมันชนิดนั้นสามารถตกผลึกได้ยาก

ตารางที่ 23 อุณหภูมิและเอนทัลปีในการตกผลึกของไขมันชนิดต่างๆ

Fats	T _{onset}	T _{peak}	T _{end}	enthalpy (J/g)
CB	21.31±0.26	15.86±0.10	-0.59±0.41	-63.82±0.64
RSF	27.80±0.80	25.38±0.43	-0.7±0.25	-68.14±1.49
Modofied RSF	43.84±0.36	17.47±0.19	2.35±0.24	-61.43±1.24
Coberine	23.38±0.35	15.35±0.11	-2.05±0.55	-58.39±2.83
Melarin	28.82±0.65	17.23±0.37	0.99±1.43	-99.02±0.80

คุณสมบัติทางกายภาพ อุณหภูมิในการหลอมเหลว การตกผลึก ค่าเปอร์เซ็นต์การเป็นของแข็งในรูปผลึก รูปร่างผลึกของไขมันเมลิตเงาหลังจากดัดแปลงโครงสร้างแล้ว มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งจากลักษณะทางลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของไขมันเมลิตเงาดัดแปลงสามารถสรุปได้ว่าไขมันเมลิตเงาดัดแปลงสามารถนำไปใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ได้ แต่จากผลของ %SFC จะเห็นได้ว่ายังมีลักษณะไม่ใกล้เคียงกับของเนยโกโก้ และ Coberine เสียทีเดียว การนำไปใช้งานควรนำไปใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ ชนิด CBR

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เมล็ดเงาะเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปเงาะกระป๋อง สามารถนำ มาสกัดจนกระทั่งได้ไขมันเมล็ดเงาะ (rambutan seed fat : RSF) การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงโดยกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยเอนไซม์ไลเปสที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง $sn-1,3$ ของไตรกลีเซอไรด์จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ไตรกลีเซอไรด์ตามที่ต้องการมากที่สุด จากปัจจัยต่างๆคือ ชนิดของ acyl donor ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา อัตราส่วนของสารตั้งต้น ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ พบว่าการทำปฏิกิริยาของไขมันเมล็ดเงาะต่อ acyl donor เป็น 1 : 3 : 3 (ไขมันเมล็ดเงาะ : กรด สเตียริก : กรดปาล์มิติก)โดยน้ำหนัก ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 8 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 10% โดยน้ำหนักของสารตั้งต้น และค่า a_w เริ่มต้นของเอนไซม์ 0.11 ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง โดยไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงที่ได้มี POP POST และ StOST ประมาณ 21.29 และ 16% ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงมากที่สุดกับเนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาดที่นำมาศึกษาที่มี POP POST และ StOST 23.2 35.9 และ 21.0% ตามลำดับ จากนั้นนำไขมันเมล็ดเงาะมาทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสด้วยสภาวะเหมาะสมดังกล่าวที่เลือกไว้ แล้วนำไขมันที่ได้จากปฏิกิริยาไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพคล้ายกับไขมันทดแทนเนยโกโก้ที่จำหน่ายในท้องตลาด ชนิด CBR (Melarin) ซึ่งคุณสมบัติทางกายภาพที่ได้ส่วนใหญ่ของไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงคล้ายเนยโกโก้มากกว่า Melarin ทั้งนี้หากไขมันเมล็ดเงาะที่ดัดแปลงได้มีทั้งคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเหมือน กับเนยโกโก้ จะสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ทุกสัดส่วนในการผลิตช็อกโกแลต เรียกว่า CBE และหากมีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนหรือใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แต่คุณสมบัติทางเคมีบางส่วนคล้ายกับเนยโกโก้ก็จะสามารถนำมาใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBR จากผลการทดลองไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลงที่ได้จึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBR

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่าง และชนิดของกรดไขมันที่ตำแหน่งที่ 2 ของโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ เพื่อให้สามารถวิเคราะห์การจัดเรียงโครงสร้างและสามารถอธิบายพฤติกรรมกรดไขมันดัดแปลงจากไขมันเมล็ดงาได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น
2. ควรมีการศึกษาโครงสร้างผลึก ด้วยเทคนิค X-ray diffraction (XRD) เพื่อที่จะศึกษาเปรียบเทียบกับภาพถ่ายผลึก PLM ซึ่งผลที่ได้ควรจะสอดคล้องกับภาพถ่ายผลึก PLM
3. หากต้องการดัดแปลงไขมันเมล็ดงาให้เป็นไขมันทดแทนเนยโกโก้ชนิด CBE ควรทำการศึกษาเพื่อทำการตกผลึกแยกส่วน หรือนำมาผสมกับไขมันชนิดอื่นๆ เพื่อทำให้มีไตรกลีเซอไรด์เท่ากับปริมาณที่ต้องการและใกล้เคียงกับเนยโกโก้มากที่สุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 196-341.
- นัฐวี ตีรณานนท์. (2551). การศึกษาการนำเมล็ดงาจากอุตสาหกรรมการผลิตงากระป๋องมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีพลังงาน คณะพลังงานสิ่งแวดล้อมและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- นิธิยา รัตนพานนท์. (2548). วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. มหาคร.
- นิธิยา รัตนพานนท์. (2549). เคมีอาหาร (Food chemistry). สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. มหาคร
- ณัฐยาพรรณ พิชัยยุทธ. (2547). การใช้เนยโกโก้เทียมทดแทนเนยโกโก้สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เลียนแบบช็อกโกแลต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมศักดิ์ วรรณศิริ, ทวีศักดิ์ นวลพลับ และปฐพีชล วายุอัคคี. (2530). โกโก้. กองบรรณาธิการเฉพาะกิจ “ฐานเกษตรกรรม” ฐานเกษตรกรรม (เฉพาะกิจที่19). โรงพิมพ์มิตรสยาม กรุงเทพมหานคร.
- แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2535). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ. 157-189.
- สุวรรณา สุภิमारส. (2543). กรรมวิธีการผลิต เทคนิค และอุปกรณ์ในการผลิตการผลิตผลิตภัณฑ์จากโกโก้และช็อกโกแลต. ใน เทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและช็อกโกแลต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร. หน้า 237-296.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2554.
- อนรรฆอร ศรีไสยเพชร. (2553). ลิพิด (Lipid). [ออนไลน์] เข้าถึงได้เมื่อ 12 กันยายน 2554, เข้าถึงได้จาก http://www.science.mju.ac.th/chemistry/download/a_srisaipet/คม320_lipid.pdf

ภาษาต่างประเทศ

- Abigor, R.D., Marmer, W.N., Foglia, T.A., Jones, K.C., DiCiccio, R.J., Ashby, R. and Uadia, P.O. (2003). Production of cocoa butter-like fats by the Lipase-Catalyzed Interesterification of Palm Oil and Hydrogenated Soybean Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1193-1196.
- Adhikari, D., Li, P., Shin, J.-A. et al. (2009). Lipase-catalysed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch

- and continuous reactor for production of zero trans shortening fats. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 458–464.
- Ahmadi, L., Marangoni, A.G. (2009). Functionality and physical properties of interesterified high oleic shortening structured with stearic acid. *Food Chemistry*, 117, 668–673.
- Alim, M.A., Lee, J.-H., Shin, J.-A., Lee, Y.J., Choi, M.-S., Akoh, C.C. and Lee, K.-T. (2008). Lipase-catalyzed production of solid fat stock from fractionated rice bran oil, palm stearin, and conjugated linoleic acid by response surface methodology. *Food Chemistry*, 106, 712–719.
- AOCS. (2000). In D. Firestone, (Eds.). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 6th ed. American Oil Chemists' Society. Champaign, USA.
- Avrami, M. (1939). Kinetics of Phase Change I: General Theory. *Journal of Chemical Physics*, 7, 1103–1112.
- Beckett, S.T. (2000). The Science of Chocolate, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Bernard, W. M. (1989). *Chocolate, cocoa, and Confectionery*. 3rd edition, Science and Technology. New York.
- Caprette, D. R. (2005). Experimental Biosciences: Introduction laboratory-Bios 211 [Online]. Accessed 2 March 2010. Available from <http://www.ruf.rice.edu/~bioslab/methods/microscopy/dfield.html>.
- Ciftci, O.N., Fadiloglu, S. and Gogus, F. (2009). Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. *Bioresource Technology*, 100, 324–329.
- Chnadhapuram, M. and Sunkireddy, Y.R. (2012). Preparation of palm olein enriched with medium chain fatty acids by lipase acidolysis. *Food Chemistry*, 132, 216–221.
- Chopra, R., Reddy, S.R.Y. and Sambaiah, K. (2008) Structured lipids from rice bran oil and stearic acid using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 110, 32–39.
- De Martini Soares, F.A.S., da Silva, R.C., Guimarães da Silva, K.C., Lourenço, M.B., Soares, D.F. and Gioielli, L.A. (2009). Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of blends of palm stearin and palm olein. *Food Research International*, 42, 1287–1294.
- Farmani, J., Hamed, M., Safari, M. and Madadlou, A. (2007). Transfree Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends

- of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. *Food Chemistry*, 102, 827–833.
- Fiebig, H.-J. and Lüttke, J. (2003) Solid fat content in fats and oils – determination by pulsed nuclear magnetic resonance spectroscopy [C-IV 3 g (3003)]. *Eur. J. Lipid Sci Technol*, 105, 377–380.
- Foglia, F.A., and Villeneuve, P. (1997). Carica papaya Latex-Catalyzed Synthesis of Structured Triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(11), 1447–1450.
- Gandhi, N.N. (1997). Applications of Lipase. *JAOCS*, 74, 621–634.
- Ghotra, B. S., Dyal, S. D. and Narine, S. S. (2002). Lipid shortenings: a review. *Food Research International*, 35, 1015–1048.
- Gordon, M.H. and Rahman, I.A. (1991). Effects of Minor Component on the Crystallization of Coconut Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(8), 577–579.
- Jeyarani, T. and Reddy, S.Y. (2010). Effect of enzymatic interesterification on physicochemical properties of mahua oil and kokum fat blend. *Food Chemistry*, 123, 249–253.
- Kaneko, F. (2001). Polymorphism and phase transitions of fatty acids and acylglycerols, in *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems*, edited by N. Garti, and K. Sato, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 53–98.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. and Doi, Y. (2004). High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 83, 79–86.
- Koyano, T. & Sato, K. (2002). Physical Properties of Fats in Food. In: K. K. Rajah, *Fats in Food Technology* (pp.1–29). Sheffield: Sheffield Academic Press.
- Kuk, M.S., Tetlow, R. and Dowd, M.K. (2005) Cottonseed extraction with mixtures of acetone and hexane. *JAOCS*, 82(8), 609–612.
- Kurashige, J., Matsuzaki, N., and Takahashi, H. (1993). Enzymatic modification of canola/palm oil mixtures: Effects on the fluidity of the mixture. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(9), 849–852.
- Lee, J.H., Yu, F., Vu, P.L., Chai, M.S., Akoh, C.C. and Lee, K.T. (2007). Compositional study on rice bran oil after lipase-catalyzed glycerolysis and solvent fractionations. *Journal of Food Science*, 72(3), 163–167.
- Lipp, M. and Anklem, E. (1998). Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate. Part A. Compositional data. *Food Chemistry*, 62, 73–97.
- Lidefelt, J.O. (2007). Vegetable oils and fats [Online]. Accessed 14 May 2010. Available

- from <http://www.annaochanna.se/pdf/Vegetabilisk%20Handbok.pdf>.
- Liu, K.J., Chang, H.M., Liu, K.M. (2007). Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. *Food chem*, 100, 1303-1311.
- Long, K., Zubir, I., Hussin, A. B., Idris, N., Ghazali, H. M., and Lai, O. M. (2003). Effect of enzymatic transesterification with flaxseed oil on the high-melting glycerides of palm stearin and palm olein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(2), 133–137.
- Marty, S. and Marangoni, A.G. (2009). Effect of cocoa butter origin, tempering procedure, and structure on oil migration kinetics. *Crystal Growth & Design*, 9(10), 4415-4423.
- Maruyama, T., Nakajima, M., Ichikawa, S., Nabetani, H., Furusaki, S., and Seki, M. (2000). Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(11), 1121-1124.
- Microscopy Berkeley. (2011). Polarized Light Microscope [Online]. Accessed 20 November 2011. Available from <http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/plm/plm.html>.
- Morton, J.F., 1987. Rambutan. in: *Fruits of Warm Climates*, edited by J.F. Morton, Miami, FL, pp. 262–265.
- Mullin, J.W. (1993). *Crystallization*, 3rd edition, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
- Myerson, A.S. (2002). *Handbook of Industrial Crystallization*, 2nd edition, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
- Oh, J.-E., Lee, K.-W., Park, H.-K., Kim, J.-Y., Kwon, K.-I., Kim, J.-W., Kim, H.-R. and Kim, I.-H. (2009). Lipase-Catalyzed Acidolysis of Olive Oil with Capric Acid: Effect of Water Activity on Incorporation and Acyl Migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9280–9283.
- Osborn, H.T. and Akoh, C.C. (2002). Structured lipids—novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Institute of Food Technologists*, 3, 110-120.
- Pinyaphong, P., and Phutrakul, S. (2009). Modification of palm oil structure to cocoa butter equivalent by *Carica papaya* lipase-catalyzed interesterification. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54, 536-540.
- Rao, R., Sankar, K.U., Sambaiah, K., and Lokesh, B.R. (2001). Differential scanning calorimetric studies on structured lipids from coconut oil triglycerides

- containing stearic acid. *European Food Research and Technology*, 212, 334–343.
- Reshma, M.V., Saritha, S.S., Balachandran, C. and Arumughan, C. (2008). Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. *Bioresource Technology*, 99, 5011–5019.
- Reshma, M.V., Balachandran, C., Arumughan, C., Sunderasan, A., Sukumaran, D., Thomas, S., and Saritha, S.S. (2010). Extraction, separation and for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 120, 1041-1046.
- Ribeiro, A.P.B, Basso, R.C., Grimaldi, R., Gioielli, L.A., Santos, A.O., Cardoso, L.P. and Gonçalves, L.A.G. (2009). Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fullyhydrogenated cottonseed oil blends. *Food Research International*, 42, 1153-1162.
- Rincón-Cardona, J.A., Martini, S., Candal, R.J. and Herrera, M.L. (2013). Polymorphic behavior during isothermal crystallization of high stearic high oleic sunflower oil stearins. *Food Research International*, 51, 86–97.
- Sato K., Molecular Aspects in Fat Polymorphism, in Crystallization and Solidification Properties of Lipids, edited by N. Widlak, R. Hartel, and S. Narine, AOCS Press, Illinois, 2001, pp. 1-16.
- Salas, J.J., Bootello, M.A., Martinez-Force, E., and Garcs, R. (2011). Production of stearate-rich butters by solvent fractionation of high stearic–high oleic sunflower oil. *Food Chemistry*, 124, 450–458.
- Senanayake, S.P.J.N., and Shahidi, F. (2005). Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. In Baily's Industrial Oil and Fat Products. 6th edition, edited by F. Shahidi, Wilie-Interscience, New York, pp. 555-584.
- Sharma, R., Chisti,Y. and Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Silva, R.C.D., Soares, F.A.S.D.M., Hazzan, M., Capacla, I.R., Gonclaves, M.I.A. and Gioielli, L.A. (2012). Continuous enzymatic interesterification of lard and soybean oil blend: Effects of different flow rates on physical properties and acyl migration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 76, 23-28.
- Simoneau, C., Hannaert, P. & Anklam, E. (1999). Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model system: analysis of triacylglyceride profiles by high resolution GC. *Food Chemistry*, 65, 111–116.

- Solis-Fuentes, J.A. and Duran-de-Bazua, M.C. (2003). Characterization of eutectic mixtures in different natural fat blends by thermal analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 105, 742-748.
- Solis-Fuentes, J.A. and Duran-de-Bazua, M.C. (2004). Mango seed uses: thermal behaviour of mango seed almond fat and its mixtures with cocoa butter. *Bioresource Technology*. 92, 71-78.
- Solis-Fuentes J.A., Camey-Ortiz, G., Hernandez-Medel, M.R., Perez-Mendoza, F., and Duran-de-Bazua, M.C. (2010). Composition, phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed. *Bioresource Technology*. 101, 799-803.
- Sonwai, S., Kaphueakngam, P. and Flood, A. (2012). Blending of mango kernel fat and palm oil mid-fraction to obtain cocoa butter equivalent. *J Food Sci Technol*. (Article In Press: DOI: 10.1007/s13197-012-0808-7)
- Stewart, I. and Kristott, J. (2004). European Union Chocolate Directive Defines Vegetable Fats for Chocolate, *Lipid Technology*, 16, 11-14.
- Talbot, G., 1999. Vegetable Fats, in *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 3rd Edition by S.T. Beckett, Blackie Academic & Professional, Oxford, pp. 307-322.
- Tang, D. and Marangoni, A. G. (2006). Microstructure and fractal analysis of fat crystal networks. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(5), 377-388.
- Tchobo, F.P., Piombo, G., Pina, M., Soumanou, M.M., Villeneuve, P., and Sohounhloue, D.C.K. (2009). Enzymatic synthesis of cocoa butter equivalent through transesterification of *Pentadesma Butyracea* butter. *Journal of Food Lipids*, 16, 605-617.
- Timms, R.E., 1994. Physical Chemistry of Fats. In *Fats in Food Product*. Moran, D.P.J. and Rajah, K.K. 1st ed. Great Britain. Oxford.
- Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry*, 36, 933-939.
- Wang, H.-X, Wu, H., Ho, C.-T, and Weng, X.-C. (2006). Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*, 97, 661-665.
- Winayanuwattikuna, K., Kaewpiboon, C., Piriyananona, K., Tantonga, S., Thakernkarnkita, W., Chulalaksananukulb, W., and Yongvanich, T. (2008). Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy*. 32, 1279-1286.
- Wikipedia encyclopedia. (2011). Dark field microscopy [Online]. Accessed 27

- November 2011. Available from
http://en.wikipedia.org/wiki/Dark_field_microscopy.
- Xu, X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000, 287-303.
- Yazdi, Z.K. and Alemzadeh, I. (2011). Improvement of palm oil and sunflower oil blends by enzymatic interestrification. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1093-1099.
- Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.N.A., Omar, M.A.K., Jr. Smith., R.L. (2006). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction and fractionation of palm kernel oil from palm kernel as cocoa butter replacers blend. *Journal of Food Engineering*, 73, 210–216.
- Zarringhalami, S., Sahari, M.A., Barzegar, M., and Hamidi-Esfehani, Z. (2010). Enzymatically modified tea seed oil as cocoa butter replacer in dark chocolate. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 540–545.
- Zee, F. (1993). Rambutan and pili nuts: potential crops for Hawai. in: *New Crops*. Edited by J. Janick, and J.E. Simon, J. Wiley and Sons Inc., New York, pp. 461–465.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
กระบวนการเตรียมเมล็ดเงาะและกระบวนการสกัด

กระบวนการเตรียมเมล็ดงาและกระบวนการสกัด

1. ขั้นตอนการเตรียมเมล็ดงาก่อนการสกัดไขมัน

1. นำเมล็ดงาที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตงาสอดใส่สับประรดบรรจุกระป๋องบรรจุในถุงสีดำ
2. นำเมล็ดงาไปตากแห้ง
3. แกะเปลือกสีน้ำตาลออกจนเหลือแต่เนื้อในเมล็ดสีเหลือง
4. อบเมล็ดงาด้วยตู้อบสุญญากาศที่ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 10
วิธีคำนวณร้อยละความชื้นมาตรฐานแห้ง (% dry basis)
= (น้ำหนักก่อนอบ - น้ำหนักหลังอบ)/น้ำหนักหลังอบ x 100
5. บดเมล็ดงาด้วย warring blender
6. บรรจุเมล็ดงาใส่ถุงซิปล็อก และเก็บลงในภาชนะที่ปิดสนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2. การสกัดน้ำมันด้วยวิธี Soxhlet Extraction

1. บรรจุเมล็ดงาที่บดแล้วในถุงผ้า ปริมาณ 400 กรัม
2. ตั้งเครื่องสกัดไขมันบน Hot Plate
3. บรรจุถุงผ้าลงในเครื่องสกัดไขมัน
4. เติมตัวทำละลาย Hexane 1000 มิลลิลิตร
5. ต่อเครื่อง water cooler กับเครื่องสกัดไขมัน
6. ต่อเทอร์โมคัปเปิลกับเครื่องสกัดไขมัน
7. เปิด Hot Plate เพื่อให้ความร้อน อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข
การทำไขมันให้บริสุทธิ์ (purification)

การให้น้ำมันบริสุทธิ์ (purification)

ตามวิธีของ Wesson method

1. ละลายไขมัน (crude fat) ที่ได้จากการสกัดในปิโตรเลียมอีเทอร์ด้วยอัตราส่วนของน้ำมัน : ปิโตรเลียมอีเทอร์ เท่ากับ 1:5 (w/v)
2. เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 14 พร้อมกับการคนอย่างแรงเป็นเวลา 3 นาที (ปริมาตรที่ใช้คิดจากโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิลิตร ต่อไขมัน 1 กรัม)
3. เติมเอทานอลร้อยละ 50 ด้วยอัตราส่วนไขมัน : เอทานอล 1:2.5 (w/v) ในขณะที่ยังคนอยู่
4. ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแยกชั้น โดยชั้นบนเป็นชั้นของอีเทอร์ที่มีไขมันบริสุทธิ์ละลายอยู่
5. เมื่อทำการแยกส่วนบนออกมาแล้วเติมปิโตรเลียมอีเทอร์อีกครั้งเพื่อสกัดซ้ำ ตั้งไว้ให้แยกชั้นใช้ส่วนบน
6. กำจัดปิโตรเลียมอีเทอร์ออกโดยการระเหยใช้เครื่อง rotary evaporator จะได้ไขมันที่บริสุทธิ์ (purified fat)
7. เก็บไขมันที่บริสุทธิ์ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์



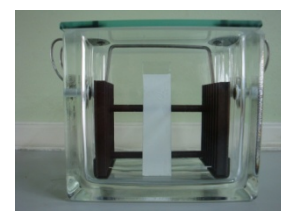
ที่มา: Solis-Fuentes และ Duran-de-Bazua (2004)

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยเทคนิค Thin layer chromatography

1. เตรียมตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ตามกรรมวิธีของ Abigor และคณะ (2003) ประกอบด้วย hexane : ether : acetic acid เท่ากับ 80 : 20 : 1 โดยปริมาตร
2. นำตัวอย่างไขมันไปจุดที่แผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (10 × 20 cm, 250 μ m) ให้สูงจากด้านล่างประมาณ 1 ซม. ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม. เป่าด้วยเครื่องเป่าลมร้อน จากนั้นจุดตัวอย่างอีกจนกระทั่งครบ 10 จุดข้างลงไปตำแหน่งเดิม เพื่อเป็นการเพิ่มความเข้มข้นให้กับตัวอย่าง แต่การเป่าตัวอย่างจะต้องทุกครั้งเมื่อหยดตัวอย่างลงไป (แต่ละตัวอย่างควรมีความเข้มข้นตัวอย่างเท่ากัน) โดยไขมันที่ทำการศึกษาคือ ไขมันเมล็ดเงาะ ไขมันเมล็ดเงาะดัดแปลง สารละลายมาตรฐานโคกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์
3. เทตัวทำละลายลงไปให้มีความสูงประมาณ 0.5 ซม. จากนั้นวางแผ่น TLC ลงใน Chamber ให้จุดตัวอย่างอยู่เหนือตัวทำละลาย
4. วางแผ่น TLC ทั้งไว้ใน Chamber จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่วัดไว้ แล้วนำแผ่น TLC ไปเก็บในบีกเกอร์ที่มีไอโอดีนอยู่ จากนั้นไอของไอโอดีนจะทำให้แผ่น TLC ที่มีไขมันอยู่เกิดสีน้ำตาล แล้ววงกลมตำแหน่งที่เกิดสีน้ำตาลขึ้น เพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของไขมันชนิดต่างๆ
5. เมื่อไอของไอโอดีนระเหยหมด จึงจุดไขมันบริเวณที่ต้องการศึกษาไปทำละลายด้วย acetone จากนั้นนำไปเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสของสารละลายและผงซิลิกาเจล โดยใช้เครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง นำสารละลายใสส่วนของ acetone ที่ละลายไขมันที่อยู่ในผงซิลิกาเจลเก็บไว้
6. นำไปส่วนของสารละลายที่ได้ไปทำการศึกษากว่าเป็นองค์ประกอบใดในไขมันด้วยเทคนิค HPLC



ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในไขมันเมล็ดเงาะ

การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ในไขมันเมล็ดเงาะ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างไขมันบริสุทธิ์ หรือ ไขมันที่ดัดแปลงโครงสร้าง ประมาณ 10 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ รอกระทั่งไขมันละลายในอะซิโตนหมด ใช้หลอดฉีดยา (syringe) ดูดตัวอย่างแล้วกรองด้วยตัวกรอง (syringe filter) ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บสารละลายที่ผ่านการกรองลงในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -18°C เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ด้วยเครื่อง HPLC

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณไตรกลีเซอไรด์จะใช้เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยตั้งสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

คอลัมน์ : 2 Reverse column C-18, 4.6x250 mm, 5 μm particle size

อุณหภูมิคอลัมน์ : 45°C

เฟสเคลื่อนที่ : อะซิโตน: อะซิโตนไนไตรต์ สัดส่วน 63.5 : 36.5 (v/v)

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

Detector : diode array detector SPD-M20A

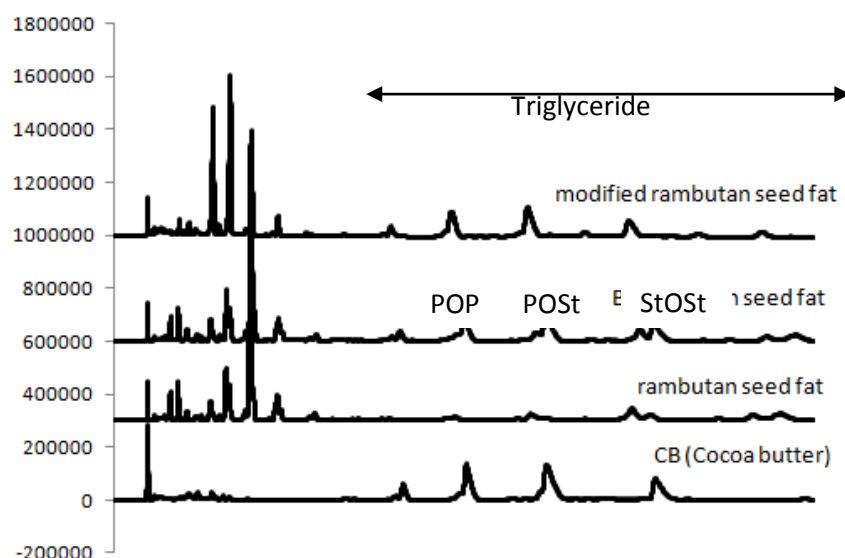
Injection volume : 20 μL

3. เปรียบเทียบมาตรฐานไตรกลีเซอไรด์ POP และ OOO เพื่อให้ทราบ retention time ของไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบกับไขมันชนิดต่างๆที่ได้

4 การศึกษาชนิดของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันนั้น จะต้องทำการศึกษาโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในไขมันหลังดัดแปลงโครงสร้างที่ได้เพื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณไตรกลีเซอไรด์มาตรฐาน จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของไตรกลีเซอไรด์จากพื้นที่ใต้พีคหลังจาก integrate แล้วนำค่าที่ได้เชิงปริมาณมาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อเลือกสภาวะที่ดีที่สุดของแต่ละปัจจัยมาทำการศึกษาต่อไป ตัวอย่าง Chromatogram ที่ได้แสดงในภาพที่ 46 ไขมันเมล็ดเงาะก่อนดัดแปลงมีโครงสร้างที่ไม่เหมือนเนยโกโก้ หลังจากดัดแปลงแล้วองค์ประกอบไตรกลีเซอไรด์ที่ได้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งจากโครมาโตแกรมแสดงให้เห็นว่ามีความคล้ายกับเนยโกโก้มากขึ้น โดยที่ไขมันเมล็ดเงาะหลังจากดัดแปลงโครงสร้างในช่วง retention time 0-30 นาที มีองค์ประกอบของไขมันบางประเภทเพิ่มมากขึ้น ก็คือโมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ ที่ถูกเอนไซม์ตัดกรดไขมันอิสระออกที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ขณะเกิดปฏิกิริยาและไม่มีกรดไขมันอิสระเข้าไปจับในตำแหน่งดังกล่าว จึงไม่กลายเป็นโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (Abigor และคณะ, 2003) รวมทั้งยังมีกรดไขมันอิสระที่เหลือจากการเติมลงไป และที่ถูกตัดจากโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ การที่โมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์สามารถเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้ก่อน เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้เลือกใช้เฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) เป็น C18 ภายในบรรจุด้วย bonded silica ซึ่งมีสภาพไม่มีขั้ว จึงสามารถดูดซับไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของไขมันที่ไม่มีขั้วได้ดี ส่วนสารที่มีขั้ว คือ โมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ สามารถถูกดูดซับได้ในคอลัมน์ได้ไม่ดี และสามารถละลาย

ได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพเดียวกันคือ acetone และ acetonitrile ที่มีความเข้มข้นน้อย จึงเคลื่อนที่ออกมาให้เห็นเป็นโครมาโตแกรมก่อนไตรกลีเซอไรด์ ในทำนองเดียวกันจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยเทคนิค TLC โดยเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Hexane ซึ่งไม่มีขั้ว สามารถดูดซับองค์ประกอบของไขมันที่ไม่มีขั้ว ก็คือ ไตรกลีเซอไรด์ได้ดี ทั้งนี้เป็นผลจากสภาพการละลายได้ของตัวอย่างไขมันกับเฟสเคลื่อนที่ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบต่างๆจากกัน



ภาพที่ 46 Chromatogram ของ HPLC ที่ได้ของตัวอย่างไขมันชนิดต่างๆ

ภาคผนวก จ
การเตรียมสารละลายเกลืออิมัลชัน

การเตรียมสารละลายเกลืออิมิตัว

1. นำเกลือชนิดที่ต้องการมาปรับค่าปริมาณความชื้นของเอนไซม์ โดยชั่งน้ำหนักเกลือและน้ำตามตารางแสดงปริมาณความชื้นของเกลือแต่ละชนิดและสัดส่วนในการเตรียมสารละลายเกลืออิมิตัว

เกลือ	Equilibrium			
	relative humidity (ERH,%)	a_w	salt (gm)	water (gm)
LiCl	11.15	0.11	150	85
CH ₃ COOH	22.6	0.23	200	65
MgCl ₂	32.73	0.33	200	25

2. นำสารละลายเกลืออิมิตัวบรรจุในโถดูดความชื้น (dessicator)
3. นำเอนไซม์ที่ต้องการปรับค่าความชื้น ไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่บรรจุสารละลายเกลืออิมิตัวเก็บไว้ที่อุณหภูมิคงที่ที่ 25°C เป็นระยะเวลา 5 วัน หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่
4. วัดค่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของเอนไซม์ โดยใช้เครื่องวัด water activity ก่อนจะนำเอนไซม์มาใช้ทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชัน

ภาคผนวก จ
การแยกกรดไขมันอิสระ

การแยกกรดไขมันอิสระ

1. นำไขมันดัดแปลงที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C ปริมาณ 0.85 กรัม ละลายด้วย hexane 5 มิลลิลิตร ในปิเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. การทำปฏิกิริยาเพื่อแยกกรดไขมันอิสระ เติมเอทานอล 3 มิลลิลิตร
3. หยด phenolphthalein เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์บอกจุดยุติของการไตเตรด
4. ตัวไตเตรนต์ คือ 0.5 N โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอล ไตเตรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู สารละลายจะแยกเป็นสองชั้น
5. ให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C เป็นเวลา 3 นาที
6. แยกสารละลายส่วนใสด้านบนออก เพื่อที่จะนำไประเหยเอา hexane ออก แล้วจะได้ไขมันที่ถูกกำจัดกรดไขมันอิสระเรียบร้อยแล้ว

หมายเหตุ : ดัดแปลงมาจาก Alim และคณะ (2008)

ภาคผนวก ข
การศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของไขมันด้วยเทคนิค
Differential Scanning Calorimeter

การศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของไขมันด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter

ทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของการตกผลึกและการหลอมเหลวของไขมันโดยใช้เครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) รุ่น DSC 8000 PerkinElmer ตามกรรมวิธีของ AOCS (2000) ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างใส่ liquid aluminum pan สำหรับ DSC ประมาณ 2-3 mg
2. ปิดฝา pan ให้สนิท จากนั้นตัวอย่าง และ pan เปล่า นำไปใส่เครื่อง DSC
3. ตั้งค่า temperature program สำหรับการวิเคราะห์ ดังนี้
 - 3.1 ให้ความร้อนแก่ตัวอย่างจากอุณหภูมิ 20°C ไปจนถึง 80°C ด้วยอัตรา 30°C/นาที
 - 3.2 คงไว้ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 10 นาที
 - 3.3 ลดอุณหภูมิลงจาก 80°C จนถึง -40°C ด้วยอัตรา 5°C/นาที
 - 3.4 คงไว้ที่อุณหภูมิ -40°C นาน 30 นาที
 - 3.5 ให้ความร้อนจากอุณหภูมิ -40°C ไปจนถึง 80°C ด้วยอัตรา 5°C/นาที)
4. นำโครมาโตแกรมที่ได้มาหาค่าเอนทัลปี อุณหภูมิในการตกผลึก และอุณหภูมิในการหลอมเหลว

ภาคผนวก ซ
การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะผลึกของไขมัน

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะผลึกของไขมัน

1. ให้ความร้อนกับตัวอย่างไขมันที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายโครงสร้างผลึกส่วนที่เป็นของแข็ง
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างประมาณ 20 μL ใส่ลงบน glass slide แล้วปิดด้วย cover slip
3. นำตัวอย่างเก็บในตู้บ่มที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ที่อุณหภูมิ 20°C ($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$) ในสภาวะนิ่ง
4. เริ่มจับเวลา โดยทำการถ่ายภาพผลึกที่เวลา 0.5 1 2 3 6 12 24 48 ชั่วโมง ในระหว่างการทดลองต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดเวลา ($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$) เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง จำนวนและขนาดของผลึก
5. นำภาพที่ได้มาศึกษารูปร่างผลึก ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างผลึกที่ระยะเวลาต่างๆ

ภาคผนวก ฅ
การวัดค่าปริมาณความเป็นของแข็งในรูปผลึก (SFC)

การวัดค่าปริมาณความเป็นของแข็งในรูปผลึก (Solid fat content : SFC)

ทำการควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างก่อนที่จะทำการวัดค่าปริมาณความเป็นของแข็งในรูปผลึก โดยเทคนิค pulsed-Nuclear Magnetic Resonance ตามกรรมวิธีของ Fiebig และ Lüttke (2003) ดังนี้

1. ให้ความร้อนแก่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70-80°C เป็นเวลาประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตัวอย่างละลาย
2. บรรจุตัวอย่างลงในหลอดทดลองที่ใช้สำหรับเครื่อง p-NMR โดยใส่ตัวอย่างให้มีความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร
3. นำตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-80°C ประมาณ 10 นาที เพื่อทำการละลายผลึกที่เป็นของแข็งทั้งหมด
4. นำตัวอย่างให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที
5. นำตัวอย่างลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่ประมาณ 0°C เป็นเวลา 60 นาที
6. นำตัวอย่างเพิ่มอุณหภูมิไปที่อุณหภูมิที่ต้องการวัดค่า SFC เป็นเวลา 30-35 นาที เพื่อศึกษาค่าความเป็นของแข็งในรูปผลึกที่อุณหภูมิต่างๆ
7. ทำการวัดค่า SFC ด้วยเทคนิค p-NMR
8. นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาพล็อตกราฟระหว่าง %SFC (แกน Y) ของไขมันชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิต่างๆ (แกน X)

ภาคผนวก ญ

ตารางแสดงค่าร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จาก
การทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันด้วยปัจจัยต่างๆ

ตารางที่ 24 ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POST และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะโดยใช้ acyl donor ต่างชนิดกัน

สารตั้งต้น	POP (%)	POST (%)	StOSt (%)
cocoa butter	23.2	35.9	21.0
rambutan seed fat	0.4	1.5	3.7
rambutan seed fat + methyl palmitate	1.8	6.5	-
rambutan seed fat + methyl stearate	-	3.1	3.7
rambutan seed fat + palmitic acid	6.0	19.5	3.8
rambutan seed fat + stearic acid	1.3	6.8	19.4

หมายเหตุ: เครื่องหมาย - หมายความว่า ไม่พบในโครงสร้าง

ตารางที่ 25 ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POST และ StOSt ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์โดยมีอัตราส่วนของไขมันเมล็ดเงาะ : acyl donor ที่แตกต่างกัน(โดยน้ำหนัก)

ไขมันเมล็ดเงาะ : acyl donor	POP (%)	POST (%)	StOSt (%)	POP+POST+StOSt (%)
1:1	10.9±1.20 ^d	17.5±1.25 ^d	15.8±0.02 ^a	44.2±2.48 ^d
1:2	14.9±0.34 ^c	22.1±0.32 ^c	15.9±0.89 ^a	52.9±0.86 ^c
1:4	19.0±1.29 ^b	26.0±1.07 ^b	15.0±1.09 ^a	60.0±3.45 ^b
1:6	21.8±0.75 ^a	29.1±0.99 ^a	15.1±1.20 ^a	66.0±2.94 ^a
1:8	23.0±0.10 ^a	30.8±0.20 ^a	15.9±0.24 ^a	69.7±0.54 ^a
1:10	23.4±0.17 ^a	30.2±0.22 ^a	15.7±0.33 ^a	69.4±0.07 ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (ค่าเฉลี่ยของ duplicates ± standard deviation(SD))

* ตัวอักษร a,b,c ในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 26 ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POST และ StOst ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันของไขมันเมล็ดงาโดยมีอัตราส่วนของกรดปาล์มิติก : กรดสเตียริก ที่แตกต่างกัน (โดยน้ำหนัก)

ไขมันเมล็ดงา : กรดปาล์มิติก : กรดสเตียริก (โดยน้ำหนัก)	POP (%)	POST (%)	StOst (%)
1:1:5	7.4	24.7	35.6
1:2:4	13.5	28.3	25.8
1:4:2	26.9	24.2	16.4
1:5:1	34.6	17.5	15.1
1:3:3	21.8	29.1	15.1

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ตารางที่ 27 ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POST และ StOst ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดงาด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน

เวลา (ชม.)	POP (%)	POST (%)	StOst (%)	POP+POST+StOst (%)
0	0.4±0.09 ^d	1.4±0.14 ^e	3.7±0.09 ^e	5.4±0.31 ^d
2	11.2±2.33 ^c	17.3±3.27 ^d	19.1±2.29 ^a	47.6±7.90 ^c
4	17.3±1.11 ^b	24.1±1.37 ^{bc}	20.2±0.22 ^a	61.6±2.71 ^{ab}
6	20.3±0.65 ^a	27.4±1.06 ^a	18.1±1.92 ^{ab}	65.8±0.20 ^{ab}
8	21.2±0.57 ^a	29.2±0.33 ^a	17.8±0.18 ^{ab}	68.2±0.07 ^a
10	22.1±0.03 ^a	28.8±0.53 ^a	15.4±1.39 ^{bc}	66.3±1.89 ^{ab}
12	22.2±0.41 ^a	29.2±0.84 ^a	16.0±0.32 ^{bc}	67.3±1.57 ^{ab}
24	20.6±0.11 ^a	26.4±0.45 ^{ab}	13.5±0.06 ^c	60.6±0.50 ^b
48	16.5±0.00 ^b	21.6±0.62 ^c	11.0±0.04 ^d	49.0±0.58 ^c

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC
(ค่าเฉลี่ยของ duplicates ± standard deviation(SD))

* ตัวอักษร a,b,c ในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 28 ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POST และ StOst ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

ปริมาณเอนไซม์ ที่ใช้ (โดยน้ำหนักของสาร ตั้งต้น)	POP (%)	POST (%)	StOst (%)	POP+POST+StOst(%)
5%	19.3±1.79 ^b	27.5±1.66 ^a	19.4±2.29 ^a	66.2±1.16 ^a
8%	22.1±0.48 ^a	28.7±0.30 ^a	16.1±0.08 ^b	67.0±0.85 ^a
10%	21.6±0.25 ^{ab}	29.0±1.17 ^a	16.4±0.43 ^b	66.9±0.99 ^a
12%	21.0±0.10 ^{ab}	27.9±0.18 ^a	14.9±0.34 ^b	63.7±0.06 ^a
15%	21.1±1.27 ^{ab}	28.2±1.20 ^a	14.6±0.40 ^b	63.9±2.08 ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (ค่าเฉลี่ยของ duplicates ± standard deviation(SD))

* ตัวอักษร a,b,c ในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

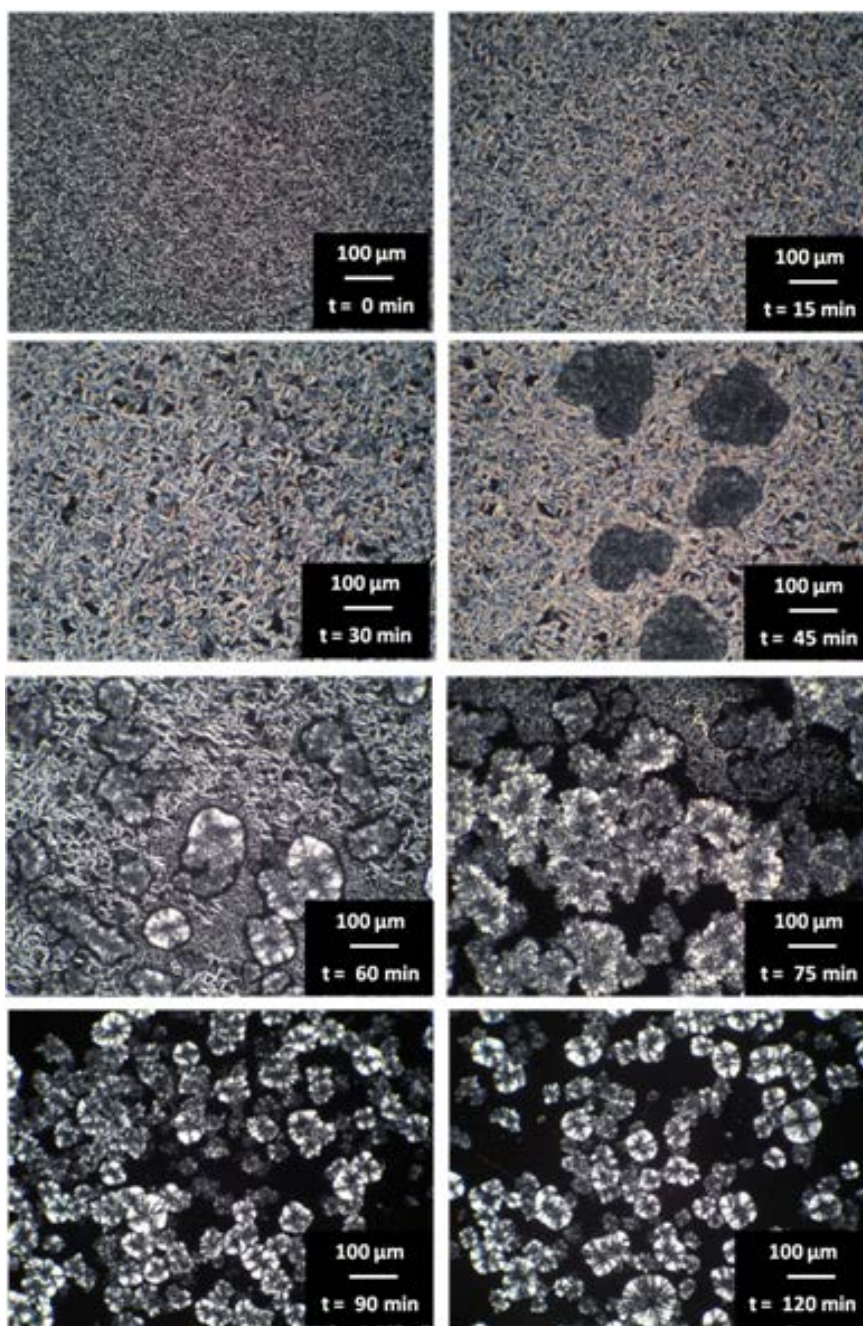
ตารางที่ 29 ร้อยละของปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ชนิด POP POST และ StOst ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันแบบใช้เอนไซม์ของไขมันเมล็ดเงาะด้วยความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

ค่า a _w เริ่มต้น ของเอนไซม์	POP (%)	POST (%)	StOst (%)	POP+POST+StOst (%)
0.11	21.8±0.75 ^a	29.1±0.99 ^a	15.1±1.20 ^a	66.0±2.94 ^a
0.23	21.7±1.52 ^a	28.7±0.92 ^a	14.6±0.45 ^a	64.9±2.89 ^a
0.33	20.8±0.80 ^a	28.2±0.53 ^a	14.2±0.57 ^a	63.1±1.90 ^a

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (ค่าเฉลี่ยของ duplicates ± standard deviation(SD))

* ตัวอักษร a,b,c ในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ภาคผนวก ก
ภาพถ่ายพฤติกรรมการตกผลึกของไขมันเมลิตเตนจากกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 47 การเปลี่ยนแปลงจำนวน ขนาด และรูปร่างของผลึกไขมันเมล็ดเงาะ ตั้งแต่เวลา 0 – 120 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C กำลังขยายของกล้องเท่ากับ 100 เท่า

ประวัติผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-สกุล: (ภาษาไทย) นายโสภาค สอนไว
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Sopark Sonwai

ตำแหน่งทางวิชาการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทร (034) 219361 ต่อ 1314 โทรสาร (034) 219361
มือถือ 085-9129510
E-mail: ssonwai@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี : วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขา Food Engineering (เกียรตินิยม),
คณะวิศวกรรมศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง 2537.

ปริญญาโท : Master of Science in Advanced Chemical Engineering, Department of
Chemical Engineering, Imperial College, University of London, England,
1998.

ปริญญาเอก: Doctor of Philosophy in Chemical Engineering (Food Engineering),
University of Cambridge, England, 2003.

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ: Food Engineering (Crystallization of fats and sugar, chocolate
science and technology).

ผลงานตีพิมพ์:

Ornlai P., **Sonwai S.** and Lertthirasuntorn S. (2016). Trans-free margarine fat by enzymatic interesterification of rice bran oil and hard palm stearin. *Food Science and Biotechnology*. (In Press)

Sopark S., Podchong P and Rousseau D. (2016). Crystallization of coconut oil under the influence of sorbitan esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 93(6), 849-858.

Sonwai S., Kaphueakngam P. and Flood A. (2014) Blending of mango kernel fat and palm oil mid-fraction to obtain cocoa butter equivalent. *Journal of Food Science and Technology*. 51(10), 2357-2369.

Sonwai S. and D. Rousseau (2008). Fat Crystal Growth and Microstructural Evolution in Industrial Milk Chocolate. *Crystal Growth & Design*. 8 (9), 3165–3174.

- Kaphueakngam P., A. Flood and **S. Sonwai** (2009). Production of Cocoa Butter Equivalent from Mango Seed Almond Fat and Palm Oil - Mid Fraction. *Asian Journal of Food and Agro - Industry*. 2(04). 441-447.
- Sonwai S.** and D. Rousseau (2010). Controlling fat bloom formation in chocolate - impact of milk fat on microstructure and fat phase crystallization. *Food Chemistry*. 119(1), 286-297.
- Rousseau D., **S. Sonwai** and R. Khan (2010). Microscale surface roughening of chocolate viewed with optical profilometry. *Journal of the American Oil Chemists Society* 87(10) 1127-1136.
- Sonwai S.** and Ponprachanuvut P. (2012). Characterization of physicochemical and thermal properties and crystallization behavior of Krabok (*Irvingia Malayana*) and rambutan seed fats. *Journal of Oleo Science*. 61(12), 671-679.
- Sonwai S.**, Kaphueakngam P. and Flood A. (2012). Blending of mango kernel fat and palm oil mid-fraction to obtain cocoa butter equivalent. *Journal of Food Science and Technology*. (Article In Press: DOI: [10.1007/s13197-012-0808-7](https://doi.org/10.1007/s13197-012-0808-7))
- Sonwai S.** and Luangsasipong V. (2013). Production of zero-trans margarines from blends of virgin coconut oil, palm stearin and palm oil. *Food Science and Technology Research*. (Accepted for publication in Vol. 19 No. 3 May/2013)

2. ประวัติผู้ช่วยวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว ภควรรณ ชัยขจรวัฒน์

(ภาษาอังกฤษ) MISS PAKHAWAN CHAIKJONWAT

ที่อยู่ปัจจุบัน 59/482 หมู่ 4 ตำบลลาดสวาย อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150

โทรศัพท์ (มือถือ) (085) 515-3966

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2549 สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศ สตรีวิทยา ๒ กรุงเทพมหานคร

พ.ศ.2553 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) สาขาวิชา พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร

พ.ศ.2554 ศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลงานวิจัย

พ.ศ.2555 แสดงผลงานในหัวข้อ การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันปาล์มส่วน กลางด้วยกรรมวิธีอินเตอร์เอสเตอร์ริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ ในงานประชุมทาง วิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 13 วันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2555 ณ วิทยาลัยการปกครองท้องถิ่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

(ภาคโปสเตอร์)

- พ.ศ.2556 แสดงผลงานในหัวข้อ การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากน้ำมันเมล็ดงาด้วยกระบวนการอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส ในงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยและสร้างสรรค์ระดับชาติและนานาชาติ "ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ ครั้งที่ 6 : บูรณาการศาสตร์และศิลป์" ระหว่างวันที่ 16-18 มกราคม 2556 ณ หอศิลป์สนามจันทร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม (ภาคโปสเตอร์)

- พ.ศ.2556 แสดงผลงานในหัวข้อ การดัดแปรโครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันเมล็ดงาด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเตอริฟิเคชันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 27 ระหว่างวันที่ 28 กุมภาพันธ์ – 1 มีนาคม 2556 ณ อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา บรมราชินีนาถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก (ภาคโปสเตอร์)