



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตัดแปลงโครงสร้างน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้โดยใช้ไลเปสจาก
ยางมะละกอ

โดย ดร. พรทิพพา พิณญาพงษ์

2 กรกฎาคม 2552

สัญญาเลขที่ MRG5080339

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการดัดแปลงโครงสร้างน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้โดยใช้ไลเปสจาก
ยางมะละกอ

ดร. พรทิพพา พิญาพงษ์
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการดัดแปลงโครงสร้างน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้โดยใช้ไลเปสจากยางมะละกอ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เพื่อมุ่งหวังที่จะศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการดัดแปรโครงสร้างของน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้เทียม โดยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ เพื่อใช้เป็นแนวทางในกระบวนการผลิตเนยโกโก้เทียมจากเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอซึ่งมีราคาถูก อันจะก่อให้เกิดการขยายผลในภาคอุตสาหกรรมได้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่เห็นคุณค่าของการวิจัยและให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุริย์ พุตระกูล ที่ได้สละเวลาในการให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่มีคุณค่าต่อการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ทุกท่าน ที่ได้สละเวลาอำนวยความสะดวกและให้บริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา คณาจารย์ ที่ทำให้ผู้วิจัยได้มีความรู้ มีพื้นฐานในการทำวิจัย และขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวของผู้วิจัยเอง ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พรทิพพา พิณญาพงษ์

รหัสโครงการ : MRG5080339

ชื่อโครงการ : การดัดแปลงโครงสร้างน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้โดยใช้ไลเปสจากยางมะละกอ

ชื่อนักวิจัย : ดร. พรทิพพา พิณญาพงษ์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

E-mail Address : porntippapinyaphong@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 1 กรกฎาคม 2552)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมจากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ โดยศึกษาการแยกไลเปสออกจากยางมะละกอ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม ผลการศึกษาพบว่า การแยกไลเปสซึ่งเป็นส่วนตะกอนของยางมะละกอออกจากน้ำยางมะละกอสด โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ $9,500 \times g$ และทำตะกอนไลเปสให้แห้งโดยวิธีไลโอไฟไลเซชัน ไลเปสที่แห้งแล้วมีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละ 10 ของน้ำหนักยางมะละกอ และมีแอกติวิตีในการไฮโดรไลสน้ำมันปาล์ม 725 ± 23 ยูนิตต่อกรัมของตะกอนยางมะละกอแห้ง เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณน้ำ 3.60% และแอกติวิตีน้ำ 0.396 การสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมจากน้ำมันปาล์มโดยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งเร่งด้วยไลเปสจากยางมะละกอได้รับอิทธิพลจาก สารที่ทำหน้าที่ให้หมู่สเตียริล อัตราส่วนของสับสเตรท ปริมาณน้ำเริ่มต้นของเอนไซม์ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และปริมาณเอนไซม์ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอในการเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ เมทิลสเตียเรทเป็นสารที่ให้หมู่สเตียริลได้ดีที่สุดและใช้ในอัตราส่วนที่มากกว่าน้ำมันปาล์ม 4 เท่า ปริมาณแอกติวิตีน้ำของเอนไซม์เท่ากับ 0.11 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45°C และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คิดเป็นร้อยละ 18 โดยน้ำหนักของเอนไซม์ ซึ่งให้ผลผลิตของเนยโกโก้เทียมคิดเป็นร้อยละ 55 ของน้ำมันปาล์มที่ใช้ และจากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้พบว่า เนยโกโก้เทียมมีปริมาณกรดไขมันอิสระคิดเป็นร้อยละ 9.75 ± 0.41 ค่าไอโอดีน 44.89 ± 0.84 ค่าสปอนนิฟิเคชัน 193.19 ± 0.78 และมีจุดหลอมเหลว $37-39^{\circ}\text{C}$

คำหลัก : เนยโกโก้เทียม, ไลเปสจากยางมะละกอ, น้ำมันปาล์ม

Project Code : MRG5080339

Project Title : Modification of palm oil structure to cocoa butter using lipase from *carica papaya* lipase

Investigator : Dr. Pornthippa Pinyaphong Uttaradit Rajabhat University

E-mail Address : porntippapinyaphong@yahoo.com

Project Period : 2 years (2 July 2007 to 1 July 2009)

Abstract

The objective of this research was to investigate the synthesis of cocoa butter equivalent from interesterification of palm oil catalyzed by *Carica papaya* lipase. Separation of lipase from papaya latex and the optimum condition of cocoa butter synthesis were studied. It was found that the insoluble part of papaya latex was separated by centrifugation at 9,500×g and then was dried by lyophilization. The yield of lipase powder was 10% w/w of latex. The enzyme possessed 725 ± 23 units of lipase/g of lyophilized particulate, 3.60% water content and 0.396 water activity. Synthesis of cocoa butter from interesterification of palm oil catalyzed by *carica papaya* lipase was affected by acyl donor sources, substrate ratio, initial water of enzyme, reaction time, reaction temperature and the amount of enzyme. The best reaction conditions were methyl stearate acted as the best acyl donor, substrate ratio (palm oil : methyl stearate, mol/mol) at 1 : 4, water activity of enzyme at 0.11, reaction time at 4 h, reaction temperature at 45 °C and 18% by weight of the enzyme. The yield of cocoa butter equivalent was 55% based on palm oil used. The chemical and physical properties of cocoa butter equivalent were $9.75 \pm 0.41\%$ free fatty acid, 44.89 ± 0.84 iodine number, 193.19 ± 0.78 saponification value and melting point at 37-39 °C.

Keywords : cocoa butter equivalent, *Carica papaya* lipase, palm oil

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
รายการรูปประกอบ	ช
รายการตารางประกอบ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 เนยโกโก้	2
1.3 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเนยโกโก้	4
1.4 เนยโกโก้เลียนแบบ	5
1.4.1 ชนิดของเนยโกโก้เลียนแบบ	7
1.4.1.1 Cocoa Butter Equivalents	7
1.4.1.2 Cocoa Butter Replacers	7
1.4.1.3 Cocoa Butter Substitutes	7
1.5 การผลิตเนยโกโก้เลียนแบบโดยกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ิฟิเคชัน	8
1.6 ขางมะละกอ	11
1.6.1 การเก็บขางมะละกอ	11
1.6.2 ไลเปสจากขางมะละกอ	11
1.6.3 ความจำเพาะของไลเปสจากขางมะละกอ	12
1.7 การแปรรูปปาล์มน้ำมัน	13
1.7.1 การตัดแปรรูปไขมันและน้ำมัน	13
1.7.1.1 การแยกส่วน	14
1.7.1.2 อินเตอร์เอสเทอร์ิฟิเคชัน	14
1.7.1.3 การทำไขมันแข็งหรือการเติมไฮโดรเจน	15
1.7.2 การนำไปใช้ประโยชน์	15
1.8 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	19

2.1	การเตรียมไลเปสจากยางมะละกอ	19
2.1.1	วิธีเก็บยางมะละกอ	19
2.1.2	วิธีการแยกไลเปส	19
2.2	การตรวจสอบสมบัติของไลเปส	19
2.2.1	วิธีการหาค่าปริมาณน้ำ	19
2.2.2	วิธีการคำนวณค่าแอกติวิตีน้ำ	20
2.2.3	วิธีหาแอกติวิตีไลเปส	20
2.2.4	วิธีศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม	21
2.2.5	วิธีศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม	21
2.2.6	วิธีการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Kjeldahl	22
2.3	วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอิน	22
2.4	วิธีศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม	23
2.4.1	วิธีศึกษาผลของแหล่งให้หมู่เอซิล	23
2.4.2	วิธีศึกษาผลของอุณหภูมิ	23
2.4.3	วิธีศึกษาผลของเวลา	23
2.4.4	วิธีศึกษาผลของแอกติวิตีน้ำเริ่มต้นของเอนไซม์	24
2.4.5	วิธีศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์	24
2.4.6	วิธีศึกษาผลของอัตราส่วนของสับสเตรท	24
2.5	วิธีแยกไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้ TLC	25
2.6	การวิเคราะห์รูปแบบกรดไขมันโดยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรสโคปี	25
2.7	วิธีวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของเนยโกโก้เทียม	25
2.8	วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของเนยโกโก้เทียม	26
2.9	วิธีศึกษาผลผลิตของเนยโกโก้เทียม	26
บทที่ 3	ผลการวิจัย	27
3.1	ผลผลิตไลเปสจากยางมะละกอ	27
3.2	คุณสมบัติของไลเปสจากยางมะละกอ	28

3.2.1 ปริมาณน้ำในไลเปส	28
3.2.2 แอคติวิตีของไลเปส	28
3.2.3 คุณสมบัติทั่วไปของไลเปสจากยางมะละกอ	29
3.3 องค์ประกอบในน้ำมันปาล์ม	30
3.4 สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมโดยไลเปสจากยางมะละกอ	31
3.4.1 ผลของแหล่งที่ให้หมูเอชิล	31
3.4.2 ผลของอุณหภูมิ	31
3.4.3 ผลของเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา	32
3.4.4 ผลของแอคติวิตีเริ่มต้น	33
3.4.5 ผลของปริมาณเอนไซม์	34
3.4.6 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมของสับสเตรท	34
3.5 คุณสมบัติทางกายภาพของเนยโกโก้เทียม	35
3.6 ผลผลิตของเนยโกโก้เทียม	35
บทที่ 4 วิจัยและสรุปผลการทดลอง	36
4.1 ผลผลิตของไลเปสจากยางมะละกอ	36
4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม	37
4.3 คุณสมบัติทางกายภาพของเนยโกโก้เทียม	38
4.4 ผลผลิตของเนยโกโก้เทียม	39
บรรณานุกรม	40
ภาคผนวก 1 Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	43
ภาคผนวก 2 บทความสำหรับการเผยแพร่	44

รายการรูปประกอบ

รูป		หน้า
1.1	กระบวนการผลิตเนยโกโก้	3
1.2	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (ก) แอซิโดไลซิส (ข) อัลกอฮอล์ไลซิส และ (ค) อินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน	9
1.3	รูปแบบไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอล (ก) และการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของไตรเอซิลกลีเซอรอล (ข) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน	10
1.4	การย่อยไตรเอซิลกลีเซอรอลของไลเปสจากยางมะละกอ	13
3.1	กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มมิกที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนกับ Cu^{+}	29
3.2	อุณหภูมิที่เหมาะสม (ก) และค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม (ข) ของไลเปสจากยางมะละกอในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์ม	30

รายการตารางประกอบ

ตาราง	หน้า
1.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเนยโกโก้	5
1.2 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ได้จากไขมันพืชแหล่งต่าง ๆ เทียบกับเนยโกโก้	6
1.3 ไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันที่ได้จากไขมันพืชแหล่งต่าง ๆ เทียบกับเนยโกโก้	6
1.4 องค์ประกอบกรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอล และแหล่งไขมัน ที่ใช้ในการสังเคราะห์เนยโกโก้เลียนแบบชนิดต่าง ๆ	8
1.5 เปรียบเทียบความสามารถของไลเปสในยางมะละกอและพาเพนบริสุทธิ์	12
3.1 น้ำหนักและไฮโดรไลซิสแอกติวิตีของไลเปสซึ่งแยกได้จากยางมะละกอสด	27
3.2 ปริมาณน้ำ (C_w) และแอกติวิตีน้ำ (A_w) ของไลเปสที่แยกได้จากยางมะละกอ	28
3.3 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์ม	31
3.4 ผลของแหล่งให้หมู่เอซิลที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันในเนยโกโก้เทียม	31
3.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์โดยไลเปสจากยางมะละกอ	32
3.6 ผลของเวลาที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์โดยไลเปสจากยางมะละกอ	33
3.7 ผลของแอกติวิตีน้ำที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันของเนยโกโก้เทียม	33
3.8 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่มีต่อรูปแบบของกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมจากการเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของไลเปสจากยางมะละกอ	34
3.9 รูปแบบของกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมเมื่อใช้อัตราส่วนของสับสเตรทที่แตกต่างกัน	35
3.10 คุณสมบัติของเนยโกโก้เทียม	35

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

เนยโกโก้ที่ดีเป็นส่วนของไขมันที่สกัดออกมาจากโกโก้ลิเควอร์ (Cocoa liquor) ด้วยการบีบอัดด้วยแรงไฮดรอลิก ซึ่งมีคุณภาพดีและราคาแพง เนยโกโก้ใช้เป็นส่วนผสมที่สำคัญในการผลิตช็อกโกแลตโดยจะให้สมบัติทางด้านประสาทสัมผัสแก่ช็อกโกแลต เช่น ทำให้ช็อกโกแลตมีรสอร่อย กรอบ และค่อย ๆ ละลายในปาก เนยโกโก้ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่สำคัญ 3 ชนิด คือ 1,3-palmitoyl-2-oleoylglycerol (POP) 1-palmitoyl-2-oleoyl-stearoylglycerol (POST) และ 1,3-stearoyl-2-oleoylglycerol (StOST) (Liu, Chang & Liu. 2007 : 1303-1311) และประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญคือ กรดปาล์มมีทิกร้อยละ 24.4 กรดสเตียริกร้อยละ 33.6 กรดโอเลอิกร้อยละ 37.0 กรดไลโนเลอิกร้อยละ 3.4 และกรดไขมันชนิดอื่น ๆ อีกร้อยละ 1.6 (Shukla. 1996 : 66-94) ในปัจจุบันมีการใช้เนยโกโก้เทียมซึ่งผลิตได้จากไขมันและน้ำมันพืชแหล่งอื่น ๆ เช่น น้ำมันปาล์ม (Palm oil) โคکمัมบัตเตอร์ (Kokum butter) และ เชียร์บัตเตอร์ (Shea butter) เป็นต้น ทดแทนเนยโกโก้ที่ผลิตจากเมล็ดโกโก้ซึ่งมีราคาแพงเพื่อลดต้นทุนการผลิตเนยโกโก้ เนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์จากน้ำมันปาล์ม เป็นไขมันที่มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับเนยโกโก้มากที่สุด เพราะองค์ประกอบของกรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันปาล์มใกล้เคียงกับองค์ประกอบในเนยโกโก้ การสังเคราะห์เนยโกโก้จากน้ำมันปาล์มใช้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งสามารถเร่งได้โดยใช้สารเคมีหรือใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของหมู่เอซิล (acyl residue) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 1 และ 3 ของกลีเซอรอลในโมเลกุลไตรเอซิลกลีเซอรอล การใช้เอนไซม์ไลเปสมีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้สารเคมี คือ สภาพที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยานั้นไม่มีความรุนแรง เนื่องจากไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง และปฏิกิริยาจะมีความจำเพาะเจาะจงสูงจึงลดการเกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by-product) ทำให้ได้ผลผลิตเนยโกโก้ในปริมาณมาก ไลเปสที่ใช้เร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันส่วนมากเป็นไลเปสจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม

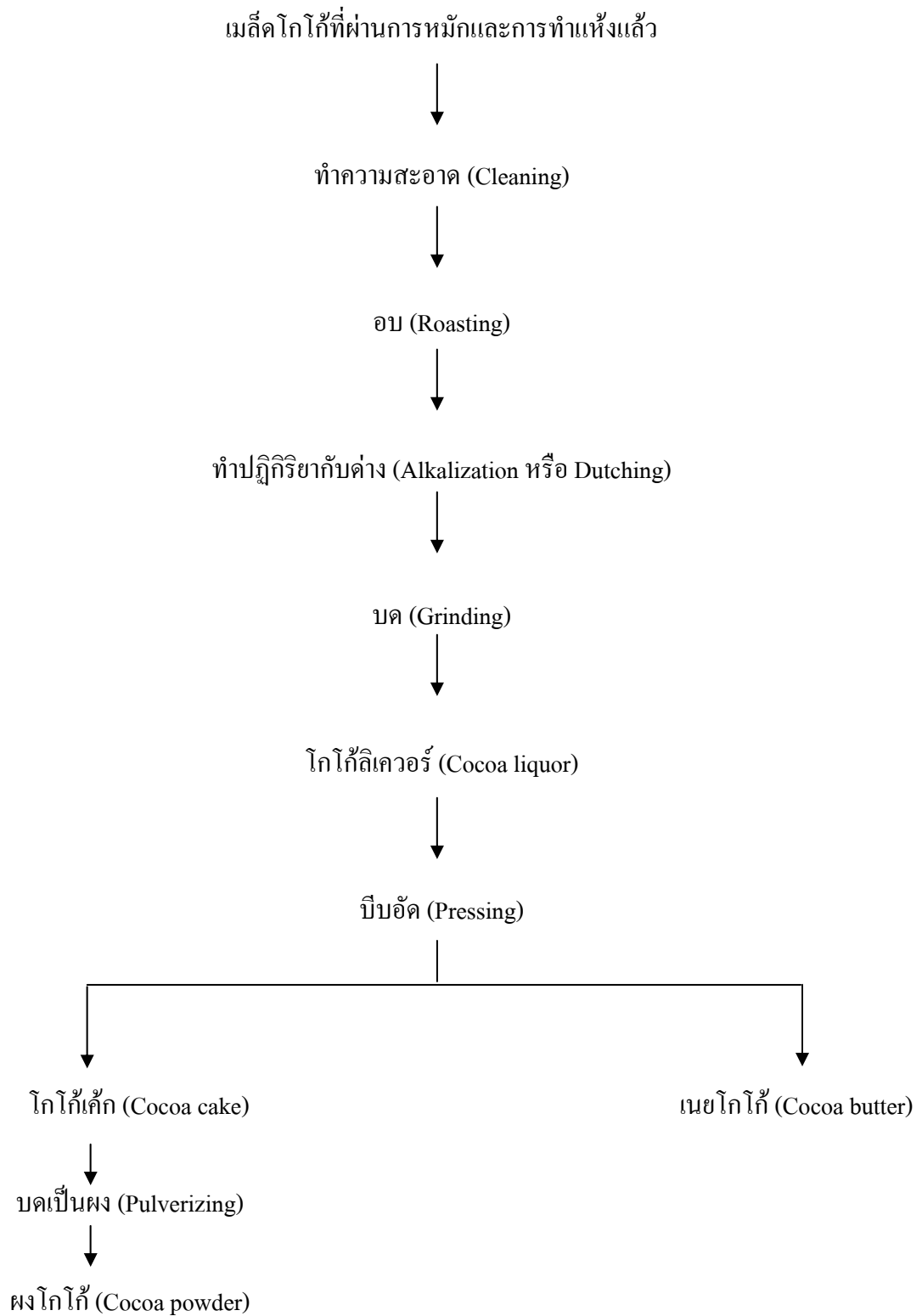
ยางมะละกอบนเป็นแหล่งของเอนไซม์ฟาเพนที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้ทำให้เนื้อนุ่ม ใช้ในการผลิตเบียร์ และใช้ในการผลิตยา (Moussaoui and others. 2001 : 556-570) ในส่วนตะกอนของยางมะละกอยังพบความสามารถของเอนไซม์ไลเปสอีกด้วย และเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอนี้มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของหมู่เอซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 1 และ 3

ของกลีเซอรอลในโมเลกุลไตรเอซิลกลีเซอรอลเช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Villeneuve and others. 1997 : 637-639) แต่เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอมีราคาถูกกว่าและสามารถนำมาใช้ในรูปของตะกอนได้โดยตรง ซึ่งจัดเป็นการตรึงเอนไซม์โดยธรรมชาติ ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการตัดแปลงไขมันและน้ำมัน มีการใช้เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอแรง ปฏิกริยากันอย่างแพร่หลาย เช่น การตัดแปลงโครงสร้างของไขมันในนม (Graille, Pina & Muderwha. 1991 : 10-13) และการสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลชนิดที่ให้พลังงานต่ำ (Foglia & Villeneuve. 1997 : 1447-1450) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะตัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้เทียมเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีในประเทศไทยโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ ซึ่งปกติมีการปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับมะละกออีกทางหนึ่งด้วย

1.2 เนยโกโก้ (Cocoa butter)

สำนักงานอาหารและยาของอังกฤษให้คำจำกัดความของเนยโกโก้ว่า เนยโกโก้เป็นไขมันที่สามารถรับประทานได้ ได้มาจากเมล็ดโกโก้ (*Theobroma cocoa*) ที่สมบูรณ์ก่อนหรือหลังการอบแห้ง (Minifie, 1989 : unpagged) เนยโกโก้เป็นไขมันธรรมชาติที่ได้จากเมล็ดโกโก้ โดยนำเนื้อโกโก้มาบีบอัดด้วยแรงไฮดรอลิก (Hydrolic press) หรือบีบอัดด้วยเครื่อง (Expeller press) เนยโกโก้จะให้สมบัติทางด้านประสาทสัมผัสแก่ช็อกโกแลตและผลิตภัณฑ์ขนมหวานต่าง ๆ เนยโกโก้มีปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลชนิด Stearic-Oleic-Stearic (SOS) สูง จึงไปเพิ่มความแข็ง ยับยั้งการเกิดฝ้าสีขาวบริเวณผิวหน้าช็อกโกแลต และลดเวลาในการควบคุมผลึก (Tempering) ทำให้ผลึกของเนยโกโก้อยู่ในรูปคงตัว จึงส่งผลให้ไม่เกิดฝ้าสีขาวบนผิวหน้าช็อกโกแลต (Reddy and Phabhaker, 1994 : 1-3)

กระบวนการผลิตเนยโกโก้แสดงดังรูป 1.1 เริ่มจากการนำเมล็ดโกโก้ที่ผ่านการหมักและการทำแห้งแล้วมาล้างทำความสะอาดทำให้แตกเป็น 2 ซีก ผ่านเข้าเครื่องกำจัดเปลือกออกโดยใช้ลมเป่า จะได้ส่วนเนื้อที่เรียกว่าเนยโกโก้ (Cocoa nib) แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 100-140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-35 นาที จากนั้นทำปฏิกริยากับด่างเพื่อปรับปรุงสีและกลิ่นรสของโกโก้ ด่างที่ใช้ได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต คาร์บอเนต ไฮดรอกไซด์ของโซเดียม โพแทสเซียม หรือ แอมโมเนียม แล้วนำเนยโกโก้มาบดเพื่อลดขนาดและทำให้เซลล์ไขมันแตก ไขมันจะออกมานอกเซลล์ซึ่งจะมีลักษณะเป็นของเหลวเรียกว่า โกโก้ลิควอร์ (Cocoa liquor) หลังจากนั้นนำไปบีบอัดเพื่อสกัดให้ได้เนยโกโก้ ออกมา ซึ่งจะมีวิธีสกัด 3 วิธี ได้แก่ (1) นำไปบีบอัดด้วยแรงไฮดรอลิก แล้วกรอง จะได้เนยโกโก้ ออกมา ซึ่งจะได้เนยโกโก้ที่ดีจากการบีบอัด (Prime press cocoa butter) ซึ่งมีคุณภาพดีและมีราคา



รูป 1.1 กระบวนการผลิตเนยโกโก้

ที่มา : คัดแปลงจาก Wainwright (1996)

แพงที่สุดในโลก ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่ยอมรับมากที่สุด โดยเนยโกโก้ที่ได้มีลักษณะสีเหลืองอ่อนมีกลิ่นหอมของโกโก้ (2) นำเมล็ดโกโก้ไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำก่อน แล้วนำมาบีบอัดด้วยเครื่อง Expeller press บางครั้งจะใช้เมล็ดโกโก้ที่มีคุณภาพด้อยมาสกัดโดยตรง แต่กลิ่นรสของโกโก้ที่ได้จะเจือจางกว่าน้ำมันที่ได้จากการบีบอัดด้วยแรงไฮดรอลิก และ (3) นำส่วนของกากที่เหลือจากการบีบอัดมาสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction cocoa butter) เพื่อนำส่วนของไขมันที่ติดออกมาใช้ เนยโกโก้แบบนี้จะไม่มิกลิ้นโกโก้และไม่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร (สุวรรณ สุกิมารส. 2543 : 237-296; Wainwright, 1996 : 353-407)

1.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของเนยโกโก้

เนยโกโก้ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลร้อยละ 98 ไดเอซิลกลีเซอรอลร้อยละ 0.3-0.5 โมโนเอซิลกลีเซอรอลร้อยละ 0.1 กรดไขมันอิสระร้อยละ 1 สเตอรอลร้อยละ 0.2 โทโคฟีรอล 150-200 ส่วนในล้านส่วน ฟอสโฟลิปิดร้อยละ 0.05-0.13 และไกลโคลิปิดร้อยละ 11.1 (Minifie, 1989) เนยโกโก้จะแข็งตัวที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เริ่มหลอมที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส และมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีสีเหลืองอ่อน และหลอมละลายอย่างรวดเร็วในปาก (Davis & Dimick, 1989 : 1488) เนยโกโก้จะช่วยปรับปรุงสมบัติทางเคมีและกายภาพของช็อกโกแลตหรือผลิตภัณฑ์ขนมหวาน ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะตัวได้แก่ ความมันวาว และสมบัติการหลอมเหลว เป็นต้น เนื่องจากเนยโกโก้เป็นไขมันพืชที่มีองค์ประกอบของไตรเอซิลกลีเซอรอลชนิดที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในตำแหน่งที่ 2 (2-monounsaturated triacylglycerol) มากกว่าร้อยละ 80 ของไตรเอซิลกลีเซอรอลทั้งหมด โดยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่สำคัญและมีปริมาณมากที่สุด ได้แก่ 1,3-ปาล์มมิโทอิล-2-โอลิโออิลกลีเซอรอล (POP) 1-ปาล์มมิโทอิล-2-โอลิโออิล-สเตียโรอิลกลีเซอรอล (POSt) และ 1,3-สเตียโรอิล-2-โอลิโออิลกลีเซอรอล (StOSt) (Loisel and others, 1998 : 73-79; Lipp and Anklam, 1998 : 73-97; Wainwright, 1996 : 353-407) ทำให้สามารถตกผลึกรวมและซ้อนกันได้ดี ส่งผลให้เนยโกโก้มีรูปผลึกที่คงตัวจึงสามารถหลอมเหลวได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิร่างกาย เนื่องจากรูปผลึกที่คงตัวจะมีจุดหลอมเหลวในช่วง 33-37 องศาเซลเซียส ดังนั้นช็อกโกแลตที่ผลิตสามารถหลอมเหลวได้ดีในปาก ส่งผลให้ความรู้สึกในปาก (mouth feel) ที่ดี (Loisel and others, 1998 : 73-79; Lipp and Anklam, 1998 : 73-97; Wainwright, 1996 : 353-407) เนยโกโก้ประกอบด้วยกรดไขมันที่สำคัญ 3 ชนิด คือ กรดปาล์มมิทิกร้อยละ 24.4 กรดสเตียริกร้อยละ 35.4 และกรดโอเลอิกร้อยละ 38.1 และไตรกลีเซอไรด์ที่สำคัญอีก 3 ชนิด คือ POP ร้อยละ 13-19 POSt ร้อยละ 36-48 StOSt ร้อยละ 23-29 (Lawler and Dimick, 1998 : 229-247; Wainwright, 1996

: 353-407) นอกจากนี้สมบัติทางกายภาพและทางเคมีอื่นๆ เช่น จุดหลอมเหลว ค่าไอโอดีน ค่าสปอนิฟิเคชัน และค่ากรดไขมันอิสระ เป็นต้น แสดงดังตาราง 1.1

ตาราง 1.1 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเนยโกโก้

สมบัติทางกายภาพและทางเคมี	เนยโกโก้
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$)	32-34
ค่าไอโอดีน (กรัม/100กรัม)	35-40
ค่าสปอนิฟิเคชัน (มก./กรัม)	188-198
ค่ากรดไขมันอิสระ(% กรดปาล์มิก)	1.5

ที่มา : คัดแปลงจาก Wainwright (1996)

1.4 เนยโกโก้เลียนแบบ (Cocoa Butter Alternatives; CBAs)

เนยโกโก้เลียนแบบเป็นไขมันที่ใช้ทดแทนเนยโกโก้ในการผลิตช็อกโกแลต เป็นเนยที่มีลักษณะแข็ง (Hard butter) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพใกล้เคียงกับเนยโกโก้ ได้แก่ องค์ประกอบของกรดไขมันและชนิดของไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลให้เนยโกโก้เทียมหลอมเหลวอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิร่างกายและความคงตัวสูงเช่นเดียวกับเนยโกโก้ธรรมชาติ (Lipp and Anklam, 1998 : 73-97; Wainwright, 1996 : 353-407; Gegiou and Staphylakis, 1985 : 1047-1051)

การเลือกแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตเนยโกโก้เทียมต้องพิจารณาถึงเหตุผลดังต่อไปนี้ (Undurraga and others, 2001 : 933-939)

1. พืชชนิดนั้นต้องมีปริมาณของกรดโอเลอิกสูง โดยเฉพาะตำแหน่งที่ 2 ของไตรเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากต้องการผลิตภัณฑ์ที่มีไตรเอซิลกลีเซอรอลอยู่ในรูปที่มีกรดโอเลอิกอยู่ในตำแหน่งที่ 2 และกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 (2-oleodisaturated) ในปริมาณสูงเพื่อให้ได้รูปแบบการหลอมเหลวและจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับเนยโกโก้มากที่สุด (Khumolo and others, 2002 : 237-244)

2. ราคาไม่แพง

3. หาได้ง่าย และมีปริมาณมากพอ

องค์ประกอบของกรดไขมันและชนิดของไตรเอซิลกลีเซอรอล ที่ได้จากไขมันพืชแหล่งอื่นๆ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เนยโกโก้เลียนแบบเทียบกับเนยโกโก้ แสดงดังตาราง 1.2

และ 1.3 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าน้ำมันปาล์มจะมีองค์ประกอบของกรดไขมัน และชนิดของไตรกลีเซอไรด์ใกล้เคียงกับเนยโกโก้และมีราคาไม่แพง เนยโกโก้เลียนแบบจัดเป็นไขมันดัดแปลงโครงสร้าง (Structured lipid) ซึ่งเป็นน้ำมันหรือไขมันที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิด และตำแหน่งของกรดไขมันไว้อย่างจำเพาะเจาะจงบนโมเลกุลของกลีเซอรอล โดยจะเป็นชนิดที่ให้ลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ (Khumolo and others. 2002 : 237-244)

ตาราง 1.2 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันที่ได้จากไขมันพืช แหล่งต่าง ๆ เทียบกับเนยโกโก้

ชนิดกรดไขมัน	เนยโกโก้	แหล่งของน้ำมันในการสังเคราะห์เนยโกโก้เลียนแบบ				
		น้ำมันปาล์ม	ถั่วอัลลิเป	เชอร์รี่	แซล	โกโก้
กรดปาล์มมิติก (P)	25	45	16	4	5	2
กรดสเตียริก (St)	36	5	46	43	44	57
กรดโอเลอิก (O)	34	38	35	45	40	40
กรดไลโนเลอิก (L)	2	10	-	7	2	22
กรดอะราซดิก (Ar)	22	-	2	-	7	-

ที่มา : Wainwright (1996)

ตาราง 1.3 ไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันที่ได้จากไขมันพืช แหล่งต่าง ๆ เทียบกับเนยโกโก้

ไตรเอซิลกลีเซอรอล	เนยโกโก้	แหล่งของน้ำมันในการสังเคราะห์เนยโกโก้เลียนแบบ				
		น้ำมันปาล์ม	ถั่วอัลลิเป	เชอร์รี่	แซล	โกโก้
POSt	39	3	35	5	11	5
StOSt	26	-	45	40	42	72
POP	16	26	7	-	1	-
StOAr	2	-	4	2	13	-
StLP	4	2	-	-	-	-
PLP	2	7	-	-	-	-
StLSt	22	2	-	-	-	-
StOO	4	3	3	27	16	15

ที่มา : Wainwright (1996)

1.4.1 ชนิดของเนยโกโก้เลียนแบบ

เนยโกโก้เลียนแบบสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ ดังนี้ (Lipp and Anklam, 1998 : 73-97; Wainwright, 1996 : 353-407)

1.4.1.1 Cocoa Butter Equivalents (CBEs)

CBEs เป็นไขมันพืชในกลุ่มที่ไม่มีกรดลอริก (Non-lauric fat) มีคุณสมบัติเหมือนกับเนยโกโก้ และสามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ทุกส่วนในการผลิตช็อกโกแลต โดยไม่ทำให้คุณสมบัติของช็อกโกแลตได้แก่ การหลอมเหลว กระบวนการผลิต และคุณลักษณะการไหลเปลี่ยนแปลงไป CBEs ผลิตจากไขมันพืชต่าง ๆ เช่น ไขมันปาล์ม ไขมันโกกัม หรือ ไขมันเจีย เป็นต้น โดยนำมาตัดแปรโครงสร้างด้วยเอนไซม์โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน และ อินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน เนยโกโก้เทียมกลุ่มนี้มี 2 ชนิดคือ

(ก) Cocoa Butter Extenders (CBEXs) สามารถใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้เพียงปริมาณน้อย โดยไม่ทำให้การหลอมเหลว กระบวนการผลิต และคุณลักษณะการไหลเปลี่ยนแปลงไป แต่ CBEXs จะมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ไม่เหมือนกับเนยโกโก้

(ข) Cocoa Butter Improvers (CBIs) มีสมบัติใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แต่จะมีไขมันแข็ง (Solid fat) สูงกว่า จึงใช้ในการปรับปรุงความอ่อนตัวของเนยโกโก้

1.4.1.2 Cocoa Butter Replacers (CBRs)

เป็นไขมันพืชในกลุ่มที่ไม่มีกรดลอริกที่ได้มาจากน้ำมันถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย และ เมล็ดปาล์ม แล้วนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรจิเนชัน และ การแยกลำดับส่วน ซึ่งทำให้สมบัติแตกต่างจากเนยโกโก้เช่น การกระจายตัวของกรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอล เป็นต้น จึงใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

1.4.1.3 Cocoa Butter Substitutes (CBSs)

เป็นไขมันพืชในกลุ่มที่ไม่มีกรดลอริก ซึ่งได้จากน้ำมันปาล์มและน้ำมันมะพร้าวมาตัดแปรทางเอนไซม์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน ผลัดกันที่ได้มีสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แต่สมบัติทางเคมีจะแตกต่างกันจึงเหมาะที่จะใช้ทดแทนเนยโกโก้ได้ร้อยละ

100

องค์ประกอบของกรดไขมัน ชนิดของไตรเอซิลกลีเซอรอล บทบาทหน้าที่และแหล่งน้ำมัน หรือ ไขมันที่ใช้ในการสังเคราะห์เนยโกโก้เลียนแบบทั้ง 3 ชนิด สรุปได้ดังตาราง 1.4

ตาราง 1.4 องค์ประกอบกรดไขมันไตรเอซิลกลีเซอรอล และแหล่งไขมันที่ใช้ในการสังเคราะห์เนยโกโก้เลียนแบบชนิดต่าง ๆ

ชนิดเนยโกโก้เลียนแบบ	แหล่งของพืช	กรดไขมัน	ไตรเอซิลกลีเซอรอล
CBEs	น้ำมันปาล์ม, เนย อิตาลี, เนยเชิร์, และเนยโกโก้	ปาล์มมิดิก, สเตียริก, โอเลอิก และไลโนเลอิก	POP, POS และ SOS
CBRs	น้ำมันถั่วเหลือง และ ปาล์มโอเลอิน	ปาล์มมิดิก, สเตียริก และไลโนเลอิก	PEE และ SEE
CBSs	น้ำมันมะพร้าว และ น้ำมันเมล็ด ปาล์ม	ลอริกและไมริสติก	LLL, LLM และ LMM

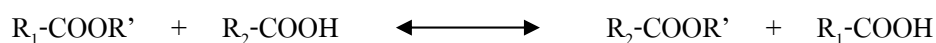
ที่มา : Lipp and Anklam (1998)

เนยโกโก้เลียนแบบที่ดีต้องประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลในรูป POP POSt และ StOSt ประมาณร้อยละ 80 จึงจะสามารถใช้แทนเนยโกโก้ได้ดี ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตที่ได้มีคุณภาพดีด้วย (Wainwright, 1996 : 353-407; Minifie, 1989 : unpagged; Gegiou and Staphylakis, 1985 : 1047-1051)

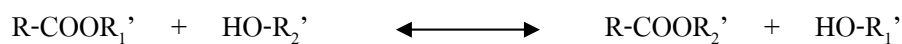
1.5 การผลิตเนยโกโก้เลียนแบบโดยกระบวนการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน

กระบวนการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification) จัดเป็นปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Tranesterification) ประเภทที่มีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลในโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลจากตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง (Ester-ester exchange) เพื่อให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบได้เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลรูปแบบใหม่ ซึ่งทำให้สมบัติทางเคมีและกายภาพของไขมันและน้ำมันแตกต่างจากไขมันเดิมตามต้องการ (Wainwright, 1996 : 353-407; Mojovic and others, 1993 : 438-443; Macrae, 1983 : 291-294) ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันประเภทต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 1.2 กระบวนการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ การใช้สารเคมี (Chemical Interesterification) เช่น โซเดียม และ โซเดียมอัลคอกไซด์ และการใช้เอนไซม์ (Enzyme Interesterification) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ไลเปสมากกว่าการใช้สารเคมี เนื่องจาก เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะเจาะจงสูงกว่า ทำให้ควบคุมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้และสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ให้มีรูปแบบของไตรเอซิลกลีเซอรอลใหม่ตามต้องการได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะ

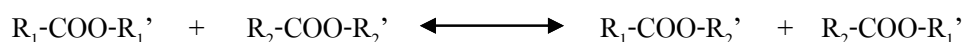
(ก) แอซิโดไลซิส (Acidolysis)



(ข) อัลคอกโซไลซิส



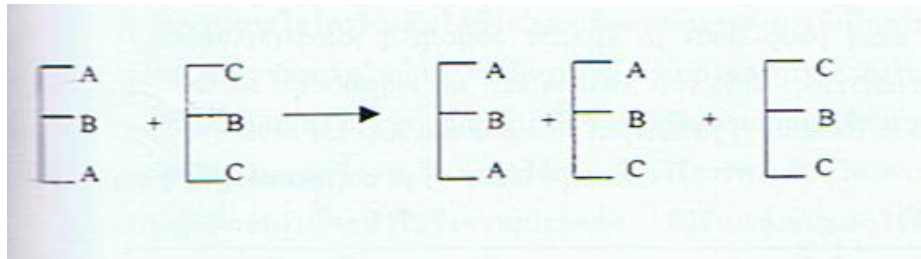
(ค) อินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน



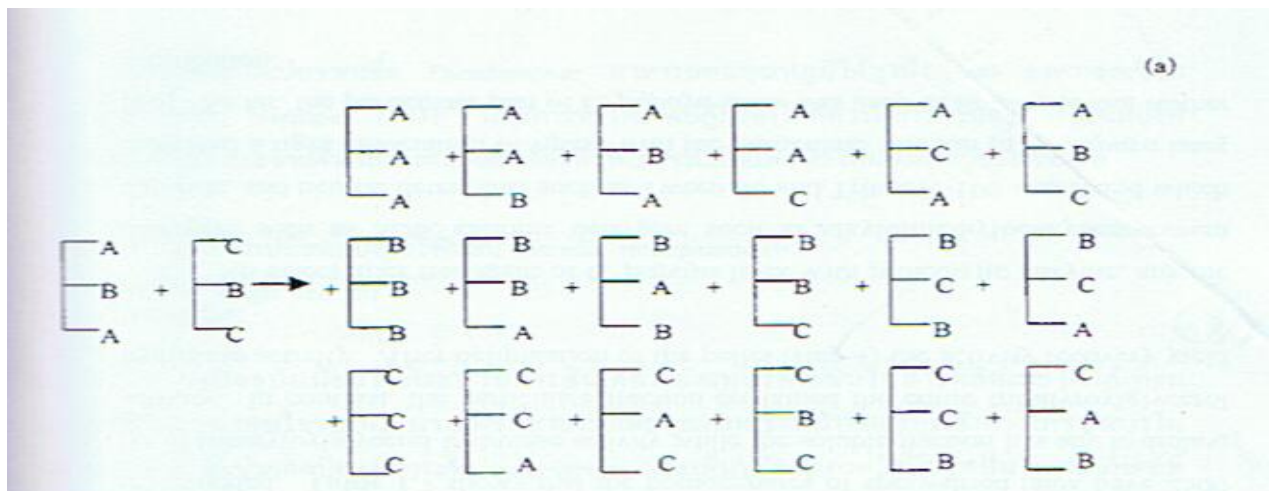
รูป 1.2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (ก) แอซิโดไลซิส (ข) อัลคอกโซไลซิส และ (ค) อินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน

ช่วยลดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (By product) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้น นอกจากนั้น การผลิตเนยโกโก้เลียนแบบด้วยวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้สารเคมีเพราะการใช้สารเคมี จำเป็นต้องใช้ร่วมกับอุณหภูมิที่สูงมากจึงส่งผลให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์เสียไป ในขณะที่การใช้ เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่ไม่รุนแรง (อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความดันปกติ) และใช้พลังงานน้อย เอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา จะเลือกชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอล เนื่องจากเอนไซม์จะไปทำลายพันธะของโครงสร้าง ไตรเอซิลกลีเซอรอลเฉพาะตำแหน่งที่ 1 และ 3 เท่านั้น ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคือ ไตรเอ ซิลกลีเซอรอลใหม่ที่มีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปเฉพาะกรดไขมันในตำแหน่งที่ 1 และ 3 เท่านั้น ดัง แสดงในรูป 1.3 ซึ่งต่างจากการใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง เอนไซม์จะตัดแบบสุ่มทุกตำแหน่งของไตรเอซิลกลีเซอรอล ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการน้อย เช่นเดียวกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี (รูป 1.3) นอกจากนี้ควรใช้เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงรูป จะ ให้ประโยชน์สูงสุดและคุ้มทุนมากกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ (Undurraga and others, 2001 : 933-939)

กระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ต้องการน้ำเพื่อ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งปริมาณน้ำที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 1-10 ของน้ำหนักไขมันที่ใช้ทำ ปฏิกิริยา เนื่องจากถ้าปริมาณน้ำสูงเกินไปจะทำให้สมดุลของระบบเลื่อนเข้าสู่สมดุลของปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส ดังนั้นในระบบจะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพราะจะมีผลต่อการลด ปริมาณน้ำ เช่น ปีโตรเลียมอีเธอร์ (จุดหลอมเหลว 60-80 องศาเซลเซียส)



(ก)



(ข)

รูป 1.3 รูปแบบไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ (ก) และการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของไตรเอซิลกลีเซอรอล (ข) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน

การเลือกใช้ตัวทำละลายต้องคำนึงถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อระบบการทำงานของเอนไซม์ด้วย โดยจะใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงเพื่อช่วยไม่ให้เอนไซม์ถูกทำลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าตัวสนับสนุน (support) ที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ตัวทำละลายไม่มีขั้ว ได้แก่ ซิลิกาเพอร์ไลต์ และซิลิกาเจล (Mojovic and others, 1993 : 438-443) ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 20-60 องศาเซลเซียส และต้องมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ไม่ให้เป็นกรดแก่หรือด่างมากเกินไป ซึ่งอยู่ในช่วงที่เอนไซม์ทำงานได้ โดยช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสคือ ถ้าเป็นไลเปสจากสัตว์ ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8 ถึง 9 แต่ขึ้นอยู่กับชนิด

ของสับสเตรท ปริมาณเกลือ และชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ ส่วนไลเปสจากจุลินทรีย์ทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ถึง 8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ โดยเฉพาะไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส และการทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีควรมีการกวนตลอดเวลาเพื่อให้เอนไซม์เกิดการกระจายตัวที่สม่ำเสมอและต้องทำในภาชนะปิด เพื่อป้องกันอากาศและความชื้น

1.6 ยางมะละกอ

ยางมะละกอเป็นของไหลมีลักษณะคล้ายน้ำมันซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นน้ำ 85% และส่วนที่เป็นตะกอนไม่ละลายน้ำอีก 25% ส่วนที่ละลายน้ำประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต 10% เกลือ 10% และไขมัน 5% นอกจากนี้มีสารชีวโมเลกุลอื่นๆ อีกเช่น กลูตาไรโอนและ ซีสเตอีนโปรตีนเอส (30%) และโปรตีนอื่นๆ อีก 10% เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากยางมะละกอได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกันอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่นใช้ทำให้เนื้อนุ่ม ใช้ในการผลิตเบียร์ และใช้ในการผลิตยา (Moussaoui and others, 2001 : 556-570) การใช้เอนไซม์จากพืชเช่นไลเปสมีข้อดีที่เหนือกว่าเอนไซม์จากสัตว์และจุลินทรีย์คือแหล่งของเอนไซม์มีมากกว่า ราคาถูกกว่า สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าและมีความจำเพาะที่มากกว่า (Villeneuve and others, 1997 : 637-639 และ Villeneuve and others, 1997 : 91-94) ความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในพืชมักพบในส่วนของเมล็ดที่กำลังงอก และในเมล็ดของพืชน้ำมัน สำหรับไลเปสในยางมะละกอได้มีรายงานการพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1995 (Giordani, Moulin & Verger, 1991 : 1069-1072)

1.6.1 การเก็บยางมะละกอ

การเก็บยางมะละกอควรทำในช่วงเช้าเพราะเป็นช่วงที่น้ำยางไหลสะดวก (Patron, 1952 : 57-61 และ Krishnamurthy and others, 1960 : 433-436) ทำได้โดยกรีดผลมะละกอตามแนวยาวลึกประมาณ 2.0 ถึง 2.5 มิลลิเมตร 3 รอยต่อหนึ่งผล นำถ้วยหรือแก้วพลาสติกมารองน้ำยางที่หยดลงมา หลังจากนั้นขูดยางที่แห้งติดอยู่ที่ผลมะละกอลงมาด้วย ยางมะละกอที่เก็บได้ควรเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์ โดยหนึ่งผลของมะละกอสามารถเก็บได้ 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งห่างกัน 4 วัน (Mardigal and others, 1980 : 279-285)

1.6.2 ไลเปสจากยางมะละกอ

ยางมะละกอนอกจากมีเอนไซม์โปรตีเอส เช่นพาเพนซึ่งมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมากมาย เช่น การทำให้เนื้อนุ่ม น้ำยาทำความสะอาดคอนกรีตเลนส์ เป็นส่วนผสมในผงซักฟอกช่วยกำจัดรอยเปื้อนและคราบเลือดเป็นต้น ยังพบความสามารถของเอนไซม์ไลเปสในยางมะละกออีกด้วย ตาราง 1.5 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์พาเพนที่บริสุทธิ์แล้ว จะไม่พบความสามารถ

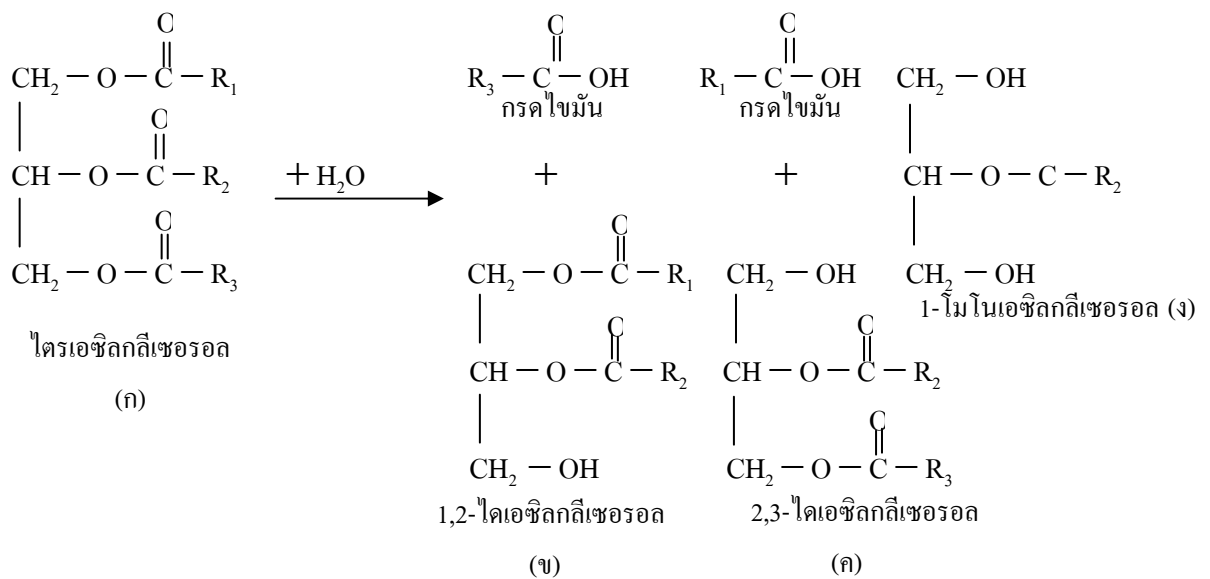
ตาราง 1.5 เปรียบเทียบความสามารถของไลเปสในยางมะละกอและพาเพนบริสุทธิ์

เอนไซม์ที่เตรียมได้	ความสามารถของไลเปส (ยูนิตต่อกรัมเอนไซม์)
พาเพนบริสุทธิ์	ไม่มี
พาเพนที่ละลายน้ำได้	ไม่มี
พาเพนที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์	1,567±35

ของไลเปสเพราะว่าเอนไซม์ไลเปสถูกกำจัดออกไประหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เฉพาะยางมะละกอที่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เท่านั้นที่แสดงความสามารถของไลเปส ดังนั้นไลเปสน่าจะอยู่ในส่วนที่เป็นตะกอนของยางมะละกอ (Caro and others, 2000 : 891-901) ต้นมะละกอที่ต่างสายพันธุ์กันจะมีความสามารถของไลเปสในยางมะละกอไม่เท่ากัน

1.6.3 ความจำเพาะของไลเปสจากยางมะละกอ

ไลเปส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายในสภาวะที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย และเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันในตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้ากำหนดให้ความจำเพาะต่อตำแหน่งคือความสามารถในการย่อยสลายที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเพียงอย่างเดียว หรือทั้งสองตำแหน่งของไตรเอซิลกลีเซอรอล ไลเปสจากยางมะละกอแสดงความจำเพาะต่อตำแหน่งสับสเตรตดังนี้คือ แสดงความจำเพาะต่อตำแหน่งที่หนึ่งและสามของไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งแสดงการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ดังรูป 1.4 การย่อยสารตั้งต้นไตรเอซิลกลีเซอรอล (รูป 1.4ก) ของไลเปสในยางมะละกอทำให้ได้ผลผลิตคือกรดไขมัน 1,2-ไดเอซิลกลีเซอรอล (รูป 1.4ข) และ 2,3-ไดเอซิลกลีเซอรอล (รูป 1.4ค) และ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอล (รูป 1.4ง)



รูป 1.4 การย่อยไตรเอซิลกลีเซอรอลของไลเปสจากยางมะละกอ

1.7 การแปรรูปปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชน้ำมันสำหรับการบริโภคและอุปโภคที่สำคัญ และสามารถให้ปริมาณน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่สูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองและเมล็ดเรพ ประเทศผู้ผลิตน้ำมันปาล์มรายใหญ่ของโลกคือ มาเลเซีย รองลงมาคืออินโดนีเซีย ไนจีเรีย โคลัมเบีย และไทย ซึ่งเป็นผู้ผลิตน้ำมันปาล์มเป็นอันดับที่ 5 ของโลก (Goh & Berhad, 2002 : 46-50) โดยทั่วไปน้ำมันปาล์มดิบมีองค์ประกอบดังต่อไปนี้คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลประมาณร้อยละ 95 กรดไขมันประมาณร้อยละ 3-5 ส่วนประกอบอื่น ๆ ประมาณร้อยละ 1 จากกระบวนการสกัดปาล์มน้ำมัน สามารถแบ่งน้ำมันปาล์มตาม วัตถุประสงค์ที่ใช้สกัดเป็น 2 ชนิด คือ น้ำมันปาล์มดิบ และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม ซึ่งมีองค์ประกอบกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์มมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว ในสัดส่วน 50:50 และ 82:18 ตามลำดับ

1.7.1 การดัดแปรไขมันและน้ำมัน

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของไขมันและน้ำมันเป็นการปรับปรุงไขมันและน้ำมันให้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ หรือดัดแปรเพื่อให้มีคุณสมบัติที่มีประโยชน์หลากหลายเพิ่มขึ้น วิธีการดัดแปรหลัก มี 3 วิธี คือ

1.7.1.1 การแยกส่วน (Fractionation)

ไขมันและน้ำมันเป็นส่วนผสมของไตรเอซิลกลีเซอรอลหลายชนิด แต่ละชนิดมีจุดหลอมเหลวต่างกัน จึงทำให้ไขมันและน้ำมันมีจุดหลอมเหลวเป็นช่วง ในการตัดแปรด้วยวิธีแยกส่วนจะใช้สมบัตินี้ในการแยกไขมันที่มีจุดหลอมเหลวต่างกัน น้ำมันที่ใช้ในการแยกส่วนคือ น้ำมันปาล์มซึ่งมีความเหมาะสมในการนำมาแยกส่วนเพราะมีส่วนความอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในสัดส่วนใกล้เคียงกัน การแยกส่วนทำได้โดยหลอมหรือละลายไขมันและน้ำมันให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วลดอุณหภูมิลง ทำให้น้ำมันและไขมันเกิดการตกผลึก หลังจากนั้นนำมารองแยกส่วนจะได้ไขมันหรือโอเลอิน และไขมันหรือสเตอริน

1.7.1.2 อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (Interesterification)

อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมัน หรือสารที่ประกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid esters) กับกรดไขมัน อัลกอฮอล์ หรือเอสเทอร์อื่นที่มีการแลกเปลี่ยนกรดไขมันทำให้เกิดเอสเทอร์ชนิดใหม่ ผลจากการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน ทำให้คุณสมบัติไขมันและน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป จะเปลี่ยนแปลงมากขึ้นกับองค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของกรดไขมัน และสภาวะที่เหมาะสม ไขมันและน้ำมันที่ผ่านการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันจะทำให้จุดหลอมเหลวของน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป โดยมีค่าเพิ่มสูงขึ้นและมีปริมาณของแข็งเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของน้ำมันก่อนการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน ปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ ต้องมีการให้ความร้อนไขมันและน้ำมันมากกว่า 250°C ซึ่งทำได้ยากจึงต้องใช้สารเร่งปฏิกิริยาเช่น โซเดียม เมทอกไซด์ (Sodium methoxide) โซเดียมเอทอกไซด์ (Sodium ethoxide) โลหะโซเดียม (Sodium metal) หรืออัลลอยด์ของโซเดียม-โพแทสเซียม (Sodium-potassium alloy) โดยใช้ประมาณ 0.01-0.1% และสามารถหยุดปฏิกิริยาได้ด้วยน้ำ วิธีการนี้ใช้ตัดแปรให้ได้ไขมันและน้ำมันที่จะนำไปใช้เฉพาะอย่าง หรือเป็นการปรับสมบัติของน้ำมันให้เหมาะสมมากขึ้น การเลือกวัตถุดิบจึงมีความจำเป็น เพื่อให้ได้องค์ประกอบของกรดไขมันตามที่ต้องการ ไขมันและน้ำมันที่จะทำเอสเทอริฟิเคชันต้องผ่านการกำจัดกรดไขมันอิสระ ทำให้เป็นกลางและแห้ง เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งสารเร่งปฏิกิริยาและอาจไม่ต้องฟอกสีก็ได้ เพราะน้ำมันจะมีสีเข้มขึ้นเมื่อผ่านการอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน จึงควรฟอกสีภายหลังและนำไปกำจัดกลิ่นต่อไป การกำจัดสารเร่งปฏิกิริยาออกเนื่องจากเป็นพิษ หรือมีผลเสียต่ออายุการเก็บ ทำได้โดยการรีไฟน์แต่จะเกิดการสูญเสีย จึงอาจเติมกรดฟอสฟอริกเพื่อทำลายสบู่ แล้วเติมสารช่วยกรองกวนผสมหลังจากนั้นกรองสารเร่งปฏิกิริยาออก

1.7.1.3 การทำไขมันแข็ง (Hardening) หรือการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation)

เป็นการเติมไฮโดรเจนที่พันธะคู่ เพื่อทำให้น้ำมันเปลี่ยนเป็นไขมันแข็ง และลดจำนวนพันธะคู่ลง ทำให้น้ำมันที่ได้มีความคงตัวต่อการเหม็นหืน ป้องกันการเกิดกลิ่นเนื่องจากกรดไขมันอิสระ และทำให้น้ำมันมีสีอ่อน การเติมไฮโดรเจนต้องมีสารเร่งปฏิกิริยา ที่นิยมใช้คือ นิกเกิล (Nickel) มีลักษณะเป็นของแข็งอยู่กับตัวค้ำจุน ที่มีลักษณะโปร่งเป็นโพรง และคงรูปร่างแข็งแรงถึงจะได้รับความร้อนสูง ปัจจัยที่มีผลต่อการเติมไฮโดรเจนคือ อุณหภูมิ ความดัน การเคลื่อนย้ายมวลสาร หรือการกวน สารเร่งปฏิกิริยาทั้งชนิด สภาพ และความเข้มข้น เวลา และสารตั้งต้น สภาพการเติมไฮโดรเจนจะมีผลต่อปริมาณไอโซเมอร์ชนิดทรานส์ (trans isomer) การควบคุมสภาวะเพื่อให้ได้น้ำมันที่มีคุณภาพตามต้องการเป็นสิ่งสำคัญ ถ้าน้ำมัน น้ำ มัน จะมีผลทำให้ยับยั้งการทำงานของนิกเกิล และทำให้น้ำมันเกิดการแตกตัว ปริมาณกรดไขมันอิสระสูงเกินไป ซึ่งจะทำให้เกิดสบู่และสารอื่น ๆ ที่จัดเป็นสารที่มีพิษต่อสารเร่งปฏิกิริยา เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และคลอรีน คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านการทำไขมันแข็งถ้ามีลักษณะเป็นกึ่งของเหลวและไขมันอ่อน จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบและขนมหวาน ไขมันอ่อนนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการทอดที่ใช้ไขมันปริมาณมาก (Deep frying) คุณค่าโภชนาการของน้ำมันที่ผ่านการทำไขมันแข็งจะมีการย่อยที่ไม่แตกต่างกัน

1.7.2 การนำไปใช้ประโยชน์

น้ำมันปาล์ม เป็นน้ำมันที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เนื่องจากความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบของกรดไขมัน ลักษณะทางเคมีและกายภาพ และคุณสมบัติอื่น ๆ ดังนี้

1. มีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชัน
2. มีปริมาณไขมันแข็งตามธรรมชาติ
3. มีความคงตัวในการเกิดผลึกเบต้าไพรม์ (β')
4. ราคาถูก หาได้ง่าย และมีการผลิตเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี
5. มีคุณค่าทางโภชนาการ

จากสมบัติเหล่านี้ของน้ำมันปาล์ม จึงได้รับการยอมรับจากภาคอุตสาหกรรมในการนำไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย แบ่งการนำไปใช้ออกเป็น 2 แบบ คือ อุตสาหกรรมอาหาร เช่น เนยขาว (Shortening) มาการีน (Margarines) หรือเนยเทียม ผลิตภัณฑ์ช็อคโกแลต (Confectionary fats) ครีมเทียม (Coffee whitener) เป็นต้น และอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร เช่น การผลิตยาง การผลิตเทียนไข ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เป็นต้น

1.8 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันนิยมใช้กระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันในการผลิตเนยโกโก้เทียม เนื่องจากความน่าสนใจของกระบวนการนี้สามารถเพิ่มคุณภาพเชิงหน้าที่และคุณค่าทางโภชนาการในผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งช่วยลดปัญหาการเกิดไอโซเมอร์ชนิดทรานส์ และเพิ่มปริมาณกรดไขมันจำเป็นในผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากกระบวนการไฮโดรจิเนชันได้ ซึ่งสาเหตุเกิดจากกระบวนการนี้เป็นการเติมไฮโดรเจนอะตอมที่พันธะคู่ในโมเลกุลของกรดไขมันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอลและทำให้ไอโซเมอร์เปลี่ยนแปลงไปด้วย นอกจากนั้นช่วยลดปัญหาจากการใช้สารเคมีและความร้อนสูงในกระบวนการแยกส่วน

กระบวนการผลิตไขมันเลียนแบบเนยโกโก้โดยการดัดแปรน้ำมันพืชสามารถทำได้หลายวิธีแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของน้ำมันพืชชนิดนั้น ๆ Reddy และ Prabhakar (Reddy & Prabhakar, 1990 : 711-717) ได้ศึกษาการผลิตเนยโกโก้เทียมจากไขมันแซต (sal fat) ซึ่งมีองค์ประกอบของไขมันชนิดไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 และมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอยู่ในตำแหน่งที่ 2 (mono-unsaturated disaturated triglyceride) ในปริมาณสูงเช่นเดียวกับองค์ประกอบของไขมันในเนยโกโก้โดยใช้กระบวนการแยกไขมันชนิดนี้ออกมาด้วยตัวทำละลายอะซิโตนร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิเพื่อให้ได้คุณสมบัติของไขมันที่แยกออกเหมือนเนยโกโก้

Tanaka และคณะ (Tanaka and others, 1987 : unpagged) ผลิตเนยโกโก้เทียมโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงจากเชื้อ *Rhizopus Delmar* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ตำแหน่ง 1,3 ของน้ำมันมะกอกกับกรดสเตียริกหรือกรดปาล์มมิก Chang และ คณะ (Chang, Abraham & John, 1990 : 832-834) ศึกษาการผลิตเนยโกโก้เทียมจากกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างน้ำมันจากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านกระบวนการไฮโดรจิเนชัน กับน้ำมันมะกอก ในสัดส่วน 1:1 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) โดยใช้เอนไซม์ไลโปไซม์ ที่มีความจำเพาะแบบ 1,3 ปริมาตรร้อยละ 10 (น้ำหนักโดยน้ำหนักน้ำมัน) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ทำให้ได้รูปแบบไตรเอซิลกลีเซอรอลชนิด POS มากที่สุด จากการสกัดแยกน้ำมันแปรรูปดังกล่าวด้วยอะซิโตนในสัดส่วน 1:10 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ได้ไขมันเลียนแบบเนยโกโก้มีไตรเอซิลกลีเซอรอลหลักอยู่ 2 ชนิด คือ POS และ SOS ในปริมาณร้อยละ 23 และ 28 ตามลำดับ ซึ่งจากการที่ไขมันเลียนแบบมีปริมาณ SOS สูงกว่าในเนยโกโก้จึงทำให้มีจุดหลอมเหลวสูงกว่าเนยโกโก้ คือ 39 องศาเซลเซียส Chong และ คณะ (Chong, Hon & Wang, 1992 : 137-140) ใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงซึ่งผลิตจากเชื้อ *Mucor meihei* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ตำแหน่ง 1,3 ของปาล์มโอเลอินผสมกับกรดไขมันสเตียริกในสัดส่วน 1:0.5 (โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง และกวนที่

ความเร็ว 200 รอบ/นาที ใช้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสร้อยละ 10 (น้ำหนักโดยน้ำหนักของน้ำมัน) ซึ่งการรวมกันของสเต็มโรลิดในปาล์มโอเลอินจะทำให้ได้ปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอลของ POST StOSt และ POP ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แล้วทำการแยกไขมันกลุ่มนี้โดยนำไขมันที่ผ่านกระบวนการอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันไปกลั่นด้วยไอน้ำภายใต้สภาวะสูญญากาศ (6 มิลลิเมตรปรอท) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 1.5 ชั่วโมง ซึ่งสามารถกลั่นแยกกรดไขมันออกได้ร้อยละ 40.3 และส่วนที่เหลือเป็นกลีเซอรอลของแข็งร้อยละ 59.7 นำส่วนของน้ำมันปาล์มโอเลอิน แยกด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและอะซีโตนพบส่วนของไขมันที่มีองค์ประกอบเหมือนเนยโกโก้ คือมีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับเนยโกโก้ที่ 38.4 องศาเซลเซียส และให้ผลผลิตร้อยละ 26.0 ส่วน Mojovic และคณะ (Mojovic and others, 1993 : 438-443) สามารถผลิตเนยโกโก้เทียม (CBE) จากน้ำมันปาล์มและกรดสเตียริก โดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงซึ่งผลิตจากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีองค์ประกอบของกรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลใกล้เคียงกับเนยโกโก้ Undurraga และคณะ (Undurraga, Markouits & Erazo, 2001 : 933-939) ผลิตเนยโกโก้เทียมโดยใช้น้ำมันปาล์มผสมกับกรดสเตียริกมาผ่านการตัดแปรโดยใช้เอนไซม์ไลเปสลิโปไซม์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันในสภาวะที่ไม่มีตัวทำละลายพบว่าเมื่อพิจารณารูปแบบการหลอมเหลวของน้ำมันปาล์มที่เหลือ จะถูกหลอมเหลวหมดอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิประมาณ 32 องศาเซลเซียส ในขณะที่ เนยโกโก้เทียมที่ได้จะมีช่วงการหลอมเหลวตั้งแต่เริ่มหลอมจนหลอมเหลวหมดใกล้เคียงกับเนยโกโก้คือ อยู่ในช่วงประมาณ 23 ถึง 39 องศาเซลเซียส ในขณะที่เนยโกโก้จะอยู่ในช่วงประมาณ 22 ถึง 36 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นพบว่าจุดหลอมเหลวของเนยโกโก้เทียมเหมือนกับเนยโกโก้เช่นกันคือประมาณ 31 องศาเซลเซียส นอกจากนั้น Khumalo และคณะ (Khumalo and others, 2002 : 237-244) ผลิตเนยโกโก้เทียมจากน้ำมันของเมล็ด *Stychnos madagascariensis* (SM) *Trichelia emetica* (TE) และ *Ximenia caffra* (XC) โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizomucor miehei* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันพบว่า น้ำมันจาก SM และ XC เมื่อถูกตัดแปรแล้วปริมาณของกรดปาล์มมิก สเตียริก และ กรดโอเลอิก ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ แต่น้ำมันจาก TE จะให้กรดโอเลอิกต่ำกว่าเนยโกโก้มาก และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างไตรกลีเซอไรด์ของน้ำมันชี้ให้เห็นว่ากรดโอเลอิกจะเป็นกรดไขมันที่สำคัญในตำแหน่งที่ 2 และมีปริมาณมากโดยเฉพาะน้ำมันจาก SM และ XC คือร้อยละ 65.9 และ 80.8 ในขณะที่น้ำมันจาก TE มีกรดโอเลอิกในตำแหน่งที่ 2 เพียงร้อยละ 40.2 เท่านั้น จากการศึกษาพบว่าน้ำมันจาก SM และ XC เหมาะใช้ผลิตเนยโกโก้เทียม เนื่องจากมีปริมาณกรดโอเลอิกสูง โดยเฉพาะตรงตำแหน่งที่ 2 ของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นกรดไขมันที่สำคัญของเนยโกโก้ Liu และ คณะ (Liu, Chang & Liu, 2007 : 1303-1311) ได้ทำการศึกษารังปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันหมู

กับ ไตรสเดียรินของเอนไซม์ไลเปสจาก *Mucor miehei* (Lipozyme IM-20) ภายใต้สภาวะซูเปอร์คริติคอลคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ความดัน 17 MPa อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความกรดต่าง 9 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าส่วนประกอบที่เหมาะสมของสับสเตรทคือ น้ำมันหมู : ไตรสเดียริน ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1.4 ค่าแอกติวิตีน้ำของเอนไซม์เท่ากับ 0.33 ทำให้ได้ผลผลิตเนยโกโก้เทียมร้อยละ 63 ซึ่งมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 34.5 องศาเซลเซียส

จะเห็นได้ว่าการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม เพื่อใช้ทดแทนเนยโกโก้ธรรมชาติมักจะสังเคราะห์จากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันจากแหล่งต่าง ๆ และน้ำมันที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม ควรจะเป็นชนิดที่ประกอบด้วยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีกรดไขมันอิ่มตัวอยู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 และมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (กรดโอเลอิก) อยู่ในตำแหน่งที่ 2 แล้วเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ เช่น จากจุลินทรีย์และจากพืช จะทำให้ได้เนยโกโก้เทียมที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันกับเนยโกโก้ธรรมชาติ โดยเฉพาะคุณสมบัติในเรื่องการหลอมเหลว สำหรับสภาวะที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา เช่น เวลา อุณหภูมิ ก็ขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้แต่ละชนิด ในบางปฏิกิริยาอาจจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมด้วย เพื่อความเป็นเนื้อเดียวกันของสับสเตรท หรือสารตั้งต้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมจากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มซึ่งเร่งโดยไลเปสจากยางมะละกอ

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1. การเตรียมไลเปสจากยางมะละกอ

2.1.1 วิธีเก็บยางมะละกอ

กรีดผลมะละกอดิบจากขั้วผลจนถึงปลายผล โดยกรีดจากผลที่ติดอยู่บนต้น ผลละประมาณ 4-6 แผล ลึกประมาณ 1-2 มิลลิเมตร รองรับน้ำยางด้วยผ้าพลาสติกที่ปูรอบต้นยาง และกวาดน้ำยางลงในกระปุกพลาสติก ปิดฝาให้แน่น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส

2.1.2 วิธีการแยกไลเปส

นำยางมะละกอ 500 กรัม ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ยางละลาย จากนั้นกรองน้ำยางด้วยตะแกรงร่อนขนาด 1,600 mesh เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเก็บ ชั่งน้ำหนักและเซนตริฟิวจ์ที่ $9,500 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกสารละลายด้านบนทิ้งไป ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เก็บตะกอนใส่ลงในขวดไลโอไฟล์ไลซ์ นำไปทำให้สารละลายแข็งตัวจากนั้นนำไปทำแห้งด้วยไลโอไฟล์ไลเซอร์ (Lyophilizer, Flexi-Dry MP ของ FIS system) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักไลเปสแห้ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบสมบัติของไลเปสจากยางมะละกอ

2.2.1 วิธีการหาค่าปริมาณน้ำ (Water content, C_w)

การหาค่าปริมาณน้ำของไลเปสทำได้โดยใช้เครื่อง Karl-Fischer Coulometer (684 KF, Metrohm) โดยเปิดสวิทช์ตู้ของเครื่องและตั้งอุณหภูมิเตาอบไว้ที่ 150°C องศาเซลเซียส และเวลาในการไคเตรท 30 นาที ปรับอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์ในระบบให้เห็นฟองแก๊สเกิดขึ้นในขวดสารละลาย Karl-Fischer (Hydranal Coulomat AG, Riedel 3483 และ Hydranal Coulometer CG, Riedel 3484, Metrohm) ให้อยู่ในช่วง 10-15 ฟอง/วินาที ใส่ไลเปสจากยางมะละกอ 20 มิลลิกรัมลงในถ้วยใส่สารตัวอย่าง แล้วนำเข้าไ่ว้ในตู้ของ Karl-Fischer Coulometer ที่ 150°C องศาเซลเซียส น้ำที่มีอยู่ในไลเปสจะระเหยกลายเป็นไอน้ำแก๊สไนโตรเจนจะนำ ไอ น้ำนี้ออกจากเตาอบ

ไปยังสถานะที่มีสารละลาย Karl-Fischer และไตเตรทหาปริมาณน้ำ ซึ่งจะปรากฏผลบนหน้าปัดของเครื่องควบคุม ซึ่งทำให้คำนวณหาปริมาณน้ำในหน่วยร้อยละของน้ำหนักไลเปส

2.2.2 วิธีการคำนวณหาค่าแอกติวิตีน้ำ (water activity, a_w)

ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดความชื้น (Thermoconstanter Humidat TH2, Novasina) ด้วยเกลือมาตรฐานที่มีค่าแอกติวิตีน้ำ (a_w) ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สารมาตรฐานเกลือลิเทียมคลอไรด์ (LiCl, $a_w = 0.11$) การปรับมาตรฐานของเครื่องทำได้โดยปรับอุณหภูมิของเครื่องให้เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส นำถ้วยบรรจุลิเทียมคลอไรด์ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง ปรับเครื่องให้อ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ให้ได้ 11.3 แล้วนำเอาถ้วยลิเทียมคลอไรด์ออกจากเครื่อง ใส่ถ้วยที่บรรจุไลเปส (ประมาณ 100 มิลลิกรัม) ใส่ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง ปิดฝาเครื่อง อ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ทุก ๆ 10 นาที จนค่าที่ได้คงที่ จำนวนค่าแอกติวิตีน้ำของไลเปสแห่งนี้ ได้โดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{แอกติวิตีน้ำ} = \frac{\text{ความชื้นสัมพัทธ์}}{100}$$

2.2.3 วิธีหาแอกติวิตีไลเปส

ผสมน้ำมันปาล์ม 0.20 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย พีเอช 7.4 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแต่ละใบจำนวน 2 ใบ ๆ แรกนำมาเติมไลเปสจากยางมะลละกอ 3 มิลลิกรัม ส่วนใบที่สองไม่ต้องเติมไลเปส ซึ่งใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำสารละลายผสมในขวดทั้งสองใบไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแต่ละใบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของไอโซออกเทนออกไปผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายคอปเปอร์ (สารละลายของคิวปริคอะซีเตต 12.50 กรัม ในน้ำ 200 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.1 ด้วยไพรีดิน แล้วเติมน้ำให้ครบ 250 มิลลิลิตร) แยกสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร นำไปหาแอกติวิตีไลเปสโดยเปรียบเทียบค่า A_{715} กับกราฟมาตรฐานแล้วใช้คำนวณหาแอกติวิตีไลเปส ทั้งนี้กำหนดให้ 1 ยูนิตของไลเปส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ณ สภาวะที่ทดลอง

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน ผสมกรดโอเลอิก 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรต่าง ๆ กันเข้ากับไอโซ ออกเทน ให้ได้ปริมาตรรวม 2.50 มิลลิลิตร เติม สารละลายคอปเปอร์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้ว คูดสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็นตัว เปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดโอเลอิกกับ A_{715}

2.2.4 วิธีศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม

เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 0.20 มิลลิลิตรและสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย พีเอช 7.4 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 7 ใบ นำแต่ละใบไปอุ่นที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 40, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม ลงไปในขวดรูปชมพู่แต่ละใบ บ่มไว้ที่อุณหภูมินั้น ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อ นาที จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมไอโซ ออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงในขวดแต่ละใบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แยกสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของไอโซออกเทนออกไปผสมกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย คอปเปอร์ แยกสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่า แอคติวิตีดังข้อ 2.2.3 แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของไลเปสกับอุณหภูมิ

2.2.5 วิธีศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม

เตรียมขวดรูปชมพู่ 6 ใบ แต่ละใบประกอบด้วยสารละลายผสมของน้ำมันปาล์ม 0.20 มิลลิลิตรและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.10 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์อยู่ด้วย พีเอช 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร เติมไลเปสจากยางมะละกอ 3 มิลลิกรัม เพื่อเร่งปฏิกิริยา นำสารละลายทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอชของ สารละลายให้เท่ากับ 1-2 ด้วย 6 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติมไอโซออกเทน 5 มิลลิลิตร ลงใน ขวดแต่ละใบ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสารละลาย นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แยกสารละลายชั้นบน ซึ่งเป็นชั้นของไอโซออกเทนออกไปผสมกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลายคอปเปอร์ แยกสารละลาย ชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่าแอคติวิตีดังข้อ 2.2.3 แล้ว เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของไลเปสกับค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์

2.2.6 วิธีการตรวจสอบปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Kjeldahl

ชั่งตัวอย่างเอนไซม์ 0.25 กรัม ใส่หลอดย่อยขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (Kjelblet) จำนวน 1 เม็ด และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง 2020 Digestion System ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้าเครื่องกลั่น Kjeltac System 1026 Distilling Unit ใช้กรดบอริก 2% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร กลั่นด้วยระบบ Auto ใช้เวลา 3.5 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่น มาไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรตไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคูณกับ Kjeldahl factor ได้เป็นค่าโปรตีนโดยใช้สมการ

$$\% \text{ไนโตรเจน (Total Nitrogen)} = \frac{(A-B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

$$\% \text{โปรตีน (Crude protein)} = \%N \times 6.25$$

A = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรตกับ blank

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2.3 วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์มโอเลอิน

ชั่งน้ำมันปาล์มโอเลอิน 40 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลิกโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้ความร้อนแก่สารละลายผสมโดยใช้อ่างน้ำร้อนจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติม โบรอนไตรฟลูออไรด์-เมทานอล (BF_3 -methanol) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายผสมข้างต้น ต้มต่อไปประมาณ 2-3 นาที หยุดให้ความร้อน ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายผสมทั้งหมดลงในกรวยแยกที่มีสารละลายผสมของเฮกเซน 25 มิลลิลิตร และ สารละลายอีเทอร์ของโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายผสมในกรวยแยกเบา ๆ แล้วตั้งไว้ให้แยกเป็น 2 ชั้น (Boyer, 1993 : unpagged) แยกสารละลายในชั้นของเฮกเซนซึ่งเป็นชั้นบนและมีเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันใส่ลงในปิเกตอร์ เติมแมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 1 กรัม ลงไป เพื่อคั่นน้ำที่เหลือออกจากสารละลายกรองสารละลาย ด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกแมกนีเซียมซัลเฟตออกไป นำสารละลายที่ได้ไประเหย

เอาเสกเซนออกโดยใช้อ่างน้ำร้อน จนกระทั่งเหลือปริมาตรสารละลาย 0.50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

2.4 วิธีศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม

การทดลองนี้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อชนิดของไตรเอซิลกลีเซอรอลในเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น แหล่งให้หมู่เอซิล อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา ปริมาณน้ำเริ่มต้นของเอนไซม์ (วัดในรูปของแอกติวิตีน้ำ) ปริมาณเอนไซม์ และอัตราส่วนของน้ำมันปาล์ม : เมทิลสเตียเรท

2.4.1 วิธีศึกษาผลของแหล่งให้หมู่เอซิล

เตรียมขวดใส่สารตัวอย่างขนาด 5 มิลลิลิตร 3 ใบ เติมน้ำมันปาล์มโอเลอิน 2 มิลลิโมล ลงในขวดตัวอย่างทั้ง 3 ขวด จากนั้นเติมเมทิลสเตียเรท เอทิลสเตียเรท และ กรดสเตียริก อย่างละ 4 มิลลิโมล ลงในขวดตัวอย่างใบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เติมไลเปสจากยางมะละกอ 0.5 กรัมลงไปในขวดตัวอย่างทั้ง 3 เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำขวดตัวอย่างทั้งหมดไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างน้ำมันคัดแปร 10 มิลลิกรัม นำไปแยกเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC) ดังอธิบายในข้อ 2.5

2.4.2 วิธีศึกษาผลของอุณหภูมิ

เตรียมขวดตัวอย่างที่ประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอิน 2 มิลลิโมล และ เมทิลสเตียเรท 4 มิลลิโมล จำนวน 4 ขวด เติมไลเปสจากยางมะละกอ 0.5 กรัมลงไปในแต่ละขวด นำขวดตัวอย่างใบที่ 1, 2, 3 และ 4 ไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างน้ำมันคัดแปร 10 มิลลิกรัม นำไปแยกเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยวิธี TLC

2.4.3 วิธีศึกษาผลของเวลา

เตรียมขวดตัวอย่างที่ประกอบด้วยน้ำมันปาล์มโอเลอิน 2 มิลลิโมล และ เมทิลสเตียเรท 4 มิลลิโมล จำนวน 4 ขวด เติมไลเปสจากยางมะละกอ 0.5 กรัมลงไปในแต่ละขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ที่เวลา 0, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง ในขวดที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำตัวอย่างที่เก็บได้ 10 มิลลิกรัม ไปแยกเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยวิธี TLC

2.4.4 วิธีศึกษาผลของแอคติวิตีน้ำเริ่มต้นของเอนไซม์

ซึ่งได้เปสจากยางมะละกอ 0.5 กรัม ใส่ลงในจานพลาสติกขนาดเล็กจำนวน 4 ใบ นำจานใส่เอนไซม์ทั้ง 4 ไปใส่ไว้ในขวดตัวอย่างที่มีฝาปิดใบที่ 1 ซึ่งบรรจุลิเทียมคลอไรด์ (LiCl, water activity, $a_w = 0.11$) ขวดใบที่ 2 บรรจุโพแทสเซียมอะซิเตท (CH_3COOK , $a_w = 0.23$) ขวดใบที่ 3 บรรจุแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2 , $a_w = 0.33$) และขวดใบที่ 4 บรรจุแมกนีเซียมไนเตรท ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $a_w = 0.53$) ตามลำดับ นำขวดตัวอย่างทั้ง 4 ใบ ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน นำเอนไซม์ในแต่ละขวดไปวัดแอคติวิตีน้ำด้วยเครื่องวัดความชื้น ดังข้อ 2.2.2

เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วย น้ำมันปาล์มโอเลอิน 2 มิลลิโมล และ เมทิลสเตียเรท 4 มิลลิโมล ใส่ลงในขวดตัวอย่าง 4 ขวด เติมไลเปสที่มี $a_w = 0.11, 0.23, 0.33$ และ 0.53 ลงในขวดตัวอย่างใบที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างน้ำมันคัดแปร 10 มิลลิกรัม นำไปแยกเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยวิธี TLC

2.4.5 วิธีศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์

เตรียมสารละลายผสมที่ประกอบด้วย น้ำมันปาล์มโอเลอิน 2 มิลลิโมล และ เมทิลสเตียเรท 4 มิลลิโมล ใส่ลงในขวดตัวอย่าง 4 ขวด ซึ่งได้เปสจากยางมะละกอ ($a_w = 0.11$) ปริมาณ 9, 18, 27 และ 36 % โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์มที่ใช้ เติมน้ำมันลงในขวดตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างน้ำมันคัดแปร 10 มิลลิกรัม นำไปแยกเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยวิธี TLC

2.4.6 วิธีศึกษาผลของอัตราส่วนของสับสเตรท

เตรียมสารละลายผสมของสับสเตรทที่ประกอบด้วยน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรทในอัตราส่วนต่าง ๆ คือ 1:1, 1:2.3, 1:3, 1:4 และ 1:5.6 ใส่ในขวดตัวอย่างใบที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ เติมไลเปสจากยางมะละกอ 18 % โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์มที่ใส่ลงไปลงในขวดตัวอย่างทั้ง 5 ใบ เพื่อเริ่มปฏิกิริยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างน้ำมันคัดแปร 10 มิลลิกรัม นำไปแยกเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยวิธี TLC

2.5 วิธีแยกไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยใช้ TLC

เติมเฮกเซน 0.50 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างน้ำมันคัดแปรร คนให้ละลาย หยดสารละลายผสมลงบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล ให้เป็นแนวยาวติดต่อกัน โดยให้ห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปแช่ในอ่างที่มีไออิมตัวของตัวทำละลาย ซึ่งประกอบด้วยเฮกเซน ไดเอทิลอีเธอร์และกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 80: 20: 1 โดยปริมาตร ตามลำดับ ปิดฝาทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่น TLC ห่างจากขอบบน 1 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ออกมาแล้วขีดแนวของตัวทำละลายไว้ ปลอ่ยให้ตัวทำละลายแห้งนำไปแช่ในอ่างที่มีไออิมตัวของฟลักไอโอดีน เป็นเวลา 2-3 นาที นำแผ่น TLC ออกมาแล้วใช้ดินสอดำทำเครื่องหมายรอบ ๆ แถบที่มีสีน้ำตาล ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบนำไปหาความสัมพันธ์กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (R_f) ใช้มีดคัดเตอร์ขูดซิลิกาเจลบนแผ่น TLC เฉพาะส่วนที่เป็นแถบของไตรเอซิลกลีเซอรอล แล้วนำไปทำปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชันกับโบรอนไตรฟลูออไรด์-เมทานอล เพื่อสังเคราะห์เป็นเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันคัดแปรร นำไปศึกษาชนิดและปริมาณของกรดไขมันต่อไป

2.6 การวิเคราะห์รูปแบบกรดไขมันโดยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรสโกปี

วิเคราะห์รูปแบบของกรดไขมันที่พบในสารตัวอย่างน้ำมันคัดแปรรโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC 6850, Agilent Technologies) ที่มีคอลัมน์ชนิดกะปิลลารี (HP-1MS, 30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m thickness) ต่ออยู่กับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MSD 5973 (EI), Agilent Technologies) ภาวะที่ใช้คือ อุณหภูมิของแหล่ง MS Quadrupole และ MS เท่ากับ 150 และ 230 องศาเซลเซียสตามลำดับ ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และอุณหภูมิที่ใช้ฉีดเท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์คือ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึง 240 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และพักไว้ที่อุณหภูมิสุดท้าย 15 นาที

2.7 วิธีวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของเนยโกโก้เทียม

จุดหลอมเหลวของเนยโกโก้เทียมวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง DSC (Differential Scanning Calorimeter, model DSC_2, Perkin-Elmer, Norwalk CT)

2.8 วิธีวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของเนยโกโก้เทียม

วิเคราะห์หาค่าไอโอดีนและค่าสaponifiเคชันโดยวิธี AOAC (AOAC, 1990 : unpagged)
สำหรับปริมาณกรดไขมันอิสระหาโดยวิธี IUPAC II.D.19 (IUPAC, 1979 : unpagged)

2.9 วิธีศึกษาผลผลิตของเนยโกโก้เทียม

เตรียมเนยโกโก้เทียมภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ สารละลายสับสเตรทที่ใช้ประกอบด้วย น้ำมันปาล์มและเมทิลสเตียเรทในอัตราส่วน 1: 4 โมล/โมล เติมน้ำเกลือจากยางมะละกอ ($\alpha_w = 0.11$) 18 % โดยน้ำหนัก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเนยโกโก้เทียมให้บริสุทธิ์โดยวิธีแยกส่วนโดยใช้อะซีโตน (Chang, Abraham & John, 1990 : 832-834) เติมน้ำอะซีโตน 30 มิลลิลิตรลงในสารละลายปฏิกิริยา กรองแยกเอาน้ำทิ้งไปโดยใช้กระดาษกรอง สารละลายฟิลเตรทที่ได้นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นให้กรองตะกอนทิ้งไป ส่วนของฟิลเตรทที่ได้นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้เนยโกโก้เทียมที่บริสุทธิ์ขึ้น นำไปคำนวณหาร้อยละของผลผลิตดังสมการ

$$\text{ผลผลิตของเนยโกโก้เทียม (\%)} = \frac{\text{จำนวนโมลของเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้} \times 100\%}{\text{จำนวนโมลของน้ำมันปาล์ม}}$$

บทที่ 3

ผลการวิจัย

ไลเปสจากยางมะละกอถูกแยกออกจากสารละลายน้ำยาง แล้วทำให้แห้ง นำไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์เช่น การย่อยสลายน้ำมันปาล์มด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม ปริมาณน้ำในเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันปาล์มโอเลอินที่ใช้ในงานวิจัย จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มโอเลอิน โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอเพื่อสังเคราะห์ เนยโกโก้เทียม เช่น ผลของตัวให้หมู่เอซิล ผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ผลของแอคติวิตีน้ำเริ่มต้นของเอนไซม์ ผลของปริมาณเอนไซม์ และผลของอัตราส่วนของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรตที่ใช้เป็นสับสเตรท ตลอดจนทำการแยกเนยโกโก้เทียมจากสารละลายปฏิกิริยา พร้อมทั้งวิเคราะห์คุณสมบัติของเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้และคำนวณหาร้อยละของผลผลิต

3.1 ผลผลิตไลเปสจากยางมะละกอ

ยางมะละกอสด 100 กรัม ได้จากการกีดผลมะละกอดิบประมาณ 30 ผล เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสอยู่ในส่วนที่ไม่ละลายของยางมะละกอ ดังนั้นจึงแยกโดยการเซนตริฟิวจ์และนำตะกอนไปทำให้แห้งด้วยเครื่องไลโอไฟไลเซชัน ทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลในน้ำมันปาล์มของไลเปสจากยางมะละกอได้ผลดังตาราง 3.1 ซึ่งจะเห็นว่าในยางมะละกามีไลเปส 10.0 % โดยน้ำหนัก และมีไฮโดรไลซิสแอคติวิตีต่อน้ำมันปาล์มโอเลอินเท่ากับ 725 ± 23 ยูนิตต่อกรัมของตะกอนยางมะละกอแห้ง

ตาราง 3.1 น้ำหนักและไฮโดรไลซิสแอคติวิตีของไลเปสซึ่งแยกได้จากยางมะละกอสด

ขั้นตอน	น้ำหนัก (กรัม)	ไฮโดรไลซิสแอคติวิตี (ยูนิต)	แอคติวิตีทั้งหมด (ยูนิต)
ยางมะละกอสด	100	80 ± 35	8,000
เซนตริฟิวจ์ : สารละลายใส	62.0	0	0
: ตะกอนเปียก	38.0	200 ± 55	7600
ไลโอไฟไลเซชัน : ตะกอนแห้ง	10.0	725 ± 23	7,250

3.2 คุณสมบัติของไลเปสจากยางมะละกอ

3.2.1 ปริมาณน้ำในไลเปส

น้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่อยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นเอนไซม์ที่จะใช้ในปฏิกิริยาที่มีน้ำอยู่น้อยจะต้องทราบปริมาณน้ำในเอนไซม์ซึ่งโดยทั่วไปควรจะต้องต่ำกว่า 10% โดยน้ำหนัก ไลเปสจากยางมะละกอที่ได้ถูกทำให้แห้งด้วยไลโอไฟล์เซอร์จึงถูกนำไปหาปริมาณน้ำ (Water content, C_w) และแอกติวิตีน้ำ (Water activity, A_w) ผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในตาราง 3.2 ซึ่งแสดงว่าไลเปสจากยางมะละกอที่เตรียมได้นี้มีปริมาณน้ำโดยเฉลี่ย 3.62% และแอกติวิตีน้ำเท่ากับ 0.395

ตาราง 3.2 ปริมาณน้ำ (C_w) และแอกติวิตีน้ำ (A_w) ของไลเปสที่แยกได้จากยางมะละกอ

ตัวอย่างไลเปส	ปริมาณน้ำในไลเปส			A_w
	น้ำหนักไลเปส (มก.)	น้ำหนักน้ำ (มก.)	C_w (%)	
1	20.00	0.75	3.75	0.412
2	21.30	0.81	3.80	0.415
3	21.10	0.73	3.46	0.390
4	20.50	0.81	3.96	0.381
5	20.40	0.73	3.59	0.420
6	20.15	0.70	3.50	0.411
7	20.00	0.75	3.75	0.385
8	21.32	0.72	3.40	0.369
9	20.56	0.73	3.57	0.400
10	21.40	0.74	3.45	0.370
เฉลี่ย			3.62	0.395

3.2.2 แอกติวิตีของไลเปส

การหาแอกติวิตีไลเปสในที่นี้ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังนั้นจึงใช้กรดปาล์มมิติกเป็นกรดไขมันมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของ Cu^{2+} กับกรดปาล์มมิติกที่เกิดจากการไฮโดรไลสน้ำมันปาล์มด้วยเอนไซม์ไลเปส (รูป 3.1)

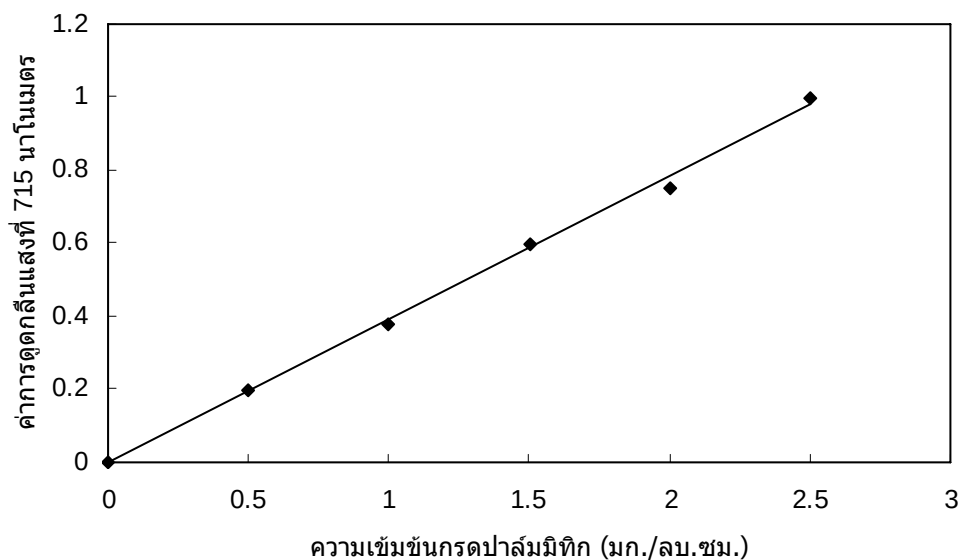
การคำนวณหาแอกติวิตีของไลเปสทำได้โดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{แอกติวิตีไลเปส} = \frac{2.95 \times 10^2 \times a}{b} \quad \text{ยูนิต/กรัมไลเปส}$$

เมื่อ a = ความเข้มข้นของกรดปาล์มมิก (มก./ซม³)

b = น้ำหนักของไลเปส (มก.) ที่ใช้ในการหาแอกติวิตีไลเปส

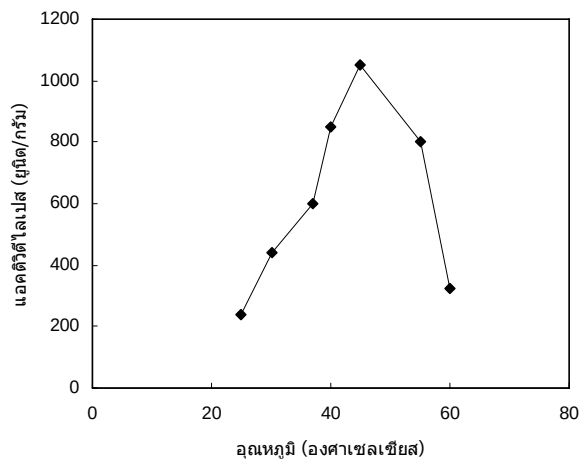
ผลการทดสอบและคำนวณหาแอกติวิตีของไลเปส 6 ตัวอย่างแสดงว่าไลเปสจากยางมะละกามีแอกติวิตีโดยเฉลี่ย 725 ยูนิต/กรัมไลเปสแห้ง



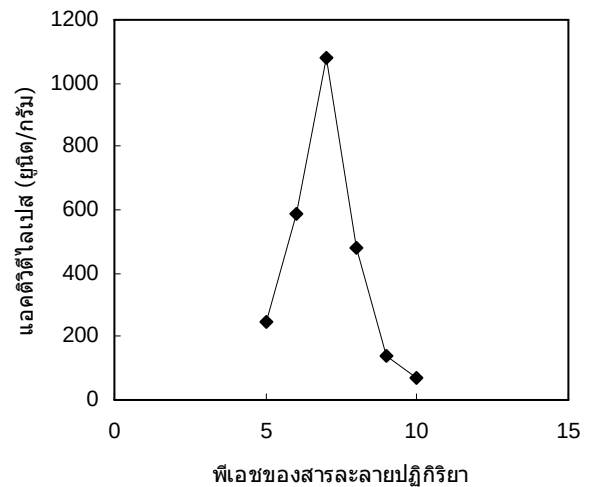
รูป 3.1 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มมิกที่เกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนกับ Cu^{2+}

3.2.3 คุณสมบัติทั่วไปของไลเปสจากยางมะละกอ

จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสจากยางมะละกอ เช่น อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม และปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ พบว่าไลเปสจากยางมะละกามีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันปาล์มที่ 45 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7 ตามลำดับ (รูป 3.2 ก และ ข)



(ก)



(ข)

รูป 3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม (ก) และ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม (ข) ของไลเปสจากยางมะละกอในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันปาล์ม

สำหรับการหาปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ 3 ครั้ง พบว่าปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในเอนไซม์ที่เตรียมได้เท่ากับ 9.85% เมื่อคำนวณค่าแอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์พบว่ามีย่านเท่ากับ 7.40 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.3 องค์ประกอบในน้ำมันปาล์ม

การวิเคราะห์หาชนิด ปริมาณ และรูปแบบของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในไตรเอซิลกลีเซอรอลของน้ำมันปาล์มมีความสำคัญก่อนที่จะเริ่มสังเคราะห์เนยโกโก้ เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มก่อนที่จะมีการดัดแปรโครงสร้างให้เป็นเนยโกโก้เทียม ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 3.3 จะเห็นได้ว่าน้ำมันปาล์มประกอบด้วยกรดโอเลอิก (48%) และกรดปาล์มมิติก (40.8%) ในปริมาณสูง แต่มีปริมาณของกรดสเตียริกในปริมาณต่ำ รูปแบบของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่พบในน้ำมันปาล์มได้แก่ POP, LOP, OOP, OOO, POS_t และ StOO ในปริมาณ 26%, 24%, 17%, 4%, 3% และ 3% ตามลำดับ (Pomtippa, 2006 : unpagged) จากผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันปาล์มมีโครงสร้างที่เหมาะสมในการถูกดัดแปรให้เป็นเนยโกโก้ เนื่องจากกรดโอเลอิกที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์มจะอยู่ตรงตำแหน่งที่ 2 ของไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งจะเป็นโครงสร้างที่คล้ายกับโครงสร้างของไตรเอซิลกลีเซอรอลในเนยโกโก้ธรรมชาติ

ตาราง 3.3 ชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปาล์ม

กรดไขมัน	ปริมาณ (%)
กรดไมริสติก (C 14:0)	0.99
กรดปาล์มมิก (C 16:0)	40.8
กรดสเตียริก (C 18:0)	0.57
กรดโอเลอิก (C 18:1)	48.1
กรดไลโนเลอิก (C 18:2)	9.52

3.4 สถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมโดยไลเปสจากยางมะละกอ

3.4.1 ผลของแหล่งที่ให้หมูเอซิล

ในการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้เทียม แหล่งที่ให้หมูเอซิลมีบทบาทสำคัญที่จะทำให้เนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้มีโครงสร้างคล้ายกับเนยธรรมชาติ ในงานวิจัยนี้เฉพาะแหล่งที่ให้หมูสเตียริล (stearyl donor) เท่านั้นที่นำมาศึกษา เนื่องจากว่าน้ำมันปาล์มโอเลอีนมีปริมาณของกรดปาล์มมิกใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติอยู่แล้ว ดังนั้นเมทิลสเตียเรท เอทิลสเตียเรทและกรดสเตียริกจึงถูกใช้เป็นแหล่งของหมูสเตียริลในปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มซึ่งเร่งด้วยไลเปสจากยางมะละกอ ผลการทดสอบพบว่าเมทิลสเตียเรทเป็นแหล่งให้หมูสเตียริลที่เหมาะสมที่สุด (ตาราง 3.4) เนื่องจากให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมิกเท่ากับ 1.37 : 1.0 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอัตราส่วนของกรดทั้งสองที่พบในเนยโกโก้ธรรมชาติ (Padley, Gunstone & Harwood, 1986 : 49-170)

ตาราง 3.4 ผลของแหล่งให้หมูเอซิลที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันในเนยโกโก้เทียม

แหล่งให้หมูเอซิล	ปริมาณกรดไขมัน (%)				อัตราส่วนของ C 18:0 ต่อ C 16:0
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	
เมทิลสเตียเรท	26.9	36.8	30.4	6.0	1.3:1
เอทิลสเตียเรท	24.5	52.1	23.4	-	2.1:1
กรดสเตียริก	30.2	24.4	37.7	7.7	0.8:1

3.4.2 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มซึ่ง

เร่งโดยไลเปสจากยางมะละกอ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส (ตาราง 3.5) เพราะวณัยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้อัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมิกเท่ากับ 1.3: 1 ซึ่งเท่ากับเนยธรรมชาติ ขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่า หรือ สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส จะทำให้เนยโกโก้เทียมที่ได้อัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมิกต่ำกว่าเนยโกโก้ธรรมชาติ

ตาราง 3.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์โดยไลเปสจากยางมะละกอ

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณกรดไขมัน (%)				อัตราส่วนของ C 18:0 ต่อ C 16:0
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	
40	32.5	28.9	35.1	3.5	0.9:1
45	26.9	36.8	30.4	6.0	1.3:1
50	31.6	34.8	32.1	1.6	1.1:1
55	31.3	28.2	36.5	4.0	0.9:1

3.4.3 ผลของเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา

ผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่มีต่อรูปแบบของกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมซึ่งสังเคราะห์จากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเร่งโดยไลเปสจากยางมะละกอ จากการศึกษาที่เวลา 0-24 ชั่วโมง พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมคือ 4 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณของกรดปาล์มมิกในน้ำมันปาล์มจาก 40.8% ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 26.9% ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณของกรดปาล์มมิกในเนยโกโก้ธรรมชาติ (ตาราง 3.6) สำหรับปริมาณของกรดสเตียริกในน้ำมันปาล์มจาก 1.58% เพิ่มขึ้นไปถึง 36.8% แต่ถ้าเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นมากกว่า 4 ชั่วโมง ปริมาณกรดสเตียริกที่พบในเนยโกโก้เทียมจะมากเกินไปเกินความต้องการ

ตาราง 3.6 ผลของเวลาที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์โดยไลเปสจากยางมะละกอ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดไขมัน (%)				อัตราส่วนของ C 18:0 ต่อ C 16:0
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	
0	40.8	1.58	48.1	9.52	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

3.4.4 ผลของแอกติวิตีเริ่มต้น

ไลเปสจากยางมะละกอถูกทำให้มีปริมาณของแอกติวิตีน้ำตามที่กำหนดโดยนำไปวางอยู่ในไออุ่นตัวของสารละลายเกลือที่มีค่าแอกติวิตีน้ำตั้งแต่ 0.11-0.53 เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นนำไลเปสจากยางมะละกอที่มีแอกติวิตีน้ำเริ่มต้นเท่ากับ 0.11, 0.23, 0.33 และ 0.53 ไปเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแอกติวิตีน้ำของเอนไซม์มีผลต่อองค์ประกอบของเนยโกโก้เทียม (ตาราง 3.7) ปริมาณแอกติวิตีน้ำของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอที่เหมาะสมที่สุดในการเร่งปฏิกิริยา คือ 0.11 ซึ่งจะช่วยให้เนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้มีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมิกใกล้เคียงกับเนยโกโก้มากที่สุด ถ้าปริมาณแอกติวิตีน้ำมากกว่า 0.11 นอกจากจะพบเนยโกโก้เทียมแล้ว ยังพบโคเลสเตอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมัน ซึ่งแสดงว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วย จึงทำให้เนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้มีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมิกต่ำ

ตาราง 3.7 ผลของแอกติวิตีน้ำที่มีต่อรูปแบบกรดไขมันของเนยโกโก้เทียม

แอกติวิตีน้ำ เริ่มต้น	ปริมาณกรดไขมัน (%)				อัตราส่วนของ C 18:0 ต่อ C 16:0
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	
0.11	26.9	36.8	30.4	6.00	1.3:1
0.23	38.7	29.8	31.5	0	0.8:1
0.33	49.5	20.4	30.1	0	0.4:1
0.53	51.2	16.7	32.1	0	0.3:1

3.4.5 ผลของปริมาณเอนไซม์

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกต่อการเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของไลเปสจากยางมะละกามีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม (ตาราง 3.8) ปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยในการเติมหมู่สเตียริลให้เข้าไปในโครงสร้างของน้ำมันปาล์ม พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 18% โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์มที่ใช้ เมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นไม่ได้มีผลต่อการเติมหมู่เอซิลเข้าไปอีก ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ 18% โดยน้ำหนักของน้ำมันปาล์มที่ใช้

ตาราง 3.8 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่มีต่อรูปแบบของกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมจากการเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของไลเปสจากยางมะละก

ปริมาณเอนไซม์ (% โดยน้ำหนัก)	ปริมาณกรดไขมัน (%)				อัตราส่วนของ C 18:0 ต่อ C 16:0
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	
9	44.6	20.3	30.1	5.0	0.5:1
18	26.9	36.8	30.4	6.0	1.3:1
27	28.1	38.5	30.1	3.3	1.3:1
36	28.1	38.5	30.5	2.8	1.3:1

3.4.6 ผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมของสับสเตรท

การใช้สับสเตรทน้ำมันปาล์มและเมทิลสเตียเรทในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ทำให้ไลเปสจากยางมะละกทำงานได้แตกต่างกัน โดยการเติมหมู่สเตียริลเข้าไปตรงตำแหน่งที่ 3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอลในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน จะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อใช้อัตราส่วนของน้ำมันปาล์มต่อเมทิลสเตียเรท เท่ากับ 1: 4 และ 1: 5.6 (ตาราง 3.9) ถ้าใช้อัตราส่วนต่ำกว่า 1: 4 จะทำให้น้ำมันดัดแปรที่สังเคราะห์ได้มี รูปแบบของกรดไขมันไม่เหมือนกับเนยโกโก้ธรรมชาติ แต่เนื่องจากเมทิลสเตียเรทมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นในการเตรียมเนยโกโก้เทียมจากปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท ควรใช้อัตราส่วนของสับสเตรทที่ 1: 4

ตาราง 3.9 รูปแบบของกรดไขมันในเนยโกโก้เทียมเมื่อใช้อัตราส่วนของสับสเตรทที่แตกต่างกัน

น้ำมันปาล์ม : เมทิลสเตียเรท (โมล : โมล)	ปริมาณกรดไขมัน (%)				อัตราส่วนของ C 18:0 ต่อ C 16:0
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	
1:1	46.8	23.4	29.8	0	0.5:1
1:2.3	34.2	27.7	31.6	6.5	0.8:1
1:3	29.8	30.2	31.4	8.6	1.0:1
1:4	26.9	36.8	30.4	6.0	1.3:1
1:5.6	28.1	38.5	30.1	3.3	1.3:1

3.5 คุณสมบัติทางกายภาพของเนยโกโก้เทียม

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพของเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้แสดงในตารางที่ 3.10 จุดหลอมเหลวของเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกันกับจุดหลอมเหลวของเนยโกโก้ธรรมชาติ คุณสมบัติอื่น ๆ เช่น ค่าไอโอดีน และค่าสปอนนิฟิเคชัน มีค่าใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติเช่นเดียวกัน ยกเว้นปริมาณกรดไขมันอิสระของเนยโกโก้เทียมจะมากกว่าเนยโกโก้ธรรมชาติ

ตาราง 3.10 คุณสมบัติของเนยโกโก้เทียม

คุณสมบัติทางกายภาพ	เนยโกโก้เทียม	เนยโกโก้ธรรมชาติ (Minifie, 1989)
จุดหลอมเหลว ($^{\circ}\text{C}$)	37-39	35-39
ค่าไอโอดีน (กรัม/100 กรัม)	44.9 ± 0.8	40.2
ค่าสปอนนิฟิเคชัน (มก/ก)	193.2 ± 0.8	190.7
ปริมาณกรดไขมันอิสระ	9.8 ± 0.4	1.15

3.6 ผลผลิตของเนยโกโก้เทียม

ผลผลิตของเนยโกโก้เทียมที่เตรียมได้จากการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ 55% ของน้ำมันปาล์มที่ใช้

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมโดยไลเปสจากยางมะละกอนั้นทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท การใช้ไลเปสที่แยกได้จากยางมะละกอและทำให้แห้งด้วยไลโอไฟไลเซชันจะต้องทำให้เอนไซม์มีค่าแอกติวิตีเริ่มต้นอยู่ที่ 0.11 ก่อนจึงจะช่วยให้ไลเปสสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมได้ เมทิลสเตียเรทเป็นสารให้หมู่สเตียริลที่ไลเปสจากยางมะละกอชอบมากกว่าเอทิลสเตียเรทและกรดสเตียริก การหาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมจากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท พบว่าไลเปสจากยางมะละกอทำให้โครงสร้างของน้ำมันปาล์มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนยโกโก้เทียม ซึ่งมีองค์ประกอบและคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติที่สุด เมื่อใช้เอนไซม์ 18% โดยน้ำหนัก เร่งปฏิกิริยาของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรทในอัตราส่วน 1:4 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลผลิตของเนยโกโก้เทียมร้อยละ 55

4.1 ผลผลิตของไลเปสจากยางมะละกอ

ยางมะละกอที่ได้จากการกรีดผลมะละกอดิบที่มีอายุ 70-100 วัน ได้ถูกเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส ซึ่งช่วยรักษาประสิทธิภาพของไลเปสในระหว่างที่ทำการแยกไลเปสในขั้นตอนต่อมา ยางมะละกามีส่วนประกอบที่เป็นสารที่ไม่ละลายในสารละลายส่วนใส ซึ่งสามารถแยกออกได้ด้วยการเซนตริฟิวจ์ด้วยแรงเหวี่ยงค่อนข้างสูงคือ $9,500 \times g$ ตะกอนหรือสารส่วนที่ไม่ละลายที่แยกได้นี้ทำให้แห้งด้วยไลโอไฟไลเซชัน เพื่อเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลายาวนานมากขึ้น และช่วยกำจัดน้ำออกจากไลเปสให้มากที่สุด ทั้งนี้เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสควบคู่กับอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันที่ต้องการ ไลเปสที่แห้งแล้วมีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละ 10 ของน้ำหนักยางมะละกอ และมีแอกติวิตีในการไฮโดรไลสน้ำมันปาล์ม 725 ± 23 หน่วยต่อกรัมของตะกอนยางมะละกอแห้ง เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี Colorimetry ในขณะที่แอกติวิตีของไลเปสที่เตรียมได้จากยางมะละกอแห้งในทางการค้ามีค่าเท่ากับ 1700 หน่วยต่อกรัมเอนไซม์ เมื่อวัดการไฮโดรไลซ์ไตรบิวทีรีนด้วยวิธีการไตเตรท (Giordani, Moulin & Verger, 1991 : 1069-1072) ไลเปสจากยางมะละกอที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้เตรียมยางมะละกอร้อยละ 250 กรัม และยางมะละกอที่ใช้ได้มาจากสวนมะละกอในแหล่งที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตไลเปสและแอกติวิตีที่ได้นั้นมีความใกล้เคียงกัน ปริมาณน้ำยางที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ทั้งหมดประมาณ 10 กิโลกรัม

ไลเปสที่ทำแห้งแล้วด้วยไลโอไฟไลเซอรั่มมีปริมาณน้ำเหลืออยู่โดยเฉลี่ย 3.60% โดยน้ำหนักของเอนไซม์ และค่าแอสติวิตีน้ำของไลเปสแห้งมีค่า 0.396 ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์หรือในภาวะที่มีน้ำต่ำ

4.2 สภาพที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียม

การสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติจากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันนั้น พบว่าน้ำมันปาล์มเป็นสารที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นเนื่องจากมีองค์ประกอบของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติ โดยเฉพาะกรดโอเลอิกอยู่ตรงตำแหน่งที่ 2 ของกลีเซอรอล ซึ่งทำให้เนยโกโก้มีจุดหลอมเหลวที่ใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติ ดังนั้นการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มเพียงเล็กน้อยโดยการเติมหมู่สเตียริลลงไป ในโครงสร้างของน้ำมันปาล์ม ก็จะทำให้ได้เนยโกโก้เทียมที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเนยโกโก้ธรรมชาติได้

การดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มให้เป็นเนยโกโก้เทียม ด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันซึ่งเร่งด้วยเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารที่ทำหน้าที่ให้หมู่สเตียริลที่เหมาะสมที่สุดคือ เมทิลสเตียเรท โดยทำให้โครงสร้างของเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้มีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมีตึกใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งจะแตกต่างจากการใช้ไลเปสจาก *Rhizopus arrhizus* เร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม พบว่ากรดสเตียริก หรือ เมทิลสเตียเรทเป็นสารที่ให้หมู่สเตียริลที่เหมาะสมที่สุด (Bloomer, Adlercreutz & Mattiasson, 1990 : 519-524; Mojovic and others, 1993 : 438-443)

ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรทซึ่งเร่งด้วยไลเปสจากยางมะละกอนั้น ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้เนยโกโก้เทียมที่มีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมีตึกน้อยกว่าอัตราส่วนที่พบในเนยโกโก้ธรรมชาติ ทั้งนี้เพราะว่ากรดสเตียริกของเมทิลสเตียเรทที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส จะละลายได้ไม่ดี ก็เลยทำให้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เกิดได้ช้า (Wang and others, 2006 : 661-665) ในทำนองเดียวกันที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้มีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมีตึกต่ำกว่าเนยโกโก้ธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากว่าที่อุณหภูมิสูง ไลเปสจากยางมะละกอจะถูก ความร้อนทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ได้ จึงทำให้เอนไซม์มีแอสติวิตีต่ำลงได้ (Minifie, 1989 : unpagged)

การเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอ เมื่อใช้น้ำมันปาล์มและเมทิลสเตียเรทเป็นสารตั้งต้น ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง เนย

โกโก้เทียมที่ได้มีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมีทิกใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติ แต่ถ้าเวลามากขึ้นจะทำให้เนยโกโก้เทียมมีปริมาณกรดสเตียริกมากขึ้นไป ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมคือ เวลาที่ 4 ชั่วโมง

การปรับปริมาณแอกติวิตีน้ำของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอโดยวิธีแช่ในไอเอ็มตัวของเกลือที่มีค่าแอกติวิตีน้ำต่าง ๆ กัน จากการที่ไลเปสจากยางมะละกอซึ่งมีค่าแอกติวิตีน้ำ 0.11 สามารถเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรทได้ดีที่สุด เพราะว่า ในการเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสนั้น จะมีปฏิกิริยาเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน คือ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะเป็นสารตั้งต้นให้กับปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ดังนั้นถ้าปริมาณน้ำของเอนไซม์ซึ่งมีความสำคัญในการรักษาสภาพของเอนไซม์ มีมากเกินไปเอนไซม์ก็จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าเอสเทอร์ฟิเคชันก็จะทำให้ได้ผลผลิตเนยโกโก้เทียมน้อยลง แต่จะได้ผลผลิตข้างเคียงมากขึ้นเช่น ไดเอซิลกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Wang and others, 2006 : 661-665)

ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอก็มีผลต่อเนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ขึ้นด้วย การเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ก็จะเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันด้วย โดยปริมาณที่เหมาะสมที่สุดคือใช้เอนไซม์ร้อยละ 18 ของน้ำหนักน้ำมันปาล์มที่ใช้ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นไปอีกก็ไม่ได้ทำให้ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

อัตราส่วนโมลของน้ำมันปาล์มต่อเมทิลสเตียเรทมีผลกระทบต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันที่เร่งด้วยไลเปสจากยางมะละกอ การใช้อัตราส่วนโมลของเมทิลสเตียเรทเป็น 4-6 เท่าของน้ำมันปาล์ม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มได้มากกว่าการใช้เมทิลสเตียเรทในจำนวนโมลที่เท่ากับน้ำมันปาล์ม หรือน้อยกว่า 4 เท่า ซึ่งจะเห็นได้จากโครงสร้างของเนยโกโก้เทียมเมื่อใช้อัตราส่วนเมทิลสเตียเรทเป็น 4 เท่าของน้ำมันปาล์ม จะมีอัตราส่วนของกรดสเตียริกต่อกรดปาล์มมีทิกใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติ

4.3 คุณสมบัติทางกายภาพของเนยโกโก้เทียม

เนยโกโก้เทียมที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์มกับเมทิลสเตียเรท เมื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเพื่อเปรียบเทียบกับเนยโกโก้ธรรมชาติ พบว่าเนยโกโก้เทียมมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 37-39 องศาเซลเซียส มีค่าไอโอดีน 44.89 ± 0.84 กรัมต่อ 100 กรัม และมีค่าสปอนิฟิเคชัน 193.19 ± 0.78 มก/ก ซึ่งใกล้เคียงกับเนยโกโก้ธรรมชาติ ยกเว้นปริมาณของกรดไขมันซึ่งคิดในรูปของกรดปาล์มมีทิกของเนยโกโก้เทียมมีค่า

เท่ากับ 9.75 ± 0.41 ซึ่งสูงกว่าเนยโกโก้ธรรมชาติมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันปาล์ม (Bloomer, Adlercreutz & Mattiasson, 1990 : 519-524)

4.4 ผลผลิตของเนยโกโก้เทียม

การทดสอบการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมโดยการดัดแปลงโครงสร้างของน้ำมันปาล์มด้วยปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งเร่งด้วยไลเปสจากยางมะละกอภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วนโมลของเมทิลสเตียเรตเป็น 4 เท่าของน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์ไลเปสจากยางมะละกอที่ใช้มีค่าแอกติวิตีน้ำ 0.11 และปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คิดเป็นร้อยละ 18 ของน้ำมันปาล์มที่ใช้ เมื่อคำนวณผลผลิตที่เกิดขึ้นพบว่าสามารถสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมคิดเป็นร้อยละ 55 ของน้ำมันปาล์มที่ใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับการเร่งปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันเมล็ดชากับเมทิลสเตียเรตและเมทิลปาล์มมิเทต ของไลเปสจากตับอ่อน ซึ่งได้ผลผลิตเนยโกโก้เทียมคิดเป็นร้อยละ 25.6 ของน้ำมันเมล็ดชาที่ใช้ (Wang and others, 2006 : 661-665) จะเห็นได้ว่าไลเปสจากยางมะละกอมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เนยโกโก้เทียมได้ดี

บรรณานุกรม

- สุวรรณ สุกิมเรศ. (2543). กรรมวิธีการผลิต เทคนิค และอุปกรณ์ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากโกโก้และช็อกโกแลต. ในเทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและช็อกโกแลต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- Angkanurukpun, P. (2006). Methanolysis of triglycerides by lipase from *carica papaya* latex for biodiesel fuel synthesis. PhD Thesis. Chiang Mai University. Thailand.
- AOAC. (1990). Official method of analysis of the association of official analytical chemists. 15th Edn. Arlington. USA.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P. & Mattiasson, B. (1990). Triglyceride interesterification by lipase. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 67 : 519-524.
- Boyer, R.F. (1993). Modern experimental biochemistry. 2nd Edn. California. Benjamin/Cummings.
- Caro, Y., Villeneuve, P., Pina, M., Reynes, M. & Graille, J. (2000). Investigation of crude latex from various *Carica papaya* varieties for lipid bioconversions. J. Am. Oil Chem. Soc. 77 : 891-901.
- Chang, M.K., Abraham, G. & John, V.T. (1990) Production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 67 : 832-834.
- Chong, C.N., Hon, Y.M. & Wang, C.M. (1992). Fractionation procedures for obtaining cocoa butter-like fat bloom enzymatically interesterified palm olein. J. Am. Oil Chem. Soc. 96 : 137-140.
- Davis, T.R. & Dimic, P.S. (1989). Isolation and thermal characterization of high-melting seed crystals formed during cocoa butter solidification. J. Am. Oil Chem. Soc. 66 : 1488.
- Foglia, T.A. & Villeneuve, P. (1997). *Carica papaya* latex lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. J. Am. Oil Chem. Soc. 74 : 1447-1450.
- Gegiou, D. & Staphylakis, K. (1985). Detection of cocoa butter equivalents in chocolate. J. Am. Oil Chem. Soc. 62: 1047-1051.
- Giordani, R., Moulin, A., & Verger, R. (1991). Tributyrilglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other lattices. Phytochemistry. 30 : 1069-1072.

- Goh, E.M. & Berhad, L.M. (2002). Applications and uses of palm and palm kernel oils in speciality products. *Malaysian Oil Sci. and Tech.* 11 : 46-50.
- Graille, J.M., Pina, D.M. & Muderwha, J.M. (1991). Making value-added products from palm oil by 1,3-regioselectivity enzymatic interesterification. *Elaeis.* 41 : 10-13.
- IUPAC. (1979). Standard methods for the analysis of oils, fat and derivatives. 6 th Edn. Pergamon Press. Oxford.
- Khumalo, L.W., Majoko, L., Read, J.S. & Ncube, I. (2002). Characterisation of some underutilized vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. *Ind. Crops Products.* 16 : 237-244.
- Krishnamurthy, G.V., Bhatia, B.S., Lal, G. & Subramanyan, V. (1960). Pilot plant studies on the preparation of crude papain from raw papaya. *J. Sci. Food Agric.* 11 : 433-436.
- Lawler, P.J. & Dimick, P.S. (1998). Crystallization and polymorphism of fat. In food lipid: chemistry, nutrition and biotechnology. (Akon, L.C. and Min, D.B., eds.), p. 229-247. Marcel Dekker. New York.
- Lipp, M. & Auklam, E. (1998). Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate: Part A. *Food Chem.* 62 : 73-97.
- 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.
- Loisel, C., Lecq, D., Keller, G. & Ollivon, M. (1998). Dynamic crystallization of dark chocolate as affected by temperature and lipid additive. *J. Food Sci.* 63 : 73-79.
- Macrae, A.R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60 : 291-294.
- Mardigal, L., Ortiz, A., Cooke, R.D. & Fernandez, R. (1980). The dependence of crude papain yield on different collection (tapping) procedures for papaya latex. *J. Sci. Food Agric.* 31 : 279-285.
- Minifie, B.W. (1989). *Chocolate cocoa and confectionery : Science and Technology.* 3 th Edn. AVI Book Publishing Company. Inc. New York.
- Mojovic, L., Siler-Marin Kovic, S., Kukic, G. & Vunjak-Novakovic, G. (1993). *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the mid-fraction of palm oil to a cocoa

- butter equivalent fat. *Enzyme Microb. Technol.* 15 : 438-443.
- Moussaoui, A.E.I., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vincentelli, J., Azarkan, M. & Looze, Y. (2001). Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 : 556-570.
- Padley, F., Gunstone, F. & Harwood, J. (1986). Occurrence and characteristics of oils and fats; in Padley, F., Gunstone, F., Harwood, J., eds., *The Lipid Handbook*. Chapman and Hall Ltd. London. 49-170.
- Patron, A. (1952). Papain production, properties and utilization. *Fruit.* 7 : 57-61.
- Reddy, S.Y. & Prabhakar, J.V. (1990). Cocoa butter substitutes from Sal (*Shorea robusta*) fat. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25 : 711-717.
- Reddy, S.Y. & Prabhakar, J.V. (1994). Cocoa butter extenders from kokum (*Garrinia indikar*) and phuwara (*Madhuca butyracea*) butter. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 : 1-3.
- Shukla, V.K.S. (1996). Confectionery fats; in Hamilton, R.J., eds., *The developments in oil and fats*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. 66-94.
- Tanaka, Y., Irinatsu, y., Noguchi, A. & Kobayashi, T. (1987). Substitute composition cocoa butter. U.S. Patent 4705692.
- Undurraga, D., Markouits, A. & Erazo, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochem.* 36 : 933-939.
- Villeneuve, P., Skarbek, A., Pina, M., Graille, J. & Foglia, T.A. (1997). Catalytic behavior of *Carica papaya* latex in transesterification reactions, *Biotech. Tech.* 11 : 637-639.
- Villeneuve, P., Pina, M., Skarbek, A., Graille, J. & Foglia, T.A. (1997). Specificity of *Carica papaya* latex in lipase-catalyzed interesterification reactions. *Biotechnol. Tech.* 11 : 91-94.
- Wainwright, R.E. (1996). Oils and fats in confections. In Bailey's Industrial oil and fat product. Vol. 3 (Hui, Y.H., ed.). p. 353-407. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Wang, H.X., Wu, H., Ho, C.T. & Weng, X.C. (2006). Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry.* 97 : 661-665.

ภาคผนวก 1

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Porntippa Pinyaphong and Suree Phutrakul. Synthesis of cocoa butter equivalent from palm oil by *Carica papaya* lipase-catalyzed interesterification, Chiang Mai J. Sci. 2009, 36(3) : 001-010.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ในด้านเชิงวิชาการ มีการนำไปใช้กับการเรียนการสอนนักศึกษาปริญญาตรี ในวิชาชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับเรื่องของไขมันและเอนไซม์ และเป็นการสร้างให้นักวิจัยมีความเชี่ยวชาญทางด้านการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับไขมันและน้ำมัน ทำให้เกิดแรงบันดาลใจในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมเกี่ยวกับไขมันและน้ำมัน และนำไปสู่การเขียนตำราที่เกี่ยวกับน้ำมันและไขมัน

3. อื่น ๆ

งานวิจัยนี้ได้ไปนำเสนอด้วยวาจาในการประชุม International Conference on Biotechnology and Food Engineering 2009 ณ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส ในวันที่ 24-26 มิถุนายน 2552