

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

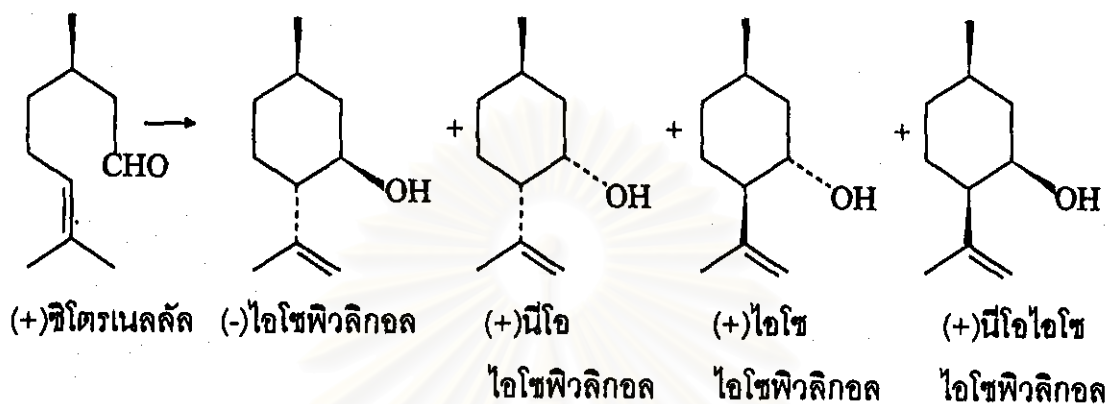
2.1 บทนำ

การศึกษาถึงปฏิกิริยาการแยกสารผสมเรซิมิกเมนทอล โดยใช้ไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ จะต้องมีการค้นหาหาข้อมูลในหลายๆ หัวข้อ ซึ่งจะแบ่งเป็นสามส่วน คือส่วนแรกจะเกี่ยวกับลักษณะโดยทั่วไปของเมนทอล ส่วนที่สองเป็นเรื่องการประยุกต์ใช้ไลเปสในตัวกลางที่ต่างกัน แล้วส่วนสุดท้ายจะเน้นลงไปในตัวข้องานวิจัยเกี่ยวกับปฏิกิริยาการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้ไลเปส

2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเมนทอล

เมนทอล (menthol or p-menthane-3-ol or 5-methyl-2-(1-methylethyl) cyclohexanol) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{10}H_{20}O$ ซึ่งสูตรโครงสร้างสามารถแสดงได้ตามรูปที่ 2.1 โดยลักษณะของเมนทอลจะประกอบด้วยสองไอโซเมอร์ในรูปแบบของ (+)เมนทอล และ (-)เมนทอล และถ้าในสารผสมของเมนทอลมีปริมาณของเมนทอลในสองไอโซเมอร์ที่เท่ากัน จะเรียกสารผสมของเมนทอลนี้ว่า เรซิมิกเมนทอล

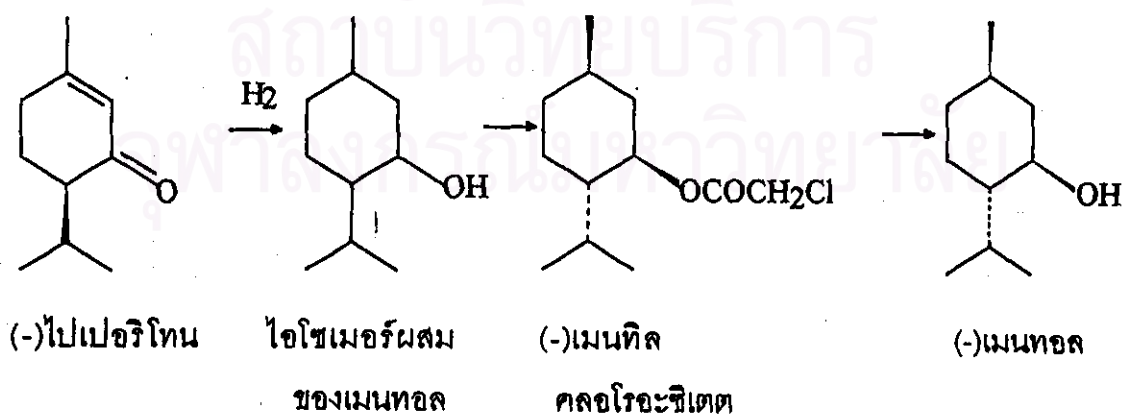
ขึ้นและทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจน เพื่อให้ได้เป็นของผสมเมนทอล แล้วผ่านกระบวนการกลั่นอีกครั้งหนึ่งเพื่อแยกไอโซเมอร์ลบออกมา



รูปที่ 2.2 ผลผลิตที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ (+)ซิโตรเนลลัล

2.2.3 (-)เมนทอลจาก (-)ไปเปอริโตน ((-)-piperitone)

(-)ไปเปอริโตน สามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจน แล้วได้เป็นของผสมเมนทอล ซึ่ง (-)เมนทอลจะถูกแยกออกโดยการตกผลึก และทำปฏิกิริยากับสารละลายเกลือของคลอโรอะซิเตต (chloroacetate) ตามรูปที่ 2.3



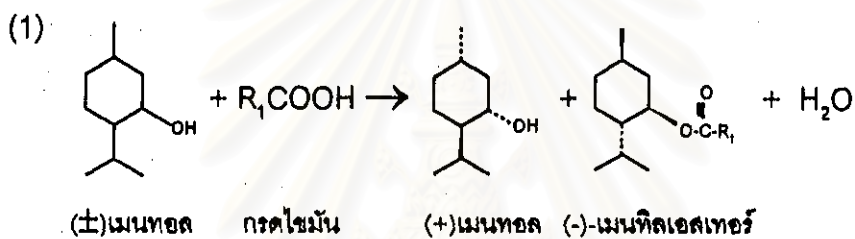
รูปที่ 2.3 ผลผลิตของ (-)เมนทอลที่เกิดจาก (-)ไปเปอริโตน.

(-)เมนทอลเป็นไอโซเมอร์ที่เกิดขึ้นจากการสกัดทางธรรมชาติของพืชจำพวก สะระแหน่ หรือที่รู้จักกันคือมินต์หรือเปปเปอร์มินต์ ซึ่งจัดอยู่ในตระกูลของ *Mentha piperita* ส่วนในการสังเคราะห์จากสารที่มีสูตรโมเลกุลใกล้เคียงกับเมนทอล เช่น (+)ซิโตรเนลลัล ((+)-citronellal), (-)ไปเปอริโทน ((-)-piperitone), (+)3-คาร์วีน ((+)-3-carene) จะได้ผลผลิตเป็นสารผสม (+)เมนทอล คือ สารผสมที่มีเมนทอลไอโซเมอร์ลบและไอโซเมอร์บวกใน ปริมาณที่เท่ากันผสมอยู่ ซึ่งสารผสมที่ได้จะมีคุณสมบัติ (เช่น ความว่องไวในการเกิด ปฏิกิริยา ความสามารถในการนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ เช่นส่วนผสมของเครื่องสำอาง, การทำ เกสซกรรม) ที่ต่ำกว่าเมนทอลที่เป็นไอโซเมอร์ลบ ประกอบกับราคาของ (+)เมนทอลจะต่ำ กว่าของ (-)เมนทอล คือ (-)เมนทอลราคาประมาณ 41,000 บาทต่อกิโลกรัม ส่วน (+)เมนทอลราคาประมาณ 9,240 บาทต่อกิโลกรัม (เป็นราคาที่ซื้อมาจากบริษัท Aldrich ใน ช่วงปลายปี 1996) ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับการแยกไอโซเมอร์ลบออกจากไอโซ เมอร์ผสมของ (+) ซึ่งปกติจะแยกโดยการทำปฏิกิริยากับตัวกระตุ้นทางเคมี (chemical catalyst) โดยใช้สภาวะของการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและความดันสูง ทำให้เสี่ยงต่อการ เกิดอันตราย และเกิดผลผลิตข้างเคียงจากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและความดันสูงได้มาก ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในส่วนของพลังงานและการกำจัดผลผลิตข้างเคียงที่ไม่ต้องการ ออกจากระบบ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาปฏิกิริยาการแยก (+)เมนทอล โดยใช้เอนไซม์เป็นตัว เร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst) เพราะเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดได้ใน ภาวะอุณหภูมิและความดันปกติ ประกอบกับเอนไซม์ยังมีลักษณะเลือกเกิดปฏิกิริยาเฉพาะ กับกลุ่มสารที่จะทำปฏิกิริยา ทำให้ปัญหาของการเกิดผลผลิตข้างเคียงที่ไม่ต้องการนั้นหมด ไป

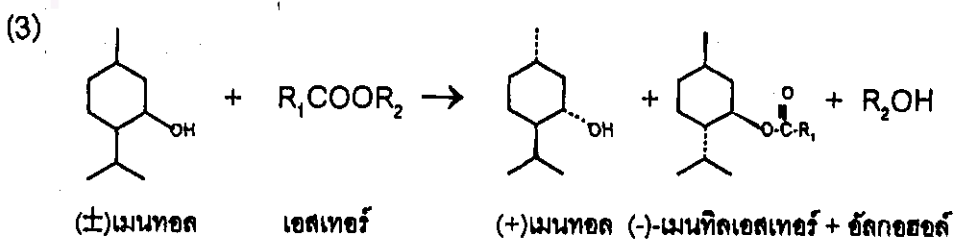
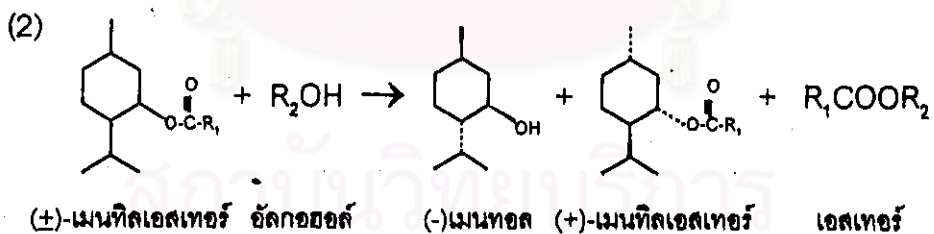
ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการแยก (+)เมนทอล คือ (-)เมนทิลเอสเทอร์ ซึ่งมี คุณสมบัติที่เหมาะสมกับการใช้เป็นสารเติมแต่งกลิ่นและรสอาหาร จะใช้ (-)เมนทิลเอสเทอร์กัน มากในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ (-)เมนทิลเอสเทอร์ ยังสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส กับน้ำได้ ซึ่งผลผลิตที่เกิดขึ้นจะได้เป็น (-)เมนทอล

การแยก (-)เมนทอลออกจาก (+)เมนทอล โดยใช้เอนไซม์มาเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา สามารถทำได้ในสามปฏิกิริยาคือ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification reaction) [Stamatis และคณะ, 1993a,b,c., Kamiya และคณะ, 1995.], ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification reaction) [Lokotsch และคณะ, 1989., Langrand และคณะ, 1986.], และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis reaction) [Langrand และคณะ, 1986]

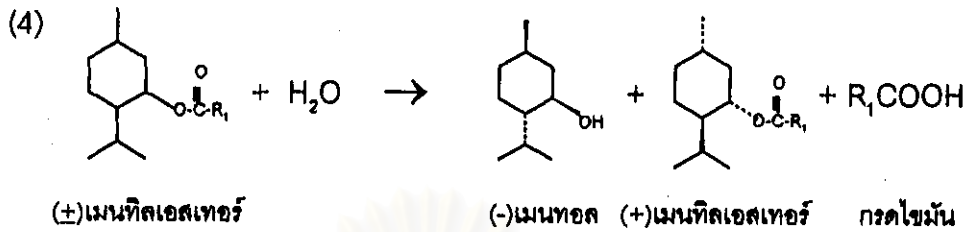
ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน;



ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน;



ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส:



2.3 การประยุกต์ใช้งานของไลเปส

ไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ที่ให้แอกติวิตี้สูงในตัวทำละลายน้ำ ซึ่งจะมีผลต่อการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส, ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน, และอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีน้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการทำปฏิกิริยาของไลเปส แต่ถ้าสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานั้นมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย ทำให้สารตั้งต้นมีโอกาสสัมผัสกับไลเปสแล้วเกิดปฏิกิริยาได้น้อยด้วย ดังนั้นจึงมีการประยุกต์นำเอาไลเปสมาทำปฏิกิริยาในระบบตัวทำละลายอื่นเพื่อให้สารตั้งต้นสามารถละลายในตัวทำละลายได้มากขึ้น ซึ่งในระบบตัวทำละลายอื่นๆ จำเป็นต้องมีน้ำอยู่ในระบบบ้าง เพื่อรักษาโครงสร้างของไลเปสไว้ไม่ให้เสียรูป ซึ่งสามารถจัดตัวกลางที่มีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือตัวกลางของตัวทำละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ

2.3.1 ไลเปสในตัวทำละลายน้ำ

ตัวเร่งปฏิกิริยาไลเปสในตัวทำละลายน้ำมักจะกล่าวถึงในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอสเทอร์ ซึ่งการศึกษาส่วนมากจะสนใจในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ [Posorske, 1984] ที่ได้ผลผลิตเป็น กรดไขมัน, กลีเซอรอล, โมโน- และ ได-กลีเซอไรด์ โดยในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์นั้น ไลเปสจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ในตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 เพราะไลเปสจะมีคุณสมบัติที่จำเพาะ ต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารในตำแหน่งที่ต่างกันของสารที่ทำปฏิกิริยา ซึ่ง Posorske (1984) ได้ศึกษาปฏิกิริยา

ไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ โดยมีไลเปสสองชนิด คือ *Candida cylindracea* กับ *Mucor miehei* เป็นตัวกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา เขาพบว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* สามารถทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ได้ในทุกตำแหน่ง หรือความยาวของโซ่ในหมู่เอซิลทั้งสามที่จับกับกลีเซอรอลแล้วเป็นไตรกลีเซอไรด์ ในขณะที่ไลเปสจาก *Mucor miehei* จะมีผลกระตุ้นต่อการเกิดปฏิกิริยาในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์

2.3.2 ไลเปสในตัวทำละลายที่ไม่ใช่น้ำ

น้ำจัดเป็นตัวทำละลายที่รักษาสภาพโครงสร้างของไลเปสไว้ แต่ถ้าในระบบมีตัวทำละลายอินทรีย์ ก็จะมีผลทำให้ไลเปสสูญเสียสภาพไป แต่การมีตัวทำละลายอินทรีย์จะไปเพิ่มความสามารถในการละลายของสารตั้งต้นที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ดังนั้นการศึกษาในตัวกลางที่ไม่ใช่น้ำสามารถแบ่งได้เป็นสองชนิดคือ ตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ และรีเวิร์สไมเซลล์

2.3.2.1 ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์

ไลเปสสามารถนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ สำหรับการผลิตสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำเช่น เทอเพิน (terpene) [Foumeron และคณะ, 1990., Claon และ Akoh, 1994., Yee และคณะ, 1995.], เอสเทอร์ที่มีกลิ่น (flavor ester) [Langrand และคณะ, 1988., Monot และคณะ, 1991.], กลีเซอรอล (glycerol) [Wang และคณะ, 1988., Janssen และคณะ, 1993.], เอสเทอร์จำพวกน้ำตาล (sugar ester) [Therisod และคณะ, 1986 และ 1987., Chopineau et al, 1988.], กรดไขมันและน้ำมัน (fat and oil) [Macrae, 1983., Linfield และคณะ, 1984.] โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะเกี่ยวกับปฏิกิริยาของเอสเทอร์ระหว่างกรดกับอัลกอฮอล์ หรืออาจเป็นปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันและอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน

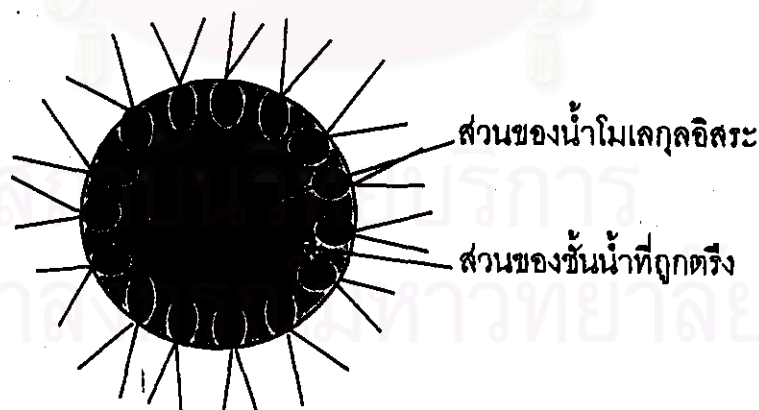
ความสามารถของไลเปสในการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาการแยก จะขึ้นกับชนิดของ อะซิลโดเนอร์ (acetyl donor) ซึ่ง Langrand และคณะ (1988) ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานเอส เทอริฟิเคชันของอัลกอฮอล์กับเอสเทอร์ โดยใช้เอสเทอร์เป็นอะซิลโดเนอร์ (ถ้าใช้กรดไขมัน แทนเอสเทอร์จะเป็นปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน) เขาพบว่าข้อได้เปรียบของปฏิกิริยาทรานเอส เทอริฟิเคชันเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันคือ ไม่เกิดน้ำขึ้นหลังจากการเกิด ปฏิกิริยา ทำให้เอนไซม์ในระบบมีความเสถียรได้สูงกว่า ความสำคัญของน้ำที่มีต่อเอนไซม์ยัง ได้มีการศึกษาต่อโดย Zaks และ Klivanov (1988) พบว่าในกรณีที่ไม่เกิดน้ำในปฏิกิริยา เอนไซม์จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้เหมาะสมขึ้น เพราะเมื่อระบบมีน้ำสูงขึ้นจะทำเอนไซม์ เกาะกลุ่มกัน ทำให้ได้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะถูกจำกัดขอบเขตของ การถ่ายเทมวลของสารตั้งต้น

ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในระบบมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา ซึ่ง Goldberg และคณะ (1990) ได้ศึกษาถึงลักษณะของน้ำ โดยดูผลในแอกติวิตีของน้ำ (water activity, a_w) ของ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันและปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันที่มีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีสารตั้งต้นเป็นตัวทำละลาย เขาพบว่าเมื่อน้ำมีแอกติวิตีสูงขึ้น จะทำให้อัตราการเกิด ปฏิกิริยาสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อค่าแอกติวิตีของน้ำสูงมากๆ ก็อาจจะทำให้เอนไซม์ถูก โมเลกุลของน้ำล้อมรอบไว้มาก ทำให้การแพร่ของสารตั้งต้นที่ไม่ละลายน้ำนั้นถูกจำกัดให้ น้อยลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงลดลง

นอกจากนี้ Chen และคณะ (1987) ก็ได้ศึกษาผลในโครงสร้างของสารตั้งต้นต่อการ เกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน พบว่าอัลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ (primary alcohol) จะให้อัตรา การเกิดปฏิกิริยาที่สูงกว่า ส่วน Claon และ Akoh (1994) ก็ได้ใช้อะซิลโดเนอร์น้ำชนิด สำหรับปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน และพบว่าไอโซโพรพิลอะซิเตต (isopropenyl acetate) และไตรอะซิเตน (triacetin) จัดเป็นอะซิลโดเนอร์ที่เหมาะสมมากสำหรับปฏิกิริยา อินเตอร์เอสเทอริฟิเคชันของเทอฟินเอสเทอร์ที่มีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งไลเปสจาก *Candida cylindracea* จะให้สัดส่วนการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดสำหรับเทอฟินเอสเทอร์

2.3.2.2 โลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์

โครงสร้างของระบบรีเวิร์สไมเซลล์จะประกอบด้วยสารละลายโลเปส ซึ่งละลายอยู่ในหยดน้ำ และถูกปกป้องจากตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยชั้นของสารลดแรงตึงผิว น้ำที่อยู่ในหยดน้ำจะมีคุณสมบัติที่ต่างจากน้ำที่อยู่ตามปกติ (bulk water) [Jain และคณะ, 1989] โดยโมเลกุลของน้ำในไมเซลล์จะประกอบด้วยส่วนของชั้นน้ำที่ถูกตรึง (bound water) ซึ่งอยู่บริเวณส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิว จะเกิดแรงที่มาจากการทำงานของระหว่างโมเลกุลของน้ำกับส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว ทำให้น้ำในบริเวณนี้มีคุณสมบัติ เช่นความหนืด ความสามารถในการเคลื่อนตัว (mobility) ที่แตกต่างออกไปจากน้ำโมเลกุลอิสระ (free water) (Kuntz และ Kauzmann, 1974) และส่วนของน้ำโมเลกุลอิสระ (free water) ที่อยู่ตรงแกนกลางของไมเซลล์ จะมีคุณสมบัติเข้าใกล้ความเป็นน้ำตามธรรมชาติ ตามรูปที่ 2.4 ซึ่งในงานวิจัยของ Jain (1989) ได้แสดงถึงความแตกต่างของจำนวนชั้นน้ำที่ถูกตรึงต่อสารลดแรงตึงผิว (n_b) และจำนวนน้ำโมเลกุลอิสระต่อสารลดแรงตึงผิว (n_f) ในระบบ AOT / น้ำ / ไฮโซ ออกเทน รีเวิร์สไมเซลล์ ตามตาราง 2.1

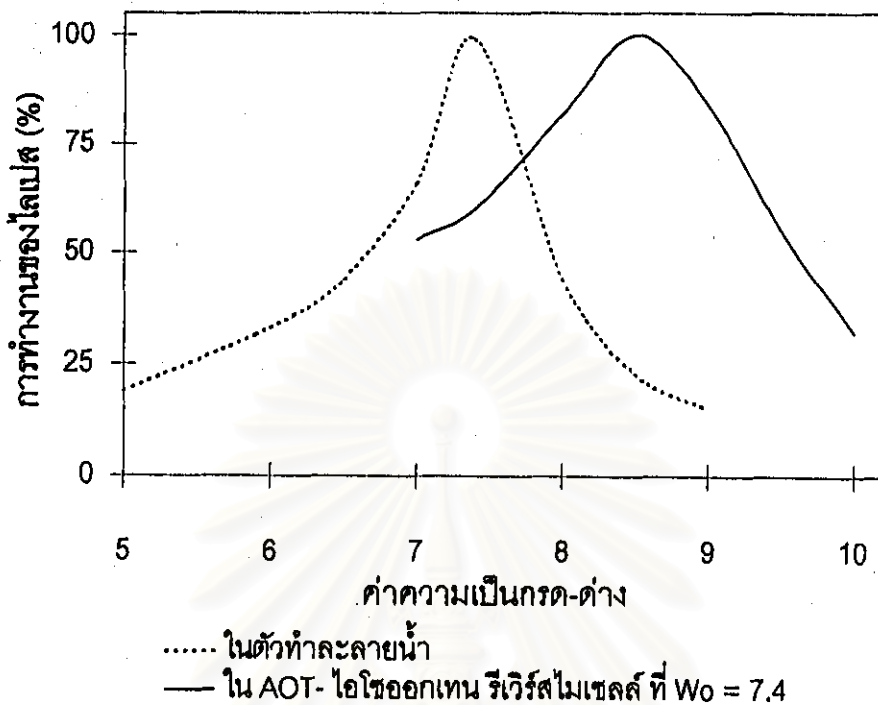


รูปที่ 2.4 แผนภาพโครงสร้างภายในไมเซลล์

ตารางที่ 2.1 จำนวนชั้นน้ำที่ถูกต้องและน้ำโมเลกุลอิสระต่อ AOT ที่ W_0 ต่างกัน

W_0	น้ำ/AOT/ ไอโซออกเทน รีเวิร์สไมเซลล์	
	n_B	n_F
5	2	3
10	5	5
13	8	5
15	10	5
18	12	6
20	12	8
25	12	13
30	12	18
40	12	28

Han and Rhee (1985, 1986, 1987) ได้ศึกษาแอกติวิตี้ของไลเปสจาก *Candida cylindracea* สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอก (olive oil) ใน AOT / ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์ เขาพบว่าแอกติวิตี้ของไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์จะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมสูงกว่าในตัวทำละลายน้ำปกติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของน้ำในทั้งสองระบบแตกต่างกัน ทำให้ความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรด-ด่าง กับแอกติวิตี้ของไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์นั้นจะต่างจากในตัวทำละลายน้ำดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อแอกติวิตี้ของไลเปสในระบบที่ต่างกัน
[Leung และคณะ, 1991]

ผลงานวิจัยของ Borzeix (1992) ได้เปรียบเทียบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในรีเวิร์สไมเซลล์, ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารละลายน้ำขนาดเล็ก (microaqueous) ซึ่งเป็นระบบที่มีสององค์ประกอบคือ ตัวทำละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์โดยปริมาณน้ำในระบบที่ถูกใช้คือ 5 ถึง 10 % โดยปริมาตร เขาพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาในรีเวิร์สไมเซลล์จะมีค่าสูงกว่าในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่จะต่ำกว่าในตัวทำละลายน้ำขนาดเล็ก ทั้งนี้เพราะในระบบรีเวิร์สไมเซลล์นั้น สารตั้งต้นจะต้องมีการกระจายตัวอยู่ในชั้นของสารลดแรงตึงผิวด้วย ทำให้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในหยดน้ำของรีเวิร์สไมเซลล์ลดลงจึงมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาได้

ผลของตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของ (-)-เมนทอล กับกรดโอเลอิกในระบบ AOT รีเวิร์สไมเซลล์ ที่ถูกศึกษาโดย Stamatis และคณะ (1993c) พบว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต่างกัน จะให้ผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ต่างกันด้วย สำหรับไลเปสจาก *Penicillium simplicissimum* จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาได้สูงขึ้นเมื่อ

ปฏิกริยานั้นเกิดขึ้นในตัวทำละลายที่เป็นไอโซออกเทน นอกจากนั้น Han and Rhee (1986) ยังสนับสนุนว่าไอโซออกเทนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ผลดีกับปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอก โดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์

ขนาดและรูปร่างของรีเวิร์สไมเซลล์มีผลต่อแอกติวิตี้ของไลเปสในปฏิกริยาไฮโดรไลซิส, เอสเทอริฟิเคชัน และทรานเอสเทอริฟิเคชัน คือการที่ไมเซลล์มีขนาดและรูปร่างที่เปลี่ยนไป จะทำให้โครงสร้างของน้ำในไมเซลล์ต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของไลเปส ทำให้แอกติวิตี้ที่ได้นั้นต่างกัน โดยการเปลี่ยนชนิดของสารลดแรงตึงผิว ก็จะมีผลต่อการจัดโครงสร้างโมเลกุลของรีเวิร์สไมเซลล์ [Valis และคณะ, 1992] และลักษณะของสารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งได้เป็นสามประเภทตามชนิดของส่วนที่มีหัวของสารลดแรงตึงผิวคือ ส่วนที่มีหัวไม่มีประจุ (nonionic surfactant) เช่น polyoxyethylene sorbitan trioleate or tween 85, pentaethylene glycol monododecyl ether or $C_{12}EO_5$, ส่วนที่มีหัวมีประจุบวก (cationic surfactant) เช่น cetyltrimethyl ammonium bromide or CTAB, trioctylmethyl ammonium chloride, และส่วนที่มีหัวมีประจุลบ (anionic surfactant) เช่น sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate or aerosol OT or AOT, sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate or SDEHP

SDEHP เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีส่วนที่มีหัวเป็นประจุลบ ซึ่งจะถูกนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ เพราะ SDEHP มีส่วนที่ไม่มีหัวเหมือนกับ AOT ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีผู้ทำการศึกษาวิจัยมาอย่างกว้างขวาง [Stamatis และคณะ, 1993a,b,c., Han และ Rhee, 1986, และ 1987., Fletcher และคณะ, 1987., Valis และคณะ, 1992., Verhaert และคณะ, 1990.] แต่ส่วนที่มีหัวจะเล็กกว่า [Shioi และคณะ, 1991, และ 1993., Faure และคณะ, 1985, และ 1987., Hu และ Gulati, 1995.] ดังนั้นจึงเป็นจุดสำคัญที่น่าจะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกริยาในระบบของ SDEHP ว่าต่างจาก AOT รีเวิร์สไมเซลล์อย่างไร และมีข้อได้เปรียบ เสียเปรียบระบบที่ใช้ AOT อย่างไร เพราะขนาดส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิวที่เล็กกว่า ย่อมทำให้ไมเซลล์มีขนาดเล็กลง และอาจได้พื้นผิวระหว่างเฟสสูงขึ้น

2.4 ปฏิบัติการแยกของเรซิมิกเมนทอลโดยใช้ไลเปส

Langrand และคณะ, (1986) ได้ศึกษาปฏิบัติการสำหรับการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวกลางสองชนิด คือตัวกลางชนิดแรกทำการทดลองภายใต้สภาวะที่เป็นอิมัลชัน (ไลเปสละลายอยู่ในหยดน้ำที่มีสารตั้งต้นละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ) และตัวกลางที่สองคือระบบตัวทำละลายอินทรีย์ (ไลเปสจะแขวนลอยอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์) ซึ่งเขาได้แสดงผลและวิเคราะห์ผลโดยพิจารณาจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น, เปอร์เซนต์การเกิดปฏิกิริยาและเอแนนทิโอซีเลคตีวิตี (enantioselectivity) ตามตารางที่ 2.2 โดยในระบบของตัวทำละลายอิมัลชัน เขาพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่สูงสุดจะเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพราะน้ำที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยานั้นสามารถจะทำให้ไลเปสมีแอคตีวิตีและความเสถียรสูงขึ้น ส่วนอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันและปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในตัวทำละลายอินทรีย์นั้นจะต่ำกว่าในตัวทำละลายอิมัลชัน เพราะตัวทำละลายอินทรีย์จะมีผลไปทำลายชั้นของน้ำรอบๆ ไลเปส ทำให้ไลเปสนั้นเสียรูปไป แต่เอแนนทิโอซีเลคตีวิตีในระบบตัวทำละลายอินทรีย์จะสูงมาก (มากกว่า 95%) ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ทำภายใต้สภาวะอิมัลชันจะได้ต่ำกว่า (ประมาณ 70 ถึง 85%)

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดไขมันกับอัลกอฮอล์ จะได้ผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาเป็นน้ำเกิดขึ้นเสมอ ซึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสย้อนกลับได้ ซึ่ง Lokotsch และคณะ (1989) ได้ศึกษาในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของเมนทอลกับการเปลี่ยนตัวเอซิลโคเอนไซม์ โดยใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเขาพบว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* จะให้แอคตีวิตีสูงสุด เมื่อไลเปสมีน้ำเป็นสภาวะแวดล้อมอยู่ประมาณ 6% ซึ่งเขายังพบอีกว่าการเติมน้ำลงไปในตัวกลางของการเกิดปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อย (ในช่วงทดลอง 2 ถึง 30 ไมโครลิตร หรือ 0.02 ถึง 0.3% โดยปริมาตร) จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันในตัวทำละลายไฮโซออกเทนนั้นต่ำลง ทั้งนี้เพราะการเติมน้ำลงในตัวกลางของการเกิดปฏิกิริยาจะทำให้สมดุลของระบบเปลี่ยนไป เกิดเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสย้อนกลับซึ่งเขาพบว่าหลังจากการเติมน้ำลงไปในระบบแล้วจะทำให้เหลือน้ำล้อมรอบไลเปสเพียง 3% ทำให้

แอกติวิตี้ของไลเปสต่ำลง จะเห็นว่าปริมาณของน้ำในระบบมีผลต่อสภาวะแวดล้อมของ เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา ถึงแม้จะเป็นระบบตัวทำละลายอินทรีย์ก็ยังคงจำเป็นต้องมีน้ำล้อมรอบอยู่บ้าง ถ้าระบบที่ใช้สามารถทำให้ไลเปสอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำได้มาก อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาก็น่าจะมากขึ้น ดังนั้นจึงได้สนใจศึกษาถึงระบบรีเวิร์สไมเซลล์ที่มีเอนไซม์ละลายอยู่ในหยดน้ำเล็กๆ ของไมเซลล์จำนวนมาก ทำให้ระบบมีพื้นผิวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยานั้นสูงขึ้น

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบปฏิกิริยาสำหรับการแยกเรซิมีกเมนทอลโดยใช้ไลเปสในตัวทำละลายอิมัลชันและตัวทำละลายอินทรีย์

ปฏิกิริยาที่ศึกษา	ผลการทดลอง							
	ตัวทำละลายอิมัลชัน				ตัวทำละลายอินทรีย์			
สารตั้งต้น → ผลผลิต	initial rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ·g-enz ⁻¹)	conversion (%)	ee (%)	เวลา (hr)	initial rate ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ·g-enz ⁻¹)	conversion (%)	ee (%)	เวลา (hr)
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส: (±)เมนทิล ลอเลท + น้ำ → (-)เมนทอล	3400	38	70	1	-	-	-	-
ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน: (±)เมนทอล + กรดลอลิก → (-)เมนทิล ลอเลท	130-250	41	86	10	7.0	45	95	10
ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน: (±)เมนทิล ลอเลท+ เพนทานอล→(-)เมนทอล (±)เทนนอล + ไตรลอลิน →(-)เมนทิล ลอเลท	1.7	48	80	360	0.35	45	94	360
	-	-	-	-	5.0	33	95	360

การเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดปฏิกิริยาการแยกของเรซิมิกเมนทอล โดยใช้ไลเปสในระบบปริเวอริสไมเซลล์จะขึ้นกับชนิดและโครงสร้างของสารตั้งต้น รวมทั้งชนิดของไลเปส ซึ่ง Stamatis และคณะ (1993a) ได้ศึกษาไลเปสสามชนิดคือจาก Rhizopus delemar, Rhizopus arrhizus, and Penicillium simplicissimum โดยให้ไลเปสนั้นถูกห้อมล้อมด้วย AOT ในไอโซออกเทน และให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในไมเซลล์เป็นปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของอัลกอฮอล์จำพวกไฮดรอกซิล (aliphatic alcohol) เช่น เอทานอล (ethanol), โพรพานอล (propanol), บิวทานอล (butanol), เพนทานอล (pentanol), เฮกซานอล (hexanol), เฮปทานอล (heptanol), ออกทานอล (octanol), และโนแนนอล (nonanol) ทำปฏิกิริยากับกรดลอริก (lauric acid) นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลของกรดไขมันที่มีความยาวของโซ่ต่างกัน (เช่น คาพริลิก (caprylic), แคปริก (capric), ลอริก (lauric), มายลิสติก (myristic), ปาล์มิติก (palmitic), สเตอริก (stearic), และโอเลอิก (oleic)) กับชนิดของอัลกอฮอล์ (เช่น อัลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิ (primary alcohol) ได้แก่ 1-เพนทานอล (1-pentanol), 1-เฮกซานอล (1-hexanol), จีรานอล (geraniol), อัลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิ (secondary alcohol) ได้แก่ 2-เพนทานอล (2-pentanol), (-)เมนทอล ((-)menthol)), หรือ อัลกอฮอล์ชนิดตติยภูมิ (tertiary alcohol) ได้แก่ 2-เมทิล-บิวเทน-2-อล (2-methyl-butan-2-ol)) ที่มีต่อแอกติวิตีของไลเปส และลักษณะโครงสร้างของปริเวอริสไมเซลล์ (เช่นปริมาณน้ำที่มีในไมเซลล์, ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว, ความเป็นกรด-ด่าง, และอุณหภูมิ) ซึ่ง Stamatis และคณะ พบว่าไลเปสจาก Penicillium simplicissimum จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูงเมื่อใช้กรดไขมันที่มีความยาวโซ่มาก และเป็นอัลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิที่มีความยาวของโซ่มากด้วย รวมทั้งเป็นอัลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิ ในขณะที่ไลเปสจาก Rhizopus delemar, และ Rhizopus arrhizus จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูงเมื่อใช้กรดไขมันที่มีความยาวโซ่ปานกลางและใช้อัลกอฮอล์ชนิดปฐมภูมิที่มีความยาวของโซ่สั้น นอกจากนี้ไลเปสจาก Penicillium simplicissimum ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารที่มีลักษณะเฉพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาของเมนทอลกับกรดไขมัน โดย Stamatis และคณะ (1993c) ได้ใช้เมนทอลที่เป็นไอโซเมอร์ (+), (-), และ (+) มาเป็นสารตั้งต้น จะได้ว่า (+)เมนทอลจะเป็นสารที่ทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ส่วน (+)เมนทอลจะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำกว่าประมาณครึ่งหนึ่งของ (-)เมนทอล ส่วนชนิดของกรดไขมันที่นำมาทำปฏิกิริยากับเมนทอล ก็จะมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา [Langrand

และคณะ, 1986., Lokotch และคณะ, 1989] นั่นคืออัตราการผลิตปฏิกิริยาจะมีค่าสูงเมื่อกรดไขมันมีความยาวของโซ่มาก

การศึกษาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่างกรดลอริกกับ (-)-เมนทอล โดยใช้ไลเปสจาก *Penicillium simplicissimum* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบของ น้ำ/AOT/ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์ [Stamatis และคณะ, 1993b] เขาได้อ้างกลไกการเกิดปฏิกิริยาว่าเป็นไปตามกลไกของ ปิงปอง ไบ-ไบ (ping pong bi-bi mechanism) ซึ่งค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ที่ได้จากการทดลองจะเป็นค่าปรากฏ (apparent) เพราะระบบรีเวิร์สไมเซลล์ไม่ได้มีเพียงเฟสเดียว นอกจากนี้เขายังพบว่าในระบบดังกล่าวกรดลอริกจะเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเมื่อใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า 37 มิลลิโมลาร์ แต่ในงานวิจัยของ Kamiya และ Goto (1997) ได้ศึกษาในปฏิกิริยาเดียวกันกับของ Stamatis และคณะ คือปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของกรดลอริกกับ (-)-เมนทอลโดยใช้ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในระบบการคละไลเปสด้วยสารลดแรงตึงผิว เขาพบว่ากลไกการเกิดปฏิกิริยานั้นเป็นไปตามกลไกของปิงปอง ไบ-ไบ และมี (-)-เมนทอลเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา

กลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบปิงปอง ไบ-ไบ สำหรับสารตั้งต้นสองตัว จะมีลักษณะที่สารตั้งต้นตัวหนึ่งจับกับเอนไซม์ก่อนแล้วได้เป็นผลผลิต หลังจากนั้นเอนไซม์ตัวเดิมในรูปแบบใหม่ก็จะไปจับกับสารตั้งต้นอีกตัวที่เหลือ แล้วได้เป็นผลผลิตตัวที่สองออกมา ซึ่งในงานของ Stamatis และคณะ (1993b) เขาได้เสนอกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังแผนภาพข้างล่างคือ

