การกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย

นางสาวปิยาภรณ์ หรินพุทธศีล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ENCAPSULATION OF LIPASE BY SPRAY DRYING

Miss Piyaporn Harinputasil

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Acedemic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย
โดย	นางสาวปิยาภรณ์ หรินพุทธศีล
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ สุทธิธารธวัช

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรงค์ ปวราจารย์)

……อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ สุทธิธารธวัช)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ชรินพาณิชกุล)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. อุรชา รักษ์ตานนท์ชัย)

ปิยาภรณ์ หรินพุทธศีล : การกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย (ENCAPSULATION OF LIPASE BY SPRAY DRYING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ สุทธิธารธวัช, 101 หน้า

ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกนั้นเป็นอุตสาหกรรมหลักที่ใช้เอนไซม์มากที่สุดทั้งในด้านปริมาณการใช้และมูลค่าทางการตลาด โดยไลเปสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญเกี่ยวกับเทคโนโลยีทางชีวภาพ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากธรรมชาติ ในการใช้เอนไซม์เป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกนั้นทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดคราบสกปรกที่ยึดติดบนเสื้อผ้าได้ดีขึ้นอีกทั้งยังปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ผงซักฟอกในปัจจุบันนั้นประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส อย่างไรก็ตามเอนไซม์นั้นไม่เสถียรต่อสภาพแวดล้อม และการเก็บรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการซักล้าง ดังนั้นในงานวิจัยนี้เพื่อทำการศึกษาการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยการทำให้เอนไซม์ไลเปสอยู่ในรูปของผงเอนไซม์แห้ง เพื่อให้มีความเสถียรต่อการใช้งานและการเก็บรักษามากขึ้น งานวิจัยนี้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า, ปริมาณไลโปเลส 100 แอล ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสที่จำหน่ายเชิงพาณิชย์ ต่อน้ำหนักแป้งมอลโตเดกซ์ตริน, ความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ติน DE 10 และแคลเซียมคลอไรด์ โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าและปริมาณไลโปเลส 100 แอลมีค่ามากขึ้น ส่งผงให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ลดลง และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินสูงขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์สูงขึ้น โดยการเติมแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการกักเก็บไลโปเลส 100 แอล จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าประสิทธิภาพของการกักเก็บไลโปเลส 100 แอลที่ดีที่สุดนั้นจะใช้อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส, ปริมาณไลโปเลส 100 แอล 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม, ความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก โดยค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับค่าแอคติวิตี้ก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอย และจากการศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์โดยใช้เครื่อง EDX และกล้องคอนโฟคอล พบว่าเอนไซม์จะอยู่บริเวณผิวของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งมากกว่าอยู่ภายในอนุภาค โดยที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้าไม่มีผลต่อการกระจายตัวของเอนไซม์

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2556.....

##5470971621 : MOJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: ENZYME LIPASE / SPRAY DRYING

PIYAPORN HARINPUTTASIL: ENCAPSULATION OF LIPASE BY SPRAY DRYING, ADVISOR: ASST. PROF. APINAN SOOTTITANTAWAT, D.Eng., 101 pp.

Lipases represent an important group of biotechnologically valuable enzymes. They are widely distributed in nature. Detergent industries are the primary consumers of enzymes, in terms of both volume and value. The use of enzymes in detergents formulations enhances the detergents ability to remove tough stains and making the detergent environmentally safe. Nowadays, many laundry-detergent products contain cocktails of enzymes including proteases, amylases, cellulases, and lipases. However, almost of enzyme are not stable especially as the laundry conditions as well as the storage conditions. In this study, the encapsulation of lipase by spray drying process was investigated to stabilize and formulate the lipases in the solid powder form. Maltodextrin DE 10 and Lipolase 100 L, which is a commercial lipase from *Thermomyces lanuginosus*, were used as wall material and core material, respectively. The effect of solid content (10- 40%), lipase content (5-40ml), $CaCl_2$ content (0-10 mM) and inlet air temperature 110-140°C on the remaining activity of encapsulated lipase were investigated. Furthermore, the morphology, moisture content, the stability of encapsulated lipase were also studied. This study indicated that maltodextrin DE 10 40%wt., lipolase 100 L 10 ml : 20 g of maltodextrin DE 10 and air inlet temperature 110°C lipase recovery was about 90 %. The moisture content of lipase powder were not significantly difference. $CaCl_2$ did not affect to the remaining activity of encapsulated lipolase 100 L. The position of encapsulated lipase was also investigated by EDX and CLSM, where enzyme was found on surface of particle rather than inside the particles. The air inlet temperature is not effect on enzyme location.

Department: ……Chemical Engineering…….. Student's Signature: .....

Field of Study: ……Chemical Engineering..... Advisor's Signature: …….....

Academic Year……...2013……...

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดนั้นต้องขอบคุณผู้มีพระคุณทั้งหลายที่อำนวยความสะดวกในการขอใช้เครื่องมือวิเคราะห์ ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา และให้กำลังใจเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้จำไม่สำเร็จได้ถ้าปราศจากบุคคลที่จะกล่าวขอขอบคุณ ดังต่อไปนี้

ผศ. ดร. อภินันท์ สุทธิธารธวัช ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ในการให้คำแนะนำตลอดการศึกษาทั้งในเรื่องการเรียนและการทำงานวิจัย อีกทั้งยังเป็นบุคคลหนึ่งที่ให้กำลังใจเสมอมา , รศ. ดร. ธวัชชัย ชรินพาณิชกุล, ผศ. ดร. วรงค์ ปวราจารย์ และ ดร.อุรชา รักษ์ตานนท์ชัย ในการเป็นกรรมการ, ประธานกรรมการและกรรมการนอกมหาวิทยาลัย สำหรับการสอบหัวข้อโครงร่างวิทยานิพนธ์และการสอบปกป้องหัวข้อวิทยานิพนธ์สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ อีกทั้งยังให้ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ดร.อลิสา วังใน และห้องวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและเครื่องมือวิเคราะห์ในการวิเคราะห์หาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์, คุณสมฤดี อรรถาชิต และศูนย์ Olympus Bioimaging Center ณ คณะวิทยาศาตสร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องคอนโฟคอล (CLSM), คุณศรัญญา พันปีและห้องวิจัยที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์

ปาริฉัตร ทิพยางค์, ศลิษา พึ่งสุข, ณัฏฐกานต์ จุงจิตตเมต, พิสุทธิ์ สุขเกษม และนิสิตหลักสูตรนอกเวลาราชการ ผู้เป็นทั้งเพื่อน, พี่ และน้องที่น่ารัก ให้กำลังใจซึ่งกันและกัน ให้ความช่วยเหลือในการเรียน สมาชิกศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีอนุภาค (CEPT) และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีอนุภาค ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีส่วนช่วยในการสอนใช้อุปกรณ์ทำงานวิจัยและเครื่องมือวิเคราะห์ แลกเปลี่ยนความคิดและทัศนคติ ดูแลการเงินที่ใช้ในการทำงานวิจัย อีกทั้งยังช่วยในการจัดหาเสบียง และเรียกเสียงหัวเราะทำให้มีกำลังใจในการปฏิบัติหน้าที่ต่อไป

ท้ายที่สุดนี้ต้องขอบคุณครอบครัวหรินพุทธศีลที่ให้กำลังใจและการสนับสนุนในการเรียนอย่างมาก และต้องขอบคุณเพื่อน ๆ ทั้งในระดับมัธยมและอุดมศึกษาที่เป็นทั้งผู้ให้กำลังใจ และเป็นผู้ที่คอยรับฟังถึงปัญหาตลอดมา

จึงขอกล่าวนามและแสดงความขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 4

1.3 ขอบเขตงานวิจัย..... 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

บทที่ 2 ทฤษฎีและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

2.1 โปรตีน (Protein)..... 6

2.1.1 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีน..... 7

2.1.2 โครงสร้างของโปรตีน..... 7

2.1.3 การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีน(Protein Denaturation)..... 10

2.2 เอนไซม์..... 13

2.2.1 การทำหน้าที่ของเอนไซม์..... 13

2.2.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อทำงานของเอนไซม์..... 14

หน้า

2.2.3 การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ 16

2.3 เอนไซม์ไลเปส 17

2.3.1 ไลโปเลส 100 แอล (Lipolase 100L) 18

2.4 เทคโนโลยีการกักเก็บ 19

2.4.1 ลักษณะของอนุภาคโดยใช้เทคนิคการกักเก็บ 20

2.5 เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย 20

2.5.1 หลักการของการอบแห้งแบบพ่นฝอย 20

2.5.2 ข้อดีของกระบวนการกักเก็บโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย 25

2.5.3 ข้อด้อยของกระบวนการกักเก็บโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย 25

2.5.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างของไมโครแคปซูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย 26

2.5.5 การวิเคราะห์เส้นโค้งเฉพาะของการอบแห้งแบบพ่นฝอย 26

2.6 สารเคลือบที่ใช้ในกระบวนการกักเก็บสาระสำคัญให้อยู่ในรูปแคปซูล 29

2.7 การกักเก็บเอนไซม์ด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย 31

2.8 ตำแหน่งของเอนไซม์ในการ immobilize 34

2.9 อิมัลชัน 34

2.9.1 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของอิมัลชัน 35

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 38

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 38

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 38

3.3 วิธีการทดลอง 43

หน้า

3.3.1 การเตรียมสารสายป้อน 43

3.3.1.1 การเตรียมสารสายป้อนของเอนไซม์ไลเปสแบบสารละลายน้ำแป้ง.....43

3.3.1.2 การเตรียมสารสายป้อนของเอนไซม์ไลเปสแบบอิมัลชันเชิงซ้อน 44

3.3.2 การทำสารสายป้อนให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย 44

3.3.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะต่าง ๆ 45

3.3.4 การวิเคราะห์ค่าแอคทีวิตี้ของผงแห้งของเอนไซม์ไลเปส 45

3.3.5 การวิเคราะห์ลักษณะผงแห้งของเอนไซม์ไลเปส 47

บทที่ 4 ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ข้อมูล 51

4.1 การศึกษาการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้ไลโปเลส 100 แอลเป็นสารสายป้อน 51

4.1.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของไลโปเลส 100 แอล 51

4.1.2 โครงสร้างอนุภาคไลโปเลส 100 แอล 52

4.1.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงไลโปเลส 100 แอล 54

4.2 การศึกษาผลของปริมาณของวัสดุห่อหุ้มในสารสายป้อน 54

4.2.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินเท่ากับร้อยละ 10 - 40 โดยน้ำหนัก 55

4.2.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินเท่ากับร้อยละ 10 - 40 โดยน้ำหนัก 57

4.2.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินเท่ากับร้อยละ 10 - 40 โดยน้ำหนัก 59

4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย 59

หน้า

4.3.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110-140 องศาเซลเซียส....60

4.3.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110-140 องศาเซลเซียส....62

4.3.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110-140 องศาเซลเซียส....64

4.4 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ในสารสายป้อนของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย....64

4.4.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 5-40 มิลลิลิตร ต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม....65

4.4.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 5-40 มิลลิลิตร ต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม....66

4.4.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 5-40 มิลลิลิตร ต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม....69

4.5 การศึกษาผลของแคลเซียมไอออน....69

4.5.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อน 0-10 มิลลิโมลต่อปริมาณสารสายป้อน....70

4.5.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อน 0-10 มิลลิโมลต่อปริมาณสารสายป้อน....71

4.5.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อน 0-10 มิลลิโมลต่อปริมาณสารสายป้อน....72

4.6 การศึกษาการเก็บรักษาไลโปเลส 100 แอล และผงเอนไซม์แห้ง....73

4.6.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของไลโปเลส 100 แอล หลังจากที่ทำการเก็บรักษา....73

4.6.2 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของอนไซม์แห้ง หลังจากที่ทำการเก็บรักษา 74

4.6.3 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของอนไซม์แห้ง หลังจากที่ทำการเก็บรักษาร่วมกับผงซักฟอก 75

4.7 การศึกษาผลของสารสายป้อน 78

4.7.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อน คือ สารละลายน้ำแป้งและอิมัลชันเชิงซ้อน 79

4.7.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อน คือ สารละลายน้ำแป้งและอิมัลชันเชิงซ้อน 81

4.7.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อน คือ สารละลายน้ำแป้งและอิมัลชันเชิงซ้อน 82

4.8 การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 5-40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 83

4.8.1 ผลของตำแหน่งของเอนไซม์เมื่อใช้เครื่อง Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) 83

4.8.2 ผลของตำแหน่งของเอนไซม์เมื่อใช้กล้องคอนโฟคอล (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) 87

4.8.3 ผลของตำแหน่งของเอนไซม์เมื่อใช้เครื่องรามานสเปกโตรสโครป 92

4.9 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง 93

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 94

5.1 สรุปผลการวิจัย 94

5.2 ข้อเสนอแนะ 95

รายการอ้างอิง 96

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 101

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1.1 วัตถุประสงค์ของการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ 3

2.1 คุณลักษณะเฉพาะของวัสดุห่อหุ้มแต่ละชนิด 31

2.2 ค่า HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) และหน้าที่การนำไปใช้ 36

2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเสถียรภาพและลักษณะปรากฏกับขนาดอนุภาค 37

3.1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณที่ใช้ในการทำสารละลายที่จะใช้ในการวัดแอคติวิตี้ 46

4.1 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นไลโปเลส 100 แอล 51

4.2 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตริน มีค่าเท่ากับ 10 – 40 % โดยน้ำหนัก 57

4.3 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 – 140 องศาเซลเซียส 60

4.4 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล 5 – 40 มิลลิลิตร ต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 66

4.5 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0 – 10 มิลลิโมล ต่อปริมาณสารสายป้อน 70

4.6 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบสารละลายน้ำแป้งและ อิมัลชันเชิงซ้อน 79

4.7 แสดงค่าความเข้มของสี FITC Isomer 1 88

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและเวลา	1
2.1	แสดงการรวมตัวกันของกรดอะมิโนด้วยพันธะเพปไทด์	6
2.2	สายเพปไทด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนอะลานีน เซอรีน และไกลซีน	6
2.3	แสดงตัวอย่างโครงสร้างแบบปฐมภูมิ	7
2.4	แสดงโครงสร้างของโปรตีนตามความซับซ้อนของโครงสร้าง	9
2.5	แสดงการเปลี่ยนแปลงสภาพทางธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความร้อน	10
2.6	แสดงการเปลี่ยนแปลงสภาพทางธรรมชาติของโปรตีน	11
2.7	แสดงการสูญเสียภาพทางธรรมชาติของโปรตีน	11
2.8	แสดงกลไกในการทำงานของเอนไซม์ร่วมกับซับสเตรต	14
2.9	แสดงปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยน้ำ (Hydrolysis) ของไตรกลีเซอไรด์	17
2.10	แสดงลักษณะโครงสร้างของไลโปเลส 100 แอล	18
2.11	แสดงองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล	18
2.12	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเทคโนโลยีที่ใช้ในการกักเก็บและขนาดอนุภาค	19
2.13	แสดงลักษณะอนุภาคจากเทคโนโลยีการกักเก็บ	20
2.14	แสดงเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย	21
2.15	หัวฉีดแบบหมุน	22
2.16	หัวฉีดแบบแรงดัน	22
2.17	หัวฉีดแบบสองของไหล	23

หน้า

2.18 ลักษณะของอนุภาคที่ได้จากการกักเก็บโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย 23

2.19 แสดงการไหลในทิศทางเดียวกันของสารสายป้อนและอากาศร้อน 24

2.20 แสดงการไหลสวนทางกันการไหลของสารสายป้อนและอากาศร้อน 24

2.21 แสดงการไหลในทิศทางผสมกันของสารสายป้อนและอากาศร้อน 24

2.22 แสดงรูปของอนุภาคเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อน ณ ช่วงเวลาการอุ่นวัสดุ 26

2.23 แสดงรูปของอนุภาคเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อน ณ ช่วงเวลาการอบแห้งที่มีอัตราคงที่ 27

2.24 แสดงรูปของอนุภาคเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อน ณ ช่วงเวลาการอบแห้งที่มีอัตราลดลง 27

2.25 การวิเคราะห์เส้นโค้งเฉพาะของการอบแห้งแบบพ่นฝอย 28

2.26 แสดงสูตรโครงสร้างของแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 29

2.27 แสดงรูปของอิมัลชัน (ก) อิมัลชันน้ำมันในน้ำ (ข) อิมัลชันน้ำในน้ำมัน 35

2.28 ลักษณะการสูญเสียเสถียรภาพของอิมัลชัน 36

2.29 โมเลกุลของโซเดียมพาลมิเตรต (Sodium palmitate) 36

2.30 การจัดเรียงตัวของอิมัลซิไฟเออร์ 37

3.1 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) 39

3.2 เครื่องสเปคโตรมิเตอร์ 40

3.3 เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย Buchi B-290 40

3.4 เครื่องเอพเพนดอร์ฟเซนตริฟิวก์ 41

3.5 เครื่องรามานสเปกโตรสโครป 41

3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 42

3.7 กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล 42

หน้า

3.8 เครื่องวัดความชื้นของอนุภาค 43

3.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพาราไนโตรฟีนอล(μmol/ml)และค่าดูดกลืนแสงจริง(A_{410})..... 46

3.10 สมการแสดงการปฏิกิริยาของโปรตีนกับสี FITC 49

3.11 แสดงสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสี FITC..... 49

3.12 แสดงการประมวลผลจากภาพ 2 มิติ มาทำเป็นภาพ 3 มิติ..... 50

4.1 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อใช้ไลโปเลส 100 แอลเป็นสารสายป้อน 53

4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของมอลโตเดกซ์ตรินในสารสายป้อนโดยน้ำหนักและค่าร้อยละของค่าคงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอยและปริมาณความชื้นของอนุภาค 56

4.3 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่าเท่ากับร้อยละ 10 – 40 โดยน้ำหนัก 58

4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอยและปริมาณความชื้นของอนุภาค..... 60

4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าและอุณหภูมิของอากาศขาออก 61

4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของมอลโตเดกซ์ตรินในสารสายป้อนโดยน้ำหนักและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอย 62

4.7 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อโดยที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยมีค่าเท่ากับ 110 - 140 องศาเซลเซียส 63

4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไลโปเลส 100 แอลและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอย..... 65

4.9 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 5 - 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 68

หน้า

4.10 กราฟแท่งแสดงค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 70

4.11 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0 - 10.0 มิลลิโมล ต่อปริมาณสารสายป้อน 73

4.12 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บไลโปเลส 100 แอลและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้ คงเหลือของเอนไซม์ 74

4.13 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บผงเอนไซม์แห้งและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือ ของเอนไซม์ 75

4.14 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บผงเอนไซม์แห้งร่วมกับผงซักฟอกและค่าร้อยละของ ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ 76

4.15 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาเท่ากับ 0 องศาเซลเซียส 77

4.16 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส 77

4.17 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส 78

4.18 แสดงลักษณะสารสายป้อน 80

4.19 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบอิมัลชันเชิงซ้อน 81

4.20 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบสารละลายน้ำแป้งและอิมัลชัน เชิงซ้อน 82

4.21 แสดงองค์ประกอบของแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 83

4.22 แสดงองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล 84

หน้า

4.23 แสดงองค์ประกอบของผงเอนไซม์แห้ง 84

4.24 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลส เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 85

4.25 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลส เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 85

4.26 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลส เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 86

4.27 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลส เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 86

4.28 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลส เท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 86

4.29 (ขวา) แสดงการกระจายของคลอรีน (ซ้าย) แสดงภาพตัดขวางของอนุภาค เมื่อสารสายป้อนเป็นสารละลายน้ำแป้งโดยปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม 87

4.30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และความเข้มของสี FITC 88

4.31 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส 89

4.32 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส 89

4.33 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส 89

หน้า

4.34 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส 90

4.35 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส 90

4.36 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส 90

4.37 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส 91

4.38 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 130 องศาเซลเซียส 91

4.39 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 140 องศาเซลเซียส 91

4.40 แสดงรามานพีคของผงเอนไซม์แห้ง, ไลโปเลส 100 แอล และแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 92

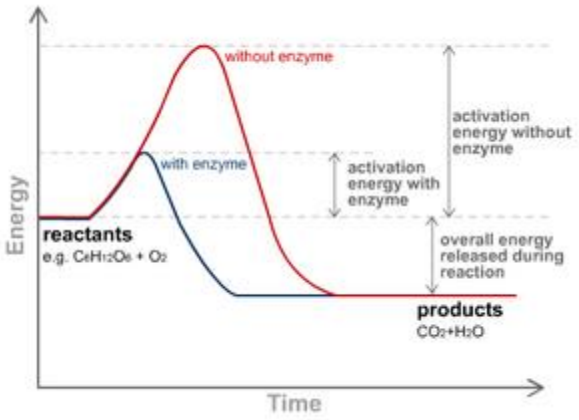
4.41 แสดง FT-IR พีคของผงเอนไซม์แห้ง, ไลโปเลส 100 แอล และแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 93

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันเอนไซม์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย อาทิเช่น อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งทอ ยา ฯลฯ (ดังตารางที่ 1.1) และนำมาใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการผลิตสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดทั้งในภาคครัวเรือนและอุตสาหกรรม สำหรับการผลิตสารเคมีเพื่อใช้ทำความสะอาดเสื้อผ้าในอดีตนั้นจะไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบของผงซักฟอกดังเช่นในปัจจุบัน โดยพบว่าเมื่อผงซักฟอกมีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบทำให้มีประสิทธิภาพในการทำความสะอาดดีขึ้น สามารถขจัดคราบสกปรกได้มากกว่า



รูปที่ 1.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาและเวลา (biologyguide.net/unit1/2_enzymes)

เอนไซม์มีหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งช่วยในการกำจัดสิ่งสกปรกที่เจือปนอยู่ได้ง่ายขึ้น ทำให้ลดระยะเวลาที่ใช้ในการทำความสะอาด ลดต้นทุน และประหยัดพลังงาน (ดังรูปที่ 1.1) เนื่องจากเอนไซม์ช่วยในการลดพลังงานกระตุ้นที่ต้องใช้ในการเกิดปฏิกิริยาทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้รวดเร็วขึ้น

เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการผลิตผงซักฟอกที่ใช้สำหรับทำความสะอาดเสื้อผ้า ได้แก่ โปรติเอส (protease), ไลเปส (lipase), อะไมเลส (amylase) และเซลลูเลส (cellulase) เพื่อช่วยกำจัดคราบสกปรกที่เกาะบนเสื้อผ้าได้ดีขึ้น โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เอนไซม์โปรติเอส สำหรับการทำความสะอาดผ้าที่มีคราบโปรตีนที่ยัง

ไม่แห้งโดยทั่วไปจะสามารถทำความสะอาดได้โดยการซักในน้ำเย็น แต่ถ้าปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งคราบโปรตีนแห้งเกาะติดบนเสื้อผ้าจะทำให้การทำความสะอาดยากขึ้น เนื่องจากน้ำจะไม่สามารถซึมผ่านในบริเวณที่คราบสกปรกเกาะติดอยู่บนเสื้อผ้าได้ ซึ่งพบว่าการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในผงซักฟอกจะช่วยให้สามารถกำจัดคราบโปรตีนได้ง่ายขึ้น แต่โดยทั่วไปนั้นคราบสกปรกบนเสื้อผ้าจะประกอบด้วยคราบโปรตีน, ไขมันและอื่น ๆ ทำให้เกิดการก่อตัวและยึดติดของคราบสกปรกบนเสื้อผ้าอย่างเหนียวแน่น ซึ่งสามารถกำจัดออกจากเสื้อผ้าได้ยากกว่าคราบสกปรกที่มีเพียงโปรตีนเท่านั้น และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อมีการเติมเอนไซม์อื่น ๆ ลงไปในผงซักฟอกร่วมกับเอนไซม์ โปรติเอส เช่น เอนไซม์ไลเปส จะทำให้สามารถทำความสะอาดคราบสกปรกบนผ้าง่ายขึ้น

เอนไซม์ไลเปส (lipase) เป็นองค์ประกอบหนึ่งในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดเสื้อผ้า โดยเอนไซม์ไลเปสจะมีหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาในการสลายไขมันหรือลิปิด (lipid) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ซึ่งไม่สามารถละลายได้ในน้ำ ทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีความชอบน้ำมากขึ้น เพื่อที่จะสามารถกำจัดไขมันได้ง่ายขึ้น โดยทั่วไปพบว่าการซักคราบไขมันด้วยน้ำเปล่าจะต้องทำการซักถึงเจ็ดครั้งจึงจะสามารถกำจัดคราบไขมันเพียงบางส่วนออกไปได้ และการซักคราบไขมันด้วยสารลดแรงตึงผิวจะต้องทำการซักประมาณสามถึงสี่ครั้ง แต่เมื่อใช้ผงซักฟอกที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไลเปสพบว่าทำการซักเพียงหนึ่งหรือสองครั้งเท่านั้นก็สามารถกำจัดคราบไขมันออกไปได้ ดังนั้นการเติมเอนไซม์ลงไปในผงซักฟอกจึงเป็นการประหยัดพลังงาน ค่าใช้จ่ายและทรัพยากรในการทำความสะอาด อีกทั้งการเติมเอนไซม์ในผงซักฟอกยังช่วยลดปริมาณของสารลดแรงตึงผิวอีกด้วย จึงเป็นการช่วยลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทำความสะอาดที่เท่ากันนั้น พบว่าผงซักฟอกที่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบจะใช้สารลดแรงตึงผิวน้อยกว่าผงซักฟอกที่ไม่มีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบ (โดยทั่วไปพบว่าจะมีเอนไซม์เป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกน้อยกว่าร้อยละ 1 โดยน้ำหนักเอนไซม์)

เนื่องจากเอนไซม์จะมีการเสื่อมสภาพจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, ความเป็นกรด-ด่างและปัจจัยจากสภาวะแวดล้อม ทำให้ไม่สามารถผสมเอนไซม์ลงไปในผงซักฟอกได้ในทันที เพราะเอนไซม์ต้องทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและแห้ง (ความชื้นในการเก็บรักษาเอนไซม์ต่ำ) ส่งผลให้ไม่สะดวกในการใช้งาน เคลื่อนย้ายและจัดเก็บเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของเหลว

ในงานวิจัยนี้จึงนำเทคโนโลยีการกักเก็บมาใช้ในการกักเก็บเอนไซม์ไลเปส เพื่อลดปัญหาในการใช้งาน เคลื่อนย้ายและจัดเก็บ โดยจะทำให้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของของเหลวอยู่ในรูปของผงเอนไซม์แห้งแทน โดยงานวิจัยนี้จะทำการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสให้อยู่ในรูปของผงแห้งด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งอาศัยหลักการแลกเปลี่ยนความร้อนระหว่างอากาศร้อนและของเหลวสายป้อน เมื่อสารสายป้อนเป็นสารละลายเอนไซม์ไลเปสในน้ำแป้ง ทำให้ของเหลวบางส่วนเกิดการระเหยออกไปจากอนุภาคทำให้ได้ผงแห้งของเอนไซม์ที่

ตารางที่ 1.1 วัตถุประสงค์ของการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

(gpo.or.th/rdi/html/enzyme เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดย ดร.เยาวพา สุวัตถิ)

เอนไซม์	ผลิตภัณฑ์ / อุตสาหกรรม	วัตถุประสงค์ หรือ ลักษณะปฏิกิริยาการใช้เอนไซม์
Amylase	เครื่องดื่มมีแอลกอฮอลล์	เพื่อเปลี่ยนแปลงน้ำตาลสำหรับหมัก เพื่อแยกแป้งออกจากสารละลายช่วยลดความขุ่นและความหนืด
	น้ำผลไม้	เพื่อแยกและทำลายแป้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดน้ำผลไม้
Cellulase	ผงซักฟอก	เพื่อขยายเส้นใยเซลลูโลสของผ้า ทำให้เอนไซม์เข้าสู่เนื้อผ้า
	กาแฟ	ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในระหว่างการทำเมล็ดกาแฟให้แห้ง
Tannase	เครื่องดื่มแอลกอฮอลล์	เพื่อแยกสารประกอบพวกพอลิฟีนอล
Lactase	ไอศกรีม	เพื่อป้องกันการตกผลึกของแลคโตส ทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อหยาบ
	นม	ช่วยทำให้โปรตีนนมมีความเสถียร
Naringinase	ผลไม้ตระกูลส้ม	เพื่อลดสารที่มีความขมในน้ำผลไม้
Protease	ผลิตภัณฑ์ขนมอบ	เพิ่มความนุ่มในแป้งนวด ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของขนมปัง มีความเป็นรูพรุนสม่ำเสมอ
	อาหารสัตว์	การย่อยสลายโปรตีนจากของเหลือทิ้งให้เป็นกรดอะมิโน
	ไวน์, เบียร์	กระบวนการแยกตะกอนโปรตีน ทำให้ผลิตภัณฑ์ใส
Lipase	เนยแข็ง	ย่อยสลายไขมันระหว่างการบ่ม ช่วยเพิ่มกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์
	น้ำมัน	เปลี่ยนลิปิดเป็นกลีเซอรอล และกรดไขมัน
	ผงซักฟอก	ลดแรงตึงผิว
Phosphatase	อาหารเด็ก	เพิ่มปริมาณฟอสเฟต
	นม	ตรวจสอบประสิทธิผลของการพาสเจอร์ไรส์
Peroxidase	การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส	โดยใช้ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส
Polyphenol oxidase	ชา กาแฟ และใบยาสูบ	เพื่อพัฒนาให้เกิดสีน้ำตาลในระหว่างการบ่ม การหมัก และการทำให้เกิดการสุกงอม
Ascorbic acid oxidase	ผักและผลไม้	ทำลายวิตามินซี

ถูกกักเก็บไว้ด้วยวัสดุห่อหุ้มที่มีความชื้นต่ำ ซึ่งผงแห้งของเอนไซม์ที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะมีอายุในการเก็บรักษายาวนานขึ้น อีกทั้งช่วยคงสภาพของเอนไซม์เพื่อประโยชน์ในการใช้งานต่อไปได้อีกด้วย และสะดวกสำหรับการใช้งาน การจัดเก็บและการขนส่ง

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษากระบวนการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย
2. ศึกษาลักษณะของอนุภาคที่ได้จากการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย
3. เพื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสหลังผ่านกระบวนการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

การแปรสภาพเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในรูปของเหลวให้อยู่ในรูปผงเอนไซม์แห้งด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย จะต้องทำการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลในการทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้ง ได้แก่ อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเพื่อใช้ในแลกเปลี่ยนความร้อนกับสารสายป้อน, ปริมาณเอนไซม์, ความเข้มข้นของของแข็ง (วัสดุห่อหุ้ม) ในสารสายป้อน โดยใช้แป้งมอลโตเดกซ์ตรินเป็นวัสดุห่อหุ้มในสารสายป้อนที่เป็นสารละลาย แล้วทำการศึกษาคุณลักษณะของผงแห้งที่ได้ เช่น ลักษณะโครงสร้าง, ขนาดอนุภาค, ความชื้น, ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสซึ่งจะส่งผลในการเร่งการเกิดปฏิกิริยา และความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษา โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านกระบวนการกักเก็บและเอนไซม์ไลเปสที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกักเก็บ

1. ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของของแข็ง (วัสดุห่อหุ้ม) ในสารสายป้อนร้อยละ 10 – 40 โดยน้ำหนัก โดยใช้แป้งมอลโตเดกซ์ตรินเป็นวัสดุห่อหุ้ม
2. ศึกษาอิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ไลเปส ในสารสายป้อน
3. ศึกษาอิทธิพลของแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายน้ำแป้ง 0 - 10 มิลลิโมลต่อปริมาณสารสายป้อน
4. ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิของอากาศขาเข้าในการอบแห้งแบบพ่นฝอย 110 – 140 องศาเซลเซียส
5. ศึกษาลักษณะของอนุภาคที่ได้จากการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย
6. การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษา โดยเปรียบเทียบเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านกระบวนการกักเก็บที่ได้จากการเตรียมสารสายป้อนในรูปของสารละลายและเอนไซม์ไลเปสที่ไม่ผ่านกระบวนการกักเก็บ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

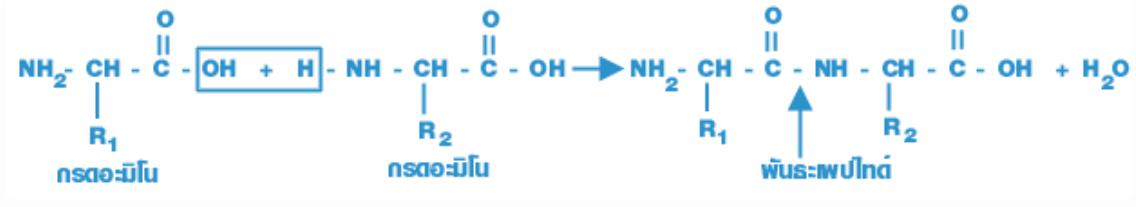
สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปผงแห้งด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสแห้งในประเทศ สำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดเสื้อผ้า

บทที่ 2

ทฤษฎีและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

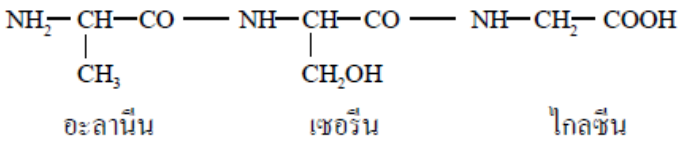
2.1 โปรตีน (Protein) [1-5]

โปรตีนประกอบด้วยสายของพอลิเพปไทด์ (polypeptide) โดยสายของพอลิเพปไทด์นั้นก็จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน (amino acid) โดยกรดอะมิโนที่ต่อกันเป็นเพปไทด์นั้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนซ์ระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งเรียกว่าพันธะเพปไทด์ ที่เกิดจากหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนโมเลกุลที่หนึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนโมเลกุลที่สองและสูญเสียน้ำไปหนึ่งโมเลกุล ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงการรวมตัวกันของกรดอะมิโนด้วยพันธะเพปไทด์
(student.chula.ac.th/~53370044/protein.html)

โดยสายเพปไทด์นั้นเกิดจากกรดอะมิโนจำนวนมากเชื่อมต่อกัน เช่น สายเพปไทด์ของกรดอะมิโนอะลานีน, เซอรีน และไกลซีน ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 สายเพปไทด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนอะลานีน เซอรีน และไกลซีน
(coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/pdf/04.pdf)

โดยโปรตีนแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกัน เนื่องจากมีโครงสร้างการจับกันของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ที่ต่างกัน และการขดพับของสายพอลิเพปไทด์ (folding) ทำให้โปรตีนมีโครงสร้างแตกต่างกัน ส่งผลให้โปรตีนแสดงหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) แตกต่างกันออกไป

2.1.1 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีน

หน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนนั้น ส่วนโครงสร้างของโปรตีนขึ้นอยู่กับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของสายพอลิเพปไทด์

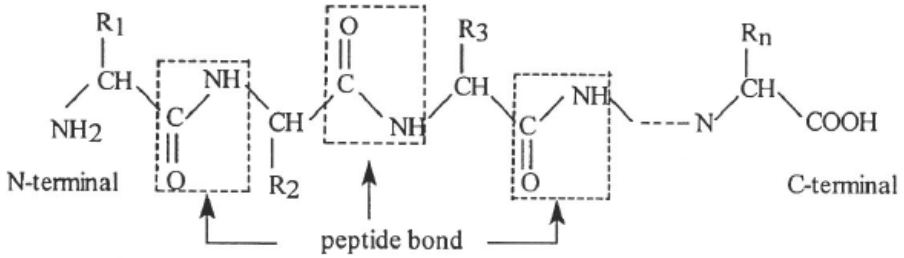
1. โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง (Structural protein) เช่น คอลลาเจนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งในร่างกาย
2. โปรตีนที่ทำหน้าที่สะสม (Storage protein) คือ โปรตีนที่สะสมเป็นอาหาร
3. โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหว (Contractile protein) เช่น ไมโอซิน และแอกติน ที่อยู่ในเซลล์ของกล้ามเนื้อ
4. โปรตีนที่ทำหน้าที่ป้องกัน (Protective protein) คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันโรคให้กับร่างกาย
5. โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (Enzyme) คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น กระบวนการย่อยอาหาร โดยเอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่ในการย่อยไขมัน
6. โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่ง (Transport protein) เช่น ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ลำเลียงก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

2.1.2 โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนแบ่งตามโครงสร้างตามความซับซ้อนได้ 4 ระดับ

- โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure)

เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนแต่ละชนิด โดยกำหนดให้หมู่อะมิโนอยู่ด้านซ้ายและหมู่คาร์บอกซิลอยู่ด้านขวา ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงตัวอย่างโครงสร้างแบบปฐมภูมิ (student.chula.ac.th/~53370044/protein.html)

โดยโครงสร้างนี้จะทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ, ตติยภูมิและจุตรภูมิ ซึ่งจะบอกถึงรูปร่างลักษณะของโปรตีน (conformation หรือ three-dimensional structure) ที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของโปรตีนชนิดนั้น ๆ ได้

- โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)

เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการขดหรือม้วนตัว (folding) ของโครงสร้างปฐมภูมิ โดยโครงสร้างนี้แสดงรูปร่างที่เป็นระเบียบของโปรตีนที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่าง C=O ในหน่วยของกรดอะมิโนกับหมู่ –NH ในสายของพอลิเพปไทด์ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีความเสถียรมากขึ้น แบ่งได้ 2 แบบ คือ โครงสร้างแบบเกลียวแอลฟาหรือแอลฟาเฮลิกซ์ (a–helix) มีรูปร่างเป็นเกลียว ทำให้สายพอลิเพปไทด์จะเกิดการหดตัวสั้นเข้า และโครงสร้างแบบพลีตบีตา (b–pleated sheet) มีสายโซ่ที่พับเป็นจีบเนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนระหว่าง C=O กับ N–H ของกรดอะมิโนระหว่างสายโซ่ที่ขนานกัน ทำให้สายพอลิเพปไทด์มีการยืดตัวออกมากที่สุด โดยการขดเป็นเกลียวหรือการพับซ้อนกันนั้นทำให้โครงสร้างมีเสถียรภาพในธรรมชาติ โดยจะมีการการม้วนพับเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าไว้ด้านใน และหันเอาส่วนด้านที่ชอบน้ำออกสู่ด้านนอก

- โครงสร้างตติยภูมิ(tertiary structure)

เกิดจากโครงสร้างทุติยภูมิแบบเกลียวแอลฟา (a–helix) ม้วนเข้าหากันและไขว้เข้าหากันทำให้ได้โครงสร้างที่เสถียรที่สุดและทำหน้าที่ได้ (native form) แต่ละบริเวณที่เกิดการม้วนพับนี้เรียกว่า domains ซึ่งเชื่อมต่อกันโดยสายพอลิเพปไทด์ โดยโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีลักษณะจำเพาะขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ ทำให้มีความสามารถและความเหมาะสมสำหรับหน้าที่ของโปรตีนที่ต่างกัน

- โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure)

เกิดจากการรวมตัวของโครงสร้างตติยภูมิ ซึ่งทำให้จะเกิดโครงสร้างใหม่ที่มีลักษณะที่ซับซ้อนมากขึ้น

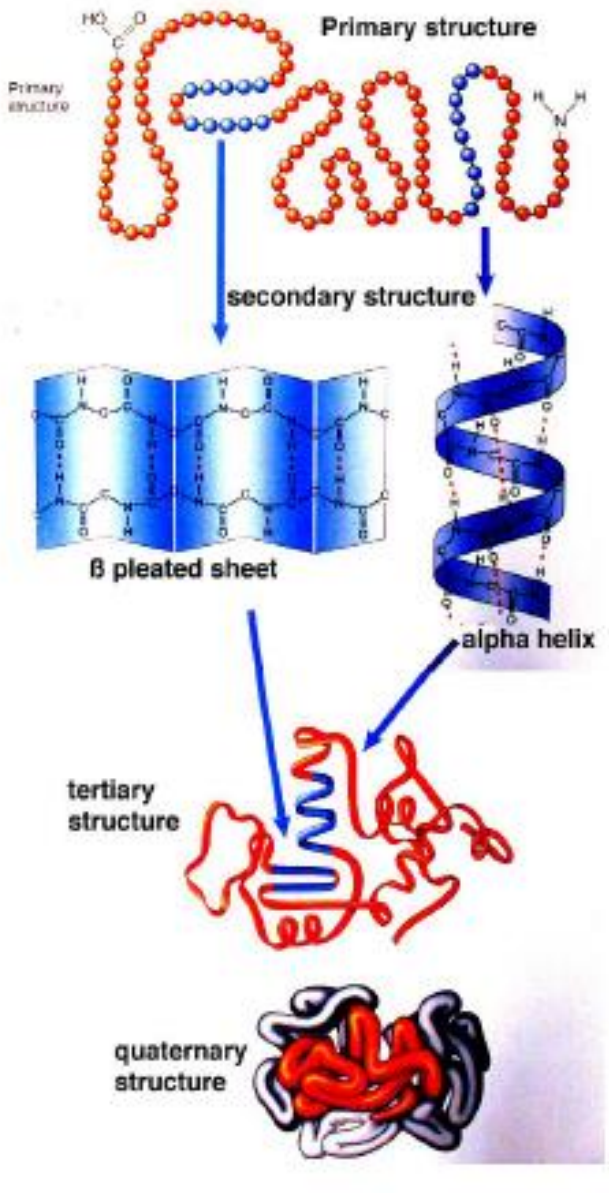
โปรตีนแบ่งตามลักษณะการจัดเรียงตัวในโครงสร้างสามมิติได้ 2 ชนิด

1) โปรตีนก้อนกลม (globular protein) เกิดจากสายพอลิเพปไทด์รวมตัวม้วนพับพันกันและอัดแน่นเป็นก้อนกลม โดยการจะมีจัดเรียงตัวของหมู่ไม่ชอบน้ำเข้าสู่ด้านในของโมเลกุลและหมู่ที่ชอบน้ำอยู่ด้านนอก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดี แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนชนิดที่เป็นก้อน (globular protein) ส่วนใหญ่นั้นส่วนที่สัมผัสกับน้ำประกอบด้วยส่วนที่ไม่มีขั้วเกือบครึ่งหนึ่ง รวมทั้งส่วนที่มีขั้วส่วนหนึ่งก็จะอยู่ด้านในของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากข้อจำกัดของการม้วนพับของโมเลกุล

2) โปรตีนเส้นใย (fibrous protein) เกิดจากสายพอลิเพปไทด์พันกันในลักษณะเหมือนเส้นใยยาว ๆ สามารถละลายน้ำได้น้อย ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง เพราะมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นสูง

โดยพันธะที่พบในโครงสร้างของโปรตีน มีพันธะหลายพันธะที่ช่วยให้โครงสร้างนั้นมีความเสถียรมากขึ้น ได้แก่

- Peptide bond เป็นพันธะที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ a-carbonyl ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งกับหมู่ a-amino ของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง พันธะนี้ก่อให้เกิดความแข็งแรงแก่สายพอลิเพปไทด์



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของโปรตีนตามความซับซ้อนของโครงสร้าง
(nmp.ac.th/eclassroom/krutew1/concept/1%20protein.pdf)

- **Disulfide bond** เป็นพันธะที่เกิดจากการจับตัวกันของ cysteine 2 residues ที่อาจจะอยู่ในสายเดียวกัน (intrachain) ของสายพอลิเพปไทด์ หรือต่างสาย (interchain) ก็ได้ โดยทั่วไป disulfide bond นี้จะทนต่อการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) ของโปรตีน แต่อย่างไรก็ตามมีสารเคมีบางชนิดสามารถทำลายพันธะนี้ได้ คือ b-mercaptoethanol, dithiotheritol เป็นต้น
- **Hydrogen bond** การสร้างพันธะนี้จะเกิดขึ้นได้ 2 แบบ แบบแรกเกิดระหว่างอะตอมของไฮโดรเจนและออกซิเจนของพันธะเพปไทด์ ซึ่งอาจจะอยู่ในสายพอลิเพปไทด์เดียวกันหรือต่างสายกันก็ได้ แบบที่สอง

เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ที่มีขั้วของสายข้างของกรดอะมิโนที่อยู่บนผิวของโปรตีนกับพันธะไฮโดรเจน โดยทั้ง 2 แบบนี้จะแสดงบทบาทที่สำคัญในการรักษาโครงสร้างของโปรตีน

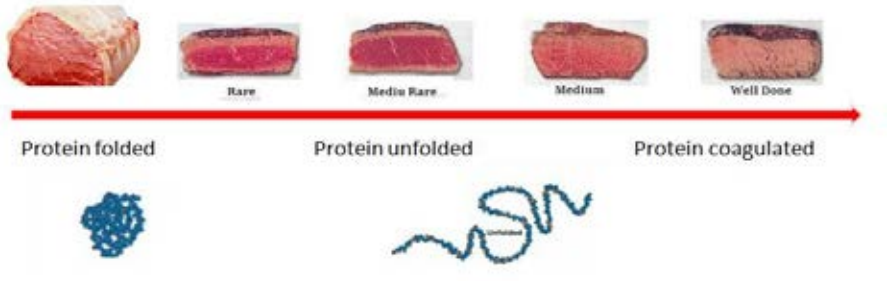
- **Van der Waals interaction** เป็นพันธะอย่างอ่อนที่เกิดระหว่างหมู่ของสายข้างของกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ ซึ่งมีส่วนช่วยให้โครงสร้างของโปรตีนมีความเสถียรขึ้น

2.1.3 การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีน (Protein Denaturation) [6-8]

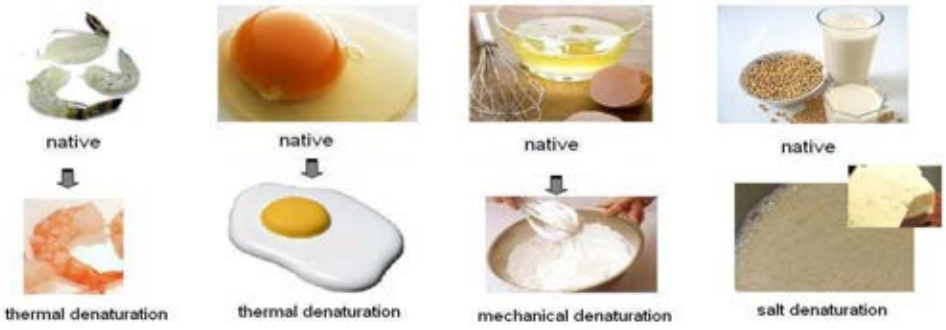
โดยปกติโปรตีนจะมีโครงสร้างอยู่ในสภาพธรรมชาติ เรียกว่า “native protein” เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure), ตติยภูมิ (tertiary structure) และจตุรภูมิ (quaternary structure) จะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturation) ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ทางชีวภาพได้อีก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “denatured protein” ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่

1. ความร้อน

ความร้อนส่งผลให้โปรตีนที่มีโครงสร้างแบบตติยภูมิและจุตรภูมิเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากความร้อนที่โปรตีนได้รับนั้นมีผลต่อพันธะไฮโดรเดรเจนถูกทำลาย จนสามารถทำลายโครงสร้างของโปรตีนได้ ซึ่งสามารถสังเหตได้จากโปรตีนนั้นเกิดการตกตะกอน โดยมราไม่สามารถเกิด renaturation ได้ เนื่องจากความร้อนนั้นทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุลอย่างรวดเร็วทำให้พันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย โดยที่พันธะเพปไทด์ของโปรตีนนั้นยังไม่ถูกทำลาย ส่งผลให้เมื่อโปรตีนได้รับความร้อนจะมีผลทำให้โครงสร้างโมเลกุลแบบตติยภูมิและจตุรภูมิ ซึ่งมีการม้วนพับซ้อนกัน มีการคลายตัวออกอย่างไม่มีระเบียบ อุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนส่วนใหญ่เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติคื อ ช่วง 55 ถึง 75 องศาเซลเซียส ยกเว้นเคซีนและซิสเตอีน ซึ่งมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งแตกสลายยากกว่า จะเกิดการสูญเสียสภาพเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 75 องศาเซลเซียส

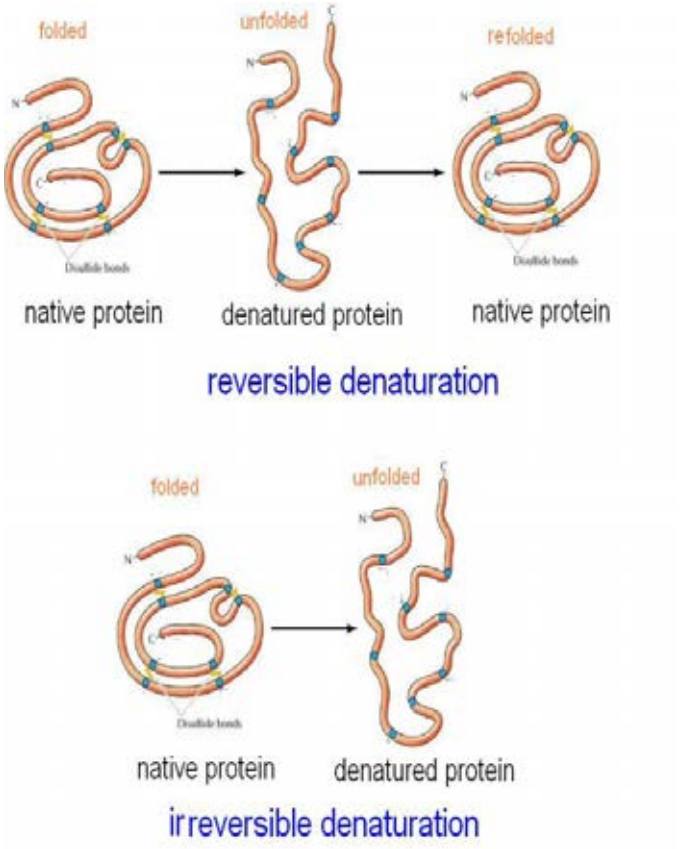


รูปที่ 2.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงสภาพทางธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความร้อน
(foodnetworksolution.com/wiki/word/0936/protein-denaturation-การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน)



รูปที่ 2.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงสภาพทางธรรมชาติของโปรตีน
(foodnetworksolution.com/wiki/word/0936/protein-denaturation-การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน)

x



รูปที่ 2.7 แสดงการสูญเสียภาพทางธรรมชาติของโปรตีน(foodnetworksolution.com/wiki/word/0936/protein-denaturation-การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน)

2. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH value)

โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน ซึ่งมีประจุทั้งที่หมู่ carboxyl (-COOH), หมู่amino ($-NH_2$) และ R group ดังนั้นโปรตีนจึงเป็นโมเลกุลที่มีประจุ โดยเมื่อค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของสารละลายโปรตีนเปลี่ยนไป มีผลทำให้ประจุรวมของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปด้วย

สำหรับ carboxylic group และ amino group จะมีการเปลี่ยนแปลงประจุได้ดังแสดง

การแตกตัวของ Carboxylic group จะเป็นดังสมการ $-COOH \leftrightarrow -COO^- + H^+$

เมื่อ $pH = pKa_1$ ค่า $[-COO^-] = [-COOH]$

$pH > pKa_1$ ค่า $[-COO^-] > [-COOH]$

$pH < pKa_1$ ค่า $[-COO^-] < [-COOH]$

การแตกตัวของ amino group จะเป็นดังสมการ $-NH_2 + H^+ \leftrightarrow -N^+H_3$

เมื่อ $pH = pKa_2$ ค่า $[-NH_2] = [-N^+H_3]$

$pH > pKa_2$ ค่า $[-NH_2] > [-N^+H_3]$

$pH < pKa_2$ ค่า $[-NH_2] < [-N^+H_3]$

หากปรับให้ pH ของสารละลายโปรตีนเปลี่ยนไปจนเท่ากับค่า Isoelectric pH (pI) ของโปรตีนนั้น ๆ ประจุบวกและประจุลบบนโปรตีนโมเลกุลเดียวกันจะเท่ากัน ทำให้ประจุรวมของโปรตีนเป็นศูนย์ จะไม่มีแรงผลักดันระหว่างโมเลกุล ทำให้โปรตีนเกิดการจับกัน (aggregate) ทำให้เกิดการตกตะกอน และในทางตรงกันข้ามหากปรับ pH ของสารละลายให้สูงหรือต่ำกว่า pI จะทำให้ประจุรวมของโปรตีนเป็นลบ หรือ บวกตามลำดับ จะเห็นว่าโปรตีนมีการละลายมากขึ้น (ใสขึ้น)

การตกตะกอนโปรตีนยังสามารถทำได้อีกวิธีหนึ่ง คือ การตกตะกอนด้วย เกลือต่างๆ เรียกว่า “Salting Out” โดยเกลือที่นิยมคือ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งมักจะใช้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ Half saturation หรือ Saturation เกลือที่ใส่ลงไปจะไปไล่โมเลกุลของน้ำที่อยู่รอบโปรตีนออก ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเข้ามาชิดและจับกันเกิดการตกตะกอน (Aggregation) และเมื่อต้องการขจัดเกลือออกให้เหลือแต่โปรตีนให้นำไปทำ Dialysis อีกครั้งหนึ่ง

3. แรงกล (mechanical denaturation)

มีผลรบกวนต่อพันธะภายในระหว่างโมเลกุลของสายพอลิเพปไทด์ ทำให้เกิดความอ่อนแอหรือถูกทำลาย เช่นเดียวกับการใช้ความร้อน โดยแรงกลนั้นอาจทำให้เกิดฟอง (foam) เช่น การตีปั่น (whipping) ไข่ขาว, การทำฟองนมเพื่อชงกาแฟลาเต้ (latte) หรือทำให้เกิดการแข็งตัว เช่น การใช้แรงดันสูง (high pressure) ก็ทำให้ไข่ขาวแข็งตัวได้เช่นเดียวกับการใช้ความร้อน

4. โลหะหนัก

โลหะหนัก หมายถึง โลหะที่มีความหนาแน่นมากกว่า 5 กรัม/ ลบ.ซม. เช่น ตะกั่ว (Pb) , แคดเมียม (Cd) และปรอท (Hg) ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ โดยโลหะจะจับรวมกับโปรตีน ส่งผลให้พันธะระหว่างโปรตีนกับโปรตีน หรือโปรตีนกับน้ำถูกทำลาย โปรตีนจึงเกิดการตกตะกอน

5. เอนไซม์

เอนไซม์จะย่อยสลายโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เช่น โปรติเอส เป็นต้น

6. Detergents และ Chaotropic agents

Detergents และ Chaotropic agents ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดสารอื่นๆ ที่เกาะรวมปนเปื้อนอยู่กับโปรตีน โดยการไปลดแรงของพันธะไฮโดรโฟบิก ระหว่างสารนั้นกับโปรตีน เช่น SDS, Triton X-100, Tween 80 และ CHAPS เป็นต้น โดย Detergents เป็นสารที่มีคุณสมบัติแอมฟิฟาติก (amphiphatic) ทำให้สามารถจับกับโปรตีนได้ จึงเป็นสาเหตุให้การจับกัน ทำให้การขดพับของสายพอลิเพปไทด์ถูกทำลาย เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน

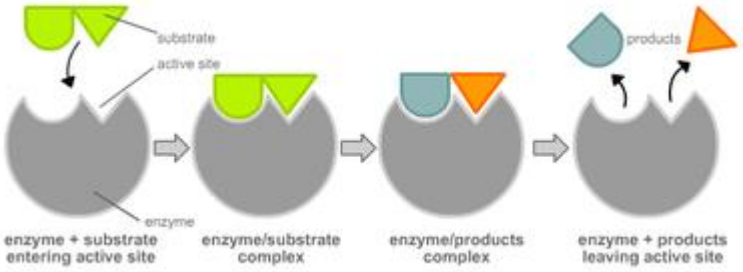
2.2 เอนไซม์ (enzyme)

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา ตั้งแต่ปฏิกิริยาง่าย ๆ เช่น ปฏิกิริยาของคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำได้เป็นกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3)จนกระทั่งถึงการสังเคราะห์โมเลกุลที่มีความซับซ้อน เช่น พวกน้ำตาล โปรตีน หรือสารอื่น ๆ

เอนไซม์ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนก้อนกลม(globular protein) โดยสายของพอลิเพปไทด์จะพับกลับไปกลับมาจนมีรูปร่างกระชับใกล้เคียงกับทรงกลม ซึ่งจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 100 – 300 หน่วย โดยที่หมู่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ หมู่แอลคิลและอะโรมาติกจะฝังตัวอยู่ในทรงกลม ส่วนหมู่ที่ชอบน้ำ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล, หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโนจะกระจายตัวอยู่บนผิวนอกของทรงกลม ทำให้เอนไซม์สามารถละลายน้ำได้

2.2.1 การทำหน้าที่ของเอนไซม์

สับสเตรต (substrate) จะเข้าจับกับเอนไซม์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนปฏิกิริยาสิ้นสุดจนได้ผลิตภัณฑ์และเอนไซม์กลับคืนมา โดยเอนไซม์สามารถช่วยในการเร่งปฏิกิริยาได้เนื่องจากเอนไซม์มีส่วนที่เป็นบริเวณเร่งหรือบริเวณก่อกัมมัสต์ (active site) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะที่จะให้สับสเตรตเข้ามาจับกับเอนไซม์ได้ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งก่อนและหลังการจับกับสารตั้งต้น โดยที่จะสามารถเข้ากันได้พอดีเหมือนกับกุญแจและแม่กุญแจ ต่อมาจะพบว่าบริเวณเร่งหรือบริเวณก่อกัมมันต์ (active site) ของเอนไซม์สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เหมาะสมกับสับสเตรตที่เข้ามาจับหรืออาจเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงกลไกในการทำงานของเอนไซม์ร่วมกับซับสเตรต (biologyguide.net/unit1/2_enzymes)

โดยเอนไซม์มีความเฉพาะเจาะจงต่อสับสเตรต และปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเป็นตัวเร่งสูงมาก เช่น อะไมเลสเป็นเอนไซม์ย่อยแป้ง ไลเปสเป็นเอนไซม์ย่อยไขมัน เป็นต้น

หน้าที่ของเอนไซม์ คือ การเปลี่ยนวิถีทางของการเกิดปฏิกิริยาเพื่อลดระดับพลังงานของสภาวะทรานซิชัน (transition state) โดยการจับยึดกับสับสเตรตและตัวทำปฏิกิริยาอื่น ๆ ให้อยู่ในทิศทางที่เหมาะสม ทำให้ลดพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยาลง ซึ่งมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น เมื่อสับสเตรตถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์แล้วก็จะไม่สามารถยึดจับกับเอนไซม์ได้อีกต่อไป และจะหลุดออกจากบริเวณรับแล้วปลดปล่อยเอนไซม์ให้เป็นอิสระ ทำให้เอนไซม์พร้อมที่จะจับกับสับสเตรตตัวใหม่เพื่อเร่งปฏิกิริยาต่อไป

เอนไซม์หลายชนิดไม่สามารถทำงานได้โดยลำพัง ซึ่งในการที่จะทำงานนั้นต้องอาศัยโมเลกุลอื่นร่วมด้วย โมเลกุลเหล่านี้เรียกว่า โคแฟกเตอร์ (Co–factor) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน หรือโคเอนไซม์ (Co–enzyme) เช่น NAD^+/NADH เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ทำงานเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่มีการถ่ายเทอิเล็กตรอน 2 ตัว ได้แก่ alcohol dehydrogenase , coenzyme–A เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ที่ชื่อ citrate synthase ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวพาของหมู่เอซิล

2.2.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อทำงานของเอนไซม์

1. อุณหภูมิ

เอนไซม์แต่ละชนิดมีความว่องไวต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน และเมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปจะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denature) ทำให้ไม่สามารถเข้ารวมกับซับสเตรตได้ สำหรับไลโปเลส 100 แอลนั้นเป็นเอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งจะสูญเสียสภาพตามธรรมชาติเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดจะอยู่ในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส [9]

2. ความเป็นกรด - ด่าง

เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด – ด่าง (pH) ที่เหมาะสม เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* ทำงานได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 7 – 11 (สภาวะด่าง) [9]

3. ปริมาณของเอนไซม์และซับสเตรต

เมื่อมีเอนไซม์และซับสเตรตมากจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

นอกจากปัจจัยทั้งสามดังที่กล่าวมาข้างต้น พบว่ามีสารบางชนิดที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น สารที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง เรียกว่า ตัวยับยั้ง (inhibitor), สารที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ เรียกว่า ตัวเร่งเร้าหรือตัวกระตุ้น (activator), สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นต้น

ตัวยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งในบางกรณีพบว่าสารบางชนิดจะเกิดการรวมเข้ากับเอนไซม์ที่แหล่งกัมมันต์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถรวมกับซับสเตรตได้ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ จะเรียกสารเหล่านั้นว่า ตัวยับยั้ง โดยตัวยับยั้งแบบนี้จะเรียกว่าคอมพีทิทีฟอินฮิบิเตอร์ (competitive inhibitor) ซึ่งจะมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับซับสเตรต ทำให้สามารถรวมตัวเข้ากับเอนไซม์ได้ดี เช่น diisopropyl *p*-nitrophenylphosphate (E600) มีผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosus* , *Thermosyntropha lipolytica* เนื่องจาก E600 จะเกิดพันธะโควาเลนซ์กับบริเวณก่อกัมมันต์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับซับสเตรตได้ [9, 10] และพบว่า EDTA และ EGTA เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus aureus* [11]

ตัวกระตุ้นหรือเร่งเร้า (Activator) เป็นสารที่มีอิทธิพลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เช่น แคลเซียมไอออน โดยพบว่าแคลเซียมคลอไรด์มีผลในการกระตุ้นการทำงานของไลเปส [12-14] ที่ได้จาก *Staphylococcus aureus* โดยแคลเซียมไอออนที่อยู่รอบ ๆ บริเวณก่อกัมมันต์มีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้ของไลเปสมีค่ามากขึ้นและแคลเซียมไอออนสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไขมันที่เกิดขึ้นระหว่างการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์ เกิดเป็นไคลสบู่ที่ไม่สามารถละลายในน้ำได้ มีผลให้กรดไขมันที่หลุดออกจากผ้าไม่สามารถกลับเข้าไปยึดเกาะบนเสื้อผ้าได้อีก

Sutherland และ Aust [15] ได้ทำการศึกษาผลของแคลเซียมต่อความเสถียรต่ออุณหภูมิและแอคติวิตี้ของ manganese peroxidase ซึ่งพบว่าแคลเซียมมีผลในการช่วยป้องกันการเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของ manganese peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่ง เนื่องจากช่วยในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์นั้นยังคงมีความสามารถในการทำงานทางชีวภาพ (แอคติวิตี้) อีกด้วย

ในผงซักฟอกยังมีสารเคมีชนิดอื่น ๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น สารลดแรงตึงผิว และสารฟอกขาว เป็นต้น สำหรับสารลดแรงตึงผิวและสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดนั้น พบว่าจะส่งผลต่อค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซับสเตรตของเอนไซม์ไลเปสและเกิดการรวมตัวเชิงซ้อนอีกด้วย [9] ทำให้ไม่สามารถทำนายอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวและสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาดที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ เนื่องจากเป็นความจำเพาะเจาะจงเฉพาะของเอนไซม์นั้น ๆ [10] และพบว่าสารออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2), โซเดียมเปอร์โบเรต ($NaBO_3$), โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) มีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสลดลง [12, 13]

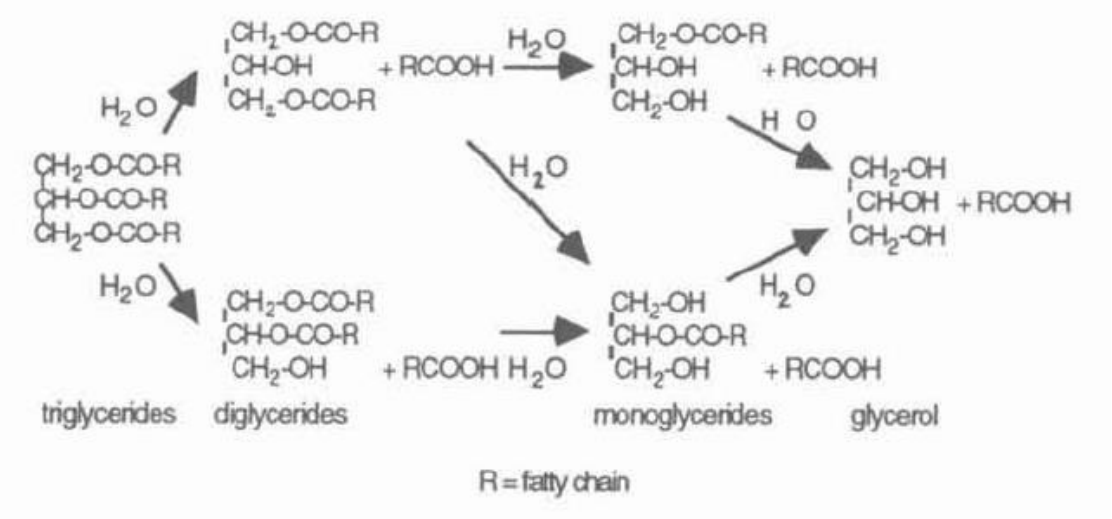
2.2.3 การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์

การสูญเสียสภาพตามธรรมชาติของเอนไซม์ ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ส่วนมากพบว่าโปรตีนเกิดการ unfolding แต่ไม่ทำลายพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเป็นพันธะระหว่างกรดอะมิโน (amino acid) ในโปรตีน แต่ทำให้พันธะซึ่งทำให้เกิดโครงสร้างระดับต่างของโปรตีน (protein structure) ถูกทำลายโดยโครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัว (unfolded) เปลี่ยนจากโครงสร้างเดิมตามธรรมชาติเป็นโครงสร้างใหม่ ซึ่งจะมีผลทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง อันเนื่องมาจากการสูญเสียความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีน ก่อให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจากการรวมตัวของโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำทำให้พันธะระหว่างโปรตีนเกาะตัวกัน เพื่อเป็นการลดการสัมผัสกับน้ำ จึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ หากการเปลี่ยนสภาพตามธรรมชาติเกิดขึ้นมาก ทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างเปลี่ยนไปจากเดิมจะทำให้เอนไซม์นั้นหยุดการทำงาน (inactive) ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่หากเกิดการเปลี่ยนแปลงไม่มากก็อาจจะกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น อัตราการเร่งปฏิกิริยา, ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้น (substrate) ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสมกับการเกิดปฏิกิริยา เช่น pH อุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งเป็นเหตุทำให้เอนไซม์สูญเสียค่าแอคติวิตี้ (loss activity) เนื่องจากซับสเตรทไม่สามารถไปอยู่ในบริเวณแหล่งก่อกัมมันต์ได้ โดยกระบวนการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติและการสูญเสียค่าแอคติวิตี้สามารถวัดได้โดยใช้เทคนิค dual polarization interferometry, CD, and QCMD เป็นต้น [16]

ในแง่ของการแปรรูปอาหารนั้นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ อาจมีประโยชน์เพราะเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเสียของอาหารและทำให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (functional properties of protein) เปลี่ยนไปอีกด้วย

2.3 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

ไลเปส (lipase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolases) หรือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด โดยเอนไซม์ไลเปสจะมีหน้าที่ช่วยในการย่อยไขมันหรือลิปิด (lipid) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ไม่มีขั้วให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ส่งผลให้มีความเป็นขั้วมากขึ้นทำให้สามารถละลายได้ในน้ำและถูกกำจัดได้ง่ายขึ้น โดยเอนไซม์ไลเปสจะทำงานในบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและไขมันซึ่งเอนไซม์จะทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงในการทำงาน [12]



รูปที่ 2.9 แสดงปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยน้ำ (Hydrolysis) ของไตรกลีเซอไรด์ [12]

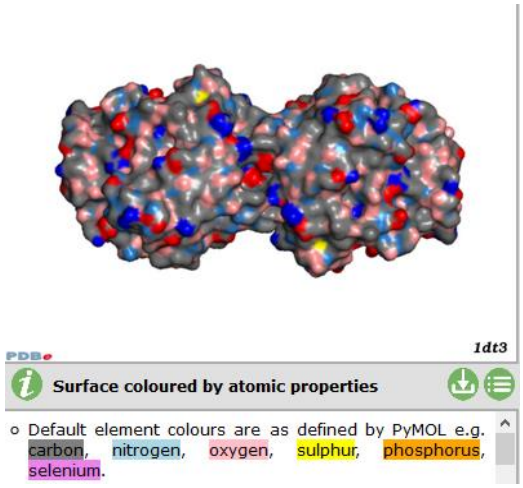
การสลายตัวของไขมันโดยใช้น้ำและเอนไซม์เป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยานั้น พบว่าจะเกิดการสลายพันธะที่หมู่คาร์บอนิล (-COO-) ของไตรกลีเซอไรด์ด้วยการแทนที่ด้วยน้ำ ได้ไดกลีเซอไรด์และกรดคาร์บอกซิลิกและเกิดการไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อไปจนกระทั่งได้กรดไขมันอิสระซึ่งไม่สามารถเกิดการไฮโดรไลซ์ได้อีก การสลายพันธะด้วยน้ำส่งผลให้โมเลกุลที่แตกออกมีความชอบน้ำมากขึ้น (มีความเป็นขั้วมากขึ้น) [17] ทำให้มีความสามารถละลายในน้ำดีขึ้นจนกระทั่งไขมันนั้นถูกกำจัดออกไปได้ ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะไม่มีอิทธิพลกับไขมันที่ไม่มีไตรกลีเซอไรด์เป็นองค์ประกอบ และพบว่าขนาดสายโซ่ของไตรกลีเซอไรด์ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสอีกด้วย โดยขนาดสายโซ่ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจะอยู่ในช่วงสายโซ่ขนาดกลาง (C_8-C_{12}) รวมทั้งที่มาของไขมันก็ส่งผลในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเช่นเดียวกัน [18] โดยทั่วไปจะผสมปริมาณเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร้อยละ 0.4 - 1.0 โดย

น้ำหนัก ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำความสะอาดได้มากกว่าร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดที่ไม่มีเอนไซม์เป็นองค์ประกอบเมื่อมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวเท่ากัน [19, 20]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์ไลเปสจะถูกยับยั้งการทำงานด้วย Zn^{2+}, Fe^{2+}, and Al^{3+} และจะถูกกระตุ้นการทำงานด้วย Ca^{2+} [21]

2.3.1 ไลโปเลส 100 แอล (Lipolase 100L) [22, 23]

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะโครงสร้างของไลโปเลส 100 แอล
(ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1dt3/summary.html)



รูปที่ 2.11 แสดงองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล (ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1dt3/summary.html)

ไลโปเลส 100 แอล เป็นเอนไซม์ไลเปสทางการค้าของบริษัท Novozymes, USA ผลิตได้จากเชื้อ *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งที่ผ่านมามีการพัฒนาสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการทำงานและการเก็บรักษา โดยไลโปเลส 100 แอลที่ผลิตจาก *Thermomyces lanuginosus* (Novozymes A/S) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้กับผงซักฟอกเนื่องจากมีความเสถียรต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 60 องศา

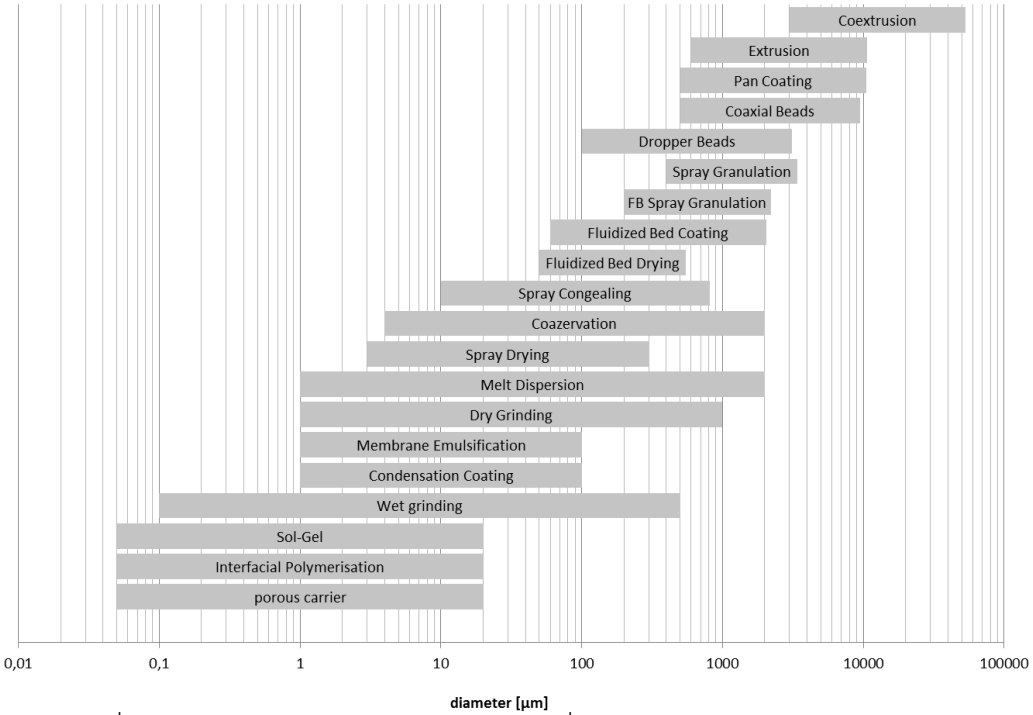
เซลเซียส [24] มีค่าแอคติวิตี้สูงในสภาวะด่าง และมีความเสถียรต่อสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (non-inonic surfactant) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของผงซักฟอก

ไลโปเลส 100 แอล มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 31,700 Da หรือ 31,700 กรัมต่อโมล [25] โดยประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 269 หน่วยต่อกัน ซึ่งไลโปเลส 100 แอลทำงานได้ในสภาวะด่าง ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ระหว่าง 9 – 11 และอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามไลโปเลส 100 แอลจะเกิดการสูญเสียสภาพโดยธรรมชาติ (denaturation) ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทำให้ค่าแอคติวิตี้หรือประสิทธิภาพในการทำงานลดลง [9]

2.4 **เทคโนโลยีการกักเก็บ** (Encapsulation Technology)

การทำให้สารอยู่ในรูปแคปซูล (encapsulation) เป็นวิธีที่ใช้ในกักเก็บสารสำคัญมีหลายวิธีดังรูปที่ 2.12 จากรูปแสดงให้เห็นว่าวิธีการกักเก็บที่ต่างกันมีผลให้อนุภาคที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน อีกทั้งมีผลต่อลักษณะของอนุภาคอีกด้วย ทั้งนี้ต้องพิจารณาหลายปัจจัยในการเลือกวิธีการกักเก็บสารสำคัญ อาทิเช่น คุณลักษณะของสารสำคัญ, คุณลักษณะของสารที่ใช้ในการหุ้ม, การนำไปใช้, ต้นทุนการผลิต ฯลฯ

จากการงานวิจัยที่ผ่านมาโดยการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Thermomyces lanuginosu* ในพอลิไวนิล-แอลกอฮอลล์ (PVA) ซึ่งเป็นกักเก็บการประเภทหนึ่ง โดยจะส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสสามารถจับกับซับสเตรตได้ดีและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากขึ้น ส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่ามากขึ้น [26]



รูปที่ 2.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเทคโนโลยีที่ใช้ในการกักเก็บและขนาดอนุภาค [27]

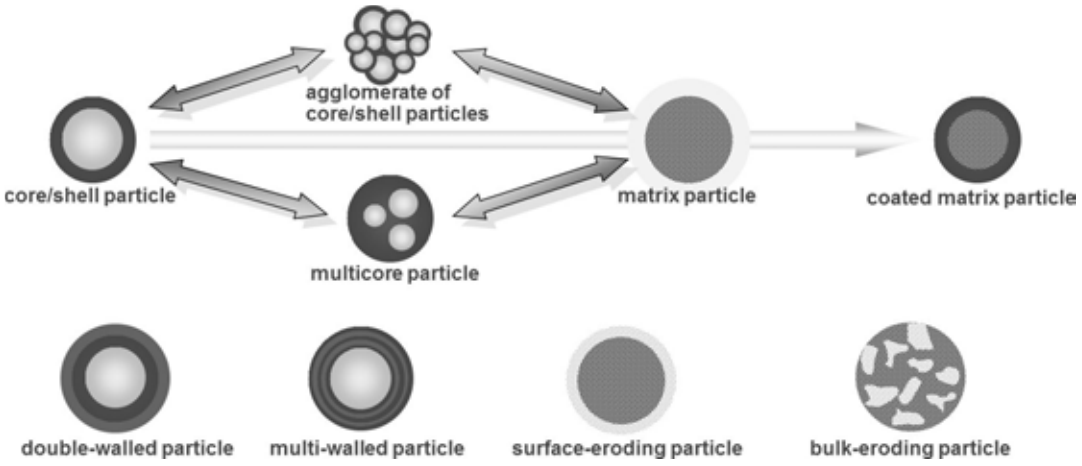
2.4.1 ลักษณะของอนุภาคโดยใช้เทคโนโลยีการกักเก็บ

ลักษณะของอนุภาคที่พบมากโดยใช้เทคโนโลยีการกักเก็บในการผลิตมี 3 ลักษณะ ได้แก่

1. Single core (True encapsulation) เป็นลักษณะของอนุภาคที่ได้จากการกักเก็บโดยใช้เทคนิค coacervation

2. Multi-core หรือ matrix encapsulation เป็นลักษณะของอนุภาคที่ได้โดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย สเปรย์ซิลลิง สเปรย์คูลลิง เอ็กซ์ทรูชันในกักเก็บ

3. Multi-wall หรือ Control release เป็นลักษณะของอนุภาคที่มีการเคลือบผิวหลายชั้น โดยมากการเคลือบผิวชั้นที่สองจะใช้เทคนิค Fluidized bed หรือ Centrifugal coating ทำให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญในสภาวะที่ต้องการได้



รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะอนุภาคจากเทคโนโลยีการกักเก็บ [27]

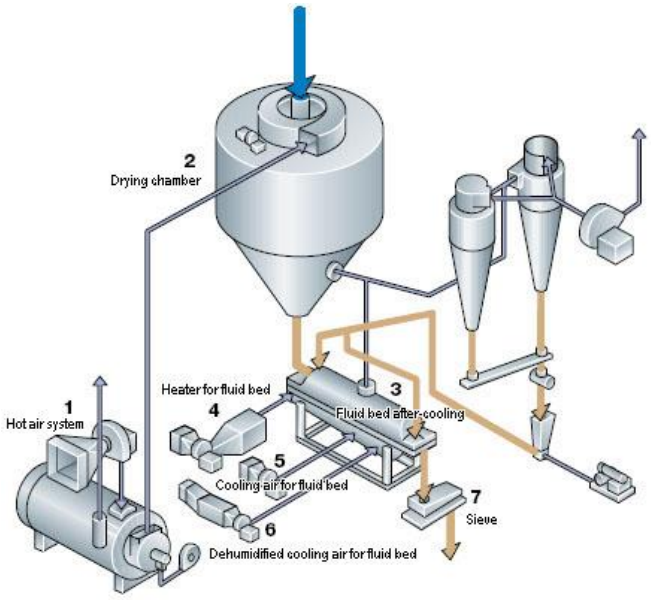
2.5 เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย [28]

การอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการกักเก็บสารสำคัญอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยา นิยมมากในการทำเครื่องดื่มสำเร็จรูปแบบแห้ง เช่น กาแฟหรือชาพร้อมดื่ม

2.5.1 หลักการของการอบแห้งแบบพ่นฝอย [29]

การอบแห้งแบบพ่นฝอยอาศัยการถ่ายเทความร้อนเป็นกลไกหลักในการเปลี่ยนของเหลวเป็นของแข็งโดยอาศัยการระเหยตัวของน้ำหรือตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบในของเหลวสายป้อนอย่างรวดเร็วระหว่างการสัมผัสกับอากาศร้อน ทำให้ของเหลวบางส่วนเกิดการระเหยออกไปทำให้ได้อนุภาคที่แห้ง โดยการทำงานของการอบแห้งแบบพ่นฝอยเริ่มจากอากาศจะถูกดูดผ่านไส้กรองและผ่านอุปกรณ์ทำความร้อน (heater) ซึ่งมีหน้าที่

ในการทำให้อากาศที่ไหลเข้ามามีอุณหภูมิสูงขึ้น จากนั้นอากาศร้อนจะถูกส่งเข้าสู่ห้องอบแห้ง (drying chamber) ในขณะที่สารสายป้อนจะถูกปั๊มเข้าสู่เครื่องพ่นละออง (atomizer) เปิดเป็นละอองที่มีขนาดเล็กของสารสายป้อนถูกพ่นเข้าสู่ห้องแบแห้ง ทำให้ละอองที่มีขนาดเล็กสัมผัสกับอากาศร้อน แล้วเกิดการถ่ายเทความร้อนจากอากาศร้อนสู่ละอองของสารสายป้อน โดยความร้อนนั้นทำให้เกิดการระเหยของตัวทำละลายอย่างรวดเร็ว และได้ผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปผงแห้ง โดยผงแห้งนั้นจะถูกส่งต่อไปยังไซโคลนเพื่อแยกอนุภาคออกจากอากาศและจะตกสู่ภาชนะที่ใช้ในการเก็บอนุภาคแห้ง



รูปที่ 2.14 แสดงเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (almil.de/index1/eng_solutions_mop_spray)

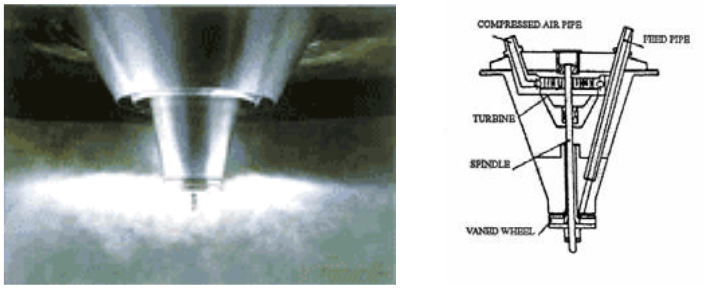
กระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย แบ่งการทำงานออกเป็น 4 ช่วง

1. การพ่นละออง (atomizer)

การทำให้ของเหลวกระจายตัวเป็นละออง (Atomization of Feed) ขั้นตอนนี้เป็นการทำให้สารสายป้อน (Feed) ที่เป็นของเหลวมีขนาดเล็กลงด้วยหัวฉีด และได้อนุภาคที่มีขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ในการสัมผัสกับอากาศร้อนมากขึ้น ทำให้เกิดการระเหยของตัวทำละลายในอนุภาคอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะต้องเลือกหัวฉีดให้เหมาะสมกับสารสายป้อนและลักษณะของอนุภาคแห้งที่ต้องการ โดยหัวฉีดที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ

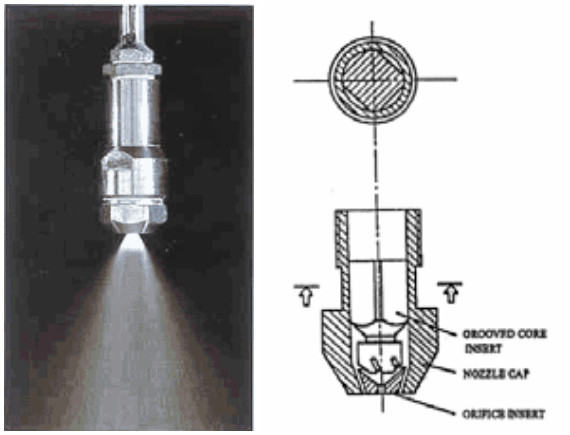
1) หัวฉีดแบบหมุน (Rotary Atomizer) สารสายป้อนจะไหลลงบนจานหมุนที่อยู่ใกล้กับจุดศูนย์กลาง โดยจานหมุนจะมีความเร็วรอบประมาณ 5,000-10,000 รอบต่อนาที และของเหลวที่ตกลงบนจานหมุนจะถูกเหวี่ยงออกสู่ด้านข้างกระจายเป็นละอองที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 30 - 120 ไมโครเมตร โดยที่ขนาดเฉลี่ย

ของอนุภาคที่ได้จะแปรผันโดยตรงกับอัตราการไหลของ สารสายป้อน, ความหนืดและแปรผกผันกับอัตราการหมุนและเส้นผ่านศูนย์กลางของจานหมุน



รูปที่ 2.15 หัวฉีดแบบหมุน (niro.com/niro/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkw6tzgb2)

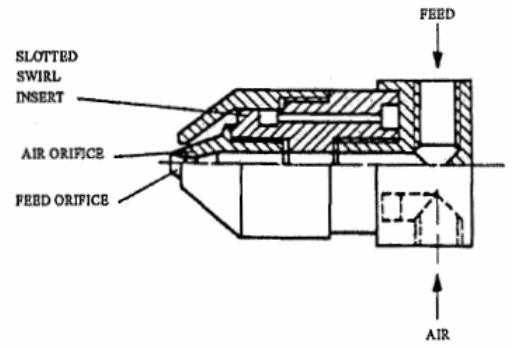
2) หัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer) สารสายป้อนจะไหลผ่านช่องของหัวฉีดที่มีขนาดเล็กภายใต้ความดันสูง ทำให้ของเหลวที่ถูกพ่นออกมาจากหัวฉีดกระจายเป็นละอองฝอย ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคประมาณ 120 - 250 ไมโครเมตร โดยขนาดของอนุภาคจะแปรผันตรงกับอัตราการไหลและความหนืดของสารสายป้อน แต่แปรผกผันกับความดัน



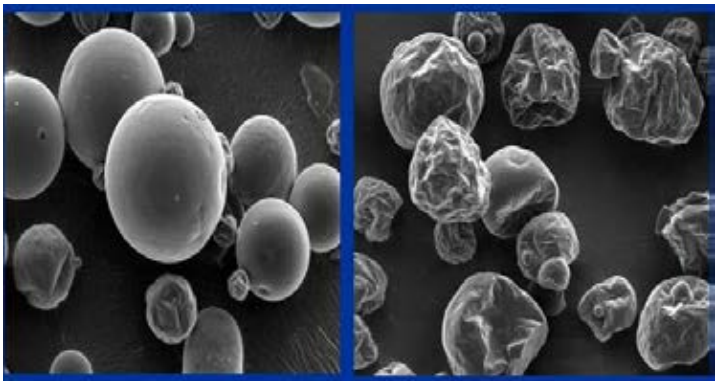
รูปที่ 2.16 หัวฉีดแบบแรงดัน

(niroinc.com/technologies/atomizers.asp, niro.com/niro/cmsdoc.nsf/webdoc/ndkw5y7gkk)

3) หัวฉีดแบบสองของไหล (Two-fluid Nozzle Atomizer ,Pneumatic Nozzle Atomizer) โดยสารสายป้อนและอากาศจะไหลผ่านหัวของหัวฉีดพร้อมกัน (Nozzle) ทำให้ของเหลวกลายเป็นละอองฝอย เนื่องจากการไหลผ่านของอากาศที่มีความเร็วสูงภายในหัวฉีด หัวฉีดแบบนี้นิยมใช้กับของเหลวที่มีความหนืดสูง โดยขนาดอนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กมาก แต่ค่าดำเนินการสูงและให้ผลผลิตน้อย



รูปที่ 2.17 หัวฉีดแบบสองของไหล (niro.com/niro/cmsdoc.nsf/webdoc/ndkw5y7glj)

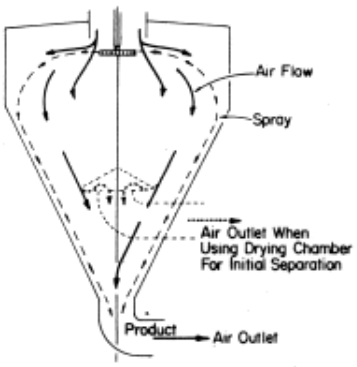


รูปที่ 2.18 ลักษณะของอนุภาคที่ได้จากการกักเก็บโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย (Madene และคณะ 2006) ด้านซ้าย : อนุภาคที่ได้จากการพ่นฝอยโดยใช้ rotary atomizer, ด้านขวา : อนุภาคที่ได้จากการพ่นฝอยโดยใช้ pressure nozzle atomizer

2. การสัมผัสระหว่างอนุภาคของสารสายป้อนกับอากาศร้อน (Droplet-hot air contact)

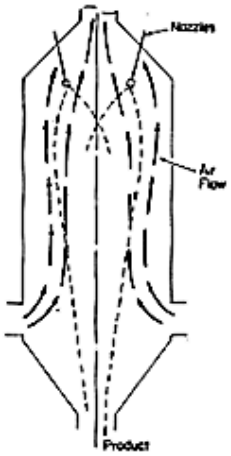
ทิศทางการเคลื่อนที่ของอากาศร้อนและสารสายป้อนเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีอิทธิพลต่อลักษณะของอนุภาคแห้ง เมื่อทิศทางการไหลเหมาะสมกับการทำงานทำให้การถ่ายเทความร้อนเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของสารสายป้อนที่ต้องการอบแห้งและลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยสามารถแบ่งทิศทางการเคลื่อนที่ของอากาศร้อนและสารสายป้อนได้ 3 แบบ โดยพิจารณาจากตำแหน่งของเครื่องพ่นละอองและอากาศแห้ง ดังนี้

1) การไหลในทิศทางเดียวกัน (Co-current flow) ของเหลว (สารสายป้อน) จะถูกพ่นออกไปในทิศทางเดียวกับอากาศร้อนที่ไหลเข้า วิธีนี้เหมาะสำหรับการกักเก็บสารสำคัญที่ไม่ทนความร้อน เนื่องจากการระเหยของน้ำเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความหนาแน่นต่ำ



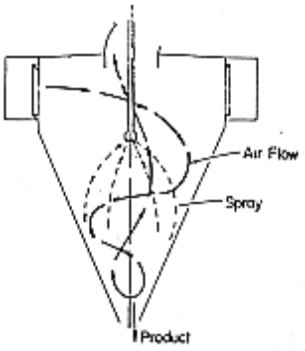
รูปที่ 2.19 แสดงการไหลในทิศทางเดียวกันของสารสายป้อนและอากาศร้อน [28]

2) การไหลสวนทางกัน (Counter-current flow) ของเหลวจะถูกพ่นในทิศทางตรงกันข้ามกับการไหลของอากาศร้อน อนุภาคที่ถูกพ่นเข้าจะมีอุณหภูมิต่ำและเมื่อได้รับความร้อนจากอากาศร้อนจะทำให้เกิดการถ่ายเทความร้อนส่งผลให้น้ำที่อยู่ในของเหลวที่ถูกพ่นเข้าไประเหยออก ทำให้อุณหภูมิของอนุภาคสูงขึ้นจนกระทั่งใกล้เคียงกับอากาศร้อนที่ไหลเข้า ซึ่งจะเหมาะกับสารสำคัญที่ทนความร้อนได้สูง



รูปที่ 2.20 แสดงการไหลสวนทางกันการไหลของสารสายป้อนและอากาศร้อน [28]

3) การไหลแบบผสมกัน (Mixed-flow) สารสายป้อนและอากาศร้อนจะไหลไปในทางเดียวกันและสวนทางกันพร้อม ๆ กัน



รูปที่ 2.21 แสดงการไหลในทิศทางผสมกันของสารสายป้อนและอากาศร้อน [28]

3. การระเหยของตัวทำละลายในละอองฝอย

การระเหยของตัวทำละลายในละอองฝอยจะเกิดขึ้นเมื่อละอองของสารสายป้อนสัมผัสกับอากาศร้อนที่ไม่มีความชื้นหรือมีความชื้นน้อยมาก ทำให้เกิดการระเหยเนื่องจากไอน้ำที่มีในอากาศร้อนไม่อิ่มตัวจึงสามารถพาความชื้นออกไปพร้อมกับอากาศขาออกได้

4. การแยกอนุภาคแห้งออกจากอากาศ

โดยทั่วไปนิยมใช้ไซโคลนในการแยกอนุภาคแห้งออกจากอากาศ โดยที่อนุภาคจะถูกเหวี่ยงตกลงสู่ด้านล่างของไซโคลนที่ถูกต่อเข้ากับภาชนะที่ใช้ในการเก็บอนุภาคแห้ง และอากาศจะไหลออกจากทางด้านบนของไซโคลนและจะถูกส่งต่อไปยังตัวเก็บขั้นสุดท้าย ทั้งนี้อาจเป็น wet scrubber หรือ bag filter หรือ electrostatic precipitator ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณอนุภาคและประสิทธิภาพการนำกลับ

2.5.2 ข้อดีของกระบวนการกักเก็บโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย

1. ขนาดของอนุภาคสม่ำเสมอ
2. ป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญอันเนื่องจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยสามารถป้องกันการสูญเสียสภาพได้จากการเติมสารปรุงแต่งเข้าไปห่อหุ้มหรือเคลือบเพื่อปกป้องเอนไซม์จากการสัมผัสกับอากาศร้อนและสภาวะแวดล้อม เช่น น้ำตาลเชิงซ้อน, โปรตีน, เกลือ เป็นต้น[14]
3. ต้นทุนในการผลิตต่ำ
4. สามารถปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบได้สะดวก เช่น สารสายป้อน, สภาวะในการทำงาน เป็นต้น

2.5.3 ข้อด้อยของกระบวนการกักเก็บโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย

1. ตัวทำละลายระเหยออกไปที่อุณหภูมิสูงอาจทำให้สารสำคัญบางชนิดเกิดการสลายตัว เนื่องจากความร้อน ซึ่งสำหรับการอบแห้งแบบพ่นฝอยทำให้โปรตีน (เอนไซม์) เกิดความเครียดเนื่องจากการสูญเสียน้ำ และเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติบางส่วน เนื่องจากสัมผัสกับอากาศร้อน [14]
2. อนุภาคแห้งที่ได้นั้นมีขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 10 – 100 ไมโครเมตร ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสำหรับการกักเก็บสารสำคัญที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่
3. ไม่สามารถทำการกักเก็บสาระสำคัญด้วยวัสดุห่อหุ้มหลายชั้นได้

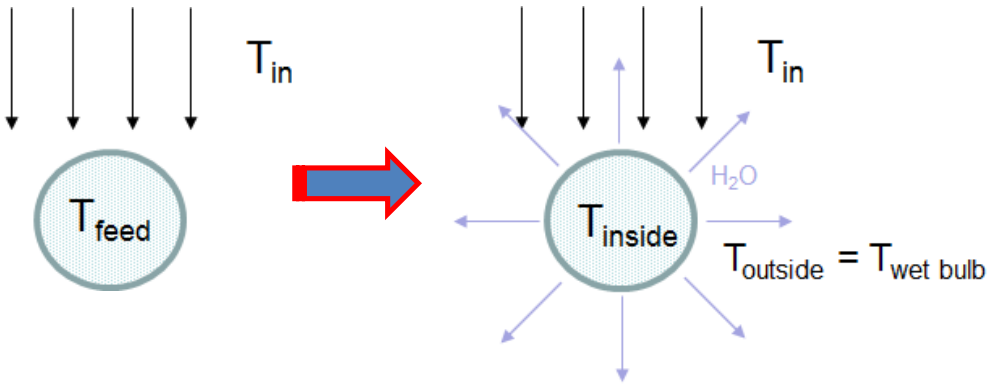
2.5.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างของอนุภาคที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย

1. องค์ประกอบและคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของวัสดุห่อหุ้ม
2. ชนิดของเครื่องพ่นละออง
3. สภาวะในการอบแห้ง เช่น อุณหภูมิ ความดัน
4. อัตราส่วนของสารห่อหุ้มและสารสำคัญ
5. อัตราการป้อนสารสายป้อนและอากาศร้อน

2.5.5 การวิเคราะห์เส้นโค้งเฉพาะของการอบแห้งแบบพ่นฝอย

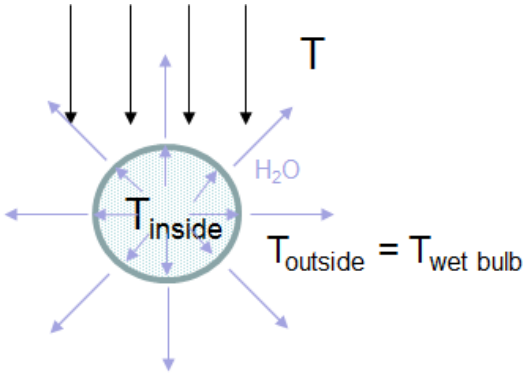
แบ่งการอบแห้งแบบพ่นฝอยเป็น 3 ช่วง คือ

1. ช่วงเวลาการอุ่นวัสดุ (Initial Period) เป็นช่วงที่อนุภาคจะมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนกระทั่งถึงอุณหภูมิสมดุล โดยอนุภาคจะรับความร้อนจากอากาศร้อนขาเข้าทำให้อุณหภูมิของอนุภาคมีค่าสูงขึ้น และจะมีอัตราการระเหยของตัวทำละลายสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากตัวทำละลาย (น้ำ) ที่บริเวณรอบ ๆ ของอนุภาคจะรับความร้อนและเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแล้วเกิดการระเหยอย่างรวดเร็ว



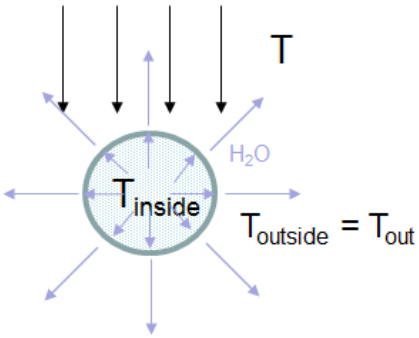
รูปที่ 2.22 แสดงรูปของอนุภาคเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อน ณ ช่วงเวลาการอุ่นวัสดุ

2. ช่วงเวลาการอบแห้งที่มีอัตราคงที่ (Constant Rate Period) เป็นช่วงที่อนุภาคจะมีอุณหภูมิคงที่โดยความร้อนจากอากาศร้อนนั้นจะทำให้ตัวทำละลาย (น้ำ) เกิดการระเหยจากผิวของอนุภาคไปยังอากาศด้านนอกและน้ำภายในอนุภาคจะแพร่มายังด้านนอก โดยที่อัตราการแพร่ของน้ำจากด้านในอนุภาคมาด้านนอกเท่ากับอัตราการระเหยของน้ำที่ผิวของอนุภาคไปยังอากาศ ทำให้ปริมาณความชื้นของอนุภาคลดลงเรื่อย ๆ อย่างคงที่



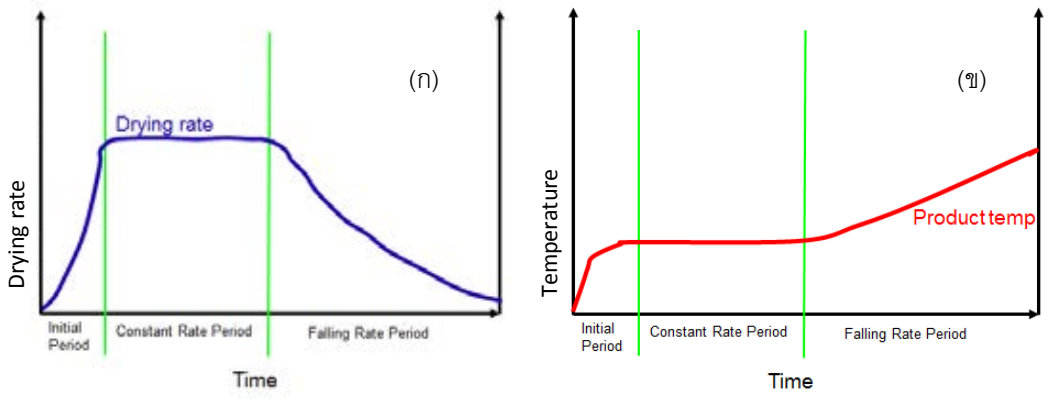
รูปที่ 2.23 แสดงรูปของอนุภาคเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อน ณ ช่วงเวลาการอบแห้งที่มีอัตราคงที่

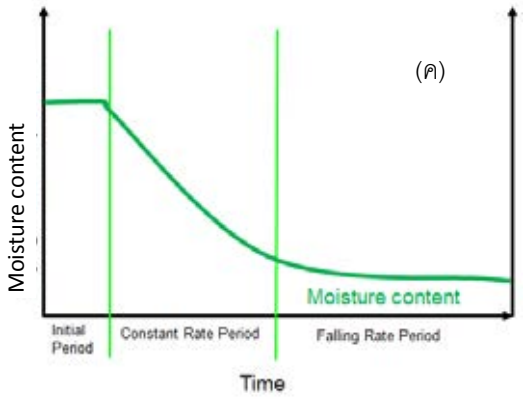
3. ช่วงเวลาการอบแห้งที่อัตราลดลง (Falling Rate Period) เป็นช่วงที่อนุภาคจะมีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยความร้อนจากอากาศร้อนจะทำให้ตัวทำละลาย (น้ำ) เกิดการระเหยจากผิวของอนุภาคไปยังอากาศด้านนอกและน้ำภายในอนุภาคจะแพร่มายังด้านนอก โดยที่อัตราการแพร่ของน้ำจากด้านในอนุภาคมาด้านนอกน้อยกว่าอัตราการระเหยของน้ำที่ผิวของอนุภาคไปยังอากาศ โดยจะเกิดการยุบตัวของพื้นผิวนอกของอนุภาคเนื่องจากการสูญเสียน้ำด้วย



รูปที่ 2.24 แสดงรูปของอนุภาคเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อน ณ ช่วงเวลาการอบแห้งที่มีอัตราลดลง

ซึ่งจากขั้นตอนทั้งหมดในการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะสามารถสร้างเส้นโค้งของการอบแห้งแบบพ่นฝอยดังรูปที่ 2.25





รูปที่ 2.25 แสดงลักษณะเส้นโค้งเฉพาะตามช่วงการอบแห้งแบบพ่นฝอย (ก) อัตราการอบแห้ง, (ข) อุณหภูมิของอนุภาค, (ค) ความชื้นของผงแห้ง

โดยที่ลักษณะของอนุภาคที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น วัสดุที่ใช้ในการห่อหุ้มสารสำคัญ, ชนิดสารสายป้อน, ปริมาณของของแข็งในสารสายป้อน, อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า, ปริมาณของตัวทำละลายที่ระเหยได้ยาก ซึ่งเมื่อปริมาณของของแข็งในสารสายป้อนมากจะส่งผลให้ผิวของผงแห้งที่ได้เกิดการยุบตัวน้อย เนื่องจากปริมาณของตัวทำละลายที่เกิดการแพร่จากภายในอนุภาคและการระเหยของตัวทำละลายบนผิวของอนุภาคมีปริมาณน้อย เมื่ออุณหภูมิของอนุภาคเริ่มลดลงก็จะเกิดการยุบตัวของพื้นผิวแทนที่ของเหลวที่ระเหยไประหว่างกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยและผงแห้งที่ได้จะมีขนาดใหญ่ และเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าสูงก็จะเกิดการยุบตัวของพื้นผิวอนุภาคมาก เนื่องจากพลังงานความร้อนที่ถ่ายเทจากอากาศร้อนไปยังอนุภาคมีค่ามากขึ้นทำให้ตัวทำละลายในอนุภาคนั้นสามารถถูกระเหยออกไปได้มากขึ้น เป็นผลให้พื้นผิวของอนุภาคเกิดการยุบตัวมาก และเมื่อปริมาณของตัวทำละลายที่ระเหยได้ยากหรืออัตราการแพร่ต่ำมาก ส่งผลให้ตัวทำละลายนั้นสามารถแพร่ไปยังผิวของอนุภาคเพื่อที่จะเกิดการระเหยออกไปมีค่าน้อย จะส่งผลให้พื้นผิวของอนุภาคมีการยุบตัวน้อย (ขรุขระน้อย/ค่อนข้างเรียบ) ผงแห้งที่ได้จะมีความกลมมากขึ้นและมีความชื้นในอนุภาคสูง ซึ่งลักษณะของอนุภาคก็จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญอีกด้วย

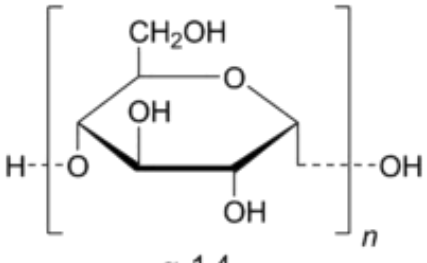
2.6 วัสดุห่อหุ้มที่ใช้ในกระบวนการกักเก็บสารสำคัญในรูปแคปซูล

วัสดุห่อหุ้มที่ใช้ในการกักเก็บสารสำคัญมีผลต่อลักษณะของอนุภาคที่ได้ ดังตารางที่ 2 โดยวัสดุห่อหุ้มที่นำมาใช้ควรจะมีน้ำหนักของแข็งสูง (high solid content), ความหนืดต่ำ (low viscosity), ความสามารถในการละลายสูงและไม่ทำปฏิกิริยากับสารสำคัญ (core material) [30] ซึ่งวัสดุห่อหุ้มที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการกักเก็บเอนไซม์ ได้แก่

1. น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ซึ่งมีราคาถูก, ช่วยป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญจากสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ได้แก่ ซูโครส (sucrose) , แลคโตส (lactose) และกลูโคส (glucose) โดยสามารถใช้ร่วมกับแป้งที่ผ่านการดัดแปลงทางเคมี (chemically modified starches) และยางไม้ (gums) ได้อีกด้วย

2. แป้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed starches) ซึ่งมีราคาถูก, มีความสามารถในการละลายสูง เช่น มอลโตเดกซ์ตริน เป็นแป้งข้าวโพดที่ถูกไฮโดรไลซ์บางส่วนด้วยกรดหรือเอนไซม์ โดยจำหน่ายในรูป Dextrose Equivalent (DEs) ค่า DE เป็นการวัดระดับ (degree) ของการย่อยสลายพอลิเมอร์ของแป้ง เหมาะสำหรับใช้ในการกักเก็บสารสำคัญที่มีขั้ว (มีความชอบน้ำ) ซึ่งเป็นแป้งที่มีขนาดโมเลกุลหลากหลาย สามารถเลือกได้ใช้ตามความเหมาะสม แต่พบว่าเมื่อใช้มอลโตเดกซ์ตรินที่มีค่า DE มาก (ขนาดโมเลกุลเล็กและมีรสหวาน) จะมีความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญได้น้อยลง และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถใช้มอลโตเดกซ์ตรินร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นวัสดุห่อหุ้มเอนไซม์ไลเปสได้ [14] และสามารถใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มร่วมกับกัมอะราบิคสำหรับการกักเก็บสารสำคัญที่เป็นน้ำมันได้ดี เนื่องจากจะได้ผงแห้งที่อยู่ในรูปเมทริกซ์ สามารถป้องกันการสูญเสียสารสำคัญเมื่อสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมได้ [31]

แป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE 10 เป็นแป้งข้าวโพดที่ถูกไฮโดรไลซ์บางส่วนด้วยกรดหรือเอนไซม์ โดยมีคุณสมบัติเหมาะสำหรับการใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสำหรับการอบแห้งแบบพ่นฝอย เหมือนชั้นฟิลม์ห่อหุ้ม เนื่องจากเป็นแป้งที่มีความชื้นต่ำ มีลักษณะร่วนซุย (ไม่เกาะกันเป็นก้อน) สามารถละลายในน้ำได้ดีโดยที่จะได้สารละลายที่มีความหนืดน้อย และสามารถทำให้แห้งได้ง่ายซึ่งจะมีค่า n เท่ากับ 10 โดยจะได้อนุภาคที่มีลักษณะผิว



α-1,4

$2 < n < 20$

รูปที่ 2.26 แสดงสูตรโครงสร้างของแป้งมอลโตเดกซ์ตริน

3. แป้งที่ผ่านการดัดแปรทางเคมี (chemically modified(emulsifying) starches) เช่น แป้งไฮแคป 100 (Hi-cap 100) เป็นแป้งข้าวโพดที่ผ่านการดัดแปรด้วยการเติมหมู่ OSA ลงไป ทำให้แป้งไฮแคปมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว ซึ่งช่วยเพิ่มความเสถียรให้แก่อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันได้ โดยเป็นแป้งที่มีความสามารถในการละลายสูงทำให้ได้ของผสมที่มีความหนืดต่ำ (low viscosity) ซึ่งทำให้สามารถระเหยน้ำออกจากกอนุภาคได้ง่ายและรวดเร็ว โดยทำให้เกิดเป็นฟิลม์ห่อหุ้มช่วยลดการสูญเสียสภาพของสารสำคัญได้ดี เหมาะสำหรับใช้เป็นวัสดุในการกักเก็บสารสำคัญที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบ นิยมนำมาใช้แทนกัมอะราบิคและเจราตินที่ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสำหรับสารสำคัญที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบเนื่องจากกัมอะราบิคและเจราตินมีราคาแพง

4. ยางไม้ (gums) เช่น กัมอะราบิก (gum Arabic or gum acacia) นิยมใช้ในการกักเก็บสารสำคัญที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถระเหยได้ง่าย เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นอิมัลชันได้ดี [30, 32] แต่ราคาสูงจึงเลือกใช้ในกรณีที่ไม่สามารถใช้วัสดุอื่นในการห่อหุ้มสารสำคัญชนิดนั้นได้

5. โปรตีน (Protein) เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุห่อหุ้ม [32] เช่น ความสามารถในการละลายสูง (solubility), ความหนืดต่ำ (viscosity), สามารถรวมตัวเข้ากับน้ำได้ (emulsifier) เมื่อใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มพบว่าผนังของอนุภาคจะฟอร์มตัวเป็นฟิลม์ โดยระหว่างการเกิดอิมัลชันนั้นโมเลกุลของโปรตีนจะดูดซับที่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและไขมันอย่างรวดเร็วทำให้เกิด stericstabilizing layer ขึ้นทันทีทำให้สามารถปกป้องหยดน้ำมัน (oil droplets) จากการกลับมารวมตัวอีกครั้ง (recoalescence) ทำให้เกิดความเสถียรทางกายภาพของอิมัลชันระหว่าง กระบวนการผลิตและการเก็บรักษา และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถใช้นมผงร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในการกักเก็บเอนไซม์ โดยพบว่าสามารถห่อหุ้มเอนไซม์ไลเปสได้ [33] และยังสามารถใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มร่วมกับกัมอะราบิคในการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสได้ดีอีกด้วยซึ่งเหมาะกับการทำผงเอนไซม์แห้งทางการค้าอีกด้วย [33]

6. เวย์โปรตีน (Whey protein) เป็นวัสดุที่นำมาใช้กักเก็บสาระสำคัญร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน โดยเวย์โปรตีนจะทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์และทำให้เกิดฟิล์มในการห่อหุ้ม ในขณะที่มอลโตเดกซ์ตรินทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้เกิดเมทริกซ์

Joana และคณะ [34] พบว่าการใช้มอลโตเดกซ์ตรินร่วมกับกัมอะราบิคเป็นวัสดุห่อหุ้มสารสำคัญ เช่น epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์จากชาเขียวด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยและเคลือบด้วยไขมันอีกชั้นด้วยสารผสมระหว่าง Egg-yolk -phosphatidylcholine (Egg-PC) และ stearylamine (SA) พบว่าการใช้ไขมันเป็นวัสดุห่อหุ้มในชั้นที่สองนั้นทำให้ปกป้องสารสำคัญจากสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะเฉพาะของวัสดุห่อหุ้มแต่ละชนิด (Madene และคณะ, 2006)

ชนิดของวัสดุห่อหุ้ม	คุณลักษณะเฉพาะ
Maltodextrin (DE<20)	Film forming
Corn syrup solid (DE>20)	Film forming
Modified starch	Very good emulsifier
Gum Arabic	Emulsifier, film forming
Modified cellulose	Film forming
Gelatin	Emulsifier, film forming
Cyclodextrin	Encapsulant, emulsifier
Lecithin	Emulsifier
Whey protein	Good emulsifier
Hydrogenated fat	Barrier to oxygen and water

2.7 การกักเก็บเอนไซม์ด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย

N. Yamada และ Y. Shoya [35] ทำการกักเก็บเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.2, โซเดียมซัลเฟตร้อยละ 2.5 และแลคโตสร้อยละ 0.5 เมื่ออุณหภูมิของอากาศขาเข้ามีค่า 150 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่า 60 องศาเซลเซียส พบว่าการเติมแลคโตส และแคลเซียมคลอไรด์มีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์โปรติเอสมีค่ามากขึ้น

Mauriello และคณะ [36] ทำการศึกษาการอบแห้งแบบพ่นฝอยแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ที่ผลิตได้จาก Lactic Acid Bacteria โดยทำการทดลองโดยนำแบคทีเรียไปกระจายตัวในนมปราศจากไขมันหรือเวย์ แล้วนำไปผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้าเท่ากับ 160, 180, และ 200 องศาเซลเซียสและปรับอัตราการป้อนสารสายป้อนเท่ากับ 10, 13, and 17 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 15, 30 และ 60 วัน พบว่าสารสายป้อนที่แบคทีเรียกระจายในนมปราศจากไขมันหรือเวย์นั้นมีผลลัพธ์ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และค่าแอคติวิตี้ของแบคทีริโอซินมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิของอากาศขาเข้ามีค่ามากขึ้น

Aysegul และคณะ [37] ทำการกักเก็บเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* (BGSC-1A751) ด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย ที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้าเท่ากับ 70, 90,110, 120 และ 130 องศาเซลเซียสพบว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียค่าแอคติวิตี้มากขึ้น และเมื่อมีกลูโคสและ

มอลโตเดกซ์ตรินเป็นวัสดุห่อหุ้ม จะช่วยในการปกป้องโครงสร้างของโปรตีน เนื่องจากมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกลูโคสและโปรตีนแทนที่น้ำที่สูญเสียไประหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย ส่งผลให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าคงเหลือมากขึ้น และเมื่อปริมาณของกลูโคลและมอลโตเดกซ์ตรินมากขึ้น (ความเข้มข้นร้อยละ 0 – 2.0 โดยน้ำหนัก) ค่าแอคติวิตี้คงเหลือจะมีค่ามากขึ้น

Alloue และคณะ [14] ทำการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้ *Yarrowia lipolytica* ด้วยการเติมสารปรุงแต่ง โดยแบ่งการวิจัยเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้ ผงนมไขมันต่ำ (skim milk powder) 120 กรัมต่อลิตรและกัมอะราบิค (gum arabic) 60 กรัมต่อลิตร โดยอุณหภูมิของอากาศขาเข้ามีค่า 165 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่า 85 องศาเซลเซียส อัตราการป้อนสาร 12 ลิตรต่อชั่วโมง และส่วนที่สองใช้แป้งมอลโตเดกซ์ตริน (Maltodextrin DE12) 120 กรัมต่อลิตร, กัมอะราบิค 60 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร โดยอุณหภูมิของอากาศขาเข้ามีค่า 165 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่า 85 องศาเซลเซียส, อัตราการป้อนสาร 14 ลิตรต่อชั่วโมง แล้วทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์แห้งที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียสในถุงฟอยด์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ พบว่า ผงแห้งที่ได้จากกักเก็บเอนไซม์โดยใช้ผงนมไขมันต่ำและกัมอะราบิคสามารถเก็บรักษาได้ 18 เดือนโดยไม่สูญเสียค่าแอคติวิตี้ และผงแห้งที่ได้จากกักเก็บเอนไซม์โดยใช้แป้งมอลโตเดกซ์ตริน, กัมอะราบิคและแคลเซียมคลอไรด์สามารถเก็บรักษาได้ 12 เดือนโดยไม่สูญเสียค่าแอคติวิตี้

Tales และคณะ [38] ทำการ immobilize เอนไซม์ไลเปสจาก Endophytic fungal โดยทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยด้วยอัตราการป้อนของสารสายป้อนเท่ากับ 17 ลิตรต่อนาที (อัตราการป้อนของไลเปสเท่ากับ 2.63 - 9.36 กรัมต่อนาที) ที่แรงดัน 1.5 กิโลต่อตารางเซนติเมตร, อัตราการป้อนอากาศแห้ง 60 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง, อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 86.4-153.6 องศาเซลเซียส, ปริมาณแลคโตส 1.95-12.05% โดยน้ำหนัก พบว่าเมื่อปริมาณแลคโตสมากขึ้นมีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่ามากขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าสูงขึ้นมีผลทำให้ค่าแอคติวิคี้คงเหลือมีค่าน้อยลง เนื่องจากระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้น จะมีแรงเครียดหลักเกิดขึ้นเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำของโปรตีนที่อยู่บนเปลือกของอนุภาค ทำให้โครงสร้างของโปรตีนบางส่วนเปลี่ยนแปลงไปโดยไม่สามารถคืนสูสภาพเดิมได้ ทำให้โปรตีนนั้นสูญเสียสภาพในการทำหน้าที่เชิงชีวภาพ และจากการศึกษาพบว่าน้ำตาลนั้นมีส่วนช่วยในการปกป้องได้ เนื่องจากน้ำตาลจะเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนที่จะถูกทำให้แห้งในบริเวณที่มีขั้ว ทำให้โครงสร้างของโปรตีนนั้นมีการสูญเสียสภาพอันเนื่องมาจากการถูกระเหยของน้ำลดลง และจากการศึกษาของ Carpenter และ Crown [39] โดยใช้ FT-IR นั้น พบว่ามีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างที่เสถียรเกิดขึ้น และพันธะบางอย่างที่ยึดโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งการ immobilize โปรตีนและการเติมสารปรุงแต่ง

(additive) นั้นมีผลทำให้มีการปกป้องโปรตีนจากการเสื่อมภาพทางเคมีและโครงสร้าง เนื่องจากอัตราการแพร่และอัตราเกิดปฏิกิริยาช้าลง โดยการเติมสารปรุงแต่งลงไปนั้นจะเป็นการลดความเป็นไปได้ที่โมเลกุลของโปรตีนจะเกิดการทำปฏิกิริยาร่วมกันแล้วเกิดการรวมตัวกัน และปริมาณความชื้น (Moisture content)ของผลิตภัณฑ์จะมีค่าน้อยลงเมื่ออุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่ามากขึ้น และปริมาณความชื้นของอนุภาคลดลงจะมีผลให้ความเสถียรและอายุของผลิตภัณฑ์มีค่ามากขึ้นอีกด้วย

สิริรัตน์ กลิ่นกุหลาบ [40] ทำการกักเก็บเอนไซม์ไฟเทสด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยสำหรับการผสมในอาหารสัตว์ โดยแบ่งการทดลองเป็นสองส่วน ส่วนแรกใช้สารสายป้อนในรูปของสารละลายน้ำแป้ง โดยใช้สารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตริน ความเข้มข้นร้อยละ 20 – 40 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้า 100, 120 และ140 องศาเซลเซียส พบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงไฟเทสแห้งมากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของแป้งมอลโตเดกซ์ตรินร้อยละ 40 โดยน้ำหนักและอุณหภูมิของอากาศขาเข้า120 องศาเซลเซียส นั้นจะมีค่าแอคติวิตี้ และเมื่อใช้สารละลายน้ำแป้งไฮแคป 100 พบว่า เมื่อใช้แป้งไฮแคป 100 เป็นวัสดุห่อหุ้มทำให้ผงเอนไซม์ไฟเทสที่ได้มีค่าแอคติวิตี้คงเหลือมากกว่า ส่วนที่สองใช้สารสายป้อนในรูปของอิมัลชันเชิงซ้อน โดยใช้น้ำมันเอ็มซีทีเป็นน้ำมันและพลูโรนิค แอล 31 เป็นสารลดแรงตึงผิวและใช้แป้งไฮแคป 100 โดยความเข้มข้นของแป้งไฮแคป 100 ร้อยละ 40 โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้า120 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์ไฟเทสแห้งที่ได้จากสารสายป้อนที่เป็นสารละลายในน้ำแป้งมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือน้อยกว่า

Tales และคณะ [41] ทำการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์หลังผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยเมื่อมีคาร์โบไฮเดรตเป็นวัสดุห่อหุ้ม โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Endophytic Fungus *Cercospora Kikuchii* โดยทำการอบแห้งด้วยอัตราการป้อนของสารสายป้อนเท่ากับ 17 ลิตรต่อนาที (อัตราการป้อนของไลเปสเท่ากับ 4 กรัมต่อนาที) ที่แรงดัน 1.5 กิโลต่อตารางเซนติเมตร, อัตราการป้อนอากาศแห้ง 60 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง, อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส โดยวัสดุห่อหุ้มได้แก่ มอลโตเดกซ์ตริน DE 10, มอลโตเดกซ์ตริน DE 20, แลคโตส (lactose), แมนนิทอล (mannitol), กัมอะราบิค (gum arabic), ทรีฮาโลส (Trehalose) และเบต้า-ไซโคลเดกซ์ตริน (β-cyclodextrin) ที่ความเข้มข้น 2, 6 และ 10% โดยน้ำหนัก แล้วทำการเก็บผงเอนไซม์แห้งที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 เดือน พบว่า แลคโตส 10% จะให้การกักเก็บดีที่สุดโดยให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือเท่ากับ 100% นั่นก็คือไม่สูญเสียเลย แต่เมื่อความเข้มข้นของวัสดุห่อหุ้มลดลงประสิทธิภาพของการกักเก็บจะลดลงด้วยไม่ว่าจะใช้วัสดุห่อหุ้มชนิดใดก็ตาม และสำหรับแป้งมอลโตเดกซ์ตรินนั้นประสิทธิภาพการกักเก็บมีค่า 90% เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 10% แล้วทำการเก็บผงเอนไซม์แห้งที่อุณหภูมิ 5, 25 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 เดือน พบว่าเมื่อทำการเก็บที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้แอคติวิตี้คงเหลือลดลง เช่น มอลโตเดกซ์ตริน DE 10 เมื่อเก็บที่ 5 องศาเซลเซียสมีแอคติวิตี้คงเหลือ 67.2% แต่ที่ 40 องศา

เซลเชียสจะมีแอคติวิตี้คงเหลือ 20.5 % และสำหรับมอลโตเดกซ์ตริน DE 20 เมื่อเก็บที่ 5 องศาเซลเซียสมีแอคติวิตี้คงเหลือ 46.6% แต่ที่ 40 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตี้คงเหลือ 15.0 %

2.8 ตำแหน่งของเอนไซม์ในการ immobilize

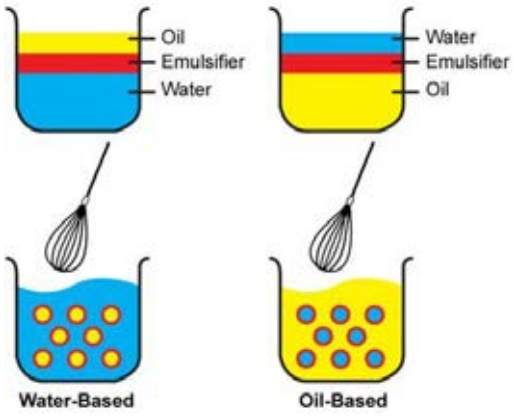
Kouisni และ Rochefort [42] ใช้กล้องคอนโฟคอล (Confocal Laser Scanning Microscope,CLSM) ในการศึกษาตำแหน่งของโปรตีนในไมโครแคปซูล ซึ่งใช้ BSA เป็นตัวแทนของ laccase โดยจะทำการย้อม BSA ด้วย sulforhodamide แล้วทำการย้อมสี แคปซูล polythyleneimine ด้วย FITC เพื่อที่จะใช้บ่งบอกตำแหน่งของผนังแคปซูลที่กักเก็บเอนไซม์ พบว่าโปรตีนอยู่บริเวณของผนังของแคปซูล เนื่องจากเกิดพันธะไอออนิกที่แข็งแรงระหว่างโพลิเมอร์กับโปรตีน โดยพบว่าเมื่อปริมาณ BSA มากขึ้นก็จะมี BSA ภายในแคปซูลมากขึ้นเป็นสัดสัดส่วนกับโปรตีนภายในแคปซูล

2.9 อิมัลชัน [6, 43-45]

อิมัลชันประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ที่ไม่สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ เช่น น้ำและน้ำมัน ซึ่งสังเกตได้ว่าสารผสมที่ได้นั้นจะมีลักษณะขุ่นมัวและเมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้น ทำให้ต้องมีการเติมอิมัลซิไฟเออร์ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เพื่อทำให้การรวมตัวของสารเหล่านั้นมีความเสถียรมากขึ้น โดยอิมัลชันที่เกิดขึ้นแบ่งออกเป็น 2 วัฏภาค คือ ส่วนที่เป็นหยดเล็ก ๆ ของของเหลวที่เรียกว่าวัฏภาคภายใน หรือส่วนกระจาย (internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า วัฏภาคภายนอกหรือส่วนต่อเนื่อง (external or continuous phase) ซึ่งลักษณะของอนุภาคได้จะขึ้นกับสารที่ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคภายนอก และสามารถแบ่งอิมัลชันตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในและวัฏภาคภายนอก ได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

1. อิมัลชันน้ำในน้ำมัน (oil-in-water emulsion หรือ W/O emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีส่วนต่อเนื่องเป็นน้ำมัน และมีส่วนกระจายเป็นน้ำ เช่น เนย และมาการีน
2. อิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion หรือ O/W emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีส่วนต่อเนื่องเป็นน้ำและมีส่วนกระจายเป็นน้ำมัน เช่น น้ำนมและครีม, น้ำสลัดชนิดข้น และมายองเนส

3. อิมัลชันเชิงซ้อน (Multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น W/O/W หรือ O/W/O โดยในการทำให้เกิดอิมัลชันเชิงซ้อนนั้นจะต้องทำการเตรียมอิมัลชันของสารชั้นในก่อนจากนั้นจึงนำอิมัลชันที่ได้มาทำอิมัลชันซ้อนอีกครั้ง



(ก) (ข)

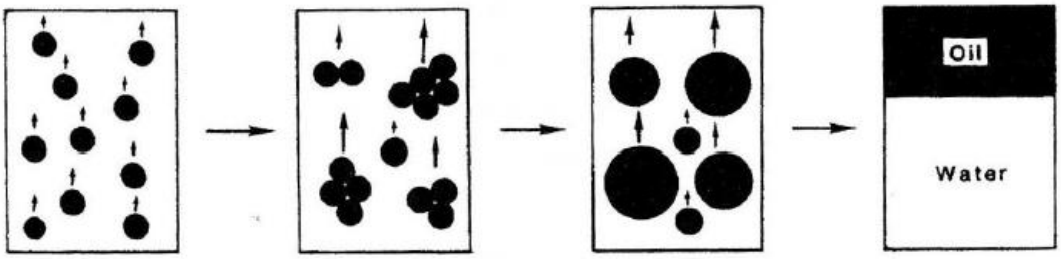
รูปที่ 2.27 แสดงรูปของอิมัลชัน (ก) อิมัลชันน้ำมันในน้ำ (ข) อิมัลชันน้ำในน้ำมัน
(dr-spiller.com.au/your-skin/how-other-ranges-work)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการกักเก็บสารสำคัญในวัสดุห่อหุ้มนั้นส่วนใหญ่สารสายป้อนจะอยู่ในรูปของสารละลาย แต่ต่อมามีการเตรียมสารสายป้อนที่อยู่ในรูปของอิมัลชันซึ่งพบว่าทำให้มีความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบได้ดีกว่า เช่น การใช้เวย์โปรตีนเป็นวัสดุห่อหุ้มทำให้ได้อนุภาคที่มีความสามารถในการต้านทานการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสภาพแวดล้อมได้ดี สำหรับการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยของส้มโดยใช้เทคนิคการอบแห้งแบบพ่นฝอย (Kim และ Morr) พบว่าสามารถใช้เวย์โปรตีนร่วมกับคาร์โบไฮเดรตเป็นวัสดุห่อหุ้มสารให้กลิ่นรสได้ (Young และคณะ , Sheu และ Rosenberg) โดยเวย์โปรตีนจะทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์และทำให้เกิดฟิล์ม ในขณะที่คาร์โบไฮเดรต (มอลโตเดกซ์ตริน) จะทำหน้าที่เป็นสารที่ทำให้เกิดเมทริกซ์ (Sheu และ Rosenberg) และพบว่าการทำอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำส่งผลให้ได้อนุภาคที่มีความเสถียรและมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียดีขึ้น [46] และการทำไมโครอิมัลชันที่บรรจุยาไดอะซิแพมทำให้ได้ตัวยาที่มีความสามารถในการละลายสูงขึ้นและมีการควบคุมการปลดปล่อยของการกักเก็บยาได้ดี [47]

2.9.1 ปัจจัยที่ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของอิมัลชัน

อิมัลชันที่เกิดขึ้นจะไม่ค่อยคงตัวหรือไม่ค่อยมีเสถียรภาพนั้นอาจเกิดการแยกตัวของส่วนน้ำและน้ำมันหรือไขมัน ซึ่งสามารถป้องกันได้โดย

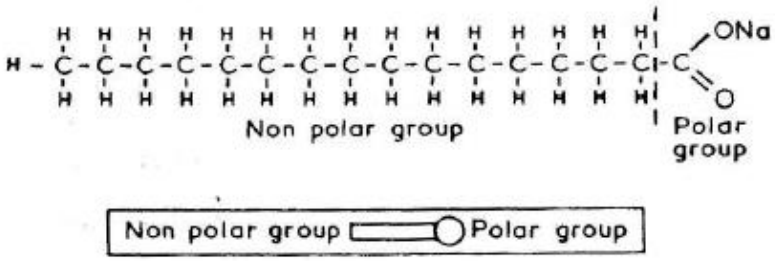
1. สารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier หรือ emulsifying agents) เป็นตัวช่วยทำให้อิมัลชันมีความคงตัวและเสถียรมากขึ้น โดยอิมัลชันเป็นส่วนผสมของน้ำซึ่งเป็นสารที่มีขั้ว (polar) กับน้ำมันซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) ส่วนในโมเลกุลของอิมัลซิไฟเออร์ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (polar) จึงหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (non-polar) จึงหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำมัน (hydrophobic)
2. การใช้อัตราส่วนของส่วนกระจายและส่วนต่อเนื่องที่เหมาะสม



รูปที่ 2.28 ลักษณะการสูญเสียเสถียรภาพของอิมัลชัน [48]

3. การรักษาความหนืดของส่วนต่อเนื่องให้สูง เพื่อป้องกันไม่ให้ส่วนกระจายกลับเข้ามารวมตัวกัน

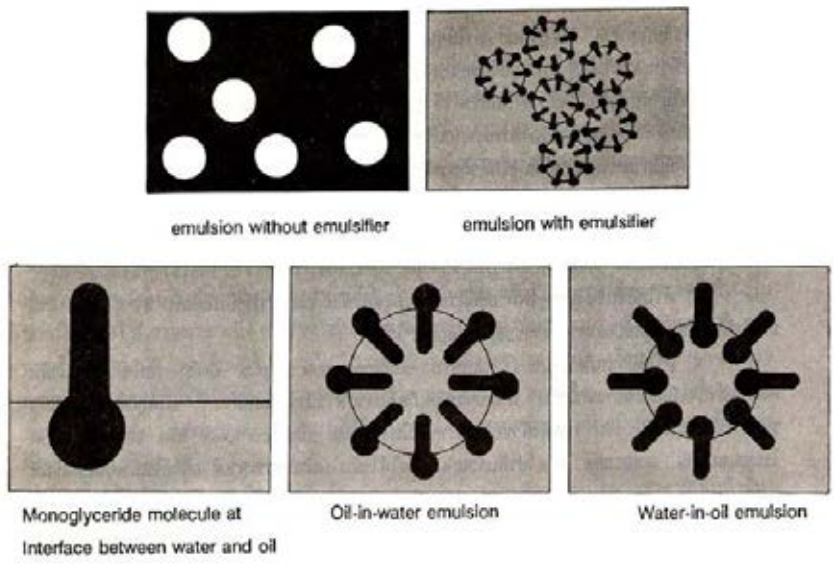
4. การลดขนาดของส่วนกระจายให้เล็กลง ด้วยการทำโฮโมจีไนเซชันด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ซึ่งจะเป็นการทำอิมัลชันที่ความดันสูง 10,000-70,000 kPa ผ่านวาล์วที่มีช่องว่างเล็ก ๆ ที่มีระยะห่าง 15-300 μm ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความดันอย่างรวดเร็วขณะที่ไหลผ่านวาล์วออกมาจะทำให้ส่วนกระจายเกิดการแตกตัวทำให้มีขนาดเล็กลง



รูปที่ 2.29 โมเลกุลของโซเดียมพาลมิเตต (Sodium palmitate) (Brennan และคณะ, 1990)

ตารางที่ 2.2 ค่า HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) และหน้าที่การนำไปใช้ (Smith, 1991)

HLB	Function
4-6	w/o emulsifiers
7-9	Wetting agents
8-18	o/w emulsifiers
13-15	Detergents
15-18	Solubilisers



รูปที่ 2.30 การจัดเรียงตัวของอิมัลซิไฟเออร์ [49]

ตารางที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเสถียรภาพและลักษณะที่ปรากฏกับขนาดอนุภาค (Smith, 1991)

Particle size (μm)	Appearance	Stability
0.05 and smaller	Transparent	Extremely stable
0.05-0.1	Translucent	Excellent
0.1-1.0	Blue white	Good
1.0-10.0	Milky white	Tendency to cream
> 10.0	Coarse	Quick breaking

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำงานวิจัย

1. เอนไซม์ไลเปส (Lipolase 100L) จากบริษัท Novozymes ประเทศสหรัสอเมริกา
2. พาราไนโตรฟีนอล (p-Nitrophenol) จากบริษัท Sigma-Aldrich
3. พาราไนโตรฟีนิลพาลมิเตต (p-Nitropheylpalmitate) จากบริษัท Sigma-Aldrich
4. กัมอะราบิค (Gum arabic)
5. ไทรตอนเอ็กซ์ 100 (Triton X-100)
6. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
7. แป้งมอลโตเดกซ์ตริน จากบริษัทซีทีเคมีคอล ประเทศไทย
8. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)
10. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)
11. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($KNaC_4H_4O_6$)
12. คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทาไฮเดรต ($CuSo_4.5H_2O$)
13. Folin-Ciocalteu
14. FITC Isomer 1 จากบริษัท
15. ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethylformamide, DMF)
16. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องปั่นกวนและให้ความร้อน (Magnetic stirrer and hot plate) ความเร็วรอบ 0 - 1,100 รอบต่อนาที ปริมาตรไม่เกิน 20 ลิตร อุณหภูมิ 0 – 300 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ IKA ประเทศเยอรมันนี
2. เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ยี่ห้อ IKA ประเทศเยอรมัน
3. ตู้อบ (Oven) เพื่อใช้ในการรักษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา

4. เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) รุ่น Nicolet 6700 ยี่ห้อ Thermo sciencetific ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. เครื่องสเปคโตรมิเตอร์ ยี่ห้อ Thermo sciencetific ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-290 ประเทศเยอรมัน
7. เครื่องเอพเพนดอร์ฟเซนตริฟิวก์ ยี่ห้อ eppendorf รุ่น 5417C ประเทศเยอรมัน
8. เครื่องรามานสเปกโตรสโครป รุ่น NT-MDT (NTEGRA spectra) ประเทศรัสเซีย
9. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410 และยังต่อกับอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ธาตุของบริษัท Oxford รุ่น INCA 300
10. กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (Confocal Laser Scanning Microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น Fluoview FV10i-LIV ประเทศญี่ปุ่น
11. เครื่องวัดความชื้นของอนุภาค ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น HR83 ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. คอลัมน์สำหรับHI-trap (Sephadex G-25)

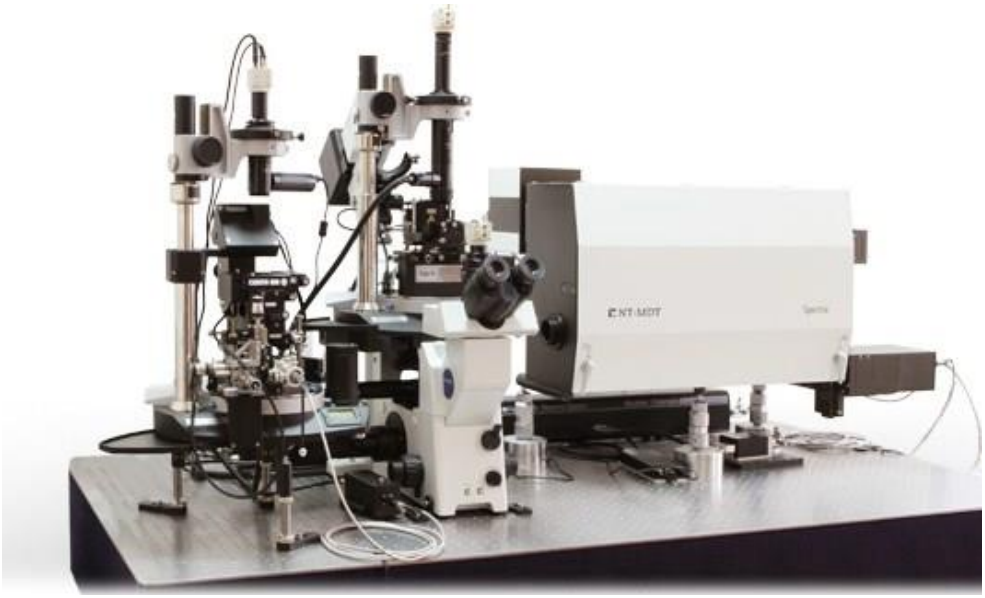
รูปที่ 3.1 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

รูปที่ 3.2 เครื่องสเปคโตรมิเตอร์

รูปที่ 3.3 เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย Buchi B-290

(mybuchi.com/Spray-Drying-Equipment.16249.0.html)

รูปที่ 3.4 เครื่องเอพเพนดอร์ฟเซนตริฟิวก์



รูปที่ 3.5 เครื่องรามานสเปกโตรสโครป (ntmdt.com/afm-raman/ntegra-spectra)

รูปที่ 3.6 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

รูปที่ 3.7 กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล

รูปที่ 3.8 เครื่องวัดความชื้นของอนุภาค

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารสายป้อน

สารสายป้อนในการอบแห้งแบบพ่นฝอยในงานวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบสารละลายน้ำแป้ง และแบบอิมัลชันเชิงซ้อน ($W_1/O/W_2$)

3.3.1.1 การเตรียมสารสายป้อนของเอนไซม์ไลเปสแบบสารละลายน้ำแป้ง

ผสมแป้งกับน้ำที่ไม่มีไอออนด้วยเครื่องกวน (ในอัตราส่วนความเข้มข้นของแป้งต่อน้ำที่ไม่มีไอออนที่ต้องการ) เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นค่อย ๆ เทเอนไซม์ไลเปสในปริมาณที่ต้องการลงในสารละลายน้ำแป้งอย่างต่อเนื่อง โดยในขณะที่ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันนั้นจะมีการหล่อเย็นด้วยน้ำแข็งตลอดเวลา แล้วนำสารละลายเอนไซม์ ไลเปสในน้ำแป้งที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอย หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไลเปสในน้ำแป้งที่ได้ใช้เป็นสารสายป้อนสำหรับการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิอากาศขาเข้าที่กำหนด แล้วนำผงแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่ โดยละลายผงเอนไซม์แห้งในอัตราส่วนเดียวกับปริมาณของแข็งที่มีในสารสายป้อน เพื่อที่จะสามารถเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้

หลังจากการอบแห้งแบบพ่นฝอยและค่าแอคติวิตี้ก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอยได้ ในการคำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์

3.3.1.2 การเตรียมสารสายป้อนของเอนไซม์ไลเปสแบบอิมัลชันเชิงซ้อน ($W_1/O/W_2$) [40]

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก เป็นการเตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (W_1/O) และขั้นตอนที่สอง คือ การเตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมันในน้ำ ($W_1/O/W_2$)

1. การเตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (W_1/O)

เริ่มจากการเตรียมเฟสน้ำมัน โดยการผสมน้ำมันเอ็มซีที (MCT oil) กับสารลดแรงตึงผิวพลูโรนิค แอล 31 ในอัตราส่วนน้ำมันต่อน้ำ เท่ากับ 70:30 โดยน้ำหนักแล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ที่มีการหล่อเย็นด้วยน้ำแข็ง จากนั้นค่อย ๆ เทเอนไซม์ไลเปสลงไปอย่างต่อเนื่อง โดยมีปริมาณเอนไซม์ไลเปสเป็นจำนวน 3 เท่าของสารลดแรงตึงผิว ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ที่มีการหล่อเย็นด้วยน้ำแข็งอีกครั้ง ด้วยความเร็วรอบในการกวน 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

2. การเตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมันในน้ำ ($W_1/O/W_2$)

เริ่มจากการเตรียมสารละลายแป้งดัดแปร (HI-CAP 100) ในปริมาณ 4 ส่วนโดยน้ำหนัก โดยผสมแป้งดัดแปรและน้ำที่ไม่มีไอออนด้วยเครื่องกวนเป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นนำอิมัลชันน้ำในน้ำมันที่ได้จากการเตรียมในขั้นตอนแรกปริมาณ 1 ส่วนโดยน้ำหนัก เทลงในสารละลายแป้งดัดแปรอย่างต่อเนื่อง แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ ที่มีการหล่อเย็นด้วยน้ำแข็ง ความเร็วรอบในการกวน 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจะได้อิมัลชันเชิงซ้อน แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอย หลังจากนั้นนำอิมัลชันเชิงซ้อนที่ได้ใช้เป็นสารสายป้อนสำหรับการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้าที่กำหนด แล้วนำผงแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่ โดยละลายผงเอนไซม์แห้งในอัตราส่วนเดียวกับปริมาณของแข็งที่มีในสารสายป้อน เพื่อที่จะสามารถเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้หลังจากการอบแห้งแบบพ่นฝอยและค่าแอคติวิตี้ก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอยได้ ในการคำนวณหาประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์

3.3.2 การทำสารสายป้อนให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย

นำสารที่ได้จากขั้นตอน 3.3.1 มาใช้เป็นสารสายป้อนที่จะใช้ในการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยปั๊มจะดูดสารสายป้อนเข้าสู่เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยผ่านเครื่องทำละอองหรือหัวฉีด (atomizer) ที่อัตราการไหลที่กำหนด เมื่อสารสายป้อนที่ถูกทำให้เป็นละอองสัมผัสกับอากาศร้อนภายในห้องอบแห้งที่มีอากาศร้อนไหลผ่านใน

อุณหภูมิที่กำหนด จะเกิดการแลกเปลี่ยนความร้อนทำให้น้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายในชั้นนอกสุดเกิดการระเหยอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ผงแห้งของเอนไซม์ไลเปสซึ่งจะถูกเก็บอยู่ในอุปกรณ์สะสมอนุภาค (collector) แล้วนำผงแห้งของเอนไซม์ ไลเปสที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของเอไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่

3.3.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะต่าง ๆ

1. ความเสถียรในการเก็บรักษา

เก็บผงเอนไซม์แห้งและเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกักเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25, 45 องศาเซลเซียสและทำการวัดค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ไลเปสทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยจะเก็บผงเอนไซม์แห้งในถุงฟอยด์ซึ่งมีการปิดผนึกอย่างแน่นหนา

2. ความเสถียรในการเก็บรักษาร่วมกับผงซักฟอก

เก็บผงเอนไซม์แห้งร่วมกับผงซักฟอกในอัตราส่วนที่เท่ากัน (เพื่อที่จะสามารถคำนวณกลับในการวัดค่าแอคติวิตี้ได้สะดวก) โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 4, 25, 45 องศาเซลเซียสและทำการวัดค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ไลเปสที่เหลืออยู่ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน โดยจะเก็บผงเอนไซม์แห้งที่ผสมกับผงซักฟอกในถุงฟอยด์ซึ่งมีการปิดผนึกอย่างแน่นหนา

โดยความเสถียรของผงเอนไซม์แห้งนั้น ประเมินจากประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ (ณ เวลานั้น) เทียบกับประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์เริ่มต้น (ก่อนทำการเก็บรักษา) ซึ่งจะใช้ค่าว่า retention ในการอธิบาย โดย $Retention(\%) = \frac{\text{ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ก่อนทำการเก็บรักษา}}{\text{ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์หลังทำการเก็บรักษา}} \times 100\%$

3.3.4 การวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของผงแห้งของเอนไซม์ไลเปส

การหาค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส (ถ้าเอนไซม์อยู่ในรูปผงให้ทำการละลายก่อน) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) เพื่อวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยเตรียมสารละลายดังตารางที่ 3.1 แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีแล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสที่มีอยู่

สารละลาย ก. คือ สารละลายไนโตรฟีนิลพาลมิเตรตในไอโซโพรพานอล ความเข้มข้น 0.71 มิลลิโมล

สารละลาย ข. คือ สารละลายที่ประกอบด้วย 0.4% โดยน้ำหนักของไทรตอน-เอ็กซ์ 100 และ 0.1% โดยน้ำหนักของกัมอะราบิค

บัฟเฟอร์ คือ บัฟเฟอร์ที่ได้จากการเตรียม Tris-HCL ความเข้มข้น 0.1 M pH 9.0

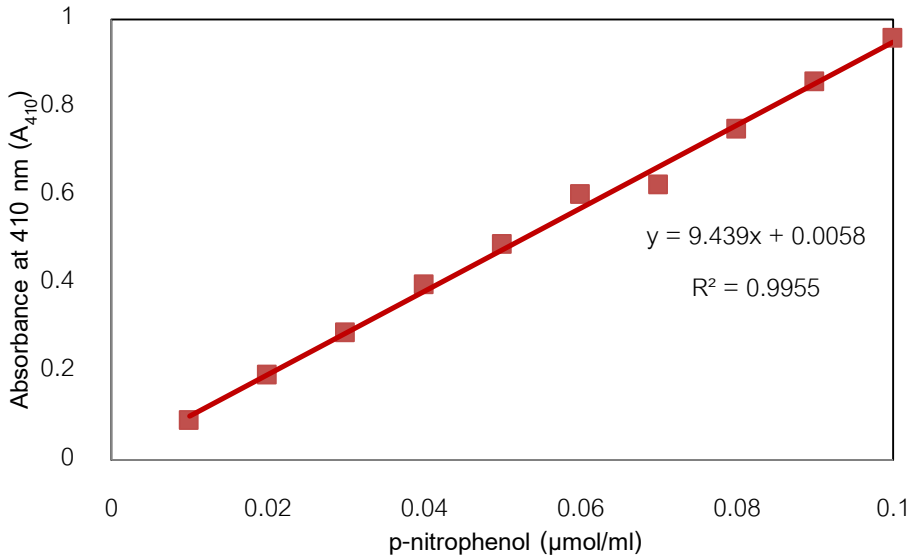
ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมลต่อเวลาภายใต้สภาวะที่กำหนด

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณที่ใช้ในการทำสารละลายที่จะใช้ในการวัดแอคติวิตี้

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (µl)			
	Blank	Control no enzyme	Control no substrate	Experimental
สารละลาย ก.	-	9	-	9
สารละลาย ข.	81	81	81	81
บัฟเฟอร์	119	110	99	90
เอนไซม์	-	-	20	20
รวม(µl)	200	200	200	200

<u>กราฟสารละลายมาตรฐาน</u>

เตรียมสารละลายไนโตรฟีนอลในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 9.0 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกค่าแล้วนำมาพล็อตกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟีนอลและค่าดูดกลืนแสง



รูปที่ 3.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณพาราไนโตรฟีนอล (µmol/ml) และค่าดูดกลืนแสงจริง (A_{410})

ค่าดูดกลืนแสงจริง(A_{410}) = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้(A_{410}) – ค่าดูดกลืนแสงของภาชนะ(Blank, 0.05187)

$$\text{ปริมาณพาราไนโตรฟีนอล}\left(\text{ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร}\right) = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงจริง}(A_{410}) - 0.005}{9.439}$$

จำนวนยูนิตของเอนไซม์ไลเปส

$$= \frac{\text{ปริมาณพาราไนโตรฟีนอล}\left(\text{ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร}\right) \times \text{ปริมาณการเจือจางเอนไซม์}}{0.02 \text{ มิลลิลิตร} \times 30 \text{ นาที}}$$

โดยกำหนดให้ Remaining Activity(%) สำหรับการคำนวณประสิทธิภาพในการอบแห้งแบบพ่นฝอย หมายถึง (ดังสมการด้านล่าง)

$$Remaining\ Activity(\%) = \frac{\text{แอคติวิตี้หลังจากผ่านการอบแห้งแบบพ่นฝอย}}{\text{แอคติวิตี้ก่อนผ่านการอบแห้งแบบพ่นฝอย}} \times 100\ \%$$

3.3.5 การวิเคราะห์ลักษณะผงแห้งของเอนไซม์ไลเปส

1. วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของอนุภาคและขนาดของอนุภาค

วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของอนุภาคและขนาดของอนุภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) ในการศึกษาโครงสร้างภายนอก โดยนำผงเอนไซม์แห้งมาติดลงบน SEM stub และศึกษาโครงสร้างภายในของผงเอนไซม์แห้ง โดยการนำผงเอนไซม์ลงบนเทปกาวแล้วนำเทปกาวมาแปะทับและดึงเทปกาวทั้งสองด้านออกจากกันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลให้อนุภาคผงแห้งบางส่วนแตกออกจากกัน แล้วนำไปแปะลงบน SEM stub แล้วทำการเคลือบตัวอย่างด้วยทองคำ แล้วนำตัวอย่างที่เตรียมไว้วางในห้องวางตัวอย่างของเครื่อง SEM ที่อัตราเร่งของอิเล็กตรอน (Electron concentration) 15 kV ซึ่งทำการถ่ายภาพในขณะที่กำลังขยายต่ำเพื่อดูภาพรวมของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งและถ่ายภาพในขณะที่กำลังขยายสูงเพื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวของอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง

2. วิเคราะห์ความชื้นของอนุภาค

วิเคราะห์ความชื้นของอนุภาคโดยใช้เครื่อง Halogen Moisture analyzer ทำการวัดความชื้นของผงเอนไซม์แห้งโดยชั่งสารจำนวน 0.5 กรัมลงบนถาดแล้วทำการเริ่มวัดความชื้น โดยอาศัยความร้อนจากหลอดฮาโลเจนภายในเครื่องทำให้น้ำหนักของสารที่คงเหลือลดลง แล้วนำไปคำนวณปริมาณความชื้นของอนุภาคที่มีในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งจะทำการทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยความชื้นของอนุภาคที่ได้

3. วิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง

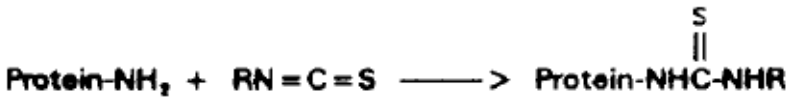
วิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งใช้เครื่อง Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) โดยอาศัยการเร่งอิเล็กตรอนให้มีพลังงานสูงพอที่จะเข้าชนสารตัวอย่าง ทำให้อิเล็กตรอนในระดับชั้นพลังงานที่อยู่วงในบางส่วนได้รับพลังงานแล้วหลุดออกไปจากอะตอม จากนั้นอิเล็กตรอนวงนอกจะคายพลังงาน (ในรูปรังสีเอกซ์ ซึ่งมีค่าเฉพาะตามธาตุ และเมื่อทำการวัดค่าพลังงานนี้ด้วย EDX จะสามารถวิเคราะห์ได้ว่าตัวอย่างประกอบไปด้วยธาตุใดบ้าง โดยแสดงผลเป็น สเปกตรัมพลังงานของธาตุต่าง ๆ พร้อมกับระบุสัดส่วนปริมาณของแต่ละส่วนประกอบ สามารถสร้างแผนที่ระบุได้ว่าแต่ละธาตุอยู่ในบริเวณใดบ้าง (Mapping)) ออกไปบางส่วนรวมทั้งมีการเปลี่ยนชั้นพลังงานเข้ามาแทนที่อิเล็กตอนนี่หลุดออกไป โดยเตรียมตัวอย่างเหมือนกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แล้วทำการวิเคราะห์องค์กระกอบของธาตุที่มีอยู่ในตัวอย่าง เพื่อเลือกธาตุที่ต้องการทำ Chemical Mapping ที่ต้องการจะศึกษาการกระจายตัวบนผิวของอนุภาค โดยจะมีความแม่นยำมากเมื่อตัวอย่างมีความหนาประมาณ 100 nm หรือ 0.1 μm [50]

วิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งใช้เครื่องรามานสเปกโตรสโครป รุ่น NT-MDT (NTEGRA spectra) ประเทศรัสเซีย ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์บนอนุภาค โดยอาศัยหลักการชนแบบไม่ยืดหยุ่นระหว่างโฟตอนกับโมเลกุลของสาร จากนั้นพลังงานบางส่วนจะถูกถ่ายเทไปยังโมเลกุลทำให้เกิดการสั่นของโมเลกุลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง polarizability แล้วเกิดกระเจิง โดยเตรียมตัวอย่างบน stub แล้ววางในห้องวางตัวอย่างของเครื่องรามานสเปกโตรสโครปแล้วทำการวิเคราะห์ เริ่มจากการหาตำแหน่งของรามานพีคของสารที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคแต่ละชนิด จากนั้นทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่สนใจศึกษาตำแหน่งของสารที่เป็นองค์ประกอบแต่ละชนิด โดยจะทำการ Mapping คล้ายกับ EDX แต่ต่างกันตรงที่จะเป็นการ Mapping การกระจายตัวขององค์ประกอบนั้น ๆ ซึ่งจะอาศัยพีคของรามานที่แตกต่างกัน

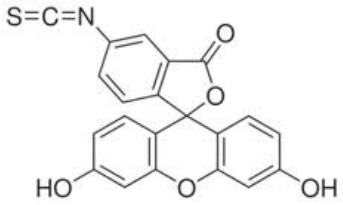
วิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล (CLSM) ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์บนอนุภาค โดยเตรียมตัวอย่างบน stub แล้ววางในห้องวางตัวอย่างของกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอล แล้วทำการวิเคราะห์ ซึ่งในการวิเคราะห์ตำแหน่งของไลโปเลส 100 แอลนั้นต้องทำการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์กับไลโปเลส 100 แอลด้วยสี Fluorescein-5-Isothiocyanate (FITC Isomer I) ก่อนแล้วทำการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 ซึ่งอาศัยหลักการโครมาโตกราฟีในการแยก เนื่องจากการคอลัมน์ Sephadex G-25 ที่ใช้ในการแยกนั้น เป็นการแยกโดยใช้ขนาดของโมเลกุลในการแยก โดยสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะแทรกเข้าไปอยู่ในรูพรุนของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์และสารที่มีมวลโมเลกุลสูงจะแทรกตัวอยู่ตามช่องว่างระหว่างคอลัมน์และอนุภาคที่อยู่ในคอลัมน์ ทำให้สามารถผ่านลงสู่ด้านล้างของคอลัมน์ได้ก่อน โดยไลโปเลส 100 แอลที่ถูกย้อมด้วยสีนั้นจะถูกแยกผ่านคอลัมน์มาก่อน แล้วจึงนำไปผสมเข้ากับสารละลายน้ำแป้งเป็นสารสายป้อนแล้วนำไปผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย จะได้ผงเอนไซม์แห้งที่มีสีฟลูออเรสเซนต์ติดอยู่ หลังจากนั้นจึงนำผงเอนไซม์แห้งที่ได้ไปเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตำแหน่งเอนไซม์ของอนุภาค

หมายเหตุ

สี FITC Isomer 1 เป็นสีเรืองแสงที่ให้แสงสีเขียว มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 389.38 กรัมต่อโมล โดยหมู่ isothiocyanate (–N=C=S) ทำปฏิกิริยากับหมู่ primary amine ของโปรตีน, เพปไทด์ และโมเลกุลทางชีวภาพ ดังรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 สมการแสดงการปฏิกิริยาของโปรตีนกับสี FITC



รูปที่ 3. 11 แสดงสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสี FITC

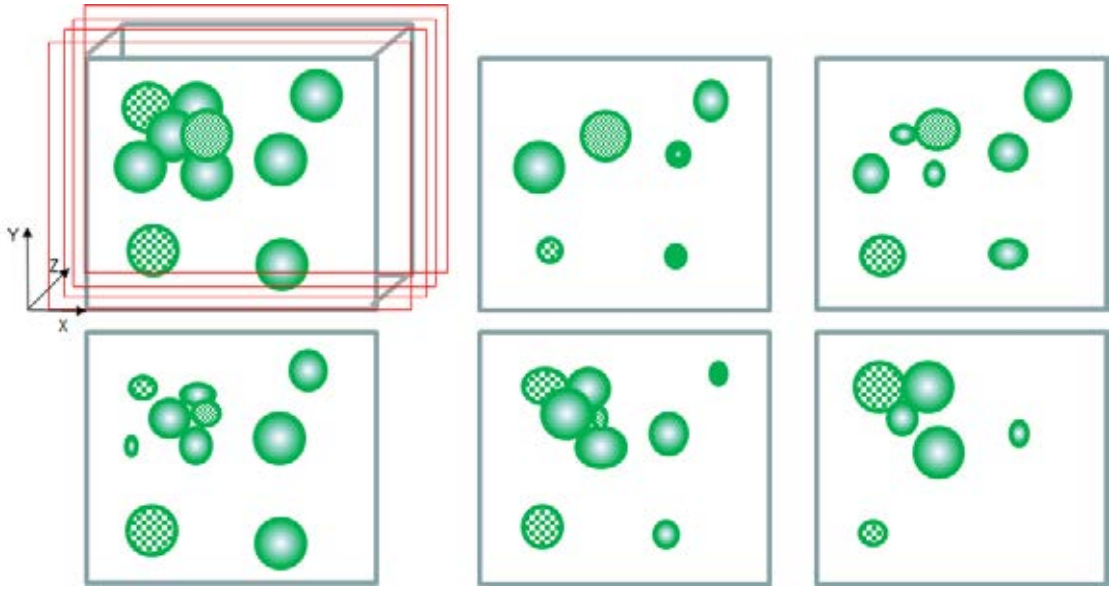
การย้อมสีไลโปเลส 100 แอล ด้วยสี FITC

1. เตรียมไลโปเลส 100 แอล โดยเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตในความเข้มข้น 0.1 M, pH 8.3
2. ละลาย FITC Isomer1 ซึ่งเป็นสีย้อมที่ทำปฏิกิริยาที่หมู่เอมีน (amine) ในตัวทำละลายไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (DMF) 10 mg/ml
3. เติมสีย้อมที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ลงในไลโปเลส 100 แอลที่เตรียมในขั้นตอนที่ 1 ในอัตราส่วน สีย้อมต่อเอนไซม์เท่ากับ 1 : 10 โดยปริมาตร ในขณะที่มีการปั่นกวนตลอดเวลา
4. บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในขณะที่มีการปั่นกวนตลอดเวลา
5. แยกไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC ด้วยคอลัมน์ HI-trap (Sephadex G-25)

กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) [51]

เป็นกล้องที่ใช้สำหรับงานที่ต้องการภาพที่มีความละเอียดสูงโดยสามารถทำการเก็บภาพตามความลึกของชิ้นได้งาน ซึ่งต่างจากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยสามารถบันทึกภาพทีละจุดแล้วนำสัญญาณที่บันทึกได้ทั้งหมดมาประมวลผลสร้างภาพ 2 มิติให้เป็นภาพ 3 มิติได้ ซึ่งในการทำงานนั้นจะเริ่มจากแสงเลเซอร์

จะถูกปล่อยออกมาจากแหล่งกำเนิดแสดงแบบจุดอ่านเลนส์ที่ทำหน้าที่ในการโฟกัสจุด ไปยังตัวอย่างโดยที่แสงนั้นจะถูกสะท้อนกลับออกมายังเลนส์อีกครั้ง (โดยที่จะมีความยาวคลื่นแตกต่างกับแสงเลเซอร์ที่ถูกปล่อยออกไปจากแหล่งกำเนิด) ผ่านไปยังตัวแยกแสง (beam slitter) ซึ่งจะส่งผลให้แสงบางช่วงความยาวคลื่นสามารถผ่านไปได้ (แสงจากแหล่งกำเนิด) ในขณะที่แสงในช่วงความยาวคลื่นอื่นจะถูกสะท้อนกลับออกมาผ่านไปยังรูปขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ในการรับแสงทำให้ได้ภาพที่คมชัด ซึ่งความสว่างของภาพจะขึ้นกับความเข้มของสัญญาณแสงสะท้อน โดยเมื่อได้ภาพ 2 มิติที่ระดับความลึกที่ต่างกันแล้วนั้น ก็จะสามารถนำภาพดังกล่าวมาประมวลผงเป็นภาพ 3 มิติ โดยการใช้เทคนิค CLSM นั้นก็จะมีความสามารถในการใช้งาน โดยจะขึ้นกับชนิดของตัวอย่างนั้น ๆ ทำให้ระดับความลึกที่จะสามารถทำการโฟกัสได้ต่างกัน



รูปที่ 3.12 แสดงการประมวลผลจากภาพ 2 มิติ มาทำเป็นภาพ 3 มิติ

4. วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาค

ใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) ทำการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาค เตรียมตัวอย่างโดยการผสมตัวอย่างที่ต้องการวัดหมู่ฟังก์ชันเข้ากับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วทำการบดให้เป็นเนื้อด้วยกัน แล้วทำการอัดเพื่อขึ้นรูปแล้วนำไปใส่ในที่ใส่ตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์

บทที่4

ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้ไลโปเลส 100 แอลเป็นสารสายป้อน

ปัจจุบันการกักเก็บเอนไซม์หรือการ Immobilize เอนไซม์นั้นมีการศึกษาโดยการใช้เทคโนโลยีการอบแห้งแบบพ่นฝอยอย่างแพร่หลาย แต่ยังอยู่ในการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการกักเก็บเอนไซม์ไลเปส จึงต้องมีการอบแห้งแบบพ่นฝอยเอยไซม์โดยที่ไม่มีการเติมสารอื่น ๆ เพื่อที่จะสามารถทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเติมสารอื่นเพื่อช่วยในการกักเก็บเอนไซม์ได้

งานวิจัยนี้ทำการอบแห้งด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นไลโปเลส 100 แอล , อัตราการป้อน 6 มิลลิลิตรต่อนาที, aspirater 20 % และใช้อะตอมไมเซอร์แบบหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer) เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 - 200 องศาเซลเซียส

4.1.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของไลโปเลส 100 แอล

ในการทดสอบหาค่าแอคติวิตี้นั้นเมื่อเอนไซม์อยู่ในรูปผงเอนไซม์แห้งจะต้องทำการละลายให้อยู่ในรูปของของเหลว โดยจะละลายในอัตราส่วนเดียวกับปริมาณของแข็งที่มีอยู่ในไลโปเลส 100 แอล (ละลายผงเอนไซม์แห้ง 0.082 กรัมในน้ำ 0.912 กรัม, solid content เท่ากับร้อยละ 8.2 โดยน้ำหนัก) จากนั้นจึงนำมาทดสอบหาค่าแอคติวิตี้ ดังหัวข้อที่ 3.3.4 การวิเคราะห์ค่าแอคติวิตี้ของผงเอนไซม์แห้ง

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นไลโปเลส 100 แอล

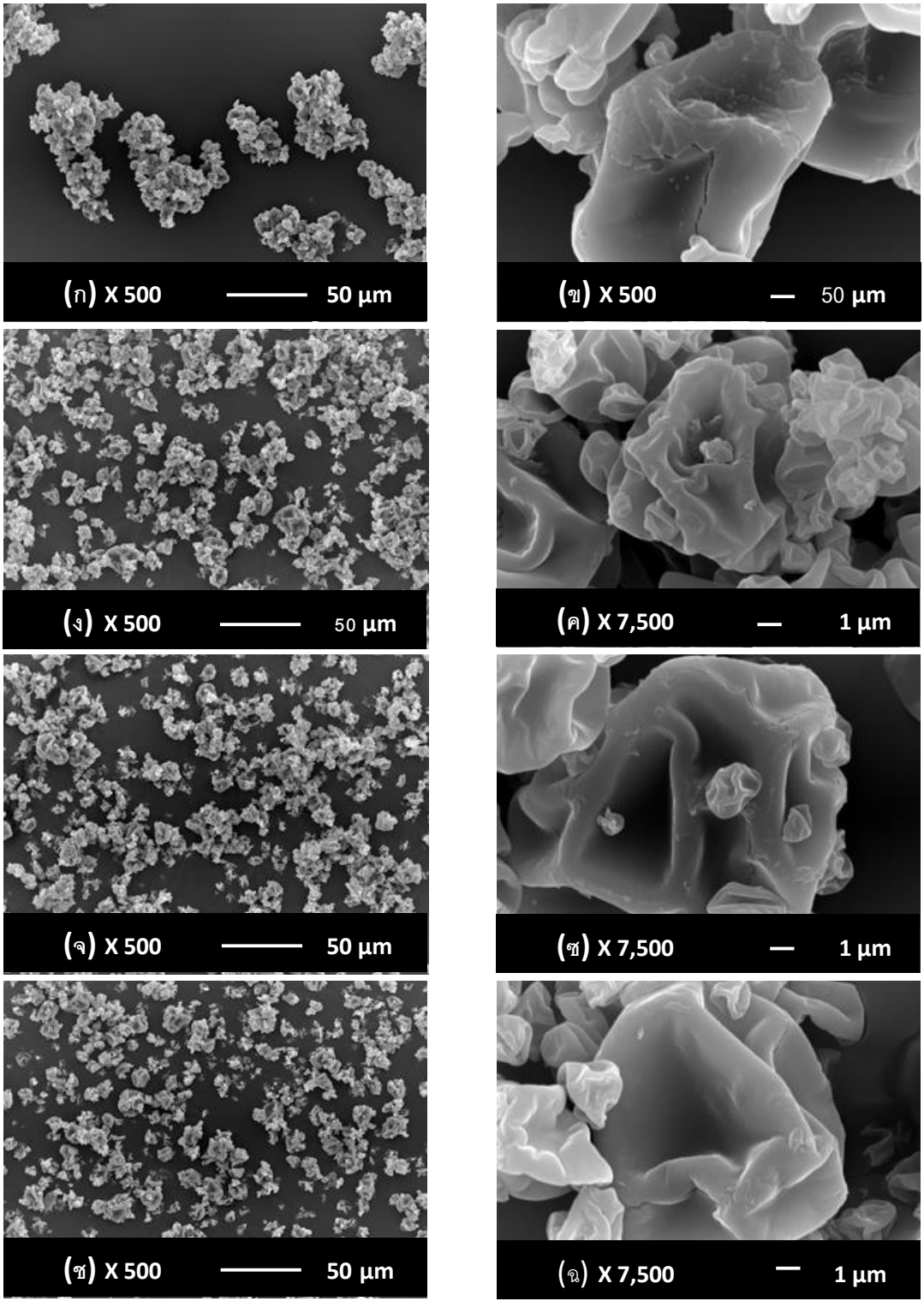
อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า (°C)	อุณหภูมิของอากาศขาออก (°C)	ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ (%)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าแอคติวิตี้ต่อกรัม (unit/g)	ปริมาณความชื้น (moisture content,%)
110	66	14.77	11.93	1.86	812 ± 20	10.37
140	87	14.32	11.85	2.25	788 ± 20	9.38
170	102	12.34	11.67	2.15	679 ± 20	8.68
200	121	10.38	10.00	2.38	571 ± 20	7.65

จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยไลโปเลส 100 แอลนั้นทำให้ค่าแอคติวิตี้ลดลงอย่างมาก มีค่าเพียง 10 - 15 % เมื่อเทียบกับไลโปเลส 100 แอลที่ไม่ผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งการอบแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์ไลเปสโดยตรงนั้นมีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังผ่านกระบวนการมีค่าน้อยมาก อันเนื่องมาจากการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากการสูญเสียน้ำของโปรตีน (เอนไซม์) และความร้อน ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลในทำหน้าทางชีวภาพของโปรตีนอย่างมาก เนื่องจากไลโปเลส 100 แอลจะมีการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส [9] จึงไม่เหมาะสมในการกักเก็บเอนไซม์โดยไม่มีการเติมสารปรุงแต่ง และจากงานวิจัยนี้พบว่าอุณหภูมิขาออกของอากาศมีค่าในช่วง 66-121 องศาเซลเซียส นั่นหมายถึงอุณหภูมิของผิวของอนุภาคผงไลโปเลส 100 แอลแห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์เป็นเหตุที่ทำให้แอคติวิตี้คงเหลือเมื่อผ่านการอบแห้งแบบพ่นฝอยมีค่าลดลง แต่เนื่องจากอุณหภูมิภายในของอนุภาคจะมีค่าน้อยกว่าภายนอกจึงทำให้เอนไซม์ที่กระจายตัวภายในอนุภาคนั้นยังคงมีความสามารถทางชีวภาพอยู่ จึงยังคงมีค่าแอคติวิตี้คงเหลืออยู่บางส่วน

แอคติวิตี้ของไลโปเลส 100 แอล ที่ไม่ผ่านกระบวนการกักเก็บมีค่าเท่ากับ 450 ยูนิตต่อ ไลโปเลส 100 แอล 1 มิลลิลิตร โดยไลโปเลส 100 แอลจะมีของแข็ง (solid content) เพียงร้อยละ 8.2 โดยน้ำหนัก ซึ่งทำให้ค่าแอคติวิตี้ของไลโปเลสมีค่าเท่ากับ 5,500 ยูนิตต่อน้ำหนักไลโปเลส 100 แอลแห้ง 1 กรัม แต่เมื่อผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยมาแล้วนั้นจะทำให้แอคติวิตี้ของไลโปเลสคงเหลือมีค่าเท่ากับ 500 - 800 ยูนิตต่อน้ำหนักไลโปเลส 100 แอล แห้ง 1 กรัม (ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ 10 -15%)

4.1.2 โครงสร้างอนุภาคไลโปเลส 100 แอล หลังผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย

เมื่อพิจารณาโครงสร้างภายนอกของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าโครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้งที่ได้นั้นเป็นทรงกลม โดยมีพื้นผิวที่มีลักษณะเป็นหลุมโดยรอบอนุภาค ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosenberg และคณ [52]ะ และสิริรัตน์ [40] ซึ่งพบว่าอนุภาคที่เกิดขึ้นนั้นเกิดการจากหดตัวของอนุภาคระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย อันเนื่องมาจากระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นอุณหภูมิผิวของอนุภาคจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจากการสัมผัสกับอากาศร้อนทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนความร้อนและการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็ว จึงเกิดการสร้างของเปลือกอนุภาคและเมื่อผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าอนุภาคที่เกิดขึ้นนั้นถูกระเหยน้ำออกไปในปริมาณมาก จึงเกิดการยุบตัวของพื้นผิวของอนุภาคเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะดังรูป เนื่องจากการสูญเสียน้ำ จากรูป 4.1 พบว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าสูงขึ้นจะมีส่งผลให้โครงสร้างของอนุภาคมีการหดตัวเป็นหลุมมากขึ้น



รูปที่ 4.1 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อใช้ไลโปเลส 100 แอลเป็นสารสายป้อน โดยที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (ก, ข) 110°C , (ค, ง) 140°C , (จ, ฉ) 170°C ,(ช, ฌ) 200°C

เนื่องจากการระเหยไปของน้ำ ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของผงเอนไซม์แห้งกับอากาศจะมีค่ามากขึ้นไปด้วยทำให้เพิ่มโอกาสการสัมผัสกับอากาศร้อน ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์จึงมีค่าลดลงอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง ดังตารางที่ 4.1

4.1.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงไลโปเลส 100 แอล

จากการศึกษาพบว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าสูงขึ้น มีผลทำให้ความชื้นของผงเอนไซม์แห้งที่ได้มีค่าลดลง เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนมีค่าสูงขึ้นทำให้อัตราการระเหยของน้ำมีค่าสูงขึ้นด้วย ส่งผลให้ผงเอนไซม์แห้งที่ได้มีความชื้นน้อยลง และยังพบว่าการที่อุณหภูมิของอากาศขาเข้าสูงขึ้นมีผลทำให้ขนาดของผงเอนไซม์แห้งที่ได้มีขนาดเล็กลง ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างภายนอกจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เนื่องจากเกิดการหดตัวของอนุภาคที่มากกว่าทำให้อนุภาคนั้นมีขนาดเล็กลง ดังตารางที่ 4.1

4.2 การศึกษาผลของปริมาณของวัสดุห่อหุ้มในสารสายป้อน

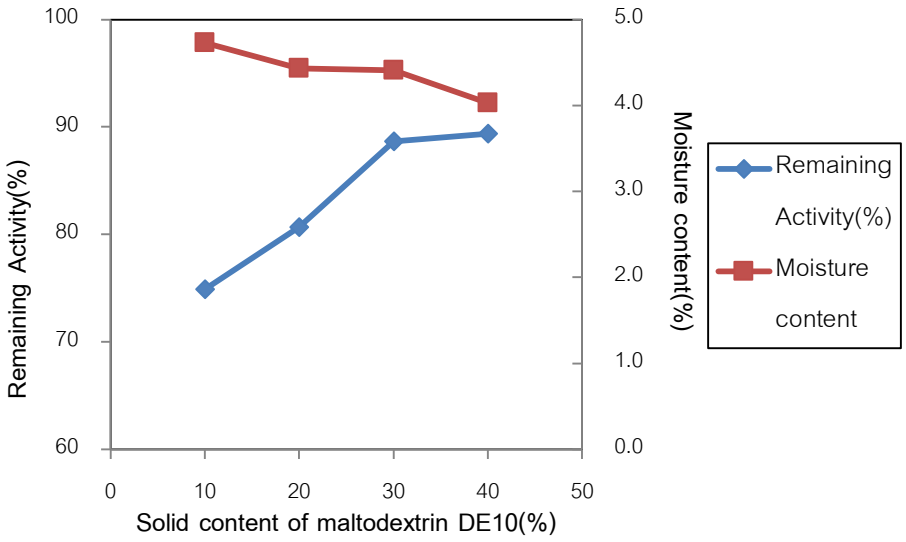
จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยไลโปเลส 100 แอล (เอนไซม์) โดยที่ไม่มีการเติมสารอื่น พบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บมีค่าต่ำมาก ทำให้มีการเติมสารปรุงแต่ง (additive) หรือวัสดุห่อหุ้มเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ โดยปริมาณของวัสดุห่อหุ้มก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บเช่นกัน ซึ่งเมื่อปริมาณของวัสดุน้อยเกินไปก็จะทำให้สารสำคัญที่ต้องการกักเก็บนั้นไม่สามารถถูกกักเก็บได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้สูญเสียสารสำคัญเหล่านั้นไประหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย และเมื่อปริมาณของวัสดุห่อหุ้มมากเกินไปนอกจากจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตแล้วยังไม่ช่วยให้ประสิทธิภาพการกักเก็บดีขึ้นและยังส่งผลให้กักเก็บสารสำคัญได้ในปริมาณที่น้อยลงอีกด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาปริมาณวัสดุห่อหุ้มที่ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญดีที่สุด

งานวิจัยนี้ ทำการอบแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 โดยน้ำหนักผสมกับไลโปเลส 100 แอล ในอัตราส่วนไลโปเลส 100 แอล 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส, อัตราป้อน 6 มิลลิลิตรต่อนาที, aspirater 20 % และใช้อะตอมไมเซอร์แบบหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer) เมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่าร้อยละ 10 – 40 โดยน้ำหนัก

4.2.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งเท่ากับร้อยละ 10 – 40 โดยน้ำหนัก

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมากขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บไลโปเลส 100 แอลทำได้ดีขึ้น ซึ่งประมวลผลด้วยค่าแอคติวิตี้ของไลเปสที่คงเหลือ จากรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตรินร้อยละ 40 โดยน้ำหนักจะให้ผลการกักเก็บได้ดีที่สุด มีค่าแอคติวิตี้คงเหลือประมาณร้อยละ 90 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตรินสูงขึ้น ค่าแอคติวิติคงเหลือของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้น เป็นผลเนื่องจากแป้งมอลโตเดกซ์ตรินจะช่วยในการปกป้องเอนไซม์จากความร้อนระหว่างกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยแป้งมอลโตเดกซ์ตรินจะรับพลังงานความร้อนจากอากาศร้อนไปส่วนหนึ่งทำให้เอนไซม์นั้นรับความร้อนในปริมาณที่น้อยลง โดยความร้อนจากอากาศร้อนขาเข้านั้นทำให้เกิดการระเหยของน้ำซึ่งทำให้การสูญเสียน้ำทำให้โครงสร้างของเอนไซม์นั้นเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้เอนไซม์นั้นสูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ทางชีวภาพ แต่อุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งมากขึ้น ซึ่งในทางทฤษฎีนั้นเมื่ออุณหภูมิของอากาศขาออกสูงขึ้นควรจะทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าลดลง เนื่องจากเอนไซม์จะได้รับพลังงานความร้อนจากอากาศร้อนขาเข้ามากขึ้น ทำให้อนุภาคของผงเอนไซม์แห้งมีอุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติมากขึ้น แต่ในการวิจัยในหัวข้อนี้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือกลับมีค่าสูงขึ้นนั้น เป็นผลมาจากปริมาณของวัสดุห่อหุ้มที่มากขึ้นมีผลให้สามารถป้องกันเอนไซม์จากความร้อนได้ดีขึ้นนั่นเอง เนื่องจากแป้งมอลโตเดกซ์ตรินที่เติมลงไปนั้นจะช่วยรับพลังงานไปบางส่วนทำให้เมื่อปริมาณของแป้งมากขึ้นเอนไซม์จึงได้รับพลังงานความร้อนลดลง โดยอุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่าสูงขึ้นในขณะที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าเท่ากัน คือ 110 องศาเซลเซียสนั้นเป็นผลมาจากพลังงานที่ใช้ต้องใช้ในการระเหยน้ำออกจากอนุภาคมากขึ้นเมื่อสารสายป้อนมีความเข้มข้นของแป้งมอลโตเดกซ์ตรินน้อยลง ทำให้อุณหภูมิขาออกของอากาศมีค่าต่ำกว่า

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกักเก็บไลโปเลส 100 แอล เมื่อมีการเติมสารปรุงแต่ง เช่น แป้งมอลโตเดกซ์ตรินลง พบว่าสารปรุงแต่งนั้นจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ดีขึ้นอย่างมาก จากร้อยละ 10 - 15 (ดังหัวข้อที่ 4.1) เป็นร้อยละ 75 - 90 เนื่องจากวัสดุห่อหุ้มจะช่วยในการปกป้องโครงสร้างของเอนไซม์เนื่องจากมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างวัสดุห่อหุ้มที่มีโครงสร้างที่เสถียรและเอนไซม์แทนที่น้ำที่สูญเสียไประหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์นั้นมีการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติอันเนื่องมาจากการถูกระเหยของน้ำลดลง [38] อีกทั้งการเติมวัสดุห่อหุ้มนั้นมีผลทำให้เอนไซม์ที่ผ่านการอบแห้งได้รับความร้อนในปริมาณที่น้อยลง จึงส่งผลให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าคงเหลือมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Burak I Erdinc ที่



รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของมอลโตเดกซ์ตรินในสารสายป้อนโดยน้ำหนักและค่าร้อยละของค่าคงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอยและปริมาณความชื้นของอนุภาค

ทำการศึกษาการกักเก็บโปรตีนใน ALGINATE/CHITOSAN พบว่าเมื่อมี alginate เป็นองค์ประกอบในสารสายป้อนนั้นเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บ subtilisin ได้มากกว่า 50% เมื่อเทียบกับเมื่อไม่มี alginate เป็นองค์ประกอบ และสอดคล้องกับ Aysegul และคณะ ซึ่งพบว่าเมื่อมีกลูโคส, แป้งมอลโตเดกซ์ตริน และแลคโตสเป็นวัสดุห่อหุ้ม จะช่วยในการปกป้องโครงสร้างของโปรตีน จึงส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าคงเหลือมากขึ้น อีกทั้งเมื่อเพิ่มปริมาณวัสดุห่อหุ้มจะพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์จะมีค่ามากขึ้นอีกด้วย [37, 38] และสอดคล้องกับTales และคณะ ซึ่งทำการ immobilize เอนไซม์ไลเปสจาก *Endophytic fungal* โดยทำการอบแห้งด้วยอัตราการป้อนเท่ากับ 17 ลิตรต่อนาที (อัตราการป้อนของไลเปสเท่ากับ 2.63 - 9.36 กรัมต่อนาที) ที่แรงดัน 1.5 กิโลต่อตารางเซนติเมตร, อัตราการป้อนอากาศแห้ง 60 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง, อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 86.4 - 153.6 องศาเซลเซียส, ปริมาณแลคโตส 1.95 - 12.05% โดยน้ำหนัก พบว่าเมื่อปริมาณแลคโตส มากขึ้น มีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่ามากขึ้น และจากการศึกษาพบว่าน้ำตาลนั้นมีส่วนช่วยในการปกป้องเอนไซม์ได้ เนื่องจากน้ำตาลจะเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนที่จะถูกทำให้แห้งในบริเวณที่มีขั้ว ทำให้โครงสร้างของโปรตีนนั้นมีการสูญเสียสภาพอันเนื่องมาจากการถูกระเหยของน้ำลดลง และจากการศึกษาของ Carpenter และ Crown โดยใช้ FT-IR นั้น พบว่ามีพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างที่เสถียรเกิดขึ้น และพันธะบางอย่างที่ยึดโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย [39] ซึ่งการ immobilize โปรตีนและการเติมสารปรุงแต่ง (additive) นั้นมีผลทำให้มีการปกป้องโปรตีน จากการเสื่อมภาพทางเคมีและโครงสร้าง เนื่องจากอัตราการแพร่และอัตราเกิดปฏิกิริยาช้าลงโดยการเติมสารปรุงแต่งลงไปนั้นจะเป็นการลดความเป็นไปได้ที่โมเลกุลของโปรตีนจะเกิดการทำปฏิกิริยาร่วมกัน

และเกิดการรวมตัวกัน และปริมาณความชื้น (Moisture content) ของผลิตภัณฑ์จะมีค่าน้อยลงเมื่ออุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่ามากขึ้น และเมื่อปริมาณความชื้นลดลงจะมีผลให้ความเสถียรและอายุของผลิตภัณฑ์มีค่ามากขึ้นอีกด้วย [38]

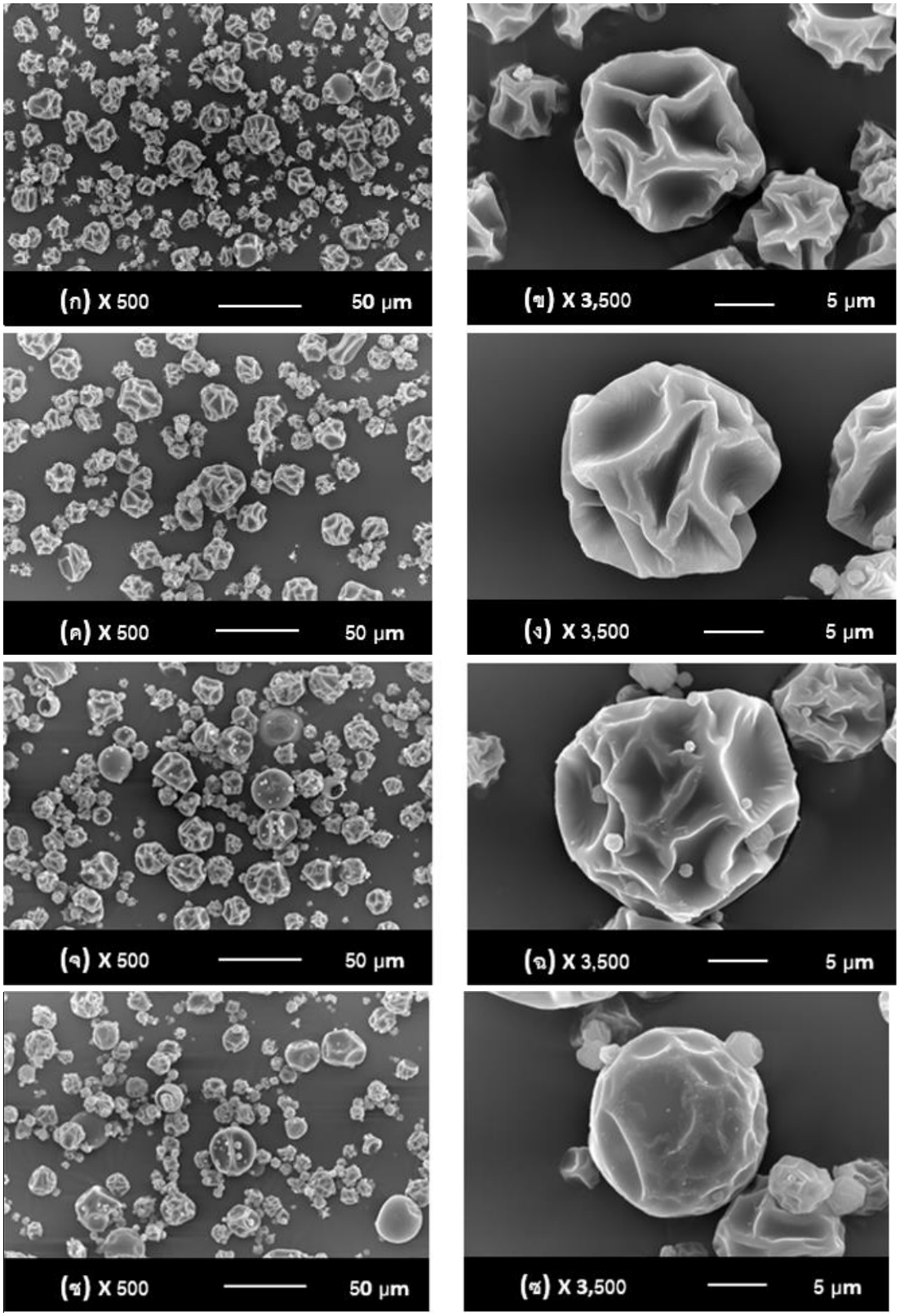
ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่าเท่ากับ 10 – 40 % โดยน้ำหนัก

ความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตริน (% wt.)	อุณหภูมิของอากาศขาออก (°C)	ขนาดอนุภาค (μm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ (%)	ค่าแอคติวิตี้ต่อกรัมผงเอนไซม์แห้ง (unit/g)	ปริมาณความชื้น (moisture content, %)
10	58	14.17	3.48	74.9	242 ± 15	6.62
20	59	14.88	4.65	80.7	261 ± 15	5.71
30	61	15.54	4.52	88.65	287 ± 15	5.29
40	69	15.78	4.44	89.35	289 ± 15	4.73

ดังนั้นการ immobilize โปรตีนและการเติมสารปรุงแต่ง (additive) นั้นมีผลทำให้มีการปกป้องโปรตีนจากการเสื่อมสภาพทางเคมีและโครงสร้าง เนื่องจากอัตราการแพร่และอัตราเกิดปฏิกิริยาช้าลง โดยการเติมสารปรุงแต่งลงไปนั้นจะเป็นการลดความเป็นไปได้ที่โมเลกุลของโปรตีนจะเกิดการทำปฏิกิริยาร่วมกันและเกิดการรวมตัวกันอีกด้วย

4.2.2 โครงสร้างของอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 10 – 40 โดยน้ำหนัก

เมื่อพิจารณาโครงสร้างภายนอกของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าโครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้งที่ได้นั้นเป็นทรงกลม โดยมีพื้นผิวมีลักษณะเป็นหลุมโดยรอบอนุภาค เมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้พื้นผิวของอนุภาคมีลักษณะยุบตัวน้อยลง เมื่อพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับอากาศร้อนลดลงทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน อันเนื่องมาจากเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมากขึ้น ทำให้ปริมาณความชื้นที่มีในอนุภาคลดลง ดังนั้นการยุบตัวของอนุภาคอันเนื่องมาจากการหายไปของน้ำจึงลดลงด้วย ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งใหญ่ขึ้น



รูปที่ 4.3 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณความเข้มของสารละลายมอลโตเดกซ์ตริน (ก, ข) 10% MD , (ค, ง) 20% MD , (จ, ฉ) 30% MD ,(ช, ซ) 40% MD โดยน้ำหนัก

4.2.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่าเท่ากับร้อยละ 10 – 40 โดยน้ำหนัก

จากการศึกษาพบว่าเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมากขึ้น มีผลทำให้ความชื้นของผงเอนไซม์แห้งที่ได้มีค่าลดลง อันเนื่องมาจากเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมากขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำที่มีในอนุภาคลดลง ทำให้อนุภาคที่ได้จึงมีความแห้งมากขึ้น เนื่องจากได้รับพลังงานความร้อนเท่ากันเมื่อเทียบกับเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายแป้งมอลโตเดกซ์ตรินน้อยกว่าทำให้ความชื้นคงเหลือของอนุภาคมีค่าลดลง และส่งผลให้อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้นอีกด้วยซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างภายนอกจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เนื่องจากเกิดการหดตัวของอนุภาคที่น้อยกว่าทำให้อนุภาคนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังตารางที่ 4.2

4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

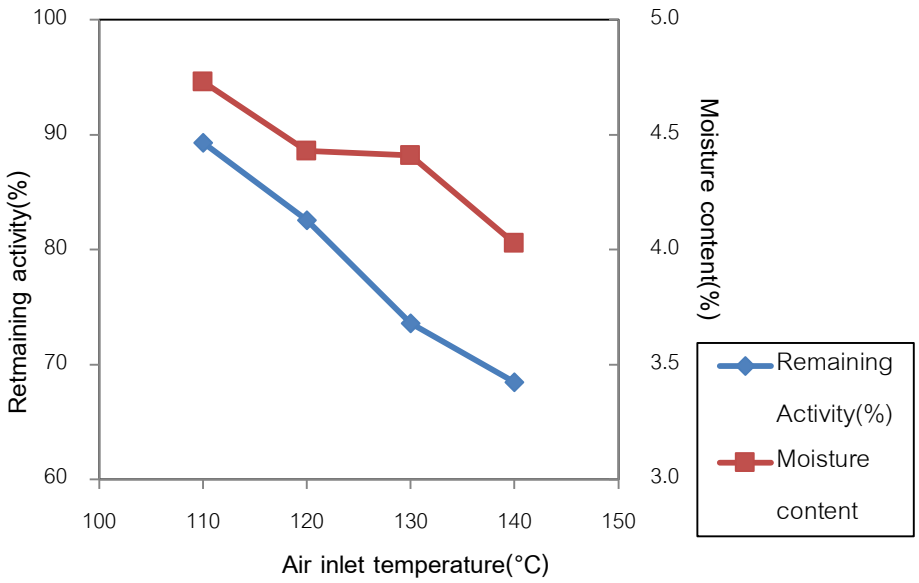
อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญ เนื่องจากสารสำคัญหลายชนิดเป็นสารที่สามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่ออุณหภูมินั้นมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิที่สารนั้น ๆ เกิดการสลายตัวหรือเสื่อมสภาพ ดังนั้นในการอบแห้งนั้นอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญเป็นอันดับต้น ๆ นอกจากนั้นอุณหภูมิของอากาศขาเข้ายังมีผลต่อลักษณะของอนุภาคผงแห้งที่ได้ และปริมาณความชื้นที่คงเหลือในผลิตภัณฑ์อีกด้วย จึงต้องทำการศึกษาอุณหภูมิของอากาศขาเข้าที่ทำให้การอบแห้งแบบพ่นฝอยของเอนไซม์ที่ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ดีที่สุด เนื่องจากเมื่อทำการอบแห้งที่อุณหภูมิที่ต่ำนั้นจะส่งผลให้อนุภาคที่ได้มีความชื้นสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อยเนื่องจากปริมาณของตัวทำละลายที่ต้องการระเหยออกไปนั้นระเหยออกไปได้น้อยเกินไป และเมื่ออุณหภูมิที่ทำการอบแห้งสูงเกินไปก็จะส่งผลให้สารสำคัญอาจเกิดการสลายตัวหรือเสื่อมสภาพระหว่างการอบแห้งอันเนื่องมาจากความร้อน แต่จะได้อนุภาคที่มีความชื้นต่ำ และผลิตภัณฑ์ปริมาณมาก

งานวิจัยนี้ทำการอบแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 40% โดยน้ำหนัก ผสมกับไลโปเลส 100 แอล ในอัตราส่วนไลโปเลส 100 แอล 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม โดยใช้อัตราการป้อนสารสายป้อน 6 มิลลิลิตรต่อนาที, aspirater 20 % และใช้อะตอมไมเซอร์แบบหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer) โดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 - 140 องศาเซลเซียส

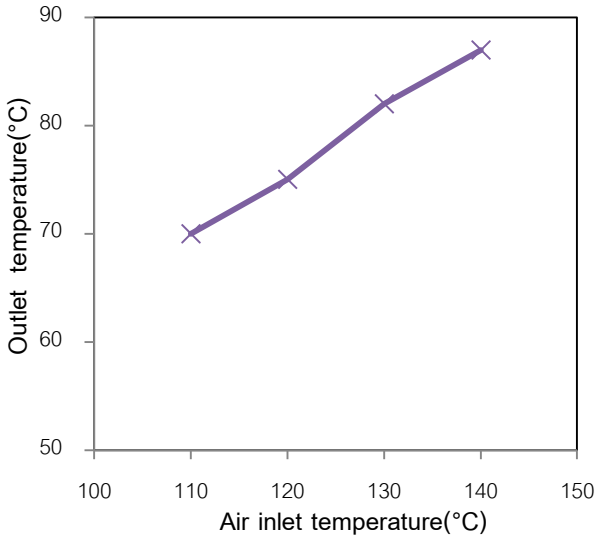
4.3.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 - 140 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 – 140 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า (ºC)	อุณหภูมิของอากาศขาออก (ºC)	ขนาดอนุภาค (µm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ (%)	ค่าแอคติวิตี้ต่อกรัม (unit/g)	ปริมาณความชื้น (moisture content,%)
110	69	16.60	5.12	89.32	289 ± 15	4.73
120	76	15.36	4.03	82.60	267 ± 15	4.43
130	81	14.94	5.43	73.60	238 ± 15	4.41
140	85	14.51	4.61	68.50	221 ±15	4.03



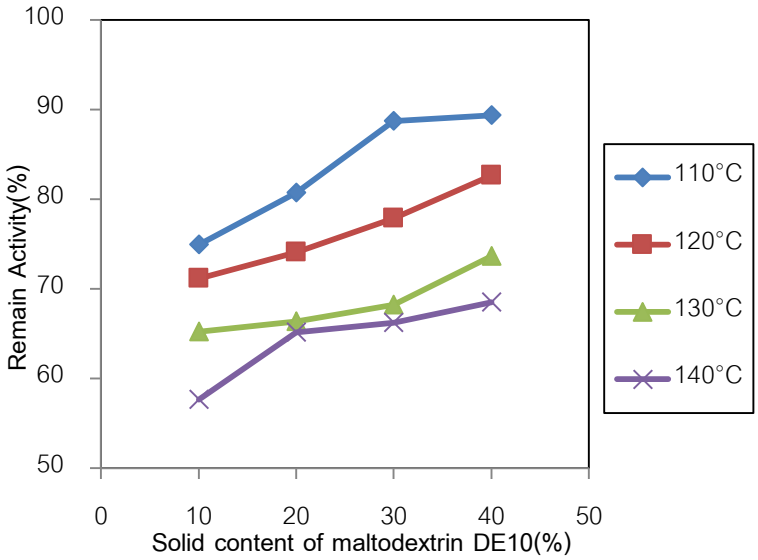
รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอยและปริมาณความชื้นของอนุภาค



รูปที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าและอุณหภูมิของอากาศขาออก

พบว่าอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามากขึ้นส่งผลให้การประสิทธิภาพในกักเก็บไลโปเลส 100 แอลลดลง ซึ่งประมวลผลด้วยค่าแอคติวิตี้ของไลเปสที่คงเหลือ จากรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียสจะให้ผลการกักเก็บเอนไซม์ได้ดีที่สุด มีค่าแอคติวิตี้คงเหลือประมาณร้อยละ 89 ซึ่งเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าสูงขึ้น ค่าแอคติวิติคงเหลือของเอนไซม์จะมีค่าลดลง เป็นผลจากอุณหภูมิของอนุภาคนั้นก็จะมีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้ความร้อนที่เอนไซม์ได้รับนั้นมีค่ามากขึ้นด้วย ซึ่งจะเกิดการสูญเสียน้ำที่มากขึ้นทำให้โครงสร้างของเอนไซม์นั้นเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติมากขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าและอุณหภูมิของอากาศขาออกจะพบว่า เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าสูงขึ้นจะส่งผลให้อุณหภูมิของอากาศขาออกสูงขึ้นด้วย ซึ่งอุณหภูมิของอากาศขาออกก็คืออุณหภูมิของภายนอกของอนุภาคซึ่งจะพบว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศขาเข้ามีค่า 110 องศาเซลเซียสอุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่า 69 - 85องศาเซลเซียสและจากข้อมูลของไลโปเลส 100 แอลนั้น พบว่าจะเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส [9] ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการที่ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งมีค่าลดลงเมื่อผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้น ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการสูญเสียสภาพของเอนไซม์เนื่องจากความร้อน นั่นก็คืออุณหภูมินั่นเอง และเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่ามากกว่า 110 องศาเซลเซียสนั้นก็จะทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าแอคติวิตี้มีค่าน้อยกว่านั้นเอง และเนื่องจากการสูญเสียสภาพที่เกิดจากความร้อนนั้นเป็นปรากฏการณ์ที่ไม่สามารถผันกลับได้ จึงทำให้การทำงานทางชีวภาพของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปเป็นเหตุให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าลดลง สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Burak I Erdinc ซึ่งทำการศึกษาการกักเก็บโปรตีนใน ALGINATE/CHITOSAN ด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอยโดย เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 150 และ

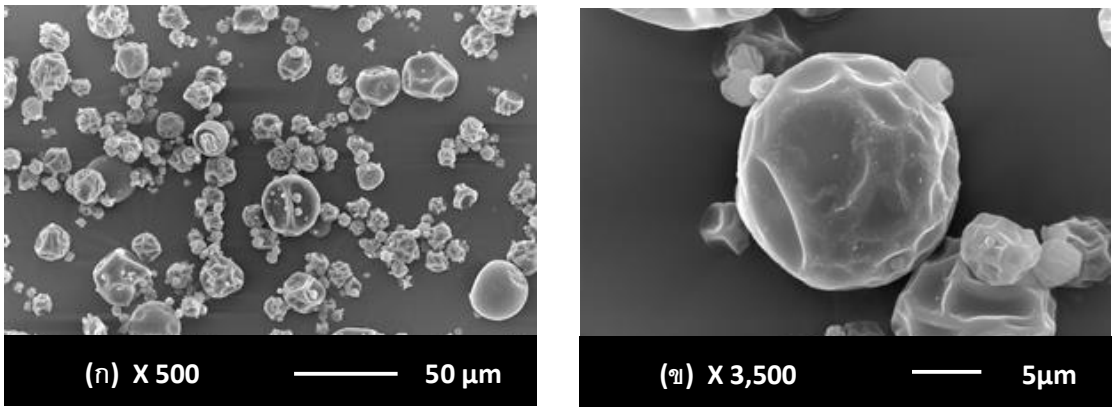
175 องศาเซลเซียส, อัตราปริมาณการป้อนของสารสายป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บโปรตีนลดลง [53]

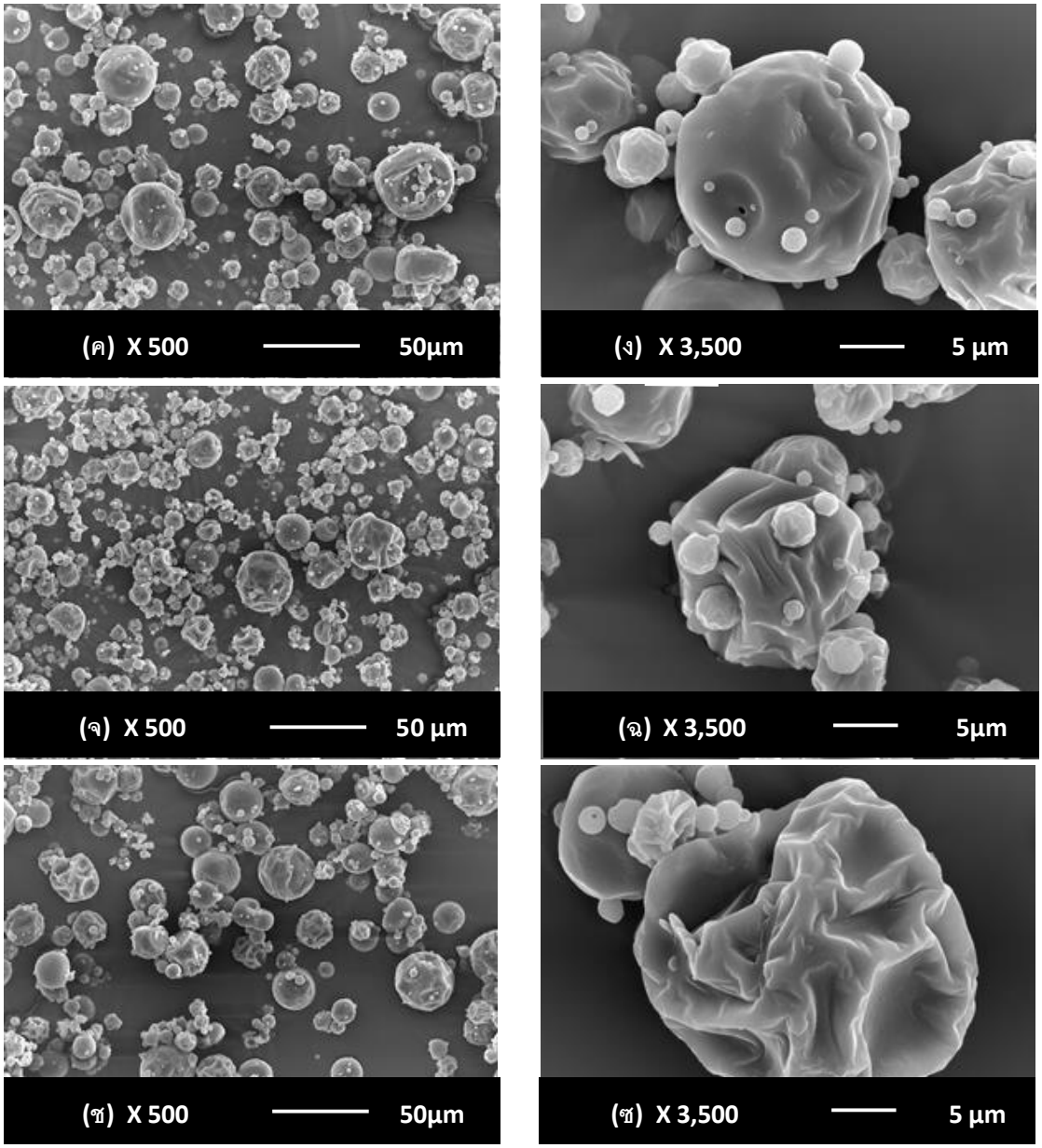


รูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของมอลโตเดกซ์ตรินในสารสายป้อนโดยน้ำหนักและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอย

จากรูป 4.6 พบว่าแม้อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าสูงขึ้นก็จะไม่เปลี่ยนแปลงแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแป้งมอลโตเดกซ์ตรินในสารสายป้อนและค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ โดยเมื่อปริมาณของมอลโตเดกซ์ตรินในสารสายป้อนมากขึ้นจะส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่ามากขึ้น ซึ่งหมายความว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์สูงขึ้นนั่นเอง

4.3.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 - 140 องศาเซลเซียส





รูปที่ 4.7 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อโดยที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (ก, ข) 110ºC , (ค, ง) 120ºC , (จ, ฉ) 130ºC ,(ช, ซ) 140ºC

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะโครงสร้างของอนุภาคภายนอก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีผลต่อลักษณะของโครงสร้างอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง โดยเมื่ออุณหภูมิของอากาศขาเข้าสูงขึ้นมีผลทำให้ลักษณะพื้นผิวของอนุภาคของผงเอนไซม์แห้งที่ได้จะมีการยุบหัวหรือหดตัวมากขึ้น เนื่องจากในขณะที่เกิดการสร้างผิวชั้นนอกของอนุภาคชั้นเกิดที่อุณหภูมิที่สูงกว่าทำให้การระเหยของน้ำบนอนุภาคนั้นเกิดเร็วกว่าเมื่ออบแห้งที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า ดังนั้นการฟอร์มตัวของเปลือกก็จะเกิดเร็วขึ้นทำ

ให้น้ำภายในอนุภาคนั้นที่ได้รับความร้อนไปได้แพร่ผ่านออกมาโดยจะเกิดเป็นโพรงเนื่องจากการที่น้ำระเหยไป และเกิดการยุบตัวหรือหดตัวของอนุภาคมากขึ้น ทำให้ที่ผิวของอนุภาคนั้นจะมีความขรุขระสูง และความชื้นของอนุภาคก็จะมีค่าน้อยกว่าอีกด้วย และพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตี้คงเหลือและลักษณะของพื้นผิวก็จะพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือจะมีค่าน้อยเมื่อลักษณะพื้นผิวมีความขรุขระมากกว่า เนื่องจากอนุภาคสามารถสัมผัสกับอากาศร้อนได้มากกว่าซึ่งส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ได้มากกว่า

โดยอุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 140 องศาเซลเซียสจะทำให้พื้นผิวของอนุภาคของผงเอนไซม์แห้งนั้นเกิดการยุบตัวมากที่สุด และเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามีค่าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียสนั้นก็ทำให้พื้นผิวของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งเกิดการยุบตัวน้อยที่สุด โดยเมื่อพิจารณาถึงค่าแอคติวิตี้คงเหลือพบว่าการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้า 110 องศาเซลเซียสนั้นจะมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือมากที่สุดดังตารางที่ 4.3

4.3.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 - 140 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 4.3 นั้นพบว่าเมื่อทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าสูงนั้น จะทำให้ปริมาณความชื้นที่มีในอนุภาคมีค่าลดลงและขนาดของอนุภาคที่ได้จะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากการอบแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิสูง จะส่งผลให้ปริมาณความร้อนที่เกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างอนุภาคและอากาศนั้นมีค่ามากขึ้น ทำให้มีพลังงานที่จะทำให้น้ำภายในของอนุภาคเกิดการระเหยมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้สามารถระเหยได้ออกไปจากอนุภาคมีค่ามากขึ้น ดังนั้นปริมาณน้ำที่คงเหลือภายในอนุภาคจึงมีปริมาณน้อยลง และส่งผลให้ขนาดของอนุภาคมีค่าน้อยลงอีกด้วย เนื่องจากในขณะที่เกิดการฟอร์มตัวของอนุภาคนั้นน้ำได้ถูกระเหยไปจากอนุภาคมีปริมาณมากกว่า ทำให้อนุภาคจึงมีขนาดเล็กลง และการหดตัวหรือยุบตัวของพื้นผิวของอนุภาคจากการระเหยไปของน้ำก็จะยุบตัวลงไปมากขึ้น

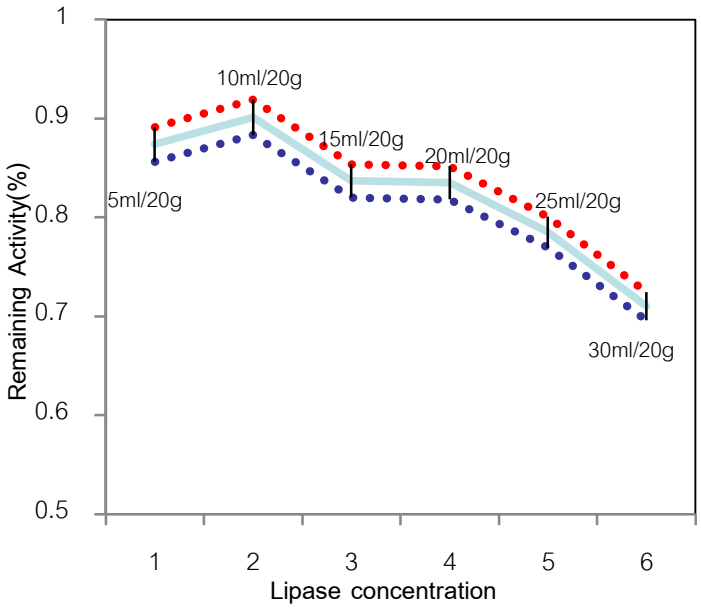
4.4 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ในสารสายป้อนของเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

ปริมาณเอนไซม์ในสารสายป้อนนั้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการอบแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากในปกติแล้วในการทำการกักเก็บสารใด ๆ ก็ตามจะต้องการการกักเก็บที่มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมุ่งเน้นไปที่การกักเก็บอย่างมีประสิทธิภาพสูงโดยต้องการใส่สารสำคัญในปริมาณน้อยที่สุดเพื่อให้สารสำคัญนั้นถูกกักเก็บอย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับการนำไปใช้งาน แต่ในขณะเดียวกันนั้นบางส่วนก็ต้องการใส่สารสำคัญลงไปให้

ได้มากที่สุดเพื่อที่จะลดค่าใช้จ่ายในการกักเก็บสารสำคัญ ดังนั้นงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการกักเก็บโดยการอบแห้งแบบพ่นฝอย

งานวิจัยนี้ ทำการอบแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 40% โดยน้ำหนักผสมกับไลโปเลส 100 แอล ในอัตราส่วนไลโปเลส 100 แอล 5 - 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม โดยใช้อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส, อัตราป้อน 6 มิลลิลิตรต่อนาที, aspirater 20 % และใช้อะตอมไมเซอร์แบบหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer)

4.4.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 5 - 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม



รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไลโปเลส 100 แอลและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอย

พบว่าเมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลมากขึ้น ส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์ลดลง ซึ่งปริมาณไลโปเลสที่ทำให้ประสิทธิภาพของการกักเก็บเอนไซม์ดีที่สุดคือ ไลโปเลส 5 - 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม โดยเมื่อปริมาณไลโปเลสในสารสายป้อนมีค่ามากขึ้นทำให้ระบบของสารสายป้อนนั้นมีค่า solid content จริง ๆ ลดลง ปริมาณของของเหลวที่จะต้องระเหยออกไปจากอนุภาคระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะมีค่ามากขึ้น แสดงว่าปริมาณของวัสดุห่อหุ้มต่อสาระสำคัญจะมีค่าลดลง ทำให้สามารถช่วยในการปกป้องสารสำคัญนั่นก็คือเอนไซม์จากการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติอันเนื่องมาจากความร้อนที่ได้รับ

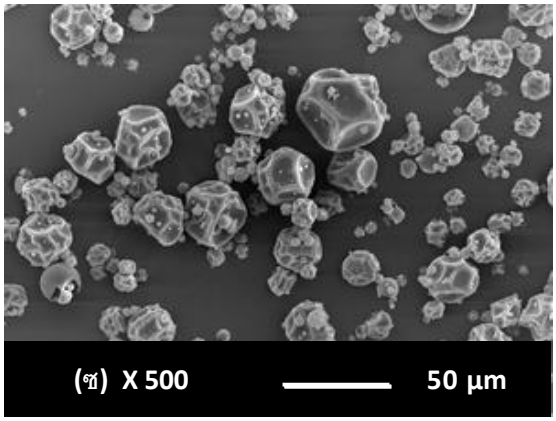
ลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ลดลง โดยสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Burak I Erdinc [53] ซึ่งทำการศึกษาการกักเก็บโปรตีนใน Alginate/Chitosan ด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอยโดย อัตราปริมาณการป้อนของสารสายป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่อปริมาณของ subtilisin มากขึ้นมีผลให้แอคติวิตี้คงเหลือ subtilisin ลดลงตามลำดับ โดยทำการศึกษาปริมาณของ subtilisin ต่อน้ำหนักของอนุภาค ในช่วง 0.1 – 0.33 กรัมของ subtilisin ต่อกรัมของอนุภาค โดยพบว่าปริมาณ subtilisin เท่ากับ 0.1 กรัมให้ผลการกักเก็บ subtilisin ดีที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิของอากาศขาออกกลับพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อเอนไซม์มากขึ้น

ตารางที่ 4.4 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล 5 – 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

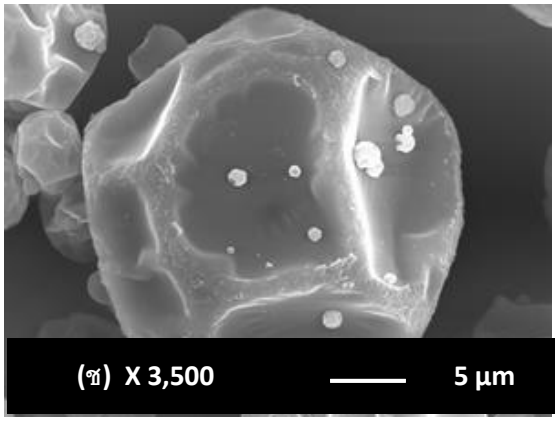
ปริมาณของไลโปเลส 100 แอล (ml) ต่อแป้ง 20 g	อุณหภูมิของอากาศขาออก (ºC)	ขนาดอนุภาค (µm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ (%)	ค่าแอคติวิตี้ต่อกรัม (unit/g)	ปริมาณความชื้น (moisture content,%)
5	69	17.08	6.55	87.40	183 ± 15	4.70
10	69	15.91	5.51	90.12	289 ± 15	4.73
15	69	14.87	5.54	83.70	404 ± 15	5.89
20	69	13.19	4.63	83.50	477 ± 15	6.32
25	69	13.06	5.05	78.50	501 ± 15	6.51
30	68	13.01	5.07	71.00	520 ± 15	6.72
40	68	12.59	4.98	60.58	578 ± 15	7.16

4.4.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 5 - 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

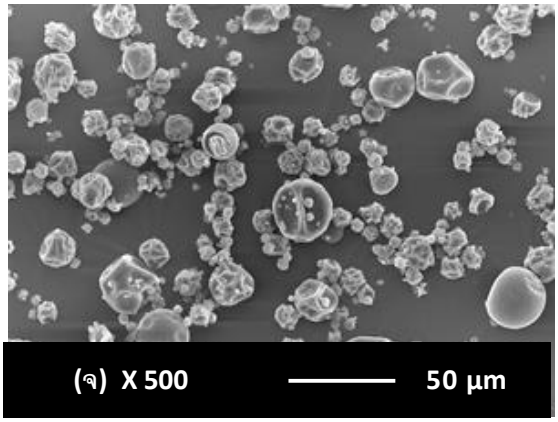
เมื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลในสารสายป้อนมากขึ้น จะทำให้พื้นผิวของโครงสร้างอนุภาคผงเอนไซม์แห้งเกิดการยุบตัวหรือหดตัวน้อยลง ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อมีโปรตีนและแป้งมอลโตเดกซ์เป็นวัสดุห่อหุ้มจะพบว่า โปรตีนจะฟอร์มตัวเป็นฟิลม์อยู่บนผิวของอนุภาคและแป้งมอลโตเดกซ์ตรินนั้นจะอยู่ในส่วนของ matrix ภายในอนุภาค และในงานวิจัยนี้นั้นเป็นการกักเก็บเอนไซม์ด้วยแป้งมอลโตเดกซ์ตรินเช่นกัน โดยเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งนั้นน่าจะเกิดการฟอร์มตัวอยู่บริเวณผิวของอนุภาค ซึ่งเมื่อสัมผัสกับอากาศร้อนขาเข้า มีผลให้น้ำในเอนไซม์นั้นจะถูกระเหยออกไปอย่างรวดเร็วเป็นผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์มีการเปลี่ยนไป จึงเป็นเหตุ



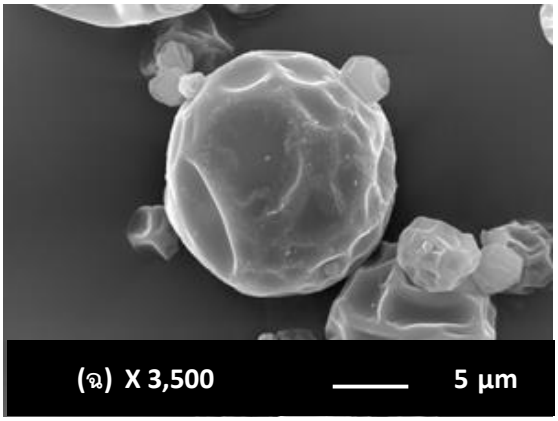
(ช) X 500 50 µm



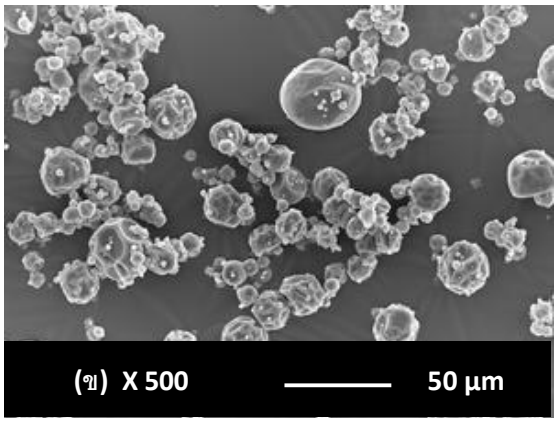
(ช) X 3,500 5 µm



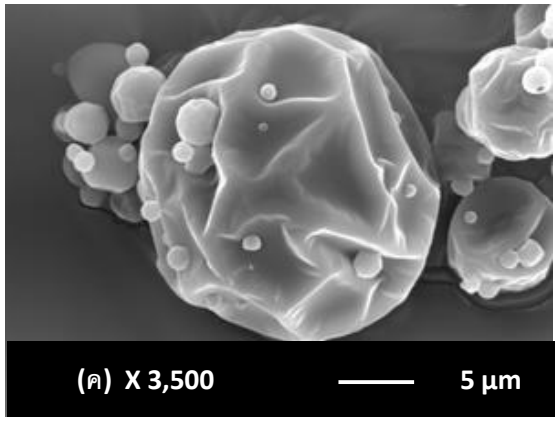
(จ) X 500 50 µm



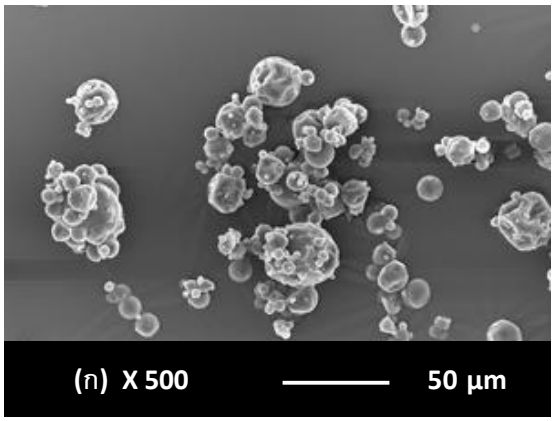
(ฉ) X 3,500 5 µm



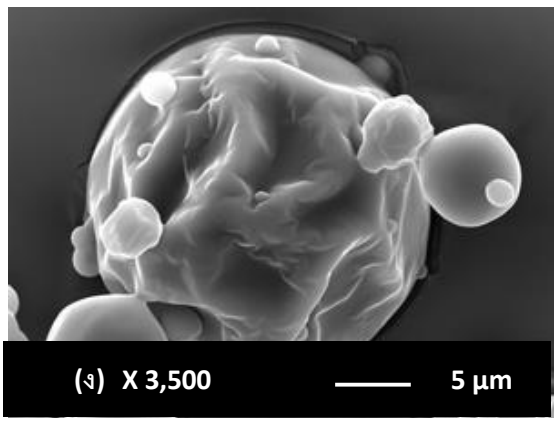
(ข) X 500 50 µm



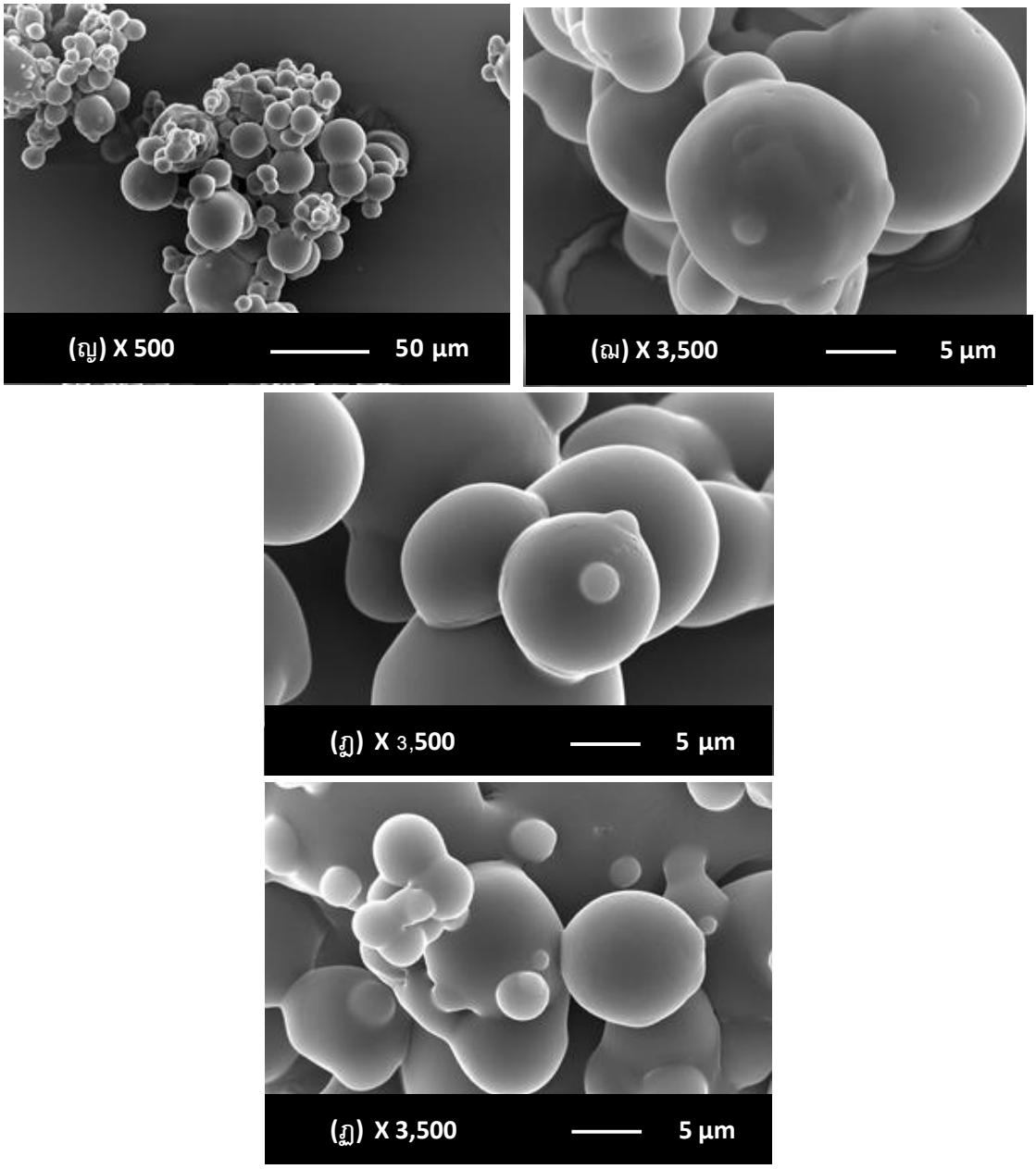
(ค) X 3,500 5 µm



(ก) X 500 50 µm



(ง) X 3,500 5 µm



รูปที่ 4.9 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ (ก, ข) 5 , (ค, ง) 10 , (จ, ฉ) 15 , (ช, ซ) 20 , (ฌ, ญ) 25 , (ฎ) 30 และ (ฏ) 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

ที่ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์อันเนื่องมาจากความร้อน ส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์จึงมีค่าลดลง แต่ก็ยังมีเอนไซม์บางส่วนถูกกักเก็บไว้ภายในอนุภาค ทำให้ยังคงรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ไว้ได้จึงทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ยังคงมีค่าสูงอยู่ แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์ในสารสายป้อนมากขึ้น ก็จะส่งผลให้ทำให้พื้นผิวของอนุภาคที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นเต็มไปด้วยเอนไซม์ในปริมาณ

มากขึ้น ซึ่งจะเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์อันเนื่องมาจากความร้อน และเกิดการจับตัวกันของเอนไซม์ที่สูญเสียไฮโดรเจนจากการระเหยไปของน้ำอีกด้วยเนื่องจากมีเอนไซม์บริเวณผิวของอนุภาคในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ลดลง

4.4.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 5 - 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

จากตารางที่ 4.4 เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลในสารสายป้อนมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณความชื้นของผงเอนไซม์แห้งมากขึ้นและขนาดของอนุภาคนั้นมีขนาดเล็ก เนื่องจากการเพิ่มปริมาณไลโปเลส 100 แอลในระบบนั้นเปรียบเสมือนการเพิ่มปริมาณของของเหลวของสารสายป้อน เนื่องจากไลโปเลสแอลมีปริมาณของแข็ง (solid content) เพียงร้อยละ 8.2 โดยน้ำหนัก แต่ในขณะเดียวกันนั้นสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีปริมาณของแข็งสูงถึงร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก ดังนั้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณของไลโปเลส 100 แอล จึงเป็นการทำให้ปริมาณของของเหลวที่ต้องระเหยไปในระหว่างการอบแห้งของอนุภาคจึงมีค่ามากขึ้น ในขณะที่ปริมาณความร้อนที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนความร้อนนั้นมีค่าเท่าเดิม จึงทำให้ปริมาณความชื้นของอนุภาคคงเหลือมีค่าสูงขึ้น โดยที่ขนาดของอนุภาคนั้นจะมีขนาดเล็กลงเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้น และจากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าเมื่อนำผงเอนไซม์แห้งที่มีปริมาณไลโปเลส 100 แอล ต่างกันวางไว้ในบริเวณเดียวกันพบว่า ผงเอนไซม์แห้งที่มีปริมาณไลโปเลสมากจะเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคจับเป็นกลุ่มก้อนได้ดีอีกด้วย

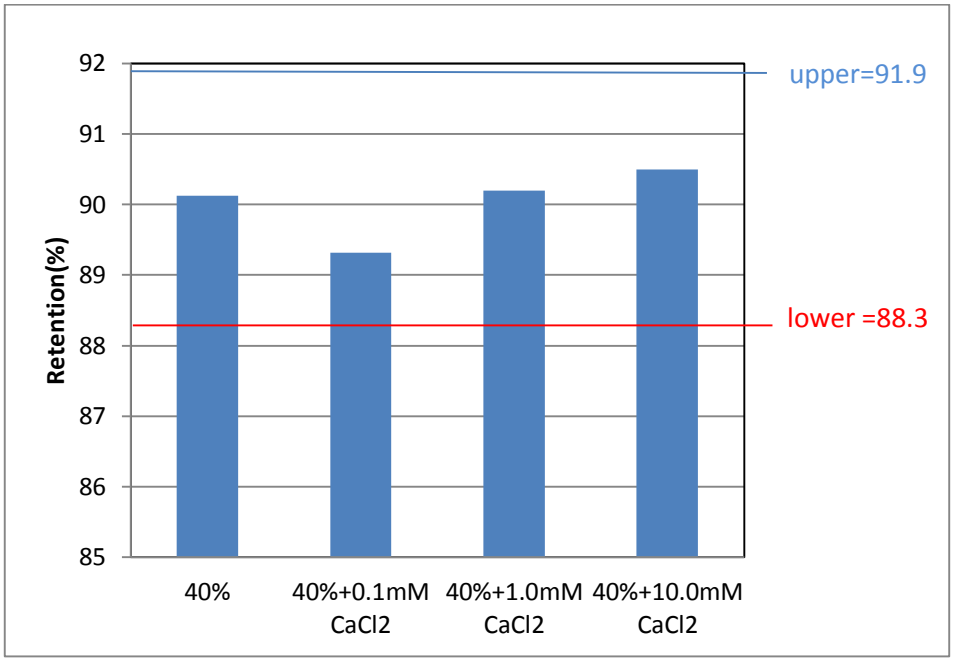
4.5 การศึกษาผลของแคลเซียมไอออน

เนื่องจากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแคลเซียมไอออนในสารสายป้อนก่อนทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยเอนไซม์นั้น มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ดีขึ้น ซึ่งในหลาย ๆ งายวิจัยเหล่านั้นเติมแคลเซียมไอออนโดยการเติมแคลเซียมคลอดไรด์ลงไปในระบบ และพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์นั้นมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับระบบที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ เนื่องจากแคลเซียมไอออนจะช่วยทำให้เอนไซม์จับกับซับสเตรตได้ดีขึ้นในบริเวณก่อกัมมันต์ จึงเป็นเหตุที่ทำให้ต้องการที่จะศึกษาในประเด็นนี้

งานวิจัยนี้ ทำการอบแห้งด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนคือสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 40% โดยน้ำหนักผสมกับไลโปเลส 100 แอล ในอัตราส่วนไลโปเลส 100 แอล 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม โดยใช้อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิของอากาศขาออกเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส, อัตราป้อน 6 มิลลิลิตรต่อนาที, aspirater 20 % และใช้

อะตอมไมเซอร์แบบหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer) โดยมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อนก่อนทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยในปริมาณ 0 - 10.0 มิลลิโมลต่อปริมาณของสารสายป้อน

4.5.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อน 0 - 10.0 มิลลิโมลต่อปริมาณของสารสายป้อน



รูปที่ 4.10 กราฟแท่งแสดงค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หลังการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์

ตารางที่ 4.5 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0 – 10 มิลลิโมลต่อปริมาณสารสายป้อน

ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ (mM)	อุณหภูมิของอากาศขาออก (°C)	ขนาดอนุภาค (µm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ (%)	ค่าแอคติวิตี้ต่อกรัม (unit/g)	ปริมาณความชื้น (moisture content,%)
0	69	15.60	5.15	90.12	100 ± 15	4.73
0.1	69	15.66	5.31	89.32	100 ± 15	4.85
1.0	69	15.69	6.17	90.20	100 ± 15	4.71
10.0	69	15.53	4.66	90.50	100 ± 15	4.78

จากงานวิจัยพบว่าการเติม แคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายน้ำแป้งหรือไลโปเลส 100 แอล ก่อนทำการผสมกันเป็นสารสายป้อนนั้น ไม่มีผลต่อค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ ไม่ว่าจะเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0 – 10 มิลลิโมลต่อลิตรของสารสายป้อนนั้น พบว่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้มีการเติมแห้งมอลโตเดกซ์ตรินในปริมาณที่เพียงพอต่อการปกป้องเอนไซม์จากความร้อนที่ได้รับระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอย ทำให้แคลเซียมไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมานั้นพบว่าแคลเซียมไอออนช่วยในการทำให้เอนไซม์ที่เติมลงไปก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นมีผลทำให้แอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์นั้น ๆ มีค่าสูงขึ้น แต่เนื่องจากไลโปเลส 100 แอล เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ไม่ทราบองค์ประกอบภายในผลิตภัณฑ์ไลโปเลส 100 แอล และจากการทำการวิเคราะห์ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล ด้วยเครื่อง Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) พบว่ามีทั้งแคลเซียมและคลอไรด์เป็นองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล ทำให้สันนิษฐานหรืออนุมาน ได้ว่าไลโปเลส 100 แอล นั้นมีแคลเซียมคลอไรด์ซึ่งนิยมใช้เป็น stabilizer สำหรับเอนไซม์เป็นองค์ประกอบ ทำให้เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อนก่อนทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยจึงไม่ส่งผลให้แอคติวิตี้คงเหลือมีค่าสูงขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยของ N. Yamada และ Y. Shoya [35] ที่ทำการกักเก็บเอนไซม์โปรติเอส ด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยอุณหภูมิของอากาศขาเข้ามีค่า 150 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของอากาศขาออกมีค่า 60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.2 ลงในสารสายป้อนก่อนทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์โปรติเอสมีค่ามากขึ้น และสำหรับงานวิจัยของ Alloue และคณะ [14], Crutzen [12] และ Cherif และคณะ [13] พบว่าแคลเซียมคลอไรด์มีผลในการช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยแคลเซียมไอออนที่อยู่รอบ ๆ บริเวณก่อกัมมันต์มีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสมีค่ามากขึ้น ซึ่ง Sutherland และ Aust [15] ได้ทำการศึกษาผลของแคลเซียมต่อความเสถียรต่ออุณหภูมิและแอคติวิตี้ของ manganese peroxidase พบว่าแคลเซียมมีผลในการช่วยป้องกันการเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ เนื่องจากช่วยในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ ส่งผลให้เอนไซม์นั้นยังคงมีความสามารถในการทำงานทางชีวภาพอีกด้วย [15] และพบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่ออุณหภูมิของอากาศขาออก ซึ่งก็เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บเอนไซม์มีค่าไม่ต่างกัน

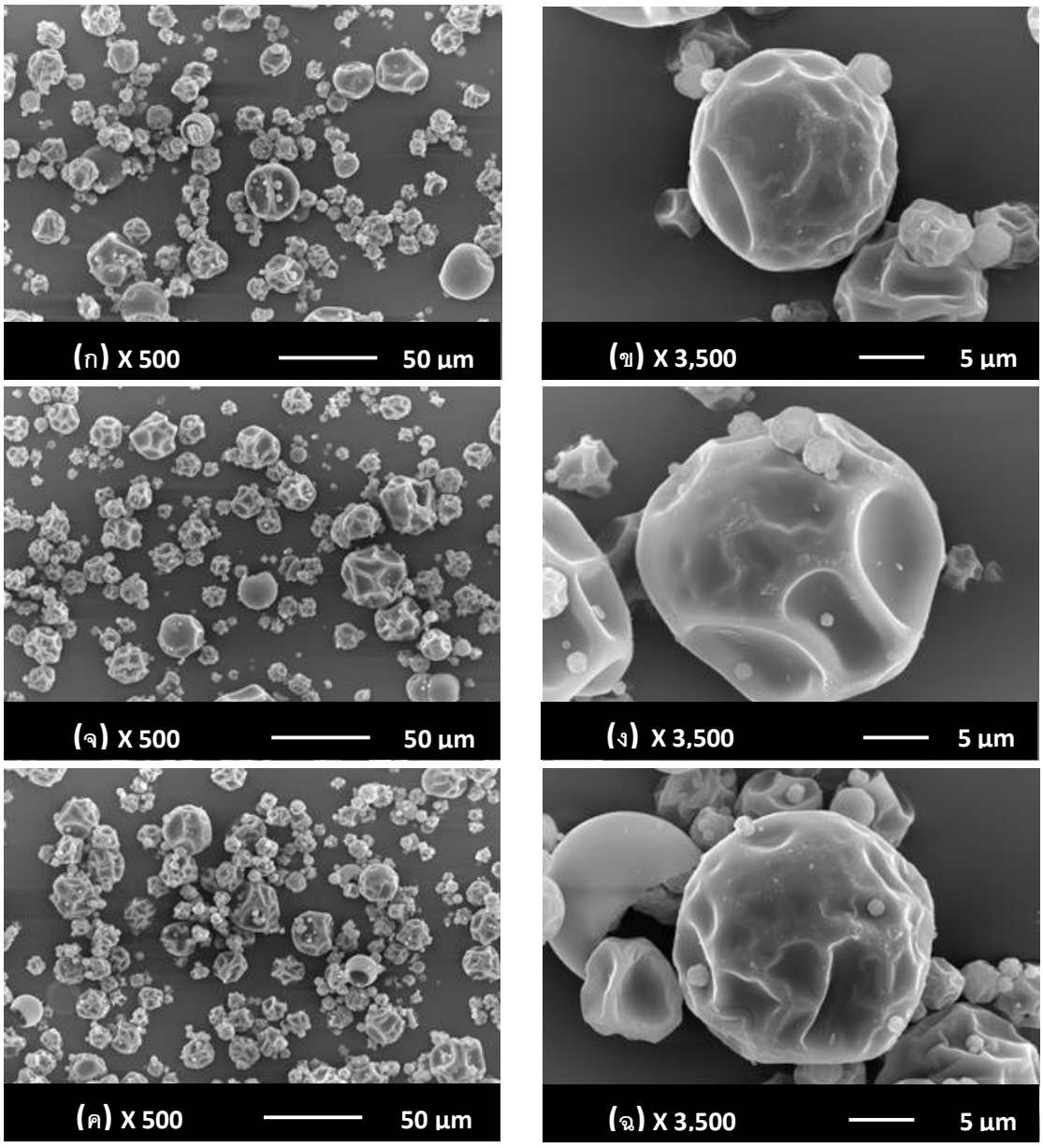
4.5.2 โครงสร้างอนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อน 0 - 10.0 มิลลิโมลต่อปริมาณของสารสายป้อน

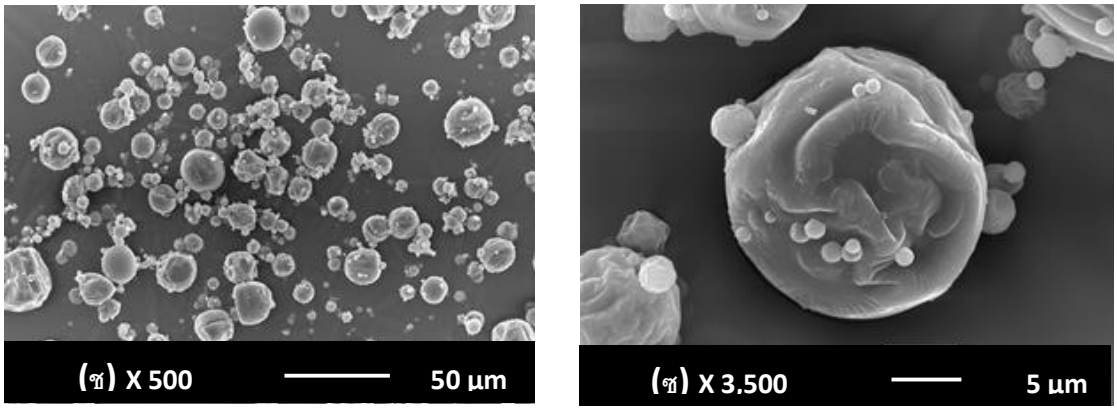
จากการทำการวิเคราะห์โครงสร้างของผงเอนไซม์แห้งนั้น พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อนก่อนทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นไม่มีผลต่อโครงสร้างของผงเอนไซม์แห้ง เนื่องจากพบว่ารูปที่ได้จากการ

วิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้นพบว่ามีลักษณะของอนุภาคที่ได้นั้นไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.11

4.5.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อมีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในสารสายป้อน 0 - 10.0 มิลลิโมลต่อปริมาณของสารสายป้อน

จากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงไปในสายสายป้อนก่อนการทำการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นมีไม่มีผลต่อปริมาณความชื้นที่คงเหลือของอนุภาคผงเอนไซม์และขนาดของอนุภาค





รูปที่ 4.11 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณแคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ (ก, ข) 0 , (ค, ง) 0.1 , (จ, ฉ) 1.0 และ (ช, ซ) 10.0 มิลลิโมลต่อปริมาณสารสายป้อน

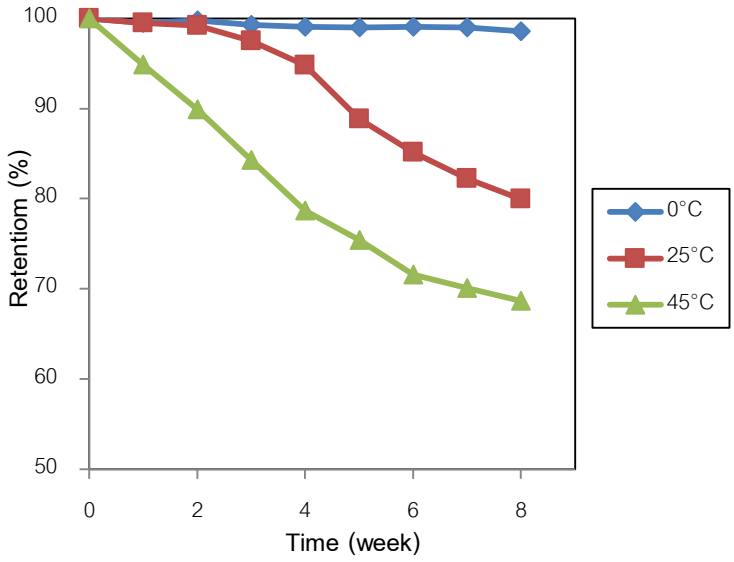
4.6 การศึกษาการเก็บรักษาไลโปเลส 100 แอลและผงเอนไซม์แห้ง

นอกจากปัจจัยดังที่กล่าวมาแล้วนั้น ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการประเมินประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ คือ ความเสถียรในการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลจากหลาย ๆ ปัจจัย ได้แก่ สถานะของเอนไซม์ สภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ เป็นต้น

โดยงานวิจัยนี้จะทำการเก็บรักษาไลโปเลส 100 แอลในสถานะของของเหลว, ผงเอนไซม์แห้งและผงเอนไซม์แห้งที่ผสมกับผงซักฟอก โดยจะเก็บไลโปเลส 100 แอลใน eppendorf tube และเก็บผงเอนไซม์ในถุงฟอยด์ปิดผนึกที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.6.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของไลโปเลส 100 แอล หลังจากที่ทำการเก็บรักษา

พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าน้อยที่สุด ดังรูปที่ 4.12 โดยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนั้นพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่าไม่ต่างจากตอนเริ่มต้น เนื่องจากอุณหภูมิในการเก็บรักษานั้นมีความสำคัญต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากเมื่อเอนไซม์ได้รับความร้อนนั้นจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกรบกวนมีผลให้อาจเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ จึงส่งผลต่อค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์แม้จะไม่ได้ผ่านกระบวนการกักเก็บด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยก็ตาม



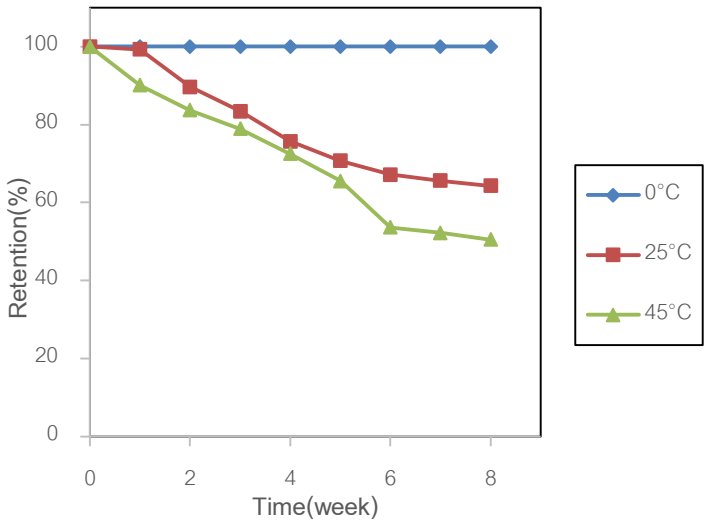
รูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บไลโปเลส 100 แอล และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์

โดยเมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์จะพบว่าไลโปเลสที่ถูกเก็บรักษาที่ 45 องศาเซลเซียสนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพอย่างชัดเจน เนื่องจากมีการตกตะกอนเกิดขึ้นเป็นเหตุผลที่ทำให้ทราบได้ว่าไลโปเลส 100 แอลนั้นเกิดการการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ส่วนเอนไซม์ที่ถูกเก็บรักษาที่ 25 และ 0 องศาเซลเซียสนั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพให้เห็นด้วยตาเปล่า แต่พบว่าไลโปเลสที่ถูกเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียสนั้นมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือลดลง โดยค่าแอคติวิตี้คงเหลือที่มีค่าลดลงนั้นเนื่องจาก ความร้อนที่ได้รับระหว่างการเก็บรักษามีผลทำให้เกิดการรบกวนโครงสร้างของเอนไซม์บางส่วนทำให้สูญเสียสภาพทางธรรมชาติ

และเมื่อทำการเก็บรักษาผงไลโปเลส 100 แอล แห้ง ที่อุณหภูมิเดียวกันนั้น พบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่าไม่ปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาที่มากขึ้น เนื่องจากไลโปเลส 100 แอลที่ถูกทำให้แห้งนั้นมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์สูญเสียภาพทางธรรมชาติระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยจนไม่อาจจะสูญเสียสภาพด้วยอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาได้อีกจึงเป็นผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่าเท่ากับแอคติวิตี้คงเหลือในตอนเริ่มต้น

4.6.2 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง หลังจากที่ทำการเก็บรักษา

โดยงานวิจัยนี้จะทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าน้อยที่สุด โดยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนั้นพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่าไม่ต่างจากตอนเริ่มต้น ดังรูปที่ 4.13 โดยความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ทำการเก็บรักษาต่อค่าแอคติวิตี้ที่คงเหลือนั้นเหมือนกับการเก็บรักษาไลโปเลส 100 แอล ในสถานะของของเหลว

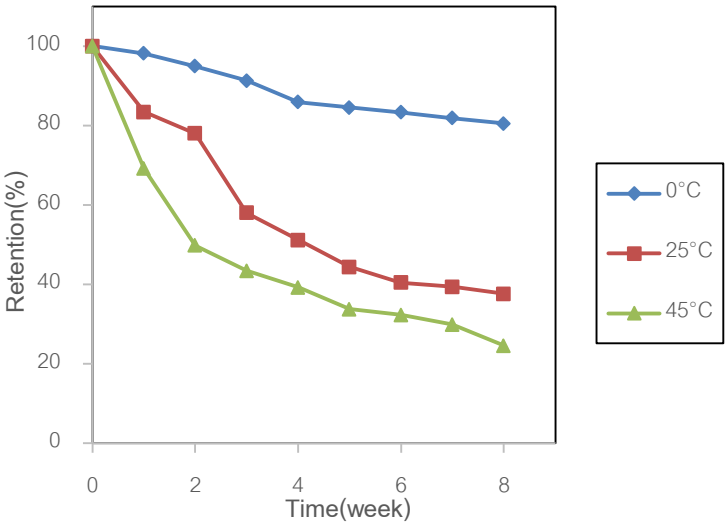


รูปที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บผงเอนไซม์แห้งและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์

และพบว่าผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนที่มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์นั้น มีค่าแอคติวิตี้คงเหลือไม่แตกต่างจากจากผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ และเมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ให้ผลในการกักเก็บไม่ต่างกัน คือ ค่าแอคติวิตี้ของผงเอนไซม์แห้งจะมีค่าลดลงเมื่อเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษามากขึ้น ซึ่งปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ที่เติมเข้าไปไม่ส่งผลต่อค่าแอคติวิตี้คงเหลือในการเก็บรักษา

4.6.3 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง หลังจากที่ทำการเก็บรักษาร่วมกับผงซักฟอก

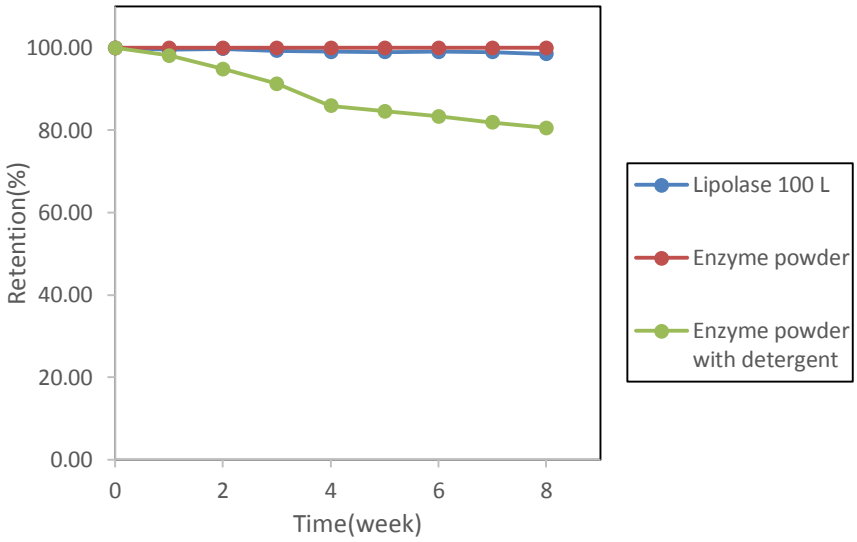
โดยงานวิจัยนี้จะทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์ร่วมกับผงซักฟอกในอัตราส่วนต่อน้ำหนักที่เท่ากันที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าน้อยที่สุด ดังรูปที่ 4.14 เนื่องจากผงซักฟอกนั้นประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบบางชนิดที่มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (ไลโปเลส 100 แอล) จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์ที่เก็บร่วมกับผงซักฟอกจึงมีค่าน้อยกว่า และเมื่อสังเกตจากลักษณะทางกายภาพพบว่าผงเอนไซม์แห้งที่เก็บรักษาร่วมกับผงซักฟอกจะเกิดสีน้ำตาลขึ้น โดยสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นนั้นจะมีความเข้มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษามากขึ้น



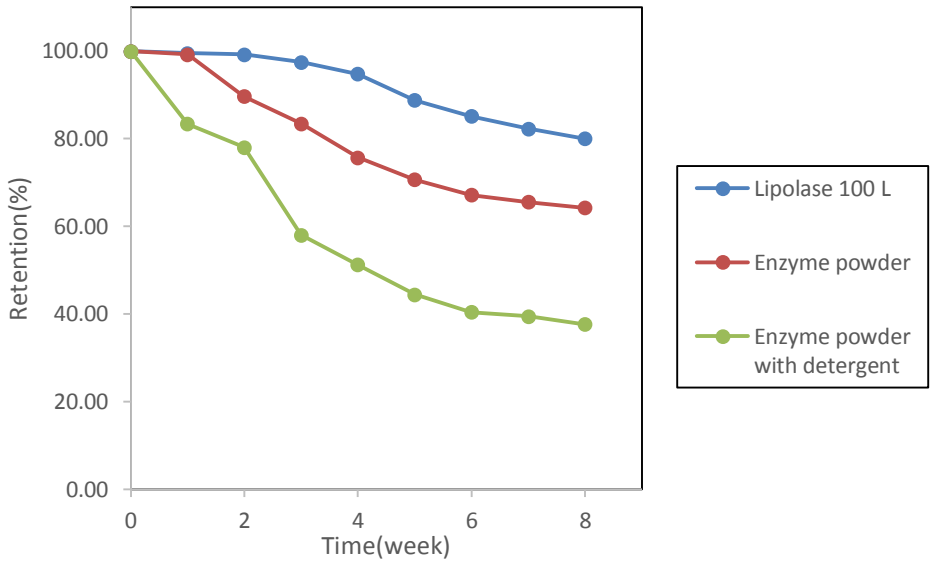
รูปที่ 4.14 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บผงเอนไซม์แห้งร่วมกับผงซักฟอกและค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์

โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าแอคติวิตี้ของไลโปเลส 100 แอล, ผงเอนไซม์แห้ง และผงเอนไซม์ที่ผสมกับผงซักฟอกหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ (ดังรูปที่ 4.15 – 4.17) พบว่าเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของของเหลวนั้นจะทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่ามากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีความเสถียร โดยที่ผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือลดลง เนื่องจากเอนไซม์นั้นอยู่ในรูปที่ขาดความเสถียรเนื่องจากการสูญเสียน้ำในโครงสร้าง และเมื่อนำผงเอนไซม์แห้งผสมกับผงซักฟอกนั้นพบว่าจะมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือลดลงมากที่สุด เนื่องจากผงซักฟอกทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานไปบางส่วน

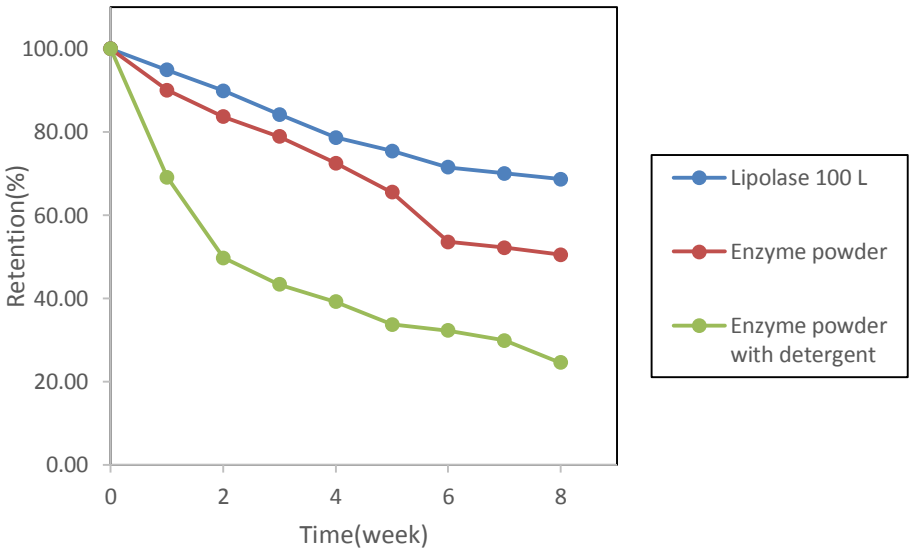
ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการวัดค่าแอคติวิตี้ของไลโปเลส 100 แอลและวัดค่าแอคติวิตี้ของไลโปเลส 100 แอลร่วมกับผงซักฟอกที่ไม่ผ่านการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้น พบว่าค่าแอคติวิตี้ของไลโปเลส 100 แอลร่วมกับผงซักฟอกจะมีค่าเพียง 80%ของค่าแอคติวิตี้ของไลโปเลส 100 แอล ดังนั้นเมื่อทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์แห้งร่วมกับผงซักฟอกจึงมีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้ของผงเอนไซม์แห้งมีค่าลดลงเช่นกัน



รูปที่ 4.15 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาเท่ากับ 0 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.16 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.17 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

โดยเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาผงเอนไซม์แห้งมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้เกิดการรบกวนโครงสร้างเอนไซม์อันเนื่องมาจากความร้อนที่ได้รับ จึงส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือนั้นมีค่าลดลง

4.7 การศึกษาผลของสารสายป้อน

สารสายป้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการอบแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งนอกจากจะประกอบด้วยวัสดุห่อหุ้มและปริมาณที่ใช้นั้น อีกปัจจัยที่มีความสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งก็คือรูปแบบของสารสายป้อน เนื่องจากการอบแห้งแบบพ่นฝอยโดยใช้สารละลายน้ำแป้งเป็นสารสายป้อน พบว่าเอนไซม์ขาดเสถียรภาพในการเก็บรักษา เนื่องจากการการสูญเสียน้ำของโมเลกุลของเอนไซม์ จึงทำให้เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ เป็นเหตุให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์มีค่าลดลง ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมานั้นจึงมีการเติมสาร เช่น แลคโตสและทรีฮาโลส ซึ่งพบว่าทำให้ค่าแอคติวิตี้ของเอนไซม์คงเหลือมีค่ามากขึ้น [41] อีกทั้งยังช่วยในการเก็บรักษาทำให้มีความเสถียรในการเก็บรักษามากขึ้น ส่งผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือจากการเก็บรักษาสูญเสียน้อยลง และในงานวิจัยบางส่วนนั้นได้มีการใช้สารสายป้อนซึ่งอยู่ในรูปของอิมัลชัน โดยพบว่าสารสายป้อนแบบอิมัลชันสำหรับการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์สูงกว่าสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้งและยังพบอีกว่าทำให้มีความเสถียรในการเก็บรักษามากขึ้น ทำให้เกิดแรงจูงใจที่จะศึกษาอิทธิผลของรูปแบบของสารสายป้อน

งานวิจัยนี้ ทำการอบแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนคือสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 40% โดยน้ำหนักผสมกับไลโปเลส 100 แอล ในอัตราส่วนไลโปเลส 100 แอล 10 มิลลิลิตรต่อ

แป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม และเมื่อสารสายป้อนคืออิมัลชันเชิงซ้อน จะผสมไลโปเลส 100 แอลและพลูโรนิค แอล 31เข้ากับน้ำมัน MCT ในอัตราส่วน 0.75 : 2.25 : 7 ส่วนโดยน้ำหนักตามลำดับ (5 กรัม) ตามงานวิจัยของ สิริรัตน์ [40] เนื่องเป็นอัตราส่วนที่ทำให้ทั้งสามส่วนนั้นเสถียร จะได้ W_1/O แล้วนำไปผสมกับสารละลายน้ำแป้งไฮแคป 100 40% 20 กรัมแป้ง จะได้อิมัลชันเชิงซ้อน ($W_1/O/W_2$) โดยใช้อุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส, อัตราป้อน 6 มิลลิลิตรต่อนาที, aspirater 20 % และใช้อะตอมไมเซอร์แบบหัวฉีดแบบแรงดัน (Pressure Nozzles Atomizer)

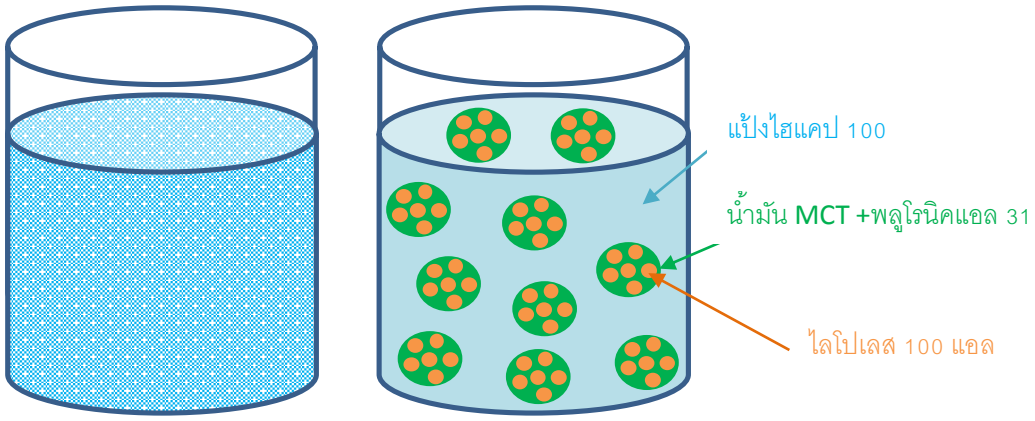
4.7.1 ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อน คือ สารละลายน้ำแป้งและอิมัลชันเชิงซ้อน

ตารางที่ 4.6 แสดงข้อมูลที่ได้จากการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบสารละลายน้ำแป้ง และอิมัลชันเชิงซ้อน

สารสายป้อน	อุณหภูมิของอากาศขาออก (ºC)	ขนาดอนุภาค (μm)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	ค่าแอคติวิตี้คงเหลือ (%)	ค่าแอคติวิตี้ต่อกรัม (unit/g)	ปริมาณความชื้น (moisture content,%)
สารละลายน้ำแป้ง	69	15.60	5.15	90.12	289 ± 15	4.73
อิมัลชันเชิงซ้อน	72	15.08	5.10	99.20	88 ± 8	4.08

จากผลการวิจัย พบว่าค่าแอคติวิตี้ของผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบอิมัลชันเชิงซ้อนนั้นจะให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ได้ดีกว่า ซึ่งจะมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือหลังผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยร้อยละ 99 โดยที่ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้งมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 90 ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี เนื่องจากผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบอิมัลชันเชิงซ้อนจะมีการกักเก็บที่หนาแน่นกว่า โดยเอนไซม์จะอยู่ในชั้นภายในน้ำมันโดยมีชั้นแป้งห่อหุ้มอีกครั้ง ซึ่งน้ำมันก็จะมีส่วนช่วยในการปกป้องเอนไซม์จากความร้อน ลดปริมาณการสูญเสียน้ำของเอนไซม์ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์นั้นเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติน้อยลง (ไลโปเลส 100 แอล ถูกกักเก็บไว้ภายในชั้นน้ำมัน ดังนั้นเมื่อผ่านกระบวนอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะมีเฉพาะน้ำที่เป็นองค์ประกอบของสารละลายน้ำแป้งที่ถูกระเหยไป เอนไซม์จึงไม่เกิดการสูญเสียน้ำ ทำให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่มีความเสถียร) เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีความสามารถทางชีวภาพ ทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือมีค่าสูงกว่าผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้ง และเมื่อทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์แห้งเมื่อสารสายป้อน คือ อิมัลชันเชิงซ้อน พบว่า มีความเสถียรในการเก็บรักษา

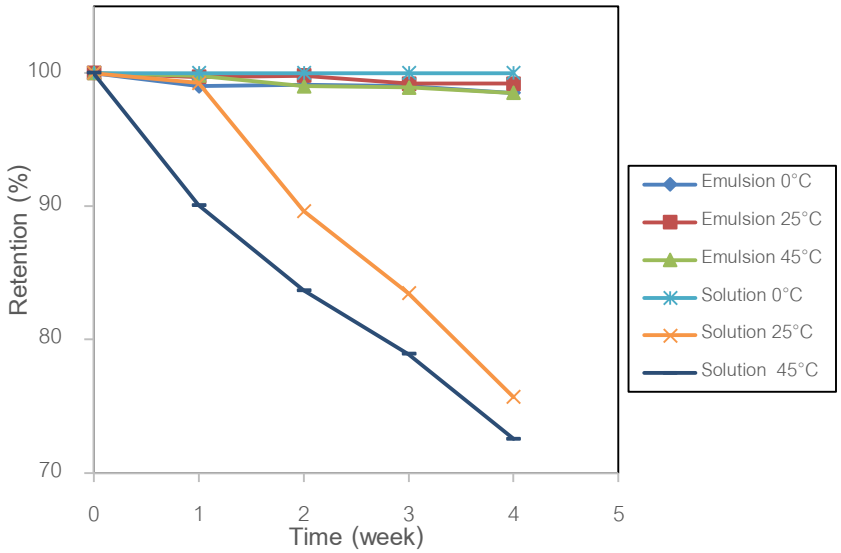
สูงกว่าเมื่อสารสายป้อน คือ สารละลายน้ำแป้ง โดยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสพบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นไม่มีผลทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์ลดลง ซึ่งต่างจากเมื่อสารสายป้อนเป็นสารละลายน้ำแป้ง ซึ่งสามารถอธิบายได้จากกลไกการกักเก็บอันเนื่องจากรูปแบบของสารสายป้อนที่ต่างกัน ดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะสารสายป้อน (ซ้าย) แบบสารละลายน้ำแป้ง (ขวา) แบบอิมัลชันเชิงซ้อน

ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ สิริรัตน์ กลิ่นกุหลาบ [40] ซึ่งทำการกักเก็บเอนไซม์ไฟเทสด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยสำหรับการผสมในอาหารสัตว์ พบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ไฟเทสเมื่อสารสายป้อนที่อยู่ในรูปของอิมัลชันเชิงซ้อนดีกว่าสารสายป้อนที่อยู่ในรูปของอิมัลชันเชิงซ้อน และจากงานวิจัยของJoana และคณะ [34]พบว่าการใช้มอลโตเดกซ์ตรินร่วมกับกัมอะราบิคเป็นวัสดุห่อหุ้มสารสำคัญ เช่น epigallocatechin gallate (EGCG) ซึ่งเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์จากชาเขียวด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอยและเคลือบด้วยไขมันอีกชั้นด้วยสารผสมระหว่าง Egg-yolk -phosphatidylcholine (Egg-PC) และ stearylamine (SA) พบว่าการใช้ไขมันเป็นวัสดุห่อหุ้มในชั้นที่สองนั้นทำให้ปกป้องสารสำคัญจากสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น และจากงานวิจัยของณัฐชัยและอัมพร [47] การทำไมโครอิมัลชันที่บรรจุยาไดอะซิแพมทำให้ได้ตัวยาที่มีความสามารถในการละลายสูงขึ้นและมีการควบคุมการปลดปล่อยของการกักเก็บยาได้ดี และจากงานวิจัยของ ภัทรวรรณและคณะ [46] พบว่าการทำอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำส่งผลให้ความเสถียรและมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียดีขึ้น

และเมื่อทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบอิมัลชันที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งแบบอิมัลชันนั้นมีค่าไม่ต่างจากค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งเริ่มต้น ดังรูปที่ 4.19 หมายถึงประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบอิมัลชันนั้นสูง โดยให้ผงเอนไซม์แห้งที่มีความเสถียรในการเก็บรักษา เนื่องจากมีชั้นน้ำมันในการห่อหุ้มเอนไซม์ซึ่งช่วยในการป้องกันการสัมผัสของเอนไซม์กับสิ่งแวดล้อม ทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์มีค่าสูง ในขณะที่ผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้งนั้นเมื่อทำการเก็บรักษาเหมือนกันจะให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือต่ำกว่า (จากรูป 4.19)

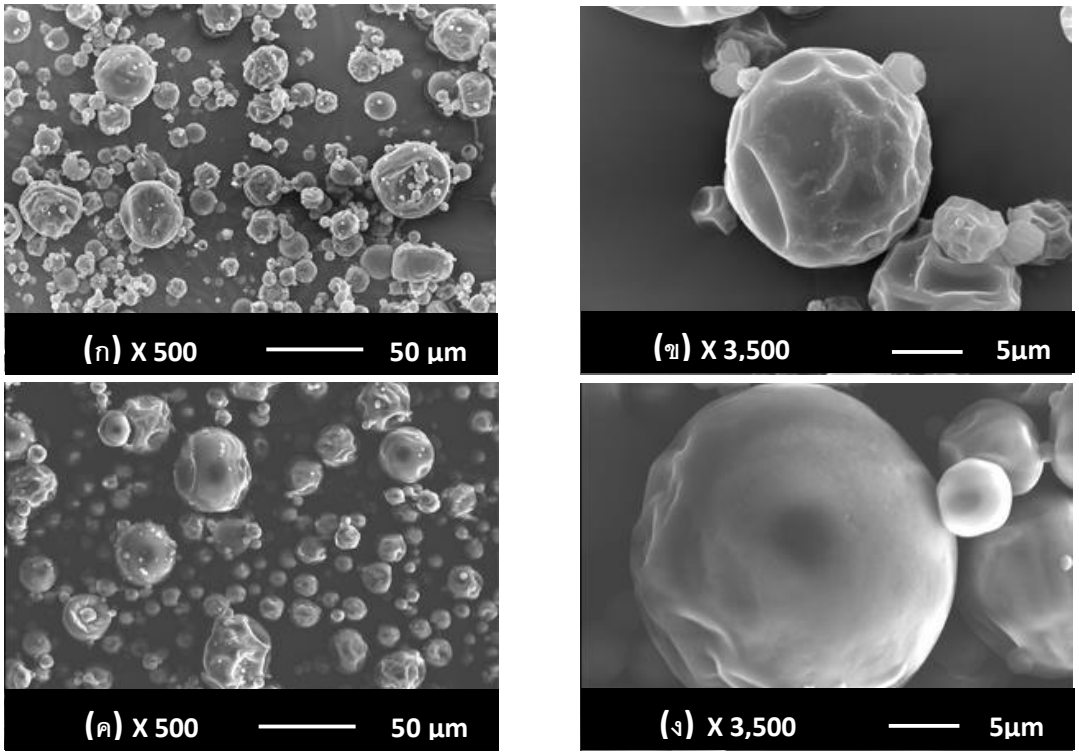


รูปที่ 4. 19 แสดงความสัมพันธ์ระยะเวลาในการเก็บเอนไซม์และค่าร้อยละของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบอิมัลชันเชิงซ้อน

4.7.2 โครงสร้างของอนุภาคหลังของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อน คือสารละลายน้ำแป้งและอิมัลชันเชิงซ้อน

จากการทำการวิเคราะห์โครงสร้างของผงเอนไซม์แห้งโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น พบว่ารูปแบบของสารสายป้อนมีผลต่อลักษณะของอนุภาคที่ได้ โดยพื้นผิวอนุภาคของผงเอนไซม์แห้งที่ได้จากสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้งนั้นจะเกิดการหดตัว/ยุบตัวมากกว่า ดังรูปที่ 4.20 ทำให้มีพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนความร้อนกับอากาศร้อนขาเข้ามากกว่าเป็นเหตุให้มีค่าคงเหลือของแอคติวิตี้น้อยกว่า ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลปริมาณของเอนไซม์ที่อยู่ในสารสายป้อนและอีกส่วนเป็นผลมาจากแป้งที่ใช้ในการห่อหุ้มเนื่องจากสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้งใช้แป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10 แต่สารสายป้อนแบบอิมัลชันเชิงซ้อนนั้นจะใช้แป้งไฮแคป 100 อีกทั้งยังมีปริมาณเอนไซม์น้อยลงเมื่อเทียบกับปริมาณแป้งที่เท่ากัน เนื่องจากสารสายป้อนแบบอิมัลชันเชิงซ้อนนั้นจะต้องใช้แป้งที่ถูกดัดแปรมาแล้วซึ่งมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์เพื่อที่จะสามารถทำให้สารสายป้อนนั้นมีความเสถียร และยังมีการใช้สารลดแรงตึงผิวซึ่งในการทดลองนี้ใช้พลูโรนิค แอล 31 ซึ่งมีค่า HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) ในระหว่าง 7 - 14 ซึ่งจะเหมาะสำหรับการทำอิมัลชันเชิงซ้อน ($W_1/O/W_2$) อีกทั้งยังมีชั้นน้ำมัน MCT ในการปกป้องเอนไซม์อีกด้วย โดยเอนไซม์จะอยู่ในชั้นภายในน้ำมันโดยมีชั้นแป้งห่อหุ้มอีกครั้ง ซึ่งน้ำมันก็จะมีส่วนช่วยในการปกป้องเอนไซม์จากความร้อน ลดปริมาณการสูญเสียน้ำของเอนไซม์ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์นั้นเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติน้อยลง จึงเป็นเหตุที่ทำให้สารสาย

ป้อนแบบอิมัลชันเชิงซ้อนมีประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ที่ดีกว่าสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้ง ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์



รูปที่ 4.20 โครงสร้างภายนอกของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อนเป็นแบบ (ก, ข) สารละลายน้ำแป้ง และ (ค, ง) อิมัลชันเชิงซ้อน

4.7.3 ปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง เมื่อสารสายป้อน คือ สารละลายน้ำแป้งและอิมัลชันเชิงซ้อน

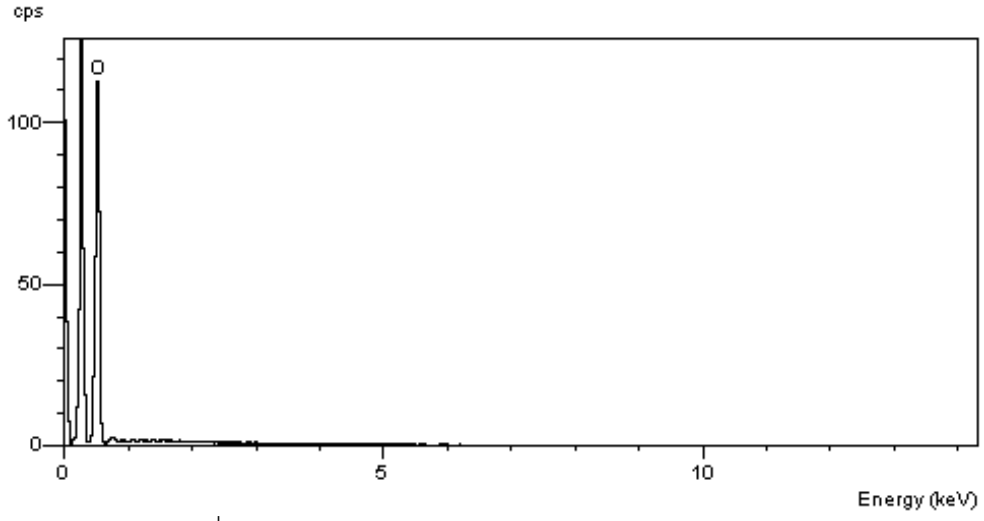
รูปแบบของสารสายป้อนมีผลต่อปริมาณความชื้นและขนาดของผงเอนไซม์แห้ง โดยพบว่าสารสายป้อนแบบสารละลายน้ำแป้งจะได้ผงเอนไซม์แห้งที่มีปริมาณความชื้นและขนาดของอนุภาคมากขึ้น ดังตารางที่ 4.6 สำหรับปริมาณความชื้นที่มีค่ามากกว่านั้นเป็นผลจากรูปแบบในการกักเก็บเอนไซม์ เนื่องจากปริมาณน้ำที่จะต้องถูกระเหยไปมีค่ามากกว่า เมื่อได้รับความร้อนในปริมาณที่เท่ากันจะทำให้ปริมาณความชื้นที่หลงเหลืออยู่ในอนุภาคมีค่ามากกว่า

4.8 การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 5 – 40 มิลลิลิตร ต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

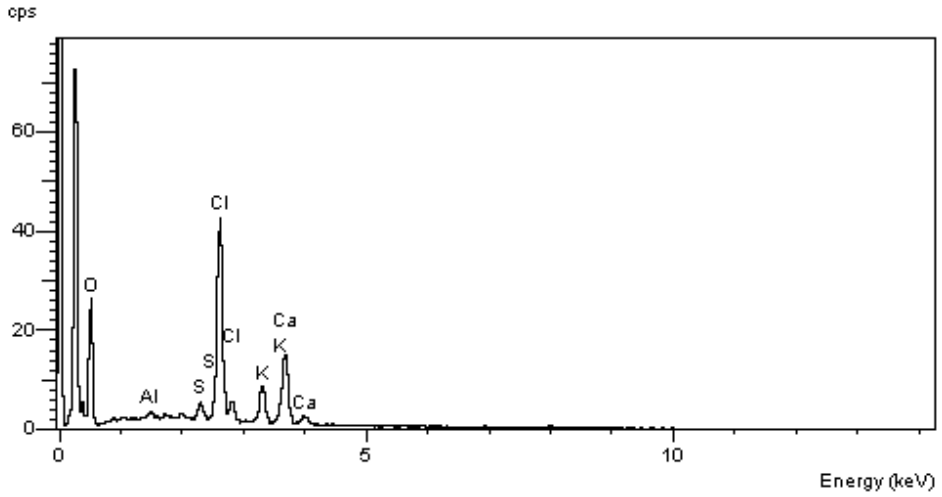
ปริมาณของเอนไซม์ในสารสายป้อนนอกจากจะมีผลต่อโครงสร้างหรือลักษณะของอนุภาค, ขนาดของอนุภาค และความชื้นของอนุภาคดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ปริมาณของเอนไซม์ยังมีผลต่อตำแหน่งของเอนไซม์อีกด้วย ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์โดยส่งผลต่อค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์โดยในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาตำแหน่งหรือการกระจายตัวของเอนไซม์ของอนุภาคผงเอนไซม์แห้งเมื่อปริมาณโปเลส 100 แอล ในสารสายป้อนมากขึ้น

4.8.1 ผลของตำแหน่งของเอนไซม์เมื่อใช้เครื่อง Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

จากการศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยเครื่อง Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) โดยทำการวิเคราะห์ธาตุที่มีในองค์กระกอบของแป้งมอลโตเดกซ์ตรินซึ่งถูกใช้เป็นวัสดุห่อหุ้ม และองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล เพื่อระบุธาตุที่มีในองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.21 และรูปที่ 4.22 ตามลำดับ



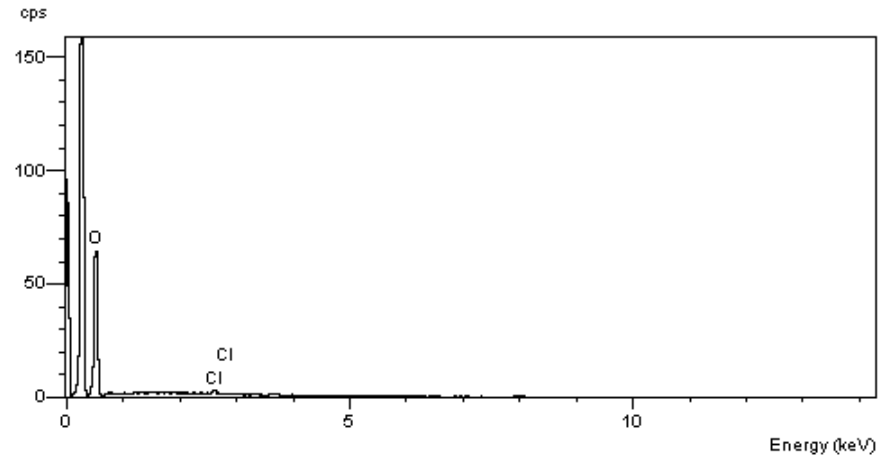
รูปที่ 4.21 แสดงองค์ประกอบของแป้งมอลโตเดกซ์ตริน



รูปที่ 4.22 แสดงองค์ประกอบของไลโปเลส 100 แอล

พบว่าแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีคาร์บอนและออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 4.21 และไลโปเลส 100 แอลนั้นมีคาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน อะลูมิเนียม ซัลเฟอร์ คลอรีน โพแทสเซียม และแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 4.22 ดังนั้นในการวิเคราะห์การกระจายตัวของไลโปเลสของอนุภาคจึงไม่สามารถใช้การกระจายตัวของคาร์บอนหรือออกซินเจนเป็นตัวแทนการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลได้ เนื่องจากคาร์บอนและออกซิเจนต่างก็เป็นองค์ประกอบของทั้งแป้งมอลโตเดกซ์ตรินและไลโปเลส 100 แอล

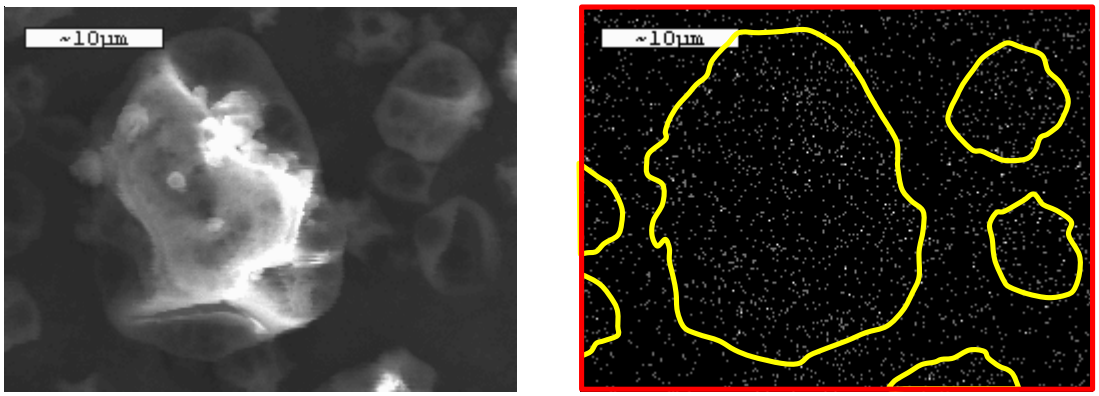
ไลโปเลส 100 แอลเป็นเอนไซม์ไลเปสซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง โดยทั่วไปนั้นโปรตีนจะประกอบไปด้วยคาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจนและซัลเฟอร์เป็นหลัก โดยหลักการนั้นจึงคาดว่าในการวิเคราะห์การกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลนั้น ควรจะวิเคราะห์จากธาตุไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์ แต่เนื่องจากพีคของโนโตรเจนนั้นมีปริมาณน้อยและอยู่ระหว่างคาร์บอนและออกซิเจนที่มีปริมาณมากจึงไม่สามารถวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนี้ได้ จึงคาดว่าต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณของซัลเฟอร์แทน



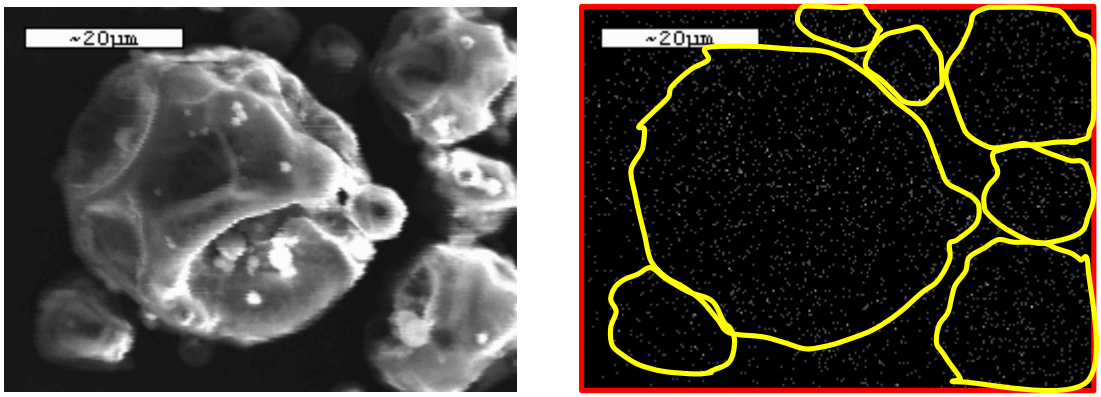
รูปที่ 4.23 แสดงองค์ประกอบของผงเอนไซม์แห้ง

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของผงเอนไซม์แห้งนั้นพบว่าสามารถวิเคราะห์ได้ว่ามีคาร์บอน ออกซิเจนและคลอรีนเป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 4.23 ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ธาตุคลอรีนในการวิเคราะห์ตำแหน่งของไลโปเลส 100 แอลแทน เนื่องจากในไลโปเลส 100 แอลนั้นมีคลอรีนเป็นองค์ประกอบแต่แป้งมอลโตเดกซ์ตรินไม่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ

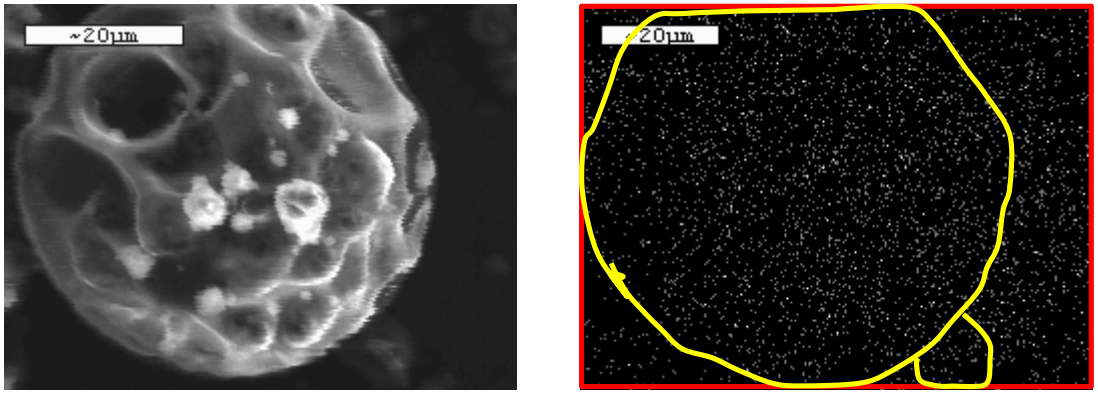
จากการวิเคราะห์ตำแหน่งการกระจายตัวของคลอรีนบนผิวของอนุภาคนั้นพบว่า เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลมากขึ้น จะพบการกระจายของคลอรีนบนผิวของอนุภาคมากขึ้น โดยเมื่อปริมาณไลโปเลสเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัมนั้นไม่สามารถทำการวิเคราะห์การกระจายตัวบนพื้นผิวของอนุภาคได้ แต่เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลมากขึ้น (10, 15, 20, 30, 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม) จะพบการกระจายของคลอรีนบนพื้นผิวของอนุภาคมากขึ้นตามลำดับ ดังรูปที่ 4.24 - 4.28



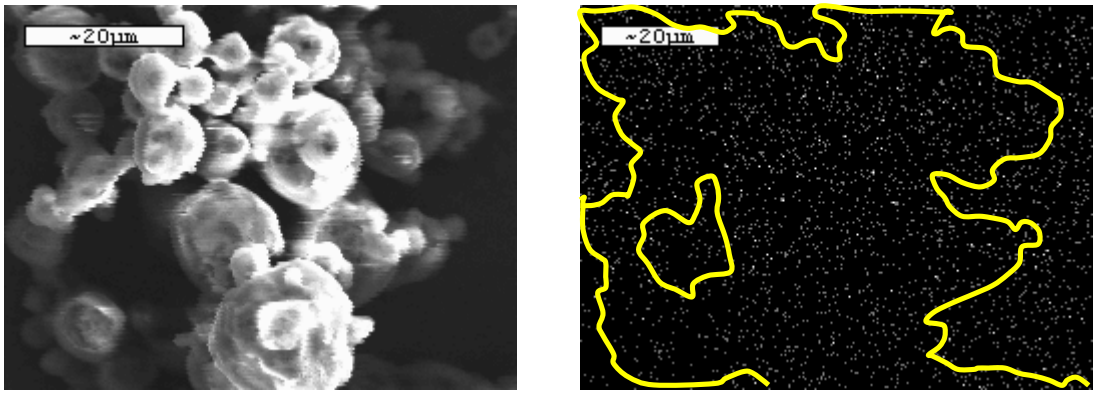
รูปที่ 4.24 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลสเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม



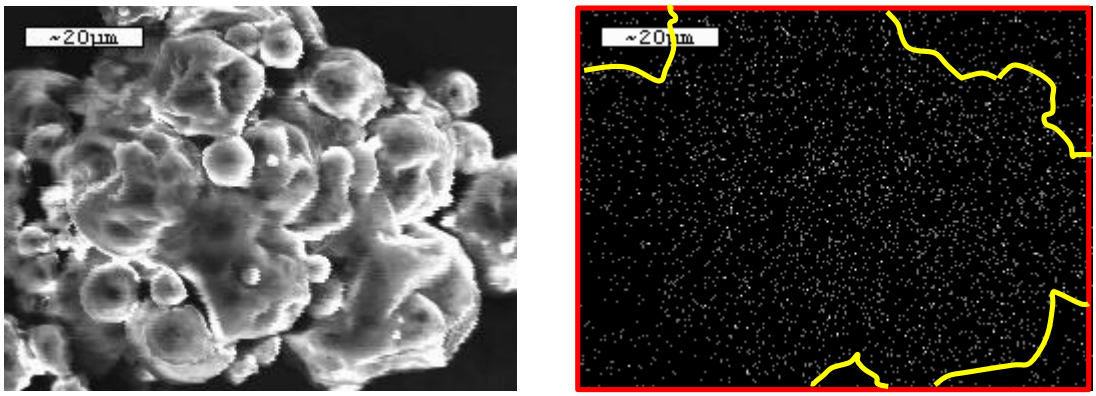
รูปที่ 4.25 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลสเท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม



รูปที่ 4.26 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลสเท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

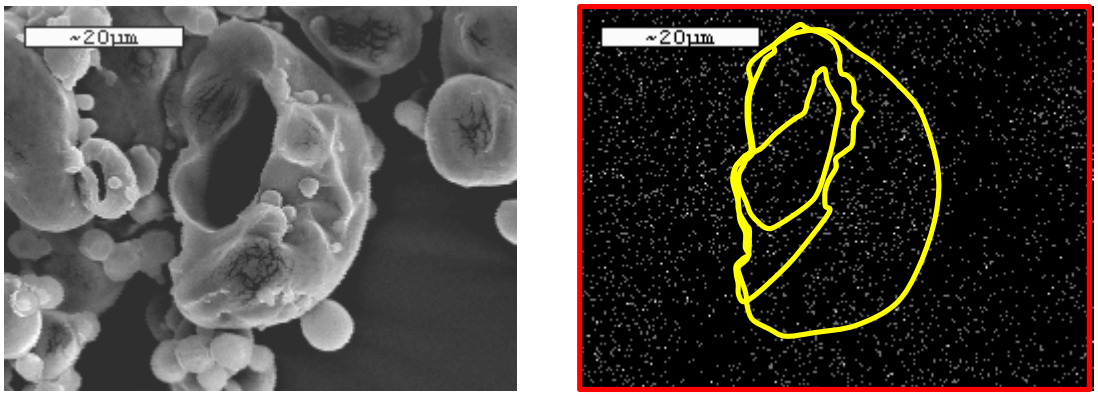


รูปที่ 4.27 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลสเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม



รูปที่ 4.28 (ซ้าย) แสดงลักษณะพื้นผิวของอนุภาค และ (ขวา) แสดงการกระจายตัวของคลอรีน เมื่อปริมาณไลโปเลสเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

สำหรับสารสายป้อนที่เป็นสารละลายน้ำแป้ง โดยปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 5 และ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัมนั้น เมื่อทำการวิเคราะห์ธาตุของอนุภาคที่ถูกตัดขวางด้วยเครื่อง EDX พบว่าไม่สามารถทำการหาธาตุคลอรีนได้ ทำให้ไม่สามารถทำ **EDX mapping** ของการกระจายตัวของคลอรีนได้ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์อนุภาคตัดขวางของสารสายป้อนที่เป็นสารละลายน้ำแป้ง โดยปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัมนั้น พบว่าปริมาณของไลโปแลส 100 แอลน้อยกว่า เมื่อเทียบกับพื้นผิวของอนุภาค จากการวิเคราะห์ตำแหน่งการกระจายตัวของคลอรีนจากอนุภาคที่ถูกตัดขวาง ดังรูปที่ 4.29 โดยที่เมื่อปริมาณของไลโปเลสต่อแป้งที่มากขึ้นนั้นไม่สามารถทำการตัดอนุภาคได้จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้



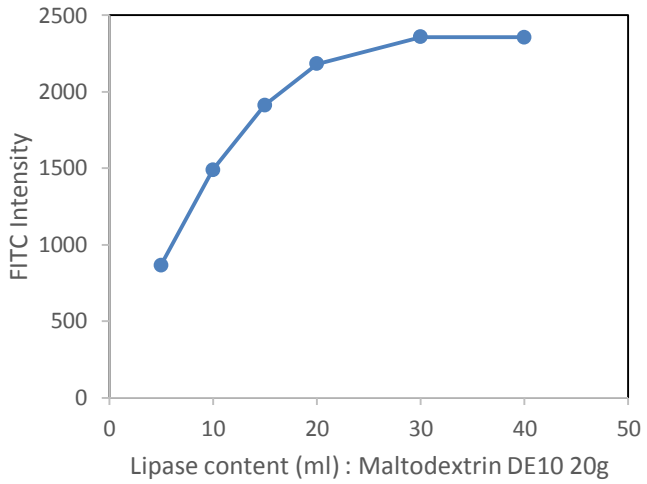
รูปที่ 4.29 (ขวา) แสดงการกระจายของคลอรีน (ซ้าย) แสดงภาพตัดขวางของอนุภาค เมื่อสารสายป้อนเป็นสารละลายน้ำแป้งโดยปริมาณของไลโปเลส 100 แอลเท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม

4.8.2 ผลของตำแหน่งของเอนไซม์เมื่อใช้กล้องคอนโฟคอล (Confocal Laser Scanning Microscope,CLSM)

เมื่อนำไลโปเลส 100 แอล (เอนไซม์) ไปทำให้ติดสีด้วยสี FITC แล้วทำการแยกสี FITC ที่ไม่ติดกับเอนไซม์ออกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 แล้วแยกไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC ออกแล้วนำมาผสมกับสารละลายน้ำแป้งตามอัตราส่วนที่ต้องการ แล้วนำไปผ่านกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย จะได้อนุภาคของผงเอนไซม์แห้ง แล้วนำผงเอนไซม์แห้งที่ได้ไปเตรียมตัวอย่างบน cover slip จากนั้นวางตัวอย่างบน Holder เพื่อนำไปวางในที่วางตัวอย่าง ปิดฝาครอบแล้วทำการวิเคราะห์ โดยสี FITC ที่นำมาทำให้ไลโปเลส 100 แอล ติดสีนั้นเป็นสี Fluorescence ที่ให้สีเขียว โดยจะทำปฏิกิริยากับหมู่ amide เท่านั้น ดังนั้นสี FITC จึงไม่สามารถติดกับแป้งมอลโตเดกซ์ตรินได้

จากการวิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์ที่ติดสี FITC บนอนุภาคด้วยกล้องคอนโฟคอลนั้น พบว่าเอนไซม์กระจายตัวอยู่บนบริเวณพื้นผิวของอนุภาคมากกว่าภายในอนุภาค ซึ่งจะพบว่าเมื่อปริมาณของเอนไซม์มากขึ้นก็จะมีสีเขียวบนพื้นผิวของอนุภาคมากขึ้นโดยที่เอนไซม์จะยังกระจายตัวบริเวณพื้นผิวของอนุภาคมากกว่าภายใน

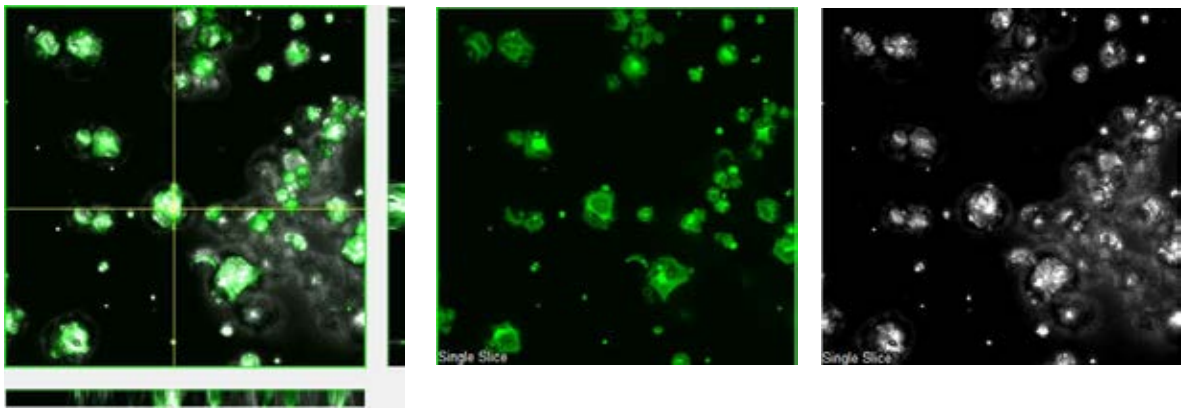
อนุภาค ดังรูปที่ 4.31 – 4.36 และเมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มของสี FITC ดังรูปที่ 4.30 และตารางที่ 4.7 พบว่ามีค่าความเข้มของสี FITC มากขึ้นความเข้มของสี และเมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้ามากขึ้นก็ไม่ส่งผลต่อการกระจายตัวของเอนไซม์ ดังรูปที่ 4.32, 4.37 - 4.39 และเมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มของสี FITC ดังตารางที่ 4.7 พบว่ามีค่าความเข้มของสี FITC ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องทั้งรูปการกระจายตัวของ FITC บนอนุภาคและค่าความเข้มของสี



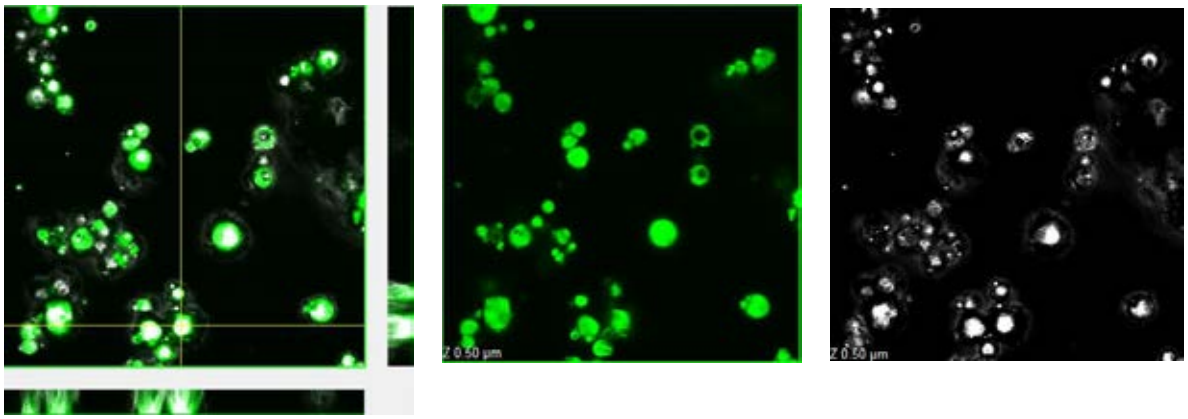
รูปที่ 4.30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และความเข้มของสี FITC

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าความเข้มของสี (Intensity) FITC Isomer I

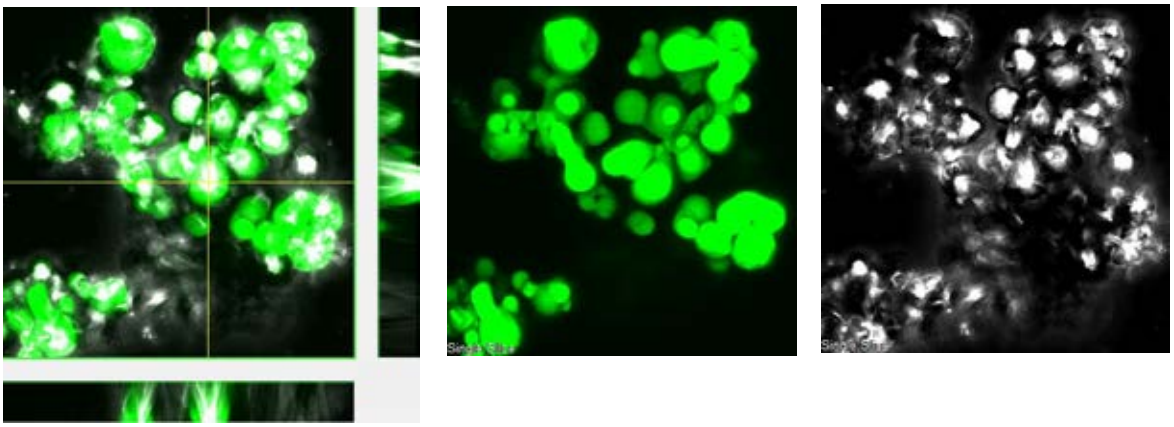
ปริมาณของไลโปเลส 100 แอล (ml) ต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 (g)	อุณหภูมิของอากาศขาเข้า(°C)	ความเข้มของสี (Intensity) FITC Isomer 1
5	110	864.50
10	110	1488.07
15	110	1911.14
20	110	2181.39
30	110	2358.39
40	110	2355.57
10	120	1462.31
10	130	1464.62
10	140	1471.07



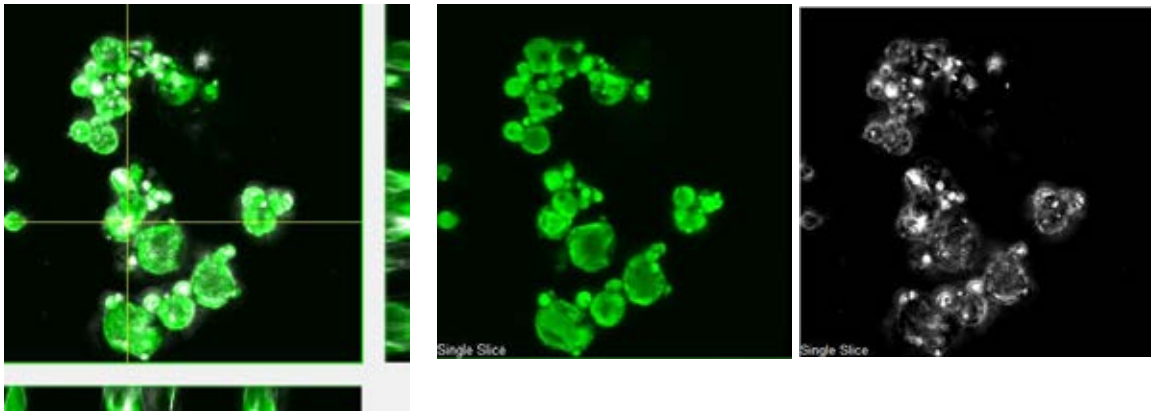
รูปที่ 4.31 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส



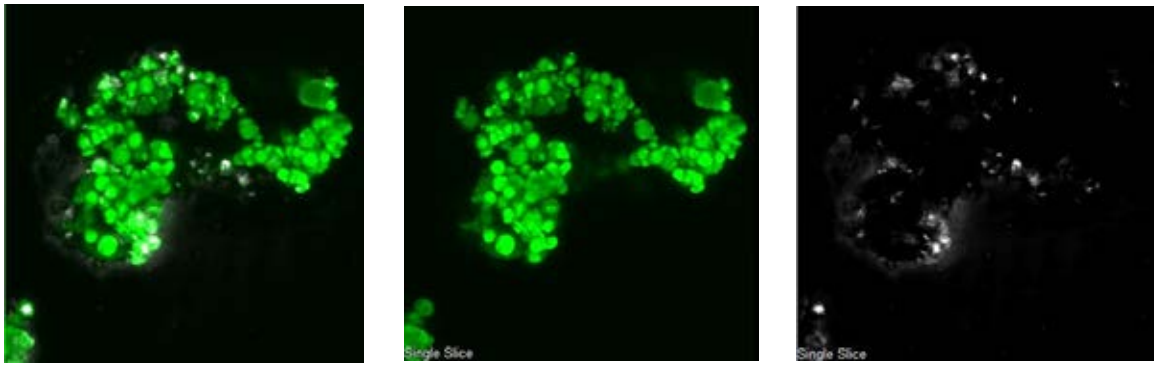
รูปที่ 4.32 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส



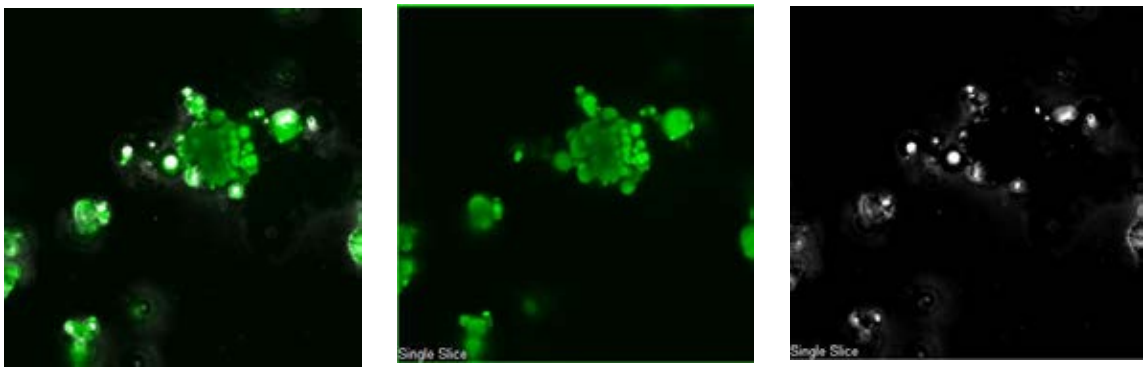
รูปที่ 4.33 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส



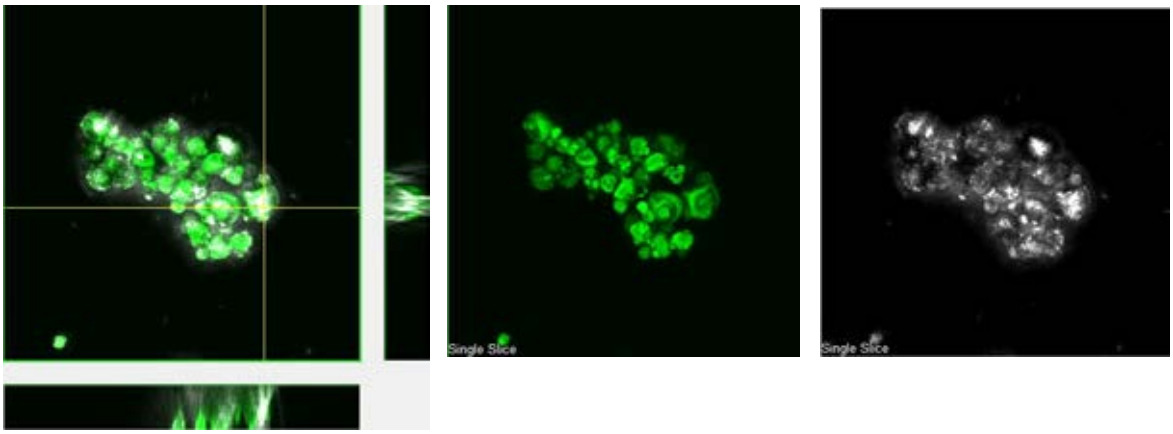
รูปที่ 4.34 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 20 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส



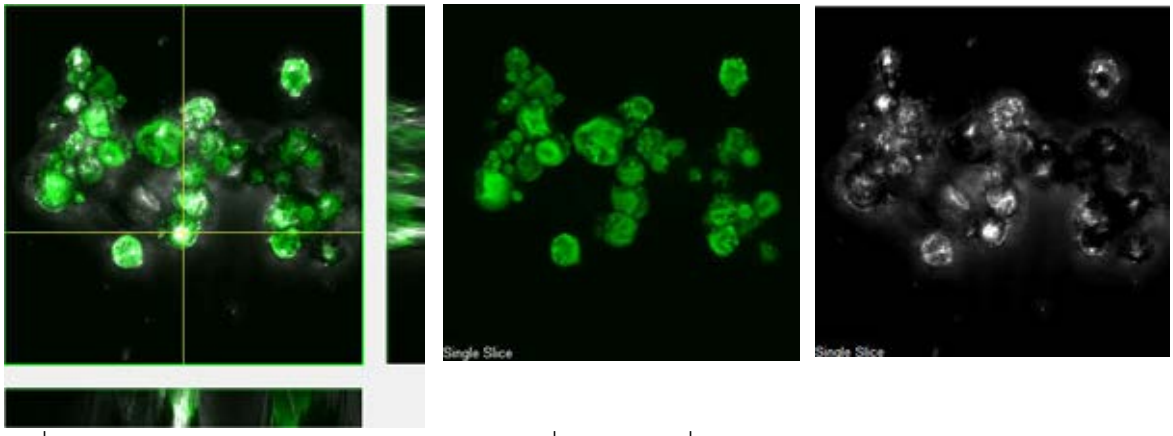
รูปที่ 4.35 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส



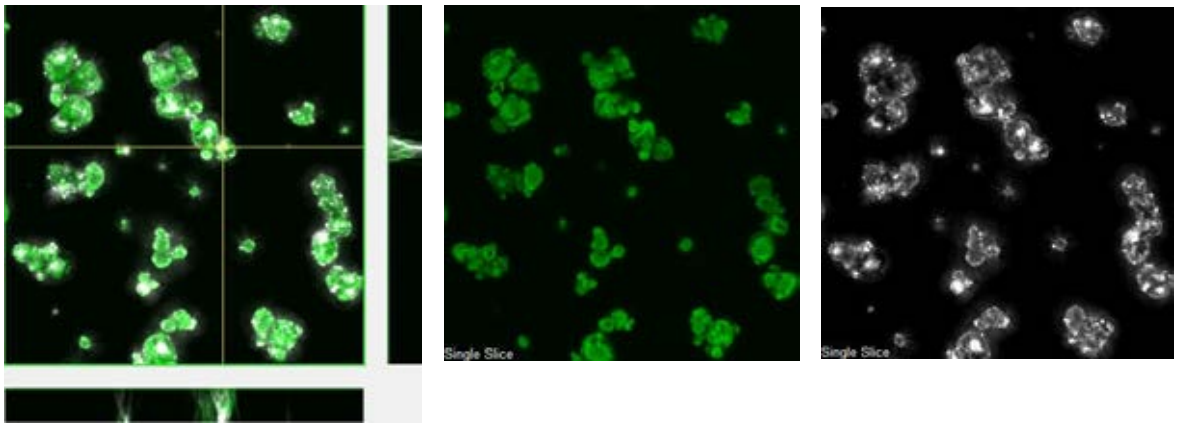
รูปที่ 4.36 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 110 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.37 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 120 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.38 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 130 องศาเซลเซียส

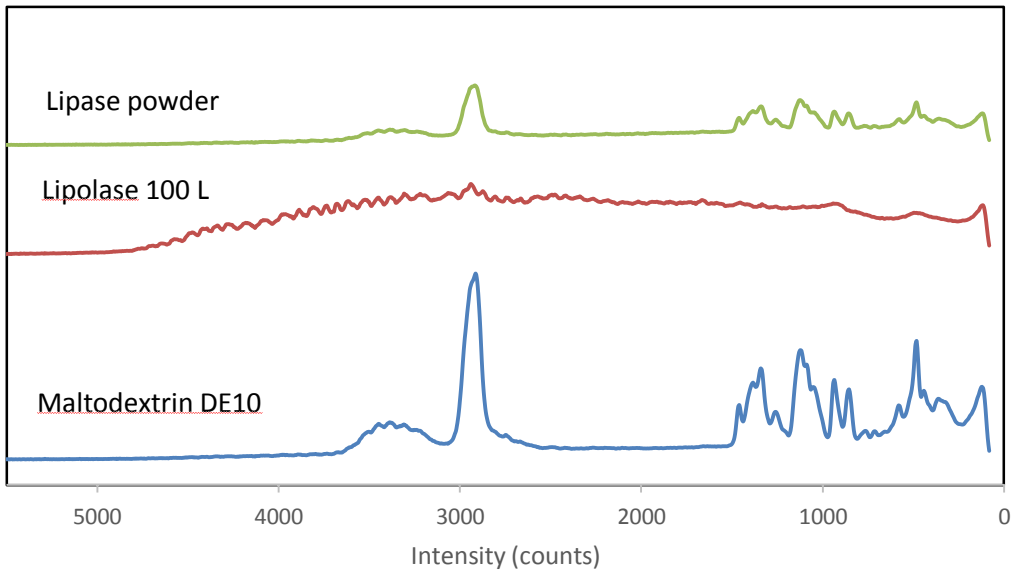


รูปที่ 4.39 แสดงการกระจายตัวของไลโปเลส 100 แอลที่ติดสี FITC เมื่อปริมาณของไลโปเลส 100 แอล เท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อแป้งมอลโตเดกซ์ตริน 20 กรัม เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 140 องศาเซลเซียส

4.8.3 ผลของตำแหน่งของเอนไซม์เมื่อใช้เครื่องรามานสเปกโตสโครป

เริ่มด้วยการทำการหาตำแหน่งของรามานพีคของสารแต่ละชนิด จากนั้นทำการวิเคราะห์ว่าสารแต่ละชนิดนั้น มีพีคใดที่มีตำแหน่งต่างกัน แล้วทำการระบุพีคของสารชนิดนั้น ๆ โดยสารที่เป็นองค์ประกอบแต่ละชนิดนั้นจะต้องมีตำแหน่งของรามานพีคที่ต่างกัน และมีพีคที่ชัดเจนจึงจะสามารถทำการวิเคราะห์ได้ ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคในการทำ Raman Mapping ซึ่งจะทำการ Mapping สารแต่ละชนิดด้วยสีที่ต่างกัน โดยจะสามารถทำการวิเคราะห์อนุภาคว่ากระจายตัวของสารแต่ละชนิดอยู่บริเวณใดของอนุภาค

โดยจากการทำการวิเคราะห์ไลโปเลส 100 แอลพบว่าไม่สามารถทำการระบุรามานพีคที่ชัดเจนได้ ดังรูปที่ 4.40 เนื่องจากไลโปเลส 100 แอล นั้นเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ประกอบด้วยองค์ประกอบของสารหลายชนิด จึงทำให้ไม่สามารถทำการระบุรามานพีคที่ชัดเจนได้ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ตำแหน่งของเอนไซม์บนอนุภาคด้วยเทคนิคนี้ได้



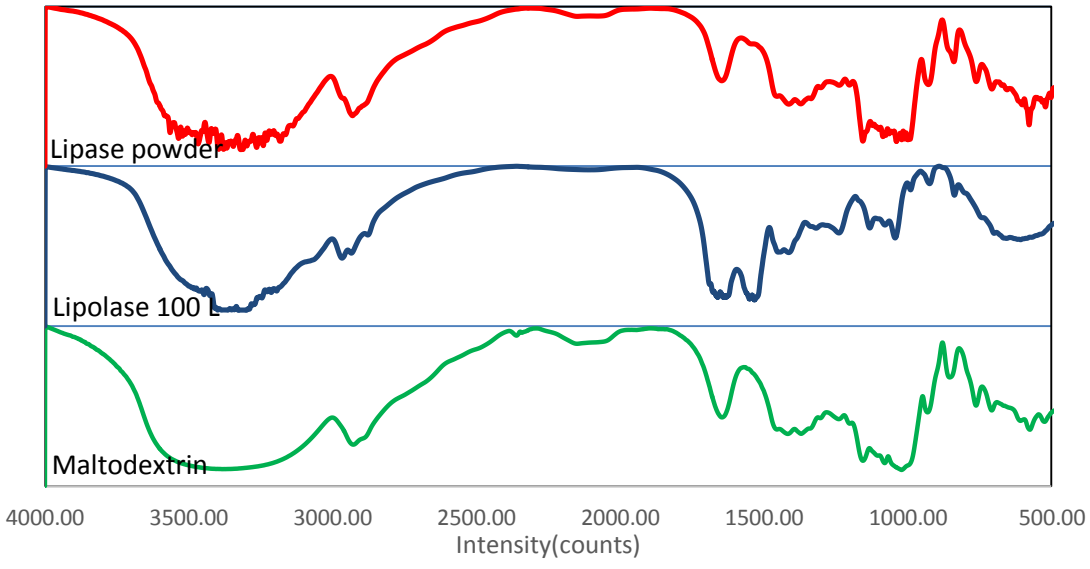
รูปที่ 4.40 แสดงรามานพีคของผงเอนไซม์แห้ง, ไลโปเลส 100 แอล และแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10

จากการวิเคราะห์ตำแหน่งการกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยเครื่อง EDX, กล้องคอนโฟคอล และเครื่องรามานสเปกโตสโครป พบว่าผลของการกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยเครื่อง EDX และกล้องคอนโฟคอล ให้ผลไปในทางเดียวกัน โดยพบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์มากขึ้นจะมีเอนไซม์กระจายตัวบนพื้นผิวของผงเอนไซม์แห้งมากขึ้น และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างการกระจายตัวของเอนไซม์ภายในอนุภาคและพื้นผิวของอนุภาคจะพบว่าเอนไซม์มีการกระจายตัวบนพื้นผิวของอนุภาคมากกว่าด้านในของอนุภาคจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเอนไซม์จากอนุภาคที่ถูกตัดขวาง ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งหลังผ่าน

กระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอย เมื่อปริมาณไลโปเลส 100 แอลมากขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์กระจายตัวอยู่บนผิวของอนุภาคมากกว่ากระจายตัวภายในอนุภาค ซึ่งในระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นผิวของอนุภาคจะสัมผัสกับอากาศร้อนและเกิดการถ่ายเทความร้อนและถ่ายเทมวลโดยตรงโดยการพาความร้อน เป็นผลให้เอนไซม์บริเวณผิวของอนุภาคเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติจากความร้อนของอากาศขาเข้า ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจนไม่สามารถทำหน้าที่เชิงชีวภาพได้ มีผลให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งลดลง ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วยเครื่องรามานสเปกโตสโครปที่ใช้ในการทำ Raman Mapping นั้นไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้

4.9 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคผงเอนไซม์แห้ง

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันโดยใช้เครื่อง FT-IR นั้น พบว่าไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาหมู่ amine ได้ ดังรูปที่ 4.41 เนื่องจากการพบว่า FT-IR พีคของแป้งมอลโตเดกซ์ตรินและไลโปเลส 100 แอลนั้นมีความใกล้เคียงกัน โดยที่จาก FT-IR ของไลโปเลส 100 แอลนั้นยังไม่ปรากฏพีคของหมู่ amine อย่างชัดเจน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของผงเอนไซม์แห้งได้



รูปที่ 4.41 แสดง FT-IR พีคของผงเอนไซม์แห้ง, ไลโปเลส 100 แอล และแป้งมอลโตเดกซ์ตริน DE10

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถทำการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสให้อยู่ในรูปของผงเอนไซม์แห้ง โดยใช้แป้งมอลโตเดกซ์ตรินเป็นวัสดุห่อหุ้มด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งจากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการกักเก็บไลโปเลส 100 แอล สามารถสรุปได้ดังนี้

การเติมแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีผลช่วยให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ดี โดยเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งมอลโตเดกซ์ตรินมีค่าสูงขึ้นจะพบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอันเนื่องมาจากระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นอนุภาคจะรับพลังงานความร้อนจากอากาศร้อนโดยตรง ทำให้เกิดการถ่ายเทของอุณหภูมิและความชื้น โดยความร้อนจากอากาศจะส่งผลให้อนุภาคมีอุณหภูมิสูงขึ้นและความชื้นในอนุภาคจะลดลง ซึ่งแป้งมอลโตเดกซ์ตรินจะได้รับพลังงานไปส่วนหนึ่งทำให้เอนไซม์นั้นรับพลังงานในปริมาณที่น้อยลงส่งผลให้เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติน้อยลงไปด้วย โดยที่จะส่งผลให้ผงเอนไซม์แห้งที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากการหดตัวอันเนื่องมาจากปริมาณน้ำที่หายไปของอนุภาคน้อยลง (โครงสร้างภายนอกของอนุภาคจะมีการยุบตัวน้อย) ทำให้พื้นที่ผิวในการสัมผัสกับอากาศร้อนจะมีค่าลดลง ทำให้เอนไซม์มีโอกาสที่จะเกิดการสัมผัสกับน้อยลง ทำให้ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของเอนไซม์หรือประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ดีขึ้น

ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิของอากาศร้อนขาเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย, ปริมาณเอนไซม์ มีค่าสูงขึ้นจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บเอนไซม์ลดลง เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิการอบแห้งที่สูงขึ้นจะมีผลทำให้เอนไซม์ได้รับความร้อนระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยมากขึ้น ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์บางส่วนเปลี่ยนไปเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ ส่งผลให้เอนไซม์นั้นไม่สามารถจับกับซับสเตรตได้อีกต่อไป (ไม่สามารถทำหน้าที่ทางชีวภาพได้) ค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งจึงมีค่าลดลง และเมื่อปริมาณเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นจะทำให้ปริมาณแป้งต่อปริมาณเอนไซม์มีค่าลดลงอีกทั้งเปรียบเสมือนการทำให้ความเข้มข้นของสารละลายน้ำแป้งลดลงอีกด้วย และเมื่อทำการศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ด้วย EDX และ CLSM พบว่าการกระจายตัวของเอนไซม์บนผิวของอนุภาคมากกว่าภายในของอนุภาค (เอนไซม์อยู่มีความหนาแน่นบริเวณผิวของอนุภาคมากกว่าภายในของอนุภาค) จึงมีผลทำให้มีโอกาสที่เอนไซม์จะเกิดการสัมผัสกับอากาศร้อนเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลของประสิทธิภาพการกักเก็บเอนไซม์อีกด้วย

และเมื่อทำการเก็บรักษาผงเอนไซม์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 0, 25 และ 45 องศาเซลเซียสพบว่าค่าแอคติวิตี้คงเหลือของผงเอนไซม์แห้งจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ทำการเก็บรักษามากขึ้น เป็นผลมาก

จากความร้อนนั้นทำให้เกิดการรบกวนเอนไซม์ทำให้ความสถียรของโครงสร้างลดลง ค่าแอคติวิตี้คงเหลือจึงมีค่าลดลง โดยผงเอนไซม์แห้งที่ผสมกับผงซักฟอกนั้นจะมีค่าแอคติวิตี้คงเหลือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับผงเอนไซม์แห้งที่เก็บแยก เนื่องจากผงซักฟอกประกอบด้วยสารหลายชนิดซึ่งอาจทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางส่วนเป็นผลให้ค่าแอคติวิตี้ของผงเอนไซม์แห้งที่เก็บร่วมกับผงซักฟอกมีค่าลดลง

จึงมีการทดลองการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอยโดยการเปลี่ยนสารสายป้อนเป็นแบบอิมัลชันเชิงซ้อน ซึ่งเอนไซม์จะอยู่ในใช้น้ำมันโดยจะมีชั้นแป้งหุ้มอีกครั้ง ระหว่างการอบแห้งแบบพ่นฝอยนั้นจะมีเพียงน้ำในชั้นแป้งที่จะถูกระเหยไปทำให้เอนไซม์นั้นจะอยู่ในสภาวะของของเหลวในชั้นน้ำมัน ทำให้เอนไซม์ยังอยู่ในสภาวะที่มีความเสถียร จึงมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูง

5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อศึกษาการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ผู้วิจัยขอเสนอแนวทางในการปรับปรุงเพื่อทำการศึกษาเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

- ศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ (yield) ด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย
- ศึกษาการกักเก็บเอนไซม์ไลเปสโดยใช้วัสดุห่อหุ้มชนิดอื่นมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ของผงซักฟอก
- ศึกษาการกักเก็บเอนไซม์ไลเปส (ไลโปเลส 100 แอล) ด้วยการอบแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้สารสายป้อนแบบอิมัลชันเชิงซ้อน
- ศึกษาการกักเก็บเอนไซม์แบบหลายชนิด โดยกักเก็บเอนไซม์ไลเปสไว้ด้านในอิมัลชันและกักเก็บเอนไซม์โปรติเอสไว้ด้านนอกของอิมัลชันเพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายเอนไซม์ไลเปส
- ศึกษาอิทธิพลของปริมาณและตำแหน่งของเอนไซม์ในการกักเก็บเอนไซม์ โดยแนะนำให้ใช้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง เพื่อที่จะสามารถใช้เทคนิคของ Raman mapping เพื่อทำการระบุตำแหน่งของเอนไซม์ทั้งภายในและภายนอกของอนุภาค ใช้เทคนิค EPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) หรือ ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) ในการศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผิวของอนุภาคอีกด้วย

รายการอ้างอิง

[1] บทที่4 โปรตีน. เคมีอาหาร [ออนไลน์] Available from: http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/pdf/04.pdf [18 กรกฎาคม 2556]

[2] ชนิดและหน้าที่ของโปรตีน. [ออนไลน์] Available from: 203.172.248.146/files/1203261010433983_12072814143200.pdf [9 สิงหาคม 2556]

[3] *protein*. [ออนไลน์] Available from: http://www.student.chula.ac.th/~53370044/protein.html [20 กันยายน 2556]

[4] โปรตีน. [ออนไลน์] Available from: http://vichakarn.triamudom.ac.th/comtech/studentproject/final54/832BioTec/bio/Website%20%28Biomolecule%29/Protein.htm [15 กรกฎาคม 2556]

[5] โปรตีน. [ออนไลน์] Available from: www.nmp.ac.th/eclassroom/krutew1/concept/1%20protein.pdf [6 มิถุนายน 2556]

[6] บทที่ 5 โปรตีน. [ออนไลน์] Available from: http://science.srru.ac.th/org/sci-elearning/courseonline/4022503/chapter5-protein8.htm [20 สิงหาคม 2556]

[7] พรเฉลิมพงศ์, ผ.ด.พ. and ศ.ด.น. รัตนาปนนท์. *Protein denaturation* / การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน [ออนไลน์] 1 กันยายน 2553Available from: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0936/protein-denaturation-การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน]

[8] 1101 201 : สัปดาห์ที่ 5 การตกตะกอนโปรตีน. [ออนไลน์] Available from: http://webstat.sci.ubu.ac.th/wwwSci/news/showdoc.php?DOCID=8926 [20 กันยายน 2556]

[9] Jesper E. Mogensen, P.S., and Daniel E. Otzen, *Activation, Inhibition, and Destabilization of Thermomyces lanuginosus Lipase by Detergents.* American Chemical Society, 2005. 44: p. 1719-1730.

[10] Moh'd A. Salameh, J.W., *Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from Thermosyntropha lipolytica.* The Open Biochemistry Journal, 2010. 4: p. 7.

[11] Habib Horchani, H.M., Nadia Ben Salem, Youssef Gargouri, Adel Sayari, *Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated Staphylococcus aureus strain.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. 56: p. 237-245.

[12] Andre Crutzen, M.L.D., *Handbook of Detergents*. Vol. 82. 1999.

[13] Slim Cherif, S.M., Fatma Hadrich, Slim Abdelkafi and Sami Sayadi, *A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations.* Lipids in Health and Disease, 2011. 10: p. 221-228.

[14] Waze Aimée Mireille Alloue, J.D., Karim Amighi, Philippe Thonart, *Storage of Yarrowia lipolytica lipase after spray-drying in the presence of additives.* Process Biochemistry, 2007. 42(9): p. 1357-1361.

[15] Sutherland GR, A.S., *The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase.* Arch Biochem Biophys, 1996. 332(1): p. 128-134.

[16] *Denaturation (biochemistry)*. [online] Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Denaturation_%28biochemistry%29 [24 September 2013]

[17] Æ, E.n.J.Æ.V.B.Æ.G.n.L.n.Æ.M.F.n.-S. and M.G.a.-R.n.Æ.D.A.-V.Æ.J.M.a. Vicaria, *Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme–Surfactant Interactions and Washing Tests.* J Surfact Deterg, 2007. 10: p. 61-70.

[18] Pastore, J.N.d.P.J.A.B.C.G.M., *CHARACTERIZATION OF ALKALINE LIPASE FROM FUSARIUM OXYSPORUM AND THE EFFECT OF DIFFERENT SURFACTANTS AND DETERGENTS ON THE ENZYME ACTIVITY.* Brazilian Journal of Microbiology, 2006. 37: p. 5.

[19] J. Xia, X. Chen, and I.A. Nnanna, *Activity and stability of Penicillium cyclopium lipase in surfactant and detergent solutions.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996. 73: p. 115-120.

[20] C. Hemachander, R.P., *Lipase from Ralstonia pickettii as an additive in laundry detergent formulations.* Process Biochemistry, 2000. 35: p. 809-814.

[21] Kugimiya W, O.Y., Hashimoto Y, Takagi Y., *Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from Pseudomonas fragi.* Biochem Biophys Res Commun, 1986. 141: p. 185-190.

[22] R. K. Saxena, P.K.G., Rani Gupta, W. Sheba Davidson, and S.B.a.R. Gulati, *Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry.*

[23] *THE STRUCTURAL ORIGINS OF INTERFACIAL ACTIVATION IN THERMOMYCES (HUMICOLA) LANUGINOSA LIPASE*. [Online] Available from: http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1dt3/summary.html [10 August 2013]

[24] Giancarlo Soncini Júniorl, S.M.M.F.R.A.P.G.J.C.M., *Mycelial growth and microscopic characteristics of Thermomyces lanuginosus Tsiklinskaya in YpSs medium with different carbon sources* Hoehnea 2007. 34.

[25] Jurado, E., et al., *Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in O/W emulsions.* Chemical Engineering Science, 2006. 61(15): p. 5010-5020.

[26] Brenda Rogelina Cruz-Ortiz, L.J.R.-G., * Yolanda Garza García, José Antonio and a.J.R.-M. Rodríguez de la Garza, *Immobilization of Thermomyces lanuginosus Lipase in PVA-alginate Beads.* J. Mex. Chem. Soc., 2011. 55: p. 176-180.

[27] Beate Hack1, Holger Egger1, Jens Uhlemann1, Michel Henriet2, Wolfgang Wirth2, and A.W.P.V.a.D.G. Duff1, *Advanced Agrochemical Formulations through Encapsulation Strategies?* Chemie Ingenieur Technik, 2012. 84: p. 223-234.

[28] ไทรท์ ศรีโยธา, ค.อ., พิศาล ฝ่ายชาวนา และ สมรรถ ขันทะมูล, การศึกษาระบบการอบแห้งแบบพ่นฝอย.

[29] บุญเกิด, ส. การทำงานของ*spray drying* เบื้องต้น. วิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ]

[30] Atmane Madene, M.J., Joe¨ l Scher & Ste´phane Desobry, *Flavour encapsulation and controlled release – a review.* International Journal of Food Science and Technology, 2006. 41: p. 1-21.

[31] Sankarikutty B, S.M., Narayanan CS, Mathew AG, *Studies on encapsulation of cardamom oil by spray-drying technique.* J Food Sci Technol, 1988. 25: p. 352-356.

[32] Reineccius, G.A., *The Spray Drying of Food Flavors.* Deying Technology, 2004. 22: p. 1289-1324.

[33] Fickers P, O.M., Destain J, Weekers F, Thonart P, *Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast Yarrowia lipolytica.* Enzyme Microb Technol, 2006. 38: p. 756-759.

[34] Joana F.P.S. Gomesa, S.R., Maria do Carmo Pereira, Ivone Peres,Susana Moreno, José Toca-Herrera, Manuel A.N. Coelho, *Lipid/particle assemblies based on maltodextrin–gum arabic core as bio-carriers.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. 76: p. 449-455.

[35] Shoga, N.Y.a.Y., *Solid enzyme preparation and process for producing the same*, in *EP patent* 0 501 375 *A*11992.

[36] Mauriello, G.A., Maria; Andolfi, Rosamaria; Moschetti, Giancarlo; Villani, Francesco, *Spray-Drying of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria.* Journal of Food Protection, 1999. 62: p. 773-777.

[37] Aysegul Namaldi, P.C.a.Y.U., *Effects of spray drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders.* Drying Technology: An International, 2006. 24: p. 1495-1500.

[38] Tales A. Costa-Silva , S.S., Cláudia R. Fernandes Souza & Wanderley P. Oliveira. *Immobilization of endophytic fungal lipase by spray drying*. in 8*th World Congress of Chemical Engineering (WCCE*8). 2009. Montréal, Canada.

[39] Carpenter, J.F., J.H. Crown, *Modes of stabolization of protein by organic solutes during desiccation.* Cryobiology, 1988. 25: p. 495-470.

[40] กลิ่นกุหลาบหิรัญ, น., การกักเก็บเอนไซม์ไฟเทสด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย, in คณะวิศวกรรมศาตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี2553, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[41] Tales A. Costa-Silva, M.A.N., Claudia R. Fernandes Souza, Wanderley P. Oliveira and Suraia Said, *Lipase Production by Endophytic Fungus Cercospora kikuchii: Stability of Enzmatic Activity after Spray Drying in the Presence of Carbohydrates.* Drying Technology: An International, 2011. 29: p. 1112-1119.

[42] L. Kouisni, D.R., *Confocal Microscopy Study of Polymer Microcapsules for Enzyme Immobilisation in Paper Substrates.* Journal of Applied Polymer Science, 2008. 111: p. 1-10.

[43] ลีลาพิสิทธ์, ผ.พ., ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอิมัลชั่น. หนังสือเครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง

[44] J. A. GRABOWSKI, V.-D.T., AND C. R. DAUBERT, *Spray-Drying of Amylase Hydrolyzed Sweetpotato Puree and Physicochemical Properties of Powder.* JOURNAL OF FOOD SCIENCEJFS E: Food Engineering and Physical Properties, 2006. 71: p. 209-217.

[45] เจริญกูล, อ., การแปรรูปอาหารเบื้องต้น. บทที่2 ไขมันและน้ำมัน. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.

[46] ภัทรวรรณ หมกทอง, พ.ป., สุเมธ ตันตระเธียร, สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์, ผลของตัวทำอิมัลชันต่อความเสถียรและประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.

[47] เตชะจิรกุล, น. and น. นาคเรืองศรี, การพัฒนาไมโครอิมัลชันที่บรรจุยาไดอะซิแพม.

[48] Friberg SE, G.R., Kayali IH. Emulsion stability. In: Larsson K, FribergF S.E. editor. Food Emulsions. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.; 1990;p. 1, *Emulsion stability*. Food Emulsions. 1990, New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.

[49] รัตนาปนนท์, น., คอลลอยด์. 2534, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 54-77.

[50] *Introduction to Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDS)*. [Online] Available from: micron.ucr.edu/public/manuals/EDS-intro.pdf [4 October 2013]

[51] กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน. Available from: http://th.wikipedia.org/wiki/กล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน [20 กันยายน 2556]

[52] Rosenberg, M., Kopeman, I.J.,and Talmon, Y., *Factors affecting retention in spray drying microencapsulation of volatile materials.* Journal of agriculture and food chemistry, 1990. 39: p. 1288-1294.

[53] Erdinc, B.I., *MICRO/NANOENCAPSULATION OF PROTEINS WITHIN ALGINATE/CHITOSAN MATRIX BY SPRAY DRYING*, in *Department of Chemical Engineering* 2007, Queen's University: Kingston, Ontario, Canada. p. 90.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยาภรณ์ หรินพุทธศีล เกิดวันที่ 5 สิงหาคม 2530 สำเร็จการศึกษาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีในปี 2552 สำเร็จการศึกษาสาธารณสุขศาสตรบัณฑิต วิชาเอกอาชีวอนามัยและความปลอดภัย สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราชในปี 2554 และเข้าทำงานที่บริษัท ยูเนี่ยนคอมปาวด์ จำกัด ในตำแหน่งนักเคมี ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2552 จนถึงเดือนสิงหาคม 2554 และเข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2554