บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายเบสที่ความเข้มข้นสูงๆ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20% ซึ่งการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสเป็นการแยกกรดไขมันแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อกรดไขมันหรือต่อตำแหน่งของกรดไขมันที่อยู่ในโมเลกุลของกลีเซอร์ไรด์ ดังนั้นการย่อยด้วยสารละลายเบสจึงถือว่าเป็นการย่อยสลายที่ค่อนข้างสมบูรณ์คือ สามารถทำการย่อยสลายไตรกลีเซอร์ไรด์ได้กรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ทั้งนี้การย่อยสลายกรดไขมันได้ปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการย่อยสลายด้วย ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาขั้นตอนการย่อยสลายโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายเบส โดยได้ศึกษาช่วงเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเนื่องจากเป็นตัวแปรที่สำคัญในการศึกษาถึงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยให้ตัวแปรอื่นคงที่ ได้แก่ ปริมาณของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเริ่มต้นปริมาณ 5 กรัม อุณหภูมิคงที่ที่ 80 องศาเซลเซียส ปริมาณและความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 20 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นต้น เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้อย่างเต็มที่ โดยในการทดลองได้แปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายคือ 30 60 และ90 นาที โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20 % ให้มากเกินพอในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัม และพบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเพื่อให้ได้กรดไขมันอิสระออกมามากที่สุดคือที่เวลา 60 นาที โดยกวนตลอดเวลาในช่วงของการย่อยสลายเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างทั่วถึง และทำการควบคุมอุณหภูมิของสารละลายในการเกิดปฏิกิริยาให้คงที่ 80 องศาเซลเซียสตลอดการย่อยสลาย โดยพบปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ย่อยสลายที่เวลา 60 นาที เท่ากับ 45.96% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดจากการวิเคราะห์โดยวิธีไทเทรต ส่วนปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดที่เวลา 30 และ 90 นาที มีค่าเท่ากับ 20.58 และ 33.87% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด แต่เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด ขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเริ่มต้นด้วยว่ามีปริมาณมากน้อยเท่าใด โดย

เวลาที่เหมาะสมอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ถ้ามีการใช้ปริมาณน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเริ่มต้นในปริมาณที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาถึงขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ของกรดไขมัน โดยทำการเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีกาซ การเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปเมธิลเอสเทอร์ เป็นวิธีที่สะดวกและง่ายต่อการวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดและสามารถหาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดได้ โดย Marie และคณะ (1961) ได้ศึกษาวิธีการเตรียมเมธิลเอสเทอร์หลายวิธีพบว่าความเหมาะสมในการเตรียมเมธิลเอสเทอร์แต่ละวิธีขึ้นอยู่กับธรรมชาติและองค์ประกอบของสารตัวอย่างที่นำมาเตรียมเมธิลเอสเทอร์ วิธีการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยากับ diazomethane พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น การเกิดปฏิกิริยากับ methanol-hydrochloric acid with sublimation และ ion exchange resin เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมในการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ส่วนการเตรียมเมธิลเอสเทอร์โดยทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (esterification) ของเมธานอลกับกรดไขมันอิสระ โดยมีโบรอนไตรฟลูออไรด์ละลายอยู่ในเมธานอล (borontrifluoride in methanol) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน มีข้อดีคือสามารถเตรียมอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดไขมันได้ง่ายและรวดเร็ว และเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการเตรียมเมธิลเอสเทอร์กรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลสูงและเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Marie et al., 1961) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกาซ ในปัจจุบันถือว่าวิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันในน้ำมันโดยทั่วไปและเหมาะสมกับการเตรียมเมธิลเอสเทอร์กรดไขมันในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดซึ่งใช้ในการทดลองนี้

จากผลการทดลองศึกษาขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยการทำปฏิกิริยากับเมธานอลโดยมีโบรอนไตรฟลูอไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถทำการเตรียมเอสเทอร์ของกรดไขมันเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ โดยศึกษาถึงเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่มีโบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันคือที่เวลา 15 นาที โดยจะได้ %recovery เท่ากับ 94 % ถือว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ในการแสดงถึงประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันด้วยวิธีเมธิลเลชั่น จากการทดลองของ Marie และคณะ (1961)พบว่าเวลาที่ใช้ในการเตรียมเมธิลเอสเทอร์กรดไขมันด้วยวิธีเมธิลเลชันโดยมีโบรอนไตรฟลูออไรด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใช้เวลาในการเตรียมเพียง 2 นาทีเท่านั้น ซึ่งน้อยกว่าที่ได้จากการทดลองนี้ เพราะว่าการเตรียม

เมธิลเอสเทอร์ของ Marie และคณะ (1961) ใช้กรดไขมันที่มีความบริสุทธิ์สูงเป็นสารเริ่มต้น แต่ในการทดลองนี้ได้นำกรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสมาเตรียมเมธิลเอสเทอร์ ประกอบด้วยกรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์และสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ไม่ใช่กรดไขมันเป็นต้น จะเห็นว่าองค์ประกอบของสารตัวอย่างที่นำมาเตรียมมีความแตกต่างกันทำให้ประสิทธิของการเตรียมเมธิลเอสเทอร์แตกต่างกันด้วย

จากการทดลองย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสในสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้เวลาในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบส 60 นาทีและใช้น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัม อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 % ได้กรดไขมันผสมที่ได้จากการย่อยและนำไปเตรียมอนุพันธ์เมธิลเอสเทอร์กรดไขมันเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกาซ ได้ผลในตารางที่ 3.4 และโครมาโทแกรมในรูปที่ 3.4 โดยในการคำนวณหาปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดจะเทียบกับกรดไขมันผสมมาตรฐาน โดยจะฉีดวิเคราะห์เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผสมสารมาตรฐานภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์สารตัวอย่าง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.1 และโครมาโทแกรมในรูปที่ 3.1 สังเกตเห็นว่าในสารละลายเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันผสมมาตรฐานประกอบด้วยกรดไขมันทั้งหมด 10 ชนิดเท่านั้น แต่พบว่ามีกรดไขมันเพิ่มขึ้นมาหนึ่งตัวคือ กรดไอโคซิโนอิคซึ่งไม่ได้เป็นองค์ประกอบในสารมาตรฐานผสมที่ใช้ จึงได้ทำการฉีดวิเคราะห์แยกต่างหาก และได้แสดงค่าเวลารีเทนชันในตารางที่ 3.1 เพราะว่ากรดไอโคซิโนอิคถือว่าเป็นกรดไขมันอีกชนิดหนึ่งที่พบมากในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และจากการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสในสภาวะที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์หาองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดทางด้านคุณภาพโดยการเทียบเวลารีเทนชันที่เมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันแต่ละชนิดกับค่ารีเทนชันของเมธิลเอสเทอร์กรดไขมันผสมมาตรฐานในตารางที่ 3.1 และวิเคราะห์ทางด้านปริมาณโดยการเทียบพื้นที่ใต้พีกของเมธิลเอสเอทร์ของกรดไขมันแต่ละชนิดกับเมธิลเอสเทอร์กรดไขมันผสมมาตรฐานในตารางที่ 3.1

จากการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสในสภาวะที่เหมาะสม พบว่ากรดไขมันที่สามารถวิเคราะห์ได้มีทั้งหมด 11 ชนิด โดยมีปริมาณของกรดไขมันรวมทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 52.12% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และได้แสดงลำดับการแยกกรดไขมันก่อนหลังตามค่ารีเทนชันเรียงจากน้อยไปหามาก ดังนี้ กรดไมริสติค(6.930) กรดปาล์มิติค (7.493) กรดสเตียริค(8.533) กรดโอเลอิค (8.683) กรดลิโนเลอิค (9.015) กรดลิโนเลนิค (9.562)

กรดอะราชิดิค (10.437) กรดไอโคซิโนอิค (1.690) กรดเบเฮนิค (13.897) กรดอีรูซิค (14.305) และกรดลิกโนเซอริค (20.158) ตามลำดับ โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ กรดโอเลอิค จะพบ 16.0281 กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดและคิดเป็นร้อยละต่อกรดไขมันอิสระทั้งหมด พบว่าได้เท่ากับ 30.49 และกรดไขมันที่พบรองลงมาคือกรดลิโนเลอิค 13.16% และกรดอีรูซิค 10.78% จากการทดลองพบว่ากรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลต่ำจากออกมาก่อนกรดไขมันที่มีมวลโมเลกุลสูง และพบว่ากรดไขมันอิ่มตัวจะออกมาก่อนกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลอยู่หนึ่งพันธะจะออกมาก่อนกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลสองและสามพันธะตามลำดับ โดยกรดไขมันที่น่าสนใจในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดนี้ก็คือกรดอีรูซิค ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลอยู่หนึ่งพันธะ และกรดอีรูซิคสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งถือว่าเป็นกรดไขมันที่สำคัญมากชนิดหนึ่ง และจากการวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด โดยใช้วิธีการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่าปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 55.49% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีพบว่ามีปริมาณเท่ากับ 52.12% โดยน้ำหนักของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด โดยพบว่าปริมาณที่วิเคราะห์ด้วยการไทเทรตมีปริมาณของกรดไขมันอิสระมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟี เนื่องจากการหาปริมาณโดยการไทเทรตเป็นการหาปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสซึ่งค่อนข้างเป็นวิธีที่หยาบกว่า ส่วนการหาปริมาณด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกาซเป็นการหาปริมาณของกรดไขมันบางชนิดเท่านั้น ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่วิเคราะห์จัดว่าเป็นกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบที่พบในปริมาณที่สูงในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และในขั้นตอนการเตรียมเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันพบว่าไม่สามารถทำการเตรียมได้ 100% ทำให้เกิดการสูญเสียกรดไขมันส่วนหนึ่ง ซึ่งทำให้ปริมาณของกรดไขมันที่ได้น้อยกว่าการไทเทรต และการหาปริมาณของกรดไขมันโดยวิธีโครมาโทกราฟีกาซจะคำนวณเทียบกับพื้นที่ใต้พีกของกรดไขมันผสมมาตรฐานที่เตรียมได้

จากการทดลองของกรกฎ (2540) ซึ่งได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ได้จากบริษัทลานนาโปรดักซ์ จำกัดเช่นเดียวกัน พบว่าสามารถย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้กรดไขมันในปริมาณที่ไม่แตกต่าง โดยพบกรดลิโนเลอิคมากที่สุด 12.99% กรดโอเลอิค 11.51% และกรดอีรูซิค 11.21% แต่จากการทดลองนี้พบกรดโอเลอิคมากที่สุดปริมาณ 16.02% กรดลิโนเลอิค 13.16% และกรดอีรูซิคประมาณ 10.77% โดยเทียบกับปริมาณไขมัน และจาก

ตารางที่ 3.4 พบว่าปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่ได้จากการย่อยสลายเมื่อเทียบกับการย่อยสลายของกรกฎพบว่าปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดมีปริมาณที่มากกว่าเพียงเล็กน้อย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดของบริษัท Nippon Yuryo Kentei Kyokai (1997) พบว่าปริมาณของกรดไขมันที่พบแต่ละชนิดมีปริมาณที่มากกว่าที่ได้จากการทดลองนี้ โดยพบกรดโอเลอิคมากที่สุด 25.6% รองลงมากรดลิโนเลอิค 23.0% และกรดอีรูซิค 18.7% สังเกตเห็นว่าปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดพบมากกว่าการย่อยสลายที่ได้จากการทดลองนี้ เนื่องน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบน้อย จัดว่าเป็น medium erucic acid rapeseed oil โดย Zadernowski (1978) ได้ศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันของ rapeseed พบว่าปริมาณของกรดอีรูซิคที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 11.7% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณของกรดอีรูซิคที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองนี้ ดังนั้นปริมาณของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดสามารถแปรผันได้ตามแหล่งที่ปลูก ฤดูการเพาะปลูก และตามสายพันธุ์ของมัสตาร์ดด้วย

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสถือว่าเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้ เนื่องการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสเป็นการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด โดยทำการย่อยสลายแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของกรดไขมันหรือต่อชนิดของกรดไขมัน ดังนั้นเมื่อย่อยได้สมบูรณ์จะได้กรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย การย่อยสลายด้วยสารละลายเบสถือว่าเป็นการย่อยที่สามารถนำไปใช้ในการเปรียบเทียบกับการย่อยสลายด้วยวิธีการอื่นๆ ได้ ถึงแม้จะเป็นวิธีที่ไม่ละเอียดมากนัก

4.2 การแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa*

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดนอกจากอาศัยการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสแล้ว ยังสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการย่อยสลายเพื่อหาองค์ประกอบในน้ำมันทั่วไป คือ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นแหล่งเอนไซม์ที่ผลิตได้ง่ายและผลิตได้มากเพียงพอกับความต้องการ ในการทดลองใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในประเภทไม่มีความจำเพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยา โดยสามารถเข้าเร่งสลายพันธะเอสเทอร์ทั้ง 3 ตำแหน่งในโมเลกุลของ

ไตรกลีเซอไรด์ และพบว่าถ้าเอนไซม์ชนิดนี้เข้าเร่งปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล และเมื่อย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สภาวะย่อยสลายเดียวกันกับ Michael และคณะ (1995) คือ ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปสเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีเท่ากับ 50 ยูนิต ย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเป็นเวลานาน 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากการวิเคราะห์พบว่ากรดไขมันที่ถูกย่อยออกมามีทั้งหมด 10 ชนิดและพบปริมาณของกรดไขมันรวมทั้งหมดเท่ากับ 18.90% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดดังแสดงในตารางที่ 3.5 และโครมาโมแกรมในรูปที่ 3.5

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดด้วยวิธีการไทเทรตพบว่าปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดมีเท่ากับ 20.69% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด โดยกรดไขมันที่พบมากที่สุดคือกรดโอเลอิคเช่นเดียวกับการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส คิดเทียบกับน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเท่ากับ 6.16% และคิดเทียบกับปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 32.59% และกรดไขมันที่พบรองลงมาคือ กรดลิโนเลอิคและกรดอีรูซิคโดยพบมีปริมาณเท่ากับ 3.35 และ 4.85% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดหรือเท่ากับ 17.71 และ 25.64% ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมดตามลำดับ จากการสังเกตพบว่าปริมาณของกรดไขมันที่ย่อยสลายได้มีปริมาณน้อยกว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส โดยปริมาณของกรดไขมันที่ย่อยสลายด้วยสารละลายเบสพบปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดเท่ากับ 55.49% ส่วนปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสมีเท่ากับ 20.69%ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด เนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสแตกต่างจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส เพราะการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสเป็นการสลายพันธะเอสเทอร์ที่อยู่ในโมเลกุลของกลีเซอร์ไรด์ทั้งหมด จึงสามารถทำการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้กรดไขมันอิสระออกมามาก ส่วนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสพบว่ามีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยเฉพาะในด้านการทำงานของเอนไซม์ เช่น ด้านความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* พบว่าถ้าปฏิกิริยาเกิดได้อย่างไม่เต็มที่ จะพบโมเลกุลที่เป็นกรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอร์ไรด์ และโมโนกลีเซอร์ไรด์ซึ่งเกิดขึ้นเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ดังนั้นทำให้ไม่สามารถทำการวิเคราะห์กรดไขมันทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้ ดังนั้นการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* จึงได้กรดไขมันอิสระออกมาน้อยกว่าที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส แต่พบว่ากรดอีรูซิคสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส โดยปริมาณของกรดอีรูซิคจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปส มีปริมาณเท่ากับ 25.64% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด ในขณะที่จากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสมีปริมาณ 20.50%

จากการศึกษาของ McNeill และคณะ (1995) ซึ่งศึกษาการย่อยสลายน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบสูง (high erucic acid rapesed oil) โดยได้ศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ 3 ชนิดและวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันอิสระที่ถูกย่อยสลาย ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ พบว่า *Pseudomonas cepacia* lipase สามารถย่อยสลายและได้กรดไขมันอิสระที่มีคาร์บอน 22 อะตอม (C_{22}) คาดว่าคือ กรดอีรูซิคมากที่สุด 39.9% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Philip และคณะ (1993) และพบกรดไขมันที่รองลงมาคือกรดไขมันอิสระที่มีคาร์บอน 18 อะตอม (C_{18}) 32.6% ซึ่งอาจเป็นกรดโอเลอิค กรดลิโนเลอิค และกรดลิโนเลนิค เป็นต้น *Candida rugosa* lipase สามารถทำการย่อยสลายและได้กรดไขมันอิสระที่มีคาร์บอน 18 อะตอม (C_{18}) มากที่สุดคือ 37.5% และรองลงมาคือ กรดไขมันอิสระที่มีคาร์บอน 22 อะตอม (C_{22}) 23.3% และเมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidum* พบกรดไขมันที่มีคาร์บอน 18 อะตอม (C_{18}) มากที่สุด 34.1% เมื่อทำการย่อยสลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* พบไดกลีเซอไรด์ (C_{44}) ซึ่งคาดเดาได้ว่าเป็นไดอีรูซินที่มีกรดอีรูซิคอยู่ในตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในโมเลกุลถึง 13.9% เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าเกิดการย่อยในทำนองเดียวกันคือ พบกรดโอเลอิค 6.16% และกรดลิโนเลอิค (C_{18}) 3.35% รวมกันมากที่สุดและกรดไขมันที่พบรองลงมาคือกรดอีรูซิค (C_{22}) 4.85% และเมื่อเทียบกับการทดลองของ Michael และคณะ (1995) พบว่าเมื่อทำการย่อยสลายน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูงด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* จะได้ไดอีรูซินบริสุทธ์ (pure dierucin) ประมาณ 17% เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ให้เป็นไตรอีรูซิน (trierucin) นอกจากนี้พบกรดอีรูซิคเป็นกรดไขมันอิสระที่ได้จากการย่อยสลาย ดังนั้นสรุปได้ว่าในการทดลองนี้การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ได้กรดอีรูซิคปริมาณน้อย (4.85%) อาจเนื่องมาจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่นำมาใช้ในการย่อยสลายไม่ได้เป็นน้ำมันที่มีกรดอีรูซิคเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง

4.3 การแยกกรดไขมันจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp.

เพื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* กับจุลินทรีย์อื่น จึงได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นสารสกัดจากกากมัสตาร์ด เพื่อนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด กับเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และเป็นการใช้ประโยชน์จากกากมัสตาร์ดให้เกิดคุณค่ามากที่สุด โดยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นถูกขับออกมาอยู่ในน้ำเลี้ยง จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์ที่ได้ไปศึกษาถึงสมบัติของเอนไซม์ไลเปส โดยการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้ และนำไปย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดซึ่งเป็นสับสเตรท แล้วตรวจสอบหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกย่อยออกมาโดยการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05499 โมลาร์โดยมีฟีนอล์ฟธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ และกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถย่อยสลายไขมันให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง และได้ศึกษาผลของตัวแปรที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช เวลา และปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.6 และ รูปที่ 3.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 3.34 ยูนิตต่อ 1 มิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์ และค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ พีเอช 7.0 โดยใช้สารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.7 ได้แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 3.4736 ต่อ 1 มิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์ และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายคือเวลา 30 นาที ดังแสดงในตารางที่ 3.8 และ รูปที่ 3.8 ได้แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 5.0768 ต่อ 1 มิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 140 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที พบวามีแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 5.0768 ยูนิตต่อ 1 มิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์

จากการทดลองของ Ohnishi และคณะ (1994) ซึ่งได้เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* บน rice medium และ soy bean medium พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสมีค่าน้อยกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. ในอาหารเหลวมัสตาร์ดถึง 5 เท่า ถือว่ากากมัสตาร์ดสามารถใช้เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อีกแหล่งหนึ่ง และจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้สามารถทำการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดและน้ำมันมะกอกได้ โดยได้ทดสอบหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทนั้นพบว่า เอนไซม์ไลเปสมีแอคติวิตีเท่ากับ 1.78 ยูนิตต่อมิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์ (ผลการทดลองไม่ได้แสดง) สังเกตเห็นว่ามีค่าน้อยกว่าเมื่อใช้น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเป็นสับสเตรท น้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดนี้เป็นสับสเตรทที่แตกต่างจากสับสเตรทที่นำมาใช้ในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไป ซึ่งใช้น้ำมันมะกอก

จากการทดลองได้ศึกษาผลของปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่มีต่อการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด 5 กรัม โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์ไลเปส คือ 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (แอคติวิตีเท่ากับ 5 10 15 20 และ 25 ยูนิต) ภายใต้สภาวะการย่อยสลายเป็นเวลา 30 นาทีและเขย่าด้วยเครื่องเขย่าตลอดเวลา พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดมีค่าอยู่ในช่วง 20 - 25 ยูนิตของเอนไซม์ไลเปสหรือประมาณ 4 - 5 มิลลิลิตรของสารสกัดเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.9 และโครมาโทแกรมในรูปที่ 3.9 โดยสังเกตเห็นว่าโครมาโทแกรมที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. พีกแต่ละพีกมีลักษณะที่ค่อนข้างเล็ก เนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ใช้เวลาในการย่อยสลายเพียง 30 นาที เนื่องจากเป็นเวลาที่เอนไซม์ไลเปสมีแอคติวิตีสูงที่สุดจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นสรุปได้ว่าความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับปัจจัย เช่น ปริมาณของสับสเตรตเริ่มต้น เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ในการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ*Candida rugosa* และ เชื้อ *Aspergillus* sp. ใช้ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นจากเชื้อทั้งสองเท่ากับ 25 ยูนิต ปริมาณน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเริ่มต้น 5 กรัมและใช้เวลา 20 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. มีค่ามากกว่าการย่อยสลายในเวลา 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* พบว่ามีปริมาณของกรดไขมันรวมทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยพบปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

Candida rugosa และจากเชื้อ *Aspergillus* sp. มีปริมาณเท่ากับ 10.59 และ 9.34% เมื่อวิเคราะห์ด้วยการไทเทรตและเท่ากับ 7.33 และ 7.32% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเมื่อวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีกาซดังแสดงในตารางที่ 3.10 แต่แตกต่างในปริมาณของกรดไขมันแต่ละชนิดที่ถูกย่อยออกมา โดยกรดไขมันอิสระที่พบมีปริมาณมากที่สุดคือ กรดโอเลอิค โดยปริมาณของกรดโอเลอิคที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. เมื่อคิดเทียบกับร้อยละของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.20 และคิดเทียบกับร้อยละของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 43.73 และจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* จะพบกรดโอเลอิค 2.22% เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และ 30.33% เมื่อเทียบกับปริมาณของกรดไขมันทั้งหมด และพบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. มีปริมาณของกรดไขมันชนิดอื่นๆ มากกว่าเล็กน้อยยกเว้น กรดลิโนเลอิค กรดลิโนเลนิค และกรดอีรูซิค ที่พบว่ามีปริมาณน้อยกว่า สรุปได้ว่าเอนไซม์ไลเปสที่มาจากต่างแหล่งมีความจำเพาะในการย่อยสลายน้ำมันได้แตกต่างกัน เห็นได้จากเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. มีความสามารถในการทำงานแตกต่างจากเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* โดยความสามารถในการทำงานและการย่อยสลายไขมันขึ้นอยู่กับลักษณะของปฏิกิริยาและสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย ส่วนความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ไม่ทราบแน่ชัดเนื่องจากในการทดลองไม่ได้ศึกษาถึงความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส จากการสังเกตปริมาณของกรดไขมันที่ถูกย่อยพบว่า ปริมาณของกรดปาล์มิติค กรดสเตียริค มีปริมาณมากกว่าที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และกรดที่พบมากคือกรดโอเลอิค และพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่มาจากต่างแหล่งจะมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันในกระบวนการซักล้างได้แตกต่างกัน การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* พบว่าสามารถทำการย่อยสลายไตรโอเลอินได้กรดไขมันโอเลอิคมากที่สุด แสดงว่าในการย่อยสลายเพื่อให้ได้กรดไขมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. มีความจำเพาะต่อกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนต่อกันเป็นสายตรงที่มีจำนวนคาร์บอนไม่เกิน 20 และสามารถย่อยสลายกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะอยู่ในโมเลกุล แต่อย่างไรก็ดีต้องทำการศึกษาถึงความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ต่อไป กล่าวโดยสรุปพบว่าความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสทั้งสองชนิดให้กรดไขมันอิสระออกมาในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกัน

4.4 การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* และ เชื้อ *Aspergillus* sp. ร่วมกับดีเทอร์เจนต์

Fujii และคณะ (1986) ได้นำดีเทอร์เจนต์เข้ามาร่วมในการย่อยสลายไขมันออกจากเส้นใยของผ้า โดยใช้ร่วมกับเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* (หรือ *Candida cylindracea)* พบว่าใช้สารละลายดีเทอร์เจนต์ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เมื่อแตกตัวแล้วให้ประจุลบ (anionic detergent) กับกลุ่มที่ไม่มีประจุ (nonionic detergent) เข้มข้น 0.04% เป็นตัวร่วมกับเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันมะกอกที่ติดอยู่บนเส้นใยผ้า โดยทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าได้กรดไขมันอิสระมากกว่าการย่อยสลายที่ใช้เอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงได้ศึกษาการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อทั้งสองชนิด โดยมีดีเทอร์เจนต์เป็นตัวร่วมในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย การย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสร่วมกับดีเทอร์เจนต์ได้ทำการเปรียบเทียบกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสเพียงเดียว และได้เลือกดีเทอร์เจนต์ที่ใช้เป็นตัวร่วมในการเกิดปฏิกิริยาโดยแบ่งดีเทอร์เจนต์เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เมื่อเกิดการแตกตัวให้ประจุลบเรียกว่า anionic detergent โดยเลือกมา 2 ชนิดคือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และโซเดียมโดเดซิลเบนซินซัลโฟเนต และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เมื่อเกิดการแตกตัวแล้วให้ประจุบวก เรียกว่า cationic detergent โดยเลือกมา 2 ชนิดคือเตตระเอธิลแอมโมเนียมคลอไรด์ และโดเดซิลไตร-เมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์

จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกับดีเทอร์เจนต์ โดยการย่อยสลายใช้เอนไซม์ไลเปส 25 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 30 นาที พบว่ากลุ่มของดีเทอร์เจนต์ที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวร่วมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสคือกลุ่ม cationic detergent จากตารางที่ 3.11 การหาปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดด้วยการไทเทรตพบว่าปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ร่วมกับ เตตระเอธิลแอมโมเนียมคลอไรด์ และโดเดซิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ มีปริมาณเท่ากับ 6.34 และ 5.26% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดตามลำดับ ขณะที่ปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสอย่างเดียวภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 4.92% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และพบว่าดีเทอร์เจนต์ชนิด เตตระเอธิลแอมโมเนียมคลอไรด์ สามารถใช้เป็นตัวร่วมในการย่อยสลายของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เนื่องจากพบปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดมากที่สุด

จากตารางที่ 3.12 การหาปริมาณของกรดไขมันอิสระทั้งหมดด้วยการไทเทรต พบว่าปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ร่วมกับดีเทอร์เจนต์กลุ่ม cationic detergent พบว่าปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดมีปริมาณเท่ากับ 1.1038 และ 1.7955% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดตามลำดับ และพบว่าดีเทอร์เจนต์ชนิด โดเดซิลไตรเมธิลแอมโมเนียมโบรไมด์ สามารถใช้เป็นตัวร่วมในการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. เนื่องจากพบปริมาณของกรดไขมันอิสระมากที่สุด เมื่อเทียบกับดีเทอร์เจนต์ชนิดอื่น จากตารางที่ 3.11 และตารางที่ 3.12 พบว่าปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกับดีเทอร์เจนต์กลุ่ม anionic detergent พบว่ามีปริมาณน้อยกว่าเมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสอย่างเดียว ดังนั้นได้ว่าดีเทอร์เจนต์กลุ่มนี้มีสมบัติในการเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้อย่างเต็มที่ได้ และสังเกตเห็นว่าในการย่อยสลายที่มีดีเทอร์เจนต์กลุ่ม cationic fetergent เป็นตัวร่วมในการเกิดปฏิกิริยาได้ปริมาณของกรดไขมันอิสระมากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสเพียงเดียว แต่ลักษณะกลไกของการเข้าร่วมในการเกิดปฏิกิริยาของดีเทอร์เจนต์ไม่ทราบแน่ชัด อาจเป็นผลจากโมเลกุลของดีเทอร์เจนต์เกิดการแตกตัวสามารถเข้าไปจับกับโมเลกุลของกรดไขมันในกลีเซอร์ไรด์ได้ ทำให้กรดไขมันอยู่ในตำแหน่งที่เอนไซม์ไลเปสสามารถเข้าไปเร่งปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าการย่อยสลายที่ไม่มีดีเทอร์เจนต์ จึงทำให้ได้กรดไขมันอิสระมากกว่าปกติ ดังนั้นสรุปได้ว่าดีเทอร์เจนต์ประเภท cationic detegent สามารถนำมาเป็นตัวร่วมในการเกิดปฏิกิริยาเพื่อย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดโดยใช้เอนไซม์ไลเปสได้

ในปัจจุบันพบว่าได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการซักล้าง จากการทดลองของ Takako และคณะ (1985) ได้ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการย่อยสลายน้ำมันมะกอกหรือไตรโอเลอิน (triolein) ออกจากเส้นใยผ้า และจากการทดลองพบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ในอุตสาหกรรมซักล้างพบว่าได้ปริมาณกรดไขมันอิสระมากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus var.* และในการเลือกใช้ดีเทอร์เจนต์จะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมต่อเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ด้วย เนื่องจากว่าดีเทอร์เจนต์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ได้แตกต่างกัน โดยพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นตัวร่วมในปฏิกิริยา แหล่งที่มาของเอนไซม์ และความจำเพาะต่อเอนไซม์เป็นสำคัญ

4.5 การแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนชนิดอื่นจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดพบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่ถูกย่อยสลายที่พบมากที่สุดคือกรดโอเลอิค และกรดไขมันที่พบรองลงมาคือกรดลิโนเลอิค และกรดอีรูซิค จากองค์ประกอบโดยทั่วไปพบว่าในน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดประกอบด้วยกรดอีรูซิคในปริมาณที่สูงถึงเกือบ 50% ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด แต่ในการทดลองพบว่าน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดที่นำมาใช้มีกรดอีรูซิคในปริมาณที่ไม่สูงมากนักถือว่าเป็นประเภท medium erucic acid rapeseed oil ได้ เนื่องจากกรดอีรูซิคเป็นกรดไขมันชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญมาก โดยเฉพาะในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ พบว่ากรดอีรูซิคสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างกว้างขวาง จัดว่าเป็นกรดไขมันที่มีราคาแพงชนิดหนึ่ง และจากการทดลองได้ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเพื่อให้ได้กรดอีรูซิคออกมาให้มากที่สุด โดยมีกรดไขมันชนิดอื่นปนออกมาน้อยที่สุด และได้เลือกการย่อยสลายกรดไขมันโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง โดยการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* สามารถย่อยได้กรดอีรูซิคคิดเป็นร้อยละของกรดไขมันที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 25.64 พบว่าเป็นปริมาณที่มากกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณของกรดอีรูซิคที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. และเทคนิคที่ใช้ในการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนอื่น ได้ใช้การตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการแยกกรดไขมันออกจากกรดไขมันอื่นที่ไม่ต้องการ

Hagemann และคณะ (1962) ได้ศึกษาการแยกกรดอีรูซิคโดยการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าที่อุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันผสมของน้ำมันเมล็ด *Crambe abyssinica* ซึ่งในน้ำมันประกอบด้วยกรดอีรูซิคในปริมาณที่สูงถึง 55% (Flank et al., 1986) และพบว่าสามารถแยกกรดอีรูซิคได้บริสุทธิ์สูงถึง 94-98% ในการทดลองนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันอื่นโดยใช้สารละลายน้ำผสมตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายน้ำผสมเอธานอลอัตราส่วน 3 : 1 สารละลายน้ำผสมเมธานอลอัตราส่วน 8 : 1 และสารละลายน้ำผสมอะซิโตนอัตราส่วน 5 : 1 (Hagemann et al.,1962) พบว่าการตกผลึกเพื่อแยกกรดอีรูซิคที่อุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียสด้วยสารละลายน้ำผสมเอธานอลอัตราส่วน 3 : 1 ถือว่าเป็นสารละลายน้ำผสมตัวทำละลายที่เหมาะสมในการตกผลึกเพื่อแยกกรดอีรูซิค ตารางที่ 3.14 แสดงผลการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนชนิดอื่นที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida*

rugosa พบว่าเมื่อตกผลึกด้วยสารละลายน้ำผสมเอธานอลจะพบกรดอีรูซิคออกมาในปริมาณที่มากที่สุด และมากกว่ากรดไขมันชนิดอื่นที่ปน โดยคิดเป็นร้อยละของกรดไขมันที่แยกและวิเคราะห์ได้ทั้งหมด 31.75 และมากกว่าเมื่อตกผลึกด้วยสารละลายน้ำผสมเมธานอลและน้ำผสมอะซิโตน แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดอีรูซิคที่ตกผลึกได้คิดเป็น 10% ของกรดอีรูซิคที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เท่านั้น

จากตารางที่ 3.15 แสดงถึงการตกผลึกเพื่อแยกกรดอีรูซิคที่อุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียสด้วยสารละลายน้ำผสมเอธานอลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. พบว่าสามารถทำการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนอื่น คิดเป็นร้อยละของกรดไขมันที่แยกและวิเคราะห์ได้เท่ากับ 27.51 โดยที่การแยกด้วยสารละลายน้ำผสมเมธานอลและอะซิโตนสามารถแยกกรดอีรูซิคได้ 13.98% และ 22.02% ตามลำดับเมื่อเทียบกับปริมาณของกรดไขมันที่แยกและวิเคราะห์ได้ทั้งหมด ดังนั้นสรุปได้ว่าสารละลายน้ำผสมตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนชนิดอื่นคือ สารละลายน้ำผสมเอธานอล และจากการทดลองพบกรดไขมันชนิดอื่นปนมาในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของกรดอีรูซิคที่แยกได้ และกรดไขมันที่ปนมาส่วนใหญ่ คือกรดโอเลอิค เพราะว่าในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดนั้นจะพบกรดโอเลอิคเป็นองค์ประกอบมากที่สุด ทำให้ไม่สามาถหลีกเลี่ยงการปนมาของกรดไขมันชนิดนี้ได้ และกรดไขมันชนิดอื่นที่ปนมาพบว่ามีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันกับกรดอีรูซิคมาก และมีมวลโมเลกุลที่มีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดความยากลำบากในการที่จะแยกกรดไขมันเหล่านี้ออกจากกันได้อย่างสิ้นเชิงได้ จากการทดลองของ Prabha และคณะ (1992) ได้แยกกรดอีรูซิคให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative high performance liquid chromatography ก่อนแล้วทำการตกผลึกที่อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส พบว่าได้กรดอีรูซิคบริสุทธิ์สูงถึง 99% ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการแยกกรดอีรูซิคด้วยวิธีการตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ สามารถนำไปใช้ประโยชน์และกรดอีรูซิคที่ผ่านการแยกด้วยวิธีนี้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนต่อไป เพื่อให้ได้กรดอีรูซิคมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางด้านอุตสาหกรรมต่อไป อนึ่งการแยกกรดอีรูซิคออกจากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดนี้ถือว่าเป็นใช้ประโยชน์จากน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดอีกทางหนึ่งด้วย

โดยสรุปจากการทดลองได้ทำการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดด้วยสารละลายเบสและเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อสองชนิดพบว่า การย่อยสลายด้วยสารละลายเบสถือว่าเป็นวิธีที่สามารถทำการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้กรดไขมันอิสระออกมามากที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่น คือได้กรดไขมันถึง 55.49% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดเมื่อวิเคราะห์โดยการไทเทรต ส่วนการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ได้ปริมาณของกรดไขมัน

อิสระน้อยกว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส คือได้เท่ากับ 20.69% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด เมื่อวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต แต่พบว่าได้กรดอีรูซิคซึ่งถือว่าเป็นกรดไขมันที่บทบาทสำคัญมากในปัจจุบัน ในปริมาณที่มากกว่าการย่อยสลายด้วยวิธีอื่น และในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ก็สามารถย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้ปริมาณกรดไขมันอิสระออกมาในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* หากย่อยสลายในสภาวะเดียวกัน พบว่ามีปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดเท่ากับ 9.34% และพบปริมาณของกรดไขมันจากการย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* เท่ากับ 10.59% ของน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ด และในการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกับดีเทอร์เจนต์ พบว่าดีเทอร์เจนต์ในกลุ่ม cationic detergent สามารถนำมาใช้เป็นตัวร่วมในการย่อยสลายน้ำมันเมล็ดมัสตาร์ดได้ การแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันเจือปนชนิดอื่นใช้วิธีตกผลึกที่อุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียสและใช้สารละลายน้ำผสมเอธานอล อัตราส่วน 3 : 1 เป็นสารละลายเพื่อแยกกรดอีรูซิคออกจากกรดไขมันชนิดอื่น