

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องโดยนำเสนอตามลำดับดังต่อไปนี้

- 2.1 ความรู้เกี่ยวกับเมล็ดยางพารา
- 2.2 ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส
- 2.3 ความรู้เกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ตรึงรูป
- 2.4 ความรู้เกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ด้วยอัลจินต ซัลเฟต แกลบ และเซลลูโลสที่มีรูพรุน
- 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้เกี่ยวกับเมล็ดยางพารา

2.1.1 ปริมาณวัตถุดิบเมล็ดยางพารา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ปลูกยางพารามากเป็นอันดับหนึ่งของโลก มีปริมาณการผลิตมากกว่า 2 ล้านตันต่อปี พื้นที่ปลูกยางพาราของไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากจำนวน 10.98 ล้านไร่ในปี 2533 เป็น 12.24 ล้านไร่ ในปี 2539 เพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 8 ต่อปี โดยมีพื้นที่การปลูกยางพาราประมาณร้อยละ 85 อยู่ใน 14 จังหวัดภาคใต้ จังหวัดสุราษฎร์ธานี มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด จำนวน 1,772,324 ไร่ รองลงมาคือจังหวัดสงขลา และนครศรีธรรมราช จำนวน 1,631,058 ไร่ และ 1,289,047 ไร่ ตามลำดับ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นจำนวนมากในรูปของยางแผ่นรมควัน ยางเครฟ ยางแท่ง และอื่น ๆ นอกเหนือจากนี้ยางพาราซึ่งเป็นผลผลิตโดยตรงแล้ว ส่วนต่าง ๆ ของยางพาราก็ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ ตลอดจนใช้ในอุตสาหกรรมได้อีกมากมาย เช่น ไม้ยางพารานำไปใช้ทำไม้ค้ำยันไม้แบบก่อสร้าง ลังไม้ เฝ้าน้ำ เครื่องเรือน เยื่อกระดาษ และใช้เป็นเชื้อเพลิงในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ คือ อุตสาหกรรมปลาป่น อุตสาหกรรมเครื่องปั้นดินเผา อุตสาหกรรมยางแผ่นรมควัน ฯลฯ นอกจากนี้เมล็ดยางพาราก็ยังสามารถนำมาสกัดน้ำมันเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสบู่ เกสซ์กันต์ ยารักษาโรค กาว วัตถุระเบิด อุตสาหกรรมหนัง สิ่งทอ วัสดุหล่อลื่นหมึกพิมพ์ผ้าน้ำมัน ยาขัดโลหะ สี พลาสติก ไนลอน ยาดับเพลิง แชมพู ผงซักฟอก น้ำมันใส่หม้อเครื่องสำอาง ยาฆ่าแมลง ฯลฯ

ต้นยางพาราจะเริ่มมีเมล็ดเมื่ออายุได้ประมาณ 4 ปีขึ้นไป แต่ยังให้เมล็ดน้อยมาก และจะมีเมล็ดเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ จนกระทั่งมีเมล็ดสูงสุดเมื่ออายุประมาณ 20 ปี ซึ่งต้นยางพาราแต่ละท้องถิ่นหรือแต่ละแปลงให้เมล็ดไม่เท่ากัน บางท้องถิ่นหรือบางแปลงก็ให้เมล็ดมาก บางแปลงก็ให้เมล็ดน้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายอย่าง เช่น โรคระบาด สภาพความสมบูรณ์ของดิน การบำรุงรักษา อายุของต้นยางพารา ภูมิอากาศ คือถ้าปีใดฝนตกชุกเกินไปหรือแล้งเกินไป ดอกยางพาราก็จะร่วงมาก โอกาสให้เมล็ดก็น้อยลง และที่สำคัญที่สุดคือ พันธุ์ของยางพาราซึ่งแต่ละพันธุ์จะให้เมล็ดไม่เท่ากัน บางพันธุ์เมล็ดตก บางพันธุ์เมล็ดน้อยตลอดจนวิธีการปลูกซึ่งถ้าปลูกให้มีช่วงห่างกันมาก ระหว่างต้นและระหว่างแถวแล้ว ก็จะทำให้ได้เมล็ดยางพารามาก ถ้าปลูกช่วงระหว่างต้นและระหว่างแถวใกล้กันมากก็จะทำให้ได้เมล็ดยางพาราน้อย จากการศึกษาของศูนย์พัฒนาเศรษฐกิจอุตสาหกรรมภาคใต้ ปรากฏว่าต้นยางพารา 1 ไร่ (ประมาณ 70 ต้น) จะให้เมล็ดยางพาราประมาณ 120 กิโลกรัม

2.1.2 ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของเมล็ดยางพารา

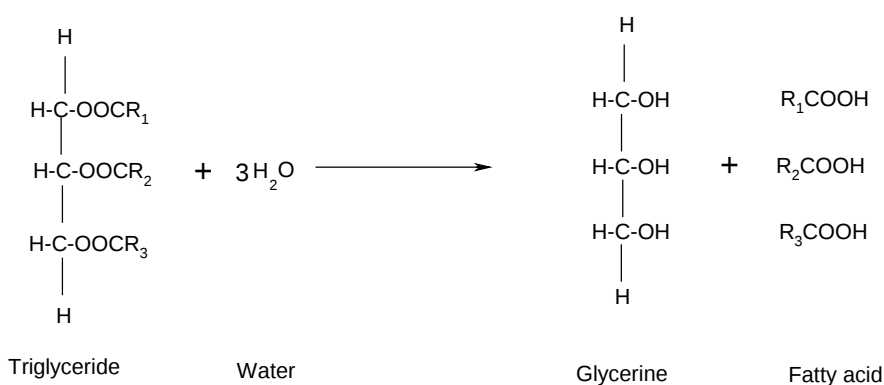
ยางพาราเป็นพืชที่มีผลและเมล็ดเพื่อขยายพันธุ์เหมือนพืชชนิดอื่น ๆ ตามฤดูกาล ถ้าหากว่าต้นยางพารามีดอกและเกสรผสมแล้ว 3-4 เดือน จะให้ผลและมีเมล็ดร่วง 2 ช่วง คือ ประมาณเดือน กรกฎาคม ถึง สิงหาคม และประมาณเดือนกุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม ผลมีขนาดโต 4.5 – 6 เซนติเมตร ผลหนึ่งมี 3 เมล็ด แต่ละเมล็ดมีรูปร่างกลมรี สีน้ำตาล ขนาด 2.0 – 2.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 3-4 กรัม เปลือกในเป็นเยื่อบาง ๆ สีขาว เนื้อในมีลักษณะนิ่ม สีเหลืองอ่อนดังภาพประกอบที่ 2.1



ภาพประกอบที่ 2.1 ลักษณะเมล็ดยางพารา
ที่มา ปานฤทัย พุทธทองศรี (2555)

2.1.3 น้ำมันเมล็ดยางพารา (rubber seed oil)

น้ำมันเมล็ดยางพาราเป็นน้ำมันพืชชนิดหนึ่งที่มีสมบัติเป็นสารอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ เกิดจากเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอริน (glycerin) ที่เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เวลาเกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะได้กลีเซอรินและกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ปฏิกริยาดังภาพประกอบที่ 2.2



ภาพประกอบที่ 2.2 ปฏิกริยาการเกิดไฮโดรไลซิส

ที่มา : องอาจ แสงรุ่ง (2530)

น้ำมันเมล็ดยางพารามีสีเหลืองอ่อน กลิ่นคล้ายน้ำมันลินซีด (linseed oil) ถ้าหยดให้บาง ๆ แล้ววางทิ้งไว้จะแห้งซึ่งมีสมบัติเป็นน้ำมันประเภทกึ่งแห้ง (semi-drying oil) ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการนำไปทำน้ำมันผสมสีหรือน้ำมันชักเงาได้ (องอาจ แสงรุ่ง , 2530) น้ำมันเมล็ดยางพารามีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติน้ำมันยางพารา

คุณสมบัติ	น้ำมันดิบ	น้ำมันบริสุทธิ์	หน่วย
1.สถานะทางกายภาพที่ 30 องศาเซลเซียส	ของเหลว	ของเหลว	-
2.สี	เหลืองทอง	เหลืองทอง	-
3.ความถ่วงจำเพาะที่ 30 องศาเซลเซียส	0.922	0.918	-
4.ความหนืดที่ 30 องศาเซลเซียส	41.24	37.85	Centistokes

ตารางที่ 1 (ต่อ) คุณสมบัติน้ำมันยางพารา

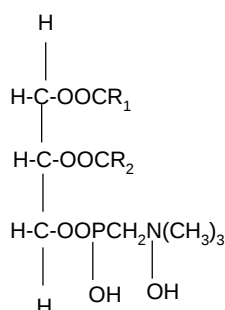
คุณสมบัติ	น้ำมันดิบ	น้ำมันบริสุทธิ์	หน่วย
5.จุดวาบไฟ	294	290	องศาเซลเซียส
6.ค่าความเป็นกรด	4.0	1.0	Mg KOH/g oil
7.กรดไขมันอิสระ (โอเลอิก)	2.0	0.5	%
8.ค่าเปอร์ออกไซด์	2.5	1.0	-
9.ค่าไอโอดีน	142.6	142.6	g-Iodine/100g

ที่มา : Ikwauagwu *et al.*, (2000)

องค์ประกอบของน้ำมันเป็นสารประกอบพวกกลีเซอไรด์และนอนกลีเซอไรด์ ส่วนใหญ่น้ำมันเป็นสารประกอบกลีเซอไรด์จำแนกส่วนประกอบได้ดังนี้

1. น้ำมัน (triglyceride)
2. สารประกอบโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) และไดกลีเซอไรด์ (diglyceride)
3. กรดไขมันอิสระแบ่งออกเป็น กรดไขมันอิ่มตัวได้แก่ myristic , palmitic , stearic , arachidic , behenic และ lingnocerlic

4. ฟอสฟาไทด์ (phosphatides) มีลักษณะเหนียว เรียกว่า ยางเหนียว (gum) ในน้ำมันดิบ (crude oil) ฟอสฟาไทด์ที่สำคัญมีอยู่ 2 ชนิด คือ lecithin และ cephalin สำหรับ lecithin เป็นสารที่ละลายในแอลกอฮอล์ เป็นสาร optically active และเป็นเอสเตอร์ของ glycerphosphoric acid มีสูตรโครงสร้างดังภาพประกอบที่ 2.3

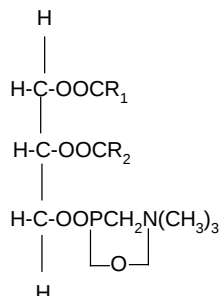


ภาพประกอบที่ 2.3 โครงสร้าง lecithin

ที่มา : อองอาจ แสงรุ่ง (2530)

ส่วน cephalin เป็นการรวมของพันธะที่เป็นเอสเตอร์กับ endo salt ไม่ละลายใน

แอลกอฮอล์ มีสูตรโครงสร้างดังภาพประกอบที่ 2.4



ภาพประกอบที่ 2.4 โครงสร้าง cephalin

ที่มา : องอาจ แสงรุ่ง (2530)

2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของน้ำมันเมล็ดยางพารา

เมล็ดยางพาราจะมีสีน้ำตาลลายขาวคล้ายเมล็ดละหู่ ยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร และหนักประมาณ 3.6 กรัม ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเนื้อใน (kernel) ร้อยละ 65 ส่วนที่เป็นเปลือกนอก (shell) ร้อยละ 35 โดยทั่วไปน้ำมันจากเมล็ดยางพาราจะมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณร้อยละ 18-22 และ 78-82 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2) ซึ่งน้ำมันเมล็ดยางพารานั้นจัดเป็นน้ำมันกึ่งชักแห้ง (semi-drying oil) ตารางที่ 2.3 แสดงสมบัติทั่วไปของน้ำมันเมล็ดยางพาราน้ำมัน

ตารางที่ 2.2 ปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆ ในน้ำมันเมล็ดยางพารา

ชนิดของกรดไขมัน	(%)
กรดไขมันอิ่มตัว	
กรดปาล์มติก (C16:0)	11
กรดสเตียริก (C18:0)	12
กรดอะราซิดิก (C20:0)	1
กรดไขมันไม่อิ่มตัว	
กรดโอเลอิก (C18:1)	17
กรดลิโนเลอิก (C18:2)	35
กรดลิโนเลนิก (C18:3)	24

ที่มา : ดารณี เจริญสุข (2554)

ตารางที่ 2.3 สมบัติของน้ำมันเมล็ดยางพารา

สมบัติ	ช่วงค่าที่วัดได้
ค่าความเป็นกรด (acid value) (mg KOH/g)	4-40
ค่าสaponification value (mg KOH/g)	190-195
ค่าไอโอดีน (iodine number) (g I ₂ /100 g)	132-141
ดัชนีหักเหที่ 40°C (refractive index)	1.466-1.469
ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity)	0.92

ที่มา : ดารณี เจริญสุข (2554)

2.2 ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolase, EC. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่พันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งมีกรดไขมันสายยาวเป็นส่วนประกอบได้ผลผลิต คือ กรดไขมันอิสระ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ และกลีเซอรอล การเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของสับสเตรทกับชั้นน้ำ (oil-water interface) นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้ โดยเร่งการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่าง กลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระ

แหล่งของไลเปสพบทั้งในสัตว์ พืช แบคทีเรีย และรา ในสัตว์พบในน้ำนม และตับอ่อน (pancreas) ไลเปสจากพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอก เช่น เมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง เป็นต้น

2.2.1 ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท

เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสับสเตรท สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1) ความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (position specificity) ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1.1) ไลเปสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่ง 1- และ 3- บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipases)

ไลเปสในกลุ่มนี้ จะเร่งปฏิกิริยาการตัดกรดไขมันเฉพาะตำแหน่งที่อยู่ด้านนอกของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้กรดไขมันอิสระ, 1,2(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่เนื่องจากโมเลกุลของ 1,2(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ไม่คงตัว ถ้าปล่อยให้ปฏิกิริยาเกิด

ต่อไป จะเกิดการย้ายกรดไขมัน (acyl migration) จากตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ 3604 ดี และ 1-โมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อน , *Bacillus subtilis* 168 , *Mucor javanicus* M, *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM20), *Aspergillus niger* A, *Rhizopus javanicus* F, *Rhizopus niveus* N [14], *Rhizopus delemar*

2.2.2 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

การเปลี่ยนแปลง pH จะมีผลต่อการแตกตัวของหมู่ R ของกรดอะมิโนที่เป็นเบสหรือแอซิดิกในโมเลกุลของเอนไซม์ โดยเฉพาะถ้าหมู่ R ที่เป็นเบสหรือแอซิดิกนั้นอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ การรวมตัวกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทที่อาศัยพันธะไอออนิกนั้นต้องการแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงกันข้าม เมื่อ pH เปลี่ยนไปประจุบนโมเลกุลเอนไซม์จะเปลี่ยนไป ทำให้สัมพรรคภาพ (affinity) ระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทไม่เหมือนเดิม ถ้า pH สูงเกินไปหรือต่ำเกินไปจะทำให้สภาพธรรมชาติของโมเลกุลเอนไซม์

2.2.3 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราเร็วปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาทางเคมีทั่ว ๆ ไป เมื่อเพิ่มอุณหภูมิอัตราเร็วจะเพิ่มขึ้น แต่สำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นมีขีดจำกัด อุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุด เรียกว่า optimum temperature ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้อัตราเร็วปฏิกิริยาลดลง เนื่องจากความร้อนไปทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ จนไม่สามารถทำงานได้ดังเดิม ความร้อนจะทำลายโครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิ และโครงสร้างจตุรภูมิของเอนไซม์ เอนไซม์ของพวกสัตว์เลือดอุ่นมี optimum temperature ประมาณ 37 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 0 และ 100 องศาเซลเซียส อัตราเร็วปฏิกิริยาของเอนไซม์เกือบจะเป็นศูนย์ ซึ่งจะเห็นได้จากการที่เราทำการสเตอริไลซ์เครื่องใช้ต่าง ๆ โดยการต้มของเหล่านั้นในน้ำเดือด เพื่อเป็นการทำลายสภาพธรรมชาติเอนไซม์ที่อาจจะติดมากับเครื่องใช้ นั้น ๆ โปรตีนส่วนใหญ่จะมีการละลายเพิ่มขึ้น ถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น แต่มีขีดจำกัดว่าไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ถ้าเกินช่วง 40-50 องศาเซลเซียสไปแล้ว โมเลกุลโปรตีนจะไม่ค่อยเสถียรและเริ่มจะสูญเสียสภาพธรรมชาติ คุณสมบัติในการละลายลดต่ำลง โดยมากแล้วโปรตีนจะรักษาเสถียรภาพได้ในช่วงอุณหภูมิต่ำ ความเสถียรต่ออุณหภูมิขึ้นกับส่วนประกอบของสารอาหารและสารละลายที่ใช้ตรวจสอบไลเปส สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีแอกติวิตีที่ดีในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส ไลเปสจากจุลินทรีย์มีช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่า โดยมีแอกติวิตีที่อุณหภูมิในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส Sugihara และคณะ รายงานว่า *Bacillus* sp. ที่แยกจากดิน (น้อยกว่า 30 องศาเซลเซียส) ผลิตไลเปสที่แสดงค่าแอกติวิตีได้ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่ 60 องศาเซลเซียส ค่าแอกติวิตีลดลงที่ 65 องศาเซลเซียส Ramakrishnan และ Banerjee ทำการเลี้ยง *Aspergillus niger* ในถั่วลิสง

(groundnutcake) และน้ำมันถั่วลิสง พบว่าอุณหภูมิที่ผลิตไลเปสให้เมีแอกติวิตีที่สูง คือ 35 องศาเซลเซียส Hofelmann และคณะ ทำการวิเคราะห์ไลเปสจาก *Aspergillus niger* (Lipase2212D, Rohm) ซึ่งเป็นไอโซเอนไซม์ ไลเปสทั้งสองมีความเสถียรต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส แอกติวิตีจะลดลงร้อยละ 40 ที่ 60 องศาเซลเซียสหลังจากผ่านไป 10 นาที และสูญเสียแอกติวิตีทั้งหมดที่ 80 องศาเซลเซียส

2.2.4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์ มีประโยชน์ดังนี้

- 1) เพิ่มความสามารถในการละลายของสับสเตรท หรือผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้น้อยในน้ำ (non polar)
- 2) เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลเอนโดนามิกไปในทิศทางที่เกิดการสังเคราะห์มากกว่าการเกิดไฮโดรไลซิส (เช่น การสังเคราะห์เอสเทอร์, เปปไทด์, แลคโตน เป็นต้น)
- 3) ลดการยับยั้งปฏิกิริยาของสับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์
- 4) เอนไซม์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้แยกเอนไซม์ได้ง่ายด้วยการกรอง ส่วนผลิตภัณฑ์แยกออกได้โดยการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์
- 5) ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์เติบโตได้ไม่ดีในตัวทำละลายอินทรีย์
- 6) เพิ่มความเสถียรของเอนไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อความร้อน
- 7) เพิ่ม stereoselectivity และ enantioselectivity ของเอนไซม์
- 8) ลดปริมาณฟองในระบบ

ข้อดีทั้งหมดตามที่กล่าวมาแล้ว อาจไม่ใช่ของปฏิกิริยาใดปฏิกิริยาหนึ่งเพียงปฏิกิริยาเดียว และการเร่งในตัวกลางดังกล่าวอาจพบข้อเสียได้ เช่น เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ เกิดการยับยั้งจากตัวทำละลายอินทรีย์ เพิ่มความซับซ้อนของระบบ และต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายสำหรับตัวทำละลายอินทรีย์ จากการค้นพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยมีโมเลกุลของน้ำเพียงปริมาณเล็กน้อยที่จับกับโมเลกุลของเอนไซม์ในการรักษาโครงรูปของเอนไซม์ให้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (active conformation state) ทำให้มีการตื่นตัวในด้านงานค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับการใช้ตัวเร่งทางชีวภาพ ในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ในตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ได้มีหลายชนิดได้แก่เอนไซม์ในกลุ่ม Oxidoreductases, Hydrolases และ Isomerases ทำให้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมหลายประเภทเช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง เกษษกรรมหรือเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ การใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายในสภาพที่มีปริมาณน้ำต่ำมีข้อดีอยู่หลายประการ คือ ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของสับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

สมดุลของปฏิกิริยาไปในทิศทางที่ส่งเสริม ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของไฮโดรไลซิส ลดการยับยั้งปฏิกิริยาโดย สับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเอนไซม์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์จึงสามารถใช้การตรึง เอนไซม์แบบง่าย ๆ เช่น การดูดซับเอนไซม์บนพาหะตรึง สามารถป้องกันการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ การแยกเอนไซม์ทำได้ง่าย ช่วยเพิ่ม stereoselectivity และ enantioselectivity ของเอนไซม์ และเป็นการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์อาจมีข้อเสียคือตัวทำละลายอินทรีย์อาจทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ หรืออาจเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากการจำกัดของการแพร่ การปิดกั้นที่บริเวณเร่ง การเปลี่ยนแปลงไปของโครงร่างที่เหมาะสมของโมเลกุลเอนไซม์ ลดลักษณะที่ยืดหยุ่นและเคลื่อนไหวได้ของโมเลกุลเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) ลักษณะปฏิกิริยาเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

วิธีการในการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์มี 8 วิธี

(1) ระบบที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมตัวกับน้ำ (water miscible solvents) ลงไปในสารละลายที่เป็นน้ำซึ่งมีเอนไซม์ละลายอยู่ สับสเตรทจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์ยังช่วยลดปริมาณน้ำและเปลี่ยนสมดุลของปฏิกิริยาได้

(2) วิธีที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (water immiscible solvents) ลงไปในสารละลายที่เป็นน้ำที่มีเอนไซม์ละลายอยู่ ทำให้เกิดระบบสองวัฏภาค (biphasic system) ส่วนใหญ่สับสเตรทละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีสับสเตรทปริมาณน้อยที่ละลายในส่วนที่เป็นน้ำซึ่งเป็นพื้นที่ที่สับสเตรทจับกับเอนไซม์เพื่อทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ การใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย เช่น เฮกเซน และไอโซออกเทน มีประโยชน์ในแง่ที่ทำให้เกิดการทำลายเอนไซม์น้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว ข้อดีของระบบนี้คือ เตรียมได้ง่าย สามารถแยกเอนไซม์และผลิตภัณฑ์ออกได้อย่างสะดวก และลดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ แต่แอกติวิตีของเอนไซม์จะขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ (interface) และเอนไซม์ส่วนมากไวต่อการเสียสภาพธรรมชาติ โดยแรงระหว่างชั้นของเหลว (interfacial forces) ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสซึ่งการเร่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์

(3) ระบบของเหลวสองวัฏภาคระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ สารละลายที่เป็นน้ำซึ่งมีปริมาณมากกว่าตัวทำละลายในระบบ ส่วนเอนไซม์อยู่ในรูปเอนไซม์ตรึงแขวนลอยในส่วนที่เป็นน้ำ เอนไซม์ในรูปอนุภาคของแข็งที่กระจายตัวในรูปหยดสารละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ เอนไซม์ที่ยึดเกาะบนอนุภาคของแข็ง (disperser particles) เมื่อกระจายตัวในรูปหยดสารละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ

(4) ระบบที่เอนไซม์ถูกกักไว้ในพาหะตรึงที่มีรูพรุน ซึ่งมีน้ำบรรจุอยู่เต็ม และแขวนลอยในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ วิธีนี้เอนไซม์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำ การใช้

เอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์สิ่งที่เจือปนอยู่อาจสร้างสิ่งแวดล้อมรอบโมเลกุลของเอนไซม์ (microenvironment) ซึ่งช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์

(5) วิธีที่มีเอนไซม์ดูดซับบนพาหะตรึงที่มีรูพรุนแล้วทำการระเหยน้ำออกจากนั้นเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำวิธีนี้จะมีน้ำเกาะอยู่กับเอนไซม์ และพาหะตรึงในปริมาณ เล็กน้อยซึ่งเพียงพอต่อการเร่งปฏิกิริยา

(6) วิธีที่มีการเติมเอนไซม์ลงไปโดยตรงในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำเอนไซม์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จึงอยู่ในรูปสารแขวนลอย และมีปริมาณน้ำเพียงเล็กน้อยเกาะอยู่กับเอนไซม์ พอที่จะทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่วิธีนี้อาจทำให้การแพร่กระจายของเอนไซม์เป็นไปได้ยาก เนื่องจากเอนไซม์ดึงดูดกันด้วยแรงไอออนิกที่แข็งแรงกว่าแรงที่ดึงดูดในตัวทำละลายอินทรีย์

(7) วิธีที่เอนไซม์ถูกกักอยู่ใน reversed micelles (water in oil) ที่มีน้ำบรรจุอยู่ reversed micelles มีลักษณะเป็นสารละลายใส ประกอบด้วยหยดน้ำเล็ก ๆ ที่ถูกทำให้คงตัวด้วยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ เอนไซม์ละลายในส่วนที่เป็นน้ำ เอนไซม์เวิลเปสมักถูกใช้ในระบบนี้ เพราะมีเนื้อที่ของ interface สูง มีผลให้ได้แอกติวิตีสูง

(8) วิธีที่เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงให้ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการจับกับสารบางชนิด เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ด้วยพันธะโควาเลนต์ และอาศัยลักษณะที่เป็นไฮโดรโฟบิกของสายไฮโดรคาร์บอน ช่วยในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

2) ปัจจัยที่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ตรึงในตัวทำละลายอินทรีย์

การทำงานของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

(1) น้ำ โดยน้ำจำเป็นสำหรับแอกติวิตีของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา และมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ การรักษาปริมาณน้ำที่พอเหมาะเป็นสิ่งสำคัญ ถ้ามีน้ำมากเกินไปสมดุลของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนไปในทิศทางการเกิดปฏิกิริยาการสลายด้วยน้ำ แต่ถ้ามีน้ำน้อยเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา น้ำที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคือ ส่วนที่เรียกว่า “bound water” เป็นส่วนของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของเอนไซม์ น้ำส่วนนี้มีสำคัญต่อการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ น้ำเหล่านี้มีส่วนทั้งทางตรงและทางอ้อมเกี่ยวกับพันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ ที่อยู่ในเอนไซม์ โดยที่แรงเหล่านี้ จะช่วยให้เอนไซม์คงรูปตามธรรมชาติ และช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ถ้าน้ำส่วนนี้ถูกดึงออกไป จะทำให้เอนไซม์ผิดรูป เอนไซม์จึงสูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา ส่วนน้ำที่อยู่ถัดออกมาเรียกว่า “bulk water” เป็นน้ำส่วนที่ไม่ได้เกาะอยู่กับเอนไซม์ สามารถขจัดออก ได้โดยที่เอนไซม์ยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์จะไม่สามารถทำงานได้ถ้าปราศจากน้ำที่จะรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ ได้มีผู้ประมาณปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาไว้ว่า ต้องการน้ำที่

เรียงตัวเพียงชั้นเดียวที่ผิวของเอนไซม์ ก็พอต่อการทำให้เอนไซม์มีโครงสร้างที่ยึดหยุ่นโดยการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ที่มีประจุบนโมเลกุลของเอนไซม์ ปริมาณน้ำที่พอเหมาะสำหรับแต่ละปฏิกิริยาแตกต่างกันไปขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของเอนไซม์ พาหะตริง ตัวทำ ละลายอินทรีย์ และ สับสเตรท รวมถึงปริมาณและความเป็นโพลาไรซ์ของสารเหล่านั้น การกระจายของน้ำในระบบก็มีผลสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา โดยน้ำบางส่วนจับกับเอนไซม์ และพาหะตริง บางส่วนละลายในตัวทำ ละลายอินทรีย์ โดยทั่วไปการรายงานเกี่ยวกับปริมาณน้ำมีรายงานปริมาณน้ำทั้งหมดในระบบ ทำให้เป็นการยากในการเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน จึงได้มีผู้ทำการวัด ปริมาณน้ำที่มีอยู่เพื่อให้เข้าใจพฤติกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ตัวแปร คือ wateractivity (A_w) ในระบบ ที่มีองค์ประกอบหลายชนิดผสมกันอยู่ แต่ละองค์ประกอบมีผลต่อ A_w ทั้งหมดในระบบนั้น ค่า A_w ของสารประกอบหนึ่ง ๆ สัมพันธ์กับความดันของน้ำที่สัมผัสกับสารประกอบนั้นและแปรตามอุณหภูมิ และความดันบรรยากาศ จากคำนิยาม A_w จะมีค่าเท่ากันหมดในทุกวัฏภาคที่มีภาวะสมดุล ทำให้ใช้แสดงปริมาณน้ำในระบบของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้หน่วยร้อยละโดยน้ำหนัก หรือปริมาตร ค่า A_w คือ ค่าที่แสดงความชื้นสัมพัทธ์ในวัฏภาคที่เป็นก๊าซสามารถปรับได้โดยการทำให้อยู่ในบรรยากาศที่ควบคุมความชื้น ด้วยการใช้สารละลายอิ่มตัวของเกลือค่า A_w เป็นค่าที่บ่งชี้ว่าเป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์หรือปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดย ปฏิกิริยาการสังเคราะห์มักเกิด เมื่อ A_w ลดลงมากพอ ในการเร่งปฏิกิริยาในตัวทำ ละลายอินทรีย์ที่มีปริมาณน้ำจำกัดทำให้เอนไซม์ ทนต่อ อุณหภูมิสูงได้ (Thermal stability) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก Porcine pancreas สามารถทำงานได้นานหลายชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในเฮกเซนที่มีน้ำอยู่น้อยมาก เนื่องจากหมู่ที่มีประจุของเอนไซม์เกิดพันธะไฮโดรเจนกันเอง ทำให้เอนไซม์ยังคงรูปร่างที่มีความแข็งแรง (structure rigidity) สามารถใช้เร่งปฏิกิริยาได้ต่อไป

(2) ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

การเลือกตัวทำ ละลายอินทรีย์มีความสำคัญต่อแอคติวิตี และมีส่วน สำคัญในการคงอยู่ของปริมาณน้ำรอบ ๆ เอนไซม์ (bound water) ตัวทำละลายอินทรีย์จำ แนกได้ เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water miscible หรือ hydrophilic solvent) เช่น อะซิโตรไนโตรล เตตระไฮโดรฟูแรน ไดออกเซน ไพรดีน และอะซิโตน เป็นต้น ตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้ ชอบที่จะดึงน้ำรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เกิดการคล้อยออกเป็นสายยาวมีผลทำให้แอคติวิตีต่ำ ส่วนกลุ่มที่สองเป็นตัวทำ ละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water immiscible หรือ hydrophobic solvent) เช่น เฮปเทน ไอโซออกเทน เฮกเซน ไดโอโซโพรพิลอีเทอร์และไดบิวทิลอีเทอร์ เป็นต้น ตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้ไม่แย่งดึงน้ำออกจากเอนไซม์ทำให้มีแอคติวิตีเช่นเดิม ดังนั้นแอคติวิตีในการเร่งในตัวทำ ละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิกจึงสูงกว่าชนิดไฮโดรฟิลิก

ในอดีตการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ อาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ เช่นความ มีขั้ว การละลายน้ำ ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลจากการทดลองอยู่มาก ต่อมา Brink และ Tramper ใช้ Hildebran solution parameter และน้ำหนักโมเลกุลในการทำ นายผลของตัวทำละลาย พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Hildebran solution ต่ำ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่ค่า Hildebran solution วัดได้ยากในตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นได้ใช้ตัวแปร คือ $\log P$ เพื่อทำนายอัตราการเกิดปฏิกิริยาของ เอนไซม์ในตัวทำละลาย อินทรีย์ และใช้ในการเลือกชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ คำนิยามของ $\log P$ หมายถึง ค่า $\log$ ของ Partition Coefficient (P) ในระบบสองวัฏภาคระหว่าง octanol/น้ำ และสามารถ วัดได้โดยการ ทดลองหรือการคำนวณจากค่า hydrophobic fragmentation constants โดยที่ตัวทำละลาย อินทรีย์แต่ละชนิด มีค่า $\log P$ แตกต่างกันไป และสามารถแบ่งกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 3 ชนิด คือ

- ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ น้อยกว่า 2 ละลายน้ำได้มากกว่า ร้อยละ 0.4 เป็น ตัวทำละลายชนิดไฮโดรฟิลิกที่ไม่เหมาะต่อการใช้งาน เนื่องจากมีผลเปลี่ยนแปลงน้ำล้อมรอบเอนไซม์ เป็นอย่างมาก
- ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ อยู่ระหว่าง 2-4 ละลายน้ำได้ ร้อยละ 0.04-0.4 เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิกที่ให้แอกติวิตีสูง และมีผลเปลี่ยนแปลงน้ำที่ล้อมรอบเอนไซม์ เพียงเล็กน้อย
- ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ มากกว่า 4 ไม่ละลายน้ำเป็นไฮโดรโฟบิกอย่างสูง ให้ค่าแอกติวิตีสูงที่สุดและไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงน้ำล้อมรอบเอนไซม์

Reslow และคณะ ทำการศึกษาผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไคโมทรูปซิน ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ แตกต่างกันไป พบว่า ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด ไฮโดรโฟบิกที่มีค่า $\log P$ สูง ให้แอกติวิตีสูงกว่าตัวทำละลายชนิดไฮโดรฟิลิกที่มีค่า $\log P$ ต่ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ ชนิดไฮโดรโฟบิกใช้ปริมาณน้ำน้อยกว่าชนิดไฮโดรฟิลิก เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาได้สูงสุด ตัวทำละลาย อินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิกทำให้เอนไซม์มีความเสถียรดีกว่าตัวทำละลายชนิดไฮโดรฟิลิก ซึ่งสอดคล้อง กับ Zaks และ Klivanov ที่พบว่าความเสถียรต่ออุณหภูมิและการเก็บรักษาจะมีค่าสูงในตัวทำ ละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิก

2.2.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส (นิยม กำลั้งดี, 2539)

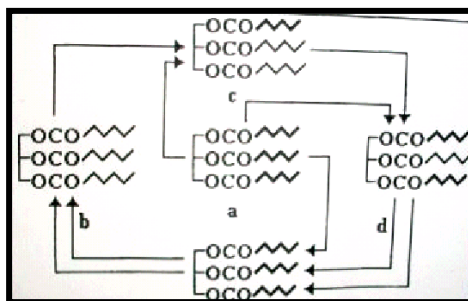
1) เอนไซม์ไลเปสกับเปลี่ยนแปลงในเชิงอุตสาหกรรม

ถึงแม้ว่าเอนไซม์ไลเปส หรือ glycerolesterhydrolase (E.C. 3.1.1.3) มีการนำมาใช้ในเชิงอุตสาหกรรมค่อนข้างเป็นเวลานาน เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะอย่าง ยิงในอาหารหมักเพราะเอนไซม์ไลเปสจะเป็นตัวผลิตกลิ่นรส (flavor) ในอาหารชนิดนั้น ๆ ให้มีกลิ่นรส เฉพาะตัว แต่ปริมาณใช้และปริมาณการผลิตมีจำกัด เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสนั้นมีข้อจำกัดในด้านต่าง ๆ ค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่สำคัญในเชิงอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ย่อยสลาย

โพรตีน หรือ กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายแบ่ง อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในเชิงอุตสาหกรรมนั้นมีแนวโน้มและศักยภาพที่สูงขึ้น หมายความว่าเอนไซม์ไลเปสเริ่มมีความสำคัญ มีบทบาท และมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากขึ้น มิได้จำกัดอยู่เพียงอุตสาหกรรมอาหาร หรืออุตสาหกรรมผงซักฟอกอันเป็นลักษณะการใช้เอนไซม์ในรูปแบบเดิมดังแต่ก่อน

เอนไซม์ไลเปสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความจำเพาะต่อตำแหน่งของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) คือกลุ่มที่มีสมบัติจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ และกลุ่มที่มีคุณสมบัติไม่จำเพาะต่อตำแหน่งดังกล่าวบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเอนไซม์ไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้จะไม่ถูกแบ่งออกจากกันโดยเด็ดขาด เพราะว่าเอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์นั้นคือเอนไซม์ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะที่มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์ได้น้อยกว่านั่นเอง

ปฏิกิริยาการใช้เอนไซม์ไลเปส สำหรับการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของไขมันและน้ำมันเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีผลมาจากการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปส เมื่ออยู่ในสภาวะใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสเมื่ออยู่ในสภาวะ low-water environments หรือ microaqueous system ในสภาวะดังกล่าวไขมันและน้ำมันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่ตำแหน่งของ acyl residue ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 และ 3 (C_1 และ C_3) ของกลีเซอรอลในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เกิดจากกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส (ภาพประกอบที่ 2.5) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในระบบดังกล่าวนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง hydrolysis, transesterification และ synthesis ester ตัวอย่างการใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของไขมันและน้ำมันที่ได้พัฒนามาสู่ระดับอุตสาหกรรมแล้ว ได้แก่ การดัดแปลงโครงสร้างน้ำมันปาล์มซึ่งมีราคาต่ำให้เป็น Cocoa butter-like fats ที่มีค่าสูงกว่าเพื่อใช้ทดแทน Cocoa butter ในอุตสาหกรรมอาหาร



ภาพประกอบที่ 2.5 การประยุกต์ใช้การเปลี่ยนแปลงแทนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 และ 3 (C_1 และ C_3) ของกลีเซอรอลในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่เกิดจากกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสโดยปฏิกิริยา acidolysis หรือ transesterification

ที่มา : นิยม กำลังดี (2539)

เนื่องจากปฏิกิริยาเอนไซม์ไลเปสนั้นมีความจำเพาะต่อตำแหน่งและลักษณะโครงสร้างของสารตั้งต้นจึงทำให้สามารถใช้เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์สารต่างๆได้มากมาย เช่น กรดไขมันและกลีเซอรอล สารไตรกลีเซอไรด์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactants) ลักษณะการเกิดปฏิกิริยา transesterification ที่จำเพาะนั้นเป็นข้อดีและได้เปรียบกระบวนการสังเคราะห์ด้วยวิธีเคมีเป็นอย่างมากในแง่ของการควบคุมการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารเคมีของไขมันและน้ำมันได้ตามต้องการ

เอนไซม์ไลเปสที่มีการผลิตในเชิงการค้าเพื่อใช้ในกระบวนการ transesterification เป็นครั้งแรกในอเมริกา โดยใช้เชื้อรา *Mucor miehei* เอนไซม์จากเชื้อราชนิดนี้มีสมบัติที่เหมาะสมเพราะมีความจำเพาะต่อตำแหน่งสูง สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี เมื่อตรึงเอนไซม์ชนิดนี้บน anion-exchange resin พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Mucor miehei* ไม่สูญเสียประสิทธิภาพการผลิต (productivity) และประสิทธิภาพในความจำเพาะปฏิกิริยา มีรายงานว่าสามารถใช้เอนไซม์ที่ตรึงนี้ในกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นานกว่า 1,800 ชั่วโมง

ส่วนการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปสที่เป็นกลุ่ม alkaline lipase ในอุตสาหกรรมซักล้างนั้น เพราะว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นทำให้สามารถลดอุณหภูมิของการซักล้างได้ ช่วยลดปริมาณการใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactants) และยังมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมน้อยกว่า การใช้สารเคมีปัจจุบันนี้การใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมการซักล้างมีปริมาณที่มากขึ้น เนื่องจากสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยกระบวนการหมักได้ในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการใช้ การเพิ่มปริมาณเอนไซม์โดยกระบวนการหมักนั้นเป็นผลที่เกิดจากการพัฒนาความรู้ในการควบคุมการหมัก การปรับปรุงเทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมตัวอย่างเช่น การตัดต่อส่วน promoter ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) และส่วน terminator ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (gluco amylase) จากเชื้อ *Aspergillus niger* แล้วนำมาเชื่อมต่อเข้ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Aspergillus niger* เป็นต้น เป็นผลให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเซลล์จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งจากความรู้และความเข้าใจถึงลักษณะโครงสร้างและกลไกต่าง ๆ เหล่านี้ของเอนไซม์ไลเปส เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการพัฒนาการความก้าวหน้าการใช้เอนไซม์ดังกล่าวมาสู่ระดับอุตสาหกรรม

2) การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมกระดาษ

การใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษเตรียมโครงสร้างไขมันตามวัตถุประสงค์ รวมถึงการใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตทางชีวภาพเพื่อมาทดแทนกระบวนการผลิตดั้งเดิมที่ใช้วิธีทางเคมีเอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษ ในปัจจุบันแนวโน้มการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ร่วมอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษมีมากขึ้น แทนที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสและลิกนินเนสเพียงอย่างเดียว การใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นมี

ในร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนและเอนไซม์กลุ่ม lipoprotein lipase ที่มีบทบาทในการไฮโดรไลซ์สารไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดและในลำไส้เล็ก เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ไขมันสายยาวได้น้อยกว่าไขมันสายปานกลาง (medium-chain) สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญในการเลือกลักษณะและชนิดของอาหารที่บริโภคเข้าไป ตามปกติไขมันและน้ำมันที่ประกอบด้วยไขมันสายยาว เช่น น้ำมันถั่วเหลืองมักนิยมใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับผู้ป่วยที่ต้องการพลังงานสูงในโรงพยาบาลทั่ว ๆ ไป ซึ่งเมื่อร่างกายได้รับกรดไขมันสายยาวเหล่านี้เข้าไป สารไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกิจกรรมของ lipoprotein lipase ที่อยู่ในชั้นเนื้อเยื่อของหลอดเลือดและมีการปล่อยกรดไขมันออกมาเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้กับร่างกายต่อไป มีเหตุผลหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดความพยายามที่จะเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของไขมันเพื่อให้มีองค์ประกอบที่เหมาะสมขึ้นมาทดแทนการใช้ไขมันตามธรรมชาติที่มีกรดไขมันสายยาวผสมอยู่ประการสำคัญคือ lipoprotein lipase นั้นมีกิจกรรมไฮโดรไลซ์กรดไขมันสายยาวได้ช้า ทำให้ย่อยสลายไขมันหรือน้ำมันในกระแสเลือดได้ช้า นอกจากนี้ไขมันตามธรรมชาติที่อยู่ในลักษณะของสารอิมัลชันนั้นประกอบไปด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเมื่อร่างกายได้รับสารดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลานานจะเป็นปัจจัยที่ทำให้ร่างกายได้รับไขมันในปริมาณที่มากเกินไปจนเกินความจำเป็น ดังนั้นไขมันหรือน้ำมันชนิดใหม่ที่ได้มีการผสมระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับกรดไขมันสายที่ไม่ยาวมากและกรดไขมันสายยาวในสัดส่วนที่เหมาะสม จึงได้มีการพัฒนาปรับปรุงเพื่อใช้ทดแทนการบริโภคน้ำมันที่มีกรดไขมันสายยาวเป็นองค์ประกอบมากขึ้นในปัจจุบัน

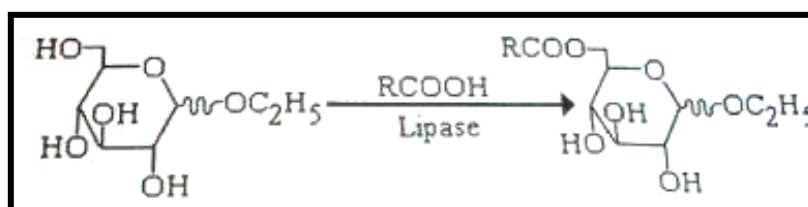
4) เอนไซม์ไลเปสในกระบวนการทางเคมีอินทรีย์

มีความเป็นไปได้สูงที่จะนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการกระบวนการทางเคมีอินทรีย์ต่าง ๆ และปัจจุบันกำลังมีการพัฒนาอยู่ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ มากมายที่กำลังเป็นที่สนใจและมีความก้าวหน้าในการศึกษามาก คือ การใช้เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์สารประกอบที่เป็น enantio-selective hydrolysis หรือการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการผลิตในเชิงพาณิชย์เรียกว่า “เอสเทอร์ชีวภาพ (bioesters)”

5) กรีนเคมีคัล (Green chemicals)

เอนไซม์ไลเปสได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เพื่อลดปัญหาและความยุ่งยากในการผลิตด้วยวิธีการทางเคมีแบบเดิม ตัวอย่างเช่นการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *candida antarctica B* ในการผลิตกลูโคไซด์เอสเทอร์ (glucoside esters) (ภาพประกอบที่ 7) สารประกอบชนิดนี้สร้างจากกรดไขมันและสารกลูโคไซด์อย่างง่าย และมีคุณสมบัติในการช่วยลดแรงตึงผิวส่วนใหญ่ใช้เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอาง ผงซักฟอกที่ใช้ตามบ้านเรือน ใช้อย่อยสลายหรือเป็นตัวทำลายไขมันและกรีส (grease) ในอุตสาหกรรมโลหะ อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ และ

เครื่องหนึ่ง สิ่งที่ดีซึ่งสารประกอบชนิดนี้คือสามารถใช้ผลิตทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ โดยอาศัยกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่อาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทั้งยังมีความปลอดภัยมากกว่ากระบวนการทางเคมีตัวผลิตภัณฑ์เองยังมีความปลอดภัยต่อตัวผู้ใช้ และย่อยสลายได้ง่ายด้วยกระบวนการทางชีวภาพในธรรมชาติเนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ปัจจุบันมีรายงานว่า การสังเคราะห์สารกลูโคไซด์เอสเทอร์ด้วยวิธีการตั้งเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *candida antractica* ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยใช้กรดไขมันและกลูโคไซด์เป็นสารตั้งต้นสามารถพัฒนาไปสู่ระดับโรงงานอุตสาหกรรมทดลอง(pilot-scale)ได้แล้ว ซึ่งเป็นตัวอย่างหนึ่งที่ใช้ให้เห็นถึงศักยภาพที่จะพัฒนาการใช้ประโยชน์เอนไซม์ไลเปสไปสู่ระดับอุตสาหกรรม โดยอาศัยเทคโนโลยีและความรู้ต่างๆที่เกี่ยวข้อง



ภาพประกอบที่ 2.7 การสร้าง simple glucosides จาก fatty acids โดยการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ที่มา : นิยม คำลึงดี (2539)

สิ่งต่าง ๆ ที่ได้กล่าวนี้สามารถบ่งบอกได้เด่นชัดว่า เทคโนโลยีการพัฒนาเอนไซม์ไลเปสนั้น ไม่ได้มีบทบาทอยู่เฉพาะอุตสาหกรรมเอนไซม์แบบเก่า ๆ เท่านั้น แต่สามารถที่จะพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิต และสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ได้มากมาย รวมทั้งเมื่อพิจารณาถึงผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์และความปลอดภัยของกระบวนการผลิตที่จะมีผลต่อคนงานหรือผู้ที่เกี่ยวข้อง จะเห็นว่ากระบวนการผลิตที่ใช้เอนไซม์นั้นดีกว่ากระบวนการทางเคมีดั้งเดิม ดังนั้นเป็นที่คาดหวังว่าการพัฒนาการใช้เอนไซม์ไลเปสในด้านต่าง ๆ จะเพิ่มควมสำคัญมากขึ้นในอนาคตอันใกล้

6) การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสด้านอื่นๆ

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในทางเทคโนโลยีชีวภาพอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีข้อดีหลายประการเช่น เอนไซม์มีความคงตัวใน organic solvents, เอนไซม์ไม่ต้องการ cofactors, เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ substrate น้อย (broad substrate specificity) และที่สำคัญ ไลเปสมีความจำเพาะเจาะจงในเรื่อง enantioselectivity มีการรายงานว่า มีเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ประโยชน์ทางการค้าในปัจจุบัน มีต้นกำเนิดมาจาก 34 แหล่งของเอนไซม์ที่

แตกต่างกัน ซึ่งในนั้นมี 18 แหล่งแยกได้จากพวก fungi เช่น *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* เป็นต้น และแหล่งจากแบคทีเรีย เช่น *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium viscosum* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ไลเปสได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ (organic synthesis), ใช้เติมในผงซักฟอกเพื่อช่วยประสิทธิภาพการซักล้าง, เพิ่มรสชาติในอาหาร, ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ, และในอนาคตอาจมีการนำมาใช้เพื่อการบำบัดของเสีย

2.3 เอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนด หรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมีหรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์ เปลี่ยนจากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) (ปราณี, 2547)

วิวัฒนาการของการศึกษาวิจัยด้านการเตรียมและการนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับ แม้ว่าในปัจจุบันเราจะยังไม่สามารถหาสูตรสำเร็จที่ระบุให้ชัดเจนว่าเอนไซม์ชนิดหนึ่งจะตรึงรูปด้วยวิธีใดก็ตาม แต่ก็มียุทธศาสตร์และผลงานวิจัยพอที่จะชี้ให้เห็นได้ว่าควรใช้วิธีใด ส่วนประสิทธิภาพและความเหมาะสมของการใช้งานก็เป็นกรณีๆ ไป อย่างไรก็ตาม วิวัฒนาการของการศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปเกิดขึ้นเป็นลำดับจนปัจจุบันนี้ก็ด้วยเหตุผลที่สืบเนื่องมาจากการใช้เอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดบางประการดังนี้

1. ข้อจำกัดของเอนไซม์อิสระ

- 1.1 เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
- 1.2 เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)
- 1.3 เอนไซม์อิสระใน *in vitro* ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้
- 1.4 เอนไซม์อิสระถ้าจะให้มียิจกรรมเอนไซม์สูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน
- 1.5 เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในสารละลายของซับสเตรตและผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะปนเปื้อนในลักษณะ proteinoous contaminants โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พีเอชของโปรตีนชนิดนั้น แยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง
- 1.6 เอนไซม์อิสระ ส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้นั้น

ลักษณะ solid catalyst ไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆ เช่น fluidized bed และ packed bed ในระบบต่อเนื่อง (continuous) ได้ อาจจะใช้ได้กับ stirred tank และ ultrafiltration membrane ได้ (กรณีของ ultrafiltration membrane จัดเป็นรูปหนึ่งของเอนไซม์ตรึงรูป

1.7 เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

1.8 เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์ก่อน

1.9 เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูด หายใจ การสัมผัสในปริมาณมากด้วยขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระที่กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นทางออกที่นำไปสู่การแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ ด้วยวิธีการต่างๆ และแก้ปัญหาไปตามลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่ได้ ถ้าหากแก้ได้หมดก็นับว่าได้ประสบผลสำเร็จยิ่ง อย่างไรก็ตามในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปก็อาจมีบ้าง ได้แก่ กิจกรรมเอนไซม์อาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพวยงมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไปและอาจมีผลต่อหมู่ที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วยมีปัญหาเกี่ยวกับซับสเตรท ที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือมีลักษณะแขวนลอย (suspension) ด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) และชนิดของตัวพวยงอาจจะมีผลกระทบต่อผลผลิต เช่น ปนเปื้อนหรือทำปฏิกิริยากับผลผลิต

2. ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

2.1 มีโอกาสเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม

2.2 ใช้ระบบ multi-enzymes ในลักษณะ in vitro ได้

2.3 ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่องได้

2.4 ใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์เดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวพวยงและวิธีการตรึงรูป

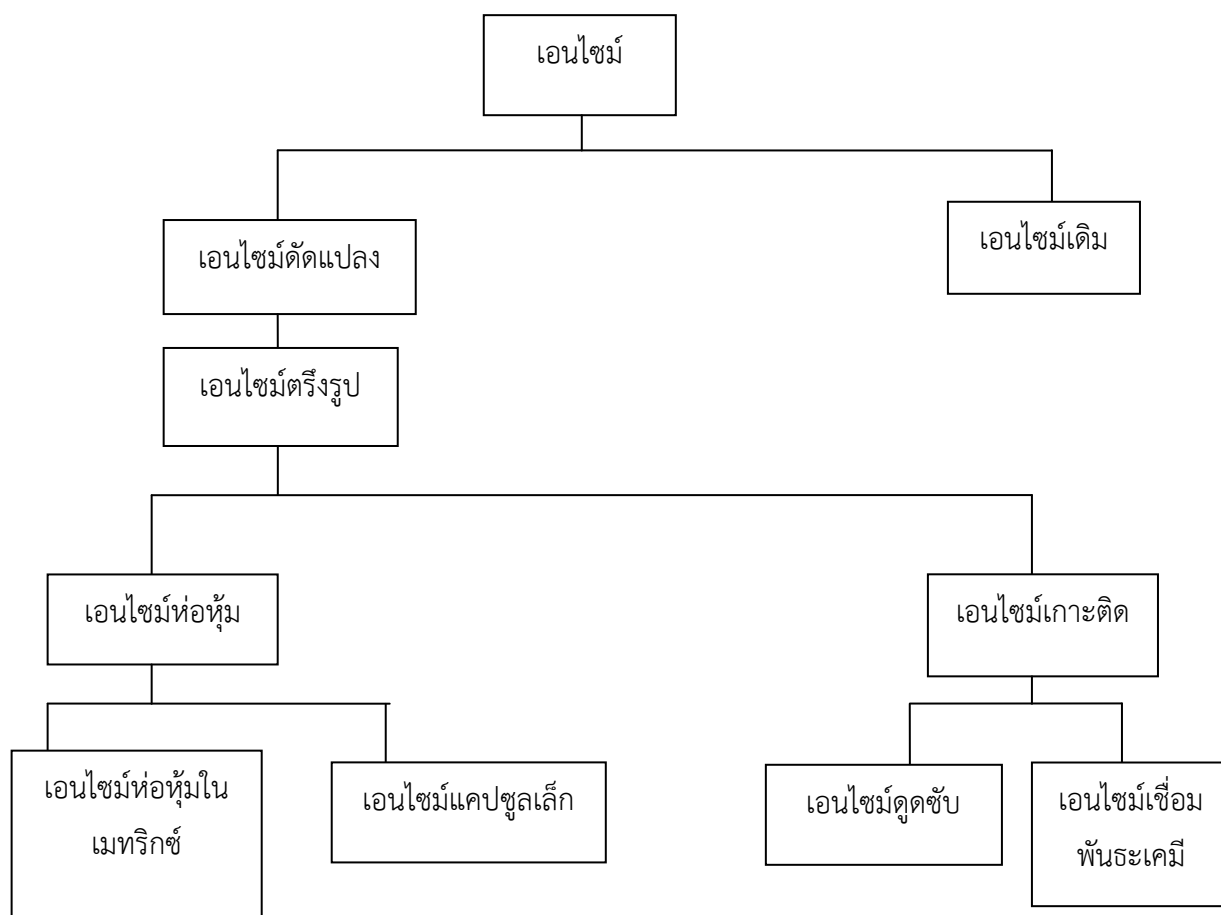
2.5 ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพวยงและลักษณะซับสเตรท

2.6 เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป

3. ชนิดหรือรูปของเอนไซม์

เอนไซม์โดยทั่วไปมี 2 รูป คือ เอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิม (native enzymes)

และเอนไซม์ดัดแปลง (modified enzymes) (ปราณี, 2547) ในกรณีของเอนไซม์ดัดแปลงสามารถทำได้หลายวิธี การทำเอนไซม์ที่ถูกตรึง ก็จัดเป็นวิธีหนึ่งของเอนไซม์ดัดแปลง ซึ่งสามารถสรุปเป็นแผนภาพรวมได้ดังภาพประกอบที่ 2.8



ภาพประกอบที่ 2.8 แสดงวิธีการตรึงเอนไซม์

ที่มา: ประวิทย์ เจียมจวนขาว (2550)

4. วิธีการตรึงเอนไซม์

การศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปเป็นทางออกของการนำเอนไซม์สู่อุตสาหกรรม แม้ว่าบางครั้งจะพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ด้อยกว่าเอนไซม์อิสระ แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาข้อได้เปรียบด้านอื่นๆ เช่น เสถียรภาพของการใช้งาน สภาวะการทำปฏิกิริยา เป็นต้น พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีสมบัติดังกล่าวสูงกว่าเอนไซม์อิสระ (ผ่องผกา, 2537) ฉะนั้นการจะพิจารณาข้อได้เปรียบเสียเปรียบใดสำคัญ จึงขึ้นอยู่กับลักษณะอุตสาหกรรมนั้นหรือมีฉะนั้นต้องทดลองศึกษาหาวิธีการตรึงรูปจนกว่าจะพบความ

เหมาะสมระหว่างเอนไซม์และอุตสาหกรรมนั้นๆ ดังได้รวบรวมสรุปลักษณะสำคัญของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 วิธีการตรึงรูปและสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป

สมบัติ	วิธีการเชื่อมกับตัวพุง			
	วิธีการเชื่อมขวาง	วิธีการดูดซับทางกายภาพ	วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์	วิธีการห่อหุ้ม
การเตรียม	ยาก	ง่าย	ยาก	ง่าย
ค่ากิจกรรมเอนไซม์	ปานกลาง	ต่ำ	สูง	สูง
ความจำเพาะต่อสับเตรท	เปลี่ยนได้	ไม่เปลี่ยน	เปลี่ยนได้	ไม่เปลี่ยน
แรงเชื่อมพันธะกับตัวพุง	แข็งแรง	อ่อน	แข็งแรง	ไม่มี
การนำตัวพุงกับคืน	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้
การนำไปใช้ทั่วไป	ต่ำ	ได้ต่ำ	ได้ปานกลาง	ได้สูง
ค่าใช้จ่าย	ปานกลาง	ถูก	แพง	ถูก

ที่มา: ปราณี อ่านเปรื่อง (2547)

4.1 การเชื่อมขวาง (Crosslinking method)

การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเหมือนกับการสร้างพันธะโควาเลนต์ แต่ไม่ต้องใช้ตัวพุงที่เป็นของแข็ง เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ได้โดยการสร้างพันธะเชื่อมไขว้ภายในและระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์จับกันเป็นก้อนสามมิติ ซึ่งทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำ สารเชื่อมไขว้ที่ใช้จะมีกลุ่มฟังก์ชันตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งสารเชื่อมไขว้จะจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ สารเชื่อมไขว้ ได้แก่ อะลิฟาติกไดเอมีน (aliphatic diamines) ไดเมทิลอะดิพิเมท (dimethyladipimate) ไดเมทิลซุเบอริไมด์ (dimethyl suberimidate) และกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งสารนี้เป็นตัวที่นิยมใช้มากที่สุด ปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเชื่อมไขว้ที่ใช้ โดยสารเหล่านี้จะมีหมู่ต่างๆ ที่ใช้จับโมเลกุลของเอนไซม์ คือ สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่คาร์บอนิล จับกับ แอล-โลซีนของเอนไซม์ (เกิดการจับแบบ Schiff's base) สารเชื่อมไขว้ที่มีไดอะโซ จับกับแอล-โลซีน แอล-ฮิสติดีน แอล-ไทโรซีนแอล-อาร์จินีน หรือ แอล-ซิสเตอีน (เกิดการจับกันด้วยพันธะไดอะโซ) สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่ไอโซไซยาเนต จับกับ

primary amino group (เกิดการจับกันด้วยพันธะเปปไทด์) สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่อัลคิลไฮโดรเจนจับกับ หมู่นิวคลีโอไฟล์ (เกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน) และหมู่ไฮดรอกซีเซตทาไมด์ จับกับ แอล-ซีสเทอีน (เกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน) การเชื่อมไขว้ระหว่างเอนไซม์กับกลูตาอัลดีไฮด์นั้นมีความเสถียรมากและ ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ ถึงแม้ว่าอุณหภูมิและพีเอชเปลี่ยนแปลงไปมากก็ตาม เนื่องจาก เกิดการจับกันแบบ Schiff's base เกิดพันธะ aldimine ซึ่งมีความแข็งแรงมาก นอกจากนั้นการเชื่อม ไขว้ยังเกิดจากปฏิกิริยาหมู่เอมีโนของเอนไซม์ จับตรงพันธะ ethylenic double bond ของ unsaturated oligomers ของ กลูตาอัลดีไฮด์สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้เอนไซม์ที่ถูกเชื่อมไขว้และ ไม่ละลายน้ำ โดยที่ไม่สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ขึ้นอยู่กับความสมดุลขององค์ประกอบ ต่างๆ คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเชื่อมไขว้ พีเอช ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย (ionic strength) อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เมื่อเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความ เข้มข้นต่ำลงในสารละลายของสารเชื่อมไขว้ ในระยะแรกจะได้โพลิเมอร์ที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์มากขึ้นจะเกิดพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและไม่ ละลายน้ำ ความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมในการตรึงอยู่ในช่วง 50-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การ ตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้เกิดขึ้นได้เร็วมากเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอชใกล้กับจุดไอโซอิเล็กทริกของเอนไซม์นั้นๆ

ธรรมชาติของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำโดยที่ เอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนไลซีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูงทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำได้ ง่ายขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงเพิ่มขึ้นด้วยโดยจะเพิ่ม จนถึงจุดๆ หนึ่งแล้วจะลดลง อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูตาอัลดีไฮด์กับความเข้มข้นของโปรตีน มักอยู่ในช่วง 10-100 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) โดยความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ให้ค่ากิจกรรม ของเอนไซม์สูงสุด จะอยู่ในช่วง 0.3 – 0.6 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือ สามารถ ใช้สารเชื่อมไขว้เพียงชนิดเดียว ตรึงภายในขั้นตอนเดียวและปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้เกิดได้ง่าย ส่วน ข้อบกพร่องนั้น คือ มีความยากในการเลือกใช้สภาวะที่ใช้และควบคุมปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้ระหว่าง โมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ขนาดของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำที่มีขนาดใหญ่และเอนไซม์ยังคงมี กิจกรรมเหลืออยู่สูง นอกจากนั้น เมื่อนำไปใช้งาน ยังเกิดปัญหาเรื่องการไหลเนื่องจากเอนไซม์ที่ถูก ตรึงด้วยวิธีนี้จะมีลักษณะเป็นเจล

4.2 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical-adsorption method)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้พันธะที่ใช้จะเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงวานเดอร์วาลส์ (vanderwaals force) และไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพุงที่เป็นของแข็ง การ ตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพุงที่ใช้ตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทิ้ง ไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกจากตัวพุงด้วยการเหวี่ยงหรือการกรองความสามารถ

ในการดูดซับเอนไซม์บนตัวพองขึ้นอยู่กับ พีเอช ธรรมชาติของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของอออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์กับพาหะและอุณหภูมิที่ใช้ นอกจากนี้ยังต้องอาศัยธรรมชาติของเอนไซม์และตัวพอง เช่น พื้นที่ผิวของตัวพอง อัตราส่วนของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกจับบนตัวพองและกิจกรรมของเอนไซม์หลังถูกจับ การควบคุมสภาวะต่างๆ เหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการตรึงเอนไซม์ได้ดีและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังคงมีอยู่สูง ปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพอง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพองกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จนถึงจุดอิ่มตัวถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีกก็ไม่ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงเพิ่มขึ้น ตัวพองที่ใช้ดูดซับ (adsorbant) ที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ ตัวพองที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ เซลลูโลส activated carbon คอกลาเจน ถ่าน (charcoal) คอนคานาวาลินเอ (concanavalin A) เป็นต้น และตัวพองที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ DEAE-Sephadex อะลูมินา แก้ว ไฮดรอกซีลาพาไทท์ (hydroxylapatite) และซิลิกา เป็นต้น ส่วนการจับที่อาศัยพันธะไฮโดรโฟบิก ตัวพองที่ใช้จะมีส่วนที่ไม่ขี้น้ำโดยเฉพาะกลุ่มที่เป็นอะโรมาติกซึ่งกลุ่มนี้มีความสามารถจับกับเอนไซม์ โดยอาศัยไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน กับโปรตีนที่มีส่วนที่เหลือ (residues) คือ ทริปโตเฟน ไทโรซีนและไอโซลูซีน

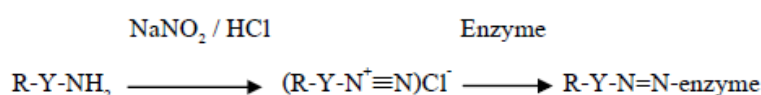
4.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent-binding method)

วิธีการผลิตเอนไซม์ตรึงรูปอีกวิธีหนึ่งและเป็นที่ยอมรับกันมาก เนื่องจากวิธีนี้มีความแข็งแรงระหว่างตัวพองที่แข็งแรงมาก ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพองได้ยาก แต่จะมีการเตรียมที่ยากและราคาสูง (Chaplin and Brucke, 1990) และพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปแข็งแรงขึ้น ทนต่ออุณหภูมิและพีเอชที่รุนแรงได้มากขึ้น ความมีเสถียรภาพเหล่านี้จะส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงแค่น้อยเท่านั้น เมื่อเวลาผ่านไปนานๆ หรือเมื่อมีการนำกลับมาใช้ซ้ำ (Huckel *et al.*, 1996) เป็นการตรึงเอนไซม์โดยมีการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพองด้วยพันธะโควาเลนต์ การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ทำได้ยากกว่าวิธีอื่น ๆ เนื่องจากปฏิกิริยาคอนข้างซับซ้อนและรุนแรง การจับกันนี้อาศัยโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีนที่มีต่อตัวพอง สิ่งสำคัญในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ คือ กรดอะมิโนที่มีผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ต้องไม่เกี่ยวข้องกับการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์กับตัวพอง ซึ่งควบคุมได้ยาก และโดยทั่วไปเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึง แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ตัวยับยั้งแบบแข่งขันหรือซับสเตรทเข้าไปจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณเร่ง ทำให้ป้องกันบริเวณนี้จากการเกิดพันธะกับตัวพอง ตัวพองชนิดนี้จะมีกลุ่มฟังก์ชันจำนวนมาก ทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ด้วยปฏิกิริยาหลายชนิด ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์โดยวิธีโควาเลนต์ คือ กลุ่มฟังก์ชันของโปรตีนที่เหมาะสมต่อการสร้างพันธะโควาเลนต์ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดจากการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพองและตัวพองที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่เหมาะสมต่อการ

จับกับเอนไซม์การเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ คือการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้มีผู้นามาศึกษามากที่สุด การตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถทำได้ 7 วิธีย่อยๆ ดังนี้ (ปราณี, 2547)

ก. วิธีไดอะโซ (Diazo method)

วิธีไดอะโซ คือ การสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์และตัวพุงที่มีอนุพันธ์ไดอะโซเนียม ($-N \equiv N$) เรียกกระบวนการนี้ว่า ไดอะโซไทเซชัน (diazotization) เช่น ตัวพุงที่มี aromatic amino group ($R-Y-NH_2$) ดังปฏิกิริยา

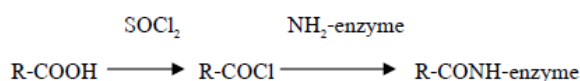


เอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์โดยวิธีนี้ได้แก่ เอนไซม์ที่มีหมู่อะมิโนอิสระมีหมู่ฮิสติดีนหรือหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซิล

ข. วิธีการเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide binding method)

วิธีการเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์ คือ การเชื่อมระหว่างโมเลกุลเอนไซม์และตัวพุง ด้วยพันธะเปปไทด์สังเคราะห์ ($-CO-NH-$) ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ

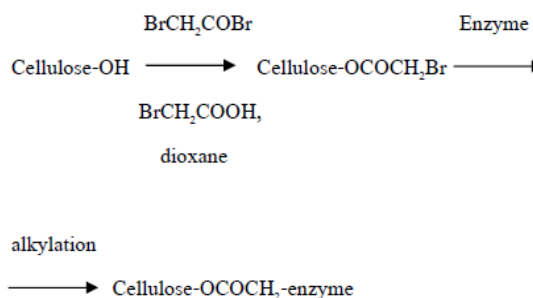
1) ตัวพุงมีหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) และหมู่เอมิโน ($-NH_2$) ถูกทำให้เป็นอนุพันธ์ที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อนุพันธ์ของ acid azide, คลอไรด์ ไอโซไซยาเนต เป็นต้น แล้วเชื่อมกับหมู่เอมิโนของเอนไซม์ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ตัวพุงถูกทำให้เป็นอนุพันธ์คลอไรด์ ดังนี้



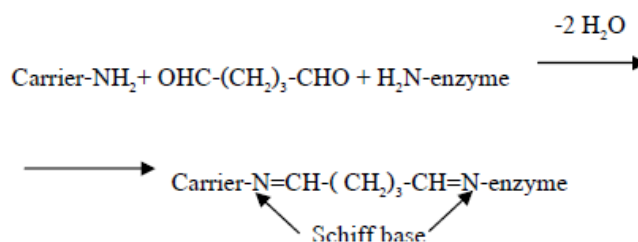
2) ใช้สารควบแน่น ได้แก่ คาร์โบไดอิมิด (carbodiimide), Woodward's reagent K เป็นตัวกลางสร้างพันธะเปปไทด์ เมื่อพันธะเปปไทด์เกิดขึ้นแล้ว สารควบแน่นจะถูกปล่อยกลับคืนมาดังเดิม

ค. วิธีการเติมหมู่อัลคิล (Alkylation method)

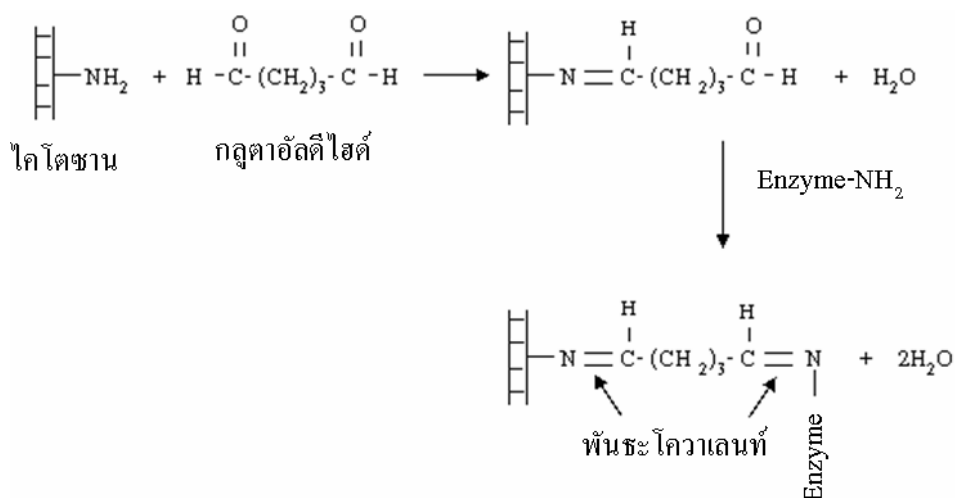
วิธีการเติมหมู่อัลคิล คือการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่เอมิโน ฟีนอลิก หรือซัลไฟดริล ของเอนไซม์กับหมู่เฮไลด์ (halide) ของตัวพุงแบบ alkylation ดังปฏิกิริยา



วิธีการเชื่อมพันธะด้วยสารมีหน้าที่คู่ (Bifunctional reagents binding method) การเชื่อมขวางระหว่างตัวพุงและเอนไซม์ ด้วยสารเชื่อมขวาง (crosslinkers) ซึ่งเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของตัวพุงกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ สารเชื่อมขวางอาจเป็นพวกสารมีหน้าที่คู่ (bifunctional reagents) หรือมีหมู่ 2 หมู่ทำหน้าที่เดียวกัน ดังปฏิกิริยา



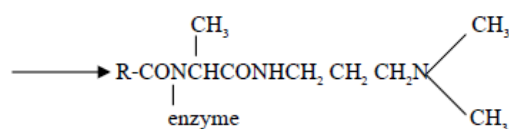
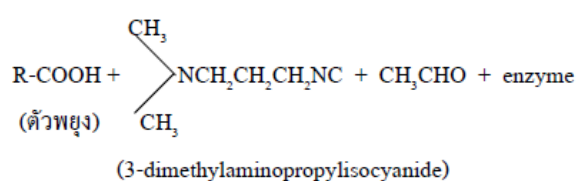
ตัวอย่างสารมีหน้าที่คู่ที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น กลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งมีหมู่อัลดีไฮด์ที่ปลายทั้ง 2 หมู่ ที่สามารถเชื่อมกับหมู่อะมิโนของตัวพุงกับเอนไซม์ ตัวอย่างการใช้กลูตาอัลดีไฮด์ เป็นสารเชื่อมขวาง ซึ่งปลายข้างหนึ่งจะมีหน้าที่จับกับหมู่เอมีนของโคโคซานและปลายอีกข้างหนึ่งจะจับกับหมู่เอมีนของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์แสดงดังภาพประกอบที่ 2.9



ภาพประกอบที่ 2.9 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง

จ. วิธีการเชื่อมกับตัวพุงด้วยปฏิกิริยาอุจิ (Ugi reaction binding method)

วิธีการเชื่อมกับตัวพุงด้วยปฏิกิริยาอุจิ เป็นวิธีผสมของการทำให้สารประกอบในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยหมู่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น ไอโซไซยาไนด์ (isocyanide, R4) อัลดีไฮด์ (aldehyde, R1) คีโตน (ketone, R2) คาร์บอกซิล (carboxyl, R5) เอมีน (amine, R3) ทั้งนี้ตัวพุงและเอนไซม์ต้องมีหมู่ไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้ อย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ เพื่อทำให้เกิด N-substituted amide (R4-NH-CO-CR1R2-NR3-CO-R5) ทั้งนี้ตัวพุงต้องเป็นตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างวิธีการเชื่อมกับตัวพุงด้วยปฏิกิริยาอุจิ โดยที่ตัวพุงมีหมู่คาร์บอกซิล (R-COOH) ดังปฏิกิริยา



สมการข้างต้นนี้ ตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำมีหมู่คาร์บอกซิล (R5) ผสมรวมกับสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีหมู่อะมิโน(R3,H₂N-enzyme) จากนั้นเติมอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde(R1,CH₃CHO) และ 3-dimethylaminopropylisocyanide (R4) กวนสารละลายทั้งหมดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่พีเอช 6.5 ซึ่งปรับโดยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 นอร์มอล (0.5N HCl) จะได้เอนไซม์ตรึงรูปในลักษณะ N-substituted amide

ฉ. วิธีการเชื่อมพันธะโดยการแลกเปลี่ยนหมู่ไทออลเป็นไดซัลไฟด์ (Thiol → disulfide)

วิธีการเชื่อมพันธะโดยการแลกเปลี่ยนหมู่ไทออลเป็นไดซัลไฟด์ เป็นวิธีการตรึงรูปแบบแลกเปลี่ยนหมู่ไทออล (-SH) ของเอนไซม์และตัวพุง ซึ่งการตรึงรูปวิธีนี้ค่อนข้างจำกัดกับเอนไซม์ยูริเอสเท่านั้น (มีหมู่ไทออล) แต่ปัจจุบันก็มีการศึกษากับเอนไซม์ที่ไม่มีหมู่ไทออล เช่น แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งต้องเติมหมู่ไทออล (thiolation) ให้กับเอนไซม์ก่อน

ข. วิธีการเชื่อมพันธะกับตัวพุงด้วยวิธีอื่นๆ

1) การใช้แป้งไดอัลดีไฮด์ (dialdehyde starch, OHC-starch-CHO) ซึ่งเป็นตัวพุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ 2 หมู่ สามารถใช้เป็นตัวพุงในการจับกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์แบบปฏิกิริยาชิฟเบส ได้แก่ การตรึงรูปปาเปน

3) การใช้พอลิ (4-ฟอร์มิล-เมทอกซีฟีนอล) เมทาอะคริเลต (poly (4-formylmethoxyphenol) methacrylate) เป็นตัวพุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ที่ไวต่อปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของเอนไซม์

3) วิธีการสร้างพันธะกวอะนิติน (Guanidine)

4) วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ร่วมกับโคแฟกเตอร์

4.4 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม (Entrapment method)

วิธีนี้เป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้มีสารบางตัวผ่านเข้าออกได้ (semipermeable membrane) โดยจะยอมให้มีการแพร่เข้าออกของโมเลกุลซับสเตรตและผลิตภัณฑ์การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่การตรึงจะไม่มีพันธะเคมีใดๆ ระหว่างเอนไซม์และพอลิเมอร์หรือแผ่นเมมเบรนที่ล้อมรอบ ดังนั้น จึงสามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิดรวมทั้งเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ ทั้งที่มีขนาดและคุณสมบัติแตกต่างกันก็ตาม การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับการตรึงเอนไซม์ที่ใช้พันธะทางเคมีการตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้ม สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ

ก. การห่อหุ้มภายในเจล (gel-entrapment method)

วิธีนี้เป็นการทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปอยู่ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตาข่ายพอลิเมอร์นี้เตรียมได้จาก สารเริ่มต้น (precursor) ที่เป็นโมโนเมอร์โอลิโกเมอร์ หรือพอลิเมอร์แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลาย ด้วยการเปลี่ยนตัวแปรของการละลาย ซึ่งได้แก่ ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอ็อกซิเจน และพีเอช เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมขวาง การห่อหุ้มโดยใช้เจล ที่เกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นโมโนเมอร์ เป็นการตรึงเอนไซม์โดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ ที่ได้จากการกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน โดยใช้อะคริลาไมด์เป็นโมโนเมอร์และสารเชื่อมขวางที่ใช้จับโมโนเมอร์ โดยทั่วไปจะเป็น N,N- methylene bisacrylamide (bis) ปฏิกิริยานี้เกิดได้เมื่อไม่มีออกซิเจนและใช้อุณหภูมิต่ำ (10-25 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างกระบวนการตรึง ปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชันนี้จะใช้ $K_2S_2O_8$ หรือ riboflavin เป็นตัวเริ่มต้น และ dimethylamino propionitrile (DMAPN) หรือเป็นตัวเร่ง ข้อเสียของวิธีนี้ คือ เจลชนิดนี้ไม่มีความคงทนต่อแรงกล ทำให้โครงร่างตาข่ายเปิดออกซึ่งผลให้เอนไซม์หลุดออกจากเจลได้ แต่อย่างไรก็ตาม สามารถแก้ไขข้อบกพร่องนี้ได้ โดยการทำให้เกิดการเชื่อมขวางอย่างเหมาะสม

การห่อหุ้มด้วยเจลที่เกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์ การเตรียมพอลิเมอร์จากสารเริ่มต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์ จะให้ผลดีกว่าการใช้โมโนเมอร์ เนื่องจาก ขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าของโมโนเมอร์ ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้อยกว่า ความร้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเกิดขึ้นน้อย เนื่องจากเกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้อยนั่นเอง อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของสารตั้งต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์จำเป็นต้องใช้สารที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น กลุ่มอีพอกซีคาร์บอนิล หรือไฮดรอกซิล ซึ่งกลุ่มเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ ดังนั้นการตรึงด้วยวิธีนี้จะมีทั้งการห่อหุ้มเอนไซม์และเกิดพันธะโควาเลนต์การห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยพอลิเมอร์ ที่มีโมเลกุลเป็นลูกโซ่ยาว เป็นการตรึงเอนไซม์โดยการเติมเอนไซม์ลงในพอลิเมอร์ธรรมชาติ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้คือ โปรตีน (คอลลาเจนและเจลาติน) และโพลีแซคคาไรด์ (อะการ์ แคลเซียมอัลจิเนต แคปทา-คาร์ราจีแนนและไคโตแซน)

ข. การห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber-entrapment)

วิธีนี้เป็นการตรึงเอนไซม์ไว้ในโพรงขนาดเล็กของเส้นใยสังเคราะห์ ซึ่งทำได้โดยละลายพอลิเมอร์ที่ใช้ทำเป็นเจล ที่นิยมใช้คือ เซลลูโลสไตรอะซีเตต (cellulose triacetate) ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ (คลอโรฟอร์ม เมทิลีนคลอไรด์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์) แล้วผสมสารละลายเอนไซม์ลงไป นำอิมัลชันที่ได้นี้ผ่านเครื่อง extruder ลงในของเหลวที่ทำให้อิมัลชันเกิดการจับตัวกันเป็นของแข็ง ซึ่งของเหลวที่ใช้ตกตะกอนนี้มักเป็น โทลูอิน หรือ ปีโตรเลียมอีเธอร์วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ เส้นใยที่ได้สามารถทนกรดอ่อนและด่างอ่อนได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็มีข้อบกพร่องคือข้อบัพการที่มีโมเลกุลเล็ก เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปได้ เนื่องจากการตรึงทำให้เกิด

การปิดกั้นการเข้าออก นอกจากนั้นเอนไซม์อาจถูกทำลายด้วยตัวทำลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวทำลายของพอลิเมอร์และสารที่ใช้ตกตะกอน

ค. การตรึงเอนไซม์ด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (microencapsulation)

วิธีนี้เป็นการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็กที่เตรียมได้จากพอลิเมอร์ที่เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งพอลิเมอร์นี้มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ที่สามารถปล่อยให้ซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ผ่านได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อให้ซับสเตรตสัมผัสกับเอนไซม์ได้และสามารถตรึงเอนไซม์ได้หลายชนิดพร้อมๆ กัน ในขั้นตอนเดียว โดยไม่จำกัดว่าเอนไซม์นั้นจะผ่านการตรึงด้วยวิธีอื่นมาก่อนหรือไม่ ข้อบกพร่องของวิธีนี้คือ ไม่สามารถใช้สำหรับกรณีที่ใช้ซับสเตรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึงและเอนไซม์อาจเข้าไปอยู่ในผนังของเยื่อพอลิเมอร์ได้

2.4 ความรู้เกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ด้วยอัลจินต ซีเล้าเกลบ และเซลลูโลสที่มีรูพรุน

2.4.1 ความรู้เกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ด้วยอัลจินต

2.4.1.1 ความรู้เกี่ยวกับโซเดียมอัลจินต (Sodium alginate)

โซเดียมอัลจินตเป็นสารจำพวกโคพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ของ 1,4-linked β -D-mannuronic acid และ α -L-guluronic acid ซึ่งมีคุณสมบัติที่มีประจุเป็นลบ การใช้อัลจินตมาตรึงเอนไซม์ได้เป็นที่ยอมรับกันมาก เนื่องจากวิธีการตรึงง่าย ไม่มีความเป็นพิษ ปฏิกริยาระหว่างการตรึงไม่รุนแรง และให้ผลในการตรึงเอนไซม์ที่สูง ทั้งนี้เป็นเพราะว่าอัลจินตมีประจุเป็นลบ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ทำให้อัลจินตแข็งตัวมีประจุเป็นบวก จึงทำให้เกิดโครงร่างตาข่ายที่มีความแข็งแรง และทำให้เอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยอัลจินตมีความแข็งแรงตามไปด้วย

2.4.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินต

1) ปริมาณเอนไซม์และสารบางชนิด (additive)

การใช้ปริมาณเอนไซม์ที่พอเหมาะเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่ง โดยถ้าใช้เอนไซม์ในการตรึงมากเกินไป ค่าแอกติวิตีลดลงได้เนื่องจากการต้านการแพร่ของซับสเตรตไปยังบริเวณเร่งของเอนไซม์ แต่ถ้าใช้เอนไซม์ในการตรึงน้อยเกินไปเอนไซม์อาจมีแอกติวิตีต่ำ Wehtje และคณะพบว่าการใช้เอนไซม์ตรึงน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมเอนไซม์/กรัมพาหะตรึง ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีและความคงตัวต่ำ การสูญเสียแอกติวิตีอาจเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการระเหยน้ำ พบว่าถ้ามีการเติมสารบางชนิด เช่น โปรตีนหรือโพลีเอทิลีนไกลคอล ลงไปในเอนไซม์ไลเปสก่อนหรือระหว่างการตรึงเอนไซม์

อาจมีแอกติวิตีเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารบางชนิด เช่น erythritol, arabitol และ sorbitol ลงไปในเอนไซม์ไลเปสก่อนทำ การระเหิดน้ำออกทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงได้

2) ความเข้มข้นของอัลจินเต ความเข้มข้นของตัวพุงมีผลต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส จากงานวิจัยของ Keehom และคณะ (2004) พบว่าความเข้มข้นของอัลจินเตที่เหมาะสมในการนำมา ตรึงเอนไซม์ไลเปส Candidarugosa แบบ Cross-linking คือ 1.5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งให้ ปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงไว้ภายในและจำนวนของเอนไซม์ตรึงรูปที่สูง รวมทั้งให้ค่ากิจกรรมการ ย่อยสลายและมีประสิทธิภาพการยึดเกาะที่สูงเช่นกัน เมื่อความเข้มข้นของอัลจินเตเพิ่มขึ้นค่า ประสิทธิภาพการยึดเกาะ>Loading Efficiency) ก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่กิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilization Yield) จะลดลงเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจินเตจะทำให้ตาข่ายพอลิ เมอร์มีความหนาแน่นมากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ภายในได้ยากขึ้น ทำให้ค่ากิจกรรมหลังการ ยึดเกาะลดลง (ประวิทย์ เจริญจวนขาว , 2550)

3) ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์

แคลเซียมคลอไรด์มีหน้าที่คือเป็นตัวที่ทำให้อัลจินเตแข็งตัว เนื่องจากการยึดจับ กันระหว่างประจุลบของอัลจินตกับประจุบวกของ Ca และเกิดเป็นลักษณะของเมล็ด bead โดย พบว่าเมื่อเพิ่ม จะมีผลต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Loading Efficiency) และกิจกรรมหลังการ ยึดเกาะ (Immobilization Yield) น้อยมาก เนื่องจากปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์มีเหลือเพียงพอ ต่อการสร้างตาข่ายของพอลิเมอร์ ซึ่งความเข้มข้นส่วนใหญ่ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์จะอยู่ที่ 100 มิลลิโม ลาร์ โดยจะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีความแข็งแรง มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายและประสิทธิภาพการยึด เกาะที่สูง (Keehoon et al.,2004)

4) ขนาดของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

ขนาดของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากใน การทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์ สับสเตรทจะต้องแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยาภายในตัว เอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ปฏิกิริยาจะเกิดได้ช้ากว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาด เล็ก เพราะเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดเล็กจะทำให้สับสเตรท สามารถแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ได้เร็วกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ และนอกจากนี้พื้นที่ผิวสัมผัสของเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดเล็ก จะมีมากกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ ในปริมาตรของเอนไซม์ตรึงรูปที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปทำให้ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ (Immobilization Yield) ลดลง ส่วนค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Loading Efficiency) พบว่าที่ขนาดเอนไซม์ตรึงรูปต่างๆจะไม่ส่งผล ต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Keehoon et al.,2004)

5) อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับอัลจินเต

เมื่อสัดส่วนของเอนไซม์ไลเปสต่อความเข้มข้นของอัลจินเตจะส่งผลให้ได้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์สูงขึ้น แต่จะทำให้ค่าประสิทธิภาพการยิดเกาะและกิจกรรมหลังการยิดเกาะต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากอัลจินเตมีความสามารถในการเก็บกักเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนไว้ในช่องว่างของตาข่ายที่สร้างขึ้นเท่านั้น ซึ่งตัวพองแต่ละตัวจะมีความสามารถในการดูดซับหรือเก็บกักได้ไม่เท่ากัน จึงทำให้เอนไซม์ส่วนที่เหลือที่พองไม่สามารถเก็บกักเอาไว้ได้หลุดออกมาภายนอกตัวพองและละลายอยู่ในสารละลาย ทำให้ค่าประสิทธิภาพการยิดเกาะต่ำลง โดยพบว่าอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับอัลจินเตที่เหมาะสมคือ เอนไซม์ไลเปส 30 มิลลิกรัมโปรตีนและอัลจินเต 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งจะได้ค่ากิจกรรมการย่อยสลาย และประสิทธิภาพการยิดเกาะสูง

5) ข้อจำกัดของการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินเต

ข้อจำกัดของการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจินเต คือ ตาข่ายพอลิเมอร์ของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ที่ได้จะมีขนาดใหญ่ทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ภายใน ซึ่งแนวทางการแก้ปัญหา คือ การนำสารตัวอื่นมาหุ้มไว้ภายนอกของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะช่วยให้รูของเอนไซม์ตรึงรูปมีขนาดเล็กลง โดยที่สารที่นำมาหุ้มควรมีคุณสมบัติที่เป็นตาข่ายพอลิเมอร์เช่นกันแต่มีขนาดของช่องว่างเล็กกว่า ตัวอย่างสารที่นำมาหุ้มได้แก่ ไคโตแซนและซิลิเกต เป็นต้น สำหรับผลของการหุ้มเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป การตรึงด้วยอัลจินเต เป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม การใช้วิธีนี้กับเอนไซม์ยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ คือ ในระหว่างการนำไปใช้นั้นเอนไซม์ที่ตรึงไว้อยู่ภายในจะมีการรั่วออกมา ซึ่งเป็นผลให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง จากรายงานวิจัยของ Keehoon และคณะ (2004) พบว่า การนำสารพอลิเมอร์ไคโตแซนและซิลิเตมาหุ้มภายนอก จะทำให้ขนาดของรูพรุนเล็กลง

2.4.1.2 ความรู้เกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ด้วยซีเถ้าแกลบ

1) ความรู้เกี่ยวกับแกลบ

แกลบ (Rice hull) เป็นส่วนของเปลือกเมล็ดข้าว โดยปกติจะเป็นของเหลือทิ้งที่ไม่มีค่าแต่ในปัจจุบันได้มีการนำแกลบมาใช้ประโยชน์มากขึ้นดังเช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงเป็นส่วนผสมในการทำอิฐ เป็นวัสดุในการเพาะชำต้นพืช ใช้ในฟาร์มปศุสัตว์ เป็นวัตถุดิบในการผลิตผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) และผลิตสารซิลิกา การเผาแกลบที่อุณหภูมิสูงส่วนประกอบอื่นๆที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ เช่น พวกเซลลูโลส ลิกนิน น้ำตาล โปรตีน และวิตามิน เกิดการสลายตัวเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และแก๊สอื่นๆอีกเล็กน้อยและได้ส่วนที่เหลือคือซีเถ้าแกลบและคาร์บอนร้อยละ 45 ซีเถ้าแกลบ (Rice ash) จะมีสารหลายชนิด เช่น SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , CaO , MgO , Na_2O และ K_2O องค์ประกอบหลักที่สำคัญคือซิลิกอนไดออกไซด์

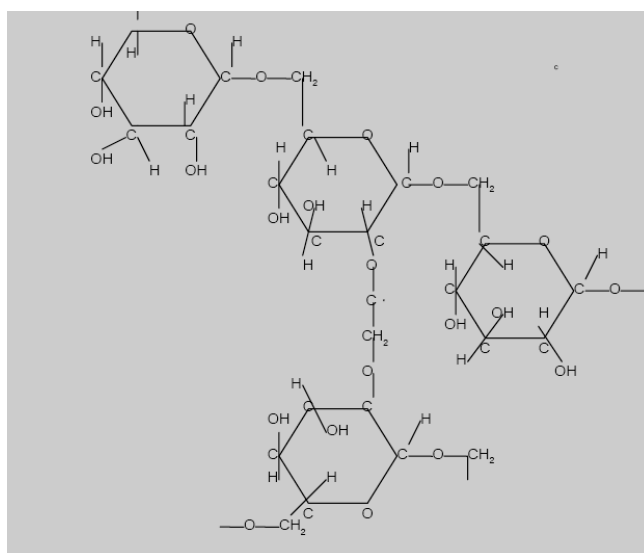
(SiO₂) มากกว่าร้อยละ 90 ส่วนออกไซด์อื่นๆปกคลุมบริเวณดูดซับไว้ กรดอนินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดซัลฟริกหรือไฮโดรคลอริก สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซีเมนต์ที่เคลือบได้อย่างรวดเร็วและดึงเอา ออกไซด์ของธาตุโลหะต่างๆที่มีฤทธิ์เป็นเบส เช่น อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ออกมาซีเมนต์ที่เคลือบที่ได้จะมีความพรุนและความสามารถในการดูดซับสารเพิ่มขึ้นดังรายงานของ Proctor และ Palaniappan กล่าวว่า ซีเมนต์ที่ผ่านการชะด้วยกรดสามารถดูดซับสารได้มากกว่าซีเมนต์ที่ไม่ได้ถูกชะด้วยกรด จากการทดลองชะซีเมนต์ที่เคลือบโดยกรดซัลฟริกที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ ร้อยละ 10 , 20 , 30 , 40 และ 50 พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชะซีเมนต์ที่เคลือบ ทั้งนี้ดูจากการ ที่ให้ค่า %การดูดซับโปรตีนสูงสุด แต่การเพิ่มความเข้มข้นกรดเป็นร้อยละ 50 ค่า%การดูดซับโปรตีน ลดลง สาเหตุอาจเนื่องมาจากกรดที่ความเข้มข้นนี้จะไปดึงเอาอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญใน การคงรูปโครงสร้างของซีเมนต์ที่เคลือบออกมากเกินไป โครงสร้างเกิดการยุบตัวการดูดซับโปรตีนจึงลดลง จะเห็นได้ว่าการชะด้วยกรดจะทำให้ซีเมนต์ที่เคลือบมีโครงสร้างเกือบทั้งหมดอยู่ในรูป ซิลิกาไดออกไซด์โลหะออกไซด์ชนิดนี้มีประจุลบ จากการตรึงเอนไซม์ที่อาศัยหลักการดึงดูดประจุ ของเอนไซม์กับพาหะตรึง ทำให้สามารถตรึงพาหะตรึงที่มีประจุลบเข้ากับเอนไซม์ที่มีประจุบวกด้วย พันธะไอออนิกได้ แต่การตรึงด้วยพันธะนี้จะทำให้มีแรงยึดที่ไม่เหนียวแน่นบนพาหะตรึง ดังนั้นการ เปลี่ยนแปลงพีเอชและไอออนในสารละลายมีผลทำให้เกิดการหลุดของเอนไซม์จากพาหะตรึงได้ง่าย จึงไม่เหมาะต่อการนำไปใช้ในปฏิกิริยาที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองตรึงเอนไซม์ ไลเปสจากแมล็ดอย่างพาราด้วยพันธะไอออนิกและวิธีดูดซับบนซีเมนต์ที่เคลือบที่ถูกชะด้วยกรดเข้มข้นร้อยละ 40 วิธีนี้ทำให้เอนไซม์ตกตะกอนและเกาะที่ผิวซีเมนต์ที่เคลือบได้โดยง่าย จากนั้นนำเอนไซม์ที่ตรึง ได้มาหาแอกติวิตีโดยวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วยการนำไปไทเทรตกับ NaOH เข้มข้น 0.01 M

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบทางเคมีของซีเมนต์ที่เคลือบ

Composition	%
Silicon dioxide (SiO ₂)	93.15
Aluminium oxide (Al ₂ O ₃)	0.41
Iron oxide (Fe ₂ O ₃)	0.20
Calcium oxide (CaO)	0.41
Magnesium oxide (MgO)	0.45
Sodium oxide (Na ₂ O)	0.08
Potassium oxide (K ₂ O)	2.31
Loss	2.77
Total	99.78

2.4.1.3 ความรู้เกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ด้วยเซลลูโลสที่มีรูพรุน (cellulose bead)

Sephadex G-25 เป็นวัสดุรูปทรงกลมที่มีรูพรุนที่ผลิตจากสารประกอบของเซลลูโลส (Bead Cellulose) ที่ได้มีการผลิตจำหน่ายในปัจจุบัน เป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ที่ก่อตัวขึ้นใหม่โดยกรรมวิธีการผลิตจาก Viscose ทุกๆ อนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลม ถูกควบคุมให้มีรูพรุนที่สม่ำเสมอ โดยนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการ ได้แก่ วัสดุรองรับทางกายภาพ (Physical Support) วัสดุสำหรับกระบวนการ Chromatography วัสดุสำหรับกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchanger) ดูดซับโลหะ (Metal Chelating Metal) ตัวดูดซับทางเคมี (Chemisorbances) ตัวดูดซับที่มีสัมพันธภาพ (Affinity Absorbents) ดูดจับเอนไซม์ (Immobilized Enzymes)



ภาพประกอบที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของ Sephadex G-25

ที่มา : พิชญ รัตนรักษ์ (2541)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวิณี จารุวรรณ (2540) ได้ทำการตรึง เอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้ซีเล้า แกลบเป็นพาหะตรึง เพื่อศึกษากิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลมาจากชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน และปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการที่จะรักษาโครงรูป ของเอนไซม์ และศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง คือ โทลูอีน , คลอโรฟอร์ม, ไดเอทิลอีเทอร์ , ไดโซโพรพิลอีเทอร์ , เฮกเซน , เฮปเทน , ออกเทน , ไอโซออกเทน และ โนเนน ซึ่งแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงเป็นคือ 0.21, 0.62, 11.86 ,12.07, 26.61, 32.23, 35.58, 91.67 และ 38.18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ตามลำดับ ไอโซออกเทน

เป็นตัวทำลายที่ดีที่สุดสำหรับการทดลองในครั้งนี้ และพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงตามความ เป็นขั้วของตัวทำลายอินทรีย์ที่สูงขึ้น ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ พบว่า ปริมาณน้ำที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด จะเพิ่มขึ้นตามความเป็นขั้วของตัวทำลาย อินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น สำหรับตัวทำลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ 3 ชนิด คือ ไดออกเซน , เอทานอล และ อะซิโตน พบว่าเมื่อเพิ่มน้ำในตัวทำลายอินทรีย์จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในตัวทำลายอินทรีย์พบว่าเอนไซม์มีความ คงตัวดีที่สุดในไดโอโซพรอพิลอีเทอร์ แอคติวิตีของเอนไซม์ยังคงเป็น 100 %เมื่อ เวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง ตัวทำลายอินทรีย์อีกชนิดที่ทำให้เอนไซม์มีความคงตัว คือ ออกเทน ที่ ชั่วโมงที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์เหลืออยู่ 58.07 % เอนไซม์เหลือครึ่งชีวิตหลังจากชั่วโมง ที่ 8 ของการปฏิบัติกริยา ในขณะที่ครึ่งชีวิตของเอนไซม์ในไดเอโนบิวทิลอีเทอร์ ใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมง และการศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ที่แขวนลอยในไอโซออกเทน พบว่าสามารถไฮโดรไลซ์น้ำมันมะกอกได้ 61.82 % เมื่อใช้น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 4 % (v/v) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง

พิษณุ รัตนรักษ์ (2541) ได้ทำการศึกษการตรึงเอนไซม์ไลเปสในตัวทำลายอินทรีย์ชนิดต่างๆโดยใช้ซีเถ้าแอลบเป็นพาหะตรึง ซึ่งจะทำการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับเอนไซม์ให้ติดอยู่บนผิวซีเถ้าแอลบ โดยใช้เครื่องตรึงเอนไซม์ที่ทำการออกแบบและสร้างขึ้นเพื่อควบคุม อัตราการหยุดสารถลายเอนไซม์ให้มีความสม่ำเสมอ โดยใช้ซีเถ้าแอลบที่เผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการปรับสภาพซีเถ้าแอลบด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น ร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นพาหะในการตรึงและทำการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำที่ใช้ละลายเอนไซม์ไลเปสก่อนทำการตรึง เมื่อนำซีเถ้าแอลบที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาใช้เป็นพาหะสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger* และทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันมะกอกในตัวทำลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าตัวทำลายอินทรีย์ที่มีค่า log P มากกว่า 3 คือ โนเนน (log P 5.1), ออกเทน (log P 4.5), ไอโซออกเทน (log P 4.5), เฮปเทน (log P 4.0) และ เฮกเซน (log P 3.5) ให้ค่าไฮโดรไลซิสแอคติวิตีที่สูงกว่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระที่ทำ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันมะกอกในสารถลายบัฟเฟอร์ การเพิ่ม ปริมาณน้ำที่ใช้ละลายเอนไซม์ให้มากขึ้นมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำลายประเภทอะโรเมติกไฮโดรคาร์บอนและคลอรีเนตไฮโดรคาร์บอนมีค่าแอคติวิตีที่ต่ำหรือไม่มีเลย แต่ในตัวทำลายประเภทอีเทอร์จะให้ค่าแอคติวิตีปานกลางในกลุ่มของตัวทำลายที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำที่ได้ทำการทดลองนั้น อะซิโตนจะให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุด

Lavayre และ Baratti (1982) ศึกษาตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *C.cylindracea* ด้วยวิธีดูดซับบน Spherosil (แก้วรูปพรุน) ที่ทำให้มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก ด้วยการเติมอนุพันธ์กลุ่ม iodopropyl บนแก้วรูปพรุนที่มีขนาดรูพรุนต่างกัน 2 ชนิดคือ ชนิด XOB 015 และ XOC 005) เพื่อเร่งการไฮโดรไลซ์ 3-คลอโร-2- เมทิลโพรพานอล พบว่า การตรึงบน Spherosil XOB 015 และ XOC 005 สามารถดูดซับเอนไซม์ได้สูงถึง 37.5 และ 20 มก./กรัมพาหะตรึง มีแอคติวิตี

113 และ 95 ยูนิต/นาที/กรัมพาหะตึง คิดเป็นร้อยละ 103 และ 155 เมื่อเปรียบเทียบกับ เอนไซม์อิสระตามลำดับ

Proctor และ Palaniappan (1989) รายงานการใช้เชื้อเถ้าแกลบดูดซับฟอสโฟลิปิดจาก Miscella ของน้ำมันถั่วเหลือง พบว่า การใช้ alkaline ash 0.5 กรัม ดูดซับได้ดีกว่าการใช้ 1 กรัม เมื่อเปรียบเทียบการดูดซับระหว่าง acid ash และ alkaline ash เมื่อใช้ปริมาณ 0.5 กรัมเท่ากันพบว่า acid ash สามารถดูดซับฟอสโฟลิปิดได้มากกว่า alkaline ash

Montero และคณะ (1993) ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปส *C.cylindracea* ด้วยวิธีดูดซับบน แผ่นโพลีเอทิลีน ศึกษาการปรับสภาพพาหะตึงด้วยวิธีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนนำมาตรึง พบว่าการเติม เอทานอล อะซิโตน อะซิโตรโนไตรล์ 2-โพรพานอลหรือเมทานอลก่อนนำมาตรึงจะ ทำให้เพิ่มการดูดซับและแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ถึง 4-5 เท่าเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ช่วยเพิ่ม ปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการคงรูปของเอนไซม์ เมื่อศึกษาผลของพีเอชความแรงของอออนของตัวกลาง ต่อแอกติวิตี พบว่าแอกติวิตีสูงขึ้นในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 5.7-6.5 และความแรงอออนน้อยกว่า หรือเท่ากับ 0.2 โมลาร์ การตรึงต้องการปริมาณเอนไซม์ 5-1.5 ยูนิต/มก.พาหะตึง โดยให้แอกติวิตี สัมพันธ์ร้อยละ 17-21 นอกจากนี้ค่าแอกติวิตียังลดลง เมื่อปริมาณน้ำของเอนไซม์ลดลง และ การเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปเอนไซม์ตรึง มีผลช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงได้

Ngando Ebongue และคณะ (2006) ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาการสลายไขมันในน้ำมันมะกอก ด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก (*Elaeis guineensis* Jacq ปาล์มเทศเนอรา. var.) อิสระโดยใช้สารละลาย บัฟเฟอร์และเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ลดแรงตึงผิวด้วยวิธีการบ่ม ซึ่งวิธีการบ่มให้ค่าแอกติวิตีสูง และได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ pH และอุณหภูมิโดยใช้อุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 20°C– 50°C พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเนื้อปาล์ม คือ 35°C และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ pH ตั้งแต่ 6.5-12.0 พบว่าเอนไซม์ไม่ ทำงานเมื่อ pH ต่ำกว่า 7.0 และสูงกว่า 11.5 ช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 9-10 จึง เลือกใช้ที่ pH 9 โปรตีนในน้ำมันมะกอกถูกยับยั้งด้วย tetrahydrolipstatin (THL) โดยละลายในเฮ กเซนและสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น

Gupta และคณะ (2010) ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปส *Rhizomucor mihei* ใน Polysulfone globules ทำการตรึงด้วยวิธีการดูดซับบนเม็ด PS globules ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ (microspheres) ชนิด ไฮโดรโฟบิกที่มีรูพรุน ทำจากสารละลาย PS ความเข้มข้น 10%, 15%, และ 20% (w/v) ใน อุณหภูมิห้อง เพื่อให้มีความหนืดที่แตกต่างกันและทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันมะกอกในสารละลาย บัฟเฟอร์ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ในปริมาณ 4.32 mg /g พบว่า globules PS20% มีพื้นผิวรู พรุนสูงสุดแต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนน้อยที่สุดและเมื่อนำสารตั้งต้นความเข้มข้นต่างๆมา วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotomet นำมาพล็อตกราฟ Lineweaver-Burk หาค่า R^2 พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงมีค่าสูง คือ 83.3 mM เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ มีค่าเท่ากับ 62.5 mM ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันมะกอกการทำงานลดลง 16-20%