



วิทยานิพนธ์

การตรึงโปรตีนเอนไซม์โคไลซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม
เพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส

**Covalent and Entrapment Immobilization of Protease on Chitosan
for Use in Seasoning Sauce Production**

นางสาวปาริชาติ กิจสงเสริมชน

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

ปริญญญา

วิศวกรรมเคมี

วิศวกรรมเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การตรึงโปรตีนเอนไซม์โคไลซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม
เพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส

Covalent and Entrapment Immobilization of Protease on Chitosan for Use in
Seasoning Sauce Production

นามผู้วิจัย นางสาวปาริชาติ กิจส่งเสริมธน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทยา หาญสกุลอักษร, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์อภิญา ดวงจันทร์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ไพศาล คงกาญจนา, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรึงโปรตีนเอนไซม์ไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม
เพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส

Covalent and Entrapment Immobilization of Protease on Chitosan for Use in
Seasoning Sauce Production

โดย

นางสาวปาริชาติ กิจส่งเสริมชน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
พ.ศ. 2550

ปาริชาติ กิจสงเสริมชน 2550: การตรึงโปรตีนโตนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และ
วิธีการห่อหุ้มเพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
(วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ปรธานกรรมการที่ปรึกษา:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทยา หาญกุลลักษณ์, Ph.D. 82 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตน้ำซอสปรุงรส โดยการใช้เอนไซม์โปรตีนเอสเมตรึงไว้บนโตนโคโตซาน ในการ
ทดลองประกอบด้วย การตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสเมตรึงไว้บนโตนโคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการ
ห่อหุ้ม โดยเฉพาะวิธีการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์
ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ และผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีต่อการตรึงเอนไซม์ เปรียบเทียบ
กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงในแต่ละวิธีกับเอนไซม์อิสระและผลการกระจายตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ โดยใช้
กลีโกลจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดไปทดสอบ
คุณสมบัติ ได้แก่ ความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอช นอกจากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสมไป
ผลิตน้ำซอสปรุงรส โดยศึกษาผลของการใช้ซ้ำ เปรียบเทียบระหว่างวิธีการตรึงรูปทั้ง 2 วิธี

การตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสเมตรึงไว้บนโตนโคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์
สูงสุดเท่ากับ 2,898 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ 11,930 ไมโครกรัม ที่ความเข้มข้นของ
กลูตาอัลดีไฮด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กระตุ้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศา
เซลเซียส แล้วนำมาตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสเมตรึงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นไอออน (Ionic Strength)
เท่ากับ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขณะที่การตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสเมตรึง
โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโตนโคโตซานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2,189
ยูนิตต่อกรัมโปรตีน และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ 8,467 ไมโครกรัม โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระเท่ากับ
15,450 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน จากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงทั้ง 2 วิธี ไปทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอช
พบว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส และ พีเอชประมาณ 7 นอกจากนั้น ปริมาณไนโตรเจน
จากกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มในการ
ผลิตน้ำซอสปรุงรสหลังจากการใช้ซ้ำครั้งที่ 4 มีค่าเท่ากับ 1,800 และ 706 ไมโครกรัมตามลำดับ

Parichart Kitsongsermthon 2007: Covalent and Entrapment Immobilization of Protease on Chitosan for Use in Seasoning Sauce Production. Master of Engineering (Chemical Engineering, Major Field: Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor Nanthiya Hansupalak, Ph.D. 82 pages.

This work studied protease enzyme immobilized on chitosan by two methods; covalent bond and entrapment for use in seasoning sauce production. Particularly, for covalent bond method, effects of glutaraldehyde concentration, activated time and the effects of temperature and pH on immobilized protease were investigated. The activity of immobilized enzyme by covalent bond and entrapment compared with free enzyme and the distribution of enzyme on chitosan surface were confirmed with scanning electron microscopy. The stability against temperature and pH of the highest activity immobilized enzyme was tested. In addition, the immobilized enzyme obtained from optimal conditions was used to study the reusability for seasoning sauce production.

The results obtained from the experiment showed that the immobilized enzyme on chitosan by covalent bond gave the highest activity of 2,898 unit/g protein and 11,930 μg in protein coupling, when the glutaraldehyde concentration used is 0.1 %w/v and activated for 2 hours 30 minutes at 30 °C then immobilized with protease in phosphate buffer solution that have ionic strength 0.05 M, pH 7 at 40 °C for 3 hours. The immobilized enzyme on chitosan by entrapment at 37 °C gave the highest activity of 2,189 unit/g protein and 8,467 μg in protein coupling. The activity of free protease was also found to be 15,450 unit/g protein. From the study of protease enzyme immobilized by two methods, the immobilized enzyme was stable and active at approximately 50°C and pH 7. The amounts of nitrogen from amino acid obtained from the immobilized enzyme by covalent bond and entrapment methods for use in seasoning sauce production after four cycles are 1,800 and 706 microgram, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและความกรุณาจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. อภิญา ดวงจันทร์ ประธานการสอบ ผศ. ดร. นันทิยา หาญสุภลักษณ์ ที่ปรึกษาและกรรมการ และรศ. ดร. สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์ กรรมการ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

งานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากหน่วยงานดังต่อไปนี้ สถาบันพัฒนาและวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และโครงการพัฒนานักคิดและวิจัยด้านวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ADB)

ขอขอบคุณ รศ. ดร. เพ็ญจิตร์ ศรีนพคุณ และ ผศ. ดร. จรัญ นัตรมานพ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านคำแนะนำและเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ รศ. ดร. สมบัติ ขอทวีวัฒนา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อข้อมูลเรื่องการผลิตน้ำซอสปรุงรส และคุณดุษฎี รัตนพระ ที่ให้คำแนะนำเรื่องการตรึงเอนไซม์

ปาริชาติ กิจส่งเสริมชน

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตการวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	38
ผลและวิจารณ์	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	60
สรุป	60
ข้อเสนอแนะ	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์	70
ภาคผนวก ข การคำนวณ	76
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	วิธีการตรึงรูปและสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป
2	ผลของประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์
ตารางผนวกที่	
ก1	วิธีการเตรียมสารละลาย L-tyrosine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยทั่วไป	9
2 กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยใช้เอนไซม์เพื่อลดสาร 3-MCPD	10
3 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ก. พลังงานอิสระการกระตุ้นและ ข. เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานอิสระการกระตุ้น	13
4 รูปของเอนไซม์	19
5 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้กลูตาออลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง	26
6 ขั้นตอนการผลิตไคติน – ไคโตซาน	31
7 โครงสร้างทางเคมีของไคติน	31
8 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	32
9 ผลของระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาออลดีไฮด์ที่มีต่อ ก. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และ ข. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ โดยกระตุ้นด้วยกลูตาออลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 30 °C สภาวะการตรึงเอนไซม์คือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 °C เส้นทึบได้จากการทำ non-linear equation	43
10 ผลของความเข้มข้นของกลูตาออลดีไฮด์ที่มีต่อ ก. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ และ ข. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยกระตุ้นด้วยกลูตาออลดีไฮด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที อุณหภูมิ 30 °C สภาวะการตรึงเอนไซม์คือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 °C เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น	45
11 ผลของพีเอชและอุณหภูมิในการตรึงเอนไซม์ที่มีต่อ ก. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และ ข. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 30 (◊), 40 (◻) , 50 (◴) และ 60 (✕) °C ตามลำดับ โดยสภาวะที่ใช้กระตุ้นเม็ดไคโตซานด้วยกลูตาออลดีไฮด์คือ ความเข้มข้นของกลูตาออลดีไฮด์เป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กระตุ้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น	48
12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ภาพบริเวณส่วนพื้นผิวของเม็ดโคโคซานที่ ก. ไม่มีเอนไซม์ ข. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และ ค. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม	52
14	ภาพบริเวณส่วนตัดขวางของเม็ดโคโคซานที่ ก. ไม่มีเอนไซม์ ข. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และ ค. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม	53
15	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่มีต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ($\diamond$) เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม ($\square$) และเอนไซม์อิสระ ($\triangle$) เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น	55
16	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่มีต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ($\diamond$) เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม ($\square$) และเอนไซม์อิสระ ($\triangle$) เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น	56
17	ผลของการใช้ซ้ำในการผลิตน้ำซอสปรุงรสที่มีต่อ ก. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ข. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ และ ค. ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน สัญลักษณ์ $\diamond$ และ $\square$ แทนวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม ตามลำดับ เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น	58
ภาพผนวกที่		
ก1	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส	74
ก2	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	75

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

การตรึงโปรตีนเอนไซม์โคไลซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม เพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส

Covalent and Entrapment Immobilization of Protease on Chitosan for Use in Seasoning Sauce Production

คำนำ

เครื่องปรุงแต่งรสเค็มที่ผู้บริโภคคนไทยคุ้นเคยมานาน ได้แก่ น้ำปลา กะปิ ปลาร้า ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว ซอสปรุงรส และ เครื่องปรุงพื้นบ้านอื่นๆ ซึ่งในอดีตได้มีการผลิต เพื่อการบริโภค ภายในประเทศและได้มีการนำเข้าจากต่างประเทศด้วย ต่อมาได้เริ่มมีการส่งออกไปจำหน่ายยัง ต่างประเทศบ้าง (นิรนาม, 2540) โดยเครื่องปรุงแต่งรสเค็มที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว และ น้ำซอสปรุงรส โดยซีอิ๊วถูกคิดค้นขึ้นจากชาวจีนมาเป็นเวลานานกว่า 3 พัน ปีแล้ว ต่อมาได้มีการผลิตเต้าเจี้ยว โดยอาศัยกากที่เหลือจากการผลิตซีอิ๊วเป็นวัตถุดิบสำคัญด้วย กระบวนการผลิตที่ต้องใช้ระยะเวลาหมักนานไม่น้อยกว่า 2-3 เดือน เพื่อให้ได้กลิ่นและรสชาติของ ซีอิ๊ว จึงทำให้ผู้ประกอบการหันมาใช้สารเคมีในการย่อยสลายโปรตีนทดแทนการย่อยสลายด้วยการ ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ วิธีการดังกล่าวทำให้กระบวนการผลิตใช้ระยะเวลาด้านลง เกิดผลิตภัณฑ์ ใหม่ที่เรียกว่า ซีอิ๊วเคมี หรือ น้ำซอสปรุงรส

น้ำซอสปรุงรส (seasoning sauce) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ใช้ปรุงอาหารมีโปรตีน พืชที่ย่อยสลายแล้วด้วยกรด เป็นส่วนประกอบสำคัญ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, มอก. 8-2539) ด้วยกระบวนการผลิตที่ใช้ระยะเวลาน้อย เมื่อเทียบกับการผลิต ซีอิ๊วหมัก ทำให้ ผู้ประกอบการหันมาให้ความสนใจกับผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วเค็มมากขึ้น แต่เนื่องจากการใช้กรดเกลือที่ เข้มข้นภายใต้อุณหภูมิสูง 130 องศาเซลเซียส (ศูนย์วิจัยเศรษฐศาสตร์ประยุกต์, 2540) จึงเกิด สารประกอบในกลุ่มไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon compound) ซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษโดยตรง ต่อร่างกาย โดยเฉพาะสารในกลุ่ม คลอโรไฮไดรอิน (chlorohydrins) อาทิ 3-chloro-1-propanol (CP), 2,3-dichloro-1-propanol หรือ 1,3-dichloro-2-propanol (DCP) และ 3-monochloro-propanediols (3-MCPD) (Salunkhe and Kadam, 1989) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า สารในกลุ่มนี้สามารถก่อให้เกิด มะเร็งในร่างกายได้ (Wittmann, 1991) ดังนั้นในปัจจุบันผู้ประกอบการ รวมถึงหน่วยงานต่างๆ ทั้ง

ในแต่ละประเทศจึงได้พยายามหาวิธีการลดปริมาณสารดังกล่าวอยู่ ซึ่งการนำเชื้อจุลินทรีย์ หรือ เอนไซม์เข้ามาใช้ในกระบวนการผลิต ควบคู่กับการใช้อุณหภูมิต่ำ สำหรับการย่อยสลายโปรตีนจาก กากถั่วเหลือง น่าจะเป็นการลดปริมาณสารดังกล่าวไม่มากนักน้อย ซึ่ง คงศักดิ์ (2544) ได้ศึกษาการ พัฒนาการวิธีการผลิตน้ำซอสปรุงรสจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันโดยใช้เอนไซม์ เพื่อทดแทน กรรมวิธีการผลิตเดิมที่ใช้กรดเกลือเข้มข้นภายใต้อุณหภูมิสูง ที่ก่อให้เกิดสาร 3-MCPD ซึ่งกระตุ้น การสร้างเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาพบว่าสามารถลดปริมาณสาร 3-MCPD ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์น้ำซอส ปรุงรสที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยใช้สภาวะในการสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ ระดับ ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 พีเอช 5.0 - 7.0 ที่อุณหภูมิ 50 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 ชั่วโมง (คงศักดิ์, 2544)

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ทำการผลิตน้ำซอสปรุงรส โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส มาตรังไว้ บนโคโคซาน การอาศัยโปรติเอสมาเป็นวัตถุดิบสำคัญที่ทำหน้าที่ ในการย่อยสลายโปรตีนจากกาก ถั่วเหลือง เพื่อผลิตเป็นน้ำซอสปรุงรส เนื่องจากโปรติเอส มีจุดด้อยคือ ราคาแพงจึงมีแนวคิดที่จะนำ โปรติเอสมาตรังไว้บนโคโคซาน เพื่อที่จะสามารถนำกลับมาใช้ใหม่หลายๆ รอบ เป็นการลด ต้นทุนในการผลิตน้ำซอสปรุงรส โดยงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษา การตรึงโปรติเอสบน โคโคซานด้วยพันธะโควาเลนต์ และวิธีการห่อหุ้ม เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส ด้วยกระบวนการทางเคมีโดยทำการศึกษาในระดับปฏิบัติการเพื่อนำไปสู่ การใช้งานจริงในอนาคต ด้านอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรตีนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ และวิธีการห่อหุ้ม โดยเปรียบเทียบจากค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ
2. ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ โดยวัดจากปริมาณเอนไซม์ที่สูญเสีย
3. ศึกษาการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงในการผลิตน้ำซอสปรุงรสและการใช้ซ้ำ

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรตีนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ และวิธีการห่อหุ้ม โดยจะศึกษาผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (Protein coupling) รวมทั้งประสิทธิภาพในการใช้หมักน้ำซอสปรุงรส (ปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนและผลของการใช้ซ้ำ)

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับซอสปรุงรส

ซอสปรุงรส หรือที่เรียกอีกอย่างว่า ซีอิ๊วเคมี จัดเป็นอาหารประเภทเครื่องชูรส (Underriner and Hume, 1994) ที่มีลักษณะคล้ายน้ำปลา ใช้เป็นเครื่องจิ้มหรือเครื่องปรุงรสอาหารได้เกือบทุกประเภท รสชาติหลักคือความเค็ม นอกจากนั้นยังมีกลิ่นรสเฉพาะตัว (Nicholas, 1976) มีกลิ่นหอม และรสชาติที่คล้ายเนื้อ (Takashi *et al.*, 1991; Olero *et al.*, 1998; Chyong and Chou, 1999) อันเป็นสิ่งที่ช่วยเสริมให้อาหารมีรสชาติอร่อยมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังให้คุณค่าทางอาหาร อาทิ โปรตีน จากพืช กรดอะมิโน (amino acid) อีกหลายตัว ซอสปรุงรสมิได้มีต้นกำเนิดมาจากซีอิ๊วหมัก ซึ่งเริ่มเดิมทีเป็นอาหารเฉพาะสำหรับชาวเอเชีย โดยมีถิ่นกำเนิดจากประเทศจีน และแพร่หลายออกสู่ประเทศด้านแถบยุโรปในเวลาต่อมา จนปัจจุบันนี้ ซีอิ๊วหมักได้เป็นที่นิยมบริโภคกันไปทั่วโลก และได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก จึงทำให้มีการผลิตเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ โดยเฉพาะที่ประเทศญี่ปุ่น มีการผลิตและส่งออกจำหน่ายเป็นสินค้าที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละจำนวนมาก (วิเชียร, 2534)

ซีอิ๊วมีชื่อเรียกต่างๆ กันมากมายตามท้องถิ่นและภาษาที่แตกต่างกันออกไป เช่น Shoyu ในภาษาญี่ปุ่น ส่วนในภาษาอังกฤษเรียกว่า soy sauce สำหรับในภาษาไทยเรียกว่า ซีอิ๊ว หรือหมายถึง ซีอิ๊วหมัก โดยเรียกทับศัพท์ตามภาษาจีนแต้จิ๋วหรือถ้าเป็นซีอิ๊วเคมี จะเรียกว่า “ซอสปรุงรส” (seasoning sauce) เพื่อบอกถึงความแตกต่างและในภาษาจีนจะมีชื่อเรียกซีอิ๊วกันมากมายหลายสิบชื่อ ตามภาษาท้องถิ่นและมีชื่อหลักที่เรียกกันติดปากว่า “เจียงอิ้ว” ซึ่งเป็นภาษาจีนกลางและให้ถือว่า เป็นชื่อที่ใช้เรียกกันเป็นทางการด้วย โดยตามหลักของพจนานุกรมจีน (ไพบุลย์, 2521) ซีอิ๊ว หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำถั่วเหลือง ข้าว แป้งสาลี มาเพาะด้วยเชื้อแล้วเติมน้ำเกลือ นำไปตากแดด จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี กลิ่น รสตามความต้องการ ส่วนในประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า Kecap หรือ Kecap ในประเทศเกาหลี เรียกว่า Kanjang และในประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า Toyo (วรารุณี และ รุ่งนภา, 2532) เป็นต้น

จากประวัติศาสตร์อันยาวนานพบว่า มากกว่าสามพันปีมาแล้วที่ชาวจีนเป็นผู้คิดค้นการทำ ซีอิ๊ว ซึ่งเริ่มต้นมาจากพระสงฆ์เป็นผู้ผลิต โดยใช้ถั่วเหลืองซึ่งถือว่าเป็นอาหารสำคัญเพราะเป็น

แหล่งของโปรตีนและไขมัน จากนั้นจึงได้ถูกเผยแพร่ไปยังส่วนอื่นทั่วทุกประเทศเป็นเวลานานกว่าสองพันปีมาแล้วและได้มีการพัฒนารูปแบบของซีอิ๊วออกมาเป็นจำนวนมาก

1.1 การผลิตซีอิ๊ว (Soy sauce production) สามารถผลิตได้โดยอาศัย 3 วิธีการดังนี้

1.1.1 กระบวนการหมัก (Fermented soy sauce process) เป็นวิธีการที่ทำกันมาแต่ดั้งเดิม อาศัยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งผลิตจากเชื้อราที่ใช้ในการหมัก วิธีการนี้เป็นที่นิยมทำกันมากที่สุด เพราะให้กลิ่นและรสชาติดีที่สุด

ก. ขั้นตอนการหมักเพื่อผลิตซีอิ๊วมีดังนี้

1) การเตรียมวัตถุดิบ วัตถุดิบที่สำคัญในการหมักซีอิ๊วมี 3 อย่างคือ

ถั่วเหลือง แป้งข้าวสาลี และเกลือ เป็นต้น ถั่วเหลืองที่ใช้อาจใช้ทั้งเมล็ดก็ได้แต่จะมีปัญหาของไขมันที่มีอยู่ในถั่วเหลืองนั้น ดังนั้นในระหว่างการหมักจึงจำเป็นต้องแยกเอาไขมันออกจากร้าน้ำหมักหรืออาจใช้ถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดไขมันออกไปแล้วก็ได้ นอกจากนั้นแล้วในระยะหลังได้มีการนำเอากากถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัตถุดิบแทนถั่วเหลือง เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากในกากถั่วเหลืองยังคงมีไนโตรเจนเหลือในปริมาณสูงนั่นเอง

การเตรียมถั่วเหลืองก่อนการหมัก ถั่วเหลืองจะถูกนำไปแช่น้ำ 12-15 ชั่วโมง (ต้องเปลี่ยนน้ำที่ใช้ทุกๆ 2-3 ชั่วโมงต่อครั้ง เพื่อช่วยลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ เช่น spore-forming bacillus ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของซีอิ๊วได้) แล้วจึงนึ่งหรือต้มเพื่อให้ถั่วเหลืองนุ่มและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ จากนั้นทำให้ถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งให้เย็นเพื่อลดอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปผสมกับแป้งสาลี ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนที่นำไปทำการหมักด้วยเชื้อราต่อไป

2) การหมัก ก่อนที่จะทำการหมัก สิ่งที่จะต้องเตรียมก่อนคือ โคจิ ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อ โคจิในที่นี้เรียกว่า Seed (tane) koji เตรียมขึ้นมาโดยเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* หรือ *A. sojae* บนข้าวเหนียวหรือรำข้าวสาลีผสมแป้งถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งเช่นกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน (การหมักในช่วงนี้เป็นการหมักในสภาพแห้ง) หลังจากเตรียม Seed koji ได้แล้วจึงนำไปถ่ายใส่วัตถุดิบที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 1 โดยใช้โคจิประมาณ 0.1-0.2

เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ผสมถั่วเหลือง แป้งข้าวสาลีและโคจิให้คลุกเคล้าเข้ากันอย่างดี จึงนำไปใส่ ถาดหรือถังหมักกระจายให้ทั่ว และปรับให้มีความหนาประมาณ 5 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน (ทั้งนี้เวลาที่ใช้ในการบ่มอาจยาวนานกว่าที่กำหนด ขึ้นกับ เอนไซม์ถูกผลิตขึ้นมาในระดับที่เพียงพอต่อความต้องการหรือไม่) หลังจากนั้นเติมน้ำเกลือความเข้มข้น 17-19 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ลงไป ซึ่งน้ำเกลือในระดับความเข้มข้นที่ใช้จะทำให้ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย (putrefactive bacteria) ไม่สามารถเจริญเติบโตในช่วงการหมัก และการบ่ม อย่างไรก็ตามถ้าปรับความเข้มข้นของเกลือให้สูงกว่า 23 เปอร์เซ็นต์ จะส่งผลยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (halophilic bacteria) และเชื้อยีสต์ที่ชอบเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแรงดันออสโมซิสสูง (osmophilic yeasts) ซึ่งเป็นเชื้อที่จำเป็นในการหมักก็ได้ ดังนั้นจึงอาจทำให้การหมักไม่เกิดขึ้น ในระหว่างการหมักโคจิ ผสมกับน้ำเกลือในช่วงนี้ ซึ่งเป็นการหมักในสภาพอาหารเหลวเป็นเวลา 2 เดือนถึง 1 ปี เอนไซม์ที่ ผลิตขึ้นมาจากโคจิจะทำการย่อยสลายโปรตีนให้ได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ ในขณะที่เดียวกัน แป้งก็จะถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลซึ่งจะถูกหมักต่อไปอีกจนเกิดกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ขึ้นมา รวมทั้งแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย ในช่วงนี้พีเอชของน้ำหมักจะลดต่ำลงอยู่ใน ระดับพีเอช 4.5-4.8 และคาร์บอนไดออกไซด์จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่มไมใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ซึ่งจะทำให้เกิดกลิ่น และรสชาติที่เราไม่ต้องการ ดังนั้นจึง จำเป็นต้องแก้ไขด้วยการให้อากาศเข้าไปในระหว่างการหมักในอัตราที่เหมาะสม ซึ่งวิธีที่ได้จากการ หมักในช่วงนี้จะมีกลิ่นและรสชาติที่เฉพาะ ทั้งนี้เนื่องจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์

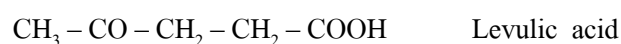
3) การเก็บเกี่ยวซีอิ๊ว เมื่อการเก็บเกี่ยวซีอิ๊วสมบูรณ์แล้ว จะต้องแยกเอาน้ำ ซีอิ๊วออกมา โดยอาศัยเครื่องกดแบบเชิงกลหรือกดแบบไฮดรอลิก น้ำซีอิ๊วที่ได้จะถูกนำไปให้ความ ร้อนในระดับ 70-80 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์และทำให้โปรตีนสภาพรวมทั้ง ตกตะกอนโปรตีนอีกด้วย จากนั้นเติมสารที่ช่วยให้ใส เช่น สารส้ม (alum) หรือ kaolin แล้วนำไป กรองบรรจุขวดและส่งจำหน่ายต่อไป

1.1.2 กระบวนการทางเคมี (Chemical soy sauce process) อาศัยการย่อยสลายวัตถุดิบ (ส่วนผสมของถั่วเหลืองกับข้าวสาลี) โดยใช้กรดเกลือที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ วิธีการนี้เป็น วิธีที่ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

ซีอิ๊วเคมี (Chemical soy sauce) หมายถึง ซอสปรุงรส (seasoning sauce) เป็นผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วประเภทที่ได้จากการใช้กรดกลูตอัมเข้มข้น (Fellows 1990; Puppo and Anon, 1999) เข้ามาย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดเอาน้ำมันออกไปแล้ว ใช้เวลาน้อยกว่าการหมักแบบธรรมชาติ โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ ปริมาณกรดอะมิโน (amino acid) ที่ได้จะมากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ส่งผลให้มีกลิ่น กลิ่นรสและรสชาติ ที่ดีกว่าการหมักซีอิ๊วแบบธรรมชาติ ซีอิ๊วเคมี หรือ น้ำซอสปรุงรส จะประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ กรดอะมิโนเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีอยู่ด้วยกัน 20 ชนิด อาทิ ไลซีน (lysine) ทริปโทเฟน (typtophane) ลูซีน (leucine) อาร์จินีน (arginine) วาลีน (valine) รวมถึง กรดกลูตามิก (glutamic acid) เป็นต้น ในปัจจุบันยังค้นพบว่า การย่อยสลายโปรตีนโดยใช้กรดกลูตอัมที่เข้มข้นภายใต้อุณหภูมิสูง จะส่งผลให้เกิดสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) (วรรณนา, 2534) ซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษโดยตรงต่อร่างกาย ซึ่งเราสามารถใช้เชื้อ จุลินทรีย์ หรือใช้เอนไซม์เข้ามาเป็นส่วนช่วยย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง (นภา, 2534) แต่เพื่อลดระยะเวลาในกระบวนการผลิตให้รวดเร็วขึ้นจึงได้มีการนำเอนไซม์มาตรึงไว้บนพอลิเมอร์

1.1.3 กระบวนการกึ่งเคมี (Semicheical soy sauce process) เป็นวิธีการที่นำเอาวิธีการหมักและวิธีการทางเคมีมาใช้ร่วมกัน ทั้งนี้โดยทำการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรดกลูตอัมเข้มข้น 7-8 เปอร์เซ็นต์ ก่อน จากนั้นจึงปรับพีเอชให้เป็นกลาง (ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์) แล้วจึงเติมโคจิลงไป เพื่อทำการย่อยสลายวัตถุดิบส่วนที่เหลือด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา (โคจิ) จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ในกลุ่มที่สามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือสูงได้ (halophilic yeast) ลงไปด้วย ทำการหมักอีกประมาณ 2-3 เดือน

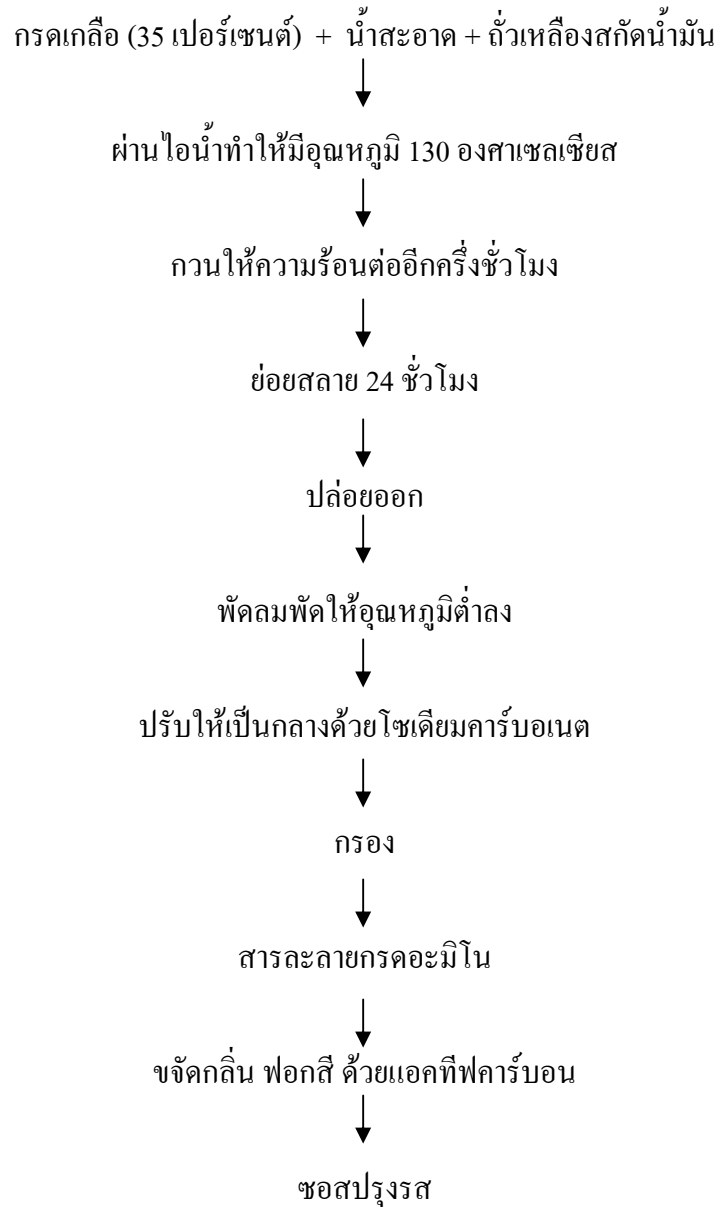
ซีอิ๊วกึ่งเคมี (Semi-Chemical soy sauce) หมายถึงซีอิ๊วที่ได้จากการผลิตน้ำซอสปรุงรส ที่เกิดปัญหาขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ที่ทราบกันดีในนามของกรดลิวูลินิก (levulinic acid) หรือกรดลิวูลิก (levulic acid) ในสารละลายกรดอะมิโน และให้โทษต่อร่างกายมนุษย์ ซึ่งขั้นตอนการเกิดกรดลิวูลิก นั้นเกิดจากการนำพืชที่ให้ปริมาณโปรตีนสูงมาเป็นวัตถุดิบ เช่น แป้ง ถั่วเหลือง เมื่อแป้งเจอกรดกลูตอัมที่มีความเข้มข้นสูง และอุณหภูมิในการย่อยสลายสูงด้วย ก็จะเกิดน้ำตาลกลูโคส (glucose) และมอลโตส (maltose) (Anna and Stecchini, 1994) รวมถึงกรดลิวูลิก ที่มีโครงสร้างโมเลกุล ดังนี้



กรดลิวลิก (วิเชียร, 2534) สามารถละลายน้ำได้มีฤทธิ์เป็นกรด มีพิษในตัวเองแต่โดยปกติการหมักชีวีแบบธรรมชาติที่ใช้ถั่วเหลือง และข้าวสาลีนั้น ทำการหมักโดยย่อยสลายได้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสเท่านั้น ไม่มีกรดลิวลิกเกิดขึ้น เราจึงสามารถตรวจสอบได้ว่าชีวีชนิดใดเป็นชีวีที่หมักตามธรรมชาติหรือชีวีเคมี (น้ำขอสปริงรอส) วิธีการแก้ไขหรือลดปริมาณกรดลิวลิก สามารถกระทำได้โดยการใช้กรดเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ ภายใต้สภาวะของอุณหภูมิที่ต่ำด้วย

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้กระบวนการหมักจะมี 3 วิธีการ แต่กระบวนการทางเคมีจะประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมากที่สุด (วรารุณี และ รุ่งนภา, 2532) ในปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำขอสปริงรสทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ได้นำเอาเทคโนโลยีต่างๆ จากต่างประเทศเข้ามาช่วยเสริมในกระบวนการผลิต ทั้งนี้เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดที่เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ เทคโนโลยีที่นำเข้ามาเช่น การใช้ถังอัดความดันแทนโอ่งดินในกระบวนการผลิต การใช้เครื่องควบคุมการผลิต (ควบคุมเวลาย่อยสลายโปรตีน ควบคุมการเติมกรดและการเติมน้ำ) แทนการใช้แรงงานคน ฯลฯ ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนการผลิตโดยย่อดังนี้

ขั้นตอนการผลิตน้ำซอสปรุงรส



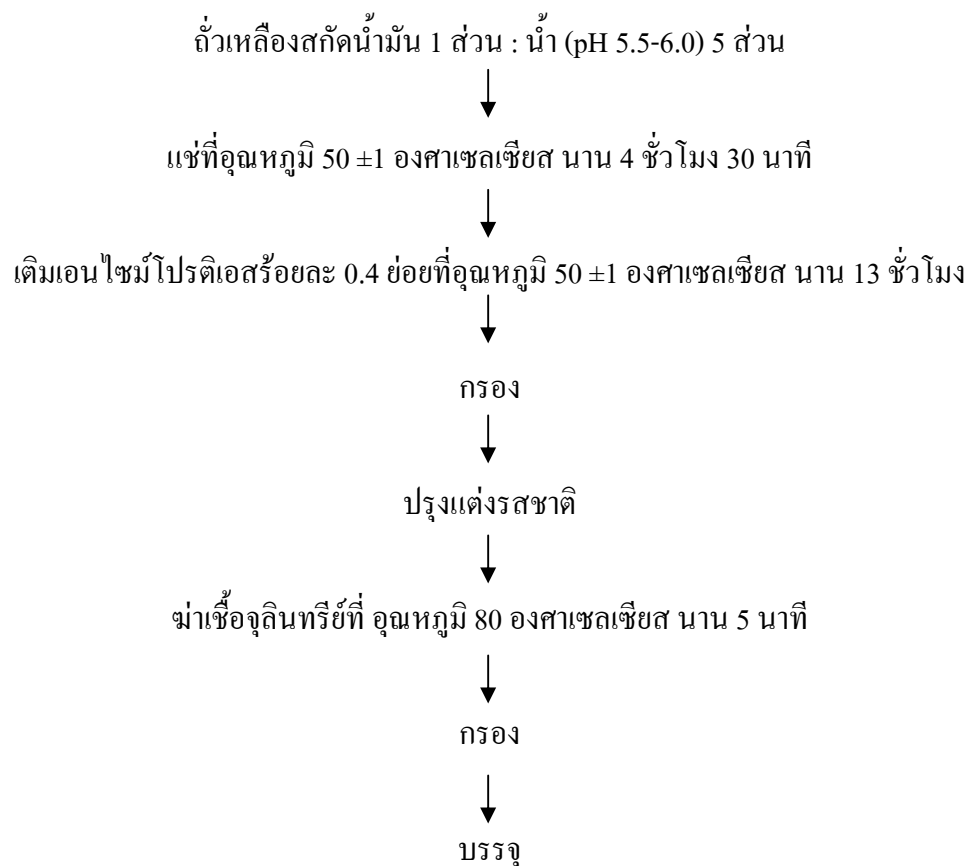
ภาพที่ 1 กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยทั่วไป

ที่มา: ศูนย์วิจัยเศรษฐศาสตร์ประยุกต์ (2540)

ด้วยกรรมวิธีการผลิตน้ำซอสปรุงรส ดังแสดงในภาพที่ 1 จำเป็นที่จะต้องควบคุมสถานะการย่อยสลายโปรตีนถั่วโดยใช้กรดเกลือที่เข้มข้นภายใต้อุณหภูมิสูง จึงส่งผลให้เกิดสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอน ซึ่งก่อให้เกิดความเป็นพิษโดยตรงต่อร่างกาย อาทิ สารพิษที่อยู่ในกลุ่มของ

chlorohydrins เช่น 3-chloro-1-propanol (CP), 1,3-dichloro-2-propanol (DCP) และสาร 3-monochloro-propanediols (3-MCPD) เป็นต้น สารพิษดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อโดยตรงหรือโดยอ้อมต่อร่างกาย (Salunkhe and Kadam, 1989; Wittmann, 1991) ดังนั้นในปัจจุบันผู้ประกอบการรวมถึงหน่วยงานต่างๆ จึงได้พยายามหาวิธีการลดปริมาณสารดังกล่าวอยู่ ซึ่งการนำเชื้อจุลินทรีย์หรือเอนไซม์เข้ามาใช้ในกระบวนการผลิต ควบคู่กับการใช้อุณหภูมิต่ำ สำหรับการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วเหลืองและปริมาณความเข้มข้นของกรดเกลือ (HCL) ที่เจือจางลง น่าจะเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถลดปริมาณสารดังกล่าวได้ไม่มากนักน้อย กรรมวิธีดังกล่าวได้แสดงให้เห็นดังภาพที่ 2

ขั้นตอนการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยใช้เอนไซม์เพื่อลดสาร 3-MCPD



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยใช้เอนไซม์เพื่อลดสาร 3-MCPD

ที่มา: คงศักดิ์ (2544)

สาร 3-MCPD คือ 3-chloro-1, 2-propanediol เป็นสารปนเปื้อนที่จัดอยู่ในกลุ่ม chloropropanols ที่พบใน hydrolysis vegetable protein (HVP) ซึ่งเป็นการผลิตโดยวิธีการเดิมที่นิยมกันในปัจจุบัน โดยการใช้เมล็ดพืชที่มีโปรตีนสูงเป็นวัตถุดิบที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted vegetable protein) ย่อยสลายสารโปรตีนด้วยกรดเกลือ (traditional hydrochloric acid hydrolysis) ซึ่งสามารถพบสารพิษหลายตัวด้วยกัน แต่ตัวที่สำคัญได้แก่ 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) และ 1,3-dichloro-2-propanol (DCP) a-dichlorohydrine

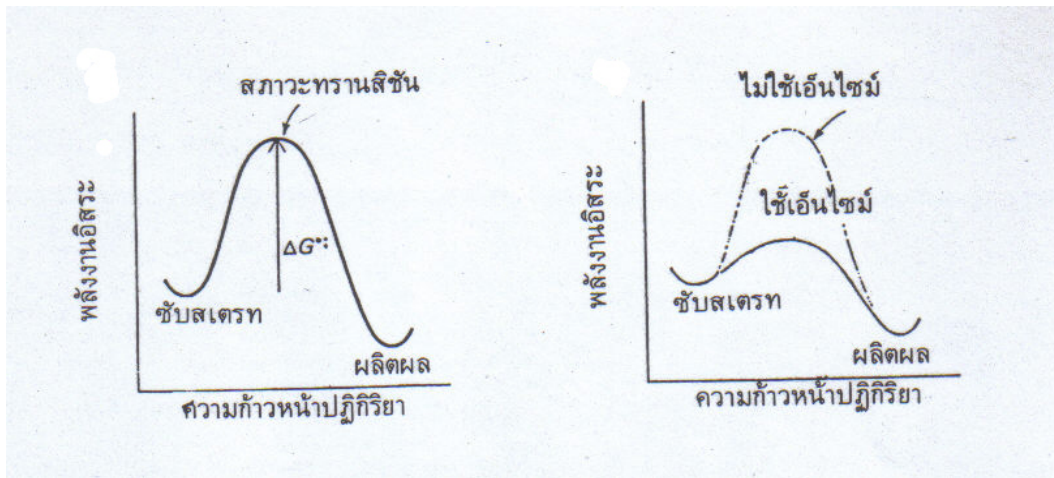
ความเป็นพิษของสาร 3-MCPD จากการศึกษาด้านพิษวิทยาในหนูทดลอง พบว่า ความเป็นพิษเฉียบพลันที่ LD_{50} มีค่า 152 mg/kg ในระยะสั้นมีพิษต่อไตของหนู ในลิงก่อให้เกิดภาวะโลหิตจาง (anaemia) ภาวะเม็ดเลือดขาวลดลง (leucopenia) และภาวะเกล็ดเลือดลดลง (thrombocytopenia) สำหรับในระยะยาวพบว่า ในหนูทดลองมีการเคลื่อนไหวกของ spermatozoa ที่ผิดปกติ ส่งผลให้เกิดการสร้างเซลล์มะเร็ง (carcinogenic effect) และทำให้เกิด renal tumor, testicular tumor ซึ่งมีผลต่อระบบการสืบพันธุ์และทำให้เป็นหมันในที่สุด ส่วนการเฝ้าสังเกตในมนุษย์ โดยการศึกษาเซลล์ในหลอดทดลอง พบว่า ลดการเคลื่อนไหวกของ human spermatozoa และส่งผลให้ metabolic activity ลดลง (วารุณี, 2543ก)

2. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์

คำว่า enzyme แปลว่า in yeast ที่นาย Friedrich Wilhelm Kuhn นำมาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1878 เพื่อใช้เรียกตัวเร่งปฏิกิริยาการหมักน้ำตาลโดยยีสต์ ต่อมาพบว่า ปฏิกิริยาเคมีของการใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นในร่างกายต้องอาศัยตัวเร่งชนิดเดียวกันนี้ ดังนั้นเอนไซม์จึงไม่ได้หมายถึงตัวเร่งที่พบในยีสต์เท่านั้น แต่รวมถึงตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีอื่นๆ ที่พบในสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย (biological catalysts) เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น (สุนันทา, 2547) ซึ่งจัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพหรือตัวเร่งอินทรีย์เพราะสังเคราะห์ขึ้นมาจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตหรือพูดอีกนัยหนึ่งว่า เอนไซม์เกิดจากสิ่งมีชีวิตเท่านั้น ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ด้วยวิธีทางเคมี เอนไซม์ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในขบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต เพราะปฏิกิริยาในระบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นเองได้ยากถ้าขาดเอนไซม์ เพราะสิ่งมีชีวิตต้องสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ให้ทันต่อความต้องการของร่างกายไม่เช่นนั้นก็ไม่สามารถดำรงชีพอยู่ได้ ดังนั้นเอนไซม์จึงต้องมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่สูงมาก

เอนไซม์ปริมาณเพียงเล็กน้อยสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เป็นล้านเท่าหรือมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เช่น การไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสด้วยเอนไซม์ invertase (sucrase) ปฏิกิริยาจะเกิดเร็วมากและไม่ต้องใช้ความร้อน แต่ถ้าใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี คือ กรดไฮโดรคลอริก ปฏิกิริยาจะเกิดช้ากว่ามากและต้องให้ความร้อนด้วยจึงเกิดผลิตภัณฑ์ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนระดับสมดุลของปฏิกิริยาได้ (chemical equilibrium) คือ ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้นก็จริง แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จะคงที่ไม่ว่าปฏิกิริยานั้นจะมีเอนไซม์หรือไม่มีก็ตาม (ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเร็วเท่านั้น) นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา เช่น เอนไซม์ invertase ที่ได้กล่าวถึงไปแล้วมีความจำเพาะต่อน้ำตาลซูโครสเท่านั้น ถ้ามีไคแซคคาไรด์อื่นๆ เช่น มัลโตสหรือแลคโตสปามา เอนไซม์จะไม่ไฮโดรไลซ์น้ำตาลสองตัวนี้ แต่กรดไฮโดรคลอริกจะสลายพันธะไกลโคซิดิกทุกพันธะและความจำเพาะของปฏิกิริยาจะมีต่อตัวซับสเตรทหรือสารตั้งต้นด้วย เช่น เอนไซม์อาจทำปฏิกิริยากับซับสเตรทเพียงชนิดเดียวหรือสารอื่นที่มีโครงสร้างใกล้เคียงสัมพันธ์กันได้

ในปี ค.ศ. 1926 นักเคมีชาวอเมริกา ชื่อ นาย James B. Sumner (เรื่องลักษณะ, 2545) สามารถสกัดเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ซึ่งไฮโดรไลซ์ยูเรียให้กลายเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาได้และแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ยูรีเอสเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง จากนั้นได้มีการทดลองค้นคว้าต่างๆ จนสรุปว่า เอนไซม์ทุกชนิดมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในเซลล์และเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อน (globular protein) (พัชรา, 2541) ดังนั้นเอนไซม์จึงสามารถโดนทำลายได้ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ คล้ายโปรตีน ในเซลล์ปกติจะมีเอนไซม์ชนิดต่างๆ ประมาณ 3,000 ชนิด การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำได้โดยลดพลังงานกระตุ้น (activated energy) ของปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งการที่สารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ได้นั้นต้องผ่านสภาวะทรานสิชัน (transition state) ที่จุดนี้พลังงานจะสูงกว่าสารตั้งต้น ดังนั้นปฏิกิริยาต้องได้รับพลังงานที่มากกว่าความแตกต่างของพลังงานระหว่างสภาวะทรานสิชันและสารตั้งต้นหรือที่เรียกว่า พลังงานกระตุ้นดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เมื่อเอนไซม์ทำให้พลังงานกระตุ้นลดลง สารตั้งต้นจึงสามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ง่ายขึ้น ปฏิกิริยาจึงเกิดเร็วขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 3



ก.

ข.

ภาพที่ 3 แสดงการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ก. พลังงานอิสระการกระตุ้นและ ข. เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานอิสระการกระตุ้น
ที่มา: สุนันทา (2547)

ในอุตสาหกรรมต่างๆ หลายประเภทมีการใช้เอนไซม์เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีหรือปฏิกิริยาอื่นที่ไม่สามารถใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีได้ เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีกว่าของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยามากกว่าและไม่เป็นอันตรายเพราะเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิและความดันที่สูง (พัชรา, 2541) การทำงานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้องอาศัยความละเอียดอย่างมากเพราะตัวแปรที่เกี่ยวข้องมักเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเอนไซม์และโครงสร้างของเอนไซม์เองซึ่งมีโปรตีนเป็นสารองค์ประกอบ เอนไซม์มีมากมายหลายพันชนิด เอนไซม์ชนิดเดียวกันอาจผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ประเภทแล้วแต่กรรมวิธีในการผลิต

2.1 ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ คือ ความสามารถในการเลือกเกิดปฏิกิริยาและเลือกทำการเร่งปฏิกิริยากับซับสเตรตต่างๆ โดยความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับ (สุนันทา, 2547)

2.1.1 โครงสร้างของโมเลกุลซับสเตรท (สารตั้งต้น) โดยโครงสร้างของซับสเตรทประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่จะไปจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ (binding group) และพันธะที่เกิดการเปลี่ยนแปลง (susceptible bond) จากการกระทำของเอนไซม์

2.1.2 โครงสร้างของเอนไซม์ (conformation) เอนไซม์แต่ละชนิดมีโครงสร้างเฉพาะตัวและเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเหมือนกันทุกครั้งก่อนเข้าไปทำการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ต้องไม่ใช่สายโปรตีนที่ยาวเหยียดเป็นเส้นตรงแต่ต้องมีการคดงอที่จำเพาะ (specific folding) เพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมในการรวมตัวกับซับสเตรท ซึ่งทุกครั้งที่มีการเร่งปฏิกิริยาต้องเกิดการคดงอให้มีโครงสร้างแบบเดิมนี้ทุกครั้ง จึงสามารถทำการเร่งปฏิกิริยาได้

2.1.3 ลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site, substrate site หรือ catalytic site) เป็นตำแหน่งบนโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นแอ่งเล็กๆ ให้โมเลกุลซับสเตรทเข้าไปจับ ซึ่งจะเกิดแรงยึดเหนี่ยวอย่างอ่อนระหว่างเอนไซม์และซับสเตรท เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก เป็นต้น บริเวณเร่งเป็นบริเวณที่มีการรวมกันของหมู่ R ของกรดอะมิโนซึ่งอยู่ในเปปไทด์สายเดียวกันหรือต่างสายก็ได้ ทำให้หมู่ R มาอยู่ใกล้กัน เอนไซม์จึงมีการคดงออย่างจำเพาะเพื่อมีโครงสร้างพร้อมเร่งปฏิกิริยาได้ ซึ่งซับสเตรทจะเข้าไปทำปฏิกิริยาที่บริเวณนี้

2.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme assay)

การหากิจกรรมของเอนไซม์เป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ เพราะเอนไซม์ปริมาณหนึ่งๆ ประกอบด้วยเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้และไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ (สุนันทา, 2544)

การหากิจกรรมของเอนไซม์มักทำการหาหลังขั้นตอนการแยกและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ การหาค่ากิจกรรมนั้นใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทและโคแฟกเตอร์ค่อนข้างสูง เพื่อให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์เพียงอย่างเดียว โดยวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพราะมีความถูกต้องแม่นยำกว่าการติดตามซับสเตรทที่หายไปและจะวัดสะดวกยิ่งขึ้นถ้า

ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารมีสีหรือสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น UV ได้ โดยใช้เครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

การหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ควรบ่งบอกถึงความเข้มข้นของสารตลอดจนสถานะที่ใช้ในการทดลองไว้ให้ชัดเจน คือ บอกความเข้มข้นของซับสเตรต เอนไซม์ โคแฟกเตอร์ อุณหภูมิ ค่าพีเอช หรือค่าต่างๆที่จำเป็นให้ละเอียด และมีค่าที่ต้องรู้ नियาม ดังนี้

เอนไซม์ 1 ยูนิต (one international unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่กำหนด

Specific activity มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีนหรือไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน โดยค่า specific activity ที่สูงขึ้นหมายความว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

Yield (percent) เป็นการคิดเทียบความบริสุทธิ์ของขั้นตอนหนึ่งๆ กับขั้นตอนแรก
คิดจาก

$$\frac{\text{ปริมาณยูนิตทั้งหมดของขั้นตอนนั้น}}{\text{ปริมาณยูนิตทั้งหมดของขั้นตอนแรก}} \times 100$$

เอนไซม์ยังมีความบริสุทธิ์มากเท่าใด นั่นคือ yield ที่ได้ยิ่งลดน้อยลง เพราะต้องผ่านกระบวนการอื่นๆ ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

3. เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของสารจำพวกโปรตีน จึงมักถูกเรียกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน (นิลวรรณ, 2548) โดยย่อยให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กๆ เอนไซม์หลายชนิดจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสและสามารถแบ่งประเภทออกเป็นประเภทย่อยๆ ได้อีก โดยเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งใช้ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในซับสเตรตที่มีโครงสร้างซับซ้อนต่างๆ เอนไซม์โปรติเอสต่างชนิดกันชอบย่อยพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งที่ต่างกัน

เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ พืชที่นำมาสกัดเอนไซม์โปรติเอส เช่น ต้นมะละกอ (*carica papaya*) ต้นสับปะรด (*anana sativa* pineapple) ต้น figs (*ficus carica*, *ficus glabrata*) ต้น artichokes (*cynera cardunculus*) และถั่วเหลือง (*soya hispida*) ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืชนั้นมีหมู่ซัลไฟด์ (sulfhydryl) ตรงบริเวณเร่งเป็นสมบัติเฉพาะ เอนไซม์ที่ผลิตจากพืช เช่น papain, chymopapain, bromelain, ficin หรือสามารถสกัดเอนไซม์โปรติเอสได้จากสัตว์จำพวกเลี้ยงลูกด้วยนม เช่น รกสัตว์ (animal pancreas) เอนไซม์ที่ผลิตได้จากสัตว์ส่วนมากในตอนแรกจะอยู่ในรูปที่ไม่เร่งปฏิกิริยา (proenzyme) จนกว่าอยู่ในสถานะที่ทำให้เอนไซม์เริ่มทำงาน เช่น ได้รับความชื้นจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร คือ เปปไซม์จะเริ่มต่ำลง ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูป active ซึ่งสามารถทำงานได้ที่พีเอชต่ำๆ เรียกเอนไซม์ประเภทนี้ว่า endoprotease เช่น pepsin, chymosin, trypsin เป็นต้น การใช้งานเอนไซม์โปรติเอส เช่น ทำเนื้อให้อ่อน การผลิตอาหาร เบียร์ เบเกอรี่ หรืออุตสาหกรรมที่ย่อยโปรตีน ฟอกหนัง หรือยารักษาโรค (เป็นตัวช่วยเตรียมการย่อย) (Anwar and Saleemuddin, 1998) แต่การสกัดเอนไซม์จากพืชและสัตว์ยังมีข้อจำกัดเรื่องคุณภาพและปริมาณ (อรพิน, 2523)

นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสยังสามารถผลิตได้จากพวกจุลินทรีย์ต่างๆ แต่มีแค่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ผลิตในเชิงอุตสาหกรรมได้ เพราะให้ผลได้ (yield) จากการผลิตที่สูงและเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จะออกมาอยู่นอกเซลล์ ทำให้สามารถสกัดแยกได้ง่าย ไม่ได้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตแล้วอยู่ในเซลล์จึงไม่ต้องทำการแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้มาจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตได้ เช่น แบคทีเรีย (*B.licheniformis*) รา (*A.candidus*, *A.flavor*, *A.oryzae*, *A.niger*) หรือพวกยีสต์ เป็นต้น

4. เอนไซม์ตรึงรูป

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

วิวัฒนาการของการศึกษาวิจัยด้านการเตรียมและการนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้เกิดขึ้น
 อย่างเป็นลำดับ แม้ว่าในปัจจุบันเราจะยังไม่สามารถหาสูตรสำเร็จที่ระบุให้ชัดเจนว่าเอนไซม์ชนิด
 หนึ่งจะตรึงรูปด้วยวิธีใดก็ตาม แต่ก็มีหลักฐานและผลงานวิจัยพอที่จะชี้ให้เห็นได้ว่าควรใช้วิธีใด ส่วน
 ประสิทธิภาพและความเหมาะสมของการใช้งานก็เป็นกรณีๆ ไป อย่างไรก็ตาม วิวัฒนาการเรื่อง
 การศึกษาเอนไซม์ตรึงรูป เกิดขึ้นเป็นลำดับจนปัจจุบันนี้ก็ด้วยเหตุผลที่สืบเนื่องมาจากการใช้
 เอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดบางประการดังนี้

4.1 ข้อจำกัดของเอนไซม์อิสระ

4.1.1 เอนไซม์อิสระไม่เสถียร

4.1.2 เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)

4.1.3 เอนไซม์อิสระใน *in vitro* ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้

4.1.4 เอนไซม์อิสระถ้าจะให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

4.1.5 เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในสารละลายของซับสเตรทและผลผลิตทำให้
 แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะปนเปื้อนในลักษณะ *proteineous contaminants*
 โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พิเศษของโปรตีนชนิดนั้น แยก
 ออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง

4.1.6 เอนไซม์อิสระ ส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ใน
 ลักษณะ *solid catalyst* ไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆ เช่น *fluidized*
bed และ *packed bed* ในระบบต่อเนื่อง (*continuous*) ได้ อาจจะใช้ได้กับ *sitred tank* และ
ultrafiltration membrane ได้ (กรณีของ *ultrafiltration membrane* จัดเป็นรูปหนึ่งของเอนไซม์ตรึง
 รูป

4.1.7 เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

4.1.8 เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้งาน ต้องผ่านกระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์ก่อน

4.1.9 เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูด หายใจ การสัมผัสใน ปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระที่กล่าวมาข้างต้น จึงเป็นทางออกที่นำไปสู่การ แก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ ด้วยวิธีการต่างๆ และแก้ปัญหาไปตาม ลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่ถูกตรึงที่ได้ ถ้าหากแก้ไขได้หมดก็นับว่าได้ประสบผลสำเร็จยิ่ง อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปก็อาจมีบ้าง ได้แก่ กิจกรรม เอนไซม์อาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพุงมีผลให้โครง รูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไปและอาจมีผลต่อหมู่ที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วยมีปัญหา กับซับสเตรท ที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือมีลักษณะแขวนลอย (suspension) ด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) และชนิดของตัวพุงอาจจะมีผลกระทบต่อผลผลิต เช่น ปนเปื้อนหรือทำปฏิกิริยา กับผลผลิต

4.2 ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

4.2.1 มีโอกาสเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม

4.2.2 ใช้ระบบ multi-enzymes ในลักษณะ in vitro ได้

4.2.3 ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่องได้

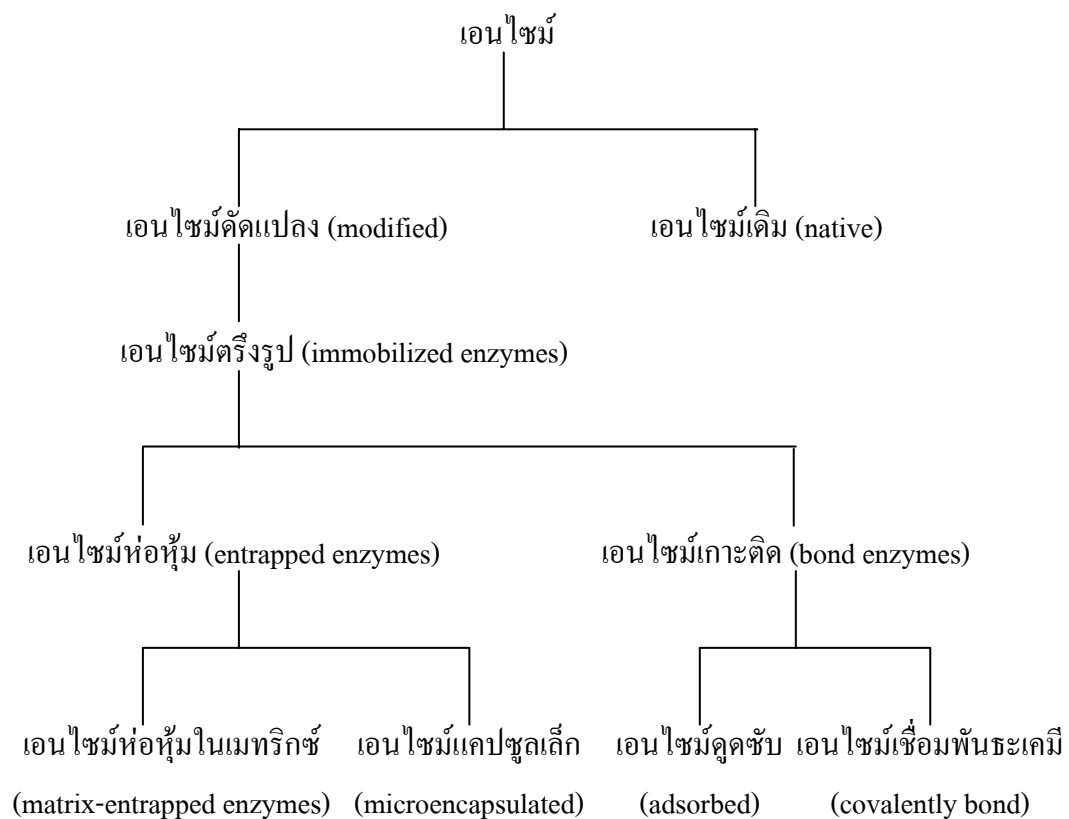
4.2.4 ใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์เดิมได้ ทั้งนี้ ขึ้นกับชนิดตัวพุงและวิธีการตรึงรูป

4.2.5 ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพุง และลักษณะซับสเตรท

4.2.6 เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดี เหมือน
เอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป

4.3 ชนิดหรือรูปของเอนไซม์

เอนไซม์โดยทั่วไปมี 2 รูป คือ เอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิม (native enzymes) และ
เอนไซม์ดัดแปลง (modified enzymes) (ปราณี, 2547) ในกรณีของเอนไซม์ดัดแปลงสามารถทำได้
หลายวิธี การทำเอนไซม์ที่ถูกตรึง ก็จัดเป็นวิธีหนึ่งของเอนไซม์ดัดแปลง ซึ่งสามารถสรุปเป็นแผน
ภาพรวมได้ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 รูปของเอนไซม์

ที่มา: ปราณี (2547)

4.4 วิธีการตรึงเอนไซม์

การศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปเป็นทางออกของการนำเอนไซม์สู่อุตสาหกรรม แม้ว่าบางครั้งจะพบว่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์อิสระ แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาข้อได้เปรียบด้านอื่นๆ เช่น เสถียรภาพของการใช้งาน สภาวะการทำปฏิกิริยา เป็นต้น พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีสมบัติดังกล่าวสูงกว่าเอนไซม์อิสระ (ผ่องผกา, 2537) ฉะนั้นการจะพิจารณาข้อได้เปรียบเสียเปรียบใดสำคัญจึงขึ้นอยู่กับลักษณะอุตสาหกรรมนั้นหรือมิฉะนั้นต้องทดลองศึกษาหาวิธีการตรึงรูปจนกว่าจะพบความเหมาะสมระหว่างเอนไซม์และอุตสาหกรรมนั้นๆ ดังได้รวบรวมสรุปลักษณะสำคัญของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ในแต่ละวิธี ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีการตรึงรูปและสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป

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

ที่มา: ปราณี (2547)

4.4.1 การเชื่อมขวาง (Crosslinking method)

การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเหมือนกับการสร้างพันธะโควาเลนต์ แต่ไม่ต้องใช้ตัวพุงที่เป็นของแข็ง เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ได้โดยการสร้างพันธะ

เชื่อมไขว้ภายในและระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์จับกันเป็นก้อนสามมิติ ซึ่งทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำ สารเชื่อมไขว้ที่ใช้จะมีกลุ่มฟังก์ชันตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ซึ่งสารเชื่อมไขว้นี้จะจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ สารเชื่อมไขว้ ได้แก่ อะลิฟาติกไดเอมีน (aliphatic diamines) ไดเมทิลอะดิพิเมท (dimethyladipimate) ไดเมทิลซึบเอร์มิเอท (dimethyl suberimidate) และกลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งสารนี้เป็นตัวที่นิยมใช้มากที่สุด ปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเชื่อมไขว้ที่ใช้ โดยสารเหล่านี้จะมีหมู่ต่างๆ ที่ใช้จับโมเลกุลของเอนไซม์ คือ สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่คาร์บอนิล จับกับ แอล-ไลซีนของเอนไซม์ (เกิดการจับแบบ Schiff's base) สารเชื่อมไขว้ที่มีโคอะโซ จับกับแอล-ไลซีน แอล-ฮิสติดีน แอล-ไทโรซีน แอล-อาร์จินีน หรือ แอล-ซิสเทอีน (เกิดการจับกันด้วยพันธะโคอะโซ) สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล จับกับ primary amino group (เกิดการจับกันด้วยพันธะเปปไทด์) สารเชื่อมไขว้ที่มีหมู่อัลคิลไฮดรอกไซด์จับกับหมู่นิวคลีโอไฟล์ (เกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน) และหมู่ไฮดรอกซีอะซิเตต จับกับ แอล-ซิสเทอีน (เกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน) การเชื่อมไขว้ระหว่างเอนไซม์กับกลูตาอัลดีไฮด์นั้นมีความเสถียรมากและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ ถึงแม้ว่าอุณหภูมิและพีเอชเปลี่ยนแปลงไปมากก็ตาม เนื่องจากเกิดการจับกันแบบ Schiff's base เกิดพันธะ aldimine ซึ่งมีความแข็งแรงมาก นอกจากนั้นการเชื่อมไขว้ยังเกิดจากปฏิกิริยาหมู่อะมิโนของเอนไซม์ จับตรงพันธะ ethylenic double bond ของ α,β -unsaturated oligomers ของ กลูตาอัลดีไฮด์

สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้เอนไซม์ที่ถูกเชื่อมไขว้และไม่ละลายน้ำ โดยที่ไม่สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติขององค์ประกอบต่างๆ คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารเชื่อมไขว้ พีเอช ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย (ionic strength) อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เมื่อเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำลงในสารละลายของสารเชื่อมไขว้ ในระยะแรกจะได้โพลิเมอร์ที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์มากขึ้นจะเกิดพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและไม่ละลายน้ำ ความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมในการตรึงอยู่ในช่วง 50-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตรึงเอนไซม์โดยวิธีนี้เกิดขึ้นได้เร็วมากเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอชใกล้เคียงกับจุดไอโซอิเล็กตริกของเอนไซม์นั้นๆ

ธรรมชาติของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์ให้อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ โดยที่เอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนไลซีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูงทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำได้ง่ายขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงเพิ่มขึ้น

ด้วยโดยจะเพิ่มจนถึงจุดๆ หนึ่งแล้วจะลดลง อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างกลูตาอัลดีไฮด์กับความเข้มข้นของโปรตีนมักอยู่ในช่วง 10-100 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) โดยความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จะอยู่ในช่วง 0.3 – 0.6 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้คือ สามารถใช้สารเชื่อมไขว้เพียงชนิดเดียว ตรึงภายในขั้นตอนเดียวและปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้เกิดได้ง่าย ส่วนข้อบกพร่องนั้น คือ มีความยากในการเลือกใช้สภาวะที่ใช้และความคุมปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อให้ได้ขนาดของเอนไซม์ไม่ละลายน้ำที่มีขนาดใหญ่ และเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่สูง นอกจากนั้น เมื่อนำไปใช้งาน ยังเกิดปัญหาเรื่องการไหลเนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะมีลักษณะเป็นเจล

4.4.2 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (Physical-adsorption method)

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ พันธะที่ใช้จะเป็นพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงวานเดอร์วาลส์ (vanderwaals force) และไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน (hydrophobic interaction) ซึ่งยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับผิวของตัวพุงที่เป็นของแข็ง การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพุงที่ใช้ตรึงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทิ้งไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกด้วยวิธีการเหวี่ยงหรือการกรอง

ความสามารถในการดูดซับเอนไซม์บนตัวพุงขึ้นอยู่กับ พีเอช ธรรมชาติของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์กับพาหะและอุณหภูมิที่ใช้ นอกจากนี้ยังต้องอาศัยธรรมชาติของเอนไซม์และตัวพุง เช่น พื้นที่ผิวของตัวพุง อัตราส่วนของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกจับบนตัวพุงและกิจกรรมของเอนไซม์หลังถูกจับ การควบคุมสภาวะต่างๆ เหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการตรึงเอนไซม์ได้ดี และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงยังคงมีอยู่สูง ปัจจัยหลักที่มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพุง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สัมผัสกับหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวของตัวพุงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จนถึงจุดอิ่มตัวถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์อีก ก็ไม่ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงเพิ่มขึ้น

ตัวพุงที่ใช้ดูดซับ (adsorbant) ที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ ตัวพุงที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ เซลลูโลส activated carbon คอลลาเจน ถ่าน (charcoal) คอนคานาวัลลินเอ (concanavalin A)

เป็นต้น และตัวพวงที่เป็นสารอนินทรีย์ ได้แก่ DEAE-Sephadex อะลูมินา แก้ว ไฮดรอกซีลาพาไทท์ (hydroxylapatite) และซิลิกา เป็นต้น

ส่วนการจับที่อาศัยพันธะไฮโดรโฟบิก ตัวพวงที่ใช้จะมีส่วนที่ไม่มีขั้วโดยเฉพาะกลุ่มที่เป็นอะโรมาติกซึ่งกลุ่มนี้จะมีความสามารถจับกับเอนไซม์ โดยอาศัยไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอคชัน กับโปรตีนที่มีส่วนที่เหลือ (residues) คือ ทริปโตเฟน ไทโรซีนและไอโซลูซีน

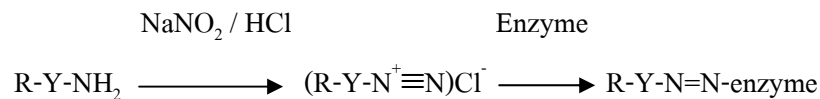
4.4.3 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent-binding method)

วิธีการผลิตเอนไซม์ตรึงรูปอีกวิธีหนึ่งและเป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากวิธีนี้มีแรงกระทำระหว่างตัวพวงที่แข็งแรงมาก ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพวงได้ยาก แต่จะมีการเตรียมที่ยุ่ยยากและราคาสูง (Chaplin and Brucke, 1990) และพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ตรึงรูปแข็งแรงขึ้น ทนต่ออุณหภูมิและพีเอชที่รุนแรงได้มากขึ้น ความมีเสถียรภาพเหล่านี้จะส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงแต่เล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเวลาผ่านไปนานๆ หรือเมื่อมีการนำกลับมาใช้ซ้ำ (Huckel *et al.*, 1996) เป็นการตรึงเอนไซม์โดยมีการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพวงด้วยพันธะโควาเลนต์ การเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ทำได้ยากกว่าวิธีอื่น ๆ เนื่องจากปฏิกิริยาค่อนข้างซับซ้อนและรุนแรง การจับกันนี้อาศัยโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีนที่มีต่อตัวพวง สิ่งสำคัญในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ คือ กรดอะมิโนที่มีผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ต้องไม่เกี่ยวข้องกับการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์กับตัวพวง ซึ่งควบคุมได้ยากและโดยทั่วไปเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตรึง แต่ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ตัวยับยั้งแบบแข่งขันหรือซับสเตรทเข้าไปจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณเร่ง ทำให้ป้องกันบริเวณนี้จากการเกิดพันธะกับตัวพวง ตัวพวงชนิดนี้จะมีกลุ่มฟังก์ชันจำนวนมาก ทำให้สามารถตรึงเอนไซม์ด้วยปฏิกิริยาหลายชนิด ปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์โดยวิธีโควาเลนต์ คือ กลุ่มฟังก์ชันของโปรตีนที่เหมาะสมต่อการสร้างพันธะโควาเลนต์ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดจากการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพวงและตัวพวงที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่เหมาะสมต่อการจับกับเอนไซม์

การเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ คือการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพวงด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้มีผู้นามาศึกษามากที่สุด การตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถทำได้ 7 วิธีย่อยๆ ดังนี้ (ปราณี, 2547)

ก. วิธีไดอะโซ (Diazo method)

วิธีไดอะโซ คือ การสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์และตัวพยุงที่มีอนุพันธ์ไดอะโซเนียม ($-N^+=N$) เรียกกระบวนการนี้ว่า ไดอะโซไทเซชัน (diazotization) เช่น ตัวพยุงที่มี aromatic amino group ($R-Y-NH_2$) ดังปฏิกิริยา

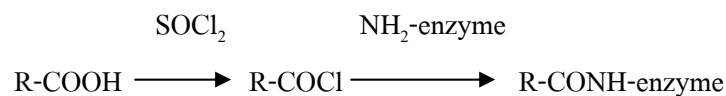


เอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์โดยวิธีนี้ได้แก่ เอนไซม์ที่มีหมู่อะมิโนอิสระมีหมู่ฮิสทิดีนหรือหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซิล

ข. วิธีการเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide binding method)

วิธีการเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์ คือ การเชื่อมระหว่างโมเลกุลเอนไซม์และตัวพยุงด้วยพันธะเปปไทด์สังเคราะห์ ($-CO-NH-$) ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ

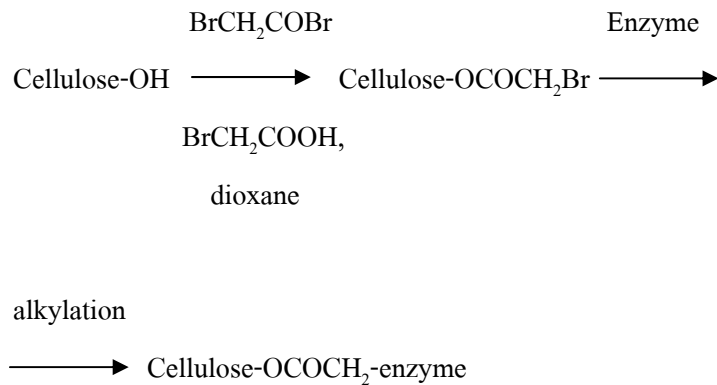
1) ตัวพยุงมีหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) และหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ถูกทำให้เป็นอนุพันธ์ที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อนุพันธ์ของ acid azide, คลอไรด์ ไอโซไซยานาต เป็นต้น แล้วเชื่อมกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ตัวพยุงถูกทำให้เป็นอนุพันธ์คลอไรด์ ดังนี้



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

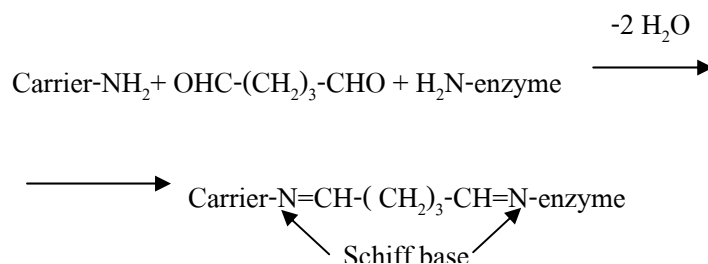
ค. วิธีการเติมหมู่แอลคิล (Alkylation method)

วิธีการเติมหมู่แอลคิล คือการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่อะมิโน ฟีนอลิก หรือซัลไฟดริล ของเอนไซม์กับหมู่เฮไลด์ (halide) ของตัวพยุงแบบ alkylation ดังปฏิกิริยา



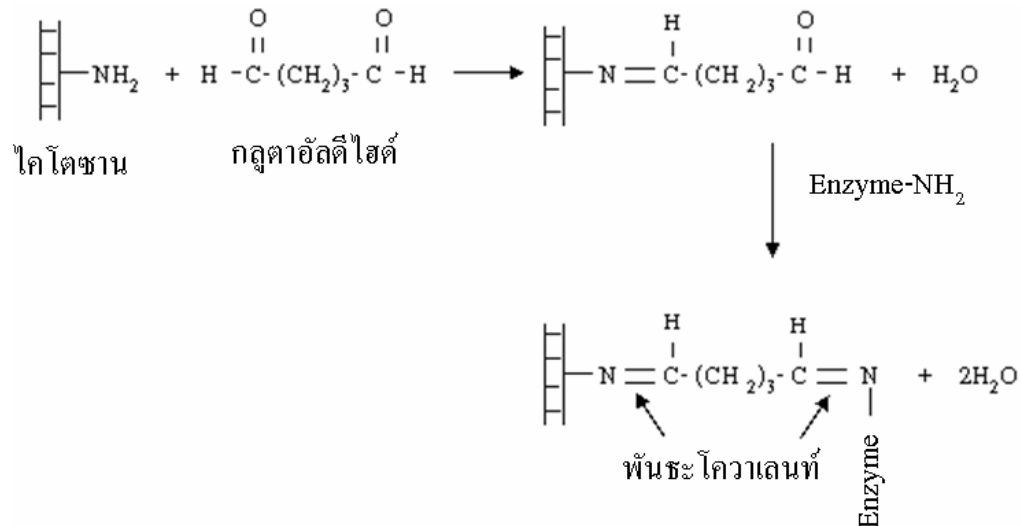
ง. วิธีการเชื่อมพันธะด้วยสารมีหน้าที่คู่ (Bifunctional reagents binding method)

การเชื่อมขวางระหว่างตัวพยุงและเอนไซม์ ด้วยสารเชื่อมขวาง (cross-linkers) ซึ่งเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของตัวพยุงกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ สารเชื่อมขวางอาจเป็นพวกสารมีหน้าที่คู่ (bifunctional reagents) หรือมีหมู่ 2 หมู่ทำหน้าที่เดียวกัน ดังปฏิกิริยา



ตัวอย่างสารมีหน้าที่คู่ที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น กลูตาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งมีหมู่อัลดีไฮด์ที่ปลายทั้ง 2 หมู่ ที่สามารถเชื่อมกับหมู่อะมิโนของตัวพยุงกับเอนไซม์ ตัวอย่างการใช้กลูตาอัลดีไฮด์ เป็นสารเชื่อมขวาง ซึ่งปลายข้างหนึ่งจะมีหน้าที่จับกับหมู่

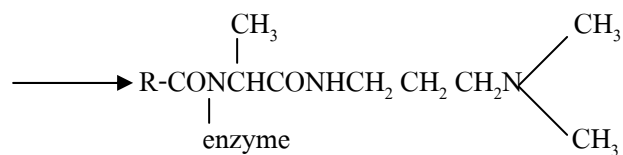
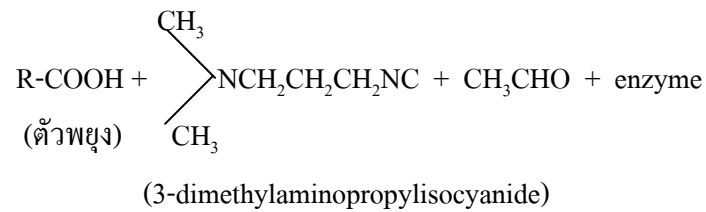
เอมีนของไคโตซานและปลายอีกข้างหนึ่งจะจับกับหมู่เอมีนของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง
ที่มา: Songjun *et al.*, (2004)

จ. วิธีการเชื่อมกับตัวพยุงด้วยปฏิกิริยาอูจิ (Ugi reaction binding method)

วิธีการเชื่อมกับตัวพยุงด้วยปฏิกิริยาอูจิ เป็นวิธีผสมของการทำให้สารประกอบในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยหมู่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น ไอโซไซยาไนด์ (isocyanide, R_4) อัลดีไฮด์ (aldehyde, R_1) คีโตน (ketone, R_2) คาร์บอกซิล (carboxyl, R_3) เอมีน (amine, R_3) ทั้งนี้ตัวพยุงและเอนไซม์ต้องมีหมู่ไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้ อย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้ เพื่อทำให้เกิด N-substituted amide ($\text{R}_4\text{-NH-CO-CR}_1\text{R}_2\text{-NR}_3\text{-CO-R}_5$) ทั้งนี้ตัวพยุงต้องเป็นตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างวิธีการเชื่อมกับตัวพยุงด้วยปฏิกิริยาอูจิ โดยที่ตัวพยุงมีหมู่คาร์บอกซิล (R-COOH) ดังปฏิกิริยา



สมการข้างต้นนี้ ตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำมีหมู่คาร์บอกซิล (R_3) ผสมรวมกับ สารละลายเอนไซม์ซึ่งมีหมู่อะมิโน (R_3 , H_2N -enzyme) จากนั้นเติมอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde (R_1 , CH_3CHO) และ 3-dimethylaminopropylisocyanide (R_4) กวนสารละลายทั้งหมดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่พีเอช 6.5 ซึ่งปรับโดยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 นอร์มอล (0.5N HCl) จะได้เอนไซม์ โครงสร้างในลักษณะ N-substituted amide

ฉ. วิธีการเชื่อมพันธะโดยการแลกเปลี่ยนหมู่ไทออลเป็นไดซัลไฟด์ (Thiol $\rightarrow$ disulfide)

วิธีการเชื่อมพันธะโดยการแลกเปลี่ยนหมู่ไทออลเป็นไดซัลไฟด์ เป็นวิธีการ โครงสร้างแบบแลกเปลี่ยนหมู่ไทออล (-SH) ของเอนไซม์และตัวพยุง ซึ่งการตรึงวิธีนี้ค่อนข้าง จำกัดกับเอนไซม์ยูริเอสเท่านั้น (มีหมู่ไทออล) แต่ปัจจุบันก็มีการศึกษากับเอนไซม์ที่ไม่มีหมู่ไทออล เช่น แอลฟา-อะไมเลส ซึ่งต้องเติมหมู่ไทออล (thiolation) ให้กับเอนไซม์ก่อน

ช. วิธีการเชื่อมพันธะกับตัวพยุงด้วยวิธีอื่นๆ

1) การใช้แป้งไดอัลดีไฮด์ (dialdehyde starch, OHC -starch- CHO) ซึ่งเป็น ตัวพยุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ 2 หมู่ สามารถใช้เป็นตัวพยุงในการจับกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์แบบ ปฏิกริยาซฟเบส ได้แก่ การตรึงรูปปาเปน

2) การใช้พอลิ (4-ฟอร์มิล-เมทอกซีฟีนอล) เมทาอะคริเลต (poly(4-formyl-methoxyphenol) methacrylate) เป็นตัวพุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ที่ไวต่อปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับ หมู่อะมิโนของเอนไซม์

3) วิธีการสร้างพันธะกัวอะนิดีน (Guanidine)

4) วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ร่วมกับโคแฟกเตอร์

4.4.4 การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม (Entrapment method)

วิธีนี้เป็นการตรึงเอนไซม์อิสระไว้ภายในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์หรือ ห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้มีสารบางตัวผ่านเข้าออกได้ (semipermeable membrane) โดยจะยอมให้มีการแพร่เข้าออกของโมเลกุลขนาดเล็กและผลิตภัณฑ์

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่การ ตรึงจะไม่มีพันธะเคมีใดๆ ระหว่างเอนไซม์และพอลิเมอร์หรือแผ่นเมมเบรนที่ล้อมรอบ ดังนั้น จึงสามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิดรวมทั้งเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ ทั้งที่มี ขนาดและคุณสมบัติแตกต่างกันก็ตาม การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้น ปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับการตรึงเอนไซม์ที่ใช้พันธะทางเคมีการ ตรึงเอนไซม์ด้วยการห่อหุ้ม สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ

ก. การห่อหุ้มภายในเจล (gel-entrapment method)

วิธีนี้เป็นการทำให้โมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปอยู่ในช่องตาข่ายของพอลิ เมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งตาข่ายพอลิเมอร์นี้เตรียมได้จาก สารเริ่มต้น (precursor) ที่เป็นโมโนเมอร์ โอลิโกเมอร์หรือพอลิเมอร์แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการละลาย ด้วยการ เปลี่ยนตัวแปรของการละลาย ซึ่งได้แก่ ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ความเข้มข้นของออสโมส และพีเอช เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการเชื่อมไขว้

การห่อหุ้มโดยใช้เจล ที่เกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นโมโนเมอร์ เป็นการตรึงเอนไซม์โดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ ที่ได้จากกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน โดยใช้อะคริลาไมด์เป็นโมโนเมอร์และสารเชื่อมไขว้ที่ใช้จับโมโนเมอร์ โดยทั่วไปจะเป็น N,N- methylene bisacrylamide (bis) ปฏิกิริยานี้เกิดได้เมื่อไม่มีออกซิเจนและใช้อุณหภูมิต่ำ (10-25 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างกระบวนการตรึง ปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันนี้จะใช้ $K_2S_2O_8$ หรือ riboflavin เป็นตัวเริ่มต้น และ β -dimethylamino propionitrile (DMAPN) หรือเป็นตัวเร่ง ข้อเสียของวิธีนี้ คือ เจลชนิดนี้ไม่มีความคงทนต่อแรงกล ทำให้โครงสร้างตาข่ายเป็ดออก ซึ่งผลให้เอนไซม์หลุดออกจากเจลได้ แต่อย่างไรก็ตาม สามารถแก้ไขข้อบกพร่องนี้ได้ โดยการทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ที่เหมาะสม

การห่อหุ้มด้วยเจลที่เกิดจากสารตั้งต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์ การเตรียมพอลิเมอร์จากสารเริ่มต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์ จะให้ผลดีกว่าการใช้โมโนเมอร์ เนื่องจาก ขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าของโมโนเมอร์ ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้อยกว่า ความร้อนที่เกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันเกิดขึ้นน้อย เนื่องจากเกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลน้อยนั่นเอง อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของสารตั้งต้นที่เป็นโอลิโกเมอร์จำเป็นต้องใช้สารที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น กลุ่มอีพอกซีคาร์บอนิลหรือไฮดรอกซิลไฮดรอกซิล ซึ่งกลุ่มเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ ดังนั้นการตรึงด้วยวิธีนี้จะมีทั้งการห่อหุ้มเอนไซม์และเกิดพันธะโควาเลนต์

การห่อหุ้มเอนไซม์ด้วยพอลิเมอร์ ที่มีโมเลกุลเป็นลูกโซ่ยาวเป็นการตรึงเอนไซม์โดยการเติมเอนไซม์ลงในพอลิเมอร์ธรรมชาติ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้คือ โปรตีน (คอลลาเจน และเจลาติน) และโพลีแซ็กคาไรด์ (อะการ์ แคลเซียมอัลจิเนต แคลปา-คาร์ราจีแนนและไคโตแซน)

ข. การห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber-entrapment)

วิธีนี้เป็นการตรึงเอนไซม์ไว้ในโพรงขนาดเล็กของเส้นใยสังเคราะห์ ซึ่งทำได้โดยละลายพอลิเมอร์ที่ใช้ทำเป็นเจล ที่นิยมใช้คือ เซลลูโลสไตรอะซีเตต (cellulose triacetate) ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ (คลอโรฟอร์ม เมทิลีนคลอไรด์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์) แล้วผสมสารละลายเอนไซม์ลงไป นำอิมัลชันที่ได้นี้ผ่านเครื่อง extruder ลงในของเหลวที่ทำให้อิมัลชันเกิดการจับตัวกันเป็นของแข็ง ซึ่งของเหลวที่ใช้ตกตะกอนนี้มักเป็น โทลูอีน หรือ ปิโตรเลียมอีเธอร์ วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ เส้นใยที่ได้สามารถทนกรดอ่อนและด่างอ่อนได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้

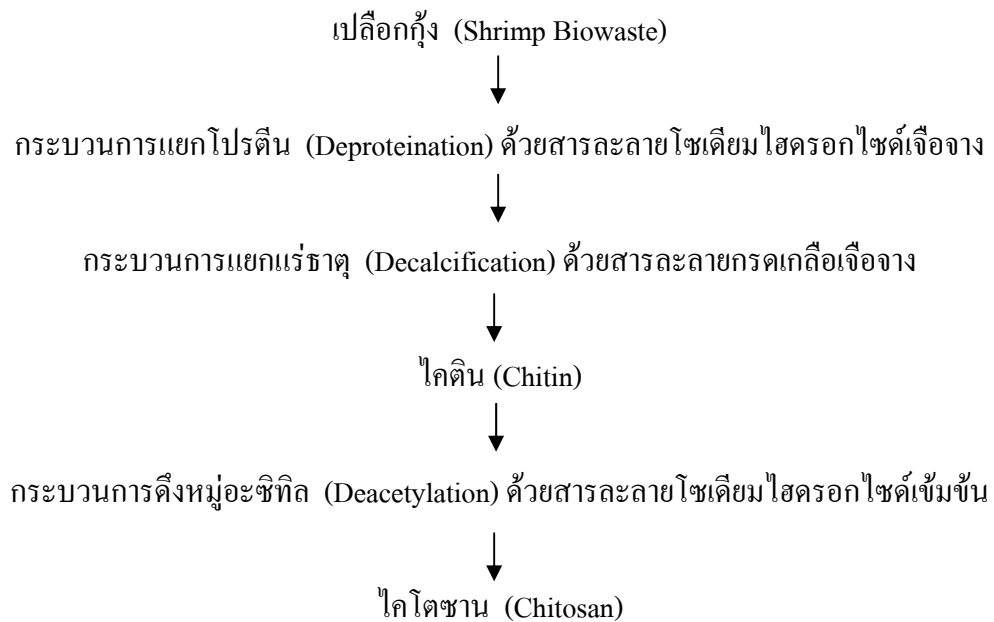
ก็มีข้อบกพร่องคือข้อเสียดรต ที่มีโมเลกุลเล็ก เท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าไปได้ เนื่องจากการตริงทำให้ เกิดการปิดกั้นการเข้าออก นอกจากนั้นเอนไซม์อาจถูกทำลายด้วยตัวทำลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัว ทำลายของพอลิเมอร์และสารที่ใช้ตักตะกอน

ค. การตริงเอนไซม์ด้วยแคปซูลขนาดเล็ก (microencapsulation)

วิธีนี้เป็นกรห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็กที่เตรียมได้จากพอลิเมอร์ ที่เป็นสารอินทรีย์ ซึ่งพอลิเมอร์นี้มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ที่สามารถปล่อยให้ข้อเสียดรตและ ผลิตภัณฑ์ผ่านได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ มีพื้นที่ผิวมากเพื่อให้ข้อเสียดรตสัมผัสกับเอนไซม์ได้และ สามารถตริงเอนไซม์ได้หลายชนิดพร้อมๆ กัน ในขั้นตอนเดียว โดยไม่จำกัดว่าเอนไซม์นั้นจะผ่าน การตริงด้วยวิธีอื่นมาก่อนหรือไม่ ข้อบกพร่องของวิธีนี้คือ ไม่สามารถใช้สำหรับกรณีที่ใช้ ข้อเสียดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมในระหว่างกระบวนการตริงและ เอนไซม์อาจเข้าไปอยู่ในผนังของเยื่อพอลิเมอร์ได้

5. การใช้ไคโตซานเป็นตัวพองสำหรับตริงเอนไซม์

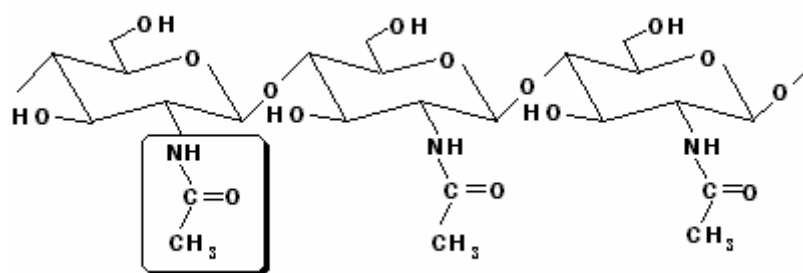
ไคโตซาน มีชื่อทางเคมีว่า Poly [β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] ซึ่งเป็น อนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่อะซิติล (acetyl) ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine (เรียกว่า deacetylation คือ เปลี่ยนน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine เป็น glucosamine) ออกตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปที่สุด ผลิตภัณฑ์ไคโตซานที่ได้จะมีคุณภาพและสมบัติแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ เทคนิคและขั้นตอนการผลิต



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการผลิตไคติน – ไคโตซาน

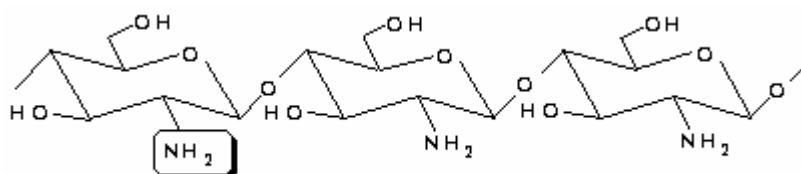
ที่มา: ประภัสสร (2548)

ไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ธรรมชาติ ที่มีมากที่สุดในโลก รองจากเซลลูโลส (cellulose) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส ที่มีธาตุไนโตรเจนเกาะอยู่ภายในโมเลกุลและมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน โครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซานแสดงดังภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

ที่มา: ประภัสสร (2548)



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา: ประภัสสร (2548)

ไคโตซานสามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิด ได้แก่ สารละลายอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดไพรูวิก กรดมาลิก กรดทาร์ทริกและกรดซิตริก นอกจากนี้สามารถละลายในกรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริกเจือจางและกรดเปอร์คลอริก ละลายได้น้อยในกรดฟอสฟอริก แต่ไม่ละลายในกรดซัลฟูริก ปกติแล้วไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ในสายพอลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่ acetyl (เปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation) นี้มีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายไคโตซาน ซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีสายยาวและสารละลายที่มีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นต้น ดังนั้นการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation และน้ำหนักโมเลกุล

ไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพที่มีความหลากหลายและมีสมบัติที่โดดเด่น อาทิ มีคุณสมบัติในการดูดซับและจับตรึงที่ดี (Pereira *et al.*, 2003) สามารถทนอุณหภูมิได้สูงโดยมีค่า Tg (glass transition temperature) ประมาณ 154 องศาเซลเซียส (Seshadri *et al.*, 2005) มีความเป็นประจุบวกสูง สามารถทำเป็นแผ่นฟิล์ม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่มีพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้น ไคติน-ไคโตซานจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์และอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างมากมาย อาทิเช่น ด้านอาหาร ไคโตซานมีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด และ ด้านการแพทย์ มีการวิจัยนำแผ่นไคโตซานมาใช้ปิดแผล ช่วยทำให้ไม่เป็นแผลเป็น โดยไคโตซานช่วยลดการ contraction ของ fibroblast ทำให้แผลเรียบ กระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมบาดแผลให้หายเร็วขึ้น เป็นต้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Adinarayana *et al.* (2003) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* PE-11 โดยวิธีการห่อหุ้มในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) เพื่อศึกษาผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต ชนิดของสารละลายที่ทำให้เกิดเป็นเม็ด แคลเซียมอัลจิเนต ความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้เกิดเป็นเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดเป็นเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต โดยวิธีการตรึงรูปแบบห่อหุ้มนี้ทำได้โดย นำสารละลายแคลเซียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์) ใส่ในหลอดเข็มฉีดยาที่มีหัวเข็มขนาดต่างๆ กันและหยดลงในสารละลายต่างๆ กัน (BaCl_2 SrCl_2 และ CaCl_2) และจะเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายที่ทำให้เกิดเป็นเม็ด (0.01 0.125 0.25 0.375 และ 0.5 โมลาร์) จากนั้นแช่เม็ดแคลเซียมอัลจิเนตไว้ในสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเวลาที่ต่างๆ กัน (1 6 11 16 และ 21 ชั่วโมง) นำเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่ได้มาล้างด้วยน้ำ 3-4 ครั้ง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ ความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ แช่เม็ดแคลเซียมอัลจิเนตในสารละลาย CaCl_2 เข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง และเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.24 มิลลิเมตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 9 ครั้ง

Betigeri and Neau (2002) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยวิธีการห่อหุ้มด้วย พอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ โซเดียมอัลจิเนต ไคโตซานและอะกาโรส ก่อนการตรึงได้ทดสอบความคงตัวของเม็ดพอลิเมอร์ที่พื้เอชที่ใช้ในการตรึง คือ พื้เอช 7.2 สำหรับโซเดียมอัลจิเนตและไคโตซาน สำหรับอะกาโรสทดสอบที่พื้เอช 7.4 พบว่าอะกาโรสไม่มีความคงตัวที่พื้เอชที่ทดสอบ ดังนั้นจึงทำการตรึงไลเปสด้วยโซเดียมอัลจิเนตและไคโตซาน พบว่าที่สภาวะการตรึงคือ ใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 240 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ส่วนไลเปสที่ถูกห่อหุ้มด้วยไคโตซาน จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 42 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ห่อหุ้มด้วยไคโตซาน มีค่าสูงกว่าการตรึงด้วยโซเดียมอัลจิเนต นอกจากนี้ขนาดของรูพรุนที่ใหญ่ขึ้นของเม็ดไคโตซาน สามารถเพิ่มค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งขนาดรูพรุนนี้ แปรผกผันกับความเข้มข้น

ของไคโตซานที่ใช้ในการหุ้ม ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่ 2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้สูญเสียเอนไซม์ขณะทำการห่อหุ้มน้อยที่สุด และมีการหลุดร่วของเอนไซม์จากที่ห่อหุ้มต่ำที่สุด

Chang and Juang (2007) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ β -glucosidase ที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์บนไคโตซาน ในการตรึงจะใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับไคโตซาน ซึ่งพบว่าสภาวะที่ทำให้การตรึงเอนไซม์ได้มากที่สุดคือ ใช้ปริมาณเอนไซม์ 2 มิลลิตรต่อเม็ดไคโตซาน 0.05 กรัม กระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ 5 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเมื่อนำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ตรึงรูปแล้วไปวัดเสถียรภาพที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 25-75 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์มีเสถียรภาพทางความร้อนที่สูงกว่าเอนไซม์อิสระที่ทุกๆ อุณหภูมิ ในส่วนค่าพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ก็ได้ถูกทดสอบ พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์อิสระในทุกๆ ช่วงพีเอช นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์โดยเก็บเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปในอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระนาน 25 วันและ 18 วัน ตามลำดับ

Chellapandian (1997) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรติเอสบนแร่หินทรายด้วยพันธะโควาเลนต์ เปรียบเทียบผลระหว่างการใส่เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป ผลที่ได้คือ เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพที่จะทำงานในช่วงที่อุณหภูมิและพีเอชกว้างขึ้น และสามารถนำไปใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง โดยที่กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเพียงแค่ 22 เปอร์เซ็นต์

Jegan *et al.* (2005) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ปาเปนจาก *Carica papaya* โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต ที่สภาวะการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 4.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรึงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการตรึง 6 ชั่วโมง เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร จากการทดลองพบว่า เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระไปทดสอบความคงตัวของพีเอชและอุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวที่พีเอช ตั้งแต่ 5-10 และอุณหภูมิตั้งแต่ 20-90 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่เอนไซม์อิสระมีความคงตัวที่พีเอช 5-7 เท่านั้น นอกจากนั้นสามารถเก็บเอนไซม์ที่ถูกตรึงได้นาน 120 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และยัง

ทำให้ประสิทธิภาพการใช้งานซ้ำเป็นไปด้วยดีคือ มีกิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลงเพียงแค่ 33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากใช้งานไปแล้ว 6 ครั้ง

Juang *et al.* (2001) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) บนไคโตซานเพื่อนำไปดูดซับตัวถูกละลาย ทำได้โดยการนำไคโตซานซึ่งมีหมู่เอมีนอยู่แล้วมากระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง (crosslink agent) ระหว่างไคโตซานกับเอนไซม์ พบว่า ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์มีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่นำไปใช้ในการดูดซับตัวถูกละลาย กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ไม่พอดีกับจำนวนหมู่เอมีนบนไคโตซาน ทำให้มีกลูตาอัลดีไฮด์หลงเหลืออยู่ในระบบ กลูตาอัลดีไฮด์ที่หลงเหลืออยู่นี้จะทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายเอง ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการดูดซับตัวถูกละลายลดลง และที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีสถานะในการตรึง คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 377 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและใช้เวลาในการตรึง 18 ชั่วโมง จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 6 ไมโครโมลต่อนาที

Ruchi *et al.* (2006) ได้ศึกษาเสถียรภาพการตรึงเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* โดยเปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการตรึงโปรติเอสโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ กับการตรึงโปรติเอสโดยวิธีการดูดซับ สถานะการตรึงโดยวิธีการดูดซับ คือ ละลายซีไลต์ 1 กรัมในอะซิเตดบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมล ปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองแล้วล้างด้วย อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ส่วนในการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ จะใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะระหว่างไคโตซานกับโปรติเอส ทำได้โดยนำไคโตซานมากระตุ้น (activate) ด้วยสารละลายกลูตาอัลดีไฮด์ก่อนที่จะนำไปตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ให้เสถียรภาพที่สูงกว่าการตรึงด้วยวิธีการดูดซับ กล่าวคือ ในการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า

Songjun *et al.* (2004) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์เปปซิน โดยวิธีการห่อหุ้มในพอลิเมอร์ที่เตรียมโดย การทำปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันแบบดิสเพอซัน (dispersion polymerization) ระหว่างมอนอเมอร์เมทาคริเลต (methacrylate) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันคือ หมู่คาร์บอกซิลกับเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) และพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone) แล้วนำไปตรึง

เอนไซม์เปปซินด้วยวิธีการห่อหุ้มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีเสถียรภาพที่จะทำงานในช่วงอุณหภูมิและพีเอชกว้างขึ้นและยังทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น

Yi-SuOh *et al.* (2000) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* K-187 บนไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสอะซิเตตซัคซินเนต (hydroxyl propyl methyl cellulose acetate succinate) ด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้คาร์โบไดไมด์ เป็นตัวกระตุ้น เพื่อศึกษาผลของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ความคงตัวของเอนไซม์ และระยะเวลาในการเก็บรักษาเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าเอนไซม์อิสระ และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด นอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปยังสามารถเก็บได้นาน 12 วัน ในขณะที่เอนไซม์อิสระเก็บได้เพียง 8 วัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันได้รับความเอื้อเฟื้อจาก บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์จำกัด

1.2 เอนไซม์โปรติเอสทางการค้าชนิดน้ำจาก *Aspergillus oryzae* Sigma, Germany

1.3 ไคโตซานชนิดผง: fine grade, Micronized Chitosan Specification Sheet, Thailand

1.4 ตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide, NaOH Solution): Analysis grade, Merck, Germany กรดอะซิติก: Analysis grade, Carlo Erba Reagenti, Italy กลูตาอิลลิไซด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์: Analysis grade, Fluka, Switzerland โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต: Analysis grade, Aldrich, Germany โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4): Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K_2HPO_4): Analysis grade, Ajax Fine chem, Australia กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์: Analysis grade, Merck, Germany

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer): model PRIM Light & Advance, Secoman, France ใช้วัดค่าดูดกลืนแสง

2.2 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน: model FP-528, LECO, USA

2.3 เครื่องทำแห้ง (freeze dryer): รุ่น VFV 1, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.4 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM): model SXL 30, Philip, Netherland

วิธีการ

1. การตรึงเอนไซม์โปรตีนโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยไคโตซาน

ซังไคโตซาน 0.2 กรัมทำละลายในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (เตรียมโดยละลายสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 0.1 มิลลิตรในน้ำกลั่น 9.9 มิลลิตร) จากนั้นผสมสารละลายไคโตซานกับสารละลายเอนไซม์โปรตีน 0.5 มิลลิตร กวนให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดเข็มฉีดยา ที่มีหัวเข็มขนาด 22 G แล้วคั่วให้ของเหลวหยดลงในสารละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตความเข้มข้น 0.136 โมลาร์ (โดยละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต 5 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 100 มิลลิตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 75 นาที ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 (Betegeri and Neau, 2002)

2. การตรึงเอนไซม์โปรตีนบนไคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์

2.1 การเตรียมไคโตซานชนิดเม็ดและตรึงเอนไซม์

เตรียมเม็ดไคโตซานโดยใช้วิธีที่ได้อธิบายในข้อ 1 (โดยไม่เติมเอนไซม์) จากนั้นเติมกลูตาอัลดีไฮด์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิตร แล้วนำไปแช่ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 เติมสารละลายเอนไซม์โปรตีนปริมาตร 0.5 มิลลิตรและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 20 มิลลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยนำไปผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึง

ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (คุชฎี, 2549)

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง

2.2.1 ศึกษาผลของระยะเวลาในการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ต่างๆ กัน คือ 1 3 6 และ 8 ชั่วโมง หลังจากตรึงเสร็จ วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

2.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ต่างๆ กัน คือ 0 0.025 0.05 0.1 0.25 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลาในการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสม ที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 2.2.1 หลังจากตรึงเสร็จ วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

2.3 ศึกษาสภาวะการตรึงเอนไซม์

2.3.1 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์

ทำการตรึงเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.1 และเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วในข้อ 2.2.1 และ 2.2.2 มาตรึงเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับพีเอชต่างๆ กัน คือ 5 6 7 8 และ 9 (ความเข้มข้นไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์ให้คงที่ที่ 0.05 โมลาร์) และที่ระดับอุณหภูมิในการตรึงเอนไซม์ต่างๆ กัน คือ 30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส หลังจากตรึงเสร็จ วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

3. ศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM)

นำเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง (freeze dryer) จากนั้นทำการส่องดูภาพส่วนพื้นผิวและส่วนตัดขวางของเม็ดโคโคซาน หลังจากตรึงเอนไซม์ เพื่อดูการกระจายตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ (ไม่มีเอนไซม์และมีเอนไซม์) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

4. ศึกษาผลของความคงตัวของเอนไซม์ตริงรูป

4.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ตริงรูป

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

4.2 ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ตริงรูป

โดยนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ระดับพีเอชต่างๆ คือ 5 6 7 และ 8 (ความเข้มข้นไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์ให้คงที่ที่ 0.05 โมลาร์) และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

5. การใช้งานเอนไซม์ที่ถูกตรึงในการผลิตน้ำซอสปรุงรส

5.1 วิธีการผลิตน้ำซอสปรุงรส

ในการผลิตน้ำซอสปรุงรสนี้จะใช้วิธีของกงศักดิ์ (กงศักดิ์, 2544) แต่ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานแทนเอนไซม์อิสระ ซึ่งมีวิธีการดังนี้ แช่กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันปริมาณ 20 มิลลิลิตร ในน้ำ 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 4 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที เติมเอนไซม์ที่ถูกตรึงและเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 13 ชั่วโมง กรองน้ำซอสปรุงรสที่ได้ด้วยชุดกรองสุญญากาศ

5.2 การใช้ซ้ำ

ในการทดสอบการใช้งานซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูปในการผลิตน้ำซอสปรุงรสนั้น ก่อนการใช้งานในแต่ละครั้งจะล้างเอนไซม์ตรึงรูปด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 จำนวน 2 ครั้ง

6. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะใช้วิธีของมณีรัตน์ (มณีรัตน์, 2542) โดยชั่งน้ำหนักเม็ดไคโตซานที่ผ่านการตรึงเอนไซม์และนำไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ก โดยแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจะใช้วิธีของ Bradford (Bradford, 1976) โดยเก็บส่วนใสที่ได้วัดปริมาตรทั้งหมดและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีที่แสดงในงานวิจัยของชนิกานต์ (ชนิกานต์, 2550) จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (protein coupling) โดยแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำ 3 ครั้ง

ผลและวิจารณ์

ในงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาเปรียบเทียบชนิดของพันธะที่ใช้ตรึงเอนไซม์โปรติเอส เพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรสที่ให้สาร 3-MPCD ต่ำกว่าสูตรที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบัน โดยได้เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์กับวิธีการห่อหุ้มด้วยตัวพุง (ไม่มีแรงกระทำระหว่างเอนไซม์กับตัวพุง) รวมทั้งในการใช้ทำซอสปรุงรส พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากการตรึงรูปทั้ง 2 วิธีมีขนาดเม็ดประมาณ 2.68 ± 0.07 และ 2.51 ± 0.13 มิลลิเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสำหรับการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ได้ศึกษาหาความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ และผลของอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์

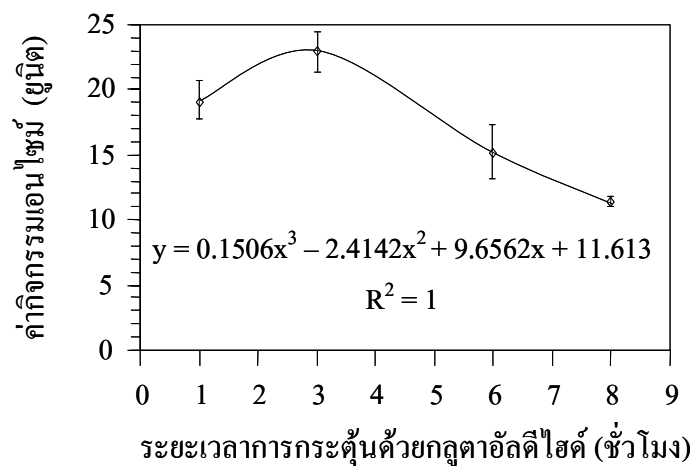
1. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์โปรติเอสบนไลโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์

1.1 ผลของสภาวะการใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง

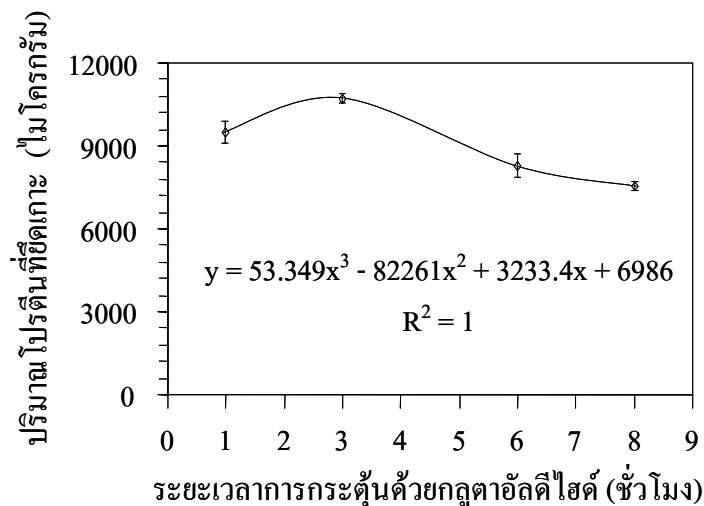
1.1.1 ผลของระยะเวลาในการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์

เมื่อตรึงเอนไซม์โปรติเอสบนไลโคซานซึ่งมีหมู่เอมีนอยู่แล้วมากระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ เพื่อให้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง (crosslink agent) ระหว่างไลโคซานกับเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ที่สภาวะความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 1 3 6 และ 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรึงเอนไซม์ที่สภาวะเดียวกันคือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากภาพที่ 9ก เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่เม็ดไลโคซานแช่ในกลูตาอัลดีไฮด์ หรือเรียกอีกอย่างว่า ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์กับค่ากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าที่เวลาในการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ต่างๆ กันมีผลต่อการตรึงเอนไซม์เช่นกัน ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเปลี่ยนระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์จาก 1 ชั่วโมง เป็น 8 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่กระตุ้น จนถึงจุดสูงสุดที่เวลาหนึ่ง จากนั้นมีค่าลดลง ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์กับเวลา พบว่าสามารถอธิบายได้ด้วยสมการโพลิโนเมียล ดีกรี 3 ซึ่งจะได้ว่าเวลาที่

ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ดีที่สุดคือ 2 ชั่วโมง 30 นาที โดยอิทธิพลของระยะเวลาที่ใช้กระตุ้นที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมนี้ มีลักษณะคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของ β -glucosidase ที่ตรง โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์บนโคโคซาน ที่ใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง โดยได้พบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆ (30-210 นาที) พบว่าที่เวลา 120 นาทีจะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด (Chang and Juang, 2007)



ก.



ข.

ภาพที่ 9 ผลของระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อ ก. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และ ข. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ โดยกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่อุณหภูมิ 30 °C สภาวะการตรึงเอนไซม์คือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 °C เส้นที่บได้จากการทำ non-linear regression

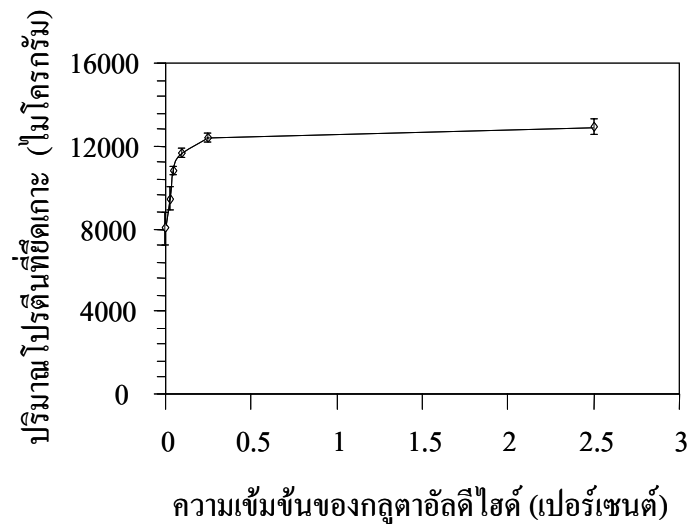
นอกจากนี้ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงของระยะเวลาการกระตุ้นที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะมีลักษณะเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างๆ (ดังภาพที่ 9ข) การเพิ่มขึ้นของค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สามารถอธิบายได้ด้วยภาพที่ 5 คือการเพิ่มระยะเวลาการกระตุ้นเป็นการเพิ่มปริมาณกลูตาอัลดีไฮด์ที่มาเกาะบนไคโตซาน ซึ่งส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ที่มาเกาะที่กลูตาอัลดีไฮด์อีกหนึ่งหมู่ทางด้านปลายมากขึ้นตามไปด้วยและมีผลทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ตรงรูปสูงขึ้น แต่ค่าทั้งสองมีค่าลดลงที่เวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เพิ่มเป็น 3 ชั่วโมงหรือมากกว่า เพราะเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นมากเกินไป ทำให้หมู่อัลดีไฮด์อีกหนึ่งหมู่ที่เหลือทางด้านปลายซึ่งไวต่อปฏิกริยานั้นมีโอกาสมากขึ้นในการจับกับหมู่เอมีนของไคโตซานได้ ดังนั้นจึงเกิดการสูญเสียหมู่อัลดีไฮด์ที่จับกับหมู่เอมีนของเอนไซม์ที่เดิมลงมาในภายหลังได้ ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะจึงลดลง รวมทั้งค่ากิจกรรมเอนไซม์ด้วย

1.1.2 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์

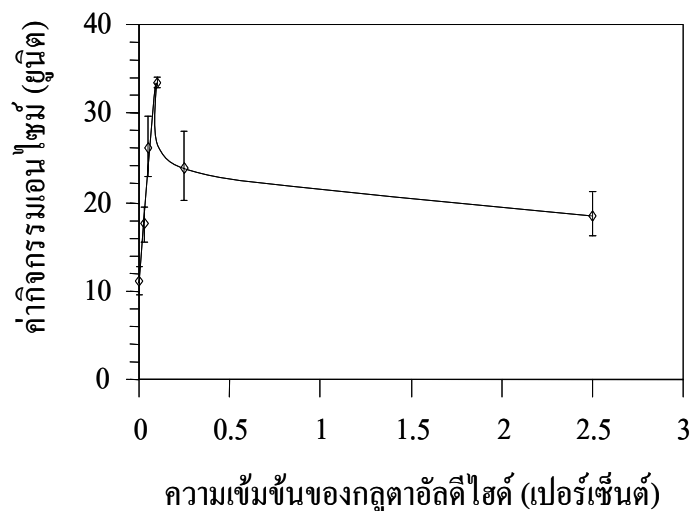
ภาพที่ 10 ได้แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะที่ความเข้มข้นต่างๆ ของกลูตาอัลดีไฮด์ (0 0.025 0.05 0.1 0.25 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยที่ความเข้มข้นเป็นศูนย์นั้นหมายถึงตรึงเอนไซม์บนเม็ดไคโตซานโดยไม่เติมกลูตาอัลดีไฮด์) สภาวะอื่นๆ ที่ใช้ในการกระตุ้นและตรึงเอนไซม์จะควบคุมให้คงที่ คือ เวลาในการกระตุ้นเป็น 2 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และตรึงเอนไซม์ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 10ก พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์จาก 0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จนถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เพื่อเข้าสู่ค่าคงที่ค่าหนึ่ง ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เป็นศูนย์นั้นหมายถึงผิวของเม็ดไคโตซานไม่มีพันธะระหว่างพอลิเมอร์นี้กับกลูตาอัลดีไฮด์ ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (8,085 ไมโครกรัม) บนเม็ดไคโตซาน จึงเป็นการตรึงรูปที่เป็นแบบดูดซับ (adsorption) เท่านั้น โดยแรงกระทำระหว่างเอนไซม์และตัวพยุงนี้แข็งแรงมากพอที่จะยึดเอนไซม์ไม่ให้หลุดไปในขั้นตอนการล้างหลังจากทำการตรึงเสร็จ อย่างไรก็ตามเมื่อตรึงเอนไซม์บนเม็ดไคโตซานที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่ำ พบว่าสามารถยึดเอนไซม์ได้มากกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแรงกระทำที่ยึดระหว่างเอนไซม์และตัวพยุงนั้นมีความแข็งแรงมากกว่า อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น

กลูตาอัลดีไฮด์เพิ่มจาก 0.25 เป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเพิ่มขึ้นน้อย ซึ่งมีสาเหตุจากผิวของเม็ดโกลโดซานนั้นเข้าใกล้จุดที่อิ่มตัวไปด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ ดังนั้นปริมาณกลูตาอัลดีไฮด์บนผิวที่ 2 สถานะนี้ใกล้เคียงกัน จึงทำให้ปริมาณโปรตีนที่เกาะได้มีค่าใกล้เคียงเช่นกัน



ก.



ข.

ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อ ก. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ และ ข. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C สถานะการตรึงเอนไซม์คือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 °C เส้นที่แสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น

ภาพที่ 10ข แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดแล้วลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์ เมื่อความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ใช้เปลี่ยนแปลงจาก 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ สูงสุดในภาพนี้คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งทางด้านซ้ายของจุดสูงสุดนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ในการตรึงมากขึ้นก็จะทำให้กลูตาอัลดีไฮด์มาติดที่โคโคซานมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ที่ยึดเกาะและค่ากิจกรรมมากขึ้นด้วย แต่เมื่อกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและสูงกว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลง ทั้งๆ ที่มีปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะสูงขึ้นเรื่อยๆ ก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการที่เมื่อมีปริมาณโปรตีน เกาะบนโคโคซานมากเกินไปจะทำให้เอนไซม์เข้าไปเกาะบนโคโคซานในสภาพที่แออัด ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ทั้งๆ ที่อาจมีปริมาณเอนไซม์เหลืออยู่ในสารละลายสูงในรูปที่เสียสภาพจึงทำให้ไม่สามารถทำงานได้ดีเท่าที่ควร นอกจากนี้เนื่องจากเอนไซม์สามารถตรึงบนโคโคซานเมื่อไม่มีกลูตาอัลดีไฮด์ (ที่ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เป็น 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในภาพที่ 10ข) ได้ ดังนั้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จึงมีค่ามากกว่าศูนย์

อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่มีต่อปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่พบในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานของ Fernando *et al.* (2005) ซึ่งได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสบนอะกาโรสด้วยพันธะโควาเลนต์โดยกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ แต่เนื่องจากสภาพที่ใช้กระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์และการตรึงเอนไซม์แตกต่างจากงานนี้ จึงพบว่าค่าความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Giovanni *et al.* (2001) ได้รายงานไว้ว่า ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการกระตุ้นเมื่อดโคโคซาน ก่อนที่จะนำไปตรึงโปรตีนเอส จากเชื้อ *Aspergillus niger* คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากงานของ Fernando *et al.* (2005) และ Giovanni *et al.* (2001) ใช้เอนไซม์ที่มาจากเชื้อเดียวกัน จึงทำให้ค่าความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เท่ากัน นอกจากนี้ ดุษฎี (2549) ที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสบนโคโคซานด้วยพันธะโควาเลนต์และใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง ได้รายงานการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปเป็นแนวโน้มเดียวกัน ความเข้มข้นกลูตาอัลดีไฮด์ที่เหมาะสมคือ 0.05 เปอร์เซ็นต์

1.2 ผลของสภาวะการตรึงเอนไซม์

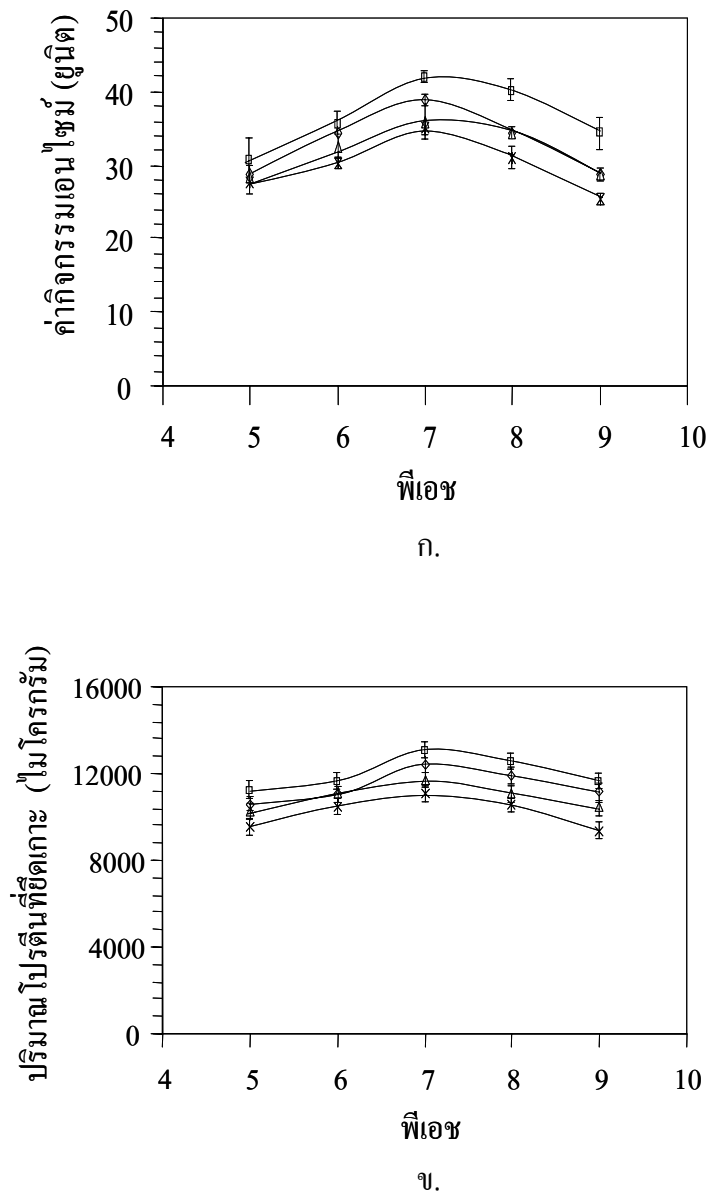
ในการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ ได้เริ่มต้นจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นตัวพวง (โคโคซาน) ด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ ซึ่งได้กล่าวข้างต้นแล้ว สิ่งที่ทำต่อไปคือการหาสภาวะอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ ดังได้กล่าวต่อไปนี้

1.2.1 ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการตรึงเอนไซม์

ในการศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อการตรึงเอนไซม์โปรตีนที่ยึดเกาะบนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ ต้องทำการกระตุ้นตัวพวงก่อนด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ โดยใช้ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์คงที่ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและระยะเวลาของการกระตุ้นคงที่ที่ 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำตัวพวงที่กระตุ้นแล้วมาตรึงเอนไซม์ ที่พีเอชต่างๆ (5 6 7 8 และ 9) และที่อุณหภูมิต่างๆ (30 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส)

การเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเมื่อใช้พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ ในการตรึงเอนไซม์แสดงดังภาพที่ 11ก และ 11ข ตามลำดับ จากภาพทั้งสองจะเห็นว่าที่พีเอชต่ำและสูงกว่า 7 ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลงเป็นเปอร์เซ็นต์สูงกว่าการลดลงของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเมื่อตรึงเอนไซม์ที่ค่าพีเอชเหล่านั้น ซึ่งสาเหตุของการลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอชต่ำหรือสูงกว่า 7 นั้นเป็นผลจากการเสถียรภาพของเอนไซม์อันเนื่องมาจากค่าพีเอชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุสุทธิ (Net charge) ซึ่งมีผลต่อรูปร่างและการทำงานของเอนไซม์ (ปราณี, 2547) เนื่องจากในการตรึงเอนไซม์นี้ บริเวณผิวของโคโคซานจะมีตัวเชื่อมขวางซึ่งสามารถจับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์และเนื่องจากพันธะนี้มีความแข็งแรงและไม่ขึ้นกับค่าพีเอชของระบบ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงที่พีเอชต่างๆ จึงควรมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะมีค่าลดลงที่พีเอชสูงและต่ำกว่า 7 ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากเอนไซม์ที่ยึดเกาะบนโคโคซานด้วยพันธะอื่นๆ ซึ่งอาจถูกทำลายได้อย่างง่ายดายที่พีเอชต่างๆ และเนื่องจากโปรตีนเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* โดยเป็นเอนไซม์ที่มีช่วงปฏิกิริยาของพีเอชที่ปานกลาง (ปราณี, 2547) ดังนั้นจึงสอดคล้องกับผลที่ได้จากภาพที่ 11ข นั่นคือค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ตรึงที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือที่พีเอช 7 นอกจากนี้ใน

งานวิจัยของ Giovanni *et al.* (2001) ยังได้รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์โปรติเอสบนอะกาโรส คือที่พีเอช 7



ภาพที่ 11 ผลของพีเอชและอุณหภูมิในการตรึงเอนไซม์ที่มีต่อ ก. ค่ากิจกรรมเอนไซม์ และ ข. ปริมาณโปรตีนที่ดูดเกาะ ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 30 (◇), 40 (□), 50 (△) และ 60 (×) °C ตามลำดับ โดยสภาวะที่ใช้กระตุ้นเม็ดโคโตซานด้วยกลูตาอัลดีไฮด์คือ ความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์เป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กระตุ้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น

จากการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมเอนไซม์ กล่าวคือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดและมีค่าลดลงที่อุณหภูมิ 30 50 และ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 11ข) เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาของการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยเป็นไปตามสมการของ Arrhenius (Srisagul, 2004) ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจึงสามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสนั้น คาดว่าเอนไซม์อาจเกิดการเสียสภาพด้วยความร้อน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานของ Ruchi *et al.* (2006) ที่ได้รายงานไว้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การตรึงเอนไซม์โปรตีนที่มาจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* คือ 40 องศาเซลเซียส เพราะเป็นอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

2. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึง (Loading efficiency)

ประสิทธิภาพการตรึงในที่นี้หมายถึงอัตราส่วนของปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะบนตัวพุง หลังจากการตรึงและการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แล้ว เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่มีในสารละลายเอนไซม์ โดยในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพดังกล่าวเมื่อตรึงเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และการห่อหุ้ม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์

วิธีการตรึงรูป	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)			ประสิทธิภาพการตรึง (เปอร์เซ็นต์)
	เริ่มต้น	ในสารละลายโซเดียมไทรโพลิฟอสเฟต	ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง	
โควาเลนต์	17,440±938	3,644±180	494±26	76.27±0.92
ห่อหุ้ม	17,440±938	9,189±238	1,153±28	40.69±1.45

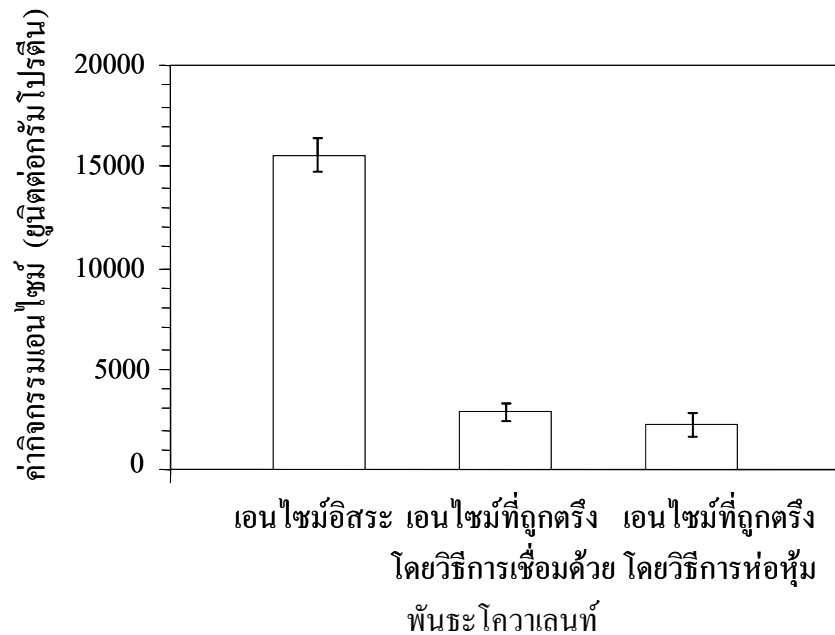
จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าค่าประสิทธิภาพการตรึงเมื่อตรึงเอนไซม์บนไลโคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มมีค่าเท่ากับ 76.27 และ 40.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหลังจากที่ทำการตรึงและล้างเมดไลโคโตซาน เอนไซม์บางส่วนเท่านั้นที่ถูกห่อหุ้มด้วยไลโคโตซาน โดยพบว่าการสูญเสียเอนไซม์เกิดขึ้นขณะทำการหยดลงไปในสารละลายโซเดียมไทรโพลิฟอสเฟตเพื่อให้เกิดเป็นเจลที่แข็งแรงและกลายเป็นเมดไลโคโตซานและขณะล้างด้วย

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Betigeri and Neau (2002) ที่ได้ห่อหุ้มไลเปสด้วยไคโตซานและพบว่าการสูญเสียเอนไซม์จะเกิดในขณะที่ไคโตซานกำลังอยู่ในระยะแรกของการเกิดเจล โดยเอนไซม์อาจหลุดและละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมไทรโพลิฟอสเฟตได้ นอกจากนี้การล้างเมล็ดเพื่อกำจัดไคโตซานที่เกาะหลวมๆ ออกไปนั้น จะนำเอนไซม์ที่ติดอยู่ที่ผิวนอกของเมล็ดออกไปด้วย

นอกจากนี้จะเห็นว่าประสิทธิภาพการตรึงเมื่อตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสบนไคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์มีค่ามากกว่าวิธีการห่อหุ้ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์แรงเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงแข็งแรงมาก เมื่อเทียบกับวิธีการตรึงรูปอื่นๆ ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพุงได้ยาก ในขณะที่วิธีการห่อหุ้มจะไม่มี การเชื่อมพันธะเคมีใดๆ ระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงเลย เอนไซม์จึงหลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย (ปราณี, 2547) ส่งผลให้ประสิทธิภาพการตรึงต่ำกว่าวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ นอกจากนี้ผลที่ได้จากการวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Mohamed *et al.* (1998) ที่พบว่าการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Bacillus mycoides* โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงสูงสุด รองลงมาคือ วิธีการห่อหุ้มและการดูดซับ

3. ผลการเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่างๆ

ภาพที่ 12 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยของยูนิตต่อกรัมโปรตีนที่อยู่ในรูปเอนไซม์อิสระและที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม จะเห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เมื่อตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์มีค่าเท่ากับ 2,898 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากวิธีการห่อหุ้มที่มีค่าเท่ากับ 2,189 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ทั้งนี้จะมาจากชั้นสเตรทสามารถแพร่เข้าไปทำปฏิกิริยากับแอคทีฟไซต์ (active sites) ของเอนไซม์ที่ตรึงบนเมล็ดไคโตซานได้อย่างง่ายดาย เมื่อเทียบกับเอนไซม์ ที่อยู่ภายในไคโตซาน โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Toshiba and Qayyum (2007) ที่ได้พบว่าการตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Aspergillus oryzae* บนแคลเซียมอัลจินต ด้วยพันธะโควาเลนต์จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจินต

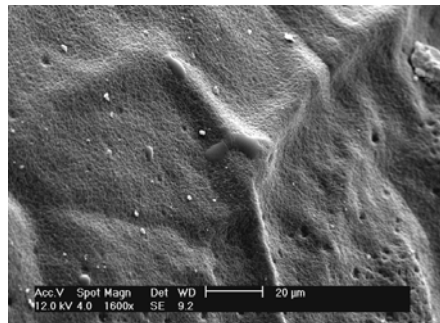


ภาพที่ 12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม

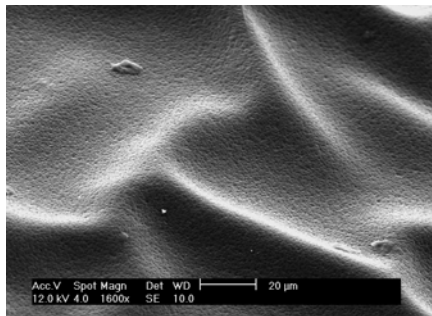
เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปจะเห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์อิสระมีค่าสูงกว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปทั้งวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ และวิธีการห่อหุ้ม โดยเอนไซม์อิสระมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 15,450 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (ภาพที่12) ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานซึ่งเป็นตัวพองที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ทำให้ในขณะที่อาจจะไปดึงน้ำออกจากเอนไซม์ มีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพ (denature) โครงสร้างสามมิติเปลี่ยนไป ซึ่งจะส่งผลต่อบริเวณเร่ง (active site) ที่ใช้ในการจับซับสเตรต ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดน้อยลง (Villeneuve *et al.*, 2000) นอกจากนี้เอนไซม์อาจจะเข้าไปเกาะบนไคโตซานในสภาพที่แออัด ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์อยู่เบียดชิดกัน ซับสเตรตไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ จึงทำให้ไม่สามารถทำงานได้ดีเท่าที่ควร โดยในงานวิจัยของ Dincer and Telefoncu (2007) ได้พบว่าในการตรึงเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus niger* ด้วยพันธะโควาเลนต์จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ต่ำกว่าของเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้ยังได้มีรายงานเดียวกันนี้ในบทความอื่นๆ ด้วย (Ruchi *et al.*, 2006)

4. ผลการศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM)

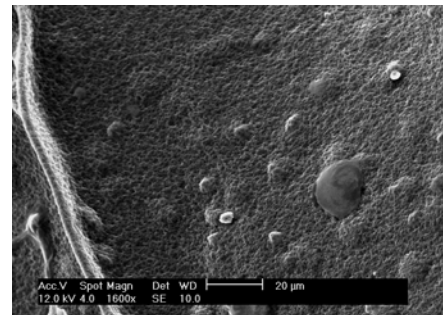
ในส่วนนี้ได้ศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์บนผิวและภายในของเม็ดโคโตซานทั้งที่ไม่มีเอนไซม์และที่มีเอนไซม์ โดยใช้เครื่องวัด SEM ภาพที่ 13 ก- ค ได้แสดงภาพบริเวณส่วนพื้นผิวของเม็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และมีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม ตามลำดับ



ก.



ข.

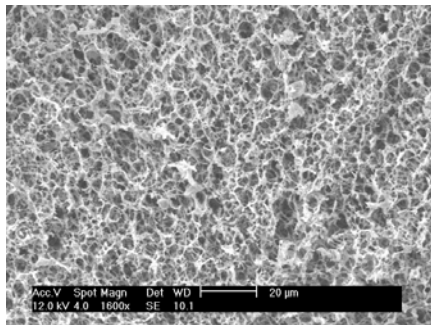


ค.

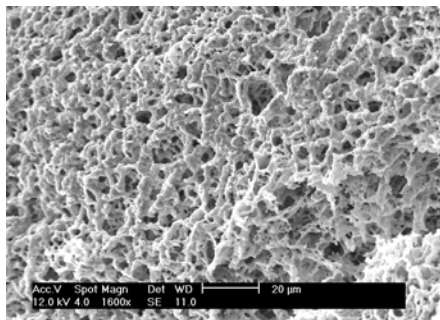
ภาพที่ 13 ภาพบริเวณส่วนพื้นผิวของเม็ดโคโตซานที่ ก. ไม่มีเอนไซม์ ข. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และ ค. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม

เม็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์อยู่บนผิว (ภาพที่ 13ก) จะเห็นว่าผิวที่เรียบ แต่มีรูพรุนใหญ่กระจาย ในขณะที่เม็ดโคโตซานที่มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ จะเห็นว่าผิวที่เรียบ เนียน (มีรูพรุนขนาดใกล้เคียงกันและกระจายอย่างสม่ำเสมอไปทั่วผิว ดูภาพที่ 13ข) เนื่องจากมีประสิทธิภาพการตรึงประมาณ 76.27 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจเป็นสาเหตุของการกระจายของ

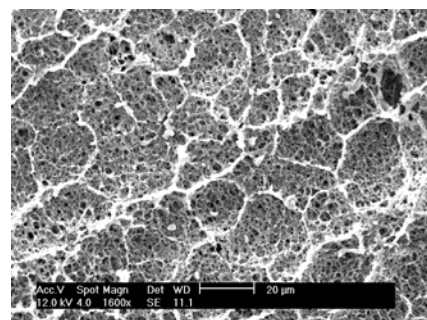
เอนไซม์ที่ไม่สม่ำเสมอ กล่าวคือยังคงเห็นรูพรุนอยู่บ้าง แต่เป็นรูพรุนที่แสดงถึงบริเวณที่ไม่มีเอนไซม์มาเกาะและเม็ดโคโคซานที่มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มนั้น จะเห็นว่ามีลักษณะผิวที่มีรูพรุนมากที่สุด (ภาพที่ 13ก) ซึ่งมีสาเหตุจากในวิธีการห่อหุ้มนั้น โคโคซานจะผสมกับเอนไซม์และอยู่ในรูปสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงได้ทำการหยดลงในสารละลายโซเดียมไตรโพลิฟอสเฟตเพื่อให้เกิดเป็นเม็ดกลมและนำไปล้าง ซึ่งเอนไซม์ที่อยู่ใกล้กับผิวภายนอกของเม็ดสามารถหลุดออกขณะตรึงและล้างได้อย่างง่ายดาย (ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 2) ดังนั้นเมื่อถ่ายภาพผิวของเม็ดโคโคซานนี้ จึงเห็นรูพรุนมากมายเกิดขึ้น แต่บางบริเวณจะมีลักษณะของผิวที่คล้ายกับผิวของเม็ดโคโคซานในภาพที่ 13ก นั่นเป็นเพราะไม่มีเอนไซม์นั่นเอง



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 14 ภาพบริเวณส่วนตัดขวางของเม็ดโคโคซานที่ ก. ไม่มีเอนไซม์ ข. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และ ค. มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม

ภาพที่ 14 ก- ค ได้แสดงภาพบริเวณส่วนตัดขวางของเม็ดโคโคซานที่ไม่มีเอนไซม์ มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และมีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม

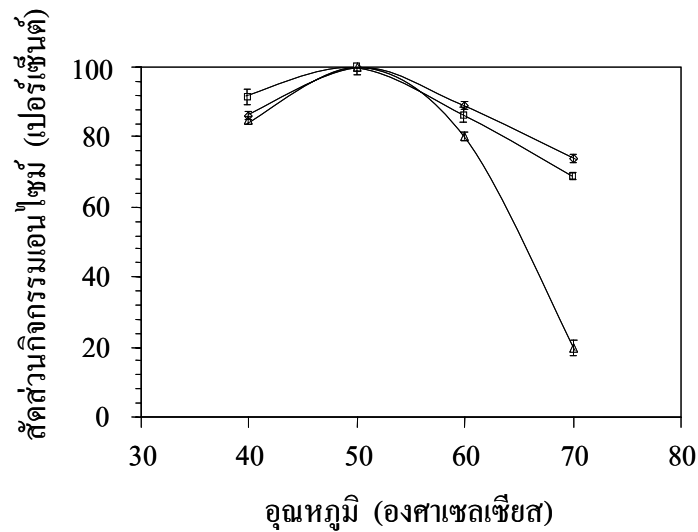
ตามลำดับ โดยเห็นว่าภาพตัดขวางของเม็ดโคโคซานที่ไม่มีเอนไซม์คล้ายคลึงกับภาพของเม็ดโคโคซานที่มีเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ บ่งบอกว่าในการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ เอนไซม์จะอยู่ที่ผิวภายนอกของเม็ดโคโคซาน อย่างไรก็ตามเนื่องจากการวางตำแหน่งของเม็ดโคโคซานขณะส่อง SEM อยู่ในลักษณะที่เอียง จึงมองเห็นขนาดของรูพรุนในภาพที่ 14ก ไม่ชัดเจนและดูเหมือนมีขนาดเล็กกว่า ในขณะที่ภาพที่ 14ข จะเห็นรูพรุนขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าและไม่มีเอนไซม์อยู่ ส่วนภาพที่ 14ค จะสังเกตเห็นขนาดรูพรุนที่เล็กลงและเห็นส่วนที่เป็นสีขาวชัดเจนซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่มีเอนไซม์ แต่การกระจายตัวของเอนไซม์ไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ภาพที่แสดงบริเวณที่มีเอนไซม์นี้คล้ายคลึงกับสิ่งที่ชนิกานต์ (2550) ได้รายงานไว้

5. ผลการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป

ในที่นี้ ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งแสดงในเทอมของสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์) มีค่าเท่ากับอัตราส่วนของค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิหรือพีเอชต่างๆ ต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด ณ พีเอชหรืออุณหภูมินั้นๆ ตามลำดับ ในกรณีของเอนไซม์อิสระนั้น สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ ได้จากข้อมูลของเอนไซม์โปรติเอส จากผู้ผลิตบมจ. อีสต์เอเชียติก (ประเทศไทย)

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป

ในการศึกษานี้ ได้เขย่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่างๆ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 โดยอุณหภูมิของสารละลายที่ใช้มีค่าต่างๆ คือ 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลาของการเขย่าคือ 15 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 15

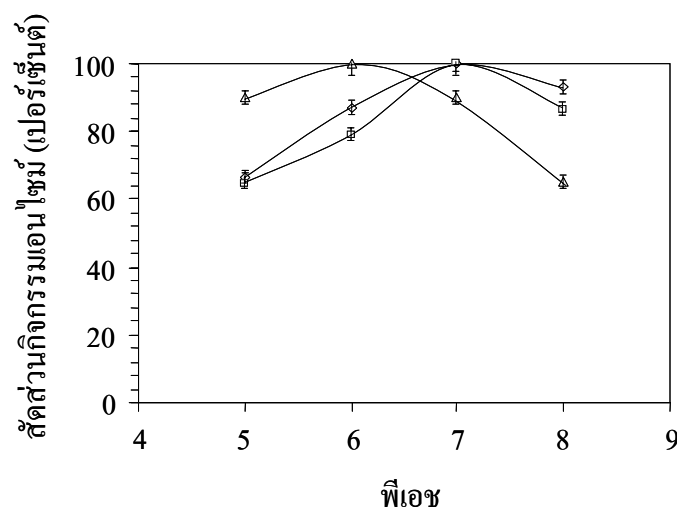


ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่มีต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึง โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (◇) เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม (□) และ เอนไซม์อิสระ (△) เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น

จากภาพที่ 15 จะเห็นว่าเมื่อตรึงเอนไซม์โปรตีนบนไคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มกราฟที่ได้มีแนวโน้มเดียวกัน คือ สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง จากนั้นมีค่าลดลงและที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเหลือเพียง 73.87 และ 68.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์อิสระมีสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์เหลือน้อยมาก (เพียง 20 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Gonchar and Auslender (1996) โดยอุณหภูมิมีผลต่อค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาของการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็นไปตามสมการของ Arrhenius (Srisagul, 2004) แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์โปรตีนทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (denature) ซึ่งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุด มีรายงานจาก Ashwani *et al.* (2005) ที่ศึกษาอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรตีน ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้มในแคลเซียมอัลจินेट โดยแช่เอนไซม์ที่ถูกตรึงที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีในทิสโบริคลอริกบัฟเฟอร์พีเอช 8 พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 70 องศาเซลเซียส จะไม่เหลือกิจกรรมของเอนไซม์

5.2 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรีงรูป

ในการศึกษานี้ ได้เขย่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่างๆ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยพีเอชของสารละลายที่ใช้มีค่าต่างๆ คือ 5 6 7 และ 8 (ความเข้มข้นไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์ให้คงที่ที่ 0.05 โมลาร์) ระยะเวลาของการเขย่าคงที่ที่ 15 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่มีต่อสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ($\diamond$) เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการห่อหุ้ม ($\square$) และเอนไซม์อิสระ ($\triangle$) เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น

จากภาพที่ 16 จะเห็นว่าเมื่อตรึงเอนไซม์โปรตีนสเปนไคโตซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มกราฟที่ได้มีแนวโน้มเดียวกัน คือเมื่อพีเอชสูงขึ้น สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยมีค่าสูงที่สุดที่พีเอช 7 และที่พีเอช 8 สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูปยังคงมีค่าสูงกว่า (93.17 และ 86.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์อิสระ ซึ่งมีค่าเพียง 65 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเอนไซม์ตรีงรูปจะมีความคงตัวต่อพีเอชสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยเอนไซม์อิสระมีค่าสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่พีเอช 6 เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Bayramoglu *et al.* (2002) ที่กล่าวว่าเอนไซม์ตรีงรูปสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงขึ้นและยังสามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชที่กว้างขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระและพบว่าที่พีเอช 7 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด โดยคาดว่าสาเหตุจากเอนไซม์เสียสภาพ (denature) ที่พีเอช 5 6 และ 8

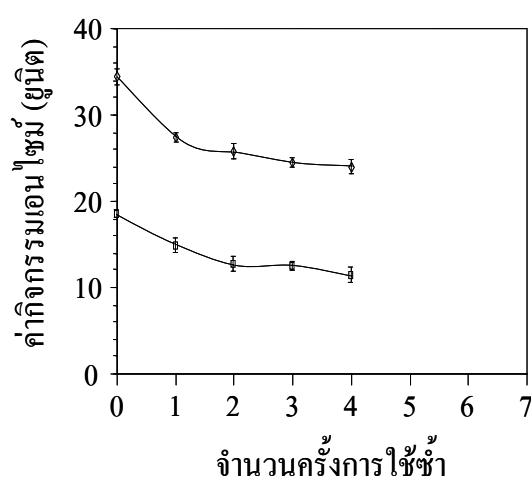
ส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยของ Chung-Jen *et al.* (2006) และ Yi-Su *et al.* (2000)

6. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานเอนไซม์ที่ถูกตรึง

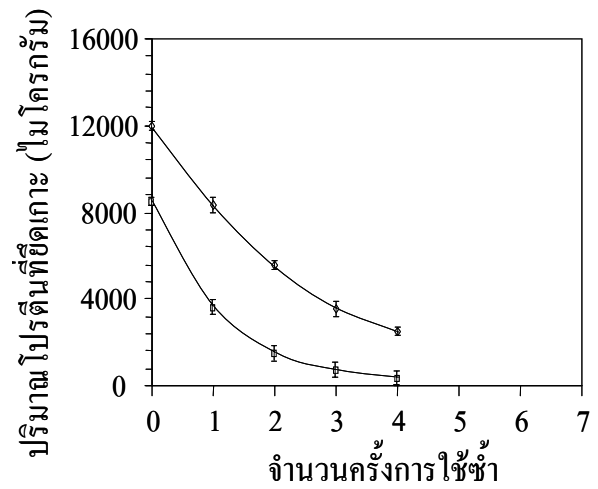
ในการศึกษานี้เป็นการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีการต่างๆ ไปผลิตน้ำซอสปรุงรสที่สถานะเดียวกัน แล้วเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะและปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนในแต่ละครั้งของการใช้ซ้ำ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17

จากภาพที่ 17ก จะเห็นว่าเมื่อตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสบนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มกราฟที่ได้จะมีแนวโน้มเดียวกัน คือ เมื่อเอนไซม์ตรึงรูปผ่านการใช้ซ้ำไปแล้ว 1 ครั้งค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วจากนั้นเมื่อใช้ซ้ำครั้งต่อไปค่ากิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนแปลงน้อย การลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์นั้นเกิดจากปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะลดลง (เอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพระหว่างการใช้งาน) ดังแสดงในภาพที่ 17ข ซึ่งเป็นไปตามที่รายงานไว้ใน Jegan *et al.* (2005) ส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนซึ่งเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพของน้ำซอสปรุงรสลดลงด้วย (ภาพที่ 17ค)

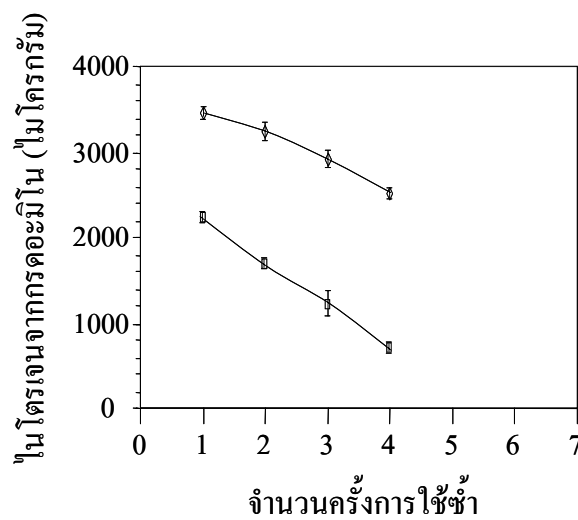
ค่ากิจกรรมเอนไซม์เมื่อตรึงเอนไซม์โปรตีนเอสบนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์มีค่ามากกว่าวิธีการห่อหุ้มในทุกๆ ครั้งของการใช้ซ้ำ โดยหลังจากการใช้ซ้ำครั้งที่ 4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มมีค่าเท่ากับ 23.93 และ 11.28 ยูนิต ตามลำดับ (ภาพที่ 17ก) เนื่องจากวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์แรงเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพวยงแข็งแรงมาก ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพวยงได้ยาก ในขณะที่วิธีการห่อหุ้มจะไม่มีมีการเชื่อมพันธะเคมีใดๆ ระหว่างเอนไซม์กับตัวพวยงเลย เอนไซม์จึงหลุดออกจากตัวพวยงได้ง่าย (ปราณี, 2547) ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะต่ำกว่า นอกจากนี้ยังส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ด้วย



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 17 ผลของการใช้ซ้ำในการผลิตน้ำซอสปรุงรสที่มีต่อ ก. ค่ากิจกรรมแอมโมเนียมไนโตรเจน ข. ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ และ ค. ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน สัญลักษณ์ ◇ และ □ แทนวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม ตามลำดับ เส้นทึบแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเท่านั้น

จากภาพที่ 17 จะเห็นว่าปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตรึงรูปที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มเข้ามาช่วยในกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส สำหรับการย่อยสลายโปรตีนจากกากถั่วเหลืองหลังผ่านการใช้ซ้ำครั้งที่ 1 มีค่าเท่ากับ

3,4556 และ 2,228 ไมโครกรัม ตามลำดับ ซึ่งค่าปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตรึงรูปของทั้ง 2 วิธี มีค่ามากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระในกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสในงานวิจัยของ คงศักดิ์ (2544) ถึง 5 เท่า สาเหตุของการเพิ่มขึ้นของค่าปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนอาจมาจากเอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำงานได้ดี ณ สภาพที่ใช้ทำน้ำซอสปรุงรส (จากผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป) มีรายงานของ Jegan *et al.* (2005) ที่ตรึงเอนไซม์ปาเปนจาก *Carica papaya* โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต แล้วนำเอนไซม์ปาเปนที่ตรึงแล้วมาใช้ซ้ำในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเคซีน พบว่าเมื่อมีการใช้ซ้ำไปแล้ว 1 ครั้งทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วจากนั้นเมื่อใช้ซ้ำครั้งต่อไป ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะคงที่ โดยสามารถใช้ซ้ำได้ทั้งหมด 6 ครั้ง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การตรึงเอนไซม์โปรตีนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2,898 หน่วยต่อกรัมโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ 11,930 ไมโครกรัม และประสิทธิภาพการตรึง 74.25 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะในการตรึง คือความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กระตุ้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรึงเอนไซม์โปรตีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นไอออน (Ionic Strength) เท่ากับ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2. การตรึงเอนไซม์โปรตีนโดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโคโคซานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2,189 หน่วยต่อกรัมโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ 8,467 ไมโครกรัมและประสิทธิภาพการตรึง 45.01 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ที่ถูกตรึง พบว่า เอนไซม์ที่ถูกตรึงทั้ง 2 วิธีมีความคงตัวที่พีเอชประมาณ 7 และอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส

4. การนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงไปใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส พบว่าปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มในการผลิตน้ำซอสปรุงรสหลังจากการใช้ซ้ำครั้งที่ 4 มีค่าเท่ากับ 1,800 และ 706 ไมโครกรัมตามลำดับ

จากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่าการตรึงเอนไซม์โปรตีนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ เป็นวิธีการตรึงที่ดีที่สุด เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ ประสิทธิภาพการตรึงและปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนสูงกว่าวิธีการห่อหุ้ม

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาตัวแปรอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการตรึงเอนไซม์โปรติเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มเพิ่มเติม เช่น ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงเพราะปริมาณเอนไซม์ต่างๆ กันมีผลต่อการตรึงเอนไซม์เช่นกัน (Roberto *et al.*, 2005)
2. การใช้เอนไซม์เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในกรรมวิธีการผลิต ควรได้มีการศึกษาและประเมินต้นทุนการผลิต ซึ่งจะเป็นผลดีในการหาจุดคุ้มทุนของราคาขายผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสที่ผ่านการพัฒนากรรมวิธีดังกล่าวนี้
3. การใช้กลูตาอัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษในน้ำซอสปรุงรส ดังนั้นควรศึกษาหาสารเชื่อมขวางอื่นๆ ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส
4. การนำน้ำซอสปรุงรสที่ได้ไปปรุงแต่งรสชาติ มาเชื้อจุลินทรีย์และนำไปวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณจุลินทรีย์ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำซอสปรุงรสไปปรับประทาน
5. ในกระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรสได้เลือกใช้ถั่วเหลืองสกัดน้ำมัน มาใช้เป็นวัตถุดิบหลัก ในการผลิตน้ำซอสปรุงรสและเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ซึ่งนอกเหนือจากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้วสามารถใช้โปรตีนจากพืชชนิดอื่นได้อีก อาทิ ข้าวโพดสกัดน้ำมัน ถั่วเขียวสกัดน้ำมันและอาจใช้ผสมกันในอัตราส่วนที่พอเหมาะ น่าจะเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณ โปรตีนในน้ำซอสปรุงรสได้ นอกจากปริมาณโปรตีนที่อาจเพิ่มขึ้นแล้ว วัตถุดิบแต่ละชนิดยังมีคุณสมบัติในการให้กลิ่นและรสชาติที่แตกต่างกันซึ่งจะช่วยให้การพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นไปในทิศทางที่น่าพอใจมากยิ่งขึ้น (คงศักดิ์, 2544)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คงศักดิ์ สหะศักดิ์มนตรี. 2544. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตน้ำซอสปรุงรสโดยใช้เอนไซม์เพื่อลดสาร 3-MCPD. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนิกานต์ ต้นสุริยวงศ์. 2550. การตรึงไลเปสบนพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ไม่ชอบน้ำด้วยพันธะโควาเลนต์เพื่อผลิตไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภฎี รัตนพระ. 2549. การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเมล็ดทานตะวัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นภา โล่ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. บริษัทฟีนี พับบลิชিং, กรุงเทพฯ.
- นิรนาม. 2540. ถั่วเหลือง. งานทะเบียนและประมวลผลทางสถิติ. กองแผนงาน. กรมวิชาการเกษตร. วรวิสาหกิจพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- นิลวรรณ เพชรบุรณิน. 2548. พลังแห่งเอนไซม์บำบัด. บริษัท พิมพ์ดีการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ประภัสสร สุรวฒนาวรรณ. 2548. ไคติน-ไคโตซาน. แหล่งที่มา: <http://www.gpo.or.th/rdi/html/chitin.html>, 4 เมษายน 2548.
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ผ่องผกา ขงพานิชกุล. 2537. การตรึงเอนไซม์และการศึกษาคุณสมบัติของ β - xylosidase จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* รหัส 4-4S-IF. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพบูลย์ สุเมธอักษร. 2521. **การทำชีว้ในเมืองไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พัชรา วีระกะลัส. 2541. **เอนไซม์**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มณีรัตน์ ตีรนนทกุล. 2542. **การศึกษาทดลองหมักกล้วยเหลือทิ้งแบบอาหารแข็งในระบบแพคเบด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรืองลักษณ์ จามิกรณ์. 2545. **ชีวเคมี 2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

วรรณา ตั้งเจริญชัย. 2534. **คว้นสำหรับรมอาหาร**. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ คุร่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม**. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์, กรุงเทพฯ.

วารุณี เสนสุภา. 2543. **โครงการพัฒนาการผลิตซอสปรุงรสเพื่อลดสาร 3-MCPD, น. 1-2. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา**. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. **ชีว้**. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยเศรษฐศาสตร์ประยุกต์ คณะเศรษฐศาสตร์. 2540. **รายงานการวิจัยศักยภาพในการพัฒนาอุตสาหกรรมเครื่องปรุงรส: อุตสาหกรรมผลิตชีว้ เต้าเจี้ยว และซอสปรุงรส**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุนันทา ภัญญาวัธน์. 2544. **ชีวเคมี 1**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

สุนันทา ภัญญาวัธน์. 2547. **ชีวเคมี 2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

อรพิน ภูมิภมร. 2523. **ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหมัก**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adinarayana, K., K.V.V.S.N. Bapi Raju and P. Ellaaiah. 2003. Investigations on alkaline protease production with *B.Subtilis* PE-11 immobilized in calcium alginate gel beads. **Process Biochemistry**. 39: 1331-1339.

Anna, P., A.D. Bo and M. Stecchini. 1994. Effect of maillard reaction product on protease activity in vitro. **Journal of Food Quality**. 17: 211-220.

Anwar A. and M. Saleemuddin. 1998. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**. 64: 175-183.

Ashwani M., K. Shiwani, S. Hari and C. Kamboj. 2005. Characterization of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) immobilized in Ca alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**. 37: 318-323.

Bayramoglu, G., Y. Kacar, A. Denizli and M.Y. Arica. 2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. **Journal of Food Engineering**. 52: 367-374.

Betigeri, S.S. and S.H. Neau. 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**. 23: 3627-3636.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254.

- Chang, Min-Yun and Ruey-Shin Juang. 2007. **Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of β -glucosidase.** Biochemical Engineering Journal.
- Chaplin, M.F. and C. Brucke. 1990. **Enzyme technology.** Cambridge University, United Kingdom.
- Chellapandian, M. 1997. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. **Process Biochemistry.** 33: 169-173.
- Chung-Jen Chiang, Hong-Chen Chen, Hsueh-Feng Kuo, Yun-Peng Chao and Jason T.C. Tzen. 2006. **A simple and effective method to prepare immobilized enzymes using artificial oil bodies.** Enzyme and Microbial Technology.
- Chyong, H.H. and C.C. Chou. 1999. Volatile components of the Chinese fermented soyabean curd as affected by the addition of ethanol in aging solution. **Journal of the Science of food and Agriculture.** 79: 243-248.
- Dincer Ayse and Telefoncu Azmi. 2007. Improving the stability of cellulose by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 45: 10-14.
- Fellows, P. 1990. **Food processing Technology Principles and Practice.** Ellis Horwood Ltd., Cornwall.
- Fernando Lopez-Gallego, Lorena Betancor, Aurelio Hidalgo, Noelia Alonso, Gloria Fernandez-Lorente, Jose M. Guisan and Roberto Fernandez-Lafuente. 2005. Preparation of a robust of D-amino acid oxidase on sephabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme and Microbial Technology.** 37: 750-756.

- Giovanni Spagna, Riccardo N., Barbagallo, Daniele Casarini and Pier Giorgio Pifferi. 2001. A novel chitosan derivative to immobilized α -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. **Enzyme and Microbial Technology**. 28: 427-438.
- Gonchar, A.M. and V.L. Auslender. 1996. Immobilization of bacterial proteases on water-solved polymer by means of electron beam. **Radiation Physics and Chemistry**. 48: 795-797.
- Huckel, M., H.J. Writh and M.T.W. Hearn. 1996. Porous Zirconia: a new support material for enzyme immobilization. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**. 31: 165-179.
- Jegan Roy, J., S. Sumi, K. Sangeetha and T. Emilia Abraham. 2005. Chemical modification and immobilization of papain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 80: 184-188.
- Juang, R.S., F.C. Wu and R.L. Tseng. 2001. Solute adsorption and enzyme immobilization chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresource Technology**. 80: 187-193.
- Kise, H. and A. Hayakawa. 1991. Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**. 13: 584-588.
- Mohamed, A. Abdel-Naby, A-M.S. Ismail, S.A. Ahmed and Ahmed F. Abdel Fattah. 1998. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. **Bioresource Technology**. 64: 205-210.
- Olero, M.A., A.J. Cabello, M.C. Vasallo, L. Garcia and J.C. Lopez. 1998. Preparation of an imitation soy sauce from hydrolyzed dried yeast *Candida utilis*. **Journal of Food Processing and Preservation**. 22: 419-432.

- Pereira, E.B., G.M. Zanin and H.F. Castro. 2003. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Chemical Engineering**. 20: 343-355.
- Puppo, M.C. and Anon. 1999. Soybean protein dispersions at acid pH thermal and rheological properties. **Journal of Food Science**. 64: 50-56.
- Roberto Dalla-Vecchia, Damianni Sebrao, Maria da Graca Nascimento and Valdir Soldi. 2005. Carboxymethylcellulose and polyvinyl alcohol used as a film support for lipase immobilization. **Process Biochemistry**. 40: 2677-2682.
- Ruchi Gaur, Hema Pant, Ruchi Jain and S.K. Khare. 2006. Galacto- oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**. 97: 426-430.
- Salunkhe, D.K. and S.S. Kadam. 1989. **World Food Legumes: Nutritional Chemical, Process Technology And Utilization**. CRC Press.Inc., Florida.
- Seshadri, R., L. Zivanovic and J. Weiss. 2005. Effect of molecular weight and acid solvent on the thermo-mechanical properties of solution-casted chitosan films. **Department of food science and technology food chemistry and biophysics laboratory**.
- Songjun, Li., Jie Hu and Bailing Liu. 2004. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **Bio Systems**. 77: 25-32.
- Srisagul Sungthongjeen. 2004. Application of Arrhenius equation and Plackett-Burman design to ascorbic acid syrup development. **Naresuan University Journal**. 12(2): 1-12.
- Takashi, H., M. Sugishita, Y. Fukushima, T. Fukase and H. Motai. 1991. Continuous production of soy sauce by a bioreactor system. **Press Biochem**. 26: 39-45.

- Toshiba Haider and Qayyum Husain. 2007. **Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose.** International Journal of Biological Macromolecules.
- Underriner, E.W. and I.R. Hume. 1994. **Handbook of Industrial Seasoning.** Chapman & Hall. Clays Ltd., London.
- Villeneuve, P., J.M. Muderhwa., J.Graille and M.J. Haas. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Eazymatic.** 9: 113-148.
- Wittmann, R. 1991. Determination of dichloropropanols and monochloropropanediols in seasonings and seasoned food. **Zeitschrift Fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A.** 193(3): 224-229.
- Yi-Su Oh, Ing-Lung Shih, Yew-Min Tzeng, San-Lang Wang. 2000. Protease Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. **Enzyme and Microbial Technology.** 27: 3-10.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

1.1 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

1.1.1 สารละลาย 0.1 N NaOH เตรียมโดยละลาย NaOH จำนวน 0.4 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 สารละลาย 0.1 N HCl เตรียมโดยการผสม HCl conc. (37 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 1.17 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.3 สารละลาย 0.2 M monobasic potassium phosphate เตรียมโดยละลาย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4) จำนวน 3.12 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.4 สารละลาย 0.2 M dibasic potassium phosphate เตรียมโดยละลาย ไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K_2HPO_4) จำนวน 3.56 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.5 สารละลาย 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.00 เตรียมโดยผสม สารละลาย 0.2 M monobasic potassium phosphate จำนวน 19.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย 0.2 M dibasic potassium phosphate จำนวน 30.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.6 สารละลายเคซีน (casein) 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายเคซีนจำนวน 1.5 กรัมกับสารละลาย 0.1 N NaOH จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นพร้อมคนเบาๆ เพื่อให้เคซีนละลายจนหมด ปล่อยให้สารละลายเคซีนเย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.00 ด้วย สารละลาย 0.1 N HCl และ 0.1 N NaOH จากนั้นเติมสารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.00 จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.7 สารละลาย 0.4 M trichloroacetic acid (TCA) เตรียมโดยละลาย trichloroacetic acid จำนวน 6.54 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.8 สารละลาย 0.4 M Na_2CO_3 เตรียมโดยละลาย Na_2CO_3 จำนวน 4.24 กรัมกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.9 สารละลาย folin reagent เตรียมได้โดยผสมสารละลาย folin กับน้ำกลั่นใน อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปใช้ทันที

1.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

1.2.1 เตรียมสารละลาย L-tyrosine เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย L-tyrosine จำนวน 0.2 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2.2 สารละลาย L-tyrosine เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอดทดลองด้วยอัตราส่วนดังตาราง

ตารางผนวกที่ ก1 วิธีการเตรียมสารละลาย L-tyrosine ที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอด ที่	ปริมาณสารละลาย L-tyrosine (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำ กลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	1.0	0
2	0.2	0.8	40
3	0.4	0.6	80
4	0.6	0.4	120
5	0.8	0.2	160
6	1.0	0	200

1.2.3 เติมสารละลาย 0.4 M Na_2CO_3 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

1.2.4 เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1 เพราะเป็นหลอดควบคุม (blank) ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

1.2.5 นาที่ที่ 10 นำหลอดทดลองที่ 1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรทันที กด set blank ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีทันทีเช่นกัน ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6

1.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาวาดกราฟมาตรฐาน ให้แกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

1.2.7 จากกราฟมาตรฐานสามารถสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์ที่ช่วงโม่งต่างๆ จึงทราบค่ากิจกรรมโปรติเอสได้

ค่ากิจกรรมโปรติเอสกำหนดให้ 1 ยูนิตของกิจกรรมโปรติเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้สาร L-tyrosine ซึ่งอยู่ในอัตราเท่ากับ L-tyrosine 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1.3 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (มณีรัตน์, 2542)

1.3.1 นำสารละลายเคซีนที่เตรียมได้แช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1.3.2 ใส่ น้ำกลั่นแทนไคโตซานชนิดเม็ดที่ได้จากการตรึงรูปลงไป ในหลอดทดลองที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ ใส่ไคโตซานชนิดเม็ดที่ได้จากการตรึงรูปพร้อมชั่งน้ำหนัก นำหลอดทดลองทั้งหมดไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ก่อนทำการวิเคราะห์

1.3.3 เติมสารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ เติมน้ำกลั่นแทนไคโตซานชนิดเม็ดที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดอื่นๆ เติมสารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

1.3.4 นาที่ที่ 10 เติมสารละลาย 0.4 M TCA ลงในหลอดที่เติมน้ำกลั่นแทนไคโตซานชนิดเม็ดจำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม 0.4 M TCA ลงในหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีเช่นกัน ตามลำดับ ตั้งหลอดทดลองทั้งหมดทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

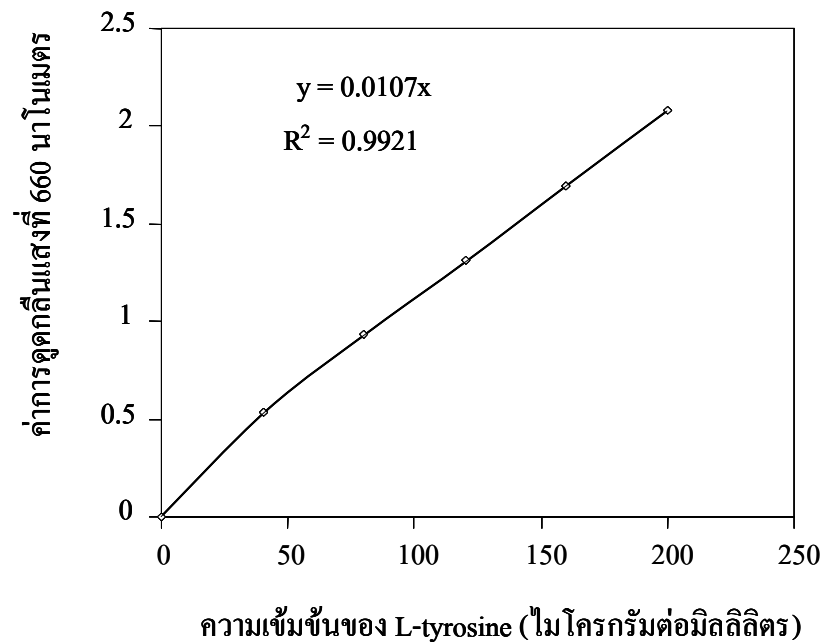
1.3.5 ดูดส่วนใสที่กรองได้อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด

1.3.6 เติมสารละลาย 0.4 M Na_2CO_3 ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.3.7 เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่กรองได้ของหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นแทนไคโตซานชนิดเม็ดที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

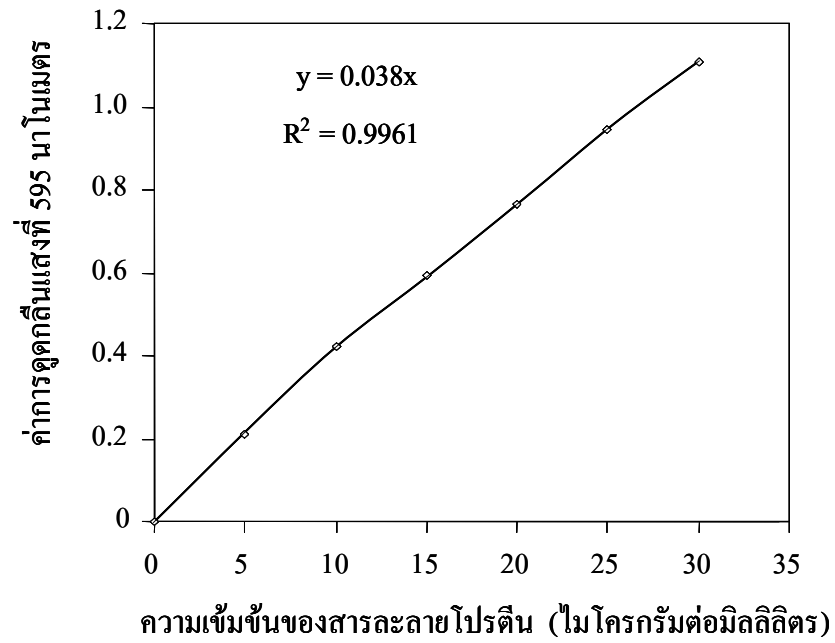
1.3.8 นาที่ที่ 10 นำหลอดทดลองที่ใช้น้ำกลั่นแทนไคโตซานชนิดเม็ดที่ได้จากการตรึงรูปเป็นหลอดควบคุม (blank) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความ

ขาวคลื่น 660 นาโนเมตรทันทีที่ กด set blank ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีทันทีเช่นกัน ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ได้ผลดังภาพผนวกที่ ก1



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์โปรติเอส



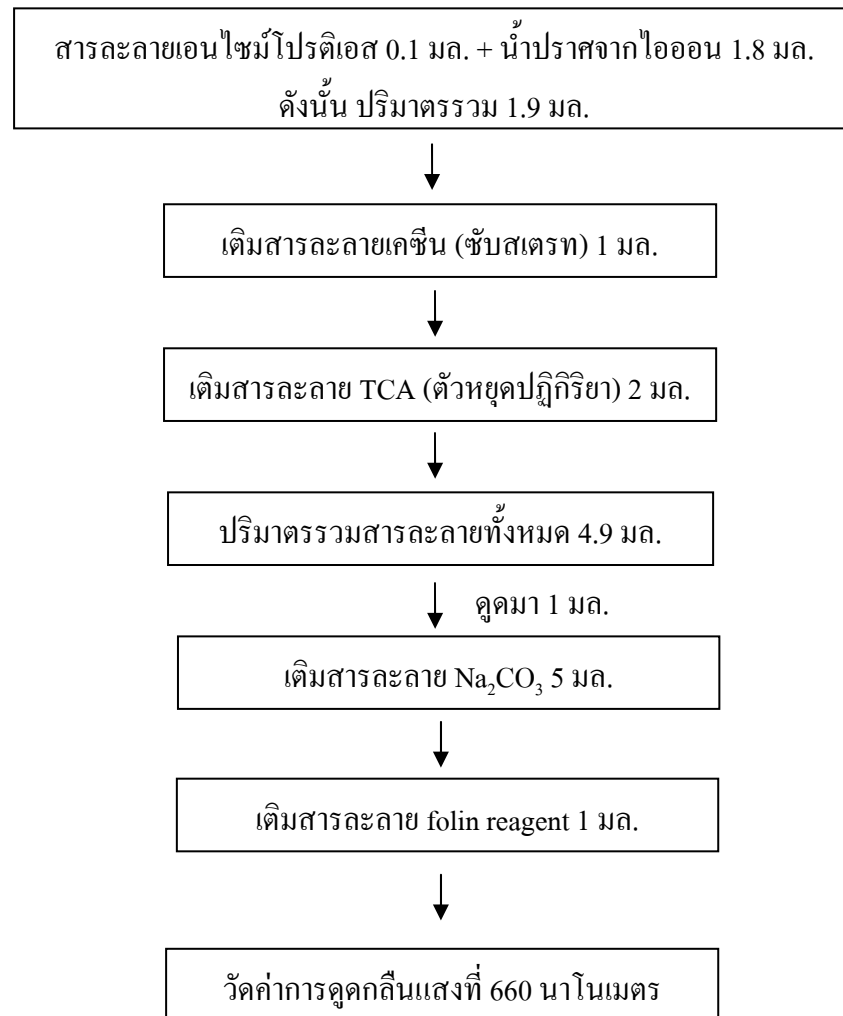
ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์อิสระและกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป

1.1 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์อิสระ



จากแผนภาพข้างต้น หลังจากนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรแล้ว จะได้ว่า

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์อิสระ (ยูนิต)} = \frac{A_{660}}{\text{ความเข้มข้น}} \times \frac{1}{10} \times 4.9$$

โดย

A_{660} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

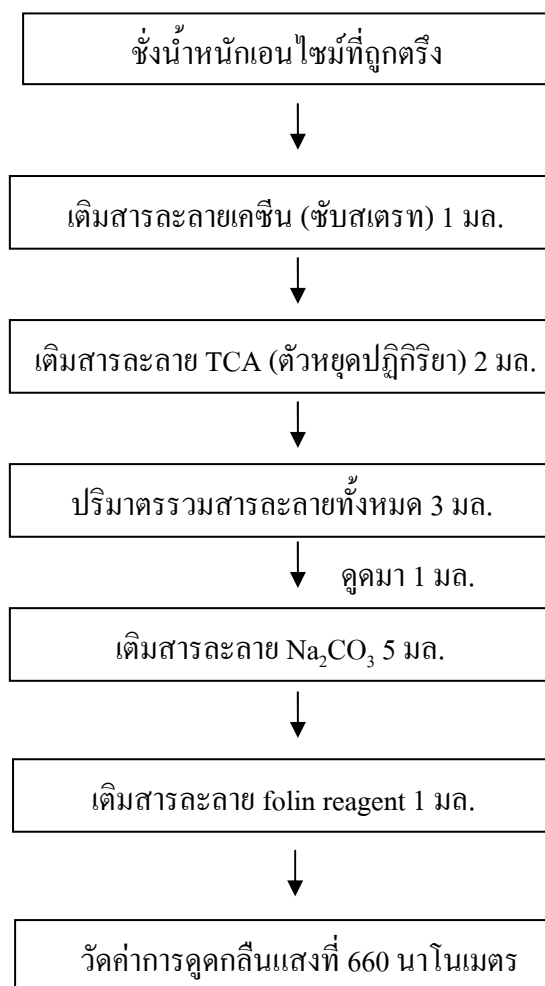
ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน L-tyrosine = 0.0107

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 1 มิลลิลิตร

เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 10 นาที

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = 1.9+1+2 = 4.9 มิลลิลิตร

1.2 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ที่จริงรูป



จากแผนภาพข้างต้น หลังจากนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรแล้ว จะได้ว่า

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูป (ยูนิต)} = \frac{A_{660}}{\text{ความเข้มข้น}} \times \frac{1}{10} \times \left(3 + \frac{\text{น้ำหนักเอนไซม์ตรีงรูป}}{0.9953} \right)$$

โดย

A_{660} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน L-tyrosine = 0.0107

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 1 มิลลิลิตร

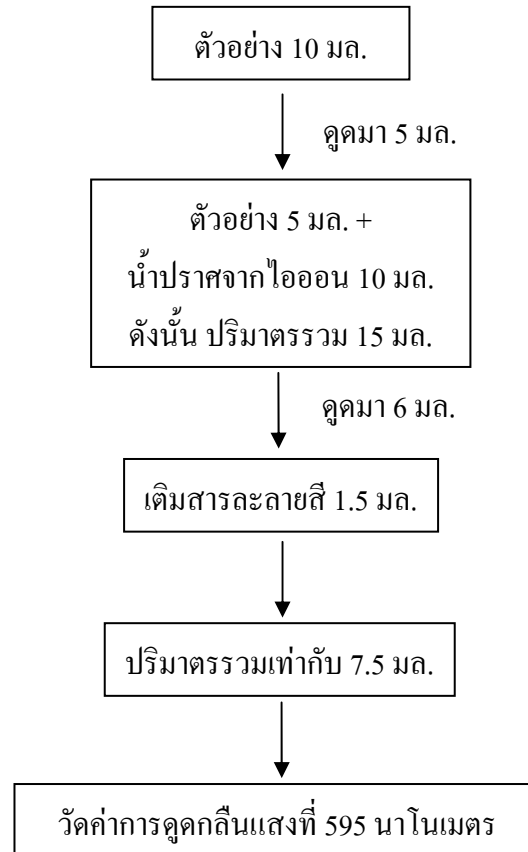
เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 10 นาที

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = 1+2 = 3 มิลลิลิตร

น้ำหนักเอนไซม์ตรีงรูป (กรัม)

ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรีงรูป = 0.9953 กรัมต่อมิลลิลิตร

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน



จากแผนภาพข้างต้น หลังจากนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรแล้ว จะได้ว่า

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)} = \frac{A_{595}}{\text{ความชัน}} \times \frac{15}{5} \times 10$$

โดย

A_{595} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความชันของกราฟมาตรฐาน L-tyrosine = 0.038

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = 5+10 = 15 มิลลิลิตร

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 5 มิลลิลิตร

ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ = 10 มิลลิลิตร

3. การคำนวณสัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ (Activity yield)

$$\text{สัดส่วนกิจกรรมเอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)} = [U_i/U_m] \times 100$$

โดย

U_i = ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิหรือพีเอชต่างๆ (ยูนิต)

U_m = ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ณ พีเอชหรืออุณหภูมิใดๆ (ยูนิต)

4. การคำนวณปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (Protein coupling)

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ (ไมโครกรัม)} = P_0 - P_f$$

โดย

P_0 = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง (ไมโครกรัม)

P_f = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์หลังตรึง (ไมโครกรัม)

5. การคำนวณประสิทธิภาพการตรึง (Loading efficiency)

$$\text{ประสิทธิภาพการตรึง (เปอร์เซ็นต์)} = [(P_0 - P_f)/P_0] \times 100$$

โดย

P_0 = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนตรึง (ไมโครกรัม)

P_f = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์หลังตรึง (ไมโครกรัม)

6. การคำนวณปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโน (ไมโครกรัม)} = N_t - N_p - N_w$$

โดย

N_t = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ไมโครกรัม)

N_p = ปริมาณไนโตรเจนจากเอนไซม์โปรตีนเอส (ไมโครกรัม)

N_w = ปริมาณไนโตรเจนจากน้ำแช่แก้วเหลืองสกัดน้ำมัน (ไมโครกรัม)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปาริชาติ กิจสงเสริมธน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 มิถุนายน 2526
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ.(วิทยาศาสตร์ บัณฑิต) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยสอนจากโครงการพัฒนาระบบบัณฑิตศึกษาและวิจัย ด้านวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2548-2550)