



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)
ปริญญญา

วิศวกรรมเคมี
สาขา

วิศวกรรมเคมี
ภาควิชา

เรื่อง การตรึงโปรตีนเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์

Immobilization of Protease on Chitosan by Covalent Bond

นามผู้วิจัย นางสาวนิตยา เยาว์แสง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รักษาราชการแทน

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทยา หาญสุกลักขณ์, Ph.D.)

(รองศาสตราจารย์เมตตา เจริญพานิช, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรึงโปรตีนเอนไซม์ไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์

Immobilization of Protease on Chitosan by Covalent Bond

โดย

นางสาวนิตยา เขียวแสง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี)

พ.ศ. 2552

นิตยา เยาว์แสง 2552: การตรึงโปรตีนโตนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ ปริญา
วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทยา หาญสุกัลักษณ์, Ph.D.
87 หน้า

การทดลองนี้ศึกษาการตรึงโปรตีนโตนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยครอบคลุม
การถ่ายโอนมวล เสถียรภาพต่ออุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์อิสระเทียบกับเอนไซม์ที่ตรึงรูป
ด้วยพันธะโควาเลนต์ รวมทั้งศึกษาการใช้ซ้ำและการเก็บเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ที่
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปบนโตนโคโตซาน
ด้วยพันธะโควาเลนต์เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ จากการศึกษาพบว่าการตรึงรูปเอนไซม์บน
เม็ดโตนโคโตซานที่กระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์ สามารถเพิ่มความเสถียรภาพต่ออุณหภูมิและพีเอช
ของเอนไซม์ได้ ทั้งยังสามารถนำเอนไซม์มาใช้ซ้ำและเก็บเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศา
เซลเซียส โดยค่ากิจกรรมของโปรตีนตรึงรูปลดลงเพียง 17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 28
วัน นอกจากนี้ยังพบว่าค่า K_m ของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ บ่งบอก
ความสามารถในการจับกับซับสเตรตที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูปด้วย
พันธะโควาเลนต์มีค่าต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ เนื่องจากมีข้อจำกัดของเครื่องเขย่าทำให้ปัญหาการ
ถ่ายโอนมวลยังคงเกิดขึ้น

Nittaya Yaosang 2009: Immobilization of Protease on Chitosan by Covalent Bond.
Master of Engineering (Chemical Engineering), Major Field: Chemical Engineering,
Department of Chemical Engineering. Thesis Advisor: Assistant Professor
Nanthiya Hansupalak, Ph.D. 87 pages.

The protease immobilization on chitosan beads, activated by glutaraldehyde, including mass transfer, pH stability and temperature stability, reuse and storage was investigated. Kinetics and thermal deactivation were also covered. Results showed the increases in stabilities immobilization while $V_{\max}$ was decreased but free and immobilized enzyme showed almost same K_m value. Residual activities of free enzyme were lower than those of immobilized enzyme when the reuse and storage experiments were applied. Due to the shaker's limitation, mass transfer problem still existed and might be the cause of the lower $V_{\max}$ upon immobilization.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.นันทิยา หาญสุภลักษณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากหน่วยงานดังต่อไปนี้ โครงการพัฒนานวัตกรรมและวิจัยด้านวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ADB) และโครงการทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมีทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ

นิตยา เยาว์แสง

เมษายน 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	66
สรุป	66
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์	74
ภาคผนวก ข การคำนวณ	81
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความสำคัญของโปรตีนในด้านอุตสาหกรรมอาหาร	5
2 การค้าขายโปรตีนในตลาดโลก	5
3 สมบัติทางเคมีกายภาพของเม็ดโกลโดซานที่ไม่มีเอนไซม์และมีเอนไซม์ตรึงรูป	45
4 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ได้จากความเข้มข้นเริ่มต้น	57
5 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป R^2 และ $(V_{\max}$ และ K_m)	57
6 แสดงค่าคงที่ k_d และ E_d ของเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์	64
7 ค่าครึ่งชีวิต (half life) ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป ที่ได้จากการทำนายด้วยกราฟและค่าที่ได้จากการทดลอง	65
 ตารางผนวกที่	
ก1 วิธีการเตรียมสารละลาย L-tyrosine ที่ความเข้มข้นต่างๆ	77
ก2 วิธีการเตรียมสารละลาย โปรตีนของ BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการทำเอนไซม์ตรีงรูป แบ่งเป็นวิธีการทางเคมีและการทางกายภาพ	9
2	กระบวนการทำเอนไซม์ตรีงรูปตามวิธีเชื่อมตัวพุง วิธีเชื่อมขวาง และวิธีห่อหุ้ม	10
3	ปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชัน	11
4	ปฏิกิริยาที่ตัวพุงถูกทำให้เป็นอนุพันธ์คลอไรด์	12
5	ปฏิกิริยาการเติมหมู่อัลคิล	13
6	ปฏิกิริยาการสร้างซฟเบส	13
7	ปฏิกิริยาอูจิ	14
8	ปฏิกิริยาอูจิ เมื่อตัวพุงมีหมู่คาร์บอกซิล	15
9	โครงสร้างทางเคมีของไคติน	17
10	โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน	17
11	ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์	19
12	เส้นโค้งการอิ่มตัวด้วยซับสเตรต (Substrate Saturation curve)	20
13	ความเข้มข้นของซับสเตรต (S) ต่อปริมาณการเกิดเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ (ES)	23
14	Lineweaver-Burk plot หน่วยของ V และ $[S]$ ที่นิยมใช้คือ $\mu\text{M}/\text{min}$ และ mM ตามลำดับ	27
15	ภาพ SEM ของบริเวณพื้นที่ผิวของเม็ดไคโตซาน (ก,ข) ไม่มีเอนไซม์และมีเอนไซม์ที่ตรึงด้วย (ค,ง) พันธะโควาเลนต์ และ (จ,ฉ) วิธีห่อหุ้ม	42
16	ภาพ SEM ของภาคตัดขวางของเม็ดไคโตซาน (ก,ข) ไม่มีเอนไซม์ และมีเอนไซม์ที่ตรึงด้วย (ค,ง) พันธะโควาเลนต์ และ (จ,ฉ) วิธีห่อหุ้ม	44
17	การกระจายตัวของรูพรุนของเม็ดไคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ และตรีงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้ม	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18	อิทธิพลของอัตราการถ่ายโอนมวลของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์กับ ซับสเตรตโดยเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบที่ (▲) 50 รอบต่อนาที, (■) 100 รอบต่อ นาที และ (◆) 160 รอบต่อนาที โดยสภาวะที่วัดกิจกรรมคือ 40 องศาเซลเซียส พี เอช 7 และความเข้มข้นของซับสเตรต (ก) 0.5, (ข) 1.5, และ (ค) 4.5 เปอร์เซ็นต์ 47
19	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระสัมพัทธ์ (●) และต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูปสัมพัทธ์ (○) โดยสภาวะที่วัดกิจกรรมคือ 40 องศา เซลเซียส พีเอช 7 50
20	ผลของพีเอชที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระสัมพัทธ์ (●) และ กิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูปสัมพัทธ์ (○) โดยสภาวะที่วัดกิจกรรมคือ 40 องศา เซลเซียส พีเอช 7 51
21	ผลของการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยสภาวะที่วัด กิจกรรมคือ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 53
22	ผลของการเก็บเอนไซม์อิสระ (●) และกิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูป (○) บนไคโตซาน ด้วยพันธะโควาเลนต์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่วัดกิจกรรมคือ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 54
23	ผลของความเข้มข้นของซับสเตรตที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของค่ากิจกรรมเอนไซม์ ต่อเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ก) เอนไซม์อิสระ (ข) เอนไซม์ตรีงรูปบนไคโต ซานด้วยพันธะโควาเลนต์ ($\times$, +, *, Δ และ $\diamond$ คือความเข้มข้นของซับสเตรต เท่ากับ 1, 3, 5, 7 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) 56
24	ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V$ และ $1/[S]$ ตามความสัมพันธ์ของสมการไลวีเวอร์เบิร์ก ของเอนไซม์อิสระ (●) และเอนไซม์ตรีงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ (○) 58
25	อิทธิพลของความเข้มข้นของซับสเตรตกับเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ อิสระ (●) และเอนไซม์ตรีงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ (○) ด้วยสมการ อันดับหนึ่งของ Michaelis-Menten (เส้นประแสดงค่า $V_{\max}$ โดยประมาณ) 59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 กราฟค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ (ก) และเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตซานด้วย พันธะโควาเลนต์ (ข) ใช้ในการหาครึ่งชีวิตจากการทดลอง (◆, ■, ▲, × และ * คือ อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 ตามลำดับ)	61
27 การพล็อตกราฟปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการเสื่อมสภาพของเอนไซม์อิสระ (ก) และเอนไซม์ตรึงรูป (ข) ด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิต่างๆ (+, ×, * , Δ และ ◇ คือ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ)	62
28 อาร์เรเนียสพล็อตด้วยค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสภาพด้วยความร้อนของเอนไซม์ ตรึงรูป (o) และเอนไซม์อิสระ (●)	63
 ภาพผนวกที่	
ก1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส	78
ก2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	80

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

E_d	=	deactivation energy (kcal/mol)
K_m	=	Michaelis-Menten constant (mol/ml)
V_{max}	=	maximum velocity (U/g protene)
R	=	gas constant (8.314 J/mol K)
BET	=	The Brunauer-Emmet and Telle

การตรึงโปรตีนเอนไซม์โคติซานด้วยพันธะโควาเลนต์

Immobilization of Protease on Chitosan by Covalent Bond

คำนำ

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่นำมาใช้ในหลายอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุตสาหกรรมอาหาร การนำเอนไซม์มาใช้ในวงการอุตสาหกรรมต่างๆ ไปจะอยู่ในรูปของเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำมาใช้ได้ไปอีกลักษณะหนึ่ง คือ ใช้ในแบบของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว ให้กลายเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้น้อยมาก โดยการนำเอนไซม์อิสระมาจำกัดให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนด หรือนำมาจับยึดไว้กับตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำหรือทำให้โมเลกุลเอนไซม์จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น (ปราณี, 2547)

เอนไซม์ตรึงรูปเมื่อใช้งานแล้วสามารถแยกนำกลับมาใช้งานได้อีกหลายครั้งจนกว่าค่ากิจกรรม (activity) หรือความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้ในรูปเอนไซม์อิสระ และสามารถใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระดั้งเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับทางเลือกชนิดของตัวกลางที่ใช้จับ กับวิธีการตรึงรูป ดังนั้นจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ ซึ่งจะต้องใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่จุดหนึ่งที่เหมาะสมเท่านั้น (ปราณี, 2547) นอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปยังสามารถใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอื่นอีกหลายประเภท เช่น กระบวนการน้ำเสีย การรักษาเชื้อโรค เทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์ และการประยุกต์ใช้ด้านสิ่งแวดล้อม (Gonchar and Auslender, 1995)

โปรตีนเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของสารจำพวกโปรตีน จึงมักถูกเรียกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน (นิลวรรณ, 2548) โดยย่อยให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กๆ สามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ และนอกจากนี้เอนไซม์โปรตีนยังสามารถผลิตได้จากพวกจุลินทรีย์ต่างๆ ปัจจุบันนี้การใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเคมี และแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพ ดังนั้นการตรึงเอนไซม์เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ อาจเป็นวิธีหนึ่งในการลดต้นทุนในการผลิต

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับเป็นตัวกลางที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ (Chang and Juang, 2005) นอกจากนี้ไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพที่มีความหลากหลายและมีสมบัติที่โดดเด่น อาทิ มีคุณสมบัติในการดูดซับและจับตรึงที่ดี (Pereira *et al.*, 2003) สามารถทนอุณหภูมิได้สูงโดยมีค่า Tg (glass transition temperature) ประมาณ 154 องศาเซลเซียส (Seshadri *et al.*, 2005) มีความเป็นประจุบวกสูง สามารถทำเป็นแผ่นฟิล์ม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่มีพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นไคโตซานจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์และอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างมากมาย อาทิ เช่น ด้านอาหาร ด้านการเกษตร ด้านการบำบัดน้ำเสีย ด้านสิ่งทอ และ ด้านการแพทย์ ไคโตซานจึงเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

แนวทางการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงให้ความสนใจในการศึกษาการตรึงเอนไซม์ โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส มาตรึงไว้บนพอลิเมอร์ดังกล่าว เนื่องจากโปรติเอส มีจุดด้อยคือ ราคาแพงจึงมีแนวคิดที่จะนำโปรติเอสมาตรึงไว้บนพอลิเมอร์ เพื่อที่จะสามารถนำกลับมาใช้ใหม่หลาย ๆ รอบ เป็นการลดต้นทุนในการผลิต โดยมีจุดประสงค์ในการศึกษาการตรึงโปรติเอสบนพอลิเมอร์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยทำการศึกษาในระดับปฏิบัติการเพื่อนำไปสู่การใช้งานจริงในอนาคตด้านอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการตรึงโปรตีนเอนไซม์โคโคซานด้วยวิธีโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้ม
2. ศึกษาเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ
3. ศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานของเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์
4. ศึกษาอิทธิพลของการถ่ายโอนมวลระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตของเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์
5. ศึกษาจลนพลศาสตร์และการเสื่อมสภาพด้วยความร้อนของเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาพื้นฐานวิทยาและการกระจายตัวขนาดรูพรุนเท่านั้นที่เป็นการเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์และแบบห่อหุ้ม และการศึกษาในด้านๆ อื่นจะเป็นการศึกษาโดยใช้เอนไซม์โปรตีนที่ตรึงรูปบนโคโคซานด้วยพันธะโควาเลนต์เท่านั้น

การตรวจเอกสาร

เอนไซม์โปรติเอส

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

เอนไซม์โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งในพืชและสัตว์ พืชที่นำมาสกัดเอนไซม์โปรติเอส เช่น ต้นมะละกอ (*carica papaya*) ต้นสับปะรด (*anana sativa* pineapple) ต้น figs (*ficus carica*, *ficus glabrata*) ต้น artichokes (*cynera cardunculus*) 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

โปรติเอสแบ่งกลุ่มตามกลไกการทำงานได้ 4 ประเภท คือ โปรติเอสซีรีน (serine protease) โปรติเอสซัลไฟดริล (sulfhydryl protease) โปรติเอสมีโลหะ (metal-containing protease) และโปรติเอสกรด (acid protease) โดย *Aspergillus oryzae* โปรติเอส เป็นโปรติเอสที่ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติเหมือนโปรติเอสมีโลหะ (Laszlo, 1990) ซึ่งนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท ดังแสดงในตารางที่ 1 และนอกจากนี้ โปรติเอสที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีความสำคัญทางค้า เมื่อเทียบกับโปรติเอสอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ความสำคัญของโปรตีนในด้านอุตสาหกรรมอาหาร

ผลิตภัณฑ์/ชนิดอุตสาหกรรม	วัตถุประสงค์ หรือลักษณะปฏิกิริยา การใช้เอนไซม์
ผลิตภัณฑ์ขนมอบ	เพิ่มความนุ่มในแป้งนวด ลดเวลานวด เพื่อการยืดของแป้งนวด ทำให้ลักษณะของขนมปังมีความเป็นรูพรุนสม่ำเสมอ ขนาดก้อนโต
เครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์	พัฒนาให้มีเนื้อ กลิ่นรส และคุณค่าทางอาหารในระหว่างการหมัก และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรอง การทำให้ใส และลดการตกตะกอนระหว่างการแช่เย็น
ธัญชาติ	1. เพื่อตัดแปร โปรตีนในธัญชาติ ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการทำให้แห้งตลอดทั้งจะช่วยปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์ 2. ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตมิโซและเต้าหู้
เนยแข็ง	1. เกิดการตกตะกอนโปรตีนนม 2. เกิดกลิ่นรสระหว่างการบ่มเนยแข็ง
ไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่	ปรับปรุงสมบัติด้านการทำแห้ง
อาหารสัตว์	การย่อยสลายโปรตีนจากของเหลือทิ้งให้เป็นกรดอะมิโนหรือสารแปปไทด์สายสั้นสำหรับผสมในอาหารสัตว์
ไฮโดรไลเสตของโปรตีน	กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส น้ำปลา และน้ำชูจากวัตถุดิบที่มีโปรตีน ทั้งจากพืช สัตว์
ไวน์ เบียร์	กระบวนการแยกตะกอนโปรตีน ทำให้ผลิตภัณฑ์ใส อาจเพิ่มฟองในเบียร์ได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีส่วนของโปรตีนละลายน้ำได้ มากขึ้น เพิ่มเนื้อให้ผลิตภัณฑ์ด้วย
เนื้อสัตว์	กระบวนการทำให้เนื้อนุ่ม
ผงซักฟอก	ผสมในสารซักฟอกเพื่อละลายสิ่งสกปรกที่เป็นโปรตีน

ที่มา: ปราณี (2547)

ตารางที่ 2 การค้าขายโปรติเอสในตลาดโลก

Enzyme	Millions of dollars	Market share of microbial proteanases	
		Microbial enzymes (%)	Total enzyme (%)
Bacterial alkaline proteinase	90	37	30
Microbial rennet	18	7	6
Other microbial proteainase	10	4	3.5
Animal rennet	18	-	11
Other animal proteanases	8	-	2.5
Plant proteinases	33	-	11
All other microbial enzymes (non proteolytic)	125	52	41
Total	302	100	100

ที่มา: Fogathy (1996)

เอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) คือ เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลว กลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) (ปราณี, 2547)

1. ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระ

เอนไซม์อิสระมีข้อจำกัดมากมาย (ปราณี, 2547) คือ

1.1 เอนไซม์อิสระไม่เสถียร

1.2 เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)

1.3 เอนไซม์อิสระ ถ้าจะให้มีความกิจกรรมเอนไซม์สูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

1.4 เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในการละลายของซับสเตรตและผลผลิต ทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน จะเกิดการปนเปื้อนในลักษณะสารปนเปื้อนโปรตีน (proteineous contaminants) โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิและพีเอชของโปรตีนชนิดนั้น จะแยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มเติม กล่าวคือผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง

1.5 เอนไซม์อิสระ มีสถานะทำปฏิกิริยาจำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออุตสาหกรรมที่ต้องใช้เอนไซม์นั้นๆ

1.6 เอนไซม์อิสระ ส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในการละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้งานกับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆ เช่น ฟลูอิดไคซ์เบด (fluidized bed) เบดบรรจุ (packed bed) ในระบบต่อเนื่องได้

1.7 เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

1.8 เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัดและทำบริสุทธิ์ก่อน

1.9 เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูดหายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดของเอนไซม์อิสระเหล่านี้ จึงเป็นทางออกที่นำไปสู่การแก้ปัญหาโดยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ อย่างไรก็ตาม ผลกระทบที่เกิดจากเอนไซม์ตรึงรูปก็มีด้วยเช่นกัน

2. ผลกระทบของการทำเอนไซม์ตรึงรูป (ปราณี, 2547)

ค่ากิจกรรมอาจถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพรมีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย นอกจากนี้ความไม่เข้ากันของตัวพรมกับซับสเตรต ทำให้การเข้าถึงซับสเตรตของเอนไซม์แย่ เมื่อ

เอนไซม์ตรึงรูปมีลักษณะเป็นแคทาลิสต์แข็ง (solid catalyst) จะเกิดปัญหาด้านการถ่ายเทมวลภายนอกและภายใน (external and internal mass transfer) ถ้าแคทาลิสต์นั้นมีรูพรุนเพิ่มด้วย

3. ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูปมีโอกาสเพิ่มค่ากิจกรรม (activity) และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม สามารถใช้กับระบบเอนไซม์หลายชนิดได้ ในลักษณะ in vitro ได้ สามารถใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง ใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ ใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวพุงและวิธีการตรึงรูป และสามารถนำไปใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพุง และลักษณะของซับสเตรต (ปราณี, 2547)

4. พอลิเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ มีทั้งพอลิเมอร์ธรรมชาติเช่น ไคโตซาน (chitosan) เซลลูโลส (cellulose) เป็นต้น และพอลิเมอร์สังเคราะห์เช่น พอลิเอไมด์ (polyamide) พอลิโพรไพลีน (polypropylene) พอลิสไตรีน (polystyrene) พอลิเอทิลีน (polyethylene) พอลิเมทิลเมทาอะคริเลต (poly(methyl methacrylate), PMMA) และ พอลิเอทิลีนไนมีน (polyethylenimine) เป็นต้น การใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ ถึงแม้ว่าจะมีราคาที่สูงกว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติ แต่ก็มีข้อดี ดังนี้

4.1 ทนทานต่ออุณหภูมิและพีเอชที่รุนแรงและทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพได้ดี

4.2 คุณสมบัติของความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำ (hydrophilic-hydrophobic) สามารถปรับให้ตรงกับความต้องการได้โดยการเลือกโคมอนอเมอร์ (co-monomer) ที่เหมาะสมขณะทำการสังเคราะห์

4.3 สัณฐานวิทยา (morphology) สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยเติมชนิดและสารที่เหมาะสมขณะทำการสังเคราะห์

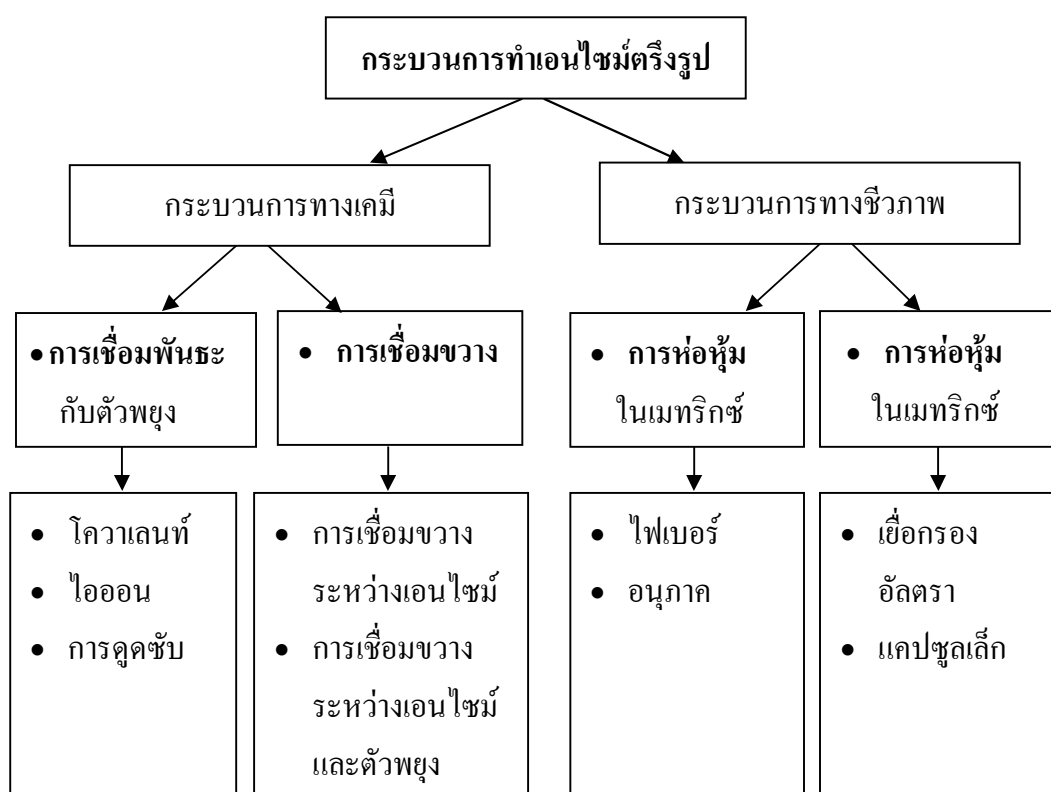
4.4 การปรับสภาพผิว (surface modifications) สามารถทำได้ด้วยการเติมหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive groups)

5. หมู่ต่างๆ บนตัวพยางค์ที่เชื่อมกับหมู่ไวปฏิกิริยาของเอนไซม์

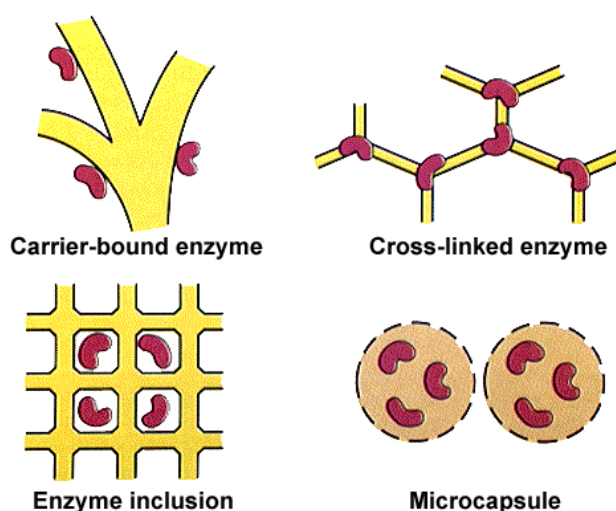
ตัวพยางค์บางชนิดสามารถทำให้มีหมู่ที่ไวต่อการเชื่อมกับหมู่ต่างๆ ของเอนไซม์ได้โดยวิธีการต่างๆ กัน ตามลักษณะหมู่ไวปฏิกิริยานั้นๆ เช่น หมู่ไดอะโซเนียม (diazonium group: $-N^+ \equiv N$) หมู่แอซิดเอไซด์ (acid azide group: $-N=N^+=N^-$) หมู่ไอโซไซยาเนต (isocyanate group: $-N-CO$) หมู่ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate group: $-N-CS$) หมู่แอคทีฟเฮไลด์ (active halide group: $-Br, -I, -F, -Cl$) หมู่แอคทีฟไซยาโน (active cyano group: $-C \equiv N$) หมู่แอคทีฟอะมิโน (active amino group: $-NH_2$) หมู่แอคทีฟคาร์บอกซิล (active carboxyl group: $-COOH$) หมู่แอคทีฟไดซัลไฟด์ (active disulfide group: $-S-S-$) และ หมู่แอคทีฟอัลดีไฮด์ (active aldehyde group: $-CHO$)

6. กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป

แบ่งกระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูปตามแผนภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป แบ่งเป็นวิธีการทางเคมีและการทางกายภาพ
ที่มา: ปรานี (2547)



ภาพที่ 2 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีเชื่อมตัวพุง วิธีเชื่อมขวาง และวิธีห่อหุ้ม
ที่มา: ปราณี (2547)

7. วิธีการตรึงรูป

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์แบ่งเป็น 3 วิธี คือ การเชื่อมกับตัวพุง การเชื่อมขวาง และวิธีห่อหุ้ม (ปราณี, 2547) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

7.1 วิธีการเชื่อมกับตัวพุง (carrier binding method) เป็นการเชื่อมเอนไซม์กับตัวพุง การเชื่อมมีทั้งสิ้น 3 วิธีคือ การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption method) เชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding method) และเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method)

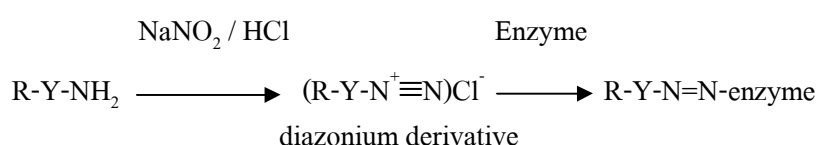
7.1.1 วิธีการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption method) คือ การดูดซับของเอนไซม์บนพื้นผิวภายนอกของตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ วิธีการตรึงรูปวิธีนี้จะไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างตามมิติ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมีเกิดขึ้น และแรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงอ่อนมาก ดังนั้นการนำตัวพุงกลับมาใช้ซ้ำสามารถทำได้ง่ายเหมาะกับตัวพุงราคาแพง ซึ่งพันธะที่เกิดขึ้นในวิธีนี้จะเป็พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงวันเดอวาลส์ (van der waals force) และ แรงกระทำระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และวิธีนี้อาจมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์บ้างเล็กน้อยในลักษณะของการหมุนตัวของเอนไซม์เพื่อจับกับซับสเตรต (stereospecific effect) การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำได้โดยผสมสารละลายเอนไซม์กับตัวพุงที่ใช้ตรึง ภายใต้

สภาวะที่เหมาะสม ทั้งไว้เพื่อให้มีการจับกัน จากนั้นแยกเอนไซม์ที่ถูกตรึงออกด้วยการเหวี่ยงหรือการกรอง ตัวอย่างตัวพุงที่นิยมใช้ตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ เบนโทไนต์ (bentonite) เจลแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate gel) ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) แก้วพรุน (porous glass) โคลนกรด (acid clay) คาโอลิไนต์ (kaolinite) อะลูมินา (alumina) และพอลิเมอร์ธรรมชาติ อาทิ แป้ง กลูเทน คอลลาเจน

7.1.2 วิธีการเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding method) คือการเชื่อมระหว่างโปรตีนของเอนไซม์กับตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำโดยใช้พันธะไอออนิก ตัวอย่างตัวพุงที่นิยมใช้ตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ สารที่มีอนุมูลแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange residue) เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) และพอลิเมอร์สังเคราะห์ เป็นต้น ซึ่งอนุมูลประจุในตัวพุงและในเอนไซม์ต้องต่างกัน เช่น เอนไซม์มีอนุมูลประจุบวก (anionic residue) เช่น กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และตัวพุงมีอนุมูลประจุลบ (cationic residue) เช่น DEAE-cellulose และ DEAE-sephadex เป็นต้น

7.1.3 วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method) คือการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้มีผู้นำมาศึกษามากที่สุด และเนื่องจากพันธะโควาเลนต์ต้องผ่านขั้นตอนการสลายของพันธะโควาเลนต์ที่แข็งแรง และเสถียรมาก ด้วยเหตุนี้ภาวะของปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์จึงค่อนข้างรุนแรง และมีผลโดยตรงต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ และโครงสร้างสามมิติด้วย ผลกระทบดังกล่าวมีทั้งช่วยให้ค่ากิจกรรมสูงขึ้นและลดลง ได้ ทั้ง 2 กรณี ขึ้นอยู่กับสภาวะการตรึงที่ทดลอง ซึ่งการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถทำได้ 7 วิธีย่อยๆ ดังนี้

ก. วิธีไดเอโซ (dialzo method) คือการสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์และตัวพุงที่มีอนุพันธ์ไดเอโซเนียม ($-N^+=N$) เรียกกระบวนการนี้ว่า ไดเอโซไทเซชัน (diazotization) เช่น ตัวพุงที่มี aromatic amino group ($R-Y-NH_2$) แสดงดังภาพที่ 3

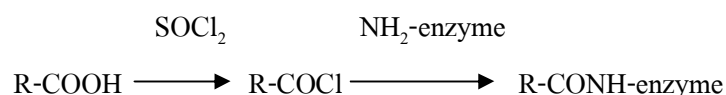


ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชัน

เอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์โดยวิธีนี้ได้แก่ เอนไซม์ที่มีหมู่อะมิโนอิสระมีหมู่อิมิดาโซลหรือหมู่ฟีนอลิกไฮดรอกซิล

ข. วิธีการเชื่อมด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide binding method) คือ การเชื่อมระหว่างโมเลกุลเอนไซม์และตัวพวง ด้วยพันธะเปปไทด์สังเคราะห์ (-CO-NH-) ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ

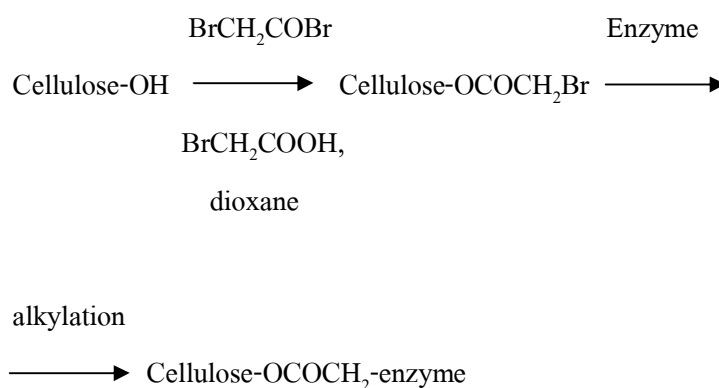
1) ตัวพวงมีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และหมู่อะมิโน (-NH₂) ถูกทำให้เป็นอนุพันธ์ที่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อนุพันธ์ของ acid azide คลอไรด์ และไอโซไซยานาต เป็นต้น แล้วเชื่อมกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ตัวพวงถูกทำให้เป็นอนุพันธ์คลอไรด์ แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาที่ตัวพวงถูกทำให้เป็นอนุพันธ์คลอไรด์

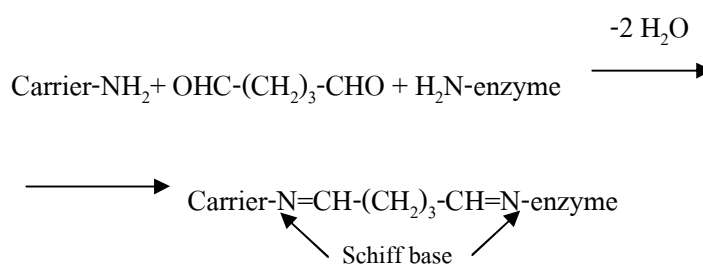
2) ใช้สารควบแน่น ได้แก่ คาร์โบไดอิมิด (carbodiimide) และ Woodward's reagent K เป็นตัวกลางสร้างพันธะเปปไทด์ เมื่อพันธะเปปไทด์เกิดขึ้นแล้ว สารควบแน่นจะถูกปล่อยกลับคืนมาดังเดิม

ค. วิธีการเติมหมู่อัลคิล (alkylation method) คือการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่อะมิโน ฟีนอลิก หรือซัลไฟดริล ของเอนไซม์กับหมู่เฮไลด์ (halide) ของตัวพวงแบบ alkylation แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ปฏิกริยาการเติมหมู่แอลคิล

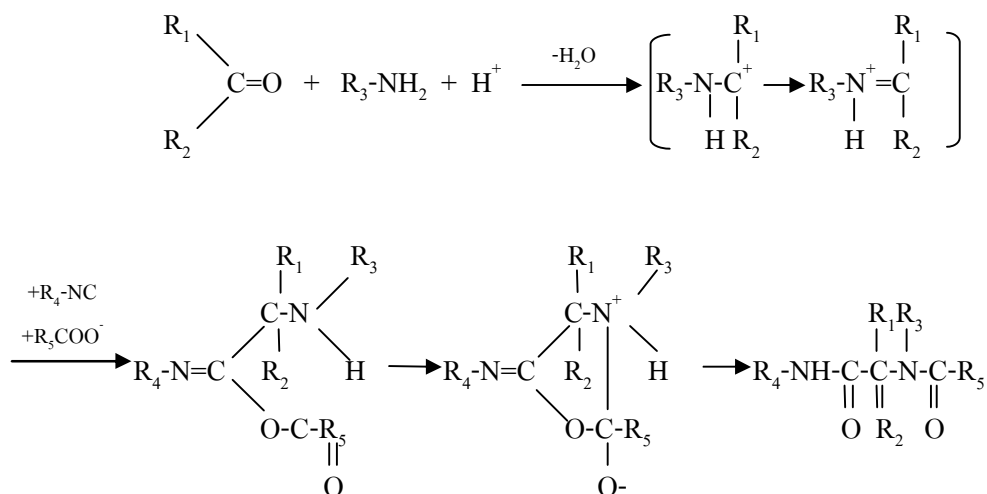
ง. วิธีการเชื่อมพันธะด้วยสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 1 คู่ (bifunctional reagents binding method) เป็นการเชื่อมขวางระหว่างตัวพุงและเอนไซม์ด้วยสารเชื่อมขวาง (cross-linkers) ซึ่งจะเชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของตัวพุงกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ สารเชื่อมขวางอาจเป็นพวกสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ (bifunctional reagents) ที่ทำหน้าที่เดียวกัน ตัวอย่างสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน 1 คู่ที่รู้จักกันแพร่หลาย เช่น กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ซึ่งมีหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่ ที่สามารถเชื่อมกับหมู่อะมิโนของตัวพุงกับเอนไซม์ ด้วยวิธีการสร้างชิฟเบส (schiff base) แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ปฏิกริยาการสร้างชิฟเบส ซึ่งก็คือหมู่ฟังก์ชัน $-\text{C}=\text{N}-\text{X}$ โดยที่ X คือหมู่เอริลหรือแอลคิล แต่ต้องไม่ใช่ไฮโดรเจน

จ. วิธีการเชื่อมกับตัวพุงด้วยปฏิกิริยาอุจิ (ugi reaction binding method) เป็นวิธีผสมของการทำให้สารประกอบในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยหมู่ไวต่อปฏิกิริยา เช่น อัลดีไฮด์ (aldehyde, R_1) คีโตน (ketone, R_2) เอมีน (amine, $\text{R}_3\text{-NH}_2$) ไอโซไซยาไนด์ (isocyanide, $\text{R}_4\text{-N}\equiv\text{C}$) และคาร์บอกซิล (carboxyl, $\text{R}_5\text{-COOH}$) ทั้งนี้ตัวพุงและเอนไซม์ต้องมีหมู่ไวต่อปฏิกิริยาเหล่านี้

อย่างไรอย่างหนึ่งก็ได้ เพื่อทำให้เกิด N-substituted amide ($R_4\text{-NH-CO-CR}_1\text{R}_2\text{-NR}_3\text{-CO-R}_5$) ทั้งนี้ตัวพวงต้องเป็นตัวพวงที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งอาจมีหมู่ใดก็ได้จาก R_1 R_2 R_3 R_4 และ R_5 ดังปฏิกิริยาแสดงในภาพที่ 7



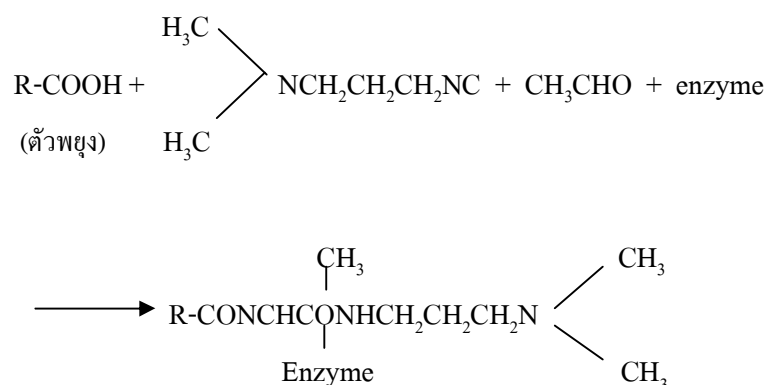
ภาพที่ 7 ปฏิกิริยาอูจิ

จากภาพที่ 7 เกิดปฏิกิริยาดังนี้

1. สารอะมิโน (amino compound (R_3)) จะทำปฏิกิริยากับสารคาร์บอนิล (carbonyl compound (R_1, R_2)) เกิด immonium ion

2. ไอออนแอมโมเนียม (immonium ion) จะทำปฏิกิริยาเกาะคู่ (couple) กับไอโซไซยาไนด์ (isocyanide (R_4)) และสารคาร์บอกซิล (carboxyl compound (R_5)) เกิดเป็นเอไมด์ (amide)

ดังนั้นถ้าหากว่า R_1 - R_5 อันหนึ่งอันใดเป็นตัวพวง ก็จะเกิดการตรึงรูปของเอนไซม์บนตัวพวง ดังตัวอย่างในภาพที่ 8 ที่ใช้ R_5 เป็นตัวพวง



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาอูจิ เมื่อตัวพุงมีหมู่คาร์บอกซิล

ปฏิกิริยาข้างต้นนี้เกิดจากตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำที่มีหมู่คาร์บอกซิล (R_3) ผสมรวมกับสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีหมู่อะมิโน (H_2N -enzyme, R_3) จากนั้นเติมอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde (CH_3CHO , R_2) และ 3-dimethylaminopropylisocyanide (R_4) กวนสารละลายทั้งหมดเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่พีเอช 6.5 ซึ่งปรับโดยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 นอร์มอล (0.5N HCl) จะได้เอนไซม์ตรึงรูปในลักษณะ N-substituted amide

ฉ. วิธีการเชื่อมพันธะโดยการแลกเปลี่ยนหมู่ไทออล (thiol, -SH) เป็นไดซัลไฟด์ (disulfide) ซึ่งเป็นวิธีการตรึงรูปแบบแลกเปลี่ยนหมู่ไทออลของเอนไซม์และตัวพุง ซึ่งการตรึงรูปวิธีนี้ค่อนข้างจำกัดกับเอนไซม์ยูริเอสเท่านั้น (มีหมู่ไทออล) แต่ปัจจุบันก็มีการศึกษากับเอนไซม์ที่ไม่มีหมู่ไทออล เช่น α -อะไมเลส ซึ่งต้องเติมหมู่ไทออลให้กับเอนไซม์ก่อน (thiolation)

ช. วิธีการเชื่อมพันธะกับตัวพุงด้วยวิธีอื่นๆ ได้แก่

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

2) การใช้พอลิ (4-ฟอร์มิล-เมทอกซีฟีนอล) เมทาอะคริเลต หรือ poly (4-formyl-methoxyphenol) methacrylate เป็นตัวพุงที่มีหมู่อัลดีไฮด์ที่ไวต่อปฏิกิริยา จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ ก.

3) วิธีการสร้างพันธะกัวนิดีน (guanidine)

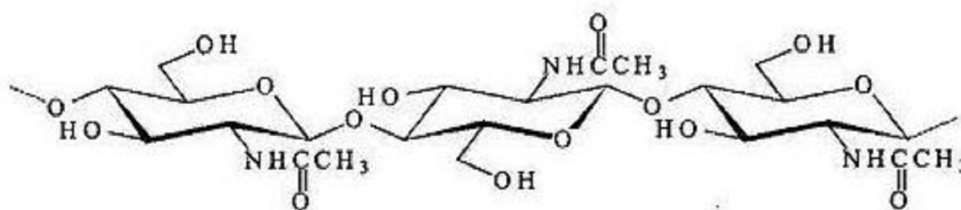
4) วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ร่วมกับโคแฟกเตอร์

7.2 วิธีการเชื่อมขวาง (cross-linking method) การทำเอนไซม์ตรึงรูปวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับวิธีการสร้างพันธะโควาเลนต์ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพุง เอนไซม์จะถูกตรึงรูปด้วยการสร้างพันธะเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้สารเชื่อมขวาง (cross-linkers) ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุลหรือมากกว่า (bi- or multifunctional reagents) ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ละลายน้ำได้น้อยลง ตัวอย่างสารเชื่อมขวางได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) อนุพันธ์ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate derivative) อนุพันธ์ไอโซไซยาเนต (isocyanate derivative) และ บิสไดอะโซเบนซีน (bisdiazobenzidine) เป็นต้น และเนื่องจากวิธีนี้ก่อให้เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ ฉะนั้นจะมีผลต่อโครงสร้างสามมิติและกิจกรรมเอนไซม์ได้ง่าย

7.3 วิธีห่อหุ้ม (entrapping method) เป็นวิธีการตรึงรูปแบบรวมเอนไซม์อิสระไว้ในช่องว่างของตาข่ายพอลิเมอร์ หรือห่อหุ้มเอนไซม์อิสระไว้ด้วยเยื่อบางที่ยอมให้สารซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แตกต่างจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมี โดยที่การตรึงจะไม่มีพันธะเคมีใด ๆ ระหว่างเอนไซม์และพอลิเมอร์ หรือแผ่นเมมเบรนที่ล้อมรอบ จึงสามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิดรวมทั้งเซลล์และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ทั้งที่มีขนาดและคุณสมบัติแตกต่างกันก็ตาม การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ทำให้ความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับการตรึงเอนไซม์ที่ใช้พันธะทางเคมี

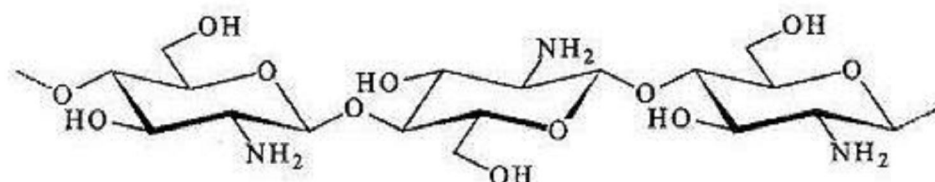
การใช้โคโคซานเป็นตัวพุงสำหรับการตรึงเอนไซม์

โคโคซาน คือ สารพอลิเมอร์ชีวภาพที่สกัดจากไคติน ชื่อทางเคมีคือ Poly [β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่อะซิไทล (acetyl) ของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine (เรียกว่า deacetylation เป็นการเปลี่ยนน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine เป็น glucosamine) ออกตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ผลิตภัณฑ์โคโคซานที่ได้จะมีคุณภาพและสมบัติแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับเทคนิคและขั้นตอนการผลิต รูปที่ 9 และ 10 เป็นลักษณะโครงสร้างของ ไคติน และโคโคซาน ตามลำดับ



ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

ที่มา: พูนทรัพย์ (2552)



ภาพที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน

ที่มา: พูนทรัพย์ (2552)

ไคโตซานเป็นตัวย่อยที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากไคโตซานมีราคาถูก และไม่อันตรายกับเอนไซม์ (Kumer,2000) และนอกจากนี้ไคโตซานไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในสารละลายหลายชนิด ได้แก่ สารละลายอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดไพรูวิก กรดมาลิก กรดทาร์ทาริก กรดซิตริก กรดไนตริก กรดไฮโดรคลอริกเจือจางและกรดเปอร์คลอริก ละลายได้น้อยในกรดฟอสฟอริก แต่ไม่ละลายในกรดซัลฟูริก ปกติแล้วไคโตซานที่ได้จะมีส่วนผสมของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine และ glucosamine อยู่ในสายพอลิเมอร์เดียวกัน ซึ่งระดับการกำจัดหมู่ acetyl (หรือเรียกว่า เปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation) นี้มีผลต่อสมบัติและการทำงานของไคโตซาน

น้ำหนักรโมเลกุลของไคโตซานบอกถึงความยาวของสายโซ่ ซึ่งมีผลต่อความหนืด เช่น ไคโตซานที่มีน้ำหนักรโมเลกุลสูงจะมีสายยาวและสารละลายมีความหนืดมากกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักรโมเลกุลต่ำ เป็นต้น ดังนั้นการนำไคโตซานไปใช้ประโยชน์จะต้องพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด deacetylation และน้ำหนักรโมเลกุลไคโตซานเป็นวัสดุชีวภาพที่มีความหลากหลายและมีสมบัติที่โดดเด่น มีความเป็นประจุบวกสูง สามารถทำเป็นแผ่นฟิล์ม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่มีพิษและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้โคโคซานในการผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างมากมาย อาทิ มีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด จึงใช้ในด้านอาหารและการแพทย์ เช่น มีการวิจัยนำแผ่นโคโคซานมาใช้ปิดแผล ช่วยทำให้ไม่เป็นแผลเป็น ทำให้แผลเรียบ และหายได้เร็วขึ้น เป็นต้น

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

1. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับความเร็วของปฏิกิริยา รวมทั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์ ปัจจัยต่าง ๆ ที่จะเป็นตัวกำหนดความเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์ต่างชนิดกัน จะมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน แต่ยังคงมีหลักการพื้นฐานเดียวกัน (ปราณี, 2547) ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังต่อไปนี้

1.1 ความเป็นกรดค่า (pH) เอนไซม์แต่ละตัวจะมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของมัน (optimum pH)

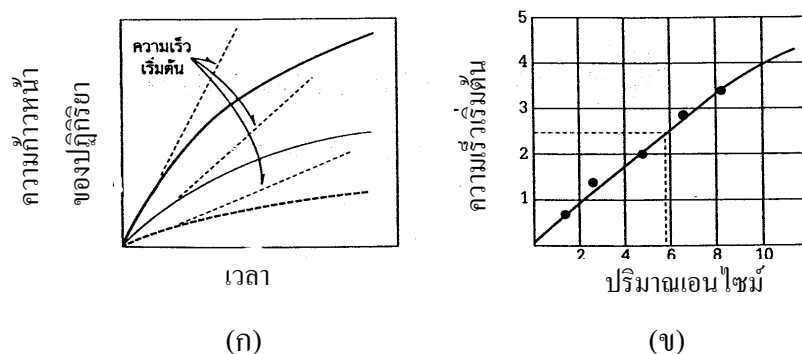
1.2 อุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เร็วได้ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงมากเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสภาพเดิมของมันไป เพราะเกิด denaturation เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงสุดของมัน (optimum temperature)

1.3 ความเข้มข้นของซับสเตรต เมื่อจำนวนเอนไซม์คงที่ จำนวนซับสเตรตที่เพิ่มขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นด้วย (ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง) จนถึงจุดหนึ่งก็จะหยุดคงที่ตลอดไป ไม่ว่าจะเพิ่มจำนวนซับสเตรตขึ้นไปอีก (ปฏิกิริยาอันดับศูนย์) ที่เป็นเช่นนี้อธิบายได้ว่าเมื่อจำนวนซับสเตรตยังมีน้อย บริเวณเร่งของเอนไซม์ยังถูกใช้ไม่หมด จำนวนซับสเตรตที่เพิ่มขึ้นก็จะไปจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนซับสเตรตที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อซับสเตรตเพิ่มขึ้นจนบริเวณเร่งของเอนไซม์ถูกใช้ไปเต็มที่ (จำนวนผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้เกิดด้วยอัตราเร็วสูงสุดแล้วเท่าที่เอนไซม์สามารถเร่งได้) การเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจึงไม่

ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นได้อีก บางกรณีอาจลดลงด้วยหากว่าซับสเตรตที่มีมากเกินไปยับยั้งปฏิกิริยา

1.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ การเกิดปฏิกิริยาจะช้าหรือเร็วขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ จะมีเอนไซม์ถูกสังเคราะห์ในปริมาณจำนวนหนึ่ง (constitutive enzyme) และเมื่อมีซับสเตรตเข้าไปจะเกิดการเร่งให้มีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องมาเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น เรียกเอนไซม์ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้างขึ้นเมื่อมีซับสเตรตว่า inducible enzymes

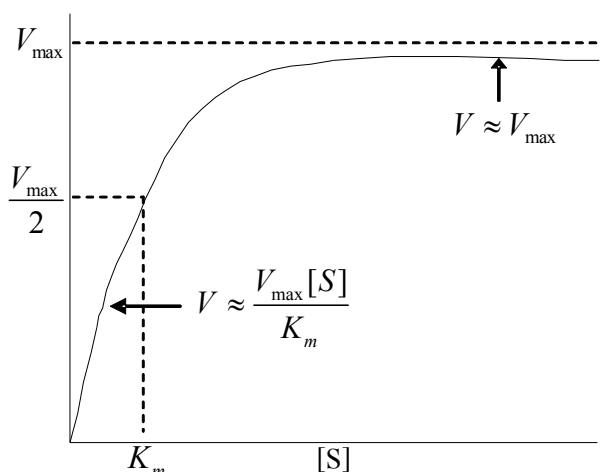
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์นั้น L. Michaels และ M.L. Menten (1913) ได้อธิบายไว้ดังนี้ว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับ “สารตั้งต้น” (substrate) หรืออาจเรียกว่า “สารที่จะเข้าทำปฏิกิริยา” (reactant) เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น (Lehninger *et al.*, 1993) โดยเอนไซม์จะจับกับสารตั้งต้นดังกล่าวอย่างสนิทเหมือนกับ “แม่กุญแจกับลูกกุญแจ” เกิดเป็น “สารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์กับสารตั้งต้น” (enzyme substrate complex) และได้ทดลองใช้อินเวอร์เทสหรือซูเครสสกัดจากยีสต์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายซูโครส เป็น กลูโคสและฟรุกโทส โดยกำหนดให้ปริมาณซับสเตรต (ซูโครส) เริ่มต้นเท่ากันทุกการทดลอง โดยมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ หรือปริมาณเอนไซม์ วัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial velocity) และนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์ ได้กราฟเส้นตรงดังภาพที่ 11 (ข) ความเร็วเริ่มต้นจะแปรผันตามปริมาณเอนไซม์ สำหรับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาวัดได้จากการเกิดผลิตภัณฑ์ต่อหน่วยเวลาในช่วงต้นปฏิกิริยาตามภาพที่ 11 (ก) โดยมีค่าคงที่ในช่วงนี้เท่านั้น แต่ในระยะหลังกราฟเป็นเส้นโค้ง เพราะความเร็วในการเกิดผลิตภัณฑ์ค่อยๆ ลดต่ำลง



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์

- (ก) ความก้าวหน้าของปฏิกิริยาและเวลาที่ปริมาณเอนไซม์ต่าง ๆ
- (ข) ความเร็วเริ่มต้นและปริมาณเอนไซม์

เมื่อกำหนดให้ปริมาณเอนไซม์คงที่แล้ววัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มข้นของซับสเตรตต่างๆ จะได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V) และความเข้มข้นของซับสเตรต ($[S]$) ดังภาพที่ 12 เรียกเส้นกราฟที่ได้ว่า เส้นโค้งการอิ่มตัวด้วยซับสเตรต (substrate saturation curve) ในลักษณะ rectangular hyperbola เส้นกราฟนี้แสดงถึงการเข้าสู่ค่าคงที่ค่าหนึ่งซึ่งเรียกว่า ค่าความเร็วเริ่มต้นสูงสุด ($V_{\max}$) นอกจากนี้ค่า K_m (เรียกว่า Michaelis-Menten constant) เท่ากับความเข้มข้นของซับสเตรตจำเพาะที่ทำให้ความเร็วเริ่มต้นเป็นครึ่งหนึ่งของ $V_{\max}$ ดังนั้น ค่า K_m จึงเป็นค่าคงที่สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตและความเร็วเริ่มต้น เส้นกราฟนี้สามารถแบ่งปฏิกิริยาออกเป็น 2 ระยะ คือ



ภาพที่ 12 เส้นโค้งการอิ่มตัวด้วยซับสเตรต (substrate saturation curve)

ที่มา: Lehninger (1993)

1. ปฏิกิริยาในระยะ first order kinetics, $[S] \leq 0.01K_m$ (ในทางปฏิบัติ $[S] \approx 0.05K_m$)

เป็นช่วงที่ปริมาณซับสเตรตต่ำ โดยที่ความเร็วเริ่มต้นขึ้นกับความเข้มข้นของซับสเตรตเพียงอย่างเดียว ($V \propto [S]^1$)

จากสมการ Michaelis-Menten

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

เมื่อ $[S] < 0.05K_m$

แทนค่าใน (1)
$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + 0.05K_m} \quad (2)$$

โดยเทอมของ $0.05K_m$ มีค่าน้อยมาก

$$V = \frac{[S]^1 V_{\max}}{K_m} \quad (3)$$

ดังนั้น $V \propto [S]^1$ และเรียกว่าเป็น first order kinetics

2. ปฏิกิริยาในระยะ zero order kinetics, $[S] \geq 100K_m$ (ในทางปฏิบัติ $[S] \approx 20K_m$)

แทนค่า $[S] > 20K_m$ ในสมการ 1

เป็นช่วงความเข้มข้นของซับสเตรตที่สูง และค่าความเร็วเริ่มต้นไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของซับสเตรตอีกต่อไป ($V \propto [S]^0$) ความเร็วเริ่มต้นที่คงที่นี้ เรียกว่า ความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (maximum velocity, $V_{\max}$)

แทนค่า $[S] > 20K_m$ ในสมการ 1

แทนค่าใน (1)
$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

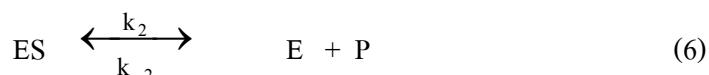
โดยเทอมของ K_m มีค่าน้อยมาก

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{[S]} = V_{\max} [S]^0 \quad (4)$$

ดังนั้น $V \propto [S]^0$ และเรียกว่าเป็น zero order kinetics

นอกจากปฏิกิริยาทั้งสองลักษณะนี้แล้ว Victor Henri ได้ทดลองและสรุปว่า เอนไซม์จะจับกับซับสเตรตก่อนเพื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์-ซับสเตรต (enzyme-substrate complex, ES) (ปราณี, 2547) ดังนั้น Michaelis และ Menten ได้ตั้งสมมุติฐานตามข้อสรุปนี้และได้

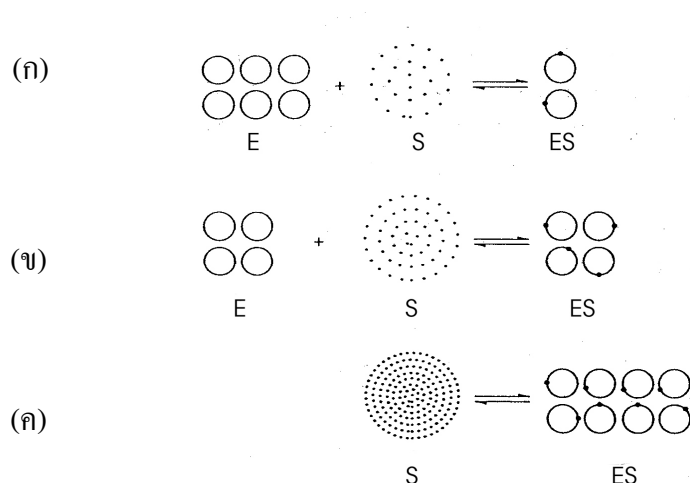
รายงานว่าการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์และซับสเตรตเพื่อเป็นสารประกอบเชิงซ้อนนี้เป็นปฏิกิริยาผันกลับได้และเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วดังสมการ 5



จากนั้น ES จะสลายได้เป็นผลผลิต (P) และเอนไซม์อิสระ (E) ดังสมการ 6 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับได้เช่นกัน แต่ช้ากว่าปฏิกิริยาในสมการ 5 จึงจัดเป็นปฏิกิริยาที่กำหนดความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมด เรียก rate-limiting step หรือ rate-determining step หรือสามารถกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่า ความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมดขึ้นกับปริมาณ [ES] ซึ่งแปรผันกับความเข้มข้นของซับสเตรต [S] อธิบายได้ดังต่อไปนี้

ก. ถ้าเอนไซม์ทั้งหมดอยู่ในรูปของ ES ความเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าสูง โดยจะเกิดได้ถ้าเอนไซม์อิ่มตัวด้วยซับสเตรต (substrate saturation) ตามภาพที่ 13ก โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีความเร็วเริ่มต้นคงที่และเท่ากับความเร็วเริ่มต้นสูงสุด (V_{max}) ทันทีตามภาพที่ 12 นอกจากนี้ปริมาณซับสเตรตที่สูงทำให้ปฏิกิริยาไปทางขวามากขึ้น ดังนั้นจากสมการ 5 จึงได้ ES สูงขึ้นถ้าเติม S ลงไปมาก ส่งผลให้ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาในสมการที่ 6 มีค่าสูงตาม ทั้งนี้เมื่อ ES สลายให้ผลผลิต (P) และเอนไซม์อิสระ (E) ในวงจรแรก (first cycle) ของปฏิกิริยา เอนไซม์ที่ออกมานี้จะจับกับซับสเตรตทันทีและนำไปสู่การเร่งปฏิกิริยาในวงจรที่ 2 (second cycle) ดังนั้นจึงไม่มีเอนไซม์อิสระ (E) เหลือค้างในระบบ สภาพเช่นนี้คือสภาพที่เอนไซม์อิ่มตัวด้วยซับสเตรต

ข. ถ้าเอนไซม์ในระบบส่วนมากอยู่ในรูปเอนไซม์อิสระ (E) ความเร็วปฏิกิริยาก็จะต่ำกว่า เพราะปริมาณ ES ที่เกิดมีค่าต่ำนั่นเอง การเพิ่มปริมาณ S ทำให้เกิด ES มากขึ้น (ภาพที่ 13ข และ ข)



ภาพที่ 13 ความเข้มข้นของซับสเตรต (S) ต่อปริมาณการเกิดเอนไซม์-ซับสเตรตคอมเพล็กซ์ (ES)
ที่มา: ปราณี (2547)

2. การสร้างสมการจลนพลศาสตร์โดย Michaelis-Menten

สำหรับสมการเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ คือ ปฏิกริยาในสมการ 5 และ 6 ดังนี้



สร้างโดย Henri-Michaelis-Menten ซึ่งใช้อธิบายการสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรตและความเร็วปฏิกิริยาไว้ในลักษณะ Michaelis-Menten equation ด้วยการกำหนดให้

- $[E]_0$ = ความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นทั้งหมด (ผลรวมความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับซับสเตรต)
- $[ES]$ = ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับซับสเตรตที่เวลาใดๆ
- $[E]_0 - [ES]$ = ความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระที่เวลาใดๆ
- $[E]$ = ความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระที่เวลาใดๆ

- $[S]_0$ = ความเข้มข้นของซับสเตรตที่เวลาเริ่มต้น ซึ่งใช้ในปริมาณสูงกว่าเอนไซม์
 มากๆ ดังนั้นปริมาณซับสเตรตที่จับอยู่กับเอนไซม์ ($[ES]$)จะมีน้อยมาก เมื่อ
 เทียบกับปริมาณซับสเตรตทั้งหมดเริ่มต้น
- $[S]$ = ความเข้มข้นของซับสเตรตอิสระที่เวลาใดๆ
- $[P]$ = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เวลาใดๆ

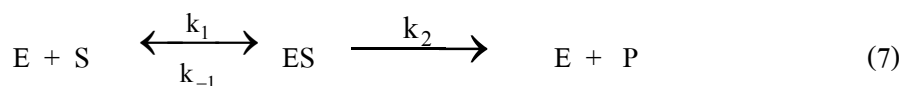
ข้อกำหนดในการสร้างสมการ เป็นดังนี้

1. $[S]_0 \gg [E]_0$

ความเข้มข้นของซับสเตรตทั้งหมด (หรือความเข้มข้นของซับสเตรตที่เวลาเริ่มต้น)
 จะสูงกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมดมาก (หรือความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นทั้งหมด)
 โดยทั่วไป $[S]_0 = 10^{-5}$ - 10^{-2} โมลาร์ ในขณะที่ $[E]_0 = 10^{-9}$ - 10^{-6} โมลาร์

2. ปฏิกิริยา $ES \xrightarrow{k_2} E + P$ เป็นปฏิกิริยาไม่ผันกลับ (irreversible reaction)

ความเร็วปฏิกิริยาเริ่มต้นที่วัดเป็นความเร็วของปฏิกิริยาทันทีที่เอนไซม์รวมกับ
 ซับสเตรตเป็น ES ในช่วงนี้ $[P]$ มีค่าน้อยมาก ดังนั้นปฏิกิริยาดังกล่าวจึงไม่ผันกลับหรืออาจกล่าวได้
 ว่าผลิตภัณฑ์เปลี่ยนกลับมาเป็น ES น้อยมาก ดังนั้นค่า k_2 สามารถตัดทิ้งได้ และปฏิกิริยาที่ปรากฏ
 ในสมการ 5 และ 6 เขียนต่อกันได้ดังนี้



3. ที่สภาวะคงตัว (steady state) ที่เวลาใด ๆ ได้ว่า $\frac{d[ES]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt}$ (8)

สภาวะคงตัว (steady state) คือสภาวะที่ ES กลายเป็น P และ E ซึ่ง E ที่เกิดขึ้นนี้จะจับ
 กับ S เพื่อเปลี่ยนเป็น ES ทันที นั่นคืออัตราการเกิด ES เท่ากับอัตราการหายไปของ ES และทำให้
 ค่า $[ES]$ คงที่ตลอดเวลา

4. ปฏิกิริยา $ES \xrightarrow{k_2} E + P$ เป็นปฏิกิริยาที่กำหนดความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมด
 เนื่องจากปฏิกิริยา $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES$ เกิดขึ้นเร็วมาก ดังนั้นความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V)
 ขึ้นอยู่กับขั้นตอนของปฏิกิริยา $ES \xrightarrow{k_2} E + P$ หรือขึ้นกับ $[ES]$ ดังนั้น $V = k_2[ES]$

ดังนั้นจากปฏิกิริยาที่แสดงในสมการ 7 จะได้ว่า

ก. ความเร็วของการเกิด ES คือ $\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S]$ (9)

ข. ความเร็วของการสลาย ES คือ $-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$ (10)

ที่สภาวะคงตัว (steady state) ความเร็วของการเกิด ES = ความเร็วของการสลาย ES

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (11)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (12)$$

ซึ่ง $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m = \text{Michaelis-Menten constant}$ (13)

เนื่องจากการวัดปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระ $[E]$ และ $[ES]$ ที่เวลาใดๆ ในทางปฏิบัติทำได้ยาก จึงต้องเปลี่ยนรูปสมการใหม่โดยแทนค่า $[E]$ เป็น $[E]_0$ กล่าวคือ $[E]_0 = [E] + [ES]$ ดังนั้นแทนค่า $[E]$ ด้วย $[E]_0 - [ES]$ ลงในสมการ 12 จะได้

$$K_m = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]} \quad (14)$$

ดังนั้นได้ว่า $[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_m + [S]}$ (15)

เนื่องจากตามข้อกำหนดข้อ 4 ได้ว่า $V = k_2[ES]$ (16)

แทนค่าสมการ 15 ในสมการ 16 จะได้ $V = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + [S]}$ (17)

ถ้า $[S]$ สูงเกินพอ $[E]_0 = [ES]$ และทำให้ $V = V_{\max}$
แทนค่าดังกล่าวลงใน 16 จะได้

$$V_{\max} = k_2[ES] = k_2[E]_0 \quad (18)$$

แทนค่าสมการ 18 ในสมการ 17 $V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$ (19)

ซึ่งสมการที่ 19 นี้คือ Michaelis-Menten equation นั่นเอง

ถ้า $V = \frac{V_{\max}}{2}$ (20)

แทนค่านี้ลงในสมการ 19 จะได้

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (21)$$

จัดรูปสมการ 21 ได้เป็น $K_m + [S] = 2[S]$ (22)

และได้ว่า $K_m = [S]$ (23)

3. วิธีการเขียนกราฟจากข้อมูลของจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (methods of plotting enzyme kinetics data)

ตามที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วว่า จากการทำการทดลองโดยวิธีของ Michaelis-Menten แล้วเขียนกราฟระหว่าง V กับ $[S]$ จะได้กราฟไฮเพอร์โบลา ซึ่งค่อนข้างจะยุ่งยากในการประเมินค่า $V_{\max}$ และ K_m เพื่อที่จะให้การหาค่าทั้งสองนี้ไม่ซับซ้อน จึงต้องหาวิธีเขียนกราฟความสัมพันธ์ออกมาเป็นเส้นตรง เช่น สำหรับสมการอันดับหนึ่งของ Michaelis-Menten (1st order Michaelis-Menten)

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

สามารถทำให้อยู่ในรูปสมการกราฟเส้นตรง $y = ax + b$ ได้โดยกลับเศษเป็นส่วน

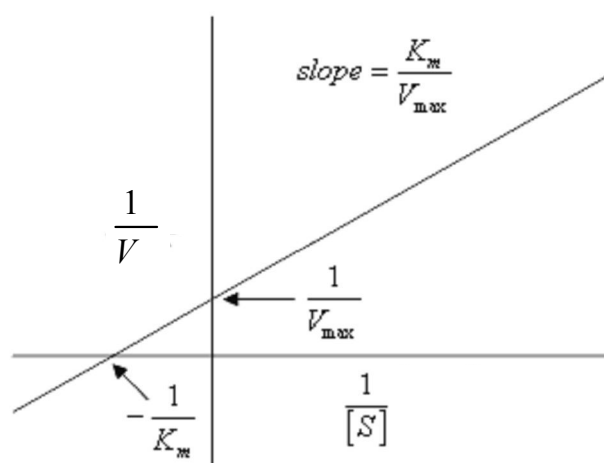
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (24)$$

แยกเทอม V และ $[S]$ ได้ว่า
$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (25)$$

เรียกวิธีนี้ว่า Lineweaver-Burk plot ดังนั้นถ้าเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{V}$ และ $\frac{1}{[S]}$ จะได้ความชันเท่ากับ

$\frac{K_m}{V_{\max}}$ และจุดตัดบนแกน y เท่ากับ $\frac{1}{V_{\max}}$ ตามภาพที่ 14 นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อ $\frac{1}{V} = 0$ จะทำให้

$$\left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{V_{\max}} \text{ และ } \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m} \text{ กล่าวคือ จุดตัดบนแกน } \frac{1}{[S]} \text{ คือ } -\frac{1}{K_m}$$



ภาพที่ 14 Lineweaver-Burk plot หน่วยของ V และ $[S]$ ที่นิยมใช้คือ $\mu\text{M}/\text{min}$ และ mM ตามลำดับ

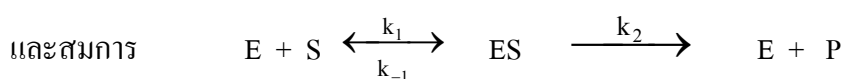
ที่มา: Lehninger (1993)

4. ความหมายของค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m)

สมการ Michaelis-Menten นี้ได้อธิบายได้ทั้งปฏิกิริยาที่มีซับสเตรตตัวเดียว และปฏิกิริยาที่มีซับสเตรตสองตัว โดยการทำให้ซับสเตรตตัวหนึ่งมีค่าความเข้มข้นคงที่ที่ระดับอิ่มตัว ทำให้ปฏิกิริยานี้มีกฎอัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นคล้ายอัตราเร็วอันดับที่หนึ่ง (pseudo-single-substrate reaction) โดยเอนไซม์อาจมีบริเวณจับซับสเตรต (active site) บริเวณเดียวหรือหลายบริเวณก็ได้ แต่มีข้อแม้ว่าบริเวณจับเหล่านั้นต้องไม่ทำปฏิกิริยากัน โดยทั่วไป สมการ Michaelis-Menten จะถูกนำมาใช้วิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์แทบทุกปฏิกิริยา โดยค่า K_m มีความหมายดังนี้ (ปราณี, 2547)

ระบุความเร็วของปฏิกิริยาโดยพิจารณาจากระดับ $[ES]$

จากนิยาม
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (26)$$



ในกรณีที่ $k_{-1} \gg k_2$ และทำให้

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (27)$$

ดังนั้นค่า K_m จึงขึ้นกับปฏิกิริยา $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES$ เพียงอย่างเดียว หรืออีกนัยหนึ่งขึ้นกับ dissociation constant (k_{-1}) หรือ affinity constant (k_1) ของ ES นั้นเอง ถ้าค่า K_m ต่ำ แสดงว่าเอนไซม์สามารถสร้าง ES ได้มาก หรือ ES แตกตัวได้น้อย ($k_1 > k_{-1}$) เนื่องจากความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมดขึ้นกับค่า $[ES]$ ดังนั้นสามารถอธิบายได้ว่า ถ้าเอนไซม์ทั้งหมดอยู่ในรูปของ ES ความเร็วของปฏิกิริยาก็จะสูง (K_m จะต่ำ) ค่าคงที่ K_m นี้สามารถคำนวณได้ด้วยวิธีเขียนกราฟ โดยจะพบว่าค่า K_m ของแต่ละเอนไซม์จะแตกต่างกันไป เอนไซม์ตัวเดียวกันแต่หากจับกับสารตั้งต้นต่างชนิดก็จะมีค่า K_m ต่างกัน

5. ความหมายของค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด ($V_{\max}$)

ค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ต่อซับสเตรตจำเพาะ ($V_{\max}$) เป็นค่าแสดงประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้เมื่อกำหนดปริมาณเอนไซม์ในหน่วยโมลาร์ (molar) เท่ากัน ความสำคัญของค่าความเร็วสูงสุด ($V_{\max}$) นั้นนำมาใช้กำหนดค่า k_{cat} ซึ่ง k_{cat} คือ จำนวนหมุนเวียน (turnover number) ของเอนไซม์ เป็นจำนวนโมเลกุลของสารตั้งต้นสูงสุดที่จะถูกเปลี่ยนให้เป็นผลิตภัณฑ์ภายในเวลา 1 วินาทีต่อ 1 บริเวณเร่ง (active site) เนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดนั้นคำนวณที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูง ๆ ซึ่งบริเวณเร่งทั้งหมดถูกจับไว้ด้วยสารตั้งต้น ดังนั้น จำนวนหมุนเวียน จึงเป็นค่าที่ใช้บอกความเร็วของเอนไซม์ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ ในขณะที่บริเวณเร่งถูกใช้เต็มที่

ค่า k_{cat} เป็นสัดส่วนโดยตรงกับ $V_{\max}$ แต่เป็นสัดส่วนผกผันกับความเข้มข้นของเอนไซม์รวม $[E]_t$ ดังนั้น จะได้

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]_t} \quad (28)$$

6. ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Effect of temperature on enzyme stability and activity)

ปฏิกิริยาเคมีส่วนใหญ่จะให้ความเร็วปฏิกิริยาสูงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ให้แก่โมเลกุลของสารปฏิกิริยา แล้วมีผลให้เกิดการชนกันได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา สำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เช่นเดียวกัน เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและกิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดเนื่องจากโครงสร้างระดับตติยภูมิ (tertiary structure) เรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จะต้องจับกับซับสเตรตที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ระดับตติยภูมินี้มีพันธะแรงอ่อนที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์จำนวนมาก ด้วยเหตุนี้โมเลกุลของเอนไซม์มีโครงสร้างที่ละเอียดอ่อนมาก ถ้าโมเลกุลของสารปฏิกิริยามีพลังงานมากเกินไป โครงสร้างตติยภูมิเสียหาย (disrupt) มีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ และสูญเสียค่ากิจกรรมไป (denature) ดังนั้นสรุปได้ว่าอุณหภูมิของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นมีผลให้ V เพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิดการเพิ่มความเร็วการชนกันระหว่าง E และ S แต่ในบางกรณีจะไม่เป็นเช่นนั้นก็ได้ เนื่องจากอุณหภูมิสูงจะเพิ่มอัตราเร็วของการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ได้ด้วย

การเสีสภาพด้วยความร้อน (thermal deactivation) คือผลของอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์เสีสภาพซึ่งสามารถอธิบายได้ดังสมการต่อไปนี้



จากสมการที่ 29 $[E]$ และ $[E_d]$ คือปริมาณเอนไซม์ก่อนการเสีสภาพและที่เสีสภาพด้วยความร้อน ตามลำดับ และ k_d คือค่าคงที่ของการเสีสภาพจากความร้อน (deactivation rate constant) โดยมีกัขึ้นอยู่กัอุณหภูมิตามสมการของอาร์เรเนียส (Arrhenius's Equation) และถ้าสมมติว่าจลนพลศาสตร์ของการเสีสภาพด้วยความร้อน เป็น pseudo-first order จะได้ว่า

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_d t + C \quad (30)$$

โดย A_0 และ A เป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลาเริ่มต้น (ไม่ผ่านการบ่มหรือยังไม่เสีสภาพด้วยความร้อน) และเวลาใดๆ (ได้มีการเสีสภาพด้วยความร้อนแล้วบ้าง) ตามลำดับมีหน่วยเป็นยูนิตการที่สมการ 30 ใช้ค่ากิจกรรมแทนปริมาณเอนไซม์ มีสาเหตุจากค่ากิจกรรมนี้เป็นค่าที่สัมพันธ์กัปริมาณเอนไซม์อยู่แล้ว โดยแสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตสารต่อหนึ่งหน่วยเวลาและสามารถวัดได้ง่ายจากการทดลอง

6.1 สมการของอาร์เรเนียส (Arrhenius's Equation)

อาร์เรเนียสได้แสดงสมการของค่าอัตราเร็วคงที่โดยอยู่ในเทอมของอุณหภูมิ พลังงานของการกระตุ้น และแฟกเตอร์ของความถี่ (frequency factor) ของปฏิกิริยา โดยในปี ค.ศ. 1889 อาร์เรเนียสเสนอว่าพลังงานของการกระตุ้นเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา ทั้งนี้เนื่องจากสมดุลคงที่มีค่าเท่ากับอัตราส่วนของอัตราเร็วคงที่สองตัวนั้นคือ $K_{eq} = k_1/k_2$ ดังนั้นค่าอัตราเร็วคงที่ควรจะขึ้นกัอุณหภูมิเช่นเดียวกับค่าสมดุลคงที่ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าสมดุลคงที่เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไปนั้นสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการของวานท์ฮอฟ (Van't Hoff Equation) ที่ว่า

$$\left(\frac{d \ln K}{dT} \right) = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (31)$$

โดย ΔH° = ผลต่างเอนทาลปีมาตรฐานของปฏิกิริยา R = ค่าคงที่ของแก๊ส (gas constant) และ K = ค่าสมดุลที่ ซึ่งเท่ากับ k_f/k_r โดยที่ k_f และ k_r เป็นค่าอัตราเร็วคงที่ของปฏิกิริยาไปทางขวา (forward) และปฏิกิริยาย้อนกลับ (reverse) ตามลำดับ สามารถเขียนสมการ 31 ให้อยู่ในรูปของค่าอัตราเร็วคงที่ได้ดังนี้

$$\frac{d \ln k_f / k_r}{dT} = \frac{d \ln k_f}{dT} - \frac{d \ln k_r}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (32)$$

ซึ่งเขียนแยกเป็น 2 สมการ เพื่อแสดงค่า k_f และ k_r ดังนี้

$$\frac{d \ln k_f}{dT} = \frac{\Delta H_f^\circ}{RT^2} + \lambda \quad (33)$$

$$\frac{d \ln k_r}{dT} = \frac{\Delta H_r^\circ}{RT^2} + \lambda \quad (34)$$

โดยอาร์เรเนียสให้ λ มีค่าเป็นศูนย์ และแสดงความเกี่ยวข้องระหว่างค่าอัตราเร็วคงที่ k กับอุณหภูมิ T โดยใช้สมการ

$$\left(\frac{d \ln k}{dT} \right)_p = \frac{E_d}{RT^2} \quad (35)$$

โดยให้ E_d คือพลังงานกระตุ้นในการเสียดสภาพ ซึ่งมีค่าเท่ากับผลต่างเอนทาลปีมาตรฐานของปฏิกิริยา ΔH° ที่ปรากฏในสมการวานท์ฮอฟ นำสมการ 35 มาแยกตัวแปรให้อยู่คนละข้างของสมการได้

$$d \ln k = \frac{E_d}{R} \cdot \frac{dT}{T^2} \quad (36)$$

ทำการอินทิเกรต และเรียก k นี้ว่า k_d จะได้

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad (37)$$

โดย A เป็นค่าคงที่ของการทำอินทิเกรต ที่อาร์เรเนียสเรียกว่าเป็นแฟกเตอร์ของความถี่ (Frequency factor) และถ้าเขียนกราฟระหว่าง $\ln k_d$ กับ $1/T$ จะได้กราฟเป็นเส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ $-E_d/R$

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเอนไซม์โปรติเอส

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

Ruchi *et al.* (2006) ได้ศึกษาเสถียรภาพการตรึงเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* โดยเปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการตรึงโปรติเอสโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ กับการตรึงโปรติเอสโดยวิธีการดูดซับ ในการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ จะใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมพันธะระหว่างไคโตซานกับโปรติเอส ทำได้โดยนำไคโตซานมากระตุ้น (activate) ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ก่อนที่จะนำไปตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ให้เสถียรภาพที่สูงกว่าการตรึงด้วยวิธีการดูดซับ กล่าวคือในการตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า

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

2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเอนไซม์บนโคโคซาน

Betigeri and Neau (2002) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยวิธีห่อหุ้มด้วย พอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ โพลีเอทิลีนไกลคอล โคโคซานและอะกาโรส ก่อนการตรึงได้ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์พอลิเมอร์ที่ห่อหุ้มที่ใช้ในการตรึง พบว่าอะกาโรสไม่มีความคงตัวที่ห่อหุ้มที่ทดสอบ ดังนั้นจึงทำการตรึงไลเปสด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลและโคโคซาน พบว่าประสิทธิภาพการตรึงคือใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เอนไซม์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 240 หน่วยต่อมิลลิกรัม ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ส่วนไลเปสที่ถูกห่อหุ้มด้วยโคโคซาน จะได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1150 หน่วยต่อมิลลิกรัม โดยค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 42 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ห่อหุ้มด้วยโคโคซานมีค่าสูงกว่าการตรึงด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล

Juang *et al.* (2001) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) บนโคโคซานเพื่อนำไปดูดซับตัวถูกละลาย ทำได้โดยการนำโคโคซานซึ่งมีหมู่เอมีนอยู่แล้วมากระตุ้นด้วยกลูตาร์ลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า ความเข้มข้นของกลูตาร์ลดีไฮด์มีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่นำไปใช้ในการดูดซับตัวถูกละลาย กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของกลูตาร์ลดีไฮด์ไม่พอดีกับจำนวนหมู่เอมีนบนโคโคซาน ทำให้มีกลูตาร์ลดีไฮด์หลงเหลืออยู่ในระบบกลูตาร์ลดีไฮด์ที่หลงเหลืออยู่นี้จะทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายเอง ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการดูดซับตัวถูกละลายลดลง

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจลนพลศาสตร์

Chang and Juang (2005) ศึกษาค่ากิจกรรม, เสถียรภาพ และจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ โดยตรึงเอนไซม์อะไมเลสสามชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส เบต้าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ใช้กลูตาร์ลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปทั้งสามชนิดจะให้ค่ากิจกรรมที่สูงกว่าเอนไซม์อิสระ และยังสามารถรักษาเสถียรภาพในการทำงาน ได้ถึง 81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้งานไปแล้ว 50 ครั้ง จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ พบว่า เอนไซม์ตรึงรูป มีค่าความเร็วเริ่มต้นสูงสุด (V_{max}) สูงกว่าเอนไซม์อิสระ และมีค่าคงที่ Michaelis-Menten (K_m) น้อยกว่าเอนไซม์อิสระ ยกเว้นกลูโคอะไมเลสที่มีค่าความเร็ว

เริ่มต้นสูงสุด ($V_{\max}$) ต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ตรีงรูปความสามารถในการจับกับซับสเตรตได้น้อยกว่าเอนไซม์อิสระ เนื่องจากเอนไซม์ตรีงรูปจะมีโครงสร้างเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ

Chang and Juang (2007) ศึกษาเสถียรภาพและการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ โดยตรีงเอนไซม์ฟอสฟาเทสบนเม็ดกลมของวัสดุคอมโพสิตที่เตรียมจาก สารผสมระหว่างไคโตซานและเซอโคเนียมออกไซด์แบบแห้ง (DCZ) สารผสมระหว่างไคโตซานและเซอโคเนียมออกไซด์แบบเปียก (WCZ) ไคโตซานแบบแห้ง (DC) ไคโตซานแบบเปียก (WC) โดยใช้ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการกระตุ้น คือ 90 นาที ในการศึกษาเสถียรภาพต่ออุณหภูมิและพีเอช พบว่า เอนไซม์ตรีงรูปทั้ง 4 ชนิด มีเสถียรภาพต่อพีเอชมากกว่าเอนไซม์อิสระ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปค่อนข้างคงที่ในช่วงพีเอชที่ศึกษา ขณะที่เอนไซม์อิสระค่ากิจกรรมจะสูงสุดที่พีเอชหนึ่งเท่านั้น (เป็นรูปประฆังคว่ำ) และทั้งเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระมีแนวโน้มที่เหมือนกันในการศึกษาเสถียรภาพต่ออุณหภูมิ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

- 1.1 เอนไซม์โปรติเอส ทางการค้าชนิดน้ำจาก *Aspergillus oryzae* (เป็น flavourzyme) ยี่ห้อ Sigma, ประเทศเยอรมนี (500 U/g)
- 1.2 ไคโตซานชนิดผง (deacetylation = $90 \pm 5\%$, MW~500 K) fine grade, Micronized Chitosan Specification Sheet, Elan Corp. ประเทศไทย
- 1.3 กลูตารัลดีไฮด์เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์: เกรควิเคราะห์, Fluka, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.4 สารเคมีอื่นๆ เป็นเกรควิเคราะห์และใช้โดยตรง

2. อุปกรณ์

- 2.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer): รุ่น UV 160A ยี่ห้อ Shimadzu ญี่ปุ่น
- 2.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM): รุ่น JEOL JSM-S410 ญี่ปุ่น
- 2.3 เครื่อง Autosorb1 รุ่น Quantachrome S/N 1150207031 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.4 เครื่องทำแห้ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ Telstar cryodos รุ่น CRY 000S-80

วิธีการ

1. การตรึงเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีห่อหุ้มด้วยไคโตซาน

ละลายไคโตซาน 0.2 กรัมใน 10 มิลลิลิตรของสารละลายกรดอะซิติกที่เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (เตรียมโดยละลายสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 9.9 มิลลิลิตร) ผสมสารละลายไคโตซานที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับ สารละลายโปรติเอส 0.5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน (ละลายในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบ ต่อนาที แต่ไม่ต้องเปิดความร้อน ใช้เวลาในการละลาย 30 นาที จนละลายเข้ากันจนหมด) จากนั้น

ดูดสารละลายทั้งหมดที่ได้ด้วยหลอดเข็มฉีดยา ที่มีหัวเข็มขนาด 22 G (กำจัดฟองอากาศด้วยการให้ปลายหลอดชี้ขึ้นบน แล้วดีดด้านข้างและดันขึ้นช้าๆ เพื่อไล่ฟองออกไป) หยดของเหลวลงในสารละลายโซเดียมไทรโพลีฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.136 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร (โดยละลายโซเดียมไทรโพลีฟอสเฟต 5.0029 กรัม ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7 โดยปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์นี้จนได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 75 นาที ล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 (Betegeri and Neau, 2002)

2. การตรึงเอนไซม์โปรตีนโคโคซานโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์

2.1 การกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์

เตรียมเม็ดโคโคซานโดยใช้วิธีที่ได้อธิบายในข้อ 1 (โดยไม่เติมเอนไซม์) แล้วเติมกลูตารัลดีไฮด์ เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพูนั่น (ใช้เม็ดที่ได้จากการตรึงในข้อที่ 1 ทั้งหมด) แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบเวลาล้างบดนี้ด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 7 จนครบ 3 ครั้ง

2.2 การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์

ผสมโปรตีนจำนวน 0.5 มิลลิลิตรกับ 20 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ให้เข้ากัน ในขวดรูปชมพู่เล็กขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลายนี้ลงไปขวดรูปชมพู่ที่มีเม็ดบีดที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์แล้วจากข้อที่ 2.1 แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง (ใช้ตู้เย็น) เมื่อครบเวลาให้กรองเม็ดบีดที่ตรึงเอนไซม์แล้วด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41 เก็บน้ำตรึงนี้ในขวดรูปชมพู่เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ไม่ตรึงล้างเม็ดบีดนี้ด้วย 2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (ในน้ำกลั่น) จำนวน 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเท 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ลงไปพอท่วมเม็ดบีด แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งานต่อไป (ก่อนนำไปใช้ ให้ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องสักครู่ก่อน)

3. การกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) และ พื้นที่ผิวจำเพาะ (BET surface area)

3.1 การกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)

นำเม็ดโคโตซานที่ได้ตรึงเอนไซม์โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้มไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง (freeze dryer) แล้วใช้มีดแบ่งครึ่งเม็ดโคโตซานที่แช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำการส่องดูภาพส่วนตัดขวางและผิวของเม็ดโคโตซาน เพื่อการกระจายตัวของเอนไซม์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

3.2 ศึกษาขนาดของรูพรุน

นำเม็ดโคโตซานทั้งที่ไม่มีเอนไซม์ และมีเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้มที่ผ่านการทำแห้งแล้ว ไปวิเคราะห์หาพื้นที่ผิวรวม (BET surface area) ปริมาตรรวมของรูพรุน (total pore volume) และขนาดรูพรุนเฉลี่ยของเม็ดปิด (average pore size) ด้วยเทคนิคการแทนที่ผิวหรือรูพรุนด้วยแก๊สไนโตรเจนเหลว

4. วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

วิธีวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์สามารถอ่านรายละเอียดได้จากบทความอื่นๆ (Han and Shahid, 1995) และในภาคผนวก ก โดยกล่าวสรุปได้ว่า สำหรับเอนไซม์ตรึงรูป จะนำเม็ดโคโตซานที่มีเอนไซม์เกาะ (ประมาณ 8 – 9 เม็ด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.45 ± 0.06 มิลลิเมตร) เข้าทำปฏิกิริยากับเคซีน ที่ 40 องศาเซลเซียส pH 7 นาน 10 นาที ที่ 160 รอบต่อนาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยากับ TCA นำไปกรองแยกส่วนที่ใสมา 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม NaCO_3 และ folin reagent แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หมายถึงเอนไซม์อิสระที่ใช้วัดค่ากิจกรรมจะอยู่ในรูปของเหลว (flavourzyme) โดยปริมาตรที่ใช้คือ 0.5 มิลลิลิตร โดยการวัดค่ากิจกรรมแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้ง ค่ากิจกรรม (activity) ที่ใช้ในการทดลองนี้ นิยามได้ว่า 1 ยูนิต (U) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะที่กำหนด และค่ากิจกรรมเฉพาะ (specific activity) มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

หรือไมโครโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน โดยค่า specific activity ที่สูงขึ้นหมายความว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

5. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจะใช้วิธีของ Bradford (1976) และในอธิบายไว้ในภาคผนวก ก โดยเก็บส่วนของเหลวที่ได้จากการทดลอง (ของเหลวที่เหลือจากการแยกเม็ดโคโตซานที่มีเอนไซม์เกาะออกไปแล้ว) แล้ววัดปริมาตรที่ได้ และจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ซึ่งทำซ้ำ 3 ครั้ง ปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะเม็ดโคโตซาน จะได้จากการหักลบปริมาณโปรตีน เช่น

ปริมาณโปรตีนที่เกาะบนเม็ดที่ได้จากการตรึง

= ปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปเริ่มต้น – (ปริมาณโปรตีนที่พบในสารละลายหลังจากการตรึงได้เสร็จสิ้นและได้แยกเม็ดออกไป + ปริมาณโปรตีนที่พบในบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างเม็ดโคโตซานเหล่านั้น) เป็นต้น

6. ศึกษาอิทธิพลของการถ่ายโอนมวลที่มีต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ศึกษาโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรต (เคซีน) ที่ความเข้มข้น 0.5-4.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแต่ละความเข้มข้นของซับสเตรตจะทำการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า (50-160 รอบต่อนาที) ขณะทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์กับกับซับสเตรต (เคซีน) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ค่ากิจกรรมได้วัดที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ ด้วยวิธีตามข้อ 4

7. ศึกษาผลของเสถียรภาพของเอนไซม์ตึรงรูปและเอนไซม์อิสระ

7.1 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์

อิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงาน ทำโดยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (ทั้งในรูปตึรงและอิสระ) ที่ได้ผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ (40 – 80 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาทีโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาทีตลอดเวลาที่แช่สภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเป็นตามข้อ 4 และปริมาณโปรตีนที่หลงเหลืออยู่บนเม็ดไลโคโตซานหาได้จากปริมาณโปรตีนที่อยู่ในของเหลว

7.2 ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีต่อเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์

อิทธิพลของพีเอชที่มีต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์ (ทั้งเอนไซม์ตึรงรูปและอิสระ) ที่ได้ผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ (5-9) เป็นเวลา 15 นาที โดยอุณหภูมิที่ใช้บ่มคงที่ที่ตลอดการทดลองที่ 40 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที สภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมเป็นตามข้อ 4 และปริมาณโปรตีนที่หลงเหลืออยู่บนเม็ดไลโคโตซานหาได้จากปริมาณโปรตีนที่อยู่ในของเหลว

7.3 ศึกษาการใช้ซ้ำของเอนไซม์เอนไซม์ตึรงรูปและการเก็บเอนไซม์ทั้งเอนไซม์ตึรงรูปและอิสระ

การศึกษากการใช้ซ้ำทำได้โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการตึรงรูปด้วยพันธะโควาเลนทไปทำปฏิกิริยาด้วยซับสเตรตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จ กรองเอนไซม์ตึรงรูป แล้วนำไปล้างให้สะอาดด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 หลังจากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยาซ้ำที่สภาวะเดียวกัน 9 ครั้ง โดยแต่ละสภาวะที่ใช้นำไปวัดค่ากิจกรรมเป็นตามข้อ 4 และปริมาณโปรตีนที่หลงเหลืออยู่บนเม็ดไลโคโตซานหาได้จากปริมาณโปรตีนที่อยู่ในของเหลว

ในการศึกษากการเก็บเอนไซม์ทำโดยนำเอนไซม์ทั้งตึรงรูปและอิสระไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำออกมาวัดค่ากิจกรรมตามข้อ 4 ทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 1 เดือน

8. ศึกษาจนผลศาสตร์และการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ

8.1 ศึกษาจนผลศาสตร์ของเอนไซม์

เป็นการให้เอนไซม์ (ทั้งที่ตรึงรูปบนเม็ดไลโคโตซานและอิสระ) ทำปฏิกิริยากับซับสเตรต (เคซีน) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ (0.1–1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ 0–300 นาที ตามลำดับ) ที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 7 วัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำมาคำนวณเป็นค่ากิจกรรมได้ (หน่วยคือ ไมโครโมลต่อกรัมโปรตีน)

8.2 ศึกษาการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ด้วยความร้อน

เป็นการบ่มเอนไซม์ (ทั้งที่ตรึงรูปบนเม็ดไลโคโตซานและอิสระ) ในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7 (ซึ่งเป็นพีเอชที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงที่สุด โดยทราบจากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้) ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ (40–80 องศาเซลเซียส และ 0–720 นาที ตามลำดับ) แล้วนำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มนี้มาทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่ 40 องศาเซลเซียสและพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 7 และเขย่าที่ 160 รอบต่อนาที ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรม (หน่วยคือ ไมโครโมลต่อนาที – กรัมโปรตีน หรือเรียกสั้นๆ ว่า ยูนิตต่อกรัมโปรตีน)

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้เตรียมเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์โคโคซานขนาดประมาณ 2.45 ± 0.06 มิลลิเมตร โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 5 ส่วนคือ (1) ศึกษาการกระจายตัวของเอนไซม์บนเม็ดโคโคซาน (เตรียมเอนไซม์ด้วยวิธีโควาเลนซ์และวิธีห่อหุ้ม) ด้วย SEM และ BET (2) ศึกษาเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ (3) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานซ้ำของเอนไซม์ที่ถูกตรึงรวมทั้งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่เก็บที่ 4°C ที่ระยะเวลาต่างๆ (4) ศึกษาอิทธิพลของการถ่ายโอนมวลระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต และ (5) ศึกษาจลนพลศาสตร์และการเสื่อมสภาพด้วยความร้อนของเอนไซม์ที่ตรึงด้วยพันธะโควาเลนซ์เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

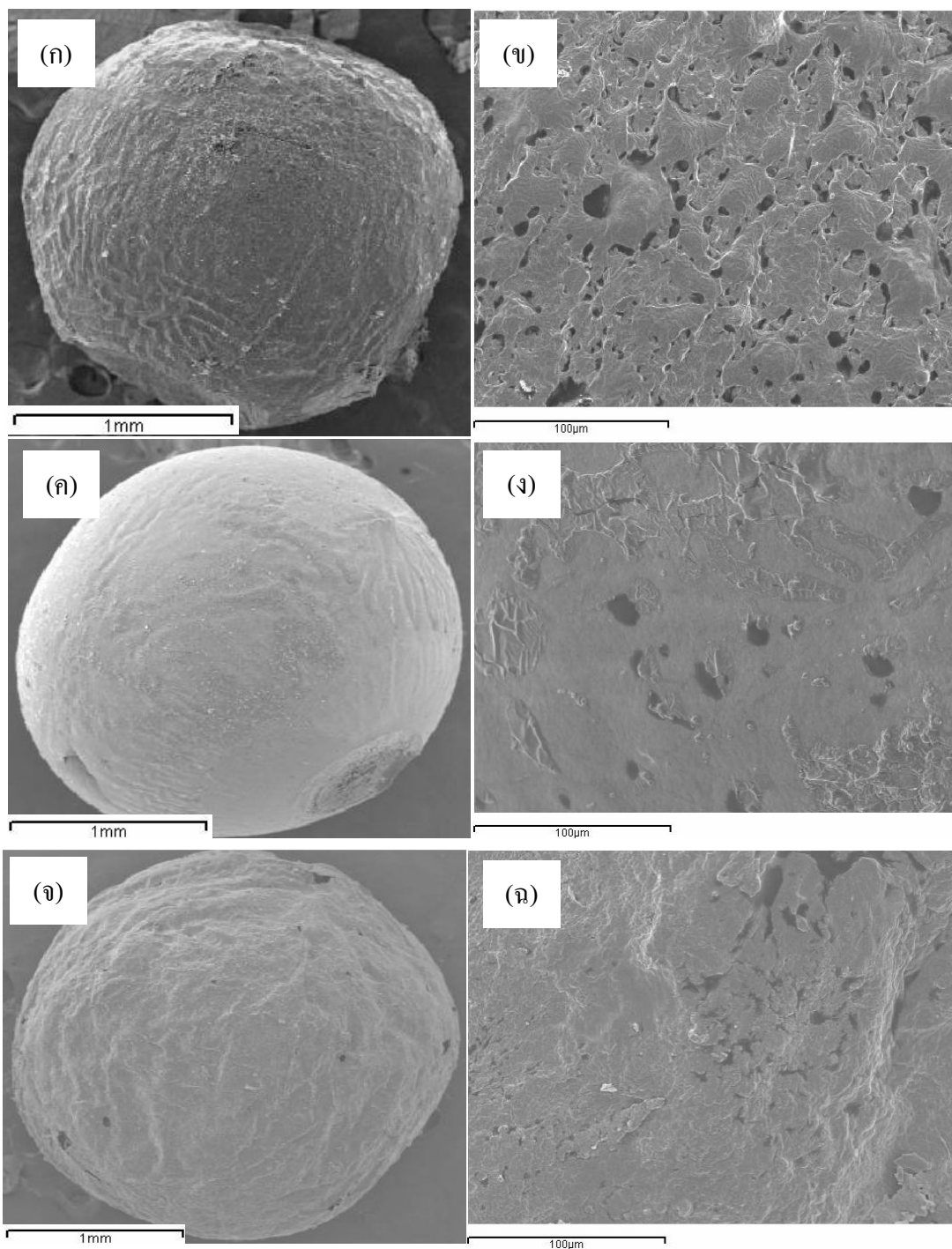
1. การกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM) และ ขนาดของรูพรุน

1.1 การกระจายตัวของเอนไซม์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy, SEM)

เม็ดโคโคซานที่ใช้ในงานวิจัยนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจากการหดยดสารละลายโคโคซานในสารละลายกรดอะซิติก ลงในสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต ซึ่งสารละลายโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตนี้แตกตัวเป็น OH^- และ tripolyphosphoric ions (TPP ions) ซึ่งไอออนทั้งสองจะกระทำกับหมู่ $-\text{NH}_3^+$ ของโคโคซาน ทำให้โคโคซานละลายในน้ำได้น้อยลง (อิทธิพลของหมู่ไฮดรอกซิลที่ทำให้ $-\text{NH}_3^+$ กลายเป็น $-\text{NH}_2$) และ TPP ions ทำให้โคโคซานเชื่อมต่อกันด้วยแรงกระทำแบบ electrostatic และกลายเป็นของแข็ง (Mi *et al.*, 2002)

จากภาพที่ 15 ก- จ ได้ว่าผิวของเม็ดโคโคซานที่ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนซ์มีลักษณะพื้นผิวที่เรียบที่สุดและมีรูพรุนน้อย ซึ่งมีสาเหตุจากการเกาะของเอนไซม์ ยกเว้นบริเวณด้านล่างของเม็ดโคโคซานนี้ที่พบรูพรุนมากมาย อย่างไรก็ตามบางเม็ดจะไม่เกิดรูที่ด้านบนนี้ (ดูภาพที่ 15 ก และ จ) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเทคนิคการหดยด โดยในงานวิจัยนี้เป็นการหดยดด้วยมือ จึงทำให้พบเม็ดทั้งสองลักษณะปนกัน ภาพที่ 15 ก และ จ แสดงผิวของเม็ดโคโคซานที่ไม่มีเอนไซม์และเตรียมเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม ตามลำดับ โดยมีลักษณะรอยนูนเกิดขึ้นทั่วเม็ดที่ชัดเจนมากกว่าผิว

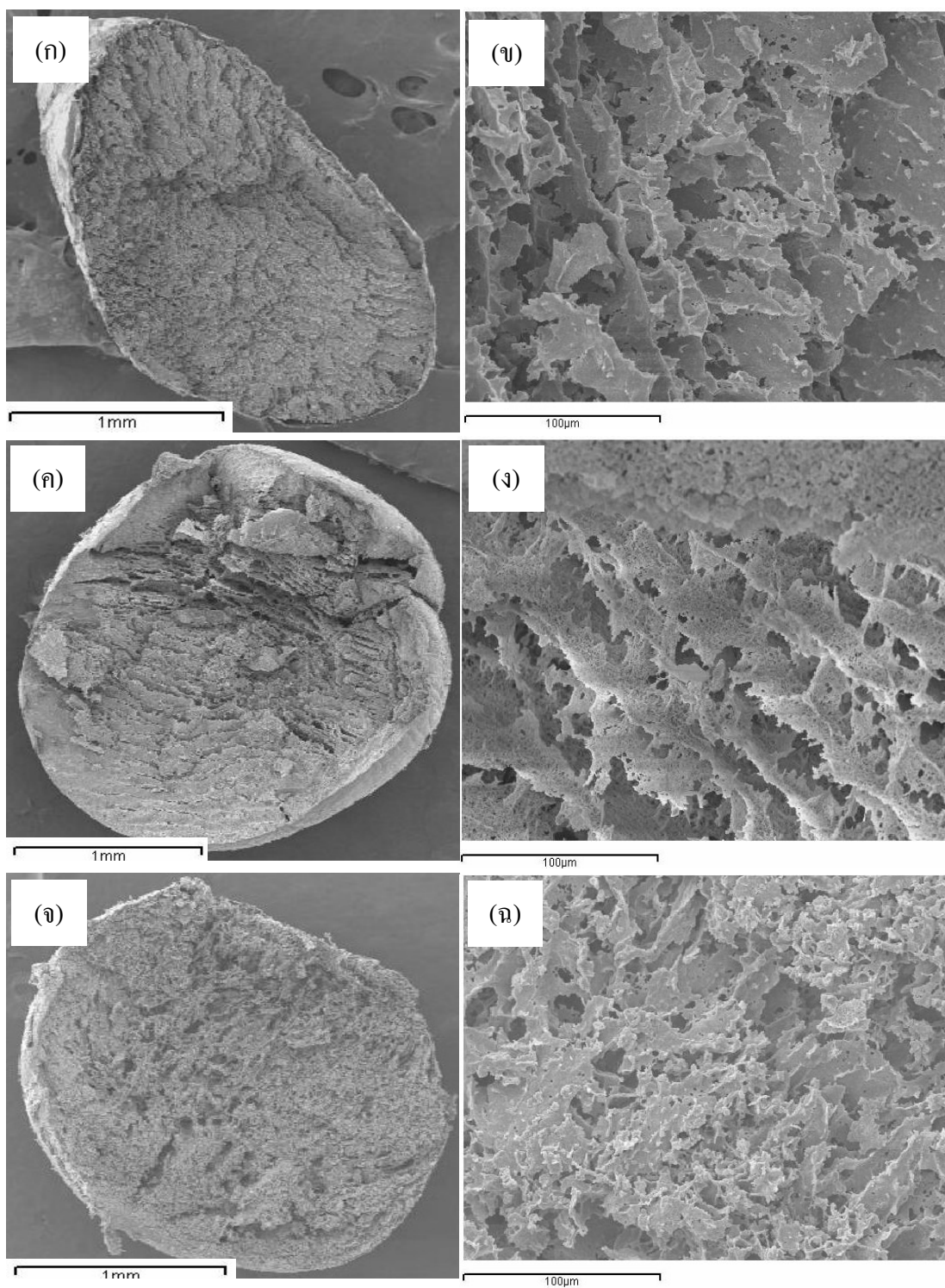
ของเมล็ดโคโตซานที่ตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ เพราะมีเอนไซม์มาเกาะที่ผิวมาก รอยยูนนี้
เป็นลักษณะของผิวเมล็ดโคโตซานที่เกิดขึ้นเมื่อผ่านการอบแห้งด้วยวิธี Freedried (Ha *et al.*,1996)



ภาพที่ 15 ภาพ SEM ของบริเวณพื้นที่ผิวของเมล็ดโคโตซาน (ก,ข) ไม่มีเอนไซม์ และเอนไซม์ที่
ตรึงด้วย (ค,ง) พันธะโควาเลนต์ และ (จ,ฉ) วิธีห่อหุ้ม

นอกจากนี้ยังพบรูพรุนเกิดขึ้นทั่วไปบนเมล็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ และตรึงเอนไซม์ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของปาริชาติ (2550)

เมื่อพิจารณาภาคตัดขวางของเมล็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ และมีเอนไซม์ที่ตรึงด้วย 2 วิธี ดังกล่าว (ดูภาพที่ 16 ก ค และ จ) พบว่าภาคตัดขวางของเมล็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์คล้ายกับเมล็ดโคโตซานที่ตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยโคโตซานเกาะกันเป็นแผ่นบางที่มีการเชื่อมกันระหว่างแผ่น เมื่อพิจารณาที่กำลังขยายสูงขึ้น (500 เท่า) พบว่าเมล็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ แผ่นโคโตซานที่อยู่ภายในเมล็ดจะมีรูพรุนที่น้อยกว่าของเมล็ดโคโตซานที่ตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ คาดว่าอาจมีสาเหตุจากการกระตุ้นผิวด้วยกลูตารัลดีไฮด์ โดยเมล็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์จะเป็นเมล็ดที่ไม่ได้นำไปกระตุ้นด้วยสารดังกล่าว สำหรับภาคตัดขวางของเมล็ดโคโตซานที่ตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม (ภาพที่ 16 ฉ) จะพบอนุภาคเกาะที่แผ่นโคโตซาน ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ นอกจากนี้แผ่นโคโตซานเหล่านี้เป็นแผ่นสั้นๆ ไม่ยาวเท่าแผ่นโคโตซานที่ปรากฏในภาพที่ 16 ข และ ง สำหรับภาคตัดขวางของเมล็ดโคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์และตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 16 ภาพ SEM ของภาคตัดขวางของเมล็ดโคโตซาน (ก,ข)ไม่มีเอนไซม์ และมีเอนไซม์ที่ตรึงด้วย (ค,ง) ฟันชะโควาเลนท์ และ (จ,ฉ) วิธีห่อหุ้ม

1.2. ศึกษาขนาดของรูพรุน

การศึกษาพื้นที่ผิวจำเพาะ (BET surface area) ปริมาตรรวมของรูพรุน (total pore volume) และขนาดรูพรุนเฉลี่ยของเม็ดปิด (average pore size) ในช่วง macropores ทำโดยวัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิคการแทนที่ผิวหรือรูพรุนด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 465 นาที โดยผล ที่ได้แสดงในตารางที่ 3 ซึ่งเห็นว่าเม็ดไคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์มีพื้นที่ผิวจำเพาะมากที่สุดรองลงมาคือ เอนไซม์ตรึงรูปด้วยด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้มตามลำดับ ซึ่งผลนี้ สอดคล้องกับการลดลงของปริมาตรรวมของรูพรุนเมื่อตรึงเอนไซม์ทั้งแบบพันธะโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้ม

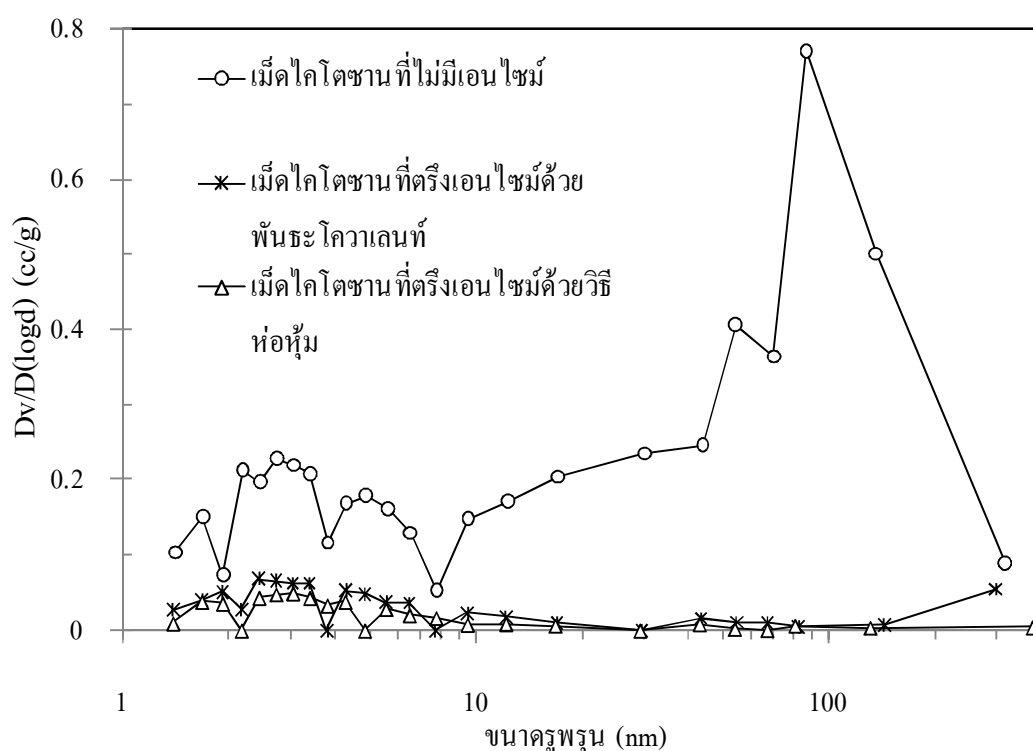
ตารางที่ 3 สมบัติทางเคมีกายภาพของเม็ดไคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์และมีเอนไซม์ตรึงรูป

ตัวอย่าง	BET surface area (m ² /g)	Total pore volume (cc/g)	Average pore size (nm)
เม็ดที่ไม่มีเอนไซม์	60.470	0.57070	37.70
เม็ดที่ตรึงรูปเอนไซม์ด้วย			
โควาเลนต์	9.819	0.05180	21.10
ห่อหุ้ม	3.392	0.01997	23.55

การลดลงของพื้นที่ผิวจำเพาะและปริมาตรรวมของรูพรุนเมื่อตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ บ่งบอกว่ามีเอนไซม์อยู่ภายในเม็ดไคโตซาน ซึ่งเมื่อพิจารณาภาพที่ได้จาก SEM (ภาพที่ 15ข) จะพบรูพรุนขนาดใหญ่ที่ผิวและรูพรุนเหล่านี้ยังเชื่อมต่อกัน จึงทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปได้มาก ส่งผลให้พื้นที่ผิวจำเพาะลดลง 7 เท่า และปริมาตรรวมของรูพรุนที่ลดลง 9 เท่า สำหรับเม็ดไคโตซานที่ตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มนั้นพบว่าพื้นที่ผิวจำเพาะและปริมาตรรวมของรูพรุนมีค่าต่ำที่สุด โดยมีสาเหตุจากการผสมเอนไซม์เข้ากับสารละลายไคโตซานก่อนการทำให้เกิดเป็นเม็ด ดังนั้นเอนไซม์จึงขัดขวางการเชื่อมต่อกันของไคโตซานภายในเม็ด (รูที่เกิดขึ้นไม่ได้เชื่อมต่อกันเป็นรูที่ยาว)

นอกจากได้ข้อมูลสมบัติทางเคมีกายภาพแล้ว ยังได้ข้อมูลการกระจายของรูพรุนดังแสดงในภาพที่ 17 สำหรับเม็ดไคโตซานที่ไม่มีเอนไซม์ แสดงให้เห็นว่ารูพรุนอยู่ในช่วง mesopore

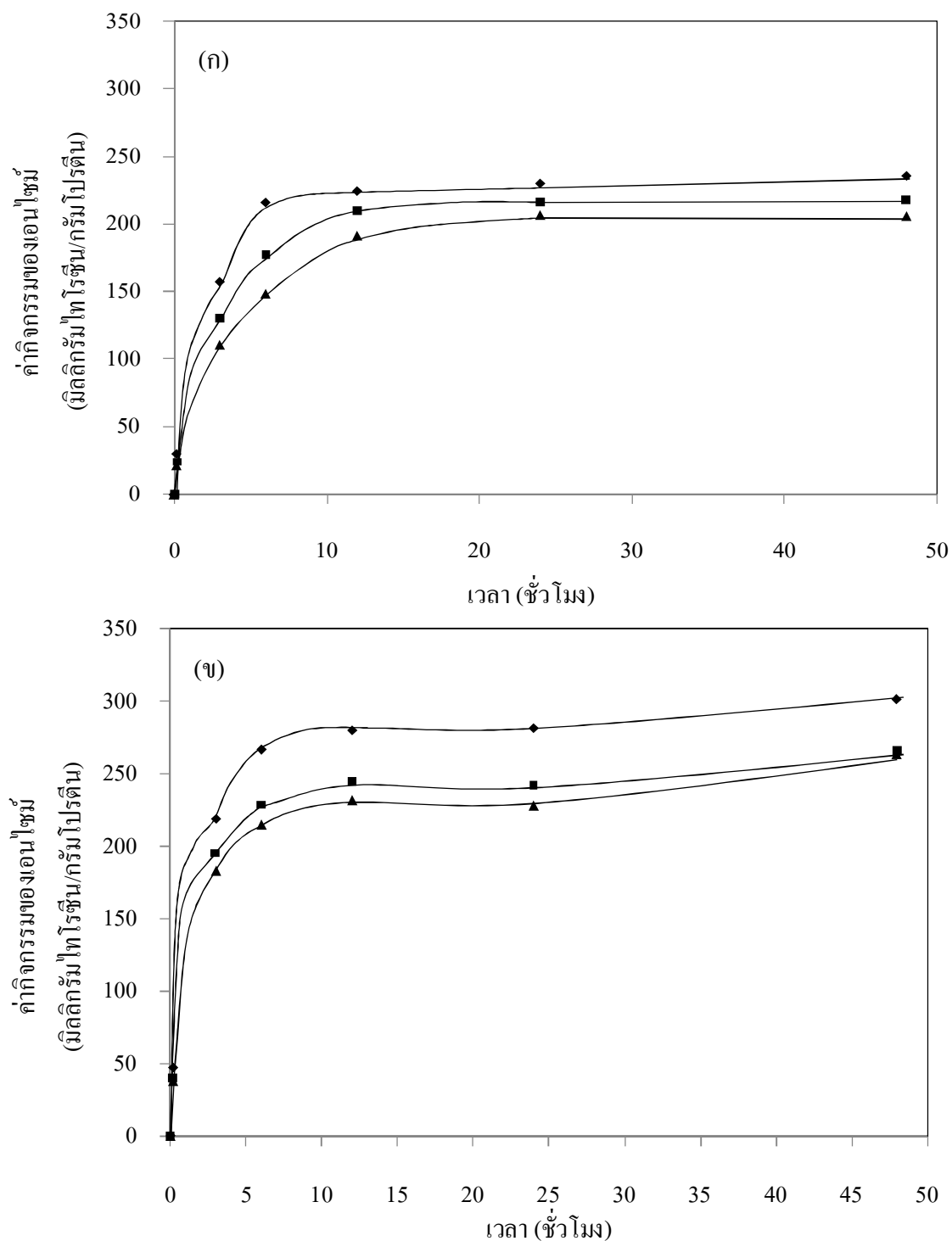
(2-50 นาโนเมตร) และ macropore (>50 นาโนเมตร) ในขณะที่เม็ดโคลิตซานที่มีเอนไซม์พบว่ารูพรุนอยู่ในช่วง mesopore เท่านั้น และเมื่อพิจารณาเฉพาะในช่วง mesopore เห็นว่าเม็ดโคลิตซานที่ไม่มีเอนไซม์และตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนท์รูพรุนมีขนาดเท่ากัน แต่เม็ดโคลิตซานที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มรูพรุนจะแตกต่างออกไปเล็กน้อย เนื่องจากการผสมกันระหว่างเอนไซม์และโคลิตซานแล้วทำให้เป็นเม็ด ซึ่งการตรึงรูปด้วยวิธีห่อหุ้มมีรูพรุนน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับ BET surface area อีกด้วย



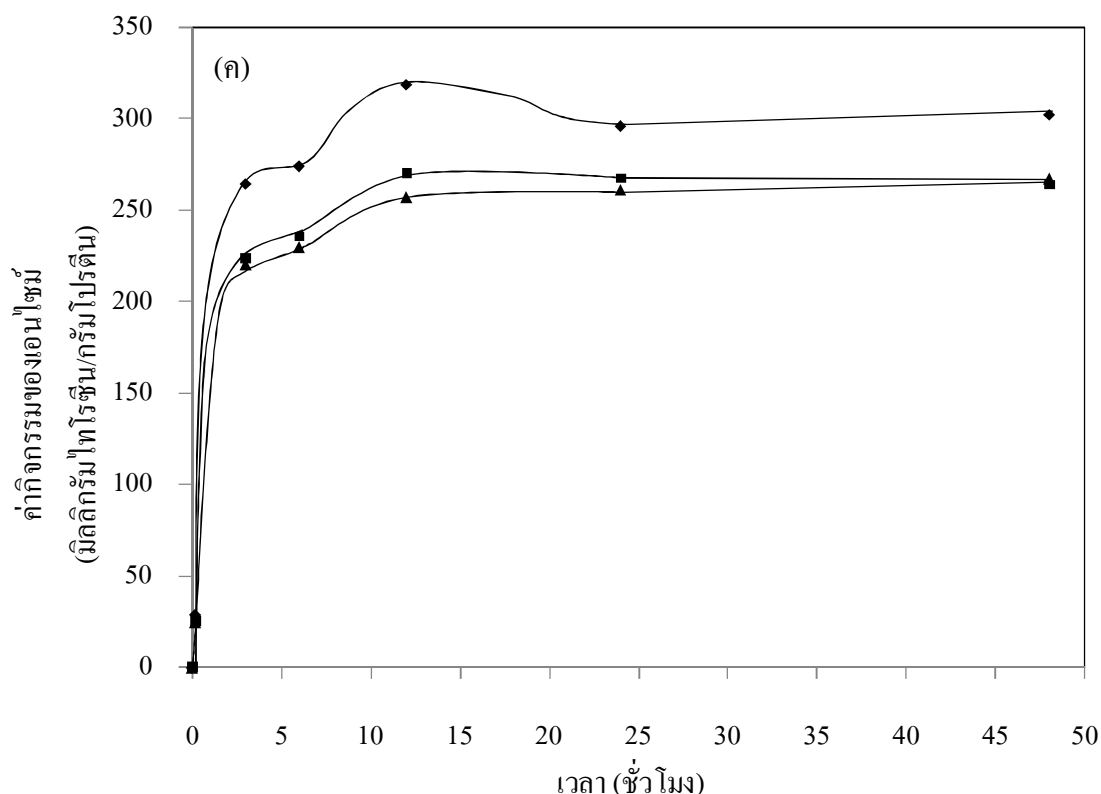
ภาพที่ 17 การกระจายตัวของรูพรุนของเม็ดโคลิตซานที่ไม่มีเอนไซม์ และตรึงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์และวิธีห่อหุ้ม

3. ผลของการถ่ายโอนมวลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป

การถ่ายโอนมวลศึกษาโดยการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า (50-160 รอบต่อนาที) ขณะเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนท์กับเม็ดโคลิตซานกับซับสเตรต โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ผลการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมที่เวลาต่างๆ เป็นดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 อิทธิพลของอัตราการถ่ายโอนมวลของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์กับชั้น
สเตรตโดยเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบที่ (▲) 50 (■) 100 และ (◆) 160 รอบต่อนาที
โดยสภาวะที่วัดกิจกรรมคือ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และความเข้มข้นของชั้นสเตรต
(ก) 0.5 (ข) 1.5 และ (ค) 4.5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 18 (ต่อ)

การถ่ายโอนมวลมีผลต่อค่ากิจกรรมหรืออัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลวิจัยที่ได้อภิปรายก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการมีเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ที่ผิวนอกและในรูของเม็ดโกลโดซาน ดังนั้นการเกิดผลิตภัณฑ์จึงได้รับอิทธิพลจากการถ่ายโอนมวลทั้งภายนอกและภายใน (external and internal mass transfer) ของเม็ดโกลโดซาน ทำให้เกิดชั้นของฟิล์มของของเหลว (liquid film layer) รอบเม็ดโกลโดซาน ซึ่งส่งผลให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในบัลค์ (bulk) ที่ผิวของเม็ดและในรูของเม็ดมีค่าไม่เท่ากัน การเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่าทำให้เม็ดมีการเคลื่อนที่และช่วยลดความหนาของฟิล์มได้ ส่งผลให้ความเข้มข้นในบัลค์เท่ากับที่ผิว ซึ่งเป็นการทำให้การถ่ายโอนมวลภายนอก (external mass transfer) ดีขึ้น

ภาพที่ 18 ก-ค พบว่าที่ทุกความเข้มข้นของซับสเตรต ความเร็วยรอบมีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปบนโกลโดซานด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ความเข้มข้นของซับสเตรตต่างๆ โดยค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยา แล้วจะเข้าสู่ค่าคงที่หลังจากผ่านไปแล้ว 12 ชั่วโมง ที่ความเร็วยรอบ 160 รอบต่อนาที ค่ากิจกรรมมีค่าสูงที่สุด ดังนั้นที่สภาวะนี้ความหนา

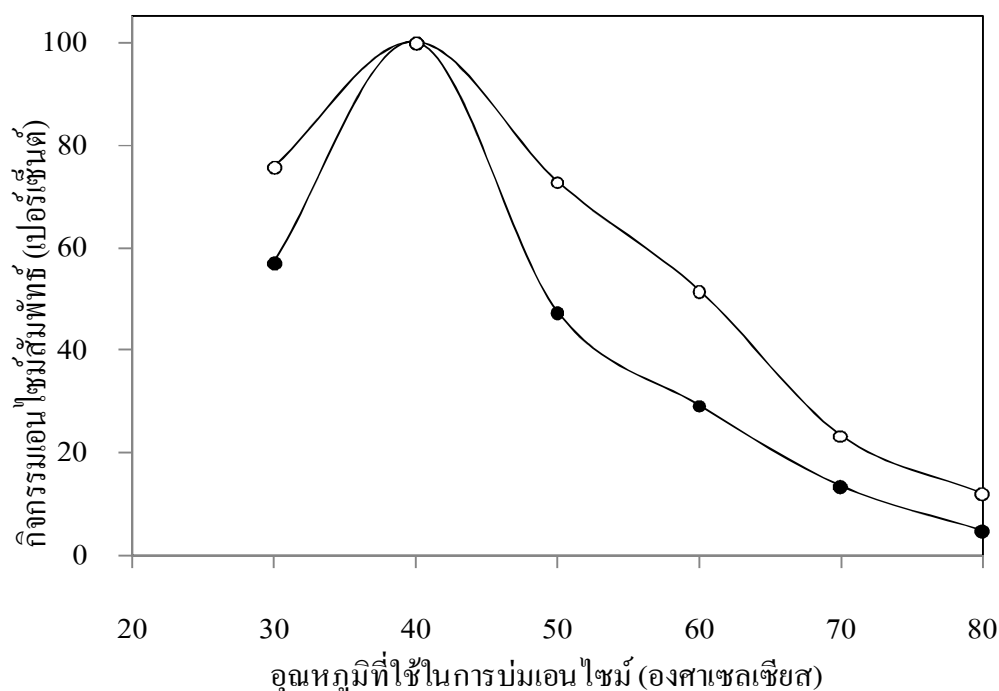
ของแผ่นฟิล์มที่ล้อมรอบเมื่มีค่าต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องเขย่าที่ไม่สามารถเพิ่มความเร็วรอบได้สูงกว่านี้ ดังนั้นในการศึกษาหัวข้ออื่นๆ งานวิจัยนี้จึงใช้ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ซึ่งทำให้อิทธิพลของการถ่ายโอนมวลภายนอกมีค่าต่ำที่สุดแล้ว (หมายเหตุการเพิ่มความเร็วรอบให้สูงกว่านี้อาจช่วยกำจัดอิทธิพลของการถ่ายโอนมวลภายนอกได้ ซึ่งจะช่วยในการศึกษาจลนพลศาสตร์ ทำให้ได้ค่าพารามิเตอร์ที่น่าเชื่อถือ) อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมที่วัดได้ในงานวิจัยนี้ที่ความเร็วรอบในการเขย่าต่างๆ มีค่าประมาณ 10^{-6} โมลต่อกรัม-นาที (same order of magnitude) ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบในงานวิจัยอื่นๆ โดยการเปลี่ยนความเร็วรอบของการเขย่าไม่ทำให้ v_{order} เพิ่มขึ้น (Benyahia and Polomakaki, 2005) นั่นแสดงว่ายังสามารถใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 160 รอบต่อนาทีในการศึกษาจลนพลศาสตร์ได้ โดยอิทธิพลของการถ่ายโอนมวลภายนอกยังคงมีอยู่แต่อยู่ในระดับที่ต่ำมากและยอมรับได้

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจาก 0.5 ไปเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ค่าดังกล่าวไม่เพิ่มขึ้นมากนักเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจาก 1.5 เป็น 4.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Ingesson *et al.* (2001) โดยเขาพบว่าความเร็วเริ่มต้นและปริมาณของผลิตภัณฑ์ของการไฮโดรไลซิสเอนไซม์เซลลูเลส มีค่าลดลงเนื่องจากการละลายเซลลูโลส (ซับสเตรต) ที่ไม่ดีและความหนืดของสารละลายซับสเตรตที่สูงเกินไป แต่ในงานวิจัยนี้การเข้าสู่ค่าคงที่ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเข้มข้นของซับสเตรต (เคซีน) 4.5 เปอร์เซ็นต์ น่าจะเกิดจากการไม่มีอิทธิพลของ concentration gradient ที่มีต่อการถ่ายโอนมวล เพราะสารละลายเคซีนที่เตรียมได้นี้ไม่หนืด

4. ศึกษาเสถียรภาพของอุณหภูมิและพีเอชที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปและอิสระ

4.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

เมื่อเปรียบเทียบการบ่มโปรตีนอิสระและโปรตีนที่ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์บนเม็ดโกลโดซาน ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 7 ในช่วงอุณหภูมิ 30–90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดังแสดงในภาพที่ 19

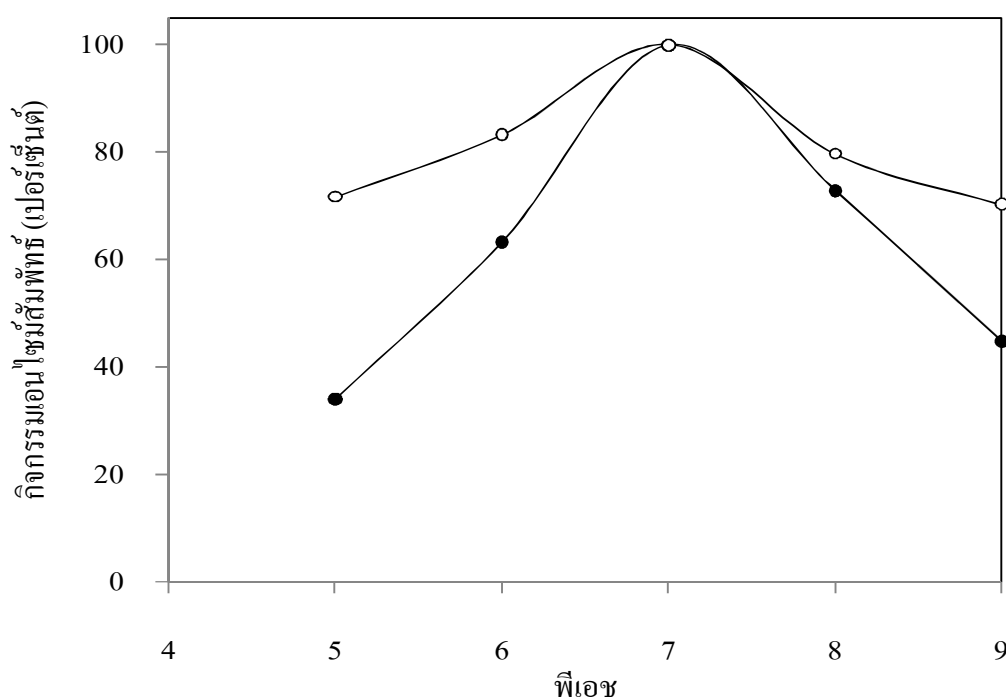


ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระสัมพัทธ์ (●) และต่อกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสัมพัทธ์ (o)

พบว่า (ภาพที่ 19) ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ทั้งสองประเภทมีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจากนั้นก็มีค่าลดลง ซึ่งเป็นผลจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์เนื่องจากความร้อนที่มากเกินไป แต่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียสให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ที่ต่ำทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ เนื่องจากตลอดช่วงอุณหภูมิที่ใช้บ่มนี้ที่อุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้ไปลดการปนเปื้อนของโปรตีน และมีค่าคงที่ในการทำปฏิกิริยาต่ำ (Chaplin and Bucke, 1990) ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่ามากกว่าเอนไซม์อิสระตลอดช่วงอุณหภูมิที่ใช้บ่มนี้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยงานวิจัยของ Bhandari *et al.* (2009) ศึกษาเสถียรภาพของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปไทออลโปรติเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์เหมือนกับงานวิจัยนี้ พบว่าให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่าที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้

4.2 ศึกษาอิทธิพลของพีเอช

เสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ ทำโดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงแล้ว มาบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆ (5 ถึง 9) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ภาพที่ 20 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ค่าพีเอชต่างๆ



ภาพที่ 20 ผลของพีเอชที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์อิสระสัมพัทธ์ (●) และกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปสัมพัทธ์ (○)

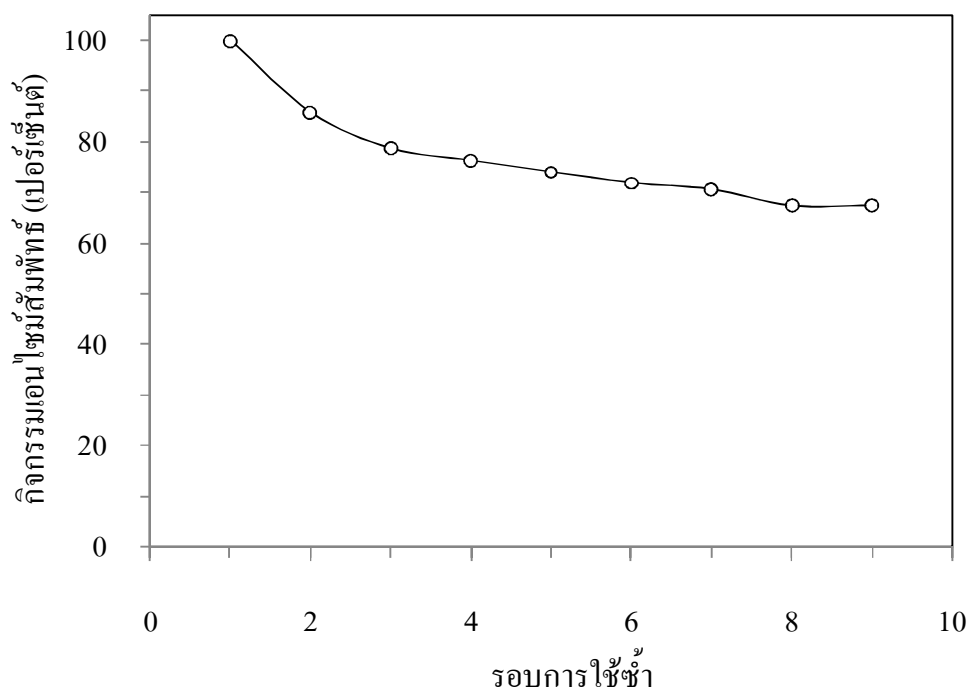
พบว่า (ภาพที่ 20) ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ทั้งสองประเภทมีค่าเพิ่มขึ้นตามพีเอชที่เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่พีเอช 7 จากนั้นมีค่าลดลง ซึ่งเป็นผลจากการเสื่อมสภาพ และเปลี่ยนโครงสร้างของเอนไซม์ แต่พบว่าที่พีเอชต่ำกว่า 7 และสูงกว่า 7 ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลงเนื่องจากพีเอชเปลี่ยน ทำให้ประจุสุทธิเปลี่ยนไป โครงสร้างจึงเปลี่ยน เพราะการผลักกันหรือดูดกันของประจุ จึงทำให้ค่ากิจกรรมเปลี่ยนไป (Chaplin and Bucke, 1990) ตลอดช่วงพีเอชที่ใช้บ่มนี้ ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่ามากกว่าเอนไซม์อิสระ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อพีเอชสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยงานวิจัยของ Bhandari *et al.* (2009)

ศึกษาเสถียรภาพต่อพีเอชของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปไทออลโปรตีนบนโคโคซานด้วยพันธะโควาเลนต์เหมือนกันงานวิจัยนี้ แต่พบว่าให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ พีเอช 6 ซึ่งเป็นผลที่แตกต่างกับงานวิจัยนี้ เนื่องจากว่าโปรตีนที่ใช้เป็นโปรตีนต่างชนิดกัน

5. ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานเอนไซม์ที่ถูกตรึง

5.1 ศึกษาการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์

การทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูป โดยนำมาทำปฏิกิริยากับซับสเตรต (เคซีน) ซ้ำเป็นจำนวน 9 รอบการใช้ซ้ำ โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาก็คือ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และใช้ความเข้มข้นของซับสเตรต 1.5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 21 พบว่าค่ากิจกรรมของโปรตีนตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อใช้ซ้ำครั้งที่ 1 และจะค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ จนเริ่มคงที่ในการใช้ซ้ำครั้งที่ 8 ซึ่งเป็นผล มาจากเอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพระหว่างการใช้งาน และเนื่องจากการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์แรงกระทำระหว่างเอนไซม์กับตัวพวยมีความแข็งแรงมาก ทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพวยได้ยากจึงเห็นว่าเมื่อใช้ซ้ำไปเรื่อยๆ ค่ากิจกรรมจะเริ่มคงที่ หลังจากใช้ซ้ำไปแล้ว 5, 7 และ 9 ครั้ง พบว่าเอนไซม์ยังคงรักษาสภาพได้ 74.08, 70.71 และ 67.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น

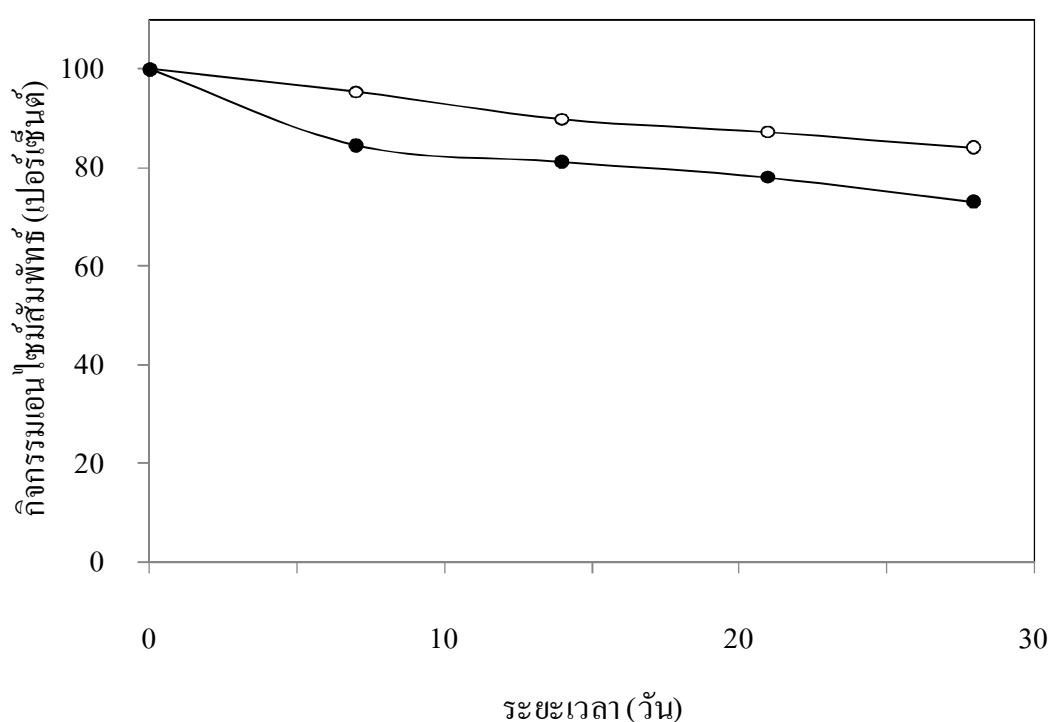


ภาพที่ 21 ผลของการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยสถานะที่วัดกิจกรรมคือ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7

งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Silva *et al.* (2006) ศึกษาการใช้ซ้ำของการตรึงรูปอัลคาไลน์โปรติเอสบน Eudragit S-100 พบว่ายังคงรักษาสภาพได้ 72 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น หลังจากใช้ซ้ำไปแล้ว 5 รอบ และในงานวิจัยของ Altun *et al.* (2007) ศึกษาการใช้ซ้ำของเปปซินตรึงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์พบว่า สามารถคงสภาพได้เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น หลังจากใช้ซ้ำไปแล้ว 7 รอบ และค่ากิจกรรมจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากใช้ซ้ำไปแล้ว 3 รอบ แสดงว่าโปรติเอสตรึงรูปบนไคโตซานในงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็น fungal protease สามารถคงสภาพในการใช้ซ้ำได้มากกว่าเปปซินซึ่งใช้วิธีการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์บนไคโตซานเหมือนกัน

5.2 ศึกษาการเก็บ (storage) ของเอนไซม์

การทดลองนี้ทำการศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และเอนไซม์อิสระในการเก็บค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการตรึงโปรตีนที่สภาวะที่เหมาะสม แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 ภาพที่ 22 แสดงผลการเก็บค้างคืนของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์และเอนไซม์อิสระ พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ของเอนไซม์ตรึงรูปมากกว่าเอนไซม์อิสระ แสดงว่าในช่วงระยะเวลาเดียวกันเอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพในการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ และเมื่อพิจารณาเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์ลดลง แต่ยังคงรักษาสภาพได้ 83 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เอนไซม์อิสระยังคงรักษาสภาพได้ 73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน



ภาพที่ 22 ผลของการเก็บเอนไซม์อิสระ (●) และกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป (o) บนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

โดยงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการเก็บค่าขึ้นของเอนไซม์ตรีงรูปชนิดเป็ยกและแห้ง รวมทั้งเอนไซม์อิสระ พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงและคงที่แล้วหลังจากวันที่ 30 โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปมากกว่าเอนไซม์อิสระในช่วงระยะเวลาเดียวกัน และเอนไซม์ตรีงรูปยังรักษาสภาพได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้น และนอกจากนี้ยังพบในงานวิจัยของ Chiou and Wu (2004) , Altun *et al.* (2007)

6. ศึกษาจลนพลศาสตร์และการเสื่อมสภาพของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูป

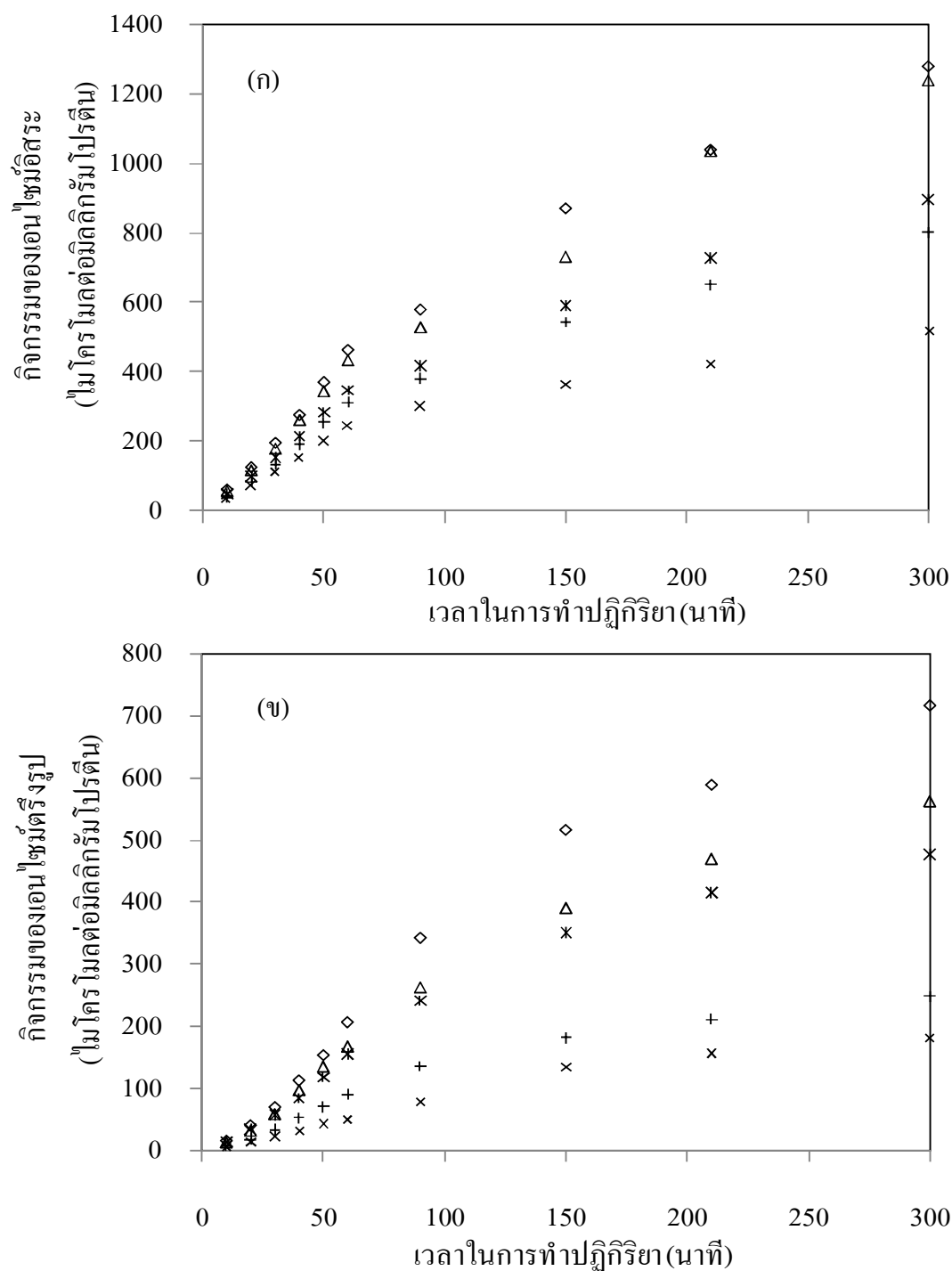
6.1 ศึกษาจลนพลศาสตร์

ภาพที่ 23 ก และ ข แสดงการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูปบนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์กับเวลาที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ (เอนไซม์อิสระหรือที่ตรีงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์) กับซับสเตรต (เคซิน) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเคซินและเวลาต่าง ๆ โดยอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 40 องศาเซลเซียส โดย พบว่าภาพทั้งสองแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งตรีงรูปและอิสระที่คล้ายคลึงกัน คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระและตรีงรูปเพิ่มขึ้นตามเวลา และเข้าสู่ค่าคงที่ที่เวลามากกว่า 300 นาที และนอกจากนี้พบว่าที่เวลาใดๆ เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตที่ใช้เริ่มต้นสูงขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระจะเพิ่มขึ้นด้วย จลนพลศาสตร์ของการตรีงโปรตีนเอนไซม์บนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถอธิบายได้ โดยใช้สมการของ มิเคลิส-เมนเทน อันดับหนึ่ง (สมการที่ 19)

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (19)$$

โดยที่ v (หรือ ความเร็วของปฏิกิริยา) สามารถหาได้จากความชันเริ่มต้นของภาพที่ 23 ก และ ข สำหรับเอนไซม์อิสระและตรีงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ ตามลำดับ และได้แสดงค่าที่ได้ในตารางที่ 4 แล้วค่าพารามิเตอร์ $V_{\max}$ และ K_m สามารถหาได้จากการทำให้สมการมิเคลิส-เมนเทน เป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นวิธีการของไลน์วีเวอร์เบิร์ก (สมการที่ 25)

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (25)$$



ภาพที่ 23 ผลของความเข้มข้นของซับสเตรตที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่อเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (ก) เอนไซม์อิสระ (ข) เอนไซม์ตรึงรูปบนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ (×, +, *, Δ และ ◇ คือความเข้มข้นของซับสเตรตเท่ากับ 1, 3, 5, 7 และ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg protene}^1$) ที่ได้จากความชันเริ่มต้นของภาพที่ 23 ก และ ข

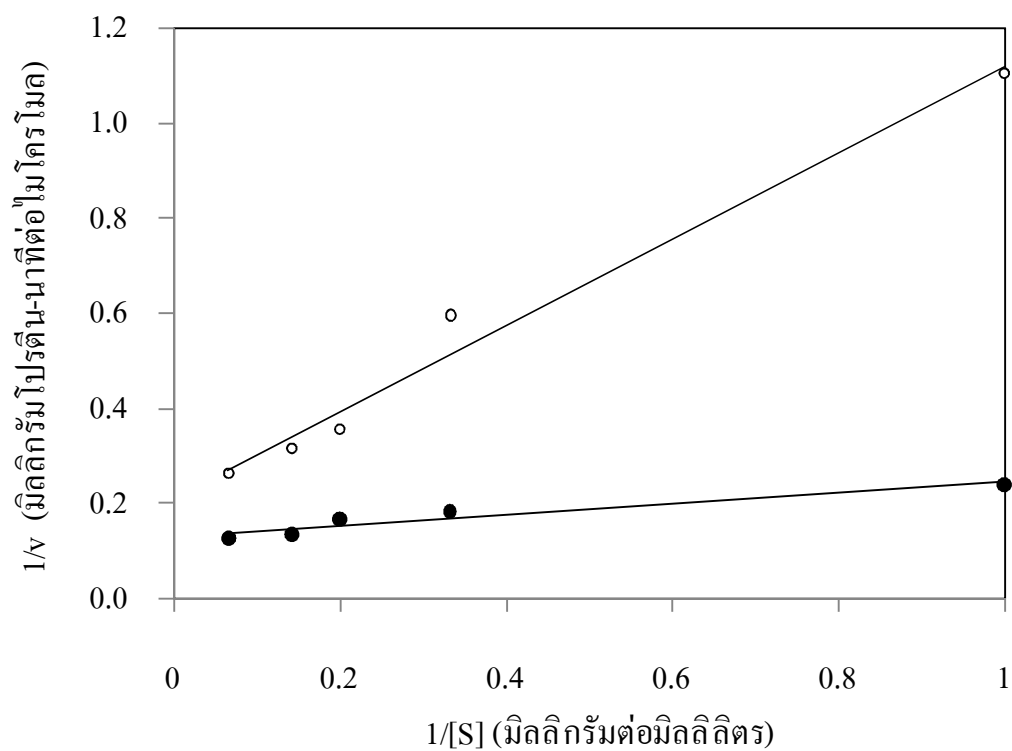
ความเข้มข้นยับยั้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ชนิดของเอนไซม์	
	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรึงรูป
1	0.906	4.209
3	1.685	5.521
5	2.823	6.036
7	3.194	7.569
15	3.818	8.073

¹ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg protene}$ คือ ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

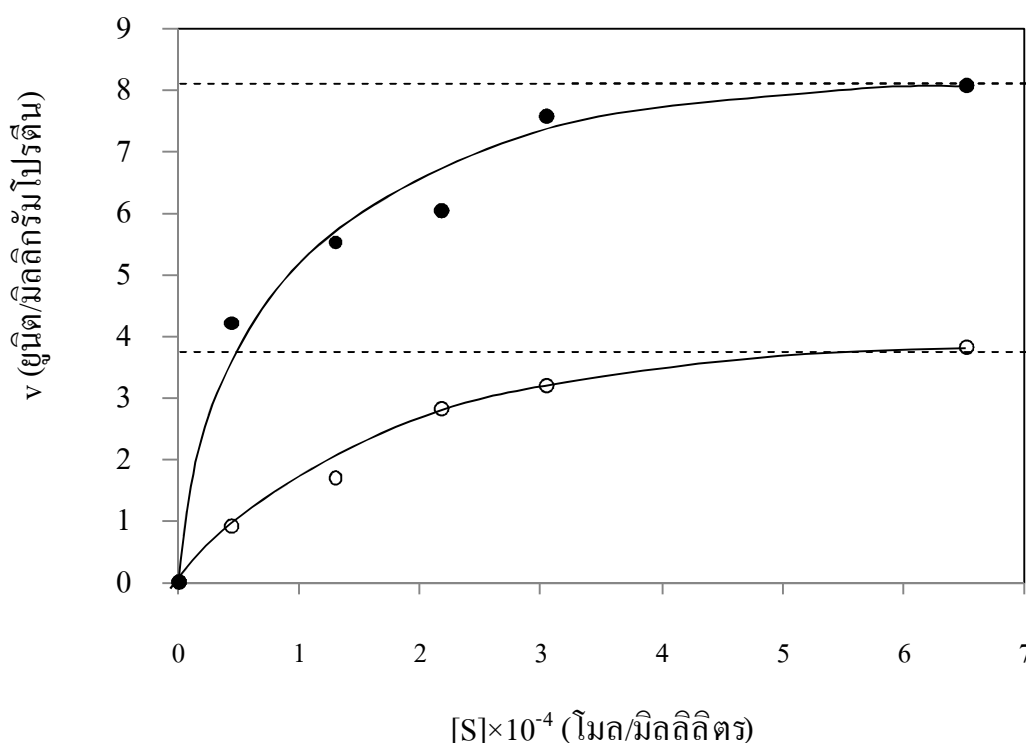
โดยที่ค่า $V_{\max}$ และ K_m ที่ได้นี้ได้แสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่า ค่า R^2 ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.99 แต่ยังถือว่ายอมรับได้ เพราะ R^2 ที่แสดงในงานวิจัยอื่นๆ สำหรับการ fit curve เข้ากับสมการมิเคลิส-เมนเทนนี้มีค่าประมาณ 0.91-0.96 สำหรับเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ (Gummadi *et al.*, 2009 และ Chang and Juang, 2007) และภาพที่ 24 ได้แสดงกราฟเพื่อใช้หาพารามิเตอร์เหล่านี้ นอกจากนี้เมื่อใช้ค่าพารามิเตอร์ที่ได้แทนลงในสมการ มิเคลิส-เมนเทน (สมการที่ 15) แล้วคำนวณค่า $V_{\max}$ ดังแสดงในภาพที่ 24 จะเห็นว่าค่า $V_{\max}$ ที่ได้จากสมการมิเคลิส-เมนเทน และที่อ่านได้จากภาพที่ 24 มีค่าใกล้เคียงกันในช่วงความเข้มข้นของ เคซีนที่สนใจนี้

ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป ($V_{\max}$ และ K_m)

	R^2	$V_{\max}$ (U/mg protene)	K_m (mol/ml)
เอนไซม์อิสระ	0.9087	7.812	3.97×10^{-5}
เอนไซม์ตรึงรูป	0.9816	4.831	3.90×10^{-5}



ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่าง $1/v$ และ $1/[S]$ ตามความสัมพันธ์ของสมการไลวีเวอร์เบิร์ก ของ เอนไซม์อิสระ (●) และเอนไซม์ตรึงรูปบนโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ (○)



ภาพที่ 25 อิทธิพลของความเข้มข้นของซับสเตรตกับเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์อิสระ (●) และเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ (○) ด้วยสมการอันดับหนึ่งของมิเคลิส-เมนเทน (เส้นประแสดงค่า $V_{\max}$ โดยประมาณ)

ตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีค่า K_m ใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการจับกันได้ (affinity) ระหว่างเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปกับซับสเตรตได้ใกล้เคียงกันเมื่อเทียบกับของเอนไซม์อิสระกับซับสเตรต นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด ($V_{\max}$) ของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำกว่าของเอนไซม์อิสระ บ่งบอกว่าเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์มีประสิทธิภาพต่ำกว่า โดยมีสาเหตุมาจากปัญหาผลกระทบด้านการถ่ายเทมวล (Sangeetha and Abraham, 2008) ซึ่งได้ยืนยันด้วยผลการทดลองก่อนหน้านี้แล้วว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้มีทั้งที่อยู่บนผิวเม็ดไคโตซานและในรูของเม็ดไคโตซานด้วย และด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่ใช้ในการศึกษาจลนพลศาสตร์นี้ อิทธิพลของการถ่ายเทมวลยังคงมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปกับซับสเตรต แต่มีค่าต่ำ

ค่า K_m ของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ ยังพบได้ในงานวิจัยของ Sangeetha and Abraham (2008) ที่ศึกษาการตรึง fungal protease (แต่ไม่ใช่ flavourzyme) บน โคลิตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และมิกลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้

ค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูปบนโคลิตซานด้วยพันธะโควาเลนต์มีค่าต่ำกว่าของเอนไซม์อิสระ นี่ยังสามารถพบได้ในงานวิจัยอื่นๆ เช่นการตรึงรูปซีรีน V8 โปรติเอสบน AFM tip ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Nakamura *et al.*, 2007) การตรึงโปรติเอสกับ water soluble-insoluble polymer ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Silva *et al.*, 2006) เมื่อเปรียบเทียบ V_{max} ของเอนไซม์โปรติเอสตรึงรูปที่ได้ในงานวิจัยนี้ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kumar *et al.* (2009) ซึ่งได้ค่า V_{max} เท่ากับ 4.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเป็นการตรึง acid protease บน mesoporous activated carbon (FMAC)

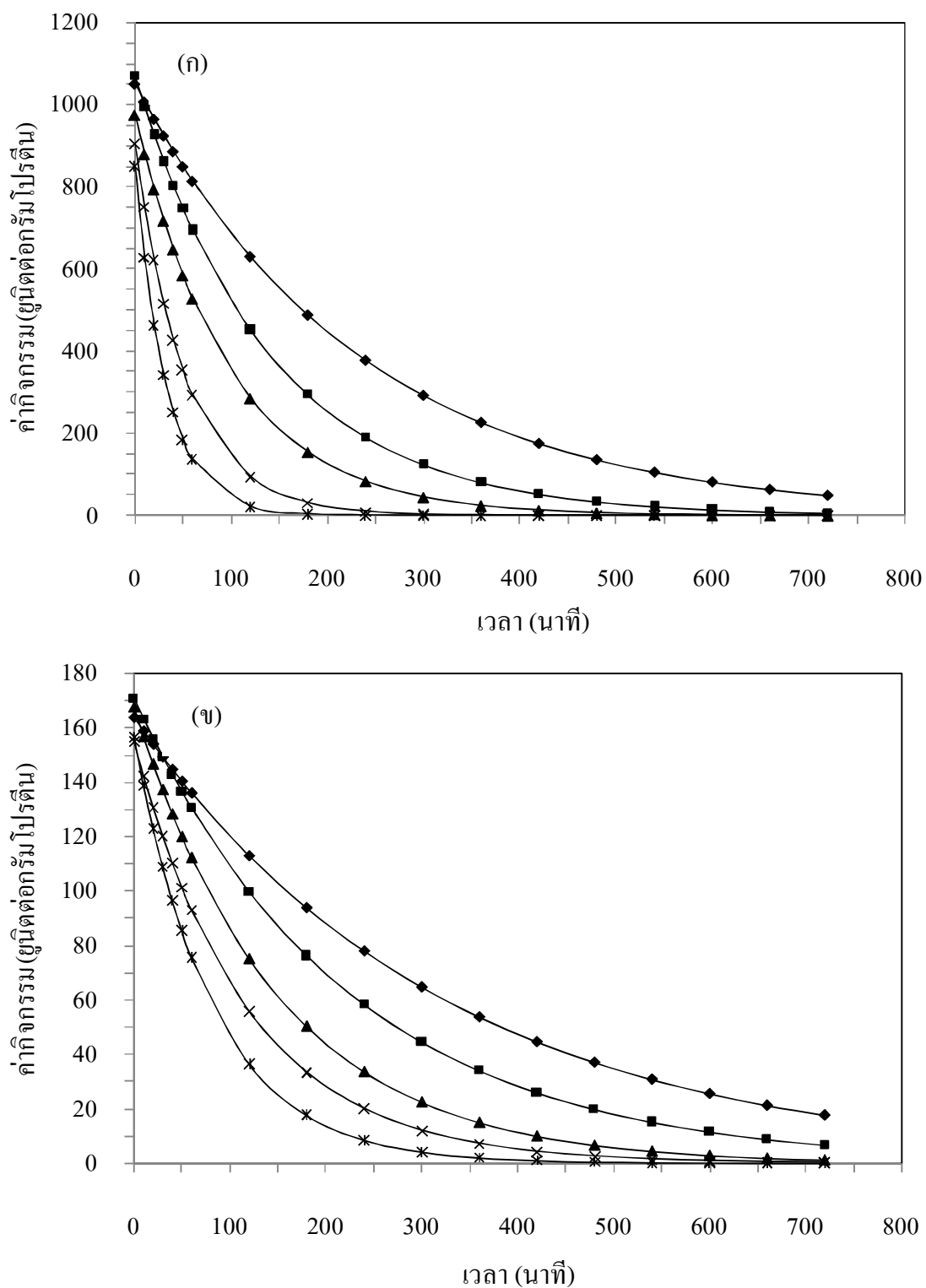
6.2 การเสื่อมสภาพด้วยความร้อน

การเสื่อมสภาพนี้ศึกษาโดยการบ่มเอนไซม์โปรติเอสที่สนใจในบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิคงที่เป็นเวลาต่างๆ แล้วจึงนำเอนไซม์นั้นมาวัดค่ากิจกรรมตามที่ได้อธิบายในวิธีการทดลอง ภาพที่ 26 แสดงการเสื่อมสภาพ (การลดลงของค่ากิจกรรม) ของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์และเอนไซม์อิสระที่เวลาและอุณหภูมิต่างๆ โดยจะเห็นว่าที่เวลาเท่ากัน การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ค่ากิจกรรมของทั้งเอนไซม์อิสระและตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ลดลง

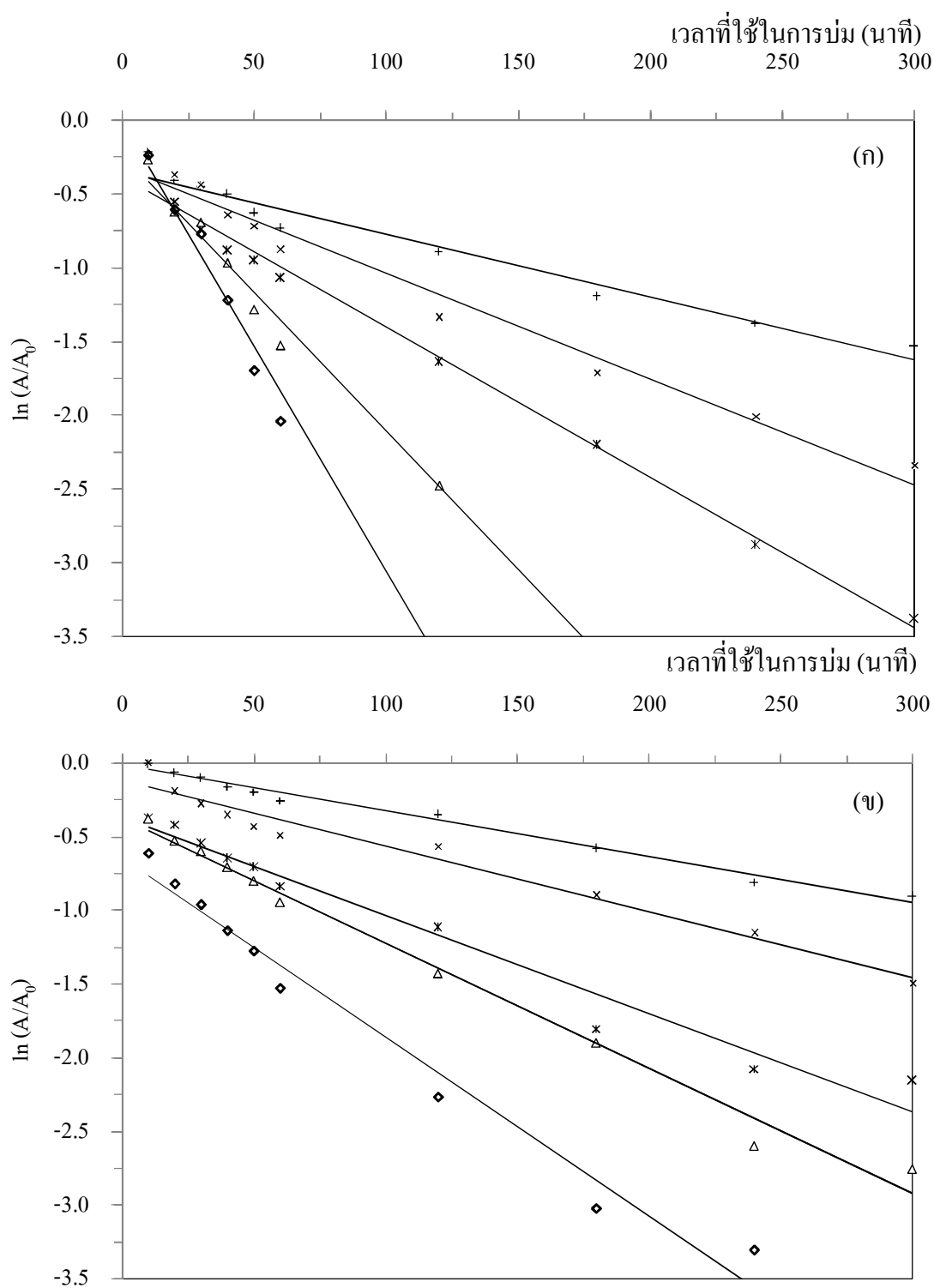
นอกจากนี้การเสื่อมสภาพของเอนไซม์ด้วยความร้อน มักนิยมให้เป็นปฏิกิริยา pseudo-first order ดังสมการที่ 38 โดยค่า k_d ที่ได้สามารถนำไปใช้หาค่าพลังงานกระตุ้นในการเสื่อมสภาพ (deactivation energy, E_d)

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_d t + C \quad (38)$$

โดย A_0 เป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลาเริ่มต้น (ไม่ผ่านการบ่ม) และ A เป็นค่ากิจกรรมที่เวลาใดๆ มีหน่วยเป็นยูนิต โดยเป็นค่าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ต่อหนึ่งหน่วยเวลา k_d เป็นค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยาและ C เป็นค่าคงที่ ภาพที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ กับเวลาสำหรับเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปบนโคลิตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ตามลำดับ



ภาพที่ 26 กราฟค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระ (ก) และเอนไซม์ตรึงรูปบนไคโตซานด้วยพันธะโคเวเลนต์ (ข) ใช้ในการหาครึ่งชีวิตจากการทดลอง ($\diamond, \blacksquare, \blacktriangle, \times$ และ $*$ คืออุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 ตามลำดับ)

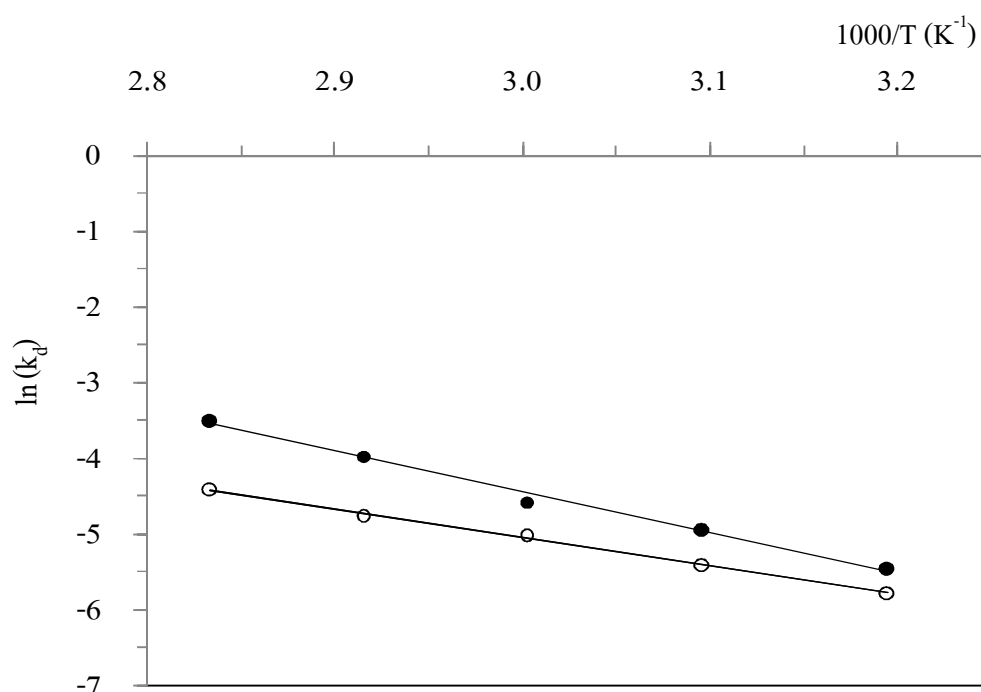


ภาพที่ 27 ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งของการเสื่อมสภาพของเอนไซม์อิสระ(ก) และ เอนไซม์ตรึงรูป (ข) ด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิต่างๆ (+, x, *, Δ และ ◊ คือ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ)

โดยภาพที่ 27 จะเห็นว่าในช่วงเวลาน้อยๆ การเปลี่ยนแปลงของ $\ln(A/A_0)$ กับเวลาเป็นไปตามปฏิกิริยา pseudo-first order (แปรผันตรงกับเวลา) นอกจากนี้ที่เวลาคงที่ค่าๆ หนึ่ง ค่า $\ln(A/A_0)$ ของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าสูงกว่าของเอนไซม์อิสระ บ่งบอกถึงความเสถียรของเอนไซม์ตรึงรูปต่อความร้อนที่สูงกว่านั่นเอง ค่าความชันที่อ่านได้จากกราฟระหว่าง $\ln(A/A_0)$ กับเวลา (ภาพที่ 27) คือค่า k_d และค่า k_d ที่ได้ที่อุณหภูมิต่างๆ นี้สามารถนำไปใช้หาค่า E_d ซึ่งเป็นความชันของสมการเส้นตรง (ดูภาพที่ 28) ตามความสัมพันธ์ของสมการอาร์เรเนียส (สมการที่ 39) โดยค่าเหล่านี้ได้สรุปไว้ในตารางที่ 5 ตามลำดับ

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad (39)$$

โดย A เป็นค่าคงที่หรือแฟกเตอร์ความถี่ E_d เป็นพลังงานที่ใช้ในการเสื่อมสภาพเอนไซม์ (deactivation energy) ซึ่งสัมพันธ์กับตัวเร่งปฏิกิริยา หรือในที่นี้ก็คือการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ (kJ/mol) R เป็นค่าคงที่ของแก๊ส (8.314 J/mol K) และ T เป็นอุณหภูมิสัมบูรณ์ (K) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงในภาพที่ 28 โดยจะเห็นว่าผลการทดลองสอดคล้องกับสมการข้างต้น คือกราฟที่ได้เป็นสมการเส้นตรง โดยความชันที่ได้เท่ากับ $-\frac{E_d}{R}$



ภาพที่ 28 อาร์เรเนียสพล็อตระหว่างค่าคงที่ของอัตราการเสื่อมสภาพด้วยความร้อนของเอนไซม์ตรึงรูป (○) และเอนไซม์อิสระ (●) กับอุณหภูมิที่ใช้บ่มเอนไซม์

ตารางที่ 6 แสดงค่า k_d และ E_d ที่ได้จากการ fit สมการอาร์เรเนียสเข้ากับข้อมูลการทดลอง เพื่อความสะดวกในการเปรียบเทียบค่า E_d ที่ได้นี้กับที่ได้มีการรายงานในบทความอื่นๆ จึงได้เปลี่ยนจาก kJ/mol เป็น kcal/mol โดยค่า R^2 ทั้งสองที่ได้จากการ fit มีค่าสูงกว่า 0.99 บ่งบอกว่าค่าคงที่ของการเสื่อมสภาพของเอนไซม์เป็นไปตามสมการอาร์เรเนียส ค่า k_d ของโปรติเอสตรังรูปน้อยกว่าโปรติเอสอิสระ และค่า E_d ของโปรติเอสอิสระและโปรติเอสตรังรูปที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Ahmed *et al.* (2008) ซึ่งได้ค่า E_d ของโปรติเอสอิสระและตรังรูปเท่ากับ 6.206 และ 5.688 kcal/mol ตามลำดับ

แม้ว่าค่า E_d ของเอนไซม์ตรังรูปมีค่าต่ำกว่าของเอนไซม์อิสระซึ่งแสดงถึงพลังงานที่ใช้ในการเสื่อมสภาพเอนไซม์ (deactivation energy) ที่ต่ำ แต่ด้วยแฟกเตอร์ความถี่ A ในสมการที่ 33 ที่บ่งบอกถึงโอกาสในการชนที่ต่ำ ทำให้ค่า k_d สำหรับการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ตรังรูปมีค่าต่ำ บ่งบอกถึงการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ตรังรูปที่เกิดได้ช้ากว่าหรือเอนไซม์ตรังรูปทนต่อความร้อนได้ดีกว่านั่นเอง ลักษณะของค่า k_d ที่ต่ำเนื่องจากมีค่า A ต่ำนี้สามารถพบในงานวิจัยอื่นๆ ได้ (Min and Juang, 2005; Ahmed *et al.*, 2008)

ตารางที่ 6 แสดงค่าคงที่ k_d และ E_d ของเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรังรูปด้วยพันธะโควาเลนต์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	k_d ($\mu\text{mol/g protene}$)		E_d (kcal/mol)	
	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรังรูป	เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรังรูป
40	3.09×10^{-3}	4.26×10^{-3}		
50	7.17×10^{-3}	4.47×10^{-3}	10.716	7.399
60	1.0×10^{-2}	6.67×10^{-3}	($R^2=0.9918$)	($R^2=0.9970$)
70	1.87×10^{-2}	8.50×10^{-3}		
80	3.04×10^{-2}	1.21×10^{-2}		

ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) หรือ half life เป็นอีกตัวแปรที่สามารถบ่งบอกเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ โดยเป็นช่วงเวลาที่ค่ากิจกรรม (Residual enzyme activity) มีค่าเหลือเพียง 50% ของค่ากิจกรรมเริ่มต้น ดังนั้นจากสมการที่ 40 จะได้ค่าครึ่งชีวิตเป็น

$$\ln \frac{0.5A_0}{A_0} = -k_d t_{1/2} \quad (40)$$

นั่นคือ

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0.5}{k_d} \quad (41)$$

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบระหว่างค่าครึ่งชีวิตที่ได้จากการทดลอง (คำนวณจากสมการที่ 41) กับที่ได้จากการทำนาย (อ่านได้จากภาพที่ 26) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและที่อุณหภูมิมากขึ้นค่าครึ่งชีวิตค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ตรีงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์และเอนไซม์อิสระมีค่าลดลง ซึ่งบ่งบอกถึงการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงขึ้นและทำให้ทำงานได้แยลง นอกจากนี้ยังพบว่าตลอดช่วงอุณหภูมิที่สนใจนี้ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ตรีงรูปมีค่าสูงกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งยืนยันถึงความเสถียรต่อความร้อนและการเสื่อมสภาพที่เกิดช้ากว่าของเอนไซม์โปรติเอสตรีงรูปเมื่อเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสอิสระ

ตารางที่ 7 ค่าครึ่งชีวิต (min) ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรีงรูป ที่ได้จากการทำนายจากกราฟ (ภาพที่ 26) และค่าที่ได้จากการทดลอง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เอนไซม์อิสระ		เอนไซม์ตรีงรูป	
	การทำนาย	การทดลอง	การทำนาย	การทดลอง
40	160.00	162.62	229.63	223.96
50	110.00	96.62	146.30	154.98
60	76.67	67.82	111.11	103.92
70	50.00	36.99	90.74	81.58
80	26.67	22.79	60.37	57.10

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้ศึกษาการตรึงโปรตีนบนโคโคซานด้วยวิธีห่อหุ้ม และเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวกระตุ้นที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง แล้วนำมาตรึงเอนไซม์โปรตีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นไอออน (ionic strength) เท่ากับ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ศึกษา BET และ SEM พบว่าพื้นที่ผิวจำเพาะและปริมาตรรวมของรูพรุน รวมทั้งภาพที่ได้จาก SEM เมื่อตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีห่อหุ้มมีรูพรุนขนาดเล็กกว่าเม็ดโคโคซานที่ไม่มีเอนไซม์ เมื่อนำมาทดสอบผลของการถ่ายโอนมวลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์พบว่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที และที่ความเข้มข้นของซับสเตรต 1.5 เปอร์เซ็นต์ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด และจากการศึกษาเสถียรภาพของอุณหภูมิและพีเอชของเอนไซม์ตรึงรูปบนโคโคซานด้วยพันธะโควาเลนต์เทียบกับเอนไซม์อิสระพบว่าให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 ทั้งเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์และเอนไซม์อิสระ ในการศึกษาการใช้ซ้ำพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถรักษาประสิทธิภาพการใช้ซ้ำได้ถึง 67 เปอร์เซ็นต์เทียบกับค่ากิจกรรมเริ่มต้นหลังจากใช้ซ้ำไปแล้ว 9 รอบ และเมื่อนำไปเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยังคงรักษาสภาพได้ถึง 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ถึง 28 วัน

นอกจากนี้ผลการศึกษาด้านพลศาสตร์ พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์มีความสามารถในการจับกันได้ (affinity) ระหว่างเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปกับซับสเตรตได้ใกล้เคียงกันเมื่อเทียบกับของเอนไซม์อิสระกับซับสเตรต แต่ค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำกว่าของเอนไซม์อิสระ รวมทั้งศึกษาการเสื่อมสภาพด้วยความร้อน พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปเสื่อมสภาพได้ช้ากว่าเอนไซม์อิสระ

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการตรึงรูปด้วยวิธีห่อหุ้ม เอนไซม์ตรึงรูปจะเสียสภาพขณะทำปฏิกิริยา ดังนั้น ควรหาวิธีในการทำให้เอนไซม์มีความแข็งแรงมากขึ้น เช่นการเติมเคลย์ เป็นต้น
2. ควรศึกษาพารามิเตอร์อื่นที่มีอิทธิพลต่อการตรึงโปรตีนเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม เช่นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึง เป็นต้น
3. ควรศึกษาพารามิเตอร์อื่นที่มีอิทธิพลต่อการตรึงโปรตีนเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์เพิ่มเติม เช่น ชนิดของตัวกระตุ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นิลวรรณ เพชรบุรณิน. 2548. **พลังแห่งเอนไซม์บำบัด**. บริษัท พิมพ์ดีการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พิมพ์ครั้งที่ 4, กรุงเทพฯ.

พูนทรัพย์ วิชัยพงษ์. 2552. **ไคติน-ไคโตซาน**. แหล่งที่มา:

http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_12_2548_chitin-chitosan.pdf, เมษายน 2552

ปาริชาติ กิจส่งเสริมชน. 2550. การตรึงโปรตีนเอนไซม์ไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม เพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

อิสลาร์ คีอราเม. 2551. การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนพอลิฟีนิลซิลโฟนด้วยพันธะโควาเลนต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdullah, A.Z., N.S. Sulaiman and A.H.Kamaruddin. 2009. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**. 44:263-270.

Ahmed, S.A., Al-domany, N.M.A. El-Shayeb, H.H. Radwan and S.A. Saleh. 2008. Optimization immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**. 5:434-446.

- Altun, G.D. and S.A. Cetinus. 2007. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**. 100:964-971.
- Betigeri, S.S. and S.H. Neau. 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**. 23: 3627-3636.
- Benyahai, F. and R. Polomarkaki. 2005. Mass transfer and kinetic studies under no cell growth conditions in nitrification using alginate gel immobilized *Nitrosomonas*. **Process Biochemistry**. 40:1251-1262.
- Bhandari, S., V.K. Gupta and H. Singh. 2009. Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. **Biocatalysis and Biotransformation**. 27(1):71-77.
- 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, M. Y. and R. S. Juang. 2005. Activities, stabilities, and reaction kinetics of free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**. 36: 75-82.
- Chang, M. Y. and R. S. Juang. 2007. Stability and reactivity of acid phosphatase immobilized on composite beads of chitosan and ZrO₂ particles. **Biological Macromolecules**. 40: 224-231
- Chaplin, M. F. and C. Bucke. 1990. **Enzyme technology**. Cambridge University.
- Chellapandian, M. 1997. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. **Process Biochemistry**. 33: 169-173.

- Chiou, S.H. and W.T. Wu. 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of hydroxyl groups. **Biomaterials**. 25:197-204.
- Fogarty, W.M. 1996. Microbial enzymes and biotechnology. **Applied Sciences Publisher Ltd**. 1-336.
- Gonchar, A. M. and V. L. Auslender. 1995. Immobilization of Bacterial on Water-Solved Polymer by Means of Electron .Institute of Nuclear Physics, **Siberian Branch of Russian Academy of Sciences**.
- Gummadi, S.N., K.B. Ganesh and D. Santhosh. 2009. Enhanced degradation of caffeine by immobilized cell of *Pseudomonas* sp. In agar-agar matrix using statistical approach. **Biochemical Engineering Journal**. 44:136-141.
- Ha, B.J., O.S. Lee and Y.S. Lee. 1996. Studies on the physic-chemical properties on several chitosan beads. **Journal of Korean Industry and Engineering chemistry**. 7:186-193.
- Han, X.Q. and F. Shahid. 1995. Extraction of harp seal gastric protease their immobilization on chitin. **Food Chemistry**. 52:71-76.
- Ingesson, H., G. Zacchi , B. Yang, A.R. Esteghlalian, and J.N. Saddler. 2001. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**. 88:177-182.
- 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.

- Kumar, A.G., S. Swarnalatha, P. Kamatchi and G. Sekaran. 2009. Immobilization of hight catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. **Biochemical Engineering.** 43: 185-190.
- Kumer, R. and N.V. Majeti. 2000. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional polymer.** 46:1-27.
- Laszlo, P. 1990. Mechanisms of Protease Action.CRC Press. **Inc.United States.** 43-86.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993. **Principles of Biochemistry.** Worth Publishers.
- Lin, Y.C. and H. Bai. 2006. Temperature effect on pore structure of nanostructured zeolite particles synthesized by Aerosol Spray Method. **Aerosol and Air Quality Research.**1: 43-53.
- Mi, F.L., S.S. Shyu, C.T. Chen and J.Y. Lai. 2002. Adsorption of indomethacin onto chemically modified chitosan beads. **Polymer.** 43:757-765.
- Nakamura, C., C.Miyamoto,I. Obataya, S. Takeda, M. Yabuta and J. Miyake. 2007. Enzymatic nanolithography of FRET peptide layer using V8 protease-immobilized AFM probe. **Biosensor and Bioelectronics.** 22:2308-2314.
- 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.
- Ruchi, G., P. Hema, J. Ruchi and S.K. Khare. 2006. Galacto- oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry.** 97: 426-430.

- Sangeetha, K. and T.E. Abraham. 2008. Investigation on the development of study bioactive hydrogel beads. **Journal of Applied Polymer Science**. 107: 2899-2908.
- 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**.
- Silva, C.J.S.M., Q. Zhang, J. Shen and A. Cavaco-Paulo. 2006. Immobilization of proteases with a water soluble-insoluble reversible polymer for treatment of wool. **Enzyme and Microbial Technology**. 39: 634-640.
- Yi-Su, O., S. Ing-Lung, T. Yew-Min and W. San-Lang. 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

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

1. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

1.1 สารละลาย 0.1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก เตรียมโดยการผสมกรดไฮโดรคลอริก (37 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 1.17 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2 สารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 0.4 กรัม กับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.3 สารละลาย 0.2 โมลาร์ โมโนเบสิก โพแทสเซียมฟอสเฟต เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (KH_2PO_4) จำนวน 3.12 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.4 สารละลาย 0.2 โมลาร์ ไดเบสิก โพแทสเซียมฟอสเฟต เตรียมโดยละลายไดโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K_2HPO_4) จำนวน 3.56 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.5 สารละลาย 0.05 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 เตรียมโดยผสมสารละลาย 0.2 โมลาร์ โมโนเบสิก โพแทสเซียมฟอสเฟต จำนวน 19.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย 0.2 ไดเบสิก โพแทสเซียมฟอสเฟต จำนวน 30.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.6 สารละลายเคซีน (casein) 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายเคซีนจำนวน 1.5 กรัมกับสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในอ่างน้ำอุ่นพร้อม 30 นาที เพื่อให้เคซีนละลายจนหมด ปล่อยให้สารละลายเคซีนเย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเติมสารละลาย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.7 สารละลาย 0.4 โมลาร์ กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เตรียมโดยละลาย TCA จำนวน 6.54 กรัมกับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.8 สารละลาย 0.4 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต เตรียมโดยละลายโซเดียมคาร์บอเนตจำนวน 4.24 กรัมกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.9 สารละลายโฟลีน (folin reagent) เตรียมได้โดยผสมสารละลายโฟลีนกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปใช้ทันที

2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของโปรตีน (Han and Shahid, 1995)

2.1 ใส่น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ลงไปหลอดทดลองที่ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ ใส่เม็ดบีดที่ได้จากการตรึงรูป (ใช้ประมาณ 8-9 เม็ด ให้ชั่งน้ำหนักเม็ดทั้งหมดก่อนมาทดสอบ) นำหลอดทดลองทั้งหมดใส่ใน rack และวางทั้ง rack ในน้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส

2.2 เติมสารละลายเคซีที่เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง จำนวน 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดอื่นๆ เติมสารละลายเคซีนดังกล่าว จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที (ทุกหลอดยังคงอยู่ใน rack ซึ่งวางในอ่างน้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียสตลอดเวลา)

2.3 นาที่ที่ 10 เติมสารละลาย 0.4 M TCA ที่เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง ลงในหลอดที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติม 0.4 M TCA ลงในหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีเช่นกัน ตามลำดับ ตั้งหลอดทดลองทั้งหมดทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (หมายเหตุทุกหลอดอยู่ใน rack ซึ่งวางในอ่างน้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียสตลอดเวลา จนกว่าจะถึงเวลากรอง)

2.4 คูณส่วนใสที่กรองได้อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมสารละลาย 0.4 M Na_2CO_3 ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดจำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เตรียม folin reagent ตอนนี้ โดยคูณ folin 5 ml ผสมกับน้ำกลั่น 5 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เขย่าให้เข้ากันนานๆ

2.5 เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายที่กรองได้ของหลอดทดลองที่เติมน้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ เติมสารละลาย folin reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรเช่นกันที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

2.6 นาที่ที่ 10 เทหลอดทดลองที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) ลงใน cuvette 2 อัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรทันที กด auto

zero แล้วดึง cuvette อันหนึ่งออก แล้วด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง จากนั้นนำที่ที่ 10 กว่าๆ เทของเหลวในหลอดอันถัดไปลงใน cuvette เพื่อกลั้ว และเทที่เหลือลงไปอีก แล้ววัดค่า absorbance ที่นาที่ที่ 11 ทันที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้

3. การสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรตีน

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

3.2 สารละลาย L-tyrosine เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นลงในแต่ละหลอดทดลองด้วยอัตราส่วนดังตารางภาคผนวก ก1

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

3.3 เติมสารละลาย 0.4 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.4 เติมสารละลายฟอสฟอรัส จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1 เพราะเป็นหลอดควบคุม (blank) ที่นาที่ที่ 0 ส่วนหลอดทดลองอื่นๆ เติมสารละลายฟอสฟอรัส จำนวน 1 มิลลิลิตรเช่นกัน ที่เวลาต่างๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แต่ละหลอดทำปฏิกิริยาครบ 10 นาที

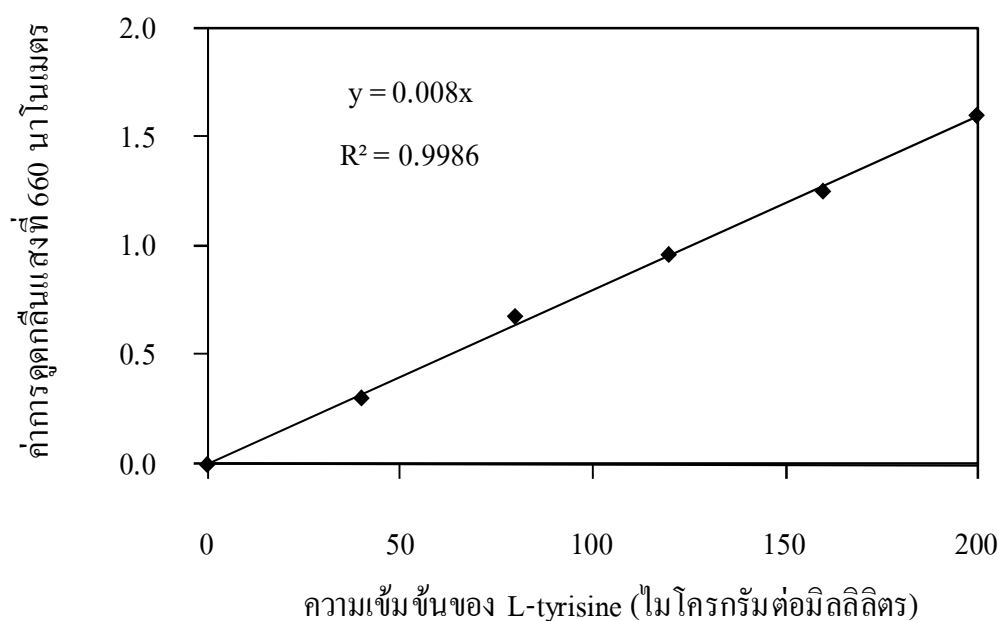
3.5 นาที่ที่ 10 นำหลอดทดลองที่ 1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรทันที กด auto zero blank ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง

ของหลอดทดลองอื่นๆ ที่ทำปฏิกิริยาครบ 10 นาทีทันทีเช่นกัน ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6

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

3.7 จากกราฟมาตรฐานสามารถสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย L-tyrosine เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์ที่ชั่วโมงต่างๆ จึงทราบค่ากิจกรรมโปรติเอสได้ ดังภาพผนวกที่ ก 1

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



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมโปรติเอส

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

1. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของโปรตีนเอส

1.1 สารละลายสี เตรียมโดยละลายสารสี Coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัม ในเอทานอล (99.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (85 เปอร์เซ็นต์) ลงไป 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 41

1.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สำหรับ calibration) เตรียมสารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 50 มิลลิกรัม ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่น เพื่อชะฟองที่เกิดขึ้น เมื่อชะฟองหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0-30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(ถ้าเป็นการทดลองเพื่อหาปริมาณโปรตีน สารละลายโปรตีนมาตรฐานจะหมายถึงของเหลวที่จะวัดหาโปรตีน)

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโปรตีนเอส

2.1 เตรียมสารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางภาคผนวก ก2

ตารางผนวกที่ ก2 วิธีการเตรียมสารละลาย โปรตีนของ BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

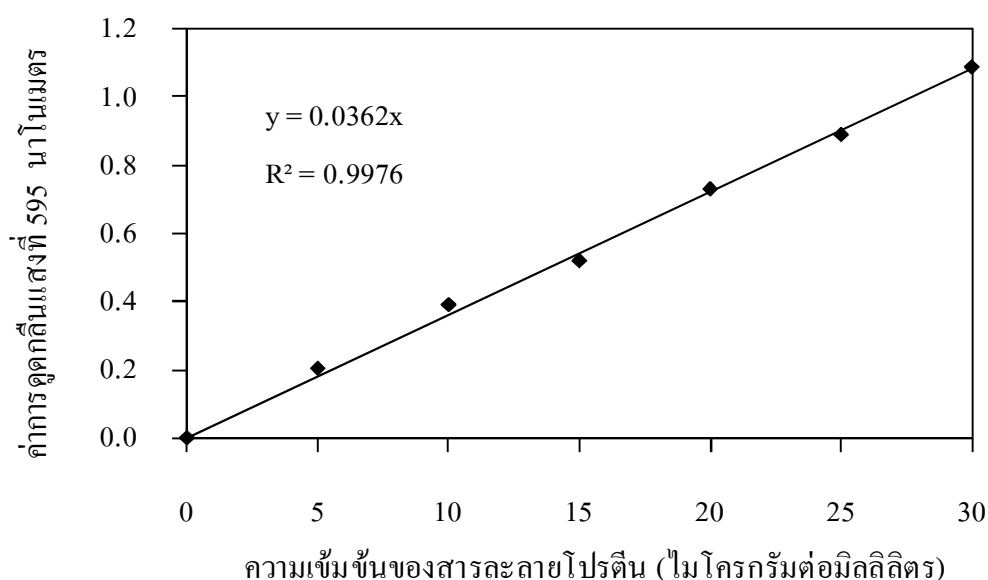
หลอด ที่	ความเข้มข้นของสารละลาย เข้มข้น 500 µg/ml ที่ดูคมา (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำ กลั่น (ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	2000	0
2	20	1980	5
3	40	1960	10
4	60	1940	15
5	80	1920	20
6	100	1900	25
7	120	1880	30

3. วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bradford M.M.,1976)

3.1 ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เข้มข้นต่างๆ(ถ้าเป็นการทดลองเพื่อหาปริมาณโปรตีน สารละลายโปรตีนมาตรฐานจะหมายถึงของเหลวที่จะวัดหาโปรตีน) ลงในหลอดทดลองจำนวน 6 มิลลิลิตร

3.2 เติมสารละลายสีลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าทิ้งไว้ 5 นาที

3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 7 เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์ที่ชั่วโมงต่างๆ จึงทราบค่ากิจกรรมโปรตีนได้ ดังภาพผนวกที่ ก 1



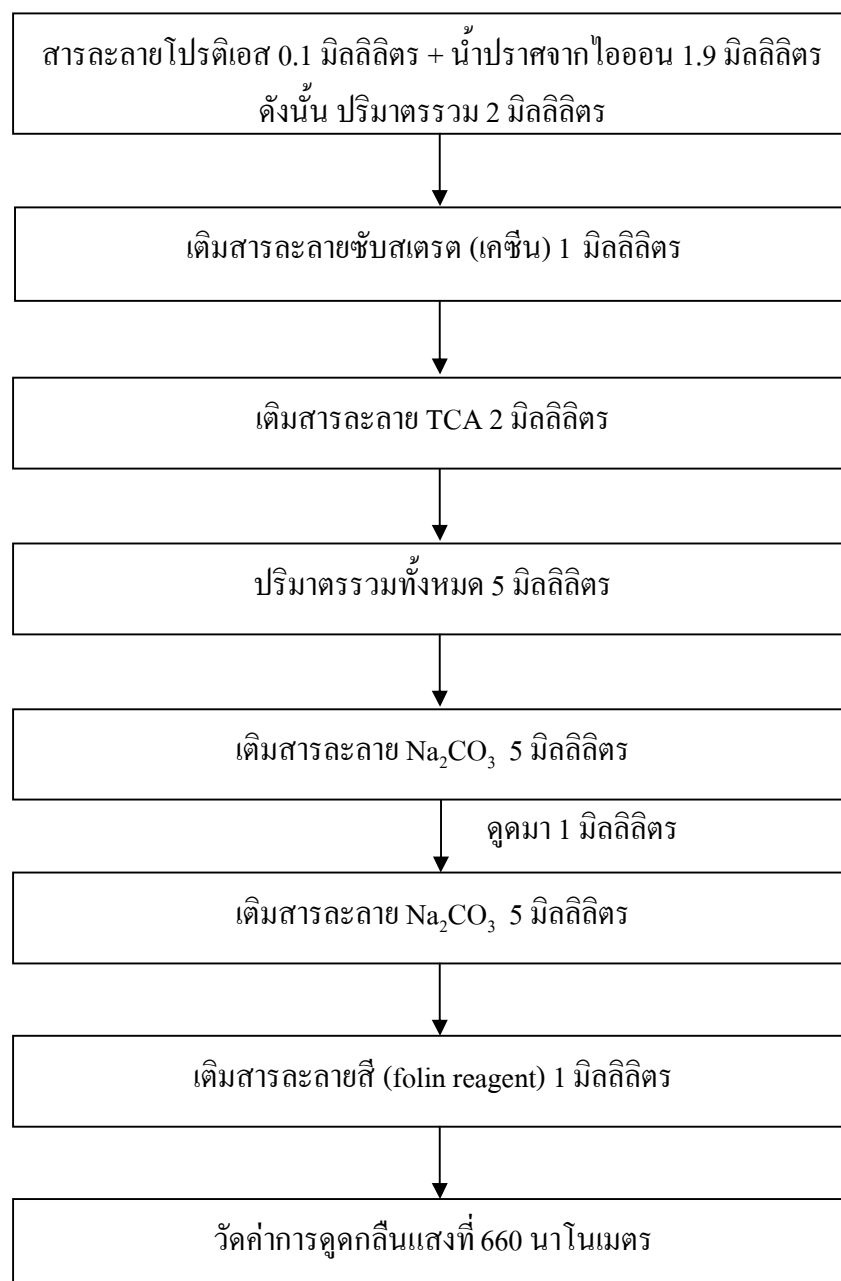
ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์อิสระและกิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป

1.1 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์อิสระ



จากแผนภาพ สามารถนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อิสระได้ดังนี้

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์อิสระ (ยูนิต)} = \frac{A_{660}}{\text{slope}} \times \frac{1}{10} \times 5$$

โดย

A_{660} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

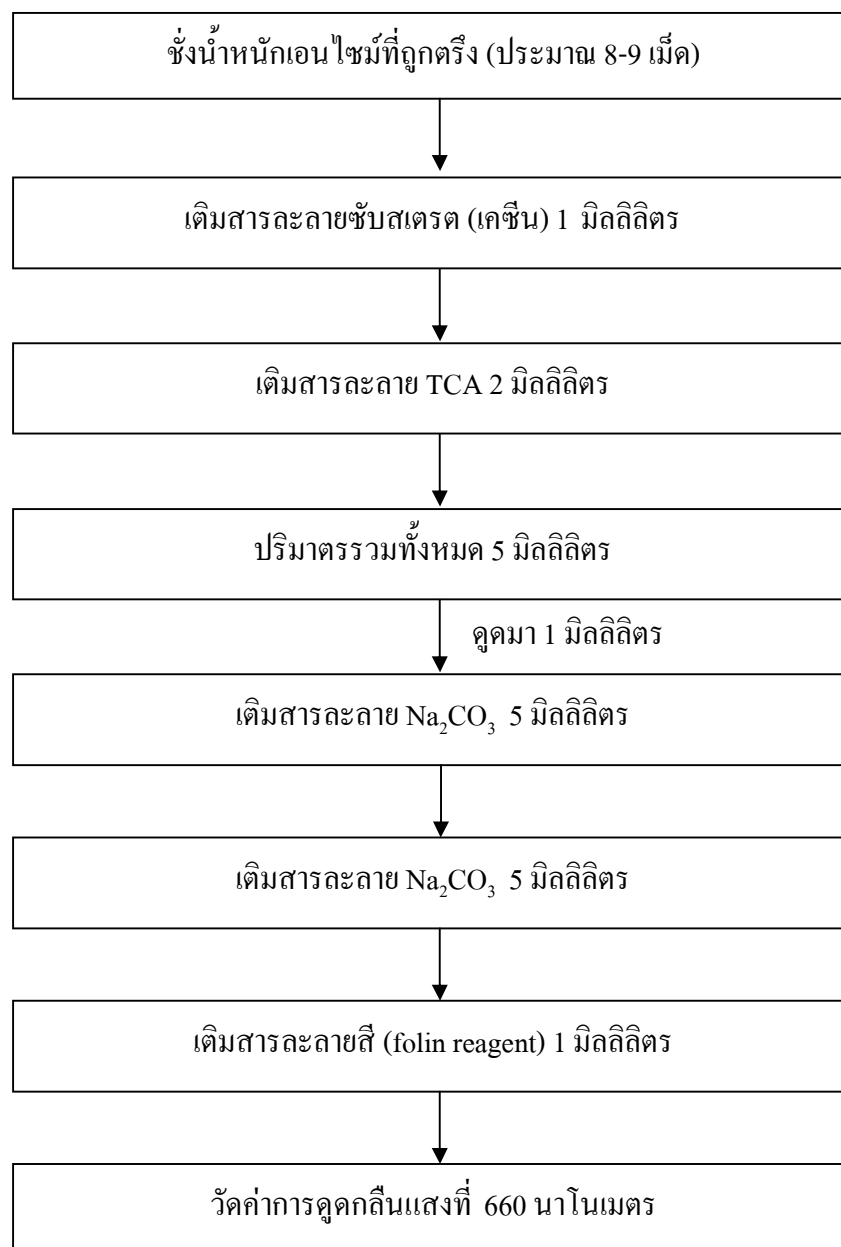
ความชันของกราฟมาตรฐาน L-tyrosine = 0.008

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 1 มิลลิลิตร

เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 10 นาที

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = 5 มิลลิลิตร

1.2 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ตริงรูป



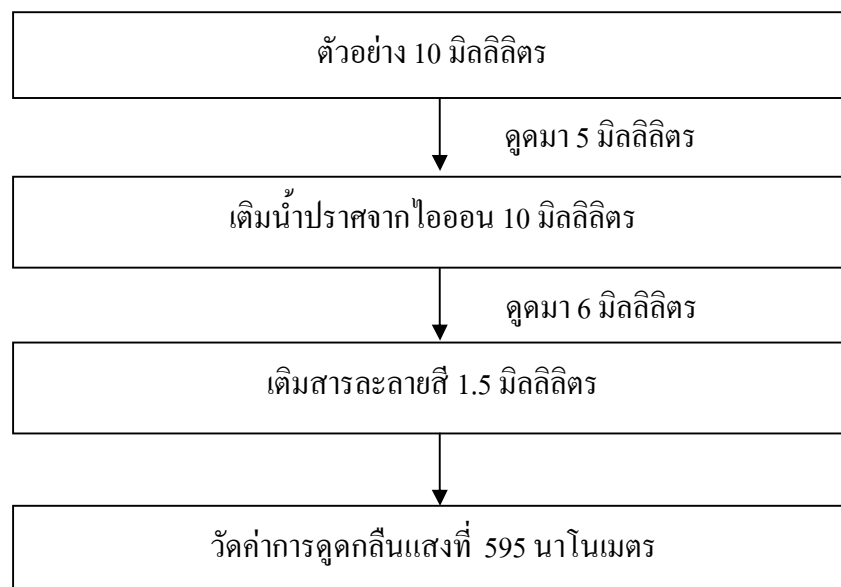
จากแผนภาพ สามารถนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรีงรูปได้ดังนี้

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ตรีงรูป (ยูนิต)} = \frac{A_{660}}{\text{slope}} \times \frac{1}{10} \times \left(3 + \frac{0.15}{0.9953} \right)$$

โดย

A_{660}	= ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
ความชันของกราฟมาตรฐาน L-tyrosine	= 0.008
สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	= 1 มิลลิลิตร
เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา	= 10 นาที
ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา	= 3 มิลลิลิตร
น้ำหนักเอนไซม์ตรีงรูป	= 0.15 กรัม
ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรีงรูป	= 0.9953 กรัมต่อมิลลิลิตร

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน



จากแผนภาพ สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีน ได้ดังนี้

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

A_{595} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความชันของกราฟมาตรฐาน L-tyrosine = 0.038

ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา = 15 มิลลิลิตร

สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 5 มิลลิลิตร

ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ = 10 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวนิตยา เยาว์แสง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	19 เมษายน 2527
สถานที่เกิด	อำเภอศรีนครินทร์ จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา	วศ.บ. (วิศวกรรมเคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นิสิตปริญญาโท ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	โครงการพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โครงการทุนสนับสนุนของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์