รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัด เพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

(Development of high-efficiency lipase immobilization on economic efficiency carrier for biodiesel production)

หัวหน้าโครงการ

ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประเภทเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานส่วนแรกของโครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 และขอขอบพระคุณหน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

หัวข้อโครงการวิจัย การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัดเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD 003 บนแร่มอนท์-มอริลโลไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์ โดยวิธี Physical adsorption และศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึง พบว่า เอนไซม์ไลเปสตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ มีสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงดังนี้ การใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุงเท่ากับ 5:1 ใช้เวลาในการตรึง 90 นาที เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือ พีเอช 9 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 70 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 6-9 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 45-80 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์มีสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุงเท่ากับ 3:1 ใช้เวลาในการตรึง 30 นาที ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานคือพีเอช 6-7 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 45 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่อพีเอชที่ช่วงพีเอช 7-10 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 45-80 องศาเซลเซียส ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าแร่มอนท์มอริลโลไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารพยุงสาหรับตรึงเอนไซม์ไลเปส แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสภาวะที่สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปทั้งสองแบบไปใช้ในการผลิตไบโอ-ดีเซลต่อไป

คำสำคัญ: เอนไซม์ไลเปส, การตรึงเอนไซม์, แร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์, *Bacillus* spp.

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Email : patcharanan@buu.ac.th, patcharanana@gmail.com

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง..... ข

สารบัญรูปภาพ..... ค

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 5

รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์และการตรึงเอนไซม์..... 5

รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อบาซิลลัส..... 14

รายละเอียดเกี่ยวกับแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ 15

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 18

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 20

วัสดุอุปกรณ์..... 20

วิธีการทดลอง..... 21

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 27

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง..... 34

สรุปผลการทดลอง..... 34

อภิปรายผลการทดลอง..... 34

เอกสารอ้างอิง..... 40

ภาคผนวก..... 42

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 43

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี..... 45

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin 47

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยาเคมี……..……..	6
2	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส……..……	8
3	สมบัติที่พึงประสงค์ของสารพยุง.....……..……..	12

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* ใต้กล้องจุลทรรศน์…….……..	15
2	โครงสร้างของแร่มอนท์มอริโลไนท์……..……..……	16
3	ลักษณะของผงแร่มอนท์มอริโลไนท์……..	16
4	โครงสร้างของแร่เวอร์มิคูไลท์ ……..……..	17
5	ลักษณะของแร่เวอร์มิคูไลท์……..……..……..	17
6	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (มิลลิยูนิตต่อกรัม) เมื่อตรึงเอนไซม์ด้วยอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อสารพยุงที่แตกต่างกัน ……..……..……...	28
7	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (มิลลิยูนิตต่อกรัม) เมื่อตรึงเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างๆ ……	29
8	Optimum pH ของเอนไซม์ไลเปส……..……..……..	30
9	Optimum temperature ของเอนไซม์ไลเปส……..……...	31
10	ความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช…….....	32
11	ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ……	33
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin ที่ความเข้มข้น 0-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร……..	47

บทที่1
บทนำ

เอนไซม์เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับมนุษย์มาตั้งแต่สมัยโบราณ มีผู้สนใจทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์เรื่อยมา ในปัจจุบันเอนไซม์มีบทบาทเป็นสารเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการต่างๆทั้งภายในและภายนอกเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยมีลักษณะเป็นสารประกอบอินทรีย์โปรตีน เอนไซม์ถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลายทั้งในรูปเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป ไม่ว่าจะเป็น ด้านการแพทย์ เกษตรกรรมและ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านอุตสาหกรรม และเน้นการใช้งานเอนไซม์ตรึงรูปเนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นคือ สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ จึงมีความคุ้มค่าในการใช้งาน (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์กับสารที่มห้หมู่เอซิลได้ (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545) เอนไซม์ไลเปสสกัดได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย) แต่มีจุลินทรีย์เป็นแหล่งเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญ เนื่องจากง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยวและการทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ ด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) คือ เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการตรึง (Immobilization) ซึ่งหมายถึง การนำเอาเอนไซม์มาติดไว้กับวัสดุหรือสารพยุงใดๆ และยังคงมีกิจกรรมเหมือนเอนไซม์อิสระ โดยที่สารตั้งต้น หรือซับสเตรตสามารถผ่านเข้าไปในวัสดุหรือสารพยุง และถูกเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ได้ โดยการตรึงเอนไซม์กับสารพยุงมีข้อดีหลายประการที่สำคัญคือ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เนื่องจากสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย สามารถหยุดและควบคุมปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และมีความคงตัวสูง (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ตรึงรูปยังคงมีข้อจำกัดในการใช้งานโดยปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปได้แก่ ระยะระหว่างเอนไซม์กับสารพยุง การเปลี่ยนแปลงพีเอช การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเข้มข้นของซับสเตรต อย่างไรก็ตามกระบวนการตรึงเอนไซม์ยังอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อาจจะลดลงหลังจากผ่านกระบวนการตรึง ซึ่งอาจเป็นผลเกี่ยวเนื่องมาจากการทำลายโครงสร้างบางส่วนของโปรตีนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการตรึง นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมรอบเอนไซม์ตรึงรูปจะแตกต่างจากสภาวะแวดล้อมรอบเอนไซม์อิสระ ซึ่งอาจเกิดจากสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของสารพยุง หรือการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารพยุงและซับสเตรต นอกจากข้อจำกัดที่กล่าวมาแล้ว สารพยุงบางชนิดยังมีราคาสูง มีขั้นตอนใน

การใช้งานที่ค่อนข้างยุ่งยาก จึงมีการสนใจศึกษาเพื่อจะหาสารพยุงชนิดใหม่มาทดแทนและลดข้อจำกัดของสารพยุงชนิดเดิม (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556)

แร่ดินเหนียวเป็นหนึ่งในสารที่มีสมบัติเป็นสารพยุงที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ แร่ดินเหนียว คือ แร่ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญภายในดินจัดอยู่ในกลุ่มแร่ดินเบนทอไนต์ (Bentonite) ซึ่งเป็นดินที่เกิดจากการสลายตัวของเถ้าภูเขาไฟ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่ แร่กลุ่มมอนท์มอริลโรไนท์ แร่กลุ่มคาโอริไนท์ และแร่กลุ่มอีไลท์ (พลช ตั้งฐานทรัพย์,ม.ป.ป) ซึ่งกลุ่มที่พบมากที่สุด คือ แร่มอนท์มอริลโรไนท์ (Montmorillonite) ซึ่งมีสมบัติเป็นตัวดูดซับที่ดี นอกจากแร่ดินเหนียวแล้วยังมีแร่เวอร์มิคูไลท์ (Vermiculite) ซึ่งเป็นแร่ในกลุ่ม Mica ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีพื้นที่ผิวมาก มีคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนประจุที่ดี และมีความสามารถในการดูดซับสูง (Chellapandian & Sastry, 1992) จึงเป็นแร่ที่น่าสนใจในการนำมาตรึงเอนไซม์เช่นกัน มีรายงานการวิจัยที่นำแร่ดินมาใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส Scherer, Vladimir, Pergher and Oliveira (2011) ศึกษาหาสารพยุงเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์ไลเปส พบว่าแร่ดินเหนียวมีศักยภาพสูงสำหรับใช้เป็นสารพยุงในการตรึงเอนไซม์ไลเปส โดยมีอัตราการตรึงอยู่ที่ร้อยละ 76.32 และ 52.01 เมื่อใช้ KSF montmorillonite และ Natural montmorillonite ตามลำดับ จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแร่ดินเหนียวมีสมบัติในการเป็นตัวพยุงที่ดี และจากสมบัติการเป็นตัวดูดซับที่ดีของแร่ทั้งสองชนิด จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาการตรึงเอนไซม์บนแร่ดินเหนียว และแร่เวอร์มิคูไลท์ แทนสารพยุงชนิดเดิม เช่น ซิลิกา,ไคโตซาน ที่อาจจะมีราคาสูงหรือมีความยุ่งยากในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์

ความมุ่งหมายของการศึกษา

เพื่อพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจาก *Bacillus* sp. เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม

ความสำคัญของการศึกษา

ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. โดยใช้แร่ดินเหนียวเป็นตัวพยุง ด้วยวิธี Physical adsorption และทราบคุณสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป ได้แก่ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอชและอุณหภูมิต่างๆ และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล

สมมติฐานของการศึกษา

1. Crude enzyme และเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต มีกิจกรรมแตกต่างกันบนแร่ดินเหนียว

2. แร่มอนท์มอริลโรไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์ มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวพยุงในการตรึงเอนไซม์

3. ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการตรึงที่แตกต่างกัน มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงแตกต่างกัน

4. ระดับของพีเอช และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีผลต่อกิจกรรมและความเสถียรของเอนไซม์แตกต่างกัน

5. เอนไซม์ตรึงรูปบนแร่มอนท์มอริลโรไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์สามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซลได้

ขอบเขตของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน แร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD 003 เป็นแหล่งของเอนไซม์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหาร Production medium แล้วเก็บ Crude enzyme ไปเตรียมให้เป็นเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ จากนั้นนำไปใช้ในการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์บนแร่ทั้งสองชนิด โดยทำการศึกษาปัจจัยต่างๆดังนี้ (1) ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงโดยทำการศึกษาจากอัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อวัสดุพยุงที่แตกต่างกัน คือ อัตราส่วน 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 ตามลำดับ (2) ผลของเวลาต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึง โดยเก็บตัวอย่างออกมา

วิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ ภายในช่วงเวลา 120 นาที (3) ศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (4) ศึกษาความเสถียรต่อ pH โดยนำเอนไซม์ไปบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกัน และศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ โดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่ช่วงอุณหภูมิแตกต่างกัน ตลอดจนการศึกษาการเร่งปฏิกิริยา esterification และ transesterification ของเอนไซม์โดยมีกรดโอเลอิกและน้ำมันปาล์มเป็นซับสเตรท ตามลำดับ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า แบ่งเป็น 4 หัวข้อคือ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ และการตรึงเอนไซม์
2. รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Baciilus* sp.
3. รายละเอียดเกี่ยวกับแร่ มอนท์มอริลโรไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ และการตรึงเอนไซม์

1.1 รายละเอียดทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนลักษณะก้อน (ยกเว้นไรโบไซม์เป็นอาร์เอ็นโมเลกุล) ทำหน้าที่เป็นแคทาลิสต์ (Catalyst) หรือตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งในสิ่งมีชีวิต และในหลอดทดลอง ปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เข้าร่วมจะเกิดได้ช้าลง ส่วนปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เข้าร่วมจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้นถึง 10^7 เท่า โดยการทำงานของเอนไซม์จะมีความจำเพาะสูง ทั้งต่อชนิดของซับสเตรต ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและปฏิกิริยาเคมีที่เข้าร่วม ทำให้เอนไซม์ชนิดหนึ่งมักเร่งปฏิกิริยาเพียงปฏิกิริยาเดียวหรือหลายปฏิกิริยาต่อเนื่องกัน หลังจากเอนไซม์มีกิจกรรมเปลี่ยนซับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว เอนไซม์โมเลกุลนั้นสามารถหมุนเวียนกลับมาเปลี่ยนซับสเตรตโมเลกุลต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้อีก โดยซับสเตรตจะจับกับเอนไซม์โดยอาศัยแรงหรือพันธะต่างๆที่บริเวณเร่ง (Active site) ซึ่งบรเวณนี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนเรสซิดิวที่มีความจำเพาะชนิดต่างๆ ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต และเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงซับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) คณะกรรมาธิการเอนไซม์นานาชาติได้จัดระบบจำแนกเอนไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเข้าไปทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มเอนไซม์ตามชนิดของปฏิกิริยาเคมี

กลุ่ม	ลักษณะปฏิกิริยาเคมี	ตัวอย่าง
1. ออกซิโดรีดักเทส (Oxidoreductases)	เคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน A+B ⟶ A+B	แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส
2. ทรานสเฟอเรส (Transferases)	เคลื่อนย้ายอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชันระหว่างโมเลกุล A-B + C ⟶ A + B-C	เฮกโซไคเนส
3. ไฮโดรเลส (Hydrolases)	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส A-B + H_2O ⟶ A-H + B-OH	ทริปซิน, ไลเปส
4. ไลเอส (Lyases)	ตัดพันธะ C-C,C-O,C-N และพันธะอื่นๆ ทำให้เกิดพันธะคู่ A-B ⟶ A = B + X ‖ X Y	ไพรูเวตดีคาร์บอกซีเลส
5. ไอโซเมอเรส (Isomerases)	เคลื่อนย้ายอะตอมหรือหมู่ฟังก์ชันภายในโมเลกุล A-B ⟶ B – A ‖ ‖ X Y Y X	กลูโคสไอโซเมอเรส
6. ไลเกส (Ligases)	สร้างพันธะควบคู่กับการสลายพลังงาน(ATP) A + B ⟶ A-B	ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส

(ที่มา : ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556 หน้า 21)

1.2 เอนไซม์ไลเปส (Lipases) (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

เป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolases) ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไขมัน และน้ำมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเปสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อย หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย ไลเปสเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันโดยการทำให้พันธะเอสเทอร์แตกตัวเช่นเดียวกับเอนไซม์เอสเทอเรส จึงทำให้เกิดความสับสนระหว่างไลเปส และเอสเทอเรส Arthus,1902 ; Deyon & Moral (1903) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดา (2547) ได้ให้คำจำกัดความของไลเปสว่าเป็น

เอนไซม์ที่เร่งการย่อยสลายเอสเทอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ในปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสจัดอยู่ในประเภท Triacylglycerol acylhydrolases ตาม The International Union of Biochemistry (IUB)- system มีรหัสเป็น EC 3.1.1.3 ไลเปสที่แท้จริงจะย่อยสลายโมเลกุลน้ำมันและไขมัน ซึ่งปฏิกิริยาย่อยสลายนี้สามารถผันกลับได้ในระบบที่มีน้ำน้อย หรือในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์ โดยปฏิกิริยาผันกลับได้นี้มี 2 ปฏิกิริยาคือ Transesterification และ Esterification เอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญในเมทาบอลิซึมของไขมันซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิตจึงพบในทั้งสัตว์ พืช จุลินทรีย์

1.2.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์

เอนไซม์ไลเปสจากตับ (Pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ ทำหน้าที่ย่อยสลายไขมันในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เป็นเอนไซม์ประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อที่มีบทบาทและความสำคัญต่อการนำไปใช้รักษาโรคและในทางการแพทย์ (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Steiner & Williams, 2002) พบว่าไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล *Canine* เป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่น่าสนใจเนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายกับของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ จึงเกิดความสนใจเนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้

1.2.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช

เอนไซม์ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อซับสเตรตสูง ผลปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้า เป็นแหล่งสำคัญของไลเปส (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Huang & Brockman, 1984) รายงานว่าโดยธรรมชาติเมล็ดพืชสะสมไขมันไว้ใน Lipid-bodies และ Glyoxysomes ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปสได้ ขณะที่ไลเปสของเมล็ดธัญพืชจะถูกพบได้ในรำ เช่น รำข้าวสาลี และ รำข้าวเจ้า นอกจากนี้ยังมีการพบเอนไซม์ไลเปสในยางมะละกอ และหญ้าบางชนิดด้วย

1.2.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ เนื่องจากไลเปสจากพืชและจากสัตว์มีความซับซ้อนในการสกัดอันเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้แหล่งเอนไซม์ไลเปสทั้งสองจึงไม่ถูกนำมาใช้กันแพร่หลาย ต่างจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกใช้มากในอุตสาหกรรมทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ(ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Jaeger & Reetz, 1998) อธิบายว่าไลเปสจากจุลินทรีย์มีลักษณะเฉพาะที่สำคัญ 4 ประการคือ (1) มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ (2) ไม่ต้องการ Cofactors ในการทำงาน (3) มีความจำเพาะต่อซับสเตรตหลายชนิด (4) มี Enantioselectivity สูง ในปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในทางการค้า 129 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อรา 53 สายพันธุ์ แบคทีเรีย 53 สายพันธุ์ และยีสต์ 23 สายพันธุ์ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

แบคทีเรีย	เชื้อรา	ยีสต์
Achromobacter sp. *A. lipolyticus* *Acinetobacter* sp. *Alcaligenes* sp. *Bacillus cereus* *B. megaterium* *Enterococcus faecalis* *Lactobacillus* sp. *Flavobacterium arborescens*	*Aspergillus* sp. *Aspergillus awamori* *A. flavus* *A. niger* *A. oryzae* *Fusarium oxysporum* *F. solani* *Penicillium* sp. *Rhizopus* sp.	*Candida* sp. *C. rugosa* *Proteus* sp. *S. cerevisiae* *Schizosaccharomyces* *Torula thermophila*

(ที่มา : ณกัญภัทร จินดา, 2547, หน้า 25)

1.2.3.1 เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา และยีสต์ ที่ใช้ส่วนใหญ่ในทางการค้าได้จากเชื้อรา ได้แก่ *Mucor javanicus*, *Rhizopus sp.*, *Humicola lanuginosa*, *Aspergillus sp.* และยีสต์ได้แก่ *Candida lipolytica*, *C. antarctica*, *C. rugosa*, และ *C. cylindracea* เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งนี้มักใช้ในการ resolution ของ secondary alcohol esters

1.2.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย มีความสำคัญที่สุดในตลาดเอนไซม์และการวิจัยทางด้านเอนไซม์ เนื่องจากสามารถผลิตได้ปริมาณมากๆ มีความคงทนต่อสภาวะกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติ regioselectivity และ chiral selectivity ที่เด่นชัดอีกด้วย โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

กลุ่มที่ 1 มี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas alcaligenes* เอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 โมเลกุล ส่วนชนิดที่สองเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas glumae* และ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 320 โมเลกุล

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas fluorescens* และ *enterobacterium*, *Serratia marcescens* เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์ในกลุ่มแรก มีขนาดและลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันเล็กน้อยยกเว้นส่วนที่เป็น N-terminal และลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้บริเวณเร่งซีรีน (active site serine)

กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. และ Staphylococcus เอนไซม์ในกลุ่มที่ 3 มีกรดอะมิโน Alanine (Ala) เป็นกรดอะมิโนตัวแรกใน Consensus pentapeptide sequence (Gly-X-Ser-X-Gly) แทนที่จะเป็น Glycine (Gly) แบบเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ

1.3 การตรึงเอนไซม์ (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556)

การตรึงเอนไซม์ (Enzyme immobilization) หมายถึงการนำเอาเอนไซม์มายึดติดไว้กับวัสดุหรือสารพยุงใดๆ และยังคงมีกิจกรรมเหมือนเอนไซม์อิสระ โดยที่สารตั้งต้นหรือซับสเตรตสามารถผ่านเข้าไปและถูกเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ได้ เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงเรียกว่า เอนไซม์ตรึงรูป (Immobilized enzyme) การใช้เอนไซม์ตรึงรูปจะช่วยเสริมประสิทธิภาพในด้านการจัดการ ดูแลรักษา และเพิ่มความทนทานในการใช้งาน ความสะดวกในการนำกลับมาใช้ใหม่หรือการใช้อย่างต่อเนื่อง การตรึงเอนไซม์เหมาะสำหรับเอนไซม์ที่มีกระบวนการผลิตยุ่งยาก ราคาแพง และที่สำคัญช่วยลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้กระบวนการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเอนไซม์ยังทำได้ง่าย ผลิตภัณฑ์ที่ได้ปนเปื้อนเอนไซม์น้อยลง

1.3.1 ประโยชน์ของการตรึงเอนไซม์ การนำเอาเอนไซม์มาตรึงอยู่กับสารพยุงมีข้อดีหลายประการที่สำคัญคือ (1) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่หรือใช้ซ้ำได้ (2) สามารถหยุด หรือระงับปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วโดยการแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสารละลาย (3) เอนไซม์ตรึงรูปมีความคงตัวสูง (4) เก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายเนื่องจากไม่มีการผสมรวมกันระหว่างผลิตภัณฑ์กับเอนไซม์ตรึงรูป (5) มีประโยชน์ทางการวิเคราะห์ต่างๆ เช่น มีครึ่งชีวิตที่ยาว ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมสารเคมี และการคาดคะเนอัตราการสลายตัว

1.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป ปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์เป็นการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลหนึ่งไปเป็นโมเลกุลอีกชนิดหนึ่ง โดยเกิดที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เมื่อพิจารณาตามลักษณะธรรมชาติของเอนไซม์ตรึงรูปแล้วพบว่าปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาได้แก่

1.3.2.1 ระยะห่างระหว่างเอนไซม์กับสารพยุง การยึดเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับสารพยุงจะมีหมู่ที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อเพื่อทำให้ยึดเกาะกันได้ เรียกว่า Spacing group ส่วนใหญ่จะเป็น CH_2 group หรือหมู่อื่นๆ จำนวนโมเลกุลหรือระยะความยาวของ Spacing group จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ ถ้ามีจำนวนโมเลกุลหรือระยะความยาวของหมู่ที่สั้นเกินไปอาจมีผลทำให้ซับสเตรตเข้าสู่บริเวณเร่งปฏิกิริยาได้ยาก เนื่องจากมีสารพยุงอยู่ใกล้บริเวณนั้นหรือเบียดบังอยู่ แต่ถ้าระยะความยาวของ Spacing group มากเกินไป เอนไซม์อาจแกว่งหรือเคลื่อนไปมาทำให้

ซับสเตรตเข้าจับบริเวณเร่งได้ยากเช่นกัน

1.3.2.2 การเปลี่ยนแปลงพีเอช เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอช เอนไซม์แต่ละชนิดมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีผลต่อการจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต กิจกรรมของเอนไซม์ ปฏิกิริยาไอออไนเซชั่นของซับสเตรต และการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการตรึงรูปแล้วจะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระ

1.3.2.3 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ โดยทั่วไปเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นเดียวกับปฏิกิริยาเคมีทั่วไป แต่ขณะเดียวกันเอนไซม์จะเสียสภาพเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เรียกว่า การเสียสภาพเนื่องจากความร้อน เพราะความคงทนของเอนไซม์จะลดลงเนื่องจากถูกทำลายโดยความร้อน ดังนั้นในขั้นตอนการตรึงรูปหากปล่อยให้เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงเกินไปในเวลานานจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้

1.3.2.4 ความเข้มข้นของซับสเตรต ตาม Michaelis-Menten kinetics ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรตประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาแรกเป็นการจับกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์และเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่ 2

$$\text{Enzyme} + \text{Substrate} \underset{}{\overset{k1}{\longleftrightarrow}} \text{Enzyme - Substrate Complex} \overset{k2}{\longrightarrow} \text{Products} + \text{Enzyme}$$

จากโมเดลดังกล่าวถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์ตรึงรูปคงที่ แต่ความเข้มข้นของซับสเตรตเพิ่มขึ้นจนมากเกินพอที่จะจับเอนไซม์ทั้งหมดเพื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ปฏิกิริยาแรกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 2 ค่อนข้างจำกัดนั้นคือการเปลี่ยนแปลงเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาจะไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของซับสเตรตที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมากเกินพอที่จะจับกับเอนไซม์

1.3.3 ปัจจัยที่อาจเปลี่ยนแปลงหลังการตรึงเอนไซม์

1.3.3.1 อายุการใช้งาน จุดประสงค์หลักของการตรึงเอนไซม์คือ ความต้องการให้อายุการใช้งานของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถนำกลับมาทำปฏิกิริยาซ้ำหรือนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลังจากการฟื้นฟูประสิทธิภาพ

1.3.3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ หรือประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงรูปอาจลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากปัยหาการเคลื่อนที่ของมวลสารทำให้ซับสเตรตเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ยากขึ้น

1.3.3.3 ระดับอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม หลังจากการตรึงเอนไซม์จะเกิดสภาวะแวดล้อมรอบเอนไซม์และสารพยุงเรียกว่า ภาวะแวดล้อมจุลภาค (Microenvironment) และภาวะแวดล้อมในสารละลายนั้นๆ เรียกว่า ภาวะแวดล้อมมหาภาค (Macroenviroment) ซึ่งมีผลทำให้ระดับอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เนื่องมาจากระดับอุณหภูมิและพีเอชที่จะแทรกเข้าสู่ภาวะแวดล้อมจุลภาคจะลดลงต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงควรรักษาระดับอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปเพื่อจะได้ปรับภาวะแวดล้อมในสารละลายให้อยู่ในระดับที่เอนไซม์ต้องการ นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ตรึงด้วยวิธีที่แตกต่างกัน หรือใช้สารพยุงต่างชนิดกัน จะมีผลทำให้สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปที่เกิดขึ้นแตกต่างกันด้วย ซึ่งเป็นข้อดีในแง่ที่เราสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปเหล่านี้ไปใช้ในสภาวะที่แตกต่างกันได้ตามวัตถุประสงค์ของการทำปฏิกิริยา

1.3.3.4 ความคงทน ความคงทนของเอนไซม์ตรึงรูปต่อภาวะแวดล้อมอาจสูงขึ้น เช่น อุณหภูมิ พีเอช สารละลายหรือการย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ความคงทนของเอนไซม์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับกระบวนการตรึง นั่นคือ ความคงทนของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นถ้าสารพยุงให้ภาวะแวดล้อมที่จะรักษาความคงทนของเอนไซม์ และความคงทนของเอนไซม์จะลดลงถ้าสารพยุงที่ใช้มีผลในการทำลายโปรตีนเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่จับกับสารพยุงอนินทรีย์ เช่น แก้วหรือเซรามิกจะมีความคงทนมากกว่าเอนไซม์ที่จับกับสารพยุงอินทรีย์

1.3.3.5 สมบัติทางจลนศาสตร์ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อันเนื่องมาจากกระบวนการตรึงยังไม่มีการศึกษารายละเอียดมากนัก โดยปกติจะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่อผ่านกระบวนการตรึงซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องจากการทำลายบางส่วนของโปรตีน เมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาพตรึงรูปแล้วจะพบว่า ภาวะแวดล้อมรอบๆเอนไซม์จะแตกต่างจากภาวะแวดล้อมเมื่ออยู่ในรูปเอนไซม์อิสระที่อยู่ในสารละลายต่างๆ ภาวะแวดล้อมใหม่นี้อาจเกิดจากสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารพยุง หรืออาจเกิดจากการทำปฏิกิริยากันของสารพยุงกับซับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยานั้นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า V_{max} และค่า K_m ที่วัดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปไม่ใช่ค่าที่แท้จริงที่ได้จากการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์อิสระ จึงถือเป็นค่าเปรียบเทียบหรือ apparent values เนื่องจากการแพร่ของซับสเตรตเข้าสู่สารพยุงมีผลทำให้ค่าที่ได้เปลี่ยนแปลงไป การแพร่ของซับสเตรตจากสารละลายเข้าสู่เอนไซม์ตรึงรูปมีผลต่อการจำกัดอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา และอัตราการเคลื่อนที่ของซับสเตรตขึ้นอยู่กับความหนาของแผ่นฟิล์มของสารพยุง นอกจากนี้มวลโมเลกุลของซับสเตรตก็มีผลด้วย ซับสเตรตที่มีมวลโมเลกุลสูงจะมีปัญหาการผ่านเข้าสารพยุง

1.4 วิธีการตรึงเอนไซม์ (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556)

สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาในการตรึงเอนไซม์คือ การเลือกวิธีที่จะช่วยลดหรือป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ให้มากที่สุด โดยวิธีการที่เลือกนั้นต้องไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะ หรือสมบัติทางธรรมชาติของเอนไซม์ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาในการตรึงเอนไซม์นั้น นอกจากจะต้องคัดเลือกเอนไซม์ที่มีลักษณะและคุณสมบัติตามที่ต้องการแล้วยังต้องพิจารณาถึงชนิดของสารพยุงและวิธีการตรึงที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกได้ว่าวิธีการตรึงใดเหมาะสมกับเอนไซม์ชนิดใด ส่วนสารพยุงที่เลือกใช้ควรมีความคงตัวทางด้านกายภาพ เคมี และชีวภาพ มีความแข็งแรง ไม่เป็นพิษและราคาไม่แพง การคัดเลือกสารพยุงที่เมาะสมต้องพิจารณาจากสมบัติของเอนไซม์ที่ต้องการตรึง ได้แก่ ขนาดของโมเลกุล พื้นที่ผิว อัตราส่วนระหว่างหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ รวมทั้งส่วนประกอบทางเคมีของเอนไซม์ สมบัติและข้อควรพิจารณาในการคัดเลือกสารพยุงแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติที่พึงประสงค์ของสารพยุง

สมบัติ	เกณฑ์
1.การละลาย	ต่ำ
2.การย่อยสลายโดยชีวภาพ	ต่ำ
3.ความคงทน	สูง(มีสมบัติทางกลศาสตร์ที่ดี ไม่แตกสลายง่าย)
4.การแพร่	สูง
5.วิธีการตรึง	ง่าย
6.การเข้าทำลายโดยสิ่งมีชีวิต	ต่ำ
7.ต้นทุน	ต่ำ

(ที่มา : ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556, หน้า 153)

วิธีการตรึงเอนไซม์กับสารพยุงแบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

1.4.1 การยึดเกาะ (Carrier-binding) เป็นการเอาเอนไซม์มายึดเกาะอยู่กับสารพยุงที่ไม่ละลายน้ำด้วยพันธะโคเวเลนซ์ พันธะไอออน การดูดซับทางกายภาพ หรือความจำเพาะทางชีวภาพ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปจะขึ้นอยู่กับสมบัติของสารพยุงนั้นๆ การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แบ่งย่อยออกเป็น 4 วิธีตามลักษณะการยึดเกาะ คือ (1) การยึดเกาะหรือการดูดซับทางกายภาพ (2) การยึดเกาะด้วยความจำเพาะทางชีวภาพ (3) การยึดเกาะด้วยไอออน (4) การยึดเกาะด้วยพันธะโคเวเลนซ์

1.4.1.1 การยึดเกาะหรือการดูดซับทางกายภาพและเคมี (Physical-chemical adsorption) การดูดซับของเอนไซม์บริเวณพื้นผิวของสารพยุงที่ไม่ละลายน้ำเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีการนำไปใช้ทั่วไป และสามารถใช้เอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูง การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้เป็นการยึดเกาะทางกายภาพของเอนไซม์กับสารพยุงโดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน การทำปฏิกิริยาร่วมกับสารที่ไม่ชอบน้ำ การเชื่อมต่อของเกลือและแรงแวนเดอร์วาลส์ ขั้นตอนการตรึงประกอบด้วยการผสมเอนไซม์กับสารพยุงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เช่น พีเอช ความแรงไอออน และเวลาที่ใช้ในการดูดซับ จากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการแยกและชะล้างส่วนที่ไม่ถูกตรึงออก โดยวิธีนี้เป็นที่นิยมทำทั่วไปเนื่องจากทำได้ง่าย รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องมีการปรับหรือกระตุ้นสารพยุงหรือเอนไซม์ก่อนการตรึง เนื่องจากวิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีจึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ หรือมีผลในการทำลายบริเวณเร่งน้อยที่สุดหรือไม่เกิดขึ้นเลย จึงมีผลในการทำลายเอนไซม์น้อยกว่าวิธีที่ใช้สารเคมีร่วมด้วย นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่พบได้ทั่วไปในเยื่อเมมเบรนของสิ่งมีชีวิต ข้อเสียของวิธีนี้คือ เป็นการยึดเกาะด้วยพันธะที่ไม่แข็งแรง เอนไซม์จึงหลุดออกจากสารพยุงได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารละลาย ข้อเสียอื่นๆคือไม่มีความจำเพาะจึงอาจเกิดการยึดเกาะของโปรตีนหรือสารอื่นร่วมด้วย ซึ่งมีผลต่อสมบัติของเอนไซม์

1.4.2 การเชื่อมประสาน (Cross-linking) การตรึงเอนไซม์วิธีนี้เกิดขึ้นเนื่องจากการเชื่อมประสานโดยวิธีทางเคมี หรือทางกายภาพระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับโมเลกุลของโปรตีนหรือหมู่ฟังก์ชันอื่นที่อยู่บนสารพยุงที่ไม่ละลายน้ำเพื่อเกิดเป็นโครงสร้างสามมิติขนาดใหญ่ การเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์จะเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ เพราะโปรตีนบางชนิดจะทำหน้าที่หลักเป็นสารพยุงอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ซึ่งมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีนี้ร่วมกับการตรึงวิธีอื่นเพื่อให้เอนไซม์ที่ยึดเกาะมีความคงทนและลดการหลุดออกของเอนไซม์

1.4.3 การกักเก็บ (Entraping) เป็นการนำเอนไซม์บรรจุลงในช่องของสารพยุงพอลิเมอร์หรือเยื่อเมมเบรน โดยที่ซับสเตรตสามารถผ่านเข้า-ออกได้ วิธีนี้ไม่มีการเกิดพันธะใดๆระหว่างเอนไซม์กับสารพยุง จึงสามารถใช้กับเอนไซม์ได้หลายชนิดและเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ข้อเสียคือการผ่านเข้าออกของมวลสาร สารที่มีมวลโมเลกุลสูงจะผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ยาก ขั้นตอนการตรึงเกิดขึ้นในสภาวะการพอลิเมอร์ไรซ์ของสารเคมีที่มีความรุนแรง ซึ่งอาจมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้การนำเอาสารพยุงกลับมาใช้ใหม่เป็นไปได้ยาก การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้แบ่งออกเป็น 3 วิธีคือ (1) การกักเก็บในเจล (2) การกักเก็บในไฟเบอร์ (3) การกักเก็บในไมโครแคปซูล

2. รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ *Bacillus* sp. (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, 2553)

Bacillus เป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Bacillaceae* ในปัจจุบันมีมากกว่า 60 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแอโรบส์ (Aerobes) หรือแฟคัลเททีฟแอนแอโรบส์ (Facultative anaerobes) มีรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก (แสดงในภาพที่ 1) มีการเรียงตัวเป็นสายยาวและมีสปอร์ บางครั้งอาจพบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุหลายวันจะมีการติดสีได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Gram variable) ให้ผลบวกต่อการทดสอบออกซิเดส และคาทาเลส สปอร์ของเชื้อ *Bacillus* จะถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน สปอร์จะทำให้เชื้อมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี เชื้อเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารครบถ้วน เช่น Blood agar โดยเชื้อสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่นละออง ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียที่มีการดำรงชีพอย่างอิสระ บางสปีชีส์พบว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งมีสปอร์ที่มีความสำคัญมีอยู่ 2 สกุล ได้แก่ *Bacillus* และ *Clostridium* โดยทั้งสองเชื้อมีความแตกต่างกันคือ *Bacillus* ให้ผลบวกต่อการทดสอบคาทาเลส และจะสร้างสปอร์ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วน *Clostridium* อยู่ในกลุ่มแอนแอโรบส์ จะให้ผลลบต่อการทดสอบคาทาเลสและการสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

2.1 เชื้อ *Bacillus* จำแนกออกเป็นสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะของเชื้อหลายประการ ได้แก่ ขนาดของเซลล์ เช่น มีขนาดใหญ่หรือเล็ก มีขนาดมากว่าหรือน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร ฉุปร่างของสปอร์ เช่น รูปไข่ (Oval) หรือรูปกลม (Spherical) ตำแหน่งของสปอร์ เช่น อยู่ตรงกลางเซลล์ (Central) ค่อนมาทางปลายเซลล์ (Subterminal) หรือปลายเซลล์ (Terminal) การเคลื่อนที่ การสร้างแคปซูล การทดสอบความไวต่อยาเพนนิซิลิน การสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar การทดสอบความไวต่อแกมมาฟาจ การทดสอบความเหมือนกันของลำดับเบสบนเส้นดีเอ็นเอ และการทดสอบชีวเคมีอื่นๆ เช่น การย่อยสลายแป้ง การสร้างอินโดล การรีดิวซ์ไนเตรต ทำให้สามารถจำแนกเชื้อ *Bacillus* ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, 2553) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เซลล์มีขนาดความกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปไข่มีขนาดเล็ก ทำให้รูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *B. anthracis, B. cereus, B. thuringiensis, B. megaterium, B. mycoides*

กลุ่มที่ 2 เซลล์มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปไข่มีขนาดเล็ก ทำให้รูปร่างของเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ เชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ *B. subtilis, B. pumilus, B. licheniformis, B. coagulans, B. firmus*

กลุ่มที่ 3 เซลล์มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปกลมมีขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์โป่งออก สปอร์อยู่ปลายเซลล์ เชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *B. sphaericus, B. polymyxa, B. stearothermophilus, B. circulans, B. laterosporus, B. brevis, B. alvei*

ภาพที่ 1 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* (ที่มา : Perkins, n.d.)

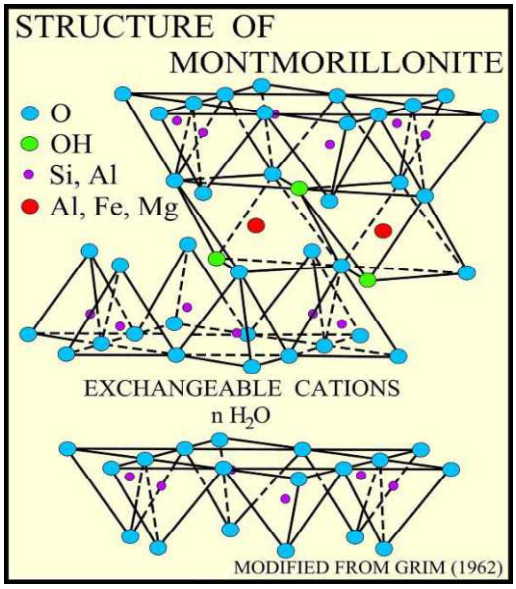
3. รายละเอียดเกี่ยวกับแร่ มอนท์มอริลโรไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์

3.1 แร่มอนท์มอริลโลไนท์ (Montmorillonite) อยู่ในกลุ่มดินสเมคไตต์ (Smectite) จัดเป็นแร่ดินเหนียว ชื่อของ Montmorillonite นี้ดัดแปลงมาจาก Montmorillan เป็นภาษาฝรั่งเศส ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเบนโทไนต์ ลักษณะ โครงสร้างพื้นฐานของแร่มอนต์มอริลโลไนต์ คือมีลักษณะเป็นแผ่นหรือเกล็ดขนาดเล็กๆซ้อนกัน 3 ชั้น มีแผ่นกลางเป็นแผ่นของกลุ่มโมเลกุล อลูมินั่มไฮดรอกซิลโมเลกุลแปดระนาบ (Octahedral Aluminum Hydroxyl) อยู่ตรงกลางระหว่าง แผ่นของกลุ่มโมเลกุลซิลิคอนออกไซด์โมเลกุลสี่เหลี่ยมปิรามิด (Siliconoxygen Tetrahedral) (แสดงในภาพที่ 2) โดยที่อะตอมของอลูมิเนียมบางส่วนจะถูกแทนที่ด้วยอะตอมของแมกนีเซียม หรืออะตอมของธาตุเหล็ก ซึ่งจะช่วยสร้างประจุลบบนระนาบด้านฐานของโมเลกุล
ซิลิกา และจะมีการสร้างสมดุลโดยการแลกเปลี่ยนประจุบวกกับแผ่นที่อยู่ติดกันในแร่มอนต์มอริลโลไนท์ตามธรรมชาติ, ประจุบวกเหล่านี้มักจะเป็นแคลเซียม, โซเดียม หรือแมกนีเซียม ขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศ และสภาวะแวดล้อมในช่วงเวลาที่ก่อตัว และลักษณะการก่อตัวของแร่ ในทางเคมี มอนต์มอริลโลไนต์ สามารถเขียนเป็นสูตรโมเลกุล ได้ดังนี้

$$M + [Al_2y\ (Mg\ Fe)y]\ Si_4\ O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$$

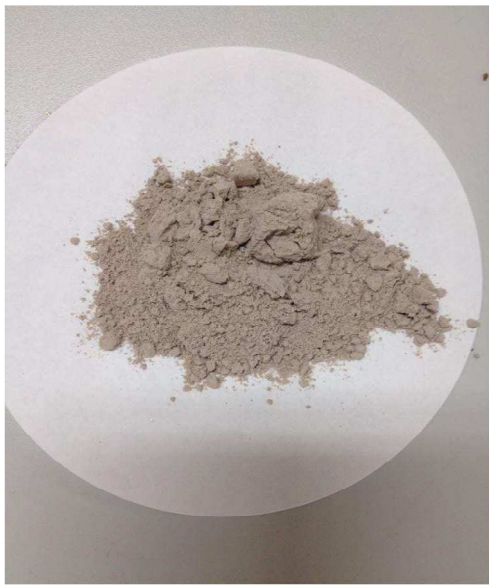
โดยที่ + M หมายถึงประจุบวกที่มาทำการแลกเปลี่ยนประจุกัน อาจเป็นได้ทั้ง แคลเซียม หรือโซเดียม โครงสร้างทางกายภาพของแร่มอนต์มอริลโลไนต์ (Montmorillonite) คือ กลุ่มของเกล็ด

หรือผลึก ที่มีระนาบฐานที่กว้าง แตกต่างกันอยู่ในช่วงความยาวที่ 0.2-2.0 ไมครอน (10^{-6} เมตร) และความหนาที่ 6-10 ไมครอน ซึ่งในความเป็นจริง ลักษณะและการก่อตัวของผลึก สามารถแตกต่างกันไปได้ ตามการกำเนิด และลักษณะเฉพาะที่ ของแหล่งแร่ (บริษัทนาซ่ากรุ๊ป2008 จำกัด, 2557) ผงแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีลักษณะดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 2 โครงสร้างของมอนท์มอริโลไนท์

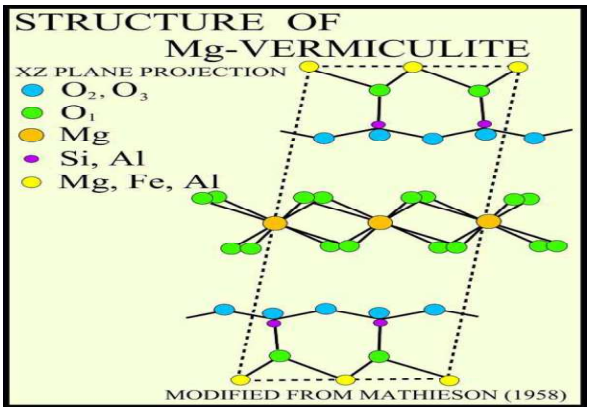
(From : U.S. Geological Survey, n.d.)



ภาพที่ 3 ลักษณะของผงแร่มอนท์มอริโลไนท์

(ที่มา : จากการศึกษานี้)

3.2 แร่เวอร์มิคูไลท์ (Vermiculite) ประกอบด้วยน้ำ, แร่ซิลิเกต ถูกจัดเป็น phyllosilicate มีสมบัติการขยายตัวอย่างมากเมื่อได้รับความร้อน เวอร์มิคูไลท์ที่เกิดจากการผุกร่อนหรือการเปลี่ยนแปลงความร้อนของ แร่ไบโอไทท์ (Biotite) หรือแร่ฟลอโกไพท์ (Phlogopite) เวอร์มิคูไลท์เป็นดินเหนียว 02:01 คือมีแผ่น Octahedral ถูกประกบด้วยแผ่น Tetrahedral (แสดงในภาพที่ 4) มีการหดและขยายตัวอยู่ในระดับปานกลาง เวอร์มิคูไลท์มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนบวกในระดับสูงที่ 100-150 meq/100 กรัม เวอร์มิคูไลท์ที่อยู่ในสภาพ Micas โพแทสเซียมไอออนระหว่างแผ่นโมเลกุลจะถูกแทนที่ด้วยแมกนีเซียมและไอออนของเหล็ก (The mineral and locality database, n.d.) สูตรโมเลกุลของเวอร์มิคูไลท์เขียนได้ดังนี้ $(Mg,Fe,Al)_3((Al, Si)_4O_{10})(OH)_2 \cdot 4H_2O$ ลักษณะทั่วไปของแร่เวอร์มิคูไลท์แสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 4 โครงสร้างของแร่เวอร์มิคูไลท์

(From : U.S. Geological Survey, n.d.)

ภาพที่ 5 ลักษณะของแร่เวอร์มิคูไลท์

(ที่มา : จากการศึกษานี้)

4. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Garwood , Mortland and Pinnavaia (1983) ได้ทำการศึกษาการตรึงกลูโคสออกซิเดสบนแร่มอนท์มอริลโรไนท์ โดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic และ Ionic เป็นตัวเชื่อมพันธะกับกลูโคสออกซิเดส (พีเอช 3-8) ที่มีสภาวะเป็นกลาง เป็นประจุบวก และประจุลบ ถูกนำมาเชื่อมติดกับพื้นผิวภายนอกของ Hexadecyltrimethylammonium montmorillonite โดยอาศัยกลไกการไม่ชอบน้ำ พบว่า ที่พีเอช 4.0 ขีดจำกัดในการดูดซับมีค่าเท่ากับ 4.7 กรัมต่อ 100 กรัมของแร่ดิน โดยค่าพีเอช ที่เหมาะสมที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดมีแนวโน้มที่คล้ายกันทั้งในเอนไซม์ตรึงและเอนไซม์อิสระ แต่ในเอนไซม์ตรึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ในทางตรงกันข้าม Na^{+}-montmorillonite สามารถจับกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสในรูป Active form โดยอาศัยกลไกการแทรกตัวของประจุได้ดีที่ค่าพีเอชที่ต่ำกว่าจุด Isoelectric

Chellapandian and Sastry (1992) ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์โปรติเอสบนแร่เวอร์มิคูไลท์ เวอร์มิคูไลท์เป็นแร่ที่จัดเป็นวัสดุเฉื่อย แข็งแรง และมีราคาถูก จึงถูกนำมาใช้ในการตรึงโปรติเอสด้วยวิธีการดูดซับ โดยทำการศึกษา โพแทสเซียม แคลเซียม และอลูมิเนียม บนเวอร์มิคูไลท์ที่มีผลต่อการดูดซับเอนไซม์โปรติเอส พบว่าที่พีเอช 6.5 เวอ์มิคูไลท์ที่มีอลูมิเนียมอิ่มตัวอยู่ให้ผลการดูดซับเอนไซม์มากที่สุด เวอร์มิคูไลท์ที่มีประจุบวกมีการดูดซับเอนไซม์สูงที่สุดภายใต้สภาวะการตรึง คือ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสองเท่าการดูดซับเอนไซม์ก็มีแนวโน้มสูงขึ้น

Chellapandian (1998) ได้ทำการศึกษาการเตรียมและคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ โดยอาศัยพันธะ โควาเลนท์ เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระพบว่า เอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมจำเพาะที่ต่ำกับสารตั้งต้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชและมีความเสถียรต่อความร้อนอยู่ในช่วงที่กว้าง ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่ออัลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูปมีค่าค่อนไปทางค่าพีเอชที่เป็นด่าง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงรูป อัลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงรูปบนแร่เวอร์มิคูไลท์แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติทางความคงตัวและการใช้ซ้ำที่ดี

Ranjitha, Karthy, & Mohankumar (2009) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Vibrio fischeri* พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด จากนั้นนำเอนไซม์ไปทำบริสุทธิ์ต่อแล้วศึกษา

คุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่า มีกิจกรรมจำเพาะ 121 ยูนิตต่อมิลลิกรัม มีค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 7 ถึง 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส

Scherer , Vladimir, Pergher, and Oliveira (2011) ได้ศึกษาหาสารพยุงเพื่อใช้ในการตรึงเอนไซม์ไล-เปส พบว่าแร่ดินเหนียวมีศักยภาพสูงสำหรับใช้เป็นสารพยุงในการตรึงเอนไซม์ไลเปส โดยมีร้อยละของการตรึงอยู่ที่ร้อยละ 76.32 และ52.01 เมื่อใช้ KSF montmorillonite และ natural montmorillonite ตามลำดับ โดยวัตถุประสงค์ของงานนี้คือการรายงานประสิทธิภาพการทำงานของตัวพยุงที่แตกต่างกันในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู การตรึงเอนไซม์ถูกทดสอบในตัวพยุงหลายประเภท ได้แก่ Accurel, activated alumina, kaolin, montmorillonite, ion exchange resins และ zeolites. ลักษณะของสารพยุงแต่ละชนิดแสดงให้เห็นความแตกต่างกันด้านความจำเพาะและสัณฐานวิทยา โดยดูผลของปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับ, ร้อยละของการตรึง และกิจกรรมของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันที่ส่งผลต่อตัวเร่งปฏิกิริยาของการตรึง

Kumar, Sharma, Kumar, & Singh (2012) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus pumilus* RK31 โดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆ (50, 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์) พบว่า ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 60 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 123.82 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

Sharma and Kanwar (2012) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* โดยทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวตั้งแต่ 10 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

   1.1 *Bacillus* sp. BLCD 003

2. วัสดุและอุปกรณ์

   2.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker JSSI-100C , ประเทศเกาหลี)

   2.2 เครื่อง Centrifuge (5804R , ประเทศเยอรมนี)

   2.3 เครื่อง Spectrophotometer (SPECTRO star Nano-BMG Labtech , ประเทศเยอรมนี)

   2.4 เครื่อง Magnetic Stirrer (Heidolph MR 3002G , ประเทศเยอรมนี)

   2.5 Desiccator

   2.6 96-well microliter plate (Thermo scientific, ประเทศจีน)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

   3.1 Trypticase Soy agar (TSA)

   3.2 Trypticase Soy broth (TSB)

   3.3 Production medium

4. สารเคมี (ภาคผนวก ก)

   4.1 Sodium dodecyl sulfate (Ajax Finechem, ประเทศออสเตรีย)

   4.2 เมทานอล (Hayman, ประเทศอังกฤษ)

   4.3 น้ำมันปาล์มดิบ

   4.4 น้ำมันมะกอก (Extra Virgin; SABROSO)

   4.5 *p*-nitrophenylpalmitate (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

   4.6 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Ajax Finechem, ประเทศนิวซีแลนด์)

   4.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, ประเทศนิวซีแลนด์)

   4.8 2-propanol (VWR International S.A.S, ประชาคมยุโรป)

   4.9 Triton X-100 (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

4.10 Solution A

4.11 Solution B

4.12 แร่มอนท์มอริลโลไนท์ (ชมรมเกษตรกรปลอดสารพิษ, ประเทศไทย)

4.13 แร่เวอร์มิคูไลท์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อ และการเตรียม Crude enzyme

1.1 นำเชื้อ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD 003 เพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็น Stock เชื้อ

1.2 นำเชื้อจาก Stock (1loop) มาลงในอาหาร TSB ปริมาณ 20 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

1.3 นำมาปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บตะกอนมาแขวนลอยเซลล์ใน Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7)

1.4 ปรับความขุ่นของเซลล์โดยวัดค่าดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร) ให้มีค่าเท่ากับ 1 โดยใช้ Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 (หัวเชื้อ)

1.5 นำหัวเชื้อมา 0.4 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร Production medium

1.6 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 1.6 ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที เก็บตะกอนมาละลายใน phosphate buffer (0.05 โมลาร์, pH 7.0) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำ dialysis ใน phosphate buffer (1 มิลลิโมลาร์, pH 7.0)

3. การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

3.1 นำแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์มาใช้ในการศึกษาการตรึงเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ด้วยวิธี Physical adsorption (Scherer *et al.*, 2011) โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อวัสดุที่ใช้ตรึงเอนไซม์เท่ากับ 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

3.2 กวนส่วนผสมของเอนไซม์และแร่ดินด้วย Magnetic stirrer ตลอดเวลาในสภาวะ 4 องศาเซลเซียสบนถาดน้ำแข็ง เก็บแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ที่เวลา 60 นาทีโดยกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1ทำให้แห้งในโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 (การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทำที่สภาวะเดียวกันทุกการทดลอง ตั้งแต่ข้อ 2-5)

4. การศึกษาผลของเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

4.1 นำแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์มาใช้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ด้วยวิธี Physical adsorption (Scherer *et al.*, 2011) โดยใช้อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ต่อวัสดุที่ใช้ตรึงเอนไซม์ที่ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 2

4.2 กวนส่วนผสมด้วย Magnetic stirrer ตลอดเวลาในสภาวะ 4 องศาเซลเซียส เก็บแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิคูไลท์ที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาทีโดยกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1ทำให้แห้งในโถดูดความชื้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

5. การศึกษา Optimum pH ของเอนไซม์ และ ความเสถียรของเอนไซม์ต่อ pH

5.1 การทดสอบ optimum pH ทำได้โดยการนำเอาเอนไซม์ ทั้งเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงมาวัดกิจกรรมโดยใช้ solution B ที่มีค่า pH แตกต่างกัน ได้แก่ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ตามลำดับที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.2 การทดสอบผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ทำได้โดยนำบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่ช่วง pH แตกต่างกัน (4.0 และ 10.0) คือ อะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 4.0 และ 5.0) โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0 และ 7.0) ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (pH 8.0 และ 9.0) และ คาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (pH 10.0)

4.1.1 เอนไซม์อิสระ

1) เอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH แตกต่างกันชนิดละ 2 มิลลิลิตร บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

4.1.2 เอนไซม์ตรึง

1) เอนไซม์น้ำหนัก 0.5 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่มีค่า pH ต่างๆ 1 มิลลิลิตร บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

4.1.3 ชุดควบคุม

1) นำบัฟเฟอร์แต่ละชนิดที่มีค่า pH ต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

2) นำเอนไซม์ (ไม่ได้ใส่บัฟเฟอร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เอนไซม์ตรึง 0.5 กรัม) บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (ชุดควบคุมเชิงบวก)

6. การศึกษา Optimum temperature ของเอนไซม์ และ ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

6.1 การทดสอบ Optimum temperature ทำได้โดยการบ่มเอนไซม์ตรึงและเอนไซม์อิสระกับซับสเตรต (ชุดควบคุมเติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์) ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง 4, 15, 25, 45, 55, 70 และ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

6.2 การทดสอบผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ทำได้โดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ อุณหภูมิห้อง 4,15,25,45,55,70 และ 80 องศาเซลเซียส

6.1.1 เอนไซม์อิสระ

1) นำเอนไซม์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์(พีเอช 7) 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆนาน 1 ชั่วโมง

2) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.1.2 เอนไซม์ตรึง

1) นำเอนไซม์ตรึง 0.5 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์(พีเอช 7) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง

2) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.1.3 ชุดควบคุม

1) นำบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่างๆนาน 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (ชุดควบคุมเชิงลบ)

2) นำเอนไซม์(ไม่ได้ใส่บัฟเฟอร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เอนไซม์ตรึง 0.5 กรัม) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆนาน 1 ชั่วโมงและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (ชุดควบคุมเชิงบวก)

7. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยา esterification

เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ตรึง (3% โดยน้ำหนัก/น้ำหนัก) ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา esterification ของกรดโอเลอิก (0.25 โมลาร์) และเมทานอล (0.4 โมลาร์) ในเฮกเซน เขย่าส่วนผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บส่วนผสมของปฏิกิริยามาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ 2 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Nawani et al., 2006) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทำได้โดยวิธีไตเตรท (Sirisha et al., 2010)

8. ศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์ไลเปสในกระบวนการ transesterification

กระบวนการมาตรฐานในที่นี้ คือ ใช้น้ำมันปาล์มและเมทานอล ในอัตราส่วนโมลาร์ 1:3, เอนไซม์ไลเปส 5 มิลลิลิตร, ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส, บนเครื่อง rotary shaker ที่ระดับความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น จากนั้นนำสารละลายชั้นบนไปตรวจสอบบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาและผสมสารเรืองแสง F254 เทียบกับตัวอย่างที่ได้จากการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและน้ำมันปาล์มโดยใช้สารละลายผสมของ hexane/ethyl acetate/ acetic acid (90:10:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่

9. วิธีการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Winkler and Stuckmann, 1979)

9.1 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์อิสระ

9.1.1 ปิเปตสารละลายผสมของ Solution A กับ B (อัตราส่วน 1:9) มา 180 ไมโครลิตร pre-warmed ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.1.2 เติมเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม Solution A+B บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.1.3 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

9.2 วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตรึง

<u>ชุดทดสอบ(เติมสารยับยั้งหลังวัดกิจกรรม)</u>

9.2.1 ชั่งส่วนของแข็ง (แร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์) ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์มา 0.02 กรัม

9.2.2 ปิเปตสารละลายผสมของ Solution A+B (อัตราส่วน 1:9) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ที่มีแร่ดินอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9.2.3 ปิเปตส่วนใสด้านบนจากแต่ละหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ย้ายไปลงหลุมใหม่

9.2.4 เติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (0.05% SDS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

9.2.5 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

<u>ชุดควบคุม (เติมสารยับยั้งก่อนวัดกิจกรรม)</u>

9.2.1 ชั่งส่วนของแข็ง (แร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์) ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์มา 0.01 กรัม

9.2.2 ปิเปตสารละลายผสมของ Solution A+B (อัตราส่วน 1:9) มา 90 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ที่มีแร่ดิน แล้วเติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (0.05% SDS) ปริมาตร 90 ไมโครลิตร

9.2.3 ปิเปตส่วนใสด้านบนจากแต่ละหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ย้ายไปลงหลุมใหม่

9.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

หมายเหตุ: ปิเปต Solution A มา 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมเปล่าของ 96-well microtitre plate (เพื่อใช้เป็น Blank) สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{410nm} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{(extinction coefficient ของ pNP) (มิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร)} \times \text{ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}} \times 10^3$$

วิธีการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึง (ยูนิตต่อกรัม)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึง (มิลลิยูนิตต่อกรัม)} = \frac{A_{410nm} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{(extinction coefficient ของ pNP) (มิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร)} \times \text{น้ำหนักเอนไซม์ตรึง (กรัม)}} \times 10^3$$

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย p-NPP แล้วทำให้มี p-nitrophenol เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที

หมายเหตุ: เมื่อ A_{410} = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ค่า extinction coefficient ของ *p*-nitrophenol (pNP) = 15 ต่อมิลลิโมลาร์ต่อเซนติเมตร

การคำนวณร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์

กำหนดให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงที่สุดคิดเป็น 100% จากนั้นนำค่ากิจกรรมที่ต้องการคำนวณหาร้อยละ มาเทียบกับค่ากิจกรรมที่สูงที่สุด ดังนี้

$$\frac{A \times 100}{B}$$

A คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องการคำนวณเป็นร้อยละ

B คือ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุด

10. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

10.1 เตรียมตัวอย่างใน 96- well microtitre plate โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาคือ ตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร Bradford reagent 200 ไมโครลิตร มีปริมาตรรวมเป็น 220 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม

10.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

10.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

10.4 นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนจากกราฟของสารละลายมาตรฐาน BSA

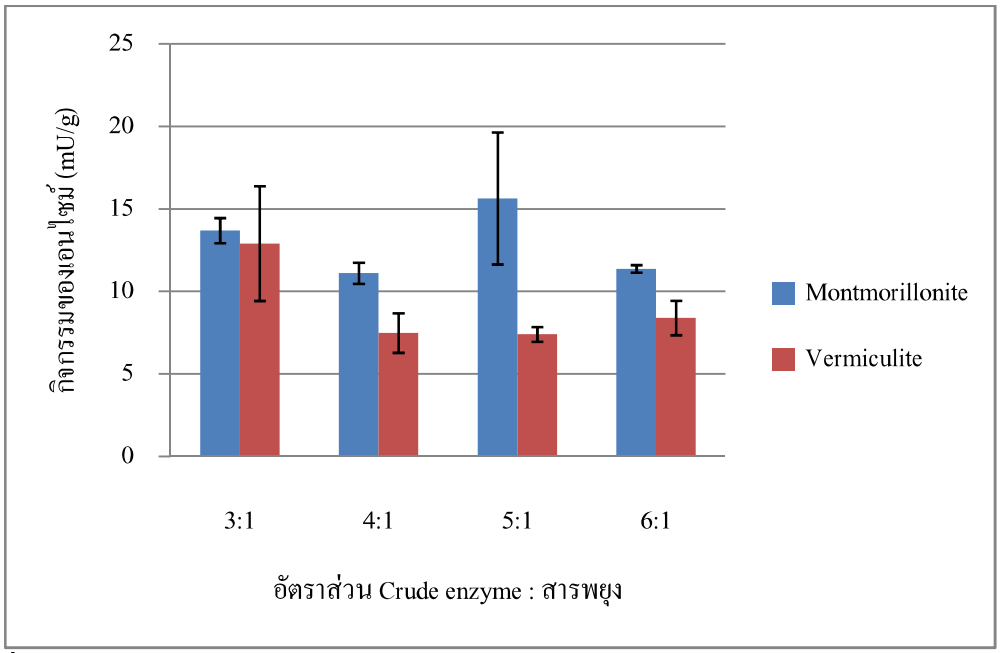
บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การเตรียมเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์และการตรึงเอนไซม์

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD 003 ใน Production medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บ Crude enzyme ไปตกตะกอนโปรตีนแบบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ นำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด ปริมาณโปรตีนทั้งหมด กิจกรรมจำเพาะ ความบริสุทธิ์ และปริมาณเอนไซม์คงเหลือ พบว่า เมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด และปริมาณโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.2361 ยูนิต และ 12.436 มิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปริมาณเอนไซม์คงเหลือสูงที่สุด เท่ากับ 14.070 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่ได้ไปทำ dialysis และนำไปตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์เปรียบเทียบกับการตรึงโดยใช้ Crude enzyme พบว่า เอนไซม์ที่ตรึงโดยใช้ Crude enzyme ให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) สูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงโดยใช้เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ประมาณ 1.6 เท่า ที่เวลา 30 นาที จึงได้เลือกใช้ Crude enzyme ในการทดลองการตรึงเอนไซม์ในขั้นต่อๆไป

2. การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

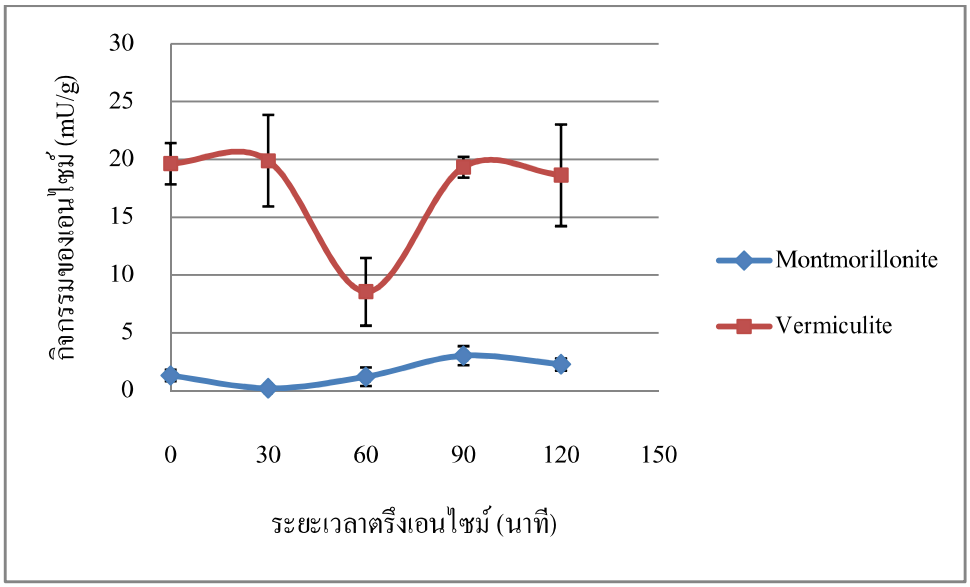
เมื่อนำ Crude enzyme มาผสมกับสารพยุง ซึ่งได้แก่ แร่มอนท์มอริลโลไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์ ด้วยอัตราส่วนระหว่าง Crude enzyme ต่อสารพยุง ดังนี้ 3:1, 4:1, 5:1 และ 6:1 โดยใช้เวลาตรึง 60 นาที พบว่า อัตราส่วนระหว่าง Crude enzyme ต่อสารพยุง ที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในเอนไซม์ที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์คือ 5:1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 15.64 มิลลิยูนิตต่อกรัม ส่วนเอนไซม์ที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์พบว่าอัตราส่วนระหว่าง Crude enzyme ต่อสารพยุงที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 3:1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.90 มิลลิยูนิตต่อกรัม ดังแสดงในภาพที่ 6 จึงเลือกอัตราส่วนทั้งสองค่าไปทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (มิลลิยูนิตต่อกรัม) เมื่อตรึงเอนไซม์ด้วยอัตราส่วนระหว่าง Crude enzyme ต่อสารพยุง ที่แตกต่างกัน

3. การศึกษาผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปส

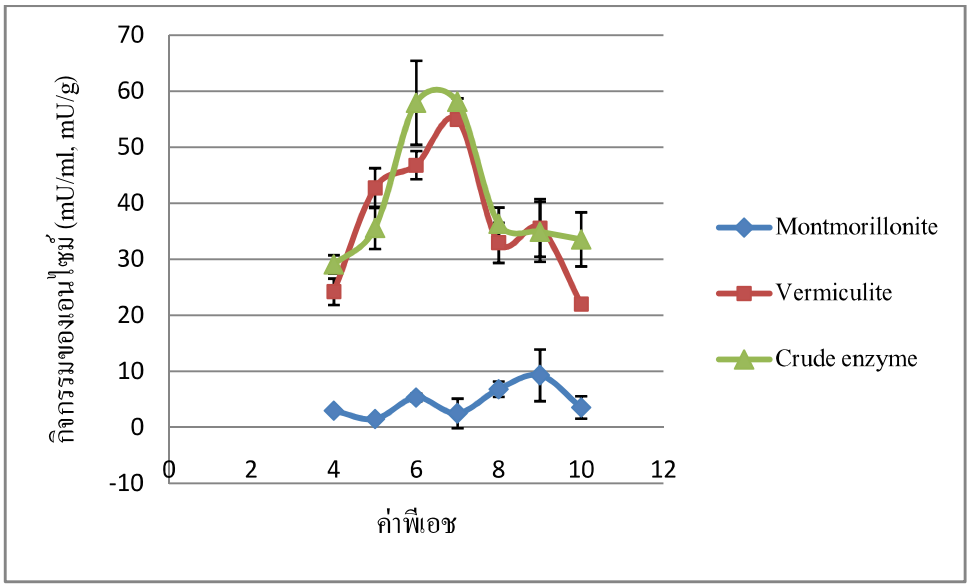
เมื่อนำเอนไซม์ที่ผสมกับสารพยุง โดยเอนไซม์ที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ใช้อัตราส่วนระหว่าง Crude enzyme ต่อสารพยุงคือ 5:1 และเอนไซม์ที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์ใช้อัตราส่วนระหว่าง Crude enzyme ต่อสารพยุงคือ 3:1 มาทดสอบหาระยะเวลาการตรึงที่ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุด พบว่า เอนไซม์ที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดเมื่อตรึงโดยใช้ระยะเวลา 90 นาที ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.01 มิลลิยูนิตต่อกรัม ส่วนเอนไซม์ที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดเมื่อตรึงโดยใช้ระยะเวลา 30 นาที ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 19.90 มิลลิยูนิตต่อกรัม ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (มิลลิยูนิตต่อกรัม) เมื่อตรึงเอนไซม์ไลเปสบนแร่ดินด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพที่ระยะเวลาต่างๆ

4. การศึกษา Optimum pH ของเอนไซม์

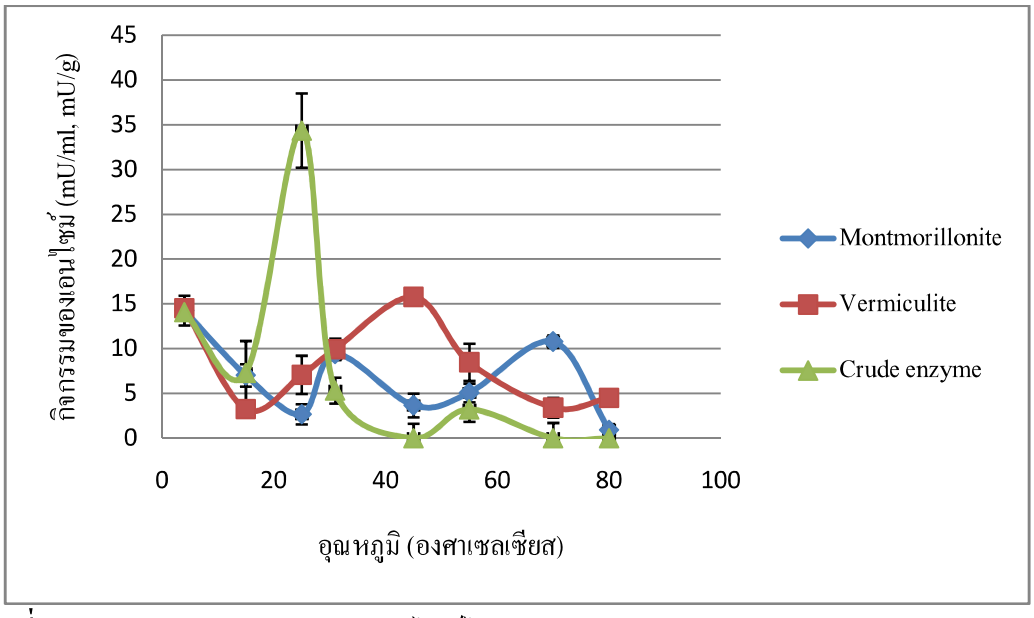
เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์ และ Crude-enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์บน 96-well microtiter plate โดยใช้ซับสเตรตที่ประกอบด้วย Solution B ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ได้แก่ พีเอช 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ พีเอช 10 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ คือ พีเอช 9 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์ คือ พีเอช 7 และพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์อิสระ (Crude enzyme) คือ พีเอช 6-7 ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 Optimum pH ของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่ดินเปรียบเทียบกับ Crude enzyme

5. การศึกษา Optimum temperature ของเอนไซม์

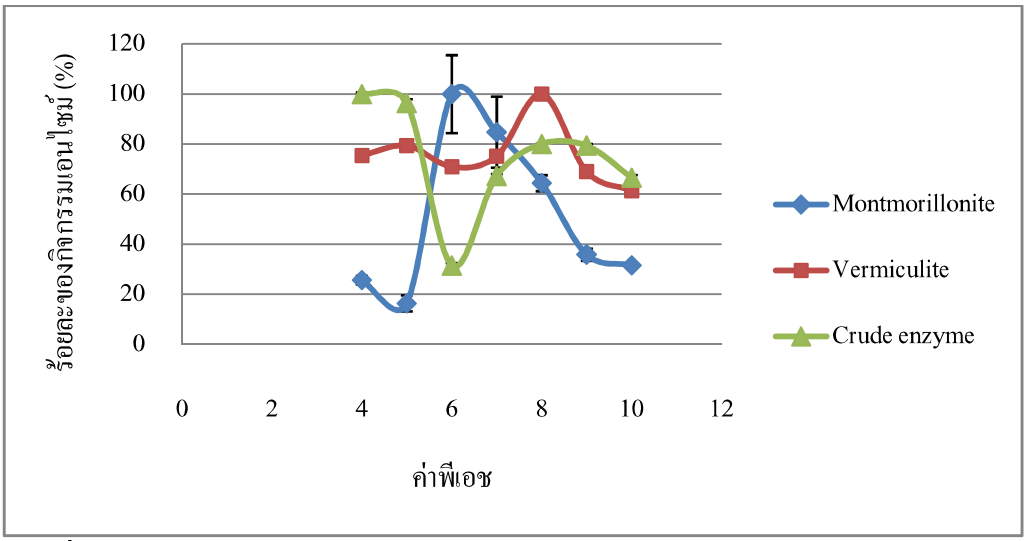
เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์ และ Crude-enzyme มาผสมกับซับสเตรต (ชุดควบคุมเติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง, 4, 15, 25, 45, 55, 70, และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า อุณหภูมิที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีค่ากิจกรรมดีที่สุด คือ 70 องศาเซลเซียสและรองลงมาคือที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส(อุณหภูมิห้อง) สำหรับเอนไซม์ที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์มีกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดที่ 45 และ 4 องศาเซลเซียส และ Crude enzyme คือ 25 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 Optimum temperature ของเอนไซม์ไลเปส

6. การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์ และ Crude-enzyme มาศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช โดยนำเอนไซม์ตรึง และ Crude enzyme มาผสมกับบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน ได้แก่ พีเอช 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ พีเอช 10 จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 6-8 โดยมีกิจกรรมตั้งแต่ร้อยละ 60 ขึ้นไป เอนไซม์ที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์มีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 4-10 โดยมีกิจกรรมตั้งแต่ร้อยละ 65 ขึ้นไป และ Crude enzyme มีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 4-5 และ 7-10 โดยมีกิจกรรมตั้งแต่ร้อยละ 65 ขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 10

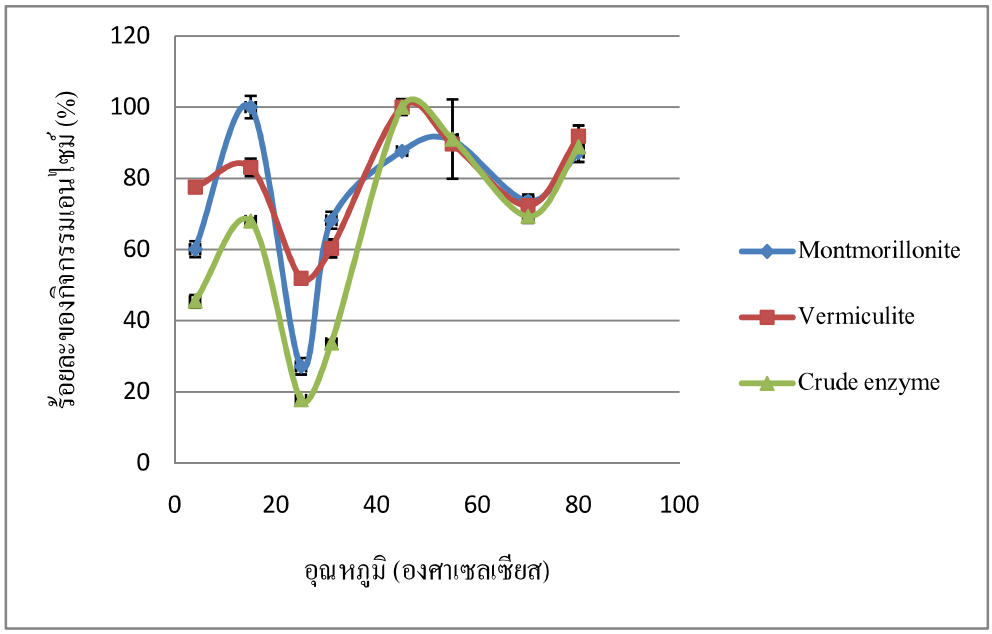


ภาพที่ 10 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อพีเอช

(หมายเหตุ : ร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์คำนวณได้จาก A x 100/B โดยที่ A คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องการคำนวนเป็นร้อยละ, B คือค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุด)

7. การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์, แร่เวอร์มิคูไลท์ และ Crude-enzyme มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง 4, 15, 25, 45, 55, 70 และ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เพื่อศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 15 และ 45-80 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ตั้งแต่ร้อยละ 70 ขึ้นไป เอนไซม์ที่ตรึงบนเวอร์มิคูไลท์ มีความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 4-15 และ 45-80 องศาเซลเซียสโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ตั้งแต่ร้อยละ 70 ขึ้นไปและ Crude enzyme มีความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 45-80 องศาเซลเซียสโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ตั้งแต่ร้อยละ 70 ขึ้นไป ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ

(หมายเหตุ : ร้อยละของกิจกรรมเอนไซม์คำนวณได้จาก A x 100/B โดยที่ A คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องการคำนวนเป็นร้อยละ, B คือค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงที่สุด)

8. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในปฏิกิริยา esterification และการศึกษาการผลิตไบโอดีเซลโดยเอนไซม์ไลเปส

เมื่อนำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์และแร่เวอร์มิ-คูไลท์ มาทดสอบการเร่งปฏิกิริยา esterification และ transesterification พบว่ายังไม่พบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ทั้ง 3 รูปแบบสำหรับการเร่งปฏิกิริยา esterification และ transesterification ให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการไม่ว่าจะตรวจผลโดยการไทเทรตหรือ TLC ก็ตาม

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

เมื่อศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์บนแร่มอนท์มอริลโลไนท์พบว่า การตรึงเอนไซม์บนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุงที่เหมาะสมคือ 5:1 โดยใช้ระยะเวลาในการตรึง 90 นาที โดยเอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 9 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 70 องศาเซลเซียส มีความเสถียรของเอนไซม์ตรึงอยู่ในช่วงพีเอช 6-8 และ มีความเสถียรของเอนไซม์ตรึงต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 15 และ 45-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุงที่เหมาะสมคือ 3:1 โดยใช้ระยะเวลาในการตรึง 30 นาที โดยเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 45 องศาเซลเซียส มีความเสถียรของเอนไซม์ตรึงอยู่ในช่วงพีเอช 4-10 และ มีความเสถียรของเอนไซม์ตรึงต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 4-15 และ 45-80 องศาเซลเซียส ส่วน Crude enzyme นั้นได้ทำการทดลอง 4 การทดลอง พบว่า Crude enzyme มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6-7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 25 องศาเซลเซียส มีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 4-5 และ 7-10 และ มีความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 45-80 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงพบว่า เอนไซม์อิสระมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่พีเอชเป็นกลางเช่นเดียวกันกับเอนไซม์ที่ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ ส่วนเอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่พีเอชเป็นด่าง เอนไซม์ตรึงบนแร่ทั้ง 2 ชนิด มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นกรด, กลาง และด่าง ในขณะที่เอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีความเสถียรในช่วงที่แคบกว่า คือ ที่ช่วงพีเอชเป็นกลางและด่างเท่านั้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่ตรึงบนแร่ทั้ง 2 ชนิดยังมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิทั้งอุณหภูมิต่ำ และอุณหภูมิสูง แต่เอนไซม์อิสระมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่แคบกว่า คือ เสถียรในช่วงอุณหภูมิสูงเท่านั้น

อภิปรายผลการทดลอง

วิธีการตรึงเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย นิยมใช้งานทั่วไป ที่สำคัญคือไม่ต้องมีการปรับ

หรือกระตุ้นสารพยุงก่อนตรึงจึงไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีเข้าช่วย ทำให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์ หรือมีผลต่อการทำลายบริเวณเร่งน้อยมากหรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย นอกจากนี้วิธีนี้ยังเหมือนกับวิธีที่พบได้ทั่วไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556)

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุง พบว่า ในเอนไซม์ที่ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุงที่เหมาะสมคือ 5:1 ส่วนเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่อสารพยุงที่เหมาะสมคือ 3:1 ทำให้ทราบว่าขีดจำกัดของการตรึงเอนไซม์บนสารพยุงทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน เนื่องจากการตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพนั้นเป็นการเกาะติดเอนไซม์ไว้บนพื้นผิวของสารพยุง แต่เนื่องจากแร่ทั้งสองชนิดมีขนาดโมเลกุล พื้นที่ผิว สมบัติทางเคมี และรูปร่างที่แตกต่างกันส่งผลให้การยึดเกาะของเอนไซม์แตกต่างกันไปด้วย ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล (2556) กล่าวว่า หลักการพื้นฐานในการเลือกสารพยุงโดยพิจารณาสมบัติทางด้านกายภาพ คือ ความแข็งแรง พื้นผิว รูปร่าง พื้นที่สำหรับเพิ่มขนาดของมวล ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าสารพยุงที่มีพื้นที่ผิวมากกว่าจะมีโอกาสในการจับกับเอนไซม์ได้มากกว่าสารพยุงที่มีพื้นที่ผิวที่น้อยกว่า อย่างไรก็ตามในการตรึงเอนไซม์จะยังคงมีเอนไซม์อิสระหลงเหลืออยู่ เนื่องจากไม่มีพื้นที่ในการจับหรือสร้างพันธะกับสารพยุง และพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์แล้วกิจกรรมของเอนไซม์กลับลดลง อาจเป็นผลมาจากการที่ไม่ได้ทำการชะล้างเอนไซม์ตรึงทำให้เอนไซม์อิสระที่ปนเปื้อนในแต่ละชุดการทดลองไม่เท่ากันส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไม่คงที่ หรือไม่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากยิ่งปนเปื้อนเอนไซม์อิสระมาก ยิ่งมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้มากขึ้นด้วย

จากการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการตรึงเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ใช้ระยะเวลาในการตรึง 90 นาที เอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ใช้ระยะเวลาในการตรึง 30 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนสารพยุงทั้ง 2 ชนิด จากผลการทดสอบเมื่อเพิ่มระยะเวลาการตรึงให้นานขึ้นในสารพยุงทั้ง 2 ชนิด พบว่า ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันคือ กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง สาเหตุที่ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมที่ลดลงเมื่อใช้เวลาในการตรึงนานขึ้น อาจเกิดจากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นโมเลกุลของเอนไซม์เกิดการเรียงตัวใหม่ทำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์ถูกบดบังส่งผลให้ซับสเตรตไม่สามารถเข้าจับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ (Costa *at al*. 2001) อีกเหตุผลหนึ่งที่เป็นไปได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการตรึงให้นานขึ้น คือ เกิดจากสภาวะที่บริเวณภาวะแวดล้อมจุลภาคของเอนไซม์มีความแตกต่างจากบริเวณ Bulk solution ของสารละลายมาก ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ

Zhang and Zeng (2006) ที่รายงานว่า เมื่อใช้เวลาในการตรึงเอนไซม์ β–galactosidase บนไคโตซานนานกว่า 10 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง

จากการศึกษา Optimum pH และ Optimum temperature ของเอนไซม์ พบว่า Crude enzyme มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 9 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 6-7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 45 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่า ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานในเอนไซม์ตรึงรูปและ Crude enzyme มีความแตกต่างกัน คือ เมื่อเอนไซม์อยู่ในรูปตรึงทั้งพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานมีแนวโน้มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมหลังจากกระบวนการตรึง โดยหลังจากการตรึงจะเกิดภาวะแวดล้อมรอบๆ เอนไซม์ และสารพยุงเรียกว่า ภาวะแวดล้อมจุลภาค (Microenvironment) และสภาวะแวดล้อมในสารละลายของปฏิกิริยานั้นๆ เรียกว่า ภาวะแวดล้อมมหาภาค (Macroenvironment) ซึ่งส่งผลให้ระดับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากระดับพีเอชและอุณหภูมิที่จะแทรกเข้าถึงสภาวะแวดล้อมแบบจุลภาคลดลงจนต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ใช้สารพยุงต่างชนิดกันในการตรึงจะมีผลทำให้ภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปแตกต่างกันด้วย (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) โดยจะเห็นได้ว่า เอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานสูงกว่าเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการจับกันของเอนไซม์กับสารพยุงของสารพยุงทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน ตามสภาพธรรมชาตินั้นแร่มอนท์มอริลโลไนท์ และ แร่เวอร์มิคูไลท์จะมีการแลกเปลี่ยนประจุเพื่อรักษาสมดุลโดยอิออนของโลหะ เช่น อิออนของเหล็ก, อิออนของแคลเซียม, อิออนของแม็กนีเซียม และอิออนของโซเดียม เป็นต้น เมื่อนำแร่ทั้ง 2 ชนิด มาตรึงเอนไซม์อาจเป็นไปได้ที่อิออนของโลหะจะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีผลต่อการเพิ่มขึ้น และลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ Ksandopulo & Ruban (1974) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดาและทรัพย์ทวี ฝุ่นละทอง (2549) พบว่าไลเปสจาก *Bacillus thermoleovorans* ถูกยับยั้งด้วยอิออนของเหล็ก Malcata, Garcia, Hill, and Amumdson (1992) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดาและทรัพย์ทวี ฝุ่นละทอง (2549) รายงานว่าอิออนของโซเดียมทำให้กิจกรรมไลเปสจากตับอ่อน และจาก *Aspergillus wentii* เพิ่มขึ้นแต่กลับมีผลยับยั้งกิจกรรมของไลเปสของไอโซเมอร์ 2 ชนิด ของ *Aspergillus niger* นอกจากนี้อิออนของโลหะที่มีความเข้มข้นต่ำมีผลไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในระยะเวลาอันสั้น จากนั้นเอนไซม์จะกลับมามีกิจกรรมได้อีกครั้ง เรียกว่า การ

ยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible inhibition) ซึ่งที่กล่าวมาอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การทดลองแต่ละครั้งมีค่ากิจกรรมที่ไม่แน่นอน และแตกต่างกัน

จากการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อ pH และ ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ พบว่า Crude enzyme มีความเสถียรของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 7-10 เช่นเดียวกับเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์ ส่วนเอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์มีความเสถียรของเอนไซม์ตรึงอยู่ในช่วงพีเอช 6-9 ทั้ง Crude enzyme, เอนไซม์ตรึงบนแร่มอนท์มอริลโลไนท์ และเอนไซม์ตรึงบนแร่เวอร์มิคูไลท์มีความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิในช่วง 45-80 องศาเซลเซียสเท่ากัน ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นพบว่าเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชและอุณหภูมิ โดยทั้ง Crude enzyme และเอนไซม์ตรึงที่ผ่านกระบวนการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพนั้นไม่มีสารหรือสิ่งใดมาห่อหุ้มจึงทำให้เอนไซม์ยิ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดยทั่วไปพบว่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ส่งผลให้การทำงานและความไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์เปลี่ยนไป นอกจากนี้ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงยังมีผลต่อการจับกันของเอนไซม์และซับสเตรต (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) ในงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าทั้ง Crude enzyme และเอนไซม์ตรึงบนสารพยุงทั้ง 2 ชนิดมีความเสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง-ด่าง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่พีเอชที่มีความเป็นกรดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์หรือทำให้เอนไซม์จับกับซับสเตรตได้ไม่ดีตามที่กล่าวไว้ข้างต้น จากผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ พบว่า ทั้ง Crude enzyme และเอนไซม์ตรึงบนสารพยุงทั้ง 2 ชนิดมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิสูง ตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสขึ้นไปซึ่งในเอนไซม์ตรึงบนสารพยุงทั้ง 2 ชนิดให้ผลที่สอดคล้องกับการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ยกเว้น Crude enzyme ที่ให้ผลขัดแย้งกับการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ Crude enzyme มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 25 องศาเซลเซียสแต่มีความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิในช่วง 45-80 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากขั้นตอนการทดลองที่แตกต่างกันคือ ในขั้นตอนหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นทำโดยการนำ Crude enzyme บ่มร่วมกับซับสเตรตที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับซับสเตรตในสภาวะที่มีผลของอุณหภูมิมาเกี่ยวข้อง โดยทั่วไปเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมีแนวโน้มที่สูงขึ้นส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยามาก จนเมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นในระดับหนึ่งอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับโดยโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ไปรวมกับเอนไซม์ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556) เมื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมจึงมีค่ากิจกรรมที่ต่ำ ในทางกลับกันชุดที่บ่มด้วยอุณหภูมิที่ต่ำจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรตที่ช้ากว่าส่งผลให้โอกาสในการเกิดปฏิกิริยาผันกลับมีน้อยกว่าหรืออาจไม่

เกิดขึ้นเลยเมื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมจึงอาจมีค่ากิจกรรมที่สูงกว่าชุดที่บ่มด้วยอุณหภูมิสูง ส่วนการหาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิทำโดยการนำ Crude enzyme บ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ แต่ไม่มีการใส่ซับสเตรตจึงไม่มีปฏิกิริยาใดๆในขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ นี้ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยการนำ Crude enzyme ที่ผ่านการบ่มร่วมกับบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิต่างๆมาบ่มร่วมกับซับสเตรตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนนี้จึงไม่มีผลความต่างของอุณหภูมิที่จะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าหรือเร็วด้วยระยะเวลาการบ่มที่เท่ากันคือ 15 นาที จึงไม่เกิดปฏิกิริยาการผันกลับของผลิตภัณฑ์หรือเกิดได้น้อยกว่าขั้นตอนการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ผลของความเสถียรต่ออุณหภูมิของ Crude enzyme ไม่สอดคล้องกับผลของความเหมาะสมต่ออุณหภูมิ

จากผลของระยะเวลาที่ใช้ตรึงเอนไซม์พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้น ลดลง ไม่คงที่ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยทั่วไปที่พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาการตรึงจนถึงระยะเวลาที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดหลังจากนั้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาอีกกิจกรรมจะมีแนวโน้มลดลง และจากผลความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิพบว่า เอนไซม์มีกิจกรรมที่ไม่คงที่เช่นกัน โดยที่อุณหภูมิสูงมีกิจกรรมที่ดีกว่า เมื่อวิเคราะห์จากผลทั้ง 2 การทดลองสาเหตุของความไม่คงที่ของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในงานวิจัยนี้อาจมาจากการที่เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD 003 มีหลายไอโซไซม์ทำให้มีสมบัติทางกายภาพ และทางจลศาสตร์แตกต่างกันออกไป จึงมีการทำงานได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการวัดความเข้มของสี (Colorimetric assay) โดยใช้ Chromogenic *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) เมื่อเอนไซม์ไลเปสทำงานจะย่อย *p*NPP จนได้ *p*-nitrophenol จากนั้นจะวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือความเข้มของ *p*-nitrophenol โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้ Sodium Lauryl Sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาทำหน้าที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่เหลือในขั้นตอนการวัดกิจกรรม และในชุดควบคุม Kanwar, Kaushal, Jawed, Gupta, and Chimni. (2005) พบว่า SDS ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus coagulans* ได้อย่างสมบูรณ์ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้ให้ผลกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างน้อย ทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง จึงควรมีการศึกษาเพื่อหาเอนไซม์จากแหล่งอื่นๆมาทดแทน เช่น เอนไซม์สำเร็จรูป เป็นต้น และในการศึกษาควรทำการทดลองซ้ำกันหลายๆครั้ง เพื่อเกิดความแม่นยำในการวิเคราะห์ผลและลดค่า

ความคลาดเคลื่อนที่จะเกิดขึ้นได้ สำหรับสารพยุง แร่มอนท์มอริลโลไนท์ และแร่เวอร์มิคูไลท์นั้น ควรมีการศึกษาข้อมูลทางด้านคุณสมบัติ โครงสร้างเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากอาจจะเป็นประโยชน์ในการอธิบายกลไกการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสารพยุง หรือเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ตรึงบนแร่ทั้ง 2 ชนิดได้ดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ณกัญภัทร จินดา. (2547). เอนไซม์ไลเปส 1 แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 24(3), 114-131.

ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. (2549). เอนไซม์ไลเปส: การผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 26(2), 20-34.

บริษัท นาซ่ากรุ๊ป2008 จากัด. (2557). แร่มอนท์มอริลโลไนท์คืออะไร. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 พฤษภาคม 2557. เข้าถึงได้จาก http://nazagroup2008.com

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สานักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พลช ตั้งฐานทรัพย์. (2556). เอกสารประกอบการสอนธรรมชาติของดิน. ภาควิชาวิศวกรรมโยธา. มหาวิทยาลัยมหานคร.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิตและวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์. (2553). แบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: แอกทีฟ พริ้นท์.

Chellapandian, M. & Sastry, C. A. (1992). Immobilization of microbial protease on vermiculite. *Bioprocess Engineering*, 8, 33-38.

Chellapandian, M. (1998). Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. *Process Biochemistry*, 2, 169-173.

Costa, S.A., Tzanov, T., Paar, A., Gudelj, M., Gubitz, G.M. & Cavaco-Paulo, A. (2001). Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 815-819.

Garwood, G.A., Mortland, M.M., & Pinnavaia, T.J. (1983). Immobilization of glucose oxidase on montmorillonite clay:hydrophobic and ionic modes of binding. *Journal of Molecular Catalysis*, 22, 153-163.

Huang, A.H.C., & Brockman, B. H. L. (1984). *Plant lipases*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 65, 897-899.

Jaeger, K-E., & Reetz. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.

Kanwar, S.S., Kaushal, R.K., Jawed, A., Gupta, R., & Chimni, S.S. (2005). Methods for

inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42, 233-237.

Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., & Singh, D. (2012). Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Properties. *World Applied Sciences Journal*. 16(7), 940-948.

Nawani, N., Khurana, J., and Kaur, J. (2006). A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290, 17-22.

Ranjitha, P., Karthy, E.S., & Mohankumar, A. (2009). Purification and Characterization of the Lipase from Marine *Vibrio fischeri*. *International Journal of Biology*. 1(2), 48-56.

Scherer, R., Vladimir, J., Pergher, S., & Oliveira, D. (2011). Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase. *Materials Research*, 14(4), 483-492.

Sharma, C. K., & Kanwar, S. S. (2012). Purification of a novel thermophilic lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. *ISCA Journal of Biological Sciences*. 1(3), 43-48.

Sirisha, E., Rajasekar, N., and Narasu, M.L. (2010). Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research*, 4, 249-252.

Steiner, J.M., & Williams, D.A. (2002). Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochemistry*, 84, 1243-1251.

The mineral and locality database. (n.d.). Vermiculite. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 พฤษภาคม 2557. เข้าถึงได้จาก http://www.mindat.org/Vermiculite.

U.S. Geological Survey. (n.d.). Montmorillonite and Vermiculite. วันที่สืบค้นข้อมูล 25 พฤษภาคม 2557. เข้าถึงได้จาก http://www.usgs.gov/Montmorillonite or Vermiculite.

Winkler, U.K., and M. Stuckmann. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663- 670.

Zhang, J. & Zeng, J. (2006) Immobilization of β–galactosidase on tamarind gum and chitosan composite microspheres. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21, 415- 432.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0 กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	3.0 กรัม
Glucose (dextrose)	2.5 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่น แล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ละ 20 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Tryptone Soy Agar (TSA)

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	15.0 กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	5.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้น ด้วยน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสทิ้งไว้สักพัก แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

3. Production medium

Glucose	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0 กรัม
Sodium Chloride	1.25 กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	100 มิลลิโมลาร์

น้ำกลั่น	990 มิลลิลิตร
น้ำมันปาล์ม	1 เปอร์เซ็นต์
pH 6.0	

วิธีการเตรียม

ชั่งส่วนประกอบข้างต้น (ยกเว้นน้ำมันปาล์ม) ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 990 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 6.0 แบ่งส่วนผสมใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 19.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำมันปาล์มดิบลงไปในขวดชมพู่ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียม 100 mM Potassium phosphate buffer (ดัดแปลงจาก สุดาพร ปุกแก้ว, 2550)

เตรียมสารละลาย K_2HPO_4+ KH_2PO_4 โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

1.1 เตรียมสารละลาย K_2HPO_4

เตรียม stock 500 mM K_2HPO_4 (100 ml)

K_2HPO_4	8.709 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

1.2 เตรียมสารละลาย KH_2PO_4

เตรียม stock 500 mM KH_2PO_4 (100 ml)

KH_2PO_4	6.805 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

1.3 นำ 500 mM K_2HPO_4 มา 50 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH โดยค่อยๆเท stock 500 mM KH_2PO_4 ลงไปจนกว่าจะได้ pH 7.0 จะได้ stock 500 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0

1.4 จากนั้นนำไปเจือจางให้เป็น 100 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ stock 500 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0 มา 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จะได้ 100 mM Potassium phosphate buffer

2. การเตรียม 50 mM Potassium phosphate buffer (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

100 mM Potassium phosphate buffer pH 7.0	50 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียม Solution A และ B (ดัดแปลงจาก Winkler and Stuckmann, 1979)

Solution A

p-Nitrophenylpalmitate	0.0623 กรัม
2-propanol	10 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย p-Nitrophenylpalmitate ลงใน 2-propanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอด vial ปราศจากเชื้อ เก็บแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Solution B

Phosphate buffer pH 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์	99.6 มิลลิลิตร
Triton X- 100	0.4 มิลลิลิตร
Gum Arabic	0.1 กรัม

วิธีการเตรียม

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาผสมให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม Bradford reagent (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Brilliant Blue G-250	10 มิลลิกรัม
Phosphoric acid	10 มิลลิลิตร
Ethanol (95%)	5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

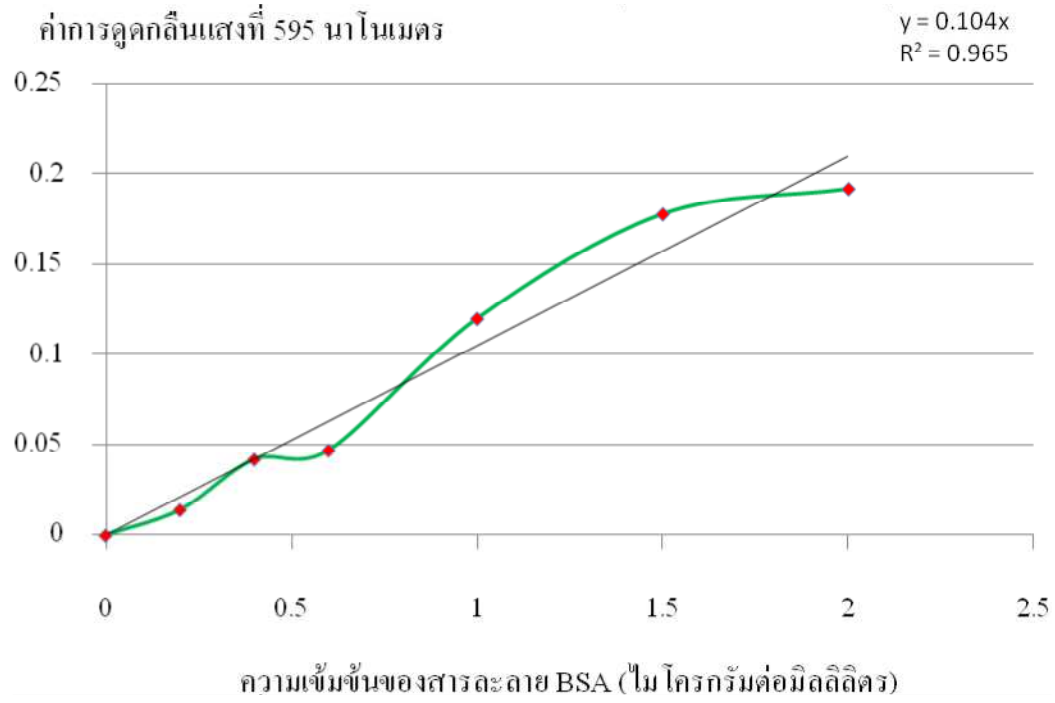
ละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 ใน Ethanol (95%) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม Phosphoric acid 10 มิลลิลิตร ลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวด Duran ปราศจากเชื้อ เก็บแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมแร่ดินเหนียว Montmorillonite

นำแร่ดินเหนียว Montmorillonite มาบดละเอียดในโกร่ง บรรจุใส่ถุง นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 3 รอบ เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine Serum Albumin



ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin ที่ความเข้มข้น 0-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร