

บทที่ 5

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การเลือกทำปฏิกิริยาของเรซิมิกเมนทอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ จะแบ่งการศึกษาเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกจะศึกษาถึงความสามารถในการละลายของ เอนไซม์ไลเปสในระบบโซเดียม บิส-2-เอทิลเฮกซิลฟอสเฟต (sodium bis-2-ethylhexyl phosphate, SDEHP) รีเวิร์สไมเซลล์ โดยการเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์ในช่วงแรกนี้จะ ใช้วิธีการถ่ายเทมวลข้ามเฟส (phase transfer) และศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการละลายของ ไลเปส ได้แก่ ความเข้มข้นของ SDEHP และอิออนิกสเตรงท์ (ionic strength) ในสารละลาย บัฟเฟอร์ ส่วนในการทดลองช่วงที่ 2 จะศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชัน (transesterification reaction) ระหว่างเรซิมิกเมนทอลกับไตรอะซิทีน ในระบบ SDEHP รีเวิร์สไมเซลล์ โดยการเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์ในช่วงที่ 2 นี้จะใช้ วิธีการฉีด (injection) และใช้การออกแบบการทดลอง (experimental design) มาช่วยในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งตัวแปรที่นำมาศึกษา คือ สัดส่วน เชนโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (surfactant) (W_0), ความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลและ ไตรอะซิทีน, ความเป็นกรด-ด่าง (pH)ของบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ

การเตรียมสารละลายไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ด้วยวิธีการถ่ายเทมวลข้ามเฟส เตรียม โดยนำเฟสของไลเปสในการละลายบัฟเฟอร์ และโซเดียมคลอไรด์มาสัมผัสกับเฟสของ รีเวิร์สไมเซลล์ซึ่งประกอบด้วย SDEHP ในไอโซ-ออกเทน (iso-octane) ที่ปริมาตรเท่ากัน แล้ว ปลดปล่อยให้สมดุลง ก็จะทำให้แยกเฟสเป็นสารละลายไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ในเฟสบน ส่วนการ เตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์ด้วยวิธีการฉีด เตรียมโดยการฉีดสารละลายไลเปสใน บัฟเฟอร์กับโซเดียมคลอไรด์ลงใน SDEHP ในไอโซ-ออกเทน ซึ่งวิธีการเตรียมสารละลาย

รีเวิร์สไมเซลล์ที่ต่างกันก็จะเหมาะกับการนำไปใช้งานที่ต่างกัน คือถ้าเป็นวิธีการถ่ายเทมวลข้ามเฟสจะเหมาะกับการสกัดแยกเอนไซม์ออกจากสารละลาย หรือทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ส่วนถ้าเป็นการทำปฏิกิริยาของสารใดๆโดยมีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก็จะเลือกใช้วิธีการฉีด ทั้งนี้เพราะวิธีการฉีดสามารถควบคุมปริมาณน้ำ และปริมาณไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้เราจะเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการละลายของไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ด้วยวิธีการถ่ายเทมวลข้ามเฟส และนำสภาวะที่เหมาะสมนี้มาใช้ละลายไลเปสด้วยวิธีการฉีดเพื่อทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเรซิพิกเมนทอลกับไตรอะซิดีนในรีเวิร์สไมเซลล์ ทั้งนี้เพราะคุณสมบัติทางด้านกายภาพของการเตรียมสารละลายรีเวิร์สไมเซลล์ด้วยวิธีการถ่ายเทมวลข้ามเฟสและการฉีดนั้นจะไม่แตกต่างกัน [Shioi et al, 1991]

5.1 ตัวแปรที่มีผลต่อการละลายของไลเปส

ตัวแปรที่มีผลต่อการละลายของไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ คือตัวแปรที่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการทำละลายของระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ตัวแปรที่สำคัญเหล่านี้ คือ ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์, ค่าอ็อกซิเจนตรรก์ และความเข้มข้นของ SDEHP ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ส่วนตัวแปรที่นำมาศึกษาจะมีเพียงแค่ว่าอ็อกซิเจนตรรก์ กับความเข้มข้นของ SDEHP ส่วนความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์จะไม่ได้ศึกษาในส่วนของการละลายของไลเปส แต่จะศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างในส่วนของการเกิดปฏิกิริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ซึ่งจะกล่าวต่อไปในหัวข้อ 5.2 ทั้งนี้เพราะความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์จะให้ผลกระทบโดยตรงต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าการละลายของไลเปส

5.1.1 ผลของค่าอ็อกซิเจนตรรก์

ตัวแปรหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการละลายของสารละลายไลเปส (ไลเปส + สารละลายบัฟเฟอร์) ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ คือ ค่าอ็อกซิเจนตรรก์ซึ่งคือ ความเข้มข้นของอ็อกซิเจนในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยมีผู้ทดลองพบว่ายิ่งความเข้มข้นของอ็อกซิเจนมากยิ่งทำให้ความสามารถในการทำละลายบัฟเฟอร์ของระบบรีเวิร์สไมเซลล์ลดลง ทั้งนี้เพราะสารละลาย

บัฟเฟอร์ที่มีค่าไอออนิกสเตรงท์สูงจะมีผลทำให้แรงทางไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของน้ำ และ/หรือเอนไซม์กับประจุที่ส่วนมีขั้วของสารลดแรงตึงผิวเปลี่ยนแปลงไป [Dekker และคณะ, 1989., Matzke และคณะ, 1992., Hu และ Gulari, 1996., Andrews, 1994] ในกรณี ที่สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าไอออนิกสเตรงท์สูงทำให้ปริมาณน้ำในไมเซลล์ลดลง โมเลกุลของ เอนไซม์ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์จึงถูกละลายในรีเวิร์สไมเซลล์ได้น้อยลง และ การที่ไอออนิกสเตรงท์มีค่าสูงขึ้นแล้วทำให้รีเวิร์สไมเซลล์มีความสามารถในการทำละลายน้ำ ได้น้อยลง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "salting-out effect"

ทั้งนี้ค่าไอออนิกสเตรงท์ (I) สามารถคำนวณจากสมการดังนี้ คือ

$$I = 0.5 \sum c_i Z_i^2$$

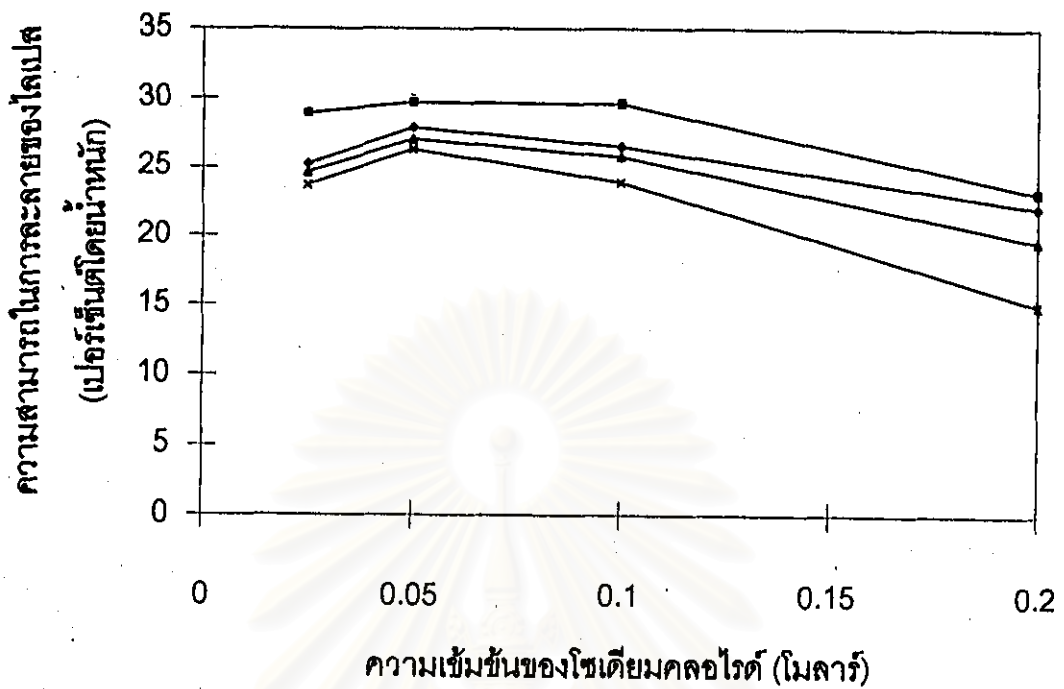
เมื่อ Z_i คือจำนวนประจุของไอออน และ c_i เป็นจำนวนโมลาร์ของสาร ซึ่งในการทดลองจะใช้ โซเดียมคลอไรด์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (KH₂PO₄ กับ NaOH) เป็นตัวกำหนดค่าไอออนิก สเตรงท์ เช่นเมื่อระบบมีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สามารถคำนวณค่าไอออนิกสเตรงท์ได้เป็น 0.5*(0.1*1² + 0.1*1² + 0.05*1² + 0.05*1² + 0.05*1² + 0.05*1²) เท่ากับ 0.2 ซึ่งสามารถแสดงค่าไอออนิกสเตรงท์ของระบบที่ความเข้มข้น ต่างๆ กันได้ตามตาราง 5.1

ตาราง 5.1 ค่าไอออนิกสเตรงท์ที่ความเข้มข้นของสารต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (M)	ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (M)			
	0.025	0.05	0.1	0.2
0.025	0.075	0.125	0.225	0.425
0.05	0.100	0.150	0.250	0.450
0.1	0.150	0.200	0.300	0.500
0.2	0.250	0.300	0.400	0.600

ในการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของค่าอิออนิกสเตรงท์ ต่อการละลายของไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ ก็จะศึกษาถึงผลของโซเดียมคลอไรด์และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง 0.025 ถึง 0.2 โมลาร์ ได้ผลดังแสดงในกราฟรูป 5.1 ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า ความสามารถในการละลายของไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ จะเพิ่มขึ้น 10.7, 2.8, 9.8, และ 11.0 % จากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.025 ถึง 0.05 โมลาร์ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คงที่ที่ 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ และความสามารถในการละลายของไลเปสจะลดลง 20.8, 21.9, 27.4, และ 43.0% จากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.05 ถึง 0.2 โมลาร์ ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ โดยค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลองนั้นเป็น $\pm 7.43\%$ ซึ่งจะเห็นว่าค่าความเปลี่ยนแปลงของการละลายในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.025 ถึง 0.05 โมลาร์จะมีการเปลี่ยนแปลงในแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น แต่จะสังเกตเห็นว่าการเพิ่มขึ้นของการละลายนั้นยังอยู่ในช่วงของความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง แสดงว่าค่าการละลายที่ได้ในช่วงนี้อาจถือได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนในช่วงที่โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นในช่วง 0.05 ถึง 0.2 โมลาร์จะให้การละลายที่ลดลงเนื่องจากค่าความแตกต่างที่วัดได้มีค่ามากกว่าค่าความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวจะสอดคล้องกับงานวิจัยของผู้อื่น [Hu และ Gulari, 1996., Andrews, 1994] คือค่าการละลายจะมีค่าสูงสุดและคงที่อยู่ที่ค่าหนึ่งในช่วงอิออนิกสเตรงท์ต่ำและจะลดลงเมื่ออิออนิกสเตรงท์มีค่ามากขึ้น

ส่วนความเข้มข้นของบัฟเฟอร์จะมีผลต่อการละลายของไลเปสในทำนองเดียวกันกับของโซเดียมคลอไรด์ ตามกราฟรูปที่ 5.1 คือ ความสามารถในการละลายของไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์ จะเพิ่มขึ้น 14.7, 6.5, 11.7, และ 5.0 % จากความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ 0.025 ถึง 0.05 โมลาร์ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์คงที่ที่ 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ และความสามารถในการละลายของไลเปสจะลดลง 18.0, 11.4, 19.3, และ 35.3% จากความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ 0.05 ถึง 0.2 โมลาร์ เมื่อกำหนดให้โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นคงที่ที่ 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีแนวโน้มเช่นเดียวกับกรณีของโซเดียมคลอไรด์ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของผู้อื่นเช่นกัน

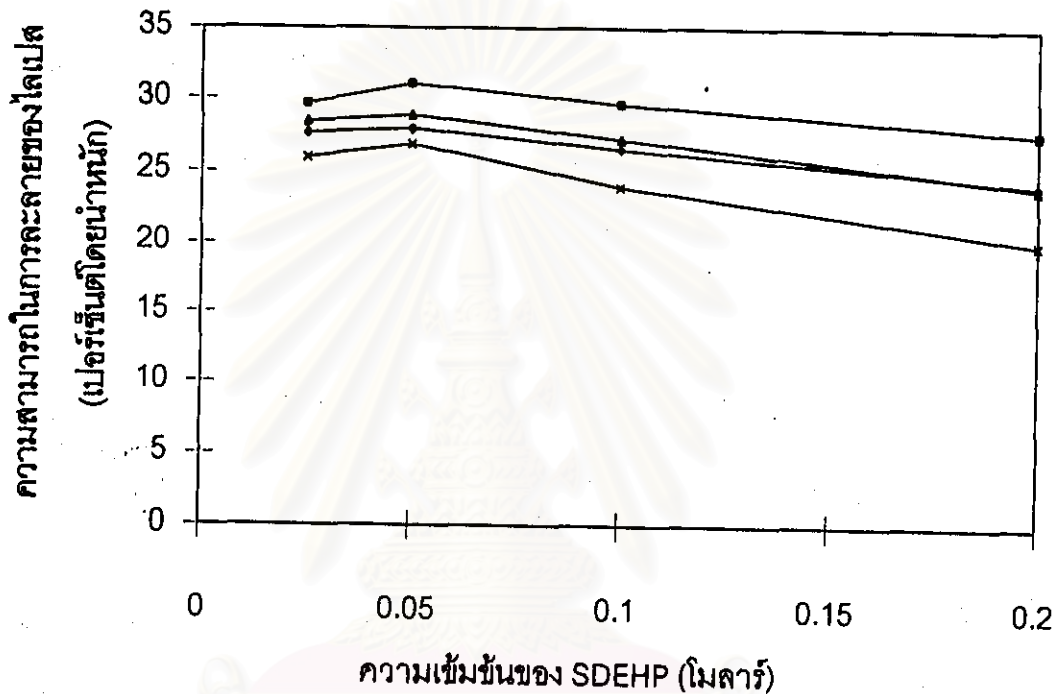


รูปที่ 5.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการละลายของสารละลายโพลีเอทิลีนในระบบปริเวอริลไมเซลล์ ที่สภาวะการทดลองของ 0.1 โมลาร์ของ SDEHP, ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7, อุณหภูมิเท่ากับ 30 °C ความเข้มข้นของโพลีเอทิลีนเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสัญลักษณ์แทนความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คือ (◆), 0.025 โมลาร์; (■), 0.05 โมลาร์; (▲), 0.1 โมลาร์; (✕), 0.2 โมลาร์; [ภาคผนวก ก3]

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของ SDEHP

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจะมีผลต่อปริมาณไมเซลล์ที่มีอยู่ในระบบคือความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่สูงขึ้นจะมีผลทำให้ปริเวอริลไมเซลล์มีจำนวนมากขึ้น แต่จะไม่มีผลต่อขนาดของไมเซลล์ [Dekker และคณะ, 1989, Shioi และคณะ, 1991] ซึ่งจากการทดลองที่ได้แสดงตามกราฟรูปที่ 5.2 จะเห็นว่า ความสามารถในการละลายของโพลีเอทิลีนในปริเวอริลไมเซลล์ จะเพิ่มขึ้น 1.1, 4.7, 3.2, และ 3.5% จากความเข้มข้นของ SDEHP ที่ 0.025 ถึง 0.05 โมลาร์ เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คงที่ที่ 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ และความสามารถในการละลายของโพลีเอทิลีนจะลดลง 13.6, 11.0, 18.4, และ 25.4% จากความเข้มข้นของ SDEHP ที่ 0.05 ถึง 0.2 โมลาร์ เมื่อกำหนดให้บัฟเฟอร์มี

ความเข้มข้นคงที่ที่ 0.025, 0.05, 0.1, และ 0.2 โมลาร์ ตามลำดับ จะเห็นว่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (SDEHP) ที่เปลี่ยนแปลงไปจะไม่ค่อยมีผลต่อความสามารถในการละลายของไลเปสมากนัก ซึ่งเป็นผลการทดลองที่ขัดแย้งกับทฤษฎีข้างต้น โดยในขณะนี้ยังไม่สามารถหาเหตุผลที่เหมาะสมมาอธิบายได้เนื่องจากระบบ SDEHP/ไอโซออกเทนมีผู้ทำวิจัยน้อยมาก ทำให้ความเข้าใจในระบบรีเวิร์สไมเซลล์นี้ยังไม่แจ่มชัดนัก



รูปที่ 5.2 ผลของความเข้มข้นของ SDEHP และสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการละลายของสารละลายไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ที่สภาวะการทดลองของ 0.1 โมลาร์ของ โซเดียมคลอไรด์, ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7, อุณหภูมิเท่ากับ 30 °C ความเข้มข้นของไลเปสเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสัญลักษณ์แทนความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คือ (◆), 0.025 โมลาร์; (■), 0.05 โมลาร์; (▲), 0.1 โมลาร์; (×), 0.2 โมลาร์; [ภาคผนวก ก4]

จากการศึกษาถึงความสามารถในการละลายของไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของ SDEHP/ไอโซออกเทน พบว่าตัวแปรที่เหมาะสมต่อการละลายของไลเปสในระบบคือ 0.1 โมลาร์ของ SDEHP, 0.1 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์, และ 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ โดยค่าของตัวแปรที่เหมาะสมต่อการละลายของไลเปสเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในส่วนของการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ที่มีไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

5.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดย เอนไซม์ไลเปส

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเรซิมิกเมนทอล กับไตรอะซิทีนในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ จะอาศัยข้อมูลที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถในการละลายของไลเปสมาใช้ คือที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ SDEHP 0.1, 0.05, และ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ โดยการเตรียมไลเปสในรีเวิร์สไมเซลล์จะใช้วิธีการฉีด โดยตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันและที่ศึกษาในงานวิจัยนี้คือ สัดส่วนเชิงโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (W_0), ความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลและไตรอะซิทีน, ความเป็นกรด-ด่างของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ โดยการทดลองจะนำเอาทฤษฎีการออกแบบการทดลอง (experimental design) มาใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งห้าต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันโดยเอนไซม์ไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ โดยใช้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific rate, Y) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณา ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข1 ซึ่งผลการทดลองจากการใช้ทฤษฎีการออกแบบการทดลองจะแสดงในรูปของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น (initial rate) และอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของการออกแบบการทดลองแบบสองระดับ (two-factorial design) ดังแสดงในตารางที่ ข4 และการออกแบบการทดลองแบบองค์ประกอบตรงกลาง (central composition design, CCD) ดังแสดงในตารางที่ ข8

การวางแผนการออกแบบการทดลอง (experimental design) ที่ถูกนำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาในงานวิจัยนี้เพราะประโยชน์หลายประการดังต่อไปนี้ คือ

- ประหยัดเวลาในการทดลอง เพราะสามารถที่จะลดชุดทดลองที่ต้องทำเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมลงไปได้ถึงสามในสี่ของชุดทดลองทั้งหมด

- เมื่อจำนวนชุดทดลองลดลง ก็ทำให้การใช้สารเคมีต่างๆ ลดลงด้วย ซึ่งมีผลต่อการลดต้นทุนการวิจัย

- ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าตัวแปรใดมีอิทธิพลมากที่สุด และมีอิทธิพลร่วมกับตัวแปรอื่นในการเกิดปฏิกิริยาหรือไม่

งานวิจัยนี้ได้มุ่งศึกษาถึงการเกิดปฏิกิริยาการแยกเรซิมีกเมนทอลโดยมีเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบปริเวอริสไมเซลล์ของ SDEHP/น้ำ/ไอโซออกเทน เอนไซม์ไลเปสจะละลายได้ดีในน้ำโดยจะละลายอยู่ในหยดน้ำขนาดเล็กซึ่งถูกล้อมรอบด้วยชั้นของ SDEHP ส่วนไอโซออกเทนซึ่งเป็นเฟสต่อเนื่องจะทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บและป้อนสารตั้งต้นให้เอนไซม์ตลอดระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกสกัดออกจากหยดน้ำตลอดระยะเวลาการผลิตเนื่องจากมีความสามารถในการละลายในไอโซออกเทนได้ดีกว่า จะเห็นได้ว่าในระบบที่ทำการศึกษานี้เป็นการทำปฏิกิริยาควบคู่ไปกับการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากสิ่งแวดล้อมของเอนไซม์ในขั้นตอนเดียว ทำให้ปัญหาที่อาจเกิดจากการที่ผลิตภัณฑ์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ถูกตัดออกไป อัตราการถ่ายเทมวลของสารตั้งต้นจากเฟสต่อเนื่องไปยังเฟสของหยดน้ำ และของผลิตภัณฑ์จากเฟสของหยดน้ำไปยังเฟสต่อเนื่องมีค่าสูงมากเนื่องจากมีพื้นที่การถ่ายเทมวลสารต่อปริมาตรที่สูง (ประมาณ 10,000 เท่าของระบบสองเฟสของตัวทำละลายน้ำ-ตัวทำละลายอินทรีย์ [Binks, 1993]) จึงอาจถือได้ว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นขั้นตอนที่กำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาในระบบปริเวอริสไมเซลล์

ถึงแม้ว่าระบบปริเวอริสไมเซลล์จะมีลักษณะที่เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นสารละลายเนื้อเดียว แต่หากพิจารณาให้ละเอียดในระดับจุลภาคแล้วจะพบว่าแต่ละส่วนของปริเวอริสไมเซลล์จะมีลักษณะในทางกายภาพที่ไม่เหมือนกัน El Seoud และคณะ (1984) ได้เสนอโมเดลซึ่งแสดงถึงองค์ประกอบของปริเวอริสไมเซลล์ 3 ส่วน (ตามรูปที่ 2.4) คือ

1. ส่วนที่ไม่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว จะแทรกตัวอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นเฟสต่อเนื่อง
2. ส่วนของชั้นน้ำที่ถูกตรึง (bound water) เกิดเนื่องจากแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของน้ำ และส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว ทำให้น้ำในบริเวณนี้มีคุณสมบัติ เช่น ความหนืด ความสามารถในการเคลื่อนตัว (mobility) ที่แตกต่างออกไปจากน้ำโมเลกุลอิสระ (free water) (Kuntz และ Kauzmann, 1974)
3. ส่วนของน้ำโมเลกุลอิสระ น้ำในปริเวอริสไมเซลล์จะมีคุณสมบัติเข้าใกล้ความเป็นน้ำในธรรมชาติเมื่อค่า W_0 สูงขึ้น

จากโมเดลข้างต้นจะเห็นได้ว่ารีเวิร์สไมเซลล์ที่ไม่มีน้ำจะมีส่วนประกอบเพียงส่วนเดียวคือ ส่วนที่ไม่มีหัวของสารลดแรงตึงผิว เมื่อมีการเติมน้ำเข้าสู่ระบบโมเลกุลของน้ำจะไฮเดรท (hydrate) ส่วนที่มีหัวของสารลดแรงตึงผิว รีเวิร์สไมเซลล์ในกรณีนี้จึงประกอบด้วยสองส่วน คือ ส่วนที่มีหัวของสารลดแรงตึงผิว และส่วนของชั้นน้ำที่ถูกตรึงหากปริมาณน้ำที่มีอยู่เท่ากับหรือน้อยกว่าปริมาณที่ต้องการเพื่อการไฮเดรท แต่เมื่อปริมาณน้ำในระบบมีมากขึ้น น้ำส่วนที่เหลือจากการไฮเดรทส่วนที่มีหัวของสารลดแรงตึงผิวจะเป็นส่วนประกอบที่สามของรีเวิร์สไมเซลล์ ซึ่งคือส่วนของน้ำโมเลกุลอิสระ

การศึกษาถึงตัวแปรที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาการแยกเรซิคมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบ SDEHP/ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์ โดยการพิจารณาจากการวางแผนการออกแบบการทดลองจะพบว่าตัวแปรที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ สัดส่วนเชิงโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (W_0) กับความเข้มข้นของเรซิคมิกเมนทอล (12), W_0 กับความเข้มข้นของไตรอะซิติน (13), W_0 กับอุณหภูมิ (15) และความเข้มข้นของไตรอะซิติน กับความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ (34)

5.2.1 ผลของ W_0 และความเข้มข้นของเรซิคมิกเมนทอล

ปฏิกิริยาการแยกเรซิคมิกเมนทอลในรีเวิร์สไมเซลล์จะเกิดขึ้นได้ดีมากน้อยเพียงไรขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญสองประการคือ หนึ่ง ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เอง ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่เหมาะสมที่จะจับกับสารตั้งต้น และสอง ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา ทั้ง W_0 และความเข้มข้นของเรซิคมิกเมนทอล จึงมีผลทั้งในทางตรงและทางอ้อมต่อการเกิดปฏิกิริยาที่ทำการศึกษา

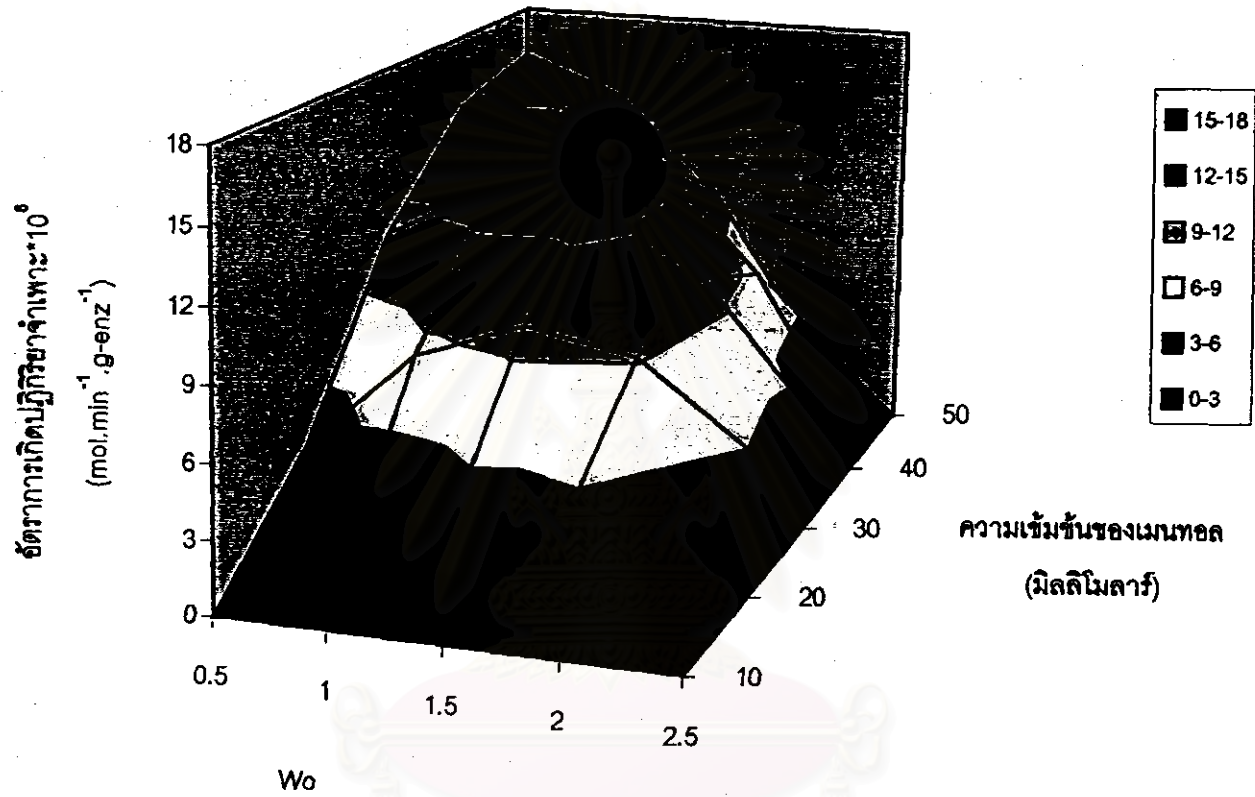
W_0 เป็นค่าอัตราส่วนเชิงโมลระหว่างน้ำและสารลดแรงตึงผิวที่มีอยู่ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ บอกให้ทราบถึงขนาดของรีเวิร์สไมเซลล์ที่เรากำลังทำการศึกษ โดยขนาดของรีเวิร์สไมเซลล์จะแปรผันตามค่า W_0 ในปี 1984 Nicholson และ Clarke ได้เสนอสมการความสัมพันธ์ระหว่างรัศมีของรีเวิร์สไมเซลล์กับค่า W_0 สำหรับระบบที่ใช้ AOT เป็นสารลดแรงตึงผิวดังนี้

$$r \text{ (in nm)} = 0.175 W_0 + 1.5$$

ค่า W_0 ที่แตกต่างกันนอกจากจะแสดงถึงขนาดของรีเวิร์สไมเซลล์ที่ต่างกัน ยังอาจใช้เป็นค่าที่บ่งชี้ได้ว่าระบบรีเวิร์สไมเซลล์ที่เราทำการศึกษามีองค์ประกอบกี่ส่วน (ส่วนที่ไม่มีหัวของสารลดแรงตึงผิว, และ/หรือส่วนของชั้นน้ำที่ถูกตรึง, และ/หรือส่วนของน้ำไมเลกุลอิสระ) ซึ่งสภาพแวดล้อมที่ต่างกันเหล่านี้ย่อมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยนักวิจัยหลายท่านค้นพบว่าเอนไซม์ที่ละลายในรีเวิร์สไมเซลล์ เช่น ไลโซไซม์ (Steinmann และคณะ, 1986), ทริปซิน (Walde และคณะ, 1988) และไมอิลินเบซิคโปรตีน (Nicot และคณะ, 1985) มีรูปร่างสามมิติที่เปลี่ยนแปลงไปจากที่พบเมื่อละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ถูกแรงกระทำที่แตกต่างไป จากกรณีที่โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปนี้ ในบางกรณีพบว่าเอนไซม์ในรีเวิร์สไมเซลล์มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่นกรณีของอัลฟา-โคโมทริปซิน ซึ่งเร่งปฏิกิริยาดีเอซิลเลชัน (deacylation) ของ N-trans-Cinnamoyl (Likhenshtein และคณะ, 1983, และ Martinek และคณะ, 1986)

ส่วนเรซิมีกเมนทอลจะมีการกระจายตัวอยู่ในองค์ประกอบส่วนต่างๆของรีเวิร์สไมเซลล์จากการทดลองพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (partition coefficient) ของเรซิมีกเมนทอลในระบบสองเฟสของไอโซออกเทนและสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 มีค่าเท่ากับ 44.51 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตามภาคผนวก ก ในตาราง ก14 โดยที่ขีดจำกัดของความสามารถในการละลายของเรซิมีกเมนทอลในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 มีค่า 0.35 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิเดียวกัน (ตามภาคผนวก ก ในตาราง ก15)

ในงานวิจัยนี้เราได้ทำการศึกษาถึงผลที่มีต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงค่า W_0 ในช่วง 0.5-2.5 และความเข้มข้นของเมนทอลในช่วง 10-50 mM โดยคงความเข้มข้นของไตรอะซิตินที่ 50 mM ซึ่งผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.3 ผลของ Wo กับความเข้มข้นของเมมทอลในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน ที่ 0.1 M NaCl; 0.05 M บัฟเฟอร์, ความเป็นกรด-ด่าง = 7; [SDEHP] = 0.1 M; [ไลเปส] = 0.1 mg/ml; ความเข้มข้นของไตรอะซิติก = 50 mM, อุณหภูมิ = 35 องศาเซลเซียส (ตาราง ก7)

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วว่าโครงสร้างของโมเลกุลของ SDEHP และ AOT มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก จะแตกต่างกันเฉพาะส่วนที่มีหัวของโมเลกุลซึ่งสำหรับ SDEHP มีขนาดเล็กกว่า AOT มาก ยังผลให้ความสามารถในการทำละลายน้ำของ SDEHP มีน้อยกว่าซึ่ง Faure และคณะ (1985, 1987) พบว่าระบบรีเวิร์สไมเซลล์ที่มี SDEHP เป็นสารลดแรงตึงผิวจะมีความเสถียรก็ต่อเมื่อ W_0 มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ส่วนระบบของ AOT ค่า W_0 อยู่ในระดับที่มากกว่า 10 (Zulauf และ Eicke, 1979, และ Lang และคณะ, 1991) ทำให้ในงานวิจัยนี้ต้องศึกษาถึงผลของ W_0 ในช่วงที่ต่ำกว่างานวิจัยของกลุ่มวิจัยอื่น (ซึ่งโดยมากใช้ AOT เป็นสารลดแรงตึงผิว)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าทั้ง W_0 และความเข้มข้นของเรซิมีกเมนทอลมีอิทธิพลร่วมกันต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน โดยค่า W_0 ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาจะเปลี่ยนแปลงจากค่าประมาณ 2 ในระบบที่มีเรซิมีกเมนทอล 10 มิลลิโมลาร์ ไปเป็นค่าประมาณ 0.5 ในระบบที่มีเรซิมีกเมนทอล 50 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เดียวกันพบว่าระดับของการยับยั้งปฏิกิริยาของเรซิมีกเมนทอล (substrate inhibition) อยู่ที่ 30 มิลลิโมลาร์ในระบบที่มีค่า W_0 เท่ากับ 2.5 แต่ในระบบที่ W_0 เท่ากับ 0.5 ไม่พบการยับยั้ง ปฏิกิริยาของเรซิมีกเมนทอลแม้ที่ความเข้มข้นจะสูงถึง 50 มิลลิโมลาร์ ที่ W_0 ต่ำรีเวิร์สไมเซลล์มีขนาดเล็ก เอนไซม์ที่ละลายอยู่ในน้ำจึงน่าจะอยู่ในบริเวณชั้นของน้ำที่ถูกตรึง และ/หรืออยู่ใกล้กับชั้นของ SDEHP มาก เนื่องจากรีเวิร์สไมเซลล์มีลักษณะโครงสร้างที่ยืดหยุ่นเคลื่อนตัวอยู่ตลอดเวลา (flexible) เอนไซม์ในระบบที่มีค่า W_0 ต่ำจึงน่าจะมีโอกาสประสพกับสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเมนทอลที่สูงกว่า (เนื่องจากในไฮโซออกเทนมีเรซิมีกเมนทอลที่มีความเข้มข้นสูงกว่าในหยดน้ำของรีเวิร์สไมเซลล์) ที่ W_0 ต่ำๆจึงน่าจะเห็นระดับการยับยั้งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นที่ต่ำกว่าในระบบที่มีค่า W_0 สูง แต่ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทางตรงข้ามกับคำอธิบายข้างต้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าขนาดของรีเวิร์สไมเซลล์น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ทำให้ความสามารถในการจับตัวกับสารตั้งต้นเปลี่ยนแปลงไป และส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยา และระดับการยับยั้งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นแตกต่างกันไปด้วย

ระดับการยับยั้งปฏิกิริยาของเรซิมีกเมนทอลที่กล่าวถึงในที่นี้ เป็นค่าความเข้มข้นที่วัดได้ในสารละลายทั้งระบบของรีเวิร์สไมเซลล์ ไม่ใช่ในหยดน้ำที่เอนไซม์ละลายอยู่ซึ่งค่า

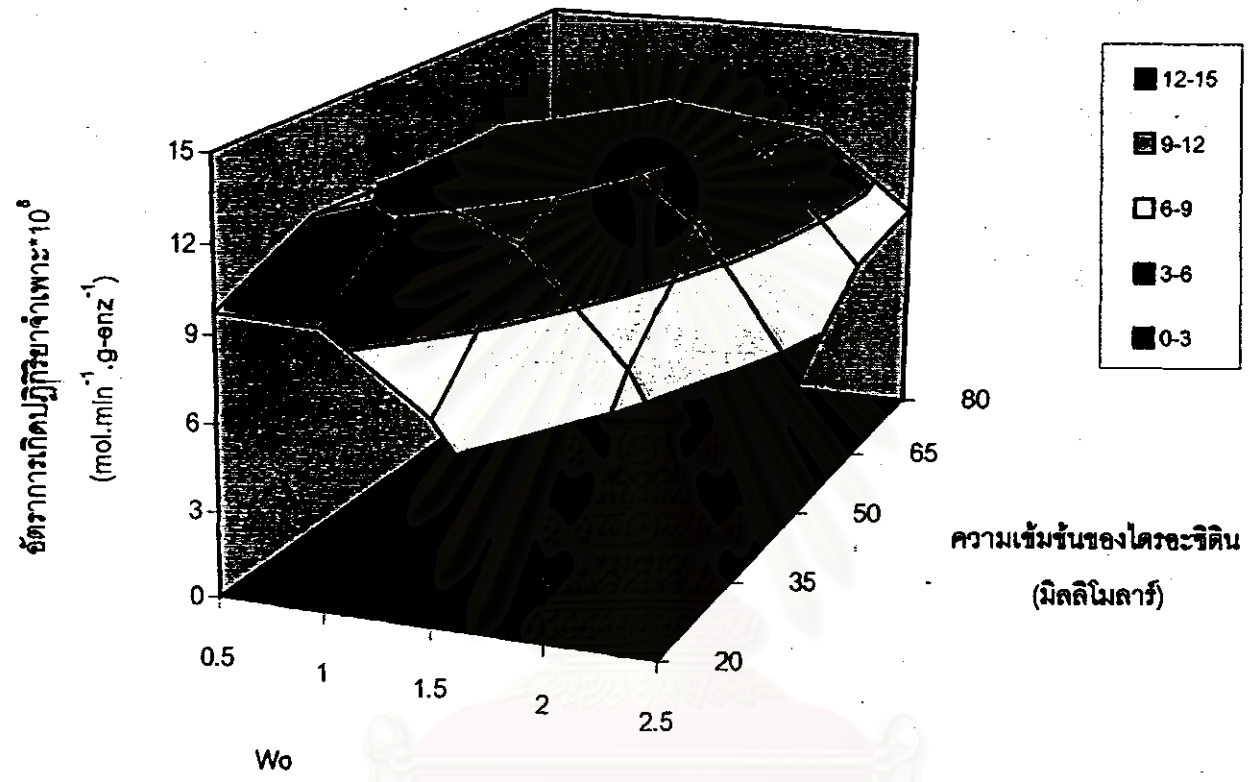
ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในหยดน้ำภายในรีเวิร์สไมเซลล์สามารถประมาณได้จากค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสารนั้นในระบบสองเฟสของไฮโดรออกเทนและสารละลายบัฟเฟอร์ ดังที่แสดงแล้วข้างต้น ที่เรซิฟิกเมนทอล 30 มิลลิโมลาร์ ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ จะมีความเข้มข้นประมาณ 0.67 มิลลิโมลาร์ในหยดน้ำ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าขีดจำกัดของความสามารถในการละลายของเรซิฟิกเมนทอลในน้ำ (เท่ากับ 0.35 มิลลิโมลาร์) นั่นก็หมายความว่าถ้าใช้เมนทอลในระบบทั้งหมด 30 มิลลิโมลาร์ เมื่อถึงสภาวะสมดุล ก็จะมีเมนทอลอยู่ในหยดน้ำได้เพียง 0.35 มิลลิโมลาร์เท่านั้น ทำให้การเพิ่มความเข้มข้นของเมนทอลที่มากกว่า 30 มิลลิโมลาร์ไม่น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการเกิดปฏิกิริยา แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่าความเข้มข้นของเมนทอลที่มากกว่า 30 มิลลิโมลาร์ ก็ยังมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการเกิดปฏิกิริยา แสดงให้เห็นว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของเมนทอลที่หาได้นั้นต่ำกว่าค่าที่เป็นจริง เนื่องจากการทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่นั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนจากการที่เราละเลยการละลายของเมนทอลในชั้นของ SDEHP ที่อยู่ระหว่างชั้นของหยดน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์

ในระบบที่มีความเข้มข้นของเรซิฟิกเมนทอลต่ำกว่า 30 มิลลิโมลาร์ ผลของ W_0 ต่อการเกิดปฏิกิริยาจะมีลักษณะเป็นรูปประฆังคว่ำ คืออัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงขึ้นเมื่อ W_0 มีค่าสูงขึ้นจนถึงค่าสูงสุดค่าหนึ่งซึ่งหากมากเกินไปแล้วอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะลดลงปรากฏการณ์ในลักษณะเช่นนี้พบได้ในเอนไซม์อื่น ๆ อีกมากกว่า 15 ชนิดที่มีผู้ทำการวิจัยมา ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในชั้นของน้ำที่ถูกตรึง และจะเร่งปฏิกิริยาได้น้อยลงเมื่ออยู่ในส่วนที่ไม่มีหัวของสารลดแรงตึงผิว และเมื่ออยู่ในส่วนของน้ำโมเลกุลอิสระ (เมื่อ W_0 ของระบบมีค่าสูงขึ้น) (Bry และคณะ, 1989) แต่อย่างไรก็ตาม Hillhorst และคณะ (1984) ก็ยังพบว่าเอนไซม์ที่คณะของเขาทำการศึกษาให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาที่น้อยลงเมื่อ W_0 มีค่าสูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระบบที่มีเรซิฟิกเมนทอลเข้มข้นมากกว่า 30 มิลลิโมลาร์ ในงานวิจัยนี้

5.2.2 ผลของ W_0 และความเข้มข้นของไตรอะซิติน

ขอบเขตในการเลือกความเข้มข้นของไตรอะซิตินมาใช้ในการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันนั้น จะพิจารณาจากความสามารถในการละลายของไตรอะซิตินในตัวทำละลายอินทรีย์ (ไอโซออกเทน) ซึ่งจากการทดลอง โดยการผสมสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ของไตรอะซิตินในไอโซออกเทนแล้วปล่อยให้อยู่ในสมดุล พบว่ายังมีการแบ่งชั้นระหว่างไตรอะซิตินกับไอโซออกเทนอยู่ แสดงว่าความเข้มข้นของไตรอะซิตินนั้นมากกว่าขีดจำกัดของการละลายได้ในไอโซออกเทน ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของไตรอะซิตินในช่วง 20 ถึง 80 มิลลิโมลาร์ เพราะไตรอะซิตินจะละลายได้ทั้งหมด นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของไตรอะซิตินในระบบสองเฟสของไอโซออกเทนและสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีค่าเป็น 1.05 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตามภาคผนวก ก ในตาราง ก14 โดยที่ขีดจำกัดของความสามารถในการละลายของไตรอะซิตินในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 มีค่า 26.6 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิเดียวกัน (ตามภาคผนวก ก ในตาราง ก15)

ผลของ W_0 กับความเข้มข้นของไตรอะซิตินที่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันสามารถแสดงได้ตามกราฟรูปที่ 5.4 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของไตรอะซิตินสูงขึ้น ค่า W_0 ที่เหมาะสมจะเพิ่มขึ้น โดยเปลี่ยนจาก W_0 เท่ากับ 0.5 ที่ 20 มิลลิโมลาร์ของไตรอะซิติน ไปเป็น W_0 เท่ากับ 1.5 ที่ 80 มิลลิโมลาร์ไตรอะซิติน ส่วนการเพิ่มขึ้นของค่า W_0 จะมีผลทำให้ความเข้มข้นของไตรอะซิตินที่เหมาะสมมีค่าเพิ่มขึ้น โดยที่ W_0 เท่ากับ 0.5 ระบบจะเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของไตรอะซิตินนั้นมากกว่า 50 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้า W_0 เพิ่มขึ้นเป็น 2.5 พบว่าไตรอะซิตินจะไม่เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาแม้ว่าจะใช้ไตรอะซิตินที่ความเข้มข้นสูงถึง 80 มิลลิโมลาร์ สรุปว่าที่ W_0 ต่ำๆจะพบระดับการยับยั้งปฏิกิริยาของไตรอะซิตินที่ต่ำกว่าในระบบที่มีค่า W_0 สูง เพราะการที่ W_0 มีค่าต่ำจะทำให้ไมเซลล์มีขนาดเล็ก เอนไซม์ที่ละลายอยู่ในน้ำจึงน่าจะอยู่ในบริเวณของชั้นน้ำที่ถูกต้อง และ/หรืออยู่ใกล้กับชั้นของ SDEHP มาก ทำให้เอนไซม์น่าจะมีโอกาสประสบกับสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของไตรอะซิตินได้มาก



รูปที่ 5.4 ผลของ W_o กับความเข้มข้นของไดอะอะซิติกในปฏิกิริยาทรานเอสเตอริฟิเคชัน ที่ 0.1 M NaCl; 0.05 M บัฟเฟอร์, ความเป็นกรด-ด่าง = 7; [SDEHP] = 0.1 M; [ไลเปส] = 0.1 mg/ml; ความเข้มข้นของเมทอล = 30 mM และอุณหภูมิ = 35 องศาเซลเซียส [ตาราง ก8]

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยลักษณะของไตรอะซิทีนที่สามารถละลายน้ำได้บ้าง ทำให้ความเข้มข้นของไตรอะซิทีนในหยดน้ำภายในรีเวิร์สไมเซลล์มีได้มาก ซึ่งสามารถประมาณจากค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของไตรอะซิทีนในระบบสองเฟสของไอโซออกเทนและสารละลายบัฟเฟอร์ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยที่ไตรอะซิทีน 50 มิลลิโมลาร์ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์จะมีความเข้มข้นประมาณ 47.6 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าขีดจำกัดของความสามารถในการละลายของไตรอะซิทีนในน้ำ (เท่ากับ 26.6 มิลลิโมลาร์) นั่นก็หมายความว่า ถ้าใช้ไตรอะซิทีนในระบบทั้งหมด 50 มิลลิโมลาร์ เมื่อถึงสภาวะสมดุล ก็จะมีไตรอะซิทีนอยู่ในหยดน้ำได้เพียง 26.6 มิลลิโมลาร์เท่านั้น ทำให้การเพิ่มความเข้มข้นของไตรอะซิทีนในระบบทั้งหมดให้มากขึ้น นั้นไม่น่าจะมีผลการเปลี่ยนแปลงของการเกิดปฏิกิริยา แต่จากผลการทดลองที่ได้พบว่าความเข้มข้นของไตรอะซิทีนที่เปลี่ยนแปลงก็จะมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการเกิดปฏิกิริยาแสดงให้เห็นว่าค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของไตรอะซิทีนที่หาได้นั้นมีค่าต่ำกว่าค่าที่เป็นจริง ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.2.1

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นเมื่อ W_0 มีค่าสูงขึ้นจนถึงค่าสูงสุดค่าหนึ่งซึ่งหากมากเกินไปแล้วอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะลดลง แสดงว่าไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อตำแหน่งของไลเปสอยู่บริเวณของชั้นน้ำที่ถูกตรึงและจะเร่งปฏิกิริยาได้น้อยลงเมื่ออยู่ในส่วนที่ไม่มีหัวของสารลดแรงตึงผิว และเมื่ออยู่ในส่วนของน้ำโมเลกุลอิสระ (เมื่อ W_0 ของระบบมีค่าสูงขึ้น) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของคณะอื่นๆโดยทั่วไปดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.2.1

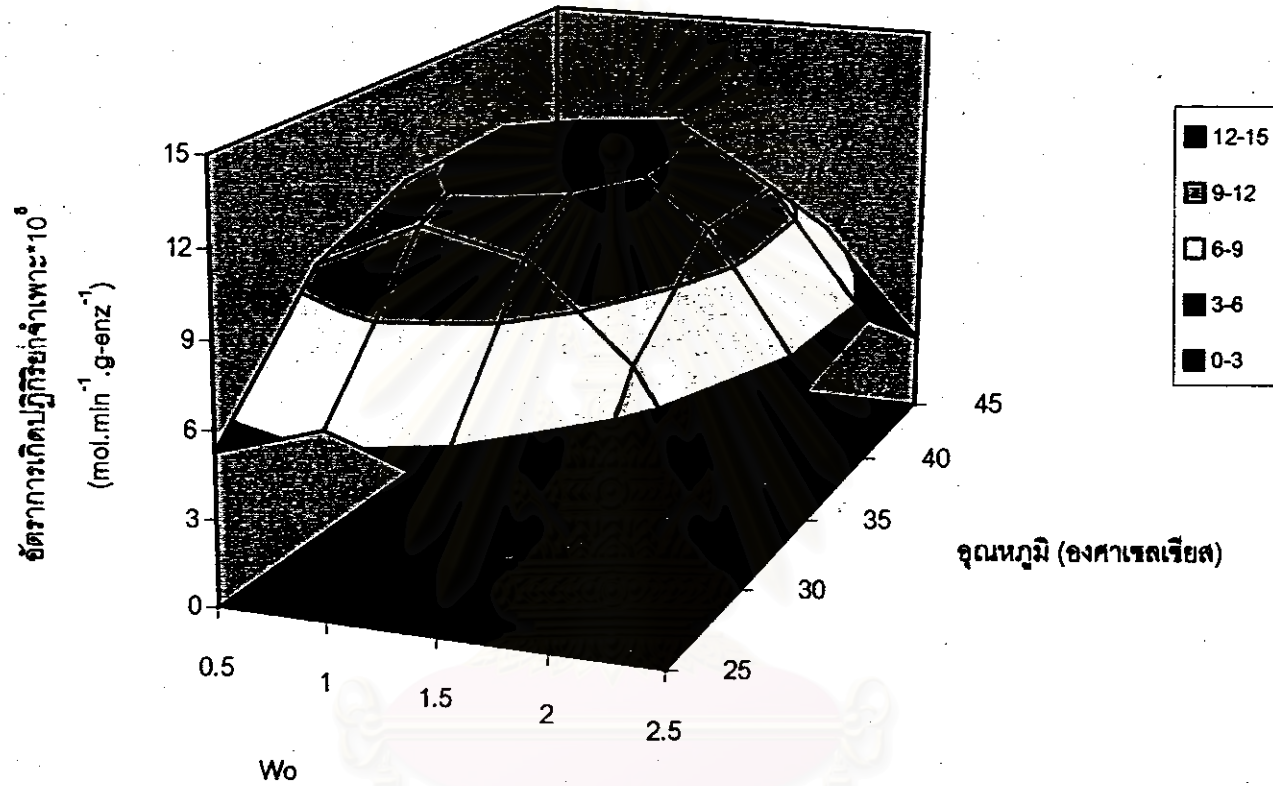
5.2.3 ผลของ W_0 และอุณหภูมิ

พิจารณาจากกราฟรูปที่ 5.5 จะเห็นว่าผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจะมีแนวโน้มที่เหมือนกันในทุกๆ ช่วง W_0 คือ W_0 ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเพื่อให้ได้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดคือ 1.0 ถึง 1.5 สำหรับทุกๆ ช่วงอุณหภูมิ และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส สำหรับทุกๆ ช่วง W_0

อุณหภูมิจะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อค่า W_0 เท่านั้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Zulauf และ Elike (1979) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อขนาดของไมเซลล์ในระบบปริเวอรัลไมเซลล์ของน้ำ / AOT / ไอโซออกเทน พบว่าที่ W_0 น้อยกว่า 10 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะไม่ทำให้ขนาดของไมเซลล์เปลี่ยนไป แต่ถ้า W_0 มากกว่า 10 ขนาดของไมเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะขนาดไมเซลล์ที่ใหญ่จะมีแรงดึงดูดภายในไมเซลล์ลดลง ดังนั้นการเพิ่มพลังงานให้กับระบบ เช่น การเพิ่มอุณหภูมิก็นำมาซึ่งการทำให้ไมเซลล์ขยายขนาดขึ้น ซึ่งจะเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การบวมของไมเซลล์ (swollen micelle) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่า การเปลี่ยนแปลงทั้งอุณหภูมิ และ W_0 จะมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยามาก โดย W_0 จะมีผลต่อขนาดของไมเซลล์ ทำให้โครงสร้างภายในไมเซลล์นั้นต่างกันเมื่อค่า W_0 ต่างกัน ซึ่งได้อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว

ส่วนอุณหภูมิจัดเป็นตัวแปรที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น โดยอุณหภูมิจะมีผลต่อค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา (reaction rate constant, $K(T)$) ตามสมการ 3.12 เรียกว่า สมการของอาร์เรเนียส (Arrhenius equation) ซึ่งค่า $K(T)$ จะมีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทำให้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นสูงขึ้น แต่สำหรับในการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงๆ กลับให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ต่ำลง ทั้งนี้เพราะไลเปสจัดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ไม่เหมาะที่จะทำงานในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง เพราะจะทำให้ไลเปสนั้นสูญเสียโครงสร้างเดิมไป ทำให้แอกติวิตีของไลเปสลดต่ำลง ค่าของอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจึงต่ำ

จากผลการทดลองที่ได้สามารถนำมาคำนวณหาค่าพลังงานกระตุ้น (activation energy, E) ของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของไตรอะซิติกกับเรซิสิกเมนทอลใน



รูปที่ 5.5 ผลของ W_o กับจุลหนุมิที่มีต่อปฏิกิริยาทรานเอสเทอริเฟอริสชัน ที่ 0.1 M NaCl; 0.05 M บัฟเฟอร์, ความเป็นกรด-ด่าง = 7; [SDEHP] = 0.1 M; [ไลเปด] = 0.1 mg/ml; ความเข้มข้นของโคโรละซิน = 50 mM และ ความเข้มข้นของเมทอล = 30 mM [ตาราง n9]

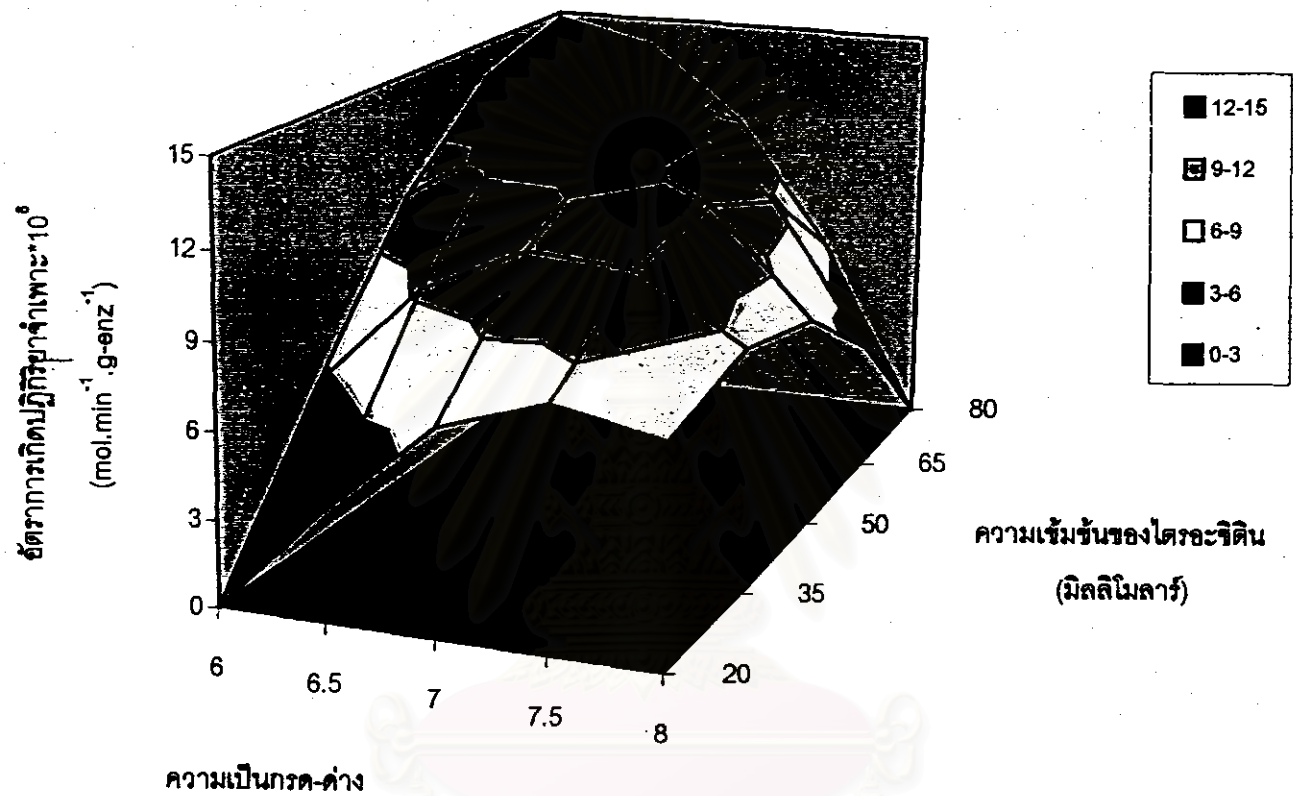
ระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ได้จากความสัมพันธ์ตามสมการของอาร์เรเนียสจะได้ค่า $E = 67.88$ กิโลจูลต่อโมล

5.2.4 ผลของความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของไตรอะซิติน

ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในการวางแผนออกแบบการทดลอง จะกำหนดให้อยู่ในช่วง 6 ถึง 8 ซึ่งเป็นช่วงที่ไลเปสจาก *Candida cylindracea* นั้นให้แอกติวิตีได้สูงสุด [Valis และคณะ, 1992] ซึ่งเขาพบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจะต่างกันตามระบบที่เลือกใช้ เช่นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของน้ำ / สารลดแรงตึงผิว / ไอโซออกเทน ของ AOT และ CTAB คือ 6.5 และ 6.0 ตามลำดับ

บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกัน จะทำให้เกิดการแตกตัวของประจุบนพื้นผิวของโมเลกุลของเอนไซม์แตกต่างกัน ทำให้เกิดแรงไฟฟ้าสถิตขึ้นภายในโมเลกุลระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับส่วนหัวที่มีประจุของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของประจุบนไลเปสและประจุส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว [Dekker และคณะ, 1989] เช่นในระบบที่สารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบคือ มีส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวเป็นประจุลบและมีค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่ต่ำกว่าค่าตรงจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point, pI) ของเอนไซม์ทำให้โมเลกุลของเอนไซม์มีประจุบวก จึงเกิดแรงดึงดูดทางประจุไฟฟ้าระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับส่วนหัวของสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นโมเลกุลของเอนไซม์จึงอยู่ใกล้กับชั้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น

จากผลการทดลองในผลของความเป็นกรด-ด่าง กับความเข้มข้นของไตรอะซิตินในระบบรีเวิร์สไมเซลล์สามารถแสดงได้ตามกราฟรูปที่ 5.6 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของไตรอะซิตินที่สูงขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาจะค่อยๆ เปลี่ยนจากค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ที่ 20 มิลลิโมลาร์ไตรอะซิติน ไปเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ที่ 80 มิลลิโมลาร์ไตรอะซิติน และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ความเข้มข้นของไตรอะซิตินที่เหมาะสมจะเพิ่มขึ้น โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ไตรอะซิตินจะ



รูปที่ 5.6 ผลของความเป็นกรด-ด่าง และ ความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน ที่ 0.1 M NaCl; 0.05 M บัฟเฟอร์; [SDEHP] = 0.1 M; [ไลเปส] = 0.1 mg/ml; $W_o = 1.5$; ความเข้มข้นของเมทอล = 30 mM และอุณหภูมิ = 35 องศาเซลเซียส [ตาราง ก10]

เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นของไตรอะซิตินประมาณ 50 มิลลิโมลาร์และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงถึง 6 พบว่าไตรอะซิตินจะไม่เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์แม้ไตรอะซิตินจะมีความเข้มข้นถึง 80 มิลลิโมลาร์

จากข้อสังเกตข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไตรอะซิตินและค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์มีอิทธิพลร่วมกันต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าไตรอะซิตินซึ่งละลายน้ำได้พอสมควรมีผลร่วมกับค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการแตกตัวเป็นประจุของเอนไซม์ซึ่งจะมีผลต่อชนิดของแรงทางไฟฟ้าสถิตที่กระทำระหว่างเอนไซม์และส่วนหัวที่มีประจุของสารลดแรงตึงผิวและมีผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

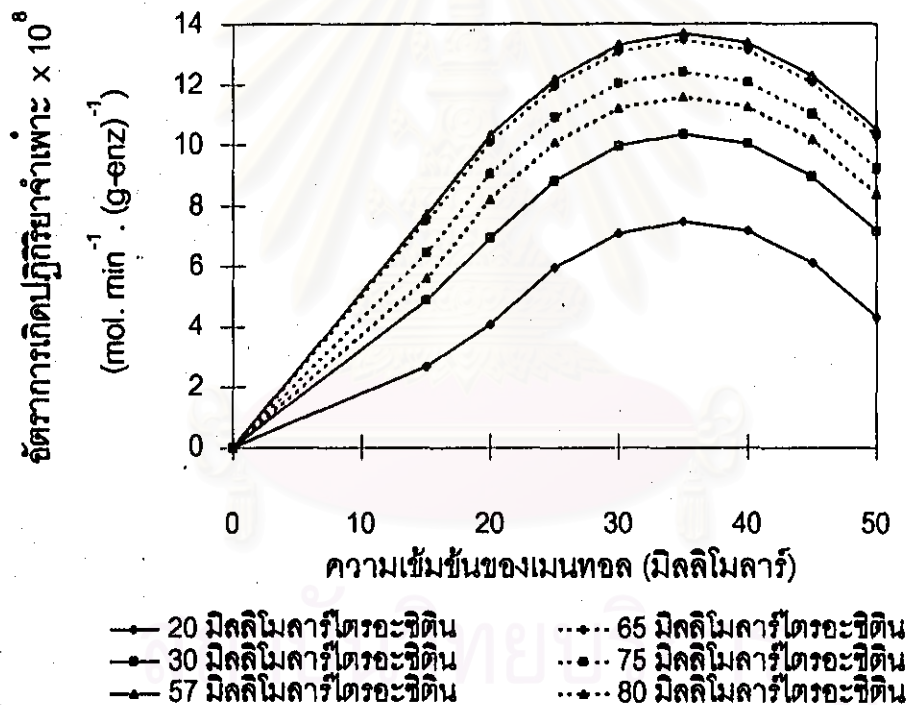
5.2.5 การหาจุดที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งห้า

พิจารณาจากกราฟ 5.3 ถึง 5.6 ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของ W_0 , ความเข้มข้นของเรซิมิกแมนทอล, และไตรอะซิติน, ค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์, และอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างเรซิมิกแมนทอลกับไตรอะซิตินในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ซึ่งเราจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวแปรทั้งห้าต่อการเกิดปฏิกิริยาเพื่อให้ได้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุด ซึ่งสามารถหาค่าสูงสุดของแต่ละตัวแปรได้ตามภาคผนวก ข2 ซึ่งจะได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเรซิมิกแมนทอลและไตรอะซิตินโดยไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในระบบ SDEHP/ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์คือ

W_0	=	1.22
ความเข้มข้นของแมนทอล	=	38.06 มิลลิโมลาร์
ความเข้มข้นของไตรอะซิติน	=	65.5 มิลลิโมลาร์
ค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์	=	6.7
อุณหภูมิ	=	33.9 องศาเซลเซียส

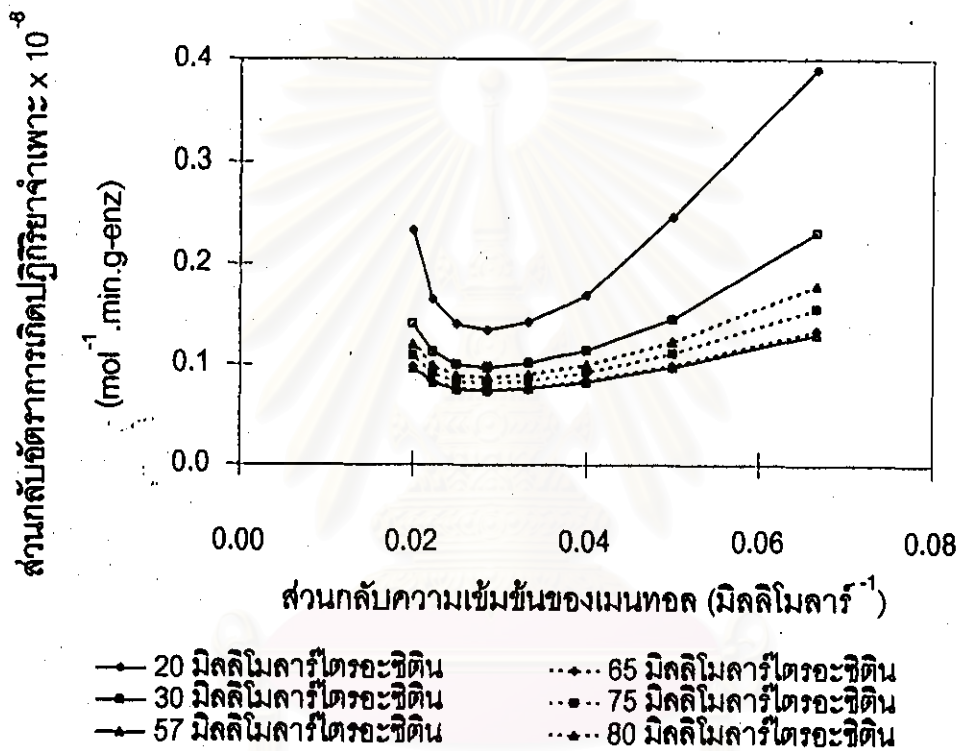
5.3 การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

ความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับความเข้มข้นของเมนทอลในปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเรซิไมกเมนทอลกับไตรอะซิติน โดยมีไลเปสจาก *Candida cylindracea* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์แสดงดังกราฟรูปที่ 5.7 จะเห็นว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะจะเพิ่มขึ้นเมื่อเมนทอลและไตรอะซิตินมีความเข้มข้นสูงขึ้น และลดลงเมื่อเมนทอลมีความเข้มข้นสูงกว่า 35 มิลลิโมลาร์ และไตรอะซิตินมีความเข้มข้นมากกว่า 57 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าระบบมีสารตั้งต้นทั้งสองเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของสารทั้งสองสูงกว่าค่าจำกัดค่าหนึ่ง



รูปที่ 5.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับความเข้มข้นต่างๆของเมนทอลและไตรอะซิติน สภาวะของการทดลอง: ความเข้มข้นของ SDEHP เป็น 0.1 โมลาร์, W_0 เป็น 1.2, ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7 และอุณหภูมิเป็น 33 องศาเซลเซียส [ตามตาราง ก11]

สำหรับการหาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ สามารถหาได้โดยการพิจารณาจาก โลว์ วี เวย์-เบอร์กั พล็อต (Lineweaver-burk plot) ของส่วนกลับระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยา จำเพาะกับความเข้มข้นของเมนทอล (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, และ 50 มิลลิโมลาร์) และกำหนดความเข้มข้นของไตรอะซิทีนให้คงที่ที่ 20, 30, 57, 65, 75, และ 80 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5.8



รูปที่ 5.8 การพลอตส่วนกลับของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับเมนทอล [ตามตาราง ก12]

จะสังเกตเห็นว่าความชันของกราฟจะลดลง (พิจารณาตามกราฟรูปที่ 5.8) เมื่อความเข้มข้นของไตรอะซิทีนเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อไตรอะซิทีนมีความเข้มข้นสูงกว่า 57 มิลลิโมลาร์ ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงนี้สอดคล้องกับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบ แรนดอม ไบ-ไบ (random bi-bi mechanism) [Segel และคณะ, 1975] ตามภาคผนวก ค

ทั้งนี้กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันที่พบในงานวิจัยนี้เป็นกลไกแบบ แรนดอม ไบ-ไบ ซึ่งต่างจากกลไกแบบปิงปอง ไบ-ไบ (ping pong bi-bi) ที่พบจากงานวิจัยของผู้อื่นในปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกันเช่น ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของฮ็อคคานอลกับกรด

ลอลิกในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของน้ำ / AOT / ไอโซออกเทนที่มีไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยา [Stamatis และคณะ, 1995], เอสเทอร์ฟิเคชันของ (-)เมนทอลกับกรดลอลิกในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของน้ำ / AOT / ไอโซออกเทน ที่มีไลเปสจาก *Penicillium simplicissimum* เป็นตัวกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา [Stamatis และคณะ, 1993b], เอสเทอร์ฟิเคชันของเบนซิลแอลกอฮอล์กับกรดลอลิกในระบบการตรึงไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในสารลดแรงตึงผิว [Goto และคณะ, 1995], เอสเทอร์ฟิเคชันของ (-)เมนทอลกับกรดลอลิกในระบบการตรึงไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในสารลดแรงตึงผิว [Kamiya และ Goto, 1997]

สมการที่ได้จากภาคผนวก ค คือสมการที่อธิบายถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบแรนดอม โบ-โบ ซึ่งสามารถเขียนสมการได้เป็น

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{\alpha K_A' K_B' + \alpha K_B' [A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{12}}\right) + \alpha K_A' [B] \left(1 + \frac{[B]}{K_H}\right) + [A][B]} \dots\dots\dots(5.1)$$

พิจารณาตามกราฟรูปที่ 5.8 ในกรณีที่ความเข้มข้นของเมนทอล ([B]) น้อยกว่าค่าจำกัดค่าหนึ่ง จะไม่มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา นั่นคือจะได้ว่า $[B] \ll K_H$ ทำให้พจน์ของ $[B]/K_H$ นั้นน้อยมากสามารถตัดทิ้งได้ และสามารถเขียนสมการ (5.1) ใหม่ได้เป็น

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{\alpha K_A' K_B' + \alpha K_B' [A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{12}}\right) + \alpha K_A' [B] + [A][B]}$$

เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเมนทอลเปลี่ยนแปลง จะได้

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{[B]}{\alpha K_B' \left(1 + \frac{[A]}{K_{12}} + \frac{K_A'}{[A]}\right) + [B] \left(1 + \frac{\alpha K_A'}{[A]}\right)}$$

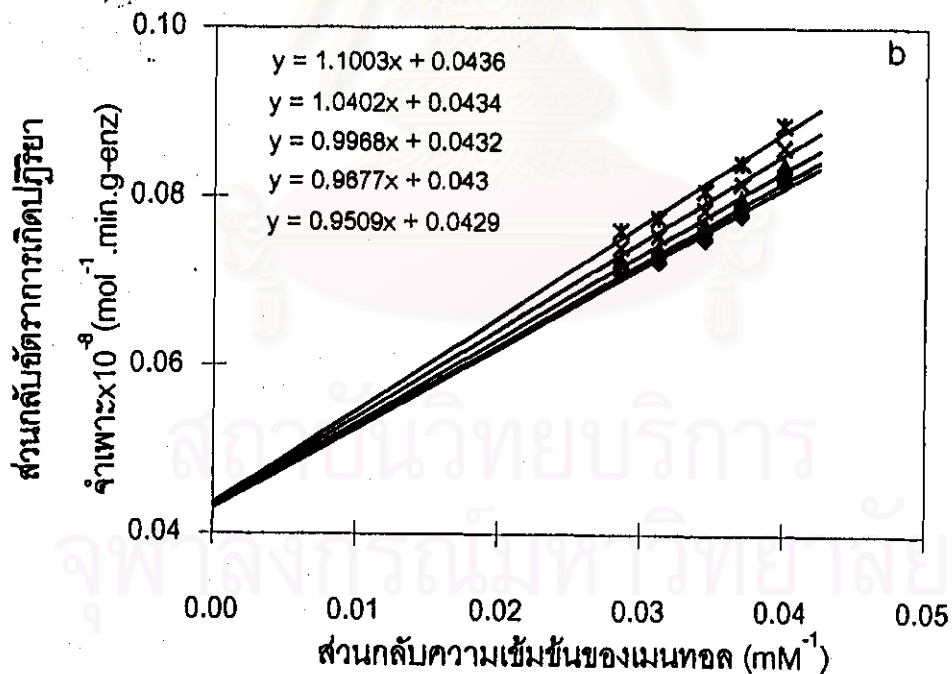
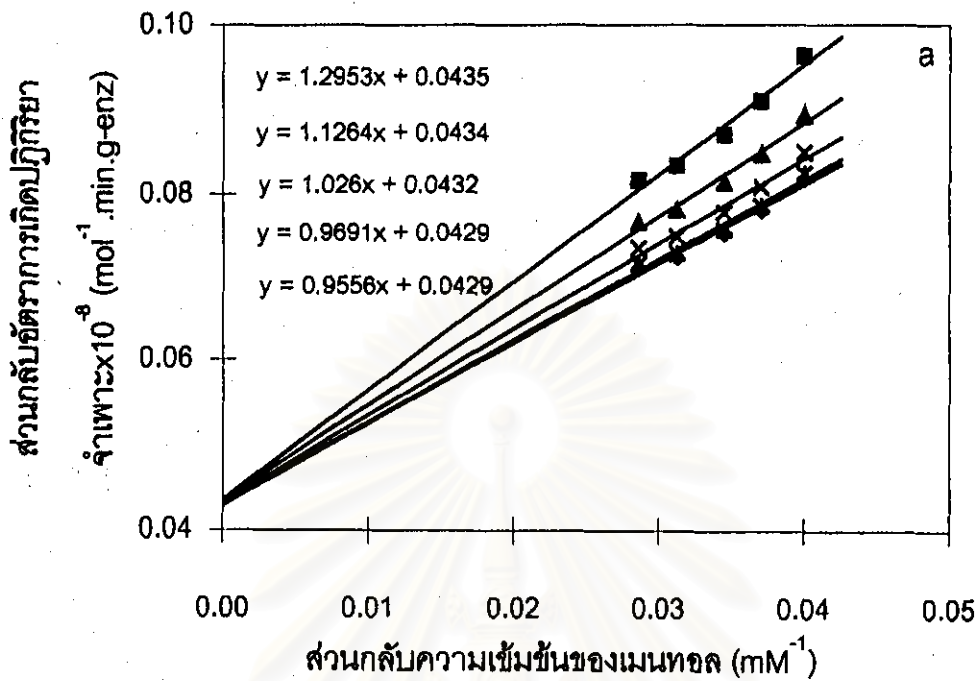
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{[B] V_{\max}} \frac{\alpha K'_B (1 + [A] + K'_A) + 1}{K'_{12} [A]} + \frac{1}{V_{\max}} \frac{(1 + \alpha K'_A)}{[A]} \quad \dots\dots\dots(5.2)$$

จุดตัดแกน Y (intercept) ที่ได้จากการพลอตส่วนกลับของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับส่วนกลับความเข้มข้นของเมทอลตามกราฟรูปที่ 5.9 มีค่าดังสมการ (5.3)

$$\text{จุดตัดแกน Y} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{(1 + \alpha K'_A)}{[A]} \quad \dots\dots\dots(5.3)$$

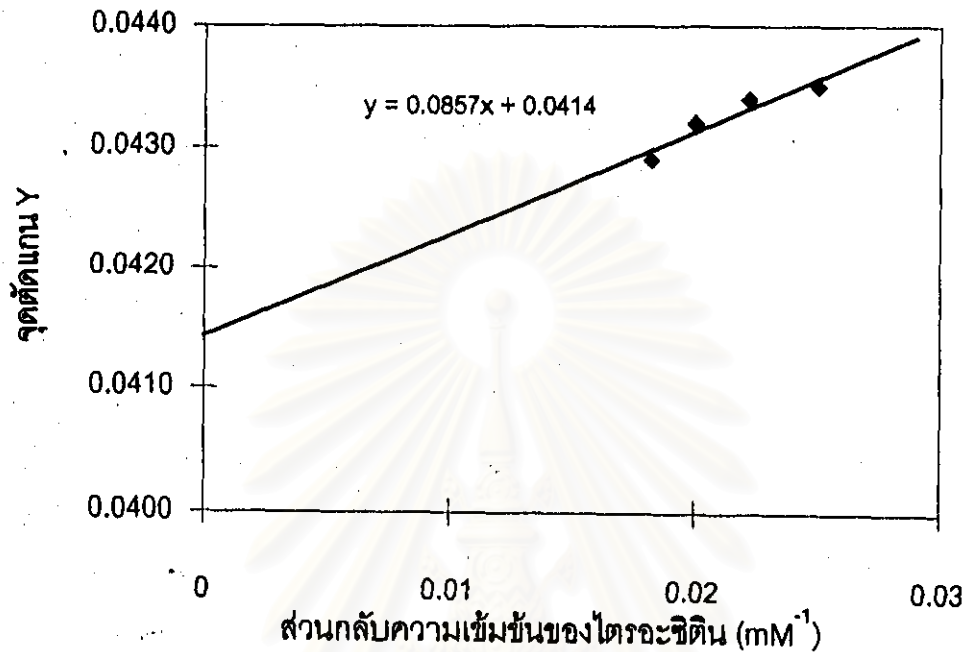
กราฟรูปที่ 5.9 เป็นการแสดงความสัมพันธ์ของส่วนกลับความเข้มข้นของเมทอลกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาซึ่งจะเหมือนกันกับกราฟรูปที่ 5.8 ต่างกันตรงที่กราฟในรูปที่ 5.9 จะแสดงค่าส่วนกลับของอัตราการเกิดปฏิกิริยาในช่วงที่เมทอลยังไม่เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาและยังแบ่งการพิจารณาเป็นสองกราฟคือที่ความเข้มข้นของไตรอะซิทีนต่ำ (5.9a) และที่ความเข้มข้นของไตรอะซิทีนสูง (5.9b)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟรูปที่ 5.9 ความสัมพันธ์ของส่วนกลับอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับความเข้มข้นของเมนทอลเมื่อ a) กำหนดให้ความเข้มข้นของไตรอะซิทีนมีค่าต่ำและคงที่ที่ (■)=40, (▲)=45, (×)=50, (*)=55, (◆)=57 มิลลิโมลาร์ b) กำหนดให้ความเข้มข้นของไตรอะซิทีนมีค่าสูงและคงที่ที่ (◆)=64, (■)=67, (▲)=70, (×)=73, (*)=76, มิลลิโมลาร์

พลอตค่าจุดตัดแกน Y กับ ส่วนกลับความเข้มข้นของไตรอะซิติน จะได้จุดตัดแกน Y เป็น $1/V_{\max}^{\cdot}$ และค่าความชันจะเป็น $\alpha K_A^{\cdot}/V_{\max}^{\cdot}$ ตามกราฟรูปที่ 5.10



รูปที่ 5.10 ความสัมพันธ์ของจุดตัดแกน Y กับส่วนกลับความเข้มข้นของไตรอะซิติน

$$\text{จุดตัดแกน Y} = \frac{1}{V_{\max}^{\cdot}} = 0.0414 \times 10^2 \text{ } (\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{g-enz})$$

$$V_{\max}^{\cdot} = 0.2415 \text{ } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g-enz}^{-1})$$

$$= 14.5 \text{ } (\mu\text{mol} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{g-enz}^{-1})$$

$$\text{ค่าความชัน} = \frac{\alpha K_A^{\cdot}}{V_{\max}^{\cdot}} = 0.0857 \times 10^5 \text{ } (\text{min} \cdot \text{g-enz})$$

$$\alpha K_A^{\cdot} = 2.07 \text{ } (\text{mM})$$

ส่วนค่าความชัน_(B) ที่ได้จากการพลอตส่วนกลับของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับความเข้มข้นของเมทอล สามารถนำมาหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไตรอะซิตินได้ดังสมการ (5.4)

$$\text{Slope}_{1/[B]} = \frac{\alpha K'_B}{V'_{\max}} + \frac{\alpha K'_B}{V'_{\max} K'_{i2}} [A] + \frac{K'_A (\alpha K'_B) [A]^2}{V'_{\max}} \dots \dots \dots (5.4)$$

ซึ่งจากสมการ (5.4) ค่าความชันของ $1/[B]$ จะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไตรอะซิติน ได้เป็นสองกรณี

กรณีที่ 1 ที่ความเข้มข้นของไตรอะซิตินต่ำกว่าจุดที่จะทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้น แสดงว่า $[A] \ll K'_{i2}$ ทำให้ค่าของ $[A]/K'_{i2}$ มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ดังนั้นจึงเหลือสมการที่จะพิจารณาเพียง

$$\text{Slope}_{1/[B]} = \frac{\alpha K'_B}{V'_{\max}} + \frac{K'_A (\alpha K'_B) [A]^2}{V'_{\max}}$$

แล้วพลอตกราฟระหว่างค่าความชัน $1/[B]$ กับ ส่วนกลับความเข้มข้นของไตรอะซิติน ($[A]^{-1}$) ตามกราฟรูปที่ 5.11a จะได้

$$\text{จุดตัดแกน Y} = \frac{\alpha K'_B}{V'_{\max}} = 0.1404 \times 10^5 \text{ (min.g-enz)}$$

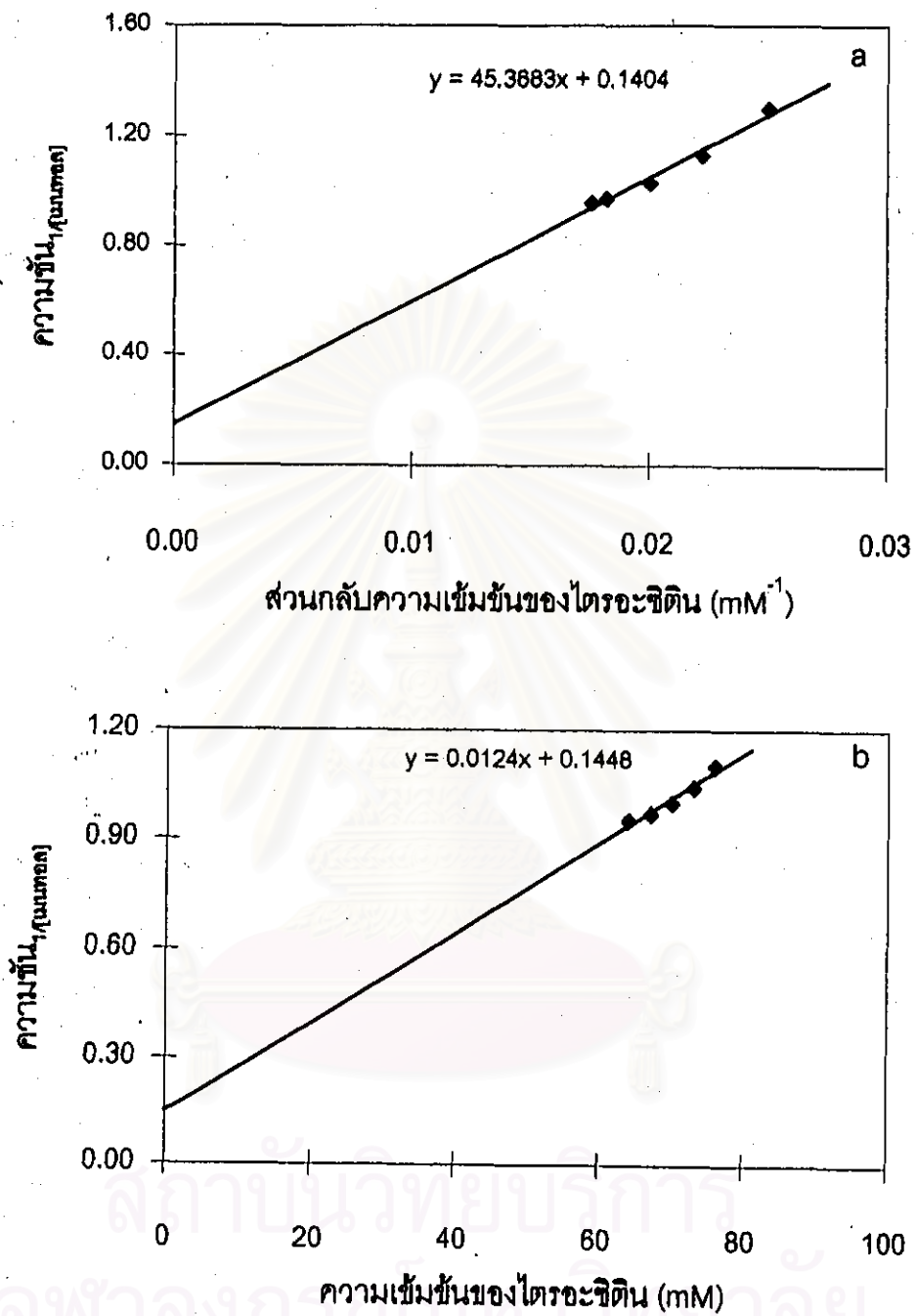
$$\alpha K'_B = 3.39 \text{ (mM)}$$

$$\text{ค่าความชัน} = \frac{K'_A (\alpha K'_B)}{V'_{\max}} = 45.368 \times 10^5 \text{ (mM.min.g-enz)}$$

$$K'_A = 323.2 \text{ (mM)}$$

กรณีที่ 2 ความเข้มข้นของไตรอะซิตินสูงกว่าจุดที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (มากกว่า 57 มิลลิโมลาร์ของไตรอะซิติน) แสดงว่า $[A] / K'_{i2} \gg K'_A / [A]$ ทำให้พจน์ $(K'_A (\alpha K'_B)) / (V'_{\max} [A])$ นั้นสามารถตัดทิ้งได้ ทำให้สมการที่ (5.4) ลดรูปได้เป็นดังนี้

$$\text{Slope}_{1/[B]} = \frac{\alpha K'_B}{V'_{\max}} + \frac{\alpha K'_B}{V'_{\max} K'_{i2}} [A]$$



กราฟรูปที่ 5.11 ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้น $\mu\text{mol/L}$ กับความเข้มข้นของไทรอะซิทีนเมื่อ a) กำหนดให้ความเข้มข้นของไทรอะซิทีนมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งปฏิกิริยา b) กำหนดให้ความเข้มข้นของไทรอะซิทีนมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งปฏิกิริยา

แล้วพลอตกราฟระหว่างค่าความชัน $v_{1/[B]}$ กับความเข้มข้นของไตรอะซิติน ([A]) ตามกราฟรูปที่ 5.11b จะได้

$$\text{จุดตัดแกน Y} = \frac{\alpha K_B}{V_{\max}} = 0.1448 \quad \text{ซึ่งค่านี้จะต้องมีค่าเท่ากับจุดตัดแกน Y ของกราฟรูปที่ 5.11a}$$

$$\text{ค่าความชัน} = \frac{\alpha K_B}{V_{\max} K_{12}} = 0.0124 \times 10^5 \quad (\text{min.g-enz.mM}^{-1})$$

$$K_{12} = 11.32 \quad (\text{mM})$$

ในทำนองเดียวกันถ้าพลอตกราฟระหว่างส่วนกลับของอัตราการผลิตปฏิกิริยากับความเข้มข้นของไตรอะซิติน โดยพิจารณาว่าเมื่อความเข้มข้นของไตรอะซิตินน้อยกว่าค่าจำกัดค่าหนึ่ง ระบบก็จะไม่เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา เทอมของ $[A] \ll K_{12}$ มาก ทำให้เทอมของ $[A]/K_{12}$ นั้นมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ดังนั้นจากสมการที่ (5.1) จึงลดรูปเหลือเพียง

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A(\alpha K_B) + \alpha K_A [B](1 + [B]) + \alpha K_B [A] + [A][B]} \cdot \frac{1}{K_{11}}$$

แล้วกำหนดให้ A เปลี่ยนแปลงจะได้

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{\alpha K_A (1 + [B]) + \frac{K_A(\alpha K_B)}{[B]} + [A](1 + \frac{\alpha K_B}{[B]})} \cdot \frac{1}{K_{11}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[A] V_{\max}} + \frac{\alpha K_A (1 + [B]) + \frac{K_A(\alpha K_B)}{[B]} + 1}{V_{\max} [B]} \cdot \frac{1}{[B]}$$

พิจารณาค่าความชัน $_{1/[A]}$ กับความเข้มข้นของเอนไซม์เมทอลจะได้ว่า

$$\text{ความชัน}_{1/[A]} = \frac{\alpha K'_A [B]}{V_{\max} K'_{11}} + \frac{(\alpha K'_A) K'_B [B]^{-1}}{V_{\max}} + \frac{\alpha K'_A}{V_{\max}}$$

เมื่อเมทอลมีความเข้มข้นสูงกว่าขีดจำกัดค่าหนึ่ง คือมากกว่าจุดที่จะเกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยานั้นหมายความว่า $[B] \gg K'_B$ ทำให้เทอมของ $K'_B / [B]$ นั้นเข้าใกล้ศูนย์ จะได้

$$\text{ความชัน}_{1/[A]} = \frac{\alpha K'_A [B]}{V_{\max} K'_{11}} + \frac{\alpha K'_A}{V_{\max}}$$

พลอตระหว่างค่าความชัน $_{1/[A]}$ กับความเข้มข้นของเอนไซม์เมทอล ($[B]$)
จะได้

$$\text{ความชัน} = \frac{\alpha K'_A}{V_{\max} K'_{11}} = 0.0347 \times 10^5 \text{ (min.g-enz.mM}^{-1}\text{)}$$

$$K'_{11} = 2.47 \text{ (mM)}$$

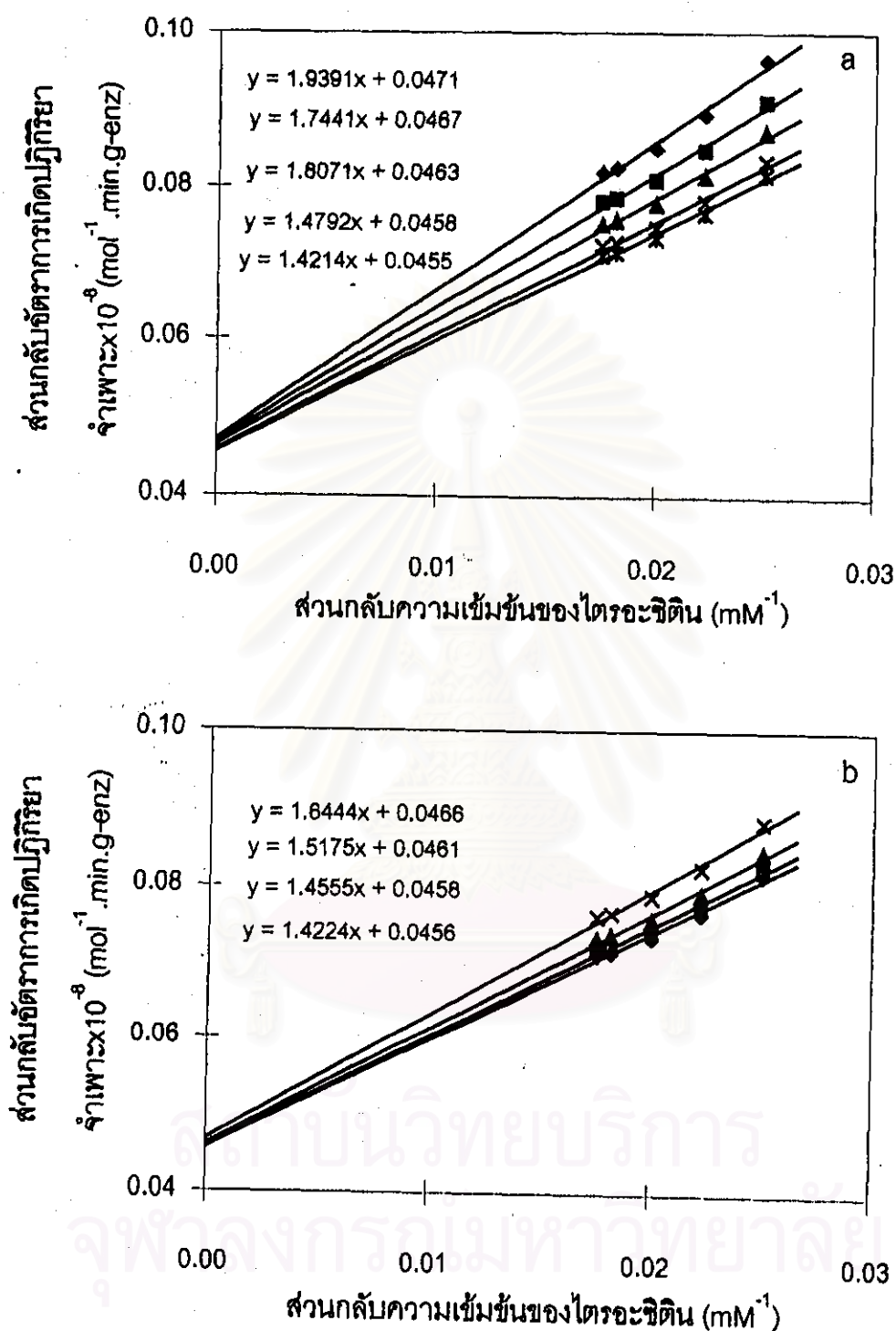
และที่ความเข้มข้นของเมทอลต่ำกว่าจุดที่จะทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของสารตั้งต้น แสดงว่า $[B] \ll K'_B$ ทำให้ค่าของ $[B] / K'_B$ มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ ดังนั้นจึงเหลือสมการที่จะพิจารณาเพียง

$$\text{ความชัน}_{1/[A]} = \frac{(\alpha K'_A) K'_B [B]^{-1}}{V_{\max}} + \frac{\alpha K'_A}{V_{\max}}$$

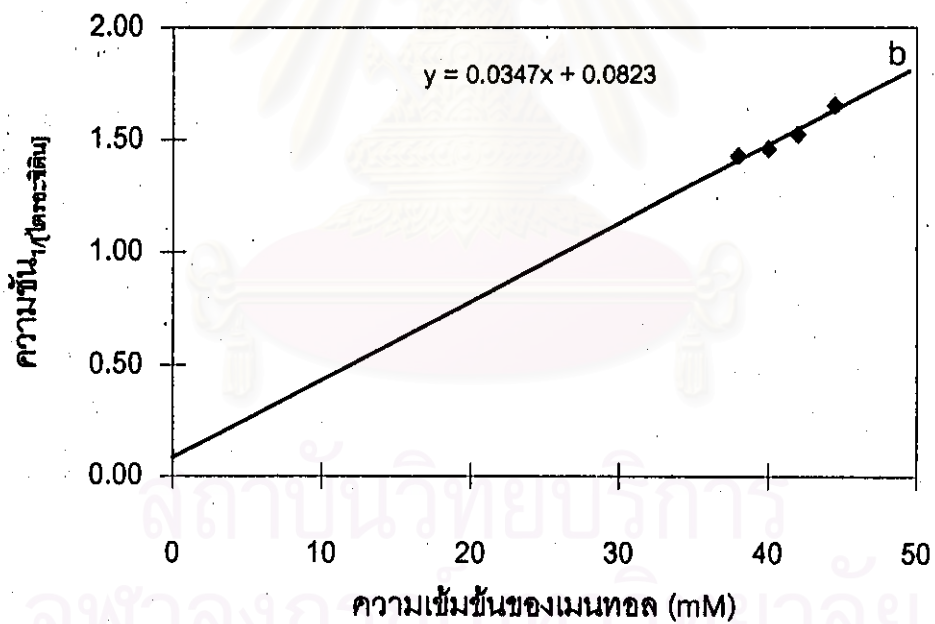
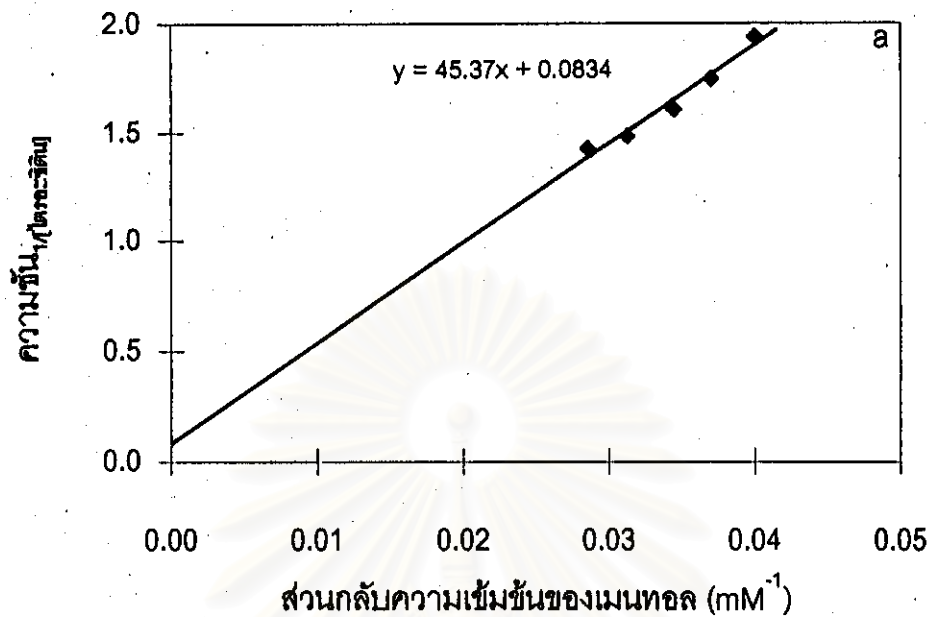
แล้วพลอตกราฟระหว่างค่าความชัน $_{1/[A]}$ กับ ส่วนกลับความเข้มข้นของเมทอล ($[B]^{-1}$) ตามกราฟรูปที่ 5.13a จะได้

$$\text{ค่าความชัน} = \frac{(\alpha K'_A) K'_B}{V_{\max}} = 45.37 \times 10^5 \text{ (mM.min.g-enz)}$$

$$K'_B = 529.3 \text{ (mM)}$$



รูปที่ 5.12 ความสัมพันธ์ของส่วนกลับอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับความเข้มข้นของไทรอะซิตินเมื่อ a) กำหนดให้ความเข้มข้นของเมนทอลมีค่าต่ำและคงที่ที่ (◆)=25, (■)=27, (▲)=29, (×)=32, และ (*)=35, มิลลิโมลาร์ b) กำหนดให้ความเข้มข้นของเมนทอลมีค่าสูงและคงที่ที่ (◆)=38, (■)=40, (▲)=42, และ (×)=45 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 5.13 ความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้น_{1/ไดอะริติน} กับความเข้มข้นของแมนทอลเมื่อ
 a) กำหนดให้ความเข้มข้นของแมนทอลมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งปฏิกิริยา b) กำหนด
 ให้ความเข้มข้นของแมนทอลมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งปฏิกิริยา

สรุปได้ว่าค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ต่างๆมีค่าดังต่อไปนี้: V_{max} เท่ากับ $14.5 \mu\text{mol} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{g-enz}^{-1}$, αK_A เท่ากับ 2.07 mM , αK_B เท่ากับ 3.39 mM , K_A เท่ากับ 323.2 mM , K_B เท่ากับ 529.3 mM , K_{12} เท่ากับ 11.32 mM และ K_{11} เท่ากับ 2.47 mM

ค่าของตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ที่คำนวณได้ (ยกเว้น V_{max}) ไม่ถือว่าเป็นค่าจริงของระบบเพราะปฏิกิริยาไม่ได้เกิดขึ้นในตัวกลางสถานะเดียวคือปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในหยดน้ำที่มีเอนไซม์ละลายอยู่ ส่วนค่าที่วัดได้เป็นค่าในตัวทำละลายอินทรีย์ ปกติค่าทางจลนพลศาสตร์ที่คำนวณได้หรือเรียกว่าค่าปรากฏจะมีค่ามากกว่าค่าจริง โดยอิทธิพลที่มีผลต่อค่า αK_A , αK_B , K_A , K_B , K_{11} , และ K_{12} มากคือค่าสัมประสิทธิ์การแพร่กระจายของสาร A และสาร B ในตัวทำละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ ($P = \text{partition coefficient} = [A]_{\text{org}} / [A]_{\text{aq}}$) (Stamatis และคณะ, 1993)

จากแผนภาพกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบแรนดอม โบ-โบ ตามภาคผนวก ค จะเห็นว่า ถ้าค่าคงที่การแตกตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้นมีค่าสูงจะทำให้ที่สมดุลจะมี [EA] อยู่ในปริมาณที่น้อยทำให้โอกาสของการเกิดปฏิกิริยานั้นเป็นไปได้น้อยด้วย ดังนั้นจากค่าคงที่การแตกตัวที่คำนวณได้ของ K_B ที่มีค่ามากกว่า K_A จะมีผลทำให้แนวทางการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารตั้งต้นนั้นเป็นไปได้ในทางที่เอนไซม์จะเลือกจับกับสาร A คือ ไตรอะซิติกอน ซึ่งแนวทางการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีความคล้ายกับกลไกแบบออเดออร์ โบ-โบ โดยสามารถคำนวณค่าคงที่การแตกตัวได้เหมือนกับกรณีของแรนดอม โบ-โบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.4 เปรียบเทียบผลการทดลองกับระบบตัวทำละลายอินทรีย์

ในหัวข้อนี้เราจะทำการเปรียบเทียบผลของการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเรซิไมกเมนทอลและไตรอะซิติน โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในสภาวะที่เหมาะสมของระบบ SDEHP / ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์ (ผลจากงานวิจัยนี้) และระบบตัวทำละลายไอโซออกเทน (Lokotsch และคณะ, 1989) สภาวะที่เหมาะสมของทั้งสองระบบมีความแตกต่างกันมาก โดยในระบบรีเวิร์สไมเซลล์จะมีสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของเมนทอลและไตรอะซิตินเท่ากับ 38 และ 65 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ สภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส, ความเข้มข้นของเมนทอลและไตรอะซิตินเท่ากับ 6.4 และ 4.55 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ซึ่งระบบที่แตกต่างกันเพียงองค์ประกอบที่เพิ่มเข้ามาคือมีสารลดแรงตึงผิว, และสารละลายบัฟเฟอร์ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ไม่น่าจะมีผลต่ออุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละระบบมากนัก ส่วนความเข้มข้นที่ต่างกันประมาณ 6 ถึง 14 เท่า อาจเนื่องมาจากการที่สารตั้งต้นต้องมีการกระจายตัวในหลายๆเฟส (ตัวทำละลายอินทรีย์, สารลดแรงตึงผิว และตัวทำละลายบัฟเฟอร์) ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ ทำให้จำเป็นต้องใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นที่สูงกว่า

เมื่อพิจารณาค่าการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันจำเพาะ (ที่สภาวะเหมาะสม) ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของ SDEHP ในไอโซออกเทน (V_{max}) พบว่ามีค่าเท่ากับ $14.5 \mu\text{mol} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{g-enz}^{-1}$ (ดูตารางที่ 5.2) ซึ่งจะต่างจากค่าการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะในปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน (ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดลอกลิกและ (-)-เมนทอล โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium simplicissimum*) ของระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของ AOT/ ไอโซออกเทนอยู่มาก คือจะมีค่าเท่ากับ $7.45 \cdot 10^0 \mu\text{mol} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{g-enz}^{-1}$ [Stamatis และคณะ, 1993b] นอกจากนี้ยังมีค่าน้อยกว่าในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่ Lokotsch และคณะ (1989) ทำให้ซึ่งมีค่าเป็น $24.2 \mu\text{mol} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{g-enz}^{-1}$ ถึงแม้ว่าอัตราการแพร่ของสารตั้งต้นในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ (ซึ่งเกิดจากการเบียดบังกันเองของเอนไซม์) จะช้ากว่าในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ (ซึ่งเอนไซม์อยู่ในลักษณะของสารละลายในหยดน้ำของไมเซลล์) แต่ยังให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สูงกว่าจึงน่าจะเป็นไปได้ที่ปฏิกิริยาในระบบตัวทำละลายอินทรีย์มีขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์

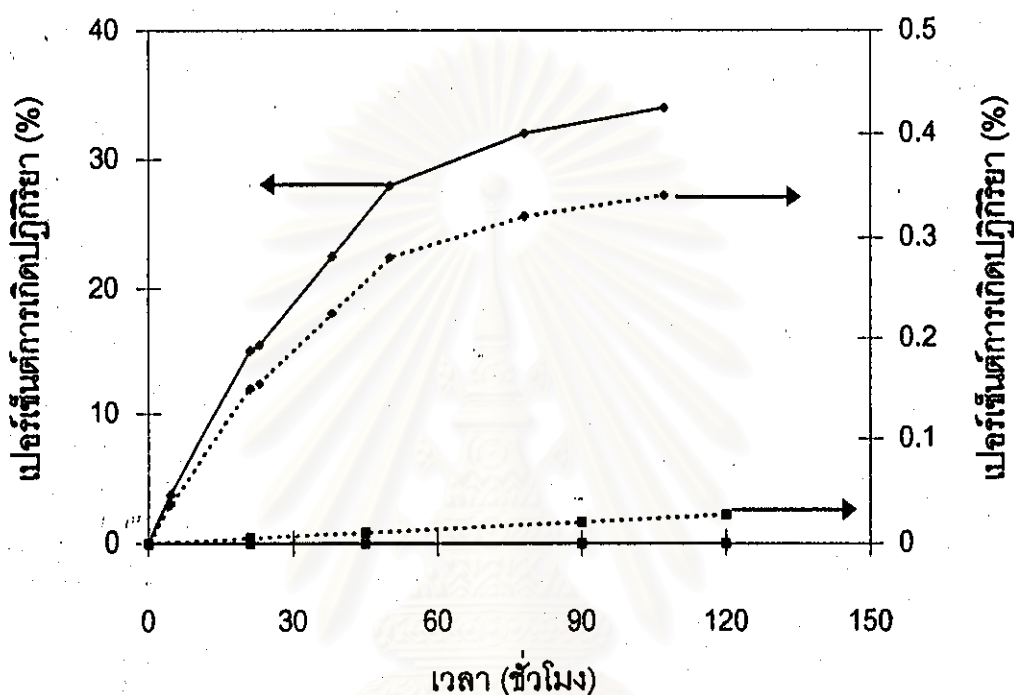
เป็นขั้นตอนที่ช้าที่สุด และกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งสอดคล้องกับที่อานนท์พัฒน กัลปพงศ์ (2541) พบในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันของเรซิมิกเมนทอลและเฮกซิล อะซิเตทในตัวทำละลายไอโซออกเทน โดยใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกับในงานวิจัยนี้ อาจเป็นไปได้ ที่สภาวะสำหรับเอนไซม์ไลเปสในระบบ SDEHP/ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์มีความไม่ เหมาะสมในแง่ของแรงทางไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของน้ำ, เอนไซม์ และส่วนที่มีหัวของ สารลดแรงตึงผิว ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้อัตราการเกิด ปฏิกิริยาที่พบต่ำกว่าในระบบตัวทำละลายอินทรีย์

ตารางที่ 5.2 เปรียบเทียบอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุดในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ของ SDEHP ในไอโซออกเทนกับระบบตัวทำละลายอินทรีย์ ณ สภาวะที่เหมาะสม ของระบบ

ระบบของการเกิดปฏิกิริยา	อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ ($\mu\text{mol}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{g}\cdot\text{enz}^{-1}$)
รีเวิร์สไมเซลล์ของ SDEHP ในไอโซออกเทน	14.5
ตัวทำละลายอินทรีย์ (ไอโซออกเทน)	24.2

เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับเรซิมิกเมนทอลที่พบในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ จะต่ำกว่าในระบบตัวทำละลายอินทรีย์มาก (ดูรูป 5.14) ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในปริมาณ เอนไซม์ที่ระบบรีเวิร์สไมเซลล์สามารถรองรับได้ (enzyme loading) (ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด ปฏิกิริยาในรูป 5.14 คำนวณจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มากกว่า แบบรีเวิร์สไมเซลล์ถึง 100 เท่า) และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ที่ สูงกว่า แต่ถ้าเทียบระบบที่ใช้ไลเปสในปริมาณที่เท่ากัน โดยลดปริมาณไลเปสในระบบตัวทำ ละลายอินทรีย์เป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามเส้นประในกราฟรูปที่ 5.14 ซึ่งจะเห็นว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาในระบบรีเวิร์สไมเซลล์จะน้อยกว่าในระบบตัวทำละลายอินทรีย์

ประมาณ 12 เท่า การที่ไม่เปรียบเทียบโดยเพิ่มปริมาณไลเปสในระบบรีเวิร์สไมเซลล์ เพราะในระบบรีเวิร์สไมเซลล์มีขีดจำกัดของการละลายได้ของไลเปส ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณไลเปสได้มากขึ้น



รูปที่ 5.14 เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาเทียบกับเวลาในระบบ (♦):ตัวทำละลายอินทรีย์จากงานวิจัยของ Lokotsch ใช้ไลเปส 10 mg/ml, ความเข้มข้นของไตรอะซิติก = 4.55 mM และความเข้มข้นของเมนทอล = 6.4 mM, (■):SDEHP รีเวิร์สไมเซลล์ในงานวิจัยนี้ ใช้ไลเปส 0.1 mg/ml, ความเข้มข้นของไตรอะซิติก = 65 mM และความเข้มข้นของเมนทอล = 38 mM, เส้นประแสดงถึงการเปรียบเทียบเมื่อใช้ปริมาณไลเปสที่เท่ากันคือ 0.1 mg/ml [ตามตารางที่ n13]

จึงอาจสรุปได้ว่าระบบตัวทำละลายอินทรีย์ไอโซออกเทนเป็นระบบที่มีความเหมาะสมกว่าระบบ SDEHP/ไอโซออกเทนรีเวิร์สไมเซลล์ เมื่อพิจารณาทั้งในแง่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะและเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยา