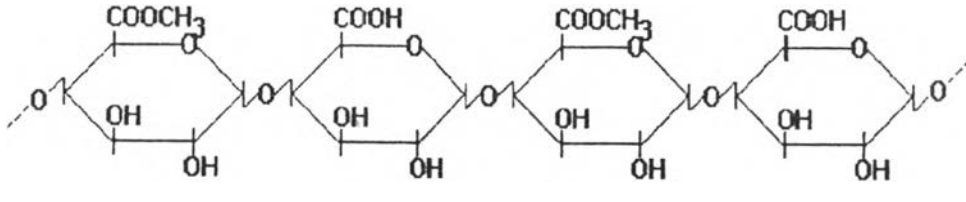
บทที่ 3

ทฤษฎี

เพกติน (Pectin)

เพกติน เป็นโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนชนิดหนึ่งของโพลีแซกคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง โดยเป็นส่วนประกอบของ middle lamellae ของผนังเซล (cell wall) เป็นสารที่ทำให้เนื้อเยื่อพืชมีความแข็งแรง เพกตินมีโครงสร้างหลักเป็น α (1,4) D-galacturonic acid โครงสร้างหลักนี้หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) บางหมู่จะถูกเอสเทอร์ริไฟค์ (esterified) ด้วยเมทธานอล (methanol) ถึงแม้ว่าในผักผลไม้ทั่วๆไป จะพบสารจำพวกเพกตินอยู่น้อย (ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) แต่ก็มีผลต่อความเข้ากันเป็นเนื้อเดียว (consistency of homogenized) ของผักและผลไม้เนื่องจากเพกตินมีลักษณะเป็นร่างแห (net work) ธรรมชาติของเพกตินเป็นพวกที่ชอบน้ำอย่างมาก (highly hydrophillic colloid) มีประจุลบ สามารถละลายน้ำได้ เมื่อมีน้ำอยู่เพกตินจะพองตัว และแขวนลอยอยู่ในน้ำเกิดเป็นสารละลายค่อนข้างหนืด ขัดขวางการตกตะกอนของอนุภาคต่างๆ ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำผลไม้ หรือไวน์ โดยทั่วไปเพกตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000-400,000 [3]



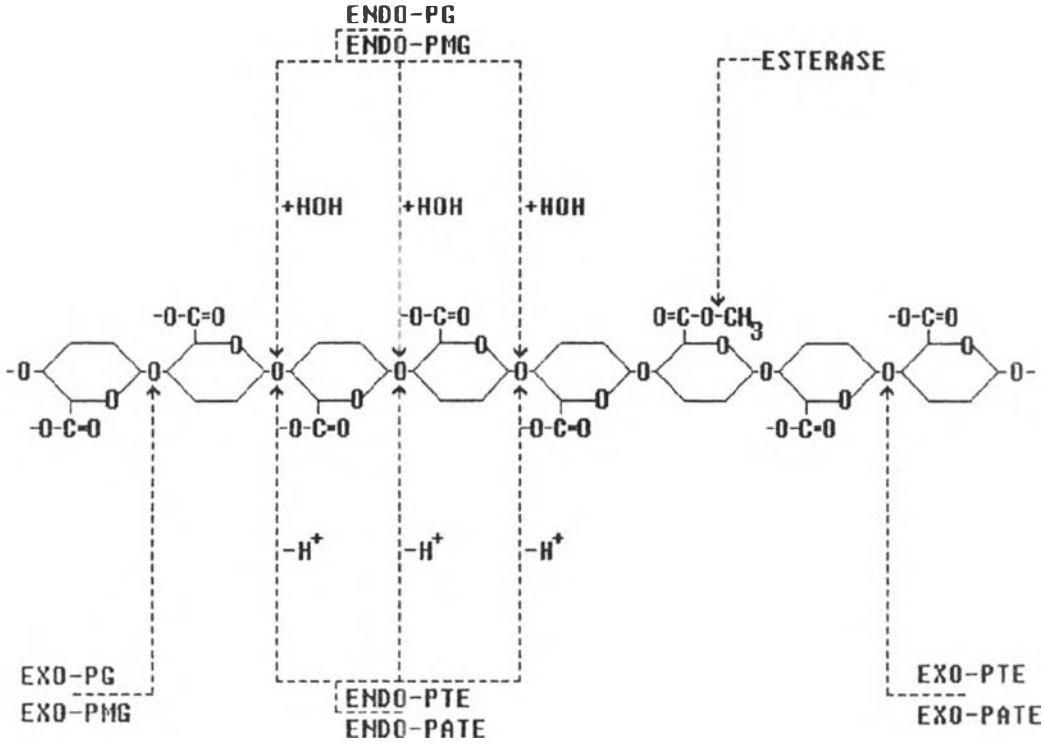
รูปที่ 3.1 โครงสร้างทั่วไปของโมเลกุลเพกติน

เอนไซม์เพกติเนส (Pectolytic enzyme)

เอนไซม์เพกติเนสได้มาจากพืชชั้นสูง แบคทีเรีย (bacteria) รา ยีสต์ (yeast) แมลง โปรโตซัว (protozoe) นีมาโทด (nematode) และหอยทาก [3] เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์หลายองค์ประกอบ (multicomponent enzyme) โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ร่วมกัน ดังตารางที่ 3.1 [4] และการทำงานของเอนไซม์ต่อสับสเตรต แสดงไว้ในรูปที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของเพคโตไลติกเอนไซม์ (Pectolytic enzyme)

Name	EC No.	Primary substrate	Products	Mechanism
Esterase				
Pectin methylesterases (pectinesterases)	3.1.1.11	Pectin	Pectic acid+ methanol	Hydrolysis
Polygalacturonases				
Protopectinases		Protopectin	Pectin	Hydrolysis
Endopolygalacturonases	3.2.1.15	Pectic acid	Oligogalacturonates	Hydrolysis
Exopolygalacturonases	3.2.1.82	Pectic acid	Monogalacturonate	Hydrolysis
Oligogalacturonate hydrolases		Trigalacturonate	Monogalacturonate	Hydrolysis
4:5 Unsaturated oligogalacturonate hydrolases		4:5 (Galacturonate)n	Unsaturated mono-galacturonate and saturated (n-1)	Hydrolysis
Endopolymethyl-galacturonases		Pectin	Methyl oligo-galacturonates	Hydrolysis
Lyases				
Endopolygalacturonate lyases (endopectate lyases)	4.2.2.2	Pectic acid	Unsaturated oligo-galacturonates	*Trans* elimination
Exopolygalacturonate lyases (exopectate lyases)	4.2.2.9	Pectic acid	Unsaturated diga-lacturonate	*Trans* elimination
Oligogalacturonate lyases	4.2.2.6	Unsaturated digalacturonate	Unsaturated monogalacturonate	*Trans* elimination
Endopolymethyl-galacturonate lyases (endopectin lyases)	4.2.2.10	Pectin	Unsaturated methyl oligo-galacturonates	*Trans* elimination



รูปที่ 3.2 ความจำเพาะและการทำงานของเพกติเนสต่อโมเลกุลของเพกติน

การตรึงรูปเอนไซม์ (Enzyme Immobilization)

เอนไซม์ตรึงรูป คือ การทำให้เอนไซม์เคลื่อนที่ไปมาไม่ได้ หรือเคลื่อนที่ได้ในพื้นที่จำกัด และยังพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนไปที่ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีประโยชน์เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ดังนี้ [5]

1. เอนไซม์ตรึงรูปสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก
2. การผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถกระทำได้ต่อเนื่อง และควบคุมได้ตามต้องการ
3. เอนไซม์ตรึงรูปบางชนิดสามารถทำให้มีคุณสมบัติทางด้านความคงทนได้โดยการเปลี่ยนแปลงวิธีการตรึงรูป
4. แยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย
5. ลดต้นทุนในการผลิต

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ แบ่งได้เป็น 4 วิธี ตามหลักพื้นฐานและเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ ดังนี้ [6]

1. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent attachment to a solid support)

2. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ (non-covalent interaction with a solid support)

3. การโอบล้อมทางกายภาพของเอนไซม์ในโพลิเมอร์ที่เป็นโพรงหรือเยื่อกึ่งผ่านได้ (physical entrapment in or by a polymer matrix or a micelle)

4. การเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent cross-linking)

1. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent attachment method)

การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ (solid support) โดยใช้หลักการเกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bonding) ของหมู่ฟังก์ชันนอลบนตัวพยุง กับปลายสายโซ่ (side chain) ของเอนไซม์ หมู่ฟังก์ชันนอลของตัวพยุงหมู่หนึ่งที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ คือ หมู่อะมิโน (amino group) ซึ่งวิธีการกระตุ้นตัวพยุงให้มีหมู่อะมิโนที่ง่ายที่สุดนั้นทำได้โดยการบำบัดด้วย

กลูตัลราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และมีการพิสูจน์แล้วพบว่าตัวพยุงที่ถูกบำบัดด้วยวิธีนี้สามารถนำไปใช้กับงานด้านอาหารได้ พันธะโควาเลนท์เป็นพันธะที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเลคตรอนอย่างสมบูรณ์ และอะตอมใช้อิเลคตรอนร่วมกัน ทำให้ไม่มีขั้วประจุในโมเลกุลที่เกิดพันธะ เพราะใช้อิเลคตรอนคู่ร่วมกัน และกระจายตัวอย่างสมมาตร เนื่องจากการเกิดพันธะโควาเลนท์ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายของพันธะโควาเลนท์เดิมดังนั้นเมื่อพลังงานการสลายพันธะ (dissociation energy) ยิ่งสูง โมเลกุลใหม่ที่ได้จะมีพันธะโควาเลนท์ที่แข็งแรง และเสถียรมากด้วย ด้วยเหตุนี้ภาวะของปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนท์จึงค่อนข้างรุนแรง ทำให้มีผลโดยตรงต่อบริเวณเร่ง (active site) และโครงรูปสามมิติ (conformation) ของเอนไซม์ ผลกระทบดังกล่าวมีทั้งช่วยทำให้แอกติวิตี (activity) สูงขึ้นและลดลงได้ ทั้งสองกรณี ขึ้นอยู่กับภาวะที่ใช้ในการตรึงรูป

2. การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ (Non-covalent interaction methods)

การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำโดยใช้หลักการต่างๆ กัน ได้แก่ การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) ซึ่งจะเป็นการดูดซับของเอนไซม์บนผิวภายนอกของตัวพยุง เอนไซม์จะถูกจับไว้ด้วยแรงดึงดูดที่ค่อนข้างอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals) หรือแรงไฮโดรโฟบิค(hydrophobic) เป็นต้น ส่วนอีกวิธีเป็นการเกิดพันธะไอออนิก (ionic bonding) ซึ่งเป็นการตรึงด้วยหลักการของการดึงดูดประจุของเอนไซม์กับตัวพยุงที่มีส่วนของโมเลกุลที่สามารถแลกเปลี่ยนประจุได้ (ion-exchange residue) วิธีการตรึงรูปโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพนี้จะไม่ค่อยมีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติและแอกติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากไม่มีพันธะเคมี แรงยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงจึงอ่อนมาก ทำให้เอนไซม์ที่ถูกดูดซับอาจหลุดออกไปจากตัวพยุงในระหว่างการใช้งานได้ สำหรับวิธีการยึดด้วยพันธะไอออนนิกนั้นก็มีผลกระทบน้อยต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งด้านการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติ และการเปลี่ยนแปลงบริเวณเร่ง รวมทั้งมีแรงยึดเหนี่ยวที่ค่อนข้างอ่อนเช่นกัน ทำให้เอนไซม์หลุดง่ายในระหว่างปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของไอออนสูง หรือมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการวิจัยโดยการปรับปรุงแรงยึดเกาะกันให้สูงขึ้น โดยทำให้เอนไซม์มีประจุมากขึ้น

3. การโอบล้อมทางกายภาพของเอนไซม์ในโพลิเมอร์ที่เป็นโพรงหรือเยื่อกึ่งผ่านได้ (Physical entrapment methods)

การตรึงรูปวิธีนี้เป็นการกักเอนไซม์อยู่ในตัวกลาง โดยเอนไซม์ไม่เกิดพันธะใดๆ กับตัวกลาง ถ้าตัวกลางเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นโพรง (polymer matrix) เรียกว่า เป็นการตรึงแบบแลททิช

(lattice type) ถ้าเป็นการยึดในเยื่อกึ่งผ่านได้ (semipermeable membrane) เรียกว่า เป็นการตรึงแบบไมโครแคปซูล (microcapsule type) ซึ่งทั้งสองกรณีนี้จะกีดกันการซึมผ่านของโมเลกุลเอนไซม์ แต่ขณะเดียวกันจะยอมให้สับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึมผ่านไปได้

4. การเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนท์ (cross-linkage method)

การตรึงรูปวิธีนี้อาศัยวิธีการสร้างพันธะเคมีเหมือนกับวิธีการสร้างพันธะโควาเลนท์ แต่วิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุง แต่ใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารไบฟังก์ชันนอล (bifunctional reagent) เกาะกับเอนไซม์แบบเชื่อมขวาง ซึ่งมีผลให้เอนไซม์หลายโมเลกุลเกาะกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ ละลายน้ำได้น้อยลง วิธีนี้มีแรงยึดที่แข็งแรง แต่ต้องใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง เอนไซม์ที่ได้มีแอกติวิตีต่ำ ใช้ปริมาณเอนไซม์มาก และเสถียรภาพ (stability) ต่ำ เนื่องจากการใช้สารเชื่อมขวางก่อให้เกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ ฉะนั้นจึงมีผลต่อโครงรูปสามมิติและแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ง่ายกว่าวิธีที่ 2 และ 3 วิธีนี้จึงนิยมใช้ควบคู่กับการยึดเกาะด้วยแรงดูดซับทางกายภาพ สารไบฟังก์ชันนอลที่นิยมใช้มากที่สุดคือ กลูตัลราลดีไฮด์

<u>สมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป (Properties of Immobilized Enzyme)</u>

สมบัติบางประการของเอนไซม์ตรึงรูปที่เปลี่ยนไปโดยกระบวนการตรึงรูปนั้น ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูป
- ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูป
- ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ (K_m, V_{max})
- เสถียรภาพที่มีต่ออายุการเก็บ และการท

<u>จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme Kinetics)</u>

สมการเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาด้านจลนพลสาศตร์ของเอนไซม์ คือ ปฏิกิริยาไมเคิลลิสเมนเทน (Michaelis-Menten mechanism) ดังปฏิกิริยานี้

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

จากปฏิกิริยาข้างบนสามารถสร้างสมการไมเคิลลิสเมนเทน (Michaelis-Menten equation) ได้ดังนี้

$$V = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s} \qquad \text{..... (1)}$$

เมื่อ K_m เป็นค่าคงที่ไมเคิลลิส (Michaelis constant)

V_{max} เป็นอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด

เนื่องจากกราฟระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V) กับความเข้มข้นของสับสเตรต (C_s) มีลักษณะเป็นไฮเปอร์โบลา (hyperbola) ทำให้การหาค่าคงที่ไมเคิลลิส และค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดมีความยุ่งยากและได้ค่าที่ไม่แม่นยำ จึงต้องมีวิธีการเขียนกราฟความสัมพันธ์ออกมาเป็นเส้นตรง ซึ่งมีวิธีต่างๆ กันหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ คือ Lineweaver-Burk Reciprocal Plot โดยมีสมการดังนี้

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{C_s} + \frac{1}{V_{max}} \qquad \text{..... (2)}$$

<u>จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูป (Kinetics of Immobilized enzyme)</u>

จลนศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปจะซับซ้อนกว่าเอนไซม์อิสระ (free enzyme) แต่ในการใช้ในอุตสาหกรรมต้องการทราบเพียงแนวโน้มของเอนไซม์ที่จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อถูกตรึงเท่านั้น เหตุผลที่จะทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงเปลี่ยนไปมีได้ 3 ประการ คือ

1. ถ้ากระบวนการตรึงเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการเกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ (solid support) จะมีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ และแอกติวิตีอาจถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงมีผลทำให้โครงรูปสามมิติของโปรตีนในเอนไซม์เปลี่ยนไปและอาจมีผลต่อหมู่ที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย

2. สภาพแวดล้อมจุลภาพ (microenvironment) ของเอนไซม์เมื่อถูกตรึงจะแตกต่างไปจากเดิม ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของตัวพยุง

3. การตรึงเอนไซม์ในตัวพยุงที่มีลักษณะเป็นร่างแห หรือทรงกลมที่มีรูพรุน ทำให้การแพร่ของสับสเตรต และสารอินทรีย์ หรือไอออนต่างๆ เป็นไปได้อย่างไม่สะดวก โดยเฉพาะสับสเตรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ หรือไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือมีลักษณะแขวนลอย (suspension) จะเคลื่อนที่เข้าหาเอนไซม์ได้ช้ามาก และมีปัญหาด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) ในกรณีนี้จะต้องดัดแปลงสมการไมเคิลลิสเมนเทน (Michaelis-Menten equation) เป็น

$$S_{outside} \leftrightarrow S_{inside} + E \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$$

ในตอนแรกความเข้มข้นของสับสเตรตต่ำ เนื่องจากสับสเตรตจะค่อยๆ แพร่ผ่านเข้ามา ทำให้อัตราการแพร่ของสับสเตรตเป็นตัวจำกัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา แต่เมื่อทิ้งไว้ระยะหนึ่ง เมื่ออัตราการแพร่สูงขึ้นและถึงจุดที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตไม่ทันช่วงนี้จะเป็นช่วงที่ความสามารถของเอนไซม์จะเป็นตัวจำกัดความเร็วของปฏิกิริยา ข้อจำกัดของอัตราการแพร่อีกประการหนึ่งคือ การแพร่ของผลผลิตที่ได้ ถ้าเป็นในสารละลายทั่วไป เมื่อเกิดผลผลิตขึ้น ผลผลิตก็จะแพร่ออกจากเอนไซม์ไปทำให้ไม่เกิดการยับยั้งจากผลผลิต (product inhibition) แต่ถ้าอยู่ในลักษณะถูกตรึงช่องว่างที่กักเก็บเอนไซม์จะเป็นตัวยับยั้งการแพร่ของผลผลิตทำให้ความเข้มข้นของผลผลิตสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ถึงแม้ว่าเมื่อคิดโดยรวมต่อปริมาตรแล้วจะเป็น ปริมาณที่น้อยมากก็ตาม

ผลกระทบด้านการถ่ายเทมวลสาร (Mass Transfer Effect)

เมื่อเอนไซม์ถูกตรึงบนตัวพยุงหรือภายในตัวพยุง สับสเตรตจะแพร่จากสารละลายภายนอก (bulk solution) ไปยังผิวของตัวพยุงซึ่งสับสเตรตจะต้องแพร่ผ่านฟิลม์ที่อยู่นิ่ง (stagnant film) ที่ผิวของตัวพยุงก่อนจึงจะสามารถเกิดปฏิกิริยาที่ผิวของตัวพยุงได้ จากนั้นจึงแพร่เข้าไปในรูพรุนของตัวพยุงเพื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในตัวพยุง ซึ่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาในระบบจะขึ้นอยู่กับจลนพลศาสตร์ที่แท้จริงของเอนไซม์ตรึงรูป และอัตราการถ่ายเทมวลสาร กล่าวคือ จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงที่มีรูพรุน ถูกควบคุมโดยความต้านทานการถ่ายเทมวลสารของสับสเตรต (mass transfer resistances) 2 แบบ คือ

1. ความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายนอก (external mass transfer resistance) ซึ่งเกิดจากสับสเตรตเคลื่อนที่จากสารละลายภายนอกไปยังผิวของตัวพยุง โดยผ่านชั้นขอบเขต (boundary layer) ของของเหลวรอบตัวพยุง

2. ความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายใน (internal mass transfer resistance) ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนที่ของสับสเตรตภายในรูพรุนของตัวพยุงที่ถูกตรึงรูป เนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ เมื่อให้ปริมาณเอนไซม์เท่ากัน ซึ่งเป็นผลมาจากโมเลกุลของเอนไซม์ไม่สามารถสัมผัสกับสารละลายสับสเตรตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับสารละลายสับสเตรตภายนอกได้หมดทุกโมเลกุล นั่นคือ อัตราการถ่ายเทมวลสารของสับสเตรตช้ากว่าอัตราการเปลี่ยนสับสเตรตไปเป็นผลผลิตโดยเอนไซม์

ความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายนอก (External Mass Transfer Resistance) :

อัตราการถ่ายเทมวลสารต่อหนึ่งหน่วยอนุภาค (rate of mass transfer per unit particle, N_s) :

$$N_s = k_s A(C_{sb} - C_s) \qquad \text{..... (3)}$$

เมื่อ k_s คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล (mass tranfer coefficient)

A คือ พื้นที่ผิวของอนุภาคเอนไซม์ตรึงรูปหนึ่งอนุภาค (surface area of one immobilized enzyme particle)

C_{sb} คือ ความเข้มข้นของสับสเตรตภายนอก (bulk concentrations of substrate)

C_s คือ ความเข้มข้นของสับสเตรตที่ผิวตัวพยุง (surface concentrations of substrate)

ที่สภาวะคงที่ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะเท่ากับอัตราการถ่ายเทมวล

$$k_s a(C_{sb} - C_s) = V' = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s} \qquad \text{..... (4)}$$

เมื่อ V' เป็นอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ผิวตัวพยุง (rate of surface reaction)

a คือ พื้นที่ผิวทั้งหมดต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสับสเตรต (total surface area per unit volume of substrate)

กำหนดตัวแปรไร้หน่วย 3 ตัว คือ :

$$N_{Da} = \frac{V_{max}}{k_s a C_{sb}} \qquad \text{..... (5)}$$

$$C_s' = \frac{C_s}{C_{sb}} \qquad \text{..... (6)}$$

และ

$$\beta = \frac{C_{sb}}{K_m} \qquad \text{..... (7)}$$

จากสมการ (4) เขียนใหม่ได้ดังนี้

$$\frac{1 - C_s'}{N_{Da}} = \frac{\beta C_s'}{1 + \beta C_s'} \qquad \text{..... (8)}$$

เมื่อ N_{Da} คือ Damköhler number ซึ่งเป็นอัตราส่วนของอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดต่ออัตราการถ่ายเทมวลสารสูงสุด

ถ้า $N_{Da} << 1$ แสดงว่าอัตราการถ่ายเทมวลสารเร็วกว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยา และปฏิกิริยารวมถูกควบคุมโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นจากสมการ (4) จะได้

$$V' = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s} \qquad \text{..... (9)}$$

ถ้า $N_{Da} >> 1$ แสดงว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วกว่าอัตราการถ่ายเทมวลสาร และอัตราการเกิดปฏิกิริยารวมถูกควบคุมโดยอัตราการถ่ายเทมวลสาร ดังนี้

$$V' = k_s a C_{sb} \qquad \text{..... (10)}$$

ซึ่งในทางวิศวกรรมเคมีสามารถอธิบายปรากฏการณ์นี้ในเชิงปริมาณได้โดยใช้ ค่า effectiveness factor, η ซึ่งนิยามว่าเป็นอัตราส่วนระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่แท้จริง (actual reaction rate, V') กับอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่มีข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลสาร (rate which would be obtained in the absence of mass transfer limitations, V) โดยกำหนดว่าเอนไซม์ทุกโมเลกุลอยู่ในสารละลายสับสเตรตที่มีความเข้มข้นเท่ากับสารละลายสับสเตรตภายนอก จะได้ความสัมพันธ์ดังนี้

$$\eta = \frac{V'}{V} \qquad \text{..... (11)}$$

$$= \frac{\dfrac{V_{max} C_s}{K_m + C_s}}{\dfrac{V_{max} C_{sb}}{K_m + C_{sb}}} = \frac{\dfrac{\beta C_s'}{1 + \beta C_s'}}{\dfrac{\beta}{1 + \beta}} \qquad \text{..... (12)}$$

ซึ่งจะเห็นว่าค่า effectiveness factor เป็นฟังก์ชันของ C_s' และ β ถ้า C_s' เท่ากับ 1 แสดงว่าความเข้มข้นของสับสเตรตที่ผิวของตัวพยุงเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรตในสารละลายภายนอก เมื่อแทน C_s' เท่ากับ 1 ในสมการ (11) จะได้ ค่า effectiveness factor เท่ากับ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลสารแต่เมื่อ C_s' เข้าใกล้ 0 จะได้ค่า effectiveness factor เข้าใกล้ 0 ด้วย ซึ่งคือกรณีที่อัตราการถ่ายเทมวลช้ากว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยามาก

ความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายใน (Internal Mass Transfer resistance) :

ความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายในจะมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็ต่อเมื่อเอนไซม์ถูกตรึงอยู่ภายในตัวพยุง ซึ่งสมการแสดงผลความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายในของเอนไซม์ตรึงรูปต่อค่า effectiveness factor ต้องมีสมมติฐานดังนี้

1. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ทุกๆ ตำแหน่งภายในเอนไซม์ตรึงรูป และค่า จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาเหมือนกับค่าที่ได้จากเอนไซม์อิสระ
2. อัตราการถ่ายเทมวลผ่านเอนไซม์ตรึงรูปเกิดจากการแพร่ของโมเลกุล
3. ไม่มีข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลสารที่ภายนอกผิวของเอนไซม์
4. เอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุง ทรงกลม

สมดุลมวลสารสำหรับทรงกลมที่มีความหนา dr :

จาก Input - Output + Generation = Accumulation

ที่สภาวะคงที่ $dC_s / dt = 0$ และให้ $(dr)^2$ หรือ $(dr)^3$ เท่ากับ 0 จะได้สมการอนุพันธ์อันดับสอง (second order differential equation) ดังนี้

$$D_s\left(\frac{d^2C_s}{dr^2}+\frac{2}{r}\frac{dC_s}{dr}\right)+V'=0 \qquad \text{..... (13)}$$

เมื่อ D_s เป็นสัมประสิทธิ์การแพร่ของสับสเตรตภายในอนุภาคเอนไซม์ตรึงรูป (Effective Diffusion of a substrate in an immobilized matrix)

ในกรณีที่ศึกษาเอนไซม์ถูกตรึงอยู่เฉพาะบนผิวของตัวพยุงเท่านั้นจึงไม่พิจารณาผลของความต้านทานการแพร่ภายในจะพิจารณาเฉพาะผลของความต้านทานการแพร่ภายนอกเท่านั้น

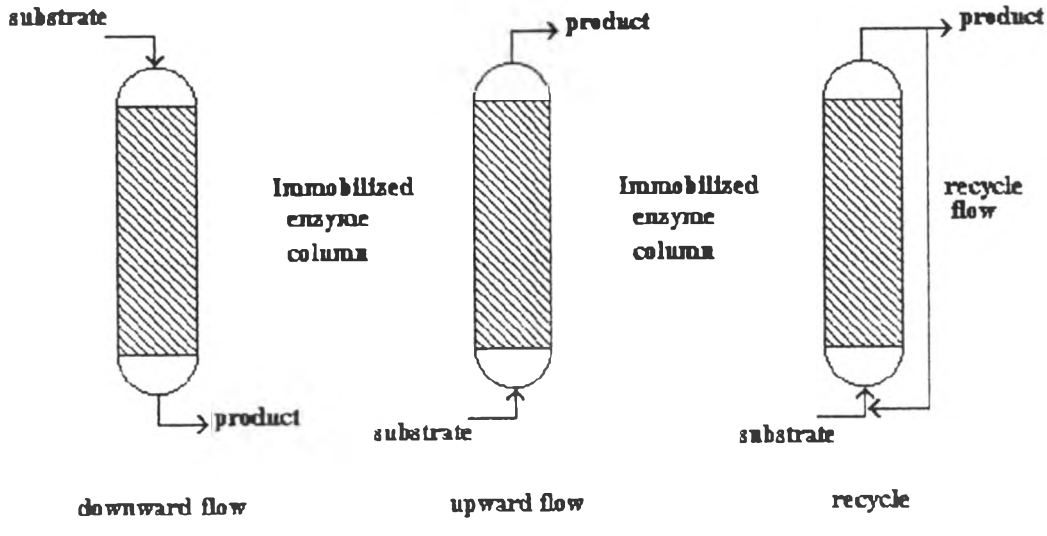
เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์แบบแพ็กเบด (Packed bed Enzyme Reactor)

เครื่องปฏิกรณ์แพ็กเบดต่อเนื่อง (continuous packed bed reactor) ดังรูปที่ 2 จัดว่าเป็นเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้อย่างกว้างขวางที่สุด ซึ่งวัสดุที่ใช้บรรจุในเบดอาจเป็นรูปทรงกลม ทรงกระบอก และรูปอสัณฐานอื่นๆ สำหรับอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของหอแพ็กเบดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของวัสดุบรรจุ (packing material) ไม่ควรต่ำกว่า 8:1 ถึง 10:1 เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบเนื่องจากผนังของหอแพ็กเบด (wall effect) ในทางทฤษฎีเราจะสมมติว่าวัสดุบรรจุมี

ขนาดเท่ากัน และบรรจุแบบสุ่มในรูปแบบเดียวกัน (uniform random packing) และการใส่วัสดุลงในเบด จะทำให้เกิดทางคดเคี้ยวจำนวนมากนี้เป็นนเสมือนหนึ่งท่อตรงหลายๆ ท่อมัดติดกัน อย่างไรก็ตามในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดนี้มีความจำเป็นต้องพิจารณาเรื่องความดันลด (pressure drop) ตลอดแนวของคอลัมน์ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากขนาดคอลัมน์ต่อความเร็วปฏิกิริยา

ทิศทางการไหลของสับสเตรตเข้าในเครื่องปฏิกรณ์แบบนี้ มีทาง 3 ทาง คือ

1. วิธีการไหลจากระดับสูงไปต่ำ (downward flow method)
2. วิธีการไหลจากระดับต่ำไปสูง (upward flow method)
3. วิธีการไหลซ้ำรอบ (recycling method)



รูปที่ 3.3 เครื่องปฏิกรณ์แบบแพ็กเบด

วิธีการแบบต่อเนื่องมีข้อได้เปรียบสูงกว่าวิธีการแบบไม่ต่อเนื่อง กล่าวคือ

- ควบคุมและทำงานได้อย่างอัตโนมัติได้ง่าย
- ลดค่าแรง
- เพิ่มเสถียรภาพด้านภาวะการทำงาน
- ควบคุมผลผลิตได้ง่าย

<u>ความดันลด (pressure drop, ΔP)</u>

ความดันลดของคอลัมน์เอนไซม์ตรึงรูปเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งของการทำให้ปฏิกิริยา

เอนไซม์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเครื่องปฏิกรณ์แบบแพ็กเบด การคำนวนค่าความดันลดของคอลัมน์แบบแพ็กเบดสามารถคำนวนได้จากสมการซึ่งเสนอโดยนักวิจัยหลายท่านดังนี้

จากสมการของ Hagen-poiseuille :

$$\Delta P = (32\mu v \Delta L) / D^2 \qquad \text{..... (14)}$$

แทนค่า D และ v ในสมการ (14) จะได้ :

$$\Delta P = (32\mu(\frac{v'}{\varepsilon})\Delta L) / (4r_H)^2 \qquad \text{..... (15)}$$

$$= 72\mu v' \Delta L(1-\varepsilon)^2 / \varepsilon^3 D_p{}^2 \qquad \text{..... (16)}$$

ค่า ΔL ในเบดจึงยาวกว่าท่อตรง เนื่องจากในเบดจริงจะเป็นท่อคดเคี้ยว และการใช้ค่า r_H ทำให้ค่า v' มีค่ามากขึ้น ดังนั้นตามผลการทดลองของ Blake-kozeny ค่าคงที่ควรเป็น 150

ดังนั้นสำหรับการไหลแบบราบเรียบ (laminar flow) ที่ค่า $N_{Re,P} < 10$ และ $\varepsilon < 0.5$ ให้ใช้สมการของ Blake-kozeny เพื่อคำนวนหาค่าความดันเนื่องจากความเสียดทาน (pressure drop due to friction)

$$\Delta P = 150\mu v' \Delta L(1-\varepsilon)^2 / \varepsilon^3 D_p{}^2 \qquad \text{..... (17)}$$

สำหรับการไหลแบบปั่นป่วน (turbulent flow) ในหอแพ็กเบด
จากสมการการไหลแบบปั่นป่วนในท่อ

$$\Delta P = 4f\rho \Delta L v^2 / 2D \qquad \text{..... (18)}$$

แทนค่า D และ v ในสมการ (18) จะได้ :

$$\Delta P = 3f\rho(v')^2 \Delta L(1-\varepsilon) / \varepsilon^3 D_p \qquad \text{..... (19)}$$

ในกรณีที่เป็นการไหลที่มีความปั่นป่วนสูง (highly turbulent flow) ค่าแฟกเตอร์แรงเสียดทาน (friction factor, f) มักมีค่าคงที่และถ้าเราสมมติว่าความขรุขระ (roughness) ในหอแพ็กเบดมีค่าคล้ายคลึงกัน ดังนั้นตามผลการทดลองของ Burke-Plummer จะได้ 3f เท่ากับ 1.75
ดังนั้นสำหรับการไหลแบบปั่นป่วนที่ $N_{Re,P} > 1000$ ให้ใช้สมการของ Burke-Plummer เพื่อคำนวนหาค่าความดันลด

$$\Delta P = 1.75\rho(v')^2 \Delta L(1-\varepsilon)/\varepsilon^3 D_p \qquad \text{..... (20)}$$

Ergen ได้เสนอสมการทั่วๆไป สำหรับการไหลที่มีค่า $N_{Re,P}$ (Reynolds number) ตั้งแต่ค่าต่ำจนถึงค่าสูงดังนี้

$$\Delta P = (150\mu v' \Delta L(1-\varepsilon)^2/\varepsilon^3 D_p^2) + (1.75\rho(v')^2 \Delta L(1-\varepsilon)/\varepsilon^3 D_p) \qquad \text{..... (21)}$$

จากสมการที่ 7 เขียนใหม่ให้อยู่ในไร้หน่วย (dimensionless group) ดังนี้

$$(\Delta P \rho \varepsilon^3 D_p)/(G')^2 \Delta L(1-\varepsilon) = (150/N_{Re,P}) + 1.75 \qquad \text{..... (22)}$$

เมื่อ ΔP = ความดันลด (pressure drop)

ρ_s = ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรึงรูป (true density of immobilized enzyme)

ε = ช่องว่างในเบด (void fraction of packed bed)

v = ความเร็วของของเหลวในท่อ (linear velocity of liquid)

v' = ความเร็วของของเหลวในหอแพ็ก (velocity of liquid)

μ = ความหนืดของของเหลว (liquid viscosity)

L = ความสูงของเบด (length of packed bed (column length))

D_P = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคของแข็ง (particle diameter)

G' = ปริมาณมวลที่ไหล (mass flow rate)

$N_{Re,P}$ = ค่าของ Renolds (Renolds number)

f = แฟกเตอร์แรงเสียดทาน (friction factor)

r_H = ขนาดรัศมีไฮโดรลิก (hydrolic radius)