หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 บทนำ

ในการศึกษาปฏิกิริยาเรโซลูชั่นของเมนทอลเรซิมิกด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ประกอบไปด้วยหลายปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดำเนินงาน การตรวจเอกสารจึงแบ่งการหาข้อมูลออกเป็นสี่ส่วน ในส่วนแรกจะกล่าวถึงลักษณะทั่วไปของเอนไซม์ไลเปส ส่วนที่สองกล่าวถึงวิธีตรึงเอนไซม์ ส่วนที่สามกล่าวถึงการศึกษาการปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์แบบ แพคเบด และส่วนสุดท้ายกล่าวถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการแยกเมนทอลเรซิมิกโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

2.2 ลักษณะของไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolases) มีชื่อเรียกตามระบบ Systematic name ว่า Triacylglycerol acylhydrolase และมีชื่อเรียกตามรหัสหรือตามระบบตัวเลข (Code or Number system) คือ EC 3.1.1.3 ไลเปสสามารถพบได้โดยทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไลเปสจากพืชส่วนใหญ่พบมากในเมล็ดพืชและธัญพืชที่ให้น้ำมัน เช่น ปาล์ม ละหุ่ง ถั่วเหลือง ข้าวเจ้า ข้าวโพด และข้าวสาลี ไลเปสจากสัตว์จะพบมากในตับอ่อนและน้ำนม ส่วนไลเปสจากจุลินทรีย์จะพบได้ทั้งในยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย เช่น Pseudomonas nuorescens, Mucor miehei, Aspergillus niger และ Candida cylindracea

การเกิดปฏิกิริยาโดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ สามารถจำแนกได้เป็น 3 แบบ คือปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) และปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (Tranesterification) (Cambou และคณะ , 1984, Langrand และคณะ, 1986)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

$$R_1COOR_2 + H_2O \longrightarrow R_1COOH + R_2OH$$

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาระหว่างเอสเทอร์กับน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอินทรีย์และอัลกอฮอร์ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยทั่ว ๆ ไปของ ไลเปสซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดไขมันอิสระ (Mozammel และคณะ, 1985., Kang และคณะ, 1988., Yang และคณะ,1992.)

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification)

$$R_1COOH + R_2OH \longrightarrow R_1COOR_2 + H_2O$$

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอินทรีย์กับอัลกอฮอร์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้คือเอสเทอร์กับน้ำ ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญอย่างหนึ่งของเอนไซม์ไลเปสในการผลิตเอสเทอร์ ซึ่งเป็นสารที่นำไปใช้ประโยชน์หลายชนิด เช่น เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม , เครื่องสำอาง , ยา และเชื้อเพลิง แต่การเกิดปฏิกิริยา เอสเทอริเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้นจะเกิดขึ้นในตัวกลางที่ไม่ใช่น้ำ แต่ต้องมีน้ำในปริมาณเล็กน้อยเพียงพอที่จะรักษาโครงรูปของเอนไซม์ไว้ (C. Marlot และคณะ, 1985., Carta และคณะ, 1990., Stamtis และคณะ, 1993.)

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (Tranesterification)

$$R_1COOR_2 + R_3OH \longrightarrow R_1COOR_3 + R_2OH$$

ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นเป็นปฏิกิริยาที่มีการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิล (acyl group) ของสารประกอบ เอสเทอร์ ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างเอสเทอร์กับกรดไขมันอิสระ (acidolysis) เอสเทอร์กับแอลกอฮอร์ (alcoholysis) เอสเทอร์กับเอสเทอร์ (interesterification) หรือ เอสเทอร์กับกรดอะมิโน (aminolysis) ก็ได้แล้วแต่ชนิดของสารตั้งต้น (Yamane, 1987.)

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่างเอสเทอร์กับแอลกอฮอร์ในการเรโซลูชั่นเมนทอลเรซิมิก โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มีความสามารถในการแยกสารที่มีคุณสมบัติรีจีโอซิเลคทีฟ[1](regioselective) และสเตอริโอซิเลคทีฟ [2] (Stereoselective) ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย (Cambou และคณะ, 1984., Wang และคณะ, 1988) การเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น อาจใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์หรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาก็ได้ แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยามีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ ตัวเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์คือ เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง และสามารถทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรง (Johannes Tramper, 1996) แต่เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพต้องมีการควบคุมสภาวะของระบบให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) ปัจจัยที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสอาจจำแนกได้ 3 ประการคือ ความจำเพาะของเอนไซม์ ปริมาณน้ำในระบบ และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

2.2.1 ความจำเพาะของเอนไซม์

เอนไซม์ไลเปสที่มีที่มาแตกต่างกันจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสับเสตรทที่แตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งเอนไซม์ไลเปสออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆดังต่อไปนี้

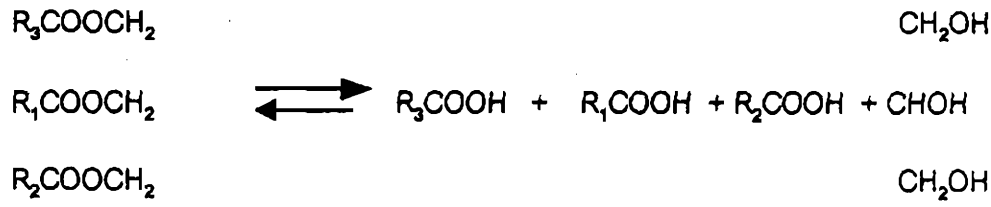
2.2.1.1 ความไม่จำเพาะต่อตำแหน่ง (Nonspecific lipase)

ในการเกิดปฏิกิริยาของโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล ปฏิกิริยาจะดำเนินไปแบบสุ่ม จะมีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลได้ทุกตำแหน่งบนไตรเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ไลเปสจาก Corynebaterium acnes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens และ Geotrichum candidum

---

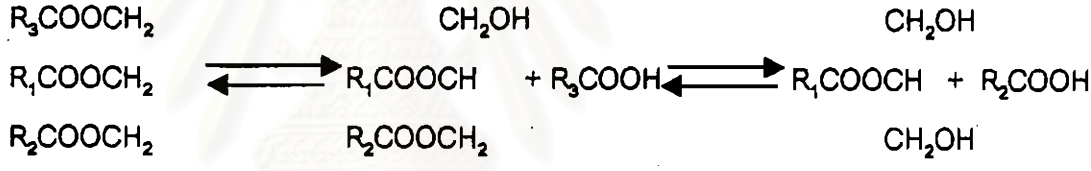
[1] รีจีโอซิเลคทีฟ เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีความแตกต่างในกลุ่มฟังก์ชัน (function group) ของสารที่มีสูตรโมเลกุลเหมือนกัน (Faber, 1955.)

[2] สเตอริโอซิเลคทีฟ เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีความแตกต่างของคู่ไอโซเมอร์ในการจัดตัวของอะตอมในระนาบโดยจะมีเพียงไอโซเมอร์เดียวที่เกิดปฏิกิริยาได้เร็ว หรือถูกย่อยสลายได้ง่าย (Parker, 1984.)



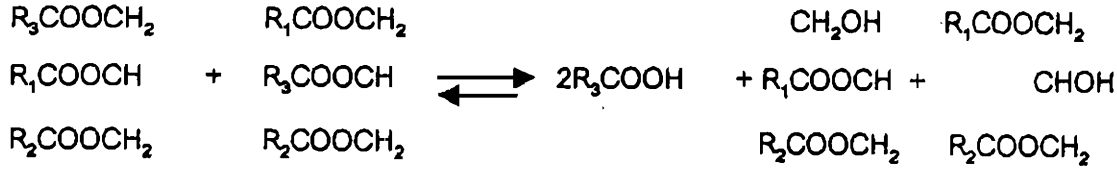
2.2.1.2 ความจำเพาะตำแหน่ง1,3 ของโมเลกุลไตรเอซิลกลีเซอรอล(1,3-specific lipase)

ไลเปสอีกพวกหนึ่งพบว่า มีการแลกเปลี่ยนหมู่เอซิลที่ตำแหน่ง 1 และ 3 เท่านั้น ส่วนตำแหน่งที่ 2 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ไลเปสในกลุ่มนี้ได้แก่ Aspergillus niger, Mucor javanicus, Mucor miehei, Rhizopus arrhizus และ Rhizopus delemar



2.2.1.3 ความจำเพาะต่อกลุ่มไขมัน (Fatty acid specific lipase)

เป็นความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่มีต่อกลุ่มไขมันคือ โมโน หรือ ไดหรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไลเปส เช่น ไลเปสจาก Penicillium cyclopium เร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล แต่ถ้าเร่งได หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ความสามารถในการเร่งจะลดต่ำลง หรือไลเปสจาก Geotricbum candidium จะเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดเมื่อสารตั้งต้นเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล แต่ถ้าสารตั้งต้นเป็นโมโน หรือ ไดเอซิลกลีเซอรอล การเร่งปฏิกิริยาจะลดต่ำลง



2.2.1.4 ความจำเพาะต่อสารสเตอรีโอเคมี (Stereospecificity)

เอนไซม์มีความจำเพาะต่อชนิดของสเตอรีโอเคมี คือต่อ racemic mixture ของกรดหรือแอลกอฮอล์เฉพาะต่อ R - หรือ S- enantiomers หรือ D- หรือ L- enantiomers รูปแบบใดรูปแบบหนึ่งจึงสามารถผลิตไอโซเมอร์เชิงแสง (Optical Isomer) ที่มีความบริสุทธิ์สูง เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก Candida cylindracea Bernard และ Klibanov (1984) พบว่า ไลเปสจาก Candida cylindracea มีความจำเพาะต่อ (R) – 2 -(p – chlorophenoxy) propionic acid โดยไม่ทำปฏิกิริยากับ (S) – methyl 2 - (p – chlorophenoxy) propionate และมีความจำเพาะต่อ (R) – butyl 2 - (p – chlorophenoxy) propionate แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับ (S) – methyl 2 - (p – chlorophenoxy) propionate Lokotsch และคณะ (1989) ทำการศึกษาการเรโซลูชั่นของ (D,L) เมนทอลพบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea จะทำปฏิกิริยาเฉพาะ (D)– เมนทอล แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ (L)– เมนทอล

$$(D,L)\ R_1OH + R_2COOR_3N \rightleftharpoons (D)\text{-}R_2COOR + (L)\text{-}R_1OH + R_3OH$$

สำหรับแหล่งของไลเปสที่น่าจะมีความเหมาะสมในการใช้เร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น เพื่อการเรโซลูชั่นเมนทอลเรซิมิกคือ ไลเปสจากCandida cylidracea ปัจจุบันได้เปลี่ยนมาใช้ชื่อใหม่ว่า Candida rugosa (G. Langrand และคณะ, 1988., Mary Welch Baillargeon และคณะ,1988., Maria V. Calvo และคณะ, 1995) เนื่องจากพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากCandida cylindracea จะให้ค่ากิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น ๆ (Lisa N. Yee และคณะ, 1995., Noriho Kamiya และคณะ, 1995.) อีกทั้งเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ยังเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในการแยกสารผสมเรซิมิก (Cambou และ Klibanov, 1984., Kirchner และคณะ, 1985., Fritsche และคณะ, 1989., Parida และ Dordick, 1990) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสารเสตอริโอเคมีสูง และยังเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันมากในภาคอุตสาหกรรม จึงสามารถหาได้ง่าย ซึ่งผลของชนิดของเอนไซม์ต่อค่ากิจกรรมแสดงได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสต่อค่ากิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยา

ผู้ทำงานวิจัย	ปฏิกิริยาที่ศึกษา	แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	ผลการศึกษา	
			Conversion (%)	Initial rate µmol/l.hr
Kamiya และคณะ (1995)	เอสเทอร์ฟิเคชั่น	Candida cylinddracea	19.	-
		Rhizopus sp.	8	-
		Pseudomonas sp.	2	-
		Mucor javanicos	1	-
		Aspergillus niger	0.5	-
		Porcine pancreas	0.5	-
อานนทพัฒน์ (2541)	ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น	Candidacylindracea	-	26.46
		Porcine pancreas	-	0.64
		Hog pancreas	-	0.46

2.2.2 ปริมาณน้ำ

น้ำเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญอย่างมากในด้านการทำงานของเอนไซม์ทั้งในด้านการรักษาสภาพแบบตามธรรมชาติของเอนไซม์ อีกทั้งน้ำจะเข้าร่วมทั้งโดยทางตรงและทางอ้อมกับพันธะต่างๆของเอนไซม์ เช่น ไฮโดรโฟบิกอินเทอร์แอกชั่น (hydrophobic interaction) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงแวนเดอวาลล์ (Van der Waal interaction) การกำจัดน้ำออกจากระบบโดยสิ้นเชิงจะทำให้เกิดการบิดทำลายโครงสร้างของเอนไซม์อย่างรุนแรง อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) และไม่สามารถทำงานได้ (Klibanov, 1986) จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ต้องการน้ำล้อมรอบโมเลกุลในระดับชั้นโมเลกุลเดียว เพื่อรักษาสภาพในการทำงาน และสามารถที่จะควบคุมให้กลุ่มที่มีประจุของเอนไซม์มีสภาวะอิออไนเซชั่น (ionization state) ให้ประจุที่เหมาะสมในการทำงาน อีกทั้งน้ำยังทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายอินทรีย์สัมผัสกับเอนไซม์โดยตรงทำให้ลดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ ซึ่งผลของปริมาณน้ำที่เหมาะสมในระบบต่อปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งแสดงได้ดังตารางที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ผลของปริมาณน้ำที่เหมาะสมในระบบต่อปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่ง

ผู้ทำงานวิจัย	ชนิดของปฏิกิริยา	แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	ชนิดของตัวยุง	ปริมาณน้ำในระบบ (%v/v)
Hansen และคณะ (1989)	อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่น	Mucor mishei	Resin	11
Kosugi และคณะ (1987)	เอสเทอริฟิเคชั่น	Rhizupus nireus	Dowex MWA-1	1
	เอสเทอริฟิเคชั่น	Pseudomonas mepihitica	Dowex MWA-1	2.2
	เอสเทอริฟิเคชั่น	Chromobacterium Viscosume	Dowex MWA-1	1.1
Lokost และคณะ (1989)	อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่น	Candida cylindracea	Lichrosob	6
Marty และคณะ (1991)	เอสเทอริฟิเคชั่น	Mucor miehei	Anionic resin	10
พรทิพา (2538)	เอสเทอริฟิเคชั่น	Candida cylindracea	Celite	10

2.2.3 ตัวทำละลายอินทรีย์

เนื่องจากโดยทั่วไปสารตั้งต้นจะไม่ละลายในน้ำแต่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์แทน และการเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นของเอนไซม์ไลเปสนั้นต้องการน้ำในระบบน้อยมาก ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แทนน้ำย่อมเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ยังมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้น้ำหลายประการ คือ ประการแรกตัวทำละลายอินทรีย์จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ประการที่สองสามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่าย และประการสุดท้ายสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่สามารถทำลายเอนไซม์ได้อีกด้วย

ในการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ให้เหมาะสมสิ่งที่นำมาพิจารณาคือสมบัติการมีขั้วของสับเสตรทกับผลิตภัณฑ์ซึ่งแสดงให้ทราบถึงความสามารถในการละลายของสารตั้งต้นกับผลิตภัณฑ์ (Reslow และคณะ, 1987) และผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อการรักษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ซึ่งจะส่งผลในการยับยั้ง หรือ ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพทางธรรมชาติ แต่ค่าที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดคือค่า log P (Laane และคณะ, 1987) โดย P คือค่า partitioning ของตัวทำละลายในระบบที่ประกอบด้วยสองเฟส (phase) ระหว่างน้ำกับอ็อคทานอล (octanol) ค่า log P เป็นตัวบ่งชี้ความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ จากค่า log P แบ่งเป็นตัวทำละลายได้ 3 กลุ่ม ตามผลที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ กลุ่มแรกคือ กลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log p < 2 เป็นตัวทำละลายชนิดมีขั้วทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมต่ำและเป็นพิษต่อเอนไซม์ กลุ่มที่สอง มีค่า log P อยู่ในระหว่าง 2 ถึง 4 เป็นตัวทำละลายที่ใช้กันอย่างกว้างขวางเช่น เฮปเทน (log P = 4) และกลุ่มสุดท้าย มีค่า log P > 4 ซึ่งจัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ไม่มีขั้วจึงมีคุณสมบัติในการละลายสับเสตรทที่ไม่มีขั้วได้เป็นอย่างดี ซึ่งค่า log Pในกลุ่มที่ 2 และ3 มีการนำมาใช้งานกันมาก(Tramper, 1996) ผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ ที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์แสดงได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ผู้ทำงานวิจัย	ชนิดของปฏิกิริยา	แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ (ค่าlog P)	ผลการศึกษา	
				Relative Activity (%)	Initial rate µmol/l.hr
Goto และคณะ (1994)	เอสเทอริฟิเคชั่น	Pseusomonas sp.	Iso-ocatane (4.5)	100	-
			Cyclohexane (3.2)	80	-
			n-dodecane (6.6)	70	-
			n-hexane (3.5)	30	-
			benzene (2.0)	13	-
			toluene (2.5)	3	-
Kamiya และคณะ (1995)	เอสเทอริฟิเคชั่น	Candida cylindracea	Iso-octane (4.5)	100	-
			heptane (4.0)	50	-
			n-hexane (3.5)	35	-
			cyclohexane (3.2)	60	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 ต่อ

ผู้ทำงานวิจัย	ชนิดของปฏิกิริยา	แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ (ค่าlog P)	ผลการศึกษา	
				Relative activity (%)	Initial rate µmol/l.hr
อานนทพัฒน์ (2541)	ทรานเอสเทอริฟิเคชัน	Candida cylindracea	Iso-octane (4.5)	-	45.07
			heptane (4.0)	-	36.88
			n-hexane (3.5)	-	22.39
			cyclohexane (3.2)	-	31.23
			benzene (2.0)	-	11.62

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ไอโซออกเทน (Isooctane) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีในไอโซออกเทน ไอโซออกเทนมีค่า log P เท่ากับ 4.5 ซึ่งแสดงถึงการเป็นตัวทำละลายเรซิมิกเมนทอลและเฮกซิลอะซิเตดซึ่งเป็นสับเสตรทได้เป็นอย่างดี ไม่เป็นพิษต่อเอนไซม์ และให้ยังค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงอีกด้วย (Chen และคณะ , 1987., Sohn และคณะ, 1987., Kang และ Rhee, 1988.,Yang และ Rhee, 1991., Goto และคณะ, 1994)

2.3 การตรึงเอนไซม์

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึงเอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ได้เลย โดยเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปนี้จะสามารถนำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้ และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำหลายครั้งอย่างต่อเนื่อง ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการตรึงรูปเอนไซม์ได้แก่วิธีในการตรึงรูปเอนไซม์แสดงได้ดังตารางที่2.4

ตารางที่ 2.4 วิธีการตรึงรูปและแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป

ผู้ทำงานวิจัย	แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	วิธีการตรึงรูป	ชนิดของตัวพยุง	แอคติวิตีที่เหลือ (%)
Lavayreและคณะ (1982)	Pancreas	ดูดซับทางกายภาพ	Spherosil	17.0
Yokozeki และคณะ (1982)	R. delemar	เชื่อมแบบพันธะไอออนิก	Spherosil QMA	28
	R. delemar	ดูดซับทางกายภาพ	Spherosil XOB15	16
	R. delemar	เชื่อมแบบพันธะโคเวเลนท์	Spherosil XOB15	9
Kimura และคณะ (1983)	Candida cylindrac	ดูดซับทางกายภาพ	Celite	21.7
	Candida cylindrac	เชื่อมแบบพันธะโคเวเลนท์	CPG-carbodiimide	5.6
	Candida cylindrac	เชื่อมแบบพันธะโคเวเลนท์	ENTP	6.8-10.3

ตารางที่ 2.4 ต่อ

ผู้ทำงานวิจัย	แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส	วิธีการตรึงรูป	ชนิดของตัวพยุง	แอคติวิตีที่เหลือ (%)
Tahoun และคณะ (1986)	Candida cylindracea	ห่อหุ้มแคปซูล	Polyacrylamide	29.0-30.8
Brady และคณะ (1988)	Candida cylindracea	ดูดซับทางกายภาพ	Ethyl cellulose	52
	Candida cylindracea	ดูดซับทางกายภาพ	Carbon	12
	Candida cylindracea	ดูดซับทางกายภาพ	Porous PP	88
	Candida cylindracea	ดูดซับทางกายภาพ	Nonporous PP	14
	Candida cylindracea	ดูดซับทางกายภาพ	Porous PP membrane	85
Kang และคณะ (1988-1989)	Candida rugosa	ดูดซับทางกายภาพ	Sephadex LH	16-18
Pronk และคณะ (1988)	Candida rugosa	ดูดซับทางกายภาพ	Cellulose	14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าในการตรึงรูปเอนไซม์แม้จะใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกัน แต่วิธีการตรึงรูปเอนไซม์และชนิดของตัวพยุงต่างกัน ก็จะให้ค่าแอคติวิตีที่แตกต่างกัน หรือ แม้แต่การใช้ตัวพยุงชนิดเดียวกัน แต่วิธีในการตรึงรูปเอนไซม์ต่างกันก็จะให้ค่าแอคติวิตีที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าวิธีในการตรึงรูปเอนไซม์มีด้วยกันหลายวิธี แต่ไม่มีวิธีใดที่สามารถใช้ในการตรึงเอนไซม์ได้ทุกกรณี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านองค์ประกอบของโครงสร้าง และสมบัติทางเคมี รวมถึงความแตกต่างกันของสับเสตรทและผลิตภัณฑ์ วิธีการตรึงเอนไซม์แต่ละวิธีจะมีขีดจำกัดและความเหมาะสมแตกต่างกันไป ในการประยุกต์เทคนิคการตรึงเอนไซม์ไปใช้งานมีหลักที่ต้อง พิจารณา 4 ข้อด้วยกัน

1. ความสะดวกในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์
2. ต้นทุนในการผลิตต่ำ
3. รักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้มากที่สุด
4. มีความเสถียรในระหว่างการใช้งาน

ในตารางที่ 2.5 ได้แสดงข้อเปรียบเทียบสมบัติและลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูป รวมทั้งราคาและการประยุกต์ใช้งานของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีต่างๆกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 ข้อเปรียบเทียบของเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยเทคนิคต่างๆ

ข้อเปรียบเทียบ	เทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์				
	การเชื่อมไขว้	การดูดซับ	การยึดด้วยพันธะไอออนิก	การยึดด้วยพันธะโคเวเลนท์	การดักจับและห่อหุ้มแคปซูล
วิธีเตรียม	สะดวกพอสมควร	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
แรงยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง	แข็งแรง	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	ปานกลาง
แอคติวิตีของเอนไซม์	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	สูง	สูง
การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่	ไม่ได้	ได้	ได้	ได้น้อยมาก	ไม่ได้
ต้นทุนในการตรึง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	สูง	ปานกลาง
ความเสถียรของเอนไซม์ตรึง	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	ปานกลาง
การประยุกต์ใช้งานทั่วไป	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้	ได้
ป้องกันการสลายของเอนไซม์ด้วยจุลลินทรีย์	ได้น้อยมาก	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 2.5 แสดงให้เห็นว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมี เช่น การเชื่อมไขว้และการสร้างพันธะโคเวเลนท์จะทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ซึ่งจะส่งผลกระทบถึงการเปลี่ยนรูปร่างของโครงสร้างและลดแอคติวิตีบางส่วนของเอนไซม์ ดังนั้นเพื่อที่จะลดปัญหาเหล่านี้จะต้องใช้สภาวะในการตรึงรูปเอนไซม์ที่ไม่รุนแรง แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะมีเสถียรภาพสูงในระหว่างการใช้งาน เนื่องจากมีพันธะที่แข็งแรงเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับเอนไซม์ หรือ เอนไซม์กับตัวพยุง โดยปกติจะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีนี้มีคุณสมบัติไม่คงทนต่อแรงกระทบ ส่วนเอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีทางกายภาพได้แก่ การดูดซับ การสร้างพันธะไอออนิก จะมีวิธีในการตรึงเอนไซม์ที่ไม่ยุ่งยาก และใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงแต่เอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้บนตัวพยุงจะหลุดได้ในระหว่างการใช้งานในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความเข้มข้นของไอออนในสารละลาย ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์ตรึงด้วยวิธีทางกายภาพจะมีแรงยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่ค่อนข้างอ่อนเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมี นั่นคือเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยวิธีนี้จะมีแอคติวิตีสูงในช่วงแรกของการใช้งานและจะลดลงตามระยะเวลาในการใช้งานเนื่องจากมีการหลุดของเอนไซม์ออกจากตัวพยุง ส่วนตัวพยุงที่ใช้ตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จะสามารถนำกลับคืนมาใช้งานได้อีกโดยง่าย ไม่ว่าจะเป็นตัวพยุงที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ การตรึงเอนไซม์อีกวิธีหนึ่งซึ่งเป็นวิธีสุดท้าย คือการดักจับและห่อหุ้มแคปซูล เอนไซม์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จะมี แอคติวิตีใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ (ในทางทฤษฎี) เพราะไม่มีพันธะใดๆเกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง แม้ว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จะรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้สูงมาก แต่เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะมีขอบเขตจำกัดในการใช้งาน โดยจะใช้งานได้ดีในกรณีที่มีสับเสตรทและสารผลิตภัณฑ์มีมวลโมเลกุลต่ำๆ เพราะถ้าใช้สารที่มีมวลโมเลกุลสูงจะทำให้เกิดแรงต้านทานการส่งผ่านสารเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้

2.4 ถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (Packed bed หรือ Fixed bed Reactor)

จุดประสงค์ข้อหนึ่งในการตรึงเอนไซม์คือ เพื่อพัฒนาไปสู่กระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ด้วยเหตุนี้จึงนำไปสู่กระบวนการผลิตในถังปฏิกรณ์ ในการเลือกใช้ก็ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการใช้งาน ราคา เสถียรภาพของเอนไซม์ รวมถึงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วย ถังปฏิกรณ์แบบแพคเบดนี้เป็นถังปฏิกรณ์ที่นิยมใช้กันมากในงานอุตสาหกรรม และงานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เนื่องจากเป็นถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตขนาดใหญ่ มีประสิทธิภาพในการผลิตสูง เพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสในการเกิดปฏิกิริยาต่อหน่วยปริมาตรสูง สามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเอนไซม์ได้ง่าย ปราศจากแรงกลที่ทำให้ความคงทนในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง ราคาพอสมควร สะดวกในการจัดสร้างและใช้งาน (Abdul Mazid,1993)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปีค.ศ 1992 Yang และ Rhee ได้ทำการศึกษาเสถียรภาพของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอก โดยทำการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก Candida rugosa ระบบนี้เป็นระบบสองเฟส คือเฟสของบัฟเฟอร์และเฟสของตัวทำละลายอินทรีย์ ทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด ผลของการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากขึ้นจะทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เช่นที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกร้อยละ 5 จะให้ค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 25 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 10 ค่าครึ่งชีวิตเพิ่มเป็น 60 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 20 ค่าครึ่งชีวิตจะเพิ่มเป็น 220 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นเกินร้อยละ 20 ได้เนื่องจากน้ำมันมะกอกจะมีความหนืดซึ่งจะเป็นการเพิ่มความดันตก และในปีค.ศ 1996 Shin และคณะ ทำการศึกษาการย่อยสลายเบนซัลดีไฮด์ ไปเป็น L-Phenylacetate (L-PAC) โดยทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก Candida utilis บนตัวพยุง Pyruvate Decarboxylase ซึ่งเป็นเรซินแลกเปลี่ยนไอออนทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด โดยป้อนสารตั้งต้น 50 มิลลิโมลาร์ ของเบนซัลดีไฮด์ และ 100 มิลลิโมลาร์ ของโซเดียมไพรูเอท เข้าไปในถังปฏิกรณ์ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหล 3.7 มิลลิโมลต่อชั่วโมง พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ L-Phenylacetate (L-PAC) 30 มิลลิโมลาร์ และมีค่าครึ่งชีวิตนานถึง 32 วัน และในปี พ.ศ 2538 รุ่งรัตน์ ได้ทำการศึกษาการย่อยสลายเพกตินด้วยเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปบน เรซินแลกเปลี่ยนไอออนในถังปฏิกรณ์แบบเพคเบดโดยคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตรและมีความสูง 30 เซนติเมตร พบว่าอัตราการป้อนสารตั้งต้นที่สูงขึ้นจะทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายสารตั้งต้นและความดันลดเพิ่มขึ้น อัตราเร็วในการป้อนที่เหมาะสมคือ 40 มิลลิลิตรต่อนาทีจะให้ปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลายสูงสุด 17.7 กรัม สามารถย่อยสลายสารละลายเพกตินภายในเวลา 45 นาทีโดยไม่สูญเสียค่ากิจกรรมเลยและเมื่อเวลาผ่านไป 150 นาที ค่ากิจกรรมจะเหลืออยู่ร้อยละ 80 ของค่า กิจกรรมเริ่มต้น

2.5 ปฏิกิริยาการแยกเมนทอลเรซิมิกโดยใช้เอนไซม์ไลเปส

ในงานวิจัยเรื่องปฏิกิริยาการแยกของเมนทอลเรซิมิกโดยใช้เอนไซม์ไลเปส มีผู้รายงานไว้ไม่มากนัก ในปีค.ศ 1989 Lokotsh และคณะ ศึกษาการเรโซลูชั่น D, L-เมนทอล โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยการศึกษาทั้งในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น,ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่น และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นในการศึกษาวิจัยในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่นของ D,L-เมนทอลกับไตรอะซิตินซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เอซิล (acyl donor)

ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไลเปสจะมีความจำเพาะต่อ (L)-เมนทอล โดยมุ่งที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะแต่ (L)-เมนทอล ปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิผลต่อปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่นได้แก่ อุณหภูมิโดยศึกษาอุณหภูมิในช่วง 37 องศาเซลเซียส ถึง 100 องศาเซลเซียสพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียค่ากิจกรรมในการทำงาน และจะเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่ในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่นเอนไซม์สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 90 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่นคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและยังพบอีกว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมในระบบนี้มีปริมาณร้อยละ 6 ซึ่งถ้าเราเพิ่มปริมาณน้ำเข้าไปอีกจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดต่ำลง เพราะทำให้สมดุลของระบบเปลี่ยนไปทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และยังพบอีกว่าหมู่ที่ให้เอซิลที่มีความยาวสายโซ่มากจะให้ค่ากิจกรรมที่สูง ในปี พ.ศ 2540 บุญชัยได้ศึกษาวิจัยการประยุกต์ใช้ระบบรีเวิร์สไมเซลล์สำหรับปฏิกิริยาที่ใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพเพื่อแยกเรซิมิกเมนทอล โดยทั่วๆไปลักษณะการทำงานของระบบรีเวอร์สไมเซลล์คือสารตั้งต้นสามารถที่จะละลายเข้าไปในเฟสแพร่กระจายและทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในหยดน้ำของรีเวอร์สไมเซลล์ ข้อได้เปรียบของการใช้ระบบรีเวอร์สไมเซลล์เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาคือเป็นระบบที่มีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเฟสมาก ทำให้อัตราการถ่ายเทมวลระหว่างเฟสสูง ปฏิกิริยาเกิดบนพื้นที่ผิวมีได้มาก อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงสูง จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์จาก Candida cylindracea เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบรีเวอร์สไมเซลล์ของ SDEHP / น้ำ / ไอโซออกเทน คือสัดส่วนเชิงโมลของน้ำต่อSDEHP (W_o) เท่ากับ1.22, ความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลเท่ากับ 38 มิลลิโมลาร์, มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.7 และอุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 33.9 องศาเซลเซียส ในการศึกษากลไกในการทำงานของการเกิดปฏิกิริยาพบว่าเป็นกลไกแบบแรนดอม ไบ-ไบซึ่งสามารถหาค่าคงที่ทางจลนพลศาตร์ (Kinetic constant) ของระบบนี้ได้ดังนี้คือ

$$\frac{1}{V} = \frac{75.6}{[A][B]}\left(1+\frac{[B]}{2.5}\right) + \frac{0.23}{[B]}\left(1+\frac{[A]}{11.3}\right) + 0.07$$

ในปีพ.ศ 2541 อานนทพัฒน์ได้ทำการศึกษาการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสในระบบตัวทำละลายน้ำ/ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทำการศึกษาการถึงแหล่งของไลเปสที่เหมาะสม 3 ชนิดในการแยกเรซิมิกเมนทอลคือเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ,Porcine pancreasและ Hog pancreas ซึ่งจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea จะให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดและเมื่อศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนหมู่เอซิล 3 ชนิดคือ Ethyl acetate, Butyl acetateและ Hexyl acetate พบว่า Hexyl acetate จะให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุด เนื่องจากพบว่าการที่หมู่เอซิลมีความยาวของสายโซ่มากจะให้ค่ากิจกรรมมากขึ้นตามไปด้วยและเมื่อศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้เท่ากับ 8 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลเท่ากับ 73 มิลลิโมลาร์, ความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตตเท่ากับ 360 มิลลิโมลาร์ , โดยใช้ความเร็วรอบในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 110 รอบต่อนาทีและใช้อุณหภูมิในการเร่งปฏิกิริยา 66 องศาเซลเซียสซึ่งที่สภาวะดังกล่าวจะให้ค่าคอนเวอร์ชั่นสุดท้าย (% Final conversion) เท่ากับร้อยละ 27.12 และในส่วนของกลไกการทำงานของปฏิกิริยาเป็นแบบแรนดอม ไบ-ไบ ซึ่งมีค่าคงที่ทางจลนพลศาตร์(Kinetic constant) ของระบบดังนี้

$$V = \frac{100.28\,[A]\,[B]}{2066.4 + 8.42\,[A]\left(1+\frac{[A]}{481.9}\right) + 33.92\,[B]\left(1+\frac{[B]}{51.19}\right) + [A]\,[B]}$$

เมื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมของระบบ SDEHP/ไอโซออกเทน รีเวอร์สไมเซลล์กับระบบตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อพิจารณาในแง่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะและเปอร์เซ็นต์การเกิดปกิกิริยาเมื่อเทียบกับเรซิมิกเมนทอล พบว่าระบบตัวทำละลายอินทรีย์จะมีความเหมาะสมกว่า ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะสำหรับเอนไซม์ไลเปสในระบบรีเวอร์สไมเซลล์อาจไม่เหมาะสมในแง่ของแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลของน้ำ,เอนไซม์และส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำกว่าในระบบตัวทำละลายอินทรีย์