บทที่ 5

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในการศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเพื่อเรโซลูชั่นเรซิมิกเมนทอล ได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกจะเป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ โดยการศึกษาตัวแปรต่างๆ ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ , ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูป และ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ ในขั้นตอนที่สองจะศึกษาถึงจลนพลศาสตร์รวมถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ และในขั้นตอนสุดท้ายจะศึกษาถึงการทำปฏิกิริยาในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด โดยศึกษาถึงผลกระทบของอัตราการไหลของสับเสตรทต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ และศึกษาถึงเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด

5.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea เพื่อนำไปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ระหว่างเรซิมิกเมนทอลกับเฮกซิลอะซิเตต เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์จะส่งผลต่อทั้งปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดอยู่บนตัวพยุง และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการตรึงเอนไซม์คือ เวลา, ความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ การควบคุมสภาวะต่างๆเหล่านี้ให้เหมาะสมจะช่วยให้มีการดูดซับเอนไซม์บนตัวพยุงได้ดี และยังคงมีความสามารถที่จะรักษาอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปไว้ได้

5.1.1 ผลของเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์

ในการทดลองชุดนี้ทำการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea บนตัวพยุงเรซินแลกเปลี่ยนไอออน Dowex MWA-1 จำนวน 5 กรัม ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการแปรเปลี่ยนค่าเวลาในการตรึงรูปเอนไซม์ตั้งแต่ 1 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้น

นำเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไปเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อหาค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป ดังแสดงไว้ในหัวข้อ 4.3.3

เวลาที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์จะมีผลต่อเอนไซม์ทั้งในด้านความสามารถในการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อทำการวัดปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงหลังจากการตรึงรูปเอนไซม์ ด้วยวิธีการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยเครื่องเสปคโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการตรึงรูป และเมื่อทำการวัดปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงหลังจากการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีชั่งน้ำหนักตัวพยุงหลังการตรึงรูป ผลที่ได้จากการวิเคราะห์สารตัวอย่างเดียวกันโดยวิเคราะห์สองวิธี จะได้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน แต่ผลการทดลองที่ได้จากทั้ง 2 วิธีมีค่าไม่เท่ากันโดยมีค่าเฉลี่ยของความแตกต่างเท่ากับร้อยละ 34 เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงได้ดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงหลังการตรึงรูป

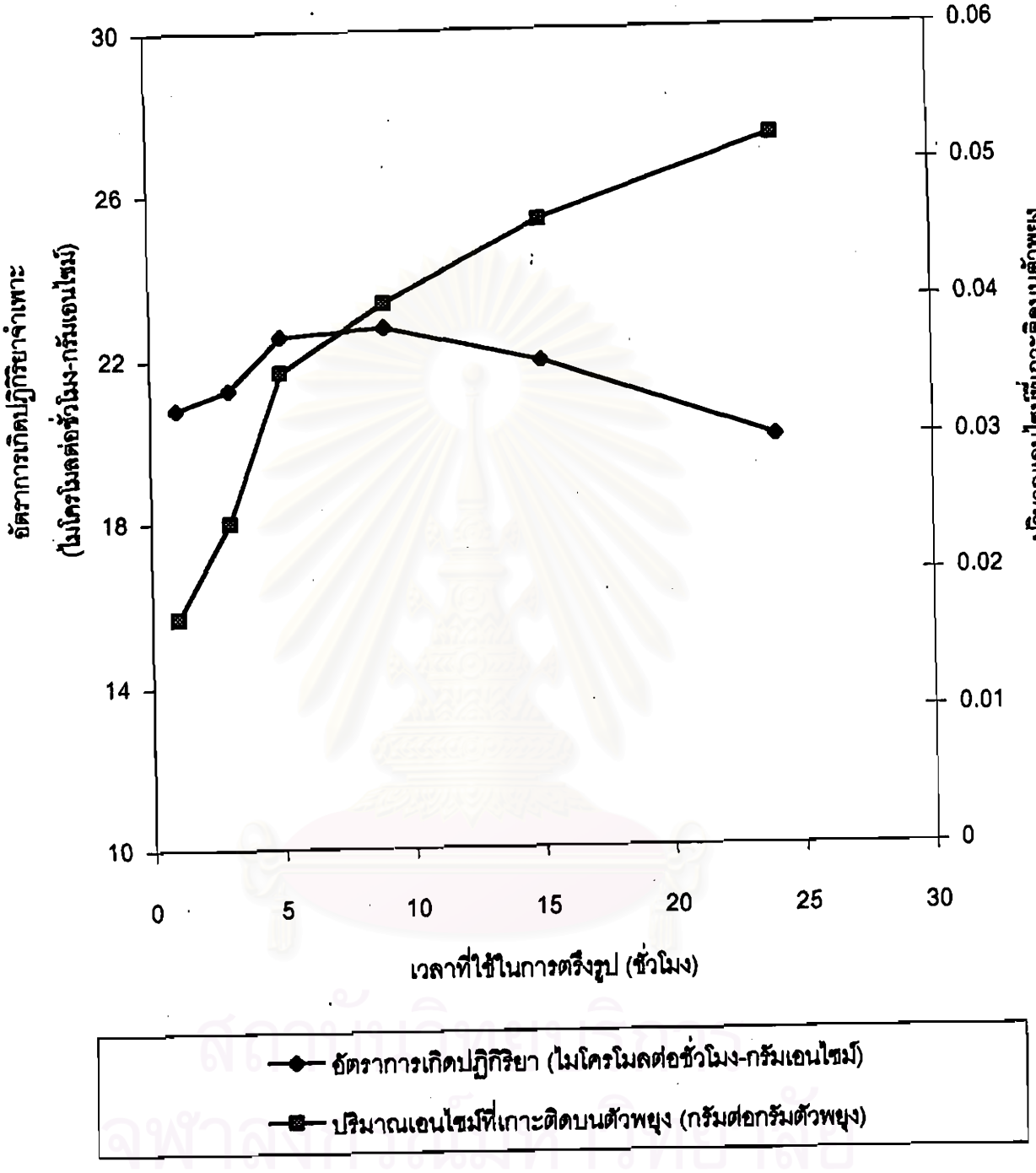
เวลาที่ใช้ในการตรึงรูป (ชั่วโมง)	ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุง ด้วยเสปคโตโฟโตมิเตอร์ (กรัมเอนไซม์)	ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุง ด้วยวิธีการชั่งน้ำหนัก (กรัมเอนไซม์)
1	0.09	0.10
3	0.13	0.17
5	0.18	0.24
9	0.23	0.28
15	0.26	0.32
20	0.28	0.36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อพิจารณาผลของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่อเวลาในการตรึงรูปเอนไซม์ จะเห็นได้ว่าในช่วง 1 ชั่วโมง ถึง 5 ชั่วโมง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปจะมีค่าเพิ่มขึ้น และจะคงที่ในช่วง 5 ชั่วโมง ถึง 9 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้เวลาในการตรึงรูปเอนไซม์มากกว่า 9 ชั่วโมง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลง ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการตรึงเอนไซม์เป็นเวลานาน ๆ ด้วยวิธีการกวนโดยเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) จะทำให้เกิดแรงเฉือน (shear force) กับเอนไซม์ มีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เอนไซม์นั้นมีโครงรูปที่จับกับสับเสตรทได้ไม่พอดี การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์-สับเสตรท (Enzyme-Substrate Complex,ES) ไม่สอดคล้องกัน มีผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง หรืออาจจะเป็นผลมาจากการที่มีปริมาณเอนไซม์เกาะติดบนตัวพยุงกันอย่างหนาแน่น ทำให้หมู่ในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ถูกบดบัง (steric hindrance) ด้วยโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยกันเองมีผลให้เอนไซม์จับกับสับเสตรทได้ยากขึ้น ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง แสดงได้ดังรูปที่ 5.1

สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองแล้วจึงเลือกใช้เวลาในการตรึงรูปเอนไซม์ที่ 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปค่อนข้างสูง และอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะเริ่มคงที่ อีกทั้งยังเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมไม่นานจนเกินไป เนื่องจากวิธีการตรึงรูปเอนไซม์มีการกวน อาจจะส่งผลกระทบต่อหมู่ในบริเวณเร่งของ (active site) ของเอนไซม์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยที่ใช้ตัวพยุง Dowex MWA-1 เหมือนกันโดย รุ่งรัตน์ (2538) พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์เพคติเนสคือ 4 ชั่วโมงเนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีค่าแอคติวิตีที่สูงและค่อนข้างคงที่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



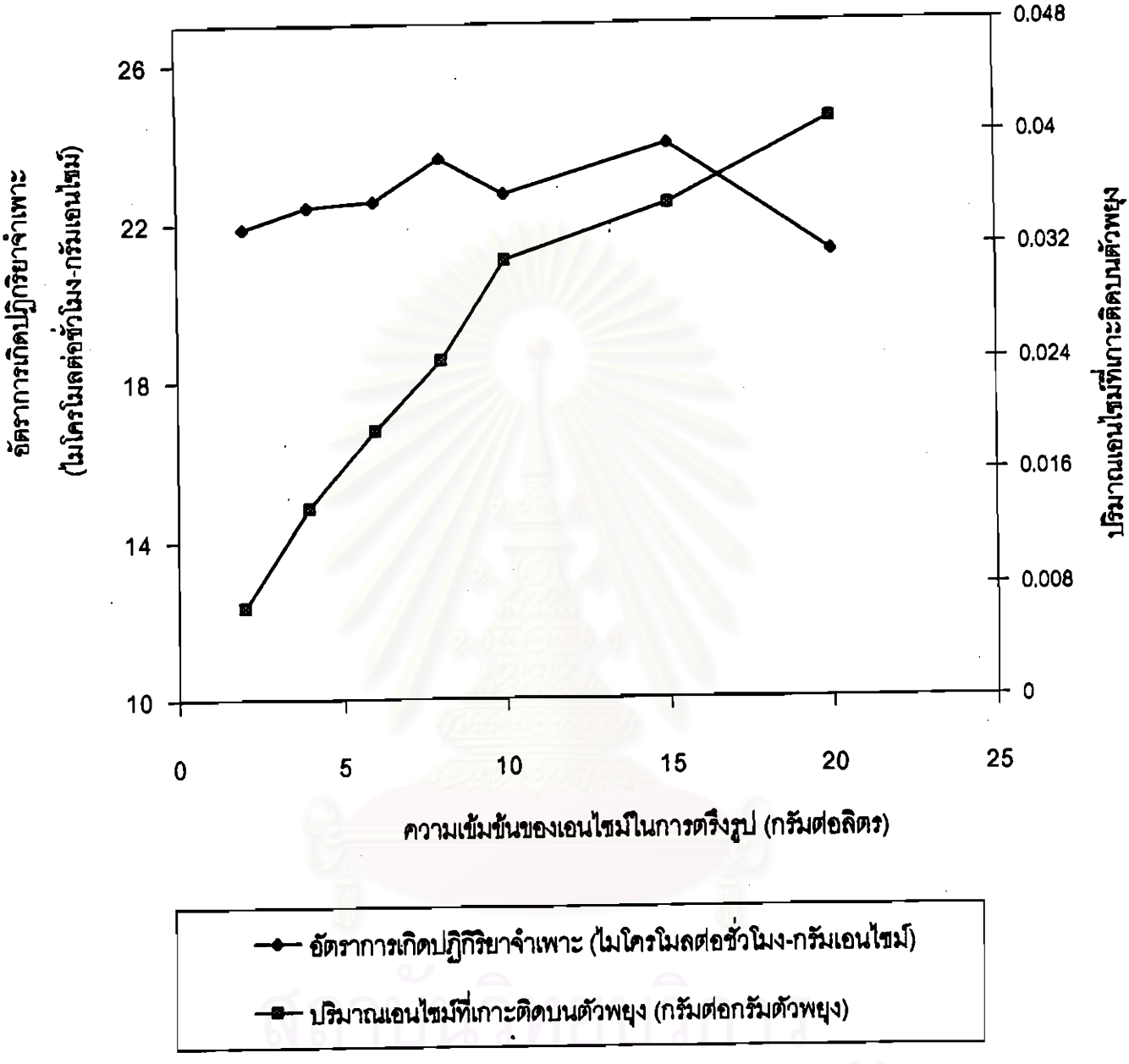
รูปที่ 5.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ต่อค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป และ ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุง ความเข้มข้นของสับเสตรทที่ใช้เรซิมิกเมนทอล 0.06 โมลาร์ และเฮกซิลอะซิเตต 1 โมลาร์ ผลการทดลองที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ชุดการทดลองที่สภาวะเดียวกัน

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์

ในการทดลองชุดนี้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ในสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อการตรึงรูปเอนไซม์บนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน Dowex MWA-1 จำนวน 5 กรัม ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยทำการแปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ตั้งแต่ 2 ถึง 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปไปเร่งปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปดังแสดงไว้ในหัวข้อ 4.3.3

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงจะเพิ่มมากขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่า 10 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงจากกราฟจะยังเห็นว่าปริมาณเอนไซม์ที่เกาะยังคงเพิ่มขึ้นแต่ในอัตราที่ลดลง ซึ่งแสดงว่าระบบมีแนวโน้มเข้าสู่สภาวะสมดุลระหว่างเฟส และเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ในช่วง 2 กรัมต่อลิตร ถึง 15 กรัมต่อลิตร อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่า 15 กรัมต่อลิตร อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าลดลง แสดงได้ดังรูปที่ 5.2 เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงแปรตามปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เพิ่มมากขึ้น แต่จากผลการทดลองเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงมากกว่า 0.040 กรัมต่อกรัมตัวพยุง จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 5.1.1 แสดงดังรูปที่ 5.1 ซึ่งเป็นผลมาจากการที่มีปริมาณเอนไซม์เกาะติดอยู่เป็นจำนวนมากบนพื้นที่ผิวสัมผัสของตัวพยุงมีผลทำให้เกิดการบดบัง (steric hindrance) โดยเอนไซม์ด้วยกันเอง ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการจับกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับสับเสตรทเป็นผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง

สำหรับงานวิจัยนี้จึงใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร เนื่องจากให้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยที่ใกล้เคียงพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปมีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน Lokotsh และคณะ (1989) ศึกษาการเรโซลูชันของ (D,L) เมนทอลในระบบปฏิกิริยาทรานเอสเทฟิเคชั่นโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์เท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร จะให้แอคติวิตีสูงสุด



รูปที่ 5.2 ผลของความเข้มข้นของเริ่มต้นเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ในสารละลายบัฟเฟอร์ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป และ ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุง ความเข้มข้นของสับเสตรทที่ใช้ เรชิมิกเมนทอล 0.06 โมลาร์ และ เฮกซิลอะซิเตต 1 โมลาร์ ผลการทดลองที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ชุดการทดลองที่สภาวะเดียว

5.1.3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์

ในการทดลองชุดนี้ทำการศึกษาหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ ตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน Dowex MWA-1 จำนวน 5 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการตรึงรูปเป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยแปรเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งแต่ 5.0 ถึง 10.0 จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปไร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปดังแสดงในหัวข้อ 4.3.3

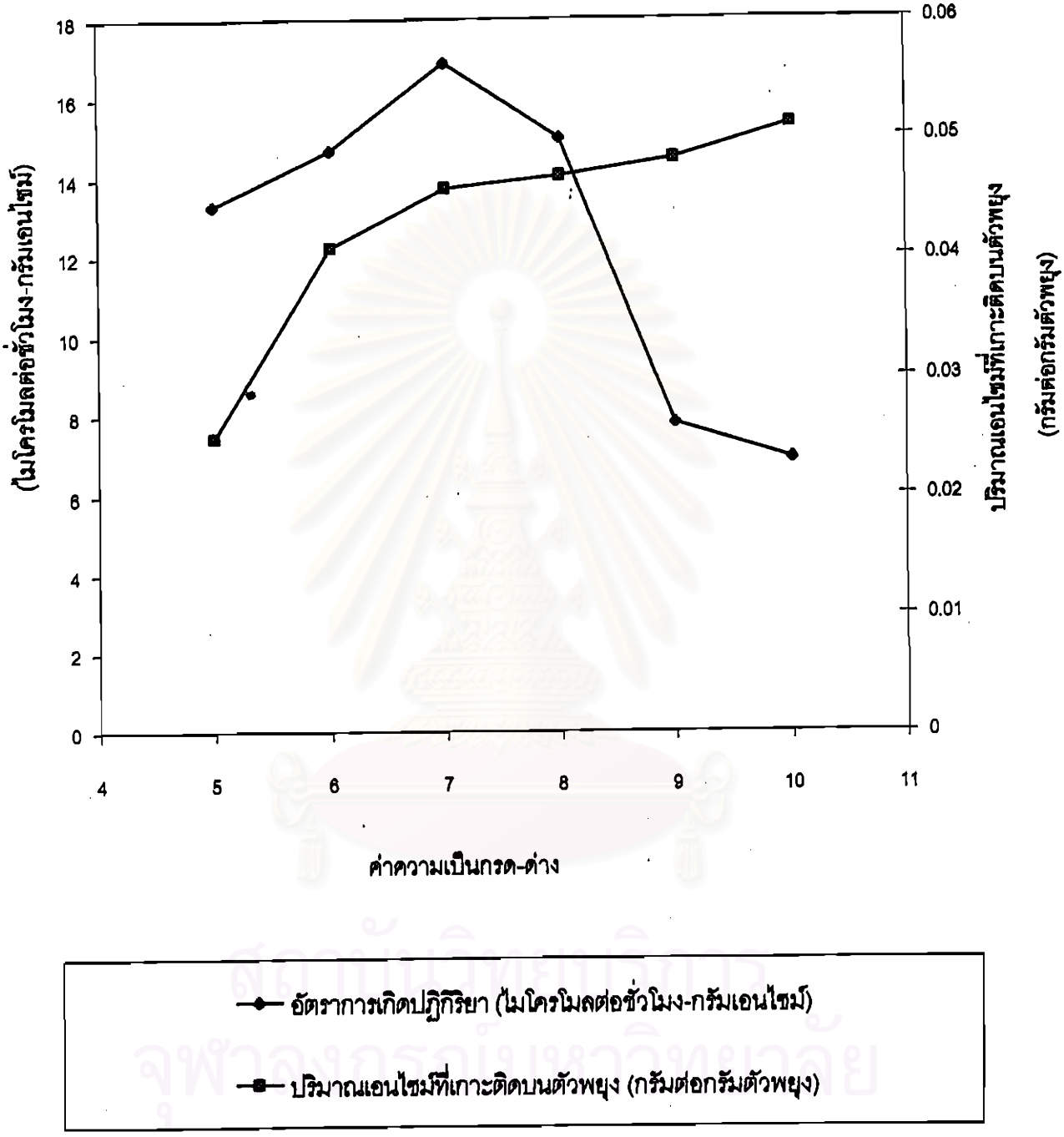
เอนไซม์ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโนหลาย ๆ ตัวมาต่อกันและเมื่อนำเอนไซม์มาละลายในบัฟเฟอร์ กรดอะมิโนเหล่านี้จะสามารถแตกตัวให้ประจุบวกหรือลบ ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์มีผลต่อประจุของกรดอะมิโน หรืออีกนัยหนึ่งสามารถอธิบายได้ว่าจำนวนและชนิดของประจุที่บริเวณเร่งและโครงรูปสามมิติของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์จึงมีอิทธิพลต่อความสามารถในการยึดเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุง และความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ผลการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดอยู่บนตัวพยุงจะแปรตามการเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ในการตรึงรูปเอนไซม์ เนื่องจากพบว่าเอนไซม์จาก Candida cylindracea มีค่าไอโซอิเล็คตริก (isoelectric point) เท่ากับ 4.5 (Heon So.sohn และคณะ, 1987) ซึ่งจุดนี้ประจุสุทธิของเอนไซม์มีค่าเท่ากับศูนย์ การเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์มากกว่าค่าไอโซอิเล็คตริก จะทำให้เอนไซม์แตกตัวออกเป็นประจุลบได้มากขึ้นและจะเข้าจับกับตัวพยุง Dowex MWA-1 ซึ่งเป็นเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบได้มากขึ้นตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ต่อค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปแสดงดังกราฟรูปที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟจะแบ่งออกเป็นสองช่วง ในช่วงแรกที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ถึง 7.0 อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราคงที่จนมีค่าสูงสุดที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ในช่วงที่สองเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 7.0 จนถึง 10.0 ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปกลับลดลงอย่างรวดเร็ว สามารถอธิบายได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 จะทำให้กลุ่มที่สามารถแตกตัวเป็นไอออน (prototropic group) ที่อยู่บริเวณเร่ง(active site) ของเอนไซม์แตกตัวเป็นไอออนที่

เหมาะสมมีผลให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติ ซึ่งจะมีผลนำไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการเชื่อมจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับเสตรทที่เหมาะสมพอดี ทำให้สับเสตรทเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตได้มากขึ้นและจะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าสูงสุด ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่น้อยกว่า 7.0 หรือมากกว่า 7.0 เอนไซม์จะแตกตัวออกเป็นไอออนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปสามมิติ ซึ่งจะมีผลต่อการเชื่อมจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับเสตรทไม่เหมาะสมพอดี ทำให้เอนไซม์จับกับสับเสตรทได้ยากขึ้น ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง Candida cylindracea การศึกษาของ Bernard Cambou และคณะ (1984) ทำการตรึงเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 8.0 Masachiro Goto และคณะทำการตรึงเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7.6 ในขณะที่พรทิภา (2538) ทำการตรึงเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea จะทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 7.0 - 8.0

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างในการตรึงเอนไซม์ที่ 7.0 เนื่องจากให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป และอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป และ ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุง ความเข้มข้นของสับเสตรทที่ใช้ เรซิมิกเมนทอล 0.06 โมลาร์ และ เฮกซิลอะซิเตต 1 โมลาร์

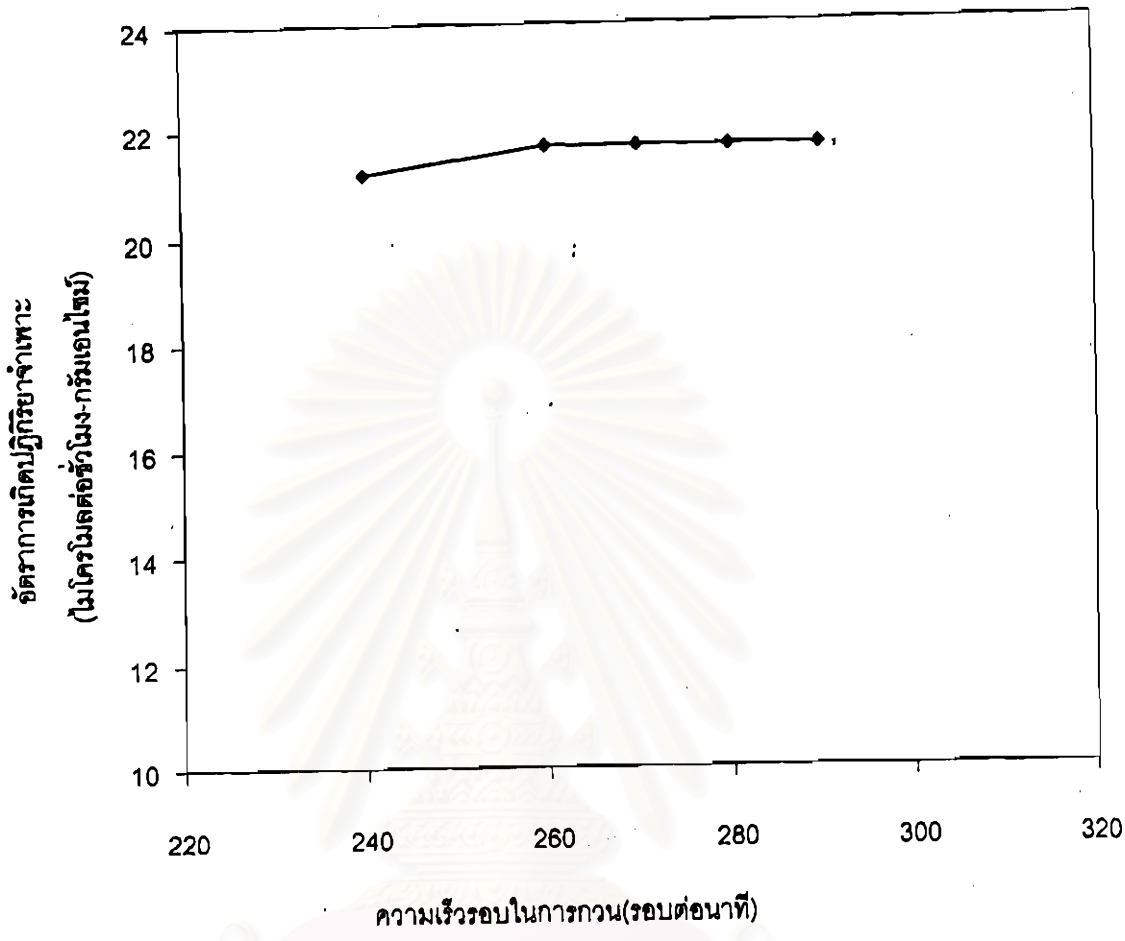
5.2 การศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูป

ในหัวข้อนี้กล่าวถึงการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ตรึงรูปบนตัวพยุงแลกเปลี่ยนประจุลบ (Dowex MWA-1) ซึ่งอาศัยสภาวะที่ใช้ในการตรึงรูปที่เหมาะสมดังได้แสดงในหัวข้อ 5.1 แต่ทั้งนี้เพื่อให้การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปได้อย่างถูกต้องและอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่วัดได้เป็นผลมาจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แท้จริง ไม่ใช่ผลอันเกิดมาจากอัตราการถ่ายเทมวลสารซึ่งอาจมีค่าน้อยกว่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในบางกรณี เราจึงเริ่มต้นการทดลองโดยการศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของปฏิกิริยาเรโซลูชั่นของเรซิมิกเมนทอล

5.2.1 การศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ

การทดลองชุดนี้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของความเร็วรอบในการกวนต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea เข้มข้นเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่เวลาในการตรึงรูป 5 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 นำไปเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นระหว่าง เรซิมิกเมนทอลกับเฮกซิลอะซิเตต โดยแปรเปลี่ยนความเร็วรอบในการกวนตั้งแต่ 240 ถึง 290 รอบต่อนาที

ในการเคลื่อนที่ของสับเสตรทเพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ตรึงติดอยู่บนตัวพยุง สับเสตรทจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปยังชั้นฟิลม์บางๆที่อยู่นิ่งบนผิวของตัวพยุง ซึ่งทำให้เกิดแรงต้านทานในการเคลื่อนที่ขึ้นเรียกว่า ความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายนอก (external mass transfer resistance) ซึ่งอาจทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาถูกจำกัดด้วยความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายนอก การเพิ่มความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมจะเป็นการลดความหนาของชั้นฟิลม์ ทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารสูงขึ้น ดังนั้นในการทำการทดลองจึงต้องหาความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสม เพื่อให้มั่นใจว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ที่วัดได้เป็นผลโดยตรงจากอัตราเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนในช่วง 240 รอบต่อนาที ถึง 290 รอบต่อนาที อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าค่อนข้างคงที่ ที่ 22 ไมโครโมลต่อชั่วโมง-กรัมเอนไซม์ แสดงดังกราฟรูปที่ 5.4



รูปที่ 5.4 ผลของความเร็วรอบในการกวนต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป

เมื่อพิจารณาผลของสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารที่ความเร็วรอบในการกวนต่างๆ ดังตารางที่ 5.2 (วิธีคำนวณแสดงดังภาคผนวก จ) ร่วมกับผลของวามเร็วรอบในการกวนต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจะเป็นการเพิ่มสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสาร ซึ่งจะทำให้การถ่ายเทมวลของสารมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อพิจารณาผลของความเร็วรอบในการกวนต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ดังรูปที่ 5.4 จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเร็วรอบ ไม่ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเพิ่มขึ้น แต่จากผลการทดลองและผลของสัมประสิทธ์การถ่ายเทมวลสารไม่สามารถสรุปชี้ชัดลงไปได้ว่าผลของการถ่ายเทมวลสารมีผลต่อขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา (rate limiting step) หรือไม่

เนื่องจากการทดลองทำการแปรเปลี่ยนค่าความเร็วรอบในการกวนทำได้ในช่วงที่จำกัด ทำให้ไม่สามารถเห็นค่าการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้อย่างชัดเจน

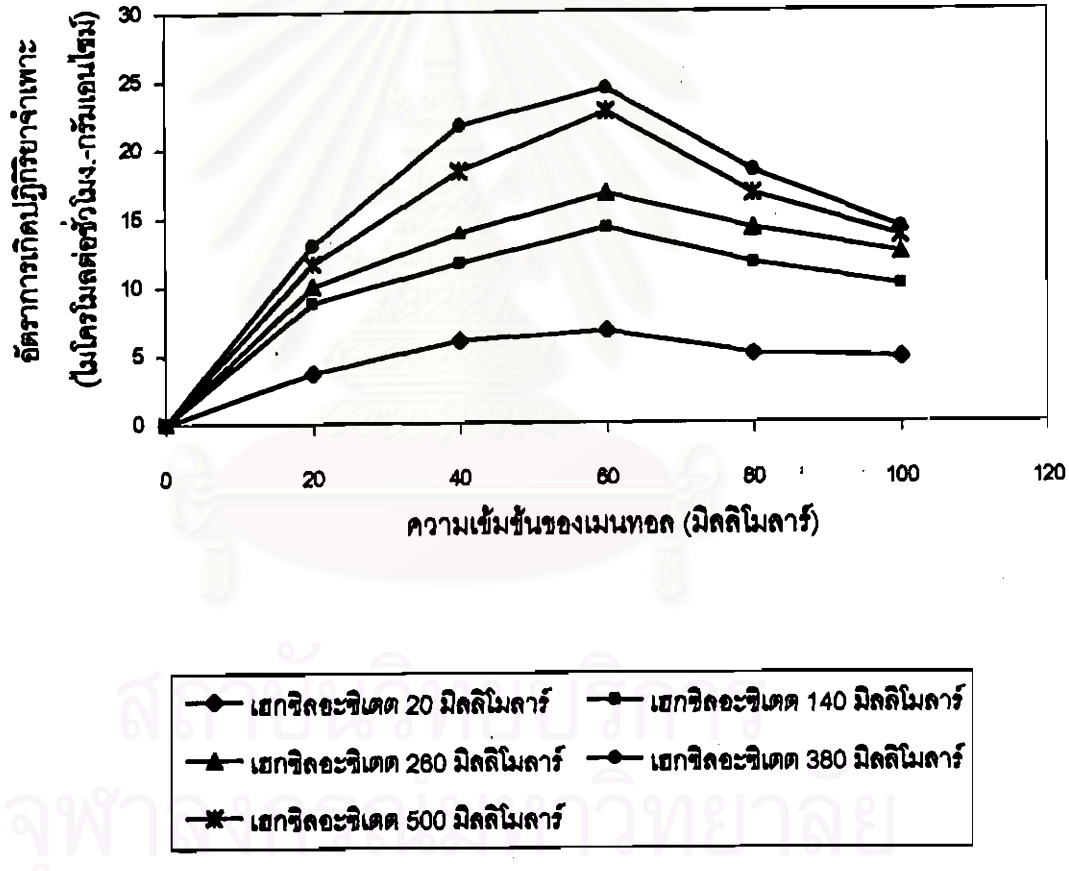
ตารางที่ 5.2 ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารที่ความเร็วรอบในการกวนต่างๆ

ความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)	$k_{c(menthol\ ,\ isooctane)}$ $\times 10^{-3}$ (m. s^{-1})	$k_{c(hexyl\ acetate\ ,\ isooctane)}$ $\times 10^{-3}$ ($m.s^{-1}$)
240	1.14	0.711
260	1.19	0.737
270	1.21	0.752
280	1.23	0.766
290	1.25	0.779

ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเร็วรอบในการกวนที่ 270 รอบต่อนาทีเป็นความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสม เนื่องจากสามารถควบคุมความเร็วรอบในการกวนได้ค่อนข้างสะดวก และเป็นความเร็วในการกวนที่ไม่สูงเกินไป เพราะถ้าใช้ความเร็วในการกวนสูงๆเป็นเวลานานอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียโครงสร้างสามมิติได้ง่าย อันเนื่องมาจากแรงเฉือน (shear force) ที่สูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะลดลง

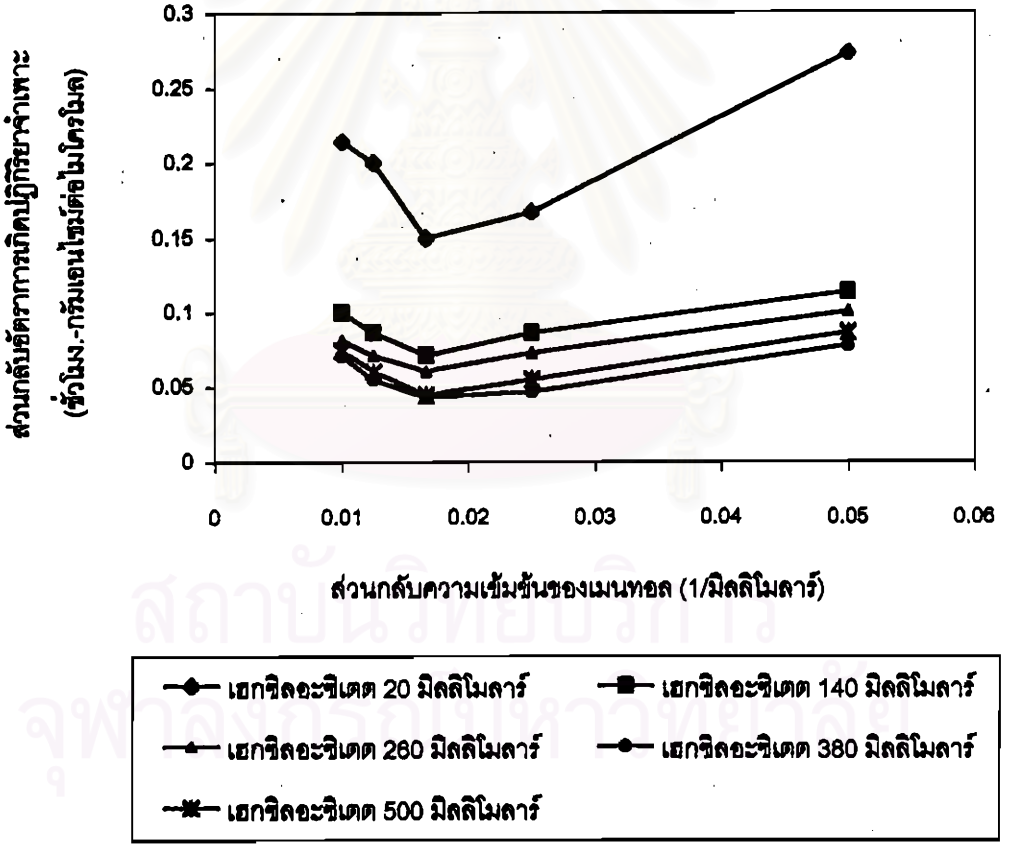
5.2.2 การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

การทดลองชุดนี้ทำการศึกษาเพื่อหาค่าคงที่ต่างๆทางจลนพลศาสตร์ และศึกษาถึงกลไกในการทำงานของเอนไซม์ ทำการทดลองโดยกำหนดให้ปริมาณเอนไซม์ตริงรูปคงที่ที่ 0.036 กรัมต่อกรัมตัวพยุง แล้วแปรค่าความเข้มข้นของสับเสตรท คือเรซิมิกเมนทอล และเฮกซิลอะซิเตต เมื่อวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลแสดงดังกราฟรูปที่ 5.5

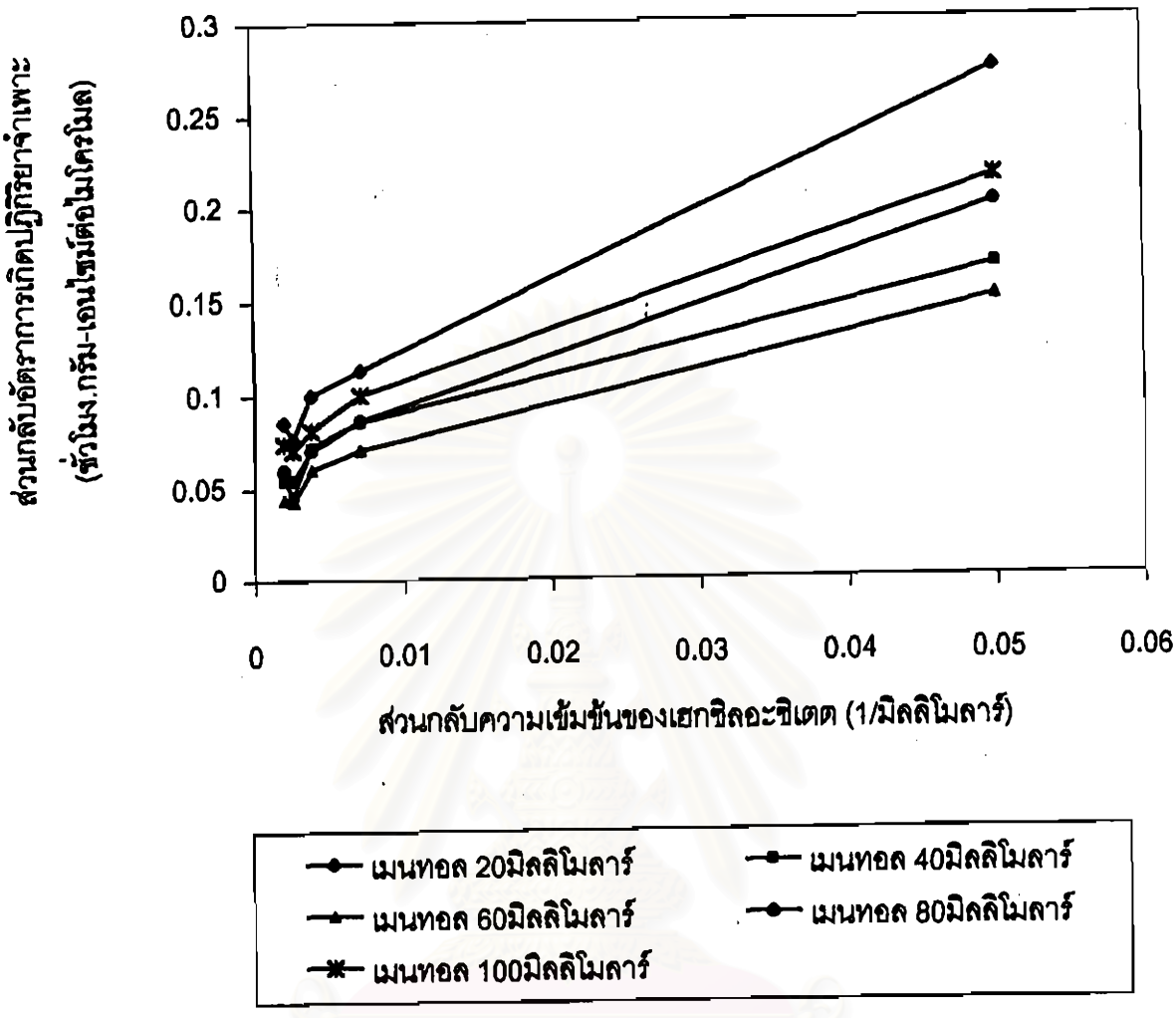


รูปที่ 5.5 แสดงผลของความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลและเฮกซิลอะซิเตต ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา

จากกราฟจะเห็นได้ว่า ในช่วงความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลมีค่าตั้งแต่ 20 ถึง 60 มิลลิโมลาร์ และเฮกซิลอะซิเตตมีค่าตั้งแต่ 20 ถึง 380 มิลลิโมลาร์อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะจะแปรผันตามเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นเริ่มต้นของสับเสตรท แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอลสูงกว่า 60 มิลลิโมลาร์ และเฮกซิลอะซิเตตสูงกว่า 380 มิลลิโมลาร์ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะจะลดลง ซึ่งแสดงว่าในสภาวะนี้มีสับเสตรททั้งสองตัวเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (inhibition) สำหรับการหาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ สามารถหาได้โดยพิจารณาจากการเขียนกราฟ ไลน์วีเวอร์-เบอร์ก ของส่วนกลับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับส่วนกลับความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอล (20, 40 , 60 , 80 และ 100 มิลลิโมลาร์) และกำหนดความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตตคงที่ ที่ 20, 140 , 260 , 380 และ 500 มิลลิโมลาร์ แสดงดังกราฟรูปที่ 5.6 - 5.7



รูปที่5.6 กราฟส่วนกลับของความเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยากับความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอล (Line – weaver Burk Plot)



รูปที่ 5.7 กราฟส่วนกลับของความเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยากับความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต (Line – weaver Burk Plot)

จากกราฟรูปที่ 5.6 เมื่อพิจารณาในส่วนที่เมนทอลไม่มีผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา(20 มิลลิโมลาร์ ถึง 60 มิลลิโมลาร์) จะเห็นว่ากราฟที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรงที่ขนานกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตตตั้งแต่ 140 มิลลิโมลาร์ ถึง 500 มิลลิโมลาร์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบปิงปอง ไบ-ไบ (Ping-Pong bi bi mechanism) (Segel และคณะ (1975)) ซึ่งคล้ายกับผลงานวิจัยของผู้อื่นในปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกัน เช่น ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของ (-)เมนทอลกับกรดลอริกในระบบรีเวอร์สไมเซลล์ของน้ำ / AOT / ไอโซออกเทน ที่มีเอนไซม์ไลเปสจาก Penicilium simplicissium เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [Stamatis และคณะ 1993) ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของอ็อคทานอลกับกรดลอริกในระบบรีเวอร์สไมเซลล์ของน้ำ / AOT / ไอโซออกเทน ที่มีเอนไซม์ไลเปสจากPseduomonas cepacia เป็น

ตัวเร่งปฏิกิริยา(Stamatis และคณะ,1995),ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของเบนซิลอัลกอฮอร์กับกรดลอริกในระบบการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ในสารลดแรงตึงผิว (Goto และคณะ ,1995) และปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่นของ (-)เมนทอลกับกรดลอริกในระบบการตรึงเอนไซม์จาก Candida cylindracea ในสารลดแรงตึงผิว (Kamiya และ Goto, 1997) แต่การเกิดปฏิกิริยาทราเอสเทอริฟิเคชั่นในบางระบบอาจมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกันไปเช่น บุญชัย (2540) ศึกษาการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ในระบบรีเวอร์ไมเซลล์ พบว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์เป็นแบบแรนดอม ไบ-ไบ (Random Bi-Bi) และอานนทพัฒน์ (2541) ศึกษาการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea ในระบบตัวทำละลายน้ำ / ตัวทำละลายอินทรีย์พบว่ากลไกในการเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบแรนดอม ไบ-ไบ เช่นเดียวกัน

ในการอธิบายกลไกการทำงานแบบปิงปอง ไบ-ไบ จะพิจารณาการทำปฏิกิริยาในช่วงการเกิดปฏิกิริยาในช่วงที่ยังไม่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยา (ความเข้มข้นของเมนทอลในช่วง 20 มิลลิโมลาร์ ถึง 60 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตตในช่วง 140 มิลลิโมลาร์ ถึง 380 มิลลิโมลาร์) แสดงดังภาคผนวก.ข สามารถเขียนสมการอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ดังนี้

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[A][B]}{k_A[B] + k_B[A] + [A][B]} \qquad (5.1)$$

เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต ([B]) มีค่าคงที่ ในขณะที่ความเข้มข้นของเรซิมิกเมนทอล ([A]) มีค่าเปลี่ยนแปลงไป จะได้

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[A]}{k_A + k_B\frac{[A]}{[B]} + [A]} \qquad (5.2)$$

เมื่อกลับสมการจะได้

$$\frac{1}{V} = \frac{k_A}{V_{max}}\frac{1}{[A]} + \frac{(k_B + 1)}{[B]}\frac{1}{V_{max}} \qquad (5.3)$$

จุดตัดแกนY (intercept) ที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่างส่วนกลับความเข้มข้นของเมนทอลกับส่วนกลับอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะดังรูปที่ 5.8 เมื่อนำไปเขียนกราฟกับส่วนกลับความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต ดังรูปที่5.9 จะสามารถหาค่าคงที่ของ V_{max} และ k_B ได้จากสมการ 5.4

$$\text{จุดตัดแกน Y} = \frac{1}{V_{max}}(1 + \frac{k_B}{[B]}) \qquad (5.4)$$

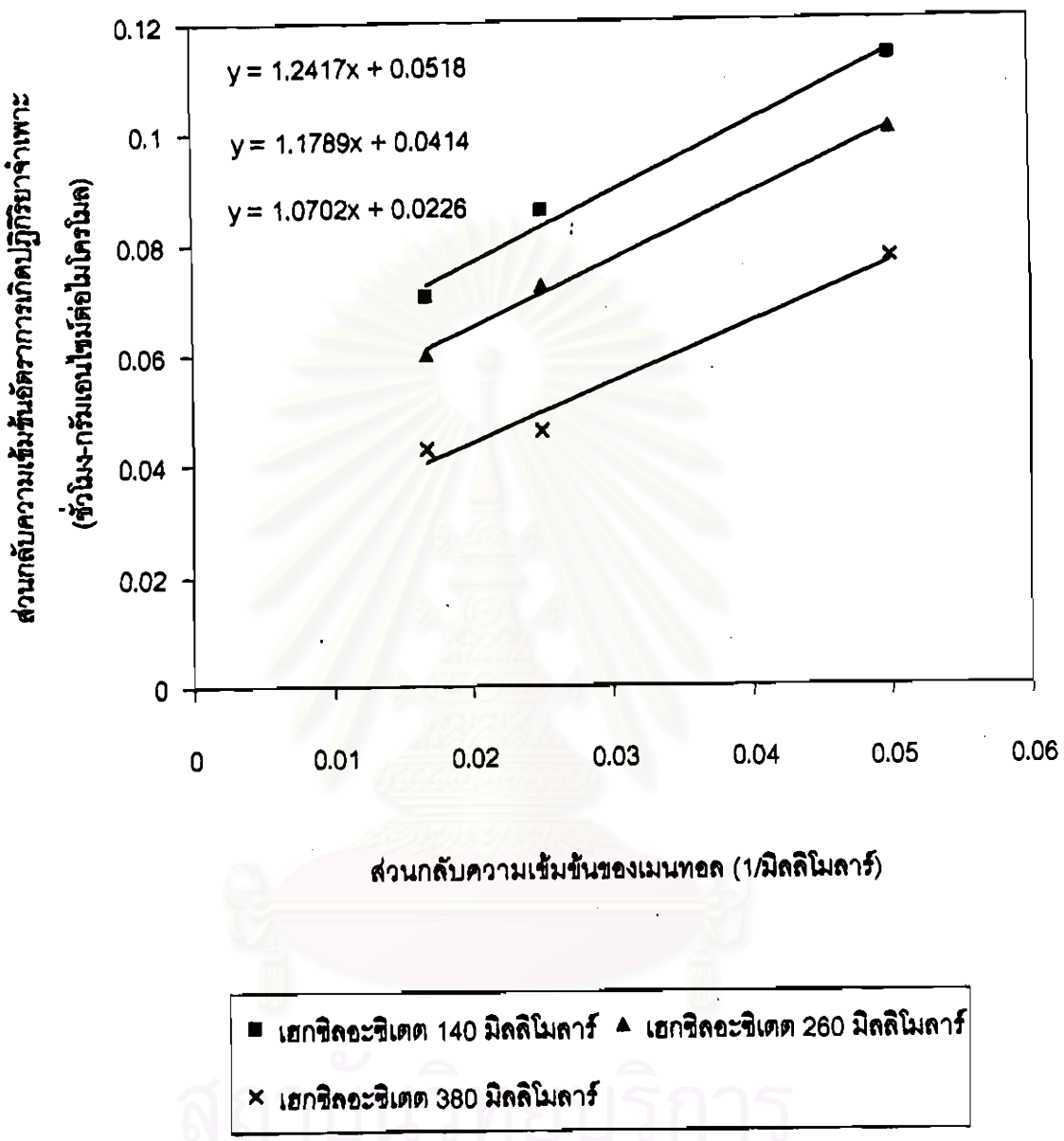
จากกราฟรูปที่ 5.9

$$\text{จุดตัดแกน Y} = \frac{1}{V_{max}} = 0.012$$

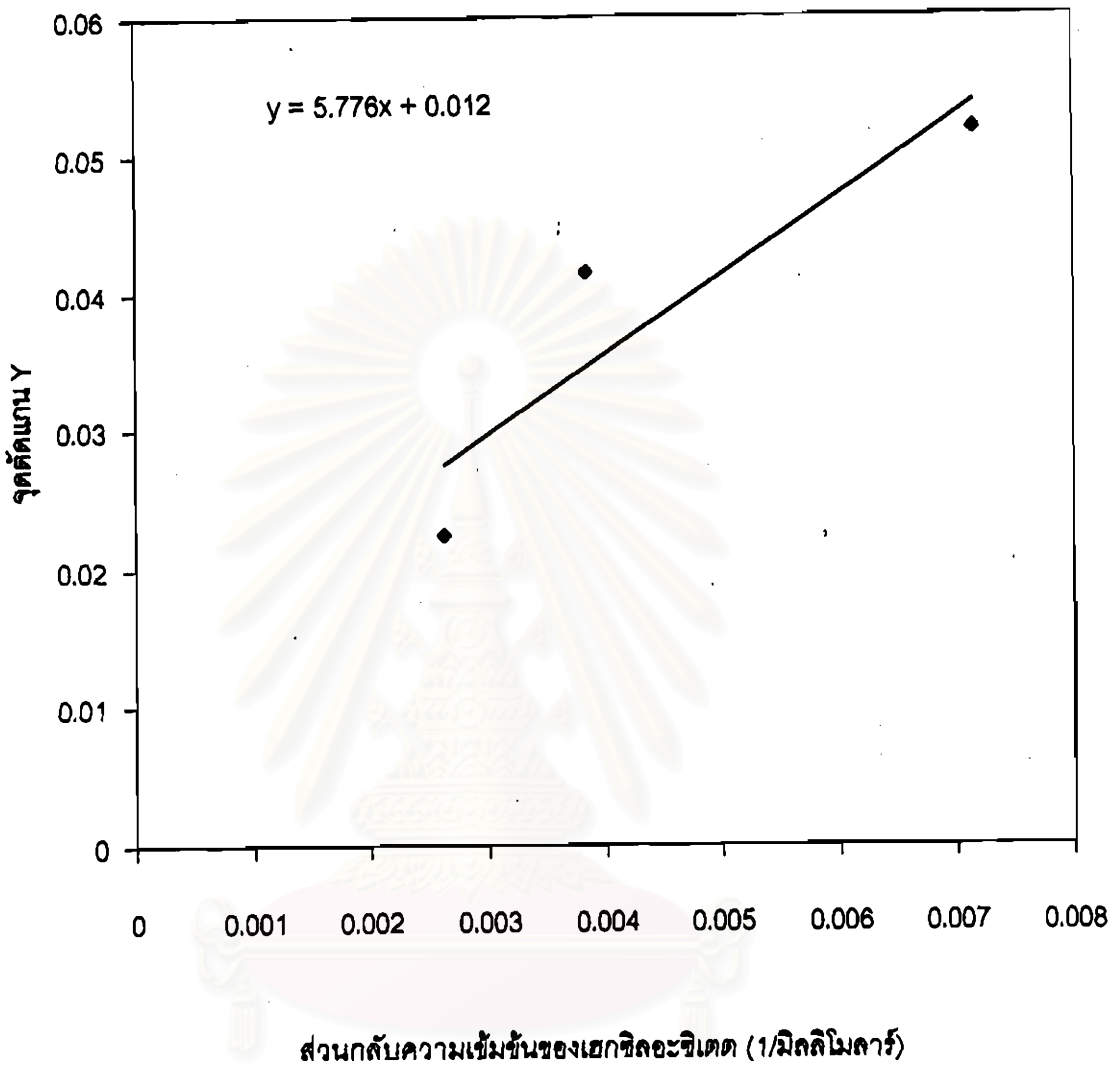
V_{max} = 83.33 ไมโครโมลต่อชั่วโมง-กรัมเอนไซม์

$$\text{ความชัน} = \frac{k_B}{V_{max}} = 5.776$$

k_B = 480 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 5.8 กราฟส่วนกลับระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับส่วนกลับความเข้มข้นของเมนทอล



รูปที่ 5.9 กราฟระหว่างจุดตัดแกน Y กับส่วนกลับความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต ([B]) เปลี่ยนแปลงไปในขณะที่ความเข้มข้นของเมนทอล ([A]) มีค่าคงที่ จะได้

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[B]}{k_B + k_A\frac{[B]}{[A]} + [B]} \qquad (5.5)$$

เมื่อกลับสมการจะได้

$$\frac{1}{V} = \frac{k_B}{V_{max}}\frac{1}{[B]} + \frac{(k_A + 1)}{[A]}\frac{1}{V_{max}} \qquad (5.6)$$

จุดตัดแกนY (intercept) ที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่างส่วนกลับความเข้มข้นของเมนทอลกับส่วนกลับอัตรการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะดังรูปที่ 5.10 เมื่อนำไปเขียนกราฟกับส่วนกลับความเข้มข้นของเมนทอล ดังรูปที่ 5.11 จะสามารถหาค่าคงที่ของ V_{max} และ k_A ได้จากสมการ 5.7

$$\text{จุดตัดแกน } Y = \frac{(1 + k_A)}{[A]}\frac{1}{V_{max}} \qquad (5.7)$$

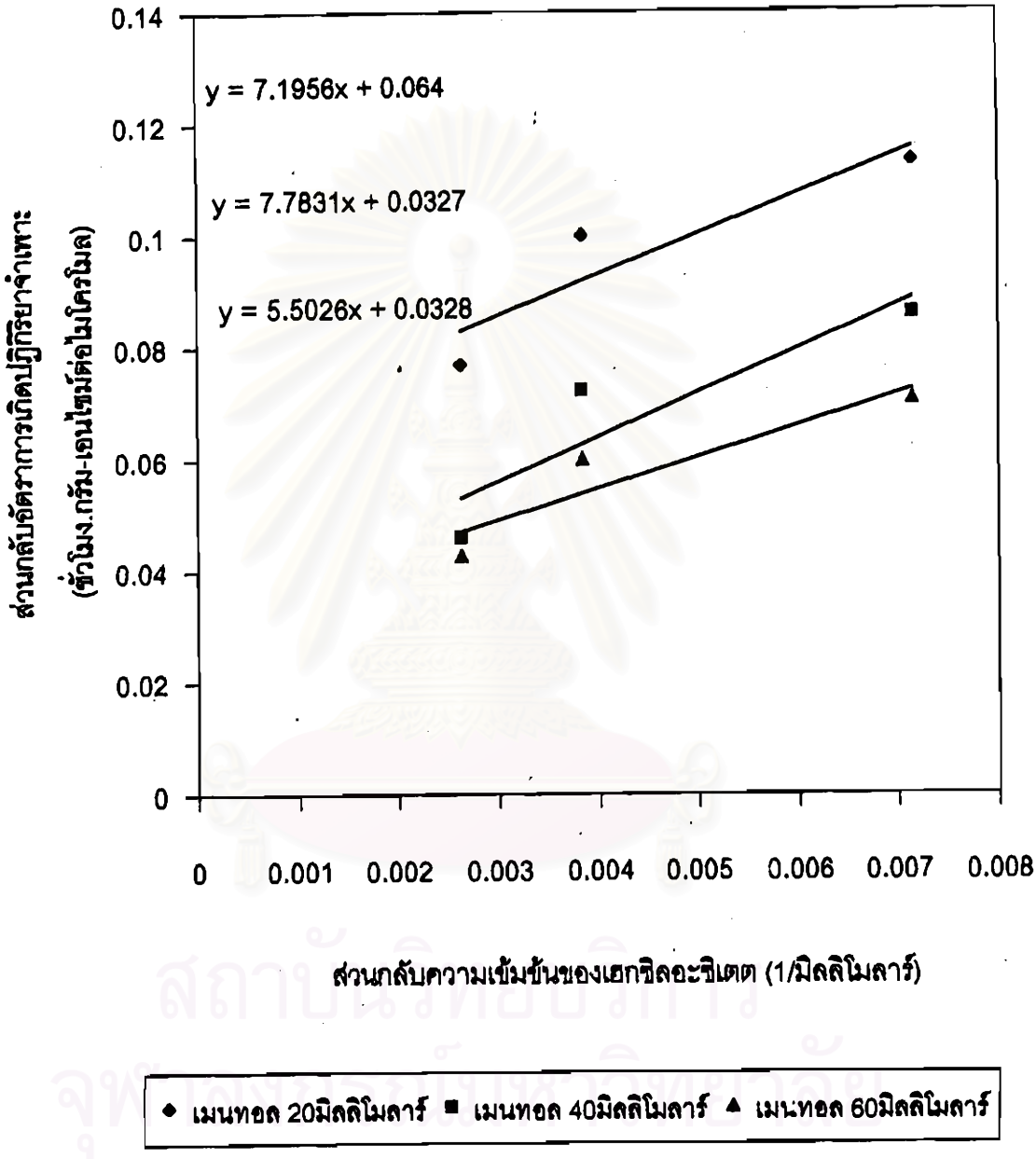
จากกราฟรูปที่ 5.11

จุดตัดแกน Y $= \frac{1}{V_{max}}$ (ซึ่งค่านี้จะต้องมีค่ากับค่าจุดตัดแกน Y ในรูปที่ 5.10)

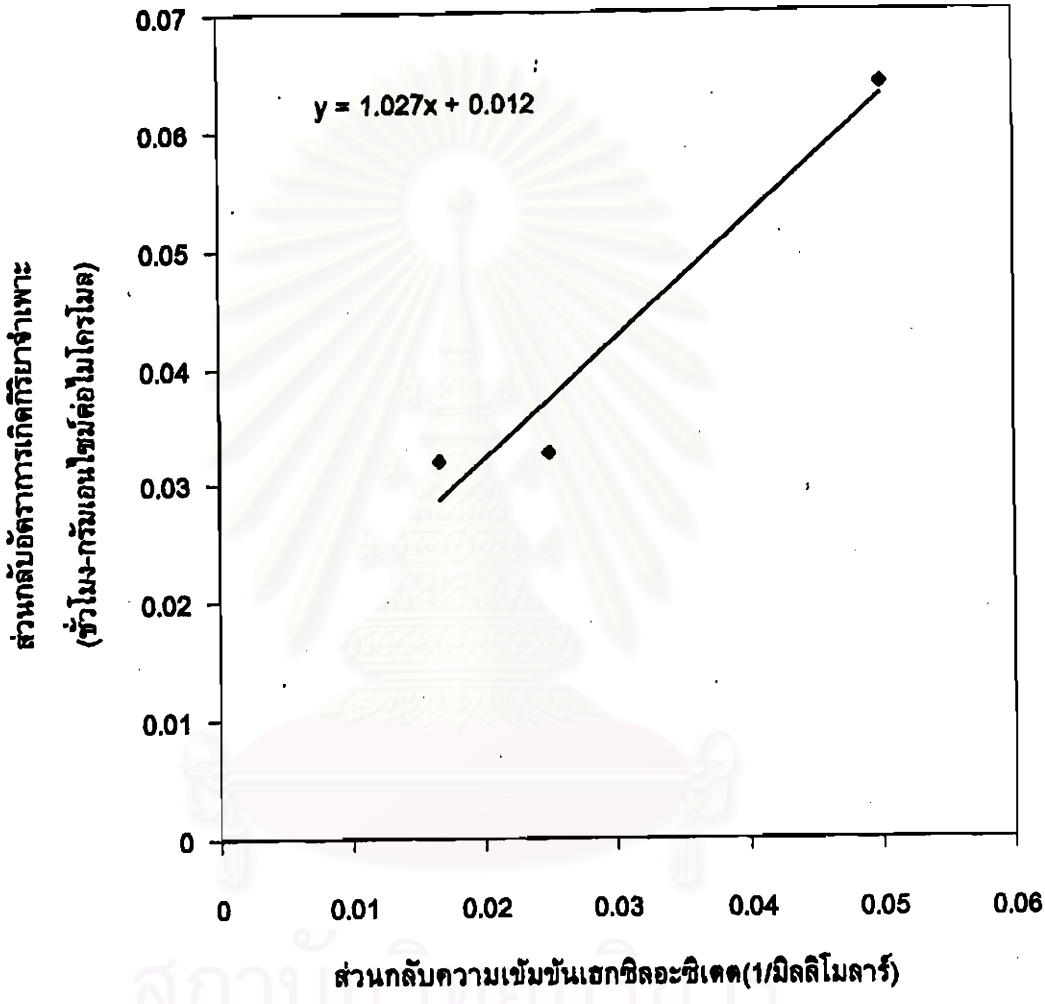
V_{max} = 83.33 ไมโครโมลต่อชั่วโมง-กรัมเอนไซม์

ความชัน $= \frac{k_A}{V_{max}} =$ 1.027

k_A = 85.58 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 5.10 กราฟส่วนกลับระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของกับส่วนกลับความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต



รูปที่ 5.11 กราฟระหว่างจุดตัดแกน Y กับ ส่วนกลับความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซึ่งสามารถหาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของระบบได้ดังนี้ คือ

V_{max} = 83.33 ไมโครโมลต่อ ชั่วโมง-กรัม.เอนไซม์

k_A = 85.58 มิลลิโมลาร์

k_B = 480 มิลลิโมลาร์

สมการแสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยา คือ

$$V = \frac{83.33\,[A]\,[B]}{480\,[A] + 85.58\,[B] + [A]\,[B]}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบค่าคงที่จลนพลศาสตร์ของงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่นๆที่ใกล้เคียง

ผู้ทำงานวิจัย	ชนิดของเอนไซม์	ระบบในการทำปฏิกิริยา	กลไกในการเกิดปฏิกิริยา	ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์
บุญชัย (2540)	Candida cylindracea	เอนไซม์ในรีเวอร์สไมเซลล์	แรนดอม ไบ-ไบ	V_{max} = 14.5 µmol/hr g-enz αk_A = 3.39 mM αk_B = 2.07 mM k_A = 529.3 mM k_B = 323.3 mM k_{I1} = 11.32 mM k_{I2} = 2.47 mM
อานนท์พัฒน์ (2541)	Candida cylindracea	เอนไซม์ในระบบตัวทำละลายอินทรีย์	แรนดอม ไบ-ไบ	V_{max} = 100.28 µmol/hr g-enz αk_A = 8.42 mM αk_B = 33.92 mM k_A = 60.92 mM k_B = 248.22 mM k_{I1} = 51.19 mM k_{I2} = 481.96 mM
อดิสรณ์(2542) (ผลงานวิจัยนี้)	Candida cylindracea	ตรึงเอนไซม์บนตัวพยุง	ปิงปอง ไบ-ไบ	V_{max} = 83.33 µmol/hr g-enz k_A = 85.58 mM k_B = 480 mM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าทั้งสามงานวิจัยนี้ทำการศึกษาปฏิกิริยาการแยกเรซิมิกเมนทอลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก Candida cylindracea เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์มีค่าแตกต่างกันไป เนื่องจากระบบในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน และมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาที่ต่างกัน พบว่าการใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ จะให้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะสูงสุดมีค่าเท่ากับ 100.28 ไมโครโมลต่อชั่วโมงกรัมเอนไซม์ โดยการใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งในระบบเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุง จะให้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะลดลงมามีค่าเท่ากับ 83.33 ไมโครโมลต่อชั่วโมงกรัมเอนไซม์ ในขณะที่โดยการใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งในระบบรีเวอร์สไมเซลล์ จะให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่ำกว่าระบบอื่นๆมีค่าเท่ากับ 14.5ไมโครโมลต่อชั่วโมงกรัมเอนไซม์ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเร่งปฏิกิริยาในระบบตัวทำละลายอินทรีย์ สับเสตรทมีโอกาสที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในบริเวณเร่งมาก และปฏิกิริยารวม (overall reaction) จะถูกควบคุมด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ (reaction rate) ทำให้ค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุด ในขณะที่ระบบเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะลดลงร้อยละ 16.7 เมื่อเปรียบเทียบกับระบบตัวทำละลายอินทรีย์ สาเหตุเนื่องมาจากกระบวนการในขั้นตอนการตรึงรูปเอนไซม์อาจทำให้โครงรูปสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป มีผลให้เอนไซม์มีโครงรูปที่จับกับสับเสตรทไม่ดี หรืออาจจะเป็นผลมาจากกลุ่มหรือหมู่ของกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์อาจจะไปมีส่วนในการเชื่อมจับกับตัวพยุงทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะลดลง และการเร่งปฏิกิริยาในระบบรีเวอร์สไมเซลล์มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะต่ำสุด เนื่องมาจากสาเหตุสำคัญสองประการ คือ ความไม่เหมาะสมในแง่ของแรงทางไฟฟ้าสถิตระหว่างโมเลกุลของน้ำ,เอนไซม์ และส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิว ทำให้โครงรูปสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป หรืออาจจะเป็นผลมาจากข้อจำกัดในเรื่องปริมาณเอนไซม์ (enzyme loading) เพราะในระบบรีเวอร์สไมเซลล์มีขีดจำกัดของการละลายของ ไลเปส ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณไลเปสได้มากขึ้น

5.3 การศึกษาการทำปฏิกิริยาในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด

การศึกษาการทำปฏิกิริยาในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด จะศึกษาถึงผลกระทบของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ และศึกษาถึงเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด

5.3.1 ผลกระทบของอัตราการไหลในการป้อนสับเสตรทเข้าสู่หอปฏิกรณ์แบบแพคเบด

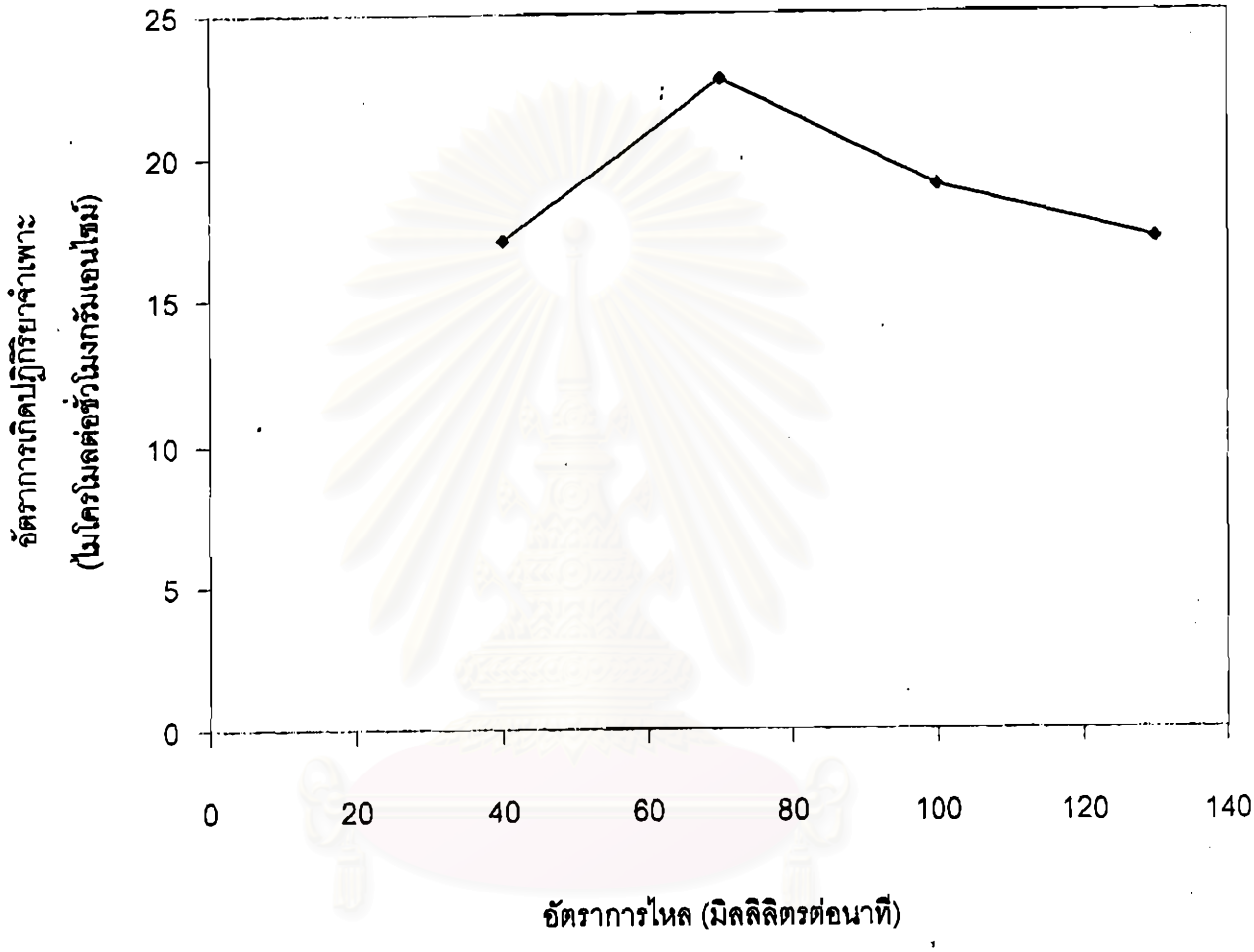
การทดลองชุดนี้ศึกษาการแปรเปลี่ยนค่าอัตราการไหลในการป้อนสับเสตรทเข้าสู่หอปฏิกรณ์ตั้งแต่ 40, 70, 100 และ 130 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ปริมาณตัวพยุง Dowex MWA-1 ตรึงรูปที่สภาวะเหมาะสมจำนวน 60 กรัม ทำปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น โดยใช้ปริมาณเมนทอลเรซิมิก 60 มิลลิโมลาร์ และเฮกซิลอะซิเตต 380 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อัตราการไหลในการป้อนสารละลายสับเสตรทเข้าสู่หอปฏิกรณ์แบบแพคเบดจะมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาผลของอัตราการไหลในการป้อนสับเสตรทต่อค่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ ตามรูปที่ 5.12 ลักษณะของกราฟจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ในช่วงแรกที่อัตราการไหลในการป้อนสับเสตรทตั้งแต่ 40 – 70 มิลลิลิตรต่อนาที จะเห็นได้ว่า อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเพิ่มขึ้นตามอัตราการไหลที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก เอนไซม์จะถูกตรึงติดอยู่เฉพาะที่บริเวณผิวของตัวพยุงเท่านั้นทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาถูกจำกัดด้วยอัตราการถ่ายเทมวลสารภายนอก (external mass transfer) จากการคำนวณค่า effectiveness factor ซึ่ง คำนวณโดยอาศัยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปที่ไม่มีผลของความต้านการถ่ายเทมวลสารภายนอก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 23.33 ไมโครโมลต่อชั่วโมงกรัม-เอนไซม์ เป็นฐานในการคำนวณ พบว่าค่า effectiveness factor มีค่าน้อยกว่า 1.0 ยืนยันให้เห็นว่ามีผลของความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายนอก และเมื่อพิจารณาผลของสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารที่อัตราการไหล 40 – 70 มิลลิลิตรต่อนาที ดังตารางที่ 5.4 (แสดงวิธีคำนวณในภาคผนวก ง) จะเห็นได้ว่าการเพิ่มอัตราการไหลในการป้อนสารละลายสับเสตรทจะทำให้สัมประสิทธิ์ การถ่ายเทมวลสารมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากความหนาของชั้นฟิล์มที่ผิวตัวพยุงลดลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ

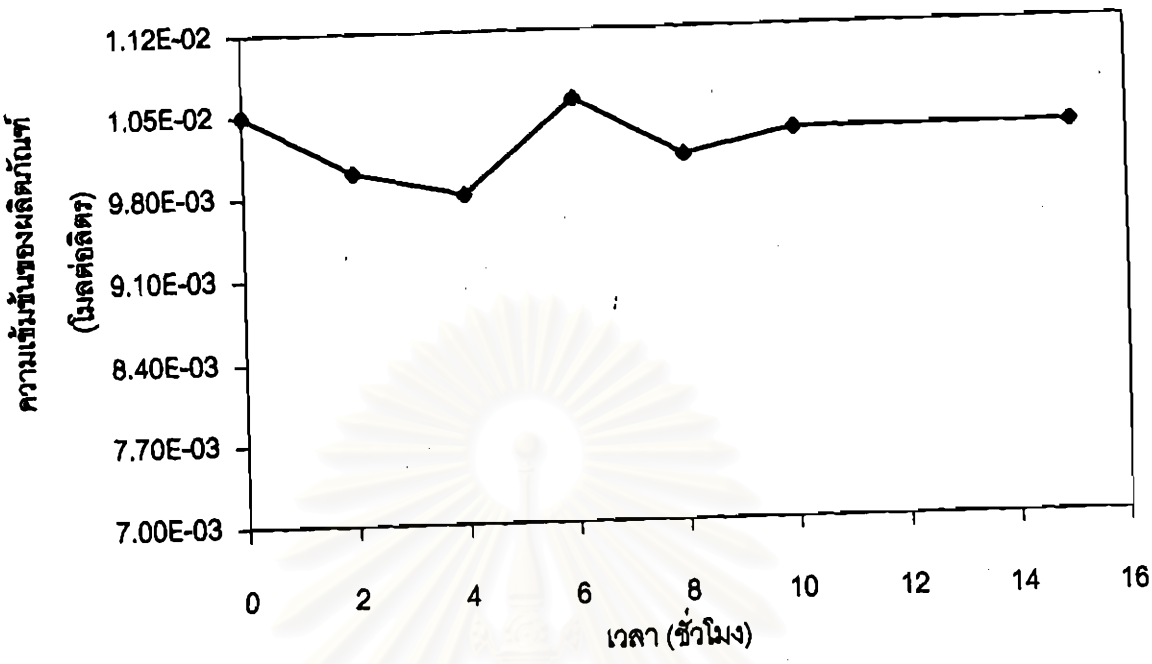
ของเอนไซม์ตรึงรูปจึงเพิ่มขึ้น แต่ในช่วงที่ 2 เมื่อเพิ่มอัตราการไหลในการป้อนสารละลายสับเสตรท ตั้งแต่ 100 –130 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลง(โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปคิดเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงเมื่อเริ่มทำปฏิกิริยา) ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากสาเหตุสำคัญ 2 ประการ คือหนึ่งอาจจะเป็นสาเหตุจากการใช้อัตราการไหลที่สูงทำให้เกิดแรงเฉือน(shear force)ขึ้นกับเอนไซม์ ทำให้โครงรูปสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบที่จะทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปจึงลดลง หรือ ในอีกกรณีหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้อัตราการไหลที่สูงมากๆ จะทำให้เอนไซม์มีโอกาสที่จะหลุดออกจากตัวพยุง ซึ่งเมื่อทำการทดสอบผลของอัตราการไหลต่อการหลุดของเอนไซม์ออกจากตัวพยุง โดยนำเอาสารละลายที่ใช้จากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปปริมาตร 240 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหลต่าง ๆ มาทำปฏิกิริยาต่อในขวดรูปชมพู่ โดยทำการกวนที่ความเร็วรอบ 270 รอบต่อนาที เก็บสารตัวอย่างตามช่วงเวลาที่เหมาะสมมาทำการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น แสดงได้ดังกราฟรูปที่ 5.13 -- 5.16 พบว่าที่อัตราการไหล 40 และ 70 มิลลิลิตรต่อนาที ไม่มีผลของของการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแสดงว่ายังไม่มีผลของการหลุดของเอนไซม์ออกจากตัวพยุง แต่ที่อัตราการไหล 100 และ 130 มิลลิลิตรต่อนาที ยังมีการเกิดปฏิกิริยาอยู่ ซึ่งแสดงว่ามีเอนไซม์ที่หลุดออกจากตัวพยุงไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยา เพราะฉะนั้นทำให้สามารถสรุปได้ว่าการลดลงของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปผลส่วนหนึ่งมาจากการหลุดของเอนไซม์ออกจากตัวพยุง ในการทำงานวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลในการป้อนสับเสตรทที่ 70 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อศึกษาหาเสถียรภาพในการทำงาน (Operation Stability) ของเอนไซม์ตรึงรูปต่อไป เนื่องจากเป็นค่าอัตราการไหลที่ทำให้เอนไซม์ยังไม่มีหลุดออกจากตัวพยุง ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญในการตรึงรูปเอนไซม์

ตารางที่ 5.4 ค่าEffectiveness factor และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารที่อัตราการไหลต่างๆ

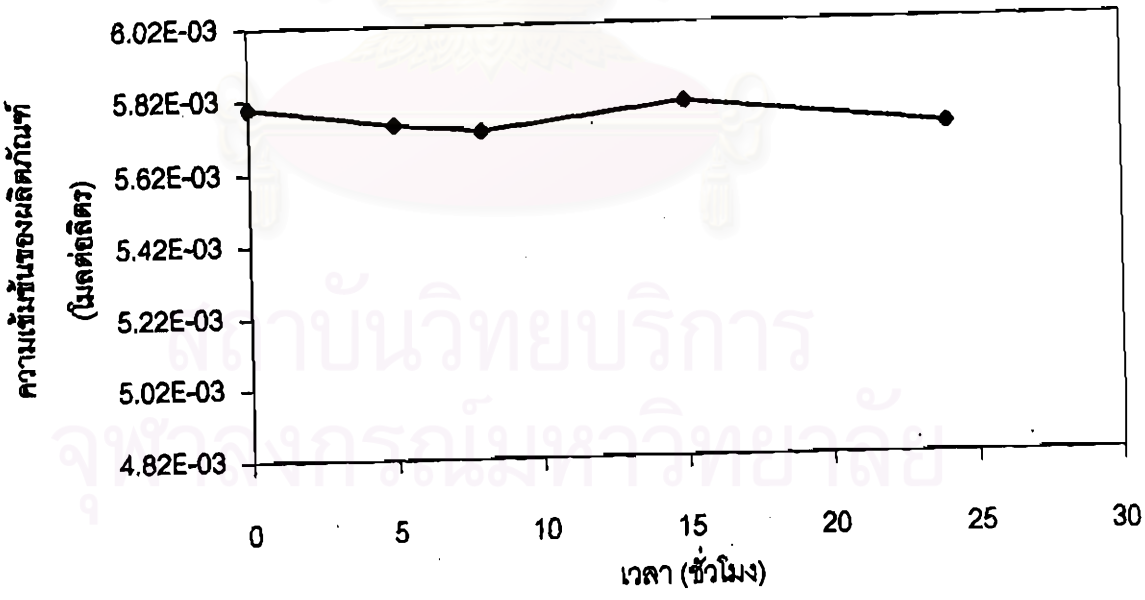
อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	efffectiveness factor	$k_{c\ (menthol\ ,\ Isooctane)}$ $x10^{-5}$ $(m.s^{-1})$	$k_{c\ (hexyl\ acetate\ ,\ Isooctane)}$ $x10^{-5}$ $(m.s^{-1})$
40	0.73	15	9
70	0.98	18	11



รูปที่ 5.12 ผลของอัตราการไหลในการป้อนสารละลายสับเสตรทเข้าสู่หอปฏิกรณ์แบบแพคเบดต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ ทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นเป็นเวลา 45 ชั่วโมง โดยใช้เมนทอลเร่ซิมิก 60 มิลลิโมลาร์กับเฮกซิลอะซิเตต 380 มิลลิโมลาร์

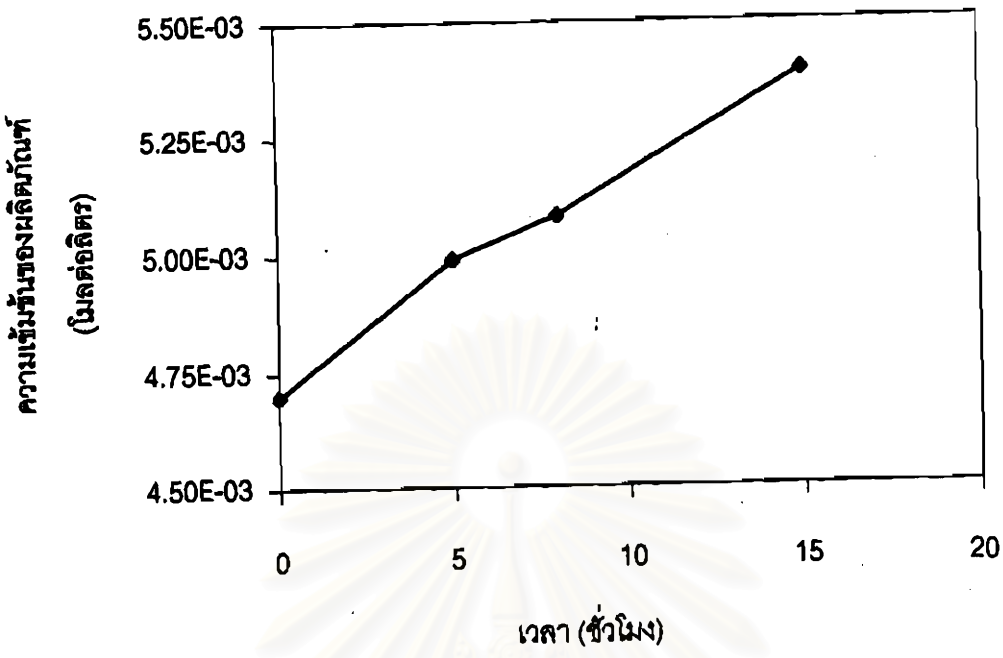


รูปที่ 5.13 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที

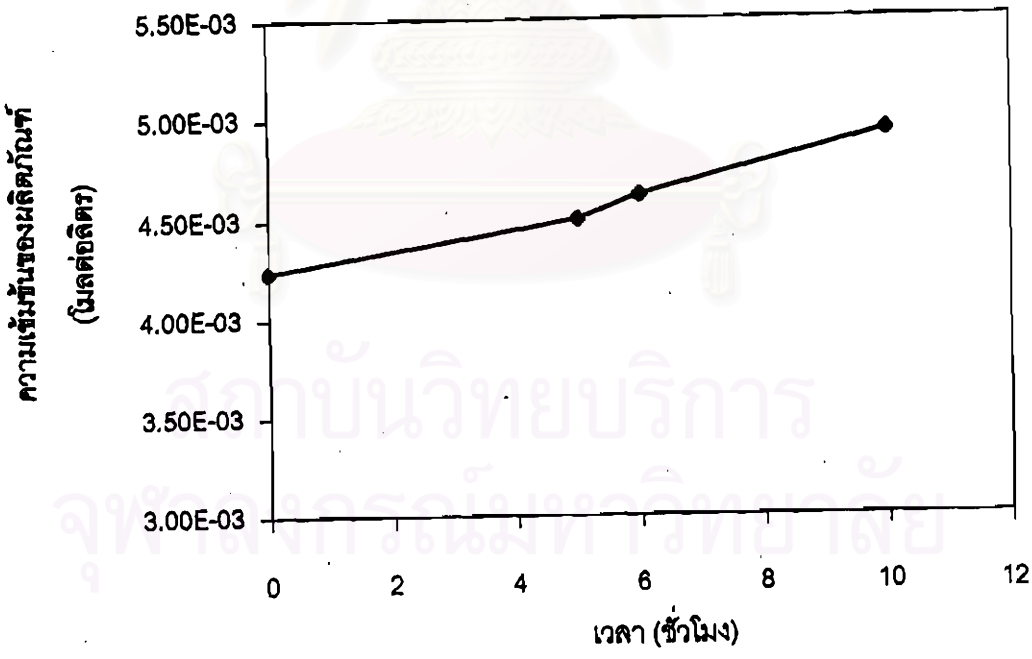


รูปที่ 5.14 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5.15 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 100 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 5.16 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 130 มิลลิลิตรต่อนาที

5.3.2 เสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบด

การทดลองชุดนี้ทำการศึกษาถึงเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 วัน ใช้ปริมาณตัวพยุง Dowex MWA-1 ตรึงรูปที่สภาวะที่เหมาะสม จำนวน 60 กรัมทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น โดยใช้ปริมาณเมนทอลเรซิมิกเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ และเฮกซิลอะซิเตตเข้มข้น 380 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

โดยทั่วไปของการทำเอนไซม์ตรึงรูป จะมีผลทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์สูงขึ้น ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ เสถียรภาพด้านแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปในระหว่างการทำงาน (operation stability) เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งของการนำเอนไซม์ตรึงรูปไปประยุกต์ใช้ในงานระดับอุตสาหกรรม จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาตามรูปที่ 5.17 จะเห็นได้ว่าในช่วงเริ่มต้นการทำปฏิกิริยา อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเท่ากับ 25 ไมโครโมลต่อชั่วโมงกรัม-เอนไซม์ หลังจากทำการเปลี่ยนสารละลายสับเสตรทใหม่ในวันที่ 2 อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูป(โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปคิดเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่เกาะติดบนตัวพยุงเมื่อเริ่มทำปฏิกิริยา)มีค่าเท่ากับ 21 ไมโครโมลต่อชั่วโมงกรัม-เอนไซม์ มีค่าลดลงร้อยละ 16 เมื่อเทียบกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะเมื่อเริ่มต้นทำปฏิกิริยา การลดลงของอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะอาจเป็นผลมาจากเมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 วัน เอนไซม์อาจจะสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไปบางส่วน หลังจากทำการเปลี่ยนสับเสตทใหม่ทุกๆ 2 วัน จนถึงวันที่ 10 อัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าค่อนข้างคงที่ เนื่องจากเอนไซม์ที่เกาะติดอยู่บนตัวพยุงยังคงมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเท่าเดิม เมื่อนำเอาสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยาทุกๆ 2 วันมาทำปฏิกิริยาต่อพบว่าไม่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าไม่มีเอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุงหลังจากการทำปฏิกิริยา(แสดงดังรูปที่ 5.18 - 5.23) และสามารถแสดงอัตราการสลายแอคติวิตีของเอนไซม์ เช่นอัตราของเสถียรภาพของการทำงาน หรือ ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ซึ่งค่าครึ่งชีวิตนี้หมายถึงเวลาที่แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือ หรือ สลายไปร้อยละ 50 ของเริ่มต้น

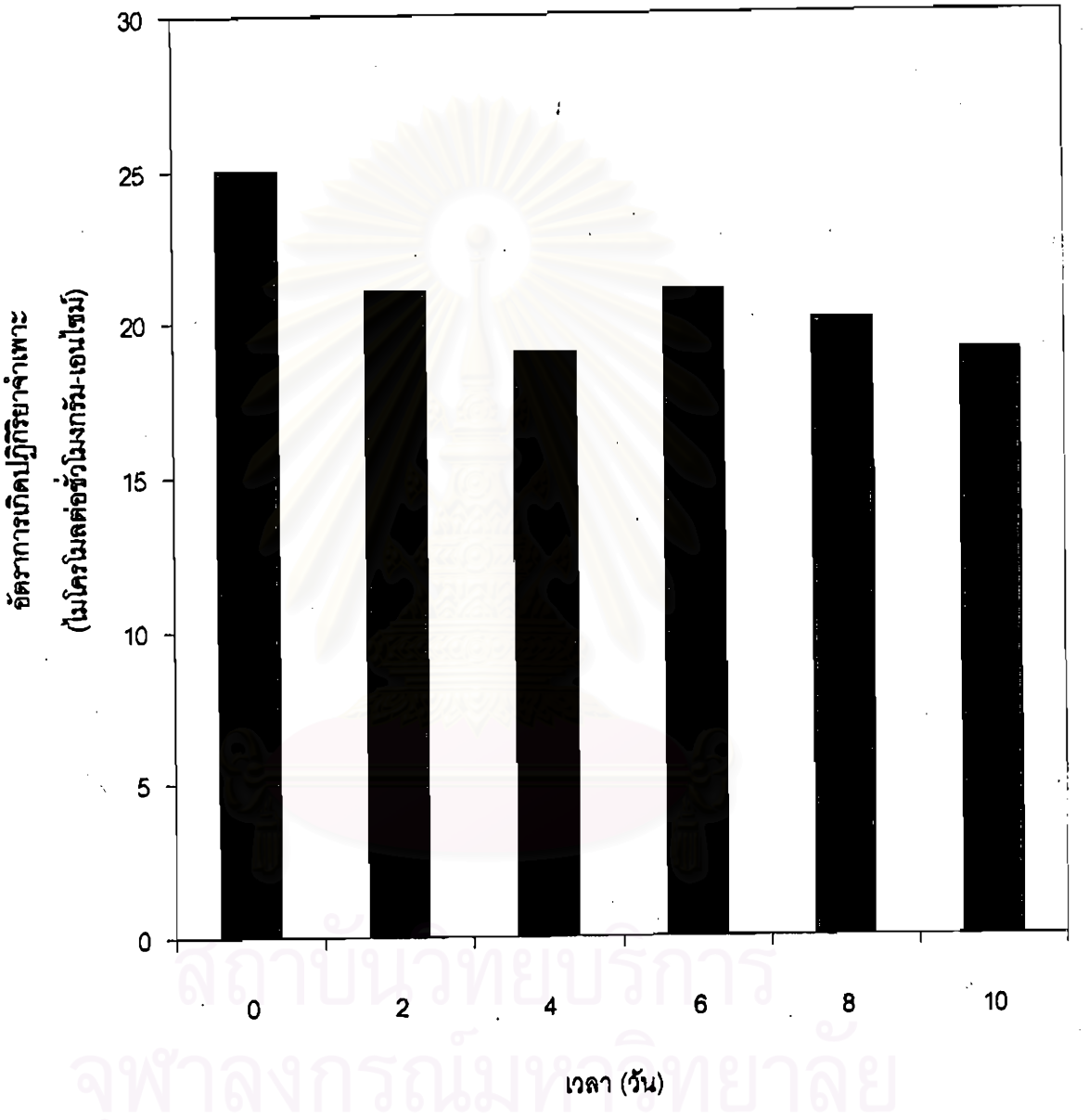
ค่าครึ่งชีวิตสามารถหาได้จากสมการที่ 5.8 – 5.9

$$k_d = \frac{2.303}{\theta} \log \frac{E_0}{E_\theta} \qquad 5.8$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_d} \qquad 5.9$$

สำหรับงานวิจัยนี้มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 25 วัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยอื่นๆ (แสดงดังตารางที่ 5.5) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะ ไอออนิก มีเสถียรภาพในการทำงานที่ดี(เมื่อเปรียบเทียบวิธีในการตรึงวิธีเดียวกัน) โดยสูญเสียอัตราการเกิดปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์เพียงร้อยละ 24 หลังจากเร่งปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

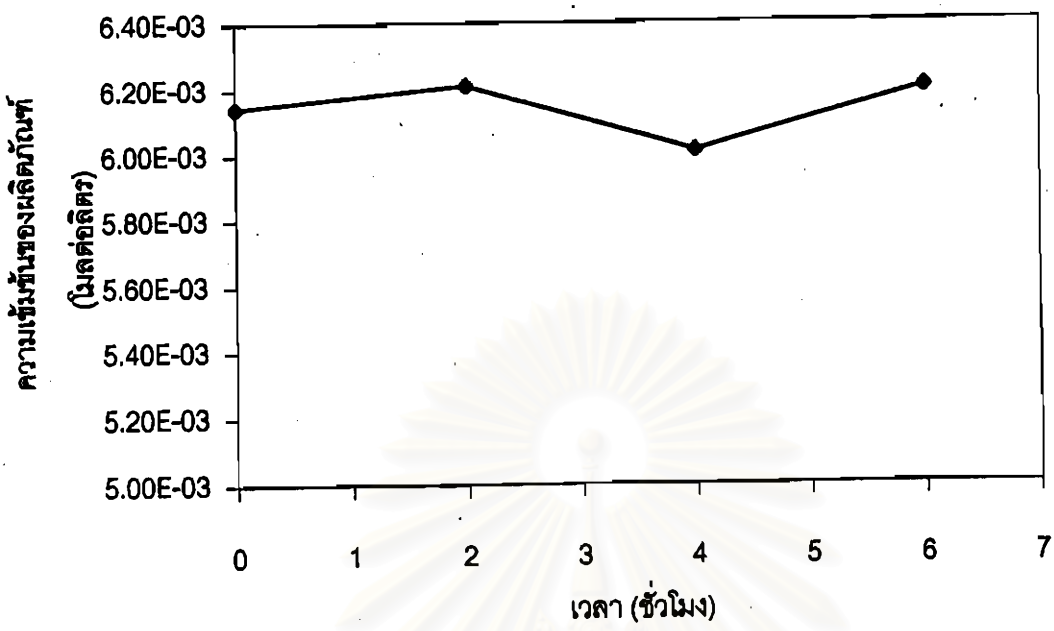


รูปที่ 5.17 แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น โดยใช้เมนทอลเรซิมิก 60 มิลลิโมลาร์ กับ เฮกซิลอะซิเตต 380 มิลลิโมลาร์ ที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องซาเซลเซียส

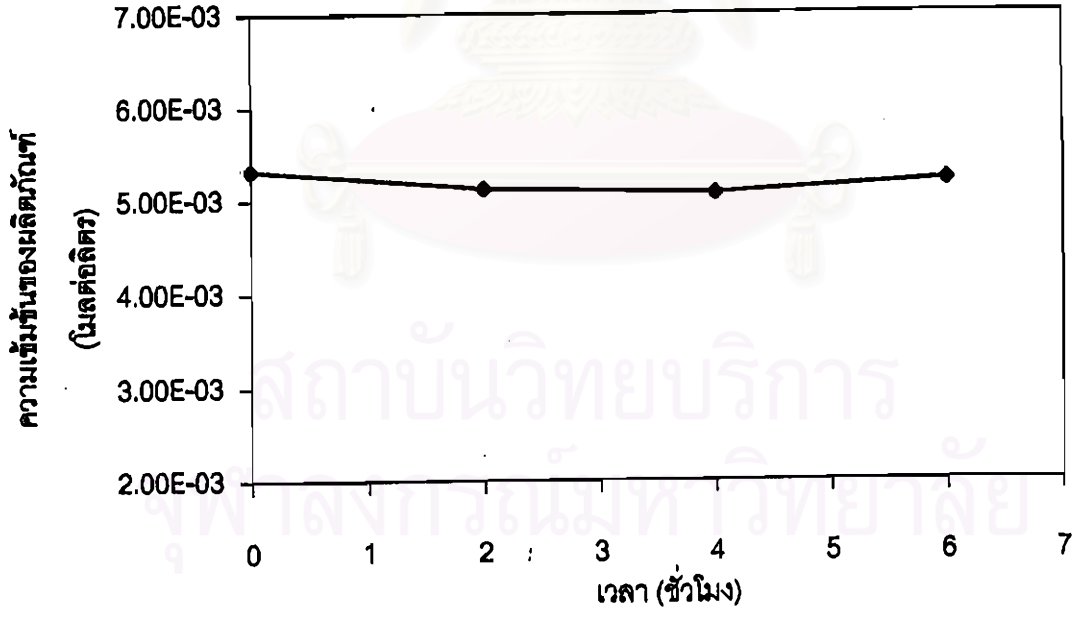
ตารางที่ 5.5 เสถียรภาพในการทำงาน (operation stability) ของเอนไซม์ตรึงรูป

ผู้ทำงานวิจัย	ชนิดของเอนไซม์	ชนิดของปฏิกิริยา	วิธีในการตรึงเอนไซม์	ค่าครึ่งชีวิต (วัน) (half – life)
Mohammad และคณะ (1985)	Candida cylindracea	ไฮโดรไลซิส	วิธีห่อหุ้มแคปซูล	15.00
Jei-Fu Shaw และคณะ(1989)	Candida rugosa	ไฮโดรไลซิส	ดูดซับทางกายภาพ	16.67
Yang และ Rhee (1991)	Candida rugosa	ไฮโดรไลซิส	เชื่อมด้วยพันธะไอออนิก	18.75
Yang และ Rhee (1992)	Candida rugosa	ไฮโดรไลซิส	เชื่อมด้วยพันธะไอออนิก	9.00
Cho และ Ree (1992)	Mucor michei	อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน	วิธีการเชื่อมไขว้	97.00
S.Shin และ Rogers(1995)	Candida Utilis	อินเทอร์เอสเทอริฟิเคชั่น	เชื่อมด้วยพันธะไอออนิก	32.00
อดิสรณ์(1999) (ผลงานวิจัยนี้)	Candida cylindracea	ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น	เชื่อมด้วยพันธะไอออนิก	25.00

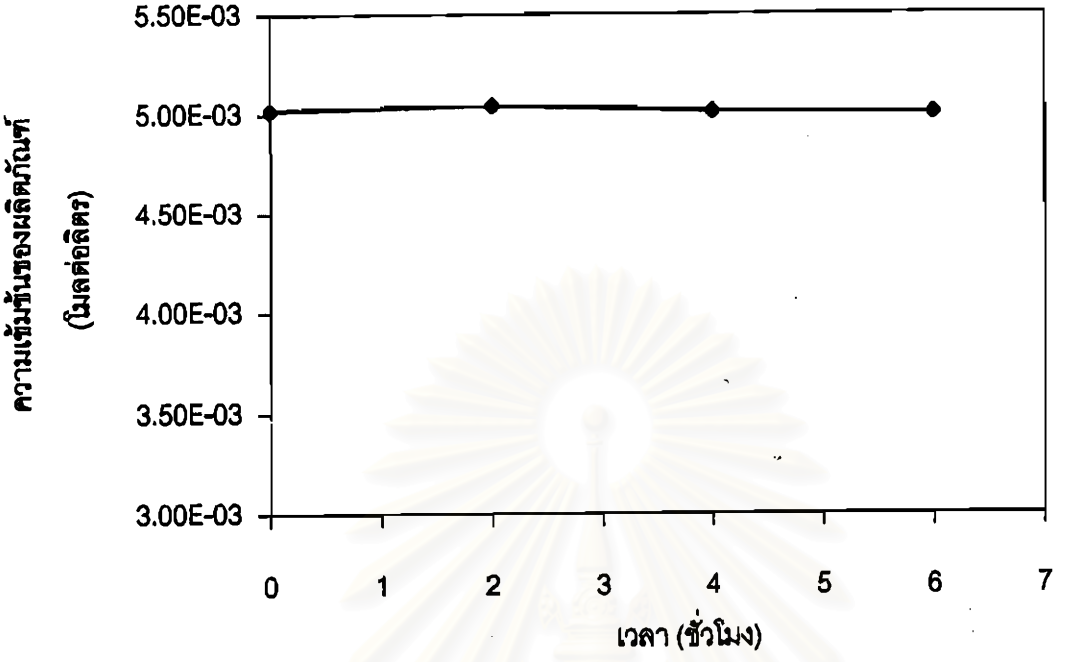
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



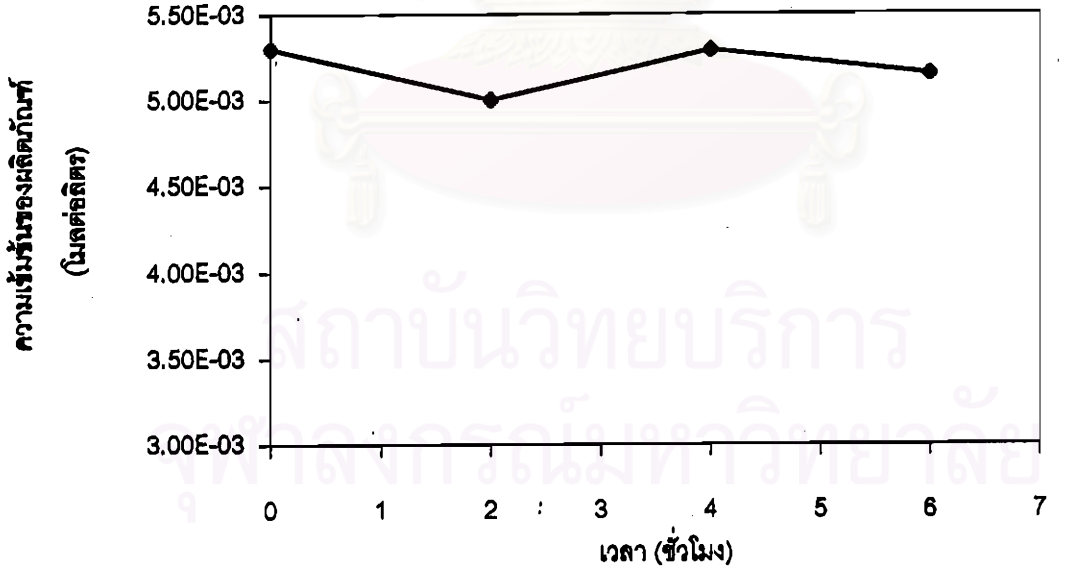
รูปที่ 5.18 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยา



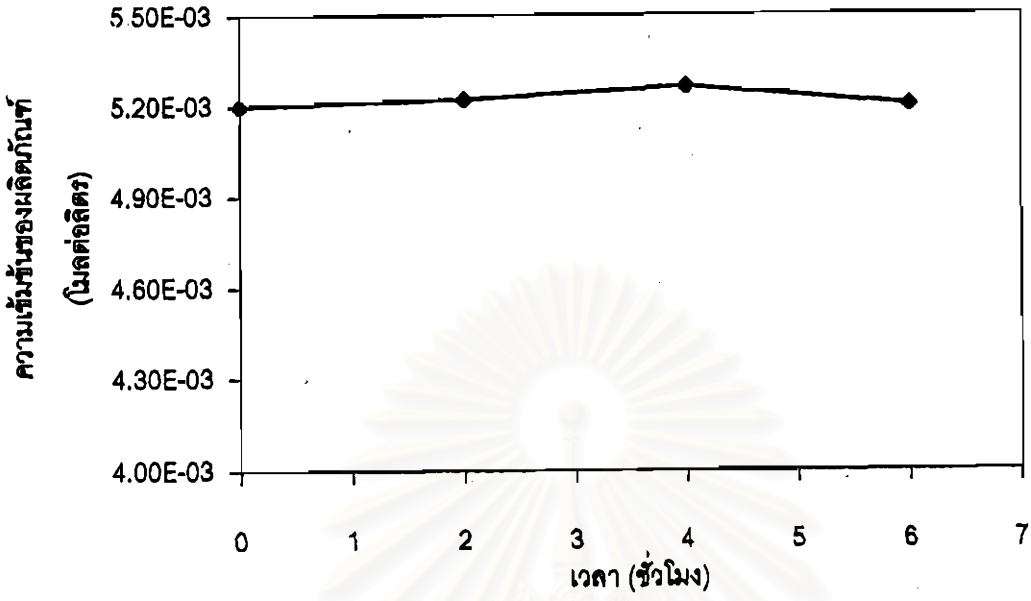
รูปที่ 5.19 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาผ่านไปเป็นเวลา 2 วัน



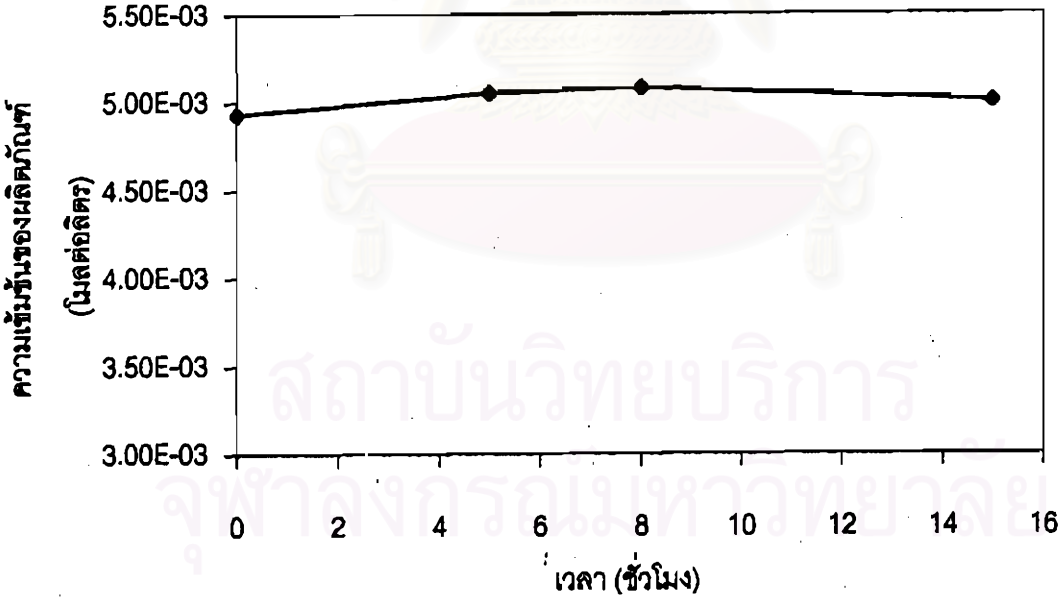
รูปที่ 5.20 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาผ่านไปเป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 5.21 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาผ่านไปเป็นเวลา 6 วัน



รูปที่ 5.22 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาผ่านไปเป็นเวลา 8 วัน



รูปที่ 5.23 ผลการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่ผ่านหอปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่อัตราการไหล 70 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อเริ่มทำปฏิกิริยาผ่านไปเป็นเวลา 10 วัน