

การประยุกต์ใช้เรโซซินอลฟอร์มัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจลเป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์



นายธนชัย ชัยจิตรสกุล

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

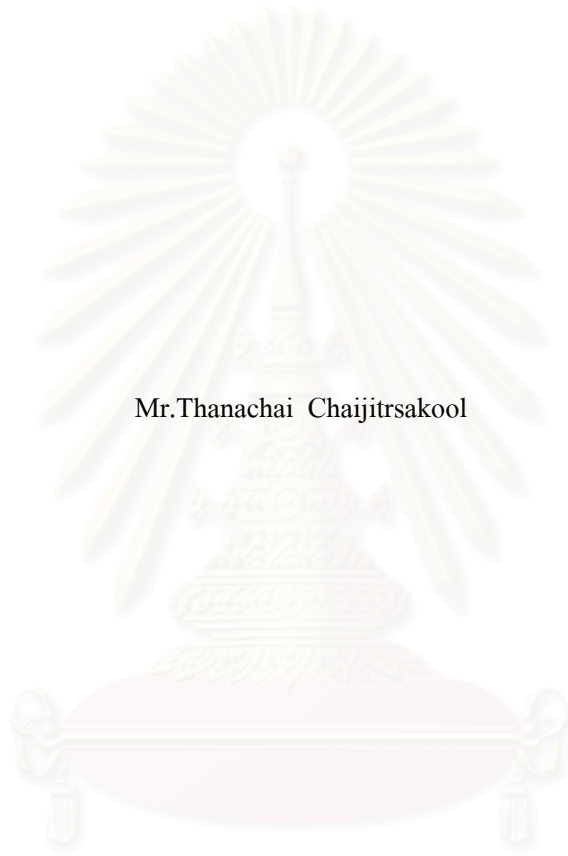
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3228-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APPLICATION OF RESORCINOL FORMALDEHYDE GELS AND CARBON GELS  
AS SUPPORT FOR ENZYME IMMOBILIZATION



Mr.Thanachai Chaijitsakool

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Engineering Program in Chemical Engineering  
Department of Chemical Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-3228-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การประยุกต์ใช้เรโซซินอลฟอร์มาลดีไฮด์เจลและคาร์บอนเจลเป็น  
ตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์

โดย

นายธนชัย ชัยจิตรสกุล


สาขาวิชา

วิศวกรรมเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา


ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปรีชานนท์

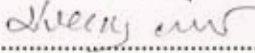
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ  
ศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาโท

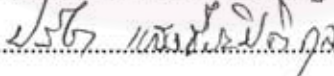
  
.....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. ดิเรก ลาวัณย์ศิริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ ตัมพะพานิชกุล)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรุ่ง ปรีชานนท์)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ กวสันต์)

  
.....กรรมการ  
(นายปรีชา แสงธีระปิติกุล)

สถาบันนวัตกรรมการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธนชัย ชัยจิตรสกุล : การประยุกต์ใช้เรโซซินอลฟอร์มัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจลเป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์. (APPLICATION OF RESORCINOL FORMALDEHYDE GELS AND CARBON GELS AS SUPPORT FOR ENZYME IMMOBILIZATION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สิริรุ่ง ปริษานนท์, 131หน้า. ISBN 974-14-3228-3

งานวิจัยนี้ศึกษากระบวนการเตรียมเรโซซินอลฟอร์มัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล ด้วยวิธีต่างกันคือ ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคตไอออนิก (RF-CS) และไม่ใช่สารลดแรงตึงผิว (RF-NS) โดย RF-NS Carbon มีสมบัติความเป็นรูพรุนดีที่สุดในที่ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซเป็น  $0.81 \text{ cm}^3/\text{g}$  พื้นที่ผิวเป็น  $550 \text{ m}^2/\text{g}$  และค่าสูงสุดการกระจายตัวของรูพรุนระดับเมโซ (Rp) เป็น  $7.2 \text{ nm}$  จากนั้นนำ RF Gel และ RF Carbon Gels ที่เตรียมได้ไปใช้ตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส ด้วยวิธีการตรึงที่แตกต่างกันคือ การตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ และวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล จากผลการวิจัยพบว่า การตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจลของ RF-NS Gel สามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเป็น 86.30% และ 84.36% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นตามลำดับ และเมื่อพิจารณากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-CS Carbon มีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเป็น 103.80 units/ml-mg protein เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ที่มีกิจกรรมจำเพาะเป็น 50.58 units/ml-mg protein ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS Carbon มีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเป็น 23.35 units/ml-mg protein เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ที่มีกิจกรรมจำเพาะเป็น 9.69 units/ml-mg protein เอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS Gel และ RF-NS Carbon Gel มีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยภายหลังการเร่งปฏิกิริยา 5 รอบ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงใน RF-NS Gel คงกิจกรรมไว้ได้สูงที่สุดเป็น 64.89% ขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS Carbon คงกิจกรรมไว้ได้สูงที่สุดเป็น 62.23% และภายหลังการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทั้งเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS Carbon สามารถรักษากิจกรรมไว้ได้สูงที่สุด โดยสามารถรักษากิจกรรมภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้มากกว่า 94%

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต..... *Emide Kmiti*.....  
 สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Amel*.....  
 ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



ID 4570339921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEY WORD: RF GELS / RF CARBON GELS / ENZYME IMMOBILIZATION

THANACHAI CHAJITRSAKOOL : APPLICATION OF RESORCINOL  
FORMALDEHYDE GELS AND CARBON GELS AS SUPPORT FOR ENZYME  
IMMOBILIZATION. THESIS ADVISOR : ASST.PROF.SEEROONG  
PRICHANONT, 131 pp. ISBN: 974-14-3228-3

In this work we studied two techniques of RF gels and carbon gels preparation, synthesized with and without cationic surfactant (RF-CS and RF-NS corresponding). RF-NS carbon shows the best porous properties comparing to RF-NS gel and RF-CS carbon with mesopore volume as high as 0.81 cm<sup>3</sup>/g, surface area as high as 550 m<sup>2</sup>/g and mesopore size distribution peak (Rp) of 7.2 nm. Next, RF gels and carbon gels were used for alkaline protease and lipase immobilization. The two immobilization techniques used were physical adsorption for RF carbon gels and entrapped for RF gel. Results showed that RF-NS gel gave highest enzyme loading; 86.30% of initial enzyme for alkaline protease and 84.36% of initial enzyme for lipase. Immobilized alkaline protease on RF-CS carbon demonstrated the specific activity of 103.80 units/ml-mg protein comparing to 50.58 units/ml-mg protein of free enzyme. Immobilized lipase on RF-NS carbon demonstrated the specific activity of 23.35 units/ml-mg protein comparing to 9.69 units/ml-mg protein of free enzyme. Moreover, immobilized enzyme in RF-NS gel and carbon gel showed higher operation stability comparing to free enzymes. After 5 cycle run, immobilized alkaline protease in RF-NS gel gave 64.89% retention activity, while immobilized lipase in RF-NS carbon gave 62.23% retention activity. Immobilized enzyme in RF-NS carbon stored at room temperature and 4° C for 4 weeks gave more than 94% retention activity.

Department.....Chemical Engineering.....Student's signature.....*Thanachai Chajitrsakool*  
Field of study .....Chemical Engineering.....Advisor's signature.....*Seerong Prichanont*  
Academic year .....2005.....Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงลงได้ ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายต่อหลายท่าน ผู้วิจัยได้ระลึกถึงพระคุณและขอบพระคุณดังนี้

อาจารย์ณัฐพร โทณานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปริษานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ที่มอบโอกาสมาโดยตลอด ให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำทั้งในงานวิจัย และการดำเนินชีวิตตลอดระยะเวลาที่ศึกษาวิจัย จนผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จ

ศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ ตัณฑะพานิชกุล ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาสันต์ และอาจารย์ปรีชา แสงธีระปิติกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับการชี้แนะข้อบกพร่อง และคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ศาสตราจารย์ ดร. Hajime Tamon ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกียวโต สำหรับคำแนะนำทางด้านอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจล

คุณวรรณคารา อินทรปัญญา และ คุณสวลี เสนาพิทักษ์ สำหรับการช่วยเหลือด้านอุปกรณ์การทดลอง เครื่องมือวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

แหล่งสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย งบประมาณแผ่นดินปี 2546-2547 ที่ให้งบประมาณตลอดการทำวิจัย

บริษัท The East Asiatic (Thailand) Public Company Limited ที่กรุณามอบอินเทอร์เน็ต แอลคาไลน์ โปรติเอสสำหรับใช้ในการวิจัย

คุณศิริพร มนชยาพิสุทธิ์สำหรับมิตรภาพที่ดีเสมอมา และความช่วยเหลือในทุกๆด้าน โดยเฉพาะการติดต่อประสานงาน ทำให้ผู้วิจัยสามารถดำเนินเรื่องขอจบการศึกษาได้สำเร็จ

คุณเจริญ ธรรมรัตน์ สำหรับข้อแนะนำ และกำลังใจที่มีให้เสมอมา อีกทั้งยังเป็นแรงผลักดันสำคัญให้ผู้วิจัยสามารถเขียนและสอบวิทยานิพนธ์ได้เสร็จสมบูรณ์

พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีอนุภาคและกระบวนการวัสดุ สำหรับความช่วยเหลือและข้อแนะนำตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

ครอบครัวช่วยจิตรสกุลที่มอบความรัก ความอบอุ่น ความเข้าใจ และโอกาสทั้งการดำเนินชีวิต และทางการศึกษามาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณความตั้งใจของตัวผู้วิจัยเอง ที่พยายามทำงานวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้จนเสร็จสมบูรณ์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 บทนำและมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 รีโซซินอล พอร์มาลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล.....	3
2.2 เอนไซม์และการตรึงเอนไซม์.....	14
<b>บทที่ 3 การสำรวจเอกสาร</b>	
3.1 รีโซซินอล พอร์มาลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล.....	37
3.2 การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส.....	41
3.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปส.....	42
<b>บทที่ 4 วิธีการดำเนินการทดลองวิจัย</b>	
4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	47
4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	48
4.3 การเตรียมและการวิเคราะห์คุณสมบัติของอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล.....	49
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอร์รี่.....	51
4.5 การศึกษาตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส.....	51
4.6 การศึกษาตรึงเอนไซม์ไลเปส.....	56

บทที่ 5 ผลการศึกษาและการอภิปรายผล	
5.1 ผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล.....	60
5.2 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอส และเอนไซม์ไลเปส.....	65
5.2.1 ผลการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ.....	65
5.2.2 ผลการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล.....	81
บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ	
6.1 สรุป.....	91
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	92
รายการอ้างอิง.....	93
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. กราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน.....	100
ภาคผนวก ข. กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล.....	101
ภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA.....	102
ภาคผนวก ง. ข้อมูลการทดลอง อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล.....	103
ภาคผนวก จ. ข้อมูลการทดลอง การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอส.....	105
ภาคผนวก ฉ. ข้อมูลการทดลอง การตรึงเอนไซม์ไลเปส.....	111
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	117



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	วิธีสร้างรูปและสมบัติของเอนไซม์สร้างรูป.....	20
2.2	แสดงข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของตัวรองรับที่ไม่มีรูพรุนและมีรูพรุน.....	22
2.3	การจัดประเภทของตัวรองรับโดยใช้สมบัติทางเคมี.....	23
2.4	แสดงการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอส ในทางอุตสาหกรรม.....	28
4.1	แสดงสรุปเงื่อนไขในการเตรียมอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจล และการนำไปใช้ ในการตรึงเอนไซม์.....	59
5.1	แสดงค่าสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel.....	61
5.2	แสดงปริมาณโปรตีน (แอลคาไลน์โปรตีเอส) ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง.....	68
5.3	แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จาก การล้างด้วยเฮปแทน 3 ครั้ง.....	69
5.4	แสดงกิจกรรมจำเพาะของ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส และ เอนไซม์ ไลเปส	73
5.5	แสดงปริมาณโปรตีน (เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส) ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอน ที่มากับน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ.....	77
5.6	แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอน ในน้ำล้างภายหลังการเร่ง ปฏิกิริยาแต่ละรอบ.....	77
5.7	แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีเอส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำ ล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ.....	86
5.8	แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้างภายหลัง การเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ.....	86
5.9	ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสอิสระและเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีเอสสร้างรูป.....	90
5.10	ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสสร้างรูป.....	90

ตารางที่	หน้า
ก.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายที่มีความเข้มข้นของไทโรซีน ต่างๆ.....	100
ข.1 แสดงค่าอัตราส่วนพื้นที่ของโครมาโตกราฟีระหว่าง บิวทานอลกับเฮปแทน กับความเข้มข้นของบิวทานอลค่าต่างๆ.....	101
ค.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นค่าต่างๆ.....	102
ง.1 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isoterm) ของไนโตรเจน ที่ 77 เคลวิน ของ RF-NS carbon.....	103
ง.2 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isoterm) ของไนโตรเจน ที่ 77 เคลวิน ของ RF-CS carbon.....	104
จ.1 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีนเอส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่เวลาการตรึงต่างๆ .....	105
จ.2 แสดงกิจกรรมที่เปลี่ยนไปของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ เมื่อทำการ ทดสอบที่สภาวะเดียวกับการตรึงที่เวลาต่างๆ.....	106
จ.3 แสดงปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ค่าความเข้มข้นเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสค่าต่างๆ.....	106
จ.4 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ.....	107
จ.5 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ.....	107
จ.6 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน.....	108
จ.7 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน.....	108
จ.8 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่ง ปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล.....	109
จ.9 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอส อิสระ และแอลคาไลน์โปรตีนเอสตรึงรูป.....	109
จ.10 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอิสระ และ แอลคาไลน์โปรตีนเอสตรึงรูป ภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ.....	110

ตารางที่	หน้า
จ.11 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ.....	110
ฉ.1 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน ที่เวลาการตรึงต่างๆ.....	111
ฉ.2 แสดงกิจกรรมที่เปลี่ยนไปของเอนไซม์ไลเปสอิสระ เมื่อทำการทดสอบที่สภาวะ เกี่ยวกับการตรึงที่เวลาต่างๆ.....	111
ฉ.3 แสดงปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ปริมาณเอนไซม์ไลเปสค่า ต่างๆ.....	112
ฉ.4 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ใช้ไปที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไลเปสอิสระ.....	112
ฉ.5 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการ เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ.....	113
ฉ.6 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการ เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน.....	113
ฉ.7 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการ เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน.....	114
ฉ.8 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการ เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล.....	114
ฉ.9 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และ ไลเปสตรึงรูป.....	115
ฉ.10 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และ แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ.....	115
ฉ.11 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ.....	116

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แผนภาพแสดงกระบวนการเตรียมอาร์โอเจล และคาร์บอนเจล.....	4
2.2	กลไกการเกิดปฏิกิริยาโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชันของเรโซซินอลกับ ฟอร์มัลดีไฮด์.....	5
2.3	แสดงการสร้างโครงสร้างของเจลในช่วงโซล-เจลทรานซิชัน.....	6
2.4	แสดงภาพถ่าย SEM ของคาร์บอนไครโอเจลไมโครสเฟียร์ที่เตรียมโดย Yamamoto และคณะ.....	10
2.5	แสดงภาพถ่าย SEM ของคาร์บอนไครโอเจลไมโครสเฟียร์ที่เตรียมโดย Tonanon และคณะ.....	11
2.6	แสดงภาพถ่าย SEM พื้นผิวของคาร์บอนไครโอเจล ที่ใช้ไตรเมทิลสเทียริล แอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นสารลดแรงตึงผิว และน้ำเป็นตัวทำละลาย.....	12
2.7	แสดงภาพถ่าย SEM พื้นผิวของคาร์บอนไครโอเจล ที่ใช้เอ็ฟซี 4430 เป็นสารลดแรงตึงผิว.....	12
2.8	แสดงภาพถ่าย SEM ของภาคตัดขวางของคาร์บอนไครโอเจลไมโคร อันนีคอมป์.....	13
2.9	แสดงปฏิกิริยาระหว่าง bisdiazobenzidine กับเอนไซม์.....	19
2.10	แสดงการทำ polyacrylamide gel ที่มีช่องตาข่ายสำหรับหุ้มเอนไซม์.....	19
4.1	แสดงแผนผังการควบคุมอุณหภูมิการ Carbonization RF gel เป็น RF carbon gel.....	49
4.2	แสดงขั้นตอนการเตรียม RF carbon gels ทั้งแบบ RF-NS carbon gel และ RF-CS carbon gel.....	50
4.3	แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ บน RF Carbon Gels.....	53
4.4	แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล ของ RF-NS Gel.....	54
4.5	แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels	57
4.6	แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจลของ RF-NS Gel.....	58

รูปที่	หน้า	
5.1	แสดงไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ในโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel โดยที่เครื่องหมายที่บ่งชี้คือการดูดซับและเครื่องหมายโปร่งคือการคายซับ.....	60
5.2	แสดงค่าปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel.....	63
5.3	แสดงภาพถ่ายSEM ของ RF carbon a) RF-CS carbon และ b) RF-NS carbon ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า.....	64
5.4	แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF-NS gel ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า.....	64
5.5	แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรตีนเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-CS และ RF-NS carbon ที่เวลาต่างๆ.....	67
5.6	แสดงปริมาณโปรตีน (ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon และ RF-CS carbon ที่เวลาต่างๆ.....	68
5.7	แสดงผลของวิธีการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพที่มีต่อกิจกรรมของ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอส อีสระและเอนไซม์ไลเปสอีสระ.....	69
5.8	แสดงปริมาณโปรตีน (แอลคาไลน์โปรตีนเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสค่าต่างๆ.....	70
5.9	แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon ที่ปริมาณ เอนไซม์ ไลเปสค่าต่างๆ.....	71
5.10	แสดงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น จากการเร่งปฏิกิริยา ของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสอีสระในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น.....	72
5.11	แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปจากการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน ของเอนไซม์ไลเปสอีสระในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น.....	73
5.12	แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆ ของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอส ที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอสอีสระ.....	76
5.13	แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆ ของเอนไซม์ ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์ไลเปสอีสระ.....	76
5.14	แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสอีสระ และ เอนไซม์แอลคาไลน์ โปรตีนเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน.....	79



รูปที่	หน้า
5.15 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน.....	79
5.16 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน.....	80
5.17 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน.....	80
5.18 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนและเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ.....	85
5.19 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจลที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆ.....	86
5.20 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป .....	87
5.21 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป.....	88
5.22 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป.....	88
5.23 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป.....	89
ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน.....	100
ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล.....	101
ค.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA.....	102

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 บทนำและมูลเหตุจูงใจ

เอนไซม์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalyst) ที่มีศักยภาพในการทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นได้มากถึง  $10^4 - 10^8$  เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง [1] ในขณะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์เพียงเล็กน้อย นอกจากนั้น คุณสมบัติที่โดดเด่นอีกประการของเอนไซม์ นั่นคือ ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเข้ากับสับสเตรต (substrate) ใหม่ได้ ด้วยเหตุนี้เอง จึงได้มีการนำเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ไปใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย โดยเฉพาะ อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม และ อุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์อิสระ (free enzyme) มีข้อจำกัดหลายประการ อาทิ ความเสถียร และความยุ่งยากในการแยกเอนไซม์อิสระออกจากสารละลายของสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว การนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้จะเป็นทางเลือกที่นำไปสู่การแก้ปัญหา อีกทั้งยังมีโอกาสเพิ่มแอกติวิตี และสามารถใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องได้ (continuous process)

วิวัฒนาการเรื่องการศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปเกิดขึ้นเป็นลำดับ ได้มีผู้ศึกษาวิจัยนำเสนอตัวรองรับ (support) ชนิดใหม่ ๆ มาใช้ในการตรึงเอนไซม์ ด้วยวิธีการตรึงที่แตกต่างกันออกไป สำหรับงานวิจัยนี้ได้เสนอวัสดุรูพรุน (porous material) ชนิดหนึ่ง คือ Resorcinol Formaldehyde gels และ carbon gels (RF gels และ RF carbon gels) RF carbon gels เป็นวัสดุระดับนาโนเมตรที่มีคุณสมบัติเด่นในหลาย ๆ ด้าน คือเป็นวัสดุโพรงที่มีความพรุนสูงมากกว่า 80% มีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงอยู่ในช่วง  $400 - 1200 \text{ m}^2/\text{g}$  และมีปริมาตรของรูพรุนระดับเมโซพอร์ (mesopore volume) สูง [2] ยิ่งไปกว่านั้น การที่ RF carbon gels สามารถสังเคราะห์ได้หลากหลายวิธี ซึ่งทำให้ได้ RF carbon gels ที่มีคุณสมบัติความเป็นรูพรุน และลักษณะพื้นผิวที่แตกต่างกัน อันจะนำไปสู่การเลือก RF carbon gels ที่มีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ตรึงเอนไซม์แต่ละชนิด

งานวิจัยนี้มีความสนใจในการนำ RF gels และ RF carbon gels ที่มีลักษณะแตกต่างกันสองชนิด มาใช้เป็นวัสดุในการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline protease) และเอนไซม์ไลเปส (Lipase) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ มีความสำคัญและใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมด้านเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมด้านอื่น ๆ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส มีความแตกต่างกันในแง่ระบบของการเร่งปฏิกิริยา กล่าวคือ เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส จะใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส (Hydrolysis) ของโปรตีน ซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลาย (aqueous system) ในขณะที่ เอนไซม์ไลเปสใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) ของแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ ซึ่งมีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย (non-aqueous system)

นอกจากนั้น งานวิจัยนี้ยังมีความสนใจศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์ที่แตกต่างกันสองวิธี คือ วิธีดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) และวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล (gel entrapment) ซึ่งสอดคล้องกับกระบวนการเตรียมวัสดุ RF ที่ผ่านกระบวนการโซล-เจล โพลีคอนเดนเซชัน (sol-gel polycondensation) ได้เป็น RF gels และการเผา RF gels ให้เป็น RF carbon gels ที่มีรูพรุนสูง

## 1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของการเตรียม RF gel และ RF carbon gels ที่มีต่อสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF gel และ RF carbon gels ที่เตรียมได้
2. เพื่อศึกษาผลของวิธีการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอส และเอนไซม์ไลเปสบน RF gel และ RF carbon gels

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. เตรียม RF gel และ RF carbon gels ด้วย 2 วิธีที่แตกต่างกัน คือ วิธีที่ใช้และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอออนิก
2. ศึกษาสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF gel และ RF carbon gels ที่เตรียมได้
3. ตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอส และเอนไซม์ไลเปสบน RF gel และ RF carbon gels โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) และวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล (Gel entrapment)
4. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกาะติดของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยา และเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงที่มี RF gel และ RF carbon gels เป็นตัวรองรับ เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความเป็นไปได้ในการนำ RF gels และ RF carbon gels ไปประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรตีนเอส และเอนไซม์ไลเปส
2. เป็นแนวทางในการศึกษาและประยุกต์ใช้ RF gels และ RF carbon gels กับตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพชนิดอื่นๆต่อไป

## บทที่ 2

### ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 รีโซซินอล ฟอर्मัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล

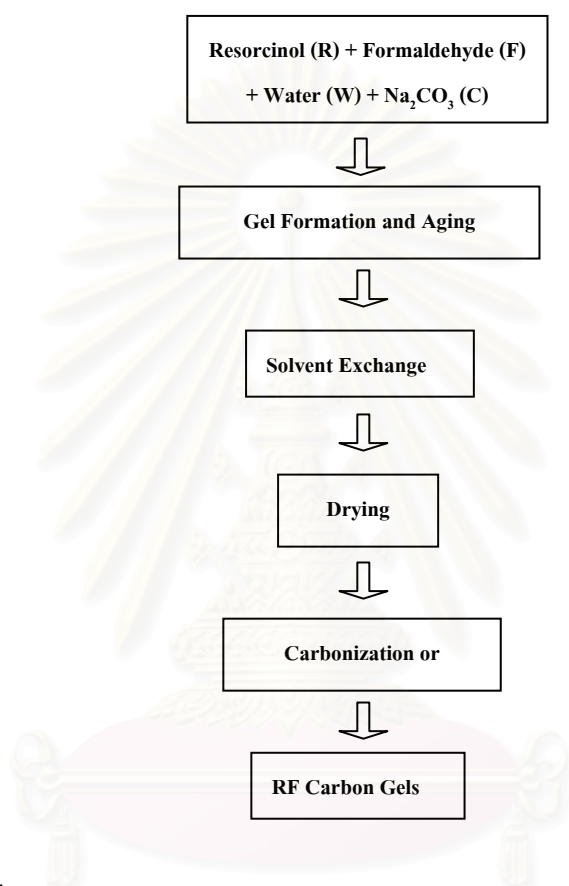
รีโซซินอล ฟอर्मัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล (Resorcinol Formaldehyde gels and carbon gels) หรือ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล (RF gels and carbon gels) เป็นวัสดุรูพรุนที่จัดอยู่ในตระกูลฟีนอลิกเรซิน (phenolic resin) ที่มีสมบัติความเป็นรูพรุนที่โดดเด่นในหลายๆ ด้าน ทั้งที่มีความพรุนสูง (>80%) มีพื้นที่ผิวสูง (400-900 m<sup>2</sup>/g) รวมถึงปริมาตรของรูพรุนสูง (1-3 cm<sup>3</sup>/g) [2] จึงทำให้วัสดุชนิดนี้ได้รับความสนใจศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลาย

Pekala เป็นผู้แรกที่ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์คาร์บอนแอโรเจลขึ้นในปี ค.ศ. 1989 โดยสังเคราะห์ปฏิกิริยาโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชัน (sol-gel polycondensation) ของรีโซซินอล (resorcinol; 1,3-dihydroxybenzene) กับฟอर्मัลดีไฮด์ (formaldehyde; HCHO) ถัดมาต่อไป ทำให้แห้งด้วยสภาวะเหนือวิกฤติ (super critical drying) ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้ได้ RF aerogels จากนั้นทำการไพโรไลซิส (pyrolysis) RF aerogels ที่ได้ ภายใต้สภาวะบรรยากาศเฉื่อย จะทำให้ได้ carbon aerogels [3]

กระบวนการโซล-เจล (sol-gel process) ค้นพบโดย Belmen เป็นกระบวนการสร้างชั้นฟิล์มบางโดยโซล (Sol) เกิดจากอนุภาคของแข็งกระจายตัวอยู่ในตัวกลางที่เป็นของเหลว และเมื่ออนุภาคโซลเริ่มเกิดการรวมตัวกันก็จะทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ขณะที่เกิดการรวมตัว สิ่งที่เราเห็นได้นั้นคือเจล (gel) โดยอนุภาคของโซลมีขนาดตั้งแต่ 10<sup>-5</sup>-10<sup>-2</sup> นาโนเมตร [4] กระบวนการโซล-เจลนี้มีศักยภาพในการสังเคราะห์วัสดุรูพรุนที่มีลักษณะการก่อตัวของรูปร่างแตกต่างกัน ทั้งแบบก้อนเดี่ยว (monolith) แบบฟิล์ม (film) แบบอนุภาคทรงกลม (microsphere) แบบเส้นใย (fiber) และแบบอื่น ๆ ซึ่งกระบวนการโซล-เจลนี้ ยังมีความสามารถในการควบคุมโครงสร้างของอนุภาคและ โครงสร้างของรูพรุนโดยการปรับเงื่อนไขบางประการ เช่น ปริมาณสารตั้งต้น เป็นต้น ดังนั้น กระบวนการโซล-เจล จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการออกแบบโครงสร้างของวัสดุที่มีรูพรุน เพื่อใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ อย่างหลากหลาย [5]

กระบวนการเตรียม อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล จะเริ่มจากการเตรียมสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น โดยมีอัตราส่วนของสารตั้งต้นต่อตัวเร่งปฏิกิริยา หรือต่อตัวทำละลายที่แตกต่างกันออกไปตามแต่ละสูตร จากนั้นสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นจะผ่านกระบวนการโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชัน จนได้เป็นอาร์เอฟไฮโดรเจล (RF hydrogels) ซึ่งยังมีน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายอยู่ภายในโครงสร้าง น้ำ

เหล่านี้จะถูกแทนที่ด้วยสารอินทรีย์โดยกระบวนการแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย (solvent exchange) จากนั้นอาร์เอฟเจลนี้จะถูกทำให้แห้งด้วยกระบวนการต่าง ๆ ซึ่งแต่ละกระบวนการจะทำให้ได้ อาร์เอฟเจลที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไป ในขั้นตอนสุดท้าย อาร์เอฟคาร์บอนเจล สามารถเตรียมได้ โดยการเผาอาร์เอฟเจลภายใต้บรรยากาศเฉื่อย (Carbonization or Pyrolysis) กระบวนการเตรียมโดยสรุปแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงกระบวนการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

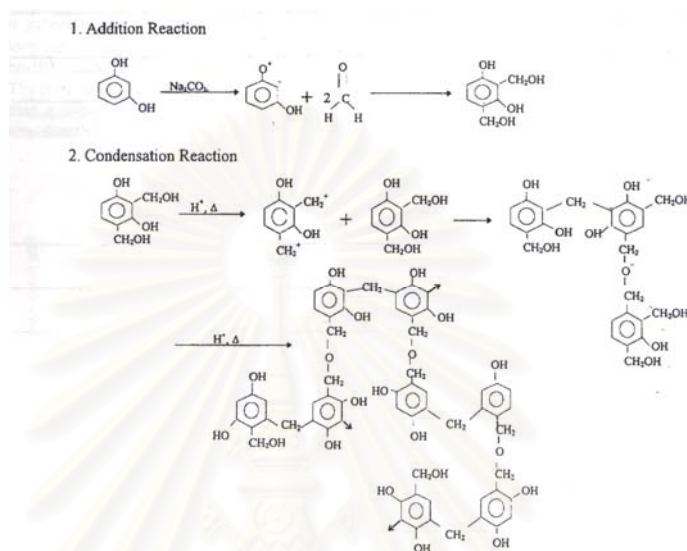
ในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล ได้มีผู้ศึกษาวิจัยแปรค่าตัวแปรต่าง ๆ หรือวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันไป เพื่อให้ได้อาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลที่มีสมบัติความเป็นรูพรุน และมีรูปสัณฐานที่มีความหลากหลายเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ตรงต่อความต้องการมากยิ่งขึ้น

### 2.1.1 กระบวนการสังเคราะห์อาร์เอฟไฮโดรเจล

อาร์เอฟไฮโดรเจล สามารถเตรียมได้โดยกระบวนการโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชันของ รีโซซินอล (Resorcinol; 1,3-dihydroxybenzene;  $C_6H_4(OH)_2$ ; R) กับฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde;  $HCHO$ ; F) โดยมีโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate;  $Na_2CO_3$ ; C) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีน้ำ (W) เป็นตัวทำละลาย [3] โดยกระบวนการโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชันนั้น ประกอบด้วยกลไก



หลัก 2 ชั้น คือ ชั้นการเกิดรีโซซินอล แอนไอออน (resorcinol anions) เพื่อทำปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ จนเกิดเป็นไฮดรอกซีเมทิล (hydroxymethyl) ของรีโซซินอล และอีกขั้นตอนหนึ่งคือกระบวนการควบแน่นของโมโนเมอร์ จนเกิดเป็นคลัสเตอร์ (clusters) [6] โดยกลไกดังกล่าวแสดงได้ดังรูปที่ 2.2



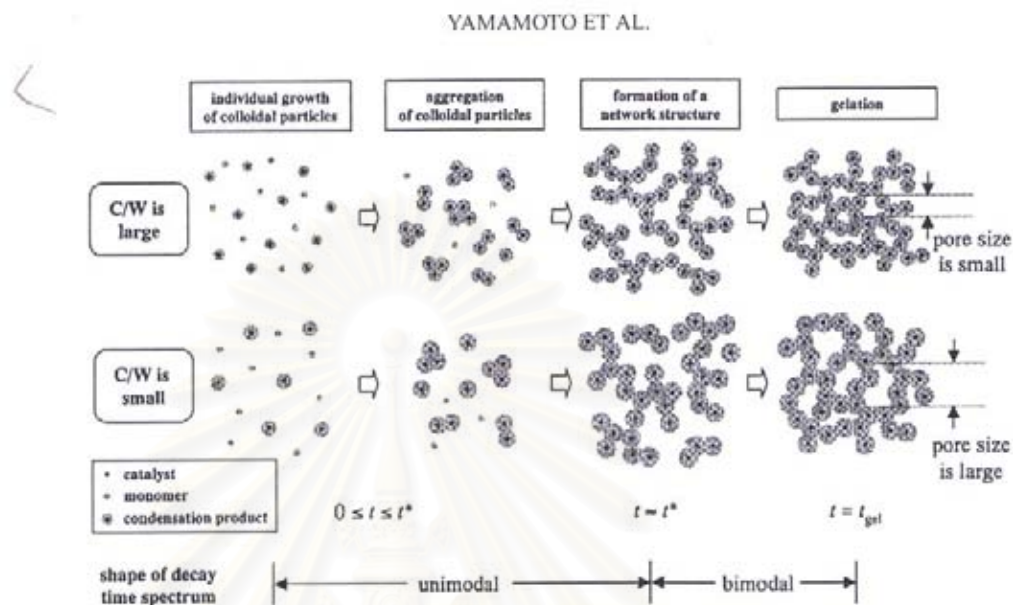
รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดปฏิกิริยาโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชันของรีโซซินอลกับฟอร์มัลดีไฮด์ [21]

ในขั้นตอนการเกิดพอลิคอนเดนเซชัน ปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อจำนวนและขนาดของอาร์เอฟคลัสเตอร์เหล่านี้ คือ อัตราส่วนระหว่างสารตั้งต้นคือรีโซซินอล (R) กับตัวเร่งปฏิกิริยา คือ โซเดียมคาร์บอเนต (C) หรือ R/C และค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น [5]

เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา Yamamoto และคณะ [7] ได้ทดลองศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่าง R กับ W (R/W) และอัตราส่วนระหว่าง R กับ C (R/C) ที่มีต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา และโครงสร้างของอาร์เอฟไฮโดรเจลที่เตรียมได้ โดยใช้ Dynamic light scattering และ Static light scattering ทำการศึกษาในช่วงการเปลี่ยนจากโซลเป็นเจล หรือ โซล-เจลทรานซิชัน (sol-gel transition) จากการศึกษาพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น เมื่อ R/W มีค่าน้อย และ R/C มีค่ามาก โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่เวลา decay time มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกันกับอัตราการเกิดปฏิกิริยา

อัตราการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวนั้นพิจารณาในขอบเขตของเวลาดีเคย์ กล่าวคือ ที่เวลาก่อนเวลาดีเคย์นี้ อนุภาคคอลลอยด์จะมีลักษณะเป็นอนุภาคแบบบราวเนียน (brownian particle) ในขณะที่หลังเวลาดีเคย์นี้ อนุภาคคอลลอยด์จะสร้างตัวกันเป็นโครงสร้างโครงข่าย (network structure) และ

สร้างตัวเป็นเจลที่สมบูรณ์ [7] ลักษณะการเกิดโครงสร้างในช่วงโซล-เจลทรานซิชัน แสดงได้ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการสร้างโครงสร้างของเจลในช่วงโซล-เจลทรานซิชัน [53]

Tamon และ Ishizaka [2] ได้ศึกษากระบวนการเกิดเจลและผลของ R/W และ R/C ที่มีต่ออาร์เอพ แอโรเจล (RF aerogel) โดยใช้ (Small-angle X-ray Scattering; SAXS) พบว่าขนาดของอนุภาคคอลลอยด์จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลา จนกระทั่งเกิดเจล อนุภาคคอลลอยด์จะมีขนาดคงที่ กล่าวคือ ไม่มีการเจริญเติบโตของอนุภาคต่อไปอีก เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ RF aerogel ภายหลังจากการทำให้แห้งพบว่า เมื่อ R/W มีค่ามาก รัศมีรูพรุนโดยเฉลี่ย (radius peak;  $r_p$ ) จะมีค่าลดลง ในขณะที่เมื่อ R/C มีค่ามาก รัศมีรูพรุนจะมีค่าสูงขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงปริมาตรรูพรุนโดยรวม (total volume;  $V_p$ ) พบว่า เมื่อ R/W ลดลง ปริมาตรรูพรุนจะมีค่าเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์เหล่านี้สามารถอธิบายได้โดยจำกัดความของรูพรุน โดยรูพรุนคือช่องว่างระหว่างเจลที่เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างกัน (interconnect) ของอนุภาค โดยช่องว่างเหล่านี้ขึ้นกับปริมาณน้ำกลั่น (W) ที่ใช้เป็นตัวละลาย และยังขึ้นกับความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา (C) จากการศึกษาเริ่มต้น พบว่า เมื่อความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ขนาดของอนุภาคคอลลอยด์จะมีขนาดเล็กลง ซึ่งส่งผลต่อการสร้างโครงสร้าง โครงข่ายที่ทำให้อยู่กันหนาแน่นขึ้น ขนาดของช่องว่างระหว่างเจลจึงลดลง

อีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างของอาร์เอพไฮโดรเจล นั่นคือ ค่าความเป็นกรด-เบส (พีเอช; pH) ของสารละลายอาร์เอพเริ่มต้น โดยตัวเร่งปฏิกิริยาโซเดียมคาร์บอเนต นอกจากจะมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาแล้ว ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลาย

อาร์เอฟอีกด้วย โดยโซเดียมคาร์บอเนตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเบส ซึ่งส่งผลให้สารละลายอาร์เอฟมีค่าพีเอชสูงขึ้น [6]

Job และคณะ [6] ได้ศึกษาผลของการควบคุมค่าพีเอชของสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นที่มีต่อโครงสร้างของคาร์บอน เซโรเจล (carbon xerogels) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH) ในการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นในช่วง พีเอช 5.45 ถึง 7.35 โดยพบว่าเจลภายหลังการทำแห้งโดยเครื่องระเหยแห้งในระบบสุญญากาศ (vacuum evaporation) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เซโรเจลที่เตรียมจากสารละลายตั้งต้นที่มีค่าพีเอชต่ำ จะมีการหดตัวหรือยุบตัว (shrinkage) ของเซโรเจลประมาณ 20% ซึ่งน้อยกว่าสารละลายตั้งต้นที่มีค่าพีเอชสูง ซึ่งจะมีการยุบตัว 60% เมื่อพิจารณาถึงสมบัติความเป็นรูพรุนของอาร์เอฟ เซโรเจล พบว่า ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นมีค่าสูง อาร์เอฟ เซโรเจลจะมีพื้นที่ผิว (surface area;  $S_{bet}$ ) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุน ( $d_p$ ) ลดลง ในขณะที่ปริมาตรรูพรุนระดับไมโคร (micropore volume) มีค่าสูงขึ้น และเมื่อทำการเผาให้เป็นคาร์บอน (carbonization or pyrolysis) พบว่าที่ค่าพีเอชเริ่มต้นสูง คาร์บอน เซโรเจลจะมีพื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุน ปริมาตรรูพรุนระดับไมโคร และขนาดรูพรุนมีค่าน้อย โดยเฉพาะเมื่อค่าพีเอชสูงมากกว่า 6.50 คาร์บอน เซโรเจลจะมีโครงสร้างเข้าใกล้ คาร์บอนที่ไม่มีรูพรุน (non-porous carbon)

การศึกษาของ Job และคณะ สอดคล้องกับ Lin และ Ritter [5] ที่ใช้กรดไนตริกเจือจาง (nitric acid;  $HNO_3$ ) โดยรายงานว่ xerogels ที่เตรียมจากสารละลายเริ่มต้นที่มีค่าพีเอช 7-7.5 ไม่สามารถตรวจพบปริมาตรรูพรุนได้ Lin และ Ritter ได้อธิบายถึงโครงสร้างรูพรุนของอาร์เอฟไฮโดรเจลที่เตรียมจากสารละลายอาร์เอฟที่มีค่าพีเอชสูง โครงสร้างรูพรุนจะอ่อน เมื่อนำอาร์เอฟไฮโดรเจลไปทำให้แห้งหรือเผาที่อุณหภูมิสูง โครงสร้างจะยุบตัวหรือเสียโครงสร้าง (collapse) ทำให้เซโรเจลหรือคาร์บอน เซโรเจล มีพื้นที่ผิว และปริมาตรรูพรุนน้อยมากจนอาจหมดไป

### 2.1.2 กระบวนการเตรียมอาร์เอฟเจล

อาร์เอฟเจล (RF gels) เป็นชื่อเรียกโดยรวม ๆ ของอาร์เอฟไฮโดรเจลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้ง โดยอาร์เอฟเจลมีชื่อเรียกเฉพาะตามวิธีการทำให้แห้งแตกต่างกัน อาร์เอฟเจลที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีเหนือวิกฤต (supercritical drying method) จะเรียกว่า อาร์เอฟ แอโรเจล (RF aerogels) อาร์เอฟเจลที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีเย็นเยือก (Freeze drying method) จะเรียกว่า อาร์เอฟไครโอเจล (RF cryogels) อาร์เอฟเจลที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธีใช้ลมร้อน (Hot air drying method) จะเรียกว่าอาร์เอฟ เซโรเจล (RF xerogels) และอาร์เอฟเจลที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยไมโครเวฟ (Microwave drying method) สำหรับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเรียกโดยใช้ชื่อ อาร์เอฟเจล (RF gels) เหตุผลที่มีผู้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการทำให้แห้งมาอย่างต่อเนื่อง เพราะกระบวนการระเหยน้ำแบบธรรมชาติ จะมีแรงคาปิลลารี (capillary force) ที่ผิวสัมผัสระหว่าง

ของเหลวและไอ (liquid-vapour interforce) อยู่มาก ซึ่งจะทำให้เกิดการหดตัวของโครงสร้างมาก เมื่อนำไปเผาให้เป็นคาร์บอนจะทำให้เกิดเป็นวัสดุที่ไม่มีรูพรุน

### 2.1.2.1 กระบวนการทำให้แห้งแบบเหนือวิกฤต (supercritical drying method)

การทำให้แห้งด้วยวิธีนี้ถึงแม้จะมีค่าใช้จ่ายสูง แต่สามารถกำจัดผลอันเนื่องมาจากความตึงผิวได้ด้วยขั้นตอนหลักๆ 4 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการแทนที่ด้วยตัวทำละลาย (solvent replacement stage) ขั้นตอนการแทนที่ด้วยกระบวนการแพร่ (diffusion replacement) ซึ่งเป็นขั้นการแพร่ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เข้ามาแทนที่ตัวทำละลายภายในรูพรุนของเจล ขั้นการผ่านสถานะเหนือวิกฤต (supercritical transition) เป็นการให้ความร้อนเพื่อเพิ่มอุณหภูมิไปสู่ช่วงอุณหภูมิของเหลวเหนือวิกฤต และขั้นการขยายตัวในสถานะที่อุณหภูมิคงที่ (isothermal expansion) ซึ่งในทุกๆขั้นตอนจะเป็นกระบวนการที่ดำเนินไปช้าๆเพื่อป้องกันการแตกหักของโครงสร้างเจล เจลที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเหนือวิกฤตนี้จะเรียกว่า แอโรเจล (aerogels) [8]

### 2.1.2.2 กระบวนการทำให้แห้งแบบเย็นเยือก (freeze drying method)

การทำให้แห้งวิธีนี้เป็นการทำให้ตัวทำละลายแข็งที่อุณหภูมิต่ำ แล้วจึงแยกออกโดยก่อนใช้วิธีนี้ สิ่งที่สำคัญคือการแลกเปลี่ยนน้ำหรือตัวทำละลายภายในเจลด้วยของเหลวอื่น เช่น ที-บิวทานอล (t-butanol) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นน้อย ในระหว่างการทำให้แข็ง ซึ่งจะช่วยลดการยุบตัวภายหลังการทำให้แห้ง วิธีการดังกล่าวนี้ คือ การแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย (solvent exchange) [9]

Tamon และคณะ [3] ได้ศึกษาการเตรียมคาร์บอนไครโอเจลโดยใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเย็นเยือก เปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม คือ การทำให้แห้งแบบเหนือวิกฤต จากการศึกษาพบว่า ไครโอเจลที่เตรียมได้มีไอโซเทอมของการดูดซับ (adsorption desorption isotherm) เป็นรูปแบบที่ 4 (IV type isotherm) เช่นเดียวกับแอโรเจล แต่ปริมาณการดูดซับก๊าซไนโตรเจนบนไครโอเจลจะน้อยกว่าแอโรเจล เมื่อพิจารณาการยุบตัวภายหลังการทำให้แห้ง พบว่า ไครโอเจลมีการยุบตัวมากกว่าแอโรเจลเล็กน้อย ส่งผลไปถึงพื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุนของไครโอเจลที่มีน้อยกว่าแอโรเจล และเมื่อนำไครโอเจลไปเผาเป็นคาร์บอนไครโอเจล พบว่า ไอโซเทอมของการดูดซับของคาร์บอนไครโอเจลในช่วงค่าความดันสัมพัทธ์ (Relative pressure) มีค่าต่ำนั้น สามารถดูดซับก๊าซไนโตรเจนได้สูงกว่าคาร์บอนแอโรเจล นั่นหมายถึงคาร์บอนไครโอเจลมีรูพรุนระดับไมโครมากกว่าแอโรเจล และคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมได้มีพื้นที่ผิวมากกว่า  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  และมีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซมากกว่า  $0.55 \text{ cm}^3/\text{g}$

แม้ว่าการทำให้แห้งแบบเย็นเยือกนี้จะทำให้เกิดการยุบตัวมากกว่าแบบเหนือวิกฤต แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก และมีต้นทุนที่ถูกกว่าและยังสามารถคงรูปของรูพรุนระดับเมโซไว้ได้ [3]



### 2.1.2.3 กระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธีอื่น

นอกจากการทำให้แห้งด้วยวิธีเหนียววิกฤต และวิธีเย็นเยือกแล้ว ยังมีวิธีที่มีความสะดวกและใช้ต้นทุนต่ำกว่า นั่นคือ การทำให้แห้งโดยใช้ลมร้อน (hot air drying) ภายในเตาอบที่เป็นบรรยากาศเฉื่อยอุณหภูมิ 323 K นานมากกว่า 48 ชั่วโมง และการทำให้แห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave drying) อาร์เอฟเจลที่ได้จากทั้งสองวิธีนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับอาร์เอฟไครโอเจลแล้วพบว่ามีความหนาแน่นมากกว่า ซึ่งทำให้รูพรุนระดับเมโซมีขนาดเล็กกว่า และมีการยุบตัวของเจลสูงกว่า แต่อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีทั้งสองนี้ยังสามารถรักษาความเป็นรูพรุนระดับเมโซไว้ได้ และยังสามารถนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป [3]

### 2.1.3 กระบวนการเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนเจล

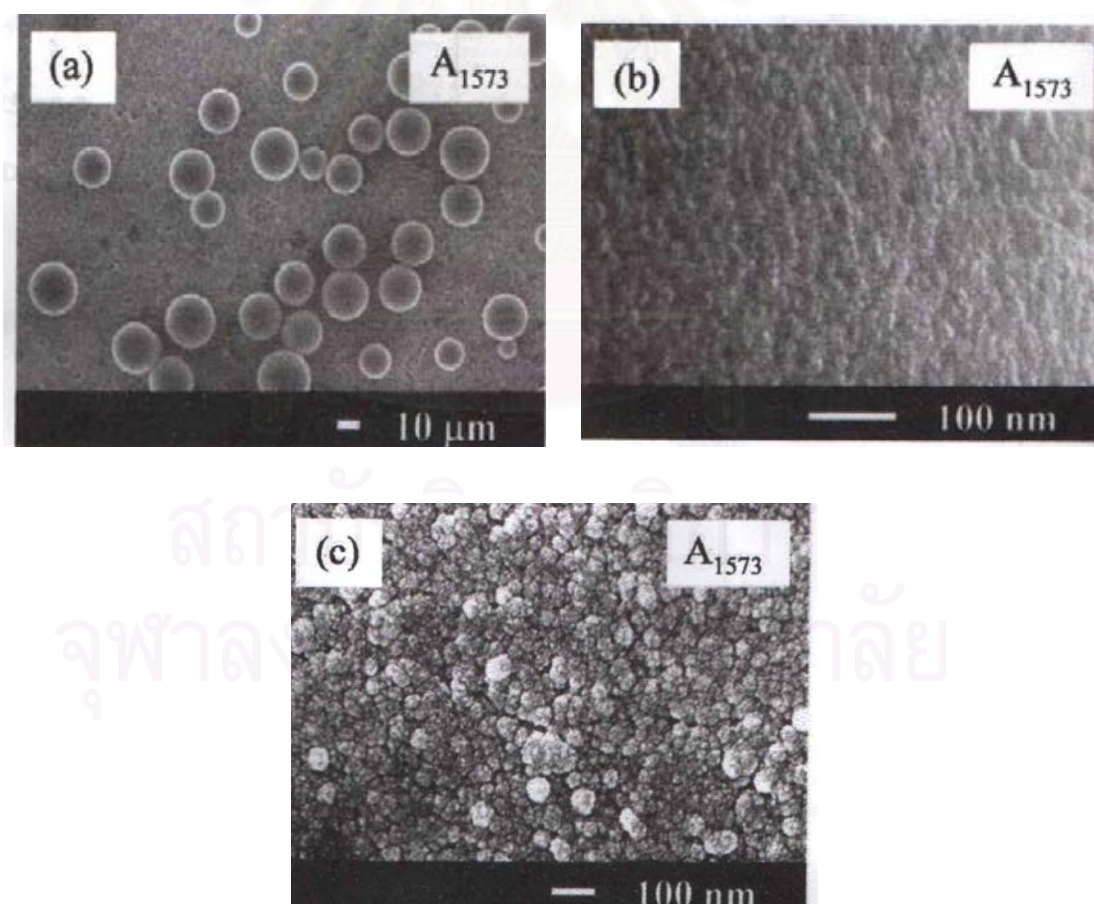
อาร์เอฟคาร์บอนเจล สามารถเตรียมได้โดยการเผา อาร์เอฟเจลที่อุณหภูมิสูง ภายในเตาเผาที่มีการไหลของก๊าซเพื่อการทำปฏิกิริยา (pyrolysis หรือ carbonization) โดยในขณะที่ทำการเผา จะมีการลดลงของน้ำหนัก (weight loss) ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิในช่วง 25-80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นขั้นการกำจัดพวคความชื้น จะมีการลดลงประมาณ 7% อุณหภูมิในช่วง 80-300 องศาเซลเซียส เป็นขั้นการกำจัดพวคสารอินทรีย์บางประเภท มีการลดลงประมาณ 5% และอุณหภูมิในช่วง 300-750 องศาเซลเซียส เป็นขั้นการสร้างโครงสร้างคาร์บอน (carbonization) มีการลดลงประมาณ 36% [5] เมื่ออุณหภูมิการเผาสูงกว่า 800 องศาเซลเซียส จะเป็นการเผาที่สมบูรณ์ เมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (IR spectroscopy) พบว่าหมู่ฟังก์ชันที่เป็นกลุ่ม OH, CH<sub>2</sub>, C-O-C และอะโรมาติกจะหมดไป โดยเฉลี่ยแล้วการลดลงของมวลหลังการเผาจะมีค่าประมาณ 35-45% [6] นอกจากการเปลี่ยนในเชิงมวลแล้ว การเผาอาร์เอฟเจลให้ได้เป็นอาร์เอฟคาร์บอนเจลนั้นยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติความเป็นรูพรุนของอาร์เอฟเจลอีกด้วย โดยอาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมได้จะมีพื้นที่ผิวสูงขึ้น แต่ขนาดรูพรุนในระดับเมโซ และเมโครจะลดลง

### 2.1.4 กระบวนการเตรียมอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลด้วยเทคนิคต่าง ๆ

การเตรียมอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจล นอกเหนือจากวิธีการเตรียมตามแบบแผนดั้งวิธีข้างต้นแล้วนั้น ยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาถึงการใช้เทคนิคที่แตกต่างกันออกไป อาทิ การใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactants) เข้ามาช่วยในขั้นการกระจายตัว (dispersion) การเตรียมคาร์บอนเจลในรูปของโครงสร้างรังผึ้งระดับไมโคร (microhoneycombs) เป็นต้น ทั้งนี้ อาจมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความสะดวกหรือความรวดเร็วในกระบวนการเตรียม หรือเพื่อสร้างอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่มีรูปลักษณะ และสมบัติความเป็นรูพรุนที่แตกต่างกันออกไป สามารถออกแบบโครงสร้างเพื่อการนำไปประยุกต์ในงานที่ต้องการวัสดุที่มีโครงสร้างเฉพาะแตกต่างกันไปได้



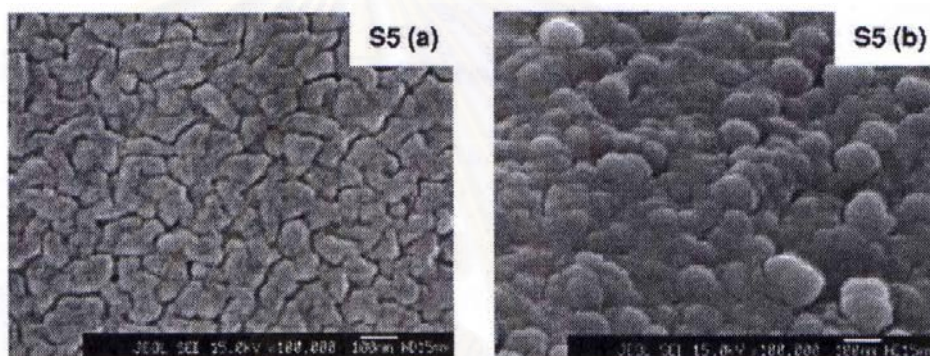
Yamamoto และคณะ [10] ได้ศึกษาการเตรียมคาร์บอนไครโอเจลที่มีลักษณะเป็นทรงกลมระดับไมโคร (carbon cryogel microspheres) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic) คือ สแปน 80 (SPAN 80) และใช้ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) เป็นตัวทำละลายในขั้นการกระจายตัว เพื่อก่อให้เกิดอินเวอร์สอีมัลชัน (inverse emulsion) โดยภายหลังการกระจายตัวจะได้อนุภาคอาร์เอพเจลที่กระจายตัวในตัวทำละลาย ลักษณะ รูปสัณฐาน พื้นผิว และภาคตัดขวาง ของคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมได้แสดงคังรูป 3.4 ซึ่งเห็นได้ว่าลักษณะของคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมได้มีลักษณะทรงกลมขนาดประมาณ 10-20  $\mu\text{m}$  และมีพื้นผิวก่อนข้างเรียบ และเมื่อตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุนของคาร์บอนไครโอเจลจะพบว่าไอโซเทอมการดูดซับเป็นชนิดที่ 4 คือมีองค์ประกอบของรูพรุนทั้งระดับไมโคร และระดับเมโซ โดยมีพื้นที่ผิวสูงกว่า 500  $\text{m}^2/\text{g}$  มีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซมากกว่า 0.90  $\text{cm}^3/\text{g}$  และมีปริมาตรรูพรุนระดับไมโครน้อยกว่า 0.24  $\text{cm}^3/\text{g}$  โดยโครงสร้างของคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมได้นี้มีลักษณะโครงสร้างแบบสองชั้น (dual structure) คือมีรูพรุนระดับเมโซอยู่ภายใน และมีรูพรุนระดับไมโครอยู่ที่พื้นผิวของคาร์บอนไครโอเจล



รูปที่ 2.4 แสดงภาพถ่าย SEM ของคาร์บอนไครโอเจลไมโครสเฟียร์ ที่เตรียมโดย Yamamoto และคณะ

(a) ไมโครสเฟียร์ (b) พื้นผิว (c) ภาคตัดขวาง [54]

จากความสำเร็จในการใช้สารลดแรงตึงผิว ในการเตรียมคาร์บอนไครโอเจล ไมโครสเฟียร์ของ Yamamoto และคณะ จึงมีผู้ทำการวิจัยโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น ๆ Tonanon และคณะ [11] ได้ศึกษาการใช้สารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ สแปน 80 (SPAN 80) ไตรเมทิลสเตียริลแอมโมเนียมคลอไรด์ (trimethylstearylammmonium chloride, C18) และ เอ็ฟซี 4430 (3M fluorad FC 4430) โดยในส่วนของการใช้สแปน 80 ได้คาร์บอนไครโอเจลที่โครงสร้างสองชั้น เช่นเดียวกับ Yamamoto และคณะ และพบว่าความเข้มข้นของสแปน 80 มีผลต่อสมบัติความเป็นรูพรุนของคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมได้ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของสแปน 80 มีค่าน้อย จะทำให้ได้คาร์บอนไครโอเจลไมโครสเฟียร์ที่มีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซสูง และมีพื้นที่ผิวอยู่ในช่วง 629-699  $\text{m}^2/\text{g}$  ลักษณะพื้นผิว และภาคตัดขวางของคาร์บอนไครโอเจลแสดงดังรูปที่ 2.5



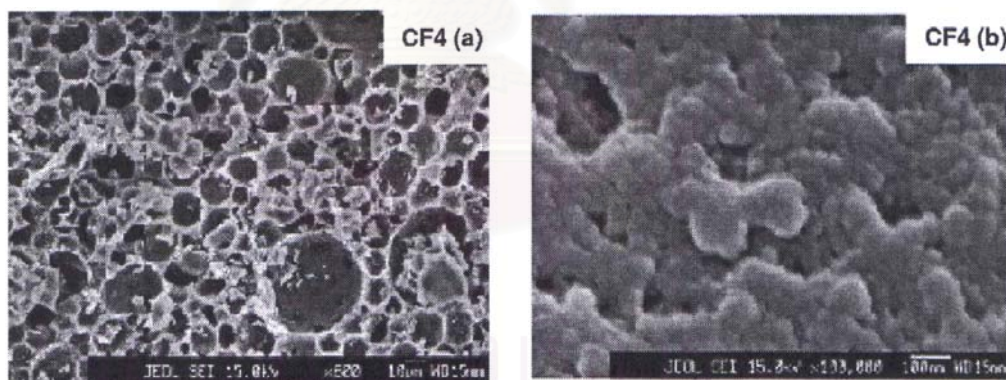
รูปที่ 2.5 แสดงภาพถ่าย SEM ของคาร์บอนไครโอเจลไมโครสเฟียร์ที่เตรียมโดย Tonanon และคณะ (a) พื้นผิว และ (b) ภาคตัดขวาง [11]

เมื่อทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำ ในขั้นตอนการกระจายตัวที่ใช้ไตรเมทิลสเตียริลแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดแคทไอออนิกในน้ำ และไซโคลเฮกเซน พบว่าสัดส่วนปริมาณของน้ำมีอิทธิพลต่อพื้นที่ผิว และปริมาตรรูพรุนระดับเมโซ และเมื่อเปรียบเทียบขนาด รูพรุนระดับเมโซกับคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมโดยใช้สแปน 80 พบว่ามีขนาดใหญ่กว่า และยิ่งไปกว่านั้นการเตรียมโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ยังเป็นวิธีที่ประหยัดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (environmental friendly) ลักษณะพื้นผิวของคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายแสดงดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงภาพถ่าย SEM พื้นผิวของคาร์บอนไฟเบอร์โอเจลที่ใช้ไตรเมทิลสเทียริลแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นสารลดแรงตึงผิว และน้ำเป็นตัวทำละลาย [11]

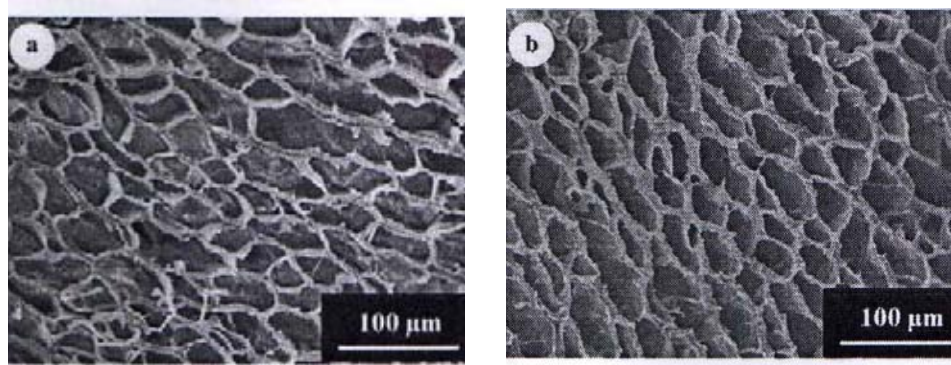
สารลดแรงตึงผิวชนิดสุดท้ายที่ Tonanone และคณะ ศึกษาคือ เอ็ฟซี 4430 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวพวกฟลูออรีเนต (fluorinated) โดยพบว่าโครงสร้างของคาร์บอนไฟเบอร์โอเจลที่เตรียมได้มีความแตกต่างไปจากสารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิดแรก โดยโครงสร้างจะมีลักษณะคล้ายฟองน้ำซึ่งประกอบไปด้วยโครงสร้างรูพรุนระดับเมโซ ลักษณะพื้นผิวของคาร์บอนไฟเบอร์โอเจลดังกล่าว แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงภาพถ่าย SEM พื้นผิวของคาร์บอนไฟเบอร์โอเจลที่ใช้เอ็ฟซี 4430 เป็นสารลดแรงตึงผิว [11]

Nishihara และคณะ [12] ประสบความสำเร็จในการเตรียมคาร์บอนไฟเบอร์โอเจลที่มีโครงสร้างเป็นไมโครฮันนี่คอมบ์ (microhoneycombs) ในขั้นของการทำให้แห้งด้วยวิธีเย็นเยือก โดยโครงสร้างที่ได้เป็นโครงสร้างรังผึ้งขนาดรูพรุนอยู่ในระดับแมคโคร โดยผนังซึ่งประกอบขึ้นด้วยอนุภาคระดับนาโนที่มีความแข็งแรงทนทานต่อการบดหรือตัด





รูปที่ 2.8 แสดงภาพถ่าย SEM ของภาคตัดขวางของคาร์บอนไครโอเจล ไมโครฮันนี่คอมบ์ [12]

### 2.1.5 การนำอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลไปประยุกต์ใช้

ด้วยคุณสมบัติความเป็นรูพรุนที่โดดเด่นของอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจล ไม่ว่าจะเป็ในแง่ของความพรุนของพื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุนที่มีค่าสูง ความสามารถในการเก็บประจุไฟฟ้า ความทนทานต่อความร้อน และยิ่งไปกว่านั้น อาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลยังสามารถเตรียมได้หลายวิธี จนได้โครงสร้างที่มีความแตกต่างกันทั้งรูปลักษณะ พื้นผิว และความเป็นรูพรุน จึงมีการนำอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลไปประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ อาทิ เป็นวัสดุที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ไฮโดรโฟบิก โครมาโทกราฟี (hydrophobic chromatography) ใช้เป็นตัวรองรับตัวเร่งปฏิกิริยา (catalytic supports) ใช้เป็นขั้วไฟฟ้า (electrode) สำหรับตัวเก็บประจุสองชั้น (electric double layer capacitors) รวมถึงการใช้เป็นตัวดูดซับ (adsorbents) สารอื่น ๆ เป็นต้น

Mukai และคณะ [13] ศึกษาการตรึงกรดเฮเทอโรพอลิ (heteropoly acids) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในโครงสร้างคาร์บอนเจล จากผลการศึกษาพบว่าคาร์บอนเจลสามารถตรึงกรดประเภทนี้ได้ และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เมทิลเทอร์เชียรีบิวทิลอีเทอร์ (methyl-tert-butyl ether) ได้ อีกทั้งยังมีความเสถียรต่อการสกัดด้วยน้ำร้อนได้นานกว่า 100 ชั่วโมง ซึ่งดีกว่าการตรึงในซีโอไลต์ชนิดวาย (Y-type zeolite) ที่มีผู้ทำการวิจัยมาก่อนหน้านี้อีกด้วย

## 2.2 เอนไซม์และการตรึงเอนไซม์

### 2.2.1 เอนไซม์

เอนไซม์ (Enzyme) คือ ตัวเร่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต (biocatalyst) ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้นได้ถึง  $10^4 - 10^8$  เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น สารที่เข้าทำปฏิกิริยากัน (reactant) มีชื่อเรียกว่าสับสเตรท (substrate) โดยส่วนใหญ่แล้ว เอนไซม์ชนิดหนึ่ง ๆ จะสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีสับสเตรทชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะเท่านั้น นั่นคือ เอนไซม์เป็นตัวเร่งที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรท

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ จะขึ้นอยู่กับโครงรูป (conformation) ของโปรตีน เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโครงสร้างของเอนไซม์ที่มีต่อการทำงาน จะเห็นว่าสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide chain) ของเอนไซม์ไม่ได้อยู่ในรูปเส้นตรง แต่จะอยู่ในรูปที่พันกัน (folding) มีผลทำให้หมู่แขนงข้าง R (side chain R group) ของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (active amino acid) ซึ่งจะอยู่ห่างกันมากถ้าสายพอลิเพปไทด์ไม่เกิดการพันกันจนเป็นก้อนให้เข้ามาอยู่ใกล้กันเกิดเป็นบริเวณแอคทีฟ (active site) ของเอนไซม์ บริเวณแอคทีฟของเอนไซม์นี้จะมีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็นบริเวณจับ (binding site) สำหรับสับสเตรต โคเอนไซม์ โคแฟกเตอร์ หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรต และจะมีกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างหรือการแตกออกของพันธะ [1]

การเร่งปฏิกิริยา (catalysis) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายใต้การทำงานของสารที่เรียกว่า ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการเร่งปฏิกิริยา ตัวเร่งจะเข้าร่วมทำปฏิกิริยาเกิดเป็นปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานต่าง ๆ (elementary step) และในปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานสุดท้ายจะให้ตัวเร่งที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงทางเคมีกลับคืนมา ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาขณะที่ไม่มีตัวเร่ง กับปฏิกิริยาที่มีตัวเร่ง จะพบว่าปฏิกิริยาขณะที่มีตัวเร่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับจำนวนและชนิดของปฏิกิริยาขั้นตอนมูลฐานที่เกิด นอกจากนี้ตัวเร่งจะไม่ทำให้ค่าสมดุลคงที่ของปฏิกิริยาเปลี่ยนไป โดยตัวเร่งเพียงแต่ไปทำให้อัตราเร็วคงที่ของปฏิกิริยาไปทางขวา (forward reaction) และของปฏิกิริยาทวนกลับ (reverse reaction) เพิ่มขึ้นในปริมาณที่เท่า ๆ กันเท่านั้น และเมื่อพิจารณาถึงการทำงานของเอนไซม์ จะเห็นว่าเอนไซม์ก็คือตัวเร่งของปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ที่เกิดในสิ่งที่มีชีวิตนั่นเอง [1] คุณสมบัติเหล่านี้ได้แก่

1. เอนไซม์ในปริมาณน้อย ๆ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. เอนไซม์จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี หลังจากทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแล้ว
3. เอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงค่าผลต่างของพลังงานอิสระ (free energy change,  $\Delta G$ ) หรือค่าสมดุลคงที่ (equilibrium constant,  $K_{eq}$ ) ของปฏิกิริยาได้

### 2.2.2 กระบวนการตรึงเอนไซม์

กระบวนการตรึงเอนไซม์ (enzyme immobilization) เป็นกระบวนการปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์ประเภทหนึ่ง โดยการนำเอนไซม์ไปเกาะหรือยึดติดบนตัวรองรับ (supports) ด้วยเทคนิคกระบวนการต่าง ๆ ถึงแม้เอนไซม์อิสระ (free enzyme) จะมีข้อดีหลายประการ แต่การนำเอนไซม์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมมีข้อจำกัด

หากจะพิจารณาถึงข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระนั้นมีอยู่มากมายหลายประการ

1. เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
2. เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่อง หรือใช้ครั้งเดียว (batch)



3. เอนไซม์อิสระ ใน in vitro ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้
4. เอนไซม์อิสระจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้งานเพื่อให้มีแอกทิวิตีสูง
5. เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในการละลายของสับสเตรต และผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน จะปนเปื้อนในลักษณะสารปนเปื้อนโปรตีน (proteineous contaminants) โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหารจะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พีเอชของโปรตีนชนิดนั้น แยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง
6. เอนไซม์อิสระมีสถานะทำปฏิกิริยา (reaction condition) จำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปอาหารบางกระบวนการ
7. เอนไซม์อิสระส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดของแข็ง (solid catalyst) ไม่ได้ มีผลให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ฟลูอิดไคซ์เบด (fluidized bed) และ แพ็คเบด (packed bed) ในระบบต่อเนื่อง (continuous) ได้
8. เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูงอันเนื่องมาจากการใช้งานได้ครั้งเดียว
9. เอนไซม์อิสระในเซลล์อินทรีย์ (intracellular enzymes) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ก่อน
10. เอนไซม์อิสระอาจก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูดหายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดเหล่านี้จึงนำไปสู่ทางออกในการแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ [1]

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัดไว้ โดยที่อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากขึ้น หรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา เทอมต่าง ๆ ที่ใช้เรียกเอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) เอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble enzymes) เอนไซม์จับรูป (trapped หรือ entrapped enzyme) เอนไซม์ยึดรูป (fixed enzymes) และเอนไซม์พยุงรูป (matrix-supported enzymes) โดยชื่อที่น่าจะเหมาะสมและใช้ได้กว้างกว่าชื่ออื่น ๆ เนื่องจากไม่ได้ระบุลักษณะให้จำเพาะทั้งสภาพและกรรมวิธีการเตรียม คือ เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) [1]

วิวัฒนาการของเอนไซม์ตรึงรูปมีมานาน ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1916 Nelson และ Griffin แห่งมหาวิทยาลัยโคลัมเบีย ได้ใช้ถ่านกัมมันต์ (active carbon) และ อะลูมินา (alumina) ดูดเอนไซม์เอาไว้ แล้วนำมาใช้ พบว่า เอนไซม์ยังมีกิจกรรม (activity) อยู่บ้าง จนกระทั่งปี ค.ศ. 1951 Campbell และคณะ ได้นำแอนติเจน (antigen) ตรึงไว้บนเซลลูโลส (cellulose) โดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะ

โคเวเลนต์ (covalent bonding) แล้วแยกแอนติบอดี (antibody) ออกมาได้สำเร็จ จึงทำให้การตรึงรูปเอนไซม์เป็นที่น่าสนใจอย่างกว้างขวาง และมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาตัวรองรับและวิธีตรึงรูปที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจนปัจจุบัน

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

1. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสิ่งแวดล้อมที่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ง่าย
2. สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้อีก
3. กระบวนการผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูป สามารถนำมาทำในระบบต่อเนื่อง (continuous system) ได้
4. เอนไซม์บางชนิดหลังการตรึงรูปแล้ว จะมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability) การเก็บรักษา (storage) ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity) ความไวในการตอบสนองต่อตัวยับยั้ง (sensitivity of inhibitor) อุณหภูมิ และความเป็นกรดค่าที่มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น [14]

5. มีโอกาสเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้ถ้าวิธีเหมาะสม
6. ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์ เอนไซม์ได้ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวรองรับ และลักษณะสัณฐาน

7. เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป [1]

อย่างไรก็ตามในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปอาจมีบ้างดังนี้ [1]

กิจกรรมอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการยึดโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวรองรับ มีผลให้โครงรูปสามมิติ (conformation) เปลี่ยนไป และอาจมีผลต่อหมู่เคมีที่อยู่ในบริเวณเร่งด้วย มีปัญหาด้านการถ่ายเทมวล (mass transfer) กับสัณฐานที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน หรือ สัณฐานมีลักษณะแขวนลอย (suspension)

เมื่อพิจารณาถึงรูปของเอนไซม์ตรึงรูปอาจแบ่งได้ดังนี้

1. อนุภาค (particles)

ตัวรองรับที่ใช้จะเป็นตัวกำหนดขนาดอนุภาค เช่น ทราย ผงคาร์บอน สารดูดซับ แก้ว พูน เปลือกไข่ โคลดิน และสารพอลิเมอร์ที่ทำเป็นแคปซูลเล็ก เป็นต้น ขนาดโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 50-200 เมช มีรูปร่างทรงกลม

2. เยื่อ (membranes) หรือ ฟิล์ม (film) หรือ แผ่น (plate)

เยื่อของเอนไซม์สามารถเตรียมได้ โดยการใส่ตัวรองรับตรึงรูป ให้อยู่ในลักษณะเยื่อ

ส่วนวิธีการเตรียมรูปร่างนั้นทำได้หลายแบบ เช่น วิธีการเกาะกับตัวรองรับในลักษณะมีพันธะเคมี ฟิสิกส์ หรือไม่มีพันธะเคมี และวิธีการห่อหุ้มด้วยเยื่อ เป็นต้น

### 3. หลอด (tubes)

การทำเอนไซม์เตรียมรูปร่างหลอด มีผู้ทดลองศึกษากันบ้าง แต่ไม่แพร่หลายเท่าการทำแบบเยื่อ ส่วนวิธีการเตรียมรูปร่างสามารถทำได้หลายวิธีเช่นเดียวกับแบบอนุภาคและเยื่อ ตัวอย่างตัวรองรับที่เป็นหลอด ได้แก่ หลอดไนลอน หลอดพอลิอะมีโนสไตรีน (polyaminostyrene tube) และหลอดพอลิอะคริลอะไมด์ (polyacrylamide tube)

### 4. เส้นใย (fibers)

การทำเอนไซม์ให้อยู่ในรูปเส้นใย ได้มีผู้ศึกษากับเอนไซม์หลายชนิด และมักทำในลักษณะการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ในเส้นใยเซลลูโลสไตรอะซิเตต โดยมีขั้นตอนการทำดังกล่าวได้สรุปคือ ผสมสารละลายเอนไซม์ในกลีเซอรอลที่ละลายลงในสารละลายของเซลลูโลสไตรอะซิเตตที่ละลายในเมธิลีนคลอไรด์ กวนสารละลายนี้ช้า ๆ จนกระทั่งเกิดเป็นอิมัลชัน เมื่อแช่ในสารละลายอิมัลชันลงในภาชนะสำหรับตกตะกอนที่มีโพลีลีนพร็อม ๆ กับค่อย ๆ สปิน (spin) จะได้เส้นใย ทำเส้นใยที่ได้ให้แห้งโดยภาวะสุญญากาศเพื่อแยกตัวทำละลาย ตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้ทดลองทำโดยวิธีนี้ได้แก่ อินเวอร์เทส แลคเทส

### 5. เยื่อกรองบางอัลตรา (ultrafiltration membranes)

การใช้เยื่อกรองบางอัลตรา เป็นตัวพุงของเอนไซม์นั้น ได้นำมาใช้ศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายถึงระดับผลิตเชิงพาณิชย์ และเยื่อดังกล่าวก็สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเอนไซม์อย่างต่อเนื่องได้ดี และอาจกล่าวได้ว่าการใช้เยื่อแบบนี้ไม่ต้องอาศัยวิธีการเตรียมรูปร่างที่กล่าวไว้เลย นอกจากนี้ วิธีการใช้เอนไซม์แบบนี้สัปดาห์แรกต้องมีมวลโมเลกุลใหญ่ และผลผลิตมีมวลโมเลกุลเล็กเท่านั้น เพราะปฏิกิริยาเกิดขึ้นเฉพาะบนผิวเยื่อกรองบางอัลตรา

## 2.2.2.1 วิธีการเตรียมรูปร่างเอนไซม์

สามารถแบ่งได้ 4 วิธี ดังนี้

### 1. วิธีดูดซับบนตัวรองรับ (adsorption method)

วิธีนี้เอนไซม์จะถูกดูดซับอยู่บนตัวรองรับที่เป็นของแข็ง โดยใช้แรงต่าง ๆ เช่น แรงจากพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน และแรงดึงดูดไฮโดรโฟบิก ความแข็งแรงของพันธะระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวค่อนข้างอ่อน จึงมีความอ่อนไหว (sensible) ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะโดยรอบ อาทิเช่น ค่าพีเอช ค่าความแข็งแรงทางไอออนิก (ionic strength) และอุณหภูมิ [15]

หากเมื่อพิจารณาถึงข้อดีของวิธีนี้ การที่มีแรงเกาะกันระหว่างตัวรองรับกับเอนไซม์อ่อนนั้น จึงทำให้สามารถนำตัวรองรับมาใช้ซ้ำได้ง่าย เหมาะกับตัวรองรับราคาแพง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน มีภาวะไม่รุนแรง และใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด [1]

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการดูดซับนั้น คือ อัตราส่วนระหว่าง พื้นที่ผิวของตัวรองรับกับ ปริมาตรของเอนไซม์ ขนาดของตัวรองรับ และอัตราส่วนระหว่างหมู่ไฮโดรฟิลิกกับหมู่ ไฮโดรโฟบิก ตัวรองรับที่ใช้กันมาก ได้แก่ อะลูมินา (alumina) ซิลิกาเจล (silica gel) คอลลาเจน (collagen) คาลิโอไนท์ (kalionite) แคลเซียมคาร์บอเนต คาร์บอน เซลลูโลส และไคติน [16]

## 2. วิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent linkage method)

เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์กับตัวรองรับที่ไม่ละลายน้ำ ด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งเป็นพันธะ ที่เกิดจากอะตอมรวมกันโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนอย่างสมบูรณ์และมีการใช้อิเล็กตรอนร่วมกันการ สร้างพันธะโคเวเลนต์ได้นั้น ต้องผ่านขั้นตอนของการสลายพันธะโคเวเลนต์เดิม การสร้างพันธะ โคเวเลนต์เป็นกระบวนการที่ค่อนข้างรุนแรง จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ ซึ่ง มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมได้ การตรึงด้วยวิธีนี้เอนไซม์ไม่หลุดออกจากตัวรองรับโดยง่าย เนื่องจากมีพันธะยึดเหนี่ยวอย่างแข็งแรง ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ และหมู่ฟังก์ชันของตัว รองรับ [17]

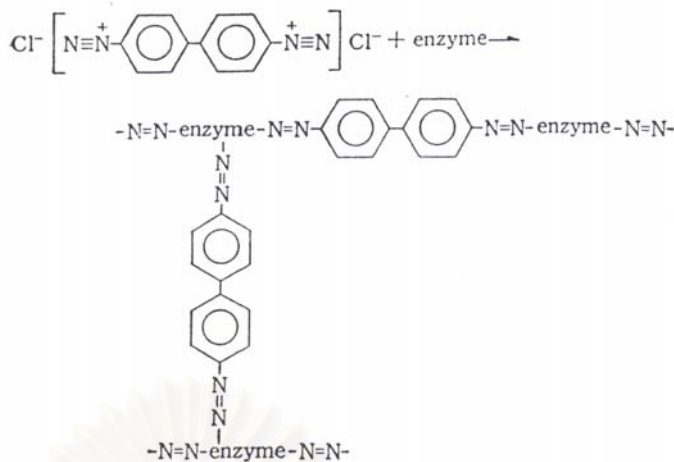
ตัวรองรับที่ใช้ในวิธีนี้มีสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ ตัวรองรับที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic support) ได้แก่ acrylamide-based polymer, maleic anhydride-based polymer, methacrylic acid-based polymer, styrene-based polymer และ polypeptide อีกกลุ่มคือตัวรองรับที่ได้จากธรรมชาติ (natural support) ได้แก่ อะกาโรส เซลลูโลส เด็กซ์แทรน แก้ว และแป้ง แต่เนื่องจากตัวรองรับจาก ธรรมชาติ สามารถถูกปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย จึงไม่นิยมนำมาใช้ [16]

## 3. การเชื่อมขวาง (cross-linking method)

เป็นวิธีที่ใช้การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ โดยการใช้สาร เคมีที่เป็นไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันแนล (multi-functional) ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นตาข่ายของ เอนไซม์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งไม่ต้องอาศัยตัวกลาง (carrier) สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ dimethyl adipidate, dimethyl suberimidate, aliphatic diamines และกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้มากที่สุด [16]

วิธีนี้อาจใช้ร่วมกับการตรึงเอนไซม์วิธีอื่น ๆ เช่น การตรึงเอนไซม์บนตัวรองรับของแข็ง และใช้การเชื่อมขวาง จะช่วยเพิ่มความเสถียรของการตรึงรูป [15]

ตัวอย่างของวิธีนี้ เช่น การใช้ bisdiazobenzidine เป็นตัวเชื่อมขวางแบบ diazo coupling กับปเปปไทด์ที่มีหมู่ฟีนอลิกของไทโรซีน หรือ หมู่อิมิดาโซลของฮิสติดีน หรือ หมู่อะมิโนอิสระ แสดง ดังรูปที่ 2.9



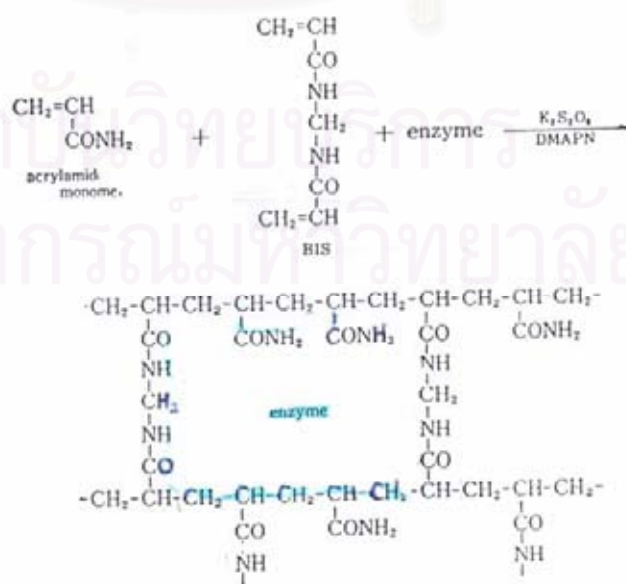
รูปที่ 2.9 แสดงปฏิกิริยาระหว่าง bisdiazobenzidine กับเอนไซม์ [1]

4. วิธีห่อหุ้ม (entrapment or encapsulation method)

เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ไว้ในช่องตาข่ายพอลิเมอร์ของตัวรองรับ ที่เป็นของแข็ง [16] เอนไซม์กับพอลิเมอร์ไม่มีการจับยึด หรือคูยึด หรือเกิดพันธะใด ๆ ดังนั้น การตรึงเอนไซม์ โดยวิธีห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ภายในตัวรองรับ จะได้เอนไซม์ที่มีสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ที่อยู่อย่างอิสระในสารละลาย กิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยวิธีนี้จะลดลงจากกิจกรรมของเอนไซม์อิสระน้อยกว่ากรณีที่ตรึงด้วยวิธีการทางเคมี

พอลิเมอร์ที่ใช้ในวิธีนี้ ได้แก่ คอลลาเจน (collagen), อัลจีเนต (alginate), คาราจีแนน (carrageenan), พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) และ แป้ง [16]

ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์วิธีนี้ แสดงดังรูปที่ 2.10 ซึ่งเป็นการทำ polyacrylamide gel ที่มีช่องตาข่ายสำหรับหุ้มเอนไซม์



รูปที่ 2.10 แสดงการทำ polyacrylamide gel ที่มีช่องตาข่ายสำหรับหุ้มเอนไซม์ [1]



เมื่อเปรียบเทียบวิธีตรึงรูปตามสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปดังตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่า วิธีดูดซับทางกายภาพถึงแม้จะมีแรงเชื่อมพันธะอ่อน แต่เมื่อพิจารณาถึงข้อดีนั้นมีหลายประการ ทั้งในแง่การเตรียมที่ง่าย กิจกรรมเอนไซม์สูง ใช้จ่ายน้อยกว่า ความจำเพาะต่อสับสเตรทไม่เปลี่ยน อีกทั้งยังสามารถนำตัวรองรับกลับไปใช้ใหม่ได้อีกด้วย

สำหรับวิธีห่อหุ้มเอนไซม์นั้น เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เอนไซม์ตรึงรูปมีความแข็งแรงของพันธะของตัวรองรับรอบเอนไซม์สูง อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีราคาถูก สามารถนำไปใช้งานได้สูง แต่มีข้อเสียอยู่บ้าง คือ วิธีการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก และไม่สามารถนำตัวรองรับกลับมาใช้ได้อีกครั้ง

สมบัติ	วิธีเชื่อมกับตัวพุง			
	วิธีดูดซับทางกายภาพ	วิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์	วิธีเชื่อมขวาง	วิธีห่อหุ้ม
การเตรียม (Preparation)	ง่าย	ยาก	ยาก	ยาก
กิจกรรม (Enzyme activity)	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	ปานกลาง
ความจำเพาะต่อสับสเตรท (Substrate specificity)	ไม่เปลี่ยน	เปลี่ยนได้	เปลี่ยนได้	ไม่เปลี่ยน
แรงเชื่อมพันธะ (Binding force)	อ่อน	แข็งแรง	แข็งแรง	แข็งแรง
การนำกลับคืน (Regeneration)	ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้
ความสามารถในการนำไปใช้ (Applicability)	ได้ต่ำ	ได้ปานกลาง	ได้ต่ำ	ได้สูง
ค่าใช้จ่าย (Cost of immobilization)	ถูก	แพง	ปานกลาง	ถูก

ตารางที่ 2.1 วิธีตรึงรูปและสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป [1]

องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ ตัวรองรับ และวิธีการที่ทำให้เอนไซม์ติดกับตัวรองรับ หรืออยู่ในตัวรองรับ สารที่ใช้เป็นตัวรองรับ มีความสำคัญต่อกิจกรรม และความคงตัวของเอนไซม์ โดยที่ไม่มีวิธีการตรึงและตัวรองรับชนิดใดที่สามารถใช้ตรึงเอนไซม์ได้ทุกชนิด [17]

การเลือกตัวรองรับอย่างรอบคอบ จะช่วยปรับปรุงค่าครึ่งชีวิตของระบบเอนไซม์ตรึงรูป รวมถึงสมรรถภาพของเอนไซม์ตรึงรูปได้อีกด้วย [15]

ตัวรองรับที่ดีโดยทั่วไปควรมีลักษณะจำเพาะ ดังต่อไปนี้

- มีพื้นที่ผิวมากเพื่อใช้สำหรับการจับยึด
- มีการซึมผ่านได้ของสาร
- ไม่ละลายน้ำ
- เสถียรต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระทบ
- มีรูปร่างและขนาดที่พอเหมาะ
- มีความต้านทานต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
- นำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้อีก

ในการนำไปใช้งานนั้นควรพิจารณาถึงสมบัติของตัวรองรับ ในส่วนของพื้นที่ผิว รูปร่าง องค์ประกอบ และการดัดแปลง เป็นต้น

### 2.2.2.2 ชนิดของตัวรองรับเอนไซม์

การแบ่งชนิดของตัวรองรับ สามารถแบ่งตามหลักเกณฑ์ต่าง ๆ ได้ดังนี้

#### 1. ลักษณะทางกายภาพของตัวรองรับ

##### 1.1 ตัวรองรับที่ไม่มีรูพรุน (non-porous support)

เมื่อใช้ตัวรองรับที่ไม่มีรูพรุนมาตรึงเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีโอกาสถูกดูดซับไว้ได้ในขอบเขตที่จำกัดซึ่งเฉพาะผิวของตัวรองรับเท่านั้น ทำให้มีพื้นที่ผิวที่ให้เอนไซม์เกาะหรือดูดซับได้น้อย [14] แนวทางในการลดปัญหานี้ อาจเลือกใช้วัสดุที่เป็นอนุภาค หรือ ไฟเบอร์ที่มีความละเอียดมาก แต่ปัญหาที่จะตามมา นั่นคือ ความยากในการแยกออกจากสารละลาย และยากในการจัดการในเครื่องปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง เนื่องจากผลของความดันลดที่สูงมาก และข้อจำกัดของอัตราการไหลของสารละลาย

สำหรับประโยชน์ของตัวรองรับประเภทนี้คือ การลดปัญหาด้านการแพร่ของสับสเตรทด้วยเพราะเอนไซม์นั้นถูกตรึงอยู่ที่ผิวภายนอก และสัมผัสโดยตรงกับสิ่งแวดล้อมโดยรอบ [15]

##### 1.2 ตัวรองรับที่มีรูพรุน (porous support)

ตัวรองรับชนิดนี้มีพื้นที่ผิวสำหรับให้เอนไซม์เกาะ หรือดูดซับมากขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนักกับตัวรองรับที่ไม่มีรูพรุน [17] นอกจากจะมีพื้นที่ผิวมากแล้ว การที่เอนไซม์ถูกตรึงอยู่ที่พื้นผิวภายในนั้น จะช่วยป้องกันเอนไซม์ จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับเอนไซม์ได้นอกจากนั้น ถ้าขนาดรูพรุนน้อยกว่า 1000 Å ยังช่วยป้องกันเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (microbes) ได้อีกด้วย

ข้อเสียของการใช้ตัวรองรับประเภทนี้ ในการตรึงเอนไซม์นั้นคือ พื้นที่ผิวส่วนมากในการ

จับเอนไซม์อยู่ภายในของโครงสร้างรูพรุน การถ่ายเทมวลของสับสเตรทเข้าไปทำปฏิกิริยาจึงมีข้อจำกัดมากกว่า [15]

### 1.3 ตัวรองรับที่มีโครงสร้างเป็นเจล (gel structure support)

ตัวอย่างของตัวรองรับพวกนี้ได้แก่ คอลลาเจน (collagen) แป้ง ซิลิกาเจล (silica gel) อะคริลามิด (acrylamide) และ เซลลูโลส (cellulose) โครงสร้างเจลเหล่านี้ใช้ในการห่อหุ้มหรือดักจับ (entrapment or encapsulation) เอนไซม์ หรือใช้ในระบบการตรึงแบบยึดด้วยพันธะโคเวเลนต์ หรือวิธีคูลซัพ

ข้อดีของการห่อหุ้มเอนไซม์ นั่นคือ ความสามารถในการจุเอนไซม์ที่ไม่จำเป็นต้องใช้พื้นที่ผิวที่มีความคงตัวมากในการจับ สำหรับข้อเสียของการใช้ตัวรองรับประเภทนี้ ในการกักขังเอนไซม์ นั่น คือ ข้อจำกัดในการแพร่ผ่าน นั่นหมายถึงวิธีการตรึงเอนไซม์ประเภทนี้ เหมาะสำหรับสับสเตรทที่มีขนาดไม่ใหญ่จนเกินไป [15]

ชนิดของตัวรองรับ	ข้อได้เปรียบ	ข้อเสียเปรียบ
ตัวรองรับที่ไม่มีรูพรุน	- ปัญหาในด้านการแพร่ผ่าน	- มีพื้นที่ผิวที่น้อย - ความจุในการจับเอนไซม์น้อย - ในกรณีที่เป็นมัดละเอียดทำให้ยากต่อการแยกออกและยากต่อการนำไปใช้ในระบบต่อเนื่อง เนื่องจากทำให้ความดันลดลง และจำกัดอัตราการไหลของสารละลาย
ตัวรองรับที่มีรูพรุน	- มีพื้นที่ผิวมาก - มีความจุเอนไซม์สูง - ช่วยป้องกันเอนไซม์จากสิ่งแวดล้อม	- มีการแพร่ของสารน้อย - พื้นที่สัมผัสกับสับสเตรทมีน้อย - ต้นทุนสูงเมื่อใช้ตัวรองรับที่ควบคุมขนาดของรูพรุน

ตารางที่ 2.2 แสดงข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของตัวรองรับที่ไม่มีรูพรุนและมีรูพรุน [17]

## 2. สมบัติทางเคมี

### 2.1 ตัวรองรับที่เป็นสารอินทรีย์ (organic support)

สารอินทรีย์โดยทั่วไปจะมีกลุ่มฟังก์ชันจำนวนมาก ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ได้โดยง่าย แต่อย่างไรก็ตามสารอินทรีย์มีข้อเสียเนื่องจากสมบัติทางกายภาพ เช่น ไม่มี ความคงทนต่อแรงกระทบ ความร้อน สารเคมี และจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยสารประเภทนี้เกิดการสูญเสียความเสถียรได้ง่าย [18]

## 2.2 ตัวรองรับที่เป็นสารอนินทรีย์ (inorganic support)

ตัวรองรับประเภทนี้มีความเหมาะสมหลายประการในการใช้งานทางด้านอุตสาหกรรม ซึ่งได้แก่ มีความคงทนสูงต่อแรงกระทบ ทนต่อความร้อน สารเคมี ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ ง่ายต่อการรักษา มีอายุการใช้งานนาน

แต่เนื่องจากผิวของสารอนินทรีย์ที่ใช้ตรงเอนไซม์นั้นมักมีกลุ่มฟังก์ชันน้อย และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ค่อนข้างช้า จึงมักต้องทำการกระตุ้นสารอนินทรีย์เหล่านั้น ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา [18]

ตัวอย่างของตัวรองรับแบ่งตามสมบัติทางเคมี แสดงดังตารางที่ 2.3

Organic supports	Inorganic supports
Cellulose	Kaolinite
Agarose	Colloidal silica
Collodion	Glass particles
Starch	Controlled pore glass
Polyacrylamides	Alumina
Dextran	Controlled pore alumina
Nylon	Controlled pore titania
Collagen	Nickel oxide
Organic copolymer (maleic anhydride, ethylene)	Controlled pore zirconia
	Hydroxyapatite
DEAE cellulose	Iron oxide

ตารางที่ 2.3 การจัดประเภทของตัวรองรับโดยใช้สมบัติทางเคมี [18]

ตัวรองรับที่ดีต้องแสดงความสามารถในการรักษาเสถียรภาพ (stability) ของเอนไซม์ให้สูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยถ้าจะพิจารณาถึงความเสถียรของเอนไซม์นั้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท [15] ดังนี้

### 1. ความเสถียรต่อการดำเนินปฏิกิริยา (operational stability)

ความเสถียรต่อการดำเนินปฏิกิริยา เป็นความเสถียร ที่แสดงถึงความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ หรือเร่งปฏิกิริยาต่อเนื่อง ซึ่งการเพิ่มความเสถียรไม่เพียงเฉพาะลดต้นทุนของเอนไซม์เท่านั้น แต่ยังช่วยลดต้นทุนการผลิตลง ความเสถียรต่อการดำเนินปฏิกิริยานี้อาจแสดงในเทอมของค่าครึ่งชีวิต ซึ่งคือเวลาที่ใช้ในการดำเนินปฏิกิริยาที่ทำให้สูญเสียกิจกรรมไป 50

เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเริ่มต้น หรืออาจแสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การลดลงของกิจกรรม (retention activity) เมื่อเทียบกับการเร่งปฏิกิริยาในรอบแรก

## 2. ความเสถียรต่อการเก็บรักษา (storage stability)

ความเสถียรต่อการเก็บรักษา เป็นความเสถียรที่มีความสำคัญมาก เมื่อเอนไซม์ที่เตรียมไม่ได้ถูกใช้อย่างต่อเนื่อง มีระยะหยุดพัก โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ยังไม่ใช้งานจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า หากเอนไซม์มีความเสถียรในการเก็บรักษาสูง จะช่วยลดต้นทุนในการเตรียมเอนไซม์ได้

เพื่อให้ตัวรองรับแสดงศักยภาพได้สูงสุดนั้น นอกจากจะต้องมีความสามารถในการรักษาความเสถียรให้กับเอนไซม์แล้วนั้น ยังต้องมีความสามารถในการนำตัวรองรับกลับมาใช้ใหม่ เมื่อเอนไซม์ตรึงสูญเสียกิจกรรมเกินกว่าจะยอมรับได้ วิธีการนำตัวรองรับกลับมาใช้ซ้ำ (support regeneration) สามารถทำได้ โดยการกำจัดเอนไซม์ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาอีกออกจากตัวรองรับ เช่น การเติมรีเอเจนต์ (reagent) บางตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxides) และสารออกซิไดซิง เอเจนต์ (oxidizing agent) ลงไปใช้ในการดึงเอนไซม์ออกจากพื้นผิว หรือทำการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเบสเพื่อให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวรองรับ (desorption) เป็นต้น

### 2.2.3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงรูป

เนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปมีสมบัติที่ต่างไปจากเอนไซม์เดิมหลายประการ จึงมีผู้ทดลองนำเอนไซม์ตรึงรูปเหล่านี้ไปใช้ในหลายรูปแบบ แต่โดยทั่วไปจะนำไปใช้ในลักษณะตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดของแข็ง (solid catalyst) ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูง และปัจจุบันนี้ก็ขยายวงการไปสู่การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ด้วย[1]

เอนไซม์ตรึงรูปและเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปถูกนำไปพัฒนาใช้ในหลายวงการ ได้แก่ กระบวนการเคมี (chemical processes) การวิเคราะห์ การรักษาทางการแพทย์ (medical treatment) และการแปรรูปอาหาร (food processing) เป็นต้น

#### 2.2.3.1 การใช้ในการวิเคราะห์ (analytical applications)

ปัจจุบันได้มีผู้พยายามใช้สมบัติพิเศษของเอนไซม์ตรึงรูป สำหรับการวิเคราะห์ในหลายๆรูปแบบ พอจะจำแนกได้ดังต่อไปนี้

**1 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ** โดยการรวมระบบเอนไซม์ตรึงรูปกับเครื่องมือวิเคราะห์ รวมทั้งการพัฒนาอิเล็กโทรดทางชีวเคมี (automated analysis and biochemical electrodes)

วิธีการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ตรึงรูปและเครื่องมือวิเคราะห์นั้น พบว่า สามารถใช้ได้อย่างกว้างขวางในวงการทางเคมีและการแพทย์เช่น การใช้ระบบเอนไซม์ตรึงรูปร่วมกับ



เครื่องมือวัด อาทิเช่น สเปกโตรโฟโตมิเตอร์, ฟลูออโรมิเตอร์, ไมโครคัลเลอริมิเตอร์ เป็นต้น รวมทั้งเครื่องมือวิเคราะห์เฉพาะทางเคมี และทางการแพทย์หลายอย่างด้วย

การใช้อิเล็กโทรดทางชีวเคมีนั้นมีความจำเพาะทางชีวภาพมาก ได้มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการวัดสารเมตาโบไลต์ในร่างกาย ในเลือด ปัสสาวะ

มีการใช้เครื่องมือทางไฟฟ้าทำงานร่วมกับเอนไซม์อิเล็กโทรด เพื่อวัดหรือตรวจสอบชีวภาพ เรียกว่า Biosensor หรือ Biodetector ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนเอนไซม์อิเล็กโทรด หรือไบโอคะทลิตส์ ส่วนทรานสดิวเซอร์ (transducers) เป็นเครื่องมือทางไฟฟ้าเคมี ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การรับสัญญาณทางเคมี ภายภาพ ชีวภาพ จากปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า และส่วนหน่วยแปลสัญญาณและบันทึกและแสดงข้อมูล (meter) เป็นหน่วยที่รับหน้าที่แปลสัญญาณและข้อมูลทางไฟฟ้าจากทรานสดิวเซอร์เพื่อมาแปลง/ขยาย แล้วนำมาเก็บและแสดงสู่ส่วนบันทึกข้อมูล

## 2 การวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิเมอร์ชีวภาพ (structural analysis of biopolymers)

พอลิเมอร์ชีวภาพได้แก่ โปรตีน กรดนิวคลีอิก สืบเนื่องจากวิธีการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิ และองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ถ้ามีการศึกษาโดยใช้การย่อยสลายด้วยโปรติเอสและเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ อาทิเช่น carboxypeptidase, leucine aminopeptidase, nuclease, phosphodiesterase หรือ phosphomonoesterase และจะพบปัญหาด้านการแยกส่วนของโปรตีนเอนไซม์ออกไปจากระบบปฏิกิริยา จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้แทน เนื่องจากแยกออกได้ง่าย เพียงทำการกรอง หรือการเซนตริฟิวส์

### 2.2.3.2 การประยุกต์สำหรับกระบวนการแปรรูปอาหาร (applications in food processings)

เอนไซม์ตรึงรูปถูกนำไปใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารหลากหลายประเภท

#### 1 การผลิตเนยแข็ง (production of cheese)

เอนไซม์เรนิน เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ ทำให้นมแข็งตัว (milk-clotting enzyme) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการผลิตเนยแข็ง แต่เนื่องจากเอนไซม์เรนินมีแหล่งผลิตจำกัดซึ่งเดิมผลิตได้จากกระเพาะลูกวัวส่วนที่ 4 จึงมีการนำเอนไซม์คล้ายเรนินจากจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมมาใช้ เพื่อที่จะแก้ปัญหาการขาดแคลนเรนิน การตกตะกอนนมอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปจึงเป็นเป้าหมายหลัก การตกตะกอนนมประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ คือ การย่อยสลายเคซีน และการเชื่อมต่อระหว่างไมเซล ดังนั้นถ้าในขั้นตอนแรกเกิดขึ้นได้โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป การแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ก็จะทำได้ง่าย

ปัจจุบัน อุตสาหกรรมเนยแข็งยังคงหาวิธีเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์เรนินตรึงรูป และวิธีการออกแบบชนิดของเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป เพื่อที่จะแยกส่วนของลิ้มนมออกจากระบบปฏิกิริยาเอนไซม์ เพราะขั้นตอน 2 ขั้นตอน มักจะเกิดในภาวะใกล้เคียงกันมาก

## 2 สุรา (liquors)

การหมักสุราอย่างต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์ตรีงรูป ได้แก่ การผลิตเบียร์โดยการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลสตรีงรูปจากจุลินทรีย์แทนการใช้มอลท์ หรือการย่อยสลายโปรตีน หรือพอลิเพปไทด์โดยเอนไซม์โปรติเอสตรีงรูป ปัจจุบันวิธีการดังกล่าวก็ยังไม่ใช้ในอุตสาหกรรม เรียก malt adjunct, starch adjunct ซึ่งจะมีรายละเอียดในตอนที 2 ต่อไป

## 3 การผลิตเบียร์ (production of beer)

การผลิตเบียร์ (brewing of beer) โดยเซลล์ยีสต์ตรีงรูป ทำได้โดยการบรรจุเซลล์ยีสต์ตรีงรูปบนอิฐพรุน (porous bricks) ในท่อพีวีซี ผ่านเวอร์ท (wort) หรือสารละลายที่พร้อมที่จะหมักด้วยเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยสารอาหารเลี้ยงยีสต์ เพื่อเปลี่ยนเป็นอัลกอฮอล์ เกิดเป็นเบียร์หลังจากหมักด้วยยีสต์ตรีงรูป

### 2.2.3.3 การประยุกต์ทางการแพทย์ (medical application)

ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อนำเอนไซม์ตรีงรูปมาใช้ในวงการแพทย์เป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มจะพัฒนาขึ้นไปเรื่อย ๆ เช่น การบำบัดด้วยเอนไซม์ (enzyme therapy) โดยทั่วไปเมื่อโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์ ถูกนำเข้าร่างกายคนหรือสัตว์หลาย ๆ ครั้ง ซ้ำ ๆ กันเพื่อรักษา (therapeutic purposes) หรือเพื่อ anaphylactic shock หรือเพื่อทดแทนการสูญเสียเอนไซม์เนื่องจากปฏิกิริยา antigen-antibody ดังนั้นการยืดเวลาเพื่อให้เอนไซม์อยู่ในร่างกายจะทำให้ยากเพราะเอนไซม์ที่ร่างกายรับเข้าไปจะถูกสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีผลให้ร่างกายสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์เหล่านั้น เพื่อที่จะลดปัญหา ดังนั้นการบำบัดด้วยเอนไซม์ตรีงรูปโดยวิธีของการผ่านเข้าเส้นเลือด จึงมีผู้สนใจทดลองศึกษา เช่น การทำเอนไซม์แคปซูลเล็ก (enzyme microcapsules) การใช้เอนไซม์ตรีงรูปในการสร้างอวัยวะเทียม เป็นต้น

## 2.2.4 เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลสโปรตีน ซึ่งผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพ โดยโปรติเอสในระยะแรก ๆ นั้นผลิตได้จากพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โปรติเอสที่ผลิตได้จากพืช เช่น โบรมิเลนจากสับปะรด ปาเปนที่ผลิตได้จากขางมะละกอ โปรติเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น เรนินจากกระเพาะลูกวัว โปรติเอสที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดคือโปรติเอสที่ได้จากจุลชีพ จุลชีพที่สามารถผลิตโปรติเอสได้มีทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย [19]

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ประเภท ซึ่งสามารถจำแนกประโยชน์ได้ดังนี้ [20]

1. การไฮโดรไลสโปรตีน (protein hydrolysis) มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กลง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้คุ้มค่ามากขึ้น

- 1.1 การไฮโดรไลสโปรตีนจากกากถั่วเหลือง หลังการไฮโดรไลสจะได้กรดอะมิโน

ออกมาเป็นจำนวนมาก นำไปใช้ผสมในอาหารสำหรับลดความอ้วน เครื่องดื่ม เป็นต้น

1.2 การหมักซอสถั่วเหลือง

1.3 การไฮโดรไลส์เจลาติน ผลิตผลจากการไฮโดรไลส์ ใช้ผสมเครื่องดื่มคาลอรีต่ำ เครื่องสำอาง เป็นต้น

1.4 เคซีน และโปรตีนจากหางนม ช่วยให้โปรตีนละลายน้ำได้มากขึ้น สารละลายที่ได้ใสขึ้น และมีรสชาติดีขึ้น

1.5 Meat protein recovery เช่น ทำสารสกัดจากเนื้อติดกระดูก ซึ่งคิดเป็น 5% ของน้ำหนักกระดูก ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ซุป

1.6 การหมักน้ำปลา ช่วยลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลา ให้คุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น ป้องกันการเกิดรสขมในน้ำปลา และยังคงปริมาณปลาที่ใช้หมักอีกด้วย

1.7 Meat tenderization ช่วยทำให้เนื้อนุ่มขึ้น

2. อุตสาหกรรมสารซักฟอก อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผสมในสารซักฟอก ช่วยย่อยโปรตีนที่เกาะติดเนื้อผ้า ทำให้ละลายออกมาพร้อมกับน้ำล้าง

3. อุตสาหกรรมเบียร์ โปรตีเอสจะช่วยย่อยตะกอนโปรตีนในเบียร์ ทำให้เบียร์ใส

4. การทำขนมปัง โปรตีเอสจะช่วยทำให้แป้งโด (dough) มีความยืดหยุ่น และขึ้นรูปได้ดี เมื่อกำลังเป็นแผ่นไม่ฉีกขาด

5. อุตสาหกรรม ทำให้หมักจับกันเป็นก้อนในกระบวนการผลิตเนยแข็ง

6. อุตสาหกรรมฟอกหนัง มี 2 ขั้นตอนในกระบวนการฟอกหนังที่นำโปรตีเอสไปใช้

- Dehairing ขั้นตอนนี้หนังสัตว์จะถูกแช่ในน้ำปูนขาว แอลคาไลน์โปรตีเอสจะช่วยลดปริมาณปูนขาวที่ใช้ได้ถึง 50% ลดระยะเวลาการแช่ปูนขาว และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย

- Bating เป็นขั้นตอนที่ทำให้หนังสัตว์นุ่ม และยืดหยุ่น โดยโปรตีเอสจากพืชจะย่อยสารพวกคอลลาเจน และอีลาสติน ส่วนโปรตีเอสจากจุลชีพจะย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อหนังสัตว์ที่ถูกแช่ด้วยปูนขาวจะไวต่อการย่อยด้วยโปรตีเอสมากกว่าหนังที่แช่ในกรด

7. ประโยชน์อื่นๆ

- ปาเปน โบรมีเลน และโปรตีเอสจากจุลชีพ เมื่อใช้กับอาหารสัตว์ ทำให้อาหารเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

- ปาเปน และนิวทรัลโปรตีเอส ใช้ในกระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์ และโปรตีนเซลล์เดียว

- เปปซิน ทริปซิน และปาเปน ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลชีพ

- ทริปซิน อัลคาไลน์โปรตีเอส ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (animal cell culture)

- นิวทรัลและอัลคาไลน์โปรตีเอสใช้ในการทำความสะอาดเชื้อหุ้มผ่านในเครื่องมือต่าง ๆ

ประเภทของอุตสาหกรรม	ขบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
Baking and Milling	Bread baking	Fungal
Brewing	Chillproofing	Papain, bromelain, pepsin, fungal, bacteria
Cereals	Condiments	Papain, bromelain, pepsin, fungal, bacteria
Dairy	Milk prevention or oxidized flavor	Pancreatin
	Milk protein hydrolysate	Papain, bromelain, pancreatin, bacteria, fungal
	Evaporate milk, stabilization	Pancreatin, pepsin, bromelain, fungal
Animal feeds	Pig starter ration	Pepsin, pancreatin, bacteria, fungal
	Poultry ration	Bacteria, fungal
	Cattle ration	
Meat, fish	Meat tenderizing	Papain, bromelain, fungal, bacteria
	Tenderizing casings	
	Condensed fish soluble	
Pharmaceutical and clinical	Digestive aids	Papain, bromelain, pancreatin, fungal, bacteria
	Wound debridement	Bacteria, animal, plant
	Treatment of bruises, inflammation, etc.	
Leather	Bating	Bacterial, pancreatin, fungal
	Unhairing	Bacterial, fungal, plant
Laundry	Spot removal	Bacteria, pancreatin, fungal
	Cold-soluble laundry starch	
Photographic	Recovery of silver from spent film	Bacterial
Textile	Desizing fibrics	Bacterial, fungal, pancreatin

ตารางที่ 2.4 แสดงการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม [19]

โปรตีเอสจากจุลชีพสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของสถานะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ [19] คือ

1. **Acid protease EC.3.4.23** จุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่เป็นจำพวกราและยีสต์ มี

แบคทีเรียบางชนิดที่ผลิตได้ เอนไซม์มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 3-4 ลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกับเอนไซม์เพปซิน เรนิน ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสาร ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA) และ di-isopropyl fluorophosphates (DFP) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-40,000 สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง (aromatic amino acid) เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.* และ *Edothia spp.* การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลือง เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็ง

**2. Thiol protease EC.3.4.22** เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงที่ pH เป็นกลาง ถูกเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือ กรดอะมิโนซิสเตอีน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารจำพวก sulphhydryl reagent เช่น chloromercuribenzoate สำหรับสาร DFP จะมีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-50,000 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.*

**3. Metallo protease EC.3.4.24** เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า neutral protease เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโครงสร้างซึ่งมักจะเป็นสังกะสี (zinc) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีน สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารจำพวก chelating agent เช่น EDTA มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 7 แต่มีความเสถียรในช่วง pH 5-10 โมเลกุลของเอนไซม์จะเสถียรขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus spp.* เช่น *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thermoproteolyticus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* และ *B. polymyxa* เป็นต้น ตัวอย่างของเมทัลโลโปรตีเอสที่สำคัญได้แก่ Thermolysin ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *B. thermoproteolyticus* การใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเบียร์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ

**4. Alkaline protease EC.3.4.21.14** มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า serine protease เนื่องจากมีหมู่กรดอะมิโนเซรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสาร di-isopropyl fluorophosphates และ phenyl-methyl sulfonyl fluoride (PMSF) มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ค่อนข้างกว้างอยู่ระหว่าง 7-11 และเมื่อมีอะตอมของโลหะแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25,000-30,000 แอลคาไลน์โปรตีเอสผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *B. licheniformis*, *B. subtilis* และ *Alkalophilic bacillus* โดยเอนไซม์จะถูกสร้างและปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อและอาจจะรวมกับเอนไซม์โปรตีเอสอื่นด้วย คือ นิวทรัลโปรตีเอส โดยที่สร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสพร้อม ๆ กับนิวทรัลโปรตีเอส หรืออาจสร้างนิวทรัลโปรตีเอสก่อน



แอลคาไลน์โปรตีเอสก็ได้ แอลคาไลน์โปรตีเอสแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างในกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยา และจลนศาสตร์ [21] ดังนี้

- **กลุ่มเอ (group A)** ได้แก่ เอนไซม์ *Subtilisin Carlsberg* จากเชื้อ *B. licheniformis* และเอนไซม์ *B. pumilus* เอนไซม์ *Subtilisin Carlsberg* เตรียมขึ้นเป็นครั้งแรกในรูปของผลึกในปี 1952 โดย Guntelberg & Ottensen จากเชื้อ *B. licheniformis* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 274 ตัว และไม่มีซิสไธนีน หรือ ซิสเทอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (spherical) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งประกอบด้วยกรดอะมิโน เซรีน 221 ฮิสติดีน 64 และแอสปาร์เตท 32 ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตไม่สูงนัก (broad specificity) และจะไฮโดรไลสพันธะเพปไทด์เป็นส่วนใหญ่และพันธะเอสเทอร์บางส่วน ในการไฮโดรไลสโปรตีนไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (activators) และไม่ต้องใช้แคลเซียมไอออนสำหรับทำให้เอนไซม์เสถียรเหมือนแอลคาไลน์โปรตีเอสอื่น ๆ เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH กว้าง และแอกติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 และสูงกว่า 11 ซึ่งสันนิษฐานว่าเอนไซม์เกิดการย่อยตัวเอง (autodigestion) โดยโมเลกุลโปรตีนจะคลายรูป (unfold) และเอนไซม์ยังคงเสถียรเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส

เอนไซม์ *Subtilisin (Subtilopeptidase A)* จาก *B. subtilis* เป็นแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ไม่ค่อยจำเพาะ โดยจะไฮโดรไลสพันธะเพปไทด์ส่วนใหญ่โดยเฉพาะพันธะที่ถัดจากกรดอะมิโนอะลานีน เบนซิลอะลานีน ไทโรซีน ทริปโตเฟน และลูซีน และยังพบอีกว่าสามารถไฮโดรไลสพันธะเพปไทด์ตรงกรดอะมิโนชนิดเบสิก เช่น อาร์จินีนอีกด้วย

- **กลุ่มบี (group B)** ได้แก่ แอลคาไลน์โปรตีเอสที่มีชื่อว่า *Subtilisin BPN (Bacterial Protease Nagarse)* จาก *B. amyloliquefaciens* ในปี 1954 Hagihara เตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อยู่ในรูปผลึกเป็นครั้งแรก ในปี 1960 Ottesen & Spector ได้แยกเอนไซม์ *Subtilisin Novo* ซึ่งเหมือน (identical) กับเอนไซม์ *Subtilisin BPN* โดยเปรียบเทียบจากลำดับกรดอะมิโน *Subtilisin Novo* มีลักษณะเป็นพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 275 ตัว กรดอะมิโนส่วนใหญ่จะเหมือน (homology) กับของ *Subtilisin Carlsberg* โดยมีกรดอะมิโนเพียง 58 ตัวเท่านั้นที่แตกต่างกัน ในโมเลกุลไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีกรดอะมิโนอะลานีนอยู่ปลายทางด้านอะมิโน และ กลูตามีนอยู่ที่ปลายทางด้านคาร์บอกซิล บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน เซรีน 221 ฮิสติดีน 54 และ แอสปาร์เตท 32 แคลเซียมไอออน ช่วยทำให้เอนไซม์เสถียร โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง หรือที่ pH ที่สูงหรือต่ำมาก เอนไซม์นี้ไฮโดรไลสพันธะเพปไทด์ และพันธะเอสเทอร์ แต่มีความจำเพาะแตกต่างจากเอนไซม์ *Subtilisin Carlsberg* แอกติวิตี และความเสถียรของเอนไซม์นี้ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ คล้ายกับเอนไซม์ *Subtilisin Carlsberg*

## 2.2.5 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส (lipase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อตามระบบว่า กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (Triacylglycerol acylhydrolase) มีชื่อตามรหัส คือ E.C.3.1.1.3 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมันโซ่ยาว (long chain) ที่ไม่ละลายน้ำที่บริเวณรอยต่อระหว่างส่วนของสารละลายเอนไซม์กับสารตั้งต้น สามารถเร่งปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสคือปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชันได้เมื่อในระบบมีน้ำอยู่น้อยมาก (microaqueous system) ซึ่งอาจถือว่าเป็นระบบที่ปราศจากน้ำ (nonaqueous system) [22]

เอนไซม์ไลเปสพบได้ในพืชจำพวกข้าวสาลี ข้าวโอต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง ส่วนในสัตว์มักพบในตับอ่อน และในนม แต่ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าจากพืชและสัตว์ เพราะเจริญเติบโตได้เร็วกว่าและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และยังสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ [22]

ไลเปสผลิตจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิด แต่ละชนิดให้ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสได้เช่น *Candida Rugosa* *Alcaligenes* sp. No. 679, *Humicola lanuginosa* และ *Rhizopus delemar* เป็นต้น การที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะกับอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย และถึงแม้ว่าไลเปสจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันเป็นอย่างมาก แต่ไลเปสก็ยังจะหมายถึง single enzyme ที่มีคุณสมบัติเป็น glycerol ester hydrolase อยู่เหมือนเดิม [23]

สามารถแบ่งประเภทของเอนไซม์ไลเปส โดยอาศัยหลักเกณฑ์ใหญ่ ๆ สองประการ [24]

### 1. แบ่งโดยอาศัยความจำเพาะตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์

#### 1.1 เอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ประเภทนี้ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ (free-fatty acid) และกลีเซอรอล เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ เอนไซม์จาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*

#### 1.2 เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

เอนไซม์ประเภทนี้จะจำเพาะตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์กลุ่มนี้คือ กรดไขมัน 1,2(,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride ซึ่งทั้งสองตัวนี้เป็นสารที่ไม่คงตัว ได้แก่ เอนไซม์ที่ได้จาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และใน *Rhizopus* อีกหลายชนิด

## 2. แบ่งโดยอาศัยรูปแบบในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

### 2.1 เอนไซม์ไลเปสที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตรงพันธะเอสเทอร์ ในโมเลกุลของกลีเซอไรด์

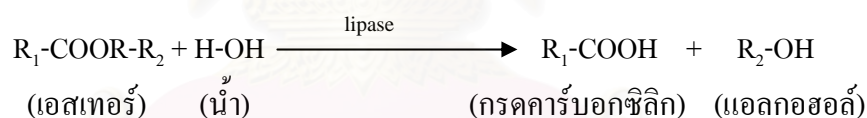
ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมัน กลีเซอรอล และ partial glycerides โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อสับสเตรตคือไขมันและน้ำมัน อยู่ในสภาพน้ำมันในน้ำ (oil-water interface)

### 2.2 เอนไซม์ไลเปสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารประกอบเอซิลกลีเซอรอล (acyl glycerol)

เรียกว่าปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) หรือปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification) ซึ่งจะเกิดขึ้นใน 4 รูปแบบ คือ เกิดขึ้นระหว่าง เอสเทอร์กับกรดไขมัน อีสรี (acidolysis) เอสเทอร์กับแอลกอฮอล์ (alcoholysis) เอสเทอร์กับเอสเทอร์ (ester exchange) และเอสเทอร์กับกรดอะมิโน (aminolysis) ปฏิกิริยาเหล่านี้มีความสำคัญมากในการปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำมันหรือไขมัน ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดไขมันในไตรเอซิลกลีเซอรอล และทำให้เกิดการกระจายตัวของกรดไขมันในไตรกลีเซอรอลเป็นอย่างดีมากกว่าน้ำมันตามธรรมชาติ

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสสามารถแบ่งการเร่งปฏิกิริยาได้สองแบบ

#### 1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

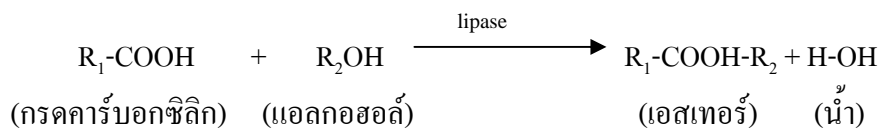


เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดคาร์บอกซิลิก และแอลกอฮอล์ โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดในสารละลายที่มีน้ำอยู่ในปริมาณมาก [4] ค่าความเป็นกรด เบสที่เหมาะสมสำหรับไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนี้อยู่ในช่วงกว้าง ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ และสับสเตรต ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40°C [25]

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยไลเปส มีประโยชน์ในเชิงการค้า เพราะสามารถผลิตกรดไขมันอีสรีได้หลายชนิด เช่น ไลเปสจากเห็ดไมซีเลีย (mycelia) ไฮโดรไลซ์ น้ำมันหลายชนิดที่ใช้ประกอบอาหาร การไฮโดรไลซีน้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม ไขมันจากน้ำมัน และไตรกลีเซอไรด์สายสั้น ๆ [26]

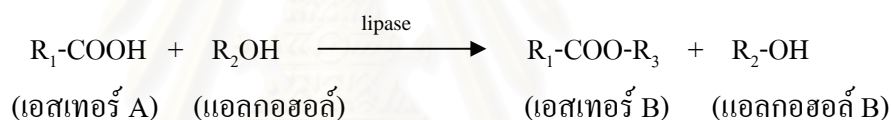
## 2. ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ มี 3 ลักษณะ [4]

### 2.1 ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification)



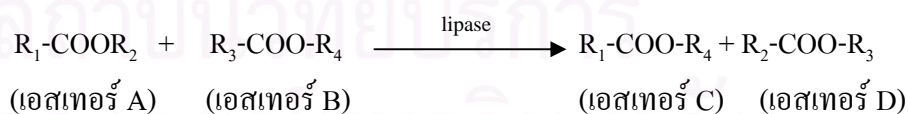
ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญอย่างหนึ่งของไลเปสในการผลิตเอสเทอร์ โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH group) ของกรดคาร์บอกซิลิกด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR group) จากแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นสารที่นำไปใช้ประโยชน์หลายชนิด เช่น เอสเทอร์ที่มีโมเลกุลสายสั้นมักจะนำไปใช้เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์ของอาหาร ยา เครื่องดื่ม ส่วนเอสเทอร์ที่มีโมเลกุลสายยาวจะใช้ผลิตภัณฑ์เดียวกับเครื่องสำอาง ยา การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จะเกิดขึ้นในตัวกลางที่ไม่ใช้น้ำ แต่ต้องมีปริมาณน้ำเพียงเล็กน้อยเพื่อรักษาโครงสร้างเอนไซม์เอาไว้ได้ [27]

### 2.2 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification)



เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการแทนที่หมู่แอลคอกซิล (OR<sub>2</sub> group) ของเอสเทอร์ A ด้วยหมู่แอลคอกซิล (OR<sub>3</sub> group) จากแอลกอฮอล์ A ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ชนิดใหม่ขึ้น

### 2.3 ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (interesterification)



เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่แอลคอกซิล (OR<sub>2</sub> group และ OR<sub>4</sub> group) ระหว่างเอสเทอร์ 2 ชนิด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ใหม่ 2 ชนิด

การคัดแปลงสมบัติไขมันและน้ำมัน โดยใช้กระบวนการอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชันซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเฉพาะตำแหน่งของกรดไขมันของไตรเอซิลกลีเซอรอล ที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคทั้งในด้านเพื่อเพิ่มหรือรักษาคุณค่าทางอาหาร ความปลอดภัยจากกรณีเกิดทรานส์-ไอโซเมอร์ และให้สมบัติการใช้ประโยชน์ตามต้องการ



การใช้ไลเปสเป็นสารเร่งปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง จึงไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความคงทนเป็นพิเศษ ช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านพลังงาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความปลอดภัยสูงเพราะใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นสารเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่วิธีทางเคมีไม่สามารถผลิตขึ้นมาได้ ตลอดจนเกิดผลข้างเคียง (by-product) น้อยมาก [23]

การดำเนินปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญ 2 ประการ

### 1. ปริมาณน้ำ

กิจกรรมของน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อ จลนศาสตร์ของการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส ไลเปสต่างๆไปจะทำปฏิกิริยาได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพวกไฮโดรโฟบิก (hydrophobic organic solvents) ที่มีข้อจำกัดปริมาณน้ำ เมื่อกิจกรรมของน้ำต่ำ สมดุลเคมีจะเลื่อนไปทางการสังเคราะห์เอสเทอร์ [28]

น้ำมีผลต่อพันธะต่าง ๆ ของเอนไซม์ เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์คงสภาพธรรมชาติ และรูปแบบการเร่งปฏิกิริยาอยู่ได้ ถ้ามีการกำจัดน้ำออกไปโดยสิ้นเชิง จะทำให้เกิดการบิดทำลายของคอนฟอร์เมชัน และเกิดการหยุดยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แต่การใช้ไลเปสเร่งปฏิกิริยา โดยมีสารประกอบเอสเทอร์เป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีน้ำน้อยมาก จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส มีผู้ศึกษาทดลองใช้น้ำร้อยละ 10 ของน้ำหนักเอนไซม์ในปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของน้ำมันปาล์ม หรือปรับค่ากิจกรรมของน้ำของระบบให้อยู่ในช่วง 0.40-0.60 และมีผู้สรุปไว้ว่าปริมาณน้ำในระดับ monolayer ที่อยู่รอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ก็เพียงพอต่อการทำงานของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

### 2. ตัวทำละลายอินทรีย์

ปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งคือตัวทำละลายอินทรีย์ การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาในปฏิกิริยาของไขมันและน้ำมันยังมีข้อได้เปรียบการใช้น้ำ เพราะไขมันและน้ำมันสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี ตัวทำละลายอินทรีย์จะยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ เช่น ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส นอกจากนี้ยังสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างโปรตีนเอสซึ่งจะไปทำลายเอนไซม์ได้อีกด้วย

ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากต่อการคงอยู่ได้ของชั้นน้ำที่อยู่รอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ พวกตัวทำละลายชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic solvents) เช่น เฮกเซน ไชโคลเฮกเซน หรือ เอทิลอะซิเตท จะมีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดการแยกของน้ำที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาออกจากเอนไซม์ แต่ตัวทำละลายชนิดที่ชอบน้ำสูงชัน (hydrophobic solvents) จะไปดึงน้ำที่จำเป็นต่อเอนไซม์ให้หลุดออกไป ทำให้เอนไซม์นั้นถูกยับยั้งได้ [25]

นอกจากปริมาณน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แล้วปัจจัยอื่น ๆ ที่ควรพิจารณาคือความจำเพาะของเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ และพีเอช เป็นต้น

ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในหลายทางด้วยกัน เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมัก เพราะไลเปสจะเป็นตัวผลิตกลิ่น รส (flavor) ให้อาหารชนิดนั้น ๆ มีกลิ่น รส เฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รูปแบบการใช้ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้น มีทั้งตั้งใจเติมไลเปสลงไปเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้แก่ โยเกิร์ต, blue cheese, Italian cheese, cake และ cookie mixes, sweet dough และ milk chocolate เป็นต้น หรืออาจใช้ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเหล่านั้นเป็นตัวให้กลิ่น รส ก็ได้ เช่น lactic acid bacteria จะผลิตไลเปสทำให้กลิ่น รส เฉพาะในอาหารเนื้อหมัก พวกไส้กรอกอิตาลี และในผักดอง พวกแตงกวาดองและกะหล่ำปลีดอง [25]

นอกจากนี้ ยังมีการนำไลเปสเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันด้วย เพราะกรดไขมันที่ได้จากกระบวนการผลิตทางเคมีต้องใช้ความร้อนสูง 480 องศาฟาเรนไฮต์ และความดันสูงถึง 70 psi ทำให้มีข้อเสีย คือ ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงที่สามารถทนความร้อนสูงได้ รวมทั้งวิธีนี้สิ้นเปลืองพลังงาน product ที่ได้มีสีคล้ำ และมีการสลายตัวของสารที่ไม่ต้องการด้วย ซึ่งถ้าใช้ไลเปสทำงานแทนแล้ว ข้อเสียต่าง ๆ เหล่านี้จะหมดไป [25]

นอกจากนี้แอลคาไลน์ ไลเปส (alkaline lipase) ยังสามารถนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ 2 ทางสำคัญ คือ หนึ่งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก และสองเพื่อใช้แทนแพนครีเอติก ไลเปส (pancreatic lipase) ในทางการแพทย์ [25]

และในปัจจุบันมีรายงานมากมายที่กล่าวถึงความเป็นไปได้ในการนำไลเปสไปใช้ในระบบ microaqueous system พบว่า ไลเปสที่อยู่ในระบบดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งไฮโดรไลซิส ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน และการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งคุณสมบัตินี้เองทำให้สามารถนำไลเปสมาใช้สังเคราะห์สารต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น สังเคราะห์กรดไขมันและกรีเซอร์ออล สังเคราะห์ triglyceride สังเคราะห์ terpene alcohol สังเคราะห์ flavor ester สังเคราะห์ peptide สังเคราะห์ biosurfactant นอกจากนี้ ยังสามารถใช้แยก (resolution) สาร active molecule ออกจาก racemic mixture ซึ่งเป็นสารที่แยกออกจากกันยากด้วยวิธีปกติได้ด้วย [25]

Seitz (1974) ได้รวบรวมการใช้ประโยชน์จากไลเปสที่มีการจดลิขสิทธิ์แล้ว พบว่าไลเปสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง การผลิต aliphatic acid การผลิตหมากฝรั่ง และยาสีฟัน รวมทั้งการกำจัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน [25]

เทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ที่ใช้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้มีผู้ศึกษามาอย่างต่อเนื่อง การตรึงเอนไซม์เป็นการป้องกันไม่ให้เอนไซม์สัมผัสกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์โดยตรง ซึ่งจะทำให้มีความคงทนมากกว่าในระบบของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid) นอกจากนี้ยัง

สะดวกต่อการแยกเอนไซม์เพื่อนำกลับไปใช้ใหม่ โดยเฉพาะเมื่อผลผลิตมีความเข้มข้นมากและอยู่ในส่วนของน้ำ ระบบนี้จะลดแรงต้านการกระจายตัวระหว่างการเคลื่อนที่ไปของสารตั้งต้นหรือผลผลิต และเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาให้สูงขึ้น แต่ระบบนี้สามารถจำกัดอัตราเร็วการถ่ายเทมวลได้เช่นกัน โดยเฉพาะเมื่อสารที่ทำให้แพร่กระจายกับตัวรองรับ มีสมบัติในการไม่รวมตัวกับน้ำ (hydrophobicity) แตกต่างกันมาก [25]

เมื่อพิจารณาถึงประโยชน์ของการใช้วัสดุซิล-เจล สำหรับกลไกการห่อหุ้มเอนไซม์ นั้นคือความเสถียรของโครงสร้างตติยภูมิของโมเลกุลโปรตีน เพราะความที่เป็นโครงสร้างเจลที่ยึดกันแน่น [29] และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบวัสดุจริง 2 ลักษณะคือ ตัวรองรับชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic support) กับ ตัวรองรับชนิดไฮโดรฟิลิก (hydrophilic support) พบว่าตัวรองรับชนิดไฮโดรโฟบิกเหมาะสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของตัวเร่งทางชีวภาพมากกว่าตัวรองรับชนิดไฮโดรฟิลิก

ตัวรองรับชนิดไฮโดรฟิลิก ทำให้มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ไปสูงเนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือเกิดการเปลี่ยนแปลงของคอนฟอร์เมชันของไลเปสในระหว่างการดูดซับ มีปริมาณไลเปสตรึงน้อย และมีความสามารถในการเข้าไปยังบริเวณแอคทีฟไซต์ของไลเปสลดลง ตัวอย่างของตัวรองรับของแข็งชนิดไฮโดรฟิลิกได้แก่ ซีไลต์ (celite), เซลลูโลส (cellulose), ซิลิกาเจล (silica gel), อะลูมินา (alumina), ไททานีย (titania) และแก้วพรุน (porous glass) เป็นต้น [28]

งานวิจัยหลายงานวิจัยได้แสดงถึงประสิทธิภาพ ของการตรึงรูปไลเปสด้วยตัวรองรับชนิดไฮโดรโฟบิก

Yokozeki และคณะ [30] รายงานว่าไลเปสที่ห่อหุ้มไว้ใน Hydrophobic cross-linked polymer มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) สูงกว่าเมื่อเทียบกับเจลชนิดไฮโดรฟิลิก (hydrophilic gels) โดยอธิบายว่า hydrophobicity ของเจลส่งผลต่อการแพร่ของสับสเตรตชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic substrates) อย่างไตรกลีเซอไรด์เพื่อเข้าไปสู่เจล

Koshiro และคณะ [31] พบว่ากิจกรรมของไลเปสที่ห่อหุ้มด้วย 5-phenylvaleric acid ในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเมนทอลนั้นขึ้นอยู่กับ gel hydrophobicity

ตัวอย่างของตัวรองรับชนิดไฮโดรโฟบิก ได้แก่ อะคริลิกโคพอลิเมอร์ (acrylic copolymer) พอลิโพรพิลีน (polypropylene) และสไตรีน (styrene) เป็นต้น [28]

## บทที่ 3

### การสำรวจเอกสาร

#### 3.1 รีโซซินอล ฟอर्मัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล (Resorcinol Formaldehyde Gels and Carbon Gels)

รีโซซินอล ฟอर्मัลดีไฮด์เจล และคาร์บอนเจล หรืออาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล (RF gels and carbon gels) เป็นวัสดุรูพรุนที่มีผู้ศึกษาวิจัยมาอย่างต่อเนื่อง การศึกษาวิจัยโดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่ออาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล อาทิ อัตราส่วนของสารตั้งต้นต่อตัวทำละลาย ความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยา ความเป็นกรดต่าง เทคนิคการทำให้แห้ง รวมไปถึงการใช้เทคนิคพิเศษอื่น ๆ ในการเตรียม จนได้อาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลที่มีคุณสมบัติความเป็นรูพรุนและรูปสัณฐานที่หลากหลาย จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำอาร์เอฟ และคาร์บอนเจลไปประยุกต์ใช้กับงาน ได้ถูกต้องเหมาะสม

Yamamoto และคณะ [7] ศึกษาการสร้างโครงสร้างของอาร์เอฟแอโรเจลในช่วงโซล-เจลทรานซิชัน (sol-gel transition) ของสารละลายอาร์เอฟโดยใช้เทคนิค Dynamic light scattering (DLS) และ Static light scattering (SLS) จากผลของ decay time พบว่าอัตราส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อน้ำ (C/W) ในสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นมีผลต่อการเติบโตของอนุภาคคอลลอยด์ที่เกิดขึ้นในช่วงต้นของกระบวนการโซล-เจล และมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการสร้างโครงสร้างโครงข่าย (network structure) ที่สมบูรณ์จากอนุภาคคอลลอยด์ เมื่อความเข้มข้นของตัวเร่งปฏิกิริยาสูงขึ้น เวลาที่ใช้ในการสร้างเจลลดลง ในขณะที่ขนาดอนุภาคคอลลอยด์มีค่าลดลง

Tamon และ Ishizaka [2] ศึกษาการเกิดโครงสร้างไฮโดรเจล (hydrogels) ในช่วงโซล-เจลทรานซิชัน โดยใช้ (small-angle x-ray scattering, SAXS) และประยุกต์ใช้สมการของ Guinier และสมการ power law ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยในช่วงแรกของการสังเคราะห์อาร์เอฟไฮโดรเจลคลัสเตอร์ (clusters) ขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 2 nm ประกอบด้วยกิ่งของสายโพลิเมอร์ จากนั้นคลัสเตอร์จะเกิดการรวมตัวกันสร้างเป็นอนุภาคขนาดประมาณ 3-6 nm สุดท้ายไฮโดรเจลที่ได้ประกอบด้วยอนุภาคขนาดประมาณ 4-7 nm และภายหลังการเกิดเจล อนุภาคจะมีขนาดคงที่

Job และคณะ [6] ศึกษาการเตรียมคาร์บอนเซโรเจล (carbon xerogels) โดยใช้การควบคุมค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น จากการศึกษาพบว่าค่าความเป็นกรดเบสต่างกัน



ในช่วงแคบส่งผลต่อรูปสัณฐาน และสมบัติความเป็นรูพรุนของอาร์เอฟเซโรเจล ซึ่งทำให้ได้โครงสร้างรูพรุนที่หลากหลาย เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น การยุบตัวของโครงสร้างมากขึ้น ส่งผลต่อพื้นที่ผิว ขนาดอนุภาค และปริมาตรรูพรุนรวมมีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาตรรูพรุนระดับไมโครมีค่าสูงขึ้น และเมื่อนำอาร์เอฟเซโรเจลไปเผา (pyrolysis) คาร์บอนเซโรเจลที่เตรียมจากสารละลายอาร์เอฟที่มีค่าพีเอชมากกว่า 6.50 จะมีพื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุนรวม และปริมาตรรูพรุนระดับไมโครน้อยมาก โครงสร้างที่ได้ถือว่าเป็นโครงสร้างที่ไร้รูพรุน (non-porous structure)

การศึกษาของ Job สอดคล้องกับการศึกษาของ Lin และ Ritter [5] โดยอาร์เอฟเซโรเจลที่เตรียมจากสารละลายอาร์เอฟที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7 ถึง 7.5 อาร์เอฟเซโรเจลที่เตรียมได้ไม่สามารถตรวจพบปริมาตรรูพรุน ในทางกลับกันที่ค่าพีเอชต่ำ อาร์เอฟเซโรเจลจะมีพื้นที่ผิว และปริมาตรรูพรุนที่สูงกว่าและมีการกระจายของขนาดรูพรุน (pore size distribution) ที่กว้างกว่า โดยรูพรุนประมาณ 85% เป็นรูพรุนระดับเมโซ

การศึกษากระบวนการทำอาร์เอฟไฮโดรเจลให้แห้ง มีลำดับการพัฒนาจากการใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเหนือวิกฤต (supercritical drying) การทำให้แห้งแบบเย็นเยือก (freeze drying) การทำให้แห้งโดยใช้ลมร้อน (hot air drying) และการทำให้แห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave drying) โดยวัตถุประสงค์ของการพัฒนาเพื่อค้นหาวิธีที่สะดวก และประหยัด ในขณะที่ยังสามารถคงโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นรูพรุนในระดับเมโซ

Tamon และคณะ [3] ศึกษาการเตรียมอาร์เอฟไครโอเจล (RF cryogels) ที่เตรียมโดยการทำอาร์เอฟไฮโดรเจลให้แห้งด้วยวิธีการทำให้แห้งแบบเย็นเยือกด้วย t-butanol อาร์เอฟไครโอเจลที่เตรียมได้เป็นวัสดุที่มีรูพรุนระดับเมโซ ที่มีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซสูงกว่า  $0.58 \text{ cm}^3/\text{g}$  ถึงแม้พื้นที่ผิว และปริมาตรรูพรุนระดับเมโซของไครโอเจลจะน้อยกว่าแอโรเจลที่เตรียมโดยใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเหนือวิกฤต แต่ไครโอเจลยังสามารถผลิตคาร์บอนที่มีรูพรุนระดับเมโซได้ โดยคาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมได้มีพื้นที่ผิวมากกว่า  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  และมีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซมีค่ามากกว่า  $0.55 \text{ cm}^3/\text{g}$  นอกจากนั้น โครงสร้างรูพรุนระดับไมโครสามารถเกิดในไครโอเจลได้ง่ายกว่าแอโรเจลในขณะทำการเผา

งานวิจัยหลายงานวิจัยได้ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (surfactants) หลายชนิดที่มีต่อรูปสัณฐาน และสมบัติความเป็นรูพรุนของอาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลที่เตรียมได้



Lee และคณะ [32] ประสบความสำเร็จในการเตรียมอาร์เอฟเจลที่มีลักษณะทรงกลมขนาดไมโคร (microspheres) โดยใช้เทคนิคโซล-เจล-อิมัลชัน (sol-gel-emulsion technique) ด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic surfactants) คือ Span 60 (sorbitan monostearate) ที่มีค่า hydrophilic lipophilic balance (HLB) เป็น 4.7 ในขณะที่การใช้ Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan mono oleate) ที่มีค่า HLB 15 ไม่สามารถเตรียมไมโครสเฟียร์ได้ และขนาดอนุภาคที่เตรียมได้สามารถควบคุมได้โดยสัดส่วนขององค์ประกอบในระบบ อัตราการกวน ลักษณะใบกวน ชนิดและปริมาณสารลดแรงตึงผิว รวมไปถึงชนิดของตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์อีกด้วย

นอกจาก Lee และคณะ ที่สามารถเตรียมอาร์เอฟเจลไมโครสเฟียร์ได้สำเร็จแล้ว Yamamoto และคณะ [10] ยังสามารถเตรียมไมโครโอเจล และคาร์บอนไมโครโอเจลไมโครสเฟียร์โดยกระบวนการอินเวอร์สอิมัลชัน โพลีเมอไรเซชัน (inverse emulsion polymerization) และเมื่อทดสอบสมบัติความเป็นรูพรุน พบว่า ไอโซเทอมของการดูดซับของคาร์บอนไมโครโอเจลไมโครสเฟียร์เป็นชนิดที่ 4 โดยไมโครสเฟียร์ที่เตรียมได้มีลักษณะโครงสร้างสองชั้น กล่าวคือ มีโครงสร้างรูพรุนระดับเมโซอยู่ภายใน และมีโครงสร้างรูพรุนระดับไมโครอยู่ที่พื้นผิวของไมโครสเฟียร์ การกระจายของรูพรุนระดับเมโซค่อนข้างแคบ และขนาดรูพรุนเฉลี่ยประมาณ 2 nm คาร์บอนที่เตรียมได้มีพื้นที่ผิวมากกว่า  $500 \text{ m}^2/\text{g}$  มีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซมากกว่า  $0.90 \text{ cm}^3/\text{g}$  และปริมาตรรูพรุนระดับไมโครน้อยกว่า  $0.24 \text{ cm}^3/\text{g}$  และเมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิของการเผา (pyrolysis temperature) พบว่ามีผลอย่างมากต่อปริมาตรรูพรุนระดับเมโซ และเมื่ออุณหภูมิการเผาสูง ค่าความเป็นไฮโดรโฟบิก (degree of hydrophobicity) ของคาร์บอนไมโครสเฟียร์มีค่าสูงขึ้น

Tonanon และคณะ [11] ศึกษาบทบาทของสารลดแรงตึงผิวที่มีต่อคาร์บอนไมโครโอเจล โดยใช้สารลดแรงตึงผิวแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ ชนิดไม่มีประจุ (nonionic surfactants) ได้แก่ SPAN 80 และ FC4430 (polymeric fluorinated surfactant) และชนิดที่มีประจุลบ หรือแคทอออนิก (cationic surfactant) คือ Trimethylstearylammmonium Chloride (C18) สำหรับการใส่ SPAN 80 ความเข้มข้น 0.5-10.0% โดยปริมาตร สามารถเตรียมคาร์บอนไมโครสเฟียร์ที่มีโครงสร้างสองชั้น โดยมีพื้นที่ผิวเป็น  $630-700 \text{ m}^2/\text{g}$  และมีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซเป็น  $0.51-0.93 \text{ cm}^3/\text{g}$  เมื่อใช้ C18 เป็นสารลดแรงตึงผิว สามารถเตรียมคาร์บอนไมโครโอเจลที่มีรูพรุนระดับเมโซที่มีพื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุนระดับเมโซแตกต่างกันไปตามอัตราส่วนของ Cyclohexane ต่อ น้ำ และคาร์บอนไมโครโอเจลนี้สามารถเตรียมได้ในระบบที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้ คาร์บอนไมโครโอเจลที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ จะมีรูพรุนระดับเมโซที่มีขนาดใหญ่กว่าการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดอื่น

สารลดแรงตึงผิวชนิดสุดท้ายที่ทำการศึกษาคือ FC4430 สามารถเตรียมไมโครเซลล์คาร์บอนไครโอเจล (microcellular carbon cryogels) ที่มีโครงสร้างคล้ายฟองน้ำ และมีพื้นที่ผิวและปริมาตรรูพรุนระดับเมโซเป็น 210-660 m<sup>2</sup>/g และ 0.37-0.92 cm<sup>3</sup>/g ตามลำดับ จากผลการศึกษามองเห็นได้ว่า ผลจากการใช้สารลดแรงตึงผิวต่างชนิดกัน สามารถเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนไครโอเจลที่มีรูปสัณฐาน และสมบัติความเป็นรูพรุนแตกต่างกันได้

เทคนิคการเตรียมคาร์บอนเจลให้ได้รูปสัณฐานที่มีความโดดเด่นแตกต่างออกไป ยังมีอีกหลายเทคนิคนอกเหนือที่กล่าวข้างต้น

บทความวิจัยที่ศึกษาถึงการประยุกต์ใช้อาร์เอฟเจลและคาร์บอนเจลในงานต่าง ๆ ยังมีปรากฏไม่มาก ที่ปรากฏเด่นชัด และมีความใกล้เคียงกับงานวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้ คือการตรึงตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในโครงสร้างของอาร์เอฟเจล

Mukai และคณะ [13] ศึกษาการตรึง Keggin-type heteropolyacids (HPAs) ในโครงสร้างของอาร์เอฟคาร์บอนเจล โดยใช้วิธีการตรึงแตกต่างกัน 2 วิธี คือ การหยด 12-tungstophosphoric acid (PW12) ลงบนอาร์เอฟไฮโดรเจล แล้วจึงทำให้แห้งและทำการเผาจนเป็นคาร์บอน และวิธีการสังเคราะห์ 12-molybdophosphoric ในส่วนผสมระหว่างอนุภาคคาร์บอนเจลกับน้ำปลอดประจุ (deionized water) จากการศึกษาพบว่ากรดถูกตรึงในคาร์บอนเจลได้ทั้งสองวิธี และยังสามารถคงอยู่ได้ภายหลังการสกัดด้วยน้ำร้อนในระยะเวลาสั้น กรดที่ตรึงในคาร์บอนเจลสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์ methyl-tert-butyl ether ได้ดี

### 3.2 การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline Protease Immobilization)

การศึกษากการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ยังมีผู้ศึกษาและเสนอบทความตีพิมพ์ยังไม่มากเท่าที่ควร บทความที่มีการตีพิมพ์ส่วนใหญ่เน้นศึกษาความเหมาะสมในการใช้ตัวรองรับชนิดต่าง ๆ มาตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

Abdel-Naby และคณะ [33] ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus Mycooides* โดยใช้วิธีการตรึงหลายวิธีบนตัวรองรับหลายชนิด จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์สามารถถูกตรึงบนไคโตซาน (chitosan) ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) บน Amberlite IR-120 ด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะไอออนิก (ionic binding) ตรึงบนไคติน (chitin) ด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding) และในพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamine) ด้วยวิธีกักขังในโพรงเจล

(entrapment) ได้ 18.8% 15.02% 79.29% และ 76.55% ของเอนไซม์เริ่มต้นตามลำดับ เมื่อทดสอบกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ตรึงเหล่านี้พบว่า สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ประมาณ 15-78% ของเอนไซม์อิสระ เมื่อทดสอบความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability) ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 6 ชั่วโมง พบว่าการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบนไคโตซาน และการตรึงด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะอีนิกบน Amberlite IR-120 ยังคงรักษาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้มากถึง 81% และ 81.9% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความเสถียรในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 6 เดือน เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์บนไคติน ยังคงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ 100%

ในการศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานของเอนไซม์ ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือการศึกษาความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทใหม่ สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอส ได้มีผู้ศึกษาความสามารถของเอนไซม์ตรึงดังกล่าว

Chellapandian [34] ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสบน Vermiculite โดยวิธีโคเวเลนต์ พบว่า เอนไซม์ถูกตรึง 12.48 mg/g และมีกิจกรรมจำเพาะ 36.25% ของเอนไซม์อิสระ และเมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา พบว่า ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงเปลี่ยนไป และเมื่อทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิพบว่าเอนไซม์ตรึงสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ โดยที่อุณหภูมิ 70°C เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงยังคงกิจกรรมไว้ได้ 28% ขณะที่เอนไซม์อิสระเหลือเพียง 17% เมื่อนำเอนไซม์ไปทดสอบความสามารถในการใช้ซ้ำ พบว่า หลังการใช้ซ้ำ 5 รอบ เอนไซม์ตรึงยังคงกิจกรรมไว้ได้ 78% ของกิจกรรมเริ่มต้น

นอกจากเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส การตรึงเอนไซม์อื่น ๆ ที่อยู่ในจำพวกเอนไซม์โปรติเอส ยังมีผู้สนใจศึกษาพอสมควร

Kise และ Hayakawa [35] ทดสอบการตรึง  $\alpha$ -Chymotrypsin (CT) บนเม็ดไคโตซาน เอนไซม์ตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดอะมิโนในตัวทำละลายอินทรีย์ ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ตรึงยังมีเสถียรภาพสูง โดยหลังการใช้งาน 23 วัน เอนไซม์ตรึง ยังคงกิจกรรมไว้ได้ 60% ของกิจกรรมสูงสุด

Unen และคณะ [36] ศึกษาการตรึงเอนไซม์ serine protease  $\alpha$ -chymotrypsin และ trypsin ด้วยวิธีการตรึงไว้ในโซล-เจล เมทริกซ์ (sol-gel matrix) ของ tetramethoxysilane (TMOS) จาก

การศึกษาพบว่า สามารถตรึงเอนไซม์  $\alpha$ -chymotrypsin ได้สูงสุดถึง 90% และสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน ของ N-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester กับ 1-propanol ในไซโคลเฮกเซน ได้กิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์อิสระ

### 3.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปส (Lipase Immobilization)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในหลากหลายอุตสาหกรรม จึงมีผู้ทำการศึกษาวិธีการปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์ไลเปสอย่างมากมาย การตรึงเอนไซม์ไลเปสเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์ อีกทั้งยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกด้วย มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเทคนิคการตรึงเอนไซม์ไลเปสทั้งวิธีดูดซับทางกายภาพและวิธีห่อหุ้มงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรึงเอนไซม์โดยวิธีดูดซับที่น่าสนใจมีดังนี้

Oliveira และคณะ [37] ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บน Styrene-divinyl benzene (STYDVB) copolymer โดยทำการศึกษาวิธีการตรึงใน 2 ระบบ คือระบบที่มีน้ำ ซึ่งคือโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นตัวทำละลาย กับระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์คือเฮปแทน จากการศึกษาพบว่าระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถตรึงเอนไซม์ได้ดีกว่าระบบที่มีน้ำ โดยตรึงได้ถึง 91.6% และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส และปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้กิจกรรมมากกว่าระบบที่มีน้ำทั้งสองปฏิกิริยา และเมื่อนำ STYDVB ไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ใหม่ (regenerate) ยังสามารถตรึงเอนไซม์ได้ถึง 88.90%

Iso และคณะ [38] ได้ศึกษาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพจากไตรกลีเซอไรด์ และ แอลกอฮอล์ โดยใช้ *Pseudomonas fluorescens* ไลเปส ที่ตรึงโดยใช้ porous kaolinite เป็นตัวรองรับ พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้มีกิจกรรมสูงขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสอิสระ และการนำไปใช้ซ้ำนั้นใช้วิธีการแยกไม่ยุ่งยาก อีกทั้งมีกิจกรรมลดลงไม่มาก เช่นเดียวกับ Norim และคณะ [39] ที่ได้ศึกษาการตรึง *Candida cylindraceae* ไลเปส โดยดูดซับบน C-18 bleading earth ซึ่งเป็นตัวรองรับชนิด hydrophobic มีกิจกรรมสูงสุดคือ  $0.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$  และมีกิจกรรมจำเพาะเทียบกับเอนไซม์อิสระเป็น 130% และเมื่อนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน 3 ครั้ง โดยมีเวลารวม 4 สัปดาห์ ยังคงมีกิจกรรมเหลือ 85%

เมื่อพิจารณาถึงเสถียรภาพของการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ หลายงานวิจัยแสดงถึงศักยภาพของเอนไซม์ตรึงรูปในแง่ความเสถียรต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรดและเบส



รวมถึงความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ Bai zheng-wu, Yin chuan-qi และ Wu li [40] ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปส บนวัสดุ chitosan-silica gel composite โดยใช้ พอร์มาลดัสต์ เป็นสารเชื่อมขวาง ทำการทดสอบความเสถียรของไลเปสตรึงรูปทั้งความเสถียรต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรดและเบส และการเก็บรักษาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เมื่อเทียบกับไลเปสอิสระพบว่าไลเปสตรึงรูปนี้สามารถปรับปรุงเสถียรภาพได้ โดยการตรึงที่ 55°C พีเอช 7.5 และ 37°C พีเอช 9.5 ให้กิจกรรม 70% ขณะที่เอนไซม์อิสระให้ 40% และเมื่อเก็บในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ที่ 37°C ในช่วง 10, 15 และ 20 วัน พบว่ามีกิจกรรม 96.6%, 81% และ 41% ของกิจกรรมเริ่มต้นใน ขณะที่เอนไซม์อิสระสูญเสียกิจกรรมในเวลา 3 วันที่สภาวะเดียวกัน

Murray และคณะ [41] ทำการตรึงไลเปสบนตัวรองรับ 2 ชนิดคือ non-porous polystyrene latex และ porous accurel EP400 powder สำหรับกระบวนการไฮโดรไลซิสของน้ำมันดอกทานตะวัน ศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ และพิจารณาถึงประสิทธิภาพของการตรึงของไลเปสบนตัวรองรับแต่ละตัว ซึ่งพบว่าถึงแม้ polystyrene latex จะมีความสามารถในการดูดซับไลเปสได้สูงแต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ สำหรับการตรึงบนอนุภาค EP400 นั้นจะมีประสิทธิภาพดีเฉพาะที่ใส่เอนไซม์ในปริมาณมาก แต่ก็มียัตราการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และได้ผลผลิตดีเทียบเท่ากับเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำมาใช้ใหม่ได้อย่างดีอีกด้วย

Hwang และคณะ [42] ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ *Bacillus stearothermophilus* L1 ไลเปสบนพื้นผิวของซิลิกาเจล โดยใช้วิธีการตรึง 2 วิธีคือ การดูดซับทางกายภาพ และการตรึงด้วยพันธะโคเวเลนต์ จากการทดสอบความสามารถในการตรึงเอนไซม์พบว่า การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 2.72 mg protein/g dry carrier ในขณะที่วิธียึดด้วยพันธะโคเวเลนต์สามารถตรึงเอนไซม์ได้ 2.23 mg protein/g dry carrier และเมื่อพิจารณาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาพบว่าเอนไซม์ตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 88% และ 63.7% ของเอนไซม์อิสระตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ โดยพบว่าเมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาต่อเนื่องนาน 4 วัน กิจกรรมของเอนไซม์อิสระลดลงอย่างมาก โดยยังคงเหลือกิจกรรมเพียง 25% ของกิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ และวิธียึดด้วยพันธะโคเวเลนต์ยังคงกิจกรรมไว้ได้ 65% และ 50% ตามลำดับ

F. He และคณะ [43] ได้ศึกษาการตรึง Porcine pancreas lipase (PPL) บน porous silica beads และใช้ในปฏิกิริยา ring-opening polymerization ของ ethylene isobutyl phosphate (EIBP) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูปเป็น 70°C และหลังจากบ่มที่ 90°C 1 ชั่วโมง ยังมี



กิจกรรมเหลือมากกว่า 70% และยังพบว่าการนำไลเปสตรังรูปมาใช้ซ้ำสำหรับปฏิกิริยา polymerization ของ EIBP นั้นเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าการใช้ในครั้งแรก

Ivanov และ Schneider [44] ได้ทำการตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluoresceus* บนตัวรองรับ 5 ชนิดคือ celite, octyl silica, aminopropyl-silica, glutar dialdehyde de-activated silica และ Eupergit C250L พบว่าการตรึงบน celite จะให้กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) สูงที่สุดคือ 25 mmol/h mg protien และ glutardialdehyde-activated silica ให้ต่ำสุดคือ 0.07 mmol/h mg protien การตรึงบน Eupergit C250L จะมีความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยาดีที่สุด และยังคงกิจกรรมไว้ได้ 30% ของกิจกรรมเริ่มต้นหลังจากใช้ 11 รอบ ซึ่งแต่ละรอบอยู่ในช่วง 2-6 ชั่วโมง

การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีห่อหุ้มนั้น ได้มีผู้ทำการศึกษาโดยการตรึงเอนไซม์ไว้ในเมทริกซ์ของ โซล-เจล ในขั้นของการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน โดย Kawakami และ Yoshida [29] ได้ศึกษากิจกรรมการเร่งปฏิกิริยา และความเสถียรต่ออุณหภูมิของไลเปสที่ตรึงแบบห่อหุ้มใน organically modified silicates โดยวิธีโซล-เจล โดยศึกษาการสังเคราะห์เอสเทอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่ามีค่ากิจกรรมสูง ความเสถียรต่ออุณหภูมิของไลเปสที่ตรึงในโครงข่ายเจลนี้มีความสัมพันธ์กับกลไกของขั้น sol-gel transition และพบว่าที่ 75°C ยังคงมีกิจกรรม 100%

Reetz และคณะ [45] ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* และ *Candida Antarctica* ในวัสดุโซล-เจล ชนิดไฮโดรโฟบิกที่เตรียมจาก  $\text{CH}_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$  (MTMOS) เพื่อนำไปเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่าง lauric acid และ n-octanol ใน isooctane โดยพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 200-300% ของเอนไซม์อิสระ

Hsu, Foglia และ Shen [46] ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* (PS-30) ไว้ในเมทริกซ์ของ sol-gel ของ phyllosilicate โดยวิธีการเริ่มจากการเชื่อมพันธะระหว่าง phyllosilicate clay กับ silicate polymers ผลิตโดยการควบคุมปฏิกิริยา hydrolysis ของ tetramethyl orthosilicate (TMOS) พบว่ากิจกรรมของไลเปสตรังรูปมีความเสถียรมาก และมีกิจกรรมดีกว่าเอนไซม์อิสระ และเมื่อนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้ให้กิจกรรมได้ดีเมื่อเทียบกับตัวรองรับอื่นๆ และพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้สามารถนำกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาได้อย่างน้อย 5 ครั้งโดยไม่สูญเสียกิจกรรม และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 6 เดือน พบว่ายังคงรักษากิจกรรมไว้ได้ 95% ในขณะที่เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระที่สูญเสียกิจกรรมไป 40%

Marlot และคณะ [22] ศึกษาการตรึงไลเปสจาก *C.cylindracea* โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ บนตัวพุงคือ ซีไลต์ (celite), แก้วXOB 015, อะลูมินา (Alumina), แก้วcorning, แก้วXOB075, ทิทาเนีย(titania) และวิธีห่อหุ้มโดยมี Polyuretane (PU) เป็นตัวรองรับ เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดลอริกกับเมนทอล โดยมีเฮปแทนเป็นตัวทำละลาย ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนซีไลต์ให้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดคือร้อยละ 82 ของกิจกรรมเอนไซม์อิสระ ในขณะที่ตัวพุงที่เหลือให้กิจกรรมร้อยละ 70, 60, 59, 41 และ 22 ตามลำดับ ในขณะที่การตรึงแบบห่อหุ้มให้กิจกรรมร้อยละ52แต่มีค่าครึ่งชีวิตการทำงานนานกว่า100ชั่วโมง

Chen [47] ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* โดยวิธีห่อหุ้มในเจลที่เกิดจาก photo-crosslinkable prepolymers สำหรับการสังเคราะห์ ethyl butyrate โดยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของ ethanol และ butyric acid ใน hexane พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้มีกิจกรรมสูงถึง 2.8 fold ปรับปรุงคุณสมบัติของเอสเทอร์ที่ได้ และลดการยับยั้งของแอลกอฮอล์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ hydrophobic gel นี้ดีกว่า hydrophilic ในแง่ของสมรรถภาพโดยรวม และเอนไซม์ตรึงนี้ยังมีกิจกรรม 70% เมื่อเทียบกับกิจกรรมตั้งต้นหลังการใช้งานแบบไม่ต่อเนื่อง 15 ครั้ง

Chen และ Lin [48] ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ด้วยวิธีห่อหุ้มในอนุภาค hybrid organic-inorganic sol-gel powder ที่เตรียมโดยปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันของ Tetramethoxysilane (TMOS) และ alkyltrimethoxysilanes พบว่าสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 95% และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้กิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์อิสระ 59 เท่า เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ตรึงรูปนี้พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิต 4 เดือน ที่อุณหภูมิ 40 °C ในเฮกเซน

Chen และ Hwang [49] ศึกษาการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรเจลใน hybrid sol-gel polymer ของ tetramethoxysilane (TMOS) และ propyltrimethoxysilane (PTMS) ที่มี polyvinylformal (PVF) resin plate เป็นตัวรองรับ โดยพบว่าสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 93% และเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน ได้กิจกรรมจำเพาะประมาณ 7.4 เท่าของเอนไซม์อิสระ และเมื่อทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปโดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์ตรึงรูปสามารถคงกิจกรรมไว้ได้ 100% เช่นเดียวกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน

จากงานวิจัยที่ยกมานั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถแสดงกิจกรรมได้ดีเทียบเท่ากับเอนไซม์ไลเปสอิสระ และในงานวิจัยกลับได้ผลที่ดีกว่า นอกจากนั้นเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปยังแสดงความมีเสถียรภาพทั้งต่อสภาวะแวดล้อมขณะทำปฏิกิริยา รวมถึงความสามารถ

ในการนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาซ้ำซึ่งถือเป็นประโยชน์สำคัญของเอนไซม์ตรึงรูปอีกด้วย

สำหรับงานวิจัยการประยุกต์ใช้ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล เป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์นั้น จากเอกสารสำรวจยังไม่พบว่ามีผู้ใดทำการวิจัย จากจุดเด่นของ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล ในหลายๆด้าน ทั้งกระบวนการสังเคราะห์ที่ทำได้ทั้งที่เป็นเจล กับที่เป็นคาร์บอน จึงสามารถใช้ในการตรึงได้ทั้งวิธีห่อหุ้ม และวิธีดูดซับทางกายภาพ รวมถึงความสามารถในการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขการเตรียมได้หลายรูปแบบ (tailor made) รวมถึงความมีรูพรุน และพื้นที่ผิวสูง จึงทำให้ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล เป็นวัสดุชนิดหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้เป็นวัสดุรองรับในการตรึงเอนไซม์ได้ดีเทียบเท่ากับหรือดีกว่าวัสดุชนิดอื่นๆ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### วิธีการดำเนินการทดลองวิจัย

#### 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

##### 4.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาร์เอฟเจล

1. รีโซซินอล 98% (Resorcinol,  $C_6H_4(OH)_2$ ) บริษัท Fluka
2. ฟอรั่มัลดีไฮด์ 38% (Formaldehyde, HCHO) บริษัท Univar
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate,  $Na_2CO_3$ ) บริษัท Ferak
4. ไตรเมทิลสเตียริลแอมโมเนียม คลอไรด์ (Trimethylstearylammonium Chloride,  $[CH_3(CH_2)_{17}N(CH_3)_3]Cl$ ) บริษัท TCI
5. ที-บิวทานอล (t-Butanol, ) บริษัท Univar

##### 4.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรึงและวัดกิจกรรมเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

1. สารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus licheniformis* (Alkaline Protease, Alcalase) บริษัท The East Asiatic (Thailand) Public Company Limited
2. เอนไซม์ไลเปส จาก *Candida rugosa* (Lipase, L-1754) บริษัท Sigma
3. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium Bicarbonate, ) บริษัท Ferak
4. เอทานอล (Ethanol,  $C_2H_5OH$ ) บริษัท Univar
5. เคซีน (Casein) บริษัท Sigma
6. ไทโรซีน (Tyrosine) บริษัท Sigma
7. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloro Acetic Acid, TCA ) บริษัท Merck

##### 4.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรึงและวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

1. เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol, ) บริษัท Univar
2. เอ็น-เฮปเทน (n-Heptane,  $C_7H_{14}$ ) บริษัท Univar
3. กรดบิวทริก (Butyric Acid, ) บริษัท Fluka
4. เฮกซะนอล (Hexanol, ) บริษัท Fluka
5. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulphate) บริษัท Ferak
6. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (Sodium Potassium Tartrate) บริษัท Ferak
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) บริษัท Univar
8. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate) บริษัท Univar

9. โฟลิน ซีโอแคลซัวร์ รีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu Reagent) บริษัท Merck

10. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) บริษัท Sigma

หมายเหตุ : สารเคมีที่ใช้ทุกตัวเป็นสารเคมีที่มีคุณภาพระดับ Lab grade

## 4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

### 4.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการเคมี
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ของบริษัท Memmert ประเทศเยอรมนี
3. เครื่องกวนแบบใบกวน (Mechanical Stirrer) ของบริษัท Kika Work Asia ประเทศมาเลเซีย
4. ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven) รุ่น TRX-2021 ขนาด 1200 วัตต์ ของบริษัท Turbora
5. เตาเผา (Furnace) ของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีอนุภาคและกระบวนการวัสดุ
6. เครื่องเขย่าแนวระดับ (Platform Shaker) รุ่น Innova 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิและความเร็วรอบ รุ่น GYROMAX 939XL ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี
9. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่องอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Dryer) รุ่น CRYODOS-50 บริษัท Millrock Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) ของบริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี

### 4.2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์

1. เครื่องวัดอัตราการดูดซับไนโตรเจน (Specific surface area measurement) รุ่น BELSORP28 ของบริษัท BEL Japan ประเทศญี่ปุ่น
2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) รุ่น JSM-6301F ของบริษัท JEOL ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น JENWAY 6405 ของบริษัท Krackeler Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา



4. แก๊สโครมาโทกราฟีก๊าซ (Gas Chromatography) รุ่น CG-7AG ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

#### 4.3 การเตรียมและการวิเคราะห์คุณลักษณะของอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

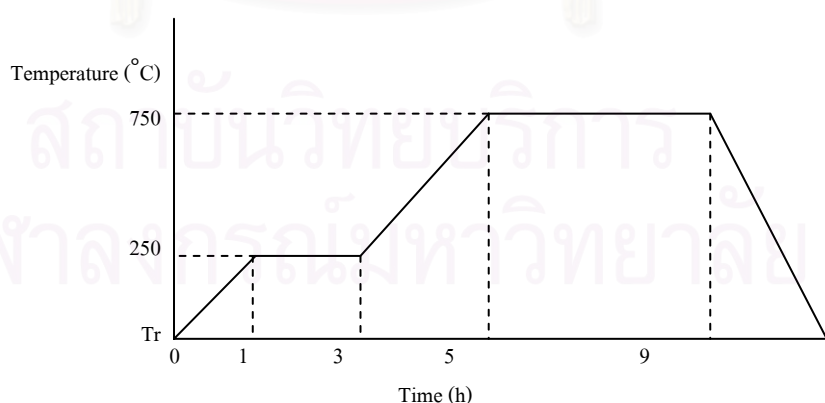
##### 4.3.1 การเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนเจลโดยไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคตไอออนิก

อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีดั้งเดิม (RF-NS) กล่าวคือ ไม่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคตไอออนิก (Trimethylstearylammmonium chloride) เตรียมได้จากสารละลายเริ่มต้นระหว่าง ริโซซินอล (R) และ ฟอิร์มาลดีไฮด์ (F) โดยมีน้ำกลั่น (W) เป็นตัวทำละลาย และ โซเดียมคาร์บอเนต (C) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดต่าง (Base catalyst) อัตราส่วนระหว่าง R/F และ C/W มีค่าคงที่คือ 0.5 และ 5.67 โมลต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ

เมื่อผสมสารละลายตามอัตราส่วนข้างต้น ปล่อยให้สารละลายเกิดเป็นเจล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการกวนเพื่อให้เจลละเอียด แล้วทำการบ่ม (aging) ที่อุณหภูมิเดียวกันนาน 1 วัน และที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน นำอาร์เอฟไฮโดรเจล (RF hydrogel) ที่เตรียมได้ไปแลกเปลี่ยนตัวทำละลาย (solvent exchange) โดยแช่ RF hydrogel ใน t-Butanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ RF gel ให้แห้งโดยการอบแห้งด้วยตู้อบไมโครเวฟ (Microwave Oven) ด้วยใช้กำลัง 160 วัตต์ เป็นเวลา 25 นาที

RF carbon gel สามารถเตรียมได้โดยการเผา RF gel ให้เป็นคาร์บอน (Carbonization) โดยมีอุณหภูมิการเผาเป็น 750 องศาเซลเซียส เผาภายใต้บรรยากาศเฉื่อยของก๊าซไนโตรเจน ด้วยอัตราการไหล 200 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที

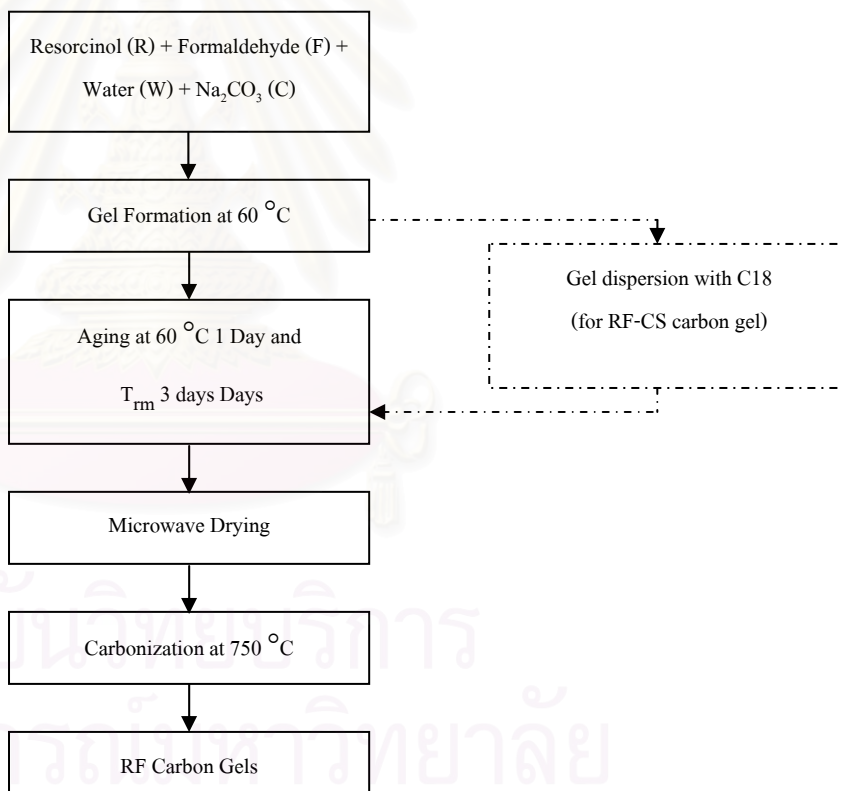
ขั้นตอนการควบคุมอุณหภูมิ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิแสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงแผนผังการควบคุมอุณหภูมิการ Carbonization RF gel เป็น RF carbon gel

#### 4.3.2 การเตรียมอาร์เอฟคาร์บอนเจลโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอออนิก

RF carbon gel ที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิว (RF-CS) เตรียมได้จากสารละลาย อาร์เอฟเริ่มต้น ผ่านกระบวนการโซล-เจล พอลิคอนเดนเซชัน (sol-gel polycondensation) เช่นเดียวกับ RF-NS แต่จะเพิ่มกระบวนการทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersion process) โดยเทสารละลายอาร์เอฟที่ใกล้สูญเสียดสภาพของไหลลงไปในสารละลายสารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอออนิก (Trimethylstearylammmonium chloride) ความเข้มข้น และมีน้ำเป็นตัวทำละลาย ทำการกวนด้วยเครื่องกวนแบบใบกวน (Mechanical Stirrer) ด้วยความเร็ว 850 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จึงกรอง RF hydrogel เพื่อนำไปบ่ม แลกเปลี่ยนตัวทำละลาย ทำให้แห้ง และเผาตามขั้นตอน และเงื่อนไขเช่นเดียวกับ RF-NS เพื่อได้เป็น RF carbon gel



รูปที่ 4.2 แสดงขั้นตอนการเตรียม RF carbon gels ทั้งแบบ RF-NS carbon gel และ RF-CS carbon gel

### 4.3.3 วิธีการวิเคราะห์อาร์เอฟเจล และอาร์เอฟคาร์บอนเจล

#### 4.3.3.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติความเป็นรูพรุน

คุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF gel และ RF carbon gels สามารถหาได้จากการวัดค่าสมมูลการดูด-คายซับก๊าซไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน โดยใช้เครื่องรุ่น BELSORP28 ของบริษัท BEL Japan Inc. และจากเส้นสมมูลการดูด-คายซับ (Adsorption and Desorption Isotherm) จะสามารถนำไปคำนวณหาปริมาตรรูพรุนระดับมีโซพอร์ (Mesopore Volume,  $V_{mes}$ ) และการกระจายขนาดรัศมีรูพรุนระดับมีโซพอร์ (Mesopore Radius Size Distribution) โดยวิธี Dollimore and Heal และคำนวณพื้นที่ผิวได้โดยใช้แบบจำลองของ Brunaker, Emmett and Teller

#### 4.3.3.2 การวิเคราะห์รูปร่าง

ลักษณะพื้นผิวของ RF gels และ RF carbon gels สามารถพิจารณาได้จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) รุ่น JSM-6301F ของบริษัท JEOL

### 4.4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอว์รี (Lowry Assay)

นำสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างละ 49 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนได้เป็นสารละลายเริ่มต้น

นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณโปรตีนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารตัวอย่างที่เจือจางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเริ่มต้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรแล้วเขย่าด้วยเครื่องผสม ภายหลังการตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีเติมสารละลายฟอลิน ซีโอแอลซัวร์ รีเอเจนต์ความเข้มข้น 50% โดยปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรลงในสารตัวอย่างแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำสารตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน โบวีน ซีรัม อัลบูมิน ได้ค่าปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 4.5 การศึกษาตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

#### 4.5.1 การตรึงโดยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) บน RF carbon gels โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

**ขั้นการเตรียมตัวรองรับ:** นำ RF carbon gels ปริมาณ 3 กรัม ไปแช่ในเอทานอล 20 มิลลิลิตร จากนั้นกรอง RF carbon gels ออกแล้วทำการล้างอีกครั้งด้วยสารละลายเอทานอล 50% เพื่อกำจัดอากาศที่อยู่ในรูพรุนของ RF carbon gels จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วทิ้งให้แห้ง

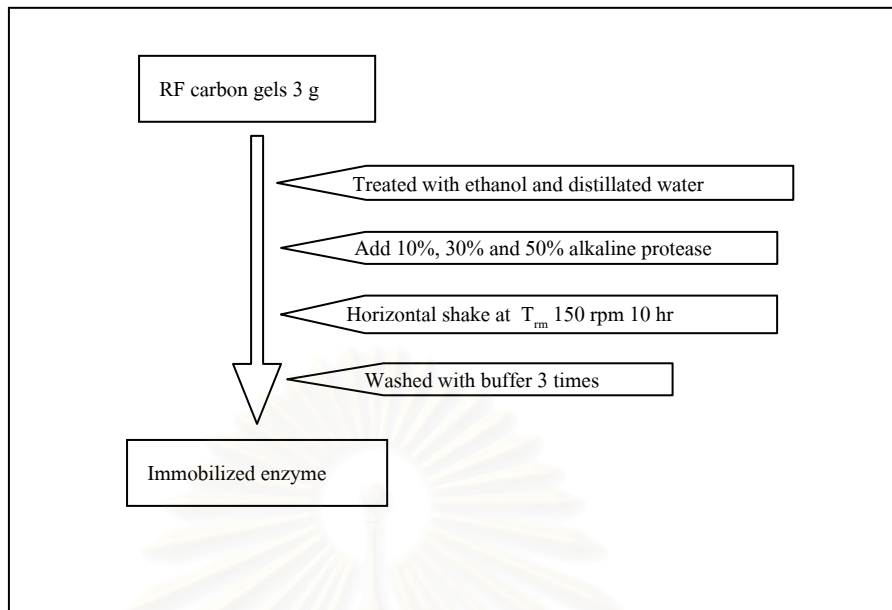
**ขั้นการตรึงเอนไซม์:** นำ RF carbon gels ที่เตรียมจากขั้นแรก ใสลงในขวดรูปชมพู่ ที่มีสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส 10%, 30% และ 50% ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น (ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวระดับที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป

ในการทดลองจะมีการทดสอบผลของแรงเฉือน (shear force) ขณะเขย่าที่มีต่อสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยการเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส 10% ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการเขย่าในแนวระดับและเก็บตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ทุก ๆ ชั่วโมง เช่นเดียวกัน แล้วนำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างไปทำปฏิกิริยาเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไป

**ขั้นการล้างเอนไซม์ตรึง:** กรอง RF carbon gels ที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ออกจากสารละลายภายหลังการเขย่า 10 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง แล้วนำน้ำล้างไปตรวจหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออกจาก RF carbon gels ในขั้นสุดท้าย ทำเอนไซม์ตรึงให้แห้งโดยการตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้จากสมการที่ 4.1

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ หรือ ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้} = \frac{\text{ปริมาณ โปรตีน ใน สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น} - \text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง} - \text{ปริมาณโปรตีนในน้ำล้าง}}{\text{ปริมาณน้ำล้าง}} \quad (4.1)$$



รูปที่ 4.3 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels

#### 4.5.2 การตรึงโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจล (Gel entrapment method)

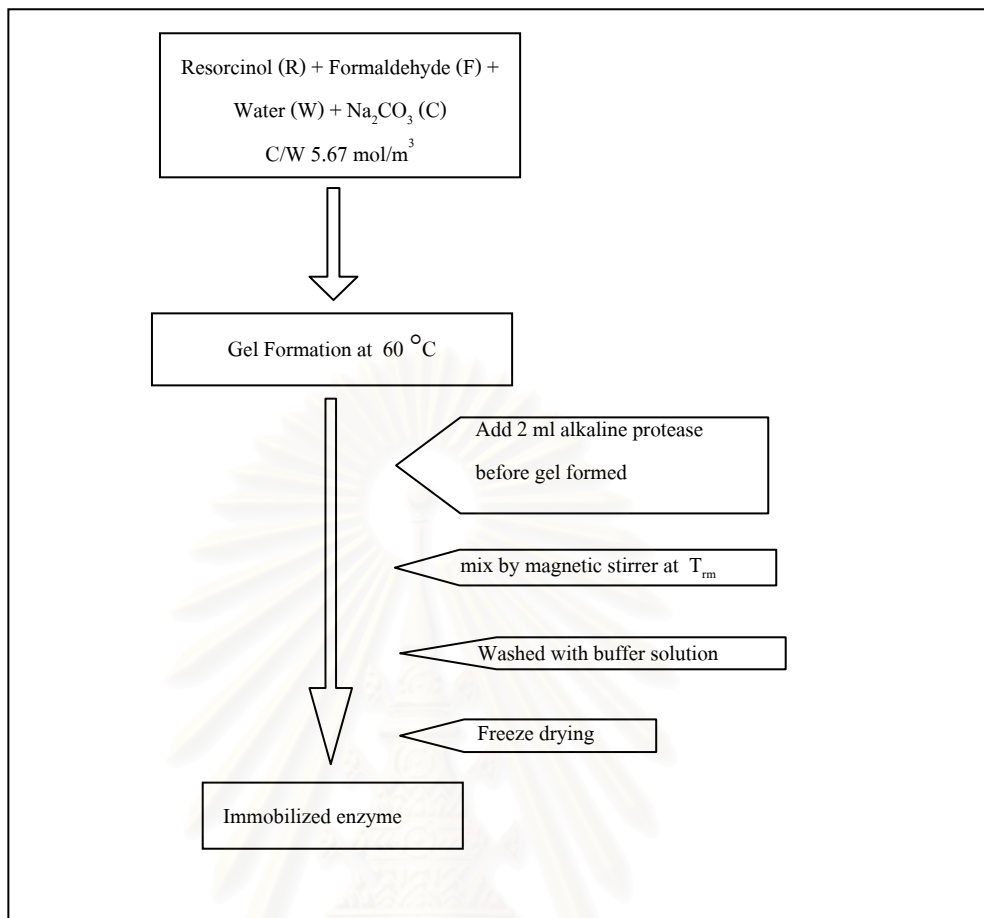
สำหรับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจลนั้น จะทำการตรึงเฉพาะกับ RF-NS gel เท่านั้น โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลาย RF ที่มีอัตราส่วน R/F และ C/W เป็น 0.5 และ 5.67 mol/m<sup>3</sup> เช่นเดียวกันแต่ปริมาณน้ำ (W) รวมของระบบจะเป็นปริมาณน้ำที่เดิมในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย RF รวมกับ ปริมาณน้ำที่มาจากสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ทั้งนี้เพื่อควบคุมให้อัตราส่วน C/W ของเอนไซม์ตรึงมีค่าคงเดิม

นำสารละลาย RF ที่เตรียมได้แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใกล้สูญเสียความเป็นของไหล จึงนำออกมาแช่อ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิของสารละลาย เมื่อสารละลายเย็นตัวลง ทำการเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 2 มิลลิลิตร ลงไป แล้วกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเบา ๆ จนสารละลายรวมตัวเป็นเนื้อเดียว แล้วจึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายแข็งซ้นกลายเป็นเจล

ทำการล้าง RF gel ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ นำน้ำล้างไปหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออก หรืออีกนัยหนึ่งคือปริมาณโปรตีนที่ไม่ถูกตรึงอยู่ใน RF gel

เอนไซม์ตรึงถูกทำให้แห้งโดยการอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Drying) ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส 30 นาที และทำการระเหิดที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์ที่แห้งจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้





รูปที่ 4.4 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีห่อหุ้มในโครงเจลของ RF-NS Gel

ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้จากสมการที่ 4.2

$$\text{ปริมาณเอนไซม์ หรือ ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้} = \text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น} - \text{ปริมาณโปรตีนในน้ำล้าง} \quad (4.2)$$

#### 4.5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมและอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

กิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส สามารถทดสอบจากการนำเอนไซม์ไปใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) โดยมีเคซีนเป็นสับสเตรท และได้ไทโรซีนเป็นผลิตภัณฑ์

บ่มสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 10% ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (1 กรัมเอนไซม์ตรึง) ในสารละลายเคซีน 1% โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม

สารละลายคาร์บอนไดออกไซด์ ไบคาร์บอนไดออกไซด์ (pH 10.5) ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร ผสมด้วย เครื่องเขย่าแนวระดับ ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทำการหยุด ปฏิกริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายกรดไตรคลอโร อะซิติก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำของผสมไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อ นาที นาน 20 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนในไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการ ดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

ในการทดสอบทุกครั้งจะมีหลอดควบคุม (control) โดยจะเติมสารละลายเอนไซม์ลงไป ภายหลังการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ไทโรซีนเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 1 นาที

สำหรับการวิเคราะห์อัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างสารละลายใน ช่วงเวลา 0 ถึง 20 นาที ไปทดสอบค่าการดูดกลืนแสง เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน หาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้

#### 4.5.4 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในการเร่งปฏิกิริยา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และ เอนไซม์ตรึง

วิธีทดสอบทำลักษณะเดียวกันกับวิธีในข้อ 4.5.3 แต่จะใช้เวลาในการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ เป็น 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเอนไซม์ออกมาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เพื่อทดสอบปริมาณ เอนไซม์ที่เหลือภายหลังจากการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงไปเร่งปฏิกิริยากับสับ สเตรทใหม่

สำหรับกรณีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ จะทำการเติมเคซีน ลงไปใหม่ในแต่ละ รอบของการเร่งปฏิกิริยา

#### 4.5.5 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในการเก็บรักษา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในการเก็บรักษาทำได้โดย นำ เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นำ เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.5.3 ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

## 4.6 การศึกษาตรึงเอนไซม์ไลเปส

### 4.6.1 การตรึงโดยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption method)

การตรึงเอนไซม์ไลเปส (lipase) บน RF carbon gels โดยวิธีดูดซับทางกายภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักเช่นเดียวกันกับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ดังนี้

**ขั้นการเตรียมตัวรองรับ:** นำ RF carbon gels ปริมาณ 2 กรัม เติมนลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเฮปแทน 20 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

**ขั้นการตรึงเอนไซม์:** สำหรับขั้นการตรึงเอนไซม์นั้นจะทำการหาชั่วโมงการตรึงที่เหมาะสมเป็นลำดับแรก โดยการเติมเอนไซม์ไลเปส 0.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี RF carbon gels แช่ในเฮปแทนจากขั้นตอนแรก จากนั้น กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2, 5 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นจะทำการล้างเอนไซม์ตรึงแสดงในขั้นตอนลำดับต่อไป เพื่อหาปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้

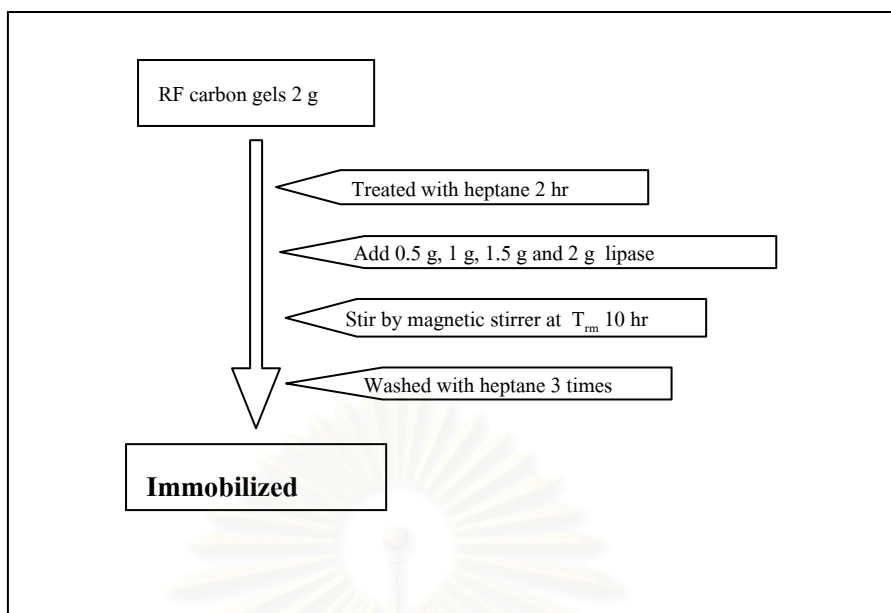
เมื่อทราบชั่วโมงการตรึงที่เหมาะสมแล้ว จะทำการทดสอบความสามารถในการรองรับปริมาณเอนไซม์ของ RF carbon gels โดยทำการตรึงเอนไซม์ในลักษณะเดียวกัน แต่เติมเอนไซม์ในปริมาณที่ต่างกันคือ 0.5 กรัม, 1 กรัม 1.5 กรัม และ 2 กรัม จากนั้นทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้

ในการทดลองจะมีการทดสอบผลของแรงเฉือน (shear force) ขณะกวนที่มีต่อเอนไซม์ไลเปสโดยการกวนเอนไซม์ไลเปสปริมาณ 0.5 กรัมในเฮปแทนโดยใช้เวลาการกวนเป็น 2, 5 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสไปเร่งปฏิกิริยา ซึ่งขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาจะแสดงในลำดับต่อไป

**ขั้นการล้างเอนไซม์ตรึง:** กรอง RF carbon gels ที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่อกจากระบบภายหลังการตรึงเอนไซม์ ใช้เฮปแทนล้างเอนไซม์ตรึง 3 ครั้ง แล้วนำน้ำล้างไปตรวจหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออกจาก RF carbon gels ในขั้นสุดท้าย ทำเอนไซม์ตรึงให้แห้งโดยการตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้เช่นเดียวกันกับสมการที่ 4.1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF Carbon Gels

#### 4.6.2 การตรึงโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจล (Gel entrapment method)

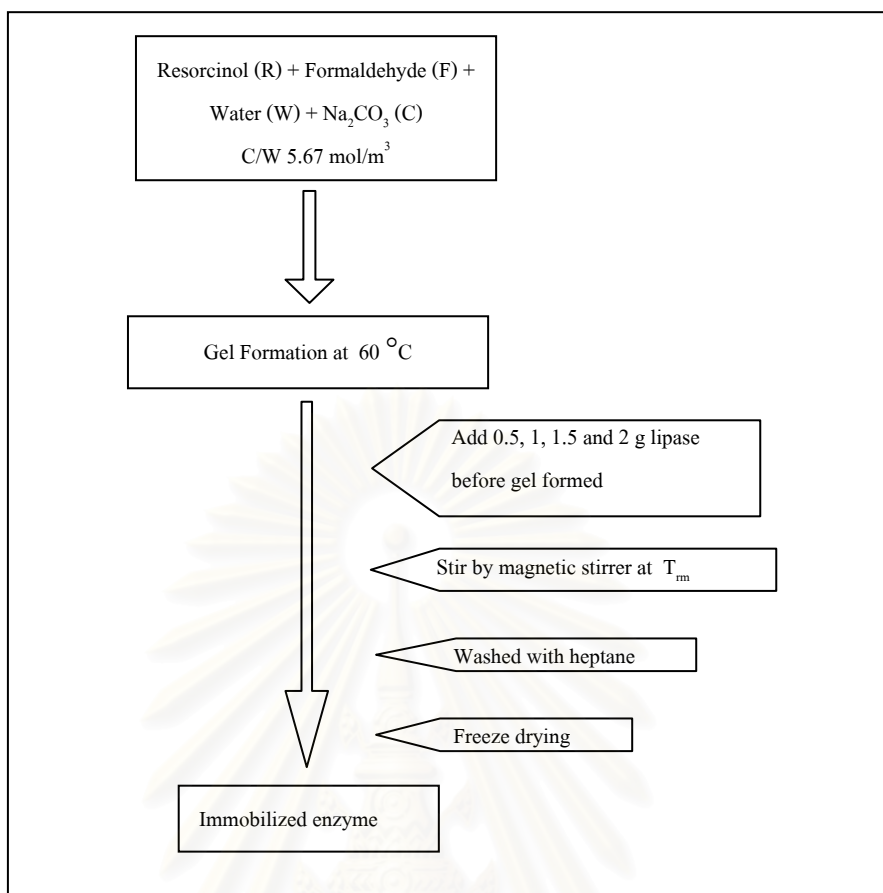
สำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีห่อหุ้มภายในเจลนั้น จะทำการตรึงเฉพาะกับ RF-NS gel เช่นเดียวกันกับการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลาย RF ที่มีอัตราส่วน R/F และ C/W เป็น 0.5 และ 5.67 โมลต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับกรณีของเอนไซม์ไลเปสที่นำมาตรึงนั้นจะอยู่ในรูปของผง ดังนั้นจึงไม่ต้องทำการชดเชยปริมาณน้ำเหมือนกับในกรณีการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

นำสารละลาย RF ที่เตรียมได้ 20 มิลลิลิตรแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใกล้สูญเสียความเป็นของไหล จึงนำออกมาแช่อ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิของสารละลาย เมื่อสารละลายเย็นตัวลง ทำการเติมเอนไซม์ไลเปส 0.5 กรัม, 1 กรัม, 1.5 กรัม และ 2 กรัม ลงไป แล้วกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กเบา ๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายแข็งซึ้นกลายเป็นเจล

ทำการล้าง RF gel ที่มีเอนไซม์อยู่ด้วยเฮปเทน นำน้ำล้างไปหาปริมาณโปรตีนที่หลุดออกหรืออีกนัยหนึ่งคือปริมาณโปรตีนที่ไม่ถูกตรึงอยู่ใน RF gel

เอนไซม์ตรึงถูกทำให้แห้งโดยการอบแห้งแบบเย็นเยือก (Freeze Drying) ที่อุณหภูมิแช่แข็ง -40 องศาเซลเซียส 30 นาที และทำการระเหิดที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เอนไซม์ที่แห้งจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมจะนำไปใช้

ปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้คำนวณได้เช่นเดียวกันกับสมการที่ 4.2



รูปที่ 4.6 แสดงขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีห่อหุ้มในโครงเจลของ RF-NS Gel

#### 4.6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมและอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส สามารถทดสอบจากการนำเอนไซม์ไปใช้เร่งปฏิกิริยา เอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification) ระหว่าง บิวทานอล กับ กรดบิวทาริก

ผสม บิวทานอล ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และ กรดบิวทาริก ความเข้มข้น 550 มิลลิโมลาร์ ใน heptane ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสอิสระ 50 มิลลิกรัม หรือ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูป 0.5 กรัม ลงในของผสม ทำการผสมด้วยเครื่องเขย่าในแนวระดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่างๆ และหยุดการเร่งปฏิกิริยาโดยการแช่แข็ง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ บิวทานอล ที่คงเหลืออยู่ในระบบโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีก๊าซ และใช้เฮกซะนอล เป็นสารมาตรฐาน (internal standard)

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาใช้ บิวทานอล ไป 1 ไมโครโมล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายในเวลา 1 นาที

สำหรับการวิเคราะห์อัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ทำได้โดยการเก็บตัวอย่างสารละลายในช่วงเวลา 0 ถึง 20 นาที ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ บิวทานอล เช่นเดียวกัน



#### 4.6.4 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน เป็นการทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาซ้ำของเอนไซม์เช่นเดียวกันกับกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

วิธีทดสอบทำลักษณะเดียวกันกับวิธีในข้อ 4.6.4 เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาครบรอบคือ 24 ชั่วโมงเสร็จสิ้น จะทำการแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกมาล้างด้วยเฮปแทน เพื่อทดสอบปริมาณเอนไซม์ที่หลุดภายหลังจากการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงไปเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทใหม่

ในกรณีของเอนไซม์ไลเปสอิสระที่อยู่ในรูปอนุภาคผง สามารถแยกเอนไซม์ออกจากระบบได้ และสามารถเติมลงในสับสเตรทใหม่ ซึ่งจะต่างกับกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ที่อยู่ในรูปของสารละลาย

#### 4.6.5 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษา

การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในการเก็บรักษาทำได้โดย นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึง ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 4.6.3 ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากวิธีการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.1

Condition	Samples		
	RF-NS carbon	RF-CS carbon	RF-NS gel
<b>1. Preparation</b>			
1.1 C/W of RF solution (mol/m <sup>3</sup> )	5.67	5.67	5.67
1.2 Surfactant	-	cationic surfactant	-
1.3 Gels formation temperature ( °C)	60	60	60
1.4 Aging	60°C 1 day, T <sub>m</sub> 3 days	60°C 1 day, T <sub>m</sub> 3 days	-
1.5 Drying	MW drying	MW drying	Freeze drying
1.6 Solvent exchange	t-butanol	t-butanol	-
1.7 Carbonization	750 °C	750 °C	-
<b>2. Enzyme immobilization</b>			
1.1 Enzyme	Alkaline protease Lipase	Alkaline protease Lipase	Alkaline protease Lipase
1.2 Immobilization techniques	Physical adsorption	Physical adsorption	Gel entrapment

ตารางที่ 4.1 แสดงสรุปเงื่อนไขในการเตรียมอาร์เอฟเจลและ คาร์บอนเจล และการนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์

## บทที่ 5

### ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

ในบทนี้จะกล่าวถึงผลและวิเคราะห์ผลการทดลองอันประกอบไปด้วย 2 หัวข้อหลักคือ ผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส โดยในส่วนของผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลนั้น จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำมาใช้ประกอบในการวิเคราะห์ผลความสามารถในการตรึง การเร่งปฏิกิริยา รวมไปถึงเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงในลำดับต่อไป

#### 5.1 ผลการเตรียมอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

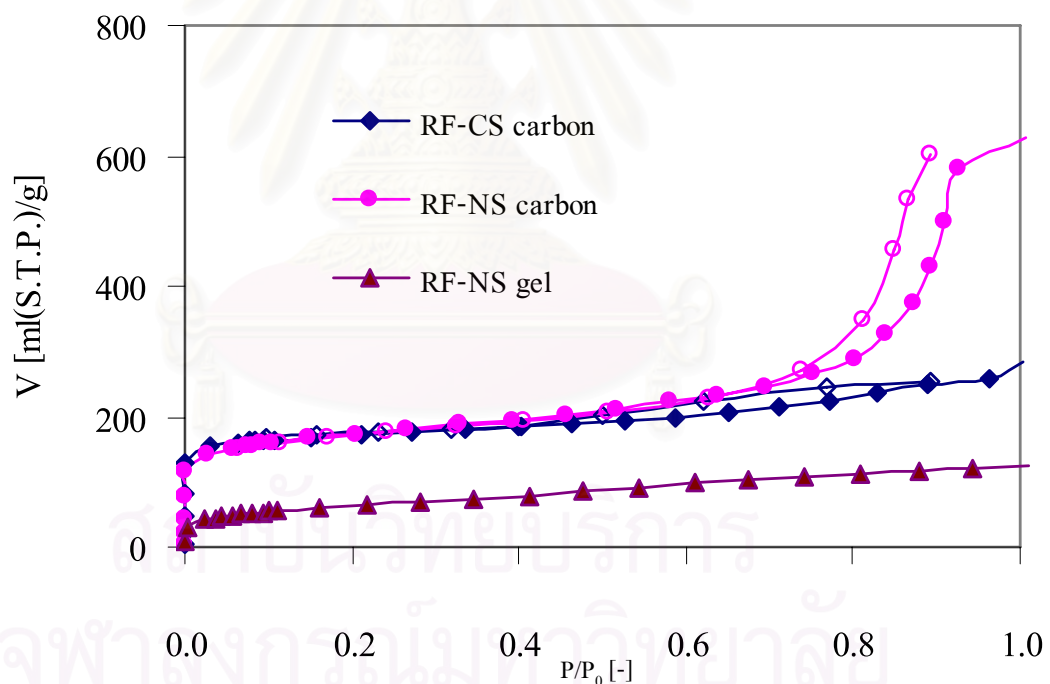
ดังที่กล่าวไว้ในส่วนของวิธีการทดลองว่า อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมนั้นจะเตรียมมาจากกรรมวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธีคือ อาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไออนิก คือ Trimethylstearylammmonium Chloride ในขั้นการทำให้อนุภาคเกิดการกระจายตัว โดยอาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีนี้จะใช้สัญลักษณ์แทนว่า RF-CS คาร์บอนเจล สำหรับอาร์เอฟคาร์บอนเจลที่เตรียมอีกวิธีที่แตกต่างกันคือ จะไม่ใช้สารลดแรงตึงผิวเข้าร่วมในกระบวนการเตรียมโดยอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่เตรียมโดยวิธีนี้จะใช้สัญลักษณ์แทนว่า RF-NS เจลและคาร์บอนเจล โดย RF-NS เจลจะมีความแตกต่างจาก RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน ตรงที่วิธีการทำให้แห้งซึ่งจะใช้วิธีการทำให้แห้งแบบเย็นเยือก (freeze drying) ขณะที่กรณีอื่นๆจะใช้วิธีการทำให้แห้งโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave drying) ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล สำหรับปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่ออาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลทั้งสองชนิดนี้จะถูกควบคุมให้มีค่าเท่ากัน อาทิอุณหภูมิในการเกิดเจล (gelation temperature) อุณหภูมิและเวลาในการบ่ม (aging temperature and aging time) และเงื่อนไขในการเผา (pyrolysis) เป็นต้น

อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลทั้งสองชนิดจะถูกตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุน ได้แก่ ปริมาตรรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ การกระจายขนาดรัศมีรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ และค่าพื้นที่ผิว BET จากผลของ ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน และตรวจสอบรูปร่างลักษณะโดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope ,SEM) ผลการตรวจสอบลักษณะต่างๆแสดงและอธิบายได้ดังนี้

### 5.1.1 ผลการตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุนของ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

การตรวจสอบสมบัติความเป็นรูพรุนนั้นจะทำการตรวจสอบเฉพาะอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่ถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์เท่านั้น โดยในงานวิจัยนี้ได้ใช้ทั้ง RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอนในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ แต่สำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล จะใช้เฉพาะ RF-NS เจลในการตรึง เพราะเป็นการเตรียมเจลที่ง่าย และไม่มีสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอาจมีผลในการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ อีกทั้งการเตรียม RF-CS เจลยังต้องใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในขั้นของการกระจาย ซึ่งจะทำให้สารละลายเอนไซม์ที่เติมลงไปมีความเจือจางเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะเลือกใช้ในการทดลองการตรึงเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีห่อหุ้ม

#### 5.1.1.1 ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน (Nitrogen Adsorption-Desorption Isotherm)



รูปที่ 5.1 แสดงไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel โดยที่เครื่องหมายทึบคือการดูดซับและเครื่องหมายโปร่งคือการคายซับ

ไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ ของไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 77 เคลวิน ของ RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอนแสดงดังรูปที่ 5.1 เมื่อพิจารณาลักษณะของไอโซเทอมจะเห็นความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะในช่วงที่ค่าความดันสัมพัทธ์ ( $P/P_0$ ) มีค่าสูงกว่า 0.6 ปริมาณการดูดซับ

ไนโตรเจนของ RF-NS คาร์บอนจะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ปริมาตรการดูดซับไนโตรเจนของ RF-CS คาร์บอนมีค่าค่อนข้างคงที่ รูปร่างลักษณะไอโซเทอมของอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองนี้เมื่อจำแนกตาม IUPAC จะจำแนกไอโซเทอมอยู่ใน Type IV กล่าวคือ โครงสร้างของ RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอน นั้นมีรูพรุนระดับเมโซพอร์

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะไอโซเทอมของ RF-CS คาร์บอน กับลักษณะไอโซเทอมของคาร์บอนไมโครโอเจล ที่ทำการเตรียมด้วยการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทไออนิก (C18) และใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเช่นเดียวกัน ของ Tonanon และคณะ [11] จะพบว่ามีความใกล้เคียงกัน

สำหรับกรณีของ RF-NS เจลนั้นพบว่าลักษณะไอโซเทอมที่ได้มีลักษณะเดียวกันกับ RF-CS คาร์บอน แต่จะมีปริมาตรการดูดซับไนโตรเจนน้อยกว่าในทุกๆค่าความดันสัมพัทธ์ จึงอาจบอกได้ว่า RF-NS เจลมีปริมาตรรูพรุนที่น้อยกว่าทั้ง RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน และรูพรุนของ RF-NS เจลนั้นจะอยู่ในช่วงไมโครพอร์

#### 5.1.1.2 ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ (Mesopore volume)

การคำนวณหาปริมาตรรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ สามารถคำนวณได้ด้วยระเบียบวิธี Dollimore และ Heal จากค่าไอโซเทอมการคายซับของไนโตรเจน เมื่อพิจารณาปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ ( $V_{meso}$ ) ของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล แสดงดังตารางที่ 5.1 จะเห็นว่า RF-NS คาร์บอนมีปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์สูงกว่าอาร์เอฟตัวอื่นๆอย่างชัดเจน โดยมีค่า  $V_{meso}$  เป็น  $0.81 \text{ cm}^3/\text{g}$  ขณะที่ RF-CS คาร์บอน และ RF-NS เจลมีค่าเป็น  $0.21 \text{ cm}^3/\text{g}$  และ  $0.15 \text{ cm}^3/\text{g}$  ตามลำดับ

Sample	Mesopore volume ( $V_{meso}$ , $\text{cm}^3/\text{g}$ )	Surface area ( $S_{BET}$ , $\text{m}^2/\text{g}$ )	Rp (nm)
RF-CS carbon	0.21	518	2.0
RF-NS carbon	0.81	550	7.2
RF-NS gel	0.15	214	1.7

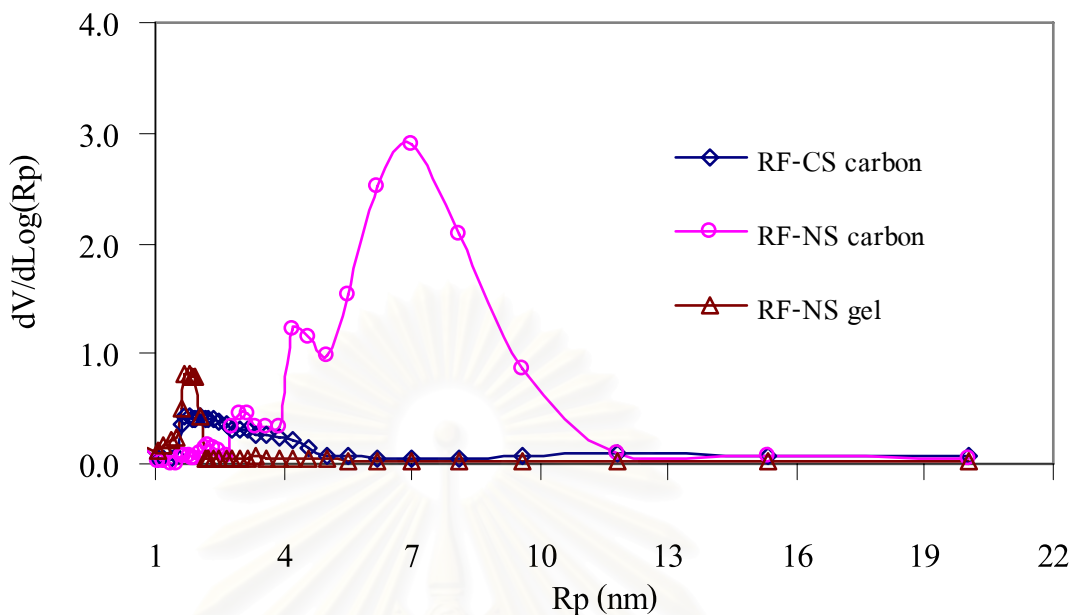
ตารางที่ 5.1 แสดงค่าสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel

### 5.1.1.3 การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ (Mesopore Size Distribution)

ผลการวิเคราะห์การกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์แสดงดังรูปที่ 5.2 จะเห็นว่า RF-NS คาร์บอน มีการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์เป็นช่วงกว้าง โดยมีค่ารูพรุนส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 4 ถึง 10 nm ในขณะที่ RF-CS คาร์บอน มีการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์เป็นช่วงแคบกว่า และค่าสูงสุดของการกระจายขนาดรูพรุน ( $R_p$ ) มีค่าน้อยมากโดยน้อยกว่า RF-NS คาร์บอน ประมาณ 4 เท่า ซึ่งผลของการกระจายขนาดรูพรุนนี้แสดงให้เห็นว่า RF-NS คาร์บอนมีรูพรุนระดับเมโซพอร์เป็นส่วนใหญ่ และขนาดของรูพรุนส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่มากกว่าขนาดรูพรุนของ RF-CS คาร์บอน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ RF-CS คาร์บอนกับ คาร์บอนไครโอเจลที่เตรียมโดย Tonanon และคณะ [11] จะพบว่าค่า  $R_p$  ของ RF-CS คาร์บอน จะมีค่าน้อยกว่าค่า  $R_p$  ของคาร์บอนไครโอเจลที่มีค่าเป็น 6 nm ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากวิธีการทำให้ RF-CS เจลให้แห้งที่มีความแตกต่างกัน กล่าวคือคาร์บอนไครโอเจลนั้นผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบเย็นเยือก ในขณะที่ RF-CS คาร์บอนผ่านกระบวนการทำให้แห้งโดยคลื่นไมโครเวฟ โอกาสการยุบตัว (shrinkage) ของโครงสร้างรูพรุนของ RF-CS เจลมีมากกว่าไครโอเจล ดังนั้นภายหลังการเผาที่อุณหภูมิสูง (pyrolysis) RF-CS คาร์บอนที่เตรียมได้จึงมีขนาดรูพรุนระดับเมโซพอร์ที่ต่ำกว่าคาร์บอนไครโอเจล นอกจากวิธีการทำให้แห้งที่จะส่งผลต่อ RF คาร์บอนที่เตรียมได้แล้ว อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม ยังเป็นปัจจัยที่อาจส่งผลให้โครงสร้างรูพรุนที่เตรียมได้ มีความแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาการกระจายขนาดรูพรุนของ RF-NS เจล ดังรูปที่ 5.2 จะพบว่าการกระจายขนาดรูพรุนจะอยู่ในช่วงที่แคบ และมีค่า  $R_p$  ต่ำอยู่ที่ 1.7 nm ทั้งนี้การที่ปริมาตรการดูดซับไนโตรเจนของ RF-NS เจลมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์เอฟตัวอื่นๆ เนื่องจาก RF-NS เจล ยังไม่ผ่านกระบวนการเผาเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ และตัวทำละลายต่างๆออกจากโครงสร้าง ลักษณะความรูพรุนของ RF-NS เจลจึงมีน้อยกว่า RF-NS คาร์บอน





รูปที่ 5.2 แสดงการกระจายขนาดรูพรุนในช่วงเมโซพอร์ ของ RF-CS carbon RF-NS carbon และ RF-NS gel

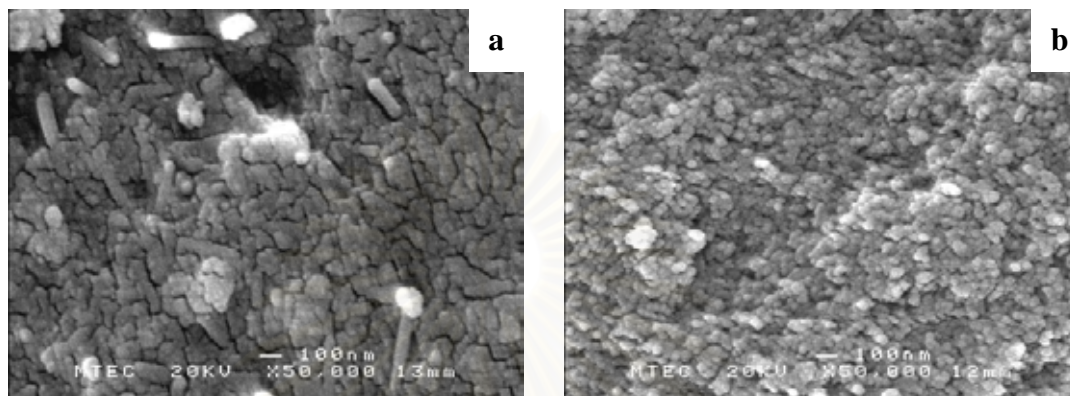
#### 5.1.1.4 พื้นที่ผิว BET (BET Surface Area)

ขนาดพื้นที่ผิว BET ของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล แสดงดังตารางที่ 5.1 โดยพบว่าพื้นที่ผิว BET ของ RF-NS คาร์บอนมีค่าสูงกว่า RF-CS คาร์บอนเล็กน้อย โดยมีค่าเป็น  $550 \text{ m}^2/\text{g}$  และ  $518 \text{ m}^2/\text{g}$  ตามลำดับ ในขณะที่ RF-NS เจล มีค่าต่ำกว่า RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน โดยมีค่าเป็น  $214 \text{ m}^2/\text{g}$  ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการเผาจะทำให้ลักษณะพื้นที่ผิวเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งโดยทั่วไปจะทำให้มีพื้นที่ผิวสูงขึ้น

#### 5.1.2 ผลการตรวจสอบรูปสัณฐานของ อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล

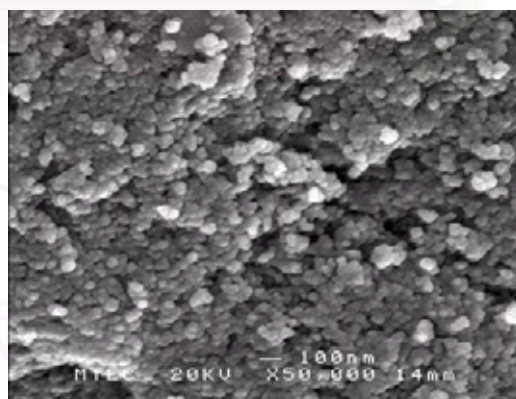
ลักษณะพื้นผิวของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล สามารถตรวจสอบได้จากภาพถ่าย SEM ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า จากรูปที่ 5.3 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของ RF-CS คาร์บอน (รูป a) กับ RF-NS คาร์บอน (รูป b) พบว่าทั้ง RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนมีลักษณะพื้นผิวที่เป็นรูพรุนอยู่ทั่ว และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของ RF-CS คาร์บอน กับคาร์บอนไครโอเจลจากงานวิจัยของ Tonanon และคณะ [11] จะพบว่ามีแตกต่างกัน โดยคาร์บอนไครโอเจลจะพบโพรงที่มีขนาดใหญ่ในระดับเมโครพอร์ ในขณะที่ RF-CS

คาร์บอนไม่สามารถตรวจพบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในกระบวนการเผาเพื่อให้ได้ RF-CS คาร์บอนเกิดการยุบตัวของโครงสร้างรูพรุนมากกว่าจึงทำให้ช่องว่างขนาดใหญ่ที่อาจเกิดขึ้นยุบตัวลง สาเหตุของการยุบตัวนั้นเนื่องมาจากกระบวนการทำให้แห้งที่ใช้คลื่นไมโครเวฟดังอธิบายไว้ในตอนต้น



รูปที่ 5.3 แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF carbon a) RF-CS carbon และ b) RF-NS carbon ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

ลักษณะพื้นผิวของ RF-NS เจลแสดงดังรูปที่ 5.4 ซึ่งจะพบว่าพื้นผิวมีความพรุนอยู่บ้าง โดยมีพื้นผิวบางส่วนที่มีการอัดแน่นของอนุภาคคาร์บอน ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาตรรูพรุน ขนาดรูพรุน และพื้นที่ผิวของ RF-NS เจล



รูปที่ 5.4 แสดงภาพถ่าย SEM ของ RF-NS gel ที่กำลังขยาย 50,000 เท่า

คุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-CS คาร์บอน RF-NS คาร์บอน และ RF-NS เจล สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5.1 เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ มีความเป็นไปได้ว่า RF-NS

คาร์บอนจะสามารถตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่า RF-CS คาร์บอนเนื่องจาก RF-NS คาร์บอนมีขนาดรูพรุนระดับเมโซพอร์ ปริมาตรรูพรุนระดับเมโซพอร์ และพื้นที่ผิว BET สูงกว่า อย่างไรก็ตามก็ยังขึ้นอยู่กับลักษณะการยึดตัวของโครงรูปเอนไซม์แต่ละชนิดด้วย ว่ามีความเหมาะสมกับพื้นผิวนั้นๆหรือไม่ เช่นเดียวกับกรณีของ RF-NS เจลที่ถึงแม้จะมีขนาดรูพรุนระดับเมโซพอร์ ปริมาตร รูพรุนระดับเมโซพอร์ และพื้นที่ผิว BET ต่ำกว่าอาร์เอฟคาร์บอน แต่ด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์ที่แตกต่างกันก็อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์แตกต่างกันได้ โดยผลการตรึงเอนไซม์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป จะแสดงในลำดับต่อไป

## 5.2 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส

ในส่วนของการตรึงเอนไซมนั้น จะแบ่งผลการทดลองออกเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) และการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล (Gel entrapment) โดยเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากการตรึงทั้งสองวิธีนี้ จะผ่านการทดสอบความสามารถในการตรึงเอนไซม์ ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา รวมถึงเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูป โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

### 5.2.1 ผลการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ

#### 5.2.1.1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนเจล

ผลปริมาณโปรตีน จากการนำเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมาตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนเจล ทั้งชนิดที่เตรียมมาจากการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดแคทอไอออนิก (RF-CS) และอาร์เอฟคาร์บอนเจลชนิดที่เตรียมโดยไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว (RF-NS) โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส 10% โดยปริมาตรของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น แสดงดังรูปที่ 5.5 โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ใช้วิธีของลอร์รี่ (Lowry Assay) จากรูปจะเห็นได้ว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสสามารถตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองชนิดได้แตกต่างกันคือ RF-NS คาร์บอนมีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงมากกว่า RF-CS คาร์บอนโดยที่ช่วงเวลาที่ 10 ของการตรึงเอนไซม์ มีปริมาณโปรตีนที่เกาะอยู่บน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน เป็น 431.42  $\mu\text{g protien/ g support}$  และ 73.59  $\mu\text{g protien/ g support}$  ตามลำดับ (น้ำหนักอาร์เอฟคาร์บอนที่ใช้ในการตรึงเป็น 3 g) ซึ่งคิดเป็น 76.25% และ 13.01% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นตามลำดับ โดยระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสมเป็น 5 ชั่วโมง จากผลการตรึงนี้พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน มีเปอร์เซ็นต์การตรึงสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Abdel-Naby และคณะ [33] ที่ศึกษาการ

ตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสบนไคโตซาน ที่สามารถตรึงได้ 18.8% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น

สำหรับเอนไซม์ไลเปส ผลปริมาณโปรตีนจากการนำเอนไซม์ไลเปส 0.5 g มาตรึงบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน แสดงดังรูปที่ 5.6

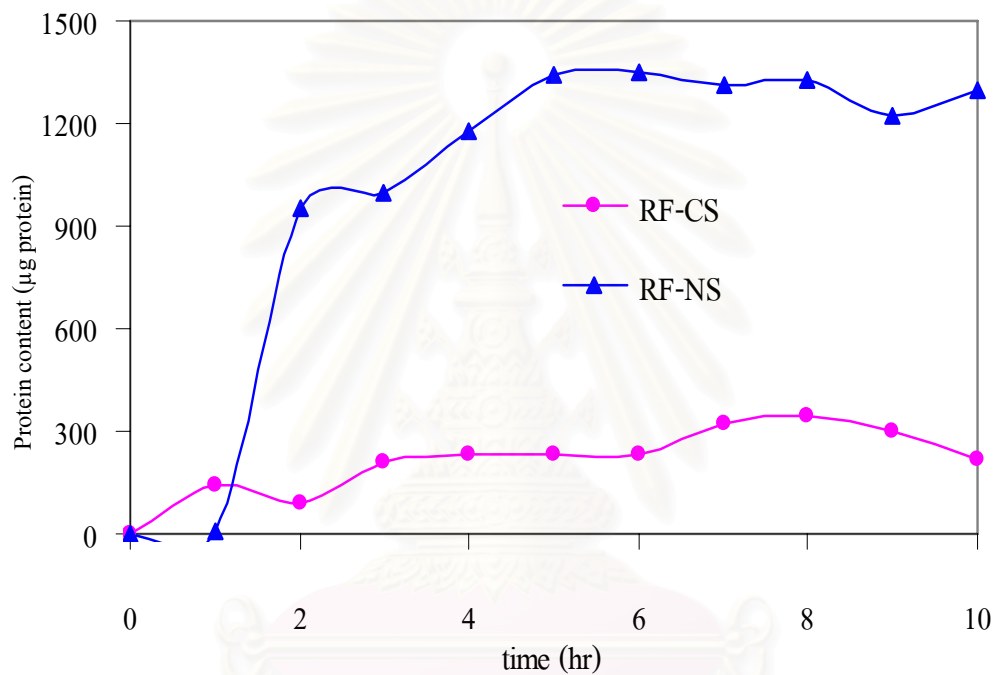
จากรูปพบว่า เมื่อที่เวลาผ่านไปปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดทั้งบน RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอน มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาการตรึงมากกว่า 5 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอนลดน้อยลง ดังนั้นเวลาที่ดีที่สุดในการตรึงเอนไซม์ ไลเปสบน RF-NS คาร์บอน คือประมาณ 5 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอน พบว่าปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอนมีมากกว่า ที่ตรึงติดบน RF-CS คาร์บอนโดยที่ ชั่วโมงที่ 5 ปริมาณโปรตีนที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอนเป็น 13.12 mg protein คิดเป็น 56.21% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น ในขณะที่บน RF-CS คาร์บอนเป็น 7.11 mg protein คิดเป็น 30.46% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น จากผลของปริมาณโปรตีนนี้แสดงให้เห็นว่า RF-NS คาร์บอน สามารถตรึงเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่า RF-CS คาร์บอน

จากผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Oliveira และคณะ [37] ที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* บน STYDVB copolymer ที่ตรึงเอนไซม์ได้ 91.6% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น พบว่ายังสามารถตรึงเอนไซม์ได้น้อยกว่า แต่สามารถตรึงได้มากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Murray และคณะ[30] ที่ตรึงเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้บน Polystyrene latex particle ที่ 0.6% w/v สามารถตรึงเอนไซม์ได้ 43% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น

การที่ทั้งเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปส สามารถตรึงบนอาร์เอฟ คาร์บอนทั้งสองชนิดได้แตกต่างกันเป็นเพราะคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF-NS คาร์บอนและ RF-CS คาร์บอนที่ต่างกัน จากผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของอาร์เอฟคาร์บอนทั้งสองชนิด ดังแสดงในหัวข้อ 5.1.1 จะเห็นได้ว่า RF-NS คาร์บอนมีปริมาตรรูพรุนในระดับเมโซ และพื้นที่ผิวสูงกว่า RF-CS คาร์บอน อีกทั้งเมื่อพิจารณาลักษณะการกระจายตัวของรูพรุนเปรียบเทียบกันยังพบว่า RF-NS คาร์บอน จะมีขนาดรูพรุนส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5-8 nm ในขณะที่ RF-CS คาร์บอน มีขนาด รูพรุนอยู่ในช่วง 2-3 nm เท่านั้น เมื่อพิจารณาจากขนาดของเอนไซม์ซึ่งพบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 nm ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสมีขนาดเป็น 6.82x6.86x5.21 nm จึงส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของ RF-CS คาร์บอนได้เต็มที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงอาจบอกได้ว่าเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน น่าจะตรึงได้ทั้งในรูพรุนของคาร์บอน และที่พื้นผิวด้านนอกของคาร์บอน ในขณะที่เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน น่าจะตรึงที่พื้นผิวภายนอกของคาร์บอน ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กได้

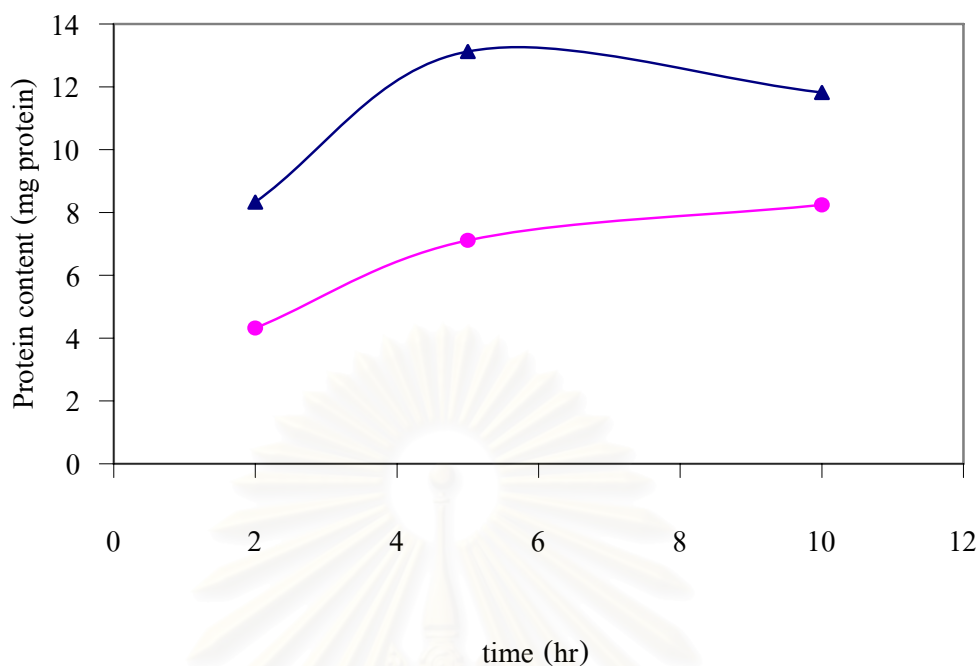
ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ บน RF-NS คาร์บอนเหมือนกัน พบว่า RF-NS คาร์บอนสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปส อาจเนื่องมาจากสภาพของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีลักษณะเป็นสารละลาย ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสอยู่ในรูปสารแขวนลอยในเฮปแทน การถ่ายเทมวลของเอนไซม์เข้าไปตรึงบน RF-NS คาร์บอนนั้น ต้องมีการถ่ายเทมวลข้ามเฟส จึงมีข้อจำกัดมากกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส



รูปที่ 5.5 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-CS และ RF-NS carbon 3 กรัม ที่เวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 5.6 แสดงปริมาณ โปรตีน (ไคเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon และ RF-CS carbon 2 กรัมที่เวลาต่างๆ

การวิจัยได้ทำการทดสอบปริมาณแอนไซม์ที่หลุดภายหลังจากทำการตรึงที่ชั่วโมงที่ 10 โดยการนำแอนไซม์ตรึงไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้งสำหรับแอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส และล้างด้วยเฮปแทน 3 ครั้ง สำหรับแอนไซม์ไคเปส ซึ่งพบการหลุดของแอนไซม์เป็นปริมาณไม่มากนัก โดยแอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนจะมีการหลุดของแอนไซม์จากการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มากกว่าการตรึงบน RF-NS คาร์บอนเล็กน้อย โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 5.2 และ 5.3

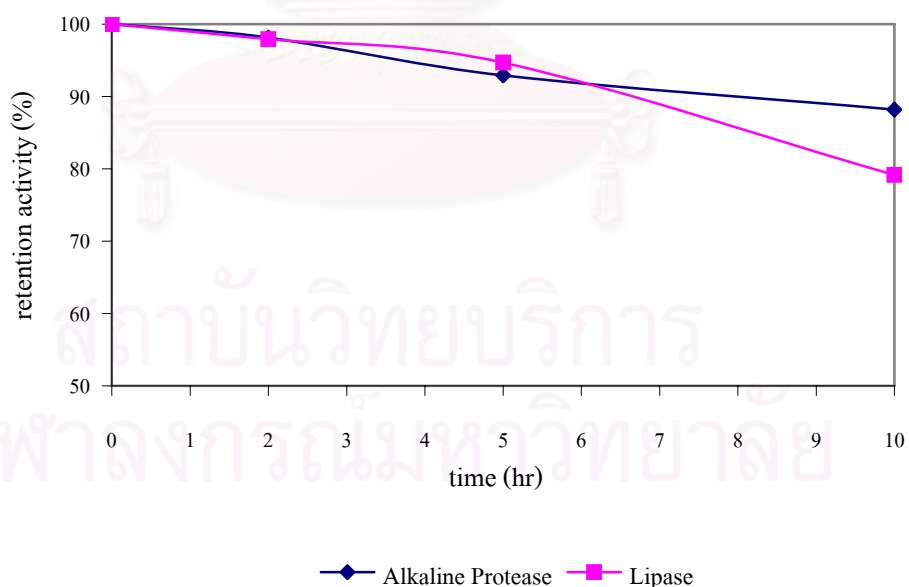
การล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (จำนวนครั้ง)	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-CS คาร์บอน ( $\mu\text{g protein/g support}$ )	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-NS คาร์บอน ( $\mu\text{g protein/g support}$ )
1	20.66	13.74
2	9.18	11.51
3	5.77	7.38
รวม	35.61	32.63

ตารางที่ 5.2 แสดงปริมาณ โปรตีน(แอลคาไลน์โพรติเอส)ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง

การล้างด้วยเฮปแทน (จำนวนครั้ง)	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-CS คาร์บอน (mg protein/g support)	ปริมาณโปรตีนที่หลุดจาก RF-NS คาร์บอน (mg protein/g support)
1	0.59	0.44
2	0.23	0.31
3	0.20	0.18
รวม	1.02	0.93

ตารางที่ 5.3 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดจาก RF-CS carbon และ RF-NS carbon จากการล้างด้วยเฮปแทน 3 ครั้ง

สิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ในการตรึงเอนไซม์นั่นคือผลของวิธีการตรึงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างตรึงเอนไซม์ ซึ่งอาจอยู่ในรูปของแรงเฉือน (shear force) อันเป็นผลจากการที่เอนไซม์โดนแรงสั่นสะเทือนเป็นเวลานาน หรือผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบผลกระทบดังกล่าว โดยทำการเขย่าเอนไซม์ที่ความเร็วรอบอุณหภูมิต่ำ และเวลาเช่นเดียวกันกับการตรึงเอนไซม์ และนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทุกๆ ชั่วโมงได้ผลแสดงดังรูปที่ 5.7

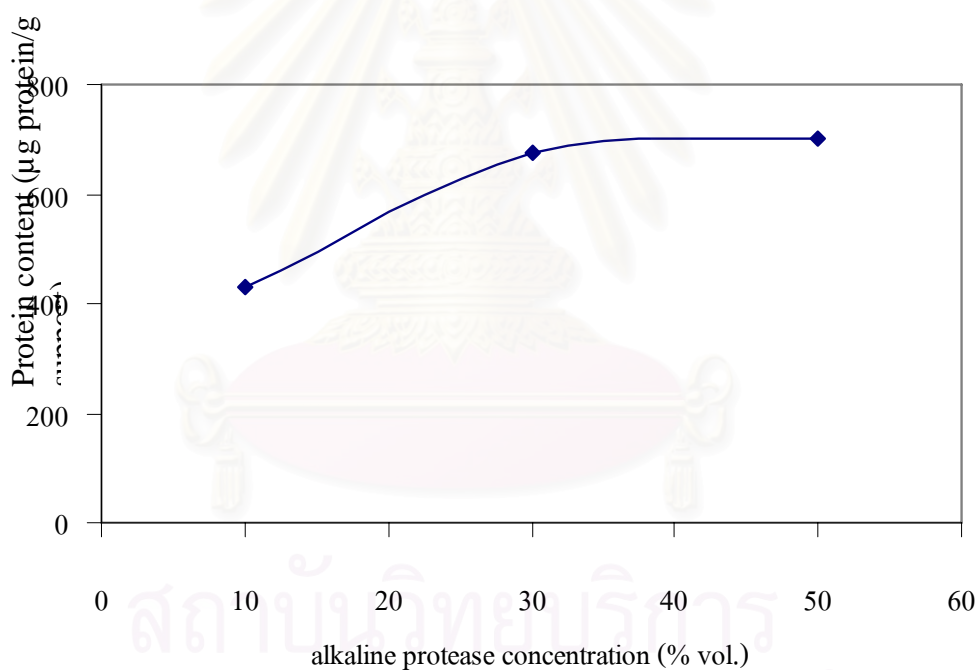


รูปที่ 5.7 แสดงผลของวิธีการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส อีสระ และเอนไซม์ไลเปสอีสระ

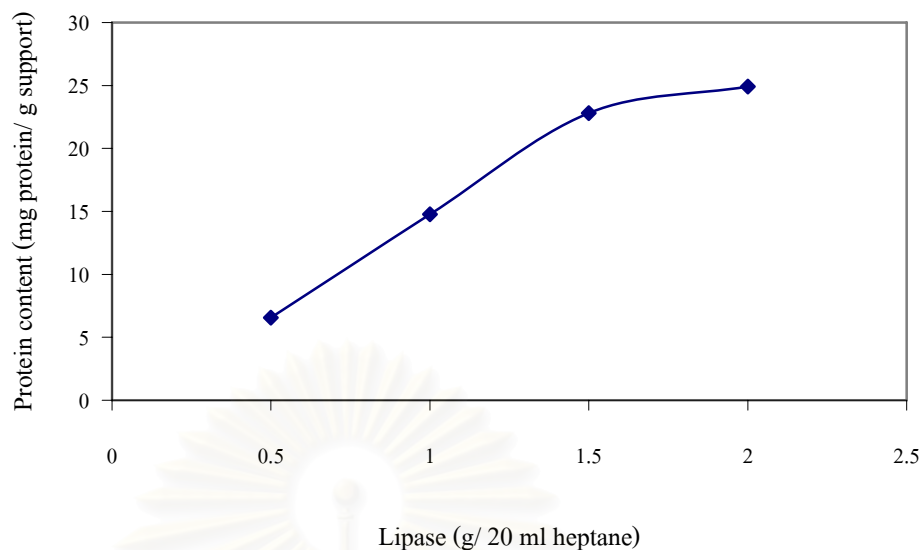
จากรูป 5.7 จะเห็นได้ว่าวิธีการตรึงที่ทำการตรึงเอนไซม์นั้นส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไม่มากนัก โดยเอนไซม์ไลเปสมีการสูญเสียกิจกรรมมากกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสเล็กน้อย ภายหลังจากทดสอบ 10 ชั่วโมง

### 5.2.1.2 ผลการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์ของอาร์เอฟคาร์บอนเจด

จากผลการตรึงเอนไซม์ในหัวข้อ 5.2.1.1 จึงสนใจเลือกเฉพาะการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอนมาทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์ โดยทำการทดสอบการตรึงที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ผลการทดสอบ แสดงดังรูปที่ 5.8 และ 5.9



รูปที่ 5.8 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon 2 กรัม ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสค่าต่างๆ



รูปที่ 5.9 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่ถูกตรึงบน RF-NS carbon 2 กรัม ที่ปริมาณเอนไซม์ ไลเปส ค่าต่างๆ

จากรูปที่ 5.8 และ 5.9 จะเห็นว่า RF-NS คาร์บอน สามารถตรึงเอนไซม์ ได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นหรือปริมาณของเอนไซม์สูงขึ้นจนกระทั่งถึงค่าที่เป็นขีดจำกัดความจุของ RF-NS คาร์บอน โดย RF-NS คาร์บอนสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 50% ของความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้น และมีปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ 702.90  $\mu\text{g protein/ g support}$  และสามารถตรึงเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดที่ 2 กรัมไลเปส โดยมีปริมาณโปรตีน ที่ตรึงได้ 24.91 mg protein/ g support

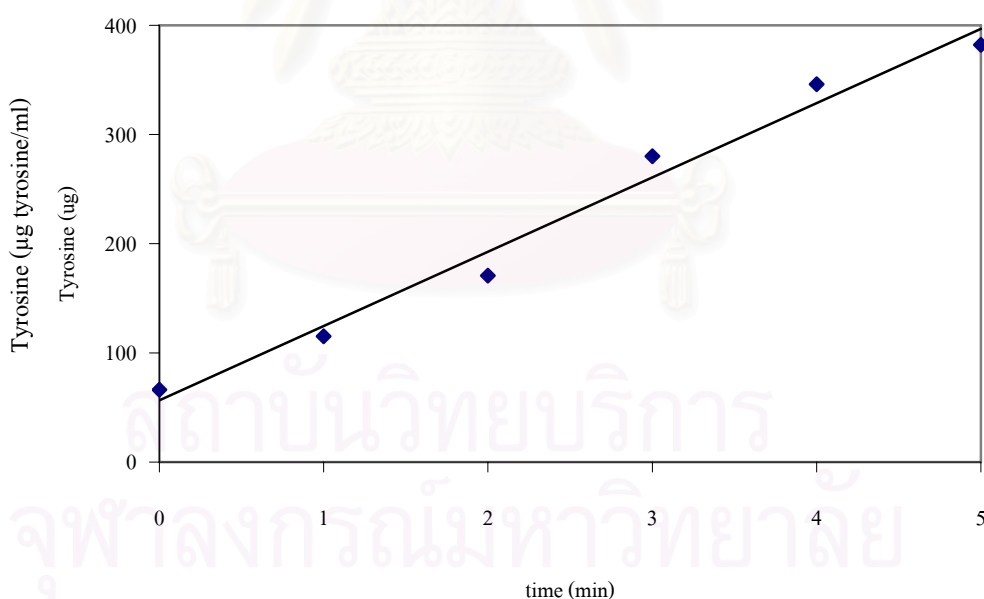
### 5.2.1.3 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น

การทดสอบความสามารถของเอนไซม์ตรึงรูปประการแรก คือการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงรูป เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ โดยการทดสอบในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส สามารถทดสอบจากปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของสารละลายเคซีน โดยใช้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ หรือเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะการเร่งปฏิกิริยา คือ อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที และทำการเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแพร่ของโมเลกุลของสับสเตรตไปยังเอนไซม์ โดยเฉพาะในกรณีของเอนไซม์ตรึงรูป ปริมาณผลิตภัณฑ์คือไทโรซีนสามารถวิเคราะห์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 280 nm เปรียบเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนดังแสดงในภาคผนวก ก

การทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส เป็นการเร่งปฏิกิริยาในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ จะแตกต่างจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ทำปฏิกิริยาในสถานะที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ถ้าเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี นั้นหมายถึงความเป็นไปได้ในการนำอาร์เอฟคาร์บอน ไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะสามารถประยุกต์ใช้อาร์เอฟคาร์บอนในขอบเขตที่กว้างขึ้นได้

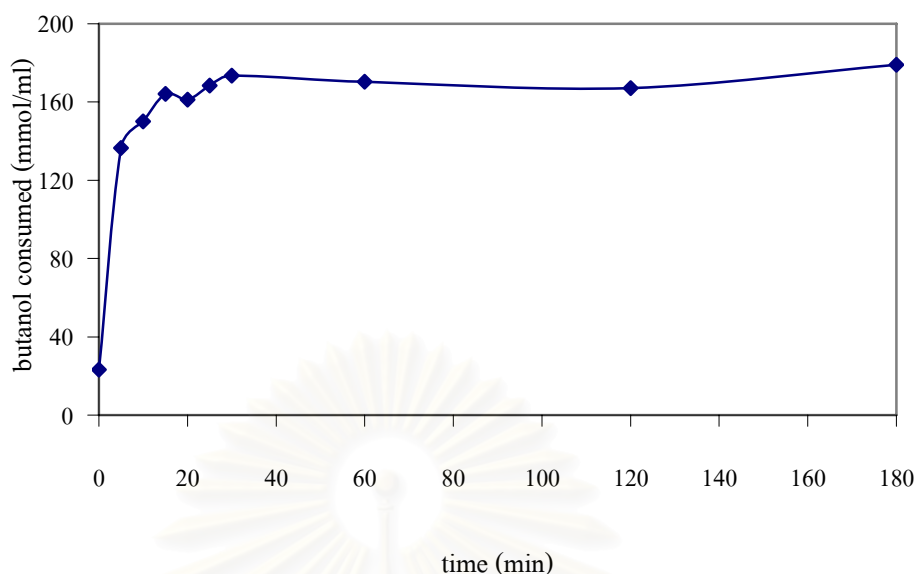
ในงานวิจัยนี้ทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันระหว่างบิวทานอล และกรดบิวทริก โดยมีเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีเฮปแทนเป็นตัวทำละลาย ภายใต้สภาวะการทำปฏิกิริยาคือเขย่าในแนวระดับด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิวทานอลที่คงเหลืออยู่ในระบบโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี และใช้เฮกซะนอลเป็นสารมาตรฐานกราฟมาตรฐานของ บิวทานอลแสดงในภาคผนวก ข

จากการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสอิสระ แสดงดังรูปที่ 5.13 และ 5.14 จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาทั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเคซีน และปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน ดำเนินปฏิกิริยาได้เร็วมากในช่วงต้นของปฏิกิริยา คือช่วง 0 ถึง 20 นาที



รูปที่ 5.10 แสดงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระที่ 45°C, 5 นาที และ 150 รอบต่อนาที





รูปที่ 5.11 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปในช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นจากการเร่งปฏิกิริยา เอสเทอร์ริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสอิสระ ที่ 37°C, 180 นาที และ 150 รอบต่อนาที

สำหรับเอนไซม์ที่ตรึงรูป สามารถทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยวิธีเช่นเดียวกับ เอนไซม์อิสระ กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ในช่วงอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น นี้ แสดงดังตารางที่ 5.4 โดยนิยามของยูนิตแอกทิวิตี้ (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอสคือ ปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ในหน่วยไมโครกรัมในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมีค่าพีเอชเป็น 10.5 ส่วนนิยามของยูนิตแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสคือปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปในหน่วยมิลลิโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Condition	Specific activity of alkaline protease (units/ml-mg protein)	Specific activity of Lipase (units/ml-mg protein)
Natural enzyme	50.58	9.69
Adsorbed on RF-CS carbon	103.80	13.04
Adsorbed on RF-NS carbon	8.08	12.81

ตารางที่ 5.4 แสดงกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์ไลเปส

จากผลการทดสอบพบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้สูงกว่าทั้งเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน หรือแม้กระทั่งเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการยึดตัวระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์

แอลคาไลน์โปรติเอสกับพื้นผิว RF-CS คาร์บอน ทำให้โครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอสมีความเหมาะสมกับโมเลกุลของเคซีนมากขึ้น อีกทั้งจากข้อสันนิษฐานเบื้องต้นที่ว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสน่าจะถูกต้องไว้เฉพาะที่พื้นผิวด้านนอกของ RF-CS คาร์บอน แทนที่จะเข้าไปในรูพรุน จึงสามารถตัดประเด็นข้อจำกัดในการแพร่ของโมเลกุลของสับสเตรตเข้าไปยังโมเลกุลของเอนไซม์ออกไปได้

สำหรับกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนนั้น มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นน้อยกว่าทั้งสองกรณี อาจเป็นสาเหตุมาจากเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนนี้ ส่วนใหญ่จะถูกตรึงอยู่ในรูพรุนของคาร์บอน ซึ่งอาจทำให้เกิดการเบียดบังกันเองของโมเลกุลเอนไซม์ ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงมีไม่เต็มที่

จากตารางที่ 5.4 พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน มีกิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสอิสระที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยในสเปคแทนนั้น มีการกระจายตัวที่ไม่ดี ซึ่งต่างจากเอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ จึงน้อยกว่าเอนไซม์ตรึงรูปในทุกกรณี

#### 5.2.1.4 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา

คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์ตรึงรูปประการหนึ่ง คือความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ให้คงไว้ได้มากที่สุด เพื่อความสามารถในการนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับไปใช้เร่งปฏิกิริยากับสับสเตรตใหม่ได้ การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป จะมีวิธีการที่แตกต่างกันบ้างในแง่ของการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาซ้ำกับสับสเตรตใหม่ โดยในส่วนของเอนไซม์ตรึงรูปนั้น เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาในแต่ละรอบเสร็จสิ้น จะทำการแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสารผสม จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่หลุดออกภายหลังการทำปฏิกิริยา แล้วจึงนำเอนไซม์ตรึงรูปไปเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรตใหม่ แต่ในกรณีของเอนไซม์อิสระนั้น การแยกเอนไซม์ออกจากสารผสมเป็นไปได้ยาก ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีการเดิมสับสเตรตเข้มข้นเพิ่มเข้าไปแทนสับสเตรตที่ถูกใช้ในการดำเนินปฏิกิริยา ภายใต้สมมติฐานที่ว่าสับสเตรตถูกใช้หมดไปภายหลังจากการเร่งปฏิกิริยาเป็นระยะเวลายาวนานในแต่ละรอบปฏิกิริยา สาเหตุที่ต้องใช้สับสเตรตเข้มข้นนั้นก็เพื่อควบคุมปริมาตรของระบบให้คงที่มากที่สุด ซึ่งจะไม่ส่งผล หรือส่งผลน้อยต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ สำหรับรอบการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสนี้คือ 6 ชั่วโมงต่อหนึ่งรอบ

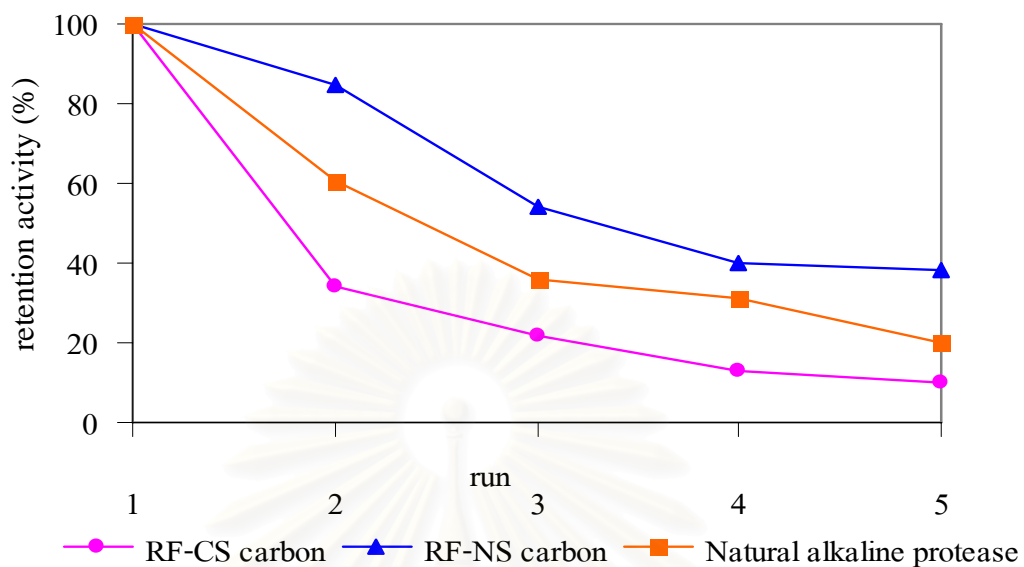
สำหรับการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ สามารถทำได้

ง่ายกว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ทั้งนี้เพราะเอนไซม์มีลักษณะเป็นสารแขวนลอย ไม่ละลายในตัวทำละลาย จึงสามารถกรองแยกออกมาได้ง่าย และนำไปใช้เร่งปฏิกิริยาใหม่ได้ ทำให้สามารถควบคุมปัจจัยในการเร่งปฏิกิริยาแต่ละครั้งได้เหมือนกัน โดยการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสนี้จะใช้รอบการเร่งปฏิกิริยาคือ 24 ชั่วโมงต่อ 1 รอบ แต่ช่วงเวลาที่สนใจคือช่วงเวลา 0-20 นาทีซึ่งเป็นช่วงการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น

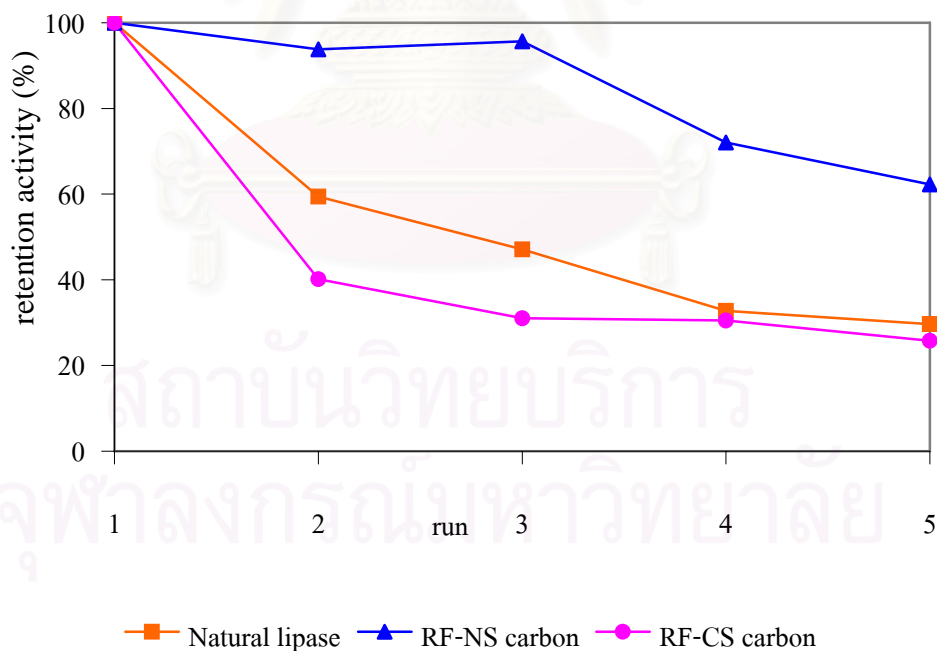
ผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ แอลคาไลน์โปรติเอสตรังรูป เอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรังรูป แสดงอยู่ในภาคผนวกที่ จ.5 ถึง จ.7 และ ฉ.5 ถึง ฉ.7 ตามลำดับ โดยในช่วงเวลาการดำเนินปฏิกิริยา 0 ถึง 5 นาที ปฏิกิริยาจะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยารอบแรก

การเปรียบเทียบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา ของเอนไซม์อิสระกับเอนไซม์ตรังรูปสามารถทำได้โดยการนำค่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ในแต่ละรอบการเร่งปฏิกิริยาของแต่ละเอนไซม์มาเปรียบเทียบในแง่ของกิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) โดยให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของรอบแรกของการเร่งปฏิกิริยาเป็น 100% ดังนั้นกิจกรรมสัมพัทธ์ในรอบถัดๆมาจะมีค่าลดลง ในส่วนของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ผลของกิจกรรมสัมพัทธ์แสดงดังรูปที่ 5.12 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรังบน RF-NS คาร์บอนจะมีการลดลงของ กิจกรรมสัมพัทธ์น้อยกว่าในกรณีอื่นๆ โดยเมื่อเร่งปฏิกิริยาไป 5 รอบปฏิกิริยาพบว่ายังคงกิจกรรมไว้ได้ 38.20% ของกิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ เหลือกิจกรรมเพียง 19.99% ของกิจกรรมเริ่มต้น ผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรังบน RF-NS คาร์บอน เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเอนไซม์ไลเปสที่ตรังบน RF-NS คาร์บอนสามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ดีที่สุดเมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาซ้ำหลายรอบปฏิกิริยา โดยเมื่อผ่านไป 5 รอบปฏิกิริยาเอนไซม์ตรังรูปนี้ยังมีกิจกรรมเป็น 62.23% ของกิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ไลเปสที่ตรังบน RF-CS คาร์บอนมีกิจกรรมเพียง 29.69% และ 25.76% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ ผลกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสแสดงดังรูปที่ 5.13

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ตรังรูปที่มี RF-NS คาร์บอนเป็นตัวรองรับ มีความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยามากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะกับเอนไซม์อิสระ อาจเป็นเพราะเอนไซม์เข้าไปยึดติดในรูพรุนของ RF-NS คาร์บอนซึ่งจะช่วยป้องกันเอนไซม์จากสิ่งแวดล้อม ภายนอกซึ่งอาจก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ได้ โดยเฉพาะกับการบ่มเอนไซม์ไว้เป็นระยะเวลาานาน



รูปที่ 5.12 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ



รูปที่ 5.13 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์ไลเปสอิสระ

เมื่อพิจารณาถึงผลการตรวจสอบการหลุดของเอนไซม์จากตัวรองรับ ดังแสดงในตารางที่ 5.5 และ 5.6 จะเห็นว่า ปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบได้ในน้ำล้าง หลังการเร่งปฏิกิริยาในรอบแรก ของเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน การหลุดของ เอนไซม์นี้อาจเป็นสาเหตุสำคัญของการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปนี้ สำหรับสาเหตุ อื่นๆอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์จากสภาวะการเร่งปฏิกิริยาซ้ำ อัน เนื่องมาจากการยึดเกาะของเอนไซม์ที่อยู่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของ RF-CS คาร์บอน

Enzyme	Protein content in washed buffer solution ( $\mu\text{g}$ protein)					
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5	Total
Adsorbed on RF-CS carbon	72.51	37.41	29.62	19.34	3.44	162.31
Adsorbed on RF-NS carbon	37.41	52.33	37.10	15.46	9.28	151.59

ตารางที่ 5.5 แสดงปริมาณโปรตีน(เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส)ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอน ในน้ำล้างภายหลัง การเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

Enzyme	Protein content in washed hepta( $\text{mg}$ protein)					
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5	Total
Adsorbed on RFCS carbon	1.23	0.75	0.23	0.31	0.11	2.63
Adsorbed on RFNS carbon	0.77	0.52	0.11	0.17	0.15	1.72

ตารางที่ 5.6 แสดงปริมาณโปรตีน(เอนไซม์ไลเปส)ที่หลุดจากอาร์เอฟคาร์บอน ที่มากับน้ำล้างภายหลังการเร่ง ปฏิกิริยาแต่ละรอบ

### 5.2.1.5 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา

เสถียรภาพของเอนไซม์อีกประเภทหนึ่ง คือเสถียรภาพในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่ อุณหภูมิต่างๆ โดยเสถียรภาพประเภทนี้มีความสำคัญมากสำหรับเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ใช้เร่งปฏิกิริยา ในทันทีหลังการเตรียมเอนไซม์ โดยทั่วไปเอนไซม์จะสามารถรักษาเสถียรภาพไว้ได้เมื่อเก็บรักษา ที่อุณหภูมิต่ำ หากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อิสระจะมีค่าลดลงตามเวลาการเก็บรักษา ดังนั้นการใช้เอนไซม์ตรึงรูปเข้ามาช่วยจะสามารถลดปัญหาดังกล่าวลงได้

การทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษาเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ ทำการทดสอบโดยการเก็บ เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงรูปไว้ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C สำหรับการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  °C) ถึงแม้ในการใช้งานจริงไม่นิยมเก็บรักษาที่อุณหภูมินี้ แต่ในงานวิจัยนี้

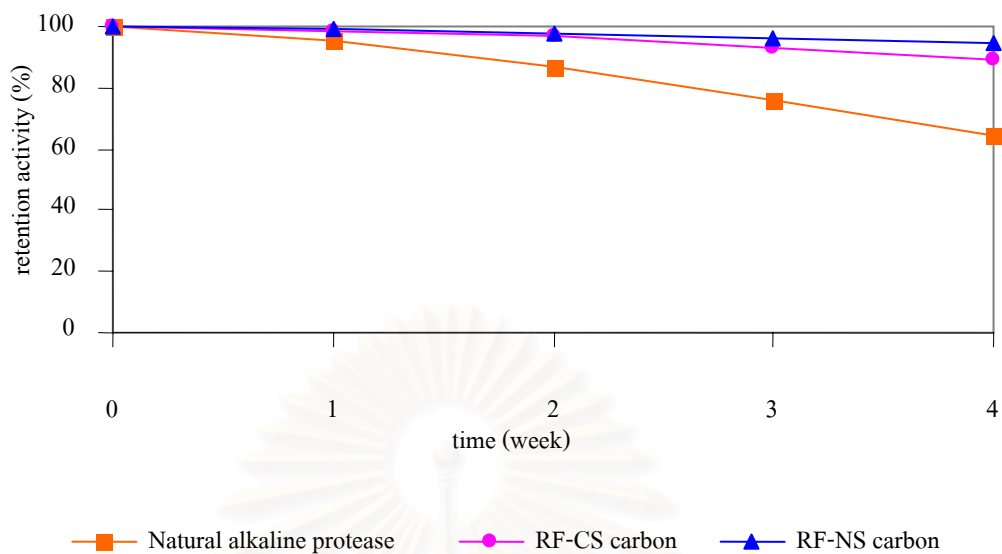


ต้องการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรีงรูป กับ เอนไซม์อิสระให้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยผลการทดสอบเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส และเอนไซม์ไลเปสแสดงดังรูปที่ 5.14, 5.15, 5.16 และ 5.17

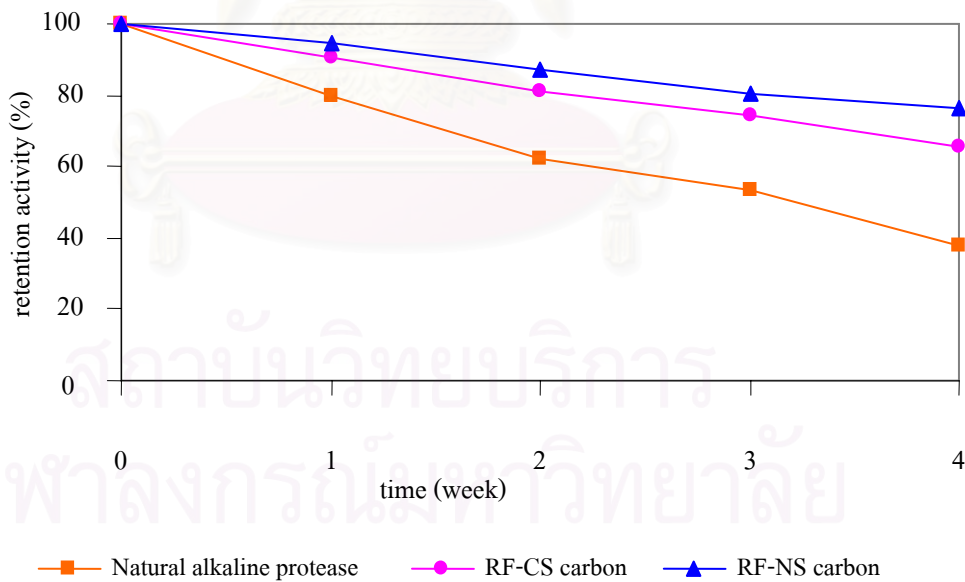
จากรูปพบว่าเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องนาน 4 สัปดาห์ ทั้ง เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสอิสระและเอนไซม์ไลเปสอิสระ จะมีกิจกรรมลดลงมากกว่าเอนไซม์ตรีงรูป โดยในส่วนของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสอิสระจะมี กิจกรรมลดลงเหลือ 64.08% และ 38.05% ของกิจกรรมเริ่มต้น เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรีงบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ยังคงกิจกรรมไว้ได้ 89.27% และ 94.32% ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับที่ อุณหภูมิ 4 °C และ 65.24% และ 76.56% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปสอิสระจะมีกิจกรรมลดลงเหลือ 70.67% และ 33.01% ของกิจกรรม เริ่มต้น เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ ไลเปสที่ตรีงบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ยังคงกิจกรรมไว้ได้ 85.42% และ 93.02% ตามลำดับที่อุณหภูมิ 4 °C และ 67.74% และ 86.54% ที่อุณหภูมิห้อง

การที่เอนไซม์ตรีงรูปสามารถรักษาเสถียรภาพได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระนี้ อาจเป็นผลมาจาก ความสามารถของอาร์เอฟคาร์บอน ในการเป็นเกราะป้องกันการสูญเสียสภาพของเอนไซม์เนื่องจาก การย่อยตัวเอง (autodigestion) ปกป้องเอนไซม์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อเอนไซม์ได้ อีกทั้งด้วยคุณสมบัติของตัวคาร์บอนที่ทนต่อการนำความร้อน จึงช่วยป้องกันเอนไซม์จากอุณหภูมิ สูงได้ดีอีกด้วย

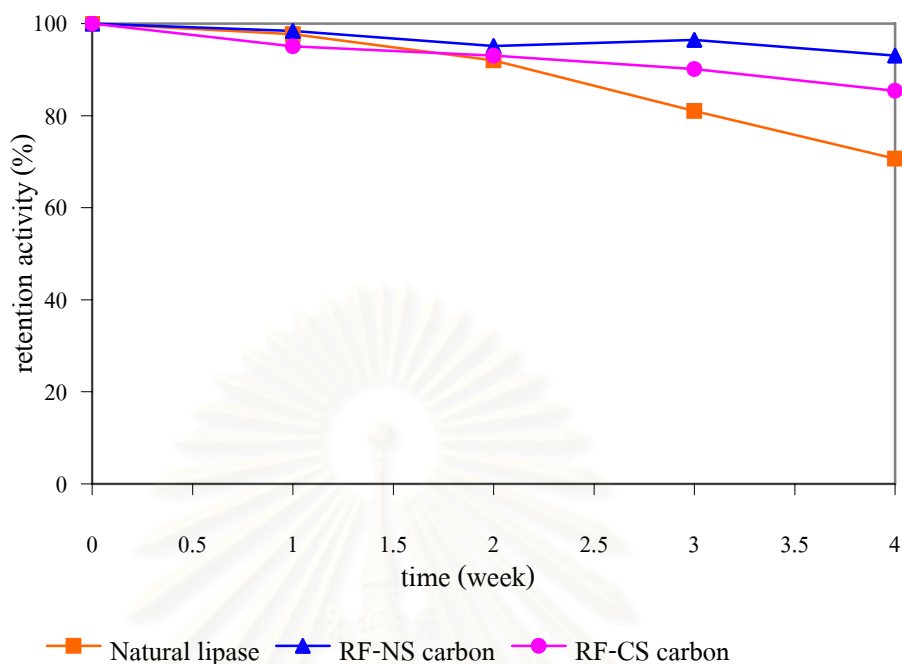
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



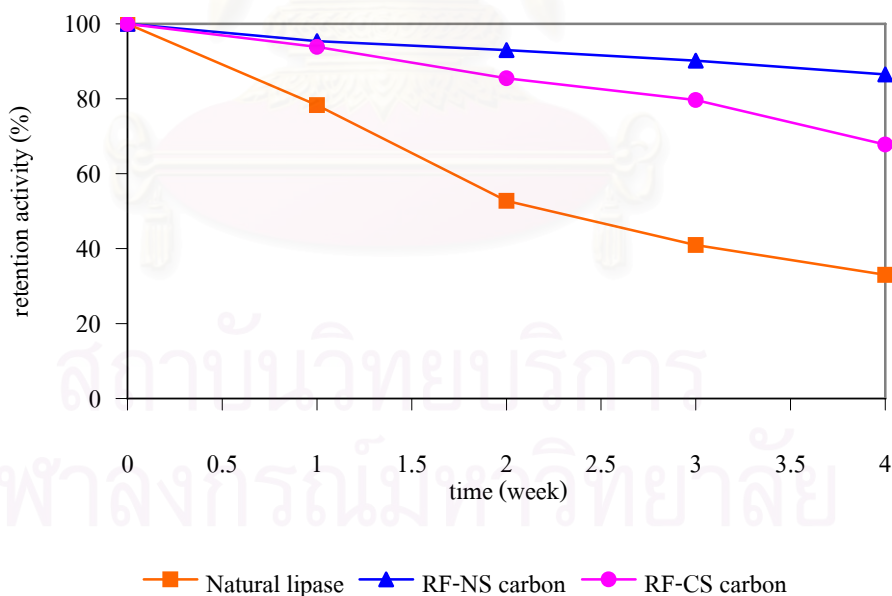
รูปที่ 5.14 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน



รูปที่ 5.15 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน



รูปที่ 5.16 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน



รูปที่ 5.17 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน

จากงานวิจัยของ Wu และ Chiou [50] ที่ทำการศึกษาเสถียรภาพในการเก็บรักษาของเอนไซม์ไลเปส *Candida rugosa* ที่ตรึงบนไคโตซานที่ถูกกระตุ้นด้วยหมู่ไฮดรอกซิล พบว่าเมื่อเก็บ

รักษาแบบแห้งที่อุณหภูมิไว้เป็นระยะเวลา 30 วัน เอนไซม์ตรึงจะยังคงรักษากิจกรรมไว้ได้ประมาณ 50% ของกิจกรรมเริ่มต้น

## 5.2.2 ผลการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล

### 5.2.2.1 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีนที่ตรึงในอาร์เอฟเจล

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มไว้ในโพรงพอลิเมอร์ของอาร์เอฟเจลนั้น เป็นงานที่ศึกษาต่อ เนื่องมาจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพดังรายงานผลไว้ในหัวข้อ 5.2.1 ซึ่งจากผลการตรึงเอนไซม์โดยใช้ RF-CS คาร์บอนนั้นไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งในแง่ของความสามารถในการตรึงเอนไซม์ ความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยา ประกอบการเตรียม RF-CS เจลนี้ จะมีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวชนิดแคตไอออนิก ซึ่งอาจมีผลในการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ รวมไปถึงการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายปริมาณมากในขั้นของการกระจายตัว จะทำให้สารละลายเอนไซม์ที่เติมลงไปในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสมีความเจือจางเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะเลือกใช้ในการทดลองการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้ม การทดลองในส่วนนี้จึงทดสอบเฉพาะกับ RF-NS เจลเท่านั้น

ในการทดลองนี้ยังมีหลายปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง อันได้แก่ปริมาณน้ำโดยรวมของสารละลายอาร์เอฟ ก่อนและหลังการเติมสารละลายเอนไซม์ที่ต้องควบคุมเพื่อให้ได้อัตราส่วนของตัวเร่งปฏิกิริยาต่อหน้า (C/W) คงที่เท่ากับ 5.67 เช่นเดียวกับกรณีการเตรียม RF-NS คาร์บอนเพื่อความถูกต้องในการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงบน RF-NS คาร์บอน ในกรณีของเอนไซม์ไลเปสซึ่งอยู่ในรูปของแข็ง การเติมเอนไซม์ลงไปในสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น ไม่ส่งผลต่อปริมาณน้ำ ในขณะที่การเติมเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส ซึ่งอยู่ในรูปสารละลาย ต้องมีการควบคุมปริมาณน้ำของสารละลายอาร์เอฟกับสารละลายเอนไซม์ โดยการควบคุมปริมาณน้ำสามารถทำได้โดยการเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่มีความเข้มข้นสูงคือ 100% โดยปริมาตร เพื่อให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำน้อยที่สุด อีกทั้งยังลดปริมาณการเติมน้ำในขั้นตอนการเตรียมสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไป โดยสัดส่วนของปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่เติมลงไปในสารละลายอาร์เอฟต่อปริมาตรของระบบโดยรวมเป็น 1:20

เวลาในการเติมสารละลายเอนไซม์ลงไปในสารละลายอาร์เอฟเป็นสิ่งที่สำคัญ โดยเวลาที่น่าจะเหมาะสมที่สุดในการเติมสารละลายเอนไซม์ คือเวลาที่สารละลายอาร์เอฟใกล้สูญเสียวความเป็นของไหล ทั้งนี้เพื่อลดผลกระทบที่อาจเกิดจากสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น อาทิ ริโซซินอล และฟอร์มัลดีไฮด์ ที่จะมีต่อโครงสร้างของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส ในช่วงที่สารละลายอาร์เอฟใกล้สูญเสียวความเป็นของไหลนั้น ได้ผ่านช่วงของการทำปฏิกิริยาในการสร้างอนุภาคคอลลอยด์ไปแล้ว คงเหลือแต่เพียงช่วงการสร้างโครงสร้างโครงข่าย (network

forming) ซึ่งเหมาะแก่การเติมสารละลายเอนไซม์ลงไปเพื่อให้เข้าไปอยู่ในโครงสร้างโครงข่ายดังกล่าวก่อนที่โครงสร้างเจลจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากการทดลองวิธีการเรียงที่เหมาะสมพบว่า หลังจากนำสารละลายอาร์เอฟไปแช่ที่อ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 10 นาที ควรนำสารละลายอาร์เอฟมาแช่อ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิในทันที เมื่ออุณหภูมิของสารละลายอาร์เอฟมีค่าประมาณอุณหภูมิห้อง จึงทำการเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ลงไป จากนั้นกวนเบาๆจนเข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วปล่อยให้แห้งเป็นเจลที่อุณหภูมิห้อง โดยระยะเวลาของการเกิดเจลในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส จะเกิดเจลหลังจากตั้งทิ้งไว้อยู่ในช่วง 15-20 นาที ซึ่งจะสังเกตเห็นสีของเจลเปลี่ยนไปจากสีส้มกลายเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสีของสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส ในขณะที่กรณีของเอนไซม์ไลเปส ระยะเวลาการเกิดเจลเร็วกว่า โดยอยู่ในช่วง 3-5 นาที

ถึงแม้ค่าความเป็นกรดเบส จะเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่ง ที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ แต่การทดลองในงานวิจัยนี้จะไม่ทำการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้น ทั้งนี้จากการศึกษางานวิจัยของ Job และคณะ [6] ที่ศึกษาผลของความเป็นกรดเบสในสารละลายอาร์เอฟเริ่มต้นที่มีต่ออาร์เอฟเซโรเจลที่เตรียมได้ พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสมีค่าสูง จะทำให้เกิดการยุบตัวของโครงสร้างเจลภายหลังการทำให้แห้งมาก ซึ่งจะทำให้เจลมีพื้นที่ผิว และปริมาตรรูพรุนน้อยมาก จนอาจเป็นวัสดุที่ไม่มีรูพรุนได้ โดยในการทดลองนี้ได้มีการตรวจสอบค่าพีเอชของสารละลาย RF-NS ในช่วงก่อนเติมสารละลายเอนไซม์พบว่ามีความค่าประมาณ 6.50 และหลังเติมสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีค่าประมาณ 7.20

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ RF-NS เจลสามารถตรึงไว้ได้นั้น ทำได้โดยการล้าง RF-NS เจลที่มีเอนไซม์ตรึง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือเฮปแทน ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโครงข่ายจึงคำนวณได้จากการทำสมดุลมวลสารของโปรตีนที่เติมเข้าไปในตอนต้น กับโปรตีนที่หลุดออกมาจากน้ำล้าง จากการวิเคราะห์พบว่า RF-NS เจลสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสคิดเป็นปริมาณโปรตีนคือ 1770.09  $\mu\text{g protein / g support}$  หรือ 86.30% ของปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปตอนต้น และสามารถตรึงเอนไซม์ไลเปสคิดเป็นปริมาณโปรตีนคือ 19.69 mg protein หรือ 84.36% ของปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปตอนต้น เมื่อเปรียบเทียบผลปริมาณเอนไซม์ที่ตรึงได้ด้วยวิธีนี้กับที่ตรึงโดยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงโดยวิธีห่อหุ้มนี้มีความสามารถในการตรึงเอนไซม์สูงกว่าทั้งสองกรณี ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่เติมสารละลายเอนไซม์ไปโดยตรงในระหว่างการฟอรั่มตัวของเจลนั้น จะช่วยให้การแพร่และการกระจายตัวของสารละลายเอนไซม์เข้าไปในเนื้อของตัวรองรับเป็นไปได้สูง และเมื่ออนุภาคของอาร์เอฟจัดเรียงตัวกันจนเกิดเป็นโครงข่ายนั้น จะโอบเอาโมเลกุลของเอนไซม์เข้าไปในโครงข่ายอนุภาค จึงส่งผลให้เอนไซม์หลุดออกมาจากโครงสร้างเจลได้ยาก และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสของ RF-NS เจลนี้กับการตรึงใน 5% (w/v)



acrylamide ที่เติม crosslinker 2% ที่ศึกษาโดย Abdel-Naby และคณะ [33] พบว่าสามารถตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอสได้มากกว่าเล็กน้อย โดย acrylamide สามารถตรึงเอนไซม์ไว้ได้ 76% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

จากผลการทดลอง เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Neau และ Betigeri [51] ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ด้วย Alginate gel beads และ Chitosan gel beads ด้วยวิธีห่อหุ้ม และทำให้แห้งด้วยกระบวนการ Freeze dried พบว่าสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 44-50% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น ขณะที่ Bryjak และคณะ [52] ทำการตรึงเอนไซม์ชนิดเดียวกันใน acrylic copolymers ตรึงเอนไซม์ได้สูงสุด 78.1% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

สำหรับการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสในส่วนของ RF-NS เจลนั้น เนื่องจากการตรึงได้ทดสอบที่ 100% สารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสแล้ว ดังนั้นจึงไม่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสารละลายเอนไซม์ที่ต่ำกว่าค่านี้ อีก ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาในเรื่องของปริมาณน้ำที่มีต่อโครงสร้างของ RF-NS เจลที่เตรียมได้ ในส่วนของเอนไซม์ไลเปส ทำการทดสอบที่อัตราส่วนของปริมาณเอนไซม์ไลเปสต่อสารละลายอาร์เอฟแตกต่างกันคือ 0.5, 1, 1.5 และ 2 g ในสารละลาย อาร์เอฟ 20 ml พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่เติมลงไป ใน RF-NS เจลกับปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้แปรผันตามกัน แต่ในกรณีการเติมเอนไซม์ 1.5 g/ 20 ml และ 2 g/ 20ml การกระจายของเอนไซม์ไม่ดีพอ และ RF-NS เจลที่ได้จะจับตัวเป็นก้อนไม่เป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ ในการทดลองลำดับต่อไปจะเลือกใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ทำการตรึงที่อัตราส่วน 0.5 g/ 20 ml ตลอดการทดลอง

### 5.2.2.2 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น

การทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่ใน RF-NS เจลสามารถทดสอบโดยใช้กระบวนการเช่นเดียวกันกับการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ที่ตรึงอยู่ใน RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน โดย RF-NS เจลที่ตรึงเอนไซม์แล้วนั้น จะต้องแห้งเป็นชิ้นเล็กๆ ในที่นี้คือเป็นรูปทรงลูกบาศก์ขนาด 2x2x2 มิลลิเมตร เพื่อลดข้อจำกัดในการแพร่ของซับสเตรตไปสู่เอนไซม์ให้น้อยที่สุด

จากการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะ (specific rate) ในช่วง 5 นาทีแรกพบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงใน RF-NS เจลมีค่ากิจกรรมจำเพาะเป็น 2.82 units/ml-mg protein ซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ และการตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-CS คาร์บอน และ RF-NS คาร์บอน ซึ่งมีค่าเป็น 50.58, 103.80 และ 8.08 units/ml-mg protein ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ กล่าวคือถ้าพิจารณาในแง่ของการข้อจำกัดในการแพร่ของโมเลกุลของซับสเตรตเข้าไปภายในเจล รวมไปถึงขนาดของเจลที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆเมื่อ

เปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคคาร์บอนแล้วยังมีขนาดใหญ่กว่ามาก นอกเหนือจากข้อจำกัดในการแพร่แล้วสาเหตุที่น้ำจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อาจเป็นเพราะเอนไซม์อยู่ในสถานะที่มีค่าความเป็นกรดเบสไม่เหมาะสม โดยค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสจะอยู่ที่พีเอช 10.5 ดังนั้นการที่เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสถูกเติมลงไปในการละลายอาร์เอฟที่มีค่าพีเอชประมาณ 6.5 ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมต่อเอนไซม์ อาจส่งผลต่อค่าประจุที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไม่เหมาะสม อาจทำให้การเร่งปฏิกิริยาลดลง นอกจากสองปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้วนั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากการทำลายโครงสร้างของเอนไซม์โดยสารเคมีที่เป็นสารตั้งต้นของสารละลายอาร์เอฟ ที่อาจเหลืออยู่หลังการเกิดปฏิกิริยา จึงส่งผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่อยู่ภายในเจล

การทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ของเอนไซม์ไลเปส ที่ตรึงอยู่ใน RF-NS เจล สามารถทดสอบได้โดยใช้กระบวนการเดียวกันกับการทดสอบของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน จากการคำนวณหากิจกรรมจำเพาะ (specific rate) ในช่วง 5 นาทีแรก พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจลมีค่ากิจกรรมจำเพาะเป็น 23.352 unit/ml สูงกว่าค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ ผลการทดลองนี้มีทิศทางที่ตรงข้ามกับในกรณีของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ที่ต่างกัน และชนิดของเอนไซม์ต่างชนิดกัน อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการละลายที่มีต่อความสามารถของเอนไซม์จึงมีความแตกต่างกัน และการที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีนี้มี กิจกรรมจำเพาะสูงกว่าในกรณีอื่นๆ อาจเป็นเพราะการวางตัวของเอนไซม์ที่อยู่ในคอนฟอร์เมชันที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของสับสเตรท จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงกว่าในกรณีอื่นๆ

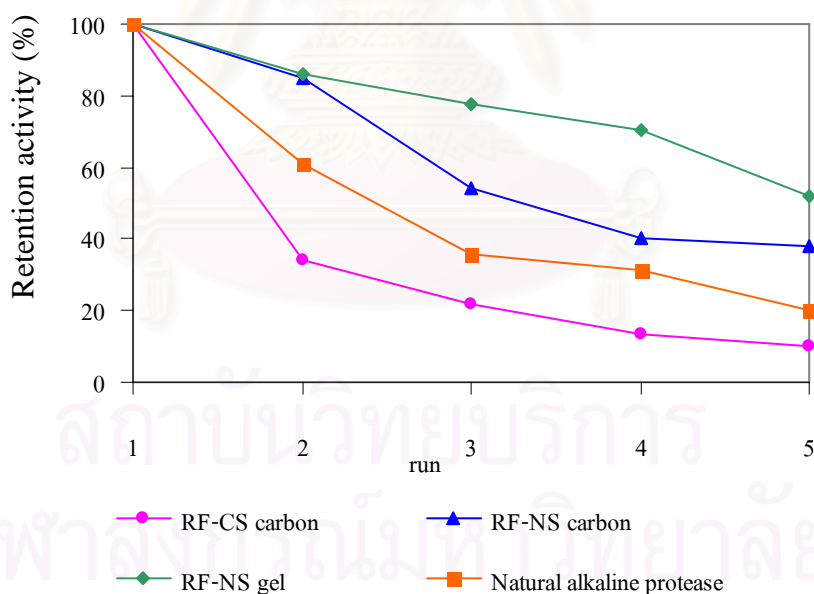
### 5.2.2.3 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา

การทดสอบเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจล สามารถทำได้เช่นเดียวกันกับการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ โดยผลการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสตรึงรูป และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ที่เวลาและรอบการดำเนินปฏิกิริยาต่างๆแสดงในภาคผนวกที่ จ.8 และ ฉ.8

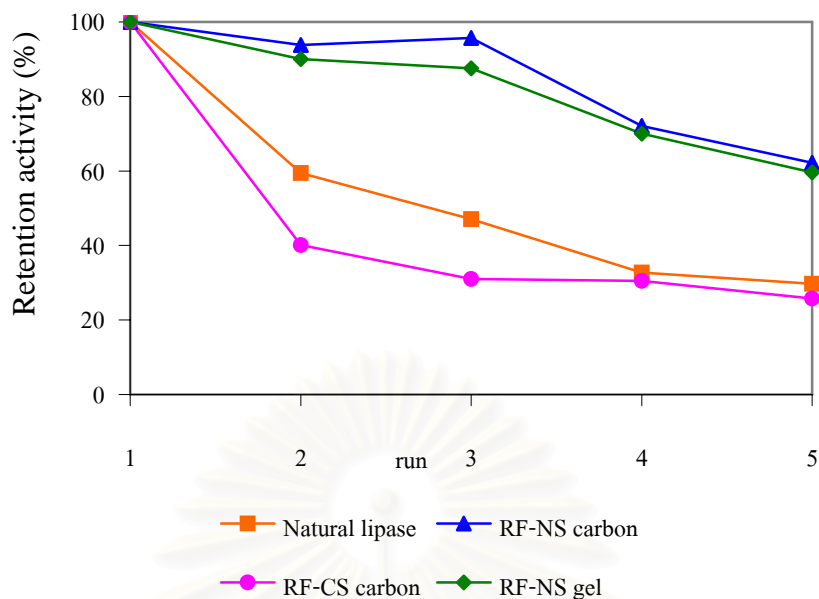
เมื่อนำค่าอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้น ในแต่ละรอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity) แสดงดังรูปที่ 5.18 และ 5.19 เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่คงเหลือในแต่ละรอบ เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-CS และ RF-NS คาร์บอน จะพบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้ม จะสามารถคงกิจกรรมไว้

ได้สูงกว่ากรณีอื่นๆ เมื่อทำการเร่งปฏิกิริยาซ้ำในแต่ละรอบ โดยพบว่าที่รอบการเร่งปฏิกิริยารอบที่ 5 เอนไซม์ยังคงกิจกรรมไว้ได้ถึง 64.89% ซึ่งมากกว่าเอนไซม์อิสระถึง 3 เท่า และเมื่อพิจารณาการหลุดของเอนไซม์ออกจากเมทริกซ์ของเจลโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ดังแสดงในตารางที่ 5.7 จะมีการหลุดของเอนไซม์น้อยกว่ากรณีอื่นๆ การที่เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มนี้มีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ เป็นเพราะเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสจะได้รับการป้องกันอยู่ภายในช่องค้ำยพอลิเมอร์ การหลุดของเอนไซม์ออกมาภายนอกตัวรองรับจึงเป็นไปได้ยาก อีกทั้งเอนไซม์จะไม่มีจับยึด หรือเกิดพันธะใดๆกับพอลิเมอร์ จึงทำให้โอกาสการเสื่อมสภาพของเอนไซม์มีน้อย

จากรูปที่ 5.19 พบว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพบน RF-NS คาร์บอนและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจล มีการลดลงของกิจกรรมสัมพัทธ์น้อยกว่าในกรณีอื่นๆ โดยที่การเร่งปฏิกิริยาผ่านไป 5 รอบ เอนไซม์ตรึงทั้งสองนี้ยังคงแสดงกิจกรรมไว้ได้ 62.23% และ 59.64% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 29.69% และ 25.76% ตามลำดับ



รูปที่ 5.18 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบนอาร์เอฟคาร์บอน และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ



รูปที่ 5.19 แสดง Retention activity ที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงในอาร์เอฟเจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงใน RF-NS เจลที่รอบการทำปฏิกิริยาต่างๆ

ผลการทดสอบการหลุดของเอนไซม์จาก RF-NS เจล แสดงดังตารางที่ 5.7 และ 5.8 ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์หลุดออกมาจาก RF-NS เจลบ้างในแต่ละรอบปฏิกิริยา

Enzyme	Protein content in washed buffer solution ( $\mu\text{g}$ protein)				
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5
RF-NS gel	38.407	34.232	14.962	13.927	17.066

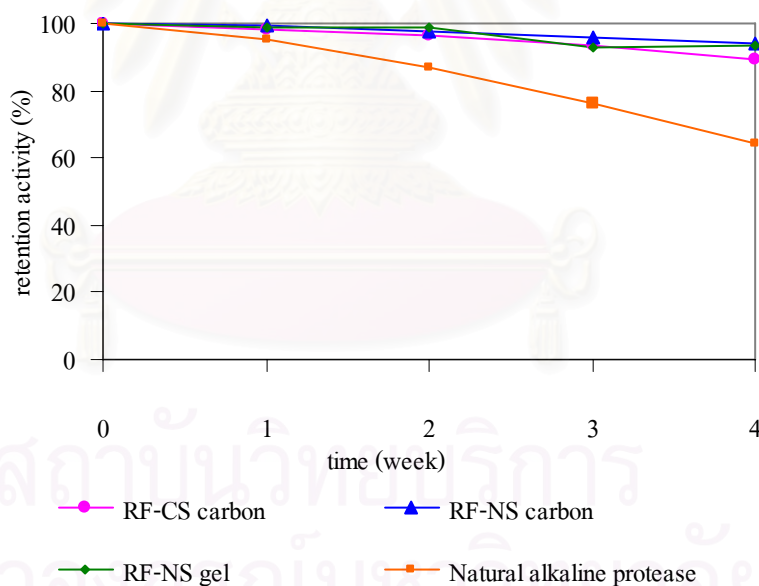
ตารางที่ 5.7 แสดงปริมาณโปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

Enzyme	Protein content in washed heptane (mg protein)				
	after run1	after run2	after run3	after run4	after run5
RF-NS gel	0.421	0.211	0.278	0.345	0.292

ตารางที่ 5.8 แสดงปริมาณโปรตีน(ไลเปส) ที่หลุดมาจาก RF-NS gel มากับน้ำล้างภายหลังการเร่งปฏิกิริยาแต่ละรอบ

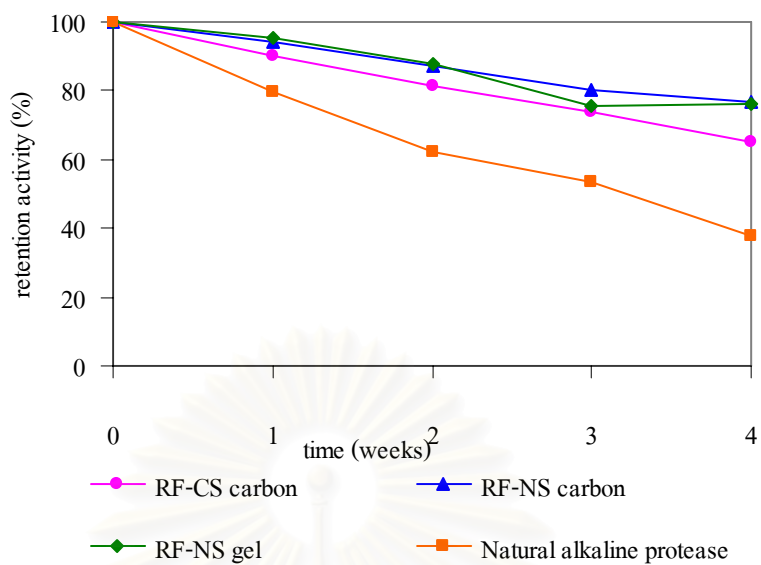
#### 5.2.2.4 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษา

ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษาเอนไซม์ตรึงรูป ที่ตรึงในพอลิเมอร์ของ RF-NS เจล เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพ แสดงดังรูปที่ 5.20, 5.21, 5.22 และ 5.23 จากรูปจะเห็นได้ว่า เอนไซม์ที่ตรึงอยู่ใน RF-NS เจล มีเสถียรภาพในการเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิ 4 °C และอุณหภูมิห้องใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน และสูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยภายหลังการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 93.24% และ 95.04% ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป มีกิจกรรมสัมพัทธ์เป็น 76.20% และ 78.01% ตามลำดับ การที่เอนไซม์มีความเสถียรในการเก็บรักษาเช่นนี้ สามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับกรณีที่เอนไซม์มีความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยาผลของความเสถียรในการเก็บรักษานี้มีลักษณะเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abdel-Naby และคณะ [33] ที่เอนไซม์ตรึงสามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ 87.9% เมื่อเก็บรักษาไว้นานถึง 5 เดือน

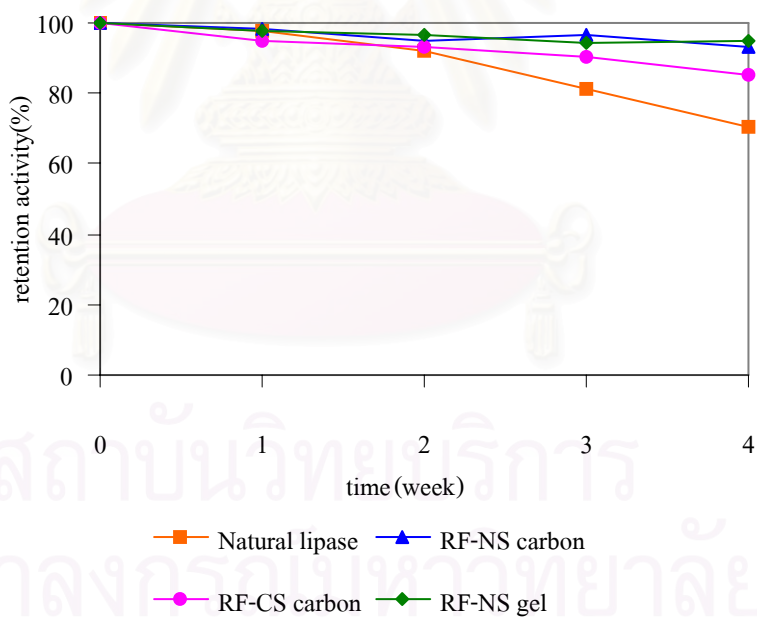


รูปที่ 5.20 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป

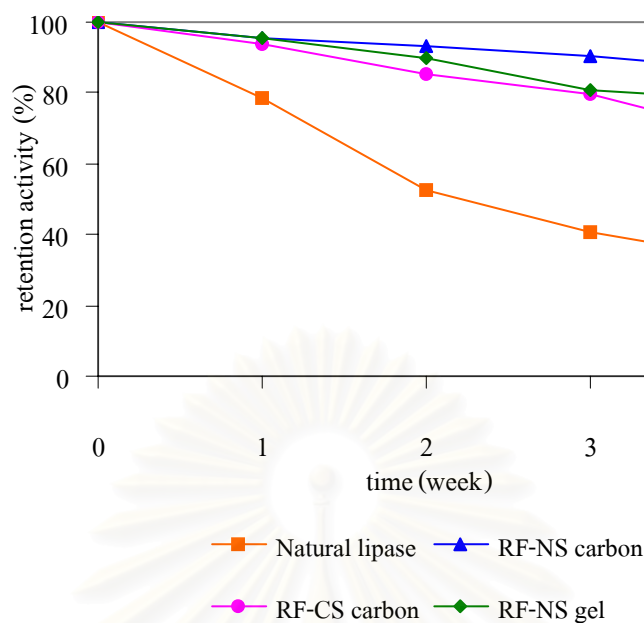




รูปที่ 5.21 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้องของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป



รูปที่ 5.22 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป



รูปที่ 5.23 แสดง Retention activity ในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

จากผลการทดลองการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปส สามารถสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ได้ดังตารางที่ 5.9 และ 5.10 ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบในแง่ของความสามารถในการตรึงเอนไซม์ จะพบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีห่อหุ้มนั้น สามารถตรึงเอนไซม์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าวิธีอื่นๆ ในขณะที่ถ้าพิจารณาอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นในรอบการใช้งานแรก ในส่วนของเอนไซม์ แอลคาไลน์โปรติเอส เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนสามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุด แต่สำหรับเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มจะมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดในขณะที่เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนและ RF-NS คาร์บอน มีกิจกรรมจำเพาะใกล้เคียงกัน และมากกว่าเอนไซม์ไลเปสอิสระ เมื่อพิจารณาถึงความเสถียรในการเร่งปฏิกิริยา และความเสถียรในการเก็บรักษา จะเห็นว่าเอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS ไม่ว่าจะด้วยวิธีดูดซับทางกายภาพหรือวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล จะมีเสถียรภาพสูงกว่าในกรณีอื่นๆอย่างเห็นได้ชัด

Enzyme Alkaline Protease	Enzyme Loading (% of initial enzyme)	Specific rate (unit/ml-mg protein)	Retention activity after 5 cycles (% of initial activity)	Retention activity after 4 weeks	
				41C (% of initial activity)	Troom (% of initial activity)
RF-CS carbon	13.01	103.8	10.06	89.27	65.24
RF-NS carbon	76.25	8.08	38.20	94.32	76.56
RF-NS gel	86.30	2.82	64.89	93.24	76.20
Natural alkaline protease	-	50.58	19.99	64.08	38.05

ตารางที่ 5.9 ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป

Enzyme Lipase	Enzyme Loading (% of initial enzyme)	Specific rate (unit/ml-mg protein)	Retention activity after 5 cycles (% of initial activity)	Retention activity after 4 weeks	
				41C (% of initial activity)	Troom (% of initial activity)
RF-CS carbon	35.28	13.04	25.76	85.42	67.74
RF-NS carbon	50.62	12.81	62.23	93.02	86.54
RF-NS gel	84.36	23.35	59.64	95.04	78.01
Natural lipase	-	9.69	29.69	70.67	33.01

ตารางที่ 5.10 ตารางสรุปคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

## บทที่ 6

### สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการประยุกต์ใช้อาร์เอฟเจล และอาร์เอฟคาร์บอนเจล (RF เจล และ RF คาร์บอนเจล) เป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์ สามารถแบ่งการสรุปผลได้เป็นสองส่วนใหญ่ๆ

#### 1. ผลการเตรียม RF เจล และ RF คาร์บอนเจล

จากผลการทดสอบสมบัติความเป็นรูพรุนของ RF เจล และ RF คาร์บอนเจล ที่เตรียมโดยใช้และไม่ใช้สารลดแรงตึงผิว ชนิดแคทอไออนิก (RF-CS และ RF-NS) พบว่าทั้ง RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน มีรูพรุนอยู่ในช่วงเมโซพอร์ โดย RF-NS คาร์บอนมีพื้นที่ผิว ปริมาตรรูพรุน ระดับเมโซ และค่าสูงสุดของการกระจายตัวของขนาดรูพรุน ( $R_p$ ) สูงกว่า RF-CS คาร์บอน และ RF-NS เจล ด้วยสมบัติความเป็นรูพรุนที่แตกต่างกันนี้ จะส่งผลต่อความสามารถในการตรึงเอนไซม์ และประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ตรึงได้

#### 2. ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปส

สามารถสรุปตามการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้ดังนี้

##### 2.1 ความสามารถในการตรึงเอนไซม์

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : RF-NS เจล โดยการตรึงด้วยวิธีห่อหุ้มในโพรงเจล สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ 86.30% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น และ RF-CS คาร์บอนตรึงได้น้อยที่สุดคือ 13.01% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น

เอนไซม์ไลเปส : RF-NS เจล สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงที่สุด และ RF-CS คาร์บอนตรึงได้น้อยที่สุดคือ 84.36% และ 35.28% ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นตามลำดับ

##### 2.2 ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอนมีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด และเอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจลมีกิจกรรมจำเพาะต่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมจำเพาะเป็น 103.80 และ 2.82 units/ml-mg protein ตามลำดับ

เอนไซม์ไลเปส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีกิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด และไลเปสอิสระมีกิจกรรมจำเพาะต่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมจำเพาะเป็น 23.35 และ 9.69 units/ml-mg protein ตามลำดับ

##### 2.3 เสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยา

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : เอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจลมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงที่สุด และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาค่ำที่สุด

โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเร่งปฏิกิริยา 5 รอบ เป็น 64.89% และ 19.99% ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ

เอนไซม์ไลเปส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูงที่สุด และเอนไซม์ไลเปสอิสระมีเสถียรภาพในการเร่งปฏิกิริยาค่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเร่งปฏิกิริยา 5 รอบ เป็น 62.23% และ 29.69% ของกิจกรรมเริ่มต้น ตามลำดับ

#### 2.4 เสถียรภาพในการเก็บรักษา

เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาทั้งที่อุณหภูมิ 4 °C และที่อุณหภูมิห้องสูงที่สุด และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาค่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเก็บรักษา 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็น 94.32% และ 64.08% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ และที่อุณหภูมิห้องเป็น 76.56% และ 38.05% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ

เอนไซม์ไลเปส : เอนไซม์ที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอนมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสูงที่สุดเป็น 86.54% ของกิจกรรมเริ่มต้น ในขณะที่เอนไซม์ที่ตรึงใน RF-NS เจล มีเสถียรภาพในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สูงที่สุดเป็น 95.04% ของกิจกรรมเริ่มต้น เอนไซม์ไลเปสอิสระยังคงมีเสถียรภาพในการเก็บรักษาค่ำที่สุดทั้งที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 °C โดยมีกิจกรรมคงเหลือภายหลังการเก็บรักษา 4 สัปดาห์เป็น 33.01% และ 70.67% ของกิจกรรมเริ่มต้นตามลำดับ

จากข้อสรุปจะเห็นได้ว่าอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลเป็นวัสดุที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวรองรับในการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสได้ โดยเอนไซม์ตรึงรูปนี้สามารถแสดงกิจกรรม และเสถียรภาพได้ดีเทียบเท่า และดีกว่าเอนไซม์อิสระ

#### ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยควรมีการทำการทดลองควบคุมเทียบเคียงกับการทดลองจริงเสมอ เพื่อสามารถอธิบายผลการทดลองได้ถูกต้องยิ่งขึ้น
2. สำหรับการวิจัยต่อยอด ควรลองศึกษาใช้อาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจลที่มีลักษณะโครงสร้างทางรูพรุนที่แตกต่างออกไปในการตรึงเอนไซม์ อาทิอาร์เอฟเจล และคาร์บอนเจล ที่เตรียมโดยการใช้เทคนิคคลื่นเหนือเสียง หรืออาร์เอฟคาร์บอนเจล ที่เตรียมโดยใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดอื่นๆ
3. ในส่วนของการศึกษาการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส และเอนไซม์ไลเปสนี้ ในอนาคตถ้าทำการศึกษาถึงโมเดลของการจับเกาะของเอนไซม์บน RF คาร์บอน หรือที่ห่อหุ้มใน RF เจล ก็จะเป็นประโยชน์ในการทำนายความเป็นไปได้ในการตรึงเอนไซม์ชนิดอื่นๆต่อไป



## รายการอ้างอิง

1. ปราณี อานเป็ร็อง. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.
2. Hajime Tamon and Hajime Ishizaka. SAXS study on gelation process in preparation of resorcinol-formaldehyde aerogel. Journal of Colloid and Interface Science 206 (1998) : 577-582.
3. H. Tamon, H. Ishizaka, T. Yamamoto and T. Suzuki. Preparation of mesoporous carbon by freeze drying. Carbon 37 (1999) : 2049-2055.
4. ดอกท บุญญานุรักษ์. เครื่องกรองน้ำชนิดที่ใช้เยื่อแผ่นซิลิกาสำหรับชนบท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.
5. C. Lin and J.A. Ritter. Effect of synthesis pH on the structure of carbon xerogels. Carbon 35 (1997) : 1271-1278.
6. Nathalie Job, Rene Pirard, Jose Marien and Jean-Paul Pirard. Porous carbon xerogels with texture tailored by pH control during sol-gel process. Carbon 42 (2004) : 619-628.
7. Takuji Yamamoto, Takashi Yoshida, Tetsuo Suzuki, Shin R. Mukai and Hajime Tamon. Dynamic and static light scattering study on the sol-gel transition of resorcinol-formaldehyde aqueous solution. Journal of Colloid and Interface Science 245 (2002) : 391-396.
8. Zdzislaw Pakowski. Drying of nanoporous and nanostructured materials. Drying 2004 A (2004) : 69-88.
9. Shaheen A. Al-Muhtaseb and James A. Ritter. Preparation and properties of resorcinol-formaldehyde organic and carbon gels. Advanced Materials 15 (2003) : 101-114.
10. T. Yamamoto, T. Sugimoto, T. Suzuki, S.R. Mukai and H. Tamon. Preparation and characterization of carbon cryogel microspheres. Carbon 40 (2002) : 1345-1351.
11. N. Tonanon, W. Tanthapanichakoon, T. Yamamoto, H. Nishihara, S.R. Mukai and H. Tamon. Influence of surfactants on porous properties of carbon cryogels

- prepared by sol-gel polycondensation of resorcinol and formaldehyde. Carbon 41 (2003) : 2981-2990.
12. Hirotoomo Nishihara, Shin R. Mukai and Hajime Tamon. Preparation of resorcinol-formaldehyde carbon cryogel microhoneycombs. Letter to the Editor / Carbon 42 (2004) : 899-901.
  13. Shin R. Mukai, Toru Sugiyama and Hajime Tamon. Immobilization of heteropoly acids in the network structure of carbon gels. Applied Catalysis A : General 256 (2003) : 99-105.
  14. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. การผลิตและการใช้ Immobilized Enzyme. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2521.
  15. Springer-Verlay. Advances biochemical engineering. 10 (1978).
  16. ศรีนวล ต้นสุวรรณ. การศึกษาการตรึงเอนไซม์กลูโคสไมเลสบนไคติน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2541.
  17. สุภาพร สุขสินชัย. การศึกษาการตรึงเอนไซม์แพคตินเนสจากเชื้อรา Rhizopus sp. 26R และสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูป. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542.
  18. วรรณรัตน์ กุศตืออาชีวะ. การตรึงเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานเฟอเรส บนตัวค้ำอนินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.
  19. เกษม พงษ์มณี. การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส โดยเชื้อ Bacillus Subtilis Tistr25. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.
  20. กัญชลิ เลิศโทคะสมบัติ. การตรวจแยกและศึกษาคุณสมบัติบางประการของ protease จาก Pseudomonas pseudomallei. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่, สาขาวิชาจุลชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2533.
  21. ร.อ.ปกรณ์ วิโรจน์กุล. การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และการศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ Bacillus Subtilis Tistr 25. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทฉบับที่, ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532
  22. C. Marlot, G. Langrad, C. Triantaphylides and J. Baratti. Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic support. Biotechnology Letter 7 (1985) : 647-650.

23. กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดิน เพื่อผลิตเอนไซม์ Lipase และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2532.
24. ทรัพย์ทวี ผุ่นทอง. การผลิตจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปส เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544.
25. เชิดศักดิ์ เมธาธิสววรรษย์. การใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพของปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันรำข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2535.
26. อุมารณ อารณพัฒน์พงศ์. การสกัดอะซาไคแรคตินจากเมล็ดสะเดาและปฏิกิริยากับไลเปส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.
27. อติสรณ์ มะซอ. การเรโซลูชันของเมนทอลเรซิมิกด้วยเอนไซม์ไลเปสตรังรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2541.
28. สุกีวรรณ เดชโยธิน. การใช้ไลเปสตรังรูปปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2538.
29. Koei Kawakami and Shigehiro Yoshida. Thermal stabilization of lipase by sol-gel entrapment in organically modified silicates formed on kieselguhr. Journal of Fermentation and Bioengineering 82 (1996) : 239-245.
30. Kenzo Yokoseki, Shigeru Yamanaka, Koichi Takinami, Yoshio Hirose, Atsuo Tanaka, Kenji Sonomoto and Saburo Fukui. Application of immobilized lipase to regip-specific interesterification of triglyceride in organic solvent. Applied Microbiology and Biotechnology 14 (1982) : 1-5.
31. Koshiro S., Sonomoto K., Tanaka A. and Fukui S. Stereoselective esterification of dimentol by polyurethane entrapped lipase in organic solvent. Journal of Biotechnology 2 (1985) : 47-57.
32. Hae-Joon Lee, Jae-Hwa Song and Jung-Hyun Kim. Synthesis of resorcinol/formaldehyde gel particles by the sol-emulsion-gel technique. Materials Letters 37 (1998) :197-200.

33. Mohamed A. Abdel-Naby, A-M. S. Ismail, S. A. Ahmed and Ahmed F. Abdel Fattah. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus Mycooides*. Bioresource Technology 64 (1998) : 205-210.
34. M. Chellapandian. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. Process Biochemistry 33 (1998) : 169-173.
35. Hideo Kise and Atsuhito Hayakawa. Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. Enzyme Microbial Technology 13 (1991) : 584-588.
36. Dirk-Jan van Unen, Johan F. J. Engbersen and David N. Reinhoudt. Sol-Gel immobilization of serine protease for application in organic solvents. Biotechnology and Bioengineering 75 (2001) : 154-158.
37. Pedro C. de Oliveira, Gizelda M. Alves and Heizir F. de Castro. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. Biochemical Engineering Journal 5 (2000) : 63-71.
38. Mamoru Iso, Baoxue Chen, Masashi Eguchi, Takashi Kudo and Surekha Shrestha. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16 (2001) : 53-58.
39. Martin Norin, John Boutelje, Erland Holmberg, and Karl Hult. Lipase immobilized by adsorption : Effect of support hydrophobicity on the reaction rate of ester synthesis in cyclohexane. Applied Microbiology and Biotechnology 28 (1988) : 527-530.
40. BAI Zheng-Wu, YIN Chuan-Qi and WU Li. Preparation of immobilized lipase with chitosan-silica gel composite carrier. Chinese Journal of Applied Chemistry 19 (2002).
41. M. Murray, D. Rooney, M. Van Neikerk, A. Montenegro and L. R. Weatherley. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. Process Biochemistry 32 (1997) : 479-486.
42. Sangpill Hwang, Kang-Taek Lee, Jim-Won Park, Byoung-Ryul Min, Seungjoo Haam, IK-Sung Ahn and Joon-Ki Jung. Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels

Biochemical Engineering Journal 17 (2004) : 85-90.

43. F. He, R.X. Zhuo, L.J. Liu, D.B. Jin, J. Feng and X.L. Wang. Immobilized lipase on porous silica beads: preparation and application for enzymatic ring-opening polymerization of cyclic phosphate. Reactive & Functional Polymers 47 (2001) : 153-158.
44. Alexander E. Ivanov and Manfred P. Schneider. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic 3 (1997) : 303-309.
45. Manfred T. Reetz, Albin Zonta, Venugopal Vijayakrishnan and Klaus Schimossek. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials : magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 134 (1998) : 251-258.
46. An-Fei Hsu, Thomas A. Foglia and Siyan Shen. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase in a phyllosilicate sol-gel matrix : effectiveness as a biocatalyst. Biotechnology Applied and Biochemistry 31(2000) : 179-183.
47. Jyh-Ping Chen. Production of Ethyl Butyrate Using Gel-Entrapped *Candida cylindracea* Lipase. Journal of Fermentation and Bioengineering 82 (1996) : 404-407.
48. Jyh-Ping Chen and Wei-Shin Lin. Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. Enzyme and Microbial Technology 32 (2003) : 901-811.
49. Jyh-Ping Chen and You-Nam Hwang. Polyvinyl formal resin plates impregnated with lipase-entrapped sol-gel polymer for flavor ester synthesis. Enzyme and Microbial Technology 33 (2003) : 513-519.
50. Shao-Hua Chiou and Wen-Teng Wu. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. Biomaterials 25 (2004) : 197-204.
51. Seema S. Betigeri and Steven H. Neau. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. Biomaterials 23 (2002) : 3627-3636.



52. Jolanta Bryjak, Katarzyna Bachmann, Barbara Pawlow, Irena Maliszewska, Andrzej Trochimczuk and Bozena N. Kolarz. Immobilization of Lipase on various acrylic copolymers. Chemical Engineering Journal 65 (1997) : 249-256.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

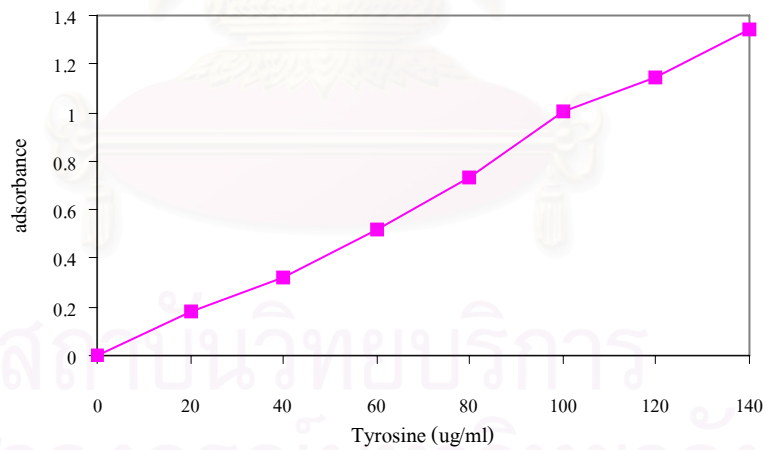
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก. กราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน

Tyrosine ( $\mu\text{g/l}$ )	Adsorbance
0	0.000
20	0.185
40	0.323
60	0.521
80	0.730
100	1.002
120	1.146
140	1.342

ตารางที่ ก.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายที่มีความเข้มข้นของไทโรซีนต่างๆ

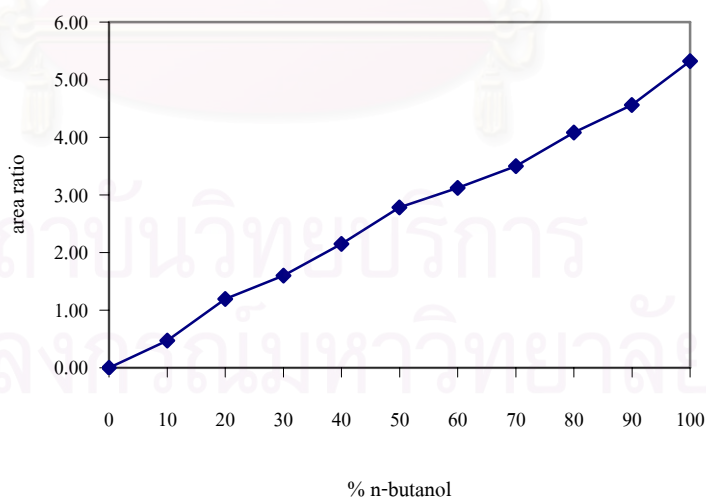


รูปที่ ก.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน

ภาคผนวก ข. กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล

% n-butanol	area ratio (butanol/heptane)
0	0.000
10	0.472
20	1.197
30	1.602
40	2.152
50	2.783
60	3.124
70	3.500
80	4.086
90	4.562
100	5.324

ตารางที่ ข.1 แสดงค่าอัตราส่วนพื้นที่ของโครมาโตกราฟีระหว่าง บิวทานอลกับเฮปเทน กับความเข้มข้นของบิวทานอลค่าต่างๆ

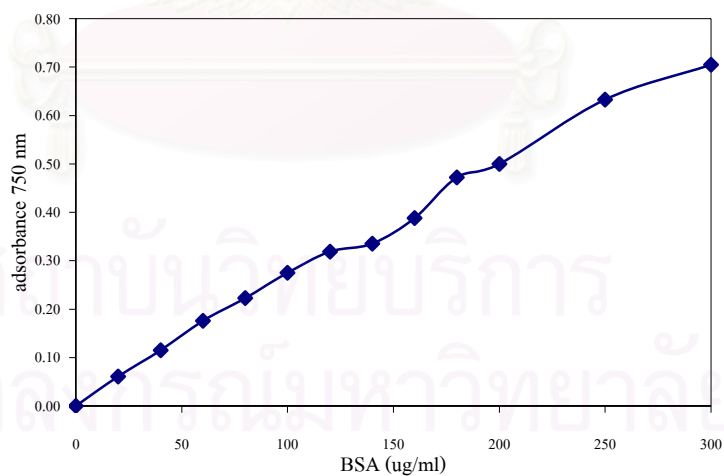


รูปที่ ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล

ภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (BSA) ที่ 750 nm

BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	adsorbance
20	0.061
40	0.115
60	0.176
80	0.223
100	0.275
120	0.319
140	0.329
160	0.388
180	0.483
200	0.500
250	0.633
300	0.705

ตารางที่ ค.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นค่าต่างๆ



รูปที่ ค.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA



**ภาคผนวก ง. ข้อมูลการทดลอง อาร์เอโฟเจล และคาร์บอนเจล**

ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวินของ RF-NS Carbon, RF-CS Carbon และ RF-NS Gel

ง.1 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวิน ของ RF-NS Carbon

Adsorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
4.92	0.000	195.59	0.392	604.2	0.891
19.57	0.000	203.64	0.455	532.2	0.865
43.88	0.000	212.15	0.518	456.8	0.849
77.96	0.000	221.68	0.579	349.6	0.813
115.85	0.002	233.12	0.636	270.3	0.739
143.03	0.027	246.98	0.694	228.7	0.627
151.76	0.058	265.03	0.751	207.4	0.507
154.78	0.073	290.22	0.801	193.8	0.407
156.41	0.081	327.4	0.840	184.0	0.325
158.43	0.091	373.11	0.872	174.6	0.242
160.33	0.103	430.89	0.892	166.4	0.172
166.58	0.149	498.54	0.911	159.2	0.114
173.24	0.204	579.09	0.926	151.1	0.063
180.44	0.264	629.42	1.005		
187.71	0.328				

ง.2 ผลไอโซเทอมการดูดซับ-คายซับ (Adsorption-Desorption Isotherm) ของไนโตรเจนที่ 77 เคลวิน ของ RF-CS Carbon

Adsorption		Adsorption		Desorption	
Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>	Vol	P/P <sub>0</sub>
5.25	0.000	184.37	0.399	255.7	0.892
20.8	0.000	188.57	0.463	246.0	0.77
46.61	0.000	193.19	0.527	221.7	0.621
82.58	0.000	198.41	0.588	201.5	0.502
128.17	0.001	205.16	0.650	186.1	0.404
154.24	0.031	213.21	0.712	180.4	0.318
160.32	0.065	223.84	0.772	175.1	0.231
162.14	0.078	237.17	0.829	170.5	0.159
163.08	0.085	250.94	0.890	165.7	0.098
164.22	0.095	258.13	0.963		
165.43	0.106	284.25	1.002		
169.01	0.153				
172.86	0.211				
176.62	0.273				
180.46	0.336				

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ. ข้อมูลการทดลอง การตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส

จ.1 ผลการตรึงเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน

เวลาในการตรึง (hr)	ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ ( $\mu\text{g}$ )		เปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่ตรึงได้ (%)	
	RF-CS	RF-NS	RF-CS	RF-NS
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	140.60	7.71	8.28	0.45
2	88.90	951.78	5.24	56.07
3	211.60	1000.84	12.47	58.96
4	234.51	1181.22	13.82	69.59
5	231.74	1345.40	13.65	79.26
6	228.77	1347.23	13.48	79.37
7	320.54	1314.31	18.88	77.43
8	342.55	1324.00	20.18	78.00
9	296.93	1223.40	17.49	72.08
10	220.79	1294.27	13.01	76.25

ตารางที่ จ.1 แสดงปริมาณ โปรตีน(แอลคาไลน์โปรติเอส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่  
เวลาการตรึงต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จ.2 ผลการวิเคราะห์การตรึงด้วยการดูดซับทางกายภาพที่มีต่อเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอสอิสระ

เวลาในการตรึง (hr)	Activity (unit)	เวลาในการตรึง (hr)	Activity (unit)
0	50.824	6	47.142
1	50.135	7	47.135
2	49.872	8	46.202
3	49.934	9	45.523
4	47.253	10	44.821
5	47.224		

ตารางที่ จ.2 แสดงกิจกรรมที่เปลี่ยนไปของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอสอิสระ เมื่อทำการทดสอบที่สภาวะเดียวกับการตรึงที่เวลาต่างๆ

จ.3 ผลการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอสของ RF-NS คาร์บอน

ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ ( $\mu\text{g protein/ g support}$ )
10	431.422
30	673.521
50	702.896

ตารางที่ จ.3 แสดงปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ค่าความเข้มข้นเอนไซม์แอลคาไลน์โพรตีเอสค่าต่างๆ

จ.4 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสเอส

เวลาในการเร่งปฏิกิริยา (min)	ปริมาณ Tyrosin ที่ผลิตได้ ( $\mu\text{g}$ )
0	66.235
1	115.369
2	170.705
3	280.001
4	345.996
5	382.141

ตารางที่ จ.4 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสเอส

จ.5 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสเอส

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	60.524	227.177	274.245	300.523	333.558
5	379.487	420.565	388.426	400.556	397.314
20	385.598	433.514	400.002	410.211	422.226

ตารางที่ จ.5 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีนเอสเอส



จ.6 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	80.761	50.884	49.598	45.213	36.176
5	118.965	63.863	57.884	50.259	40.021
20	133.353	73.537	60.259	58.612	43.638

ตารางที่ จ.6 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน

จ.7 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	57.741	54.924	48.251	43.277	37.564
5	75.190	69.741	57.741	50.264	44.230
20	107.149	78.557	63.312	57.283	50.645

ตารางที่ จ.7 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรติเอสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน

จ.8 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล

time	Tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	45.236	45.269	44.647	44.523	40.987
5	53.189	52.114	50.838	50.123	45.114
20	58.663	56.483	56.921	54.244	49.556

ตารางที่ จ.8 แสดงปริมาณไทโรซีนที่ผลิตได้ที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล

จ.9 ผลการคำนวณค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป

Enzyme	run1(%)	run2(%)	run3(%)	run4(%)	run5(%)
Physical adsorbed on RF-CS carbon	100.00	33.97	21.69	13.21	10.06
Physical adsorbed on RF-NS carbon	100.00	84.92	54.39	40.04	38.20
Gel entrapped with RF-NS gel	100.00	86.07	77.84	70.41	51.89
Natural enzyme	100.00	60.63	35.80	31.35	19.99

ตารางที่ จ.9 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป

จ.10 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป

weeks	natural enzyme (unit)		adsorbed on RF-CS carbon (unit)		adsorbed on RF-NS carbon (unit)		entraped with RF-NS gel (unit)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
	0	48.742	48.742	23.814	23.814	15.921	15.921	9.635
1	46.431	38.891	23.366	21.482	15.800	15.039	9.544	9.214
2	42.236	30.265	23.019	19.316	15.542	13.878	9.510	8.446
3	36.994	26.145	22.238	17.632	15.305	12.783	8.973	7.268
4	31.234	18.546	21.259	15.536	15.017	12.189	8.984	7.342

ตารางที่ จ.10 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

weeks	natural enzyme (%)		adsorbed on RF-CS carbon (%)		adsorbed on RF-NS carbon (%)		entraped with RF-NS gel (%)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	95.26	79.79	98.12	90.21	99.24	94.46	99.06	95.63
2	86.65	62.09	96.66	81.11	97.62	87.17	98.70	87.66
3	75.90	53.64	93.38	74.04	96.13	80.29	93.13	75.43
4	64.08	38.05	89.27	65.24	94.32	76.56	93.24	76.20

ตารางที่ จ.11 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสอิสระ และแอลคาไลน์โปรติเอสตรึงรูป ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

ภาคผนวก ฉ. ข้อมูลการทดลอง การตรึงเอนไซม์ไลเปส

ฉ.1 ผลการตรึงเอนไซม์ไลเปสบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอน

เวลาในการตรึง (hr)	ปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ (mg)		เปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่ตรึงได้ (%)	
	RF-CS	RF-NS	RF-CS	RF-NS
2	4.321	8.327	18.51	35.67
5	7.111	13.122	30.46	56.21
10	8.236	11.764	35.28	50.62

ตารางที่ ฉ.1 แสดงปริมาณ โปรตีน(ไลเปส)ที่ตรึงติดบน RF-NS คาร์บอน และ RF-CS คาร์บอนที่เวลาการตรึง  
ต่างๆ

ฉ.2 ผลการวัดการตรึงด้วยการดูดซับทางกายภาพที่มีต่อเอนไซม์ไลเปสอิสระ

เวลาในการตรึง (hr)	Activity (unit)
0	210.805
2	208.230
5	200.787
10	191.212

จ.3 ผลการทดสอบความสามารถในการจุเอนไซม์ไลเปสของ RF-NS คาร์บอน

ปริมาณเอนไซม์ (g)	ปริมาณ โปรตีนที่ตรึงได้ (mg protein)
0.5	13.122
1.0	29.527
1.5	45.607
2.0	49.818

ตารางที่ จ.3 แสดงปริมาณ โปรตีนที่ตรึงได้บน RF-NS คาร์บอนที่ปริมาณเอนไซม์ไลเปสค่าต่างๆ

จ.4 ผลการทดสอบอัตราการเร่งปฏิกิริยาเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

เวลาในการเร่งปฏิกิริยา (min)	ปริมาณ n-butanol ที่ใช้ไป (mmol/ml)
0	23.298
5	136.425
10	150.103
15	164.147
20	161.236
25	168.339
30	173.445
60	170.327
120	167.023
180	179.130

ตารางที่ จ.4 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ใช้ไปที่เวลาต่างๆ จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ



จ.5 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	23.298	27.235	29.315	23.178	26.532
5	136.425	94.456	82.536	60.178	60.124
10	150.103	105.771	88.634	70.542	66.877
15	164.147	105.163	87.452	73.456	69.323
20	161.236	110.023	94.238	78.124	72.145

ตารางที่ จ.5 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

จ.6 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	20.145	24.635	25.771	25.349	22.168
5	109.691	60.561	53.548	52.625	45.235
10	124.714	68.145	59.456	60.143	58.789
15	126.356	80.111	66.142	65.377	62.134
20	140.254	83.457	75.802	76.142	70.045

ตารางที่ จ.6 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-CS คาร์บอน

ฉ.7 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	23.645	20.144	21.788	24.175	19.117
5	149.205	137.929	141.934	114.632	97.259
10	157.456	140.006	146.657	120.235	96.532
15	162.147	145.970	150.032	127.789	102.456
20	170.403	143.021	148.780	130.013	111.156

ตารางที่ ฉ.7 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบน RF-NS คาร์บอน

ฉ.8 ผลการทดสอบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล

time (min)	butanol consumed (mmol/ml)				
	run1	run2	run3	run4	run5
0	20.145	27.235	29.315	23.178	26.532
5	104.561	103.218	102.510	82.278	76.878
10	127.477	106.405	101.659	86.479	80.124
15	135.052	110.234	108.878	87.493	81.068
20	144.423	111.478	106.456	90.364	84.697

ตารางที่ ฉ.8 แสดงปริมาณบิวทานอลที่ถูกใช้ไปเป็นเวลาต่างๆ และรอบปฏิกิริยาต่างๆจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงด้วย RF-NS เจล

ฉ.9 ผลการคำนวณค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

Enzyme	run1(%)	run2(%)	run3(%)	run4(%)	run5(%)
Physical adsorbed on RF-CS carbon	100.00	40.12	31.02	30.46	25.76
Physical adsorbed on RF-NS carbon	100.00	93.81	95.69	72.04	62.23
Gel entrapped with RF-NS gel	100.00	90.01	87.56	70.01	59.64
Natural enzyme	100.00	59.42	47.05	32.71	29.69

ตารางที่ ฉ.9 แสดงค่า retention activity จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสตรึงรูป

ฉ.10 ผลการทดสอบเสถียรภาพในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสตรึงรูป

weeks	natural enzyme (unit)		adsorbed on RF-CS carbon (unit)		adsorbed on RF-NS carbon (unit)		entrapped with RF-NS gel (unit)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
0	210.805	210.805	283.786	283.786	278.666	278.666	507.897	507.897
1	205.978	165.060	269.682	266.276	274.263	265.895	494.976	484.788
2	189.561	87.036	250.939	227.666	260.934	247.335	478.889	436.018
3	153.620	35.598	226.156	181.359	251.671	222.997	452.119	351.082
4	108.564	11.751	193.183	122.853	234.104	192.973	429.694	273.879

ตารางที่ ฉ.10 แสดงค่ากิจกรรม (unit activity) ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสตรึงรูป ภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

weeks	natural enzyme (%)		adsorbed on RF-CS carbon (%)		adsorbed on RF-NS carbon (%)		entrapped with RF-NS gel (%)	
	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom	4°C	Troom
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	97.71	78.30	95.03	93.83	98.42	95.42	97.46	95.45
2	92.03	52.73	93.05	85.50	95.14	93.02	96.75	89.94
3	81.04	40.90	90.12	79.66	96.45	90.16	94.41	80.52
4	70.67	33.01	85.42	67.74	93.02	86.54	95.04	78.01

ตารางที่ ๑๑.11 แสดงผลการคำนวณ retention activity ของเอนไซม์ไลเปสอิสระ และไลเปสตรึงรูป ภาย หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธนชัย ชัยจิตรสกุล เกิดเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2522 จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจาก ศูนย์การศึกษานอกโรงเรียน กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2545 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ที่ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2545



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย