

บทที่ 3

ตรวจเอกสาร

3.1 บทนำ

ในการศึกษาวัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตเพื่อเป็นพาหะสำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ประกอบไปด้วยหลายปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการศึกษาเนื่องจากงานวิจัยนี้มีความเกี่ยวข้องกับหลายระบบที่ได้มีผู้ศึกษามาแล้วและได้นำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ ระบบดังกล่าวได้แก่ ระบบไมโครอิมัลชัน ชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil microemulsion), ไมโครอิมัลชัน-เบสค์ออร์แกนเจล (Microemulsion-Based Organogels, MBGs) และกระบวนการโซล-เจลของซิลิกอนอัลคอกไซด์ในสารละลายวัฏภาค เดียว อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่นำเอากระบวนการโซล-เจลของซิลิกอนอัลคอกไซด์ไปใช้ในการสังเคราะห์ อนุภาคซิลิกาในระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ดังนั้นการตรวจเอกสารจึงแบ่งเนื้อหาออกเป็น 2 หัวข้อใหญ่ๆ คือ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อสมบัติของระบบดังกล่าว (ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน, MBGs และกระบวนการโซล-เจล) และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์

3.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อสมบัติของระบบ

เนื่องจากซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตเป็นวัสดุที่เตรียมได้จากการเกิดกระบวนการโซล-เจลของซิลิกอนอัลคอกไซด์ใน MBGs ซึ่งโดยพื้นฐานแล้ว MBGs เป็นเมตริกซ์เจลที่เตรียมได้จากระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน จะเห็นได้ว่าการเตรียมวัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตมีความซับซ้อน และเกี่ยวข้องกับหลายระบบซึ่งได้แก่ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน, MBGs และกระบวนการโซล-เจลของซิลิกอนอัลคอกไซด์ ดังนั้นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อสมบัติของระบบเหล่านี้ย่อมมีผลต่อสมบัติของซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตเช่นเดียวกัน

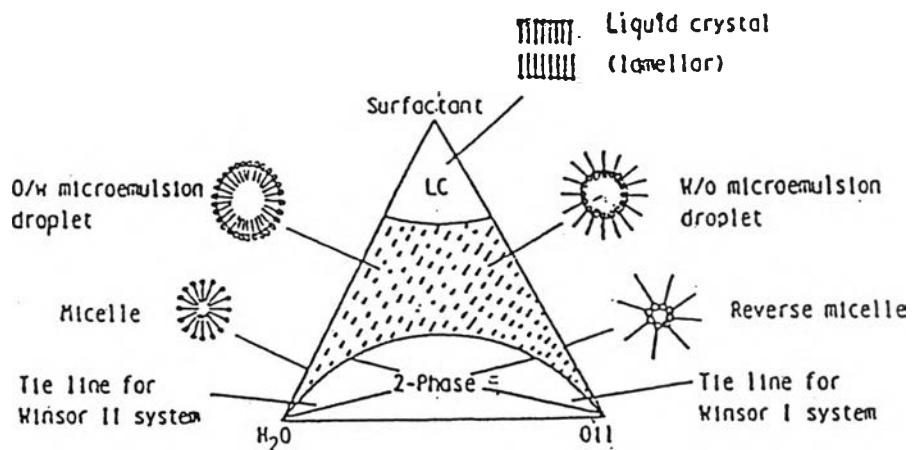
3.2.1 ไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชันเป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบคือ สารลดแรงตึงผิว, น้ำ และน้ำมัน โดยที่สารลดแรงตึงผิวทำหน้าที่เป็นตัวแพร่กระจาย (dispersing agent) โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมีทั้งลักษณะที่มีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เป็นผลให้สารลดแรงตึงผิวจัดตัวอยู่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน โดยทั่วไประบบที่ประกอบด้วยน้ำและน้ำมันจะไม่สามารถรวมตัวเป็นวัฏภาคเดียวได้ การเติมสารลดแรงตึงผิวมีผลให้ความสามารถในการละลายระหว่างน้ำและน้ำมันเพิ่มขึ้น ในลักษณะที่สารลดแรงตึงผิวจะทำให้วัฏภาคของของเหลวหนึ่งแตกตัว (dispersed phase) ออกในลักษณะที่เป็นอนุภาคกลม (globules) แล้วกระจายตัวเข้าไปในของเหลวอีกชนิดหนึ่งซึ่งมักจะมีปริมาณมากเป็นวัฏภาคต่อเนื่อง (continuous phase) ทำให้ของเหลวทั้งสองดูประหนึ่งเป็นวัฏภาคเดียว (pseudo one phase) โดยที่สารลดแรงตึงผิวจัดเรียงตัวอยู่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคในรูปของไมเซลล์ (micelle) ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ไมเซลล์จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่ำกว่าความเข้มข้นไมเซลล์วิกฤต (critical micelle concentration ; cmc) ไมเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ (รูปที่ 3.2 ก และ ค) คือ นอร์มัลไมเซลล์ (normal micelle) และรีเวอร์สไมเซลล์ (reverse micelle) นอร์มัลไมเซลล์เป็นกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่จัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนที่มีขั้วหันเข้าหาวัฏภาคน้ำและส่วนหางซึ่งไม่มีขั้วหันไปในทิศตรงกันข้ามซึ่งเป็นแกนของไมเซลล์ สำหรับรีเวอร์สไมเซลล์เป็นกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่จัดตัวในลักษณะตรงกันข้ามกับนอร์มัลไมเซลล์ ดังนั้นน้ำมันจะถูกละลายอยู่ภายในนอร์มัลไมเซลล์และน้ำจะถูกละลายอยู่ภายในรีเวอร์สไมเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูงกว่าค่า cmc จะส่งผลให้จำนวนไมเซลล์เพิ่มมากขึ้นซึ่งทำให้ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นด้วย และเมื่อปริมาณน้ำหรือน้ำมันมากเกินกว่าปริมาณของสารลดแรงตึงผิวที่จะทำให้ละลายกันได้น้ำหรือน้ำมันส่วนที่เกินก็จะอยู่แยกชั้นกันเป็น 2 วัฏภาค

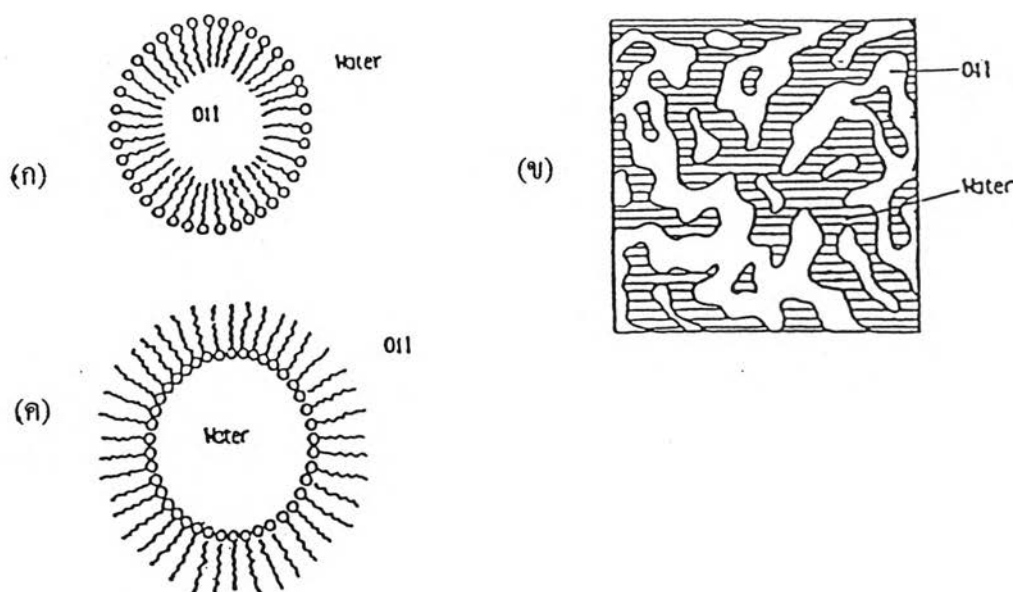
ในการศึกษาพฤติกรรมของระบบ 3 องค์ประกอบ (ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว น้ำและน้ำมัน) ที่ความดันและอุณหภูมิคงที่ สามารถแสดงได้โดยใช้ไดอะแกรมสามเหลี่ยมของกิบส์ (Gibbs triangle) ในรูปที่ 3.1 พิจารณาบริเวณระบบ 2 วัฏภาคซึ่งอยู่ที่ฐานของสามเหลี่ยม สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบวินเซอร์ I (winsor I) และระบบวินเซอร์ II (winsor II) โดยที่ระบบวินเซอร์ I ประกอบด้วยวัฏภาคของน้ำมันที่สมดุลย์กับวัฏภาคของสารละลายนอร์มัลไมเซลล์ ในส่วนของระบบวินเซอร์ II ประกอบด้วยวัฏภาคของน้ำที่สมดุลย์กับวัฏภาคของสารละลายรีเวอร์สไมเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นวัฏภาคน้ำหรือน้ำมันก็จะถูกละลายเสมือนเป็นวัฏภาคเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มจนเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งรูป

ร่างของไมเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปจากทรงกลมเช่นเป็นหกเหลี่ยมหรือลูกบาศก์ หากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวยังคงเพิ่มขึ้นจะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นวัฏภาคของเหลว-ผลึก (liquid-crystalline phase) หรือลามลลาร์ (lamellar) เกิดเป็นสารเนื้อผสม 3 วัฏภาค

สำหรับในกรณีที่ให้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวคงที่ การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของน้ำมันต่อน้ำจะมีผลต่อการจัดเรียงตัวของกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวจากนอร์มัลไมเซลล์เปลี่ยนไปเป็นระบบสองวัฏภาคต่อเนื่อง (a bicontinuous phase) แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นรีเวอร์สไมเซลล์ในที่สุด ระบบสองวัฏภาคต่อเนื่องเป็นเสมือนระบบวัฏภาคเดียวเนื่องจากทั้งน้ำและน้ำมันมีขอบเขตที่ขยายและต่อถึงกันเป็นวัฏภาคต่อเนื่อง (Rees และRobinson, 1993) (รูปที่ 3.2 ข) ในทางตรงกันข้าม รีเวอร์สไมเซลล์สามารถเปลี่ยนไปเป็นระบบสองวัฏภาคต่อเนื่องแล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นนอร์มัลไมเซลล์ได้ โดยการเพิ่มอัตราส่วนของน้ำต่อน้ำมัน



รูปที่ 3.1 แผนภาพเฟสไดอะแกรม: พื้นที่แรเงาแสดงบริเวณของระบบไมโครอิมัลชันเฟสเดียว (Rees and Robinson, 1993)

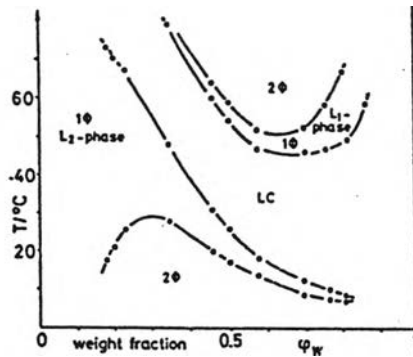


รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดง (ก) นอร์มอลไมเซลล์ (normal micelle) (ข) สองเฟสต่อเนื่อง (bicontinuous phase) และ (ค) รีเวอร์สไมเซลล์ (reverse micelle) (Rees and Robinson, 1993)

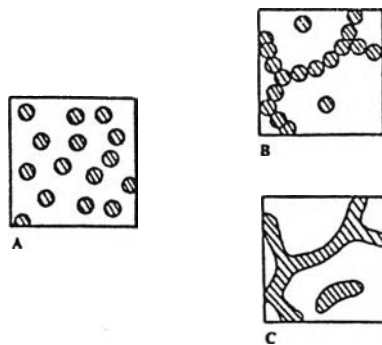
นอกจากสัดส่วนขององค์ประกอบทั้ง 3 (น้ำ, น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว) แล้ว อุณหภูมิยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อลักษณะของไมเซลล์และการแยกวัฏภาค Quillet และคณะ (1991) ได้เสนอไดอะแกรมวัฏภาคของระบบไมโครอิมัลชัน น้ำ/AOT/ไฮโซออกเทน ดังแสดงในรูปที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและสัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำต่อน้ำมัน ความเข้มข้นของ AOT เท่ากับ 0.1 ระบบที่มีความเข้มข้นของ AOT ที่สูงขึ้น ไดอะแกรมจะไม่แตกต่างกันมากนัก จะเห็นได้ว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (L_2) เกิดขึ้นเมื่อสัดส่วนของน้ำน้อย และ ไมโครอิมัลชันของน้ำมันในน้ำ (L_1) เกิดขึ้นเมื่อสัดส่วนของน้ำมาก วัฏภาคของเหลว-ผลึก (LC) จะปรากฏที่บริเวณระหว่าง L_2 และ L_1 ซึ่งสารละลายจะมีลักษณะขุ่น ที่อุณหภูมิสูงระบบจะแยกเป็น 2 วัฏภาคคือ วัฏภาคน้ำมันและ วัฏภาค L_1 ส่วนที่อุณหภูมิต่ำระบบจะแยกเป็น 2 วัฏภาคคือ วัฏภาคน้ำและวัฏภาค L_2 เมื่ออุณหภูมิสูงและต่ำกว่า L_2 ระบบจะมีลักษณะขุ่นเป็นหมอก ที่วัฏภาค L_2 ไมเซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 ถึง 20 นาโนเมตร ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำในระบบ (Quillet และคณะ, 1991) ขนาดของไมเซลล์เหล่านี้สั้นกว่าความยาวคลื่นแสงมาก (ประมาณ 560 นาโนเมตร) ดังนั้นแสงจึงสามารถผ่านได้

จึงเกิดลักษณะโปร่งใสหรือโปร่งแสงขึ้น ความหนืดของไมโครอิมัลชันต่ำเท่ากับความหนืดของไอโซออกเทนบริสุทธิ์ การเพิ่มปริมาณน้ำหรืออุณหภูมิมีผลทำให้ค่าการนำไฟฟ้าของระบบเพิ่มขึ้นอย่างมากเนื่องจากเกิดภาวะการไหลซึม (percolation transition) ซึ่งที่ภาวะนี้โครงสร้างของไมโครอิมัลชันยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจนแต่น่าจะมีลักษณะเป็นโครงข่ายที่เกิดจากไมเซลล์มาสัมผัสต่อเนื่องกันซึ่งทำให้มีลักษณะเป็นโครงข่ายของน้ำที่ต่อเนื่อง (รูปที่ 3.4)

สำหรับงานวิจัยนี้สนใจศึกษาโดยใช้ระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่ความเข้มข้นของ AOT เป็น 0.25 โมลาร์ และสัดส่วนเชิงน้ำหนักของน้ำประมาณ 0.14



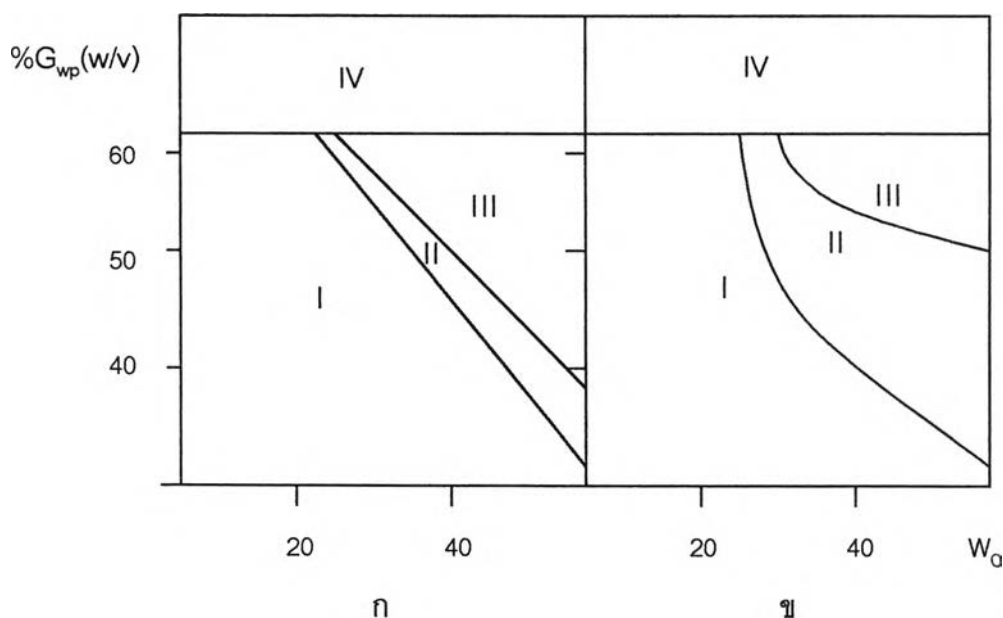
รูปที่ 3.3 ไดอะแกรมวัฏภาคของระบบไมโครอิมัลชัน น้ำ/ AOT/ ไอโซออกเทน ความเข้มข้นของ AOT เท่ากับ 0.1 โมลาร์ L_2 , ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน; L_1 , ไมโครอิมัลชันของน้ำมันในน้ำ; LC, วัฏภาคของเหลว-ผลึก; ϕ_w , สัดส่วนเชิงน้ำหนักของน้ำ (Quellet และคณะ, 1991)



รูปที่ 3.4 แบบจำลองโครงสร้างของไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน(A), และที่ภาวะการไหลซึม(B)หรือ (C) (Quellet และคณะ, 1991)

3.2.2 ไมโครอิมัลชัน-เบสค์ออร์แกโนเจล

โดยทั่วไปเจลาตินสามารถเปลี่ยนสภาพเป็นเจลหลังจากที่ถูกปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า นอกจากน้ำแล้วเจลาตินยังสามารถละลายได้ในรีเวอร์สไมเซลส์ เนื่องจากเจลาตินไม่ละลายในวัฏภาคตัวทำละลายอินทรีย์ จึงถูกจำกัดอยู่อย่างท่วมท้นภายในรีเวอร์สไมเซลส์ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำ สำหรับในระบบที่มีปริมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูงมาก (0.1 โมลาร์ หรือสูงกว่า) ระยะระหว่างไมเซลส์จะสั้น (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกลางของไมเซลส์ประมาณ 10 nm ที่ $W_0 = 30$, Haering และ Luisi, 1986) และเนื่องจากเจลาตินมีลักษณะโมเลกุลที่ยาวจึงเกิดการสัมผัสเชื่อมโยงกันระหว่างอนุภาคเล็ก ๆ ของน้ำในไมเซลส์ด้วยสายของเจลาตินเป็นผลให้กระบวนการเกิดเจล (Gelation) เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเป็นโครงข่ายของเจลที่แข็ง และเป็นเนื้อเดียวกัน ดังนั้นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ MBGs ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ W_0 ปริมาณเจลาติน และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว สามารถอธิบายได้โดยอาศัยรูปที่ 3.5 ของระบบ AOT/ไอโซออกเทน ที่มีความเข้มข้นของ AOT 100 และ 140 มิลลิโมลาร์ ดังนี้



รูปที่ 3.5 ขอบเขตเจลที่เสถียรของระบบ AOT/ไอโซออกเทน AOT (ก)100 มิลลิโมลาร์ (ข)140 มิลลิโมลาร์ แบ่งออกเป็น 4 บริเวณคือ (I) สารละลายไมโครอิมัลชัน (II) วัฏภาคของเจล (III) มีการแยกวัฏภาคของตัวทำละลายอินทรีย์จากวัฏภาคของเจล (IV) กลุ่มอนุภาคของเจลาตินจะอยู่แยกจากวัฏภาคของสารละลาย (Haering และ Luisi, 1986)

(1) ปริมาณเจลาติน

ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและ W_0 คงที่ และ W_0 มากกว่า 20 ปริมาณเจลาตินมีผลต่อการเกิดเจลสามารถอธิบายได้จากรูปที่ 3.5 (Haering และ Luisi, 1986) กล่าวคือ ที่ปริมาณเจลาตินต่ำ (I) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำในไมโครอิมัลชันซึ่งมีปริมาณสูง เจลาตินจะละลาย (gelatin hydration) อยู่ในไมเซลลินในรูปของนาโนเจล (nanogels) ซึ่งมีจำนวนน้อยปนอยู่กับไมเซลส์ที่ไม่มีเจลาตินจึงไม่สามารถเกิดเป็นออร์แกโนเจลได้ นาโนเจลจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับอนุภาคคอลลอยด์ในตัวทำละลายอินทรีย์ (Quellet และคณะ, 1991) เมื่อปริมาณเจลาตินเพิ่มขึ้น (II) นาโนเจลที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากและอยู่ใกล้กันมากเนื่องจากความเข้มข้นของ AOT สูง (มากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์) ทำให้สามารถเกิดโครงสร้างร่างแหจนเป็นโครงข่ายของเจลที่ปกคลุมตัวทำละลายได้ทั้งหมด (organogels) (Haering และ Luisi, 1986) สำหรับในระบบที่ปริมาณเจลาตินเพิ่มมากขึ้นอีก (III) ผู้เขียนคาดว่าปริมาณน้ำในระบบน้อยเกินกว่าที่จะสามารถละลายเจลาตินปริมาณที่มากนี้ได้เหมาะสม ทำให้โมเลกุลของเจลาตินสามารถละลายได้เพียงบางส่วนซึ่งพอที่จะเกิดพันธะเชื่อมขวางกันเป็นโครงข่ายของเจลได้แต่โครงข่ายเจลที่เกิดขึ้นในลักษณะที่เป็นเกลียวนี้ไม่สามารถขยายตัวห่อหุ้มตัวทำละลายอินทรีย์ได้ทั้งหมดจึงเกิดการแยกวัฏภาคของตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากเจล และทำนองเดียวกันผู้เขียนคาดว่าในระบบที่มีปริมาณเจลาตินสูงมาก (60% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรน้ำ) (IV) ปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการละลายของเจลาตินจึงไม่สามารถเกิดโครงข่ายของเจลที่มีลักษณะเป็นเกลียวได้ ดังนั้นกลุ่มอนุภาคของเจลาตินจะอยู่แยกจากวัฏภาคของสารละลาย

(2) W_0

W_0 เป็นค่าอัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวคงที่ น้ำที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของหยดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่อยู่ร่วมกันในโครงข่ายของ MBGs ขยายใหญ่ขึ้น (Atkinson และคณะ, 1991) รูปที่ 3.5 แสดงให้เห็นว่าการเกิดออร์แกโนเจลไม่สามารถเกิดขึ้นได้ทุก W_0 ที่ W_0 ต่ำกว่า 20 ไม่สามารถเกิดออร์แกโนเจล (Haering และ Luisi, 1986) (I) ผู้เขียนจึงคาดว่าอาจเป็นเพราะที่ W_0 ต่ำ ทำให้ไมเซลส์มีขนาดเล็ก และน้ำมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการไฮเดรชันของเจลาติน เจลาตินจึงเป็นของแข็งแขวนลอยอยู่ในสารละลาย อย่างไรก็ตาม MBGs (II) จะสามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีการกระจายความสมดุลย์ของน้ำและสารลดแรงตึงผิวระหว่างหลอดของเจลาตินที่อุดมไปด้วยน้ำและหยดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน Atkinson (1991) พบว่าการกระจายตัวของน้ำใน MBGs ขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ระหว่างความต้องการน้ำในการเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชันของเจลาตินและความต้องการน้ำที่กลุ่มหัวซัลโฟเนตของ AOT

(3) ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจะมีผลต่อระบบไมโครอิมัลชัน ดังกล่าวไว้แล้วในส่วนทฤษฎี กล่าวคือเมื่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจำนวนไมเซลล์จะมากขึ้นทำให้ความสามารถในการละลายน้ำเข้าไปในวัฏภาคน้ำมันได้มากขึ้น จากรูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่า ที่ W_0 คงที่หนึ่งๆ ที่ความเข้มข้นของ AOT เท่ากับ 140 มิลลิโมลาร์ ช่วงของปริมาณเจลาตินที่ทำให้เกิดออร์แกโนเจลกว้างขึ้นกว่าที่ความเข้มข้นของ AOT เท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้ผู้เขียนคาดว่าเนื่องมาจากไมเซลล์จำนวนมากจะสามารถละลายเจลาตินได้ในปริมาณที่มากขึ้น

(4) อุณหภูมิ

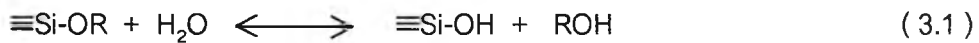
Quellet และคณะ (1991) พบว่า MBGs เป็นระบบที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ (thermal stability) ในช่วงที่จำกัดซึ่งถูกควบคุมด้วยความเสถียรของไมโครอิมัลชัน กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นของเจลาตินหนึ่งๆ ที่ไมโครอิมัลชันจะสามารถรับได้ จะมีขอบเขตของอุณหภูมิที่ทำให้ MBGs มีลักษณะเป็นเจลใสและโปร่งแสง ถ้าอุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่าขอบเขตนี้จะทำให้ระบบมีลักษณะที่ขุ่นและทึบแสง ซึ่งข้อจำกัดนี้ไม่พบในระบบของสารละลายเจลาตินในน้ำ นอกจากนี้การทำให้เจลเย็นลงอย่างรวดเร็วหลังจากให้ความร้อนโดยนำไปแช่ไว้ในน้ำเย็น (15-20 องศาเซลเซียส) และยังคงปั่นกวนจนกระทั่งเจลาตินจะทำให้ระบบเสถียรอยู่เป็นสัปดาห์ แต่ถ้าปล่อยให้เจลเย็นตัวลงอย่างช้าๆ เจลจะหดตัวอย่างช้าๆ และใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ออกมาเป็นปริมาณมากและเจลจะมีลักษณะขุ่น

3.2.3 การสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน

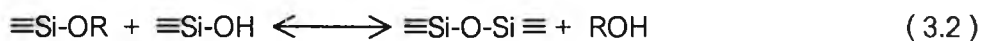
Ariagada และ Osseo-Asare (1995) ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตรโดยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเตตระเอทอกซีซิลาน (tetraethoxysilane, TEOS) ในรีเวอร์สไมโครอิมัลชันของโซเดียมบิส (2-เอทิล-เฮกซิล) ซัลโฟซักซิเนต (sodium bis (2-ethyl-hexyl) sulfosuccinate, AOT) / เดคเคน / แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ โดยอาศัยเทคนิคการวัด สเปกตรัมของฟลูออเรสเซนส์ (spectrofluorometric equipment and techniques) เพื่อบ่งลักษณะธรรมชาติของน้ำและสารละลายแอมโมเนียที่ถูกละลายอยู่ในไมเซลล์ ผลการทดลองในช่วงอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (W_0) 2 - 9.5 พบว่า W_0 มีผลต่อขนาดของไมเซลล์ในลักษณะที่แปรผันตรง กล่าวคือเมื่อ W_0 เพิ่มขึ้นขนาดของไมเซลล์ก็จะใหญ่ขึ้น (โดยที่กรด 1,3,6,8 ไพรเนเตตระซัลโฟนิค, เกลีสโซเดียม (PTS) ซึ่งเป็นสารที่ใช้วัดสเปกตรัมถูกขังอยู่ที่แกนกลางของอนุภาคน้ำที่

ถูกละลายอยู่ในไมเซลล์เนื่องจากเกิดการผลักดันระหว่างหมู่ซิลโฟเนทซึ่งมีประจุลบของสารที่ใช้วัดกับ AOT) ปฏิกริยาที่เกี่ยวข้องมีดังนี้ (Chang, C. และ Fogler, H.S.,1997)

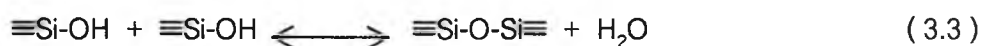
ไฮโดรไลซิส



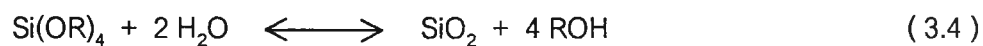
คอนเดนเซชันที่ผลิตอัลกอฮอล์



คอนเดนเซชันที่ผลิตน้ำ



ปฏิกริยารวม



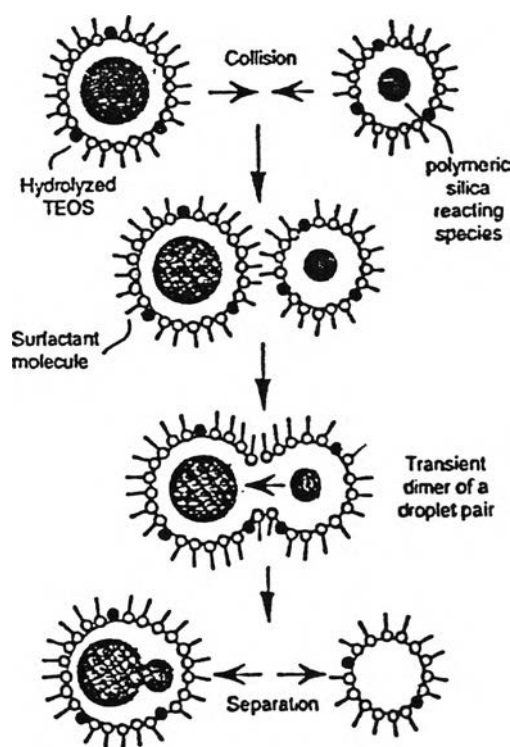
เมื่อ R เป็นหมู่ซิลคิล, $\text{C}_x\text{H}_{2x+1}$

ในกรณีของเตตระเอทอกซีซิลเลน (tetraethoxysilane, TEOS) R เป็น C_2H_5

งานวิจัยของ Arriagada และ Osseo-Asare ใช้ AOT ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบเพราะสามารถละลายน้ำได้ในปริมาณมากโดยไม่ต้องใช้สารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactants) โดยตัวแปรที่ใช้คือ ความเข้มข้นของ TEOS เท่ากับ 4.4 มิลลิโมลาร์ สารละลายแอมโมเนีย 13.9% โดยน้ำหนัก อัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อ TEOS (r) เป็น 18.5 ซึ่งเป็นปริมาณที่มากเกินไปสำหรับการเกิดปฏิกริยา และ อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว (W_0) ในช่วง 2 - 9.5 ผลการทดลองพบว่าที่ค่า W_0 น้อยกว่า 4 ไม่มีอนุภาคเกิดขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวอยู่ชิดกันแน่น โมเลกุลของน้ำถูกล้อมรอบด้วยส่วนที่มีหัวของสารลดแรงตึงผิวและไฮเดียมเคาน์เตอร์ไอออนทำให้ยับยั้งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของ TEOS เมื่อ W_0 เพิ่มขึ้นในช่วง 5 - 9.5 ทำให้ขนาดไมเซลล์ใหญ่ขึ้น ขนาดอนุภาคซิลิกาจึงใหญ่ขึ้นภายในเวลา 18 ชั่วโมง และขนาดอนุภาคสุดท้ายที่เวลา 815 ชั่วโมง มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานประมาณ 20% ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามค่า W_0 ที่เพิ่มขึ้นยกเว้นที่ $W_0 = 9.5$ พบว่าหลังจาก 10 ชั่วโมง ระบบแยกเป็น 2 วัฏภาคคือ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและสารละลายน้ำที่มีอยู่มากเกินไป และการกระจายของขนาดอนุภาคสุดท้ายเพิ่มขึ้น ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานประมาณ 25% แสดงว่าส่วนของสารละลายน้ำที่เกินส่งเสริมการเกิดนิวเคลียสไอเพิ่มขึ้นในระบบ

จากการกระจายของ Poisson (Poisson distribution) ของระบบในช่วง W_0 2-9.5 พบว่าไมเซลล์ส่วนมากสามารถที่จะเกิดอนุภาคซิลิกาขึ้นภายในไมเซลล์ได้ (intramellar process) (Arriagada และ Osseo-Asare, 1995) ซึ่งการที่จะเกิดนิวเคลียสของซิลิกาขึ้นได้นั้นจะต้องมี TEOS

อย่างน้อย 2 ไมโครเมตรอยู่ภายในไมเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดอนุภาคสุดท้ายที่ได้ใหญ่กว่าขนาดของไมเซลล์ประมาณ 5-10 เท่า แสดงว่าเกิดการแลกเปลี่ยนมวลสารกันระหว่างไมเซลล์ (intermicellar process) เกิดเป็นอนุภาคที่โตขึ้น ซึ่ง Chang, C. และ Fogler, H.S. (1997) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาโดยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ TEOS ในสารละลายไมโครอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ, น้ำในน้ำมัน และใช้สารละลายแอมโมเนียเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่าขนาดอนุภาคสุดท้ายที่ได้ใหญ่กว่าขนาดของไมเซลล์เช่นเดียวกัน เขาอธิบายกระบวนการนี้เป็นไปตามแผนภาพดังแสดงในรูปที่ 3.6 กล่าวคือ การเกิดอนุภาคซิลิกาในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ไม่ได้เกิดแต่โพลีเมอร์ไรเซชันของสารตั้งต้นที่เป็นโมโนเมอร์ แต่ยังเกิดโพลีเมอร์ไรเซชันของโพลีเมอร์ริสไปเป็นสปีชีส์ที่ใหญ่กว่า ซึ่งการที่จะทำให้เกิดช่องเปิดให้สปีชีส์ผ่านได้จะต้องมีการเปลี่ยนรูปของชั้นฟิล์มของสารลดแรงตึงผิว แต่เมื่ออนุภาคมีขนาดได้ระดับหนึ่งโพลีเมอร์ริสปีชีส์จะกลายเป็นนิวคลีโอไอซึ่งจะถูกแยกอยู่ในแต่ละหยดไมเซลล์ และจะไม่มีแลกเปลี่ยนระหว่างไมเซลล์อีกเพราะไม่สามารถที่จะทำให้ช่องเปิดมีขนาดใหญ่เพียงพอได้

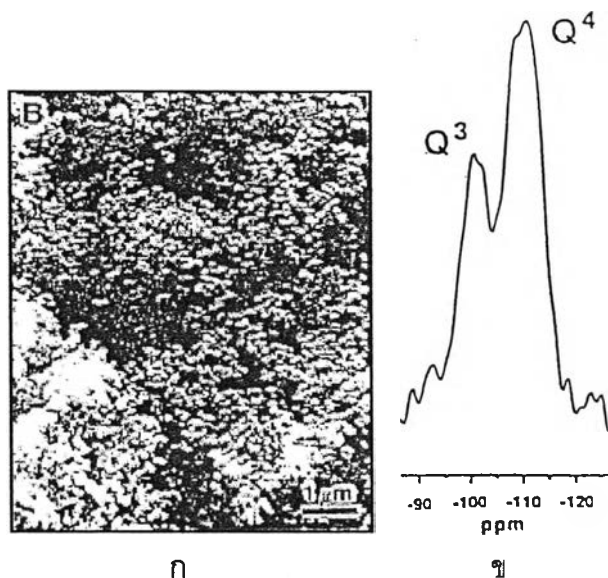


รูปที่ 3.6 การรวมตัวของอนุภาคซิลิกาที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วเคลื่อนผ่านไมเซลล์ การชนของไมเซลล์ทำให้เกิดช่องเปิดที่ทำให้อนุภาคซิลิกาที่เล็กกว่า เข้าไปรวมกับอนุภาคที่ใหญ่กว่า (Chang, C. และ Fogler, H.S., 1997)

หลังจากที่อนุภาคเกิดขึ้นเมื่อการกระจายตัวของไมเซลส์ไม่เสถียรก็จะเกิดการตกตะกอนแล้วเกิดเป็นเจลหลังจาก 1 วัน ความไม่เสถียรของระบบ AOT/ เดคเคน / แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ อาจเป็นผลเนื่องมาจากปัจจัยร่วม 2 ประการ ดังนี้คือ หนึ่ง, ไฮเดียมอิชอน (จากควอเตอร์เมียมไฮเดียมอิชอน) มีความเข้มข้นมากในไมเซลส์และที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำลง (เนื่องจากเมื่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้น ความเป็นกรด-ด่างจะต่ำลง) ไฮเดียมอิชอนอาจเกาะอยู่บนพื้นผิวของซิลิกาทำให้ประจุลบที่เหลือที่พื้นผิวต่ำลง แรงผลักจึงไม่เพียงพอต่อการห้ามอนุภาคทั้ง 2 เข้าหากันและอนุภาคเกิดการจับตัวเป็นก้อนขึ้น สอง, โมเลกุลของ AOT อาจเปลี่ยนรูปไประหว่างการสังเคราะห์เป็นผลทำให้ชั้นฟิล์มของ AOT ซึ่งมีหน้าที่ในการกระจายตัวของรีเวอร์ไมเซลส์ขาดเสถียรภาพ AOT อาจเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยเฉพาะเมื่อมีไฮดรอกซิลอิชอน จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอกซิเลตอิชอน (carboxylate ion) และ 2-เอทิลเฮกซานอล (2-ethylhexanol) ซึ่งเอทิลเฮกซานอลจะทำหน้าที่เสมือนเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมที่พื้นผิวไมเซลส์ที่ระหว่างวัฏภาคน้ำและน้ำมัน ทำให้ลดอัตราการแลกเปลี่ยนสารระหว่างไมเซลส์จึงเป็นการส่งเสริมการเกิดอนุภาคขึ้นภายในไมเซลส์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเวลาที่ใช้ในการทดลองนาน (หลายสัปดาห์) อาจทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ AOT เกิดขึ้นถึงจุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างมาก ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการรวมกลุ่มของอนุภาคดังกล่าวไว้แล้วข้างต้น

Watzke และ Dieschbourg (1994) ได้ศึกษาการสังเคราะห์เจลของซิลิกาโดยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ TMOS ในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันของระบบ AOT/ไฮโซออกเทน ที่มีส่วนประกอบดังนี้ AOT 250 มิลลิโมลาร์ในไฮโซออกเทน, $W_o = 30$, อัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อ TEOS (r) เท่ากับ 4 ในการศึกษาจะเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายน้ำที่อยู่ภายในไมเซลส์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ โดยในภาวะกรดใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ และภาวะที่เป็นกลางใช้น้ำบริสุทธิ์ พบว่า

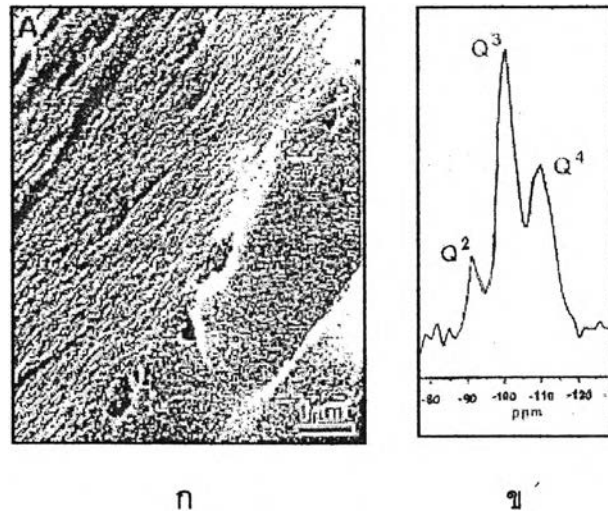
- ภาวะเป็นกลาง : เจลเกิดขึ้นหลังจาก 1 ชั่วโมง มีลักษณะขุ่นและเปราะแตกง่าย เจลเกิดจากการตกตะกอนของอนุภาคซิลิกาที่เกาะกลุ่มกัน ภาพถ่ายจาก SEM แสดงในรูปที่ 3.7 ก พื้นผิวของเจลประกอบด้วยโครงข่ายของอนุภาคเล็กๆ ของซิลิกาซึ่งเป็นโครงข่ายที่มีความพรุนสูง นอกจากนี้สเปกตรัมของ NMR ในรูปที่ 3.7 ข แสดง 2 พีก ได้แก่ Q^3 และ Q^4 (Q^n หมายถึงการแผ่ขยายของพันธะซิลิเซน ($-Si-O-Si-$) โดยที่ $n = 4$, $Q^4 = Si(OSi-)_4$, $n = 3$, $Q^3 = Si(OSi-)_3(OH)$ และ $n = 2$, $Q^2 = Si(OSi-)_2(OH)_2$) ที่ตำแหน่งประมาณ -100 และ -110 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับซึ่ง Q^4 มีสัดส่วนของพื้นที่ได้กราฟสูงแสดงว่าอนุภาคที่เกิดขึ้นเบื้องต้นเกิดขึ้นที่น้ำภายในไมเซลส์ อนุภาคคอลลอยด์มีลักษณะโครงสร้างที่แน่นและมีพันธะเชื่อมขวางสูงมาก (densified and highly crosslinked silica structure)



รูปที่ 3.7 เจลของซิลิกาจากระบบไมโครอิมัลชันของ AOT/ ไอโซออกเทน ภายใต้ภาวะที่เป็นกลาง (ก) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ข) สเปกตรัมของ MAS²⁹SiNMR (Watzke และ Dieschbourg, 1994)

- ภาวะเป็นกรด : สารละลายเกิดการแยกวัฏภาคเป็นวัฏภาคของไมโครอิมัลชันและวัฏภาคของกรดเมทานอลิก-ซิลิก (methanolic-silic acid) ซึ่งวัฏภาคนี้อาจเปลี่ยนสภาพเป็นเจลหลังจาก 1 วัน มีลักษณะเป็นแก้วโปร่งใส ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับเจลของซิลิกาที่เกิดขึ้นในระบบสารละลายน้ำวัฏภาคเดียว (homogeneous solution) ภาพถ่ายจาก SEM แสดงในรูปที่ 3.8 ก โครงสร้างของเจลมีความพรุนแต่ประกอบไปด้วยรูพรุนที่ละเอียด รูพรุนที่ใหญ่กว่าถูกเติมด้วยโครงสร้างที่มีขนาดเล็กกว่า นอกจากนี้สเปกตรัมของ NMR ในรูปที่ 3.8 ข ประกอบด้วย 3 พีค ได้แก่ Q², Q³ และ Q⁴ ซึ่ง Q² เพิ่มขึ้นจากในภาวะที่เป็นกลางของอนุภาคน้ำในไมโครอิมัลชัน ที่ตำแหน่งประมาณ -90 ส่วนในล้านส่วน และ Q³ มีสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟสูงที่สุดแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างเจลแตกต่างจากในภาวะที่เป็นกลางมาก

อย่างไรก็ตามจากสเปกตรัมของทั้งภาวะเป็นกรดและภาวะเป็นกลาง กระบวนการไฮล-เจลของซิลิกาที่เกิดขึ้นในไมโครอิมัลชันในเบื้องต้นจะเกิดเป็นอนุภาคคอลลอยด์ที่แน่น (dense colloidal particles) (Watzke และ Dieschbourg, 1994)



รูปที่ 3.8 เจลของซิลิกาจากระบบไมโครอิมัลชันของ AOT/ ไอโซออกเทน ภายใต้ภาวะที่เป็นกรด
 (ก) ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ข) สเปกตรัมของ MAS²⁹SiNMR
 (Watzke และ Dieschbourg,1994)

3.2.4 วัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต

Watzke และ Dieschbourg (1994) ได้เสนอผลงานการสังเคราะห์วัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตซึ่งเป็นวัสดุชนิดใหม่ที่เตรียมจากกระบวนการโซล-เจลของซิลิกอนอัลคอกไซด์ในไมโครอิมัลชัน-เบสท์ออร์แกโนเจล พวกเขาพบว่าวัสดุชนิดนี้มีสมบัติที่ดีและมีความพรุนสูงซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นเยื่อแผ่นสำหรับการเกิดปฏิกิริยา (reactive membrane) ตารางที่ 3.1 แสดงการเปรียบเทียบสมบัติของไมโครอิมัลชัน-เบสท์ออร์แกโนเจลและซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบสมบัติของไมโครอิมัลชัน-เบสท์ออร์แกโนเจลและซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต

ไมโครอิมัลชัน-เบสท์ออร์แกโนเจล	ซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิต
-เจลมีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส	-เจลมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 600 องศาเซลเซียส
-เมื่อแช่เจลให้อยู่ในระบบที่มีน้ำมากเจลจะบวม น้ำแล้วแตกตัวออก	-มีความเสถียรเมื่อถูกแช่น้ำ
-มีความเสถียรต่อตัวทำละลายอัลเคนที่มีโซยาว เช่น ออกเทน, ไอโซออกเทน, n-เฮปเทน, ไซโคลเฮกเซน และ n-เฮกเซน เป็นต้น	-มีความเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น อะซิโตน, เมทานอล, เอทานอล, ไซโคลเฮกเซน, ไอโซออกเทน และไดคลอโรมีเทน แต่เมื่อถูกแช่ในคลอโรฟอร์มจะบวมตัวและมีความโปร่งใสอย่างเห็นได้ชัด
-ความแข็งแรงขึ้นอยู่กับปริมาณเจลลาตินในระบบ	-มีความเสถียรเชิงกลมากกว่าไมโครอิมัลชัน-เบสท์ออร์แกโนเจล

นอกจากนี้ Watzke และ Dieschbourg ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อสมบัติของวัสดุซิลิกา-เจลลาตินนาโนคอมโพสิตซึ่งได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณเจลลาติน ดังต่อไปนี้

(1) อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

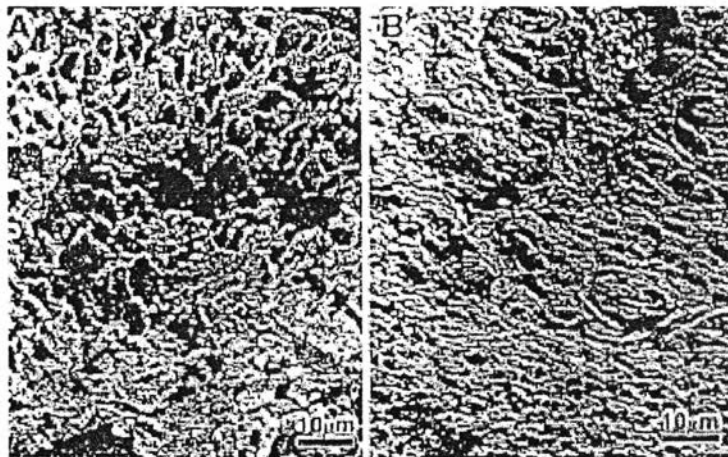
Watzke และ Dieschbourg (1994) ได้ศึกษาการสังเคราะห์วัสดุประกอบของ ซิลิกา-เจลลาดินโดยการเกิดกระบวนการโซล-เจลของ TMOS ใน MBGs ที่มีส่วนผสมดังนี้ AOT 250 มิลลิโมลาร์ในไอโซออกเทน, $W_0 = 30$, เจลาติน 1.7 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ $r = 4$ ซึ่งค่า r นี้จะไม่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาคขณะที่มีการเกิดเจล ในการศึกษาจะเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของอนุภาคน้ำในไมโครอิมัลชันที่ใช้ในการสังเคราะห์ โดยในภาวะกรดใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ และภาวะกลางใช้น้ำบริสุทธิ์ จาก SEM พบว่า

- ภาวะเป็นกลาง : วัสดุซิลิกา-เจลลาดินนาโนคอมโพสิตที่เกิดขึ้นมีโครงสร้างที่พรุน ผ่องฟูหนา ฐเป็นทรงกระบอกคล้ายรังผึ้ง รูที่ใหญ่จะเห็นความไม่กลมกลืนกันของกลุ่มก้อนซิลิกาอนุภาคเล็กๆ รวมกลุ่มกันเป็นโครงสร้างที่แน่น (dense body) การกระจายของขนาดรูพรุนกว้าง (รูปที่ 3.9 ก) นอกจากนี้ สเปกตรัมจากเทคนิค MAS²⁹Si NMR ประกอบด้วย 2 พีค ได้แก่ Q³ และ Q⁴ ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่เกิดในระบบไมโครอิมัลชันในหัวข้อ 3.2.3 (ไม่แสดงภาพ) แสดงว่าอนุภาคที่เกิดขึ้นมีลักษณะเดียวกัน

- ภาวะเป็นกรด : ภาวะนี้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดเร็วและปฏิกิริยาคอนเดนเซชันเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของกรดซิลิกที่เกิดขึ้นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเต็มที่ เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จึงมีเมทานอลเกิดขึ้นมากซึ่งจะไปห้ามการแข็งตัวของออร์แกนเจลหลังจากที่เย็นแล้ว จาก SEM (รูปที่ 3.9 ข) จะสังเกตเห็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใยทำให้เกิดโครงข่ายที่มีความพรุนสูง เส้นใยเกิดจากอนุภาคเล็กๆ มาเกาะกัน การกระจายของขนาดรูพรุนกว้าง

- ภาวะที่เป็นเบสยังไม่พบแหล่งอ้างอิงหรือนักวิจัยกลุ่มใดที่ทำการศึกษา

อย่างไรก็ตามจากสเปกตรัมของทั้งภาวะเป็นกรดและภาวะเป็นกลาง กระบวนการโซล-เจลของซิลิกาที่เกิดขึ้นในไมโครอิมัลชัน-เบสต่อออร์แกนเจลในเบื้องต้นจะเกิดเป็นอนุภาคคอลลอยด์ที่แน่น (dense colloidal particles) (Watzke และ Dieschbourg, 1994)



ก

ข

รูปที่ 3.9 วัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ก) ภายใต้ภาวะที่เป็นกลาง (ข) ภายใต้ภาวะที่เป็นกรด (Watzke และ Dieschbourg,1994)

(2) อิทธิพลของปริมาณเจลาติน

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนพื้นฐานที่สามารถเกิดพันธะโคเวเลนต์กับซิลิกา ซึ่ง Watzke และ Dieschbourg (1994) ยังได้ศึกษาอิทธิพลของปริมาณเจลาตินต่อวัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิต ในระบบเดียวกันกับหัวข้อ(1) ในภาวะกรดพบว่าปริมาณเจลาตินที่ใช้มีผลต่อการแยกวัฏภาค กล่าวคือปริมาณเจลาตินที่น้อยกว่า 0.1 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โครงสร้างที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นแก้วโปร่งใส (transparent glass body) และปริมาณเจลาตินในช่วงระหว่าง 0.1 ถึง 0.7 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระบบเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ถึง 3 วัฏภาคเมื่อปริมาณเจลาตินมากกว่า 0.7 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ไม่เกิดการแยกวัฏภาคขณะที่เกิดเจล

3.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ตริงรูป

3.3.1 ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน

ปฏิกิริยาชีวเคมีซึ่งมีเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้ภายในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันหรือรีเวอร์สไมเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจะถูกละลายในส่วนของน้ำที่อยู่ภายในไมเซลล์ซึ่งจะป้องกันการสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์โดยตรงด้วยชั้นของสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นภายในไมเซลล์จะเป็นเสมือนเครื่องปฏิกรณ์ขนาดจิ๋วสำหรับการเกิดปฏิกิริยาเคมี (micro-reactor) ประโยชน์ของการตรึงเอนไซม์ด้วยรีเวอร์สไมเซลล์คือ หนึ่ง, ระบบรีเวอร์สไมเซลล์มีความสามารถในการทำละลายโมเลกุลต่างๆ ได้หลากหลายเพราะระบบประกอบไปด้วย 3 ส่วนคือ ภูมิภาคต่อเนื่องของน้ำมัน, ชั้นโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว และหยดน้ำขนาดจิ๋วที่อยู่ภายในไมเซลล์ (microdroplets) จึงใช้ในการแก้ปัญหาในกรณีที่สารตั้งต้นมีความสามารถในการละลายต่ำเมื่อถูกใช้ในระบบของสารละลายน้ำและยังสามารถแก้ปัญหาการยับยั้งปฏิกิริยาอันเนื่องมาจากสารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการเลือกใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลายสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ได้ดี ทำให้ในส่วนของน้ำมีความเข้มข้นต่ำกว่าที่จะทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาได้ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นต่ำจะแพร่ไปสู่ภูมิภาคน้ำมันจึงเป็นการดึงสมดุลของปฏิกิริยาช่วยทำให้การเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ขึ้น สอง, การตรึงเอนไซม์ในรีเวอร์สไมเซลล์เป็นเสมือนการเลียนแบบธรรมชาติของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ทำให้สิ่งแวดล้อมของเอนไซม์เหมาะสมต่อการใช้งานและสามารถรักษาสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาได้นาน (Martinek และคณะ, 1981, 1982 และ Pileni และคณะ, 1985) ประการสุดท้าย, อนุภาคทรงกลมเล็กๆ ของน้ำภายในรีเวอร์สไมเซลล์ทำให้มีพื้นที่การถ่ายเทมวลสารที่สูงมากประมาณ 10,000 เท่าของระบบของเหลว 2 ภูมิภาค (liquid 2 phase) (Brinks, 1993) สารตั้งต้นสามารถเข้าทำปฏิกิริยาภายในไมเซลล์โดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ไมเซลล์ยังมีความยืดหยุ่น, ความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ และลักษณะของระบบที่มีความต้านทานต่ำในการถ่ายเทมวลของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ รีเวอร์สไมเซลล์จึงเป็นระบบหนึ่งที่นักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจ

ถึงแม้ว่าระบบรีเวอร์สไมเซลล์จะมีประโยชน์ต่างๆ ดังที่กล่าวมาแต่ในทางปฏิบัติพบว่า มีปัญหาในการขยายขนาดของกระบวนการ (scale-up) และในแง่ของการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อันเนื่องมาจากสารลดแรงตึงผิวทำให้ต้องอาศัยกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ที่ซับซ้อน การใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นต่ำส่งผลให้การเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ถ้าต้องการผลิตภัณฑ์สูงจะต้องใช้ถึงปฏิกรณ์ที่มีขนาดใหญ่ และหากใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้ระบบไม่เสถียรส่งผลให้เกิดการแยกภูมิภาคในที่สุด ในส่วนของการแยกสารผลิตภัณฑ์ได้มีความพยายามในการปรับปรุงวิธีการ

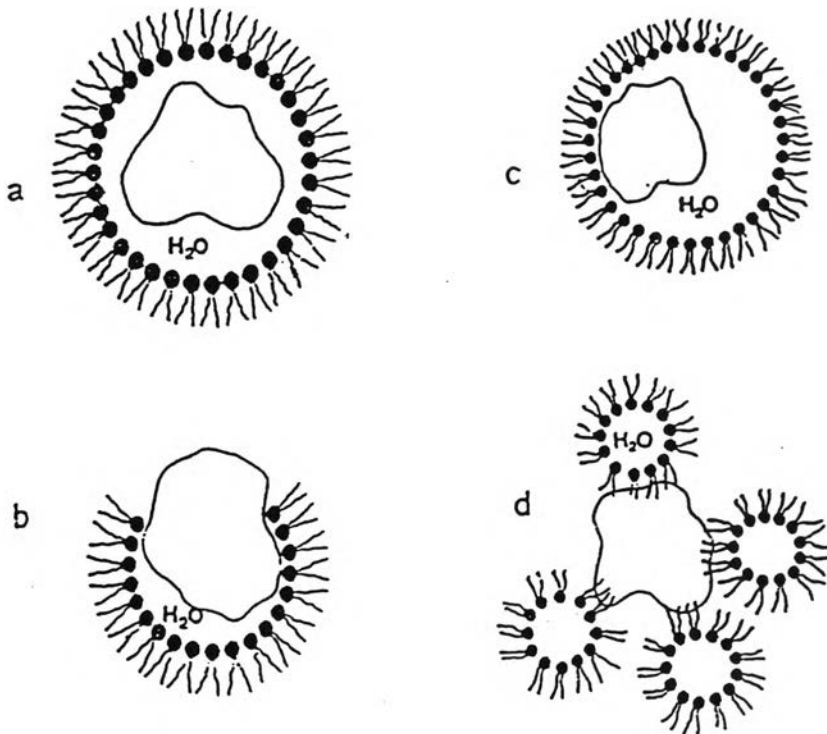
(Chang และคณะ, 1991, Chiang และTsai, 1992, และ Prazeres และคณะ, 1993) วิธีการหนึ่งก็คือทำให้เกิดการแยกวัฏภาคด้วยการเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งวิธีการนี้จะส่งผลให้เกิดการเจือปนของสารลดแรงตึงผิวปนมากับผลิตภัณฑ์นอกจากนี้อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมจะมีผลทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพหรือลดสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาได้ นอกจากการใช้อุณหภูมิแล้วได้มีการทดลองนำเอาเครื่องปฏิกรณ์เยื่อแผ่นเซรามิกส์ชนิดอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration ceramic membrane bioreactor) (Prazeres และคณะ, 1993), ระบบไดอะไลซิส (dialysis system) (Chiang และTsai, 1992) มาใช้ในการแยกผลิตภัณฑ์ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ทำให้เกิดความยุ่งยากและอาจนำไปสู่ต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น

3.3.1.1 การตรึงเอนไซม์ในรีเวอร์สไมเซลล์

ระบบรีเวอร์สไมเซลล์ที่เหมาะสมสามารถเกิดขึ้นได้หากมีการเลือกสารลดแรงตึงผิวและตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างเหมาะสม สารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้กันมากในการตรึงเอนไซม์ ได้แก่ โซเดียมได-2-เอทิลเฮกซิลซัลโฟซัคซิเนต (sodium di-2-ethylhexylsulfosuccinate, AOT) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบ (Steinman และคณะ, 1986, Hochkoepler และPalmieri, 1992, Skagerlind และคณะ, 1992, Valis และXenakis, 1992, Borzeix และคณะ, 1992, Hedstrom และคณะ, 1992, Rao และคณะ, 1993 และ Sebastiao และคณะ, 1993) และ ซิติลไตรออกทิลแอมโมเนียมโบรมไนด์ (cetyltriocetylammmoniumbromide, CTAB) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุบวก (Steinmann และคณะ, 1986) เป็นต้น ในบางกรณีมีการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactant) ซึ่งมักจะเป็นอัลกอฮอล์ชนิดโซ่ขนาดกลางเพื่อให้ระบบมีความเสถียร สำหรับการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์มีหลักในการพิจารณา 3 ประการคือ เลือกตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำและไม่ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพเสียสภาพธรรมชาติ, ตัวทำละลายสามารถทำการกระจายสารลดแรงตึงผิวได้ง่าย และประการสุดท้าย, ตัวทำละลายยอมให้สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์แพร่ผ่านแยกไปยังวัฏภาคที่ชอบระหว่างวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำ

หลังจากการเลือกระบบไมโครอิมัลชันแล้วการตรึงเอนไซม์สามารถทำได้โดยใช้วิธีฉีดสารละลายเอนไซม์เพียง 2-3 ไมโครลิตรลงไปในระบบของสารละลายไฮโดรคาร์บอนและสารลดแรงตึงผิว จากนั้นปั่นกวอย่างรุนแรงสารละลายทั้งหมดจะมีลักษณะโปร่งใสและมีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ Luisi (1985) ใช้วิธีการตรึงดังกล่าวพบว่าสารละลายของโปรตีนในระบบไมโครอิมัลชัน AOT / ไฮโซออกเทน มีความเสถียรในช่วง W_0 5-10 ($W_0 = \frac{[น้ำ]}{[สารลดแรงตึงผิว]}$) ที่อุณหภูมิห้อง Luisi และคณะ (1985) ได้เสนอแบบจำลองเมื่อโปรตีนถูกตรึงอยู่ภายในรีเวอร์สไมเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 3.10 ซึ่งจากข้อมูลส่วนใหญ่พวกเขาพบว่าสำหรับโปรตีนที่ชอบน้ำน่าจะมีลักษณะเช่นเดียวกับ

แบบจำลองวงแหวนของน้ำ (water-shell model) ซึ่งโปรตีนจะถูกขังอยู่กลางหยดน้ำขนาดเล็กภายในไมเซลล์ ชั้นของน้ำและสารลดแรงตึงผิวเป็นเสมือนด่านที่ป้องกันการสัมผัสของโปรตีนกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่อยู่ภายนอก จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำในระบบ (W_0) หรือปริมาณน้ำที่อยู่รอบๆ ตัวมัน ในบางกรณีพฤติกรรมและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในรีเวอร์สไมเซลล์พบว่าเหมือนกันกับในระบบสารละลายน้ำ (Wolf และ Luisi, 1979, Bonner และคณะ, 1980, Meier และ Luisi, 1980, Grandi และคณะ, 1981 และ Martinek และคณะ, 1981) ตัวอย่างเช่น อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในตับม้า (alcohol dehydrogenase), โรโบนิวคลีเอส (ribonuclease), และไลโปซิจีเนส (lipoxygenase) (Wolf และ Luisi, 1979, Meier และ Luisi, 1980)



รูปที่ 3.10 แบบจำลองสำหรับโปรตีนที่ถูกตรึงอยู่ภายในรีเวอร์สไมเซลล์ (ก) แบบจำลองวงแหวนของน้ำ (water-shell model) (ข) โปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำมันมากจึงสัมผัสโดยตรงกับส่วนของไฮโดรคาร์บอน (ค) โปรตีนถูกดูดซับไว้ที่ส่วนผนังด้านในของไมเซลล์ (ง) โปรตีนถูกละลายด้วยไมเซลล์เล็กๆ จำนวนหนึ่งซึ่งส่วนหางของสารลดแรงตึงผิวเกิดแรงยึดกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน (Luisi, 1985)

ขนาดของรีเวอร์สไมเซลส์เมื่อตริงเอนไซม์ไว้ภายในยังไม่เป็นที่เข้าใจกันอย่างชัดเจน Bonner และคณะ (1980) เสนอว่าเป็นผลรวมปริมาตรของโปรตีนและปริมาตรของน้ำภายในไมเซลส์ที่ไม่มีเอนไซม์อยู่ เนื่องจากข้อมูลจากการทดลองของพวกเขาพบว่าขนาดของรีเวอร์สไมเซลส์เมื่อตริงเอนไซม์ไว้ภายในมีขนาดใหญ่มากกว่าที่ไม่ได้ตริง Levashov และคณะ (1982) เสนอแบบจำลองเป็น 2 ช่วงของค่า W_0 ที่ W_0 ต่ำ เส้นผ่านศูนย์กลางภายในไมเซลส์สั้นกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ดังนั้นจะเกิดไมเซลส์ใหม่รอบๆ เอนไซม์ ปริมาตรของไมเซลส์ใหม่นี้จะประมาณเท่ากับเอนไซม์ที่ถูกละลาย ที่ W_0 สูง ปริมาณน้ำมากทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางภายในไมเซลส์ยาวกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ถือว่ารีเวอร์สไมเซลส์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ขึ้นอยู่กับการละลายของเอนไซม์ สมมติฐานนี้อาศัยข้อมูลสนับสนุนจากการทดลองที่ใช้ ^{13}C NMR (Nuclear Magnetic Resonance) ในระบบของ α -ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin) ใน AOT รีเวอร์สไมเซลส์ได้ผลเช่นเดียวกับ Shapiro และคณะ, 1989 นอกจากนี้ Fletcher และคณะ (1984) ใช้เทคนิค SANS (Small Angle Neutron Scattering) ศึกษาการละลายของ α -ไคโมทริปซินใน AOT รีเวอร์สไมเซลส์ได้ผลสอดคล้องกับแบบจำลองของ Levashov ซึ่งสรุปว่ารูปร่างของรีเวอร์สไมเซลส์ไม่ถูกรบกวนจากการละลายของโปรตีน ในทางตรงกันข้าม Pileni และคณะ (1985) ได้ศึกษาโดยอาศัยเทคนิค SAXS (Small Angle X-ray Scattering) พบว่าการเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของไมเซลส์ขึ้นอยู่กับการละลายของ α -ไคโมทริปซิน จะเห็นได้ว่าได้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันขณะที่ใช้เอนไซม์ชนิดเดียวกันในการทดลอง ซึ่งเป็นเพราะเทคนิคที่ใช้ในการทดลองที่แตกต่างกันนั่นเองจากการทดลองดังกล่าวจึงทำให้ไม่สามารถสรุปถึงอิทธิพลของความสามารถในการละลายของโปรตีนที่มีต่อขนาดไมเซลส์ได้

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ตริงรูปในรีเวอร์สไมเซลส์สามารถเกิดขึ้นได้ 2 กลไกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับการรวมตัวของสารตั้งต้นว่ามีหัวหรือไม่มีหัว สารตั้งต้นที่มีหัวจะสามารถละลายในส่วนของน้ำที่อยู่ภายในไมเซลส์ได้ ปฏิกิริยาเริ่มต้นจากการชนกันระหว่างไมเซลส์ส่งผลให้ชั้นของสารลดแรงตึงผิวเปิดออกและเกิดการเชื่อมต่อกันระหว่างไมเซลส์ชั่วคราวระยะเวลานึง (a transient reverse micelle dimer) ภายในจะเกิดการผสมกันระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนน้ำของแต่ละไมเซลส์เดิมและการแลกเปลี่ยนสารระหว่างไมเซลส์เกิดขึ้นโดยอาศัยการแพร่ กลไกที่เกิดขึ้นเรียกว่า "กระบวนการคอลลิชัน-ฟิวชัน-ฟิชชัน (a collision-fusion-fission process)" (Fletcher และคณะ, 1987) ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาภายในไมเซลส์หลังจากนั้นไมเซลส์ก็จะแยกตัวออกจากกัน ประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์เป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Verhaert และคณะ, 1990) Bru และ Garcia-Carmona (1991) กล่าวว่าอัตราการแลกเปลี่ยนระหว่างไมเซลส์นี้ขึ้นอยู่กับการขนาดของตัวถูกละลาย สำหรับสารตั้งต้นที่ไม่มีหัวส่วนมากจะละลายอยู่ในวัฏภาคของตัวทำละลายอินทรีย์ ด้วยเหตุนี้ปฏิกิริยาที่เกิดจากการใช้สารตั้งต้นใน

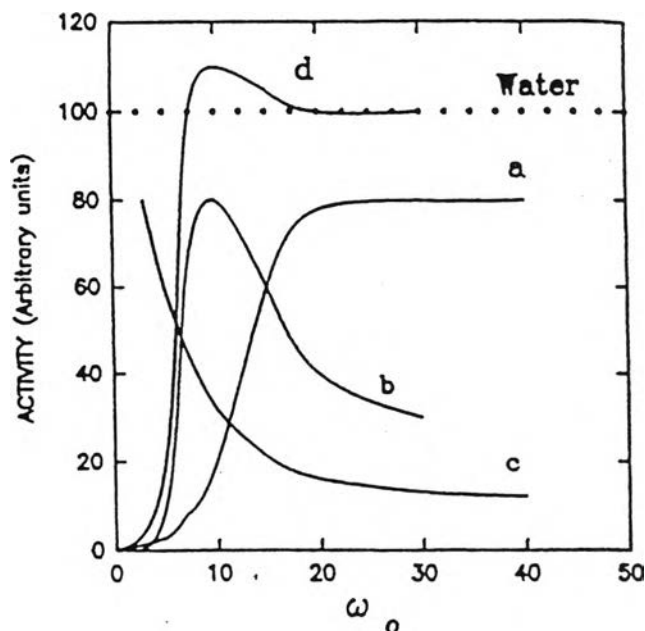
รีเวอร์สไมเซลล์ต้องพิจารณาถึงการกระจายตัว(partition)ของสารตั้งต้นระหว่างวัฏภาคน้ำมัน, ที่พื้นผิวระหว่างวัฏ-ภาค และในส่วนของวัฏภาคสารละลายน้ำ การแลกเปลี่ยนของโมเลกุลสารตั้งต้นที่ไม่มีขั้วระหว่างไมเซลล์เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ การถ่ายเทมวลของสารตั้งต้นจากวัฏภาคน้ำมันไปอยู่ในวัฏ-ภาคสารละลายน้ำที่เป็นเช่นนี้เพราะความน่าจะเป็นในการแลกเปลี่ยนระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่อยู่ภายในแต่ละไมเซลล์มีค่าต่ำ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าส่วนประกอบของระบบรีเวอร์สไมเซลล์ซึ่งได้แก่ วัฏภาคน้ำมัน, พื้นผิวระหว่างวัฏภาค และในส่วนของวัฏภาคสารละลายน้ำภายในไมเซลล์เป็นปัจจัยที่กำหนดการถ่ายเทมวลของสารตั้งต้นเข้าไปในส่วนวัฏภาคสารละลายน้ำภายในไมเซลล์

3.3.1.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์

(1) W_0

W_0 แปรผันตรงกับขนาดของรีเวอร์สไมเซลล์จึงถูกใช้เป็นตัวกำหนดสิ่งแวดล้อมขนาดเล็กของเอนไซม์ภายในรีเวอร์สไมเซลล์ Eggers และBlanch (1988) พบว่า W_0 ประมาณ 20 เหมาะสมสำหรับแอกทิวิตีของทริปโตเฟนเนส (tryptophanase) ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ที่พบโดยทั่วไปจะมีแอกทิวิตีที่เหมาะสมเมื่อใช้ W_0 ประมาณ 10 นั่นเป็นเพราะว่าทริปโตเฟนเนสเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลถึง 220 กิโลดัลตัน แต่เอนไซม์ส่วนมากที่มีแอกทิวิตีที่เหมาะสมเมื่อใช้ W_0 ประมาณ 10 มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 50 กิโลดัลตันเท่านั้น จะเห็นได้ว่าเพื่อให้ได้สิ่งแวดล้อมเช่นเดียวกับเอนไซม์ขนาดเล็ก การตรึงเอนไซม์ที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าต้องการไมเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น น้ำที่ละลายอยู่ในรีเวอร์สไมเซลล์จะเกิดปฏิกิริยาไฮเดรชันกับส่วนหัวที่ชอบน้ำ(hydrophilic group) ของสารลดแรงตึงผิวจึงจับกันแน่นทำให้น้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระเหมือนกับในระบบน้ำปริมาณมาก (bulk water) ดังนั้นน้ำที่เกินจากการไฮเดรชันก็จะไม่ถูกยึดไว้แน่น Wong และคณะ (1977) พบว่าเมื่อน้ำภายในไมเซลล์เพิ่มขึ้น สมบัติของน้ำจะใกล้เคียงกับในระบบน้ำปริมาณมาก อิทธิพลของ W_0 ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ในรีเวอร์สไมเซลล์สรุปไว้ในรูปที่ 3.11 (Sanchez-Ferrer และ Garcia-Carmona, 1994) (a) กราฟแสดงความอิมิตัว กล่าวคือเอนไซม์ต้องการน้ำโมเลกุลอิสระเพื่อที่จะทำให้ได้แอกทิวิตีสูงสุด หลังจากที่ W_0 เพิ่มขึ้นจนกระทั่งแอกทิวิตีสูงสุดแล้วการเพิ่มขึ้นของ W_0 จะไม่มีอิทธิพลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ (Bru และคณะ, 1990) (b) กราฟลักษณะระฆังคว่ำแสดงถึงขนาดของไมเซลล์ที่มีความเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่น่าจะสอดคล้องกับขนาดของเอนไซม์ (Klyachko และคณะ, 1986) (c) แสดงแอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลงขณะที่ W_0 เพิ่มขึ้น ปฏิกิริยานี้ น่าจะเกิดจากสมมติฐานที่โปรตีนมีความยืดหยุ่นลดลง ยอมให้เร่งปฏิกิริยาได้มากที่สุดที่ W_0 ต่ำ (Luisi และคณะ, 1988) (d) แสดงซูเปอร์แอกทิวิตี (superactivity) พบว่าค่าคงที่ของการเร่งปฏิกิริยา (k_{cat}) สูงกว่า

ในระบบสารละลายน้ำ ภาวะนี้เกิดขึ้นกับเอนไซม์บางตัว ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมากนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างของน้ำหรือเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ในไมเซลล์มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา (Garcia-Carmona และคณะ, 1992)



รูปที่ 3.11 อิทธิพลของขนาดไมเซลล์ (W_0) ต่อแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ในรีเวอร์สไมเซลล์ (a) กราฟแสดงความอิ่มตัว (b) กราฟลักษณะระฆังคว่ำ (c) แสดงแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ลดลงขณะที่ W_0 เพิ่มขึ้น และ (d) แสดงซูเปอร์แอกทิวิตี้ (superactivity) (Sanchez-Ferrer และ Garcia-Carmona, 1994)

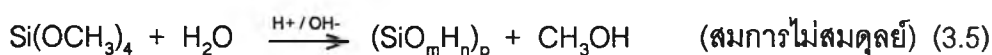
(2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-value)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำภายในไมเซลล์มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แสดงถึงคุณลักษณะทางกายภาพของรีเวอร์สไมเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของน้ำภายในไมเซลล์มักจะไม่เท่ากับในระบบสารละลายน้ำสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด โดยทั่วไปพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจะเคลื่อนไปจากระบบสารละลายน้ำ 1-3 หน่วย (ที่ปริมาณน้ำต่ำ) สำหรับไคโมทริปซิน (chymotrysin) (Menger และ Yamada, 1979, Barbaric และ Luisi, 1981) ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) (Wolf และ Luisi, 1979) และไลโซไซม์ (lysozyme) (Grandi และคณะ, 1981) ปรากฏการณ์นี้น่าจะเกิดจากความแตกต่างของภาวะทางกายภาพของน้ำในรีเวอร์สไมเซลล์ และในระบบสารละลายน้ำ อย่างไรก็ตามพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำภายในไมเซลล์ในบาง

ระบบไม่แตกต่างจากในระบบสารละลายน้ำมากนักเช่น Smith และLuisi (1980) พบว่าในระบบ AOT ในไอโซออกเทนมีความแตกต่างน้อยกว่า 0.4 หน่วยเท่านั้น และสำหรับระบบ Triton X-100 (เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ) ในไซโคลเฮกเซนพบว่ามีค่าแตกต่างน้อยกว่า 0.2 หน่วยเท่านั้น (Balasubramanian, 1981)

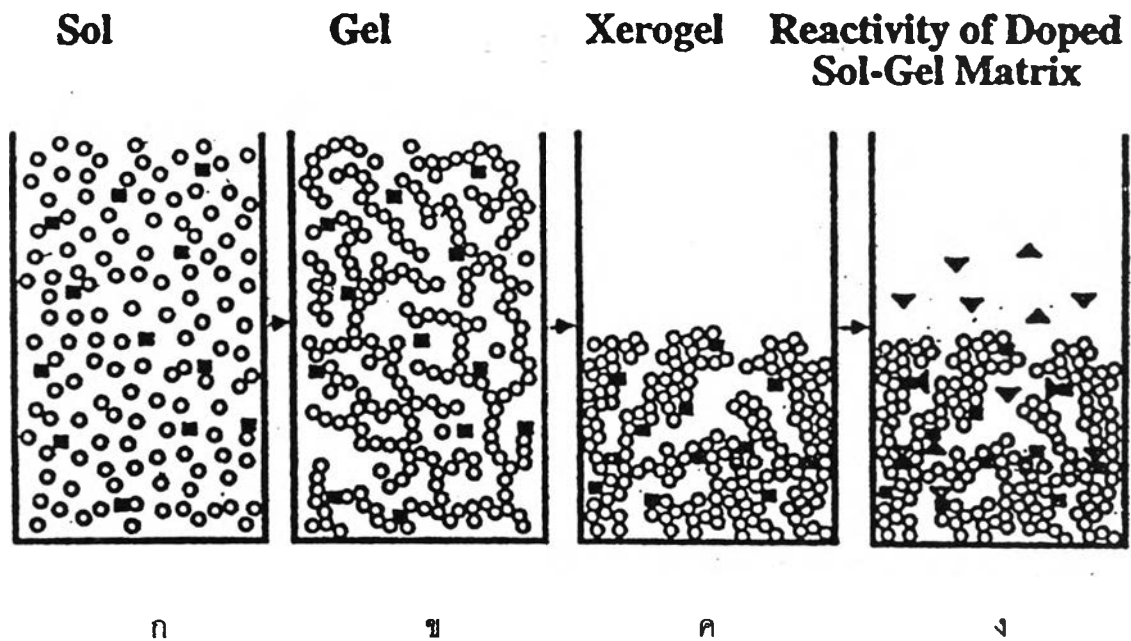
3.3.2 เอนไซม์ตรึงรูปในวัสดุซิล-เจล(sol-gel materials)

การศึกษาความเป็นไปได้ในการตรึงโมเลกุลของสารชีวภาพไว้ในวัสดุซิล-เจลในเบื้องต้นนักวิจัยหลายท่าน (Avnir และคณะ, 1984, 1985 และ Tani และคณะ, 1985) พบว่ามีความเป็นไปได้ดังนี้ หนึ่ง, โมเลกุลส่วนมากสามารถถูกตรึงไว้ในเมตริกซ์ของวัสดุซิล-เจล สอง, โมเลกุลที่ถูกตรึงสามารถรักษาสสมบัติทางกายภาพส่วนใหญ่ไว้ได้ และสาม, โมเลกุลที่ถูกตรึงสามารถรักษาสสมบัติทางเคมีส่วนใหญ่ไว้ได้ ในเบื้องต้นนิยมศึกษากระบวนการซิล-เจลเพื่อสังเคราะห์ซิลิกา (SiO_2) ซึ่งซิลิกาที่มีความพรุนสูงสามารถเตรียมได้จากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและคอนเดนเซชันของเมทอกไซด์ของซิลิกอน (TMOS) ดังแสดงในสมการที่ 3.5 นอกจากนี้สามารถเตรียมได้จาก อัลคอกไซด์, แอร์ลออกไซด์, เอซิลออกไซด์, สารประกอบ Si-N และ Si-C เป็นต้น



จากสมการที่ 3.5 m, n และ p ขึ้นอยู่กับปัจจัยซึ่งได้แก่ อัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อซิลเลน (ค่า r), ความเข้มข้นของกรดหรือด่าง, อัลคอกไซด์, อุณหภูมิ เป็นต้นดังได้กล่าวไว้แล้วในส่วนทฤษฎี โดยทั่วไป $(\text{SiO}_m\text{H}_n)_p$ เป็นวัสดุที่มีความพรุนสูง ที่ค่า m และ n มีค่าน้อยที่สุดตามทฤษฎีผลิตภัณฑ์มีสูตรโมเลกุลเป็น SiO_2 ซึ่งเป็นซิลิกาที่ไม่มีความพรุนแต่โดยทั่วไปแล้วมักจะไม่มีเกิดขึ้น

การตรึงเอนไซม์ในวัสดุซิล-เจลที่สังเคราะห์ขึ้นในสารละลายน้ำ สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 3.12 (Avnir, 1995) เริ่มต้นจากการเตรียมสารผสมระหว่างโมเลกุลของสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (เช่น TMOS) ปนอยู่กับเอนไซม์ที่ต้องการตรึงรูป ผลิตภัณฑ์เบื้องต้นที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นซิล(รูปที่ 3.12 ก), เมื่อปล่อยให้แห้งทำให้เกิดปฏิกิริยานานขึ้นซิลจะรวมตัวกันเป็นเจล(รูปที่ 3.12 ข) หลังจากทีเจลถูกปล่อยให้ระเหยแห้ง จะหดตัวลงและเปลี่ยนรูปเป็นซีโรเจล (xerogel) ที่มีความพรุนและมีเอนไซม์ถูกตรึงอยู่ภายใน รูพรุนมีขนาดเล็กทำให้เมตริกซ์มีลักษณะโปร่งใส(รูปที่ 3.12 ค) โมเลกุลภายนอกสามารถแพร่ผ่านรูพรุนเพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตรึงรูปได้(รูปที่ 3.12 ง)



รูปที่ 3.12 กระบวนการตรึงเอนไซม์ (ก) โซลของอนุภาคออกไซด์ของสารอนินทรีย์ (o) ปนอยู่กับเอนไซม์(■) (ข) โซลจะรวมตัวกันเป็นเจล (ค) เจลแห้งจะหดตัวลงและเปลี่ยนรูปเป็นซีโรเจล (xerogel) และมีเอนไซม์ (■) ถูกตรึงอยู่ภายใน (ง) โมเลกุลภายนอก (▲) สามารถแพร่ผ่านรูพรุนเพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตรึงรูปได้ (Avnir, 1995)

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่ากระบวนการโซล-เจลเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างรุนแรง การนำมาใช้งานควรพิจารณาและปรับปรุงให้เหมาะสมต่อชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ เพราะว่าอัลคอกไซด์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสามารถทำปฏิกิริยาที่พื้นผิวของเอนไซม์และบริเวณเร่งปฏิกิริยาได้(active site), ขณะที่เจลมีการหดตัว ความดันที่ถูกสร้างขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อโปรตีน, การปล่อยอัลกอฮอล์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอาจเป็นผลให้พื้นผิวของเอนไซม์และบริเวณเร่งปฏิกิริยาเสียหายไปได้ และประการสุดท้าย, บริเวณเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนที่ถูกตรึงต้องอยู่ที่บริเวณรูพรุนของเมตริกซ์ที่ใช้ตรึง

3.3.2.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอดฮีซีฟของเอนไซม์

(1) อิทธิพลของซิลีน (Effect of Silane)

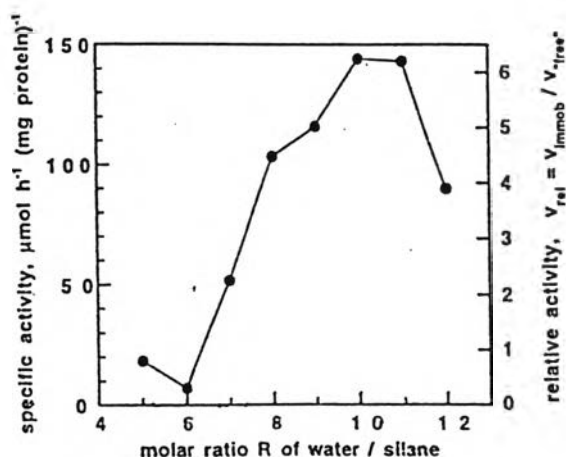
Reetz และคณะ (1994, 1995, 1996) พบว่าชนิดของซิลีนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการซิล-เจลมีผลต่อแอดฮีซีฟของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันระหว่างกรดลอริกและ 1-ออกทานอลในไอโซออกเทน ในการทดลองควบคุมที่ไม่มีเอนไซม์ไลเปสพบว่าไม่มีการทำงานของเอนไซม์ แอดฮีซีฟของเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงรูปในเมตริกซ์เจลที่เกิดจากของผสมระหว่าง TMOS และอัลคิลไตรเมทอกซีซิลีน (alkyltrimethoxysilane, $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$) เพิ่มขึ้นถึงมากกว่า 5 เท่าของไลเปสที่ไม่ได้ถูกตรึง และเมื่อใช้อัลคิลที่มีความยาวโซ่เพิ่มขึ้นจะทำให้แอดฮีซีฟที่สูงขึ้นซึ่งอาจเป็นเพราะไลเปสถูกตรึงได้อย่างเหมาะสมบนตัวพุงที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น (หมู่อัลคิลที่มีความยาวโซ่เพิ่มขึ้น) ซึ่ง Bosley และ Clayton (1994) พบว่ารูพรุนของแก้วถูกควบคุมด้วยหมู่อัลคิล อย่างไรก็ตาม Reetz และคณะ (1996) กล่าวว่าแอดฮีซีฟที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไลเปสที่ไม่ได้ตรึงรูปเป็นผลมาจากการกระจายตัวของโมเลกุลไลเปสได้ดีในเมตริกซ์เจล

(2) ตัวเติม (additive)

Reetz และคณะ (1996) ได้พยายามหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปส พวกเขาพบว่าตัวเติมสามารถส่งเสริมแอดฮีซีฟของไลเปสโดยเฉพาะตัวเติมที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecular additive) เช่น โพลีเอธิลีนไกลคอล, สารประกอบโพลีไฮดรอกซี เช่น โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และโปรตีน เช่น เจลาติน, อัลบูมิน เป็นต้น พวกเขาทดลองเพิ่มปริมาณตัวเติมในการตรึงไลเปสต่อแอดฮีซีฟของไลเปส (*Ps. Cepacia*) ที่ตรึงรูปในเมตริกซ์ที่เตรียมจากเมทิลไตรเมทอกซีซิลีน (methyltrimethoxysilane, MTMS) พบว่าแอดฮีซีฟของไลเปสลดลงหากเพิ่มตัวเติมมากกว่าความเข้มข้นของตัวเติมที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ สำหรับตัวเติมที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเช่น ซอร์บิทอล, กลีเซอรอล หรือไตรกลีเซอไรด์ ไม่ค่อยมีผลต่อแอดฮีซีฟของไลเปส เหตุผลสำหรับการเพิ่มขึ้นของแอดฮีซีฟเมื่อตัวเติมมีโมเลกุลขนาดใหญ่ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันอย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากตัวเติมสามารถป้องกันการรวมกลุ่มของเอนไซม์, ป้องกันการเสถียรภาพของเอนไซม์อันเนื่องมาจากซิลีนที่ใช้ในการเกิดเมตริกซ์ของซิลิกา หรือตัวเติมอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเจล เช่น ความพรุนและขนาดรูพรุน (Anchaleepom และคณะ, 1999) หรือความเสถียรของเอนไซม์ระหว่างปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์

(3) อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อซิลเลน (ค่า r)

อัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อซิลเลนที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาไฮล-เจลก็มีผลต่อแอกทิวิตี้ของไลเปสดังแสดงในรูปที่ 3.13 (Reetz และคณะ, 1996) พบว่าที่ค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อซิลเลนต่ำแอกทิวิตี้ของเอนไซม์จะต่ำเนื่องจากการจับกลุ่มของไลเปสที่มีความเข้มข้นสูง เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อซิลเลน อยู่ในช่วง 8-10 แอกทิวิตี้จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และลดลงอีกเมื่ออัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อซิลเลนสูงขึ้นที่ค่าอัตราส่วนโดยโมลของน้ำต่อซิลเลนสูงมากนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของการเกิดเจลซึ่งสังเกตได้จากปริมาณของไลเปสที่ยังคงลอยอยู่เพิ่มมากขึ้น

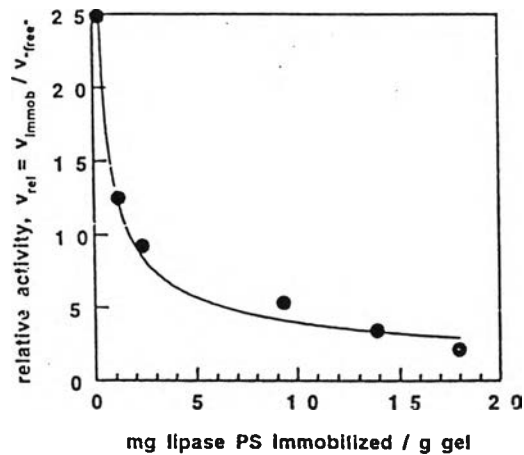


รูปที่ 3.13 อิทธิพลของค่า r ต่อแอกทิวิตี้ของไลเปส (*Ps. Cepacia*) ตรึงรูปในเมตริกซ์ที่เตรียมจากเมทิลไตรเมทอกซีซิลเลน (methyltrimethoxysilane, MTMS) ที่ $r = 8$ (Reetz และคณะ, 1996)

(4) อิทธิพลของแหล่งที่มาและปริมาณเอนไซม์

เอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มาจากแหล่งที่ต่างกันก็จะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้แตกต่าง Reetz และคณะ (1996) ได้ทำการตรึงไลเปสจากแหล่งที่มาต่างกันถึง 8 แหล่ง บนเมตริกซ์เจลที่เกิดจากของผสมระหว่าง TMOS และอัลคิลไตรเมทอกซีซิลเลนเช่นเดียวกันพบว่าแอกทิวิตี้แตกต่างกันทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ในการตรึงรูปจาก 0.2-80 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อกรัมของเจล ดังแสดงในรูปที่ 3.14 พบว่าแอกทิวิตี้ลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นเพราะว่ามีการจำกัดการแพร่ (diffusional limitations) ของสารตั้งต้นไปยังอนุภาค

ของตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้อาจเป็นเพราะเกิดการรวมกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งมีการกระจายตัวต่ำอยู่ในเมตริกซ์



รูปที่ 3.14 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (enzyme loading) ต่อแอกทิวิตี้ สำหรับไลเปส (*Ps. Cepacia*) ตรึงรูปที่เตรียมจาก MTMS ที่ $r = 8$ (Reetz และคณะ, 1996)

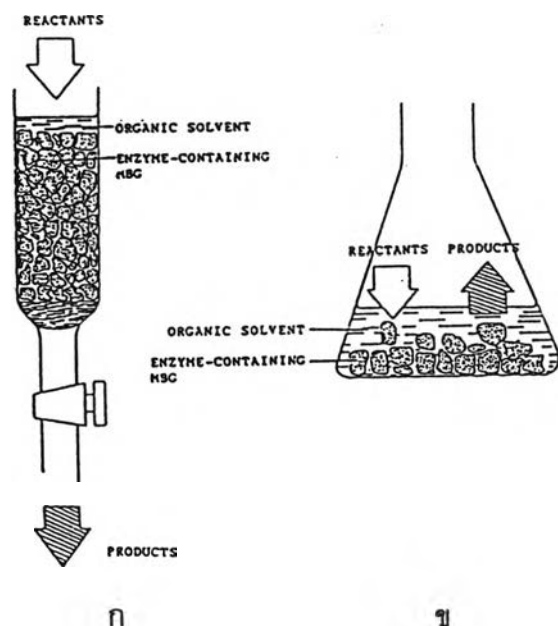
(5) ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในซิล-เจลเมตริกซ์มีความเสถียรมากและสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานเป็นเดือนๆ โดยไม่พบว่าการสูญเสียแอกทิวิตี้ได้อย่างมีนัยสำคัญ Reetz และคณะ (1996) ทำการทดลองซ้ำแบบกะโดยใช้เอนไซม์ไลเปส (*Ps. Cepacia*) ตรึงรูปซึ่งเตรียมจาก MTMS หรือ MTMS ผสมกับโพลีไดเมทิลซีซิลอกเซน (polytrimethylsiloxane, PDMS) ในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชั่นระหว่าง กรดลอริกและ 1-ออกทานอลในไอโซออกเทน หลังจากเขย่าของผสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 23 ชั่วโมง แยกเจลออกโดยการกรอง แล้วจึงล้างเจลด้วยไอโซออกเทนบริสุทธิ์และเพนเทนแล้วจึงนำกลับมาใช้ซ้ำ และหลังจากใช้เจลในปฏิกิริยาทุก 5 ครั้ง นำกลับมาล้างด้วยอะซิโตนเพื่อดึงน้ำออกจากเจลการทดสอบความเสถียรในการทำงานนี้ (operational stability) พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปสามารถรักษาแอกทิวิตี้ไว้ได้อย่างคงที่ถึง 80-85% จากการทดลองเริ่มต้น เมื่อเอนไซม์ตรึงรูปใช้ซ้ำถึง 30 ครั้ง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกดูดซับทางกายภาพไว้ที่พื้นผิวของเจลที่เตรียมจาก MTMS พบว่าเกิดการสูญเสียแอกทิวิตี้ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ซ้ำ 2-3 การทดลองเท่านั้น ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในวัสดุซิล-เจลยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าเป็นการตรึงเอนไซม์ทางกายภาพหรือด้วยพันธะร่วมระหว่างโควาเลนต์, อีออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้เมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์นาน 3 เดือนเพื่อทดสอบความเสถียรต่อการเก็บ

รักษา (storage stability) พบว่าเอนไซม์ไลเปส (*Rhizomucor miehei*) ในเจลที่เตรียมจาก MTMS ผสมกับ PDMS สามารถรักษาแอกทิวิตี้ได้ถึง 91%

3.3.3 ไมโครอิมัลชัน-เบสดอร์แกโนเจล (MBGs)

MBGs เป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (Rees และคณะ, 1991, 1995, Nascimento และคณะ, 1992, Jenta และคณะ, 1997) เอนไซม์จะถูกตรึงอยู่ในส่วนของน้ำที่ละลายอยู่ภายในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและถูกทำให้แข็งตัวด้วยโครงข่ายของเจลาติน ด้วยวิธีการนี้เอนไซม์สามารถกระจายตัวได้มากถึงในระดับไมเลกุล เมตริกซ์ของเจลาตินนี้มีลักษณะที่ใส และความแข็งของเจลขึ้นอยู่กับปริมาณเจลาตินที่ใช้ในการทำเจล ประโยชน์ของการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปใน MBGs ที่เหนือกว่าในระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันก็คือ MBGs มีความเสถียรมาก ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการที่มีการขยายขนาดของปฏิกิริยาได้ (scaling-up process), MBGs สามารถถูกนำกลับมาใช้ซ้ำได้ง่ายด้วยวิธีการแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสารละลายของปฏิกิริยา (reaction media) นอกจากนี้ยังเป็นการลดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์อื่นเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวทำให้การแยกผลิตภัณฑ์ทำได้ง่ายขึ้น ในรูปที่ 3.15 แสดงถึงการใช้งานของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงรูปไว้ใน MBGs โดยนำไปใช้ในการสังเคราะห์แบบกะและในการสังเคราะห์ในคอลัมน์

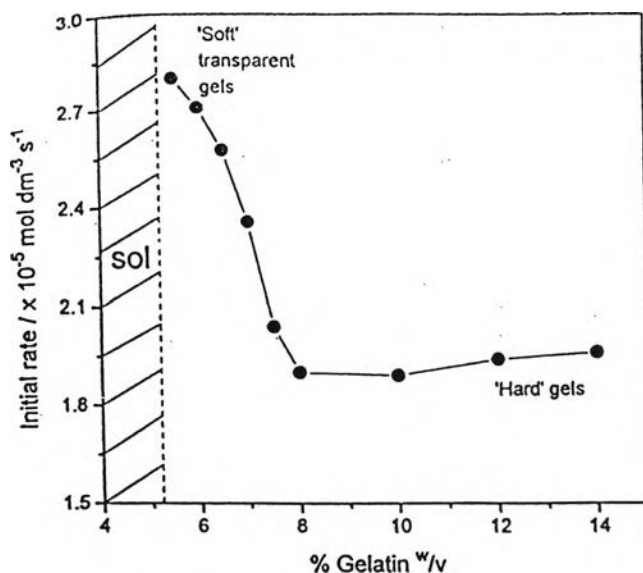


รูปที่ 3.15 วิธีการนำไลเปสที่บรรจุใน MBGs ไปใช้งานใน (ก) การสังเคราะห์ในคอลัมน์ (ข) การสังเคราะห์แบบกะ (Rees และคณะ, 1995)

3.3.3.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

(1) ความเข้มข้นของเจลาติน

Jenta และคณะ (1997) ได้แสดงความเข้มข้นของเจลาตินที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตามลักษณะทางกายภาพของ MBGs ที่เกิดขึ้น ปริมาณเจลาตินที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของ MBGs สามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วงดังได้กล่าวไว้แล้วในตอนต้น ได้แก่ ที่ปริมาณเจลาตินต่ำกว่าค่าขอบเขตระหว่างวัฏภาค (phase boundary) ช่วงปริมาณเจลาตินที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นออร์แกโนเจล และช่วงปริมาณเจลาตินที่สูงมากทำให้ปริมาณน้ำในระบบไม่เพียงพอต่อการเกิดออร์แกโนเจล เอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำได้ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเกิดเป็นออร์แกโนเจล ดังที่ Jenta และคณะ (1997) ได้ทำการทดลองตรึงเอนไซม์ไลเปส (*Chromobacterium viscosum*) ใน MBGs ที่มีความเข้มข้นของเจลาตินในช่วง 5.5-14% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เจลที่ได้จะมีปริมาตรประมาณ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเก็บไว้ที่ -25 องศาเซลเซียส หั่นเป็น 28 ชิ้นเล็กๆ เพื่อนำไปทดสอบแอคติวิตีในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (ระหว่างกรดเดคานอลิกและก-ออกทานอลได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกทิลเดคานอเอท) ผลการทดลองแสดงดังในรูปที่ 3.16 จะเห็นว่าที่ปริมาณเจลาตินต่ำๆ (น้อยกว่า 7% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แอคติวิตีจะสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เจลาตินความเข้มข้นสูง (มากกว่า 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเจลาตินมีผลต่อความเสถียรทางกายภาพของ MBGs ที่ปริมาณเจลาตินสูง เจลที่ได้มีความเสถียร, แข็ง และสามารถรักษาโครงสร้างไว้ได้ในสารละลายของปฏิกิริยา (reaction medium) ที่เจลาติน 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าที่จะรวมตัวกันเป็นออร์แกโนเจลได้ที่ $W_0 = 66.5$ อย่างไรก็ตามที่เจลาตินมากกว่า 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถสังเคราะห์ให้เป็น MBGs ได้เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น ($W_0 > 66.5$)



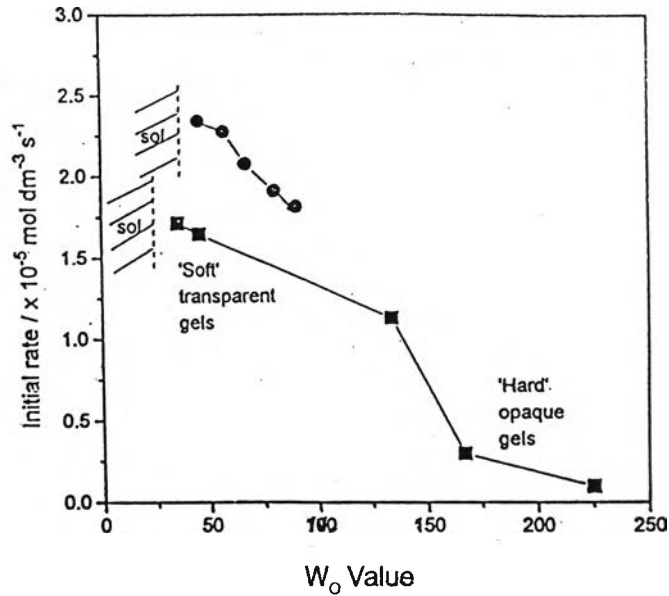
รูปที่ 3.16 อิทธิพลของความเข้มข้นของเจลาตินต่อแอกทิวิตีของไลเปสตรึงรูปใน MBGs ที่เตรียมจากระบบ AOT 0.2 โมล/ลิตรของเฮปแทน น้ำ 13.3 โมล/ลิตร (อัตราส่วนเชิงโมลของน้ำต่อ AOT (W_0) = 66.5) ไลเปส 250 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และเจลาติน 5.5-14%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Jenta และคณะ, 1997)

(2) W_0

W_0 มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของ MBGs ที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงค่า W_0 สามารถทำได้ 2 วิธีคือ การเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวคงที่ และการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเมื่อความเข้มข้นของน้ำคงที่ Jenta และคณะ (1997) ได้ใช้วิธีทั้ง 2 เพื่อศึกษาผลของ W_0 ต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปใน MBGs ดังแสดงในรูปที่ 3.17 ในกรณีแรก, การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวคงที่ แอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลงเมื่อ W_0 เพิ่มขึ้นในช่วง 45-90 ซึ่งปริมาณน้ำเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของ MBGs จะลดลง ที่ W_0 ต่ำกว่า 40 ไม่สามารถเกิดเป็นออร์แกนเจลได้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อ AOT มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ Jenta และคณะ (1997) ได้เสนอว่ามีปัจจัย 3 ประการที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของแอกทิวิตีของเอนไซม์เมื่อความเข้มข้นของน้ำเพิ่มขึ้น หนึ่งในอัตราส่วนระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำและชอบน้ำของแต่ละ MBGs (the hydrophobic/hydrophilic nature of the MBG) ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกกระทบกระเทือนเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงส่วนของน้ำที่ใช้ต่อส่วนของไฮโดรคาร์บอน การเพิ่มส่วนที่ชอบน้ำของ MBGs อาจมีผลกระทบต่อ

แยกสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ สอง, ปฏิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งเป็นปฏิริยาย้อนกลับของปฏิริยาเอสเทอริฟิเคชันอาจถูกกระตุ้นให้เกิดมากขึ้นเนื่องความเข้มข้นของน้ำที่เพิ่มขึ้น และสาม, Atkinson และคณะ (1991) พบว่าน้ำที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดของหยดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่อยู่ร่วมกันในโครงข่ายของMBGsขยายใหญ่ขึ้น นอกจากนี้ Rees และ Ribinson (1995) ได้ทำการทดลองหาค่า W_0 ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันพบว่าแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสตรีงรูปจะลดลงหลังจากที่ W_0 เพิ่มขึ้นจนถึง 5 อย่างไรก็ตามขนาดของไมเซลล์ในระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและในระบบ MBGs จะไม่เท่ากันเนื่องจากในระบบ MBGs มีการกระจายความสมดุลย์ของน้ำและสารลดแรงตึงผิวระหว่างหลอดของเจลลาตินที่อุดมไปด้วยน้ำและหยดไมโครอิมัลชันขนาดจิ๋วของน้ำในน้ำมัน

ในกรณีที่ W_0 เปลี่ยน เมื่อมีการเปลี่ยนความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวขณะที่ความเข้มข้นของน้ำคงที่ จากรูปที่ 3.17 MBGsสามารถขยายตัวได้ในช่วงที่กว้าง ($W_0 = 35-200$) เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวลดลง แอกทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสตรีงรูปก็จะลดลง เจลจะมีความแข็งเพิ่มขึ้นและทึบแสง เหตุที่แอกทิวิตี้ลดลง เป็นเพราะความเข้มข้นของ AOT ที่เปลี่ยนแปลงจะมีผลต่อพื้นที่ผิวระหว่างวัฏภาคทั้งหมดที่เกิดจากสารลดแรงตึงผิวภายใน MBGs ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่กำหนดแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ตรีงรูปใน MBGs Atkinson (1991) พบว่าการกระจายตัวของน้ำใน MBGs ขึ้นอยู่กับความสมดุลย์ระหว่างความต้องการน้ำในการเกิดปฏิริยาไฮเดรชันของเจลลาตินและความต้องการน้ำที่กลุ่มหัวซัลโฟเนตของ AOT ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของ AOT เพิ่มขึ้นจะเป็นการดึงน้ำออกทีละน้อยจากเจลลาตินไปยัง AOT ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ค่าขอบเขต (W_0 น้อยกว่า 30, เจลาติน 14 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการไฮเดรชันของเจลลาตินที่จะรักษาโครงข่าย 3 มิติไว้ได้ เจลจึงเกิดการสลายตัวเป็นของเหลว อย่างไรก็ตาม Jenta และคณะ (1997) กล่าวว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ AOT เป็นการเพิ่มจำนวนไมเซลล์แต่ขนาดลดลง ดังนั้นพื้นที่ผิวระหว่างวัฏภาคก็จะเพิ่มขึ้นทำให้แอกทิวิตี้ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในลักษณะเช่นเดียวกับระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Prazeres และคณะ, 1992, Rees และ Robinson, 1995)



รูปที่ 3.17 อิทธิพลของค่า W_0 ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นในการสังเคราะห์ออกทิลเดคคานอเอทด้วยไลเปสตรึงรูปใน MBGs 250 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ในภาวะ (●) ความเข้มข้นของ AOT คงที่ = 0.2 โมล/ลิตรของเฮปแทน และเจลาติน 8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (■) ความเข้มข้นของน้ำคงที่ = 13.3 โมล/ลิตร และเจลาติน 14% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Jenta และคณะ, 1997)

(3) ชนิดของน้ำมันและความยาวโซ่

การขยายตัวของน้ำที่จำเป็นรอบๆ เอนไซม์เป็นปัจจัยที่สำคัญในการรักษาสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตัวทำละลายที่มีขั้วสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนได้โดยตรงและแทนที่หรือดึงน้ำออกทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งมีความมีขั้วต่ำได้แก่สารประเภทไฮโดรคาร์บอน Jenta และคณะ (1997) ศึกษาอิทธิพลของความยาวโซ่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของน้ำมันที่ใช้ในการเตรียม MBGs ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปใน *n*-อัลเคน ตั้งแต่ C_6 - C_{10} ใช้ $W_0 = 66.5$ พบว่าเมื่อความยาวโซ่เพิ่มขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงเพียง 20% อาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในการแยกของสารตั้งต้นระหว่างวัฏภาคน้ำมันและที่พื้นผิวระหว่างวัฏภาค เมื่อจำนวนคาร์บอนเพิ่มขึ้นตัวทำละลายมีน้ำหนักโมเลกุลและความหนืดเพิ่มขึ้นจึงเป็นการเพิ่มความต้านทานต่อการแพร่ของสารภายในออร์แกโนเจลอย่างไรก็ตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงช้าๆ อย่างคงที่ซึ่ง Jenta และคณะ (1997) พบว่าการสังเคราะห์ออกทิลเดคคานอเอทด้วยไลเปสตรึงรูปใน MBGs มีลักษณะคล้ายคลึงกับที่เกิดในไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันคือปฏิกิริยาไม่ถูกจำกัดด้วยการแพร่ นอกจากนี้พวกเขายังได้ทดลองตรึงเอนไซม์ใน MBGs ที่เตรียมจาก *n*-เฮปแทน, ไชโคลเฮกเซน และไอโซออกเทน พบว่าแอกทิวิตีที่เกิดจาก MBGs ที่เตรียมจากไชโคลเฮกเซน และไอโซออกเทนเพิ่มจากแอกทิวิตีที่เตรียมจาก *n*-เฮป

เทจนถึง 30-40% ความแตกต่างของแอกทิวิตีที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างจุลภาคและมหภาคของ MBGs เนื่องจากการชักนำของตัวทำละลายอินทรีย์ (Atkinson, 1991 พบว่าชนิดของน้ำมันมีผลต่อการเกิดเจลและลักษณะของ MBGs ที่เกิดขึ้น)

(4) ความเสถียรในการทำงานและความเสถียรในการเก็บ

ความเสถียรในการทำงานและความเสถียรในการเก็บของเอนไซม์ตรึงรูปเป็นตัวกำหนดเชิงเศรษฐศาสตร์ที่สำคัญที่จะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการทางชีวภาพ (Buchholz และ Klein, 1987) Rees และคณะ, 1991 ทดสอบความเสถียรในการทำงานของ MBGs ที่เตรียมจากระบบ AOT 0.2 โมล/ลิตรของเฮปเทน น้ำ 13.3 โมล/ลิตร ($W_o = 66.5$) โลเปส 250 ไมโครกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และเจลาติน 14% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายหลังจากใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ออกทิลเดคานอเอท 15 รอบในช่วงเวลา 30 วันพบว่ายังคงรักษาแอกทิวิตีได้ถึง 75% ของค่าเริ่มต้น ในแต่ละรอบของการสังเคราะห์จะทำจนกระทั่งสารตั้งต้นถูกใช้ไป 10% เพื่อหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นจากนั้นจะล้างเจลด้วย n-เฮปเทนก่อนที่จะทำการทดลองซ้ำ Jenta และคณะ, 1997 ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบโดยเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์เป็น 10 เท่า โดยให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ (สับเสตรถูกใช้ไป 90%) พบว่าแอกทิวิตีลดลงอย่างคงที่ประมาณ 40% ต่อรอบ แล้วจึงล้างเจลด้วยการแช่ใน n-เฮปเทน 6 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการทดลองซ้ำ (ซึ่งไม่มีการชะเอาโลเปสปนออกมาเนื่องจากไม่พบแอกทิวิตีใน n-เฮปเทนที่ล้าง) พบว่าแอกทิวิตีที่ลดลงเป็นเพราะน้ำปริมาณมากที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาถูกดูดซับไว้ที่เจล พวกเขาได้ปรับปรุงด้วยการแช่เจลในสารละลายไมเซลส์ที่แห้งของ AOT ใน n-เฮปเทน (ไม่มีน้ำ) 24 ชั่วโมง หลังจากใช้เจลในรอบที่ 3 พบว่าในรอบที่ 4 สามารถดึงแอกทิวิตีกลับคืนมาได้เป็นเพราะความสามารถในการเลือกสกัดน้ำออกของ AOT และมีการขยายตัวของ AOT เข้าไปยังเมตริกซ์ของเจล สำหรับความเสถียรในการเก็บ Jenta และคณะ (1997) ทดสอบการทำงานของ MBGs ที่เตรียมจากระบบ AOT 0.2 โมล/ลิตรของเฮปเทน น้ำ 17.8 โมล/ลิตร ($W_o = 88.9$) โลเปส 2.0 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และเจลาติน 14% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ภายหลังจากเก็บไว้ที่ -25 องศาเซลเซียส นานกว่า 12 เดือนในการสังเคราะห์แบบกะของออกทิลเดคานอเอทไม่พบว่ามี การสูญเสียแอกทิวิตีอย่างมีนัยสำคัญ

จากงานวิจัยต่างๆ ที่ได้นำระบบไมโครอิมัลชัน, กระบวนการโซล-เจล และ MBGs มาใช้ในการตรึงเอนไซม์จะเห็นได้ว่าแต่ละระบบมีข้อดีต่างๆ กัน วัสดุซิลิกา-เจลาตินนาโนคอมโพสิตซึ่งสังเคราะห์จากองค์ประกอบของระบบเหล่านี้จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการนำไปใช้เป็นพาหะสำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ