เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลสตรึงด้วยวิธีครอสลิ้ง และวิธีเอนแคปซูเลชั่น

The Efficiency of immobilized Amylase between crosslink and encapsulation method

ณัชชา องค์วิเศษไพบูลย์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เปรียบเทียบประสิทธิภาพภาพของเอนไซม์อะไมเลสตรึงด้วยวิธีครอสลิ้ง และวิธีเอนแคปซูเลชั่น

The Efficiency of immobilized Amylase between crosslink and encapsulation method

T148886

ณัชชา องค์วิเศษไพบูลย์

สารพนู 148886
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี 30 พย. 2560
b.12877764
i.

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลสตรึงด้วยวิธีครอสลิ้งและวิธีเอนแคปซูเลชั่น

The Efficiency of Immobilized Amylase between crosslink and encapsulation method

จัดทำโดย

ณัชชา องค์วิเศษไพบูลย์ รหัสนักศึกษา 55080018

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 30/ธ.ค./59

(ดร. สุรชัย ใหญ่เย็น)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลสตรึงด้วยวิธีครอสลิ้ง และวิธีเอนแคปซูเลชั่น

ชื่อนักศึกษา ณัชชา องค์วิเศษไพบูลย์ รหัสนักศึกษา 55080018

หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. สุรชัย ใหญ่เย็น

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส Termamyl ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบตั้งต้น โดยเอนไซม์อะไมเลสจะสลายพันธะ1,4 ไกลโคไซด์ในคาร์โบไฮเดรตเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง เพื่อใช้ในการลดความหนืดในกระบวนการทำไซรัป หรืออาจใช้เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในการผลิตพลังงานทางเลือกต่างๆ ในการวิจัยนี้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ 2 รูปแบบ คือวิธีเอนแคปซูเลชันโดยใช้แอลจิเนต และวิธีการครอสลิ้งโดยใช้เจลาตินและกลูทาราแอลดีไฮด์ พบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ ในการตรึงแบบครอสลิ้งให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า โดยสามารถทนอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาได้ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ได้ถึง 95% และสามารถนำเอนไซม์กลับมาทำปฏิกิริยาได้ใหม่ถึง 3 ครั้งโดยยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ 80% จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์อะไมเลส Termamyl

คำสำคัญ : เอนไซม์อะไมเลส เอนแคปซูเลชั่น เอนแทรปเมนต์ ครอสลิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title The Efficiency of Immobilized Amylase between crosslink and encapsulation method

Student name Natcha Ongvisedpaiboon Student ID 55080018

Program Bachelor of Science in Food Science and Technology

Year 2016

Advisor Dr. Surachai Yaiyen

Abstract

The enzyme alpha amylase Termamyl is used in the industries of starch as substrate. The amylase hydrolyzes the alpha 1,4-glycosidic bonds in carbohydrates to smaller molecules. The enzyme amylase helps to reduce the viscosity of the syrup-making process. It may be used as the carbon source of microbes to produce the alternative energy. In this study, the enzyme immobilization was investigated in 2 methods : encapsulation by sodium alginate and cross-link method by gelatin and glutaldehyde. It was found that the cross-link method gave better efficiency than encapsulation in temperature and recycle time. As for the temperature, immobilized enzyme was retained activity at 40 C for 30 minutes by 95%. The recycle time was three times of reaction while enzyme activity was retained by 80%. The result suggests that cross-link method is suitable for enzyme immobilization.

Keywords : Alpha-Amylase, Encapsulation, Entrapment, Cross-link

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการทดลองวิชาปัญหาพิเศษเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ซึ่งเป็นเรื่องใหม่ในการศึกษาเนื่องจากในหลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารที่ข้าพเจ้าศึกษาอยู่ไม่มีการศึกษาด้านเอนไซม์และกระบวนการตรึงเป็นวิชาหลัก แต่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งเป็นอาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมเปิดโอกาสให้ศึกษาและทดลองจริง รวมทั้งยังอุดหนุนทุนทรัพย์ในการวิจัยทดลอง ถือเป็นการเรียนรู้จากประสบการณ์ตรง เห็นข้อผิดพลาดการทดลอง และการรู้จักปรับแก้สถานการณ์ อีกทั้งการวางแผนการทดลองและการยืมใช้เครื่องของทางคณะ พี่นักวิทย์ทุกคนยังช่วยประสานงานอย่างดี จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ และสุดท้ายขอบคุณพ่อแม่ที่เป็นกำลังใจ และขอบคุณเพื่อนๆ สำหรับคำแนะนำ และความร่วมมือในการใช้ห้องแลปร่วมกันตลอดจนจบการทดลอง

ณัชชา องค์วิเศษไพบูลย์

24 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญภาพ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1 ความหมายของการตรึงเอนไซม์	2
2.2 การผลิตเอนไซม์ตรึงรูป	2
2.3 การพิจารณาเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์	8
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	10
3.2 อุปกรณ์	10
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	13
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	23
ภาคผนวก ก	24
ภาคผนวก ข	25
ประวัติผู้เขียน	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การตรึงเอนไซม์รูปแบบต่างๆ	3
2.2	เจลาตินแบบผง และแบบแผ่น	3
2.3	กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในเจลาติน	4
2.4	โครงสร้างทางเคมีโมเลกุลของเจลาติน	4
2.5	สาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Macrocystis pyrifera* และ *Laminaria digitata*	6
2.6	(a) β-D-mannuronic acid (b) α-L-guluronic acid (c) โครงสร้างโมเลกุลโซเดียมแอลจิเนต	6
2.7	การเกิด Egg box model จาก α-L-guluronic acid เมื่อเติมแคลเซียมไอออน	7
2.8	ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ด้วยการเอนแทรปเมนต์	8
4.1.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย	13
4.1.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย	13
4.1.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของกลูโคสจากการบ่มย่อยสตาร์ช โดยเอนไซม์ - แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบในการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการกระบวนย่อย	14
4.1.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 40 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต (โมล/นาที) ที่บ่มเป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย	15
4.2.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในแผ่นเจลาติน (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย	16
4.2.2	กราฟเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเมื่อใช้แอลจิเนตเป็นสารตรึงบ่มที่ ณ อุณหภูมิ 40 และ50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที	16
4.2.3	กราฟเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในเม็ดบีทแอลจิเนตกับ - เอนไซม์ตรึงในแผ่นเจลาติน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที	17
4.3.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	18
4.3.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต บ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	18
4.3.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในแผ่นเจลาติน บ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	19
4.3.4	กราฟเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงที่ใช้สภาวะการบ่มต่างกัน เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ	19
ก.1	กราฟและสมการเส้นตรงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน	24
ข.1	การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำตาลกลูโคสด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์อะไมเลสมีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารมีด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylases) เบต้าอะไมเลส (beta-amylases) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylases) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมที่มีแป้งเป็นวัตถุดิบตั้งต้น เช่น อุตสาหกรรมไซรัป อุตสาหกรรมขนมและเครื่องดื่ม ซึ่งใช้เอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพเพื่อเร่งให้เกิดผลิตผลที่รวดเร็วยิ่งขึ้น โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (alpha-amylases,E.C.3.2.1.1) สามารถย่อยโมเลกุลในแป้งโดยตัดพันธะไกลโคไลติก (glycosidic bonds) ที่ตำแหน่งอัลฟ่า 1 และ 4 แบบสุ่มเกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลที่เล็กลง เปลี่ยนแป้งเป็นสายเดกตรินโมเลกุลสั้นๆ โอลิโกแซคคาร์ไรด์ น้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อย่างไรก็ตามประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้เพียงพอ จึงต้องใช้เอนไซม์สำเร็จรูปนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้สิ้นเปลืองต้นทุนในการผลิตผลิตภัณฑ์อย่างมาก เนื่องจากเอนไซม์อิสระที่ผ่านการใช้งานจะไม่สามารถนำมาใช้ซ้ำ หรือรียูส (reuse) ได้ แต่ถ้ามีการตรึงเอนไซม์ไว้โดยวิธีการบางอย่าง จะช่วยป้องกันเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ ช่วยในการควบคุมประสิทธิภาพในการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสตาร์ชได้ดี และยังสามารถนำเอนไซม์นั้นกลับมาใช้ซ้ำได้ จึงลดต้นทุนการผลิตและได้ผลิตภัณฑ์ที่ตรงต่อความต้องการมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์อะไมเลสตรึง โดยวิธีการเอนแคปซูเลชั่นและวิธีการเอนแทรปเมนต์

1.2.2 ศึกษาความเสถียร อัตราการปลดปล่อยของเอนไซม์ตรึง และความสามารถในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำในกระบวนการย่อยสตาร์ช

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงที่ใช้แคลเซียมแอลจิเนตกับเจลาตินเป็นสารตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีที่ต่างกัน และทราบอัตราการปลดปล่อยของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงที่สามารถย่อยสตาร์ชได้เป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆ

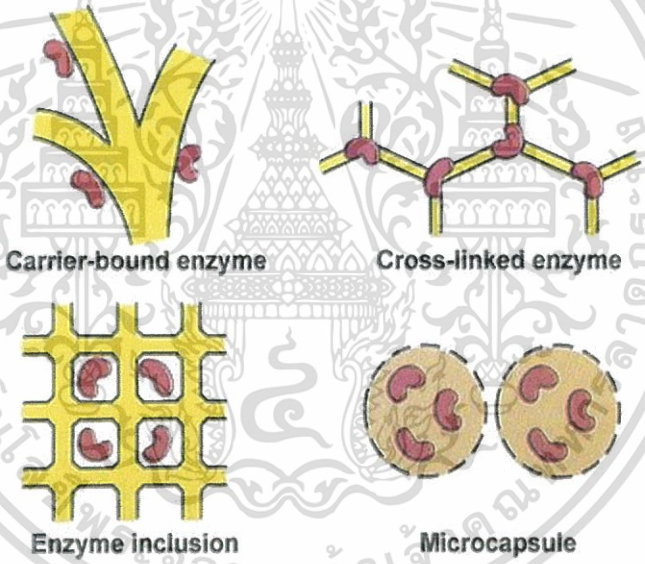
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของการตรึงเอนไซม์

การตรึงรูปเอนไซม์ (Immobilized Enzyme) เป็นวิธีการนำเอนไซม์มาจำกัดบริเวณให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนด เป็นรูปแบบของเอนไซม์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการแปรรูป โดยเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวเป็นของแข็งที่ไม่ละลายในน้ำ ความสามารถคงการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เอนไซม์ตรึงถูกปลดปล่อยออกมาจากสารหุ้มอย่างช้าๆและต่อเนื่อง การตรึงเอนไซม์ทำโดยการจับยึดกับสารตัวกลางที่ไม่ละลายในน้ำหรือละลายได้น้อยมาก หรือการทำให้โมเลกุลเอนไซม์จับเชื่อมกันเองจนมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งก่อนทำปฏิกิริยา ขณะทำปฏิกิริยาและภายหลังการทำปฏิกิริยายังคงสถานะเป็นของแข็งอยู่



รูปที่ 2.1 การตรึงเอนไซม์รูปแบบต่างๆ
ที่มา: http://enzymetechnology.blogspot.com/2009/10/enzyme-technology.html

2.2 การผลิตเอนไซม์ตรึงรูป

กระบวนการตรึงเอนไซม์ (Enzyme Immobilization Process) มีเทคนิคการตรึง 3 วิธี ได้แก่ การยึดด้วยตัวนำ (Carrier-Binding Method) การเชื่อมขวาง (Cross-Linking Method) และการดักติด (Entrapment Method)

2.2.1 วิธีตรึงด้วยการเชื่อมติดกับสารตัวกลาง (Carrier-binding Method) หรือตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ (carrier binding) ทำได้หลายรูปแบบ โดยอาศัยการเชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพยุงด้วยพันธะเคมี เช่นพันธะไอออนิก พันธะโคเวเลนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 การใช้พันธะโคเวเลนต์ (Covalent binding Method) เชื่อมต่อของโมเลกุลระหว่างเอนไซม์กับสารตัวกลางที่มีความสามารถในการจับติดส่วนประกอบของเอนไซม์ได้แก่ กรดอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มซัลฟีดริล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน ข้อดีของวิธีนี้คือเอนไซม์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของสารพยุงสม่ำเสมอ มีความคงตัวดีและการรั่วน้อย แต่ข้อเสียคือปฏิกิริยาจากการเกิดพันธะที่รุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้จะกระทบต่อโครงสร้างและแอคติวิตีของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการทำงานไปบางส่วน วัสดุตรึงรูปที่นิยมใช้ได้แก่ พอลิเมอร์จำพวกพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide Polymers) เช่น เซลลูโลส เด็กซ์ทราน (Dextran) แป้ง กลูโคส ซิลิกาที่มีรูพรุน (Porous Silica) และแก้วที่มีรูพรุน (Porous Glass)

2 การเชื่อมด้วยการเกาะหรือการดูดซับ (Adsorption Method) เป็นวิธีการตรึงเอนไซม์อีกรูปแบบหนึ่งที่เชื่อมเอนไซม์เข้ากับผิวของตัวพยุงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ อาศัยการดูดซับของสารตัวนำด้วยพันธะไอออนิก หรือพันธะไฮโดรเจน เป็นวิธีที่ง่าย แต่มีแรงดูดซับค่อนข้างต่ำ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เอนไซม์จึงหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย อย่างไรก็ตามการตรึงด้วยวิธีนี้ไม่ค่อยทำให้โครงสร้างหรือแอคติวิตีของเอนไซม์เสียไป แต่ต้องเลือกใช้ตัวพยุงทั้งจากสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์ให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ และวัตถุดิบที่ใช้เป็นซับสเตรท

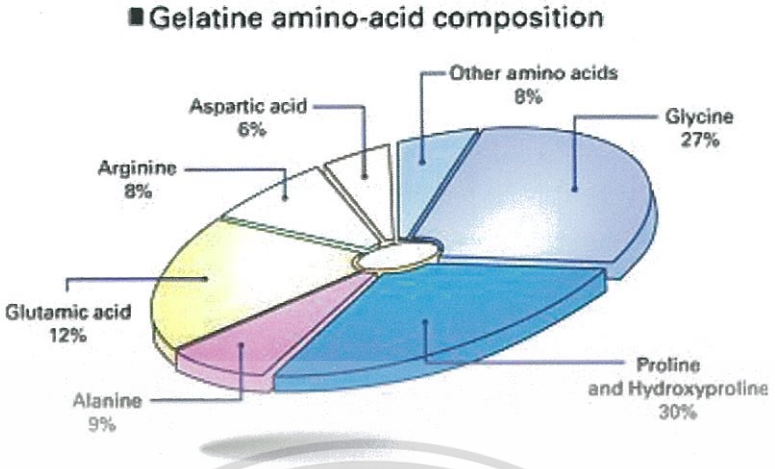
2.2.2 การตรึงรูปด้วยการเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking Method) การตรึงด้วยวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุง แต่อาศัยการเชื่อมต่อโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีแบบโคเวเลนต์ ทำให้โมเลกุลเอนไซม์ตั้งแต่ 2 โมเลกุลขึ้นไปมาต่อเชื่อมเกาะกันเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ละลายน้ำได้น้อยลงโดยใช้สารพวกไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (Multi-function Reagent) เช่น กลูทาอัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) และโทลูอีน ไดไอโซไซยาเนต (Toluene Diisocyanate) เป็นต้น การตรึงรูปเอนไซม์วิธีนี้มักเกิดปฏิกริยาการเชื่อมระหว่างโมเลกุลเอนไซม์กับสารเชื่อมขวางอย่างรุนแรง จึงมีผลต่อโครงสร้าง และแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้

เจลาติน (gelatin) เป็นโปรตีนที่สกัดได้จากการเสียสภาพของคอลลาเจน ในกระดูกสัตว์ เกล็ดปลาและหนังของสัตว์ เจลาตินมีองค์ประกอบกรดอะมิโน 18 ชนิด สามารถดูดซับน้ำได้มาก 5-10 เท่าของตัวมันเอง เมื่อนำผงเจลาตินมาละลายด้วยน้ำอุ่นจะหลอมเหลวเป็นของเหลวหนืด และเซตตัวเป็นเจลได้หากทิ้งไว้ระยะหนึ่ง มีสมบัติเป็น thermally reversible gel สามารถย้อนกลับเป็นของเหลวได้อีกครั้งเมื่อได้รับความร้อน

รูปที่ 2.2 เจลาตินแบบผง และแบบแผ่น

ที่มา: http://www.trademe.co.nz/home-living/food-beverage/baking-ingredients/auction-1065075695.htm

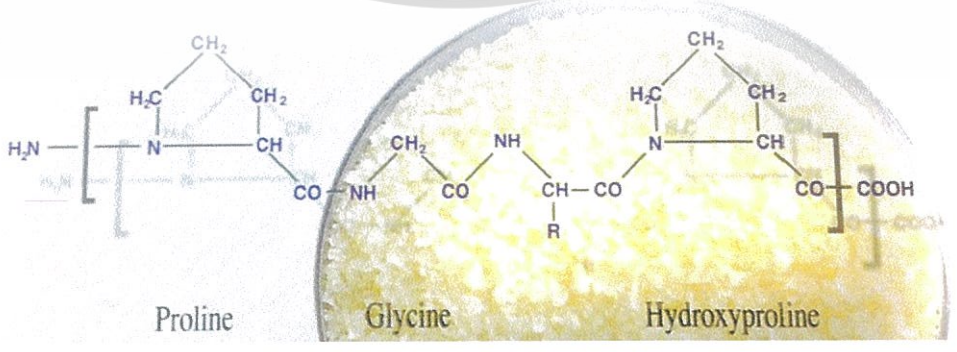
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบภายในเจลาติน

ที่มา: **บริษัทฮาลามิกส์ อินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด**

ข้อแตกต่างของเจลาตินกับสารก่อเจลอื่นๆ เช่น แอลจิเนต วุ้น เพคติน และคาราจีแนน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ได้มาจากพืช ในขณะที่เจลาตินเป็นโปรตีนที่ผลิตจากหนังหรือกระดูกสัตว์ อย่างไรก็ตามเจลที่ได้จากสารก่อเจลจากพืชยังขาดสมบัติละลายในปาก และความยืดหยุ่นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเจลาติน ในขณะที่การใช้เจลาตินก็มีข้อจำกัด เพราะมีข้อบังคับทางกฎหมายที่เกี่ยวกับหลักศาสนาอิสลาม ซึ่งเลี่ยงได้โดยการใช้ฮาลาลเจลลาตินที่ผลิตจากปลา วัว แพะ หรือจากสัตว์ที่ผ่านการเชือดอย่างถูกต้องตามหลักศาสนาในการผลิต ปัจจุบันเจลาตินจำหน่ายในรูปของผงและแผ่น มีสีออกโทนเหลืองอ่อนถึงน้ำตาล ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและวิธีการผลิต เจลาตินเป็น amphoteric protein หรือโปรตีนที่เป็นได้ทั้งกรดและด่าง มีจุดไอโซอิเล็กทริก (iso-electric point) ในช่วง 5 ถึง 9 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเจลาตินเหมือนกับกรดอะมิโนที่พบในคอลลาเจน คือมีไกลซีนประมาณ 1 ใน 3 ของกรดอะมิโนทั้งหมด มีโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนสูง ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนสามารถใช้เป็นตัววัดปริมาณคอลลาเจนหรือเจลาตินในอาหารได้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีโมเลกุลของเจลาติน

ที่มา: **บริษัทฮาลามิกส์ อินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลาตินถูกใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ในเครื่องสำอาง ใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มความหนืดให้ครีม ทางเภสัชกรรมใช้เจลาตินในการเคลือบเม็ดยาแบบแคปซูลทั้งชนิดแข็งและนิ่ม รวมถึงใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดในตำรับยาต่างๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารพบว่ามีการใช้ในผลิตภัณฑ์นม เนยนิ่ม (soft cheese) พุดดิ้ง แยม เยลลี่ หมากฝรั่ง ขนมเคี้ยวหนึบ ผลิตภัณฑ์เนื้อเคลือบผิว อาหารทะเลกระป๋อง ซุป ซอส และอื่นๆ

ในญี่ปุ่นและบราซิลยอมรับให้ใช่เอนไซมทรานสกลูตามิเนส (trans-glutaminase) สำหรับเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลเจลาติน หรือเจลาตินกับโปรตีนอื่นๆในอาหารได้ การเชื่อมต่อโมเลกุลเจลาตินกับแอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) จะเพิ่มความสามารถในการใช้ประโยชนจากเจลาตินได้ เนื่องจากกลูทาราดีไฮด์มีความคงตัวต่อความร้อน ลดการละลายน้ำ รวมถึงปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิลมเจลาติน

2.2.3 การตรึงรูปด้วยการห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ (Entrapment Method) หรือการดักติด เป็นวิธีตรึงเอนไซม์ที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง แตกต่างจากการตรึงเอนไซม์รูปแบบอื่นตรงที่วิธีนี้เอนไซม์ไม่ได้สร้างพันธะเคมีใดๆกับสารห่อหุ้ม ไม่จับยึดกับตัวพยุง และไม่จับยึดกันเอง สามารถใช้กับเอนไซม์ทุกชนิด การกักเอนไซม์ให้อยู่ในบริเวณที่จำกัด มี 2 แบบ

1 เอนไซม์ถูกขังหรือห่อหุ้มอยู่ภายในช่องตาข่ายสารโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำอย่างสม่ำเสมอ หรือการตรึงแบบแลตทิช (Lattice type) ที่ใช้สารโพลีเมอร์ธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์เป็นตัวห่อหุ้มเอนไซม์ โดยดักติดเอนไซม์ไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติในเจลของสารพอลิเมอร์ เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จในการตรึง เนื่องจากใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีข้อจำกัดและข้อเสียมากกว่า วิธีการดักติดนิยมใช้สารพวกไฮโดรเจนเฉื่อย (Inert Hydrogel) เป็นวัสดุดักติด โดยอาศัยหลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติที่เป็นรูพรุน กลไกการเกิดเจลขึ้นกับสารตัวกลางที่ใช้ ซึ่งการเตรียมเอนไซม์วิธีนี้ต้องพิจารณาชนิดของโพลีเมอร์ให้เหมาะสมกับเอนไซม์ เนื่องจากสารบางชนิดขณะเกิดเป็นโพลีเมอร์มีปฏิกริยารุนแรงทำให้เอนไซม์เสียสูญเสถียรภาพได้

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดักติดด้วยสารแอลจิเนตเป็นวิธีการตรึงที่เรียบง่าย สารแอลจิเนตที่นิยมใช้ในการตรึงคือ โซเดียมแอลจิเนต (Sodium Alginate) เป็นพอลิแอนไอออน (Polyanion) สามารถละลายน้ำที่อุณหภูมิห้องได้ อีกทั้งแอลจิเนตเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และมีเสถียรภาพต่อสารเคมีสูงที่พีเอช 5-10 ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยามากกว่า 60 ปี เป็นวัตถุเจือปนในอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย เช่น เป็นวัสดุช่วยให้แข็ง เกิดอิมัลชัน เกิดฟิล์ม หรือเกิดเจล แต่การใช้แอลจิเนตเป็นวัสดุดักติดมีข้อเสียคือ สารประกอบนี้จะเสื่อมสลายเมื่อสัมผัสกับสารออกซิไดซ์โดยตรงเช่น หมู่ธาตุแฮโลเจน หรือพีรีออเดต และระบบรีดอกซ์ เช่น พอลิฟีนอล หรือ ไทออล (Thiols) และแอลจิเนตยังสูญเสียเสถียรภาพเชิงกลเมื่อสัมผัสกับโปแทสเซียมไอออน (K^+) แมกนีเซียมไอออน (Mg^+) สารฟอสเฟต หรือ สารคีเลติง (Chelating agent) ที่มีความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตามวิธีการตรึงเอนไซม์ด้วยแอลจิเนตเป็นวิธีที่สะดวก

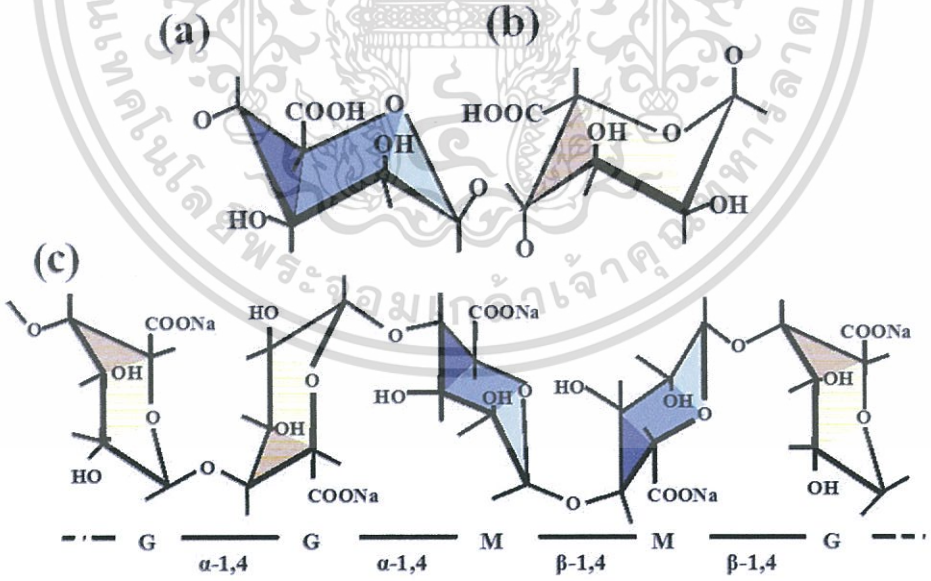
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็ว ปลอดภัย ราคาไม่แพงมากนัก สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาชีวภาพได้อย่างกว้างขวาง

แอลจิเนตสกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลเช่น *Macrocystis pyrifera, Laminaria cloustoni* และ *Laminaria digitata* มีโครงสร้างทางเคมีเป็นโพลีเมอร์ร่วมของ 1,4-β-D-manuronic acid (M) และ L-guluronic acid (G) เชื่อมกันที่ตำแหน่ง 1-4 ภายในโมเลกุลประกอบด้วย homopolymeric regions ของ G-blocks และ M-block ตามลำดับ และมีโมเลกุลบางส่วนเป็น MG-blocks

รูปที่ 2.5 สาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Macrocystis pyrifera* และ *Laminaria digitata*

ที่มา : Chris Grossman, 2008 และ Michael D.R. Guiry, 2016



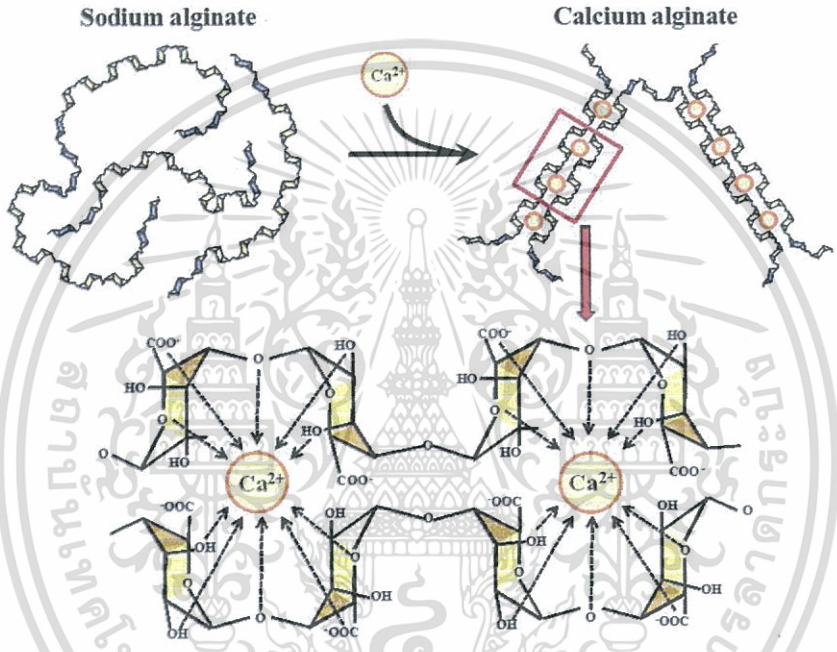
รูปที่ 2.6 (a) β-D-mannuronic acid (b) α-L-guluronic acid (c) โครงสร้างโมเลกุลโซเดียมแอลจิเนต

ที่มา: Keita Kashima and Masanao Imai, 2012

สัดส่วนของโพลีเมอร์ร่วม และโครงสร้างเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดสมบัติของแอลจิเนต เช่น ถ้าโพลีเมอร์มีปริมาณ G มากจะให้สมบัติเป็นเจลแข็ง ในขณะโพลีเมอร์ที่มีปริมาณ M สูงจะมีแนวโน้มเกิดเจลที่อ่อนนุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

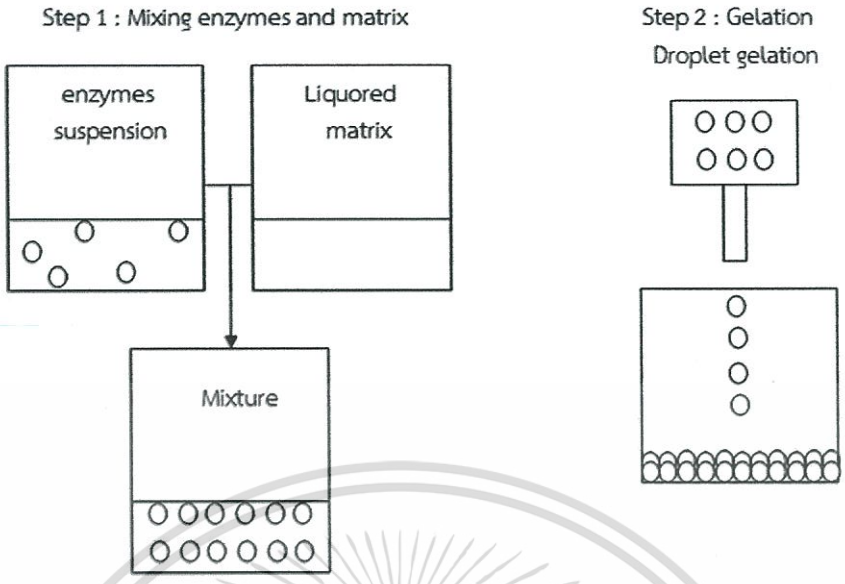
มีสภาวะการเกิดเจลที่กว้างกว่า แอลจิเนตทางการค้ามีอนุพันธ์หลายรูปแบบซึ่งมีสมบัติการละลายน้ำได้แตกต่างกัน เช่น อนุพันธ์ของเกลือ Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}, NH_4^{+} และรูปของ propylene glycol alginate ซึ่งได้จากปฏิกิริยาของ alginic acid กับpropylene oxide ภายใต้ความดัน อนุพันธ์เหล่านี้จะละลายได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ความหนืดของสารละลายแอลจิเนตที่ได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเข้มข้น น้ำหนักโมเลกุล และการมีโลหะประจุบวก อย่างไรก็ตามแอลจิเนตบางชนิดจะมีคุณสมบัติในการเกิดเจลเมื่อทำปฏิกิริยากับ Ca^{2+} โดยมี Ca^{2+} เกาะไปอยู่กับสายโพลิเมอร์ โครงสร้างของเจลจึงมีลักษณะคล้ายกล่องไข่ จึงเรียกว่า Egg box model



รูปที่ 2.7 การเกิด Egg box model จาก α-L-guluronic acid เมื่อเติมแคลเซียมไอออน
ที่มา: Keita Kashima and Masanao Imai, 2012

สมบัติของแอลจิเนตอีกอย่างหนึ่งคือ สามารถเกิด Irreversible gel ในน้ำเย็นที่มี Ca^{2+} ได้ คุณสมบัติในการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำนี้ทำให้แอลจิเนตแตกต่างจากไฮโดรคอลลอยด์ที่ได้จากสาหร่ายอื่น ๆ การเกิดเจลไอโอโนโทรปิคของแอลจิเนต (Ionotropic Gelation) เกิดเมื่อสารละลายมีไอออนของโลหะ เช่น อะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แบเรียมไอออน (Ba^{2+}) การแทนที่ของโลหะเกิดเป็นเจลโครงสร้าง 3 มิติที่ค่อนข้างเฉื่อย สารจึงถูกกักอยู่ภายในเจลด้วยสภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่ส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์ด้วยแบเรียมแอลจิเนต ทำโดยนำเอนไซม์มาผสมกับสารละลายแอลจิเนตในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วหยดลงในสารละลายแบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) หลังกระบวนการตรึงเสร็จสิ้น เอนไซม์จะยึดติดอยู่ภายในเม็ดแบเรียมแอลจิเนตที่มีสภาพเป็นของแข็งทรงกลม สีขาวขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ด้วยการเอนแทรปเมนต์
ที่มา: ดัดแปลงจาก Siripattanakul and Khun, 2010

2 เอนไซม์ถูกห่อหุ้มไว้ในแคปซูลขนาดเล็ก หรือไมโครแคปซูล (Microencapsulation) ขนาดตั้งแต่ 1 ถึง 1,000 ไมครอนโดยใช้เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชัน (microencapsulation) ทำให้สามารถปลดปล่อยสารบางชนิดหรือผลผลิตจากสารห่อหุ้ม (shell) ได้ ในขณะเดียวกันจะกักสารแกนกลาง (core) ไว้ภายในเยื่อเลือกผ่าน (Semipermeable Membrane) เช่น คอลลอยเดียน (Collodian) หรือซิลิโคน (Silicone) ซึ่งสามารถป้องกันการผ่านของเอนไซม์ได้ สารที่นิยมใช้ในการห่อหุ้มได้แก่ โปรตีนไฮโดรไลเสท ฟอสโฟลิพิด การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่ไม่มีความแข็งแรงพอที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม และอาจเกิดปัญหาการตกตะกอนได้ อีกทั้งการเตรียมเอนไซม์ที่จะตรึงด้วยวิธีนี้ ต้องมีการควบคุมสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาขณะเกิดโพลีเมอร์อย่างดี เพื่อป้องกันผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ส่วนใหญ่มักใช้กับอาหารเชิงการแพทย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางยา ลดการถูกออกซิไดซ์ของสารที่ไวต่อแสง ช่วยให้มีความคงตัวดีขึ้นและเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น อีกทั้งยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารไปยังบริเวณที่ต้องการได้ในเวลาและปริมาณที่เหมาะสม วิธีการผลิตไมโครแคปซูลมีทั้งวิธีทางเคมีและทางกายภาพ ทางการแพทย์นิยมใช้วิธีทางกายภาพชนิด freeze dry กลไกการปลดปล่อยสารแกนกลางจะอาศัยเอนไซม์ความดัน หรือปฏิกิริยาทางเคมีภายในร่างกาย เทคนิคนี้มีบทบาททั้งทางรักษาและป้องกันโรคต่างๆ เช่น เบาหวาน มะเร็ง หัวใจแลหลอดเลือด โรคติดเชื้อ และยังใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ปัจจุบันเทคนิคนี้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อห่อหุ้มสารแกนกลางด้วยสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะ เหมาะกับการปลดปล่อยสารแกนกลางให้ออกฤทธิ์รักษาและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2.3 การพิจารณาเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์พิจารณาเลือกสมบัติของวัสดุดักติดที่ใช้ให้เหมาะสมกับรูปแบบการตรึง พร้อมทั้งพิจารณาข้อดีข้อเสียของวิธีนั้นๆด้วย ปัจจัยหลักที่ใช้พิจารณาเลือกวัตถุดักติดจะคล้ายคลึงกันคือ พิจารณา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติทางกายภาพ (Physical properties) มีพื้นที่ผิวที่ใช้ในการจับยึดมาก ไม่ละลายน้ำ มีความแข็งแรง มีสภาพการยอมให้สารภายในผ่านหรือซึมออกได้ (Permeability) วัสดุดักติดสามารถทนทานต่อความร้อนและความดันสูง รวมทั้งทนต่อสภาพแวดล้อมทางกายภาพและทางเคมี อีกทั้งไม่เป็นอันตรายต่อระบบและสิ่งแวดล้อม มีความคุ้มทุน สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำ

ข้อดีของเอนไซม์ตรึงเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

1 เอนไซม์จะมีเสถียรภาพมากขึ้น ถ้าวิธีการตรึงนั้นเหมาะสม
2 ใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างออกไปจากเอนไซม์อิสระได้
3 แยกสารผลิตภัณฑ์ออกได้ง่าย
4 นำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำต่อเนื่องกันได้หลายครั้ง ช่วยลดต้นทุนการผลิต

ในอุตสาหกรรมนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้เพื่อแยกเอนไซม์หลังการใช้ไฮโดรไลซาตร์ช และนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งจนกว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดต่ำลงมาก จึงประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากกว่าการใช้เอนไซม์ในรูปอิสระ และสามารถใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระแบบเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับการเลือกชนิดของตัวกลางที่ใช้จับยึด วิธีการตรึงรูป และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกริยาที่จุดหนึ่งๆด้วย เอนไซม์ที่ถูกตรึงนี้สามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าการใช้งานเอนไซม์ในรูปอิสระ โดยเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร เช่น เอนไซม์เรนนิน (rennin) ใช้ย่อยโปรตีนเคซีน (casein) ในน้ำนม เพื่อผลิตเนยแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

Potato Starch

Thermostable alpha-amylase or Termamyl

3.1.2 สารเคมี

Glutaraldehyde

Gelatin

Sodium Alginate

Calciumchlorine

3,5 - dinitrosalicylic acid (DNS)

Glycerine

3.2 อุปกรณ์

VIS Spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo รุ่น Genesys 10VIS

Waterbath

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 วิธีการตรึงเอนไซม์อะไมเลสด้วยแอลจิเนต

3.3.1.1 นำเอนไซม์อะไมเลส 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กลีเซอไรด์ 2 มิลลิลิตร และสารละลายแอลจิเนต 80 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากผงแอลจิเนต 2 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำอุ่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร คนสารละลายเบาๆ ระวังเกิดฟองอากาศ จนพระทั่งสารละลายเนียนเป็นเนื้อเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.2 เตรียมสารละลาย 1M จากผงแคลเซียมคลอไรด์แบบฟู้ดเกรด (มวลโมเลกุล 110.8940 กรัม/โมล) ชั่งผง 55.49 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โมลต่อ 1000 มิลลิลิตร นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิตู้เย็นก่อนนำมาใช้งาน

3.3.1.3 ใช้กระบอกฉีดยา (Syringe) ใส่เข็มเบอร์เล็กดูดเอนไซม์อะไมเลสที่ผสมกับแอลจิเนตเรียบร้อยแล้วในข้อ 3.3.1.1 หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็นจากข้อ 3.3.1.2 โดยถือกระบอกฉีดยาในลักษณะตั้งและกดลงมาตรงๆ ถือให้เข็มห่างจากผิวหน้าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ประมาณ 1 เซนติเมตร หยดด้วยอัตราเร็วคงที่ คนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และเปลี่ยนสารละลายเป็นระยะเพื่อกันความเข้มข้นสารละลายเปลี่ยนไป จะได้เอนไซม์อะไมเลสตรึงในเม็ดบีทแอลจิเนตรูปทรงกลม นำไปแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ใหม่อีกครั้งก่อนตักขึ้นเก็บในกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิตู้เย็น

3.3.2 วิธีการตรึงเอนไซม์อะไมเลสด้วยเจลาติน

3.3.2.1 เตรียมเจลาติน 10 %w/v โดยนำผงเจลาติน 10 กรัมละลายในน้ำอุ่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร คนจนสารกระจายตัวทั่วกัน

3.3.2.2 นำเอนไซม์อะไมเลส 4 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร และกลูทารอลแอลดีไฮด์ 4 มิลลิลิตรผสมจนเข้ากันดี มาเทผสมในเจลาตินแล้วจึงแบ่งเทลงเพลท เพลทละ 20 มิลลิลิตร รอเจลเซตตัวที่อุณหภูมิห้อง นำไปเก็บรักษาในตู้เย็น แล้วจึงนำมาตัดเป็นวุ้นขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร จะได้เอนไซม์อะไมเลสตรึงในวุ้นเจลาติน

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เตรียมสารละลายแป้ง (Soluble starch) 2%w/v จากผงแป้ง 2 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นอุ่นแล้วเทปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรจนสารละลายถึงขีดปริมาตรที่กำหนด จะได้น้ำแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสอิสระ ปิเปตน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร น้ำแป้งและเอนไซม์อะไมเลสอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำลงบ่มใน อ่างน้ำร้อน (Water bath) อุณหภูมิ 40±2 องศาเซสเซียส จนครบเวลา 30 นาที จึงนำไปหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปิเปตสารละลายจากหลอดทดลองมา 1 มิลลิลิตรลงในหลอดใหม่และเติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดลงต้มน้ำเดือดอีก 10 นาที ครบเวลานำขึ้นเติมน้ำกลั่นอีก 5 มิลลิลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

3.3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึง แบ่งเป็นการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีคลอสลิ้ง และวิธีเอนแทรปเมนท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 กรณีบ่มเอนไซม์อะไมเลสตรึงด้วยวิธีคลอสลิ้ง ปิเปตน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร น้ำแป้ง 1 มิลลิลิตร และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ถูกตรึงไว้ด้วยแผ่นวุ้นเจลาติน 0.5 กรัมลงในหลอดทดลอง นำลงบ่มในอ่างน้ำร้อน (Water bath) อุณหภูมิ 40±2 องศาเซสเซียส จนครบเวลา 30 นาที นำมาเทแยกวุ้นและสารละลายออกจากกัน เพื่อนำแผ่นวุ้นเจลาตินไปเข้ากระบวนการย่อยสตาร์ชใหม่ และนำสารละลายที่บ่มได้ไปหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปิเปตสารละลายจากหลอดทดลองมา 1 มิลลิลิตรลงในหลอดใหม่ เติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร นำลงต้มในน้ำเดือดอีก 10 นาที ครบเวลานำหลอดทดลองขึ้นเติมน้ำกลั่นอีก 5 มิลลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยทำการย่อยซ้ำจนกว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ตรึงลดลงน้อยกว่า 50 %

2 กรณีบ่มเอนไซม์อะไมเลสตรึงด้วยวิธีเอนแทรปเมนท์ ปิเปตน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร น้ำแป้ง 1 มิลลิลิตร และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ถูกตรึงอยู่ภายในเม็ดบีทแอลจิเนต 0.5 กรัมลงในหลอดทดลอง นำลงบ่มในอ่างน้ำร้อน (Water bath) อุณหภูมิ 40±2 องศาเซสเซียส จนครบเวลา 30 นาที นำมาเทแยกเม็ดบีทและสารละลายออกจากกัน เพื่อนำบีทไปเข้ากระบวนการย่อยสตาร์ชใหม่ และนำสารละลายที่บ่มได้ไปหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปิเปตสารละลายจากหลอดทดลองมา 1 มิลลิลิตรลงในหลอดใหม่ เติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิลิตร นำลงต้มในน้ำเดือดอีก 10 นาที ครบเวลานำหลอดทดลองขึ้นเติมน้ำกลั่นอีก 5 มิลลิตร และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยทำการย่อยซ้ำจนกว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ตรึงลดลงน้อยกว่า 50 %

3.3.4 วิธีการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

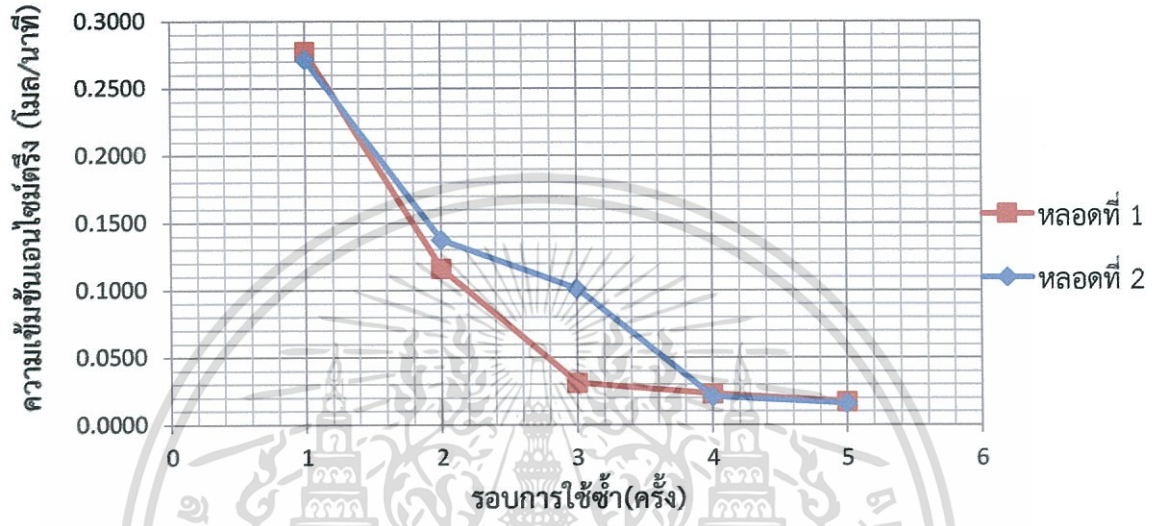
เทสารละลายจากหลอดทดลองที่ผ่านการต้ม DNS และเติมน้ำกลั่นเรียบร้อยแล้วมาวอเทค 15 วินาทีและเทลงคิวเวตพลาสติก นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นผสม DNS ต้มที่อุณหภูมิและเวลาเดินสกันเป็นหลอดแบลงก์เปรียบเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

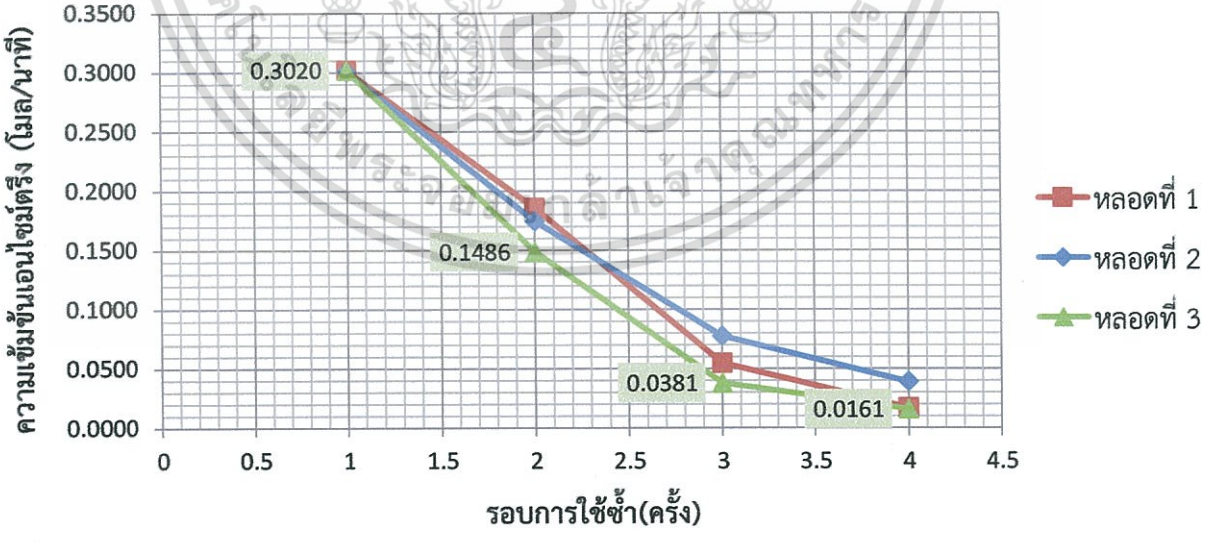
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ตรึงด้วยวิธีเอนแทรปเมนต์ในบีทแอลจิเนต

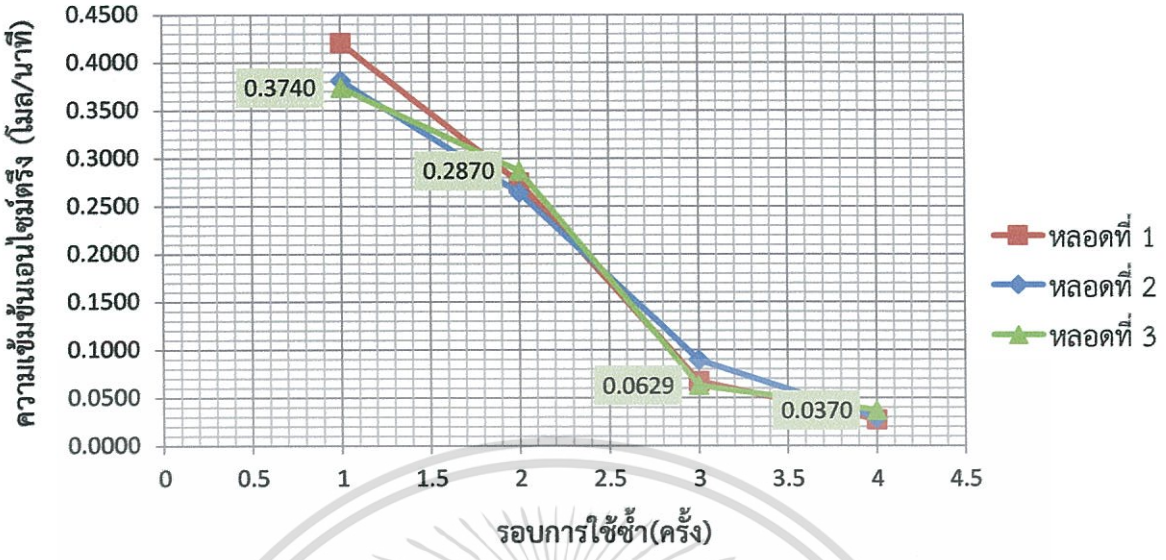


ภาพที่ 4.1.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอล-จิเนต (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย

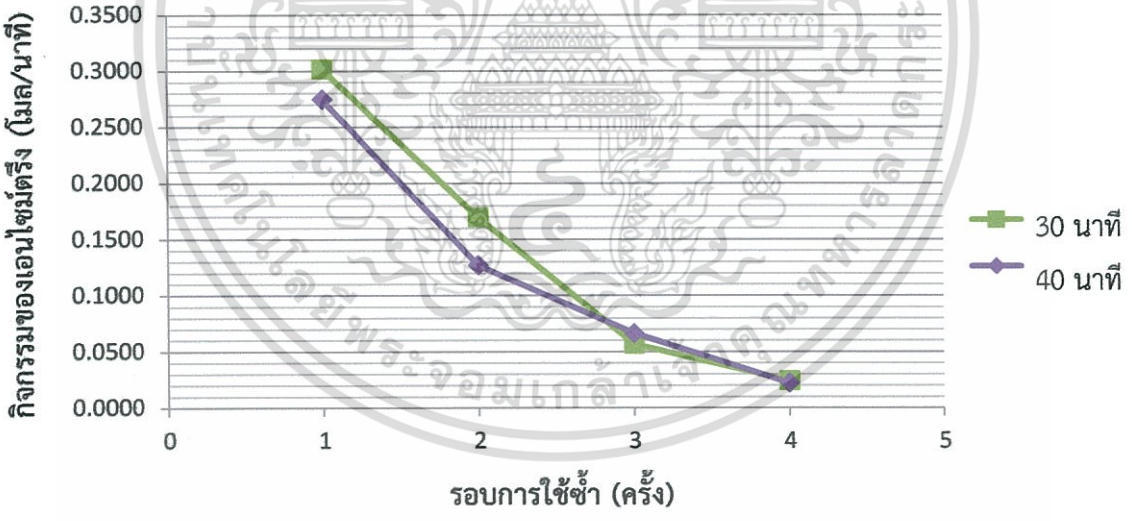


ภาพที่ 4.1.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอล-จิเนต (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเข้มข้นของกลูโคสจากการบ่มย่อยสตาร์ชโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบในการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำในการกระบวนย่อย

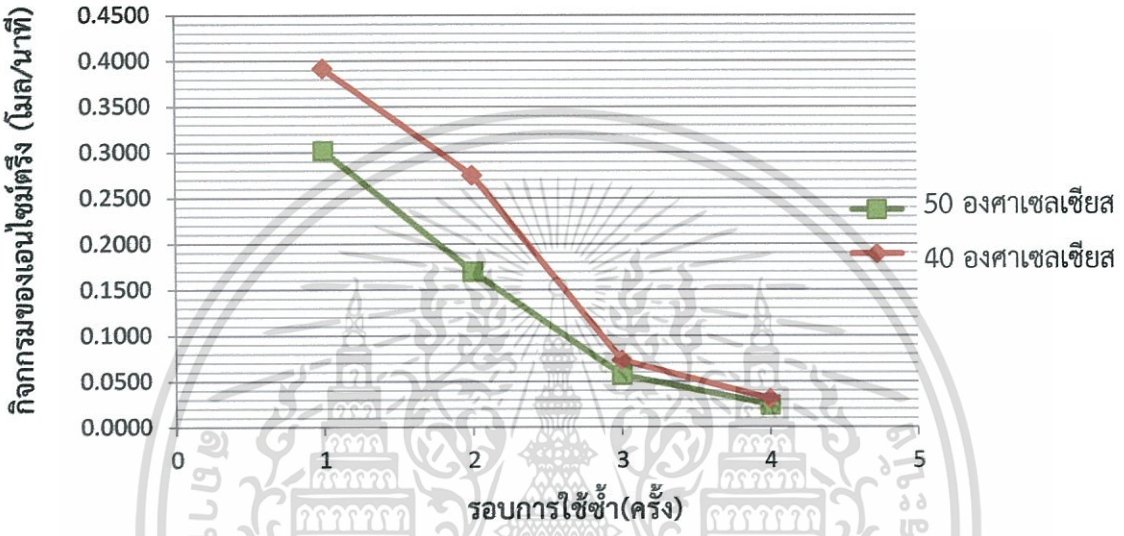


ภาพที่ 4.1.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอล-จิเนต (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 40 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย

จากการย่อยสตาร์ชด้วยเอนไซม์ที่ตรึงด้วยการเอนแทรปเมนต์ในบีทแอลจิเนต ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยระยะเวลาการบ่มที่แตกต่างกัน พบว่าการทำงานของเอนไซม์ตรึงที่ 30 นาที ให้ผลการย่อยสตาร์ชดีกว่าการย่อยที่ 40 นาที สังเกตได้จากสารละลายภายหลังการบ่มให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งแปลความได้ว่าสตาร์ชถูกไฮโดรไลซ์เป็นน้ำตาลได้มากกว่าในรอบการย่อยที่ 1 และ 2 และเมื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยซ้ำเป็นรอบที่ 3 ขึ้นไป ประสิทธิภาพของเอนไซม์บ่มที่เวลา 30 นาที และ 40 นาที ลดลงต่ำกว่า 20 % ของกิจกรรมการทำงานเริ่มต้น และพบว่าการบ่มทั้งสองเวลาเหลือกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้การบ่มที่ 30 นาทีให้ผลดีกว่าเนื่องจากเอนไซม์ได้รับความร้อนในระยะเวลาที่สั้นกว่า จึงลดโอกาสการคลายโครงสร้างของเอนไซม์ที่ทำให้หมู่ฟังก์ชันเปลี่ยนแปลงไปจนเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (Denaturalation) ได้

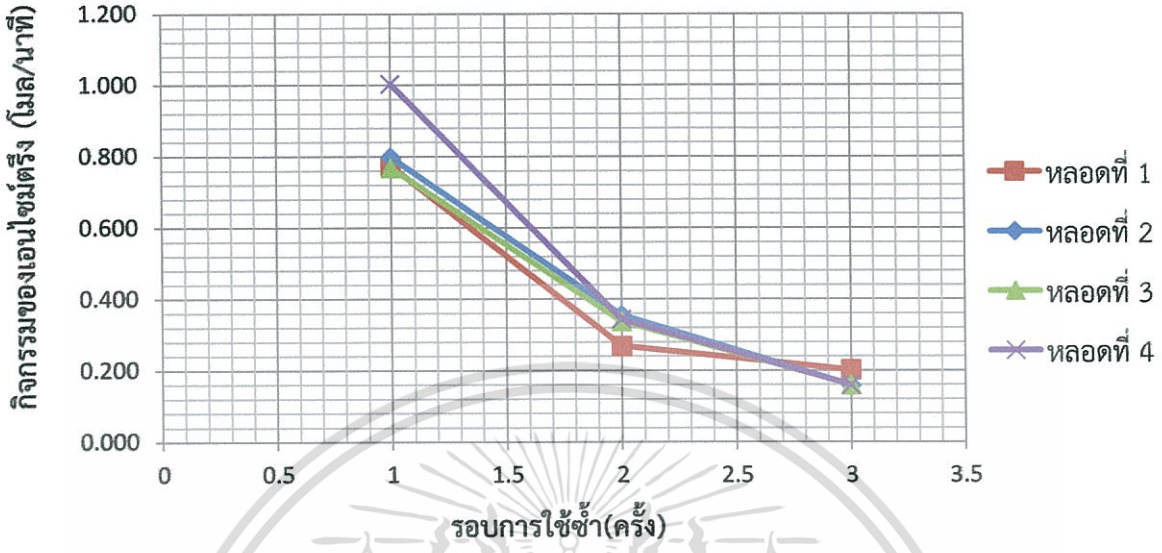


ภาพที่ 4.1.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอล-จิเนต (โมล/นาที) ที่บ่มเป็นเวลา 30 นาที ณ อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย

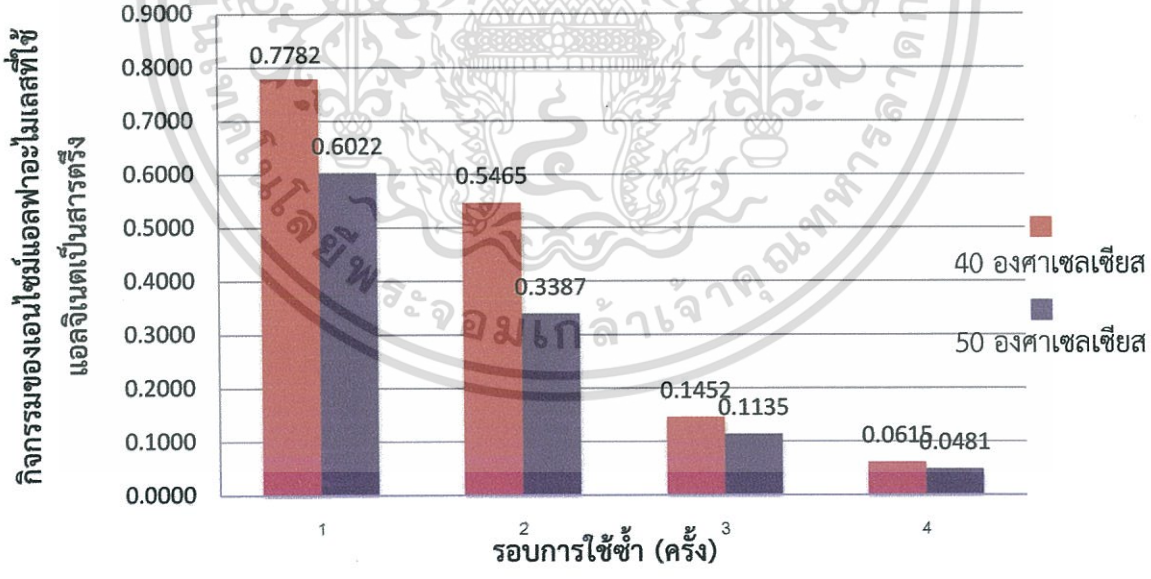
การย่อยสตาร์ชด้วยเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีการเอนแทรปเมนต์ในบีทแอลจิเนตด้วยระยะเวลาการบ่มเท่ากันแต่มีความต่างกันที่อุณหภูมิ พบว่าการทำงานของเอนไซม์ตรึงที่ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลการย่อยสตาร์ชดีกว่าตลอดกระบวนการย่อยซ้ำ สังเกตได้จากประสิทธิภาพในการย่อยที่สูงกว่า ทำให้ไฮโดรไลซ์สตาร์ชเป็นน้ำตาลได้มาก ค่าดูดกลืนแสงจึงมากกว่า ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ได้รับความร้อนในระดับที่ไม่สูงจนเกินไปจึงลดการคลายตัวของโครงสร้าง หมู่ฟังก์ชันต่างๆจึงไม่ถูกเปลี่ยนแปลง การเสียสภาพธรรมชาติจึงเกิดน้อย กว่าเอนไซม์ตรึงที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาทีเป็นสภาวะที่ใช้ในการบ่มย่อยสตาร์ชเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีการเอนแทรปเมนต์และวิธีการครอสลิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ตรึงด้วยวิธีครอสลิ้งด้วยเจลาติน



ภาพที่ 4.2.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในแผ่นเจลาติน (โมล/นาที) ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึงในกระบวนการย่อย

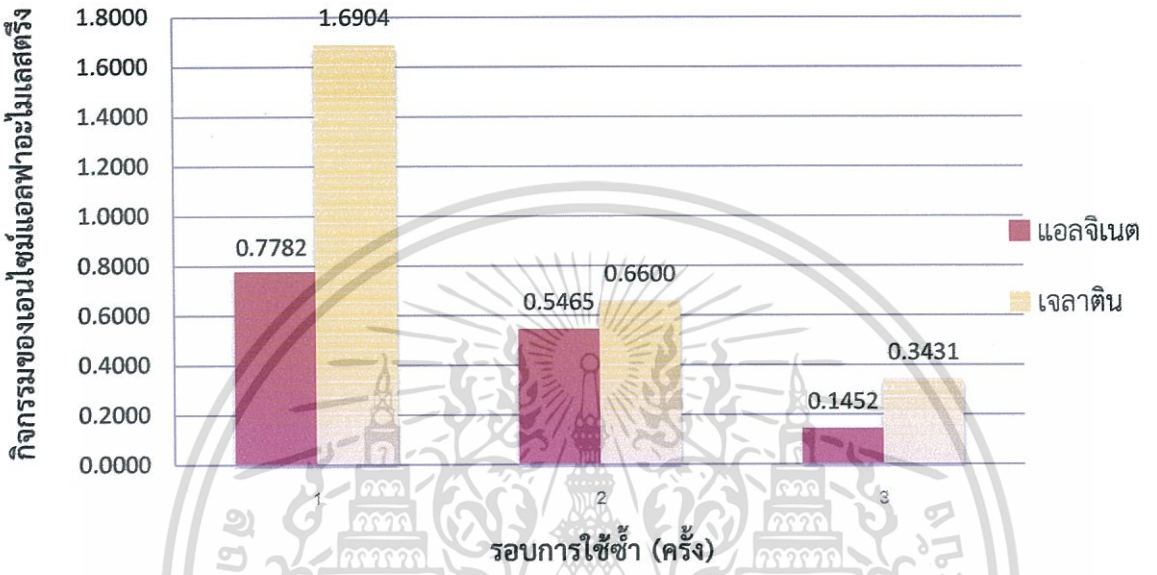


ภาพที่ 4.2.2 กราฟเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเมื่อใช้แอลจิเนตเป็นสารตรึง บ่มที่ ณ อุณหภูมิ 40 และ50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การย่อยสตาร์ชด้วยเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีการครอสลิ้งในแผ่นเจลาตินอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที พบว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ตรึงลดลงเหลือ 20 % เมื่อเทียบกับประสิทธิภาพเริ่มต้นในรอบการใช้ซ้ำที่ 3 เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีการเอนแทรปเมนต์ในบีทแอลจิเนต แต่เมื่อนำผลกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ตรึงด้วยวิธีการตรึงที่แตกต่างกันมาเปรียบเทียบ พบผลดังนี้



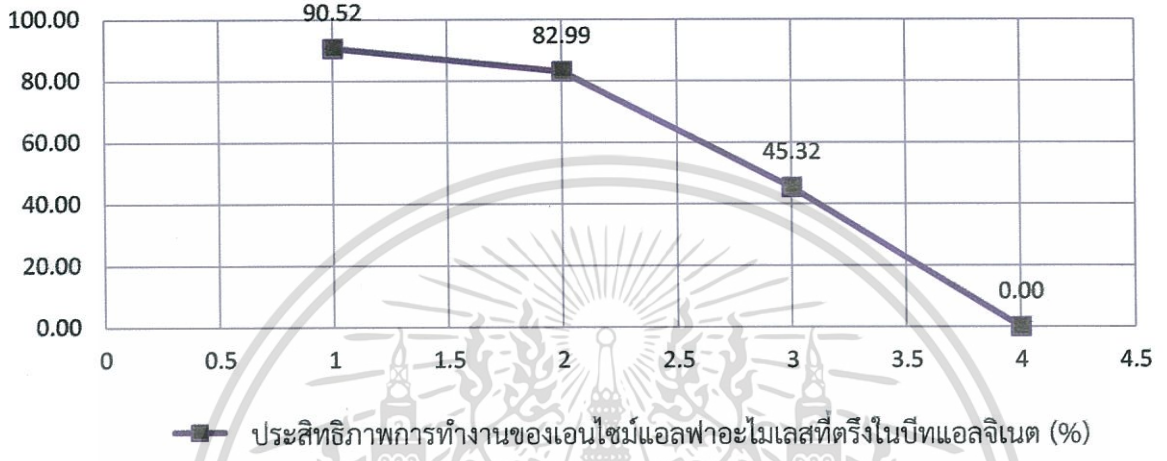
ภาพที่ 4.2.3 กราฟเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในเม็ดบีทแอลจิเนตกับเอนไซม์ตรึงในแผ่นเจลาติน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการครอสลิ้งในแผ่นเจลาตินที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกับเอนไซม์ที่ตรึงด้วยการเอนแทรปเมนต์ในบีทแอลจิเนต พบว่าเอนไซม์ตรึงในแผ่นเจลาตินให้ผลกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่สูงกว่า เนื่องจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีครอสลิ้งใช้เจลาตินร่วมกับสารละลายกลูทารอลดีไฮด์ ซึ่งมีกลูทารอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง โมเลกุลประกอบด้วยหมู่เมทิลลีน 3 โมเลกุลคั่นกลางระหว่างแอลดีไฮด์สองกลุ่ม HCO-$(CH_2)_3$-CHO (Monsan *et al.*, 1975). ที่ปลายสายของโครงสร้างมีหมู่แอลดีไฮด์อิสระ -CHO อยู่จึงสามารถจับกับหมู่เอมีนของเจลาตินและเอนไซม์ได้ พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นส่งผลให้การเชื่อมครอสลิ้งมีความแข็งแรง เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรและสามารถทนความร้อนได้มากกว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเอนแทรปเมนต์ที่เกิดแรงยึดเหนี่ยว ภายในโครงสร้างเจลอย่างอ่อนๆ ระหว่างโมเลกุลของแอลจิเนตกับไอออนของแคลเซียม การมีแคลเซียมไอออนจะช่วยลดแรงผลักระหว่างโมเลกุลของแอลจิเนต ทำให้โครงสร้างพันเกลียวยึดกันแน่นเป็นโครงร่าง 3 มิติที่สามารถกักเอนไซม์ไว้ภายใน อย่างไรก็ตามการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเอนแทรปเมนต์ สารที่ใช้ตรึงกับเอนไซม์ไม่มีการสร้างพันธะต่อกัน เอนไซม์จึงการเสียสภาพธรรมชาติจากความร้อนได้ง่ายกว่า เอนไซม์ตรึงจะถูกปลดปล่อยจากบีทแอลจิเนตในระดับหนึ่งเท่านั้น รวมทั้งเอนไซม์ตรึงมีโอกาสหลุดออกจากโครงสร้าง 3 มิติในระหว่างกระบวนการย่อยสตาร์ชได้ ทำได้สูญเสียเอนไซม์ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
148886

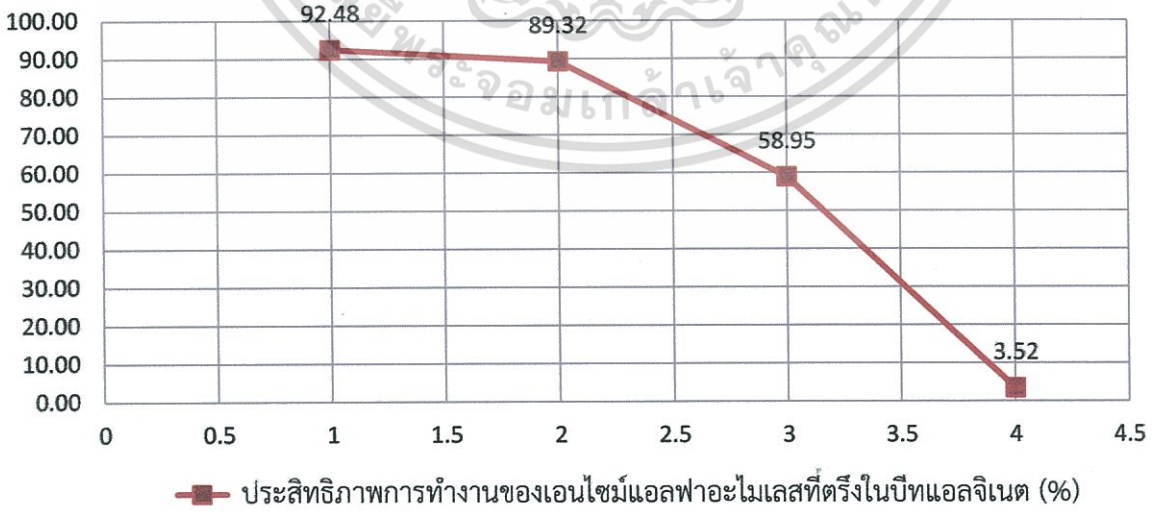
ระหว่างกระบวนการย่อย ในขณะที่การย่อยสตาร์ชของเอนไซม์ที่ตรึงในแผ่นเจลาตินสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลสตาร์ชได้มากกว่า เพราะการจับยึดระหว่างสารเชื่อมขวางและเอนไซม์ไม่ต้องอาศัยหลักการปลดปล่อยเอนไซม์ การเข้าทำปฏิกิริยาเพื่อย่อยโมเลกุลสตาร์ชจึงเกิดโดยตรง

4.3 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึง



ภาพที่ 4.3.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

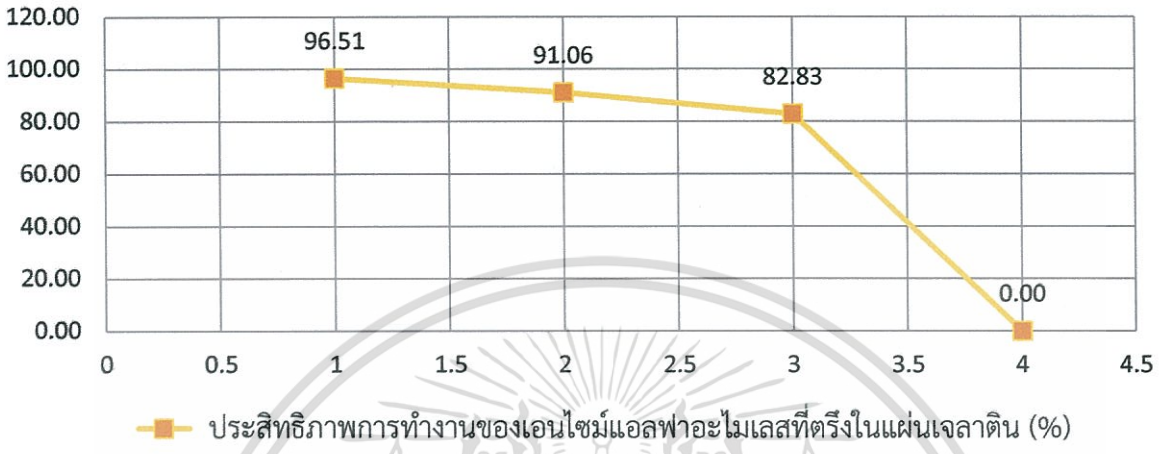
หากพิจารณาประสิทธิภาพเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ตรึงในบีทแอลจิเนตที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์ตรึงที่ตรึง ณ สภาวะนี้มีประสิทธิภาพการย่อยเริ่มต้นที่ 90.52 % สามารถนำการใช้ซ้ำได้เพียง 3 รอบ โดยในรอบที่ 3 ประสิทธิภาพจะลดลงมากกว่า 50 %



ภาพที่ 4.3.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในบีทแอลจิเนต บ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

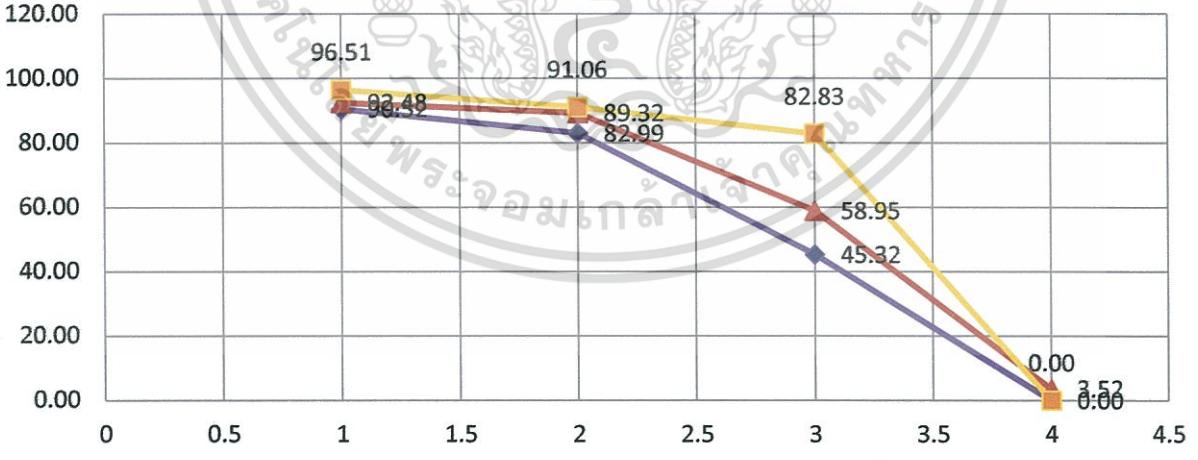
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อลดอุณหภูมิการบ่มลงเหลือ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ตรึงในบีทแอลจิเนตมีประสิทธิภาพการย่อยเริ่มต้นที่สูงขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อยคือ 92.48 % และในรอบการใช้รอบที่ 3 ยังคงประสิทธิภาพมากกว่า 50 %



ภาพที่ 4.3.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงในแผ่นเจลาติน บ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

ส่วนประสิทธิภาพของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ตรึงในแผ่นเจลาตินบ่ม ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์ตรึงที่สภาวะนี้มีประสิทธิภาพการย่อยเริ่มต้นที่ 96.51 % และในรอบการใช้ซ้ำรอบที่ 3 ยังสามารถคงประสิทธิภาพไว้มากกว่า 50 %



ภาพที่ 4.3.4 กราฟเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตรึงที่ใช้สภาวะการบ่มต่างกัน เป็นเวลา 30 นาที กับรอบการนำเอนไซม์ตรึงกลับมาใช้ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการทดสอบเอนไซม์ตรึงใช้สภาวะการย่อยทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ การบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาทีและ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเอนแทรปเมนต์ให้ผลกิจกรรมการทำงาน ประสิทธิภาพการย่อยด้อยกว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีครอสลิ้งทั้ง 3 สภาวะ เนื่องจากเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีนี้ไม่มีการสร้างพันธะใดๆกับสารเชื่อมขวาง และการกักเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยการปลดปล่อยเอนไซม์ไปจับกับซับสเตรท จึงพื้นที่ในการทำปฏิกิริยาลดลง อีกทั้งเอนไซม์ยังมีโอกาสหลุดออกจากโครงร่างดักติด ทำให้สูญเสียเอนไซม์ไประหว่างกระบวนการ ในขณะที่การตรึงเอนไซม์ด้วยการครอสลิ้งโดยอาศัยกลูทาราแอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง พบว่าหมู่แอลดีไฮด์จากสารเชื่อมขวางจะเชื่อมประสานกับหมู่เอมีนของเจลาตินและเอนไซม์เกิดพันธะโควาเลนต์ แรงไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะช่วยให้เอนไซม์ตรึงทนต่อสภาวะการบ่มย่อยได้มากยิ่งขึ้น และสมบัติของกลูทาราแอลดีไฮด์ยังช่วยป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ จึงส่งผลให้เอนไซม์ตรึงด้วยวิธีครอสลิ้งมีประสิทธิภาพการทำงานสูง อีกทั้งการตรึงเอนไซม์รูปแบบนี้เอนไซม์จะถูกยึดติดกับสารเชื่อมขวางและสารก่อเจลได้ดีจึงช่วยลดโอกาสการสูญเสียเอนไซม์ไปในระหว่างการย่อยได้มาก รวมทั้งยังช่วยในการเข้าจับกับสับสเตรทได้โดยตรง ไม่ต้องอาศัยการปลดปล่อยเอนไซม์จากโครงร่างดักติดแบบวิธีเอนแทรปเมนต์ จึงย่อยสตาร์ชได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบการบ่มย่อยสตาร์ชที่อุณหภูมิและระยะเวลาเดียวกัน โดยพบว่าการใช้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีครอสลิ้งและวิธีเอนแทรปเมนต์มีประสิทธิภาพการทำงานรอบแรก 96.51% และ 92.48% ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงมาย่อยซ้ำกิจกรรมเอนไซม์จะลดต่ำลงจนกระทั่งกิจกรรมการทำงานต่ำกว่า 20% ในรอบที่ 3 เทียบประสิทธิภาพเอนไซม์ตรึง จะพบว่าเอนไซม์ตรึงด้วยวิธีครอสลิ้งยังสามารถคงประสิทธิภาพไว้มากกว่า 80% ในขณะที่เอนไซม์ตรึงด้วยวิธีเอนแทรปเมนต์มีประสิทธิภาพคงเหลือมากกว่า 50% เท่านั้น จึงสรุปว่าได้ว่าการตรึงเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสด้วยวิธีการครอสลิ้งด้วยแผ่นเจลาตินโดยมีกลูทาราแอลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง เหมาะสมกับการบ่มย่อยสตาร์ชที่สภาวะ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีมากที่สุด

5.2 ข้อเสนอะแนะ

5.2.1 ควรปรับความเข้มข้นตัวตรึง ศึกษาผลกระทบของตัวตรึงกับเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา เพื่อดูความเหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ให้ทำปฏิกิริยาได้นานที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

นิตยา ตันติวา และนพพล เล็กสวัสดิ์. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลฟ่าอะไมเลสที่ผลิตจากเชื้อ Bacillus sp. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-004.pdf. สืบค้นเมื่อ 6 ธันวาคม 2558.

นิธิยา รัตนาปนนท์ และพิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. immobilized enzyme / เอนไซม์ตรึงรูป. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4162/immobilized-enzyme. สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2558.

นิรนาม. การตรึงเซลล์ (Cell Immobilization Process). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://app.enit.kku.ac.th/mis/administrator/doc_upload/20140308091627.pdf สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2558.

บัณฑิต พรหมรักษา จุรีรัตน์ ดาดวง เตือนจิต คำพิทักษ์ ประณิธิ หงสประภาส และพัชรี บุญศิริ. เทคนิคไมโครเอนแคปซูเลชันและบทบาททางการแพทย์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.smj.ejnal.com/e-journal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1845. สืบค้นเมื่อ 22 พฤษภาคม 2559.

ศรัณยู คำเมือง และรักฤดี สารธิมา. แอลฟ่าอะไมเลส. เข้าถึงได้จาก : http://:www.kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_bymst/ag_9_in_4.1.1_2_212() สืบค้นเมื่อ 6 ธันวาคม 2558.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2549. เอนไซม์กับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.tistrfoodprocess.net/download/article/Enzyme_food_th.htm สืบค้นเมื่อ 13 ธันวาคม 2558.

เสาวนาภรณ์ โชคสกุลพร. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากอ้อยเลาโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://rdi.npu.ac.th/rdb/uppaper/030920150040_08.pdf สืบค้นเมื่อ 24 กรกฎาคม 2559.

Blanca, E., B. Huerta, R. Castro-Muñoz and J.Y. Fernández. 2014. Use of gelatin-malto dextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (Opuntia stricta). LWT - Food Science and Technology 62: 242-248.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Food & Bio Technology. การผลิตเอนไซม์ตรึงรูป. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.sc.chula.ac.th/clubs/FoodClub/Page_16.htm สืบค้นเมื่อ 11 ธันวาคม 2558.

Istenic, K., B.D. Balanc, V.B. Djordjevic, M. Bele, V.A. Nedovic, B.M. Bugarski and N.P. Ulrih. 2015. Encapsulation of resveratrol into Ca-alginate submicron particle. Jounal of Food Engineering 167: 196-203.

Jadhav, S.B. and R.S. Singhal. 2014. Pullulan-complexed **α**-amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. Carbohydrate Polymers 105, 25 : 49–56.

Nam Sun Wang. Enzyme immobilization protocol entrapment in gelatin gel. [Online]. Available from : http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab7c.htm. 15 December 2015.

Otaka, K. 2006. Functional Oligosaccharide and Its New Aspect as Immune Modulation. [Online]. Available from : www.jsb.gr.jp/jbm/2006/0601_1.pdf. 21 November 2015.

Rahim, S.N.A., A. Sulaiman, F. Hamzah, K.H.K. Hamid, M.N.M. Rodhi, M. Musa and N.A. Edama. Enzyme encapsulation within calcium alginate-clay beads: Characterization and application for cassava slurry saccharification. Procedia Engineering 68: 411-417.

Sarker, B., J. Rompf, R. Silva, N. Lang, R. Detsch, J. Kaschta, B. Fabry and A.R. Boccaccini. 2015. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. International Journal of Biological 78: 72-78.

The Islamic Foundation. ฮาลาลเจลลาติน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.islammore.com/view/1221 สืบค้นเมื่อ 21 พฤศจิกายน 2558.

Whitaker. 1996. การใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตอาหารชนิดต่างๆ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/0510.htm สืบค้นเมื่อ 13 ธันวาคม 2558.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

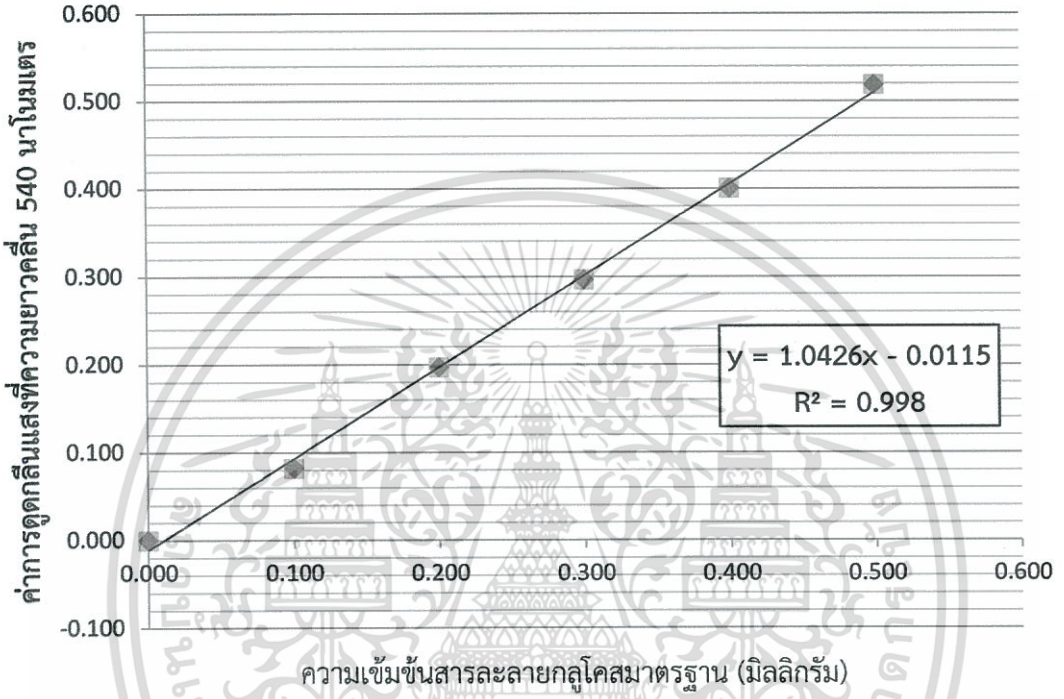
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การเขียนกราฟและสมการเส้นตรงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ก.1 กราฟและสมการเส้นตรงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน



ภาพที่ ก.1 กราฟและสมการเส้นตรงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

สมการเส้นตรง $y = 1.0426x - 0.0115$, $R^2 = 0.998$ แทน y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่บ่มย่อยสตาร์ชด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพื่อหา x หรือเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่เอนไซม์อิรสะย่อยได้ (มิลลิกรัม)

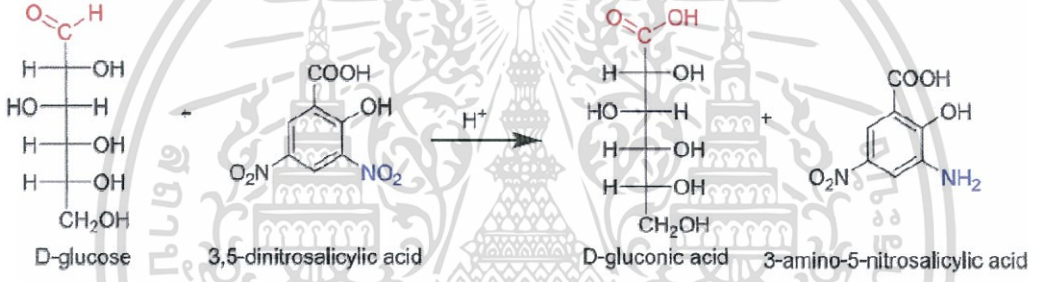
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารละลาย Dinitrosalicylic reageant (DNS reagent)

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส โดยการต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-dinitrosalicylic acid) อยู่ด้วย ปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้นและสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 500-550 นาโนเมตร ซึ่งเชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเกิดจากกระบวนการรีดักชัน เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ 3,5-dinitrosalicylic acid เป็น 3-amino-5-dinitrosalicylic acid ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดำเนินไปจนกว่าสารตั้งต้นคือน้ำตาลรีดิวซ์จะหมด



ภาพที่ ข.1 การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำตาลกลูโคสด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid
ที่มา : เสาวนาภรณ์ โชคสกุลพร (2557)

ข.2 วิธีการเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic reageant (DNS reagent)

นำผงโซเดียมคลอไรด์ (NaOH) จำนวน 4 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 300 มิลลิตร จะได้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จากนั้นใส่ 3,5-dinitrosalicylic acid 2.5 กรัม เติมน้ำกลั่นอีก 125 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันแล้วจึงเติม potassium sodium tartrate 75 กรัมลงไป คนให้เข้ากัน ใส่ magnetic bar ลงในบีกเกอร์ ใช้ฟรอยด์ปิดปากบีกเกอร์กันสิ่งสกปรกตกลงไป นำไปตั้งบน hot plate เปิด magnetic stirrer ในระดับต่ำทิ้งไว้ 1 วัน เพื่อกวนสารเบาๆ จนสาระลายผสมเข้ากันดี วันรุ่งขึ้นนำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย DNS reagent เทเก็บรักษาในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	น.ส. ณัชชา องค์วิเศษไพบูลย์
วัน เดือน ปี เกิด	19 ตุลาคม 2559
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมต้น และมัธยมปลายจากโรงเรียนหอวัง ปีการศึกษา 2551 และ2554 ตามลำดับ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ - ทหารลาดกระบัง ปี 2558
ประสบการณ์ทำงาน และผลการวิจัย	-
รางวัลที่เคยได้รับ	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้