

การตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสบนตัวพองในรูปปัดส์จากไคโตซาน

Immobilization of alcalase on chitosan beads

วราภรณ์ สุทธิวิชัยพร สายพิน ทานัชมาสัย และ วรณวิบูลย์ กาญจนบุญชอร์

Waraporn Suttiwichaiporn, Saipin Thanachasai and Wunwiboon Garnjanagoonchorn

บทคัดย่อ

ไคโตซานเจลในรูปปัดส์ถูกเตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ด และชนิดผงที่มีขนาด 60 mesh ด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวาง การเตรียมปัดส์ด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดเกล็ดจะได้ปัดส์ที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมและมีความยืดหยุ่น ส่วนปัดส์ที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดผงจะมีลักษณะแบนและเปราะบาง สำหรับการเตรียมด้วยวิธีการเชื่อมขวางพบว่า อัตราส่วนของสารเชื่อมขวาง glyoxal hydrate ต่อ tetrasodium pyrophosphate ที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อลักษณะของปัดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ด แต่จะไม่มีผลต่อปัดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดผง อย่างไรก็ตาม ปัดส์ที่เตรียมโดยวิธีการเชื่อมขวางจากไคโตซานทั้ง 2 ชนิด จะเปราะบางและไม่มีความยืดหยุ่น ดังนั้นไคโตซานเจลในรูปปัดส์ที่เตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดเกล็ดจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นตัวพองในการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลส โดยเอนไซม์อัลคาเลสที่ตรึงรูปด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์จะมีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปด้วยพันธะโคเวเลนต์คือ 3 ชั่วโมง

ABSTRACT

Chitosan gels in the form of beads were prepared from chitosan flakes and powders (60 mesh) by neutralization and crosslinking methods. Chitosan beads prepared by neutralization method from chitosan flakes had spherical shape and flexible characteristics. For chitosan beads prepared by neutralization method from chitosan powders, the flat shape and fragile characteristics were obtained. For preparation of chitosan beads by crosslinking method, the results showed that the ratio of glyoxal hydrate to tetrasodium pyrophosphate crosslinking agents influenced the characteristics of chitosan beads obtained from chitosan flakes but this was not the case when chitosan beads were prepared from chitosan powders. However, chitosan beads prepared from both chitosan flakes and powders by using crosslinking method were so fragile and inflexible. Therefore chitosan gel beads prepared by neutralization method from chitosan flakes were suitable supports for immobilizing alcalase. The immobilized alcalase by covalent binding method exhibited higher activity than that prepared by physical adsorption method. The optimal incubating time during covalent binding immobilization was 3 hours.

Key words: immobilization, alcalase, chitosan bead

W. Suttiwichaiporn: bee_nut213@hotmail.com

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University

คำนำ

เอนไซม์ตรึงรูปมีข้อดีหลายประการ เช่น มีความเสถียร สามารถใช้ซ้ำหรือใช้แบบต่อเนื่องได้ ทำให้ไม่สิ้นเปลืองเอนไซม์และยังสามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่าย จึงมีความเหมาะสมสำหรับการใช้งานในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าเอนไซม์อิสระ องค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในการตรึงรูปเอนไซม์คือ ตัวพยุง (immobilization support) ซึ่งสารที่นิยมนำมาใช้เตรียมเป็นตัวพยุงได้แก่ อัลจีเนต (alginate) อะกาโรส (agarose) ไคโตซาน (chitosan) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ซิลิกา (silica) และแก้วมีรูพรุน (controlled pore glass) เป็นต้น จากสมบัติของไคโตซานซึ่งเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่มีหมู่อะมิโนอิสระมากทำให้จับกับเอนไซม์ได้ง่าย จึงนิยมนำมาเตรียมเป็นตัวพยุงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ โดยไคโตซานเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาดีอะซิไทเลชัน (deacetylation) ของไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกของสัตว์จำพวกกุ้งและปูซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล จึงสามารถหาได้ง่ายและราคาไม่แพง นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและไม่มีความเป็นพิษ ไคโตซานไม่ละลายในน้ำแต่ละลายได้ในสารละลายที่มีความเป็นกรดเบสต่ำกว่า 6.5 เมื่ออยู่ในสารละลายกรดหมู่อะมิโน ($-NH_2$) บนสายของพอลิเมอร์ไคโตซานจะอยู่ในรูปของ $-NH_3^+$ ทำให้สามารถไปดึงดูดกับสารที่มีประจุลบหรือส่วนของไคโตซานที่มีประจุลบส่งผลให้เกิดการรวมตัวกัน (aggregation) เป็นโครงสร้างเจลได้ การเตรียมตัวพยุงจากไคโตซานสามารถทำได้โดยการละลายไคโตซานในสารละลายกรดอินทรีย์ (organic acids) เช่น กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) และกรดซิตริก (citric acid) ทำให้ได้สารละลายที่มีความข้นหนืด ซึ่งจะตกตะกอนเมื่อปรับความเป็นกรดเบสให้สูงขึ้น วิธีนี้สามารถใช้ในการเตรียมตัวพยุงไคโตซานเจลในรูปของบีดส์ (beads) เมมเบรน (membrane) ไฟเบอร์ (fiber) และแคปซูล (capsule) เป็นต้น (Krajewska, 2004) ไคโตซานในรูปบีดส์สามารถใช้เป็นตัวพยุงของเอนไซม์ได้หลายชนิด (Cetinus and Oztop, 2003; Ensunchi *et al.*, 2005; Altun and Cetinus, 2007) วิธีการเตรียมไคโตซานในรูปบีดส์สามารถทำได้หลายวิธีแต่การเตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลาง (neutralization method) และวิธีการเชื่อมขวาง (crosslinking method) สามารถทำได้ง่าย ใช้ระยะเวลาสั้น และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงชนิดของไคโตซานและวิธีการเตรียมบีดส์ที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบจาก 2 วิธีคือ วิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวาง เพื่อให้ได้ตัวพยุงที่สามารถนำไปใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลส นอกจากนี้ยังศึกษาวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบจาก 2 วิธีคือ วิธีการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption method) และวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding method) เอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปที่ได้จะมีการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร เช่น การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวพยุง

เตรียมบีดส์จากไคโตซานชนิดเกล็ดและชนิดผงที่มีขนาด 60 mesh จาก 2 วิธี คือ วิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวาง (ไคโตซานทั้ง 2 ชนิด มีค่า degree of deacetylation เท่ากับ 90% โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัททอควา พรีเมียร์ จำกัด)

- วิธีการทำให้เป็นกลาง โดยหยดสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติกเข้มข้น 8% โดยปริมาตร ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน (8%) ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.70 x 38 mm บ่มไว้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างบีดส์ของไคโตซานด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

- วิธีการเชื่อมขวาง โดยหยดสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.70 x 38 mm ลงในสารละลายที่ประกอบด้วยสารเชื่อมขวาง 2 ชนิด คือ glyoxal hydrate เข้มข้น 0.04 g/ml และ tetrasodium pyrophosphate เข้มข้น 0.03 g/ml โดยแปรอัตราส่วนของสารทั้งสองชนิดในสารละลายเป็น 1:1, 1:10, 1:15 และ 1:30 จากนั้นล้างบีดส์ของไคโตซานด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

บีดส์ของไคโตซานที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธี จะเก็บไว้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M pH 7 ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งนำไปใช้

การศึกษาลักษณะปรากฏของบีดส์จากไคโตซาน

สุ่มตัวอย่างบีดส์ของไคโตซานจำนวน 10 เม็ด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและศึกษาลักษณะของบีดส์ภายใต้เลนส์ของเครื่องนับจำนวนแบคทีเรีย (colony counter) ที่มีกำลังขยาย 1.25 เท่า คำนวณความเป็นทรงกลมของบีดส์จากไคโตซานโดยใช้สมการ $sphericity = d/d_c$ เมื่อ d_i = เส้นผ่านศูนย์กลางของทรงกลมที่ใหญ่ที่สุดที่สามารถบรรจุในวัตถุได้, d_c = เส้นผ่านศูนย์กลางของทรงกลมที่เล็กที่สุดที่สามารถล้อมรอบวัตถุได้ (Mohsenin, 1986)

การตรึงรูปเอนไซม์

ตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลส (จาก Novozymes โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอีสเอเซียติก ประเทศไทยจำกัด) บนบีดส์ของไคโตซานจาก 2 วิธี คือ วิธีการดูดซับทางกายภาพและวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

- วิธีการดูดซับทางกายภาพ โดยบ่มบีดส์ของไคโตซานปริมาณ 0.5 g ในสารละลายเอนไซม์อัลคาเลส ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (241.1 Units/ml) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7 ปริมาตร 5 ml อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แปรผันระยะเวลาในการบ่มบีดส์ของไคโตซาน 0-24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเอนไซม์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง (ตรวจสอบไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำล้าง) แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปที่ได้ ทดลอง 2 ซ้ำ

- วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยบ่มบีดส์ของไคโตซานปริมาณ 0.5 g ในสารละลายกลูทาร์ดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.6% โดยปริมาตร นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อกำจัดกลูทาร์ดีไฮด์ส่วนเกินออก จากนั้นนำบีดส์ของไคโตซานมาบ่มในสารละลายเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ (241.1 Units/ml) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7 ปริมาตร 5 ml อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันระยะเวลาในการบ่มบีดส์ของไคโตซานในสารละลายเอนไซม์ 0-24 ชั่วโมงเช่นเดียวกับการตรึงด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ จากนั้นล้างเอนไซม์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง (ตรวจสอบไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำล้าง) นำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปที่ได้ ทดลอง 2 ซ้ำ

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูป

การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสจะใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Abdel-Naby และคณะ (1998) โดยชั่งเอนไซม์ตรึงรูปประมาณ 50 mg ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเคซีนปริมาตร 1 ml นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย TCA 5% ปริมาตร 2 ml นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสปริมาตร 1 ml ลงในหลอด

ทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 2 ml และสาร Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.1 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณค่าแอกทิวิตีในรูป Units/g immobilized enzyme

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ชนิดของไคโตซานและวิธีการเตรียมตัวพองที่เหมาะสม

จากการเตรียมบีดส์ของไคโตซานด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวางจากไคโตซานชนิดเกล็ดและชนิดผงพบว่า บีดส์ของไคโตซานที่ได้จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

เมื่อทดลองเตรียมบีดส์ของไคโตซานด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากไคโตซานชนิดเกล็ดและชนิดผงพบว่า บีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานต่างชนิดกันจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยบีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ดจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม (ค่า sphericity เท่ากับ 0.880 ± 0.109) (ภาพที่ 1a) เมื่อทดลองกดจะมีความยืดหยุ่นคล้ายเจลและค่อนข้างแข็งแรง ส่วนบีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดผงจะมีรอยบุ๋มที่บริเวณส่วนกลางของบีดส์ ค่อนข้างแบน ไม่เป็นเม็ดกลม (ค่า sphericity เท่ากับ 0.360 ± 0.036) (ภาพที่ 1b) เมื่อทดลองกดพบว่า บีดส์ของไคโตซานที่ได้ค่อนข้างเปราะบาง ถูกทำลายได้ง่าย และไม่มีความยืดหยุ่น



Figure 1 Characteristics of chitosan beads prepared by neutralization method from (a) chitosan flakes and (b) chitosan powders (60 mesh).

เมื่อทดลองเตรียมบีดส์ของไคโตซานด้วยวิธีการเชื่อมขวางจากไคโตซานชนิดเกล็ดโดยแปรผันอัตราส่วนของสาร glyoxal hydrate ต่อสาร tetrasodium pyrophosphate เป็น 1:1, 1:10, 1:15 และ 1:30 พบว่า อัตราส่วนของสารเชื่อมขวางมีผลต่อลักษณะของ chitosan gel ที่ได้ เมื่ออัตราส่วนของสารเชื่อมขวางเป็น 1:1 chitosan gel ที่ได้จะมีลักษณะไม่เป็นเม็ด แต่จะมีลักษณะเป็นแผ่นบาง (ค่า sphericity เท่ากับ 0.212 ± 0.079) และค่อนข้างแข็ง (ภาพที่ 2a) เมื่อเพิ่มสัดส่วนของสาร tetrasodium pyrophosphate โดยใช้อัตราส่วนของสารเชื่อมขวางเป็น 1:10 และ 1:15 พบว่า chitosan gel มีลักษณะเป็นเม็ดกลมมากขึ้นโดยมีค่า sphericity เท่ากับ 0.367 ± 0.074 และ 0.370 ± 0.083 ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราส่วนของสาร glyoxal hydrate ต่อสาร tetrasodium pyrophosphate เป็น 1:30 chitosan gel ที่ได้จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมมากที่สุด (ค่า sphericity เท่ากับ 0.400 ± 0.091) (ภาพที่ 2d) อย่างไรก็ตามเมื่อทดลองกดพบว่า chitosan gel ที่ได้ค่อนข้างนิ่มและถูกทำลายได้ง่าย นอกจากนี้เมื่อทดลองเตรียมบีดส์ของไคโตซานโดยใช้ tetrasodium pyrophosphate เป็นสารเชื่อมขวางเพียงชนิดเดียวพบว่า chitosan gel ที่ได้จะมีลักษณะเป็นแผ่นเรียบ ค่อนข้างแบนและนิ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้สาร

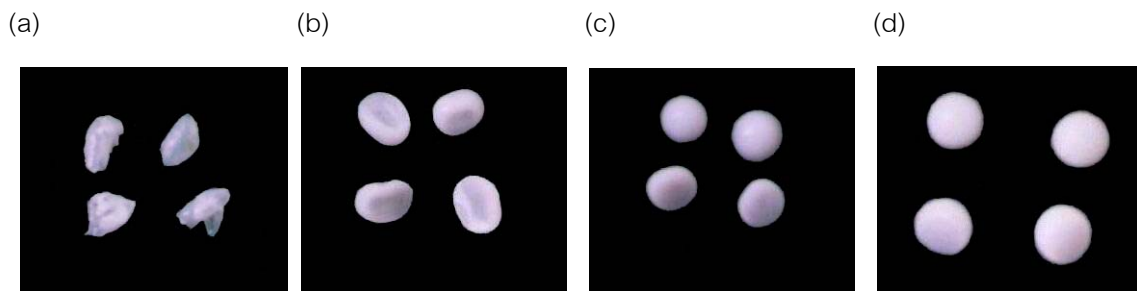


Figure 2 Characteristics of chitosan beads prepared by crosslinking method from chitosan flakes using the ratio of glyoxal hydrate to tetrasodium pyrophosphate as following; (a) 1:1, (b) 1:10, (c) 1:15 and (d) 1:30.

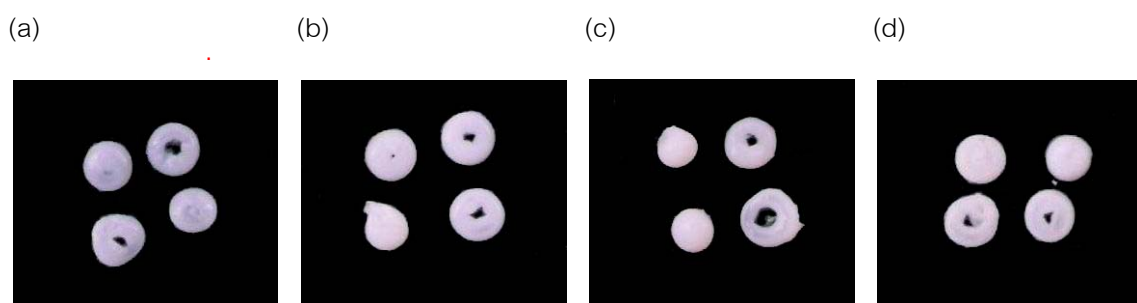


Figure 3 Effect of glyoxal hydrate and tetrasodium pyrophosphate ratios on characteristics of chitosan beads prepared by crosslinking method from chitosan powders (60 mesh) using the ratio of glyoxal hydrate to tetrasodium pyrophosphate as following; (a) 1:1, (b) 1:10, (c) 1:15 and (d) 1:30.

tetrasodium pyrophosphate เพียงชนิดเดียวภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถทำให้เกิดการเชื่อมขวางได้อย่างสมบูรณ์

สำหรับการเตรียมบีดส์ด้วยวิธีการเชื่อมขวางจากไคโตซานชนิดผงจะให้ผลที่แตกต่างจากการเตรียมด้วยไคโตซานชนิดเกล็ดโดยจะพบว่า อัตราส่วนที่ต่างกันของสารเชื่อมขวางไม่มีผลต่อรูปร่างและลักษณะของบีดส์ เนื่องจากรูปร่างและลักษณะของบีดส์จากไคโตซานที่เตรียมโดยใช้อัตราส่วนของสารเชื่อมขวางที่ต่างกันจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันคือ เป็นเม็ดกลมแบน มีรูตรงกลางคล้ายโดนัท (ภาพที่ 3) เมื่อทดลองกดยพบว่า บีดส์ของไคโตซานที่ได้มีลักษณะนิ่มและไม่มีความยืดหยุ่น

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า บีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ดจะมีลักษณะที่ดีกว่าบีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดผง ทั้งจากการเตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวาง โดยบีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดเกล็ดจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ในขณะที่บีดส์ที่เตรียมจากไคโตซานชนิดผงจะมีลักษณะคล้ายโดนัท มีรูกลวงตรงกลางและมีรูปร่างค่อนข้างแบน เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเตรียมบีดส์จากไคโตซานชนิดเกล็ดโดยวิธีการทำให้เป็นกลางและวิธีการเชื่อมขวางพบว่า การเตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางนอกจากจะให้ลักษณะของบีดส์จากไคโตซานที่ดีคือ เป็นเม็ดกลมและค่อนข้างยืดหยุ่น ทำให้บีดส์ของไคโตซานที่ได้มีความแข็งแรง

มากกว่าปดส์ของโคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีการเชื่อมขวางซึ่งแม้จะมีรูปร่างลักษณะเป็นเม็ดกลมแต่ไม่มีความยืดหยุ่น ทำให้ปดส์ของโคโตซานที่ได้ค่อนข้างนิ่ม

ดังนั้นจึงเลือกวิธีการเตรียมปดส์ด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางจากโคโตซานชนิดเกล็ดเพื่อใช้เป็นตัวพวยงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสในการทดลองต่อไป

2. วิธีที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสบนตัวพวยงในรูปปดส์จากโคโตซาน

จากการทดลองตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ โดยแปรผันระยะเวลาในการบ่มปดส์ของโคโตซานในสารละลายเอนไซม์อัลคาเลสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาของการบ่ม 1-5 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกัน และกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น (ภาพที่ 4) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์อัลคาเลสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพคือ 1 ชั่วโมง ซึ่งนอกจากจะทำให้เอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงแล้วยังใช้ระยะเวลาในการตรึงเอนไซม์น้อยอีกด้วย

เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 พบว่า ในช่วงแรกกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการตรึงรูปนานขึ้นและจะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการตรึงรูป 3 ชั่วโมง จากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ระยะเวลาในการตรึงรูปสูงกว่า 3 ชั่วโมง (ภาพที่ 4)

โดยสาเหตุที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าลดลงเมื่อใช้ระยะเวลาในการตรึงรูปนานขึ้นอาจเกิดจากสภาวะที่บริเวณ microenvironment ของเอนไซม์มีความแตกต่างจากบริเวณ bulk solution ของสารละลายมากซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อตรึงรูปด้วยระยะเวลาที่นานขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Zhang และ Zeng (2006) ที่พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาในการตรึงรูปเอนไซม์ β -galactosidase บนโคโตซานมากกว่า 10 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์จะมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน

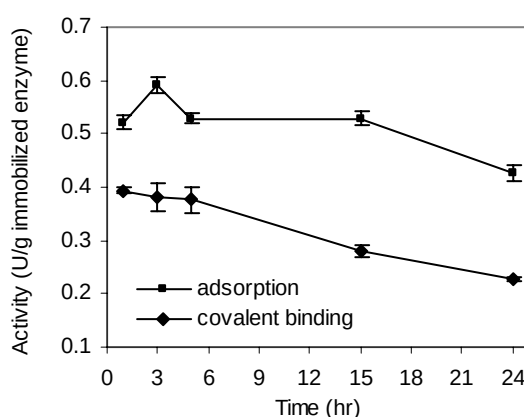


Figure 4 Effect of incubating time during enzyme immobilization on the activity of immobilized alkalase. Comparision of physical adsorption and covalent binding immobilization method.

เมื่อเปรียบเทียบการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสโดยวิธีการดูดซับทางกายภาพและวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยอาศัยกลูทาร์ลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางพบว่า เอนไซม์อัลคาเลสที่ตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์จะมีกิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์อัลคาเลสที่ตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ (ภาพที่ 4) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Abdel-Naby และคณะ (1998) ที่พบว่า การตรึงรูปเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) บนไคโตซานด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพจะมีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนไคโตซานเพียง 18.8% ซึ่งต่ำกว่าการตรึงรูปโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ที่มีปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงสูงถึง 77.41% เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับทางกายภาพจะอาศัยแรงดึงดูดทางไอออน พันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟบิกและแรงแวนเดอร์วาลส์ซึ่งเป็นแรงดึงดูดค่อนข้างอ่อน ไม่มีการเกิดพันธะเคมีทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพุงได้ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ นอกจากนี้การตรึงรูปด้วยพันธะโคเวเลนต์จะมีการใช้รีเอเจนต์ (reagents) ชนิดต่างๆ เช่น กลูทาร์ลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ไซยาโนเจนโบรไมด์ (cyanogen bromide) เป็นต้น ในการกระตุ้นหมู่ต่างๆ บนตัวพุงหรือบนพื้นผิวของเอนไซม์ให้ไวต่อปฏิกิริยา เมื่อพื้นผิวของเอนไซม์มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive group) มาก โอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาที่หมู่ฟังก์ชันนัลจำเป็น (essential functional group) ที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์จะลดน้อยลง จึงสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ (Laskin, 1985) ซึ่งแตกต่างกับการตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพที่มีความจำเพาะเจาะจงน้อยกว่า หากเกิดการดูดซับระหว่างตัวพุงกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้ (Taylor, 1991)

สรุป

ไคโตซานชนิดเกล็ดมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เตรียมเป็นตัวพุงในรูปบีดส์ โดยเตรียมด้วยวิธีการทำให้เป็นกลางซึ่งจะให้ลักษณะของบีดส์เป็นเม็ดกลม ค่อนข้างยืดหยุ่นและมีความแข็งแรง สำหรับวิธีการตรึงรูปเอนไซม์อัลคาเลสบนไคโตซานบีดส์ที่เหมาะสมคือ การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยใช้กลูทาร์ลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.6% โดยปริมาตร เป็นสารเชื่อมขวาง ซึ่งระยะเวลาในการตรึงรูปที่เหมาะสมคือ 3 ชั่วโมง เอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปที่ได้มีรูปร่าง ลักษณะ ความแข็งแรง และกิจกรรมที่เหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อไปในอนาคต

คำนิยาม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- Abdel-Naby, M.A., A-M.S. Ismail, S.A. Ahmed and A.F.A. Fattah. 1998. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus Mycoides*. *Bioresour. Technol.* 64: 205-210.
- Altun, G.D. and S.A. Cetinus. 2007. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chem.* 100: 964-971.

- Cetinus, S.A. and H.N. Oztop. 2003. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 889-894.
- Chaplin, M.F. and C. Bucke. 1990. **Enzyme technology**. The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Ensuncho, L., M.A. Cuenca and R.L. Legge. 2005. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 27: 185-191.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations : a review. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 126-139.
- Laskin, A.I. 1985. **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Canada.
- Lee, S.T., F.L. Mi, Y.J. Shen and S.S. Shyu. 2001. Equilibrium and kinetic studies of copper(II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. **Polym.** 42: 1879-1892.
- Mohsenin, N.N. 1986. **Physical Properties of Plant and Animal Materials**. Gordon and Breach Science Publishers Inc., Netherlands.
- Taylor, R.F. 1991. **Protein Immobilization Fundamentals and Applications**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Zhang, J. and J. Zeng. 2006. Immobilization of β -galactosidase on tamarind gum and chitosan composite microspheres. **J of Bioact. Compat. Polym.** 21: 415-432.