

สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต เพื่อย่อยน้ำมันปาล์มโอเลอิน

ประวิทย์ เจียมจวนขาว¹ อรัญ หันพงศักริตติกุล² และ เบญจมาส เชียรศิลป์³

Abstract

Jeamjounkhaw, P., H-Kittikun, A. and Cheirsilp, B.

Optimization of lipase entrapment in alginate gel bead for palm olein hydrolysis
Songklanakarin J. Sci. Technol., May 2007, 29(Suppl. 2) : 261-267

Lipase from *Pseudomonas* sp. was entrapped by drop-wise addition of an aqueous mixture of alginate and the biocatalyst to hardening solution of CaCl₂ for the purpose of palm olein hydrolysis. Effects of immobilization conditions including alginate concentration, CaCl₂ concentration, enzyme concentration and bead size on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity (specific activity ratio of entrapped lipase to free lipase) were investigated. An increase in alginate concentration raised immobilized yield, but decreased immobilized lipase activity and recovery of activity. CaCl₂ concentration in the tested range of 50-200 mM had slight effects on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity. In contrast to immobilized lipase activity, immobilized yield and recovery of activity decreased with increasing enzyme concentration. With increasing bead size, immobilized lipase activity and recovery of activity decreased due to mass transfer resistance whereas immobilized yield was unchanged. The optimum condition for lipase entrapment in alginate gel bead was alginate concentration at 2% (w/v), CaCl₂ concentration at 100 mM, enzyme concentration at 30 U/ml and bead size at 2 mm. Under this entrapment condition, 8.11 U/ml of immobilized lipase was obtained with 95.2% of immobilized yield and 22.2% of recovery of activity.

Key words : alginate, entrapment, immobilization, lipase, *Pseudomonas* sp.

Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

¹นักศึกษาลัทธิสุตร วทม. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ²Ph.D. (Biotechnology) รองศาสตราจารย์ ³D.Eng (Biotechnology Engineering) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: benjamas.che@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2549 รับลงตีพิมพ์ 7 ตุลาคม 2549

บทคัดย่อ

ประวิทย์ เจียมจวนขาว อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และ เบญจมาศ เชียรศิลป์
สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนตเพื่อย่อยน้ำมันปาล์มโอเลอิน
ว. สงขลานครินทร์ วทท. พฤษภาคม 2550 29(ฉบับพิเศษ 2) : 261-267

เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. ถูกตรึงรูปด้วยวิธีห่อหุ้มโดยหดยดสารผสมของอัลจิเนตและเอนไซม์ลงในสารทำให้แข็งตัว $CaCl_2$ เพื่อใช้ในการย่อยน้ำมันปาล์มโอเลอิน สภาวะในการตรึงรูปที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของอัลจิเนต ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส และขนาดของเอนไซม์ตรึงรูป โดยคัดเลือกจากค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ (%) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป และกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ (%) ผลจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตจะทำให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะเพิ่มขึ้น แต่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป และกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะลดลง สำหรับผลของความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ในช่วง 50-200 มิลลิโมลาร์ มีผลเล็กน้อยต่อค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปและกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ การเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปเพิ่มขึ้น แต่ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะและค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะลดลง ขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปที่ใหญ่ขึ้นจะส่งผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป และกิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะลดลง เนื่องจากขนาดมีผลต่อความต้านทานการแพร่ แต่ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะไม่เปลี่ยนแปลง สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนตคือ ความเข้มข้นของอัลจิเนต 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ 100 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปส 30 ยูนิต/มล. และขนาดของเอนไซม์ตรึงรูป 2 มม. ซึ่งจะทำให้ได้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ 95.2% ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป 8.11 ยูนิต/มล. และค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ 22.2%

ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสได้รับความสนใจและได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมัน เพราะการใช้เอนไซม์มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการย่อยสลายทางเคมี ฟิสิกส์ คือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรง เกิดได้ด้วยความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 30-50°C (Yamane et al., 1986) ใช้ขนาดของถังปฏิกรณ์เล็กกว่า ทำให้ประหยัดพลังงาน ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง เกิดของเสียและวัสดุเหลือทิ้งน้อย (Borncheuer and Yamane, 1994; Kosuki et al., 1995) แต่ก็มีข้อจำกัดในด้านราคา ความคงตัวของเอนไซม์ รูปแบบการใช้มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง การแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ทำได้ยาก (ปราณี, 2547) ตลอดระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงรูปเอนไซม์ได้พัฒนาก้าวหน้าไปมาก การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นวิธีหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดในการใช้เอนไซม์อิสระดังกล่าว เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปสามารถทำปฏิกิริยาได้ทันทีและทำให้บริสุทธิ์โดยเพียงแค่แยกเอาเอนไซม์ตรึงรูปออกมา ทำให้มีความคงตัวในการผลิต สามารถใช้ได้ทั้งในการผลิตแบบกะหรือแบบต่อเนื่อง และสามารถปรับการผลิต

ให้เหมาะสมได้ตามต้องการ นอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ และยังสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ จึงเป็นการลดต้นทุนการผลิต (Kaewthong et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามผลกระทบของการตรึงรูปเอนไซม์ก็อาจมีได้ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์อาจลดลงเนื่องจากโครงสร้างสามมิติที่เปลี่ยนแปลงไป เกิดปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ปัญหาการปนเปื้อนเนื่องจากตัวพุงหรือตัวพุงทำปฏิกิริยากับผลผลิต

การตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบห่อหุ้ม เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมเนื่องจากการตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง โดยเอนไซม์ไม่ได้ถูกยึดจับกับตัวพุงแต่ถูกเก็บไว้ภายในช่องว่างของพอลิเมอร์ ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี (Zorica et al., 2002) และถ้าพอลิเมอร์ที่นำมาใช้ในกระบวนการนั้นเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบก็จะทำให้เอนไซม์ไลเปสสามารถละลายและทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ดังนั้นการนำเอาอัลจิเนตที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจึงเป็น

วิธีการหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการย่อยน้ำมัน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเติมน้ำในปฏิกิริยา ทำให้ไม่เกิดการแยกชั้นของน้ำและน้ำมัน นอกจากนี้อัลจิเนตยังสามารถตรึงกับเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะต่ำ และสามารถทำปฏิกิริยาได้ในสารละลายอินทรีย์บางตัวที่ทำให้เอนไซม์ที่ใช้เสื่อมสภาพได้ (Seema and Steven, 2002) ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต ที่ให้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่คงตัว มีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมการย่อยสลายน้ำมัน ปาล์มโอเลอิน และค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะที่สูงที่สุด เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปด้วยอัลจิเนตในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ อุปกรณ์

น้ำมันปาล์มโอเลอิน ชื่อทางการค้า "มรกต" ผลิตโดยบริษัทมรกตอินดัสตรีส์ จำกัด (มหาชน) เอนไซม์ไลเปสทางการค้าชนิดผง คือ ไลเปส PS (*Pseudomonas* sp.) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Amano Seiyaku ประเทศญี่ปุ่น ตัวพุงโซเดียมอัลจิเนต (Alginic acid sodium salt from brown algae) ผลิตโดย Fluka ประเทศญี่ปุ่น และสารเคมีเกรดสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี

2. วิธีการทดลอง

2.1 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปสปริมาตร 5 มล. ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ผสมกับอัลจิเนตที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 5 มล. ให้ได้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 % น้ำหนัก/ปริมาตร ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 10, 30 และ 50 ยูนิต/มล. หยดสารละลายอัลจิเนตที่ผสมเอนไซม์ไลเปสลงในสารละลาย $CaCl_2$ (ความเข้มข้น 50 100 และ 200 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 150 มล. ด้วยปั๊มที่ความเร็ว 1 มล./นาที (โดยใช้เข็มขนาด 18 20 และ 24 G) ทำการกวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็กอยู่ตลอด หลังจากหยดเสร็จแล้วตั้งไว้ 20 นาที จากนั้นแยกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ได้จากสารละลาย $CaCl_2$

ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 10 มล. 2 ครั้ง (ดัดแปลงวิธีการของ Seema and Steven, 2002) นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป สารละลาย $CaCl_2$ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ล้าง ไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase activity) และคำนวณหาประสิทธิภาพการยึดเกาะและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะของเอนไซม์

$$\text{ประสิทธิภาพการยึดเกาะ (Immobilized yield \%)} = \frac{\text{กิจกรรมทั้งหมด} - \text{กิจกรรมที่ตกค้างในสารละลาย} \times 100}{\text{กิจกรรมทั้งหมด}}$$

กิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ (Recovery of activity %)

$$= \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์หลังตรึงรูป} \times 100}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์อิสระก่อนตรึง}}$$

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันของเอนไซม์ไลเปส

ซับสเตรทที่ใช้คือ สารผสมระหว่างน้ำมันปาล์มโอเลอินที่ละลายในไอโซออกเทน 10 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) 1 มล. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 5 มล. จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ตรึงรูปหรือสารละลายที่ได้จากการล้างเอนไซม์ที่ถูกตรึงในขั้นตอนการตรึงรูปเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มล. (ดัดแปลงจากวิธีของ Lee and Rhee, 1993)

นำสารผสมในปฏิกิริยาข้างต้นไปวิเคราะห์กรดไขมันอิสระตามวิธี cupric acetate method ของ Kwon และคณะ (1995) โดยนำมาเจือจางกับกับไอโซออกเทนให้ได้ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มล. ปั่นผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทั้งให้แยกชั้น นำส่วนไอโซออกเทนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร วัดปริมาณกรดไขมันที่ปลดปล่อยออกมาเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปของกรดปาล์มมิติก

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย น้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปปาล์มมิติก ปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C พีเอช 7

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของความเข้มข้นของอัลจิเนตและ CaCl₂

ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของอัลจิเนตและ CaCl₂ โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ไลเปส 10 ยูนิต/มล. แสดงใน Table 1 พบว่าที่ความเข้มข้นของอัลจิเนต 2 % และความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ 100 มิลลิโมลาร์ ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะสูงสุด คือ 2.78 ยูนิต/มล. และ 24.9% ตามลำดับ

ลักษณะของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) และความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ 50 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ แสดงใน Figure 1 โดยที่ Figure 1 a, b และ c ใช้ความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ 50 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5% ตามลำดับ Figure 1 d, e และ f ใช้ความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ 100 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5% ตาม

ลำดับ และ Figure 1 g, h และ i ใช้ความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ 200 มิลลิโมลาร์ และใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5% ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตจะทำให้ลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูปมีความคงรูปมากขึ้น เอนไซม์ตรึงรูปมีลักษณะเป็นทรงกลมเช่นเดียวกับการเพิ่มความเข้มข้นของ CaCl₂ แต่ความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่ต่ำเกินไปจะทำให้เกิดการสร้างโครงร่างพอลิเมอร์ภายในเอนไซม์ตรึงรูปได้ไม่ดี เอนไซม์ตรึงรูปจึงมีรูปร่างที่ไม่เสถียรโดยลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะมีลักษณะนุ่มไม่คงรูปเนื่องจากการเชื่อมกันระหว่างประจุบวกของ CaCl₂ และประจุลบของอัลจิเนตเกิดขึ้นได้ยาก ที่ทุกความเข้มข้นของอัลจิเนต ดังแสดงใน Figure 1 a, b และ c ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยึดเกาะมีค่าลดลงตามไปด้วย (Table 1)

อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตที่มากกว่า 2% และความเข้มข้นของ CaCl₂ ที่มากกว่า 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะลดลงเนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปมีความหนาแน่นมากเกินไป ทำให้การแพร่ของซับสเตรตเข้าไปภายในเกิดขึ้นได้ยากและช้ากว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีความหนาแน่นของตัวพุงที่น้อยกว่า จึงส่งผลทำให้การสัมผัสกันระหว่างซับสเตรตกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งเกิดขึ้นได้ยาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Zorica และคณะ (2002) ที่ใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 2% ในการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ดังนั้นในการ

Table 1. Effects of alginate and CaCl₂ concentrations on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity of immobilized enzyme lipase

Alginate (%)	CaCl ₂ (mM)	Immobilized yield (%)	Immobilized lipase activity (U/ml)	Recovery of activity (%)
1.5	50	97.8±0.03 ^a	2.72±0.59 ^a	21.2±1.82 ^{bc}
	100	99.6±0.02 ^a	2.41±0.07 ^{ab}	23.5±1.28 ^{ab}
	200	99.7±0.01 ^a	1.85±0.23 ^b	21.7±0.82 ^{bc}
2.0	50	98.6±0.01 ^a	2.36±0.00 ^{ab}	21.8±0.00 ^{de}
	100	99.4±0.02 ^a	2.78±0.28 ^a	24.9±0.72 ^a
	200	99.6±0.02 ^a	2.46±0.31 ^{ab}	19.9±0.62 ^{cd}
2.5	50	98.9±0.02 ^a	1.99±0.92 ^{ab}	17.1±0.96 ^c
	100	99.6±0.02 ^a	2.24±0.29 ^{ab}	18.5±0.48 ^{de}
	200	99.5±0.03 ^a	1.72±0.37 ^b	13.4±0.40 ^f

a, b, c, d, e and f in each column: Statistically significantly different (p < 0.05)

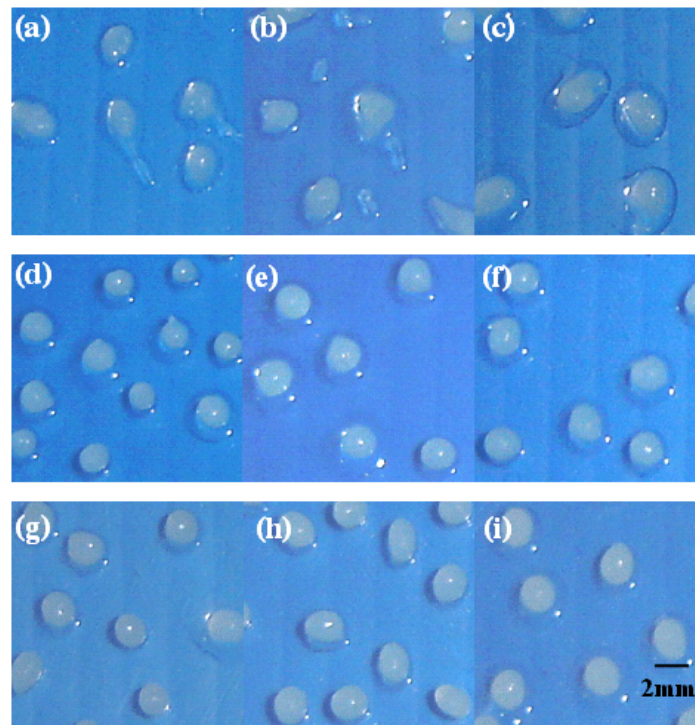


Figure 1. Characterization of beads. ((a) 1.5 % of alginate and 50 mM. of CaCl_2 concentration, (b) 2.0% of alginate and 50 mM. of CaCl_2 concentration and (c) 2.5 % of alginate and 50 mM. of CaCl_2 concentration (d) 1.5% of alginate and 100 mM. of CaCl_2 concentration, (e) 2.0% of alginate and 100 mM. of CaCl_2 concentration and (f) 2.5% of alginate and 100 mM. of CaCl_2 concentration (g) 1.5% of alginate and 200 mM. of CaCl_2 concentration, (h) 2.0% of alginate and 200 mM. of CaCl_2 concentration and (i) 2.5% of alginate and 200 mM. of CaCl_2 concentration)

[Color figure can be viewed in the electronic version]

ทดลองครั้งนี้จึงใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนต 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และความเข้มข้นของ CaCl_2 100 มิลลิโมลาร์ ในกระบวนการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยอัลจิเนต

2. ผลของความเข้มข้นเอนไซม์

ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์ไลเปสแสดงใน Table 2 โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจิเนตและ CaCl_2 ที่ 2% และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าการตรึงเอนไซม์โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์จาก 10 เป็น 30 และ 50 ยูนิต/มล. จะทำให้ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นจาก 2.78 เป็น 8.11 และ 8.92 ยูนิต/มล. ตามลำดับ แต่เมื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการ

ยึดเกาะ พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 และ 30 ยูนิต/มล. จะให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะสูงคือ 99.4% และ 95.2% ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 50 ยูนิต/มล. ทำให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะลดต่ำลงเป็น 84.2% การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูปทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีกิจกรรมมากขึ้น แต่ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยึดเกาะต่ำลง เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่ตัวพุงสามารถกักเก็บได้มีปริมาณจำกัดขึ้นอยู่กับชนิดความหนาแน่น และโครงสร้างภายในตัวพุง ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เอนไซม์ส่วนเกินไม่ถูกตรึงในอัลจิเนตและหลุดออกมาละลายใน CaCl_2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kaewthong และ H-Kittikun (2004) ที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสบน Accurel EP100 ด้วยวิธีการดูดซับ

Table 2. Effects of enzyme concentration on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity of immobilized enzyme lipase

Enzyme concentration (U/ml)	Immobilized yield (%)	Immobilized lipase activity (U/ml)	Recovery of activity (%)
10	99.4±0.02 ^a	2.78±0.28 ^b	24.9±0.72 ^a
30	95.2±0.39 ^b	8.11±0.77 ^a	22.2±0.43 ^a
50	84.2±0.92 ^c	8.92±0.83 ^a	17.8±0.16 ^b

a, b and c in each column: Statistically significantly different (p < 0.05)

Table 3. Effects of bead size on immobilized yield, immobilized lipase activity and recovery of activity of immobilized enzyme lipase

Needle size (G)	Diameter of beads (mm)	Immobilized yield (%)	Immobilized lipase Activity (U/ml)	Recovery of activity (%)
24 G (0.55 x 25 mm)	2	95.2±0.39 ^a	8.11±0.77 ^a	22.2±0.43 ^a
20 G (0.90 x 25 mm)	2.5	95.3±0.29 ^a	5.19±0.71 ^b	12.3±0.21 ^b
18 G (1.20 x 25 mm)	3	95.9±0.04 ^a	5.27±0.03 ^b	13.3±0.14 ^b

a and b in each column: Statistically significantly different (p < 0.05)

และพบว่าความเข้มข้นสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูปที่ 10 ยูนิต/มล. มีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ 80.4% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 50 ยูนิต/มล. ทำให้ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะลดลงเหลือเพียง 42.9% เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการยึดเกาะที่ความเข้มข้นเอนไซม์เดียวกัน พบว่าวิธีการตรึงรูปด้วยอัลจินตจะสามารถกักเก็บเอนไซม์ได้มากกว่าวิธีการตรึงรูปแบบดูดซับบน Accurel EP100

นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ยังทำให้ค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะลดลง เนื่องจากความหนาแน่นของเอนไซม์ในอัลจินตมีผลทำให้การจับตัวกับซับสเตรทลดน้อยลง ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะ พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงที่ 30 ยูนิต/มล. เหมาะสมกับการตรึงรูปด้วยอัลจินตและ CaCl₂ ที่มีความเข้มข้น 2% และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

3. ขนาดของเอนไซม์ตรึงรูป

ค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและค่ากิจกรรมหลังการยึดเกาะแสดงใน Table

3 โดยใช้ความเข้มข้นของอัลจินตและ CaCl₂ ที่ 2% และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 30 ยูนิต/มล. และใช้ขนาดปลายเข็มที่ต่างกันในการตรึงรูปเอนไซม์ พบว่าขนาดปลายเข็มจะมีผลต่อขนาดของ beads ที่ได้ ซึ่งปลายเข็มขนาด 24 G จะให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ beads ที่เล็กที่สุดคือ 2 มม. เมื่อคำนวณหาประสิทธิภาพการยึดเกาะ พบว่าขนาดของเข็มที่ใช้ในการตรึงไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการยึดเกาะ แต่จะมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปและกิจกรรมหลังการยึดเกาะ ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปที่วัดได้จากการตรึงเอนไซม์ที่ใช้ปลายเข็มขนาดเล็ก (24 G) จะให้ค่ากิจกรรมสูงสุดคือ 8.11 ยูนิต/มล. ทั้งนี้เนื่องจากขนาดของเอนไซม์ตรึงรูปที่เล็กกว่าจะมีพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปกับซับสเตรทได้มากกว่า และทำให้การแพร่ของซับสเตรทเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ภายในตัวตรึงเกิดขึ้นได้ง่ายกว่า จึงทำให้ได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ โดยผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Keehoon และคณะ (2004) ที่นำเอนไซม์ไลเปส *Candida rugosa* มาตรึงกับอัลจินต และพบว่า การเพิ่มขนาด beads ให้ใหญ่ขึ้นจะทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง

สรุป

จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีแบบห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต สรุปได้ว่าความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ 2% ความเข้มข้นของ CaCl_2 ที่ 100 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ 30 ยูนิต/มล. และขนาดของเจลที่ 24 G (0.55 x 25 มม.) เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์ไลเปสแบบห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต โดยจะทำให้ได้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปขนาด 2 มม. มีค่าประสิทธิภาพการยึดเกาะ 95.2% ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป 8.11 ยูนิต/มล. และค่ากิจกรรมเอนไซม์หลังการยึดเกาะ 22.2%

เอกสารอ้างอิง

- ปราณี อานเป็รื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Bornscheuer, U.T. and Yamane, T. 1994. Activity and stability fo lipase in the solid-phase glycerolysis of triolein. *Enzyme Microb. Technol.* 16 : 864-869.
- Keehoon, W., Sangbum, K., Kim, K.J., Woopark, H. and Moon, S.J. 2004. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.* 40 : 2149-2157.
- Kaewthong, W. and H-Kittikun, A. 2004. Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 35 : 218-222.
- Kaewthong, W., Sirisansaneeyakul, S., Prasertsan, P. and H-Kittikun, A. 2004. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochem.* 40 : 1525-1530.
- Kosuki, Y., Takahashi, K. and Lopaz, C. 1995. Large-scale immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I and an application for sardine oil hydrolysis. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 72 : 1281-1285.
- Kwon, S.J., Han, J.J. and Rhee, J.S. 1995. Production an in situ separation of mono-or diacylglycerol catalyzed by lipase in n-hexane. *Enzyme Microb. Technol.* 17 : 700-704.
- Lee, S.Y. and Rhee, J.S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.* 15 : 617-623.
- Seema, S.B. and Steven, H.N. 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the from of hydrogel brads. *Biomaterials.* 23 : 3627-3636.
- Yamane, T., Mohammad, M.H., Itoh, S. and Shimizu, S. 1986. Glycerolysis of fat by lipase. *Jpn. Oil Chem. Soc.* 8 : 625-631.
- Zorica, K., Svetlana, B., Aleksandra, M., Bojana, M., Mojovic, Ljiljana, M. and Branko, B. 2002. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochem.* 38 : 313-318.