การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมูบนวัสดุสนับสนุนพอลิเมอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์

The studies optimization of covalent immobilized porcine pancreatic lipase (PPL) on polymer supported

สกุลตลา เจริญสุข[1], อัยยะ จันทรศิริ[2], ทรงศักดิ์ พลานนท์[3]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู (Porcine pancreatic lipase: PPL) ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonding) บนวัสดุสนับสนุนสองชนิด ได้แก่ เรซิน ECR8204 และ ECR8285 เพื่อศึกษาและพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ให้สามารถใช้งานทดแทนตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปของวัสดุสนับสนุนแต่ละชนิด ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลาย และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสม พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงมีค่าสูงสุดถึง 58-61% เอนไซม์ PPL มีค่ากิจกรรมสูงสุดเมื่อถูกตรึงด้วยปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 7.5 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมเรซิน และ pH 7.5 สำหรับ เรซิน ECR8204, ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 7.5 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมเรซิน และ pH 7.0 สำหรับเรซิน ECR8285 จากการศึกษาด้วย SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ PPL ที่เหลือจากการตรึงรูปมีปริมาณลดลง แสดงว่าเรซินสามารถตรึงเอนไซม์นี้ไว้ได้ การวิเคราะห์โครงสร้าง 3 มิติของ PPL เฉพาะกรดอะมิโนที่โซ่ข้างมีคุณสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์จำนวน 7 ชนิด พบกรดอะมิโน Lysine, Aspartic acid และ Glutamic acid จำนวนมากที่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของเอนไซม์ กรดอะมิโน 3 ชนิดนี้อาจเป็นหมู่ที่ถูกใช้ในการสร้างพันธะโควาเลนต์กับเรซิน การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมูตรึงรูป เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไป

คำสำคัญ: เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู , วิธีการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์

[1] นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากระบวนการอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม (M-ICPE) คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

[3] อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิทยาเขตระยอง

Abstract

In this study, porcine pancreatic lipase (PPL) was covalently immobilized onto ECR8204 and ECR8285 Resins for applications as biocatalyst. Immobilizing conditions including pH and initial protein quantity were examined. The result showed that proteins loading has a maximum value of 58-61%. PPL showed the highest enzyme activity when immobilized at initial concentration of 7.5 mg/100 mg.resin, pH 7.5 for ECR8204 and initial concentration of 7.5 mg/100 mg.resin, pH 7.0 for ECR8285. From SDS-PAGE analysis, PPL quantity was decreased after immobilization, confirming that immobilized protein was the interested enzyme. 3D structure of PPL showed many Lysine, Aspartic acid and Glutamic acid at the surface. These amino acids might play an important role in covalent bond formation.

Keywords: Porcine pancreatic lipase, Covalent Immobilized technique

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol ester hydrolases, EC.3.1.1.3) เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเทคโนโลยีของเอนไซม์เนื่องจากจับกับสารตั้งต้นได้หลายประเภท สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น การไฮโดรไลซิสหรือการสังเคราะห์ของเอสเทอร์ในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน หรือเอสเทอริฟิเคชัน (Kumar, 2016; Borowiecki, 2017) เพราะสามารถกระตุ้นการย่อยสลายของไขมันและน้ำมัน (ไตรกลีเซอไรด์) และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids), โมโนกลีเซอรอล (Monoacylglycerols) และไดกลีเซอรอล (Diacylglycerols) (Villeneuve, 2000) ในปัจจุบันมีการพัฒนาและนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยา, พลังงานชีวภาพ, อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และพอลิเมอร์ชีวภาพ (Rios, 2018; Priyanka, 2019) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์เป็นที่นิยมเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก และสามารถศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมได้ง่ายเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง (Hasan, 2006) จึงเหมาะในการใช้ในปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันและทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Mendesa, 2012) แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อจำกัดในเรื่องของราคา ทำให้ไม่ได้รับความนิยมในการประยุกต์เชิงอุตสาหกรรม ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู (PPL) เป็นเอนไซม์ไลเปสชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (Biotransformation reactions) เนื่องจาก PPL มีราคาถูกเมื่อเทียบกับเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งอื่น PPL ยังได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรม มีความเสถียรสูง และมีความจำเพาะเจาะจงต่ำ จึงสามารถประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย (Mendes, 2012)

กระบวนการตรึงรูปเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ที่ถูกตรึงมีความเสถียรมากกว่าและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างง่ายดายจึงสามารถช่วยลดต้นทุนของกระบวนการเร่งปฏิกิริยาได้ (Mateo, 2007) ซึ่งกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption), การเชื่อมขวาง (Cross-linking), การกักขัง

(Entrapment) และการใช้พันธะโควาเลนต์ (Covalent bounding) (Zhao, 2015) ซึ่งการจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์มีข้อได้เปรียบวิธีตรึงรูปแบบอื่น คือ มีการยึดติดกันอย่างแข็งแรงระหว่างเอนไซม์และวัสดุสนับสนุน ทำให้เอนไซม์หลุดออกได้ยาก จึงคงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงแม้จะนำมาใช้หลาย ๆ ครั้ง (Bayramoglu, 2002; Knezevic, 2006) โดยหมู่ฟังก์ชันส่วนใหญ่ของวัสดุสนับสนุนที่ใช้เชื่อมพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ไลเปส คือ หมู่ อีพ็อกซี่ (Epoxy group), เอมีน (Amine) และอัลดีไฮด์ (Aldehyde) (Mateo, 2007)

ECR8204 และ ECR8285 resin ผลิตโดยบริษัท Purolite จำกัด ซึ่งเป็นวัสดุสนับสนุนที่ใช้หมู่ฟังก์ชันของหมู่อีพ็อกซี่ในการเชื่อมพันธะโควาเลนต์กับหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ของเอนไซม์ได้ ได้แก่ อะมิโน, ไทออล และฟีนอล ซึ่งจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นถ้าใช้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์สูง ๆ (Lifetech, 2015) โดยเรซิน ECR8204 และ ECR8285 ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชัน Epoxy methacrylate และ Epoxy/butyl methacrylate ตามลำดับจึงทำให้มีขนาดโมเลกุล และขนาดรูพรุนแตกต่างกัน โดย ECR8204 มีขนาดรูพรุนเล็กกว่า ประมาณ 300 Å ในขณะที่ ECR8285 มีขนาดรูพรุน 400 Å

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการตรึงรูปของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมูกับเรซิน ECR8204 และ ECR8285 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเพื่อใช้ทดแทนตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อแก้ไขปัญหาเรื่องสิ่งแวดล้อม และเพื่อเพิ่มผลผลิตของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาจากเอนไซม์ไลเปส เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonding)
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสบนวัสดุสนับสนุนสองชนิด คือ เรซิน ECR8204 และ ECR8285

สมมติฐานการวิจัย

เอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ที่มีสภาวะแตกต่างกันจะมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารละลายโปรตีน

โดยเตรียมจากเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู (PPL) Type II (Sigma–Aldrich, USA) ซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 20 โดยเตรียมโปรตีนที่ปริมาณ 6-9 มิลลิกรัมของโปรตีนบริสุทธิ์ต่อ 100 มิลลิกรัมของวัสดุสนับสนุน จากนั้นนำมาละลายลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่มีค่าความเป็นกรดเบส 6.5, 7.0 และ 7.5 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสารละลายส่วนใสออกจากกากโปรตีน

2. การเตรียมวัสดุสนับสนุน

โดยวัสดุสนับสนุนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเรซินที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่อีพ็อกซี่ (Epoxy resin) (Purolite, USA) ได้แก่ ECR8204 และ ECR8285 resin โดยก่อนจะนำเรซินไปผ่านกระบวนการตรึงรูปต้องทำการ equilibrated ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ก่อน (โดยค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์อ้างอิงตามสภาวะที่ใช้ในการ

เตรียมโปรตีนในการตรึงรูปแต่ละครั้ง) โดยนำไปหมุนในเครื่อง Multi rotator รุ่น Multi Bio RS-24 (Biosan, Latvia) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที ทำซ้ำ 2-4 ครั้ง

3. การตรึงรูปเอนไซม์ไลเปสด้วยพันธะโควาเลนต์

นำสารละลายส่วนใสของสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ ผสมลงบนเรซินที่ผ่านการ equilibrated ปริมาตร 400 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิกรัมของเรซิน จากนั้นนำไปหมุนในเครื่อง Multi rotator เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วจึงทำการแยกสารละลายโปรตีนส่วนที่เหลือ กับเรซินที่ตรึงเอนไซม์ไลเปสอยู่ โดยสารละลายโปรตีนส่วนที่เหลือจะนำไปหาปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงบนเรซิน (Protein loading) ต่อไป ส่วนเรซินจะนำไปล้างก่อนนำไปหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์

4. การล้างเรซินที่ผ่านการตรึงรูปแล้ว

ล้างเรซินที่ผ่านการตรึงรูปด้วยน้ำ DI ปริมาตร 1 มิลลิลิตรโดยนำไปหมุนด้วยเครื่อง Multi rotator เป็นเวลา 20 นาทีที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่ได้ถูกตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนด้วยเครื่อง Multi rotator เป็นเวลา 20 นาทีที่ความเร็วรอบ 70 รอบต่อนาทีแล้วจึงล้างด้วยน้ำ DI อีกครั้ง

5. การหาปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงบนเรซิน

การวัดปริมาณโปรตีนทำโดยใช้วิธีการวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (Ultraviolet absorbance at 280 nm ; A280) (Noble and Bailey, 2009) โดยใช้เครื่องนาโนดรอป NanoDrop™ One/One^{C} Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific™, USA) และเลือกวิธีการวัดโปรตีน 1 Abs เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการวัดสารละลายโปรตีนเริ่มต้น (Initial PPL) และสารละลายโปรตีนส่วนที่เหลือ (Residual PPL) และทำการคำนวณปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง(\%)} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น-ปริมาณโปรตีนส่วนที่เหลือ}}{\text{ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น}} \times 100$$

6. การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทำโดยการใช้วิธี *p*NPP Assay โดยเริ่มจากการเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย 4-Nitrophenol (*p*NP) (Sigma–Aldrich, USA) ทำการเตรียมสารละลาย Stock ของ *p*NP ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตรที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.00 ถึง 10 ไมโครโมลต่อลิตรแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV/Visible Scanning Spectrophotometers รุ่น GENESYS 10S Visible ของบริษัท Thermo Scientific™ จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น เพื่อให้ได้สมการเส้นตรงสำหรับค่าความเข้มข้นในตัวอย่างต่อไป

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ทำโดยการนำเรซินที่ผ่านการตรึงรูปแล้วมาทำการ equilibrated ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย p-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) (Sigma–Aldrich, USA) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลต่อลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการกรองเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสารละลาย แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรด้วย UV/Visible Scanning Spectrophotometers รุ่น GENESYS 10S Visible ของบริษัท

Thermo Scientific™ และเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐาน *p*NP เพื่อหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วย (Unit) ของ PPL คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย *p*NPP ให้เป็น *p*NP 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด และค่ากิจกรรมเอนไซม์ของ PPL ตรึงรูป สามารถหาได้จาก

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{Unit ของ PPL}}{\text{น้ำหนักแห้งของเรซิน}}$$

7. การศึกษาโปรตีนที่ถูกตรึงด้วยวิธี SDS-PAGE

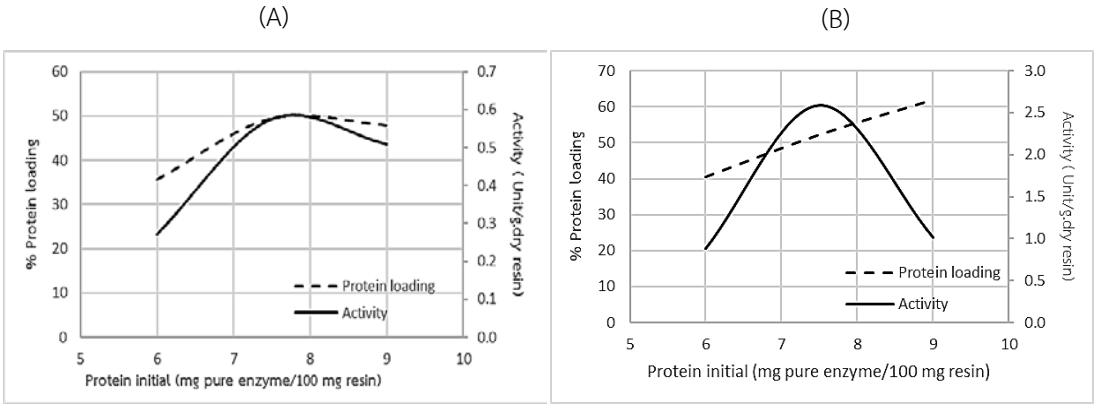
ทำการศึกษาการดูดซับเอนไซม์ลงบนเรซิน โดยการนำสารละลายโปรตีน (Free PPL) และสารละลายโปรตีนส่วนที่เหลือ ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยแยกเอนไซม์บนแผ่นอะคริลาไมด์สำเร็จรูป Mini-PROTEAN® Precast Gels (Bio-Rad, USA) ทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์และย้อมสีด้วยวิธี Silver staining (Bollag *et al*., 1996)

8. การศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้โปรแกรม Molsoft

ทำการศึกษาหมู่อะมิโนที่อยู่บนโครงสร้างของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู โดยใช้โปรแกรม Molsoft ICM Version 3.8-7a และใช้ข้อมูลของโครงสร้าง 3 มิติจาก RCSB PDB (https://www.rcsb.org) โดยใช้รหัส 1ETH (Hermoso, 1996)

สรุปผลการวิจัย

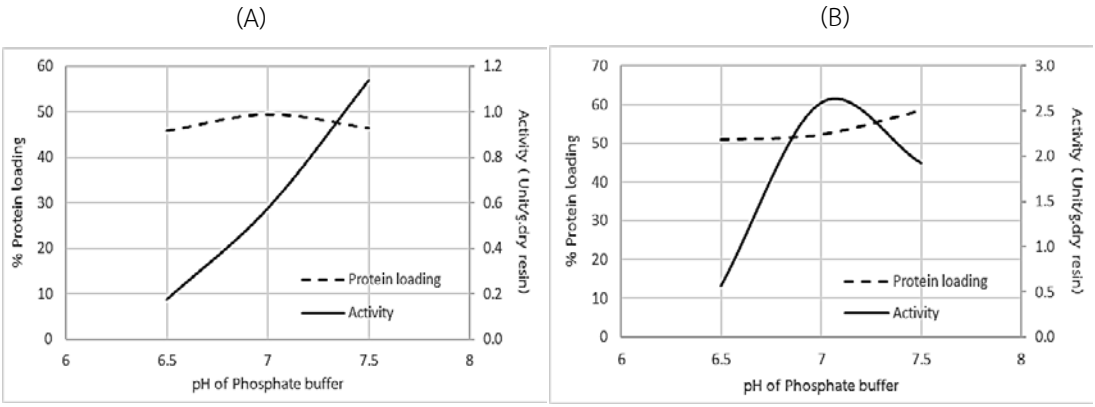
ผลของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์บนเรซิน ECR8204 และ ECR8285 ดังแสดงใน**ภาพที่ 1** โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตรพบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเรซิน ECR8204 (A) มีปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง (Protein loading) สูงสุดที่ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 7.5 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมเรซิน เช่นเดียวกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และในส่วนของการตรึงเอนไซม์บนเรซิน ECR8285 (B) พบว่าปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนเริ่มต้น แต่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 7.5 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อ 100 มิลลิกรัมเรซินเช่นเดียวกับเรซิน ECR8204



ภาพที่ 1 แสดงผลของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ใช้ในการตรึง PPL บนเรซิน ECR8204 ภาพ (A) และเรซิน ECR8285 ภาพ (B) ในสภาวะที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร

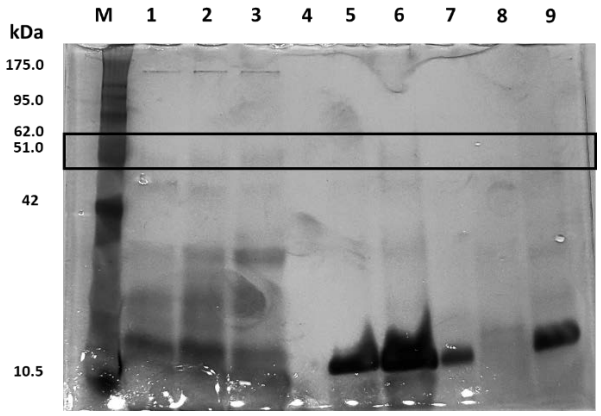
ผลของค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ดังแสดงใน**ภาพที่ 2** พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเรซิน ECR8204 (A) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามค่า pH ของสารละลาย

บัฟเฟอร์ และสูงสุดที่ pH 7.5 แต่มีปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงสูงสุดที่ pH 7.0 และในส่วนของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนเรซิน ECR8285 (B) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์และสูงสุดที่ pH 7.5 จากนั้นค่ากิจกรรมกลับลดลง และสำหรับปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงมีค่าสูงสุดที่ pH 7.5



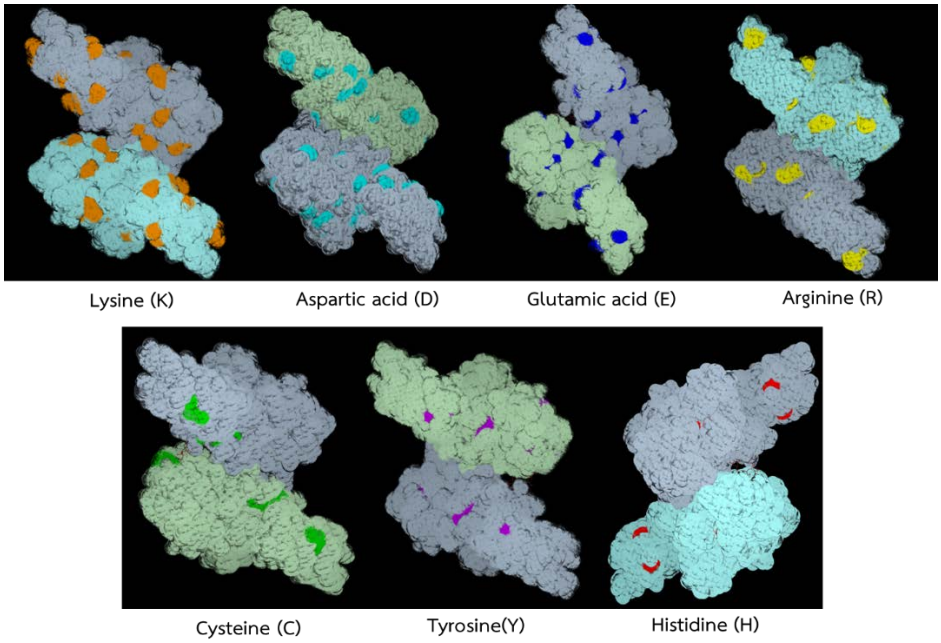
ภาพที่ 2 แสดงผลของค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตรที่ใช้ในการตรึงรูป PPL บนเรซิน ECR8204 ภาพ (A) และ ECR8285 ภาพ (B) โดยใช้โปรตีนเริ่มต้น 7.5 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อ 100 มิลลิกรัมเรซิน

ผลของ SDS PAGE แสดงความแตกต่างของโปรตีนก่อนและหลังการตรึงรูป ดังแสดงใน**ภาพที่ 3** พบว่าปริมาณโปรตีนที่อยู่ในสารละลายมีความเข้มของแถบโปรตีนที่มีขนาด 50-52 kDa มีปริมาณมากกว่าโปรตีนที่เหลือหลังจากการตรึงรูป ดังนั้นแสดงว่าการตรึง PPL ด้วยพันธะโควาเลนต์สามารถตรึงเอนไซม์ไว้ได้



ภาพที่ 3 ผลของสารละลายโปรตีนก่อนการตรึงรูป และสารละลายโปรตีนที่เหลือหลังจากการตรึงรูปแล้ว
M คือ โปรตีนมาตรฐาน Pink Plus Prestained Protein Ladder (GeneDireX, Taiwan)
1-3 คือ สารละลายโปรตีนก่อนการตรึงรูปความเข้มข้น 6, 7.5 และ 9.0 มิลลิกรัม/400 มิลลิลิตรตามลำดับ
4-6 คือ สารละลายโปรตีนที่เหลือจากการตรึงรูปบนเรซิน ECR8204 ความเข้มข้น 6.0, 7.5 และ 9.0 มิลลิกรัม. เอนไซม์ ต่อ 100 มิลลิกรัมเรซินตามลำดับ
7-9 คือ สารละลายโปรตีนที่เหลือจากการตรึงรูปบนเรซิน ECR8285 ความเข้มข้น 6.0, 7.5 และ 9.มิลลิกรัม. เอนไซม์ต่อ 100 มิลลิกรัมเรซินตามลำดับ

ผลของโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จากโปรแกรม Molsoft ของ PPL แสดงดัง**ภาพที่ 4** พบว่าประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 449 กรดอะมิโนและทำงานเป็นคู่ และจากงานวิจัยของ Bischoffa (2012) ได้เสนอว่า กรดอะมิโนที่มีโซ่ข้าง (Side chain) ที่มีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ ได้แก่ Arginine, Lysine, Histidine, Cysteine, Aspartic acid, Glutamic acid และ Tyrosine จึงทำการศึกษากรดมิโนทั้ง 7 ชนิดข้างต้นบนโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู พบว่า Arginine, Lysine, Histidine, Cysteine, Aspartic acid, Glutamic acid และ Tyrosine อยู่ที่พื้นผิวของ PPL ทั้งหมดจำนวน 10, 19, 2, 8, 17, 16 และ 6 กรดอะมิโนต่อ 1 โมเลกุลของเอนไซม์ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเรียงลำดับจำนวนกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่อยู่บนพื้นผิวของ PPL ได้ดังนี้ Lys > Asp > Glu > Arg > Cys > Tys > His



ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จากโปรแกรม Molsoft ของกรดอะมิโนบนเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมู

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลของการศึกษาของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น ต่อการตรึงรูปเอนไซม์ PPL ด้วยพันธะโควาเลนต์ ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงบนเรซิน ECR8285 มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xingxing (2016) ที่ได้ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปส SMG1-F278N บนเรซิน ECR8285 และพบว่าปริมาณของโปรตีนเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง แตกต่างกับเรซิน ECR8204 ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงมีแนวโน้มอิ่มตัวเมื่อปริมาณโปรตีนเริ่มต้นมีค่ามากกว่า 7.5 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมเรซิน ปรากฏการณ์นี้อาจเกิดจาก ECR8204 มีขนาดรูพรุน (Pore size) ที่น้อยกว่า ECR8285 (Purolite., 2015) อย่างไรก็ตามปริมารเอนไซม์ที่สูงอาจไม่เป็นผลดีต่อการทำงานของเอนไซม์เสมอไป โดยพิจารณาเรซิน ECR8285 เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นสูง (9.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมเรซิน) กลับมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ซึ่งเหตุผลอาจเกิดจากปริมาณโปรตีนที่มากเกินไปทำให้โปรตีนเกิดปฏิกิริยาจับกันเอง (Protein–protein interactions) ซึ่งทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้ ตามรายงานของ Ranjbakhsh (2012)

ในส่วนผลของการศึกษาผลของค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ต่อการตรึงรูปเอนไซม์ PPL ด้วยพันธะ โควาเลนต์ พบว่า ค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ไม่มีผลกระทบอย่างมีแนวโน้มชัดเจนต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงบนเรซิน

ทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xingxing (2016) และงานวิจัยของ Xiaohong (2017) นอกจากนี้ Xiaohong ยังเสนอว่าค่า pH ที่เหมาะสมของการตรึงรูป มีผลต่อเสถียรภาพของ PPL จึงส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ จากการทดลองนี้พบว่า PPL ที่ถูกตรึงบนเรซิน ECR8204 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อถูกตรึงภายใต้ pH 7.5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang (2013) ขณะ PPL ที่ถูกตรึงบนเรซิน ECR8285 มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.0

การตรึงรูปของ PPL บนเรซินทั้งสองชนิดสามารถยืนยันได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการศึกษาความเป็นไปได้จากโปรแกรม Molsoft พบว่ามีกรดอะมิโนทั้งหมด 7 ชนิดบนพื้นผิวของ PPL ที่มีโซ่ข้างที่มีสมบัติเป็น นิวคลีโอไฟล์ ที่สามารถเปิดวงของหมู่อีพ็อกซี่ของวัสดุสนับสนุนทั้งสองชนิด โดยให้โปรตอนกับหมู่อีพ็อกซี่ และเกิดพันธะโควาเลนต์ต่อไปได้ ซึ่งตรงตามงานวิจัยของ Bischoffa (2012) นอกจากนี้งานวิจัยอื่นยังมีการตรวจสอบการติดของโปรตีนบนวัสดุสนับสนุนด้วยวิธีอื่นอีก เช่น งานวิจัยของ Yang (2013) ทำการศึกษาพื้นผิววัสดุสนับสนุนด้วยเทคนิค SEM และศึกษาเปรียบเทียบหมู่ฟังก์ชันของวัสดุสนับสนุนก่อน และหลังผ่านการตรึงรูปด้วยเทคนิค FTIR เป็นต้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นข้อมูลสำคัญแก่ภาคอุตสาหกรรมในการนำเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหมูตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นในการหาสภาวะที่ใช้ในการตรึงรูปเท่านั้น จึงควรมีการวิเคราะห์ในเรื่องของสภาวะที่เหมาะสมของการทำงาน เช่น ปัจจัยของค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายบัฟเฟอร์, อุณหภูมิ และความเสถียรต่อความร้อน เป็นต้น รวมทั้งศึกษาการนำไปประยุกต์ใช้งานในการเร่งปฏิกิริยา เพื่อนำไปพัฒนา และต่อยอดในการใช้งานในอุตสาหกรรมต่อไป เช่น การใช้ในการเร่งปฏิกิริยาผลิตน้ำมันไบโอดีเซล, อุตสาหกรรมเกี่ยวกับอาหาร, อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Bayramoglu, G., Kacar, Y., Denizli, A., Arıca, M., Y. (2002). Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. **Journal of Food Engineering**. 52, 367–374.

Borowiecki, P., Justyniak, I., Ochal, Z. (2017). Lipase-catalyzed kinetic resolution approach toward enantiomerically enriched 1-(b-hydroxypropyl)indoles. **Tetrahedron: Asymmetry.**

Hasan, F., Shah, A., A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. 39, 235-251.

Knezevic, Z., *et al*. (2006). Immobilization of lipase from Candida rugosa on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal.** 30, 269–278.

Mateo, C., *et al*. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**. 40, 1451–1463.

Mendes, A., A., Oliveirab, P., C., Castrob. H., F., d. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 78, 119-134.

Priyanka, P., Kinsella, G., Henehan, G., T., Ryan, B., J. (2019). Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from Pseudomonas reinekei. **Protein Expression and Purification**. 153,121-130.

Ranjbakhsh, E., Bordbara, A., K., Abbasia, M., Khosropoura, A., R., Shamsa, E. (2012). Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticle. **Chemical Engineering Journal.** 179. 272-276.

Rios, N., S., *et al*. (2018). Biotechnological potential of lipases from Pseudomonas: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**. 99-120.

Villeneuve, P., Muderhwa, J., M., Graille, J., Haas, M., J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 9. 113–148.

Xiaohong L., Xiaoning, P., Qianrui W., Honghe, Z., Xianghong, M., Bingjie, L. (2017). Effective detoxification of patulin from aqueous solutions by immobilized porcine pancreatic lipase**.** Food Control. 78. 48-56.

Xingxing, L., *et al*. (2016). Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin:Characterization and its application in synthesis of partial glycerides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** 133. 154-160.

Yanga, J., Hua, Y., Jianga, L., Zoua, B., Jia, R., Huang, H. (2013). Enhancing the catalytic properties of porcine pancreatic lipase by immobilization on SBA-15 modified by functionalized ionic liquid. **Biochemical Engineering Journal**. 70. 46– 54.