

## การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุรองรับพอลิเมอร์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

### The studies of properties of immobilized lipase on polymer support by physical adsorption

ฐานัน ปธานราชภูรี<sup>1</sup>, อัยยะ จันทศิริ<sup>2</sup>, วราพร ชนะกุล<sup>3</sup>

#### บทคัดย่อ

การวิจัยศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการตรึงเอนไซม์ไลเปสรวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุรองรับพอลิเมอร์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยแหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ Porcine pancreatic lipase หรือ PPL ซึ่งเป็นเอนไซม์ไลเปสที่สกัดมาจากตับอ่อนหมู และวัสดุรองรับที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ ซึ่งได้แก่ ECR8806F, ECR1030M และ ECR1090M ซึ่งเป็นวัสดุรองรับที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันและขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนวัสดุรองรับ ECR8806F ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดอยู่ที่ 0.0795 ยูนิตต่อกรัมวัสดุรองรับแห้ง และมีค่าความจุโปรตีน 178.010 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมวัสดุรองรับ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 และค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการตรึงเอนไซม์ การวิจัยศึกษาในครั้งนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพชนิดใหม่ซึ่งจะนำไปสู่การต่อยอดเพื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมซึ่งมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น

**คำสำคัญ :** เอนไซม์ไลเปส, การตรึงเอนไซม์, กิจกรรมของเอนไซม์, การดูดซับทางกายภาพ

#### Abstract

The objective of this research is study techniques of enzyme immobilization, properties of immobilized enzyme and factors affecting to immobilized enzyme activity. For immobilized lipase from Porcine Pancreatic Lipase (PPL) using physical adsorption, the lipase was immobilized on three different commercial supports namely ECR8806F, ECR1030M and ECR1090M. The immobilized enzyme activity on ECR8806F was outstanding showing highest activity of 0.0795 U/g<sub>dry</sub> and loading capacity of 178.010 mg Protein/g when using 5 mM sodium phosphate buffer pH 7 and concentration of protein at 10 mg/mL as immobilized enzyme. This research study will be a guideline for the

<sup>1</sup> นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการบริหารการอุตสาหกรรมเคมีและสิ่งแวดล้อม (M-ICPE)

คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มจพ.วิทยาเขตระยอง

<sup>2</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มจพ.วิทยาเขตระยอง

<sup>3</sup> อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ พลังงานและสิ่งแวดล้อม มจพ.วิทยาเขตระยอง

development of new biocatalysts and use immobilized enzyme in industrial applications with more economic value.

**Keywords:** Lipase, Enzyme immobilization, Enzyme activity, Physical adsorption

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol ester hydrolase, E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์คาร์บอกซิลเทอเรส (Carboxylesterases) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอซิลกลีเซอรอล (Acylglycerols) สายโซ่ยาวให้เป็นกลีเซอรอล กรดไขมันอิสระ โมโนและไดเอซิลกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ในรอยต่อระหว่างเฟสที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ หรือที่เรียกกันว่า Interfacial activation (Mendes *et al.*, 2012)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส พบได้สิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ พืช และเนื้อเยื่อของสัตว์ โดยเอนไซม์ไลเปสที่มีการใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุดในปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (Porcine pancreatic lipase หรือ PPL) เนื่องจากมีข้อดี คือ ราคาถูกกว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ และสัตว์ชนิดอื่น จึงทำให้เอนไซม์ PPL ได้รับความสนใจในการใช้งานด้านอุตสาหกรรมการผลิต และสามารถเข้าถึงง่าย โดยมีการจำหน่ายในผู้ค้าในตลาดต่างประเทศ มีเสถียรภาพและความจำเพาะสูงสำหรับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ปัจจุบัน เอนไซม์ PPL ถูกประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตหลายประเภท เช่น การสังเคราะห์กลิ่นและรสชาติ การผลิตไบโอดีเซล การผลิตอิมัลซิไฟเออร์ การผลิตเครื่องสำอางและการผลิตยา เป็นต้น

เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้เมื่อจับกับซับสเตรตที่เป็นไขมันในสภาพของหยดน้ำมัน ผ่านกลไกการใช้งานแบบ Interfacial activation จับกับซับสเตรตที่เป็นไขมันซึ่งเป็นสารไม่มีขั้วตรงพื้นผิวที่เป็นรอยต่อระหว่างน้ำกับไขมัน จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถละลายในน้ำได้ดีและถูกตรึงบนวัสดุรองรับที่มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic support) ได้

ในปัจจุบันมีการใช้วัสดุสนับสนุนชนิดใหม่สำหรับการตรึงเอนไซม์ไลเปส เช่น อนุภาคนาโน วัสดุที่มีรูพรุน ซิลิกา ซิลิกา อะกาโรสที่เคลือบด้วยหมู่เอซิล สไตรีน และไดไวนิลเบนซิน เป็นต้น (Pascacio *et al.*, 2016)

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนหมูตรึงรูปด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนวัสดุรองรับพอลิเมอร์ที่มีชื่อทางการค้าว่า ECR8806F, ECR1030M และ ECR1090M ซึ่งเป็นวัสดุรองรับที่มีหมู่ฟังก์ชัน Octadecyl methacrylate, DVB/Methacrylate และ Macroporous styrene ซึ่งมีขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งจะเป็แนวทางในการพัฒนาตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพชนิดใหม่ซึ่งจะนำไปสู่การต่อยอดเพื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุรองรับพอลิเมอร์ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

## สมมติฐานการวิจัย

ค่า pH ของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตเฟสบัฟเฟอร์ รวมทั้งค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ ส่งผลต่อการดูดซับเอนไซม์บนวัสดุรองรับ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปมีค่าสูงกว่าของเอนไซม์ไลเปสอิสระ

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. อุปกรณ์และสารเคมี

#### 1.1 สารเคมี

- เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนหมู (Porcine pancreatic lipase หรือ PPL) (EC 3.1.1.3 Type II, CAS 9001-62-1, crude; from porcine pancreas) จากบริษัท Sigma-Aldrich

- วัสดุรองรับ (Lifetech ECR Resin) จากบริษัท Lifetech ซึ่งวัสดุรองรับที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ECR8806F, ECR1030M และ ECR1090M

- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตเฟสบัฟเฟอร์ ได้แก่ Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous และ Sodium dihydrogen orthophosphate จากบริษัท Univar

- สารซัสเตรต ได้แก่ *p*-nitrophenol หรือ *p*NP จากบริษัท Sigma-Aldrich

- สารผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ได้แก่ *p*-nitrophenyl palmitate หรือ *p*NPP จากบริษัท Alfa aesa

#### 1.2 เครื่องมือวิเคราะห์

- เครื่องวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน หรือ Thermogravimetry; TGA จากบริษัท TA Instruments

- เครื่องวิเคราะห์สารชนิดฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด หรือ Fourier Transform Infrared Spectrophotometer; FTIR จากบริษัท PerkinElmer

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสงช่วง UV หรือ UV-Vis spectrophotometer จากบริษัท Thermo Scientific

- เครื่องวัดสารปริมาณน้อย หรือ Nanodrop จากบริษัท Thermo Scientific

### 2. การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนวัสดุรองรับด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ

การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพดัดแปลงจากงานวิจัยของ Pascacio และคณะ (2016) ซึ่งมีวิธีการดำเนินการ ดังต่อไปนี้

#### 2.1 การเตรียมเอนไซม์ไลเปส

- ปริมาณโปรตีนที่ระบุในฉลากของ Commercial lipase เท่ากับ 15%

เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีโปรตีน 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งเอนไซม์น้ำหนัก 16.67 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6, 7 และ 8 ตามลำดับ

ทำการปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนออก และนำส่วนสารละลายด้านบน (Supernatant) ไปใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ต่อไป

#### 2.2 การเตรียมวัสดุรองรับ

การเตรียมวัสดุรองรับสำหรับการตรึงเอนไซม์ เพื่อกำจัดอากาศและเติมรูพรุนของวัสดุรองรับด้วยน้ำก่อนการตรึงเอนไซม์ โดยนำวัสดุรองรับ 0.1 กรัม ใส่ลงใน Disposable chromatography columns (Bio-Rad) จากนั้น

เติมเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนบนเครื่องหมุนหลอดทดลองชนิดตั้งโปรแกรมได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร และนำไปหมุนต่อบนเครื่องหมุนหลอดทดลองชนิดตั้งโปรแกรมได้เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง และทำการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อหลีกเลี่ยงการขาดน้ำ

### 2.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปสบนวัสดุรองรับ

นำสารละลายเอนไซม์ PPL ที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน Disposable chromatography columns ที่มีวัสดุรองรับ 0.1 กรัม จากนั้นไปหมุนบนเครื่องหมุนหลอดทดลองชนิดตั้งโปรแกรมได้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้เกิดการดูดซับทางกายภาพของเอนไซม์บนวัสดุรองรับ เมื่อครบเวลาทำการกรองเพื่อแยกสารละลายออกและนำไปวัดปริมาณโปรตีนที่เหลือ และล้างวัสดุรองรับที่ตรึงเอนไซม์แล้วด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง และทำการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

### 2.4 การวัดปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะ

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ก่อนและหลังตรึงเอนไซม์ด้วยเครื่อง Nanodrop ด้วยวิธีโปรตีน A280 โดยคำนวณเป็นค่าความจุโปรตีน (Loading capacity) และมีสูตรสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ค่าความจุโปรตีน (มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมวัสดุรองรับ)} = [(P_0 - P_f) / W_s]$$

โดยที่  $P_0$  = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนการตรึงรูป (หน่วย: มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$P_f$  = ปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์หลังการตรึงรูป (หน่วย: มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$W_s$  = น้ำหนักของวัสดุรองรับแห้ง (หน่วย: กรัม)

### 2.5 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

สารละลายซับสเตรต (Substrate solution) และสภาวะที่ใช้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสอิสระและเอนไซม์ไลเปสตรึงรูป ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Ali และคณะ (2015) โดยเตรียมสารละลายซับสเตรตโดยนำ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) 30 มิลลิกรัมมาละลายใน Isopropanol 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมกับสารละลาย 0.05 M Tris-HCL buffer pH 7.2 ที่มี 0.4% Triton-X 100 ละลายอยู่ เมื่อได้สารละลายซับสเตรตแล้วให้นำสารละลายเอนไซม์ 50 ไมโครลิตรหรือวัสดุรองรับที่ตรึงเอนไซม์แล้ว 0.05 กรัม ผสมกับสารละลายซับสเตรต 2.5 มิลลิลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในที่มีเมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยเป็นการตรวจสอบการเกิดขึ้นของ *p*-nitrophenol (*p*NP) เพื่อหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคำนวณได้จากปริมาณของเอนไซม์ PPL ที่สามารถย่อยซับสเตรตซึ่งในที่นี้หมายถึง *p*NPP ให้เกิดเป็น *p*NP 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะการทดลอง มีหน่วยเป็นยูนิต และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสคำนวณได้จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อปริมาตรเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด

### 2.6 การวิเคราะห์ปริมาณการตรึงโปรตีนและความคงทนของการตรึงเอนไซม์

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เหลือในสารละลายหลังการตรึงเอนไซม์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 16 ไมโครลิตรผสมกับ Sample buffer pH 6.8 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการให้ความร้อนที่ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่ตัวอย่างลงในแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ ขนาด 9 x 6 เซนติเมตร รันด้วย Running buffer โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ที่กระแสไฟฟ้า 125 โวลต์ เทียบกับโปรตีนมาร์คเกอร์ (Biohelix) ขนาด 10-175 กิโลดาลตัน

- ทดสอบความคงทนของการตรึงเอนไซม์ นำวัสดุรองรับหลังการตรึงเอนไซม์ มาผสมกับ Running buffer แล้วนำไปใส่ในเครื่องล้างความถี่สูง เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนที่เป็นสารละลายปริมาตร 16 ไมโครลิตรผสมกับ Sample buffer pH 6.8 ปริมาณ 4 ไมโครลิตรทำให้โปรตีนเสียสภาพโดยการให้ความร้อนที่ 99 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ใส่ตัวอย่างลงในแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ ขนาด 9 x 6 เซนติเมตร รันด้วย Running buffer โดยใช้เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ที่กระแสไฟฟ้า 125 โวลต์ เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Biohelix) ขนาด 10-175 กิโลดาลตัน

2.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุรองรับด้วยเทคนิค Thermogravimetric analysis (TGA)

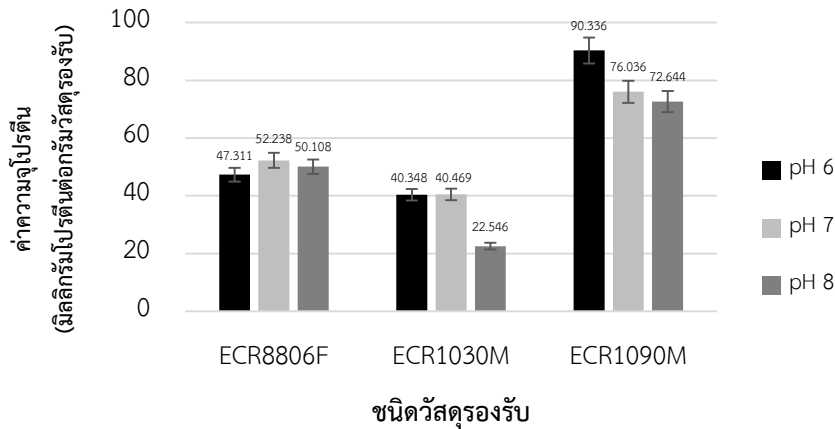
ชั่ง pan เปล่าด้วยเครื่อง TGA โดยเลือกโหมด tare เมื่อ tare เสร็จเรียบร้อยนำ pan เปล่ามาชั่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า แล้วกดตั้งค่าให้เป็นศูนย์จากนั้นบรรจุเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุรองรับหรือวัสดุรองรับที่ยังไม่ผ่านการตรึงด้วยเอนไซม์ประมาณ 5-10 กรัมและนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TGA โดยตั้งค่าเครื่อง TGA ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสุดท้าย 550 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน

2.8 การวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนตัวรองรับด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) โดยใช้โหมดการวิเคราะห์ Diffuse Reflectance

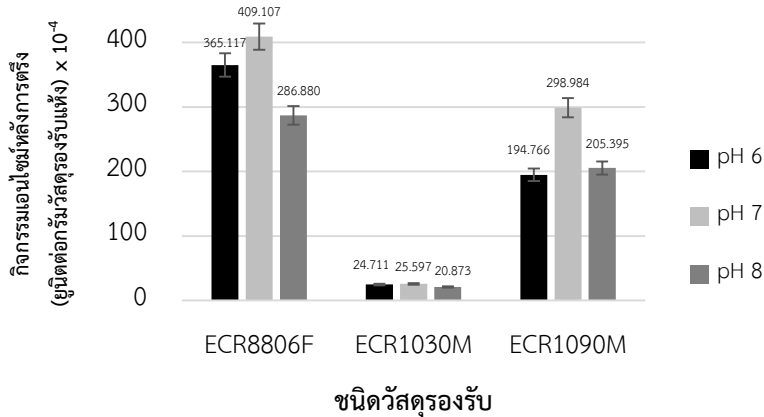
ทำการสแกน background โดยใช้ KBr บดให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งบดสารและนำไปใส่แม่พิมพ์ของ background เพื่อทำการสแกน background เมื่อสแกน background เสร็จแล้วให้นำเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปบนวัสดุรองรับหรือวัสดุรองรับที่ยังไม่ผ่านการตรึงรูปด้วยเอนไซม์มาบดผสมรวมกับ KBr ในอัตราส่วน 1:10 โดยให้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นนำไปใส่แม่พิมพ์ของตัวอย่างไปวิเคราะห์โดยตั้งค่าช่วงความยาวคลื่นที่ใช้วัดอยู่ในช่วง 4000-400  $\text{cm}^{-1}$

### สรุปผลการวิจัย

การตรึงเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนหมู (PPL) ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพบนวัสดุรองรับพอลิเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันและขนาดรูพรุนที่แตกต่างกัน พบว่าค่า pH ของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตเฟสบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ส่งผลต่อการดูดซับเอนไซม์บนวัสดุรองรับ เมื่อเริ่มต้นด้วยปริมาณเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน (2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้นเท่ากัน 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6, 7 และ 8 ตามลำดับ ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งแสดงเป็นค่าความจุโปรตีน (Loading capacity) ในหน่วยมิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมวัสดุรองรับแห่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตรึงรูปโดยให้ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสารซับสเตรต ( $p$ NPP) ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ ( $p$ NP) แสดงหน่วยเป็นยูนิิตต่อกรัมวัสดุรองรับแห่ง ดังแสดงในภาพที่ 2



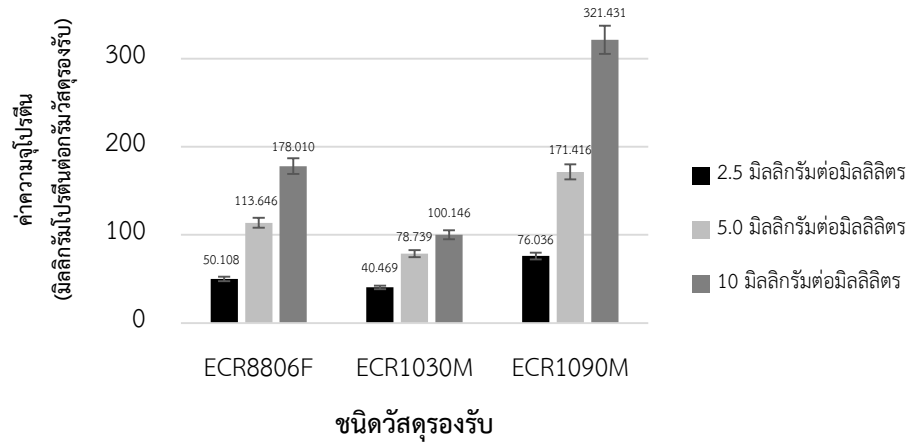
ภาพที่ 1 ค่าความจุโปรตีนหลังการตรึงเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6,7 และ 8 ในการตรึงเอนไซม์



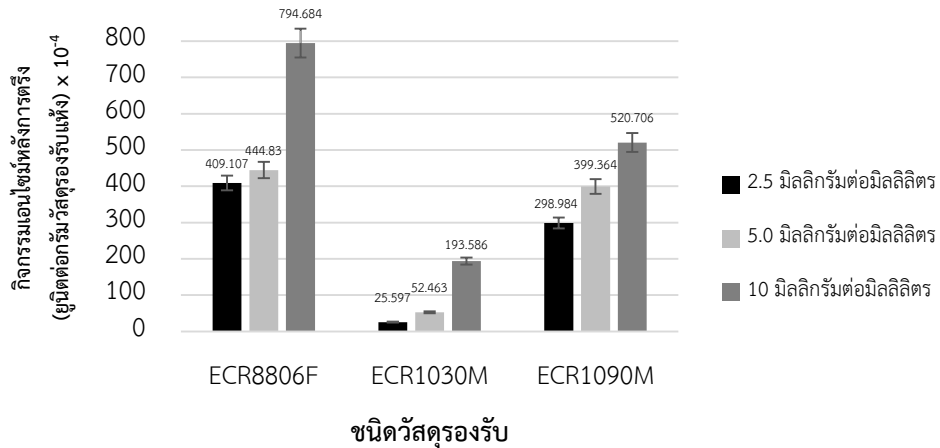
ภาพที่ 2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังการตรึงเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6,7 และ 8 ในการตรึงเอนไซม์

จากภาพที่ 2 เอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนวัสดุรองรับ ECR8806F มีค่ากิจกรรมสูงที่สุด ดังนั้นจึงทดสอบเพิ่มเติมโดยเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์เริ่มต้นที่ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการตรึงในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 ค่าความจุโปรตีนและค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูป แสดงในภาพที่ 3 และ 4 ตามลำดับ



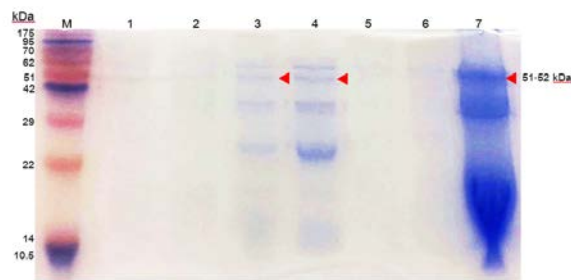


ภาพที่ 3 ค่าความจุโปรตีนหลังการตรึงเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 ในการตรึงเอนไซม์



ภาพที่ 4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังการตรึงเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 ในการตรึงเอนไซม์

ใช้วิธี SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่เหลือจากการตรึงเอนไซม์และทดสอบความคงทนของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนวัสดุรองรับทั้ง 3 ชนิด ได้ผลแสดงในภาพที่ 5 และ 6 ตามลำดับ เอนไซม์ (PPL) มีน้ำหนักอยู่ที่ 50-52 กิโลดาลตัน



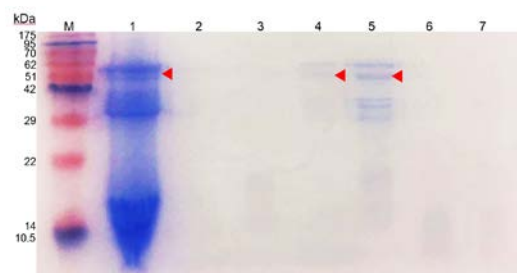
ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของสารละลายเอนไซม์หลังการตรึงเอนไซม์บนวัสดุรองรับ

M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Biohelix) ขนาด 10-175 กิโลดาลตัน

1 ถึง 6 คือ สารละลายโปรตีนหลังการตรึงเอนไซม์บนวัสดุรองรับโดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 ในการตรึงเอนไซม์

- 1, 2 = ปริมาณโปรตีนหลังการตรึงกับ ECR8806 ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 5,10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3, 4 = ปริมาณโปรตีนหลังการตรึงกับ ECR030M ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 5,10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 5, 6 = ปริมาณโปรตีนหลังการตรึงกับ ECR1090M ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 5,10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 7 = สารละลายโปรตีนก่อนการตรึงที่ความเข้มข้นโปรตีน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

◀ แสดงแถบของเอนไซม์ PPL



ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของวัสดุรองรับหลังการตรึงเอนไซม์

M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Biohelix) ขนาด 10-175 กิโลดาลตัน

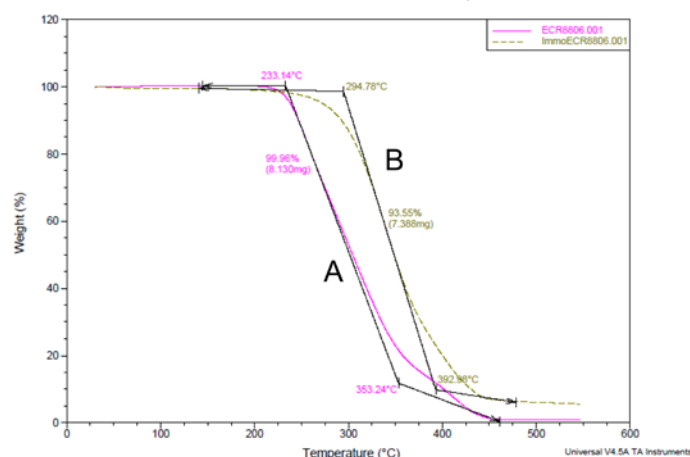
1 = สารละลายโปรตีนก่อนตรึงรูปที่ความเข้มข้นโปรตีน 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
 2 ถึง 7 คือ สารละลายโปรตีนหลังการตรึงเอนไซม์บนวัสดุรองรับโดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 ในการตรึงเอนไซม์

- 2, 3 = สารละลายจากการล้าง ECR8806 ตรึงรูป ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 5,10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4, 5 = สารละลายจากการล้าง ECR030M ตรึงรูป ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 5,10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 6, 7 = สารละลายจากการล้าง ECR1090M ตรึงรูป ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 5,10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

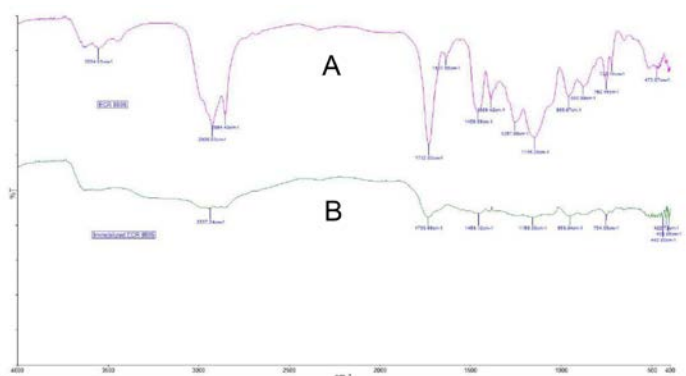
◀ แสดงแถบของเอนไซม์ PPL

ใช้วิธี TGA และ FTIR เพื่อทดสอบสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันของวัสดุรองรับ ECR8806F ก่อนและหลังการตรึงเอนไซม์ได้ผลแสดงใน ภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ





ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของ ECR8806F (A) และ ECR8806F ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ (B)



ภาพที่ 8 ผลการวิเคราะห์ FTIR ของ ECR8806F (A) และ ECR8806F ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ (B)

### อภิปรายผล

1. ผลของชนิดวัสดุรองรับและ pH ในการตรึงเอนไซม์ต่อค่าความจุโปรตีนต่อค่ากิจกรรม

เมื่อทำการตรึงเอนไซม์ที่ความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์เท่ากัน และมี pH แตกต่างกันไปพบว่า ECR1090M มีค่าความจุโปรตีนสูงที่สุดในทุก ๆ pH รองลงมาคือ ECR8806F และ ECR1030M มีค่าความจุโปรตีนน้อยที่สุดซึ่งยืนยันผลด้วยวิธี SDS-PAGE ดังภาพที่ 5 ซึ่งมีแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักเท่ากับ PPL เหลืออยู่ เมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ตรึงรูปพบว่ามีที่ตรึงรูปบน ECR8806F มีค่ากิจกรรมสูงสุดในทุก ๆ pH โดยสูงสุดที่ pH 7

2. ผลของความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้นต่อค่าความจุโปรตีนต่อค่ากิจกรรม

เมื่อทำการตรึงเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.5, 5.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ pH 7 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโปรตีนส่งผลให้ค่าความจุโปรตีนและค่ากิจกรรมในวัสดุรองรับทั้ง 3 ชนิด ซึ่งโปรตีนที่ติดอยู่บนวัสดุรองรับนั้นถูกทดสอบความคงทนโดยนำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ด้วยเครื่องล้างความถี่สูง และนำสารละลายมาทดสอบโปรตีนที่หลุดออกด้วยวิธี SDS-PAGE จากผลที่ได้พบว่า ECR8806F และ ECR1090M เป็นวัสดุรองรับที่เหมาะสมด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพ เนื่องจากมีค่ากิจกรรมสูงที่สุดและมีความคงทนสูง

3. การทดสอบคุณสมบัติทางความร้อนของ ECR8806F และ ECR8806F ตรึงรูป

จากการทดสอบสมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA พบว่า ECR8806F ที่ไม่ผ่านการตรึงจะมีอุณหภูมิเริ่มต้นการสลายตัวทางความร้อนที่ประมาณ 233.14 องศาเซลเซียส สำหรับน้ำหนักที่สูญเสียไปในช่วงอุณหภูมิ 290 ถึง 400 องศาเซลเซียสเกิดจากการสลายตัวของ Octadecyl methacrylate คิดเป็นน้ำหนักที่สูญเสียไปร้อยละ 93.55 และ ECR8806F ตรึงรูปจะมีอุณหภูมิเริ่มต้นการสลายตัวทางความร้อนที่ประมาณ 294.8 องศาเซลเซียส สำหรับน้ำหนักที่สูญเสียไปในช่วงอุณหภูมิ 230 ถึง 400 องศาเซลเซียสเกิดจากการสลายตัวของ Octadecyl methacrylate คิดเป็นหนักหนักที่สูญเสียไปร้อยละ 99.96

จากผล IR spectrum ของ ECR8806F ที่ไม่ผ่านการตรึงจะมีพีกที่สูงกว่า ECR8806F ตรึงรูป ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันของวัสดุรองรับ ถูกโปรตีนบดบังจึงมีผลทำให้พีกของ ECR8806F ตรึงรูป ต่ำกว่าพีกของ ECR8806F ที่ไม่ผ่านการตรึงด้วยเอนไซม์

### ข้อเสนอแนะ

#### ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปบนวัสดุรองรับไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชันเอสเทอร์ได้

#### ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

ควรศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตรึงรูปบนวัสดุรองรับ ด้วยวิธีการดูดซับทางกายภาพในการใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันเพื่อการผลิตไบโอดีเซล หรือเอสเทอริฟิเคชันเพื่อผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นและรส และควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มเติม

### เอกสารอ้างอิง

- Adlercreutz, P. (2012). Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society reviews**. 42: 6406–6436.
- Ali, H. C., Mbadanga, S. M., Liu, J.F., Yang, S. Z., Gi, J. D., Mu, B. Z. (2015). Significant enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* FW\_SH-1 lipase production using response surface methodology and analysis of its hydrolysis capability. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 52: 7-13.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Lafuente, R. F., Huguet, J., Guisan, J. M., (1999). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**. 58: 486–493.
- Cadirci, B. H., Yasa, I. (2010). An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. 64: 155–161.
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., Castro, H. F. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 78: 119–134.

- Mohamad, N. R., Marzuki, H. N., Buang, N. A., Huyop, F., Wahab, R. A., (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology biotechnological equipment**. 29: 205-220.
- Pascacio, V. G., Ortíz, J. J., Pérez, M. J., Yates, M., Sanchez, B. T., Quintero, A. R., Lafuente, R. F. (2017). Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**. 200: 1–10.
- Pascacio, V. G., Peirce, S., Sanchez, B. T., Yates, M., Quintero, A. R., Ortiz, J. J., Lafuente, R. F. (2016). Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**. 6: 100281–100294.
- Patel, U., Chandpura, J., Chauhan, K., Gupte S. (2018). Screening and isolation of an organic solvent tolerant lipase producing bacteria from various oil contaminated sites. **Indian Journal of Applied Microbiology**. 21: 2249-8400.
- Scherer, R., Oliveira, J. V., Pergherb, S., Oliveira, D. (2015). Screening of Supports for Immobilization of Commercial Porcine Pancreatic Lipase. **Materials Research**. 14: 483–492.
- Tischer, W., Wedekind F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. **Topics in Current Chemistry**. 200: 95–126.
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., Liu D. (2015). Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 44: 182–197.