หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันนี้เอนไซม์ที่ใช้ประโยชน์ในสาขาวิชาต่าง ๆ พบโดยทั่วไปทั้งในเซลล์พืช เซลล์สัตว์ เช่น ปาเปน จากยางมะละกอ และ สับปะรด เรนนินจากกระเพาะลูกวัวอ่อน ไคโมทริปซินจากตับอ่อนของหมู เซลลูเลสในกระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง เอนไซม์ที่ได้จากพืชและสัตว์นี้ถือเป็นผลพลอยได้ที่มีค่าทางเศรษฐกิจอย่างมาก ข้อเสียของการผลิตเอนไซม์จากเซลล์พืช และสัตว์คือ ผลิตได้น้อย เสียค่าจ้างและแรงงานในการเลี้ยงและเก็บผลิตผลสูง (Caygill, 1979) จึงมุ่งเน้นพัฒนาการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพราะมีข้อได้เปรียบคือ

1. สามารถผลิตเอนไซม์ได้ตามต้องการถ้าควบคุมสภาวะแวดล้อม และพันธุกรรมของจุลินทรีย์
2. ใช้เวลาในการผลิตสั้น
3. สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้เลี้ยงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น
4. วิธีการพัฒนาการผลิตง่ายไม่ซับซ้อน
5. มีการผลิตได้หลายวิธีถ้าใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ทำให้เกิดทางเลือกที่จะพัฒนาให้ดีที่สุดได้หลายวิธี
6. สภาวะที่ใช้ในการหมักเชื้อ (fermentation condition) เปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมได้ตามชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการผลิต
7. สามารถควบคุมจุลินทรีย์ให้ผลิตสารตามต้องการได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุกรรม (genetic engineering)

การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยกระบวนการหมักสามารถดัดแปลง ปรับปรุงให้ได้ปริมาณ ชนิดของเอนไซม์ให้เป็นไปตามต้องการได้โดย

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ จะทำได้โดยสมบูรณ์เมื่อเลือกวิธีการทดสอบที่เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ โดยวิธีการทดสอบนั้นต้องเป็นตัวแทนที่แสดงถึงปริมาณทั้งหมดของเอนไซม์ที่ผลิตได้ สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายเมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้ไปใช้ จากการทดลองเลือกได้สายพันธุ์ Aspergillus sp. ผลิตภัณฑ์เซลลูเลสจากเชื้อชนิดนี้ถือเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย โดยคณะกรรมการพิจารณาอาหารและยา (FDA)

(Taylor and Richardson, 1979) ซึ่งคาดว่าหากพัฒนาการผลิตต่อไปจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร และการผลิตเอนไซม์ควรพัฒนาให้สามารถผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก หาง่าย ได้ผลิตผลมากในระยะเวลาสั้น และสามารถแยกส่วนที่ต้องการออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย เพื่อประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม

2. การพัฒนาสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ให้ผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูงขึ้น อาจทำได้โดย

2.1 การกลายพันธุ์และการคัดเลือก (mutation and selection)

2.2 การผสมสายพันธุ์ต่าง ๆ เข้าด้วยกันเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ (hybridization)

2.3 โดยใช้เทคนิครีคอมบิแนนท์ ดีเอ็นเอ (recombinant DNA technology)

2.4 การปรับปรุงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3. พัฒนาสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อราไม่สามารถสังเคราะห์อาหารขึ้นใช้เองได้ ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญต้องให้อาหารประเภทคาร์บอนในรูปของ กลูโคส ซูโครส มอลโตส แล้วนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้สร้างสารประกอบไนโตรเจนต่อไป สารอาหารอื่นที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อรา คือ คาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ โบรอน มังกานีส ทองแดง โมลิบดินัม เหล็ก สังกะสี แคลเซียม (Bridson และ Brecker, 1970) โดยทั่วไปกลูโคสจัดเป็นสารให้คาร์บอนที่ดีที่สุด และสารอินทรีย์ไนโตรเจน (เปปโตน) เป็นสารให้ไนโตรเจนดีที่สุด รองลงมา คือ แอมโมเนีย ไนเตรท แต่ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า KC floc ร้อยละ 2 และ เปปโตน ร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุด

เนื่องจากการผลิตเซลลูเลสขึ้นกับการกระตุ้นการสร้าง (induction) การยับยั้งโดยผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (catabolite repression) และ การยับยั้งการสร้างเอนไซม์จากสารต่าง ๆ (product inhibition) เซลลูเลสยังเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นแล้วขับออกมาภายนอกเซลล์ จึงต้องคำนึงถึงการปลดปล่อยเอนไซม์ออกจากเซลล์ภายหลังสร้างอีกด้วย (protein release mechanism) สารที่สามารถใช้เป็นสารกระตุ้นการสร้างเซลลูเลสได้คือ เซลลูโลส เซลโลไบโอส และสารที่มีโครงสร้างคล้าย

กันคือ โซฟอโรส (sophorose) (Mandels และคณะ, 1962) ในกรณีที่สารกระตุ้นการสร้างมีราคาแพงอาจดัดแปลงให้โครโมโซมสามารถรับสารกระตุ้นที่หาได้ง่าย และราคาถูกกว่าได้โดยการกลายพันธุ์ (mutation) (Demain, 1972) หรือควบคุมการสร้างสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ เช่น กลูโคส (Demain, 1983) สามารถป้องกันการยับยั้งการสร้างเซลลูเลสโดยกลูโคส ได้โดยไม่ใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ใช้สารอื่นแทน เช่น แป้ง แลคโตส หรือรักษาระดับกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณต่ำที่สุด

การปลดปล่อยเอนไซม์ที่ผลิตได้ออกจากเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ สามารถกระตุ้นได้โดยใช้สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic detergents) (Reese, 1972) เช่น ทวีน 80 (Tween 80) เมื่อเติมลงในสารอาหารทำให้ผลิตเซลลูเลสเพิ่มได้มากถึง 15 - 20 เท่า ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดีขึ้น จึงมีการผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์มากขึ้นเพื่อรักษาระดับสมดุลย์ให้เป็นปกติ นอกจากนี้ยังเชื่อว่าสารลดแรงตึงผิวป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายได้ (Faith และคณะ, 1971)

นอกจากส่วนประกอบของสารอาหาร และปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลสแล้ว ขั้นตอนการเตรียมอาหารซึ่งรวมถึง การทำไร้เชื้อ (sterilization) ควรทำด้วยความระมัดระวัง การผลิตครั้งละมาก ๆ ควรใช้วิธีการทำไร้เชื้อแบบใช้ความร้อนสูงในเวลาสั้น ๆ 120 - 140 องศาเซลเซียส 10 - 40 วินาที (high temperature short time, HTST) เพื่อลดปัญหาการเปลี่ยนสี และการเกิดน้ำตาลเคี่ยวไหม้ (caramelization) ซึ่งจะลดการเจริญของเชื้อ การพัฒนาการผลิตควรเริ่มจากจำนวนน้อย โดยใช้ขวดกรวยขนาด 1 ลิตร ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบ้างแล้ว จึงขยายใหญ่ขึ้นเพื่อให้มีผลิตผลมากขึ้น

4. เลือกเครื่องมือและขบวนการที่ใช้ในการผลิตให้เหมาะสม

กระบวนการผลิตอาจแบ่งเป็นวิธีหลัก ๆ ได้ 2 วิธี คือ การใช้อาหารแข็ง (solid substrate fermentation) (Toyama, 1976; Chahal, 1985) และการใช้อาหารเหลว (submerged fermentation) ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งเหมาะกับการผลิตเอนไซม์ที่ขับออกภายนอกเซลล์และเชื้อรา (fungal extracellular enzyme) มากกว่าเพราะความชื้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้นั้นแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ เอนไซม์ที่ผลิตสกัดออกมาได้ง่ายด้วยน้ำเพียงจำนวนน้อยทำให้ได้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง แต่ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้อาหารเหลวเนื่องจากอาหารเหลวกำจัดจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่ายกว่า สามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณการใช้ออกซิเจน ความชื้นได้ง่ายกว่า วิธีการเตรียมสารตั้งต้นที่จะใช้เป็นสารอาหารไม่ยุ่งยากโดยเติมสารที่จำเป็นทั้งหมดแล้วจึง

เพาะเลี้ยงเชื้อ (batch-fermentation) หรืออาจพัฒนาการผลิตโดย เติมสารตั้งต้นทีละน้อยให้เหมาะกับแต่ละขั้นตอนของการเจริญของเชื้อ (fed-batch fermentation) (Ghose และ Sahai, 1979; Hendy และคณะ, 1982; McLean และ Podruzny, 1985) ซึ่งวิธีการนี้จะได้ผลิตผลดีกว่า และช่วยลดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์โดยสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการสลายแต่มีข้อเสียคือมีการปนเปื้อนง่ายกว่า วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยุ่งยากกว่า

5. อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้อาหารเหลว

5.1 อุณหภูมิ

อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (specific growth rate, μ) และอุณหภูมิเป็นไปตามความสัมพันธ์ของ Arrhenius ดังสมการ

$$u = Ae^{-E/RT}$$

A = ค่าคงที่
e = พลังงานการกระตุ้น
T = อุณหภูมิองศาเคลวิน
R = ค่าคงที่ของก๊าซ

จะเห็นว่าค่า μ จะเพิ่มขึ้นทุก ๆ 10 องศาเซลเซียสที่เพิ่มขึ้น และจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังนั้นควรจะเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่มีค่า μ สูงสุด ซึ่งอาจเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์หรือไม่ก็ได้ Tangnu และคณะ (1981) พบว่า สามารถผลิตเซลลูเลสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยง Trichoderma reesei ที่ 31 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน ต่อจากนั้นลดอุณหภูมิเป็น 28 องศาเซลเซียสแล้วจึงเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในวันที่เหมาะสม ทั้งที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนี้คือ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิจะมีค่าเป็นเท่าใดนั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง จึงควรพิจารณาทดลองเป็นชนิด ๆ ไป

อุณหภูมิมีผลต่อเอนไซม์ในแง่ของการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของการทำปฏิกิริยา และมีผลต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ เอนไซม์ส่วนมากโครงสร้างจะถูกความร้อนทำลายเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา จะทำให้

อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดแล้วจึงลดลง เรียกอุณหภูมิ ณ จุดที่เกิดปฏิกิริยาด้วยอัตราเร็วสูงสุดว่า อุณหภูมิเหมาะสม (optimum temperature) ในการทดลองอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของ CMCase คือ 50 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปถือว่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาเป็นไปตามสมการอาร์เรเนียส (Arrhenius equation)

$$k = A \exp(-Ea/RT)$$

A = ค่าคงที่
Ea = พลังงานการกระตุ้น (energy of activation)
T = อุณหภูมิเป็นเคลวิน
R = 8.31 J $mol^{-1}k^{-1}$

กราฟ k และ 1/T เรียกว่า กราฟอาร์เรเนียส (Arrhenius plot) จะเป็นเส้นตรง

ผลการศึกษาถึงจลนศาสตร์ของเอนไซม์จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพราะถ้าทราบว่าการผลิตเอนไซม์ถูกยับยั้งที่จุดใดจะได้แก้ไขให้ถูกต้องเพื่อเพิ่มแอคทิวิตีที่จุดนั้น เพราะเชื่อว่าการเพิ่มแอคทิวิตีจะทำให้ขั้นตอนอันเป็นจุดจำกัดการผลิตเอนไซม์ (bottle neck) ไม่สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้อีกต่อไป

5.2 ความเป็นกรด-ด่าง

สามารถศึกษาดูความสำคัญของความเป็นกรด-ด่างต่อการผลิตเซลลูเลสโดย T. reesei ได้จากงานของ Gallo และคณะ, 1981; Tangnu และคณะ, 1981; Mukhopadhyay และคณะ, 1979; Mukhopadhyay และ Malik, 1980 ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อโครงสร้างการทำงานของเอนไซม์ และมีผลต่อการเจริญของเชื้อ เช่น Trichoderma reesei เจริญเติบโตและผลิตเซลลูเลสได้ดีที่สภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4 และ 3 ตามลำดับ (Ryu และ Mandels, 1980) ในการทดลอง TISTR 3335 เจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 7 และ CMCase ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6

ความสำคัญของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์นั้นอาจแสดงได้โดย พิจารณาให้เอนไซม์สามารถแตกตัวได้ไอออน 2 ชนิด (H_2E) ค่าคงที่การแตกตัวแสดงได้ด้วยค่า k_1, k_2 ตามสมการของไมเคลลิส (Michaelis equation) ความเข้มข้นของไอออนชนิดต่าง ๆ เป็นดังนี้คือ

$$[H_2E] \rightleftharpoons [HE^-] + [H^+] \rightleftharpoons [E^{2-}] + 2[H^+]$$

$$[H_2E] = e_o/(1 + k_1/h + k_1k_2/h^2)$$

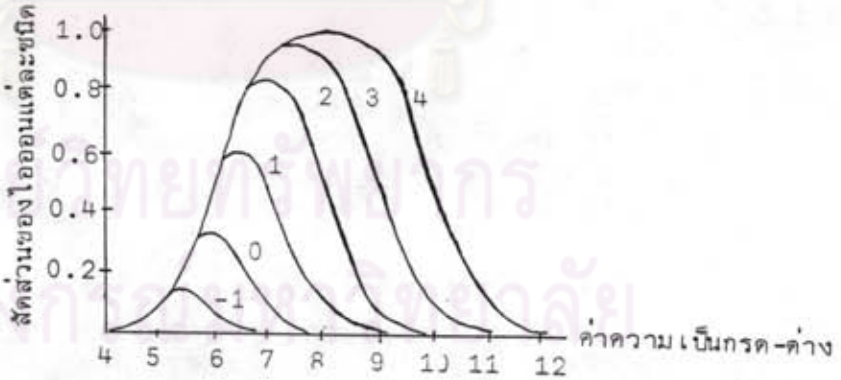
$$[HE^-] = e_o/(h/k_1 + 1 + k_2/h)$$

$$[E^{2-}] = e_o(h_2/k_1k_2 + h/k_2 + 1)$$

e_o = ความเข้มข้นทั้งหมดของเอนไซม์ที่ปรากฏในรูปไอออนทุกชนิด คือ $[H_2E][HE][E^{2-}]$

h = ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน = 10^{-pH}

ถ้าวาดกราฟระหว่าง $[HE^-]$ กับค่าความเป็นกรด-ด่างจะได้กราฟรูประฆังคว่ำ



รูปที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ในรูปของอนุมูล $[HE^-]$ กับค่าความเป็นกรด-ด่าง

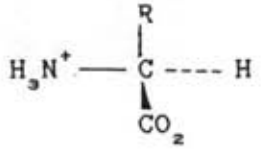
ในการทดลองดูผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อการทำงานของเซลลูเลสได้กราฟรูประฆังคว่ำเช่นเดียวกัน แต่เป็นการหาความสัมพันธ์ของอัตราเร็วเริ่มต้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเป็นการยากที่จะนำความสัมพันธ์ดังกล่าวมาพิจารณาแปรผลเพราะอัตราเร็ว

เริ่มต้นได้รับอิทธิพลจากปัจจัยหลายอย่างซึ่งต้องพิจารณาให้ถ่องแท้ก่อน และความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาแตกต่างกัน Knowles (1976) จึงเสนอให้หากราฟความสัมพันธ์ของ k_1 และ k_2 จากสมการไมเคลลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten) กับค่าความเป็นกรด-ด่าง มาใช้แทนซึ่งจะเป็นความสัมพันธ์ที่มีความสำคัญในการแปรผลมากกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ การแตกตัวของเอนไซม์ หรือสารตั้งต้นจะมีผลต่อค่า k_1 และการแตกตัวของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์และสารตั้งต้นจะมีผลต่อค่า k_2 ดังนั้นหากต้องการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างให้สมบูรณ์ต้องศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ให้ถ่องแท้ก่อนเพื่อนำค่า k_1 และ k_2 มาประกอบการพิจารณา

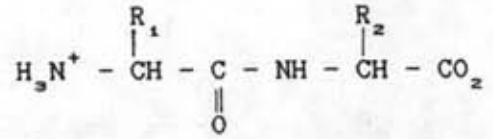
5.3 ปริมาณออกซิเจนในสารอาหาร

ถ้าเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตต้องจัดหาออกซิเจนให้เพียงพอกับความต้องการโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 0.10 - 0.25 กิโลกรัม/เซลล์ 1 กิโลกรัม/ชั่วโมง (Brown, 1970) สามารถทำได้โดยเพิ่มความดันออกซิเจนในถังเพาะเลี้ยงเชื้อ การคนหรือเขย่าขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเขย่าแรงเกินไปจะทำให้เกิดแรงต้านภายในระบบมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพลดลง (Reese และ Ryu, 1980) นอกจากนี้แรงต้านที่เกิดขึ้นเป็นต้นกำเนิดความร้อนเพิ่มการทำลายพันธะซัลเฟอร์-ซัลเฟอร์โดยโลหะหนักที่อาจมีปนเปื้อนในขบวนการผลิตได้ง่ายขึ้น (Charm และ Wong, 1981) และแรงต้านนี้ยังมีผลต่อการเจริญและการทำงานของเซลล์โดยเฉพาะในเชื้อราที่มีขนาดเล็ก ๆ (microfungi) พบว่า*Aspergillus fumigatus* ที่เพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการเขย่าสูงการเจริญของกระจุกใยรา(mycelium) น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในที่ซึ่งมีอัตราการเขย่าต่ำ (Wase และคณะ, 1985a) ในการทดลองอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง TISTR 3335 เท่ากับ 200 รอบ/นาที

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ โดยกรดอะมิโนจะมีคาร์บอนอะตอมตรงกลาง เรียกว่า คาร์บอน ล้อมรอบด้วยหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล ไฮโดรเจนอะตอม และหมู่ R ซึ่งมีหมู่ R แตกต่างกันมากกว่า 20 ชนิดทั้งในแง่ของขนาด ประจุไฟฟ้า และสมบัติความเป็นกรด-ด่าง หมู่ R โดยทั่วไปมักมีโครงสร้างเป็นเกลียว ยกเว้นกรดอะมิโนชนิดไกลซีน จะมีหมู่ R เป็นไฮโดรเจนอะตอมจึงมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ในธรรมชาติจะพบโปรตีนที่มีรูปสามมิติเป็นชนิด L ไม่มีชนิดที่เป็น D



กรดอะมิโน 2 โมเลกุลรวมตัวเป็นไดเปปไทด์ โดยเสียน้ำระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวหนึ่งกับหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง ตามรูปข้างล่าง



การเรียงตัวของกรดอะมิโนให้เป็นโครงสร้างพื้นฐาน (primary structure) ของโปรตีนจะมีลักษณะอย่างไรขึ้นกับ gene ที่ผลิตโปรตีนนั้น ๆ เอนไซม์หลายชนิดไม่สามารถทำงานได้ถ้าขาดสารชนิดหนึ่ง เรียกสารชนิดนี้ว่า โคเอนไซม์ หรือหมู่โพสเทติค (prosthetic group) และเรียกเอนไซม์นั้นว่า อะโปเอนไซม์ ซึ่งถ้ารวมกับโคเอนไซม์แล้วจะเรียกว่า ฮาโลเอนไซม์ ในการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์จำเป็นต้องใส่โคเอนไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เกิดการผลิตโดยสมบูรณ์ โดยทั่วไปมักเติม ไวตามินบี-1 ไวตามินบี-2 เพื่อให้มีโคเอนไซม์ชนิดไทอะมีน-ไพโรฟอสเฟต และฟลาวินโมโน-นิวคลีโอไทด์ ไวตามินบี-6 สำหรับโคเอนไซม์ชนิด ไพรีดอกซอลฟอสเฟต ไนอะซิน สำหรับโคเอนไซม์ชนิด นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD), กรดแพนโททีนิค สำหรับโคเอนไซม์ชนิด โคเอนไซม์ A กรดโฟลิคสำหรับโคเอนไซม์ชนิดเตตระไฮโดรโฟเลท และเติมโคเอนไซม์ไบโอติน การทำงานของเอนไซม์จะเกิดขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ สารตั้งต้นและ/หรือโคเอนไซม์ โดยอัตราเร็วของการทำปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ ดังสมการ

$$v = k_o e_o a / K_m + a$$

a = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

e_o = ความเข้มข้นของเอนไซม์

k_o = ค่าคงที่ขบวนการสลาย (catalytic constant)

k_m = ค่าคงที่ไมเคลลิส (Michalis constant)

= ค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นเมื่อความเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด

โดยความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นจนถึงค่าคงที่คือ $k_o e_o$ เรียกความเร็วขนาดนี้ว่า (V_{max}) อัตราเร็วสูงสุด (maximum velocity, limiting velocity) อัตราส่วนระหว่าง k_o/k_m (= k_s) จะเป็นตัวกำหนดความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีโครงสร้างปฐมภูมิที่คงทน แต่โครงสร้างทุติยภูมิ และตติยภูมิซึ่งมีบทบาทในการทำงานของเอนไซม์แปรเปลี่ยนได้ง่ายโดยความร้อน สภาพความเป็นกรด-ด่าง และสารที่มีผลต่อพันธะไฮโดรเจนหรือมีผลต่อแรงตึงผิวซึ่งทำให้เอนไซม์ไวต่อการรบกวนทางกล เช่นการเขย่าทำให้พื้นที่ผิวของโมเลกุลเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาถูกทำลาย การเสียคุณภาพทางเคมีอาจเกิดขึ้นได้ 2 ทางคือ ถูกออกซิไดซ์โดยอากาศโดยเฉพาะส่วนที่เป็น ซิสเตอีน (cysteine) และถูกทำลายโดยเอนไซม์ร่วมชนิดอื่น คือ โปรตีนเอส (proteinases) ซึ่งจะทำลายเอนไซม์ได้มากขึ้นเมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพราะเมื่อบริสุทธิ์แล้วจะไม่มีสารตั้งต้นตัวอื่นให้โปรตีนเอสย่อยสลายหรือมีน้อยลง การถูกออกซิไดซ์สามารถป้องกันได้โดยเติม 2-เมอแคบโตเอทธานอล ไดไธโอทรีออล ซึ่งสารเหล่านี้จะกำจัดออกซิเจน และไอออนโลหะอื่นที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดออกซิเดชันคือ Hg^{2+} Pb^{2+} Cu^{2+} สำหรับโปรตีนเอสกำจัดได้โดยทำการทดลองภายในระยะเวลาสั้นที่สุด และเลือกวิธีการทำให้บริสุทธิ์ให้สามารถแยกโปรตีนเอสได้ในขั้นต้น ๆ ของการทำการทดลอง

ในการทดลองผลของสารเคมีและไอออนที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า PCMB, $HgCl_2$ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เนื่องมาจากสารดังกล่าวทำหน้าที่ออกซิไดซ์หมู่ ซิสเตอีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน ฮิสติดีน และ เมทธิโอนีน ในส่วนประกอบของเอนไซม์ ทำให้เสียสภาพ การทำงานจึงลดลง แสดงว่าการทำงานของเอนไซม์ขึ้นกับหมู่อินโดล (indole) ที่มีในโมเลกุล

ในขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ประกอบด้วย เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนอาจทำให้สูญเสียสารที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นหากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ได้แยกสารเหล่านี้ออกไป จะทำให้คุณสมบัติการย่อยสลายของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปในทางลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อแก้ปัญหานี้จึงต้องศึกษาให้ถ่องแท้ก่อน แล้วกำหนดคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ (kinetic properties) ที่เป็นอิสระไม่ขึ้นกับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เพื่อประโยชน์ในการผลิตเซลลูเลสได้อย่างแท้จริงในขั้นอุตสาหกรรม