

การแยก *R/S* ไอโซเมอร์ของกรดไขมันแอลฟาไฮดรอกซี ด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงบนซีเถ้าแอลบ

อนรรฆอร ศรีไสยเพชร¹ นฤมล จียโชค² และ คณิต กฤษณังกูร²

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

รับเมื่อ 3 มีนาคม 2548 ตอบรับเมื่อ 2 มิถุนายน 2548

บทคัดย่อ

ซีเถ้าแอลบซึ่งผ่านการเผาในเตาที่เผาควบคุมอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชะด้วยกรดซัลฟริกเข้มข้นร้อยละ 10 ถูกนำมาใช้เป็นพาหะสำหรับตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* เอนไซม์ไลเปสตรึงนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาเพื่อจำแนก *R/S*-กรดแอลฟาไฮดรอกซี ออกแทโนอิกเมนทิลเอสเทอร์ในระบบที่มีไอโซออกเทนเป็นตัวทำละลายหลัก และมีตัวทำละลายร่วมในปริมาณเล็กน้อยที่ช่วยเพิ่มการละลายของสารตั้งต้น โดยองค์ประกอบของตัวทำละลายอินทรีย์มีอิทธิพลอย่างมากต่อปริมาณผลิตภัณฑ์และการเลือกทำปฏิกิริยากับอีแนนซีไอเมอร์ของเอนไซม์ตรึง โดยได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุดเมื่อใช้ *tert*-butyl alcohol เป็นตัวทำละลายร่วมเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นเช่น Diisopropylether, Di-*n*-butylether, Trichloroethylene และ Tetrachloroethylene อย่างไรก็ตาม แนวโน้มการเกิดผลิตภัณฑ์กลับลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายร่วมสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณน้ำและความเข้มข้นของสารตั้งต้นในระบบมีผลอย่างมากต่อความจำเพาะของเอนไซม์โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ Enantiomeric excess สูงสุด คือ ในระบบที่มีน้ำร้อยละ 0.6 และอัตราส่วนของแอลกอฮอล์กับกรดไขมันเป็น 7.5

คำสำคัญ : กรดไขมันแอลฟาไฮดรอกซี / ซีเถ้าแอลบ / เอนไซม์ตรึง / Enantiomeric Excess

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

² รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Resolution of *R/S*- α -Hydroxy Fatty Acids by Immobilized Lipase on Rice Hull Ash

Anakahaorn Srisaipet ¹, Narumon Jeyashoke ², and Kanit Krisnangkura ³

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Takham, Bangkhuntien, Bangkok 10150

Received 3 March 2005 ; accepted 2 June 2005

Abstract

Rice hull ash obtained from rice hull which was heated for 2 hrs, at 500 °C was treated with 10% sulfuric acid. The ash was used as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. The immobilized lipase can resolve *R/S*- α -hydroxy octanoic acid menthyl esters in iso-octane with a small amount of *ter*-butanol as a co-solvent for the substrate. The solvent composition strongly affects the enzyme selectivity as well as the product yield. The highest yield is obtained from system with *tert*-butanol is the co-solvent, when it compares to other cosolvents, such as Diisopropylether, Di-*n*-butylether, Trichloroethylene and Tetrachloroethylene. However, higher concentrations of co-solvents tend to decrease the product yields. Water content and substrate concentration strongly affect the enzyme selectivity. The optimal condition for highest enantiomeric excess is 0.6% water and the alcohol to α -hydroxy fatty acid ratio is 7.5.

Keywords : α -Hydroxy Fatty Acid / Rice Hull Ash / Immobilized Enzyme / Enaneiomeric Excess

¹ Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

² Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

กรดไขมันแอลฟาไฮดรอกซี (AHFA) เป็นสารประกอบไครลที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยมากในรูปของ *R*-isomer AHFAs ที่มีจำนวนคาร์บอนสายยาวๆ สามารถพบได้ในพืช ไขมันบริเวณผิวหนัง และเนื้อเยื่อพิเศษในสมอง ส่วน AHFAs สายสั้นๆ สามารถนำมาใช้เป็นสารตัวกลางทางเคมีในการผลิตยารักษาโรคและสารเคมี [1, 2] และในระบบสรีระวิทยานั้น มักจะตอบสนองต่อไอโซเมอร์เดียว ส่วนอีแนนซีโอเมอร์อื่นนั้นนอกจากจะไม่มีผลทางการรักษาแล้ว บางอีแนนซีโอเมอร์ยังให้ผลในทางลบอีกด้วย จากความสำคัญของไอโซเมอร์ และประโยชน์ของ AHFAs จึงมีความจำเป็นที่จะต้องแยกไอโซเมอร์ออกจากกัน เพื่อให้ได้ไอโซเมอร์เดี่ยวๆ และบริสุทธิ์ Tokamolthom และคณะ [3] ได้ศึกษาการแยก (*R*-) และ (*S*-) -isomers ของกรดไขมันแอลฟาไฮดรอกซี โดยไม่ใช้สารอ้างอิงบนอะไครลคอลลัมน์แก๊สโครมาโตกราฟี กระบวนการที่ใช้ในการสังเคราะห์ให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการนั้นสามารถทำได้ทั้งการใช้สารเคมีและใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการเร่งปฏิกิริยา โดยตัวเร่งทางเคมีมีข้อดีน้อยกว่าตัวเร่งทางชีวภาพคือขาดความจำเพาะต่อไอโซเมอร์ที่ต้องการ เอนไซม์ไลเปส (Acylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) มีสมบัติพิเศษตรงที่มีความจำเพาะต่อสารไครล (chiral) ซึ่งมีการเรียงตัวของหมู่ฟังก์ชันเฉพาะสารไครลที่มีความสำคัญในชีวิตประจำวันทั่วๆ ไป ตัวอย่าง เช่น ยารักษาโรค อาหาร เครื่องสำอาง สามารถใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในระบบที่มีตัวกลางเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งช่วยเพิ่มการละลายของสารตั้งต้นชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) โดยการทำให้เอนไซม์กระจายตัวอยู่บนพาหะตรึงซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับเอนไซม์ในการสัมผัสกับสารตั้งต้น โดยชนิดของวัสดุที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ชี้อาณานิ (Rice hull ash, RHA) ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร มีองค์ประกอบหลัก คือ ซิลิกา [4] จากการใช้ X-ray diffraction แสดงให้เห็นถึงลักษณะที่เป็น Amorphous silica ในรูปของ Opal [5] และจาก Infrared spectrum ของชี้อาณานิ ยังแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกับ Silicic acid [6] ดังนั้นจึงมีการใช้ชี้อาณานิเป็นตัวดูดซับสารต่างๆ ที่ไม่ต้องการในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช [4-10] นอกจากนี้ Tantrakulsiri และคณะ [11] ได้ศึกษานำชี้อาณานิมาใช้เป็นพาหะสำหรับตรึงเอนไซม์เพื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันมะกอก อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการทดลองนำชี้อาณานิมาใช้เป็นพาหะตรึงเอนไซม์สำหรับการเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีไอโซเมอร์ที่จำเพาะตามต้องการ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนานำชี้อาณานิเป็นพาหะสำหรับตรึงเอนไซม์เพื่อเร่งปฏิกิริยาการจำแนกไอโซเมอร์

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. เอนไซม์

- เอนไซม์ไลเปสอิสระจาก *Candida rugosa* และ *Candida antarctica*
- เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* และ *Candida antarctica* ที่ Entrapment in sol-gel

2. สารเคมี

R/S α -hydroxy octanoic acid จากบริษัท ชิกมาเคมีคอล จำกัด (เซนต์หลุยส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตัวทำละลายอินทรีย์ ไอโซออกเทน (Isooctane) (บ่มใน Molecular sieve ขนาด 13 อังสตรอม นาน 12 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้) และ เตตระคลอโรเอทิลีน (Tetrachloroethylene) จากบริษัท แลปสแกน จำกัด (ประเทศไทย) ไตรคลอโรเอทิลีน (Trichloroethylene) และ ไดโนอร์มัลบิวทิลอีเทอร์ (Di-*n*-butylether) จากบริษัท

คาร์โบ เออร์บาร์ จำกัด (ประเทศอิตาลี) ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์ (Diisopropylether) และเทอเทียรีบิวทิลแอลกอฮอล์ (tert-butyl alcohol) จากบริษัท ฟลูกา จำกัด (ประเทศไทย) เมนทอล (Commercial grade) จากห้างหุ้นส่วน ธงฮวดจำกัด (กรุงเทพฯ ประเทศไทย) ซึ่ได้กลบเผาในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บดและร่อนคัดขนาด 63-106 ไมโครเมตร (230-140 mesh) นำไปชะด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และกวนตลอดเวลา 5 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากอ็อกซิเจนเป็นกลาง นำไปอบให้แห้งใช้เป็นพาหะสำหรับตรึงเอนไซม์

3. การเตรียมกรดไขมันแอลฟาไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์

นำสารละลายของเอนไซม์ไลเปสอิสระมาตรึงบนซึ่ได้กลบตามวิธีของ Tantrakulsiri และคณะ [11] ในสภาวะที่มีองค์ประกอบของตัวทำละลายอินทรีย์ น้ำ สารตั้งต้น ในปริมาณต่างๆ เร่งปฏิกิริยาและกวนตลอดเวลาในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ร้อยละ 4 Na_2CO_3) จำนวน 1 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งสารละลายส่วนบนใส ใช้พาสเจอร์บีเปตค่อยๆ ดูดสารละลายชั้นบนใสในหลอดทดลอง เติมผงโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (Na_2SO_4 (anhydrous)) ลงไปเล็กน้อยเพื่อดูดน้ำที่ติดค้างมา เขย่าและตั้งทิ้งไว้สักครู่จนสารละลายใสแยกสารละลายชั้นบนมาแล้วนำไปทำแห้งภายใต้แกลสไนโตรเจน เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

4. การวิเคราะห์กรดไขมันแอลฟาไฮดรอกซีเมทิลเอสเทอร์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น Shimadzu 17A มีตัวตรวจวัดแบบแฟลมไอออไนเซชัน (บริษัท ซิมัทสึ จำกัด ประเทศไทย) การแยกวิเคราะห์ที่ไอโซเมอร์ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester ใช้คอลัมน์แบบแคปิลลารี คอลัมน์ AT-5 (ขนาด 10 เมตร x เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 มิลลิเมตร) เคลือบด้วยร้อยละ 5 Phenyl ร้อยละ 95 Methylsiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร จากบริษัท แอลเทค จำกัด (ประเทศสหรัฐอเมริกา) ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 0.056 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 200 องศาเซลเซียส อุณหภูมิอินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดีเทคเตอร์ 25 องศาเซลเซียส

5. การประเมินความบริสุทธิ์ของอีแนนทิโอเมอร์

แสดงปริมาณสัมพัทธ์ของอีแนนทิโอเมอร์ในสารผสมโดยใช้ค่า Enantiomeric excess (ee.) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$\%ee = \frac{100 \times (\text{mole of major enantiomer} - \text{mole minor enantiomer})}{\text{mole of minor enantiomer}}$$

หมายเหตุ: %Yield คือ ผลผลิตที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น

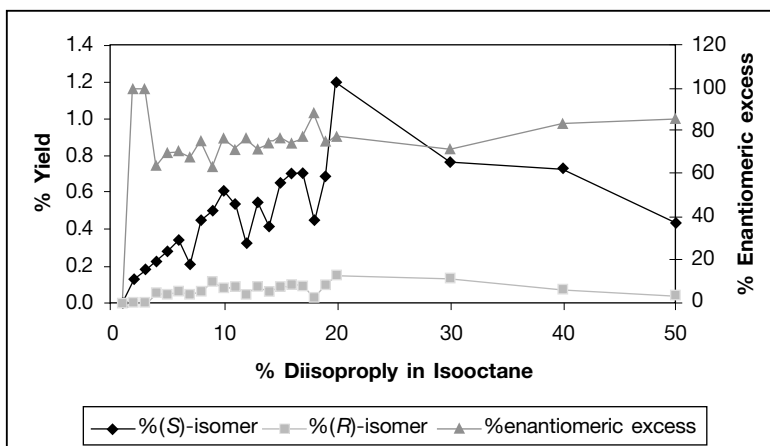
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. การศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายร่วม

การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester เกิดขึ้นได้ดีในตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว คือ ไอโซออกเทน แต่เนื่องจากถูกจำกัดด้วยการละลายของสารตั้งต้นคือกรดไขมันและแอลกอฮอล์ในตัวทำละลายชนิดนี้ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการปรับปรุงตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับเร่งปฏิกิริยาโดยการเติมตัวทำละลายร่วมเพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายของสารตั้งต้นโดยตัวทำละลายร่วมที่ศึกษามี 5 ชนิด ได้แก่ ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์ ไดนอร์มัลบิวทิลอีเทอร์ ไตรคลอโรเอทิลลีน เดรทระคลอโรเอทิลลีน และเทอเทียรีบิวทิลแอลกอฮอล์

1.1 การใช้ Diisopropylether เป็นตัวทำละลายร่วม

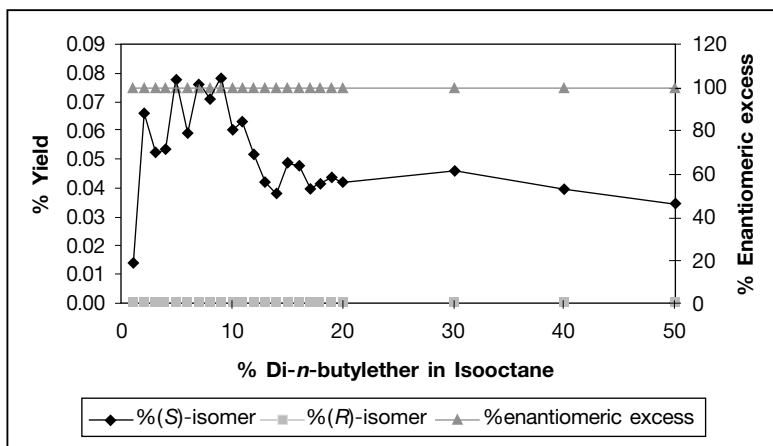
เมื่อในระบบมี Diisopropylether ร้อยละ 1-20 ของตัวทำละลายหลัก (ไอโซออกเทน) พบว่าเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ R/S - α -hydroxy octanoic acid menthyl ester เพิ่มขึ้น แต่เมื่อปริมาณ Diisopropylether เพิ่มขึ้นกว่าร้อยละ 20 ผลิตภัณฑ์ก็กลับลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นคือ (S)-isomer (ร้อยละ 0.1-1.2) ที่มี Enantiomeric excess อยู่ในช่วงร้อยละ 63-100 ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 การใช้ Diisopropylether เป็นตัวทำละลายร่วม ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์และ Enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester

1.2 การใช้ Di-n-butylether เป็นตัวทำละลายร่วม

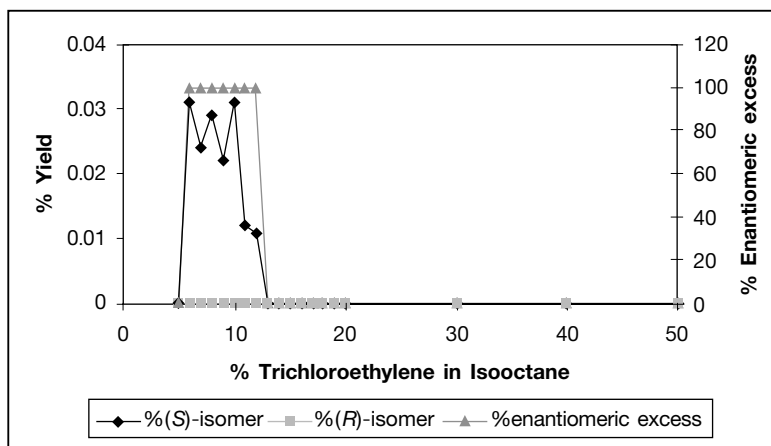
ผลของ Di-n-butylether ต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ R/S - α -hydroxy octanoic acid menthyl ester และ Enantiomeric excess แสดงในรูปที่ 2 ซึ่งในทุกสภาวะที่ทำการศึกษายังไม่พบผลิตภัณฑ์ (R)-isomer เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงเป็น (S)-isomer ทั้งร้อยละ 100 โดยปริมาณผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเมื่อ Di-n-butylether เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 10 ของตัวทำละลายหลัก (ไอโซออกเทน) ในขณะที่ถ้ามีการเติมตัวทำละลายร่วมลงไปอีกกลับทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ค่อยๆ ลดลง



รูปที่ 2 การใช้ Di-*n*-butylether เป็นตัวทำละลายร่วม ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์และ Enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester

1.3 การใช้ Trichloroethylene เป็นตัวทำละลายร่วม

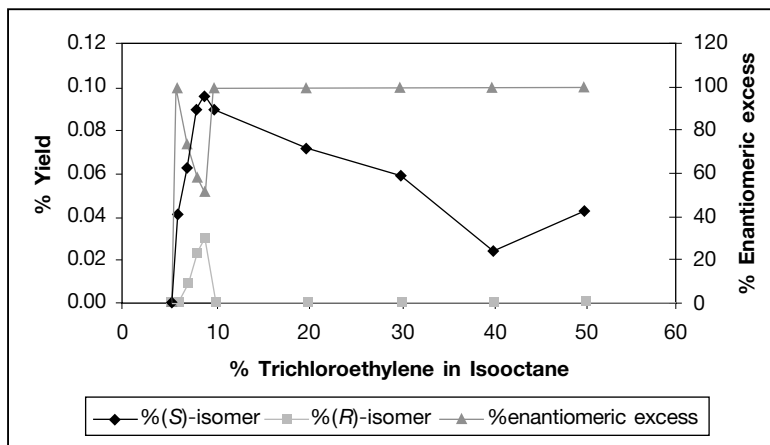
ผลการทดลองพบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของปริมาณผลิตภัณฑ์ (S)-isomer เมื่อใช้ Trichloroethylene เป็นตัวทำละลายร่วม โดยเอนไซม์ตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในระบบที่มี Trichloroethylene ร่วมอยู่ร้อยละ 6-9 ของตัวทำละลายหลัก (ไอโซออกเทน) และยังพบว่าเมื่อเจือปนผลิตภัณฑ์ (S)-isomer เกิดขึ้นเท่านั้น (ร้อยละ ee.=100) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 การใช้ Trichloroethylene เป็นตัวทำละลายร่วม ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์และ Enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester

1.4 การใช้ Tetrachloroethylene เป็นตัวทำละลายร่วม

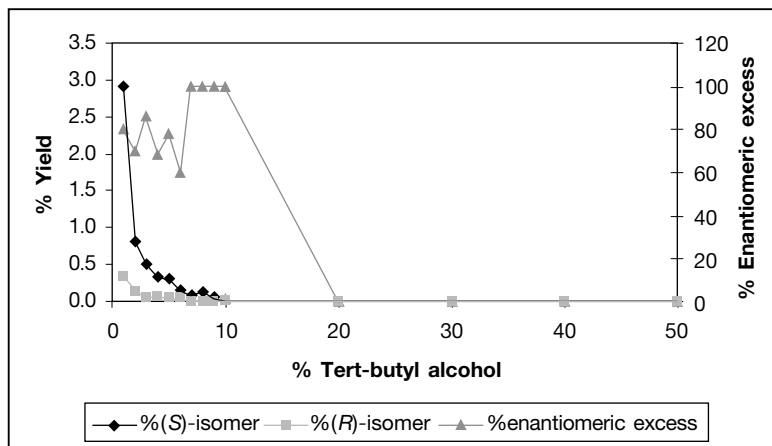
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตรึงเร่งปฏิกิริยาในระบบที่ Tetrachloroethylene เป็นตัวทำละลายร่วมพบว่าปริมาณ Tetrachloroethylene ที่เหมาะสมคือร้อยละ 9 ของตัวทำละลายหลัก (ไอโซออกเทน) ให้ผลิตภัณฑ์ (S)-isomer สูงสุด แสดงดังรูปที่ 4 และเมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลายร่วม ผลิตภัณฑ์ก็กลับลดลง โดยไปยับยั้งการเกิด (R)-isomer ทั้งหมด ดังนั้น Enantiomeric excess จึงเป็นร้อยละ 100 ที่ปริมาณ Tetrachloroethylene ในระบบมากกว่าร้อยละ 10



รูปที่ 4 การใช้ Tetrachloroethylene เป็นตัวทำละลายร่วม ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์และ Enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester

1.5 การใช้ *tert*-butyl alcohol เป็นตัวทำละลายร่วม

ในการทดลองส่วนนี้ใช้ *tert*-butyl alcohol ที่มีความเข้มข้นสูงเป็นตัวทำละลายร่วมในปฏิกิริยา แม้ว่า alcohol group สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันซึ่งอาจก่อให้เกิดการแข่งขันกันของสารตั้งต้นที่เข้าจับบริเวณเร่งของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามการมีอยู่ของหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) ทั้ง 3 หมู่ในโมเลกุลของ *tert*-butyl alcohol ทำให้เกิด Steric hindrance ซึ่งมีผลรบกวนและยับยั้งการเข้าไปจับกับสารตั้งต้นของ *tert*-butyl alcohol ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าระบบที่มี *tert*-butyl alcohol อยู่ในปริมาณต่ำ เอนไซม์ไลเปสตรึงสามารถทำงานเร่งปฏิกิริยาเกิดผลิตภัณฑ์ (S)-isomer ในปริมาณที่มากกว่า (R)-isomer ส่วนที่ *tert*-butyl alcohol ในระบบมากขึ้น การทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า *tert*-butyl alcohol เพียงปริมาณเล็กน้อยที่ใช้ในระบบช่วยในการละลายของกรดไขมัน α -hydroxy octanoic acid ทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ โดยปริมาณเอสเทอร์ของ (S)-isomer สูงที่สุดร้อยละ 3 ด้วย ee. ร้อยละ 80 เมื่อใช้ *tert*-butyl alcohol ร้อยละ 1



รูปที่ 5 การใช้ *tert*-butyl alcohol เป็นตัวทำละลายร่วม ต่อปริมาณผลิตภัณฑ์และ Enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ (S-) และ (R-) α -hydroxy octanoic acid menthyl ester และ Enantiomeric excess ขึ้นกับชนิดและปริมาณของตัวทำละลายร่วมที่ใช้ในปฏิกิริยา ทั้งนี้เนื่องมาจากตัวทำละลายร่วมส่งผลต่อการละลายของสารตั้งต้นและความมีเสถียรภาพของ Enzyme-substrate complex โดยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตัวทำละลายอินทรีย์นี้ยังทำให้ Entropic และ Enthalpic มีความแตกต่างกันออกไปตัวทำละลายร่วมที่เป็นชนิดไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งอาจรบกวน structure conformation ของเอนไซม์ ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดประสิทธิภาพลง [12-14] งานวิจัยของภาวิณี และคณะ [15] ศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่ตรึงบนซีเถ้าแอลบ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาใน Diisopropylether สูงกว่าการเร่งปฏิกิริยาใน Di-*n*-butyl ether เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องมาจากโครงสร้างของ Diisopropylether เป็นกิ่งก้าน (branch chain) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสตรงสามารถแสดงแอคติวิตีสูงกว่าในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นสายตรง (straight chain) และสำหรับปริมาณน้ำที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อพิจารณาที่ค่า log P Diisopropylether มีค่า log P ต่ำกว่า จึงต้องการน้ำมากกว่าในการที่จะรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับ Di-*n*-butyl ether และให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่มอะลิฟาติกไฮโดรคาร์บอน (aliphatic hydrocarbon) ที่พบว่าเมื่อเร่งปฏิกิริยาในไอโซออกเทนที่มีความไม่ชอบน้ำสูงและมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดในปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับตัวทำละลายอินทรีย์และชนิดของปฏิกิริยาและสำหรับงานวิจัยที่ศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อชนิดเดียวกันที่ตรึงบนซีเถ้าแอลบในตัวทำละลายอินทรีย์ของมนตรี และคณะ [16] ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติไฮโดรโปคซึ่งไม่ละลายน้ำจึงไม่ดึงน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลเอนไซม์ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีที่สูง โดยพบว่าไอโซออกเทนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทำให้เอสเทอริฟิเคชันแอคติวิตีของเอนไซม์ตรงสูงสุด กล่าวได้ว่าการที่เอนไซม์มี Enantioselectivity เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายอินทรีย์ในปฏิกิริยาซึ่งไปทำให้ความยืดหยุ่นของโมเลกุลเอนไซม์ลดลง โดยตัวทำละลายอินทรีย์มีค่า Dielectric constant ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสถานะที่เป็นน้ำ ทำให้แรงยึดเหนี่ยวภายในโมเลกุลของเอนไซม์มากขึ้น (intramolecular electrostatic interaction) เอนไซม์จึงมีความยืดหยุ่นต่ำ ส่งผลให้มี Enantioselectivity เพิ่มขึ้น โดยที่มีแอคติวิตีต่ำลง [17, 18]

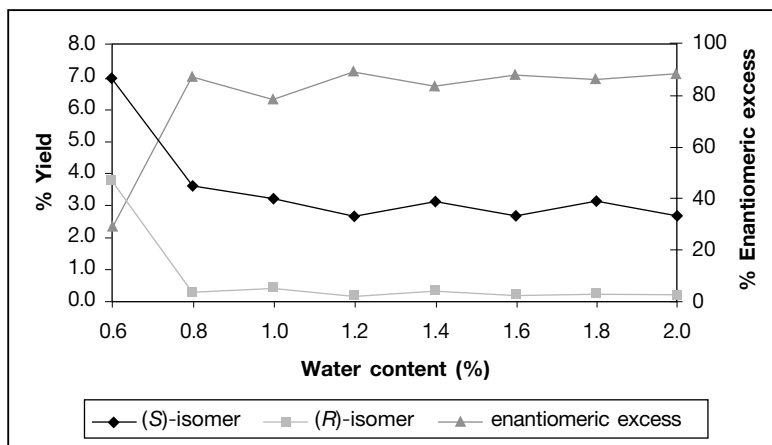
จากรายงานการวิจัยของ Mohile และคณะ [19] ที่ศึกษาการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ (*R*)-isomer ของสารตั้งต้นที่ใช้ (Butyl 2-(4-chlorophenoxy) propionate) ในสภาวะที่มีตัวกลางเป็น Ionic liquid ร่วมกับบัฟเฟอร์ กล่าวได้ว่า สภาวะแวดล้อมส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งทำให้เอนไซม์มีความสามารถและความจำเพาะในการทำงานเร่งปฏิกิริยาต่างกันไป

เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างกัน ในการศึกษาต่อไปใช้ *tert*-butyl alcohol ปริมาณร้อยละ 1 เป็นตัวทำละลายร่วม ร่วมกับไอโซออกเทน เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ไลเปสที่ตรึงบนซีเถ้าแอล

2. การศึกษาผลของปริมาณน้ำในระบบ

จากการทดลองที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าสิ่งที่ต้องพิจารณาเมื่อเอนไซม์ทำงานในตัวกลางที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์คืออันตรกิริยาของตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำที่มีอยู่ในเอนไซม์ ดังนั้นน้ำที่มีอยู่ในระบบจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

รูปที่ 6 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำในระบบต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึง โดยพบว่าเมื่อน้ำในระบบมีมากขึ้น เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาเกิดผลิตภัณฑ์ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester ในปริมาณที่ต่ำลง โดยที่เอนไซม์ยังคงมีความจำเพาะต่อผลิตภัณฑ์ (*S*)-isomer



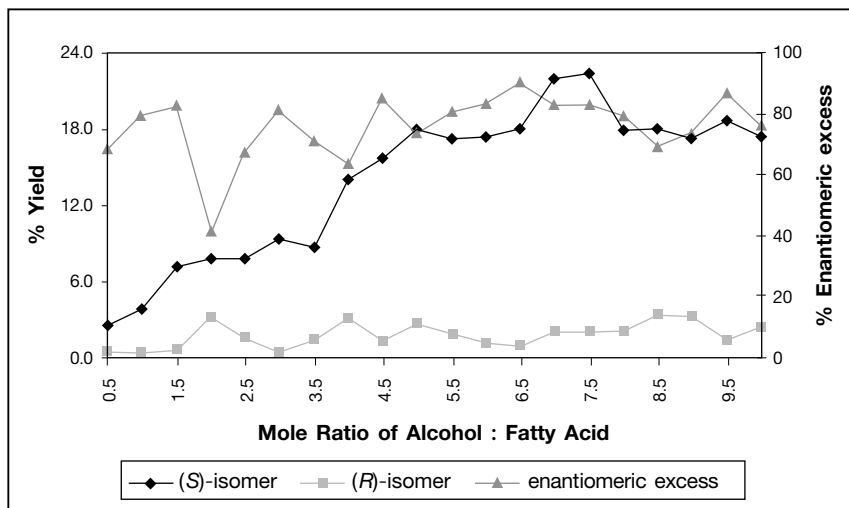
รูปที่ 6 ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ และ Enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester ที่เกิดขึ้นโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนซีเถ้าแอล
เร่งปฏิกิริยาในไอโซออกเทนที่มีร้อยละ 1 *tert*-butyl alcohol
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

เนื่องจากเอนไซม์ต้องการน้ำในปริมาณที่เหมาะสมในการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์เพื่อใช้ในการเร่งปฏิกิริยา เมื่อมีปริมาณน้ำมากเกินไปแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์มีความยืดหยุ่นมากเกินไปไม่เหมาะแก่การทำงานเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และน้ำที่มากเกินไปนี้ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของผลิตภัณฑ์และยังทำให้เกิดการต้านทานการแพร่ของสับสเตรทเข้าไปยังบริเวณเร่งของเอนไซม์ส่งผลให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ลดลง และหากว่าปริมาณน้ำในระบบมีน้อยเกินไปตัวทำละลายอินทรีย์ดึงน้ำออกจากโมเลกุลเอนไซม์ทำให้โครงสร้างเอนไซม์ไม่เหมาะกับการเร่งปฏิกิริยา สมรเมธ และคณะ [20] ศึกษาการใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่ถูกตรึงบนซีดีแอลเบ เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดไขมันอิสระจากน้ำมันรำข้าวและเอทานอลในเฮกเซน โดยศึกษาเพื่อหาปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา พบว่าที่ปริมาณน้ำในปฏิกิริยาเป็น 40 ไมโครลิตร เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ซึ่งเมื่อเพิ่มน้ำในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเกิดได้น้อยลง โดยสมดุลของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนไปในทางไฮโดรไลซิสมากกว่า ในขณะที่จิตรวรรณ และคณะ [21] รายงานถึงปริมาณน้ำที่เหมาะสมสำหรับการปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในเฮกเซนที่ต้มด้วยน้ำโดยเอนไซม์ตรึงชนิดเดียวกันเป็น 50 ไมโครลิตร (ร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรเฮกเซน)) และพบว่า การเติมน้ำในระบบมากเกินไปค่าแอคติวิตีจะลดลง เพราะเอนไซม์เกิดการเกาะกันเป็นก้อน หรือชั้นของน้ำล้อมรอบเอนไซม์หนาขึ้น ทำให้จำกัดการถ่ายเทมวล มนตรี และคณะ [16] ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันจากกรดไขมันอิสระจากน้ำมันมะกอกและบิวทานอลด้วยเอนไซม์ไลเปสตรึงจากเชื้อชนิดเดียวกันเร่งปฏิกิริยาในไอโซออกเทน พบว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็น 30 ไมโครลิตร คิดเป็นร้อยละ 0.6 (ปริมาตรต่อปริมาตรไอโซออกเทน) ซึ่งสอดคล้องกับอนรรฆอร และคณะ [22] ที่ทำการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสตรึงชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิ 10 20 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าไม่จำเป็นการศึกษาที่อุณหภูมิใดๆ เอนไซม์มีเอสเทอร์ฟิเคชันแอคติวิตีสูงสุดเมื่อมีปริมาณน้ำในระบบร้อยละ 0.6 การควบคุมปริมาณน้ำในระบบของการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง เนื่องจากกระบวนการเหล่านี้อยู่บนพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงเพื่อความเหมาะสมของสมดุลเคมีที่มีต่อ Thermodynamics reversible ของปฏิกิริยา ซึ่งการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์นั้น โมเลกุลของเอนไซม์ต้องการมี hydration layer ซึ่งทำหน้าที่เป็นเหมือนกับ buffer อยู่ระหว่างพื้นผิวรอบๆ เอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งปริมาณน้ำที่ต้องการนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ พาหะที่ใช้ตรึงเอนไซม์ และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นตัวกลางในปฏิกิริยา [23] โดยถ้าปริมาณน้ำอยู่ในระดับต่ำจะทำให้ระดับความไม่ยืดหยุ่นตัวของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น และนั่นคือเป็นการปรับปรุง Enantioselectivity ของเอนไซม์ [24, 25] ในการทดลองต่อไปใช้ปริมาณน้ำในระบบที่ร้อยละ 0.6 เนื่องจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นสูงสุด

3. การศึกษาปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสม

เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละระบบต้องมีปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมค่าหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำงาน

จากการทดลอง พบว่าเมื่ออัตราส่วนจำนวนโมลของแอลกอฮอล์กับกรดไขมันเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์ (S)-isomer ของ α -Hydroxy octanoic acid menthyl ester ก็เพิ่มขึ้นด้วย จนกระทั่งเมื่ออัตราส่วนของสับสเตรทมีค่ามากกว่า 7.5 ผลิตภัณฑ์ (S)-isomer กลับลดลง ส่วนผลิตภัณฑ์ (R)-isomer เกิดขึ้นมีค่าค่อนข้างคงที่ไม่ว่าอัตราส่วนของสารตั้งต้นมีค่าเปลี่ยนแปลงไปเท่าใดก็ตาม ทำให้ enantiomeric excess มีค่าค่อนข้างคงที่ แสดงในรูปแบบที่ 7



รูปที่ 7 อัตราส่วนจำนวนโมลของสารตั้งต้นต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ และ enantiomeric excess ของ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester ที่เกิดขึ้นโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงบนซีเถ้าแอลเบร่งปฏิกิริยาในไอโซออกเทนที่มีร้อยละ 1 *tert*-butyl alcohol ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ กล่าวได้ว่า ทรายไคที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ยังไม่อิ่มตัวสับสเตรท การเพิ่มปริมาณสับสเตรทเข้าไปในระบบทำให้สับสเตรทจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้มากขึ้น การทำงานของเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีมากขึ้นด้วย ในทางกลับกัน ถ้าปริมาณสับสเตรทมีมากเกินไป บริเวณเร่งของเอนไซม์มีอึดตัวไปด้วยสับสเตรททำให้เอนไซม์มีกิจกรรมที่คงที่ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอีกก็ไม่มีที่ว่างพอที่จะให้สับสเตรทเข้าไปจับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้อีก แต่หากสับสเตรทมีปริมาณมากขึ้นมากๆ อาจทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสับสเตรท (substrate inhibition) กิจกรรมของเอนไซม์และผลิตภัณฑ์จึงลดลง เนื่องจากปริมาณสารที่มีมากเกินไปทำให้การเคลื่อนที่เข้าหาบริเวณ active site ของเอนไซม์เกิดขึ้นได้อย่างจำกัด [26-28] จากงานวิจัยของมนตรี และคณะ [16] รายงานถึงปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจาก *Candida rugosa* ที่ตรึงบนซีเถ้าแอลเบร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในไอโซออกเทน คือ กรดไขมันอิสระ 200 ไมโครลิตร และบิวทานอล 50 ไมโครลิตร และเมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนจำนวนโมลระหว่างบิวทานอลต่อกรดไขมันอิสระ พบว่าเมื่ออัตราส่วนจำนวนโมลมีค่าน้อยแอกติวิตีของเอนไซม์ต่ำ เนื่องจากสารตั้งต้นที่มีปริมาณน้อยเป็นตัวกำหนดปริมาณสารในการเกิดเอสเทอร์ ในขณะที่อัตราส่วนจำนวนโมลมีค่ามากแอกติวิตีของเอนไซม์ก็ต่ำเช่นกัน เนื่องจากสารตั้งต้นที่มีมากเกินไปส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ และนอกจากนี้ปริมาณสารตั้งต้นที่มีอยู่เป็นตัวที่ใช้ทำนายค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยาย้อนกลับที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งนำไปสู่ Stereoselectivity ของเอนไซม์

4. การศึกษาผลของพาหะและวิธีการตรึงเอนไซม์

เนื่องจากการใช้เอนไซม์อิสระเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์พบว่าเอนไซม์ไม่ละลายและเกาะกันเป็นก้อน แพร่กระจายได้ไม่สม่ำเสมอ ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีต่ำ จึงได้มีการแก้ปัญหาโดยตรึงเอนไซม์ไว้บนพาหะ

จากตารางที่ 1 พบว่าเอนไซม์ที่ใช้แม้เป็นชนิดเดียวกัน แต่พาหะและวิธีการตรึงที่แตกต่างกันก็ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาต่างกันไป จิตวรรณ และคณะ [21] นำซี้เถ่ากลบไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 700 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และศึกษาความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมในการชะซี้เถ่ากลบเพื่อให้เกิดความพรุนที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* แล้วนำไปเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในระบบที่มีเฮกเซนเป็นตัวกลาง พบว่าการตรึงเอนไซม์บนซี้เถ่ากลบที่ถูกชะด้วยกรดเข้มข้นร้อยละ 10 เอนไซม์ตรึงมีแอกติวิตีสูงสุด และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดขึ้น ส่วนการตรึงบนซี้เถ่ากลบที่ไม่ได้ถูกชะด้วยกรดเอนไซม์สูญเสียแอกติวิตีทั้งหมด อาจเนื่องจากว่าซี้เถ่ากลบนั่นมีโลหะ (ในรูปออกไซด์ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดี) การชะด้วยกรดทำให้โลหะเหล่านี้หลุดออก และโครงสร้างซี้เถ่ากลบเกือบทั้งหมดอยู่ในรูปซิลิกอนไดออกไซด์ ออกไซด์ชนิดนี้มีประจุลบ จากการตรึงเอนไซม์ที่อาศัยหลักการดึงดูดประจุของเอนไซม์กับพาหะตรึงทำให้สามารถตรึงพาหะตรึงที่มีประจุลบเข้ากับเอนไซม์ที่มีประจุบวกด้วยพันธะอิออนิกได้ สมรเมธ และคณะ [20] ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมซี้เถ่ากลบ เพื่อใช้เป็นพาหะในการตรึงเอนไซม์ไลเปส โดยหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเผาซี้เถ่ากลบ พบว่าการใช้ซี้เถ่ากลบเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการปรับสภาพซี้เถ่ากลบด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นพาหะในการตรึงเอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์แล้วให้แอกติวิตีสูงสุด เมื่อนำซี้เถ่ากลบที่ผ่านการปรับสภาพให้เหมาะสมมาใช้เป็นพาหะตรึงเอนไซม์ไลเปสเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาบน Celite พบว่าการตรึงเอนไซม์โดยใช้ซี้เถ่ากลบเป็นพาหะตรึงให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ดีกว่าการใช้ Celite วิธีการตรึงเอนไซม์มีด้วยกันหลายวิธี แต่ไม่มีวิธีใดที่สามารถใช้ได้ทุกกรณี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านองค์ประกอบของโครงสร้าง สมบัติทางเคมี รวมถึงความชอบในการเร่งปฏิกิริยากับสารตั้งต้นแต่ละชนิด ดังนั้นในการประยุกต์ใช้เทคนิคการตรึงเอนไซม์จึงควรพิจารณาถึงต้นทุนการผลิต ความสะดวกในการตรึง และเอนไซม์ตรึงสามารถรักษาสภาพแอกติวิตีได้มากที่สุด ตลอดจนมีความเสถียรในระหว่างการใช้งาน ซี้เถ่ากลบจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นพาหะตรึงเอนไซม์เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester ในระบบที่มีตัวกลางเป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณผลิตภัณฑ์ α -hydroxy octanoic acid menthyl ester ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชัน

Source of lipase	Method and support for immobilization	%Yield		%ee
		(S)-isomer	(R)-isomer	
<i>C. rugosa</i>	- Adsorption on RHA	22.29	2.06	83.06
	- Entrapment in sol-gel	0.09	-	100
<i>C. antractica</i>	- Adsorption on RHA	0.12	-	100
	- Entrapment in sol-gel	-	-	-

4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าชนิดและปริมาณของตัวทำละลายร่วม ปริมาณน้ำ อัตราส่วนของสารตั้งต้น รวมถึงพาหะและวิธีการตรึงเอนไซม์ ล้วนส่งผลกระทบต่อความสามารถในการผลิตและจำแนก *R/S-α-hydroxy octanoic acid menthyl ester* ของเอนไซม์ไลเปสตรึงที่เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในไอโซออกเทน

5. เอกสารอ้างอิง

1. Sheldon, R. A., 1993, "The Chirality Pool", in *Chirtechnology : Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Dekker, M. (Ed.), New York.
2. Ahuja, S., 1997, "Stereoselective Analysis in Crop Protection", in *Chiral Separation : Applications and Technology*, (Ed.), American Chemical Society, Washington, DC.
3. Tokamolthom, J., Chen, S.-t., Jeyashoke, N., and Krisnangkura, K., 2002, "Gas Chromatographic Separation of *R/S-α-hydroxy Fatty Acid Ester*", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 465, pp. 299-307.
4. Proctor, A. and Sevugan, P., 1989, "Soy Oil Lutein Adsorption by Rice Hull Ash", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 66, pp. 1618-1621.
5. Proctor, A., 1990, "X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscope Studies of Processed Rice Hull Silica", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 67, pp. 576-584.
6. Proctor, A., Adhikari, C., and Blyholder, G. D., 1995, "Mode of Oleic Acid Adsorption on Rice Hull Ash Cristobalite", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 72, pp. 331-335.
7. Proctor, A., Clark, P. K., and Parker, C. A., 1995, "Rice Hull Ash Adsorbent Performance under Commerical Soy Oil Bleaching Conditions", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 72, pp. 459-462.
8. Palaniappan, S. and Proctor, A., 1990, "Competitive Adsorption of Lutein from Soy Oil onto Rice Hull Ash", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 67, pp. 572-575.
9. Proctor, A. and Sevugan, P., 1990, "Adsorption of Soy Oil Free Fatty Acids by Rice Hull Ash", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 67, pp. 15-17.
10. Proctor, A., Tan, L. C., and Palaniappan, S., 1992, "Phospholipid Adsorption onto Rice Hull Ash from Soy Oil Miscellas", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 69, pp. 1049-1050.

11. Tantrakulsiri, J., Jeyashoke, N., and Krisnangkura, K., 1997, "Utilization of Rice Hull Ash as Support Material for Immobilization of *Candida cylindracea* Lipase", *Journal of the American Oil Chemist's Society*, Vol. 74, pp. 173-175.
12. Overbeeke, P. L. A, Jongejan, J. A., and Heijnen, J. J., 2000, "Solvent Effect on Lipase Enantioselectivity. Evidence for the Present of Thermodynamic States", John Wiley & Sons Co., New York, pp. 278-290.
13. Ferrer, M., Angeles Cruces Angeles, M., Bernabe, M., Ballesteros, A., and Francisco, J. P., 1999, "Lipase-catalyzed Regioselective Acylation of Sucrose in Two-solvent Mixtures", John Wiley & Sons Co., New York, pp. 10-16.
14. Bousquet, M. P., Willemot, R. M., Monsoan, P., and Boures, E., 1999, "Enzymatic Synthesis of α - Butylglucoside Lactate : A New α -Hydroxy Acid Derivative", John Wiley & Sons Co., New York, pp. 225-234.
15. ภาวิณี จารุวรรณ, 2540, "ผลของตัวทำละลายอินทรีย์และปริมาณน้ำต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จาก *Candida cylindracea*", *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต* สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 104 หน้า.
16. มนตรี วงศ์ตินชาติ, 2543, "การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ที่ตรึงบนซีเมนต์ในตัวทำละลายอินทรีย์", *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต* สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 100 หน้า.
17. Mezzetti, A., Keith, C., and Romas, J. K., 2003, "Highly Enantioselective Kinetic Resolution of Primary Alcohols of the Type $\text{Ph-X-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{OH}$ by *Pseudomonas cepacia* Lipase: Effect of Acyl Chain Length and Solvent", *Tetrahedron Asymmetry*, Vol. 17, pp. 3971-3924.
18. Satish, C. M. and James, T. H., 1999, "Optimizing Lipase Activity, Enantioselectivity, and Stability with Medium Engineering and Immobilization for β -Blocker Synthesis", John Wiley & Sons Co., New York, pp. 213-220.
19. Mohile, S. S., Potdar, M. K., Harjani, J. R., Nara, S. J., and Salunkhe, M. M., 2004, "Ionic Liquids: Efficient Additives for *Candida rugosa* Lipase-Catalysed Enantioselective Hydrolysis of Butyl 2-(4-chlorophenoxy)propionate", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 30, pp. 158-188.

20. สมรเมธ เจียรนัยกุล, 2540, “การพัฒนาวิธีการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนซีต้ายาแลบในตัวทำละลายอินทรีย์”, *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต* สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 100 หน้า.
21. จิตวรรณ ตันตระกูลศิริ, 2539, “การตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ด้วยซีต้ายาแลบ”, *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต* สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 114 หน้า.
22. อนรรฆอร ศรีไสยเพชร, 2545, “บทบาทของน้ำและอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida rugosa* ที่ตรึงบนซีต้ายาแลบในตัวทำละลายอินทรีย์”, *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต* สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 150 หน้า.
23. Paez, B. C., Medina, A. R., Rubio, F. C., Moreno, P. G., and Molina, E., 2003, “Modeling the Effect of Free Water on Enzyme Activity in Immobilized Lipase-catalyzed Reactions in Organic Solvents”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 33, pp. 845-853.
24. Mattias, P., Costes, D., Wehtje, E., and Adlercreutz, P., 2002, “Effects of Solvent Water Activity and Temperature on Lipase and Hydroxynitrile Lyase Enantioselectivity”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30, pp. 916-923.
25. Pein, P. and Lortie, R., 1998, “Influence of Activity on the Enantioselective Esterification of (R,S)-Ibuprofen by *Acadida antarctica* Lipase B in Solventless Media”, John Wiley & Sons Co., New York, pp. 502-505.
26. Wu, J.-Y. and Liu, S.-W., 2000, “Influence of Alcohol Concentration on Lipase-catalyzed Enantioselective Esterification of Racemic Naproxen on Isooctane: Under Controlled Water Activity”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, pp. 124-130.
27. ChuaLee, S. and Mohamad, R. S., 2004, “Immobilised Lipase-catalysed Resolution of (R,S)-1-phenylethanol in Recirculated Packed Bed Reactor”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 28, pp. 111-119.
28. Domenico, P. and Guido, G. J., 2004, “Activity and Stability of the Lipase in the Synthesis of Butyl Lactate”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 34, pp. 94-100.

