ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์โครงสร้างของโพลีเอทธิลีนไกลคอล-บาวด์ เอ็นเอดีที่สังเคราะห์ขึ้น และการนำไปประยุกต์ใช้ในคอนตินิวอัสเอนไซม์รีแอคเตอร์

ชื่อผู้เขียน นางสาว ชลลดา กุลวัฒน์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ. ดร. สุรีย์	ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ด้วง	พุธศุกร์	กรรมการ
อจ. ดร. ดารารัตน์	ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

การพัฒนาในด้านเทคโนโลยีของเอนไซม์มุ่งที่จะใช้เอนไซม์ที่มีระบบซับซ้อนขึ้น และเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างต่อเนื่องหลายชนิดต้องการโคเอนไซม์ที่จะมาช่วยในการทำงาน เช่น เอ็นเอดี (พี) แบบที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอุตสาหกรรม การวิเคราะห์ และทางด้านการแพทย์ ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการสังเคราะห์โพลีเอทธิลีนไกลคอล-บาวด์ เอ็นเอดี (PEG-NAD) เพื่อใช้เป็นโคเอนไซม์ในระบบเอนไซม์แบบหมุนเวียน

PEG-NAD สังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยาอัลคิเลชันของเอ็นเอดีกับบีตา-โปรปิโอแลคโตน ได้ N^1-(2-carboxyethyl)-NAD ซึ่งเปลี่ยนให้เป็น N^6-(2-carboxyethyl)-NAD ได้โดยปฏิกิริยาเคมิคัลรีดักชัน อัลคาไลน์รีอาเรนจเมนต์ที่อุณหภูมิสูงและทำปฏิกิริยารีออกซิเดชันโดยใช้เอนไซม์อัลกอฮอลดีไฮโดรจิเนสจากยีสต์ จากนั้นทำปฏิกิริยาควบคู่กับไดอะมิโนโพลีเอทธิลีนไกลคอลในสภาวะที่มีคาร์โบไดอิมีดอยู่ ได้ผลผลิตเป็น PEG-NAD อนุพันธ์ของเอ็นเอดีที่เตรียมได้ในแต่ละขั้นทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน ตรวจสอบความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีผิวบาง และวิเคราะห์โครงสร้างโดย UV , IR และ NMR สเปคตรัม เปอร์เซนต์ของ PEG-NAD ที่บริสุทธิ์ที่สังเคราะห์ได้ คือ 14.43 เมื่อนำไปศึกษาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์โดยใช้แลคเตทดีไฮโดรจิเนสจากหัวใจหมูและอัลกอฮอลดีไฮโดรจิเนสจากยีสต์ ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาร่วมกับเอนไซม์ดีไฮโดรจิเนสของ PEG-NAD เป็น 66% และ 75% เมื่อเทียบกับเอ็นเอดี สำหรับเอนไซม์อัลกอฮอลดีไฮโดรจิเนสและแลคเตทดีไฮโดรจิเนสตามลำดับ นำ PEG-NAD ไปประยุกต์ใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์แบบต่อเนื่องซึ่งประกอบด้วยอัลกอฮอลดีไฮโดรจิเนสจากยีสต์ และแลคเตทดีไฮโดรจิเนสจากหัวใจหมู ได้ผลผลิตเป็นไพรูเวทจากแอล-แลคเตทและเอธานอลจากอะเซตาลดีไฮด์ ผลผลิตที่ได้ค่อนข้างต่ำและลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากเอนไซม์ในปฏิกรณ์สูญเสียแอคติวิตี ผลผลิตจะเพิ่มขึ้นเท่าตอนเริ่มต้นเมื่อเติมเอนไซม์ที่ประมาณว่ามีแอคติวิตีเท่าเริ่มต้นลงไป PEG-NAD มีประสิทธิภาพในการเป็นโคแฟคเตอร์ได้ดี และสามารถอยู่ในปฏิกรณ์เอนไซม์ได้นานกว่า 200 ชั่วโมงในภาวะที่ใช้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า PEG-NAD ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในระบบเอนไซม์แบบหมุนเวียน และการศึกษาเบื้องต้นเพิ่มเติมเกี่ยวกับสมบัติบางประการของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกรณ์เอนไซม์จำเป็นสำหรับการเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ได้.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Characterization of the Synthesized Polyethylene Glycol-bound NAD and Its Application in a Continuous Enzyme Reactor

Author Ms. Chollada Kullawattana

M.S. Chemistry

Examining Committee : Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul Chairman
Assist.Prof. Dr. Duang Buddhasukh Member
Lecturer Dr. Dararat Tongkao Member

Abstract

Advance in enzyme technology has been focused on the use of complex multienzyme system and the continuous utilization of enzyme requires the retention and regeneration of the coenzyme such as NAD(P) for activities in industrial , analytical or biomedical applications. For this purpose, the polyethylene glycol-bound NAD (PEG--NAD) has been synthesized as a modified coenzyme for the enzymatic cycling system.

The PEG-NAD was synthesized by alkylation of NAD with β-propiolactone to give N^1-(2-carboxyethyl)-NAD. The N^1-substituted derivative was converted to N^6-(2-carboxyethyl)-NAD by chemical reduction, alkaline rearrangement at elevated temperature and enzymatic reoxidation by yeast alcohol dehydrogenase. The N^6-derivative was then coupled to diaminopolyethylene glycol in the presence of carbodiimide

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

to yield PEG-NAD. The synthesized NAD derivatives were purified by ion exchange chromatography. The purity of the NAD derivatives was determined by thin-layer chromatography and characterized by UV, IR and NMR spectra. The percentage yield of the synthesized PEG-NAD was 14.43. The kinetic constants for NAD and PEG-NAD were studied by using lactate dehydrogenase from pig heart and alcohol dehydrogenase from yeast. The coenzymic activities of PEG-NAD was 66% and 75% of NAD for alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase respectively. The potential application of PEG-NAD was tested in a continuous enzyme reactor comprising yeast alcohol dehydrogenase and pig heart lactate dehydrogenase and produced pyruvate and ethanol from L-lactate and acetaldehyde respectively. The decrease in the product concentration was mainly due to the lost enzyme activity but it could be recovered by the addition of the initial amount of both dehydrogenases. The low production rate of pyruvate and ethanol may be due to the reaction conditions. These results implicated that PEG-NAD functioned as an efficient coenzyme analogue for applying into the enzymatic cycling system. To increase the productivity yield, more basic research into these reaction conditions is needed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved