บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

6.1.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป คือ ใช้ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมช เป็นตัวพยุง มีสารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรเป็นสารกระตุ้น สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตรเป็นสารสร้างพันธะร่วม และใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนักโดยเตรียมเป็นสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตรในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

6.1.2 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

กล่าวโดยสรุป ดังตารางที่ 18 ดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 สรุปสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

ค่าทางจลนพลศาสตร์ที่ศึกษา	เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป	เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน
พีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด	6.0	5.0
อุณหภูมิเอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด (องศาเซลเซียส)	50	50
ค่าคงที่ Michaelis (μM)	8.47	17.86
แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยของเอนไซม์เซลลูเลสต่อ มก.โปรตีน)	1.69	0.49
พีเอชที่เหมาะสมในการเก็บ	4.0	5.0
ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บ (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิห้อง	อุณหภูมิห้อง
ค่าครึ่งชีวิตเมื่อเก็บที่ภาวะการเก็บที่เหมาะสม (วัน)	> 68	> 68
ร้อยละของแอคติวิตีสัมพัทธ์หลังการเก็บ 68 วัน	85.29	62.0

จะเห็นได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์บนทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมนี้ ช่วยปรับปรุงสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ได้แก่ เพิ่มความเสถียรต่อภาวะการเปลี่ยนแปลงพีเอช และอุณหภูมิสูง เพิ่มประสิทธิภาพในการจับสารตั้งต้น เพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อหน่วยน้ำหนักของโปรตีนหรืออีกนัยหนึ่งคือเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน และเพิ่มเสถียรภาพในการเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปให้สูงขึ้นด้วย (44) นอกจากนี้ตัวพยุงที่เลือกใช้ได้แก่ ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมช ยังมีส่วนช่วยเสริมให้การใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีข้อได้เปรียบเหนือการใช้ตัวพยุงชนิดอื่นในการตรึงรูปเอนไซม์หลายประการ กล่าวคือ ทรายแม่น้ำที่ใช้เป็นวัสดุธรรมชาติที่สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก มีรูปร่างสม่ำเสมอเหมาะต่อการใช้งานในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป มีความเสถียรต่อการทำลายของจุลินทรีย์เหมือน

เม็ดแก้วพรุน (porous glass beads) และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายโดยการต้มในสารละลายกรดไนตริกเพื่อกำจัดโปรตีนของเอนไซม์ซึ่งผ่านการใช้งานมาหลายครั้งจนหมดแอคติวิตีแล้ว (45) จากผลงานวิจัยในการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีห่อหุ้มหรือกักเอนไซม์ในโพลีเมอร์เมตริกซ์ (21,22,23,46) นั้น ในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูเลส ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีโมเลกุลใหญ่ ต้องใช้ระยะเวลาช่วงหนึ่งสำหรับการแพร่จากวัฏภาคของเหลวภายนอกเข้าสู่โพลีเมอร์เมตริกซ์เพื่อเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย ในทำนองเดียวกันผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็ต้องใช้ระยะเวลาช่วง หนึ่งในการแพร่จากโพลีเมอร์เมตริกซ์ออกสู่วัฏภาคของเหลวภายนอก การตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนบนตัวพยุงได้แก่ ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมช ซึ่งมีพื้นที่ผิวสูงนี้ช่วยลดระยะเวลาการแพร่ของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ดี (47)

6.1.3 การเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

6.1.3.1 ภาวะการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดที่เอื้ออำนวยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ การโม่กากสับปะรดจนได้ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน แล้วอบไอน้ำกากสับปะรดขนาดเล็กกว่า 150 ไมครอน ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในสารละลายเอน-บิวทิลลามีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นเวลานานครึ่งชั่วโมง

6.1.3.2 การเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดโดยการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในสารละลายเอน-บิวทิลลามีน นอกจากมีผลช่วยปรับสภาพของกากสับปะรดให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนแล้วยังมีผลช่วยลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรดลงอีกด้วย

6.1.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน

การหมักแอล-ไลซีนโดยใช้ไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยสลายกากสับปะรดเป็นแหล่งของน้ำตาลสำหรับหมักและบัฟเฟอร์ในอาหารสำหรับหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *C. glutamicum* MU 3282 นั้น ปริมาณผลผลิตแอล-ไลซีนจะแปรตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารสำหรับหมัก และการผลิตแอล-ไลซีนจะถูกยับยั้งเมื่ออาหารสำหรับหมักมีความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์สูงเกินไป

6.1.5 การย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

สำหรับการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดขนาด 24 × 900 มิลลิเมตร โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปหนัก 20 กรัม สรุปผลการศึกษาได้ดังนี้คือ

6.1.5.1 ค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันมีความสัมพันธ์ผกผันกับค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรด และมีค่าต่ำเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีขนาดอนุภาคเล็กและเบา ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชันได้ง่าย และมีค่าความดันตกในช่วงต่ำ

6.1.5.2 การแปรค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดในช่วงเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันจนถึงค่าความเร็วการไหลเป็น 1.5 เท่าของค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน ไม่มีผลต่อค่าร้อยละของการเปลี่ยนสำหรับการย่อยสลายกากสับปะรด แต่ค่าความเร็วการไหลที่เท่ากับ 2 เท่าของค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันมีผลให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนสำหรับการย่อยสลายกากสับปะรดมีค่าต่ำลง

6.1.5.3 ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินงานในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดคือ 1 และ 5 กรัมต่อลิตร โดยไม่ก่อให้เกิดการถ่ายเทอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปออกจากเครื่องปฏิกรณ์

6.1.5.4 ค่าร้อยละของการเปลี่ยน ซึ่งคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายกากสับปะรดเริ่มต้น 100 กรัม มีความสัมพันธ์ผกผันกับค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยกากสับปะรดที่ใช้ ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จะมีความสัมพันธ์ตรงกับค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยกากสับปะรดที่ใช้เริ่มต้น และเวลาสูงสุดของการย่อยสลายจะลดลงเมื่อใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดที่มีความเข้มข้นลดลง

6.2 ข้อเสนอแนะ

การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์บนทราย-แม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมชนั้น มีข้อได้เปรียบเหนือการตรึงรูปวิธีอื่น ๆ หลายประการ นอกจากนี้ยังไม่ปรากฏว่ามีการทดลองใช้ทรายแม่น้ำเป็นตัวพยุงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเลย จึงนับว่าเป็นการพัฒนาเทคนิคการตรึงรูปสำหรับเอนไซม์เซลลูเลสอีกขั้นหนึ่ง

การเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว จะเห็นได้ว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนได้ดี นอกจากนี้สารละลายเอน-บิวทิลลามีนที่ใช้ไม่ก่อปัญหาเรื่องการกำจัดทิ้งเนื่องจากใช้ในปริมาณจำกัด และมีความเข้มข้นต่ำ สามารถระเหยไล่เอน-บิวทิลลามีนได้ง่ายในตู้ควัน สำหรับการใช้ไอน้ำในการเตรียมสภาพควบคู่กับสารละลายเอน-บิวทิลลามีนนั้น แม้ว่าได้ทดลองเพื่อกำหนดระยะเวลาการอบไอน้ำที่พอเหมาะแล้ว อย่างไรก็ตามการใช้ความร้อนภายใต้ความดันนี้นับว่าเป็นวิธีที่ต้องใช้พลังงานในปริมาณมาก ดังนั้นควรได้มีการทดลองให้ความร้อนโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การอบไอน้ำที่ความดันปกติ เป็นต้น เพื่อลดปริมาณพลังงานที่ใช้ลง

สำหรับการทดลองหมักแอล-ไลซีนนั้น จะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้ไฮโดรไลเสทจากการย่อยสลายกากสับปะรดเป็นแหล่งของน้ำตาลสำหรับหมักและบัฟเฟอร์ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มผลผลิตของแอล-ไลซีนดังกล่าวจะต้องมีการศึกษาวิจัยในขั้นต่อไปเพื่อปรับระดับของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแอล-ไลซีนเช่น คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความต้านทานต่อบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี การเพิ่มผลผลิตน้ำตาลสำหรับหมักในขั้นตอนการย่อยสลายกากสับปะรดและทดลองเพื่อกำหนดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการย่อยสลายกากสับปะรดให้ต่ำลง เพื่อแก้ปัญหาการยับยั้งการผลิลแอล-ไลซีนจากความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไป เป็นต้น

และในท้ายที่สุดแล้ว สำหรับการผลิตน้ำตาลสำหรับหมักโดยการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป ควรมีการเพิ่มหน่วยการกรองโดยเมมเบรนหลังจากการย่อยสลายแล้วเพื่อปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ให้พอเหมาะสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักแอล-ไลซีนต่อไป