บทที่ 4

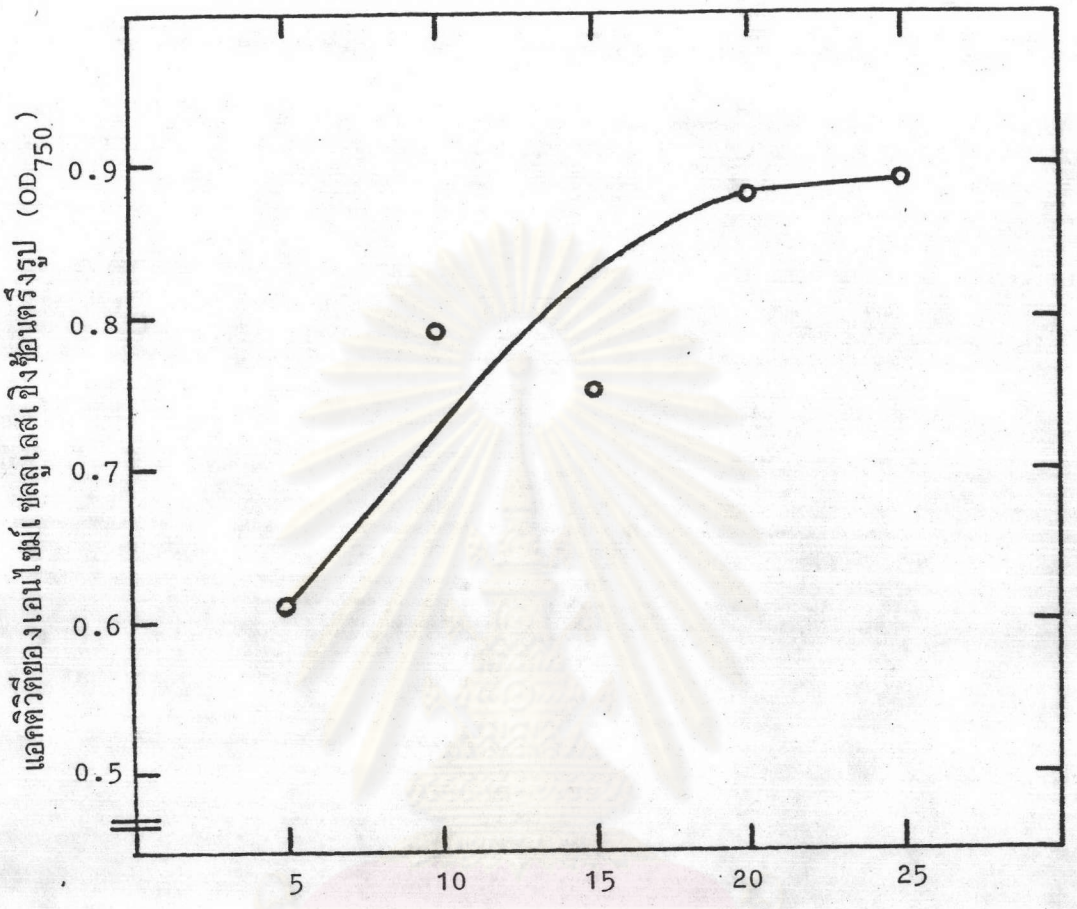
ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

4.1.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.1 เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปโดยแปรความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (ซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก) เป็น 5 ระดับ คือร้อยละ 5, 10, 15, 20 และ 25 โดยปริมาตร แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้ในภาวะต่าง ๆ ดังกล่าว ผลการทดลองพบว่าในการตรึงรูปเมื่อใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นเพิ่มจากร้อยละ 5 โดยปริมาตร ไปจนถึงความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรนั้น แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อตรึงรูปโดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 25 โดยปริมาตร แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้เพิ่มขึ้นน้อยมากจนเกือบคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 25

ดังนั้นจึงใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ในการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเพื่อกำหนดภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปในการทดลองข้อ 3.3.1.2 และ 3.3.1.3 ต่อไป



รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก

4.1.2 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส และสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.2 เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป โดยใช้การทดลองแบบแผน แฟคตอเรียล 3×3 ซึ่งแปรระดับความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสเป็นร้อยละ 2, 5 และ 7 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์เป็นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยปริมาตร กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก) เป็นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ซึ่งเป็นผลจากการทดลองข้อ 3.3.1.1 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้จากภาวะต่าง ๆ ดังกล่าว

ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอด ดังตารางที่ 10 พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และผลร่วมของระดับความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test พบว่าการตรึงรูปที่ใช้สารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตรในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์นั้นจะให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 11

ดังนั้นในการทดลองข้อ 3.3.1.3 จึงทดลองแปรอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ในการตรึงรูปด้วยภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอส และสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้นซึ่งให้เอนไซม์เชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีไม่แตกต่างกันดังกล่าว

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดในการหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีที่เอส (A) และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (G) ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป

SOV	df	SS	MS	F_{cal}
A	2	2.80×10^{-1}	1.40×10^{-1}	39.78^{**}
B	2	3.10×10^{-3}	1.50×10^{-2}	4.36^{*}
AB	4	4.56×10^{-2}	1.10×10^{-2}	3.24
Error	9	3.16×10^{-2}	3.00×10^{-3}	

A = ความเข้มข้นของสารละลายเอพีที่เอส

B = ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

* = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส (A) และสารละลายกลูตาราล-ดีไฮด์ (G) ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป

ตัวอย่าง	OD_{750}
A_2G_1	0.061^c
$A_2G_{2.5}$	0.253^b
A_2G_5	0.205^b
A_5G_1	$\underline{0.401}^a$
$A_5G_{2.5}$	$\underline{0.460}^a$
A_5G_5	$\underline{0.435}^a$
A_7G_1	$\underline{0.412}^a$
$A_7G_{2.5}$	$\underline{0.388}^a$
A_7G_5	$\underline{0.390}^a$

หมายเหตุ ตัวเลขกำกับอักษร A และ G หมายถึง ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละโดยปริมาตร ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสโดยน้ำหนักในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.3 เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปโดยใช้แบบแผนการทดลองแฟคตอเรียล 2×3×3 ซึ่งแปรระดับความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสเป็นร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตร ระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์เป็นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยปริมาตร และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1, 2:1 และ 1:1 ใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้

ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด ดังตารางที่ 12 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเลย และพบว่าผลร่วมของสองปัจจัย (A×B, A×C, และ B×C) รวมทั้งผลร่วมของทั้งสามปัจจัย (A×B×C) ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมจากภาวะต่าง ๆ กัน โดยการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 13 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะมีแอคติวิตีจัดอยู่ในระดับเดียวกันเมื่อใช้ภาวะการตรึงรูปเป็น $A_5G_{2.5}C_{2:1}$, $A_5G_{2.5}C_{1:1}$, $A_5G_5C_{2:1}$, $A_7G_{2.5}C_{2:1}$, $A_7G_{2.5}C_{1:1}$, $A_7G_5C_{2:1}$ และ $A_7G_5C_{1:1}$

ในการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนนั้นจะถือว่าภาวะที่ใช้สารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์เป็นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป ดังเหตุผลซึ่งแสดงในข้อ 5.1.3

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดในการหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส (A) สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (G) และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์องค์ประกอบในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (C) ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

SOV	df	SS	MS	F_{cal}
A	1	1.76×10^{-4}	1.76×10^{-4}	4.60×10^{-2}
B	2	5.02×10^{-2}	2.51×10^{-2}	6.55^{**}
C	2	1.78×10^{-1}	9.82×10^{-2}	23.26^{**}
AxB	2	1.81×10^{-2}	9.03×10^{-3}	2.36
AxC	2	1.52×10^{-2}	7.59×10^{-3}	1.98
BxC	4	3.50×10^{-2}	8.74×10^{-3}	2.28
AxBxC	4	1.90×10^{-2}	4.77×10^{-3}	1.25
Error	18	6.90×10^{-2}	3.83×10^{-3}	

A = ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส

B = ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

C = อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส (A) สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (G) และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์องค์ประกอบในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (C) ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

ตัวอย่าง	OD_{750}
$A_5\ G_1\ C_{5:1}$	0.401^{ef}
$A_5\ G_1\ C_{2:1}$	0.530^{bcdef}
$A_5\ G_1\ C_{1:1}$	0.488^{cdef}
$A_5\ G_{2.5}\ C_{5:1}$	0.460^{def}
$A_5\ G_{2.5}\ C_{2:1}$	0.682^{a}
$A_5\ G_{2.5}\ C_{1:1}$	0.540^{abcde}
$A_5\ G_5\ C_{5:1}$	0.435^{def}
$A_5\ G_5\ C_{2:1}$	0.575^{abcd}
$A_5\ G_5\ C_{1:1}$	0.397^{ef}
$A_7\ G_1\ C_{5:1}$	0.412^{ef}
$A_7\ G_1\ C_{2:1}$	0.455^{def}
$A_7\ G_1\ C_{1:1}$	0.460^{def}
$A_7\ G_{2.5}\ C_{5:1}$	0.388^{f}
$A_7\ G_{2.5}\ C_{2:1}$	0.615^{abc}
$A_7\ G_{2.5}\ C_{1:1}$	0.609^{abc}
$A_7\ G_5\ C_{5:1}$	0.390^{ef}
$A_7\ G_5\ C_{2:1}$	0.671^{ab}
$A_7\ G_5\ C_{1:1}$	0.541^{abcde}

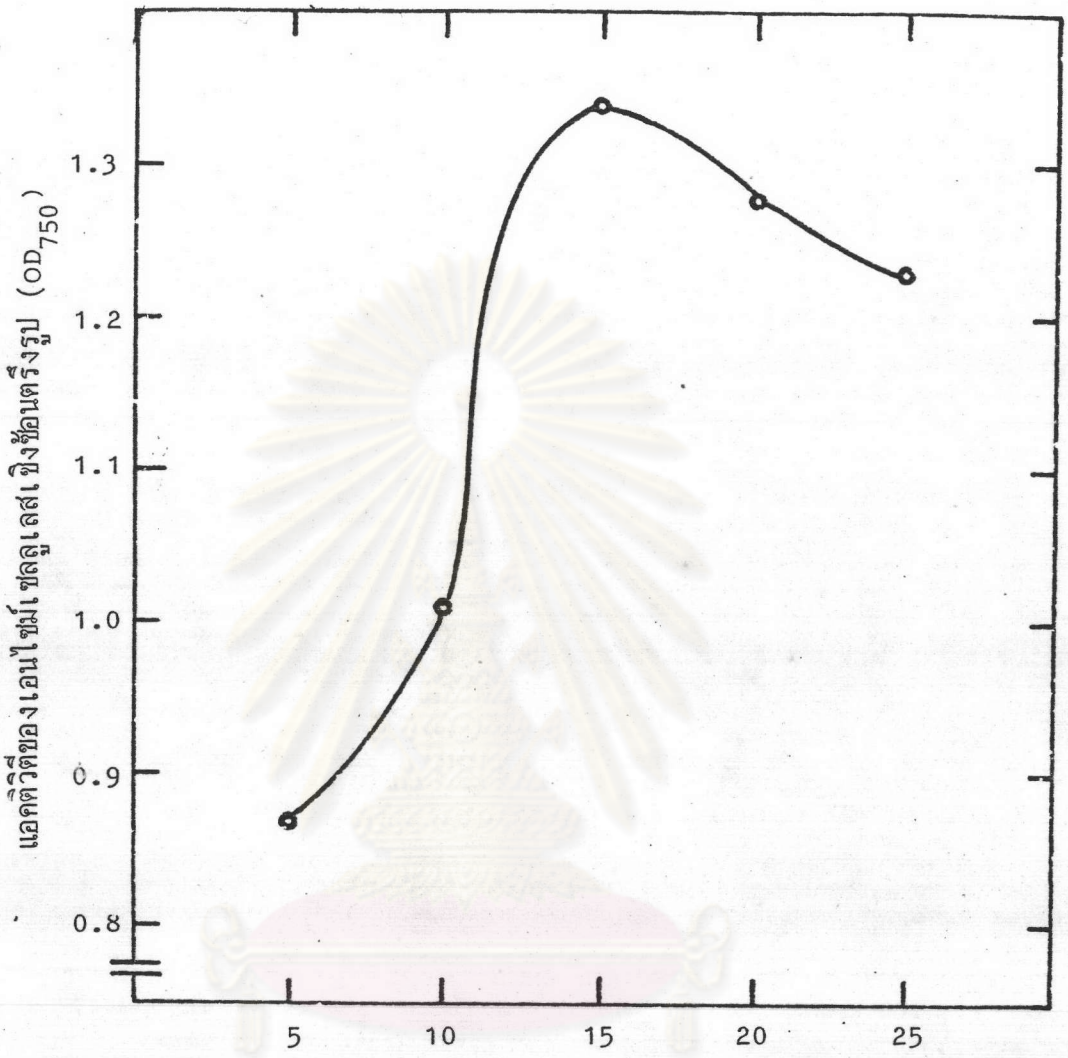
หมายเหตุ เลขกำกับอักษร A และ G หมายถึงความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เป็นร้อยละโดยปริมาตร ตามลำดับ และเลขกำกับอักษร C หมายถึงอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอส ในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

4.1.4 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปในภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ

จากการทดลองข้อ 3.3.1.4 เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปตามภาวะที่เลือกในข้อ 4.1.3 คือใช้สารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตร และอัตราส่วนขององเอนไซม์องค์ประกอบในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก โดยการแปรความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนดังกล่าวเป็นร้อยละ 5, 10, 15, 20 และ 25 โดยปริมาตร แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้

ผลการทดลองพบว่าการตรึงรูปเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนแปรจากร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 15 โดยปริมาตรนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เชิงซ้อน แต่เมื่อใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 และ 25 โดยปริมาตรตามลำดับ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้กลับมีแอคติวิตีลดลง ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในข้อ 4.1.1 ดังแสดงในรูปที่ 26

ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป คือ ภาวะที่ใช้สารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ และความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) เป็นร้อยละ 15 โดยปริมาตร



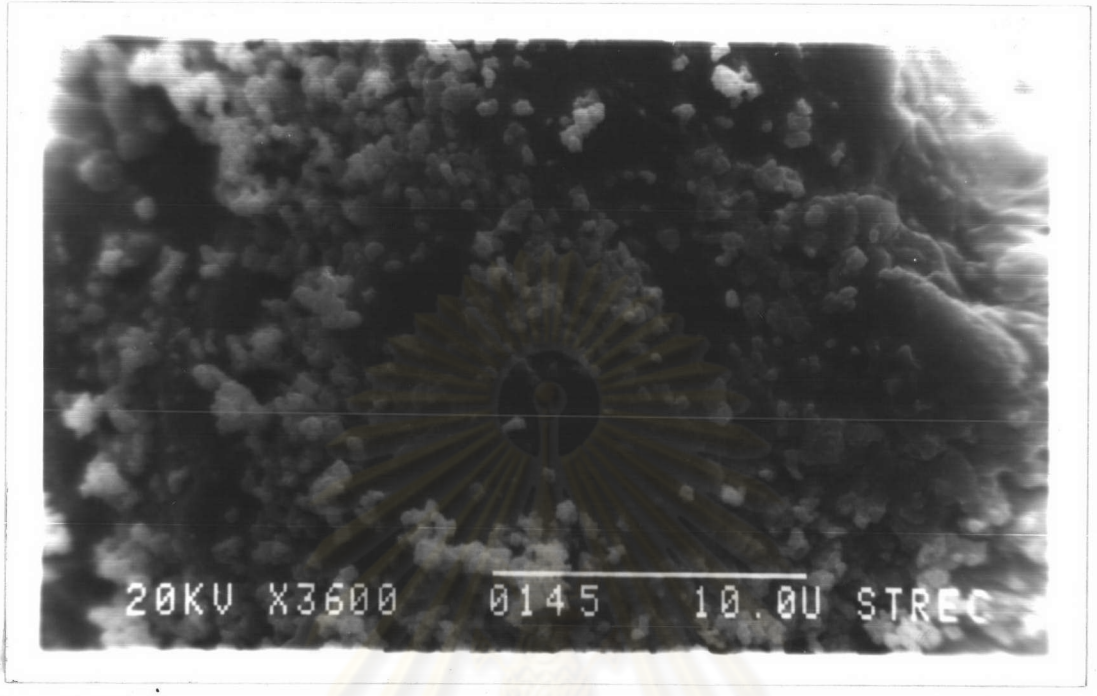
รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$ กับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (ร้อยละโดยปริมาตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

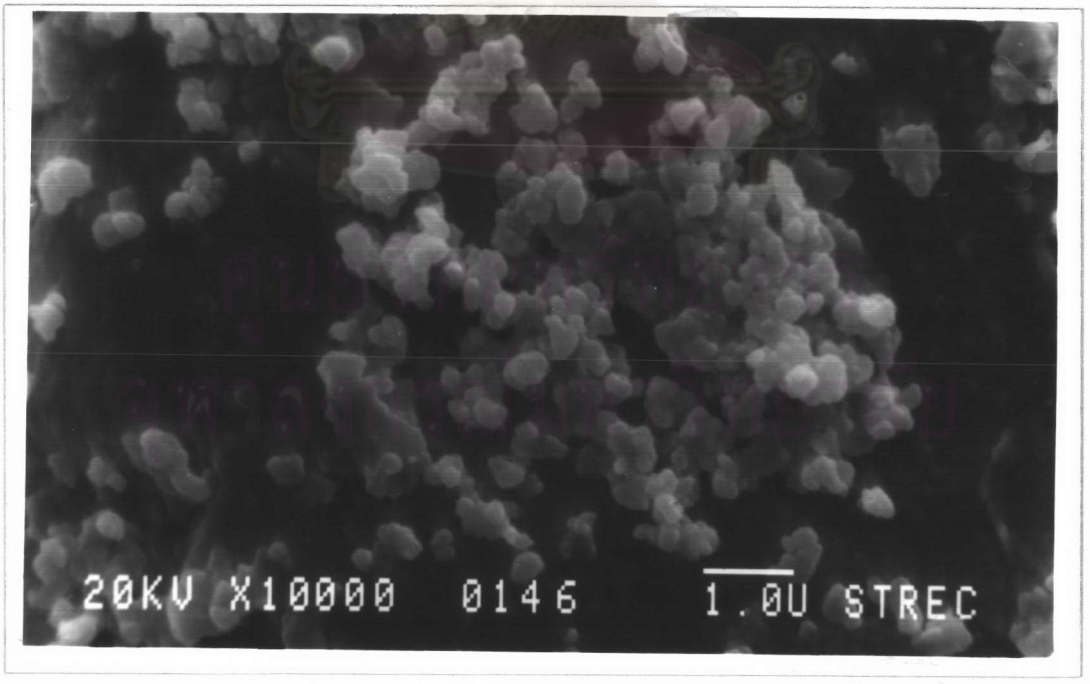
4.1.5 ศึกษาโครงสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.5 เมื่อเตรียมทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช เคลือบทอง และเตรียมสภาพเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.3.1.5 แล้วดูโครงสร้างของเม็ดทรายสะอาดเปรียบเทียบกับโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 27 และรูปที่ 28 ตามลำดับ จากรูปที่ 27 พบว่าพื้นผิวของเม็ดทรายสะอาดมีรูพรุนเล็กน้อย รูปที่ 28 ซึ่งแสดงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีลักษณะแตกต่างจากโครงสร้างของพื้นผิวเม็ดทรายอย่างชัดเจนคือ โครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะมีกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เกาะบนพื้นผิวเม็ดทรายซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวพยุง และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 10,000 เท่า ดังรูปที่ 29 จะเห็นลักษณะของกลุ่มเอนไซม์โปรตีนที่เกาะบนเม็ดทรายในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปได้ชัดเจนขึ้น

รูปที่ 27 ลักษณะพื้นผิวที่มีรูพรุนเล็กน้อยของเม็ดทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า



รูปที่ 28 ลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า



รูปที่ 29 ลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

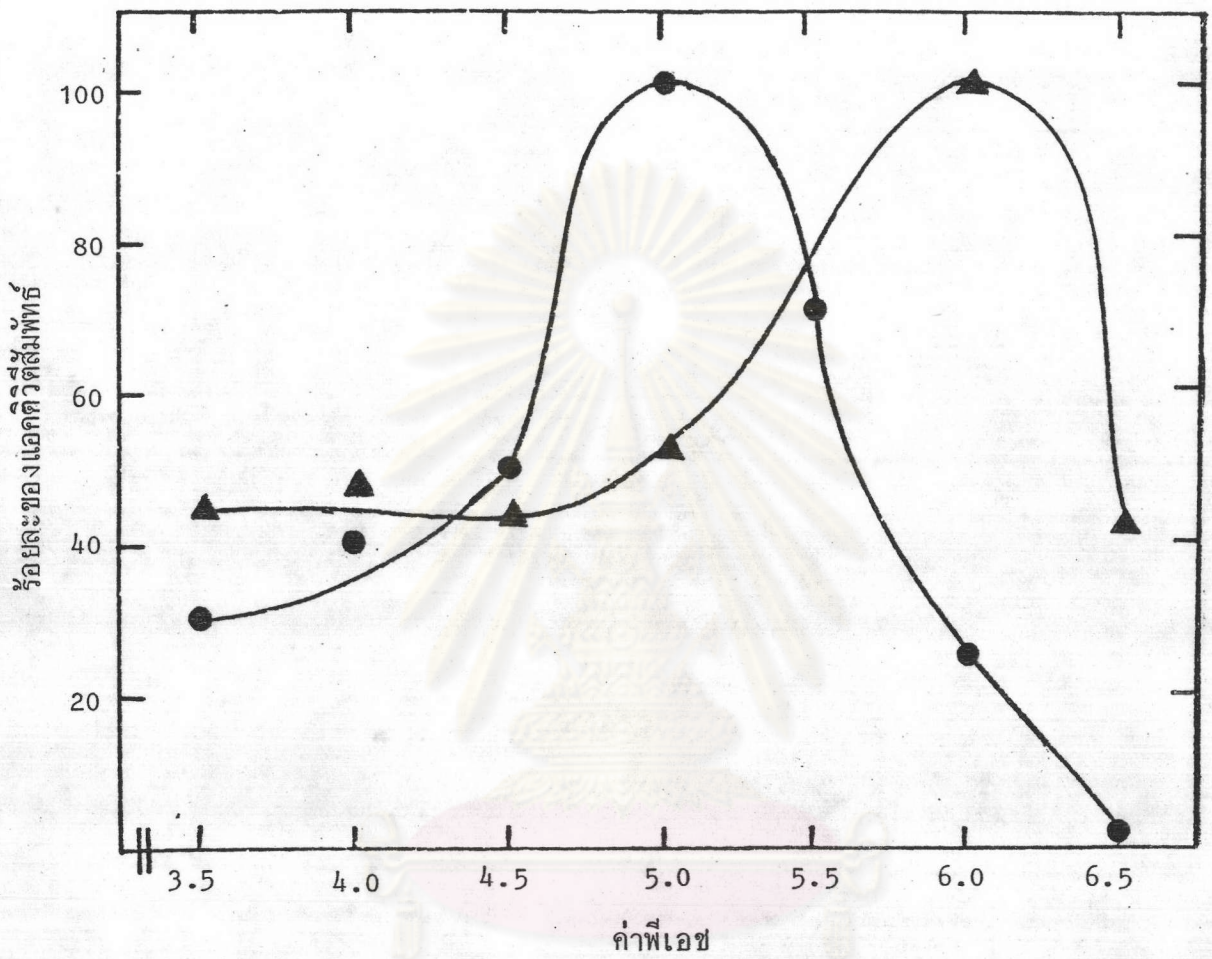
4.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

4.2.1 เปรียบเทียบช่วงของพีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (pH activity profile) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากการทดลองข้อ 3.3.2.1 โดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) และแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป โดยแปรค่าพีเอชของสารแขวนลอยเอไวเซลในสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอช 3.5-6.5

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 30 พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมจะมีแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 5.0 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 6.0 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 1 หน่วยพีเอช และพบว่าที่พีเอช 6.0 นั้นเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมจะสูญเสียแอคติวิตีไปถึงร้อยละ 75 และไม่แสดงแอคติวิตีเลยที่พีเอช 6.5 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงที่พีเอชทั้งสอง แม้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่สูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมก็ตาม แต่ที่พีเอช 3.5 และ 4.0 เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปก็ยังคงมีแอคติวิตีที่สูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมเช่นกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



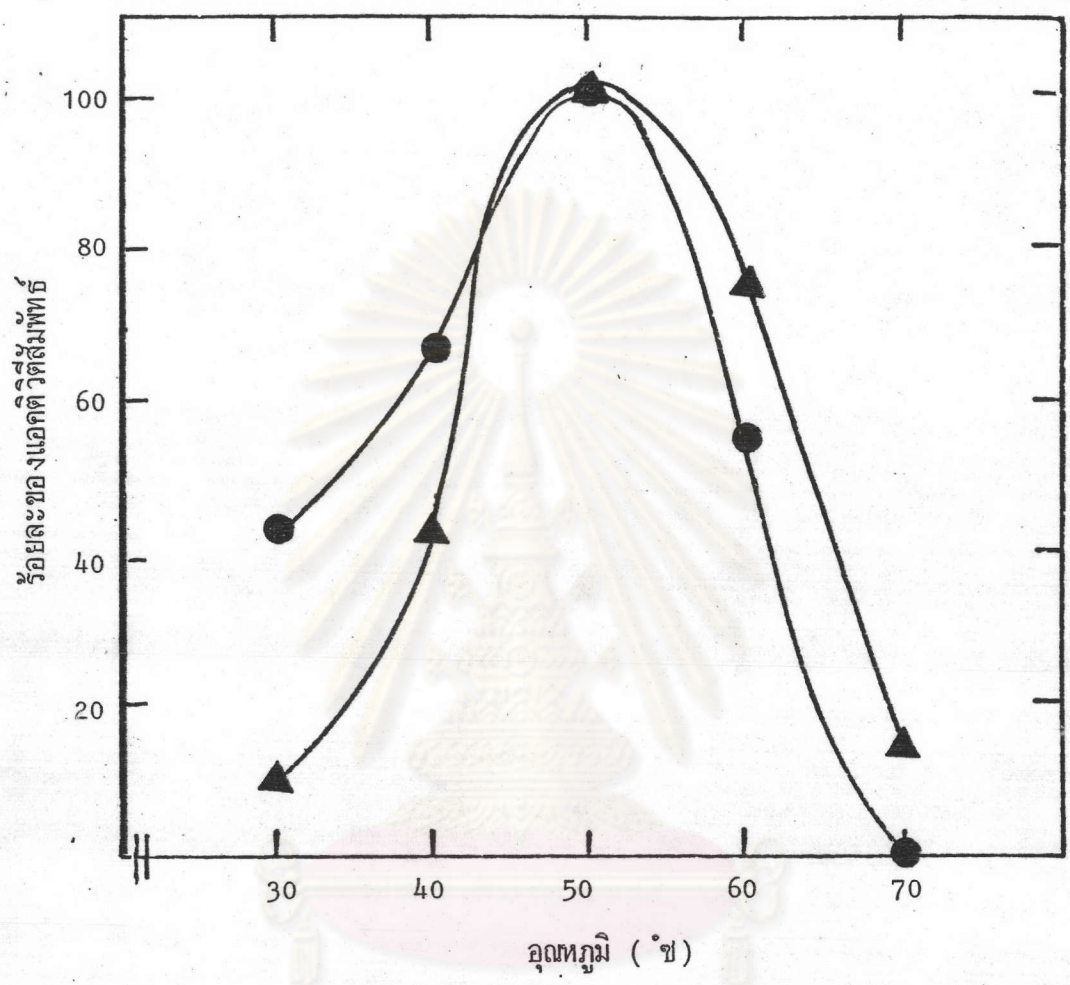
รูปที่ 30 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (●—●)กับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป (▲—▲) ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ กัน

4.2.2 เปรียบเทียบช่วงของอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (temperature activity profile) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากการทดลองข้อ 3.3.2.2 โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (ซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) ที่พีเอช 6.0 โดยแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 31 พบว่ากราฟแสดงแอคติวิตีในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเอนไซม์ทั้งสองจะแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากันคือ 50 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะมีแอคติวิตีต่ำกว่าของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม แต่ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะมีแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมจะแสดงแอคติวิตีเพียงร้อยละ 55.64 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงถึงร้อยละ 75.66 และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมไม่แสดงแอคติวิตีเลย แต่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปยังคงแสดงแอคติวิตีร้อยละ 14.29

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

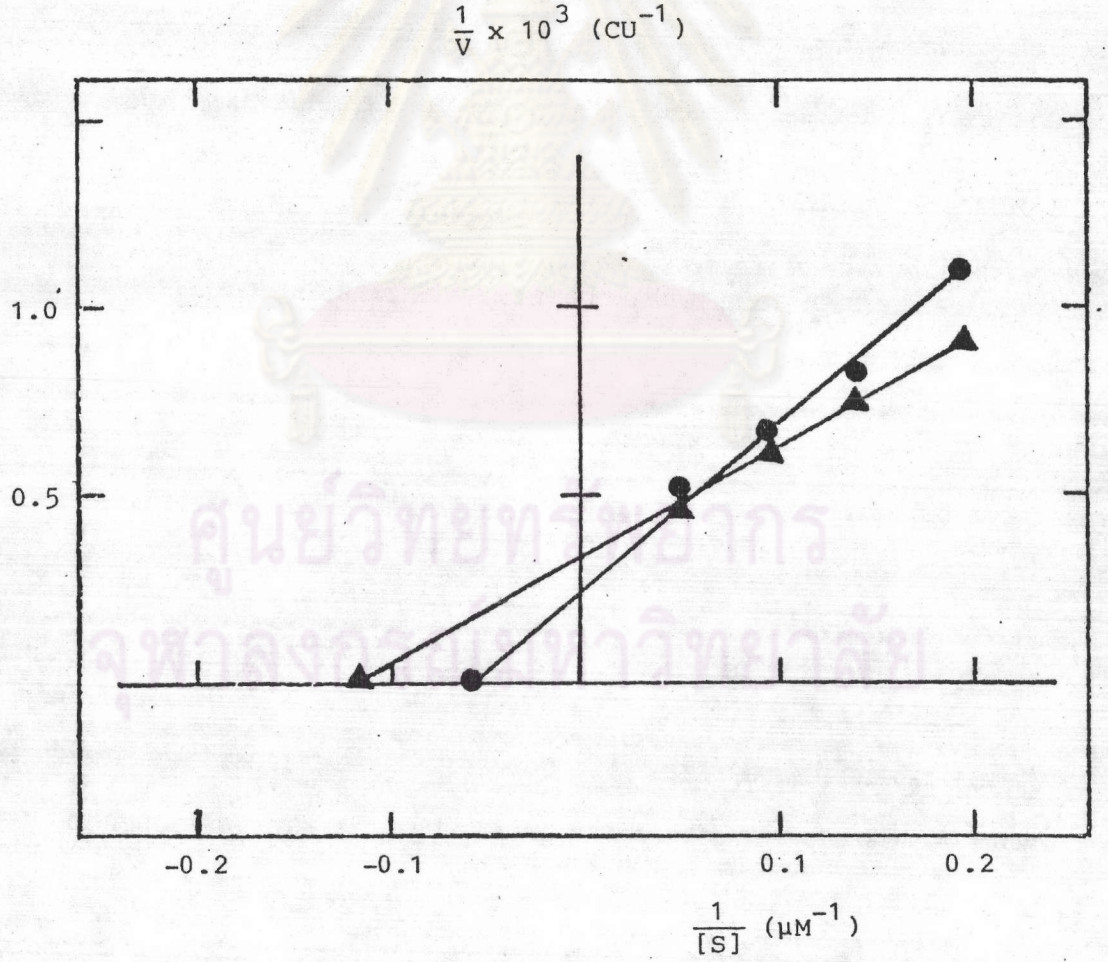


รูปที่ 31 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (●—●) กับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป (▲—▲) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

4.2.3 วัดค่าคงที่ Michaelis (Michaelis constant, K_m)

จากการทดลองข้อ 3.3.2.3 โดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยของเอไวเซลในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 32 เป็นการเปรียบเทียบกราฟไลน์วีเวอร์ เบอร์ก (Lineweaver Burk plot) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม จากกราฟไลน์วีเวอร์ เบอร์กได้ค่าคงที่ Michaelis ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมเท่ากับ 17.86 ไมโครโมลาร์ และค่าคงที่ Michaelis ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเท่ากับ 8.47 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าคงที่ Michaelis ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมถึง 2.1 เท่า



รูปที่ 32 เปรียบเทียบกราฟไลน์วีเวอร์ เบอร์ก ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (●—●) และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป (▲—▲)

4.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากการทดลองในข้อ 3.3.2.4 โดยการวัดแอคติวิตีเพื่อหาจำนวนหน่วยของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (อัตราส่วนเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม มีจำนวนหน่วยเท่ากับ 0.507 หน่วยเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนหน่วยเท่ากับ 0.036 หน่วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อมิลลิลิตร

จากการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Macro Kjeldahl distillation พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป 1 กรัม มีโปรตีนเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัม และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมปริมาณ 6 มิลลิกรัม มีโปรตีนเท่ากับ 0.0744 มิลลิกรัม เมื่อคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะจากสูตร

$$\text{แอคติวิตีจำเพาะ} = \frac{\text{จำนวนหน่วยเอนไซม์}}{\text{มิลลิกรัมโปรตีนในสารผสม}}$$

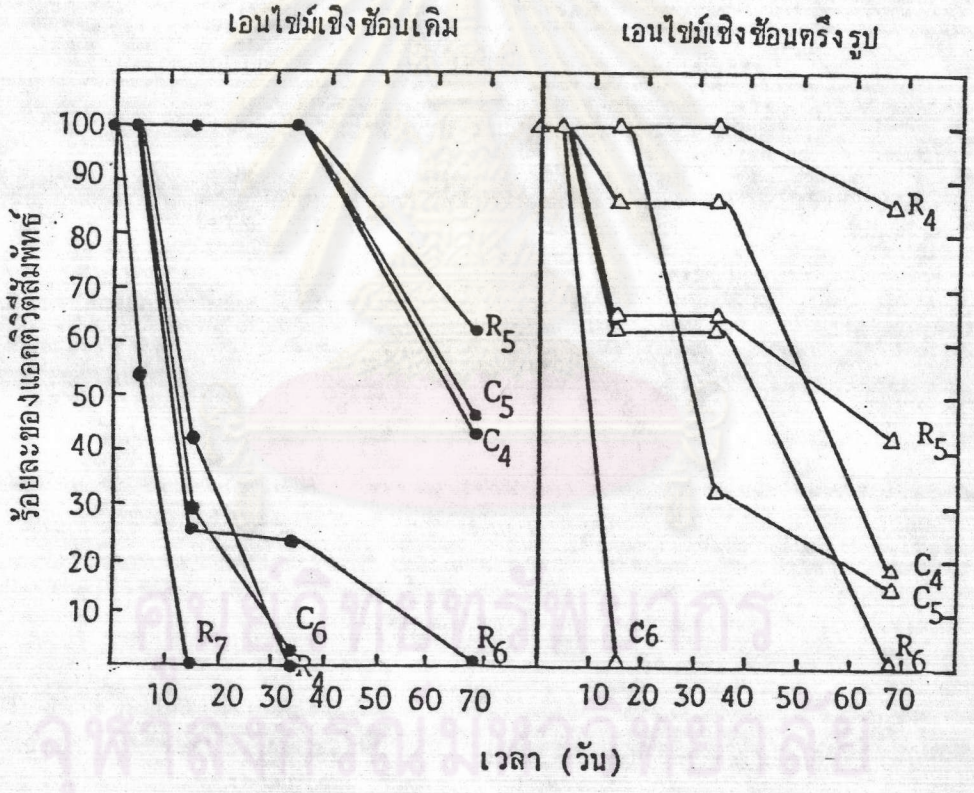
ดังนั้นสำหรับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.69 หน่วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.48 หน่วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อมิลลิกรัมโปรตีน

4.2.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากการทดลองในข้อ 3.3.2.5 โดยการเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4, 5, 6 และ 7 ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองที่เวลาการเก็บต่าง ๆ

รูปที่ 33 เป็นการเปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์ทั้งสองด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมกับระยะเวลาของการเก็บในภาวะดังกล่าว พบว่าที่ภาวะ

การเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 34 วัน เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน-ตรึงรูปยังคงมีแอคติวิตีเท่าเดิม คือร้อยละ 100 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมเสียแอคติวิตีไปทั้งหมด และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปยังคงเหลือแอคติวิตีถึงร้อยละ 85.29 เมื่อเก็บในภาวะนี้นาน 68 วัน สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมนั้นพบว่าภาวะการเก็บที่เหมาะสมคือเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเก็บนาน 68 วัน เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมจะสูญเสียแอคติวิตีไปค่อนข้างสูง คือเหลือแอคติวิตีร้อยละ 62.0 การเก็บเอนไซม์ทั้งสองในภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลางคือ พีเอช 6-7 นั้นพบว่า เอนไซม์ทั้งสองจะมีเสถียรภาพต่ำทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิห้องเย็น และสำหรับการเก็บเอนไซม์ทั้งสองที่ภาวะค่อนข้างเป็นกรด คือที่พีเอช 4-5 นั้นพบว่าจะมีเสถียรภาพดีเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 33 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (●—●) กับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป (△—△) ที่ภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน

R_4, R_5, R_6, R_7 = อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ) ที่พีเอช4,5,6,7 ตามลำดับ

C_4, C_5, C_6, C_7 = อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 °ซ)ที่พีเอช 4,5,6,7 ตามลำดับ

4.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนเดิมที่ภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน

จากการทดลองในข้อ 3.3.2.6 เมื่ออ่านค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมที่เก็บในภาวะต่าง ๆ ที่กำหนด จากรูปที่ 33 ที่ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับร้อยละ 50

ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ทั้งสองที่อ่านได้แสดงในตารางที่ 14 พบว่าเอนไซม์-เชิงซ้อนตรึงรูปจะมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 68 วัน เมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 4 ที่อุณหภูมิห้อง และค่าครึ่งชีวิตจะลดลงเมื่อเก็บในพีเอชสูงขึ้น การเก็บเอนไซม์เซลลูเลสที่อุณหภูมิห้องเย็นพบว่ามีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 53 วัน และค่าครึ่งชีวิตจะลดลงเมื่อเก็บในพีเอชสูงขึ้นเช่นกัน สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมนั้นเมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง จะมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 68 วันเช่นกันแต่เป็นที่น่าสังเกตว่า มื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 4, 6 และ 7 จะมีเสถียรภาพลดลง และพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้องเย็นก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 14 ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน

พีเอชที่เก็บ	ค่าครึ่งชีวิต (วัน)			
	เอนไซม์เชิงซ้อน		เอนไซม์เชิงซ้อนตรึงรูป	
	T_R	T_C	T_R	T_C
4	14	64	> 68	53
5	> 68	66	58	30
6	11	12	42	10
7	6	-	-	-

T_R = อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ)

T_C = อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 °ซ)

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

4.3.1 เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

จากการทดลองที่ 3.3.3.1 การเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดโดยใช้การทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 2×4×2 ซึ่งแปรขนาดอนุภาคของกากสับปะรดเป็น 150 ไมครอนและเล็กกว่า 150 ไมครอน ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีน เป็นร้อยละ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยน้ำหนัก และแปรระยะเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำเป็น 0.5 และ 1 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นแล้ว และวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตน้ำตาล-รีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากสับปะรดที่เตรียมสภาพในภาวะต่าง ๆ กันดังกล่าว

ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด ดังตารางที่ 15 พบว่าปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ขนาดอนุภาคของกากสับปะรด ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีนและเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำ รวมทั้งผลร่วมของสองปัจจัยทั้งหมด และผลร่วมของทั้งสามปัจจัยมีผลต่อผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพโดยใช้ภาวะต่าง ๆ กัน และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 34 และตารางที่ 16 พบว่าภาวะการเตรียมสภาพโดยการโม่บดกากสับปะรดจนได้ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน แล้วอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นานครึ่งชั่วโมง ในสารละลายเอน-บิวทิลลามีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือเป็นภาวะที่ทำให้กากสับปะรดมีสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการย่อยสลายสายโมเลกุลเซลลูเลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมากที่สุด

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลในการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

SOV	df	SS	MS	F_{cal}
A	1	310.51	350.51	2517.23**
B	3	565.01	188.34	1526.83**
C	1	22.95	22.95	186.06**
AxB	3	285.33	95.11	771.06**
AxC	1	15.04	15.04	121.94**
BxC	3	760.00	253.34	2053.76**
AxBxC	3	419.00	139.67	1132.27**
Error	16	1.97	1.23×10^{-1}	

A = ขนาดอนุภาคของกากสับปะรด

B = ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีน

C = เวลาที่ใช้อบไอน้ำ

** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

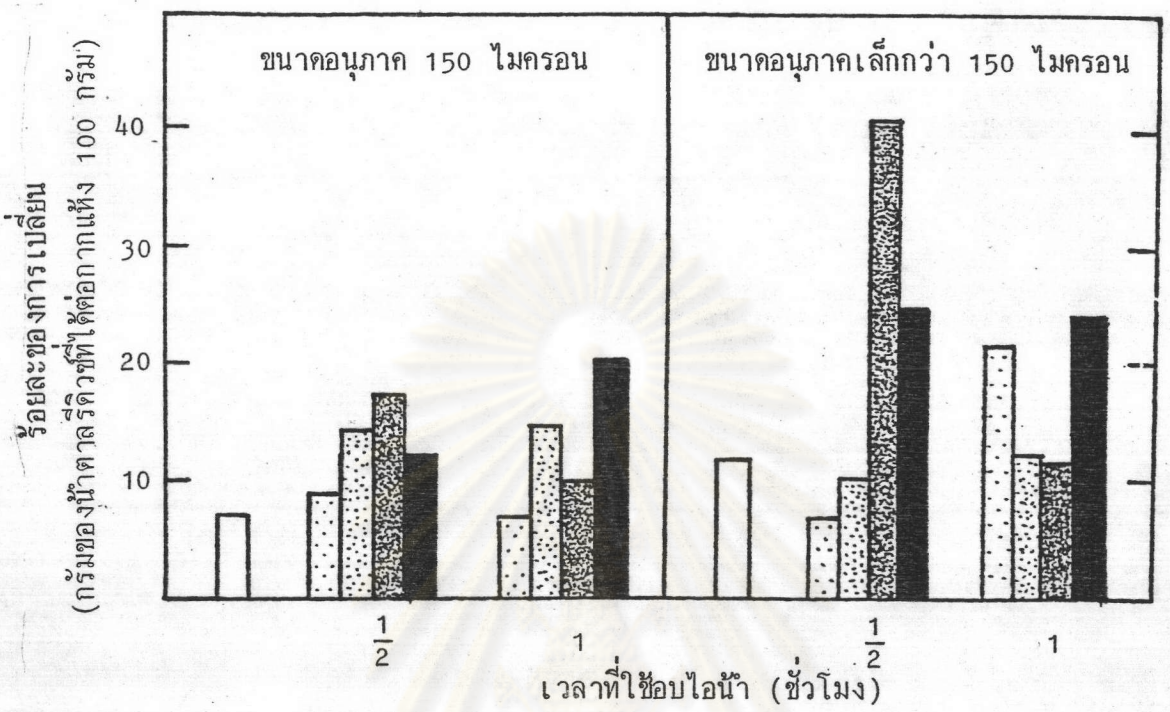
ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

ภาวะการเตรียมสภาพขั้นต้น	ร้อยละของการเปลี่ยน
$P_1C_0T_{0.5}$	8.88^{j}
$P_1C_0T_1$	6.75^{k}
$P_1C_{0.5}T_{0.5}$	14.26^{g}
$P_1C_{0.5}T_1$	14.64^{g}
$P_1C_1T_{0.5}$	17.09^{f}
$P_1C_1T_1$	9.81^{i}
$P_1C_{1.5}T_{0.5}$	11.97^{h}
$P_1C_{1.5}T_1$	20.29^{e}
$P_2C_0T_{0.5}$	6.75^{k}
$P_2C_0T_1$	21.81^{d}
$P_2C_{0.5}T_{0.5}$	9.90^{i}
$P_2C_{0.5}T_1$	12.31^{h}
$P_2C_1T_{0.5}$	$\underline{40.89}^{a}$
$P_2C_1T_1$	11.85^{h}
$P_2C_{1.5}T_{0.5}$	25.12^{b}
$P_2C_{1.5}T_1$	24.19^{c}

P_1 และ P_2 = ขนาดอนุภาคเท่ากับ 150 ไมครอน และเล็กกว่า 150 ไมครอน ตามลำดับ

C_o, $C_{0.5}$, C_1 และ $C_{1.5}$ = ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีนร้อยละ 0, 0.5, 1 และ 1.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

$T_{0.5}$ และ T_1 = เวลาที่ใช้อบไอน้ำเป็น 0.5 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 34 เปรียบเทียบร้อยละของการเปลี่ยนที่ได้จากการย่อยสลายกากสับปะรดซึ่งผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นในภาวะต่าง ๆ กัน

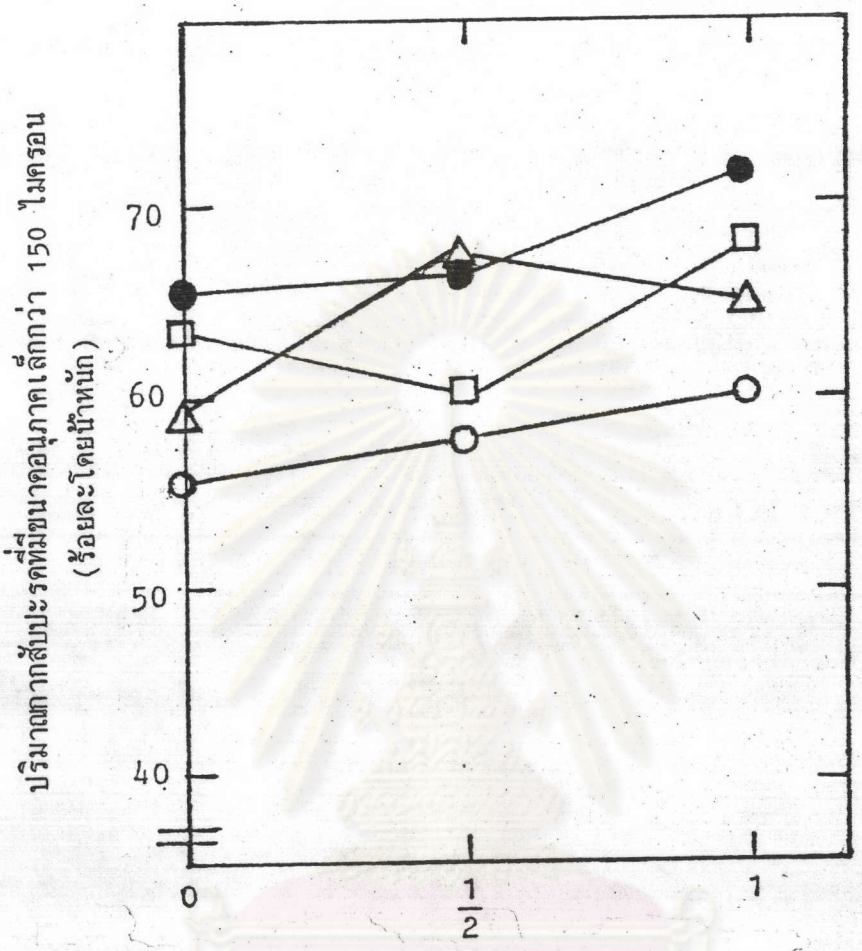
- ไม่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้น
- อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 เข้มข้น 0.1 โมลาร์
- เอน-ไวทิลลามีนเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก
- เอน-ไวทิลลามีนเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก
- เอน-ไวทิลลามีนเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก

4.3.2 ศึกษาผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรด

จากการทดลองในข้อ 3.3.3.2 โดยการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด ซึ่งมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 150 ไมครอน ด้วยภาวะต่าง ๆ ที่กำหนด แล้วร่อนเปียกกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นดังกล่าวเพื่อหาปริมาณกากซึ่งมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน เปรียบเทียบกับกากสับปะรดซึ่งไม่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้น

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 35 พบว่ากากสับปะรดบดขนาดอนุภาค 150 ไมครอน เมื่อนำมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมครอน จะมีส่วนของอนุภาคที่สามารถลอดผ่านตะแกรงได้ร้อยละ 55.81 และเมื่อเตรียมสภาพโดยการอบไอน้ำอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 0.5 และ 1 ชั่วโมง ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.8 พบว่าปริมาณกากที่มีอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 57.89 และ 60.14 ตามลำดับ เมื่อเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดโดยอบไอน้ำในเวลาที่กำหนดในสารละลายเอน-บิวทิลลามีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่ากาก-สับปะรดมีแนวโน้มที่จะมีขนาดอนุภาคลดลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 ผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคเริ่มต้นเท่ากับ 150 ไมครอน

○—○ อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8
△—△ สารละลายเอน-บิวทิลลามีนเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก
□—□ สารละลายเอน-บิวทิลลามีนเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก
●—● สารละลายเอน-บิวทิลลามีนเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก

4.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน

จากการทดลองในข้อ 3.3.4 โดยการหมักแอล-ไลซีนด้วยเชื้อ *C. glutamicum* MU 3282 ในอาหารสำหรับหมักสูตร 1 อาหารสำหรับหมักสูตร 2 และอาหารสำหรับหมักสูตร 3 แล้ววิเคราะห์ปริมาณแอล-ไลซีน เมไธโอนีน ธรีโอนีน และแอมโมเนีย ด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Amino Acid Analyzer) เปรียบเทียบกับอาหารควบคุม

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าในอาหารสำหรับหมักซึ่งมีส่วนผสมของไฮโดรไลเสทของกากสับปะรดนั้นก่อนการหมักไม่มีแอล-ไลซีนเป็นองค์ประกอบเลย สำหรับการหมักโดยใช้อาหารสำหรับหมักสูตร 1 ซึ่งมีการปรับปริมาณน้ำตาลกลูโคสและความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ให้เท่ากับอาหารสังเคราะห์พบว่า ให้ผลผลิตแอล-ไลซีน 47.05 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และพบว่าเมไธโอนีน ธรีโอนีน และแอมโมเนีย ถูกใช้จนหมด การหมักโดยใช้อาหารสำหรับหมักสูตร 2 ซึ่งมีน้ำตาลสำหรับหมักจากไฮโดรไลเสทแหล่งเดียวเท่านั้นโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็นร้อยละ 0.1 และมีสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นพอเหมาะ (เทียบเท่าอาหารสังเคราะห์) จะได้ผลผลิตแอล-ไลซีนเป็น 8.63 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และมีเมไธโอนีน และแอมโมเนียที่เหลือจากการหมักในปริมาณมาก การใช้อาหารสำหรับหมักสูตร 3 ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์และสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากอาหารสำหรับหมัก 2 ถึง 18 เท่า พบว่าผลผลิตแอล-ไลซีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย คือเท่ากับ 9.50 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และมีแอมโมเนียเหลือเท่ากับ 7.81 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนและแอมโมเนียในอาหารสำหรับหมักด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนหลังการทดลองหมักแอล-ไลซีน

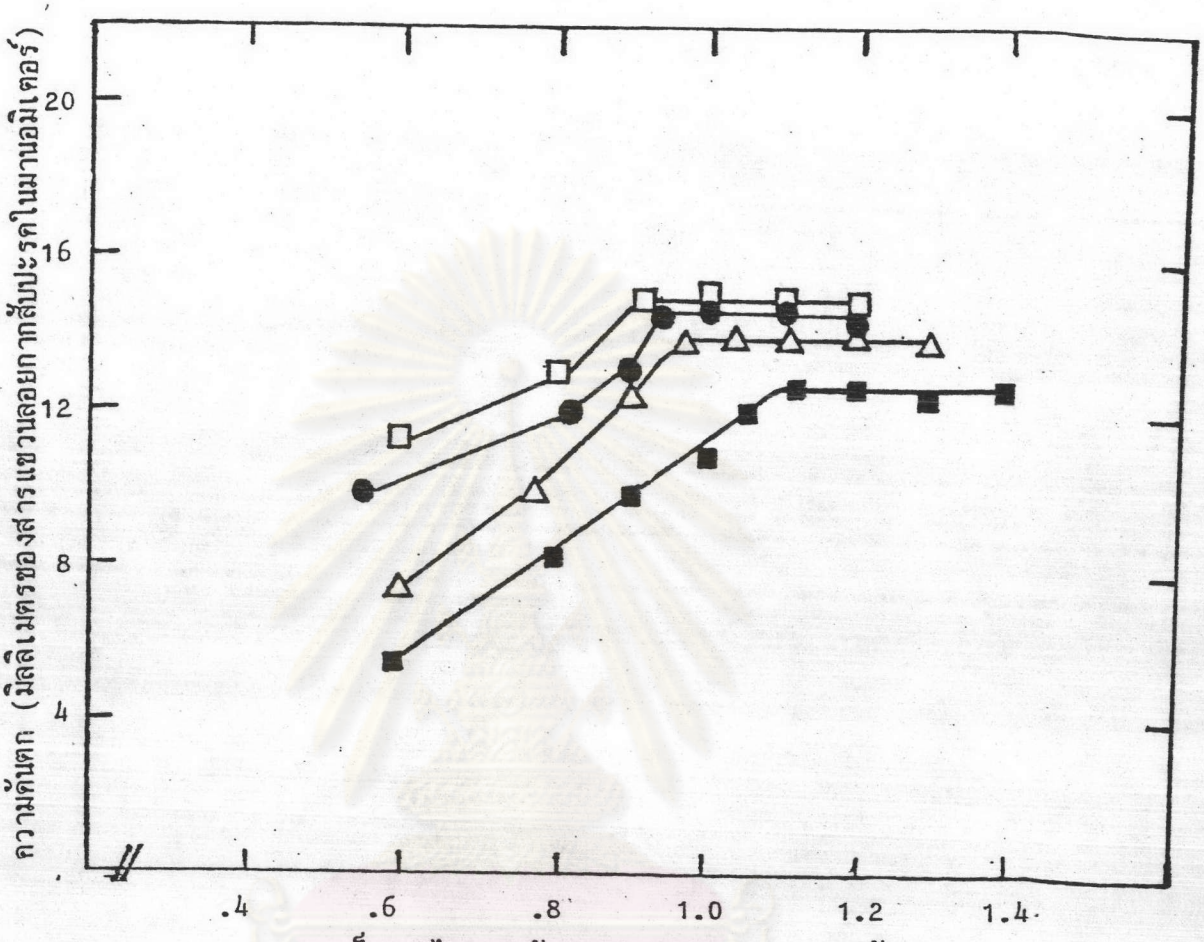
อาหารสำหรับหมัก	องค์ประกอบที่วิเคราะห์ (มก./100 มล.)			
	Lysine	Methionine	Threonine	Ammonia
อาหารควบคุม	-	20.14	11.58	34.44
อาหารสำหรับหมักสูตร 1	47.05	-	-	-
อาหารสำหรับหมักสูตร 2	8.63	17.77	-	24.26
อาหารสำหรับหมักสูตร 3	9.50	-	-	7.81

อาหารควบคุม คือ อาหารสำหรับหมักที่ไม่มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ของ *C. glutamicum* MU 3282

4.5 ศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

4.5.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

จากการทดลองในข้อ 3.3.5.1 โดยการแปรค่าความเร็วการไหลขาเข้าของสารแขวนลอยของกากสับปะรดและวัดค่าความดันตกทุกค่าความเร็วการไหล ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 34 ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดันตกและค่าความเร็วการไหลขาเข้าของสารแขวนลอยของกากสับปะรด จากรูปที่ 36 อ่านค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันของสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 1.12, 0.97, 0.94, 0.88 เซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ และพบว่าค่าความดันตกที่เกิดขึ้นในเครื่องปฏิกรณ์นี้มีค่าต่ำ คืออยู่ในช่วง 12.5 ถึง 14.5 มิลลิเมตร ของสาร-แขวนลอยกากสับปะรด



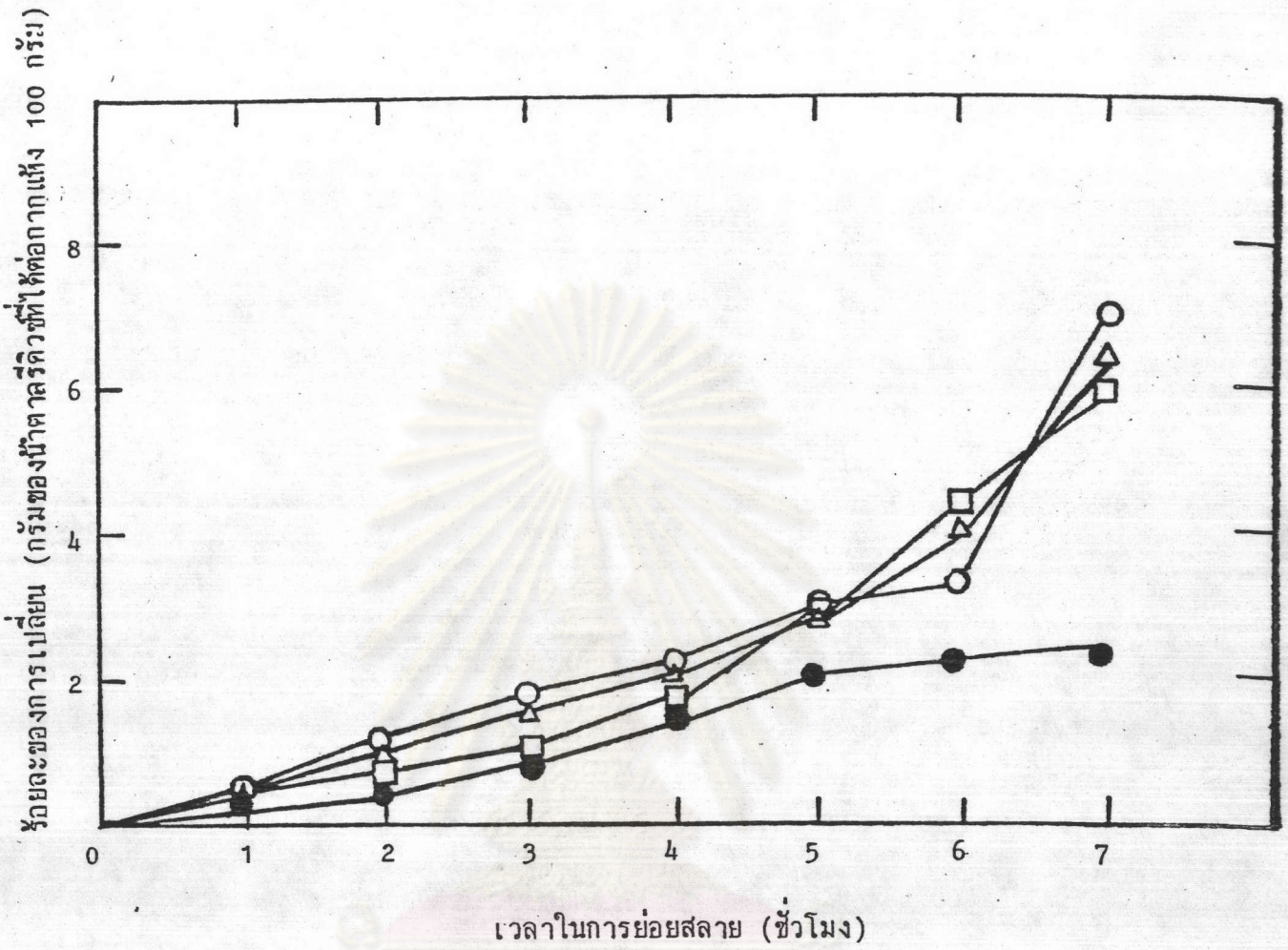
รูปที่ 36 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดันตกกับค่าความเร็วการไหลขาเข้าของสารแขวนลอยกากสับปะรดที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (■—■) 5 กรัมต่อลิตร (△—△) 10 กรัมต่อลิตร (●—●) และ 15 กรัมต่อลิตร (□—□) ตามลำดับ

4.5.2 ศึกษาอิทธิพลของความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรด ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ต่อผลการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

จากการทดลองในข้อ 3.3.5.2 การย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรด ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยการแปรค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าเป็น 0.97, 1.30, 1.55 และ 1.90 เซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ

ผลการทดลองดังรูปที่ 37 เปรียบเทียบค่าร้อยละของการเปลี่ยนที่ได้เมื่อย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าต่าง ๆ กัน พบว่าการย่อยสลายกากสับปะรดโดยใช้ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าเป็น 0.97, 1.30 และ 1.55 เซนติเมตรต่อวินาที มีแนวโน้มที่จะให้ร้อยละของการเปลี่ยนใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 3.01, 2.98 และ 2.72 ตามลำดับ เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายนาน 5 ชั่วโมง และเท่ากับ 5.95, 6.39 และ 7.11 ตามลำดับ เมื่อเวลาในการย่อยสลายเป็น 7 ชั่วโมง ในขณะที่การย่อยสลายกากสับปะรดที่ใช้ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าสูงขึ้นเป็น 1.90 เซนติเมตรต่อวินาที มีแนวโน้มที่จะให้ร้อยละของการเปลี่ยนต่ำ คือเท่ากับ 2.19 เมื่อเวลาในการย่อยสลายเป็น 7 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองในข้อ 3.3.5.3 จึงเลือกใช้ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยกากสับปะรดขาเข้าเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันตามเหตุผลในข้อ 5.5.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการเปลี่ยนกับค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยกากสับปะรดขาเข้า เมื่อย่อยสลายสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าเป็น 0.97 (□—□), 1.30 (△—△), 1.55 (○—○) และ 1.90 (●—●) เซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ

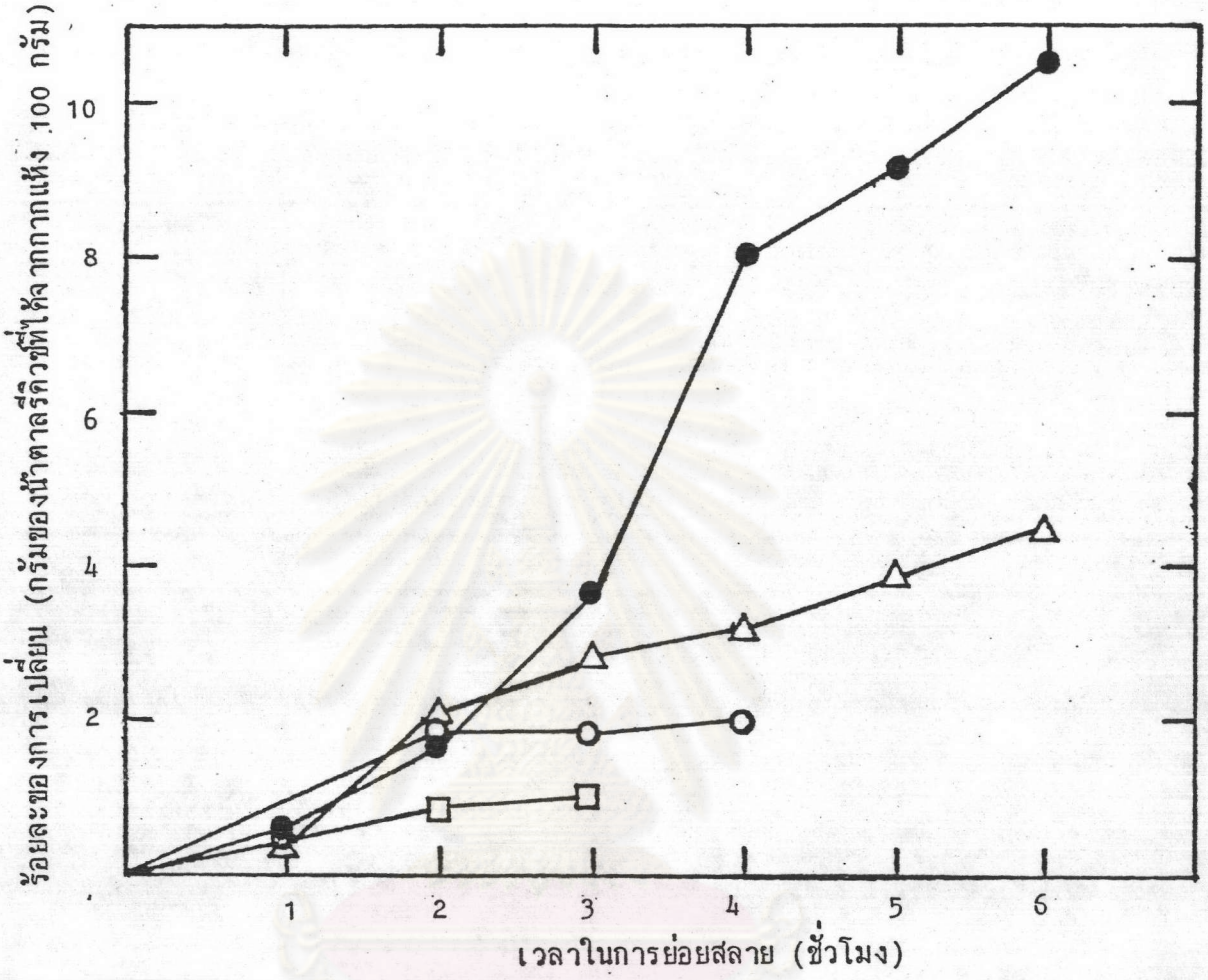
4.5.3 กำหนดความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

จากการทดลองในข้อ 3.3.5.3 โดยการย่อยสลายกากสับปะรดในรูปของสารแขวนลอยความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป หนัก 20 กรัม ทดลองที่ค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันของสารแขวนลอยแต่ละความเข้มข้น (จากผลการทดลองข้อ 4.5.1) แล้วหาปริมาณผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ในแต่ละภาวะ

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 38 พบว่าการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และ 15 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่จะให้ร้อยละของการเปลี่ยน (% conversion) ต่ำ และไม่สามารถทดลองในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดได้นานเกิน 4 ชั่วโมง เนื่องจากสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการถ่ายเท (transfer) อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปออกจากเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปในอัตราสูง

สำหรับการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่เกิดการถ่ายเทอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปออกจากเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปเลย จากรูปที่ 38 การย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่จะให้ร้อยละของการเปลี่ยนสูงโดยมีร้อยละของการเปลี่ยนเป็น 10.65 เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายนาน 6 ชั่วโมง และได้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 0.11 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การย่อยสลายสารแขวนลอยของการเปลี่ยนแปลง 4.45 ในเวลาการย่อยสลาย 6 ชั่วโมงเท่านั้น

เมื่อพิจารณาทั้งค่าร้อยละของการเปลี่ยนและความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ ซึ่งมีความสัมพันธ์ตรงกับความเข้มข้นของสารแขวนลอยกากสับปะรดที่ใช้ดังกล่าว จึงเลือกใช้สารแขวนลอยกากสับปะรดทั้ง 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาถึงผลการย่อยสลายกาก-สับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด โดยการแปรค่าเวลาของการย่อยสลายในลำดับต่อไป



รูปที่ 38 ความสัมพันธ์ของร้อยละของการเปลี่ยนที่ได้ กับเวลาในการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (●—●) 5 กรัมต่อลิตร (△—△) 10 กรัมต่อลิตร (○—○) และ 15 กรัมต่อลิตร (□—□) ตามลำดับ

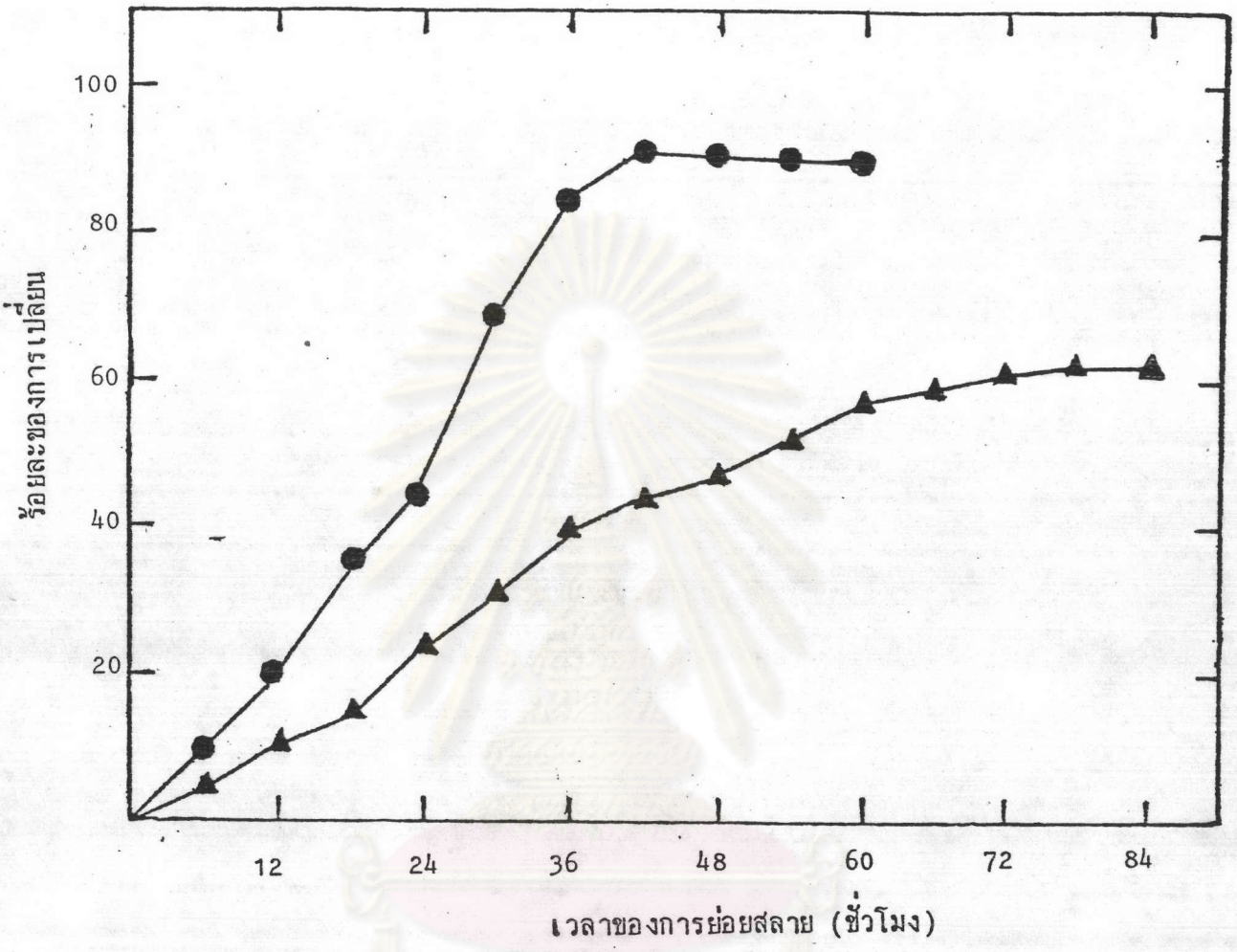
หมายเหตุ สำหรับสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถดำเนินการย่อยสลายได้นานกว่า 4 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปถูกพัดพาออกจากเครื่องปฏิกรณ์อย่างต่อเนื่องและไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเหลืออยู่ในเครื่องปฏิกรณ์เลย หลังจากเวลาดังกล่าว

4.5.4 กำหนดเวลาของการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วการไหลเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

จากการทดลองข้อ 3.3.5.4 เมื่อย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ที่ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันของแต่ละความเข้มข้น คือเท่ากับ 1.12 และ 0.97 เซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ โดยแปรระยะเวลาในการย่อยสลายเป็น 6, 12, ..., 84 ชั่วโมง

ผลการทดลองดังแสดงในรูป 39 สำหรับการย่อยสลายสารแขวนลอยกาก-สับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 61.80 เมื่อย่อยสลายนาน 72 ชั่วโมง โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การย่อยสลายสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนสูงสุดเท่ากับร้อยละ 92.84 โดยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร เมื่อย่อยสลายนานเพียง 42 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 39 ร้อยละการเปลี่ยน (% conversion) ที่เวลาการย่อยต่าง ๆ กัน เมื่อใช้สารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (●—●) เปรียบเทียบกับสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (▲—▲) ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด