บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

1. ขนาดของเม็ดทรายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์

จากการทดลองพบว่าเม็ดทรายที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.833-1.041 มิลลิเมตร หรือทรายที่สามารถร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 16 เมช แต่ไม่สามารถผ่านตะแกรงเบอร์ 20 เมชได้ เมื่อนำมาตรึงเซลล์ยีสต์ทำเบียร์ที่มีอินเวอร์เทสจะให้แอคทิวิตีของอินเวอร์เทสสูงกว่าเม็ดทรายที่มีขนาดอื่นๆ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาทรายที่นำมาคัดขนาดเพื่อตรึงเซลล์ยีสต์ดังรูปที่ 6 จะพบว่า ทรายที่มีขนาด 16-20 เมช จะมีสีแตกต่างจากทรายที่มีขนาดอื่นๆ ดังนั้นส่วนประกอบที่แตกต่างของทรายขนาด 16-20 เมชนี้ จึงอาจทำให้เซลล์ยีสต์เกาะบนพื้นผิวได้ดีกว่าทรายที่มีขนาดอื่นๆ และจากการทำ Scanning Electron Microscope ดังแสดงในรูปที่ 8-15 จะพบว่าทรายที่มีขนาดใหญ่จะมีพื้นผิวที่ขรุขระกว่าพื้นผิวของทรายขนาดเล็กกว่า และเมื่อเซลล์ยีสต์เข้าไปเกาะยังบริเวณดังกล่าวนี้ เมื่อมีการเสียดสีของเม็ดทรายเกิดขึ้นจะทำให้เซลล์ยีสต์หลุดได้น้อยลง จึงทำให้มีเซลล์ยีสต์เหลืออยู่มาก ทำให้แอคทิวิตีของเอนไซม์สูงกว่าทรายขนาดอื่นๆ

2. การตรึงเซลล์ยีสต์บนทราย

จากการทดลองตรึงเซลล์ยีสต์ที่มีอินเวอร์เทสบนทรายด้วยวิธีต่างๆ นั้น ปัจจัยสำคัญที่เลือกใช้วิธีการตรึงคือ แอคทิวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูป ซึ่งจากการทดลองพบว่าการตรึงเซลล์ยีสต์บนทรายโดยใช้โพลีเอทธิลีนไอมีนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ จะให้แอคทิวิตีของอินเวอร์เทสสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาแอคทิวิตีเฉพาะก็ยังพบว่าการตรึงด้วยวิธีนี้ให้แอคทิวิตีคงเหลือถึง 53 % ของเซลล์ยีสต์ที่ไม่ได้ผ่านการตรึงรูป ซึ่งสูงกว่าการตรึงด้วยวิธีอื่นๆ

การตรึงเซลล์บนทรายโดยใช้โพลีเอทธิลีนไอมีนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์เป็น การตรึงโดยใช้แรงยึดติดทางกายภาพ (physical adsorption) ซึ่งแรงยึดติดนี้คือแรงดึงดูดระหว่างประจุ (ionic interaction) ของประจุบวกบนโพลีเอทธิลีนไอมีนซึ่งเคลือบอยู่บนเม็ดทราย และประจุลบบนเซลล์ยีสต์ (D' Souza, et. al., 1986) สำหรับกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารไบฟังชั่นนอล ก็จะเป็นตัวเชื่อมก่อให้เกิดโครงสร้างแบบตาข่ายคลุมเซลล์

ยีสต์ที่ถูกตรึงบนทรายอีกที ทำให้เพิ่มความคงทนของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

การตรึงเซลล์ยีสต์โดยใช้อัลบูมินและกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าเมื่อนำเซลล์ตรึงรูปมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจะได้ปริมาณโปรตีนสูง แต่เมื่อพิจารณาถึงแอคทิวิตีของอินเวอร์เทส พบว่าได้ % conversion ต่ำ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้นั้นเป็นโปรตีนของเซลล์ยีสต์ และอัลบูมินรวมกันอยู่ไม่สามารถแยกได้ว่ามีเซลล์ยีสต์เกาะอยู่มากน้อยเท่าไร ซึ่งจากการทดลองน่าจะมีปริมาณเซลล์ยีสต์เกาะอยู่น้อยจึงทำให้ได้แอคทิวิตีของอินเวอร์เทสต่ำ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่พิจารณานำมาใช้

การตรึงเซลล์โดยใช้อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลน เป็นการตรึงโดยใช้พันธะโควาเลนท์ ซึ่งจะกระตุ้น (activated) ให้เกิดด้วยปฏิกิริยาไซเลนไนเซชั่น (silanization) (Kennedy & Cabral ., 1983) การตรึงโดยใช้พันธะโควาเลนท์นี้จะมีแรงดึงดูดระหว่างตัวยึดกับเอนไซม์หรือเซลล์ที่แข็งแรง จึงสามารถใช้งานได้นาน แต่วิธีดำเนินการซับซ้อนทำให้มีการสูญเสียแอคทิวิตีของเอนไซม์ได้ (Chibata, 1978) ดังนั้นในการทดลองนี้ เมื่อวิเคราะห์โปรตีนบนเซลล์ตรึงรูปจึงพบโปรตีนมาก แสดงว่าเซลล์เกิดการยึดติดกับตัวยึดได้ดี แต่เนื่องจากเซลล์มีการสูญเสียแอคทิวิตีเนื่องจากการตรึง จึงทำให้ได้แอคทิวิตีของอินเวอร์เทสต่ำ วิธีตรึงวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้

3. คุณสมบัติของอินเวอร์เทสตรึงรูป

อินเวอร์เทสในเซลล์ตรึงรูปอาจมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนคุณสมบัติเป็นผลมาจากกระบวนการตรึง (Chibata, 1978 ;Trevan, 1980)

3.1 pH ที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสตรึงรูป

pH ที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสที่สกัดได้จากยีสต์ทำเบียร์คือ 4.7 (สุริยัน, 1987) และจากอินเวอร์เทสตรึงรูปของสิวลี (สิวลี, 1987) จะได้ pH ที่เหมาะสมในการใช้งานคือ pH 4-6 แต่ในการทดลองนี้ pH ที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสตรึงรูปจะเลื่อนมาทาง pH ต่ำลงคือ pH 3.0 (รูปที่ 16) ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลประจุบวกของโพลีเอทธิลีนไอมีนซึ่ง Trevan (Trevan, 1980) อธิบายว่าผลของประจุบวกบนผิวของตัวยึดจะซับโปรตอนออกมาข้างนอก ดังนั้นจึงทำให้สภาพแวดล้อมจุลภาค (microenvironment) ภายในเซลล์ตรึงรูปมี pH สูงกว่าสภาพแวดล้อมภายนอกคือ ใน

สารละลายของปฏิกิริยา และสูงกว่า pH ของสภาพแวดล้อมเดิมของเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการตรึง ทำให้แอคทิวิตีของเอนไซม์ลดลงเมื่อสภาพแวดล้อมจุลภาคเดิมไม่เหมาะสม การปรับสภาพแวดล้อมจุลภาคให้ต่ำลงเพื่อคืนสู่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ก็คือ การลด pH ของสารละลายภายนอก ผลที่ปรากฏออกมาคือ pH ที่เหมาะสมของอินเวอร์เทสตรึงรูปเลื่อนไปทางกรดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการตรึง ทั้งนี้ก็เพื่อปรับสภาพแวดล้อมจุลภาคให้มี pH คงเดิมนั่นเอง

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสตรึงรูป

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า อินเวอร์เทสตรึงรูปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้งานที่ 40 องศาเซลเซียส จากการทดลองของสุริยัน (สุริยัน, 1987) ซึ่งได้สกัดอินเวอร์เทสจากยีสต์ทำเบียร์พบว่า เอนไซม์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้งานที่ 60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับอินเวอร์เทสตรึงรูปจากการทดลองของสิวลี (สิวลี, 1987) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสจากยีสต์ Saccharomyces cerevisiae จะอยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส (Woodward & Wiseman, 1982)

3.3 ลักษณะพื้นผิวของเซลล์ตรึงรูป

จากการทำ Scanning Electron Microscope ในรูปที่ 18 แสดงถึงพื้นผิวของทรายที่ไม่ได้ผ่านการตรึงเซลล์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับทรายที่ผ่านการตรึงเซลล์ในรูปที่ 19 และ 20 จะพบว่ามีความแตกต่างกัน ทรายที่ผ่านการตรึงเซลล์แล้วจะเห็นเซลล์ยีสต์เกาะอยู่กระจัดกระจายทั่วไปบนผิวทราย และในรูปที่ 21 ซึ่งใช้กำลังขยาย 5,000 เท่า จะแสดงขนาดของเซลล์ยีสต์บนทรายตรึงเซลล์ ซึ่งเซลล์ยีสต์จะมีขนาดประมาณ 5 ไมโครเมตร

3.4 ความเสถียรของแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปเมื่อเก็บไว้ในลักษณะแห้งที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส

พบว่าอินเวอร์เทสตรึงรูปจะมี % แอคติวิตีสัมพัทธ์ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้นและการเก็บอินเวอร์เทสตรึงรูปในลักษณะแห้งที่ 4 องศาเซลเซียส จะมี % แอคติวิตีสัมพัทธ์สูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) จากการวิเคราะห์ค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูปในขณะเก็บที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูปเมื่อเก็บในลักษณะแห้งที่ 4 องศาเซลเซียส เท่ากับ 270 วัน ซึ่งสูงกว่าค่าครึ่งชีวิตเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องซึ่งเท่ากับ 85 วัน และสำหรับอินเวอร์เทส

ตริงรูปของสิวลี (สิวลี, 1987) ก็พบว่าวิธีเก็บที่เหมาะสมที่สุดก็คือ เก็บเม็ดเจลในลักษณะแห้งที่ 4 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน โดยมีค่าครึ่งชีวิตของการเก็บ 520 วัน

4. การผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบ packed-bed

4.1 อัตราการป้อนสารละลายซูโครส และความเข้มข้นของสารละลายซูโครสในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่อง

ในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส และอัตราการป้อนสารละลายซูโครสสูงขึ้นมีผลทำให้ % conversion ต่ำลง การพิจารณาเลือกความเข้มข้นของสารละลายซูโครส และอัตราการป้อนที่เหมาะสมจะเปรียบเทียบกับน้ำเชื่อมฟรักโทสจากข้าวโพด โดยน้ำเชื่อมฟรักโทสจากข้าวโพด 42% ประกอบด้วยฟรักโทส 42% กลูโคส 52% และโอลิโกแซคคาไรด์ 6% ดังนั้นการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทเพื่อให้สามารถแข่งขันกับน้ำเชื่อมฟรักโทสจากข้าวโพดได้จะต้องมี %conversion อย่างน้อย 84% จากรูปที่ 23 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส 10% (นน./นน.) และที่อัตราการป้อนสารละลายซูโครส 0.5 มล./นาที จะให้ %conversion เท่ากับ 85 แต่ในการผลิตเชิงอุตสาหกรรม การใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้น 10% (นน./นน.) เป็นการไม่คุ้มค่าเชิงพาณิชย์ แต่ถ้าใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้นมาก ๆ จะทำให้เกิดการยับยั้งแอคติวิตีของอินเวอร์เทสได้ (Combes & Monsan , 1983) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายซูโครสที่ความเข้มข้น 15% (นน./นน.) ซึ่งที่อัตราป้อนต่ำสุดคือ 0.5 มล./นาที จะได้ %conversion ประมาณ 72% ดังนั้นจึงต้องหาวิธีที่จะเพิ่ม %conversion ให้ได้สูงกว่านี้

4.2 อัตราการป้อนสารละลายซูโครสในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องในระบบไหลย้อนกลับ

ในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทในระบบไหลย้อนกลับโดยใช้สารละลายซูโครสความเข้มข้น 15% (นน./นน.) พบว่าเมื่ออัตราการป้อนสารละลายซูโครสสูงขึ้น ในขณะที่อัตราการไหลออกต่ำลงทำให้ %conversion สูงขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะว่า เมื่อมีอัตราการป้อนสูงในขณะที่อัตราการไหลออกต่ำทำให้การไหลย้อนกลับของสารละลายน้ำตาลทรายมีมากขึ้น เหมือนเป็นการกวนทำให้สับสเตรทสัมพัสกับอินเวอร์เทสตริงรูปได้มากขึ้น ที่อัตราการป้อนสารละลายซูโครส 12 มล./นาที และที่อัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ที่ 0.6 มล./นาที

ซึ่งมีอัตราส่วนของการไหลย้อนกลับ เท่ากับ 0.95 และมีค่าสเปซไทม์ 41 นาที จะได้ %conversion เท่ากับ 87 %

4.3 ความเสถียรของแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปต่อ pH

ความเสถียรของอินเวอร์เทสตรึงรูปต่อ pH อยู่ในช่วง pH 2.5-7 และกว้างกว่าช่วง pH ของเอนไซม์ที่ไม่ได้ผ่านการตรึงซึ่งมีความเสถียรในช่วง pH 4-6 (สุริยัน ,1987) เช่นเดียวกับเอนไซม์ตรึงรูปของสิวลี (สิวลี, 1987) สำหรับเสถียรภาพของ pH ของเซลล์ตรึงรูปนั้น Chibata (Chibata,1978) อธิบายไว้ว่าไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างวิธีการตรึงและความเสถียรของเอนไซม์ ดังนั้นจึงเป็นสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อวิธีการตรึงแต่ละแบบ

4.4 ค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูปในปฏิกรณ์แบบ packed-bed

ค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูปเมื่อใช้งานในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ที่ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0 เท่ากับ 7.35 วัน ซึ่งแตกต่างจากค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูป จากการทดลองของสิวลี (สิวลี,1987) ซึ่งทำการทดลองที่ 40 องศาเซลเซียส pH 5.0 ได้ค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 10 วัน ความแตกต่างนี้เนื่องมาจากสภาวะที่ทำการทดลองแตกต่างกัน

4.5 ปริมาณโปรตีนในเซลล์ตรึงรูปก่อนและหลังการใช้งานในปฏิกรณ์แบบ packed-bed

จากการทดลองผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบ packed-bed จะพบว่าระยะแรกเมื่อเริ่มป้อนสารละลายซูโครสเข้าไป ผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจะขุ่นเล็กน้อย ต่อมาเมื่อป้อนสารละลายซูโครสได้เป็นเวลาประมาณ 10 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ออกมาจะใส ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ขุ่นในตอนแรกจึงเป็นเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงอยู่บนทรายที่หลุดออกมา จึงทำให้ปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์ได้ 86.37% ดังนั้นแอคติวิตีของอินเวอร์เทสที่ลดลงในข้อ 4.4 จึงเป็นค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ไม่ใช่เกิดจากการหลุดของเซลล์ยีสต์

5. ค่า Chemical Kinetics ของอินเวอร์เทสตรึงรูป

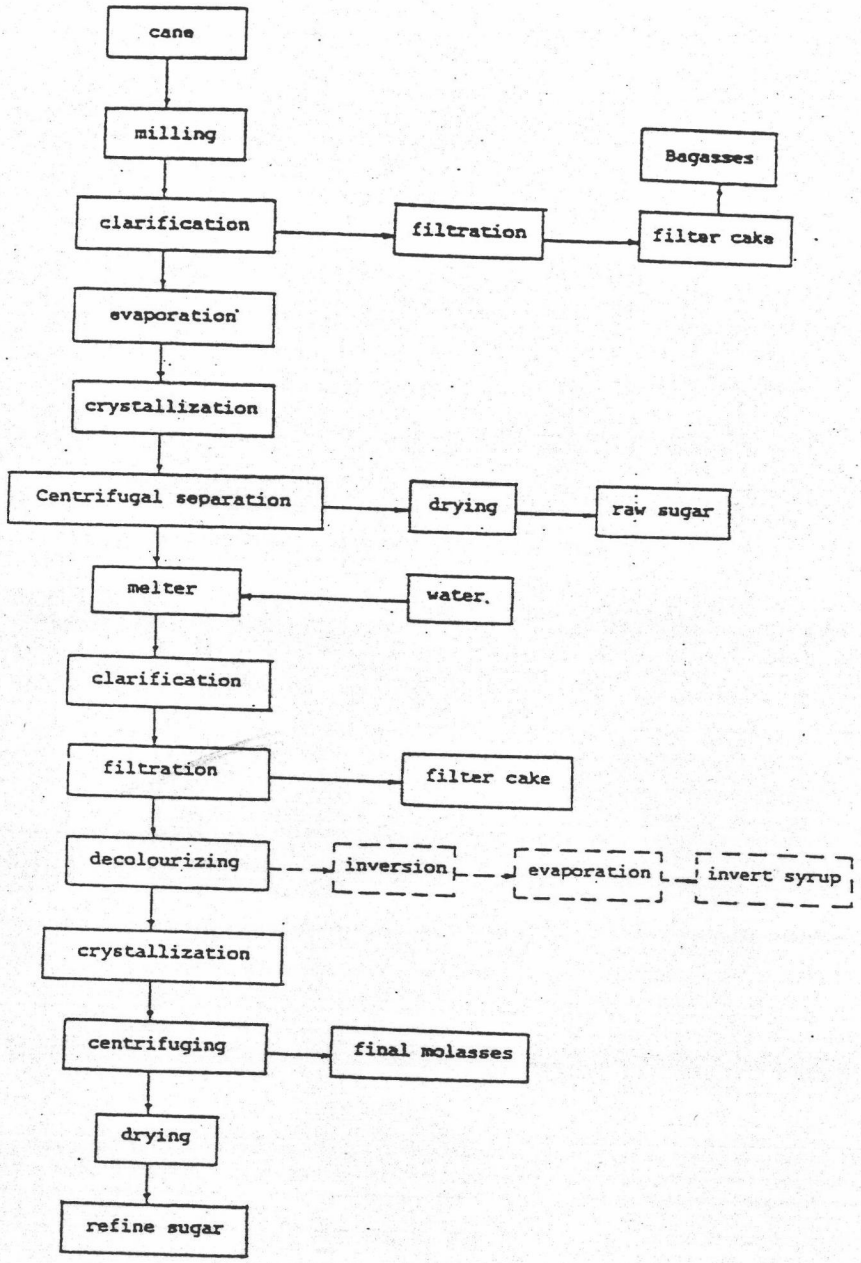
จากการทดลองศึกษาค่าคงที่ของ Michaelis-Menten แบบไม่ต่อเนื่องได้เท่ากับ 72.46 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงค่าคงที่ของ Michaelis-Menten ของเอนไซม์บริสุทธิ์ซึ่งได้ 84.9 มิลลิโมลาร์ (สุริยัน,1987) แสดงว่าอินเวอร์เทสตรึงรูปมีประสิทธิภาพ

ของการจับระหว่างเอนไซม์กับซูโครสในตำแหน่งที่เหมาะสมเช่นเดียวกับเอนไซม์บริสุทธิ์เมื่อเทียบกับค่าคงที่ของ Michaelis-Menten ของเอนไซม์ตรึงรูปของสิวลี (สิวลี, 1987) ซึ่งเท่ากับ 220.70 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์ตรึงรูปที่ตรึงโดยใช้โพลีเอทธิลีนไอมีนมีประสิทธิภาพของการจับระหว่างเอนไซม์กับซูโครสในตำแหน่งที่เหมาะสมกว่าเอนไซม์ตรึงรูปของสิวลี ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten แบบต่อเนื่องเท่ากับ 154.90 มิลลิโมลาร์ ซึ่งการที่ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten มีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราการป้อนสับสเตรท (Kobayashi & Moo-Young, 1973 ; Ahn & Byun, 1978) จากรูปที่ 29 ซึ่งแสดง Lineweaver Burk Plot ของอินเวอร์เทสตรึงรูปพบว่าในช่วงที่ความเข้มข้นของซูโครสสูงมีแนวโน้มว่า จะเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาเนื่องจากสับสเตรทเช่นเดียวกับการทดลองของสิวลี (สิวลี, 1987) ซึ่งทำให้ %conversion สูง เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้นน้อยและในกรณีการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทในแบบต่อเนื่องในระบบไหลย้อนกลับจะให้ %conversion สูงถึง 87% เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลทราย 15% (นน./นน.) ก็เป็นเพราะว่าในระบบไหลย้อนกลับจะมีการป้อนสับสเตรทอย่างช้า ๆ ในปริมาณน้อยเข้าไปยังสารละลายที่อยู่ในระบบ จึงเป็นการเจือจางสับสเตรทให้มีความเข้มข้นน้อยลง ซึ่งถ้ามีการไหลออกของสารละลายจากระบบน้อยก็ทำให้การป้อนสับสเตรทเข้ายังระบบถูกเจือจางมากขึ้น จึงลดการยับยั้งปฏิกิริยาโดยสับสเตรทได้

ค่า Chemical Kinetics ของอินเวอร์เทสตรึงรูปแบบไม่ต่อเนื่องและแบบต่อเนื่องมีค่าแตกต่างกัน เนื่องจากการวัดแอคติวิตีแบบไม่ต่อเนื่องจะศึกษาอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาตั้งต้น (initial velocity) ในขณะที่การวัดแอคติวิตีแบบต่อเนื่องจะศึกษาอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาในสภาวะสม่ำเสมอ (steady state) ดังนั้นความแตกต่างของค่า Chemical Kinetics เนื่องมาจากสภาวะในการศึกษาที่แตกต่างกัน

6. <u>การผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทจากซูโครส</u>

การผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทจากซูโครส สามารถนำเข้าร่วมกับกระบวนการผลิตซูโครสได้ โดยนำเข้าร่วมหลังการฟอกสี (decolourizing) ของซูโครส ดังรูปที่ 31 สารละลายซูโครสสามารถเข้าสู่กระบวนการอินเวอร์ชั่นซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนสารละลายซูโครสเป็นน้ำตาลอินเวอร์ท จากนั้นนำน้ำตาลอินเวอร์ทไประเหยน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ



รูปที่ 31 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และน้ำตาลอินเวอร์ท

———— การผลิตน้ำตาลทราย (Jenkins, 1966)

———— การผลิตน้ำตาลอินเวอร์ท