บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดอุปกรณ์	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	1. Aquatherm water bath shaker	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison N.J., U.S.A.
	2. Controlled environment incubator shaker G-27	
	3. Incubator shaker G-25	
เครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ	High Speed Refrigerated Centrifuge KR-20000T	Kubota Corporation Tokyo, Japan
เครื่องซักผ้า	Washer /spin-dryer ES-32 F1	Sharp corporation Osaka, Japan
เครื่องวัด pH	pH/mV-506	Crison Instrument, S.A.
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก	Laboratory hot plate PC-101	Corning, N.Y.
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง	Spectronic 21	Bausch & Lomb
เครื่องควบคุมอุณหภูมิ	Tempunit TU-16D	Techne (Cambridge) Limited England

016947

ชนิดเครื่องมือ	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องอบสุญญากาศ	VO 4-3	Ogawa Sciki Co.,LTD., Japan
เครื่องโพลาริมิเตอร์	DIP-370	Japan Spectroscopic Co.,LTD.,
ตู้แช่แข็ง	Biofreezer Model 8358 S/N 81314-132	Forma Scientific U.S.A.
เครื่องปั๊มแบบเพอริสตอลติก	1. Peristaltic pump P-3	Pharmacia Fine Chemical Sweden
	2. Amicon Peristaltic Pump CH 2/CH 2A	Amicon corporation
ตะแกรงร่อน	Laboratory Test Sieve Mesh No.16,20,80,100	Endecotts Ltd.,London, England

2. เคมีภัณฑ์

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
สารละลายกลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde 50% in water)	Fluka A.G. Buchs,Switzerland
อัลบูมินจากไข่ (Albumin from eggs)	Wako Pure Chemical Industries, LTD. Japan
โพลิเอทธินลีนไอมีน (Polyethylenimine) 50% aqueous solution.	Sigma
กลูโคส [D(+)-Glucose monohydrate]	Riedel-DE Haen Ag Seelze-Hannover
ฟรักโทส [D(+)-Fructose]	Merck,Germany.
น้ำตาลซูโครส [D(+)-Saccharose]	Fluka,Switzerland.
น้ำตาลซูโครส [น้ำตาลทราย]	พี.พี ประเทศไทย

3. เซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์ยีสต์ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากบริษัทบุญรอดบริวเวอรี จำกัด

4. การเตรียมเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในงานวิจัย

นำเซลล์ยีสต์มาสลัดน้ำเบียร์ออกด้วยเครื่องซักผ้าที่มีความเร็วรอบประมาณ 1200 รอบ/นาที ล้างเซลล์ยีสต์ที่ได้โดยเติมน้ำปราศจากประจุภาค ในอัตราส่วน เซลล์ยีสต์:น้ำปราศจากประจุภาค 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปสลัดน้ำออกด้วยเครื่องซักผ้า ทำตามวิธีนี้ 3 ครั้ง เก็บเซลล์ยีสต์ที่ได้ในกล่องโฟม ประมาณกล่องละ 500 กรัม ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมทรายเพื่อใช้ในการตรึงรูปยีสต์

ทรายที่ใช้เป็นทรายจากแม่น้ำซึ่งนำมาล้างให้สะอาด แล้วร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาดต่าง ๆ คือ 16,20,50,80 และ 100 เมช (mesh) เพื่อคัดขนาด แช่ทรายที่ได้คัดขนาดแล้วในกรดไนตริก นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำปราศจากประจุภาค นำไปอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส

6. การวิเคราะห์แอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูป

6.1 วิเคราะห์ด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์

นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 5 กรัม นน.แห้ง บรรจุในขวดแก้วทรงกรวย เติมสารละลายซูโครส 10% (นน./นน.) ที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 10 มล. บ่ม (incubate) ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (aquatherm water bath shaker) ที่ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จึงนำสารละลายมาอ่านค่ามุมบิด (angular rotation) ด้วยเครื่องโพลาริมิเตอร์ ซึ่งหลอดโพลาริมิเตอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ซม. และยาว8.0 ซม.

คำนวณค่า % conversion ดังสมการ

$$\% \text{ conversion} = \frac{\alpha_0 - \alpha_t}{\alpha_0 - \alpha_2} \times 100$$

α_0 ค่ามุมบิดที่ 0 นาที

α_t ค่ามุมบิดที่ t นาที

α_2 ค่ามุมบิด เมื่อสารละลายซูโครส 10% (นน./นน.) ที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 เปลี่ยนเป็นน้ำตาลอินเวอร์ท 100% โดยนำสารละลายซูโครส 10% (นน./นน.) ดังกล่าว ปริมาตร 15 มล. ซึ่งบรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้น 1.5 มล. นำไปบ่มในอ่างน้ำที่มีเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.2 วัดความสามารถในการเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 5 กรัม นน.แห้ง บรรจุในขวดแก้วทรงกรวย เติมสารละลายซูโครส 10% (นน./นน.) ที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 10 มล. บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายในขวดแก้วทรงกรวยใส่หลอดทดลองต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลให้เหมาะสม เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ก-1)

คำนวณ % conversion ดังสมการ

$$\% \text{ conversion} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น/มล.} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถเกิดขึ้นทั้งหมด/มล.}}$$

คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถเกิดขึ้นทั้งหมด/มล. (ภาคผนวก ก-2)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ตรึงรูป คือ ปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปที่สามารถทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล/นาที ภายใต้สภาวะดังกล่าวมาข้างต้น (Arnold, 1969; Wahced & Shall, 1971; Leemputten & Horisberg, 1974; Monsan, Combes & Alemzadeh, 1984)

7. ค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูป

วัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปตามข้อ 6.2 แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำปราศจากประจุภาค เติมน้ำปราศจากประจุภาคลงในขวดแก้วทรงกรวยปริมาตรเท่ากับสารละลายซูโครสที่ใช้ในการวัดแอคติวิตี บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีทุก ๆ 24 ชม. คำนวณค่าครึ่งชีวิต (ภาคผนวก ก-3)

8. การหาขนาดของเม็ดทรายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์

นำทรายที่ผ่านการคัดขนาดแล้วมาทำการตรึงเซลล์ยีสต์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Puvanakrishnan (Puvnaksishnan et.al,1980) ใส่ทรายลงใน 2.5% กลูตารัลดีไฮด์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0 ในอัตราส่วน ทราย:สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2:1(กรัมนน.แห้ง./มล.)คนแล้วทิ้งไว้ 30 นาทีล้างออกด้วยน้ำปราศจากประจุภาคผสมทรายกับยีสต์ 5%(กรัมนน.แห้ง/มล.)บ่มไว้ 2 ชม. โดยมีการคนเป็นครั้งคราว แล้วนำทรายที่เคลือบด้วยเซลล์ยีสต์เกลี่ยบนตะแกรงลวดเพื่อทำให้แห้งในตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำเซลล์ตรึงรูปที่ได้มาล้างยีสต์ที่มากเกินไปออก โดยแช่ในน้ำปราศจากประจุภาคนาน 6 ชั่วโมง โดยจะทำการเปลี่ยนน้ำทุก ๆ ชั่วโมง แล้วนำเข้าทำแห้งในตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำเซลล์ตรึงรูปมาวัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตามวิธีในข้อ 6.2

9. การตรึงเซลล์ยีสต์บนทราย

ศึกษาวิธีการตรึงรูปยีสต์บนทราย เพื่อคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมดังต่อไปนี้

9.1 การตรึงเซลล์โดยใช้อัลบูมิน และกลูตารัลดีไฮด์ วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Drioli(Drioliet.al. ,1984) วางแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล (factorial completly randomized design) 4^2 โดยแปรผันปริมาณเซลล์ยีสต์ 4 ระดับ คือ 5% , 10% , 15% และ 20%(กรัมนน.แห้ง/มล.)และปริมาณอัลบูมิน 4 ระดับ คือ 2% , 3% , 4% และ 5% (กรัมนน.แห้ง/มล.)

เตรียมเซลล์ตรึงรูป โดยใส่ทรายลงในส่วนผสมที่มีเซลล์ยีสต์, อัลบูมิน และ 1% กลูตารัลดีไฮด์ (มล./มล.) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH.6.0 ในอัตราส่วนทราย:ส่วนผสม 2:1(กรัมนน.แห้ง/มล.) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที คนเป็นครั้งคราว นำทรายที่เคลือบด้วยเซลล์ยีสต์ออกเกลี่ยบาง ๆ บนตะแกรงลวดเพื่อทำให้แห้งในตู้อบสูญญากาศที่ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาล้างเซลล์ยีสต์ที่มากเกินไปออกโดยแช่เซลล์ตรึงรูปในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก ๆ ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทำแห้งในตู้อบสูญญากาศที่ 40 องศาเซลเซียส นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาวัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทส ตามวิธีในข้อ 6.2

9.2 การตรึงเซลล์ยีสต์โดยใช้อะมิโนโพรพิลไทรเอททอกซีไซเลน (3-Aminopropyltriethoxysilane หรือ APTS) ดัดแปลงจากการทดลองของ Thomplinson (Thomplison et.al,1983) โดยแช่ทรายในสารละลาย APTS (APTS 5 มิลลิลิตร + น้ำปราศจากประจุ 95 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วนทราย : สารละลาย APTS 1:1 (กรัมนน.แห้ง/มล.)บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง คนเป็นครั้งคราว แล้วจึงทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำทรายไปแช่ใน 1% กลูตารัลดีไฮด์ (มล./มล.) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาแช่ในยีสต์ 5%(กรัมนน.แห้ง/ปริมาตร)บ่ม 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ทำให้แห้งในตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำเซลล์ตรึงรูปที่ได้มาล้างเซลล์ยีสต์ที่มากเกินพอออกโดยแช่ในน้ำปราศจากประจุ นาน 6 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยนน้ำทุก ๆ ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งในตู้อบสูญญากาศที่ 40 องศาเซลเซียส นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาวัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตามวิธีในข้อ 6.2

9.3 การตรึงเซลล์ยีสต์โดยใช้โพลีเอทธิลีนไอมีน (polyethylenimine หรือ PEI)ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ ดัดแปลงจากของ Yamazaki (Yamazaki,et.al.,1986) และ D'Souza (D, Souza, et,al.,1986) วางแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล (factorial completly randomized design) 2^3 โดยแปรผันปริมาณเซลล์ 2 ระดับ คือ 5% และ 10% (กรัมนน.แห้ง/มล.)ปริมาณกลูตารัลดีไฮด์ 2 ระดับ คือ 1% และ0.1% (มล./มล.) และเวลาในการแช่กลูตารัลดีไฮด์ 2 ระดับ คือ 1 และ 2 ชั่วโมง

เตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยใส่ทรายลงในสารสะลาย 0.3 % PEI pH 7.0 โดยใช้อัตราส่วนของทราย:สารละลาย PEI 2:1 (กรัมนน.แห้ง/มล.) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง โดยคนเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นดูดสารละลาย PEI ออกแล้วเติมเซลล์ยีสต์และกลูตารัลดีไฮด์ลงไปในอัตราส่วน ทราย:ส่วนผสมเซลล์ยีสต์ 2:1(กรัม นน.แห้ง/มล.)คนให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเกลี่ยบางๆ บนตะแกรงลวด แล้วทำให้แห้งในตู้อบสูญญากาศที่ 40 องศาเซลเซียส นำเซลล์ตรึงรูปมาแช่ในน้ำปราศจากประจุนาน 6 ชั่วโมง โดยมีการเปลี่ยนน้ำทุก ๆ ชั่วโมง แล้วเอาไปทำแห้งอีกครั้งในตู้อบสุญญากาศที่ 40 องศาเซลเซียส นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาวัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตามวิธีในข้อ 6.2

10. การหาปริมาณโปรตีนของเซลล์ตรึงรูป

นำเซลล์ตรึงรูปจากแต่ละวิธีที่มีแอคติวิตีดีที่สุดมาหาปริมาณโปรตีน ซึ่งได้ละลายโปรตีนออกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยใช้วิธี Lowry (ภาคผนวก ก-4)

11. การศึกษาคุณสมบัติของอินเวอร์เทสตรึงรูป

11.1 pH ที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสตรึงรูป โดยใช้สารละลายซูโครส 10% (นน./นน.) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่ pH แตกต่างกันคือ ตาเตรทบัฟเฟอร์ pH 2, 2.5 และ ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3, 4, 5 ตามลำดับ และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีที่เกิดขึ้นตามวิธีในข้อ 6.2 สร้างกราฟระหว่าง % conversion/นาที .กรัมของเซลล์ตรึงรูป กับ pH

11.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้งานของอินเวอร์เทสตรึงรูป โดยใช้สารละลายน้ำตาลทราย 10% (นน./นน.) ที่ละลายในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ 30,40,50,60 และ 70 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทสที่เกิดขึ้น ตามวิธีในข้อ 6.2 สร้างกราฟระหว่าง % conversion/นาที.กรัมของเซลล์ตรึงรูป กับ อุณหภูมิ

11.3 ตรวจสอบลักษณะพื้นผิวที่ปรากฏของเซลล์ตรึงรูปโดยใช้ Scanning Electron Microscope

11.4 ความเสถียรของแอคติวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปเมื่อเก็บไว้ในลักษณะแห้งที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส โดยนำเซลล์ตรึงรูปบรรจุในขวดพลาสติคมีฝาปิด เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส) และในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส สุ่มเซลล์ตรึงรูปมาวัดแอคติวิตี ตามวิธีในข้อ 6.2 ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน

12. การผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องด้วยปฏิกรณ์แบบ packed-bed

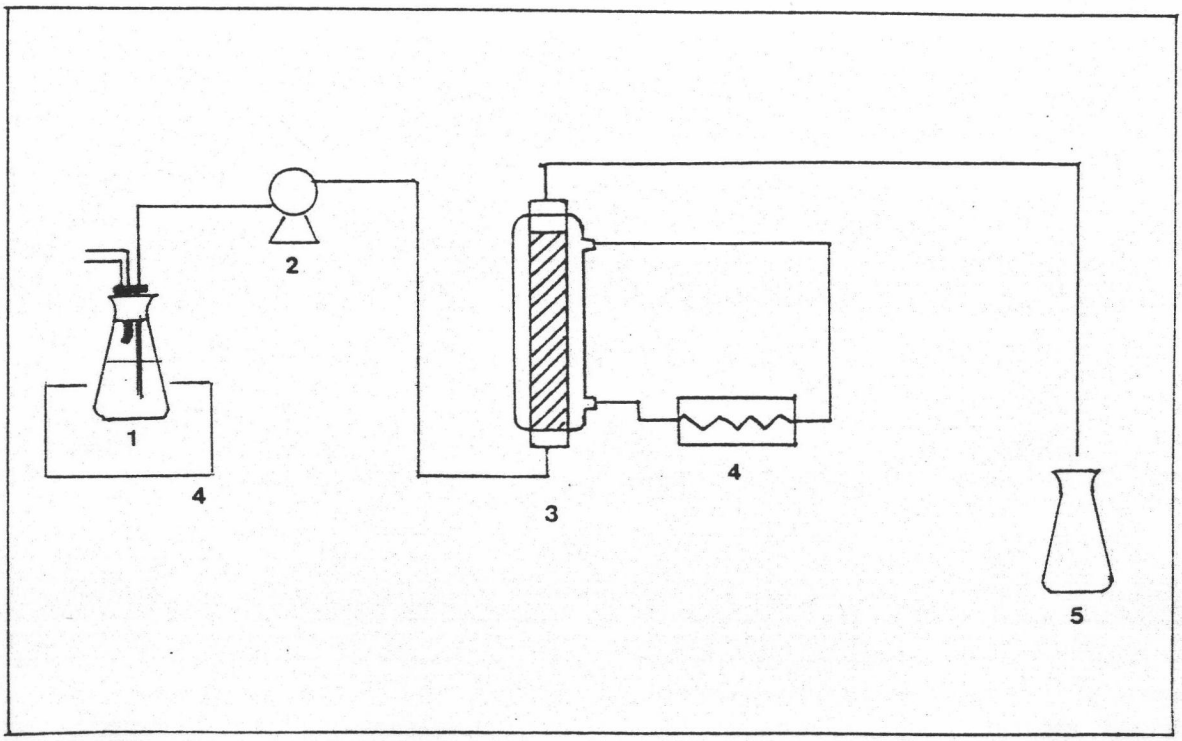
12.1 อัตราการป้อนสารละลายซูโครส และความเข้มข้นของสารละลายซูโครส ในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่อง นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 30 กรัม นน.แห้ง บรรจุในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ป้อนสารละลายซูโครสความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% ที่ละลายในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 โดยป้อนสารละลายซูโครสเข้าทางด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน อุณหภูมิของปฏิกรณ์แบบ packed-bed 40 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 2, 3

สร้างกราฟระหว่าง % conversion ที่ความเข้มข้นของสารละลายซูโครสและอัตราการป้อนต่างๆกัน

12.2 อัตราการป้อนสารละลายซูโครสที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่อง ในระบบไหลย้อนกลับ(recycle) นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 30 กรัม นน.แห้ง บรรจุในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ป้อนสารละลายซูโครสความเข้มข้น 15 % ที่ละลายในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 โดยป้อนสารละลายซูโครสเข้าทางด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ซึ่งต่อแบบไหลย้อนกลับ ดังรูปที่ 4,5 ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน อุณหภูมิของปฏิกรณ์แบบ packed-bed 40 องศาเซลเซียส

สร้างกราฟระหว่าง% conversion กับอัตราการไหลย้อนกลับที่อัตราการป้อนต่างๆ กัน

12.3 ความเสถียรของอินเวอร์เทสตรึงรูปต่อ pH นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 30 กรัม นน.แห้ง บรรจุในปฏิกรณ์แบบ packed-bed วัดแอคติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยใช้สารละลายซูโครส 15 % ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1 มล. ต่อ นาที หลังจากนั้นให้ผ่านสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH แตกต่างกัน คือ 2.5,4,5,7 และ 8 ด้วยสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทส หลังจากผ่านบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆกัน



รูปที่ 2 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลอินเวอร์ทในปฏิกรณ์แบบ packed-bed

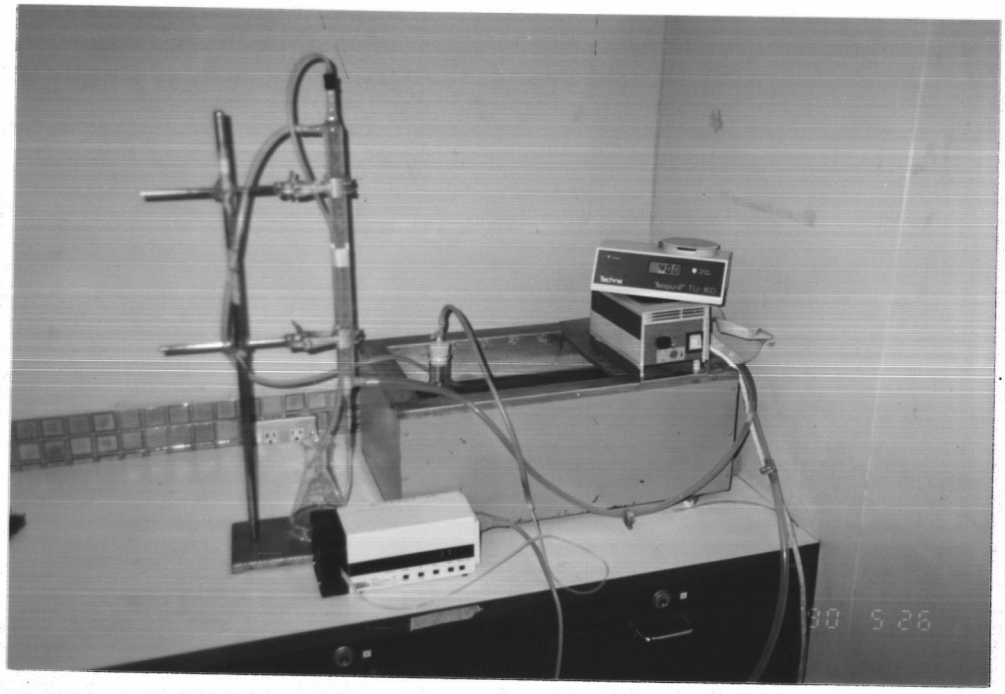
1 สารละลายซูโครส

2 ปั๊มเพอริสแตลติค

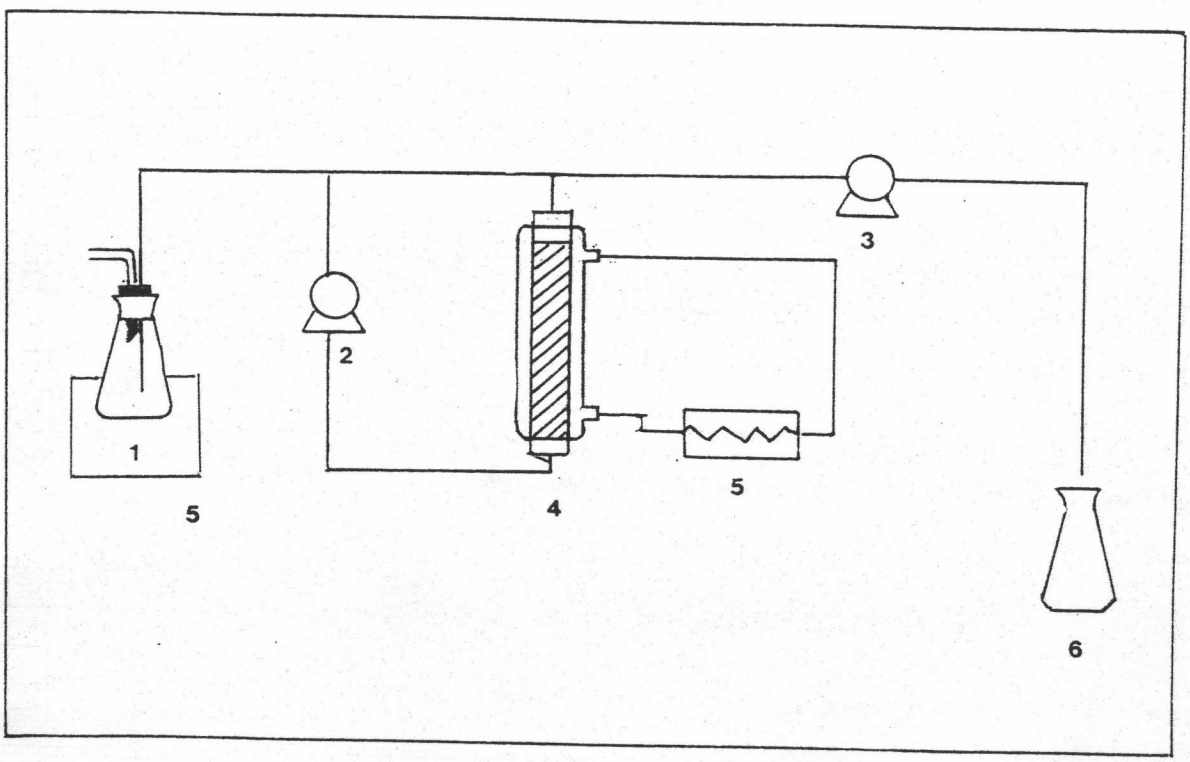
3 ปฏิกรณ์แบบ packed-bed บรรจุด้วยอินเวอร์เทสตรึงรูป

4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

5 สารละลายน้ำตาลอินเวอร์ท



รูปที่ 3 ปฏิกรณ์แบบ packed-bed และอุปกรณ์ประกอบสำหรับผลิตน้ำตาลอินเวอร์ท



รูปที่ 4 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลอินเวอร์ทในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ในระบบไหลย้อนกลับ

1 สารละลายซูโครส

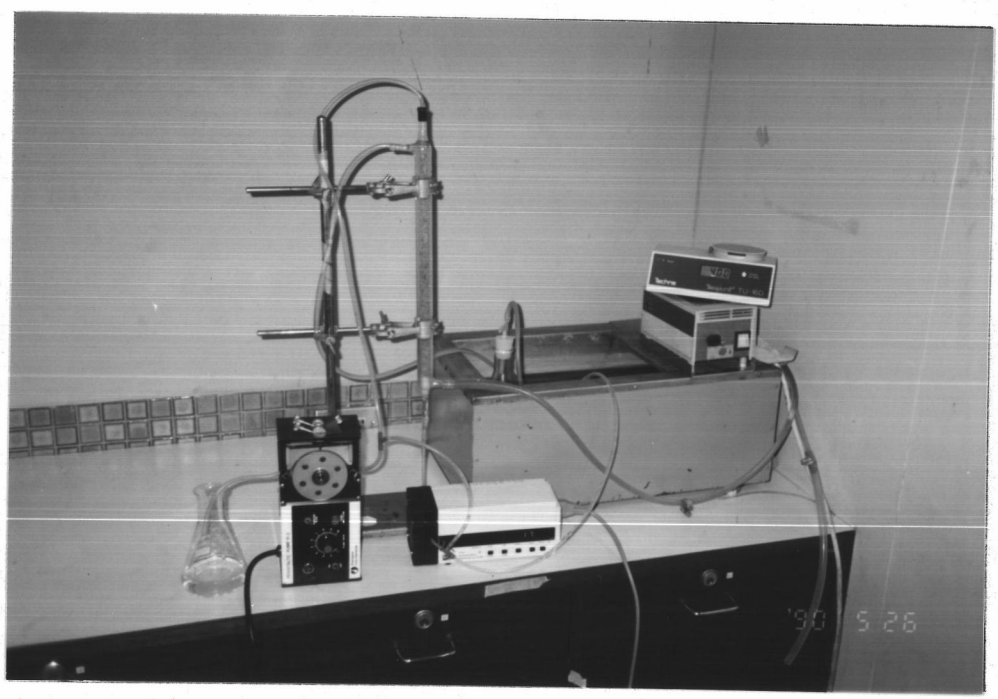
2 ปั๊มเพอริสแตลติค

3 ปั๊มเพอริสแตลติค

4 ปฏิกรณ์แบบ packed-bed บรรจุด้วยอินเวอร์เทสตรึงรูป

5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

6 สารละลายน้ำตาลอินเวอร์ท



รูปที่ 5 ปฏิกรณ์แบบ packed-bed และอุปกรณ์ประกอบสำหรับผลิตน้ำตาลอินเวอร์ท ในระบบไหลย้อนกลับ

เปรียบเทียบแอคติวิตีก่อนและหลังผ่านบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ในรูป % แอคติวิตีสัมพัทธ์

$$\% \text{ แอคติวิตีสัมพัทธ์} = \frac{\text{แอคติวิตีหลังผ่านบัฟเฟอร์ x 100}}{\text{แอคติวิตีก่อนผ่านบัฟเฟอร์}}$$

12.4 การหาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ตรึงรูปในการใช้งานในปฏิกรณ์แบบ packed-bed นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 30 กรัม นน.แห้ง บรรจุในปฏิกรณ์แบบ packed-bed วัดแอคติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทสโดยใช้วิธีเดียวกับในข้อ 12.3 ผ่านสารละลายซูโครสในปฏิกรณ์ประมาณ 5 วัน วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปคำนวณค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์

วิเคราะห์ค่าครึ่งชีวิต เช่นเดียวกับข้อ 7

12.5ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการใช้งานในปฏิกรณ์แบบ packed-bed วิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปโดยวิธีในข้อ 10 แล้วบรรจุเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 30 กรัมนน.แห้ง ผ่านสารละลายซูโครส 15% (นน./นน.) pH 3.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราไหล 1 มล./นาที เป็นเวลา 2 ชม. แล้วนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปในปฏิกรณ์แบบ packed-bed มาวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีน

เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการใช้งานใน % ปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์

$$\%\text{ปริมาณโปรตีนสัมพัทธ์} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนหลังผ่านสารละลายซูโครส}}{\text{ปริมาณโปรตีนก่อนผ่านสารละลายซูโครส}} \text{ x 100}$$

13. ค่า Chemical Kinetics ของอินเวอร์เทสตรึงรูป

13.1 ค่า Chemical Kinetics ของอินเวอร์เทสตรึงรูปแบบไม่ต่อเนื่อง นำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปมาวัดแอคติวิตีของอินเวอร์เทส ตามข้อ 6.2 แต่ใช้สารละลายซูโครสความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 โมลาร์ ที่ละลายในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถสลายซูโครส 1 ไมโครโมล/นาที ในสภาพทดลอง

หาค่าคงที่ของ Michaelis-Menten ที่ปรากฏ [Km(app)] และค่าอัตราเร็วสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยาที่ปรากฏ [Vmax (app)] (ภาคผนวก ก-7) ด้วยวิธี Lineweaver-Burk ทำโดยสร้างกราฟระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยากับส่วนกลับของความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลทราย

13.2 ค่า Chemical Kinetics ที่ปรากฏของอินเวอร์เทสตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์แบบ packed-bed

ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten ที่ปรากฏ [Km(app)] และค่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่ปรากฏ [Vmax(app)]

บรรจุเซลล์ยีสต์ตรึงรูป 30 กรัม นน.แห้ง ในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ป้อนสารละลายซูโครส 7%,10%,15%,20%,25% และ 30% (นน./นน.) ที่ละลายในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.0 เข้าสู่ด้านล่างของปฏิกรณ์แบบ packed-bed ด้วยอัตราเร็ว 1 มล.ต่อ นาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บน้ำตาลอินเวอร์ทที่ไหลจากปฏิกรณ์แบบ packed-bed ทางด้านบน วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดด้วยวิธี DNSA

ศึกษาค่า Km(app) และ Vmax (app) จากสมการ (Wang,Cooney, Demain,Dunnill,Humphrey& Lilly, 1979) (ภาคผนวก ข-7)

$$S_oX - Km(app)\ \ln(1-X) = KE/q$$

สร้างกราฟระหว่าง S_oX กับ $\ln(1-X)$