

การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทนเนสบนผิวทรายในเครื่องปฏิกรณ์  
แบบฟลูอิดไดซ์เบด



นางสาว นฤมล วงศาสุข

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

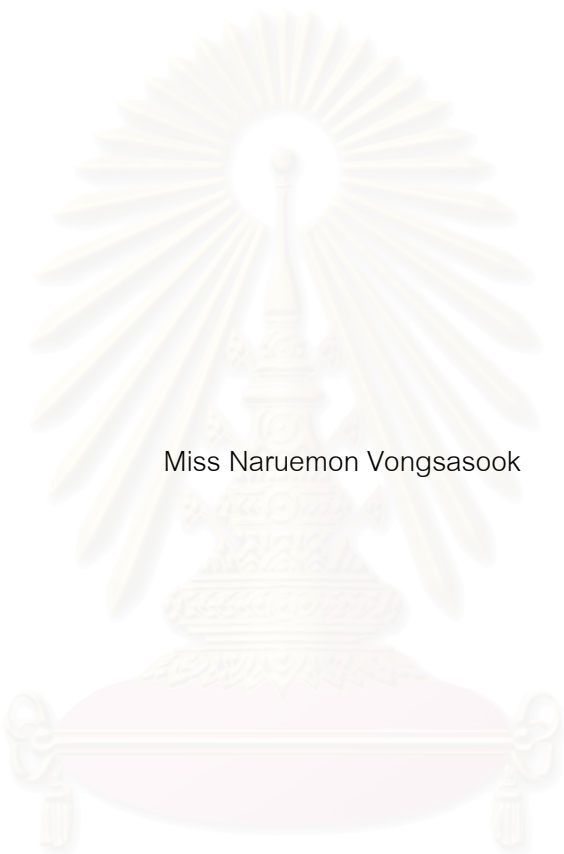
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1331-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION PROCESS OF DEXTRANASE IMMOBILISATION ONTO SAND IN  
FLUIDIZED BED REACTOR



Miss Naruemon Vongsasook

สถาบันวิทยบริการ

A thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1331-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวทรายในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด
โดย	นางสาวนฤมล วงศาสุข
สาขาวิชา	จุลชีวะวิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รักษาการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตสานต์)

รองคณบดีฝ่ายบริหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)

นฤมล วงศาสุข : การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวทรายในเครื่อง  
ปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน อ.ที่ปรึกษาร่วม:ศ.ดร.สมศักดิ์  
ดำรงค์เลิศ,131 หน้า. ISBN: 974-53-1331-9

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp.สายพันธุ์  
SMCU 3-14 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรนเนส บนผิวของทรายที่มีขนาด 16–20  
เมช โดยใช้กลูตาไรลดีไฮด์เป็นสารช่วยตรึง ได้ทำการศึกษิตัวแปรต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการ  
ตรึงรูป ได้แก่ ความเป็นกรดต่าง, ปริมาณเอนไซม์, ความเข้มข้นของกลูตาไรลดีไฮด์, ระยะเวลา  
ในการทำปฏิกิริยา ทั้งในการทดลองระดับขวดเขย่าและในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบด และ  
ได้ทำการเปรียบเทียบสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ พบว่าภาวะที่  
เหมาะสม สำหรับการตรึงรูป คือ ใช้กลูตาไรลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 2.5% (โดยปริมาตร) และ  
เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.778 มก.ต่อมล.ในระดับขวดเขย่า และเอนไซม์เจือจาง 10 เท่าใน  
การตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบด ทำการตรึงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 200 รอบต่อ  
นาที สำหรับการตรึงในขวดเขย่า และอัตราการให้อากาศ 2.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตร  
สารละลายในเครื่องปฏิกรณ์ โดยใช้เวลา 120 นาทีในการตรึงกลูตาไรลดีไฮด์ในขวดเขย่าและ  
60 นาที ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ที่ความเป็นกรดต่าง 7.0 และในขั้นตอนการตรึงรูปใช้  
เวลา 45 นาทีในขวดเขย่า 30 นาทีในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ที่ความเป็นกรดต่าง 4.0 เมื่อทำ  
การเปรียบเทียบสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้กับเอนไซม์อิสระ พบว่า เดกซ์แทรนเนส  
ตรึงรูปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานเท่ากับคือที่ 55°C ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสม  
กับการทำงานเปลี่ยนจาก 4.5 เป็น 5.0 สามารถทำงานได้ที่ช่วงความเป็นกรดต่างกว้างขึ้นที่  
4.5 – 6.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดต่างมากขึ้น และค่า  $K_m$  ของเอนไซม์  
ตรึงมีค่ามากกว่าเอนไซม์อิสระที่ 0.002 และ 0.0009 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อนำมาใช้  
ซ้ำพบว่า มีแอกติวิตีเหลืออยู่ 25% หลังจากการใช้รอบที่ 6

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2547.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4472295123 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

**KEY WORD:** Immobilization / *Dextranase* / *Fluidization*

NARUEMON VONGSASOOK : OPTIMIZATION PROCESS OF DEXTRANASE IMMOBILISATION ONTO SAND IN FLUIDIZED BED REACTOR. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SUTHEP THANIVAVARN, THESIS COADVISOR: PROF. SOMSAK DAMRONGLERD, Ph.D. 131 pp. ISBN 974-53-1331-9

The parameter of immobilization of dextranase such as pH, enzyme concentration, glutaraldehyde concentration and contact time on immobilization of dextranase in shake flask and fluidized bed reactor were studied. The properties of the immobilized dextranase such as optimum pH, temperature, thermal stability, pH stability, Michaelis constant ( $K_m$ ) and reusability were also studied. The optimum conditions for the preparation of immobilized dextranase in fluidized bed reactor were with 2.5% by volume of glutaraldehyde and the maximal enzyme loading on sand was 0.4 to 1.5 mg/g.sand (dry weight). Immobilization was performed at room temperature with agitation speed 200 rpm for shake flask and aeration rate at 2.0 vvm for immobilization in fluidized bed reactor. Times and pH for glutaraldehyde cross-linking were 120 mins in shake flask and 60 mins in reactor at pH 7.0 and immobilizing steps were 45 mins for shake flask and 30 mins in reactor at pH 4.0. Compared with free dextranase, the immobilized dextranase showed similar optimal temperature (55°C), shift in pH optimum, the immobilized dextranase activity was obtained at pH 5.0 while the optimum pH for free dextranase was found to be at pH 4.5. The  $K_m$  value of the immobilized and free dextranase was found to be at 0.002 mM and 0.0009 mM respectively. Following repeated use, the immobilized dextranase retained 25% of initial activity after the sixth hydrolysis cycle.

Department.....Microbiology.....Student's signature.....

Field of study...Industrial Microbiology...Advisor's signature.....

Academic year...2004.....Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชกร ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา และอาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

กราบขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ที่อยู่เคียงข้าง ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้เสมอมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่มีส่วนในการช่วยเหลือตลอดมา  
สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือ ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ซ
สารบัญภาพ .....	ฅ
คำย่อ .....	ญ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. ปรัชศน์วรรณกรรม.....	4
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง .....	36
4. ผลการทดลอง .....	68
5. สรุปและอภิปรายผล.....	108
รายการอ้างอิง .....	116
ภาคผนวก .....	123
ภาคผนวก ก .....	124
ภาคผนวก ข .....	125
ภาคผนวก ค .....	128
ภาคผนวก ง .....	130
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	131

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
2.1	เปรียบเทียบปริมาณอ้อยสดและอ้อยไฟไหม้ที่เข้าหีบตั้งแต่ปีการผลิต 2539/40-2542/43.	6
2.2	องค์ประกอบของน้ำอ้อย.....	10
2.3	จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้.....	19
2.4	ตัวอย่างรายงานการวิจัยที่มีการนำการตรึงมาใช้ในการตรึงเซลล์, เอนไซม์ และสาร ผลิตภัณฑ์ต่างๆ .....	21
4.1	ผลของการหาปริมาณโปรตีนและแอสติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป.....	68
4.2	ผลของการแช่ทรายในกรดแล้วเขย่าในขั้นตอนการเตรียมตัวพุงต่อการตรึงรูปเอนไซม์....	69
4.3	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป.....	94
4.4	ผลของการเสียสภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป.....	104

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 กระบวนการผลิตน้ำตาล.....	8
2.2 การเปลี่ยนซูโครส ให้เป็นเดกซ์แทรน.....	13
2.3 ก. โครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ $\alpha$ -1,6 ปริมาณสูง ข. โครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ $\alpha$ -1,3 ปริมาณสูง.....	15
2.4 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ.....	23
2.5 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังก์ชันน้ำตาลบนตัวพุงกับเอนไซม์.....	24
2.6 การเชื่อมโยงของเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์.....	25
2.7 การกักขังเอนไซม์ไว้ในรูพรุน.....	26
2.8 การกักขังเอนไซม์ให้อยู่ในลูกกลมผนังบางกึ่งซึมผ่านได้.....	26
2.9 ลักษณะของเบดที่มีของไหลต่างชนิดกันไหลผ่านด้วยความเร็วมากกว่าความเร็วต่ำสุดในการเกิดฟลูอิดไอเซชัน.....	29
2.10 รูปแบบการไหลสำหรับฟลูอิดไอซ์เบดแก๊ส-ของแข็ง.....	30
2.11 ลักษณะของเบดนิ่งที่ไม่มีและมีการเคลื่อนที่สัมพันธ์กับผนัง.....	31
2.12 ลักษณะการเกิด wake.....	32
3.1 การเตรียมตัวพุง.....	44
3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปพร้อมกับเดกซ์แทรนเนส.....	45
3.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปจากนั้นจึงค่อยล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป.....	46
3.4 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปจากนั้นเททิ้งโดยไม่ต้องล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป.....	47
3.5 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยไม่มีเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไป.....	48
4.1 แสดงลักษณะการไหลภายในในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไอซ์.....	70
4.2 แสดงทำให้เกิดการฟลูอิดไอซ์แบบ smooth fluidization.....	71
4.3 แสดงทำให้เกิดการฟลูอิดไอซ์แบบ bubbling fluidization.....	71


สารบัญภาพ ( ต่อ )

ภาพประกอบ	หน้า
4.4 ผลของเวลาและการเลือกใช้ปริมาณของทรายที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization และ แบบ bubling fluidization.....	73
4.5 แสดงผลของกลูตารัลดีไฮด์ต่อการตรึงรูปเอนไซม์.....	74
4.6 อัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขวดเขย่า.....	77
4.7 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์.....	78
4.8 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์.....	79
4.9 ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ในขวดเขย่า.....	81
4.10 ปริมาณเดกซ์แทรนเนสเจ็จจางเริ่มต้นที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์.....	82
4.11 ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป.....	84
4.12 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย.....	85
4.13 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส.....	87
4.14 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในขวดเขย่า.....	89
4.15 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์.....	89
4.16 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย.....	90
4.17 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสในขวดเขย่า.....	92
4.18 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพฟลูอิดไดซ์.....	92
4.19 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส.....	93

## สารบัญภาพ ( ต่อ )

ภาพประกอบ	หน้า
4.20 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปและ เดกซ์แทรนเนสอีสระ.....	97
4.21 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปและ เดกซ์แทรนเนสอีสระ.....	98
4.22 ผลของความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเอนไซม์ตรังรูป.....	99
4.23 ผลของความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ตรังรูป.....	100
4.24 ผลของการนำเอนไซม์ตรังรูปและเอนไซม์อีสระมาทำการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที-2000.....	101
4.25 จำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรังรูป.....	103
4.26 การประมาณค่า $K_m$ โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ของ เดกซ์แทรนเนสตรังรูปเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที – 2000 เป็นสับสเตรท โดยทำการป่ม เอนไซม์ตรังรูปที่ 55°C ความเป็นกรดต่าง 5.0.....	106
4.27 การประมาณค่า $K_m$ โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ของ เดกซ์แทรนเนสอีสระเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นสับสเตรท โดยทำการป่ม เอนไซม์ตรังรูปที่ 55°C ความเป็นกรดต่าง 4.5.....	107

## คำย่อ



°ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
μg	=	ไมโครกรัม
μM	=	ไมโครโมลาร์
μl	=	ไมโครลิตร
mM	=	มิลลิโมลาร์
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
U	=	ยูนิต (หน่วยของเอนไซม์)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญทั้งในระบบการเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากอ้อยเป็นพืชหนึ่งที่น่ามาใช้ในการผลิตน้ำตาล ปัจจุบันมีการผลิตและบริโภคน้ำตาลทั่วโลก ประมาณ 130 ล้านตัน คิดเป็นน้ำตาลที่ผลิตจากอ้อยประมาณร้อยละ 65-70 ประเทศไทยนับได้ว่าเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลอันดับที่ 4 ของโลก โดยประเทศที่ผลิตน้ำตาลจากอ้อยที่สำคัญ ได้แก่ บราซิล อินเดีย จีน คิวบา ออสเตรเลีย แอฟริกาใต้ และไทย เป็นต้น ปริมาณส่งออกในแต่ละปีเป็นส่วนที่เหลือจากการบริโภคภายในประเทศ โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญอยู่ในแถบเอเชีย ได้แก่ อินโดนีเซีย เกาหลีใต้ ญี่ปุ่น มาเลเซีย และจีน สำหรับประเทศคู่แข่งที่สำคัญของไทย คือ ออสเตรเลียไทยเป็นประเทศที่ส่งออกน้ำตาลมากเป็นอันดับต้นของโลก รองจากบราซิล สหภาพยุโรป และออสเตรเลีย (ที่มา : <http://www.wangkanai.com/knowledge.htm>)

ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 6 ล้านไร่ โดยปลูกมากในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ผลผลิตรวมทั้งประเทศในปี 2544 เท่ากับ 59 ล้านตัน/ปี หรือมีผลผลิตเฉลี่ย 9 ตัน/ไร่/ปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2544) มีโรงงานน้ำตาลทั้งหมด 46 โรง ซึ่งกระจายอยู่ในภาคต่างๆ ของประเทศ โดยมีกำลังการผลิตรวมเท่ากับ 608,103 ตัน/วัน สามารถผลิตน้ำตาลทรายทั้งประเทศได้ประมาณปีละ 6 ล้านตัน (ที่มา : <http://www.wangkanai.com/cane3.htm>)

ผลผลิตน้ำตาลประมาณร้อยละ 70 เป็นการผลิตเพื่อการส่งออก ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 30 ใช้สำหรับบริโภคภายในประเทศ ซึ่งมีทั้งบริโภคโดยตรงและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ รายได้จากการส่งออกน้ำตาลไปยังต่างประเทศในปี 2544 มีมูลค่า 30,592 ล้านบาท ซึ่งส่วนใหญ่จะส่งออกในรูปแบบน้ำตาลทรายดิบ และการส่งออกในรูปแบบของกากน้ำตาลคิดเป็นมูลค่า 2,684 ล้านบาท ส่วนรายได้ที่เกิดจากการบริโภคภายในประเทศมีมูลค่า 20,000 ล้านบาท ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ประเทศผู้รับซื้อน้ำตาลทรายที่สำคัญจากไทย ได้แก่ อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น จีน มาเลเซีย เกาหลีใต้และ กัมพูชา เป็นต้น (ที่มา : <http://www.wangkanai.com>)

ประโยชน์ของน้ำตาลสำหรับการบริโภคได้แก่แร่ธาตุต่างๆ แร่ธาตุที่มีอยู่มากในน้ำตาลทรายแดง ได้แก่ แคลเซียม โปแตสเซียม โซเดียม และเหล็ก น้ำตาลทรายแดง เป็นอีกแหล่งหนึ่ง ที่มีปริมาณแร่ธาตุ ซึ่งให้คุณประโยชน์แก่ร่างกาย แร่ธาตุเหล่านี้มาจากวัตถุดิบในการผลิต ซึ่งก็คือ "อ้อย" นั่นเอง แม้ว่าน้ำตาลทรายแดงจะมีปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ มากกว่าน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ แต่หลายคนก็ยังเลือกที่จะบริโภคน้ำตาลสีขาว ๆ นอกจากชอบสีที่ดูสะอาด สดใสแล้ว คงเพราะปัจจุบันน้ำตาลทรายขาวมีความบริสุทธิ์มากถึง 99.9% การทำให้บริสุทธิ์ก็ไม่ได้ใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อร่างกายแต่อย่างใด (ที่มา: วังขนายสาร ปีที่ 6 ฉบับที่ 61 ประจำเดือน มีนาคม-เมษายน 2543)

น้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลทราย มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเดกซ์แทรน ติดมาด้วยจากธรรมชาติ จุลินทรีย์เหล่านี้จะเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยให้เป็นเดกซ์แทรนซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเหนียวหนืด ทำให้เกาะกับพื้นผิวต่างๆ ได้ เป็นผลให้จุลินทรีย์อื่นๆ ที่ติดมาสามารถเกาะกับเดกซ์แทรนและใช้น้ำตาลในนั้นเป็นแหล่งอาหาร เมื่อเมตาบอลิซึมน้ำตาลแล้วจะมีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์ออกมาทำให้น้ำอ้อยมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เกิดการบูดเปรี้ยวและเมื่อมีปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยสูงเกินไป เดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะทำให้สารละลายน้ำตาลซูโครสมีความหนืดเพิ่มขึ้นในกระบวนการหีบอ้อยและการทำน้ำตาลให้บริสุทธิ์ นอกจากนั้นเดกซ์แทรนที่เกิดขึ้นยังได้เข้าไปรบกวนกระบวนการผลิตและก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตต่างๆ ของน้ำตาลทราย ทำให้ได้ปริมาณในการผลิตน้อยลง และผลผลิตที่ได้ไม่มีคุณภาพ ซึ่งมีผลกระทบมากต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลทราย สำหรับการแก้ไขนั้น บางโรงงานได้ใช้ความร้อนในการสลายเดกซ์แทรนโดยเมื่อความร้อนไปทำให้เดกซ์แทรนมีโมเลกุลเล็กลงความหนืดก็จะลดลงไปด้วยแต่วิธีนี้ต้องใช้พลังงานมาก หรือบางโรงงานใช้สารเคมีเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนก่อนเข้ากระบวนการผลิต ทำให้ลดปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรนได้ แต่เป็นการเสียค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น ดังนั้นการศึกษานี้ได้เสนอวิธีการนำเดกซ์แทรนเนสมาใช้แก้ปัญหาเดกซ์แทรนเนื่องจาก วิธีนี้เป็นปฏิกิริยาทางเอนไซม์ทำให้มีความจำเพาะปฏิกิริยาที่เกิดไม่รุนแรง มีความเป็นพิษต่ำ และสามารถใช้ในปริมาณที่น้อยแต่ได้ประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์อิสระมีข้อจำกัดที่สามารถใช้ได้เพียงครั้งเดียวไม่สามารถนำมาใช้ได้ใหม่อีก จึงมีผู้พยายามหาวิธีที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ได้ใหม่เพื่อความคุ้มค่า โดยใช้วิธีการตรึงรูปเอนไซม์ในวัตถุประสงค์ดังกล่าว

อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ได้รายงานถึงการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 บนผิวทราเย โดยที่ คุณสมบัติของทราเยนั้นไม่มีพิษและไม่มีอันตราย ทนต่อแรงกระแทกได้ดี มีความคงรูปสูง แม้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดต่างที่รุนแรง หรือ อุณหภูมิสูง ไม่สามารถถูกทำลายได้โดยจุลินทรีย์ อีกทั้งเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย ราคาถูกและสามารถแยกออกจากปฏิกิริยาได้ง่าย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งหวังที่จะหาวิธีที่จะเพิ่มแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปให้ได้สูง และทำการตรึงเดกซ์แทรนเนสให้ได้ในปริมาณที่มากขึ้น โดยทำการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2528) ได้ทำการกลายพันธุ์ให้ผลิตเดกซ์แทรนเนสได้สูง บนตัวพุงที่ใช้ คือ ทราเยแม่น้ำขนาด 16–20 เมช ที่อนันตพงษ์ สุขเกษ ( 2543 ) ได้ศึกษาทางกายภาพของพื้นผิวและขนาดของทราเยแล้วว่ามี ความเหมาะสมที่สุดที่จะมาขยายส่วนการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized Bed Reactor) เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราเยต่อไป

#### วัตถุประสงค์

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการทำการตรึงเดกซ์แทรนเนสในระดับขยายส่วนในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized Bed Reactor) เพื่อหาความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราเยต่อไป

#### ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเดกซ์แทรนเนสในขวดเขย่าเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการตรึงรูประดับขยายส่วนต่อไป
2. ทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด
3. ศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ตรึงได้จากเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราเยต่อไป

## บทที่ 2

### ปริทรรศน์วรรณกรรม

อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลนับว่าเป็นตลาดแรงงานใหญ่ที่มีผู้เกี่ยวข้องทั้งด้านแรงงานตัดอ้อยและแรงงานในโรงงานน้ำตาล ซึ่งรวมการจ้างงานไม่ต่ำกว่า 700,000 คน นอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกมากมายทั้ง อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอ้อยยังสร้างมูลค่าในอุตสาหกรรมต่างๆ อีก เช่น

- กากอ้อย: ใช้ผลิตกระดาษอัด, ใช้ทำปุ๋ยปรับปรุงดิน และทำเชื้อเพลิง
- กากน้ำตาล (Molasses): ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ภายในประเทศ ได้แก่

อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมต อุตสาหกรรมผลิตซอสถั่วเหลือง อุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมผลิตกรดซิตริก ศักยภาพของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของไทย ขึ้นอยู่กับการบริหารและจัดการด้านวัตถุดิบ แม้ว่าประเทศไทยจะเป็นประเทศที่ส่งออกน้ำตาลในอันดับต้น ๆ แต่เมื่อการค้าของโลกมีแนวโน้มที่เปิดเสรีมากขึ้น การแข่งขันย่อมสูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์ถึงศักยภาพการผลิตอ้อยของไทย พบอุปสรรคและปัญหาดังนี้ ปริมาณผลผลิตอ้อยโดยรวมและต่อไร่อยู่ในเกณฑ์ต่ำ ผลผลิตอ้อยที่เพิ่มในแต่ละปี เกิดจากการเพิ่มพื้นที่การปลูกอ้อยและปริมาณการกระจายของฝนที่ดีเป็นหลัก ไม่ได้มาจากการเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตอ้อยของประเทศไทยกับประเทศคู่แข่งจะเห็นได้ว่า ประเทศไทยอยู่ที่ประมาณ 8-9 ตัน/ไร่ ในขณะที่คู่แข่ง อย่างเช่น ประเทศออสเตรเลีย และบราซิลมีผลผลิตโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 15 ตัน/ไร่ ผลผลิตต่องานโดยเฉลี่ยทั้งประเทศเมื่อเทียบกับออสเตรเลียจะน้อยกว่าถึง 70% คือ ผลผลิตน้ำตาลของไทยกับออสเตรเลียนั้นอยู่ในปริมาณที่เท่าๆกัน แต่พื้นที่เพาะปลูกโดยเฉลี่ยของออสเตรเลียน้อยกว่าประเทศไทยประมาณ 50% นอกจากนี้ยังเกิดปัญหาการขาดแคลน พันธุ์ดี ที่เหมาะสมกับพื้นที่การผลิตแต่ละเขต ซึ่งเป็นปัญหาที่เกี่ยวข้องถึงปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น ปัญหาเรื่องความหวาน หรือปริมาณน้ำตาลที่ได้ต่อตันอ้อยอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ เมื่อเทียบกับประเทศคู่แข่ง คือ ประเทศไทย ผลิตน้ำตาลได้ประมาณ 103 กิโลกรัม/ตันอ้อย ในขณะที่ประเทศอื่นๆ ผลิตน้ำตาลได้ 110-115 กิโลกรัม/ตันอ้อย (หรือค่าความหวานโดยเฉลี่ยของประเทศอยู่ที่ 11-12 ซีซีเอส) ในการปลูกอ้อยนั้นเป้าหมายคือการผลิตน้ำตาล

ในส่วนของการซื้อขายอ้อย นอกจากจะซื้อขายกันตามน้ำหนักอ้อยแล้ว จะมีการซื้อขายอ้อยตามคุณภาพความหวานด้วย โดยคุณภาพความหวานวัดเป็น ซีซีเอส (CCS = commercial



cane sugar) (ซีซีเอส หมายถึงน้ำตาลซูโครสที่มีในอ้อยจำนวนหนึ่ง) การวัดซีซีเอส กระทำโดยนำน้ำอ้อยมาวัดด้วยเครื่องมือวัดค่าบริกซ์ (brix) ราคาอ้อยจะผันแปรตามคุณภาพความหวาน อ้อยที่มีความหวานมาก คือมีซีซีเอสสูงก็จะได้ราคาดี โดยค่ามาตรฐานกำหนดที่ 10 ซีซีเอสทุกๆ 1 ซีซีเอสที่เพิ่มขึ้นจากค่ามาตรฐานนี้เกษตรกรจะได้ราคาเพิ่มขึ้นตันละ 30 บาท ดังนั้นจะเห็นได้ว่าค่าความหวานนั้นมีผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกรค่อนข้างมาก ช่วงปลูกอ้อยที่เหมาะสมจะแบ่งตามเขตพื้นที่ที่ปลูกอ้อย ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 เขต คือ

1.เขตชลประทาน จะปลูกในช่วงระหว่างเดือนมกราคม ถึง พฤษภาคม

2.เขตนํ้าฝน สามารถปลูกได้ 2 ช่วง คือ

- ต้นฤดูฝน ตั้งแต่เดือนเมษายน-มิถุนายน นิยมปลูกในพื้นที่ทั่วไป

- ปลายฤดูฝน ตั้งแต่เดือนตุลาคม-ธันวาคม นิยมปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคเหนือบางพื้นที่

เนื่องจากการพื้นที่ในการปลูกอ้อยมีการขยายบริเวณเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงทำให้การจัดการด้านวัตถุดิบต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยว โดยปัจจุบันชาวไร่มีความจำเป็นต้องเผาอ้อยก่อนการตัดเนื่องจากให้ความสะดวกและรวดเร็วในการเก็บเกี่ยว ซึ่งปัญหาจากการเผาอ้อยของเกษตรกรเป็นปัญหาสำคัญมากสำหรับอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย เนื่องจากทำให้ผลผลิตน้ำตาลลดลงอย่างมาก อีกทั้งยังสร้างความเสียหายแก่เครื่องจักรหลายพันล้านบาท

ในช่วงเปิดหีบ เกษตรกรผู้ปลูกอ้อยต่างเร่งรีบที่จะตัดอ้อยส่งเข้าโรงงานจึงมีการเผาอ้อยเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการเก็บเกี่ยว ซึ่งได้มีการเปรียบเทียบปริมาณอ้อยสดและอ้อยไฟไหม้เข้าหีบดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาตามมา ดังนี้

หลังจากการเผาอ้อย จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายหมด ยกเว้นจุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลได้จำพวก *Leuconostoc* spp. ซึ่งได้แก่ *L. dextranicum* และ *L. mersenteroises* (Tsuchiya และคณะ, 1952) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เมื่อเข้ามาในชุดลูกหีบก็จะใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารที่มีความหนืดคล้ายแป้งเปียก คือ เดกซ์แทรน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงที่กว้างมาก ทำให้เกิดภาวะ purity drop ในระหว่างชุดลูกหีบ การต้มเคี่ยวช้ากว่าปกติ ผลึกน้ำตาลมีลักษณะเป็นเข็มซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ อีกทั้งการกรองยังทำได้ยากขึ้น ซึ่งภาวะที่กล่าวมานั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลของโรงงานลดลงเป็นอย่างมาก

ที่มา : วัจนายสาร ฉบับที่ 72 ประจำเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ 2545

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบปริมาณอ้อยสดและอ้อยไฟไหม้ที่เข้าหีบ

ตั้งแต่ปีการผลิต 2539/40-2542/43

ปีการผลิต	อ้อยสด ( ล้านตัน )	ร้อยละ	อ้อยไฟไหม้ ( ล้านตัน )	ร้อยละ
2539/40	13.22	23.52	42.97	76.48
2540/41	17.94	42.51	24.26	57.49
2541/42	23.90	47.74	26.16	52.26
2542/43	22.61	42.56	30.52	57.44

ที่มา : รายงานการผลิตน้ำตาลทรายปีการผลิต 2542/43 ฝ่ายวิชาการและวางแผน ศูนย์บริการการผลิต สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย

#### กระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย

กระบวนการในการผลิตน้ำตาลทรายดิบ สามารถแบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

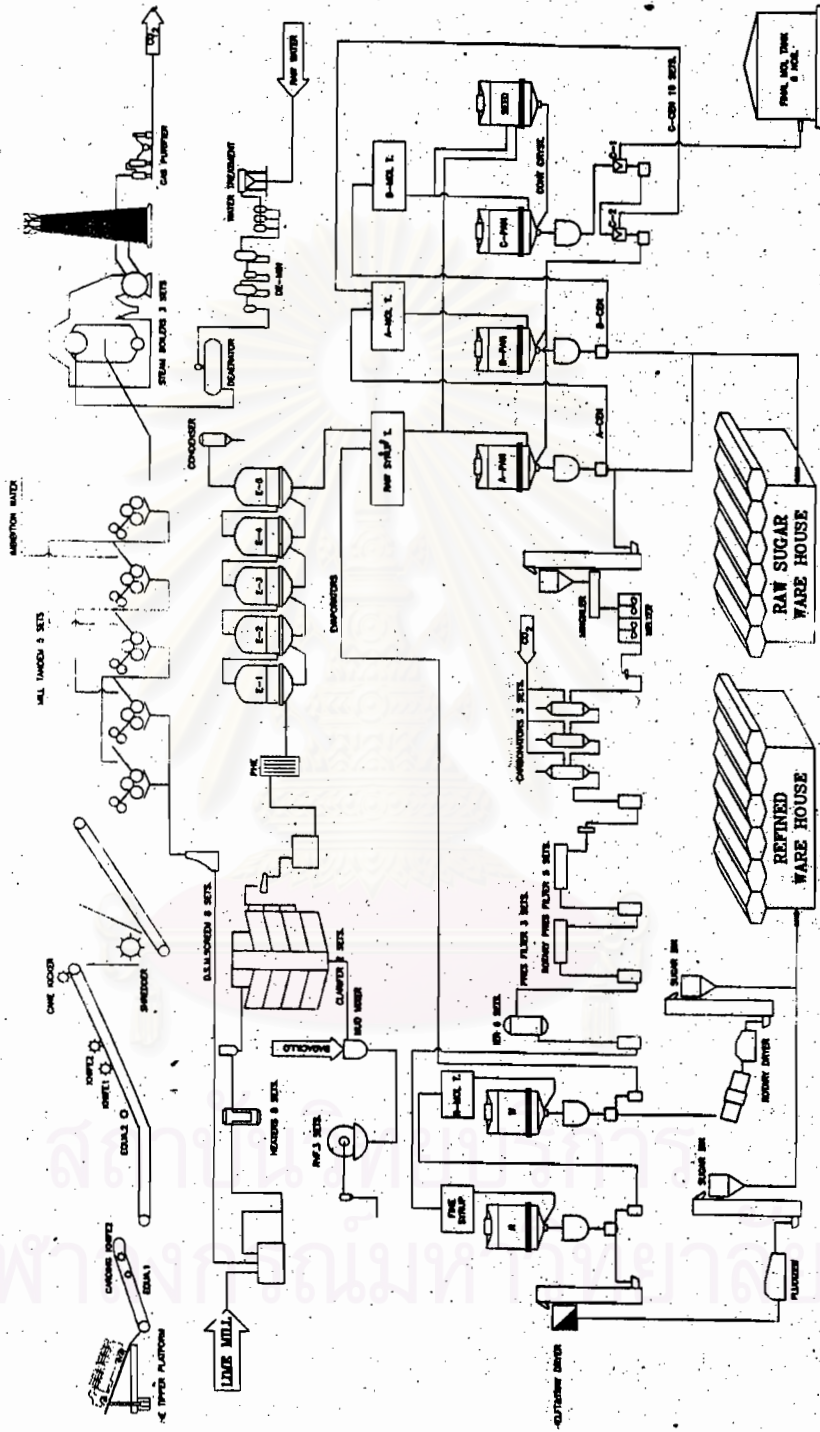
1. กระบวนการสกัดน้ำอ้อย (Juice Extraction): ทำการสกัดน้ำอ้อยโดยผ่านอ้อยเข้าไปในชุดลูกหีบ (4-5 ชุด) และกากอ้อยที่ผ่านการสกัดน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดสุดท้าย จะถูกนำไปเป็นเชื้อเพลิงเผาไหม้ภายในเตาหม้อไอน้ำ เพื่อผลิตไอน้ำมาใช้ในการกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย
2. การทำความสะอาด หรือทำใส่น้ำอ้อย (Juice Purification): น้ำอ้อยที่สกัดได้ทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการทำใส เนื่องจากน้ำอ้อยมีสิ่งสกปรกต่าง ๆ จึงต้องแยกเอาส่วนเหล่านี้ ออกโดยผ่านวิธีทางกล ได้แก่วิธี Defection method คือ การแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยด้วยวิธีการตกตะกอน โดยให้ความร้อนแก่น้ำอ้อยและผสมกับน้ำปูนขาว ผ่านเครื่องกรองต่าง ๆ และวิธีทางเคมี ได้แก่วิธี Sulphitation method คือ การฟอกสีแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งได้จากการเผากำมะถัน และ Carbonation method หมายถึง การฟอกสีแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งได้จากการฟิวส์ก๊าซ (flue gas) ในปล่องเตาหม้อไอน้ำที่ได้จากการเผาหินปูนกับถ่านโค้ก (ฟิวส์ก๊าซ คือ ควันท่อที่ออกจากปล่องซึ่งได้จากการเผากากอ้อย จะมีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 9-12% ใช้ในการตกตะกอนเพื่อผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์)

3. การต้ม (Evaporation): น้ำอ้อยที่ผ่านการทำใสแล้วจะถูกนำเข้าสู่ชุดหม้อต้ม (Multiple Evaporator) เพื่อระเหยเอาน้ำออก (ประมาณ 70%) โดยน้ำอ้อยข้นที่ออกมาจากหม้อต้มลูกสุดท้าย เรียกว่า น้ำเชื่อม (Syrup)
4. การเคี้ยว (Crystallization): น้ำเชื่อมที่ได้จากการต้มจะถูกนำเข้าหม้อเคี้ยวระบบสุญญากาศ (Vacuum Pan) เพื่อระเหยน้ำออกจนน้ำเชื่อมถึงจุดอิ่มตัว ที่จุดนี้ผลึกน้ำตาลจะเกิดขึ้น โดยที่ผลึกน้ำตาล และกากน้ำตาลที่ได้จากการเคี้ยวนี้รวมเรียกว่า เมสเสคิวท (Messecuite)
5. การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifuging): เมสเสคิวทที่ได้จากการเคี้ยวจะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล โดยใช้เครื่องปั่นผลึกน้ำตาลที่ได้นี้จะเป็นน้ำตาลดิบ จากนั้นจึงนำไปอบและบรรจุ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FLOW SHEET FOR RAW-REFINED SUGAR PROCESS



NO. TITLE	DESCRIPTION	SIZE	MATERIAL	REMARKS	DRAWN BY		DATE		SINGBURI SUGAR LIMITED	DPC.No.
					E. MUTHUKUMAR	M/T/M	DATE	DATE		
FLOW DIAGRAM					SCALE	NTS.	FILE	SINGBURI	SB 008-1998	
					APPROVED BY	DATE				

รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตน้ำตาล

ที่มา : โรงงานน้ำตาลสิงห์บุรี

วัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำตาลทรายในประเทศไทยคือ น้ำอ้อย ในน้ำอ้อยนั้นประกอบด้วย น้ำตาลซูโครสและธาตุอาหารอื่นๆ อีกเป็นจำนวนมากดังแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งเพียงพอที่จะทำให้ แแบคทีเรียต่างๆ เจริญได้ดี แแบคทีเรียที่ปะปนมาในน้ำอ้อยโดยเฉพาะอ้อยที่ผ่านการเผาก่อนนำมา หีบเหล่านี้จะก่อให้เกิดความเสียหายหลายประการต่อกระบวนการผลิตน้ำตาล เช่น ปริมาณ น้ำอ้อยลดลง, เกิดเมือกทำให้น้ำอ้อยหนืดขึ้น, เกิดปริมาณกรดเพิ่มขึ้น, มีการอุดตันของท่อเครื่อง กรองและรางส่งน้ำอ้อย, การต้มระเหยน้ำได้ช้าและการเคี้ยวน้ำตาลทำได้ช้า ซึ่งล้วนแต่ทำให้ ผลผลิตของการผลิตน้ำตาลทรายลดลงอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนที่แบคทีเรียเหล่านี้สร้างขึ้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของน้ำอ้อย (Irvine, 1981)

อ้อยที่หีบ (Millable Cane)	ปริมาณเปอร์เซ็นต์
น้ำ	73 – 76
ของแข็ง	24 – 27
ของแข็งที่ละลายได้ ( Soluble Solid )	10 – 16
ไฟเบอร์แห้ง ( Fiber Dry )	11 – 16
องค์ประกอบของน้ำอ้อย	ของแข็งที่ละลายได้ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำตาล ( Sugar )	75 – 92
ซูโครส ( Sucrose )	70 – 88
กลูโคส ( Glucose )	2 – 4
ฟรุคโตส ( Fructose )	2 – 4
เกลือ ( Salts )	3.0 – 4.5
กรดอนินทรีย์ ( Inorganic Acid )	1.5 – 4.5
กรดอินทรีย์ ( Organic Acid )	1.0 – 5.5
กรดคาร์บอกซิลิก ( Carboxylic acid )	1.1 – 3.0
กรดอะมิโน ( Amino acid )	0.5 – 2.5
อินทรีย์สารอื่นๆ ที่ไม่ใช่น้ำตาล	
โปรตีน ( Protein )	0.5 – 0.6
แป้ง ( Starch )	0.001 - 0.050
กัม ( Gum )	0.30 - 0.60
แวกซ์ ไนมัน ฟอสฟาไทด์	0.05 - 0.15
สารอื่นๆ	3.0 - 5.0

เดกซ์แทรนจัดเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลทรายด้วย เนื่องจากในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายนั้น พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Leuconostoc* sp. เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ย่อยเสียหรือเกิดรสเปรี้ยวขึ้น (Tsuchiya และคณะ, 1952) โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการสังเคราะห์แอลฟาไกลูแคนพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเดกซ์แทรน (alpha- glucan polysaccharide : dextran) จากน้ำตาลซูโครส (sucrose) ที่ได้จากแกนอ้อย โดยในน้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลทรายนั้นจะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างเดกซ์แทรนปนเปื้อนติดมาด้วยจากธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยเป็นเดกซ์แทรน (Irvine, 1981) ซึ่งมีลักษณะเหนียวหนืดจึงทำให้เกาะกับพื้นผิวต่างๆได้ดี และเมื่อมีปริมาณเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยสูงเกิน ประมาณ 1000 mg/kg (Brix basis) เดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะไปทำให้สารละลายน้ำตาลซูโครสมีความหนืดเพิ่มขึ้นในกระบวนการโม่และการทำน้ำตาลให้บริสุทธิ์ (milling & refining processes) นอกจากนี้เดกซ์แทรนจะเข้าไปรบกวนกระบวนการผลิตน้ำตาลในอีกหลายๆกระบวนการทำให้เกิดปัญหาในกระบวนการต่างๆของการผลิตน้ำตาลทราย ได้แก่ เครื่องกรองโดยเดกซ์แทรนจะรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่เกิดเป็นอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำ เกิดเป็นตะกอนขึ้น ซึ่งทำให้เกิดการอุดตัน, บริเวณท่อส่งน้ำอ้อยเป็นผลให้อัตราไหลของน้ำอ้อยต่ำลง อีกทั้งเป็นบริเวณที่เหมาะสมในการเกาะของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมาด้วย (บุญส่ง แสงอ่อน, 2525) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารและทำการปลดปล่อยกรดอินทรีย์หลายชนิดออกมา (สันต์ ฉายตระกูล, 2525) โดยกรดอินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ความเป็นกรดของน้ำอ้อยเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว มีกลิ่นและรสชาติเปลี่ยนไป, บริเวณถังทำให้ต้มระเหยน้ำได้ช้าสิ้นเปลืองพลังงานมากขึ้นและในระหว่างการระเหยน้ำนั้นจะทำให้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะไปรบกวนโดยจะเกิดการรวมตัวเป็นผลึก (crystal formation) และเกิดการแยกตัวออกมาของผลึก (crystal separation) ซึ่งจะเป็นผลทำให้เกิดการสูญเสียซูโครสในกากน้ำตาล (molasses) ในตอนท้ายสุด (Tilbury, 1974) ซึ่งจะมีผลให้ปริมาณของผลผลิตที่ได้จากกระบวนการลดลง ซึ่งอาจจำเป็นต้องมีการพักเครื่องเพื่อการทำความสะดวกก่อนที่จะทำการดำเนินการทำการผลิตต่อไป ซึ่งถ้าต้องเสียเวลาทำความสะอาดบ่อยก็จะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต และเสียเวลาในการผลิต ซึ่งเป็นการเสียเปรียบมากในเชิงเศรษฐศาสตร์

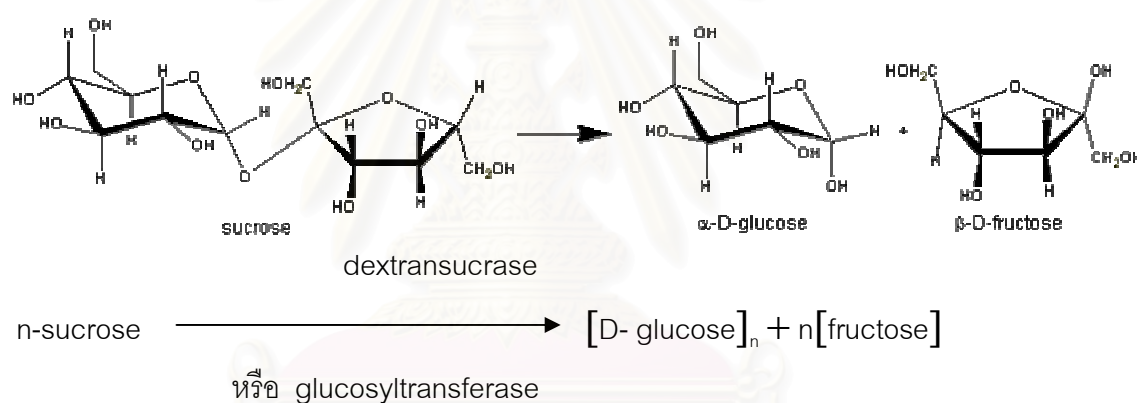
จากปัญหาที่เกิดขึ้น พอจะสรุปปัจจัยที่ทำให้เกิดปัญหานี้ได้ คือ ตัวเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเดกซ์แทรน, น้ำตาลซูโครส, และเดกซ์แทรน จึงมีการแก้ปัญหาในโรงงานน้ำตาลโดยการกำจัดปัจจัยที่เป็นตัวการให้เกิดซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน (sterilization) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและเปลืองพลังงาน, การเติมสารเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งสารที่เติมอาจทำให้น้ำตาลที่ได้มีรสชาติหรือมีสีที่เปลี่ยนไป, น้ำอ้อยที่ตัดได้เข้าสู่กระบวนการผลิตทันทีก่อนที่จะมีการสร้างเดกซ์แทรน แต่ก็มีความเป็นไปได้ยากเนื่องจากปริมาณวัตถุดิบมีจำนวนมาก หรือการกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อย ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสลายตัวกรวดร่วมกับความร้อน (Monsan และ Paul, 1991), การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต, การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Watson และ Woff, 1955) ซึ่งมีราคาแพงไม่คุ้มกับการลงทุนจึงไม่นิยมใช้ วิธีที่น่าสนใจและมีความเหมาะสมที่นิยมใช้ในปัจจุบันนี้ คือ การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยวิธีนี้เป็นปฏิกิริยาทางเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนสูง ปฏิกิริยาเกิดในสภาวะที่ไม่รุนแรง มีความเป็นพิษต่ำและใช้ปริมาณน้อยแต่ได้ผลสูง (Imrie และ Tilbury, 1972) แต่ในการใช้เอนไซม์อิสระนั้นมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เนื่องจากใช้ได้เพียงครั้งเดียวแล้วไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ดังนั้นจึงมีผู้พยายามหาวิธีที่จะนำเอนไซม์กลับมาใช้ได้ใหม่อย่างคุ้มค่า จึงมีการศึกษาถึงการนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้เพื่อที่จะสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้



### เดกซ์แทรน (dextran)

เดกซ์แทรนเป็นชื่อโดยทั่วไปของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยได้แก่ ดี-กลูโคส (D-glucose) มีลักษณะเหนียวหนืด ละลายน้ำได้ยาก เกิดจากการทำงานของเดกซ์แทรนซูโครส (dextranucrase) หรือ กลูโคซิลทรานสเฟอริส (glucosyltransferase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) โดยสารชักนำการสร้างเดกซ์แทรนได้แก่ ซูโครส ในภาวะที่มีซูโครส แบคทีเรียจะผลิตกลูโคซิลทรานสเฟอริสมาทำการเปลี่ยนซูโครส ให้เป็นเดกซ์แทรน แล้วขับออกมานอกเซลล์ พร้อมทั้งปล่อยฟรุคโตสอิสระออกมา ดังแสดงในรูปที่ 2.2

ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Schachtete, 1975)

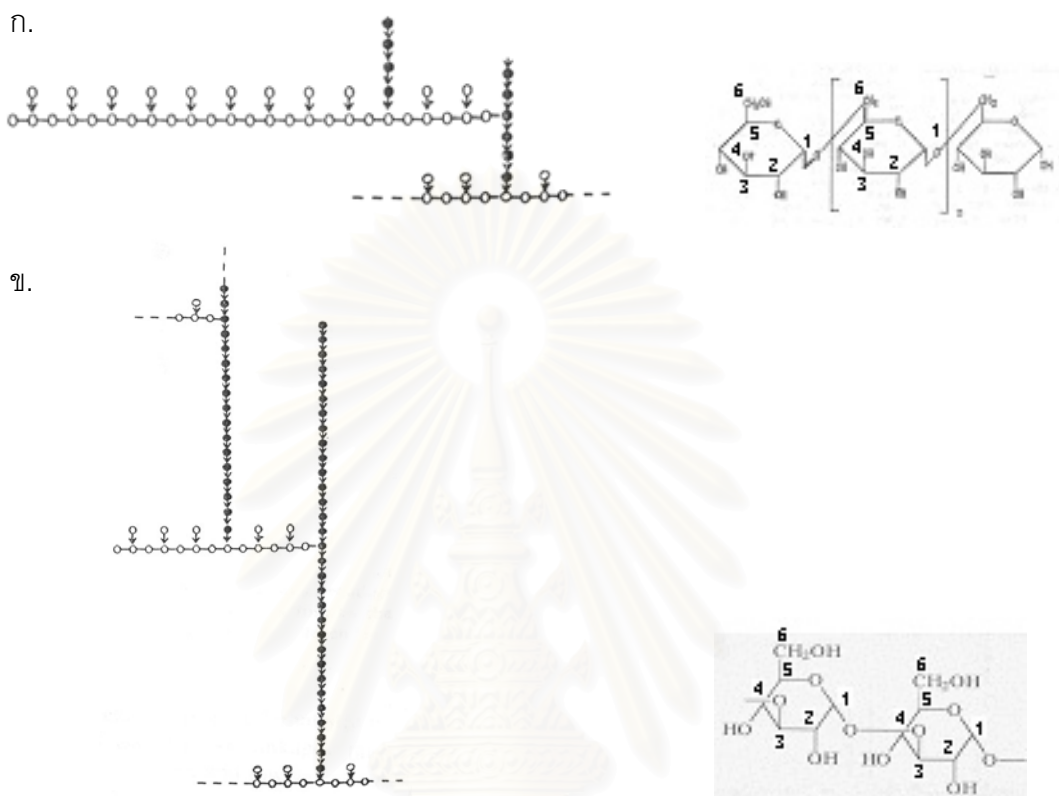


รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนซูโครส ให้เป็นเดกซ์แทรน

เดกซ์แทรนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีสมบัติทางเคมี และทางกายภาพแตกต่างกัน เช่น ความเหนียวหนืด, ความสามารถในการละลายน้ำ และสัดส่วนของพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งโดยปกติเดกซ์แทรนจะประกอบด้วยพันธะไกลโคไซด์แบบ  $\alpha$ -1,6 และ  $\alpha$ -1,3 เป็นส่วนใหญ่ พันธะ  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,2 เป็นส่วนน้อย ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (Jeanes และคณะ, 1950) ขนาดโมเลกุลและชนิดของพันธะจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายน้ำของเดกซ์แทรน โดยยิ่งขนาดโมเลกุลใหญ่และสัดส่วนของพันธะไกลโคไซด์แบบ  $\alpha$ -1,3 มากจะยิ่งละลายน้ำได้ยาก โดยเดกซ์แทรนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. เดกซ์แทรนที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble dextran) ซึ่งมีพันธะ  $\alpha$ -1,6 ในปริมาณมาก ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของกลูโคซิลทรานสเฟอไรส (sucrose: 1,6- $\alpha$ -D-glucan 3- $\alpha$ - and 6- $\alpha$ -glucosyltransferase) ที่สังเคราะห์เดกซ์แทรนพันธะ  $\alpha$ -1,6 ปริมาณมาก (Lewicki และคณะ , 1971)
2. เดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (water insoluble dextran) ซึ่งมีพันธะ  $\alpha$ -1,3 ในปริมาณมาก ถูกสังเคราะห์โดยการทำงานของกลูโคซิลทรานสเฟอไรส (sucrose:1,3- $\alpha$ -D-glucan 3- $\alpha$ -glucosyltransferase) ที่สังเคราะห์เดกซ์แทรนพันธะ  $\alpha$ -1,3 ปริมาณมาก (Guggenheim และ Newbrun, 1969)

ในปัจจุบันมีการผลิตเดกซ์แทรนในทางการค้ามากมาย โดยมีให้เลือกตามขนาดของโมเลกุลและการใช้งาน เช่น เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เติมน้ำในไอศกรีม เบเกอรี่ หรือลูกอม ช่วยให้เกิดความนุ่มของเนื้อสัมผัส เดกซ์แทรนที่ใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งใช้ในการเพิ่มปริมาตรของโลหิตในผู้ป่วยที่สูญเสียน้ำจากการถูกไฟครอกโดยไม่รบกวนระบบของแอนติเจน-แอนติบอดีที่ก่อให้เกิดการตกตะกอนของเลือด, เดกซ์แทรน T-2000 (น้ำหนักโมเลกุล 2,000,000), เดกซ์แทรน T-40 (น้ำหนักโมเลกุล 40,000) และเดกซ์แทรน T-20 (น้ำหนักโมเลกุล 20,000) เป็นต้น โดยเดกซ์แทรนที่ผลิตในทางการค้าทั้งหมด สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F ซึ่งโครงสร้างของเดกซ์แทรนที่เชื่อมดังกล่าวผลิตขึ้นประกอบด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,6 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ โดยอีก 5 เปอร์เซ็นต์เป็นพันธะ  $\alpha$ -1,3 (Wilham และคณะ, 1955)



รูปที่ 2.3 ก. โครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ  $\alpha$ -1,6 ปริมาณสูง

ข. โครงสร้างของเดกซ์แทรนพันธะ  $\alpha$ -1,3 ปริมาณสูง

(O แทนหน่วยกลูโคสในสาย  $\alpha$ -1,6 กลูแคน, — พันธะ  $\alpha$ -1,6 ไกลโคไซด์, ● หน่วยกลูโคสในสาย  $\alpha$ -1,3 กลูแคน, ↓ พันธะ  $\alpha$ -1,3 ไกลโคไซด์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากกลูโคซิลทรานสเฟอไรสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซูโครสเป็นเดกซ์แทรน โดยจะไม่เร่งปฏิกิริยาการต่อสายยาวของกลูโคสอิสระหรือกลูโคสจากน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดอื่น (Jordan และ Keyes, 1966) และด้วยความเหนียวหนืดของเดกซ์แทรนนี้เองทำให้เดกซ์แทรนได้รับความสนใจและศึกษาใน 2 แง่มุมดังนี้

### 1. การเกิดคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของฟันผุ

แบคทีเรียในช่องปากกลุ่ม Mutans Streptococci สามารถสังเคราะห์เดกซ์แทรนจากซูโครสได้ โดยเดกซ์แทรนที่ Mutans Streptococci สังเคราะห์จะประกอบด้วยทั้งเดกซ์แทรนที่ละลายน้ำได้ (ซึ่งมีพันธะ  $\alpha$ -1,6 ปริมาณสูง) และเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (ซึ่งมีพันธะ  $\alpha$ -1,3 ปริมาณสูง) โดยเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้นี้เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดการรวมกลุ่มและเกาะติดบนผิวฟันของแบคทีเรีย (Ebisu และคณะ, 1974) ได้ศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรนที่ไม่สามารถละลายน้ำได้จาก *Streptococcus mutans* OM7 176 พบว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเดกซ์แทรนพันธะ  $\alpha$ -1,3 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นพันธะ  $\alpha$ -1,6

### 2. อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย (sugar cane industry)

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากอ้อยถือเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ของประเทศ ในขั้นตอนของการหีบอ้อยจะมีการปนเปื้อนเชื้อกลุ่ม *Leuconostoc* spp. เช่น *Leuconostoc dextranicum* และ *Leuconostoc mesenteroides* ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนที่มีพันธะ  $\alpha$ -1,6 เป็นส่วนใหญ่จากซูโครสที่มีอยู่ในน้ำอ้อยได้ เดกซ์แทรนที่ผลิตจากแบคทีเรียเหล่านี้ เมื่อจับกับพื้นผิวท่อส่งน้ำอ้อยในโรงงาน จะทำให้เกิดการอุดตัน ทำให้อัตราการไหลและการกรองต่ำลงหรือหยุดชะงัก (Bennett, 1973) อาจทำให้เกิดผลึกของน้ำตาลซ้ำหรือไม่สมบูรณ์ (Imrie และ Tilbury, 1972) นอกจากนี้ความเหนียวของเดกซ์แทรนยังทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมาในน้ำอ้อยถูกยึดไว้ และเจริญโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารแล้วปลดปล่อยกรดอินทรีย์ที่เกิดจากการเมตาบอลิซึมออกมา (Celestine และ Parfait, 1988) ทำให้ความเป็นกรดของน้ำอ้อยเพิ่มขึ้น ทำให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว มีกลิ่น ทำให้คุณภาพของน้ำตาลต่ำลง Imrie และคณะ, 1972 รายงานว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท (sugar beet) โดยซูโครสส่วนหนึ่งจะสูญหายไป พร้อมทั้งมีการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะคล้ายเมือก ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

## เดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกตามระบบการเรียกเอนไซม์ว่า alpha-1,6-glucan-6-glucanohydrolase, E.C.3.3.1.11 ซึ่งเอนไซม์นี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,6 ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยของกลูโคสบนแกนหลักและส่วนที่แตกแขนงของเดกซ์แทรน เดกซ์แทรนเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการการชักนำ (inducible enzyme) และมีความจำเพาะต่อพันธะเป็นอย่างมาก สามารถแบ่งเดกซ์แทรนเนสออกเป็น 2 ชนิดตามความจำเพาะในการสลายพันธะ ได้แก่ เดกซ์แทรนเนส ( $\alpha$ -1,6-glucanase, EC 3.2.1.11) ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ  $\alpha$ -1,6 บนสายเดกซ์แทรน และเดกซ์แทรนเนส ( $\alpha$ -1,3-glucanase, EC 3.2.1.59) ซึ่งจำเพาะต่อพันธะ  $\alpha$ -1,3 บนสายเดกซ์แทรน

โดยการทำงานของเดกซ์แทรนเนสในการสลายพันธะของเดกซ์แทรนสามารถทำได้ 2 แบบ คือ

1. Exo-dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายรีดิวซ์ของสายของเดกซ์แทรน เป็นการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่คือกลูโคส
2. Endo-dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่จุดใดจุดหนึ่งในสายของเดกซ์แทรน ทำให้ได้พอลิเมอร์ของน้ำตาลในขนาดต่างๆแล้วแต่ความห่างระหว่างแต่ละจุดตัด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายอาจเป็น โอลิโกเมอร์ (oligomer), ไดเมอร์ (dimer) หรือโมโนเมอร์ (monomer) ของกลูโคส

เดกซ์แทรนเนส ( $\alpha$ -1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase; E.C.3.3.1.11) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะ  $\alpha$ -1,6 ภายในสายเดกซ์แทรนทำให้โมเลกุลของเดกซ์แทรนมีขนาดเล็กลง และมีผลทำให้ความหนืดลดลงด้วย (Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) เดกซ์แทรนเนสโดยทั่วไปที่ผลิตจากราจะย่อยพันธะ  $\alpha$ -1,6 และเป็นการตัดแบบ endo สายเดกซ์แทรนที่ถูกย่อยแล้วจะมีขนาดเล็กลง มักพบอยู่ในรูปของโอลิโกเมอร์ ไดเมอร์ หรือโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส แต่ส่วนมากอยู่ในรูปของน้ำตาลไอโซมอลโตส

## จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนสสามารถพบได้ในแหล่งต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด และจากจุลินทรีย์ต่างๆ ทั้งรา ยีสต์ แอคติโนมัยซิส และแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 2.3 แบคทีเรียในช่องปากจำนวนมากสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ (Johnson, 1990) โดยใช้ในการสลายพันธะของเดกซ์แทรนในคราบฟันเพื่อนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์สำหรับเมแทบอลิซึม (Russell และคณะ, 1992 และ Tao และคณะ, 1993)

ราเป็นจุลินทรีย์สำคัญที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ในปริมาณที่สูงมากกว่าแบคทีเรีย (Sun และคณะ, 1988) และพบว่าราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในเชิงพาณิชย์ (Sidebotham, 1974) แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการป้องกันฟันผุกับคนได้ เนื่องจากเดกซ์แทรนที่ราผลิตได้นั้นมักปนเปื้อนด้วยสารแอฟลาทอกซิน และมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ เช่น กลูแคน ซึ่งอาจก่อให้เกิดการแพ้ได้ (Leach, 1969) จึงมีการใช้เฉพาะในการแก้ปัญหาเดกซ์แทรนในโรงงานน้ำตาลเท่านั้น

จากปัญหาที่เกิดขึ้นภายในโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรน จึงได้มีการค้นคว้าหาวิธีกำจัดเดกซ์แทรนออกไปจากระบบการผลิตน้ำตาลทรายโดยใช้เดกซ์แทรนเนส เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและไม่ก่อให้เกิดปัญหาอื่นๆตามมาในขั้นตอนของการผลิตน้ำตาล ทำให้มีการผลิตเดกซ์แทรนเนสออกมาในรูปแบบเชิงการค้า แต่ทั้งนี้ก็มีข้อจำกัดของการนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ นั่นคือ ราคาที่ค่อนข้างสูงและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เพียงครั้งเดียว ดังนั้นจึงมีผู้ที่พยายามคิดค้นหาวิธีการนำเอนไซม์ไปใช้อย่างคุ้มค่า และวิธีที่น่าสนใจและเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบัน ได้แก่ การตรึงรูปเอนไซม์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนส

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย	
<i>Acromobacter sp.</i>	Sawei และคณะ, 1974
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Iwai และคณะ, 1996
<i>Bacillus circulans</i>	Okami และคณะ, 1980
<i>Bacillus megaterium</i>	Zevenhuizen, 1968
<i>Bacillus subtilis</i>	Zevenhuizen, 1968
<i>Bacteroides sp.</i>	Staat และคณะ, 1973
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	Igarashi และคณะ, 1998
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	Igarashi และคณะ, 1998
แอคทีโนมัยซีต	
<i>Bacteroides ochraceus</i>	Schachtele และคณะ, 1975
<i>Bacteroides oralis</i>	Takahashi, 1982
ยีสต์	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Holbrook และ Mcmillan, 1977
รา	
<i>Penicillium aculeatum</i>	Madhu และ Prabhu, 1985
<i>Penicillium funiculosum</i>	Chalet และ คณะ, 1970
<i>Penicillium lilacinum</i>	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
<i>Penicillium luteum</i>	Fukumoto, 1971
<i>Penicillium minioluteum</i>	Mizuno และ คณะ, 1999
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991
<i>Penicillium roquefortii</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981
<i>Penicillium verruculosum</i>	Whetley และ Moo-Yong, 1977
<i>Spicaria sp.</i>	Yamaguchi และ Gocho, 1973
<i>Spirotichum asteroides</i>	Hattori และ Ishibashi, 1981

### การตรึงรูปเอนไซม์ ( Enzyme Immobilization )

การตรึงรูปเอนไซม์ คือ การจำกัดเอนไซม์ให้อยู่ในขอบเขตที่จำกัด แต่ยังคงมีสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ อีกทั้งยังพบว่า การตรึงรูปเอนไซม์ทำให้เอนไซม์มีสมบัติที่ดีขึ้นหลายประการ เช่น สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก,นำไปใช้ในกระบวนการผลิตสามารถทำในระบบต่อเนื่องได้, สามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ง่าย และเอนไซม์บางชนิดหลังจากตรึงรูปแล้ว อาจมีสมบัติบางประการเปลี่ยนไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงขึ้น เก็บรักษาได้ง่ายและมีอายุการใช้งานได้นานขึ้น มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากขึ้น เป็นต้น องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ ตัวพวยง และวิธีการที่ทำให้เอนไซม์ติดยึดกับตัวพวยง ซึ่งได้มีงานวิจัยที่มีการนำการตรึงมาใช้มากมายดังแสดงในตารางที่ 2.4



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างรายงานการวิจัยที่มีการนำการตรึงมาใช้ในการตรึงเซลล์, เอนไซม์ และสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ

จุลินทรีย์	เอนไซม์ / สารผลิตภัณฑ์	ตัวพุงที่เลือกใช้	สารเคมีช่วยตรึง	เอกสารอ้างอิง
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ethanol	polyamide	-	Oliveira และคณะ, 1997
-	urease	chitosan beads	glutaraldehyde	Chen และ Chiu, 1999
<i>Aspergillus awamori</i> and <i>Saccharomyces pastorianus</i>	ethanol	cellulose	-	Fujii และ คณะ, 2001
anaerobic sludge	-	chitosan	lignosulfonate	Tartakovsky และคณะ, 1998
yeast cells	urease	vermiculite	glutaraldehyde	Anita และ Zue, 1997
<i>Candida rugosa</i>	-	wool	glutaraldehyde	Krastanov และ Cabral, 1997
<i>Pseudomonas isoamylase</i>	lipase	polymer	-	Mojovic และคณะ, 1998
<i>Penicillium funiculosum</i>	ตรึงเซลล์	polysaccharide matrices	-	Jinn-Tsyy และคณะ, 1998
<i>Penicillium funiculosum</i>	dextranase	chitosan	glutaraldehyde	Abdel-Naby และคณะ, 1999
<i>Penicillium aculeatum</i>	dextranase	bentonite	-	Madhu และ Prabhu, 1985
<i>Penicillium sp.</i> SMCU 3-14	dextranase	calcium alginate	-	นุสรุา เจริญกิจพิวี, 2539

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่มีการรายงานไว้

ข้อจำกัดของเอนไซม์อิสระที่ทำให้มีแนวคิดหันมาใช้เอนไซม์ตรึงรูปตาม  
ปราณี อ่านเปรื่อง (2535) ได้แก่

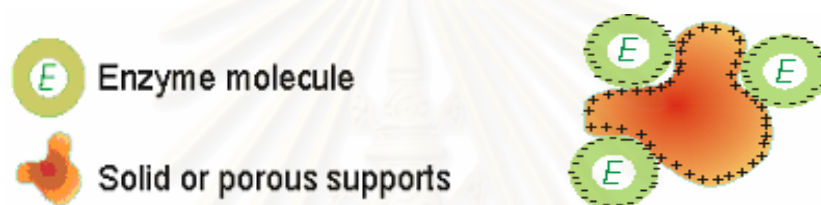
1. เอนไซม์อิสระไม่เสถียร
2. เอนไซม์อิสระนำมาใช้งานได้เพียงครั้งเดียว
3. เมื่อนำเอนไซม์อิสระผสมลงในสารละลายซับสเตรตและผลผลิต ทำให้แยกเอนไซม์ออกมาไม่ได้
4. เอนไซม์อิสระส่วนใหญ่ละลายน้ำ และในสารละลายได้ จึงนำมาใช้ในลักษณะ solid catalyst ไม่ได้ ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่างๆได้
5. เอนไซม์อิสระมีต้นทุนสูง
6. เอนไซม์อิสระอาจก่อพิษต่อผู้ใช้ หากสัมผัสในปริมาณมาก
7. เอนไซม์อิสระในเซลล์จุลินทรีย์ต้องผ่านกระบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้งาน
8. เอนไซม์อิสระที่เติมลงไปในอุตสาหกรรมที่ต้องระเหยน้ำออกในขั้นสุดท้าย จะไปเพิ่มปริมาณน้ำ ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานในการระเหยเอนไซม์อิสระที่เติมลงไปด้วย
9. เอนไซม์อิสระมีข้อจำกัดทางภาวะในการใช้งานสูง (reaction condition)

ข้อดีของการตรึงรูปเอนไซม์ ได้แก่

1. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากระบบที่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย
2. สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก
3. สามารถนำไปใช้ในระบบต่อเนื่องได้
4. ทำให้สมบัติบางประการดีขึ้น เช่น ความเสถียรต่อความร้อน, การเก็บรักษา, ช่วงความเป็นกรดต่าง, ความจำเพาะกับซับสเตรต เป็นต้น

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์สามารถแบ่งได้ 4 ประเภทหลักตาม Goel,1994 ดังนี้  
**การตรึงรูปเอนไซม์กับตัวพยุ่ง (Carrier Binding) แบ่งเป็น 4 แบบ ได้แก่**

1. **การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุ่งโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ (Physical Adsorption)** ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โดยระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุ่งจะมีแรงกระทำกันอย่างอ่อนๆ เกิดแรงดึงดูดได้หลายแบบ เช่น แรงแวลเดออร์วาล พันธะไฮโดรเจน โดยวิธีนี้เกิดได้ง่ายไม่ซับซ้อน ภาวะการตรึงไม่รุนแรง ทำให้เกิดความเสียหายกับเอนไซม์น้อย จากการที่แรงดึงดูดที่เกิดขึ้นไม่ค่อยแข็งแรงดังนั้น เอนไซม์จึงถูกชะออกจากตัวพยุ่งได้ง่ายเมื่อความเป็นกรดต่างหรืออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย



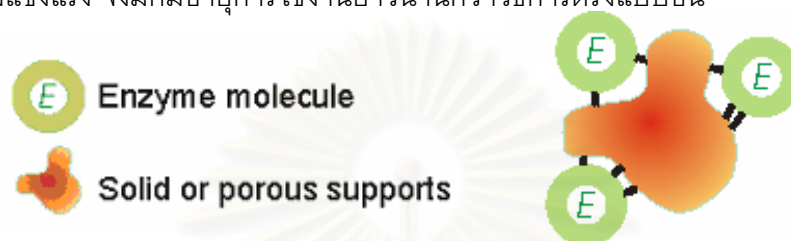
**รูปที่ 2.4** การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุ่งโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ

ที่มา : <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/immmethod.html>

การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุ่งโดยอาศัยพันธะไอออนิก (Ionic Bonding) เกิดจากอะตอม 2 อะตอมมารวมกันโดยการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากอะตอมหนึ่งไปยังอีกอะตอมหนึ่ง โดยเป็นพันธะที่เกิดได้ง่ายดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์คงแอกติวิตีไว้ได้สูง แต่แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุ่งอ่อน เอนไซม์จึงสามารถหลุดออกจากตัวพยุ่งได้ง่าย เมื่อเป็นการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง

สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยพันธะโควาเลนต์ (Covalent Bonding) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 วิธีนี้เป็นการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังก์ชันัลบนตัวพุงกับเอนไซม์ ซึ่งเป็นการเชื่อมแบบสุ่ม ทำให้ควบคุมไม่ได้ ดังนั้นอาจจะไปมีผลกระทบต่อบริเวณที่ทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ไม่สามารถไปจับกับซับสเตรตได้ จึงมีผลลดแอกติวิตีของเอนไซม์ แต่วิธีนี้การจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงค่อนข้างแข็งแรง จึงมักมีอายุการใช้งานยาวนานกว่าวิธีการตรึงแบบอื่น



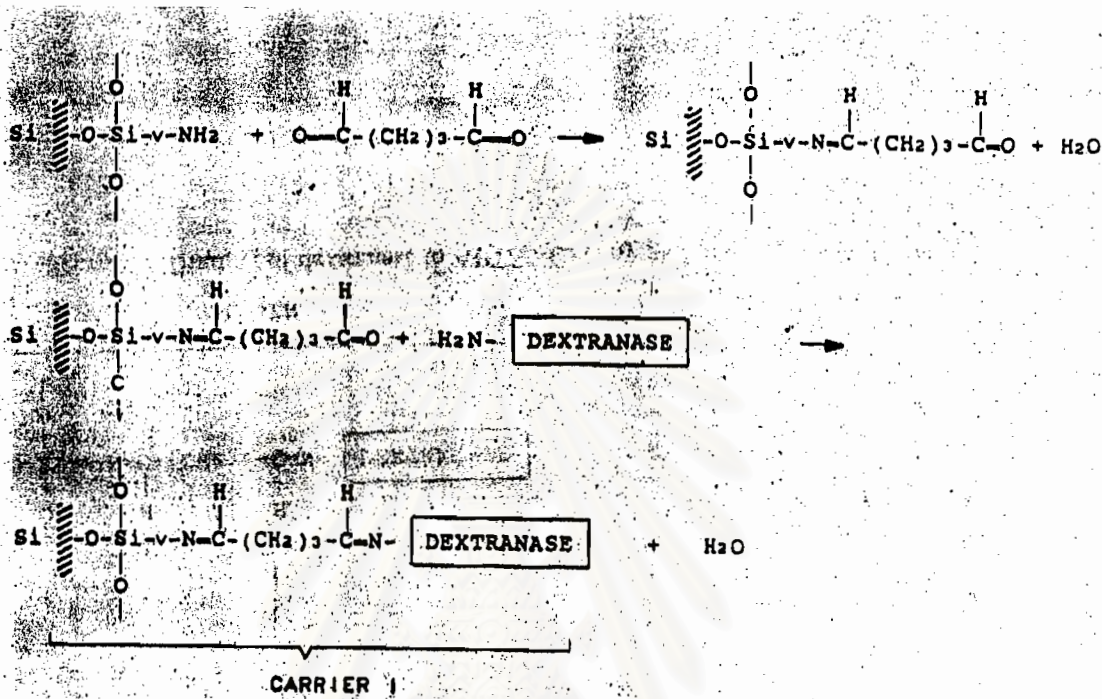
รูปที่ 2.5 การตรึงเอนไซม์กับตัวพุงโดยอาศัยการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังก์ชันัลบนตัวพุงกับเอนไซม์

ที่มา : <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/immmethod.html>

## 2. การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมโยงโดยใช้สารไพบีฟังก์ชันัล (Cross Linking)

เป็นวิธีที่ทำโดยใช้สารไพบีฟังก์ชันัลทำหน้าที่ตรึงรูประหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ทำให้มีอนุภาคใหญ่ขึ้น เกิดขึ้นง่ายไม่ยุ่งยาก สามารถควบคุมขนาดของอนุภาคและสมบัติทางกายภาพได้ แต่ในระหว่างกระบวนการตรึงเอนไซม์อาจมีการเสียสภาพระหว่างกระบวนการตรึงได้เนื่องจากเป็นการใช้สารเคมี โดยสารที่นิยมใช้ในการตรึงโดยวิธีนี้ คือ กลูตารัลดีไฮด์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



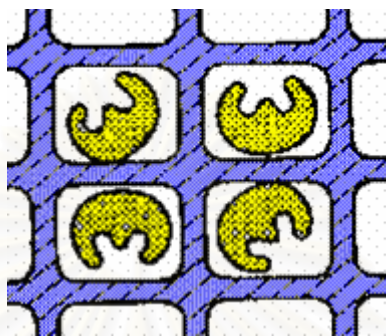
Scheme 2. Binding of dextranase to APTES-CPG by glutaraldehyde (carrier 1).

รูปที่ 2.6 การเชื่อมโยงของเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ (Rogalski และคณะ, 1997)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3. การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ภายใน ( Entrapping )

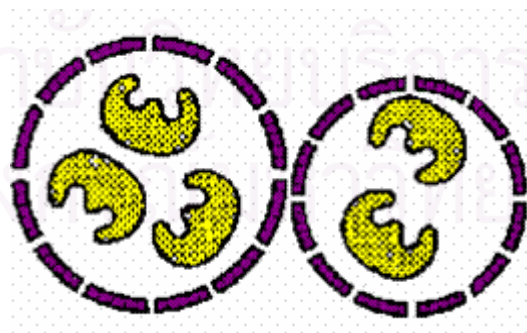
การจำกัดเอนไซม์ไว้ในตัวพวยง (Lattice type) เป็นการกักขังเอนไซม์ไว้ในรูพรุนของเจล โดยเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของเจลในสารละลายที่มีเอนไซม์อยู่ ทำให้ได้เป็นโครงสร้างของเจลที่มีรูพรุนสามารถขังเอนไซม์ให้อยู่ตามโพรงในโครงสร้างเจล ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การกักขังเอนไซม์ไว้ในรูพรุน

ที่มา : <http://prosys.korea.ac.kr/lab/bio/research/items/Enzymelmmo.html>

4. การจำกัดเอนไซม์ไว้ในแคปซูลขนาดเล็ก (Microcapsule type) เป็นการตรึงรูปเอนไซม์โดยกักขังเอนไซม์ให้อยู่ในลูกทรงกลมผนังบางแบบกึ่งซึมผ่านได้ โดยสมบัติของผนังบางนี้จะยอมให้ซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านเข้าออกได้ แต่จะไม่ยอมให้เอนไซม์ซึมผ่านออกมา ดังนั้นวิธีนี้ขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ และซับสเตรตมีความสำคัญมาก เนื่องจากถ้าเอนไซม์มีขนาดเล็กช่องต้องมีขนาดเล็กจึงจะกั้นไม่ให้เอนไซม์ออกมาได้ ดังนั้นถ้าซับสเตรตมีขนาดใหญ่จะไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปเจอเอนไซม์ได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การกักขังเอนไซม์ให้อยู่ในลูกกลมผนังบางกึ่งซึมผ่านได้

ที่มา : <http://prosys.korea.ac.kr/lab/bio/research/items/Enzymelmmo.html>

แม้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์จะมีการเตรียมได้หลายวิธี แต่ไม่มีวิธีการใดที่จะสามารถนำมาใช้  
 ได้กับเอนไซม์ทุกชนิดและทุกกรณี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งทางด้าน  
 โครงสร้าง, องค์ประกอบทางเคมี รวมทั้งความแตกต่างของซับสเตรตและสารผลิตภัณฑ์ จึงต้องมี  
 การพิจารณาเลือกวิธีการตรึงให้เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์ ซึ่งอาจจะต้องใช้วิธีการตรึงมากกว่า  
 หนึ่งวิธีมาใช้ร่วมกันเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการตรึงที่ดีที่สุดที่สามารถรักษาสัมบัติของเอนไซม์ไว้ได้มาก  
 ที่สุดและมีความคงตัวระหว่างการใช้งาน อีกทั้งต้องเป็นวิธีที่สะดวกและมีต้นทุนที่ใช้ในการตรึงต่ำ

จากรายงานของ นุสรรา เจริญกิจทวี (2539) ที่ได้ทำการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ  
*Penicillium sp.* สายพันธุ์ SMCU3-14 แบบล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจินेट ซึ่งการใช้วิธีนี้ไม่เหมาะ  
 ต่อการนำมาใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมเนื่องจากราคาในการตรึงค่อนข้างสูง เนื่องจากอัลจินेटมี  
 ราคาแพง นอกจากนี้ขั้นตอนในการตรึงมีความยุ่งยากและมีข้อจำกัดมาก โดยวิธีตรึงแบบนี้ไม่  
 เหมาะในการใช้กับซับสเตรตที่มีมวลโมเลกุลสูง ดังนั้นจึงไม่เหมาะต่อการนำมาใช้กับเดกซ์แทรน  
 เนื่องจากมีโมเลกุลสูง

จากรายงานของ อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ได้ทำการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิต  
 จากเชื้อ *Penicillium sp.* สายพันธุ์ SMCU3-14 บนผิวทราย ในขนาดเขย่า พบว่าการตรึงรูปบน  
 เม็ดทรายขนาด 16 – 20 เมช โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารไปฟังก์ชันนัล ให้แอกติวิตีดีที่สุดในที่  
 1.3 หน่วยต่อ 1 กรัมทราย จึงได้นำข้อมูลเบื้องต้นมาทำการศึกษาเพื่อที่จะนำมาตรึงในระดับขยาย  
 ส่วนต่อไป

## ฟลูอิดไดเซชัน

ในปัจจุบันฟลูอิดไดเซชันเป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจจากวงการอุตสาหกรรมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นกระบวนการที่สามารถตอบสนองความต้องการทางอุตสาหกรรมในการลดต้นทุนการผลิตและทำให้กระบวนการผลิตมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เครื่องมือฟลูอิดไดซ์เบดที่ใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่จึงได้ถูกสร้างขึ้น และพัฒนาอย่างรวดเร็วทั้งในยุโรปและอเมริกา เช่น เครื่องทำนมผงให้โตขึ้น (Agglomeration), เครื่องอบแห้งเมล็ดพืช เป็นต้น

### นิยาม

คำว่า ฟลูอิดไดเซชัน เป็นนิยามที่ใช้อธิบายกระบวนการหรือวิธีการที่ทำให้ของแข็งซึ่งมีรูปร่างลักษณะเป็นเม็ดหรือชิ้น สัมผัสกับของไหลแล้วเม็ดของแข็งเหล่านี้จะมีสมบัติคล้ายของไหล ดังนั้น เมื่อนำเม็ดของแข็งกลุ่มหนึ่งมาวางไว้บนตะแกรงในหอตดลองแล้วให้ของไหล (แก๊ส, ของเหลว) ไหลผ่านจากด้านล่างของตะแกรงที่รองรับเม็ดของแข็ง ของไหลก็จะผ่านชั้นของเม็ดของแข็ง และไหลออกทางส่วนบนของหอตดลอง เมื่อเพิ่มความเร็วของไหลขึ้นเรื่อยๆ ในที่สุดจะเห็นเม็ดของแข็งขยับตัวและลอยตัวขึ้นเป็นอิสระไม่เกาะติดกัน ของแข็งที่อยู่ในลักษณะนี้จะมีสมบัติคล้ายของไหล เรียกของแข็งที่ประพฤติตัวในลักษณะนี้ว่า ฟลูอิดไดซ์เบด และเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า ฟลูอิดไดเซชัน

### ประเภทของฟลูอิดไดเซชัน

งานของฟลูอิดไดเซชัน ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงปัจจุบันพอที่จะสรุปประเภทของงานได้เป็น 2 แบบด้วยกัน คือ ฟลูอิดไดเซชันสองสถานะและฟลูอิดไดเซชันสามสถานะ

1. ฟลูอิดไดเซชันสองสถานะ (two-phase fluidization) หมายความว่าในหอตดลองหรือในเบดที่ใช้งานประกอบด้วยสองสถานะ คือ ของแข็งกับของไหล โดยที่ของไหลจะเป็นแก๊สหรือของเหลวอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนั้นฟลูอิดไดซ์เบด 2 สถานะจึงแบ่งย่อยได้เป็น

- แก๊สฟลูอิดไดเซชัน (gas fluidization)
- ฟลูอิดไดเซชันของเหลว (liquid fluidization)

2. ฟลูอิดไดเซชันสามสถานะ (three-phase fluidization) หมายความว่าในหอตดลองหรือในเบดจะประกอบด้วยของสามสถานะอยู่พร้อม คือ ของแข็ง ของเหลว และแก๊ส

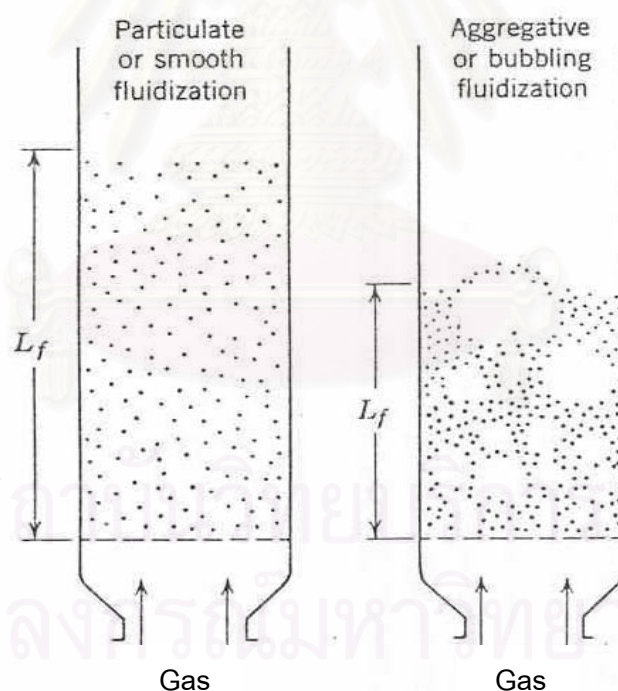
สำหรับฟลูอิดไดเซชันสามสถานะนั้นเป็นกระบวนการที่พัฒนาไปจากฟลูอิดไดเซชันสองสถานะ หอตดลองที่เป็นฟอง (bubble column) และหอตดลองที่บรรจุด้วยของแข็ง (packed bed) ดังนั้นจึงมีกลไกที่ซับซ้อนมาก



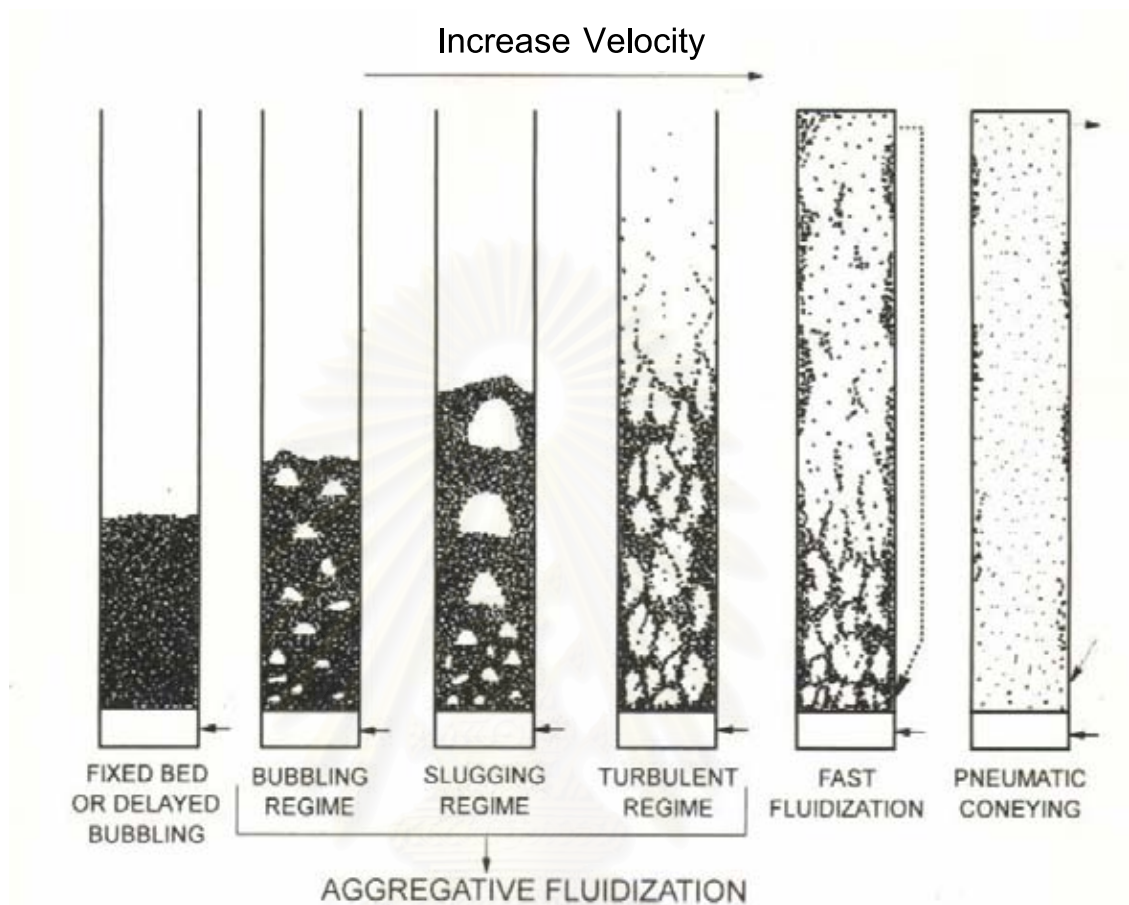
### ลักษณะของฟลูอิดไดซ์เบด

คำว่า เบด (bed) หมายถึง อาณาเขตในหอการทดลองที่มีปริมาณเม็ดของแข็งบรรจุอยู่ไม่ว่าของแข็งนั้นจะอยู่นิ่งหรือเคลื่อนไหวด้วยของไหลในหอทดลอง จะมีระดับตั้งแต่แผ่นโลหะทำเป็นตะแกรงรองรับหรือเป็นตัวกระจายแก๊ส (distributor) จนถึงระดับสูงสุดหรือผิวหน้าของเม็ดเบด

ฟลูอิดไดซ์เบดที่มีการขยายตัวของเบดเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ การลอยตัวและการหมุนรอบตัวเป็นไปอย่างช้าๆ เรียกเบดแบบนี้ว่า เบดสม่ำเสมอ หรือเบดที่เป็นเนื้อเดียวกัน สำหรับฟลูอิดไดซ์เบดที่ของไหลเป็นแก๊ส ลักษณะเบดที่เกิดขึ้นจะแตกต่างจากที่เป็นของเหลวมากเพราะว่าเมื่อความเร็วของแก๊สสูงกว่าความเร็วต่ำสุดที่ทำให้เกิดฟลูอิดไดซ์เบดแล้ว แก๊สส่วนหนึ่งยังทำหน้าที่ให้เกิดการลอยตัวของเม็ดของแข็งเหมือนเดิม แต่มีอีกส่วนหนึ่งรวมตัวกันแล้วก่อตัวกันเป็นฟองแก๊สขึ้น ฟองแก๊สก็จะแทรกตัวขึ้นมายังบนผิวหน้าของเบดและแตกตัวในที่สุด แต่ขณะที่ฟองแก๊สลอยขึ้นมาจะทำให้เม็ดของแข็งลอยติดตามฟองแก๊สขึ้นมาด้วย เม็ดของแข็งภายในเบดจึงมีการเคลื่อนที่เป็นไปอย่างซุกมุ่นวุ่นวาย ดังแสดงในรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ลักษณะของเบดที่มีของไหลต่างชนิดกันไหลผ่านด้วยความเร็วมากกว่าความเร็วต่ำสุดในการเกิดฟลูอิดไดซ์ชัน (Kunii และ Levenspiel, 1991)



รูปที่ 2.10 รูปแบบการไหลสำหรับฟลูอิดไดซ์เบดแก๊ส-ของแข็ง (Grace และคณะ, 1997)

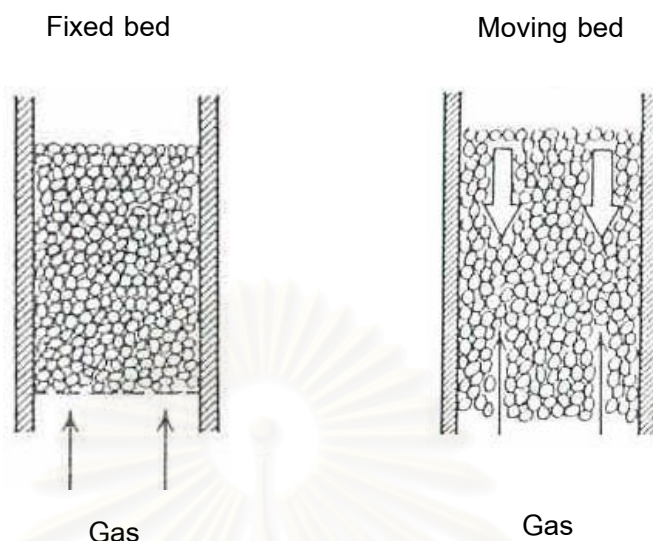
#### แก๊สฟลูอิดไดเซชัน

แก๊สฟลูอิดไดเซชันเป็นการเกิดฟลูอิดไดซ์เบดสองสถานะระหว่างของไหลที่เป็นแก๊สกับของแข็งดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ขอบเขตของฟลูอิดไดซ์เบด (regime of fluidization) สามารถแบ่งได้ดังรูปที่ 2.10

เมื่อเบดวางตัวบนตะแกรงหรือตัวกระจายแก๊ส (gas distributor) และมีแก๊สเคลื่อนที่ผ่านขึ้นมา (upward flowing) ซึ่งความเร็วที่เพิ่มขึ้น ที่เกิดขึ้นอธิบายได้ดังนี้

- เบดนิ่ง (pack bed หรือ fixed bed)

เมื่อแก๊สไหลผ่านเบดขึ้นมาด้วยความเร็วต่ำ ของแข็งที่วางตัวอยู่บนตัวกระจายแก๊สจะวางตัวนิ่งไม่เคลื่อนไหว แก๊สจะไหลคดเคี้ยวไปตามช่องว่างที่มีอยู่ในเบด หรือเบดอาจมีการเคลื่อนที่สัมผัสกับผนังแต่อนุภาคของแข็งในเบดไม่มีการเคลื่อนที่สัมผัสต่อกัน กรณีนี้เรียกว่า moving bed ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 ลักษณะของเบตนิ่งที่ไม่มีและมีการเคลื่อนที่สัมพันธ์กับผนัง(Kunii และ Levenspiel, 1991)

เมื่อแก๊สเคลื่อนที่ผ่านเบตที่วางนิ่งจะมีแรงเนื่องจากการไหลของของไหล กระทำต่ออนุภาคของแข็งในทิศทางกรไหล เรียกแรงนี้ว่าแรงเสียดทานเนื่องจากการไหล (drag force) ซึ่งจะก่อให้เกิดความดันลด (pressure drop) ตกคร่อมเบตไว้

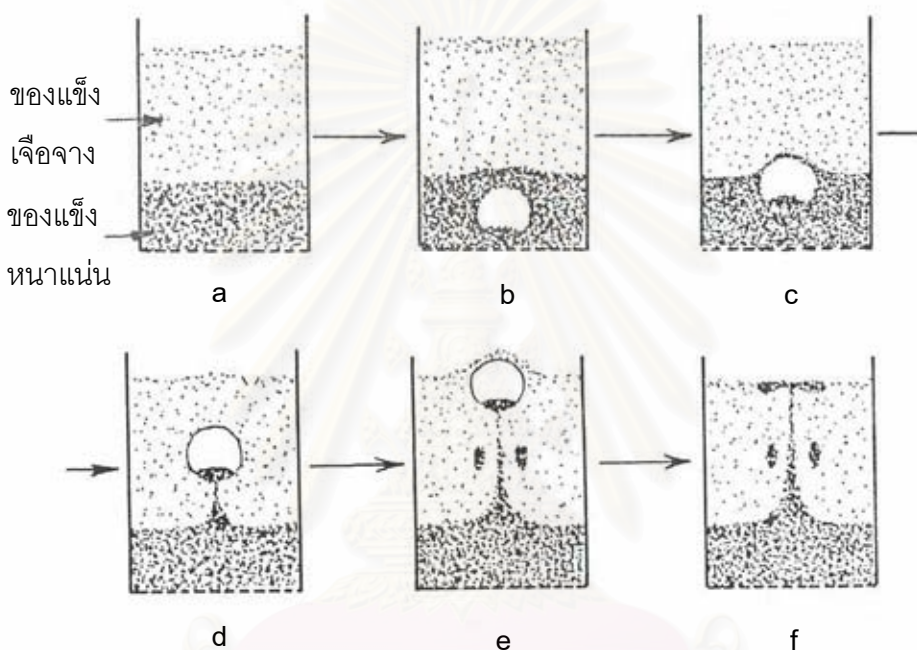
- เบตแบบฟองแก๊ส (bubbling fluidized bed)

เมื่อความเร็วแก๊สที่เคลื่อนที่ผ่านเบตนิ่งเพิ่มขึ้นจนถึงความเร็วค่าหนึ่งอนุภาคของแข็งจะเริ่มเกิดการเคลื่อนที่ขึ้น เรียกว่า การเกิดฟลูอิไดเซชัน และเรียกเบต ณ จุดนี้ว่า fluidized bed ซึ่งเป็นจุดที่อนุภาคของแข็งประพฤติตัวคล้ายของไหล

สำหรับอนุภาคของแข็ง ถ้าเพิ่มความเร็วของแก๊สจนพบว่าจะเริ่มเกิดฟองแก๊สขึ้น เบตจะเริ่มแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. ส่วนที่เป็นฟองแก๊สเรียกว่า bubble phase อาจมีอนุภาคของแข็งอยู่บ้างแต่น้อยมาก
2. ส่วนที่ไม่ใช่ฟองแก๊สหรือส่วนที่มีอนุภาคของแข็งอยู่หนาแน่น เรียกว่า emulsion phase ขนาดของฟองแก๊สที่เกิดขึ้นนี้จะมีค่าเพิ่มขึ้นตาม
  - ขนาดของอนุภาคของแข็งที่เพิ่มขึ้น
  - ความเร็วแก๊สที่เพิ่มขึ้น

ฟองแก๊สที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนที่แทรกขึ้นไป และอาจมีการรวมตัวกันผ่าน emulsion phase โดยที่อาจจะมีของแข็งบางส่วนติดไปด้วยตามฟองแก๊ส และบางส่วนวิ่งตามฟองแก๊สขึ้นมาด้วย จนกระทั่งถึงผิวบนก็จะเคลื่อนที่หลุดออกไปแล้วแตกกระจายอยู่ในเนื้อผิว อนุภาคของแข็งที่ติดอยู่เกือบทั้งหมดจะตกกลับลงมายังเบตใหม่ โดยเรียกปรากฏการณ์ที่ของแข็งเคลื่อนที่ตามฟองแก๊สนี้ว่าการเกิด wake ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ลักษณะการเกิด wake (Kunii และ Levenspiel, 1991)

ส่วนบริเวณที่อยู่เหนือเบตขึ้นไป ซึ่งฟองแก๊สจะเกิดการแตกตัวและของแข็งที่ติดไปกับฟองแก๊สจะตกลงมายังเบตอีกครั้งด้วยผลของแรงโน้มถ่วง อย่างไรก็ตามอาจจะมีอนุภาคของแข็งบางส่วน (น้อยมาก) ซึ่งมีขนาดเล็กถูกพัดพาเคลื่อนที่ไปกับแก๊สด้วย (ไม่ตกกลับลงมา) ณ ความสูงค่าหนึ่ง แต่ส่วนใหญ่อนุภาคของแข็งเกือบทั้งหมดตกกลับลงมายังเบต

- เบดแบบสลัก (slugging bed)

ดังกล่าวมาแล้วว่าขนาดของฟองแก๊สจะมีขนาดเพิ่มตามความเร็วของแก๊ส และความสูงของเบด ถ้าเบดบรรจุอยู่ในหอทดลองซึ่งมีขนาดเล็กหรือแคบและยาว ฟองแก๊สที่เกิดขึ้นอาจจะมีขนาดใหญ่เกือบเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลางหรือความกว้างของเบด (หอทดลอง) ในกรณีนี้จะสังเกตเห็นฟองแก๊สเคลื่อนที่ผ่านเบดและแยกอนุภาคของแข็งออกเป็นชั้นๆ เรียกว่าเกิดสลัก

- เบดแบบปั่นป่วน (turbulent bed)

เมื่อความเร็วของแก๊สที่เคลื่อนที่ผ่านเบดแบบฟองแก๊สเพิ่มขึ้นมากเบดจะเกิดการขยายตัว และเมื่อเพิ่มความเร็วขึ้นเรื่อยๆ จะเริ่มสังเกตเห็นรูปแบบการสัมผัสของอนุภาคของแข็งกับแก๊ส ซึ่งมีการขยายตัวเปลี่ยนแปลงไป ฟองแก๊สที่เกิดขึ้นมีการรวมตัวและแตกกระจายออกจากกันอย่างรวดเร็ว การเคลื่อนไหวภายในเบดเป็นแบบปั่นป่วน ลักษณะภายในเบดจะแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ

1. dense phase ซึ่งเป็นส่วนที่มีอนุภาคของแข็งอยู่หนาแน่น
2. dilute phase ซึ่งเป็นส่วนที่มีอนุภาคของแข็งอยู่เบาบาง

ฟลูอิดไดเซชันที่กล่าวมา อนุภาคของแข็งทั้งหมดที่สัมผัสกับแก๊สจะถูกจำกัดบริเวณอยู่ภายในระยะความสูงหนึ่งจากตัวกระจายแก๊สเท่านั้น

### ข้อดีและข้อเสียของการใช้เทคนิคฟลูอิดไดเซชัน

ข้อเปรียบเทียบระหว่างข้อดีและข้อเสียของการใช้เทคนิคทางฟลูอิดไดเซชันกับเทคนิคอื่นๆ พอสรุปได้ดังนี้

#### ข้อดี

- เนื่องจากเม็ดของแข็งเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลาทำให้เกิดการผสมกันได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ
- มีการจัดเรียงตัวของเม็ดของแข็ง เม็ดที่มีน้ำหนักน้อยจะอยู่ส่วนบน เม็ดที่มีน้ำหนักมากจะอยู่ส่วนล่าง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการแยกขนาดของเม็ดของแข็งได้
- การที่เม็ดของแข็งไหลหมุนเวียนอยู่ภายในเบด ทำให้อัตราการสัมผัสของสารละลายกับตัวกลางสูง เนื่องจากพื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดของแข็งกับของไหลมีมากเมื่อเทียบกับเบดนิ่ง
- สามารถทำการตรึงได้ในปริมาณที่มากกว่า
- เนื่องจากมีการผสมกันของเม็ดของแข็งอย่างรวดเร็วอาจทำให้ระยะเวลาที่เม็ดของแข็งสัมผัสและผสมกับของไหลสั้นลง

### ข้อเสีย

- เกิดการขัดสีระหว่างเม็ดของแข็งและภาชนะทำให้เกิดการหลุดของโปรตีนได้หากใช้ระยะเวลานานเกิน

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**Martin และคณะ, 1997** ได้ทำการศึกษาการเคลื่อนที่ของอนุภาคในเครื่องฟลูอิดไดซ์เบด โดยอนุภาคที่ใช้คืออลูมินาที่มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย  $74.9 \mu\text{m}$  พบว่าอนุภาคในช่วงนี้เคลื่อนที่ลงไปข้างล่างมากกว่าซึ่งสวนทางกับการไหลของแก๊ส กลุ่มอนุภาคที่มีความหนาแน่นสูงจะมี อัตราการไหลลงของอนุภาคมาก

**Horio และคณะ, 1992** ได้ทำการศึกษาลักษณะของการเกิดฟลูอิดไดซ์ชั้นอนุภาคทราย ซิลิกา ผลการทดลองพบว่ากลุ่มอนุภาคในช่วงฟลูอิดไดซ์ชั้นมีแรง gas drag force สัมพันธ์กับ น้ำหนัก

**Luong และ Bhattacharya, 1993** การทดลองนี้เป็นการทดลองภายใต้ภาวะปกติที่ อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาผลของตัวแปรต่างๆ ที่มีต่ออัตราการไหลย้อนกลับของของแข็งในเครื่องฟลูอิดไดซ์เบดแบบหมุนเวียน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $0.15 \text{ m}$ . และมีความสูง  $4.5 \text{ m}$ . ของแข็งที่ใช้คือ ทราย ซึ่งมีขนาด  $200 \mu\text{m}$ ,  $400 \mu\text{m}$ . และ  $500 \mu\text{m}$ . อัตราการไหลของอากาศในท่อโรเตอร์มีค่าระหว่าง  $1400\text{-}2000 \text{ liters/min}$  และ น้ำหนักของทรายทั้งหมดในระบบมีค่าระหว่าง  $15\text{-}25 \text{ kg}$ . พบว่าอัตราการไหลย้อนกลับของของแข็งใน ฟลูอิดไดซ์เบดมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราการไหลของอากาศเพิ่ม และ น้ำหนักของของแข็งทั้งหมดเพิ่มขึ้น

**Heping และ Mridul, 1994** ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของแก๊สในเครื่องฟลูอิดไดซ์เบดแบบหมุนเวียนอนุภาคที่ใช้คือ glass beads ขนาด  $116$  และ  $247 \mu\text{m}$  และความหนาแน่น  $2305$  และ  $2245 \text{ kg/m}^3$  ตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาคือความเร็วของอากาศ อัตราการไหลเวียนของของแข็ง ความเร็วของอนุภาคและขนาดของอนุภาคโดยพบว่าอัตราการไหลเวียนของอนุภาคมีอิทธิพลต่อโปรไฟล์ความเร็วของอากาศ

**Weinell และคณะ, 1997** ศึกษาการประพัตติตัวของอนุภาคชนิดหนึ่งในเครื่องฟลูอิดไดซ์เบดแบบหมุนเวียน อนุภาคที่ใช้ในการทดลองคือ ทราย ขนาด  $0.15 \text{ mm}$ . มีความหนาแน่น  $2.6 \text{ g/cm}^3$  ในการหาความเร็วอนุภาค พบว่าเมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ความเร็วของอนุภาคจะลดลง

Rhodes และคณะ, 1998 ศึกษา flow structure ของฟลูอิดไดซ์เบดแบบหมุนเวียน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.09 m. สูง 7.2 m. อนุภาคที่ใช้คือ ททราย ขนาด 100  $\mu\text{m}$ . มีความหนาแน่น 2650  $\text{kg}/\text{m}^3$  จากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความสูงกับปริมาณของของแข็ง จะแบ่งเป็น dense phase , interface และ dilute phase

Zevenhoven และคณะ, 1999 ศึกษาเกี่ยวกับความเร็วและความหนาแน่นของอนุภาค บริเวณผนังในเครื่องฟลูอิดไดซ์เบดแบบหมุนเวียน โดยเทคนิคการบันทึกภาพวีดีโอ อนุภาคที่ใช้ คือ ควอร์ทซ์ ขนาด 310 mm. มีความหนาแน่น 1700  $\text{kg}/\text{m}^3$  พบว่าที่ตำแหน่งความสูง 2.25 m. อนุภาคมีความเร็วเฉลี่ยมากกว่าที่ตำแหน่งความสูง 2.75 m.

Smolders และ Baeyens, 2000 ทำการวิจัยในเรื่องการเคลื่อนตัวของอนุภาคและเวลาที่อนุภาคอยู่ในเครื่องฟลูอิดไดซ์แบบหมุนเวียนโดยใช้ทรายขนาด 90  $\mu\text{m}$ . มีความหนาแน่น 2200  $\text{kg}/\text{m}^3$  พบว่าเวลาที่อนุภาคอยู่ในคอลัมน์มีความสัมพันธ์กับความเร็วของแก๊สและอัตราการไหลย้อนกลับ คือ เมื่อเพิ่มความเร็วของแก๊ส จะทำให้อนุภาคมีความเร็วเพิ่มขึ้น ดังนั้นเวลาที่อนุภาคอยู่ในคอลัมน์ก็จะน้อยลง

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

##### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น G-10 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A. และรุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., U.S.A.
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy, U.S.A. และ รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore.
4. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seico Co, Ltd., Japan และรุ่น HA-3D บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
5. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar flow รุ่น BV-124 บริษัท ISSCO, U.S.A.
6. เครื่องผสมสาร (mixer) รุ่น vortex-genies 2 G560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan และ รุ่น W 760 Memmert, Germany
8. เครื่องชั่ง รุ่น PB3002 และ รุ่น L200P บริษัท Sartorius, U.S.A
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P บริษัท Kubota, Japan
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigerate centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดทำความเย็น (refrigerate centrifuge) รุ่น J-30I บริษัท Beckman, Germany
12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc, U.S.A
13. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A
14. หลอดแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร G30T8 30w บริษัท Sankyo Denki, Japan
15. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS 4000 บริษัท Decan Ultrasonic, England.



16. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson, France

### เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (industrial grade dextran) บริษัท, Sigma, U.S.A.
2. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. แมกเนเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
5. แมงกานีสซัลเฟต ( $MnSO_4$ ) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
6. เบรินฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain heart infusion) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
7. โซเดียมคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ ) บริษัท Merck, Germany
8. ทริปโตเน (Tryptone) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) บริษัท AJEX Chemicals, Australia
10. โพแทสเซียมคาร์บอเนต ( $K_2CO_3$ ) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
11. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy
12. ซูโครส (sucrose) บริษัท Sigma, U.S.A.
13. กลูโคส (glucose) บริษัท Sigma, U.S.A.
14. ไอโซมอลโทส (isomaltose) บริษัท Sigma, U.S.A.
15. ไอโซมอลโทไตรโอส (isomaltotriose) บริษัท Fluka, Germany
16. ไอโซมอลโทเตตราโอส (isomaltotetraose) บริษัท Fluka, Germany
17. เซลลูโลส (cellulose) บริษัท Sigma, U.S.A.
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
19. โซเดียมไนเตรต ( $NaNO_3$ ) บริษัท Fluka, Germany
20. เฟอรัสซัลเฟต ( $FeSO_4$ ) บริษัท Unilab, U.S.A.
21. เอทานอล ( $C_2H_5OH$ ) บริษัท Labscan, Ireland
22. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
23. น้ำปลอดประจุ (deionized distilled water)
24. กรดซัลฟูริก ( $H_2SO_4$ ) บริษัท Merck, Germany
25. เดกซ์แทรน T-2000 (Dextran T-2000) บริษัท, Phamacia, Sweden
26. อัลบูมินจากซีรัมวัว (bovine serum albumin) บริษัท Sigma, U.S.A.

### 3.1 การเลี้ยงและการเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

#### 3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

*Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นเชื้อที่ได้รับการกลายพันธุ์ เพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดย สุวรรณ นพพรพันธ์ (2528) จากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531)

#### 3.1.2 อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารสูตรปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ, 1971 (ภาคผนวก ก)

#### 3.1.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

##### 3.1.3.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ลงบนอาหารแข็งเลี้ยงตามข้อ 3.1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่แล้ว เททับอาหารแข็งด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 15% (โดยปริมาตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุก 3 เดือน

##### 3.1.3.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เชื้อสปอร์และเลี้ยงเชื้อราตามวิธีตามข้อ 3.1.4 แล้วจึงนำมาชูดสปอร์ออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อโดยใช้โดยใช้ทวิน 80 0.05% (โดยปริมาตร) ที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นตัวทำลาย ดูดสปอร์แขวนลอยออกมากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก ง) เพื่อกำจัดสายใย และนำสปอร์ที่กรองได้ไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใส่ทิ้งไป จากนั้นแขวนลอยสปอร์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30% (โดยปริมาตร) ซึ่งผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

นำสปอร์จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.1.4 มาทำการระเหิดแห้ง (lyophilization) และเก็บเชื้อในรูปสปอร์แห้ง

### 3.1.4 การเลี้ยงเชื้อตั้งต้นเพื่อผลิตสปอร์

เชื้อสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 ลงบนอาหารแข็งเลี้ยงตามข้อ 3.1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่แล้ว นำไปใช้เป็นสปอร์ตั้งต้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนส ควรใช้สปอร์ที่ได้ในทันที โดยไม่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ เพื่อคงความสามารถสูงสุดของเชื้อราในการผลิตเดกซ์แทรนเนส

### 3.1.5 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในขวดแก้วทรงกรวยเพื่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส

เติมทวิน-80 ความเข้มข้น 0.1 % ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเก็บเชื้อจากข้อ 3.1.4 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวิน-80 นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง  $2 \times 10^7$  สปอร์ต่อมล. โดยใช้มีมาไซโตมิเตอร์ ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ส่วนน้ำใสนำมาวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีน คำนวณหาแอกติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา

### 3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปในขวดแก้วทรงกรวย

#### 3.2.1 การเตรียมตัวพุง

ขั้นตอนในการเตรียมตัวพุงแสดงดังรูปที่ 3.1 โดยนำทรายที่จะใช้ในการตรึงรูป ก่อนการนำไปใช้ ต้องนำมาล้างน้ำสะอาด 3 – 4 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่กรดไนตริกเข้มข้น เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ต่างๆที่ติดมาและเตรียมผิวทรายให้เหมาะสมต่อการเกาะของเอนไซม์ แล้วล้างกรดด้วยน้ำปลอดประจุจนความเป็นกรดลดลงปกติ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน เก็บไว้ในภาชนะสะอาดปิดฝาสนิท

#### 3.2.2 ศักยภาพของการเติมกลูตาไรต์ไฮโดรในกระบวนการตรึงรูปในระดับขวดเขย่า

3.2.2.1 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปโดยในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์บนผิวทรายให้ทำการเติมกลูตาไรต์ไฮโดรลงไปพร้อมกับเดกซ์แทรนเนส

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติมเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (crude dextranase) ปริมาตร 1 มล. ลงไปพร้อมกับสารละลายกลูตาไรต์ไฮโดรที่จะใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วมความเข้มข้น 2.5 % (โดยปริมาตร) ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้งขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 3.2

จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส

ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.5

3.2.2.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปจับกับผิวทรายที่จะใช้  
ตรึงก่อนจากนั้นจึงค่อยล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติม  
สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ที่จะใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วมความเข้มข้น 2.5% (โดยปริมาตร) ใน  
ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 10 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า  
แบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติสารละลายกล  
ลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินทิ้งจากนั้นล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็น  
กรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสปริมาตร 1 มล.ลงไปพร้อมกับสารละลาย  
อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า  
แบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วย  
สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง ขั้นตอนต่างๆ  
แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 3.3

จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส  
ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.5

3.2.2.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปโดยเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปจับกับผิวทรายที่จะใช้  
ตรึงก่อนจากนั้นให้เททิ้งโดยไม่ต้องล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติม  
สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่จะใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วมความเข้มข้น 2.5% (โดยปริมาตร) ใน  
ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 10 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า  
แบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมน้ำกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินทิ้งจากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปพร้อมกับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์  
0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker  
ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตท  
บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูป  
ที่ 3.4

จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส  
ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.5

3.2.2.4 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปโดยไม่มีการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไป  
กระบวนการตรึง

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย  
เติมเดกซ์แทรนเนส ปริมาตร 1 มล. ลงไปพร้อมกับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็น  
กรดต่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบ  
ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์  
ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 3.5

จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส  
ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.5

### 3.2.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปโดยในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์บนผิวทรายในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 50 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบด จากนั้นเติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่จะใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วมความเข้มข้น 2.5 % (โดยปริมาตร) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 400 มล. ให้ปริมาณอากาศที่ 2.0 vvm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที เติมน้ำกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินทิ้งจากนั้นล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 ครั้งละ 400 มล. จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติมเดกซ์แทรนเนส ปริมาตร 40 มล.ลงไปพร้อมกับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 ปริมาตร 360 มล. ให้ปริมาณอากาศที่ 2.0 vvm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง

จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.5

ทรายที่จะใช้ในการตั้งรูป



ล้างน้ำสะอาด 3 – 4 ครั้ง



แช่กรดไนตริกเข้มข้น เป็นเวลา 1 วัน



ล้างกรดด้วยน้ำปอดประจุจนความเป็นกรดลดลงปกติ



นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน



เก็บไว้ในภาชนะสะอาดปิดฝาสนิท

รูปที่ 3.1 การเตรียมตัวพุง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บรรจุทรายที่ใช้ในการตึ้ริงรูป 5 กรัม ลงในขวดแก้วทรงกรวย



เติมเดกซ์แทรนเนส ปริมาตร 1 มล.

ลงไปพร้อมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5 % ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์

ความเป็นกรดต่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล.



นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, อุณหภูมิห้อง, 30 นาที



ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง



เดกซ์แทรนเนสตึ้ริงรูป



เก็บใน สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5

รูปที่ 3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตึ้ริงรูปโดยการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปพร้อมกับเดกซ์แทรนเนส

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บรรจุทรายที่ใช้ในการตริงรูป 5 กรัม ลงในขวดแก้วทรงกรวย



เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5 % ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์  
ความเป็นกรดต่าง 7.0 ปริมาตร 10 มล.



นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, อุณหภูมิห้อง, 2 ชั่วโมง



เทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินทิ้ง



ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง



เติมเดกซ์แทรนเนส ปริมาตร 1 มล.

ลงไปพร้อมกับสารละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล.



นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที , อุณหภูมิห้อง, 30 นาที



ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง



เดกซ์แทรนเนสตริงรูป



เก็บใน สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5

รูปที่ 3.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปโดยการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไป

จากนั้นจึงค่อยล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.4 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไป  
จากนั้นเททิ้งโดยไม่ต้องล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป

บรรจุทรายที่ใช้ในการตึ้ริงรูป 5 กรัม ลงในขวดแก้วทรงกรวย



เติม 1 มล. เดกซ์แทรนเนส ลงไปพร้อมกับ 9 มล. สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์

ความเป็นกรดต่าง 4.0



นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotaty shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, อุณหภูมิห้อง, 30 นาที



ล้างทรายด้วยสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง



เดกซ์แทรนเนสตึ้ริงรูป



เก็บใน สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.5 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตึ้ริงรูปโดยไม่มีการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไป

### 3.3 วิธีการวิเคราะห์

#### 3.3.1 การตรวจสอบแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ

การตรวจสอบแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ทำตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971) ทำโดย นำส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) 0.9 มล. (ประกอบด้วย โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลต่อลิตร ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 จำนวน 0.5 มล. ผสมกับเดกซ์แทรนที่-2000 0.625% (โดยน้ำหนัก) ละลายในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 ซึ่งเป็นซบสเตรต 0.4 มล. โดยเติมส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ 0.1 มล. (ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายเนลสัน (Nelson reagent) (ภาคผนวก ข) 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสตามวิธีในข้อ 3.3.3

1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนที่-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดสอบ

การเตรียมซบสเตรตโดยซังเดกซ์แทรนที่-2000 น้ำหนัก 0.625 กรัม ละลายในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดเตรียมสาร

### 3.3.2 การวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรังรูป(ปรับปรุงจากวิธีของ อนันตพงษ์, 2543)

ใช้วิธีที่ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการหาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ ดังนี้  
 บ่มสารละลายไซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ปริมาตร 0.6 มล. และสารละลายเดกซ์แทรนที-2000 ที่ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.4 มล. ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารผสมปฏิกิริยาทั้งหมดลงใน 10 มก.เดกซ์แทรนเนสตรังรูป เขย่าด้วยเครื่องปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุม อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนที่เป็นน้ำใสมา วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952) ซึ่งสารละลายส่วนน้ำใสนี้จะต้อง ปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลให้เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์

1 หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนสตรังรูป หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย เดกซ์แทรนที-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ภาวะทดสอบ

### 3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที หลังจากนั้นเติมสารละลายเนลสัน (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และทำการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ใช้ ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. มาเติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข) 0.5 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบรเวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรังรูป( อนันตพงษ์, 2543 )

ใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบวิธีทางอ้อม (Indirect Method) โดยทำการวิเคราะห์จากผลต่างของโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสอิสระเริ่มต้นก่อนทำปฏิกิริยา กับปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสที่หลุดออกมาในน้ำล้าง โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry (1951) เช่นเดียวกับวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.4

คำนวณค่าแอกติวิตีจำเพาะ ทำโดยนำค่าแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) หารด้วยปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่าแอกติวิตีจำเพาะมีหน่วยเป็น หน่วย (Unit) ของเดกซ์แทรนเนสต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการตั้งรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ทรายเป็นตัวพุงในขวดแก้วทรงกรวย และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารร่วมช่วยในการตั้ง

#### 3.4.1 ทดสอบหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ตั้งรูป

วิเคราะห์หาแอกติวิตีของเอนไซม์ตั้งรูปตามวิธีการตั้งในหัวข้อที่ 3.2.2.2.1 โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ตั้งในตัวพุง(ทราย) และแอกติวิตีของเอนไซม์ตั้งรูป ตามวิธีดำเนินการข้อที่ 3.3.5 และ 3.3.2 ตามลำดับ

#### 3.4.2 ทดสอบหาปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ในการตั้งรูป

3.4.2.1 ในขวดเขย่าเตรียมเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้น 7 ระดับ คือ 0.1945, 0.2593, 0.389, 0.778, 1.556, 2.334 และ 3.112 ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการตั้งรูปเดกซ์แทรนเนส

3.4.2.2 ดำเนินการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในการทำการตั้งในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบดตั้งรูปตามวิธีการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.2.3 โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเจือจางเริ่มต้น 5 ระดับ คือ ไม่เจือจาง, เจือจาง 5, 10, 50 และ 100 เท่า จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูป

#### 3.4.3 ทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตั้งรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 4 ความเข้มข้น คือ 1.0, 2.5, 3.5 และ 5.0% ตามลำดับ วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม สำหรับการตั้งรูปเดกซ์แทรนเนส



#### 3.4.4 ทดสอบหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันอัตราการเขย่า 3 ระดับ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกอัตราการเขย่าที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

#### 3.4.5 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ คือ 30, 60, 120, 180 และ 300 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% และอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

#### 3.4.6 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย 7 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 120, 180 และ 300 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5 % ,อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก.โปรตีนต่อ 5 กรัมทรายแห้ง วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.4.7 ทดสอบหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายตั้งแต่ 4.0–8.0 (แปรผันทีละ 0.5) โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก. โปรตีนต่อ 5 กรัมทรายแห้ง และเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 45 นาที วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.4 เลือกความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

### 3.4.8 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก. โปรตีนต่อ 5 กรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 45 นาที และค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 7.0 วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.4.9 ทดสอบหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง เดกซ์แทรนเนสกับทราย ( การตรึงเดกซ์แทรนเนส )

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.1 โดยแปรผันความเป็นกรดต่างใน  
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดอกซ์แทรนเนสกับทราย ( การตรึงเดกซ์แทรนเนส ) ตั้งแต่ 2.5–8.0  
(แปรผันที่ละ 0.5) โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% , อัตราการเขย่าที่  
200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณ  
โปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก.โปรตีนต่อ 5 กรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่  
45 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับ  
ทรายเท่ากับ 0.5 และ 7.0 ตามลำดับ วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการ  
ดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง  
เดกซ์แทรนเนสกับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.4.10 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง เดกซ์แทรนเนสกับทราย ( การตรึงเดกซ์แทรนเนส )

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.1 โดยแปรผันความเข้มข้นของ  
สารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย 5 ระดับ คือ 0.01,  
0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่  
2.5% , อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่  
120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก.โปรตีนต่อ 5 กรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอน  
การตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 45 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา  
ระหว่างกลูตารัลดีไฮด์ กับทรายเท่ากับ 0.5 และ 7.0 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดต่างใน  
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายเท่ากับ 4.0 วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรน  
เนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมใน  
ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.4.11 ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.2.2.1 โดย ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5 % , อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก.โปรตีนต่อ 5 กรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 45 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 และ 7.0 ตามลำดับ ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายเท่ากับ 0.05 โมลาร์ และ 4.0 ตามลำดับ วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่เตรียมได้ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์ตรังรูป

### 3.4.12 ผลการเขย่าทรายในกรดไนตริก ในขั้นตอนการเตรียมตัวพุง

ในขั้นตอนการเตรียมตัวพุงให้นำทรายที่จะใช้ตรึงในกรดไนตริกเข้มข้นแช่ไว้ 1 คืน เปรียบเทียบกับการแช่ด้วยกรดไนตริกเข้มข้นแล้วทำการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำทรายที่จะใช้เป็นตัวพุงมาทำการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสตามวิธีดำเนินการทดลองข้อที่ 3.2.2.2.1 จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรังรูปมาทำการวัดแอกติวิตีของตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

### 3.5 การศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปในระดับขยาย(ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์) เปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสตรังรูปในระดับขวดเขย่า

จากการศึกษาการตรึงรูปในระดับขวดเขย่าได้เลือกภาวะต่างๆที่เหมาะสมมากที่สุดเพื่อนำมาตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบด โดยนำทรายที่ผ่านการเตรียมตัวพุงแล้วในปริมาณที่เหมาะสมมาทำการตรึงรูปตามวิธีดำเนินการข้อ 3.2.3 โดยมีการเปลี่ยนแปลงตามภาวะที่ทำการทดลอง

### 3.5.1 ทดสอบหาปริมาณทรายและปริมาตรรวมของระบบต่อการตรึงรูปเอนไซม์ ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

ทำการทดลองโดยการแปรผันปริมาณทราย 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 กรัม โดยที่แต่ละน้ำหนักให้เติมน้ำลงไปตั้งแต่ 100–2,000 มิลลิลิตร โดยทำการเพิ่มทีละ 100 มล. แล้วทำการสังเกตเพื่อบันทึกถึงลักษณะการไหลภายในฟลูอิดไดซ์ จากนั้นจึงเลือกปริมาณทรายและปริมาตรรวมของสารละลายภายในระบบที่เหมาะสมเพื่อทำการทดลองต่อไป

### 3.5.2 ทดสอบหาเวลาและการเลือกใช้ปริมาณของทรายที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization ต่อการตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

จากวิธีดำเนินการทดลองข้อที่ 3.5.1 ทำการเลือกใช้ปริมาณทรายและปริมาตรของสารละลายในฟลูอิดไดซ์ที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization มาทำการตรึงในภาวะที่ทำการศึกษาจากในระดับขวดเขย่า โดยทำการแปรผันเวลาเป็น 8 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมาทำการวัดแอกติวิตี ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

### 3.5.3 ทดสอบหาเวลาและการเลือกใช้ปริมาณของทรายที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ bubbling fluidization ต่อการตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

จากวิธีดำเนินการทดลองข้อที่ 3.5.1 ทำการเลือกใช้ปริมาณทรายและปริมาตรของสารละลายในฟลูอิดไดซ์ที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ bubbling fluidization มาทำการตรึงในภาวะที่ทำการศึกษาจากในระดับขวดเขย่า โดยทำการแปรผันเวลาเป็น 8 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมาทำการวัดแอกติวิตี ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

### 3.5.4 ทดสอบหาปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเจือจางเริ่มต้น 4 ระดับ คือ เจือจาง 5, 10, 50, 100 เท่า และไม่เจือจาง ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการให้อากาศ 2 vvm หรือเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

### 3.5.5 ทดสอบหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันการให้อากาศสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 vvm ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. อัตราให้อากาศ 2.0 vvm เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 30 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย เท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ 7.0 ตามลำดับ ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายเท่ากับ 0.05 โมลาร์ และ 4.0 ตามลำดับวัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกอัตราการให้อากาศในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

### 3.5.6 ทดสอบหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่าง เดกซ์แทรนเนสกับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันการให้อากาศสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย 5 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 vvm ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5 % เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm หรือ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีและปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 30 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ 7.0 ตามลำดับ ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายเท่ากับ 0.05 โมลาร์ และ 4.0 ตามลำดับ วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 จากนั้นเลือกอัตราการให้อากาศในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ต่อไป

### 3.5.7 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายในเครื่อง ปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาเดกซ์แทรนเนสกับทราย 7 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 120, 180 และ 300 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 vvm และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 อัตราการให้อากาศในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายเท่ากับ 2.0 vvm ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ 7.0 ตามลำดับ วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกเวลาเหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเดกซ์แทรนเนสกับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

### 3.5.8 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ คือ 30, 60, 120, 180 และ 300 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5 % และอัตราการให้อากาศที่ 2.0 vvm หรือเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.5.9 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย 7 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 120, 180 และ 300 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และเอนไซม์เจือจางเริ่มต้น 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส



### 3.5.10 ทดสอบหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายตั้งแต่ 4.0–8.0 (แปรผันทีละ 0.5) โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. และเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 30 นาที วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.5.11 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5%, อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 30 นาที และค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 7.0 วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.5.12 ทดสอบหาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง เดกซ์แทรนเนสกับทราย ( การตรึงเดกซ์แทรนเนส ) ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเดกซ์แทรนเนสกับทราย ( การตรึงเดกซ์แทรนเนส ) ตั้งแต่ 2.5 – 6.0 (แปรผันทีละ 0.5) โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5 % , อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 30 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 และ 7.0 ตามลำดับ วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.5.13 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง เดกซ์แทรนเนสกับทราย ( การตรึงเดกซ์แทรนเนส ) ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2.3 โดยใช้ทราย 50 กรัม ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย 4 ระดับ คือ 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% , อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที และปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเจือจางที่ 10 เท่า ปริมาตร 400 มล. เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 30 นาที ความเข้มข้นและความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 และ 7.0 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทรายเท่ากับ 4.0 วัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 เลือกความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

### 3.6 คุณสมบัติของเอนไซม์ตรีงรูป

#### 3.6.1 ทดสอบหาความเป็นกรดต่างและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูป

ทำการศึกษาดูโดยการแปรผันความเป็นกรดต่างของสารผสมในปฏิกิริยา โดยทำการบ่มกับ เดกซ์แทรนเนสตรีงรูปปริมาณ 10 มก. ในช่วงความเป็นกรดต่างต่างๆกัน โดยรักษาความเข้มข้นที่ใช้ เท่ากับ 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆกัน คือ

ไกลซีน ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 2.5 – 4.0

อะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0 – 6.0

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 6.0 – 8.0

ที่อุณหภูมิ 55° ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 3.3.2

เปรียบเทียบความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ ระหว่างแอกติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดต่างที่ใช้ในการบ่ม

#### 3.6.2 ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูป

ทำการศึกษาหาโดยการบ่มเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปปริมาณ 10 มก. ในสารผสมปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดต่าง 5.0 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80° ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการวัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2

### 3.6.3 ทดสอบหาความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเอนไซม์ตรีงรูป

ทำการศึกษาคือทำการบ่มกับเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปปริมาณ 10 มก. ในช่วงความเป็นกรดต่าง  
ต่างๆกัน โดยรักษาความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆกัน คือ

ไกลซีน ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 2.5 – 4.0

อะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0 – 6.0

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 6.0 – 8.0

ที่อุณหภูมิ 55° ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปมาทำการวัดแอกติวิตีของ ตาม  
วิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปโดยใช้กราฟความสัมพันธ์  
ระหว่างแอกติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดต่างที่ใช้ในการบ่ม

### 3.6.4 ทดสอบหาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ตรีงรูป

ทำการศึกษาคือทำการบ่มกับเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปปริมาณ 10 มก. ในช่วงอุณหภูมิต่างๆกัน  
โดยรักษาความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 0.05 โมลาร์ของอะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดต่าง 4.0  
ที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80° ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำ เดกซ์แทรน  
เนสตรีงรูป มาทำการวัดแอกติวิตีของ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  
แอกติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม

### 3.6.5 ผลของการนำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปมาทำการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที่ – 2000

เปรียบเทียบการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรนที่ 2000 ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยการบ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนที่ 2000 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ที่อุณหภูมิ 55°C เวลา 0–300 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมาตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2

### 3.6.7 ทดสอบหาจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ทำการศึกษาโดยหาจำนวนรอบของการใช้เอนไซม์ตรึงซ้ำ โดยทำการใช้ซ้ำ 10 รอบ

1. ทำการใช้อิเอนไซม์ตรึงซ้ำที่ 55°C 10 รอบต่อเนื่องกันโดยมีการเติมกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม
2. ทำการใช้อิเอนไซม์ตรึงซ้ำที่ 55°C 10 รอบต่อเนื่องกันโดยไม่มีการเติมกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม

บ่มเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 10 มก. ในสารผสมปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 จำนวน 0.6 มล. ผสมกับเดกซ์แทรนที่-2000 0.625% (โดยน้ำหนัก) ละลายในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ซึ่งใช้เป็นซับสเตรต 0.4 มล. ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใสต้มเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปวัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.2 ส่วนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปนำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์หลังจากนั้นนำกลับมาใช้ซ้ำในรอบใหม่ โดยทำการใช้ซ้ำ 10 รอบต่อเนื่องกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.6.8 ศึกษาการเสียความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูป

เพื่อศึกษาว่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปที่ลดลงนั้นเกิดจากการหลุดของเอนไซม์หลังการนำไปใช้งานหรือเกิดจากการเสียสภาพของบริเวณจำเพาะกับซับสเตรตของเอนไซม์ (active site) หลังจากนำไปใช้งาน วิเคราะห์โดย แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 บ่มเอนไซม์ตรีงรูป 10 มก. กับสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแยกเอนไซม์ตรีงรูปออก นำมาบ่มกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 ปริมาตร 0.6 มล. และสารละลายเอนไซม์ตรีงรูปที่ - 2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งใช้เป็นซับสเตรต ปริมาตร 0.4 มล. บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการทำปฏิกิริยามาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Somogyi (1952) ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.3

ชุดที่ 2 บ่มเอนไซม์ตรีงรูป 10 มก. กับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดต่าง 4.5 ปริมาตร 0.6 มล. และสารละลายเอนไซม์ตรีงรูปที่ - 2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งใช้เป็นซับสเตรต ปริมาตร 0.4 มล. บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาครั้งแรกมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากนั้นแยกเอนไซม์ตรีงรูปออกล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และบ่มสารผสมปฏิกิริยาต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952) ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.3

เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของทั้งสองชุดการทดลอง

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.6.9 การหาค่า $K_m$ ของเอนไซม์ทรานเนสตรังรูปและเอนไซม์ทรานเนสอิสระ

ป่มเอนไซม์ทรานเนสตรังรูปและเอนไซม์ทรานเนสอิสระปริมาณที่เท่าๆ กัน ในสารผสมของปฏิกิริยาตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.2 และ 3.3.1 ตามลำดับ โดยแปรผันความเข้มข้นของซับสเตรต คือ เอนไซม์ 2000 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.15625-2.50 % (0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 2.5% ตามลำดับ) ป่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานเนสที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำผลที่ได้มาเขียนให้อยู่ในรูปไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver - Burk Plot) ระหว่าง  $1/V$  และ  $1/[S]$  หาค่าจุดตัดแกน X นำไปคำนวณค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ทรานเนส



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของการหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูป

ทำการวิเคราะห์ผลการตรีงเด็กซ์แทรนเนสบนผิวทรายโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ตามวิธีดำเนินการทดลองที่ 3.2.2.2 โดยหาแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรีงรูป ตามวิธีดำเนินการทดลองที่ 3.3.2 และ 3.3.4 ตามลำดับ เทียบกับปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ที่หลุดออกมาในน้ำล้าง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลของการหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูป

แอกติวิตีของ เอนไซม์เริ่มต้น (หน่วย/มิลลิลิตร)	แอกติวิตีของ เอนไซม์ในน้ำล้าง (หน่วย/มิลลิลิตร)	แอกติวิตีจับ เกาะ (%)	โปรตีนเอนไซม์ เริ่มต้น (มก./มล.)	โปรตีนเอนไซม์ใน น้ำล้าง (มก./มล.)	โปรตีนจับ เกาะ (%)
$324.21 \pm 15.54$	$141.71 \pm 12.93$	$43.64 \pm 1.88$	$0.766 \pm 0.052$	$0.487 \pm 0.067$	$36.43 \pm 4.48$

และจากการทดสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูป พบว่า เอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสเมื่อนำมาตรีงรูปมีแอกติวิตีลดลงมากเมื่อเทียบกับปริมาณของโปรตีนที่สามารถตรีงได้ จึงทำการหาวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการตรีงรูปเพื่อให้ได้แอกติวิตีที่เพิ่มขึ้นต่อไป

ในกระบวนการเตรียมเอนไซม์ตรีงรูปในขวดเขย่า ตามหัวข้อที่ 3.2.2.2 นั้น พบว่า ในขั้นตอนการเตรียมตัวพยุง ในช่วงที่มีการแช่ทรายในกรดไนตริกเป็นเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นการเตรียมพื้นผิวทรายนั้น การแช่โดยไม่มีกรเขย่าอาจให้ผลไม่ดีพอทำให้ได้ แอกติวิตีน้อยมากเหลือเพียง 4% จึงทดลองให้เพิ่มการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า แอกติวิตีเอนไซม์ตรีงรูปเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 5 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.2



ตารางที่ 4.2 ผลของการแช่ทรายในกรดแล้วเขย่าในขั้นตอนการเตรียมตัวพูนต่อการตรึงรูปเอนไซม์

แช่ในกรดตั้งทิ้งไว้		แช่ในกรดเขย่า	
แอกติวิตี (หน่วย ต่อ 1 กรัมทราย)	แอกติวิตีตรึงรูป (%)	แอกติวิตี (หน่วย ต่อ 1 กรัมทราย)	แอกติวิตีตรึงรูป (%)
$1.537 \pm 0.113$	$4.21 \pm 2.18$	$15.032 \pm 0.117$	$20.78 \pm 3.74$

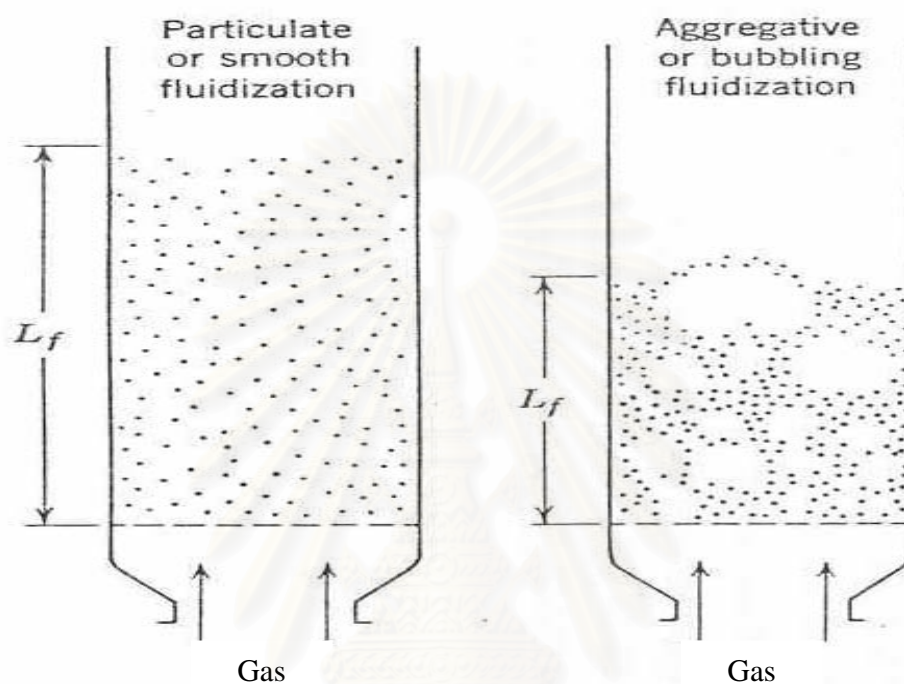
#### 4.2 การศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

ทำการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์โดยใช้สภาวะพื้นฐานจากการศึกษาการตรึงรูปในระดับขวดเขย่า

##### 4.2.1 ผลของปริมาณทรายและปริมาตรของสารละลายต่อการตรึงรูปเอนไซม์ ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

ทำการทดลองโดยการแปรผันปริมาณทราย 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 กรัม โดยที่แต่ละน้ำหนักให้เติมน้ำลงไปตั้งแต่ 100–2,000 มิลลิลิตร โดยทำการเพิ่มทีละ 100 มล. แล้วทำการสังเกตเพื่อบันทึกถึงลักษณะการไหลภายในฟลูอิดไดซ์ ผลแสดงดังรูปที่ 4.1

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.1 ลักษณะการไหลภายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

พบว่า น้ำหนักทรายและปริมาตรของสารละลายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เมื่อใส่ทรายที่มีน้ำหนักมากเกินไปจะทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ bubbling fluidization และน้ำหนักทรายที่พอดีจะทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ซึ่งทำให้เกิดการกระจายของเม็ดทรายได้ทั่ว และหากมีการเติมสารละลายมากเกินไปจะทำให้มีผลต่อน้ำหนักของสารละลายที่กอดทับเม็ดทรายทำให้เม็ดทรายไม่สามารถที่จะเคลื่อนที่ภายในฟลูอิดไดซ์เบดได้ดังรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 การเกิดฟลูอิดไดซ์แบบ  
smooth fluidization



รูปที่ 4.3 การเกิดฟลูอิดไดซ์แบบ  
bubbling fluidization

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 ผลของเวลาและการเลือกใช้ปริมาณของทรายที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization ต่อการตั้งรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

เลือกน้ำหนักทรายและปริมาตรของเหลวในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ที่พอดีจะทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization และ แบบ bubbling fluidization ต่อการตั้งรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ จากนั้นทำการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งรูปที่เวลาต่างๆ ผลแสดงดังรูปที่ 4.4

พบว่า เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ bubbling fluidization ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ซึ่งทำให้เกิดการหมุนแบบปั่นป่วนภายในมีผลให้การยึดติดของเอนไซม์อิสระกับเม็ดทรายลดลงทำให้แอคติวิตีที่ได้น้อยกว่าการเลือกปริมาณทรายที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเม็ดทรายแบบ smooth fluidization

4.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตั้งรูป เดกซ์แทรนเนสบนผิวทราย

4.3.1 ผลของการเติมกลูตารัลดีไฮด์ในระบบต่อตั้งรูปในระดับขวดเขย่า

ได้ทำการตั้งรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้ทรายเป็นตัวพุง ภายใต้ภาวะการตั้งรูป ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 3.2.2 คือ

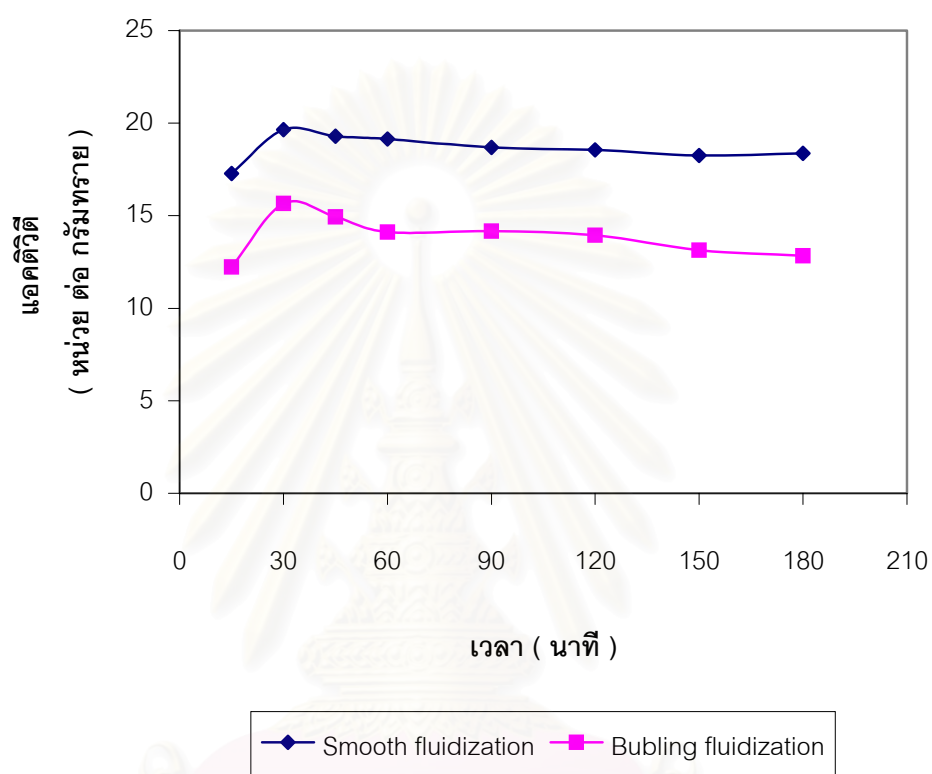
3.2.2.1 ในกระบวนการตั้งรูปเอนไซม์บนผิวทรายได้ทำการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปพร้อมกับเดกซ์แทรนเนส

3.2.2.2 เติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปจับกับผิวทรายที่จะใช้ตั้งก่อนจากนั้นจึงค่อยล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป

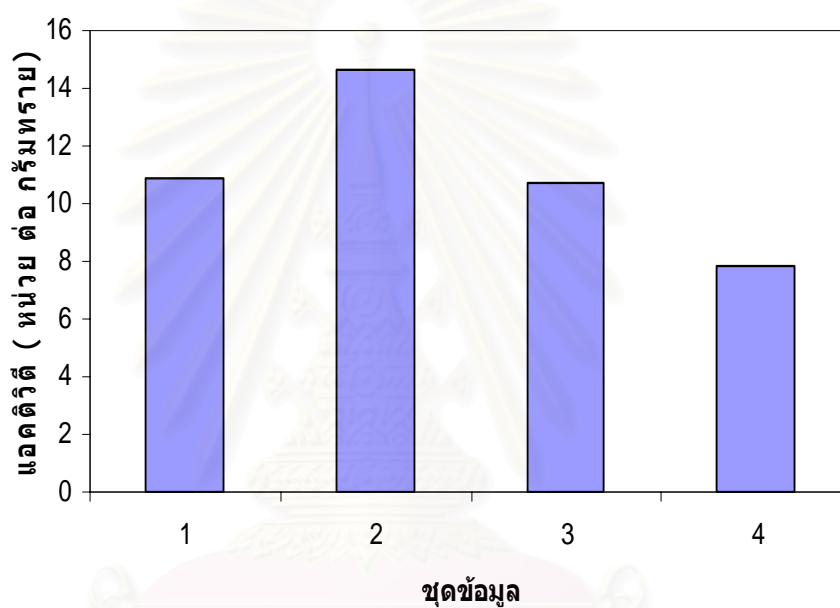
3.2.2.3 เติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปจับกับผิวทรายที่จะใช้ตั้งก่อนจากนั้นให้เททิ้งโดยไม่ต้องล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป

3.2.2.4 ไม่มีการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปในกระบวนการตั้ง

เพื่อศึกษาถึงผลของกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกินต่อการตั้งรูปเอนไซม์ จากผลการทดลองพบว่าสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อการตั้งรูปเอนไซม์ คือ ถ้าทำการล้างไม่หมดหรือให้สัมผัสกับเอนไซม์โดยตรง กลูตารัลดีไฮด์จะไปทำลายเอนไซม์ ทำให้ความสามารถในการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปลดลง แต่กลูตารัลดีไฮด์จะช่วยให้เอนไซม์ตั้งรูปยึดติดกับตัวพุงได้ดีขึ้นจากการทดลองนำเอนไซม์ตั้งรูปมาทำการใช้ซ้ำในตามวิธีการทดลองข้อ 3.6.7 ผลการทดลองดังรูปที่ 4.5 จึงทำการตั้งเอนไซม์โดยมีการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงในระบบการตั้งรูปเอนไซม์



รูปที่ 4.4 ผลของเวลาและการเลือกใช้ปริมาณของทรายที่ทำให้เกิดการฟลูอิดไดซ์แบบ smooth fluidization และ แบบ bubling fluidization



รูปที่ 4.5 ผลของกลูตาวัลดีไฮด์ต่อการตรึงรูปเอนไซม์

หมายเหตุ : ชุดข้อมูลที่ 1 = ทราย + ( เอนไซม์ + กลูตาวัลดีไฮด์ )  
 ชุดข้อมูลที่ 2 = ทราย + กลูตาวัลดีไฮด์ - ล้าง --> + เอนไซม์  
 ชุดข้อมูลที่ 3 = ทราย + กลูตาวัลดีไฮด์ - ไม่ล้าง --> + เอนไซม์  
 ชุดข้อมูลที่ 4 = ทราย + เอนไซม์

#### 4.3.2 ผลของความเร็วยุบในการเขย่าต่อการตรึงรูปเอนไซม์

ทำการแปรผันอัตราการเขย่าสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ในขวดเขย่า ตามวิธีดำเนินการข้อ 3.2.2.2 โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตี ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6

พบว่า แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ตรึงในขวดเขย่า โดยใช้อัตราการเขย่าทั้ง 3 ระดับ ไม่ให้ความแตกต่างกันแต่อย่างใด ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการทดลอง จึงเลือกใช้อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ในการทดลองต่อไป

#### 4.3.3 ผลของปริมาณการให้อากาศสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายต่อการตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

ทำการแปรผันอัตราการให้อากาศสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ตามวิธีดำเนินการข้อ 3.2.3 โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 และ 2.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรสารละลาย (vvm) จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตี ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.7

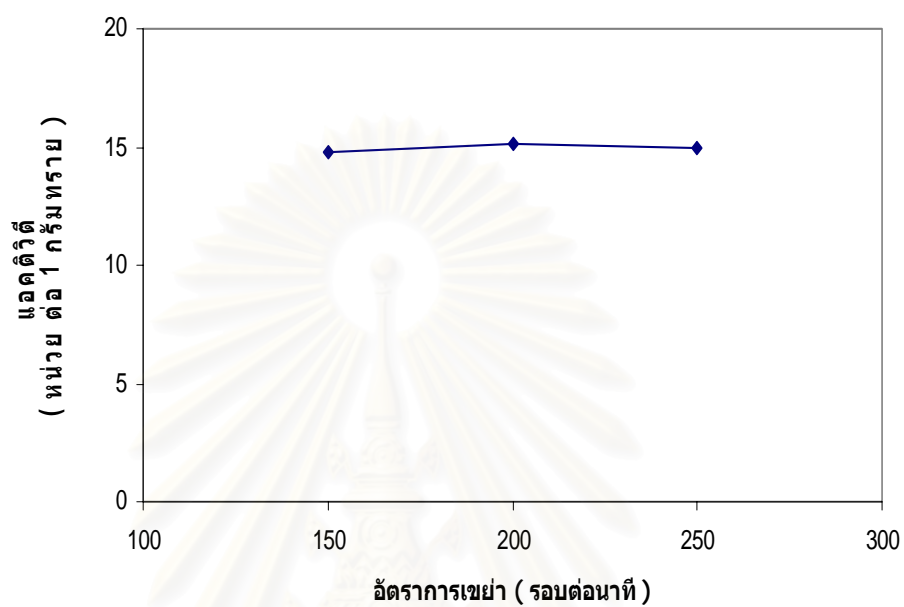
พบว่าที่ความเร็วดำ ของแข็งที่วางตัวอยู่บนตัวกระจายแก๊สจะวางตัวนิ่งไม่เคลื่อนไหว แก๊สจะไหลคดเคี้ยวไปตามช่องว่างที่มีอยู่ในเบดทำให้สารละลายภายในเบดสัมผัสกับอนุภาคของแข็ง แต่อนุภาคของแข็งในเบดไม่มีการเคลื่อนที่และเมื่อเพิ่มความเร็วของแก๊สสูงขึ้นจนถึงค่าหนึ่งแก๊สส่วนหนึ่งทำหน้าที่ให้เกิดการลอยตัวของเม็ดของแข็ง แต่มีอีกส่วนหนึ่งรวมตัวกันแล้วก่อตัวกันเป็นฟองแก๊สขึ้น ฟองแก๊สก็จะแทรกตัวขึ้นมาถึงบนผิวหน้าของเบดและแตกตัวในที่สุด แต่ขณะที่ฟองแก๊สลอยขึ้นมานี้จะทำให้เม็ดของแข็งลอยติดตามฟองแก๊สขึ้นมาด้วย เม็ดของแข็งภายในเบดจึงมีการเคลื่อนที่เป็นไปอย่างสุ่มวนวุ่นวาย ซึ่งเป็นผลให้การจับเกาะของกลูตารัลดีไฮด์ไม่คืนที่ความเร็วแก๊สสูง

#### 4.3.4 ผลของปริมาณการให้อากาศสำหรับการการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

ทำการแปรผันอัตราการให้อากาศสำหรับการทำปฏิกิริยาเดกซ์แทรนเนสกับทรายในฟลูอิดไดซ์รีแอกเตอร์ ตามวิธีดำเนินการข้อ 3.2.3 โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 และ 2.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรสารละลาย ( vvm ) จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.8

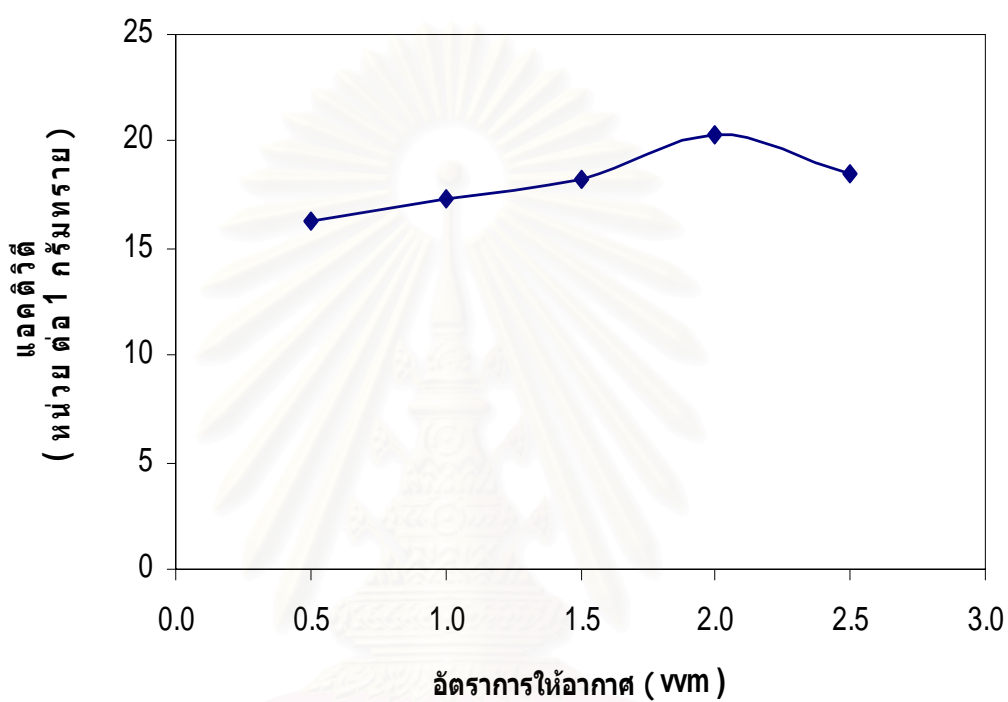
พบว่าที่ความเร็วต่ำ ของแข็งที่วางตัวอยู่บนตัวกระจายแก๊สจะวางตัวนิ่งไม่เคลื่อนไหว แก๊สจะไหลคดเคี้ยวไปตามช่องว่างที่มีอยู่ในเบด ทำให้สารละลายสัมผัสกับอนุภาคในเบด แต่อนุภาคของแข็งในเบดไม่มีการเคลื่อนที่ และเมื่อเพิ่มความเร็วของแก๊สสูงขึ้นจนถึงค่าหนึ่งแก๊สส่วนหนึ่งทำหน้าที่ให้เกิดการลอยตัวของเม็ดของแข็ง แต่มีอีกส่วนหนึ่งรวมตัวกันแล้วก่อตัวกันเป็นฟองแก๊สขึ้น ฟองแก๊สก็จะแทรกตัวขึ้นมาถึงบนผิวหน้าของเบดและแตกตัวในที่สุด แต่ขณะที่ฟองแก๊สลอยขึ้นมาจะทำให้เม็ดของแข็งลอยติดตามฟองแก๊สขึ้นมาด้วย เม็ดของแข็งภายในเบดจึงมีการเคลื่อนที่เป็นไปอย่างซูดมุนวุ่นวายซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการหลุดของโปรตีนทำให้แอกติวิตีลดลงที่ความเร็วแก๊สสูง





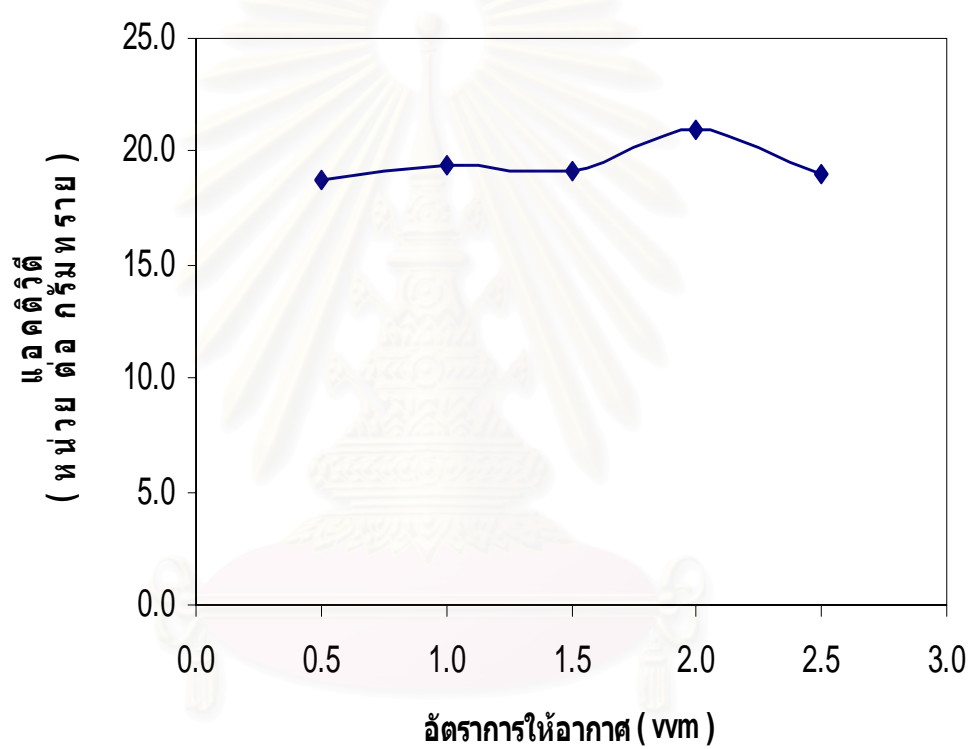
รูปที่ 4.6 อัตราการศึกษาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเด็กซ์แทนเนสตรึงรูปในขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์  
ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.8 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป  
ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

#### 4.3.5 ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการตรึงรูป

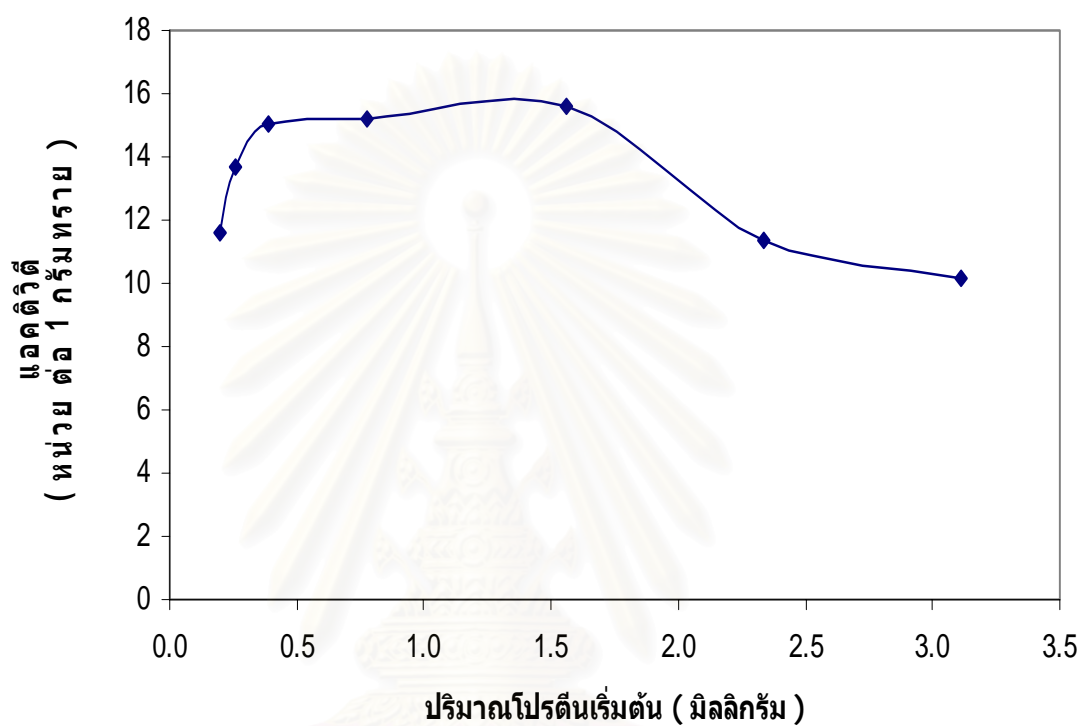
ดำเนินการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในการทำการตรึงเพื่อลดความสิ้นเปลืองเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงรูปตามวิธีการดำเนินงานวิจัยข้อ 2.4.4 โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้น 7 ระดับ คือ 0.1945, 0.2593, 0.389, 0.778, 1.556, 2.334 และ 3.112 มก.โปรตีนจากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9

พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเพิ่มขึ้นที่ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 0.2–0.4 มก. และที่ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 0.4–1.5 มก. ให้แอกติวิตีใกล้เคียงกัน จากนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะค่อยๆลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณโปรตีนเริ่มต้นช่วง 2.0–3.0 มก. เมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่ได้ เลือกใช้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.778 มก. ในการทดลองต่อไป

#### 4.3.6 ผลของเอนไซม์เจ็จจางเริ่มต้นที่ใช้ต่อการตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

ดำเนินการแปรผันปริมาณเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในการทำการตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เพื่อลดความสิ้นเปลืองเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ในการตรึงรูปตามวิธีการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.2.3 โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเจ็จจางเริ่มต้น 5 ระดับ คือ ไม่เจ็จจาง, เจ็จจาง 5, 10, 50 และ 100 เท่า จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10

พบว่า จากผลการทดลองโดยใช้เอนไซม์ที่ไม่ทำการเจ็จจางโดยบัฟเฟอร์เลย ให้แอกติวิตีต่ำพอๆกับทำการเจ็จจางเอนไซม์ที่ 100 เท่า โดยที่เอนไซม์อิสระเริ่มต้นที่ทำการเจ็จจาง 10 เท่าให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปดีที่สุด และเมื่อทำการเจ็จจางเพิ่มขึ้นก็จะให้แอกติวิตีที่มีแนวโน้มลดลง จึงเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระเจ็จจางที่ 10 เท่า ในการตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.9 ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสม  
ในการสร้างรูปเอนไซม์ในขวดเขย่า

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 ปริมาณเดกซ์แทรนเนสเจ็จางเริ่มต้นที่เหมาะสม  
ในการตรึงรูปเอนไซม์ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3.7 ผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อการตรึงรูปเอนไซม์

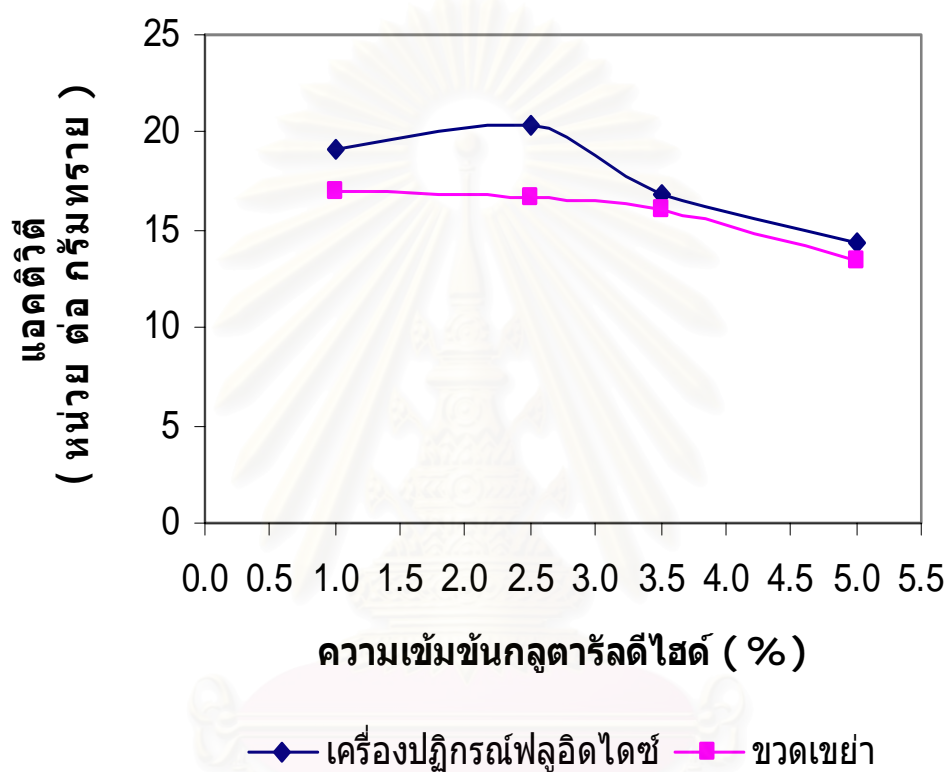
ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสในขวดเขย่าและในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อที่ 3.4.3 และ 3.5.11 ตามลำดับ โดยแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ 1.0, 2.5, 3.5 และ 5.0% จากนั้นวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11

พบว่า แนวโน้มของแอกติวิตีตรึงรูปที่ตรึงในขวดเขย่าและในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ให้รูปแบบแนวโน้มใกล้เคียงกัน คือ ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 1.0–3.5% ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปดี เนื่องจากความเข้มข้นยังไม่สูงเพียงพอที่จะทำลายเอนไซม์และที่ความเข้มข้น 2.5% ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มถึง 5.0% พบว่าทำให้แอกติวิตีลดลง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 4.3.8 ผลของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายต่อการตรึงรูปเอนไซม์

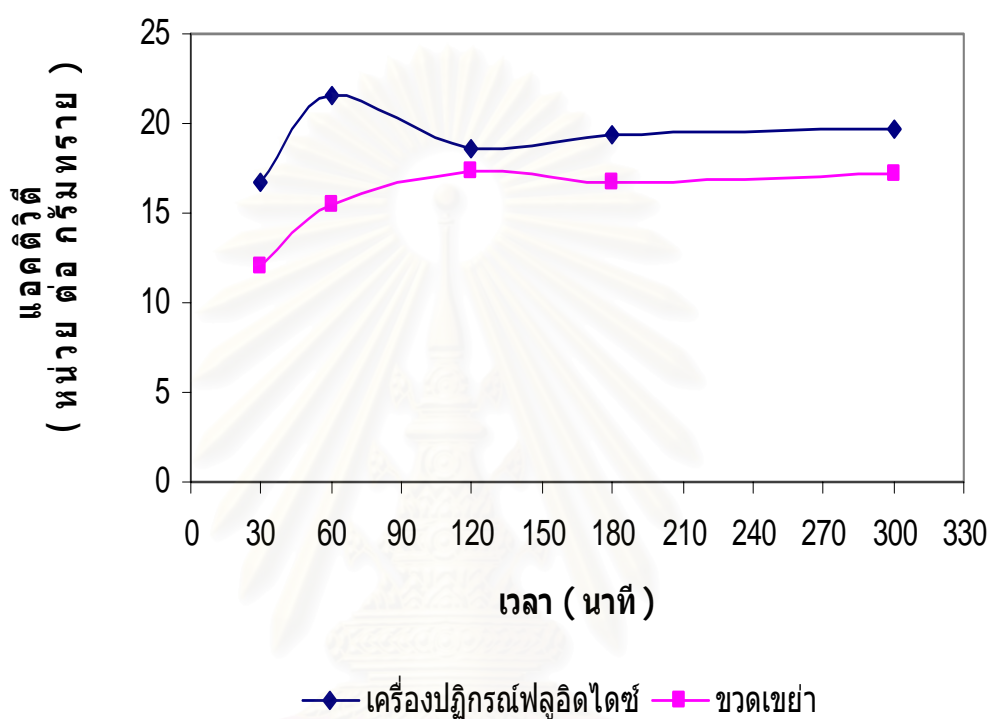
ทำการแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย โดยทำการแปรผัน 5 ระดับ คือ 30, 60, 120, 180 และ 300 นาที โดยทำการตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ตามวิธีดำเนินการข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.3 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์หาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12

เมื่อพิจารณาแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่า ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในขวดเขย่า คือ ที่ 120 นาที โดยแอกติวิตีจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในนาทีที่ 30 – 120 นาทีและหลังจากนั้นแอกติวิตีจะเริ่มมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะเวลาที่ 120–300 นาที ดังนั้นในการตรึงในขวดเขย่าจึงเลือกใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่ 120 นาที สำหรับทดลองต่อไป ในขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ทำการตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์นั้น พบว่า ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายผลของปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ คือ ที่ 60 นาที หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงจนเข้าสู่ภาวะคงที่ จากผลพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายสำหรับการตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าการตรึงในขวดเขย่า



รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่ร้อยละที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูป





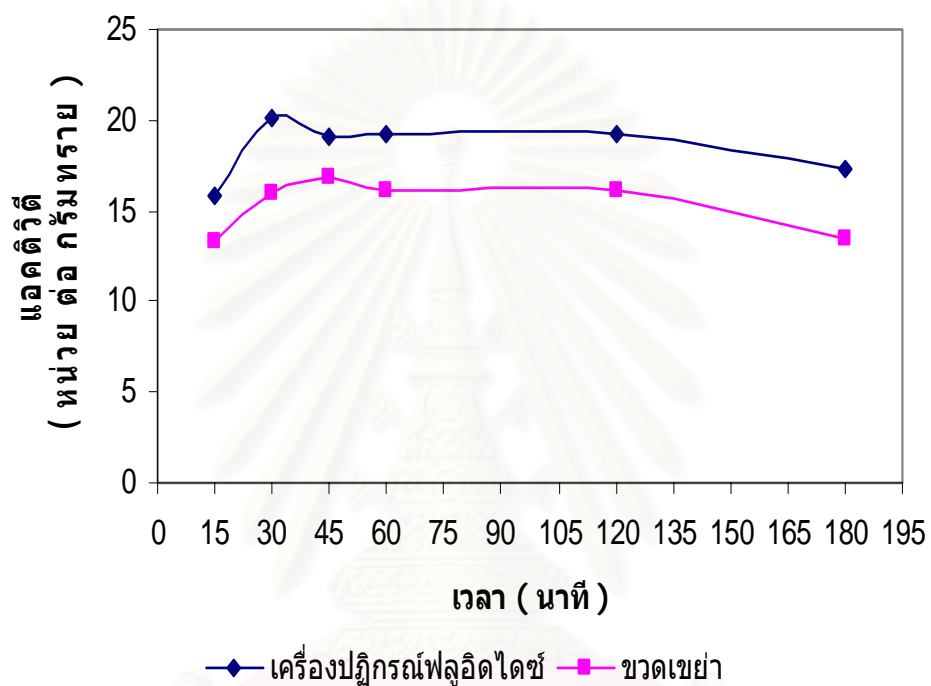
รูปที่ 4.12 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3.9 เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับผิวทราย

ดำเนินการแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสที่ตรึงบนทรายโดยทำการตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.3 ตามลำดับ โดยแปรผันเวลา 6 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาทีตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4.5 จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13

พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปในขวดเขย่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ 15–45 นาที และจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ ที่เวลา 45 นาทีผ่านไปจนถึง 180 นาที จึงเลือกใช้เวลาที่ 45 นาที เนื่องจากเป็นเวลาที่สั้นที่สุดสำหรับขั้นตอนการตรึงในขวดเขย่า และพบว่าในการตรึงโดยเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ตั้งแต่ที่ 30 นาทีเป็นต้นไป ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาที่ 30 นาทีในการตรึงโดยเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์



รูปที่ 4.13 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3.10 ผลของความเป็นกรดต่างและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์กับทรายต่อการตรึงรูปเอนไซม์

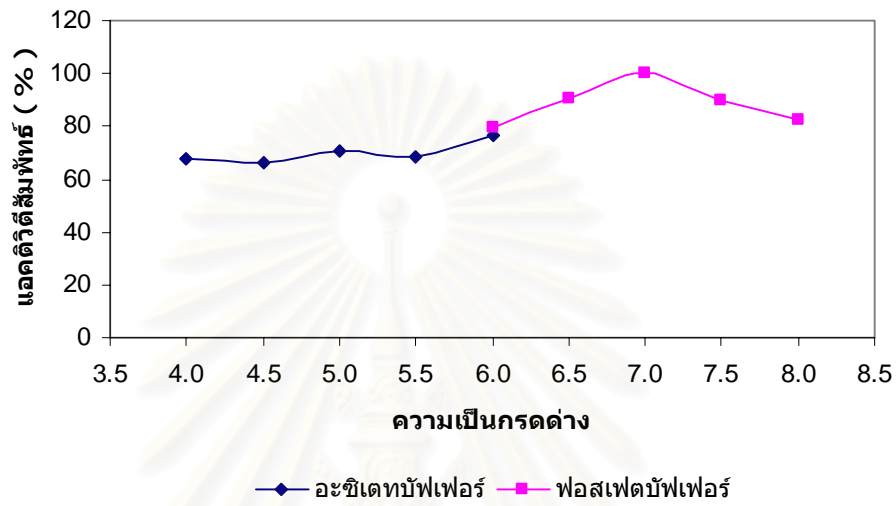
ดำเนินการแปรผันความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย ตั้งแต่ 4.0–8.0 (แปรผันที่ละ 0.5)ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.4.7 โดยทำการตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.3 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์หาแอกติวิตี ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามค่าความเป็นกรดต่างของกลูตารัลดีไฮด์ สัมพันธ์กันทั้งตรึงในระดับขวดเขย่าและตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ โดยที่ความเป็นกรดต่าง 4.0–7.0 จะเพิ่มขึ้น และจะเริ่มลดลงในช่วงความเป็นกรดต่าง 7.5–8.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.14 และ 4.15 โดยชนิดบัฟเฟอร์และความเป็นกรดต่างที่ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ดีที่สุดคือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง 7.0 จึงเลือกค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 7.0 ในการทดลองต่อไป

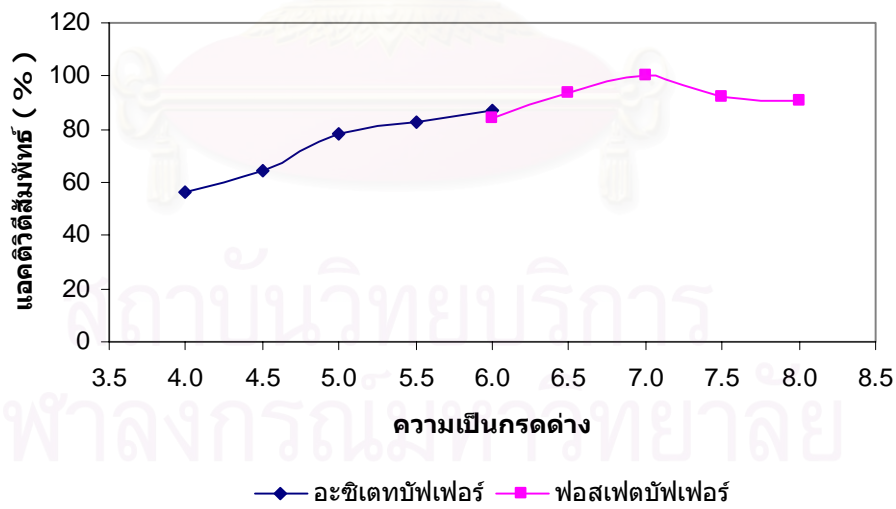
#### 4.3.11 ผลของความเข้มข้นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์กับทรายต่อการตรึงรูปเอนไซม์

ดำเนินการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ โดยทำการตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.3 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตี ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.16

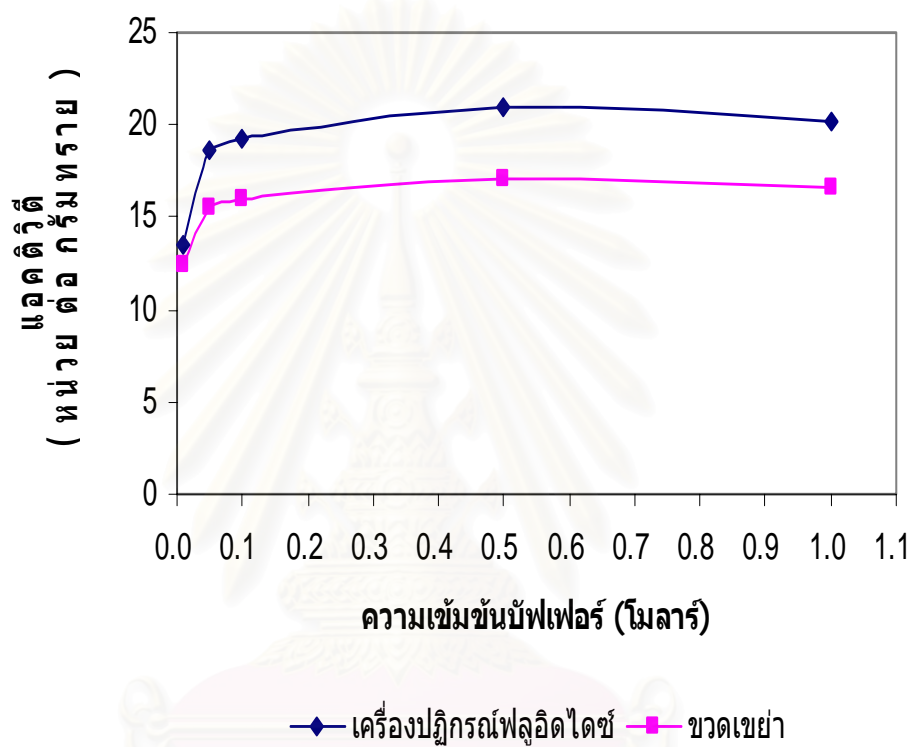
พบว่า แอกติวิตีเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยพบว่าที่สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นที่ 0.5 โมลาร์ จะให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ดีที่สุด จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์บัฟเฟอร์ที่ 0.5 โมลาร์ ใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.14 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในขวดเขย่า



รูปที่ 4.15 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์



รูปที่ 4.16 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.3.12 ผลของความเป็นกรดต่างและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการตรึงเดกซ์แทรนเนสบนผิวทราย

ดำเนินการแปรผันความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเดกซ์แทรนเนสกับทรายตั้งแต่ 2.5–6.0 (แปรผันทีละ 0.5) โดยทำการตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.3 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตี ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

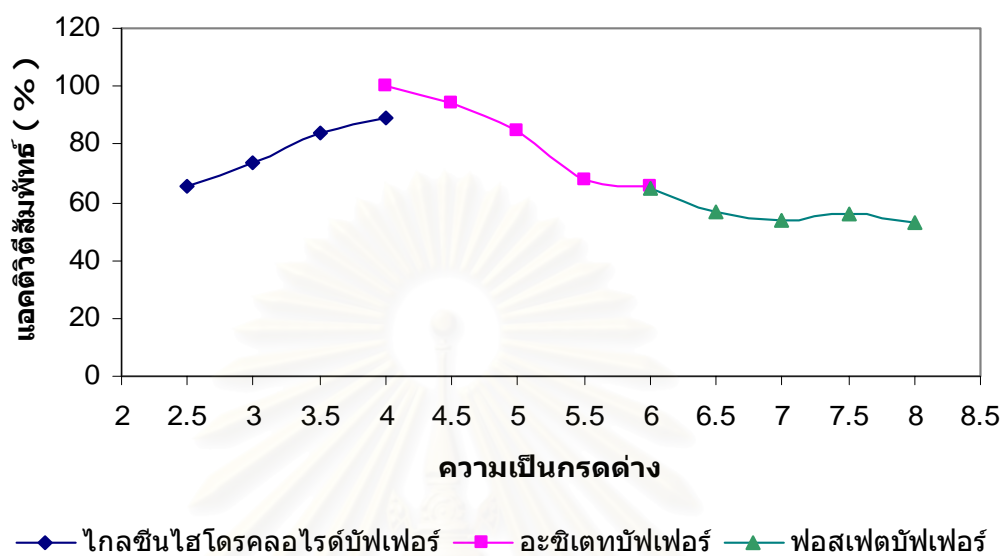
พบว่า ช่วงความเป็นกรดต่างที่ 2.5–4.0 แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและตั้งแต่ความเป็นกรดต่าง 4.5 เป็นต้นไป แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะเริ่มลดลงตามลำดับโดยให้ผลสัมพันธ์กันทั้งการตรึงในระดับขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17 และจากผลการทดลองพบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0 ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปดีที่สุด จึงเลือกค่าความเป็นกรดต่างในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 4.0 ไปใช้ในขั้นต่อไป

#### 4.3.13 ผลความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในการตรึงเดกซ์แทรนเนสบนผิวทราย

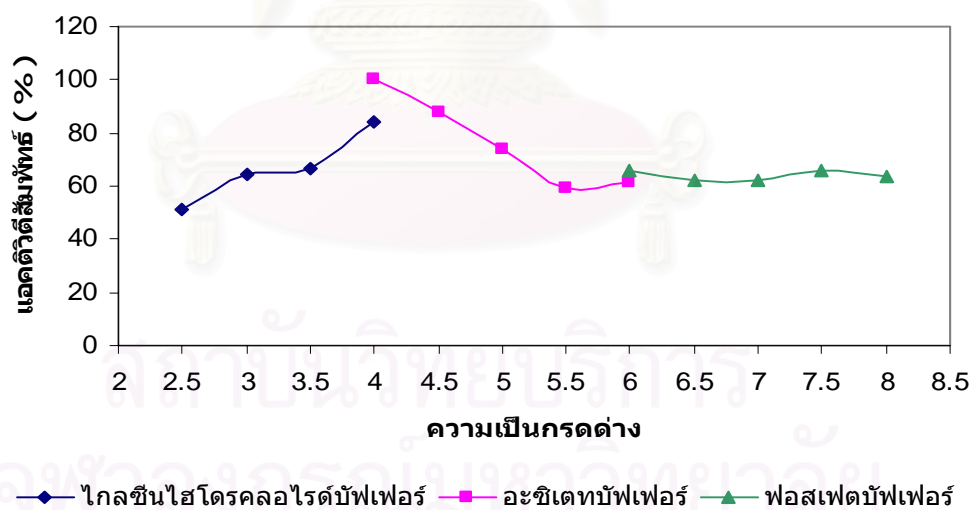
ดำเนินการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างเดกซ์แทรนเนสกับทราย 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ โดยทำการตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.2.2.2 และ 3.2.3 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตี ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.19

พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป ที่ตรึงในขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์มีแนวโน้มในทางเดียวกัน คือ เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 0.01–0.05 โมลาร์ และจะลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.19 โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปดีที่สุด จึงเลือกไปใช้ในการทดลองต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

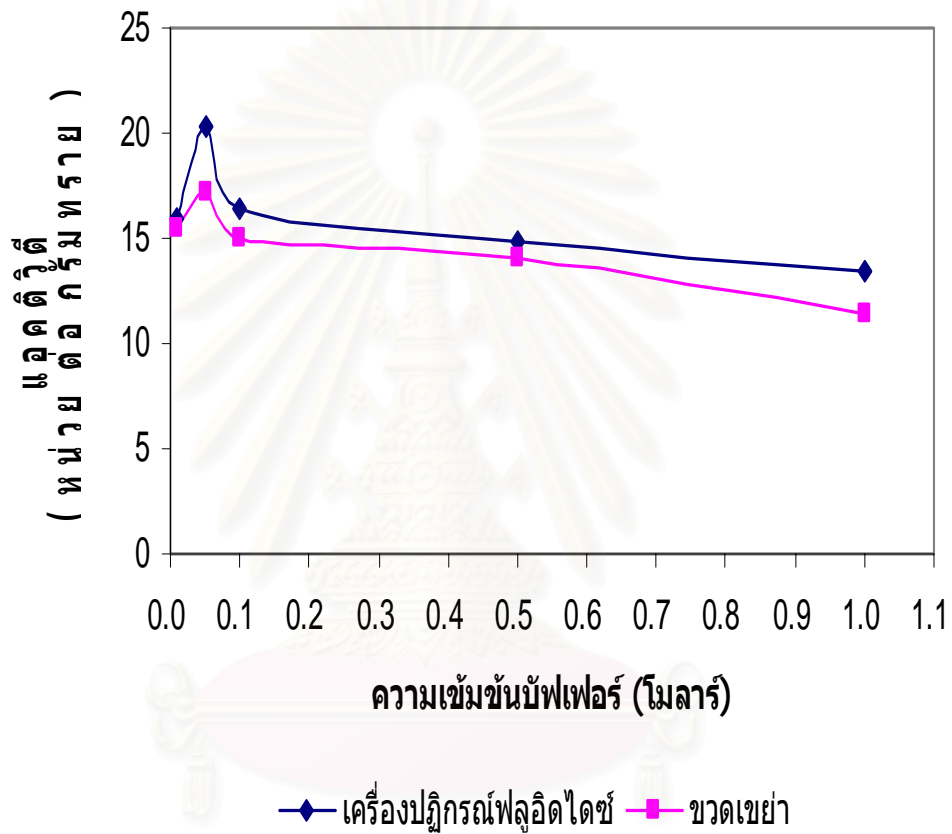


รูปที่ 4.17 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอน  
การตรึงเดกซ์แทรนเนสในขวดเขย่า



รูปที่ 4.18 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในขั้นตอน  
การตรึงเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์





รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

#### 4.3.14 ผลของอุณหภูมิต่อการตรึงรูปเอนไซม์

ดำเนินการแปรผันอุณหภูมิในการตรึงเดกซ์แทรนเนสในขวดเขย่า 2 ระดับ คือ ที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.4.10 จากนั้นวิเคราะห์แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ภาวะการทดลอง	แอกติวิตี ( หน่วย ต่อ 1 กรัมทราย)	แอกติวิตีกักขัง ( % )
อุณหภูมิห้อง	15.27 ± 0.124	22.82
4 องศาเซลเซียส	15.11 ± 0.117	22.59

พบว่า ไม่มีความแตกต่างของแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป ดังตารางที่ 4.19 ดังนั้น เพื่อความสะดวกและเพื่อประหยัดพลังงานในควบคุมอุณหภูมิในการทดลอง จึงเลือกทำการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.4 คุณสมบัติของเอนไซม์ตรีงรูป

##### 4.4.1 ผลของความเป็นกรดต่างและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระ

ทำการศึกษโดยทำการแปรผันความเป็นกรดต่างของสารผสมในปฏิกิริยา ในช่วงความเป็นกรดต่างต่างๆ โดยทำการแปรผันตั้งแต่ 4.0–8.0 โดยรักษาความเข้มข้นที่ใช้เท่ากับ 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์

พบว่า เมื่อทำการบ่มเดกซ์แทรนเนสตรีงรูป และ เดกซ์แทรนเนสอิสระที่ความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0–8.0 พบว่า ที่ความเป็นกรดต่างช่วง 4.0–5.0 เดกซ์แทรนเนสอิสระให้แอกติวิตีที่สูงกว่าเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปและพบว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระทำงานได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรดต่าง 4.5 และแอกติวิตีมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีความเป็นกรดต่างที่ 5.0–8.0 และเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปทำงานได้ดีที่สุดที่ 5.0 สูงกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระเล็กน้อย และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างสูงขึ้นเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปยังคงให้แอกติวิตีดีกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระดังแสดงในรูปที่ 4.20 ดังนั้นจึงเลือกความเป็นกรดต่างในการบ่มปฏิกิริยาที่ 5.0 ในการทำการศึกษาค้นคุณสมบัติของเอนไซม์ตรีงรูปในขั้นต่อไป

##### 4.4.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูป

ทำการศึกษโดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ตั้งแต่ 35–80 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มขึ้นทีละ 5 องศาเซลเซียส บ่มเอนไซม์ตรีงเป็นเวลา 15 นาที พบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรีงรูป มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากัน คือ ที่ 55 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 60–70 องศาเซลเซียส เดกซ์แทรนเนสตรีงรูปยังให้แอกติวิตีที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระที่สูญเสียแอกติวิตีอย่างรวดเร็วผลการทดลองดังรูปที่ 4.21

#### 4.4.3 ผลของความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเอนไซม์ตรีงรูป

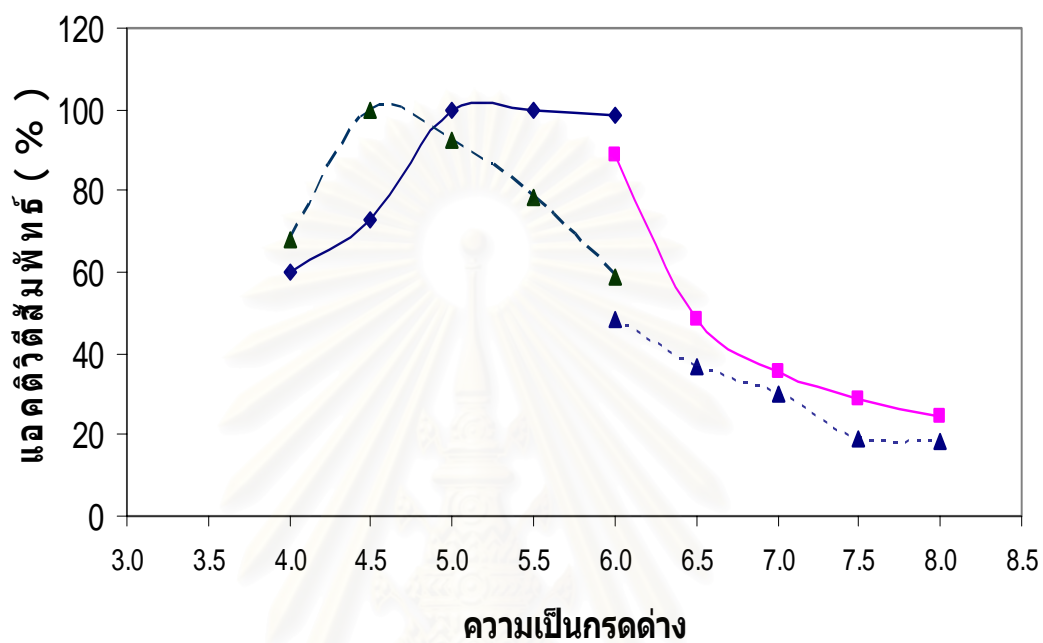
ปมเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ ในบัฟเฟอร์ที่แปรค่าความเป็นกรดต่าง ในช่วง 2.5–8.0 ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลือ โดยปมในปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม พบว่า เดกซ์แทรนเนสตรีงรูปมีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วง ตั้งแต่ 4.0–5.5 โดยที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.5 เดกซ์แทรนเนสตรีงรูปยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 80% และเดกซ์แทรนเนสอิสระ มีช่วงของความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างที่แคบกว่าที่ 4.0–5.0 โดยที่ความเป็นกรดต่าง 5.5 มีแอกติวิตีเหลืออยู่เพียง 60% ดังแสดงในรูปที่ 4.22

#### 4.4.4 ผลของความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ตรีงรูป

ปมเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ มาปมที่อุณหภูมิช่วง 35–80°ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอกติวิตีที่เหลือ โดยปมในปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม พบว่า เดกซ์แทรนเนสตรีงรูปมีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 60°ซ โดยที่อุณหภูมิ 60°ซ เดกซ์แทรนเนสตรีงรูปยังคงมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 80% และเดกซ์แทรนเนสอิสระ มีช่วงของความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงที่แคบกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55°ซ โดยมีแอกติวิตีเหลืออยู่ 70% ดังแสดงในรูปที่ 4.23

#### 4.4.5 ผลของการนำเอนไซม์ตรีงรูปและเอนไซม์อิสระไปทำการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที่-2000

เปรียบเทียบการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรนที่ 2000 ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปโดยการปมเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปกับเดกซ์แทรน ที่-2000 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ที่อุณหภูมิ 55°ซ เวลา 0–300 นาที จากการทดลองเมื่อเวลาผ่านไปจนกระทั่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมาเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เอนไซม์ตรีงรูปปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากเอนไซม์อิสระ ดังแสดงในรูปที่ 4.24 และเมื่อทำการทดลองเติมเอนไซม์อิสระลงไปโดยเริ่มที่นาทีที่ 20 และเติมทุก 15 นาที พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยออกมาหลังจากเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่ มีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยจะเริ่มเข้าสู่ภาวะคงที่มีปริมาณใกล้เคียงกันผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.25

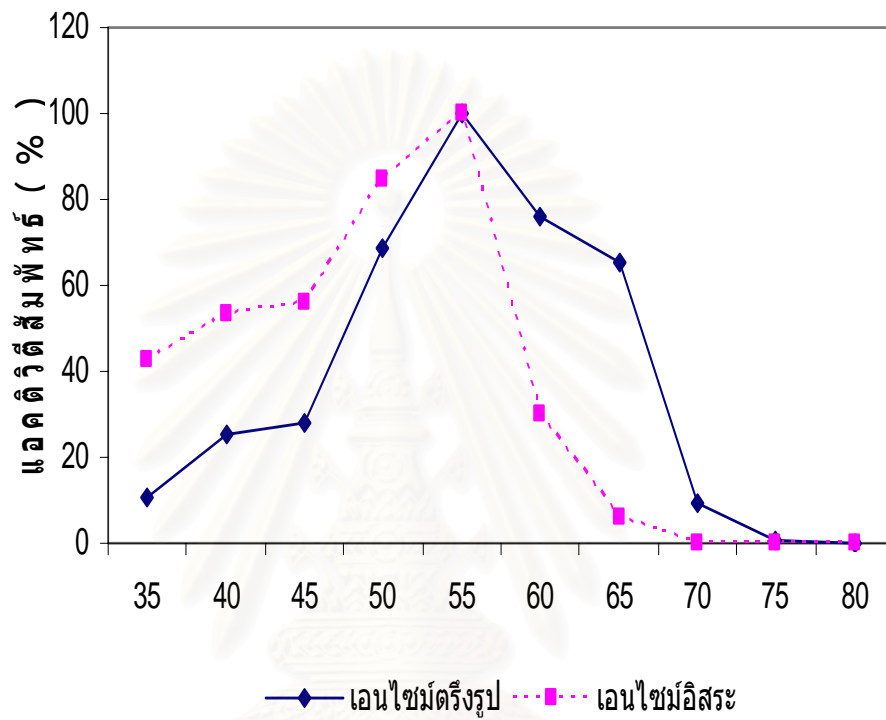


- ◆— เอนไซม์ตรึงรูป อะซิเตทาร์บเฟอร์    —■— เอนไซม์ตรึงรูป ฟอสเฟตบัพเฟอร์  
 - - ▲ - - เอนไซม์อิสระ อะซิเตทาร์บเฟอร์    ···▲··· เอนไซม์อิสระ ฟอสเฟตบัพเฟอร์

รูปที่ 4.20 ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

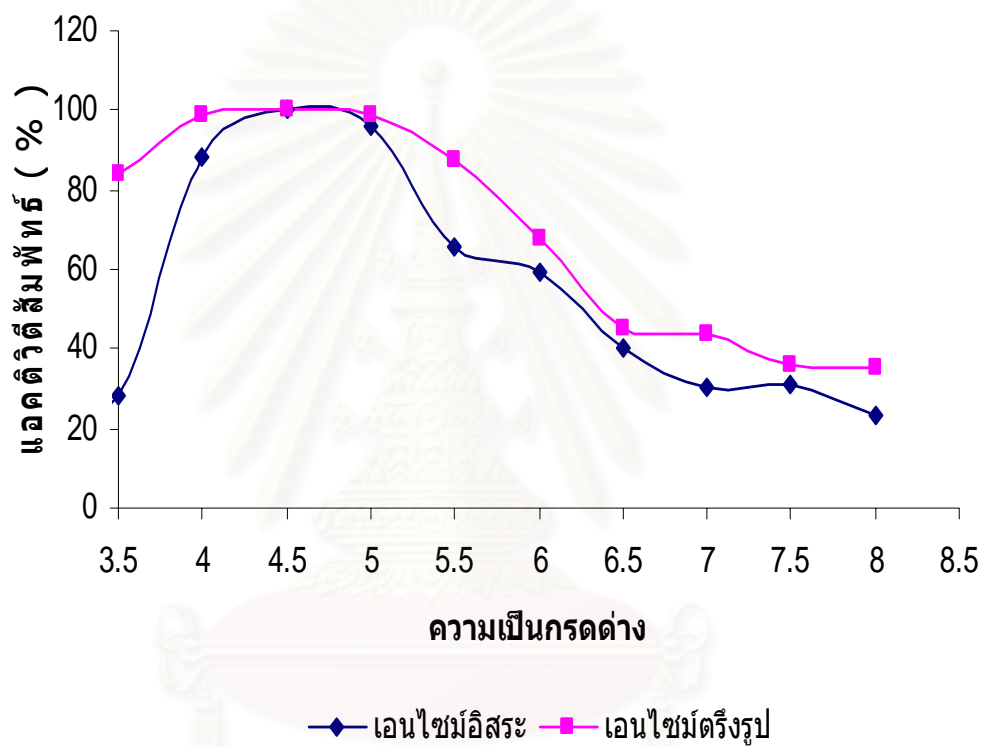
และเดกซ์แทรนเนสอิสระ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



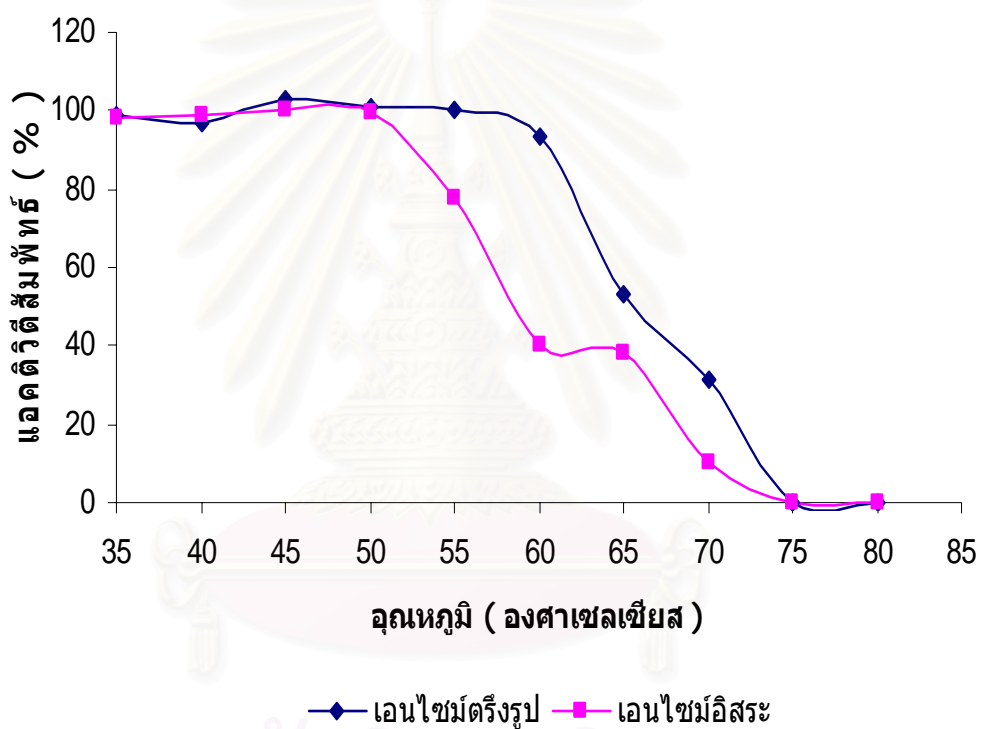
รูปที่ 4.21 คุณภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานของเด็กซ์แทรนเนสตรึงรูปและเด็กซ์แทรนเนสอิสระ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



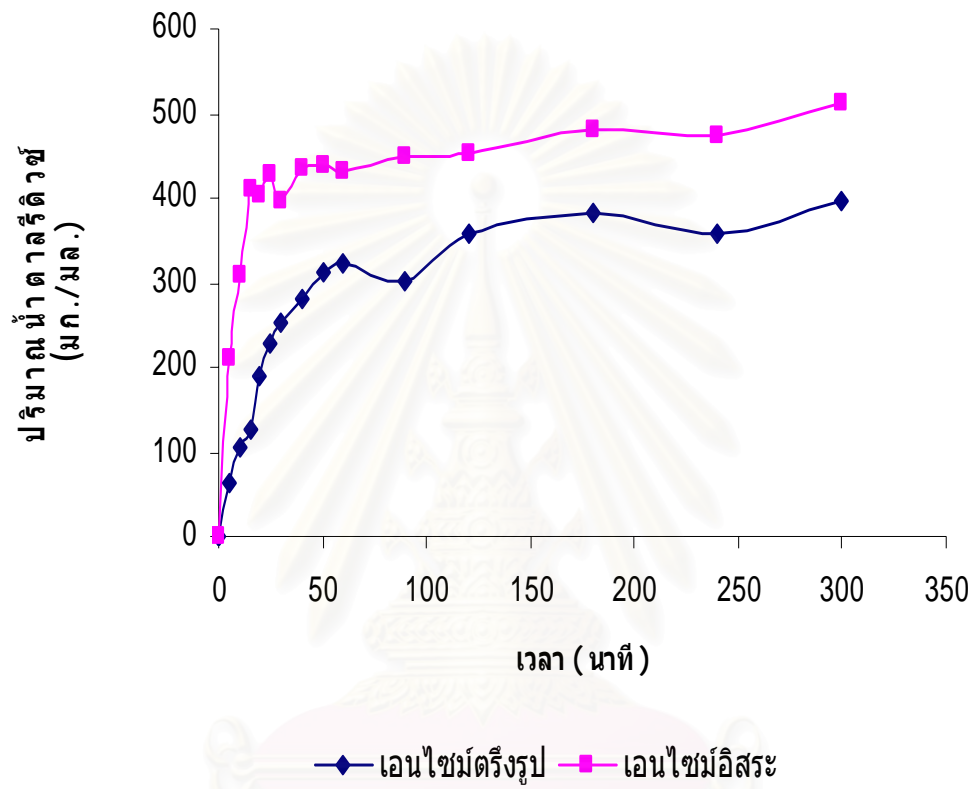
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.22 ผลของความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างของเอนไซม์ตรึงรูป



รูปที่ 4.23 ผลของความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ตรึงรูป





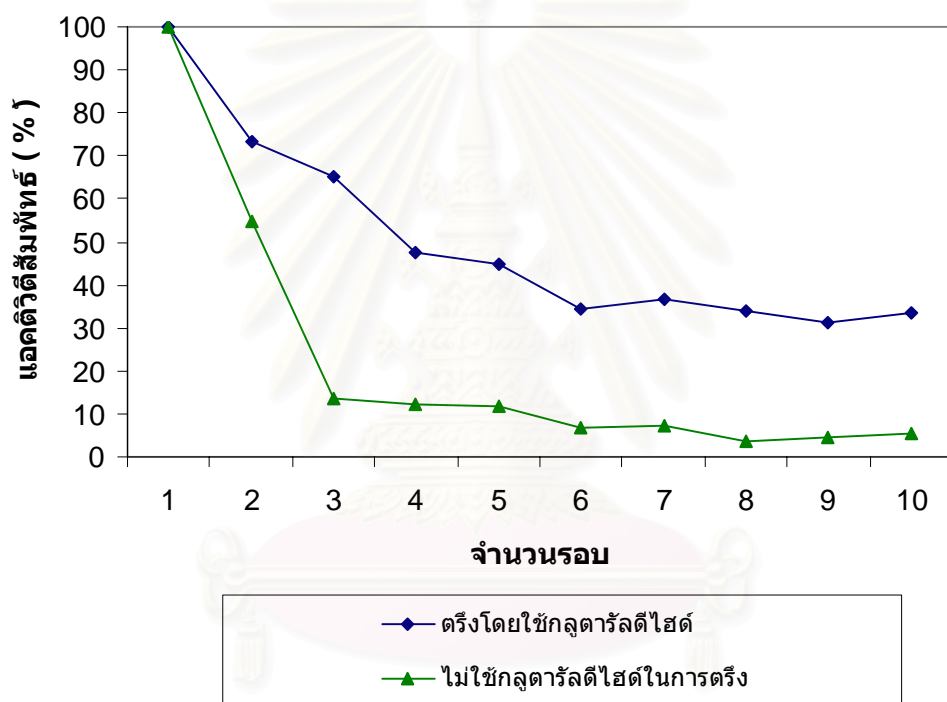
รูปที่ 4.24 ผลของการนำเอนไซม์ตริงรูปและเอนไซม์อีสระมาทำการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที่- 2000

#### 4.4.6 จำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรังรูป

เมื่อใช้เดกซ์แทรนเนสตรังรูปทำการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที่-2000 เป็นจำนวน 10 รอบ ต่อเนื่องกันที่ความเป็นกรดต่าง 5.0 ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6.7 โดยเปรียบเทียบระหว่างการตรึง โดยมีกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไข้ว และ ไม่มีกลูตารัลดีไฮด์ พบว่า แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปที่ไม่มีกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไข้วจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียงประมาณ 10% ในรอบที่ 3 ในขณะที่เอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไข้วจะยังคงมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 50% ในรอบที่ 5 และจะลดลงเหลือประมาณ 25-30% ตั้งแต่รอบที่ 6-10 ดังแสดงในรูปที่ 4.25



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.25 จำนวนรอบของการใช้ข้อเดกซ์แทรนเนสตรงรูป

#### 4.4.7 ผลของการเสียความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูป

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.6.8 โดยวัดแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปที่ถูกนำไปใช้ซ้ำในชุดการทดลองที่ 1 เทียบกับการทดลองชุดที่ 2 ซึ่งได้กำหนดให้ การทดลองชุดที่ 1 ทำการนำเอนไซม์ตรีงรูปบ่มในบัฟเฟอร์แล้วครั้งที่สองจึงค่อยมาบ่มกับซับสเตรต การทดลองชุดที่ 2 ทำการนำเอนไซม์ตรีงรูปบ่มกับซับสเตรตทั้งสองครั้ง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 ผลของการเสียสภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรีงรูป

	แอกติวิตี ( หน่วยต่อ 1 กรัมทราย)
การเติมซับสเตรต 1 รอบ	$15.676 \pm 0.442$
การเติมซับสเตรต 2 รอบ	$15.775 \pm 0.362$
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	334.59 หน่วย

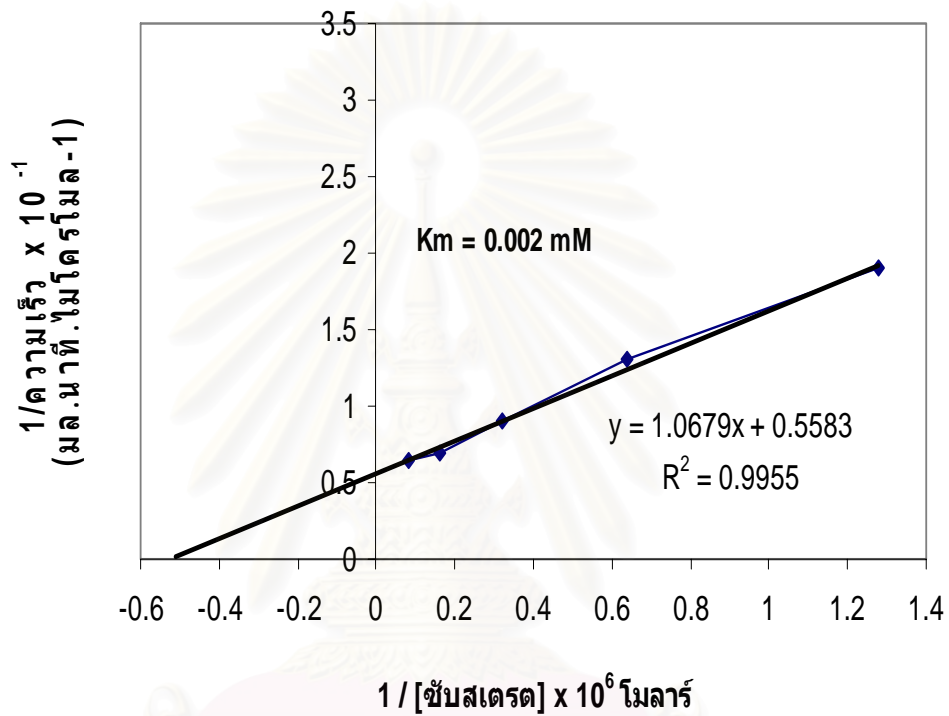
พบว่าการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปในการนำมาใช้ซ้ำในรอบที่สองมีผลลดลงทั้งสองชุดการทดลอง ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าการทำเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปเมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำในรอบต่อไป จะสูญเสียความสามารถเนื่องจากการหลุดของเอนไซม์ เป็นส่วนใหญ่ไม่ใช่จากการถูกทำลายบริเวณจำเพาะกับซับสเตรตหรือบริเวณเร่ง (active site) เนื่องจากในการทดลองชุดที่มีการบ่มกับซับสเตรต 1 รอบ ได้ทำการบ่มเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปในบัฟเฟอร์โดยไม่มีซับสเตรตในรอบที่ 1 แล้วจึงค่อยนำมาบ่มกับซับสเตรตในรอบที่สองพบว่าในรอบที่สองนั้น พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปลดลงทั้งที่ในรอบแรกไม่มีซับสเตรตไปเกาะบริเวณเร่ง เลย

4.4.8 ผลของการหาค่า  $K_m$  โดยวิธีไลเนวีเวอร์-เบิร์กของเอนไซม์ตรีงรูปเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที่-2000 เป็นซับสเตรต โดยวัดแอกติวิตีที่  $55^\circ\text{C}$  ความเป็นกรดต่างที่ 5.0 และ เดกซ์แทรนเนสอิสระเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที่-2000 เป็นซับสเตรต โดยวัดแอกติวิตีที่  $55^\circ\text{C}$  ความเป็นกรดต่างที่ 4.5

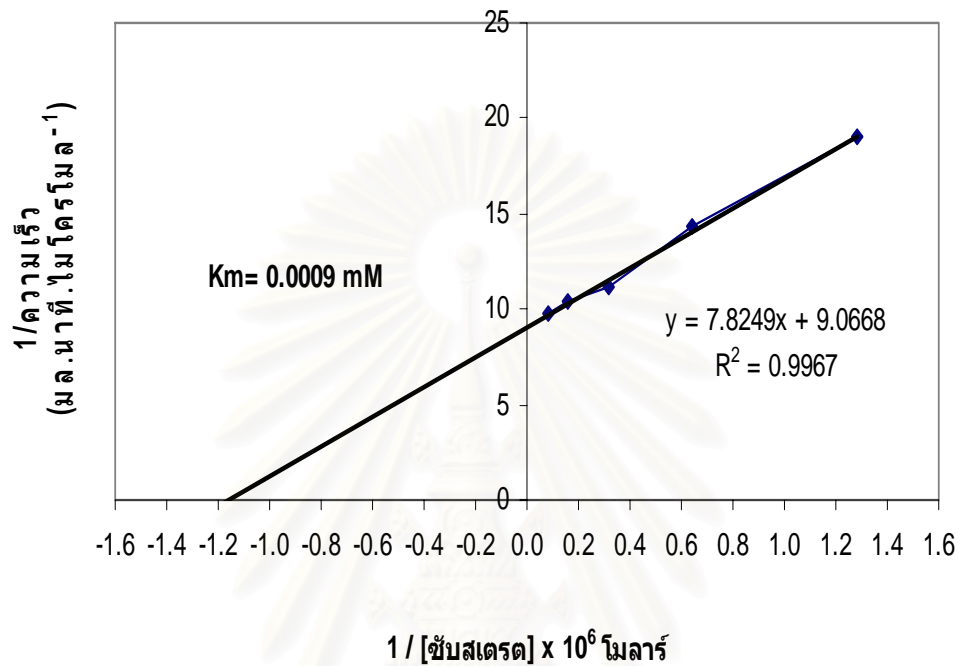
ดำเนินการวิเคราะห์ทางจลศาสตร์ของการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูป โดยแปรผันความเข้มข้นของซับสเตรต คือ เดกซ์แทรน ที่-2000 แล้วหาแอกติวิตีของเอนไซม์ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามไลเนวีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver - Burk Plot) ระหว่าง  $1/V$  และ  $1/[S]$  หาค่าจุดตัดแกน X นำไปคำนวณค่า  $K_m$  พบว่าค่า  $K_m$  ของเดกซ์แทรนเนสตรีงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ เท่ากับ 0.002 และ 0.0009 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.26 และ 4.27 ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.26 การประมาณค่า  $K_m$  โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที่  $-2000$  เป็นซับสเตรต โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่  $55^\circ\text{C}$  ความเป็นกรดต่าง 5.0



รูปที่ 4.27 การประมาณค่า  $K_m$  โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Line weaver-Burk plot) ของเดกซ์แทรนเนส อีสระเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที่-2000 เป็นซับสเตรต โดยทำการบ่มเอนไซม์ที่รูปที่ 55<sup>๐</sup> ความเป็นกรดต่าง 4.5

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผล

การทดลองนี้มุ่งที่จะหาวิธีการตรึงเดกซ์แทรนเนสในระดับขยายส่วน โดยได้ใช้เดกซ์แทรนเนส ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ที่คัดแยกโดยสุวรรณ นพพรพันธุ์ (2528) โดยการตรึงรูปบนทราย ทั้งนี้ได้ใช้ทรายเป็นตัวพุงในการตรึงรูป เนื่องจากทรายเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย มีราคาถูก ไม่มีพิษ ทนต่อแรงกระแทกได้ดี สามารถคงรูปอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดต่ำกว่าที่รุนแรงหรือในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ไม่ถูกทำลายได้โดยจุลินทรีย์ แยกออกจากระบบได้ง่ายและสามารถนำกลับมาใช้เป็นตัวพุงได้อีก โดยเพียงล้างด้วยกรดไนตริกเข้มข้นแล้วนำมาอบก็นำกลับมาใช้เป็นตัวพุงได้อีก

จากการทดลองของอนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ซึ่งได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวและขนาดของทรายที่จะใช้ในการตรึงรูป พบว่า ทรายขนาด 16–20 เมช มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ (Fluidized Bed Reactor) ในการทดลองระดับขยายส่วน

อย่างไรก็ตาม ในการทดลองเบื้องต้นพบว่าแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป มีแอกติวิตีต่ำมาก เมื่อเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์อิสระที่เติมลงไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ปัญหาดังกล่าวอาจเกิดจากกรรมวิธีการตรึงเอนไซม์โดยปริมาณโปรตีนที่ตรึงรูปมีต่ำมากหรือเอนไซม์ที่ตรึงรูปอาจทนภาวะการตรึงไม่ได้จึงทำให้สูญเสียแอกติวิตีไป การศึกษาประเด็นดังกล่าวจึงทำการศึกษารายละเอียดของการตรึงเอนไซม์โดยเริ่มจากขั้นตอนการเตรียมตัวพุงก่อนที่จะนำมาทำการตรึงรูป โดยได้นำการทดลองแช่ทรายในกรดไนตริกเข้มข้นเป็นระยะเวลาสั้นขึ้นจากเดิมแช่ทรายที่จะนำมาเป็นตัวพุงโดยตั้งทิ้งไว้ 1 วัน เพิ่มเป็นระยะเวลา 2,3,4 และ 5 วัน ตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างในแง่ของแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองแช่ทรายในกรดไนตริกเข้มข้นโดยนำไปแช่ที่ 200 รอบต่อนาที พบว่า สามารถเพิ่มแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปให้สูงขึ้นถึง 5 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าการแช่เป็นการเพิ่มการเข้าทำปฏิกิริยาของกรดไนตริกกับทราย เนื่องจากทรายมีน้ำหนักจึงเกิดการทับกันจนพื้นที่ผิวบางแห่งไม่ได้สัมผัสกับกรด ดังนั้นแม้จะแช่ทิ้งไว้ถึง 5 วัน ก็ไม่ได้เพิ่มการจับตัวของเอนไซม์แต่อย่างไร แต่การแช่จะทำให้กรดไนตริกสัมผัสกับผิวทรายได้มากขึ้นทั่วทุกพื้นผิว ทำให้กรดไนตริกสามารถที่จะไปดึงคาร์บอนเนตที่เป็นองค์ประกอบอยู่บนผิวของทรายได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการตั้งแช่ทิ้งไว้ ทำให้ทรายมีประจุเป็นบวกจึงจับกับหมู่ aldehydyde ของกลูตารัลดีไฮด์ ให้มีการจับเกาะใน



ลักษณะ ionic binding ทำให้ลดความรุนแรงของปฏิกิริยาที่เกิดจากลูตารัลดีไฮด์กับเอนไซม์และทำให้พื้นผิวเหมาะสมต่อการเกาะของเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้นนั่นเอง

ในการพิจารณาเบื้องต้นสำหรับการทดลองเลือกตั้งเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบด เนื่องจากการตั้งในเครื่องปฏิกรณ์แบบที่มีใบพัด จะทำลายสภาพของเอนไซม์ในระหว่างการตั้งมาก อีกทั้งการตั้งในเครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดซ์เบดยังเป็นระบบที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนเมื่อเทียบกับรีแอกเตอร์ชนิดอื่น และทำให้เกิดการเสียหายของเอนไซม์ในระหว่างการตั้งน้อยที่สุด จึงเลือกที่จะทำการทดลองตั้งขยายส่วน ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบด

เมื่อทดลองศึกษาผลของปริมาณทรายและปริมาตรของสารผสมปฏิกิริยาต่อการตั้งรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ พบว่า น้ำหนักของทราย (ปริมาณทราย) และปริมาตรของสารละลายในระบบมีผลต่อการกระจายตัวของเม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ พบว่าลักษณะการไหลของเม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ แบ่งได้ 2 แบบ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 คือ แบบ Smooth Fluidization เป็นการไหลที่เม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์มีการไหลกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอภายในเครื่องปฏิกรณ์ และ แบบ Bubbling Fluidization เป็นการไหลที่มีแก๊สส่วนหนึ่งทำให้เกิดการลอยตัวของเม็ดของแข็งและมีแก๊สบางส่วนเกิดเป็นฟองแทรกตัวมาบนผิวหน้าและแตกตัวซึ่งในขณะที่แก๊สแตกตัวมายังบริเวณผิวหน้าจะมีเม็ดของแข็งบางส่วนลอยติดมาด้วยทำให้เม็ดของแข็งภายในเบดมีการเคลื่อนที่แบบปั่นป่วน ซึ่งเมื่อทำการทดลองหาแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปที่เลือกปริมาณทรายและปริมาตรสารละลายในเครื่องปฏิกรณ์ให้เกิดการไหลภายในเครื่องปฏิกรณ์เป็นแบบ Smooth Fluidization และ แบบ Bubbling Fluidization พบว่า แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปที่มีการไหลของเม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์แบบ Smooth Fluidization ให้แอกติวิตีสูงกว่าแอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตั้งรูปที่มีการไหลของเม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์แบบ Bubbling Fluidization ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการที่เม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์มีการไหลแบบ Smooth Fluidization มีการกระจายตัวได้ดีกว่าแบบ Bubbling Fluidization ทำให้มีการสัมผัสกับสารผสมในเครื่องปฏิกรณ์ได้อย่างทั่วถึงในขณะที่เม็ดของแข็งภายในเครื่องปฏิกรณ์ที่มีการไหลแบบ Bubbling Fluidization ซึ่งเป็นกรไหลแบบปั่นป่วนภายในเครื่องปฏิกรณ์เกิดการเสียดสีกันมากกว่าแบบ Smooth Fluidization ทำให้โปรตีนไม่สามารถจับเกาะกับผิวทรายได้ดีเท่าการไหลแบบ Smooth Fluidization จึงทำให้แอกติวิตีต่ำกว่า ดังนั้นในการทดลองในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบด จึงเลือกน้ำหนักทรายและปริมาตรสารผสมปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเม็ดของแข็งแบบ Smooth Fluidization ในการตั้งรูปต่อไป

ในการตรึงรูปเอนไซม์ตามวิธีการของ อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ได้ทำการตรึงรูป เดกซ์แทรนเนส โดยอาศัยเฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารไบฟังก์ชันัลเพียงอย่างเดียว ในการช่วยให้ เอนไซม์ยึดติดกับตัวพุง ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของกลูตารัลดีไฮด์ต่อการตรึงรูป เดกซ์แทรนเนส โดยได้ทำการทดลองตามวิธีการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.2.2 พบว่า ผลของการเติม เดกซ์แทรนเนสผสมลงไปพร้อมกับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และการทดลองที่ทำการเติม สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ลงไปก่อนแล้วจึงเททิ้งโดยไม่ได้ทำการล้างแล้วเติมเดกซ์แทรนเนสลงไป ผลปรากฏว่าให้แอกติวิติต่ำ เมื่อเทียบกับการทดลองที่ทำการเติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไปแล้วล้าง สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ส่วนที่เกินออกก่อนทำการเติมเดกซ์แทรนเนสลงไปพบว่าให้แอกติวิติตี ที่สุด ผลแสดงดังรูปที่ 4.5 และเมื่อทดลองนำน้ำล้างเดกซ์แทรนเนสส่วนเกินที่เททิ้งมาหาแอกติวิติตี พบว่าแอกติวิติตีที่ต่ำกว่า แอกติวิติตีของน้ำล้างจากชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ลงไป (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) สามารถอธิบายผลได้ว่าเมื่อใดก็ตามที่ สารละลายกลูตารัลดีไฮด์สัมผัสกับเอนไซม์โดยตรงที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลทำลายสภาพธรรมชาติ ของเอนไซม์ ทำให้การทำงานของเอนไซม์เสื่อมไปจึงให้ได้แอกติวิติต่ำ แต่อย่างไรก็ตามกลูตารัลดี ไฮด์จัดว่าเป็นสารไบฟังก์ชันัลที่มีส่วนช่วยให้เอนไซม์ยึดติดกับตัวพุงได้ดีขึ้น โดยมีผลต่อบริเวณ เร่งปฏิกิริยาของเอนไซมน้อย ดังผลการทดลองที่นำเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วย ตรึงมาทดลองใช้ซ้ำหลายรอบปรากฏว่าแอกติวิติตีในรอบที่ 2,3 ยังคงมีแอกติวิติตีที่อยู่เมื่อเทียบกับการ ตรึงโดยไม่ได้เติมกลูตารัลดีไฮด์ลงไป ดังแสดงในรูปที่ 4.26 อธิบายได้ว่ากลูตารัลดีไฮด์น่าจะมี ผลในการจับเกาะของโปรตีนให้เสถียรมากขึ้นหากใช้ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม สอดคล้องกับการ ทดลองของ Zhou และ Chen (2001) ที่ทำการตรึงบีตา-กาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase)บนผิว ของกราฟไฟต์ โดยกล่าวว่าสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารไบฟังก์ชันัลที่มีส่วนช่วยในการยึดติด กับตัวพุงให้ดีขึ้น Celina และ คณะ (2003) ที่ได้ทำการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส โดยวิธีการ ตรึงในเม็ดเจลแอลจินेट บนโคโคซานฟิล์ม และ การใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมไข้ว พบว่า วิธีการตรึงโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ให้แอกติวิติตีที่สูง และเมื่อทดลองนำไปใช้ซ้ำพบว่าในรอบที่ 3 ยังคงเหลือแอกติวิติตีถึง 60% ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้เลือกการตรึงรูปเอนไซม์โดยใช้ กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารไบฟังก์ชันัลโดยต้องทำการเลือกความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ให้ เหมาะสมเพื่อที่จะให้ได้แอกติวิติตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ดีที่สุด

สำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรังรูปในงานวิจัยนี้ ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยตรึง โดยสภาวะที่เหมาะสมทั่วไปสำหรับการตรึงในระดับขูดเขย่าและตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบดเป็นสภาวะเดียวกัน คือ เลือกเตรียมภายใต้อุณหภูมิห้อง ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย ใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้น 2.5% (โดยปริมาตร) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.0 ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ซึ่งกลไกการตรึงรูป โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารไบฟังก์ชันัลช่วยในการตรึงนั้น มีส่วนช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น โดยจะทำหน้าที่เชื่อมโยงโมเลกุลโปรตีนของเอนไซม์ โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่ำจะให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์สูงขึ้นจนถึงค่าหนึ่ง จะทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่สูงเกินไปจะมีผลไปทำลายโครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ ทำให้เสียสภาพในการทำงาน

สำหรับอัตราการเขย่าสำหรับการทำปฏิกิริยาในขูดเขย่าได้เลือกใช้ที่ 200 รอบต่อนาที โดยคำนึงถึงความสะดวกในการทดลองเป็นหลัก เนื่องจากแอกติวิตีที่ได้จากการแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าให้ผลแอกติวิตีที่ไม่มีความแตกต่างกันมาก ดังแสดงผลในตารางที่ 4.6 และสำหรับผลของปริมาณการให้อากาศในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ผลที่ได้คือ แอกติวิตีจะคงที่ช่วงที่มีการให้อากาศแล้วไม่เพียงพอที่จะทำให้เม็ดของแข็งกระจายตัวภายในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ แต่จะมีแอกติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มการให้อากาศที่ทำให้ทรายกระจายตัวได้ดี จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเม็ดของแข็งวางตัวบนตะแกรงกระจายแก๊สและมีแก๊สผ่านขึ้นมาด้วยความเร็วที่เพิ่มขึ้น พบว่าเมื่อแก๊สผ่านเบดมาด้วยความเร็วต่ำ ไม่เพียงพอที่จะทำให้ของแข็งกระจายตัว เม็ดของแข็ง (ทราย) ที่วางตัวอยู่บนตะแกรงจะวางตัวนิ่งไม่เคลื่อนไหว แต่ยังคงมีการไหลของของไหลผ่านเม็ดของแข็งนั้นอยู่จึงทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก จนกระทั่งเพิ่มความเร็วแก๊สจนถึงค่าหนึ่งอนุภาคของเม็ดของแข็งจะเริ่มเคลื่อนที่ให้การสัมผัสกับสารผสมปฏิกิริยาได้ดีขึ้น แต่ถ้าเพิ่มปริมาณอากาศมากเกินไป ก็จะทำให้เกิดแรงเสียดสีมากขึ้นทำให้โปรตีนหลุดได้ แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจึงลดลง และนอกจากนั้นยังพบอีกว่าการตรึงรูปเอนไซม์ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ให้แอกติวิตีที่สูงกว่าการตรึงรูปในขูดเขย่า ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า ในการตรึงรูปในขูดเขย่า ในการทำการเขย่านั้นใช้เครื่องเขย่าที่เป็นแบบ rotary shaker ซึ่งมีการเขย่าในทิศทางเดียวคือเป็นแบบวงกลม ดังนั้นการชนกันของตัวทำปฏิกิริยาอาจไม่ดีเท่าการตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ซึ่งมีการให้อากาศให้เม็ดของแข็ง(ทราย)มีการกระจายตัวได้ดีกว่า ทำให้การชนกันของตัวทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้มากกว่า โอกาสในการชนในทิศทางที่เหมาะสมมากกว่า จึงทำให้เอนไซม์ที่ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์มีแอกติวิตีที่ดีกว่าการตรึงในขูดเขย่า

นอกจากนั้นความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดต่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย กลูตารัลดีไฮด์ดังกล่าว จะมีผลให้เกิดการเกาะของกลูตารัลดีไฮด์บนผิวของทราเยที่มีความเหมาะสมที่สุด ซึ่งจะเป็นผลให้ เอนไซม์สามารถสร้างพันธะยึดติดกับกลูตารัลดีไฮด์ สามารถแสดงแอกติวิตีที่ดีตามไปด้วย สอดคล้องกับการรายงานของ Puvanakrishnan และ Bose (1980) ที่ทำการตรึงเอนไซม์ทริปซินบนพื้นผิวของทราเยโดยใช้วิธีเดียวกัน กล่าวว่า กลูตารัลดีไฮด์สามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดต่างที่เป็นกลางจนถึงต่างได้ดีกว่าในช่วงที่เป็นกรด โดยในกระบวนการตรึงรูปได้ใช้เวลาการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราเยในขวดเขย่า 120 นาที และในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 60 นาที ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า การตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์มีการกระจายตัวของตัวพุง (ทราเย) ได้ดีกว่าการเขย่าในขวดเขย่า ทำให้โอกาสการชนกันของตัวปฏิกิริยาจึงมีมากกว่า และทำให้ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นกว่านั่นเอง

สำหรับขั้นตอนของการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส สภาพที่เหมาะสม คือ ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 0.3–1.5 มก. สำหรับการตรึงในขวดเขย่า โดยพบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์จะสูงขึ้นจนถึงค่าหนึ่งและจะเริ่มลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นมากกว่า 1.5 มก. แต่เมื่อทำการทดลองตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ในปริมาณที่มากขึ้น จึงได้ทำการทดลองเพื่อที่จะหาปริมาณเอนไซม์เจือจางเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่า เอนไซม์เจือจางเริ่มต้นที่ทำให้ได้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปดีที่สุดคือที่เอนไซม์เริ่มต้นเจือจาง 10 เท่า ในขณะที่ผลของการเติมเอนไซม์เริ่มต้นที่ไม่มีการเจือจางเลย, เจือจาง 5 เท่า และผลของการเติมเอนไซม์ที่เจือจางสูงขึ้น คือที่ 50 เท่า และ 100 เท่า ให้แอกติวิตีต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งสามารถอธิบายเหตุการณ์นี้ได้ว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มากเกินไป อาจมีผลกับการจัดระเบียบโมเลกุลของโปรตีน ที่ไม่เป็นระเบียบ และปริมาณโปรตีนที่มากเกินไป อาจเกิดการแย่งจับและไปบดบังบริเวณเร่งของสับสเตรทตามมาด้วย ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ต่ำ สอดคล้องกับการทดลองของ Bo'da และ Farell (1991) ที่ได้ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ บีตา-กาแลคโตซิเดส ( $\beta$ -galactosidase) โดยใช้แคลเซียมแอลจีเนต พบว่า เมื่อใส่เอนไซม์ปริมาณมากเกินไป จะให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำลง Busto และ Prabhu (1995) ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ บีตา-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucoosidase) โดยใช้แคลเซียมแอลจีเนต พบว่า การเติมเอนไซม์ปริมาณที่มากเกินไป ทำให้เกิด steric overcrowding เกิดการบดบังบริเวณเร่งของโมเลกุลโปรตีนที่อยู่ใกล้เคียงกัน

มีผลให้แอคติวิตีที่ได้ต่ำลง และ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เจือจาง 50 เท่า และ 100 เท่ามีแอคติวิตีต่ำ อธิบายได้ว่าอาจเจือจางเอนไซม์มากเกินไป ทำให้โมเลกุลของโปรตีนน้อยเกินไป เมื่อเกิดการกระจายตัวในสารผสมปฏิกิริยา จึงทำให้โอกาสที่จะเจอกันน้อยลง และเนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี สามารถอธิบายได้ตามทฤษฎีการชนของโมเลกุล (Collision Theory) โดยกล่าวว่าปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อมีการชนกันของตัวทำปฏิกิริยาในทิศทางที่เหมาะสม ทั้งนี้การที่เอนไซม์เจือจางมากเกินไป โอกาสในการชนกันของตัวทำปฏิกิริยาอาจจะน้อยตาม ทำให้แอคติวิตีที่ได้ต่ำ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงได้เลือกปริมาณเอนไซม์เจือจางเริ่มต้นที่ 10 เท่าในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เบดในการทดลองต่อไป

ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงสำหรับงานวิจัยนี้ ได้ใช้วิธีของ Lowry (1951) โดยคำนวณจากผลต่างของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นกับปริมาณโปรตีนที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาในน้ำล้าง แต่ในการตรึงเอนไซม์นี้ ได้ใช้เอนไซม์เริ่มต้นที่ไม่ได้ผ่านการทำบริสุทธิ์ (crude enzyme) จึงไม่สามารถบอกได้ว่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้เป็นโปรตีนที่เป็นเอนไซม์จริงหรือไม่ อาจเกิดความผิดพลาดในการรายงานผลได้สูง ดังนั้นในการรายงานผลงานวิจัยนี้จึงได้เปรียบเทียบจากค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ตรึงได้น้ำหนักตัวพุง

สำหรับผลของระยะเวลาการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสเนส ได้ทำการแปรผันเวลาตั้งแต่ 15–180 นาที พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป จะเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาแรก อธิบายได้ว่า ที่เวลาช่วงแรกจะมีโอกาสเกิดพันธะระหว่างเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้นจะถึงเวลาช่วงหนึ่ง เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ได้อีก เนื่องจากหมู่ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์หมด ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเข้าสู่สภาวะคงที่ แม้จะมีการเพิ่มเวลาให้นานขึ้น โดยระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในขวดเขย่าใช้เวลา 45 นาที ก็เพียงพอสำหรับที่จะทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์หมด ในขณะที่การตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์ใช้เวลาเพียง 30 นาที สามารถอธิบายได้ว่า ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิดไดซ์เม็ดของแข็ง (ทราย) มีการกระจายได้ดีกว่าการตรึงในขวดเขย่า ดังนั้นการชนกันของตัวทำปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีกว่าในขวดเขย่าจึงใช้เวลาสั้นกว่าและมีแอคติวิตีที่ดีกว่าในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในขวดเขย่า

ผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส คือ สารละลาย อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 , ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ อธิบายได้ว่า ที่ความเป็นกรดต่าง 4.0 นั้นเป็นค่าความเป็นกรดต่างที่ทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพธรรมชาติที่สมบูรณ์ที่สุด ที่ยังสามารถทำงานได้ตามปกติ จึงทำให้แอกติวิตีมีค่าสูง เนื่องจาก ความเป็นกรดต่างมีผลต่อสภาพรูปร่างของโปรตีน ถ้าความเป็นกรดต่างไม่เหมาะสม เอนไซม์ซึ่งเป็นสารประกอบพวกโปรตีนก็จะเสียสภาพไป ไม่สามารถทำงานได้ดังเดิม จึงทำให้แอกติวิตีที่ได้ต่ำ ซึ่งโดยปกติแล้วค่าความเป็นกรดต่างที่คงสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ ที่ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้น ดังการทดลองนี้ได้ทำการตรึงเดกซ์แทรนเนส ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Penicillium* sp ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ที่ปรับให้ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 สอดคล้องกับการทดลองของ Busto และ Prabhu (1995) ที่ทำการตรึง บีตา-กลูโคซิเดส ในแคลเซียมอัลจินेट พบว่า เอนไซม์ที่มาจากรา ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่าใด มักจะให้ค่าความเป็นกรดต่างขณะทำการตรึงที่ความเป็นกรดต่าง เช่นเดียวกัน โดยในการทดลองให้ค่าความเป็นกรดต่างขณะที่ทำการตรึงเอนไซม์นี้ คือ 3.0 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดต่างเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างเอนไซม์ ดังนั้นในการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.0 จึงทำให้สภาพธรรมชาติของโปรตีนที่ตรึงได้ยังคงสภาพดีที่สุด ที่จะให้แอกติวิตีของเอนไซม์ได้ดีที่สุดเช่นกัน

จากการศึกษาหาจำนวนรอบของการนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมาใช้ซ้ำ พบว่า แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป จะค่อยๆลดลง ในรอบหลังๆ ซึ่งสันนิษฐานได้ว่า เกิดจากการหลุดของโปรตีนหรืออาจเกิดจากการเสียสภาพของบริเวณเร่งของเอนไซม์ จึงได้ทำการทดลองศึกษาถึงการที่แอกติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ลดลงเมื่อมีการนำมาใช้ซ้ำ และจากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า การที่แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปลดลงเนื่องมาจากการหลุดของโปรตีน เนื่องจากได้ทดลองทำการบ่มแต่ในบัฟเฟอร์ก่อนในรอบแรก ซึ่งเอนไซม์จะไม่มีภาวะจับเกาะกับสับสเตรทให้เกิดความเสียหายบริเวณเร่งได้ แล้วจึงทำการหาแอกติวิตีในรอบต่อไป ซึ่งผลที่ได้ปรากฏว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าลดลงเหมือนกับการทดลองที่นำเอนไซม์ตรึงรูปไปใช้ก่อนรอบหนึ่งแล้วจึงเอามาใช้ซ้ำ แสดงว่า การลดลงของแอกติวิตีเกิดจากการหลุดของเอนไซม์ มากกว่าการเสียสภาพของบริเวณเร่ง สอดคล้องกับการทดลองของ Amorim และ คณะ (2003) ที่ได้ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสบนไคโตซานฟิล์ม โดยใช้กลูตาร์ลดีไฮด์เป็นสารไบฟังก์ชันนัล พบว่าเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำ แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะค่อยๆลดลง ที่หลังจากใช้ในปฏิกิริยาแล้ว 6 รอบ เหลือแอกติวิตีอยู่ประมาณ 25 %

และเมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรังรูป พบว่า ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปเท่า 5.0 และเดกซ์แทรนเนสอิสระเท่ากับ 4.5 โดยเลื่อนไปทางต่างเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.20 ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่า ในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์นั้น หมู่อะมิโน ( $-NH_2$ ) ของเอนไซม์จะถูกนำไปสร้างพันธะกับกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้หมู่คาร์บอกซิล ( $-COOH$ ) ไม่แตกตัว จึงต้องเพิ่มความเป็นกรดต่างให้สูงขึ้น เพื่อให้  $-COOH$  แตกตัวเป็น  $-COO^-$  ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ดีขึ้นตามไปด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rogalski และ คณะ (1997) ที่ได้ทำการตรึงเดกซ์แทรนบน porous glass พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ โดยจะเลื่อนไปในทางที่เป็นต่างเล็กน้อย จากเดิมที่ 5.5 เป็น 6.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระอยู่ที่  $55^{\circ}C$  เท่ากัน และที่อุณหภูมิสูงขึ้นพบว่า เดกซ์แทรนเนส ตรังรูปมีแอกติวิตีเหลืออยู่เดกซ์แทรนเนสอิสระที่อุณหภูมิเดียวกัน อธิบายได้ว่าเป็นผลมาจากวิธีการตรึงรูปและสารไบฟังก์ชันนัลที่ช่วยในการยึดติดกับตัวพวยง มีส่วนช่วยในการรักษาสภาพโมเลกุลของโปรตีนไม่ให้เกิดสภาพได้ง่าย และยังพบอีกว่า เดกซ์แทรนเนสตรังรูป มีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่าง ความเสถียรต่ออุณหภูมิ และยังสามารถใช้งานได้ในช่วงความเป็นกรดต่างที่กว้างกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.22, 4.23 และ 4.20 ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Junichi และ Matsuyama (2000) ที่ได้ทำการตรึงเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) บนเซรามิกเมมเบรน (ceramic membrane) โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง 4.0 พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงขึ้นและช่วงความเป็นกรดต่างที่กว้างขึ้น

สำหรับการหาค่า  $K_m$  ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรังรูป พบว่า มีค่า 0.0009 และ 0.002 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.26 และ 4.27 พบว่าค่า  $K_m$  ของเดกซ์แทรนเนสตรังรูปมีค่าสูงกว่า อธิบายได้ว่าเนื่องมาจากการเข้าไปจับกันระหว่างเอนไซม์และซับสเตรทในทิศทางที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูปอาจเป็นไปได้ยากกว่าในเอนไซม์อิสระนั่นเอง

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- นุสรุา เจริญกิจทวี. 2539. การตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุญส่ง แสงอ่อน. 2525. บทบาทของแบคทีเรียในน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปราณี อานเป็รื่อง. 2535. เอนไซม์ทางการอาหารตอนที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฝ้ายนโยบายและเศรษฐกิจน้ำตาล. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. กระทรวงอุตสาหกรรม. 2532. กรรมวิธีการผลิตน้ำตาล.
- สันต์ ฉายตระกูล. 2525. เดกซ์แทรนส์ทรูสำคัญของกระบวนการผลิตและคุณภาพน้ำตาลทราย. วารสารน้ำตาล พ.ศ. – มิ.ย. : 5-9.
- สุวรรณ นพพรพันธุ์. 2528. การปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนันตพงษ์ สุขเกษ. 2543. การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวทราย. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เอก แสงวิเชียร. 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญาามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาษาอังกฤษ

- Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.S., Abdel-Fattah, A.M., and Avdel-Fattah F. 1999. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. Process biochem. 34 : 391 – 398.
- Amorim R.V, Melo E.S, Carneiro-da-Cunha M.G, Ledingham W.M., and Campos-Takaki GM. 2003. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. Bioresour Technol. 89(1) : 35–39
- Anita, J. S., and Zhu, J.X. 1997. Kinetic parameters of immobilized urease. Biol. Biochem. 114 : 96 - 101.
- Antti, J., Melo, E.S., Hiraoka, N., Hirose, T., and Tsuru, D. 2003. Immobilization of urease using Amberlite MB-1. Bioresource Technology. 89 : 35 – 39.
- Bennett, M.C. 1973. Flocculation Process in Sugar Manufacturing, International Sugar Journal. 4 : 101-109.
- Bo'da, V., and Farrell, L.N. 1991. A new method for immobilization of galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. Can. J. Microbiol. 3 : 239 - 247.
- Busto, W., and Prabhu, K.A. 1995. The immobilization of glucosidase from *Lipomyces strakeyi*. Enzyme Microb. Technol. 8 : 217-220.
- Celina, K., Barbara, S., and Stanislaw, B. 2003. Immobilization of dextransucrase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. Enzyme and Microbial Technology . 34 : 555 – 560.
- Celestine-Mytril, D., and Parfait, A. 1988. HPLC Determination of organic acids in sugar cane and its industrial byproducts, International Sugar Journal. 90(1070) : 28-31.
- Chaiet, L., Kempf, A.J., Harman, R., Kaczka, E., Weston, R., Nollstadt, K. and Wolf, F.J. 1970. Isolation of a dextranase from *P. funiculosum*. Appl. Microbiol. 20 : 421–426.
- Chen, I. and Chiu, W. 1999. Urease bound to chitin with glutaraldehyde. Biotechnol. Bioeng. 13 : 5 - 7.

- Ebiso, S., Misaki, A., Kato, K. and Kotani, S. 1974. The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans* formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 38: 374-381.
- Fujii, G., Alves, T.L.M., and Freire, D.M.G., 2001. Ethanol production by immobilized *A. awamori*. Appl. Biochem. Biotechnol. 84, 791–800.
- Fukumoto, J., Tsuji, H., and Tsuru, D. 1971. Studies on mold dextranase. J. Biochem. 69 : 1113 – 1121.
- Galvez-Mariscal, A. and Lopez-Munguia, A. 1991. Production and characterization of dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 327 – 331.
- Goel, M.K., 1994. Chitin and its derivatives as supports form immobilization of enzymes. Acta Biotechnol. 3, 269–277.
- Grace, J. R., Avedan, A. A., and Knowlton, T. M. 1997. Circulating fluidized beds. London: Chapman & Hall. 9 : 70 - 77.
- Guggenheim, B. and Newbrun, E. 1969. Extracellular glucosyltransferase activity of an HS strain of *Streptococcus mutans*. Helvetica. Odontologica. Acta. 13 : 84 - 97.
- Hattori, A. and Ishibashi, K. 1981. Screening of dextranase of producing microorganisms. Agric. Biol. Chem. 45 : 2347 – 2349.
- Heping, Y. and Mridul, S. 1994. A study of solid circulation rate in a circulating fluidized bed. International journal of energy research. 17 : 479-490
- Holbrook, W.P., and Mcmillan, C. 1977. The hydrolysis of dextran by gram-negative non-sporing anaerobic bacilli. Journal of Applied Bacteriology. 43: 369-374.
- Horio, W., Mastellone, M.L. and Arena, U. 1992. The effect of particle size and density on solids distribution along the riser of a circulating fluidized bed. Chemical Engineering Science. 54 : 5383-5391
- Igarashi, D. A., Daniel, R. M., Martin, A. M. and Morgan, H. W. 1998. An appraisal of the use of dextranase. Biotechnology and Bioengineering. 26, 1141-1145.
- Imrie, F.K.E. and Tibury, R.H. 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. Sugar Tech. Reviews. 5(1) : 291 - 361.

- Irvine, J.E. 1981. Fields organics of dextran and other substance affecting sucrose crystallization. Sugar Tech. Reviews. 76(7) : 43-47.
- Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Nonma, M., Okada, G. and Chiba, S. 1996. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. Journal of Bacteriology. 176(24): 7730-7734
- Jeanes, A., Haynes, W. C., Wilham, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., Cluskey, J. E., and Fisher, H. M. 1950. Periodate oxidation of dextran. J. Am. Chem. Soc. 72 : 2655-2657.
- Jinn, T., Colowick, S. P., Kaplan N. O and Prakash, C. 1998. Removal of dextran from cane juice. Int. Sugar J. 89 : 184 - 189.
- Jordan, H.V., and Keyes, P.H. 1966. In vitro methods for the study of plaque formation and carious lesion. Arch. Oral. Biol. 11: 793-801.
- Jun ichi, I. and Matsuyama, T. 2000. Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD. Biochemical Engineering. 5: 179 - 184
- Krastanov, J.F. and Cabral, J.M.S. 1997. Commercially available supports for protein immobilization. J. Biochem. 183 : 161 - 167.
- Kunii, D., and Levenspiel, O. 1991. Circulating fluidized-bed reactors. Chemical Engineering Science 52 : 2471-2482.
- Leach, S.A. 1969. Dextranase and dental caries. British. Dental. J. 20: 325-330.
- Lewicki, W.J., Lang, L.W., and Edwards, J.R. 1971. Determination of the structure of a broth dextran produced by a cariogenic Streptococcus. Carbohydr. Res. 17: 175-182.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275.
- Luong, J. and Bhattacharya, P. 1993. The effect of particle size and density on solids distribution along the riser of a circulating fluidized bed. Chemical Engineering Science. 54 : 5383-5391.

- Madhu, S. and Prabhu, K.A. 1985. Studies on dextranase from *Penicillium aculeatum*. Enzyme Microb. Technol. May, 8:217-220.
- Martin, M., Rooney, D., Van Neikerk, M., Montenegro, A., and Weatherley, L.R., 1997. Immobilization of lipase onto lipophylic polymer particles and application to oil hydrolysis. Process Biochem. 32, 479–486.
- Mizuno, T., Mori, H., Ito, H., Matsui, H. Kimura, A., and Chiba, S. 1999. Molecular cloning of isomaltotrio-dextranase gene from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* strain 0407 and its expression in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(9): 1582-1588
- Mojovic, W., Kerhof, P.J.A.M., Van Helden, C., and Vant Riet, K., 1998. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. Biotechnol. Bioeng. 32, 512–518.
- Monsan, P. and Pual, F. 1991. Noval enzymatic synthesis of oligosaccharides and polysaccharides. Food Enzymology. Elsevier Applied Science, Englisc. p. 77 - 79.
- Nelson, N. 1944. A Photometric adaptation of the somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem. 153 : 375 - 380.
- Okami, Y., Kurasawa, S., and Hirose, Y. 1980. A new glucanase produced by a marine *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 44(5) : 1191 – 1192.
- Oliveira, A., Reh, K. D., and Buchholz, K. 1997. Unconventional immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* with alginate. Enzyme Microb. Technol. 17: 457-461.
- Puvanakrishnan, R., and Bose, S.M. 1980. Studies on the immobilization of trypsin on sand. Biotechnol. Bioeng. 12 : 919 – 928.
- Rhodes, M.J., Sollaart, M., and Wang, X. S. 1998. Flow structure in a fast fluid bed. Powder Technology. 99 : 194-200.
- Rogalski, A., Ramesh, V. and Singh, C. 1997. Bacterial dextranase immobilized on zirconia coated alkylamine glass using glutaraldehyde. Biochem. Biophys Res. Commun. 97 : 779 – 786.

- Russell, J., Szczodrak, J., Pleszczynska, M., and Fiedurek, J. 1992. An isomaltotriose producing dextranase from *Flavobacterium sp.* M-73 purification and properties. *Agric. Biol. Chem.* 47 : 2585 – 2593.
- Sawei, T., Toriyama, K., and Yano, K. 1974. A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextran. *J. Biochem.* 75: 105-112.
- Schachtele, C.F., Staat, R.H., and Harlander, S.K. 1975. Dextranase from oral bacteria: Inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surface by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 12(2) :309-317.
- Sidebotham, R.L. 1974. Dextrans. *Adv. Carbohydrate Chem. Biotechnol.* 30 : 371 – 444.
- Smolders, K., and Baeyens, J. 2000. Overall solids movement and solids residence time distribution in a CFB-riser. *Chemical Engineering Science* 55 : 4104 – 4116.
- Staat, R.H., Gawronski, T.H. and Schachtele, C.F. 1973. Detection and preliminary studies on dextranase producing microorganism from human dental plaque. *Infect. And Immun.* 8:1,009-1,016.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19 – 23.
- Sun, J., Cheng, X., Zhang, Y., Yan., Z., and Zhang., S. 1988. A strain of *Paecilomyces lilacinus* producing high quality dextranase. *Am. N.Y. Acad Sci.* 542 : 192-194.
- Takahashi, N. 1982. Isolation and properties of dextranase from *Bacteroides oralis* Ig42. *Microbiol. Immunol.* 26(5): 375-386.
- Tartakovsky, H., Matsumura, M., and Veliky, I. A. 1998. Diffusion characteristics of substrate in caalginate gel bead. *Biotechnol Bioeng.* 16 : 53 - 58.
- Tao, L., Sutelisse, I.C., Russel, R.R.B., and Ferretti, J.J. 1993. Transport of sugars, including sucrose, by the msm transport system of *Streptococcus mutans*. *J. Dent Res.* 72 : 1386-1390.
- Tsuchiya, H. M., Jeanes, A., Briker, H.M. and Wilham, C.A. 1952. Dextran degrading enzymes from molds. *J. Bacteriol.* 52 : 513 – 519.
- Tilbury, R.H. 1974. Further studies on enzymatic hydrolysis of dextran in mill juices by dextranase and fungal amylase. *Proc. 15<sup>th</sup> ISSCT.* p 1444 – 1258.

- Watson, P.R. and Woff, A. 1955. Manufacture and refining of raw cane sugar. J. Am Chem. Soc. 77 : 196.
- Weinell, C. E., Dam-Johansen, K., and Johnsson, J. E. 1997. Single-particle behavior in circulating fluidized beds. Powder Technology. 92 : 241-252.
- Whetley, M.A. and Moo-Young, M. 1977. Degradation of polysaccharide by endo- and exoenzyme : dextran-dextranase model system. Biotechnol. Bieng. 19 : 219 – 233.
- Wilham, C.V.A., Chang, M., De Jersey, J., Patel, B., Inkerman, P.A., and Hamilton, S. 1955. Isolation and characterization of a thermostable dextranase. Enzym. Microb. Technol. 20 : 242 – 247.
- Yamaguchi, T. and Gocho, J. 1973. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolation *Brevibacterium* sp. Agric. Biol. Chem. 37 : 2527 – 2533.
- Zevenhoven, R., Kohlmann, J., and Laukkanen, T. 1999. Near-wall particle velocity and concentration measurements in circulating fluidized beds. 15<sup>th</sup> International conference on fluidized bed.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. 1968. Cell-bound exodextranase of *Bacillus* sp. Carbohys. Res. 6 : 310–318
- Zhou, Q.Z.K., and Chen, X.D. 2001. Immobilization of galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. J. Food Eng. 48 : 69 – 74.
- Available from : <http://prosys.korea.ac.kr/lab/bio/research/items/EnzymeImmo.html>
- Available from : <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/immmethod.html>
- Available from : <http://www.wangkanai.com/>



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

#### สูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร Fukumoto

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

เดกซ์แทรนเกอร์ดุดูดสาหร่าย	10.0	กรัม
โซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_3$ )	2.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.009	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม

ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 4.0 ฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน  $121^\circ \text{C}$  ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที กรณีต้องการทำเป็นอาหารวุ้นให้ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 4.5 และเติมวุ้นผง (Agar) 20 กรัม

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ภาคผนวก ข

### สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952)

#### 1.1 สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (Alkaline Copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจอนฟอสเฟต 71 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 40.0 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1.0 นอร์มัล ลงไป 100 มิลลิลิตรและเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักลงไป 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทำให้ร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

#### 1.2 สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 53.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ลงไป 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซิเนตที่มีความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักลงไป 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

## 2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry's reagent)

## 2.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60.0 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )	12.0 กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6 กรัม
น้ำกลั่น	3000 มิลลิลิตร

## 2.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ )	50.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

## 2.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

Lowry A	50 ส่วน
Lowry B	1 ส่วน

## 2.4 สารละลาย Lowry D (phenol reagent) ประกอบด้วย

สารละลายโฟลีน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1000 มล. ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5

ซึ่งโซเดียมอะซิเตท 1.45 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 950 มล. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) จนเท่ากับ 4.5 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มล.

4. สารละลายเดกซ์แทรน ที่ 2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนัก)

ละลายเดกซ์แทรน ที่ 2000 จำนวน 0.625 กรัมในสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และปรับปริมาตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล.

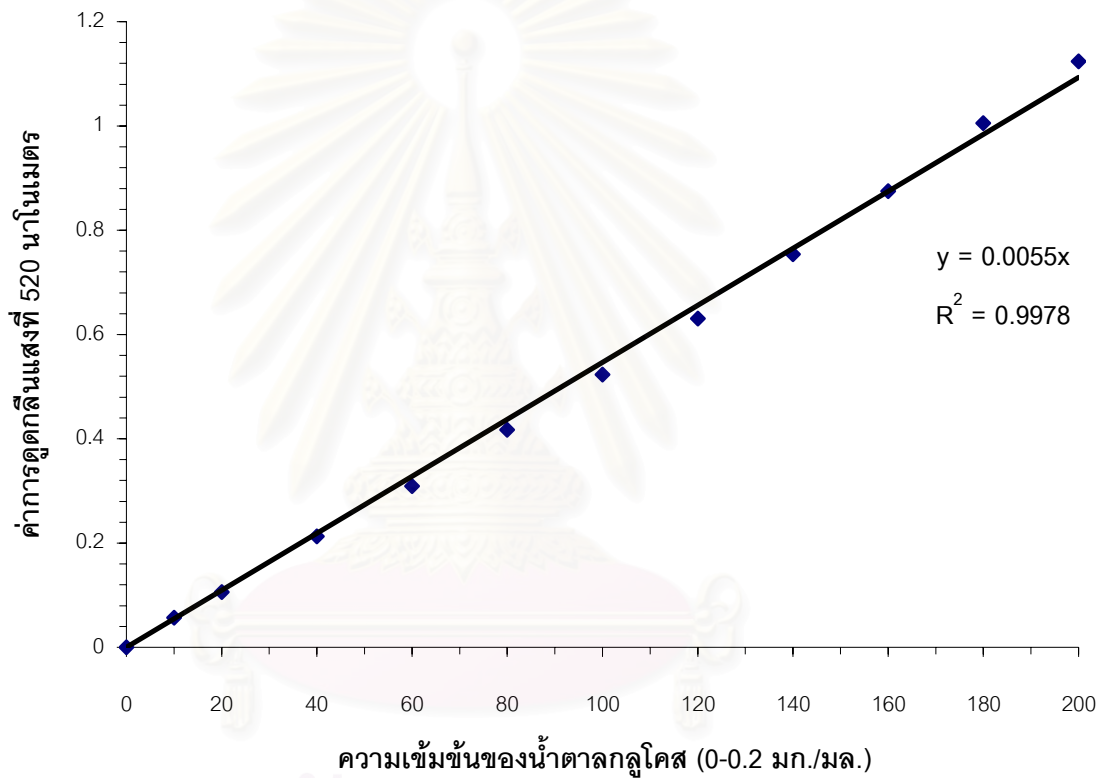
5. สารละลายกลูตาไรต์ไฮด์

เตรียมสารละลายกลูตาไรต์ไฮด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นที่ต้องการใช้ โดยสารละลายนี้จะทำหน้าที่เป็นสารสร้างพันธะร่วมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรูรูป

## ภาคผนวก ค

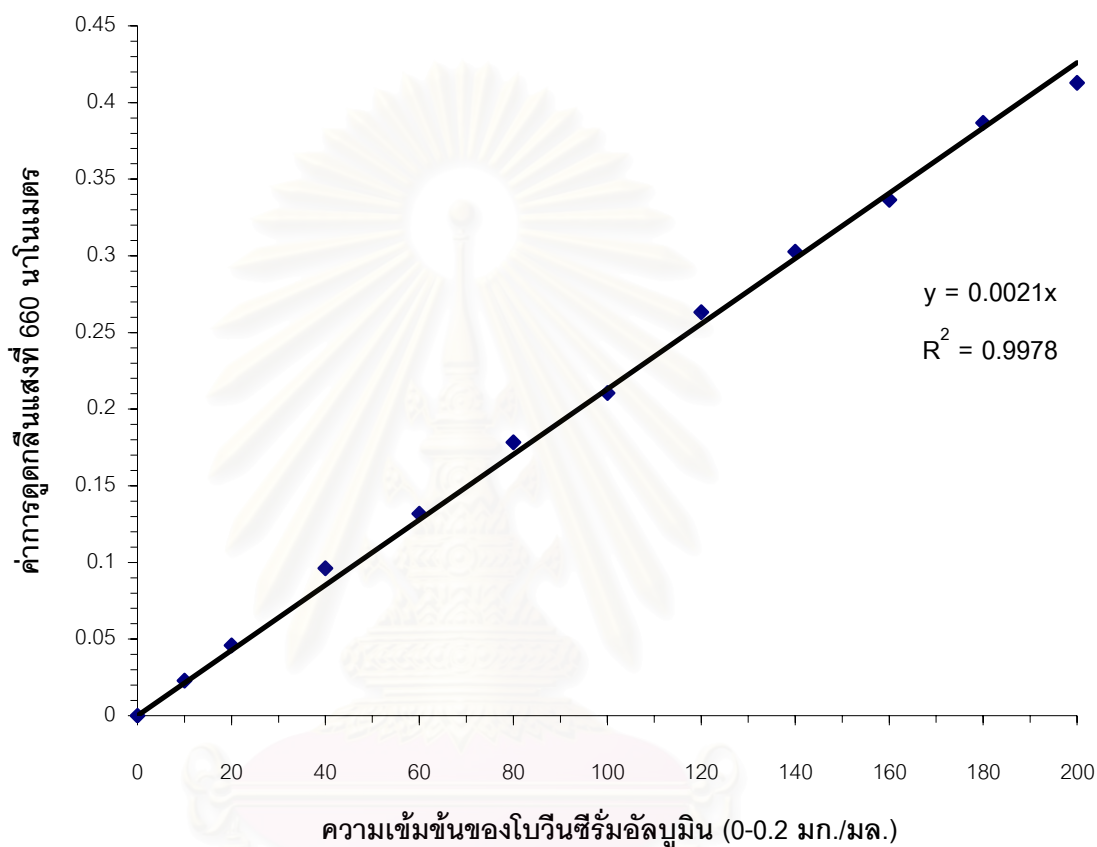
### กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Samogyi-Nelson (Samogyi, 1952)



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อ มล.

2. กราฟมาตรฐานโปรตีนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)



กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อ มล.

ภาคผนวก ง

1. ชุดกรองสปอร์ของ *Penicillium* sp. SMCU3-14 (Hopwood และคณะ, 1985)



### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นฤมล วงศาสุข เกิดวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดนครสวรรค์ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 เข้ารับการศึกษาต่อในชั้นปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 ที่อยู่ปัจจุบัน 7/269 หมู่ 4 หมู่บ้าน ราณี 2 ถนนลาดปลาเค้า แขวงจรเข้บัว เขตลาดพร้าว กรุงเทพฯ 10230



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย