

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมโดยใช้เพคตินเนส เซลลูเลส และ อะมัยเลสอิสระ

4.1.1 หาความเข้มข้นของเพคตินเนส เซลลูเลส และอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการทดลองข้อ 3.3.1.1 หาความเข้มข้นของเพคตินเนส เซลลูเลส และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม โดยแปรความเข้มข้นของเพคตินเนส และความเข้มข้นของเซลลูเลสอย่างละ 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0.02, 0.05 และ 0.10 โดย ปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอมบด และแปรอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง ติดตามค่าร้อยละของการลดความหนืด (% Viscosity reduction) ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ค่าร้อยละของการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมบดเมื่อใช้ความเข้มข้นของ เพคติน และเซลลูโลสที่ระดับต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของ เพคติน (% v/w )	อุณหภูมิ ( $^{\circ}\text{C}$ )	ความเข้มข้นของ เซลลูโลส ( % v/w )	ค่าร้อยละของการลดความหนืด (% viscosity reduction)
0.02	40	0.02	59.59
0.02	40	0.05	71.37
0.02	40	0.10	77.14
0.02	50	0.02	60.98
0.02	50	0.05	67.46
0.02	50	0.10	75.96
0.02	60	0.02	37.72
0.02	60	0.05	49.34
0.02	60	0.10	61.63
0.05	40	0.02	63.09
0.05	40	0.05	76.10
0.05	40	0.10	79.82
0.05	50	0.02	66.50
0.05	50	0.05	73.51
0.05	50	0.10	77.47
0.05	60	0.02	53.73
0.05	60	0.05	58.47
0.05	60	0.10	64.07



ความเข้มข้นของ เพคตินเอส (% v/w )	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้นของ เซลลูโลส ( % v/w )	ค่าร้อยละของการลดความหนืด (% viscosity reduction)
0.10	40	0.02	69.63
0.10	40	0.05	76.06
0.10	40	0.10	81.12
0.10	50	0.02	68.12
0.10	50	0.05	78.37
0.10	50	0.10	80.53
0.10	60	0.02	52.58
0.10	60	0.05	61.54
0.10	60	0.10	66.66

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลดังตารางที่ 4.2 พบว่า ทั้งระดับความเข้มข้นของเพคตินเอส เซลลูโลส และอุณหภูมิ ต่างก็มีผลต่อค่าร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมบดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยที่ปัจจัยร่วม (AB, AC, BC และ ABC) ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าร้อยละการลดความหนืดของกล้วยหอมมด  
เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพคตินเอส และเซลลูโลส ที่ระดับต่าง ๆ และบ่ม  
ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของเพคตินเอส(A)	2	631.30	315.65	10.08*
อุณหภูมิ (B)	2	3145.95	1572.98	50.26*
ความเข้มข้นของเซลลูโลส(C)	2	1978.08	989.04	31.60*
A TIME B	4	60.50	15.12	0.48
A TIME C	4	81.97	20.49	0.65
B TIME C	4	29.36	7.34	0.23
A * B * C	8	78.55	9.82	0.31
ERROR	27	845.05	31.30	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

เนื่องจากปัจจัยร่วม (AB, AC, BC และ ABC) ไม่มีผลต่อค่าร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของร้อยละของการลดความหนืด โดยวิธีของ Duncan's new multiple range test จึงแยกพิจารณาที่ละปัจจัยดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.3



ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมบด เมื่อใช้ ความเข้มข้นของเพคตินและเซลลูโลสที่ระดับต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยบด
ความเข้มข้นของเพคติน (% v/w)	
0.02	62.35 b
0.05	68.09 a
0.10	70.51 a
อุณหภูมิ (°C)	
40	72.66 a
50	72.10 a
60	56.20 b
ความเข้มข้นของเซลลูโลส (% v/w)	
0.02	59.11 c
0.05	68.09 b
0.10	73.82 a

a, b, c ... ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่า ระดับความเข้มข้นของเพคตินที่ให้ค่าเฉลี่ย ร้อยละของการลดความหนืด สูงที่สุดคือ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัย



สำคัญ ( $p > 0.05$ ) กับที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสม จะพบว่า ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการลดความหนืดที่ต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) แต่ค่าที่ได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของเซลลูโลสพบว่าทั้ง 3 ระดับให้ ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยที่ความเข้มข้นของเซลลูโลสร้อยละ 0.10 จะให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมบดสูงที่สุด

จากผลการทดลองที่ได้นำมาหาความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการยกกำลัง 2 ซึ่งมีรูปแบบทั่วไปของสมการคือ

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{j=1}^2 \sum_{i=j+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

เมื่อ Y คือ ตัวแปรตาม

ซึ่งในที่นี้คือ ค่าร้อยละของการลดความหนืด

$X_i$  คือ ตัวแปรอิสระ โดยที่

$X_1$  คือ ความเข้มข้นของเพคตินเนส

$X_2$  คือ ความเข้มข้นของเซลลูโลส

$X_3$  คือ อุณหภูมิ

$b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$  และ  $b_{ij}$  คือ ค่าคงที่สัมประสิทธิ์

ซึ่งจะได้สมการความสัมพันธ์ดังนี้ คือ

$$\begin{aligned} \% \text{ viscosity} = & -98.85261 + 246.4314 X_1 + 468.0235 X_2 + 6.673404 X_3 \\ & - 886.3262 X_1 X_2 + 0.7656236 X_2 X_3 + 2.389309 X_1 X_3 \\ & - 1780.937 X_1^2 - 2267.665 X_2^2 - 0.0767537 X_3^2 \end{aligned}$$

มีค่า Coefficient of determination ( $R^2$ ) = 0.9708397

Coefficient of multiple correlation = 0.985312

Standard error of estimate = 2.2697



จากสมการข้างต้นจะเห็นว่าค่า Coefficient of determination 0.971 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 หมายความว่าเส้น regression ที่ประมาณได้เหมาะสมกับตัวอย่างชุดนี้ นั่นคือ ความผันแปรของค่าร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมบดสามารถอธิบายได้ด้วยเส้น regression นี้ สำหรับค่า Coefficient of multiple correlation 0.985 หมายความว่าตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมีความสัมพันธ์กันมากในลักษณะที่เบนไปในทิศทางเดียว และมีค่า Standard error จากการประมาณ 2.27 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างน้อย ซึ่งค่าที่ได้จากการประมาณจากสมการเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมบดที่ได้จากการทดลองจริงเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากสมการ

ความเข้มข้นของ เพคตินเอส (% v/w )	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้นของ เซลลูโลส ( % v/w )	ค่าร้อยละของการลดความหนืด (% viscosity reduction)	
			ค่าจากการ ทดลอง	ค่าจากการ คำนวณ
0.02	40	0.02	59.59	60.11
0.02	40	0.05	71.37	69.78
0.02	40	0.10	77.14	76.82
0.02	50	0.02	60.98	58.40
0.02	50	0.05	67.46	68.29
0.02	50	0.10	75.96	75.72
0.02	60	0.02	37.72	41.33
0.02	60	0.05	49.34	51.46
0.02	60	0.10	61.63	59.26

(ต่อ)

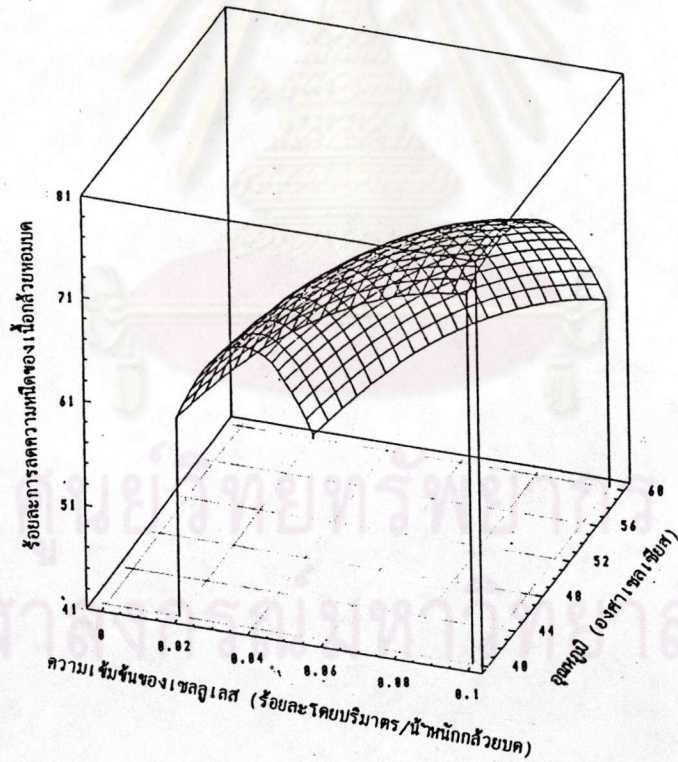
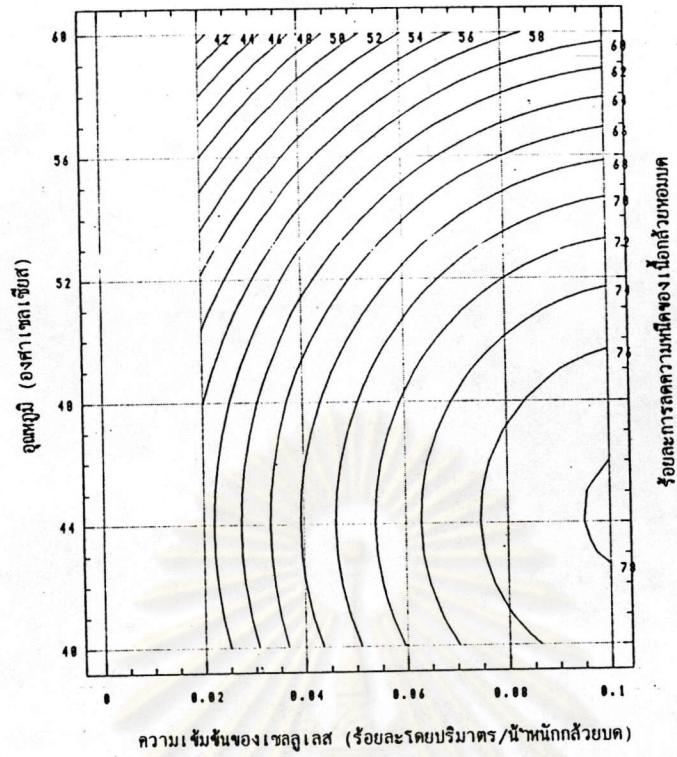


ความเข้มข้นของ เพคตินเนส (% v/w )	อุณหภูมิ (°C)	ความเข้มข้นของ เซลลูเลส ( % v/w )	ค่าร้อยละของการลดความหนืด (% viscosity reduction)	
			ค่าจากการ ทดลอง	ค่าจากการ คำนวณ
0.05	40	0.02	63.09	66.10
0.05	40	0.05	76.10	74.97
0.05	40	0.10	79.82	80.68
0.05	50	0.02	66.50	65.10
0.05	50	0.05	73.51	74.20
0.05	50	0.10	77.47	80.29
0.05	60	0.02	53.73	48.76
0.05	60	0.05	58.47	58.08
0.05	60	0.10	64.07	64.56
0.10	40	0.02	69.63	68.96
0.10	40	0.05	76.06	76.50
0.10	40	0.10	81.12	79.99
0.10	50	0.02	68.12	69.15
0.10	50	0.05	78.37	76.92
0.10	50	0.10	80.53	80.80
0.10	60	0.02	52.58	54.00
0.10	60	0.05	61.54	62.00
0.10	60	0.10	66.66	66.26



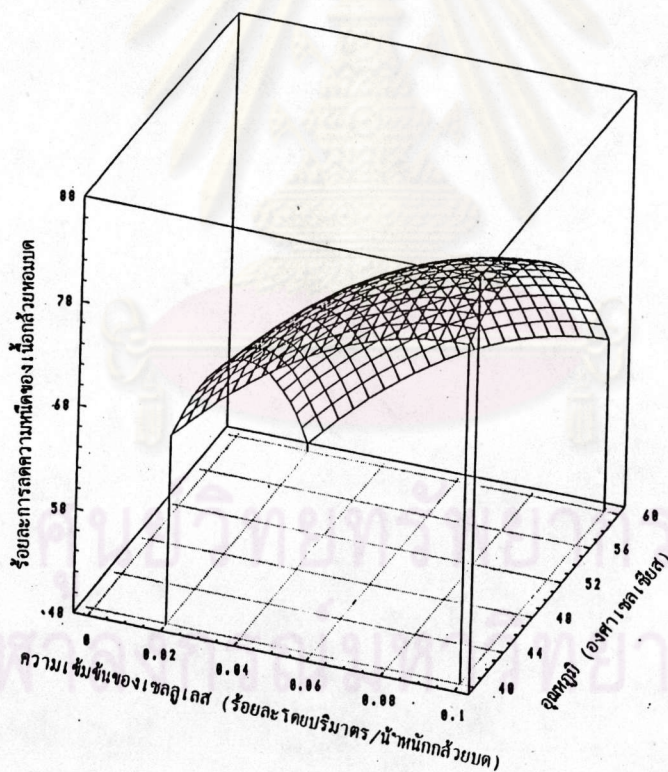
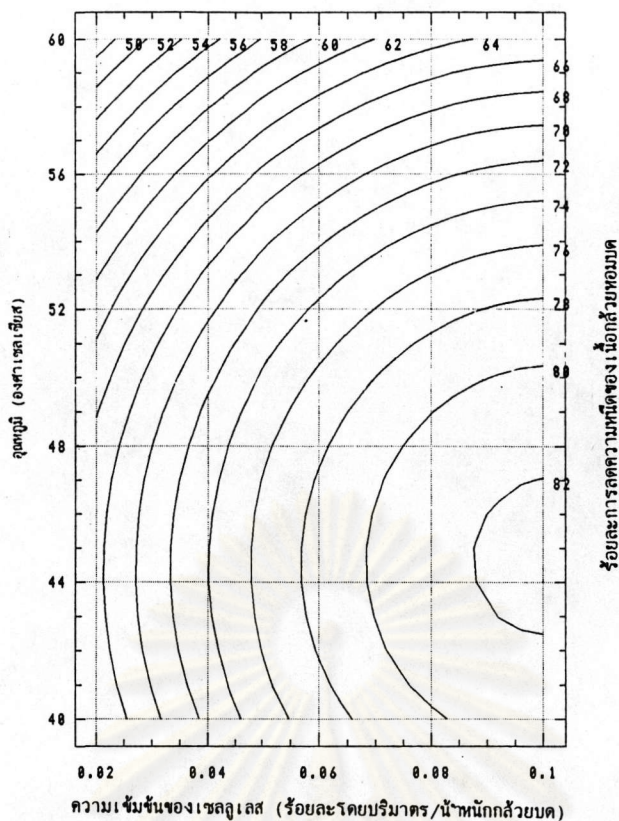
นั่นคือค่าที่ประมาณได้จากสมการสามารถใช้เป็นตัวแทนของข้อมูลจากการทดลองได้ เมื่อทำการมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ในรูปแบบ Contour plot และ Surface plot จะได้กราฟความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.1-4.9

เนื่องจากเพคตินเนสเป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม ดังนั้นความเข้มข้นของเพคตินเนสจึงเป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดในการทดลอง ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4.3 จะเห็นว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ระหว่างที่เพคตินเนสระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.10 ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของเพคตินเนสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เป็นเกณฑ์สำหรับใช้ในการพิจารณาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ตัวที่สอง คือ เซลลูเลส และอุณหภูมิที่เหมาะสมจาก contour plot และเมื่อพิจารณา contour plot และ surface plot จากรูปที่ 4.2 ขณะที่ให้ความเข้มข้นของเพคตินเนสคงที่ที่ร้อยละ 0.05 สำหรับสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม จะสังเกตว่า ระดับความเข้มข้นของเซลลูเลส และอุณหภูมิที่จะมีผลให้ค่าร้อยละของการลดความหนืดของกล้วยหอมบดเป็นเกณฑ์ที่ต้องการอยู่ในช่วง 78-80 ซึ่งในกรณีนี้จะทำได้ถ้าย่อยสลายกล้วยหอมบดด้วยเพคตินเนสร่วมกับเซลลูเลสที่ระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสเป็นร้อยละ 0.06 และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ



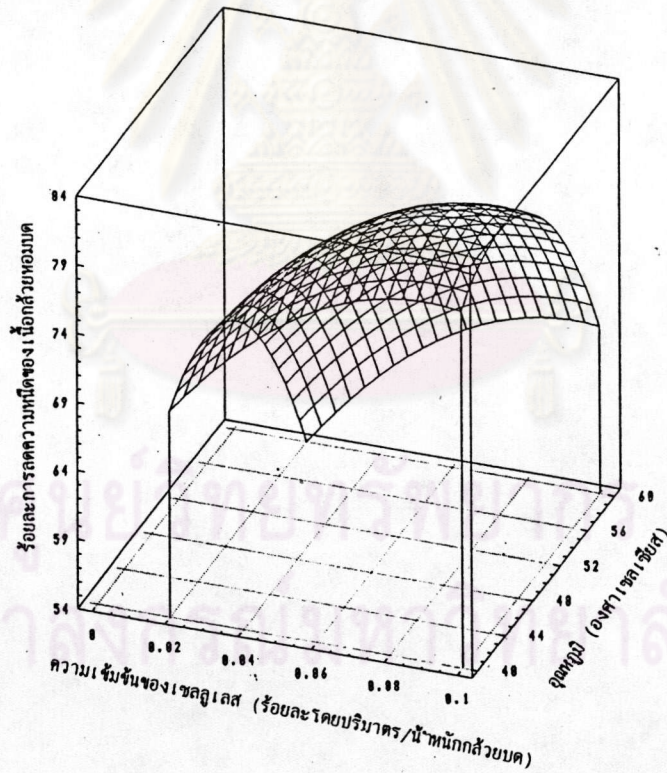
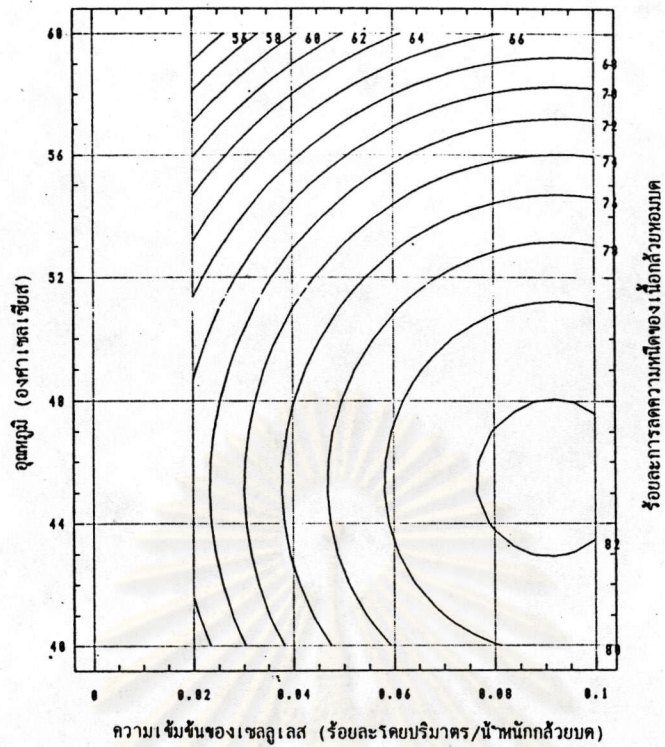
รูปที่ 4.1 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่า ร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมบด ที่ความเข้มข้นของเซลลูโลสในระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพคตินเนสสูงที่ที่ร้อยละ 0.02 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอมบด





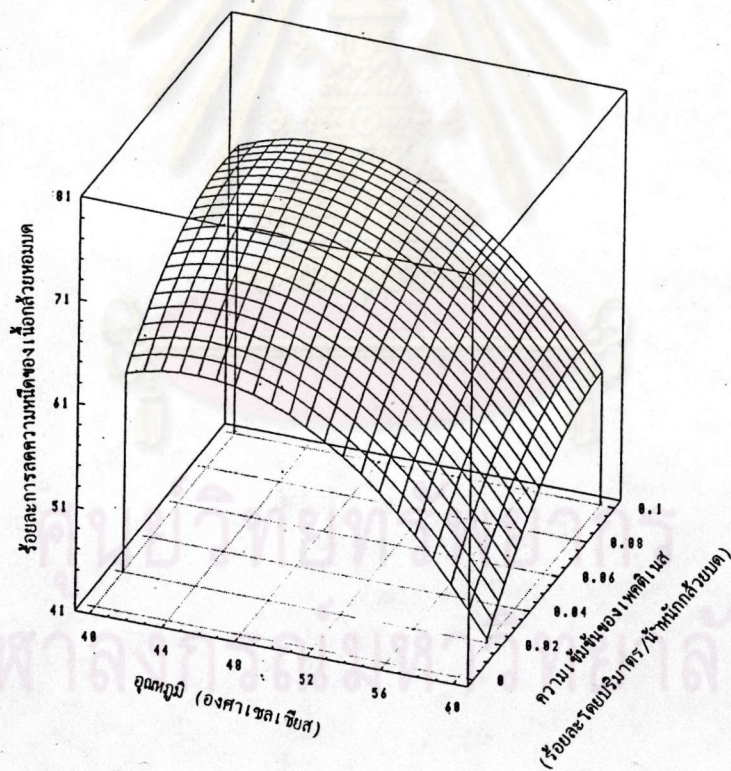
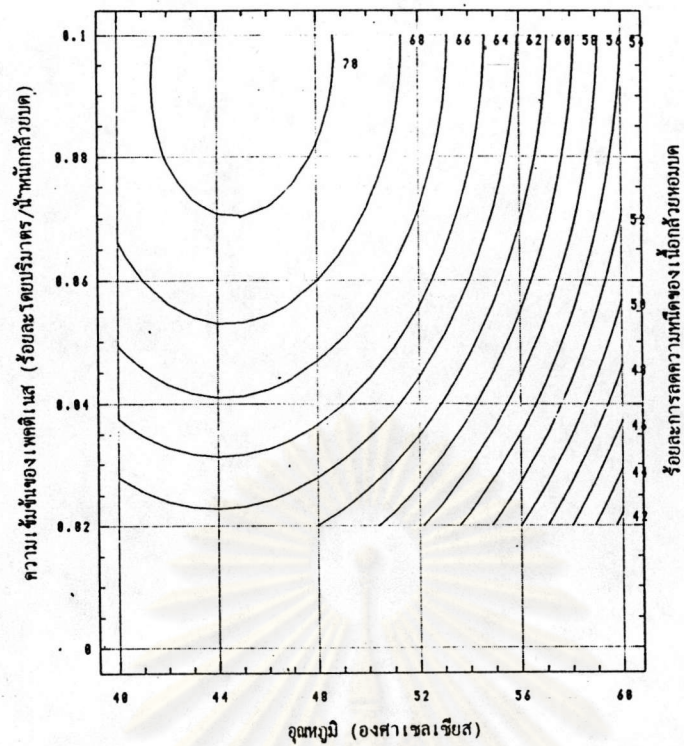
รูปที่ 4.2 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่า ร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมสด ที่ความเข้มข้นของเซลลูโลสในระดับ ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพคตินเนสคงที่ที่ร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอมสด





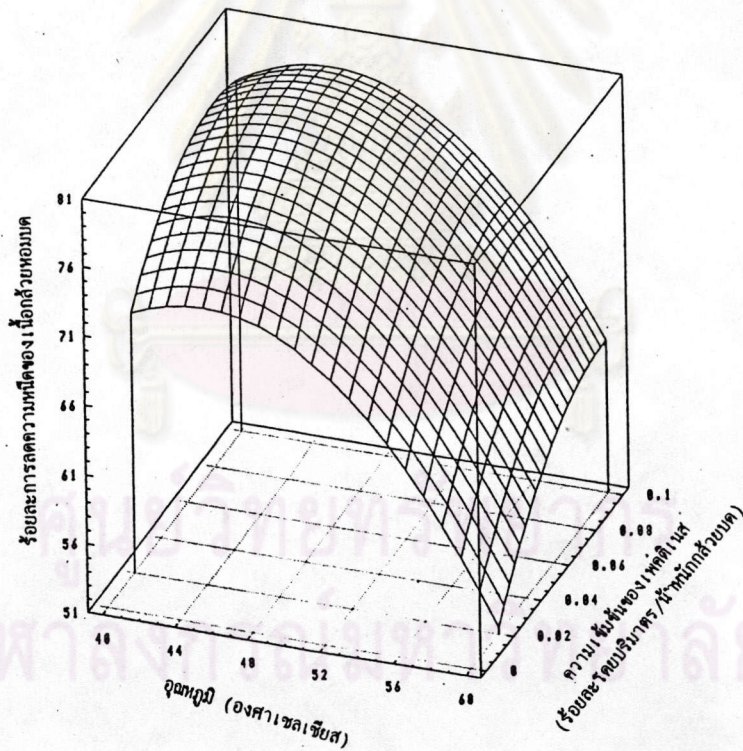
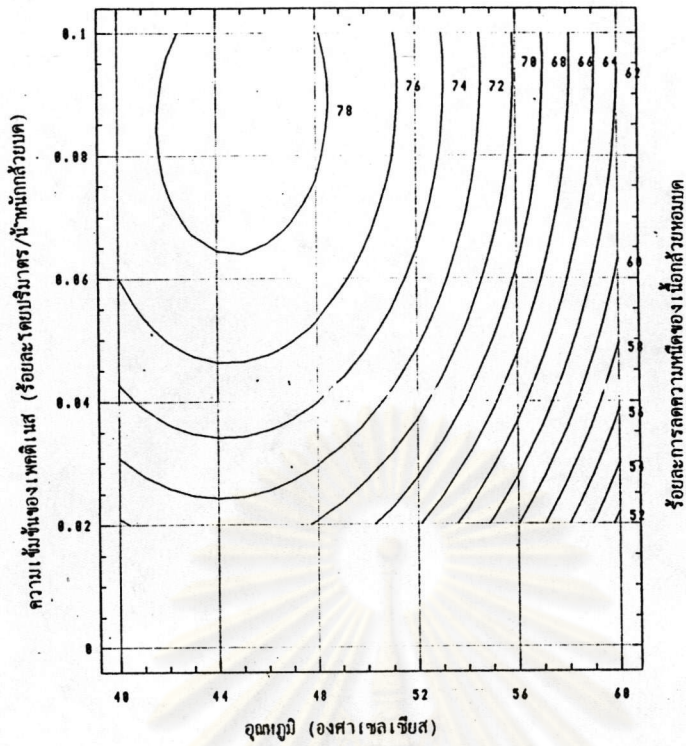
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่า ร้อยละการลดความหนืดของเนื้อมะพร้าวหมอบ ที่ความเข้มข้นของเซลลูโลสในระดับ ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพคตินเนสคงที่ที่ร้อยละ 0.10 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหมอบ





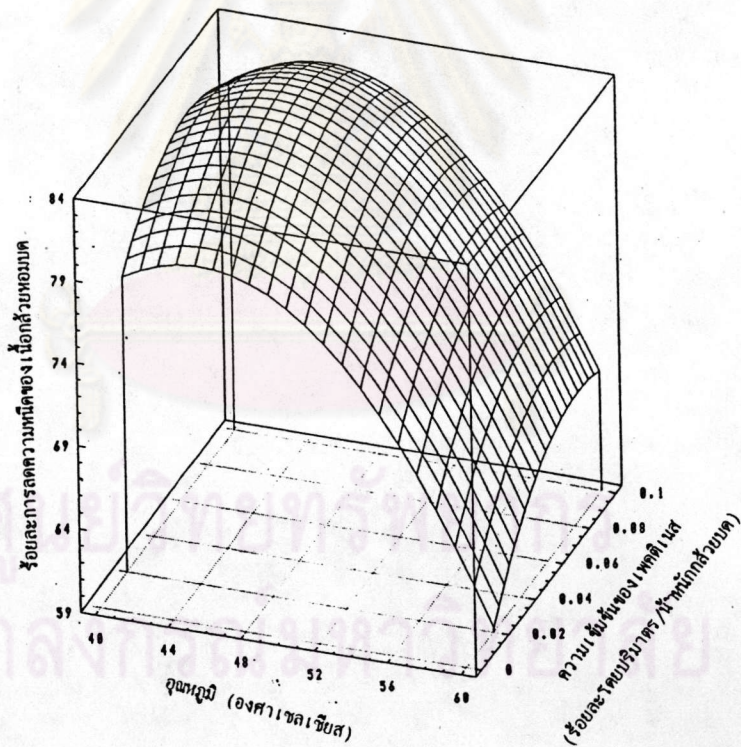
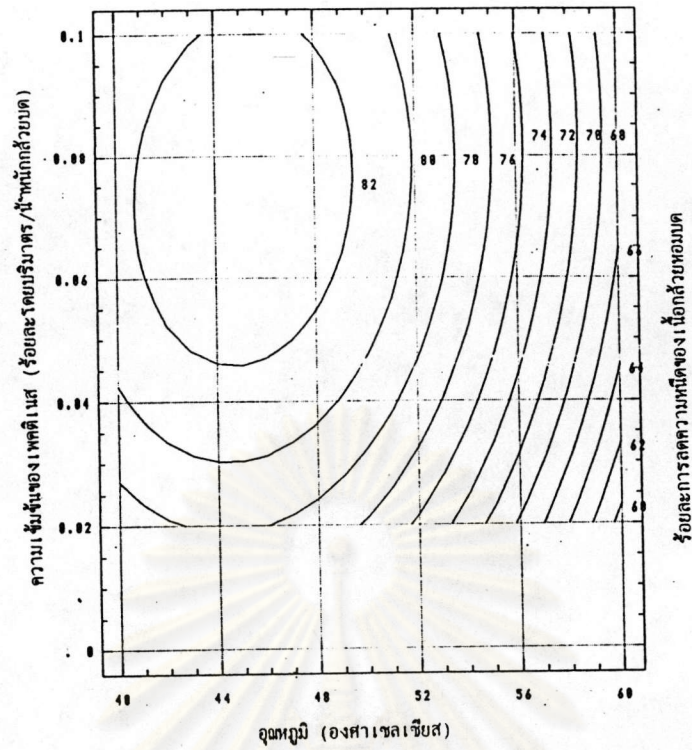
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยอบ ที่ความเข้มข้นของเพคตินาสในระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลลูโลสคงที่ที่ร้อยละ 0.02 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยอบ





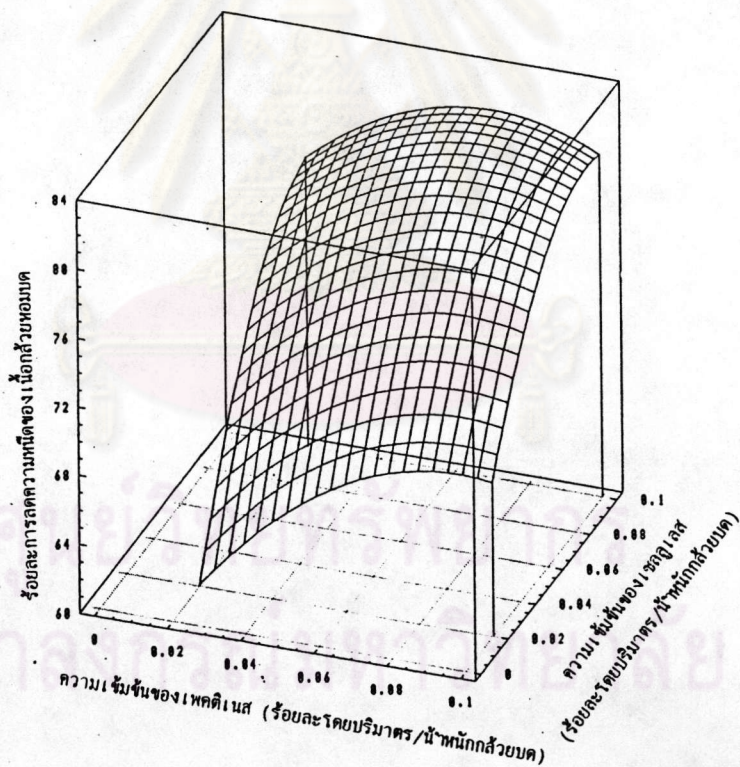
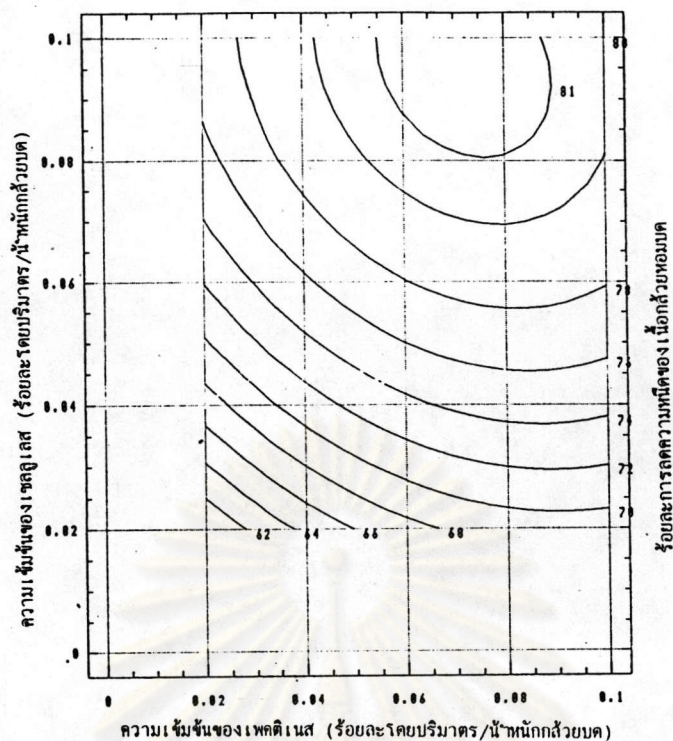
รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอม ที่ความเข้มข้นของเพคตินาสในระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เลสคิงที่ร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอม





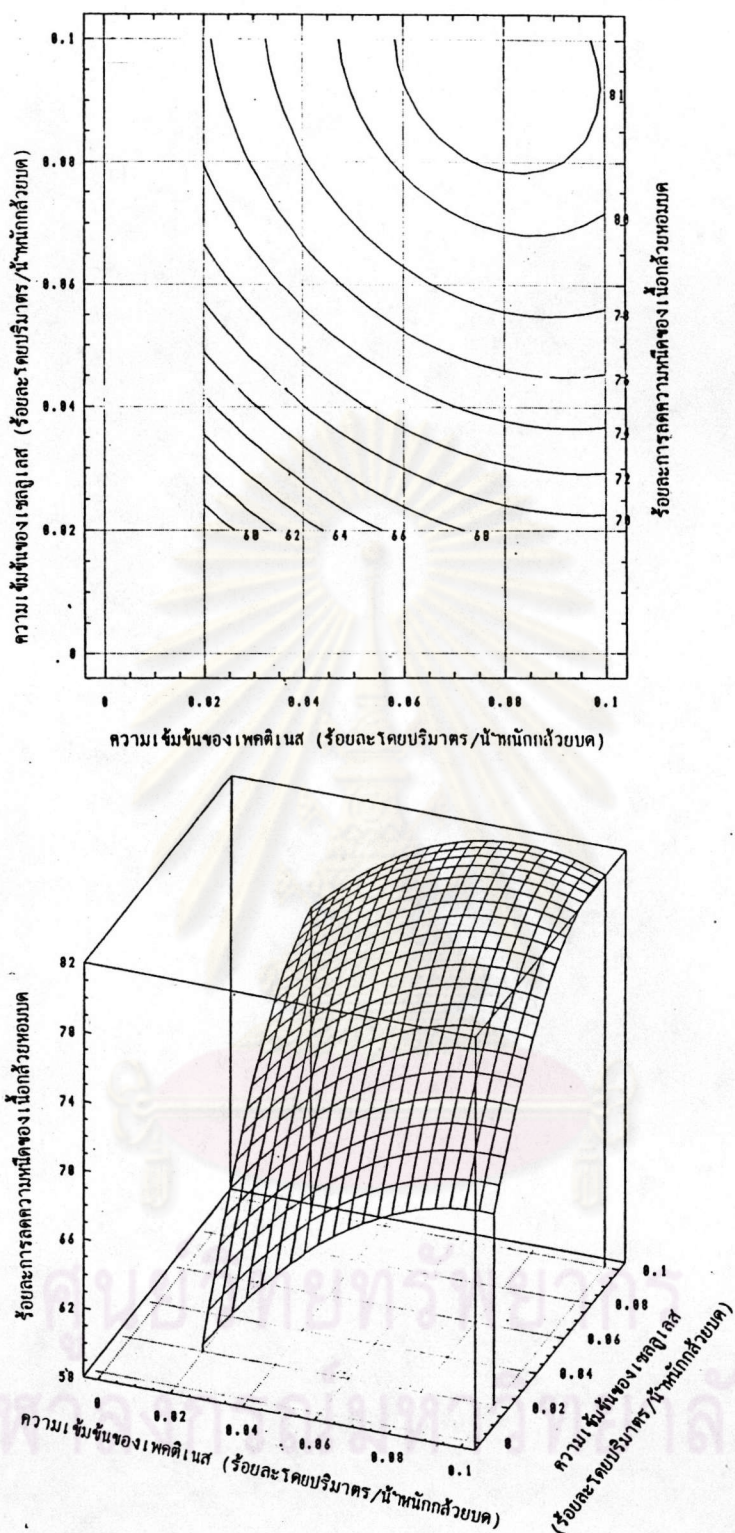
รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยมด ที่ความเข้มข้นของเพคตินเนสในระดับต่าง ๆ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เลสคิงที่ร้อยละ 0.10 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยมด





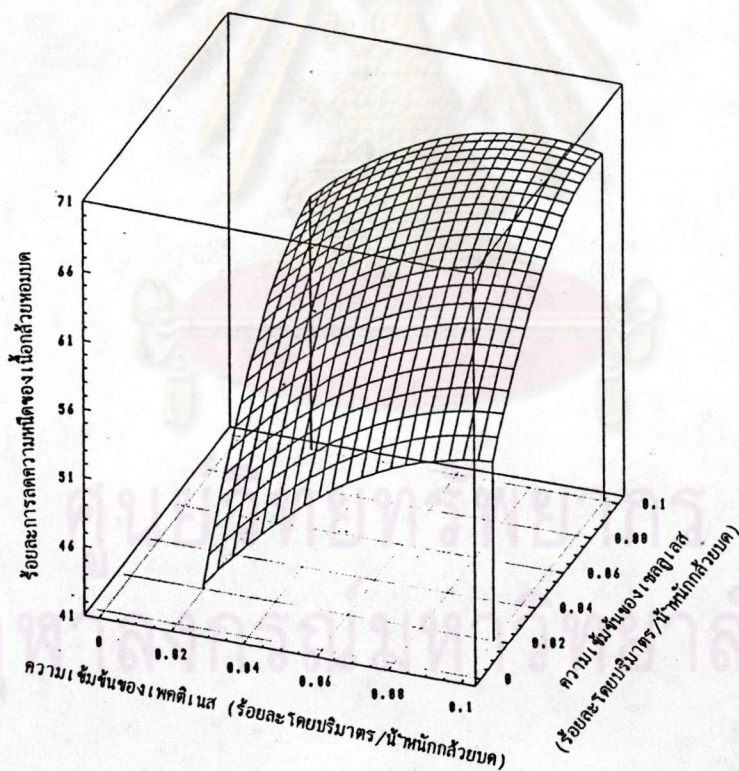
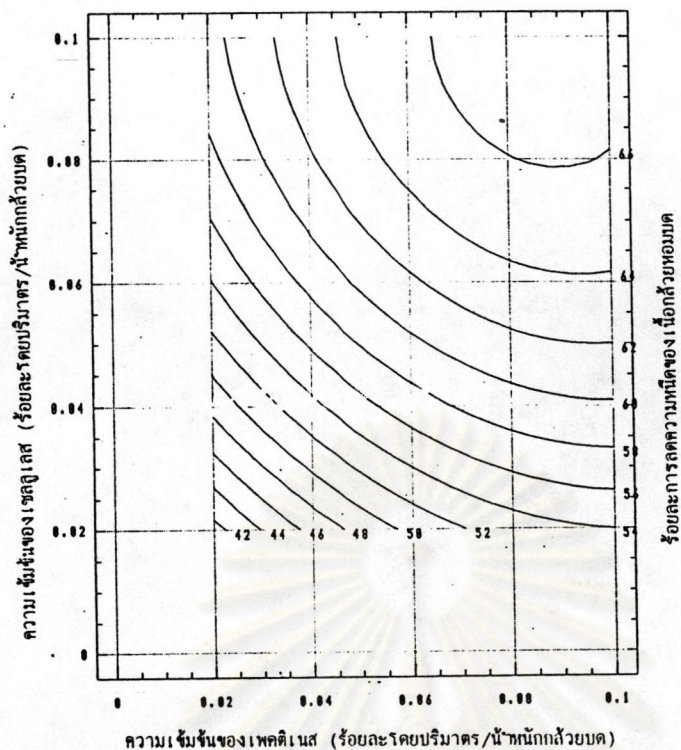
รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมบด ที่ความเข้มข้นของเพคตินเนส และเซลล์เลสในระดับต่าง ๆ เมื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเนื้อกล้วยหอมบดที่อุณหภูมิคงที่ที่ 40 องศาเซลเซียส





รูปที่ 4.8 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมมด ที่ความเข้มข้นของเพคตินเนส และเซลลูเลสในระดับต่าง ๆ เมื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเนื้อกล้วยหอมมดที่อุณหภูมิคงที่ที่ 50 องศาเซลเซียส





รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ในลักษณะ Contour plot(1) และ Surface plot(2) ของค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมบด ที่ความเข้มข้นของเพคตินเนส และเซลลูโลสในระดับต่าง ๆ เมื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเนื้อกล้วยหอมบดที่อุณหภูมิคงที่ที่ 60 องศาเซลเซียส

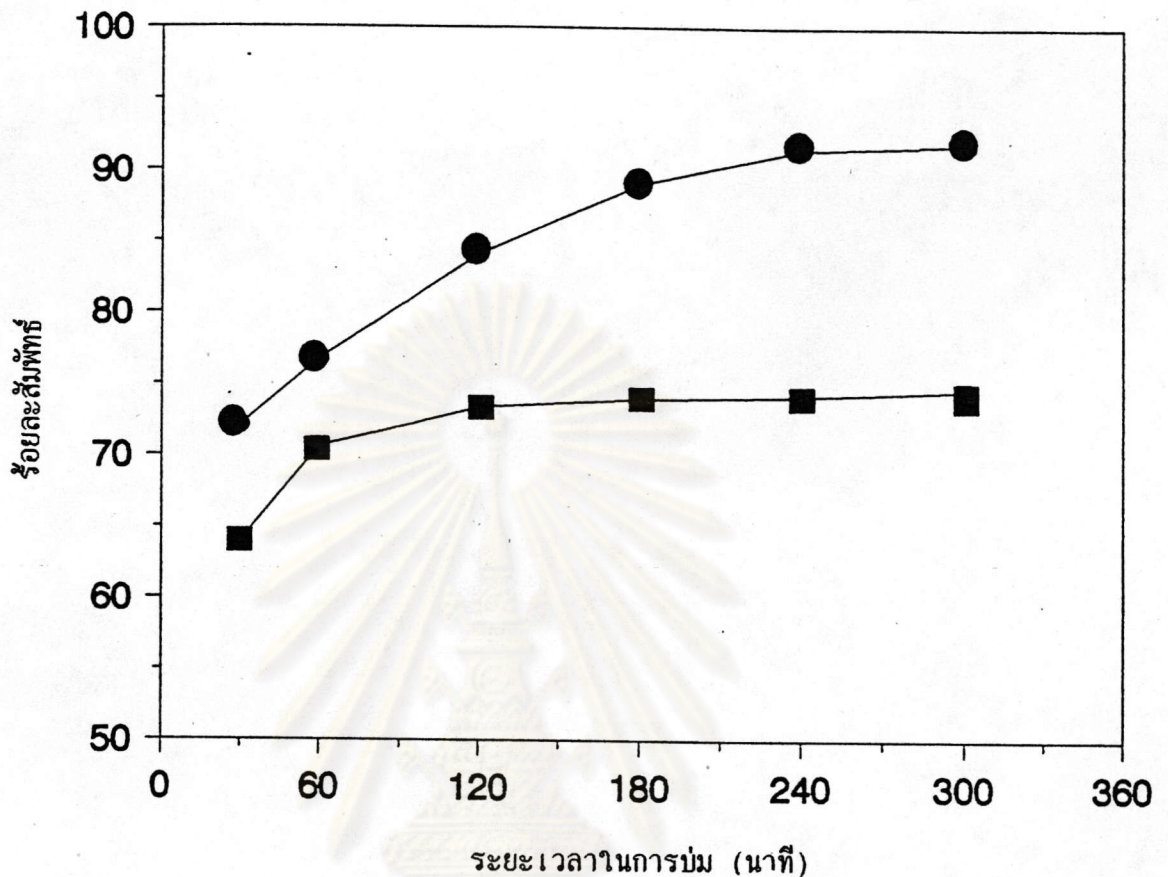


สำหรับบทบาทของเซลลูโลสนั้น จากผลการทดลองจะเห็นว่า เซลลูเลสมีผลในการช่วยเสริมการทำงานของเพคตินในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม ดังค่าการลดความหนืดของกล้วยหอมบดที่ปรากฏ เช่นเดียวกับงานวิจัยมากมายที่สนับสนุนถึงผลเสริมของการใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกัน (Voragen และคณะ, 1980; Kilara, 1982; Sreenath และคณะ, 1984; Noach, 1986; Massiot และคณะ, 1989; etc.) นอกจากนี้ พบว่าเมื่อใช้เพคตินเอสและเซลลูเลสร่วมกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองจะเลื่อนมาที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเปลี่ยนไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมเดิม คือ 35-40 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับการที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานต่างกันนี้เอง จึงเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเมื่อใช้ร่วมกัน โดยจะมีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้ เช่นเดียวกับที่มีตัวอย่างงานวิจัยจากการรวบรวมโดย Hultin (1974) ซึ่งรายงานถึงผลการวิจัยของ Gestrelus และคณะ ในปี ค.ศ.1972 แต่จะเป็นกรณีของการศึกษา pH ซึ่งพบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เชิงซ้อน มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ pH ที่เหมาะสมนี้จะเลื่อนไปทาง pH ที่เหมาะสม ในการทำงานของเอนไซม์ที่มีระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยนี้ไม่เลือกศึกษาถึงผลของ pH ในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมด้วย เนื่องจากกล้วยเป็นผลไม้ที่มีความเป็นกรดปานกลางซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้น พบว่ามี pH อยู่ในช่วง 4-4.7 ซึ่งยังคงเป็นช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ทั้งสอง

#### 4.1.2 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาย่อยสลายกล้วยหอมบดที่เหมาะสม

จากการทดลองข้อ 3.3.1.2 ย่อยสลายกล้วยหอมบดด้วยเพคตินเอส และเซลลูเลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.06 ตามลำดับ และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 45 องศาเซลเซียส ทดลองแปรระยะเวลาในการบ่มกล้วยหอมบดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดต่าง ๆ กันคือ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองแสดงดังรูป 4.10



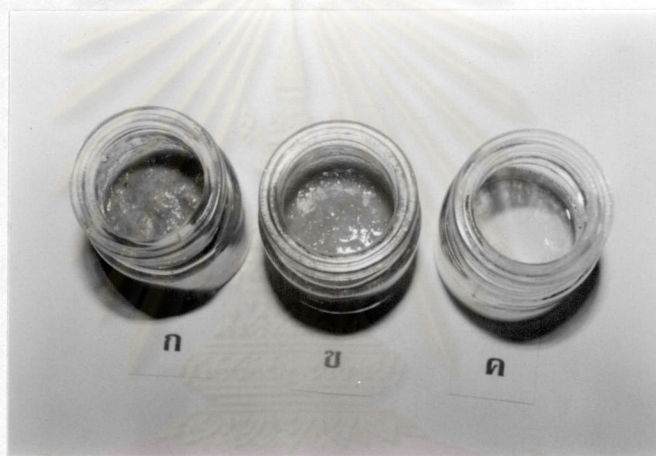


รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการลดความหนืดของเนื้อกล้วยหอมบด (●-●) และ ผลผลิตหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่ได้ออก (■-■) ที่ระยะเวลาบ่มปฏิบัติการต่างๆกัน

จากรูปที่ 4.10 จะเห็นได้ว่า ค่าร้อยละของการลดความหนืดเริ่มคงที่หลังจากระยะเวลาบ่มปฏิบัติการไปแล้ว 3 ชั่วโมง กล่าวคือ ค่าความหนืดที่ลดลงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) ตลอดระยะเวลาบ่มปฏิบัติการตั้งแต่ 3-5 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาปริมาณร้อยละของผลผลิตหัวน้ำเชื้อกล้วยที่ได้ออกพบว่าเริ่มคงที่ เมื่อย่อยสลายกล้วยบดนาน 2 ชั่วโมง และกรณีนี้อาจเป็นไปได้อีกว่าในระยะเวลา 2 ชั่วโมง เป็นระยะเกิดการทำให้กล้วยเหลว (liquefaction) ที่เกือบสมบูรณ์ ซึ่งเป็นผลมาจากผนังเซลล์พืชถูกทำลายด้วยเอนไซม์เป็นผลทำให้



ของเหลวภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาหมดพร้อมกันกับที่พอลิแซ็กคาไรด์ทุกชนิดรวมทั้งสารประกอบ เพคตินในผนังเซลล์พืช หลังจากถูกย่อยสลายแล้ว จะละลายลงสู่ส่วนที่เป็นของเหลวที่เซลล์ปล่อย ออกมา ดังนั้นแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อไปอีก ก็ไม่มีผลเพิ่มปริมาณของเหลว จากกล้วยหอมแต่อย่างไร ข้อสรุปในขั้นตอนการทดลองนี้จะบอกได้ว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง จะเพียงพอ สำหรับการสกัดหัวน้ำเชื้อจากกล้วยหอม ซึ่งให้ผลผลิตหลังการกรองแยก กากออก นอกจากนี้ พบว่า หัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่ได้ มีลักษณะปรากฏเป็นสีเหลืองอ่อนนัส ดังรูปที่ 4.11 มีปริมาณของแข็งทั้งหมด  $22(\pm 1)$  °Brix มี pH  $4.4(\pm 0.3)$  และมีกลิ่นหอมของกล้วยหอม ชัดเจน (ข้อมูลนี้เป็นผลการทดลองเบื้องต้นทางประสาทสัมผัส)

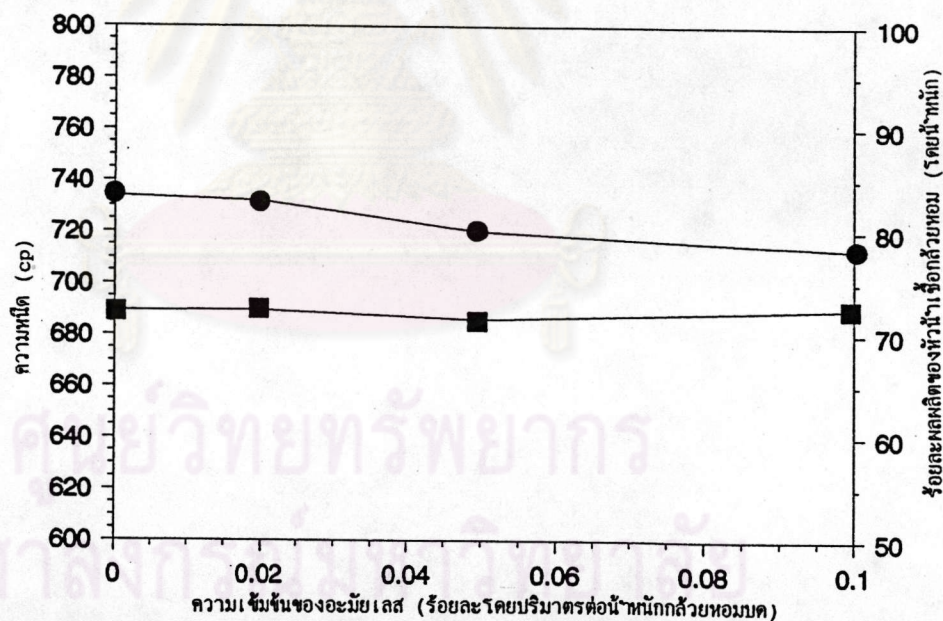


- รูปที่ 4.11 (ก) กล้วยหอมบดก่อนการเติมเพคตินผสมร่วมกับเซลลูโลส  
 (ข) กล้วยหอมบดหลังจากเติมเพคตินผสมร่วมกับเซลลูโลส  
 (ค) ของเหลวใสสกัดจากกล้วยหอมที่ได้หลังการกรอง

#### 4.1.3 ผลของการใช้อะมัยเลสในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม

จากการทดลองในข้อ 3.3.1.3 ผลของการใช้อะมัยเลสในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม โดยแปรระดับความเข้มข้นของอะมัยเลส 3 ระดับคือ ร้อยละ 0.02, 0.05 และ 0.10 โดยกำหนดลำดับการทำงานปฏิกิริยาของอะมัยเลส เพคตินเนส เซลลูเลส ในลักษณะต่างกัน 3 ลักษณะ และให้ผลดังนี้

4.1.3.1 ย่อยสลายกล้วยหอมบดด้วยอะมัยเลส (Ban 240L) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงเติมเพคตินเนสเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร/น้ำหนัก เซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร/น้ำหนัก แต่ปรับอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ผสมของเพคตินเนส และเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลผลิตอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในข้อ 4.1.3.1 นี้แสดงในรูปที่ 4.12

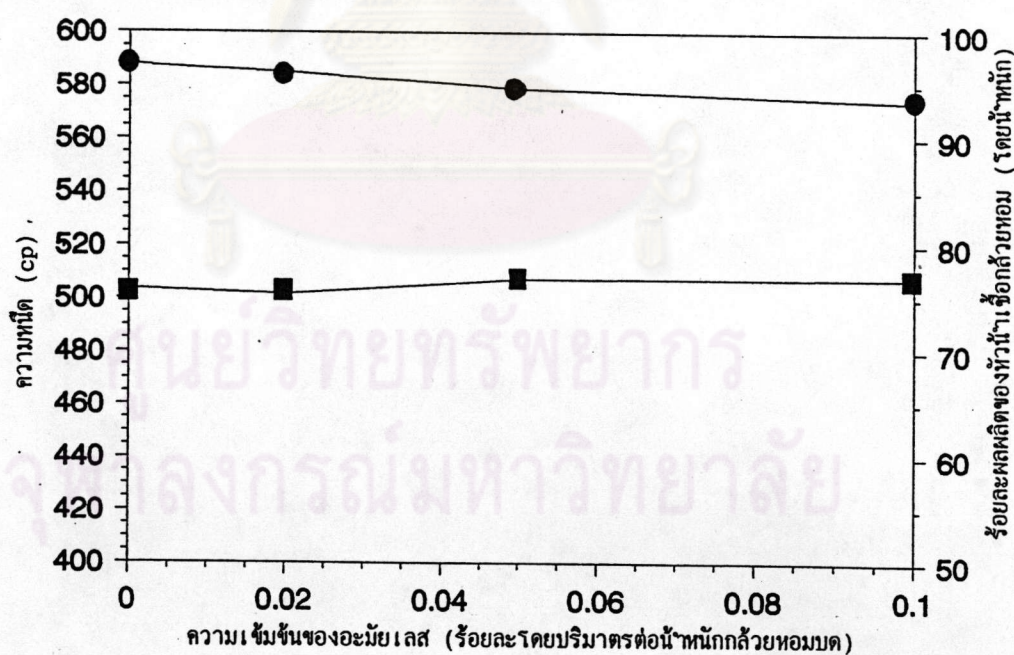


รูปที่ 4.12 ค่าความหนืดเฉลี่ยของกล้วยหอมบด (●—●) และค่าร้อยละของผลผลิตหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่ได้ (■—■) เมื่อเติมอะมัยเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนการเติมเพคตินเนสเข้มข้นร้อยละ 0.05 และเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอมบด



การเติมอะมัยเลสเพื่อย่อยสลายแป้งในเนื้อกล้วยหอมบดก่อนการเติมเพคตินเนสและเซลลูโลส มีจุดประสงค์เพื่อช่วยให้เพคตินเนสและเซลลูโลสเข้าย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืชง่ายขึ้น แต่จากรูปที่ 4.13 พบว่า อะมัยเลสไม่มีผลในการเสริมการทำงานของเพคตินเนสและเซลลูโลส จึงอาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณของแป้งที่มีในกล้วยที่ความสุกระดับ 7-8 นี้ไม่ได้มีผลในการขัดขวางเพคตินเนส และเซลลูโลสในการเข้าย่อยสลายโมเลกุลของเพคตินและเซลลูโลสในเนื้อเยื่อกล้วยหอม

4.1.3.2 ย่อยสลายกล้วยหอมบดด้วยเพคตินเนสเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร/น้ำหนัก และ เซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร/น้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย่อยสลายต่อด้วยอะมัยเลส (Ban 240L) ที่ระดับเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.13

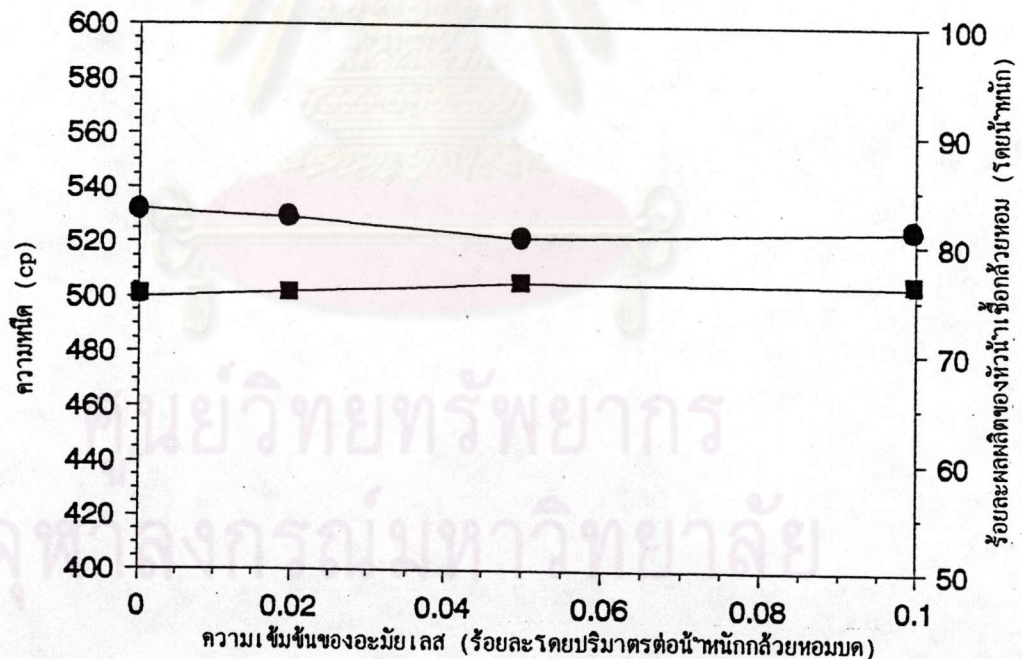


รูปที่ 4.13 ค่าความหนืดเฉลี่ยของกล้วยหอมบด (●—●) และค่าร้อยละของผลผลิตหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่ได้ (■—■) เมื่อเติมอะมัยเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากการเติมเพคตินเนสเข้มข้นร้อยละ 0.05 และเซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอมบด



การเติมอะมัยเลสหลังจากการย่อยสลายเพคตินและเซลลูโลสโดยเพคตินเอสและเซลลูเลส จุดประสงค์เพื่อย่อยสลายโรมเลกุลแข็ง เพื่อให้ได้มาซึ่งปริมาณผลผลิตของของเหลวที่เพิ่มขึ้น แต่จากรูปที่ 4.13 พบว่า อะมัยเลสไม่มีผลในการช่วยลดความหนืดหรือเพิ่มผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออกล้วยหอมแต่อย่างใด อาจเป็นไปได้ว่า แป้งในกกล้วยที่ระดับความสุก 7-8 ดังกล่าวนี้ ได้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในผลกล้วยเองในระหว่างกระบวนการสุก จนมีขนาดโรมเลกุลเป็นพอลิแซคคาไรด์เป็นสายสั้น ๆ ดังนั้นการทำงานของอะมัยเลสที่เติมภายหลังดังกล่าว จึงไม่ปรากฏผลในการลดความหนืดจากการย่อยสลายโรมเลกุลแข็ง หรือส่งผลให้มีปริมาณของผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออกล้วยหอมเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดมากนัก


4.1.3.3 ย่อยสลายกล้วยหอมบดด้วยเพคตินเอส เซลลูเลส และอะมัยเลส ร่วมกันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลดังแสดงในรูป 4.14



รูปที่ 4.14 ค่าความหนืดเฉลี่ยของกล้วยหอมบด (●-●) และค่าร้อยละของผลผลิตหัวน้ำเชื้ออกล้วยหอมที่ได้ (■-■) เมื่อใช้เพคตินเอส เซลลูเลส และอะมัยเลสร่วมกัน



จากการใช้เพคตินেস เซลลูเลส และอะมัยเลสร่วมกัน ในการสกัดหัวน้ำเชื่อม  
กล้วยภายใต้ภาวะการสกัดเดียวกัน จากรูปที่ 4.14 พบว่า อะมัยเลสไม่มีผลในการช่วยเสริมการ  
ทำงานของเพคตินেসและเซลลูเลสและไม่มีส่วนช่วยในการเพิ่มผลผลิตของหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมเช่น  
เดียวกัน ดังนั้น จากรูปที่ 4.12, 4.13 และ 4.14 จึงสรุปได้ว่า อะมัยเลสไม่มีผลในการช่วย  
เพิ่มผลผลิตของหัวน้ำเชื่อมกล้วยไม่ว่าจะเป็นการในลักษณะการทาปฏิกิริยาลำดับขั้น (sequential  
reaction) หรือ การทาปฏิกิริยาร่วมกันอย่างต่อเนื่อง (simultaneous reaction) โดยลักษณะ  
ที่อะมัยเลสไม่มีผลในการสกัดหัวน้ำเชื่อมกล้วยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Viquez และคณะ  
(1981) ซึ่งพบว่าอะมัยเลสไม่มีผลต่อการสกัดหัวน้ำเชื่อมกล้วยเช่นกัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#### 4.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเพคตินเนส เซลลูเลส และอะมัยเลสบนผ้าในลอน

##### 4.2.1 หาความเข้มข้น และ pH ของสารละลาย APTS ที่ใช้กระตุ้นผ้าในลอนที่เหมาะสม

จากวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2.1 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลาย APTS เป็นร้อยละ 1, 3 และ 5 โดยปริมาตร และแปร pH ของสารละลาย APTS เป็น 5, 7, 9, และ 10 ให้ผลการทดลองสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดดังนี้คือ

##### 4.2.1.1 ความเข้มข้น และ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเพคตินเนสบนผ้าในลอน

ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินเนสตรึงรูปเมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS ที่ความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินเนสตรึงรูปเมื่อกระตุ้นผ้าในลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่างๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย APTS (%)	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเพคตินเนสตรึงรูป (ยูนิตx10 <sup>2</sup> )			
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 10
1	8.16	11.27	13.01	14.60
3	10.32	14.50	12.56	17.65
5	12.29	13.22	14.39	19.57



เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ ให้ผลดังตารางที่ 4.6 พบว่า ทั้งระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS และ pH มีผลต่อแอกติวิตีของเพคตินเนสตรังรูปที่ 1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ )

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอกติวิตีของเพคตินเนสตรังรูป เมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS ที่มี pH และความเข้มข้นต่าง ๆ

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (A)	2	$3.96 \times 10^{-3}$	$1.98 \times 10^{-3}$	4.54*
pH (B)	3	$1.50 \times 10^{-2}$	$5.00 \times 10^{-3}$	11.49*
AB	6	$1.67 \times 10^{-3}$	$2.79 \times 10^{-4}$	0.64
ERROR	12	$5.23 \times 10^{-3}$	$4.36 \times 10^{-4}$	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

เนื่องจากปัจจัยรวมไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเพคตินเนสตรังรูปอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินเนสตรังรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงแยกพิจารณาที่ละปัจจัยดังแสดงไว้ในตารางที่

4.7



ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินสตริงรูปเมื่อกระตุ้นผ้าในลอน ด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเพคตินสตริงรูป(ยูนิตx10 <sup>2</sup> )
ความเข้มข้นของสารละลาย APTS ( % )	
1	11.76 b
3	13.76 ab
5	14.87 a
pH	
5	10.26 c
7	13.00 b
9	13.32 b
10	17.27 a

a, b, c ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

จากตารางที่ 4.7 จะเห็นได้ว่า การใช้สารละลาย APTS ที่ pH 10 ในการกระตุ้นผ้าในลอนจะให้แอกติวิตีของเพคตินสตริงรูปสูงสุด และเมื่อพิจารณา ระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS ที่เหมาะสม พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ให้ค่าแอกติวิตีของเพคตินสตริงรูปไม่มีความแตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นจึงเลือกที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS ร้อยละ 3 โดยปริมาตรที่ pH 10 เป็นภาวะเหมาะสมในการกระตุ้นผ้าในลอน



4.2.1.2 ความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสม  
สำหรับตรึงรูปเซลล์สบนผ้าในลอน

ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลล์สตรึงรูปเมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้นและ pH ต่าง ๆ ให้ผลการทดลองแสดงไว้ตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลล์สตรึงรูปเมื่อกระตุ้นผ้าในลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย APTS (%)	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรึงรูป (ยูนิต)			
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 10
1	25.29 <sup>a</sup>	20.94 <sup>c</sup>	20.99 <sup>c</sup>	24.95 <sup>a</sup>
3	21.46 <sup>c</sup>	21.99 <sup>c</sup>	22.04 <sup>c</sup>	25.20 <sup>a</sup>
5	20.90 <sup>c</sup>	21.42 <sup>c</sup>	23.53 <sup>b</sup>	25.17 <sup>a</sup>

a, b, c ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ข้อมูลจากตารางที่ 4.8 เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน ให้ผลดังตารางที่ 4.9 พบว่าปัจจัยร่วมมีผลต่อแอกติวิตีของเซลล์สตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลล์สตรึงรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงพิจารณาทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกันดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ระหว่างที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS ร้อยละ 1, 3 และ 5 โดยปริมาตรที่ pH 10 และค่าแอกติวิตีที่ได้นี้สูงกว่า



ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันที่ pH 5, 7 และ 9 ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ pH 5  
 อย่างไรก็ตามที่ pH 10 นี้คือ pH ของ APTS เมื่อละลายน้ำ ดังนั้น ภาวะที่ประหยัด และสะดวก  
 ต่อการเตรียม โดยยังคงให้แอกติวิตีสูงที่สุดคือ ที่ระดับความเข้มข้นของ APTS ร้อยละ 1 ที่ pH 10

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอกติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูป เมื่อกระตุ้น  
 ฟัาในลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของสาร				
ละลาย APTS (A)	2	0.60	0.30	0.89
pH (B)	3	45.40	15.13	45.06*
AB	6	29.91	4.98	14.84*
ERROR	12	4.03	0.34	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2.1.3 ความเข้มข้นและ pH ของสารละลาย APTS ที่เหมาะสมสำหรับ การตรึงรูปอะมีนเลสบนฟัาในลอน

ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของอะมีนเลสตรึงรูปเมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย  
 APTS ที่มีความเข้มข้นและ pH ต่าง ๆ ให้ผลการทดลองแสดงไว้ตารางที่ 4.10



ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปเมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย APTS (%)	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเพคตินเอสตรังรูป (ยูนิต)			
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 10
1	12.99 abc	13.35 abc	12.56 abcd	13.50 abc
3	12.32 bcd	14.34 ab	14.53 a	12.65 abcd
5	14.13 ab	12.35 bcd	11.70 dc	10.93 d

a, b, c, d ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

ข้อมูลจากตารางที่ 4.10 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ให้ผลดังตารางที่ 4.11 พบว่าปัจจัยร่วมมีผลต่อแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงพิจารณาทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกันดังแสดงในตารางที่ 4.10 ซึ่งพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลาย APTS ร้อยละ 3 ที่ pH 9 ให้ค่าแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามค่าที่ได้นี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ pH 5, 7, 9 และ 10 ดังนั้นภาวะที่ประหยัดและสะดวกต่อการเตรียมซึ่งยังคงให้แอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปสูงที่สุดคือ ที่ระดับความเข้มข้นของ APTS ร้อยละ 1 ที่ pH 10



ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูป เมื่อกระตุ้นผ้า  
ในลอนด้วยสารละลาย APTS ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของสาร ละลาย APTS (A)	2	5.89	2.94	4.17*
pH (B)	3	3.27	1.09	1.54
AB	6	16.65	2.77	3.93*
ERROR	12	8.47	0.71	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2.2 กำหนดความเข้มข้นและ pH ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับ การตรึงรูปเอนไซม์

จากวิธีทดลองในข้อ 3.3.2.2 กำหนดความเข้มข้น และ pH ของสารละลาย  
กลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเพคตินเนสบนในลอน โดยแปรความเข้มข้นของสารละลาย  
กลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 1, 3 และ 5 โดยปริมาตร และแปร pH ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์  
เป็น 3, 7 และ 9 ให้ผลการทดลองสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดดังนี้คือ

##### 4.2.2.1 ความเข้มข้น และ pH ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเพคตินเนสบนผ้าในลอน

ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินเนสตรึงรูปบนในลอนเมื่อใช้สารละลาย  
กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง ที่ความเข้มข้นและ pH ต่าง ๆ ให้ผลการทดลองดัง  
ตารางที่ 4.12



ตารางที่ 4.12 แอคติวิตีของเพคตินเนสตรังรูปบนผ้าในลอนเมื่อใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ (%)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเพคตินเนสตรังรูป (ยูนิต $\times 10^2$ )		
	pH 3	pH 7	pH 9
1	18.85	15.74	16.19
3	15.86	15.06	14.80
5	15.31	14.74	13.76

จากตารางที่ 4.12 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล  
ให้ผลดังตารางที่ 4.13 พบว่าทั้ง pH และระดับความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของ  
เพคตินเนสตรังรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอกติวิตีของเพคตินเนสรีงรูป เมื่อกระตุ้นผ้า  
ในลอนด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของสาร ละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (A)	2	$1.73 \times 10^{-3}$	$8.64 \times 10^{-4}$	17.32*
pH (B)	2	$1.07 \times 10^{-3}$	$5.37 \times 10^{-4}$	10.78*
AB	4	$4.19 \times 10^{-4}$	$1.05 \times 10^{-4}$	2.10
ERROR	9	$4.49 \times 10^{-4}$	$4.98 \times 10^{-5}$	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

เนื่องจากปัจจัยรวมไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเพคตินเนสรีงรูป  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินเนสรีงรูป  
โดยวิธีของ Duncan's new multiple range test จึงแยกพิจารณาที่ละปัจจัยดังแสดงไว้ดัง  
ตารางที่ 4.14

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.14 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเพคตินेत्रริงรูปเมื่อกระตุ้นฟ้าในลอน ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ pH ต่างๆโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเพคตินेत्रริงรูป(ยูนิตx10 <sup>2</sup> )
ความเข้มข้นของสารละลาย	
APTS ( % )	
1	16.92 a
3	15.24 b
5	14.60 b
pH	
3	16.67 a
7	15.18 b
9	14.92 b

a, b ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

จากตารางที่ 4.14 จะเห็นได้ว่า สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ pH 3 ให้ค่าแอกติวิตีของเพคตินेत्रริงรูปสูงที่สุดและแตกต่างจาก pH 7 และ 9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์พบว่าระดับความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่ให้แอกติวิตีของเพคตินेत्रริงรูปสูงที่สุดคือที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์สำหรับเพคตินेत्रริงรูปคือที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 ที่ pH 3

4.2.2.2 ความเข้มข้นและ pH ของสารละลายกลูตาไรต์ไฮดที่ เหมาะสม  
สำหรับการตรึงรูปเซลล์บนผ้าใยลอน

ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลล์ตรึงรูปบนผ้าใยลอนเมื่อใช้สารละลายกลูตาไรต์ไฮดเป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง ที่ความเข้มข้นและ pH ต่าง ๆ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลล์ตรึงรูปบนผ้าใยลอนเมื่อใช้สารละลายกลูตาไรต์ไฮดที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย กลูตาไรต์ไฮด (%)	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเซลล์ตรึงรูป (ยูนิต)		
	pH 3	pH 7	pH 9
1	21.76	25.55	24.25
3	22.70	25.64	24.83
5	24.42	26.86	22.90

จากตารางที่ 4.15 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลให้ผลดังตารางที่ 4.16 พบว่า เฉพาะระดับ pH เท่านั้นที่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



ตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอกติวิตีของเซลลูเลสตรังรูป เมื่อกระตุ้น  
ฟ้าในลอนด้วยสารละลายกลูตาไรลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของสาร ละลายกลูตาไรลดีไฮด์ (A)	2	2.33	1.17	0.42
pH (B)	2	28.99	14.49	5.23*
AB	4	11.03	2.76	0.99
ERROR	9	24.95	2.77	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

เนื่องจากปัจจัยร่วมไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเซลลูเลสตรังรูปอย่าง  
มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลลูเลสตรังรูปโดยวิธี  
Duncan's new multiple range test จึงคิดเฉพาะปัจจัย pH ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.17

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของเซลลูเลสตรังรูปเมื่อกระตุ้นฟ้านลอน ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ pH ต่าง ๆ โดยวิธี Duncan's new multiple range test

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเซลลูเลสตรังรูป(ยูนิต)
pH	
3	22.96 b
7	26.02 a
9	23.99 ab

a, b ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

จากตารางที่ 4.17 จะเห็นว่าการใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ pH 7 จะให้แอกติวิตีของเซลลูเลสตรังรูปสูงที่สุด และให้ผลแตกต่างกับที่ pH 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับที่ pH 9 ให้ค่าแอกติวิตีที่อยู่ระหว่างแอกติวิตีที่ได้จาก pH 3 และ pH 7 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับ pH ทั้งสอง ดังนั้น pH ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรังรูปเซลลูเลสคือ ที่ pH 7 และเนื่องจากระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเซลลูเลสตรังรูป ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรังรูป

#### 4.2.2.3 ความเข้มข้น และ pH ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรังรูปอะมัยเลสบนฟ้านลอน

ค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปบนฟ้านลอนเมื่อใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง ที่ความเข้มข้นและ pH ต่าง ๆ ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.18



ตารางที่ 4.18 แอคติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปบนผ้าในลอนเมื่อใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์  
ที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ สารละลาย กลูตารัลดีไฮด์ (%)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรังรูป (ยูนิต)		
	pH 3	pH 7	pH 9
1	17.59	17.79	18.96
3	16.91	18.15	19.07
5	15.94	18.06	20.80

จากตารางที่ 4.18 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลให้  
ผลดังตารางที่ 4.19 พบว่า ระดับ pH เท่านั้นที่มีผลต่อแอคติวิตีของอะมัยเลสตรังรูปอย่างมีนัยสำคัญ  
ทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูป เมื่อกระตุ้นฟ้า  
ในลอนด้วยสารละลายกลูตาไรลไฮดรีดที่มีความเข้มข้น และ pH ต่าง ๆ

ปัจจัย	df.	SS.	MS.	ค่า F
ความเข้มข้นของสาร ละลายกลูตาไรลไฮดรีด(A)	2	0.16	8.06	5.75E-02
pH (B)	2	23.65	11.82	8.43*
AB	4	6.96	1.74	1.24
ERROR	9	12.61	1.40	

\* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

เนื่องจากปัจจัยร่วมไม่มีผลต่อแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูป  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของอะมัยเลสตรังรูป  
โดยวิธีของ Duncan's new multiple range test จึงแยกพิจารณาที่ละปัจจัยดังแสดงไว้  
ดังตารางที่ 4.20

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.20 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอกติวิตีของอะมัยเลสตรงรูปเมื่อกระตุ้นฟ้าในลอน ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ pH ต่างๆโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี/กรัมของเอนไซม์ตรงรูป(ยูนิต)
pH	
3	16.82 b
7	18.00 ab
9	19.61 a

a, b, c ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

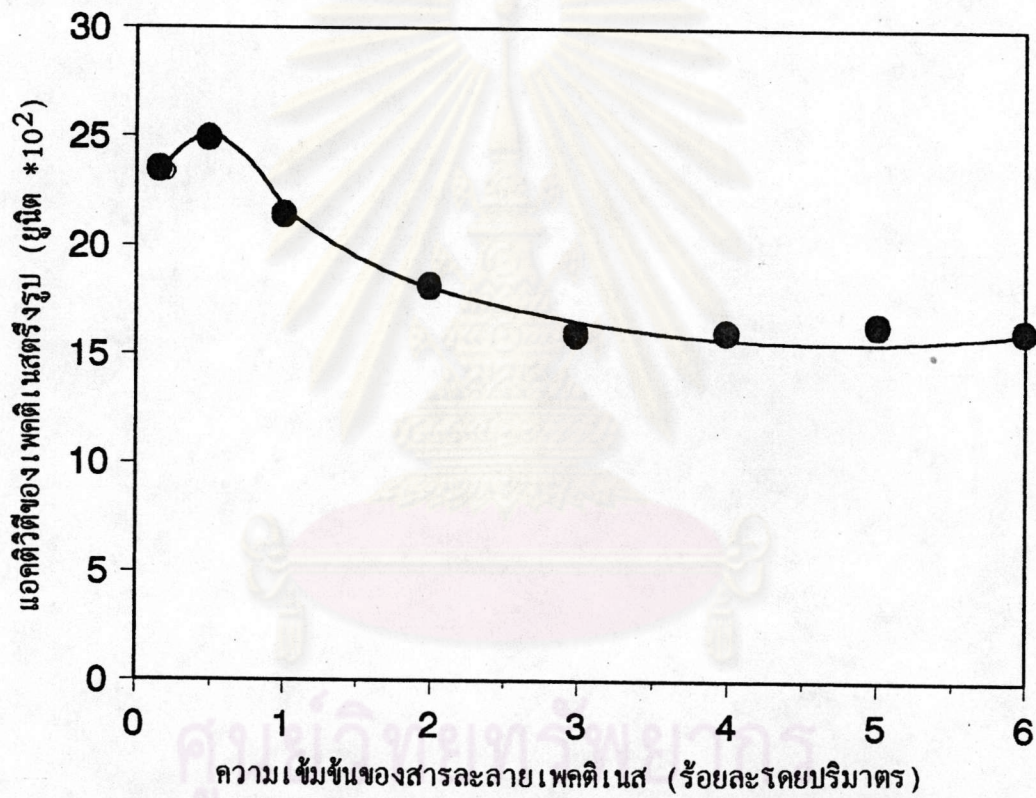
จากตารางที่ 4.20 จะเห็นว่าการใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ pH 9 จะให้แอกติวิตีของอะมัยเลสตรงรูปสูงที่สุด และให้ผลแตกต่างกับที่ pH 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับที่ pH 7 ให้ค่าแอกติวิตีที่อยู่ในระหว่างค่าแอกติวิตีที่ได้จาก pH 3 และ pH 9 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับ pH ทั้งสอง ดังนั้น pH ของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรงรูปอะมัยเลสคือ ที่ pH 9 และเนื่องจากระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของอะมัยเลสตรงรูปที่ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 โดยปริมาตร นั่นคือภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 ที่ pH 9

#### 4.2.3 หาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป

จากวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2.3 หาความเข้มข้นของเพคตินเนส

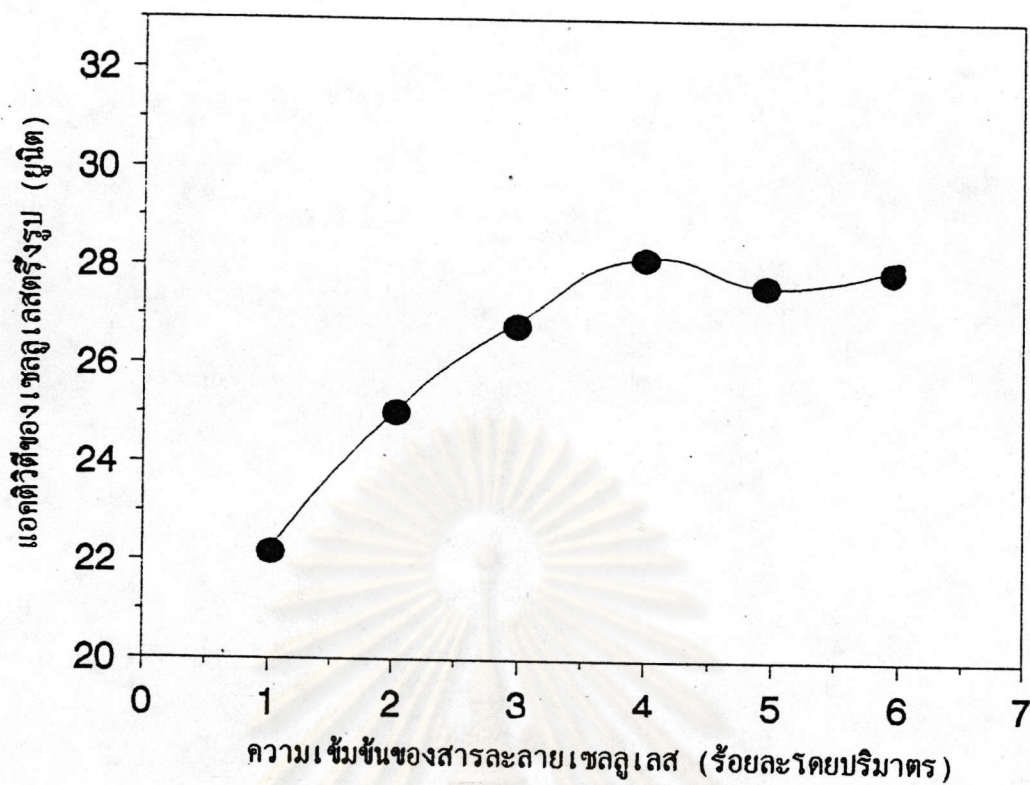
เซลลูเลส และ อะมัยเลสที่เหมาะสม ในการตรึงรูปบนผ้าในลอน ให้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่

4.15 , 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ

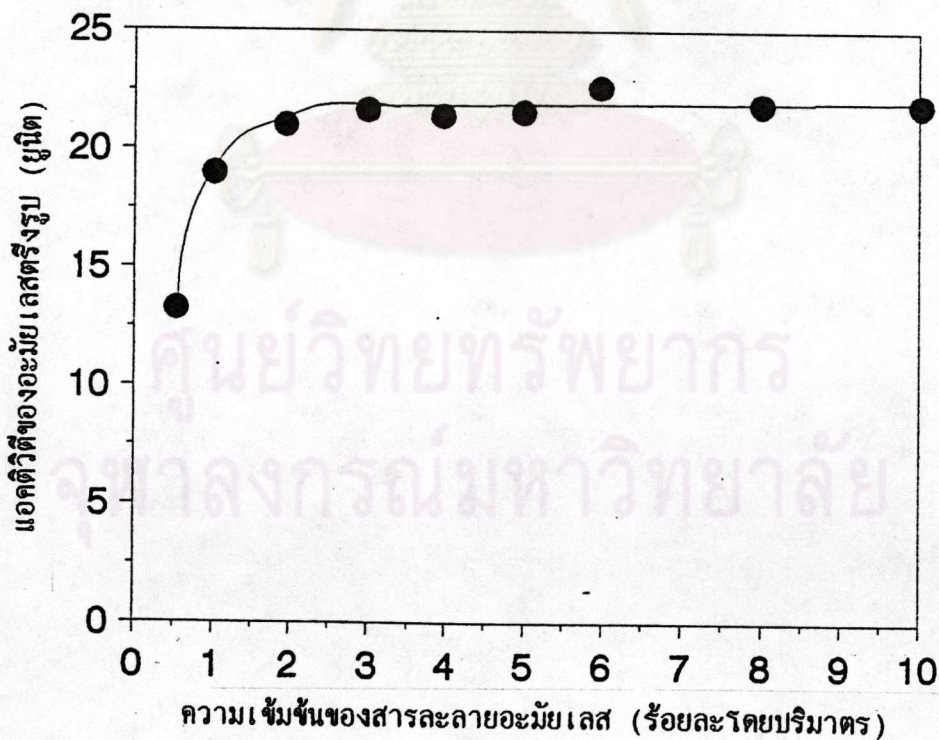


รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างแอดคิตีวิตี้ของเพคตินเนสตรึงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายเพคตินเนสที่ใช้ในการตรึงรูป





รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเซลลูเลสตรงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายเซลลูเลสที่ดำเนินการตรงรูป



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของอะมีเลสตรงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายอะมีเลสที่ดำเนินการตรงรูป



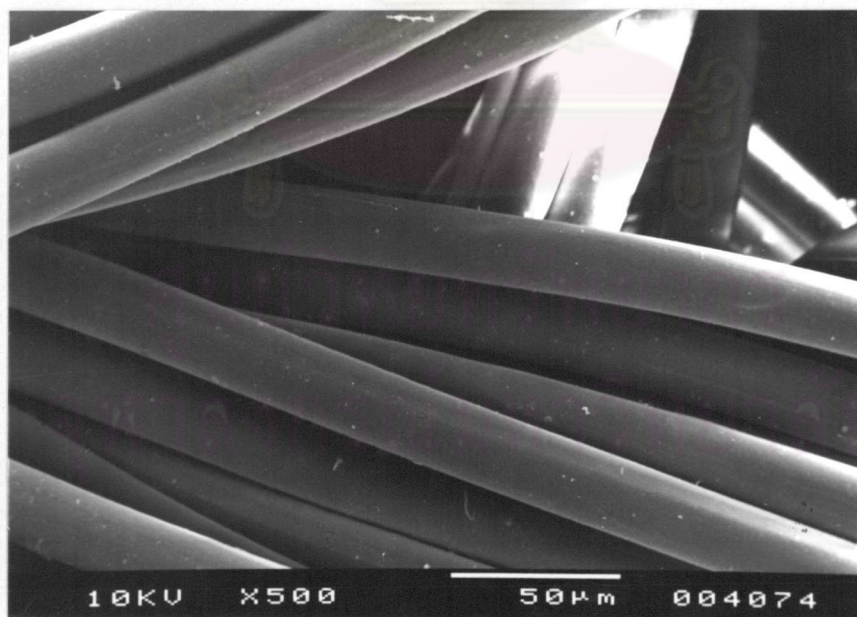
จากรูปที่ 4.15, 4.16 และ 4.17 จะเห็นว่าลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรีงรูป ทั้ง 3 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วงคือ ในช่วงแรกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรีงรูปมากขึ้น จะทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปสูงขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นผลเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ จะทำให้มีจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์เข้าชนกับหมู่วตอปฏิกิริยาบนผ้าในลอนมากขึ้น ส่งผลให้มีเอนไซม์เกาะบนผ้าในลอนมากขึ้น แอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปจึงสูงขึ้น ส่วนช่วงที่สองเป็นช่วงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์จะไม่ส่งผลต่อการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูป ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว เป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้มีการเกาะของเอนไซม์กับหมู่วตอปฏิกิริยาของตัวพุงค่อนข้างจะสมบูรณ์ จึงทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้สูงขึ้นก็ตาม สำหรับในกรณีของเพคตินเอสดังรูปที่ 4.15 จะเห็นว่า แอกติวิตีของเพคตินเอสตรีงรูปจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพคตินเอสเพิ่มขึ้นจนถึงที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร หลังจากนั้นแนวโน้มลดลง และ ที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 3 แอกติวิตีของเพคตินเอสตรีงรูปเริ่มคงที่ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลายเพคตินเอสร้อยละ 3 เป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้มีการเกาะของเอนไซม์กับหมู่วตอปฏิกิริยาของตัวพุงค่อนข้างจะสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามแอกติวิตีที่ได้นั้น ต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพคตินเอสร้อยละ 0.5 ซึ่งอาจเป็นเพราะ การที่มีเอนไซม์เพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่มีการเกาะของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์นั้นก่อให้เกิดลักษณะบดบัง (steric effect) ขึ้น ดังนั้น จากลักษณะของกราฟความสัมพันธ์ที่ได้ จึงเลือกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพคตินเอสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการตรีงรูปเพคตินเอส สำหรับในกรณีของเซลลูเลสและอะมัยเลส ดังรูปที่ 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ จะเห็นว่ามีลักษณะของความสัมพันธ์คล้ายกันคือ สารละลายเซลลูเลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 และ สารละลายอะมัยเลส ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้มีการสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงค่อนข้างสมบูรณ์ และแอกติวิตีของเอนไซม์ตรีงรูปที่ได้มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์สูงขึ้นโดยที่ไม่มีก่อให้เกิดผลในการบดบังแต่อย่างใด ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นของสารละลายเซลลูเลส และอะมัยเลส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4



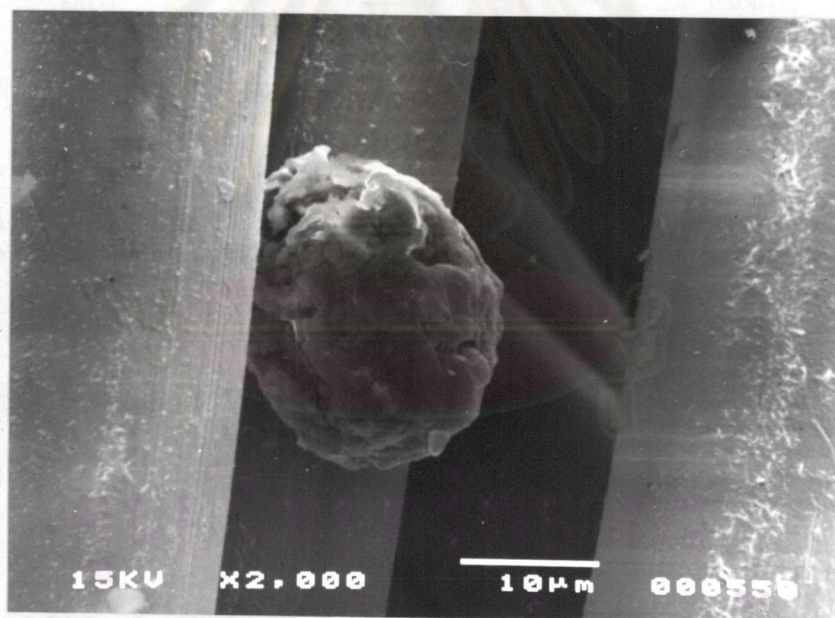
และร้อยละ 2 โดยปริมาตร เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป ตามลำดับ

#### 4.3 ศึกษาโครงสร้างของ เพคตินเอส เซลลูโลส และอะมัยเลสตรึงรูปบนผ้าไหมลอนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (SEM)

จากการทดลองข้อ 3.3.3 เมื่อตรวจดูโครงสร้างของผ้าไหมลอน รวมทั้งเพคตินเอส เซลลูโลสและอะมัยเลสตรึงรูปด้วยเครื่อง SEM ดังรูปที่ 4.18 แสดงโครงสร้างของผ้าไหมลอน ซึ่งจะเห็นว่า ผ้าไหมลอนประกอบด้วยกลุ่มของเส้นใยไหมลอนที่รวมกันเป็นมัดและมีพื้นผิวเรียบ เมื่อผ่านกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์ซึ่งเพคตินเอสตรึงรูปแสดงดังรูปที่ 4.19 เซลลูโลสตรึงรูปแสดงดังรูปที่ 4.20 และอะมัยเลสตรึงรูปแสดงดังรูปที่ 4.21 จะปรากฏกลุ่มของโปรตีนเอนไซม์มาเกาะอยู่บนเส้นใยของผ้าอย่างชัดเจน และเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีขนาดของโมเลกุลโปรตีนที่ต่างกัน

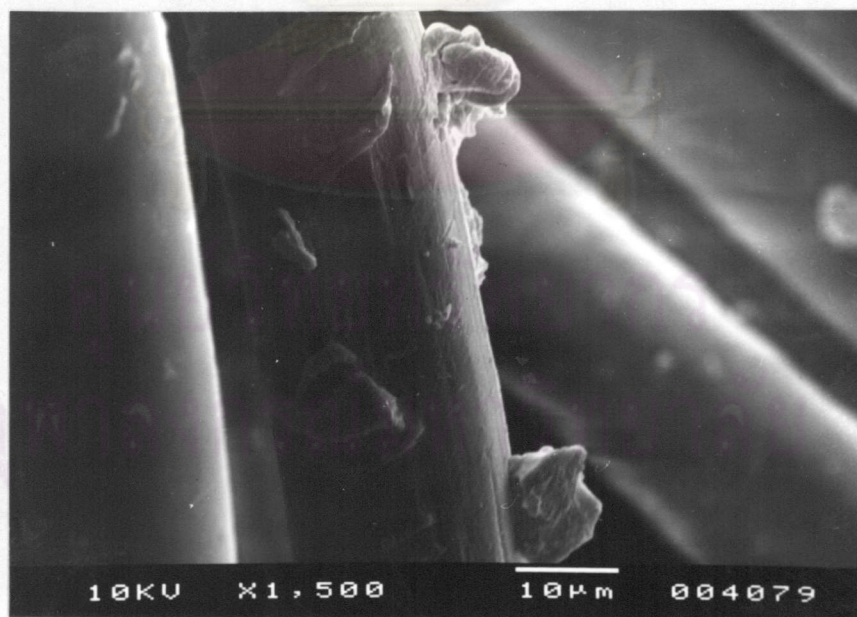
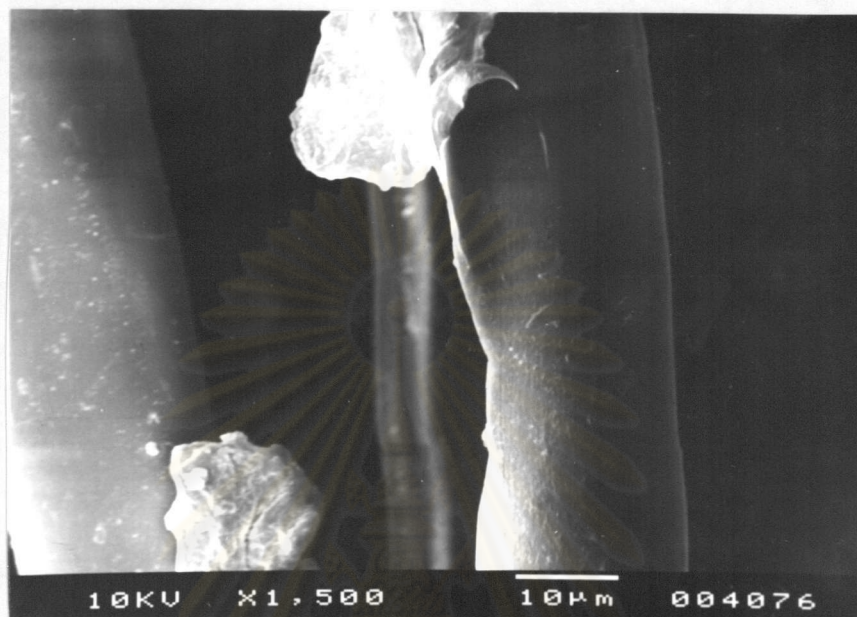


รูปที่ 4.18 โครงสร้างของผ้าไหมลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า

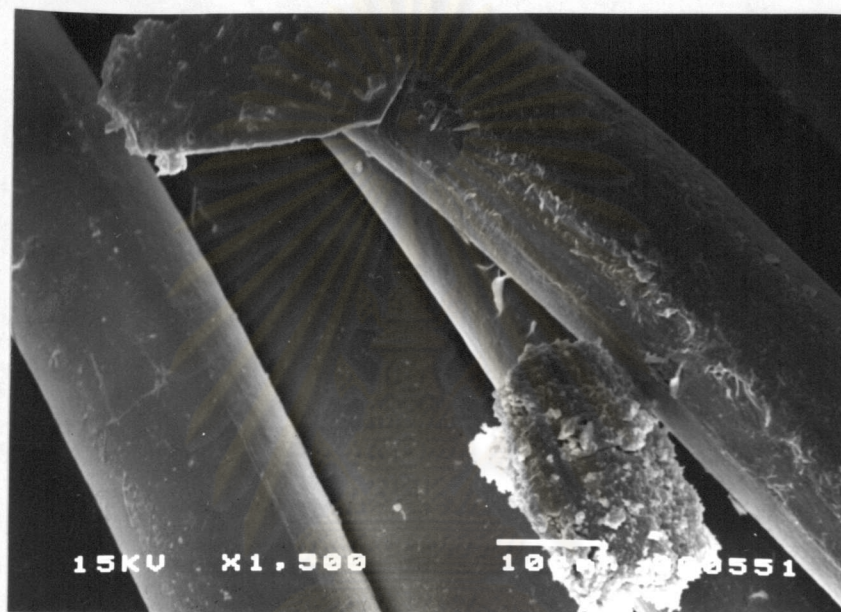


รูปที่ 4.19 โครงสร้างของเพคตินเส้นตรงรูปบนผ้าไนลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 2000 เท่า





รูปที่ 4.20 โครงสร้างของเซลลูโลสตรึงรูปแบบผ้าในลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 1500 เท่า



รูปที่ 4.21 โครงสร้างของอะมัยเลสตรงรูบนผ้าในลอนจากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 1500 เท่า

#### 4.4 ศึกษาสมบัติทางประการทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรงรูเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

##### 4.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

##### 4.4.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพคตินเอสเอร์

##### และ เพคตินเอสตรงรู

จากการทดลองในข้อ 3.3.4.1 โดยวัดแอกติวิตีของเพคตินเอสเอร์

และเพคตินเอสตรงรูในช่วงอุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่

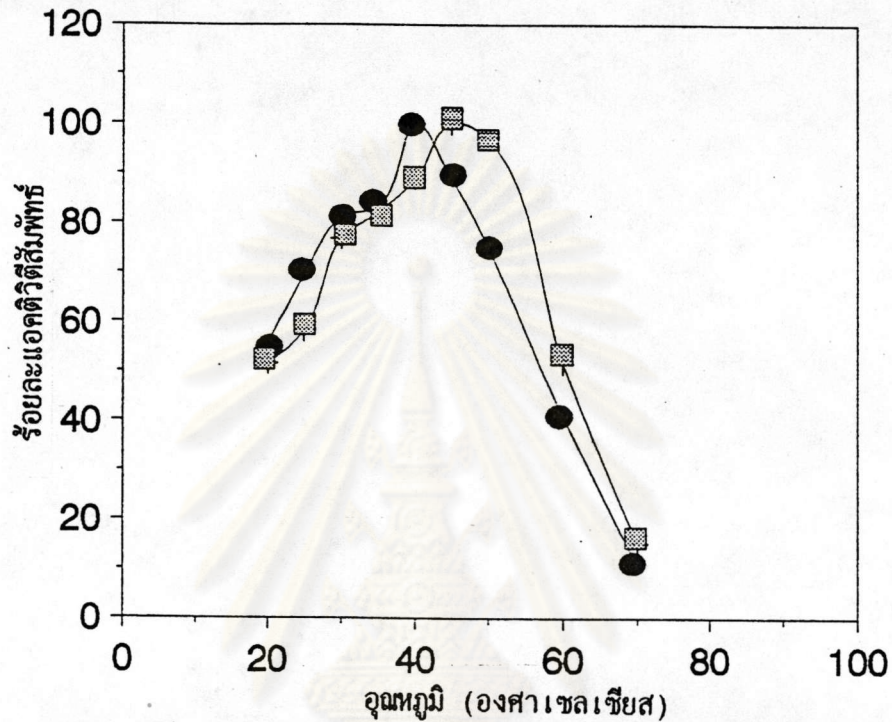
4.21 และรูปที่ 4.22



ตารางที่ 4.21 ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเพคตินเอสเระและเพคตินเอสตรังรูป

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี ( $\times 10^2$ )		แอกติวิตีสัมพัทธ์	
	อิสระ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ตรังรูป (ยูนิต/กรัม)	อิสระ (ร้อยละ)	ตรังรูป (ร้อยละ)
20	116.65	19.40	55.5	51.6
25	145.82	21.88	69.4	58.2
30	170.03	28.93	81.0	76.9
35	174.99	30.94	83.3	82.3
40	210.00	33.46	100.0	89.0
45	186.69	37.60	88.9	100.0
50	157.50	36.45	75.0	96.9
60	86.10	19.40	41.0	51.6
70	22.57	5.72	10.7	15.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.22 ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเพคตินเนสอิสระ ( ●—● ) และ เพคตินเนสตรังรูป ( ■—■ )

จากรูปที่ 4.21 จะเห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเพคตินเนสอิสระ หรือ เพคตินเนสตรังรูป กับอุณหภูมิ มีแนวโน้มในลักษณะเดียวกัน โดยลักษณะของกราฟความสัมพันธ์จะแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกเป็นช่วงที่การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลทำให้แอกติวิตีของเพคตินเนสเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสูงสุด ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้โมเลกุลของเพคตินเนสมีการเคลื่อนที่หรือพลังงานจลน์สูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการชนกันของ



โพลีเอทิลีนสไตรีนกับโพลีเอทิลีนของสปีสเตรทมากขึ้น ปฏิกริยาจึงเกิดได้ดี ส่วนช่วงที่สองเป็นช่วงที่ การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลทำให้แอกติวิตีของโพลีเอทิลีนเริ่มลดลงจากจุดที่เกิดปฏิกิริยาสูงสุด ซึ่งเป็นผล เนื่องมาจากโปรตีนเอนไซม์เริ่มเสียสภาพธรรมชาติโดยความร้อน โดยอุณหภูมิที่โพลีเอทิลีนสไตรีนและ โพลีเอทิลีนสไตรีนรูปแสดงแอกติวิตีสูงสุด คือที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งจะ เห็นว่า ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส โพลีเอทิลีนสไตรีนรูปจะมีแอกติวิตีต่ำกว่าโพลีเอทิลีน สไตรีน ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่โพลีเอทิลีนสไตรีนรูปถูกตรึงติดกับตัวพุงที่มีขนาดใหญ่ทำให้ ไม่มีอิสระในการเคลื่อนที่เข้าทำปฏิกิริยากับสปีสเตรทเหมือนกับกรณีของโพลีเอทิลีนสไตรีน แต่ อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิในช่วง 45-70 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าโพลีเอทิลีนสไตรีนรูปมีแอกติวิตีที่สูง กว่า นั่นคือเป็นไปได้ดีกว่าพันธะโคเวเลนต์ของโพลีเอทิลีนสไตรีนรูปช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของ โพลีเอทิลีนซึ่งเป็นโปรตีน ทำให้การคลายเกลียวหรือการเสียสภาพของโปรตีนนั้นเป็นไปได้อย่าง กว่าโพลีเอทิลีนสไตรีนจึงทำให้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี ซึ่งลักษณะของข้อได้เปรียบดังกล่าวนี้สอดคล้อง กับงานวิจัยของ Lozano และคณะ (1988) ตรึงโพลีเอทิลีนสไตรีน nylon polyethyleneimine copolymer โดยใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม และงานวิจัยของประพันธ์ ปิ่นศิริธรรม และ ปราณี อานเป็รื่อง (2535) ในการตรึงรูป Neutralse บนผ้าในลอนโดยใช้ สารละลาย APTS เป็นตัวกระตุ้น และ สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ที่สนับสนุนถึงข้อได้เปรียบของตรึงรูปเอนไซม์ที่ช่วยทำให้เอนไซม์มีความทนต่อการเสียสภาพ ธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ

#### 4.4.1.2 อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาของเซลลูโลสเอทิลีน และ

##### เซลลูโลสตรึงรูป

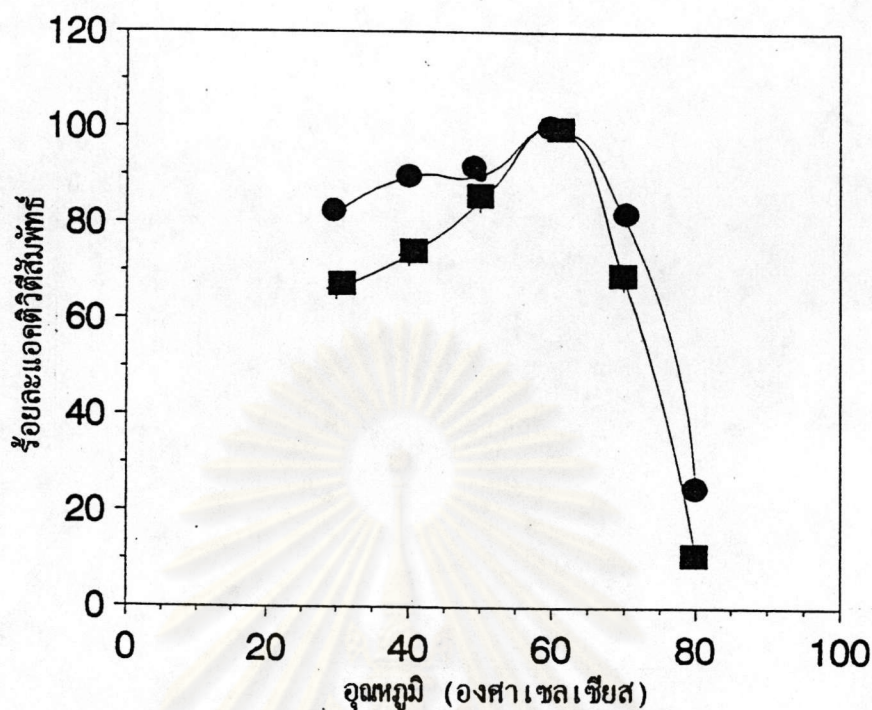
จากการทดลองในข้อ 3.3.4.2 โดยวัดแอกติวิตีของเซลลูโลสเอทิลีน และเซลลูโลสตรึงรูป ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างอุณหภูมิ กับ ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ ดังตารางที่ 4.22 และรูปที่ 4.23

ตารางที่ 4.22 แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิต่างๆของ เซลลูเลสอิสระและตรึงรูป

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี		แอคติวิตีสัมพัทธ์	
	อิสระ (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ตรึงรูป (ยูนิต/กรัม)	อิสระ (ร้อยละ)	ตรึงรูป (ร้อยละ)
30	111.49	26.40	66.2	81.8
40	123.45	28.87	73.3	89.5
50	142.48	29.00	84.6	89.9
60	168.42	32.26	100.0	100.0
70	115.19	26.26	68.4	81.4
80	18.02	7.64	10.7	23.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.23 ร้อยละแอกติวิตีสัมพันธ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเชลลูเลสอิสรระ ( ■—■ ) และ เชลลูเลสตรังรูป ( ●—● )

จากรูปที่ 4.23 จะเห็นว่าเชลลูเลสอิสรระและเชลลูเลสตรังรูป มีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเท่ากัน โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชลลูเลสตรังรูปจะกว้างกว่าเชลลูเลสอิสรระ ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับกรณีของเชลลูเลสตรังรูปบน Poly-L-glutamic acid (Takeuchi และ Makino, 1986) และ เชลลูเลสตรังรูปบน เดกซ์ทรินที่ถูกกระตุ้นด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ (Wongkhalaung และ คณะ, 1985) นอกจากนี้ จากงานวิจัยของ Puvanakrishnan และ Bose (1980) ที่ศึกษาการตรึงทริปซินบนทราย และ งานวิจัยของ Sritputtirut และ Anprung (1989) ที่ศึกษาการตรึงเชลลูเลสและเชลโลบิโอส บนทราย ด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยอาศัย APTS เป็นตัวกระตุ้นตัวพุงและกลูตารัลดีไฮด์ เป็นสารเชื่อมขวาง ก็พบว่า ให้แนวโน้มลักษณะเดียวกัน และเอนไซม์ตรังรูปที่ได้มีความทนต่อการเสียดสภาพธรรมชาติ โดยความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์อิสรระ ดังนั้น จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น รวมทั้งจากกรณีของการตรึงรูปเพคตินเนสและเชลลูเลสบนไนลอนแบบพันธะโคเวเลนต์

จะเห็นถึงข้อได้เปรียบของการตรึงรูปเอนไซม์ โดยเฉพาะการตรึงโดยใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้นตัวพุง และใช้กลูตาไรลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง ซึ่งข้อได้เปรียบนี้มีประโยชน์อย่างมากต่อการนำเอาไปใช้ในอุตสาหกรรม โดยที่ในบางครั้งอุณหภูมิของระบบมีความไม่สม่ำเสมอ อาจขึ้นสูงกว่าจุดที่ควบคุมไว้ ซึ่งการใส่เอนไซม์ตรึงรูปนี้จะทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกระทันหันได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ จึงส่งผลให้ควบคุมการทำงานของระบบในอุตสาหกรรมง่ายขึ้นเนื่องจากมีข้อจำกัดของอุณหภูมิในการทำงานน้อยลง

#### 4.4.2 pH ที่เหมาะสมในการทำงานปฏิกิริยาของเอนไซม์

##### 4.4.2.1 pH ที่เหมาะสมในการทำงานปฏิกิริยาของเพคตินเอสอิสรและ เพคตินเอสตรึงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.4.2 โดยวัดแอกติวิตีของเพคตินเอสอิสรและเพคตินเอสตรึงรูปในช่วง pH 3-6 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.24

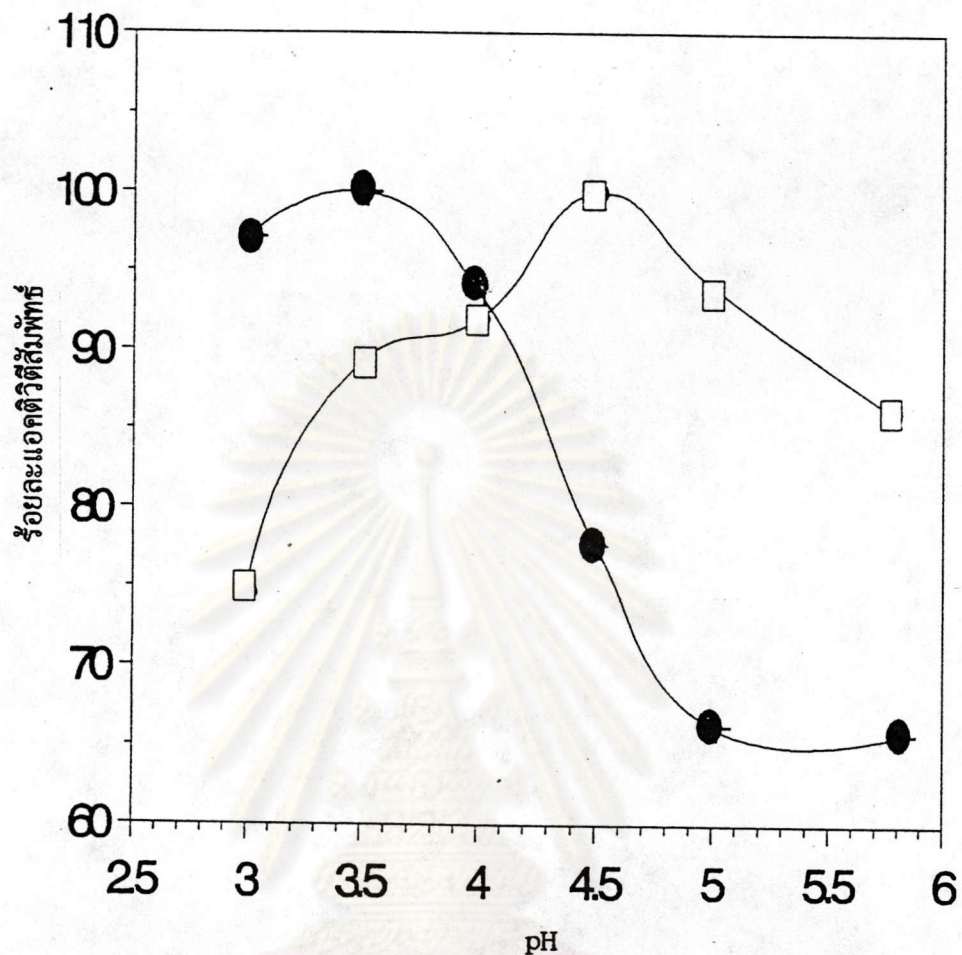
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.23 ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของ เพคตินเอสและเพคตินเอสตรังรูป

บัฟเฟอร์	pHของ สารละลาย ปฏิกิริยา*		ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี ( $\times 10^2$ )		แอกติวิตีสัมพัทธ์	
	อิสระ	ตรังรูป	อิสระ (ยูนิต/มล.)	ตรังรูป (ยูนิต/กรัม)	อิสระ (ร้อยละ)	ตรังรูป (ร้อยละ)
ซิเตรต	3.0	3.1	137.26	28.70	74.6	97.1
	3.5	3.5	164.12	29.55	89.2	100.0
	3.9	4.0	169.28	27.69	92.0	93.7
	4.5	4.5	184.00	22.96	100.0	77.7
	4.9	5.0	173.14	19.57	94.1	66.2
	5.8	5.8	158.05	19.30	85.9	65.3

\* วัด pH ของสารละลายปฏิกิริยาหลังจากบ่มเอนไซม์และหยุดปฏิกิริยาแล้ว



รูปที่ 4.24 ร้อยละแอดติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของเพคตินেসอิสระ ( □—□ ) และ เพคตินেসตรึงรูป ( ●—● )

จากรูปที่ 4.24 พบว่าเพคตินেসอิสระมีแอดติวิตีสูงสุดที่ pH 4.5 ในขณะที่ เพคตินেসตรึงรูปมีแอดติวิตีสูงสุดที่ pH 3.5 ซึ่งลดลงจากเพคตินেসอิสระ 1 หน่วย การเปลี่ยนแปลง pH ที่เหมาะสมของเพคตินেসตรึงรูปดังกล่าวนี้อาจอธิบายได้โดยอาศัยหลักการกระจายโปรตอนบริเวณใกล้ร่มเงาของเอนไซม์ตรึงรูป (partition effect) กล่าวคือการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพุง ประจุของตัวพุงจะมีผลในการดึงดูด (หรือต้านทาน) ประจุของ ร่มเงาของสับสเตรท และสารต่าง ๆ ในระบบ รวมทั้งไฮโดรเจนไอออน ส่งผลให้ pH ของระบบ (bulk phase) แตกต่างจาก pH ที่บริเวณรอบ ๆ ร่มเงาเอนไซม์ (microenvironment)



(Trevan, 1980) สำหรับกรณีนี้ใช้ตัวพวงคือผ้าในลอนที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งให้ปลาย (residue) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง 2 ปลาย คือ ปลายคาร์บอกซิลซึ่งมีประจุลบ สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของ APTS ที่ใช้กระตุ้นผ้าในลอน ในขณะที่ปลายอะมิโนซึ่งมีประจุบวกก็สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลของกลูตารัลดีไฮด์ได้เช่นกัน ซึ่งในการตรึงรูปเพคตินเนส นี้จะใช้สารละลาย APTS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร และเนื่องจากการที่ APTS มี ลักษณะโมเลกุลที่เกาะเกาะ จึงอาจขัดขวางกลูตารัลดีไฮด์ในการเข้าทำปฏิกิริยาที่ปลายอะมิโนของ ผ้าในลอน ดังนั้นการตรึงรูปเพคตินเนสตามภาวะที่ได้ข้างต้น อาจก่อให้เกิดอออนบวกเป็นส่วนใหญ่ในบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเพคตินเนสจึงเป็นผลให้อออนลบของระบบ เช่น  $\text{OH}^-$  เข้า ล้อมรอบโมเลกุลของเพคตินเนสตรึงรูป ดังนั้น pH รอบเพคตินเนสตรึงรูปจึงสูงขึ้นและสูงกว่า pH ของระบบนั้นคือ เมื่อเพคตินเนสตรึงรูปอยู่ในระบบที่มี pH 4.5 รอบ ๆ โมเลกุลของเพคตินเนส ตรึงรูปจะมี pH ที่สูงกว่า 4.5 จึงยังไม่แสดงแอกติวิตีสูงสุด แต่เมื่อเพคตินเนสตรึงรูปอยู่ใน ระบบบัฟเฟอร์ที่มี pH 3.5 ซึ่งเมื่ออออนลบในระบบเข้าล้อมรอบโมเลกุลเอนไซม์เป็นผลให้ pH รอบบริเวณดังกล่าว เป็น 4.5 พอดี จึงทำให้เพคตินเนสตรึงรูปแสดงแอกติวิตีสูงสุด ดังนั้น pH ของเพคตินเนสตรึงรูปที่แสดงแอกติวิตีสูงสุดจึงเลื่อนไปทาง pH ที่เป็นกรดจากเพคตินเอสอิสระ 1 หน่วย ซึ่งลักษณะการเบี่ยงเบนของ pH ที่เหมาะสมในการทำงาน ไปทางกรด ดังกล่าว สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hanisch, Rickard และ Nyo (1978) ที่ศึกษาการตรึงรูป poly(methoxygalacturonide)lyase บน DEAE-cellulose ที่ถูกกระตุ้นโดยเกลือ ไททาเนียม นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Stratilova และคณะ (1987) ที่ศึกษาการตรึง endopolygalacturonase บน epoxy-activated silica 3 ชนิด คือ Kieselgel, Fractosil และ Eupergit ซึ่งเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวพวงทั้งสามชนิดล้วนแล้วแต่มี pH ที่เหมาะสม ในการทำงานเบี่ยงเบนไปทางกรดทั้งสิ้น

#### 4.4.2.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสอิสระ และ เซลลูเลสตรึงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.4.2 โดยวัดแอกติวิตีของเซลลูเลส อิสระและเซลลูเลสตรึงรูปในช่วง pH 3-6 ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.25

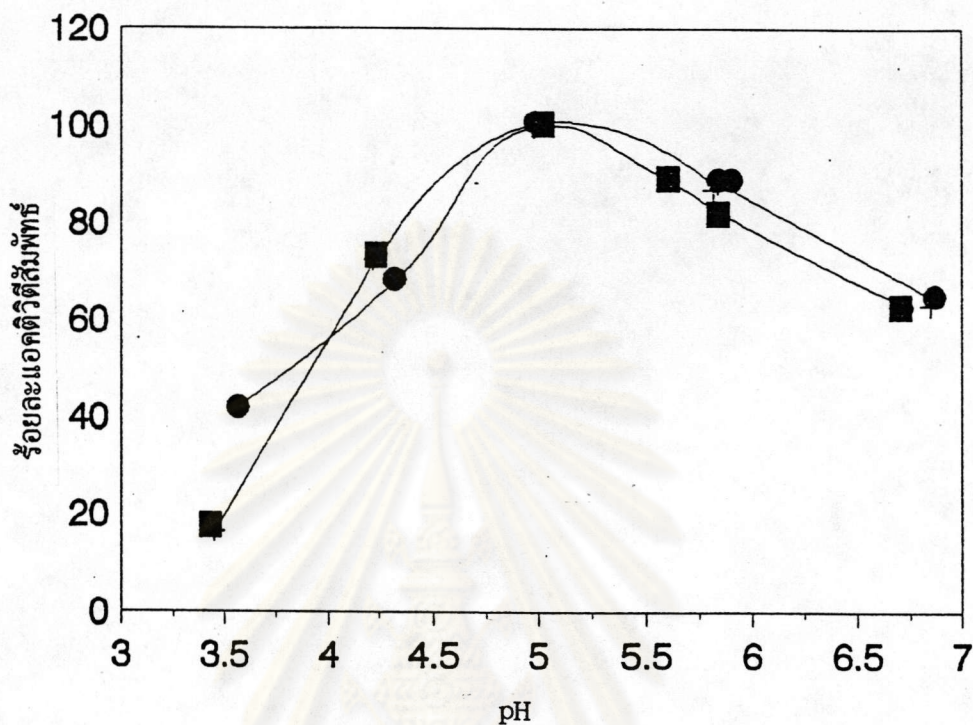


ตารางที่ 4.24 ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของเซลลูเลสอิสระและเซลลูเลสตรึงรูป

บัฟเฟอร์	pHของ สารละลาย ปฏิกิริยา*		ค่าเฉลี่ยแอกติวิตี		แอกติวิตีสัมพัทธ์	
	อิสระ	ตรึงรูป	อิสระ (ยูนิต/มล.)	ตรึงรูป (ยูนิต/กรัม)	อิสระ (ร้อยละ)	ตรึงรูป (ร้อยละ)
ซีเตรต	3.4	3.5	21.94	12.85	16.3	41.2
	4.2	4.3	97.61	21.29	72.5	68.3
	5.0	5.0	134.64	31.18	100.0	100.0
	5.8	5.8	117.13	25.47	87.0	81.7
พอสเฟต	5.8	5.6	118.88	27.59	88.3	88.5
	6.8	6.7	84.96	19.55	63.1	62.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.25 ร้อยละแอกติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของเซลลูเลสอิสระ ( ■—■ ) และ เซลลูเลสตรึงรูป ( ●—● )

จากรูปที่ 4.25 จะเห็นว่าเซลลูเลสอิสระและเซลลูเลสตรึงรูปมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ pH 5 เท่ากัน ซึ่งต่างจากกรณีของการตรึงรูปเพคตินเอส อย่างไรก็ตามอาจเป็นผลเนื่องมาจากการตรึงรูปเซลลูเลสตามภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว ทำให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างพันธะโควาเลนต์ระหว่าง APTS กับหมู่คาร์บอกซิล และกลูตารัลดีไฮด์ กับหมู่อะมิโนของผ้าในลอน ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน โดยที่ APTS มีผลในการบดบังการเข้าทำปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์ที่ปลายอะมิโนบนผ้าในลอนน้อยกว่า ซึ่งจะเห็นจากความเข้มข้นของ APTS ที่ใช้กระตุ้นผ้าในลอนน้อยกว่ากรณีของการตรึงรูปเพคตินเอส ดังนั้นผ้าในลอนจึงมีประจุโดย



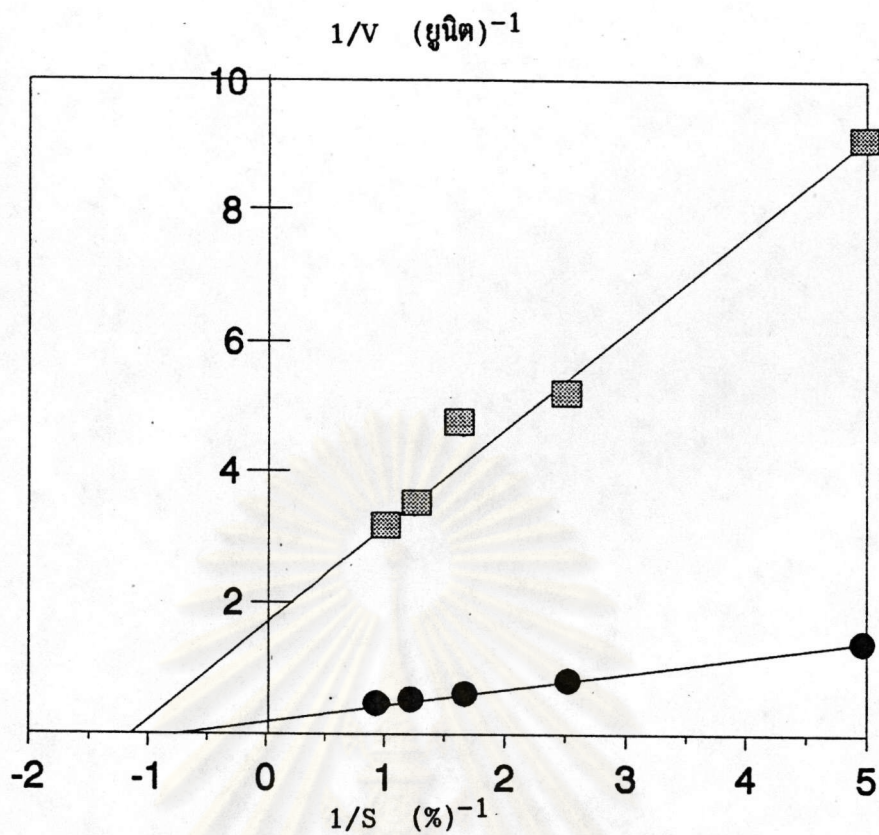
รวมเป็นกลาง เป็นผลให้การกระจายของโปรตอนในระบบของเอนไซม์ตรีงรูปจึงมีลักษณะเดียวกับในระบบของเอนไซม์อิสระ ดังนั้นเซลล์ตรีงรูปจึงแสดงแอกติวิตีสูงสุดที่ pH เดียวกับเซลล์อิสระ แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าช่วง pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรีงรูปแคบกว่าเซลล์อิสระ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เซลล์ตรีงรูปนี้มีความไว (sensitivity) ต่อการเปลี่ยนแปลง pH มากกว่าเซลล์อิสระ ซึ่งลักษณะดังกล่าวมานี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongkhalaung และ คณะ (1985) ที่ศึกษาการตรีงเซลล์ บนเดกซ์ทรินที่กระตุ้นด้วยไซยาไรนเจนโรบรามด์ และ งานวิจัยของ Roy และคณะ (1989) ที่ศึกษาการตรีง  $\beta$ -glucosidase บน CNBr-activated sepharose ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การตรีงรูปเซลล์นี้ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลง pH จึงมีผลกระทบต่อประจุของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้มากกว่าในกรณีที่เอนไซม์อยู่ในระบบสารละลาย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเข้าจับกับสับสเตรท จึงทำให้มีแอกติวิตีต่ำลงเมื่อ pH เปลี่ยนไปจาก pH ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสูงสุด

#### 4.4.3 ศึกษาค่าคงที่ Michaelis-Menten ( $K_m$ ) ของเอนไซม์

##### 4.4.3.1 ค่าคงที่ Michaelis ของเพคตินเอสอีสรีระ และ เพคตินเอสตรีงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.4.3 หาแอกติวิตีของเพคตินเอสอีสรีระ และ เพคตินเอสตรีงรูปที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆ หาค่า  $K_m$  โดยวิธี Lineweaver Burk Plot ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.26 และตารางที่ 4.25





รูปที่ 4.26 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk plot ของเพคตินเนสอิสระ (●—●) และ เพคตินเนสตรึงรูป (■—■)

ตารางที่ 4.25 ค่า  $K_m$  ของเพคตินเนสอิสระและเพคตินเนสตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 3.5 จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver Burk plot

ชนิดของเอนไซม์	ค่า $K_m$ (%)
เพคตินเนสอิสระ	1.09
เพคตินเนสตรึงรูป	0.78

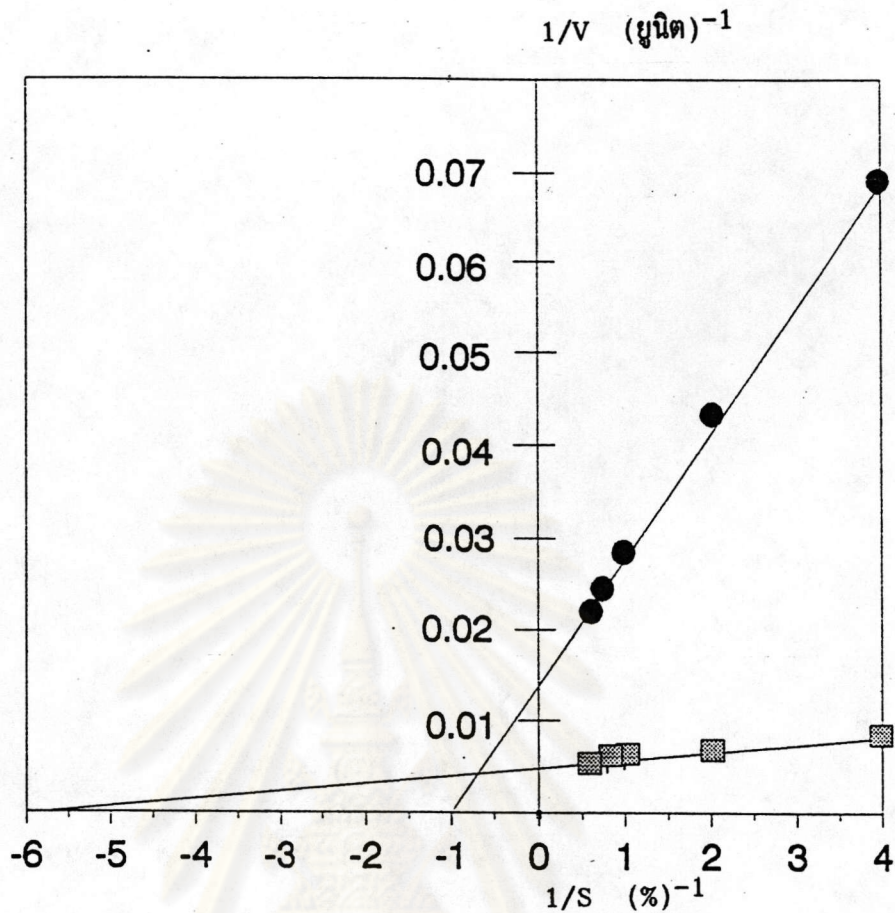


จากตารางที่ 4.25 จะเห็นได้ว่าเพคตินเอสโตรงรูปมีค่า  $K_m$  น้อยกว่าเพคตินเอสโตรง 1.4 เท่า ที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งหมายความว่าเพคตินเอสโตรงรูปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตอร์ท (เพคติน) มากกว่าเพคตินเอสโตรง แสดงให้เห็นว่าการตรึงรูปเพคตินบนผ้าในลอนโดยวิธีเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ช่วยปรับปรุงโครงสร้างของเอนไซม์ให้เหมาะสมสำหรับการเข้าจับกับสับสเตอร์ทได้ดีขึ้น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือเพคตินเอสโตรงรูปบนในลอนจะแสดงสมบัติเป็นประจวบค ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 4.4.2.1 ดังนั้นความเข้มข้นของเพคตินซึ่งมีประจุลบรอบเอนไซม์ที่พื้นผิวของในลอนจะมากกว่า ทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเข้าจับกับสับสเตอร์ทได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งลักษณะดังกล่าวสนับสนุนกับงานวิจัยของ Hanisch, Rickard และ Nyo (1978) ที่ศึกษาการตรึง poly(methoxygalacturonide)lyase บน DEAE-cellulose โดยกระตุ้นตัวพวงให้ว่ต่อปฏิกิริยาด้วยเกลือโททาเนียม และงานวิจัยของประพันธ์ ปิ่นศิโรม และ ปราณี อานเปรีอง (2535) ที่ศึกษาการตรึง Neutralse บนผ้าในลอนโดยใช้สารละลาย APTS เป็นสารกระตุ้นตัวพวงและใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง ซึ่งทั้ง 2 กรณี พบว่า การตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพวงที่มีประจุตรงข้ามกับประจุสับสเตอร์ทดังกล่าวจะช่วยทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีค่า  $K_m$  ที่ลดต่ำกว่า  $K_m$  ของเอนไซม์อิสระ ซึ่งก็หมายความว่าเอนไซม์ตรึงรูปจะมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับสับสเตอร์ทสูงกว่าเอนไซม์อิสระนั่นเอง

#### 4.4.3.2 ค่าคงที่ Michaelis ของเซลลูเลสอิสระ และ เซลลูเลสตรึงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.4.3 หาแอกติวิตีของเซลลูเลสอิสระ และเซลลูเลสตรึงรูปที่ pH 5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใส่สับสเตอร์ทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ หาค่า  $K_m$  โดยวิธี Lineweaver Burk Plot ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.27 และตารางที่ 4.26





รูปที่ 4.27 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk plot ของเชลลูเลสอิสระ ( ■—■ ) และ เชลลูเลสตรึงรูป ( ●—● )

ตารางที่ 4.26 ค่า  $K_m$  ของเชลลูเลสอิสระและเชลลูเลสตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5 จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver Burk plot

ชนิดของเอนไซม์	ค่า $K_m$ ( % )
เชลลูเลสอิสระ	0.186
เชลลูเลสตรึงรูป	0.99

จากตารางที่ 4.26 จะเห็นว่าเซลลูโลสตรึงรูปมีค่า  $K_m$  มากกว่าเซลลูโลสอิสระ 5.32 เท่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5 ซึ่งเป็นไปได้ว่า านกรณีของเซลลูโลสตรึงรูปบนในลอน ตัวพวงไม่แสดงประจักษ์อย่างเด่นชัด ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้อ

4.4.2.2 การกระจายของสปีสเตรทจึงมีลักษณะเช่นเดียวกับในระบบของเซลลูโลสอิสระ  $K_m$  ที่เพิ่มขึ้นจึงอาจเป็นผลกระทบเนื่องมาจากข้อจำกัดในการแพร่ (diffusion limitation) ซึ่งเซลลูโลสตรึงรูปมีอิสระในการเคลื่อนที่เข้าทำปฏิกิริยากับสปีสเตรทลดลง ซึ่งเกี่ยวกับเรื่องนี้

Roy, Roy และ Dube (1984) ได้ศึกษาการตรึงเซลลูโลสบน acrylamide polymer พบว่า ค่า  $K_m$  ของเซลลูโลสตรึงรูปมีค่ามากกว่าเซลลูโลสอิสระ และเมื่อลดขนาดของตัวพวงให้เล็กลง ค่า  $K_m$  จะมีค่าลดลง จากผลการทดลองดังกล่าว ซึ่งให้เห็นถึงการที่ค่า  $K_m$  เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจาก ข้อจำกัดในการแพร่ของเอนไซม์ตรึงรูป เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Emi และ Murase (1990) ที่ศึกษาโปรตีนตรึงรูปบน copoly(ethylene/acrylic acid) fiber และ งานวิจัยของ Ohmiya, Tanimura และ Takeshi (1978) ที่ศึกษาการตรึงโปรตีนบน Dowex MWA-1 ซึ่งเป็นเรซินที่มีประจุลบ โดยพบว่า เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ มีค่า  $K_m$  ที่มากกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากข้อจำกัดทางการแพร่ของเอนไซม์ตรึงรูปเช่นกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#### 4.5 การสกัดหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมโดยใช้เพคตินเนส เซลลูเลส และอะมัยเลสตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนในระบวมต่อไป

##### 4.5.1 หาปริมาณผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมโดยใช้เพคตินเนส และเซลลูเลสอิสระในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน

จากการทดลองข้อ 3.3.5.1 หาผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมที่สกัดได้โดยใช้เพคตินเนส และเซลลูเลสอิสระ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.06 โดยปริมาตร/น้ำหนักอสุจิหอมบด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนที่มีอัตราเร็วในการกวน 78 รอบต่อนาที พบว่าได้ผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 71.42 โดยน้ำหนัก

##### 4.5.2 หาปริมาณเพคตินเนสตรึงรูปที่เหมาะสมในการสกัดหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน

จากการทดลองข้อ 3.3.5.2 โดยแปรปริมาณเพคตินเนสตรึงรูป 4 ระดับ คือ 0, 20, 40 และ 60 แผ่น ต่อเนื้ออสุจิหอมบด 100 กรัม มีแอกติวิตีต่อแผ่นเท่ากับ  $1.25 \times 10^{-2}$  ยูนิต ใช้ร่วมกับเซลลูเลสอิสระ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร/เนื้ออสุจิหอมบด ติดตามปริมาณผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมที่เพิ่มขึ้น ได้ผลดังตารางที่ 4.27

ตารางที่ 4.27 แอกติวิตีของเพคตินเนสตรึงรูปในปริมาณต่าง ๆ ต่อการสกัดหัวน้ำเชื้ออสุจิหอมเมื่อใช้ร่วมกับเซลลูเลสอิสระที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตร/น้ำหนักอสุจิหอมบด

ปริมาณเพคตินเนสตรึงรูป (จำนวนแผ่น)	ผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออสุจิหอม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
0	22.31
20	42.94
40	63.46
60	73.13



ในระบบที่มีลักษณะเป็นสารกึ่งของแข็ง (semi-solid) เช่นเนื้อกล้วยหอมบด สารประกอบเพคตินจะอยู่ในลักษณะที่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเซลลูโลส ทำให้มีโครงสร้างซับซ้อนขึ้น ดังนั้นการที่เอนไซม์ตรีงรูปจะเข้าย่อยสลายสับสเตรตดังกล่าวจึงเป็นไปได้ยากกว่ากรณีของเอนไซม์อิสระ อันเป็นผลเนื่องมาจากลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ตรีงรูปเองอาจทำให้เกิดการบดบังขึ้น ซึ่งเกี่ยวกับเรื่องนี้จากงานวิจัยการตรีงรูปเพคตินบน nylon-polyethyleneimine copolymer ของ Lozano และคณะ (1988) พบว่า ขนาดของสับสเตรตที่มีผลต่อแอกติวิตีของเพคตินเอนไซม์ตรีงรูป โดยที่สับสเตรตขนาดเล็ก (กรดพอลิกลาลักโตนิก) จะถูกบดบังโดยตัวพุงน้อยกว่าสับสเตรตที่มีขนาดใหญ่ (สารประกอบเพคติน) จึงเป็นผลให้แอกติวิตีของ polygalacturonase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายกรดพอลิกลาลักโตนิก สูงกว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเพคติน (pectin-using enzymes) แต่อย่างไรก็ตาม จากตารางที่ 4.27 จะเห็นว่า เพคตินเอนไซม์ตรีงรูปบนในลอนเมื่อใช้ร่วมกับเซลลูโลสอิสระ สามารถเพิ่มผลผลิตของหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมให้สูงขึ้นได้ เช่นเดียวกับกรณีของการใช้เอนไซม์ตรีงรูปร่วมกับเซลลูโลสอิสระ นั่นก็หมายความว่า เพคตินเอนไซม์ตรีงรูปดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบเพคตินที่อยู่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์พืชได้ และพบว่าปริมาณเพคตินเอนไซม์ตรีงรูปจำนวน 60 แผ่น จะให้แอกติวิตีในการสกัดหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมได้เทียบเท่ากับกรณีการใช้เพคตินเอนไซม์ตรีงรูปที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักของกล้วยหอมบด

#### 4.5.3 กำหนดปริมาณเซลลูโลสตรีงรูปที่เหมาะสมในการสกัดหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอม โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน

จากการทดลองในข้อ 3.3.5.3 โดยแปรปริมาณเซลลูโลสตรีงรูป 4 ระดับคือ 0, 10, 20 และ 30 แผ่นต่อกล้วยหอมบด 100 กรัม มีแอกติวิตีต่อแผ่นเท่ากับ 1.41 ยูนิต ใช้ร่วมกับเพคตินเอนไซม์ตรีงรูปที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร/น้ำหนักกล้วยหอมบด ติดตามปริมาณผลผลิตของหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่เพิ่มขึ้น ได้ผลดังตารางที่ 4.28



ตารางที่ 4.28 แอคติวิตีของเซลลูเลสตรังรูปในปริมาณต่าง ๆ ต่อการสกัดหัวน้ำเชื้อจากกล้วยหอม  
เมื่อใช้ร่วมกับเพคตินเอสอิสระที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร/น้ำหนัก  
กล้วยบด

ปริมาณเซลลูเลสตรังรูป (จำนวนแผ่น)	ผลผลิตของหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
0	62.77
10	68.94
20	71.57
30	73.38

โดยปกติ ปัญหาสำหรับเอนไซม์ตรังรูปคือ ข้อจำกัดในการเคลื่อนที่เข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ซึ่ง Jain และ Wilkins (1987) รายงานว่า เซลลูเลสตรังรูปมักมีการสูญเสียแอคติวิตี เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเคลื่อนที่ ซึ่งกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลสต้องการการเคลื่อนที่ของเอนไซม์อย่างมากสำหรับการดูดจับเซลลูโลส และปล่อยผลิตภัณฑ์ออกมา แต่อย่างไรก็ตาม จากตารางที่ 4.28 จะเห็นว่า การใส่เซลลูเลสตรังรูปร่วมกับเพคตินเอสอิสระสามารถเพิ่มผลผลิตของหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมให้สูงขึ้นได้เช่นเดียวกับกรณีของการใส่เซลลูเลสอิสระร่วมกับเพคตินเอสอิสระ นั่นก็หมายความว่า เซลลูเลสตรังรูปยังคงมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสที่อยู่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชในธรรมชาติได้ ซึ่งพบว่าปริมาณเซลลูเลสตรังรูปจำนวน 20 แผ่นจะให้แอคติวิตีในการสกัดหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม เทียบเท่ากับกรณีการใส่เซลลูเลสอิสระที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักของกล้วยหอมบด



4.5.4 เปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรีงรูป และ เอนไซม์อิสระในการสกัด  
หัวน้ำเชื้อกล้วยหอม

จากการทดลองข้อ 3.3.5.4 กำหนดให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะ คือ ปริมาณ  
ของหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่เพิ่มขึ้นจากผลของเอนไซม์แต่ละชนิด ต่อปริมาณโปรตีนเอนไซม์เป็นมิลลิกรัม  
ซึ่งปริมาณโปรตีนของเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรีงรูป ที่ใช้ในการย่อยสลายกล้วยหอมบด 100  
กรัม แสดงไว้ดังตารางที่ 4.29 และตารางที่ 4.30 สำหรับเพคตินเนสและเซลลูเลสตามลำดับ

ตารางที่ 4.29 ปริมาณโปรตีนของเพคตินเนสตรีงรูป และ เพคตินเนสอิสระที่ใช้ในการสกัดหัวน้ำ  
เชื้อกล้วยหอมต่อกล้วย 100 กรัม

	มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิกรัมตัวพุง หรือ /มิลลิกรัมเอนไซม์	น้ำหนักเอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์ตรีงรูป ที่ใช้ (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ ทั้งหมด (มิลลิกรัม)
เพคตินเนสอิสระ	15.108	58	876.266
เพคตินเนสตรีงรูป	0.424	3000	1272.963

ตารางที่ 4.30 ปริมาณโปรตีนของเซลลูเลสตรีงรูป และ เซลลูเลสอิสระที่ใช้ในการสกัดหัวน้ำ  
เชื้อกล้วยหอมต่อกล้วย 100 กรัม

	มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิกรัมตัวพุง หรือ /มิลลิกรัมเอนไซม์	น้ำหนักเอนไซม์อิสระ หรือเอนไซม์ตรีงรูป ที่ใช้ (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีนที่ใช้ ทั้งหมด (มิลลิกรัม)
เซลลูเลสอิสระ	15.643	80.4	1257.676
เซลลูเลสตรีงรูป	1.476	1000	1476.500



สำหรับการหาปริมาณของหัวน้ำเชื้ออสุจิที่เพิ่มขึ้นจากผลของเอนไซม์แต่ละชนิด เช่นในกรณีที่ต้องการหาปริมาณของหัวน้ำเชื้ออสุจิที่เพิ่มขึ้นจากผลของเพคตินเอสตรังรูปในระบบที่มีการใช้เพคตินเอสตรังรูปร่วมกับเซลลูโลสอิสระ คำนวณได้จาก ผลต่างของผลผลิตที่ได้จากระบบการสกัดที่อาศัยเพคตินเอสตรังรูปร่วมกับเซลลูโลสอิสระ กับ ผลผลิตที่ได้จากระบบการสกัดที่อาศัยเฉพาะเซลลูโลสอิสระเพียงอย่างเดียวซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม (control) ในที่นี้กำหนดให้ 1 ยูนิตแอกติวิตีของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ผลผลิตของหัวน้ำเชื้ออสุจิเพิ่มขึ้น 1 มิลลิลิตร โดยเทียบกับตัวควบคุม (control) ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นสามารถคำนวณค่ายูนิตของเพคตินเอสตรังรูป และเซลลูโลสเอสตรังรูป ได้จากตารางที่ 4.27 และ 4.28 ตามลำดับ และสำหรับในกรณีของเพคตินเอสและเซลลูโลสอิสระก็คำนวณในลักษณะเดียวกัน

จากค่าโปรตีนเอนไซม์ที่สกัดจากหัวน้ำเชื้ออสุจิ 100 กรัมจากตารางที่ 4.29 และ 4.30 และ ค่ายูนิตของเอนไซม์แต่ละชนิด นำมาคำนวณหาค่าแอกติวิตีจำเพาะและแอกติวิตีสัมพัทธ์ ดังแสดงดังตารางที่ 4.31

ตารางที่ 4.31 เปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะและแอกติวิตีสัมพัทธ์ระหว่างเพคตินเอสอิสระและเพคตินเอสตรังรูป

	ยูนิต	ปริมาณโปรตีน เอนไซม์ที่ใส่ (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ( $\times 10^3$ )	แอกติวิตีสัมพัทธ์
เพคตินเอสอิสระ	49.11	876	56.06	100
เพคตินเอสตรังรูป	50.82	1273	39.92	71.21



ตารางที่ 4.32 เปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะและแอกติวิตีสัมพัทธ์ระหว่างเซลล์อิสระ และ เซลล์โครงสร้าง

	ยูนิต	ปริมาณโปรตีน เอนไซม์ที่ใช้ (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ( $\times 10^3$ )	แอกติวิตีสัมพัทธ์
เซลล์อิสระ	8.65	1258	6.87	100
เซลล์โครงสร้าง	8.80	1476	5.96	86.75

จากตารางจะเห็นว่า เพคตินเอสรีจะมีแอกติวิตีจำเพาะ  $56.06 \times 10^{-3}$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่ เพคตินเอสรีโครงสร้างมีแอกติวิตีจำเพาะ  $39.92 \times 10^{-3}$  ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเพคตินเอสรี หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เพคตินเอสรีโครงสร้างมีแอกติวิตีเทียบเท่ากับร้อยละ 71.21 ของเพคตินเอสรี สำหรับกรณีของเซลล์ก็เช่นเดียวกัน พบว่าเซลล์โครงสร้างและเซลล์อิสระมีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ  $5.96 \times 10^{-3}$  และ  $6.87 \times 10^{-3}$  ยูนิต / มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือเซลล์โครงสร้างมีแอกติวิตีเทียบเท่ากับร้อยละ 86.75 ของเซลล์อิสระ การที่เอนไซม์โครงสร้างดังกล่าวมีแอกติวิตีจำเพาะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อาจอธิบายได้โดยเหตุผลสี่ประการคือ ประการที่หนึ่ง โดยปกติการย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืชจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบย่อยในเพคตินเอสหรือเซลล์ ซึ่งเพคตินเอสหรือเซลล์ทางการค้าที่ใช้ในการตรึงรูปร่างนั้น เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย ๆ หลายชนิด ดังนั้น การตรึงรูปร่างเอนไซม์ดังกล่าว จึงมีลักษณะเป็นการตรึงรูปร่างร่วม (coimmobilization) ของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบย่อย เป็นผลให้การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ดังกล่าวบนตัวพวยจึงเป็นไปไม่ได้ดี และมีความเป็นอิสระน้อยกว่าเอนไซม์อิสระ ประการที่สอง การตรึงรูปร่างเพคตินเอสหรือเซลล์ จะทำให้เอนไซม์มีกลไกการตัดสายพอลิเมอร์ในลักษณะตัดจากปลายสายด้านนอก (exo-form) ซึ่งทำให้จำเป็นต้องมีการไฮดรอลิซัฟชั่น



ไกลโคซิลานเพคติน หรือพันธะไกลโคซิลานเซลลูโลสมากกว่าในกรณีของเอนไซม์อิสระ เพื่อที่จะ ทำให้มีการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืชมากพอที่จะปลดปล่อยของเหลวภายในเซลล์ออกมา ซึ่งเกี่ยวกับเรื่องนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Romero, Monjon และ Iborra (1988) ที่ศึกษา การตรึง polygalacturonase ร่วมกับ pectinesterase บนแก้วพูนซึ่งพบว่าเอนไซม์ตรึงรูป ดังกล่าว มีประสิทธิภาพในการลดความหนืดของสารละลายเพคติน น้อยกว่า กรณีใช้ร่วมกันในลักษณะ ของเอนไซม์อิสระ และ งานวิจัยของ Lozano และคณะ (1988) ที่ศึกษาการตรึงรูปเพคตินบน nylon-polyethyleneimine copolymer ซึ่งพบว่า การที่เพคตินตรึงรูปที่ได้มีแอกติวิตี ในการลดความหนืด ที่ต่ำนั้น เป็นผลมาจากข้อจำกัดในการไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิลิกของ รมเลกุลสับสเตรท ซึ่งจะมีลักษณะการไฮโดรไลซ์แบบย่อยสลายปลายสายพอลิเมอร์ (exo-form) มากกว่าในกรณีของเอนไซม์อิสระ ประการที่สาม เอนไซม์บางส่วนบนตัวพูนอาจมีการสูญเสีย แอกติวิตีไปในระหว่างการตรึงรูป ซึ่งการตรึงรูปมีลักษณะ เป็นการเชื่อมพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งเป็น วิธีที่ค่อนข้างรุนแรง โดยเฉพาะถ้าปฏิกิริยาเกิดที่ตำแหน่งหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาในบริเวณเร่งของ รมเลกุลเอนไซม์ ประการที่สี่คือ อาจเกิดการบดบังขึ้นในระบบ ทำให้รมเลกุลของสับสเตรท ที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะสารตั้งต้นที่เป็นสารกึ่งของแข็ง เช่น เนื้อกล้วยหอมบด ไม่สามารถเคลื่อนที่ เข้าทำปฏิกิริยากับรมเลกุลเอนไซม์ได้ รมเลกุลเอนไซม์ดังกล่าวจึงเสมือนไม่แสดงแอกติวิตีทั้งที่มี แอกติวิตีอยู่ก็ตาม ซึ่ง Lozano และคณะ (1988) พบว่า ตัวพูนมีผลในการบดบังการทำงาน ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่มีขนาดเล็ก (กรดพอลิกลูคโอรินิก) น้อยกว่าสับสเตรทที่มีขนาดใหญ่ (สารประกอบเพคติน) เป็นผลให้แอกติวิตีของ polygalacturonase สูงกว่าแอกติวิตีของ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเพคติน (pectin-using enzymes) ดังนั้น จากเหตุผลต่าง ๆ เหล่านี้ จึงเป็นผลให้เอนไซม์ตรึงรูปมีแอกติวิตีจำเพาะน้อยกว่าเอนไซม์อิสระ

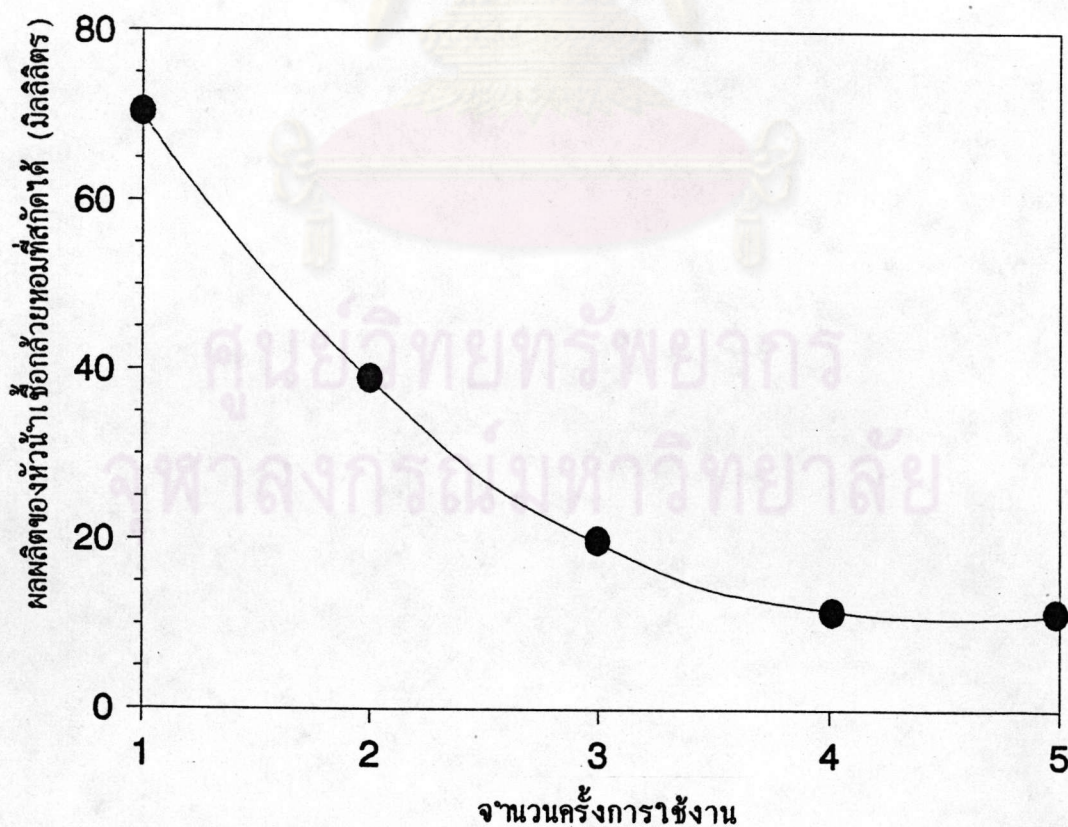
#### 4.5.5 ศึกษาประสิทธิภาพและเสถียรภาพในการสกัดหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมเมื่อใช้ เพคตินตรึงรูปร่วมกับเซลลูเลสตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน

จากการทดลองข้อ 3.3.5.5 เมื่อใช้เพคตินตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป จำนวน 60 และ 20 แผ่นตามลำดับร่วมกัน ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.33 และ รูปที่ 4.28



ตารางที่ 4.33 ประสิทธิภาพและเสถียรภาพในการทำปฏิกิริยาของเพคตินเอสและเซลลูโลสตรังรูป  
ในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน

จำนวนการไ้ใช้งาน	ผลผลิตของหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่สกัดได้ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	แอกติวิตีสัมพัทธ์
1	70.06	100
2	38.73	55.28
3	19.53	27.88
4	11.70	16.70
5	11.34	16.19



รูปที่ 4.28 ความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่สกัดได้ กับ จำนวนครั้งในการ  
ใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรังรูป

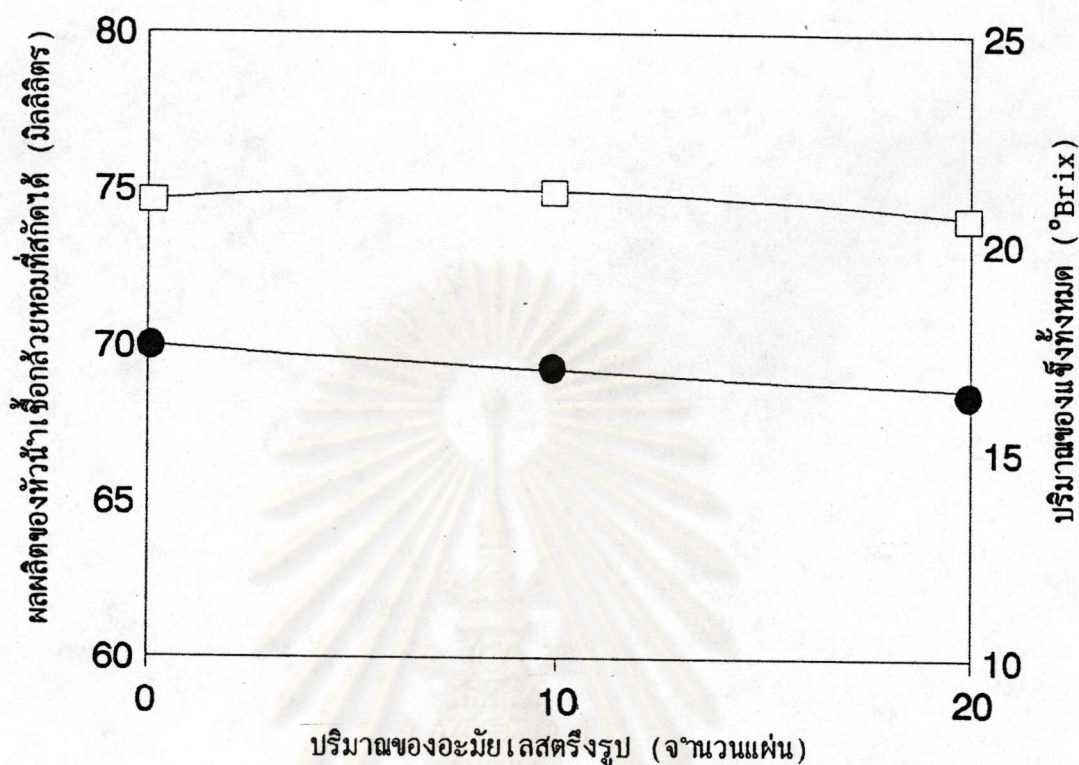


จากรูปที่ 4.28 จะเห็นว่า เมื่อจำนวนครั้งการใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ เอนไซม์ตรึงรูปมากขึ้น ประสิทธิภาพในการสกัดหัวน้ำ เชื้อก๊วยหอมจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยประสิทธิภาพลดลงไปเกือบร้อยละ 50 ในการใช้ซ้ำเป็นครั้งที่สอง และลดไปกว่าร้อยละ 70 เมื่อใช้ซ้ำเป็นครั้งที่สาม ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการหลุดของเอนไซม์จากตัวพุง หรือเกิดการเสียดสภาพทางธรรมชาติของเอนไซม์ อันเนื่องมาจากการทำงานภายใต้ระบบที่มีแรงต้านทานสูง แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ตรึงรูปมีแนวโน้มที่เสถียรหลังจากการใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 4 ซึ่งถือเป็นข้อดีประการหนึ่งสำหรับตัวพุงที่เป็นในลอน ซึ่งจากงานวิจัยของ Lozano และ คณะ (1988) ที่ศึกษาการนำเพคตินเอสตรึงรูป บน nylon polyethyleneimine copolymer มาใช้ในการทำน้ำ แอปริคอกทาให้ใส ก็พบว่า เพคตินเอสตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตในการทำงาน 8 วัน และค่าแอกติวิตีที่เหลืออยู่ของเพคตินเอสตรึงรูปบนในลอนมีแนวโน้มที่เสถียรเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้จากงานวิจัยของ Jain และคณะ (1987) ที่ศึกษาการตรึง Celluclast 200L บนในลอนโดยวิธีแตกพันธะ เปปไทด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก และ N,N-dimethylaminopropylamine นำมาใช้ในการย่อยสลายชี้เลี้ยง พบว่า แอกติวิตีลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยหลังจากการใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 5 แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีแนวโน้มที่จะเสถียรเช่นกัน ดังนั้นถึงแม้ว่า การใช้เพคตินเอสและเซลลูเลสตรึงรูปบนในลอนในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนจะมีค่าแอกติวิตีลดลงในการใช้ซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ค่อนข้างมาก แต่แอกติวิตีที่เหลืออยู่ยังคงสามารถนำไปใช้ร่วมกับเพคตินเอสและเซลลูเลสตรึงรูปชุดใหม่านครั้งต่อไปได้

#### 4.5.6 ศึกษาผลของการใช้อะมัยเลสตรึงรูปต่อการสกัดหัวน้ำ เชื้อก๊วยหอม เมื่อใช้ร่วมกับเพคตินเอส และเซลลูเลสตรึงรูป

จากการทดลองในข้อ 3.3.5.6 โดยแปรปริมาณอะมัยเลสตรึงรูป 3 ระดับคือ 0, 10 และ 20 แผ่น ต่อก๊วยหอมบด 100 กรัม มีแอกติวิตีต่อแผ่นเท่ากับ 1.15 ยูนิต โดยนำมาใช้ร่วมกับเพคตินเอส และ เซลลูเลสตรึงรูปจำนวน 60 และ 20 แผ่นตามลำดับ ให้ผลดังแสดงไว้ดังรูปที่ 4.29





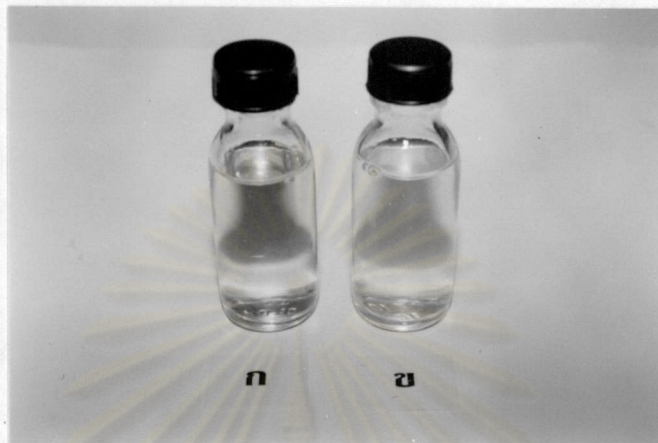
รูปที่ 4.29 ผลของอะมัยเลสตรังรูปที่ปริมาณต่าง ๆ ต่อปริมาณร้อยละของผลผลิตหัวน้ำเชื้อกลัวยหอม (●—●) และปริมาณของแข็งทั้งหมด (□—□) ในหัวน้ำเชื้อกลัวยหอมที่สกัดได้

จากรูปที่ 4.29 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของอะมัยเลสตรังรูปมากขึ้น ผลผลิตของหัวน้ำเชื้อกลัวยหอมที่ได้และปริมาณของแข็งทั้งหมด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับกรณีที่ไม่ใช้อะมัยเลสตรังรูป ซึ่งผลที่ได้มีลักษณะเดียวกับกรณีของการใช้เอนไซม์ที่อัตราตั้งนั้นจากผลการทดลองดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดหัวน้ำเชื้อกลัวยหอมทั้ง 3 ชนิด เอนไซม์ที่มีบทบาทได้แก่ เพคตินเนส และ เซลลูเลส ส่วนอะมัยเลสไม่มีส่วนช่วยในการสกัดหัวน้ำเชื้อกลัวยหอม



4.6 เปรียบเทียบสมบัติทางประสาทสัมผัสระหว่างหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่สกัดได้โดยอาศัย  
เอนไซม์อิสระและ เอนไซม์ตรึงรูป

ลักษณะของหัวน้ำเชื่อมที่ได้จากการสกัดโดยเอนไซม์อิสระและ เอนไซม์ตรึงรูปแสดง  
ได้ดังรูปที่ 4.30



รูปที่ 4.30 หัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่สกัดได้โดยอาศัยเอนไซม์อิสระ (ก) และหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่สกัด  
ได้โดยอาศัยเอนไซม์ตรึงรูป (ข)

จากการทดสอบสมบัติทางประสาทสัมผัสของหัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่สกัดโดยอาศัย  
เอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงรูป ในการทดลองข้อ 3.3.6 ซึ่งเตรียมในลักษณะเป็นน้ำกล้วย  
พร้อมดื่ม พิจารณาสมบัตินี้คือ กลิ่น รส และการยอมรับรวม เปรียบเทียบสมบัตินี้ดังกล่าวของ  
หัวน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่ได้จากทั้ง 2 กรณี โดยให้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ได้ผลดังแสดงไว้ในตาราง  
ที่ 4.34

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.34 คะแนนเฉลี่ยของการทดสอบทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบระหว่างน้ำกล้วยพร้อมดื่ม ซึ่งเตรียมได้จากหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่สกัดโดยวิธีเอนไซม์อิสระ และ เอนไซม์ตรึงรูป

การสกัดหัวน้ำ เชื้อกล้วย หอม	คะแนนเฉลี่ยของน้ำกล้วยพร้อมดื่ม ซึ่งผสมหัวน้ำเชื้อกล้วยหอม		
	กลิ่น	รส	การยอมรับรวม
เอนไซม์อิสระ	10.5 ± 2.6 <sup>b</sup>	12.6 ± 2.1 <sup>c</sup>	10.8 ± 2.0 <sup>d</sup>
เอนไซม์ตรึงรูป	12.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	12.0 ± 1.3 <sup>c</sup>	11.3 ± 1.3 <sup>d</sup>

a, b, c, d ตัวเลขในแต่ละปัจจัยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

โดยแยกพิจารณาแต่ละปัจจัยเป็นอิสระจากกัน

จากตารางที่ 4.34 จะเห็นได้ว่า คะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้านรส ของน้ำกล้วยทั้งสองชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่คะแนนเฉลี่ยด้านกลิ่น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 12.5 และ 10.5 ตามลำดับ อาจเป็นผลเนื่องมาจากกลิ่นแปลกปลอมของเอนไซม์ที่ใช้เตรียมมีผลต่อกลิ่นของหัวน้ำเชื้อที่สกัดได้จากผลไม้ (Jenniskens และคณะ, 1991) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า การใช้เอนไซม์ตรึงรูปจะช่วยลดปริมาณเอนไซม์ที่ตกค้างอยู่ในหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมที่สกัดได้ ทำให้มีผลกระทบจากกลิ่นแปลกปลอมของเอนไซม์น้อยลง จึงมีส่วนช่วยพัฒนากลิ่นของหัวน้ำเชื้อจากกล้วยหอมนั้น แต่อย่างไรก็ตาม สมบัติการยอมรับรวมของน้ำกล้วยที่เตรียมได้จากหัวน้ำเชื้อกล้วยหอมทั้งสองมีคะแนนเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยที่การยอมรับอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับมาก

ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบสมบัติด้านกลิ่นอีกอย่างหนึ่งที่นิยมคือ การวิเคราะห์องค์ประกอบของกลิ่นด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) ซึ่งจะบ่งให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณสารให้กลิ่นที่มีในผลิตภัณฑ์ แต่ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่สามารถบ่งบอกถึงลักษณะการยอมรับของผู้บริโภคต่อกลิ่นกล้วยที่สกัดได้โดยตรง ซึ่งการเปรียบเทียบ



เทียบสมบัติของหัวหน้าเขื่อนงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นถึงระดับการยอมรับของผู้บริโภค จึงเลือกใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัสเป็นหลัก หากต้องการทราบเพิ่มเติมถึงผลกระทบของเอนไซม์ต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของสารให้กลิ่นในหัวหน้าเขื่อนกล้วย น่าจะมีการศึกษาด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีในลำดับต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย