บทที่ 4

บทสรุปและวิจารณ์

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E. coli ATCC 9637 ในขวดเขย่ากับในถังหมักขนาดจุ 5 ลิตร

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเพนนิซิลิน เอซิเลส มีมากกว่า 3 ทศวรรษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสายพันธุ์ต่าง ๆ ของแบคทีเรียและเชื้อรา แต่ข้อมูลและคุณสมบัติต่าง ๆ รวมไปถึงสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์ของแบคทีเรียเท่าที่พบมีน้อยมาก เนื่องจากเป็นความลับทางอุตสาหกรรม (Rolinson และคณะ, 1960; Claride และคณะ, 1963; Szentirmai, 1964; Sikyta และ Slezak, 1964; Self และคณะ, 1969 และ Vandamme, 1983)

จันทร์เพ็ญ (1986) ได้ทำการวิจัยเพาะเลี้ยง E. coli ATCC 9637 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดสูตรปรับต่ำ (Self และคณะ, 1969) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส คือ 30 องศาเซลเซียส โดยมีกรดฟีนิลอะซิติก (0.2 เปอร์เซนต์) และโซเดียมกลูตาเมต (0.5 เปอร์เซนต์) ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Vandamme (1980) ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E. coli ควรอยู่ในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส และการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในแบคทีเรีย E. coli ด้วยกรดฟีนิลอะซิติก (Kaufman และ Bauer, 1964; Levitov และคณะ, 1967 Szentirmai, 1964; Vojtisek และ Slezuk, 1975 a, b) พบว่า ถ้าใช้ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกสูงกว่า 0.2 เปอร์เซนต์ จะไปกดการสร้างเอนไซม์ เรียกว่า ปรากฏการณ์ (Self-catabolic repression" ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่ากรดฟีนิลอะซิติกถูกใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนจนกระทั่งปฏิกิริยาคะตะบอลิสมเกิดมาเต็มที่แล้ว ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ก็จะถูกกดดันด้วยกรดฟีนิลอะซิติกที่มากเกินพอนั้น นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าโมเลกุลของน้ำตาลหลาย ๆ ชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส ฟรุตโตส และกลีเซอรอล สามารถเกิด catabolic repression ต่อการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E. coli ได้ (Szentirmai, 1964)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E. coli ATCC 9637 ที่ 30 องศาเซลเซียสในขวดเขย่า โดยใช้อาหารสูตรปรับต้าที่มีกรดฟีนิลอะซิตก 0.2 เปอร์เซนต์ และโซเดียมกลูตาเมท 0.5 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 7) พบว่าเซลล์เข้าสู่การเจริญคงที่ในชั่วโมงที่ 28 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์สูงสุดอยู่ใกล้กึ่งกลางของระยะทวีคูณ คือประมาณชั่วโมงที่ 18 ซึ่งการเจริญคงที่และให้การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 9637 ในถังหมักที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้สูตรอาหารปรับต้าเช่นเดียวกับการเลี้ยงโดยใช้ขวดเขย่า เซลล์จะมีการเจริญคงที่ และให้การผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดอยู่ในชั่วโมงที่ 16 พบว่าในถังหมักมีการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่เร็วกว่าในขวดเขย่า เพราะว่ามีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้จะพบในการสร้างเอนไซม์ชนิดอื่นบ้าง เช่น การสร้างกลูโคส ไอโซเมอเรส (Diers และคณะ, 1977)

4.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

ในงานวิจัยนี้เราเลือกใช้สารผสมของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น เพราะว่าเป็นสารอาหารที่ได้จากธรรมชาติและโครงสร้างของแคปปา-คาร์ราจีแนนและวุ้น เหมือนกันคือเป็นโพลี-แซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกาแล็คโตส (Genu technical data, 1985) โดยการตรึงเซลล์แบบ two phase system ซึ่งมีข้อได้เปรียบคือ ทำให้เม็ดเซลล์ตรึงที่ได้มีลักษณะกลมส่วนใหญ่ จึงมีประโยชน์ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยใช้หอปฏิกิริยาแบบคอลัมน์ได้ดี (Nilsson และคณะ, 1983) ขนาดรูปร่าง, ลักษณะ และ strength ของเม็ดเซลล์ตรึงที่ได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลาย ๆ อย่าง เช่น ความเร็วในการกวนด้วยแท่ง-แม่เหล็กบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก, ชนิดของวัสดุที่ใช้ตรึง ความเข้มข้นของเซลล์และของวัสดุที่ใช้ตรึง

จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตรึงในอัตราส่วนความเข้มข้นต่าง ๆ ของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น (รูปที่ 8) ผลปรากฏว่าตรวจพบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเซลล์ตรึงมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ในขณะที่ค่า strength ของเม็ดเซลล์ตรึงแปรเปลี่ยนตามความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน พบว่าที่อัตราส่วนของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเท่ากับ 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ค่า strength สูงสุด เนื่องจากมีรายงานว่า การตรึง

เซลล์โดยวิธีกักขังนี้สามารถเพิ่ม strength ของเม็ดเซลล์ตรึงที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ aspertese ได้ โดยใช้สารพวก polyfunctional reagents (Klein และ Wagner, 1983) Tosa และคณะ (1979) ในงานวิจัยนี้พบว่าเม็ดเซลล์ตรึง E. coli ที่มีแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอวิเลส เมื่อเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์แต่เพียงอย่างเดียว มีผลในการเพิ่มค่า strength (รูปที่ 9) อยู่ในช่วง $4.6\text{-}5.7\times10^{-2}$ กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ในขณะที่กลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นสูงจะไปมีผลในการลดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน แต่เมื่อทำการเสริมต่อด้วยเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน (รูปที่ 10) โดยใช้ความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนอยู่ในช่วง 0.05-0.10 โมลาร์ สามารถเพิ่ม strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงได้อีกประมาณ 2 เท่า และมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลสลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงโดยใช้วุ้นหรือแคปปา-คาร์ราจีแนนเพียงอย่างเดียว (จันทร์เพ็ญ, 1986) พบว่ามีค่า strength สูงกว่าแคปปา-คาร์ราจีแนนหรือวุ้น (2, 4 เท่า ตามลำดับ) เมื่อเปรียบดูผลกระทบของกลูตารัล-ดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ต่อแคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ก็มีผลเพียงเล็กน้อยคล้ายกับวุ้น และไม่รุนแรงเหมือนในเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน อาจเป็นเพราะว่าการที่มีวุ้นผสมในแคปปา-คาร์ราจีแนน มีส่วนช่วยปกป้องเซลล์จากปฏิกิริยาที่รุนแรงระหว่างกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ทำให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะเดียวกันการเพิ่มของวุ้นผสมในแคปปา-คาร์ราจีแนนจะเป็นตัวเร่งประสาน (cross-linked) ของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ และเซลล์ต่อแคปปา-คาร์ราจีแนน จึงทำให้ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก

4.3 สมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

ทำการตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารผสมของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่อัตราส่วนความเข้มข้นเท่ากับ 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงเซลล์อยู่ในช่วง 45-50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปเสริมด้วย 0.10 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.10 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน นำมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเพนนิซิลิน เอซิเลสของเม็ดเซลล์ตรึง

จากการศึกษาพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นมีค่าอยู่ในช่วง pH 7.0-7.5 (รูปที่ 12) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ, เซลล์ตรึงวุ้น และเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986) (ตารางที่ 2) ค่า pH ดังกล่าวของเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น มีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเพียงอย่างเดียว มีค่าสูงกว่าเซลล์ตรึงวุ้นเล็กน้อย แต่ในกลุ่มเซลล์ตรึงทั้งหมดมีค่าต่ำกว่าในเซลล์อิสระ ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 8.0-8.5 อาจเป็นเพราะว่าการตรึงเซลล์โดยใช้สารดังกล่าวนี้ มีกลุ่มบางกลุ่มบนวัสดุที่ใช้ตรึงที่มีผลทำให้การจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตเพนนิซิลิน จี ง่ายขึ้นที่ pH ต่ำ ๆ กลุ่มดังกล่าวนี้อาจเป็นกลุ่ม NH_3^+ ที่เหลือของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เป็นต้น การที่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเซลล์ตรึงนี้มีค่าต่ำกว่าของเซลล์อิสระ ทำให้เป็นข้อได้เปรียบคือ ในปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก และกรดฟีนิลอะซิติก ซึ่งจะมีผลทำให้ค่า pH ของสารละลายปฏิกิริยาลดลง

เมื่อพิจารณาในแง่ของความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลสต่อ pH พบว่าในเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น มีค่าความเสถียรของ pH อยู่ในช่วง pH 5.0-9.0 คล้ายกับเม็ดเซลล์ตรึงวุ้น และใกล้เคียงกับเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (pH 4.5-9.0) ในขณะที่เซลล์อิสระมีความเสถียรต่อ pH ในช่วงแคบ ๆ (pH 6.0-7.0) เท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ช่วยปกป้องการรวมกลุ่มของโมเลกุลเอนไซม์และหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง สมบัติของเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งมักจะเกิดที่ pH ต่ำ ๆ และอุณหภูมิสูง ๆ (Klibanov, 1983) นอกจากนี้การกักขังเซลล์ไว้ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นแล้ว ทำให้เกิดการประสานกันด้วยสารพวก cross-linking agent คือ กลูตารัลดีไฮด์ จะทำให้เอนไซม์มีรูปแบบโครงสร้างที่แน่นอน จะมีผลทำให้ค่า micro-environment ค่อนข้างคงที่ ไม่ถูกกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอกมากนัก เช่นเมื่อมีการเปลี่ยน pH ของสารละลายก็จะมีผลต่อ pH ของ micro environment น้อย จึงทำให้เอนไซม์ในเม็ดเซลล์ตรึง มีความเสถียรต่อ pH มากกว่าในเซลล์อิสระ

เมื่อศึกษาความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งในเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงทั้ง 3 ชนิด จันทร์เพ็ญ (1986) พบว่าเมื่อเก็บเซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ ไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

นาน 10 วัน จะสูญเสียแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ไปประมาณ 30 เปอร์เซนต์ แต่ในการทดลองนี้เก็บเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ได้นาน 49 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าในการตรึงเซลล์ทำให้ปกป้องการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุล และ/หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเพนนิซิลิน เอซิเลส ภายในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ส่วนในเซลล์ตรึงวุ้น เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อเก็บที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน จะลดลง 25 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บได้นาน 10 วัน แต่ไม่พบการสูญเสียแอคติวิตีในเซลล์ตรึงวุ้น แสดงว่าวุ้นมีส่วนปกป้องการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ดีกว่าแคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งสามารถสนับสนุนเหตุผลนี้ได้จากการตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ที่อุณหภูมิห้อง (28-34 องศาเซลเซียส) นาน 49 วัน พบว่ามีการลดลงของแอคติวิตี เพนนิซิลิน เอซิเลส เพียง 7 เปอร์เซนต์ ส่วนผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 กับในเซลล์ตรึงทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ในเซลล์อิสระมีความเหมาะสมในช่วงแคบกว่าเซลล์ตรึงทั้ง 3 ชนิด โดยสามารถอธิบายได้ด้วยเหตุผลเดียวกัน คือ การตรึงเซลล์มีผลช่วยปกป้องการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเพนนิซิลิน เอซิเลส

การศึกษาเปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ เทียบกับในเซลล์ตรึงทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 2) พบว่าค่า K_m ของเซลล์อิสระจะมีค่าสูงสุดติดตามด้วยเซลล์ตรึงวุ้น เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นและเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นและเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเพียงอย่างเดียว จะให้ค่า K_m ต่ำที่สุดในกลุ่ม แต่เมื่อสังเกตค่า V_{max} ของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลล์อิสระจะมีค่าสูงกว่าในเซลล์อิสระเกือบ 3 เท่า ซึ่งเราสามารถจะอธิบายได้ว่า เมื่อนำเซลล์ E. coli มาตรึงโดยวิธีกักขังนั้นอาจจะมีผลทำให้สับสเตรตคือเพนนิซิลิน จี ที่เข้าไปสู่ภายในของเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้ง 3 ถูกบังคับให้รวมกันอยู่ในบริเวณ active site จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกันของสับสเตรตกับเอนไซม์ได้ดีขึ้นหรืออาจจะอธิบายได้อีกแบบคือ ว่าการตรึงเซลล์มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้การจับกันของสับสเตรตกับเอนไซม์ดีขึ้น ส่วนที่มีการลดลงของ V_{max} ในเซลล์ตรึงทั้ง 3 ชนิดนั้นแสดงให้เห็นว่ามีข้อจำกัดของการนำสับสเตรตเข้าและนำเอาผลิตภัณฑ์ออกจากเม็ดเจลเซลล์ตรึง ซึ่งก็นับว่าเป็นข้อเสียประการหนึ่งของการตรึงเซลล์แบบกักขัง (Klein และ Wagner, 1980)

ค่า K_i ของกรดฟีนิลอะซิติกและกรด 6-อะมิโนเพนนิวิลานิกของเพนนิซิเลน เอซิเลสในเซลล์ตรึงทั้ง 3 ชนิด จะมีค่าสูงกว่าในเซลล์อิสระประมาณ 2-3 เท่า โดยเฉพาะค่า K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ไม่สามารถตรวจหาได้แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงถึง 100-200 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าการตรึงเซลล์จะช่วยให้ผลกระทบของผลิตภัณฑ์ของการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ที่จะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงได้ จึงนับว่าเป็นข้อดีอีกอย่างของการตรึงเซลล์ ทั้งนี้เป็นได้ว่าการตรึงเซลล์ในสภาวะเช่นนี้ ทำให้ได้เนื้อ เจล ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนที่มีประจุหรือโครงสร้างที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเข้าจับของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาพบว่า สามารถเก็บรักษาเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ใน 0.30 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 49 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เลย (รูปที่ 18) ในขณะเดียวกันเม็ดเจลเซลล์ตรึงนี้เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานถึง 210 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเลย นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บยังสามารถนำมาใช้ทดลองการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด ได้ถึง 17 รอบ (1 รอบต่อ 24 ชั่วโมง) โดยที่ไม่สูญเสียแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเซลล์ตรึงเลย (รูปที่ 19) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า สารผสมของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซา-เมทธิลลีนไดอามีนนี้ทำให้เกิด cross-lingking ที่แข็งแรงมาก สามารถช่วยในการปกป้องเซลล์ได้ดีกว่า โดยทำให้การเกิดการสูญเสียโครงสร้างสามมิติธรรมชาติ (unfolding) ของเอนไซม์น้อยกว่า และยังช่วยในการปกป้องโมเลกุลของออกซิเจน หรือการแปดเปื้อนจากจุลชีพชนิดอื่น ๆ ที่จะมีผลต่อเอนไซม์ได้ดีกว่าเมื่อตรึงด้วยวุ้นหรือแคปปา-คาร์ราจีแนนเพียงอย่างเดียว จึงทำให้เม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นมีความเสถียรมากกว่าเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนหรือวุ้นเพียงอย่างเดียว

4.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกโดยเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ที่อัตราส่วน 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ แล้วเสริมด้วย 0.10 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.10 โมลาร์ เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน นำเม็ดเจลเซลล์ตรึงที่ได้มาศึกษาการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด ซึ่งออกแบบโดย ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาปริมาณของเม็ดเจลเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนซิลานิก พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของเม็ดเจลเซลล์ตรึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี เป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกก็จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเป็นปฏิภาคกัน และจะให้ปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดเพิ่มขึ้นด้วย แต่เราก็พบอีกว่า เมื่อมีปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยามากขึ้น สภาวะของการเกิดฟลูอิดไดเซชั่นนี้จะทำให้เม็ดเจลมีการผุกร่อนสูง (erode) เนื่องจากการชนกันเองของเม็ดเจล และการชนของเม็ดเจลกับผนังของหอปฏิกิริยา ผลจากการติดตามวัดการสูญเสียน้ำหนักของเม็ดเจลภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยาแล้วนาน 24 ชั่วโมง พบว่ามีการลดลงของน้ำหนักเม็ดเจลเซลล์ตรึงทั้งหมดถึงประมาณ 10 เปอร์เซนต์ ถ้าหากใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึงเริ่มต้นทั้งหมดสูง 250 กรัม ในขณะที่ค่าการลดลงของน้ำหนักเม็ดเจลมีเพียง 1 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึงเริ่มต้น 100-135 กรัม ในการทดลองต่อไปเราจึงเลือกใช้ปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึง 135 กรัม ทั้งที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลงเหลือเพียง 53 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับการใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึง 250 กรัม แต่ปริมาณผลผลิตของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดที่เกิดขึ้นจะมีค่าประมาณ 75 เปอร์เซนต์ของเมื่อใช้ปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึง 250 กรัม

เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ที่เข้าสู่หอปฏิกิริยาพบว่า อัตราการเร่งของปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดที่เกิดขึ้นจะไม่เป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ที่มีค่าสูงกว่า 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ขึ้นสูงถึง 2.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งสูงประมาณ 4 เท่าของความเข้มข้นปกติก็ตาม ปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดเพิ่มขึ้นเพียง 25 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมา

มาจากอัตราการไหลของเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเร็วเกินไปทำให้การเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ หรืออาจเป็นผลมาจากการยับยั้งปฏิกิริยาของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นก็ได้ แต่เมื่อเรานำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากหอปฏิกิริยานั้นใส่กลับไปในหอปฏิกิริยาใหม่ (recycle) แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาอีก พบว่าปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมอีก 25 เปอร์เซนต์ ดังนั้นผลของการยับยั้งปฏิกิริยาเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจึงไม่น่าจะใช่หรือถ้าใช่ก็เป็นผลเพียงเล็กน้อย จึงน่าจะเป็นผลมาจากอัตราการไหลของเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเร็วไป

ในการศึกษาผลของอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาพบว่า เมื่อลดอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาลงจะมีผลทำให้ปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดมีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อัตราการเกิดปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ถึงแม้จะไม่มากนักก็ตาม ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เมื่อลดอัตราการไหลของเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับเป็นการเพิ่มเวลาที่เพนนิซิลิน จี จะอยู่ในหอปฏิกิริยา (residence time) นานขึ้น ทำให้การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเพนนิซิลิน เอซิเลส กับเพนนิซิลิน จี มีเวลานานขึ้น จึงมีผลทำให้ปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย และเมื่อทำการศึกษาผลกระทบของอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก พบว่าไม่มีความแตกต่างในแง่จลน์ศาสตร์เมื่อใช้อัตราการป้อนอากาศในช่วง 2-5 ลิตรต่อนาที แต่จะพบว่าเม็ดเจลจะมีการผุกร่อนสูงมากเมื่อใช้อัตราการป้อนอากาศอยู่ในช่วง 3-5 ลิตรต่อนาที โดยสังเกตจากความขุ่นของผลิตภัณฑ์ที่ได้หอปฏิกิริยา แสดงให้เห็นว่าอัตราการป้อนอากาศที่ใช้นั้นมีผลเพียงพอต่อกวรกวนในหอปฏิกิริยาอย่างสม่ำเสมอ

Yoshida และคณะ (1981) ทดลองผลิตรเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เซลล์ของ Aspergillus oryzae Vas bruneus Was และ Saccharomyces cerevisiae 13 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดซ์เบด พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 95 เปอร์เซนต์ของทฤษฎี (theoretical yield) โดยผลผลิตไม่มีการลดลงตลอดเวลา 5 วัน การศึกษาความเสถียรของเม็ดเจลเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดเพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ภายใต้สภาวะที่กำหนด พบว่าสามารถผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องได้นาน 5 วัน โดยที่ผลผลิตไม่มีการลดลงตลอดเวลา 5 วัน แต่ strength ของเม็ดเจลตรึงมีค่าลดลงอย่างมากประมาณ 6-7 เท่า เมื่อนำ

เม็ดเจลเซลล์ตรึงที่มีค่า strergth ลดลงไปแช่ไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคอลไรด์ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน สามารถเพิ่ม strength ให้กลับมาเกือบเท่า strength เมื่อเริ่มต้น สามารถอธิบายได้ว่า ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด โครงสร้างของเม็ดเจลแคปปา-คาร์จีแนนผสมวุ้นได้มีการสูญเสียของโพแตสเซียมอิออนไปตลอดเวลา มีผลทำให้ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงลดลง

4.5 ความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ในเชิงคณิตศาสตร์สำหรับการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่ผลิตได้ในหอปฏิกิริยาแต่ละครั้งได้มากน้อยแตกต่างกันไป สังเกตได้จากรูปที่ 20 ถึง 25 ว่าปริมาณของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดจากผลของการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี โดยเซลล์ตรึงมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกแล้วค่อย ๆ ช้าลง จนในที่สุดได้ผลผลิตคงที่ในทุกตัวแปร ที่เป็นเช่นนี้แสดงว่า ณ สภาวะดังกล่าวนี้ ระบบการทำงานระหว่างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เซลล์ตรึงกับเพนนิซิลิน จี ได้ถึงจุดสมดุลย์ของระบบการทำงานแบบต่อเนื่อง

ในระบบการทำงานแบบต่อเนื่องเวลาของการเข้าทำปฏิกิริยาของสารทั้งหลายจึงมิได้มีอิทธิพลของการเกิดผลิตผล การศึกษาการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกด้วยการฟลูอิไดซ์-เซชั่นนี้ ตัวแปรที่สำคัญควรศึกษาได้แก่

ก. ปริมาณเม็ดเซลล์ตรึง (I) (กรัม)

ข. ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี (S) (เปอร์เซนต์-น้ำหนักต่อปริมาตร)

ค. อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี (F) (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

ง. อัตราการป้อนอากาศ (U) (ลิตรต่อนาที)

เมื่อกำหนดให้ปริมาณของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้น มีค่าเท่ากับ Y (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) สมการของความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ทางคณิตศาสตร์สามารถเขียนได้เป็น

$$Y = f_1 [I, S, F, U] \qquad (1)$$

ครั้งพิจารณาถึงการทำงานของเอนไซม์ในระบบว่า ถ้าเราไม่ป้อนอากาศให้กับระบบเอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้ ซึ่งระบบการทำงานจะคล้ายกับเบดคงที่ ดังนั้นตัวแปรของ U ควรอยู่ในรูป 1 + U จึงเหมาะสมกว่า ความสัมพันธ์จึงอยู่ในรูปของ

$$Y = f_2 (I, S, F, 1 + U) \qquad (2)$$

จากการศึกษาเบื้องต้นได้ปรับอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเป็น 2 ช่วง (รูปที่ 25) ไม่ปรากฏความแตกต่างของการผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ดังนั้นตัวแปรที่สำคัญจึงเหลือเพียง

$$Y = f_3 (I, S, F) \qquad (3)$$

สมการที่ 3 เมื่อเขียนให้อยู่ในรูปของสมการ Power function จะได้เป็น

$$Y = k_1 I^{n_1} S^{n_2} F^{n_3} \qquad (4)$$

การศึกษาหาความสัมพันธ์ดังกล่าวควรศึกษาทีละตัวแปรดังต่อไปนี้

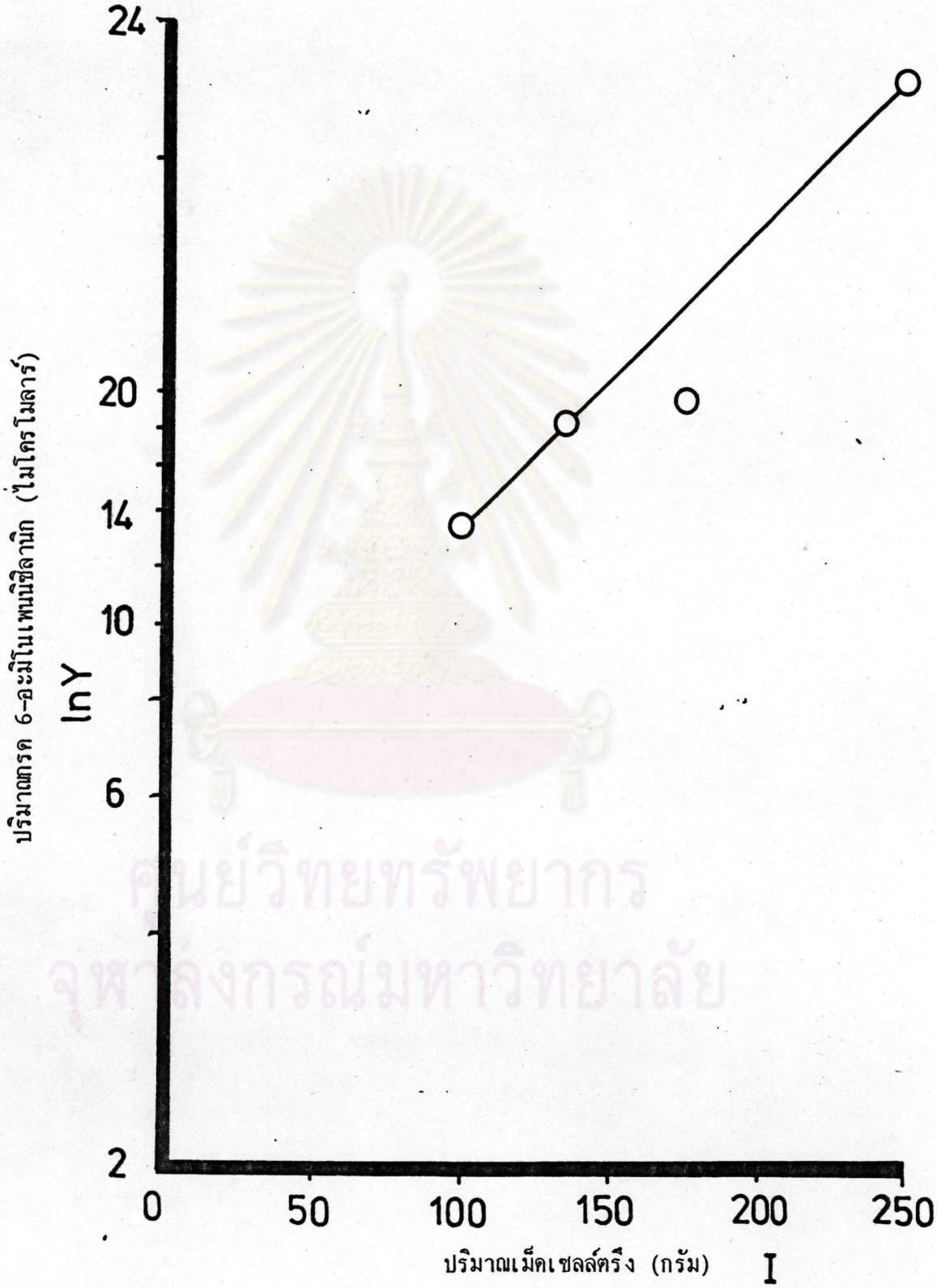
4.5.1 <u>ความสัมพันธ์ Y กับ I</u>

ที่ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี 0.625 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถูกป้อนด้วยอัตราเร็ว 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เข้าสู่หอปฏิกิริยาที่บรรจุเซลล์ตรึง (I) ในปริมาณต่าง ๆ พบว่าระบบมีการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ปริมาณคงที่เมื่อเวลาของการทำงานของระบบตั้งแต่ 12 ชั่วโมงผ่านไป นำเอาค่าของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์กับปริมาณของเซลล์ตรึงที่ใช้ในสเกล semi-log ตามรูปที่ 27 ได้กราฟเส้นตรง แสดงว่าความสัมพันธ์ของ Y และ I เป็นแบบเอกซ์โปแนนเชี่ยล ดังสมการ

$$Y = k_2 \exp n_4 I \qquad (5)$$

4.5.2 <u>ความสัมพันธ์ระหว่าง Y และ S</u>

ที่ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ต่ำ ๆ การเข้าสู่สภาวะสมดุลย์ที่เซลล์ตรึงสามารถผลิตรกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้คงที่นั้นใช้เวลาสั้นกว่าการป้อนของสารละลายเพนนิซิลิน จี ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2.5



รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ln Y กับ I เมื่อตัวแปรต่าง ๆ คงที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ปริมาณของเซลล์ตรึง 135 กรัม ก็สามารถทำให้ระบบอยู่ในสภาวะสมดุลย์เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 12 ชั่วโมง ณ เวลา 12 ชั่วโมงนี้เรานำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ของ Y กับ S ใหม่ ในสเกล log-log ปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลายเพนนิซิลิน จี ไม่สูงนัก จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.625 เปอร์เซนต์แล้ว อัตราการเปลี่ยนเพนนิซิลิน จี เป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก มีการเพิ่มขึ้นน้อยมาก (รูปที่ 28) จึงเป็นข้อจำกัดอันหนึ่ง แต่ข้อจำกัดนี้ก็ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ตรึงด้วย ความสัมพันธ์ที่ได้จะอยู่ในเทอมของ

$$Y = k_3 S^{n_2} \qquad (6)$$

4.5.3 <u>ความสัมพันธ์ Y กับ F</u>

ได้ทดลองปรับอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยา ที่อัตราเร็วต่าง ๆ กัน เพื่อหาอัตราเร็วที่เหมาะสม และได้พบว่าการเพิ่มอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี มากขึ้น โอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ตรึงกับเพนนิซิลิน จี มีน้อยลง หรืออาจกล่าวได้ว่า เวลาที่เพนนิซิลิน จี อยู่ในหอปฏิกิริยานั้นสั้นลง แต่อย่างไรก็ตาม ระบบการทำงานของเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาเข้าสู่สภาวะสมดุลย์ตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อนำผลการทดลองมาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ของ Y และ F สามารถเขียนในสเกล semi-log ดังรูปที่ 29 แสดงว่าความสัมพันธ์ของ Y กับ F อยู่ในฟังก์ชั่นเอกซ์โปเนนเชี่ยล ดังสมการ

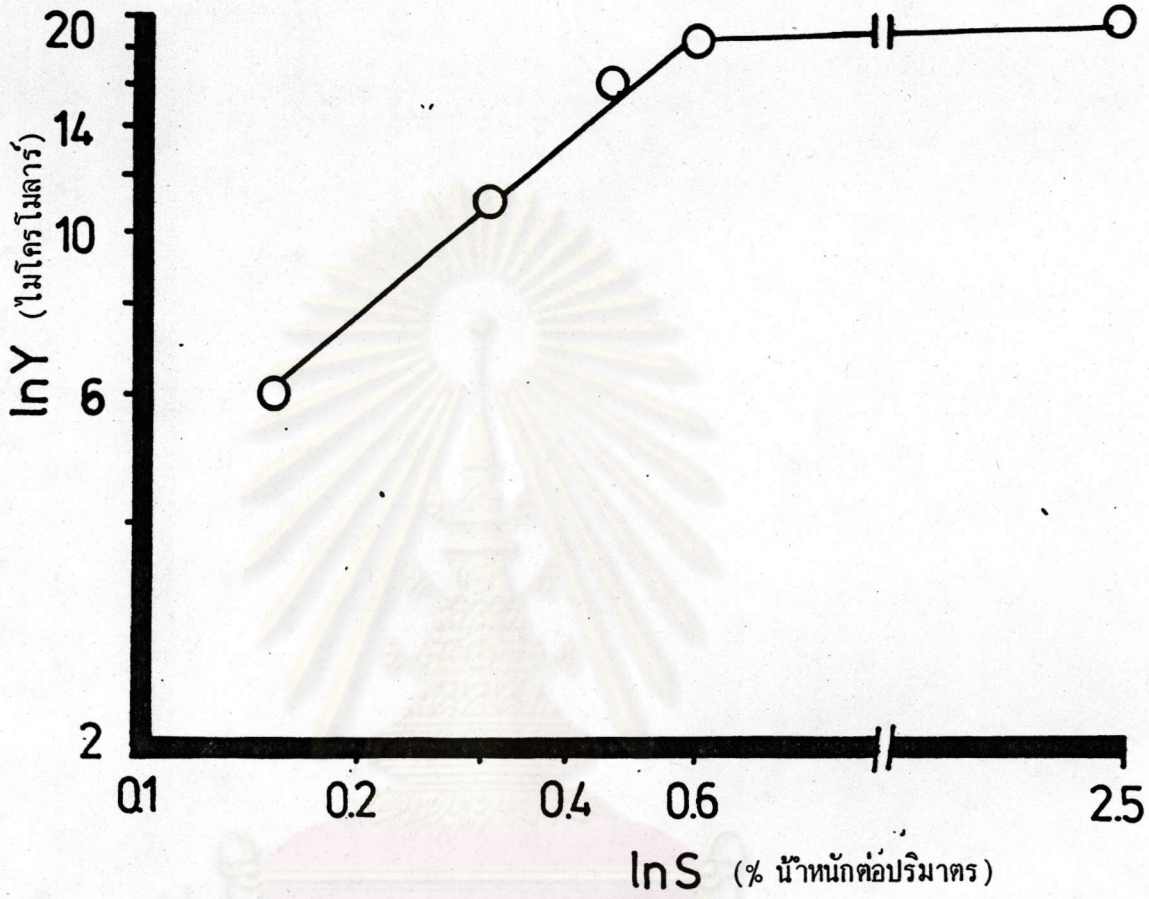
$$Y = k_4 \exp n_5 F \qquad (7)$$

4.5.4 <u>ความสัมพันธ์ของ Y, I, S และ F</u>

จากความสัมพันธ์ที่ได้ต่าง ๆ ดังกล่าวพบว่า เมื่อเรานำตัวแปรทั้งหมดมาหาความสัมพันธ์รวม สามารถทำได้โดยรวมสมการที่ 5, 6 และ 7 เข้าด้วยกัน จะได้ความสัมพันธ์ใหม่ดังนี้

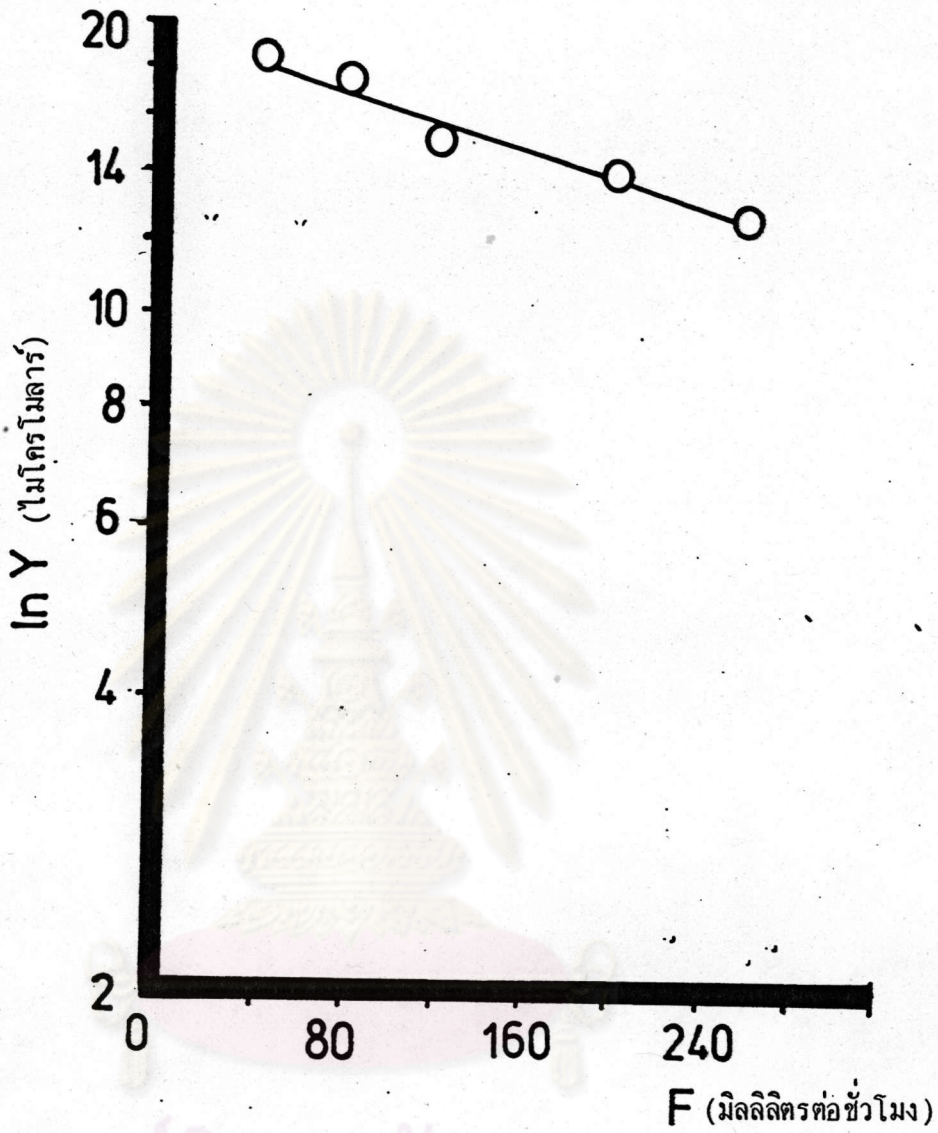
$$Y = k_5 S^{n_2} \exp n_4 I \exp n_5 F \qquad (8)$$

ความสัมพันธ์ของตัวแปรในสมการที่ 8 นี้ เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในระบบต่อเนื่อง สมการดังกล่าวนี้ยังมีตัวแปรต่าง ๆ อีกที่ยังไม่ได้ศึกษาเราจึงยกอยู่ในเทอมของค่าคงที่ k_5 ในสมการที่ 8 ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ให้ละเอียดต่อไป



รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ln Y กับ ln S เมื่อตัวแปรต่าง ๆ คงที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



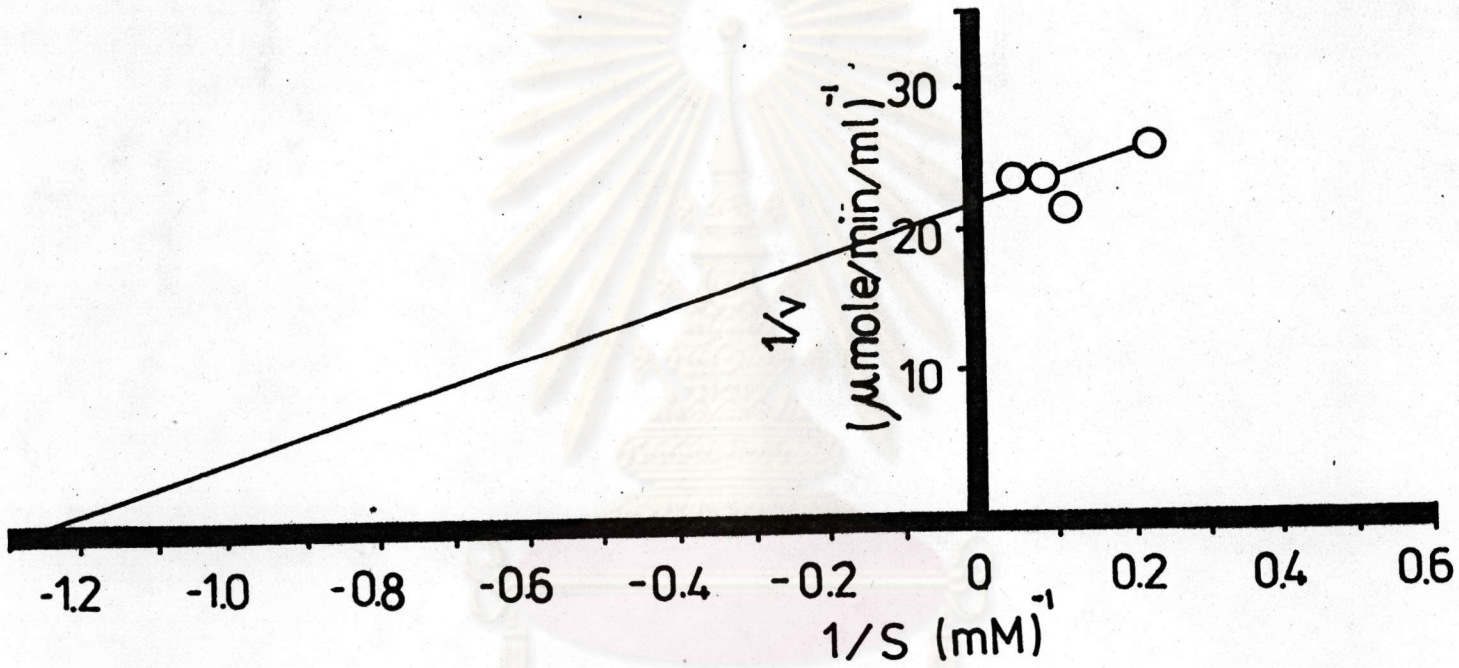
รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ln Y กับ F เมื่อตัวแปรต่าง ๆ คงที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 เปรียบเทียบการทำงานของระบบต่อเนื่องในฟลูอิดไดซ์เบดกับระบบไม่ต่อเนื่องในขวดเขย่า

จากการทดลองหาความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ที่มีผลต่ออัตราเร็วและผลผลิตของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกของระบบต่อเนื่องในฟลูอิดไดซ์เบด เราสามารถหาค่าคงที่ของจลน์ศาสตร์ออกมาได้ (รูปที่ 30) คือ เมื่อนำค่าความเข้มข้นของ เพนนิซิลิน จี กับอัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งหาจากความชั้นของแต่ละเส้นของปฏิกิริยาจากรูปที่ 23 มาทำ Line weaver-Burk plot จะพบว่าค่าคงที่ของ Michealis (Kmapp) ของปฏิกิริยามีค่าประมาณ 0.8 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูกกว่า K_m ที่หาได้ด้วยระบบไม่ต่อเนื่องประมาณ 5-6 เท่า แสดงให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยาระหว่างเพนนิซิลิน จี กับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในระบบต่อเนื่องแบบฟลูอิดไดซ์เบดนั้น เอนไซม์มีความจำเพาะและสามารถจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรตได้ดีกว่าในระบบไม่ต่อเนื่องในขวดเขย่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเหตุว่าเม็ดเซลล์ตรึงมีการเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลาในขณะเดียวกันก็มีการป้อนเพนนิซิลิน จี ใหม่เข้าสู่ระบบตลอดเวลาเช่นกัน ทำให้โอกาสที่เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะเข้าทำปฏิกิริยากับเพนนิซิลิน จี นั้นมีมาก ซึ่งปรากฏการณ์นี้คือข้อดีของการใช้ระบบต่อเนื่องฟลูอิดไดซ์เบดในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (สมศักดิ์, 2524)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 Lineweaver-Burk plot ระหว่างอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยากับความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึงเท่ากับ 135 กรัม อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศเท่ากับ 3-4 ลิตรต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ E. coli ATCC 9637 คือการเจริญในอาหารสูตรปรับต้ำที่มี 0.1 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซิติกเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และ 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต เป็นทั้งแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 เมื่อเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าและ 16 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น คือการใช้สารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นในอัตราส่วน 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้เซลล์ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดเป็นเม็ดเจล โดยการเติมนอร์มอล-บิวทิลอะซิเตต ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บรักษาไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เม็ดเจลที่ได้มีแอคติวิตีประมาณ 85 เปอร์เซนต์ของเซลล์อิสระ

3. ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อการเพิ่มของ strength เม็ดเจลเซลล์ตรึง แต่จะมีผลทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น

4. เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนจะช่วยทำให้ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงมีค่าเพิ่มขึ้น โดยที strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเพิ่มขึ้นประมาณ 3 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

5. ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นมีค่า K_m = 4.5 mM, K_i ของกรดฟีนิลอะซีติก = 12.5 mM และไม่สามารถตรวจพบ K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกเลย แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 100-200 mM

6. สามารถเก็บรักษาเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ใน 0.30 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ได้นาน 49 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเลย

7. การนำเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นมาใช้ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด 1 รอบ (24 ชั่วโมง) แล้วนำไปเก็บใน 0.30 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 210 วัน หรือ 17 รอบ โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีและ

strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงเลย

8. การนำเม็ดเจลเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนมาใช้ในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด มีสภาวะที่เหมาะสมคือใช้ปริมาณของเม็ดเจลเซลล์ตรึงเท่ากับ 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาประมาณ 60-80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาประมาณ 2.0-2.5 ลิตรต่อนาที

9. การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยใช้เซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดเบดที่สภาวะกำหนดนั้น สามารถผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกติดต่อกันนาน 5 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี แต่ strength จะลดลงประมาณ 6-7 เท่าของเมื่อเริ่มต้น

10. สามารถเพิ่ม strength ของเม็ดเจลที่เสียไประหว่างการเกิดปฏิกิริยากลับมาได้ใหม่ประมาณ 90-95% ของ strength ตั้งต้น โดยนำเม็ดเจลที่ได้หลังจากการทดลองมาเก็บไว้ใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์

ผลการวิจัยทั้งหมดนี้นับว่าได้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ของผู้ทำที่ตั้งใจไว้ และสามารถที่จะใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย