การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทราย

นาย อนันตพงษ์ สุขเกษ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาคจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0744-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ONTO SURFACE OF SAND PARTICLES

Mr. Anantapong Sukket

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-0744-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทราย
โดย	นาย อนันตพงษ์ สุขเกษ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……...……คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

……..อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

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

……..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

……..กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อนันตพงษ์ สุขเกษ : การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทราย. (IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ONTO SURFACE OF SAND PARTICLES) อ. ที่ปรึกษา : [ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน], อ.ที่ปรึกษาร่วม : [ศ. ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ] จำนวนหน้า หน้า. ISBN 974-13-0744-6.

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 บนผิวของทรายขนาด 16 – 20 เมช โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นสารช่วยตรึง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปคือ ใช้กลูตารัลดีไฮด์ 2.5% (โดยปริมาตร) และความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนส 0.1690 มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง โดยทำที่อุณหภูมิห้อง, อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับเวลาและความเป็นกรดด่างที่ใช้ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย และการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสคือ 120 นาที ที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 และ 45 นาที ที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 ตามลำดับ

คุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระพบว่า เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะคงเหลือ 37 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย โดยสูงขึ้นจาก pH 4.5 เป็น 5.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานนั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอยู่ในช่วงแคบตั้งแต่ 3.5 – 4.5 แต่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิดีกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ ยังพบอีกว่า เมื่อเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปไว้ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จะสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้เมื่อนำเดกซ์แทรเนสตรึงรูปมาใช้ไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที–2000 ซ้ำแบบต่อเนื่อง ยังคงสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ หลังผ่านการใช้งานไป 10 รอบ ส่วนค่าคงที่ไมคิลิสมีค่าเท่ากับ 12.50 ไมโครโมลาร์ สำหรับสับสเตรทเดกซ์แทรน ที–2000 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ

ภาควิชา…….จุลชีววิทยา…….. ลายมือชื่อนิสิต.....…….....
สาขาวิชา..จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....…….....
ปีการศึกษา…2543…….…….. ลายมือชื่ออาจารย์ทีปรึกษาร่วม…….....

4172527523 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Penicillium* sp. SMCU 3-14 / IMMOBILIZATION / DEXTRANASE / SAND

ANANTAPONG SUKKET : IMMOBILIZATION OF DEXTRANASE ONTO SURFACE OF SAND PARTICLES. (THESIS TITLE) THESIS ADVISOR : [ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D.], THESIS COADVISOR : [PROF. SOMSAK DAMRONGLERD, Ph.D.], pp. ISBN 974-13-0744-6.

Dextranase from *Penicillium* sp. SMCU 3-14 was immobilized on 16 – 20 mesh sand surface using glutaraldehyde as bifunctional agent. The optimum conditions for the preparation of immobilized dextranase were with 2.5% by volume of glutaraldehyde and the maximal enzyme loading on sand was 0.1690 mg. per gram sand (dry weight). Immobilization was performed at room temperature with agitation speed of 200 rpm. Times and pH for cross–linking and enzyme immobilizing steps were 120 mins at pH 7.0 and 45 mins at pH 4.0, respectively.

In comparison to free dextranase, the immobilized dextranase retained 37% of its original specific activity. The optimum pH of the immobilized enzyme was found shift from pH 4.5 to 5.0, while the optimum temperature of both free and immobilized enzyme was found to be the same at 55 ^{o}C. As of pH stability, immobilized dextranase was stable within a narrow pH range, between 3.5 to 5.5, whereas its temperature stability was better than of the free enzyme. Moreover, the immobilized enzyme could retain more than 95% of its activity even stored for 30 days in 0.05 M acetate buffer pH 4.5 at 4 ^{o}C. After the tenth cycle of its repetative hydrolysis, the enzyme still gave 65% of its initial activity. Finally, the Michaelis constant, K_m of the immobilized dextranase toward its substrate dextran T-2000 was 12.50 μM, which is higher than that of free enzyme.

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

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

Academic year …2000…….…… Co-advisor's signature.....….....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนกำลังใจที่ผู้วิจัยได้รับมาตลอด อีกทั้งได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน และอาจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบ ที่ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆ ท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณ ปนัดดา กติกาวงศ์ ที่มีส่วนช่วยเหลือในทุกๆ เรื่องเกี่ยวกับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และสำหรับกำลังใจที่ดีที่มีให้กันตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย และพี่สาว รวมทั้งญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดียิ่ง ตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……...จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……..……ช
สารบัญตาราง……..……...ซ
สารบัญรูป……..……ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ……..……ฏ
บทที่
1. บทนำ……...1
2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย……...…...29
3. ผลการทดลอง……49
4. การสรุปและอภิปรายผล……91
รายการอ้างอิง……101
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก……...107
ภาคผนวก ข……...……...……...108
ภาคผนวก ค……...……...110
ประวัติผู้เขียน……113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 แสดงผลผลิตน้ำตาลโลก……3
2 แสดงองค์ประกอบของอ้อย และของแข็ง ……..8
3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำอ้อย ……..……9
4 เปรียบเทียบผลสำรวจอ้อยและน้ำตาลทรายตั้งแต่ปีการผลิต 2525/26 – 2541/42……..10
5 เปรียบเทียบปริมาณอ้อยสดและอ้อยไฟไหม้เข้าหีบตั้งแต่ ปีการผลิต 2539/40 – 2542/43…….……..11
6 เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส …….……..16
7 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ …….……..24
8 ตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส…….……27
9 แสดงการเปรียบเทียบแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะระหว่างเดกซ์แทรนเนสอิสระ กับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ตามวิธีของนุสรา เจริญกิจทวี, 2539…….……..49
10 ผลของวิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายขนาด 16 – 20 เมช …… …….53
11 ผลความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป…….……..55
12 ผลของอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป……..……57
13 ผลของเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย……..59
14 ผลของปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่เหมาะสม ที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์……61
15 ผลของเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส …….……...63
16 ผลของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลูตารัลดีไฮด์กับทราย……..……..66
17 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย……..……68
18 ผลของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส ……..……70
19 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส…….72

20 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป.....74
21 สรุปสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส.....98
22 เปรียบเทียบสมบัติบางประการของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
และเดกซ์แทรนเนสอิสระ.....100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย…..……..……..7
2 ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจากเดกซ์แทรนซูเครส……..……..…13
3 วิธีการตรึงรูปเอนไซม์…..……..…..20
4 การเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ ……..…..……22
5 ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 1..……..……36
6 ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 2…….……..……37
7 ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 3……..……...38
8 ผลของการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในการย่อยสลาย เดกซ์แทรน ที - 2000 ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์……....……..…51
9 ผลของการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในการย่อยสลาย เดกซ์แทรน ที – 2000 ต่อความแข็งของเม็ดเจล…….…..……....52
10 ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียม เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป……..……..56
11 อัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป…….……..…...58
12 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย……..60
13 ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสม ที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์…….…...62
14 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส…….64
15 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่าง กลูตารัลดีไฮด์กับทราย……..……..……..67
16 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย……..……..…..69
17 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส……71
18 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัพเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส……73
19 ผลของการหลุดของเอนไซม์ (leaching) จากทรายที่ทำหน้าที่เป็นตัวพยุง ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป……...…75

20 ภาพแสดงพื้นที่ผิวของทรายก่อนการตรึงรูป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน
แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)……..….77
21 ภาพแสดงพื้นที่ผิวของทรายหลังการตรึงรูป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน
แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)…….……77
22 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรเนสตรึงรูป
และเดกซ์แทรนเนสอิสระ…….……...……..…79
23 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
และเดกซ์แทรนเนสอิสระ……..…….....80
24 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
และเดกซ์แทรนเนสอิสระ…….82
25 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
และเดกซ์แทรนเนสอิสระ……..…….……83
26 ความเสถียรของการเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่อุณหภูมิ 4 °ซ
ระหว่างที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0…….…….85
27 จำนวนรอบในการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปซ้ำเพื่อการไฮโดรไลซ์
เดกซ์แทรน ที-2000 ความเป็นกรดด่าง 5.0 ระหว่างอุณหภูมิ 40 และ 50 °ซ……...….....86
28 จำนวนรอบในการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปซ้ำเพื่อการไฮโดรไลซ์
เดกซ์แทรน ที-2000 ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 โดยคงอุณหภูมิที่ 40 °ซ…….....…87
29 การประมาณค่า K_m โดยวิธีไลน์วิเวอร์-เบิร์กของเดกซ์แทรนเนสอิสระเมื่อใช้
เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นสับสเตรท โดยวัดแอคติวิตีที่ 55 °ซ ความเป็นกรดด่าง 4.5…...…89
30 การประมาณค่า K_m โดยวิธีไลน์วิเวอร์-เบิร์กของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเมื่อใช้
เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นสับสเตรท โดยวัดแอคติวิตีที่ 55 °ซ ความเป็นกรดด่าง 5.0…...…90
31 สรุปแผนผังแสดงขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส…….99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
^{o}ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะน้ำตาลทรายเป็นสินค้าส่งออกที่นำเงินตราต่างประเทศเข้าประเทศประมาณร้อยละ 15 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรกรรมทั้งหมด นอกจากนี้ยังช่วยแก้ปัญหาสังคมที่เกิดจากการว่างงาน ทำให้เกิดการจ้างงานในชนบท เป็นจำนวนกว่า 6 แสนคน ส่งผลให้มีเงินทุนหมุนเวียนในระบบเศรษฐกิจไม่ต่ำกว่า 150,000 ล้านบาทต่อปี และยังสามารถทำรายได้ในรูปภาษีให้กับรัฐบาลปีละหลายพันล้านบาท

ประเทศไทยจัดเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลทรายรายใหญ่เป็นอันดับ 3 ของโลก รองจากบราซิลและออสเตรเลีย (ไม่รวมกลุ่มสหภาพยุโรป) โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คือ อ้อย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* ซึ่งเป็นพืชที่เหมาะสมต่อภูมิอากาศแบบร้อนชื้นของประเทศไทยเพียงอย่างเดียว (บุญส่ง แสงอ่อน, 2525) สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งแต่ละภาคจะปลูกอ้อยในพันธุ์ที่แตกต่างกันไปตามลักษณะอากาศและสภาพดิน (การค้นคว้าและการทดลอง, 2510) นอกจากนี้ หัวผักกาดหวาน (บีท) ก็สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลทรายได้เช่นกัน

น้ำตาลทราย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ซูโครส (sucrose) เป็นน้ำตาลชนิดไดแซกคาไรด์ (disaccharide) ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซกคาไรด์ (monosaccharide) สองชนิดคือ กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) น้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ร่างกายจะดูดซึมไปใช้ที่บริเวณลำไส้เล็กเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดเพราะมีความจำเป็นต่อสมองและเซลล์ทุกเซลล์ในร่างกาย ซูโครสเป็นสารอาหารที่ร่างกายใช้ได้ง่ายชนิดหนึ่ง ซึ่งแตกต่างจากอาหารชนิดอื่นในด้านคุณภาพความหวาน และคงไว้ซึ่งรสชาติโดยไม่เปลี่ยนแปลง อาจกล่าวได้ว่าน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหารอันเนื่องมาจากคุณสมบัติดังนี้

1. น้ำตาลเป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย ช่วยให้ร่างกายใช้ทดแทนพลังงานที่สูญเสียไปอย่างรวดเร็ว
2. น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่มีราคาถูก ให้พลังงานมากกว่าและมีราคาถูกกว่าอาหารส่วนมาก

3. เป็นสารให้ความหวานที่เป็นที่นิยม เพราะความสม่ำเสมอ มีระดับความหวานพอเหมาะ ไม่มีผลตกค้างภายหลังรับประทาน นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มรสชาติในอาหารที่ด้อยรสชาติแต่มีคุณค่า

ชนิดของน้ำตาล

น้ำตาลที่สร้างขึ้นในต้นอ้อยนั้นมีหลายชนิด แต่ที่แยกเอามาทำเป็นน้ำตาลใช้บริโภคกันคือผลึกของซูโครสที่ได้จากน้ำอ้อย นอกจากนั้น น้ำตาลซูโครสที่ใช้บริโภคก็อาจผลิตได้จากน้ำเชื่อมหรือได้จากต้นตาล มะพร้าว ข้าวโพดหวาน เมเปิล และหัวผักกาดหวาน จึงทำให้น้ำตาลมีชื่อเรียกหลายอย่าง น้ำตาลที่คนไทยรู้จักโดยทั่วไป มีดังนี้

1. น้ำตาลทรายดิบ (Raw Sugar) หมายถึง ผลึกซูโครสที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ เป็นเกล็ดใสสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม ตามสีของกากน้ำตาลที่หุ้มอยู่นอกผลึก มีความชื้นปานกลาง เกล็ดน้ำตาลจะจับเกาะติดกันไม่ร่วน วิธีการผลิตใช้ปูนขาวเป็นตัวฟอกสีของน้ำอ้อย น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากอ้อยโดยตรงและยังไม่บริสุทธิ์พอที่จะบริโภคได้ ใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทำน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์อีกทีหนึ่ง

2. น้ำตาลทรายขาว (Plantation White Sugar) หมายถึง ผลึกซูโครสที่มีความบริสุทธิ์สูง เป็นเกล็ดใสสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน มีความชื้นเล็กน้อย เกล็ดน้ำตาลร่วนไม่ติดกันและมีกากน้ำตาลติดอยู่เป็นส่วนน้อย ผลิตจากอ้อยโดยตรง วิธีการผลิตใช้กำมะถันหรือกาซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวฟอกสี

3. น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refined sugar) หมายถึง ผลึกซูโครสที่มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด มีลักษณะเป็นเกล็ดใส สีขาวสะอาดปราศจากกากน้ำตาล (Molassess) เกือบไม่มีความชื้นเลย ผลิตจากน้ำตาลทรายดิบ

4. น้ำตาลทรายสีรำ (Brown sugar) หมายถึง น้ำตาลทรายขาวทั่วๆ ไป เป็นเกล็ดใสเล็กกว่าน้ำตาลทรายดิบเล็กน้อย มีสีน้ำตาลอ่อนเนื่องมาจากสีของน้ำตาลไหม้ หรือสีของกากน้ำตาลมีความชื้นน้อยกว่าน้ำตาลทรายดิบ น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลทรายแดง

5. น้ำตาลทรายแดง (Soft Brown Sugar) เป็นผงละเอียดหรืออาจจับตัวกันเป็นก้อน มีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มีความชื้นสูง มีกลิ่นน้ำตาลไหม้ ผลิตจากอ้อยโดยตรง มีทั้งการเคี่ยวในกะทะเปิด (open pan method) หรือใช้กรรมวิธีการผลิตที่ทันสมัย

6. น้ำตาลทรายอัดก้อน หรือน้ำตาลทรายปอนด์ (Cube Sugar) เป็นก้อนสี่เหลี่ยม นิยมใช้ในการชงเครื่องดื่มประเภท น้ำชา กาแฟ ได้จากการอัดน้ำทรายขาวเป็นก้อน แล้วผ่านเข้าอบด้วยความร้อนจากแสงอินฟราเรด เพื่อลดความชื้นให้เหลือเพียง 0.5 – 1.0% จากนั้นจึงเป่าด้วยลมเย็นเพื่อให้แข็งเป็นก้อนบรรจุในกล่องกระดาษ

7. น้ำตาลปี๊บ เป็นก้อนเหนียวมีความหนืดสูง มีสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มีความชื้นมาก ผลิตจากต้นตาลและมะพร้าว ใช้ประกอบอาหารและขนม

8. น้ำตาลกรวด (Crystalline Sugar) เป็นก้อนเหลี่ยมคล้ายก้อนสารส้มสีขาวใส ผลิตจากน้ำเชื่อมจากอ้อย โดยผ่านกระบวนการตกผลึกอย่างช้าๆ เป็นเวลาหลายวัน จะมีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลทรายชนิดอื่น

ปัจจุบันผลผลิตน้ำตาลโลกจากอ้อยคิดเป็น 70% และหัวผักกาดหวานคิดเป็น 30% ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลผลิตน้ำตาลโลก

วัตถุดิบ	ผลผลิตน้ำตาล (1,000 ตัน มูลค่าน้ำตาลทรายดิบ)					
	2535/36	2536/37	2537/38	2538/39	2539/40	2540/41
หัวผักกาดหวาน	38,921	39,512	35,248	36,358	37,744	37,996
อ้อย	73,044	70,206	81,037	87,307	85,284	86,217
รวม	111,965	109,718	116,285	123,665	123,028	124,213

ที่มา : อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายในประเทศไทย 2541-42

ประเทศไทยมีโรงงานน้ำตาลทั้งหมด 46 โรงงาน กระจายอยู่ตามภาคต่างๆ ได้แก่ ภาคเหนือ 9 โรงงาน ภาคกลาง 22 โรงงาน ภาคตะวันออก 9 โรงงาน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 โรงงาน สำหรับกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายของโรงงานแต่ละโรงงานแต่ละแห่งย่อยใช้กรรมวิธีในการผลิตที่แตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยของความต้องการ ความพร้อมในด้านเงินทุน การจัดทำเครื่องจักรอุปกรณ์การผลิต ตลอดจนความสามารถในการจัดการ กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ ดังต่อไปนี้ (ฝ่ายพัฒนาเทคโนโลยีน้ำตาล, 2532 และ Barnes, 1974)

กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

1. การขนส่งอ้อยลงบนสะพานป้อนอ้อย โดยขนถ่ายอ้อยลงจากรถบรรทุก ซึ่งอ้อยที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะ, คุณภาพ และน้ำหนักอ้อย เทลงบนสะพานอ้อยโดยเครื่องขนถ่ายอ้อยแบบต่างๆ เช่น คราด หรือ แบบแท่นเทรถบรรทุกอ้อยระบบไฮโดรลิค แบบเครื่องกว้านหรือปั่นจั่น เมื่ออ้อยถูกถ่ายลงบนสะพานป้อนอ้อยแล้วจะผ่านเข้าเครื่องมือเตรียมอ้อยชนิดต่างๆ

2. การเตรียมอ้อยป้อนลูกหีบ เป็นการแปรรูปอ้อยให้ลูกหีบสามารถทำงานได้สะดวกและมีประสิทธิภาพ เครื่องมือในการเตรียมอ้อยชุดต่างๆ ได้แก่ มีดหนุนสับอ้อย ทำหน้าที่สับอ้อยและเกลี่ยให้ส่วนบนของกองอ้อยมีระดับต่ำลงและสม่ำเสมอกับการป้อนเข้ามีดสับชุดต่อๆ ไป ซึ่งทำหน้าที่ทอนอ้อยให้เป็นชิ้นเล็กลงไปตามลำดับก่อนเข้าเครื่องฉีกอ้อยให้เป็นท่อนเล็กลงไปตามลำดับก่อนเข้าเครื่องฉีกอ้อยให้เป็นฝอยละเอียดพอสมควร โดยการตีด้วยแท่งค้อน

3. การสกัดน้ำอ้อย เครื่องมือที่ใช้สกัดน้ำอ้อย ได้แก่ชุดลูกหีบที่ติดตั้งเป็นแถวต่อเนื่อง แถวที่หนึ่งอาจประกอบด้วยชุดลูกหีบ 4 – 7 ชุด ปกติชุดหนึ่งๆใช้ลูกหีบ 3 ลูก ในตำแหน่งชุดสามเหลี่ยม ลูกกลิ้งแต่ละลูกของชุดลูกหีบจะมีฟันและร่องผิวแนบต่างๆ กันโดยที่ทำหน้าที่ต่างๆ กัน คือ เพื่อช่วยจับยึดอ้อยที่ป้อนเข้ามา ช่วยสกัดและระบายน้ำอ้อยลงรางน้ำอ้อย และช่วยคายกากอ้อยจากชุดลูกหีบ กากอ้อยจะนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในเตาหม้อน้ำ โดยทั่วไปเครื่องหีบชุดแรกจะได้น้ำอ้อยประมาณร้อยละ 60 เครื่องหีบชุดต่อไปจะบีบคั้นน้ำอ้อยเพิ่มขึ้นอีก ทั้งนี้โดยการพรมน้ำให้พ่นลงบนอ้อยเมื่อผ่านลูกหีบหมดแล้วจะเหลือแต่เศษอ้อยหรือชานอ้อย (bagasse)

น้ำอ้อยรวมที่ผ่านตะแกรงแยกกากอ้อยแล้วจะถูกส่งไปเข้ากรรมวิธีทำน้ำอ้อยให้ใสต่อไป อย่างไรก็ตามระหว่างที่ทำการสกัดน้ำอ้อยจะต้องดูแลไม่ให้น้ำอ้อยสูญเสียปริมาตรโดยการรั่วไหลจากปั๊มหรือท่อส่งต่างๆ ตลอดจนมิให้เกิดการเสื่อมเสียคุณภาพเนื่องจากการทำลายน้ำตาล

จากจุลินทรีย์ ซึ่งประการหลังป้องกันโดยการรักษาความสะอาดบริเวณหน่วยลูกหีบ โดยการฉีดล้างด้วยไอน้ำ หรือใช้สารเคมีทำลายจุลินทรีย์ ที่อนุญาตให้ใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร

4. การทำอ้อยให้ใส เมื่อได้น้ำอ้อยจากการหีบมาแล้วจะเข้าสู่กรรมวิธีการทำให้ใส โดยปกติกรรมวิธีทำน้ำอ้อยให้ใส มี 3 วิธี

4.1 Defection method หมายถึงการแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยด้วยวิธีการตกตะกอนโดยให้ความร้อนแก่น้ำอ้อยและผสมกับน้ำปูนขาว น้ำตาลทรายดิบที่ได้จะไม่ใช้ในการบริโภคแต่จะใช้ในการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์

4.2 Sulphitation method หมายถึงการฟอกสีแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งได้จากการเผากำมะถัน

4.3 Carbonation method หมายถึงการฟอกสีแยกสิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อยด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งได้จากการฟลิวก๊าซ (flue gas) ในปล่องเตาหม้อไอน้ำที่ได้จากการเผาหินปูนกับถ่านโค๊ก (ฟลิวก๊าซ คือ ควันก๊าซที่ออกจากปล่องซึ่งได้จากการเผากากอ้อยจะมีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 9 – 12% ใช้ในการตกตะกอนเพื่อผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์)

น้ำตาลทรายขาวที่ได้จากการฟอกสีด้วยวิธี sulphitation จะใช้ปริมาณปูนขาวน้อยกว่าแบบ carbonation แต่ลักษณะสีของน้ำตาลจะด้อยกว่า ช่วงที่เปลี่ยนแปลงสีระหว่างการเก็บจะสั้นกว่าและ % recovery ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามน้ำตาลทรายขาวที่ผลิตจากทั้งสองวิธีใช้บริโภคได้โดยตรง แต่กรณีที่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้น้ำตาลทรายที่ได้จากกรรมวิธี carbonation มากกว่า เพราะมีสารตกค้างจากกระบวนการทางเคมีต่ำกว่า

5. การต้มน้ำอ้อยให้เป็นน้ำเชื่อม น้ำอ้อยใสที่ผ่านกรรมวิธีการทำให้ใสตามระบบต่างๆ เช่น sulphitation เมื่อผ่านก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลงในถังผสม (sulphitator) จะเกิดเป็นตะกอน calcium sulphite ทำการดูดซึมและดูดซับแยกสารที่เป็น สี, สิ่งสกปรกออกจากน้ำอ้อย แยกตะกอนออกแล้วเข้าขั้นตอนต่อไป ถ้าเป็นขบวนการจาก carbonation เปลี่ยนจากก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์แทน น้ำอ้อยใสที่ได้แยกตะกอนออกแล้วจะถูกส่งเข้าชุดหม้อต้ม ซึ่งอาจระเหยอย่างต่อเนื่องกันจนได้น้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นตามต้องการ หม้อต้มที่ใช้เป็นระบบ 4 ถึง 6 ชุด ซึ่งชุดหนึ่งๆ จะประกอบด้วยหม้อต้ม 1 ใบ หรือมากกว่า จากนั้นจึงถ่ายน้ำเชื่อมที่ได้ไปเก็บไว้ในถังพักน้ำเชื่อม

6. การต้มเคี่ยวน้ำเชื่อมให้เป็นผลึกน้ำตาล น้ำเชื่อมที่ได้จากข้อ 5 มีความเข้มข้น 60 – 65°บริกซ์ นำน้ำเชื่อมจากถังพักน้ำเชื่อมไปต้มเคี่ยวในหม้อเคี่ยวซึ่งให้ความร้อนต่ำภายใต้สูญญากาศ โดยทั่วไปการเคี่ยวน้ำเชื่อมให้เป็นผลึกน้ำตาลมีอยู่ 3 วิธี

6.1 วิธีเคี่ยวให้เกิดผลึกน้ำตาลขึ้นมาเอง ซึ่งจะต้องเคี่ยวจนกระทั่งความเข้มข้นของน้ำเชื่อมเพิ่มขึ้นจนถึงภาวะเหนือจุดอิ่มตัวสูงสุด แล้วจึงลดความเข้มข้นลงมาเลี้ยงผลึกน้ำตาลที่เกิดขึ้นจนได้ขนาดที่ต้องการ

6.2 วิธีกระตุ้นให้เกิดผลึกน้ำตาลอย่างฉับพลัน (shock seeding)

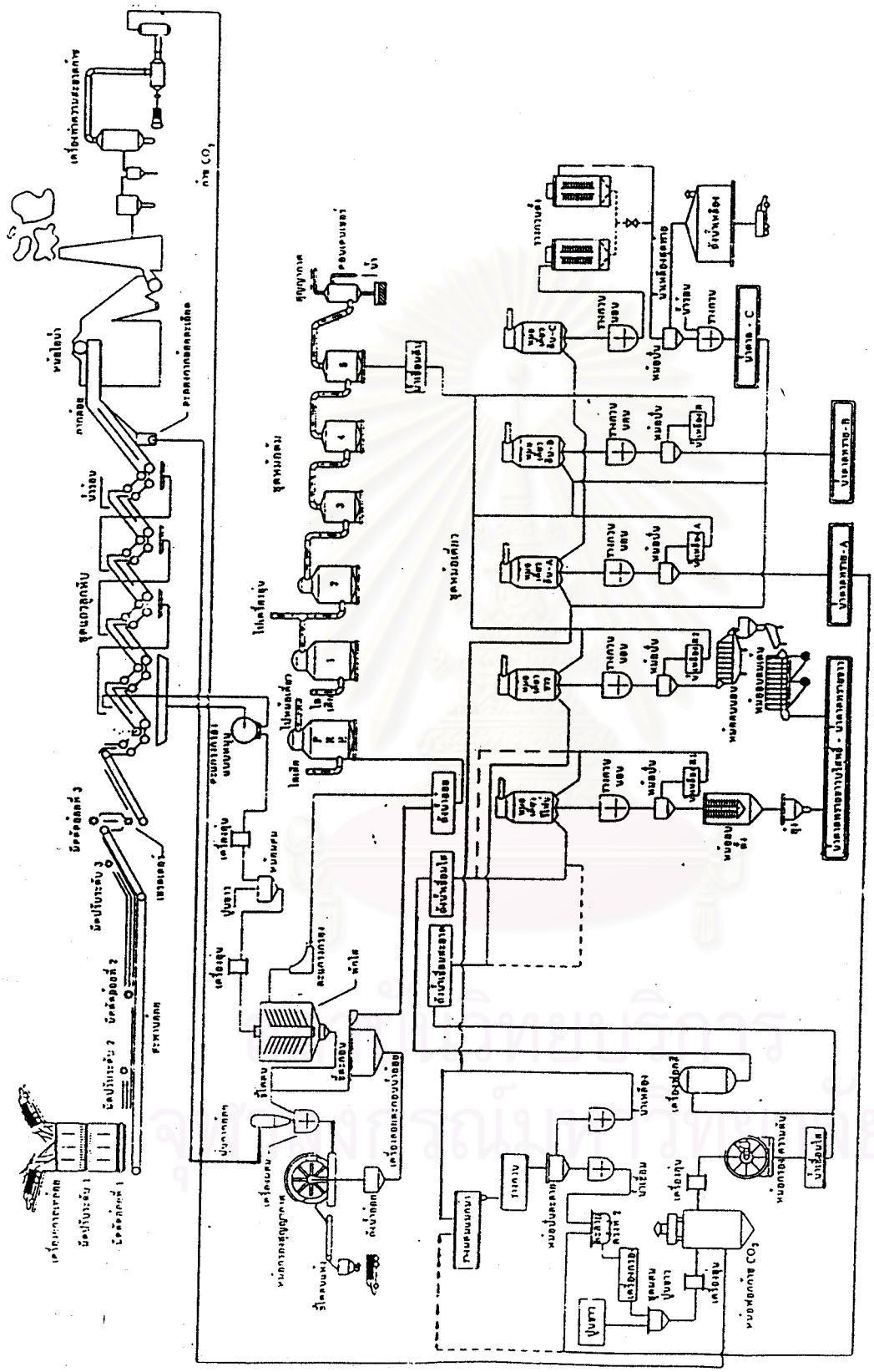
6.3 วิธีเติมหัวเชื้อผลึก (true seeding) ซึ่งได้จากการบดน้ำตาลทรายขาวในแอลกอฮอล์ หรือบางครั้งเรียกว่า wet seeding จนได้น้ำเชื่อมที่อยู่ในลักษณะเต็มไปด้วยผลึกน้ำตาล เรียกว่า แมสซิควิท (massecuite) ซึ่งจะมีน้ำเหลืออยู่ประมาณ 8 – 10% ความเข้มข้น 92 – 93 °บริกซ์

7. การเลี้ยงผลึกน้ำตาลทรายในถังพักผลึก เนื่องจากแมสซิควิทที่ปล่อยออกมาจากหม้อเคี่ยวประกอบด้วยผลึกน้ำตาลและน้ำเลี้ยงผลึก ซึ่งในน้ำเลี้ยงผลึกยังคงมีปริมาณน้ำตาลละลายอยู่มากพอที่จะตกผลึกออกมาอีก เมื่ออุณหภูมิของแมสซิควิทลดลง

ช่วงเวลาพักแมสซิควิท จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดและคุณภาพของแมสซิควิท เช่น กรณีที่เป็นน้ำตาลทรายขาวอาจจะไม่มีการพักเลี้ยงผลึกของแมสซิควิทเลยจะปล่อยลงรางกวน (mixer) เพื่อป้อนหม้อน้ำตาลโดยตรง ทั้งนี้เพราะความหนืดของน้ำเลี้ยงผลึกมีอัตราการตกผลึกสูง แต่ถ้าต้องการเก็บผลผลิตน้ำตาลทรายในขั้นนี้ให้สูงขึ้นก็จะมีการพักเลี้ยงผลึกประมาณ 2 – 4 ชั่วโมง เป็นต้น

8. การปั่นแยกผลึกน้ำตาลทรายในหม้อปั่น การแยกผลึกน้ำตาลทรายออกจากแมสซิควิทอาศัยการทำงานของหม้อปั่นน้ำตาลซึ่งมีหลายแบบ ตัวหม้อรับแมสซิควิททุกแบบจะทำด้วยโลหะมีรูที่ข้างหม้อเป็นแถวๆ สำหรับระบายกากน้ำตาลขณะปั่นทำงาน โดยกากน้ำตาลจะแยกตัวออกจากแมสซิควิทด้วยแรงหนีจุดศูนย์กลาง ทิ้งผลึกน้ำตาลให้ค้างอยู่บนตะแกรงหม้อปั่นแล้วลอดผ่านแผ่นโครงรองรับตะแกรง รวมตัวไหลออกจากช่องระบายน้ำตาลที่อยู่ข้างล่าง

9. การอบ บรรจุ และเก็บน้ำตาล น้ำตาลทรายที่ออกจากหม้อปั่น ปกติจะมีความชื้นอยู่ประมาณช่วง 1 – 2% ยกเว้นจะมีการใช้ไอน้ำอบไล่ความชื้นบางส่วนออก อย่างไรก็ตามถ้าปล่อยให้มีความชื้นอยู่กับผลึกน้ำตาลดังกล่าว น้ำตาลทรายที่ชื้นนี้จะเสื่อมคุณภาพเร็วและถูกทำลายโดยเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องมีการนำน้ำตาลทรายที่ออกจากหม้อปั่นแล้วไปผ่านหม้ออบน้ำตาลทรายก่อนจึงนำไปบรรจุและเก็บต่อไป



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของอ้อย และของแข็ง (Irvine, 1981)

อ้อยที่หีบ (Millable Cane)	ปริมาณ เปอร์เซ็นต์
น้ำ	73 – 76
ของแข็ง	24 – 27
ไพเบอร์แห้ง (Fiber dry)	11 – 16
ของแข็งที่ละลายได้ (Soluble Solids)	10 – 16
น้ำตาล (Sugar)	75 – 92
ซูโคส (Sucrose)	70 – 88
กลูโคส (Glucose)	2 – 4
ฟรุคโตส (Fructose)	2 – 4
เกลือ (Salts)	3.0 – 4.5
กรดอนินทรีย์ (Inorganic acid)	1.5 – 4.5
กรดอินทรีย์ (Organic acid)	1.0 – 5.5
กรดคาร์บอกซิลิก	1.1 – 3.0
กรดอะมิโน	0.5 – 2.5
อินทรีย์สารอื่นๆ ที่ไม่ใช่น้ำตาล	
โปรตีน (Protein)	0.5 – 0.6
แป้ง (Starch)	0.001 – 0.050
กัม (Gums)	0.30 – 0.60
แวกซ์ ไขมัน ฟอสฟาไทด์	0.05 – 0.15
สารอื่นๆ	3.0 – 5.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำอ้อย (Barnes, 1974)

องค์ประกอบอ้อย 100 กรัม	ปริมาณเฉลี่ย	หน่วย
พีเอชของอ้อยที่เจริญเต็มที่	5.18	
พลังงานอาหาร (food energy)	55.15	แคลอรี
ความชื้น (moisture)	84.95	เปอร์เซ็นต์
โปรตีน (protein)	0.345	กรัม
ไขมัน (fat)	0.20	กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate)	14.30	กรัม
เถ้า (ash)	0.30	กรัม
แคลเซียม (calcium)	12.0	มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส (phosphorus)	8.50	มิลลิกรัม
เหล็ก (iron)	0.55	มิลลิกรัม
โซเดียม (sodium)	2.00	มิลลิกรัม
โบตัสเซียม (potassium)	102	มิลลิกรัม
วิตามิน เอ (β-carotene equivalent)	ปริมาณเล็กน้อย	
วิตามิน บี 1 (thiamine)	0.01	มิลลิกรัม
วิตามิน บี 2 (riboflavin)	0.01	มิลลิกรัม
ไนอะซิน (niacin)	0.10	มิลลิกรัม
วิตามิน ซี (ascobic acid)	ปริมาณเล็กน้อย	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากข้อมูลสถิติย้อนหลังของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายในประเทศไทย พบว่ามีการขยายตัวการผลิตน้ำตาลในอัตราสูงมากจาก 2.22 ล้านตัน ในปีการผลิต 2525/26 เป็น 6.03 ล้านตัน ในปีการผลิต 2538/39 อีกทั้งมีการเพิ่มขึ้นของพื้นที่การปลูกอ้อยอย่างต่อเนื่องเช่นกัน ซึ่งในปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกอ้อยทั่วประเทศประมาณ 6.0 ล้านไร่ ดังตารางที่ 4 โดยปลูกมากในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ตามลำดับ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลสำรวจอ้อยและน้ำตาลทรายตั้งแต่ปีการผลิต 2525/26 – 2541/42

ปีการผลิต	พื้นที่ปลูก (ล้านไร่)	อ้อยเข้าหีบ (ล้านตัน)	น้ำตาล (ล้านตัน)
2525/26	4.08	23.92	2.22
2526/27	3.55	23.09	2.21
2527/28	3.81	25.05	2.47
2528/29	3.86	24.00	2.48
2529/30	3.46	24.44	2.54
2530/31	3.75	27.19	2.59
2531/32	4.13	36.67	2.90
2532/33	4.56	33.56	3.35
2533/34	5.28	40.44	3.83
2534/35	6.06	47.50	4.88
2535/36	6.04	34.71	3.62
2536/37	6.03	37.57	3.82
2537/38	5.64	50.46	5.27
2538/39	6.24	57.69	6.03
2539/40	6.00	56.19	5.82
2540/41	5.74	42.21	4.08
2541/42	5.91	50.06	5.19

ที่มา : อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายในประเทศไทย 2541/42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพื้นที่การปลูกอ้อย ทำให้การจัดการด้านวัตถุดิบต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนแรงงานในการเก็บเกี่ยว โดยปัจจุบันชาวไร่มีความจำเป็นต้องเผาอ้อยก่อนการตัดเพื่อเพิ่มความสะดวกและรวดเร็ว ซึ่งปัญหาอ้อยไฟไหม้เป็นปัญหาที่ใหญ่มากในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย และเป็นจุดเชื่อมโยงไปสู่การแข่งขันทางตลาดการค้าที่ต้องใช้มาตรฐานที่ว่าด้วยสิ่งแวดล้อม (ISO 14000) เป็นผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมของประเทศ เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ที่เกี่ยวข้อง และที่สำคัญที่สุดคือ ลดประสิทธิภาพการผลิตของโรงงาน

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณอ้อยสดและอ้อยไฟไหม้เข้าหีบตั้งแต่ปีการผลิต 2539/40 – 2542/43

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

ที่มา : รายงานการผลิตน้ำตาลทรายปีการผลิต 2542/43 ฝ่ายวิชาการและวางแผน ศูนย์บริการการผลิต สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลกระทบของอ้อยไฟไหม้ต่อประสิทธิภาพการผลิตของโรงงานน้ำตาล มีดังต่อไปนี้ คือ

1. การสูญเสียน้ำตาลในลำต้นอ้อย

ความร้อนในระหว่างการเผาอ้อย คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาทุกชนิดที่อยู่ในลำต้นของอ้อย รวมทั้งการแตกตัวของน้ำตาลซูโครส ทั้งนี้ถ้าอ้อยมีบาดแผลมาก ก็จะยิ่งเกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น และถ้าทิ้งเวลาไว้นานความร้อนระอุนาน การแตกตัวของน้ำตาลซูโครสก็มีมากขึ้นด้วย

2. เกิดการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ให้มีปรากฏในผลิตภัณฑ์

ในธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่ตามดิน และบาดแผลของอ้อย ส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นอาหารและสร้างเมือกหรืออื่นๆ เมื่อทำการเผาอ้อยจะทำให้เชื้อที่ไม่ทนร้อนหรือไม่สร้างสปอร์ก็จะถูกทำลาย เมื่ออ้อยเย็นตัวลง จุลินทรีย์ที่ทนอยู่ได้ก็จะเจริญได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพวกที่สร้างสปอร์หรือพวกที่ใช้น้ำตาลได้ดี จากการสำรวจ (กล้า ณรงค์ และ สิริวัฒนา, 2539) พบเชื้อที่สร้างสปอร์อยู่ในน้ำตาลทรายขาวจากโรงงานในประเทศในระดับต่างๆ กัน

3. เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการผลิต

หลังจากการเผาอ้อย จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายหมด ยกเว้นแต่จุลินทรีย์ที่ใช้น้ำตาลได้จำพวก *Leuconostoc* spp. ซึ่งได้แก่ *L. dextranicum* และ *L. mersenteroides* (Tsuchiya และคณะ, 1952) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอากาศร้อนชื้น จึงเพิ่มปริมาณได้สูง เมื่อเข้ามาในชุดลูกหีบก็จะใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารที่มีความเหนียวหนืด คือ เดกซ์แทรน มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว เดกซ์แทรนที่เกิดขึ้นนี้ จะทำให้เกิดสภาวะ purity drop ในระหว่างชุดลูกหีบ การต้มเคี่ยวช้ากว่าปกติ ผลึกน้ำตาลมีลักษณะเป็นเข็ม และการกรองทำได้ยากขึ้น ซึ่งสภาวะที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นสาเหตุทำให้ประสิทธิภาพการผลิตของโรงงานลดลงอย่างมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดกซ์แทรน (Dextran)

เดกซ์แทรน เป็นโฮโมโพลิเมอร์ของ ดี-กลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α–1,6 เป็นแกนหลักอาจมีการแตกแขนงออกเป็นพันธะ α–1,3 และ α–1,4 ได้ เกิดจากปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ซูโครสให้กลายเป็นกลูโคสและฟรุคโตส โดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลูโคซิลทรานเฟอเรส (glucosyltransferase, GTF) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Leuconostoc* spp. มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวนี้ จากนั้นกลูโคสแต่ละหน่วยจะถูกต่อเรียงกันเป็นสายโพลิเมอร์ของกลูโคสโดยมีกลไกการสังเคราะห์เดกซ์แทรน ตามรูปที่ 2

$$\text{n Sucrose} \xrightarrow{\text{Dextransucrase}} [\text{ D-glucose }]_n + \text{n fructose}$$

ซูโครส เดกซ์แทรน ฟรุคโตส

รูปที่ 2 ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจากเดกซ์แทรนซูเครส (Barnes, 1974)

เดกซ์แทรนที่สร้างขึ้นมีความยาวและขนาดโมเลกุลแตกต่างกันมาก คือตั้งแต่หลายพันขึ้นไปจนถึงหลายล้านดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนแขนงย่อยนี้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การแตกแขนง (branching) ของพันธะกลูโคสนี้จะลดคุณสมบัติการละลายน้ำ และทำให้เดกซ์แทรนมีลักษณะเหนียว ประกอบกับน้ำหนักโมเลกุลของเดกซ์แทรนสูงถึง 10^6 – 10^7 ดาลตัน ยิ่งทำให้เกิดลักษณะเหนียวหนืดและเกาะกับพื้นผิวต่างๆ เช่น ท่อส่งน้ำอ้อย ถัง เครื่องกรอง และอื่นๆ เกิดการอุดตัน เป็นผลให้อัตราการไหลของน้ำอ้อยต่ำลง การถ่ายเทความร้อนลดลง การต้มระเหยน้ำได้ช้า การเคี่ยวน้ำตาลก็ทำได้ช้าเช่นกัน นอกจากนี้เดกซ์แทรนโมเลกุลใหญ่ๆ ก็จะไปเปลี่ยนแปลงกระบวนการการตกผลึกของน้ำตาลทำให้รูปร่างผิดแปลกไปจากเดิมกลายเป็นรูปร่างแหลมคล้ายเข็ม (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2540) อีกทั้งคุณสมบัติความหนืดเหนียวของเดกซ์แทรนนี้ยังทำให้แบคทีเรียอื่นๆที่ปนเปื้อนมาในน้ำอ้อยจะถูกจับไว้ด้วย แบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารได้และปล่อยกรดอินทรีย์หลายชนิดออกมา เช่น กรดแลคติค กรดบิวทิริค เป็นต้น กรดอินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ความเป็นกรดของน้ำอ้อยเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว สำหรับฟรุคโตสที่เหลืออยู่ก็อาจสลายตัวเป็นกรดอินทรีย์และสารประกอบที่มีสีขึ้น การเกิดผลึกของน้ำตาลทรายช้าลงหรือไม่สมบูรณ์ (สันต์ ฉายตระกูล, 2525)

จากปัญหาดังกล่าวมาข้างต้น พอจะสรุปปัจจัยที่ก่อให้เกิดปัญหาได้ 3 ประการ ดังนี้ เชื้อแบคทีเรีย น้ำตาลซูโครส และเดกซ์แทรน การแก้ปัญหาในโรงงานน้ำตาลจึงอาจทำได้โดยการกำจัดปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง เช่นการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน (sterilization) หรือเติมสารกำจัดแบคทีเรีย (bacteriocide) ลงไป แต่ในทางปฏิบัติยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร โดยในกรณีแรกต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ส่วนในกรณีหลังทำให้น้ำตาลที่ได้มีรสชาติหรือมีสีเปลี่ยนไป วิธีที่สาม คือ การนำอ้อยที่ตัดแล้วเข้าแปรรูปเป็นน้ำตาลทรายทันที แต่เป็นการยากที่จะทำการแปรรูปได้หมดทุกๆวันเพราะวัตถุดิบที่เข้ามามีปริมาณมากกว่าความสามารถในการผลิตได้ในแต่ละวันจึงมีการค้างของวัตถุดิบ วิธีที่สี่ คือ การควบคุมปริมาณเดกซ์แทรนในระบบ ทำได้ 2 วิธี (Imrie และ Tibury, 1972) ด้วยกัน คือ

1. การป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย โดยอาศัยข้อเท็จจริงที่ว่าเดกซ์แทรนเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนของ *Leuconostoc mersenteroides* และ *Leuconostoc dextranicum* ดังนั้นการป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนจำเป็นต้องกำจัดที่ต้นเหตุ เช่น

1.1 การใช้วิธีทางกายภาพ คือการป้องกันน้ำอ้อยบูดเน่าด้วยการควบคุมสภาวะแวดล้อมทางกายภาพ เพื่อหยุดการเจริญของเชื้อ เช่น การเก็บที่อุณหภูมิต่ำ การใช้ความร้อน การควบคุมความเป็นกรดด่างของน้ำอ้อย และการควบคุมปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ได้ (water activity) และการฉายรังสี เป็นต้น แต่วิธีทั้งหมดล้วนเป็นวิธีที่ใช้ได้ผลในระดับห้องปฏิบัติการ จึงไม่ประสบผลสำเร็จในการนำไปใช้จริง

1.2 การใช้วิธีทางเคมี ได้แก่ การใช้สารเคมีฆ่าหรือยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocide หรือ bacteriostatic) กับต้นอ้อย ดินที่ปลูก หรือใช้กับเครื่องมือที่ใช้ในการตัดอ้อย แต่วิธีนี้อาจมีสารเคมีตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

2. การกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อย ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

2.1 การสลายด้วยกรดร่วมกับความร้อน (Monsan และ Paul, 1991) แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เกิดการตัดโมเลกุลเดกซ์แทรนแบบสุ่ม (random) และอาจทำให้เกิด sucrose inversion ได้

2.2 การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic wave) (Watson และ Woff, 1955) นอกจากนี้อาจใช้วิธีทางกาพภาย เช่น อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) ไดอะไลซิส (dialysis) และรีเวอร์สออสโมซิส (reverse osmosis) แต่วิธีการเหล่านี้ไม่นิยมเนื่องจากมีราคาแพงไม่คุ้มกับการลงทุน

อย่างไรก็ตาม วิธีการที่น่าสนใจและมีความเหมาะสมวิธีหนึ่งในปัจจุบันนี้ คือ การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (Dextranase, E.C.3.2.1.11) ซึ่งข้อดีของการใช้เอนไซม์มีดังนี้ คือ เป็นปฏิกิริยาทางเอนไซม์ที่จำเพาะต่อเดกซ์แทรนสูง ปฏิกิริยาเกิดในสภาวะที่ไม่รุนแรง (อุณหภูมิ, ความเป็นกรดด่าง) มีความเป็นพิษต่ำ และใช้ปริมาณน้อยแต่ได้ผลสูง (Imrie และ Tilbury, 1972)

เดกซ์แทรนเนส

เดกซ์แทรนเนส เป็นเอนไซม์ที่มีชื่อเรียกตามระบบว่า E.C.3.2.1.11 , α–1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase มีความจำเพาะเจาะจงต่อการสลายพันธะ α–1,6 ภายในสายเดกซ์แทรน ทำให้เดกซ์แทรนมีขนาดเล็กลงและคุณสมบัติความหนืดเหนียวก็ลดลงด้วย (Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991) พบว่าหากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาดของกลูโคสต่ำกว่า 8 หน่วยแล้ว เดกซ์แทรนจะสูญเสียคุณสมบัติความหนืดเหนียวทั้งหมด

เดกซ์แทรนเนสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งในแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีส ดังแสดงในตารางที่ 6 นอกจากนี้ยังพบในพืชชั้นสูง และเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด พบว่าเชื้อราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในเชิงพานิชย์ (Sidebotham, 1974) เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเท่าที่มีการรายงานนั้น เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยต้องอาศัยสารชักนำ (inducible enzyme) ซึ่งก็คือ เดกซ์แทรน และถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Koenig และ Day, 1989) เอนไซม์นี้สามารถย่อยเดกซ์แทรน ได้สองแบบ คือ

1. Exo - spliting dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่เชื่อมโมเลกุลของกลูโคสจากปลายของสายเดกซ์แทรนด้านใดด้านหนึ่ง เป็นการตัดทีละโมเลกุลของกลูโคส

2. Endo - spliting dextranase เป็นเดกซ์แทรนเนสที่ย่อยสลายพันธะที่จุดใดจุดหนึ่งในสายเดกซ์แทรนทำให้ได้สายโพลิเมอร์น้ำตาลสั้นๆ ผลการย่อยเดกซ์แทรนเป็นสายสั้นๆ ทำให้โมเลกุลลดลง มีผลทำให้สมบัติความเหนียวหนืดลดลงตามไปด้วย ซึ่งเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อราโดยทั่วไปพบว่า จะมีการย่อยสลายแบบ Endo สายเดกซ์แทรนที่ถูกย่อยแล้วจะมีขนาดเล็กลง มักพบอยู่ในรูปของ โอลิโกเมอร์ ไดเมอร์ หรือโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส แต่ส่วนมากอยู่ในรูปของน้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose)

ตารางที่ 6 เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
รา ได้แก่	
Aspergillus sp.	(Foxgarty และ Kelly, 1984)
	(Godfrey และ Reichelt, 1983)
A. carneus	(Hirsoka และคณะ, 1972)
Chaetomium gracile	(Hattori และ Ishibashi, 1981)
	(Hattori และคณะ, 1981)
Gilberella fujikuroi	(Hattori และ Ishibashi, 1981)
Penicillium funicolosum	(Abdel-Naby และคณะ, 1999)
	(Sugiura และ Ito, 1974)
	(Kosaric และคณะ, 1973)
	(Chaiet และคณะ, 1970)
P. lilacinus	(Galves-Mariscal และ Lopez-Munguia, 1991)
P. luteum	(Tsuru และคณะ, 1971)
P. verruculosum	(Tchuchiya และคณะ, 1952)
	(Wheatley และ Moo-Young,1977)
P. aculeatum	(Madhu และ Prabhu, 1984)
P. notatum	(Szczodrak และคณะ, 1994)
Penicillium sp. strain 61	(เอก แสงวิเชียร, 2531)
Penicillium sp. SMCU 3 - 14	(สุวรรณา นพพรพันธุ์, 2538)
Verticillium sp.	(Tchuchiya และคณะ, 1952)
	(Foxgarty และ Kelly, 1984)
ยีสต์ ได้แก่	
Lipomyces stakeyi	(Webb และ Spencer-Martins, 1983)
	(Koenig และ Day, 1988)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
แอคติโนมัยซีตีส ได้แก่	
Actinomyces israelrii	(Staat และ Schachtele, 1974)
	(Staat และคณะ, 1973)
Streptomyces cinamonensis	(Staat และ Schachtele, 1974)
แบคทีเรีย ได้แก่	
Achromobacter sp.	(Foxgarty และ Kelly, 1984)
Bacillus sp.	(Zevenhuizen, 1968)
Bacteroides sp.	(Baily และ Clark, 1959)
Brevibacterium sp.	(Yamaguchi และ Gocho, 1973)
Cytophaga johnsonii	(Foxgarty และ Kelly, 1984)
Flavobacterium sp.	(Kobayashi และคณะ, 1983)
Lactobacillus bifidus	(Foxgarty และ Kelly, 1984)
Micrococcus sp. strain Z - 10	(ณฐินี สุวรรณสิงห์, 2533)
Streptococcus mitis	(Staat และ Schachtele, 1974)
Thermophilic bacterium, Rt364.	(Wynter และคณะ,1997)

จากปัญหาที่เกิดขึ้นภายในโรงงานอุสาหกรรมผลิตน้ำตาล อันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนนั้น จึงได้มีบริษัทผู้ผลิตหลายราย ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสออกมาในรูปเชิงทางการค้าเพื่อนำไปใช้แก้ไขปัญหาดังกล่าว ทั้งนี้เพราะเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีความจำเพาะสูง และไม่ก่อให้เกิดปัญหาอื่นๆ ตามมาในขั้นตอนการผลิต ดังตัวอย่างเช่น

Dextranex™ L - 4000 ของบริษัท Solvey ASIA PACIFIC ประเทศสิงคโปร์ (Solvey, 1996)

Dextranase 25 L และ 50 L ของบริษัท NOVO ประเทศเดนมาร์ก (NOVO, 1983)

Talozyme ของบริษัท Tate and Lyte ประเทศอังกฤษ (Inkerman, 1980)

Glucanase D-1 ของบริษัท Pfizer ประเทศสหรัฐอเมริกา (Tilbury, 1974)

และได้มีการทดลองนำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเหล่านี้ไปใช้แก้ไขปัญหาที่เกิดจากเดกซ์แทรนในโรงงานผลิตน้ำตาลของประเทศต่างๆ เช่น ออสเตรเลีย, จาไมก้า, เปอร์โตริโก้, อินเดีย และบางประเทศในแถบทวีปอเมริกาใต้

Jolly และ Prakash (1987) ศึกษาในประเทศอินเดีย ทดลองใช้ NOVO Dextranase 25 L กำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อย โดยใช้ปริมาณ 100 ppm ที่อุณหภูมิ 60 °ซ และเวลา 15 นาที สามารถกำจัดเดกซ์แทรนออกไปได้ร้อยละ 48 – 52 และถ้ามีการต้มที่ 100 °ซ หลังจากการกรองจะสามารถกำจัดเดกซ์แทรนได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 61 – 85

Tilbury (1974) ทำการศึกษาในหมู่เกาะเวสต์อินดีสต์ พบว่าเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 3 หน่วยต่อน้ำอ้อย 100 มล. สามารถกำจัดเดกซ์แทรน 68.5% ภายในเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในแต่ประเทศ ความรุนแรงและการกำจัดไม่เท่ากัน มีอัตราที่เรียกว่า dextran hydrolyzed / minute / unit ต่างกันไป คำนวณค่าใช้จ่ายเท่ากับ 1.0 – 1.5 เหรียญสหรัฐต่อการผลิตน้ำตาล 1 ตัน

Fulcher (1974) และ Inkerman (1980) รายงานถึงการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. ในรัฐ Queenland ประเทศออสเตรเลีย ถ้าเพิ่มการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเป็น 8 หน่วยต่อ 100 มล.น้ำอ้อย แทน 3 หน่วยต่อ 100 มล. ตามการรายงานของ Tilbury แล้ว จะช่วยเพิ่มปริมาณและคุณภาพของน้ำตาลได้ และรายงานเพิ่มเติมอีกว่า การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสทางการค้า 2 ชนิด คือ Glucanase D-1 และ NOVO Dextranase กับ Dextran T-2000 อัตราการย่อยสลายเดกซ์แทรนจะลดลง เมื่อมีเดกซ์แทรนเกินกว่า 4,000 ppm แต่ถ้ามีเดกซ์แทรนต่ำจะมีผลเพียงอัตราการย่อยสลายเท่านั้น แต่เนื่องจากเอนไซม์ในเชิงการค้าทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติแตกต่างกันในแง่ของความเป็นกรดด่าง, อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ จึงเป็นปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึงในการใช้เอนไซม์แต่ละชนิด

Inkerman (1980) รายงานการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในประเทศออสเตรเลียว่ามีประโยชน์มากในกรณีที่อ้อยได้รับความเสียหายก่อนเข้าหีบ โดยการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 5 – 10 หน่วย ในสภาวะการผลิตปกติ ถ้าสามารถย่อยสลายเดกซ์แทรนให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ก็ถือว่าเป็นการเพียงพอที่จะขจัดความเสียหายอันเนื่องมาจากเดกซ์แทรนได้ โดยไม่ต้องรอให้เกิดการย่อยสลายอย่างสมบรูณ์ ซึ่งการย่อยสลายในระดับนี้เพียงพอที่จะลดการเกิดผลึกน้ำตาลรูปเข็มลงได้ อย่างไรก็ตามเขาได้เสนอว่า ถ้ามีเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 °ซ เนื่องจากปัจจุบันเดกซ์แทรนในรูปเชิงการทางค้าเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 °ซ สำหรับ

ค่าใช้จ่ายของเอนไซม์เมื่อคิดถึงปริมาณน้ำตาลที่ต้องสูญเสียไปในรูปเดกซ์แทรนและกากน้ำตาลแล้ว เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสก็จะทำให้ผลกำไรที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

Inkerman และ Jame (1976)ใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่มีชื่อทางการค้าว่า Glucanase D -1 ย่อยสลายเดกซ์แทรนได้ 95 – 97% แต่เนื่องจากมีราคาแพง จึงเป็นข้อจำกัดในด้านการใช้งานอีกประการหนึ่ง

จากเอกสารแนะนำการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของบริษัท Solvey ASIA PACIFIC (1996) ได้ทำการศึกษาพบว่าถ้ามีเดกซ์แทรนมากกว่า 100 มก.ต่อน้ำอ้อย 100 มล. จะพบว่ามีเดกซ์แทรนโมเลกุลสูงเป็นจำนวนมากเพิ่มความเหนียวของสารละลายน้ำตาลทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (refining process) ทำได้ยากขึ้น และยังมีผลกระทบเป็นลูกโซ่ไปยังขั้นตอนอื่นๆ เช่น อัตราการกรองลดลง เนื่องจากเดกซ์แทรนไปเกาะที่แผ่นกรองทำให้อุดตันและต้องเปลี่ยนแผ่นกรองบ่อยๆ อัตราการต้ม (boiling rate) การเกิดผลึกน้ำตาล การระเหยน้ำ การสูญเสียซูโครสไปในรูปของเดกซ์แทรนและกลูโคสในกากน้ำตาล ผลผลิตของน้ำตาลต่อตันอ้อยลดลงถ้ามีเดกซ์แทรนมากอาจถึงขั้นต้องปิดโรงงานทำความสะอาดหน่วยการผลิตอื่นๆได้ เดกซ์แทรนเนสนี้ผลิตจาก *Chaetomium gracile* var. Dextranex L - 4000 สายพันธุ์นี้ทางสหรัฐอเมริกา ยินยอมให้ใช้ในอุตสาหกรรมทางอาหาร และไม่มี invertase ซึ่งสามารถทำลายน้ำตาลได้ เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีภาวะที่เหมาะสมคือ ความเป็นกรดด่างที่ 5.0 – 5.5 อุณหภูมิที่ 50 – 60 °ซ 10°บริกซ์ เอนไซม์จากเชื้อนี้สามารถใช้ในโรงงานน้ำตาลได้ดี เนื่องจากสามารถทนอุณหภูมิสูงและปลอดภัยต่อผู้บริโภคอีกด้วย

จากเอกสารแนะนำการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของบริษัท NOVO (1983) ได้เสนอว่าควรใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสกำจัดเดกซ์แทรนในช่วงแรกของการผลิตโดยการเติมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสลงไปในน้ำอ้อยดิบหรือระหว่างการหีบ หรือหลังจากหีบแล้วจะเป็นช่วงที่ดีที่สุด แต่การเติมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสก็อาจจะทำได้ในช่วงขั้นตอนการทำให้ใส (clarification) หรือในช่วงต้มระเหยน้ำอ้อย โดยการเติมเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส 5 กรัม ต่อตันน้ำอ้อย ภายใต้ภาวะที่มีเดกซ์แทรน 10,000 ppm น้ำตาล 20 °บริกซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาที จะลดปริมาณเดกซ์แทรนลงได้ถึง 90% ส่วนภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส คือ ช่วงอุณหภูมิ 50 – 55 °ซ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 – 5.5 ระยะเวลาของการทำงานไม่ควรเกิน 30 นาที

เมื่อคำนึงถึงข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในโรงงานผลิตน้ำตาล คือ การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์จะใช้ได้เพียงครั้งเดียว ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ อีกทั้งราคาที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมีผู้พยายามคิดค้นหาวิธีการใช้เอนไซม์อย่างคุ้มค่า วิธีการหนึ่งที่น่าสนใจและกำลังเป็นที่นิยมกันในปัจจุบัน คือ การตรึงรูปเอนไซม์

การตรึงรูปเอนไซม์ (Enzyme Immobilization)

การตรึงรูปเอนไซม์ หมายถึง การจำกัดเขตเอนไซม์ให้อยู่ในขอบเขตที่กำหนดให้ แต่ยังคงคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตามระบบการสร้างเอนไซม์ตรึงรูปนั้น (Wang และคณะ,1979) อีกทั้งยังได้มีการพบว่าเอนไซม์ตรึงรูป มีสมบัติที่ดีขึ้นหลายประการ ได้แก่

1. สามารถแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากสิ่งแวดล้อมที่เกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ง่าย
2. สามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ได้อีก
3. กระบวนการผลิตที่ใช้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำในระบบต่อเนื่องได้
4. เอนไซม์บางชนิดหลังจากการตรึงรูปแล้ว จะมีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability), การเก็บรักษา (storage), ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate specificity), ความไวต่อการตอบสนองต่อตัวยับยั้ง (sensitivity of inhibitor), อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น

วิธีการตรึงรูปเอนไซม์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตาม Chibata (1978) แสดงดังรูปที่ 3 และมีรายละเอียด ดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 วิธีการตรึงรูปเอนไซม์

1. การตรึงรูปเอนไซม์กับตัวพยุง
สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

1.1 การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงโดยหลักการดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption)

การดูดซับกับตัวพยุงนั้นเกิดขึ้นกับแรงดึงดูดได้หลายแบบ เช่น พันธะเชิงไอออน พันธะไฮโดรเจน แรงวันเดอร์วาล วิธีนี้ดีในแง่ที่เกิดการตรึงรูปง่ายไม่ซับซ้อน และภาวะการตรึงไม่รุนแรง แต่แรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงไม่ค่อยแข็งแรง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation) ของเอนไซม์ และเกิดความเสียหายกับเอนไซม์น้อย สามารถนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่ได้อีก ซึ่งเอนไซม์จะถูกชะออกจากตัวพยุงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง

1.2 การตรึงเอนไซม์กับตัวพยุงโดยอาศัยพันธะไอออนิค (Ionic binding)

พันธะไอออนิคเป็นพันธะเคมีที่เกิดจากอะตอม 2 อะตอม รวมกันโดยถ่ายเท (transfer) อิเลคตรอนจากอะตอมหนึ่งไปยังอีกอะตอมหนึ่ง พันธะไอออนิคเป็นพันธะที่เกิดง่าย ดังนั้นจึงมีผลต่อการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์น้อย แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอ่อน เอนไซม์สามารถหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของสารละลาย หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงความแรงของพันธะ ฉะนั้นการรักษาค่าพีเอชของสารละลายและความแรงของพันธะให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้

1.3 การตรึงรูปเอนไซม์กับตัวพยุงโดยอาศัยพันธะโควาเลนท์ (Covalent binding)

การตรึงวิธีนี้เกิดจากการเชื่อมระหว่างกลุ่มฟังก์ชันนัลบนตัวพยุงกับเอนไซม์ เกิดปฏิกิริยาเชื่อมกันเป็นพันธะโควาเลนท์ใหม่ บางครั้งจะนำตัวพยุงมากระตุ้นโดยเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ต่างๆ การเชื่อมเอนไซม์ติดกับตัวพยุงจะพยายามเชื่อมโดยใช้กลุ่มฟังก์ชันนัลของเอนไซม์ที่ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาการเร่งด้วยเอนไซม์ แต่บางครั้งก็ควบคุมไม่ได้ เพราะเกิดการเชื่อมแบบสุ่ม เอนไซม์มักมีอายุการใช้งานยาวนานกว่าวิธีการตรึงแบบอื่นๆ

2. การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมโยงโดยใช้สารไบฟังก์ชันนัล

การตรึงวิธีนี้ทำโดยใช้สารไบฟังก์ชันนัลซึ่งทำหน้าที่ตรึงรูประหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ ทำให้เกิดเป็นอนุภาคใหญ่ขึ้น วิธีการตรึงแบบนี้จะเกิดขึ้นง่าย ไม่ค่อยซับซ้อน สามารถควบคุมสมบัติทางกายภาพและขนาดของอนุภาคที่ตรึงได้ แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ เอนไซม์จะเสียแอคติวิตีไปในกระบวนการตรึงรูปด้วยสารพวกนี้ จึงมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน แต่ก็มีสารไบฟังก์ชันนัลตัวหนึ่ง คือ กลูตารัลดีไฮด์ (Taylor, 1991) นิยมนำมาใช้ตรึงรูป ซึ่งปฏิกิริยาการตรึงรูปนี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ และสามารถคงทนอยู่ได้ในสภาพความเป็นกรดด่างหรืออุณหภูมิที่รุนแรง

รูปที่ 4 การเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ (Crueger และ Crueger, 1991)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีดักจับเอนไซม์ไว้ภายใน (Entrapment)

วิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

3.1 การจำกัดเขตเอนไซม์ในตัวพยุง (Lattice type)

เป็นการกักขังเอนไซม์ไว้ในโพรงของเจล เกิดจากการโฟลิเมอไรเซชั่นของเจลในสารละลายที่มีเอนไซม์อยู่ ได้เป็นโครงสร้างของเจลที่ขังเอนไซม์ให้อยู่ตามโพรงในโครงสร้างของเจลเหล่านั้น

3.2 การจำกัดเขตเอนไซม์ในแคปซูลขนาดเล็ก (Microcapsule type)

เป็นการตรึงรูปเอนไซม์ในลูกทรงกลมผนังบางแบบกึ่งซึมผ่านได้ (semipermeable membrane) ผนังบางนี้จะไม่ยอมให้เอนไซม์ที่ถูกกักขังไว้ภายในซึมผ่านออกมา แต่จะยอมให้สับสเตรทและผลิตภัณฑ์ซึมผ่านได้

แม้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์จะมีวิธีการเตรียมได้หลายวิธี แต่ไม่มีวิธีการเตรียมใดที่จะสามารถนำมาใช้ได้กับเอนไซม์ทุกชนิดและทุกกรณี เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความความแตกต่างกันทางด้านองค์ประกอบของโครงสร้างและสมบัติทางเคมี รวมทั้งความแตกต่างของสับสเตรทและสารผลิตภัณฑ์ วิธีการตรึงเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น จะต้องทำการทดลองเพื่อให้ได้วิธีที่ให้ประสิทธิภาพในการตรึงที่ดี รักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้มากที่สุดและมีความคงตัวระหว่างการใช้งาน พร้อมทั้งต้องเป็นวิธีที่สะดวกและมีต้นทุนต่ำ ซึ่งได้เปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีต่างๆ ดังตารางที่ 7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการต่างๆ (Kennedy และ Cabral, 1987)

ข้อเปรียบเทียบ	เทคนิคการตรึงเอนไซม์				
	เชื่อมโยง	ดูดยึดทางกายภาพ	ดูดยึดด้วยพันธะไอออนิค	ดูดยึดด้วยพันธะโควาเลนท์	ดักจับ
1. วิธีการเตรียม	สะดวก	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
2. การยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง	แข็งแรง	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	ปานกลาง
3. การนำตัวพยุงกลับมาใช้ใหม่	ไม่ได้	ได้	ได้	ได้ในบางกรณี	ไม่ได้
4. ต้นทุนในการตรึง	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ	สูง
5. ความคงตัวของเอนไซม์ตรึงรูป	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	ปานกลาง
6. การประยุกต์ใช้งาน	ไม่ได้	ได้	ได้	ไม่ได้	ได้
7. ป้องกันการสลายตัวของเอนไซม์จากจุลินทรีย์	ได้บางครั้ง	ไม่ได้	ไม่ได้	ไม่ได้	ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวพยุงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์

องค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์, ตัวพยุง, วิธีการที่ทำให้เอนไซม์ดูดยึดกับตัวพยุงหรืออยู่ภายในตัวพยุง วัสดุที่ใช้เป็นตัวพยุงมีความสำคัญมากต่อแอคติวิตีและความคงตัวของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม ตัวพยุงที่ดีควรมีลักษณะดังนี้ คือ เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ มีพื้นผิวมากเพื่อใช้สำหรับการดูดยึดของเอนไซม์ มีการซึมผ่านได้ของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ โมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) มีความคงตัวต่อสารเคมี ความร้อนและแรงกระแทก มีรูปร่างที่พอเหมาะ มีความต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์และสามารถนำกลับคืนมาใช้ใหม่ได้ การจัดแบ่งชนิดของตัวพยุง สามารถแบ่งตัวพยุงตามลักษณะทางกายภาพหรือแบ่งตามสมบัติทางเคมี ได้ดังนี้

ชนิดของตัวพยุงแบ่งตามลักษณะทางกายภาพได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ตัวพยุงที่ไม่มีรูพรุน เมื่อใช้ตัวพยุงที่ไม่มีรูพรุนมาตรึงเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีโอกาสถูกดูดยึดไว้ได้ในขอบเขตที่จำกัด ซึ่งเฉพาะที่ผิวของตัวพยุงเท่านั้น แต่มีข้อดีคือ สับสเตรทสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้โดยง่าย เนื่องจากเอนไซม์ถูกยึดไว้ที่บริเวณผิวรอบนอกของตัวพยุง

2. ตัวพยุงที่มีรูพรุน ตัวพยุงชนิดนี้มีพื้นที่ผิวสำหรับให้เอนไซม์เกาะหรือดูดยึดมากขึ้นเมื่อเทียบในปริมาณ 1 หน่วยน้ำหนักกับตัวพยุงที่ไม่มีรูพรุน ดังนั้นตัวพยุงที่มีรูพรุนสามารถดูดยึดเอนไซม์ไว้ได้มากกว่า แต่มีข้อเสียเนื่องจากพื้นที่ภายในรูพรุนที่เอนไซม์ถูกตรึงนั้น จะต้องมีขนาดของรูพรุนใหญ่เพียงพอสำหรับให้โมเลกุลของสับสเตรทผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้และในขณะเดียวกันจะต้องให้สารผลิตภัณฑ์ผ่านออกได้สะดวก

ชนิดของตัวพยุงแบ่งตามสมบัติทางเคมีได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ตัวพยุงที่เป็นสารอินทรีย์ ตัวพยุงที่เป็นสารอินทรีย์นั้นมีข้อได้เปรียบกว่าในการใช้งานทางอุตสาหกรรม ทั้งนี้สารอินทรีย์มีกลุ่มฟังก์ชัน (function group) จำนวนมาก ที่สามารถตรึงเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ตัวพยุงอินทรีย์มีข้อเสียเนื่องจากสมบัติทางกายภาพที่ทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยตัวพยุงที่เป็นสารอินทรีย์นี้ มีการสูญเสียความคงตัวได้ง่ายเมื่อได้รับการกระทบจากความร้อน สารเคมีและจุลินทรีย์ เป็นต้น

2. ตัวพยุงที่เป็นสารอนินทรีย์ ตัวพยุงที่เป็นสารอนินทรีย์มีความเหมาะสมหลายประการในการใช้งานทางอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความคงทนต่อแรงกระแทก, ทนต่อความร้อน

สารเคมี, ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์, ง่ายต่อการเก็บรักษา, มีอายุของการใช้งานนาน และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีกโดยง่าย นอกจากนี้ตัวพยุงอนินทรีย์ยังมีรูปร่างคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง ความดันหรืออุณหภูมิก็ตาม ตัวพยุงมีเพียงหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) เท่านั้นที่จะทำการดูดยึดเข้ากับปลายด้านที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (carboxy group) หรือหมู่อะมิโน (amino group) ของเอนไซม์ด้วยการดูดซับ (adsorp) หรือระหว่างอิออน และจะไม่เกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงที่เป็นสารอนินทรีย์ (Kennedy และ Cabral, 1987)

มีรายงานหลายฉบับที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยใช้วิธีการตรึงแบบต่างๆ กัน และมีการใช้วัสดุที่ทำหน้าที่เป็นตัวพยุงแตกต่างกันไปด้วย แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสยังไม่เป็นที่แพร่หลายกันมากนัก ซึ่งพอที่จะรวบรวมไว้ได้แสดงดังตารางที่ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์	ตัวพยุงที่เลือกใช้	สารเคมีช่วยตรึง	เอกสารอ้างอิง
Penicillium funiculosum	Sepharose 4 B	Cyanogen bromide	Suguira และ Ito (1974)
Brevibacterium fuscum var. *dextranolyticum*	Sepharose 4 B	Cyanogen bromide	Suguira และ Ito (1975)
-	Porous titanium (IV) oxide	Ammonia	Kennedy และ Kay (1977)
-	Porous titanium (IV) oxide	Diazotised 1,3-diamino benzene	Kennedy และ Kay (1977)
-	Zircinia coated alkylamine glass	Glutaraldehyde	Ramesh และ Singh (1980)
Penicillium aculeutum	Bentonite	-	Madhu และ Prabhu (1985)
Penicillium notatum	Silanised porous glass	Glutaraldehyde	Rogalski และคณะ (1997)
Penicillium funiculosum	Chitosan	Glutaraldehyde	Abdel-Naby และคณะ (1999)
Penicillium sp. strain 61	Silanised activated carbon	Glutaraldehyde	อุษณีย์ กุลินทร-ประเสริฐ (2535)
Penicillium sp. SMCU 3-14	Calcium alginate	-	นุสรา เจริญกิจทวี (2539)

- หมายถึง ไม่มีการรายงานไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรายงานของ นุสรา เจริญกิจทวี (2539) ได้เคยตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. SMUC 3-14 แบบล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งการเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์ดังกล่าวนั้น ไม่เหมาะที่นำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมเนื่องจากราคาต้นทุนในการตรึงเอนไซม์ค่อนข้างสูงเพราะว่าอัลจิเนตมีราคาแพง นอกจากนี้ขั้นตอนในการตรึงมีข้อจำกัดมากมาย ยิ่งไปกว่านั้นวิธีการตรึงแบบนี้ไม่เหมาะที่จะใช้กับสับสเตรตที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น เดกซ์แทรน เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาวิธีการตรึงที่เหมาะสม สำหรับตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ที่สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2528) ทำการกลายพันธุ์แล้วให้ผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้สูง และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง บนตัวพยุงที่มีราคาถูก ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ทราย เนื่องจากทรายเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายภายในประเทศ มีราคาถูกและมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลโดยไม่ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการผลิตมากนัก พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงและสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในระดับขยายส่วนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 เขย่าแบบโรตารี่ บริษัท New Brunwick Scientific Co.,Inc.,Edison, N. J., USA
2. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Water bath Shaker) เขย่าแบบรีซิโปรคอล รุ่น 1086 บริษัท Gesellschaft fur labortechnit (GFL)
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-20 Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 บริษัท Milton Roy Co., USA
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น H–88 L4 บริษัท Kokusan, Japan
7. เครื่องผสมสาร (Vortex–Genie 2) รุ่น G560 E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
8. ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar flow ISSCO รุ่น BV–124, USA
9. เครื่องชั่ง รุ่น L2200P Satorius, USA
10. เครื่องชั่ง รุ่น AG 204 Mettler Toledo, Switzerland
11. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น UNILUX–12 บริษัท Kyowa, Tokyo, Japan
12. ตะแกรงร่อน แบบ Laboratory test sieve mesh No. 8 – 50 บริษัท Endecotts Ltd., England

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคมีภัณฑ์

1. เดกซ์แทรนคุณภาพอุตสาหกรรม น้ำหนักโมเลกุล 5 – 40×10^6 Sigma Chemical Co., USA
2. เดกซ์แทรน ที-2000 น้ำหนักโมเลกุล 2×10^6 Pharmacia, Sweden
3. ทวีน–80 BDH Chemical Ltd., England
4. โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin) Sigma Chemical Co., USA
5. กลูโคส E. Merck, Germany
6. 3–อะมิโนโพรพิวไทรเอททอกซีไซเลน (3–aminoproplytriethoxysilane, APTS) Sigma Chemical Co., USA
7. กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde 50% in water) Fluka AG. Buchs, Switzerland
8. โฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (Folin phenol reagent) Carlo erba reagenti,
9. ไดโปรตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) E. Merck, Germany
10. โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) Carlo erba reagenti,
11. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) Fluka AG. Buchs, Switzerland
12. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) Ajax Chemicals, Australia
13. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) Difco Laboratories, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3–14 เป็นเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ (mutate) โดย สุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) จากเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดย เอก แสงวิเชียร (2531)

2.1.2 การเก็บรักษาเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1การเก็บเชื้อในระยะสั้น

เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3–14 ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ (ภาคผนวก ก.) ที่มีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1% บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จนสปอร์เจริญเต็มที่ เก็บไว้ที่ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

2.1.2.2การเก็บเชื้อในระยะยาว

เก็บสปอร์ของเชื้อรา โดยวิธี Lyophilization

2.2 การเลี้ยงเชื้อในขวดแก้วทรงกรวยเพื่อเตรียมเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3–14

เติมทวีน-80 ความเข้มข้น 0.1% ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที) ลงในหลอดเก็บเชื้อรา (stock culture) จากข้อ 2.1.2.1 ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาแขวนลอยในทวีน-80 นับสปอร์ให้อยู่ในช่วง 2×10^7 สปอร์ต่อมล. โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ถ่ายสปอร์แขวนลอย 1 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงจาก Fukumoto และคณะ ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วรูปทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

ส่วนน้ำใสนำมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีน คำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา

2.3 การตรวจสอบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ทำตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971) ดังนี้ นำสารละลายเดกซ์แทรน ที-2000 ความเข้มข้น 0.625% ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 0.4 มล. และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 0.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 0.1 มล. แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที นำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลอดปล่อยออกมาโดยวิธีของ Somogyi (1952)

1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรน ที-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

การเตรียมสับสเตรท โดยชั่งเดกซ์แทรน ที-2000 น้ำหนัก 0.625 กรัม ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.ในขวดเตรียมสาร (volumetric flask)

2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มล. เติม Alkaline copper reagent (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วเติม Nelson’s reagent (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เติมน้ำปลอดประจุ (deionized water) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมล.

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (1951)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายผสม Lowry C (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที จึงเติมสารละลาย Lowry D (ภาคผนวก ข.) ปริมาตร 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานที่ใช้โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมล.

การคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะทำได้โดยนำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (หน่วยต่อมล.) หารด้วยปริมาณโปรตีน (มก.ต่อมล.) ค่าแอคติวิตีจำเพาะมีหน่วยเป็น หน่วย (unit) ของเอนไซม์ต่อมก.โปรตีน

2.6 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

วิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนตัวพยุง

2.6.1 การเลือกตัวพยุง

ตัวพยุงที่คัดเลือกนำมาใช้ในการตรึงเดกซ์แทรนเนส ในงานวิจัยนี้ คือ ทรายแม่น้ำ ซึ่งมีขนาดต่างๆ กัน คือ

1. ทราย ขนาด 8 – 16 เมช
2. ทราย ขนาด 16 – 20 เมช
3. ทราย ขนาด 20 – 50 เมช

โดยเลือกทรายขนาด 16 – 20 เมช ซึ่งมีขนาด, น้ำหนักที่พอเหมาะและมีความเหมาะสมมากที่สุด ที่จะนำไปใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized Bed Reactor) นำมาใช้เป็นตัวพยุงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อไป

2.6.2 การเตรียมตัวพยุง

ทรายที่นำมาใช้เป็นตัวพยุง ก่อนนำไปใช้ ต้องนำมาล้างน้ำสะอาด 3 - 4 ครั้ง แล้วจึงนำไปแช่ในกรดไนตริกเข้มข้น เป็นเวลา 1 วัน เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ต่างๆ ที่ติดมา ล้างกรดด้วยน้ำปลอดประจุ นำไปอบแห้งอุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 1 วัน เก็บไว้ในภาชนะสะอาดปิดฝาสนิท

2.6.3 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 1

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติมสารกระตุ้นตัวพยุง APTS 5% (โดยปริมาตร)ในอะซิโตน ปริมาตร 10 มล.ในอัตราส่วน ทราย : APTS เท่ากับ 1 : 2 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชม. เทสารละลาย APTS ทิ้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 1 วัน เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5% (โดยปริมาตร) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.6 ปริมาตร 10 มล. ที่จะใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วม นำไปเขย่าที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชม. ล้างทรายด้วยน้ำปลอดประจุ 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 6 มล. และเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase) ปริมาตร 4 มล. นำไปเขย่าที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชม. ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งพบว่าไม่มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเหลืออยู่ ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 5 จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ (% activity retained)

2.6.4 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 2

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 6 มล. และเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase) ปริมาตร 4 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งพบว่าไม่มีแอคติวิตี

ของเดกซ์แทรนเนสเหลืออยู่ ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 6 จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ (% activity retained)

2.6.5 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธีการเตรียมแบบที่ 3

บรรจุทรายที่ใช้ในการตรึงรูป 5 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในขวดแก้วทรงกรวย เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5% (โดยปริมาตร) ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.6 ปริมาตร 10 มล. ที่จะใช้เป็นสารสร้างพันธะร่วม นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. ล้างทรายด้วยน้ำปลอดประจุ 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 6 มล. และเดกซ์แทรนเนสที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude dextranase)ปริมาตร 4 มล. นำไปเขย่าที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 2 ชม. ล้างทรายด้วยสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 จำนวน 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งพบว่าไม่มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเหลืออยู่ ขั้นตอนต่างๆ แสดงด้วยภาพดังรูปที่ 7 จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ (% activity retained)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทราย (16-20 เมช) 5.00 กรัม
และ APTS 5% ใน อะซิโตน 10 มล.
↓
เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 3 ชม.
↓
เทสารละลาย APTS 5% ทิ้ง
↓
นำตัวพยุงไปอบที่ 45 °ซ, เวลา 1 วัน
↓
เติมกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
0.1โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.6 ปริมาตร 10 มล.
↓
เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 2 ชม.
↓
เทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ทิ้ง
↓
ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง
↓
เติมเดกซ์แทรนเนส (crude enzyme) ปริมาตร 4 มล.
และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 6 มล.
↓
เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 2 ชม.
↓
ล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5, 4 ครั้ง
↓
เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
(เก็บไว้ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่ 4 °ซ)

รูปที่ 5 ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 1

ทราย (16-20 เมช) 5.00 กรัม

↓

เติมเดกซ์แทรนเนส (crude enzyme) ปริมาตร 4 มล.
และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 6 มล.

↓

เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 2 ชม.

↓

ล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5, 4 ครั้ง

↓

เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
(เก็บไว้ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่ 4 ^{o}ซ)

รูปที่ 6 ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทราย (16-20 เมช) 5.00 กรัม

↓

เติมกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.6 ปริมาตร 10 มล.

↓

เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 2 ชม.

↓

เทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ทิ้ง

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

↓

เติมเดกซ์แทรนเนส (crude enzyme) ปริมาตร 4 มล.
และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 6 มล.

↓

เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 2 ชม.

↓

ล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5, 4 ครั้ง

↓

เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
(เก็บไว้ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่ 4 °ซ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 3

2.6.6 การเตรียมเดกซ์แทรเนสตรึงรูปโดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (Entrapment) ตามวิธีของ นุสรา เจริญกิจทวี (2539)

นำสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มล. ผสมกับเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเทียบเท่ากับปริมาณโปรตีน 3.8360 มก. แล้วหยดสารละลายผสมลงในแคลเซียมคลอไรด์ 0.14 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 5.3 ปริมาตร 600 มล. ที่ปั่นกวนเบาๆ ตลอดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างเม็ดเจลตรึงด้วยแคลเซียมคลอไรด์ 0.14 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 5.3 จำนวน 4 ครั้ง นำไปชั่งน้ำหนักก่อนที่จะนำไปใช้ จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสและปริมาณโปรตีนตรึง ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ

2.7 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการหาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสดังนี้ บ่มสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 ปริมาตร 0.6 มล. และสารละลายเดกซ์แทรนที-2000 ความเข้มข้น 0.625% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.4 มล. จนได้อุณหภูมิ 55 °ซ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นเติมสารผสมปฏิกิริยาทั้งหมดลงใน 100 มก. เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป เขย่าด้วยเครื่องปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 55 °ซ อัตราการเขย่า 200 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลายส่วนน้ำใสนำไปวิเคราห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi (1952) ซึ่งสารละลายส่วนน้ำใสนี้จะต้องปรับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลให้เหมาะสมก่อนนำไปวิเคราะห์

สำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (ในรูปสารละลายจากเม็ดเจล) ทำได้โดยชั่งเม็ดเจลตรึงรูป 0.5 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0 ปริมาตร 4.5 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืน นำสารละลายแขวนลอยมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตามวิธีของ Fukumoto และคณะ (1971)

1 หน่วย (unit) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายเดกซ์แทรนที-2000 และปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแบบวิธีทางอ้อม (Indirect Method) โดยวิเคราะห์จากผลต่างของโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสอิสระที่เริ่มต้นก่อนทำปฏิกิริยา กับปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาในน้ำล้าง โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry (1951) เช่นเดียวกับวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.5

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ทำได้โดย ชั่งเม็ดเจลตรึง 0.5 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0 ปริมาตร 4.5 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืน นำสารแขวนลอยมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง ตามวิธีของ Lowry (1951) ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.5 เช่นเดียวกัน

2.9 การวัดความแข็งของเม็ดเจลตรึง (gel strength) โดยเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้น (นุสรา เจริญกิจทวี, 2539)

2.9.1 ลักษณะและส่วนประกอบของเครื่องมือ

มีลักษณะคล้ายตาชั่งแขนเดียวแบบสปริง ประกอบด้วยโลหะ 2 ส่วนที่สำคัญคือ จานโลหะ 2 ใบ ที่เชื่อมต่อกันด้วยแท่งโลหะทรงกระบอกตัน สามารถขยับแท่งโลหะขึ้นลงได้โดยไม่มีความฝืดโดยมีส่วนบนเป็นจานใส่น้ำหนัก ส่วนล่างเป็นจานกดน้ำหนักลงบนตัวอย่าง ส่วนที่ 2 เป็นแท่นที่ใส่ตัวอย่าง

2.9.2 วิธีวัดและเปรียบเทียบ strength ของเม็ดเจลตรึง

วางเม็ดเจลตรึงบนแท่นใส่ตัวอย่างให้เม็ดเจลตรึงอยู่ที่จุดศูนย์กลางของจานกดน้ำหนักเลื่อนแท่งโลหะทรงกระบอกมาสัมผัสเม็ดเจลตรึง ใส่น้ำหนักครั้งละ 1 กรัม หาน้ำหนักสุดท้ายที่ทำให้เม็ดเจลตรึงแบนติดกระจก เนื่องจากว่าเม็ดเจลตรึงไม่มีรอยปริแตกให้สังเกตเห็น

ในการทดลองนี้จะสุ่มตัวอย่างของเม็ดเจลตรึง ซึ่งได้วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจลตรึงก่อนอย่างน้อย 5 เม็ด

2.9.3 วิธีรายงานความแข็งของเม็ดเจลตรึง (gel strength)

รายงานเป็นน้ำหนักต่ำสุดที่ทำให้เม็ดเจลแบนติดกระจก โดยคำนวณค่าน้ำหนักที่เติมบนจานชั่ง ต่อพื้นที่ผิวเม็ดเจลตรึง รายงานเป็นหน่วย กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.10 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทรายโดยวิธีการเตรียมที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึง

จากการคัดเลือกวิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจากทั้งหมด 3 วิธีนั้น วิธีที่ให้แอคติวิตีแอคติวิตีจำเพาะ และเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%activity retained) ดีที่สุด คือ วิธีที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึงรูป (วิธีแบบที่ 3) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทรายขนาด 16 – 20 เมช ต่อไป

2.10.1 ทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 4 ระดับ คือ 1.0, 2.5, 3.5 และ 5.0% ตามลำดับ วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.2 ทดสอบหาอัตราเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันอัตราการเขย่า 3 ระดับ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกอัตราการเขย่าที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.3 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันเวลาในการทำปฏิกิริยา 5 ระดับ คือ 30, 60, 120, 180 และ 300 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% และอัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.4 ทดสอบหาปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น 6 ระดับ คือ 0.0338, 0.0592, 0.0845, 0.1690, 0.3380 และ 0.6760 มิลลิกรัมของโปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที และเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.5 ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 6 ระดับ คือ 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที และปริมาณโปรตีนเดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.1690 มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกเวลาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.6 ทดสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับตัวพยุงตั้งแต่ 4.0 – 8.0 (แปรผันที่ละ 0.5) โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที ปริมาณโปรตีนเดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.1690 มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง และเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 45 นาที วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.7 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที ปริมาณโปรตีนเดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.1690 มก. โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 45 นาที และค่าความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 7.0 วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.8 ทดสอบหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสตั้งแต่ 2.5 – 6.0 (แปรผันทีละ 0.5) โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที ปริมาณโปรตีนเดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.1690 มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 45 นาที ความเข้มข้นและค่าความ

เป็นกรดด่างของสารละลายบัพเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ 7.0 ตามลำดับ วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกค่าความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.9 ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัพเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที ปริมาณโปรตีนเดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.1690 มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 45 นาที ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายบัพเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายเท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ 7.0 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 4.0 วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกค่าความเข้มข้นของบัพเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสม สำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

2.10.10 ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.5 โดยแปรผันอุณหภูมิในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 2 ระดับ คือ 4 ^{o}ซ และ อุณหภูมิห้อง (28 – 31 ^{o}ซ) ตามลำดับ โดยคงที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 2.5% อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 120 นาที ปริมาณโปรตีนเดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่ 0.1690 มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง เวลาที่ใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส 45 นาที ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายบัพเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับตัวพยุงเท่ากับ 0.5 โมลาร์ และ 7.0 ตามลำดับ ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 0.05 โมลาร์ และ 4.0 ตามลำดับ วัดแอคติวิตีและโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ เลือกอุณหภูมิในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส .

2.11 ศึกษาการหลุดของเอนไซม์ (leaching) จากทรายของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยใส่สารผสมปฏิกิริยาทั้งหมด ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 รวมทั้งเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป 100 มก. บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นแยกเดกซ์แทรเนสตรึงรูปออก และบ่มสารผสมปฏิกิริยาต่อไปอีกเป็นเวลา 15 นาที ตลอดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยานำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Somogyi (1952) ทุกๆ 5 นาที

2.12 ศึกษาภาพถ่ายอิเลคตรอน โดยใช้เครื่องถ่ายภาพ Scanning Electron Microscope เปรียบเทียบภาพปรากฏของโปรตีนเอนไซม์บนผิวของทราย (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ดำเนินการโดยนำตัวอย่างทรายก่อนและหลังทำการตรึงรูปเอนไซม์ ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) เพื่อดูภาพปรากฏของโปรตีนที่ยึดติดอยู่บนผิวของทราย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13 การศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

2.13.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระปริมาณที่เท่าๆ กัน และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 100 มก. ในสารผสมของปฏิกิริยาที่มีความเป็นกรดด่างในช่วงต่างๆ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ของ

ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 2.5 – 3.5
อะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.5 – 6.0
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0 – 7.0

บ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตีตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดด่างที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระแสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดด่างของสารผสมปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

2.13.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระปริมาณที่เท่าๆ กัน และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 100 มก. ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตี ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ แสดงแอคติวิตี โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่ใช้บ่มทำปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง)

2.13.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระปริมาณที่เท่าๆ กัน และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 100 มก. ในสารละลายบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ชนิดต่างๆ คือ

ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัพเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 2.5 – 3.5
อะซิเตท บัพเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.5 – 6.0
ฟอสเฟต บัพเฟอร์ ในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0 – 7.0

ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการบ่ม (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่ม)

2.13.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระปริมาณที่เท่าๆ กัน และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 100 มก. ในสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.7 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรึงกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิที่ใช้บ่มทำปฏิกิริยา (โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่ม)

2.13.5 ความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในระหว่างการเก็บ

เก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้ววัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในช่วงเวลาการเก็บ 30 วัน โดยวัดแอคติวิตีทุกๆ 2 วัน

2.13.6 ทดสอบหาจำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

บ่มเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 100 มก. ในสารผสมปฏิกิริยา โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

1. เปรียบเทียบอุณหภูมิที่ 40 และ 50 °ซ โดยคงความเป็นกรดด่างที่ 5.0
2. เปรียบเทียบความเป็นกรดด่างที่ 4.5 และ 5.0 โดยคงอุณหภูมิที่ 40 °ซ

ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกส่วนน้ำใสออก นำไปต้มเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้ววัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ส่วนเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปนำไปล้างด้วยบัพเฟอร์ หลังจากนั้นนำกลับมาใช้ซ้ำในรอบใหม่ โดยทำการใช้ซ้ำ 10 รอบ ต่อเนื่องกัน

2.13.7 หาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน ที–2000

บ่มเดกซ์แทรนอิสระในปริมาณที่เท่าๆ กัน และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปปริมาณ 100 มก. ในสารผสมปฏิกิริยา โดยแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรน ที–2000 ตั้งแต่ 0.15625 – 2.5% (0.15625, 0.3125, 0.625, 1.25 และ 2.5% ตามลำดับ) ที่อุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 15 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟในรูปของไลน์-ลิเวอร์เบิร์กระหว่าง 1/V และ1/[S] หาจุดตัดแกน X นำค่าไปคำนวณเพื่อหาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสแบบล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ทำการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.6 แล้ววัดแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส ในลักษณะที่เป็นเม็ดเจลและสารละลายจากการสลายเม็ดเจล รวมทั้งวัดความแข็งของเม็ดเจล (gel strength) ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.9

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะระหว่างเดกซ์แทรนเนสอิสระกับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ตามวิธีของนุสรา เจริญกิจทวี, 2539.

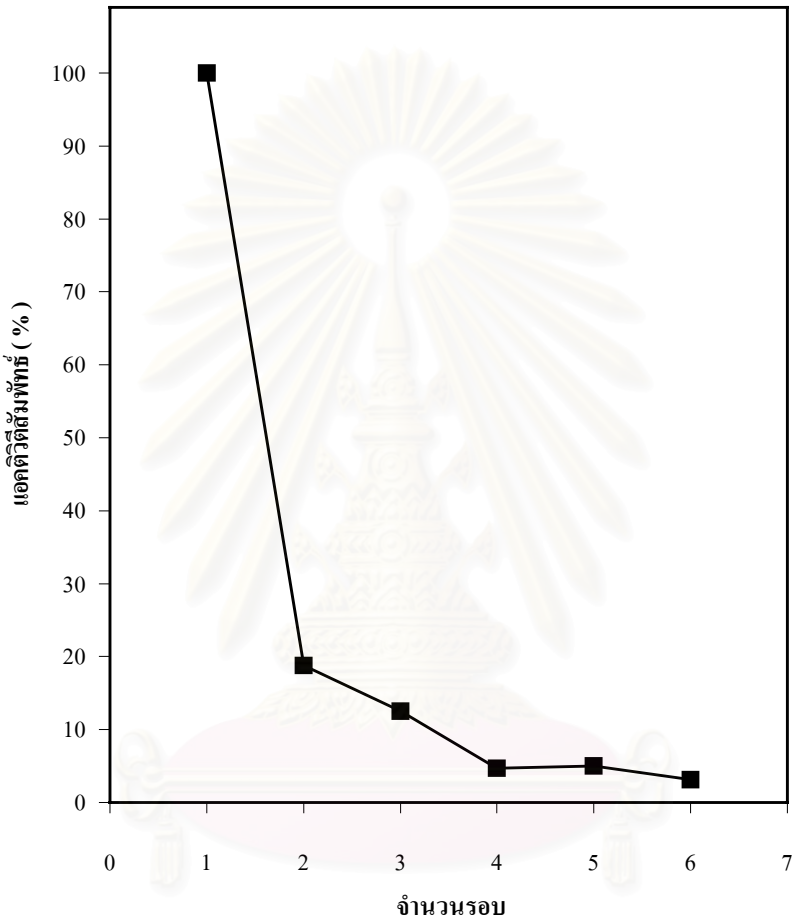
รูปแบบเอนไซม์ [1]	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย / มก.โปรตีน)
เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (วิเคราะห์ในรูปเม็ดเจล)	31.34	0.8471	64.93
เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (วิเคราะห์ในรูปสารละลายจากเม็ดเจล)	350.17	0.8471	725.44
เดกซ์แทรนเนสอิสระ	1,918.70	-----	500.18

[1] ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่ใช้ในทุกกรณีเท่ากับ 3.8360 มก.

พบว่า เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีแอคติวิตีจำเพาะลดลง เมื่อถูกตรึงรูปโดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และในแง่ของแอคติวิตีจะมีความแตกต่างกันมากระหว่างเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในลักษณะที่เป็นเม็ดเจลและสารละลายจากการสลายเม็ดเจล เมื่อเทียบจากน้ำหนักเม็ดเจลที่เท่ากัน ดังตารางที่ 9 นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ตรึงได้ในเม็ดเจลนั้น ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเอนไซม์อิสระที่ใช้ตรึง

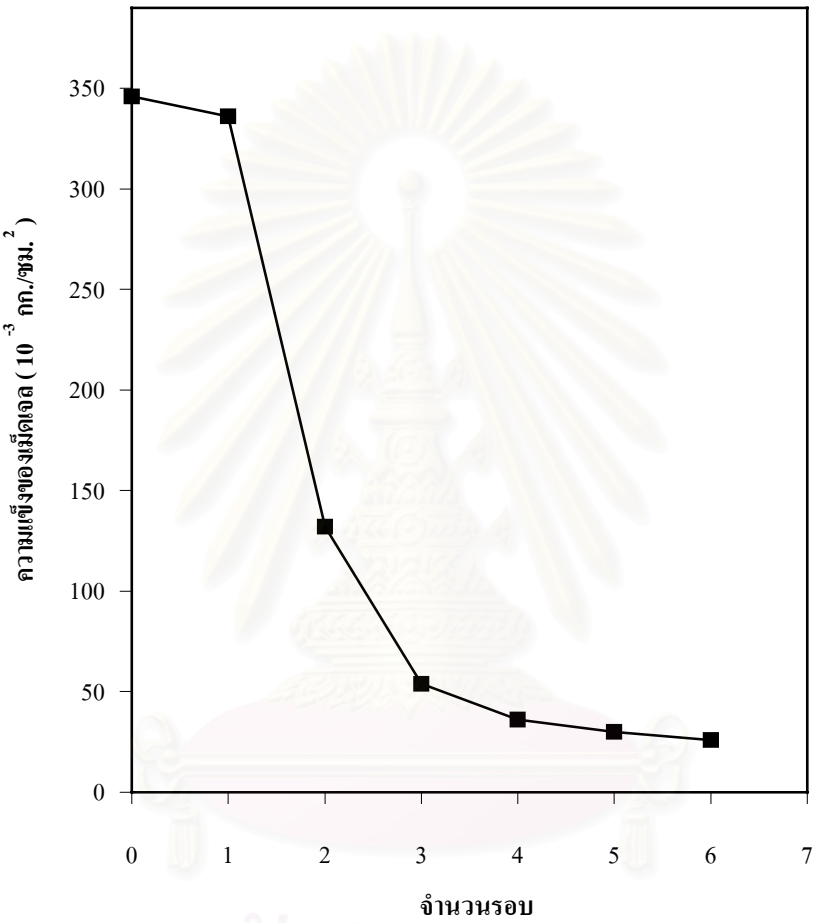
และเมื่อนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมาไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที – 2000 แบบต่อเนื่อง แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและความแข็งของเม็ดเจล (gel strength) พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อผ่านการใช้งานเพียง 2 รอบเท่านั้น โดยสูญเสียแอคติวิตีไปมากกว่า 80% ดังแสดงในรูปที่ 8 นอกจากนี้ยังเกิดการบวมของเม็ดเจล โดยที่เม็ดเจลมีขนาดใหญ่ขึ้น ยังผลให้ความแข็งของเม็ดเจลลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อนำกลับมาใช้งานซ้ำ ดังผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 จากข้อจำกัดของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนตดังกล่าวมาข้างต้น จึงมีความพยายามในการเปลี่ยนวิธีการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสใหม่ ให้มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำไปใช้งานจริง โดยต้องคำนึงถึงความสะดวกในการเตรียม ประหยัดค่าใช้จ่ายและคุณสมบัติที่ดีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ผลของการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน ที - 2000 ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ผลของการใช้ซ้ำของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในการย่อยสลายเดกซ์แทรน ที 2000 ต่อความแข็งของเม็ดเจล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยใช้ทรายเป็นตัวพยุง

จากการบวมของเม็ดเจลตรึงแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ และความแข็งของเม็ดเจลลดลงอย่างควบคุมไม่ได้ จึงทดลองทำการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงของแข็งเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว โดยใช้ทรายแม่น้ำขนาด 16 – 20 เมช (ภาคผนวก ค.) ที่คัดเลือกจากสถานที่ต่างๆ กัน 3 แหล่ง เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวพยุงในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ภายใต้ภาวะการตรึงรูป ตามวิธีการดำเนินการวิจัยข้อ 2.6.3, 2.6.4 และ 2.6.5 ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลของวิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายขนาด 16 – 20 เมช

วิธีการเตรียม	ตัวอย่างทราย	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
แบบที่ 1[2]	**1**	1.6080	0.0435	36.97	8.89
	2	1.9764	0.0435	45.43	10.92
	3	1.8420	0.0653	28.21	6.78
แบบที่ 2[3]	**1**	8.7132	0.1400	62.24	14.96
	2	7.8066	0.1200	65.06	15.64
	3	8.3040	0.1200	69.20	16.63
แบบที่ 3[4]	**1**	14.0352	0.1400	100.25	24.10
	2	15.5556	0.1500	103.70	24.93
	3	14.5032	0.1400	103.59	24.90
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น		1,364.52	-----	416.01	-----

หมายเหตุ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 3.3800 มก.

[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

[2] วิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 1 : Sand + APTS + Glutaraldehyde + Dextranase

[3] วิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 2 : Sand + Dextranase

[4] วิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 3 : Sand + Glutaraldehyde + Dextranase

จากวิธีการตรึงสามวิธีที่เลือกพบว่า มีความแตกต่างกันของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในทั้งสามวิธี และเมื่อพิจารณาในแง่แอคติวิตีจำเพาะ ประกอบกับเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ (% activity retained) ที่ได้จากการวิเคราะห์แอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °ซ และความเป็นกรดด่างที่ 4.5 แล้วนั้น วิธีการตรึงรูปแบบที่ 3 จะให้แอคติวิตี แอคติวิตีจำเพาะ และเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ สูงกว่าวิธีการเตรียมแบบอื่นๆ นอกจากนี้ในแต่ละวิธีได้ใช้ตัวอย่างทรายต่างตัวอย่างกัน 3 ชุด มาทำการทดลอง แต่ไม่ปรากฏความแตกต่างของแอคติวิตีของทรายทั้ง 3 ชุดภายในวิธีการเตรียมแบบเดียวกัน ดังนั้นจึงได้เลือกวิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแบบที่ 3 เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทราย

3.3.1 ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

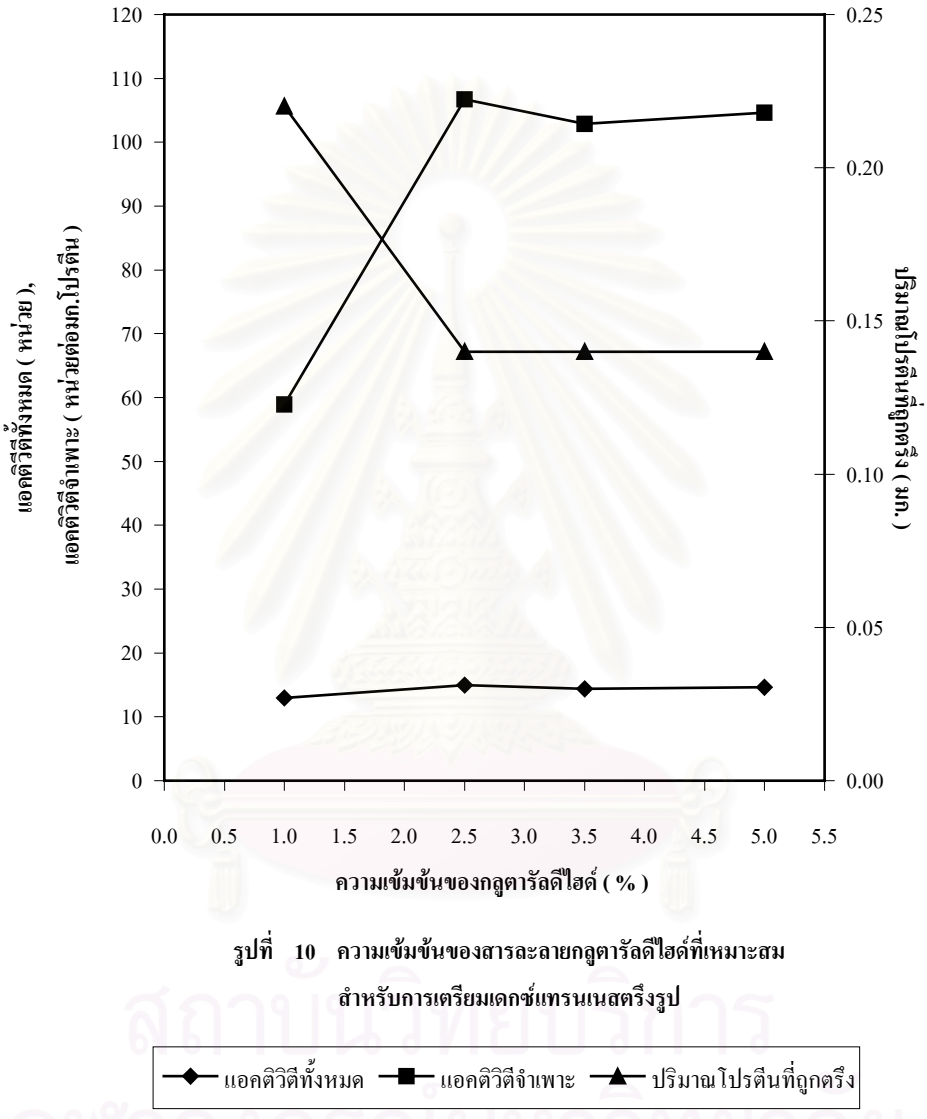
ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.10.1 ออกเป็น 4 ระดับ คือ 1.0, 2.5, 3.5 และ 5.0% แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11 และ รูปที่ 10

ตารางที่ 11 ผลความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (%)	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
1.0	12.9678	0.2200	58.94	14.35
2.5	14.9412	0.1400	106.72	25.99
3.5	14.4001	0.1400	102.86	25.05
5.0	14.6496	0.1400	104.64	25.48
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	1,387.92	-----	410.63	-----

หมายเหตุ
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 3.3800 มก.
[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่าสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 2.5% จะทำให้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดคือ 14.9412 หน่วย และ 106.72 หน่วยต่อมก.โปรตีน ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ 25.99% ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 10 ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

3.3.2 อัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

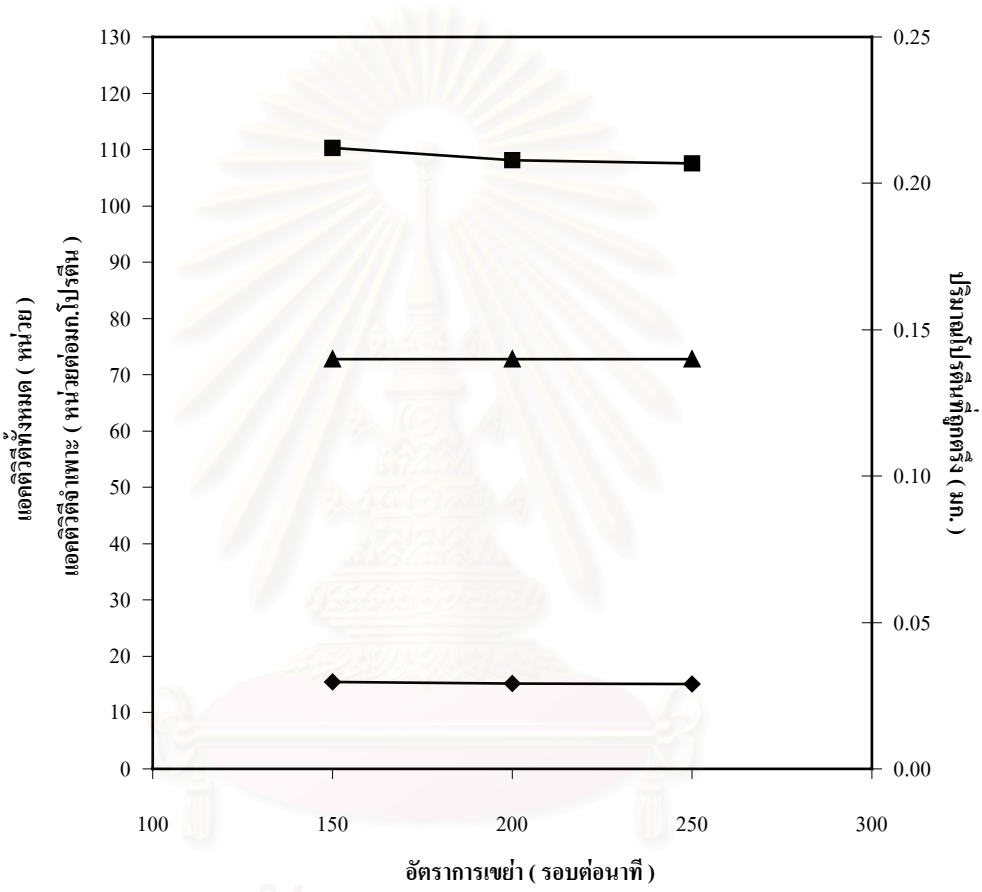
ทำการแปรผันอัตราการเขย่าสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.10.2 ออกเป็น 3 ระดับ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 และ รูปที่ 11

ตารางที่ 12 ผลของอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

อัตราการเขย่า (รอบต่อนาที)	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
150	15.4386	0.1400	110.28	26.86
200	15.1320	0.1400	108.09	26.32
250	15.0588	0.1400	107.56	26.19
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	1,387.92	-----	410.63	-----

หมายเหตุ
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 3.3800 มก.
[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่า ทั้งแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ตรึงโดยใช้อัตราการเขย่าทั้ง 3 ระดับ ไม่ให้ความแตกต่างกันแต่อย่างไร อีกทั้งโปรตีนที่ถูกตรึงก็มีปริมาณที่เท่ากันด้วยทั้ง 3 สภาวะ ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการทำการทดลอง จึงเลือกใช้อัตราการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ในการทดลองต่อๆ ไป



รูปที่ 11 อัตราเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

3.3.3 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

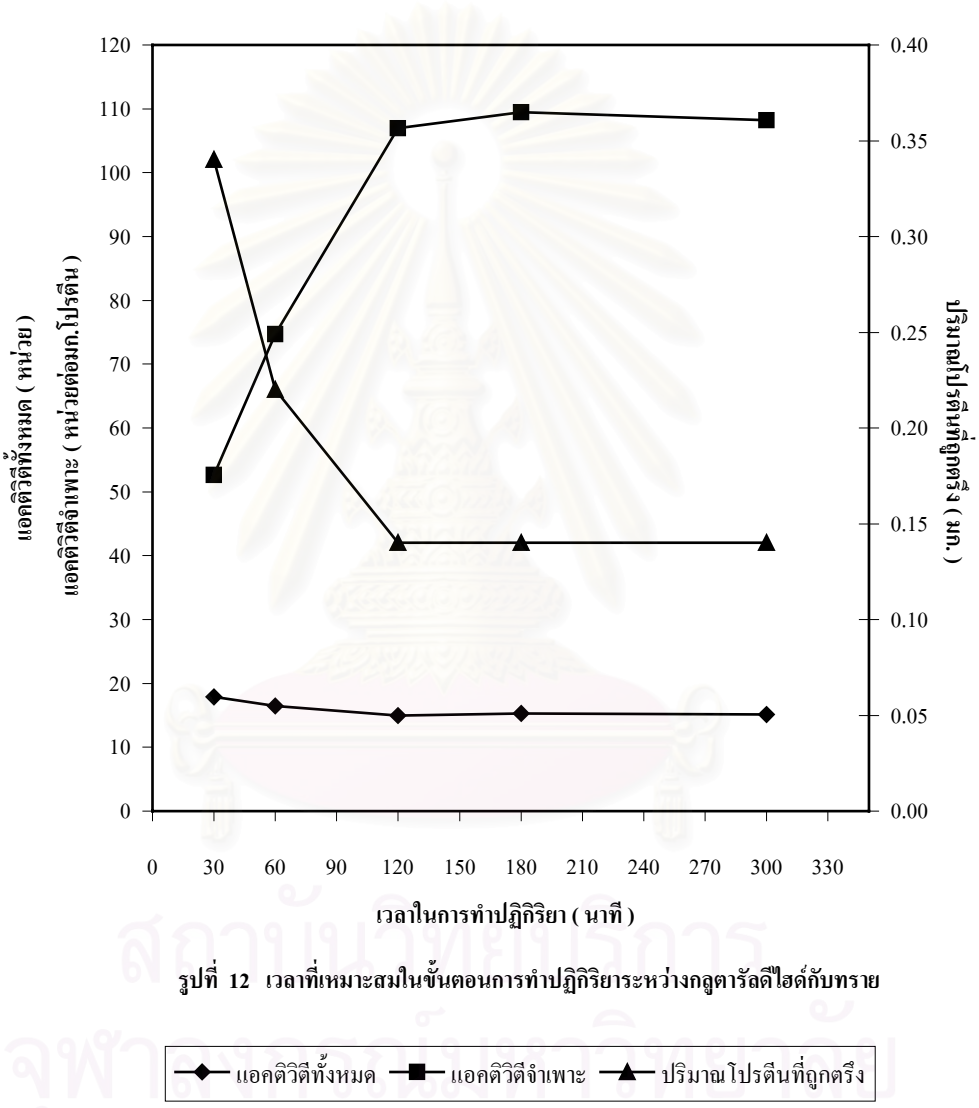
ดำเนินการแปรผันเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย 5 ระดับ ตามวิธีดำเนินวิจัยข้อ 2.10.3 คือ 30, 60, 120, 180 และ 300 นาที แล้วตรวจสอบแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 13 ผลของเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

เวลา (นาที)	แอคติวิตีทั้งหมด [1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง [1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
30	17.8950	0.3400	52.63	12.82
60	16.4328	0.2200	74.69	18.19
120	14.9706	0.1400	106.93	26.04
180	15.3216	0.1400	109.44	26.65
300	15.1464	0.1400	108.19	26.35
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	1,387.92	-----	410.63	-----

หมายเหตุ
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น เท่ากับ 3.3800 มก.
[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่า ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยาคือ 120 นาที ดังตารางที่ 13 และ รูปที่ 12 เมื่อพิจารณาจากแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยที่ตั้งแต่ช่วงเวลา 120 – 300 นาที มีค่าใกล้เคียงกับมาก และในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงนั้นเริ่มมีค่าคงที่ตั้งแต่ระยะเวลา 120 นาที เท่ากับ 0.1400 มก.โปรตีน เป็นต้นไป ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดี-ไฮด์กับทราย 120 นาที สำหรับในการทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 12 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

3.3.4 ปริมาณของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรึงรูป

จากการทดลองก่อนหน้า ทำให้ทราบว่าโปรตีนที่ถูกตรึงรูปบนตัวพยุงนั้นมีค่อนข้างน้อย เพื่อลดการสิ้นเปลืองเอนไซม์ที่ใช้เริ่มต้นในการตรึงรูป จึงทดลองการแปรผันปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นที่ใช้ตรึงตั้งแต่ 0.1690 – 3.3800 มก.โปรตีน แล้วตรวจสอบแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

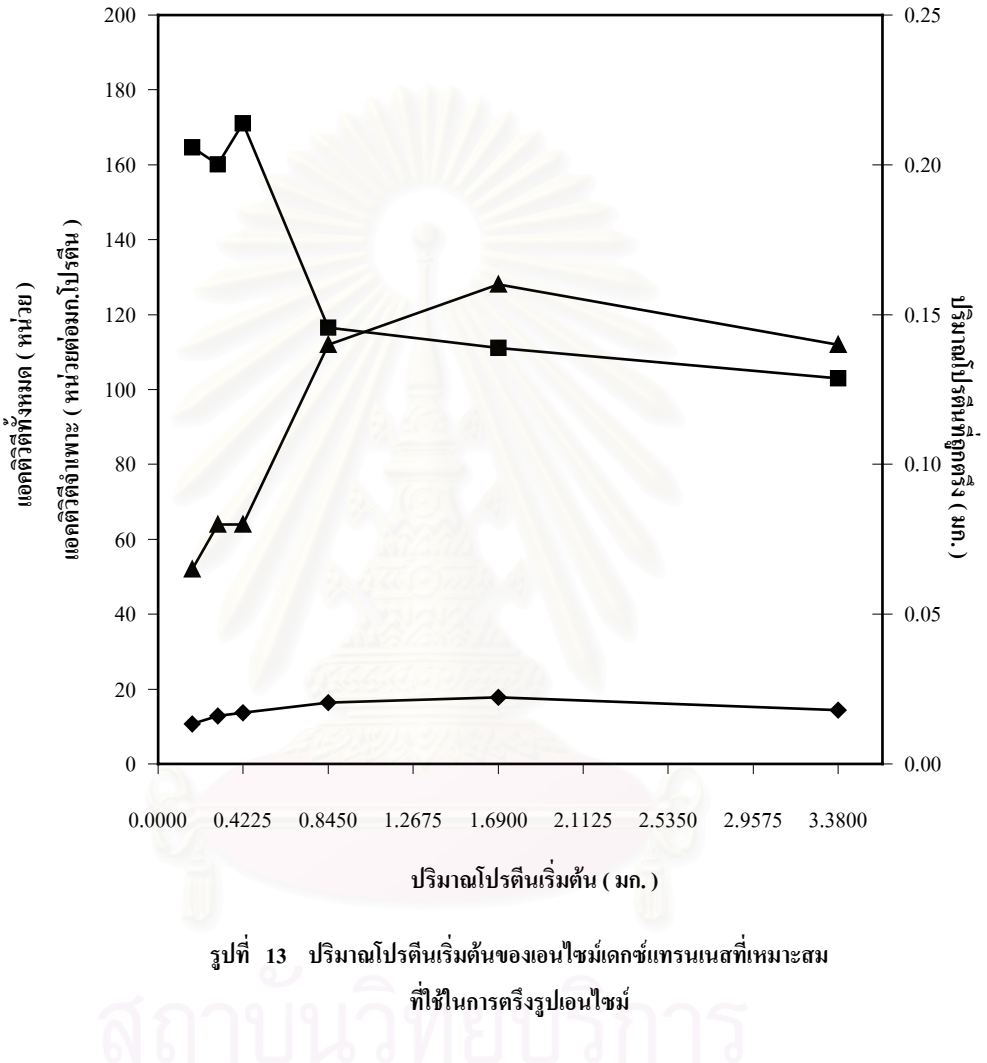
ตารางที่ 14 ผลของปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น		แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	เปอร์เซ็นต์การยึดติดของโปรตีน	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย / มก. โปรตีน)
(มก.โปรตีน)	(มก.โปรตีนต่อกรัมทรายแห้ง)				
0.1690	0.0338	10.7016	0.0650	38.46	164.64
0.2958	0.0592	12.8070	0.0800	27.05	160.09
0.4225	0.0845	13.6842	0.0800	18.93	171.05
0.8450	0.1690	16.3158	0.1400	16.57	116.54
1.6900	0.3380	17.7780	0.1600	9.47	111.11
3.3800	0.6760	14.4150	0.1400	4.14	102.96

หมายเหตุ

[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นจาก 0.1690 ถึง 3.3800 มก. นั้น มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงและแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเพิ่มขึ้น และเข้าสู่ภาวะคงที่เมื่อใช้ปริมาณโปตีนเริ่มต้นตั้งแต่ 0.8450 มก. เป็นต้นไป ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 14 และรูปที่ 13 แต่เมื่อพิจารณาในแง่ของแอคติวิตีจำเพาะ และเปอร์เซ็นต์การยึดติดของโปรตีน ผลการทดลองจะตรงกันข้ามคือ ค่าพารามิเตอร์ทั้งสองดังกล่าวข้างต้นจะลดลง เมื่อมีการเพิ่มของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาทางด้าน 2 พารามิเตอร์ที่สำคัญคือ แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงควบคู่กัน ซึ่งมีความน่าเชื่อถือมากกว่า จึงเลือกที่จะใช้ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก. ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 13 ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสม ที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.5 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

ทำการแปรผันเวลาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่เวลาตั้งแต่ 15, 30, 45, 60, 120 และ 180 นาที แล้วตรวจสอบแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 15 ผลของเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

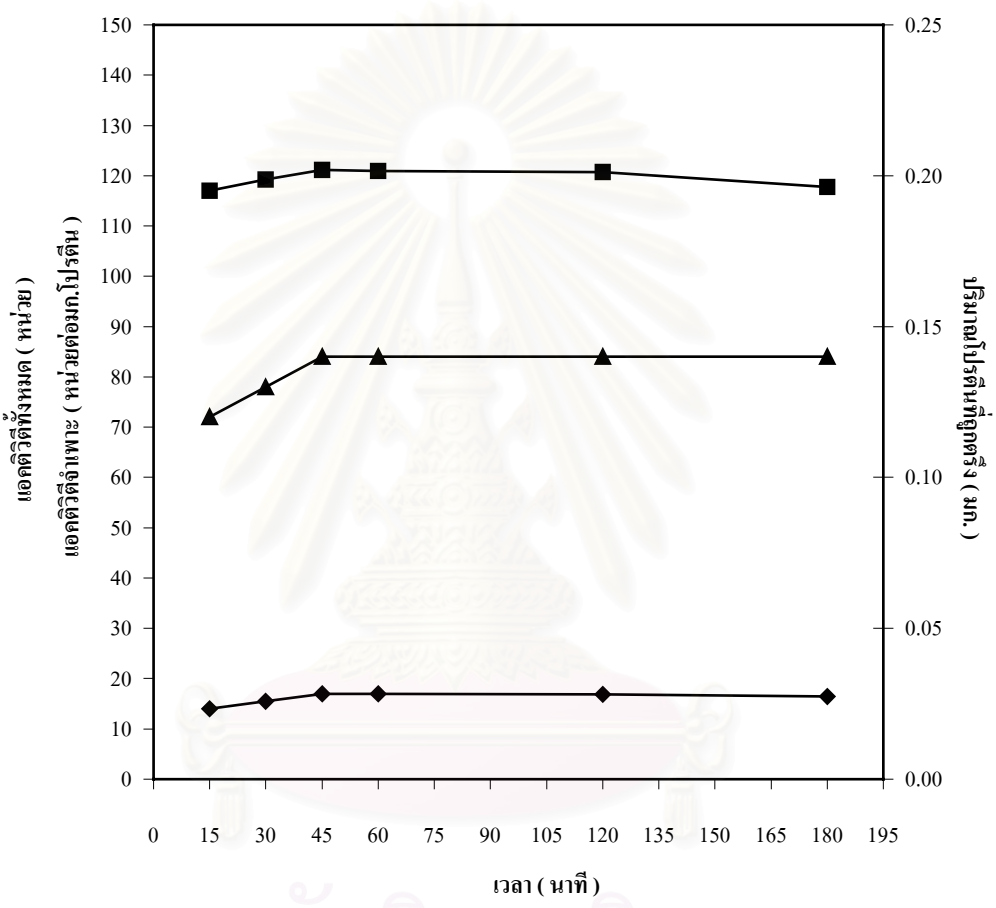
เวลา (นาที)	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
15	14.0352	0.1200	116.96	28.48
30	15.4968	0.1300	119.21	29.03
45	16.9590	0.1400	121.14	29.50
60	16.9302	0.1400	120.93	29.45
120	16.9008	0.1400	120.72	29.40
180	16.4910	0.1400	117.79	28.69
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	346.98	-----	410.63	-----

หมายเหตุ

ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.

[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่าเมื่อระยะเวลาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 15 ถึง 180 นาที มีผลให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงและแอคติวิตีเพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 15 และ รูปที่ 14 และจะเข้าสู่ภาวะคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 45 นาที มีค่าเท่ากับ 0.1400 มก.โปรตีน และประมาณ 16.9 หน่วย ตามลำดับ สำหรับที่เวลา 45 นาทีนั้น เป็นเวลาที่สั้นที่สุดสำหรับขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ให้แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 14 เวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

3.3.6 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

ดำเนินการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.10.6 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 – 8.0 (เพิ่มค่าความเป็นกรดด่างครั้งละ 0.5 หน่วย) แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

พบว่า ตั้งแต่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 ถึง 7.0 แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และตั้งแต่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 เป็นต้นไป มีผลทำให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสลดลง ดังตารางที่ 16 และ รูปที่ 15 โดยที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จะให้แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดคือ 17.3478 หน่วย และ 123.91 หน่วยต่อมก.โปรตีน ตามลำดับ จึงเลือกค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ 7.0 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

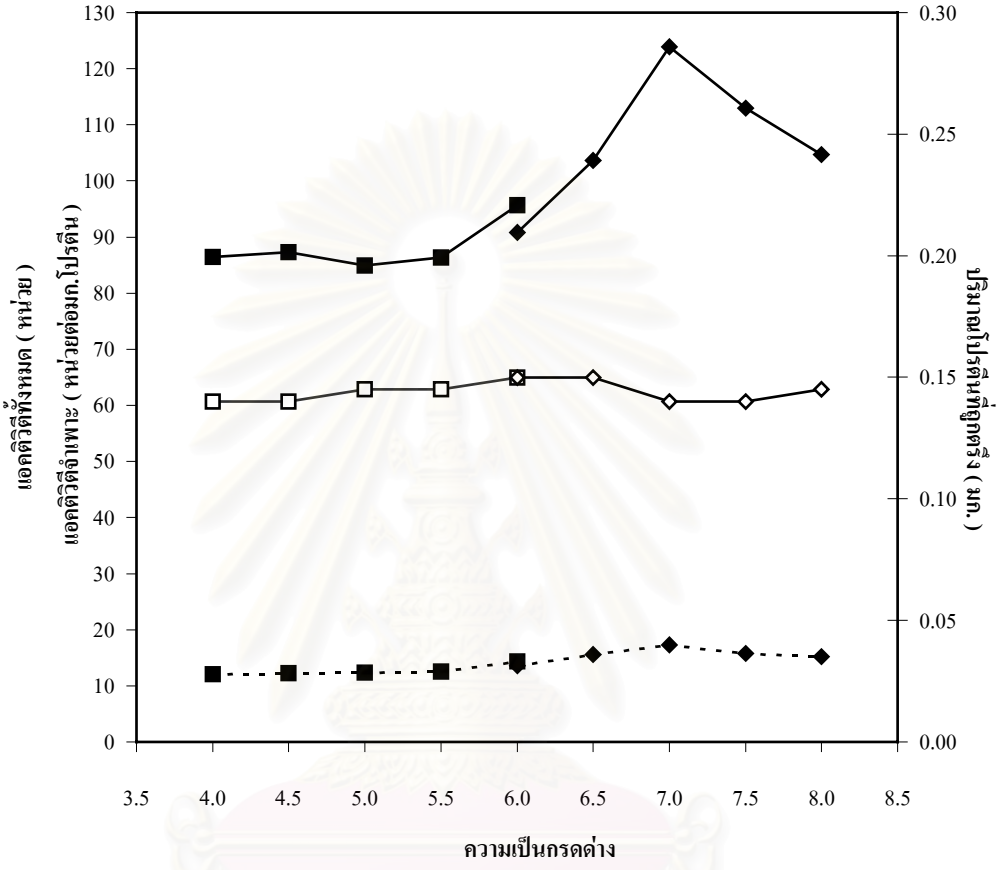
ชนิดบัฟเฟอร์	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0	12.1054	0.1400	86.47	21.06
อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5	12.2222	0.1400	87.30	21.26
อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0	12.3196	0.1450	84.96	20.69
อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5	12.5146	0.1450	86.31	21.02
อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0	14.3568	0.1500	95.71	23.31
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0	13.6257	0.1500	90.84	22.12
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5	15.5553	0.1500	103.70	25.25
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0	17.3478	0.1400	123.91	30.18
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5	15.8187	0.1400	112.99	27.52
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0	15.1755	0.1450	104.66	25.49
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	346.98	-----	410.63	-----

หมายเหตุ

ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.

[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

3.3.7 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

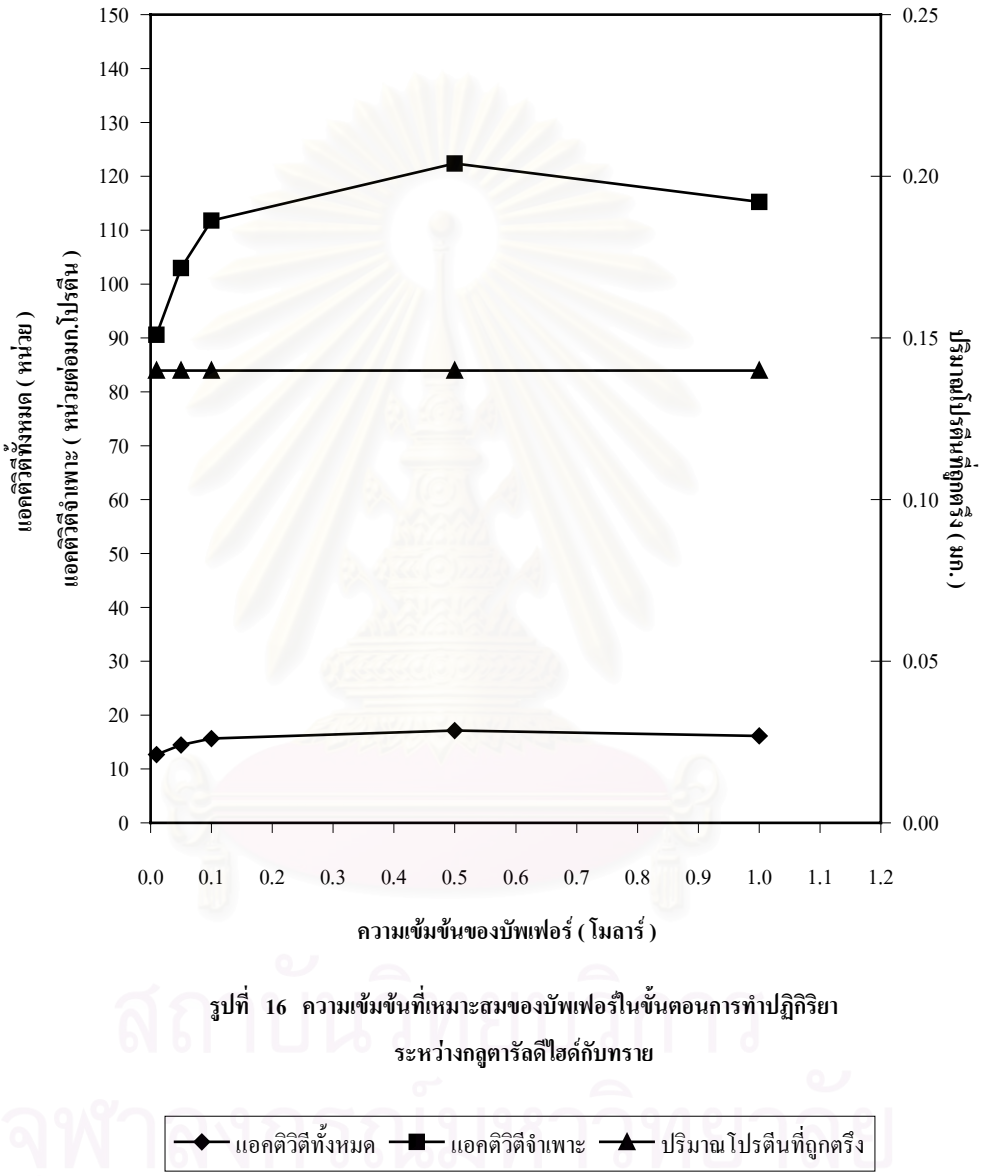
ดำเนินการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ระดับคือ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 โมลาร์ แล้วิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 17 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ (โมลาร์)	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
0.01	12.6900	0.1400	90.64	22.07
0.05	14.4150	0.1400	102.96	25.07
0.1	15.6432	0.1400	111.74	27.21
0.5	17.1348	0.1400	122.39	29.81
1.0	16.1406	0.1400	115.29	28.08
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	346.98	-----	410.63	-----

หมายเหตุ
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.
[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่า ไม่มีความแตกต่างในแง่ของปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง แต่มีความแตกต่างในแง่แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยที่การเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ มีผลให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นด้วย ดังตารางที่ 17 และ รูปที่ 16 ซึ่งความเข้มข้นที่ 0.5 โมลาร์ จะให้แอคติวิตีดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกค่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ดังกล่าวไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 16 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย

3.3.8 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

ดำเนินการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.10.8 โดยแปรผันความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 2.5 – 6.0 (เพิ่มค่าความเป็นกรดด่างครั้งละ 0.5 หน่วย) แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

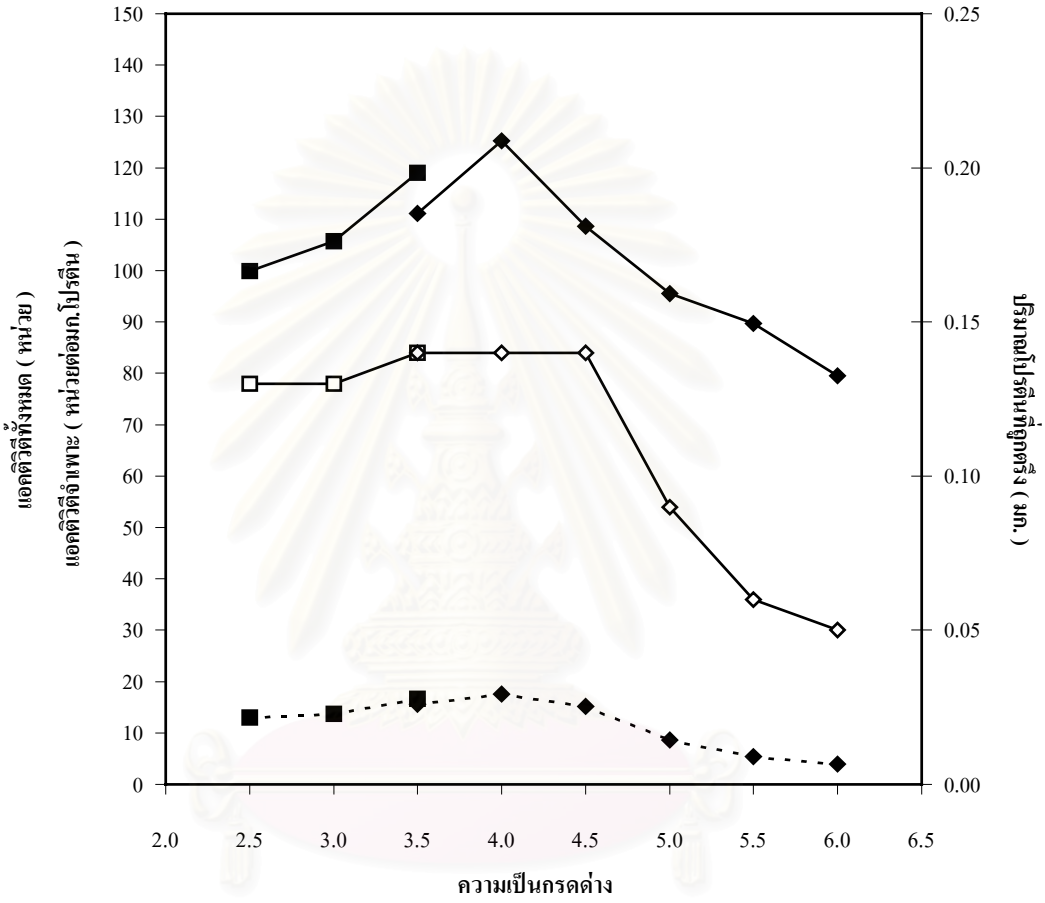
ตารางที่ 18 ผลของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

ชนิดบัพเฟอร์	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัพเฟอร์ พีเอช 2.5	12.9822	0.1300	99.86	24.32
ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัพเฟอร์ พีเอช 3.0	13.7424	0.1300	105.71	25.74
ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ บัพเฟอร์ พีเอช 3.5	16.6668	0.1400	119.05	25.51
อะซิเตทบัพเฟอร์ พีเอช 3.5	15.5556	0.1400	111.11	27.06
อะซิเตทบัพเฟอร์ พีเอช 4.0	17.5440	0.1400	125.31	30.52
อะซิเตทบัพเฟอร์ พีเอช 4.5	15.2046	0.1400	108.60	26.45
อะซิเตทบัพเฟอร์ พีเอช 5.0	8.5932	0.0900	95.51	26.17
อะซิเตทบัพเฟอร์ พีเอช 5.5	5.3802	0.0600	89.67	21.84
อะซิเตทบัพเฟอร์ พีเอช 6.0	3.9768	0.0500	79.54	19.37
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	346.98	-----	410.63	-----

หมายเหตุ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.

[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่า ตั้งแต่ช่วงความเป็นกรดด่าง 2.5 ถึง 4.0 ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงจะเพิ่มขึ้นตามค่าความเป็นกรดด่าง และตั้งแต่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 เป็นต้นไปนั้น ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงก็จะลดลงตามลำดับ ดังตารางที่ 18 และ รูปที่ 17 โดยที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะมีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุดคือ 17.5440 หน่วยและ 125.31 หน่วยต่อมก.โปรตีนตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกค่าความเป็นกรดด่างในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสที่ 4.0 ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 17 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.9 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

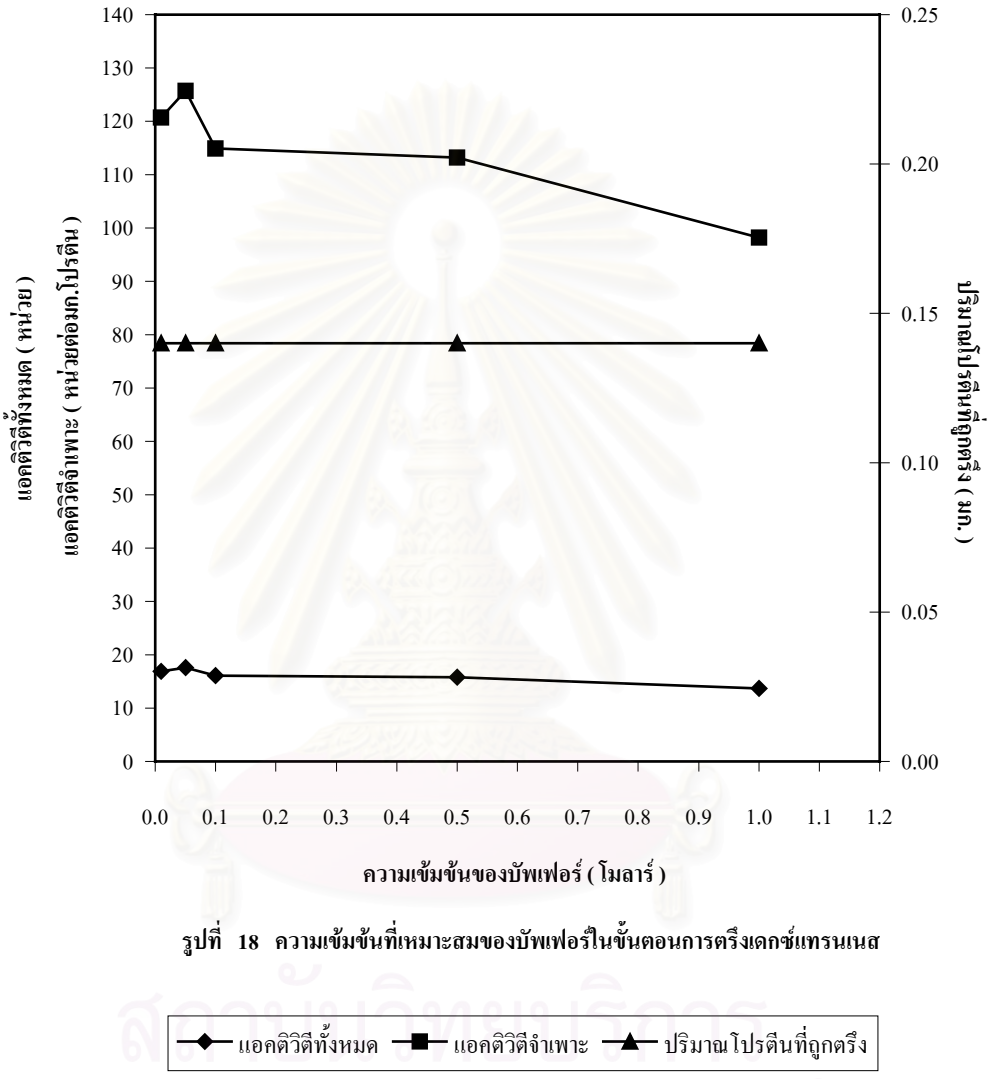
ดำเนินการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ระดับคือ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 โมลาร์ แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 19 ผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ (โมลาร์)	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
0.01	16.9008	0.1400	120.72	29.40
0.05	17.6022	0.1400	125.73	30.62
0.1	16.0818	0.1400	114.87	27.97
0.5	15.8478	0.1400	113.20	27.57
1.0	13.7424	0.1400	98.16	23.90
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	346.98	-----	410.63	-----

หมายเหตุ
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.
[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.0 กรัม

พบว่า ไม่มีความแตกต่างในแง่ของปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง แต่มีความแตกต่างในแง่ของแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะ ดังตารางที่ 19 และ รูปที่ 18 โดยที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 โมลาร์ จะให้แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปดีที่สุดคือ 17.6022 หน่วย และ 125.73 หน่วยต่อมก.โปรตีน ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ 0.05 โมลาร์ ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 18 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.10 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ดำเนินการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.10.10 เพื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ระหว่างอุณหภูมิห้อง (28 – 31 °ซ) และที่อุณหภูมิ 4 °ซ แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 20 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

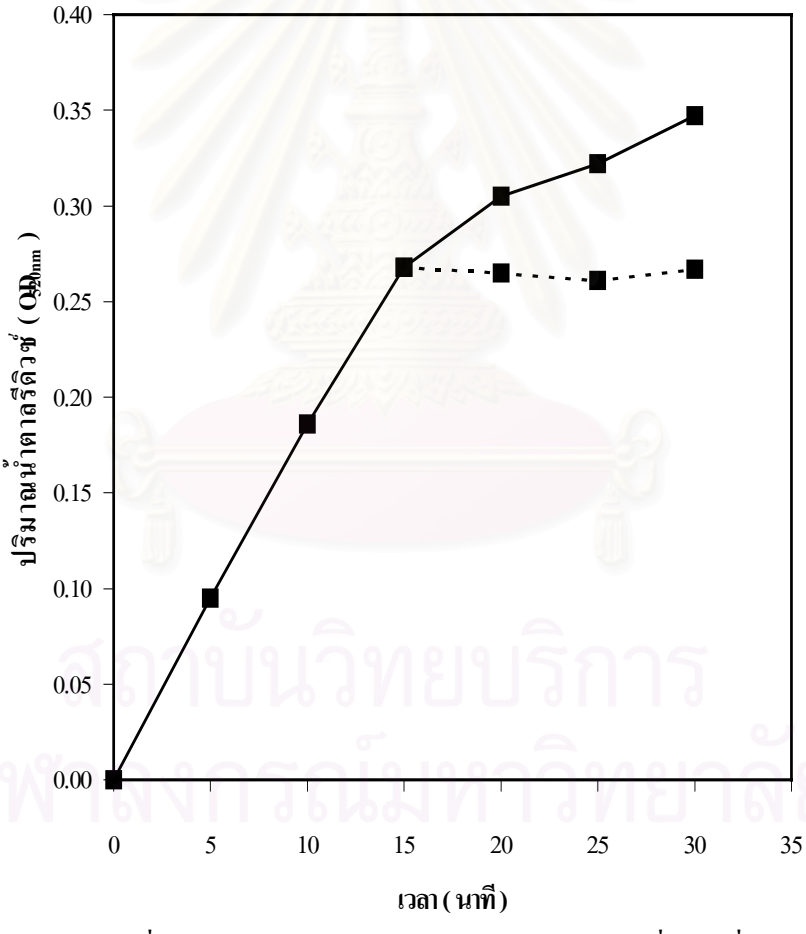
อุณหภูมิ	แอคติวิตีทั้งหมด[1] (หน่วย)	ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง[1] (มก.โปรตีน)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักขังไว้ (%)
อุณหภูมิห้อง 28 – 31 °ซ	17.8950	0.1400	127.82	31.13
4 °ซ	16.9008	0.1350	125.19	30.49
เอนไซม์อิสระเริ่มต้น	346.98	-----	410.63	-----

หมายเหตุ
ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.
[1] คำนวณจากน้ำหนักเปียกของทรายทั้งหมด 6.00 กรัม

พบว่า ไม่มีความแตกต่างทั้งในแง่ของแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง โดยที่อุณหภูมิทั้ง 2 สภาวะนี้ ให้แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงในตารางที่ 20 ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการทำการทดลองและประหยัดพลังงานที่ต้องใช้ในการควบคุมอุณหภูมิ จึงเลือกใช้อุณหภูมิห้องสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

3.4 ศึกษาการหลุดของเดกซ์แทรนเนส (leaching) จากทรายที่ทำหน้าที่เป็นตัวพยุงของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 2.11 โดยวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสก่อนและหลังการแยกเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออกจากสารผสมปฏิกิริยาพบว่า หลังการแยกเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออกจากระบบ ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบที่ได้นั้น ค่อนข้างคงที่ ที่เวลา 20, 25 และ 30 นาที หรือ 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ หลังการเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออก ซึ่งแสดงว่าไม่มีการหลุดของเอนไซม์ หรือมีการหลุดออกน้อยมาก ดังแสดงในรูปที่ 19

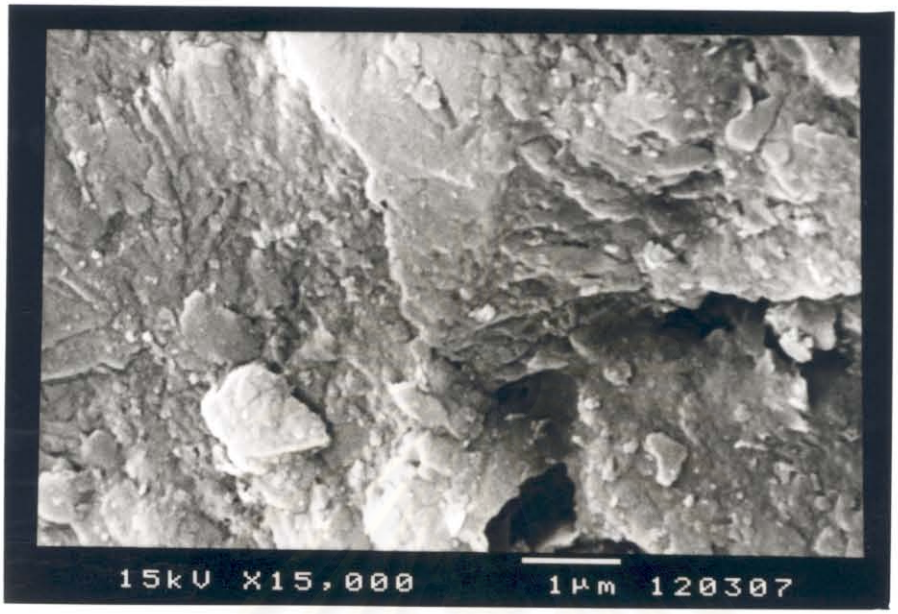


รูปที่ 19 ผลของการหลุดของเอนไซม์ (leaching) จากทรายที่ทำหน้าที่เป็นตัวพยุงของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

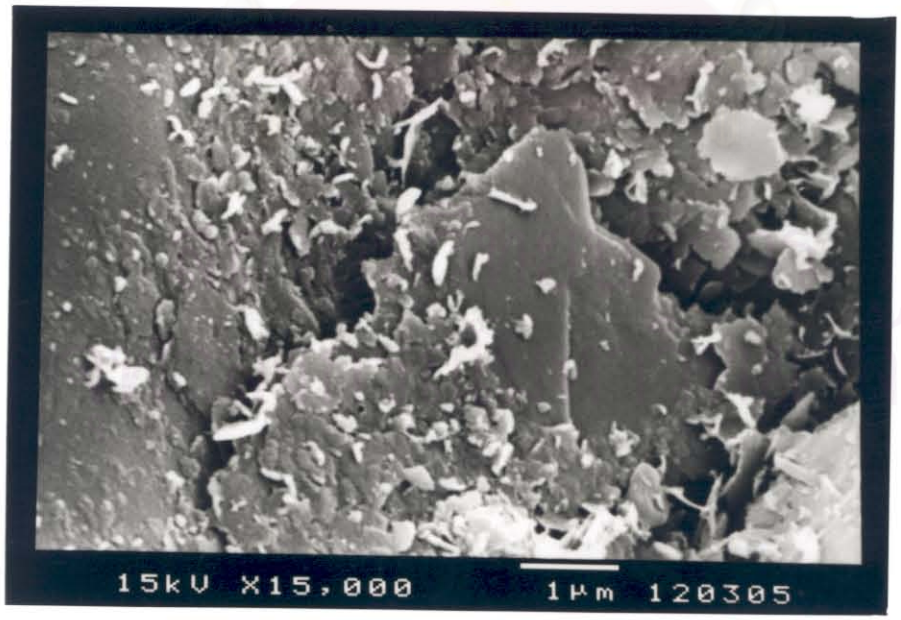
3.5 ศึกษาภาพถ่ายอิเลคตรอนโดยใช้เครื่องถ่ายภาพ Scanning Electron Microscope (SEM) เปรียบเทียบภาพปรากฏของโปรตีนเอนไซม์บนผิวของทราย

หลังจากดำเนินการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสภายใต้สภาวะในการตรึงที่เหมาะสม โดยใช้ทรายเป็นตัวพยุงแล้ว จึงนำตัวอย่างทรายที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด เพื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของทรายทั้งก่อนและหลังทำการตรึงรูปเอนไซม์ พบว่า ทรายที่นำมาใช้ทดลองนั้น หลังจากผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวพยุงจะทำให้พื้นผิวสะอาดขึ้น โดยไม่มีสิ่งสกปรกติดอยู่ที่พื้นผิว และเมื่อนำมาใช้ตรึงรูปเอนไซม์โดยดำเนินการภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้วนั้น มีผลทำให้โมเลกุลโปรตีนของเอนไซม์สามารถยึดเกาะติดอยู่บริเวณพื้นผิวของทราย โดยสังเกตเห็นได้เป็นลักษณะกลุ่มก้อนเล็กๆ บริเวณรอบผิวทราย ดังแสดงในรูปที่ 20 และ 21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ภาพแสดงพื้นผิวของทรายก่อนการตรึงรูป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)



รูปที่ 21 ภาพแสดงพื้นผิวของทรายหลังการตรึงรูป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

3.6 การศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

3.6.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

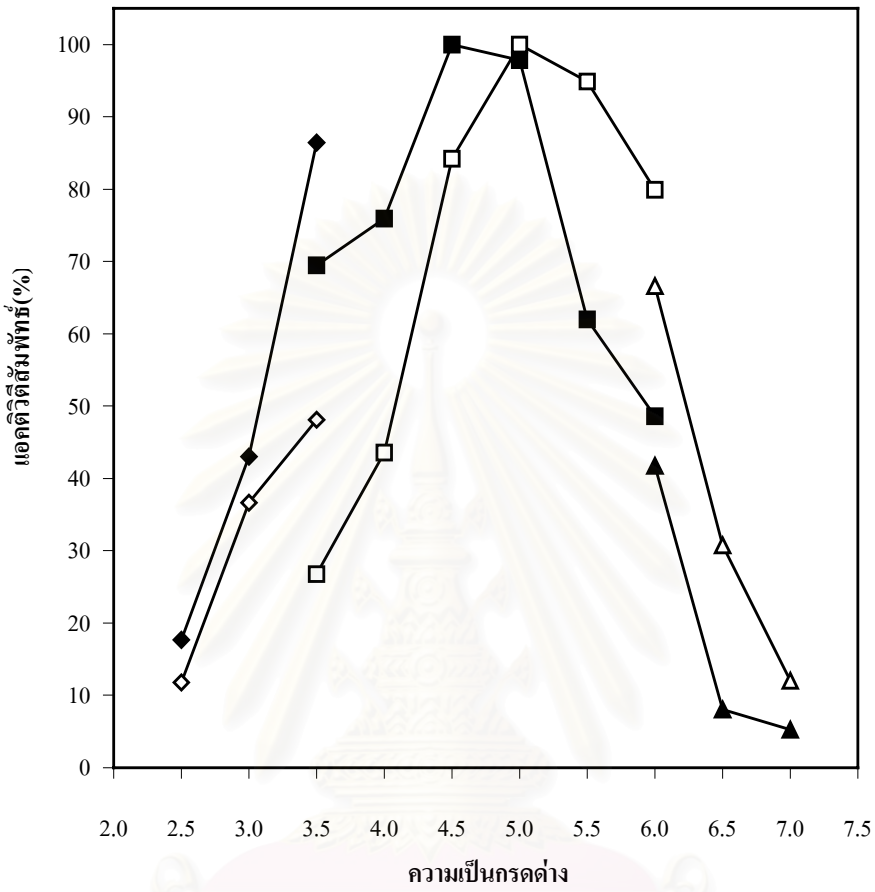
เมื่อทำการแปรผันความเป็นกรดด่างในช่วง 2.5 – 7.0 และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 4.5 ขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 5.0 ดังแสดงในรูปที่ 22

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จะบ่มปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ความเป็นกรดด่างคือ 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ

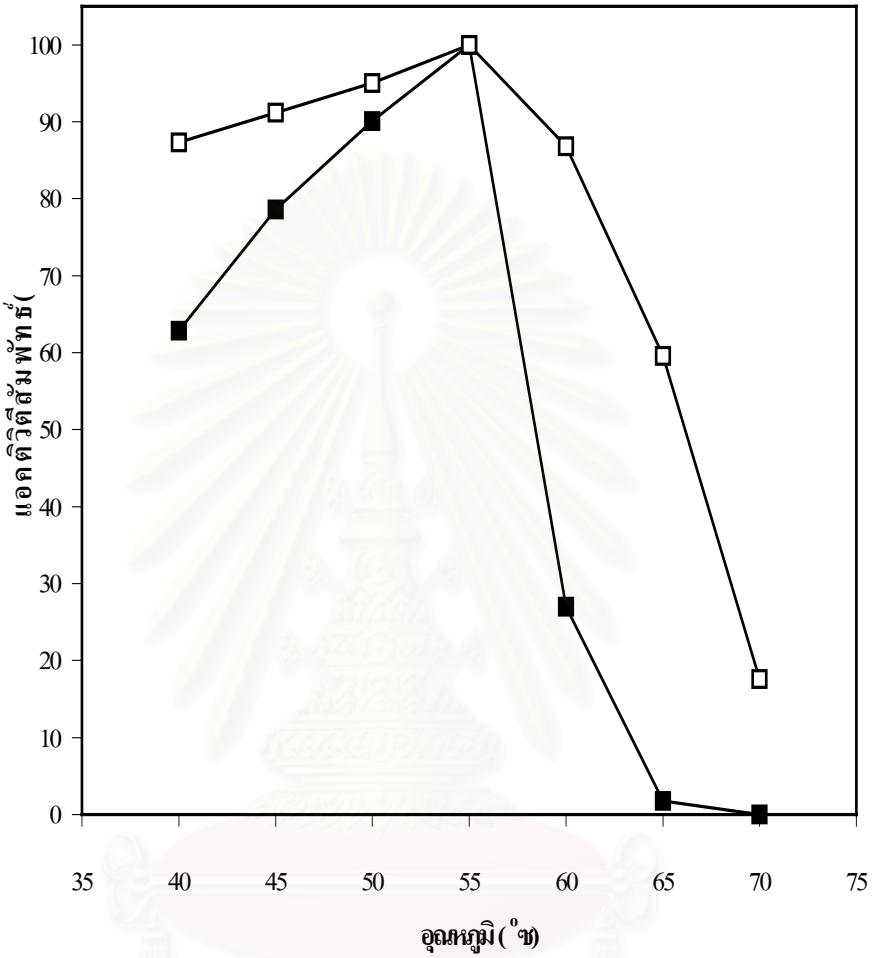
3.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

เมื่อทดลองบ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40 – 70 °ซ พบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากันคือ 55 °ซ ดังแสดงในรูปที่ 23 และยังพบว่า ที่อุณหภูมิ 60 และ 65 °ซ เดกซ์แทรนเนสอิสระจะสูญเสียแอคติวิตีไปถึง 70% และ 98% ตามลำดับ ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ยังมีแอคติวิตีสูงกว่า 55% ที่อุณหภูมิทั้งสอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรเนสตรึงรูป และเดกซ์แทรนเนสอิสระ



รูปที่ 23 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์เทรนเนสตรึงรูป และเดกซ์เทรนเนสอิสระ

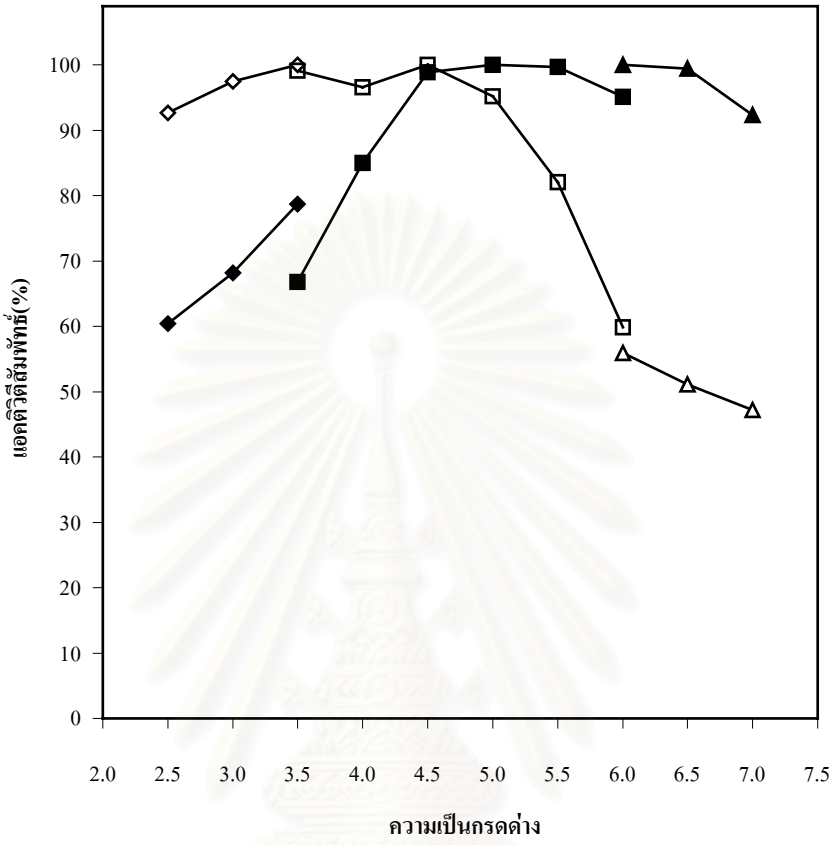
3.6.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ

บ่มเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในบัฟเฟอร์ที่แปรค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 2.5 – 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือ โดยบ่มปฏิกิริยาภายใต้ภาวะที่เหมาะสม พบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วงตั้งแต่ 4.5 – 6.5 โดยค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และ 7.0 เดกซ์แทรนเนสอิสระยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่มากกว่า 80% และในช่วง 2.5 – 4.0 ก็ยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 60% ส่วนในเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างที่แคบกว่าคือตั้งแต่ 3.5 – 4.5 โดยที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2.5 – 3.0 และ 5.0 มีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 95% และในช่วง 5.5 – 7.0 ยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 60% ดังแสดงในรูปที่ 24

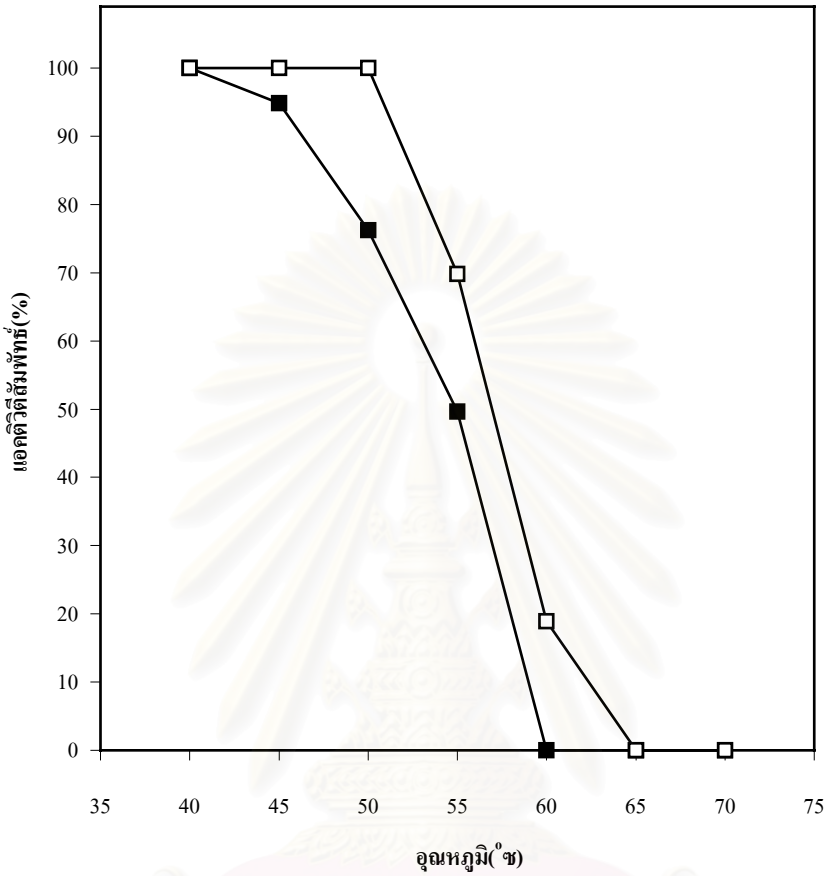
3.6.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

นำเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป มาบ่มที่อุณหภูมิ 40 – 70 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะแอคติวิตีที่เหลืออยู่ โดยทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ พบว่า เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปยังมีแอคติวิตีคงเหลือ 100% ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 °ซ ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสอิสระจะมีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 100% ที่อุณหภูมิ 40 – 45 °ซ ดังแสดงในรูปที่ 25 และจะสูญเสียแอคติวิตีรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่อุณหภูมิเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป และเดกซ์แทรนเนสอิสระ



รูปที่ 25 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป และเดกซ์แทรนเนสอิสระ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.5 ความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในระหว่างการเก็บ

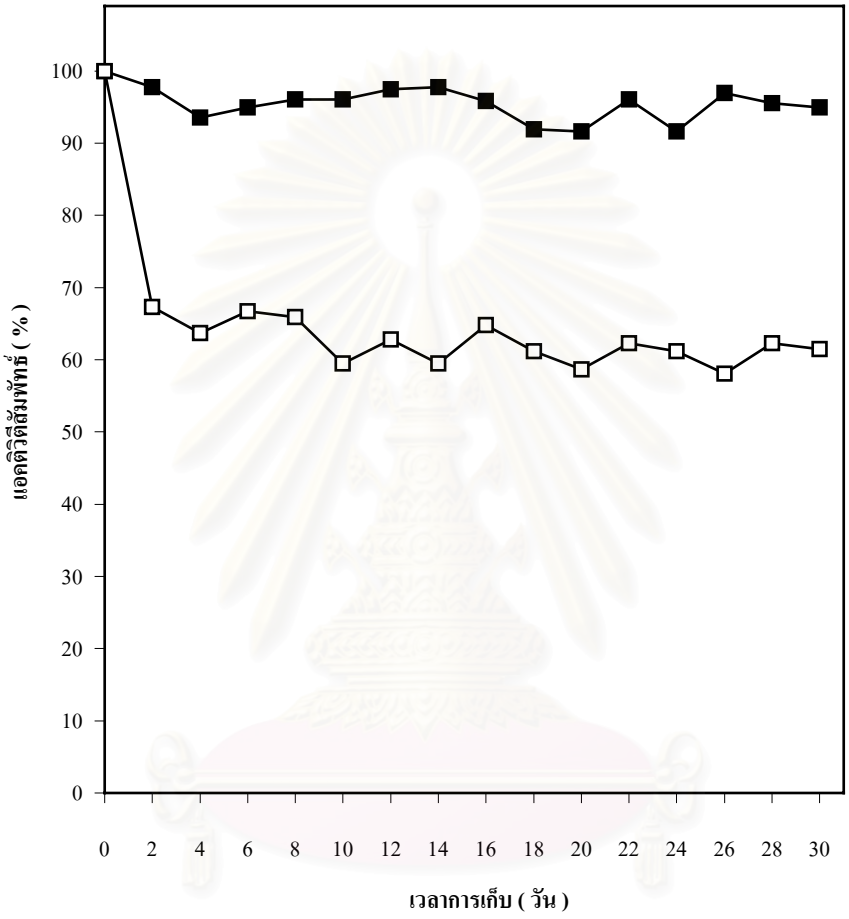
เมื่อทดลองเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 วัน โดยทำการวัดแอคติวิตีทุกๆ 2 วัน พบว่า เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปยังคงรักษาแอคติวิตีไว้ได้ดีที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 ดังแสดงในรูปที่ 26 โดยมีแอคติวิตีคงเหลืออยู่ 95% ตลอดระยะเวลาการเก็บ 30 วัน ส่วนที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะสูญเสียแอคติวิตีไปมากกว่าหลังจากเวลาผ่านไปเพียง 2 วัน ซึ่งมีแอคติวิตีคงเหลือ 65% และจะมีแอคติวิตีคงที่ไปตลอดระยะเวลาการเก็บเช่นเดียวกัน

3.6.6 จำนวนรอบของการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

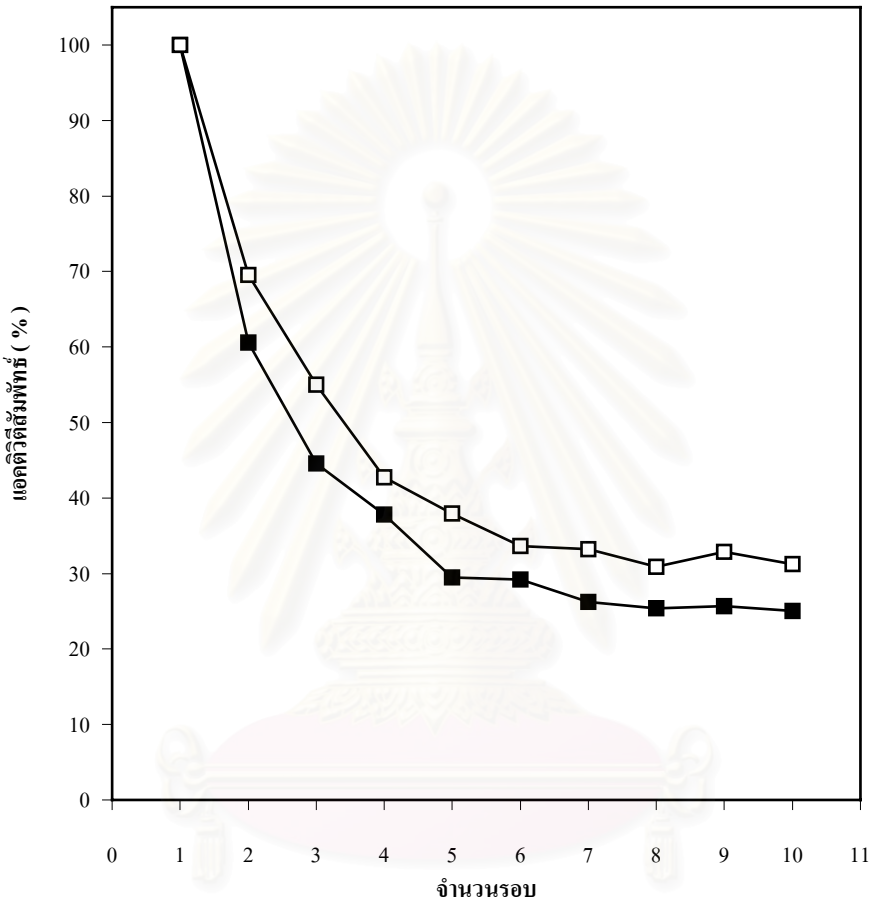
เมื่อใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที – 2000 เป็นจำนวน 10 รอบต่อเนื่องกัน ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 โดยเปรียบเทียบระหว่างอุณหภูมิ 40 และ 50 °ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 50 °ซ แอคติวิตีของเดกซ์แทรเนสตรึงรูปจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในรูปที่ 27 โดยในการใช้งานในรอบที่ 5 มีแอคติวิตีคงเหลือ 30% และจะเริ่มคงที่ตั้งแต่รอบที่ 7 (จนถึงรอบที่ 10) ประมาณ 25% ส่วนที่อุณหภูมิ 40 °ซ ก็มีลักษณะที่คล้ายกัน แต่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสามารถรักษาแอคติวิตีในแต่ละรอบการใช้งานไว้ได้ดีกว่าเล็กน้อย โดยในการใช้งานในรอบที่ 6 มีแอคติวิตีคงเหลือ 35% และจะคงที่จนถึงรอบการใช้งานที่ 10

และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 โดยคงอุณหภูมิที่ 40 °ซ พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 มีการลดลงของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสน้อยกว่า ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 ดังแสดงในรูปที่ 28 โดยในรอบที่ 5 ของการใช้งานนั้น ยังมีแอคติวิตีคงเหลือ 65% และจะคงที่จนถึงรอบการใช้งานที่ 10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

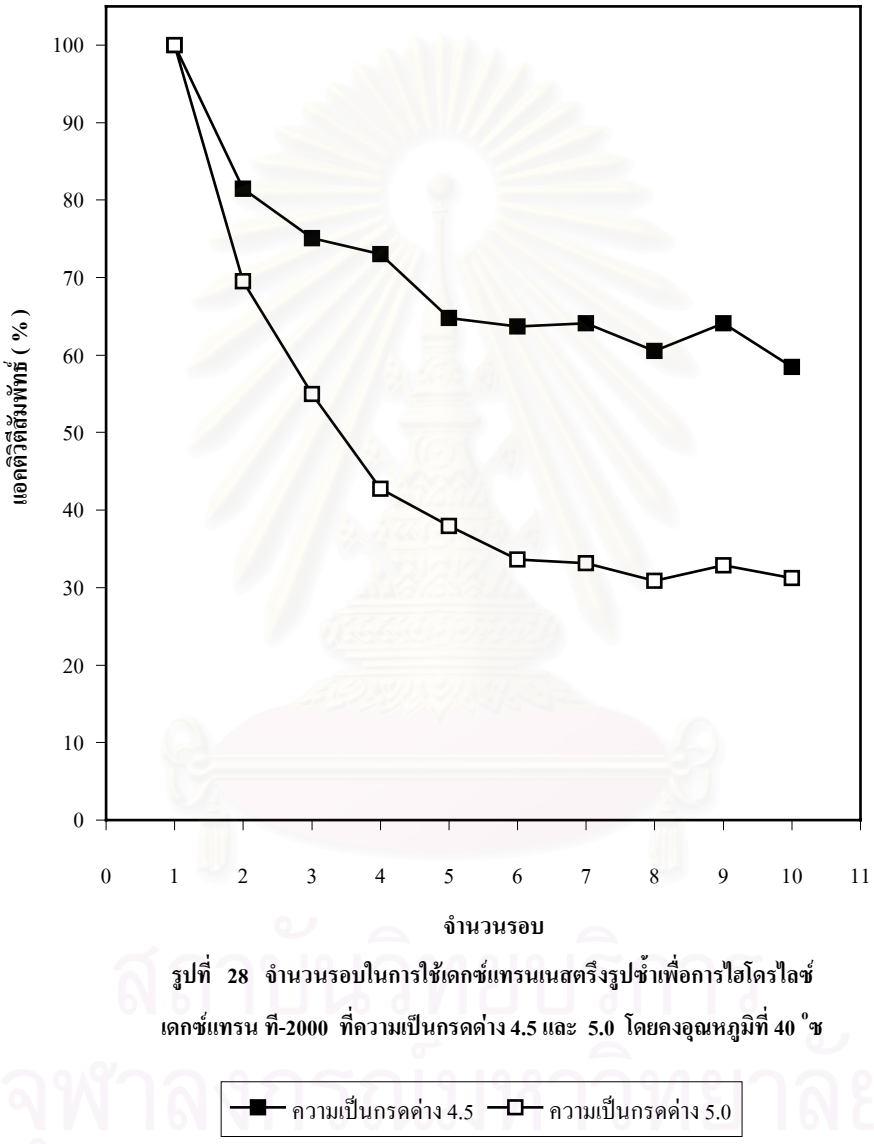


รูปที่ 26 ความเสถียรของการเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่อุณหภูมิ 4 °ซ ระหว่างที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0



รูปที่ 27 จำนวนรอบในการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปซ้ำเพื่อการไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที-2000 ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 ระหว่างอุณหภูมิ 40 และ 50 °ซ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

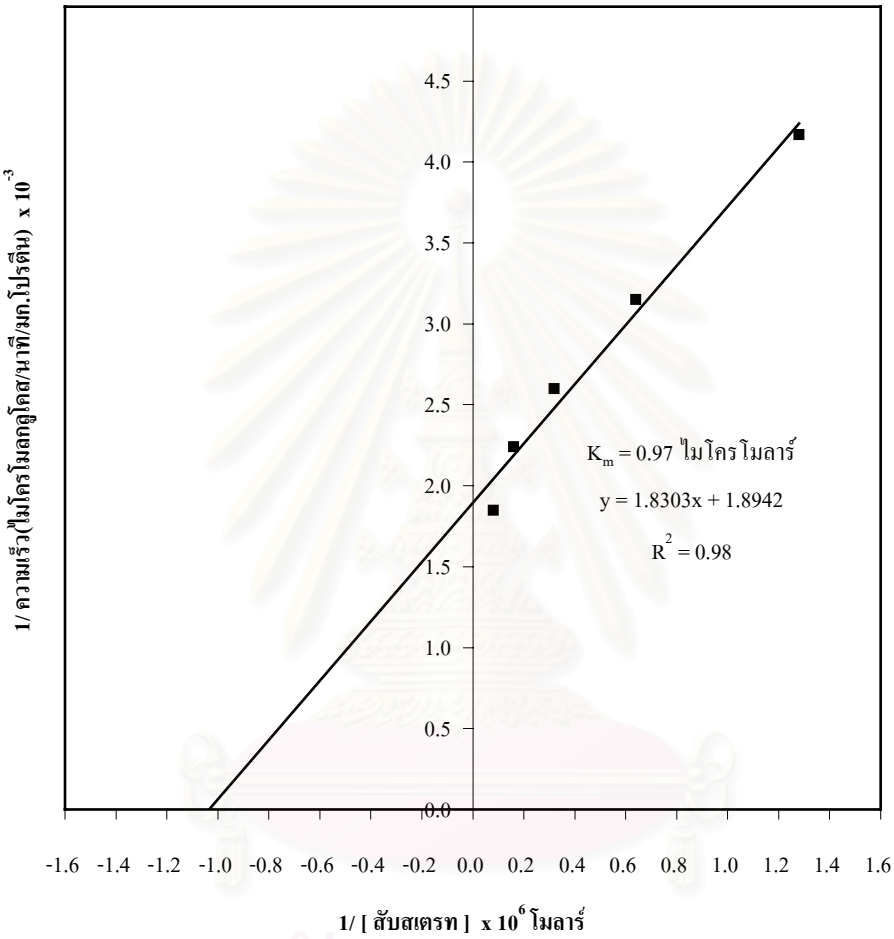


รูปที่ 28 จำนวนรอบในการใช้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปซ้ำเพื่อการไฮโดรไลซ์ เดกซ์แทรน ที-2000 ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 โดยคงอุณหภูมิที่ 40 °ซ

3.6.7 การหาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระต่อเดกซ์แทรน ที – 2000

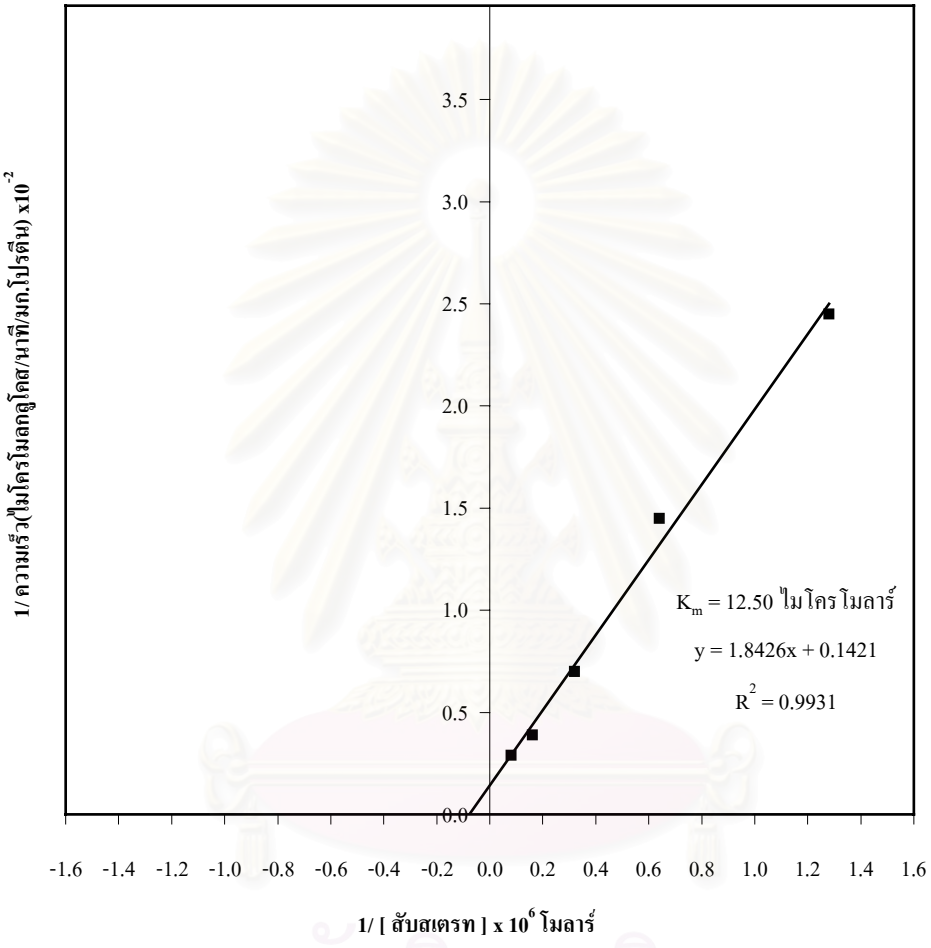
ดำเนินการวิเคราะห์ทางจลนพลศาสตร์ของการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ โดยแปรผันความเข้มข้นของสับเสตท เดกซ์แทรน ที – 2000 แล้วหาแอคติวิตีของเอนไซม์ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามวิธีของไลน์วีเวอร์–เบิร์ก (Lineweaver-Burk Plot) ระหว่าง 1/V และ 1/[S] พบว่า ค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระเท่ากับ 12.50 และ 0.97 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 29 และ 30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 การประมาณค่า K_m โดยวิธีไลน์วิเวอร์-เบิร์กของเดกซ์แทรนเนสอิสระเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นสับสเตรท โดยวัดแอคติวิตีที่ 55 °ซ ความเป็นกรดด่าง 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 การประมาณค่า K_m โดยวิธีไลน์วิเวอร์-เบิร์กของเดกซ์แทรนแนสตรึงรูปเมื่อใช้เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นสับสเตรท โดยวัดแอคติวิตีที่ 55 °ซ ความเป็นกรดด่าง 5.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การสรุปและอภิปรายผล

1. การตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

นุสรา เจริญกิจทวี (2539) ได้ทำการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium* sp.สายพันธุ์ SMCU 3-14 เป็นครั้งแรกโดยวิธีล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยวิธีดังกล่าวมีข้อดี ที่ภาวะในการตรึงรูปนั้นไม่รุนแรง ทำให้เอนไซม์ตรึงจึงไม่เสียสภาพ (denature) และมีแอคติวิตีที่ดีอยู่เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ อีกทั้งแคลเซียมอัลจิเนตสามารถใช้งานที่อุณหภูมิ 55 °ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในการสลายเดกซ์แทรน ที-2000 ได้

อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ระหว่างเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในลักษณะที่เป็นเม็ดเจลกับสารละลายจากการสลายเม็ดเจล มีแอคติวิตีที่ต่างกันมาก (ดังตารางที่ 9) ทั้งนี้เนื่องจากว่า วิธีการตรึงเอนไซม์แบบล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนตนั้น เป็นวิธีที่กักขังเอนไซม์ไว้ในเม็ดเจล ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาสับสเตรทต้องแพร่ผ่านเข้าไปในรูพรุนของเม็ดเจลเพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ถูกตรึงอยู่ ซึ่งในกรณีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส สับสเตรท คือ เดกซ์แทรน ที-2000 เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ (MW 2,000,000) ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการแพร่ผ่านเข้าไปในรูพรุนของเม็ดเจลได้ ดังนั้นแอคติวิตีส่วนใหญ่จึงเป็นแอคติวิตีที่เกิดขึ้นอาจจะได้มาจากโมเลกุลของเอนไซม์ที่อยู่รอบเม็ดเจลเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tanaka และคณะ (1984) ที่พบว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 20,000 จะไม่สามารถผ่านเข้าออกจากรูพรุนของเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตได้

ในการทดลองพบว่า เมื่อนำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมาไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที-2000 แบบต่อเนื่องในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสจะลดลงอย่างรวดเร็วในรอบต่อๆ ไป และพบการบวมของเม็ดเจล ซึ่งมีผลทำให้ความแข็งของเม็ดเจลลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการหลุดออกของแคลเซียมไอออนจากเม็ดเจล โครงสร้างของเจลจะไม่คงตัว ดังนั้นโมเลกุลของเอนไซม์สามารถหลุดออกจากร่างแหของเม็ดเจล (gel lattice)ได้ โดย Shoichet และคณะ (1996) ได้รายงานว่า สารที่มีองค์ประกอบของ ซิเตรท แลคเตท และฟอสเฟต จะมีผลทำให้เม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตมีความเสถียรต่ำลง กล่าวคือ เม็ดเจลจะมีความแข็ง (gel strength) ลดลงนั่นเอง Blandino และคณะ (2000) ได้ทำศึกษาการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ในการขึ้นเม็ดเจล พบว่าสามารถที่จะลดการหลุดออกของโมเลกุลเอนไซม์ได้

แต่การเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตและแคลเซียมคลอไรด์ดังกล่าว จะมีผลต่อขนาดของรูพรุนโดยตรง ทำให้การผ่านเข้าออกของสารทำได้ยากขึ้น

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมา ทำให้เห็นว่าการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสแบบล้อมจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนตมีข้อจำกัด และเป็นการยากต่อการแก้ไขปรับปรุงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานอุตสาหกรรมจริง ดังนั้นจึงมีความพยายามในการเปลี่ยนวิธีการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสใหม่ด้วยวิธียึดติดโมเลกุลของเอนไซม์ไว้กับตัวพยุงโดยอาศัยแรงพันธะชนิดต่างๆ แล้วเปรียบเทียบวิธีที่เหมาะสมที่สุด เพื่อคัดเลือกนำไปใช้ในการตรึงรูปต่อไป

2. การคัดเลือกวิธีการตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส

ในงานวิจัยนี้ใช้ ทรายแม่น้ำ เป็นตัวพยุงเพื่อการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 สาเหตุที่เลือกใช้ทรายเป็นตัวพยุง คือ โดยคุณสมบัติของทรายที่ไม่มีพิษและไม่มีอันตรายเมื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทนต่อแรงกระแทกได้ดี สามารถคงรูปเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงหรือความเป็นกรดด่างที่รุนแรง และไม่ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นวัสดุที่สามารถหาได้ง่ายและมีราคาถูก เคยมีการศึกษาและนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์หลายชนิดเช่น ทริปซิน และ เรนนิน เป็นต้น

ในการพิจารณาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของพื้นผิวและขนาดของทรายที่จะใช้ในการทดลองทั้ง 3 ขนาด (ภาคผนวก ค.) พบว่า ทรายขนาด 16 - 20 เมช มีความเหมาะสมมากที่สุดที่จะนำไปใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิดไดซ์เบด (Fluidized Bed Reactor) โดยที่ทรายขนาด 16 - 20 เมช ดังกล่าวนี้ มีน้ำหนักที่พอเหมาะไม่เบาหรือหนักจนเกินไป

สำหรับการคัดเลือกวิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจากทั้งหมด 3 วิธีนั้น วิธีที่ให้แอคติวิตี แอคติวิตีจำเพาะและเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักขังไว้ (% Activity retained) ดีที่สุดนั้น คือ วิธีที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึง สอดคล้องกับการศึกษาของ Puvanakrishnan และ Bose (1980) ตรึงเอนไซม์ทริปซินบนพื้นผิวทราย, Zhou และ Chen (2001) ตรึงเอนไซม์บีตา-กาแลคโตซิเดส บนผิวของกราไฟต์ โดยกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารไบฟังก์ชันนัลมีส่วนช่วยในการยึดติดกับตัวพยุงให้ดีขึ้น โดยมีผลต่อบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์น้อยที่สุด หรืออาจเป็นไปได้ว่าวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์นี้ ทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ในระหว่างการตรึงน้อยที่สุดก็ได้ นอกจากนี้เมื่อใช้ทรายจากแหล่งตัวอย่างต่างๆ กัน มาทดลอง

ตรึงรูปเอนไซม์ไม่ปรากฏความแตกต่างของแอคติวิตีภายในวิธีการเตรียมแบบเดียวกัน (ตารางที่ 10) แสดงว่าทรายแต่ละแหล่งตัวอย่างนั้น น่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวพยุงสำหรับตรึงเอนไซม์ สิน สินสกุล (2540) รายงานไว้ว่า ทรายที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมทำแบบหล่อหรือก่อสร้างจะประกอบไปด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ซิลิกา (SiO_2) มากกว่า 98% และนอกเหนือจากนั้นจะปนเปื้อนด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ เช่น แคลเซียม (CaO) และแมกนีเซียม (MgO) เป็นต้น

จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้กล่าวมา จึงได้เลือกวิธีการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสต่อไป

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนผิวของทราย

ในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ วิธีที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด โดยเลือกที่จะเตรียมภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง (28 – 31 ^{o}ซ) และใช้อัตราการเขย่าสำหรับการทำปฏิกิริยาที่ 200 รอบต่อนาที โดยที่คำนึงถึงความสะดวกในการทำการทดลอง รวมถึงเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานที่จะต้องใช้ในการควบคุมอุณหภูมิ เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดเมื่อมีการชนกันของตัวทำปฏิกิริยา ทั้งนี้อัตราการเขย่าด้วยความเร็วรอบดังกล่าวข้างต้นนั้น เพียงพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ ประกอบกับเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ใช้ในงานวิจัยนี้จากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3–14 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้ดี ดังนั้นการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง จึงไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

สำหรับในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทรายนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% (โดยปริมาตร)ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0 โดยใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 120 นาที ซึ่งกลไกการตรึงรูปและการทำงานอาจอธิบายได้ว่า การตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสบนผิวของทรายโดยมีเฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึงนั้น กลูตารัลดีไฮด์จะมีส่วนช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโยงโมเลกุลโปรตีนของเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่ำๆ โปรตีนสามารถยึดติดกับผิวของทรายได้มาก มีผลมาจากการจัดเรียงโมเลกุลโปรตีนอาจยังไม่เป็นระเบียบ ยังผลให้เกิดแรงยึดติดแบบดูดซับระหว่างโมเลกุลโปรตีนอื่นๆ ตามมาด้วย จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์สูงขึ้น ทำให้การจัดเรียงตัวโมเลกุลโปรตีนของเอนไซม์นั้นมีความเป็นระเบียบมากขึ้น โดยเกิดขึ้นจากการเชื่อม

โยงด้วยกลูตารัลดีไฮด์เพียงเท่านั้น มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น นอกจากนี้ความเข้มข้นและค่าความเป็นกรดด่างของบัพเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายกลูตารัลดีไฮด์ดังกล่าวข้างต้นนั้น จะมีผลทำให้การจัดเรียงตัวของโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์บนผิวของทรายมีความเหมาะสมที่สุด ยังผลให้เอนไซม์ที่สร้างพันธะยึดติดกับกลูตารัลดีไฮด์สามารถแสดงแอคติวิตีที่ดีตามไปด้วย สอดคล้องกับการรายงานของ Puvanakrishnan และ Bose (1980) ที่ตรึงเอนไซม์ทริปซินบนพื้นผิวของทรายโดยใช้วิธีเดียวกัน ซึ่งอธิบายได้ว่าการจัดเรียงโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์ในช่วงความเป็นกรดด่างที่เป็นกลางจนถึงด่างนั้น มีความเหมาะสมมากกว่าในช่วงที่เป็นกรด

ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส สภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 0.8450 มก.โปรตีน และระยะเวลาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสเท่ากับ 45 นาที ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นตั้งแต่ 0.1690 – 3.3800 มก. นั้น ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงและแอคติวิตีของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสมีแนวโน้มสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 13 เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสด้วยวิธีการเตรียมที่ใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์นั้น เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อมีการชนกันของตัวทำปฏิกิริยา ในที่นี้คือหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์กับหมู่ฟังก์ชันนัลของเอนไซม์ ดังนั้นความเข้มข้นที่ต่ำของเอนไซม์ จะทำให้อัตราการชนกันของหมู่ฟังก์ชันนัลของเอนไซม์กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์เกิดขึ้นได้น้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น อัตราการชนกันก็เกิดได้มาก ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยึดติดของโปรตีนและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปจะมีผลตรงกันข้าม เนื่องจากพารามิเตอร์ทั้งสองนี้มีการลดลงตามลำดับ ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อค่าพารามิเตอร์ทั้งสอง คือ วิธีการวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งเป็นผลมาจากการคำนวณผลต่างของปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการตรึง ดังนั้นในการเลือกสภาวะที่เหมาะสม จำเป็นต้องเลือกพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ที่มีความเชื่อถือมากที่สุด ซึ่งในการทดลองนี้คือ แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึง โดยทั้งสองค่าพารามิเตอร์นี้จะต้องพิจารณาควบคู่กัน

นอกจากนี้ ผลของการเพิ่มระยะเวลาการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนสตั้งแต่ 15 - 180 นาที มีผลให้แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงเพิ่มขึ้นนั้น สามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่มเวลาในช่วงแรกๆ ตั้งแต่ 15 ถึง 45 นาทีนั้น ทำให้มีโอกาสเกิดพันธะระหว่างเอนไซม์กับกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น ต่อมาเมื่อเพิ่มเวลาให้นานขึ้นอีก เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ได้เนื่องจากหมู่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หมดแล้ว แอคติวิตีและปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงจึงเข้าสู่ภาวะคงที่

สำหรับสารละลายบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส คือ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.0 ซึ่งอธิบายได้ว่า การเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกนั้น เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำให้เอนไซม์สามารถถูกตรึงบนทรายได้ดี แต่เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างขึ้นไปอีก การเกิดพันธะระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับโปรตีนเป็นไปได้ยากขึ้น ทำให้เอนไซม์ถูกตรึงได้น้อยลง ค่าแอคติวิตีที่ได้จึงต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 17 และที่ค่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ดังกล่าวนั้น เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะมีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะดีที่สุด โดยที่เป็นค่าเดียวกับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป

ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงสำหรับงานวิจัยนี้ ได้ใช้วิธีของ Lowry (1951) โดยคำนวณจากผลต่างของปริมาณโปรตีนเริ่มต้นกับปริมาณโปรตีนที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาในน้ำล้าง แต่พบว่าปริมาณโปรตีนที่ถูกตรึงนั้นมีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำมาก จึงทำให้มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ ซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดในการคำนวณผลได้สูง ดังนั้นการนำค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวนี้ไปพิจารณาเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองนั้น จะต้องนำค่าพารามิเตอร์อื่นๆ มาพิจารณาประกอบด้วยเสมอ เช่น แอคติวิตีของเอนไซม์ เป็นต้น

4. ศึกษาการหลุดของเดกซ์แทรนเนสจากทรายที่ทำหน้าที่เป็นตัวพยุงของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

จากรูปที่ 19 พบว่า การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้เฉพาะกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารช่วยในการตรึงนั้น หลังจากแยกเดกซ์แทรนเนสออกจากสารผสมปฏิกิริยา น้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้ยังคงมีปริมาณคงที่ แสดงว่า การยึดเกาะของเอนไซม์บนผิวทรายมีความแข็งแรงเพียงพอ อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปได้ทำภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มคือ 55 ^{o}ซ และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 นั่นแสดงว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้นไม่มีผลต่อการหลุดออกของเอนไซม์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

ในการหาค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระเท่ากับ 4.5 และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเท่ากับ 5.0 โดยเลื่อนไปทางด่างเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 22 ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่า ในกระบวนการตรึงรูปเอนไซม์นั้น หมู่อะมิโน ($-NH_2$) ของเอนไซม์จะถูกนำไปสร้างพันธะโควาเลนท์กับกลูตารัลดีไฮด์ จึงทำให้หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ไม่แตกตัว ดังนั้นจึงต้องเพิ่ม pH ให้สูงขึ้น เพื่อช่วยในการแตกตัวเป็น ($-COO^-$) ทำให้เอนไซม์สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น ยังผลให้มีประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้นตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramesh และ Singh (1980) ที่ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบน Zirconia coated alkylamine glass โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเลื่อนจาก 5.4 มาที่ 5.2 - 6.2 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน พบว่าทั้งเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากัน คือ 55 °ซ แต่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีเหลืออยู่มากกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระที่อุณหภูมิเดียวกัน ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากวิธีการตรึงรูปและตัวพยุงมีส่วนช่วยในการรักษาสภาพโมเลกุลของโปรตีนไม่ให้เสียสภาพ (denature) คล้ายกับการรายงานของ Pifferi และคณะ (1989) ที่ได้ตรึงรูปเอนไซม์เอนโด-โพลีกาแลคทูโรเนสบน Trimalehylchitosan (TMC)

นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์อิสระมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างที่ดีในช่วงตั้งแต่ 4.5 -6.5 ส่วนเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอยู่ในช่วงที่แคบกว่า คือตั้งแต่ 3.5 - 4.5 โดยเลื่อนไปทางกรด ทั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Pifferi และคณะ (1989) ที่ได้ตรึงรูปเอนไซม์ เอนโด-โพลีกาแลคทูโรเนส บน Trimalehylchitosan (TMC) ซึ่งผลดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับค่า Isoelectric pH ของเอนไซม์ตรึงรูปชนิดนั้นๆ ส่วนความเสถียรต่ออุณหภูมินั้น พบว่า เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ในช่วงที่กว้างกว่าเอนไซม์อิสระและยังคงรักษาแอคติวิตีไว้ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิเดียวกัน โดยมากแล้วการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงจะความเสถียรต่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Chibata (1978) อธิบายไว้ว่า ไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนของความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรึงรูปเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน ดังนั้นจึงเป็นสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อวิธีการตรึงรูปแต่ละแบบ

สำหรับการเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปไว้ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 พบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้น เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปยังคงรักษาแอคติวิตีได้ดีตลอดอายุการเก็บทั้งหมด 30 วัน เป็นผลเนื่องมาจากที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้น อยู่ในช่วงที่เอนไซม์ตรึงรูปมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างดีที่สุด ส่วนที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะลดลงไปบ้าง ตามลำดับ

ในการเปรียบเทียบการใช้ซ้ำเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเพื่อไฮโดรไลซ์เดกซ์แทรน ที-2000 ที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 5.0 เปรียบเทียบอุณหภูมิระหว่าง 45 และ 50 °ซ พบว่า อุณหภูมิในการทำงานมีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส โดยที่ทั้ง 2 สภาวะนั้น มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ยังคงรักษาแอคติวิตีไว้ได้ดีกว่า ดังแสดงในรูปที่ 27 และเมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 4.5 และ 5.0 โดยคงอุณหภูมิที่ 40 °ซ แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกัน โดยพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้น เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ดีกว่าที่ 5.0 สืบเนื่องมาจากที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 นั้น เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีความเสถียรที่ดีกว่านั้นเอง

และจากการประมาณค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปต่อเดกซ์แทรน ที-2000 พบว่า เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีค่า K_m สูงกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระเท่ากับ 12.50 และ 0.97 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แสดงว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระมีความไวในการจับกับเดกซ์แทรนได้ดีกว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ซึ่งผลของการเพิ่มขึ้นของค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสหลังจากการตรึงรูป สอดคล้องกับผลการรายงานการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสของ Abdel-Naby และคณะ (1999), Ramesh และSingh (1980), Sugiura และ Ito (1975), และ Sugiura และ Ito (1974)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 สรุปสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

ขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (สภาวะที่เหมาะสม)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย) [1]	โปรตีนที่ถูกตรึงทั้งหมด (มก.โปรตีน) [1]	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)
ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ **(2.5 เปอร์เซ็นต์)**	14.9412	0.1400	106.72
อัตราการเขย่า **(200 รอบต่อนาที)**	15.1320	0.1400	108.09
เวลาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย **(120 นาที)**	14.9706	0.1400	106.93
ปริมาณเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสเริ่มต้น **(0.8450 มก.โปรตีน)**	16.3158	0.1400	116.54
เวลาในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส **(45 นาที)**	16.9590	0.1400	121.14
พีเอชในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย **(พีเอช 7.0)**	17.3478	0.1400	123.91
ความเข้มข้นของบัพเฟอร์ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับทราย **(0.5 โมลาร์)**	17.1348	0.1400	122.39
พีเอชในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส **(พีเอช 4.0)**	17.5440	0.1400	125.31
ความเข้มข้นของบัพเฟอร์ในขั้นตอนการตรึงเดกซ์แทรนเนส **(0.05 โมลาร์)**	17.6022	0.1400	125.73
อุณหภูมิในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป **(อุณหภูมิห้อง 28 – 31°ซ)**	17.8950	0.1400	127.82

หมายเหตุ

[1] คำนวณจากน้ำหนักทรายเปียกทั้งหมด 6.0 กรัม

ทราย (16-20 เมช)
5.0 กรัม (น้ำหนักแห้ง)
↓
เติมกลูตารัลดีไฮด์ 2.5 % ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์
0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0 ปริมาตร 10 มล.
↓
เขย่า 200 รอบต่อนาที, เป็นเวลา 2 ชม. (อุณหภูมิห้อง 28 – 31 °ซ)
↓
เทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% ทิ้ง
↓
ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง
↓
เติมเดกซ์แทรนเนส (crude enzyme) ปริมาตร 1 มล. เทียบเท่ากับ 0.8450 มก.โปรตีน
และสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.0 ปริมาตร 9 มล.
↓
เขย่า 200 รอบต่อนาที, เวลา 45 นาที (อุณหภูมิห้อง 28 – 31 °ซ)
↓
ล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5, 4 ครั้ง
↓
เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป
(เก็บไว้ในสารละลายอะซิเตทบัพเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 4.5 ที่ 4 °ซ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 สรุปแผนผังแสดงขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบสมบัติบางประการของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเดกซ์แทรนเนสอิสระ

สมบัติของเอนไซม์	เดกซ์แทรนเนสอิสระ	เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (งานวิจัยนี้)	เดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (นุสรา เจริญกิจทวี, 2539)
แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	410.63	152.05	64.93
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	4.5	5.0	4.5
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	55 °ซ	55 °ซ	55 – 60 °ซ
ช่วงความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	4.5 – 6.5	3.5 – 4.5	-
ช่วงความเสถียรต่ออุณหภูมิ	≤ 45 °ซ	≤ 50 °ซ	-
K_m (ไมโครโมลาร์)	0.97	12.50	1.79 (วิเคราะห์จากการสลายเม็ดเจล)

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้รายงานไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอด และสิริวัฒนา จิตตรีพล. 2539. การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงในน้ำตาลทรายขาวของประเทศไทย. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขา อุตสาหกรรมการเกษตร. 30 ม.ค. – 1 ก.พ. : 173 – 180.

กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2540. ผลกระทบของอ้อยไฟไหม้ต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลไทย. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กองการค้นคว้าและทดลอง. 2510. คู่มือนักวิชาการ.

ณฐินี สุวรรณสิงห์. 2533. เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นุสรา เจริญกิจทวี. 2539. การตรึงเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อ *Penicillium* sp. SMCU 3-14. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญส่ง แสงอ่อน. 2525. บทบาทของแบคทีเรียในน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฝ่ายนโยบายและเศษรฐกิจน้ำตาล. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. กระทรวงอุตสาหกรรม. 2542. อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายในประเทศไทย 2541 - 2542.

ฝ่ายพัฒนาเทคโนโลยีน้ำตาล. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล. กระทรวงอุตสาหกรรม. 2532. กรรมวิธีการผลิตน้ำตาล.

สันต์ ฉายตระกูล. 2525. เดกซ์แทรนศัตรูสำคัญของกระบวนการผลิตและคุณภาพน้ำตาลทราย. วารสารน้ำตาล พ.ค. – มิ.ย. : 5 – 9.

สิน สินสกุล. 2540. ทรายในประเทศไทย. การสัมมนา เรื่อง การจัดการทรัพยากรทรายของประเทศไทย. : 1 – 11.

สุวรรณา นพพรพันธ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุษณีย์ กุลินทรประเสริฐ. 2535. การตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอก แสงวิเชียร, 2531. เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.S., Abdel-Fattah, A.M., and Abdel-Fattah F. 1999. Preparation and Some Properties of Immobilized *Penicillium funiculosum* 258 Dextranase. Process biochem. 34 : 391 – 398.

Baily, R. W. and Slark, R. T. 1959. A Bacterial Dextranase. Biochem J. 72, 49 – 54.

Barnes, A.C. 1974. The Sugar Cane. Billing and Sons. London. p 424 – 469.

Blandino, A., Macias, M., and Cantero, D. 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. Enzym. Microb. Technol. 27 : 319 – 324.

Chaiet, L. Kempf, A. J., Harman, R., Kaczka, E., Weston, R., Nollstadt, K. and Wolf, F. J. 1970. Isolation of A Dextranase from *P. funiculosum*. Appl. Microbiol. 20 : 421 – 426.

Chibata I. 1987. Immobilized Enzyme (Research and Development). John Wiley and Sons, New York. p. 5 – 7.

Crueger, W. and Crueger, A. 1991. Bitechnolgy : A Textbook of Industrial Microbiology. Science Tech, Inc., Madison. p 386.

Foxgarty, W. M. and Kelly, C. J. 1984.Topics in Enzyme and Fermentation Technology 3. (wiseman A.ed.) John Wiley and Sons, New York. p. 67 – 69

Galvez-Mariscal, A. and Lopez-Mungia, A. 1991. Production and Characterization of Dextranase from an Isolated *Pacilomyces lilacinus* Strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 327 – 331.

Godfrey, T. and Reichelt, 1983. J. Industrail Enzymology. Macillan Pub. The Nature Press, U.K. p. 432 – 478

Hattori, A. and Ishibashi, K. 1981. Screening of Dextranase of Producing Microorganisms. Agric. Biol. Chem., 45 : 2347 – 2349.

Hattori, A., Ishibashi, K. and Minati, S. 1981. The Purification and Characterization of the Dextranase of *Chaetomium gracile*. Agric. Biol. Chem. 45 : 2409 – 2416.

Hirsoka, N., Fukumoto, J. and Tsuru D. 1972. Studies (III) Purification and Some Enzymatic Properties of *A. carneus*. J. Biochem. 71 : 57 – 64.

Imrie, F.K.E. and Tibury, R.H. 1972. Polysaccharides in Sugar Cane and its Products. Williums, J. C. and Kelsell, D. F., CS.I.R.O. (eds.) Sugar Tech. Reviews. Elsevier Publishing Company. Netherlands. 5(1) : 291 – 361.

Inkerman, P.A. 1980. An Appraisal of the Use of Dextranase. Proc. 15th ISSCT. p 2411 – 2427.

Irvine, J.E. 1981. Fields Organics of Dextran and Other Sustance Affecing Sucrose Crystallization. Sug. Y. Azucar. 76(7) : 43 –47.

Jolly, S.C. and Prakash, C. 1987. Removal of Dextran from Cane Juice. Int. Sugar J. 89 : 184 – 189.

Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1983. Solid Phase Biochemistry. Wiley. New York. p 253 – 391.

Kennedy, J.F. and Cabral, J.M.S. 1987. Enzyme immobilization. In J. F. Kennedy (ed.) Biotechnology Vol. 7a. : Enzyme Technology. Fed. Repub. Of Germany, Weinheim. p 349 – 402.

Kobayashi, M., Takagi, S., Shiota, M., Mitsushi, Y. and Matsuda, K. 1983. An Isomaltotriose – producing Dextranase from *Flavobacterium* sp. M – 73 Purification and Properties. Agric. Biol. Chem. 47 : 2585 – 2593.

Koenig, D. W. and Day, D. F., 1988. Production of Dextranase by *Lipomyces stsrkeyi*. Biotech Lett. 10(2) : 117 – 122.

Koenig, D.W. and Day, D.F. 1989. The Purification Characterization of a Dextranase from *Lipomyces strakeyi*. Eur. J. Biochem. 183 : 161 – 167.

Kosaric, M., Yu, K. and Zajic, J. E. 1973. Dextranase Production from *P. funiculosum*. Biotechnol. Bioeng. 15 : 729 – 741.

Lee, J.M. and Fox, P.F. 1985. Purification and Characterization of *Paecilomyces lilacinus* Dextranase. Enzym. Microb. Technol. 7 : 573 – 577.

Madhu and Prabhu, K. A. 1984. Studies on Dextranase from *P. aculeatum*. Enzym. Microb. Technol. 6 : 217 – 220.

Monsan, P. and Pual, F. 1991. Noval Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides and Polysaccharides. Food Enzymology. Elsevier Applied Science, English. p. 77 –79.

NOVO. 1983. Product from Data Infromation 112C – GB, Novo Enzyme Division, Denmark.

Pifferi, P. G., Tramontini, M., and Malacarne, A. 1989. Immobilization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* on Various Types of Macromolecular Supports. Biotechnol. Bioeng. 33 : 1258 – 1266.

Puvanakrishnan, R., and Bose, S. M. 1980. Studies on the Immobilization of Trypsin on Sand. Biotechnol. Bioeng. 12 : 919 – 928.

Ramesh, V. and Singh, C. 1980. Bacterial Dextranase Immobilized on Zirconia Coated Alkylamine Glass using Glutaraldehyde. Bichem. Biophys Res. Commun. 97 : 779 – 786.

Shoichet, M. S., Li, R. H., White, M. L., and Winn, S. R. 1996. Stability of Hydrogels Used in Cell Encapsulation : An in vitro Comparison of Alginate and Agarose. Biotechnol. Bioeng. 50 : 374 – 381.

Sidebotham, R. L. 1974. Dextrans. Adv. Carbohydate Chem. Biotechnol. 30 : 371 – 444.

Solvey. 1996. Product from Data Information, Solvey Enzyme Division, Singpore.

Staat, R. H. and Schachtele, C. F. 1974. Dextranase from Oral Bacteria. Infect. And Immun. 12 : 309 – 317.

Staat, R. H., Gawronski, T. H. and Schachtele. C. F. 1973. Detection and Preliminary Studies on Dextranase Producing Microorganism from Human Dental Plaque. Infect. And Immun. 8 : 1009 – 1016.

Sugiara, M. and Ito, A. 1974. Studies on Dextranase IV. Immobilization of Dextranase from *Penicillium funiculosum* IAM 7013. Chem. Pharm. Bull. 22 : 2941 – 2946.

Sugiura, M. and Ito, A. 1975. Studies on Dextranase VIII : Some Enzymatic Properties of Immobilized Dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum*. Chem. Pharm. Bull. 23 : 3223 – 3227.

Szczodrak, J., Pleszczynska, M. and Fiedurek, J. 1994. *Penicillium notatum* 1 a New Source of Dextranase. J Indust. Microbiol. 13 : 315 – 320.

Tanaka, H., Matsumura, M., and Veliky, I. A. 1984. Diffusion characteristics of substrate in Ca-alginate gel beads. Biotechnol Bioeng. 16 : 53 – 58.

Taylor, R.F. 1991. Commercially Available Supports for Protein Immobilization. Marcel Dekker Inc., New York. p 377.

Tchuchiya, H. M., Jeanes, A., Briker, H. M. and Wilham, C. A. 1952. Dextran Degrading Enzymes from Molds. J. Bacteriol. 52 : 513 – 519.

Tilbury, R.H. 1971. Dextran and Dextranase. Proc. 14th ISSCT. p 1277 – 1286.

Tilbury, R.H. 1974. Further Stdies on Enzymatic Hydrolysis of Dextran in Mill Jiuces by Dextranase and Fungal α -amylase. Proc. 15th ISSCT. p 1444 – 1258.

Wang, D.I.C., Coony, C.L., Demain, A.L. 1979. Enzyme Kinetics and Immobilization in ferment. Technol. John Wiley ans Sons. USA. p 318 – 336.

Watson, P.R. and Woff, A. 1955. J. Am. Chem. Soc. 77 : 196.

Webb, E. and Spencer-Martins, I. 1983. Extracellular Endodextranase from the Yeast *Lipomyces stsrkeyi*. Can. J. Microbiol. 29 : 1092 – 1095.

Wheatley, M. A. and Moo-Young, M. 1977. Degradation of Polysaccharide by Endo- and Exoenzyme : Dextran–Dextranase Model System. Biotechnol. Bioeng. 19 : 219 – 233.

Wynter, C.V.A., Chang, M., De Jersey, J., Patel, B., Inkerman, P.A., and Hamilton, S. 1997. Isolation and Characterization of a Thermostable Dextranase. Enzym. Microb. Technol. 20 : 242 –247.

Yamaguchi, T. and Gocho, J. 1973. Produ ction and Properties of Alkaline Dextranase from a Newly Isolation *Brevibacterium* sp. Agric. Biol. Chem. 37 : 2527 – 2533.

Zevenhuizen, L. P. T. M. 1968. Cell–bound Exodextranase of *Bacillus* sp. Carbohydrate Res. 6 : 310 – 318.

Zhou, Q. Z. K., and Chen, X. D. 2001. Immobilization of β-galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde. J. Food Eng. 48 : 69 – 74.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสตามวิธี Fukumoto และคณะ ซึ่งปรับปรุงโดย เอก แสงวิเชียร(2531)

เดกซ์แทรนเกรดอุตสาหกรรม (น้ำหนักโมเลกุล 4 - 50 $\times 10^6$)	1.0	เปอร์เซ็นต์
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	0.2	เปอร์เซ็นต์
ไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.2	เปอร์เซ็นต์
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.05	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	เปอร์เซ็นต์
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.0005	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	0.2	เปอร์เซ็นต์

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4.0 นึ่งฆ่าเชื้อ 121°ซ 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi (1952) – Nelson (1944)

1.1 อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (Alkaline copper reagent)

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม และเกลือของโรเซล (Potassium ammonium tartrate.$4H_2O$) 40 กรัม ในน้ำ 700 มล. เติม 1 นอร์มัล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มล. แล้วเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 80 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนนำมาใช้

1.2 เนลสัน รีเอเจนต์ (Nelson's reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$] 53.2 กรัม ในน้ำปลอดประจุ 900 มล. แล้วเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 21 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย โซเดียมอาซีเนท ($NaHASO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 12% ปริมาตร 50 มล. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปลอดประจุ เก็นในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนนำมาใช้

2. รีเอเจนต์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

2.1 สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12.0	กรัม
โซเดียมโปรตัสเซียมทาร์เทรท	0.6	กรัม
น้ำปลอดประจุ	3.0	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	5.0	กรัม
น้ำปลอดประจุ	1.0	ลิตร

2.3 สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย

สารละลาย Lowry A	50	ส่วน
สารละลาย Lowry B	1	ส่วน

2.4 สารละลาย Lowry D (phenol reagent)ประกอบด้วย

สารละลายโพลิน ฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำปลอดประจุ	1	ส่วน

3. สารละลาย 3–อะมิโนโพรพิวไทรเอททอกซีไซเลน (APTS)

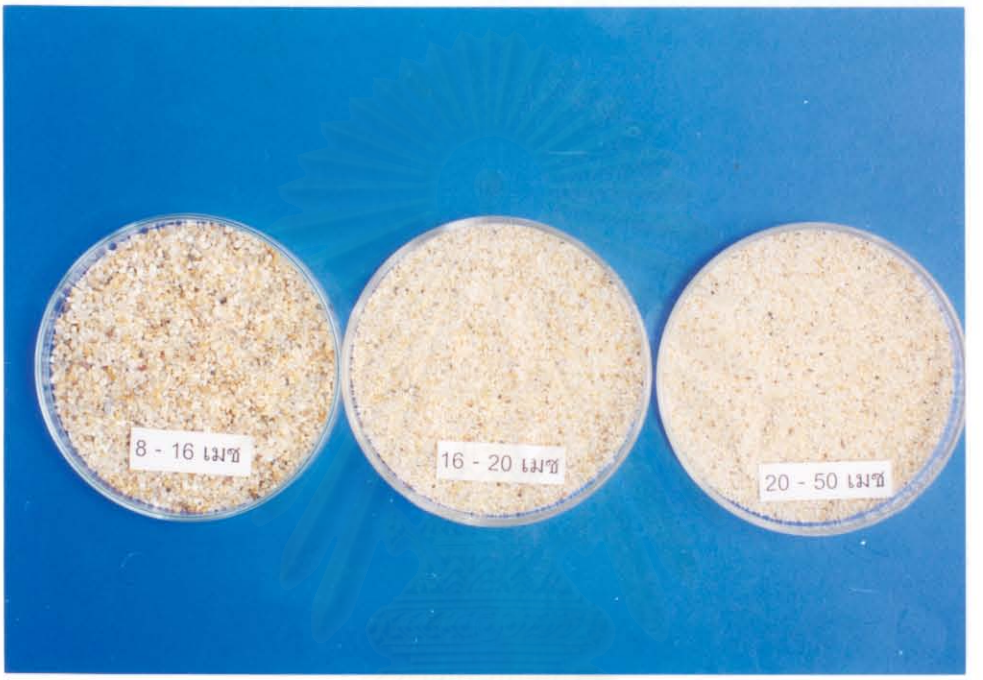
เตรียมสารละลาย 3–อะมิโนโพรพิวไทรเอททอกซีไซเลนในอะซิโตน ให้มีความเข้มข้นเป็น 5% (โดยปริมาตร) สารละลายนี้จะทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นตัวพยุงในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

4. สารละลายกลูตารัลดีไฮด์

เตรียมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในสารละลายบัพเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นที่ใช้ 2.5% สารละลายนี้จะทำหน้าทีเป็นสารสร้างพันธะร่วมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปวิธีที่ 1 และสารช่วยในการตรึงรูปเอนไซม์วิธีที่ 3

ภาคผนวก ค.

ค-1 ลักษณะของตัวพยุงที่ใช้ในการตรึงรูป



รูปที่ ค-1.1 เปรียบเทียบขนาดของทรายที่นำมาคัดเลือกใช้ในการตรึงรูป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ค-1.2 ลักษณะของทรายขนาด 16 – 20 เมช ที่ใช้ในการตรึงรูป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ค-1.3 ภาพถ่ายลักษณะพื้นผิวของทรายขนาด 16 – 20 เมช
ภายใต้กล้องอิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นาย อนันตพงษ์ สุขเกษ เกิดวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 และเข้ารับการศึกษาต่อในขั้นปริญญาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541 ที่อยู่ปัจจุบัน เลขที่ 168 หมู่ที่ 2 ตำบลบ่อโพง อำเภอนครหลวง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย