บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

5.1.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป

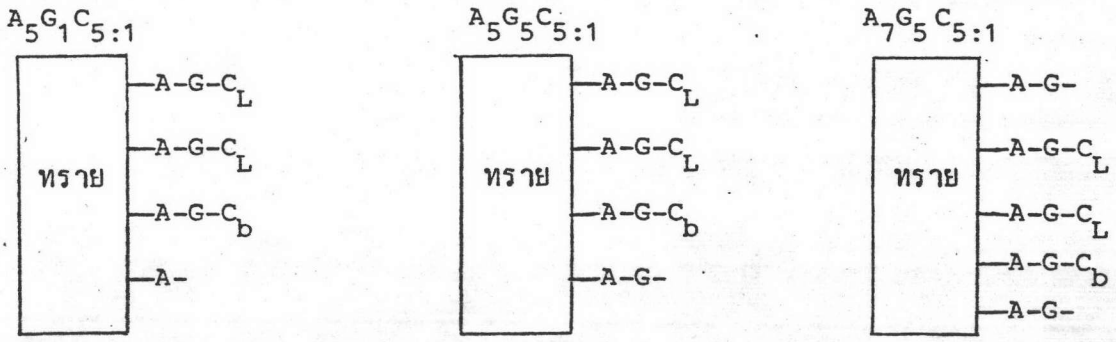
จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 ในรูปที่ 25 พบว่าการตรึงรูปเมื่อใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 โดยปริมาตรไปจนถึงความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรนั้น แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์โดยการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้เป็นปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดเมื่อมีการชนกันของตัวทำปฏิกิริยา (reactant) ในที่นี้ได้แก่ หมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์ หรือของเอพีทีเอสกับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน การตรึงรูปโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นต่ำเกินไป เช่น ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรทำให้อัตราการชนของหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนกับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์หรือของเอพีทีเอสเกิดขึ้นต่ำเกินไป ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเกาะบนเม็ดทรายไม่เพียงพอจึงมีผลให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีต่ำ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนไปจนถึงร้อยละ 20 โดยปริมาตร ทำให้โอกาสเกิดการชนของสารตั้งต้นดังกล่าวมีเพิ่มขึ้น เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนสามารถเกาะบนเม็ดทรายได้เพิ่มขึ้น จึงได้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเป็นร้อยละ 25 โดยปริมาตร พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปที่ได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนเกือบคงที่นั้นอาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร มีการเกาะหรือสร้างพันธะโคเวเลนต์ของเอนไซม์บนเม็ดทรายอย่างสมบูรณ์แล้ว ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนจึงไม่มีผลเพิ่มปริมาณเอนไซม์บนเม็ดทรายอีก และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนนี้ไม่ก่อให้เกิดผลบดบัง (steric effect) แต่อย่างใด อาจเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสส่วนที่มากเกินพอจากการสร้างพันธะโคเวเลนต์นั้นถูกชะล้างโดยบัฟเฟอร์พีเอช 5.2 ออกได้ง่าย

ดังนั้นจึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้เมื่อเตรียมโดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยปริมาตรจึงเท่ากับเมื่อเตรียมโดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ดังรูปที่ 25

5.1.2 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.1.2 เมื่อวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอด พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และ 95 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนนี้เป็นการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์อันเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและปฏิกิริยาจะเกิดได้เมื่อมีการชนกันของสารตั้งต้น ซึ่งก็คือหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์หรือของเอพีทีเอสกับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดย Duncan's new multiple range test พบว่าการตรึงรูปที่ใช้สารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตรในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์นั้นจะให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 11 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ใช้ในการตรึงรูปนั้นมีปริมาณของเอนไซม์เซลโลไบเอสที่ค่อนข้างจำกัดหรืออีกนัยหนึ่งคือเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ใช้มีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มีแอคติวิตีไม่แตกต่างกัน ซึ่งเหตุผลดังกล่าวอาจอธิบายได้ดังรูปที่ 40 ดังนี้

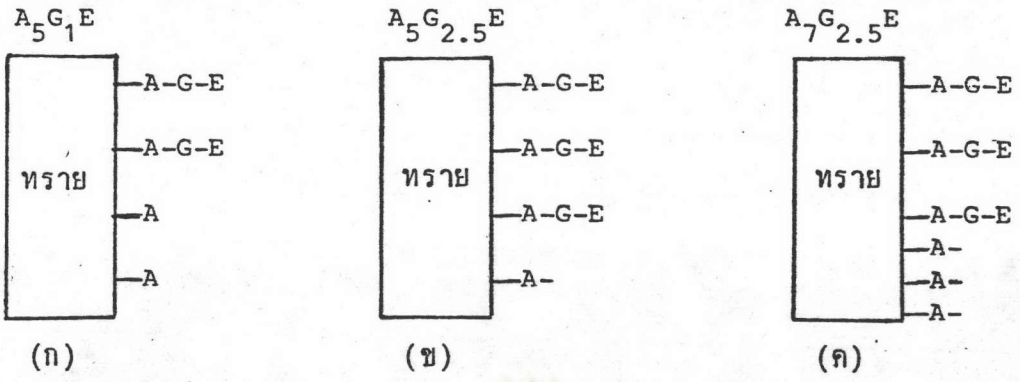


รูปที่ 40 การคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้จากภาวะความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตาราลดีไฮด์ต่างกัน แต่กลับมีแอคติวิตีเท่ากัน เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ใช้มีอัตราส่วนของเอนไซม์ประกอบที่จำกัด

C_E,C_b หมายถึงเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เซลโลไบเอส ตามลำดับ

5.1.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตาราลดีไฮด์และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสโดยน้ำหนักในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

จากผลการทดลองข้อ 4.1.3 เมื่อวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดดังตารางที่ 12 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอส มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 อาจเป็นเพราะเอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนมีการเชื่อมพันธะโคเวเลนต์กับเฉพาะหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตาราลดีไฮด์เท่านั้น ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายกลูตาราลดีไฮด์และอัตราส่วนองค์ประกอบของเอนไซม์เท่านั้นจึงมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป ดังรูปที่ 41



รูปที่ 41 การคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปซึ่งมีแอคติวิตีขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนของเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

โดย A = เอพีทีเอส

G = กลูตารัลดีไฮด์

E = เอนไซม์ซึ่งอาจเป็นเอนไซม์เซลลูเลสหรือเอนไซม์เซลโลไบเอสก็ได้

เมื่อพิจารณาตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่าการตรึงรูปโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนซึ่งมีสัดส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 มีแนวโน้มที่จะให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ซึ่งมีสัดส่วนขององค์ประกอบดังกล่าวเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก ในทุกระดับของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ที่เท่ากัน เช่น การตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_1C_{2:1}$ จะให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_1C_{5:1}$ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อเพิ่มส่วนของเอนไซม์เซลโลไบเอสจาก 1 ส่วนในทั้งหมด 6 ส่วน เป็น 1 ใน 3 ส่วน ทำให้โอกาสที่เอนไซม์เซลโลไบเอสจะเข้าชนกับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์บนเม็ดทรายก็จะมีมากขึ้น จึงมีผลให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น แต่เมื่อสัดส่วนของเอนไซม์เซลโลไบเอสเพิ่มจาก 1 ใน 3 ส่วน เป็น 1 ใน 2 ส่วนของทั้งหมดนั้น ทำให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้กลับมีแอคติวิตีเท่าเดิม (เช่น ในภาวะ $A_7G_1C_{2:1}$ และภาวะ $A_7G_1C_{1:1}$ ให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีแอคติวิตีเท่ากัน) หรือลดลงอาจเป็นเพราะเอนไซม์เซลโลไบเอสที่เพิ่มขึ้นมีผลขัดขวางกันเอง (9) ในการเข้าชนกับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์บนเม็ดทราย ทำให้เอนไซม์เซลโลไบเอสที่มีมากขึ้นเข้าเกาะบนเม็ดทรายได้เท่าเดิมหรือน้อยลง หรืออาจเป็นเพราะการเพิ่มส่วนของเอนไซม์เซลโลไบเอสมากเกินไปมีผลให้สัดส่วน

ของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกาะบนเม็ดทรายลดลงจึงทำให้ได้เซลโลไบโอสและเซลโลทริโอส (ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์เซลโลไบเอส) ในปริมาณต่ำ ดังนั้นแม้ว่าบนเม็ดทรายจะมีเอนไซม์เซลโลไบเอสในสัดส่วนที่สูงก็ไม่ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความแตกต่างของแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมจากภาวะต่าง ๆ กันโดย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 13 พบว่าภาวะการตรึงรูป $A_5G_{2.5}C_{2:1}$ ให้เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุด แต่ยังมีภาวะอื่นที่จัดอยู่ในระดับเดียวกันคือ ภาวะ $A_5G_{2.5}C_{1:1}$, $A_5G_5C_{2:1}$, $A_7G_{2.5}C_{2:1}$, $A_7G_{2.5}C_{1:1}$, $A_7G_5C_{2:1}$ และ $A_7G_5C_{1:1}$ การที่เลือกภาวะการตรึงรูป $A_5G_{2.5}C_{2:1}$ เป็นภาวะการตรึงรูปที่เหมาะสมที่สุด มีเหตุผลดังนี้

5.1.3.1 ภาวะการตรึงรูปที่ใช้สารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นสูง นอกจากจะไม่มีผลช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้แล้วยังเป็นการสิ้นเปลืองอีกด้วย เนื่องจากเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์มีราคาสูง

5.1.3.2 สำหรับภาวะการตรึงรูป $A_5G_{2.5}C_{1:1}$ จะเห็นได้ว่าต้องเสริมเอนไซม์เซลโลไบเอสลงในเอนไซม์เซลลูเลสเดิมในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งการเสริมดังกล่าวไม่มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเพิ่มขึ้น แต่กลับเป็นการสิ้นเปลืองเมื่อเทียบกับภาวะ $A_5G_{2.5}C_{2:1}$ ซึ่งต้องการเอนไซม์เซลโลไบเอสเพื่อเสริมในเอนไซม์เซลลูเลสเดิมน้อยกว่าภาวะแรก

5.1.4 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปในภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอส และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้อ 4.1.4 ดังแสดงในรูปที่ 26 เมื่อเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปในภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ

2.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ โดยแปรค่าความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนระหว่างร้อยละ 5 ถึงร้อยละ 15 โดยปริมาตรนั้น แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มีแนวโน้มคล้ายคลึงกับผลการทดลองในข้อ 4.1.1 คือแอคติวิตีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน สามารถใช้หลักการเกิดปฏิกิริยาเคมีโดยการชนกันของตัวทำปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกับเหตุผลในข้อ 5.1.1 เมื่อสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20 และร้อยละ 25 โดยปริมาตร ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้กลับมีแอคติวิตีลดลง ซึ่งให้ผลแตกต่างไปจากการทดลองในข้อ 4.1.1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการทดลองในครั้งนี้ใช้เอนไซม์เซลโลไบเอสในอัตราส่วนเพิ่มขึ้นจาก 1 ส่วน ในเอนไซม์ทั้งหมด 6 ส่วนโดยน้ำหนัก เป็น 1 ส่วน ในเอนไซม์ทั้งหมด 3 ส่วนโดยน้ำหนัก อัตราส่วนของเอนไซม์เซลโลไบเอสที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นสาเหตุให้ผลบดบัง (steric effect) ซึ่งไม่ปรากฏในการทดลองข้อ 4.1.1 กลับปรากฏชัดขึ้นในการทดลองครั้งนี้ (9) ทำให้การสร้างพันธะระหว่างหมู่-ฟังก์ชันของเอนไซม์กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์เกิดยากขึ้น เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้จึงมีแอคติวิตีลดลงอย่างเห็นได้ชัดในรูปที่ 26

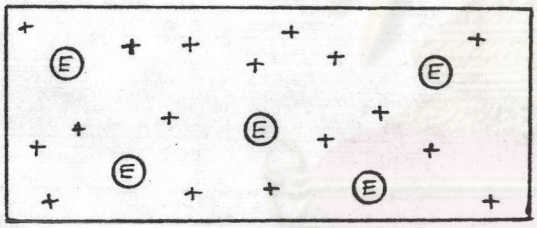
5.1.5 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดขนาด 60 — 80 เมช

จากผลการทดลองข้อ 4.1.5 โดยดูโครงสร้างของทรายสะอาดเปรียบเทียบกับโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า (รูปที่ 27 และรูปที่ 28 ตามลำดับ) ทำให้เห็นความแตกต่างของทรายสะอาดและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปได้อย่างชัดเจนโดยทรายสะอาดขนาด 60 — 80 เมช มีลักษณะพื้นผิวเป็นรูพรุนและไม่พบว่ามีกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเกาะอยู่เลย ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปรากฏชัดว่ามีกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เกาะกระจายตัวอยู่เป็นจำนวนมากบนพื้นผิวของทรายสะอาด การเกาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนบนพื้นผิวของทรายสะอาดนี้เป็นการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนกับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์ เมื่อดูโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า ทำให้เห็นลักษณะกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปได้ชัดเจนขึ้น

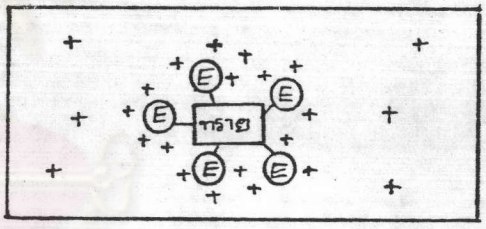
5.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

5.2.1 เปรียบเทียบช่วงพีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1 ดังแสดงในรูปที่ 30 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมมีแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 5 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 6 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 1 หน่วยพีเอช ทั้งนี้อาจอธิบายได้โดยอาศัยหลักการกระจายของโปรตอนบริเวณใกล้เอนไซม์ตรึงรูป (37) โดยบริเวณใกล้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีการกระจายของโปรตอนเพิ่มขึ้นหรืออาจกล่าวได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนโดยวิธีนี้ทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีไอออนลบเป็นส่วนใหญ่ที่บริเวณเร่ง ดังนั้นโปรตอนในระบบจึงเข้าล้อมรอบใกล้เอนไซม์ตรึงรูป ทำให้บริเวณใกล้เอนไซม์ตรึงรูปมีความหนาแน่นของไอออนบวกเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 42 (ข)



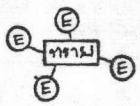
ก) เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมในสารละลายบัฟเฟอร์เจือจางพีเอช 5



ข) เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในสารละลายบัฟเฟอร์เจือจางพีเอช 5

รูปที่ 42 การกระจายไอออนบวกในระบบที่มีเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (ก) และระบบที่มีเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป (ข) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงสุด

Ⓔ = เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม



= เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีประจุลบเป็นส่วนใหญ่บนบริเวณเร่ง

\+ = ไอออนบวก เช่น โปรตอน (H^+)

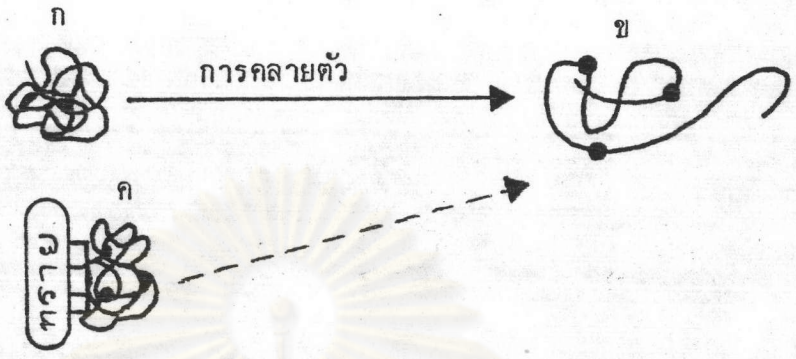
จากรูปที่ 42 (ก) เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 จะแสดงแอคติวิตีสูงสุด เมื่อนำมาตรึงรูปบนทรายสะอาดขนาด 60 ถึง 80 เมช โดย

การเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ทำให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่มีไอออนลบเป็นส่วนใหญ่บนบริเวณเร่งเมื่ออยู่ในระบบที่มีสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5 ไอออนบวกซึ่งอาจเป็นโปรตอนจากระบบจะเข้าล้อมรอบบริเวณใกล้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีผลให้ค่าพีเอชในบริเวณใกล้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปต่ำกว่าพีเอช 5 ซึ่งจากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าบริเวณใกล้เอนไซม์เซลลูเลสขณะนี้มีพีเอชเท่ากับ 4 คือลดลง 1 หน่วยพีเอช เมื่อใช้สับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6 มีผลทำให้ค่าพีเอชบริเวณใกล้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเป็น 5 จึงทำให้เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่เอนไซม์เดิมจะมีแอคติวิตีเพียงร้อยละ 25 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6 ดังนั้นค่าพีเอชที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะแสดงแอคติวิตีสูงสุดจึงเลื่อนไปจากค่าพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 1 หน่วยพีเอช

5.2.2 เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (temperature activity profile) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากผลการทดลองข้อ 4.2.2 ดังรูปที่ 31 พบว่ากราฟแสดงแอคติวิตีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมมีลักษณะคล้ายกัน คือเป็นรูประฆังคว่ำ การเพิ่มอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาย่อยสลายจาก 30 องศาเซลเซียสไปจนถึง 50 องศาเซลเซียส มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลาย ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีนั้นจะต้องมีการสัมผัสหรือชนกันของอนุภาคของเอนไซม์และสับสเตรท การเพิ่มอุณหภูมิทำให้อนุภาคของเอนไซม์และสับสเตรทมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้นมีผลให้เกิดการชนมากขึ้น ปฏิกิริยาการย่อยสลายจึงเกิดได้ดีขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตีต่ำกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม อาจเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมมาก การเพิ่มอุณหภูมิในปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนนั้นทำให้อนุภาคของทั้งเอนไซม์และสับสเตรทมีการเคลื่อนที่เข้าชนกันได้เพิ่มขึ้น แต่กรณีที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปการเพิ่มอุณหภูมิเป็นผลให้อนุภาคของสับสเตรทเป็นส่วนใหญ่ที่เกิดการเคลื่อนที่เข้าชนอนุภาคขนาดใหญ่ของเอนไซม์ ดังนั้นเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจึงมีแอคติวิตีต่ำกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมในช่วงอุณหภูมิต่ำ ในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมจะมีแอคติวิตีลดลงและเสียแอคติวิตีไปจนหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปยังคงมีแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม เนื่องจากพันธะโคเวเลนต์ที่เกิดจากการตรึงรูปเป็นพันธะ

ทางเคมีที่แข็งแรงมาก ดังนั้นจึงมีผลช่วยตรึง (fix) โปรตีนของเอนไซม์ไว้บนตัวพยุงคือทรายได้อย่างแข็งแรง ทำให้โปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูปเกิดการคลายตัว (unfold) เนื่องจากความร้อนได้ยากกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ (38) ดังรูปที่ 43



รูปที่ 43 การคลายตัวของโปรตีนของเอนไซม์อิสระ (ก) โดยมีสาเหตุจากความร้อน และในกรณีเอนไซม์ที่เชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะที่แข็งแรง (ค) จะเกิดการคลายตัวได้ยาก (— — ▶)

5.2.3 วัดค่าคงที่ Michaelis (K_m)

จากผลการทดลองข้อ 4.2.3 ค่าคงที่ Michaelis ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีค่าต้ำกว่าของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมถึง 2.1 เท่า อาจกล่าวได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนบนทรายสะอาดโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้มีผลช่วยปรับปรุงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ให้มีลักษณะเหมาะสำหรับการเข้าจับของสับสเตรทในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ได้ดีขึ้น หรืออีกนัยหนึ่งคือ เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการจับกับสับสเตรทได้สูงกว่านั่นเอง นับว่าเป็นข้อได้เปรียบของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป

5.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.4 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1.69 หน่วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเดิมมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.48 หน่วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อมิลลิกรัมโปรตีน จะเห็นได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีนี้ช่วยทำให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มี

ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น คือในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมากกว่า นับว่าเป็นข้อได้เปรียบของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนในรูปเอนไซม์ตรึงรูปอีกประการหนึ่ง

5.2.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

จากผลการทดลองข้อ 4.2.5 เมื่อเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในบัฟเฟอร์พีเอช 4 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 34 วัน พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปยังคงมีแอคติวิตีเท่าเดิม คือร้อยละ 100 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมเสียแอคติวิตีไปทั้งหมด ทั้งนี้ เป็นเพราะพันธะโคเวเลนต์ซึ่งใช้เชื่อมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนไว้บนเม็ดทรายนั้นเป็นพันธะทางเคมีที่มีความแข็งแรงมากและมีความเสถียรต่อสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด (38) เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนจึงยังคงสามารถเกาะบนเม็ดทรายได้ดีเมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 4 นอกจากนี้ ยังกล่าวได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนโดยวิธีนี้มีผลให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้มีความคงทนต่อการแปลงสภาพ (denaturation) โดยสภาวะความเป็นกรดได้ดีกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม (38) เมื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพในการเก็บของเอนไซม์ทั้งสอง โดยพิจารณาแอคติวิตีที่เหลืออยู่หลังจากการเก็บเอนไซม์ทั้งสองในสภาวะการเก็บที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์แต่ละชนิด คือเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในบัฟเฟอร์พีเอช 4 และเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเดิมในบัฟเฟอร์พีเอช 5 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 68 วัน จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีเสถียรภาพในการเก็บสูงกว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึงร้อยละ 85.29 ในขณะที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมเหลือแอคติวิตีเพียงร้อยละ 62 นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เก็บในสภาวะค่อนข้างเป็นกลาง คือ บัฟเฟอร์พีเอช 6 และ 7 จะมีเสถียรภาพต่ำ ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิห้องเย็น

จากรูปที่ 31 การเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ภาวะค่อนข้างเป็นกรด คือที่พีเอช 4-6 พบว่าเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ) จะมีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 °ซ) ปรากฏการณ์นี้คล้ายคลึงกับผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสในเมล็ดพืชที่กำลังงอก (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PD) โดย Pitel และคณะ (39)

กล่าวคือ เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสจะมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศา-เซลเซียส แต่เมื่อเก็บเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่าเอนไซม์เสียแอคติวิตีไปมากที่สุด โดยเหลือแอคติวิตีเพียงร้อยละ 3.9 เท่านั้น ในขณะที่เอนไซม์อื่นได้แก่ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase, PER) และเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase, ACP) ยังคงมีแอคติวิตีถึงร้อยละ 94 และ 95 ตามลำดับ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วันเช่นกัน Funfu และคณะ (40) ซึ่งศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ในร่างกายคน โดยการบ่มเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 พบว่าเอนไซม์จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยอยู่ในรูปของโมโนเมอร์ของโปรตีนซึ่งเป็นรูปที่ไม่แอคทีฟ (inactive G6PD) นอกจากนี้สำหรับเอนไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (EC 1.4.1.3) จาก *Azospirillum brasilense* จากการศึกษาของ Maulik และคณะ (41) พบว่ามีความไวและไม่คงตัวต่ออุณหภูมิต่ำ (cold-sensitive และ cold-labile) เช่นกัน

สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนนั้น เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 °ซ) จะมีเสถียรภาพต่ำกว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนนี้มีความไว (sensitive) และไม่คงตัวต่ออุณหภูมิต่ำ โดยอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งทำให้เอนไซม์เชิงซ้อนอยู่ในรูปที่ไม่แอคทีฟ จึงทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีลดลง

5.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมที่สภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน

จากผลการทดลองข้อ 4.2.6 ดังตารางที่ 14 พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 68 วัน เมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 4 ที่อุณหภูมิห้องและค่า

ครึ่งชีวิตจะมีค่าลดลงเมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอชสูงขึ้น ตามลำดับ ซึ่งการเก็บที่อุณหภูมิห้องเย็นก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะที่เป็นกรดช่วยป้องกันการเสื่อมเสียจากการทำลายของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสภาวะที่เป็นกลาง และเนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปไม่ถูกแปลงสภาพโดยภาวะความเป็นกรดดังที่ได้กล่าวในข้อ 5.2.5 ดังนั้นการเก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในสภาพที่เป็นกรดจึงทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพสูงกว่าในสภาพเป็นกลาง

สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมนั้นเมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 5 มีเสถียรภาพสูง แต่เมื่อเก็บในบัฟเฟอร์พีเอชลดลง (พีเอช 4) พบว่าเสถียรภาพหรืออีกนัยหนึ่งคือ ค่าครึ่งชีวิตลดลง เป็นเพราะเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมถูกแปลงสภาพได้ง่ายโดยสภาวะความเป็นกรดและการเก็บในบัฟเฟอร์พีเอชเป็นกลาง พบว่ามีเสถียรภาพต่ำเช่นกัน เนื่องจากถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ได้ง่าย แนวโน้มดังกล่าวคล้ายคลึงกันในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิห้องเย็น

อย่างไรก็ตาม เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปบนทรายขนาด 60 80 เมชนี้มีเสถียรภาพในการเก็บสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานของ Fadda และคณะ (16) ซึ่งตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Trichoderma viride* (Röhm cellulase 2230 A) บนตัวพยุงชนิดต่าง ๆ ได้แก่ CNBr-Sepharose , ConA-Sepharose และ CNBr-glass beads โดยพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 30 วัน สำหรับการตรึงรูปบน CNBr-Sepharose และ ConA-Sepharose โดยมีแอคติวิตีเหลือเท่ากับร้อยละ 68 และ 62 หลังการเก็บนาน 30 วัน ตามลำดับ และสำหรับเอนไซม์ตรึงรูปบน CNBr-glass beads นั้นพบว่ามีค่าครึ่งชีวิต 11 วัน และมีแอคติวิตีเหลือเพียงร้อยละ 38 หลังการเก็บนาน 30 วัน (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้กระดาษกรองเป็นสับสเตรท)

5.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

5.3.1 เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมขั้นต้นกากสับปะรด

จากผลการทดลองข้อ 4.3.1 เมื่อวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดดังตารางที่ 15 พบว่าปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ขนาดอนุภาคของกากสับปะรด ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีน และเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำ มีผลต่อผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายกากสับปะรดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

กล่าวอีกนัยหนึ่งคือการเตรียมสภาพขั้นต้นโดยการโม่บดกากสับปะรดให้มีขนาดอนุภาคเล็กลง การใช้สารละลายเอน-บิวทิลลามีนและการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่เหมาะสมนั้น มีผลช่วยให้กากสับปะรดมีสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการเข้าทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมากขึ้น โดยแต่ละปัจจัยมีผลดังนี้คือ

การโม่บดกากสับปะรดให้มีขนาดอนุภาคเล็กลง เป็นการใช้แรงเฉือนและแรงบีบอัด มีผลทำให้ความยาวของสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง นอกจากนี้การที่กากสับปะรดมีขนาดอนุภาคเล็กลงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายอีกด้วย ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นได้ว่ากากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน มีแนวโน้มที่ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายสูงกว่ากากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 150 ไมครอน

การอบไอน้ำที่ความดันสูงช่วยทำให้เซลลูโลสและลิกนินบางส่วนถูกย่อยสลายไป หรือมีสภาพที่เอื้อต่อการเข้าย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้มากขึ้น (8)

สารละลายเอน-บิวทิลลามีนความเข้มข้นที่เหมาะสมมีผลช่วยสกัดเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสบางส่วนลงสู่วัฏภาคของเหลว (liquid phase) ในรูปของผสมของน้ำตาลโมเลกุลใหญ่และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวบางส่วน นอกจากนี้เอน-บิวทิลลามีนยังมีผลโดยตรงในการกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้างของเซลลูโลส Tanaka และคณะ (42) ได้ให้ข้อสังเกตไว้ว่าการใช้สารละลายเอน-บิวทิลลามีนความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานในการเตรียมสภาพขั้นต้นจะก่อให้เกิดการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการเตรียมสภาพขั้นต้นบางส่วน อย่างไรก็ตามการใช้เอน-บิวทิลลามีนยังช่วยประหยัดพลังงานในการอบไอน้ำเมื่อเทียบกับการอบไอน้ำในสภาวะที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เจือจางหรือสภาวะที่มีน้ำบริสุทธิ์ เนื่องจากเอน-บิวทิลลามีนมีจุดเดือดเพียง 77 องศาเซลเซียส และมีความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอเพียง 109 แคลอรีต่อกรัม ซึ่งมีค่าต่ำกว่าของน้ำบริสุทธิ์ และเนื่องจากเอน-บิวทิลลามีนสามารถระเหยได้ดีจึงสามารถกำจัดออกจากกากสับปะรดหลังจากการเตรียมสภาพขั้นต้นแล้วด้วยการระเหยโดยการให้ความร้อน และถ้ามีการให้ความร้อนเพื่อระเหยไล่เอน-บิวทิลลามีนอย่างเพียงพอแล้ว จะสามารถไล่เอน-บิวทิลลามีนออกได้จนเกือบสมบูรณ์ และไม่จำเป็นต้องใช้กรดเพื่อปรับสภาพพีเอชของเซลลูโลสก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งต่างจากการเตรียมสภาพขั้นต้นโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (43)

นอกจากนี้ Tanaka และคณะ ยังให้ความเห็นว่าการโม่บดวัตถุดิบก่อนจะมีผลช่วยเสริมการกำจัดลิคนินโดยเอน-บิวทิลลามีนอีกด้วย (43)ซึ่งจากผลการทดลองเตรียมสภาพ

ขั้นต้นกากสับปะรดพบว่าการเตรียมสภาพขั้นต้นโดยการโม่บด การอบไอน้ำ และการใช้สารละลายเอน-บิวทิลลามีนนั้นมีผลร่วมทั้งแบบสองปัจจัยและสามปัจจัยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อย-สลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 เช่นกัน

5.3.2 ศึกษาผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรด

จากผลการทดลองข้อ 4.3.2 พบว่าการเตรียมสภาพขั้นต้นโดยใช้เอน-บิวทิลลามีนควบคู่กับการอบไอน้ำ มีผลช่วยลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรด ซึ่งมีขนาดอนุภาคเริ่มต้นเท่ากับ 150 ไมครอน ทั้งนี้เป็นเพราะเอน-บิวทิลลามีนมีผลกำจัดลิกนินซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มกลุ่มของไมโคร-ไฟบริลซึ่งรวมตัวกันเป็นแมคโครไฟบริล เมื่อลิกนินซึ่งทำหน้าที่ดังกล่าวถูกทำลายลงจึงมีผลทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนนี้ถูกทำลายลงด้วย

5.4 <u>การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน</u>

จากผลการทดลองข้อ 4.4 เมื่อหมักแอล-ไลซีนในอาหารสำหรับหมัก 1 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารสังเคราะห์พบว่าได้แอล-ไลซีน 47.05 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร โดยไม่มีสารอาหารจำเป็น (เมไธโอนีน ธรีโอนีน และแอมโมเนีย) เหลือเลย แสดงว่าจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างเต็มที่ เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลงโดยที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ยังเหมาะสมคือเท่ากับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในอาหารสังเคราะห์ พบว่าได้แอล-ไลซีนปริมาณลดลง และยังมีสารอาหารจำเป็นเหลืออยู่นั้นอาจกล่าวได้ว่าผลผลิตแอล-ไลซีนแปรตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารสำหรับหมัก (33)

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและบัฟเฟอร์ขึ้นจากอาหารสำหรับหมักสูตร 2 ถึง 18 เท่า ผลผลิตแอล-ไลซีนกลับเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่สูงเกินไปทำให้การผลิตแอล-ไลซีนของ *C. glutamicum* (Hom^-) ลดลง (33)

ข้อเสนอแนะเพื่อเพิ่มผลผลิตแอล-ไลซีนอาจทำได้ดังนี้คือ

5.4.1 เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลสำหรับหมักที่ผลิตโดยการย่อยสลายกากสับปะรดอาจทำได้โดยการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลจากการย่อยแล้วใช้ระบบการกรองแยกกากจากนั้นแยกเกลือออก (desalting) และทำให้เข้มข้นขึ้น

5.4.2 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการย่อยสลายกากสับปะรดให้ต่ำลง เมื่อทำให้น้ำตาลสำหรับหมักเข้มข้นขึ้นโดยการระเหยจะไม่เกิดปัญหาความเข้มข้นของ

สารละลายบัฟเฟอร์สูงเกินไป

5.4.3 เลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความต้านทานต่อสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นสูงได้ดี

5.5 ศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

5.5.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

จากผลการทดลองข้อ 4.5.1 พบว่าค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันเมื่อใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร เป็น 1.12, 0.97, 0.94 และ 0.88 ซม.ต่อวินาทีตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีค่าต่ำเนื่องจากอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีขนาดเล็กและเบาจึงทำให้เกิดฟลูอิไดเซชันได้ง่าย และค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันกับค่าความหนาแน่นของของไหลดังนี้ (27)

$$U_{mf}^{2} = \frac{D_p^2 (\rho_s - \rho_f) g_c}{1650 \rho_f}$$

เมื่อ U_{mf} คือ ค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

D_p คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดของแข็ง

ρ_s คือ ความหนาแน่นของของแข็ง

ρ_f คือ ความหนาแน่นของของไหล

g_c คือ แฟคเตอร์เปลี่ยนหน่วยของแรงและน้ำหนัก

สำหรับการทดลองนี้ค่า D_p, g_c และ ρ_s มีค่าคงที่ ดังนั้นค่าความเร็วต่ำสุดของการไหลจึงแปรผกผันกับ ρ_f หรืออีกนัยหนึ่งคือความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดนั่นเอง

5.5.2 ศึกษาอิทธิพลของความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ต่อผลการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

จากผลการทดลองข้อ 4.5.2 เมื่อทดลองย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าเป็น 0.97, 1.30 และ 1.55 เซนติเมตรต่อวินาที มีแนวโน้มที่จะให้ร้อยละของการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะที่ความเร็วของการไหลในช่วงของค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันและความเร็วที่สูงกว่าเล็กน้อยนั้น ลักษณะของเบดจะมีความสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกันตลอดทั้งเบด (Uniform and homogeneous) อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเริ่มลอยตัวอยู่ในกระแสของสารแขวนลอยกากสับปะรดโดยระยะห่างระหว่างอนุภาคน้อย (27) ดังนั้นโอกาสที่อนุภาคของกากสับปะรดจะสัมผัสกับอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจึงมีมากและเนื่องจากความเร็วการไหลไม่สูงนักจึงมีโอกาสสัมผัสและเกาะเกี่ยวเพื่อทำปฏิกิริยาการย่อยได้ในช่วงเวลานาน ในขณะที่เพิ่มความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดเป็น 1.90 เซนติเมตรต่อวินาที หรือประมาณ 2 เท่าของค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันนั้นอาจเป็นค่าความเร็วที่ทำให้อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเคลื่อนที่แบบชุลมุน ระยะห่างระหว่างอนุภาคเพิ่มขึ้นมาก และเคลื่อนที่แยกจากกันมากเกินไปจนโอกาสที่จะเกิดการสัมผัสกับอนุภาคของกากสับปะรดมีน้อยลง นอกจากนี้การเพิ่มความเร็วการไหลดังกล่าวอาจทำให้ระยะเวลาที่อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปสัมผัสและเกาะเกี่ยวเพื่อทำปฏิกิริยาการย่อยสลายนั้นสั้นมาก เนื่องจากกากสับปะรดมีการเคลื่อนที่เร็วและรุนแรงเกินไปจนไม่สามารถเกาะเกี่ยวอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปไว้ได้ในระยะเวลาอันสมควร ปรากฏการณ์ที่เมื่อเพิ่มความเร็วการไหลระดับหนึ่งแล้วมีแนวโน้มให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายต่ำลงนี้คล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Karube และคณะ (29) ซึ่งทำการย่อยสลายสารแขวนลอยเอไวซิล เอสเอฟ (Avicel SF) ความเข้มข้น 3.3 กรัมต่อลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดเช่นกัน โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายจะต่ำลงเมื่อใช้ความเร็วการไหลขาเข้าของสับสเตรทเป็น 3 เท่าของค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

จากผลการทดลองนี้เลือกความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันในการศึกษาการย่อยสลายสารแขวนลอยกากสับปะรดในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากการเพิ่มความเร็วการไหลในช่วงสูงกว่าค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันเล็กน้อยยังคงให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนในระดับที่ใกล้เคียงกับการย่อยสลายโดยใช้ค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน นอกจากนี้การเพิ่มค่าความเร็วการไหลขึ้นเป็น 2 เท่า ของค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันมีผลให้ค่าร้อยละการเปลี่ยนต่ำลงอีกด้วย

5.5.3 กำหนดความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

จากผลการทดลองในข้อ 4.5.3 พบว่าการย่อยสลายกากสับปะรดที่มีความเข้มข้น 10 และ 15 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มที่ให้ร้อยละของการเปลี่ยนต่ำมาก และไม่สามารถทดลองในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดได้นานเกิน 4 ชั่วโมง เนื่องจากเกิดการถ่ายเท อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปโดยสารแขวนลอยของกากสับปะรด ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อเกิดฟลูอิไดเซชันของอนุภาคของเอนไซม์เชิงซ้อนตรึงรูปนั้น เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะสัมผัสและเกาะเกี่ยวกับอนุภาคของกากสับปะรดในระยะเวลาหนึ่งแล้วแยกตัวออกเกิดการเกาะเกี่ยวกับอนุภาคของกากสับปะรดที่เข้ามาใหม่ สำหรับสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่มีความเข้มข้น 10 และ 15 กรัมต่อลิตรนั้น อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปจะแยกออกจากกากสับปะรดได้น้อยมาก เนื่องจากกากสับปะรดมีความหนาแน่นสูงทำให้อนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปซึ่งมีขนาดเล็กและเบาถูกพัดพาติดออกไปพร้อมกากสับปะรดตลอดเวลา จนกระทั่งไม่มีเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเหลืออยู่ในเครื่องปฏิกรณ์เมื่อทดลองนาน 4 ชั่วโมง ดังนั้นสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 10 และ 15 กรัมต่อลิตร จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้ย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปนี้

สำหรับการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร นั้นเนื่องจากมีความเข้มข้นไม่สูงนักจึงไม่เกิดการถ่ายเทอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปออกจากเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปเลย และพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาล-รีดิวซ์ที่ได้มีความสัมพันธ์ตรงกับความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่ใช้คือ เมื่อใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 1 กรัมต่อลิตร เป็น 5 กรัมต่อลิตร จะ

ให้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นสูงขึ้นจาก 0.11 กรัมต่อลิตร เป็น 0.22 กรัมต่อลิตร เมื่อย่อยสลายกากสับปะรดนาน 6 ชั่วโมงเท่ากัน เพราะการย่อยเป็นปฏิกิริยาทางเคมี การเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นจะเกิดการผลักดันให้ปฏิกิริยาดำเนินไปในทิศทางที่จะให้ผลิตภัณฑ์ได้เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการเปลี่ยนพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นผกผันกับค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่ใช้ คือเมื่อใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 1 กรัมต่อลิตร เป็น 5 กรัมต่อลิตร จะให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนลดลงจากร้อยละ 10.65 เป็นร้อยละ 4.45 ตามลำดับนั้นแสดงว่าการใช้สารตั้งต้นความเข้มข้นสูงขึ้นดังกล่าว แม้จะมีผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้สูงขึ้น แต่ปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ไปเมื่อเทียบกับปริมาณสารตั้งต้นเริ่มต้นนั้นต่ำกว่าการใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร จึงให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนที่สูงกว่าการใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

5.5.4 กำหนดเวลาของการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วการไหลเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

จากผลการทดลองข้อ 4.5.4 การย่อยสลายกากสับปะรดโดยใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดพบว่าได้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนหรืออีกนัยหนึ่งคือ ร้อยละโดยน้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้เมื่อเทียบกับน้ำหนักกากสับปะรดแห้งเริ่มต้นมีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 61.8 และคิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 3.1 กรัมต่อลิตร เมื่อย่อยสลายนาน 72 ชั่วโมง เมื่อใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้นลดลงเป็น 1 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าร้อยละของการเปลี่ยนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 92.84 และคิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในไฮโดรไลเสทเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร โดยที่ใช้เวลาในการย่อยสลายลดลงเป็น 42 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาผลงานวิจัยของ Fadda และคณะ (16) ในการย่อยสลายฟางข้าวสาลีที่เตรียมในรูปของสารแขวนลอยที่มีความเข้มข้นถึง 30 กรัมต่อลิตร โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปบน CNBr-glass beads ในการย่อยสลายแบบไม่ต่อเนื่อง (batch hydrolysis) พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในเวลาของการย่อยสลายนานถึง 144 ชั่วโมง และคิดเป็นร้อยละของการเปลี่ยนเพียง 33.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้วัตถุดิบในปริมาณ 100 กรัมเท่ากัน สำหรับการย่อยสลายฟางข้าวสาลีจะต้องเตรียมสารแขวนลอยของฟางข้าวสาลีความเข้มข้น 30

กรัมต่อลิตร ปริมาตรสุทธิ 3.3 ลิตร แล้วย่อยสลายนานถึง 144 ชั่วโมง จึงจะทำให้ได้น้ำตาล-รีดิวซ์ทั้งหมด 33.3 กรัม ในขณะที่การย่อยสลายกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในสารแขวนลอยกากสับปะรดที่มีปริมาตรสุทธิ 20 ลิตร ใช้เวลาการย่อยเพียง 72 ชั่วโมง ก็จะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดถึง 62.8 กรัม ซึ่งเมื่อเพิ่มหน่วยการกรองแยกกากที่เหลือออก และแยกเกลือ จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยน้ำ (evaporation) หลังจากการย่อยสลายกาก-สับปะรดดังกล่าวก็จะทำให้ได้สารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการในเวลาอันรวดเร็วกว่า

ข้อสังเกตคือการย่อยสลายกากสับปะรดโดยใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 5 กรัมต่อลิตรนั้น แม้ว่าจะให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น แต่จะให้ค่าร้อยละของการเปลี่ยนต่ำลง นอกจากนี้ยังมีผลให้เกิดการถ่ายเทอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปออกจากเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดอีกด้วย เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ใช้มีขนาดอนุภาคที่เล็กและเบา นอกจากนี้การเพิ่มขนาดอนุภาคของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปให้ใหญ่ขึ้นเพื่อให้หนักพอที่จะต้านแรงพยุงของสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้นสูงนั้นจะมีผลลดพื้นที่ผิวการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วย ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้โดยวิธีการที่กล่าวข้างต้นน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย