บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	ตัวแบบ (model)	ประเทศ บริษัท หรือหน่วยงานผู้ผลิต
ตู้อบ (hot air incubator)	SC 1086	ศูนย์พัฒนาและบริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เครื่องเขย่า	-	ศูนย์พัฒนาและบริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด	A 200 S. และ 1518 MP8	Sartorius GmbH, Federal Republic of Germany
เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)	-	ศูนย์พัฒนาและบริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	UV-240	Shimadzu corporation Kyoto Japan
หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)	SS-320	Tomy Seiko Co., LTD., Japan
เครื่องโม่บด (pin mill)	FFC-23	Shantung Chimoh Agricultural Machinery Works, The People's Republic of China
เครื่องอังน้ำแบบเขย่า (shaker bath)	2563	Forma Scientific Marietta, Ohio.
เครื่อง SEM (Scanning Electron Microscope)	JSM 35CF	JEOL

อุปกรณ์	ตัวแบบ (model)	ประเทศ บริษัท หรือหน่วยงานผู้ผลิต
เครื่องเคลือบทองไฟน์ โคท	Ion sputter model JEC-1100	JEOL
ตู้แช่เย็น	-	บริษัทไทยเทคนิคอินดัสตรี จำกัด
เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 มิลลิเมตร สูง 90 เซนติเมตร (จากตัวกระจายของเหลวถึงท่อของเหลวไหลออก)	-	ประกอบขึ้นเองตามคำอธิบายในข้อ 3.2.6.1
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Medifuge	Heraeus, Christ
เครื่องวัดพีเอช	pH meter 220	Corning, USA.
เครื่องผสมเวอร์เทกซ์ (vertex mixer)	Super-Mixer cat. No. 1291	Lab-line Instruments, USA.
เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator)	Type 51111	Heidolph; F.R. Germany

3.2 วัสดุและสารเคมี

3.2.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

ทรายแม่น้ำขนาด 60-80 เมช

กรดไนตริก (Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover)

อะมิโนโพลฟิลไตรเอธอกซีไซเลน (Sigma Chemical Company USA.)

กลูตารัลดีไฮด์ (Fluka Chemie Ag. Switzerland)

โซเดียมอะซิเตดไตรไฮเดรท (J.T. Baker Chemicals B.V.-Denventer-Holland)

กรดอะซิติก (Merck Chemical Company)

เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ประกอบด้วย

เอนไซม์เซลลูเลส ชื่อทางการค้า เซลลูคลาสท์ 1.5L (Celluclast 1.5 L) (NOVO Industri A/S Copenhegen Denmark)

เอนไซม์เซลโลไบเอส ชื่อทางการค้า โนโวไซม์ 188 (Novozyme^{TM} 188) (NOVO Industri A/S Copenhegen Denmark)

วิธีเตรียม

3.2.1.1 ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมช (19)

แช่ทรายแม่น้ำขนาด 60-80 เมช ในสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 14 นอร์มัล กวนเป็นระยะ ๆ นาน 6 ชั่วโมง เทสารละลายกรดไนตริกออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนน้ำที่ผ่านการล้างมีค่าพีเอชเท่ากับค่าพีเอชของน้ำกลั่นเริ่มต้น นำทราย-แม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมช ที่ได้ไปอบแห้งในตู้อบความชื้นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เก็บโดยการบรรจุลงในขวดแก้วที่แห้งสะอาด ปิดฝา

3.2.1.2 กรดไนตริก

ใช้กรดไนตริกเข้มข้นซึ่งเป็นสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 14 นอร์มัล

3.2.1.3 สารละลายอะมิโนโพรพิลไตรเอธอกซีไซเลน

เรียกย่อ เอพีทีเอส (APTES) สารละลายเอพีทีเอสเป็นสารละลายที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นที่ใช้คือร้อยละ 5 โดยปริมาตร เอพีทีเอสทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นตัวพยุงในการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

3.2.1.4 สารละลายกลูตารัลดีไฮด์

ความเข้มข้นที่ใช้คือ ร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย กลูตารัลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นสารสร้างพันธะร่วมในการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

3.2.1.5 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2

เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ที่มีความเข้มข้น 0.2

โมลาร์ โดยการผสมสารละลายโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรทความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 39.5 : 10.5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.2 ในการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งได้จากการทำให้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เจือจางลงเท่าตัว

3.2.1.6 สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเตรียมโดยนำเอนไซม์เซลลูเลสผสมกับเอนไซม์เซลโลไบเอส ในอัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก จากนั้นละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ได้ลงในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้ได้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร ซึ่งใช้ในการตรึงรูป

3.2.2 สารเคมีที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

3.2.2.1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (BDH Chemical Ltd. Poole England)

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรท (Merck Chemical Company)

เอไวเซล พีเอช-101 (Avicel PH-101) (Fluka Chemie Ag Switzerland)

แอโรซิล 200 (Aerosil 200)

3.2.2.2 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (34)

กลูโคส แอนไฮดรัส (Merck Chemical Company)

โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)

โปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทท (Merck Chemical Company)

โซเดียมคาร์บอเนต (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)

โซเดียมไบคาร์บอเนต (Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)

คอปเปอร์ซัลเฟต (Farmitalia Carlo Erba)

แอมโมเนียมโมลิบเดต (May & Baker Ltd. Dagenham England)

กรดกำมะถัน(Riedel-de Haen Ag Seelze-Hannover)

โซเดียมไฮโดรเจนอาร์ซิเนต (Merck Chemical Company)

วิธีเตรียม

3.2.2.1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส

3.2.2.1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยการผสมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ กับสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 87.7 : 12.3 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยเจือจางสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ลงเท่าตัว

3.2.2.1.2 สารแขวนลอยของเอไวเซล พีเอช-101 (Avicel PH-101 suspension)

ผสมเอไวเซล พีเอช-101 ซึ่งเป็นไมโครคริสตัล-ไลน์เซลลูโลส 1 กรัม และแอโรซิล 0.25 กรัม ทำหน้าที่เป็นเซอร์เฟสแอคทีฟเอเจนท์ (surface active agent)เข้ากับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็ก นาน 1 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน และกวน ตลอดเวลาขณะทำการปิเปตสารแขวนลอยของเอไวเซลพีเอช-101 นี้มาใช้เป็นสับสเตรทในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

3.2.2.2 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson

3.2.2.2.1 สารละลายน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.2.2.2.2 สารละลาย Somogyi 1

ละลายโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 180 กรัม โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วปริมาตร 600 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย จากนั้นละลายโปตัสเซียมโซเดียมทาร์เตท 15 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต 30 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต 20 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมซัลเฟต แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วจนได้สารละลาย Somogyi 1 ที่มีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.2.2.3 สารละลาย Somogyi 2

ละลายโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส 90 กรัม โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วปริมาตร 375 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย จากนั้นละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมซัลเฟต แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้ว จนได้สารละลาย Somogyi 2 ที่มีปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

3.2.2.2.4 สารละลาย Somogyi

เตรียมโดยผสมสารละลาย Somogyi 1 และสารละลาย Somogyi 2 ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตร

3.2.2.2.5 สารละลาย Nelson

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 100 กรัม โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1,800 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย เติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 84 มิลลิลิตร ลงในสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนอาร์ซิเนตความเข้มข้นร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งมีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายลงในสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต บรรจุขวดสีชา แล้วนำสารละลายเนลสันที่ได้อบในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ก่อนการใช้งาน ในกรณีที่สารละลายเนลสัน

เกิดตะกอนสีเหลือง แสดงว่าสารละลายเนลสันนั้นหมดสภาพการใช้งานแล้ว

3.2.3 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

คอปเปอร์ซัลเฟต (Farmitalia Carlo Erba)

โปแตสเซียมซัลเฟต (P.P.H. Polskie Odezynniki Chemiczne Gliwice)

กรดบอริก (May & Baker Ltd. Dagenham England)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Farmitalia Carlo Erba)

กรดกำมะถัน (Riedel-De Haen Ag Seelze-Hannover)

กรดเกลือ (Merck Chemical Company)

โปแตสเซียมไฮโดรเจนแพทาเลต (BDH Chemical Ltd. Poole England)

เมธิลีน บลู (May & Baker Ltd. Dagenham England)

เมธิล เรด (May & Baker Ltd. Dagenham England)

ฟีนอฟทาลีน (May & Baker Ltd. Dagenham England)

เอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Merck Chemical Company)

3.2.3.1 สารละลายกรดบอริก

เตรียมสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

3.2.3.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

3.2.3.3 สารละลายกรดเกลือ

เตรียมสารละลายโปแตสเซียมไฮโดรเจนแพทาเลทความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเติมอินดิเคเตอร์ (ได้แก่ ฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ซึ่งมีเอธานอล เป็นตัวทำละลาย) 3 หยด จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 นอร์มัล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยสูตร

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$0.1 \times 20 = M_2 \times 20.04$$

$$M_2 = 0.0998$$

เตรียมสารละลายกรดเกลือ ความเข้มข้นประมาณ 1 นอร์มัล แล้วเติมอินดิเคเตอร์ (ได้แก่ ฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร มีเอธานอล เป็นตัวทำละลาย) 3 หยด ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.0998 นอร์มัล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ โดยสูตร

$$M_2V_2 = M_3V_3$$

$$0.0998 \times 21.5 = M_3 \times 20$$

$$M_3 = 0.1073$$

ดังนั้นสารละลายกรดเกลือที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 0.1073 นอร์มัล

3.2.3.4 อินดิเคเตอร์

3.2.3.4.1 ฟีนอฟทาลีน

ละลายฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย แล้วปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.2.3.4.2 สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม

ผสมสารละลายเมธิลีน-บลูความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ในเอธานอล เข้ากับสารละลายเมธิล-เรด ความเข้มข้น 0.2 ในเอธานอล ในอัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตร

3.2.4 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

กากสับปะรดสด (โรงงานสยามพรีเสริฟ ฟู้ด จำกัด)

เอน-บิวทิลลามีน (Merck Chemical Company)

โซเดียมอะซิเตดไตรไฮเดรท (J.T. Baker Chemicals B.V.-Denventer-Holland)

กรดอะซิติก (Merck Chemical Company)

วิธีเตรียม

3.2.4.1 กากสับปะรดสด

กากสับปะรดสดได้แก่ เนื้อสับปะรดส่วนที่ขูดออกจากเปลือก และส่วนที่เหลือจากการตัดแต่ง ผ่านการบีบเอาน้ำสับปะรดออกไปใช้ประโยชน์แล้ว มีลักษณะเป็นเศษฝอยสีเหลืองอ่อนดังรูปที่ ก-1 กากสับปะรดที่ผ่านการทำแห้งแล้วมีองค์ประกอบดังตารางที่ ก-1 หน้า 146

3.2.4.2 สารละลายเอน-บิวทิลลามีน

เตรียมสารละลายเอน-บิวทิลลามีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

3.2.4.3 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8

เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยการผสมสารละลายโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรทความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เข้ากับสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในอัตราส่วน 3 : 2 โดยปริมาตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.8 แล้วเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยการเจือจางสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ลง 1 เท่าตัว

3.2.5 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน

Corynebacterium glutamicum MU 3282 โฮโมซีรีน ออกโซโทรฟ (Hom⁻) ต้านทานต่อ AEC (AEC^R) (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ)

อาหารเชิงซ้อน (complex medium, CM)

อาหารสังเคราะห์ (synthetic medium, SYN)

อาหารสำหรับหมัก (fermentation medium, FM)

เทรซ อีลีเมนท์ (trace elements)

โซเดียมคลอไรด์ (May & Baker Ltd. Dagenham England)

ไฮโดรไลเสทของกากสับปะรด

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Farmitalia Carlo Erba)

วิธีเตรียม

3.2.5.1 อาหารเชิงซ้อน

ละลายองค์ประกอบทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยใช้น้ำกลั่น

ตารางที่ 7 องค์ประกอบของอาหารเชิงซ้อน 1,000 มิลลิลิตร (33)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
กลูโคส (Glucose)	20.0
ยีสต์ เอกซ์แทรกท์ (yeast extract)	1.0
เคซีน (เอนไซม์) ไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate)	6.0
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	4.0
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.5
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$)	0.25
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01
แมงกานีสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MnSO_4.7H_2O$)	0.01

เป็นตัวทำละลาย ปริมาณขององค์ประกอบในตารางที่ 6 เป็นปริมาณที่ใช้ในการเตรียมอาหารเชิงซ้อนที่มีปริมาตรสุทธิ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเชิงซ้อนให้เท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 นอร์มัล ก่อนการฆ่าเชื้อ

3.2.5.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์

เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 นอร์มัล โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.5.4 อาหารสังเคราะห์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย และเติมสารละลายเทรซอีลี เมนท์ 1 มิลลิลิตร ปริมาณขององค์ประกอบในตารางที่ 8 เป็นปริมาณที่ใช้ในการเตรียมอาหารเชิงซ้อนที่มีปริมาตรสุทธิ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารสังเคราะห์ให้เท่ากับ 7.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 นอร์มัล ก่อนการฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ 1,000 มิลลิลิตร (33)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
กลูโคส (glucose)	40.0
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.5
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3.0
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท ($CaCl_2.2H_2O$)	0.001
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($MgSO_4.7H_2O$)	0.25
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01
ดี-ไบโอติน(d-biotin)	3.0×10^{-5}
แอล-เมไธโอนีน (L-methionine)	0.1
แอล-ธรีโอนีน (L-threonine)	0.1

3.2.5.5 สารละลายเทรซ อีลีเมนท์ (trace element)

ละลายองค์ประกอบทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 9 ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของสารละลายเทรซ อีลีเมนท์ 1,000 มิลลิลิตร (33)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.88
เฟอร์รัสคลอไรด์เตตระไฮเดรท ($FeCl_2.4H_2O$)	0.82
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท ($CuSO_4.5H_2O$)	0.027
โซเดียมบอเรท ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	0.0088
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรท ($MnCl_2.4H_2O$)	0.0072
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรท ($(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$)	0.0037

3.2.5.6 ไฮโดรไลเสทของกากสับปะรด

นำกากสับปะรดที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมสภาพขั้นต้นตามวิธีในข้อ 3.2.6.3 ย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป 50 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบถังกวน โดยเตรียมสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จะได้ไฮโดรไลเสทของกากสับปะรดที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 4.9 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลเสทของกากสับปะรดที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 19.6 กรัมต่อลิตร ได้จากการทำให้ไฮโดรไลเสทที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 4.9 กรัมต่อลิตร เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่ความดันต่ำ

3.2.5.7 อาหารสำหรับหมัก

3.2.5.7.1 อาหารสำหรับหมัก 1 (มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 4.0) นำองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ดังตารางที่ 8 (ยกเว้น กลูโคส โปตัสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต) ในปริมาณสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ละลายลงในไฮโดรไลเสทของกากสับปะรดซึ่งมีน้ำตาลรีดิซ์ความเข้มข้น 4.9 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 20.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารสำหรับหมักที่ได้เป็นร้อยละ 4.0 โดยการเติมน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ แล้วปรับปริมาตรรวมให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.5.7.2 อาหารสำหรับหมัก 2 (มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.1) เตรียมอาหารสำหรับหมักดังข้อ 3.2.5.7.1 ยกเว้นการเติมน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เพื่อปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารสำหรับหมัก

3.2.5.7.3 อาหารสำหรับหมัก 3 (มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 1.8) นำองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ ดังตารางที่ 8 (ยกเว้น กลูโคส โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต) ในปริมาณสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ละลายลงในไฮโดรไลเสทของกากสับปะรด ซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 19.6 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 90.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร อาหารสำหรับหมักนี้จะมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เป็น 18 เท่าของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในอาหารสำหรับหมักในข้อ 3.2.5.7.1 และ 3.2.5.7.2

3.2.5.8 เชื้อ (inoculum) ของ *C. glutamicum* MU3282

ถ่ายเชื้อ *C. glutamicum* MU 3282 บนนิวเตรียน เอการ์ สแลนท์ (NA slant) ลงสู่อาหารเชิงซ้อนปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกเซลล์ของ *C. glutamicum* ที่ได้ถ่ายลงสู่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก จากนั้นถ่ายเชื้อ *C. glutamicum* MU3282 ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารสำหรับหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดอาหารสำหรับหมักที่มี *C. glutamicum* MU3282 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ *C. glutamicum* MU3282 ที่ได้ลงในอาหารสำหรับหมักปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าขวดอาหารสำหมักที่มี *C. glutamicum* MU 3282 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เชื้อ *C. glutamicum* MU 3282 ที่เตรียมได้นี้ใช้ในการหมักแอล-ไลซีนต่อไป

3.2.6 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

ปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด

เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

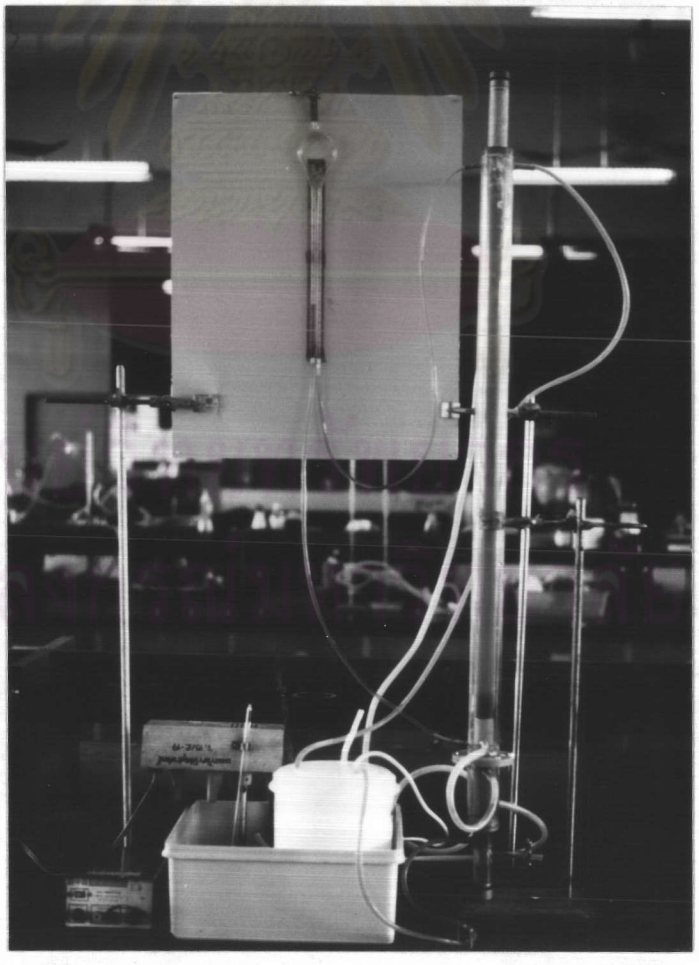
สารแขวนลอยของกากสับปะรด

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6

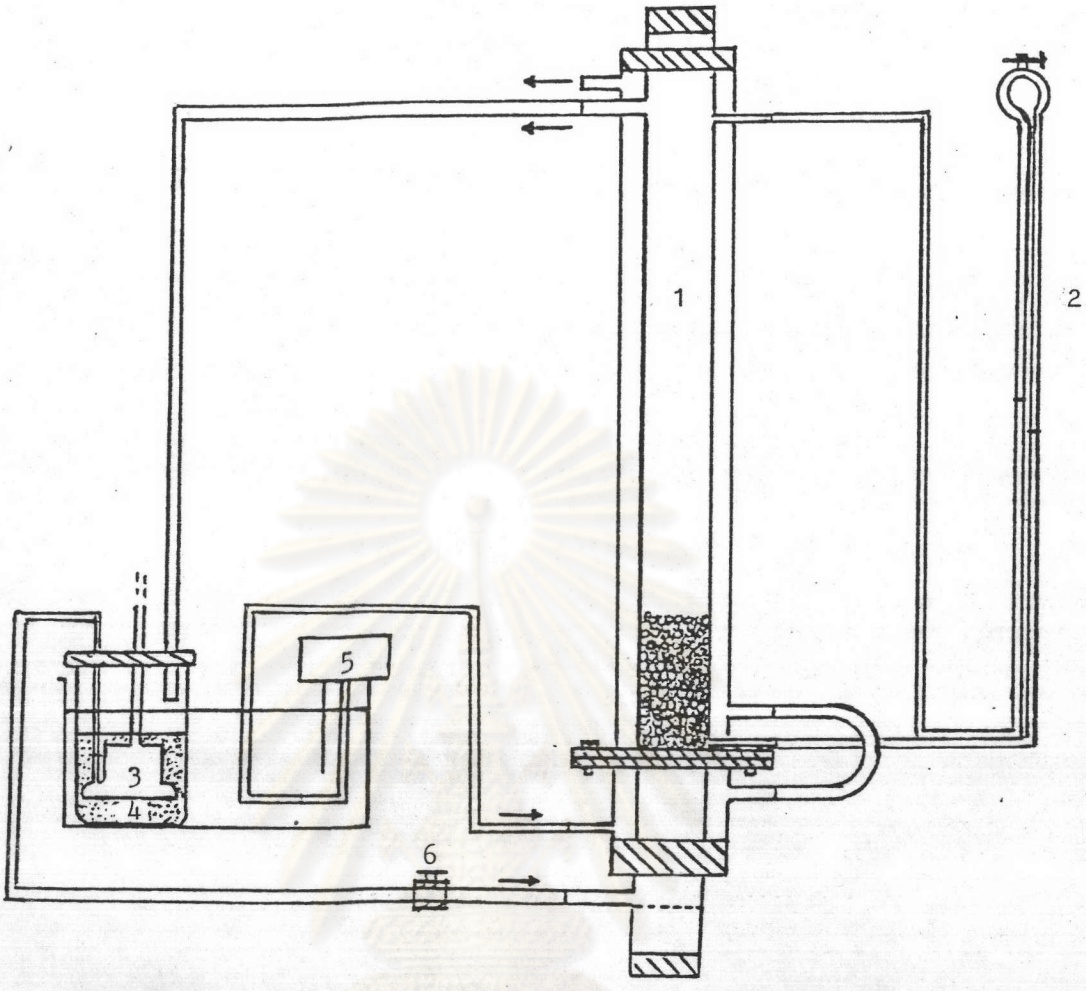
วิธีเตรียม

3.2.6.1 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด

ประกอบเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 24 มิลลิเมตร ความสูง 90 เซนติเมตร วัดจากตัวกระจายของเหลวถึงท่อของเหลวไหลออก มีท่อน้ำรักษาอุณหภูมิห่อหุ้มภายนอก ท่อที่ใช้เป็นวัสดุชนิดโพลีไวนิลคลอไรด์ (PVC) ชนิดใส อุปกรณ์ที่ใช้ร่วมกับเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดได้แก่ หม้อแปลงไฟฟ้ากระแสสลับ (AC adaptor input AC 220 V)50 C/S output DC 3A 6V-12V). เครื่องสูบ (pump) ขนาด 300 แกลลอนต่อชั่วโมง เครื่องอังน้ำ (water bath) ขนาดเล็ก และมานอมิเตอร์ รายละเอียดของเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดและการจัดอุปกรณ์ประกอบต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 20 และ 21



รูปที่ 20 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดและอุปกรณ์ประกอบอื่น ๆ



รูปที่ 21 แผนผังเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดและอุปกรณ์ประกอบอื่น ๆ

1 คือ เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด

2 คือ มานอมิเตอร์

3 คือ เครื่องสูบ

4 คือ สารแขวนลอยของกากสับปะรด

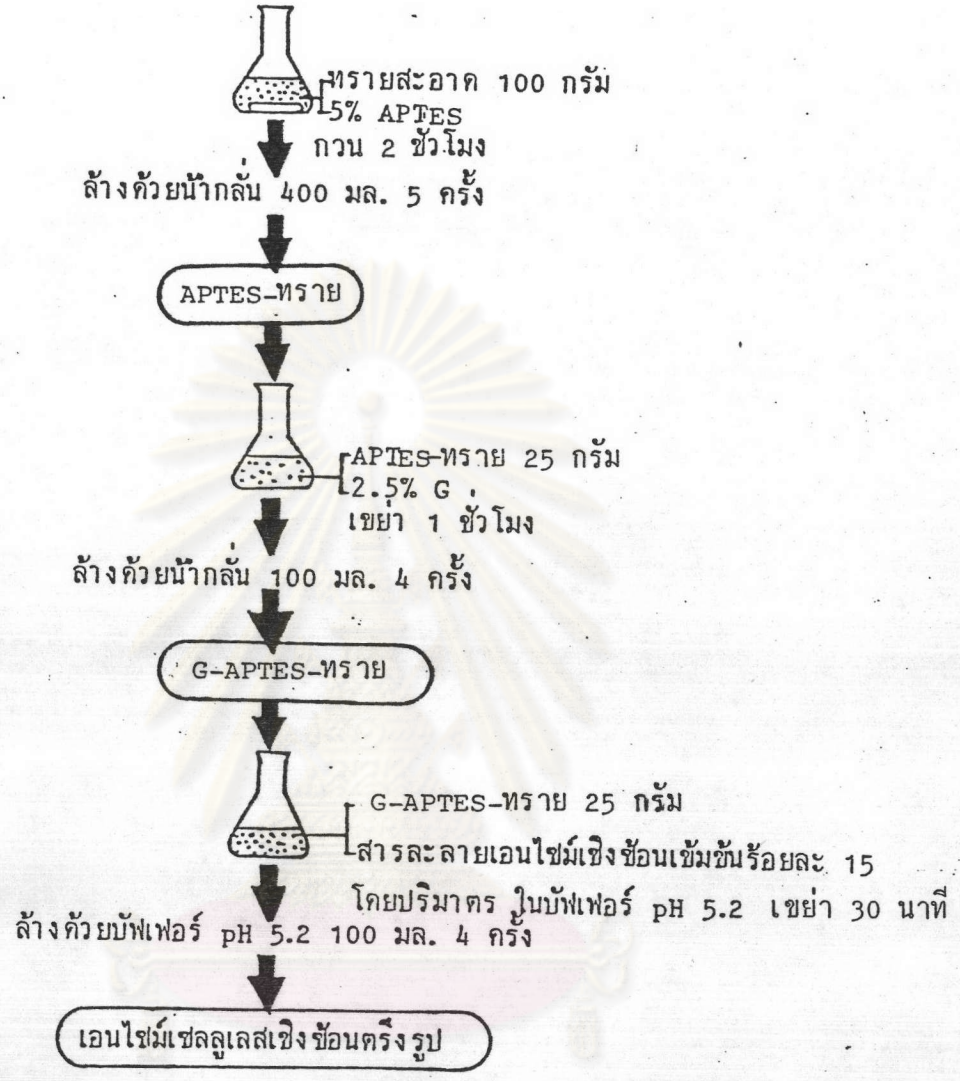
5 คือ เครื่องอังน้ำ

6 คือ วาล์วเปิด-ปิด

3.2.6.2 เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป (19)

วิธีเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีดังนี้คือ นำทรายแม่น้ำขนาด 60-80 เมช ที่สะอาดปริมาณ 100 กรัม ในสารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร มากวนด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กนาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร 5 ครั้ง แบ่งทรายที่ถูกกระตุ้นด้วยเอพีทีเอสออกเป็น 4 ส่วน ๆ ละ 25 กรัม แต่ละส่วนเติมสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร ปริมาณส่วนละ 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร 4 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในทรายแต่ละส่วนปริมาณส่วนละ 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่านาน 30 นาที แล้วล้างด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 4 ครั้ง ขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวนี้แสดงในรูปที่ 22 และรูปที่ 23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 แผนผังขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

◁ การผลิต APTES-ทราย

ล้างน้ำกลั่น

APTES-ทราย

◁ การผลิต G-APTES-ทราย

ล้างน้ำกลั่น

G-APTES-ทราย

◁ การผลิตเอนไซม์-G-APTES-ทราย

ล้างด้วยบัฟเฟอร์

รูปที่ 23 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์

3.2.6.3 สารแขวนลอยของกากสับปะรด

นำกากสับปะรดสดบีบน้ำออกแล้วอบแห้งในตู้อบ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นบดกากสับปะรดแห้งด้วยเครื่อง pin mill แล้วร่อนกากสับปะรดบดที่ได้ผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 150 ไมครอน จากนั้นเติมสารละลายเอน-บิวทิลลามีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 5 เท่าของน้ำหนักกากสับปะรดที่ใช้ นำกากสับปะรดในสารละลายเอน-บิวทิลลามีนเข้าอบไอน้ำในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำกากสับปะรดที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมสภาพขั้นต้นที่ได้นี้มาให้ความร้อนโดยตั้งบนอ่างน้ำเดือดเพื่อไล่เอน-บิวทิลลามีนที่ตกค้างออกจนหมด

การศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดนั้นถ้าใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดที่มีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร จะนำกากบดหนัก 5 กรัม ผ่านขั้นตอนการเตรียมสภาพขั้นต้นดังกล่าว แล้วผสมกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นแล้วลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 ลิตร กวนของผสมด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กจนกากมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ พร้อมกับให้ความร้อนเบื้องต้น (preheating) แก่สารแขวนลอยของกากสับปะรดในอ่างน้ำร้อน ดังรูปที่ 20

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

3.3.1.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5 : 1 โดยน้ำหนัก ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.6.2 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน 5 ระดับ คือ ร้อยละ 5, 10, 15, 20 และ 25 โดยปริมาตร วัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ ก-4 แล้วเลือกความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ให้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุด จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

3.3.1.2 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป โดยใช้การทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 3×3 ซึ่งแปรระดับความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสเป็นร้อยละ 2, 5 และ 7 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยปริมาตร กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (ซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสผสมกับเอนไซม์เซลโลไบเอส ในอัตราส่วน 5 : 1 โดยน้ำหนัก) เป็นร้อยละ 20 โดยปริมาตร

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้โดยวิธีในข้อ ก-4

เลือกความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนโดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (analysis of variance) ของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) และ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3.1.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส กลูตารัลดีไฮด์และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสโดยน้ำหนักในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.6.2 ใช้แบบแผนการทดลองเป็นแฟคตอเรียล 2×3×3 ซึ่งแปรระดับความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสเป็นร้อยละ 5 และ 7 โดยปริมาตร ระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยปริมาตร และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโบไบเอสเป็น 5:1, 2:1 และ 1:1 ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้โดยวิธีในข้อ ก-4

เลือกความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส กลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปโดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด และ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3.1.4 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปโดยใช้ภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตรตามลำดับ

เตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปตามวิธีในข้อ 3.2.6.2 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (ซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1) เป็นร้อยละ 5, 10, 15, 20 และ 25 โดยปริมาตร

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ได้โดยวิธีในข้อ ก-4

เลือกความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ให้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุดจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

3.3.1.5 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช (35)

เคลือบทองทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช ด้วยเครื่องไฟน์โคท (fine coat) นาน 5 นาที ดูโครงสร้างของทรายสะอาดเคลือบทองด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า

แช่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป 1 กรัม ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ออก จากนั้นแช่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในสารละลายออสเมียมเตตรอกไซด์

(osmium tetroxide) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายออสเมียมเตตรอกไซด์ออก จากนั้นระเหยน้ำบางส่วนออกจากเอนไซม์ตรึงรูปโดยใช้สารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 อบเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปให้แห้งสนิทแล้วเคลือบทองด้วยเครื่องไฟน์โคทนาน 5 นาที ดูโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า เปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดที่กำลังขยายเท่ากัน จากนั้นดูโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

3.3.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

3.3.2.1 เปรียบเทียบช่วงของพีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (pH activity profile) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับของเอนไซม์เชิงซ้อนเดิม

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม และแอคติวิตีของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (ซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการแปรค่าพีเอชของสารแขวนลอยเอไวเซล พีเอช-101 ในสารละลายบัฟเฟอร์ช่วง 3.5-6.5

เปรียบเทียบช่วงของพีเอชที่เอนไซม์ทั้งสองแสดงแอคติวิตีโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ทั้งสองกับค่าพีเอชของสารแขวนลอยเอไวเซล

3.3.2.2 เปรียบเทียบช่วงของอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (Temperature activity profile) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเดิม

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม และของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโบไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารแขวนลอยเอไวเซลในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 เป็นสับสเตรท โดยแปรระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายสับสเตรทในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส

เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ทั้งสองแสดงแอคติวิตีโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ทั้งสองกับค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว

3.3.2.3 วัดค่าคงที่ Michaelis (Michaelis constant, K_m)

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม และของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการแปรค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยของเอไวเซลในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

เปรียบเทียบค่าคงที่ Michaelis จากกราฟไลน์วีเวอร์_เบอร์ก (Lineweaver Burk plot) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลสเดิม

3.3.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 1 กรัม และของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก) ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม โดยวิธี Macro Kjeldahl distillation (36)

คำนวณร้อยละโปรตีนโดยการคูณร้อยละของไนโตรเจนด้วยแฟคเตอร์ 6.25 แล้วคำนวณหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ จากสูตร

$$\text{แอคติวิตีจำเพาะ} = \frac{\text{จำนวนหน่วยเอนไซม์ (CU)}}{\text{ปริมาณโปรตีนในสารผสม (มิลลิกรัม)}}$$

3.3.2.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

เก็บเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4, 5, 6 และ 7 ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองในช่วงเวลาของการเก็บเท่ากับ 1, 4, 15, 34 และ 68 วัน

เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์ทั้งสองด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับระยะเวลาของการเก็บในสภาวะต่าง ๆ ดังกล่าว

3.3.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมที่สภาวะของการเก็บต่าง ๆ กัน

อ่านค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมที่เก็บในสภาวะต่าง ๆ กันดังกล่าวในข้อ 3.3.2.5 จากกราฟความสัมพันธ์ในข้อ 3.3.2.5 ที่ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับร้อยละ 50

3.3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

3.3.3.1 เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

เตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดสดตามวิธีในข้อ 3.2.6.3 โดยใช้การทดลองแบบแผนแฟคตอเรียล 2×4×2 ซึ่งแปรขนาดอนุภาคของกากสับปะรดบดเป็น 150 ไมครอน และขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีนเป็นร้อยละ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยน้ำหนัก (ในกรณีความเข้มข้นของเอน-บิวทิลลามีนเป็น 0 จะใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์แทน) และแปรระยะเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำเป็น 0.5 และ 1 ชั่วโมง

จากนั้นทดลองย่อยสลายกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นในภาวะต่าง ๆ ดังกล่าว โดยใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (อัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เซลโลไบเอสเท่ากับ 5:1 โดยน้ำหนัก) ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารแขวนลอยของกากสับปะรดก่อนและหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน โดยวิธี Somogyi-Nelson (34)

เลือกภาวะการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดที่เอื้ออำนวยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอด และ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบผลของการใช้ภาวะการเตรียมสภาพขั้นต้นต่าง ๆ กันต่อผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนด้วยกราฟรูปแท่ง ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้กับเวลาที่ใช้อบไอน้ำในภาวะที่มีเอน-บิวทิลลามีนความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับกากที่มีอนุภาคขนาดเท่ากับ 150 ไมครอน และขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน

3.3.3.2 ศึกษาผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรด

แบ่งชั่งกากสับปะรดขนาดอนุภาคเท่ากับ 150 ไมครอน เป็นส่วน ๆ ส่วนละประมาณ 1 กรัม แล้วอบแห้งกากสับปะรดในตู้อบความชื้น อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้กากสับปะรดที่มีน้ำหนักคงที่ และบันทึกน้ำหนักเริ่มต้นของกากทุก ๆ ส่วนไว้ จากนั้นเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด โดยแปรระดับความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีนเป็นร้อยละ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยน้ำหนัก (ในกรณีความเข้มข้นของเอน-บิวทิลลามีนเป็น 0 ใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์แทน) และแปรระยะเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำเป็น 0, 0.5 และ 1 ชั่วโมง

นำกากสับปะรดที่ผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นแล้วมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นร่อนเปียกสารแขวนลอยของกากสับปะรดดังกล่าวผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมครอน และผ่านน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงบนกากสับปะรดที่ค้างบนตะแกรงอีกครั้งเพื่อชะกากที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน ให้รอดผ่านตะแกรงจนหมด นำกากที่เหลือค้างบนตะแกรงขนาด 150 ไมครอน มาอบแห้งในตู้อบความชื้นอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้กากสับปะรดที่มีน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักกากที่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า 150 ไมครอนนี้

คำนวณปริมาณกากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน เป็นร้อยละโดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักกากแห้งเริ่มต้น

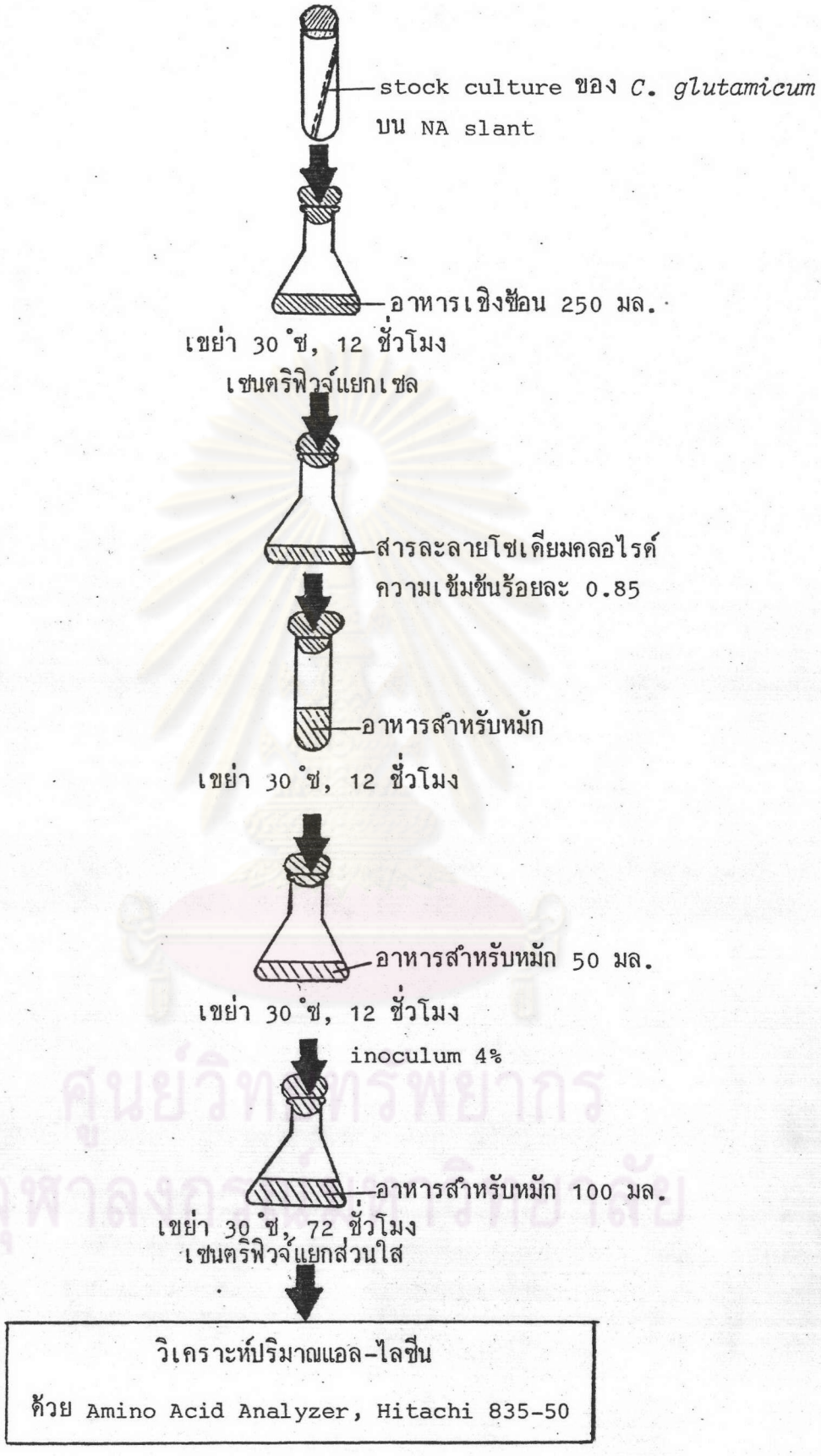
เปรียบเทียบผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นด้วยภาวะต่าง ๆ กัน ต่อการลดขนาดของกากสับปะรดด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน กับเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำในภาวะที่มีเอน-บิวทิลลามีนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

3.3.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน

เตรียมเชื้อ (inoculum) ของ *C. glutamicum* MU3282 ตามวิธีในข้อ 3.2.5.8 จากนั้นใช้เชื้อปริมาณร้อยละ 4 โดยปริมาตร ถ่ายลงในอาหารสำหรับหมักซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 3.2.5.7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ โดยแปรปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.5.7 เขย่าขวดบรรจุอาหารสำหรับหมัก ซึ่งมีเชื้อ *C. glutamicum* MU 3282 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงแยกเชื้อ *C. glutamicum* MU 3282 ออก

นำของเหลวใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงอาหารสำหรับหมักซึ่งผ่านการหมักแอล-ไลซีนข้างต้นมาวิเคราะห์ปริมาณแอล-ไลซีน เมไธโอนีน ธรีโอนีน และแอมโมเนีย ด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid analyzer) เปรียบเทียบกับอาหารควบคุม ขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวแสดงในรูปที่ 24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 แผนผังขั้นตอนการหมักแอล-ไลซีน

3.3.5 ศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

3.3.5.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน (28)

ดำเนินงานด้วยเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดโดยใช้สารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.2.6.3 ซึ่งมีความเข้มข้นของกากเป็น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 1 ลิตร และใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปหนัก 20 กรัม

เปิดวาล์วควบคุมความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาเข้าให้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเกิดการฟลูอิไดซ์อย่างแรง จากนั้นลดความเร็วการไหลจนเกิดลักษณะเบดนิ่ง แล้วจึงเริ่มแปรค่าความเร็วการไหลค่าต่ำจนเป็นค่าสูง วัดค่าความดันตกโดยมานอมิเตอร์ทุกค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรด สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดันตกและค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยกากสับปะรดขาเข้า หาค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันสำหรับสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

3.3.5.2 ศึกษาอิทธิพลของความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ต่อการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

ย่อยสลายกากสับปะรดที่เตรียมในรูปสารแขวนลอยความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปหนัก 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแปรค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดขาขาเข้าเป็น 0.97, 1.30, 1.55 และ 1.9 เซนติเมตรต่อวินาที

เปรียบเทียบค่าร้อยละของการเปลี่ยน ซึ่งคิดจากน้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ต่อกากแห้งเริ่มต้น 100 กรัม เมื่อใช้ความเร็วการไหลต่าง ๆ กันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการเปลี่ยนกับเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายกากสับปะรดเมื่อใช้ความเร็วของการไหลต่าง ๆ กัน

3.3.5.3 กำหนดความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

ย่อยสลายกากสับปะรดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปปริมาณ 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยแปรค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดเป็น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.2.6.3 ความเร็วการไหลที่ใช้เป็นความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันของสารแขวนลอยแต่ละค่าความเข้มข้นที่หาได้จากการทดลองในข้อ 3.3.5.1

เก็บตัวอย่างสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่ผ่านการย่อยทุก ๆ 1 ชั่วโมง นาน 6 ชั่วโมง

หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายสารแขวนลอยกากสับปะรดแต่ละค่าความเข้มข้นในทุก ๆ ชั่วโมง

เลือกความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการเปลี่ยน (น้ำหนักของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ต่อกากแห้งเริ่มต้น 100 กรัม) กับเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

3.3.5.4 กำหนดเวลาสูงสุดของการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด ซึ่งให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อใช้ความเร็วการไหลเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

เตรียมสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตามวิธีในข้อ 3.2.6.3 แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

ฆ่าเชื้อชุดอุปกรณ์ฟลูอิไดเซชัน ได้แก่ หม้อบรรจุสารแขวนลอยของกากสับปะรด เครื่องสูบ เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด สายยาง โดย

การสูบเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เข้าสู่ชุดอุปกรณ์ที่ประกอบเข้าด้วยกันแล้ว จากนั้นเทเอธานอล ออกจากหม้อบรรจุสับสเตรท ปล่อยให้ชุดอุปกรณ์แห้ง 2-3 ชั่วโมง แล้วสูบน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ที่ปราศจากเชื้อเข้าสู่ชุดอุปกรณ์เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีเอธานอล ตกค้างในชุดอุปกรณ์ เปลี่ยนน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 5 ครั้ง

ย่อยกากสับปะรดที่เตรียมเป็นสารแขวนลอยข้างต้นด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปหนัก 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยกากสับปะรดขาเข้าเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน โดยแปรเวลาของการย่อยสลายเป็น 6, 12, 18, 24, 30, ..., 72, 78, 84 ชั่วโมง

เปรียบเทียบผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายที่เวลาต่าง ๆ กัน จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการเปลี่ยนกับเวลาของการย่อยสลายกากสับปะรด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย