การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเพื่อทดลองผลิตแอล-ไลซีนจากกากสับปะรด

นางสาว นฤมล ศรีพุทธิรัตน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-661-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17840120

PREPARATION OF IMMOBILIZED CELLULASE COMPLEXES FOR A TRIAL PRODUCTION OF L-LYSINE FROM PINEAPPLE WASTE

Miss Narumol Sriputtirut

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Food Technology

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN 974-576-661-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเพื่อทดลองผลิตแอล-ไลซีน จากกากสับปะรด
โดย	นางสาวนฤมล ศรีพุทธิรัตน์
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ธัญพิทยากุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นฤมล ศรีพุทธิรัตน์ : การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเพื่อทดลองผลิตแอล-ไลซีนจากกากสับปะรด (PREPARATION OF IMMOBILIZED CELLULASE COMPLEXES FOR A TRIAL PRODUCTION OF L-LYSINE FROM PINEAPPLE WASTE) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ปราณี อ่านเปรื่อง, 169 หน้า.

จากผลงานวิจัยพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยใช้ทรายแม่น้ำสะอาดขนาด 60-80 เมช เป็นตัวพยุง มีสารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรเป็นตัวกระตุ้น สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยปริมาตร เป็นสารสร้างพันธะร่วม และใช้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 ในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตร เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้จากภาวะนี้มีค่าคงที่ Michaelis (K_m) เท่ากับ 8.47 ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าค่า K_m ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 2.1 เท่า เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม แต่ค่าพีเอชที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 6.0 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 1 หน่วยพีเอช แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเท่ากับ 1.69 หน่วยของเอนไซม์เซลลูเลสต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 3.5 เท่า นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปยังมีเสถียรภาพสูงสุดเมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.0 ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 68 วัน และยังคงเหลือแอคติวิตีถึงร้อยละ 85.29 เมื่อเก็บไว้นาน 68 วัน

ภาวะการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรดที่ช่วยให้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ การโม่กากสับปะรดจนได้ขนาดอนุภาคเล็กกว่า 150 ไมครอน แล้วอบไอน้ำที่ 120 องศาเซลเซียส ในสารละลายเอน-บิวทิลลามีนความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก นานครึ่งชั่วโมง โดยพบว่าการเตรียมสภาพดังกล่าวมีผลช่วยลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรดลงด้วย เมื่อทดลองหมักแอล-ไลซีนโดยใช้ไฮโดรไลเสทจากการย่อยสลายกากสับปะรดเป็นแหล่งของน้ำตาลสำหรับหมัก และบัฟเฟอร์ พบว่าได้ผลผลิตแอล-ไลซีนสูงสุด 47.05 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และพบว่าผลผลิตแอล-ไลซีนจะแปรตามความเข้มข้นของน้ำตาลสำหรับหมัก และการผลิตแอล-ไลซีนจะถูกยับยั้งเมื่ออาหารสำหรับหมักมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงเกินไป

จากการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดขนาด 24 × 900 มิลลิเมตร ที่ค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน (1.12 เซนติเมตรต่อวินาที) พบว่าสามารถย่อยสลายกากสับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ในเวลา 42 ชั่วโมง ให้ร้อยละของการเปลี่ยนกากสับปะรดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (% conversion) ถึง 92.84

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีการอาหาร

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

NARUMOL SRIPUTTIRUT : PREPARATION OF IMMOBILIZED CELLULASE COMPLEXES FOR A TRIAL PRODUCTION OF L-LYSINE FROM PINEAPPLE WASTE. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PRANEE ANPRUNG, Ph.D., 169 PP.

The optimum condition for the preparation of immobilized cellulase complexes by covalent bonding method has been found: 60-80 mesh river-bed sand as carrier, 5% by volume of APTS solution as carrier activator, 2.5% by volume of glutaraldehyde solution as intermolecular cross-linker and a ratio of 2:1 by weight between cellulase and cellobiase in cellulase complexes solution the concentration of which is 15% by volume. The Michaelis constant, K_m, of the immobilized cellulase complexes has been determined to be 8.47 μM which is 2.1 times smaller than that of the native cellulase complexes. For Avicel PH-101 hydrolysis, both the immobilized enzymes and the soluble enzymes have an optimum temperature of 50°C and the optimum pH of 6.0 for the former and 5.0 for the latter. The specific activity of the immobilized enzymes is 1.69 CU/mg while its half life has been determined to be longer than 68 days and the retained activity is 85.29% after storage in buffer pH 4.0 at 28-30°C for 68 days.

The pretreatment condition of pineapple waste, which enhance the hydrolytic effect of the cellulase complexes is : milling the solid pineapple waste until it is reduced to particles of size smaller than 150 micron, and half an hour steaming at 120°C in 1% (by weight) n-butylamine solution. Under such condition, the pineapple waste was found to be more susceptible to enzymic hydrolysis and its particle size was further reduced.

A trial production of L-lysine by *C. glutamicum* using the pineapple waste hydrolysate as fermentable sugar and buffer source was investigated. It was found that the amount of lysine produced depended on fermentable sugar concentration. Moreover, the production of lysine was inhibited by excessive phosphate buffer concentration in the fermentation medium. The maximum L-lysine production was 47.05 mg/100 ml.

The hydrolysis of pineapple waste using the immobilized cellulase complexes in fluidized bed reactor 24 x 900 mm. was studied. The hydrolysis of 1 g/l pineapple waste suspension at the minimum flow velocity of 1.12 cm/s for 42 hrs. resulted in 92.84 % conversion.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีการอาหาร

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี ทั้งนี้เนื่องจากความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งให้คำแนะนำทั้งทางด้านความรู้พื้นฐานทางทฤษฎีและเทคนิควิธีการวิจัยต่าง ๆ รวมทั้งมีส่วนช่วยให้ข้าพเจ้าได้นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 13 และครั้งที่ 14 และ International conference on Biotechnology and Food ณ มหาวิทยาลัย Hohenheim ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน นับเป็นบุคคลผู้ให้กำเนิดวิญญาณของนักวิจัยแก่ข้าพเจ้าโดยแท้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยุทธ ธัญพิทยากุล ประธานกรรมการ และอาจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล กรรมการ ในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บริษัท อีสต์เอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด ผู้ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์เซลลูเลสและเซลโลไบเอส ตลอดงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ โครงการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนา (STDB) ที่กรุณาให้เงินอุดหนุนการศึกษาและการค้นคว้าวิจัยขั้นปริญญาโท ประจำปี 2530 แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาของการศึกษาทั้งหมด

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยอีกส่วนหนึ่ง รวมทั้งเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่อำนวยความสะดวกแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาวัสดุศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และอำนวยความสะดวกแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับดำเนินงานวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธราพงษ์ วิทิตศานต์ ภาควิชาเคมีเทคนิค ผู้ให้คำแนะนำสำหรับงานวิจัยบางส่วนแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ คุณสมพร เอี่ยมสำอางค์ และศูนย์พัฒนาและบริการเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือให้การประกอบชุดเครื่อง

ปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับเชื้อ *C. glutamicum* MU 3282 พร้อมทั้งได้กรุณาให้คำแนะนำในส่วนการผลิตแอล-ไลซีน

ขอขอบพระคุณ คุณกุหลาบ พิมพ์สุวรรณ์ ที่อำนวยความสะดวกสำหรับงานการพิมพ์ทั้งหมดที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ คุณรุจิเรข ขจรศักดิ์ชัย เพื่อน พี่ และน้อง เทคโนโลยีทางอาหารทุกคนที่ให้กำลังใจและกำลังกายช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบเท้าขอบพระคุณพ่อ แม่ และพี่ชาย ผู้เป็นเสมือนชีวิตทั้งหมดของข้าพเจ้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

คำย่อและสัญญลักษณ์ ..... น

บทที่

1. บทนำ 1

2. วารสารปริทัศน์

2.1 เซลลูโลส

2.1.1 โครงสร้างของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช 5

2.1.2 วัตถุดิบที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ 7

2.2 เอนไซม์เซลลูเลส

2.2.1 แหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส 9

2.2.2 องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส 9

2.2.3 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส 10

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 11

2.3 การเตรียมสภาพขั้นต้นวัตถุดิบ

2.3.1 การเตรียมสภาพขั้นต้นทางเคมี 14

2.3.2 การเตรียมสภาพขั้นต้นทางกายภาพ 14

2.4 การผลิตน้ำตาลสำหรับหมักโดยการย่อยสลายเซลลูโลส

2.4.1 การย่อยสลายด้วยกรด 15

บทที่ หน้า

2.4.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 15
2.5 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสอิสระ 16
2.6 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูป 16
2.6.1 การตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมกับตัวพยุง 19
2.6.2 การตรึงรูปโดยวิธีเชื่อมข้าม 23
2.6.3 การตรึงรูปโดยวิธีห่อหุ้ม 24
2.7 การตรึงรูปร่วม 28
2.8 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด
2.8.1 นิยาม 30
2.8.2 ประเภทของฟลูอิไดเซชัน 30
2.8.3 ลักษณะของฟลูอิไดซ์เบด 31
2.8.4 ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของฟลูอิไดเซชัน 33
2.8.5 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 34
2.9 แอล-ไลซีน
2.9.1 ความสำคัญและความเป็นมาของแอล-ไลซีน 34
2.9.2 วิถีการสังเคราะห์ไลซีนทางชีวภาพ 35
2.9.3 การผลิตไลซีนโดยวิธีการหมัก 38
2.9.4 การควบคุมการผลิตแอล-ไลซีนและผลการลดการควบคุม ในสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง 41
2.9.5 การผลิตไลซีนโดยวิธีใช้เอนไซม์ 44
2.9.6 การใช้กรดอะมิโนในอาหารสัตว์ 45
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย
3.1 อุปกรณ์ 49
3.2 วัสดุและสารเคมี
3.2.1 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ตรึงรูปเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน . 50
3.2.2 สารเคมีที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน . 52
3.2.3 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณโปรตีน 55
3.2.4 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมกากสับปะรด 56

บทที่ หน้า

3.2.5 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน 57
3.2.6 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 61
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย
3.3.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป 67
3.3.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 70
3.3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด 72
3.3.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน 74
3.3.5 ศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 76
4. ผลการวิจัย
4.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป
4.1.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนักที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป 79
4.1.2 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป 81
4.1.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสโดยน้ำหนักในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน 84

บทที่ หน้า

4.1.4 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน ซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปในภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ 87

4.1.5 ศึกษาโครงสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช 89

4.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

4.2.1 เปรียบเทียบช่วงของพีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 91

4.2.2 เปรียบเทียบช่วงของอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 93

4.2.3 วัดค่าคงที่ Michaelis 95

4.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 96

4.2.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 96

4.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมที่ภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน 98

บทที่ หน้า

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

4.3.1 เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกาก-สับปะรด 99

4.3.2 ศึกษาผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรด 103

4.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน 105

4.5 ศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

4.5.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน 106

4.5.2 ศึกษาอิทธิพลของความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ต่อผลการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 108

4.5.3 กำหนดความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 110

4.5.4 กำหนดเวลาของการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วการไหลเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน 112

5. อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป

5.1.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปซึ่งมีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนักที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป 114

บทที่ หน้า

5.1.2 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป 115

5.1.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตาราลดีไฮด์ และอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอส โดยน้ำหนักในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน 116

5.1.4 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนซึ่งมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลสต่อ เอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปในภาวะที่มีสารละลายเอพีทีเอส และสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 2.5 โดยปริมาตร ตามลำดับ 118

5.1.5 ศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช 119

5.2 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม

5.2.1 เปรียบเทียบช่วงพีเอชที่เอนไซม์แสดง แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับของเอนไซม์เซลลูเลสเดิม 120

5.2.2 เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (Temperature activity profile) ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 121

5.2.3 วัดค่าคงที่ Michaelis (K_m) 122

5.2.4 หาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบกับของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 122

5.2.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม . 123

บทที่ หน้า

5.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมที่สภาวะการเก็บต่างๆกัน 124

5.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด

5.3.1 เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมขั้นต้นกากสับปะรด 125

5.3.2 ศึกษาผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรด 127

5.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน 127

5.5 ศึกษาการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน-ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

5.5.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน 128

5.5.2 ศึกษาอิทธิพลของความเร็วการไหลของสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัม ต่อลิตร ต่อผลการย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 129

5.5.3 กำหนดความเข้มข้นของสารแขวนลอยของกากสับปะรดที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ เซลลูเลสเชิงซ้อน-ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 130

5.5.4 กำหนดเวลาของการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วการไหลเท่ากับค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน 131

บทที่ หน้า

6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

6.1.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์..... 133

6.1.2 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม..... 133

6.1.3 การเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด 135

6.1.4 การทดลองเบื้องต้นในการผลิตแอล-ไลซีน 135

6.1.5 การย่อยสลายกากสับปะรดในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลส-เชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 136

6.2 ข้อเสนอแนะ 137

เอกสารอ้างอิง 138

ภาคผนวก..... 145

ประวัติผู้เขียน 168

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กำลังการผลิตและปริมาณการผลิตสับปะรดกระป๋องในประเทศไทย ตั้งแต่ พ.ศ. 2522 ถึง พ.ศ. 2527	2
2	สถิติการนำเข้ากรดอะมิโน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 ถึง พ.ศ. 2529	3
3	ปริมาณเซลลูโลสในวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ	8
4	การตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการต่าง ๆ	17
5	การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตแอล-ไลซีน	41
6	สัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารแต่ละชนิด	46
7	องค์ประกอบของอาหารเชิงซ้อน 1,000 มิลลิลิตร	58
8	องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ 1,000 มิลลิลิตร	59
9	องค์ประกอบของสารละลายเทรซ อีลีเมนท์ 1,000 มิลลิลิตร	60
10	ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดในการหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป	82
11	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป	83
12	ผลการวิเคราะห์วา เรียนซ์ของข้อมูลแบบสุ่มตลอดในการหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์องค์ประกอบในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่เหมาะสมในการตรึงรูป	85
13	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์องค์ประกอบในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่เหมาะสมในการตรึงรูป	86

ตารางที่ หน้า

14 ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม และเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปในภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน 98

15 ผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของข้อมูลในการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด 100

16 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสภาพขั้นต้นกากสับปะรด 101

17 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนและแอมโมเนียในอาหารสำหรับหมักด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนหลังการทดลองหมักแอล-ไลซีน 106

18 สรุปสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม 134

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าสูง	1
2	การเรียงตัวของผนังเซลล์แต่ละชั้นในเซลล์พืช และตำแหน่งของมิดเดิล ลาเมลลา	5
3	พันธะไฮโดรเจนในเซลลูโลส	6
4	ลำดับการรวมกลุ่มของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชและโครงสร้างของสายโมเลกุลเซลลูโลส	7
5	การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์ "x" และเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส ตามสมมติฐานของ Cowling	10
6	การจัดเรียงตัวของหน่วยกลูโคไพราโนสในทิศทางตรงข้ามกันในผลึกเซลลูโลส	12
7	ลักษณะการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีต่าง ๆ	18
8	การเชื่อมไขว้เอนไซม์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมไขว้	23
9	ลักษณะการห่อหุ้มเอนไซม์เซลลูเลสโดยร่างแหโพลีเมอร์ก่อนและหลังการทำแห้ง	25
10	ระบบที่ใช้ย่อยเซลลูโลสโดยรวมปฏิกรณ์ถังกวนเข้ากับปฏิกรณ์เมมเบรน	27
11	การตรึงรูปร่วมของเอนไซม์และเซลล์จุลินทรีย์	29
12	การผลิตเอธานอลจากเซลโลไบโอสโดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ตรึงรูปร่วมกับเอนไซม์บีตา-กลูโคสิเดส	30
13	ระดับของเบดภายในหอทดลอง	31
14	ความสัมพันธ์ระหว่างความดันตกของเบด กับค่าความเร็วของของไหลในหอทดลองฟลูอิไดซ์เบด	32
15	วิถีของการสังเคราะห์ไลซีนในแบคทีเรีย (วิถีไดอะมิโนไพมิลิค แอซิด)	36
16	การลดผลการควบคุม (deregulation) การสังเคราะห์ไลซีนในสายพันธุ์เปลี่ยนพวกโฮโมซีรีนออกโซโทรฟของ C. glutamicum	42
17	ผลการลดการควบคุมการสังเคราะห์ไลซีนในสายพันธุ์เปลี่ยนของ B. flavum ซึ่งต้านทานต่อเอส-(บีตา-อะมิโนเอธิล)-แอล-ซิสทีน (AEC)	44

รูปที่ หน้า

18 กระบวนการผลิตแอล-ไลซีนโดยใช้เอนไซม์ 45
19 การใช้ตัวแบบคอมพิวเตอร์ "Least Cost" ในการสร้างสูตรอาหารสัตว์ .. 47
20 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดและอุปกรณ์ประกอบอื่น ๆ 62
21 แผนผังการจัดเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบดและอุปกรณ์ประกอบอื่น ๆ 63
22 แผนผังขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ 65
23 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ 66
24 แผนผังขั้นตอนการหมักแอล-ไลซีน 75
25 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปกับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 5:1 โดยน้ำหนัก 80
26 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่ภาวะ $A_5G_{2.5}$ กับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่มีอัตราส่วนของเอนไซม์เซลลูเลสต่อเอนไซม์เซลโลไบเอสเป็น 2:1 โดยน้ำหนัก 88
27 ลักษณะพื้นผิวที่มีรูพรุนเล็กน้อยของเม็ดทรายสะอาดขนาด 60-80 เมช จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า 89
28 ลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,600 เท่า 90
29 ลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป จากเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า 90
30 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม กับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ กัน 92
31 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมกับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 94

รูปที่ หน้า

32 เปรียบเทียบกราฟไลน์ วีเวอร์เบอร์กของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิมและเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป 95

33 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม กับเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป ที่ภาวะการเก็บต่าง ๆ กัน 97

34 เปรียบเทียบร้อยละของการเปลี่ยนที่ได้จากการย่อยสลายกากสับปะรด ซึ่งผ่านการเตรียมสภาพขั้นต้นในภาวะต่าง ๆ กัน 102

35 ผลของการเตรียมสภาพขั้นต้นต่อการลดขนาดอนุภาคของกากสับปะรดที่มีขนาดอนุภาคเริ่มต้นเท่ากับ 150 ไมครอน 104

36 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดันตกกับค่าความเร็วการไหลขาเข้าของสารแขวนลอยกากสับปะรดที่มีความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ... 107

37 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการเปลี่ยนกับค่าความเร็วการไหลของสารแขวนลอยกากสับปะรดขาเข้า เมื่อย่อยสลายสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเร็วการไหลของสารแขวนลอยขาเข้าเป็น 0.97, 1.30, 1.55 และ 1.90 เซนติเมตรต่อวินาที 109

38 ความสัมพันธ์ของร้อยละของการเปลี่ยนที่ได้กับเวลาในการย่อยสลายสารแขวนลอยของกากสับปะรดความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร .. 111

39 ร้อยละของการเปลี่ยนที่เวลาการย่อยต่าง ๆ กัน เมื่อใช้สารแขวนลอยกาก-สับปะรดความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสารแขวนลอยกากสับปะรดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด 113

40 การคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปที่เตรียมได้จากภาวะความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ต่างกัน แต่กลับมีแอคติวิตีเท่ากัน เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนที่ใช้มีอัตราส่วนของเอนไซม์องค์ประกอบที่จำกัด 116

41 การคาดคะเนโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปซึ่งมีแอคติวิตีขึ้นกับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ และอัตราส่วนของเอนไซม์องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน 117

รูปที่ หน้า

42 การกระจายไอออนบวกในระบบที่มีเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนเดิม และระบบที่มีเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูป ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อนตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงสุด 120

43 การคลายตัวของโปรตีนของเอนไซม์อิสระ โดยมีสาเหตุจากความร้อน และในกรณีเอนไซม์ที่เชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะที่แข็งแรงจะเกิดการคลายตัวได้ยาก . 122

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญญลักษณ์

ค.ศ. = คริสต์ศักราช

พ.ศ. = พุทธศักราช

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

°ซ = องศาเซลเซียส

A = ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส

APTES = Aminopropyltriethoxy silane

C = ความเข้มข้นของสารละลายเอน-บิวทิลลามีน

$C_{x:y}$ = อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์เซลลูเลส (x) ต่อเอนไซม์เซลโลไบเอส (y) ในเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน

CU = หน่วยของเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งหมายถึงปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาของสับสเตรท 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

G = ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์

μM = ไมโครโมลาร์

NA = nutrient agar

OD_{750} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

P = ขนาดอนุภาคของกากสับปะรด

SEM = Scanning Electron Microscope

T = เวลาที่ใช้อบไอน้ำกากสับปะรด

T_e = อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 °ซ)

T_R = อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ)