บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญ และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ของ Escherichia coli ATCC 9637 ในถังหมักกับขวดเขย่า

เลี้ยง E. coli ATCC 9637 ในถังหมักกับขวดเขย่าตามวิธีทดลองข้อ 2.6.2 และ 2.6.3 โดยใช้อาหารสูตรปรับค่าซึ่งมี 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต กับ 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

พบว่า E. coli ATCC 9637 ให้ค่าการเจริญสูงสุด และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในถังหมักใกล้เคียงกับในขวดเขย่า (ตามรูปที่ 7) แต่ใช้เวลาดังกล่าวเร็วกว่าประมาณ 2 เท่า ดังนั้นในการทดลองเราจึงทำการเลี้ยงและเก็บเซลล์โดยใช้ถังหมัก เพราะเหตุว่าใช้เวลาสั้นกว่า และสามารถเก็บเซลล์ได้ทีละมาก ๆ

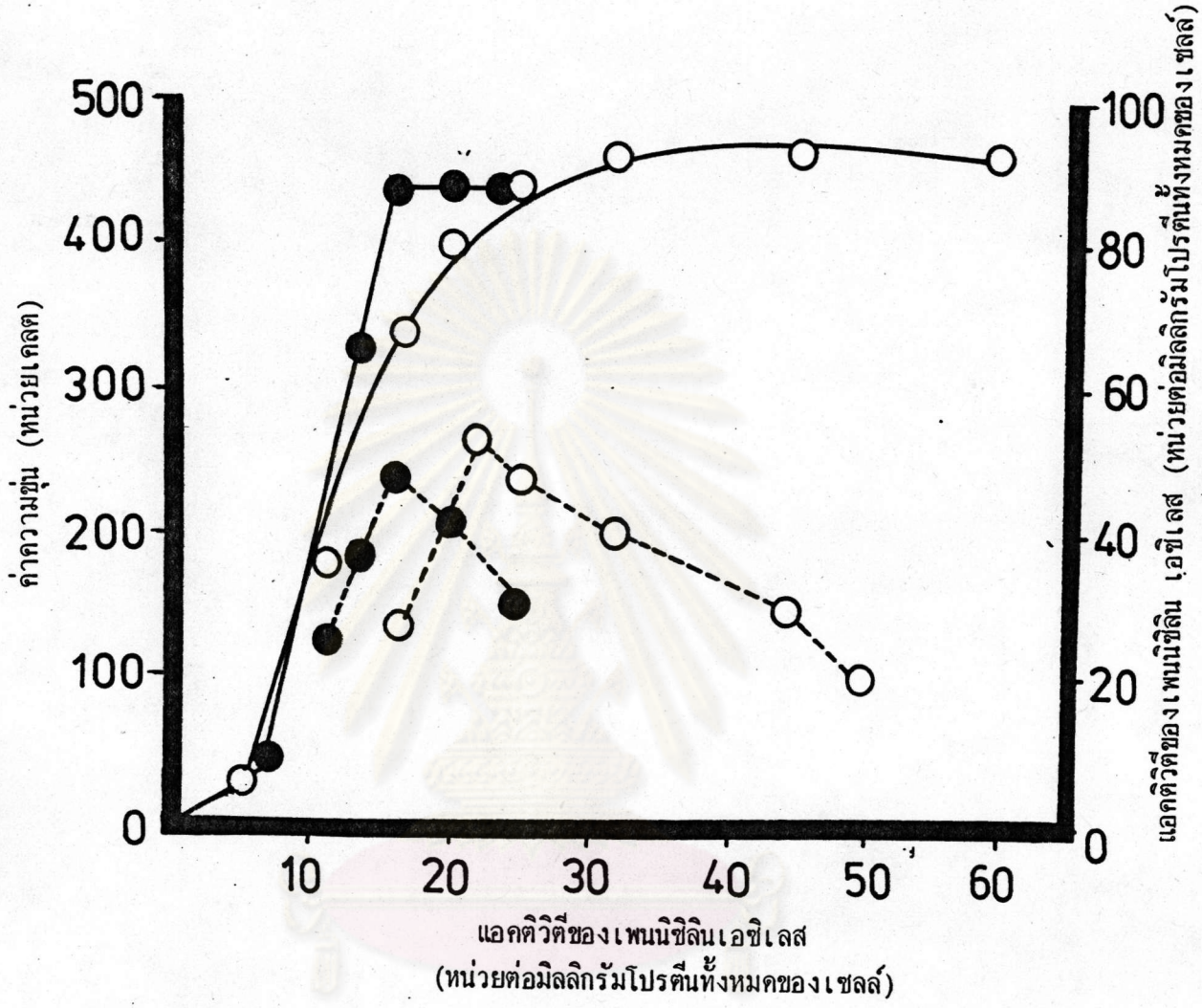
3.2 การศึกษาผลกระทบของอัตราส่วนของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นต่ออุณหภูมิการแข็งตัว และ strength ของเม็ดเจลแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

แปรผันอัตราส่วนของเปอร์เซนต์แคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นตั้งแต่ 0.5:2.5, 1:2, 1.5:1.5 และ 2:1 เมื่อความเข้มข้นของวัสดุตรึงเซลล์รวม 3 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กับ 1:3, 1.5:2.5, 2:2 และ 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ สำหรับความเข้มข้นวัสดุตรึงเซลล์รวม 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในปริมาตร รวมทั้งหมด 20 มิลลิลิตร เมื่อไม่มีเซลล์แบคทีเรีย วัดอุณหภูมิการแข็งตัวของเม็ดเจล (วิธีทดลองข้อ 2.12)และ strength ของเม็ดเจล (วิธีทดลองข้อ 2.11) เมื่อทำการตรึงโดยไม่มีเซลล์ (วิธีทดลองข้อ 2.10.2)

ผลการทดลอง (ตารางที่ 1) พบว่าอุณหภูมิการแข็งตัวของเม็ดเจลทั้งหมดมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (24-35 องศาเซลเซียส) แต่ค่า strength ของเม็ดเจลมีค่าแตกต่างอย่างชัดเจน จะเห็นได้จากที่ความเข้มข้นของวัสดุตรึง 3.0 เปอร์เซนต์ เมื่อเพิ่มเปอร์เซนต์ของแคปปา-คาร์ราจีแนน ให้มากกว่าหรือเท่ากับเปอร์เซนต์ความเข้มข้นวุ้น โดยเมื่อใช้อัตราส่วน

เปอร์เซนต์ความเข้มข้น แคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเท่ากับ 1:2 จะได้ค่า strength ของเม็ดเจลเท่ากับ 15-20 × 10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ในขณะที่ถ้าใช้อัตราส่วนดังกล่าวเท่ากับ 1.5:1.5 จะให้ค่า strength เพิ่มขึ้นประมาณ 4-5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์น้ำหนักของวัสดุตรึงทั้งหมดที่ 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าที่เปอร์เซนต์น้ำหนักของวัสดุตรึงทั้งหมดที่ 4.0 เปอร์เซนต์ มีค่า strength มากกว่าที่ 3.0 เปอร์เซนต์ประมาณ 2 เท่า จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ในการทดลองต่อไป โดยจะเลือกอัตราส่วนของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเท่ากับ 1.5:1.5, 2.0:1.0 กับ 2.0:2.0 และ 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส (----) ของ E. coli ATCC 9637 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำเสริมด้วย 0.2% กรดฟินิลอะซีติก และ 0.5% โซเดียมกลูตาเมต โดยขวดเขย่า (o) และถังหมัก (●) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

<u>ตารางที่</u> 1 ผลกระทบของอัตราส่วนเปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ต่อ strength และอุณหภูมิการแข็งตัวของเจล

อัตราส่วนของแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น (เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร)	อุณหภูมิการแข็งตัวของเจล (องศาเซลเซียส)	strength ($\times 10^{-2}$ กก./ตร.ซม.)
ที่เปอร์เซนต์น้ำหนักรวม 3 เปอร์เซนต์		
0.5 : 2.5	34.0	10 - 15
1.0 : 2.0	34.0	15 - 20
1.5 : 1.5	34.0	60 - 70
2.0 : 1.0	35.0	90 - 100
ที่เปอร์เซนต์น้ำหนักรวม 4 เปอร์เซนต์		
1.0 : 3.0	35.0	15 - 20
1.5 : 2.5	34.5	20 - 25
2.0 : 2.0	35.5	130 - 140
2.5 : 1.5	35.0	130 - 140

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การศึกษาผลกระทบของอัตราส่วน ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึง

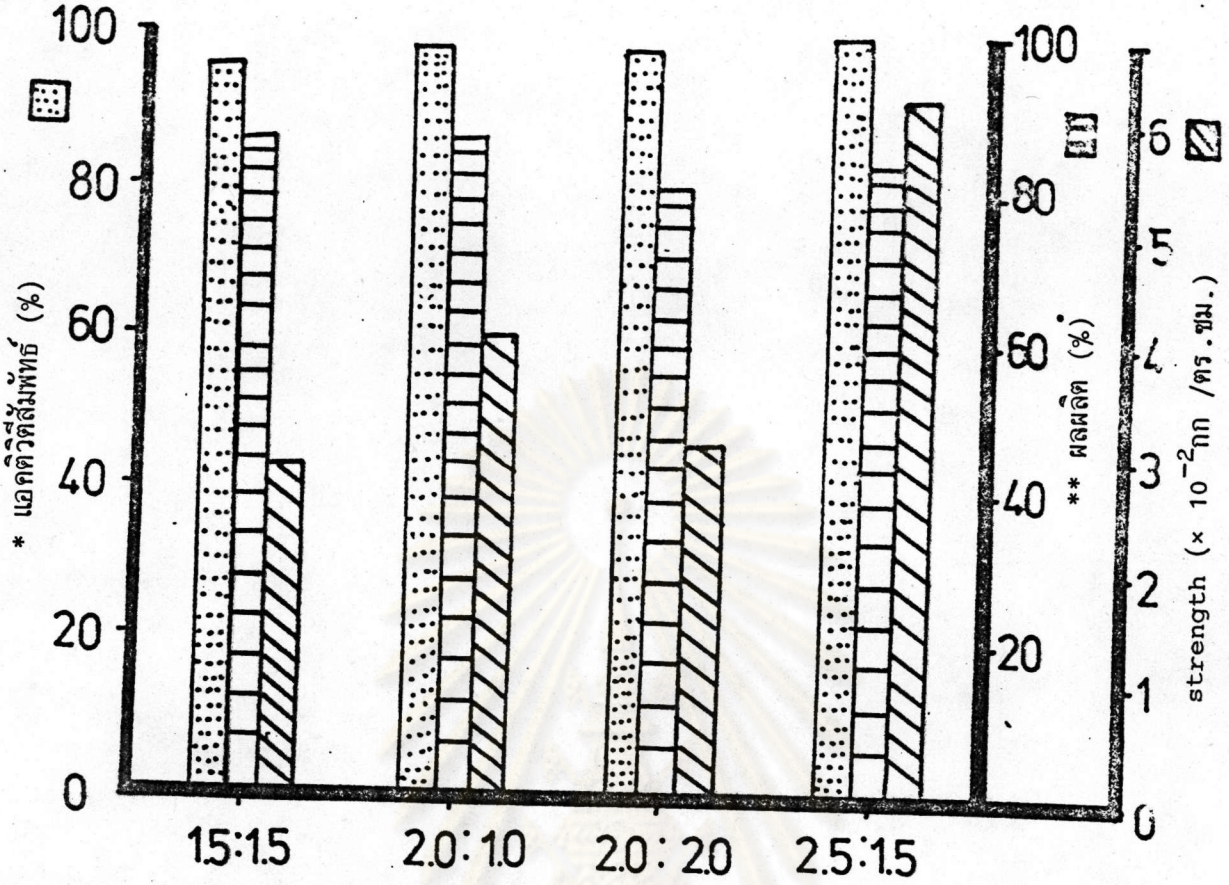
ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 (10 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายผสมของแคปาา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่อัตราส่วนความเข้มข้น 1.5:1.5, 2.0:1.0 กับ 2.0:2.0 และ 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามวิธีทดลองข้อ 2.10.2 ติดตามแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength (ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.2 และ 2.11 ตามลำดับ)

ผลการทดลอง (รูปที่ 8) พบว่าอัตราส่วน 1.5:1.5, 2.0:1.0 ให้เปอร์เซนต์ผลผลิตของเซลล์ตรึงสูงกว่าที่อัตราส่วน 2.0:2.0 และ 2.5:1.5 เพียงเล็กน้อย แต่แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส กลับต่ำกว่า และค่า strength ของอัตราส่วนความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่ 2.5:1.5 มีค่าสูงกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ ถึง 2 เท่า จึงได้นำอัตราส่วนดังกล่าวนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์ต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเซลล์ E. coli ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามวิธีข้อ 2.10.2 นำเซลล์ตรึงที่ได้มาเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.01-0.30 โมลาร์) รายละเอียดตามวิธีทดลองข้อ 2.14

จากการทดลอง (รูปที่ 9) พบว่า กลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อการเพิ่ม strength ของเม็ดเซลล์ตรึง แต่กลับจะมีผลทำให้แอคติวิตีของเพนนิซิลินเอซิเลส ในเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น จะมีค่าลดลงต่ำมากกว่า 70 เปอร์เซนต์ เมื่อความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์มากกว่า 0.10 โมลาร์ แต่หลังจากนั้นการลดลงของแอคติวิตีก็มีเพียงเล็กน้อย คล้ายกับของเม็ดเซลล์ตรึงวุ้น แต่จะดีกว่าเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเล็กน้อย ที่คุณจันทร์เพ็ญ เดชะอำไพทำไว้



รูปที่ 8 แสดงผลกระทบของอัตราส่วนของแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นต่อ strength, เปอร์เซนต์ผลผลิตและแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเจล เมื่อใช้ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

$$* \text{ \% แอคติวิตีสัมพัทธ์} = \frac{\text{แอคติวิตีของเม็ดเซลล์ตรึงที่วัดได้}}{\text{แอคติวิตีของเม็ดเซลล์ตรึงที่สูงที่สุด}} \times 100$$

$$** \text{ \% ผลผลิต} = \frac{\text{น.น.เม็ดเจลที่เกิดขึ้น}}{\text{น.น.เจลทั้งหมด}} \times 100$$

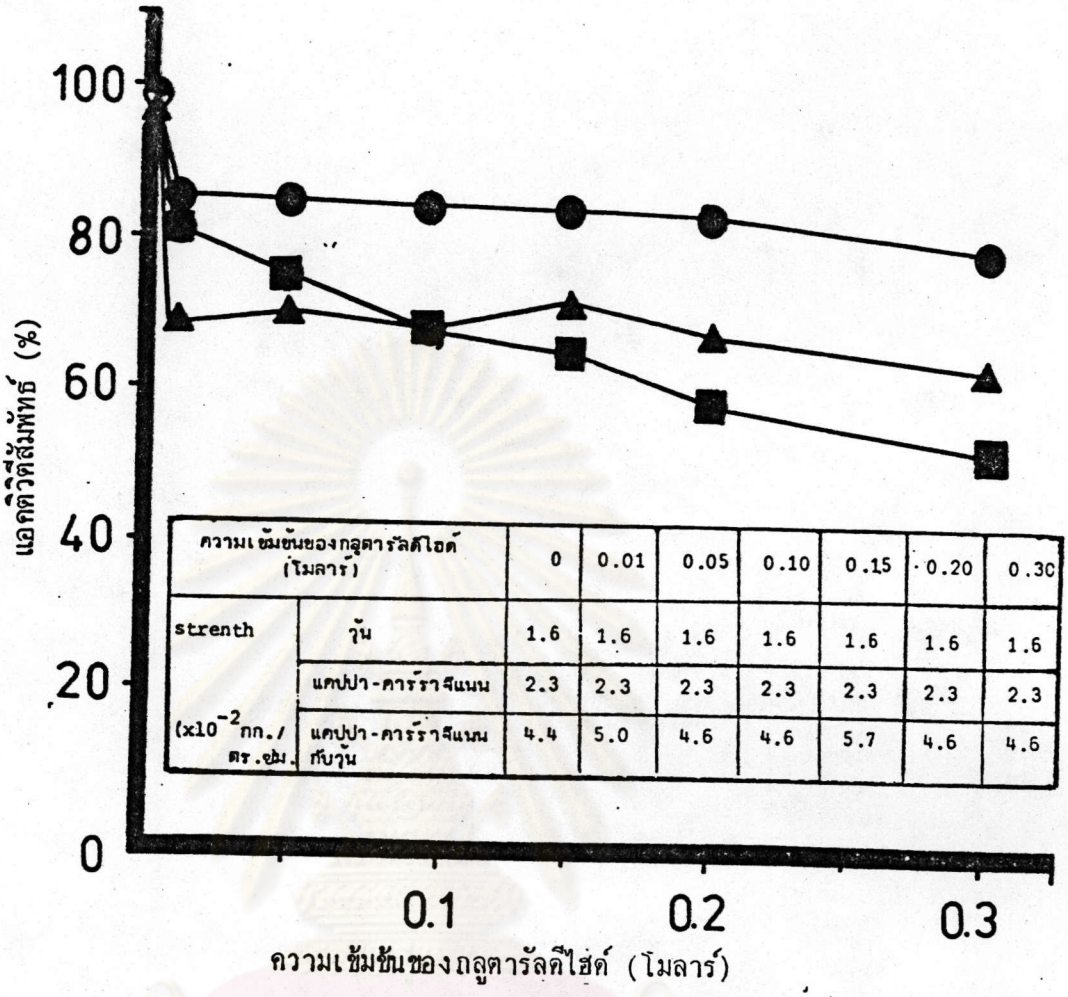
3.5 ผลกระทบของความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลีนไดอามีนต่อ strength และแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

นำเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาตรึงด้วยสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ความเข้มข้น 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ (วิธีข้อ 2.10.2) ศึกษาผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลีนไดอามีนโดยให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ 0.10 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ก่อนแล้วแปรค่าความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนตั้งแต่ 0-0.30 โมลาร์ อีกครั้ง (วิธีทดลองข้อ 2.14) จากผลการทดลอง (รูปที่ 10) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลีนไดอามีน ค่า

ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง (ทำการวัดด้วยเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นเองตามวิธีทดลองข้อ 2.11) มีค่าเพิ่มขึ้น โดยที่ค่า strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่มีค่าเพิ่มจาก 5.0×10^{-2} เป็น 8.3×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และหลังจากนั้นก็มีค่าลดลงเหลือ 6.2×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เมื่อความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลีน-ไดอามีนมากกว่า 0.15 โมลาร์

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงวุ้นและเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986) พบว่า เมื่อทำการเสริมซ้ำด้วยเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนความเข้มข้น 0.05-0.10 โมลาร์ ค่า strength ของเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น มีค่าสูงกว่าของเซลล์ตรึงวุ้นประมาณ 4 เท่า และสูงกว่าเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนประมาณ 2 เท่า ส่วนแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเม็ดเซลล์ตรึงของสารผสมมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย คล้ายกับเม็ดเซลล์ตรึงวุ้น แต่จะมีค่าสูงกว่าเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

จากข้อได้เปรียบทั้ง 2 กรณี คือ strength และ แอคติวิตีของเอนไซม์ เราจึงเลือกที่จะนำเม็ดเซลล์ตรึงของสารผสมแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น ทำการศึกษาสมบัติต่าง ๆ เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาที่จะนำไปใช้ในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยาต่อไป



ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (โมลาร์)		0	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
strenth ($x10^{-2}$ กก./ตร.ซม.)	วุ้น	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
	แคปปา-คาร์ราจีแนน	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
	แคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น	4.4	5.0	4.6	4.6	5.7	4.6	4.6

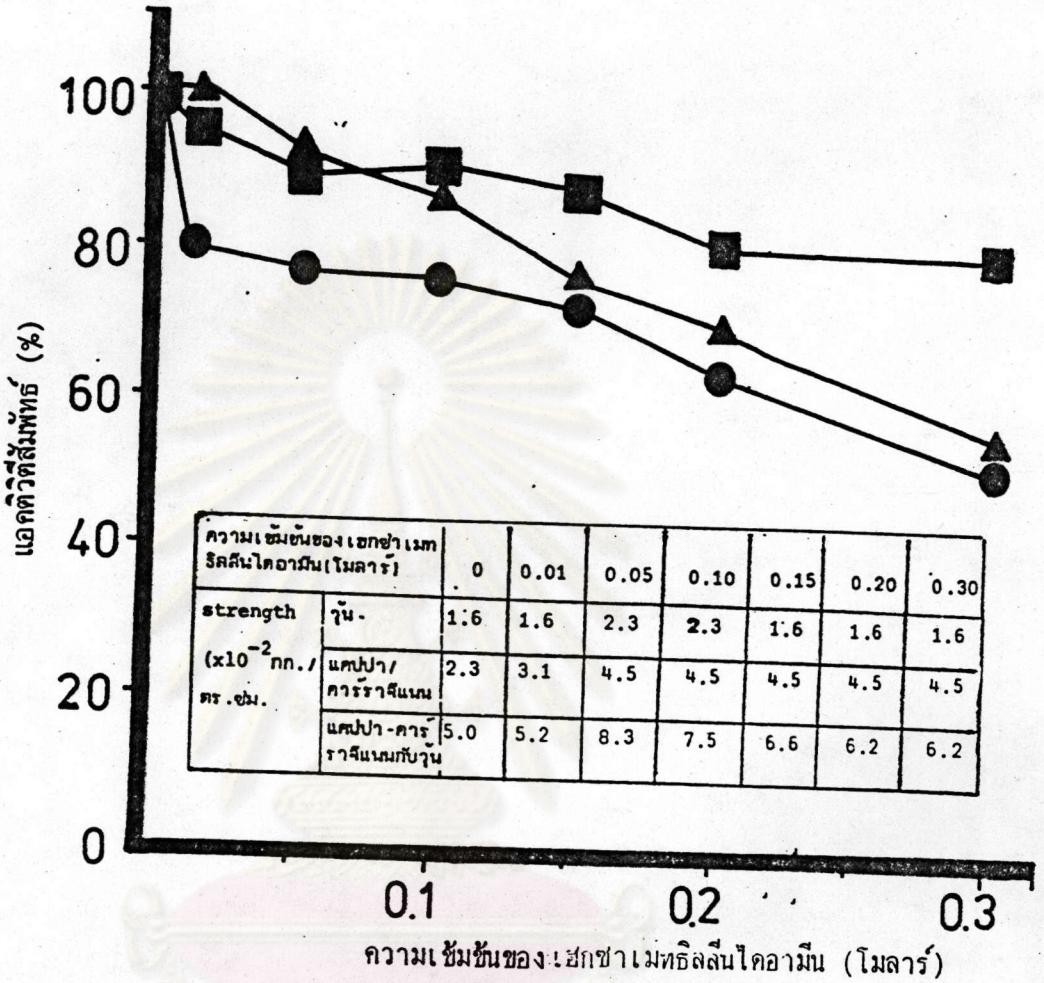
รูปที่ 9 ผลกระทบของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงโดย

ก. ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น (■) (จันทร์เพ็ญ, 1986)

ข. ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน (●) (จันทร์เพ็ญ, 1986)

ค. ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น อัตราส่วน 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (▲)

i17483642



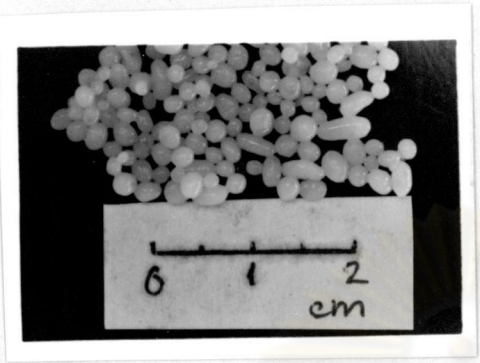
ความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน(โมลาร์)		0	0.01	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30
strength ($x10^{-2}$ กก./ตร.ซม.	วุ้น	1.6	1.6	2.3	2.3	1.6	1.6	1.6
	แคปปา/คาร์ราจีแนน	2.3	3.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	แคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น	5.0	5.2	8.3	7.5	6.6	6.2	6.2

รูปที่ 10 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ 0.1 โมลาร์ กับความเข้มข้นเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีนต่อแอคติวิตีเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงโดย

ก. ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น (■) (จันทร์เพ็ญ, 1986)

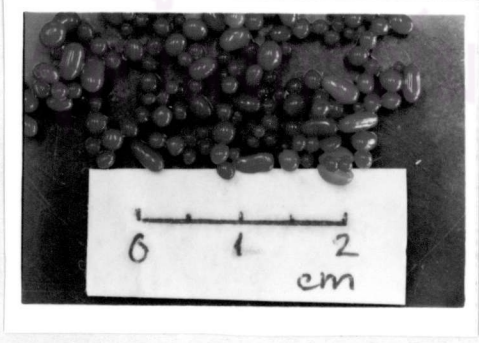
ข. ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน) (●) (จันทร์เพ็ญ, 1986)

ค. ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น อัตราส่วน 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (▲)



ก) เม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

ข) เม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์



ค) เม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน

รูปที่ 11 รูปเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

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

ตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่ความเข้มข้น 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำเม็ดเซลล์ตรึงมาเสริมด้วย 0.10 โมลาร์ กลูตารัลดีไฮด์ และ 0.10 โมลาร์ เฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน ตามวิธีทดลองข้อ 2.14 จากนั้นจึงนำมาศึกษาสมบัติต่าง ๆ

3.6.1 pH ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Optimum pH)

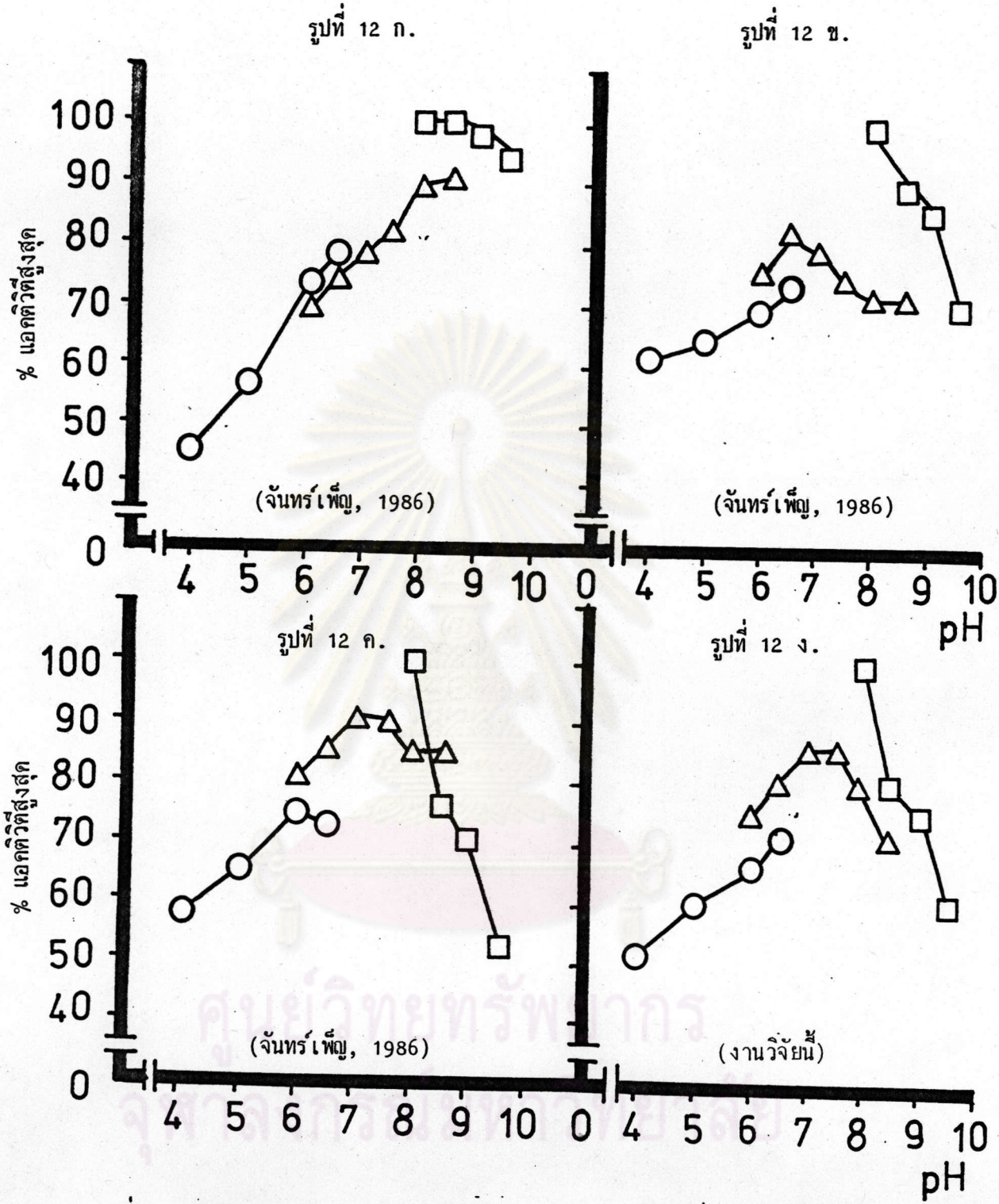
นำเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน อินคิวเบตกับเพนนิซิลิน จี ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 4.0-9.7 ทำการวัดแอคติวิตีคล้ายกับวิธีทดลองข้อ 2.8.2 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของเซลล์ตรึงมีค่าอยู่ในช่วง pH 7.0-7.5 (รูปที่ 12 ง) คล้ายกับในเซลล์ตรึงวุ้นและเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยจะมีค่าที่ต่ำกว่าในเซลล์อิสระ

3.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Optimum temperature)

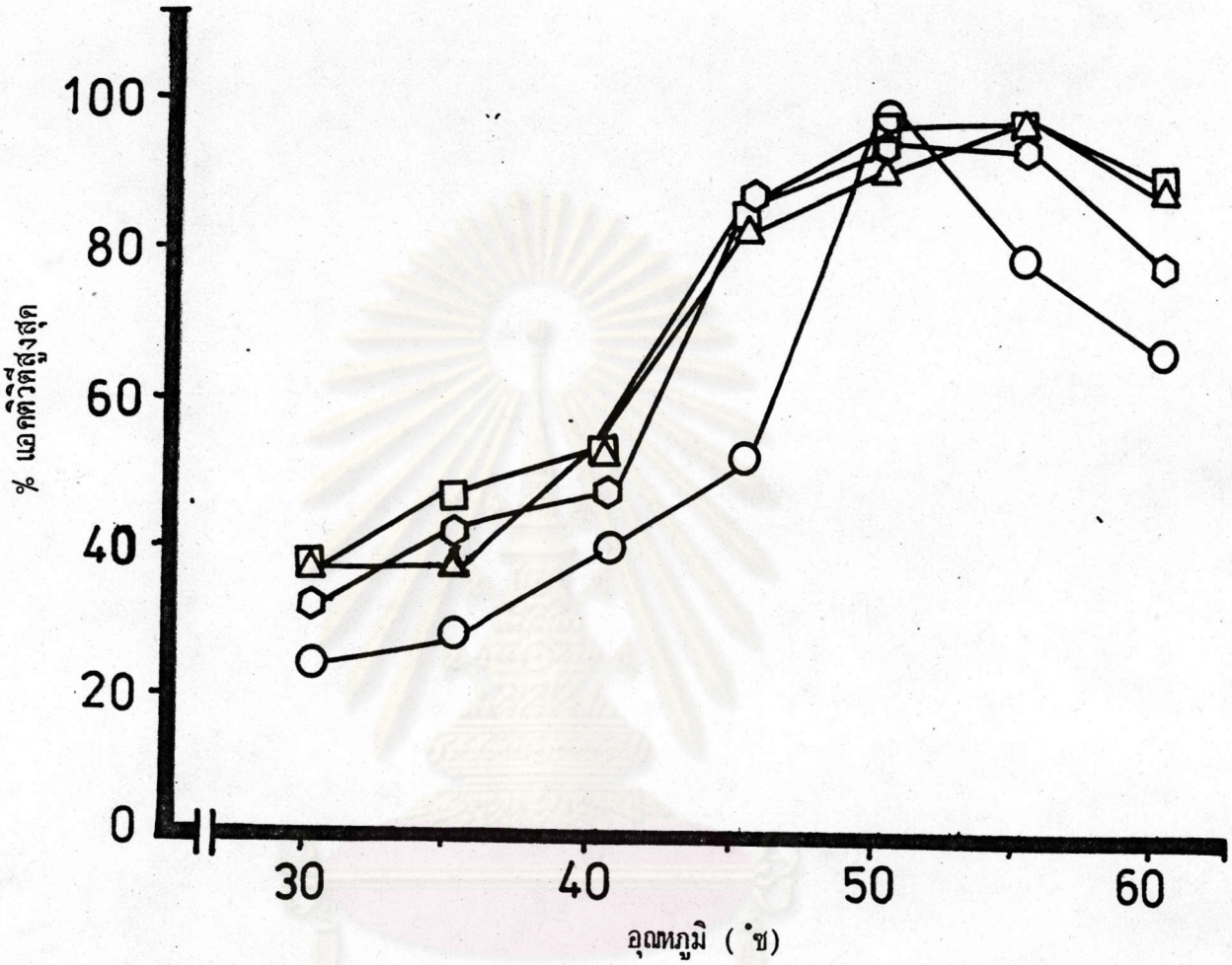
นำเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน อินคิวเบตกับเพนนิซิลิน จี ที่ละลายใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30-60 องศาเซลเซียส พบว่าเม็ดเซลล์ตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีในช่วยอุณหภูมิกว้างมากกว่าเซลล์อิสระ (45-60 องศาเซลเซียส) (รูปที่ 13)

3.6.3 ผลกระทบของ pH ต่อความเสถียรของเพนนิซิลินเอซิเลส (pH stability)

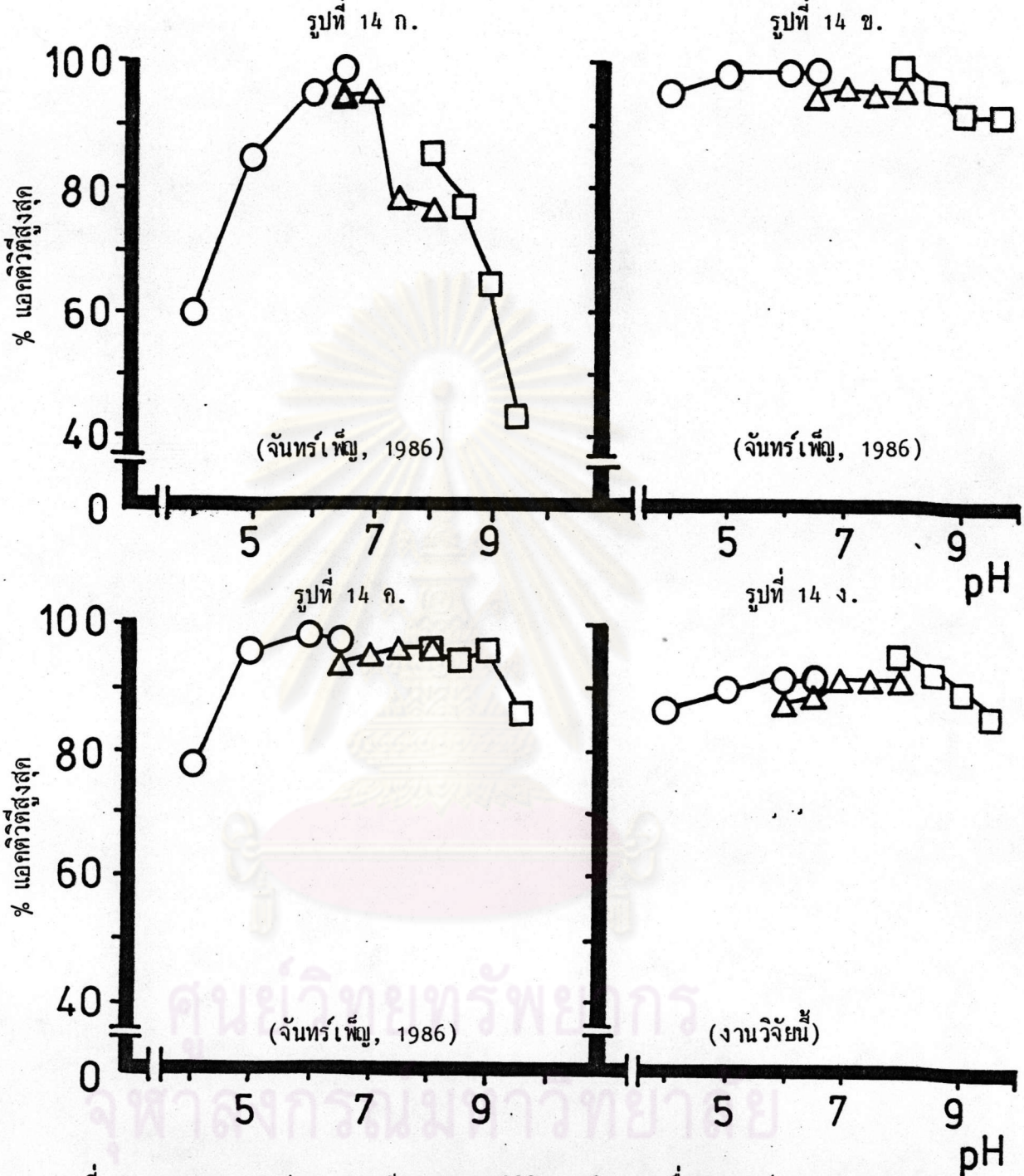
นำเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ไปอินคิวเบตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 4.0-9.7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส จากผลการทดลอง (รูปที่ 14 ง) พบว่าเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 แคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น มีช่วงความเสถียรของ pH ในช่วงที่กว้าง คือ pH 4.5-9.0 หรือกว้างกว่านี้ ซึ่งเหมือนกันในเซลล์ตรึงวุ้นและเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน และกว้างกว่าในเซลล์อิสระ



รูปที่ 12 ผลกระทบของ pH ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ (รูปที่ 12 ก.), เซลล์ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 12 ข.), เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 12 ค.) และเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น เสริมกลูตารับดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 12 ง.) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH ต่าง ๆ คือ pH 4.0-6.5 (อะซิเตตบัฟเฟอร์, o), pH 6.0-8.5 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, Δ) และ pH 8.0-9.7 (ทริสกรดไฮโดรคลอริก, □)



รูปที่ 13 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ pH 7.5 เมื่อใช้เซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ (○), เซลล์ตรึงวุ้น (△), แคปปา-คาร์ราจีแนน (□), โดยจันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ กับแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น (⬡) ที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนในงานวิจัย



รูปที่ 14 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อใช้เซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ (รูปที่ 14 ก), เซลล์ตรึงวุ้น เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 14 ข), เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลีน-ไดอามีน (รูปที่ 14 ค), และเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (รูปที่ 14 ง) แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ชนิดต่าง ๆ อะซิเตตบัฟเฟอร์ (o), ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Δ) และทริส กรดไฮโดรคลอริก (□) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง นำไปวัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีข้อ 2.9.2

3.6.4 ผลกระทบของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส (Temperature stability)

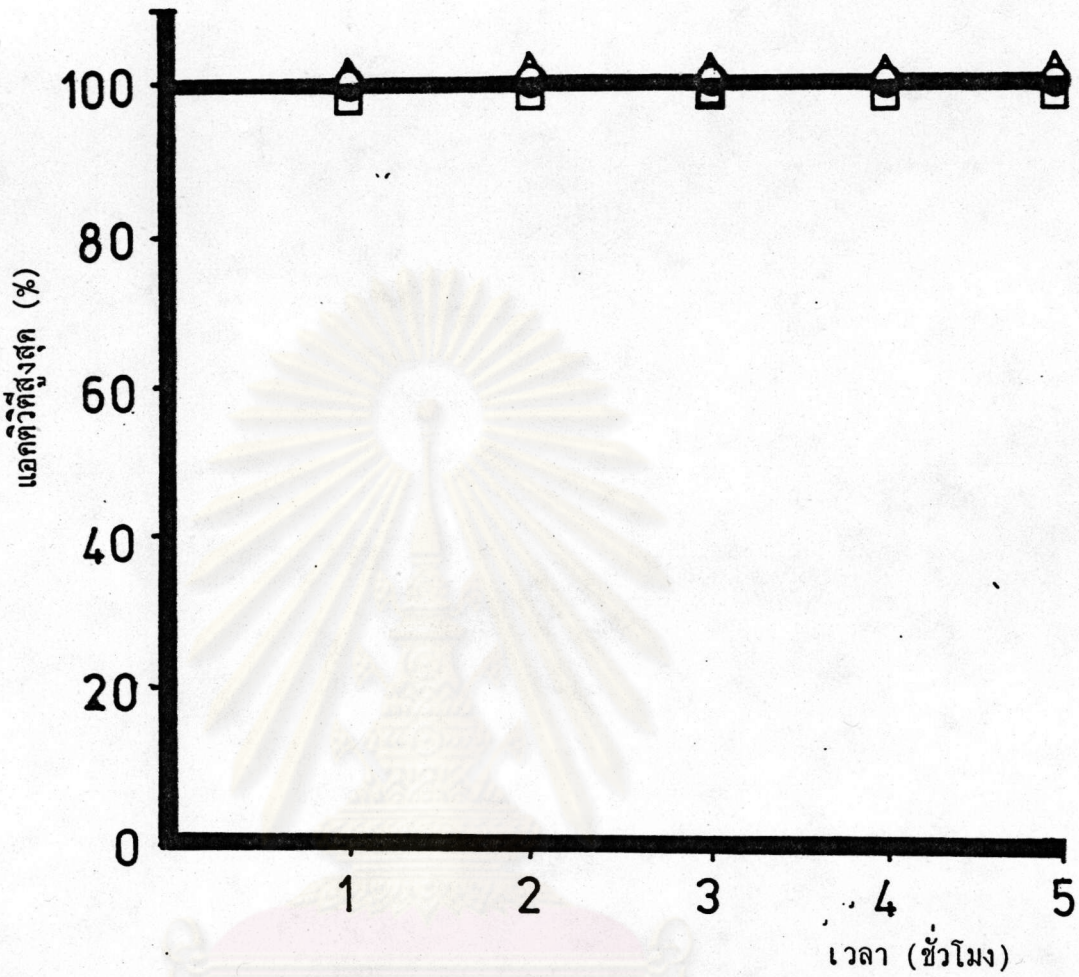
นำเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน มาอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ที่เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง พบว่ามีความเสถียรตลอดเวลา 5 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย (รูปที่ 15) คล้ายคลึงกับคุณสมบัติที่พบในเซลล์ตรึงวุ้นและตรึงคาร์ราจีแนนเดี่ยว ๆ และเซลล์อิสระด้วย

3.6.5 ผลกระทบของความเข้มข้นสับสเตรต เพนนิซิลิน จี ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น

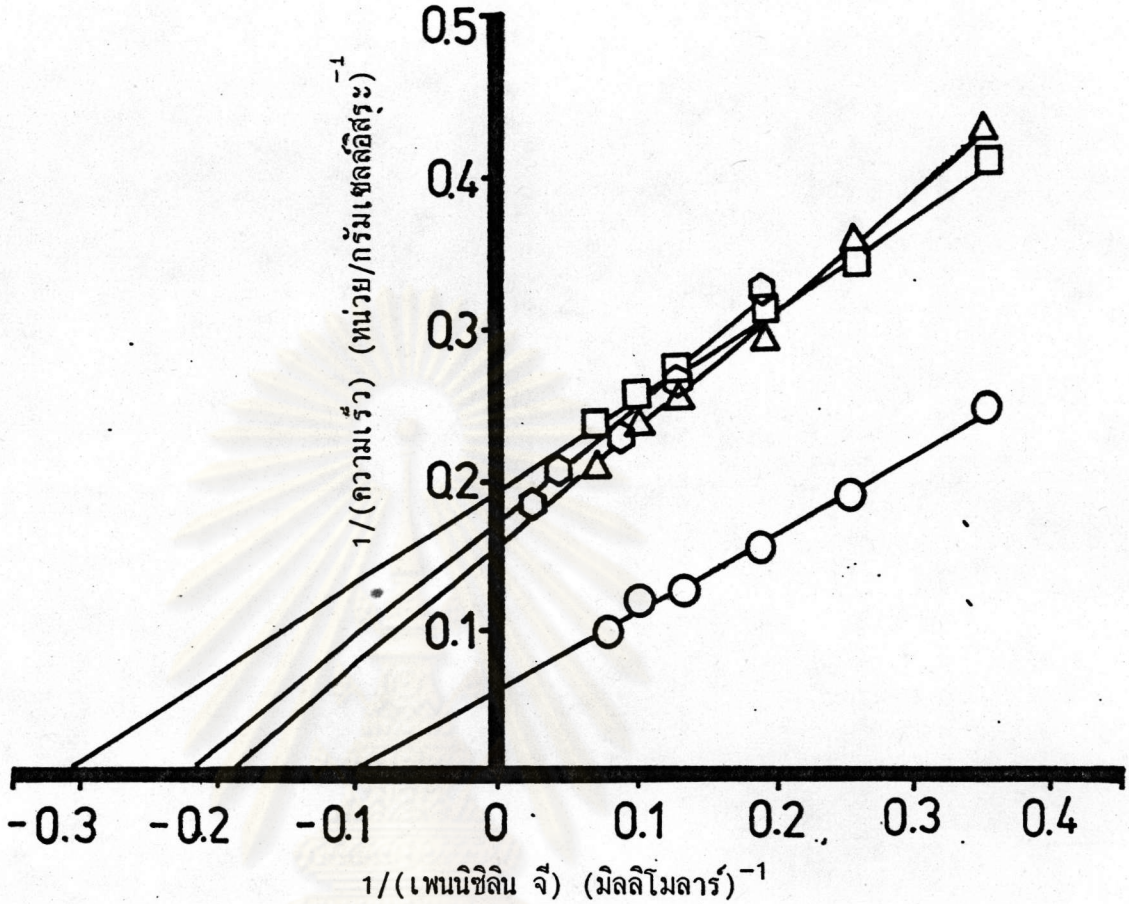
เมื่ออินคิวเบตเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนนั้นอินคิวเบตในเพนนิซิลิน จี ความเข้มข้นตั้งแต่ 4.0-44.0 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส แล้วนำมาวิเคราะห์โดย Lineweaver Burk plot ตามรูปที่ 16 จะพบว่า ค่า K_m ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวัน ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน จะมีค่าระหว่างค่า K_m ของเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน และเซลล์ตรึงวุ้น แต่จะต่ำกว่าค่า K_m ในเซลล์อิสระเล็กน้อย (ค่า K_m ของเซลล์อิสระ เซลล์ตรึงวุ้น เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น และเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนอย่างเดียวมีค่าประมาณ 6.7, 5.5, 4.5 และ 3.4 ตามลำดับ)

3.6.6 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ (กรดฟีนิลอะซิติก) ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ตรึง

วัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีข้อ 2.8.2 เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกแตกต่างกันตั้งแต่ 0-40 มิลลิโมลาร์ ที่แต่ละค่าความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรต เพนนิวิลิน จี (7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์) แล้วทำการพลอตกราฟหาค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i) ของกรดฟีนิลอะซิติก โดยอาศัย Dixon plot (Dixon, 1953)



รูปที่ 15 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อใช้ E. coli ATCC 9637 อิสระ (o), เซลล์ตรึงวุ้น (Δ), เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (□) (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986) กับเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ผสมวุ้น (●) งานวิจัยนี้ (เซลล์ตรึงทั้ง 3 เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน) อินคิวเบต ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7.5 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง



แหล่งของเพนนิซิลิน เอซิเลส	K_m	V_{max}
E. coli ATCC 9637	6.7	16.7
เซลล์ตรึงวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์ เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน	5.5	6.7
เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธีลลีนไดอามีน	3.1	5.3
เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น	4.5	6.0

รูปที่ 16 Lineweaver-Burk plot ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ (o), เซลล์ตรึงวุ้น (Δ), เซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (⬡) โดยจันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ และเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น (□) ใช้ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ตั้งแต่ 3-14 มิลลิโมลาร์

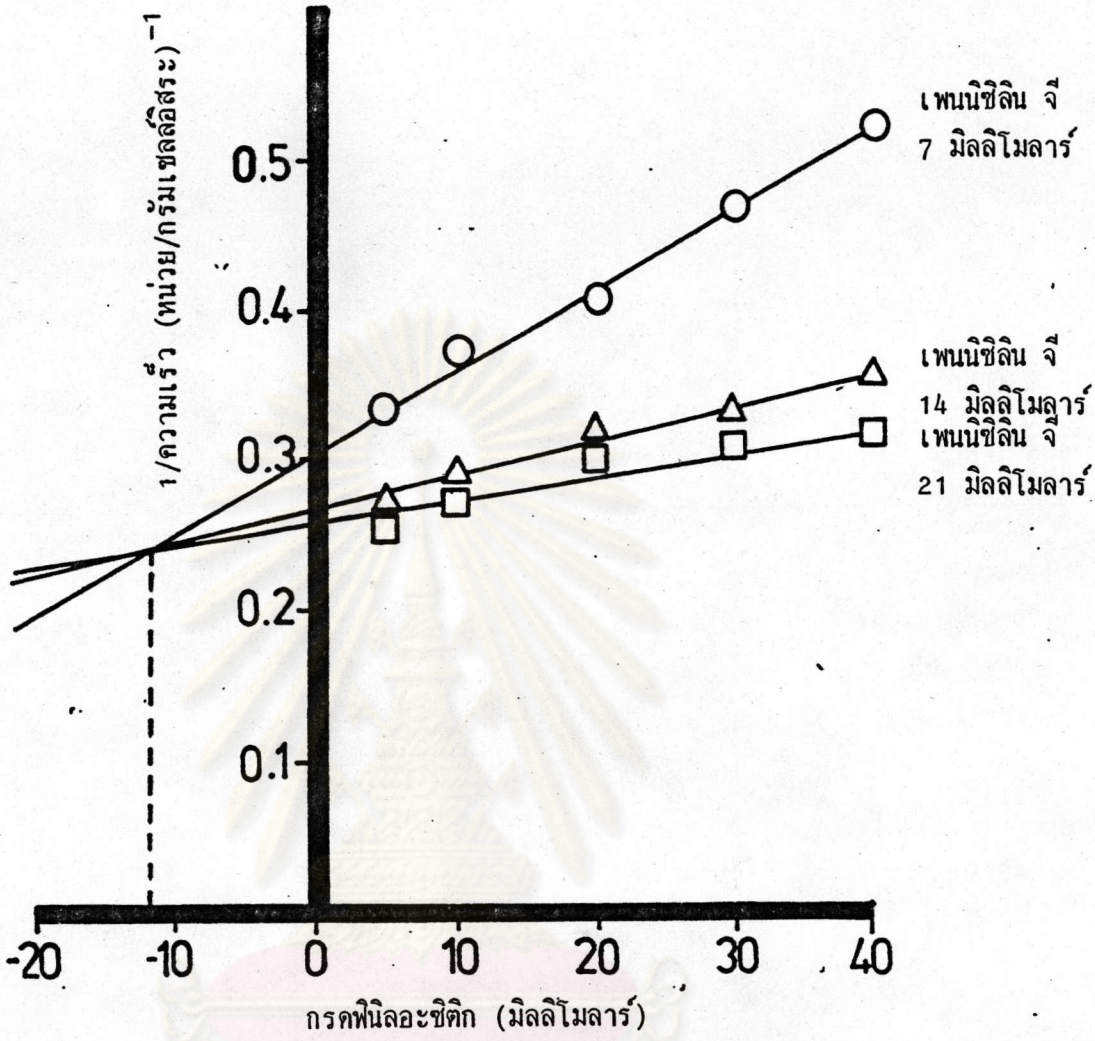
รูปที่ 17 แสดง Dixon plot ของเพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่ออยู่ในสภาวะของเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน พบว่าค่าคงที่ของการยับยั้งการทำงานของเพนนิซิลิน เอซิเลส โดยกรดฟีนิลอะซิติกซึ่งแสดงด้วยค่า K_i ของเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์จีแนนผสมวุ้นมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระประมาณ 3 เท่า และสูงกว่าเซลล์ตรึงวุ้นหรือแคปปา-คาร์ราจีแนนเพียงอย่างเดียวเล็กน้อย รูปแบบการยับยั้งเป็นแบบแข่งขัน (competitive inhibition)

3.6.7 <u>การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ (กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก) ต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในเซลล์อิสระ</u>

วัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์จีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ตามวิธีข้อ 2.9.2 เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แตกต่างกันตั้งแต่ 10-30 มิลลิโมลาร์ ที่แต่ละความเข้มข้นคงที่ของสับสเตรตเพนนิซิลิน จี (4, 7 และ 14 มิลลิโมลาร์) พบว่าไม่สามารถหาค่า K_i ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก สำหรับเม็ดเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นได้ แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก สูงถึง 200 มิลลิโมลาร์ก็ตาม

ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ทั้งหมดของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ได้แสดงรวมกันไว้ในตารางที่ 2 โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ, ตรึงวุ้น และตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (จันทร์เพ็ญ, 1986)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 Dixon plot ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมด้วยกลูตารับดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยา คือ กรดฟีนิลอะซิติก ตั้งแต่ 5-40 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี คงที่ 7 (o), 14 (Δ) และ 21 (□) มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ตารางที่ 2 สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 อิสระ, เซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น, แคปปา-คาร์ราจีแนน (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986) และแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน

คุณสมบัติของเพนนิซิลิน เอซิเลส	เซลล์ E. coli ATCC 9637			
	อิสระ	ตรึงวุ้น (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986)	ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986)	ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ผสมวุ้น
Michaelis-Menten constant, K_m (mM)	6.7	5.5	3.3	4.5
K_i-กรดฟีนิลอะซิติก (mM)	4.0	8.0	7.0	12.5
K_i-กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (mM)	12.3	20.3	35.3	-
Optimum pH	8-8.5	6.5	7.0-7.5	7.0-7.5
pH stability (37 °ซ, 15 ชั่วโมง)	6.5-7.0	5.0-8.0	5.0-9.0	5.0-8.0
Optimum temperature (°C)	50	45-60	45-60	45-55
Thermal stability (37 °ซ, 5 ชั่วโมง)	ไม่สูญเสียแอคติวิตี	ไม่สูญเสียแอคติวิตี	ไม่สูญเสียแอคติวิตี	ไม่สูญเสียแอคติวิตี
Storage stability (4 °ซ, 30 วัน)	สูญเสียแอคติวิตี 25% ที่ 4 °ซ 30 วัน	ไม่สูญเสียแอคติวิตี	ไม่สูญเสียแอคติวิตี	ไม่สูญเสียแอคติวิตี ที่ 4 °ซ สลับอุณหภูมิห้อง นาน 210 วัน

3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน

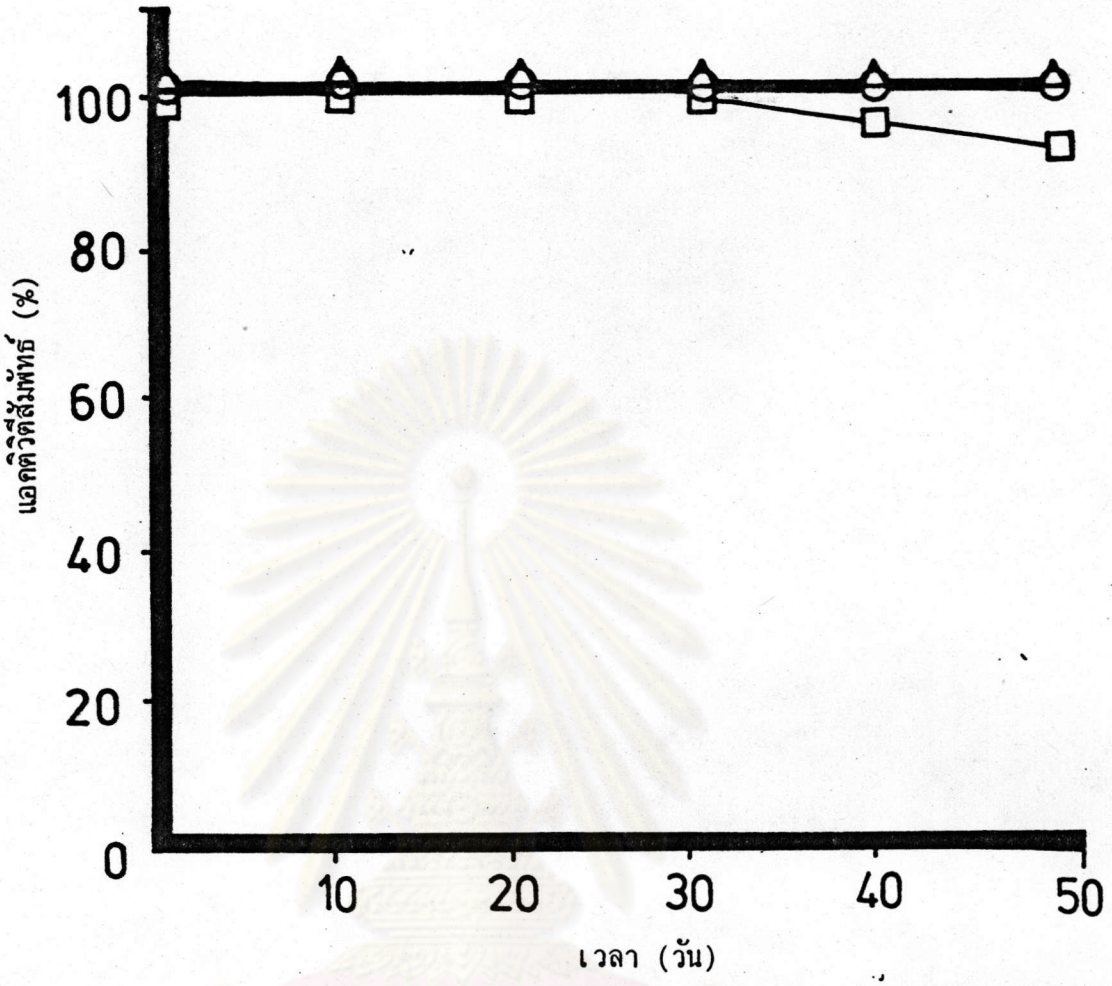
เก็บรักษาเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดแอมีนไว้ใน 0.30 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 4, 27 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (28-34 องศาเซลเซียส) วัดแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสเป็นระยะ ๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้น

จากผลการทดลอง รูปที่ 18 พบว่าเมื่อเก็บเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ไม่พบการสูญเสียของแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เลย ตลอดเวลา 49 วัน และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่ามีการสูญเสียแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสลงไปเล็กน้อย (เหลือแอคติวิตีประมาณ 93 เปอร์เซนต์) เมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาเดียวกัน

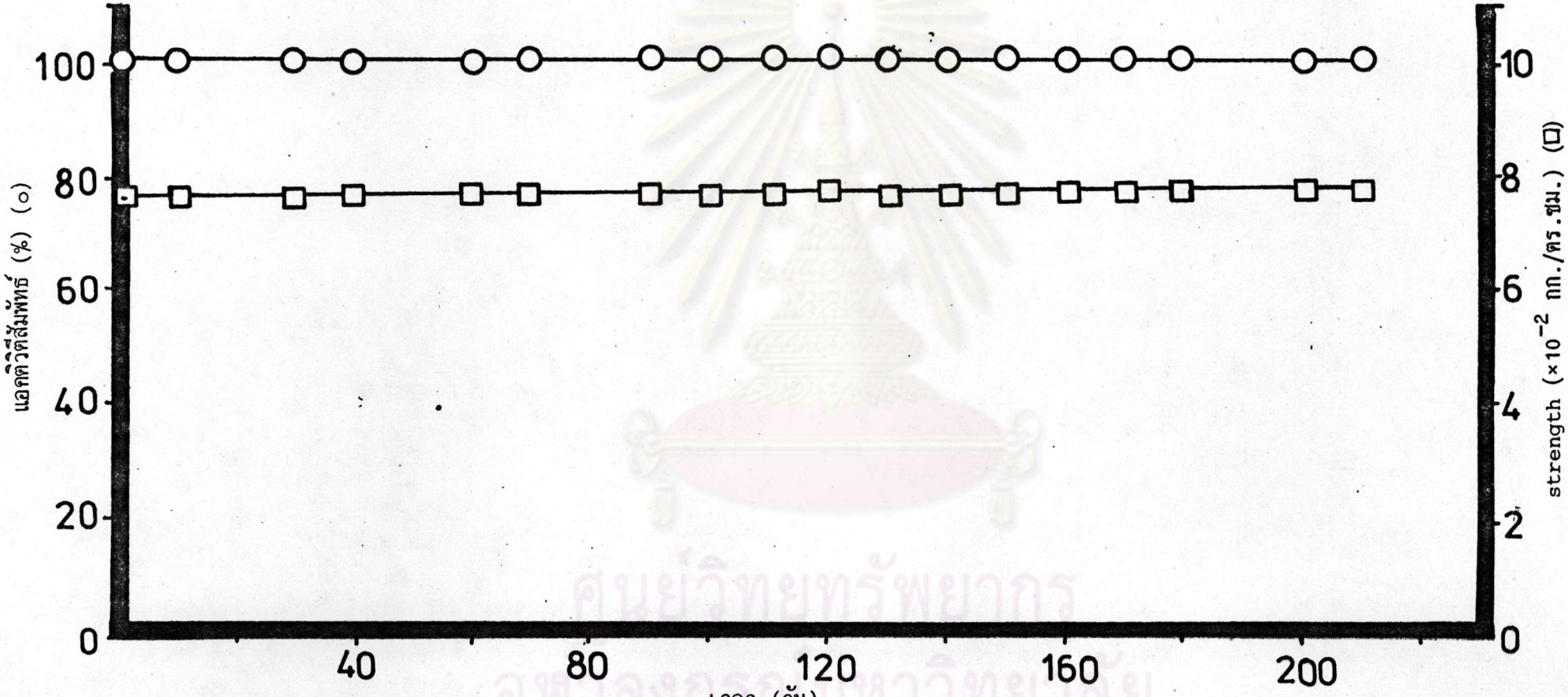
จากผลการทดลอง รูปที่ 19 เป็นการเก็บรักษาเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทำการทดลองการผลิตในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดเป็นระยะ ๆ พร้อมกับการตรวจหาแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส (วิธีการทดลองข้อ 2.8.2) พบว่าไม่มีแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส เลย ตลอดเวลา 210 วัน และเมื่อนำมาทำการทดลองผลิตในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด สามารถผลิตได้ 17 รอบ (24 ชั่วโมงต่อ 1 รอบ) โดยที่ไม่สูญเสียแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเซลล์ตรึงเลย

3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลาจากเพนนิซิลิน จี โดยใช้เซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนในหอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดซ์เบด

นำเซลล์ E. coli ATCC 9637 เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นที่อัตราส่วน 2.5:1.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน นำเม็ดเจลเซลตรึงที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรด 6-อะมิโน เพนนิซิลานิก ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด ตามวิธีทดลองข้อ 2.15 โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรต



รูปที่ 18 แสดงความเสถียรของแคติวิตี เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น (เสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีน-ไดอามีน เมื่อเก็บใน 0.3 โมลาร์โพแต่สเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (o), 27 (Δ) และอุณหภูมิห้อง (□) ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน นาน 49 วัน



รูปที่ 19 แสดงความเสถียรของแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส (o) และ strength (□) ของเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น ซึ่งเสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อเก็บใน 0.30 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

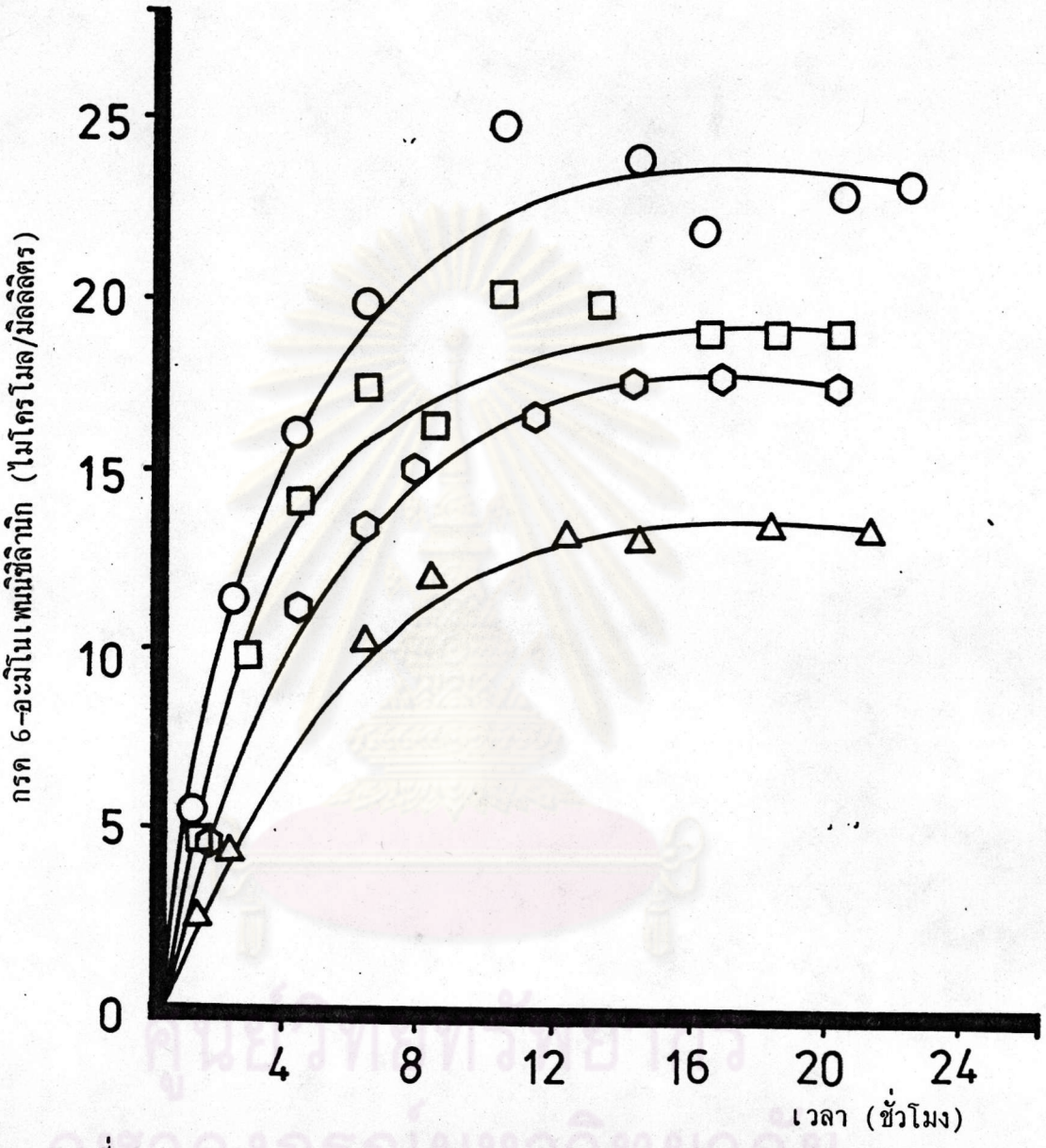
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.1 ผลกระทบของปริมาณเม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

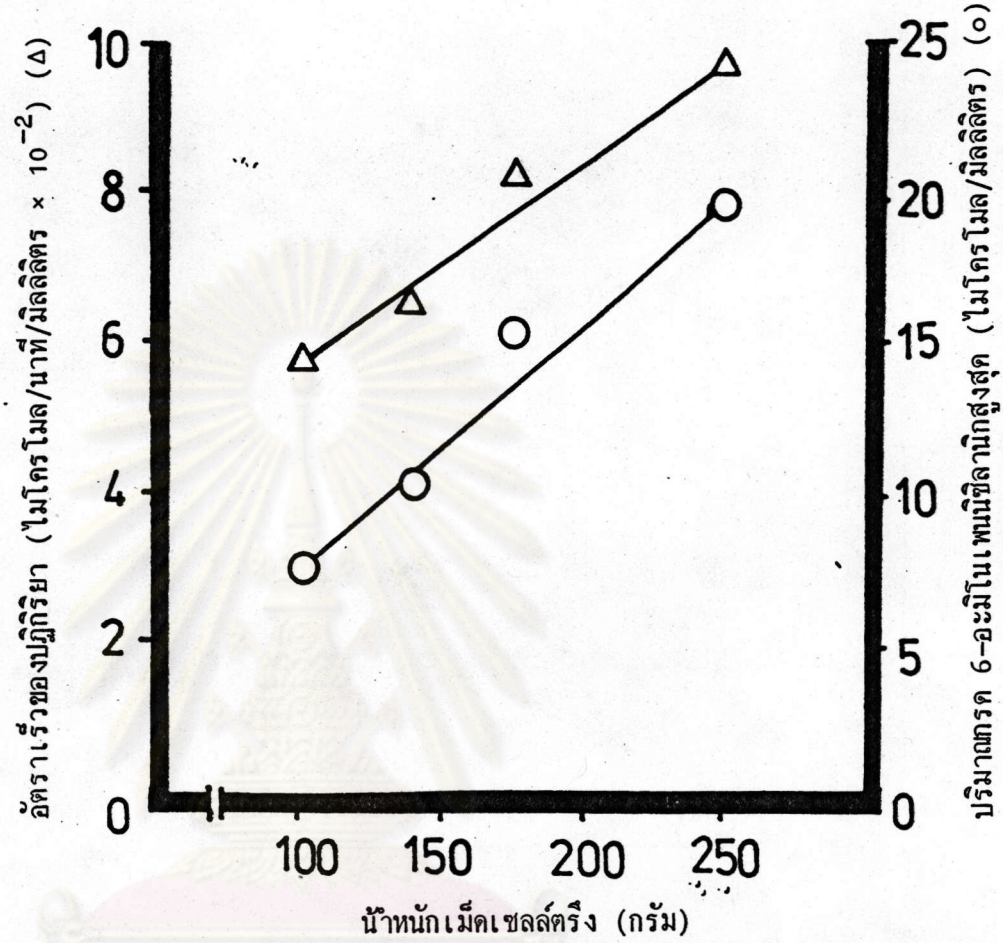
ทดลองแปรค่าน้ำหนักของเม็ดเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปาคาร์จีแนนผสมวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนที่เตรียมได้เท่ากับ 100, 135, 175 และ 250 กรัม ใส่ลงไปในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด ใช้ความเข้มข้นเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.625 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตรการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 3-4 ลิตรต่อนาที วัดปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นตามวิธีทดลองข้อ 2.8.2 ที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่าปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยาเมื่อแปรค่าน้ำหนักของเม็ดเซลล์ตรึง เริ่มมีค่าคงที่ในชั่วโมงที่ 10 เหมือนกัน แต่อัตราการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกมีค่าแปรตามน้ำหนักของเม็ดเซลล์ตรึงที่ใช้ (0.029, 0.042, 0.062 และ 0.078 ไมโครโมลกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ) ค่าปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยาก็มีค่าเพิ่มขึ้นแปรตามน้ำหนักของเม็ดเจลเซลล์-ตรึงที่ใช้ (14.0, 17.6, 21.0 และ 24.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) (รูปที่ 21)

3.8.2 ผลกระทบของความเข้มข้นเพนนิซิลิน จี ต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิ-ซิลานิกในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

แปรค่าความเข้มข้นเพนนิซิลิน จี สำหรับการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก เท่ากับ 0.154, 0.313, 0.470, 0.625 และ 2.5 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง อัตรการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 3-4 ลิตรต่อนาที และใช้เม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาเท่ากับ 135 กรัม วัดปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นที่เวลาต่าง ๆ (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.8.2) ผลการทดลอง (รูปที่ 22) พบว่าปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยามีค่าแปรตามความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ที่ใช้ โดยปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดเท่ากับ 5.8, 10.5, 16.0, 17.0 และ 20.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกเริ่มคงที่ในเวลาแตกต่างกันด้วย (3, 6, 9, 11 และ 14 ชั่วโมง ตามลำดับ) แต่อัตราการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกจะมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.038-0.045 ไมโครโมล กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่อมิลลิลิตรต่อนาที (รูปที่ 23)

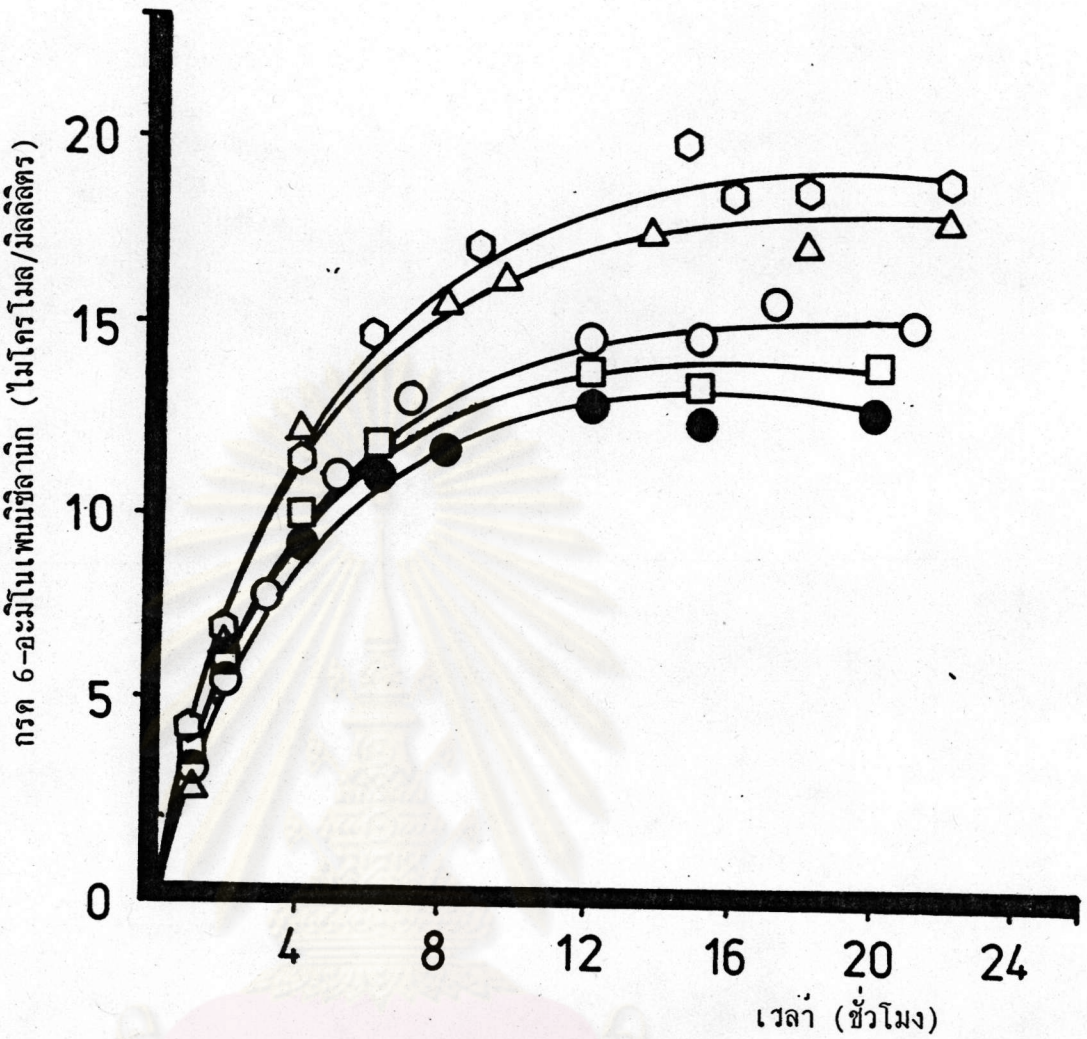


รูปที่ 20 แสดงการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด โดยเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น เสริมกลูตารัล-ดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน แปรค่าปริมาณเม็ดเจลเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด 100 (△), 135 (⬡), 175 (□) และ 250 (○) เมื่อใช้ความเข้มข้นเพนนิซิลิน จี 0.625% (น้ำหนักต่อปริมาตร), อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 3-5 ลิตรต่อนาที

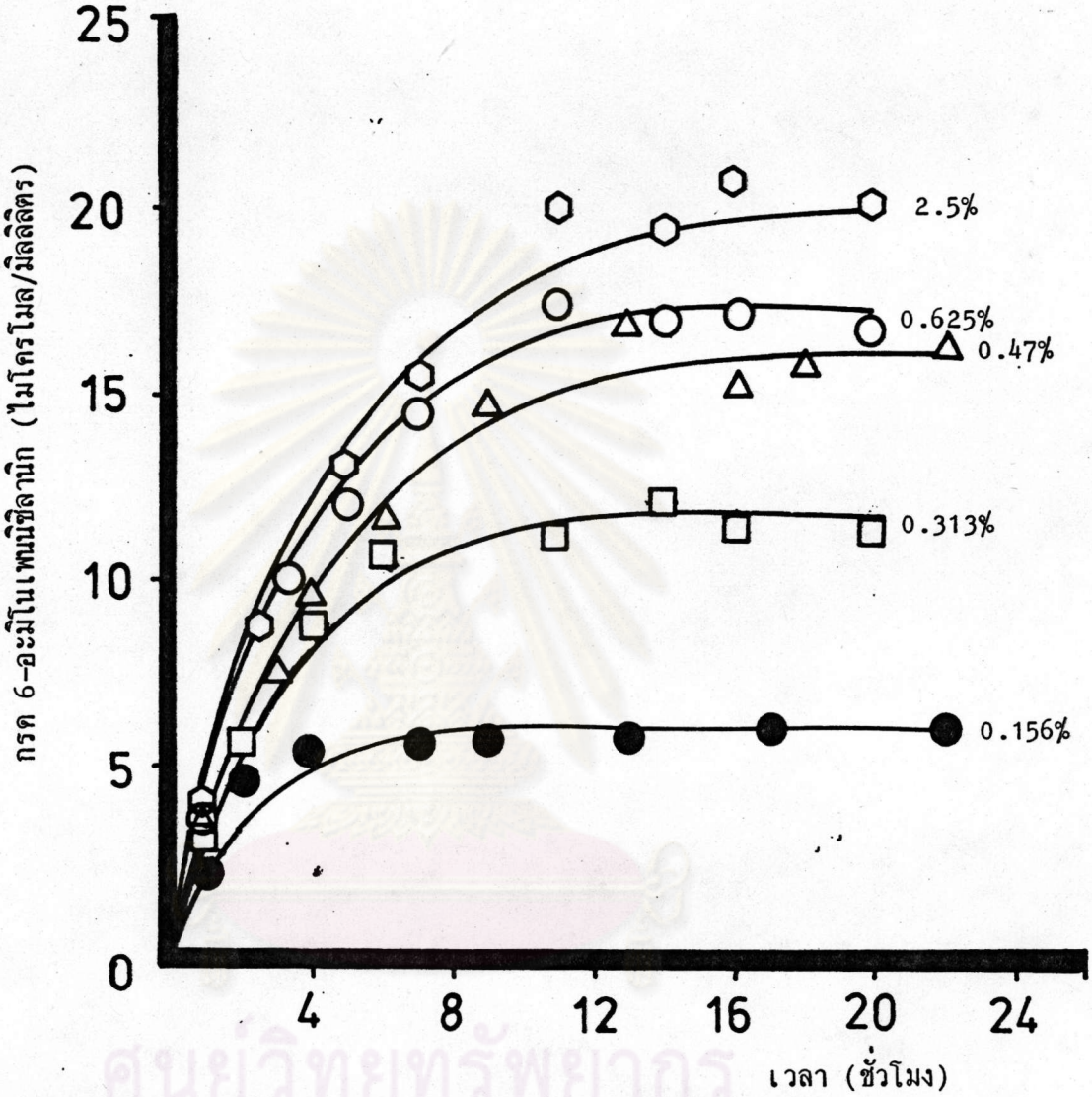


รูปที่ 21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Δ) และปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุด (o) กับน้ำหนักของเม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

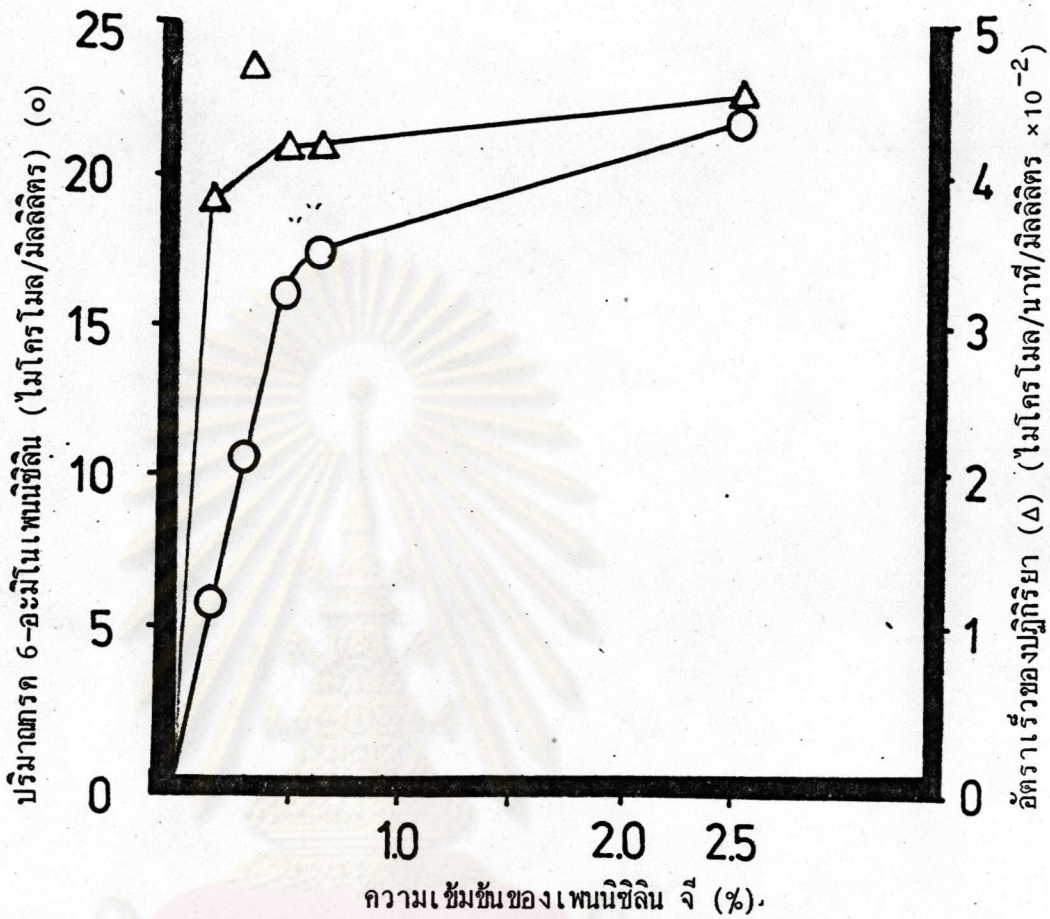
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 แสดงการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด โดยเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นเสริมกลูตารัล-ดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน แปรค่าความเร็วของการป้อนสับสเตรต (F), = 40 (⬡), 80 (Δ), 120 (o), 180 (□) และ 250 (●) มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึง 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลินจี 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ U = 3-5 ลิตรต่อนาที



รูปที่ 22 แสดงการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด โดยเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น เสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน แปรค่าความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ตั้งแต่ 0.156 (●), 0.313 (□), 0.470 (Δ), 0.625 (o) และ 2.5 (○) เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อใช้เม็ดเซลล์ตรึง 135 กรัม, F = 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และ U = 3-5 ลิตรต่อนาที



รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยา (Δ) และปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุด (o) กับความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.3 ผลกระทบของอัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

เมื่อใช้ปริมาณเม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาเท่ากับ 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 3-4 ลิตรต่อนาที แล้วแปรค่าอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 40, 80, 120, 160 และ 250 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ผลการทดลอง (รูปที่ 24) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาจะทำให้ปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงสุดมีค่าลดลง (18.5, 17.8, 15.0, 14.0 และ 12.5 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) แต่อัตราการเกิดกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.038-0.042 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ต่อนาทีและปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก เริ่มมีค่าคงที่ในชั่วโมงที่ 8

3.8.4 ผลกระทบของอัตราการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

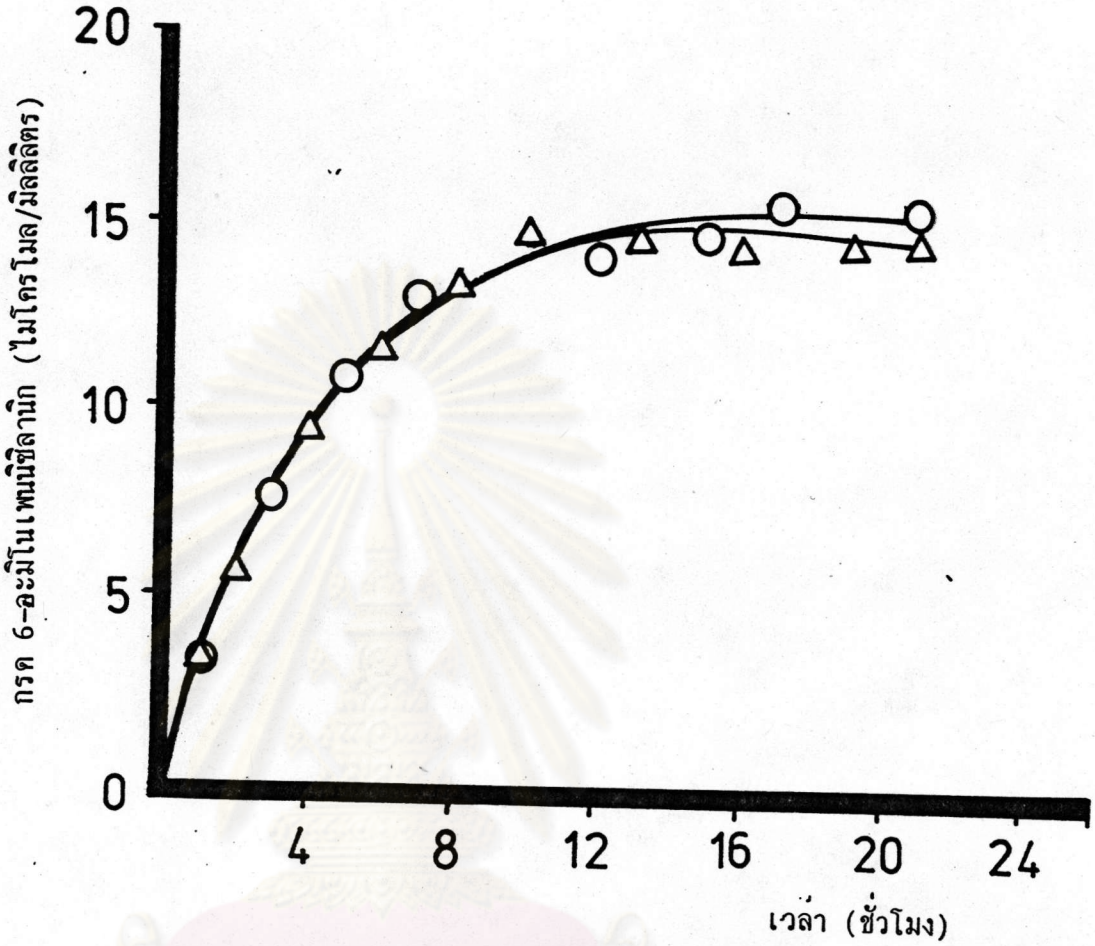
ใช้ปริมาณเม็ดเซลล์ตรึงในหอปฏิกิริยาเท่ากับ 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์ อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 2-3, 3-4 ลิตรต่อนาที ผลการทดลอง (รูปที่ 25) ไม่พบความแตกต่างกันเลย แต่จะพบว่าถ้าใช้อัตราการป้อนอากาศ 2-3 ลิตรต่อนาทีจะมีการผุกร่อน (erosion) ของเม็ดเจลเซลล์ตรึงต่ำกว่า

3.9 ความเสถียรของเม็ดเจลเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้นซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ทำการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด

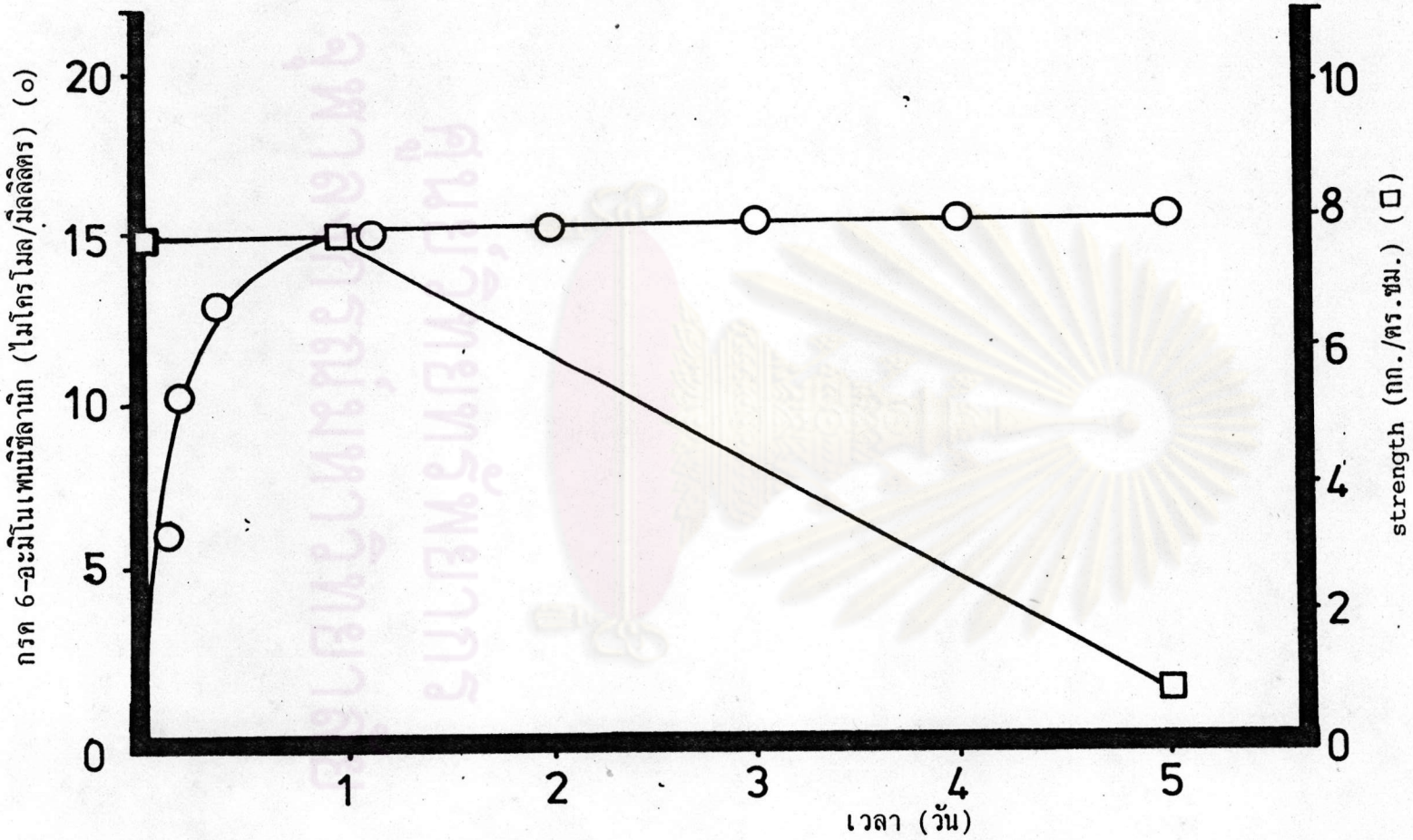
นำเม็ดเจลเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนใส่ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดเท่ากับ 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี เท่ากับ 0.47 เปอร์เซนต์น้ำหนักต่อปริมาตร อัตราการป้อนเพนนิซิลิน จี เข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการการป้อนอากาศเข้าสู่หอปฏิกิริยาเท่ากับ 2-3 ลิตรต่อนาที ทำการวัดปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยาตามวิธีทดลองข้อ 2.8.2 พบว่าสามารถผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกมีค่า

เท่ากับ 15.5 ไมโครต่อมิลลิลิตร ตลอดระยะเวลานาน 5 วัน โดยไม่มีการลดลง แต่กลับพบว่า strength ของเม็ดเจลเซลล์มีค่าลดลงอย่างมากจาก 7.6×10^{-2} เหลือเพียง 0.08×10^{-2} กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (ตามรูปที่ 26)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 แสดงการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด.. โดยเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้นเสริมกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน แปรค่าความเร็วของการป้อนอากาศ (F) = 2-3 (o), 3-5 (Δ) ลิตรต่อนาที เมื่อใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึง 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ U = 80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง



รูปที่ 26 แสดงความเสถียรของการผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก แบบต่อเนื่องในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด และ strength โดยเซลล์ E. coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนกับวุ้น เสริมกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึง 135 กรัม ความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี 0.47 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร), F = 80 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และ U = 2-3 ลิตรต่อนาที ติดตามวัดปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เกิดขึ้นในหอปฏิกิริยา เป็นระยะเวลานาน 5 วัน