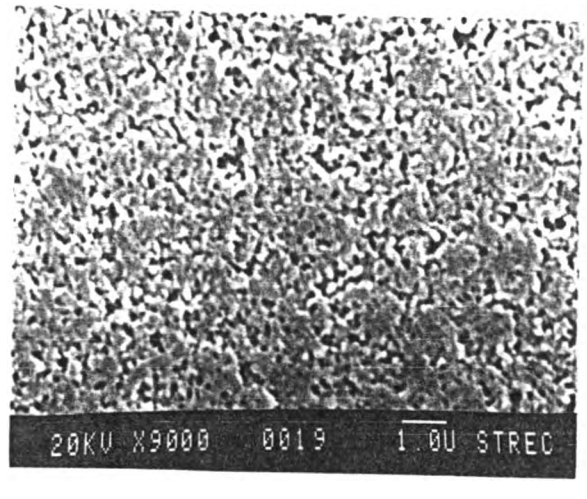
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

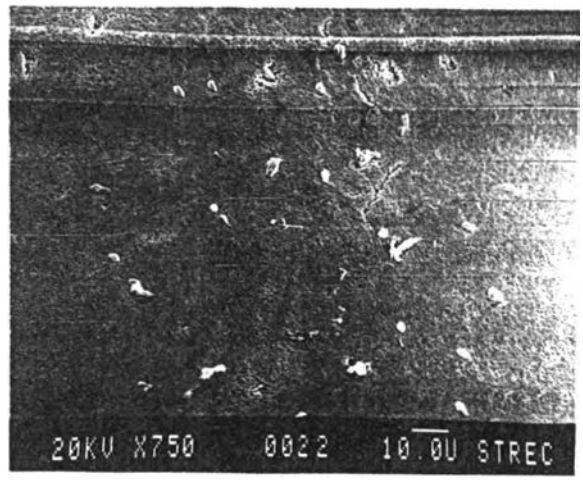
ผลการทดลอง วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

การตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14 บนตัวพยุง DOWEX MWA-1

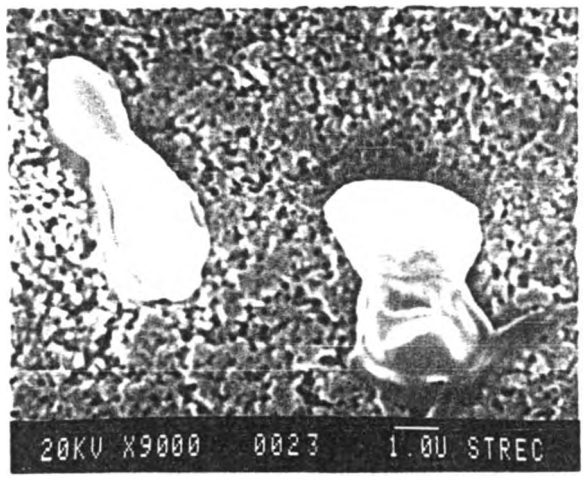
จากการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14 บนตัวพยุง DOWEX MWA-1 ซึ่งเป็นเรซินแลกเปลี่ยนไอออน พบว่าเอนไซม์จะถูกตรึงรูปอยู่เฉพาะบริเวณผิวของตัวพยุงเท่านั้น ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของตัวพยุงได้ โดยพิจารณาจากการทำ Scanning Electron Microscope จะเห็นว่าขนาดโมเลกุลของเอนไซม์มีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของตัวพยุงมาก (รูปที่ 5.1-5.3) และเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000-30,000 จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 17.5-21.0 นาโนเมตร [4] ซึ่งใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของตัวพยุง (11.6 นาโนเมตร จากการวัดด้วยเครื่อง BET) มาก และการที่โมเลกุลเอนไซม์จับบนตัวพยุงเป็นบางตำแหน่งนั้น เนื่องมาจากหมู่ฟังก์ชันนอล (functional group) ของตัวพยุงที่สามารถจับกับเอนไซม์ได้มีเฉพาะในบางตำแหน่งเท่านั้น และโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่จับบนตัวพยุงแล้วเป็นตัวขัดขวางการเข้าจับของโมเลกุลเอนไซม์อื่นๆ



รูปที่ 5.1 พื้นผิวของเรซินโดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 9000 เท่า



รูปที่ 5.2 พื้นผิวของเรซินที่ถูกตรึงรูปด้วยเอนไซม์เพกติเนส ที่ภาวะที่เหมาะสมโดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 750 เท่า

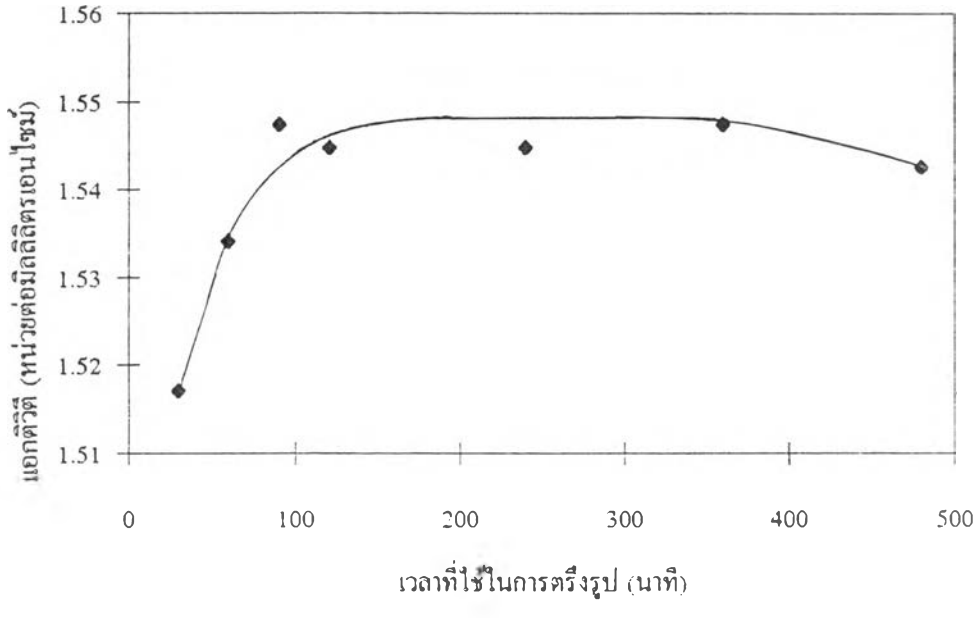


รูปที่ 5.3 เอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปบนเรซิน ที่ภาวะที่เหมาะสมโดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 9000 เท่า

ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14

1. เวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14

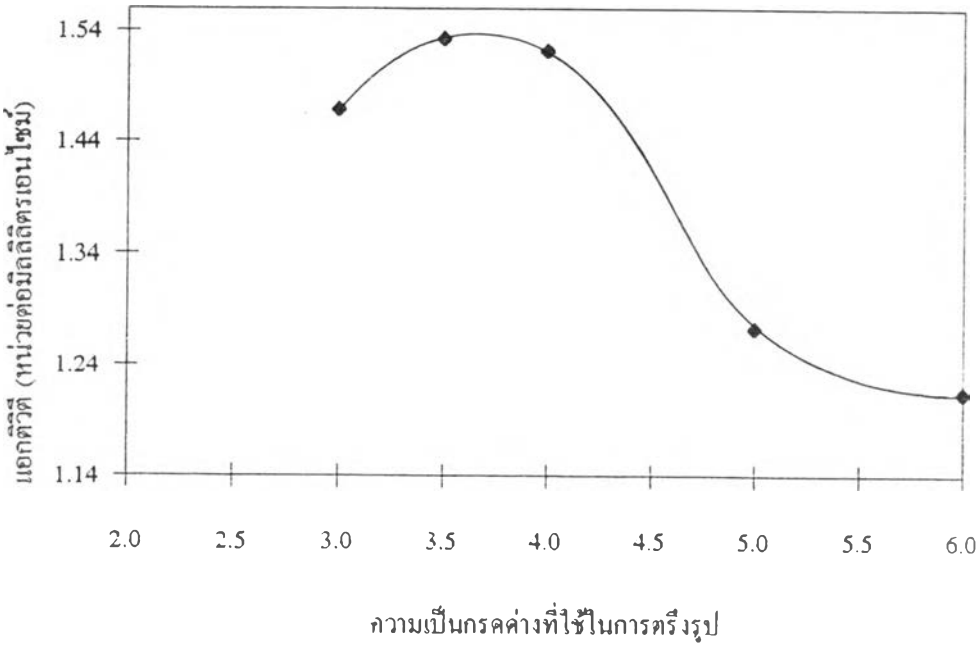
จากการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรบนตัวพยุง DOWEX MWA-1 จำนวน 5 กรัม ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสโดยแปรเปลี่ยนค่าเวลาในการตรึงรูปตั้งแต่ 30 นาที ถึง 480 ชั่วโมง เนื่องจากและให้แอกติวิตีสูงสุด คือช่วงเวลา 90-360 นาที (รูปที่ 5.4) ทั้งนี้เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันนอลของตัวพยุงที่สามารถจับกับหมู่ฟังก์ชันนอลของเอนไซม์ได้มีปริมาณจำกัด สำหรับงานวิจัยนี้จะเลือกใช้เวลาในการตรึงรูปที่ 240 นาที (4 ชั่วโมง) เนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้มีค่าแอกติวิตีค่อนข้างคงที่ แสดงว่ามีเสถียรภาพดี ซึ่งแอกติวิตีที่ได้มีค่าประมาณ 1.55 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์



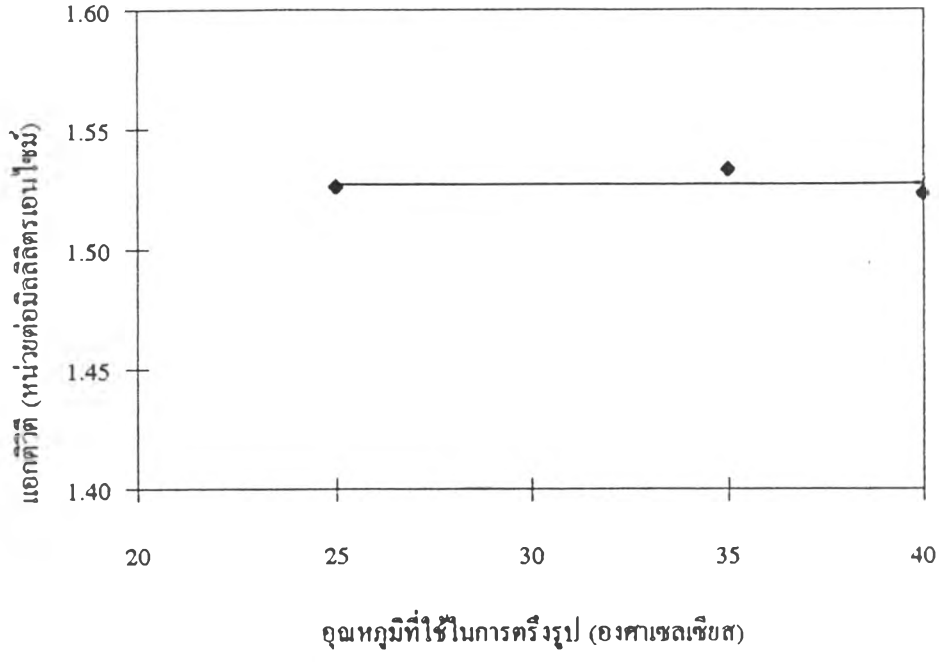
รูปที่ 5.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14 ต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที

2. ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14

ผลการศึกษาหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ทางการค้าชื่อ NOVOFERM 14 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน DOWEX MWA-1 จำนวน 5 กรัม ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในการตรึงรูปตั้งแต่ 3-6 ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยทำการตรึงรูปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์นี้มีค่าเท่ากับ 3.5 ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างนี้จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด (รูปที่ 5.5) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำกว่า 3.5 จะให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำเกินไปอาจมีผลทำให้เอนไซม์บางส่วนเสียสภาพ (denaturated) ได้



รูปที่ 5.5 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14 ต่อค่าแอกติวิตีต่อของเอนไซม์ตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที



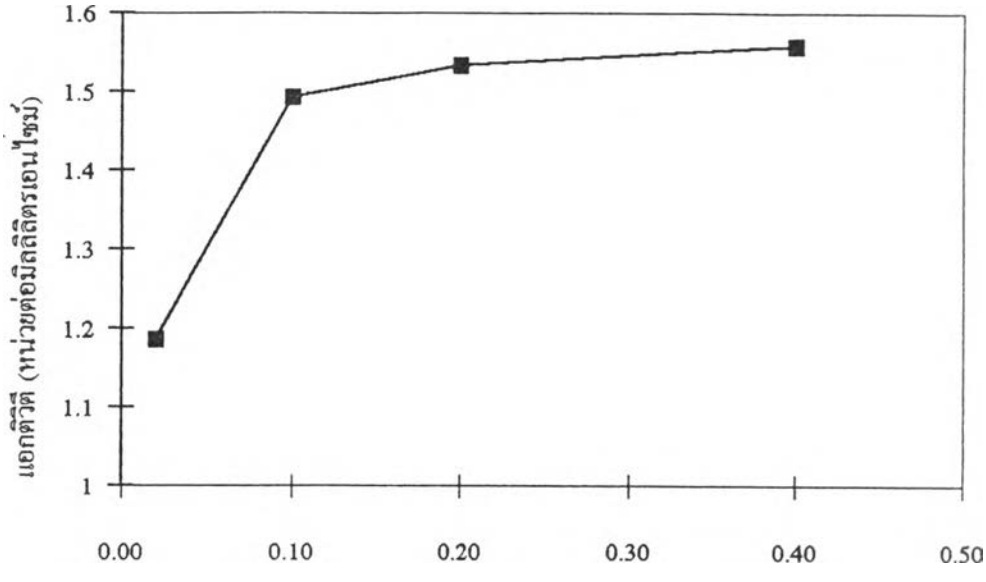
รูปที่ 5.6 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14 ต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ NOVOFERM 14

ผลการศึกษาหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์ทางการค้าชื่อ NOVOFERM 14 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน DOWEX MWA-1 จำนวน 5 กรัมโดยการแปรเปลี่ยนค่าอุณหภูมิในการตรึงรูปตั้งแต่ 25-40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยทำการตรึงรูปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์นี้อยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5.6) สำหรับการทดลองนี้จะใช้อุณหภูมิในการตรึงรูปเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมินี้มีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องจึงสะดวกต่อการปฏิบัติงาน

4. ความเข้มข้นของเอนไซม์ NOVOFERM 14 ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ NOVOFERM 14 ต่อการตรึงรูปเอนไซม์นี้ เมื่อทำการแปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.02-0.40 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง และภาวะการตรึงรูปที่เหมาะสม (ที่ความเป็นกรดค่าง 3.5 ในซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป คือ



รูปที่ 5.7 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูปต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสับสเตรตที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที

0.2 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง (รูปที่ 5.7) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.4 มิลลิลิตรต่อกรัมดังพยุง จะพบว่าค่าแอกติวิตีที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าแอกติวิตีที่ได้จากการใช้เอนไซม์เข้มข้น 0.2 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง ทั้งนี้เนื่องมาจากขีดจำกัดของความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง และผลการบดบังกันเองระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของสับสเตรตโมเลกุลใหญ่ ซึ่ง Rexova-Benkova L. และคณะ [13] ได้ทำการศึกษาและพบว่าได้ผลในทำนองเดียวกัน

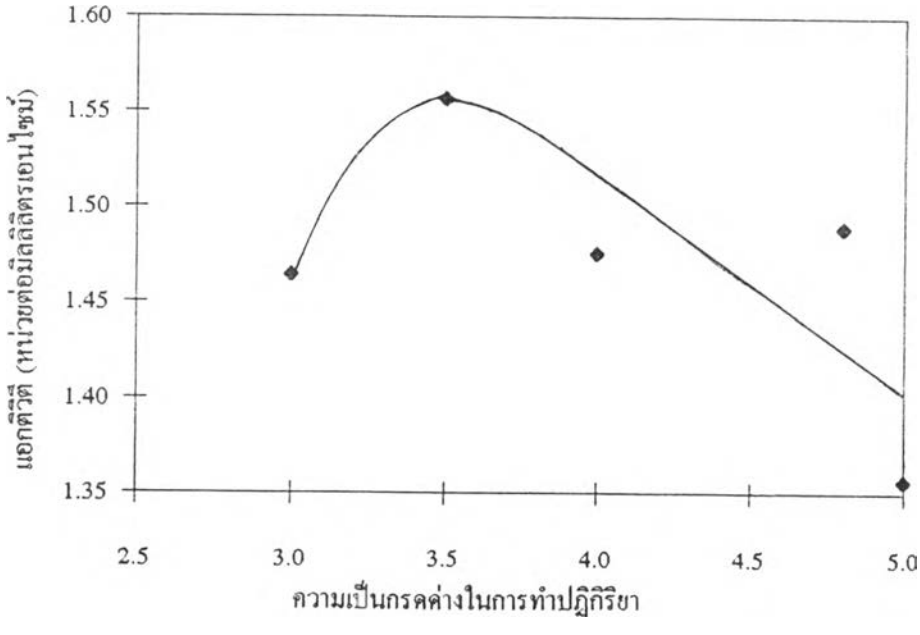
ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูป คือ ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง และเวลาที่ใช้ในการตรึงรูป 4 ชั่งโมง ซึ่งจะให้ค่าแอกติวิตีเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.53-1.56 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์ ในการวิจัยนี้จะนำค่าแอกติวิตีนี้เก็บไว้เพื่อเป็นการตรวจสอบแอกติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อๆไป

<u>คุณสมบัติของเอนไซม์ NOVOFERM 14 ตรึงรูปบน DOWEX MWA-1</u>

ตรึงเอนไซม์ NOVOFERM 14 เข้มข้น 0.2 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง บนตัวพยุง DOWEX MWA-1 ในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวน 168 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่งโมง จากนั้นนำมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ

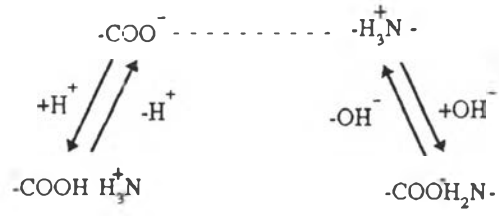
1. ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป

เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ภาวะที่เหมาะสมมาทำปฏิกิริยากับสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ กันตั้งแต่ 3-5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 1.2 (บทที่ 4) พบว่า ความเป็นกรด-ด่างของสับสเตรตมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างของสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเพกตินของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าเท่ากับ 3.5 (รูปที่ 5.8) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของสับสเตรตที่เหมาะสมนี้จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด และจะพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของสับสเตรตสูงหรือต่ำกว่า 3.5 จะมีผลทำให้แอกติวิตีลดลง ซึ่งอธิบายได้ว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าและสูงกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมนั้น กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาจะถูกเพิ่มโปรตอน (proton, H^+) และลดโปรตอน ตามลำดับ ทำให้เข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรตได้ไม่ดี และความเป็น



รูปที่ 5.8 ผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างในการทำปฏิกิริยาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ NOVOFERM 14 ตรึงรูปบน DOWEX MWA-1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

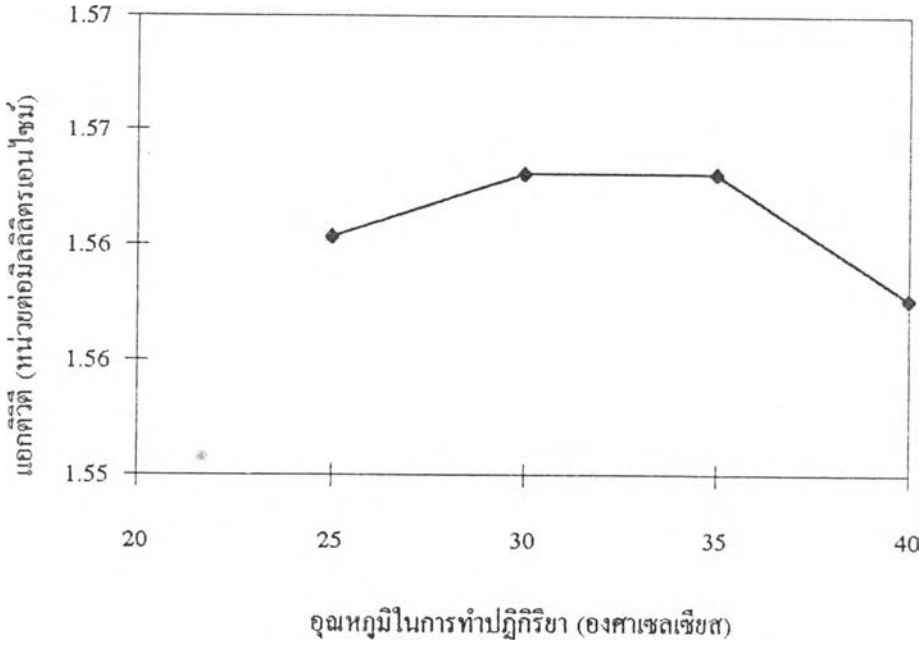
กรด-ด่างยังมีผลต่อพันธะไฟฟ้าสถิต (electrostatic bond) ในโครงสร้างของเอนไซม์ในระดับทุติยภูมิ (secondary order) หรือตติยภูมิ (tertiary order) ดังปฏิกิริยา



รวมทั้งมีผลต่อการแตกตัว (ionization) ของสับสเตรต ดังนั้นในการวัดปฏิกิริยาเอนไซม์ต้องปรับและควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมที่สุดที่ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป

เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ภาวะที่เหมาะสมมาทำปฏิกิริยากับสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 ที่

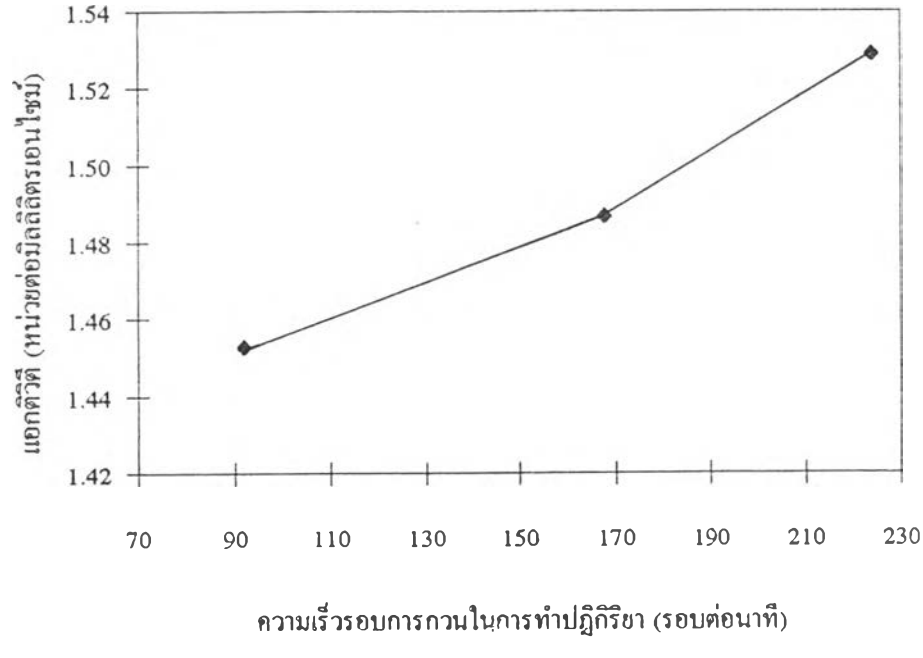


รูปที่ 5.9 ผลกระทบของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ NOVOFERM 14 ตรึงรูปบน DOWEX MWA-1 ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5

อุณหภูมิต่างๆ กันตั้งแต่ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 1.2 (บทที่ 4) พบว่า อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเพกตินของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5.9) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมนี้จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมินี้มีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องจึงสะดวกต่อการปฏิบัติงาน และจะพบว่าอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่สูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้แอกติวิตีลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะมีความคงตัวที่ระดับอุณหภูมิหนึ่งที่เหมาะสม ซึ่งจะแตกต่างกันสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด และเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ และอุณหภูมิยังมีผลต่อสมดุล (equilibria) หรือมีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมี กล่าวคือมีผลต่อการละลายของสับสเตรต และการแตกตัวของบัฟเฟอร์ นอกจากนั้นยังมีผลต่อการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต และการแตกตัวของกรดอะมิโนในบริเวณเร่ง (ionization of active site) ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนมีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสิ้น

3. ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อปฏิกิริยาเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ภาวะที่เหมาะสมมาทำปฏิกิริยากับสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 ที่



รูปที่ 5.10 ผลของความเร็วรอบในการกวนต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายเพกตินของเอนไซม์ตรึงรูป

อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการแปรเปลี่ยนค่าความเร็วรอบในการกวนตั้งแต่ 92-224 รอบต่อนาที และทำการวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 1.2 (บทที่ 4) พบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจะทำให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่ามากขึ้น (รูปที่ 5.10) เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์เฉพาะบริเวณผิวของตัวพยุงนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะถูกจำกัดด้วยอัตราการถ่ายเทมวลสารภายนอก (external mass transfer) ซึ่งการเพิ่มความเร็วรอบในการกวนจะทำให้ข้อจำกัดของอัตราการถ่ายเทมวลสารภายนอกลดลง เนื่องจากความหนาของชั้นฟิล์มที่ผิวตัวพยุงลดลง อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงเพิ่มขึ้น [13]

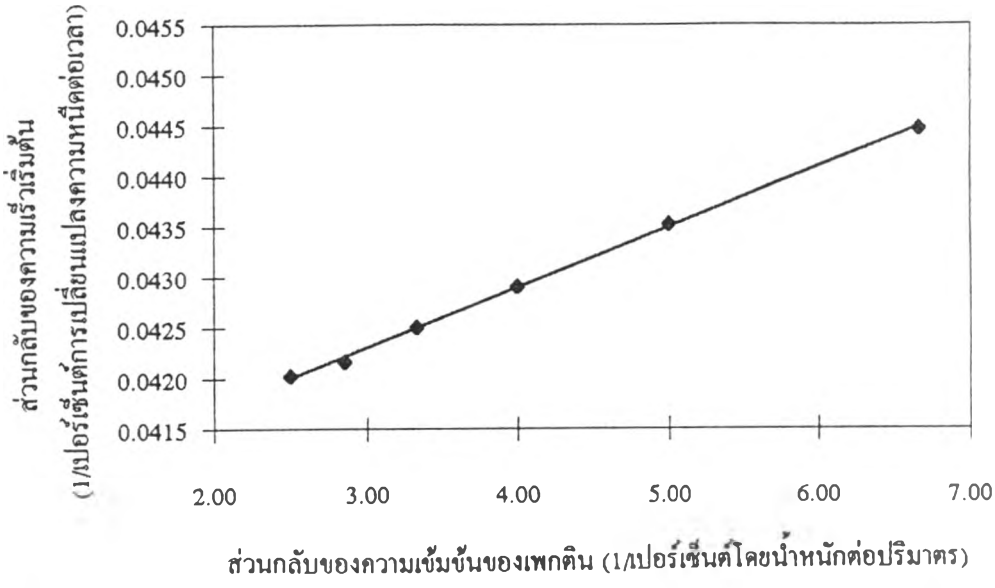
ภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการกวน 168 รอบต่อนาที เนื่องจากสามารถควบคุมความเร็วรอบได้ค่อนข้างสะดวก และคงที่

4. ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป

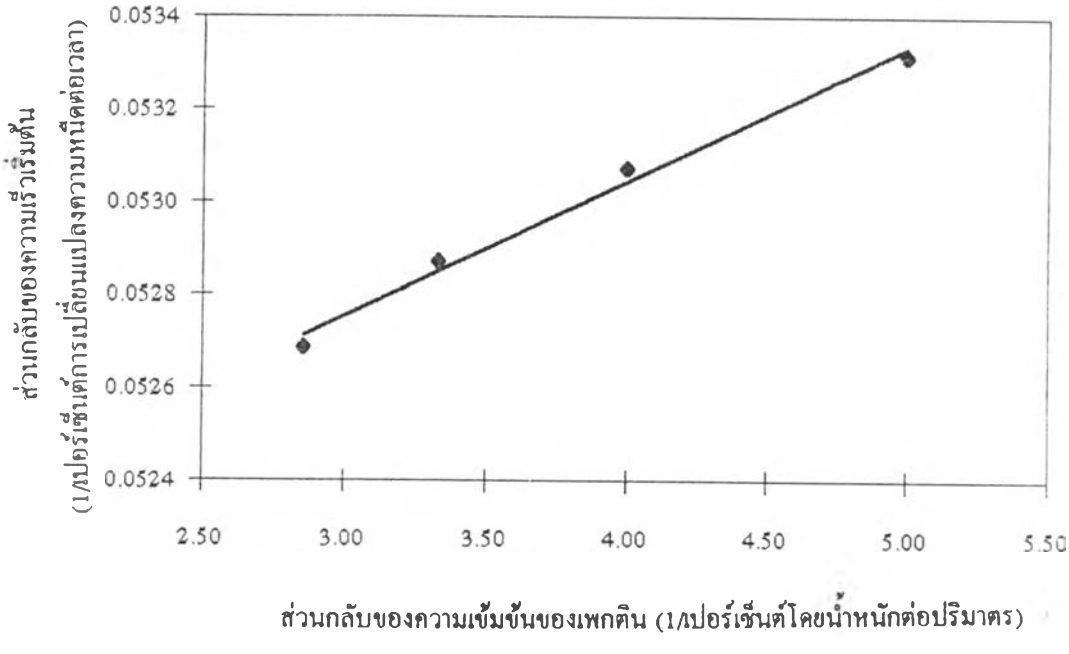
เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปมาทำปฏิกิริยากับสารละลายเพกตินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการวัดค่าแอกติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 1.2 (บทที่ 4) พบว่าเอนไซม์ NOVOFERM 14 อิสระมีค่า V_{max} และ K_m เท่ากับ 24.69 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความหนืดต่อเวลา และ 0.0148 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5.1 และรูปที่ 5.11) ส่วนเอนไซม์ NOVOFERM 14 ตรึงรูปบนตัวพยุง DOWEX MWA-1 มีค่า $V_{max(app)}$ และ $K_{m(app)}$ น้อยกว่าเอนไซม์อิสระคือมีค่าเท่ากับ 19.27 เปอร์เซ็นต์การ

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ

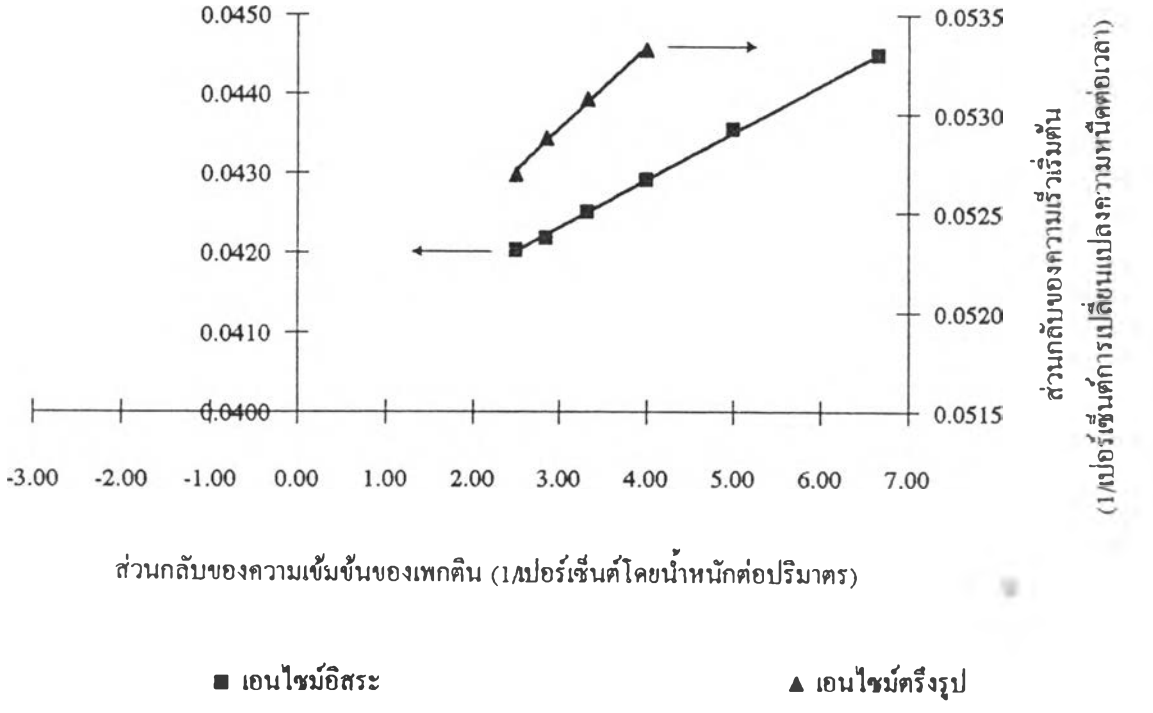
คุณสมบัติของเพกติเนส NOVOFERM 14	ชนิดของเอนไซม์เพกติเนส	
	เอนไซม์ NOVOFERM 14 อิสระ	เอนไซม์ NOVOFERM 14 ตรึงรูป
ค่าคงที่ไมเคิลลิสเมนเทน, Km (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	0.0148	0.0056
ความเร็วสูงสุด, Vmax (เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความหนืดต่อเวลา	24.69	19.27
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	3.5	3.5
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	35	30-35
แอกติวิตีสูงสุด (หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์-นาที)	0.158	0.103



รูปที่ 5.11 Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ NOVOFERM 14 อิสระที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และใช้ความเข้มข้นของเพกตินตั้งแต่ 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 5.12 Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ NOVOFERM 14 ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และใช้ความเข้มข้นของเพกตินตั้งแต่ 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 5.13 Lineweaver-Burk Plot เปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 โดยใช้เพกตินเข้มข้น 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เปลี่ยนแปลงความหนืดต่อเวลา และ 0.0056 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ (ตารางที่ 5.1 และรูปที่ 5.12-5.13) ซึ่งการลดลงของค่า $K_{m(app)}$ นั้นเนื่องมาจากการตรึงรูปเอนไซม์มีผลทำให้สับสเตรตที่ถูกนำเข้าไปยังเอนไซม์ตรึงรูปถูกบังคับให้รวมกันอยู่ใกล้บริเวณเร่งของเอนไซม์จึงเพิ่มประสิทธิภาพของการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตได้ดีขึ้น หรืออธิบายได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้การจับของเอนไซม์กับสับสเตรตมีประสิทธิภาพดีขึ้น และเมื่อตัวพยุงมีประจุไฟฟ้าสถิตต่างชนิดกับสับสเตรตก็อาจเป็นผลมาจากประจุไฟฟ้าสถิต (electrostatic change) ของตัวพยุง ซึ่งในที่นี้ตัวพยุงมีประจุบวกแต่สับสเตรตมีประจุลบทำให้เกิดการดึงดูดกัน ทำให้ความเข้มข้นของสับสเตรตในสภาพแวดล้อมจุลภาค (microenvironment) ของเอนไซม์สูงกว่าภายนอก ความสามารถในการจับกับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต (affinity) สูงขึ้นจึงทำให้ค่า $K_{m(app)}$ ของเอนไซม์ตรึงรูปจึงต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัว

พยุงที่อาศัยหลักการตรึงด้วยพันธะไอออนิก (ionic bond) จะให้ค่า $K_{m(app)}$ แตกต่างไปจากเดิมมากกว่าตัวพยุงที่อาศัยการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) เพราะมีปริมาณของประจุมากกว่า ส่วนการลดลงของค่า $V_{max(app)}$ ในเอนไซม์ตรึงรูปนั้น แสดงให้เห็นชัดถึงความจำกัดของการนำสับสเตรตเข้าและผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกจากเอนไซม์ตรึงรูป ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลสารภายนอก จากการคำนวนหาค่า effectiveness factor (ภาคผนวก จ2) พบว่าค่า effectiveness factor น้อยกว่า 1.0 แสดงให้เห็นว่ามีผลของความต้านทานการถ่ายเทมวลสารภายนอกต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยารวม

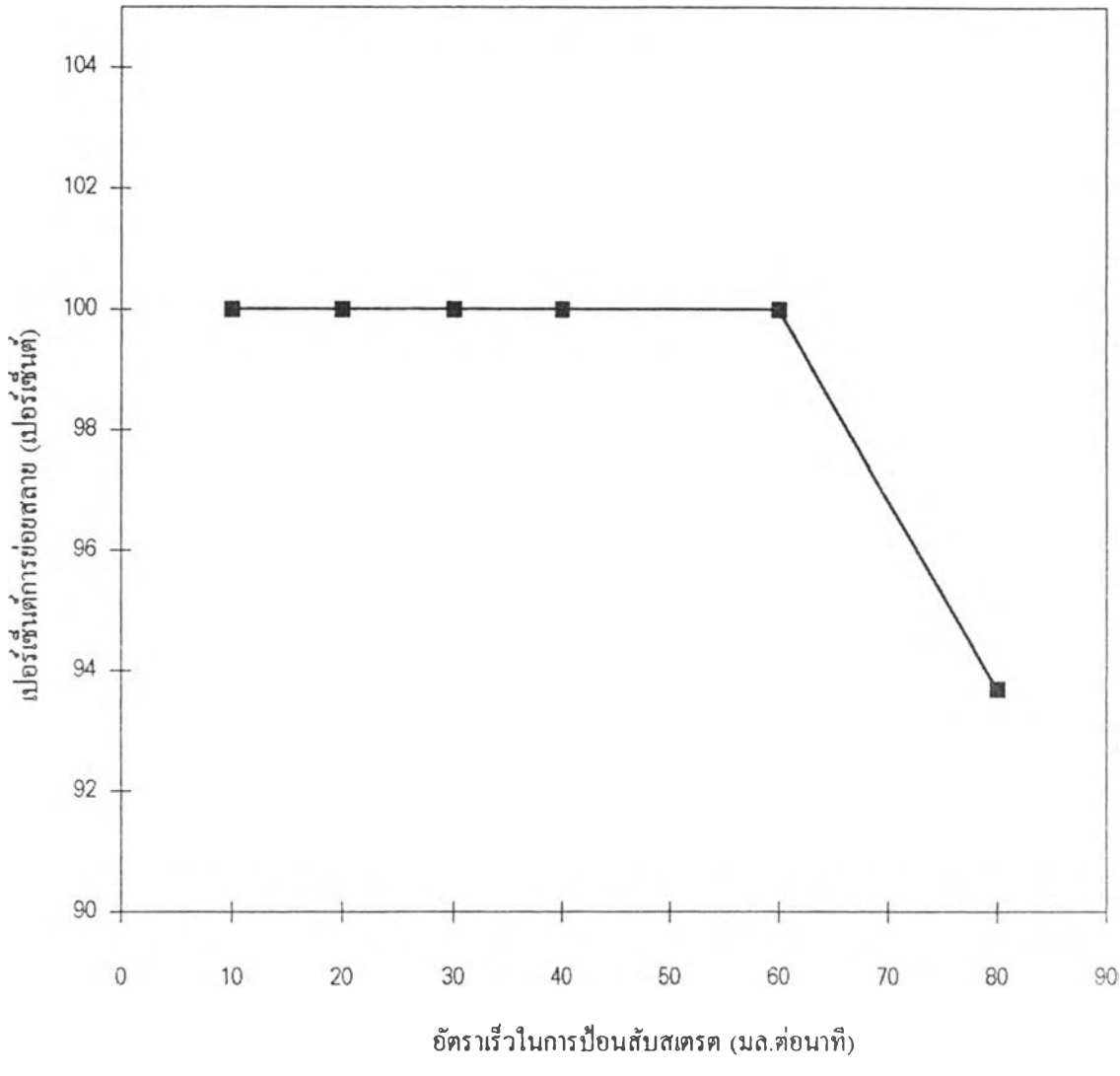
5. ผลกระทบของอัตราเร็วในการป้อนเพกตินเข้าสู่หอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบดต่อการย่อยสลายเพกติน

จากการศึกษาการแปรเปลี่ยนค่าอัตราเร็วในการป้อนเพกตินเข้าสู่หอปฏิกิริยาตั้งแต่ 10 20 30 40 60 และ 80 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ปริมาณเรซินตรึงรูปเท่ากับ 166 กรัม และสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ได้ผลดังนี้

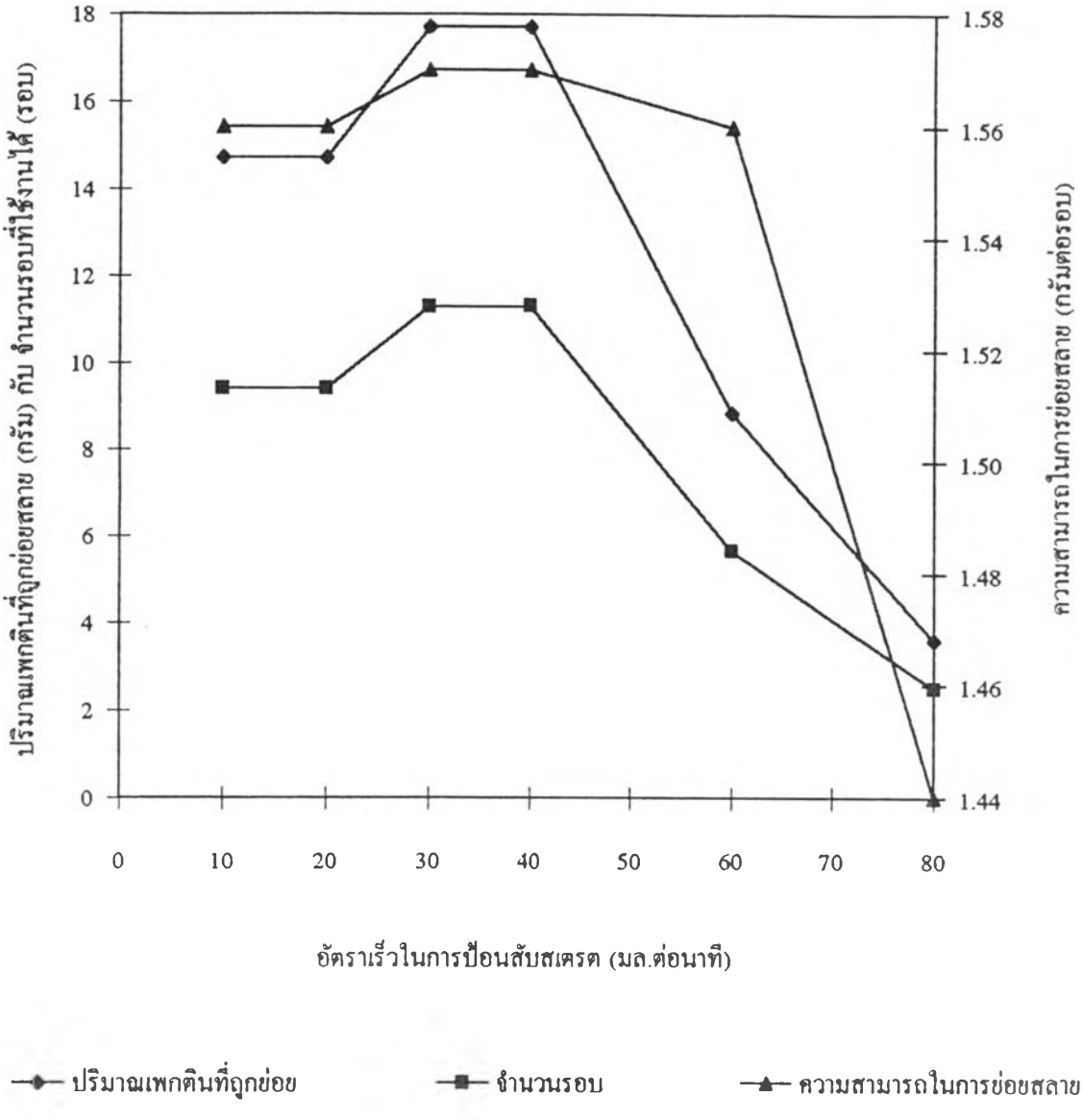
ผลของอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป พบว่าอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินสูงสุดที่ยังคงให้ปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลายสูงสุด (17.7 กรัม ที่ 100 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย) คือ 40 มิลลิลิตรต่อนาที (รูปที่ 5.14-5.15) ที่อัตราเร็วในการป้อนมากกว่า 60 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเปอร์การย่อยสลายลดลง เนื่องจากเวลาที่สับสเตรตสัมผัสกับเอนไซม์น้อยลง และมีการหลุดของเอนไซม์บางส่วนจากผิวของตัวพยุง โดยจะพิจารณาจากการนำตัวอย่างที่เก็บออกมาจากเอนไซม์ตรึงรูปมาทำการวัดความหนืด พบว่ายังคงมีการย่อยสลายเพกตินต่อไปอีก เนื่องจากยังคงมีการลดลงของความหนืด (ภาคผนวก จ1)

ผลของอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินต่ออัตราเร็วในการย่อยสลายเพกติน นั้นพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการป้อนเพกตินจะทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพกตินเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.16) ทั้งนี้เนื่องจากผลของการแพร่ภายนอกของเอนไซม์ตรึงรูปที่ผิวตัวพยุงลดลงซึ่งเกี่ยวเนื่องกับการลดความหนาของชั้นฟิล์มต้านทาน (boundary layer) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rexova-Benkova [13]

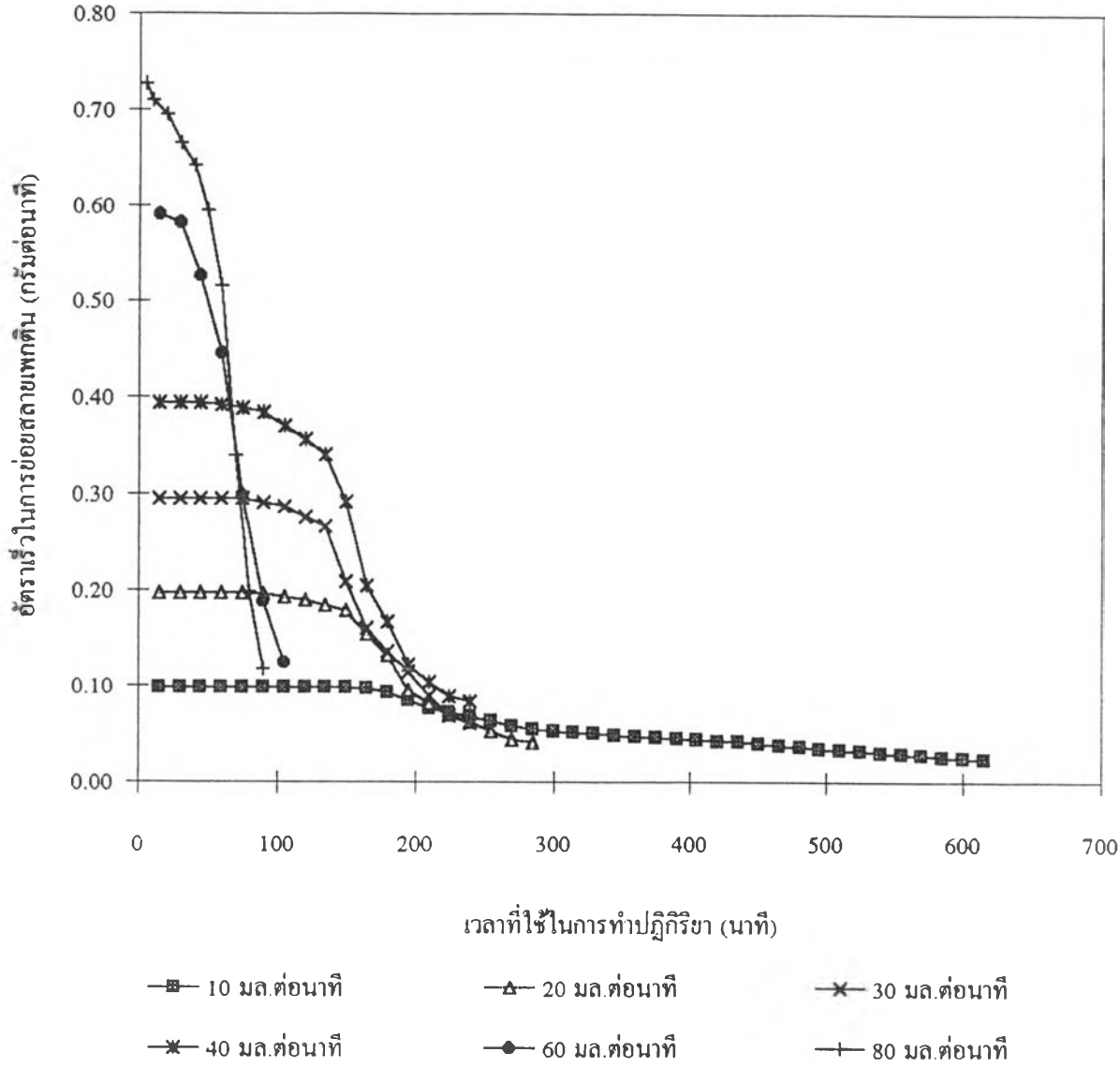
ผลของอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินต่อความดันลด พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินจะทำให้ความดันลดมีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.17-5.18) ซึ่งสอดคล้องกับสมการของ Ergen (รูปที่ 5.19-5.30)



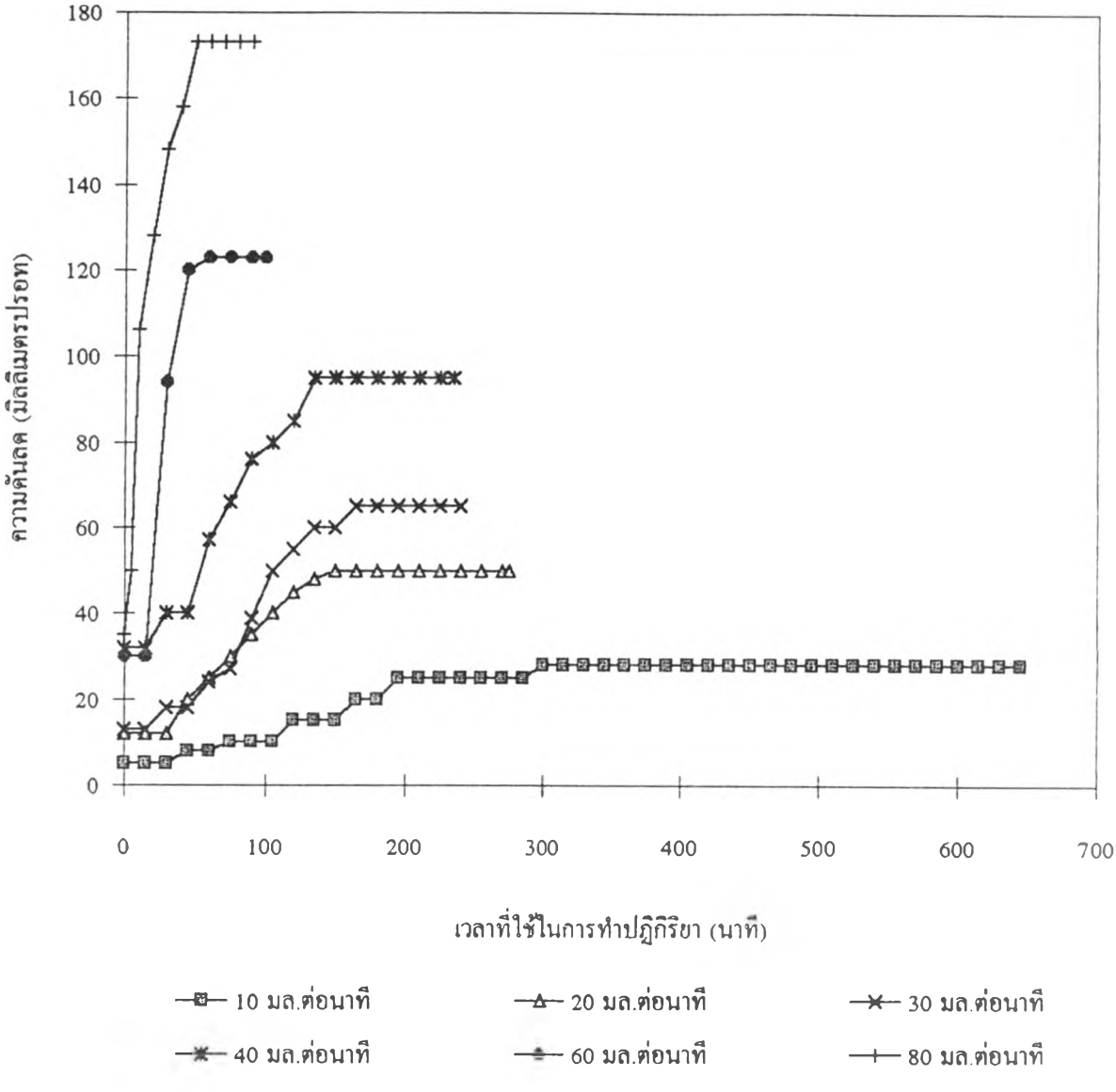
รูปที่ 5.14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเพกตินกับอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกติน ในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเพกติน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



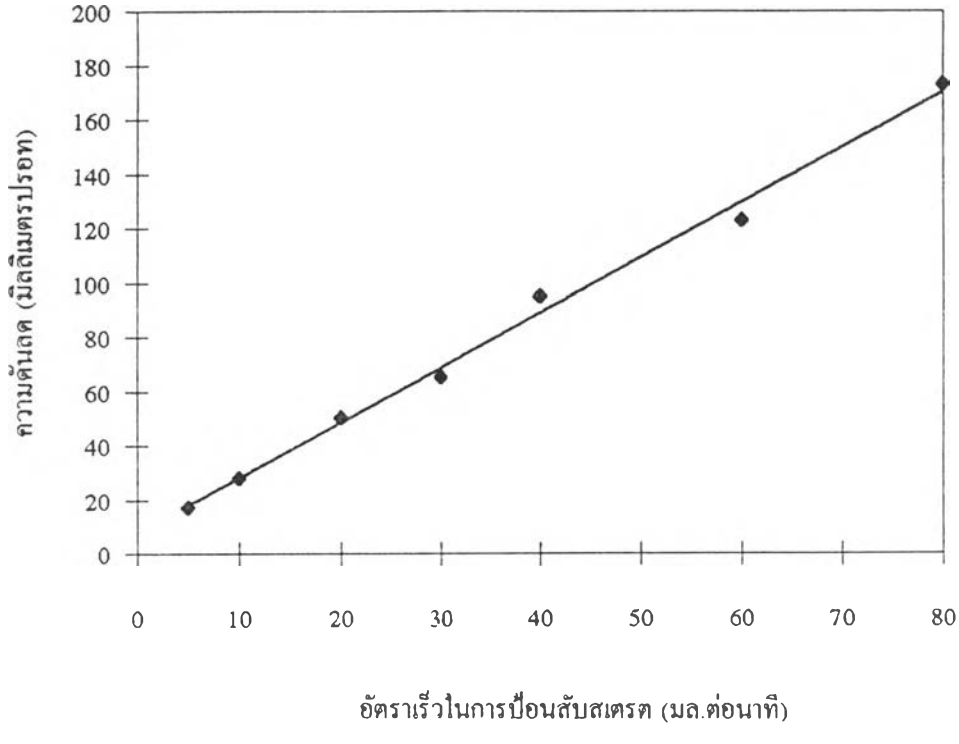
รูปที่ 5.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลาย จำนวนรอบในการย่อยสลายได้ 100 เปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย และความสามารถในการย่อยสลาย กับอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต ในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเพกติน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ค่าง 3.5



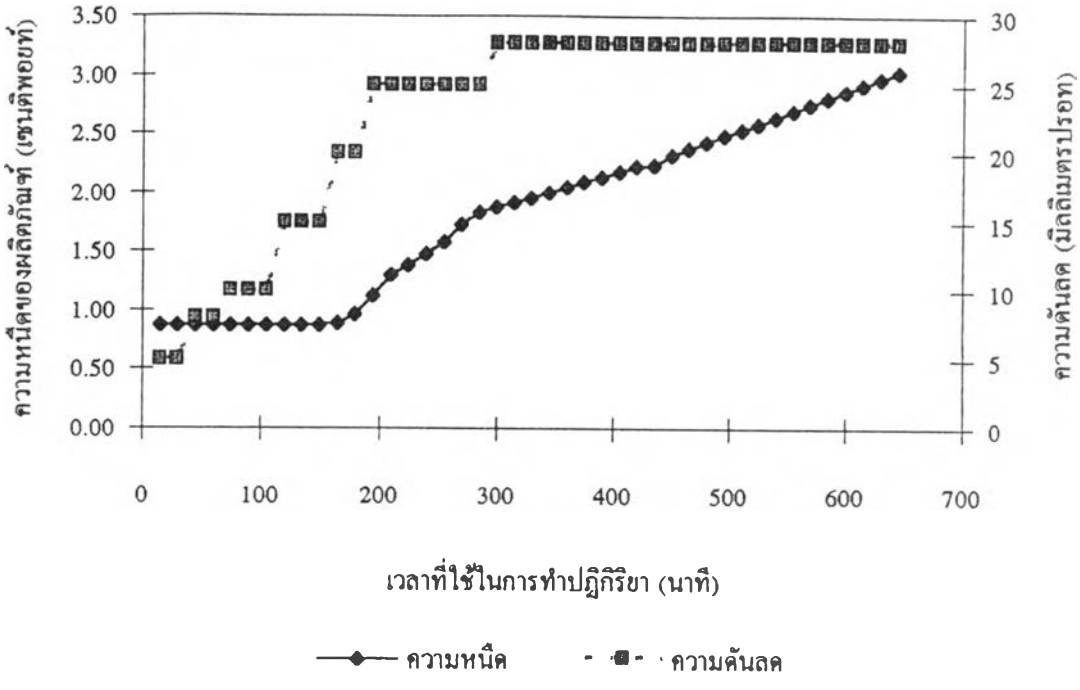
รูปที่ 5.16 ผลของอัตราเร็วในการป้อนเพกตินต่ออัตราเร็วในการย่อยสลาย ด้วยเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเพกติน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



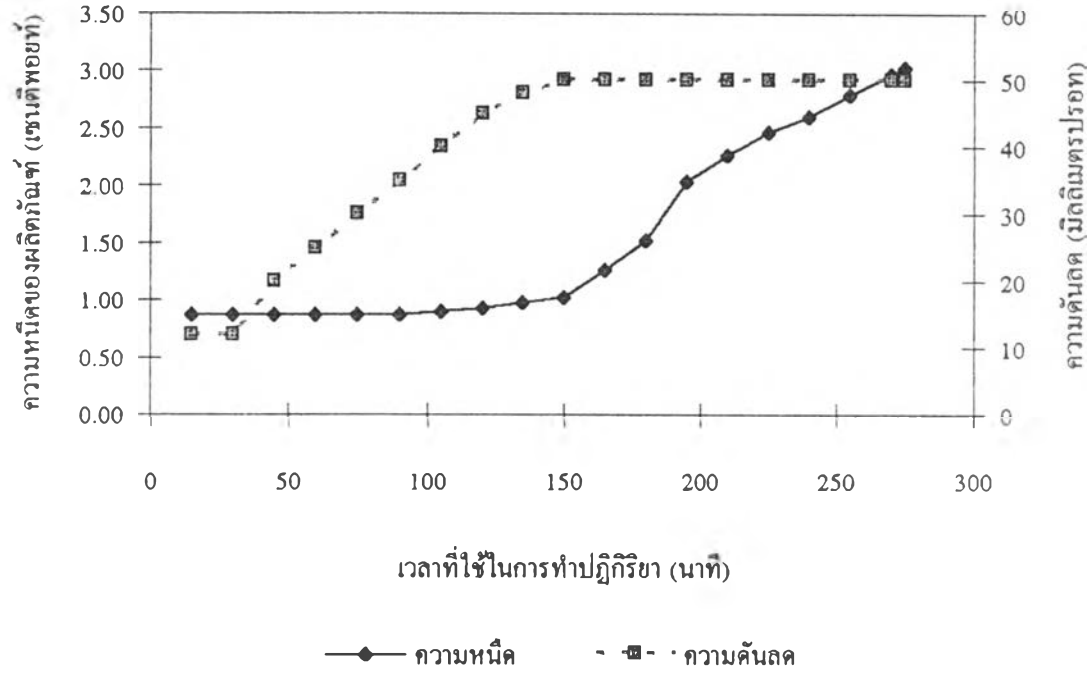
รูปที่ 5.17 ผลของอัตราเร็วในการป้อนเพกตินต่อความดันลดในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายเพกติน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



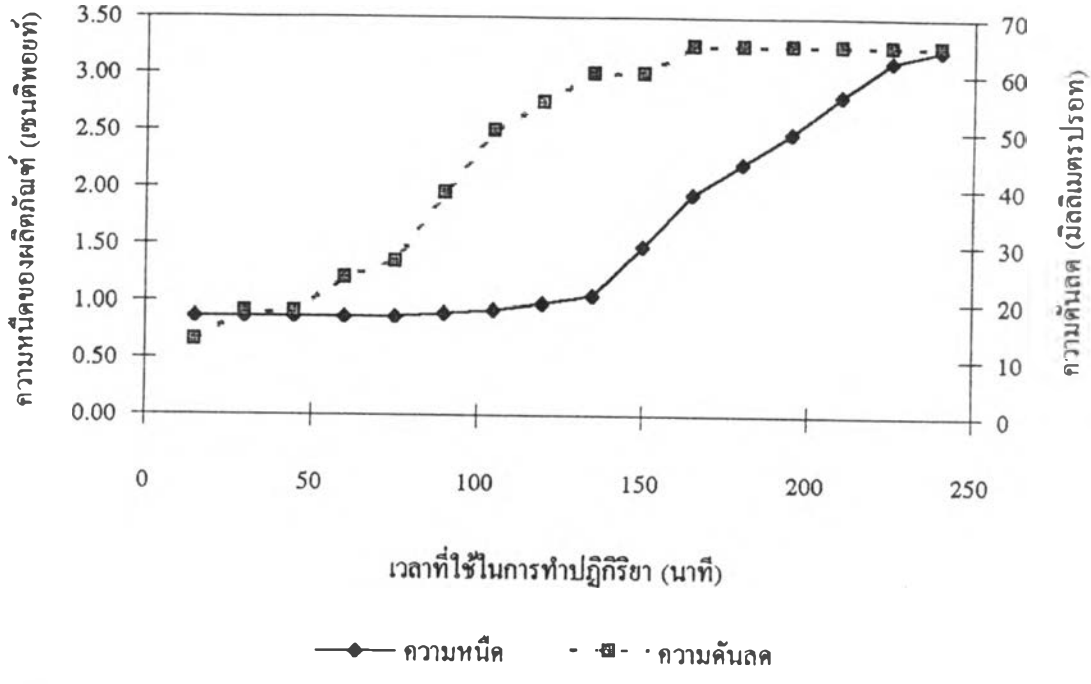
รูปที่ 5.18 แสดงค่าความดันลดของหอปฏิกิริยาแพ็กเบด ที่อัตราการป้อนสับสเตรตตั้งแต่ 10-80 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณเอนไซม์ตรึงรูป 166 กรัม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.5



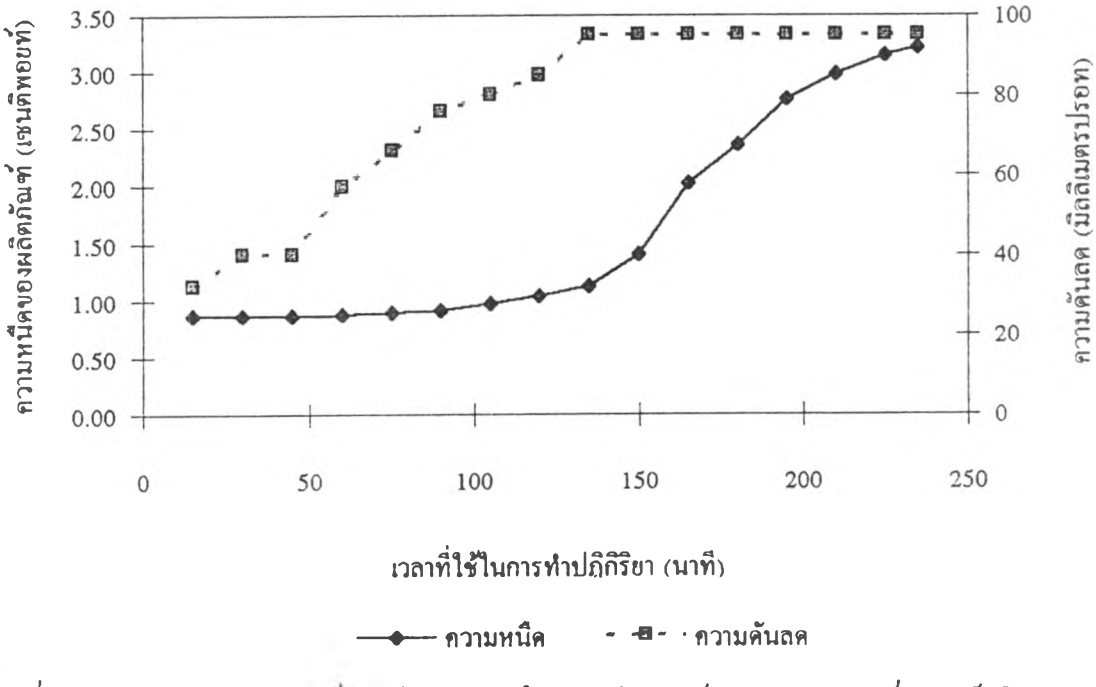
รูปที่ 5.19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด ที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 10 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



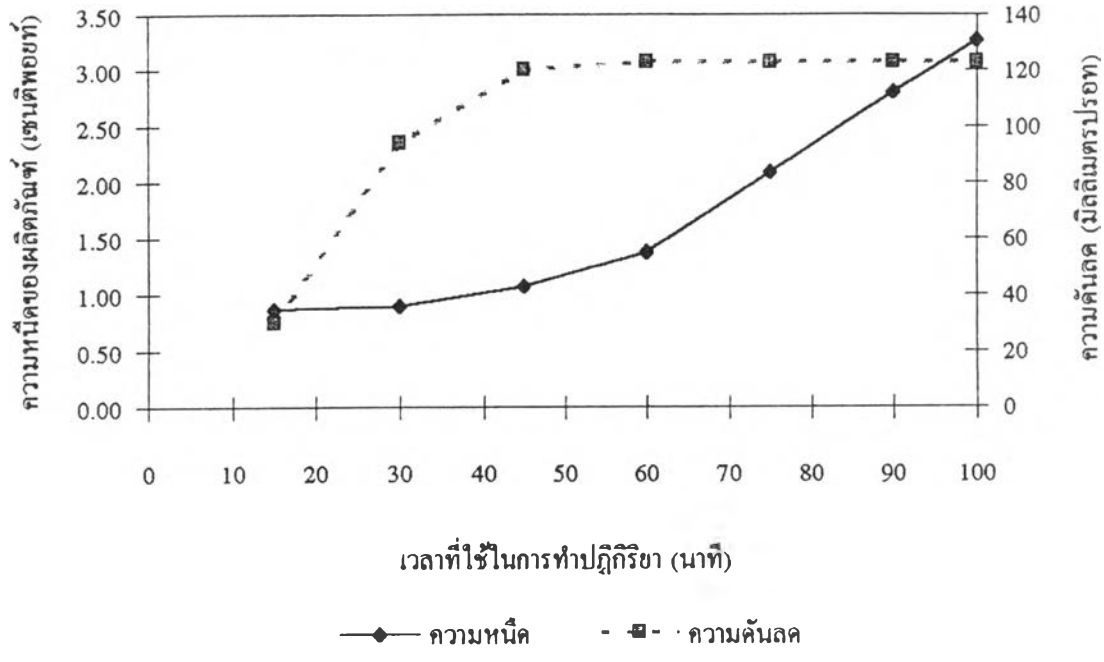
รูปที่ 5.20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด ที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 20 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



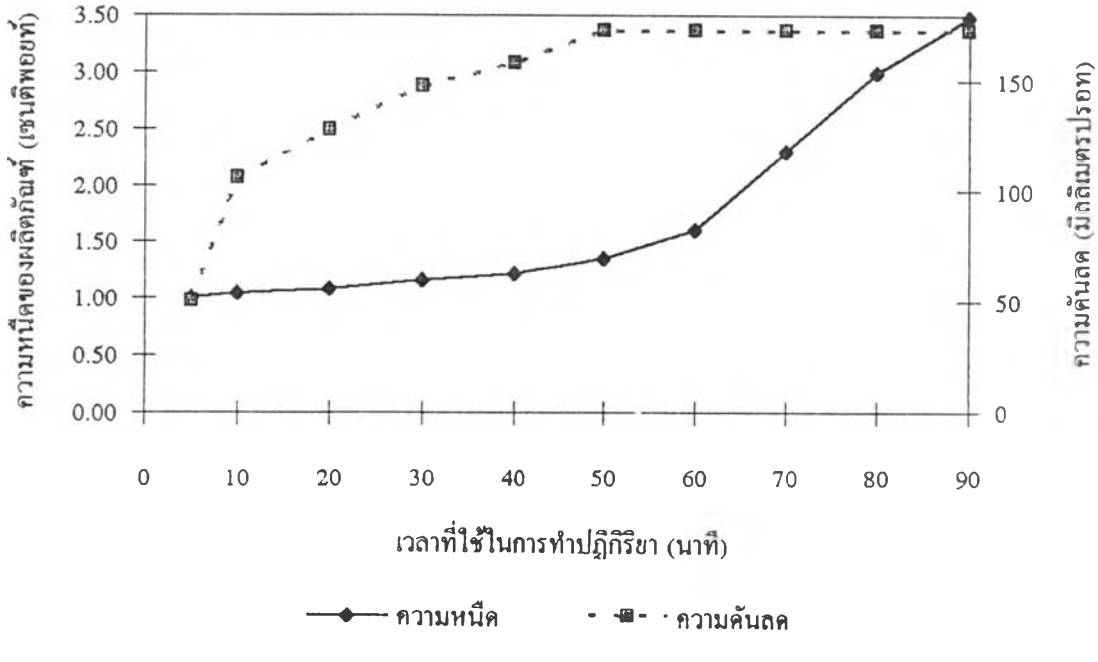
รูปที่ 5.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด ที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 30 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



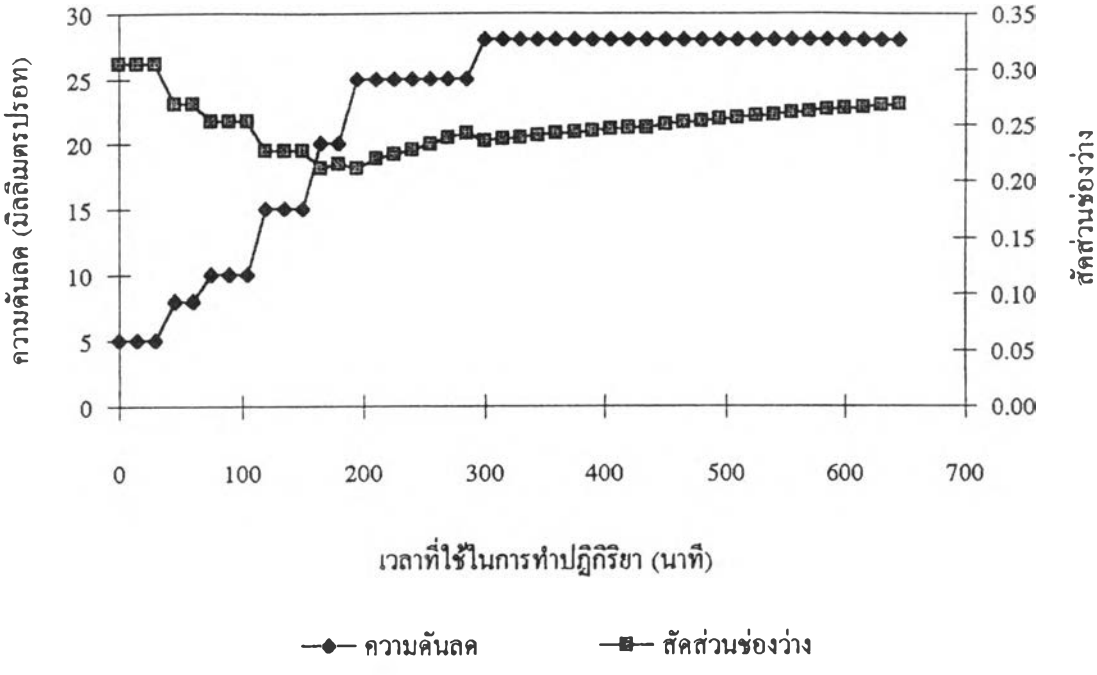
รูปที่ 5.22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด ที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 40 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



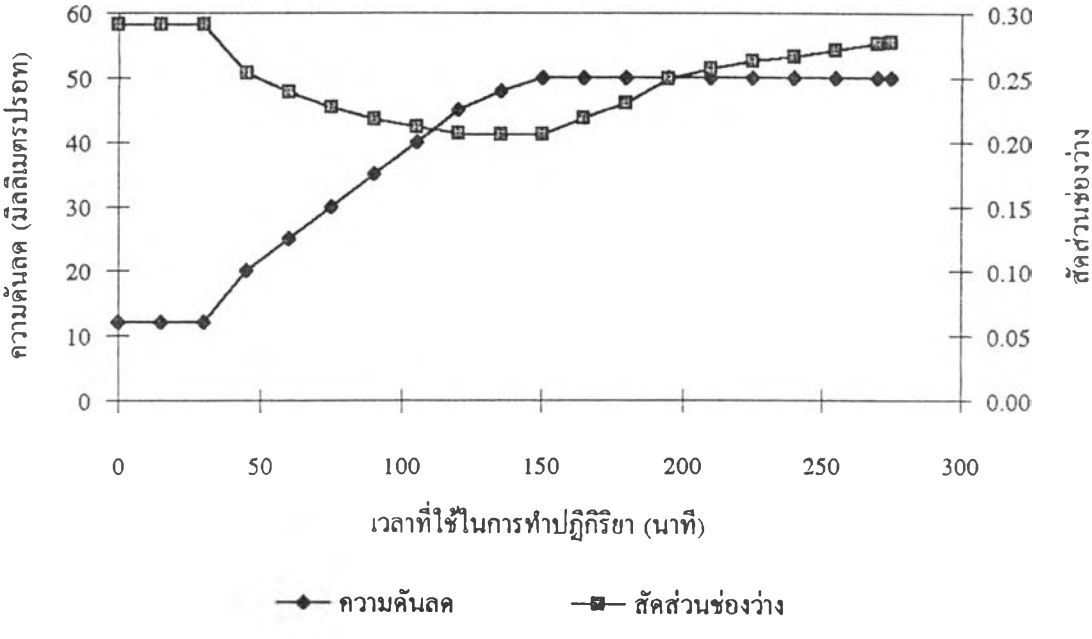
รูปที่ 5.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด ที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 60 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



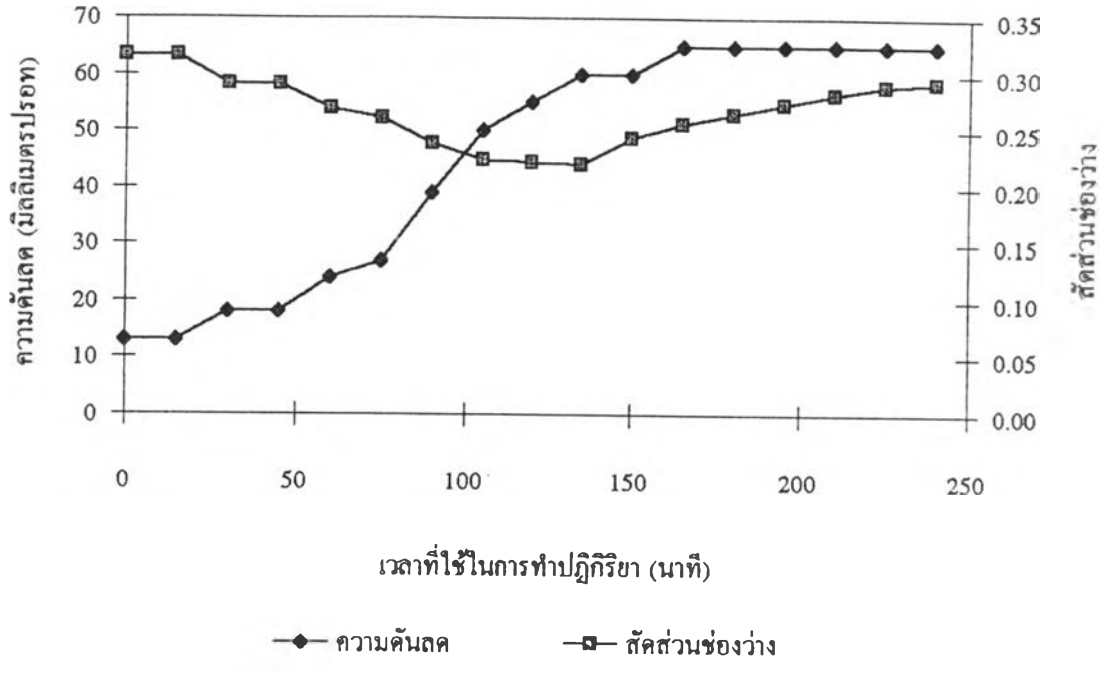
รูปที่ 5.24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด ที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 80 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



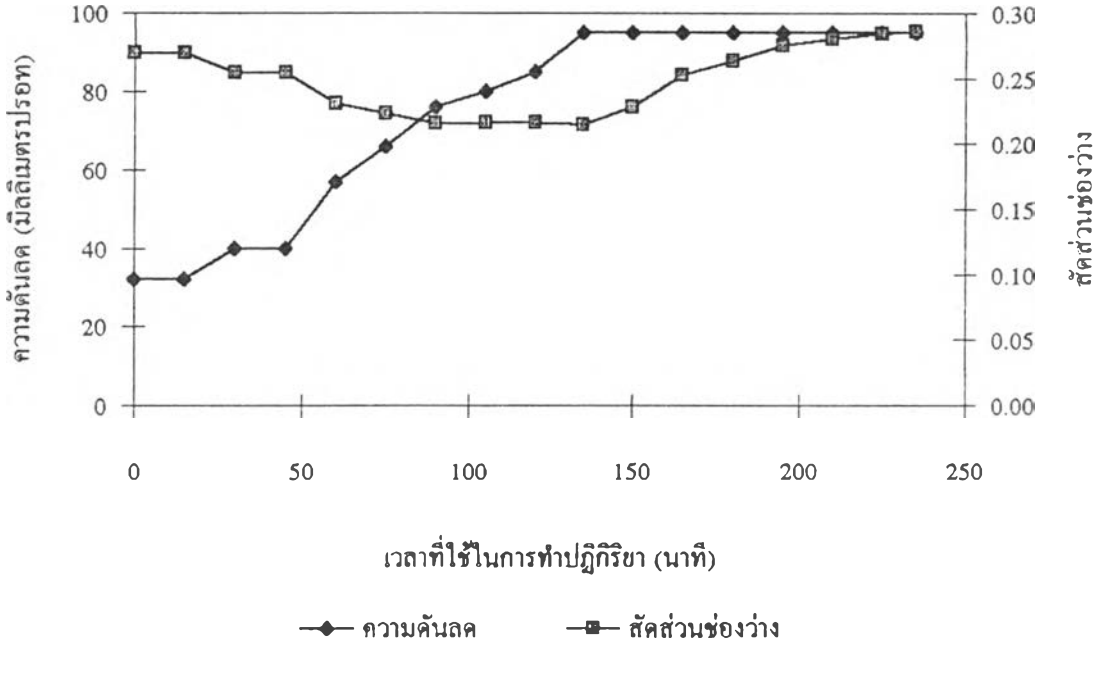
รูปที่ 5.25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 10 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



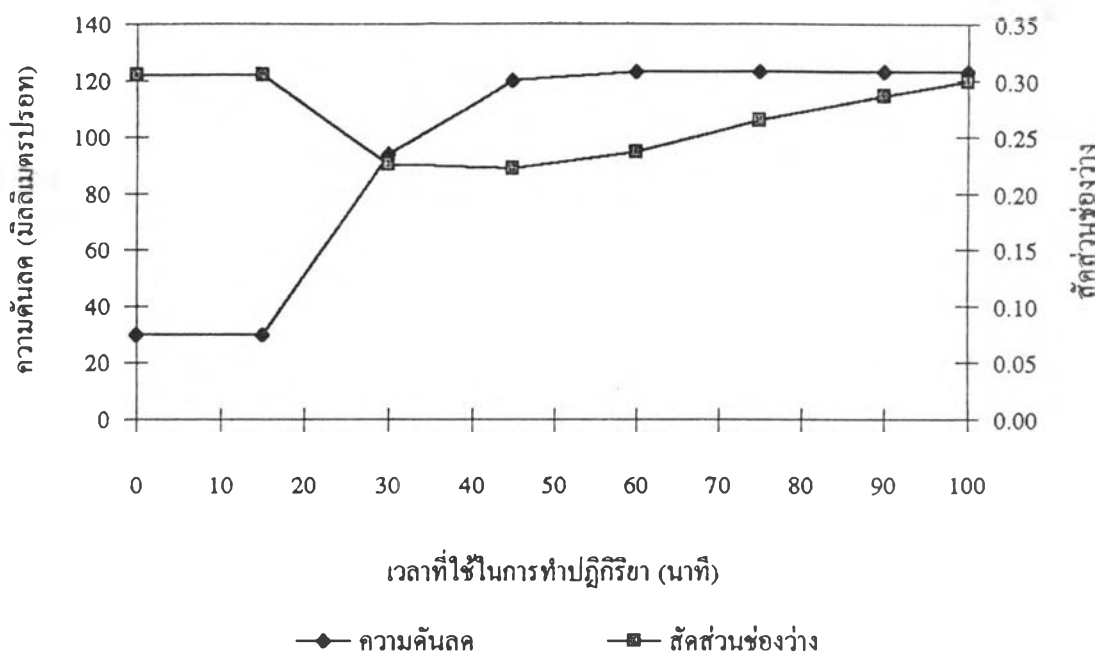
รูปที่ 5.26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 20 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



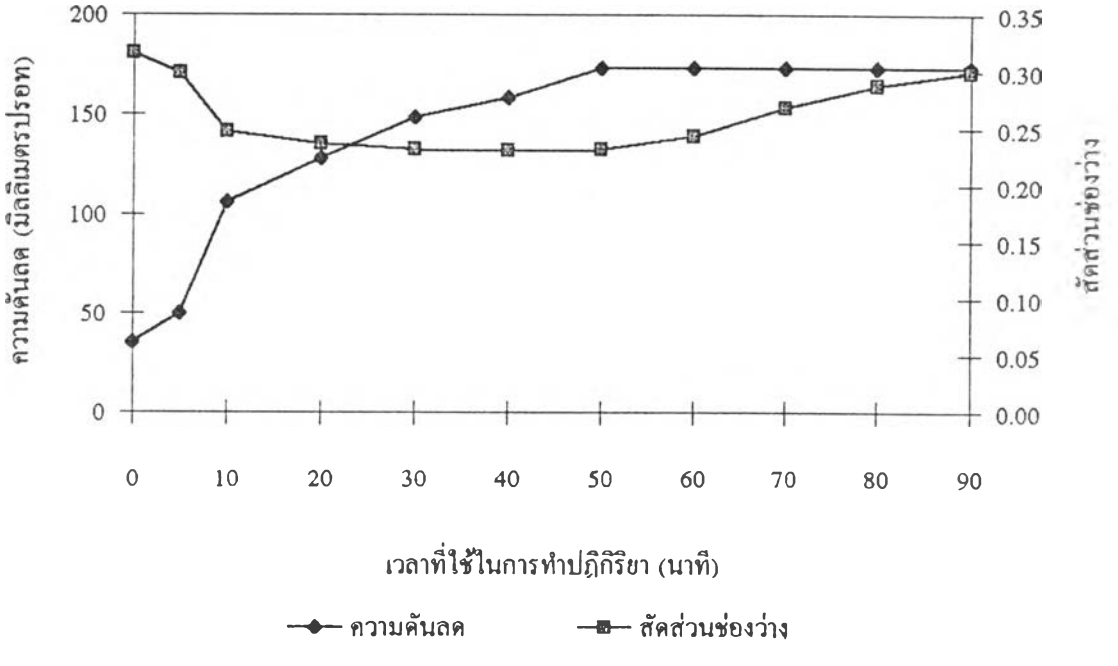
รูปที่ 5.27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 30 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



รูปที่ 5.28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 40 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



รูปที่ 5.29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 60 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



รูปที่ 5.30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 80 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5

6. ผลกระทบของความเข้มข้นของเพกตินต่อการย่อยการสลายเพกตินในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด

จากการศึกษาโดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเพกตินตั้งแต่ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และทำการทดลองที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หอปฏิกิริยาบรรจุเรซินตรึงรูปเป็นปริมาณเท่ากับ 166 กรัมและป้อนสารละลายเพกตินด้วยอัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที ได้ผลดังนี้

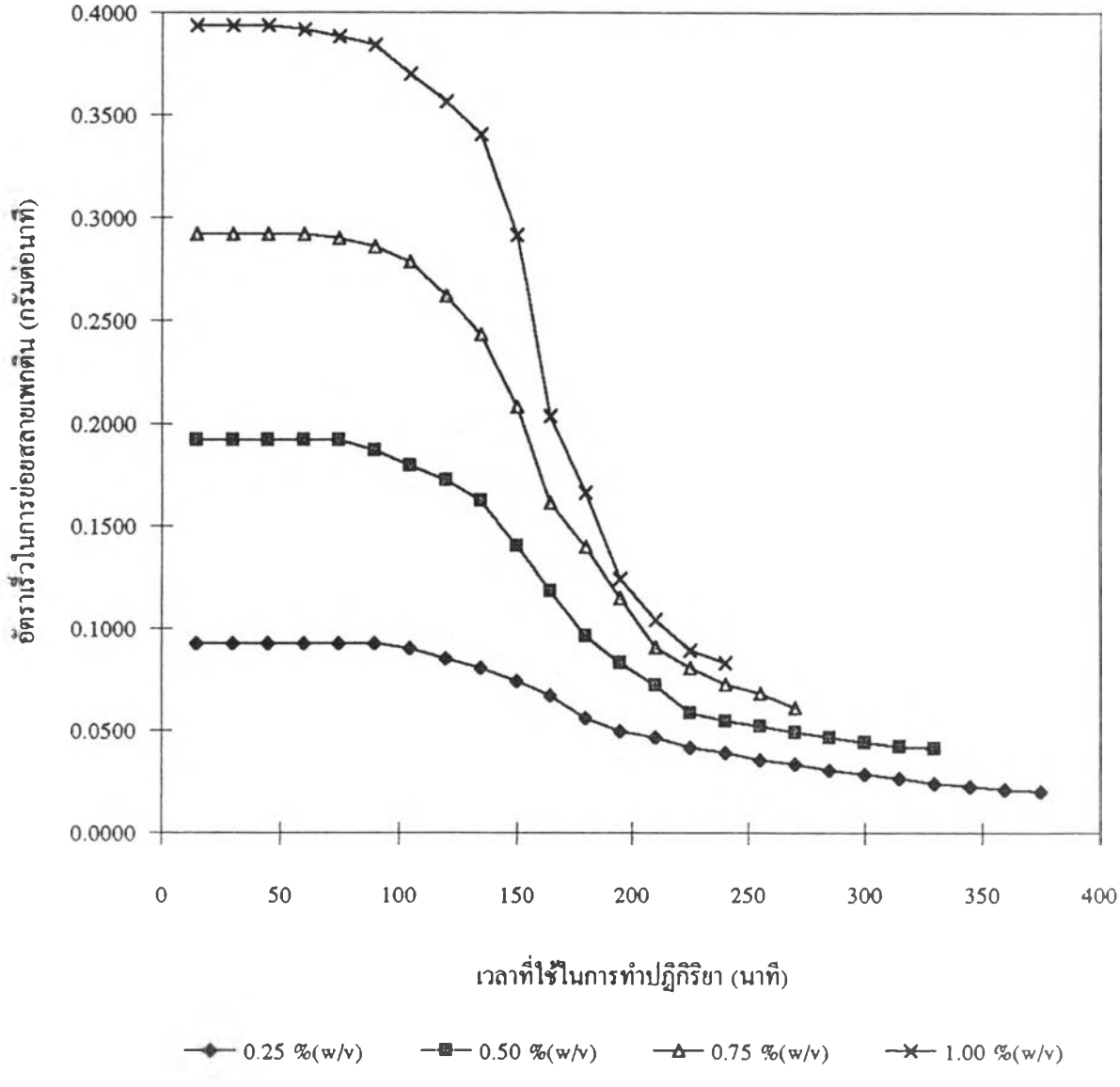
ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่ออัตราเร็วในการย่อยสลายเพกติน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพกตินจะทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายเพกตินมีค่าเพิ่มขึ้น (รูป 5.31) ซึ่งเป็นไปตามสมการ $-r_A=kC_A^n$ หรือ $V=V_{max}[S]/K_m+[S]$ จะเห็นว่าอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้ และสัมพันธ์กับปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลาย (รูปที่ 5.32)

ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อแอกติวิตีของเอนไซม์นั้น พบว่าในช่วงแรกของเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของสารละลายเพกตินที่สูงจะให้ค่าแอกติวิตีสูงกว่า (ในช่วงความเข้มข้นของเพกตินที่ทดลอง) ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปมีปริมาณมากพอที่จะทำปฏิกิริยากับสับสเตรตที่ใช้ ดังนั้นเมื่อปริมาณสับสเตรตมากขึ้นโอกาสที่จะจับกับเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยานานขึ้น ที่ความเข้มข้นของสับสเตรตสูง จะพบว่าอัตราการลดลงอย่างรวดเร็วของแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป เนื่องจากมีการสะสมของอนุภาคของแข็งที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเพกตินที่เกิดจากสารละลายเพกตินที่ถูกย่อยสลายในช่วงแรก ซึ่งเมื่อสารละลายเพกตินที่ใช้มีความเข้มข้นสูง ปริมาณอนุภาคของแข็งที่ได้จากการย่อยจะมาก ทำให้เกิดการขัดขวางและอุดตันการเข้าไปทำปฏิกิริยาของสับสเตรตที่เข้ามาในช่วงหลัง (รูปที่ 5.33)

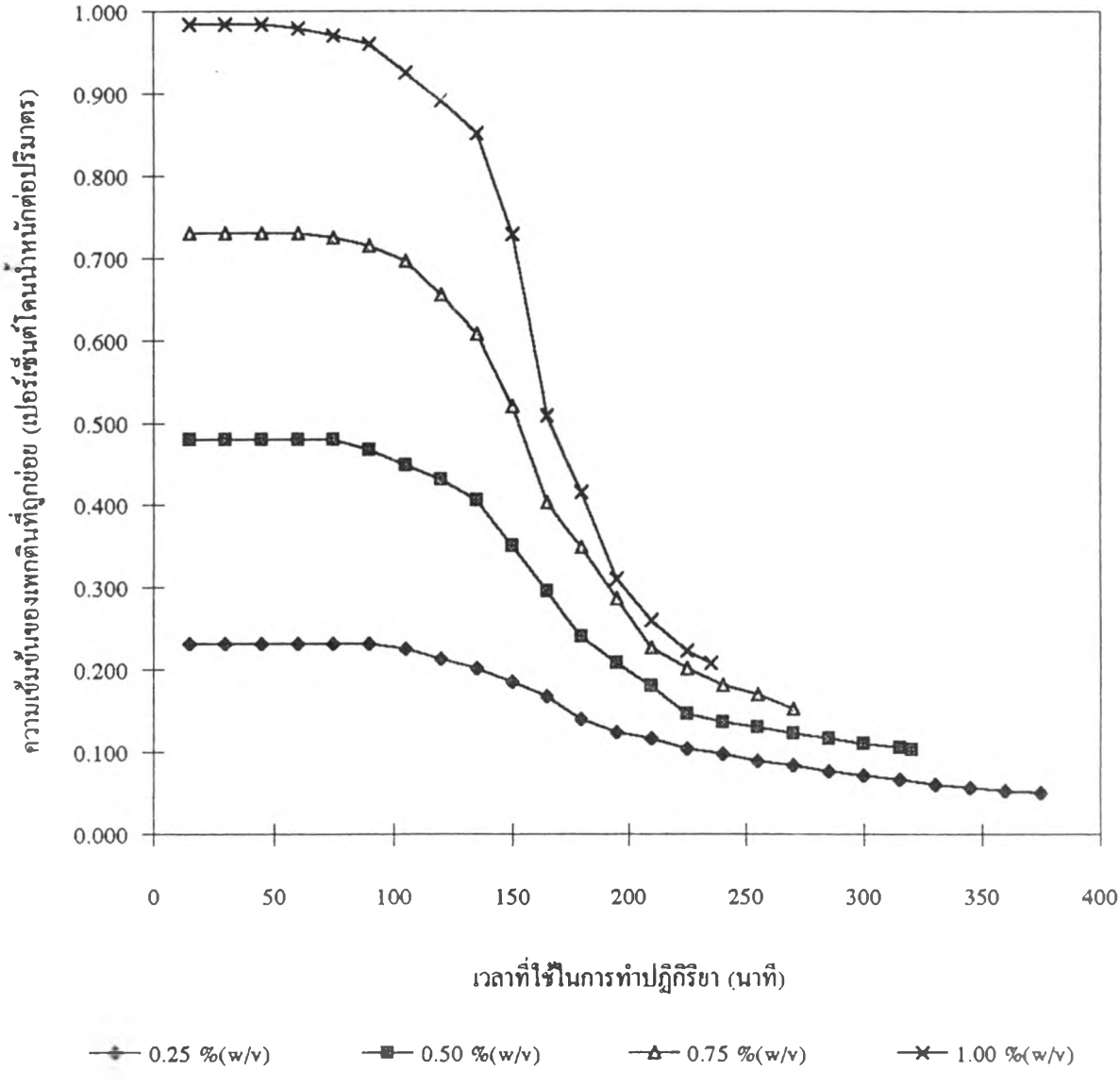
ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อความดันลด พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพกตินจะทำให้ความดันลดมีค่ามากขึ้น (รูปที่ 5.34-5.35) ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของเพกตินซึ่งเป็นสารที่มีความหนืด ทำให้ความหนืดมากขึ้น ความเร็วในการไหลของสารละลายช้าลง ส่งผลให้ค่าตัวเลขเรโนลด์ (Reynold number) น้อยลง ค่าความดันลดจึงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.36-5.39) ซึ่งสอดคล้องกับสมการความดันลดของ Ergen และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพกติน ปริมาณอนุภาคของแข็งที่ได้จากการย่อยสลายจะมากขึ้น ทำให้เกิดการอุดตัน สัดส่วนช่องว่างระหว่างอนุภาคตัวพยุงจะมีค่าลดลง ส่งผลให้ค่าความดันลดสูงขึ้น (รูปที่ 5.40-5.43) ซึ่งสอดคล้องกับสมการของ Ergen เช่นกัน

7. เสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด

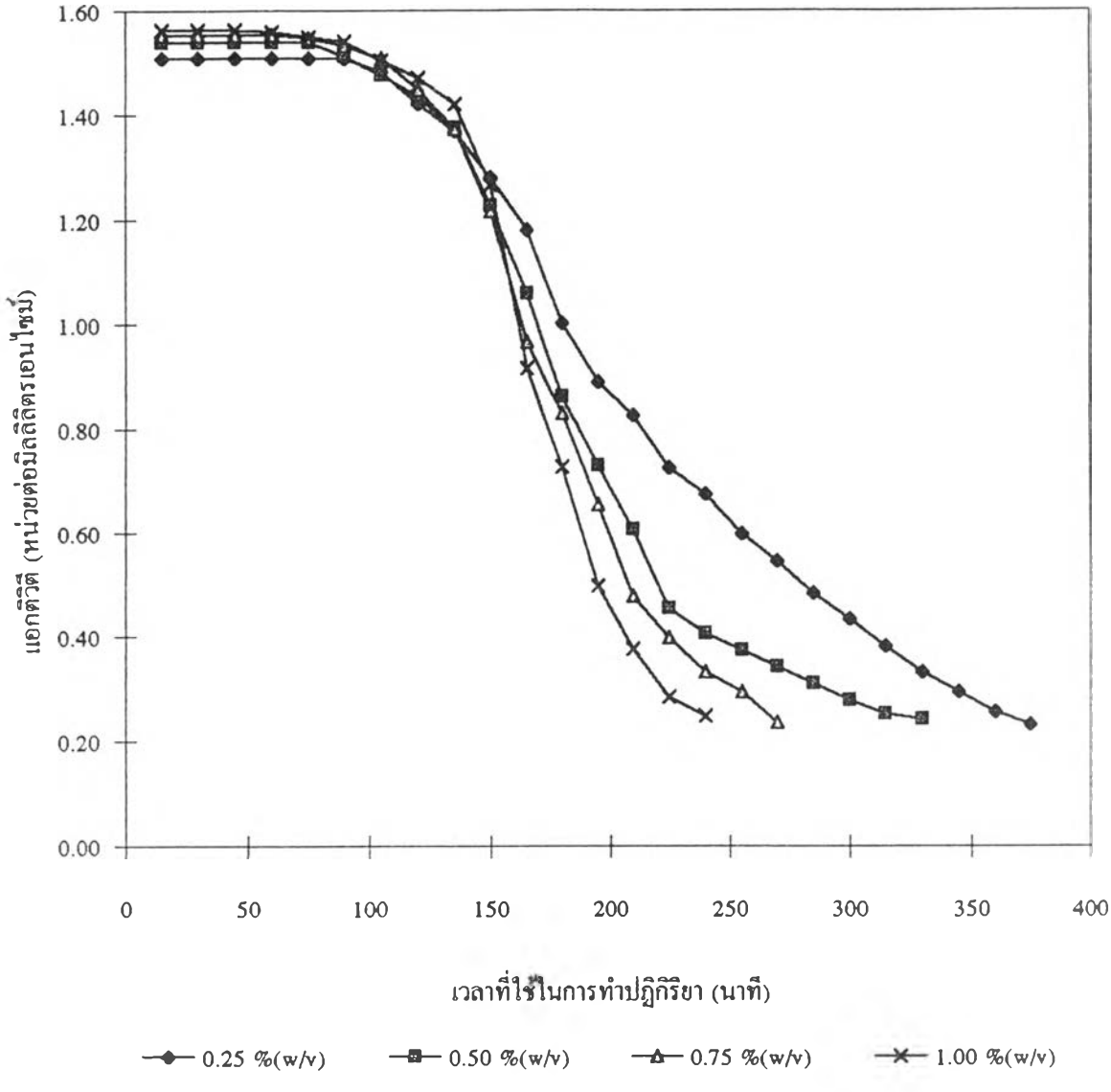
จากการศึกษาโดยใช้เรซิน 166 กรัม บรรจุในหอปฏิกิริยาแบบแพ็กเบด ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร และความสูง 30 เซนติเมตร แล้วผ่านสารละลายเพกตินเข้มข้น 1.00 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5 ด้วยอัตราการป้อนเพกตินเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายสารละลายเพกตินเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถย่อยสลายสารละลายเพกตินเป็นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลาย 10 กรัม ภายในเวลา 45 นาที โดยไม่สูญเสียแอกติวิตีเลย และสามารถย่อยสลายสารละลายเพกตินได้เป็นระยะเวลาประมาณ 150 นาที โดยยังคงเหลือแอกติวิตีเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีเริ่มต้น และสามารถย่อยสลายสารละลายเพกตินเป็นปริมาตร 3600 มิลลิลิตร และย่อยสลายสารละลายเพกตินได้ 9000 มิลลิลิตร โดยสูญเสียแอกติวิตีประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีเริ่มต้น (รูปที่ 5.44)



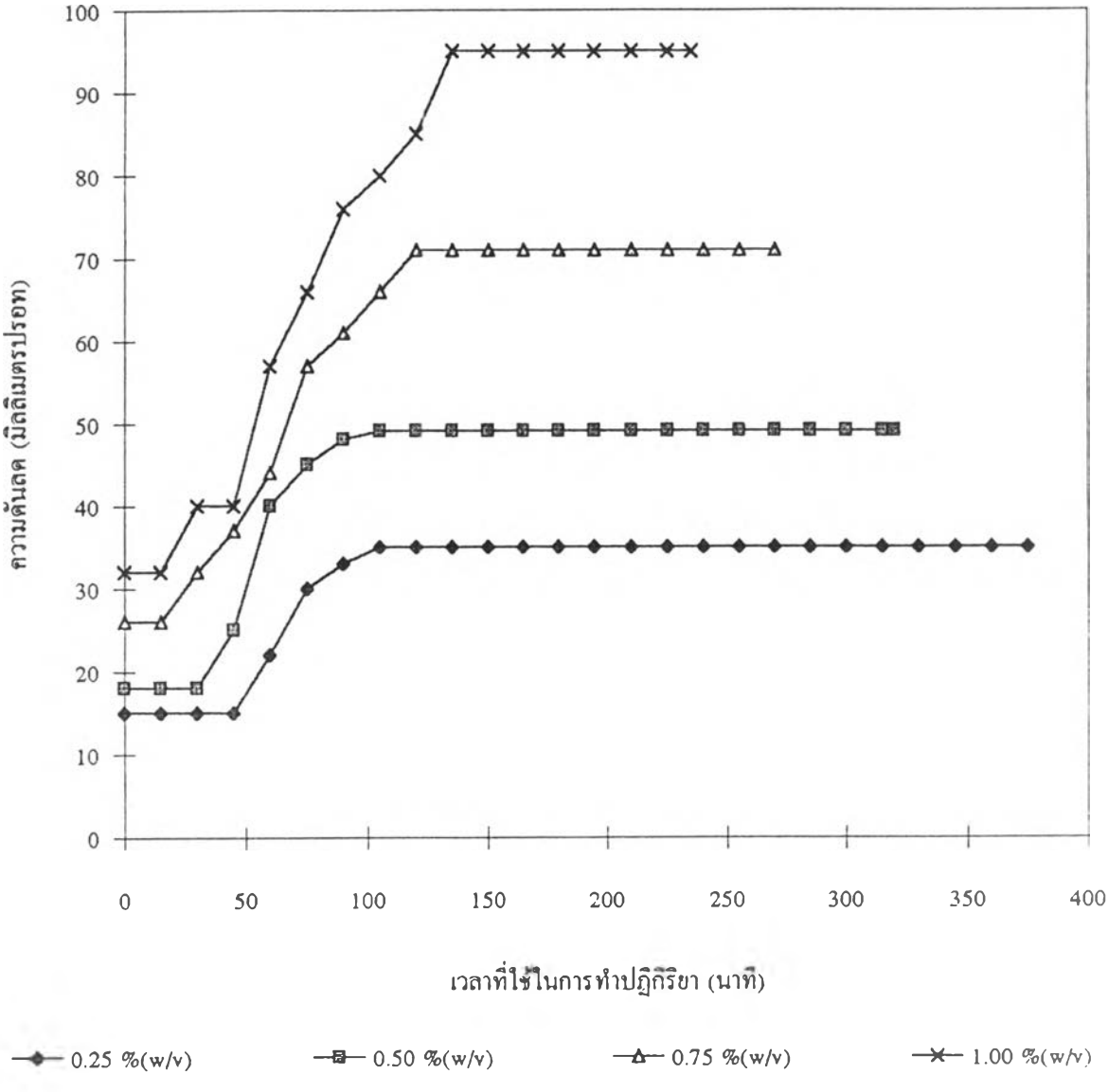
รูปที่ 5.31 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่ออัตราเร็วในการย่อยสลายเพกตินด้วยเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูป 166 กรัม และอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที



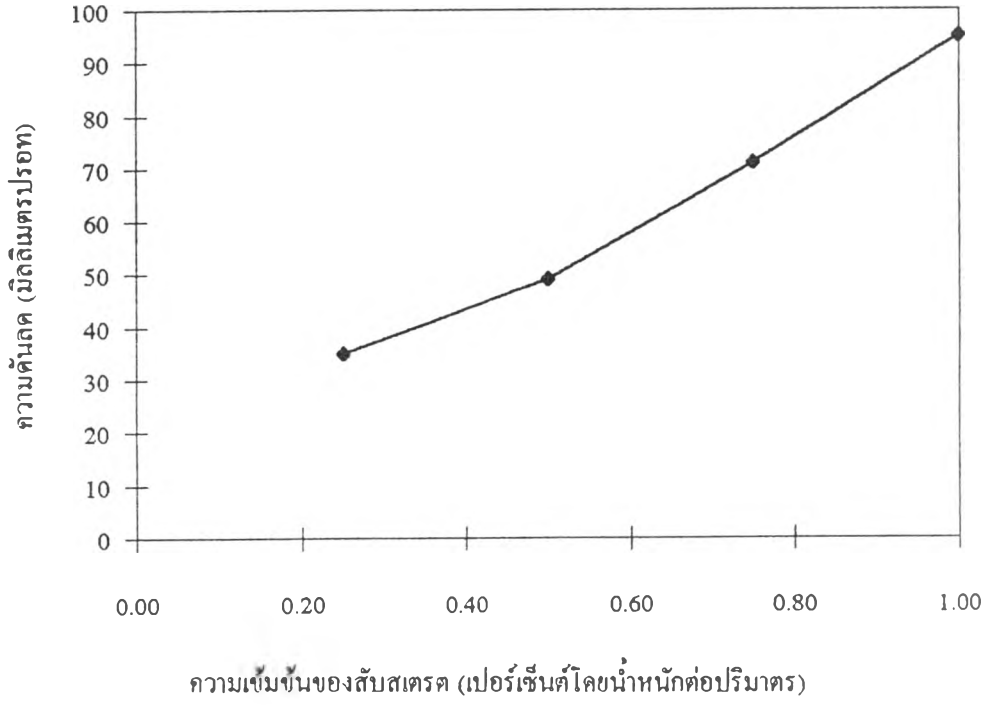
รูปที่ 5.32 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ค่าง 3.5 เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูป 166 กรัม และอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที



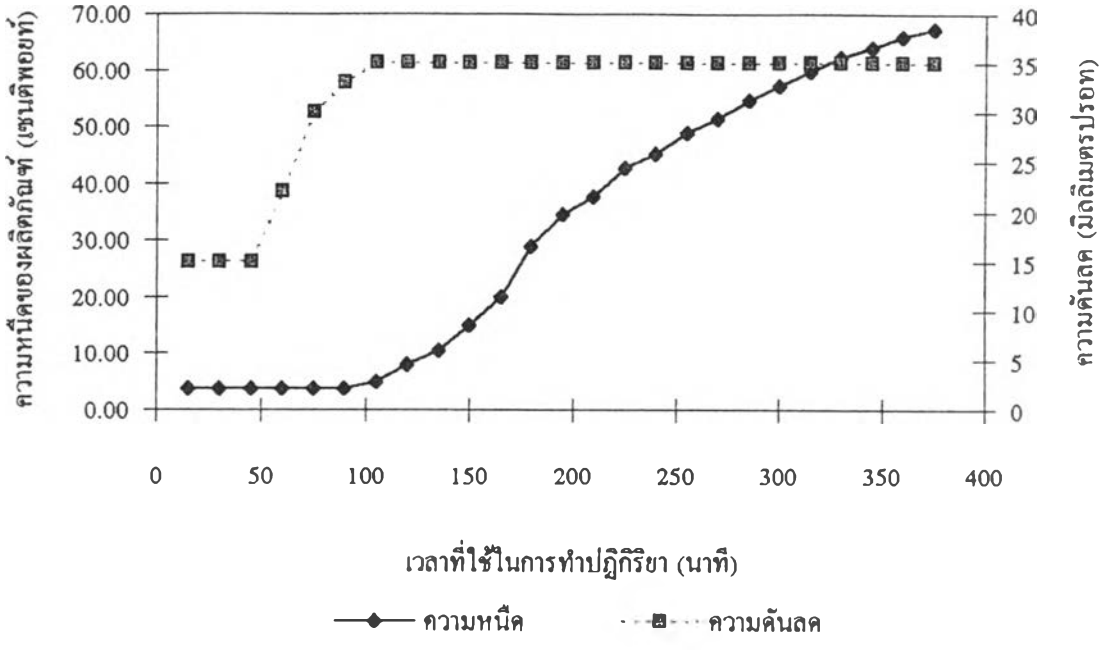
รูปที่ 5.33 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และใช้เอนไซม์ตรึงรูป 166 กรัม และอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที



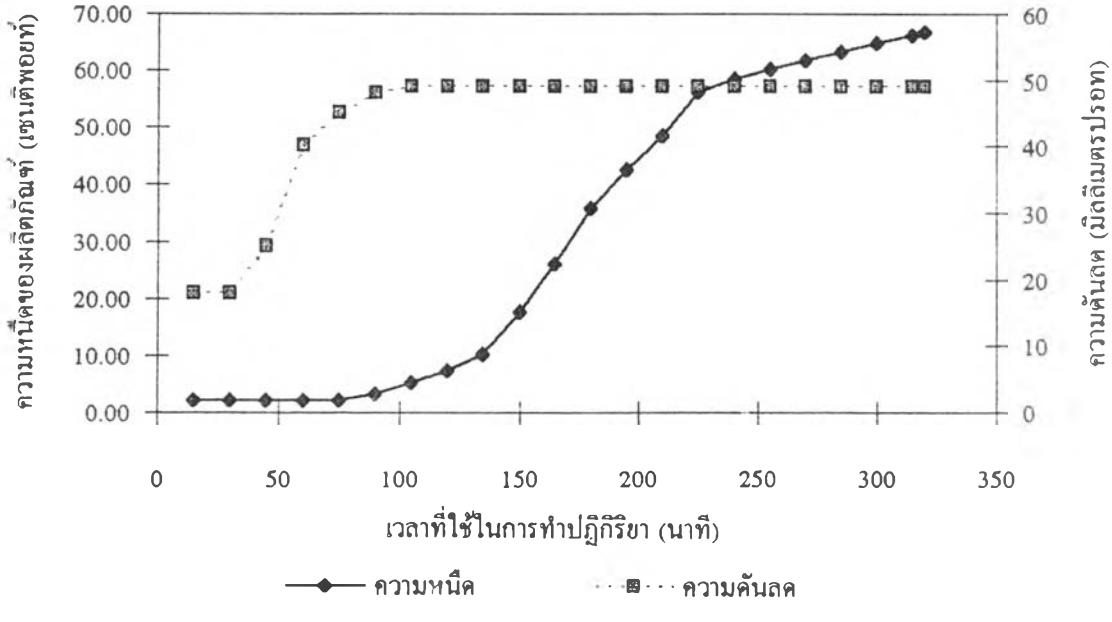
รูปที่ 5.34 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อความดันลดในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 และใช้เอนไซม์ตรึงรูป 166 กรัม และอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกตินเท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อนาที



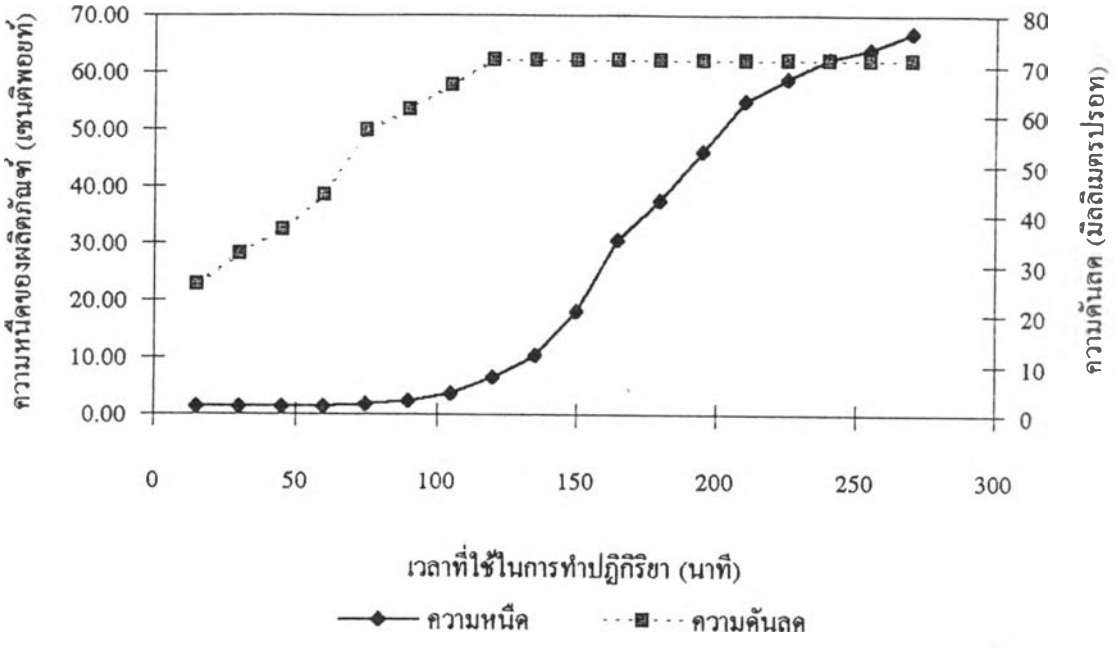
รูปที่ 5.35 แสดงค่าความดันลดของหอปฏิกิริยาแพ็กเบด ที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆ ตั้งแต่ 0.25-1.00 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูป 166 กรัม และอัตราเร็วในการป้อนสารละลายเพกติน 40 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



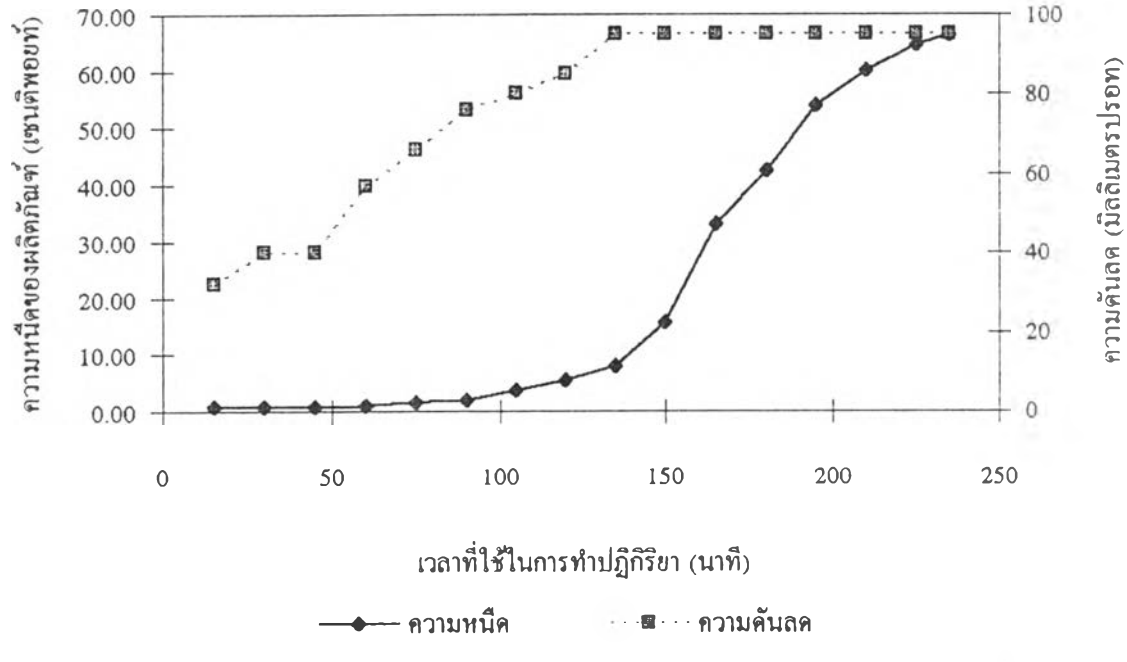
รูปที่ 5.36 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



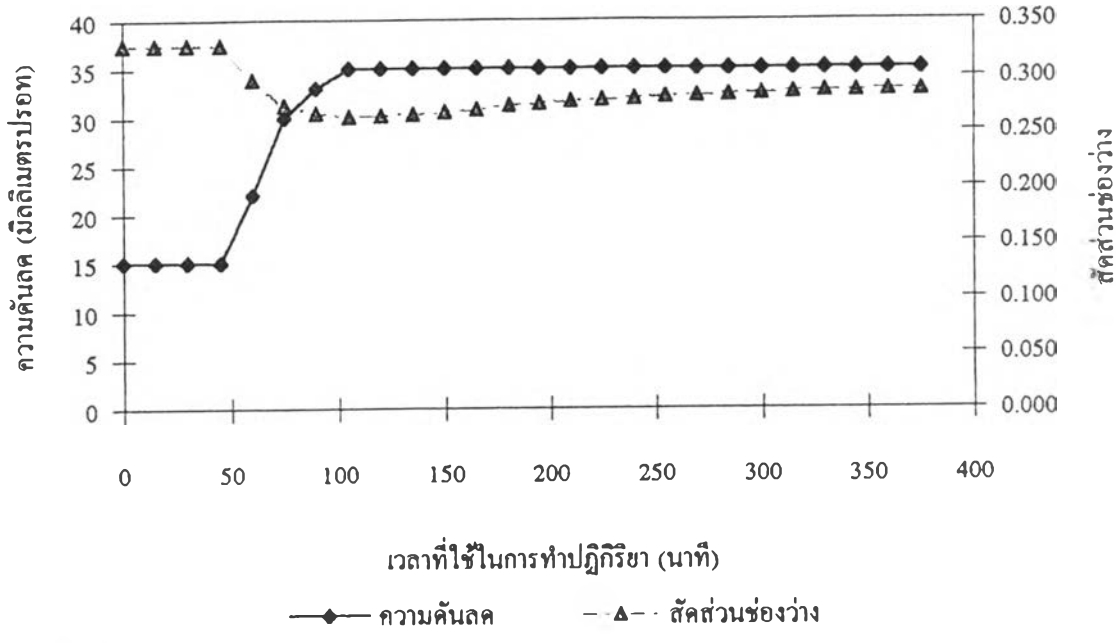
รูปที่ 5.37 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความดันลด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 0.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



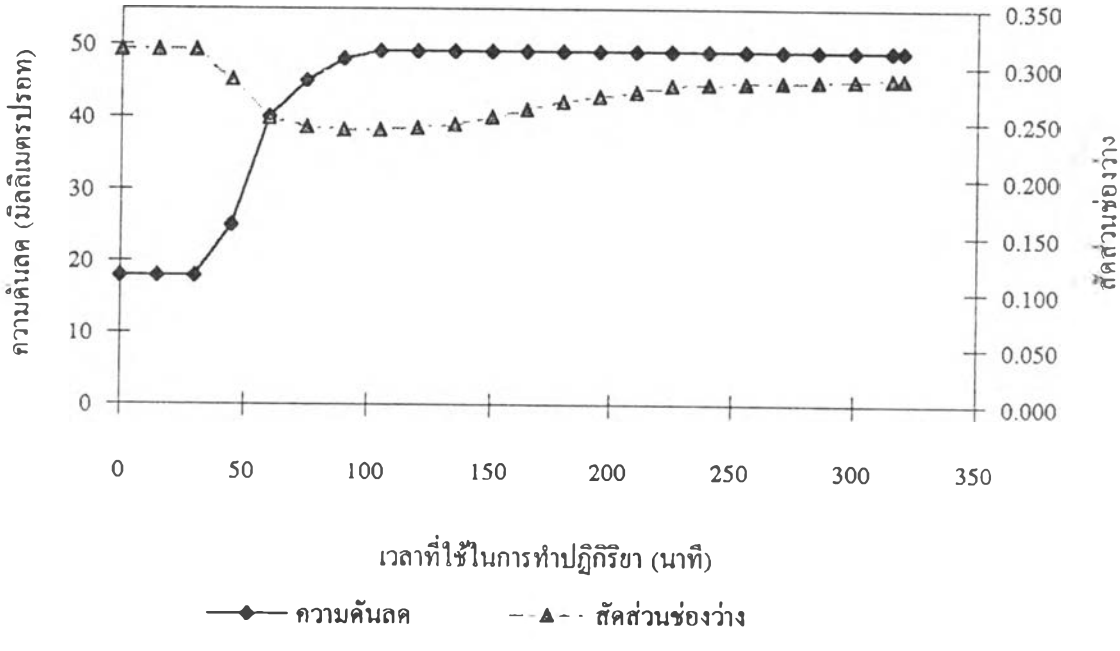
รูปที่ 5.38 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความต้นลด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



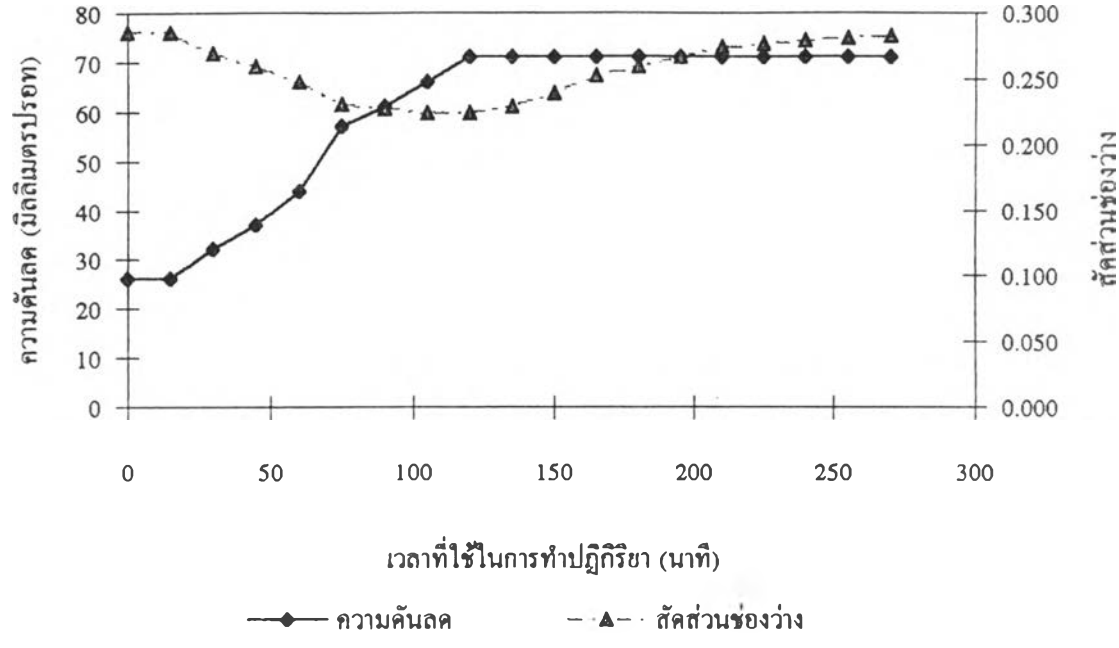
รูปที่ 5.39 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดของผลิตภัณฑ์กับความต้นลด เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 1.00 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



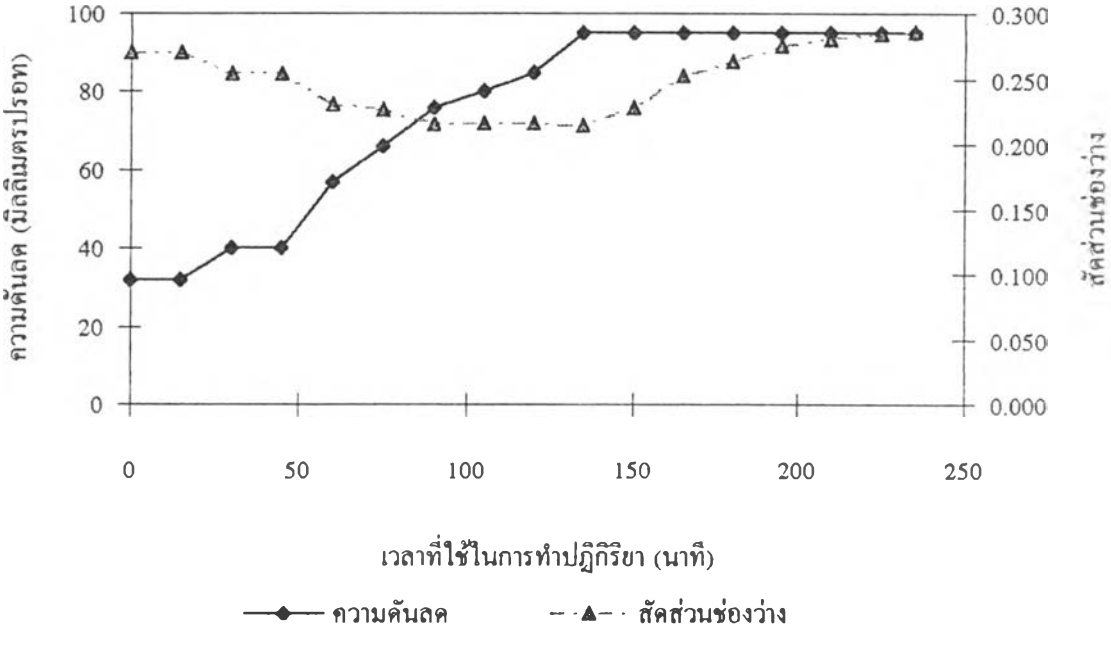
รูปที่ 5.40 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่าง เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



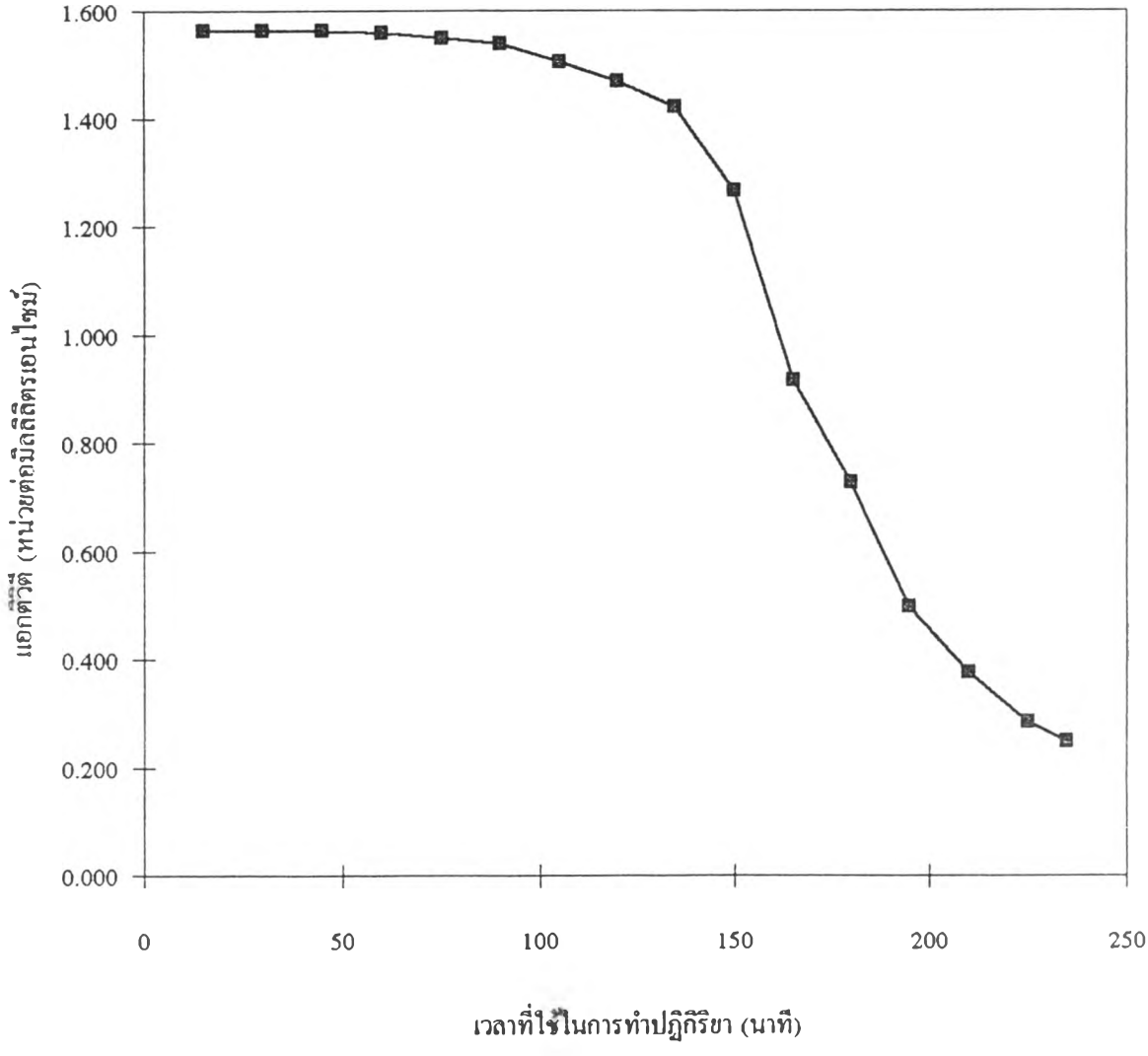
รูปที่ 5.41 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่าง เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 0.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



รูปที่ 5.42 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่าง เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



รูปที่ 5.43 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่าง เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพกติน 1.00 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยอัตราเร็วในการป้อน 40 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5



รูปที่ 5.44 แสดงเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด เมื่อความเข้มข้นของสารละลายสับสเตรตเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง 3.5

สรุปผลการทดลอง

1. การตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนส มีชื่อทางการค้าว่า NOVOFERM 14 บนตัวพยุงที่เป็นเรซิน มีชื่อทางการค้าว่า DOWEX MWA-1 เป็นการตรึงรูปด้วยพันธะไอออนิก ซึ่งภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูป คือ ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง และเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปเท่ากับ 4 ชั่วโมง

2. ภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ คือ ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส

3. ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ พบว่าค่าคงที่ไมเคิลลิสเมนเทน (K_m) ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระมีค่าเท่ากับ 0.0056 และ 0.0148 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ และค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระมีค่าเท่ากับ 19.27 และ 24.69 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความหนืดต่อเวลาตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าค่าคงที่ไมเคิลลิสเมนเทนกับค่าความเร็วสูงสุดของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าน้อยกว่าเอนไซม์อิสระประมาณ 2.6 และ 1.2 เท่าตามลำดับ นั่นคือความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตของเอนไซม์ตรึงรูปมากกว่าเอนไซม์อิสระ แต่อัตราเร็วในการเปลี่ยนสับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ตรึงรูปช้ากว่าเอนไซม์อิสระ

4. อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรตที่สูงขึ้นจะทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายสับสเตรตและความคันลดเพิ่มขึ้น แต่อัตราการลดลงของแอกติวิตีจะเร็วกว่าที่อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรตต่ำ ซึ่งอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรตที่เหมาะสม 40 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้ปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 17.7 กรัม ที่เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

5. ความเข้มข้นของสับสเตรตสูงทำให้อัตราเร็วในการย่อยสลายสับสเตรตและความคันลดสูง และค่าแอกติวิตีที่สูงในช่วงแรกของเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาหรือในช่วงเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ในช่วงหลังที่ความเข้มข้นของสับสเตรตสูง อัตราการลดลงของแอกติวิตีเร็วกว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่ำ เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของสับสเตรตที่เหมาะสมคือ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากความหนาแน่นของตัวพยุงที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่แตกต่างจากสับสเตรตมากนัก และหอปฏิกิริยาแพ็กเบดมักมีปัญหาเกี่ยวกับความดันลดที่สูงเกินไป รวมทั้งอาจมีการอุดตันของอนุภาคแขวนลอยอยู่ในสารป้อน จึงทำให้ระบบหนึ่งที่น่าศึกษาเพื่อช่วยลดปัญหาเหล่านี้ คือ ระบบที่เป็นฟลูอิดไดซ์เบด