หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

ข้อมูลจากการทดลองที่จะกล่าวถึงต่อไปในบทนี้ ทั้งที่เป็นรูปและตาราง เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate)

3.1 ผลการตรึงสเตรพโตมัยซิส 190-1 ที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส

จากการนำเซลที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 5 และ 10 ลิตร มาตรึงตามวิธีการต่าง ๆ ดังกล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.4 พบว่าเซลที่ผ่านการตรึงด้วยความร้อนและขึ้นรูปมีแอคติวิตีสัมพัทธ์สูงสุดคือ 85% เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเซลที่ตรึงด้วยความร้อนแต่ไม่ได้ขึ้นรูป และการตรึงโดยวิธีอื่น ๆ ให้แอคติวิตีสัมพัทธ์ลดหลั่นลงมา ดังแสดงในตารางที่ 9 แต่เม็ดเซลที่ตรึงด้วยความร้อนไม่คงทนต่อการแตกสลาย กล่าวคือเม็ดเซลแตกสลายเกือบทั้งหมดในขณะวัดแอคติวิตี จึงไม่เหมาะแก่การใช้งาน เซลตรึงรูปที่เหมาะสมควรมีความคงทนต่อการแตกสลายสูง พบว่าเมื่อนำเซลที่ตรึงโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ และโดยการใช้กลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับไคโตแซนตามวิธีการดังกล่าวมาทดสอบความคงทนต่อการแตกสลายพบว่าให้ความขุ่นของเซลแขวนลอยเป็น 0.15 และ 0.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ดังนั้นจึงเลือกการตรึงเซล 2 วิธีนี้มาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 ผลของพีเอชต่อการตรึงเซลด้วยกลูตารัลดีไฮด์และด้วยไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์

นำเซลที่ตรึงด้วยความร้อนและขึ้นรูปแล้วมาตรึงในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังวิธีที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.2.2 ยกเว้นแปรค่าความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เป็น 1 % และ 3% ในแต่ละความเข้มข้นแปรค่าพีเอชที่ใช้ในการตรึงระหว่าง พีเอช 4-9 โดย

พีเอช 4, 5 ใช้โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer)

ตารางที่ 9 ผลการตรึงสเตรพโตมัยซิส 190-1 โดยการใช้ความร้อน โซเดียมอัลจิเนท ไคโตแซน กลูตารัลดีไฮด์ และไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์

วิธีการตรึง	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	ความคงทนต่อการแตกสลาย (OD_{600})	เส้นผ่าศูนย์กลางของเซลตรึงรูปขณะแห้ง(มม.)
เซลตรึงด้วยความร้อน (กลุ่มควบคุม) (วิธีที่ 2.4.1)	100	-	ไม่ได้ขึ้นรูป
โซเดียมอัลจิเนท (วิธีที่ 2.4.2)	59	0.35	1.8 (เม็ดชื้น)
ไคโตแซน (วิธี 2.4.3)	60	0.60	1.0
กลูตารัลดีไฮด์ที่ -70 องศาเซลเซียส (วิธี 2.4.4.1)	12	0.87	1.0
เซลขึ้นรูปแล้วตรึงในกลูตารัลดีไฮด์ (วิธี 2.4.4.2)	10	0.15	1.0
กลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับไคโตแซน (วิธี 2.4.5)	16	0.06	1.0
เซลตรึงด้วยความร้อนและขึ้นรูป	85	>2.0	1.0

พีเอช 6, 7, 8 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer)

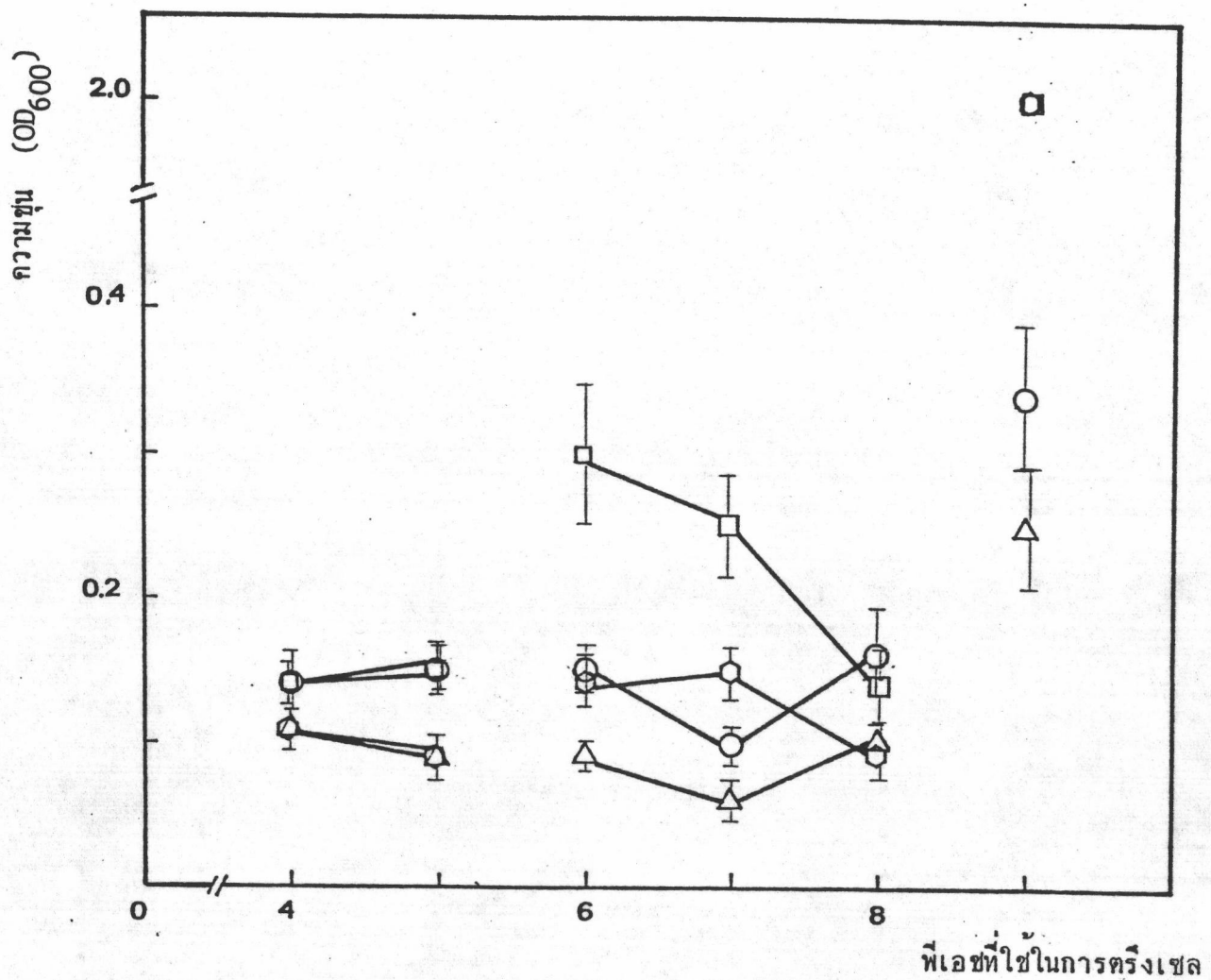
พีเอช 9 ใช้ทริสบัฟเฟอร์ (Tris buffer)

และนำเซลที่ตรึงด้วยไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.5 ยกเว้นแปรค่าความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เป็น 1% และ 3% ในแต่ละความเข้มข้นแปรค่าพีเอชระหว่าง 4-9 ตามลำดับ โดยใช้บัฟเฟอร์เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จากผลการทดลองพบว่า (รูปที่ 16) ที่พีเอช 9.0 มีการแตกสลายของเซลตรึงรูปสูง โดยเฉพาะวิธีตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งแตกสลายเกือบทั้งหมด แต่แอคติวิตีสัมพัทธ์มีค่าสูงเมื่อเทียบกับเซลตรึงด้วยความร้อน(รูปที่ 17) เพราะการแตกสลายทำให้เอนไซม์สัมผัสกับกลูโคสได้ดีขึ้น มีการถ่ายเทมวลดีขึ้น จึงให้แอคติวิตีสัมพัทธ์สูง

การตรึงโดยใช้ไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ให้ผลดีกว่ากลูตารัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียว ในช่วงพีเอช 5-9 อีกทั้งยังมีความคงทนต่อการแตกสลายดีกว่าในช่วงพีเอช 6-9 ส่วนช่วงพีเอช 4-5 ให้ผลใกล้เคียงกัน (รูปที่ 16) การตรึงที่เหมาะสม คือการใช้ไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ที่พีเอช 5.0 เพราะเป็นพีเอชที่ให้แอคติวิตีสัมพัทธ์สูงและมีความคงทนต่อการแตกสลายดีพอควร ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกตรึงที่พีเอช 5.0

3.3 <u>อิทธิพลของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

นำเซลที่ตรึงโดยวิธีที่กล่าวไว้ใน ข้อ 2.4.5 คือใช้ไคโตแซนตรึงร่วมกับ 1% กลูตารัลดีไฮด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บ่มไว้ในสารละลายที่มีองค์ประกอบ ดังกล่าวไว้ใน ข้อ 2.5.1.3 ยกเว้นใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ คือ 5.0 ถึง 9.0 ที่ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ กำหนดให้พีเอชที่ให้แอคติวิตีสูงสุดมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 100% เทียบกับเซลที่ตรึงด้วยความร้อนโดยใช้สภาวะเช่นเดียวกันและให้พีเอชที่มีแอคติวิตีสูงสุดมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 100% เช่นกัน ผลการทดลองในรูปที่ 18 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในเซลตรึงรูปจะสูงกว่าของเซลที่ตรึงด้วยความร้อน คือ แอคติวิตีสูงสุดของเซลตรึงรูปอยู่ที่พีเอช 8.0 ขณะที่แอคติวิตีสูงสุดของเซลตรึงด้วยความร้อนอยู่ที่พีเอช 7.0 ดังนั้นในการทดลองต่อไปการหาแอคติวิตีของเซลตรึงรูปจะบ่มที่ พีเอช 8.0 ส่วนกลุ่มควบคุม (control group) ที่ใช้เซลที่ตรึงด้วยความร้อน จะบ่มที่พีเอช 7.0 ตามเดิม



รูปที่ 16 ผลของพีเอชในการตรึงเซลต่อความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตรึงรูป เมื่อตรึงเซลโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 2.4.4.2 และใช้กลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับไคโตแซนตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 2.4.5 โดยผันแปรพีเอชต่าง ๆ ต่อไปนี้

พีเอช 4-5 ใช้ 0.5 โมลาร์โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์

พีเอช 6-8 ใช้ 0.5 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

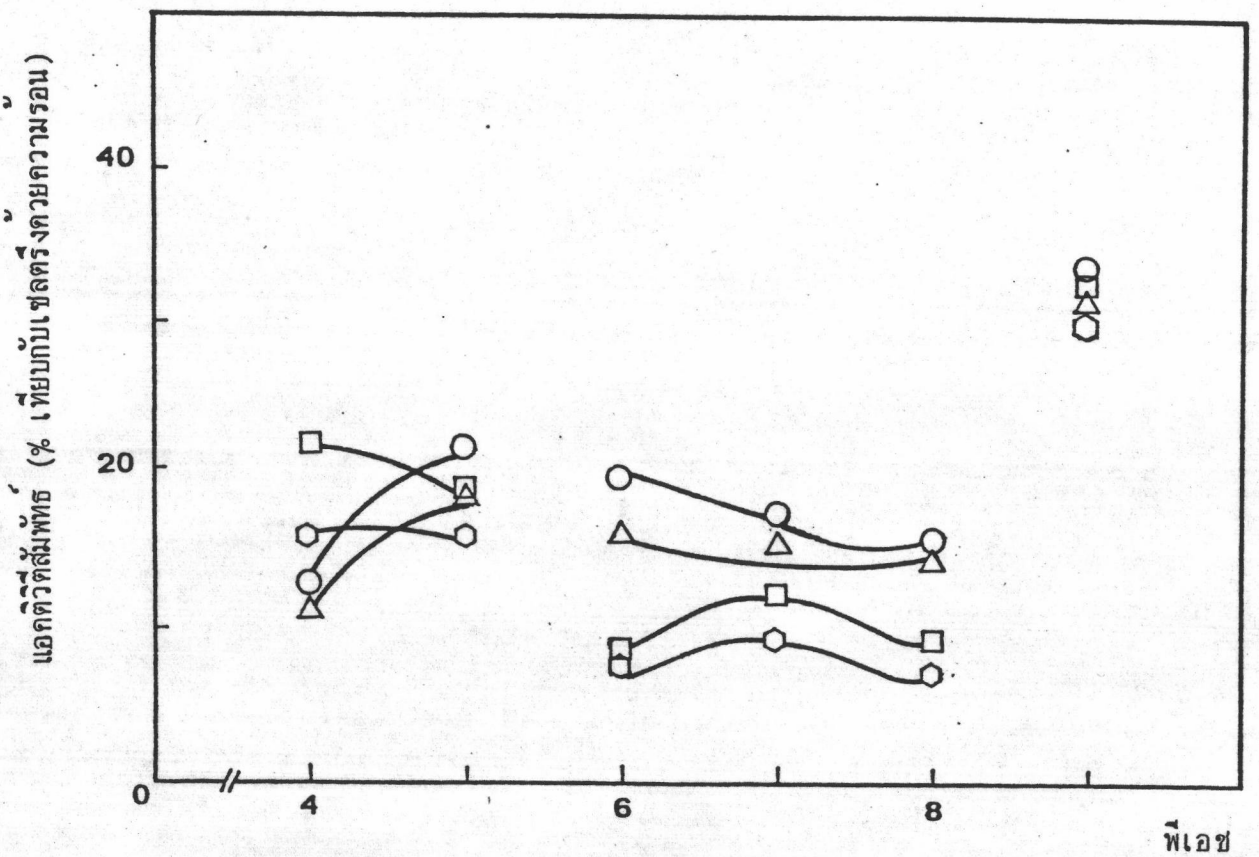
พีเอช 9 ใช้ 0.5 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์

(○) ไคโตแซนร่วมกับ 1% กลูตารัลดีไฮด์

(△) ไคโตแซนร่วมกับ 3% กลูตารัลดีไฮด์

(□) 1% กลูตารัลดีไฮด์

(⬡) 3% กลูตารัลดีไฮด์



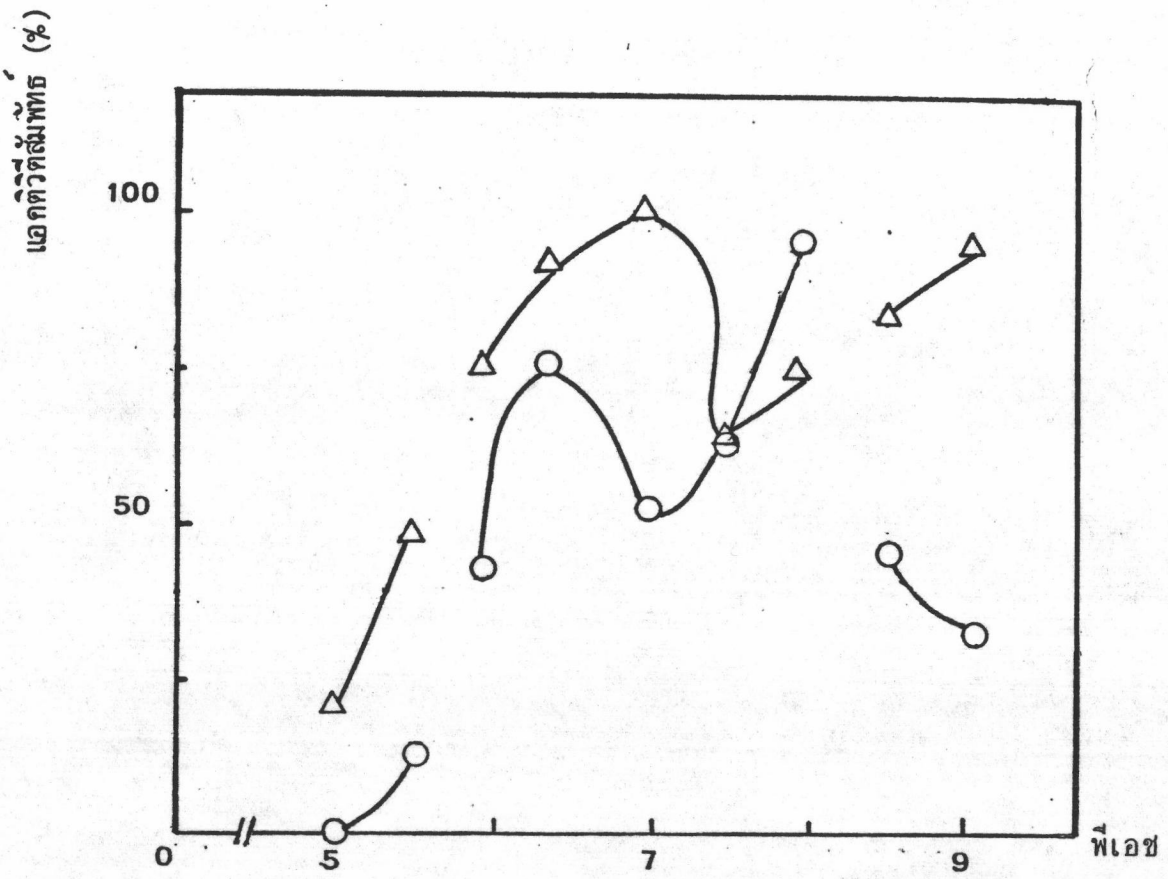
รูปที่ 17 ผลของพีเอชในการตรึงเซลต่อแอคติวิตีคงเหลือของเซลตรึงรูป เมื่อตรึงเซลตามวิธีที่แสดงไว้ในรูป 16

(○) ไคโตแซนร่วมกับ 1% กลูตารัลดีไฮด์

(△) ไคโตแซนร่วมกับ 3% กลูตารัลดีไฮด์

(□) 1% กลูตารัลดีไฮด์

(⬡) 3% กลูตารัลดีไฮด์



รูปที่ 18 อิทธิพลของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเซลตรึงรูป นำเซลตรึงรูปบ่มในสารละลายผสมของ 0.5 โมลาร์กลูโคส 0.005 โมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต 1×10^{-4} โมลาร์โคบอลท์คลอไรด์ และ 0.15 โมลาร์บัฟเฟอร์ ซึ่งผันแปรพีเอชตั้งแต่ 5.0-9.0 เป็นเวลา 30 นาที เทียบกับเซลตรึงด้วยความร้อนที่บ่มในสภาวะเดียวกันโดย

พีเอช 5.0-5.5 ใช้โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์

พีเอช 6.0-8.0 ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอช 8.5-9.0 ใช้ทริสบัฟเฟอร์

กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดของเซลแต่ละวิธีการตรึงมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 100%

(○) เซลตรึงรูป

(△) เซลตรึงด้วยความร้อน

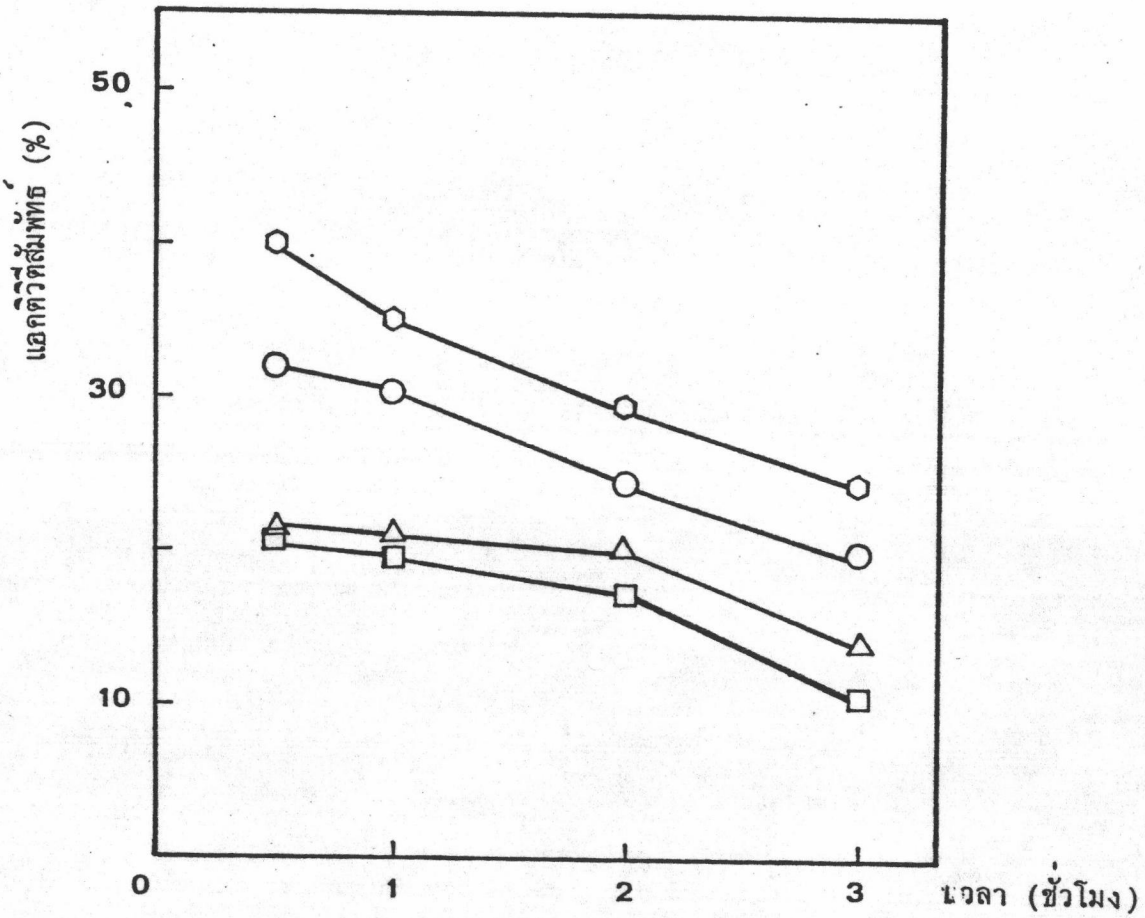
3.4 ผลของความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์และเวลาที่ใช้ในการตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับไคโตแซน

จากการตรึงเซลสเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 โดยใช้ไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ ดังสภาวะการตรึงที่กล่าวไว้ในข้อที่ 3.3ยกเว้นแปรค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็น 1, 2 และ 3% โดยในแต่ละความเข้มข้นแปรค่าเวลาในการตรึงเป็น Ø.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ ขึ้นรูปโดยใช้หัวฉีดขนาด 1 มม. พบว่าสภาวะที่ให้แอคติวิตีสัมพัทธ์สูงสุด คือที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ Ø.5% และใช้เวลาในการตรึง Ø.5 ชั่วโมง โดยให้แอคติวิตีสัมพัทธ์ 4Ø% ดังแสดงในรูปที่ 19 แต่จากผลการทดลองในรูปที่ 2Ø จะเห็นได้ว่าสภาวะการตรึงที่ให้ความคงทนต่อการแตกสลายสูงอยู่ในกลุ่มที่ใช้เวลาในการตรึง 1 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าความขุ่นใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วงการดูดกลืนแสงที่ 6ØØ นาโนเมตร ตั้งแต่ Ø.Ø73-Ø.Ø96 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้สภาวะในการตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น Ø.5% ใช้เวลาในการตรึง 1 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะเป็นสภาวะที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์น้อยที่สุด แต่ให้แอคติวิตีสัมพัทธ์สูงถึง 35% และคงทนต่อการแตกสลายสูง

3.5 ผลของเวลาที่ใช้ในการบ่มล่วงหน้า (preincubation)ของเซลตรึงรูป

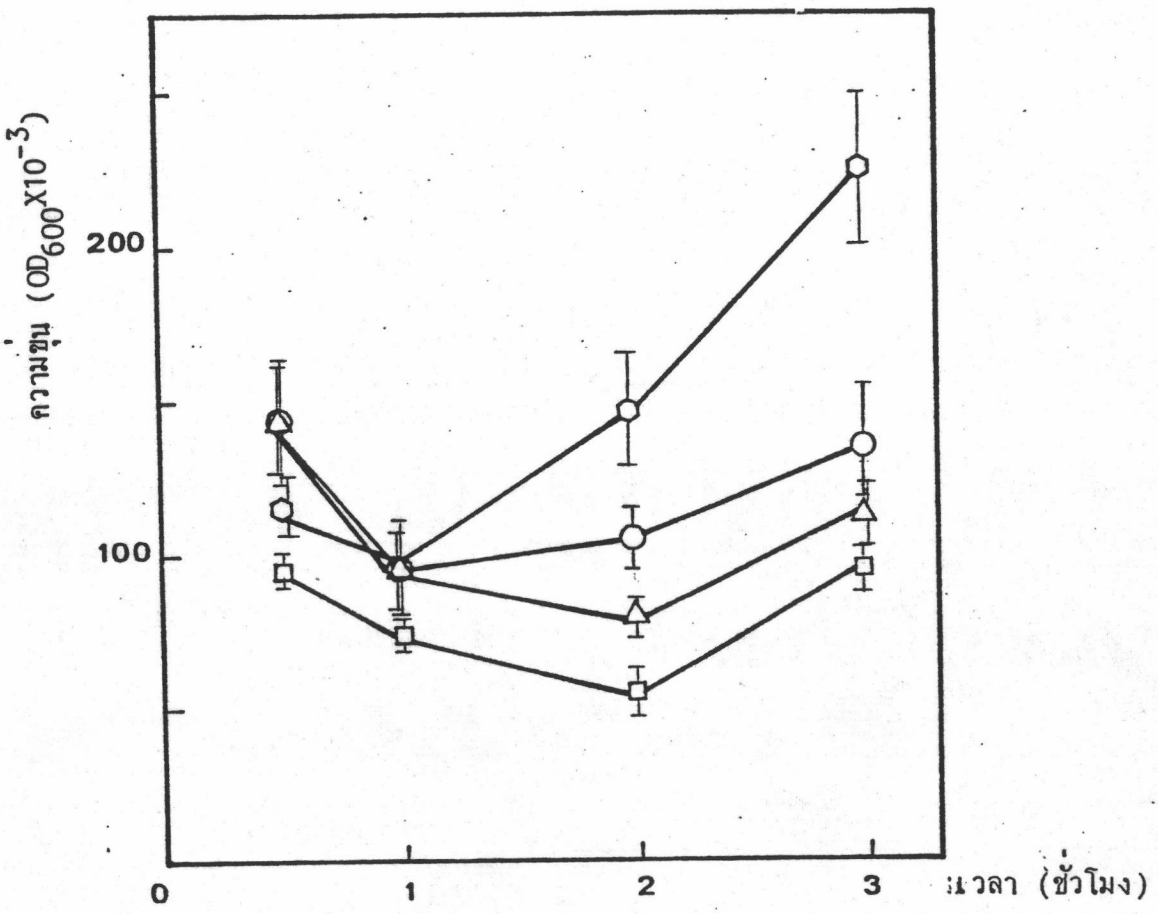
หลังจากการตรึงเซลด้วยไคโตแซนและกลูตารัลดีไฮด์แล้ว ขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการคือการทำเซลให้แห้งและตัดเป็นท่อน เซลตรึงรูปที่แห้งแล้วจะมีขนาดเล็กลงเนื่องจากเซลตรึงรูปเสียความชื้นจึงมีการหดตัว จากผลการทดลองในตารางที่ 1Ø พบว่า เซลตรึงรูปที่แห้งแล้วจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางลดลงประมาณ 25% ซึ่งจะทำให้มีปริมาตรลดลง 4Ø% ดังนั้นในการวัดแอคติวิตีของเซลตรึงรูปจึงต้องบ่มเซลล่วงหน้า (preincubate) ให้เซลตรึงรูปบวมเต็มที่เพื่อให้มีประ สิทธิภาพการถ่ายเทมวลสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทสสูงสุดก่อนนำไปบ่มในสารละลายของปฏิกิริยา

จากการทดลองบ่มเซลตรึงรูปล่วงหน้าก่อนนำไปวัดแอคติวิตีโดยผันแปรเวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ Ø ถึง 26 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาสั้นที่สุดที่ทำให้เซลตรึงรูปบวมตัวเต็มที่และมีแอคติวิตีสูงสุด คือ 8 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 21 ดังนั้นในการทดลองต่อไป การวัดแอคติวิตีของเซลตรึงรูปจะบ่มให้เซลบวมก่อนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง



รูปที่ 19 ผลของความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการตรึงกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีคงเหลือของเซลตรึงรูป โดยการตรึงเซลด้วยวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 4.5 แต่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5–3.0 % และแปรผันเวลาตั้งแต่ 0.5–3.0 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.0 ในสารละลาย 0.5 โมลาร์โซเดียมอะซีเตต เปรียบเทียบกับเซลตรึงด้วยความร้อน โดยกำหนดให้เซลตรึงด้วยความร้อนมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100%

(⬡) ไคโตแซนรวมกับ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์
(○) ไคโตแซนรวมกับ 1% กลูตารัลดีไฮด์
(△) ไคโตแซนรวมกับ 2% กลูตารัลดีไฮด์
(□) ไคโตแซนรวมกับ 3% กลูตารัลดีไฮด์



รูปที่ 20 ผลของความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ต่อความคงทนต่อการแตกสลายของเซลตรึงรูป โดยการตรึงเซลด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่เวลาและความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการตรึงด้วยไคโตแซน ตามวิธีการตรึงในรูปที่ 19

(⬡) ไคโตแซนร่วมกับ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์

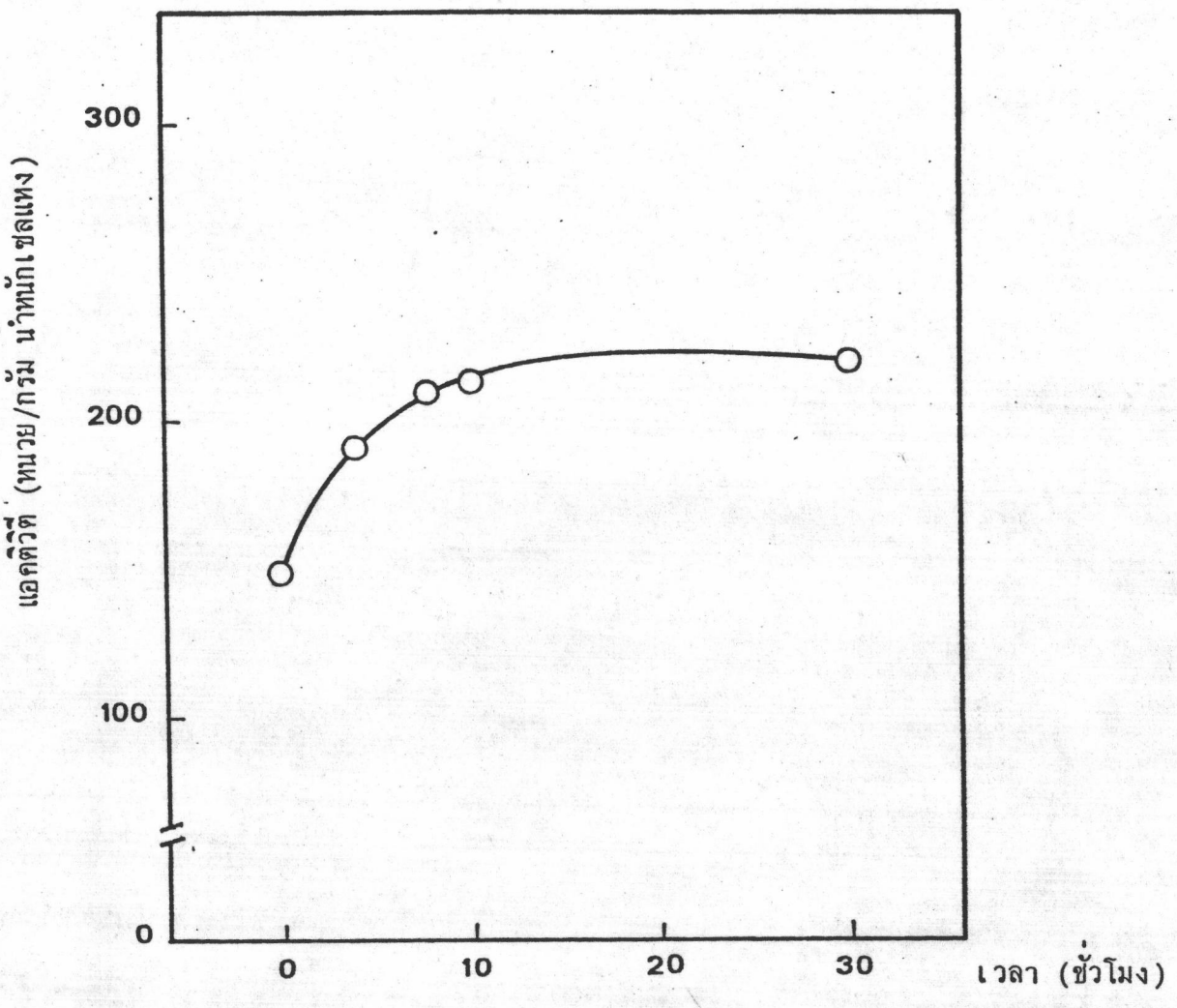
(○) ไคโตแซนร่วมกับ 1% กลูตารัลดีไฮด์

(△) ไคโตแซนร่วมกับ 2% กลูตารัลดีไฮด์

(□) ไคโตแซนร่วมกับ 3% กลูตารัลดีไฮด์

ตารางที่ 10 ผลของการทำให้แห้งต่อขนาดของเซลตริงรูป เมื่อผ่านการทำให้แห้งตามวิธีที่บรรยายไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.5 หลังการตริงเซล

เซลตริงรูป	ความชื้น (%)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มม.)	ปริมาตรสัมพัทธ์ (%)
ก่อนทำให้แห้ง	80	1	100
หลังทำให้แห้ง	12	0.78	60



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการบ่มล่วงหน้าของเอนไซม์ในเซลตรึงรูปและแอคติวิตี

ตรึงเซลด้วยไกโตแซนร่วมกับ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บ่มเซลตรึงรูปในสารละลายของปฏิกิริยาสำหรับวัดแอคติวิตีพีเอช 8.0 โดยแปรผันเวลาในการบ่มล่วงหน้าตั้งแต่ 0-26 ชั่วโมง

3.6 การศึกษาสมบัติของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 ในสภาพเซลตรึงรูป

3.6.1 ความเสถียรต่อพีเอชของเอนไซม์

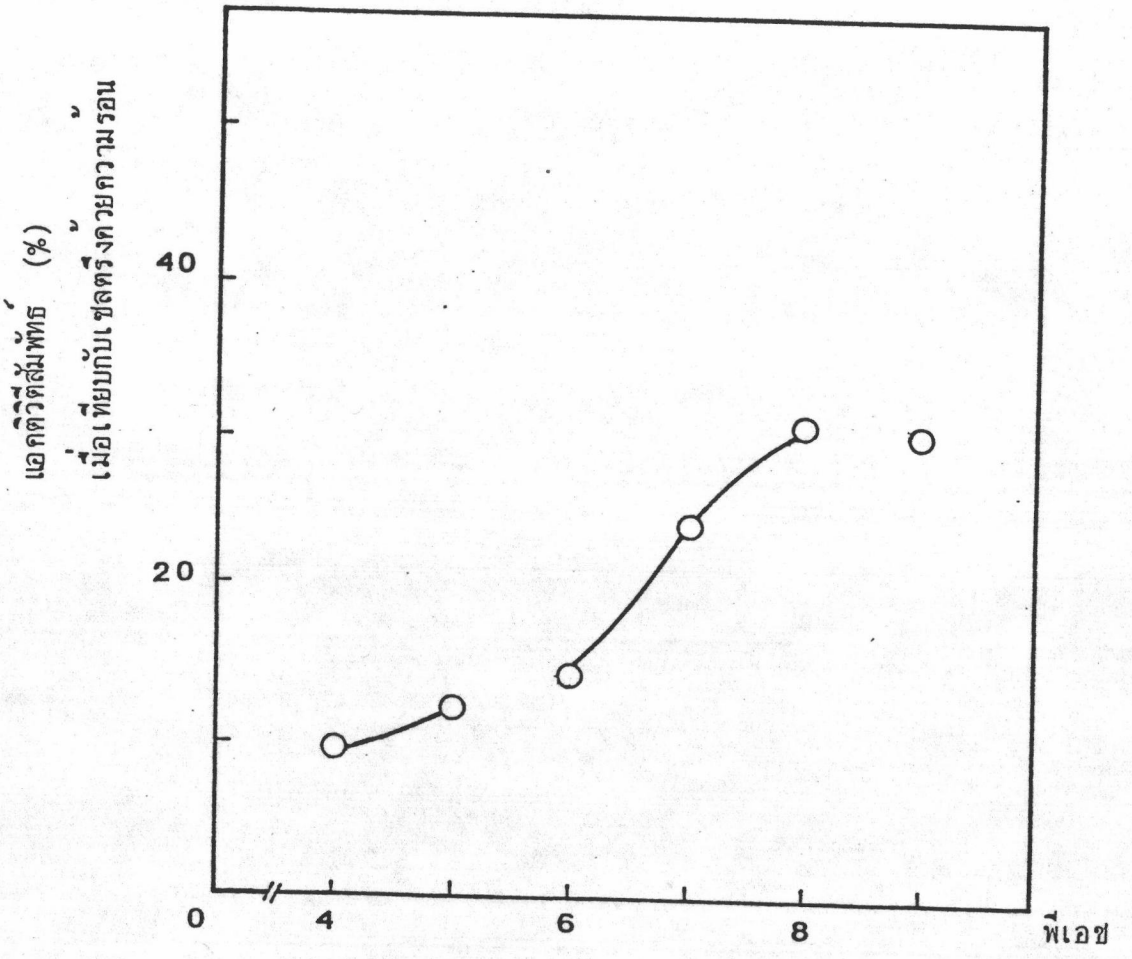
จากการตรวจสอบความเสถียรต่อพีเอชของเอนไซม์ในสภาพเซลตรึงรูปโดยบ่มเซลตรึงรูปที่ตรึงด้วยไคโตแซนร่วมกับ Ø.5% กลูตารัลดีไฮด์ ดังสภาวะที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.4 และเซลที่ตรึงด้วยความร้อนที่พีเอชต่าง ๆ คือ 4-9 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีคงเหลือของเซลตรึงรูปโดยไม่ต้องบ่มล่วงหน้าอีก เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเซลที่ตรึงด้วยความร้อน จากผลการทดลองในรูปที่ 22 พบว่า เซลตรึงรูปมีความเสถียรต่อพีเอชในช่วงที่เป็นกลางและเป็นด่าง โดยมีความเสถียรสูงสุดในช่วงพีเอชระหว่าง 8-9 คือ มีแอคติวิตีสัมพัทธ์ประมาณ 3Ø% เมื่อเทียบกับเซลที่ตรึงด้วยความร้อน ในขณะที่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดเอนไซม์ของเซลตรึงรูปจะมีความเสถียรต่ำกว่า ดังแสดงในรูปที่ 23

3.6.2 ความเสถียรต่อความร้อนของเอนไซม์

นำเซลตรึงรูปที่ผ่านการบ่มล่วงหน้า 8 ชั่วโมงในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8.Ø มาบ่มต่อในสารละลายดังกล่าว เป็นเวลา 3Ø นาที โดยผันแปรอุณหภูมิในการบ่มตั้งแต่ 3Ø-9Ø องศาเซลเซียส ขณะเดียวกันนำเซลตรึงด้วยความร้อนที่บ่มในสภาวะที่แปรผันอุณหภูมิเดียวกันแต่ไม่มีการบ่มล่วงหน้าและควบคุมพีเอชที่ 7.Ø จากนั้นนำมาตรวจสอบแอคติวิตีคงเหลือของเอนไซม์

จากการทดลองพบว่า ความเสถียรต่อความร้อนของเซลตรึงรูปเมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเซลที่ตรึงด้วยความร้อนและไม่ผ่านการบ่ม เซลตรึงรูปจะมีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิช่วง 3Ø-5Ø องศาเซลเซียส โดยมีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 45% จากนั้นความเสถียรจะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบเสถียนภาพต่อความร้อนของเอนไซม์ในเซลตรึงรูปด้วยไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ และเอนไซม์ในเซลที่ผ่านการตรึงด้วยความร้อนดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่า เอนไซม์ที่เตรียมได้ทั้ง 2 วิธีมีความเสถียรต่อความร้อนไม่แตกต่างกันมากนัก โดยในช่วงอุณหภูมิ 3Ø-6Ø องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างช้าๆ แต่ที่ 7Ø องศา



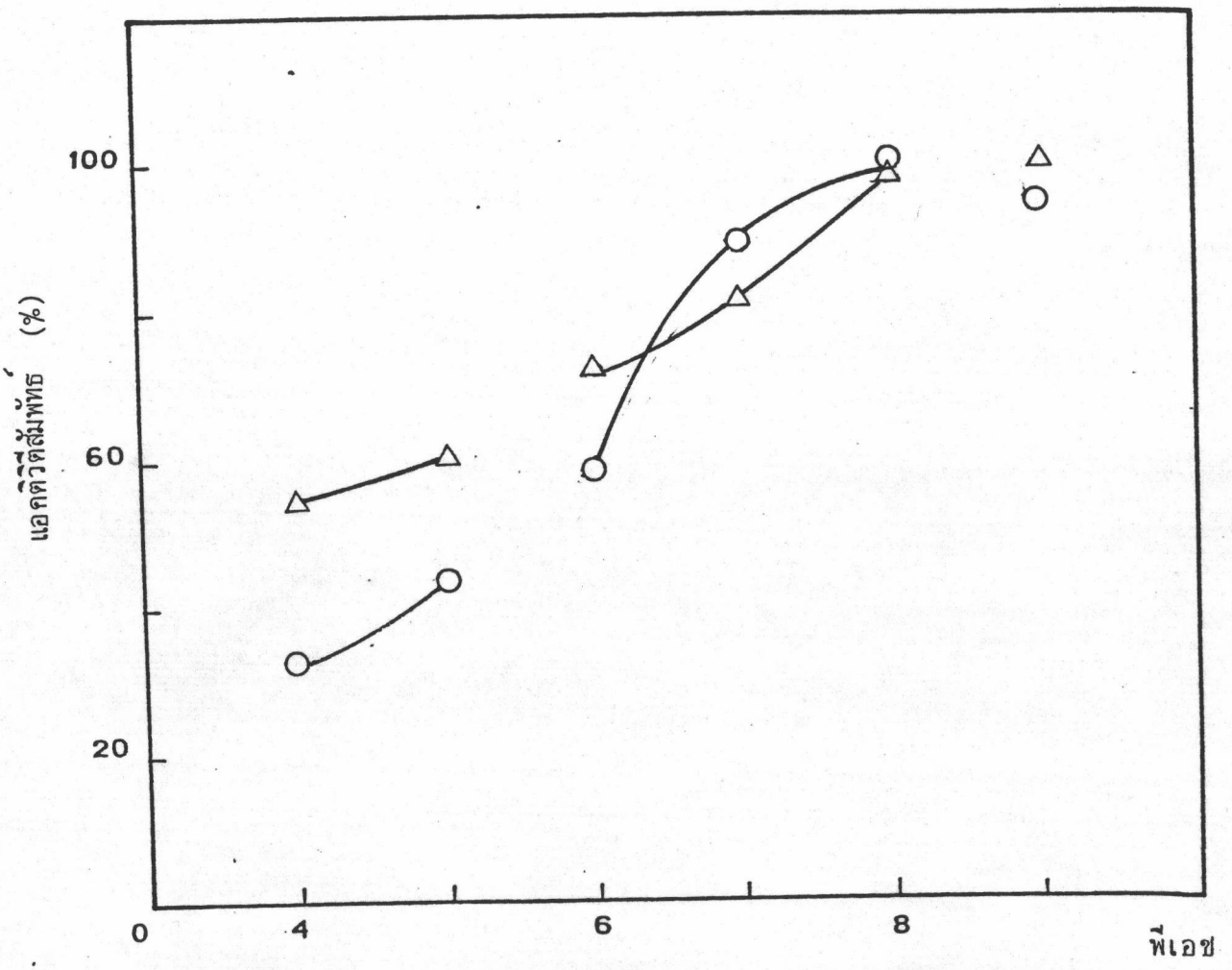
รูปที่ 22 ความเสถียรต่อพีเอชของเอนไซม์ในเซล ตรึงรูป โดยนำเซล ตรึงรูปมาบ่มในบัฟเฟอร์ต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนี้

พีเอช 4–5 บ่มใน 0.15 โมลาร์โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์

พีเอช 6–8 บ่มใน 0.15 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอช 9 บ่มใน 0.15 โมลาร์ทริสบัฟเฟอร์

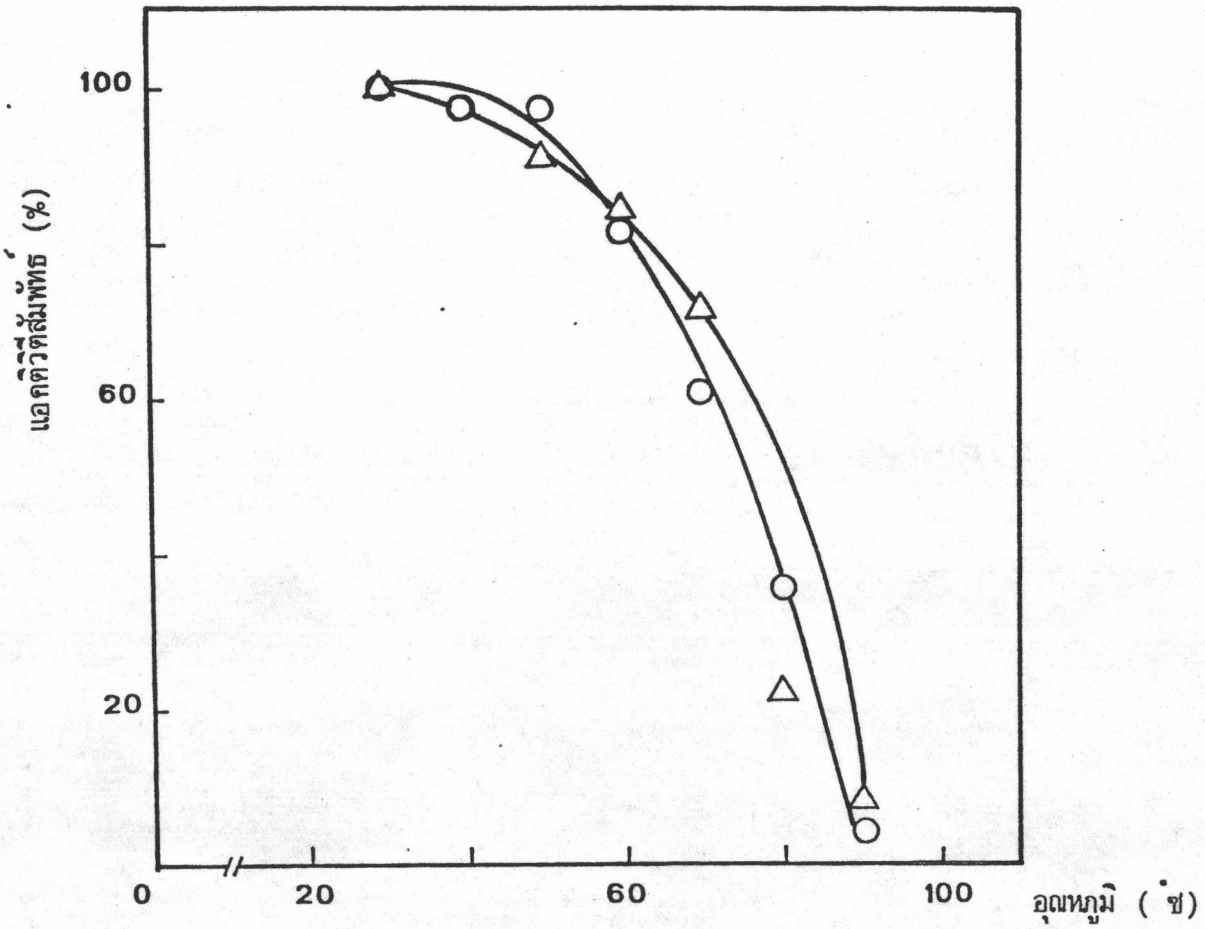
นำมาวัดแอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.5.1.3 ยกเว้นควบคุมพีเอชที่ 8.0 และไม่ต้องบ่มเซลล่วงหน้า



รูปที่ 23 ความเสถียรต่อพีเอชของเซล ตรึงรูปเทียบกับเซล ที่ตรึงด้วยความร้อนนำเซล ที่ผ่านการตรึงด้วยความร้อนมาบ่มที่พีเอชต่าง ๆ ดังกล่าวในรูปที่ 22 นำมาวัดแอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.5.1.1 เปรียบเทียบกับความเสถียรของเอนไซม์ในเซล ตรึงรูป ดังบรรยายไว้ในรูปที่ 22 กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดของการตรึงแต่ละวิธีมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 100%

(○) ไคโตแซนร่วมกับ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์

(△) เซลที่ตรึงด้วยความร้อน



รูปที่ 24 ความเสถียรต่อความร้อนของเอนไซม์ในเซล ตรึงรูปและเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยความร้อน บ่มเซล ตรึงรูปในสารละลาย 0.15 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ที่ 4ซ 8 ชั่วโมง เพื่อให้เซล บวมเต็มที่ จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ซึ่งแปรผันตั้งแต่ 30-90ซ 30 นาที นำมาวัดแอคติวิตีคงเหลือภายใต้สภาวะดังกล่าวในรูปที่ 22 เปรียบเทียบกับการตรึงด้วยความร้อนซึ่งบ่มใน 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 โดยแปรผันอุณหภูมิ และใช้เวลาในการบ่มเช่นเดียวกับเซล ตรึงรูป นำมาวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 2.5.1.1 กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดของแต่ละวิธีการมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100%

(○) ไคโตแซนรวมกับ 0.5% กลูตารัลดีไฮด์

(△) เซล ชั้น

เซลเซียสขึ้นไปเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว

3.6.3 ความเสถียรในการเก็บรักษา (storage stability) เซลตรึงรูป

นำเซลตรึงรูปที่ทำให้แห้งและตัดเป็นท่อนเล็ก ๆ แล้ว มาเก็บที่สภาวะต่าง ๆ ดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ -2Ø องศาเซลเซียส 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้องในสภาพแห้ง กับที่ 4 องศาเซลเซียสในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Ø.15 โมลาร์ พีเอช 8.Ø นำเซลตรึงรูปที่เก็บด้วยวิธีต่างๆ มาวัดแอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ใต้รูปที่ 22 ยกเว้นมีการบ่มเซลตรึงรูปล่วงหน้า 8 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส

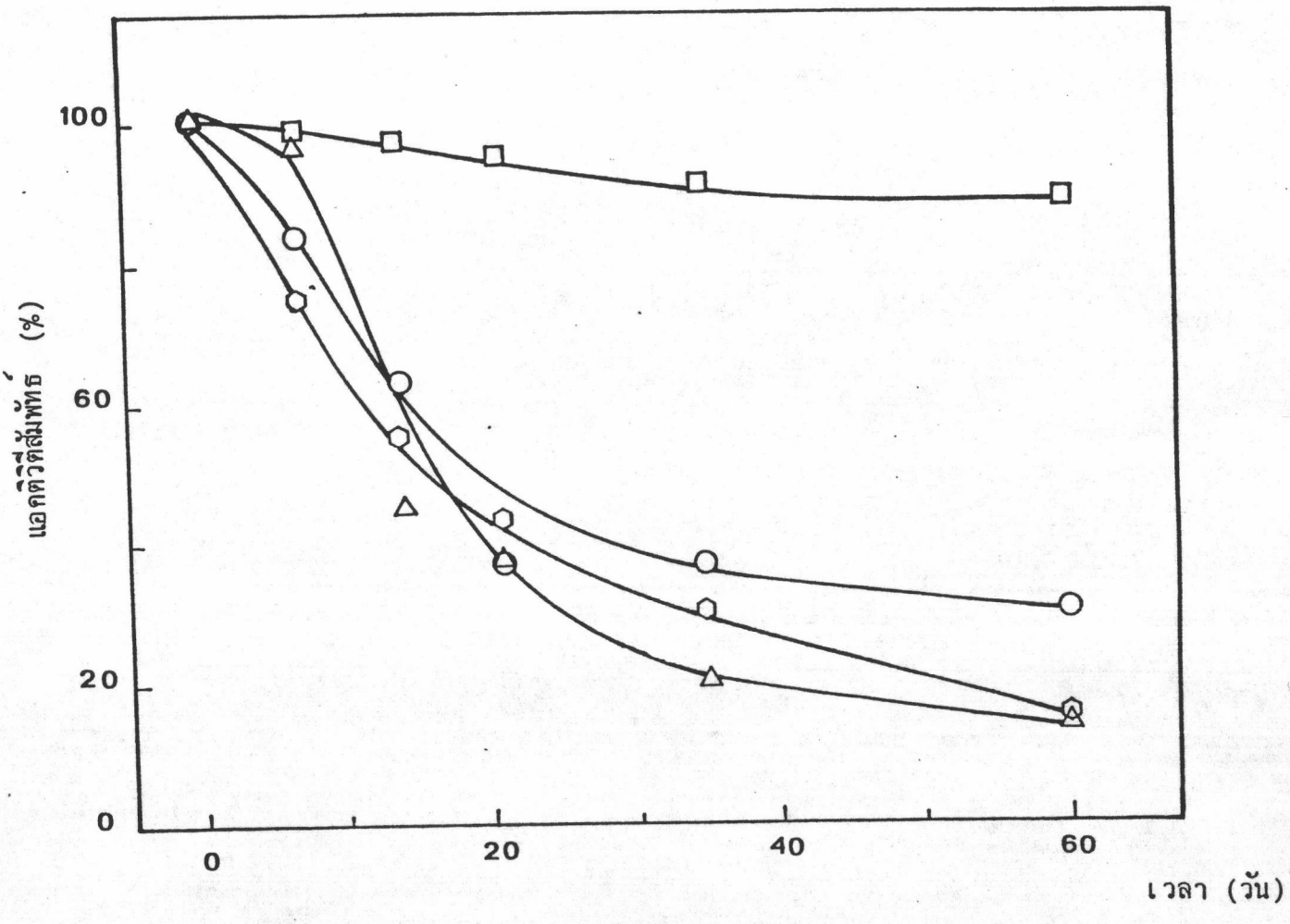
ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 25 พบว่า เอนไซม์จะเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วในการเก็บที่ -2Ø องศาเซลเซียส 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องในสภาพแห้ง ทั้ง 3 วิธีดังกล่าวจะมีครึ่งชีวิตในการเก็บ (storage half life) ใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 14-18 วัน ส่วนวิธีแช่ในบัฟเฟอร์ที่ 4 องศาเซลเซียสนั้นจากการประมาณค่า (extrapolate) ครึ่งชีวิต โดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least square method) (ภาคผนวก 3) พบว่ามีครึ่งชีวิตประมาณ 25Ø วัน หรือ 8.3 เดือน

3.6.4 ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลของเซลตรึงรูป

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลของเซลตรึงรูปตามวิธีการที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.5.3 พบว่า เซลตรึงรูปมีประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลเท่ากับ Ø.55 ดังแสดงในตารางที่ 11

3.6.5 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่ออัตราเร็วของเอนไซม์

จากการวัดแอคติวิตีตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.5.1.3 ยกเว้นควบคุมที่พีเอช 8.Ø บ่มเซลล่วงหน้า 8 ชั่วโมง และผันแปรความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ Ø.1, Ø.2, Ø.5, Ø.6, Ø.7 และ 1.Ø โมลาร์ จากนั้นเขียนกราฟระหว่าง 1/ความเข้มข้นกลูโคส และ 1/อัตราเร็วของปฏิกิริยา พบว่าเซลตรึงรูปมีค่าคงที่ไมคาลิสเป็น Ø.31 โมลาร์ ความสัมพันธ์



รูปที่ 25 ความเสถียรในการเก็บรักษาเซล ตรึงรูป

แสดงผลการเก็บเซลตรึงรูปในสภาวะต่าง ๆ คือ ที่อุณหภูมิ -20 °ซ ในสภาพแห้ง ที่ 4 °ซ ในสภาพแห้ง ที่ 4 °ซ ในสารละลาย 0.15 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 8.0 และที่อุณหภูมิห้องในสภาพแห้ง

เซลตรึงรูปที่เก็บในสารละลาย 0.15 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ 4 °ซ มีครึ่งชีวิตนานที่สุด คือ 250 วัน

(○) เก็บที่ -20 °ซ ในสภาพแห้ง

(△) เก็บที่ 4 °ซ ในสภาพแห้ง

(□) เก็บที่ 4 °ซ ใน 0.5 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

(⬡) เก็บที่อุณหภูมิห้องในสภาพแห้ง

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลของเซลตริงรูป

เซลตริงรูป	แอคติวิตี (หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้ง)
เซลตริงรูปที่ไม่บด	470
เซลตริงรูปที่บดแล้ว	850
ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล (effectiveness factor)	0.55

ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสและอัตราเร็วปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูปที่ 26 ก ส่วน ความสัมพันธ์ระหว่าง 1/ความเข้มข้นกลูโคส และ 1/อัตราเร็วปฏิกิริยาแสดงไว้ในรูปที่ 26 ข

3.7 การใช้เฟอรัสซัลเฟตเพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แทนการใช้โคบอลท์คลอไรด์

จากการศึกษาผลของตัวกระตุ้นการทำงาน (activator) ของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 พบว่าเอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่อมี แมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) และโคบอลท์อิออน (Co^{2+}) ร่วมกัน (59) ดังนั้นจึงใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ร่วมกับโคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2$) ในสารผสมของปฏิกิริยา แต่เนื่องจากโคบอลท์เป็นสารพิษ ดังนั้นในการผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทสความเข้มข้นสูงสำหรับบริโภคจึงต้องหลีกเลี่ยงการใช้โคบอลท์

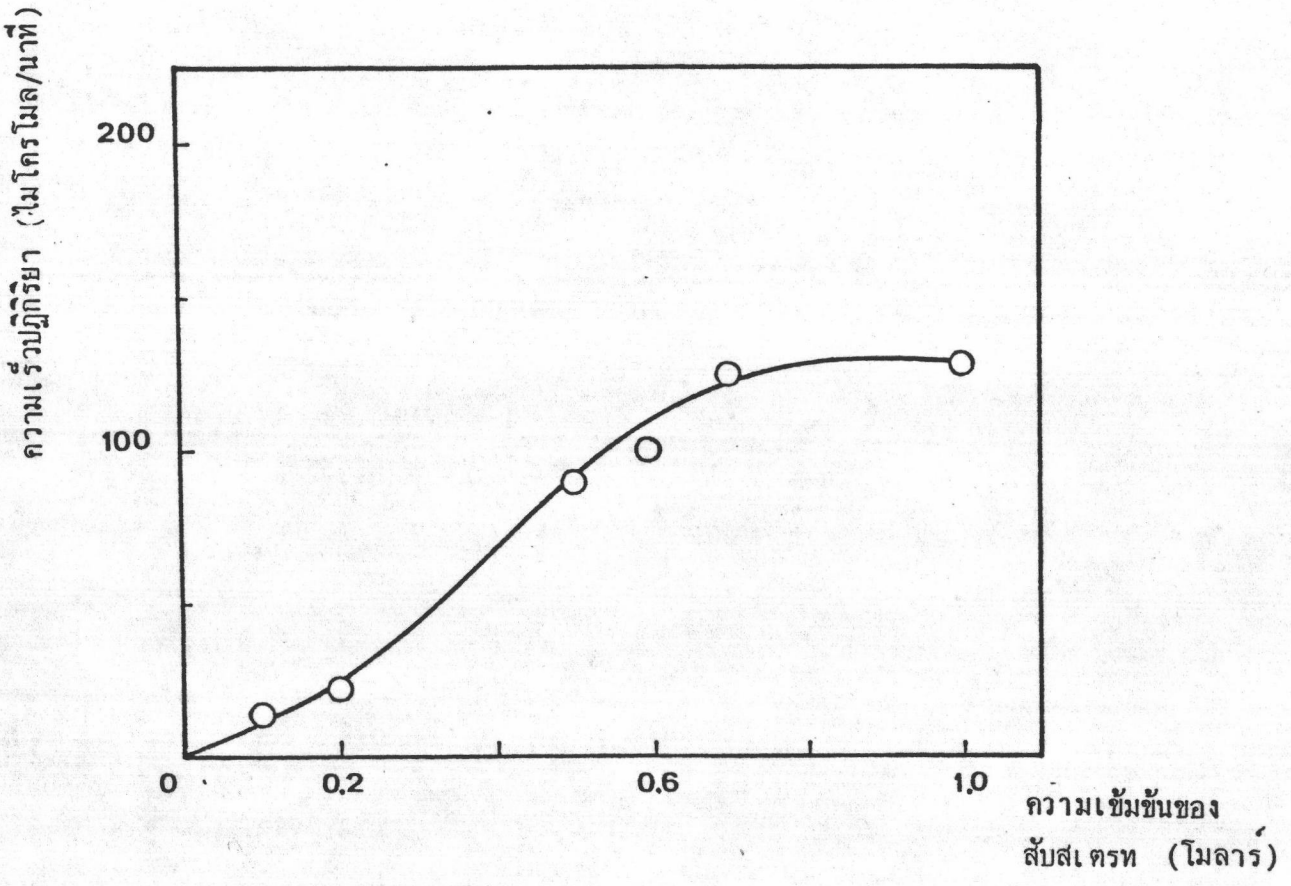
ในปี คศ. 1977 Fujita และคณะ (28) ได้ทดลองใช้สารประกอบโลหะต่าง ๆ เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสแทนโคบอลท์คลอไรด์ พบว่าเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) สามารถใช้แทนโคบอลท์คลอไรด์ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาผลของเฟอรัสซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ทดแทนโคบอลท์คลอไรด์

จากวิธีการทดลองตามที่ได้กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.6 พบว่า เฟอรัสซัลเฟตกระตุ้นการทำงานของกลูโคสไอโซเมอเรสจากสเตรพโตมัยซิส 19Ø-1 ได้ผลใกล้เคียงกันในช่วงความเข้มข้น $5x10^{-5}$ ถึง $5x10^{-4}$ โมลาร์ และทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 1.3 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้โคบอลท์คลอไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 12

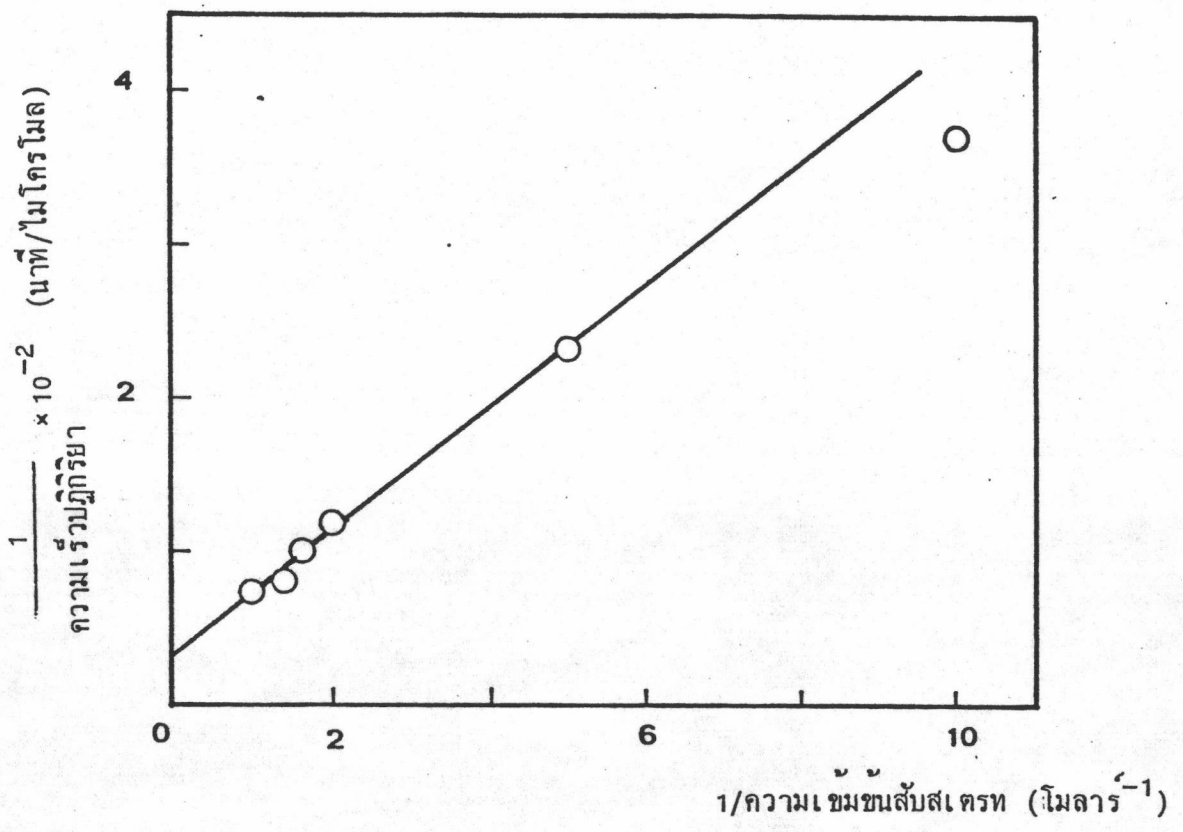
ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้เฟอรัสซัลเฟต $5x10^{-5}$ โมลาร์แทนโคบอลท์คลอไรด์ $1x10^{-4}$ โมลาร์

3.8 ผลของพีเอชต่อการเกิดตะกอนในสารผสมของปฏิกิริยา

จากการบ่มเชลตริงรูปในสารผสมของปฏิกิริยาเพื่อวัดแอคติวิตีในสภาวะดังกล่าวในรูปที่ 22 ยกเว้นใช้สารละลายเฟอรัสซัลเฟต $5x10^{-5}$ โมลาร์แทนโคบอลท์คลอไรด์ $1x10^{-4}$ โมลาร์ และบ่มล่วงหน้าที่ 4 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง พบว่าในขณะบ่มเชลตริงรูปที่ 8Ø องศาเซลเซียส มีตะกอนขาวเกิดขึ้นในสารผสมของปฏิกิริยา และจากการทดสอบเบื้องต้น (preliminary test) โดยการใช้งานเชลตริงรูปในปฏิกรณ์แบบแพคเบดที่ 65 องศาเซลเซียส



รูปที่ 26 ก ผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเซลตรึงรูป ตามวิธีการดังกล่าวในข้อ 3.6.5



รูปที่ 26 ข ไลน์วีเวอร์-เบิร์ก พลอทของกลูโคสไอโซเมอเรสในเซลตรึงรูปกับกลูโคส

ตารางที่ 12 ผลการใช้เฟอรัสซัลเฟตแทนโคบอลท์คลอไรด์ในการเร่งการทำงานของเอนไซม์พบว่าเฟอรัสซัลเฟตให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นเป็น 1.3 เท่าของโคบอลท์คลอไรด์

	$FeSo_4$			$CoCl_2$
ความเข้มข้น	$5x10^{-5}$ โมลาร์	$1x10^{-4}$ โมลาร์	$5x10^{-4}$ โมลาร์	$1x10^{-4}$ โมลาร์ (กลุ่มควบคุม)
แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	129	126	132	100

พบว่า ตะกอนขาวนี้สามารถทำให้เกิดการอุดตันของปฏิกรณ์ ในการทดลองต่อไปนี้จึงเป็นการทดลองเพื่อแก้ปัญหาการตกตะกอนของสารผสมของปฏิกิริยาเพื่อนำผลไปใช้ในการทดลองในปฏิกรณ์แบบแพคเบดต่อไป

จากการทดลองบ่มสารละลายต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ Ø.ØØ5 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต ใน Ø.15 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $5x10^{-5}$ โมลาร์ เฟอรัสซัลเฟตใน Ø.15 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และสารผสมของปฏิกิริยาตามที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยแปรผันพีเอชที่พีเอช 7และ 8 บ่มที่ 8Ø องศาเซลเซียส 3Ø นาที พบว่า ในสภาวะที่เป็นด่างสารละลายผสมของสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตจะเกิดตะกอนเบาขึ้นภายในหลอด ส่วนในสภาวะเป็นกลางไม่มีตะกอนเกิดขึ้น รวมทั้งเฟอรัสซัลเฟตทั้งหมดด้วย ดังผลการทดลองในตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าตะกอนที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นตะกอนของแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อแมกนีเซียมอิออนอยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง

3.9 การยับยั้งการเกิดแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์โดยการใช้สารละลายอีดีทีเอ (EDTA)

จากการทดลองบ่มเซลตริงรูปในสารละลายผสมสำหรับวัดแอคติวิตี ซึ่งมีอีดีทีเอ ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ Ø.ØØ3, Ø.ØØ5 และ Ø.ØØ7 โมลาร์ บ่มที่พีเอช 8.Ø อุณหภูมิ 8Ø องศาเซลเซียส นาน 3Ø นาที พบว่า ที่ความเข้มข้นของอีดีทีเอเป็น Ø.ØØ5 และ Ø.ØØ7 โมลาร์ ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น แม้จะบ่มต่อไปอีกจนครบ 1 ชั่วโมงก็ไม่เกิดตะกอน ส่วนสารละลายที่มีอีดีทีเอ Ø.ØØ3 โมลาร์ มีตะกอนเบาเกิดขึ้น จากการวัดแอคติวิตีพบว่าการเติมอีดีทีเอจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 14 ดังนั้นปริมาณอีดีทีเอที่เหมาะสมควรมีปริมาณเท่ากับแมกนีเซียมซัลเฟตในสารละลายจึงจะยับยั้งการเกิดแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และเสียแอคติวิตีน้อยที่สุด

3.1Ø การหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตและอีดีทีเอ และเฟอรัสซัลเฟตที่เหมาะสมในสารละลายกลูโคสสำหรับบ่มเซล

จากการทดลองบ่มเซลในสารละลายกลูโคสดังสภาวะและวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 3.9 ยกเว้นผันแปรความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟตในช่วง Ø.Ø โมลาร์ ถึง $3.Øx10^{-4}$ โมลาร์ และ

ตารางที่ 13 ผลการบ่มสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตีและส่วนประกอบ ดังกล่าวในข้อ 3.8 ใช้สภาวะในการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แปรผันพีเอชที่พีเอช 7 และ 8 สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้นโดยดูจากความขุ่น

สารละลาย		ตะกอน
พีเอช 7	$5x10^{-5}$ โมลาร์เฟอรัสซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ไม่มี
	0.005 โมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ไม่มี
	สารละลายผสมสำหรับวัดแอคติวิตี	ไม่มี
พีเอช 8	$5x10^{-5}$ โมลาร์เฟอรัสซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ไม่มี
	0.005 โมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์	มี
	สารละลายผสมสำหรับวัดแอคติวิตี	มี

ตารางที่ 14 ผลการบ่มเซลตริงรูปในสารละลายผสมสำหรับวัดแอคติวิตีซึ่งกล่าวไว้ในข้อ 3.8 ยกเว้นแปรผันความเข้มข้นของอีดีทีเอ ตั้งแต่ ๐.๐-๐.๐๐๗ โมลาร์ และมีความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน ๐.๐๐๕ โมลาร์ สังเกตการเกิดตะกอนโดยดูจากความขุ่น

ความเข้มข้นของ EDTA ในสารละลายกลูโคสสำหรับบ่มเซล	แอคติวิตี		การเกิดตะกอน
	แอคติวิตีปรากฏ (หน่วย/กรัมนน.แห้ง)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	
๐.๐ โมลาร์	625	100	มี
๐.๐๐๓ โมลาร์	510	82	มี
๐.๐๐๕ โมลาร์	429	69	ไม่มี
๐.๐๐๗ โมลาร์	260	42	ไม่มี

ในแต่ละความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต ทำการผันแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตและอีดีทีเอในช่วง Ø.Ø1-Ø.Ø2 โมลาร์ โดยให้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเท่ากับความเข้มข้นของอีดีทีเอเสมอ

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 27 ก พบว่าที่ความเข้มข้นของอีดีทีเอและเฟอรัสซัลเฟตเป็น Ø.Ø1 โมลาร์และ $1.Øx1Ø^{-4}$ โมลาร์ กับที่ความเข้มข้น Ø.Ø15 และ $2.Øx1Ø^{-4}$ โมลาร์ตามลำดับ จะมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยที่สุด คือ มีแอคติวิตีประมาณ Ø.8 เท่า ของเซลตรึงรูปที่วัดตามวิธีการในข้อ 3.9 ยกเว้นไม่เติมอีดีทีเอ โดยให้เซลตรึงรูปดังกล่าวนี้มีแอคติวิตีเท่ากับ 1ØØ% ส่วนในรูป 27 ข เป็นแอคติวิตีเมื่อสัมพัทธ์กับเซลที่ตรึงด้วยความร้อน โดยให้เซลที่ตรึงด้วยความร้อนมีแอคติวิตีเป็น 1ØØ% ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการบ่มเซลตรึงรูปของแมกนีเซียมซัลเฟต อีดีทีเอและเฟอรัสซัลเฟตคือ Ø.Ø1, Ø.Ø1 และ $1x1Ø^{-4}$ โมลาร์ตามลำดับ เพราะเป็นส่วนประกอบที่ใช้สารในความเข้มข้นต่ำที่สุด

3.11 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในเซลตรึงรูปในปฏิกรณ์แบบแพคเบด (column reactor)

3.11.1 ผลของอัตราเร็วของการไหลของสารตั้งต้นต่อการผลิตฟรักโทส

จากการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 7.3 เปลี่ยนค่าอัตราเร็วของการไหล (flow rate) ให้อยู่ในรูปของสเปซไทม์ (space time, τ) ดังนี้

$$\tau = \frac{\text{ปริมาตรของช่องว่างระหว่างเซลตรึงรูป}}{\text{อัตราเร็วของการไหล}}$$

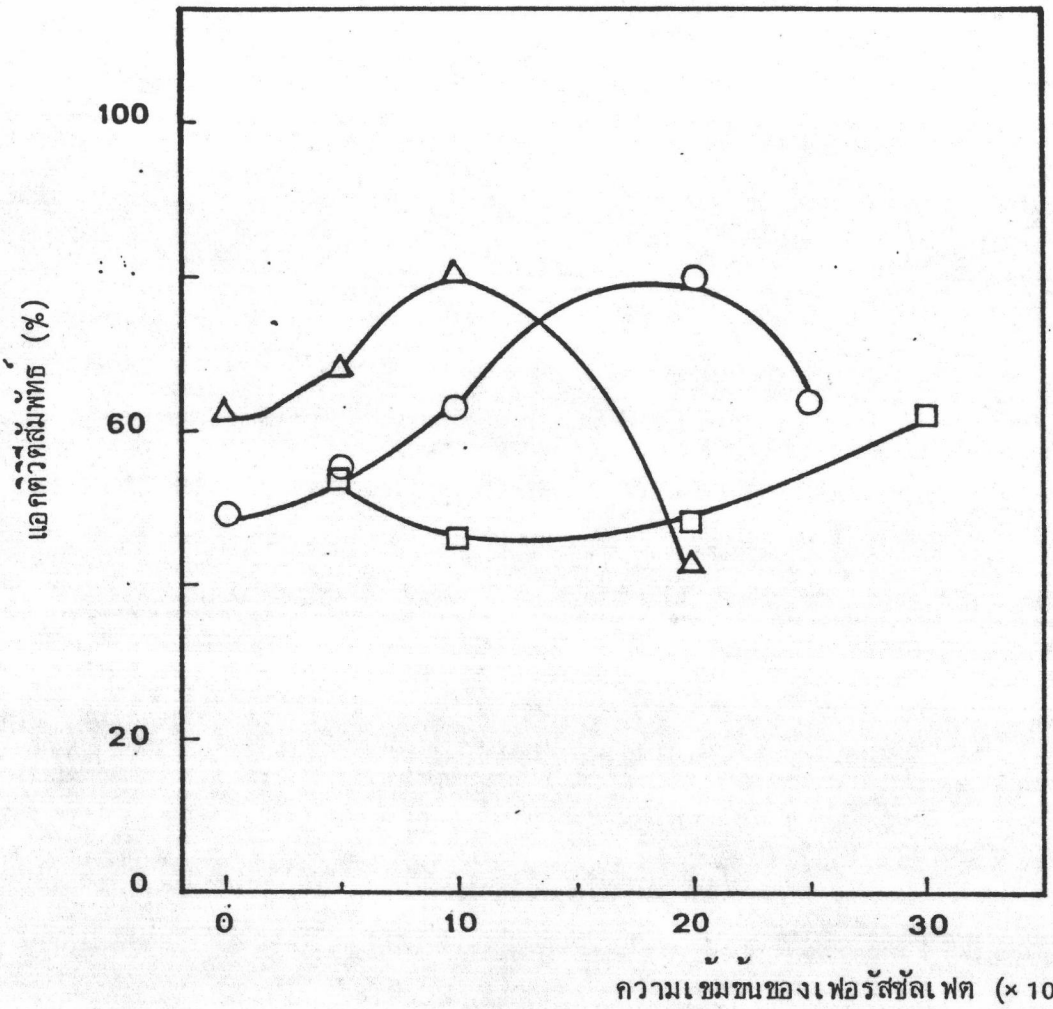
ส่วนกำลังผลิต (productivity, π) คำนวณได้จาก

$$\pi = \frac{S_o X}{\tau}$$

โดย S_o คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายกลูโคส

X คือ สัดส่วนของฟรักโทสที่เกิดขึ้น (conversion)

τ คือ Space time



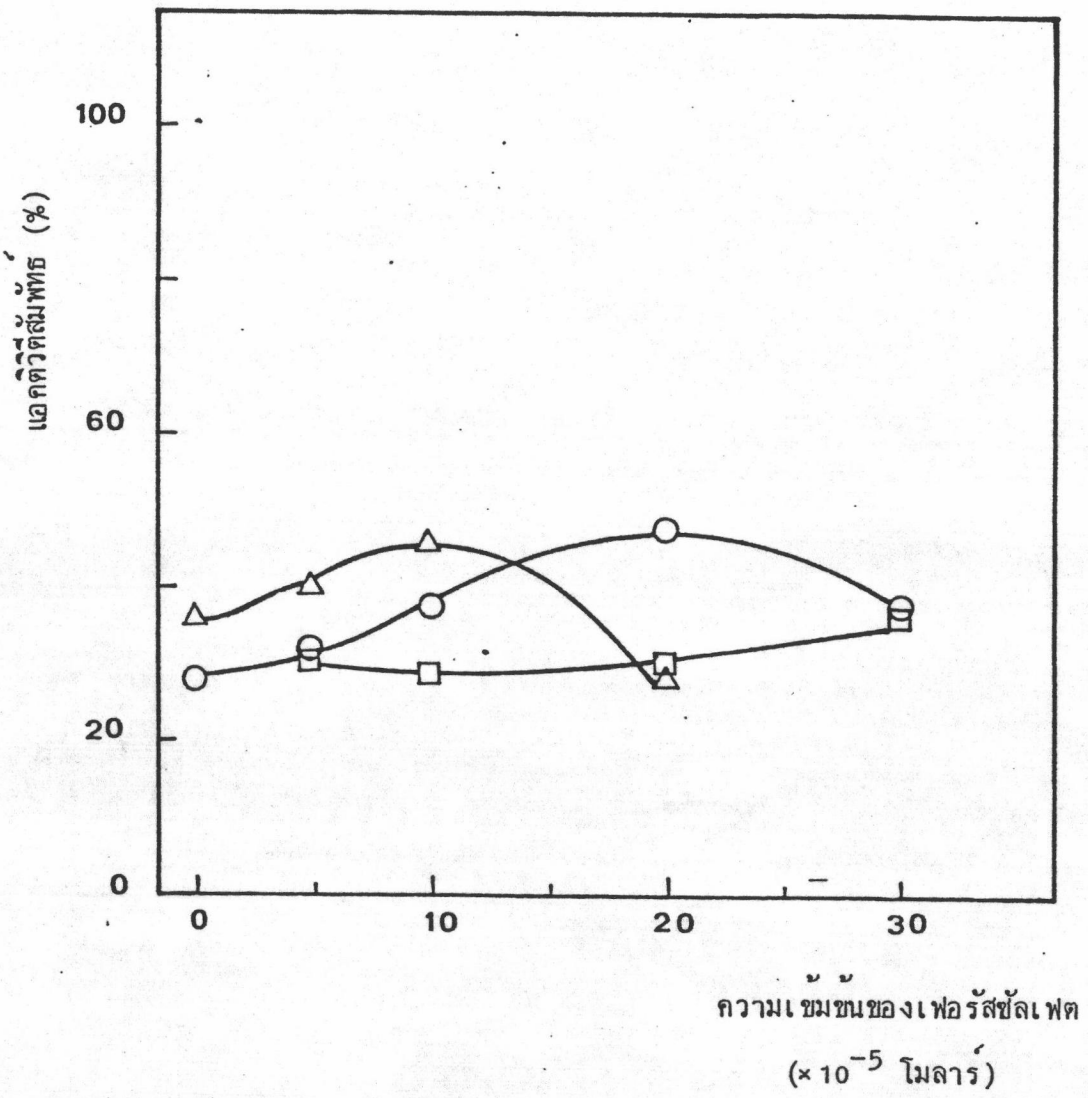
รูปที่ 27 ก ผลของอีดีทีเอ แมกนีเซียมอิออน และเฟอรัสอิออน ต่อแอคติวิตีของเซลตรึงรูป เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเซลตรึงรูปที่บ่มในสารละลายผสมดังกล่าวในตารางที่ 14 ยกเว้นผันแปรความเข้มข้นของอีดีทีเอและแมกนีเซียมซัลเฟตที่ 0.01-0.02 โมลาร์ และผันแปรเฟอรัสซัลเฟตที่ 0 ถึง 3×10^{-4} โมลาร์

กำหนดให้เซลตรึงรูปที่วัดแอคติวิตีตามสภาวะดังกล่าวในตารางที่ 12 และไม่เติมอีดีทีเอมีแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100%

(△) 0.01 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต

(○) 0.015 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต

(□) 0.02 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต



รูปที่ 27 ข ผลของอีดีทีเอ แมกนีเซียมอิออน และเฟอรัสอิออน ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวในรูปที่ 27 ก เมื่อเทียบกับเซลที่ตรึงด้วยความร้อน กำหนดให้เซลที่ตรึงด้วยความร้อนและยังไม่ผ่านกรรมวิธีใด ๆ มีแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100%

(△) 0.01 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต และอีดีทีเอ

(○) 0.015 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต และอีดีทีเอ

(□) 0.02 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต และอีดีทีเอ

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 28 พบว่า อัตราการเกิดฟรักโทสจะสูงสุดเมื่อใช้สเปซไทม์มากกว่า 30 นาที ซึ่งอัตราการเกิดฟรักโทสสูงสุดที่ได้นั้น (maximum conversion) คือ 52% ที่อัตราเร็วการไหลสูงสัดส่วนของฟรักโทสจะต่ำลงแต่กำลังผลิตจะสูงขึ้น ในขณะที่อัตราเร็วการไหลต่ำ (สเปซไทม์มาก) สัดส่วนของฟรักโทสจะสูงแต่กำลังผลิตจะต่ำ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้คำนวณเพื่อกำหนดสเปซไทม์ที่เหมาะสมในเชิงเศรษฐศาสตร์การผลิต เพื่อให้มีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด

3.11.2 การศึกษาครึ่งชีวิตของเซลตรึงรูปในการใช้งานแบบต่อเนื่อง

จากการทดลองที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.7.3 โดยศึกษาครึ่งชีวิตของเซลตรึงรูปในการใช้งานที่พีเอช 7.0 และ 8.0 พบว่า เซลตรึงรูปที่ใช้งานที่พีเอช 7 มีครึ่งชีวิตที่ 22 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้งานที่ พีเอช 8 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตามที่ได้ศึกษามาแล้ว เซลตรึงรูปมีครึ่งชีวิตถึง 625 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 29 ก และ ข ตามลำดับ

3.12 <u>สรุปสภาวะที่ได้จากการทดลอง</u>

1. สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์

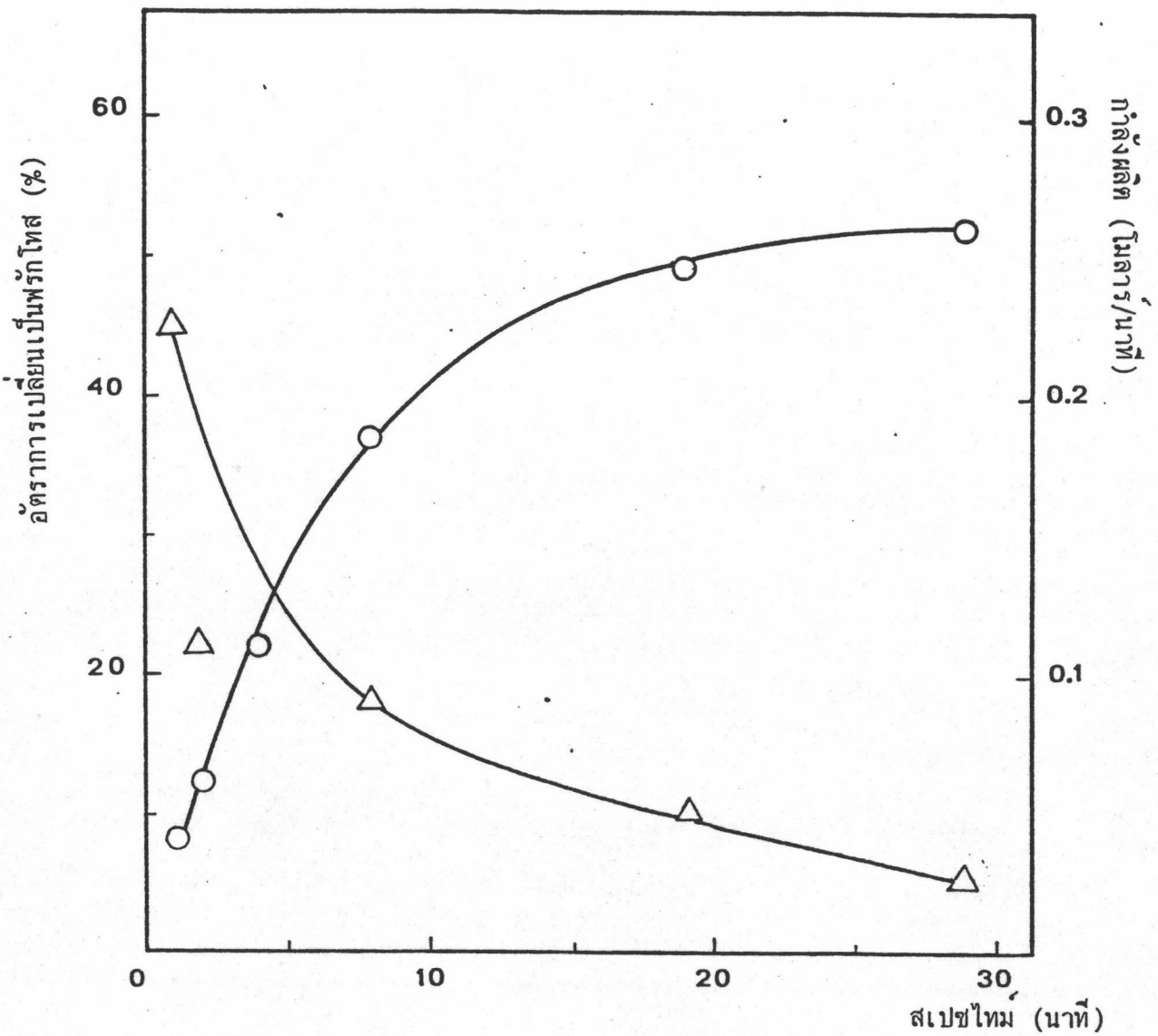
ตรึงด้วยไคโตแซนจากนั้นนำไปตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.5% ใน 0.5 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 5.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. สภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคติวิตี

บ่มใน 0.15 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ที่มี 0.005 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต, $5x10^{-5}$ โมลาร์ เฟอรัสซัลเฟต และ 0.5 โมลาร์กลูโคส ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

3. องค์ประกอบที่เหมาะสมของสารละลายตั้งต้นในปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง

2	M	กลูโคส
$1x10^{-4}$	M	$FeSO_4$
0.010	M	$MgSO_4$



รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างสเปซไทม์กับอัตราการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส (○) (conversion) และกำลังผลิต (productivity, △) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 ข้อ 7.3

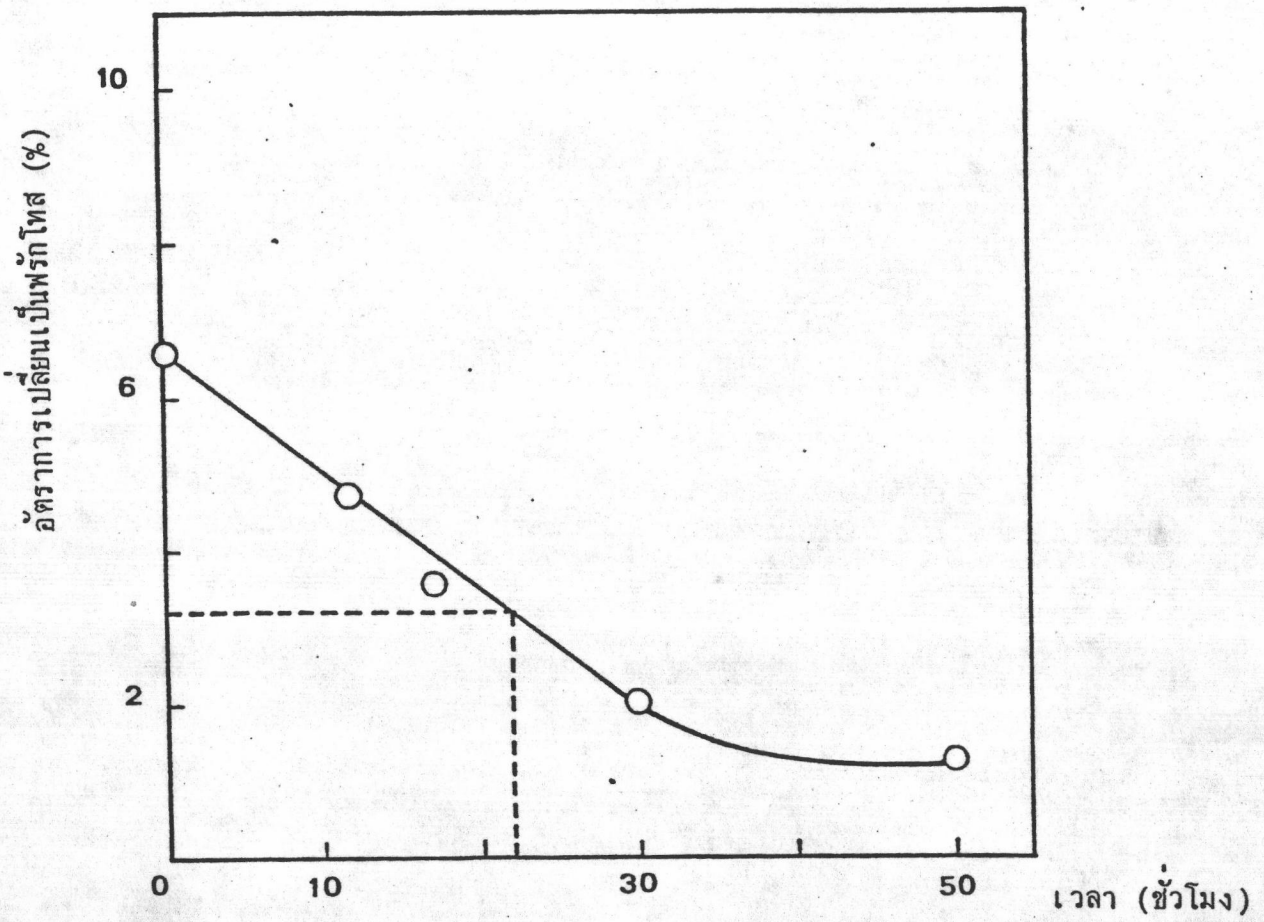
E_o = ปริมาณของเซลตรึงรูป 1 กรัม

S_o = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 2 โมลาร์

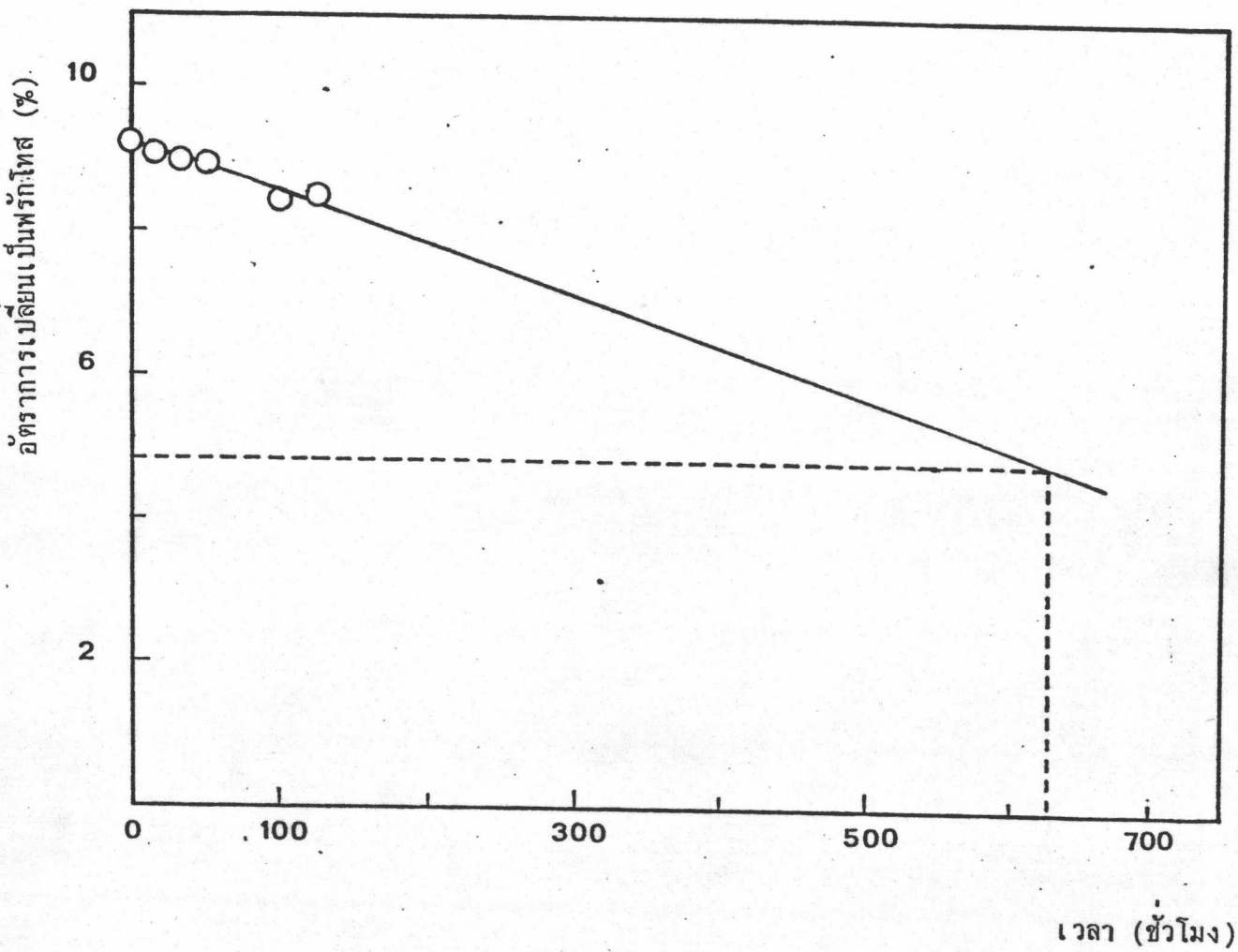
เส้นผ่าศูนย์กลางปฏิกรณ์ 7.8 มม.

ความสูงของเซลตรึงรูปในปฏิกรณ์(bed height) 32 ซม.

ปริมาตรช่องว่างระหว่างเซลตรึงรูป (void volume) 5 มล.



รูปที่ 29 ก การประมาณครึ่งชีวิตของเซลตรึงรูป ที่พีเอช 7.0 ดังการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 2.7.3



รูปที่ 29 ข การประมาณครึ่งชีวิตของเซลตริงรูป ที่พีเอช 8.0 ดังการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 2.7.3

Ø.ØlØ M EDTA

Ø.2 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.Ø

4. สมบัติของเอนไซม์ในเซลตริงรูป

K_m = Ø.31 โมลาร์

แอคติวิตีคงเหลือ = 54Ø หน่วย/กรัม(น้ำหนักแห้ง)

ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล = Ø.55

อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด = 52%

ครึ่งชีวิตที่พีเอช 8.Ø = 625 ชั่วโมง

ครึ่งชีวิตที่พีเอช 7.Ø = 22 ชั่วโมง

ความเสถียรต่อความร้อน มีความเสถียรสูงในช่วง 3Ø-5Ø °ซ

ความเสถียรต่อพีเอช มีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 8.Ø

ความเสถียรในการเก็บรักษา มีครึ่งชีวิต 25Ø วัน ที่ 4 °ซ ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Ø.15 โมลาร์ พีเอช 8.Ø