หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

กระบวนการอินเวอร์ชั่นเป็นการสลายซูโครสเพื่อให้ได้ฟรักโทสและกลูโคส ซึ่งเรียกว่าน้ำตาลอินเวอร์ท น้ำตาลอินเวอร์ทมีความหวานมากกว่าซูโครส 1.23 เท่า (Woodward & Wiseman,1982) และไม่ตกผลึกที่ความเข้มข้นสูงๆ น้ำตาลอินเวอร์ทที่ผสมกับซูโครสจะละลายน้ำได้ดีกว่าซูโครสเพียงอย่างเดียว (Norman, 1968)ดังนั้นจึงใช้น้ำตาลอินเวอร์ทหน่วงเหนี่ยวการตกผลึกของซูโครสในอุตสาหกรรมขนม-หวาน

น้ำตาลอินเวอร์ทสามารถใช้แทนซูโครส เพื่อควบคุมคุณภาพในการผลิตน้ำอัดลมได้ เช่น เครื่องดื่มโคล่า ซึ่งมีสภาพเป็นกรด ซูโครสจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลอินเวอร์ททำให้มีความหวานเพิ่มขึ้น ดังนั้นความหวานของผลิตภัณฑ์จึงไม่แน่นอน ทำให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในตลาดได้ภายในเวลาที่จำกัด แต่ถ้าใช้น้ำตาลอินเวอร์ทจะสามารถควบคุมความหวานได้ตามสูตรตั้งแต่เริ่มต้น ทำให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในตลาดได้นานโดยที่ความหวานไม่เปลี่ยนแปลง

นอกจากนั้นในอุตสาหกรรมขนมอบการใช้น้ำตาลอินเวอร์ทจะให้ผลดีกว่าซูโครส เพราะน้ำตาลอินเวอร์ทเป็นน้ำตาลรีดิวส์จึงเกิดสีน้ำตาลได้ดีกว่าและซูโครสที่ไม่ละลายจะทำลายฟองอากาศที่อยู่ภายในก้อนเค็ก(Moroz et al.,1973) ทำให้อายุการเก็บสั้นลง

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถนำน้ำตาลอินเวอร์ทมาใช้แทนซูโครสได้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด การผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทจากซูโครสในปัจจุบันผลิตได้ 3 วิธี คือ (Moroz et al., 1973) การใช้กรด เรซิน และเอนไซม์ แต่การผลิตโดยใช้กรดและเรซิน มีข้อเสียมากกว่าการใช้เอนไซม์ดังนี้ (Marconi & Morisi., 1974 ; Wiseman, 1979)

1. ใช้พลังงานกระตุ้นสูง และต้องใช้สภาวะที่รุนแรง จึงทำให้ต้องสิ้นเปลืองพลังงาน และค่าใช้จ่ายในการสร้างเครื่องมือที่ทนต่อการผุกร่อน

2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสี กลิ่น และรสไม่พึงประสงค์

3. เกิดโอลิโกแซคคาไรด์ขึ้นในระหว่างกระบวนการทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่ม

ในขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์

4.มีอัตราการสลายต่ำทำให้ต้องใช้สารตั้งต้นที่มีความบริสุทธิ์มาก

น้ำตาลอินเวอร์ทที่ได้จากการผลิตโดยใช้กรด และเอนไซม์ได้แสดงในตารางที่ 1.

เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทคือ อินเวอร์เทส ซึ่งพบมากในยีสต์ ในประเทศไทยมีโรงงานผลิตเบียร์หลายแห่ง ดังนั้นจึงมียีสต์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากโรงงาน เช่น ใน พศ. 2527 บริษัทบุญรอดบริวเวอรี จำกัด มียีสต์เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากโรงงาน 4.2 ล้านลิตร/ปี ($7.14 \times 10^5$ กิโลกรัมน้ำหนักแห้งต่อปี)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของน้ำเชื่อมอินเวอร์ท (Flegel et al, 1982).

| | Lyle's Golden syrup | Tate Golden syrup | Tate Dark refineds |
|---|---|---|---|
| Sucrose % (W/W) | 31.5-22.8 | 32.0-38.0 | 27.0-33.6 |
| Invert % (W/W) | 48.0-49.8 | 42.5-48.5 | 38.0-44.0 |
| Ash % (W/W) | 1.3-1.5 | | |
| Solid % (W/W) | 82.5-83.0 | 82.0-83.0 | 82.0-83.0 |
| Colour ($IU^{420}$) | 330-440 | | |
| Acid or Invertase | Acid | Invertase | Invertase |

1.1 อินเวอร์เทส

อินเวอร์เทส (E.C. 3.2.1.26) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยสลายซูโครสให้เป็นฟรักโทสและกลูโคส มีชื่อเรียกแตกต่างกันเช่น อินเวอร์เทส(invertase) อินเวอร์ทิน (invertin), แซคคาเรส (saccharase), ซูเครส (sucrase) และ บีตา-ฟรักโทฟูราโนซิเดส (β-fructofuranosidase) เอนไซม์นี้มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ (Neuberg & Robert , 1946)

1. บีตา-ฟรักโทฟูราโนซิเดส (β-fructofuranosidase)
2. อัลฟา-กลูโคไพราโนซิเดส (α-glucopyranosidase)

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์โดยดูการย่อยราฟฟิโนส [raffinose-(galactose-glucose-fructose)] พบว่า อัลฟา-กลูโคไพราโนซิเดสไม่สามารถย่อยราฟฟิโนสได้ แต่บีตา-ฟรักโทฟูราโนซิเดส ย่อยราฟฟิโนสได้ฟรักโทสและเมลิไบโอส [melibiose (galactose-glucose)]

อินเวอร์เทสที่ได้จากยีสต์เป็นบีตา-ฟรักโทฟูราโนซิเดส ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำหนักเอนไซม์ทั้งหมด คาร์โบไฮเดรตที่ประกอบส่วนใหญ่เป็นแมนแนน (mannan) (Wiseman , 1979)

1.2 แหล่งของอินเวอร์เทส

อินเวอร์เทสพบได้ทั้งในแบคทีเรีย ยีสต์ รา พืช และสัตว์ชั้นสูง แต่พบมากในยีสต์ โดยเฉพาะยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ยีสต์ทำขนมปัง ยีสต์ที่ใช้ผลิตเบียร์และเหล้า เป็นต้น คุณสมบัติของอินเวอร์เทสจากแหล่งต่างๆ มีคุณสมบัติแตกต่าง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของอินเวอร์เทสจากแหล่งต่างๆ (Woodward & Wiseman , 1982)

| แหล่งของอินเวอร์เทส | pHที่เหมาะสม | Km* (ซูโครส มิลลิโมลาร์) | น้ำหนักโมเลกุล |
|---|---|---|---|
| ยีสต์ | | | |
| Saccharomyces cerevisiae | 3.5-6.0 | 28.0 | 270,000 |
| Candida ultilis | 3.5-6.0 | 27.7 | 210,000 |
| แบคทีเรีย | | | |
| Streptococcus mitis 903 | 6.3-7.2 | 74.0 | 49,000 |
| S.mutant HS-6 | 5.0-5.5 | 20.0 | 160,000 |
| Bacillus subtilis | 6.5 | - | 55,000 |
| พืชชั้นสูง | | | |
| มะเขือเทศ | 4.5 | 9.5 | - |
| กล้วย | 3.5 | 2.7 | 220,000 |
| อ้อย | | | |
| ชนิดที่เป็นกรด | 5.3 | 2.8 | 380,000 |
| ชนิดที่เป็นกลาง | 7.0 | 0.32 | 66,000 |

Km* Michaelis-Menten constant

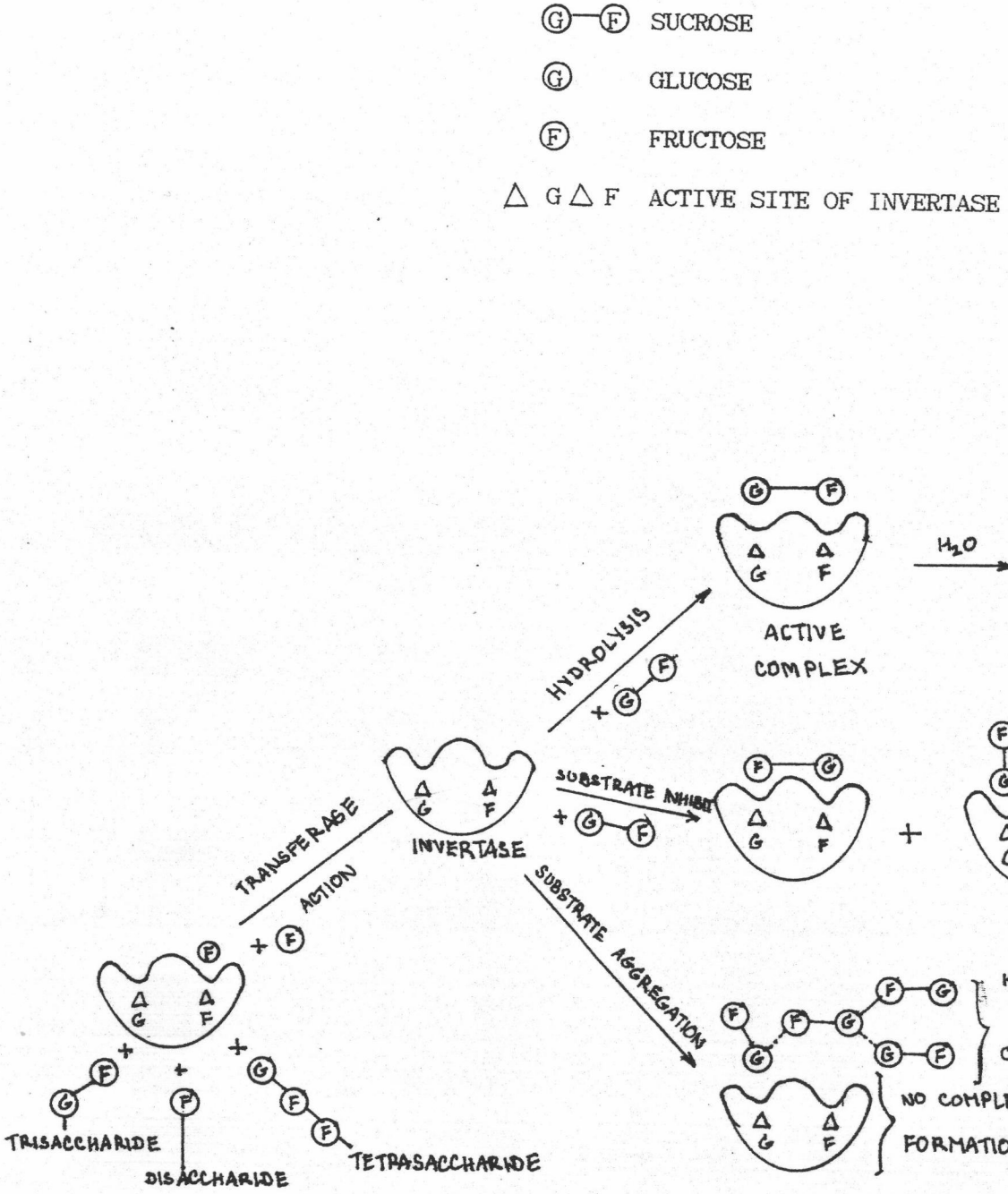
1.3 ปฏิกิริยาของอินเวอร์เทส

ปฏิกิริยาย่อยสลายซูโครสของอินเวอร์เทสเกิดอย่างเจาะจงที่โมเลกุลซูโครสตรงตำแหน่งฟรักโทส โดยเกิดการย้าย(transfer) ฟรักโทสที่ได้จากการย่อยสลายซูโครส (sucrose residue) ไปยังโมเลกุลของน้ำดังสมการที่ 2 หรือไปยังโมเลกุลซูโครส หรือคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ดังสมการที่ 3 ในกรณีที่ความเข้มข้นของซูโครสสูงหรือคาร์โบไฮเดรตอื่นสูง (Myrback , 1960 ; Andersen ,Thiesen & Broe ,1969) และแบบจำลองกลไกการทำงานของอินเวอร์เทส แสดงดังรูปที่ 1

Fructosyl-O-glucosyl + enzyme-OH $\rightleftharpoons$ Fructosyl-O-enzyme + glucose (1)

Fructosyl-O-enzyme + $H_2O \longrightarrow$ Fructose + enzyme-OH (hydrolysis) (2)

Fructosyl-O-enzyme + R-OH $\rightleftharpoons$ Fructosyl-O-R + enzyme-OH (transfer) (3)




รูปที่1 แบบจำลองกลไกการทำงานของอินเวอร์เทส(Bowski,Saini,Ryu&Vieth1971)

นอกจากนี้อาจเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาเนื่องจากสับสเตรต (substrate - inhibition) และเกิดการเกาะกันเป็นกลุ่มของสับสเตรต (substrate aggregation) ทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ (Combes & Monsan , 1983)

1.4 สารยับยั้งการทำงานของอินเวอร์เทส (inhibitor)

เกลือของโลหะหนัก เช่น ทองแดง ($Cu^{++}$) ปรอท ($Hg^{++}$) และเงิน ($Ag^{+}$) สามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอร์เทสแบบผันกลับได้ ( reversible) การรวมตัวของไอโอดีนกับอินเวอร์เทส เรียกว่า ไอโอดีนอินเวอร์เทส จะยับยั้งการทำงานของอินเวอร์เทสได้มากกว่า 50 % (Neuberg & Robert , 1946) แต่พบว่าค่าคงที่ของ Michaelis-Menten ของไอโอดีนอินเวอร์เทส มีค่าเท่ากับอินเวอร์เทสอิสระ (Myrback , 1960) กรดไนตรัส (nitrous acid) มีผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) สีต่างๆ (fuchsin, safranin, congo red) สามารถจับกับอินเวอร์เทสทำให้อินเวอร์เทสเสียแอคติวิตี สารที่สามารถจับกับกลุ่มคาร์โบนิลของอินเวอร์เทส เช่น อะนีลีน (aniline) พารา-โทลูอิดีน (*p*-toluidine) และฟินิลไฮดราซีน (phenylhydrazine) ยับยั้งการทำงานของอินเวอร์เทสแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive) อินเวอร์เทสอาจถูกยับยั้งการทำงานโดยไทโรซิเนส (tyrosinase) ส่วนประจุภาคของบัฟเฟอร์ เช่นอะซีเตท จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับประจุภาคของโลหะ ซึ่งเท่ากับเป็นการป้องกันอินเวอร์เทสจากเกลือของโลหะได้ (Myrback, 1960) และเกลือแคลเซียมไม่มีผลต่อการทำงานของอินเวอร์เทส (Lardy & Anderson , 1942)

1.5 การตรึงอินเวอร์เทส

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมสามารถใช้ได้ 2 รูปแบบคือ เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป แต่ในการใช้เอนไซม์อิสระนั้นสามารถใช้ได้เพียงครั้งเดียว และมีเอนไซม์ปนมาในผลิตภัณฑ์ด้วย จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิต และเอนไซม์ก็เป็นสารที่มีราคาแพงอีกด้วย ดังนั้นจึงได้คิดนำเอนไซม์มาใช้เป็นคะตะลิสต์ในปฏิกิริยาได้หลายครั้ง โดยที่ไม่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ กระบวนการดังกล่าว คือ การใช้เอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูปหรือเซลล์ตรึงรูป คือ เอนไซม์หรือเซลล์ที่ไม่เคลื่อนที่ และอยู่ใน

ที่จำกัด โดยที่ยังสามารถทำงานได้ดี ซึ่งสามารถนำไปใช้ซ้ำและใช้งานอย่างต่อเนื่องได้ การศึกษาเอนไซม์ตรึงรูป เริ่มตั้งแต่ปี คศ.1960 (Chibata , 1978) โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อนำเอนไซม์มาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ

การตรึงอินเวอร์เทส แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การตรึงเอนไซม์ (enzyme immobilization) และการตรึงเซลล์ที่มีเอนไซม์บรรจุอยู่ภายใน (microbial cell immobilization)

1.5.1 การตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์นั้นทำได้โดยนำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (purified enzyme) มายึดให้อยู่กับตัวยึด (support) หรือพาหะ (carrier) การเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปโดยทั่วไปสามารถทำได้ 3 วิธี คือ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ ,2521)

1.5.1.1 การตรึงเอนไซม์กับตัวยึด (carrier-binding method)

ใช้ตัวยึดที่ไม่ละลายน้ำเกาะกับเอนไซม์ การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวยึด ใช้หลักการต่าง ๆ กัน ได้แก่ แรงดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การเกิดพันธะอิออนิค (ionic bonding) และการเกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bonding)

วิธีนี้เป็นวิธีตรึงเอนไซม์ที่เก่าแก่ที่สุด ปริมาณของเอนไซม์ที่เกาะกับตัวยึดและแอคติวิตีหลังการตรึงขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวยึด ดังนั้นการเลือกตัวยึดและวิธีในการยึดเอนไซม์กับตัวยึดจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการตรึงแบบนี้

ตัวยึดที่นิยมใช้กันมากได้แก่ อนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เช่น เซลลูโลส (cellulose) , อากาโรส (agarose) และโพลีอะครีลามีดเจล (polyacrylamide gel)

1.5.1.2 การเชื่อมโยง (cross-linkage method)

ใช้ปฏิกิริยาระหว่างสารไบฟังชั่นนอล (bifunctional reagent) เกาะกับเอนไซม์แบบเชื่อมโยง วิธีนี้มีแรงยึดที่แข็งแรง แต่ต้องใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง เอนไซม์มีแอคติวิตีต่ำ ใช้ปริมาณเอนไซม์มาก เสถียรภาพต่ำ วิธีนี้นิยมใช้ควบกับการยึดเกาะด้วยแรงดูดซับทางกายภาพ สารไบฟังชั่นนอลที่นิยมใช้ ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์

(glutaraldehyde) เอธิลีน มาลีอิก แอนไฮไดรด์ (ethylene meleic anhydride) เฮกซาเมทธิลีน ได ไอโซไซยาเนท (hexamethylene di-isocyanate)

1.5.1.3 การโอบล้อม (entrapping method)

เป็นการกักเอนไซม์อยู่ในตัวกลาง โดยเอนไซม์ไม่เกิดพันธะใด ๆ กับตัวกลาง ถ้าตัวกลางเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นโพรง (polymer matrix) เรียกว่าเป็นการตรึงแบบแลททิช (lattice type) ถ้าเป็นการยึดในเยื่อกึ่งผ่านได้ (semipermeable membrane) เรียกว่าเป็นการตรึงแบบไมโครแคปซูล(microcapsule type)

ตัวกลางที่ใช้ในการตรึงแบบแลททิชมักเป็นโพลีเมอร์ ซึ่งสังเคราะห์จากโมโนเมอร์ (monomer) อีกทีหนึ่ง เช่น โพลีอะครีลามีด (polyacrylamide) หรืออาจเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติ เช่น แป้ง เป็นต้น

ตัวกลางที่ใช้ในการตรึงแบบไมโครแคปซูล ได้แก่ ไนลอน (nylon) โพลีสไตรีน (polystyrene) ไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose)

การตรึงอินเวอร์เทสโดยอาศัยหลักการต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ได้รวบรวมและแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วิธีการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส

| วิธีการตรึง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| 1.การตรึงกับตัวยึด (carrier binding) | |
| การตรึงโดยอาศัยแรงยึดเกาะทางกายภาพ (physical adsorption) | |
| -การตรึงบนถ่าน(activated carbon) | Nelson & Griffin , 1916 |
| -การตรึงบนเบนโตไนท์ (bentonite) | Monsan & Durand , 1971 |
| การตรึงโดยพันธะอิออนิค (ionic binding) | |
| -การตรึงบน ดีอีเออี-เซลลูโลส(DEAE-cellulose) | Maeda & Suzuki , 1973<br>Suzuki,Ozawa & Maeda,1966<br>Usami,Noda & Goto, 1971 |
| -การตรึงบนเม็ดเซลลูโลสรูพรุน (porous cellulose bead) | Dickensheets, Chen & Tsao , 1977 |
| -การตรึงบนแอมเบอร์ไลท์ (amberlite) | Boudrant & Cheftel,1975 |
| -การตรึงบนเรซิน (anion-exchange resin) | Ooshima , Sakimoto & Harano , 1980a |
| การตรึงโดยพันธะโควาเลนท์ (covalent bonding) | |
| -การตรึงบนอนุภาคแม่เหล็ก(magnetic particle) | Leemputten & Horisberger 1974 |
| -การตรึงบนฮอร์นเบลนด์ (hornblende) | Thornton,Flynn & Johnson 1975 |
| -การตรึงบนแคปซูลของไกลซิดิล เมทธาครีเลท (macroporous glycidyl methacrylate) | Marck,Valentova & Kas , 1984 |

| วิธีการตรึง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| -การตรึงบนแก้วรูพรุน (porous glass) | Mason & Weetall , 1972<br>Ooshima , Sakimoto & Harano , 1980b |
| -การตรึงบนกรดคาร์บอกซีเมทธิล เซลลูโลส คลอไรด์ (carboxymethyl cellulose acid chloride) | Simionescu, Dumitriu, Popa & Moldovan,1984 |
| -การตรึงบนเกลือไดโซไลซ 4-อะมิโนเบนซอล เซลลูโลส (Dizolized 4-aminobenzoy cellulose) | Simionescu , Popa & Dumitriu , 1984 |
| -การตรึงบนแคปซูลของโพลิสไตรีน (macroporous polystyrene) | Mansfeld & Schellenberger , 1987 |
| 2.การยึดเกาะโดยวิธีเชื่อมโยง (cross-linking method) | |
| -การตรึงบนซังข้าวโพด(corn stover) | Monsan , Combes , & Alemzadah , 1984 |
| -การตรึงบนผ้าฝ้าย (cotton cloth) | Yamazaki,Cheok &Fraser, 1984 |
| 3.การตรึงโดยจำกัดเขตในพื้นที่จำกัด (entrapping method) | |
| การกักไว้ในตาข่าย (lattice type) | |
| -การตรึงด้วยโพลีอะครีลามีด (polyacrylamide) | Kawashima & Umaeda,1974 |
| -การตรึงด้วยโพลีอะครีลิก (polyacrylic acid) | Maeda,Yamauchi & Sakimae, 1975 |

| วิธีการตรึง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| -การตรึงด้วยโพลีไวนิล ไพร์โรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone) | Maeda, Yamauchi & Sakimae , 1974 |
| -การตรึงด้วยวุ้น (agar) | Toda & Shoda , 1975 |
| -การตรึงด้วยเจลาติน (gelatin) | Gianfreda, Parascandola & Scardi, 1980<br>Parascandola & Scardi, 1982 |
| -การตรึงด้วยอัลจิเนต(alginate gel) | Linko, Weckstorm & Linko , 1980 |
| การกักในแคปซูลขนาดเล็ก(microcapsule type) | |
| -การตรึงด้วยเซลลูโลส ไตรอะซิเตท (fibers of cellulose triacetate) | Marconi Gulinelli & Morisi, 1974 |
| -การตรึงบนท่อไนล่อน (nylon tube) | Onyezili & Onitiri, 1981 |

1.5.2 <u>การตรึงเซลล์ที่มีอินเวอร์เทส</u>

หลักการสำคัญที่เกิดขึ้นภายหลังการตรึงเซลล์ คือ การตรึงเซลล์ที่มีเอนไซม์อยู่ภายใน โดยทั่วไปแล้ว การตรึงเซลล์มีข้อได้เปรียบกว่าการตรึงเอนไซม์ คือ ทำได้ง่ายกว่า โดยลดขั้นตอน และค่าใช้จ่ายในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ มีการสูญเสียแอคติวิตีน้อยกว่า เอนไซม์บางชนิดต้องการปัจจัยร่วม (cofactor) ในการทำงาน ดังนั้น การตรึงเซลล์จะทำให้เอนไซม์ใช้ปัจจัยร่วมที่มีอยู่ภายในเซลล์ได้โดยไม่ต้องตรึงปัจจัยร่วมหรือเติมปัจจัยร่วมลงในปฏิกิริยาอีก และนอกจากนี้ เอนไซม์บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาพใกล้เคียงสภาวะธรรมชาติจะมีเสถียรภาพสูงกว่าสภาพที่แยกออกมาให้บริสุทธิ์ ดังนั้นในลักษณะ

นี้ การตรึงเซลล์จะให้ผลดีกว่าการตรึงเอนไซม์ (Durand & Navarro , 1978)

การตรึงเซลล์มีข้อเสียเปรียบการตรึงเอนไซม์ คือ การถ่ายเทมวลทำได้ยาก เนื่องจากมีผนังเซลล์ (cell wall) หรือเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) กั้นอยู่ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า และนอกจากนี้ระหว่างการใช้งานเซลล์อาจปล่อยสารภายในเซลล์หรือเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ทำให้ได้สารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์

การตรึงเซลล์สามารถแบ่งออกได้ 3 วิธี เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ คือ มีการยึดเกาะกับตัวกลาง การเชื่อมโยง และการโอบล้อม

1.5.2.1 การตรึงเซลล์กับตัวกลาง (carrier binding method)

โดยมากเป็นการตรึงกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือเชื่อมโยงด้วยพันธะโควาเลนท์กับตัวกลางประเภทโพลิเมอร์

1.5.2.2 การตรึงเซลล์ด้วยการเชื่อมโยง (cross-linking method)

เป็นการเชื่อมโยงเซลล์โดยไม่มีตัวกลาง (carrier) ใช้เพียงสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมโยง (cross-linking reagent) สารเชื่อมโยงที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

1.5.2.3 การโอบล้อม (entrapping method)

การตรึงเซลล์โดยวิธีโอบล้อมในโพรงของโพลิเมอร์ (polymer matrix) เป็นวิธีที่ได้รับการศึกษามากที่สุด ในบรรดาการตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ (Chibata , 1983) โพลีเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ได้แก่ คาราจีแนน (karageenan) คอลลาเจน (collagen) โพลีอะครีลามิด (polyacrylamide) อัลจิเนต (alginate) สำหรับวุ้น (agar) และเจลาติน (gelatin) ไม่นิยมใช้เพราะมีจุดหลอมเหลวต่ำ

การตรึงเซลล์ที่มีอินเวอร์เทสโดยวิธีต่าง ๆ ได้แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 วิธีการตรึงเซลล์ที่มีอินเวอร์เทส

| วิธีการตรึง | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|
| 1.การยึดเกาะด้วยวิธีเชื่อมโยง (cross-linking) | D'Souze , 1985 |
| -การตรึงเซลล์ยีสต์บนแผ่นกระจก | |
| 2.การตรึงโดยการโอบล้อม (entrapping method) | |
| -การตรึงเซลล์ยีสต์บนวุ้น (agar pellet) | Toda & Shoda , 1975 |
| -การตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยอัลบูมินและกลูตารัลดีไฮด์ | สิวลี , 1987 |

1.6 คุณสมบัติของเอนไซม์และเซลล์ตรึงรูป

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ และ เซลล์ตรึงรูปมีดังต่อไปนี้ (Chibata , 1982)

1.6.1 ความเจาะจงต่อสารตั้งต้น (substrate specificity) เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูปมีความเจาะจงต่อสารตั้งต้นที่มีขนาดเล็กได้ดี แต่ในกรณีที่สารตั้งต้นมีขนาดใหญ่มาก ความเจาะจงต่อสารตั้งต้นจะลดลง

1.6.2 เสถียรภาพ (stability) มีเสถียรภาพต่อสารเคมีต่าง ๆ และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น

1.6.3 pH ที่เหมาะสม (optimum pH) อาจมีการเปลี่ยนแปลง pH เนื่องจาก การเปลี่ยนแปลงประจุภาคของเอนไซม์กับตัวยึด

1.6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) มีการเปลี่ยนแปลงเสถียรภาพต่อความร้อน บางกรณีสูงกว่าเอนไซม์อิสระ

1.6.5 ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ (kinetic constant) อาจมีการเปลี่ยนแปลงค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงประจุภาคในเอนไซม์และตัวยึด

1.7 เหตุจูงใจในการทำวิจัย

จากงานวิจัยของสิวลีซึ่งได้ศึกษาการตรึงรูปยีสต์ทำเบียร์โดยใช้คัลเซียมอัลจิเนต (สิวลี , 1987) พบว่าได้ค่า Effectiveness factor ประมาณ 0.5 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งแสดงว่าเซลล์ยีสต์ที่อยู่ด้านในของเซลล์ตรึงรูปไม่มีส่วนในการเกิดแอคติวิตีเท่าที่ควร

ในงานวิจัยนี้จึงใช้การตรึงรูปยีสต์โดยวิธีเคลือบบนตัวยึดเพื่อขจัดปัญหาเรื่อง Effectiveness Factor อีกทั้งเมื่อนำมาศึกษาการตรึงรูปยีสต์บนเม็ดทรายซึ่งเป็นตัวยึดที่สามารถหาได้ง่าย และมีราคาถูก ซึ่งทำให้สามารถที่จะผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

ดังนั้นงานวิจัยที่ทำนี้จึงเป็นการหาวิธีที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ทำเบียร์บนทราย รวมทั้งศึกษาลักษณะ สมบัติ และการใช้งานของเซลล์ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์แบบ packed-bed โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเซลล์ตรึงรูปแบบขยายส่วน เพื่อใช้ผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทในระดับอุตสาหกรรม

1.8 ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการตรึงรูปยีสต์ทำเบียร์บนทราย
2. ศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ตรึงรูปที่คัดเลือกได้จากข้อ 1
3. ศึกษาการใช้งานของเซลล์ตรึงรูปในกระบวนการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์แบบ packed-bed
4. ศึกษาค่า Chemical Kinetics ของเซลล์ตรึงรูปที่ได้ในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบไม่ต่อเนื่องและแบบต่อเนื่อง