บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ภาวะที่เหมาะสมในการตริงรูปปาเปนและนิวเตรสบนทราย

5.1.1 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า และเวลาที่เหมาะสมในการตริงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล พบว่าทั้งความเร็วของเครื่องเขย่าและเวลาที่ใช้ในการตริงรูป มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดพันธะโควาเลนต์ค่อนข้างจะซับซ้อนและไม่ค่อยนุ่มนวล ดังนั้นจึงต้องอาศัยพลังงานจลน์ และเวลาการตริงรูปที่เหมาะสมในการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างตัวพยุงซึ่งมีหมู่อัลดีไฮด์ที่พร้อมจะทำปฏิกิริยา Shiff's base กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test จะเห็นว่าที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที เวลาในการตริงรูป 90 นาที จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากที่เวลา 120 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าที่เวลา 90 นาที ก็เพียงพอแล้วในการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์และตัวพยุง สำหรับการตริงรูปที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปที่ได้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากความแรงของเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบนี้เป็นแบบการเคลื่อนที่อย่างช้า ๆ ทำให้มีจำนวนโมเลกุลเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีพลังงานเพียงพอในการเกิดพันธะโควาเลนต์ และเมื่อเพิ่มความเร็วสูงขึ้นเป็น 300 และ 400 รอบ/นาที ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ตริงรูปที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการชนกันของโมเลกุลรุนแรงและเร็วเกินไป จนไม่สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ได้อย่างสมบูรณ์ และอาจทำให้เกิดการทำลายเชิงกลซึ่งมีผลต่อการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเอนไซม์

5.1.2 ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

5.1.2.1 ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปปาเปนบนทราย

จากผลการทดลองข้อ 4.1.2.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล พบว่าทั้งความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส และกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลแบบ Duncan's new multiple range test จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสร้อยละ 3 และ กลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 9 ให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปสูงสุด แต่ไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสร้อยละ 3 และกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่ประหยัด และให้แอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปสูงสุด คือใช้ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสร้อยละ 3 และกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 7 โดยปริมาตร จากข้อมูลในตารางที่ 4.3 จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปที่ได้ค่อนข้างต่ำมากเมื่อใช้สารละลายเอพีทีเอสเพียงอย่างเดียวในการตรึงรูป เนื่องจากสารละลายเอพีทีเอสเป็นสารกระตุ้นตัวพยุงโดยทำให้ตัวพยุงมีหมู่ amine เมื่อไม่มีสารสร้างพันธะร่วมซึ่งทำหน้าที่เชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง จึงไม่สามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงได้ สำหรับกรณีที่ใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียวในการตรึงรูป แอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปที่ได้ค่อนข้างต่ำมากเช่นกัน เนื่องจากหมู่อัลดีไฮด์ของกลูตารัลดีไฮด์ไม่สามารถเกิดพันธะกับทราย เนื่องจากทรายเป็นตัวพยุงที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งไม่สามารถเกิด Shiff's base กับหมู่อัลดีไฮด์ได้ ดังนั้นเมื่อเติมเอนไซม์ลงไปหลังปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้แล้ว ทรายจะไม่สามารถจับกับโมเลกุลบนเอนไซม์ได้ด้วยพันธะโควาเลนต์ แต่อาจจะจับกับทรายด้วยพันธะอื่นที่มีแรงจับกันอ่อนได้บ้าง ดังค่าแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปที่ได้ค่อนข้างต่ำมาก

5.1.2.2 ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปนิวเตรสบนทราย

จากผลการทดลองข้อ 4.1.2.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล พบว่าทั้งความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส และกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของนิวเตรสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6 จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลแบบ Duncan's new multiple range test จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสร้อยละ 0 และกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 ให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของนิวเตรสตรึงรูปสูงสุด แต่ไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสร้อยละ 0 และ 1 และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0 และ 5 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จะเห็นว่าภาวะการตรึงรูปที่ไม่ใช้สารละลายเอพีทีเอสและ/หรือ สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้ได้นิวเตรสตรึงรูปที่มีค่าเฉลี่ยสูงสุดไม่แตกต่างจากภาวะการตรึงรูปที่ใช้ทั้งสารละลายเอพีทีเอสและสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากพันธะที่เกิดขึ้นในกรณีที่ไม่ใช้สารกระตุ้นตัวพยุงและสารสร้างพันธะร่วมดังกล่าวเป็นพันธะแบบดูดซับ (adsorption) ซึ่งแรงที่ใช้ในการเกาะบนอนุภาคทรายเป็นแรงดึงดูดอ่อน ๆ ซึ่งทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวพยุงได้ง่าย ดังนั้นการพิจารณาเลือกภาวะในการตรึงรูปจึงต้องพิจารณาประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของนิวเตรสตรึงรูปบนทรายที่ภาวะต่าง ๆ เพื่อเลือกภาวะการตรึงรูปในการศึกษาต่อไป

5.1.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของนิวเตรสบนทราย

ทดสอบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของนิวเตรสบนตัวพยุงโดยพิจารณาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายโดยนิวเตรสอิสระที่หลุดออกจากตัวพยุง หลังจากแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกที่เวลา 20 นาที ที่ภาวะการตรึงรูปต่าง ๆ ซึ่งเตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอสร้อยละ 0, 0 และ 1 โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 0, 1, และ 5 โดยปริมาตร ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.1

การเลือกภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูป จะพิจารณาภาวะที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการเกาะเกี่ยวกับตัวพยุงดีที่สุด นั่นคือปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นจากนิวเตรสอิสระที่หลุดออกจากตัวพยุงต่อเวลาในการทำปฏิกิริยาต่ำที่สุด ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไทโรซีนและเวลาในการทำปฏิกริยา แสดงดังรูปที่ 4.1 จากการคำนวณความชันของกราฟ พบว่าความชันของกราฟ A', B' และ C' ในรูปที่ 4.1 มีค่าเท่ากับ 2.50, 2.61 และ 0.45 ไมโครกรัม มิลลิลิตร$^{-1}$นาที$^{-1}$ ตามลำดับ จะเห็นว่ากราฟ C' มีความชันน้อยที่สุด ส่วนกราฟ A' และ B' มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสูงกว่าความชันของกราฟ C' 5.5 และ 5.8 เท่า ตามลำดับ นั่นคือการตรึงรูปโดยใช้สารละลายเอพีทีเอสความเข้มข้นร้อยละ 1 และกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นภาวะที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการเกาะเกี่ยวบนตัวพยุงดีที่สุดซึ่งสอดคล้องกับเหตุผลดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.1.1.2

5.1.4 <u>พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการตรึงรูป</u>

พีเอชของสารละลายในระหว่างการตรึงรูปมีความสำคัญมาก เนื่องจากมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการตรึงรูปและประจุของหมู่ทางเคมีของเอนไซม์ โดยจะต้องเป็นพีเอชที่ไม่ทำให้หมู่ของสารที่ใช้ในการเชื่อมขวางระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงนั้นไปจับกับหมู่เร่งปฏิกริยา (catalytic group) ที่อยู่บนบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ และควรเป็นพีเอชที่หมู่ทางเคมีของตัวพยุงที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการจับกับเอนไซม์เกิดพันธะกันได้อย่างดีที่สุด จากการทดลองแปรพีเอชของสารละลายป่าเป่นและนิวเตรส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ พิจารณากราฟรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมในการตรึงรูปป่าเป่นและนิวเตรสบนทรายคือ พีเอช 8.5 (ทริสบัฟเฟอร์) และ พีเอช 6.0 (อะซิเตท-บัฟเฟอร์) ตามลำดับ

5.1.5 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการตรึงรูป

5.1.5.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของปาเปนในการตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.1.5.1 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.10 พิจารณากราฟรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของปาเปนมากขึ้นแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-5 และเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากการวิเคราะห์ผลข้อมูลพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูปมีผลต่อแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$)ดังแสดงในตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลแบบ Duncan's new multiple range test พบว่าค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปที่ได้สูงสุดเมื่อใช้สารละลายปาเปนความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่ไม่แตกต่างจากความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 6 ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายปาเปนความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปปาเปนบนทราย อย่างไรก็ตามได้มีนักวิจัยหลายท่านได้ทดลองตรึงรูปปาเปนบนตัวพยุงต่าง ๆ และพบว่าความเข้มข้นของสารละลายปาเปนที่เหมาะสมในการตรึงรูปแปรตามวิธีการตรึงรูป ชนิดของตัวพยุง และแอคติวิตีเริ่มต้นของปาเปน ดังนี้ Emi และ Murase (1990) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายปาเปน (3.5 m Anson μg/mg, Merck) ที่เหมาะสมในการตรึงรูปบน copoly (ethylene/acrylic acid) fiber คือ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Hiyashi และคณะ (1992) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายปาเปน (3.5 m Anson μg/mg,Merck) ที่เหมาะสมในการตรึงรูปด้วยวิธี azide method บน porous poly -(δ-methyl-L-glutamate)beads คือ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Goldstein และคณะ (1970) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายปาเปน (13-18 esterase unit/mg) ที่เหมาะสมในการตรึงรูปบน (dialdehyde)-starch-methylenedianiline (S-MDA) คือ 3 มิลลิกรัม /100 มิลลิกรัมตัวพยุง

5.1.5.2 <u>ความเข้มข้นที่เหมาะสมของนิวเตรสในการตริงรูป</u>

จากผลการทดลองข้อ 4.1.5.2 ผลการทดลองแสดงดังตาราง ที่ 4.12 พิจารณากราฟรูปที่ 4.13 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของนิวเตรสมากขึ้นแอคติวิตีของนิวเตรสตริงรูปที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-3 และเริ่มคงที่ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3-8 โดยปริมาตร จากการวิเคราะห์ผลข้อมูล พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตริงรูปมีผลต่อแอคติวิตีของนิวเตรสตริงรูปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลแบบ Duncan's new multiple range test พบว่าค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของนิวเตรสตริงรูปที่ได้สูงสุดเมื่อใช้สารละลายนิวเตรสความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่ไม่แตกต่างจากความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายนิวเตรสความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นภาวะที่เหมาะสมในการตริงรูปนิวเตรสบนทราย สำหรับงานวิจัยของประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และปราณี อ่านเปรื่อง (2535) ซึ่งทดลองตริงนิวเตรสบนไนลอน พบว่าแนวโน้มของแอคติวิตีนิวเตรสตริงรูปที่ได้แปรตามความเข้มข้นของนิวเตรสที่ใช้ในการตริงรูป และเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร

5.2 <u>โครงสร้างของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปเปรียบเทียบกับโครงสร้างของทรายสะอาดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (SEM)</u>

จากผลการทดลองข้อ 4.2 เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจดูโครงสร้างของทรายสะอาดเปรียบเทียบกับโครงสร้างของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปด้วยเครื่อง SEM แสดงดังรูปที่ 4.4 ที่กำลังขยาย 350 เท่า จะเห็นว่าผิวทรายสะอาดมีลักษณะขรุขระและมีรูพรุนขนาดต่าง ๆ รอบ ๆ เม็ดทราย และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 5,000 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โครงสร้างของทรายชัดเจนยิ่งขึ้น เมื่อพิจารณารูปที่ 4.6 และ 4.7 ซึ่งเป็นรูปของปาเปนตริงรูปบนทรายที่กำลังขยาย 5,000 เท่า จะเห็นว่ามีกลุ่มโปรตีนของเอนไซม์เกาะอยู่บนทรายที่มีผิวขรุขระ สำหรับรูปที่ 4.8 และ 4.9 เป็นรูปของนิวเตรสตริงรูปบนทรายที่กำลังขยาย 5,000 เท่า ซึ่งจะเห็นว่ากลุ่มโปรตีนของนิวเตรสมีขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าปาเปน

5.3 สมบัติเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปเทียบกับปาเปนและนิวเตรสอิสระ

5.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของปาเปน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.14 พิจารณากราฟรูปที่ 4.10 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากขึ้น แอคติวิตีของปาเปนทั้งอิสระและตริงรูปเพิ่มมากขึ้น และแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากันคือ 80 °C จากนั้นแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 80-100 °C ทั้งนี้โดยทั่วไป อิทธิพลของอุณหภูมิจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 2 ประการ (Stauffer, 1989) คือ

(1) เพิ่มอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้สัดส่วนโมลของโมเลกุลเอนไซม์ที่มีพลังงานเท่ากับพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาที่สารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทจะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น

(2) การเพิ่มอุณหภูมิถึงจุดหนึ่งจะเป็นการเพิ่มอัตราการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะเสียสภาพของโปรตีน (protein denaturation) ไปด้วยความร้อนสูง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างปาเปนตริงรูปและอิสระ จะเห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 80 °C ปาเปนอิสระมีแอคติวิตีสูงกว่าปาเปนตริงรูป ทั้งนี้เนื่องมาจากการตริงรูป ทำให้อนุภาคของเอนไซม์ตริงรูปไม่มีอิสระในการเคลื่อนที่ และเมื่อพิจารณาในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 80 ° C แอคติวิตีของปาเปนตริงรูปสูงกว่าปาเปนอิสระ เนื่องจากการที่ลักษณะของทรายชิ่งมีขนาดใหญ่ มีผิวขรุขระและรูพรุนจำนวนมาก ทำให้อุณหภูมิรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ต่ำกว่าอุณหภูมิของสารละลายภายนอกจึงทำให้ปาเปนตริงรูปทนต่ออุณหภูมิได้สูงกว่าปาเปนอิสระ

สำหรับการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของนิวเตรส แสดงดังตารางที่ 4.15 พิจารณากราฟรูปที่ 4.10 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิมากขึ้นแอคติวิตีของนิวเตรสอิสระและตริงรูปเพิ่มมากขึ้น และแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากันคือ 50 ° C จาก

นั้นแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 50-80 ° C เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์อิสระและตรึงรูปจะเห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 ° C นิวเตรสตรึงรูปมีแอคติวิตีที่ต่ำกว่านิวเตรสอิสระ เมื่อพิจารณาในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 60 ° C แอคติวิตีของนิวเตรสตรึงรูปสูงกว่านิวเตรสอิสระ ทั้งนี้สามารถอธิบายเหตุผลได้ในทำนองเดียวกันกับกรณีของปาเปน

จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Puvanakrishnan และ Bose (1980) ซึ่งตรึงรูปทริปซินบนทรายโดยใช้สารละลายเอพีทีเอสเป็นสารกระตุ้นตัวพยุงและกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าทั้งทริปซินอิสระและตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากันคือ 45 ° C โดยทริปซินตรึงรูปสามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ดีกว่าทริปซินอิสระ เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Ohmiya และคณะ (1978) ซึ่งทดลองตรึงรูป alkaline protease และ rennet บน Dowex MWA-1 (ขนาด 20-50 เมช) โดยใช้สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าทั้ง alkaline protease และ rennet อิสระและตรึงรูป แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากันคือ 60 ° C และ 50 ° C ตามลำดับ โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าสูงกว่าอิสระ ตลอดช่วงอุณหภูมิ 30-70 ° C อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1984 Puvanakrishnan และ Bose ได้ทดลองตรึงรูปเปปซินบนทราย โดยใช้สารละลายเอพีทีเอสเป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และ 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าอุณหภูมิที่เปปซินอิสระและตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดคือ 40 ° C และ 45 ° C ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของประพันธ์ ปิ่นคีโรดม และปราณี อ่านเปรื่อง (2535) ซึ่งทดลองตรึงรูปนิวเตรสบนผ้าไนลอน พบว่านิวเตรสอิสระและตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 ° C และ 55 ° C ตามลำดับ โดยนิวเตรสตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงกว่าอิสระในช่วงอุณหภูมิที่มากกว่า 50 ° C จะเห็นว่าการตรึงรูปเอนไซม์มีผลทำให้อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุดไม่เปลี่ยนแปลง หรือเปลี่ยนแปลงไปในทางที่สูงขึ้น ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ วิธีการตรึงรูป และลักษณะทางเคมีและกายภาพของตัวพยุง สรุปแล้วการตรึงรูปโดยวิธีที่เสนอนี้มีผลทำให้เอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งจะเป็นข้อได้เปรียบในการใช้งานทางอุตสาหกรรม ซึ่งมักเกิดปัญหาในการควบคุมอุณหภูมิวัตถุดิบที่มีปริมาณมากให้มีอุณหภูมิที่สม่ำเสมอตลอดเวลา โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในทางที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณากราฟรูปที่ 4.10 อีกครั้ง จะเห็นว่าที่อุณหภูมิสูงปาเปนและนิวเตรสอิสระมี

แอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่ปาเปนและนิวเตรสตริงรูปยังคงมีแอคติวิตีคงเหลือสูงกว่ามาก เช่นที่อุณหภูมิ 90 ° C ปาเปนอิสระแอคติวิตีคงเหลือเพียงร้อยละ 25.84 ขณะที่ปาเปนตริงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือถึงร้อยละ 47.07 และที่อุณหภูมิ 70 ° C นิวเตรสอิสระมีแอคติวิตีคงเหลือเพียงร้อยละ 1.29 ขณะที่นิวเตรสตริงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 12.67

5.3.2 <u>พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์</u>

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของปาเปน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.16 จากกราฟรูปที่ 4.11 จะเห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาของปาเปนตริงรูปมีค่าเท่ากับ 5.9 ขณะที่พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของปาเปนอิสระคือ 6.4 นั่นคือการตริงรูปทำให้พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เลื่อนไปจากเดิมทางกรด 0.5 หน่วย ทั้งนี้อธิบายได้ว่าการที่พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตริงรูปแตกต่างจากอิสระนั้นเป็นผลมาจากประจุบนตัวพยุง การเกิดการดัดแปรทางเคมี (chemical-modification) ของเอนไซม์จากการตริงรูป โดยอาจเกิดจากกรดอะมิโนบางตัวที่มีส่วนร่วมในการเกิดพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุง มีผลทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดประจุสุทธิของโปรตีนเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชมากน้อยแค่ไหน ขึ้นกับชนิด ธรรมชาติ และจำนวนของกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลง (Goldstein และคณะ, 1970) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pK ของหมู่อิออนไนซ์ได้ในบริเวณเร่ง (active site ionizing group) ของเอนไซม์ตริงรูป การที่ประจุบนตัวพยุงมีผลต่อพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตริงรูป เนื่องจากเอนไซม์ตริงรูปจะสร้างสภาวะแวดล้อมเล็ก ๆ (microenvironment) รอบ ๆ ตัวพยุง มีผลทำให้เกิดการแพร่กระจายของโปรตอนแตกต่างจากภาวะปกติ (Trevan, 1980) ดังนั้นการที่พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของปาเปนตริงรูปเลื่อนไปทางกรดนั้น แสดงว่าการตริงรูปปาเปนบนทรายโดยวิธีนี้ทำให้เกิดอิออนบวกเป็นส่วนใหญ่ที่บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ตริงรูป ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการผลักโปรตอนออกไปยังสารละลายภายนอก มีผลทำให้บริเวณรอบ ๆ เอนไซม์มีพีเอชสูงกว่าสารละลายภายนอก จากการทดลองนี้พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของปาเปนอิสระคือ 6.4 แต่ที่พีเอช 6.4 เอนไซม์ตริงรูปแสดงแอคติวิตีเพียงร้อยละ 90 เท่านั้น หรือเทียบได้ว่าแสดงแอคติวิตีที่พีเอช 6.9 นั่นคือพีเอชภายในบริเวณรอบ ๆ เอนไซม์จะสูง

กว่าสารละลายภายนอก 0.5 หน่วย ดังนั้นเมื่อลดพีเอชของสารละลายเป็น 5.9 ทำให้พีเอชบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์เทียบเท่ากับที่พีเอช 6.4 ทำให้ปาเปนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Puvanakrishnan และ Bose (1980) ซึ่งพบว่าการตรึงรูปเปปซินบนทรายโดยใช้สารละลายเอมีทีเอสเป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่าพีเอชที่เปปซินตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดเลื่อนไปทางกรด 2 หน่วย และในปีเดียวกันเขาทั้ง 2 พบว่าการตรึงรูปทริปซินบนทรายโดยใช้สารละลายเอมีทีเอสเป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม มีผลทำให้พีเอชที่ทริปซินตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดเลื่อนไปทางกรด 0.3 หน่วย และในปี 1984 เขาทั้ง 2 พบว่าการตรึงรูปทริปซินบนทรายโดยใช้สารละลายเอมีทีเอสเป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และ EDC เป็นสารสร้างพันธะร่วม มีผลทำให้ทริปซินตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดเลื่อนไปทางกรด 1.7 หน่วย จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของนิวเตรส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.17 จากกราฟรูปที่ 4.11 จะเห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของนิวเตรสตรึงรูปมีค่าเท่ากับ 7.1 ขณะที่พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของนิวเตรสอิสระคือ 6.7 นั่นคือการตรึงรูปทำให้พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เลื่อนไปจากเดิมทางด่าง 0.4 หน่วย ทั้งนี้อธิบายได้ในทางตรงกันข้ามกับปาเปน กล่าวคือการตรึงรูปนิวเตรสบนทรายโดยวิธีนี้ทำให้เกิดอิออนลบเป็นส่วนใหญ่ที่บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการดูดโปรตอนเข้ามารอบ ๆ เอนไซม์ ทำให้บริเวณรอบ ๆ เอนไซม์มีพีเอชต่ำกว่าสารละลายภายนอก จากการทดลองนี้พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของนิวเตรสอิสระคือ 6.7 แต่ที่พีเอช 6.7 เอนไซม์ตรึงรูปแสดงแอคติวิตีเพียงร้อยละ 87 เท่านั้น และเมื่อเพิ่มพีเอชเป็น 7.1 ทำให้ปริมาณโปรตอนรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ลดลงเทียบเท่ากับที่พีเอช 6.7 ทำให้นิวเตรสตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 7.1 เนื่องจากพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปคือ 5.9 และ 7.1 ตามลำดับ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องปรับพีเอชของน้ำนึ่งปลาให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากน้ำนึ่งปลามีพีเอชอยู่ในช่วงที่ปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดคือ 6.0-7.0 ทำให้ไม่สิ้นเปลืองเวลา แรงงาน อุปกรณ์ และสารเคมีที่จำเป็นต้องใช้ในการรักษาพีเอชของระบบให้สม่ำเสมอ

5.3.3 ผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของปาเปนอิสระและตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.18 จากกราฟรูปที่ 4.12 ก จะเห็นว่าปาเปนอิสระและตรึงรูปมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 50 ° C ใกล้เคียงกัน ขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 ° C พบว่าเอนไซม์ปาเปนตรึงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือสูงกว่าปาเปนอิสระ โดยที่เวลา 50 นาที ปาเปนอิสระมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 37.59 ขณะที่ปาเปนตรึงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 41.97 เนื่องจากปาเปนเป็นเอนไซม์ประเภท sulfhydryl protease ซึ่งมี disulfide bond ที่ต้านทานต่อความร้อนจึงทำให้ปาเปนอิสระมีเสถียรภาพต่อความร้อนค่อนข้างสูงใกล้เคียงกับปาเปนตรึงรูปที่อุณหภูมิ 70 °C

สำหรับการศึกษาผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของนิวเตรสอิสระและตรึงรูป แสดงดังตารางที่ 4.19 จากกราฟรูปที่ 4.12 ข จะเห็นว่านิวเตรสอิสระและตรึงรูปมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 50 ° C ใกล้เคียงกัน ขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 ° C พบว่านิวเตรสตรึงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือสูงกว่านิวเตรสอิสระค่อนข้างมาก โดยที่เวลา 50 นาที นิวเตรสอิสระมีแอคติวิตีคงเหลือเพียงร้อยละ 1.39 ขณะที่นิวเตรสตรึงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือถึงร้อยละ 38.75 ทั้งนี้อธิบายได้ว่า การที่ความร้อนสามารถทำลายเสถียรภาพของเอนไซม์นั้น เนื่องจากความร้อนทำให้สัดส่วนของโมเลกุลจำนวนมากที่มีพลังงานเพียงพอที่จะถึงสภาวะเสียธรรมชาติ (denature state) แต่การตรึงรูปเอนไซม์โดยเฉพาะบนตัวพยุงทราย ซึ่งมีผิวที่ขรุขระและเป็นตัวพยุงที่มีขนาดใหญ่ จะช่วยบดบังอิทธิพลของความร้อนที่จะเข้ามาถึงบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ให้ลดน้อยลง นอกจากนี้พันธะโควาเลนต์ซึ่งทำหน้าที่ยึดเอนไซม์กับตัวพยุงจะช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของโปรตีนเอนไซม์เมื่อได้รับความร้อน ได้มีผู้วิจัยหลายท่านได้ทดลองหาเสถียรภาพต่อความร้อนของเอนไซม์กลุ่มโปรติเอสตรึงรูปเทียบกับอิสระบนตัวพยุงต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองสนับสนุนผลงานวิจัยดังนี้ Emi และ Murase (1990) พบว่าการตรึงรูปปาเปนบน copoly (ethylene/acrylic acid) fiber ทำให้ปาเปนตรึงรูปมีเสถียรภาพดีกว่าปาเปนอิสระที่อุณหภูมิ 70 ° C นาน 60 นาที โดยมีแอคติวิตีคงเหลือสูงกว่าอิสระถึง 3 เท่า Hayashi และคณะ (1992) พบว่าการตรึงรูปปาเปนบน porous poly (δ-methyl L-glutamate) beads ทำให้ปาเปนตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อความร้อนดีกว่าปาเปนอิสระที่อุณหภูมิ 70 ° C นาน 60 นาที ถึง 2-3 เท่า Puvanakrishnan และ Bose (1980) พบว่าการตรึงรูปเปปซินบนทรายมีทำให้

ทริปซินตริงรูปมีเสถียรภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 25-45 ° C พีเอช 5.0 นาน 30 นาที โดยแอคติวิตีไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45-60 ° C แอคติวิตีค่อย ๆ ลดลง แต่ยังมีแอคติวิตีคงเหลือสูงกว่าเปปซินอิสระในช่วงอุณหภูมิ 25-60 ° C Ohmiya และคณะ (1978) พบว่าการตริงรูป alkaline proteases และ rennet บน Dowex MWA-1 มีเสถียรภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60 ° C นาน 2 ชั่วโมง โดยมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 70 ขณะที่เอนไซม์อิสระมีแอคติวิตีคงเหลือเพียงร้อยละ 30 Anprung และคณะ (1989) พบว่าเรนนินตริงรูปบนทรายมีเสถียรภาพต่อความร้อนดีกว่าอิสระตลอดช่วงอุณหภูมิ 50-60 ° C

จากงานวิจัยต่าง ๆ จะเห็นว่าการตริงรูปมีผลทำให้เอนไซม์ตริงรูปที่ได้มีเสถียรภาพดีกว่าเอนไซม์อิสระ ทำให้มีข้อได้เปรียบในการใช้งานทางอุตสาหกรรมมากเนื่องจากเอนไซม์อิสระบางชนิดแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง เมื่อนำมาใช้งานในอุตสาหกรรมจะมีปัญหาในด้านเสถียรภาพต่อความร้อน เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างมากตามเวลาการใช้งาน ทำให้ยากต่อการควบคุมคุณภาพและปริมาณผลผลิตที่ได้ ดังนั้นการนำเอนไซม์ตริงรูปมาใช้จึงให้ผลดีในแง่เสถียรภาพต่อความร้อน โดยสามารถใช้งานกับระบบที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงได้เป็นเวลานาน โดยแอคติวิตีไม่ลดหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระจึงเหมาะสมกับการนำเอนไซม์ตริงรูปไปใช้งานในระบบต่อเนื่องได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.3.4 <u>ผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์</u>

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเสถียรภาพต่อพีเอชของเอนไซม์ตริงรูป คือธรรมชาติทางเคมีของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดพันธะระหว่างโปรตีนเอนไซม์และตัวพยุง และเสถียรภาพของโครงสร้างจตุรภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีนบนเอนไซม์อิสระ (Goldstein และคณะ, 1970) จากการศึกษาเสถียรภาพของปาเปนตริงรูปและอิสระที่พีเอช 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.5 ที่อุณหภูมิ 37 ° C เวลา 0-3 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ พิจารณากราฟรูปที่ 4.13 ก จะเห็นว่าปาเปนอิสระมีเสถียรภาพดีที่พีเอช 5.0 และมีเสถียรภาพลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ขณะที่ปาเปนตริงรูปมีเสถียรภาพดีกว่าอิสระในช่วงพีเอชที่เป็นกลางถึงด่างคือ 7.0 และ 8.5 และมีเสถียรภาพน้อยกว่าอิสระที่พีเอช 5.0 และ 6.0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Goldstein และคณะ (1970)

ซึ่งรายงานว่าปาเปนอิสระมีเสถียรภาพดีที่พีเอช 5.0-6.5 ขณะที่ปาเปนตรึงรูปบน S-MDA มีเสถียรภาพต่อพีเอชดีกว่าปาเปนอิสระที่พีเอชมากกว่า 6.5 สำหรับผลการศึกษาเสถียรภาพของนิวเตรสตรึงรูปและอิสระที่พีเอช 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.5 ที่อุณหภูมิ 37 ° C ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.22 และ 4.23 ตามลำดับ พิจารณากราฟรูปที่ 4.13 ข จะเห็นว่านิวเตรสตรึงรูปมีเสถียรภาพดีที่พีเอชในช่วงกลางถึงด่างคือ 7.0 และ 8.5 โดยที่พีเอช 7.0 แอคติวิตีของนิวเตรสตรึงรูปใกล้เคียงกับอิสระ และมีเสถียรภาพดีกว่าอิสระที่พีเอช 5.0 และ 8.5

เนื่องจากน้ำนึ่งปลาที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองนี้มีพีเอชอยู่ในช่วง 6.0-7.0 ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพการใช้งานระหว่างปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปดังที่รายงานตอนต้นนี้สำหรับไปสู่งานในอุตสาหกรรมแล้ว จะเห็นว่านิวเตรสมีข้อได้เปรียบกว่าปาเปนในแง่มีเสถียรภาพดีกว่าปาเปนที่พีเอชสูงกว่า 6.0 และมีเสถียรภาพดีมากที่พีเอช 7.0 นาน 90 นาที โดยแอคติวิตีลดลงเพียงร้อยละ 6.0

5.3.5 ค่าคงที่ไมคิลิส (Michaelis, Km)

จากผลการศึกษาค่าคงที่ไมคิลิสของปาเปน โดยวิเคราะห์วิเคราะห์แอคติวิตีของปาเปนอิสระและตรึงรูปที่พีเอช 6.4 และ 5.9 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 80 °C และหาค่า Km โดยวิธี Lineweaver-Burk plot คำนวณค่า 1/S และ 1/V ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.14 ซึ่งหาค่า Km ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.26 จะเห็นว่าค่า Km ของปาเปนตรึงรูปมีค่าน้อยกว่าปาเปนอิสระ 7.29 เท่า แสดงว่าการตรึงรูปเอนไซม์มีผลทำให้สับสเตรทมีแรงดูด (affinity) สำหรับจับกับเอนไซม์ดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการตรึงรูปโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ มีผลช่วยปรับปรุงโครงรูปของเอนไซม์ให้มีลักษณะเหมาะสมสำหรับการเข้าจับของสับสเตรท ณ บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ดีขึ้น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าปาเปนตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับสับสเตรทดีกว่าปาเปนอิสระ

สำหรับผลการศึกษาค่าคงที่ไมคิลิสของนิวเตรส โดยวิเคราะห์แอคติวิตีของนิวเตรสอิสระและตรึงรูปที่พีเอช 6.7 และ 7.1 ตามลำดับที่อุณหภูมิ 50 ° C และหาค่า Km โดยวิธี Lineweaver-Burk plot คำนวณค่า 1/S และ 1/V ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.25 และรูปที่ 4.14 ซึ่งหาค่า Km ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.26 จะเห็นว่าค่า Km ของ

นิวเตรสตรึงรูปมีค่าน้อยกว่านิวเตรสอิสระ 4.88 เท่า แสดงว่าการตรึงรูปนิวเตรสมีผลทำให้สับสเตรทมีแรงดูด (affinity) สำหรับจับกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และปราณี อ่านเปรื่อง (2535) ซึ่งพบว่านิวเตรสตรึงรูปบนไนลอนมีค่า Km เท่ากับ 9.71×10^{-4} โมลาร์ ขณะที่นิวเตรสอิสระมีค่า Km เท่ากับ 1.25×10^{-2} โมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าอิสระ 12.8 เท่า ที่อุณหภูมิ 55 °C ผลการทดลองที่ปรากฏนี้อาจนับได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบอีกข้อหนึ่งของเอนไซม์ในลักษณะตัวเร่งปฏิกิริยาแข็ง (solid catalyst) ที่เตรียมได้สำหรับในกรณีการย่อยสลายสับสเตรทเคซีน นอกจากนี้ยังมีผลงานวิจัยของ Anprung และคณะ (1989) ซึ่งสนับสนับสนุนผลการลดลงของค่า Km ของโปรติเอสตรึงรูปบนทราย โดยพบว่าค่า Km ของเรนนินตรึงรูปบนทรายมีค่าเท่ากับ 4.18 ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าอิสระ (6.75 ไมโครโมลาร์) 1.6 เท่า

5.3.6 <u>ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์</u>

จากผลการทดลองศึกษาค่าแอคติวิตีจำเพาะของปาเปนและนิวเตรสอิสระที่พีเอช 6.4 และ 6.7 ที่อุณหภูมิ 80 ° C และ 50 ° C ตามลำดับ และตรึงรูปที่ 5.9 และ 7.1 ที่อุณหภูมิ 80 ° C และ 50 ° C ตามลำดับ หาค่า Km โดยวิธี Lineweaver-Burk plot คำนวณค่า 1/S และ 1/V ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.27 จะเห็นว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของปาเปนอิสระมีค่า 482.3 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่ปาเปนตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 451.98 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งน้อยกว่าปาเปนอิสระ 1.07 เท่า สำหรับค่าแอคติวิตีจำเพาะของนิวเตรสอิสระมีค่าเท่ากับ 4608.4 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่นิวเตรสตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพียง 337.9 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีนเท่านั้น ซึ่งน้อยกว่านิวเตรสอิสระถึง 13.6 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากการตรึงรูปทำให้การเคลื่อนที่ของเอนไซม์ตรึงรูปไม่อิสระเพียงพอเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ดังนั้นเมื่อเทียบที่โปรตีนเอนไซม์เท่ากัน ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจึงมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ หรืออาจเกิดจากภาวะการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ค่อนข้างรุนแรง ดังนั้นอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ เป็นผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ลดลง

การลดลงของค่าแอคติวิตีจำเพาะของนิวเตรสตรึงรูปบนทรายสอดคล้องกับผลงานวิจัยของประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และปราณี อ่านเปรื่อง (2535) ซึ่งพบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของนิวเตรสอิสระและตรึงรูปบนผ้าไนลอนมีค่าเท่ากับ 717.2 และ 611.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเทียบเป็นจำนวนเท่าแล้วพบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของนิวเตรสตรึงรูปน้อยกว่าอิสระ 1.17 เท่า

5.4 ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.4 วิเคราะห์แอคติวิตีคงเหลือของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูป เมื่อทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายเคซีน 1-7 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.28 และรูปที่ 4.15 จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด ลดลงมาก เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำ 1-3 ครั้งแรก และคงที่เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำในครั้งต่อ ๆ ไป โดยปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 29 และ 50 ตามลำดับ ทั้งนี้อธิบายได้ว่าการทำปฏิกิริยาในช่วง 3 ครั้งแรก แอคติวิตีของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปลดลงอย่างมาก อาจเนื่องจากในระหว่างการตรึงรูปมีเอนไซม์บางส่วนที่เกาะกับตัวพยุงแบบพันธะโควาเลนต์ และบางส่วนเป็นแบบการดูดซับ (adsorption) ซึ่งโมเลกุลเกาะกันด้วยแรงอ่อน ดังนั้นการทดสอบแอคติวิตีที่ได้ในครั้งแรก ๆ ค่าที่ได้จึงเป็นค่ารวมที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ส่วนนี้ร่วมกันกับเอนไซม์ที่เกาะกับตัวพยุงแบบพันธะโควาเลนต์ และผลปรากฏชัดเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำในครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยเอนไซม์ชุดเดิมนี้ในการย่อยสับสเตรทที่เตรียมใหม่ คือเอนไซม์ส่วนที่เกาะกันด้วยการดูดซับตัวพยุงหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่ายในขณะทำปฏิกิริยา และถูกชะออกไปด้วยบัฟเฟอร์ จนกระทั่งเมื่อทำปฏิกริยาซ้ำในครั้งต่อ ๆ ไป คือ 4-7 ครั้ง จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิดไม่เปลี่ยนแปลง กล่าวอีกนัยหนึ่งว่าโมเลกุลเอนไซม์ที่เกาะกับตัวพยุงด้วยแรงเกาะที่แข็งแรงจะหลุดไปกับสารปฏิกิริยาได้ยาก และการใช้งานซ้ำมีผลน้อยต่อเอนไซม์บนตัวพยุงเหล่านี้ดังค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ยังไม่มีแนวโน้มลดลงแต่อย่างใด ข้อนี้ก็เช่นกันที่จะเป็นคุณลักษณะของเอนไซม์ตรึงรูปที่จะได้เปรียบกว่าเอนไซม์อิสระสำหรับการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมในระบบต่อเนื่อง หากมีการพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีแอคติวิตีลดลงตามเวลาการใช้งานแล้วจะต้องปรับโดยเพิ่มปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปต่อสับสเตรทให้มากขึ้นเช่นเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด ทำได้โดยเพิ่ม

จำนวนคอลัมน์ หรือให้สับสเตรทไหลวนซ้ำในเครื่องปฏิกรณ์จนได้ผลผลิตตามต้องการ เป็นต้น

5.5 ผลของสารปฏิกริยาต่อเสถียรภาพของปาเปนและนิวเตรสตริงรูป

5.5.1 ผลของอีดีทีเอและซีสเตอีนต่อเสถียรภาพของปาเปนตริงรูป

จากการทดลองข้อ 4.5.1 เปรียบเทียบผลของอีดีทีเอความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ และซีสเตอีนความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ ในน้ำกลั่นและในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 ต่อแอคติวิตีคงเหลือของปาเปนตริงรูปที่เวลา 0, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.29 จะเห็นว่าสภาวะการเก็บโดยใช้สารละลายอีดีทีเอและซีสเตอีนในสารละลายทริสบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 เป็นสภาวะที่ทำให้ปาเปนตริงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือดีที่สุด

การที่อีดีทีเอและซีสเตอีนมีผลช่วยในการรักษาเสถียรภาพของปาเปนนั้น เนื่องจากปาเปนเป็นเอนไซม์ประเภทโปรติเอสที่มีหมู่ซัลไฟดริลในบริเวณเร่งซึ่งถูกยับยั้งแอคติวิตีได้โดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยอากาศและอิออนของโลหะหนัก เช่น Cd^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} และ Pb^{2+} ดังนั้นซีสเตอีนช่วยในการรักษาแอคติวิตีโดยทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกับสารละลายอีดีทีเอซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวจับโลหะหนัก ทั้งนี้ความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ทดลองตามรายงานจากผลงานวิจัยของ Chiou และ Beuchat (1986) ซึ่งตริงรูปปาเปนบน Dowex MWA-1 โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม และพบว่าซีสเตอีนความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ และอีดีทีเอ 2 มิลลิโมลาร์ ช่วยในการรักษาเสถียรภาพของปาเปนตริงรูปได้นานถึง 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 5 °C โดยมีแอคติวิตีคงเหลือสูงถึงร้อยละ 95 จากผลการทดลองที่ได้ทำในที่นี้ตามข้อ 4.5.1 พบว่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์หลังจากการเก็บในภาวะดังกล่าวในระยะ 48 ชั่วโมงแรก จะลดลงอย่างรวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บในบัฟเฟอร์แต่เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามภายใต้ภาวะการเก็บนี้สามารถรักษาแอคติวิตีได้สูงกว่าถึง 3.4 เท่า จึงเลือกภาวะนี้ในการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บระยะยาวสำหรับประเมินอายุการเก็บและความเหมาะสมในการใช้งานของเอนไซม์ตริงรูปต่อไป ดังปรากฏในข้อ 5.6

5.5.2 ผลของแคลเซียมอิออนต่อเสถียรภาพของนิวเตรสตริงรูป

เนื่องจากนิวเตรสเป็นเอนไซม์ประเภท metallo-endopeptidases มี Zn เป็น prosthetic group ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โดย Ca^{2+} มีส่วนสำคัญในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 2×10^{-2} โมลาร์ โดยจะมีผลในการลดการเกิด autolysis จากผลการทดลองข้อ 4.5.2 เปรียบเทียบผลของแคลเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 2×10^{-3} โมลาร์ ในน้ำกลั่น และในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ต่อแอคติวิตีคงเหลือของนิวเตรสตริงรูปที่เวลาเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.30 จะเห็นว่าสภาวะการเก็บโดยใช้สารละลายแคลเซียมซัลเฟตในน้ำกลั่น เป็นสภาวะที่ทำให้นิวเตรสตริงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือดีที่สุด ถึงแม้ว่าแอคติวิตีของนิวเตรสตริงรูปหลังจากการเก็บใน 48 ชั่วโมงแรก จะลดลงประมาณร้อยละ 50 แต่เมื่อเปรียบเทียบการเก็บในสารละลายทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 หรือในสารละลายแคลเซียมซัลเฟตในบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 จะเห็นว่าสภาวะการเก็บนี้สามารถรักษาแอคติวิตีได้สูงกว่าถึง 1.96 และ 1.76 เท่า ตามลำดับ จึงเลือกสภาวะนี้ในการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ในระหว่างการเก็บระยะยาวสำหรับประเมินอายุการเก็บและความเหมาะสมในการใช้งานของเอนไซม์ตริงรูปต่อไป ดังปรากฏในข้อ 5.6

5.6 เสถียรภาพของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปในระหว่างการเก็บ

จากผลการทดลองข้อ 4.5 วิเคราะห์แอคติวิตีของปาเปนตริงรูปซึ่งเก็บในสารละลายอีดีทีเอและซีสเตอีนในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 และนิวเตรสตริงรูปซึ่งเก็บในสารละลายแคลเซียมซัลเฟตในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 ° C) และที่อุณหภูมิตู้เย็น (8-10 ° C) ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 4, 8, 16, 24, 32 และ 65 วัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.31 และรูปที่ 4.16 จะเห็นว่าแอคติวิตีคงเหลือของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่อุณหภูมิ 28-30 ° C ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 8-10 ° C เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงเป็นการเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อาทิเช่นปฏิกิริยาการสูญเสียธรรมชาติของโปรตีน เป็นต้น อย่างไรก็ตามแอคติวิตีของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปที่อุณหภูมิ 8-10 °C ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 1-4 วันแรก คิดเป็นร้อยละ 78.8 และ 53.3 ของแอคติวิตีเริ่มต้นตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลดังที่เคยอธิบายในเรื่องของประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำ

กล่าวคือมีเอนไซม์บางส่วนที่เกาะกับตัวพยุงในลักษณะการดูดซับ (adsorption) ซึ่งจะค่อย ๆ หลุดออกไปเมื่อระยะเวลาการเก็บในสารละลายนานขึ้น จะเห็นว่าแอคติวิตีคงเหลือของปาเปนและนิวเตรสไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บในช่วง 16-65 วัน คือมีแอคติวิตีคงเหลือคิดเป็นร้อยละ 19.5±1.18 และ 34.3±0.16 ตามลำดับ จากข้อมูลนี้อาจจะกล่าวได้ว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปค่อนข้างจะเสถียรหลังจากแช่ในสารละลายที่เลือกมา ที่อุณหภูมิ 8-10 ° C เป็นเวลา 16 วัน ด้วยเหตุผลสนับสนุนจากลักษณะการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์และตัวพยุงด้วยแรงพันธะต่างกันดังได้เคยเสนอไว้แล้ว ข้อมูลที่ปรากฏเช่นนี้มิได้เป็นข้อขัดแย้งสำหรับการนำเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่มีการผลิตต่อเนื่องระยะยาวแต่อย่างใด แต่กลับจะให้ผลดีต่อการนำไปใช้กล่าวคือ ข้อมูลได้ชี้ให้ทราบว่าตลอดระยะเวลาหลังจากแช่เอนไซม์ตรึงรูปในสารละลายไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เอนไซม์ที่เกาะกับตัวพยุงด้วยแรงอ่อนจะเกาะไม่ได้นาน ส่วนกลุ่มเอนไซม์ที่เกาะกับตัวพยุงด้วยแรงที่แข็งแรง เช่นพันธะโควาเลนต์จะยังคงเหลืออยู่ในระดับเดิมตลอดระยะเวลามากกว่า 40 วัน (65-16 วัน) กล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ที่เตรียมได้นี้ค่อนข้างมีแอคติวิตีที่คงตัว (ประมาณ 9.0 และ 23.4 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ) ตลอดระยะเวลาการเก็บค่อนข้างยาว จึงน่าจะประกันความเป็นไปได้ที่จะใช้งานในระบบต่อเนื่องของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้ สำหรับในทางปฏิบัติของการใช้เอนไซม์ในลักษณะ solid catalyst จะมีทางออกสำหรับแก้ไขปัญหาด้านการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยปรับเปลี่ยนแอคติวิตีของเอนไซม์ให้คงตัวในระหว่างปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าเอนไซม์อิสระซึ่งอยู่ในสภาพ liquid catalyst ถ้าเพียงแต่ทราบข้อมูลด้านเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปนั้น อาทิเช่นทำโดยการกระตุ้นเอนไซม์ตรึงรูปใหม่ (reactivation of immobilized enzyme) เพื่อเพิ่มแอคติวิตีหลังจากการใช้งานอย่างต่อเนื่องในระยะเวลาหนึ่ง ดังเช่นการทดลองของ Sakai (1989) ซึ่งทดลองตรึงรูป Fishes Enzyme จาก *Aspergillus sojae* S297 ในการย่อยสลายน้ำนึ่งปลาในเครื่องปฏิกรณ์แบบ Plug Flow Reactor ที่อุณหภูมิ 50 ° C พบว่าเมื่อทำการย่อยสลายจนถึง 20 ครั้ง การสูญเสียแอคติวิตีจะเกิดขึ้นมาก จึงต้องกระตุ้นคอลัมน์โดยการตรึงรูปใหม่บนตัวพยุงเดิม เป็นต้น

5.7 การย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ป่าเบ่นและนิวเตรสตริงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

5.7.1 ผลของอุณหภูมิและจำนวนรอบต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

5.7.1.1 ความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

ความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น หมายถึงความเร็วที่กลุ่มอนุภาคเริ่มขยับตัว ผิวบนสุดของกลุ่มอนุภาคที่เคยไม่เรียบก็เรียบเสมอกัน ความเร็วนี้เป็นความเร็วต่ำสุดที่ทำให้อนุภาคอยู่ในสภาวะเสมือนของไหล และถ้าต้องการให้สภาวะเสมือนของไหลมีคุณสมบัติต่าง ๆ ดีที่สุด จะต้องใช้ความเร็วไม่ต่ำกว่า 1.5 เท่า ของความเร็วต่ำสุด (สมศักดิ์ ดำรงเลิศ, 2528)

จากผลการทดลองข้อ 4.7.1.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.32 พิจารณากราฟรูปที่ 4.17 จะเห็นว่าค่าความเร็วต่ำสุดที่ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชั่นของทรายจำนวน 15 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร จำนวน 1 คอลัมน์ ที่อุณหภูมิ 35 ° C และ 50 ° C เท่ากับ 84 และ 105 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับสมการ 5.1

$$U_{mf}^2 = \frac{D_p^2 (\rho_g - \rho_f) g_c}{1650 \mu} \qquad (5.1)$$

เมื่อ U_{mf} = อัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

D_p = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดของแข็ง

ρ_g = ความหนาแน่นของของแข็ง

ρ_f = ความหนาแน่นของของเหลว

g_c = อัตราเร่งจากแรงโน้มถ่วง

μ = ความหนืดของของไหล

กล่าวคือการทดลองนี้ค่า D_p, ρ_g , g_c และ ρ_f เป็นค่าคงที่ ดังนั้นอัตราเร็วของการไหลจะแปรผักผันกับค่าความหนืดของของไหล เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงค่าความหนืดต่ำลง ดังนั้นอัตราเร็วต่ำสุดที่อุณหภูมิ 50 ° C จึงสูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 ° C และสำหรับค่าความดันตกของระบบเมื่อเกิดฟลูอิไดเซชั่น พบว่าที่อุณหภูมิ 50 ° C ความดันตกมีค่า 4.45 เซนติเมตรปรอท และที่อุณหภูมิ 35 ° C ความดันตกของระบบมีค่า 4.50 เซนติเมตรปรอท ซึ่งสอดคล้องกับสมการ 5.2

$$\Delta P = \frac{200\, U\mu L_e (1-\varepsilon_e)^2}{D_p^2 \phi_s^2 g_c \varepsilon_e^3} \qquad (5.2)$$

เมื่อ ΔP = ความดันตกของเบด

U = ความเร็วของของไหล

μ = ความหนืดของของเหลว

L_e = ความสูงของเบด

ε_e = สัดส่วนช่องว่างเบด

D_p = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดของของแข็ง

ϕ_s = แฟคเตอร์รูปร่าง

g_c = อัตราเร่งจากแรงดึงดูดโลก

สำหรับการทดลองนี้ค่า U, L_e, ε_e, D_p, ϕ_s และ g_c เป็นค่าคงที่ ดังนั้นความดันตกของเบดแปรผันตรงกับความหนืดของของเหลว เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงค่าความหนืดลดต่ำลง ดังนั้นความดันตกในระบบที่อุณหภูมิ 50 ° C จึงต่ำกว่าความดันตกในระบบที่อุณหภูมิ 30 ° C

5.7.1.2 <u>ผลของอุณหภูมิและจำนวนรอบต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา</u>

จากผลการทดลองศึกษาอุณหภูมิและจำนวนรอบต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาที่ space velocity เท่ากับ 13.2 (นาที)$^{-1}$ ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด ขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร จำนวน 1 คอลัมน์ โดยกำหนดปริมาณน้ำนึ่งปลา 4,000 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.33 พิจารณากราฟรูปที่ 4.18 จะเห็นว่าระดับการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา เนื่องจากในการทดลองใช้น้ำนึ่งปลา 4,000 มิลลิลิตร อัตราการไหล 150 มิลลิลิตร/นาที ดังนั้น 1 รอบของการทำปฏิกิริยาใช้เวลา 25 นาที ดังนั้นเมื่อพิจารณาอัตราเร็วในการย่อยสลายต่อเวลาในรอบแรก จะเห็นว่ามีอัตราเร็วในการการย่อยสลายสูง และลดลงในรอบที่ 2 และ 3 ทั้งนี้อธิบายได้ว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ในสับสเตรท เมื่อพันธะเหล่านั้นถูกย่อยสลายไป ก็จะเกิดภาวะจำกัดของสับสเตรท (substrate limitation) ขึ้น (Whitaker,1972) นอกจากนี้อาจเกิดจากเหตุผลหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการใช้งานอย่างต่อเนื่อง อาทิเช่น การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนของเอนไซม์ การดูดซับสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การปนเปื้อนของแบคทีเรีย การหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุง และการถูกรบกวนจากอัตราการไหลในคอลัมน์ (Chibata,1978) เป็นต้น เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิ จะเห็นว่าระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 50 ° C สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 ° C ในทุกรอบของการย่อยสลาย โดยนิวเตรสตรึงรูปย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาได้ดีกว่าปาเปนตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิ 35 ° C ปาเปนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสัมพัทธ์เพียงร้อยละ 10.85 และนิวเตรสตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสัมพัทธ์เพียงร้อยละ 44.34 เท่านั้น ขณะที่อุณหภูมิ 50 ° C ปาเปนตรึงรูปแสดงแอคติวิตีร้อยละ 34.16 ส่วนนิวเตรสแสดงแอคติวิตีสูงสุด (จากผลการทดลองข้อ 4.3.1) สำหรับเหตุผลที่ไม่ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 80 ° C ทั้ง ๆ ที่เป็นอุณหภูมิที่ปาเปนแสดงแอคติวิตีสูงสุด เพราะที่อุณหภูมิสูงถึง 80 ° C เอนไซม์จะมีเสถียรภาพลดลงเมื่อระยะเวลาการใช้งานอย่างต่อเนื่องเพิ่มขึ้น ดังผลการทดลองในตอนต้นเรื่องผลของความร้อนต่อเสถียรภาพของปาเปนข้อ 4.3.3.1 ซึ่งพบว่าปาเปนตรึงรูปมีแอคติวิตีคงเหลือเพียงร้อยละ 44.5 เมื่อแช่ในอ่างน้ำ

ควบคุมอุณหภูมิที่ 70 ° C นาน 60 นาที

5.7.2 ผลของปริมาณปาเปนและนิวเตรสตริงรูปต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

5.7.2.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

จากผลการทดลองข้อ 4.7.2.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.34 พิจารณากราฟรูปที่ 4.19 จะเห็นว่าค่าความเร็วต่ำสุดที่ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชั่นของทรายจำนวน 10, 15 และ 25 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร จำนวน 3 คอลัมน์ต่อเนื่องกัน ที่อุณหภูมิ 50 ° C เท่ากับ 150, 180 และ 200 มิลลิลิตร/นาที นั่นคือเมื่อปริมาณเอนไซม์ตริงรูปในคอลัมน์เพิ่มขึ้น ค่าความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น หมายถึงความเร็วที่กลุ่มอนุภาคเริ่มลอยตัวเป็นอิสระ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่าเม็ดของแข็งอยู่ในสภาวะสมดุลของแรง 2 แรง ที่เกิดขึ้นบนเม็ดของแข็ง คือแรงที่เกิดจากน้ำหนักของตัวเม็ดของของแข็งเองกับแรงพยุงจากของไหล หรือเกิดจากแรงเสียดทานกับแรงต้านของของไหล ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณของของแข็งในเบดมากขึ้น แรงที่เกิดจากแรงเสียดทานกับแรงต้านของของไหลจึงต้องเพิ่มมากขึ้นในการทำให้กลุ่มอนุภาคเริ่มขยับตัว เป็นผลให้ความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัส่นเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของของแข็งในเบด เมื่อพิจารณาความดันตกในเบด จะเห็นว่าเมื่อปริมาณของแข็งในเบดเพิ่มมากขึ้น ความดันตกในเบดเพิ่มขึ้นที่ทุก ๆ อัตราการไหล ซึ่งสอดคล้องกับสมการ 5.3

$$\Delta P = \frac{200\ U\mu L_e (1-\varepsilon_e)^2}{D_p^2 O_s^2 g_c \varepsilon_e^3} \qquad (5.3)$$

เมื่อ ΔP = ความดันตกของเบด

U = ความเร็วของของไหล

μ = ความหนืดของของเหลว

L_e = ความสูงของเบด

ε_e = สัดส่วนช่องว่างเบด

D_p = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดของของแข็ง

ϕ_s = แฟคเตอร์รูปร่าง

g_c = อัตราเร่งจากแรงดึงดูดโลก

กล่าวคือสำหรับการทดลองนี้ค่า L_e, ε_e, D_p, ϕ_s และ g_c เป็นค่าคงที่ และเมื่อพิจารณาที่อัตราการไหลคงที่ จะเห็นว่าค่าความดันตกในเบดแปรผันตามปริมาณความสูงของเบด หรือปริมาณของแข็งในเบดนั่นเอง

5.7.2.1 <u>ผลของปริมาณปาเปนและนิวเตรสตริงรูปต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา</u>

จากผลการทดลองข้อ 4.7.2.1 ศึกษาผลของปริมาณปาเปนและนิวเตรสตริงรูปต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาที่ space velocity เท่ากับ 11.0, 7.9 และ 5.5 (นาที)$^{-1}$ ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร จำนวน 3 คอลัมน์ ต่อเนื่องกัน กำหนดปริมาณน้ำนึ่งปลา 1,000 มิลลิลิตร ไหลวนเวียนภายในคอลัมน์เป็นเวลา 7 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.35 พิจารณากราฟรูปที่ 4.20 จะเห็นว่าระดับการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น โดยมีอัตราเร็วในการย่อยสลายสูงในชั่วโมงแรก และลดลงในชั่วโมงถัดไป ทั้งนี้เนื่องจากเกิดภาวะจำกัดของสับสเตรท เช่นเดียวกับผลการทดลองข้อ 5.7.1.2 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอัตราเร็วในการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาของปาเปน และนิวเตรสตริงรูป จะเห็นว่านิวเตรสตริงรูปย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาได้ดีกว่าปาเปนตริงรูปในทุก ๆ ค่า space velocity ทั้งนี้สืบเนื่องมาจากความแตกต่างของเอนไซม์ทั้งสองในด้านการเสื่อมแอคติวิตีของเอนไซม์ (decay of enzyme activity) โดยอุณหภูมิและระยะเวลาทำปฏิกิริยา กล่าวคือที่ 50 $^{\circ}$ C เป็นอุณหภูมิที่นิวเตรสแสดงแอคติวิตีสูงสุด ขณะที่ปาเปนแสดงแอคติวิตีเพียงร้อยละ 34.16 ของแอคติวิตีระดับสูงสุดเท่านั้น และผลการทดลองข้อ 4.4 ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำโดยกำหนดให้แต่ละครั้งมีระยะเวลาทำปฏิกิริยานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C และพบว่าหลังจากทำปฏิกิริยา

7 ชั่ว รวมระยะเวลาทำปฏิกิริยา 70 นาที ปาเปนมีแอคติวิตีคงเหลือเพียงร้อยละ 29 ของเริ่มต้น ขณะที่นิวเตรสมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 50 ซึ่งมากกว่าปาเปนถึง 1.7 เท่า เมื่อพิจารณาผลของ space velocity ต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนิ่งปลาจะเห็นว่า space velocity มีผลต่ออัตราเร็วในการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนิ่งปลาโดยอัตราเร็วในการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อลดค่า space velocity ลง ผลปรากฏเช่นนี้อธิบายได้ว่าเมื่อลด space velocity ลง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เพิ่มปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปในคอลัมน์ขึ้น มีผลทำให้ปริมาณเอนไซม์ต่อสับสเตรทเพิ่มขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มความเร็วของปฏิกิริยาการย่อยสลาย

เมื่อพิจารณานิวเตรสตรึงรูปที่ space velocity เท่ากับ 5.5 $(นาที)^{-1}$ จะเห็นว่าระดับการย่อยสลายเริ่มคงที่ภายในเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยระดับการย่อยสลายโปรตีนตั้งแต่ 3-7 ชั่วโมง ร้อยละ 78.62 ± 1.05 เทียบเท่ากับการย่อยสลายด้วยนิวเตรสตรึงรูปที่ space velocity เท่ากับ 7.9 $(นาที)^{-1}$ ซึ่งระดับการย่อยสลายเริ่มคงที่ภายในเวลา 3 ชั่วโมงเท่ากัน และมีค่าเฉลี่ยระดับการย่อยสลายโปรตีนตั้งแต่ 3-7 ชั่วโมง ร้อยละ 78.72 ± 1.33 สำหรับการย่อยสลายที่ space velocity เท่ากับ 11.0 $(นาที)^{-1}$ จะเห็นว่าอัตราการย่อยสลายค่อย ๆ เพิ่มขึ้น โดยมีระดับการย่อยสลายสูงสุดที่เวลา 7 ชั่วโมง นั่นคือ ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนิ่งปลาด้วยนิวเตรสตรึงรูปที่ space velocity เท่ากับ 7.9 $(นาที)^{-1}$ นาน 3 ชั่วโมง ก็เพียงพอในการจะทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด เพราะการยืดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนิ่งปลานาน ๆ จะส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งด้านการปนเปื้อนจุลินทรีย์ และการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ทางเคมีและทางกายภาพได้ ดังนั้นการเลือกสภาวะที่ดีต้องพิจารณาด้วยเกณฑ์รวม ได้แก่ปริมาณของผลผลิตหรืออัตราการย่อยสลายระยะเวลาปฏิกิริยาที่จะกระทบต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

เมื่อพิจารณาการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนิ่งปลาด้วยปาเปนตรึงรูปที่ space velocity เท่ากับ 5.5 $(นาที)^{-1}$ จะเห็นว่าระดับการย่อยสลายเริ่มคงที่ภายในเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยระดับการย่อยสลายโปรตีนตั้งแต่ 4-7 ชั่วโมง ร้อยละ 65.44 ± 3.18 สำหรับระดับการย่อยสลายที่ space velocity เท่ากับ 7.9 และ 11.0 $(นาที)^{-1}$ จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการย่อยสลายในคอลัมน์ แต่ยังไม่ถึงระดับการย่อยสลายสูงสุดภายในเวลานานถึง 7 ชั่วโมง และให้ผลผลิตเพียงระดับการย่อยสลายร้อยละ 43.69 และ 41.45 ตามลำดับ

เท่านั้น ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เกิดระดับย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาสูงสุดด้วยป่าเปนตริงรูปคือ ที่ space velocity เท่ากับ 5.5 (นาที)$^{-1}$ นาน 4 ชั่วโมง เพราะการยืดเวลาการทำปฏิกริยานาน ๆ จะมีผลกระทบต่อคุณภาพดังเหตุผลเดียวกับกรณีของการใช้นิวเตรสตริงรูป

จากรูปที่ 4.21 เป็นการเปรียบเทียบลักษณะสารสกัดจากปลาที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์ป่าเปนและนิวเตรสตริงรูปกับน้ำนึ่งปลาเริ่มต้น จะเห็นว่าน้ำนึ่งปลามีลักษณะเป็นสารแขวนลอยของโปรตีน ขณะที่สารสกัดจากปลาที่ได้มีลักษณะใส และมีตะกอนเบาอยู่ที่ก้นหลอด ทั้งนี้เนื่องจากป่าเปนและนิวเตรสทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาได้เป็นสารสกัดจากปลา ซึ่งประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งมีสมบัติในการละลายสูง ส่วนการตกตะกอนอาจเกิดจากมีสายเปปไทด์บางส่วนเกิดการสร้างพันธะจับกันเอง หรืออาจจะจับกับอิออนบางตัวที่มีอยู่ในน้ำนึ่งปลาและทำให้เกิดการตกตะกอนลงมา

5.8 <u>การเตรียมและศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากปลาแบบแห้งและแบบเข้มข้น</u>

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากปลาเข้มข้นซึ่งผ่านการระเหยน้ำภายใต้ความดัน และสารสกัดจากปลาผงแห้งที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยและแช่เยือกแข็งเปรียบเทียบกับสารสกัดจากปลาที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปใด ๆ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.36 จะเห็นว่าสารสกัดจากปลาทั้ง 3 ชนิด มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือเถ้า จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากปลาเข้มข้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำเข้มข้นมีสีน้ำตาลเข้ม ดังรูปที่ 4.22 มีกลิ่นรสปลาย่างดังการทดสอบทางประสาทสัมผัส ซึ่งรายงานจากผู้ทดสอบจำนวนหนึ่ง (ไม่ได้แสดงผลไว้ในที่นี้) สีและกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากปฏิกิริยา Maillard reaction แบบ non-enzymatic browning reaction และ Strecker degradation ในระหว่างการให้ความร้อน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนในโปรตีน หรือในสายเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนอิสระกับ glycosidic sugars ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีอยู่ในสารสกัดจากปลาที่ได้ ปฏิกิริยานี้มีพลังงานกระตุ้น (activation energy) สูง ดังนั้นเมื่ออาหารที่มีโปรตีนและน้ำตาลรีดิวส์ได้รับความร้อนปฏิกิริยาจะเกิดได้ดี (Bender, 1978)

สารสกัดจากปลาผงแห้งที่ได้จากวิธีพ่นฝอยมีสีเหลืองอ่อน ค่อนข้างรวมตัวกัน (agglomerate) ส่วนผงแห้งที่ได้จากวิธีแช่เยือกแข็งมีสีเหลืองอ่อนกว่า โครงสร้างพองเบา (porosity) ดังแสดงในรูปที่ 4.23 และ 4.24 ตามลำดับ

การทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยเป็นการฉีดของเหลวผ่าน atomizer ขึ้นไปสัมผัสกับลมร้อนและถูกทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว จากการทำแห้งที่ความร้อนสูงนี้ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเข้มกว่าการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งซึ่งเป็นวิธีการทำแห้งโดยอาศัยหลักการแช่แข็งอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำให้น้ำระเหิดออกภายใต้ความดัน ซึ่งการทำแห้งด้วยวิธีนี้ใช้อุณหภูมิที่ต่ำมาก ทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะแห้งและเป็นรูพรุนซึ่งมาจากการระเหิดของผลึกน้ำแข็งที่ถูกล้อมรอบด้วยสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ (Fennema, 1975)

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการละลายของสารสกัดจากปลาผงแห้งที่ได้จากการทำแห้งน้ำนึ่งปลาเริ่มต้นและสารสกัดจากปลาที่ได้จากเครื่องปฏิกรณ์ปาเปนและนิวเตรสตริงรูปด้วยวิธีพ่นฝอย และแช่เยือกแข็ง โดยพิจารณาดรรชนีการละลายของไนโตรเจน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.37 จะเห็นว่าผงแห้งที่ได้จากวิธีแช่เยือกแข็ง มีสมบัติการละลายดีกว่าผงแห้งที่ได้จากวิธีพ่นฝอย ทั้งนี้เนื่องจากวิธีพ่นฝอยใช้ความร้อนสูงถึง 200 ° C ประกอบกับ shear force ในระหว่างการปั๊ม และแรงอัดผ่าน atomizer ซึ่งมีผลต่อการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และ functional properties ของผลิตภัณฑ์ ส่วนการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง ใช้อุณหภูมิเพียง 30 ° C ภายใต้ความดันน้อยกว่า 0.1 มม.ปรอท ทำให้รักษาคุณสมบัติเดิมของผลิตภัณฑ์ไว้ได้ดี (Fennema, 1975) เมื่อพิจารณาสารสกัดจากปลาผงแห้งที่ระดับการย่อยสลายสูงสุด พบว่ามีสมบัติการละลายดีกว่าผงแห้งที่ได้จากน้ำนึ่งปลาที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยสลายใด ๆ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธีการทำแห้งแบบเดียวกัน ทั้งนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากการย่อยสลายของเอนไซม์ได้ผลผลิตเป็นเปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีสมบัติการละลายสูง (Adler-Nissan, 1976) นอกจากนี้สารสกัดจากปลาที่ได้จากการย่อยสลายด้วยนิวเตรสตริงรูป มีสมบัติการละลายดีกว่าสารสกัดจากปลาที่ได้จากบทบาทของปาเปนตริงรูปเล็กน้อย ซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะความแตกต่างของระดับการย่อยสลายของโปรตีนของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Quaglia และ Orban (1986) ซึ่งทดลองใช้อัลคาเลสทดลองใช้อัลคาเลสย่อยสลายโปรตีนจากปลาซาร์ดีนและแปรระดับการย่อยสลายโดยแปรอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรท หรือเวลาการย่อยสลาย

ผลการทดลองพบว่าที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 สารสกัดจากปลามีค่าดรรชนีการละลายของไนโตรเจน ร้อยละ 77.0, 82.9, 89.1 และ 92.3 ตามลำดับ กล่าวโดยสรุปก็คือระดับการย่อยสลายโปรตีนต่างกันจะมีผลให้ค่าดรรชนีการละลายของไนโตรเจนต่างกัน

จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระในน้ำนึ่งปลาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากปลาผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.38 พิจารณากราฟรูปที่ 4.25 จะเห็นว่าฮีสติดีน และไลซีนลดลงอย่างมาก ขณะที่กรดอะมิโนอื่น ๆ ลดลงเล็กน้อย ยกเว้นฟีนิลอะลานีน และไทโรซีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Sakai (1989) ซึ่งได้ทดลองย่อยสลายน้ำนึ่งปลาด้วยโปรติเอสตริงรูปที่อุณหภูมิ 50 ° C และพบว่าฮีสติดีน ลดลงอย่างมาก ขณะที่ไกลซีน อะลานีน และกรดกลูตามิคมีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลงานวิจัยของ Hale (1969) ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนจากปลา red Hake ด้วยปาเปน และแบคทีเรียเอนไซม์จาก NOVO ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 65 ° C และ 50 ° C ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่ากรดอะมิโนส่วนใหญ่ลดลงยกเว้นทรีโอนีน และผลงานวิจัยของ Richie และ Mackie (1982) ซึ่งทดลองย่อยสลายเศษปลา white fish ด้วยปาเปนนาน 30 นาที และเปรียบเทียบองค์ประกอบกรดอะมิโนก่อนและหลังการย่อยสลาย พบว่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนทั้งหมดลดลงเล็กน้อย และลดมากในกรณีของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสเตอีน และเมไธโอนีน ทั้งนี้อธิบายได้ว่ากรดอะมิโนบางชนิดถูกออกซิเดชั่นในระหว่างการย่อยสลาย โดยเฉพาะกรดอะมิโนฮิสติดีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบมากในอาหารทะเล และถูกออกซิเดชั่นได้อย่างรวดเร็วในระหว่างการย่อยสลาย นอกจากนี้กรดอะมิโนบางส่วนสามารถเกิดปฏิกิริยา Maillard reaction ระหว่างหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน เปปไทด์ หรือโปรตีน กับ glycosidic sugars เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลงจะเกิด melanoidins ซึ่งมีสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ โดยในช่วงต้นของปฏิกิริยา α-amino groups ของ lysine residues เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา จึงมีผลทำให้ไลซีนลดลงอย่างมาก และในขั้นตอนต่อไป reactive unsaturated polycarbonyl compounds ที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกัน และจับกับกรดอะมิโนอื่น ๆ มีผลทำให้เกิดการลดลงของกรดอะมิโนอื่น ๆ ตามมา (Tannenbaum, 1979)

5.9 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากปลาเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

5.9.1 การใช้สารสกัดจากปลาแบบเข้มข้นในผลิตภัณฑ์บาบิคิวไก่ย่าง

เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากปลาที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นรสหอมของปลาย่าง จึงทดลองใช้ในลักษณะสารให้กลิ่นรสปลาในผลิตภัณฑ์บาบิคิวไก่ ตามตำรับอาหารญี่ปุ่น ผลการศึกษาในด้านนี้ทำโดยการประกอบเป็นอาหาร และเสนอให้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน วัยระหว่าง 23-27 ปี ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านความแรงกลิ่นรสปลาย่างและการยอมรับรวม เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสปลาย่าง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.39

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าผลิตภัณฑ์ยาคิโทริทั้ง 3 ตัวอย่าง แตกต่างกันด้านความแรงกลิ่นรสปลาย่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.40 จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test พบว่าระดับกลิ่นรสปลาย่างในผลิตภัณฑ์ที่เติมสารสกัดจากปลาเข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากปลาอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าผู้ทดสอบสามารถรับกลิ่นรสปลาย่างและแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารสกัดจากปลาเข้มข้นที่ได้ค่อนข้างมาก แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลิ่นรสปลาย่าง ที่ได้จาสารสกัดจากปลาเข้มข้นที่ได้จากปาเปนและนิวเตรสได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการบดบังจากเครื่องเทศ และกลิ่นเหล้ามิริน สำหรับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับรวมในผลิตภัณฑ์ที่เติมสารสกัดจากปลาเข้มข้นที่ได้ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูป พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสอยู่ในช่วง 6.7-7.0 นั่นคือผู้ทดสอบยอมรับการใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้นในผลิตภัณฑ์ยาคิโทริอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างยอมรับได้มาก ดังนั้นถ้าสามารถใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้นเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารในลักษณะที่เป็นของเหลวข้น จะให้ความสะดวกต่อผู้บริโภคมาก เนื่องจากกรรมวิธีการทำยาคิโทริ (บาบิคิวไก่ย่างญี่ปุ่น) จะต้องใช้น้ำที่คั้นจากปลาทาโร (ปลาทูน่า) ย่างมาเป็นส่วนผสมทำให้สิ้นเปลืองเวลา และราคาแพง นอกจากนี้จากข้อมูลสัมภาษณ์บริษัทผู้ผลิตสารสกัดจากปลาเข้มข้นจากน้ำนึ่งปลาทูน่าพันธ์ Skipjack โดยการใช้เอนไซม์อิสระในขั้นตอนการย่อยสลายตามวิธีการที่บริษัทในประเทศญี่ปุ่นกำหนด พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้นี้จะส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นประเทศคู่ค้า

ปลาทูน่ากระป๋อง และใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้นในลักษณะที่ไม่แตกต่างไปจากงานทดลองนี้เว้นแต่ว่าจะมีการประกอบสูตร (formulate) ตามรสชาติพื้นฐานของผู้บริโภคในท้องถิ่นนั้น เช่น เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต น้ำตาล เครื่องเทศ เป็นต้น ในส่วนของผู้ทดสอบคนไทยซึ่งมิได้ผิดเพี้ยนไปจากชาวญี่ปุ่นมากนัก ก็ได้แสดงผลการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารสกัดจากปลาเป็นสารให้ และ/หรือ เสริมรสชาติค่อนข้างดีมาก สิ่งปรากฏเช่นนี้อาจจะเป็นสัญญาณที่จะชี้ให้ทราบว่าสารสกัดจากปลาเข้มข้นโดยวิธีที่นำเสนอนี้น่าจะเป็นผลิตผลพลอยได้อย่างหนึ่งจากน้ำนึ่งปลาที่ควรได้รับความสนใจ

5.9.2 <u>การใช้สารสกัดจากปลาผงแห้งในผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสซุปปลา</u>

เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากปลาผงแห้งที่ได้จากการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูป ซึ่งผ่านการทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย และแช่เยือกแข็ง มีสีเหลืองอ่อน กลิ่นรสหอมของปลา ไม่มีคาวแรง ละลายได้ง่ายในน้ำที่อุณหภูมิห้องได้สารละลายลักษณะซุปใส ที่ใช้ในอาหารทั่วไปของชาวตะวันออก จึงได้ทดลองนำมาใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสซุปปลาในเครื่องปรุงอัดก้อนรสซุปปลา นำซุปก้อนที่ได้มาละลายเป็นน้ำซุปดังแสดงในรูปที่ 4.28 นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรส และการยอมรับรวม โดยเติมน้ำซุปลงในบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.41

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรส ความใส กลิ่นรสแปลกปลอม และการยอมรับรวมในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย และแช่เยือกแข็งทั้งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูป ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.42 โดยมีคะแนนเฉลี่ยด้านกลิ่นรสอยู่ในช่วง 6.0-6.7 (ค่อนข้างมีกลิ่นรสดี) คะแนนด้านความใสอยู่ในช่วง 7.1-7.8 (ค่อนข้างใสเหมือนบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปทั่วไป) และคะแนนด้านกลิ่นรสแปลกปลอมอยู่ในช่วง 7.3-8.1 (ไม่มีกลิ่นรสแปลกปลอม) สำหรับการทดสอบด้านการยอมรับกลิ่นรสปลาในผลิตภัณฑ์บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป พบว่าคะแนนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.1-7.4 นั่นคือผู้ทดสอบยอมรับการใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสปลาที่ได้จากการทำแห้งสารสกัดจากปลาในผลิตภัณฑ์บะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสซุปปลาอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างยอมรับได้มาก เมื่อ

พิจารณาความใสของน้ำซุปในรูปที่ 4.28 จะเห็นว่าน้ำซุปที่ได้จากผงแห้งจากวิธีพ่นฝอยจะใสน้อยกว่าผงแห้งที่ได้จากวิธีแช่เยือกแข็ง แต่ผู้ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ อาจเนื่องจากในน้ำซุปบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปประเภทนี้มีส่วนผสมของเครื่องเทศและพริกป่นอยู่มาก เมื่อบริโภคพร้อมกับบะหมี่ ทำให้ผู้ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ถ้าพิจารณาจากข้อมูลทั่วไปในกระบวนการผลิตสารสกัดจากปลาผงแห้งด้วย 2 วิธีที่กล่าวมานี้จะเห็นว่าวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอยอาจให้ข้อดีในด้านความสามารถในการทำแห้งรวดเร็ว ต่อเนื่อง และต้นทุนการผลิตไม่สูงนักเมื่อเทียบกับวิธีแช่เยือกแข็ง แต่เนื่องจากการทดลองที่รายงานผลขณะนี้นั้นมิได้ประเมินมูลค่าการผลิต (cost of production) เชิงเปรียบเทียบไว้ชัดเจนจึงได้แต่ระบุเปรียบเทียบในลักษณะประมาณเท่านั้น

อย่างไรก็ตามจากการนำเสนอแนวทางการใช้สารสกัดจากปลา 2 แบบ ที่ผลิตได้คือ แบบเข้มข้น สีน้ำตาลเข้ม กลิ่นหอมปลาย่าง และแบบผงแห้ง สีเหลืองอ่อน เป็นสารให้กลิ่นรสปลา ละลายได้ลักษณะซุปใสหรือกึ่งใส มาประกอบสูตรอาหารในลักษณะเป็นสารให้กลิ่นรสปลา และเสริมโปรตีนที่เป็นประโยชน์ดังความปรากฏพร้อมอาจจะยังประโยชน์ต่อไปทั้งทางวิชาการและอุตสาหกรรมท้องถิ่นได้

การนำสารสกัดจากปลาเข้มข้นและแบบแห้งมาใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ยาคิโทริและซุปปลาอัดก้อนนี้ เป็นเพียงแนวทางหนึ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปสู่อุตสาหกรรมที่มีศักยภาพต่อไปในอนาคต