การย่อยสลายเพกตินด้วยเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

นางสาว รุ่งรัตน์ ชัยกิจไทย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-418-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16758298

DEPECTINIZATION BY PECTINASE IMMOBILIZED ON ION-EXCHANGE RESIN

Miss Roongrat Chaikitthai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering

Department of Chemical Engineering

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-418-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายเพกตินด้วยเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน
โดย	นางสาว รุ่งรัตน์ ชัยกิจไทย
ภาควิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะสาร ประเสริฐธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สุวัฒนา พวงเพิกศึก)

..... กรรมการ

(ดร. ธราธร มงคลศรี)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

รุ่งรัตน์ ชัยกิจไทย : การย่อยสลายเพกตินด้วยเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน
(DEPECTINIZATION BY PECTINASE IMMOBILIZED ON ION-EXCHANGE RESIN)
อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, 127 หน้า. ISBN 974-632-418-7

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาการย่อยสลายสารละลายเพกติน โดยใช้เอนไซม์เพกติเนส (NOVOFERM 14) ตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (DOWEX MWA-1) ด้วยพันธะไอออนิก การทดลองประกอบด้วยการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูป เปรียบเทียบสมบัติทางจลนพลศาสตร์ระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ จากผลการศึกษาพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวพยุง ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่าประมาณ 1.53-1.56 หน่วยต่อมิลลิลิตรเอนไซม์ ค่าคงที่ไมเคิลลิสเมนเทนของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าน้อยกว่าเอนไซม์อิสระประมาณ 2.6 เท่า ในขณะที่ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าน้อยกว่าเอนไซม์อิสระประมาณ 1.2 เท่า

ผลของอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรตและความเข้มข้นของสับสเตรตต่อค่าแอกติวิตีจะทำการศึกษาในถังปฏิกรณ์แพ็กเบด พบว่าอัตราการย่อยสลายสับสเตรตและความดันลดจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่แอกติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออัตราการป้อนเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตเพิ่มขึ้น อัตราการย่อยสลายและความดันลดเพิ่มขึ้นเช่นเดียว ในช่วง 150 นาทีแรก ค่าแอกติวิตีที่ความเข้มข้นของสับสเตรตสูงจะสูงกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ หลังจากนั้นแอกติวิตีที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่ำจะสูงกว่าที่ความเข้มข้นสูง การศึกษาเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปทำโดยใช้สับสเตรตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรต 40 มิลลิลิตรต่อนาที ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถย่อยสลายสารละลายเพกตินเป็นปริมาตร 1800 มิลลิลิตรได้อย่างสมบูรณ์ ในเวลา 45 นาที

ภาควิชา .....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต .....รุ่งรัตน์ ชัยกิจไทย.....
สาขาวิชา .....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์.....
ปีการศึกษา ...2537..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C416503 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
KEY WORD: PECTINASE/ ENZYME IMMOBILIZATION/ DEPECTINIZATION
ROONGRAT CHAIKITTHAI : DEPECTINIZATION BY PECTINASE IMMOBILIZED ON ION-EXCHANGE RESIN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr. Ing. 127 pp. ISBN 974-632-418-7

Degradation of pectin by using pectinase immobilized on ion-exchange resin by ionic bond was studied in this work. Experiments were designed to find out suitable conditions for immobilization and to compare kinetic properties between immobilized enzyme and free enzyme. The experimental results showed that a suitable condition for immobilization which provided optimum activity was 0.2 ml/g(support) of enzyme concentration, pH of 3.5, temperature of 35°C and contact time of 4 hr. The optimum activity of immobilized enzyme was approximately 1.53-1.56 units per ml enzyme when the enzyme reacted with 1.0 wt/v% of pectin solution at pH of 3.5 and temperature of 35°C. The Michaelis-Menten constant of immobilized enzyme was 2.6 times less than that of free enzyme while the maximum velocity of reaction of immobilized enzyme was approximately 1.2 times greater than that of free enzyme.

Effect of flow rate of substrate and concentration of substrate on activity of immobilized enzyme were studied in a packed bed reactor. It was found that degradation rate of substrate and pressure drop increased while the activity decreased rapidly when the flow rate increased. When the concentration of substrate increased, degradation rate and pressure drop of the reactor also increased. In the first period, 0-150 minutes, the activity of immobilized enzyme at high substrate concentration was higher than at low concentration. On the other hand, after 150 minutes, the activity of the enzyme at high concentration was lower. Operation stability of immobilized enzyme was studied by using 1.0 wt/v% of pectin solution as feed. Flow rate of substrate was 40 ml/min, and the reaction was carried out at a temperature of 35°C and pH of 3.5. The result showed that 1800 ml of pectin solution was degraded completely in 45 minutes.

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต รุ่งรัตน์ ชัยกิจไทย

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา จิรากร เมืองนพโภชย์

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะสาร ประเสริฐธรรม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ สุวัฒนา พวงเพิกศึก และดร. ธราธร มงคลศรี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ชุติมณฑ์ วีระประภาศพงษ์ และอาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ของการวิจัยด้วยดีตลอดมา จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัย

เนื่องด้วยทุนวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ซึ่งคอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ 1

วัตถุประสงค์ 3

2. ตรวจเอกสาร 4

3. ทฤษฎี 17

เพกติน 17

เอนไซม์เพกติเนส 18

การตรึงรูปเอนไซม์ 20

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ 22

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูป 23

ผลกระทบด้านการถ่ายเทมวลสาร 24

เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์แบบแพ็กเบด 27

4. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 31

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 31

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ 33

วิธีการทดลอง 33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5. ผลการทดลอง วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง 40
ผลการทดลอง และวิเคราะห์ 40
สรุปผลการทดลอง 76
ข้อเสนอแนะ 77
เอกสารอ้างอิง 78
ภาคผนวก 82
ประวัติผู้แต่ง 127

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 องค์ประกอบของเพกโตไลติกเอนไซม์..... 18

5.1 เปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ..... 49

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

3.1 โครงสร้างทั่วไปของโมเลกุลเพกติน 17

3.2 ความจำเพาะและการทำงานของเพกติเนสต่อโมเลกุลเพกติน 19

3.3 เครื่องปฏิกรณ์แบบแพ็กเบด 28

4.1 ภาพถ่ายหอปฏิกิริยาแพ็กเบด 32

4.2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของหอปฏิกิริยาแพ็กเบด 32

4.3 ลักษณะและวิธีการใช้ Oswald viscometer 35

4.4 ภาพถ่ายแสดงการวัดความหนืดโดยใช้ Oswald viscometer 36

5.1 พื้นผิวของเรซินจากการวิเคราะห์ด้วย SEM 40

5.2 พื้นผิวของเรซินที่ถูกตรึงรูป ที่กำลังขยาย 750 เท่า 41

5.3 พื้นผิวของเรซินที่ถูกตรึงรูป ที่กำลังขยาย 9000 เท่า 41

5.4 ผลของเวลาที่ใช้ในการตรึงรูป 42

5.5 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการตรึงรูป 43

5.6 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการตรึงรูป 44

5.7 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูป 45

5.8 ผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างในการทำปฏิกิริยาต่อ
แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป 46

5.9 ผลกระทบของอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป 47

5.10 ผลของความเร็วรอบในการกวนต่อปฏิกิริยาย่อยสลายเพกติน
ของเอนไซม์ตรึงรูป 48

5.11 Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์อิสระ 50

5.12 Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ตรึงรูป 50

5.13 Lineweaver-Burk Plot เปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ตรึงรูป
กับเอนไซม์อิสระ 51

รูปที่ หน้า

5.14 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายกับอัตราเร็วในการป้อน..... 53
5.15 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลาย.....
จำนวนรอบในการย่อยสลาย และความสามารถในการย่อยสลาย.....
กับอัตราเร็วในการป้อน..... 54
5.16 ผลของอัตราเร็วในการป้อนต่ออัตราเร็วในการย่อยสลาย..... 55
5.17 ผลของอัตราเร็วในการป้อนต่อความดันลด..... 56
5.18 ความดันลดที่อัตราการป้อนสับสเตรต 10 ถึง 80 มล.ต่อนาที..... 57
5.19 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 10 มล.ต่อนาที..... 58
5.20 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 20 มล.ต่อนาที..... 58
5.21 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 30 มล.ต่อนาที..... 59
5.22 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 40 มล.ต่อนาที..... 59
5.23 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 60 มล.ต่อนาที..... 60
5.24 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 80 มล.ต่อนาที..... 60
5.25 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 10 มล.ต่อนาที..... 61
5.26 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 20 มล.ต่อนาที..... 61
5.27 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 30 มล.ต่อนาที..... 62

รูปที่ หน้า

5.28 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 40 มล.ต่อนาที..... 62
5.29 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 60 มล.ต่อนาที..... 63
5.30 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่อัตราเร็ว.....
ในการป้อน 80 มล.ต่อนาที..... 63
5.31 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่ออัตราเร็วในการย่อยสลาย.....
ในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด..... 66
5.32 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อปริมาณเพกตินที่ถูกย่อยสลาย.....
ในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด..... 67
5.33 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูป.....
ในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด..... 68
5.34 ผลของความเข้มข้นของเพกตินต่อความดันลดในหอปฏิกิริยาแพ็กเบด..... 69
5.35 ความดันลดของหอปฏิกิริยาแพ็กเบดที่ความเข้มข้นของสับสเตรต.....
0.25 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 70
5.36 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 71
5.37 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 0.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 71
5.38 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 72
5.39 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดกับความดันลดที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 72
5.40 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 73

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

5.41 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 0.50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 73
5.42 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 74
5.43 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันลดกับสัดส่วนช่องว่างที่ความเข้มข้นของ.....
เพกติน 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..... 74
5.44 เสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงในหอปฏิกิริยาแพ็กเบดที่ความเข้มข้น.....
ของสับสเตรต 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยหนักต่อปริมาตร และอัตราการไหล.....
40 มล.ต่อนาที..... 75

สัญลักษณ์

a	พื้นที่ผิวทั้งหมดต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสับสเตรต
A	พื้นที่ผิวของอนุภาคเอนไซม์ตรึงรูปหนึ่งอนุภาค
C_S	ความเข้มข้นของสับสเตรตภายนอก
C_S	ความเข้มข้นของสับสเตรตที่ผิวตัวพยุง
D_P	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคของแข็ง
D_S	สัมประสิทธิ์การแพร่ของสับสเตรตภายในอนุภาคเอนไซม์ตรึงรูป
f	แฟกเตอร์แรงเสียดทาน
G'	อัตรามวลที่ไหล
k_s	สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล
L	ความสูงของเบด
N_{da}	Damköhler number
$N_{Re,P}$	ค่าของ Renolds
r_H	ขนาดรัศมีไฮโดรลิก
v	ความเร็วของของเหลวในท่อ
v'	ความเร็วของของเหลวในหอแพ็ก
V	อัตราการเกิดปฏิกิริยา
ΔP	ความดันลด
ρ_S	ความหนาแน่นของเอนไซม์ตรึงรูป
ε	ช่องว่างในเบด
μ	ความหนืดของของ.หลว