บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ในปี ค.ศ. 1982 Anaya M.C. และคณะ ได้ทำการศึกษากระบวนการทำให้สารละลายเพกติน (pectin) ใสอย่างต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์แบบตะแกรง (basket reactor) ที่ถูกตรึงรูปด้วยเอนไซม์เพกติเนส (pectinase) ซึ่งเครื่องปฏิกรณ์แบบตะแกรงนี้มีลักษณะเป็นตาข่ายรูปทรงกระบอกติดอยู่กับแกนกลางซึ่งสามารถหมุนได้ เขาศึกษาผลของพารามิเตอร์ (parameter) ต่างๆ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ ต่อคุณสมบัติของเอนไซม์อิสระ (free enzyme) รวมทั้งศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา (reaction rate) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 5.2 และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างนี้จะให้ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์มีค่าแอกติวิตี (activity) สูงสุดในช่วงที่กว้างมากนั่นคือ 30-80 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.2 0อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใช้สารละลายเพกตินที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จะเป็นเส้นตรงจนกระทั่งความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 25 ส่วนในล้านส่วน และแอกติวิตีของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 3.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมผลิตภัณฑ์ สำหรับค่าคงที่ไมเคิลลิส (Michaelis constant, K_m) มีค่าเท่ากับ 0.16 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 5.2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แอกติวิตีจะลดลงจากค่าเริ่มต้นเพียง 17 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่เมื่อเก็บในน้ำค่าแอกติวิตีจะลดลงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) บนเส้นใยจากเยื่อไม้ (sisal hemp fibers) มีแอกติวิตีประมาณ 6-8 เปอร์เซ็นต์ และจะสูญเสียแอกติวิตีไปประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทำปฏิกิริยาไป 5 ครั้งกับสารละลายเพกตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จนกระทั่งความหนืดของสารละลายเพกตินลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ของค่าความหนืดเริ่มต้นแต่เมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะทำให้ค่าแอกติวิตีเพิ่มขึ้น 15 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดคือ ใช้เอนไซม์ 166 หน่วย (50 มิลลิกรัม) ต่อเส้นใย 1 กรัม และสารละลายเพกตินเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำให้แอกติวิตีมีค่าเท่ากับ 22.3 หน่วยต่อกรัม และเมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้นี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แอกติวิตีจะลดลงจากค่าเริ่มต้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และยังคงรักษาค่าแอกติวิตีที่เหลืออีก 30 เปอร์เซ็นต์ไว้ได้เป็นเวลานาน

จากผลการศึกษาและเปรียบเทียบผลทางด้านจลนศาสตร์ (kinetics) ระหว่างเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปนี้ เขาอธิบายว่าเนื่องมาจากเส้ยใยไม่มีประจุและมีพื้นที่จำเพาะ (specific area) ที่จะให้เอนไซม์เกาะน้อย รวมทั้งความต้านทานภายนอกต่อการส่งผ่านสับสเตรต (substrate) เพื่อเข้าทำปฏิกิริยา สำหรับความเป็นไปได้ในการใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบตะแกรงกับของไหลที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (non homogenous fluids) และเอนไซม์ตรึงรูปนี้ โดยพิจารณาผลของข้อจำกัดการแพร่ภายนอก (external diffusional limitations) พบว่าการเพิ่มความเร็วรอบในการหมุน (speed of rotation) จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้น ซึ่งค่าความเร็วรอบที่เหมาะสมคือ 5 รอบต่อนาที แม้ว่าเอนไซม์ตรึงรูปจะมีเสถียรภาพ (stability) ต่ำแต่ระบบนี้ก็น่าจะเก็บไว้พิจารณาเมื่อของเหลวที่ใช้ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน และเป็นปฏิกิริยาเอนไซม์ที่สับสเตรตมีผลยับยั้งปฏิกิริยา (substrate inhibition) มาก [5] ในปีเดียวกัน (ค.ศ. 1982) Kminkova M. และคณะ ศึกษาเปรียบเทียบการตรึงรูปเพกติเนสบนเรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resin) ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) โดยวิธีการเชื่อมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และ azo-coupling ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ทางการค้าชื่อ Pectofoetidin G3X และเรซินที่ใช้ 2 ชนิดคือ ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกที่มีอนุพันธ์คาร์บอกซิลิก (carboxylic cation exchanger, Ostion KM) และตัวแลกเปลี่ยนประจุลบที่มีอนุพันธ์อะมิโนโพลีสไตรีนชนิดตติยภูมิ (tert-aminopolystyrene anion exchanger, Ostion AT) พบว่าเมื่อใช้ตัวพยุง Ostion AT ที่มีอนุพันธ์อะมิโน โดยวิธีเชื่อมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ทดสอบกับเพกตินความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.9 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 112.5 หน่วยต่อกรัมเอนไซม์ และมีค่าครึ่งชีวิต (half-lift) 456 วัน ซึ่งจากการทดลองนี้เขาได้เสนอว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากวิธีการเตรียมอนุพันธ์อะมิโนจาก Ostion AT นั้นสามารถทำได้ง่าย และมีราคาไม่สูง [6]

ต่อมาในปี ค.ศ. 1986 Findlay C.J. และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเพกติเนสบนกระดูกเป็ดไก่ ซึ่งทำให้มีขนาดประมาณ 10-20 เมช โดยใช้วิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ เอซิลเอไซด์ (acyl-azide) และคาโบดิอิไมด์ (carbodiimide) เนื่องจากกระดูกเป็ดและไก่มีราคาถูก หาง่าย มีรูพรุน ไม่เป็นพิษ และมีความแข็ง รวมทั้งมีหมู่ฟังก์ชันนอล (functional group) ทางเคมี จากการศึกษาพบว่า เมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปตามวิธีดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบกับสารละลายเพกตินในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.4 จะมีแอกติวิตีเท่ากับ 0.27 0.11 และ 0.10 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งก็จะเห็นได้ว่าวิธีการตรึงรูปที่ดีที่สุดคือการเชื่อมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ [7]

ปี ค.ศ. 1987 Lozano P. และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเพกติเนสบนไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ที่มีขนาดรูพรุน 10 ไมโครเมตร และมีความสามารถให้น้ำผ่านได้ 82 ลิตรต่อตารางเมตร-วินาที โดยวิธีการกระตุ้นด้วย O-alkylation เพื่อใช้ในการทำให้น้ำผลไม้ใสในถังปฏิกรณ์ที่มีการไหลของสับสเตรตแบบขนานกับเมมเบรน (cross flow reactor) และผลิตภัณฑ์จะไหลผ่านเมมเบรนในทิศตั้งฉาก ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้มีชื่อทางการค้าว่า Pectinol D เมื่อนำมาทดสอบกับสารละลายเพกตินเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 และน้ำ apricot สด พบว่าค่า $K_{m(app)}$ และ $V_{m(app)}$ เท่ากับ 0.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 155 หน่วยต่อกรัมตัวพยุง ซึ่งมีค่าสูงกว่าและต่ำกว่าเมื่อใช้ถังกวนตามลำดับ ซึ่งเขาอธิบายว่าเป็นผลมาจากอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาถูกจำกัดโดยการแพร่ภายนอกของสับสเตรต ทำให้มีผลต่ออัตราการไหลวนกลับ (recirculation rate) ของสับสเตรต และการจำกัดเนื่องจากการแพร่ภายนอกนี้สามารถทำให้ลดลงได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลของสับสเตรต สำหรับการทำให้น้ำ apricot ใสจะทำในระบบแบบต่อเนื่องที่มีอัตราการไหลวนกลับของน้ำ apricot เท่ากับ 2.4 ลิตรต่อชั่วโมง และความดันเท่ากับ 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ตรึงรูปร่วมกับไมโครฟิลเทรชัน (microfiltration)น้ำผลไม้ที่ได้จะมีความหนืดสัมพัทธ์ (relative viscosity) เท่ากับ 11.6 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 45 นาที ขณะที่น้ำผลไม้ที่ได้จากการใช้ไมโครฟิลเทรชันเพียงอย่างเดียวจะมีความหนืดสัมพัทธ์มากกว่า คือ เท่ากับ 335 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 100 นาที จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการใช้เอนไซม์ตรึงรูปบนเมมเบรนให้ประสิทธิภาพในการกรองสูงกว่าการใช้ไมโครฟิลเทร-ชันเมมเบรน microfiltration membrane) อย่างเดียวและยังมีอายุการใช้งานนานกว่า ซึ่งเขาได้อธิบายว่าเป็นผลมาจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ช่วยทำให้ผิวหน้าของไมโครฟิลเทรชันเมมเบรนไม่เกิดการอุดตันของคอลลอยด์ (colloid) ในน้ำผลไม้ [2]

ในปี ค.ศ. 1992 Maxim S. และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเพกติเนสบนตัวพยุงอาครีลิค (acrylic support) ชนิดต่างๆ ได้แก่ PONILEX AS, PONILEX ASH และ PONILEX CC เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการกำจัดเพกตินในน้ำแอปเปิล พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Ultrazym 100G ตรึงบนตัวพยุงชนิด PONILEX ASH ทดสอบกับน้ำแอปเปิลที่เก็บไว้เป็นเวลา 6-8 เดือน ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5-4.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะมีแอกติวิตีของเพกตินเอสเทอเรส (pectinesterase) อยู่ในช่วง 99.8-296.4 เปอร์เซ็นต์ และแอกติวิตีตัวที่ใช้ตัดโมเลกุลเพกตินสายตรง (chain splitting) อยู่ในช่วง 101.85-252.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปบนตัวพยุงชนิด PONILEX AS และ PONILEX CC และยังพบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปบน PONILEX ASH จะให้ค่าแอกติวิตีสูงกว่าเอนไซม์อิสระ และแอกติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเป็นกรดของสับสเตรต เนื่องจากเพกตินในน้ำแอปเปิลที่

อ่อนและสดที่มีค่าความเป็นกรดมากจะมีหมู่เอสเทอร์ (ester group) น้อยทำให้โพลีกาแลกทูโรเนส (polygalacturonase) ทำงานได้ดีขึ้น และยังพบว่าเมื่อใช้ Ultrazyme 100G เพียงตัวเดียวตรึงรูปบน PONILEX ASH จะให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายองค์ประกอบของแข็งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำแอปเปิลอย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกับการใช้ Ultrazyme 100G ร่วมกับอะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) ในรูปเอนไซม์อิสระ หรือการใช้ Ultrazyme 100G ร่วมกับอะไมโลกลูโคซิเดส ตรึงรูปบน PONILEX CC ส่วนเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์เพกติเนสตรึงรูปบนตัวพยุง PONILEX ASH จะทดสอบโดยการวัดแอกติวิตีของเพกตินเอสเทอเรสและแอกติวิตีของตัวที่ใช้ตัดโมเลกุลเพกตินสายตรง ผลปรากฏว่า แอกติวิตีไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการใช้ 17 ครั้ง ในกระบวนการย่อยสลายเพกตินในน้ำแอปเปิลที่เก็บไว้ 6-8 เดือน [8]

ในรายงานที่ผ่านมาจะเห็นว่านอกจากมีการตรึงรูปเพกติเนสหรือเพกโตไลติกเอนไซม์ (pectolytic enzyme) บนตัวพยุงชนิดต่างๆและวิธีการตรึงรูปที่ต่างกันดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการตรึงรูปเอนไซม์ในกลุ่มของเพกโตไลติกเอนไซม์เพียงชนิดเดียว ได้แก่ โพลีกาแลกทูโรเนส เพกตินไลเอส (pectinlyase) เพกตินเอสเทอเรส (pectin esterase) และโพลี-เมทธอกซีกาแลกทูโรไนด์ไลเอส (poly(methoxygalacturonide)lyase) บนตัวพยุงต่างๆ นอกจากนั้นยังมีรายงานที่ศึกษาการตรึงรูปเชื้อราที่ผลิตเพกโตไลติกเอนไซม์ (pectinolytic fungi) บนก้อนเจลาติน (gelatin block) ดังที่จะกล่าวต่อไป

ปี คศ. 1975 Weibel M.K. และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเพกตินเอสเทอเรส บนแก้วมีรูพรุนที่มีหมู่เบนโซอิลเอไซด์ (benzoyl azide) โดยการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์ พบว่าเมื่อลดขนาดของตัวพยุงลงประมาณ 12 เท่าจะทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากข้อจำกัดของการถ่ายเทมวลสารภายในต่อค่าเทอนโอเวอร์ (turnover) และยังพบว่าเศษส่วนน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight fraction) ของสับสเตรตไม่มีผลต่อพฤติกรรมทางด้านจลนศาสตร์ของเอนไซม์อิสระ นั่นคือ เมื่อใช้สับสเตรตที่มีเศษส่วนน้ำหนักโมเลกุลมากหรือน้อยก็ตามจะให้ค่า K_m ปรากฏเท่ากันคือ 0.08 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่สำหรับเอนไซม์ตรึงรูปนั้นพบว่าเมื่อสับสเตรตมีเศษส่วนน้ำหนักโมเลกุลน้อยค่า K_m ปรากฏจะมีค่าเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่เมื่อใช้สับสเตรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้นจะทำให้ค่า K_m ปรากฏเพิ่มขึ้น 5 เท่า คือมีค่าเท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่เศษส่วนน้ำหนักโมเลกุลไม่มีผลต่อค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูป นั่นคือ ไม่ว่าเศษส่วนน้ำหนักโมเลกุลจะมีค่ามากหรือน้อยก็ตามค่า V_{max} ยังคงมีค่าเท่าเดิม และค่าความเป็นกรด-ด่างที่หมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปจะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากความสามารถในการจับกันระหว่างร่างแหของตัวพยุงกับสับสเตรตที่เป็นโพลีอิเล็กโตรไลต์ (polyelectro- lyte) สำหรับเสถียรภาพต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ตรึงรูปนี้พบว่ามีค่าครึ่งชีวิตประมาณ

2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ตรึงรูปโดยวิธีนี้มีแอกติวิตีเพียง 0.8 หน่วยต่อมิลลิกรัม แต่เมื่อใช้ตัวพยุงที่มีขนาดเล็กลงกว่า 60 เมช ค่าแอกติวิตีจะเพิ่มขึ้นประมาณ 12 เท่า คือมีค่าประมาณ 9.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม ซึ่งเป็นผลมาจากตัวพยุงมีพื้นที่ผิวในการจับกับเอนไซม์มากขึ้น ส่วนเสถียรภาพในการเก็บเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงรูปพบว่า เมื่อเก็บเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือนครึ่ง ค่าแอกติวิตียังคงเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเอนไซม์ตรึงรูปเมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แอกติวิตีจะเหลือ 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แอกติวิตีจะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ [9]

ในปี ค.ศ. 1978 Hanisch W.H. และคณะ ทำการศึกษาการตรึงรูปโพลีเมทธอกซีกาแลกทูโรไนด์ไลเอส (poly(methoxygalacturonide)lyase, PMGL) บนตัวพยุง 2 ชนิดคือ DEAE-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) และแก้วมีรูพรุนโดยวิธีการเชื่อมด้วยโลหะไทเทเนียม (titanium) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์อิสระ, เอนไซม์ตรึงรูปบนแก้วมีรูพรุน และเอนไซม์ตรึงรูปบน DEAE-เซลลูโลสมีค่าเท่ากับ 5.2, 6.2-6.9 และ 3.7-4.7 ตามลำดับ และเมื่อใช้สารละลายเพกตินเข้มข้นระหว่าง 0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรตทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดจะได้ค่า K_m เท่ากับ 1.1, 0.83 และ 0.17 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเพกตินตามลำดับ [10]

ในปี ค.ศ. 1981 Rexova-Benkova L. และคณะ ศึกษาเกี่ยวกับการตรึงรูปเอนโดดีกาแลกทูโรนาเนส (Endo-D-galacturonanase) โดยการดูดซับบนโพลีเอทธิลีนเทอร์เรพธาเลท (polyethyleneterephthalate) ที่มีรูพรุน พบว่าการตรึงรูปวิธีนี้ให้แอกติวิตีต่ำ ซึ่งค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์สูงสุดเท่ากับ 42.4 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเอนไซม์บนตัวพยุงที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 5.25 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุง ซึ่งจะให้ค่าแอกติวิตีเท่ากับ 58 และ 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 5 และ 30 นาทีตามลำดับ และค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนตัวพยุง และพบว่าปริมาณของเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพยุงไม่ขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่ค่าความเร็วและความแรงในการดูดซับของเอนไซม์บนตัวพยุงขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างหรือค่าความแรงของประจุ (ionic strength) และภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์คือ อะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2 และที่ภาวะนี้เมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าแอกติวิตีจะลดลงในช่วง 1-2 วันแรก ประมาณ 12-15 เปอร์เซ็นต์ และค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่เก็บในภาวะนี้จะคงที่อยู่ที่ระดับนี้ไปเป็นเวลาหลายเดือน เขากล่าวว่าการลดลงของแอกติวิตีในช่วงแรกของเอนไซม์ไม่ได้เกิดจาก

การหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุง และเอนไซม์เอนโดดีกาแลกทูโรนาเนสที่ถูกตรึงรูปที่ภาวะที่เหมาะสมนี้เอนไซม์จะไม่หลุดออกจากตัวพยุงที่ภาวะในการเก็บที่เป็นน้ำ อะซิเตต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4-7 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 0.1-1 โมลต่อลิตร กัวนิดีน (guanidine) 3 โมลต่อลิตร เพกตินเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมเพกเตต (sodium pectate) และเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิห้องนั้นพบว่าสามารถย่อยสลายสารละลายโซเดียมเพกเตต อย่างต่อเนื่องเป็นปริมาตร 6000 เท่าของปริมาตรเบด และยังพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนโดดีกาแลกทูโรนาเนสที่ถูกตรึงรูปนั้นไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเอนไซม์อิสระ นั่นคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมยังคงมีค่าเป็น 4 และ 4.8 เช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ และยังพบว่าผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ก็มีลักษณะเดียวกัน ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าประมาณ 40 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่อใช้ดีกาแลกทูโรนิกแอซิด (D-galacturonic acid) เป็นสับสเตรต ค่า V_{max} ของเอนไซม์อิสระมีค่าเท่ากับ 2.08 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม-วินาที ส่วนค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลงจากค่า V_{max} ของเอนไซม์อิสระไปประมาณ 0.35 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม-วินาที เช่นเดียวกับค่า K_m จะลดลงจาก $1.95*10^{-3}$ โมลต่อลิตร เป็น $1.57*10^{-3}$ โมลต่อลิตร และพบว่าการตรึงรูปโดยวิธีการดูดซับนี้จะเปลี่ยนรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ต่อสับสเตรตน้อยกว่าการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) และยังสามารถกระทำต่อสับสเตรตโมเลกุลใหญ่ได้ใกล้เคียงกับเมื่อใช้เอนไซม์อิสระ ทำให้การทำงานของเอนไซม์ไม่ถูกจำกัดเมื่อสับสเตรตมีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งต่างกับการตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์โดยหมู่อะมิโน [11]

ปี ค.ศ. 1983 Rexova-Benkova L. และคณะ ได้ศึกษาการตรึงรูปเอนโดโพลีกาแลกทูโรเนส (Endopolygalacturonase) บนตัวพยุงโพลี 2,6-ไดเมทธิลพาราฟีนิลีนออกไซด์ (poly(2,6-dimethyl-p-phynyleneoxide) หรือ Sorfix ที่มีรูพรุนด้วยพันธะโควาเลนท์โดยการกระตุ้นด้วยกลูตาราลดีไฮด์ ซึ่ง Sorfix ที่ใช้มีพื้นที่ผิวจำเพาะ 590 ตารางเมตรต่อกรัม ขนาดอนุภาคเท่ากับ 0.2-1.2 มิลลิเมตร และปริมาตรรูพรุนเท่ากับ 0.459 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกรัม พบว่าตัวพยุงที่ถูกทำให้มีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde) 2.91 มิลลิโมลต่อกรัมตัวพยุง จะให้แอกติวิตีเท่ากับ 0.267 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มหมู่อัลดีไฮด์บนตัวพยุงเป็น 4.26 มิลลิโมลต่อกรัมตัวพยุงจะทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากมีโมเลกุลเอนไซม์เชื่อมพันธะโควาเลนท์บนตัวพยุงมากเกินไปทำให้เกิดการบดบังกันเองระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์จึงขัดขวางการเข้าไปทำปฏิกิริยาของสับสเตรตโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นจะเห็นว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์ที่จับกับตัวพยุง ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่จับกับตัวพยุงที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 13.4 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวพยุงจะให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 0.305 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรึง

รูปคือ 48 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0-4.1 นอกจากนั้นยังศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปนี้และพบว่าสามารถเก็บไว้ได้นานหลายสัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีเลย แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้นคือ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จะสูญเสียแอกติวิตีไปประมาณ 40 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการสูญเสียแอกติวิตีนี้ไม่ได้เกิดจากการหลุดของเอนไซม์ออกจากตัวพยุง ส่วนค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูป (0.55 หน่วยต่อมิลลิกรัม) จะน้อยกว่าค่า V_{max} ของเอนไซม์อิสระ (2.68 หน่วยต่อมิลลิกรัม) และค่า K_m ของเอนไซม์ตรึงรูป (6.6 มิลลิโมลต่อลิตร) จะมากกว่าค่า K_m ของเอนไซม์อิสระ (1.95 มิลลิโมลต่อลิตร) ซึ่งเขาได้อธิบายว่าเป็นผลมาจากการบดบังกันเองของโมเลกุลเอนไซม์ และผลกระทบนี้จะทำให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ลดลงเมื่อสับสเตรตมีโมเลกุลใหญ่ขึ้น [12]

Rexova-Benkova L. และคณะ ยังได้ทำการศึกษาผลกระทบต่อคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา (catalytic properties) ของการตรึงรูปเอนโดโพลีกาแลกทูโรเนสและเพกตินเอสเทอเรส พบว่าการตรึงรูปเอนโดโพลีกาแลกทูโรเนส และเพกตินเอสเทอเรสบนตัวพยุงต่างๆ ด้วยวิธีการตรึงรูปต่างๆ กันล้วนแต่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงและการลดลงของแอกติวิตีก็จะมากน้อยแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการตรึงรูป, ชนิดตัวพยุงที่ใช้ด้วย สำหรับตัวพยุงชนิดเดียวกันการสูญเสียแอกติวิตีขึ้นอยู่กับความพรุนของตัวพยุงหรือขนาดรูพรุน เนื่องจากขนาดรูพรุนมีผลต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของสับสเตรตโมเลกุลใหญ่ และยังพบว่าตัวพยุงที่มีขนาดรูพรุนเล็กมากๆ จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุด เนื่องจากการจับกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์กับตัวพยุงจะเกิดขึ้นเฉพาะที่บริเวณพื้นผิวภายนอกของตัวพยุงเท่านั้น ทำให้ไม่มีผลกระทบเนื่องจากการแพร่ภายในรูพรุนของตัวพยุง นอกจากนั้นการสูญเสียแอกติวิตียังขึ้นกับความเป็นกรด-ด่างของภาวะที่ใช้ตรึงรูป และพบว่าการตรึงรูปเอนไซม์นี้ไม่ควรทำที่ภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่า 6 เนื่องจากเอนไซม์นี้ไม่เสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือมีความเป็นด่างมาก จะทำให้แอกติวิตีบางส่วนถูกทำลายไป สำหรับตัวพยุงที่มีพื้นที่ผิวสัมผัสสูง เช่น Spheron Sorfix Sorsilen และ Eupergit แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะขึ้นอยู่กับจำนวนเอนไซม์ที่จับที่ผิวตัวพยุง ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จะทำให้แอกติวิตีเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งที่สูงสุด แล้วแอกติวิตีจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อไปอีก ทั้งนี้เนื่องจากผลการบดบังกันเองระหว่างโมเลกุลเอนไซม์ที่หนาแน่นมากๆ บนผิวตัวพยุงต่อสับสเตรตโมเลกุลใหญ่ ซึ่งปัญหานี้จะลดลงเมื่อเพิ่มระยะห่างหรือช่องว่าง (spacer) ระหว่างเอนไซม์กับผิวตัวพยุง ทำให้แอกติวิตีและความเร็วสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นได้ และยังพบว่าสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์โดยวิธีการดูดซับนั้นเมื่อทำการเพิ่มค่าอัตราการไหลของสับสเตรตจะทำให้อัตราการย่อยสลายสับสเตรตแบบสุ่มเพิ่มขึ้น และยังทำให้ค่า K_m ปรากฏของ

เอนไซม์ตรึงรูปวิธีนี้มีค่าลดลงอีกด้วย เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลของสับสเตรตจะทำให้ข้อจำกัดเนื่องจากการแพร่ภายนอกลดลงมีผลให้อัตราการส่งผ่านสับสเตรตเพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น [13]

ปี ค.ศ. 1985 Omekova J. และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเอนโดโพลีกาแลกทูโรเนสด้วยพันธะโควาเลนท์บนตัวพยุงโพลี-6-คาโปแลกแตม (poly(6-caprolactame) หรือ Sorbamide ที่มีรูพรุนด้วยการกระตุ้นด้วยกลูตาราลดีไฮด์ พบว่า Sorbamide ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาราลดีไฮด์จะมีหมู่อะมิโนซึ่งสามารถเกิดพันธะโควาเลนท์กับเอนไซม์ได้ แต่เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะไม่มีแอกติวิตีเลย ส่วน Sorbamide ที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาราลดีไฮด์จะมีหมู่อัลดีไฮด์ 0.39 มิลลิโมลต่อกรัมตัวพยุง ซึ่งตัวพยุง 1 กรัม สามารถเกิดพันธะกับเอนไซม์ 0.93 มิลลิกรัมได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 และเมื่อใช้โซเดียมเพกเตต (sodium pectate) เป็นสับสเตรตพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปนี้จะมีค่าประมาณ 0.369 หน่วยต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ (แอกติวิตีสัมพัทธ์ 24.7 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อลดขนาดโมเลกุลของสับสเตรตลงค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์จะเพิ่มขึ้น และยังพบว่าเมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปนี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลงประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ และจะยังคงที่ที่ระดับนี้นานเป็นเวลาหลายสัปดาห์ ซึ่งเขากล่าวว่าการลดลงของแอกติวิตีนี้ไม่ได้เกิดจากการหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุง เนื่องจากการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยวิธีนี้มีเสถียรภาพมาก สำหรับค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูปนี้ (0.67 หน่วยต่อมิลลิกรัม) มีค่าน้อยกว่าค่า V_{max} ของเอนไซม์อิสระ (1.35 หน่วยต่อมิลลิกรัม) ส่วนค่า K_m ของเอนไซม์ตรึงรูป ($1.03*10^{-3}$ โมลต่อลิตร) มีค่าน้อยกว่าค่า K_m ของเอนไซม์อิสระ ($1.52*10^{-3}$ โมลต่อลิตร) และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปนี้เท่ากับ 4.7 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเขาพบว่าที่อุณหภูมินี้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อบ่ม (incubated) ไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่เมื่อลดอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส แอกติวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลง 75 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส แอกติวิตีของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลง 25 เปอร์เซ็นต์ของค่าแอกติวิตีเริ่มต้น [14]

ในปีเดียวกัน (ค.ศ. 1985) Markovic O. และคณะ ได้ศึกษาการตรึงรูปเพคตินเอสเทอเรส (pectinesterase) จากมะเขือเทศ และเชื้อจุลินทรีย์ (Aspergillus foetidus) โดยใช้พันธะโควาเลนท์บนตัวพยุง Sepharose 4B ที่ถูกกระตุ้นด้วย CNBr และโดยการดูดซับบนตัวพยุงโพลีเอทธิลีน-เทอร์เรพธาเลท (polyethylene terephterlate) พบว่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเพกตินเอสเทอเรสที่ได้จากจุลินทรีย์ โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์บน Sepharose 4B ที่ถูกกระตุ้นด้วย CNBr และโดยการดูดซับบนโพลีเอทธิลีนเทอร์เรพธาเลท มีค่าเท่ากับ 11.5 และ 23 เปอร์เซ็นต์ตาม

ลำดับ และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์อิสระ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูปจะเพิ่มขึ้นและเอนไซม์ตรึงรูปยังมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิมากขึ้น และค่า K_m ปรากฏสำหรับเพกตินเอสเทอเรสจากมะเขือเทศตรึงรูปบนตัวพยุงทั้ง 2 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นจาก K_m ของเอนไซม์อิสระประมาณ 5-6 เท่า ส่วน K_m ปรากฏ สำหรับเพกตินเอสเทอเรสจากจุลินทรีย์ตรึงรูปบนตัวพยุงทั้ง 2 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 4-7 เท่า นอกจากนั้นยังทำการตรึงรูปเพกตินเอสเทอเรสจากมะเขือเทศและจุลินทรีย์บนตัวพยุง Enzacryl AA ที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธีไดอะโซติเซชัน (diazotization) พบว่าจะมีการสูญหายของแอกติวิตีอย่างสมบูรณ์ เขาได้อธิบายว่าเนื่องจากความสามารถในการจับกันของเอนไซม์จากมะเขือเทศกับสับสเตรตต่ำกว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทำให้แอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์จากมะเขือเทศตรึงรูปมีค่าต่ำ และเนื่องจากเพกตินมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้ขนาดโมเลกุลไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากถูกดีเอส เทอริฟิเคชัน (deesterification) ซึ่งจะมีผลของการบดบังและการแพร่ และยังเนื่องจากตำแหน่งของบริเวณจับกัน (binding sites) ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์แตกต่างจากเอนไซม์จากมะเขือเทศ จากการทดลองจะเห็นว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์ตรึงรูปบน Sorsilen เหมาะสำหรับนำไปใช้กับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมยังอยู่ในช่วงที่เป็นกรดเช่นเดียวกับช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของโพลีกาแลกทูโรเนสอีกด้วย [15]

ปี ค.ศ. 1987 Rexova-Benkova L. และคณะ ได้ศึกษาการตรึงรูปเอนโดดีกาแลกทูโรนาเนส (Endo-D-galacturonanase) ด้วยพันธะโควาเลนท์บนไฮดรอกซีอัลคิลเจล (hydroxyalkyl gels) หรือ Spherons ที่ถูกกระตุ้นด้วยไซยาโนเจนโบรไมด์ (cyanogen bromide) เจลที่ใช้นี้มี 3 ชนิดคือ Spheron 300 , Spheron 500 และ Spheron 1000 ซึ่งมีขนาดรูพรุนต่างๆกัน เขาได้ทำการหาปริมาณเอนไซม์ที่เกาะบนตัวพยุง รวมทั้งแอกติวิตีและค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ นอกจากนั้นยังศึกษาเสถียรภาพต่อความร้อน เสถียรภาพในการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเสถียรภาพต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ด้วย ซึ่งเขาพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในการตรึงรูปเท่ากับ 5.5 ปริมาณเอนไซม์ที่จับกับตัวพยุงทั้ง 3 ชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 10.9 , 10.8 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเจลตามลำดับ และมีค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 20.2 , 36.6 และ 56.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณเอนไซม์ที่จับบน Spheron 300 และ Spheron 500 มีค่าสูงที่สุด เนื่องมาจากมีพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface) มากที่สุดคือเท่ากับ 19.5 และ 23.0 ตารางเมตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีผลทำให้เอนไซม์จับกับตัวพยุงได้ดีขึ้น แต่แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างที่สูงจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ และขนาดรูพรุนของตัวพยุงก็เป็นสัดส่วนโดยตรงกับแอกติวิตีสัมพัทธ์ ทั้งนี้เนื่องจากสับสเตรตซึ่งมีโมเลกุลใหญ่

สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในรูพรุนของเจลที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ได้ดีกว่าเจลที่มีขนาดรูพรุนเล็ก ดังนั้น ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เมื่อใช้ตัวพยุง Spheron 1000 จะมีค่าสูงสุด นอกจากยังพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่จับบนตัวพยุงก็มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ นั่นคือ ถ้ามีปริมาณเอนไซม์ที่จับบนตัวพยุงมาก แอกติวิตีของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากผลของการบดบัง (steric) มากขึ้น และยังพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปบน Spheron 300 และ Spheron 500 มีค่าลดลงไม่ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของค่าเริ่มต้น เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 2 ปี ส่วนค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปบน Spheron 1000 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 เดือน และเมื่อทำการทดลองในระบบต่อเนื่องโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปบน Spheron 500 บรรจุในคอลัมน์ แล้วป้อนสารละลายโซเดียมเพกเตต (sodium pectate) เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในช่วงเวลา 21 วัน แอกติวิตีจะลดลง 38 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของการตรึงรูปที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5 ต่อค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุง Spheron 300 และ Spheron 500 พบว่าค่าคงที่ไมเคิลลิสเมนเทน (Michaelis-Menten constant) มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของการบดบัง (steric) และปัจจัยอื่นๆ ที่สัมพันธ์กับกลไกของเอนไซม์ส่งผลให้ค่าแอกติวิตีลดลงในขณะที่ค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะลดลงประมาณ 79 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [16]

และในปีเดียวกัน (ค.ศ. 1987) Stratilova E. และคณะ ได้ศึกษาการตรึงรูปเอนโดโพลีกา-แลกทูโรเนสบนตัวพยุง 3-2,3-อีพอกซีโปรพอกซีโปรพิวซิลิกา (3-(2,3-epoxypropoxypropyl)-silica) 2 ชนิดคือ Fractosil 500 และ Kieselgel และตัวพยุงออกซิเรนอะคริลิก (oxirane-acrylic beads) หรือ Eupergit C NO. 7727/37 ซึ่งตัวพยุงแต่ละตัวจะมีขนาดรูพรุนแตกต่างกันคือเท่ากับ 33, 8 นาโนเมตร และ 0.1-2.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ พบว่าสำหรับตัวพยุงทุกตัวที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.8 เอนไซม์จะจับกับตัวพยุงได้มากที่สุดแต่เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นเอนไซม์จะจับกับตัวพยุงได้น้อยลง ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปทุกตัวที่ทำให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดคือ 4.6-4.8 และปริมาณเอนไซม์ที่จับกับตัวพยุงที่เหมาะสมสำหรับตัวพยุง Fractosil Kieselgel และ Eupergit C มีค่าเท่ากับ 2.92 1.30 และ 1.46 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีค่าแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 16.25 10.23 และ 47.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงเหล่านี้ไว้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.8-6.0 และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหลายเดือนพบว่า เอนไซม์ตรึงรูปเหล่านี้จะไม่สูญเสียแอกติวิตีเลย และเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปนี้มาใช้อย่างต่อเนื่องที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมและอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปบน Kieselgel, Fractosil และ Eupergit C จะลดลง 30 22 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเขาว่าการลดลงของแอกติวิตีนี้ไม่ได้เกิดจากการหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุงแต่เกิดจากการดูดซับของสับสเตรตโดยร่างแหตัวพยุง

น้อย และยังพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงทุกตัวจะเบี่ยงเบนไปทางด้านกรดมากขึ้น นั่นคือเปลี่ยนจากค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.8 (เอนไซม์อิสระ) เป็น 3.8 สำหรับ Fractosil, 4.2 สำหรับ Eupergit C และ 4.6 สำหรับ Kieselgel ส่วนค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงทุกตัวจะเปลี่ยนจาก 40 องศาเซลเซียส (เอนไซม์อิสระ) เป็น 50 องศาเซลเซียส และค่า K_m ของเอนไซม์ตรึงรูป (3.58-5.00 มิลลิโมลต่อลิตร) จะมากกว่าค่า K_m ของเอนไซม์อิสระ (2.84 มิลลิโมลต่อลิตร) ส่วนค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลงจากค่า V_{max} ของเอนไซม์อิสระมากน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนเอนไซม์ที่จับกับตัวพยุง ความพรุนของตัวพยุง และธรรมชาติทางเคมีของร่างแหตัวพยุงกับเอนไซม์ [17]

ปี ค.ศ. 1988 Miranda C. และคณะ ศึกษาการทำให้สารละลายเพกตินใสโดยนำสปอร์ (spore) ของเชื้อราที่ผลิตเพกโตไลติกเอนไซม์มาตรึงรูปบนก้อนเจลาตินที่มีรูพรุน เมื่อใช้ก้อนเจลาตินมีรูพรุนขนาด 3 ลูกบาศก์เซนติเมตรตรึงรูปสปอร์พบว่าเส้นใยของราจะไม่หลุดออกมาจากก้อนเจลาติน และสามารถย่อยสลายสารละลายเพกตินเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 4 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อใช้กลุ่มเส้นใยราอิสระในปริมาณที่เท่ากันจะใช้เวลาในการย่อยสลายสารละลายเพกตินนานกว่า 24 ชั่วโมง และถ้านำไปใช้ในการย่อยสลายน้ำแอปเปิลพบว่าเส้นใยราที่ถูกตรึงรูปจะใช้เวลาในการย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 3 ชั่งโมง แต่เส้นใยราอิสระจะใช้เวลาในการย่อยสลายนานกว่า 48 ชั่งโมง และยังพบว่าสปอร์หรือเส้นใยที่ถูกตรึงรูปในก้อนเจลาตินที่มีรูพรุนสามารถนำมาใช้ในการย่อยสลายสารละลายเพกตินได้อย่างสมบูรณ์ได้มากกว่า 10 ครั้งโดยไม่มีการหลุดของเส้นใย และไม่มีการสูญเสียประสิทธิภาพในการย่อยสลาย จากผลการศึกษาเหล่านี้ทำให้เขาพบว่าการตรึงรูปจุลินทรีย์ที่เป็นเส้นใยพวกรานั้นต้องใช้ตัวพยุงที่มีรูพรุนเพียงพอที่จะให้เส้นใยเจริญเติบโตออกมาได้และมีการส่งผ่านอาหารและออกซิเจนได้ง่าย และสามารถให้สับสเตรตที่มีโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ง่าย [18]

ปี ค.ศ. 1993 Spagna G. และคณะ ศึกษาการตรึงรูปเพกตินไลเอส (pectinlyase) บนตัวพยุงอีพอกซี (epoxy) 2 ชนิด คือ Eupergit C และ γ-glycidoxypropyltrimethoxysilane (γ-alumina) พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปนี้มีแอกติวิตีไม่สูง ซึ่งแอกติวิตีสูงสุดมีค่าประมาณ 115 หน่วยต่อกรัมเมื่อใช้ Eupergit C เป็นตัวพยุงและทำการตรึงรูปที่ภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม และเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจะทำให้แอกติวิตีของหมู่อีพอกซีของตัวพยุงลดลงแต่จะทำให้จำนวนหมู่อะมิโน (amino) ของเอนไซม์ซึ่งจำเป็นในการเกิดพันธะโควาเลนท์เพิ่มขึ้น และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเข้าใกล้ค่า pI (isoelectric point สำหรับเพกตินไลเอสนี้มีค่าเท่ากับ 3.7) จะพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการดูดซับ (adsorption yield, %AY) มีแนวโน้มลดลงแต่ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการตรึงรูป (immobilized yield, %IY) จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแรงยึดเหนี่ยว

ของประจุระหว่างโมเลกุลและภายในโมเลกุลของเอนไซม์จะมีค่าสูงทำให้โครงรูปสามมิติ (conformation) ของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง และพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงมีแนวโน้มลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) โครงรูปสามมิติของเอนไซม์จะยิ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลง และยังพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปจะมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิมากกว่าเอไซม์อิสระ นั่นคือที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสหรือเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีก 15 องศาเซลเซียส เอนไซม์อิสระจะสูญเสียแอกติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เอนไซม์ตรึงรูปจะสูญเสียแอกติวิตีเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ และค่า V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูป (0.60 ไมโครโมลต่อนาที-มิลลิกรัม) จะน้อยกว่าค่า V_{max} ของเอนไซม์อิสระ (9.62 ไมโครโมลต่อนาที-มิลลิกรัม) ในขณะที่ค่า K_m ของเอนไซม์ตรึงรูป (1.5 มิลลิโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร) มีค่ามากกว่าค่า K_m ของเอนไซม์อิสระ (0.1 มิลลิโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร) ทั้งนี้เนื่องมาจากสับสเตรตถูกจำกัดต่อการเข้าไปยังบริเวณเร่งของเอนไซม์ตรึงรูป สำหรับค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.3 จะมีค่าเท่ากันแต่ที่เวลามากกว่า 200 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปยังคงเหลือแอกติวิตีประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีเริ่มต้น ส่วนเอนไซม์อิสระไม่มีแอกติวิตีเหลือเลย [19]

ปี ค.ศ. 1994 Dinnella C. ศึกษาการตรึงรูปเอนโดเพกตินไลเอส (endopectinlyase) บนแกมมาอะลูมินา (γ-alumina) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 150-250 ไมโครเมตร โดยการเชื่อมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการดูดซับ (adsorption yield percentage, AY%) จะมีค่าต่ำสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้กับค่าไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point, pI ซึ่งเท่ากับ 7.7) เนื่องจากประจุลบทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเอนไซม์จับกับแกมมาอะลูมินา และที่ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการดูดซับต่ำนี้จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการตรึงรูป (immobilization yield percentage, IY%) สูงถึง 78-90 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าเมื่อลดค่าความเป็นกรด-ด่างของสับสเตรตลง ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการดูดซับจะมีค่าเพิ่มขึ้น แต่จำนวนเอนไซม์ที่ว่องไว (active) จะยังคงที่ เนื่องจากแม้ว่าจะมีการดูดซับเอนไซม์หลายๆ ชั้นก็ตามแต่จะมีเอนไซม์ที่ชั้นผิวบนชั้นเดียวที่ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรตได้ สำหรับค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์อิสระจะมีค่าเท่ากับ 160 ไมโครโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร และ 14.0 โมลต่อนาที-ลูกบาศก์เซนติเมตร ต่างกับค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ตรึงรูปซึ่งมีค่าเท่ากับ 440 ไมโครโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร และ 5.4 โมลต่อนาที-ลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากมีข้อจำกัดของการแพร่ และยังพบว่าการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยวิธีการดูดซับแล้วเชื่อมด้วยกลูตัลราลดีไฮด์จะไม่ทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปเพิ่มขึ้นแต่จะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอกติวิตี และพบว่าเมื่อไม่มีฟอสเฟต (phosphate) ในสารละลายที่ใช้ตรึงรูปจะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการดูดซับต่ำ

กว่า และให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของการตรึงรูปสูงกว่าเมื่อมีฟอสเฟต นั่นคือฟอสเฟตจะเป็นตัวทำให้เสถียรภาพในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงอนินทรีย์ดีขึ้น [20]

ในปีเดียวกัน (ค.ศ. 1994) Spagna G. และคณะ ได้ศึกษาการตรึงรูปเพกตินไลเอส (pectinlyase) บนโพลีเอไมด์ (polyamide) 2 ชนิดคือ ไนลอน 6 (nylon 6) และไนลอน 11 (nylon 11) เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม ซึ่งวิธีการตรึงรูปที่ใช้จะเป็นการกระตุ้นตัวพยุงโดยตรงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และวิธีการเติมหมู่อัลคิล (alkylation) ด้วยไดเมทธิลซัลเฟต (dimethylsulphate) แล้วตามด้วยเอมีน (amine) และกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมนั้นไนลอน 6 ที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตารัลดีไฮด์จะให้แอกติวิตีประมาณ 200 หน่วยต่อกรัม และให้ค่าครึ่งชีวิตประมาณ 190 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.3 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส [21]

จากรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนสและเอนไซม์บางตัวในกลุ่มของเพกติเนส รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตเพกติเนส จะเห็นว่ามีการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนสเพื่อใช้ในระบบแบบต่อเนื่องค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการตรึงรูปเอนไซม์ตัวอื่นๆ เช่น อะไมเลส (amylase) โปรติเอส (protease) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้กับถังปฏิกรณ์แบบแพ็กเบด (packed bed reactor) ซึ่งสามารถควบคุมการทำงานได้ง่ายให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนจากสับสเตรตไปเป็นผลผลิตสูงกว่าการใช้ถังกวนแบบต่อเนื่อง และยังให้ผลผลิตสูงกว่าด้วยโดยเฉพาะเมื่อระบบเป็นแบบที่ผลผลิตเป็นตัวยับยั้งอัตราการเกิดปฏิกิริยา [22] และข้อมูลที่ได้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาไปสู่การใช้เทคนิคฟลูอิดไดซ์เซชัน (fluidization) ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดเอนไซม์ตรึงรูปกับสับสเตรต และทำให้เกิดการผสมกันได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ นอกจากนั้นยังพบว่า การตรึงรูปบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออนสามารถ ทำได้ง่าย ตัวพยุงที่ใช้มีราคาไม่สูงและสามารถหาได้ง่าย และสารเคมีที่ใช้ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภคเมื่อนำเอนไซม์ตรึงรูปนี้ไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหาร ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมภายในประเทศด้วยเหตุผลดังกล่าวเหล่านี้ทำให้วิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เพกติเนสบนเรซินแลกเปลี่ยนไอออน และนำมาใช้ในถังปฏิกรณ์แบบแพ็กเบด