บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ตัวพยุงที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

เมื่อใช้คาร์บอนกัมมันต์ ทราย และเม็ดแก้ว เป็นตัวพยุงในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส ภายใต้ภาวะการตรึงรูปเดียวกันตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.5.3 และ 3.5.4 กล่าวคือใช้ 1% APTS และ 1% CNBr เป็นสารกระตุ้น และ 2.5% กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนตัวพยุงแต่ละชนิดที่นำมาใช้ มีความแตกต่างกันภายใต้สภาวะที่ทำการทดลองโดยในสภาวะนี้ เมื่อคิดจากเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้(% activity retained) และแอคติวิตีจำเพาะที่ได้จากการวิเคราะห์แอคติวิตีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และpH 5.5 นั้น คาร์บอนกัมมันต์แสดงแอคติวิตีสูงกว่าตัวพยุงชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้นี้ไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่าตัวพยุงชนิดใดเหมาะสมกับเอนไซม์นี้ทั้งนี้เพราะทุกปัจจัยที่ศึกษานั้นเป็นตัวแปรที่ขึ้นกับชนิดของตัวพยุงและชนิดของเอนไซม์ด้วย ซึ่งงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาถึงรายละเอียดในแง่นี้ จึงได้เลือกคาร์บอนกัมมันต์เป็นตัวพยุง เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการศึกษาการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส และคาร์บอนกัมมันต์นี้ยังเป็นตัวพยุงธรรมชาติ ที่ได้จากการนำกะลามะพร้าวมาผ่านกระบวนการต่างๆ (ภาคผนวก ง-2) ทั้งยังหาได้ง่ายในประเทศเกษตรกรรม และเหมาะสมในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่า ทรายและเม็ดแก้วเป็นตัวพยุงที่ด้อยกว่าคาร์บอนกัมมันต์ ถ้าหากมีการทดลองแปรภาวะการตรึงรูปที่เหมาะสมต่อไป ก็อาจจะให้ผลที่ดีกว่านี้ได้

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนตัวพยุงชนิดต่างๆ ในภาวะที่ใช้สารละลาย 1% APTS และ 1% CNBr เป็นสารกระตุ้น และใช้ 2.5% กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วมในปฏิกิริยาการตรึงรูป โดยเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ใช้ในการตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะ 50 หน่วยต่อมก.โปรตีน

สารกระตุ้น	สารสร้างพันธะร่วม	ตัวพยุง	*แอคติวิตีทั้งหมด (total activity) (หน่วย)	**โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก. โปรตีน)
1% APTS	2.5% กลูตารัลดีไฮด์	คาร์บอน	262	3.8	53.3	69
		ทราย	184	3.8	37.5	56
		เม็ดแก้ว	13	0.9	2.8	14
1% CNBr	2.5% กลูตารัลดีไฮด์	คาร์บอน	306	3.7	62.4	83
		ทราย	205	3.2	41.8	64
		เม็ดแก้ว	27	1.3	5.5	21

* หน่วยของแอคติวิตีทั้งหมด หมายถึง หน่วยต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

** โปรตีนทั้งหมด หมายถึง ปริมาณโปรตีนต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์

2.1 ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.8.1 เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล3x3 (Factorial completely randomized design) ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย APTS 3 ระดับ คือ 1% 2% และ 3% โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 3 ระดับ คือ 1% 2.5% และ 5% โดยปริมาตร โดยให้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสคงที่คือ 50หน่วยต่อมก. โปรตีน แล้ววัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้จากภาวะต่างๆดังกล่าว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอด(ตารางที่ 8) พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย APTS มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และผลร่วมของระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's New Multiple Range Test(ตารางที่ 9) พบว่า การตรึงรูปที่ใช้สารละลาย APTS 2% โดยปริมาตร และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยปริมาตร จะให้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุด โดยมีความแตกต่างจากค่าอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งให้แอคติวิตีจำเพาะ 75 หน่วยต่อมก.โปรตีน และมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained) ถึง 62% ดังนั้นจึงคัดเลือกภาวะนี้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป และจะใช้สัญลักษณ์ $A_2G_{2.5}$ แทนภาวะที่ได้นี้

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนคาร์บอนกัมมันต์ โดยเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ใช้ในการตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะ 50 หน่วยต่อมก.โปรตีน

ภาวะ	ความเข้มข้นของ APTS (%)	ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (%)	*แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	**โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อ มก.โปรตีน)	แอคติวิตีที่กักไว้ (%)
A_1G_1	1	1	88	2.8	31	18.0
$A_1G_{2.5}$	1	2.5	181	3.5	52	40.8
A_1G_5	1	5	138	3.3	42	28.1
A_2G_1	2	1	201	3.5	57	41.0
$A_2G_{2.5}$	2	2.5	299	4.0	75	61.8
A_2G_5	2	5	189	3.6	53	38.5
A_3G_1	3	1	133	3.1	43	27.1
$A_3G_{2.5}$	3	2.5	152	3.2	48	31.0
A_3G_5	3	5	140	2.9	48	28.6

* หน่วยของแอคติวิตีทั้งหมด หมายถึง หน่วยต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

** โปรตีนทั้งหมด หมายถึง ปริมาณโปรตีนต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน

SOV	df	SS	MS	$F_{\text{คำนวณ}}$	$F_{\text{ตาราง}}$
A=APTS	2	0.1619	0.0810	1,125.00**	5.01
B=กลูตารัลดีไฮด์	2	0.0599	0.0300	416.67**	6.01
AB	4	0.0330	8.25×10^{-3}	114.58**	4.58
Error	18	1.3×10^{-3}	7.2×10^{-5}		
Total	26	0.2561			

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน

สภาวะ	OD_{520}
$A_2G_{2.5}$	0.5180 ^{a}
A_2G_1	0.3480 ^{b}
A_2G_5	0.3273 ^{c}
$A_1G_{2.5}$	0.2803 ^{d}
$A_3G_{2.5}$	0.2633 ^{e}
A_3G_5	0.2417 ^{f}
A_1G_5	0.2390 ^{f}
A_3G_1	0.2307 ^{f}
A_1G_1	0.1523 ^{g}

a-g ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแต่ละระดับของตัวแปร หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2 ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.8.2 เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล3x3 (Factorial completely randomized design) ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย CNBr 3 ระดับ คือ 1% 2% และ 3% โดยปริมาตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 3 ระดับ คือ 1% 2.5% และ 5% โดยปริมาตร โดยให้ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสคงที่ คือ 50 หน่วยต่อมก. โปรตีน แล้ววัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมได้จากภาวะต่างๆดังกล่าว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอด(ตารางที่ 11) พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย CNBr มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% และความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % และผลร่วมของระดับความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's New Multiple Range Test (ตารางที่ 12) พบว่าการตรึงรูปที่ใช้สารละลาย CNBr 3% โดยนน.ต่อปริมาตร และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยปริมาตร จะให้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุด โดยมีความแตกต่างจากค่าอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งให้แอคติวิตีจำเพาะ 113 หน่วยต่อมก.โปรตีน และมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained) ถึง 78% ดังนั้น จึงคัดเลือกภาวะนี้เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป และจะใช้สัญลักษณ์ $C_3G_{2.5}$ แทนภาวะที่ได้นี้

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนคาร์บอนกัมมันต์โดยเดกซ์แทรนเนสอิสระที่ใช้ในการตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะ 50 หน่วยต่อมก.โปรตีน

ภาวะ	ความเข้มข้นของ CNBr (%)	ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (%)	*แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	**โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	แอคติวิตี-ที่กักไว้ (%)
C_1G_1	1	1	132	2.5	53	26.9
$C_1G_{2.5}$	1	2.5	234	2.7	87	57.7
C_1G_5	1	5	228	2.8	81	46.4
C_2G_1	2	1	224	2.6	86	45.7
$C_2G_{2.5}$	2	2.5	268	2.8	95	54.6
C_2G_5	2	5	272	3.0	91	55.4
C_3G_1	3	1	321	3.2	100	65.4
$C_3G_{2.5}$	3	2.5	383	3.4	113	77.8
C_3G_5	3	5	356	3.3	108	72.6

* หน่วยของแอคติวิตีทั้งหมด หมายถึง หน่วยต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

** โปรตีนทั้งหมด หมายถึง ปริมาณโปรตีนต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลายกลูตารัลดีไอด์ ในระดับต่างๆกัน

SOV	df	SS	MS	$F_{คำนวณ}$	$F_{ตาราง}$
A=CNBr	2	0.3324	0.1662	2,720.13**	6.01
B=กลูตารัลดีไอด์	2	0.0756	0.0378	618.66**	6.01
AB	4	0.0128	3.2×10^{-3}	52.37**	4.58
Error	18	1.1×10^{-3}	6.11×10^{-5}		
Total	26	0.4219			

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ในระดับต่างๆกัน

สภาวะ	OD_{520}
$C_2G_{2.5}$	0.6640^{a}
C_3G_5	0.6170^{b}
C_3G_1	0.5573^{c}
C_2G_5	0.4723^{d}
$C_2G_{2.5}$	0.4647^{d}
$C_1G_{2.5}$	0.4060^{e}
C_1G_5	0.3963^{ef}
C_2G_1	0.3880^{f}
C_1G_1	0.2307^{g}

a-g ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแต่ละระดับของตัวแปร หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.3 ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.3.3 เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปตามภาวะที่เลือกในข้อ 2.1 คือ ใช้ความเข้มข้นของสารละลาย APTS 2% โดยปริมาตรร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยปริมาตร และข้อ 2.2 คือใช้ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr 3% โดยนน.ต่อปริมาตร ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% โดยปริมาตร โดยแปรความเข้มข้นของโปรตีนเดกซ์แทรนเนส ตั้งแต่ 4-20 มก.ในปริมาณเอนไซม์ 20 มล.(10-50 หน่วยต่อมล.) วัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ตรึงรูป และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีที่กักไว้ (% activity retained) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 13 และ14 ตามลำดับ

พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจาก 4-20 มก.ในปริมาณเอนไซม์ 20 มล.(10-50 หน่วยต่อมล.) นั้นมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเพิ่มขึ้น แต่เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว % ปริมาณโปรตีนที่กักไว้และ %แอคติวิตีที่กักไว้ จะสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เพิ่มขึ้นจนถึงภาวะหนึ่งแล้วจะลดลง และความเข้มข้นของโปรตีนเอนไซม์สูงสุดที่จะสามารถกักไว้ได้คือ 10 มก.(25 หน่วยต่อมล.) ทั้งในภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ดังนั้น จะนำภาวะที่ได้เหล่านี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 13 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ (มก.)	**ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มก.)	%ปริมาณโปรตีนที่กักไว้	แอคติวิตีที่ใช้ (หน่วย)	*แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	%แอคติวิตีที่กักไว้	แอคติวิตีจำเพาะ
4	1.1	27.5	200	68	34.8	62
8	2.6	32.5	400	169	51.1	65
10	4.0	40.0	500	301	63.2	75
16	4.9	30.6	800	362	48.3	74
20	5.8	29.0	1,000	423	48.9	73

* หน่วยของแอคติวิตีทั้งหมด หมายถึง หน่วยต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

** โปรตีนทั้งหมด หมายถึง ปริมาณโปรตีนต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$

ปริมาณโปรตีน ที่ใช้ (มก.)	**ปริมาณโปรตีน ที่กักไว้ (มก.)	%ปริมาณโปรตีน ที่กักไว้	แอคติวิตี ที่ใช้ (หน่วย)	*แอคติวิตี ทั้งหมด (หน่วย)	%แอคติวิตี ที่กักไว้	แอคติวิตี จำเพาะ
4	0.9	20.0	200	72	38.4	80
8	2.2	27.5	400	216	56.5	99
10	3.6	36.0	500	412	74.8	114
16	4.5	28.1	800	478	61.5	106
20	5.2	26.5	1,000	511	51.8	98

* หน่วยของแอคติวิตีทั้งหมด หมายถึง หน่วยต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

** โปรตีนทั้งหมด หมายถึง ปริมาณโปรตีนต่อ 9 กรัมนน.เปียกของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

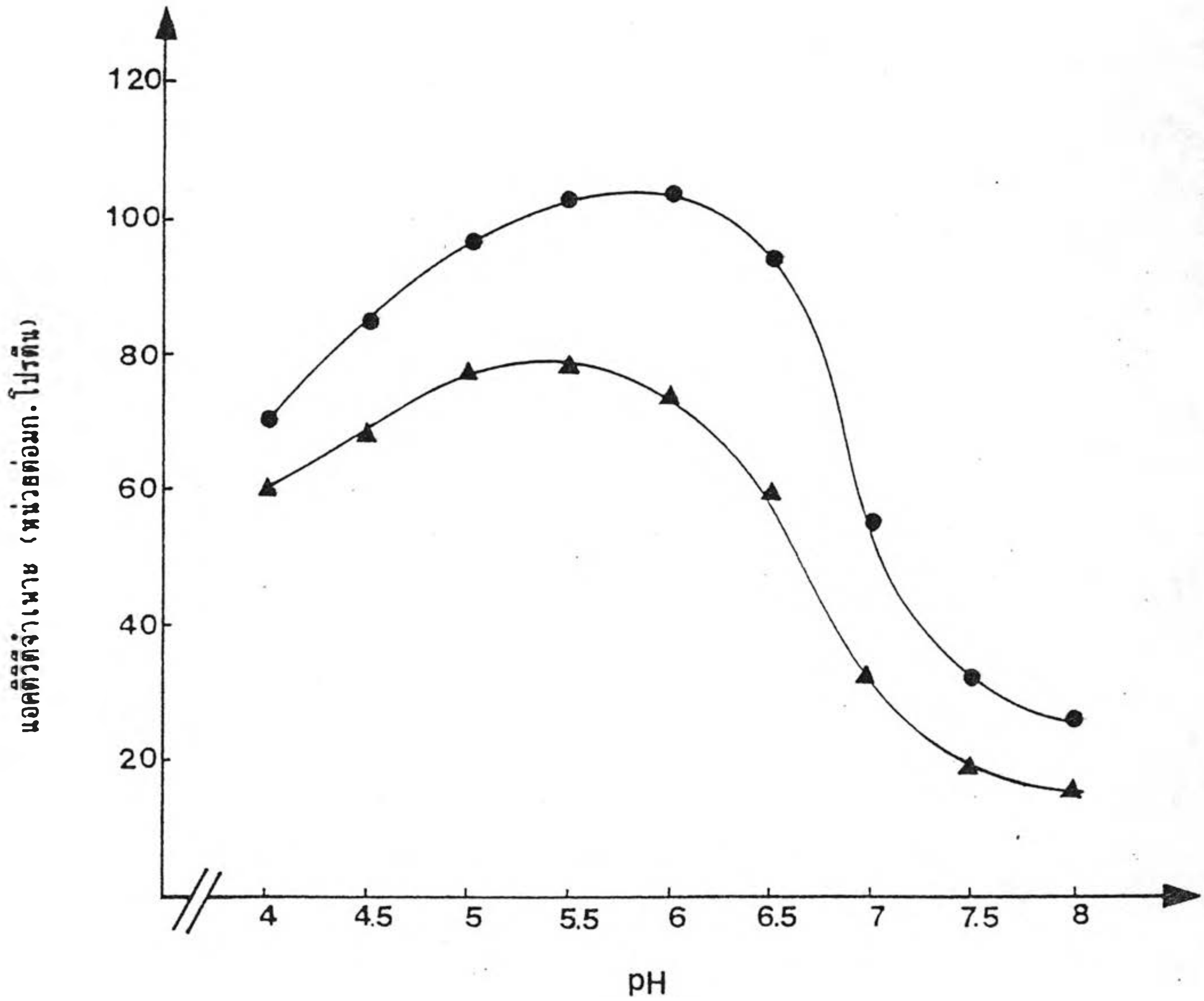
2.4 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.8.4 เตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ตามรูปที่ 8 โดยแปรผันความเป็นกรดด่างของสารละลายที่นำมาใช้ในขั้นตอนต่างๆของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ในช่วง 4.0 ถึง 8.0

ผลการทดลองพบว่าในภาวะ $A_2G_{2.5}$ เมื่อแปรความเป็นกรดด่างของสารละลายจาก pH 4.0 ถึง 8.0 นั้น ช่วง pH 4.0 ถึง 5.5 แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ตามค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อค่า pH ตั้งแต่ 6.0 ขึ้นไป พบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้กลับมีแอคติวิติลดลง และที่ pH 5.5 ให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 78 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 9

ในทำนองเดียวกันที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$ เมื่อแปรความเป็นกรดด่างของสารละลายจาก pH 4.0 ถึง 8.0 นั้น ช่วง pH 4.0 ถึง 6.0 แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อค่า pH ตั้งแต่ 6.5 ขึ้นไป พบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้กลับมีแอคติวิตีลดลง และที่ pH 5.5 และ 6.0 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 103 และ 105 หน่วยต่อมก. โปรตีน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9

จะเห็นได้ว่าการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ นั้น เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่างๆกันเป็นตัวทำละลายของ APTS หรือ CNBr และกลูตารัลดีไฮด์นั้น ไม่มีผลทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด เมื่อเทียบกับการเตรียมในภาวะปกติ ที่ใช้น้ำปลอดประจุเป็นตัวทำละลาย ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ดังนั้นการทดลองต่อไป จึงเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปของภาวะ $A_3G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ในภาวะปกติ เช่นเดียวกับวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 3.5.3 และ 3.5.4 ตามลำดับ



รูปที่ 9 ผลความเป็นกรดด่างที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยแปรผันความเป็นกรดด่างของสารละลายที่นำมาใช้ในขั้นตอนต่างๆ ของการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส ดังวิธีในบทที่ 2 ข้อ 10.4

▲ เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_1G_{2.5}$

● เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$

2.5 เวลาที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$

การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังที่กล่าวข้างต้น ได้แก่

1. กระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น (APTS หรือ CNBr)
2. สร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์
3. ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

ขั้นตอนที่ 1

เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ของการกระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น (APTS และ CNBr) ในช่วง 0.5-5 ชั่วโมง และกำหนดเวลาในขั้นตอนอื่นๆไว้แน่นอน คือ 2 ชั่วโมงสำหรับเวลาของการสร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์ และ 2 ชั่วโมงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.8.5 พบว่าการเตรียมเดกซ์แทรนเนสทั้งวิธีที่ใช้ APTS และ CNBr เป็นตัวกระตุ้นนั้น ระยะเวลาสั้นที่สุดที่ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปดี คือที่ 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 10

ขั้นตอนที่ 2

เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ของการสร้างพันธะร่วม โดยกลูตารัลดีไฮด์ในช่วง 0.5-5 ชั่วโมง ร่วมกับสารกระตุ้น (APTS และ CNBr) และกำหนดเวลาขั้นตอนอื่นๆไว้แน่นอน คือ 3 ชั่วโมงสำหรับการกระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น และ 2 ชั่วโมงสำหรับการตรึงรูปเอนไซม์ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.8.5 พบว่าการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งวิธีที่ใช้ APTS และ CNBr เป็นสารกระตุ้นร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์นั้น ระยะเวลาสั้นที่สุดที่ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปดี คือที่ 2 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 11

ขั้นตอนที่ 3

เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ของการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในช่วง 0.5- 5 ชั่วโมง และกำหนดเวลาขั้นตอนอื่นๆไว้แน่นอน คือ 3 ชั่วโมงสำหรับการกระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น และ 2 ชั่วโมงสำหรับการสร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์ ตามวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.8.5 พบว่า การเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธีใช้ APTS และ CNBr ร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์ทั้ง 2วิธีนั้น เวลาที่สั้นที่สุดสำหรับขั้นตอนตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสที่ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปดี คือที่ 3 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 12

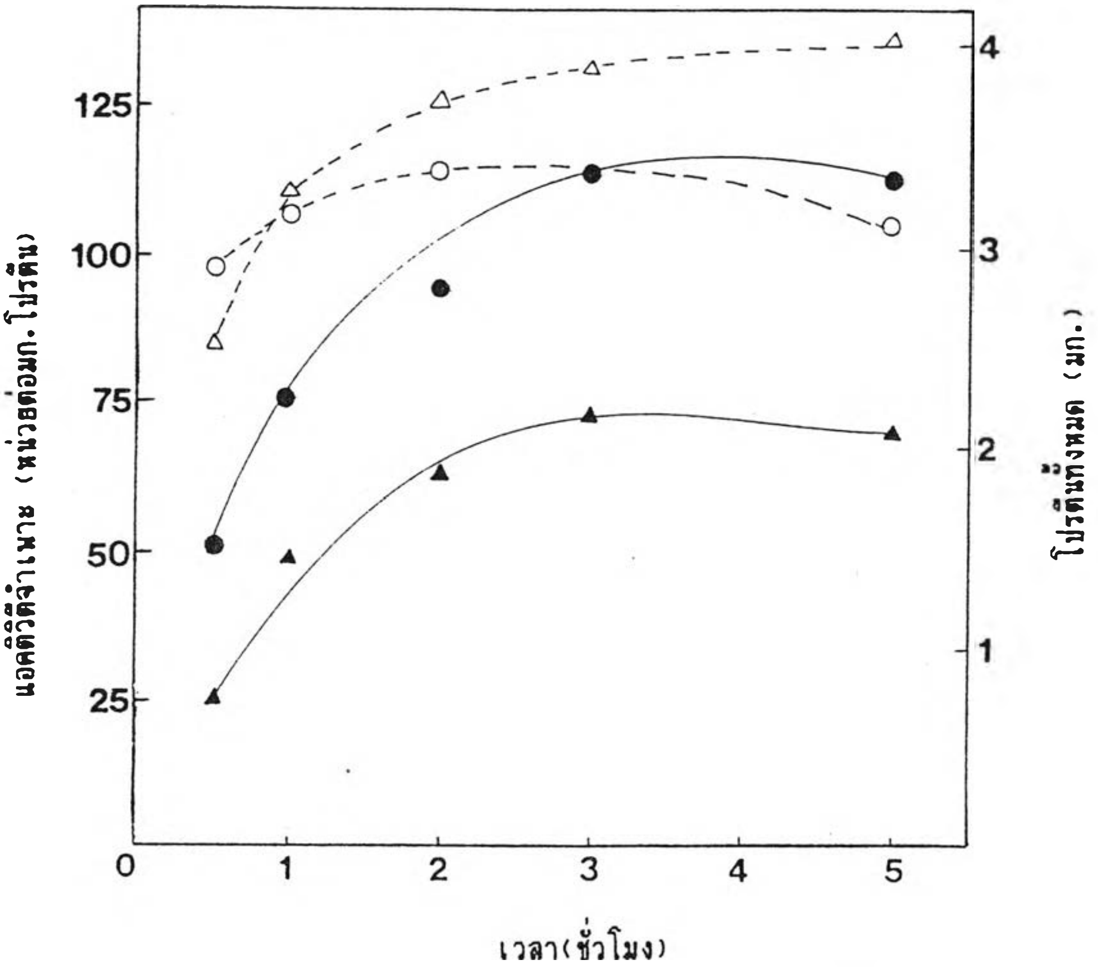
จากตารางที่ 15 กล่าวโดยสรุปได้ว่า เวลาที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป แต่ละขั้นตอนเป็นดังนี้ คือ

ขั้นตอนที่ 1 กระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น (APTS หรือ CNBr) ใช้เวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 สร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์ ใช้เวลา 2 ชั่วโมง

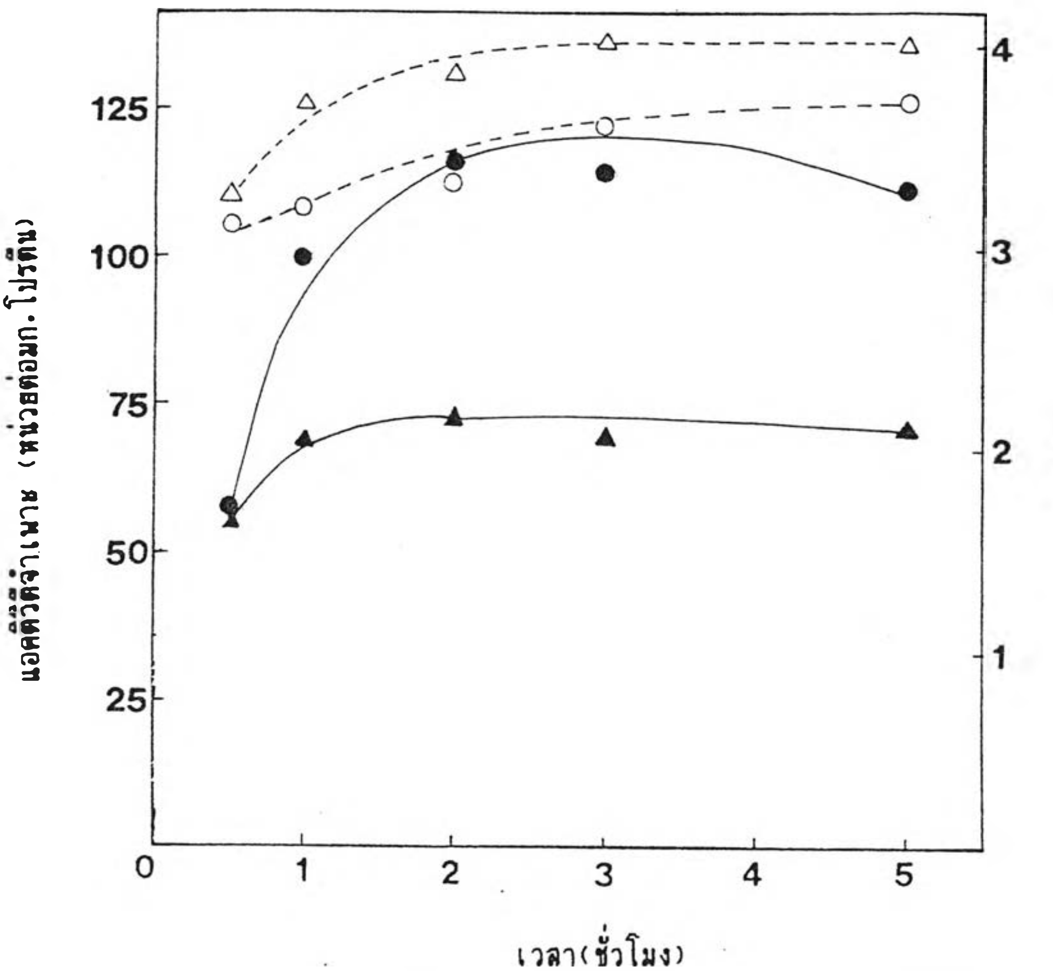
ขั้นตอนที่ 3 ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส ใช้เวลา 3 ชั่วโมง

แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจากภาวะนี้เมื่อเทียบกับภาวะที่ได้จากตารางที่ 7 และ 10 ไม่ได้ทำให้แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเท่าไรนัก กล่าวคือเพิ่มขึ้นจาก 75เป็น 80 หน่วยต่อมก.โปรตีนในภาวะ $A_2G_{2.5}$ และจาก 113 เป็น 118 หน่วยต่อมก.โปรตีนในภาวะ $C_3G_{2.5}$ ดังนั้น การทดลองครั้งต่อไปจะใช้ภาวะการเตรียมดังรูปที่ 8 คือ 3 ชั่วโมงสำหรับการกระตุ้นตัวพยุง 2 ชั่วโมงสำหรับการสร้างพันธะร่วม และ 2 ชั่วโมงสำหรับตรึงรูปเอนไซม์



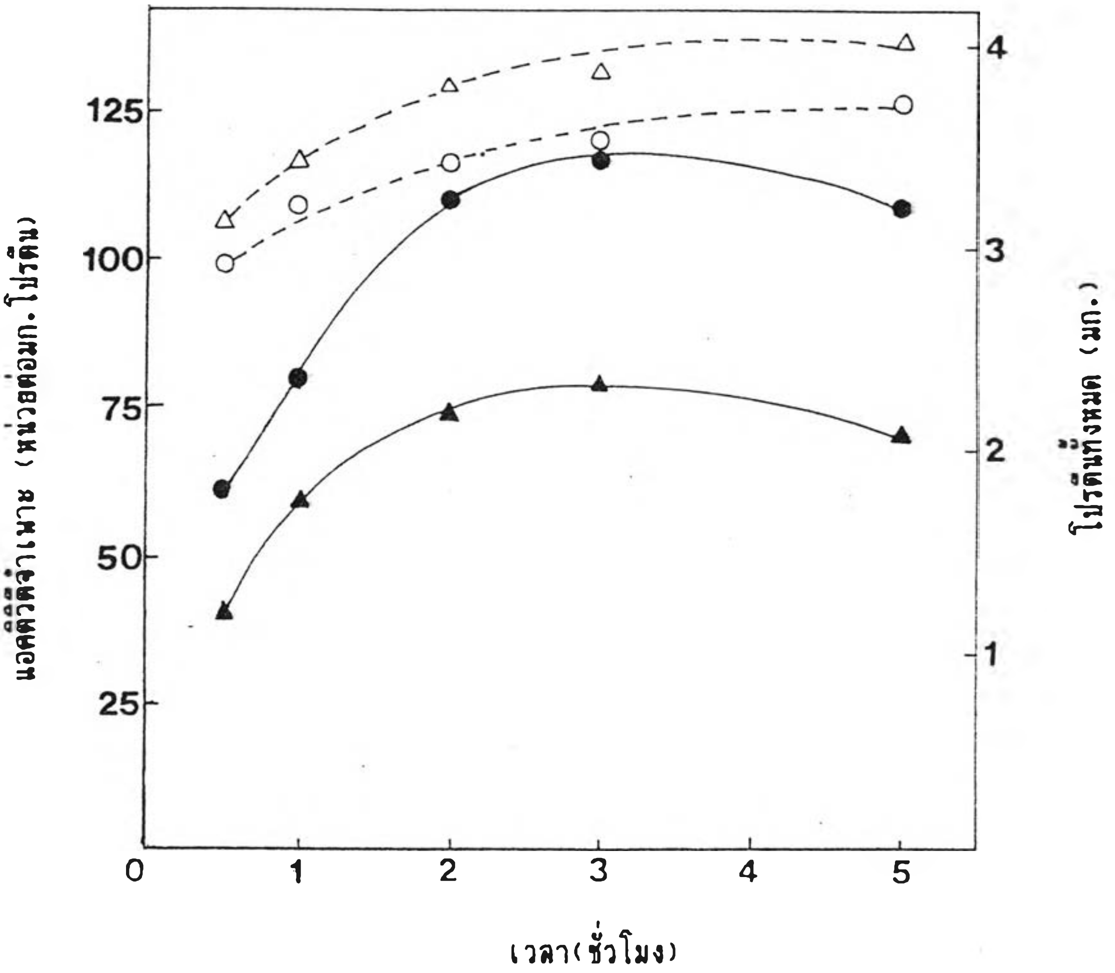
รูปที่ 10 ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขั้นตอนการกระตุ้นเมทริกซ์โดยสารกระตุ้น โดยแปรผันเวลาตั้งแต่ 0.5-5 ชั่วโมง ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 10.5

-▲- แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
-●- แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$
-△- ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{1.5}$
-○- ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$



รูปที่ 11 ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขั้นตอนการสร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์ โดยแปรผันเวลาตั้งแต่ 0.5-5 ชั่วโมง ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 10.5

-▲- แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
-●- แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$
-△- ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
-○- ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$



รูปที่ 12 ผลของเวลาที่มีต่อการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในขั้นตอนการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส โดยแปรผันเวลาตั้งแต่ 0.5-5 ชั่วโมง ตามวิธีในบทที่2 ข้อ 10.5

- ▲ แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
- ● แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$
- △ ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
- ○ ปริมาณโปรตีนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$

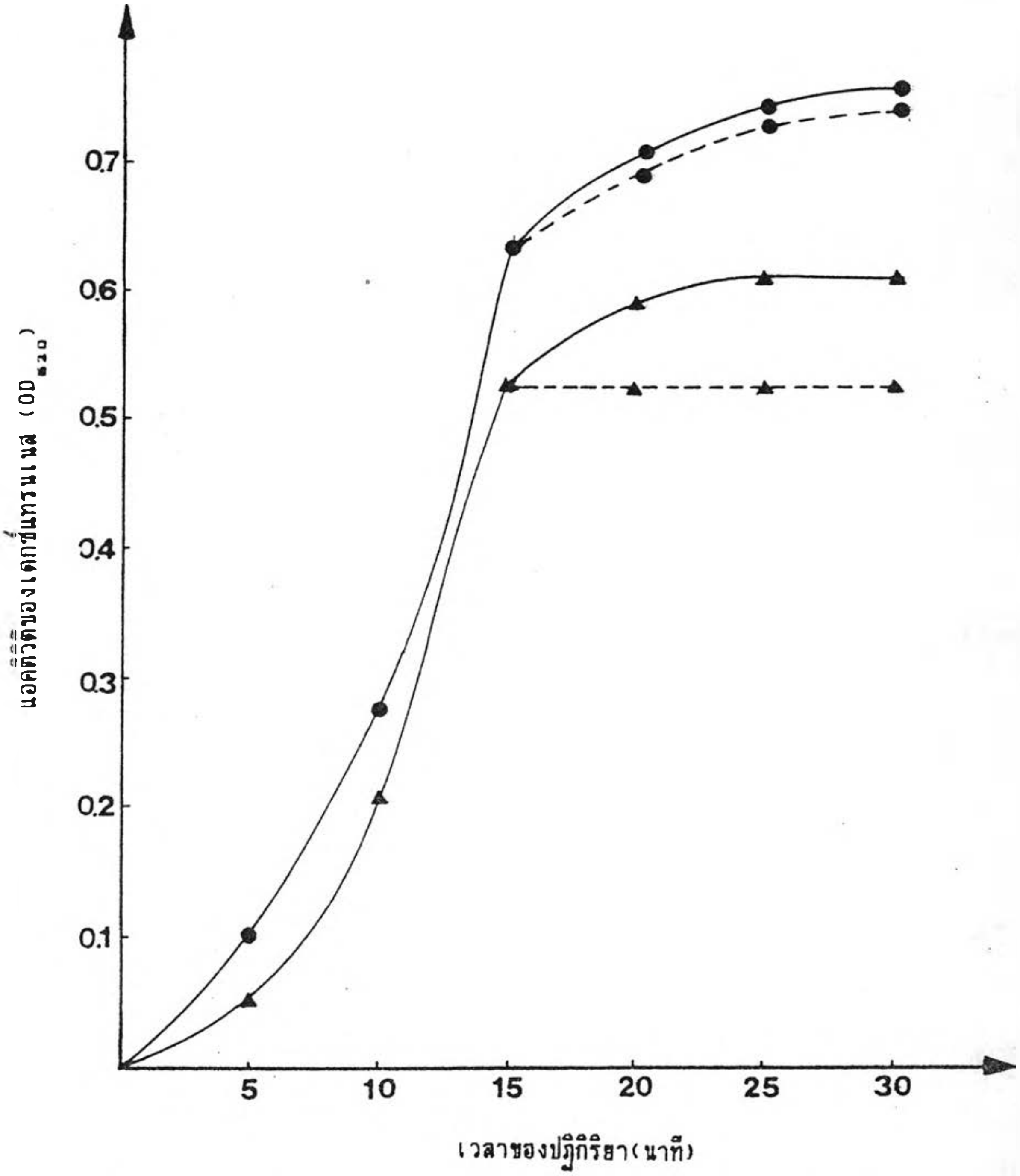
ตารางที่ 15 ผลของการแปรผันเวลาในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป ของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$

	แอคติวิตีที่กักไว้ (%)		โปรตีนทั้งหมด (มก.)		แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	
	$A_2G_{2.5}$	$C_3G_{2.5}$	$A_2G_{2.5}$	$C_3G_{2.5}$	$A_2G_{2.5}$	$C_3G_{2.5}$
ภาวะการเตรียมปกติ	61.8	77.8	4.0	3.6	75	113
แปรผันเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น						
0.5 ชั่วโมง	12.5	29.6	2.5	2.9	25	51
1.0 "	32.3	48.0	3.3	3.2	49	75
2.0 "	48.6	66.0	3.8	3.4	64	97
3.0 "	60.6	78.9	3.9	3.4	74	116
5.0 "	56.8	70.7	4.0	3.1	71	114
แปรผันเวลาที่ใช้ในการสร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์						
0.5 ชั่วโมง	36.3	36.6	3.3	3.1	55	59
1.0 "	51.8	64.6	3.7	3.2	70	101
2.0 "	59.0	77.9	3.9	3.3	72	118
3.0 "	56.0	83.5	4.0	3.6	70	116
5.0 "	57.6	85.9	4.0	3.8	72	113
แปรผันเวลาในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส						
0.5 ชั่วโมง	25.6	35.4	3.2	2.9	40	61
1.0 "	42.0	51.8	3.5	3.2	60	81
2.0 "	56.2	76.2	3.8	3.4	74	112
3.0 "	62.4	85.0	3.9	3.6	80	118
5.0 "	56.8	83.6	4.0	3.8	71	110

หมายเหตุ แต่ละการทดลองนั้น แยกทำกันในแต่ละภาวะที่กำหนด

2.6 ศึกษาการหลุดของเดกซ์แทรนเนส(leaching)จากคาร์บอนกัมมันต์ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 10.6 โดยการวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสก่อนและหลังจากที่แยกเอาเดกซ์แทรนเนสออกจากสารผสมปฏิกิริยา พบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมจากภาวะ $A_2G_{2.5}$ นั้นหลังจากที่แยกเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออก แอคติวิตียังคงที่ต่อไปหลังจากเวลาผ่านไป 15 นาที ต่างจากเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่เตรียมจากภาวะ $C_3G_{2.5}$ ซึ่งเมื่อแยกเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออก ยังพบว่ามีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น ซึ่งแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดเนื่องจากเอนไซม์ที่เกาะอยู่บนคาร์บอนกัมมันต์นั้นหลุดออกมาในสารผสมปฏิกิริยาด้วย ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 ผลของการหลุดของเอนไซม์ หลังจากที่แยกเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปออกจากสารผสมปฏิกิริยาที่เกิดปฏิกิริยาแล้ว 15 นาที และบ่มต่ออีก 15 นาที

—▲— แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสภาวะ $A_2G_{2.6}$ ก่อนแยกเอนไซม์ตรึงรูปออก

—●— แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสภาวะ $C_3G_{2.5}$ ก่อนแยกเอนไซม์ตรึงรูปออก

--▲-- แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส หลังจากแยกเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสภาวะ $A_2G_{2.6}$ ออก

--●-- แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส หลังจากแยกเอาเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสภาวะ $C_3G_{2.5}$ ออก

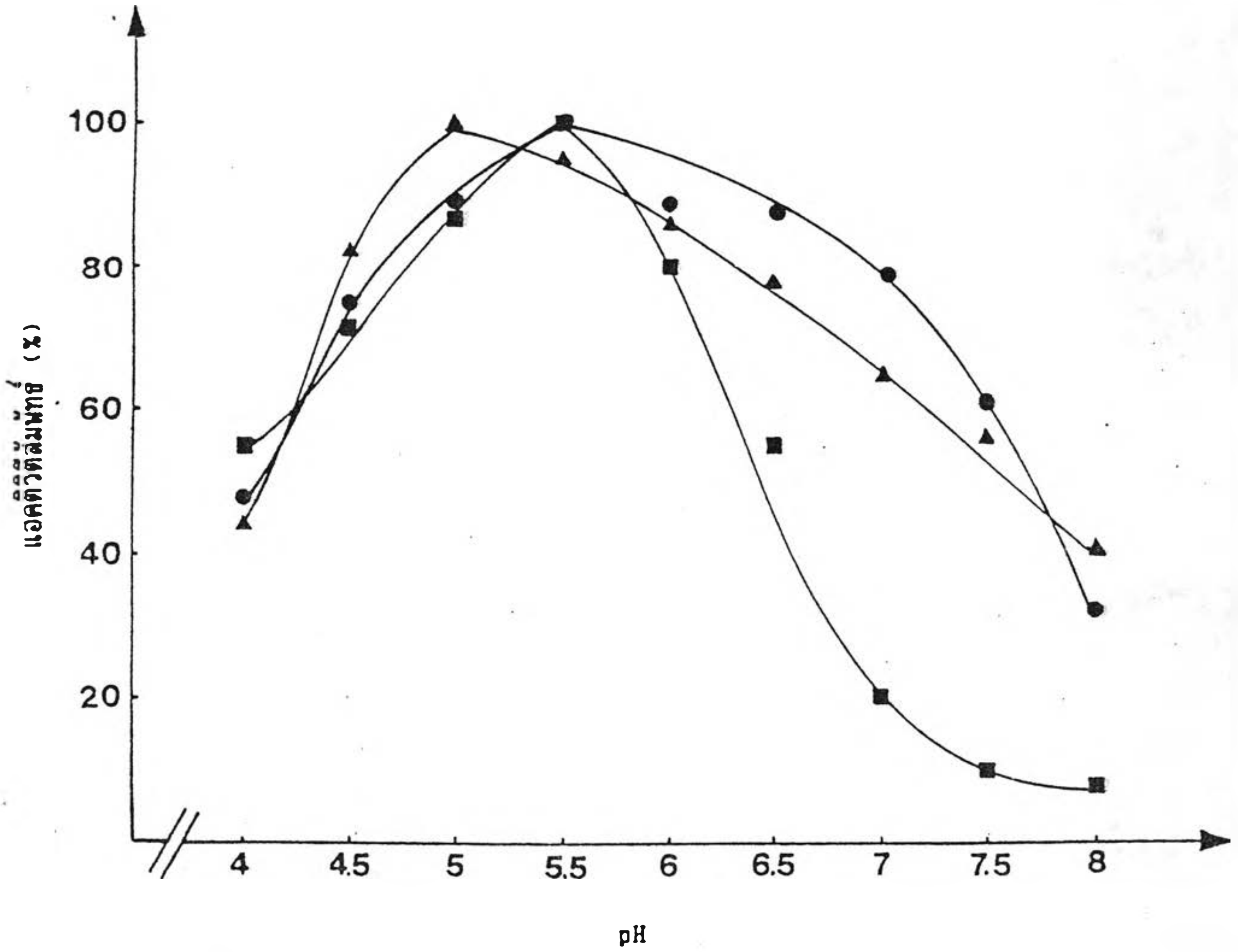
3. การศึกษาคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

3.1 เปรียบเทียบช่วงความเป็นกรดด่างที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (pH activity profile) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 11.1 โดยการวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและแอคติวิตีของเอนไซม์อิสระ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยแปรความเป็นกรดด่างของสารผสมปฏิกิริยาในช่วง 4.0 ถึง 8.0

ผลการทดลอง แสดงดังรูปที่ 14 พบว่ากราฟแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ในช่วง pH 4.0 ถึง 8.0 มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ จะแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.0 ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$ จะแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.5 เช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ

นอกจากนี้มีความแตกต่างระหว่างเอนไซม์ตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ คือเอนไซม์ตรึงรูปจะมีการสูญเสียแอคติวิตีต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ในเกือบทุกค่า pH (เมื่อเทียบกับแอคติวิตีสูงสุด) และการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์อิสระนั้นยิ่งเพิ่มมากขึ้นในช่วงตั้งแต่ pH 6.5 ขึ้นไป



รูปที่ 14 ผลของความเป็นกรดด่างที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ โดยทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเทียบกับเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และแปรความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 4.0 ถึง 8.0

▲ เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_1G_{2.5}$

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 81 หน่วยต่อมก.โปรตีน

● เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 110 หน่วยต่อมก.โปรตีน

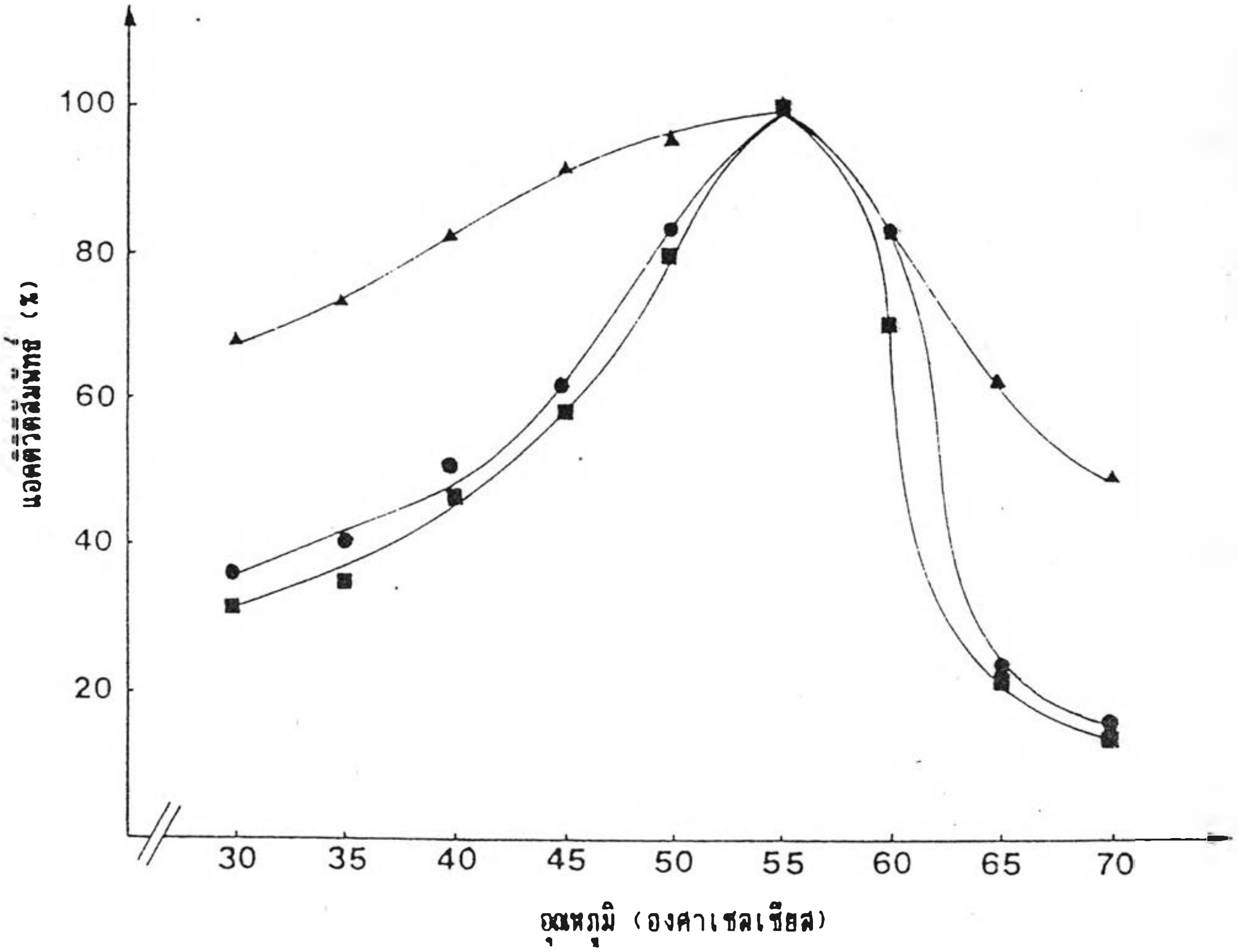
■ เดกซ์แทรนเนสอิสระ

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 50 หน่วยต่อมก.โปรตีน

3.2 เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตี (temperature activity profile) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 11.2 ทำการวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ ที่ pH 5 และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ และเอนไซม์อิสระที่ pH 5.5 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 15 พบว่าทั้งเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิเดียวกัน คือ 55 องศาเซลเซียส เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ ให้แอคติวิตีสัมพัทธ์มากกว่า 80% ในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 65 และ 70 องศาเซลเซียส เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$ และเอนไซม์อิสระนั้นจะสูญเสียแอคติวิตีไปถึง 80% และ 85% ตามลำดับ ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ ยังคงมีแอคติวิตีสูงกว่า 50% ที่อุณหภูมิทั้งสองดังกล่าว



รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ โดยทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ$A_2G_{2.5}$ ที่ pH 5 และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $C_3G_{2.6}$ กับเอนไซม์อิสระ ที่ pH 5.5 โดยแปรอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส

▲ เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 149 หน่วยต่อมก.โปรตีน

● เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 218 หน่วยต่อมก.โปรตีน

■ เดกซ์แทรนเนสอิสระ
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 98 หน่วยต่อมก.โปรตีน

3.3 เปรียบเทียบความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง(pH stability profile) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ

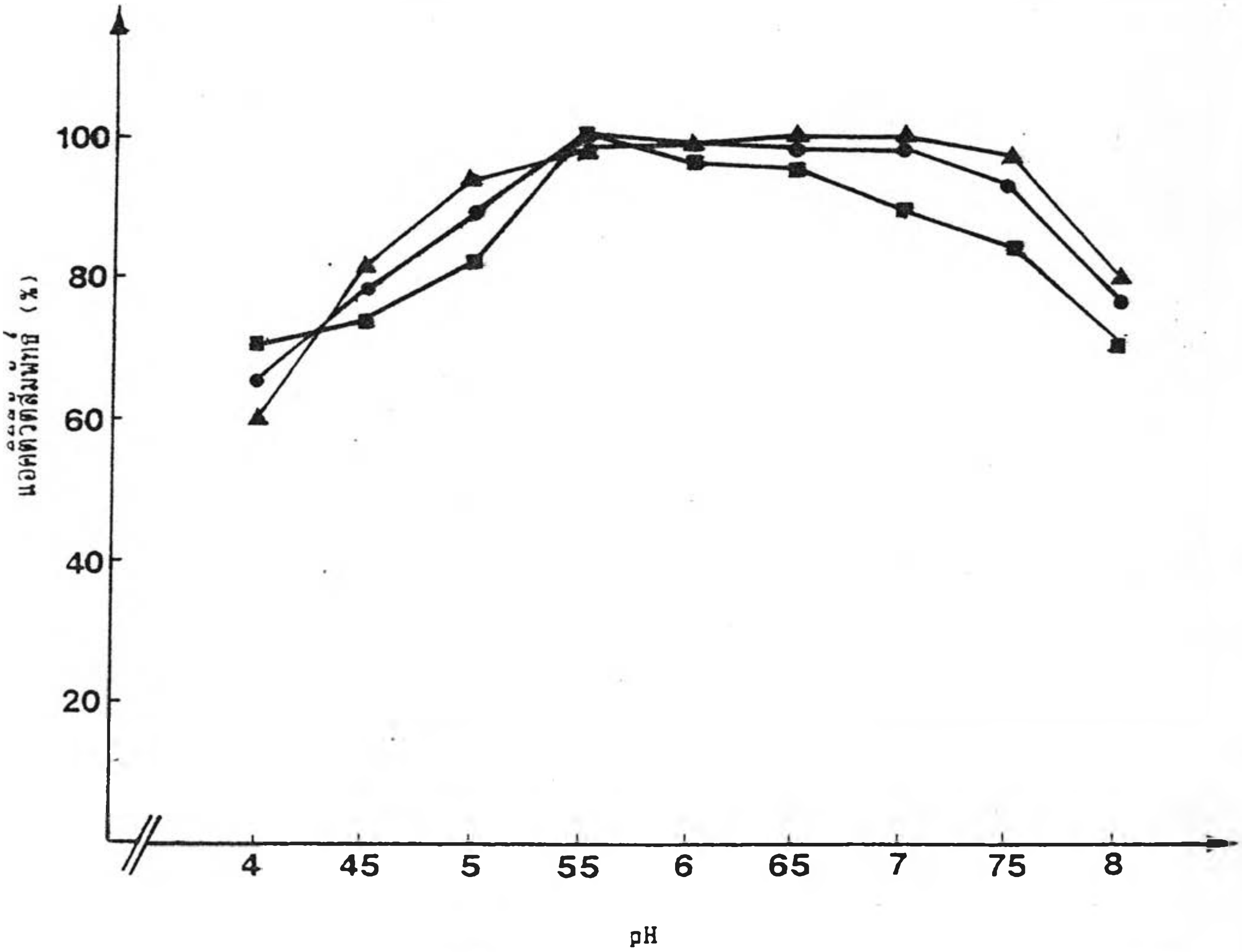
จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.9.3 ทำการวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยแปรความเป็นกรดด่างของสารผสมปฏิกิริยาในช่วง 4.0 ถึง 8.0

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16 พบว่าทั้งเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระมีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างได้ดีในช่วง pH 5.5-7.0 และความเสถียรจะลดลงเมื่อ pH ต่ำกว่า 5.5 และสูงกว่า 7 ขึ้นไป

3.4 เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิ (temperature stability profile) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.9.4 ทำการวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ ที่ pH 5 และแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ และเอนไซม์อิสระที่ pH 5.5 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาในช่วงตั้งแต่ 40 ถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปทั้งภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ยังคงมีแอคติวิตี 100% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์อิสระสูญเสียแอคติวิตีถึง 35% ที่อุณหภูมิเดียวกัน



รูปที่ 16 ผลความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระที่ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 4.0 ถึง 8.0 โดยทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเทียบกับเอนไซม์อิสระ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็น เป็นเวลา 60 นาที

▲ เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{1.5}$

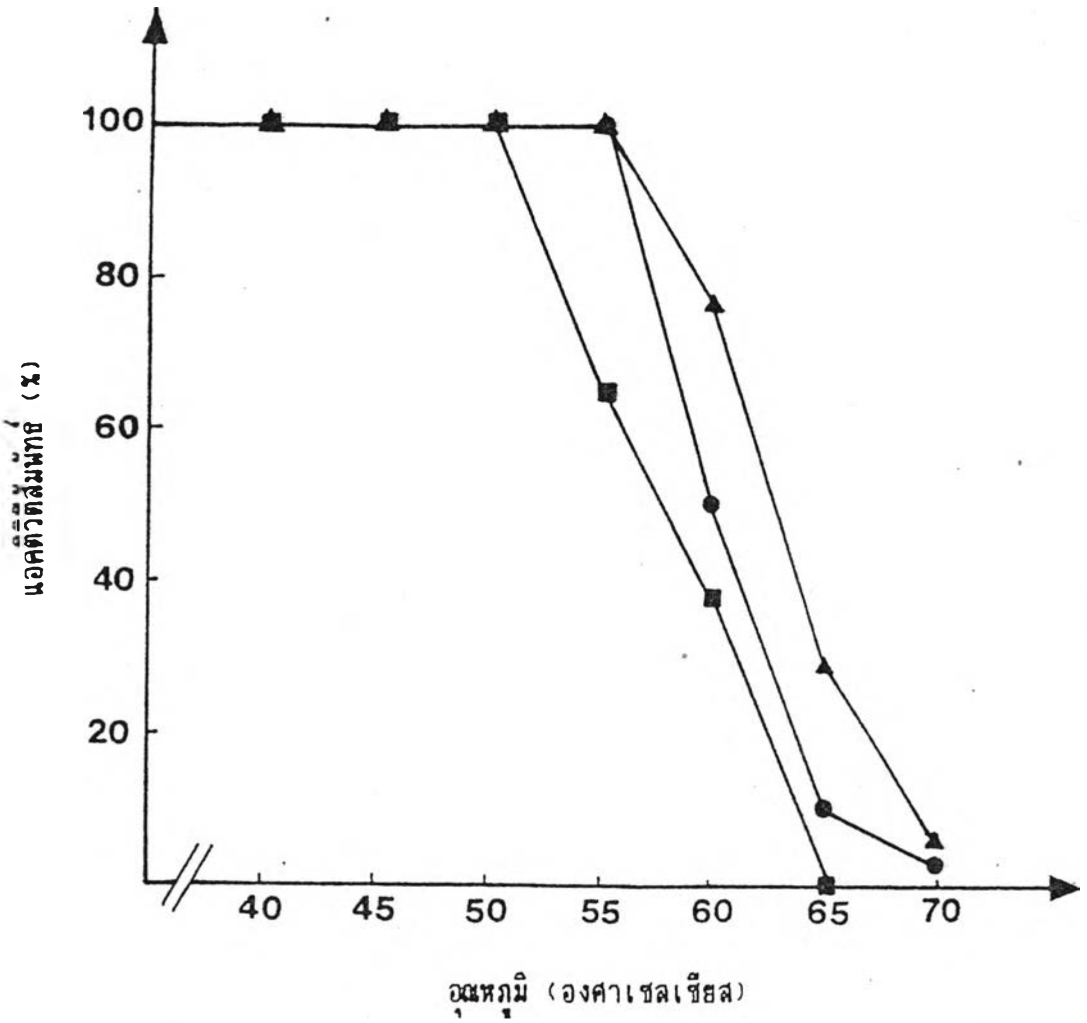
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 182 หน่วยต่อมก.โปรตีน

● เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 240 หน่วยต่อมก.โปรตีน

■ เดกซ์แทรนเนสอิสระ

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 106 หน่วยต่อมก.โปรตีน



รูปที่ 17 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป และเอนไซม์อิสระ ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 40 ถึง 70 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 60 นาที โดยตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ ที่ pH 5 และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ กับเอนไซม์อิสระ ที่pH 5.5 อุณหภูมิ 55° C

—▲— เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_2G_{2.5}$
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 218 หน่วยต่อมก.โปรตีน

—●— เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3G_{2.5}$
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 265 หน่วยต่อมก.โปรตีน

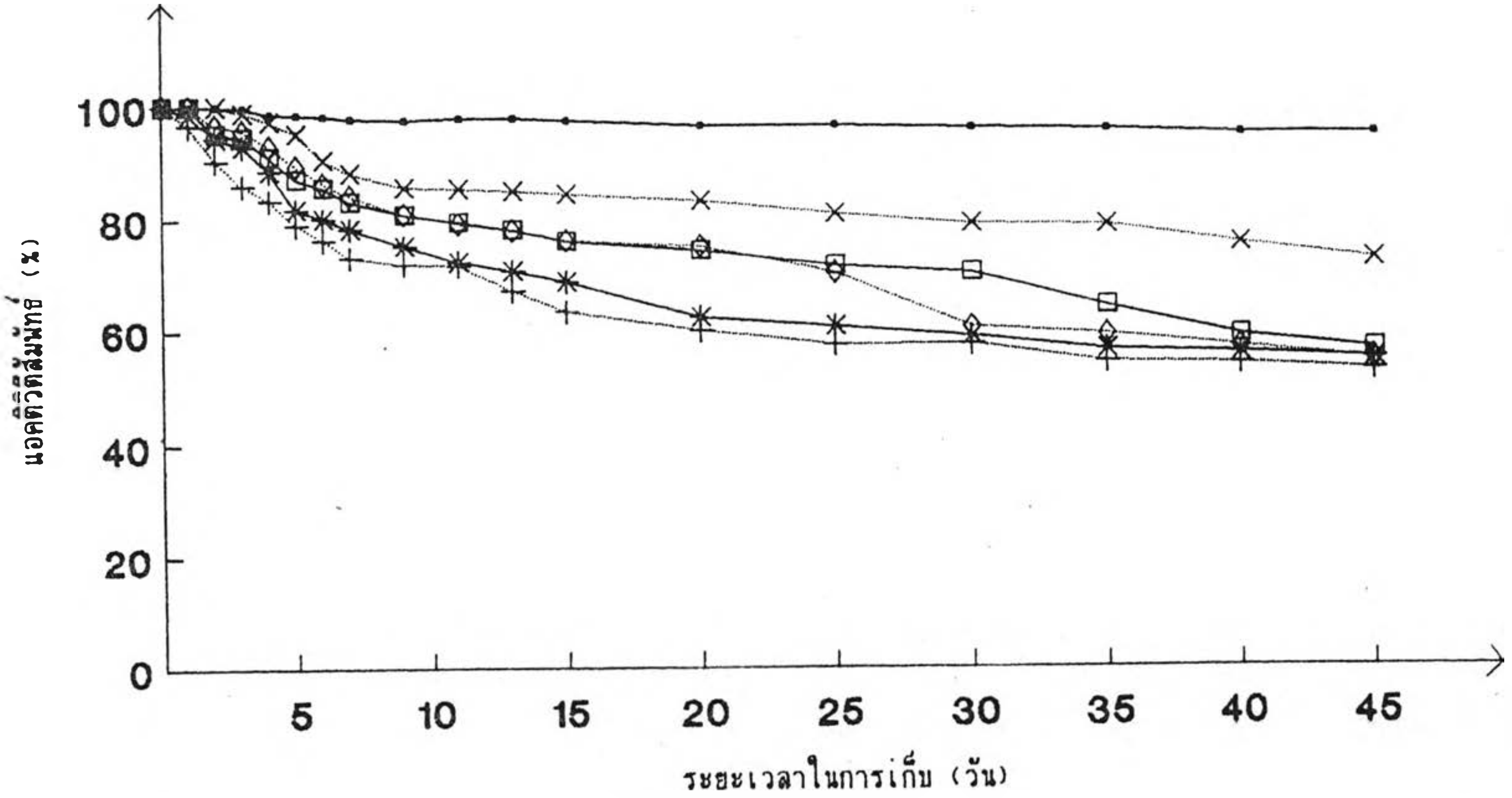
—■— เดกซ์แทรนเนสอิสระ
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% เท่ากับ 116 หน่วยต่อมก.โปรตีน

3.5 เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ

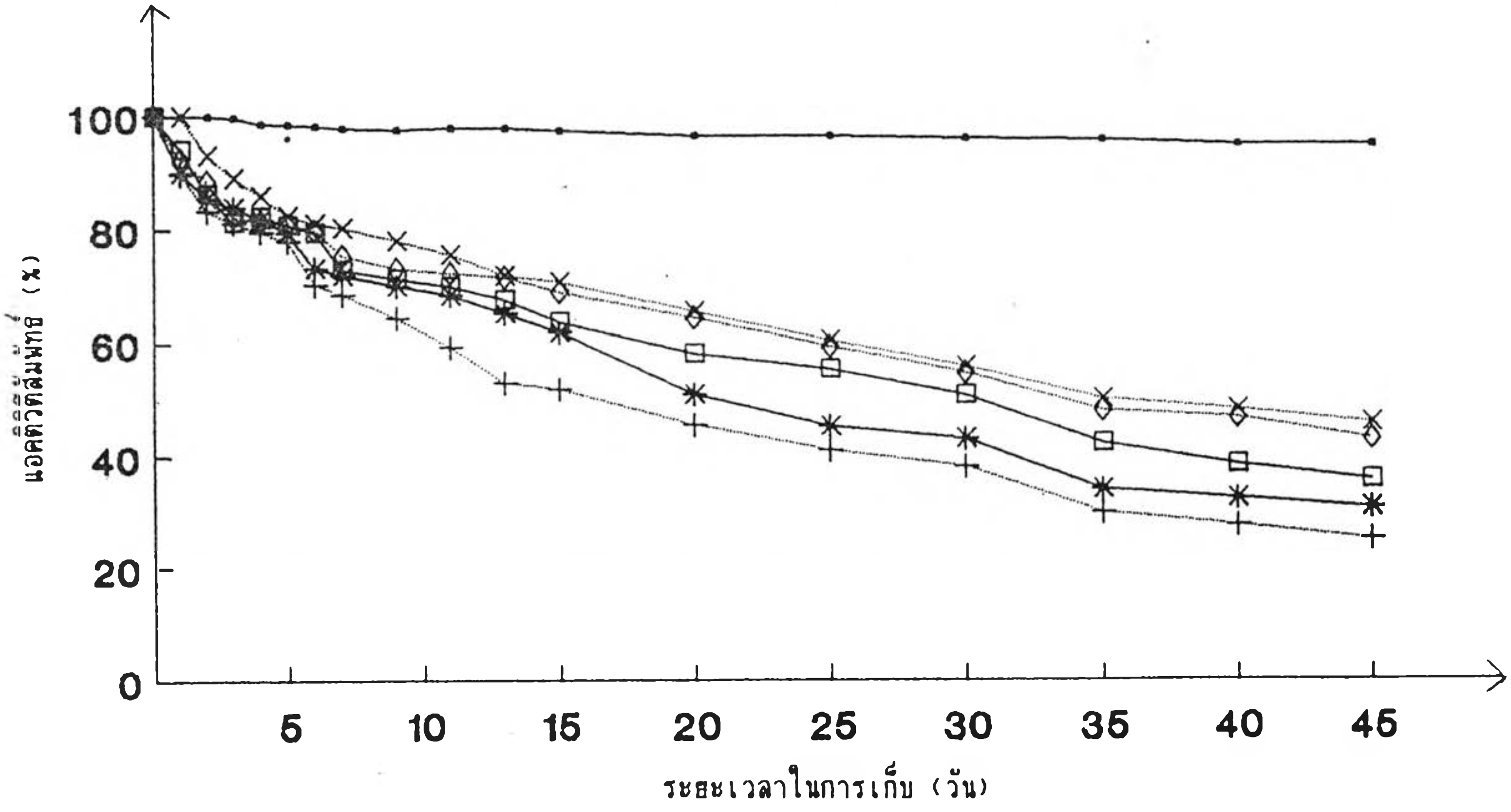
จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.9.5 โดยการเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5, 6, 6.5, 7 และ 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระที่เก็บในสภาพยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่18 และ19 สำหรับภาวะที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และรูปที่20 และ21 สำหรับภาวะที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบภาวะการเก็บที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วนั้น พบว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ดีกว่าการเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง และการสูญเสียแอคติวิตีจะยิ่งเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น โดยในภาวะที่อุณหภูมิห้อง เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากภาวะ $C_3G_{2.5}$ จะสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดภายในระยะเวลา 20-25 วัน ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากภาวะ $A_2G_{2.5}$ ใช้เวลา 30 วัน และเอนไซม์อิสระ ใช้เวลา 35 วัน

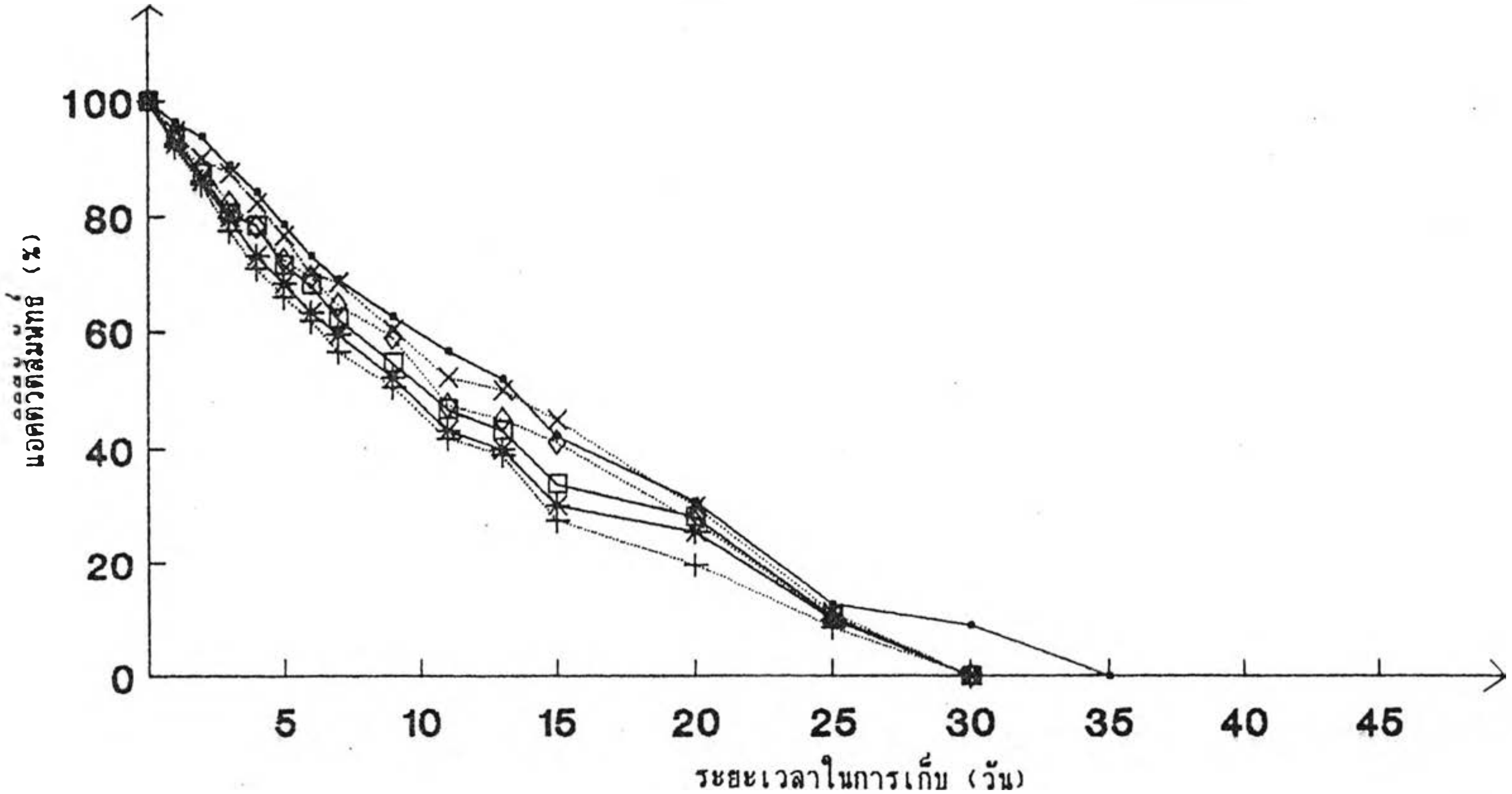
ส่วนในภาวะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เดกซ์แทรนเนสอิสระจะยังคงรักษาแอคติวิตีได้ดี โดยรักษาแอคติวิตีได้ถึง 95% ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะสูญเสียแอคติวิตีไปมากกว่า และเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากภาวะ $C_3G_{2.5}$ จะสูญเสียแอคติวิตีมากกว่าภาวะ $A_2G_{2.5}$ ในระยะเวลาของการเก็บเดียวกัน และยังพบว่าการเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ pH 7 นั้นจะคงเหลือแอคติวิตีสูงกว่าการเก็บที่ pH อื่นๆทั้งภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ดังนั้นการหาค่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะอ่านจากภาวะการเก็บที่ pH 7 นี้



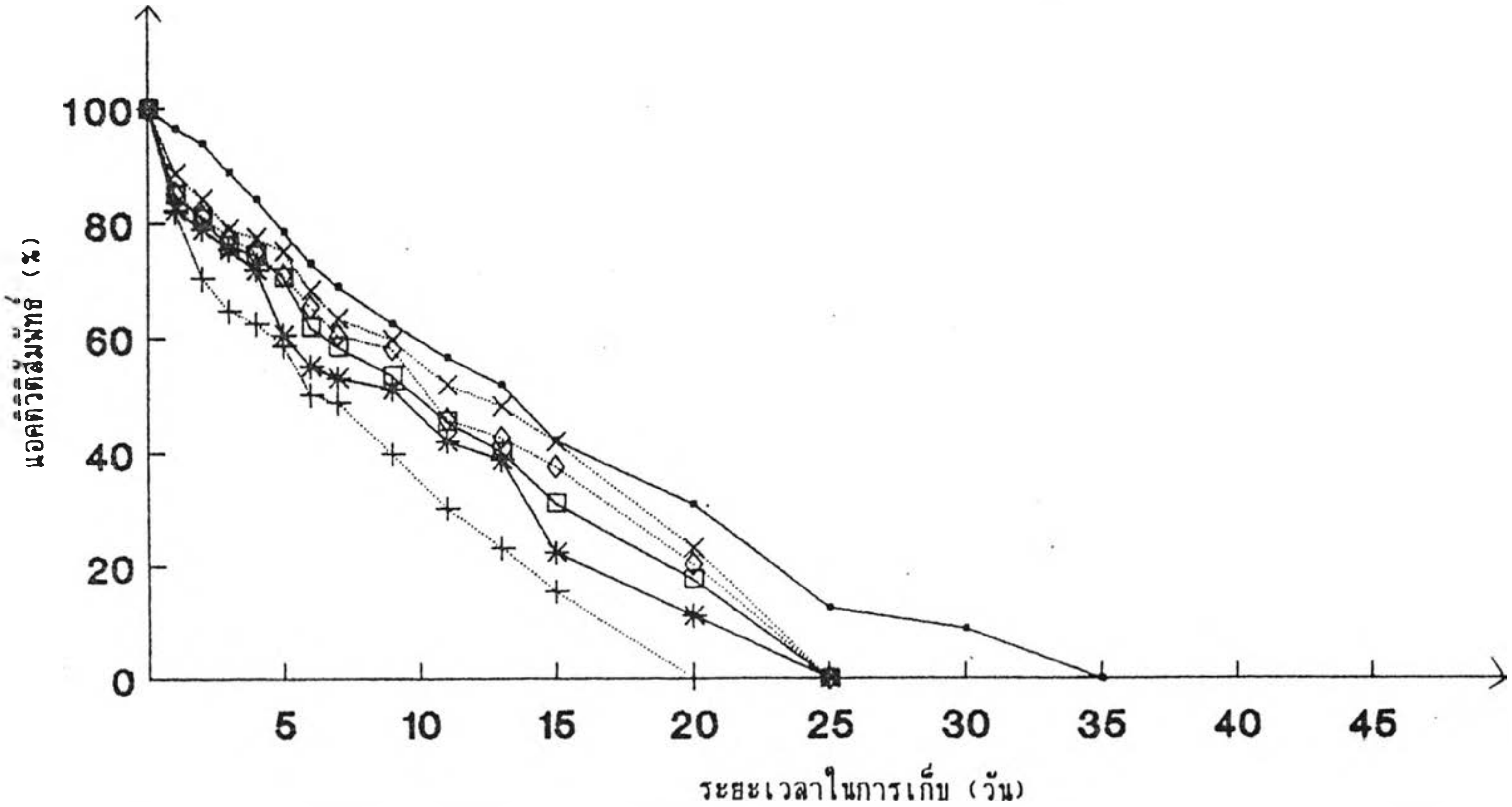
รูปที่ 18 เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ ต่อระยะเวลาในการเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5(—+—) pH 6(—✳—) pH 6.5(—□—) pH 7(—×—) pH 7.5(—◇—) เทียบกับเอนไซม์อิสระ (—•—)ที่เก็บในสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา45วัน



รูปที่ 19 เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $C_3G_{2.8}$ ต่อระยะเวลาในการเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5(—+—) pH 6(—✳—) pH 6.5(—□—) pH 7(—×—) pH 7.5(—◇—) เทียบกับเอนไซม์อิสระ(—•—) ที่เก็บในสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา45วัน



รูปที่ 20 เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $A_2G_{2.0}$ ต่อระยะเวลาในการเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5(—+—) pH 6(—✳—) pH 6.5(—⊟—) pH 7(—×—) pH 7.5(—◇—) เทียบกับเอนไซม์อิสระ(—•—) ที่เก็บในสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน



รูปที่ 21 เสถียรภาพของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปภาวะ $C_3G_{2.5}$ ต่อระยะเวลาในการเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5(+) pH 6(✱) pH 6.5(⊟) pH 7(×) pH 7.5(◇) เทียบกับเอนไซม์อิสระ(•) ที่เก็บในสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน

3.6 หาครึ่งชีวิต (half life) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปกับเอนไซม์อิสระ

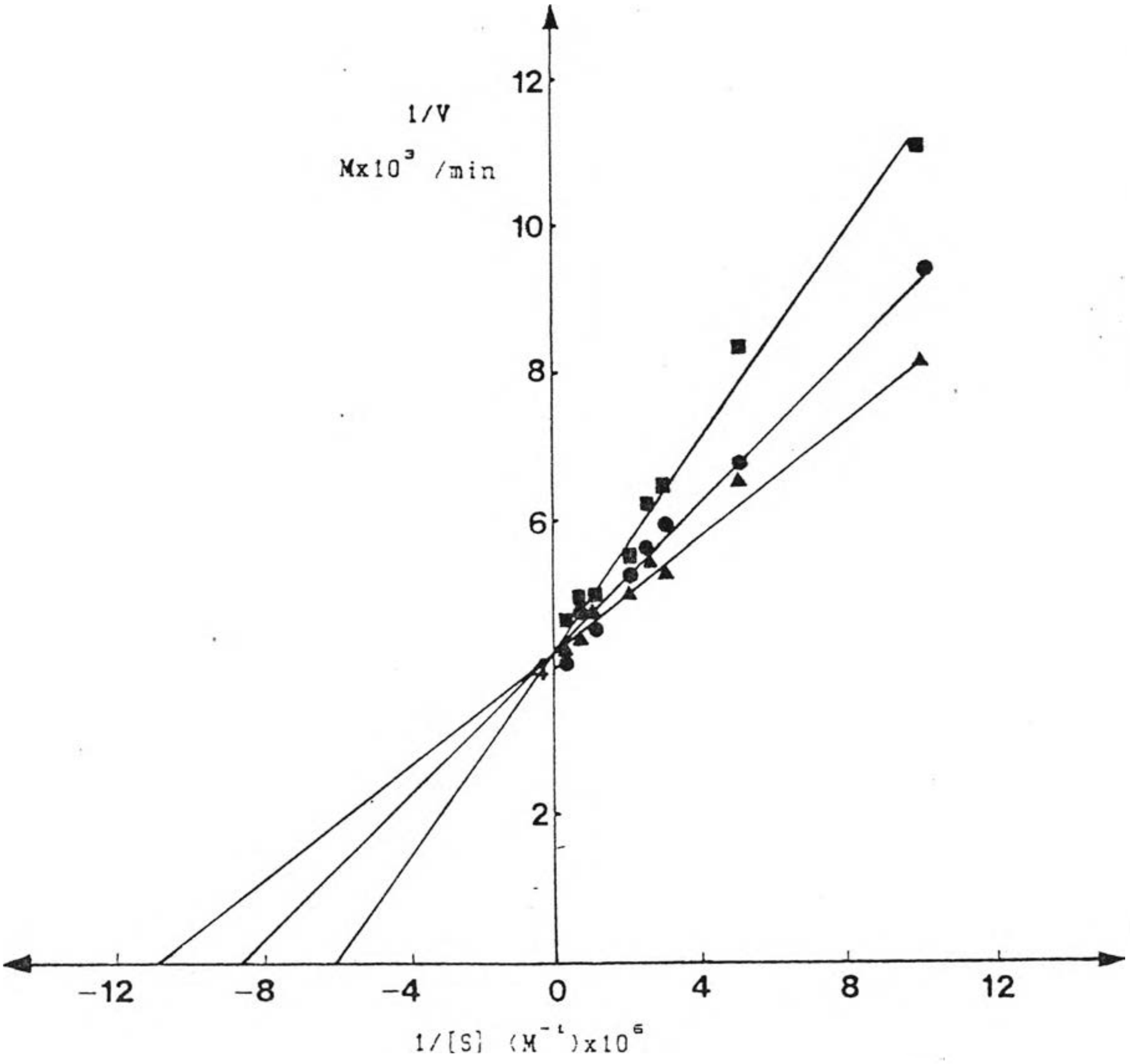
จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.9.6 อ่านค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ตรึงรูปที่เก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 และเอนไซม์อิสระที่เก็บในสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเก็บกับแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 50 % (รูปที่ 18 และ 19)

ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ ที่อ่านได้จากกราฟ พบว่า เอนไซม์อิสระจะมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 45 วัน ส่วนเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากภาวะ $A_2G_{2.5}$ มีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 45 วันเช่นกัน แต่แอคติวิตีที่เหลือต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ในขณะที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$ มีค่าครึ่งชีวิต 37 วัน เมื่อเก็บในภาวะเดียวกัน

3.7 หาค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระต่อเดกซ์แทรน ที 2000

จากวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 3.9.7 โดยการวัดแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปและเอนไซม์อิสระ ที่แปรความเข้มข้นของเดกซ์แทรน ที-2000 ตั้งแต่ 0-5.0 % ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22 เป็นการเปรียบเทียบกราฟไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk Plot) พบว่าค่า K_m ของเอนไซม์อิสระเท่ากับ $1.6x10^{-6}$ M. และค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ และภาวะ $C_3G_{2.5}$ เท่ากับ $9.1x10^{-7}$ M. และ $1.16x10^{-6}$ M. ตามลำดับ



รูปที่ 22 ผลของการหาค่า K_m โดยวิธีไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Lineweaver-Burk Plot) ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป และเอนไซม์อิสระ เมื่อมีเดกซ์แทรน ที 2000 เป็นสับสเตรท โดยวัดแอคติวิตีที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

—▲— เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $A_1B_{2.5}$
—●— เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้จากสภาวะ $C_3B_{2.5}$
—■— เดกซ์แทรนเนสอิสระ