บทที่ 4

อภิปรายผลการวิจัย

1. ตัวพยุงที่เลือกใช้ในการทดลองตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส โดยใช้การเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ ซึ่งมี APTS และ CNBr เป็นสารกระตุ้น และกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม สำหรับตัวพยุงที่เลือกใช้เป็นแนวทางในการศึกษา คือ คาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งเป็นวัสดุที่ได้จากธรรมชาติ สามารถนำมาใช้กับอาหารได้โดยไม่มีพิษและไม่เป็นอันตราย มีพื้นที่ผิวมาก ทนต่อแรงกระทบได้ดี และเสถียรในอุณหภูมิที่ใช้ตรึงรูป ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์จึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (69) ตัวพยุงชนิดนี้ได้มีการศึกษามานานและถูกนำมาใช้ในการตรึงเอนไซม์หลายชนิด เช่น ทริพซิน(49) กลูโคอะไมเลส (52) เป็นต้น โดยช่วงแรกที่ศึกษานั้นมักจะใช้วิธีดูดซับ (adsorption)ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก เสียค่าใช้จ่ายต่ำ การเสียสภาพของเอนไซม์ในระหว่างการตรึงรูปน้อย แต่เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จากวิธีนี้ มีเสถียรภาพไม่ดีนัก จึงมีการพัฒนามาใช้การตรึงรูปแบบพันธะโควาเลนท์ ซึ่งทำให้เอนไซม์ยึดกับตัวพยุงได้ดีกว่า

2. การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนส

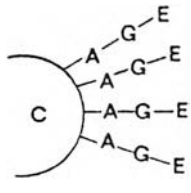
2.1 ความเข้มข้นของสารละลายAPTSและกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอด สำหรับการทดลองหาความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม ในการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป (ตารางที่ 8) พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์ เป็นการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเคมี และปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการชนกันของสารตั้งต้นซึ่งคือหมู่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive group) ของAPTS และกลูตารัลดีไฮด์กับหมู่ฟังชันนัลของเอนไซม์

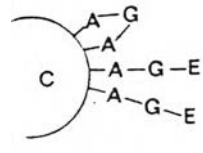
จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าที่ความเข้มข้นของ APTS คงที่ การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์จาก 1% โดยปริมาตร เป็น 2.5% โดยปริมาตร ทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นต่อไป จาก 2.5% โดยปริมาตร เป็น 5% โดยปริมาตร จะทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้อธิบายได้ว่า การเพิ่มความเข้มข้นในช่วงแรกเป็นการเพิ่มปริมาณโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์ ทำให้เกิดพันธะระหว่างกลูตารัลดีไฮด์กับโมเลกุลของเอนไซม์มากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้เอนไซม์ถูกตรึงบนตัวพยุงสูงขึ้น ดังนั้นเมื่อนำมาวัดแอคติวิตีค่าที่ได้จึงสูงขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 23 ก)

ต่อมาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ให้สูงขึ้นอีก กลูตารัลดีไฮด์จะใช้หมู่ฟังชันนัลของมันเชื่อม APTS ที่อยู่บนตัวพยุงเข้าด้วยกัน ทำให้การเชื่อมพันธะของเอนไซม์กับหมู่อัลดีไฮด์เกิดขึ้นได้ยากที่บริเวณดังกล่าว เมื่อนำมาวัดค่าแอคติวิตีจึงทำให้ได้ค่าต่ำลง (รูปที่ 23 ข)

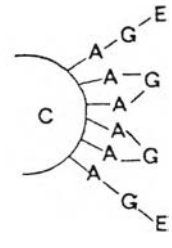
ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของAPTS จาก 1% เป็น 2 % โดยปริมาตรจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการเชื่อมของ APTS บนตัวพยุงมากขึ้น ทำให้มีโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์ไปเชื่อมกับ APTS ได้มากขึ้น จึงเป็นการเพิ่มโอกาสให้เอนไซม์ถูกตรึงบนตัวพยุงได้สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นต่อไปเป็น 3% โดยปริมาตร จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้เพราะเกิดพันธะระหว่างโปรตีนกับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น มีผลทำให้หมู่ไวที่เกิดขึ้นนั้นไปบดบัง (sterric hindrance) บริเวณเร่ง(active site)ของเอนไซม์ทั้งหมดหรือบางส่วน (รูปที่ 23 ค)



รูปที่ 23 ก



รูปที่ 23 ข



รูปที่ 23 ค

การวิเคราะห์การสร้างพันธะโควาเลนท์ระหว่างตัวพยุงและเอนไซม์

C คือ คาร์บอน

A คือ สารกระตุ้น APTS

G คือ กลูตารัลดีไฮด์

E คือ เอนไซม์

2.2 ความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้แบบสุ่มตลอดสำหรับการทดลองหาความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมในการเตรียมเดกซ์แทรน-เนสตรึงรูป (ตารางที่ 11) พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย CNBr และกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์เป็นการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนท์ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเคมี และปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการชนกันของสารตั้งต้น ซึ่งคือหมู่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive group) ของ CNBr และกลูตารัลดีไฮด์กับหมู่ฟังชันนัลของเอนไซม์

เนื่องจากการที่พบว่าความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์-แทรนเนสตรึงรูป จึงเป็นการสนับสนุนกลไกที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในกระบวนการตรึงรูปที่มี CNBr เป็นสารกระตุ้นร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม (ดังรูปที่ 7) ซึ่งถึงแม้ว่าตามทฤษฎีจะเกิดรูปแบบทั้ง reactive form และ inert form แต่จากข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ เสนอแนะว่าส่วนใหญ่ของการกระตุ้นตัวพยุงด้วย CNBr นั้นจะเกิดในรูปแบบของ inert form มากกว่า ซึ่งจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับกลูตารัลดีไฮด์ก่อนแล้วจึงเชื่อมติดกับเอนไซม์ได้เป็นเอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นการแปรความเข้มข้นของกลูตารัล-ดีไฮด์จึงมีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าที่ความเข้มข้นของ CNBr คงที่ การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์จาก 1% โดยปริมาตร เป็น 2.5% โดยปริมาตร ทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นต่อไป จาก 2.5% โดยปริมาตร เป็น 5% โดยปริมาตร จะทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้อธิบายได้ว่า การเพิ่มความเข้มข้นในช่วงแรกเป็นการทำให้ปริมาณโมเลกุลของกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสให้เอนไซม์ถูกตรึงบนตัวพยุงสูงขึ้น ดังนั้นเมื่อนำมาวัดแอคติวิตีค่าที่ได้จึงสูงขึ้น ต่อมาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ให้สูงขึ้นอีก กลูตารัลดีไฮด์จะใช้หมู่ฟังชันนัลของมันเชื่อม CNBr ที่อยู่บนตัวพยุงเข้าด้วยกัน ทำให้บริเวณดังกล่าวไม่มีการตรึงเอนไซม์เกิดขึ้น เมื่อนำมาวัดค่าแอคติวิตีจึงทำให้ได้ค่าต่ำลง เช่นเดียวกับกรณีของ APTS

ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของCNBr จาก 1% เป็น 3% จะมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากมีโมเลกุลของ CNBr ที่จะไปเกาะบนตัวพยุงมากขึ้น ยังผลให้เกิดโมเลกุลของ CNBr ที่เชื่อมกับกลูตารัลดีไฮด์มากขึ้น ซึ่งจะทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่ไปเกาะมีมากขึ้นตามลำดับ จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงตามลำดับ

2.3 <u>ความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$</u>

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ2.3 ดังตารางที่ 13 และ 14 พบว่าการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4-20 มก.โปรตีนในปริมาตรเอนไซม์ 20 มล. (10-50 หน่วยต่อมล.) นั้นแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแนวโน้มสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการตรึงรูปเอนไซม์โดยการเชื่อมแบบพันธะโควาเลนท์เป็นปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อมีการชนกันของตัวทำปฏิกิริยา ในที่นี้คือหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์ และหมู่ฟังชันนัลของเอนไซม์ ดังนั้น ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำ จะทำให้อัตราการชนกันของหมู่ฟังชันนัลของเอนไซม์กับหมู่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์เกิดขึ้นต่ำด้วย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้นอัตราการชนกันก็เกิดได้มาก ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงขึ้นตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระนั้น เมื่อคิดเทียบเป็น % โปรตีนที่ถูกไว้และ % แอคติวิตีที่ถูกไว้นั้นจะเพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งเท่านั้นและจะลดลง ทั้งนี้อธิบายได้ว่า ในกระบวนการตรึงรูป จะมีเอนไซม์เกาะบนตัวพยุงได้เพียงจำนวนหนึ่งเท่านั้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ความเข้มข้นโปรตีน 10 มก. มีผลทำให้หมู่ไวต่อปฏิกิริยาบนตัวพยุงอิ่มตัวด้วยโปรตีน ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นต่อไปเอนไซม์ที่จะถูกตรึงบนตัวพยุงจะเพิ่มจากเดิมเพียงเล็กน้อย และไม่ทำให้แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fadda และคณะ(70)

2.4 <u>ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสในภาวะ $A_1G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$</u>

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 2.4 ดังรูปที่ 9 พบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปจะให้ค่าแอคติวิตีสูงขึ้น ตามค่าpH ที่เพิ่มขึ้นจนถึง pH 6 สำหรับภาวะ $C_3G_{2.5}$ และจนกระทั่งถึง pH 5.5 สำหรับภาวะ AG หลังจากนั้นเมื่อค่าpH สูงขึ้น ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลง ซึ่งอธิบายได้ว่าการเพิ่มค่า pH ในช่วงแรกนั้นเหมาะสมต่อสภาพการเกิดปฏิกิริยาเคมี จึงทำให้เอนไซม์สามารถถูกตรึงบนตัวพยุงได้ดี แต่เมื่อเพิ่มค่า pH แล้วอาจกระทบกระเทือนต่อบริเวณเร่ง(active site)ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เริ่มเสียสภาพธรรมชาติ ค่าแอคติวิตีที่ได้จึงต่ำลง

อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับการใช้น้ำปลอดประจุเป็นตัวทำละลายของ APTS หรือ CNBr และกลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นการเตรียมในภาวะปกตินั้น การเตรียมโดยใช้บัฟเฟอร์นี้ไม่มีผลทำให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด ดังนั้นจึงเลือกที่จะใช้น้ำปลอดประจุเป็นตัวทำละลาย ทั้งนี้เนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และประหยัด

2.5 เวลาที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปของภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 2.5 ดังตารางที่ 15 พบว่าทั้งภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ เวลาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในขั้นตอนต่างๆ ได้แก่

1. กระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้นจะใช้เวลา 3 ชั่วโมง
2. สร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์จะใช้เวลา 2 ชั่วโมง
3. ตริงรูปเดกซ์แทรนเนสจะใช้เวลา 3 ชั่วโมง

ซึ่งจะให้แอคติวิตีที่กักไว้ 62.4% และ 85.0 % ในภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับภาวะการเตรียมปกติ คือ

1. ใช้เวลาในการกระตุ้นตัวพยุงโดยสารกระตุ้น 3 ชั่วโมง
2. ใช้เวลาในการสร้างพันธะร่วมโดยกลูตารัลดีไฮด์ 2 ชั่วโมง
3. ใช้เวลาในการตริงรูปเดกซ์แทรนเนส 2 ชั่วโมง

ซึ่งจะให้แอคติวิตีที่กักไว้ 61.8% และ 77.8% ในภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ $C_3G_{2.5}$ ตามลำดับ โดยจะเห็นได้ว่าค่าแอคติวิตีที่กักไว้ ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันเท่าไรนัก ดังนั้นจึงเลือกที่จะตริงรูปเดกซ์แทรนเนสในภาวะเดิม เพราะเป็นการประหยัดเวลามากกว่า

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

จากวิธีดำเนินการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 2.6 ดังรูปที่ 13 พบว่าการตริงรุปเดกซ์แทรนเนส ในภาวะ $A_2G_{2.5}$ น่าจะเหมาะสมกว่า ภาวะ $C_3G_{2.5}$ ทั้งนี้เพราะเมื่อศึกษาการหลุดของเอนไซม์จากคาร์บอนกัมมันต์แล้ว พบว่าหลังจากแยกเดกซ์แทรนเนสตริงรุปออก เดกซ์แทรนเนสตริงรุปที่เตรียมจากภาวะ $C_3G_{2.5}$ ยังตรวจพบแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงทำให้พบว่าเดกซ์แทรนเนสตริงรุปภาวะนี้มีแอคติวิตีสูงกว่าภาวะ $A_2G_{2.5}$ ซึ่งความจริงแล้วไม่ใช่เป็นแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่เกาะอยู่บนตัวพยุง อาจจะเป็นเดกซ์แทรนเนสที่หลุดออกมาจึงทำให้ค่าแอคติวิตีที่ได้สูงกว่าความเป็นจริง ทั้งนี้ เนื่องจากการเกาะของเอนไซม์บนตัวพยุงไม่แน่นเพียงพอ

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบสารกระตุ้นระหว่าง APTS และ CNBrที่ใช้ในกระบวนการตริงรุปเดกซ์แทรนเนสบนคาร์บอนกัมมันต์แล้ว APTS น่าจะเหมาะสมกว่า ซึ่งมีรายงานการเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงแบบพันธะโควาเลนท์โดยมี APTS เป็นสารกระตุ้นเป็นวิธีที่นิยมในการตริงรุปเอนไซม์บนคาร์บอน (45) อย่างไรก็ตามจะตัดสินว่า CNBr เป็นสารกระตุ้นที่ไม่เหมาะสมไม่ได้ จะต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรุปที่เตรียมจากทั้ง 2 ภาวะ ประกอบการพิจารณาด้วยอีกชั้นหนึ่ง

นอกจากนี้มีข้อสังเกตที่ว่า แอคติวิตีที่ได้ในแต่ละการทดลองนั้นไม่เท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจาก เอนไซม์ที่ใช้ในการตริงรุปในงานวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ซึ่งมีขีดจำกัดในคุณสมบัติที่เป็น non-specific และ non-homogeneous ของเอนไซม์

3. การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ

3.1 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์

จากผลการวิจัยในบทที่ 3 ข้อ 3.1 ดังรูปที่ 14 พบว่าเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ จะแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5 ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ภาวะ $C_3G_{2.5}$ จะแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.5 เช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ

สำหรับกรณีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ อธิบายได้ว่าเอนไซม์อิสระนั้นปกติจะมีความสามารถในการทำงานได้ดีที่ pH ที่เหมาะสม การที่เอนไซม์จะจับกับสับสเตรทได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับประจุของโปรตีนของเอนไซม์ซึ่งจะแปรตาม pH ของบัฟเฟอร์ ในกรณีการตริงรูปเอนไซม์นั้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เหมาะสมได้ โดยเกิดขึ้นได้ 3 กรณี คือ pHเลื่อนไปทางกรด pHเลื่อนไปทางด่าง และ pHไม่เปลี่ยนแปลง

สำหรับเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ นั้น เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เหมาะสมโดยเลื่อนมาที่pH ต่ำลงไปทางกรด กล่าวคือเลื่อนจาก pH 5.5 เป็น pH5 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในกระบวนการตริงรูปเอนไซม์นั้น ตัวพยุงคือคาร์บอนกัมมันต์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงประจุ แต่สารละลาย APTS หรือ กลูตารัลดีไฮด์ นั้นจะเพิ่มประจุลบให้กับผิวของตัวพยุง ดังนั้นเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีต้องลดประจุลบให้เท่าเดิม คือลดค่า pH นั่นเอง ซึ่ง Trevan (71) ได้อธิบายเกี่ยวกับเรื่องนี้ไว้ว่าผลของประจุลบบนผิวของตัวพยุงนี้ จะขับอิเลคตรอนออกมาข้างนอก จึงทำให้สภาพแวดล้อมจุลภาค (microenvironment) ภายในของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปมี pH ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสภาพแวดล้อมภายนอกคือ ในสารละลายของปฏิกิริยาและต่ำกว่า pH ของสภาพแวดล้อมจุลภาคเดิมของเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้เนราะ pH ของสภาพแวดล้อมของจุลภาคเดิมไม่เหมาะสม ฉะนั้นการปรับสภาพแวดล้อมจุลภาคให้ต่ำลงเพื่อคืนสู่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ก็คือ การลด pH ของสารละลายภายนอก ผลที่ปรากฏออกมาคือ pH ที่เหมาะสมของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในภาวะ $A_2G_{2.5}$ จึงเลื่อนไปทางกรดเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้เพื่อปรับสภาพแวดล้อมจุลภาคในมี pH คงเดิม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Madhu และ Prabhu (48) ที่ตริงรูปเดกซ์แทรนเนสบนเบนโทไนท์

โดย pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปเลื่อนจาก pH 5.6 มาที่ pH 3-5.8 และงานวิจัยของ Shimizu และ Ishihara (72) ที่ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์เซลลูโลไลติกและเฮมิเซลลูโลไลติกบนตัวพยุงอนินทรีย์ โดย pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูปเลื่อนไปทางกรดเช่นเดียวกัน

ดังที่กล่าวข้างต้นว่าการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ตรึงรูปอาจเลื่อนไปทางด่างได้ โดย Chibata (74) ได้รายงานว่าเอนไซม์บางชนิดหลังจากตรึงรูปแล้วมีผลทำให้ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานเลื่อนไปทางด่าง ได้แก่ ทริพซิน ไคโมทริพซิน และอะไมเลสที่ตรึงรูปโดยการเชื่อมพันธะเปปไตด์กับ CM-cellulose azide

หรือบางกรณีอาจไม่มีการเปลี่ยนแปลงของpH ที่เหมาะสม ได้แก่งานวิจัยของ Anprung และคณะ (58) ที่ศึกษาการตรึงรูปเรนนินบนทราย และการตรึงรูปนารินจิเนสบน Porous glass beads ที่ศึกษาโดย Park และ Chang (75) ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับกรณีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในภาวะ $C_3G_{2.5}$ ที่อธิบายได้ว่าในกระบวนการตรึงรูปโดยใช้ CNBr นั้นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของประจุบนตัวพยุง ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปยังคงสามารถทำงานได้ดีในสภาพแวดล้อมจุลภาคเดิม จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ pH ที่เหมาะสมนั่นเอง

นอกจากนี้เอนไซม์ตรึงรูปมีช่วงpHที่แสดงแอคติวิตีได้กว้างกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พบเช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Leonowicz และคณะ(68) ที่ศึกษาการตรึงรูปแลคเคสจากเชื้อราบน Porous glass bead และงานวิจัยการตรึงรูปไอโดรจิเนสของ Deloggio และ Grave (73)

ซึ่งจากการที่เอนไซม์ตรึงรูปภาวะ $A_2G_{2.5}$ มี pH ที่เหมาะสมเลื่อนจาก pH 5.5 ไปเป็น pH 5 นั้น เมื่อดูจากสภาพ pH ของอ้อยปกติที่เจริญเต็มที่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.18 และยังอาจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยวซึ่งมีผลทำให้ pH ลดลงไปอีก จึงทำให้เอนไซม์ตรึงรูปนี้มีความได้เปรียบในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานน้ำตาล โดยจะสามารถนำไปใช้ในช่วงแรกที่ได้น้ำอ้อยดิบมาก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการเติมน้ำปูนขาวหรือในช่วงที่ได้เป็นน้ำเชื่อมแล้วซึ่งจะมีปัญหาเนื่องจากเดกซ์แทรนเกิดขึ้น

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์

จากผลการวิจัยในบทที่ 3 ข้อ 3.2 ดังรูปที่ 15 พบว่ากราฟแสดงแอคติวิตีในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส ของเอนไซม์อิสระ และเอนไซม์ตรึงรูป มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือเป็นรูประฆังคว่ำ ซึ่งในช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิ จะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาย่อยสลายของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาเคมี ซึ่งจะต้องมีการชนกันระหว่างอนุภาคของเอนไซม์และสับสเตรท การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มพลังงานจลน์ให้แก่อนุภาคของเอนไซม์และสับสเตรท ทำให้มีการชนกันมากขึ้น จึงให้ค่าแอคติวิตีที่สูงขึ้น โดยทั้งเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเทียบกับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสของงานวิจัยอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในงานวิจัยนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการใช้งานสูงกว่า ทั้งนี้เพราะกระบวนการตรึงรูปที่ใช้เป็นการเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ ซึ่งเป็นพันธะเคมีที่แข็งแรง ทำให้ช่วยยึดโปรตีนของเอนไซม์บนตัวพยุงได้ดี จึงมีผลให้โปรตีนคลายตัวเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นได้ยากกว่าเอนไซม์อิสระ

ตารางที่ 16 สรุปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในงานวิจัยอื่นๆ

เอนไซม์	วิธีการตรึงรูป	อุณหภูมิที่เหมาะสม		เอกสารอ้างอิง
		เอนไซม์อิสระ	เอนไซม์ตรึงรูป	
เดกซ์แทรนเนสจากแบคทีเรีย	Glutaraldehyde Coupling (Zirconia coat alklylamine glass)	35	50	47
เดกซ์แทรนเนสจาก *P.aculeatum*	Adsorption (Bentonite)	50	50	48
เดกซ์แทรนเนสจาก *P.funiculosum*	Activated by CNBr (Sepharose4B)	50	50	27
เดกซ์แทรนเนสจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61	Activated by APTS (Activated carbon)	55	55	งานวิจัยนี้

3.3 <u>ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างของเอนไซม์</u>

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 3.3 ดังรูปที่ 16 พบว่าทั้งเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระสามารถทนต่อความเป็นกรดด่างได้ดีที่ pH 5.5-7 ในระยะเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงใช้ pH ช่วงนี้ในการศึกษาเสถียรภาพการเก็บของเดกซ์แทรนเนสสตรึงรูป

3.4 <u>ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์</u>

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 3.4 ดังรูปที่ 17 พบว่าเอนไซม์อิสระจะทนต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในขณะที่เอนไซม์ตรึงรูปจะทนต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ซึ่งทนความร้อนได้มากกว่าเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้เพราะ โดยมากการตรึงรูปเอนไซม์ด้วยการเชื่อมแบบพันธะโควาเลนท์นั้นมักจะเพิ่มความเสถียรต่ออุณหภูมิ อย่างไรก็ตาม Chibata (74) อธิบายไว้ว่า ไม่มีความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างวิธีตรึงและความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน ดังนั้นจึงเป็นสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อวิธีการตรึงรูปแต่ละแบบ หรืออาจจะอธิบายในอีกแง่หนึ่งว่าความเสถียรต่อความร้อนของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งสับสเตรทและผลิตภัณฑ์นั้น จะสามารถช่วยป้องกันการสูญเสียโดยธรรมชาติของเอนไซม์จากความร้อนได้ (45)

3.5 <u>ความเสถียรของเอนไซม์ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง</u>

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 3.5 ดังรูปที่18-21 พบว่าเดกซ์แทรนเนสตริงรูปจะมี % แอคติวิตีสัมพัทธ์ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บนานขึ้น และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมี % แอคติวิตีสัมพัทธ์สูงกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง เช่นเดียวกับเอนไซม์อิสระ

เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์อิสระที่เก็บในลักษณะ ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme)กับเดกซ์แทรนเนสตริงรูปที่เก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 กับ7.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเอนไซม์ตริงรูปทั้งที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ และ$C_3G_{2.5}$ จะมีการสูญเสียแอคติวิตีไปตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นมากกว่า ในขณะที่เอนไซม์อิสระมีเสถียรภาพในการเก็บดีกว่า สามารถรักษาแอคติวิตีได้ดีกว่า โดยพบว่ามีการสูญเสียแอคติวิตีน้อยมากในระยะเวลา 45 วัน กล่าวคือสูญเสียไปประมาณ 5 % เท่านั้นในภาวะการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาพของเอนไซม์อิสระที่เก็บนั้นเป็นสภาพที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme)โดยได้จากการเลี้ยงเชื้อให้เชื้อราผลิตเดกซ์แทรนเนส แล้วกรองส่วนน้ำใสที่มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสมาใช้ส่วนประกอบของส่วนน้ำใสนี้อาจมีสารบางตัวที่ช่วยในการรักษา(preserve) ไม่ให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไป และในเอนไซม์นี้ยังไม่มีผลของ ionic strength จากบัฟเฟอร์มาเกี่ยวข้องอีกด้วย

สำหรับเดกซ์แทรนเนสตริงรูป การเก็บในภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลางจะดีกว่าการเก็บในภาวะกรด ทั้งนี้เพราะภาวะที่เป็นกรดจะทำให้โปรตีนของเอนไซม์เกิดการคลายตัวได้ง่ายกว่า จึงเสียสภาพธรรมชาติไป และจะเห็นได้ว่าเสถียรภาพในการเก็บ (storage stability)ของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป จะไม่ใช่เป็นค่าเดียวกับ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตริงรูป

3.6 ครึ่งชีวิต (Half life)

จากการวิเคราะห์ค่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป เมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสตริงรูป ในภาวะ $A_1G_{2.5}$ มีค่ามากกว่า 45 วัน ซึ่งมีค่าสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสตริงรูปในภาวะ$C_3G_{2.5}$ ซึ่งเท่ากับ 37 วัน ส่วนเอนไซม์อิสระมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 45 วัน และยังคงรักษาแอคติวิตีได้ถึง 95% เหตุผลเป็นดังเช่นที่กล่าวในข้อ 3.5

3.7 ค่าคงที่ไมคิลิส (K_m)

จากผลการวิจัยบทที่ 3 ข้อ 3.7 ดังรูปที่ 20 พบว่าเอนไซม์ตริงรูปที่ภาวะ $A_2G_{2.5}$ และภาวะ $C_3G_{2.5}$ มีค่า K_m ต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ 1.8 และ 1.4 เท่า ตามลำดับ แสดงว่าเดกซ์แทรนเนสตริงรูปมีประสิทธิภาพในการจับระหว่างเอนไซม์กับเดกซ์แทรนในตำแหน่งที่เหมาะสมกว่าเอนไซม์อิสระ และยังชี้ให้เห็นว่า การตริงรูปไม่ได้ทำลายบริเวณเร่งของเอนไซม์ แต่กลับช่วยให้เอนไซม์จับสับสเตรทได้ดีขึ้น

Weetall (60) ได้อธิบายถึงค่า K_m ไว้ว่าค่านี้จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมจุลภาค(Microenvironment)ของเอนไซม์ ถ้าสับสเตรทไม่มีประจุ ค่า K_m จะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ถ้าระหว่างสับสเตรทและตัวพยุงมีประจุที่เหมือนกันแล้ว จะมีผลให้ค่า K_m เพิ่มขึ้นมาก ในทางตรงกันข้าม ถ้ามีประจุที่ต่างกัน จะมีผลให้ค่า K_m ลดลงมาก เมื่อเทียบกับงานวิจัยนี้ค่า K_m เพิ่มขึ้นเล็กน้อย สอดคล้องกับความจริงที่ว่าเดกซ์แทรนที่ใช้เป็นสับสเตรทนั้นไม่มีประจุ

ในผลงานวิจัยของ Sugiura และ Ito (27) ที่ศึกษาการตริงรูปเดกซ์แทรนเนสบน Sepharose 4 B นั้นพบว่า K_m ที่ได้สูงกว่า เอนไซม์อิสระ 2-5 เท่า ทั้งนี้เพราะการแพร่ของสับสเตรทจากภายนอกเพื่อเข้าสู่ Sepharose 4 B นั้นไม่สะดวก ซึ่งปัญหาดังกล่าวนี้ไม่เกิดขึ้นกับกรณีการตริงเอนไซม์บนคาร์บอนกัมมันต์ ซึ่งมีพื้นที่ผิวสูง และไม่มีปัญหาของการแพร่ของสับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการตริงเอนไซม์บนคาร์บอนกัมมันต์น่าจะมีข้อได้เปรียบในแง่การนำไปใช้งานมากกว่า