

การผลิตพริกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้ลิแวนซูเครสตรึงบนโคโตซาน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Production of Fructooligosaccharide from Sucrose by using Levansucrase Immobilized
on Chitosan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

FACULTY OF ENGINEERING

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้สแตเวนชู
	เครสตรึงบนโคโคซาน
โดย	น.ส.ศศินา พลับวังกล้า
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ สุทธิธารวัช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐ พิษญากร

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ เตชวรสินสกุล)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพานิชกุล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ สุทธิธารวัช)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐ พิษญากร)	
.....	กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิชัย อัสสะบำรุงรัตน์)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ธนพล เจริญวงษ์ไพบูลย์)	

ศศินา พลั้ววังกล้า : การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้ลีแวนซูเครสตรึงบนไคโตซาน. (Production of Fructooligosaccharide from Sucrose by using Levansucrase Immobilized on Chitosan) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร. อภินันท์ สุทธิธารวัช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.รัฐ พิษญาวงกูร

ปัจจุบันผู้บริโภคเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ และนิยมใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาลเพิ่มขึ้น ประเทศไทยมีอัตราการบริโภคน้ำตาลทรายเกินกว่าความต้องการ ดังนั้นการนำน้ำตาลทรายมาแปรรูปเป็นฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีมูลค่าสูงกว่าน้ำตาลทราย 50 เท่าและเป็นสารให้ความหวานที่มีประโยชน์ งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนจากซูโครสด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส และชนิดอินูลินด้วยเอนไซม์อินูโลซูเครส ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสมโดยใช้เอนไซม์อิสระ และเครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรึง การตรึงเอนไซม์บนเม็ดไคโตซาน core – shell มีค่าการทำงานเอนไซม์ตรึงมากกว่าการตรึงเอนไซม์บนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล มีค่าการทำงานเอนไซม์ลีแวนซูเครสอยู่ที่ 48.12 และ 37.44 U/กรัม ตามลำดับ ส่วนอินูโลซูเครสเท่ากับ 55.57 และ 45.14 U/กรัม ตามลำดับ จากการทดลองใช้ซ้ำ 5 ครั้ง เป็นเวลาทั้งหมด 120 ชั่วโมง ด้วยลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดไคโตซาน core – shell มีค่าผลได้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เฉลี่ย 26.36 % มากกว่าการตรึงบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจลที่ได้ 8.85 % และอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดไคโตซาน core – shell มีค่าผลได้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เฉลี่ย 37.57 % ซึ่งมากกว่าการตรึงบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจลที่ได้ 31.98 % นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดไคโตซาน core – shell ในการผลิตให้ค่าผลได้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เฉลี่ย 36.6 % มากกว่าการใช้ลีแวนซูเครสอย่างเดียว ดังนั้นการใช้เอนไซม์ผสมเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนเพิ่มขึ้น 38.84 % เมื่อนำผลการทดลองหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา พบว่าค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกซิลเลชันมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และเอนไซม์ลีแวนซูเครสเกิดไฮโดรไลซิสมากกว่าอินูโลซูเครส

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

6370273021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORD: fructooligosaccharide, Levansucrase, inulosucrase, immobilized enzyme

Sasina Plubwungklam : Production of Fructooligosaccharide from Sucrose by using Levansucrase Immobilized on Chitosan. Advisor: Asst. Prof. APINAN SOOTTITANTAWAT Co-advisor: Asst. Prof. RATH PICHYANGKURA

Nowadays, the increasing trend in health & wellness accelerate the demand in healthy ingredients including low-calories sweeteners. Thailand, which has abundant of sugar supply, can add values to sugar by converting it to fructooligosaccharide (FOSs). In this research, the production of FOSs using levansucrase and inulosucrase in free enzyme stirred reactors and immobilized enzyme packed bed reactors were investigated. The FOSs productions with 500 U of enzymes were perform in 50 ml of 50% (w/v) sucrose solution. The sucrose conversions and FOSs yields were in the range of 60.16 to 95.52 % and 9.37 to 47.22 % respectively. It was found that enzyme immobilized on core-shell chitosan beads (CSB) had higher sucrose conversions and higher FOSs yields than those on hydrogel chitosan beads (HGB). The five cycles stability test showed that enzymes immobilized on CSB had greater stability than those on HGB. Moreover, the FOSs production using mixed levansucrase and inulosucrase immobilized on CSB was tested and showed higher FOSs yield than the case of using only levansucrase. The kinetic models were also determined using EQUATRAN with regression analysis. The transfructosylation reaction dominated the overall reactions but levansucrase had higher rate of hydrolysis reaction than inulosucrase.

Field of Study: Chemical Engineering

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดี ได้รับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจ จากหลายฝ่ายด้วยกัน

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิวัฒน์ สุทธิธารธวัช อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ให้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และสนับสนุนตลอดการทำงานวิจัย รวมถึงนายตรีรัตน์ วัชรานุกเคราะห์ และ เพื่อน ๆ ในทีมทุกคน

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัฐ พิษญากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่อำนวยความสะดวก ในการเข้าใช้ทรัพยากรของภาควิชาชีวเคมี รวมถึงนางสาว มนัสนันท์ พวงพัฒนชัย ผู้ผลิตเอนไซม์ให้ใน งานวิจัยนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย ชรินพานิชกุล ที่ให้เกียรติเป็นประธานในการสอบ วิทยานิพนธ์รวมถึง ศาสตราจารย์ ดร. สุทธิชัย อัสสะบารุงรัตน์ และ ดร. ธนพล เจริญวงษ์ไพบูลย์ที่ให้ เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์นี้ รวมถึงให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะให้วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้มีความสมบูรณ์

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีอนุภาคและกระบวนการวัสดุ และ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนการศึกษาของ ผู้วิจัย

ขอขอบคุณบริษัทน้ำมันพีชปทุม ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือวิเคราะห์ของเหลวโครมาโทกราฟี สมรรถนะสูง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน ๆ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา ทำให้ งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

จึงขอกล่าวนามและแสดงความขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ศศิณา พลับวังกล้า

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์.....	5
2.1.1 ความหมายฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์.....	5
2.1.2 ประโยชน์ของฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์.....	5
2.1.3 โครงสร้างฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์.....	5
2.2 เอนไซม์.....	6
2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	6
2.2.2 เอนไซม์ลีแวนซูเครส.....	7

2.2.3 เอนไซม์อินูโลซูเครส.....	9
2.3 การตรึงเอนไซม์ (Enzyme Immobilization)	10
2.3.1 วิธีการตรึงเอนไซม์	11
2.3.2 วัสดุที่ใช้เป็นตัวพอง	12
2.3.3 ตัวแปรการตรึงเอนไซม์.....	14
2.4 จลนพลศาสตร์ (Kinetics).....	15
2.4.1 ปฏิกริยาการเกิดพรุทโตออลิโกแซคคาไรด์	16
2.5 เครื่องปฏิกรณ์สำหรับผลิตพรุทโตออลิโกแซคคาไรด์.....	18
บทที่ 3 ดำเนินงานวิจัย	21
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	21
3.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง.....	22
3.2.1 เอนไซม์อินูโลซูเครส.....	22
3.2.2 เอนไซม์ลีแวนซูเครส	22
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง	22
3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	22
3.3.2 เครื่องมือวิเคราะห์.....	23
3.3.3 โปรแกรมคอมพิวเตอร์.....	23
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.4.1 การเตรียมสารละลายไคโตซาน.....	25
3.4.2 การผลิตเม็ดไคโตซาน (Chitosan beads).....	25
3.4.3 การตรึงเอนไซม์	26
3.4.4 การผลิตพรุทโตออลิโกแซคคาไรด์.....	27
3.4.5 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์	31
3.4.6 วิธีการหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	33

3.5 แผนดำเนินงานวิจัย.....	34
บทที่ 4 ผลการทดลอง	35
4.1 เอนไซม์อิสระ	35
4.1.1 การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสมโดยใช้เอนไซม์อิสระ ..	35
4.1.2 ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ	40
4.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวพุง	48
4.3 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโคซาน	49
4.4 การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโคซาน	51
4.4.1 ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานแบบไฮโดรเจล	51
4.4.2 ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core-shell	53
4.4.3 อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล	56
4.4.4 อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core - shell	58
4.4.5 การเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครส	61
4.4.6 การเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครส	65
4.5 การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน	69
4.5.1 การเปรียบเทียบระหว่างการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบใช้เอนไซม์ชนิดเดียวและเอนไซม์ผสมต่ออนุกรมกัน	72
4.6 การหาค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง	76
4.6.1 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล	76
4.6.2 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core - shell	79
4.6.3 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล	81
4.6.4 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core-shell....	83
4.6.5 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคซาน core-shell	86

4.6.6 การเปรียบเทียบค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟลูกโตซิลเลชันของเอนไซม์ตรีง	88
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	90
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณการทำงานของเอนไซม์	94
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ	95
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลองการผลิตฟลูกโตออลิโกแซคคาไรด์	99
ภาคผนวก ง การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา.....	104
บรรณานุกรม.....	107
ประวัติผู้เขียน.....	113



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงข้อดีและข้อเสียของวิธีการตรึงเอนไซม์แบบต่าง ๆ	11
ตารางที่ 2 แสดงวิธีการตรึงเอนไซม์ลีแวนซูเครส และวัสดุที่ใช้เป็นตัวพุง.....	12
ตารางที่ 3 แสดงการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชนิดต่าง ๆ	19
ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	21
ตารางที่ 5 แสดงการทดลองผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์	30
ตารางที่ 6 แสดงแผนดำเนินงานวิจัยในระยะเวลา 12 เดือน	34
ตารางที่ 7 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครส	42
ตารางที่ 8 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสอิสระ	46
ตารางที่ 9 แสดงค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ	47
ตารางที่ 10 แสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ	47
ตารางที่ 11 แสดงลักษณะทางกายภาพของเม็ดโคโคซาน	49
ตารางที่ 12 แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึง	49
ตารางที่ 13 แสดงค่าตัวแปรการตรึงเอนไซม์	49
ตารางที่ 14 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึง	77
ตารางที่ 15 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึง	83
ตารางที่ 16 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ผสม	87
ตารางที่ 17 แสดงค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันของเอนไซม์ตรึง	88
ตารางที่ 18 แสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึง	88
ตารางที่ 19 สรุปผลการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ต่าง ๆ	92
ตารางที่ 20 สรุปผลค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยา	93
ตารางที่ 21 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ลีแวนซูเครสอิสระ	99

ตารางที่ 22 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 100

ตารางที่ 23 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล 101

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสรระ 102

ตารางที่ 25 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 103

ตารางที่ 26 แสดงตัวแปรที่ใช้ในการหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา 105

ตารางที่ 27 แสดงสูตรโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล 106



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม (A) และเบตนิ่งแบบหมุนเวียน (B).....	3
รูปที่ 2 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน....	4
รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน (A) และอินูลิน (B) [19].....	6
รูปที่ 4 แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากชูโครส [28].....	8
รูปที่ 5 แสดงผลของค่ากรด-เบส ต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส [8].....	8
รูปที่ 6 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส [8].....	9
รูปที่ 7 แสดงผลของความเข้มข้นชูโครสกับร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ และค่าการเปลี่ยนของชูโครส [8].....	9
รูปที่ 8 แสดงผลของค่ากรด-เบส ต่อการทำงานของเอนไซม์อินูโลซูเครส [29].....	10
รูปที่ 9 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์อินูโลซูเครส [29].....	10
รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างการตรึงลิแวนซูเครสบนโคโตซานกับกลูตารัลดีไฮด์ [31].....	13
รูปที่ 11 แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell เมื่อนำไปใช้ซ้ำ 12 ครั้ง ครึ่งละ 2 ชั่วโมง [29].....	14
รูปที่ 12 แสดงผลของผลิตภัณฑ์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน (A) เดิม disaccharide (B) เดิม trisaccharide (C) ลงในปฏิกิริยา [40].....	18
รูปที่ 13 แสดงแผนผังการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเอนไซม์.....	18
รูปที่ 14 แสดงแผนผังขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	24
รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการผลิตเม็ดโคโตซานแบบไฮโดรเจล.....	25
รูปที่ 16 แสดงขั้นตอนการผลิตเม็ดโคโตซานแบบ core-shell.....	26
รูปที่ 17 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม.....	28
รูปที่ 18 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรึง.....	29

รูปที่ 19 แสดงการทดลองผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน	30
รูปที่ 20 แสดงโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระที่ 4 ชั่วโมง.....	35
รูปที่ 21 แสดงผลโครมาโทแกรม จากเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) ของผลิตภัณฑ์	37
รูปที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส.....	37
รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส	38
รูปที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครส	39
รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครส.....	39
รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และผลการคำนวณ (เส้นทึบ : Rocha และเส้นประ :งานวิจัยนี้) ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระที่เวลาต่าง ๆ....	42
รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส GF ₂ GF ₃ และGF ₄ ด้วยเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระ.....	44
รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และการคำนวณ (เส้นประ) ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระที่เวลาต่าง ๆ.....	45
รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส GF ₂ GF ₃ และGF ₄ ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระ.....	46
รูปที่ 30 แสดงเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลและ core-shell.....	48
รูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล	52
รูปที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล	52
รูปที่ 33 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้สำหรับการใช้ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลซ้ำ 5 ครั้ง.....	53
รูปที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core – shell.....	54

รูปที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ ลีแวนซู เครสตรังบนไคโตซาน core – shell.....	55
รูปที่ 36 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้สำหรับการใช้ ลีแวนซูเครสตรังบน เม็ดไคโตซาน core-shell ซ้ำ 5 ครั้ง	56
รูปที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้น ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรังบนไคโตซาน ไฮโดรเจล	57
รูปที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ อินูโลซูเครสตรังบนไคโตซานไฮโดรเจล.....	57
รูปที่ 39 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ รอบต่างๆ สำหรับ การใช้ซ้ำอินู โลซูเครสตรังบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล.....	58
รูปที่ 40 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้น ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรังบนไคโตซาน core-shell.....	59
รูปที่ 41 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ อินูโลซูเครสตรังบนไคโตซาน core – shell.....	60
รูปที่ 42 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ รอบต่าง ๆ สำหรับการใช้ซ้ำ อินู โลซูเครสตรังบนเม็ดไคโตซาน core-shell.....	61
รูปที่ 39 แสดงค่าการเปลี่ยนซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ลีแวนซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรังบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และเม็ดไคโตซาน core – shell (CSB)	62
รูปที่ 44 แสดงค่าผลได้ฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ลีแวนซูเครสในรูปแบบ เอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรังบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และ core – shell (CSB) ..	63
รูปที่ 45 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสของการลีแวนซูเครสตรังบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และตรังบนเม็ดไคโตซาน core – shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง	64
รูปที่ 46 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ลีแวนซูเครสตรังบนเม็ดไคโตซาน ไฮโดรเจล (HGB) และตรังบนเม็ดไคโตซาน core – shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง.....	64
รูปที่ 47 แสดงค่าการเปลี่ยนซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรังบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และเม็ดไคโตซาน core – shell (CSB)	66

รูปที่ 48 แสดงค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์หลักที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรึงบนเม็ดโคโคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และเม็ดโคโคโตซาน core – shell (CSB) 67

รูปที่ 49 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสของการใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง 68

รูปที่ 50 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง..... 68

รูปที่ 51 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้น ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสตรึงบนโคโคโตซาน core-shell ต่ออนุกรมกัน 70

รูปที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสตรึงบนโคโคโตซาน core-shell ต่ออนุกรมกัน 70

รูปที่ 53 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสและร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่รอบต่าง ๆ ณ เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการใช้อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสตรึงบน core-shell ซ้ำ 5 ครั้ง 71

รูปที่ 54 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสที่เวลาต่าง ๆ จากเอนไซม์ลิแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell ครั้งที่ 1 72

รูปที่ 55 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่เวลาต่าง ๆ จากเอนไซม์ลิแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell ครั้งที่ 1 74

รูปที่ 56 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell ซ้ำ 5 ครั้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง 75

รูปที่ 57 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell ซ้ำ 5 ครั้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง..... 75

รูปที่ 58 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) การคำนวณ 77

รูปที่ 59 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ โดยใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซานไฮโดรเจล..... 78

รูปที่ 60 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และคำนวณจากโมเดล (เส้นประ) ของอินูโลซูเครสตรึงบน core – shell..... 79

รูปที่ 61 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณ ของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส GF ₂ GF ₃ และGF ₄ โดยใช้อินุโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell.....	80
รูปที่ 62 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และคำนวณจากโมเดล (เส้นประ) ของลิวโนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล	81
รูปที่ 63 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณ ของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส GF ₂ GF ₃ และGF ₄ โดยใช้ลิวโนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล.....	82
รูปที่ 64 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และการคำนวณ (เส้นประ) ของลิวโนซูเครสตรึงบนบนเม็ดโคโตซาน core – shell ที่เวลาต่าง ๆ.....	84
รูปที่ 65 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส GF ₂ GF ₃ และ GF ₄ ด้วยลิวโนตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell	85
รูปที่ 66 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และคำนวณจากโมเดล (เส้นประ) ของเอนไซม์ผสมตรึงบน core - shell.....	86
รูปที่ 67 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณ ของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส GF ₂ GF ₃ และGF ₄ โดยใช้เอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell.....	87
รูปที่ 68 กราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคส	94
รูปที่ 69 กราฟมาตรฐานของฟรุคโตส.....	95
รูปที่ 70 กราฟมาตรฐานของกลูโคส.....	96
รูปที่ 71 กราฟมาตรฐานของซูโครส.....	96
รูปที่ 72 กราฟมาตรฐานของ1-Kestose (GF ₂).....	97
รูปที่ 73 กราฟมาตรฐานของ Nystose (GF ₃).....	97
รูปที่ 74 กราฟมาตรฐานของ1 ^F - Fructofuranosylnystose (GF ₄).....	98

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการวิจัย

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจและความสำคัญเรื่องสุขภาพมากขึ้น เลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและหลีกเลี่ยงอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูง เชื่อว่าส่งผลเสียต่อสุขภาพ ทำให้เลือกใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาลและฟรีไบโอติกมากขึ้น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide, FOS) เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และได้รับความสนใจมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารและยา ใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาล [1] เนื่องจากให้พลังงานต่ำประมาณ 1 ถึง 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม มีค่าดัชนีน้ำตาล (glycemic index) เป็น 0 [2] และมีคุณสมบัติเป็นฟรีไบโอติก นิยมนำมาเติมในผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มใยอาหาร ลดพลังงานและเสริมสุขภาพ [3] สามารถพบได้ในพืช ผัก และผลไม้ [4] สามารถสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลทรายโดยใช้เอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase) [1] ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งการเชื่อมกันของพันธะ คือ อินูลิน (Inulin) จะเชื่อมกันที่ตำแหน่ง β -(2,1) และลีแวน (Levan) ที่ β -(2,6) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนมีคุณสมบัติทางฟรีไบโอติกมากกว่าและไม่สามารถพบได้ในพืช ผัก และผลไม้ สามารถสังเคราะห์ได้จากเอนไซม์ลีแวนซูเครสจึงมีมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์ที่สูงกว่าอินูลิน และในปัจจุบันยังไม่มีการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนและเอนไซม์ลีแวนซูเครสเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย มีเพียงการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินและเอนไซม์อินูโลซูเครสเท่านั้น [5]

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอัตราการผลิตน้ำตาลทรายสูงถึง 8 ล้านตันต่อปี ซึ่งมากเป็นอันดับที่ 3 ของโลกและมีความต้องการบริโภคภายในประเทศอยู่ที่ 2.5 ล้านตันต่อปี จากอัตราการผลิตและการบริโภคน้ำตาลทรายในประเทศไทย [6] พบว่าอัตราการผลิตน้ำตาลทรายในประเทศมีมากกว่าความต้องการที่ใช้บริโภคในประเทศ ดังนั้นการนำน้ำตาลทรายมาแปรรูปให้เป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีมูลค่าสูงกว่าน้ำตาลทราย 50 เท่า และมีแนวโน้มเป็นความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้นในอนาคต จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มโอกาสทางเศรษฐกิจของประเทศ และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค

ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถผลิตได้จากน้ำตาลทราย โดยใช้เอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส การผลิตจากเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) มีข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากเอนไซม์สามารถใช้งานได้ครั้งเดียวและไม่เสถียร การนำเอนไซม์มาตรึงเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายเป็นของแข็ง ทำให้สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้ มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงของค่ากรด - เบส และอุณหภูมิมากขึ้น ประสิทธิภาพของการตรึงเอนไซม์

ขึ้นอยู่กับทางเลือกชนิดของตัวพุงที่ใช้ และวิธีการตรึงเอนไซม์ วัสดุที่ใช้เป็นตัวพุงสำหรับตรึงเอนไซม์ จำเป็นต้องเสถียร มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ไม่ทำปฏิกิริยากับพื้นผิวหรือผลิตภัณฑ์ในกระบวนการ ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาการผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส (sucrose) โดยใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน [7, 8] แคลเซียมอัลจิเนต [9, 10] sepabeads EC-EP [8, 11] และแอมเบอร์ไลท์ IRA 900 [10] การตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์ให้ประสิทธิภาพสูงสุด [12] ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Activity) ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารตั้งต้น ค่ากรด - เบส อุณหภูมิ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้น อุณหภูมิ และค่ากรด - เบส ที่เหมาะสม ในการผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ คือใช้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 50 % (w/v) [8, 13] ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส [8, 12, 14] และค่ากรด - เบส ที่เหมาะสมของลิแวนซูเครส 6.0 [8, 12, 13] ส่วนของอินูโลซูเครส อยู่ที่ 5.5

งานวิจัยนี้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครสและอินูโลซูเครส ทั้งแบบเอนไซม์อิสระในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม (Stirred tank reactor) และเอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซานในเครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่ง (Packed bed reactor) ระดับห้องปฏิบัติการ ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของซูโครส 50 % (w/v) อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่าง ๆ ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบเชิงปริมาณ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้เป็นข้อมูลการทดลองซึ่งนำไปหาค่าคงที่ของการเกิดปฏิกิริยา (apparent kinetic rate) ด้วยโปรแกรม EQUATRAN เพื่อใช้สำหรับออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ในกระบวนการ ช่วยประหยัดเวลาในการทำการทดลอง และค่าใช้จ่ายในการสร้างโรงงานต้นแบบ (pilot plant)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครสและอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

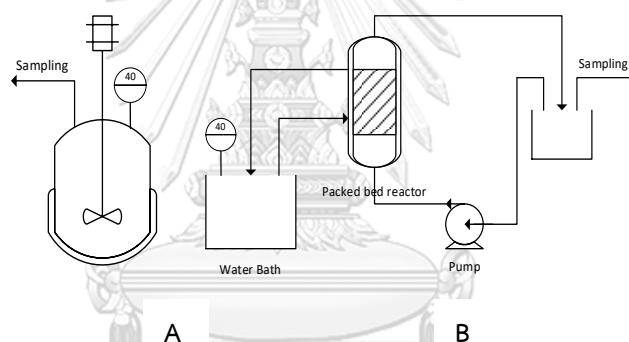
งานวิจัยนี้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส ในระดับห้องปฏิบัติการ ทำปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของซูโครส 50 % (w/v) ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส โดยศึกษาดังต่อไปนี้

1.3.1 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส 500 U ค่ากรด-เบส 6.0 ในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสม แสดงในรูปที่ 1A

1.3.2 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินด้วยเอนไซม์อินูโลซูเครส 500 U ค่ากรด-เบส 5.5 ในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสม แสดงในรูปที่ 1A

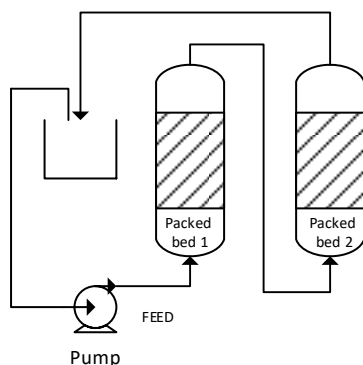
1.3.3 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนโดยใช้ลิแวนซูเครสตรังบน เม็ดโคโตซานไฮโดรเจล (hydrogel) และ core-shell 500 U ค่ากรด-เบส 6.0 ในเครื่องปฏิกรณ์แบบ เบนิ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร สูง 75 มิลลิเมตร โดยป้อนซูโครสเข้าระบบด้านล่างขึ้นสู่ด้านบน (up flow) ที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินระบบแบบหมุนเวียน (recirculate) แสดงในรูปที่ 1B

1.3.4 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินโดยใช้อินูโลซูเครสตรังบน เม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core - shell 500U ค่ากรด-เบส 5.5 ในเครื่องปฏิกรณ์แบบนิ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร สูง 75 มิลลิเมตร โดยป้อนซูโครสเข้าระบบด้านล่างขึ้นสู่ด้านบน ที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินระบบแบบหมุนเวียน แสดงในรูปที่ 1B



รูปที่ 1 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม (A) และเบนิ่งแบบหมุนเวียน (B)

1.3.5 ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์แบบนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน โดยเครื่องปฏิกรณ์ที่ 1 บรรจุเอนไซม์อินูโลซูเครส 250 U และเครื่องปฏิกรณ์ที่ 2 บรรจุเอนไซม์ลิแวนซูเครส 250 U อัตราส่วนการทำงานของเอนไซม์อินูโลซูเครสต่อลิแวนซูเครส เป็น 1 : 1 ป้อนซูโครสเข้าด้านล่าง ที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินระบบดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตหนึ่งแบบต่ออนุกรมกัน

1.3.6 ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ หาค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา จากผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม EQUATRAN

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพิ่มองค์ความรู้ปฏิกิริยาการเกิดฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส เพื่อนำไปพัฒนา งานวิจัยในอนาคต

1.4.2 สามารถนำค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาไปออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ในกระบวนการผลิต ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้

1.4.3 เป็นทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าของน้ำตาลทรายให้เป็นฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเพิ่ม โอกาสทางเศรษฐกิจและตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค

บทที่ 2

ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

2.1.1 ความหมายฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

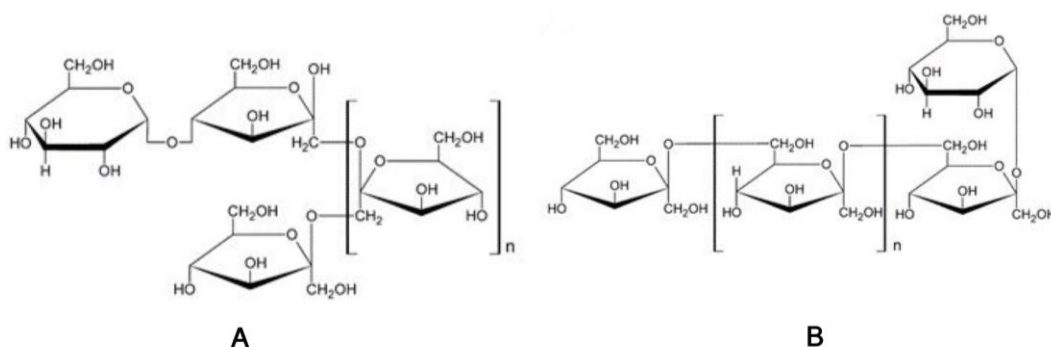
ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นพรีไบโอติก และสารให้ความหวานแทนน้ำตาล ให้ความหวาน ร้อยละ 25 ถึง 50 ของน้ำตาลทราย ละลายน้ำได้ดีแต่ไม่หนืด ให้พลังงานต่ำ 1 ถึง 1.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม มีค่าดัชนีน้ำตาลเป็น 0 [2] นิยมนำมาเติมในผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มใยอาหาร ลดพลังงานและเสริมสุขภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เครื่องดื่ม นมทารก และยา เป็นต้น [3] สามารถพบได้ในพืช ผัก และผลไม้ เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ หัวหอม หน่อไม้ฝรั่ง อาร์ติโช๊ค หัวชีคอรี่ แก้วมังกร แคนตาลีน ถั่วเหลือง กระเทียม ต้นหอม มะเขือเทศ และพืชประเภทหัว [2, 3] สามารถสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลทรายโดยใช้เอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส

2.1.2 ประโยชน์ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

- 2.1.2.1 ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ดีและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค [2]
- 2.1.2.2 ช่วยในการย่อยอาหารและปรับสมดุลระบบขับถ่ายให้มีประสิทธิภาพ [2]
- 2.1.2.3 ช่วยเพิ่มความเป็นกรดในลำไส้ ลดปริมาณแอมโมเนียและยูเรียในเลือด [2]
- 2.1.2.4 ช่วยรักษาระดับกลูโคสและไขมันในเลือดให้เป็นปกติ [15]
- 2.1.2.5 ช่วยเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ และแคลเซียม [16]
- 2.1.2.6 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การอักเสบและมะเร็ง [17, 18]

2.1.3 โครงสร้างฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ โอลิโกฟรุคโตส เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีฟรุคโตส (fructose) และกลูโคส (glucose) เป็นองค์ประกอบ โมเลกุลของฟรุคโตสเชื่อมต่อเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) และที่ปลายสุดของสายจะเชื่อมกับกลูโคส ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด ตามตำแหน่งที่เชื่อมกันของพันธะ คือ อินูลิน และลิแวน



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน (A) และอินูลิน (B) [19]

2.1.3.1 ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลิน

ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลิน (Inulin Fructooligosaccharide, I-FOS) มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลฟรุกโตสเชื่อมกันด้วยพันธะที่ตำแหน่ง β -(2,1) และกลูโคสเชื่อมที่ปลายสาย ดังที่แสดงในรูปที่ 3 (A) สามารถพบได้ในพืช ผัก และผลไม้ สังเคราะห์ด้วยเอนไซม์อินูลูโคซูเครส (E.C.2.4.1.9) ที่มีโครงสร้างแบบ 1F (1- β -fructofuranosyl) $_n$ -sucrose ถ้ามีจำนวน n ตั้งแต่ 1 ถึง 3 จะเป็น 1-Ketose (GF₂) Nystose (GF₃) และ fructofuranosyl nystose (GF₄) [20]

2.1.3.2 ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน

ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน (Levan Fructooligosaccharide, L-FOS) มีโครงสร้างเป็นน้ำตาลฟรุกโตสเชื่อมกันที่ตำแหน่ง β -(2,6) ในสายหลักและเชื่อมต่อกับ d-glucosyl ที่ตำแหน่ง β -(2,1) แบบโซ่กิ่ง [14] ดังที่แสดงในรูปที่ 3 (B) สามารถสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ลิแวนซูเครส (E.C.2.4.1.10) ซึ่งมีโครงสร้างแบบ 6F (6- β -fructofuranosyl) $_n$ -sucrose ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนมีคุณสมบัติทางฟรีไบโอติกมากกว่าอินูลิน [5] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การอักเสบ และมะเร็ง ซึ่งไม่พบในอินูลิน [17] สามารถนำไปใช้ในเครื่องสำอาง ทำให้มีมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์สูงกว่าอินูลิน [18]

2.2 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สามารถเพิ่มอัตราการเกิดของปฏิกิริยา โดยลดพลังงานกระตุ้น (activation energy) เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นหรือซับสเตรต (substrate) ที่จำเพาะเท่านั้น

2.2.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

2.2.1.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์และสารตั้งต้น

การเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ เป็นการรวมตัวของเอนไซม์กับสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสอง การชนกันจะมากขึ้นต่อเมื่อปริมาณ

เอนไซม์ และสารตั้งต้นมากขึ้น ถ้ามีสารตั้งต้นเพียงพอ และเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์เป็น 2 เท่าทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ต่อไปเรื่อย ๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะคงที่และลดลง เนื่องจากสารตั้งต้นไม่เพียงพอ

2.2.1.2 ค่ากรด-เบส (pH)

ค่ากรด-เบส ของสารละลายจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ เอนไซม์แต่ละชนิดมีค่ากรด-เบส ที่เหมาะสมในการทำงานที่แตกต่างกัน เมื่อค่ากรด-เบส สูงหรือต่ำกว่าที่เหมาะสม ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ และการทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ประกอบด้วย หมู่อะมิโน ($-NH_2$) และคาร์บอกซิล ($-COOH$) เมื่อค่ากรด-เบส มีการเปลี่ยนแปลงไฮโดรเจนไอออนในสารละลาย จะเปลี่ยนแปลง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

ค่ากรด-เบส ลดลง	$-NH_2$ กลายเป็น $-NH_3^+$
ค่ากรด-เบส เพิ่มขึ้น	$-COOH$ กลายเป็น $-COO^-$
ค่ากรด-เบส อยู่ที่ isoelectric point	เป็น $-NH_2$ และ $-COOH$

ค่ากรด-เบส ที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 6.0 ถึง 8.0

2.2.1.3 อุณหภูมิ

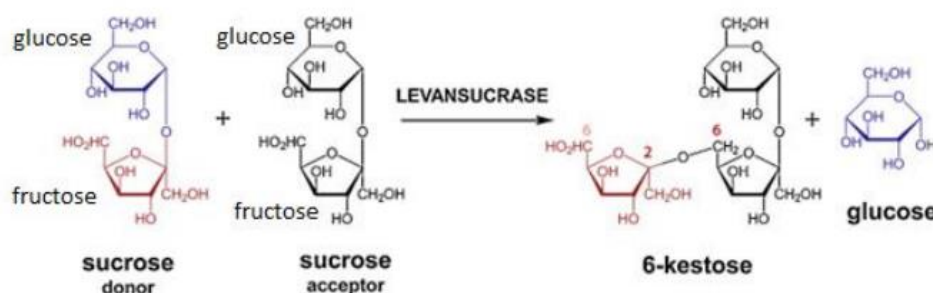
การเพิ่มอุณหภูมิทำให้พลังงานจลน์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่ถ้าสูงเกินไปทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ และเข้าร่วมกับซับสเตรตหรือสารตั้งต้นไม่ได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 25 ถึง 50 องศาเซลเซียส

2.2.1.4 ผลิตกัณฑ์ที่เกิดขึ้น

อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถวัดได้จากอัตราการหายไปของสารตั้งต้น หรือการเกิดขึ้นของผลิตภัณฑ์ พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากมีการลดลงของสารตั้งต้น การเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ และการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้น จนถึงความเข้มข้นหนึ่ง อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ (reversibility) โมเลกุลของผลิตภัณฑ์รวมกับเอนไซม์แทนสารตั้งต้น ทำให้ปฏิกิริยาถูกจำกัดได้

2.2.2 เอนไซม์ลิแวนซูเครส

ลิแวนซูเครส (EC 2.4.1.10, sucrose:2,6- β -D-fructan 6- β -D-fructosyltransferase) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส [5] สามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่ *Bacillus licheniformis* [8], *Bacillus subtilis* [21], *Zymomonas mobilis* [22], *Aspergillus niger* [23], *Aspergillus japonicus* [24], *Aureobasidium pullulans* [25], *Lactobacillus* [26], *Candida utilis* [27]

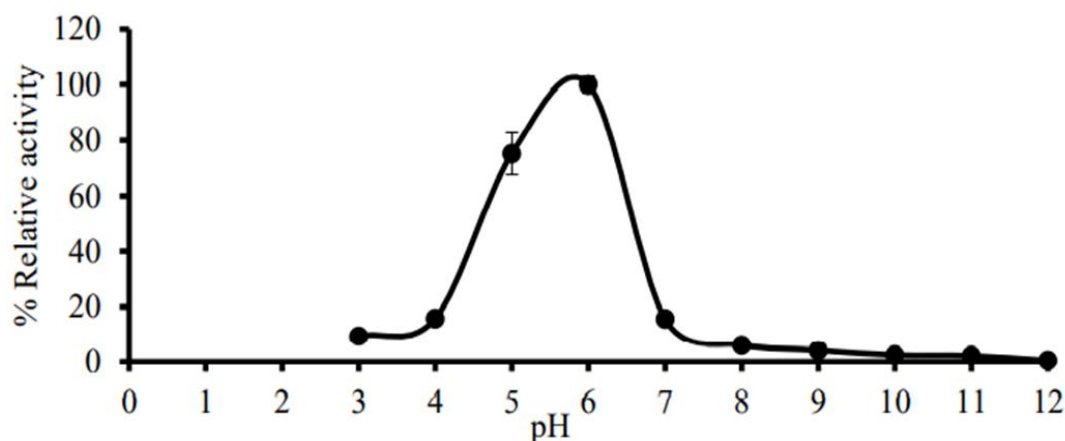


รูปที่ 4 แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากซูโครส [28]

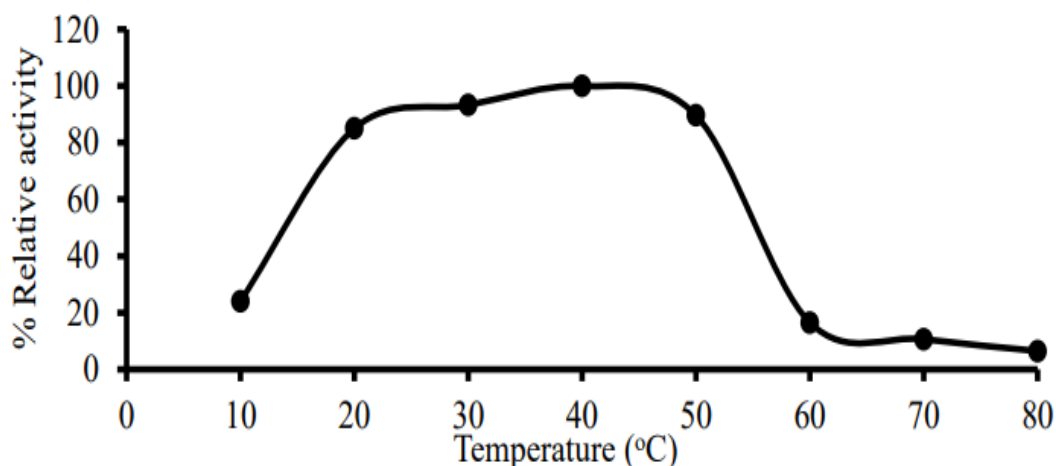
เอนไซม์ลิแวนซูเครสมี 2 หน้าที่ คือ ย่อยสลายซูโครสให้กลายเป็นกลูโคส และฟรุกโตส เรียกว่า กระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และเชื่อมต่อโมเลกุลฟรุกโตสให้ได้เป็นลิแวนฟรุกโต-ออลิโกแซคคาไรด์ เรียกว่า กระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน (transfructosylation) [20] จากรูปที่ 4 แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากซูโครสได้ผลิตภัณฑ์เป็น 6-kestose และกลูโคส

สุรวุฒิ และคณะ (2011) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่สังเคราะห์จาก *Bacillus licheniformis* Y246S ใช้สำหรับผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนจากการศึกษาผลของค่ากรด-เบส ต่อการทำงานของเอนไซม์ (activity) แสดงดังรูปที่ 5 ทำการทดลองที่ซูโครส 1.6 % (w/v) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ 10 มิลลิโมลาร์ บรีดตัน-โรบินสันบัฟเฟอร์ ค่ากรด-เบส 3 ถึง 11 ได้ค่ากรด-เบส เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 6.0 และผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 6 ได้อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ในช่วง 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส

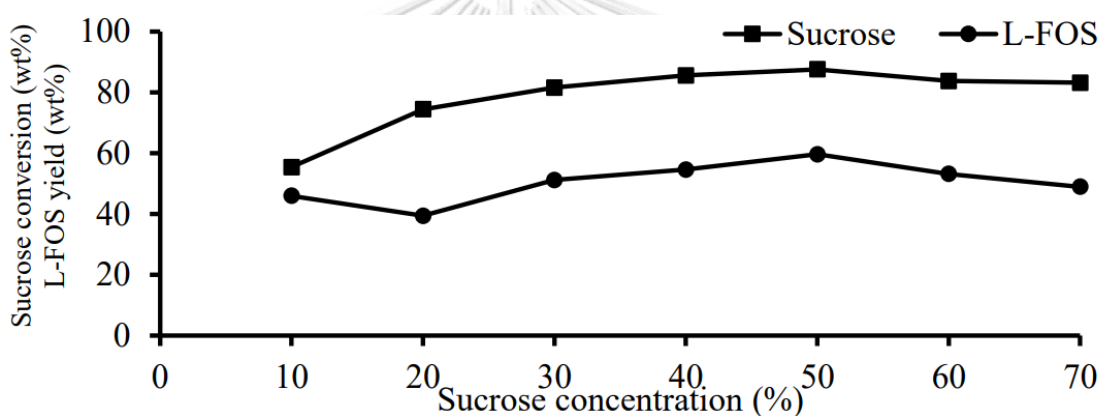
การศึกษาผลของความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นกับฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนในรูปของร้อยละผลได้ (Yield) และค่าการเปลี่ยนแปลง (Conversion) ของซูโครส แสดงในรูปที่ 7 ได้ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 50 % (w/v) ให้ค่าสูงสุด



รูปที่ 5 แสดงผลของค่ากรด-เบส ต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส [8]



รูปที่ 6 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส [8]

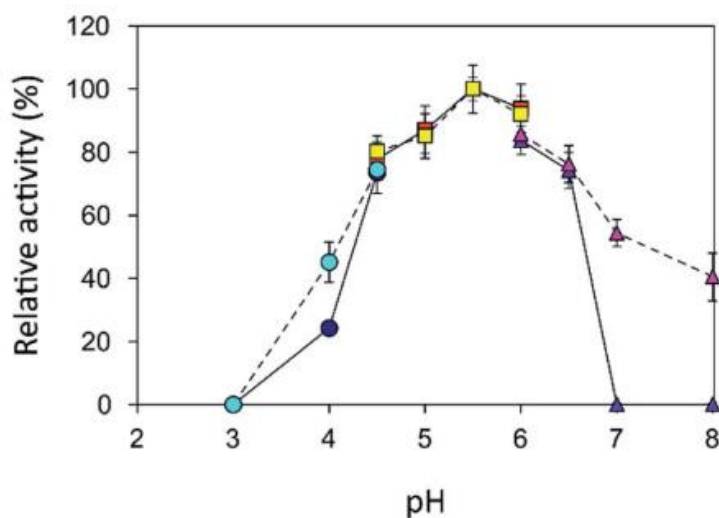


รูปที่ 7 แสดงผลของความเข้มข้นซูโครสกับร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ และค่าการเปลี่ยนแปลงของซูโครส [8]

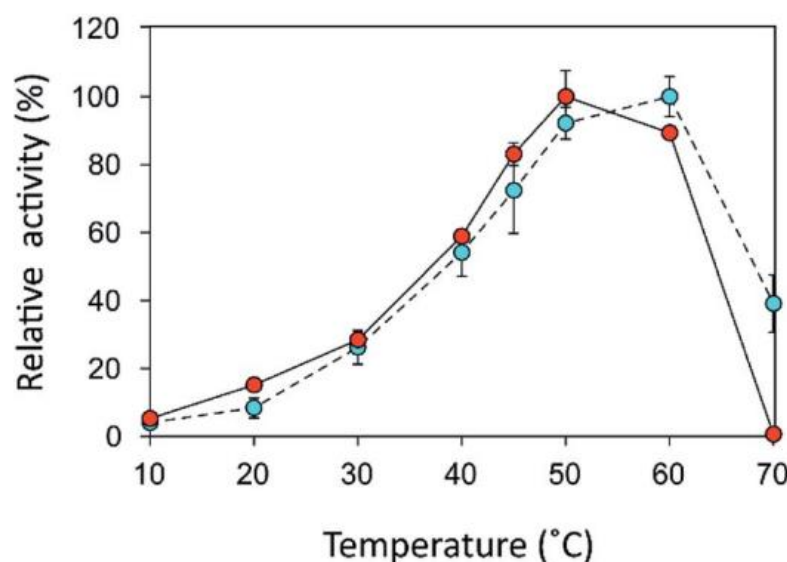
2.2.3 เอนไซม์อินูโลซูเครส

อินูโลซูเครส (EC 2.4.1.9) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส [5] สามารถสังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* [8], *Aspergillus kawachii*[23], *Aspergillus japonicus*, *Lactobacillus reuteri* [29] , *Lactobacillus gasserii*[27]

ธนพล และคณะ (2015) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินูโลซูเครสที่สังเคราะห์จาก *Lactobacillus reuteri* 121 (LrInu-N555A) ใช้สำหรับผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลิน จากการศึกษาผลของค่ากรด-เบส ต่อการทำงานของเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 8 ได้ค่ากรด-เบส เหมาะสมอยู่ที่ 5.5 ด้วยบัฟเฟอร์อะซิเตรท และผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 9 ได้อุณหภูมิเหมาะสมอยู่ในช่วง 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส



รูปที่ 8 แสดงผลของค่ากรด-เบส ต่อการทำงานของเอนไซม์อินูลูโคซูเครส [29]



รูปที่ 9 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์อินูลูโคซูเครส [29]

2.3 การตรึงเอนไซม์ (Enzyme Immobilization)

การนำเอนไซม์มาตรึงเป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายเป็นของแข็งไม่ละลายน้ำ สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้อีกหลายครั้งจนกว่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงต่ำมาก ทำให้ประหยัดกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงของค่ากรด-เบส และอุณหภูมิมากขึ้น [30] สามารถใช้งานในระบบที่มีเอนไซม์หลายตัว เอนไซม์ตรึงสามารถนำไปใช้งานในเครื่องปฏิกรณ์ได้หลากหลาย และดำเนินการได้แบบต่อเนื่อง (Continuous) และแบบกะ (Batch) เอนไซม์ตรึงจึงนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าเอนไซม์

อิสระ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ตรึงขึ้นอยู่กับทางเลือกชนิดของตัวพุงที่ใช้ และวิธีการตรึงเอนไซม์ที่เหมาะสม

2.3.1 วิธีการตรึงเอนไซม์

2.3.1.1 การเชื่อมกับตัวพุง (Carrier binding)

การเชื่อมระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงที่ไม่ละลายน้ำ มีหลายวิธี ได้แก่ การดูดซับทางกายภาพ (Adsorption) เป็นการดูดซับเอนไซม์บนผิวด้านนอกของตัวพุง ไม่มีพันธะเคมี สามารถนำตัวพุงกลับมาใช้ซ้ำได้ เหมาะกับตัวพุงที่มีราคาแพง และการเชื่อมพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพุงด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) เป็นพันธะที่แข็งแรงจับแน่นไม่หลุดออกจากกัน

2.3.1.2 วิธีการเชื่อมแบบไขว้ (Cross-link)

เอนไซม์ 2 โมเลกุลหรือมากกว่า จะสร้างพันธะไขว้เกาะกันเป็นกลุ่มกลายเป็นโมเลกุลใหญ่ โดยไม่ต้องใช้ตัวพุง ทำให้ละลายน้ำได้น้อยลง การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปวิธีนี้นิยมใช้ร่วมกับวิธีอื่น

2.3.1.3 วิธีการห่อหุ้ม (Entrapment)

เอนไซม์อิสระถูกห่อหุ้มไว้ในช่องของสารห่อหุ้มโพลิเมอร์ และไม่เชื่อมพันธะกับสารห่อหุ้ม สารห่อหุ้มยอมให้สารตั้งต้นผ่าน แต่เอนไซม์ไม่สามารถผ่านออกมาได้ ต้องเลือกชนิดของสารให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยารุนแรงทำให้เสียเสถียรภาพของเอนไซม์ การห่อหุ้มเอนไซม์มีหลากหลายแบบได้แก่ ห่อหุ้มในแคปซูลขนาดเล็ก ห่อหุ้มในเจล และห่อหุ้มในไฟเบอร์

ตารางที่ 1 แสดงข้อดีและข้อเสียของวิธีการตรึงเอนไซม์แบบต่าง ๆ

วิธีการตรึง	ข้อดี	ข้อเสีย
ดูดซับทางกายภาพ	ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก	เอนไซม์หลุดออกจากตัวพุงได้ง่าย
พันธะโควาเลนต์	ไม่มีการรั่วของเอนไซม์ เอนไซม์เสถียรภาพ	สูญเสียการทำงานของเอนไซม์
เชื่อมโยงแบบขวาง	ไม่ต้องใช้ตัวพุง	สูญเสียการทำงาน และโครงสร้างของ เอนไซม์
ห่อหุ้ม	ง่าย สามารถใช้งานได้ กว้างขวาง	ค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมกับสารตั้งต้นที่มีมวลโมเลกุลสูง

2.3.2 วัสดุที่ใช้เป็นตัวพอง

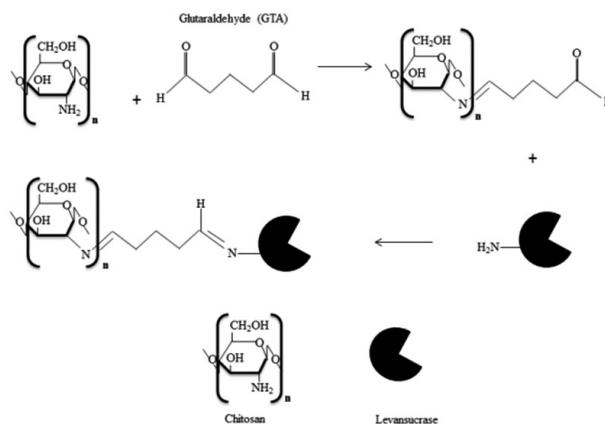
วัสดุที่ใช้เป็นตัวพองสำหรับตรึงเอนไซม์ เป็นหนึ่งในตัวแปรที่สำคัญในกระบวนการตรึงเอนไซม์ ต้องเลือกตัวพองให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ใช้ ตัวพองที่ดีต้องมีคุณลักษณะต่อไปนี้ เสถียร ไม่ละลายน้ำ มีความคงทนสูง ไม่แตกสลายง่าย และไม่ทำปฏิกิริยากับพื้นผิวหรือผลิตภัณฑ์ในกระบวนการผลิต

ตารางที่ 2 แสดงวิธีการตรึงเอนไซม์ลีแวนซูเครส และวัสดุที่ใช้เป็นตัวพอง

วัสดุที่ใช้เป็นตัวพอง	วิธีการตรึง	FOS %	Immobilization yield %	อ้างอิง
ไคโตซาน	พันธะโควาเลนต์	47.4	96	[12]
EC-EP	พันธะโควาเลนต์	-	38	[12]
PDCC	พันธะโควาเลนต์	-	93.57	[12]
ไคโตซาน	พันธะโควาเลนต์	-	81.51	[14]
แอมเบอร์ไลท์ IRA 900	ดูดซับทางกายภาพ	53	42	[10]
แคลเซียมอัลจิ เนต	ห่อหุ้ม	61.4	82	[10]
ไคโตซาน	พันธะโควาเลนต์	55	88	[31]
ไคโตซาน	พันธะโควาเลนต์	59	82	[7]
ไคโตซาน	เชื่อมแบบขวาง และ พันธะโควาเลนต์	72.2	81	[32]
แคลเซียมอัลจิ เนต	เชื่อมแบบขวาง และ พันธะโควาเลนต์	68.5	90	[32]

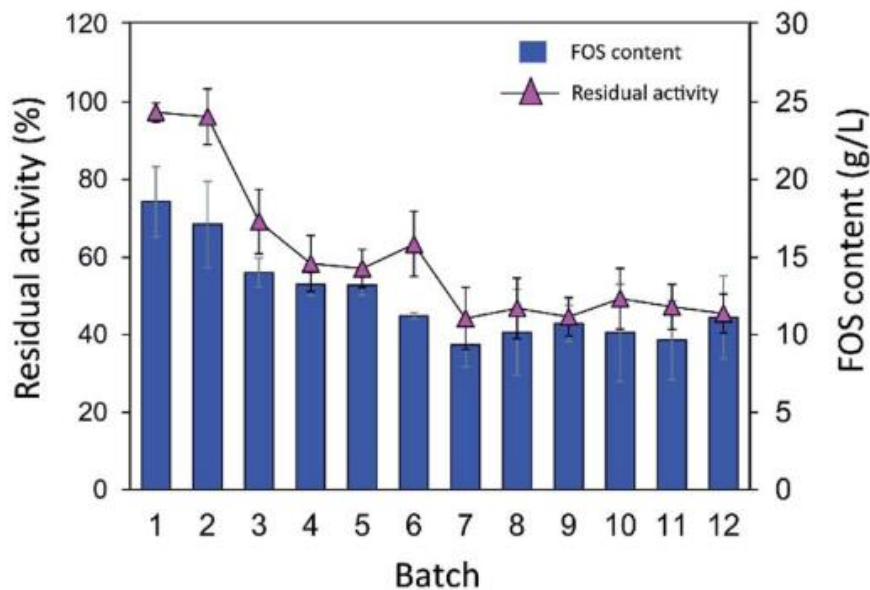
ไคโตซาน (Chitosan) เป็นโพลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติ เกิดขึ้นจากไคติน (Chitin) และเป็นโคโพลิเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ไคโตซานมีหมู่อะมิโน และไฮดรอกซิล (Hydroxyl) ซึ่งไวต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ไคโตซานมีคุณสมบัติในการขึ้นรูปเป็นเจลสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ปลอดภัย ไม่ทำปฏิกิริยา ต้านเชื้อแบคทีเรีย และมีความชอบน้ำ คุณสมบัติที่เฉพาะตัว ทำให้ไคโตซานเป็นหนึ่งในโพลิเมอร์จากธรรมชาติ ถูกนำมาใช้เป็นตัวพองสำหรับการตรึงเอนไซม์ กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) มักใช้เป็นสารเชื่อมขวาง และกระตุ้นการ

ตรึงเอนไซม์บนไคโตซาน เนื่องจากเอนไซม์ และบนพื้นผิวไคโตซานมีหมู่อะมิโน เมื่อกระตุ้นด้วย กลูตารัลดีไฮด์ และเชื่อมพันธะโควาเลนต์กับหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ได้โครงสร้างดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างการตรึงลิแวนซูเครสบนไคโตซานกับกลูตารัลดีไฮด์ [31]

ธนพล และคณะ (2015) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเม็ดไคโตซานสำหรับใช้ตรึงเอนไซม์ เนื่องจากโครงสร้างของเม็ดไคโตซานแบบไฮโดรเจลมีลักษณะคล้ายเจลลี่ ง่ายต่อการผิดรูปเมื่อได้รับแรง หรือความดัน การเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ของเม็ดไคโตซาน โดยนำเม็ดไคโตซานแบบไฮโดรเจลไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เม็ดไคโตซานแบบแห้งที่มีความแข็งแรงขึ้น แต่ความสามารถในการดูดซับโปรตีนลดลง ดังนั้นทำให้พื้นผิวมีความพรุน และมีความสามารถในการจับโปรตีนด้วยการบวมน้ำ (Swell) โดยแช่เม็ดไคโตซานแบบแห้งในสารละลายกรดอะซิติก 0.5 % (w/v) เป็นเวลา 60 วินาที เพื่อให้ไคโตซานละลาย และทำให้เป็นกลางโดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณโมลาร์ที่เท่ากับกรดอะซิติก จะได้เม็ดไคโตซานแบบ core-shell เส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดไคโตซานแบบ core-shell เล็กกว่าเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล การลดลงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางทำให้อัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเพิ่มขึ้นและผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับโปรตีนของเม็ดไคโตซานแบบ core-shell แบบไฮโดรเจล และแบบแห้ง จะได้ 6.68 3.24 และ 0.157 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งเม็ดไคโตซานแบบ core-shell สามารถดูดซับโปรตีนได้มากที่สุด และการตรึงเอนไซม์บนเม็ดไคโตซานแบบ core-shell สามารถนำไปใช้ซ้ำได้ 12 ครั้งเป็นเวลาโดยรวม 24 ชั่วโมง คงเหลือการทำงานของเอนไซม์อยู่ 45 % ดังแสดงในรูปที่ 11 [29]



รูปที่ 11 แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core-shell เมื่อนำไปใช้ซ้ำ 12 ครั้ง ครั้งละ 2 ชั่วโมง [29]

2.3.3 ตัวแปรการตรึงเอนไซม์

Immobilization yield

$$Y_i = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (2-1) \quad [33]$$

Immobilization efficiency

$$E_f = \frac{A_m}{A_i - A_f} \times 100 \quad (2-2) \quad [33]$$

Activity recovery

$$A_r = \frac{A_m}{A_i} \times 100 \quad (2-3) \quad [33]$$

- โดยที่
- A_i คือ การทำงานของเอนไซม์เริ่มต้น (U)
 - A_f คือ การทำงานของเอนไซม์ที่เหลือจากการตรึง (U)
 - A_m คือ การทำงานของเอนไซม์ที่ติดอยู่บนตัวพุง (U)

2.4 จลนพลศาสตร์ (Kinetics)

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาทำให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยา (Reaction Mechanism) และอัตราการเกิดปฏิกิริยา (rate of reaction, r) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาหลัก และปฏิกิริยาข้างเคียง การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นเปลี่ยนแปลง สามารถนำข้อมูลมาใช้ในการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ให้เหมาะสม และกำหนดสภาวะที่ดีที่สุดในการขยายขนาดไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ คือ การหาอัตราการเกิดปฏิกิริยา และค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา (apparent rate constant, k_{app}) โดยทั่วไปหาได้จากการทดลอง และเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของสารที่อยู่ในปฏิกิริยา ซึ่งเขียนให้อยู่ในรูปของความเข้มข้นต่อเวลาของสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

โดยทั่วไปอัตราการเกิดของปฏิกิริยาไม่ขึ้นกับขนาด ในกรณีที่อัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมี (kinetic rate) มีค่าที่มากกว่าอัตราเร็วทางกายภาพ (physical rate) อัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมีจะเป็นตัวควบคุมระบบ การกวนผสมหรือการถ่ายโอนมวลสารไม่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยา อัตราเร็วทางกายภาพ เช่น อัตราของการถ่ายโอนมวล (mass transfer) อัตราการถ่ายโอนความร้อน (heat transfer) และอัตราการถ่ายโอนโมเมนตัม (momentum transfer) แต่ในกรณีที่ขนาดใหญ่ขึ้นการกวนผสมหรือการถ่ายโอนมวลสารมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา ส่งผลต่อการขยายขนาด ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เท่ากับการทดลองในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากอัตราเร็วทางกายภาพมีค่ามากขึ้นหรือมากกว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเคมี ทำให้การกวนผสมหรือการถ่ายโอนมวลสาร ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาในระบบ จำเป็นต้องศึกษาอัตราการไหลในการป้อนสารตั้งต้นเข้าเครื่องปฏิกรณ์

การใช้งานของเครื่องปฏิกรณ์ในกระบวนการผลิตมีหลายประเภท เช่น เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน (Stirred tank reactor) เครื่องปฏิกรณ์แบบท่อ (Plug flow reactor) และเครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่ง (Packed bed reactor) เป็นต้น ขึ้นอยู่กับสถานะของสารที่ใช้เป็นแก๊ส ของเหลว หรือของแข็ง เครื่องปฏิกรณ์สามารถดำเนินได้ทั้งแบบกะ แบบต่อเนื่อง และแบบกึ่งกะ (semi-batch) สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับกระบวนการผลิต สมการที่ใช้ในการคำนวณแตกต่างกันในแต่ละประเภท และการดำเนินงาน ดังนี้

สมการสมดุลโมล (Mole Balance Equation)

$$F_{j0} - F_j + \int_0^V r_j dV = \frac{dN_j}{dt} \quad (2-4) \quad [34]$$

การดำเนินงานแบบกะ ไม่มีสารเข้าและออกจากระบบ

$$\begin{aligned} F_{j0} &= F_j = 0 \\ \frac{dN_j}{dt} &= r_j V \end{aligned} \quad (2-5) \quad [34]$$

การดำเนินงานแบบต่อเนื่อง ภายใต้สภาวะคงที่ (steady state)

$$\frac{dN_j}{dt} = 0$$

สำหรับเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสม

$$V = \frac{F_{j0} - F_j}{-r_j} \quad (2-6) \quad [34]$$

สำหรับเครื่องปฏิกรณ์แบบท่อไหล

$$\frac{dF_j}{dV} = r_j \quad (2-7) \quad [34]$$

สำหรับเครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่ง

$$\frac{dF_j}{dW} = r'_j \quad (2-8) \quad [34]$$

2.4.1 ปฏิริยาการเกิดฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์

การสังเคราะห์ฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ ประกอบด้วย กระบวนการไฮโดรไลซิส เป็นการย่อยสลายซูโครสให้กลายเป็นกลูโคส และฟรุกโตส แสดงในสมการที่ (2-9) และกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน ทำหน้าที่เชื่อมต่อสายฟรุกโตสกับโมเลกุลกลูโคส เป็น ฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ แสดงในสมการที่ (2-10) ไฮโดรไลซิส



ทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน



โดยที่ GF คือ ซูโครส

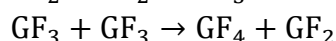
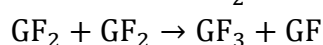
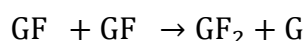
G คือ กลูโคส

F คือ ฟรุกโตส

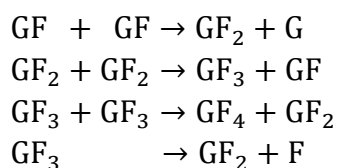
GF_n, GF_{n+1} คือ ฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์

จากงานวิจัยก่อนหน้ามีการศึกษาการเกิดปฏิริยาของผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จาก ซูโครส และกำหนดกลไกการเกิดปฏิริยาไว้หลายรูปแบบ ดังต่อไปนี้

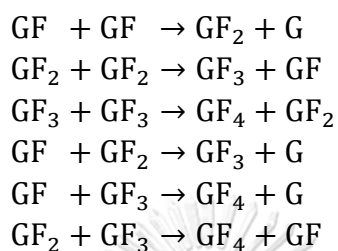
Jung และคณะ (1989) [35]



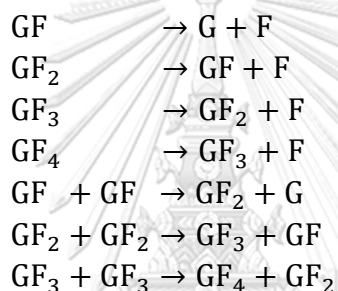
Duan และคณะ (1994) [36]



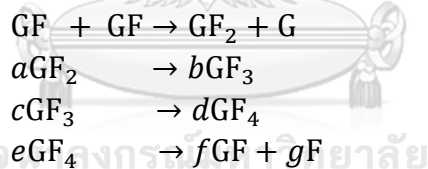
Nishizawa และคณะ (2001) [37]



Rocha และคณะ (2009) [38]

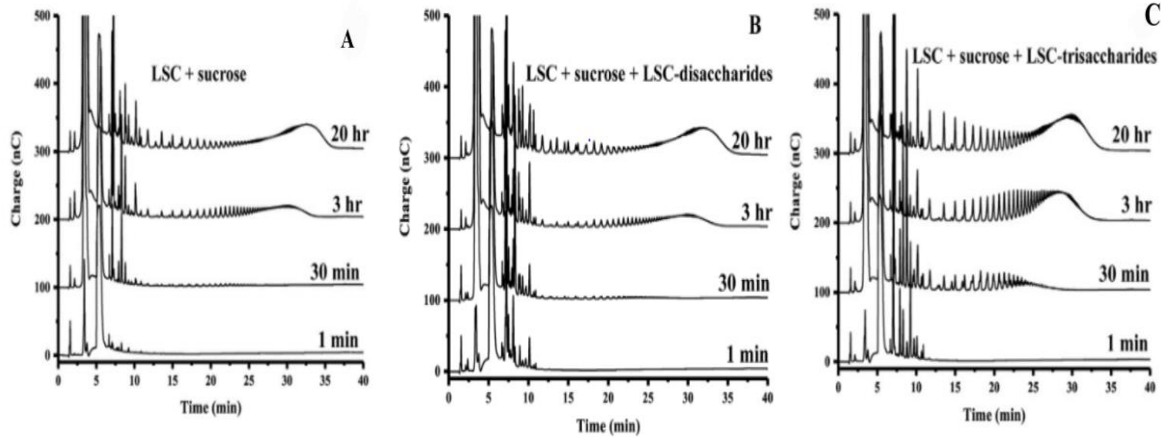


Schorsch และคณะ (2018) [39]



กรัณท์ และคณะ (2022) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์

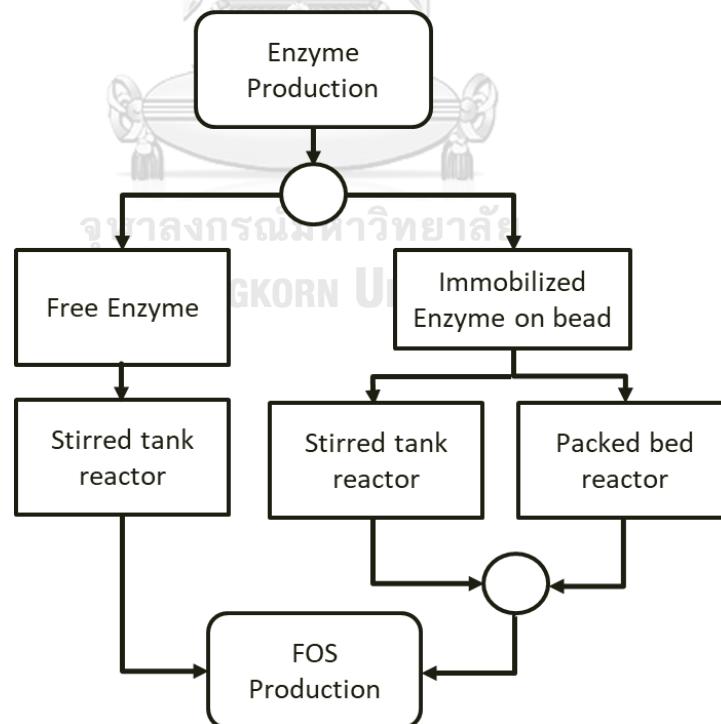
ชนิดลิแวนโดยการเติม disaccharide (GF_2) และ trisaccharide (GF_3) ลงในปฏิกิริยา ทำการทดลอง ที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 250 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยากับลิแวนซูโครส 2 U/มล. ที่เวลาต่าง ๆ เติม GF_2 และ GF_3 25 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาพบว่า การเติม GF_2 และ GF_3 ลงในปฏิกิริยาทำให้ผลิตภัณฑ์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนเพิ่มขึ้น [40] ดังแสดงในรูปที่ 12



รูปที่ 12 แสดงผลของผลิตภัณฑ์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน (A) เติม disaccharide (B) เติม trisaccharide (C) ลงในปฏิกิริยา [40]

2.5 เครื่องปฏิกรณ์สำหรับผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์

การสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การหมักของจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์อิสระ และ การใช้เอนไซม์ตรึง การสังเคราะห์ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่าการหมักของจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ตรึงสามารถใช้ได้ทั้งเครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่ง และเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสม ต่างจากการใช้เอนไซม์อิสระที่สามารถใช้ได้เฉพาะเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสม



รูปที่ 13 แสดงแผนผังการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากเอนไซม์

ตารางที่ 3 แสดงการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชนิดต่างๆ

เครื่องปฏิกรณ์	ระบบเอนไซม์	ซูโครสเริ่มต้น % (w/v)	อุณหภูมิ (°C)	กรด-เบส	เวลา	FOS yield %	อ้างอิง
ถังกวนผสม แบบกะ	1230 U/กรัม ตรึงบนไคโตซาน	60	50	5.5	2.5 ชม. 50 รอบ	40 - 60%	[41]
ถังกวนผสม แบบกะ	ตรึงบน EC-EP	63	60	5.6	144 ชม.	62%	[11]
Basket แบบ กะ	22 U/มล.	50	48	6	48 - 96 ชม.	44 - 60%	[13]
เบตนิ่ง แบบต่อเนื่อง	ตรึงบนซิลิกา 270 U/กรัม	40	30	5.5	20 มล./ชม. 26วัน	1512 กรัม ของ GF ₂	[42]
ถังกวนผสม	ตรึงบน Niobium 5U/มล.	50	50	4.5	96 ชม.	46%	[43]
เบตนิ่งแบบ หมุนเวียน	ตรึงบน แคลเซียมอัลจิเนต	50	42	5.5	24 ชม.	55%	[44]
ฟลูอิดไคซ์เบต	ตรึงบนไคโตซาน	60	50	5.5	0.08 มล./นาที	54%	[7]
เบตนิ่ง	ตรึงบนไคโตซาน	60	50	5.5	-	59%	[7]

เครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่ง เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นของแข็งบรรจุอยู่ โดยทั่วไปจะป้อนสารตั้งต้นสถานะของเหลวและแก๊ส สามารถป้อนเข้าทางด้านบน (Down flow) ของเครื่องปฏิกรณ์เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดฟลูอิดไดเซชัน (Fluidization) และการป้อนเข้าด้านล่าง (Up flow) เพื่อช่วยในเรื่องการกระจายตัวของเหลวให้ทั่วตัวเร่งปฏิกิริยา

Lorenzoni และคณะ (2015) ศึกษาผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรึงบนไคโตซานที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 60 % (w/v) อุณหภูมิคงที่ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด - เบส 5.5 ในเครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่ง และฟลูอิดไดซ์เบตโดยป้อนซูโครสเข้าสู่ระบบด้านล่าง เครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่งสามารถผลิตฟรุกโตแซคคาไรด์ได้ 59 % ซึ่งมากกว่าฟลูอิดไดซ์เบตที่ผลิตได้ 54 % เครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่งจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่าสำหรับการผลิตฟรุกโตแซคคาไรด์ เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่มากกว่า มีเทคโนโลยีง่ายกว่า มีความเสถียรในการปฏิบัติงานสูง และไม่มีการอุดตันของคอลัมน์ [7]

Cheng และคณะ (1996) ศึกษาการผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง เนื่องจากการเกิดฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ใช้เวลานาน การใช้เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบไหลผ่านครั้งเดียวต้องใช้เครื่องปฏิกรณ์ที่มีขนาดยาวมาก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ดังนั้นการดำเนินระบบแบบหมุนเวียนสามารถผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งที่มีขนาดเล็กกว่าได้ งานวิจัยนี้ผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นซูโครส 50 % (w/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ป้อนซูโครสเข้าสู่ระบบที่อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่ออนาที ดำเนินระบบแบบหมุนเวียนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ได้ 55 % [44]

Santos-Moriano และคณะ (2015) ผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนด้วยซูโครส โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นซูโครส 60 % (w/v) ในบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ค่ากรด - เบส 5.4 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง โดยใช้ลิแวนซูโครสตรึงบนเม็ด Vinyl sulfone-activated silica แบบโควาเลนต์ วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เทียบกับสารมาตรฐาน 1-kestose, nystose, 1-Fructosyl nystose จาก TCI Europe และ 6-kestose, blastose, neokestose, neonystose ทำให้บริสุทธิ์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อนำเอนไซม์ไปใช้ซ้ำ 17 ครั้ง การทำงานของเอนไซม์ลดลงเหลือ 50% อัตราส่วนการทำปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิเลชันต่อไฮโดรไลซิส (T/H) ของเอนไซม์อิสระเท่ากับ 1.2 และเอนไซม์แบบตรึงเท่ากับ 1.7 ซึ่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถหาได้จากปริมาณฟรุกโตสอิสระ และปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิเลชันสามารถหาได้จากปริมาณความแตกต่างกลูโคสกับฟรุกโตส [14]

บทที่ 3

ดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครส และอินูโลซูเครส ดำเนินการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยมีรายละเอียดของสารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ และวิธีการทดลอง ดังต่อไปนี้

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 4 แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	สูตรเคมี	บริษัทผู้ผลิต
ซูโครส	$C_{12}H_{22}O_{11}$	LOBA
ฟรุคโตส	$C_6H_{12}O_6$	KEMAUS
กลูโคส	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	KEMAUS
กรดอะซิติก	CH_3COOH	QReC
กรดแลคติก	$C_3H_6O_6$	KEMAUS
กรดซิตริก	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	QReC
ไคโตซาน	-	Marine Bio
เอทานอล	C_2H_6O	-
อะซิโตน	C_3H_6O	-
โซเดียมไฮดรอกไซด์	NaOH	KEMAUS
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	K_2HPO_4	KEMAUS
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	KH_2PO_4	LOBA
อะซิโตนไนไตรล์	C_2H_3N	Macron
กลูตาร์ลดีไฮด์ 25%	$C_5H_8O_2$	LOBA
โซเดียมคลอไรด์	NaCl	-
1-kestose	$C_{18}H_{32}O_{16}$	WAKO
nystose	$C_{24}H_{42}O_{21}$	WAKO
1 ^F -fructofuranosylnystose	$C_{30}H_{52}O_{26}$	WAKO

3.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เอนไซม์อินูลูโคซูเครส

เอนไซม์อินูลูโคซูเครสที่สังเคราะห์จาก *Lactobacillus reuteri* 121 (Lrlnu-N555A)

3.2.2 เอนไซม์ลีแวนซูเครส

เอนไซม์ลีแวนซูเครสที่สังเคราะห์จาก *Bacillus licheniformis* RN-01 (OPL-K82H/N83R)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.1 เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น ATX224R

3.3.1.2 เครื่องวัดค่ากรด - เบส (pH meter)

3.3.1.3 เครื่องกวนสารชนิดให้ความร้อน (hot plate stirrer) ยี่ห้อ IKA

3.3.1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ PolyScience

3.3.1.5 เครื่องอบ

3.3.1.6 ป้อน Peristaltic BT100M MC Series

3.3.1.7 ขวด Vial 2 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Kima

3.3.1.8 ไชริงค์ (Syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร ยี่ห้อ NIPRO

3.3.1.9 กระดาษกรองไนลอน ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Whatman

3.3.1.10 ไชริงค์กรองไนลอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มม. รูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

3.3.1.11 ไมโครเพลท (Microplate) 96 หลุม ยี่ห้อ Falcon

3.3.1.12 เข็มฉีดยา ขนาด 18G x11/2 นิ้ว ยี่ห้อ NIPRO

3.3.1.13 บีกเกอร์ ขนาด 50 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.3.1.14 กระบอกตวง ขนาด 25 50 100 250 และ 1000 มิลลิลิตร

3.3.1.15 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 100 และ 250 มิลลิลิตร

3.3.1.16 ขวด Duran ขนาด 100 250 500 และ 2000 มิลลิลิตร

3.3.1.17 หลอดไมโครเซ็นติพีวัก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.1.18 ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.3.1.19 ไมโครปิเปตต์ทีป ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.3.1.20 เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสม ขนาด 10 ลิตร

3.3.1.21 เครื่องปฏิกรณ์ ขนาด 15x75 มิลลิเมตร

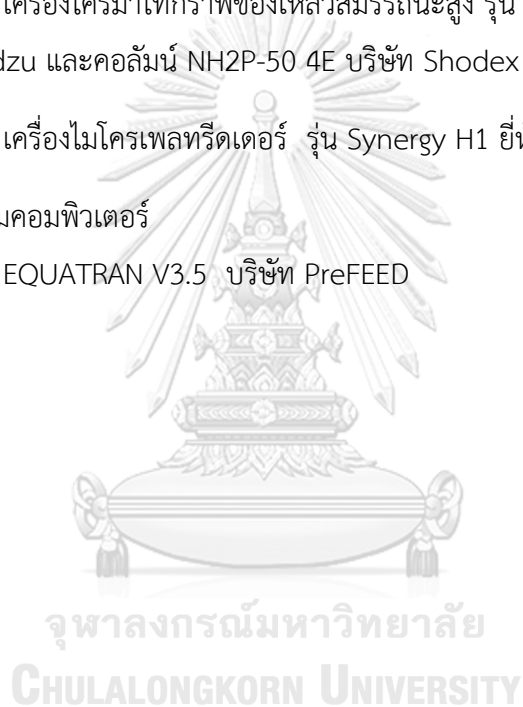
3.3.2 เครื่องมือวิเคราะห์

3.3.2.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น Prominence UFLC ยี่ห้อ Shimadzu และคอลัมน์ NH2P-50 4E บริษัท Shodex

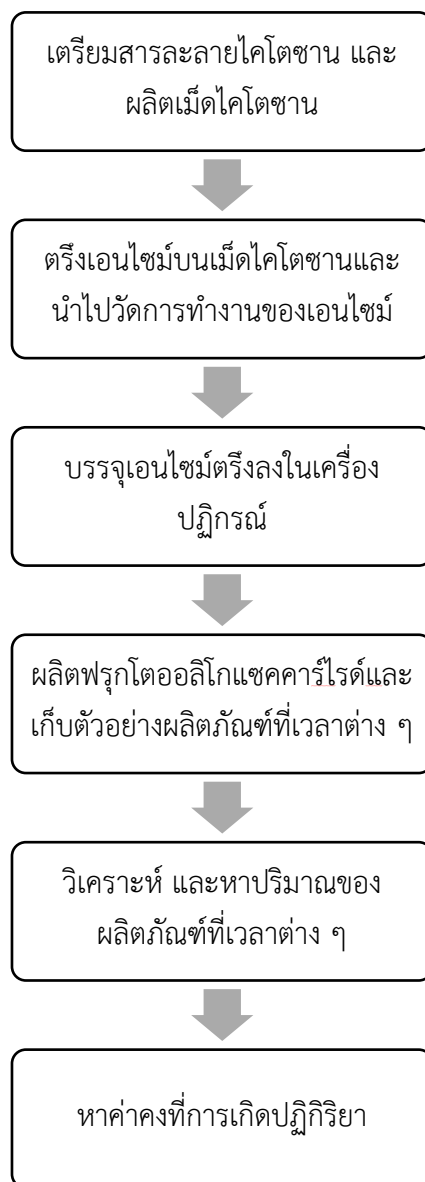
3.3.2.2 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ รุ่น Synergy H1 ยี่ห้อ BioTek

3.3.3 โปรแกรมคอมพิวเตอร์

3.3.3.1 EQUATRAN V3.5 บริษัท PreFEED



3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



รูปที่ 14 แสดงแผนผังขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารละลายไคโตซาน

สารละลายไคโตซาน ประกอบด้วย ไคโตซาน 15.5 กรัมต่อลิตร กรดอะซิติก 1% (w/v) และน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

- เตรียมสารละลายไคโตซานในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสมที่ความเร็วรอบใบกวน 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 47 ชั่วโมง

- เติมกรดแลคติก 1% (w/v) กรดซิตริก 1% (w/v) และกรดอะซิติก 1% (w/v) กวนต่ออีก 1 ชั่วโมง ระยะเวลาการกวนทั้งหมดเป็น 48 ชั่วโมง

3.4.2 การผลิตเม็ดไคโตซาน (Chitosan beads)

3.4.2.1 การผลิตเม็ดไคโตซานแบบไฮโดรเจล

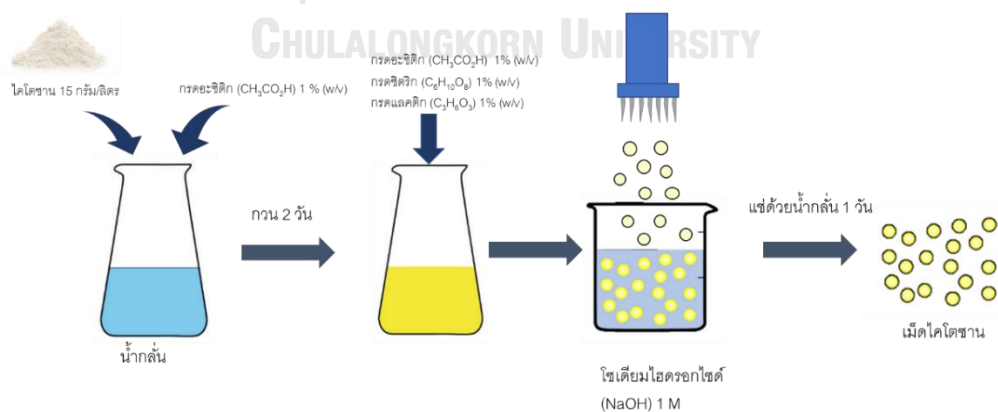
เม็ดไคโตซานไฮโดรเจลสามารถผลิตโดยการหยดสารละลายไคโตซานลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

- เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ในเอทานอล 60 % (v/v) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับสารละลายไคโตซาน

- ใช้ปั๊มในการหยดสารละลายไคโตซานที่ความเร็วรอบ 10 รอบต่อนาที ระยะห่างระหว่างเข็มหยดกับระดับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 30 เซนติเมตร ขณะที่หยดไคโตซาน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต้องกวนตลอดเวลา

- แยกเม็ดไคโตซานจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าจนกระทั่งค่ากรด - เบส เป็นกลาง

- แخذด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน จะได้เป็นเม็ดไคโตซานแบบไฮโดรเจล



รูปที่ 15 แสดงขั้นตอนการผลิตเม็ดไคโตซานแบบไฮโดรเจล

3.4.2.2 การผลิตเม็ดโคโตนแบบ core-shell

เม็ดโคโตน core-shell เป็นการเพิ่มความแข็งแรงของเม็ดโคโตนด้วยการอบแห้งและทำให้พื้นผิวมีความพูนด้วยการบวมน้ำ (Swell) [29]

- นำเม็ดโคโตนแบบไฮดรเจลมาล้างและแช่ทิ้งไว้ในอะซิโตน (Acetone, C_3H_6O) ประมาณ 2 ชั่วโมง
- นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นเม็ดโคโตนแบบแห้ง (Dry beads)
- นำเม็ดโคโตนแบบแห้งทำให้ผิวบวมน้ำ โดยแช่ในกรดอะซิติก 1% (w/v) เป็นเวลา 60 วินาที และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณโมลาร์ที่เท่ากับกรดอะซิติก
- ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่ากรด - เบส เป็นกลาง จะได้เป็นเม็ดโคโตนแบบ core - shell



รูปที่ 16 แสดงขั้นตอนการผลิตเม็ดโคโตนแบบ core-shell

3.4.3 การตรึงเอนไซม์

3.4.3.1 การตรึงเอนไซม์ลีแวนซูเครส

ก่อนเริ่มตรึงเอนไซม์ควรเตรียมน้ำทิ้งให้หมด นำเม็ดโคโตนไปซังน้ำหนัก

- เติมกลูตารัลดีไฮด์ 2% (w/v) และเอนไซม์ลีแวนซูเครสที่อยู่ในฟอสเฟต ค่ากรด-เบส 6.0 ลงในเม็ดโคโตนที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อเม็ดโคโตนเท่ากับ 1 มิลลิลิตร : 1.2 กรัม
- กวนเบา ๆ ให้เข้ากัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- เมื่อสิ้นสุดการตรึงเอนไซม์ แยกเอนไซม์ที่เหลือออกจากเอนไซม์ตรึง
- ล้างเอนไซม์ตรึงด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ ค่ากรด - เบส 6.0 ที่มีโซเดียม-คลอไรด์ 1 โมลาร์จำนวน 1 ครั้ง
- ล้างด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ ค่ากรด - เบส 6.0 อีก 3 ครั้ง

- เก็บเอนไซม์ตรึงไว้ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ ค่ากรด-เบส 6.0 ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ท่อด้วยภาชนะพอยล์เพื่อป้องกันแสง

3.4.3.2 การตรึงเอนไซม์อินูลูโครส

การตรึงเอนไซม์อินูลูโครสทำเหมือนการตรึงลิแวนซูโครสทุกขั้นตอน

- เปลี่ยนจากเอนไซม์ลิแวนซูโครสเป็นอินูลูโครส

- เปลี่ยนจากบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ ค่ากรด-เบส 6.0 เป็น ล้างและเก็บด้วย บัฟเฟอร์อะซิเตรท 50 มิลลิโมลาร์ ค่ากรด-เบส 5.5

3.4.4 การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส โดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูโครส และอินูลูโครส ดำเนินการทดลองที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 50% (w/v) ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์ต่าง ๆ เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง คำนวณหาความเข้มข้นของสาร ค่าการเปลี่ยนแปลงของซูโครสและค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่าง ๆ

3.4.4.1 เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวนผสมโดยใช้เอนไซม์อิสระ

3.4.4.1.1 เอนไซม์ลิแวนซูโครส

ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูโครส 500 U ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม

- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟตค่ากรด-เบส 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ดำเนินการทดลองแบบกะ ดังแสดงในรูปที่ 17 ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส

- เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและนำไปแช่แข็ง

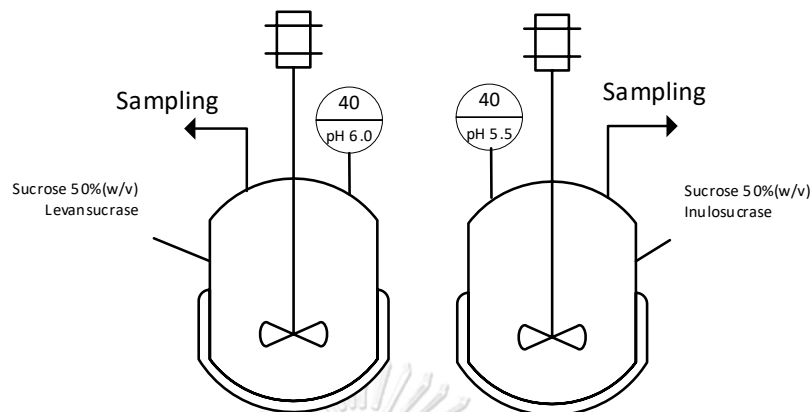
3.4.4.1.2 เอนไซม์อินูลูโครส

ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินูลูโครส 500 U ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม

- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์อะซิเตรทค่ากรด-เบส 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ดำเนินการทดลองแบบกะ ดังแสดงในรูปที่ 17 ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส

- เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและนำไปแช่แข็ง



รูปที่ 17 แสดงการทดลองผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม

3.4.4.2 เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรึง

3.4.4.2.1 เอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

ผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนจากซูโครส โดยใช้ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง

- บรรจุเอนไซม์ตรึงลงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งและชั่งน้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา
- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟตค่ากรด-เบส 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ป้อนเข้าด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ด้วยปั๊มที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดลองแบบหมุนเวียน ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ

- เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่แข็ง

3.4.4.2.2 เอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

ผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนจากซูโครส โดยใช้ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง

- บรรจุเอนไซม์ตรึงลงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งและชั่งน้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา
- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ฟอสเฟตค่ากรด-เบส 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ป้อนเข้าด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ด้วยปั๊มที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดลองแบบหมุนเวียน ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ

- เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่แข็ง

3.4.4.2.3 เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินจากซูโครส โดยใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง

- บรรจุเอนไซม์ตรึงลงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งและชั่งน้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา
- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์อะซิเตรทค่ากรด-เบส

5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ป้อนเข้าด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ด้วยปั๊มที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดลองแบบหมุนเวียน ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ

- เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่แข็ง

3.4.4.2.4 เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินจากซูโครส โดยใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง

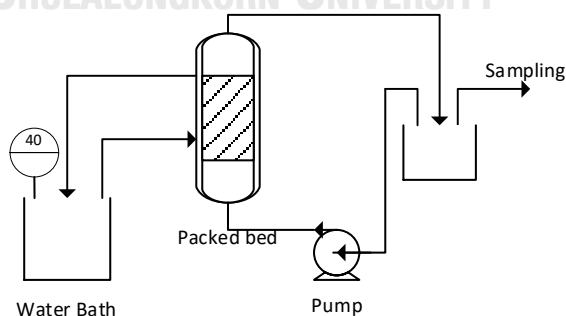
- บรรจุเอนไซม์ตรึงลงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งและชั่งน้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา
- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์อะซิเตรทค่ากรด-เบส

5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ป้อนเข้าด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ด้วยปั๊มที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดลองแบบหมุนเวียน ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ

- เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่แข็ง

CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 18 แสดงการทดลองผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรึง

3.4.4.3 เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน

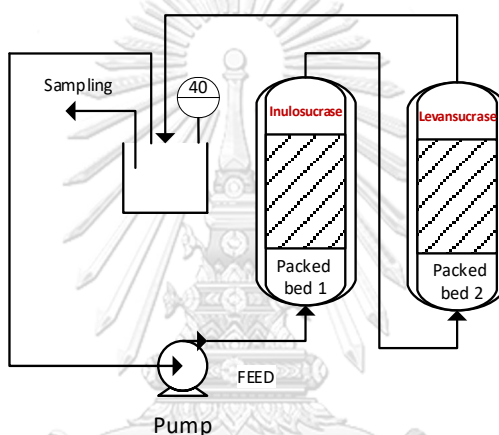
ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสตรึงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน การทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด 500 U

- บรรจุเอนไซม์อินูโลซูเครส 250 U ลงในเครื่องปฏิกรณ์ที่ 1 และเอนไซม์ลิวานูซูเครสตรัง 250 U ลงในเครื่องปฏิกรณ์ที่ 2 ซึ่งน้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา

- เตรียมซูโครสความเข้มข้น 50% (w/v) ใน 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ฟอสเฟตค่ากรด -เบส 6.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ป้อนซูโครสเข้าด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ที่ 1 ด้วยปั๊มที่อัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที เครื่องปฏิกรณ์ที่ 1 ต่ออนุกรมกับเครื่องปฏิกรณ์ที่ 2 ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียสด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ แสดงดังรูปที่ 19

- เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่แข็ง



รูปที่ 19 แสดงการทดลองผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน
ตารางที่ 5 แสดงการทดลองผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์

การทดลอง	เครื่องปฏิกรณ์	เอนไซม์
1.ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ อิสระ	ถึงกวนผสมดำเนิน ระบบแบบกะ	ลิวานูซูเครส 500 U อินูโลซูเครส 500 U
2.ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ ตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลและ core-shell	เบตนิ่งแบบ หมุนเวียน	ลิวานูซูเครสตรัง 500 U อินูโลซูเครสตรัง 500 U
3.ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาจากเอนไซม์ อินูโลซูเครสและลิวานูซูเครสตรึงบน เม็ดโคโคซาน	เบตนิ่งต่ออนุกรม	อินูโลซูเครสตรัง : ลิวานูซูเครสตรัง 250 U : 250 U

3.4.5 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

3.4.5.1 วัดการทำงานของเอนไซม์โดยวิธี DNS (Dinitrosalicylic acid)

เตรียมสารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ใน 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ค่ากรด-เบส 6.0 สำหรับเอนไซม์ลิแวนซูเครสและใน 50 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์อะซิเตรท ค่ากรด-เบส 5.5 สำหรับเอนไซม์อินูโลซูเครส

- บ่มสารละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- ใส่เอนไซม์ 25 ไมโครลิตร เริ่มจับเวลาทำปฏิกิริยา 5 นาที
- หยุดปฏิกิริยาโดยเติม DNS 0.5 มิลลิลิตร ปริมาณเท่ากับสารละลาย
- นำไปต้มเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้สีเปลี่ยน
- ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและเจือจาง 5 เท่าด้วยการเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร
- ปิเปตตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ใส่ไมโครเพลท 96 well
- นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเตอร์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) 540 นาโนเมตร

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ทั้งหมดที่ปล่อยมาสามารถกำหนดโดยสารมาตรฐานกลูโคส หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ (U) แสดงปริมาณของเอนไซม์ที่ปล่อยกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อนาที

คำนวณการทำงานของเอนไซม์เริ่มต้น (A_i) เอนไซม์ที่ติดอยู่บนตัวพุง (A_m) และเอนไซม์ที่เหลือจากการตรึง (A_f) ในหน่วยการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด (U) จากกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคส และนำไปหาค่าตัวแปรการตรึงเอนไซม์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

Immobilization yield

$$Y_i = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

Immobilization efficiency

$$E_f = \frac{A_m}{A_i - A_f} \times 100$$

Activity recovery

$$A_r = \frac{A_m}{A_i} \times 100$$

3.4.5.2 วิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ผลิตภัณฑ์ถูกวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Prominence UFLC, Shimadzu) ตัวตรวจวัดดัชนีการหักเหของแสง (RID-20A, Shimadzu) และ คอลัมน์อะมิโน NH2P-50 4E ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (Shodex Asahipak) คำนวณหาปริมาณของสารโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส 1-Kestose (GF₂) Nystose (GF₃) และ 1^F-Fructofuranosyl nystose (GF₄)

- นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นกรองด้วย nylon syringe filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

- เตรียมอะซิโตไนไตรล์ 70% (v/v) ในน้ำกลั่น กรองด้วยชุดกรองและปั๊มสุญญากาศผ่านกระดาษกรอง nylon membrane เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.47 ไมโครเมตร

ตั้งค่าระบบการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังนี้

ตัวตรวจวัด (Detector) : การหักเหของแสง (Refractive Index Detector ,RID)

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) : อะซิโตไนไตรล์ต่อน้ำ เป็นอัตราส่วน 75 : 25

เฟสคงที่ (Stationary phase) : โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl Alcohol)

อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

อุณหภูมิคอลัมน์ : 30 องศาเซลเซียส

ปริมาณฉีดต่อเข็ม : 10 ไมโครลิตร

เวลาต่อเข็ม : 30 นาที

สารล้างเข็ม : น้ำกลั่น

3.4.5.3 วิเคราะห์โครมาโทกราฟีแบบชั้นฟิล์มบาง (TLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นฟิล์มบาง เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเบื้องต้น จากความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่เท่ากัน เพื่อพิจารณาองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เทียบกับสารมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์สามารถแยกด้วยตัวทำละลายที่ประกอบด้วย อะซิโตไนไตรล์ : บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ เป็นอัตราส่วน 2 : 1 : 1 : 1 ตามลำดับ

- แด้ม (spot) ผลิตภัณฑ์ตัวอย่างลงบนแผ่น TLC 0.5 ไมโครลิตร

- นำแผ่น TLC จุ่มลงในภาชนะปิด ตัวทำละลายจะค่อยๆ เคลื่อนที่ รอจนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่เต็มแผ่น TLC

- นำแผ่น TLC ไปเป่าให้แห้งและนำไปจุ่มซ้ำอีก 2 ครั้ง

- แสดงผลโดยการฉีดพ่นด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยเอทานอล 27 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก 10 มิลลิลิตร ออร์ซินอล 0.1 กรัม และน้ำ 8 มิลลิลิตร

3.4.6 วิธีการหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา

การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ จะได้ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดที่เวลาต่าง ๆ นำผลการทดลองมาหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา โดยใช้วิธีการถดถอย (Regression) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

3.4.6.1 กำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยา

3.4.6.2 ตั้งสมการสมดุลโมลของระบบและอัตราการเกิดปฏิกิริยา ลงในโปรแกรม

EQUATRAN

3.4.6.3 กำหนดให้ข้อมูลจากจำนวนกับการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยใช้คำสั่ง Least ให้โปรแกรมคำนวณค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาที่ได้เป็นค่าที่ทำให้ผลจากการคำนวณกับการทดลองใกล้เคียงกันที่สุด เพื่อประเมินความเหมาะสมของค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาจากวิธีการถดถอยก่อนนำไปคำนวณออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ สามารถนำข้อมูลจากการทดลอง และการคำนวณมาแสดงความสัมพันธ์ในรูปของกราฟเส้นตรง พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (R^2) ได้จากสมการ 3-1

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_s)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_m)^2} \quad (3-1) \quad [45]$$

โดย R^2 ยิ่งเข้าใกล้ 1 จะแสดงว่าค่าจากการทดลองและการคำนวณเป็นเส้นตรงมากขึ้นและสามารถหาค่าความคาดเคลื่อน (Error) ระหว่างการคำนวณของโมเดลกับข้อมูลการจากทดลอง ในรูปของค่าเบี่ยงเบนจากสมการ 3-2

$$MSD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[(x_{i,exp} - x_{i,cal})^2 \right] \quad (3-2) \quad [45]$$

โดยที่ MSD คือ ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนกำลังสอง

$x_{i,cal}$ คือ ข้อมูลจากการคำนวณ

$x_{i,exp}$ คือ ข้อมูลจากการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

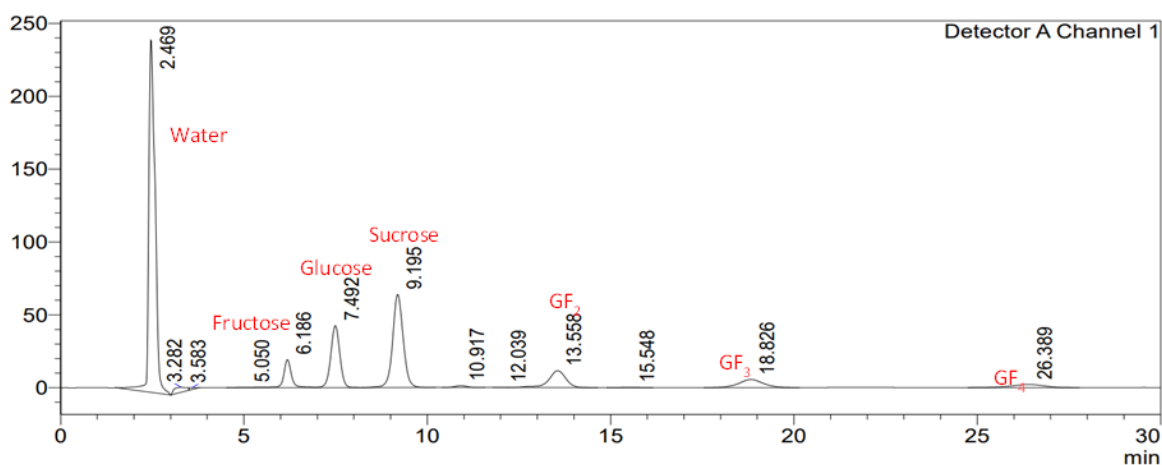
งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส ในเครื่องปฏิกรณ์ต่าง ๆ ได้แก่ เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสมใช้เอนไซม์แบบอิสระ เครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่งใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน ไฮโดรเจลและ core-shell เปรียบเทียบกัน ดำเนินการทดลองที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 50% (w/v) ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ ลีแวนซูเครส และอินูโลซูเครส

4.1 เอนไซม์อิสระ

4.1.1 การผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสมโดยใช้เอนไซม์อิสระ

การผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม ดำเนินการทดลองแบบกะ ที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 50% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และอุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) จะได้โครมาโทแกรม (Chromatogram) ดังแสดงในรูปที่ 20 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์อินูโลซูเครส ณ ชั่วโมงที่ 4 คำนวณหาปริมาณของสารที่เวลาต่าง ๆ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส 1-Kestose (GF₂) Nystose (GF₃) และ Fructofuranosyl nystose (GF₄) ศึกษาความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ร้อยละการเปลี่ยนของซูโครส และร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เป็นผลิตภัณฑ์หลัก กลูโคส และฟรุคโตสเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้

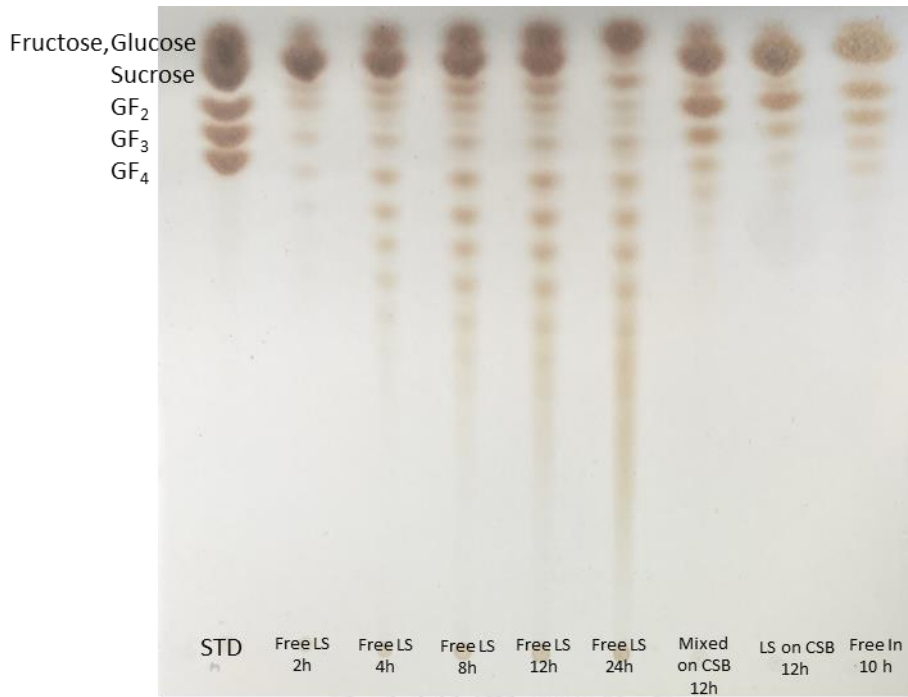
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



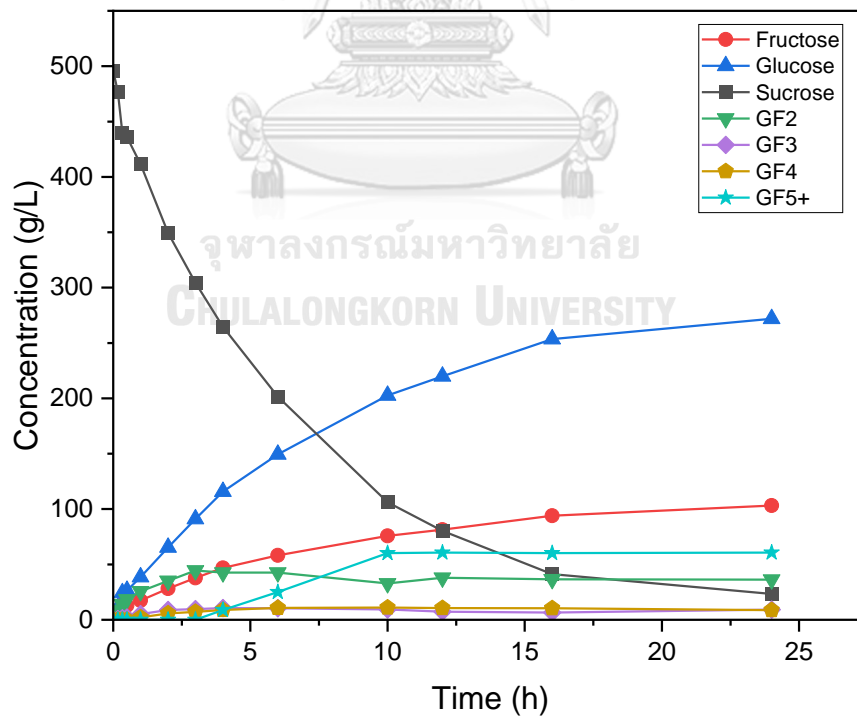
รูปที่ 20 แสดงโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระที่ 4 ชั่วโมง

4.1.1.1 เอนไซม์ลีสแวนซูเครสอิสระ

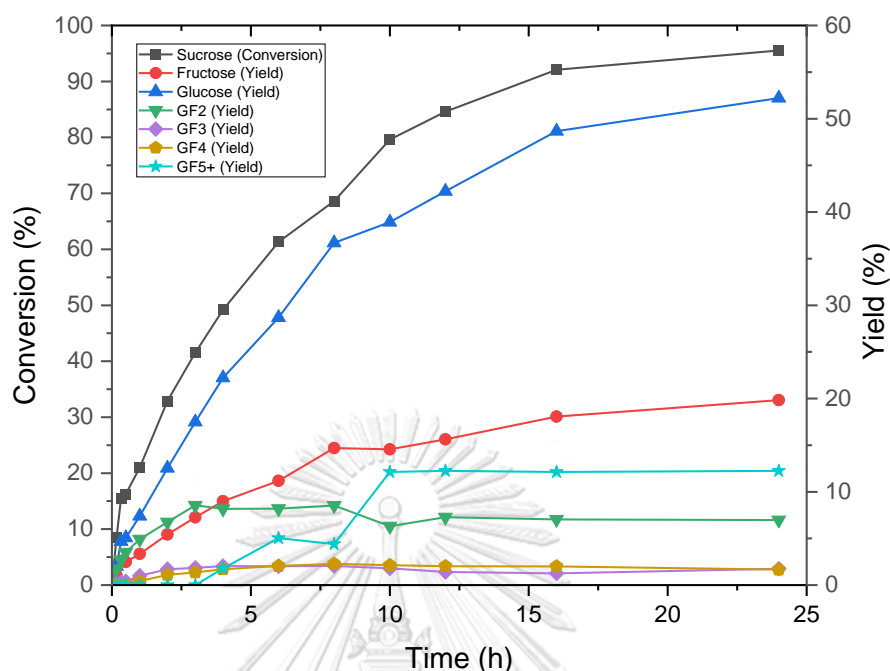
การผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีสแวนจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลีสแวนซูเครส 500 U ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม จากรูปที่ 22 แสดงความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 3 ชั่วโมง อัตราการลดลงของซูโครสในการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ค่อนข้างเร็ว ณ เวลา 3 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีสแวนได้ 58.40 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF_2 GF_3 และ GF_4 เท่ากับ 42.42 9.21 และ 6.77 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ช่วงเวลาที่ 3 ถึง 8 ชั่วโมง ปริมาณ GF_2 ในระบบคงที่ สันนิษฐานว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 และปฏิกิริยาที่ 2 ใกล้เคียงกัน จึงทำให้ปริมาณในระบบ GF_2 ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 3 เพิ่มขึ้นจนปริมาณ GF_4 ในระบบเท่ากับและมากกว่าปริมาณของ GF_3 และเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ 70.80 กรัม/ลิตร จากทฤษฎี ปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ เท่ากับ ปริมาณกลูโคส - ปริมาณฟรุคโตส แต่สามารถวัดปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ GF_2 GF_3 และ GF_4 ได้เท่ากับ 62.00 สันนิษฐานว่ามีการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีสแวนที่ DP (Degree of Polymerization) มากกว่า 5 ซึ่งเกิดเป็น GF_{5+} แต่มีข้อจำกัดของสารมาตรฐานและเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถวิเคราะห์ปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ได้เพียง GF_2 GF_3 และ GF_4 จึงคำนวณปริมาณ GF_{5+} จากปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดลบด้วยปริมาณของ GF_2 GF_3 และ GF_4 จากรูปที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบผลิตภัณฑ์เบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) การผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีสแวนโดยใช้เอนไซม์ลีสแวนซูเครส มีฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ที่ DP มากกว่า 5 จะได้ว่ามีการเกิด GF_{5+} เกิดขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงและชั่วโมงที่ 8 12 และ 24 จะมีฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ GF_{5+} เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ณ เวลา 8 ชั่วโมง ปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วย GF_2 GF_3 GF_4 และ GF_{5+} เท่ากับ 42.28 10.21 11.26 และ 21.80 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และช่วงเวลาที่ 8 ถึง 24 ชั่วโมง ปริมาณของ GF_2 GF_3 และ GF_4 ในระบบค่อย ๆ ลดลง ส่วนปริมาณของ GF_{5+} เพิ่มขึ้น ณ เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วย GF_2 GF_3 GF_4 และ GF_{5+} 36.28 9.12 8.66 และ 45.43 กรัม/ลิตรตามลำดับ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีสแวนซูเครส 500 U กับสารตั้งต้นซูโครส 50 % (w/v) เกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิส จากปริมาณฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดที่มากกว่าฟรุคโตสในระบบ



รูปที่ 21 แสดงผลโครมาโทแกรม จากเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) ของผลิตภัณฑ์



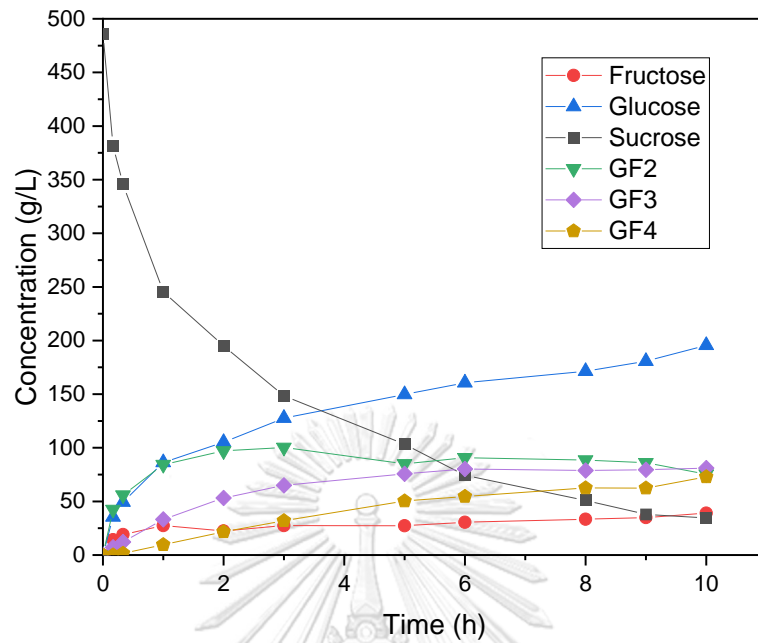
รูปที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครส



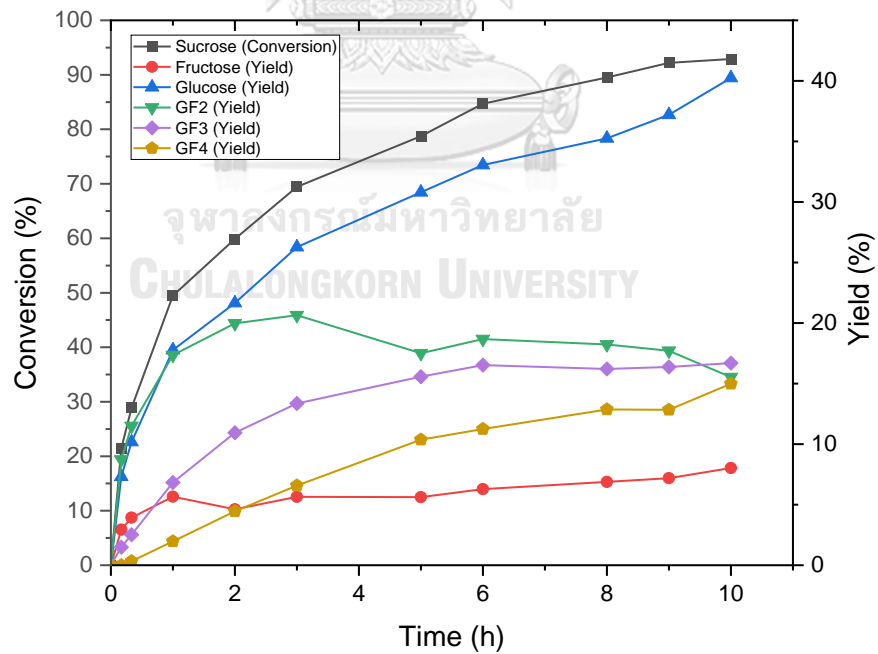
รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อีแลนซุโครส

4.1.1.2 เอนไซม์อีแลนซุโครสอิสระ

การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์อีแลนซุโครส 500 U ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม จะได้ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 24 ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 3 ชั่วโมง อัตราการลดลงของซูโครสในการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ค่อนข้างเร็ว ณ เวลา 3 ชั่วโมง มีการใช้ซูโครส 337.50 กรัม/ลิตร เท่ากับ 69.45 % สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 197.23 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 100.37 64.92 และ 31.94 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งคำนวณค่าร้อยละผลได้ เท่ากับ 20.65 13.36 และ 6.57 เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ปริมาณ GF₂ ค่อย ๆ ลดลง เนื่องจากเกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน ปฏิกริยาที่ 2 มากกว่าปฏิกริยาที่ 1 ทำให้ปริมาณ GF₂ ในระบบเริ่มลดลง ช่วงเวลาที่ 3 ถึง 10 ชั่วโมง ปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น จากปริมาณของ GF₃ และ GF₄ ที่เพิ่มขึ้น ณ เวลาที่ 10 ชั่วโมงสามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินได้ 229.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณค่าร้อยละผลได้รวม เท่ากับ 47.22 ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 100.37 64.92 และ 31.94 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปฏิกริยาของเอนไซม์อีแลนซุโครส 500 U กับสารตั้งต้นซูโครส 50 % เกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิส จากปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มากกว่าฟรุกโตสในระบบ



รูปที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูลูซูเครส



รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ของร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูลูซูเครส

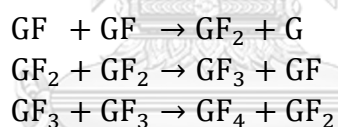
4.1.1.3 การเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ลีสแวนซูโครสอิสระและเอนไซม์อินูโลซูโครสอิสระ

การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสในเครื่องปฏิกรณ์ถึงกวนผสม ดำเนินการแบบกะ ที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 50% (w/v) อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส การใช้เอนไซม์ลีสแวนซูโครสจะให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีสแวนและมีผลิตภัณฑ์ DP ที่มากกว่า 5 เกิดขึ้นด้วย จะได้เป็น GF₅₊ ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์อินูโลซูโครสที่ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลิน ที่ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่านั้น จากการทดลองจะพบว่าการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์อิสระอินูโลซูโครสและลีสแวนซูโครส จะมีร้อยละการเปลี่ยนซูโครสที่ใกล้เคียง 95.89 และ 95.52 ตามลำดับ แต่อินูโลซูโครสมีร้อยละผลได้ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าลีสแวนซูโครส ซึ่งเท่ากับ 47.22 และ 27.82 ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์ลีสแวนซูโครสทำปฏิกิริยากับซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูโครส จากปริมาณฟรุคโตสที่เกิดขึ้นในระบบ

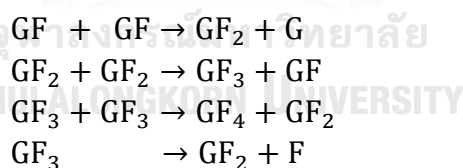
4.1.2 ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส และกำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยาไว้หลายรูปแบบ ดังต่อไปนี้

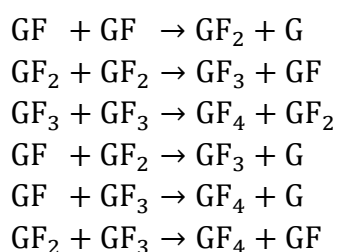
Jung และคณะ (1989) [35]



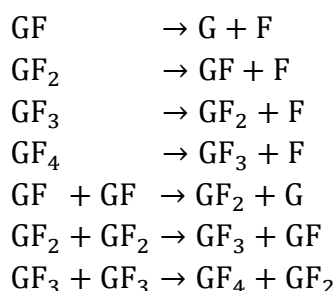
Duan และคณะ (1994) [36]



Nishizawa และคณะ (2001) [37]



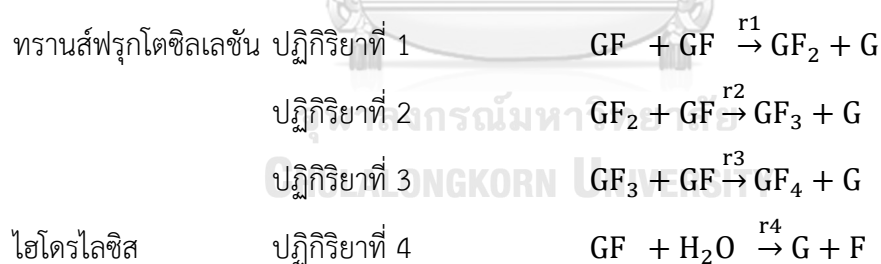
Rocha และคณะ (2009) [38]

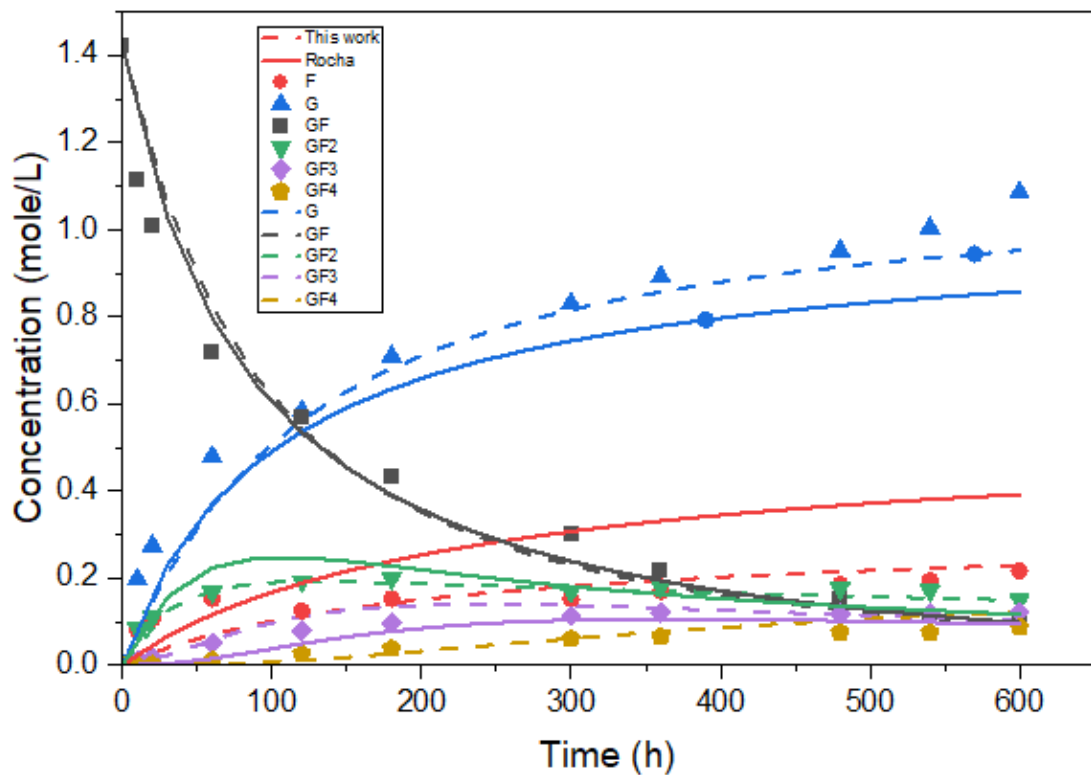


งานวิจัยนี้จะเลือกกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Duan และคณะ (1994) [36] และ Rocha และคณะ (2009) [38] มาหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากการทดลองมีการผลิตฟรุกโตสเกิดขึ้นด้วย ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Jung และคณะ (1989) [35] และ Nishizawa และคณะ (2001) [37] ไม่มีฟรุกโตสในระบบ

4.1.2.1 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูลูโครสอัสสระ

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูลูโครส 500 U โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 7 จะได้ว่า ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาที่ได้จากกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ Duan และคณะ (1994) และ Rocha และคณะ (2009) มีความคลาดเคลื่อนระหว่างการคำนวณของโมเดลกับข้อมูลการทดลองในรูปของค่าเบี่ยงเบน MSD ค่อนข้างสูง งานวิจัยนี้จึงกำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยาใหม่ดังต่อไปนี้





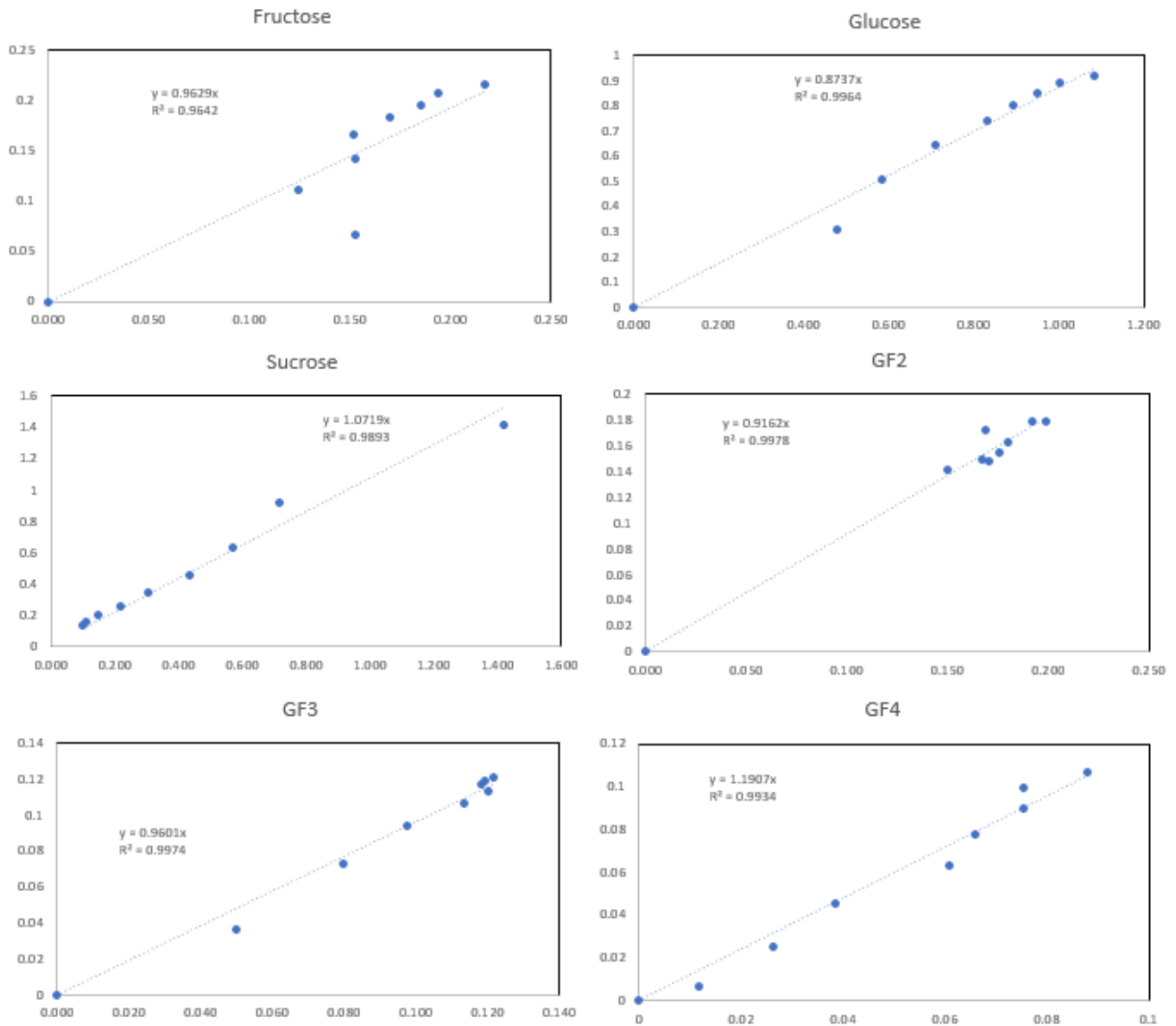
รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และผลการคำนวณ (เส้นทึบ : Rocha และเส้นประ : งานวิจัยนี้) ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระที่เวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 7 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครส

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	Duan (1994)	Rocha (2009)	งานวิจัยนี้
k_1 (L/mol •h)	16.61×10^{-3}	11.09×10^{-3}	9.83×10^{-3}
k_2 (L/mol •h)	63.55×10^{-3}	30.51×10^{-3}	25.46×10^{-3}
k_3 (L/mol •h)	31.96×10^{-3}	35.62×10^{-3}	2.64×10^{-3}
k_4 (1/h)	4.8×10^{-3}	5.54×10^{-3}	3.24×10^{-3}
k_5 (1/h)	-	2.59×10^{-8}	-
k_6 (1/h)	-	1.41×10^{-8}	-
k_7 (1/h)	-	3.13×10^{-8}	-
MSD	0.212	0.156	0.062

จากตารางที่ 7 จะได้ว่าค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาที่กำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยาใหม่ของงานวิจัยนี้ มีความคลาดเคลื่อนระหว่างการคำนวณของโมเดลกับข้อมูลการทดลองในรูปของค่าเบี่ยงเบน MSD เท่ากับ 0.062 ซึ่งน้อยกว่าของ Duan และ Rocha เมื่อนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นจากการคำนวณที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 26 สัญลักษณ์แทนข้อมูลจากการทดลอง เส้นแทนข้อมูลจากการคำนวณ โดยเส้นทึบ : Rocha และเส้นประ : งานวิจัยนี้ จากรูปจะเห็นว่าเส้นประมีความใกล้เคียงกับข้อมูลการทดลองมากกว่าและเมื่อหาค่าความสัมพันธ์ R^2 ความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากคำนวณของซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส GF_2 GF_3 และ GF_4 มี เท่ากับ 0.992 0.997 0.962 0.988 0.999 และ 0.988 ตามลำดับ

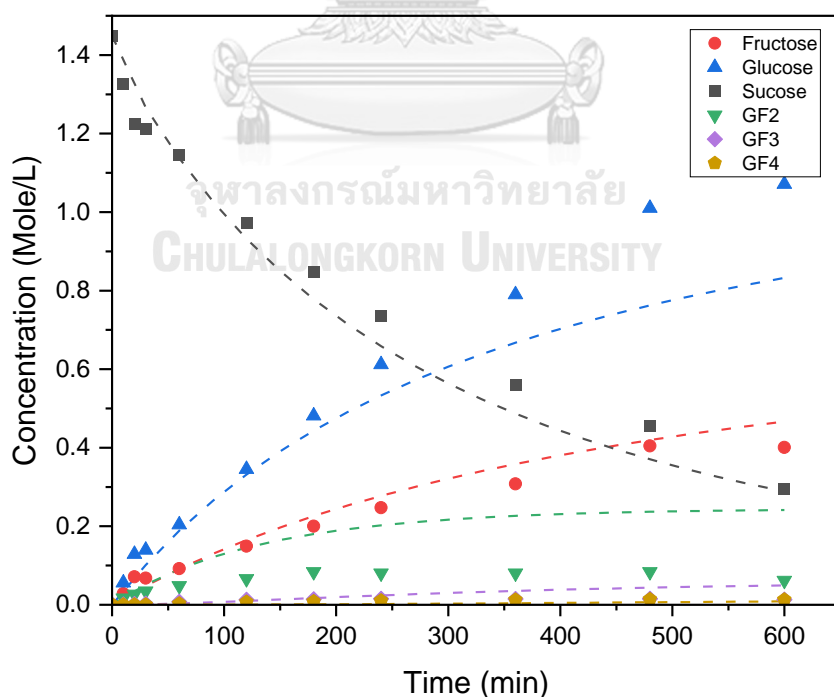
จากการหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครส 500 U โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้ว่าค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาที่กำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยาใหม่ของงานวิจัยนี้ มีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุดและค่าความสัมพันธ์ R^2 ของสารทุกตัวในระบบมากกว่า 0.8 แบบจำลองนี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ได้ ดังนั้นจึงนำกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ได้ไปหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับการทดลองอื่น ๆ



รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ ด้วยเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระ

4.1.2.2 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระ

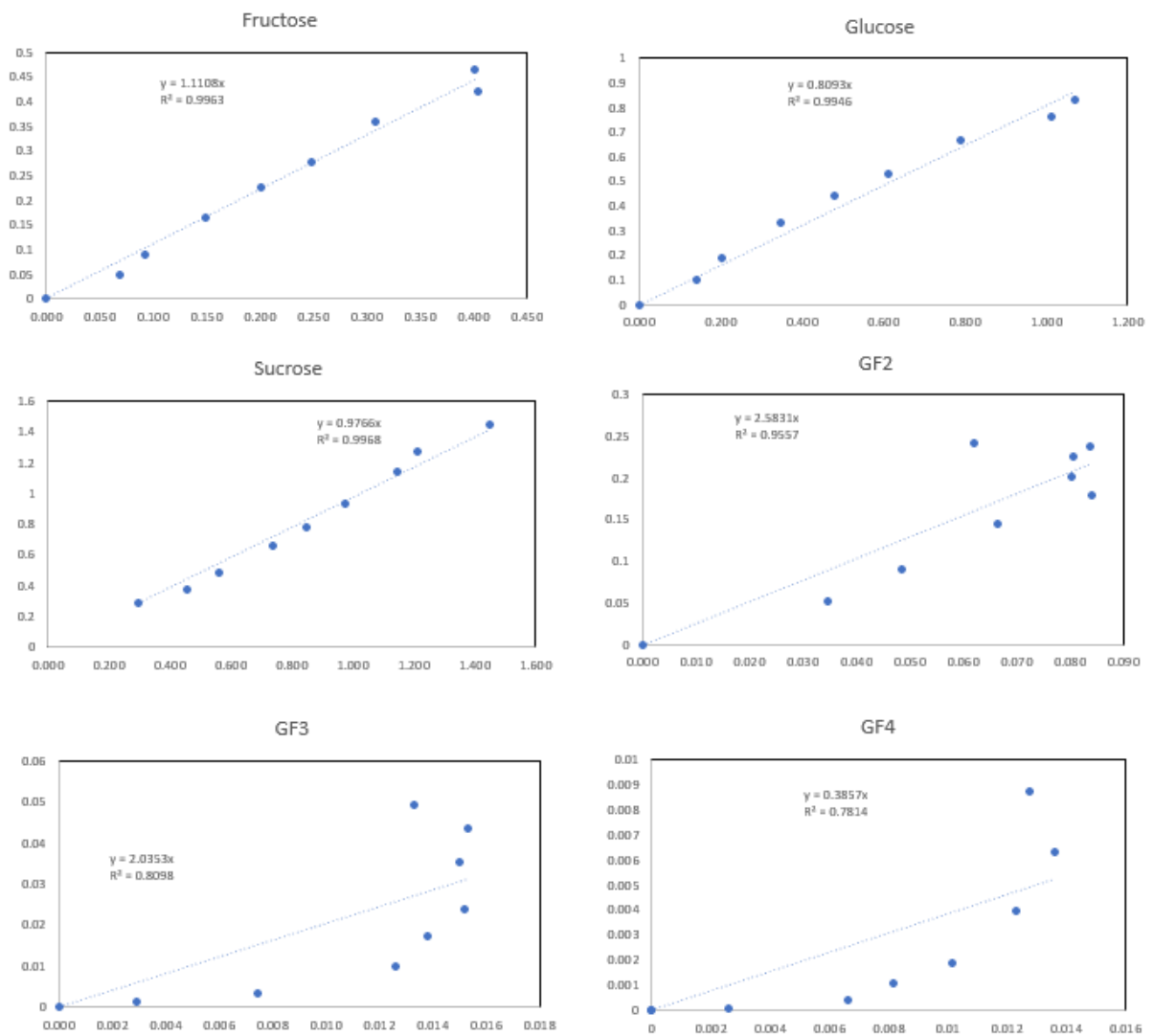
การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิแวนซูเครส 500 U โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่กำหนดไว้ข้างต้น ปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 เป็นการเกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน และปฏิกิริยาที่ 4 เป็นการเกิดไฮโดรไลซิส จะได้ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 8 พบว่า ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาที่ 1 มากกว่าปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 $k_1 > k_2 > k_3$ และมีค่าความคลาดเคลื่อนระหว่างการคำนวณของโมเดลกับข้อมูลการทดลองในรูปของค่าเบี่ยงเบน MSD เท่ากับ 0.177 รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการทดลองในรูปแบบสัญลักษณ์และความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณในรูปแบบเส้นประ ที่เวลาต่าง ๆ ค่าของซูโครส กลูโคส และฟรุกโตสมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ความเข้มข้นจากการคำนวณของ GF₂ GF₃ และ GF₄ ต่างจากผลการทดลอง เนื่องจากผลการทดลองมีการเกิดฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ GF₅₊ เกิดขึ้นด้วย จากกลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 เป็นของ GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่านั้น จึงทำให้มีความแตกต่างกันและเมื่อนำความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณของซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF₂ GF₃ และ GF₄ มีค่าความสัมพันธ์ R² เท่ากับ 0.997 0.995 0.996 0.956 0.810 และ 0.718 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 29



รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และการคำนวณ (เส้นประ) ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระที่เวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 8 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูโครสอิสระ

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	เอนไซม์ลีแวนซูโครส
k_1 (L/mol · h)	2.90×10^{-3}
k_2 (L/mol · h)	2.82×10^{-3}
k_3 (L/mol · h)	2.61×10^{-3}
k_4 (1/h)	3.58×10^{-3}



รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ ด้วยเอนไซม์ลีแวนซูโครสอิสระ

4.1.2.3 การเปรียบเทียบค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ

ตารางที่ 9 แสดงค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	เอนไซม์	
	ลิแวนซูเครส	อินูโลซูเครส
k_1 (L/mol •h)	2.90×10^{-3}	9.83×10^{-3}
k_2 (L/mol •h)	2.82×10^{-3}	25.46×10^{-3}
k_3 (L/mol •h)	2.61×10^{-3}	2.64×10^{-3}
k_4 (1/h)	3.58×10^{-3}	3.24×10^{-3}

จากตารางที่ 9 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (k_4) ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระมากกว่าเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระ ซึ่งตรงกับผลการทดลองที่ใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระในการผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์จะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครส จากปริมาณฟรุคโตสในระบบที่มากกว่า และอัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 ของเอนไซม์อินูโลซูเครสจะมากกว่าเอนไซม์ลิแวนซูเครส จากค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา k_1 k_2 และ k_3 ที่มีค่ามากกว่า ซึ่งตรงกับผลการทดลองที่เอนไซม์อินูโลซูเครสผลิตฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ได้ปริมาณมากกว่าการใช้ลิแวนซูเครส แต่ในส่วนของลิแวนซูเครส กลไกการเกิดปฏิกิริยานี้ อาจจะทำนายการเกิดปฏิกิริยาได้แม่นยำไม่มากนัก เนื่องจากการมีฟรุคโตออลิโกแซคคาไรด์ GF_{5+} เกิดขึ้นด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระ

อัตราการเกิดปฏิกิริยา	เอนไซม์	
	ลิแวนซูเครส	อินูโลซูเครส
ทรานส์ฟรุคโตซิลเลชัน		
ปฏิกิริยาที่ 1	6.19×10^{-3}	20.95×10^{-3}
(mol / L •h)		
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส		
(mol / L •h)	5.23×10^{-3}	4.73×10^{-3}

จากตารางที่ 10 แสดงอัตราการเกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 และไฮโดรไลซิสปฏิกิริยาที่ 4 ซึ่งคำนวณจากความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 1.46 โมล/ลิตร และค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 และ 4 (k_1 , k_4) จะได้ว่าอัตราการเกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระและเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระจะมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งตรงกับผลการทดลองที่ได้ปริมาณฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์มากกว่าฟรุกโตสในระบบ และเอนไซม์ลิแวนซูเครสมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าเอนไซม์อินูโลซูเครส ซึ่งตรงกับผลการทดลองที่ปริมาณฟรุกโตสในระบบของการใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครสมากกว่าของเอนไซม์อินูโลซูเครส

4.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวพอง

วัสดุที่ใช้เป็นตัวพองสำหรับตรึงเอนไซม์ในงานวิจัยนี้คือ เม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core-shell จากการผลิตเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล เมื่อนำไปอบแห้งจะได้เป็นเม็ดโคโตซานอบแห้งที่มีความแข็งแรงมากขึ้นและนำไปทำให้ผิววมน้ำจะได้เป็นเม็ดโคโตซาน core-shell ที่มีแกนกลางที่แข็งแรงแสดงดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 แสดงเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core-shell

ตัวแปรที่ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core-shell ได้แก่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พื้นที่ผิว น้ำหนัก และความหนาแน่นรวม (Bulk Density) แสดงดังตารางที่ 11 เม็ดโคโตซาน core-shell มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กกว่าเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล เมื่อบรรจุเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core-shell ในปริมาตรที่เท่ากัน จะได้จำนวนและน้ำหนักของเม็ดโคโตซาน core-shell ที่มากกว่า ทำให้ความหนาแน่นรวมของเม็ดโคโตซาน core-shell จึงมากกว่าไฮโดรเจล ซึ่งมีสาเหตุมาจากเม็ดโคโตซาน core-shell มีแกนกลางที่แข็งที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งจึงมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กลง ทำให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 11 แสดงลักษณะทางกายภาพของเม็ดโคโตซาน

ลักษณะทางกายภาพ	เม็ดโคโตซานไฮโดรเจล	เม็ดโคโตซานcore-shell
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)	3.62 ± 0.29	1.42 ± 0.12
น้ำหนัก (มิลลิกรัม/เม็ด)	21.10 ± 1.13	3.90 ± 0.31
ความหนาแน่นรวม (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	793.10 ± 7.76	986.50 ± 8.51

4.3 การศึกษาผลของการตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซาน

ตรึงเอนไซม์ลีแวนซูเครสและอินูโลซูเครสบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและcore-shell ที่อัตราส่วนปริมาตรเอนไซม์ต่อเม็ดโคโตซาน เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อ 1.2 กรัม โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวาง ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์ที่ตรึงบนเม็ดโคโตซานและเอนไซม์ที่เหลือนอกจากการตรึง วัดการทำงานของเอนไซม์โดยวิธี DNS วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้คำนวณการทำงานของเอนไซม์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส $y = 0.01238x$ โดยแกน y แสดงค่าการดูดกลืนแสง และแกน x แสดงปริมาณกลูโคสที่เอนไซม์ปล่อย 1 ไมโครโมลต่อนาที (U) จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึง

การทำงานของเอนไซม์ (Activity)	ลีแวนซูเครส		อินูโลซูเครส	
	ไฮโดรเจล	Core-shell	ไฮโดรเจล	Core-shell
เอนไซม์อิสระ (U/มล.)	102.48 ± 1.73	102.48 ± 0.73	108.50 ± 1.55	108.50 ± 1.55
เอนไซม์ตรึง (U/กรัม)	37.44 ± 5.50	48.12 ± 2.55	45.14 ± 4.32	55.57 ± 6.12
เอนไซม์ตรึง (U/มล.*)	29.69	47.47	35.80	54.82
เอนไซม์ที่เหลือน (U/มล.)	4.61 ± 1.32	8.09 ± 1.13	1.44 ± 0.72	4.17 ± 0.74

*ปริมาตรของเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง ในหน่วยมิลลิลิตร

ตารางที่ 13 แสดงค่าตัวแปรการตรึงเอนไซม์

ตัวแปรการตรึงเอนไซม์ (%)	ลิแวนซูเครส		อินูโลซูเครส	
	ไฮโดรเจล	Core-shell	ไฮโดรเจล	Core-shell
Immobilization yield	95.50	92.11	98.67	96.16
Immobilization efficiency	49.90	66.50	55.00	69.47
Activity recovery	47.65	61.25	54.27	66.80

จากตารางที่ 12 พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell (U/กรัม) มีค่าสูงกว่าการตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล ซึ่งคาดว่าเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลมีความเป็นรูพรุนสูงกว่าทำให้เอนไซม์อาจจะดูดซับเข้าไปข้างในเม็ด ในขณะที่เม็ดโคโตซาน core - shell มีแกนกลางที่แข็งทำให้เอนไซม์เกาะอยู่บริเวณผิวด้านนอกเท่านั้น ไม่สามารถเข้าไปด้านในของเม็ดได้ จึงทำให้การตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell ในหน่วย U/มิลลิลิตร ยังมีค่าสูงกว่าเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล คำนวณจาก ความหนาแน่นรวม (กรัม/มิลลิลิตร) \times ค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึง (U/กรัม) แสดงว่าที่จำนวนหน่วยการทำงานของเอนไซม์ (U) เท่ากัน เครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่งที่ใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะมีขนาดเครื่องปฏิกรณ์ที่เล็กกว่า ทำให้สามารถลดต้นทุนการสร้างเครื่องปฏิกรณ์ลงได้

จากตารางที่ 13 พบว่าค่าร้อยละผลได้การตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลมีค่าสูงกว่าเม็ดโคโตซาน core-shell เล็กน้อย ซึ่งคำนวณจากเอนไซม์ที่เหลือ(U)/เอนไซม์เริ่มต้น(U) แสดงว่าเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลสามารถดูดซับเอนไซม์อิสระไปยังพื้นผิวเม็ดโคโตซานได้ดีกว่า ทำให้เอนไซม์ที่เหลือน้อยกว่า อย่างไรก็ตามต้องพิจารณาค่าประสิทธิภาพการตรึงและค่านำกลับด้วย ซึ่งประสิทธิภาพการตรึงคำนวณจาก เอนไซม์ตรึง(U) / (เอนไซม์เริ่มต้น - เอนไซม์ที่เหลือ) และค่านำกลับคำนวณจาก เอนไซม์ตรึง (U) /เอนไซม์เริ่มต้น (U) พบว่าการตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซาน core - shell ให้ค่าประสิทธิภาพการตรึงและค่านำกลับที่สูงกว่าการตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล ในการตรึงเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด แสดงว่า เอนไซม์ที่ติดที่ผิวตัวพวยแบบ core - shell มีความสามารถในการทำงานได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานข้างต้น

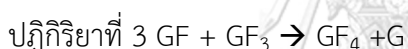
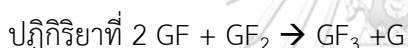
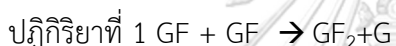
ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การตรึงเอนไซม์อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสบนเม็ดโคโตซาน core - shell ให้ผลดีกว่าการตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล ในส่วนของค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึง ประสิทธิภาพการตรึง และค่านำกลับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนพล และคณะ (2015) ที่ศึกษาการตรึงเอนไซม์อินูโลซูเครสบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core- shell จะได้

ค่าการทำงานของเอนไซม์อินูลูโครสตรงบนเม็ดโคโตซาน core – shell ประมาณ 50 U/กรัม ซึ่งมากกว่าการตรงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลที่ได้ 40 U/กรัม โดยใช้เอนไซม์เริ่มต้น 100 U/มิลลิลิตร

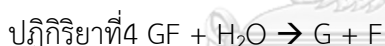
4.4 การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรงบนเม็ดโคโตซาน

การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ตรงบนเม็ดโคโตซาน 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง ป้อนซูโครสเข้าด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินระบบแบบหมุนเวียน ที่ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น 50% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และอุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ศึกษาความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ค่าการเปลี่ยนของซูโครส ค่าร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์หลักและความสามารถในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรง 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง รวมทั้งหมดเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ปฏิกิริยาการเกิดฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากซูโครสกับเอนไซม์ ประกอบด้วย
ทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน

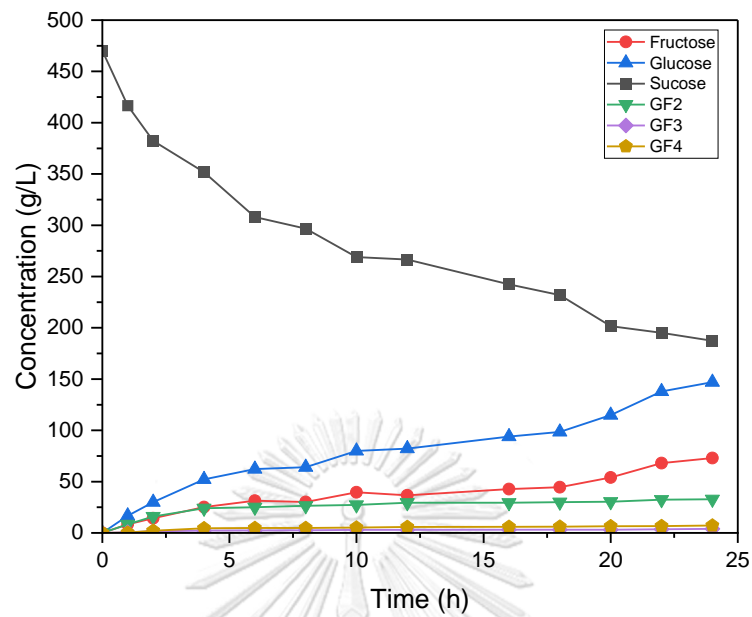


ไฮโดรไลซิส

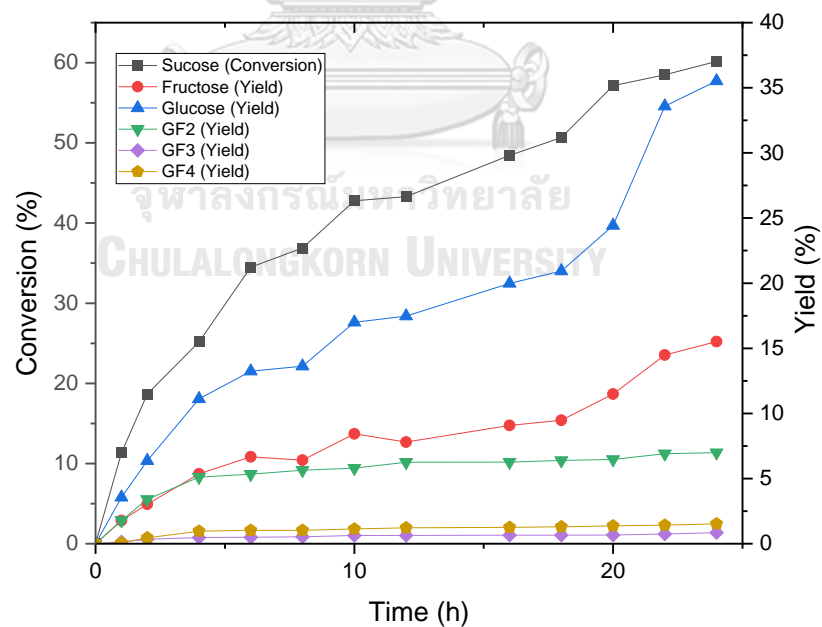


4.4.1 ลิแวนซูโครสตรงบนเม็ดโคโตซานแบบไฮโดรเจล

การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูโครสตรงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 500 U ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง นำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 13.50 กรัม จะได้ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 31 ณ เวลา 4 ชั่วโมงสามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 30.74 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF_2 GF_3 และ GF_4 เท่ากับ 24.02 2.23 และ 4.49 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ช่วงเวลา 0 ถึง 12 ชั่วโมง เกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิส จากปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าปริมาณฟรุกโตสในระบบ เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของกลูโคสและฟรุกโตสที่เพิ่มขึ้นค่อนข้างมาก ช่วงเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง มีการลดลงของซูโครสอย่างต่อเนื่อง แต่ปริมาณผลิตภัณฑ์หลักฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นค่อนข้างช้า เนื่องจากเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสมากกว่าทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน ทำให้ปริมาณฟรุกโตสในระบบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ณ เวลาที่ 24 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 44.06 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF_2 GF_3 และ GF_4 เท่ากับ 32.88 4.00 และ 7.18 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณฟรุกโตส อยู่ที่ 72.93 กรัม/ลิตร

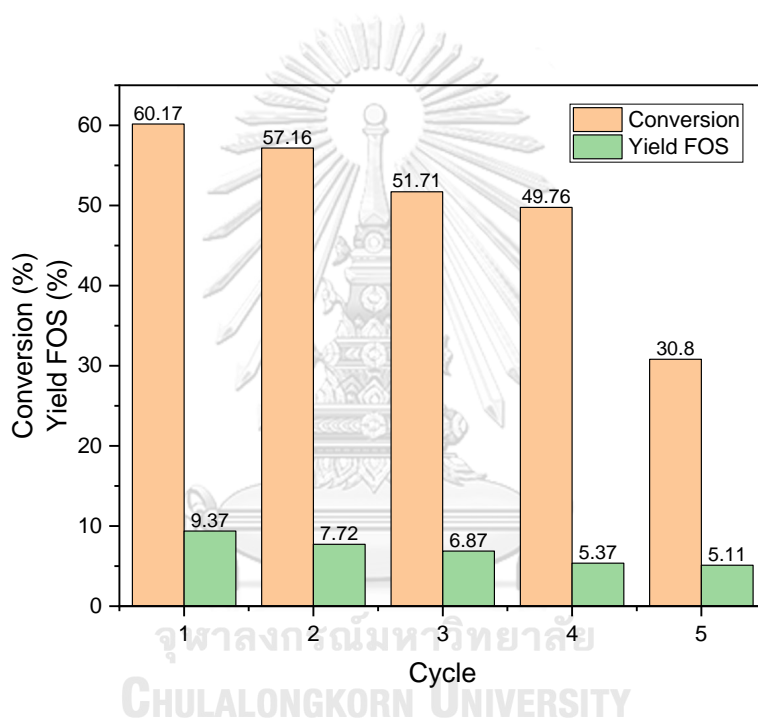


รูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ทีแวนซูเครสตรึงบนเม็ด
ไคโตซานไฮโดรเจล



รูปที่ 32 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ทีแวนซูเครสตรึงบนเม็ด
ไคโตซานไฮโดรเจล

จากการนำลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลมาใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ในการผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ สามารถผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวน ค่าผลได้เฉลี่ยเท่ากับ 8.85 % และค่าการเปลี่ยนซูโครสเฉลี่ยเท่ากับ 49.92 % แนวโน้มของค่าการเปลี่ยนซูโครสลดลงครั้งละ 5.00 14.08 17.30 และ 48.81 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ แนวโน้มของค่าผลได้ลดลงครั้งละ 17.61 26.67 42.69 และ 45.46 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 33 เนื่องจากเอนไซม์มีการเสื่อมสภาพเมื่อถูกใช้งานไปที่ระยะเวลาหนึ่ง ค่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานของสุรวุฒิ และคณะ (2011) ที่ศึกษาการใช้ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 12 ชั่วโมง จะมีค่าร้อยละผลได้ของผลิตภัณฑ์และค่าการเปลี่ยนของซูโครสลดลงในแต่ละครั้ง

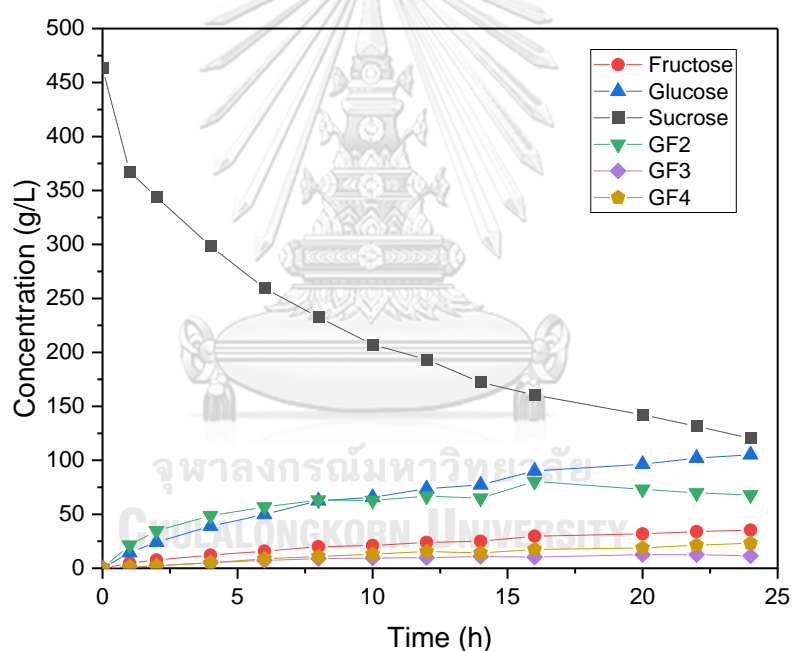


รูปที่ 33 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้สำหรับการใช้ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลซ้ำ 5 ครั้ง

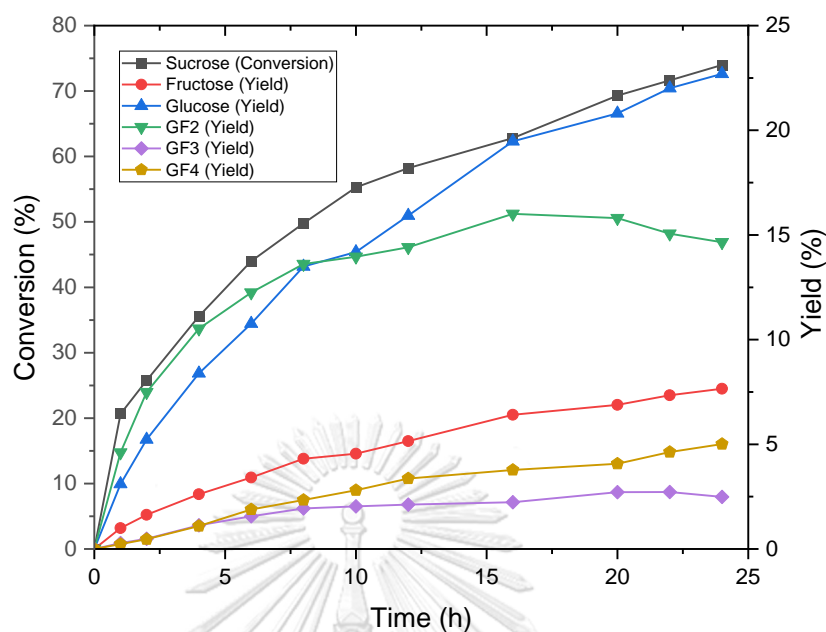
4.4.2 ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

การผลิตฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนจากซูโครสด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา 500 U ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 10.33 กรัม จะได้ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 34 จากกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน ปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นของซูโครสมากทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ 1 มากกว่าและเร็วกว่าปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 จึงทำให้มีปริมาณ GF_2 มากกว่า GF_3 และ GF_4 เมื่อเกิดปฏิกิริยาไประยะเวลาหนึ่งปริมาณ GF_2 และ GF_3 มากขึ้นและซูโครสเหลือน้อยลง ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ 3 และ 4 เร็วขึ้น ทำให้ช่วงเวลาหลัง 6 ชั่วโมงมีปริมาณของ GF_4 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

และมากกว่า GF₃ ณ เวลาที่ 16 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 108.28 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 80.45 10.35 และ 17.47 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นเวลาที่มียปริมาณ GF₂ มากที่สุดในระบบและค่อย ๆ ลดลงหลังจากนั้น เนื่องจากปริมาณซูโครสในระบบซึ่งเป็นสารตั้งต้นเหลือน้อยลง ทำให้การเกิดปฏิกิริยาที่ 1 ช้าลง เกิดปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 เร็วขึ้น ช่วงเวลาที่ 16 ถึง 24 ชั่วโมง ปริมาณ GF₂ เริ่มลดลง แต่อัตราการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์คงที่ จากปริมาณของ GF₃ และ GF₄ ที่เพิ่มขึ้น ณ เวลาที่ 24 ชั่วโมงสามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนได้ 108.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณค่าร้อยละผลได้รวม เท่ากับ 23.37 ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 67.90 15.61 และ 24.60 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซาน core-shell 500 U เกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิสจากปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าฟรุกโตสในระบบ



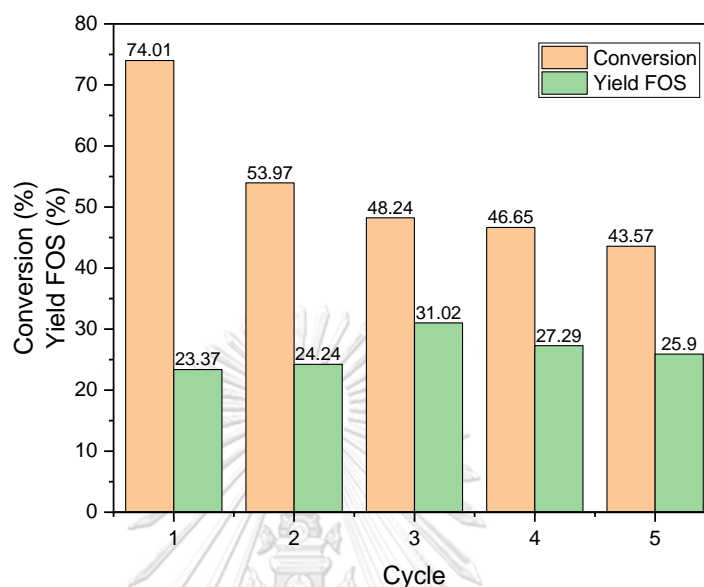
รูปที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของสาร ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซาน core - shell



รูปที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์
ลิแวนซูเครสตรึงบนโคโคโตซาน core – shell

การใช้ลิแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core-shell ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 120 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวน ร้อยละผลได้เฉลี่ยเท่ากับ 26.36 และร้อยละการเปลี่ยนซูโครสเฉลี่ยเท่ากับ 53.29 จากรูปที่ 36 แนวโน้มของร้อยละผลได้เพิ่มขึ้น ซึ่งครั้งที่ 3 มีร้อยละผลได้มากที่สุด 31.02 และมากกว่าการผลิต ครั้งที่ 1 เนื่องจากการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรึง เป็นการเกิดปฏิกิริยาแบบเนื้อผสม มีการถ่ายโอนมวลสารตั้งต้นผิวของเม็ดโคโคโตซานจากการคำนวณมวลรวมของการผลิตครั้งที่ 1 จะมีปริมาณสารในระบบบางส่วนหายไป เมื่อเทียบกับการผลิตโดยใช้เอนไซม์อิสระจะพบว่าปริมาณสารในระบบเท่าเดิม เมื่อทดลองซ้ำครั้งที่ 2 3 4 และ 5 ป้อนสารตั้งต้นเข้าระบบโดยไม่มีการล้าง เอนไซม์ตรึง ปริมาณสารในระบบคงที่ สันนิษฐานว่ามีปริมาณสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์อยู่บนเม็ดของ เอนไซม์ตรึง จึงทำให้ครั้งที่ 1 ปริมาณสารในระบบบางส่วนหายไป ส่วนครั้งที่ 2 3 4 และ 5 ปริมาณ สารเท่าเดิม เนื่องจากตัวเม็ดของเอนไซม์ตรึงมีปริมาณสารจากครั้งที่ 1 เข้าไปแล้ว ทำให้เกิดปฏิกิริยา ดีขึ้น ใช้ปริมาณซูโครสลดลงแต่ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้น แนวโน้มของร้อยละการเปลี่ยนซูโครสลดลงครั้ง ละ 27.06 34.80 36.95 และ 41.12 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ แนวโน้มของร้อยละผลได้เพิ่มขึ้นครั้ง ละ 3.73 32.60 16.77 และ 10.83 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 36 ค่าผลได้เฉลี่ย ผลิตภัณฑ์จากเอนไซม์ลิแวนซูเครส ตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell มีค่าใกล้เคียงกับการเอนไซม์

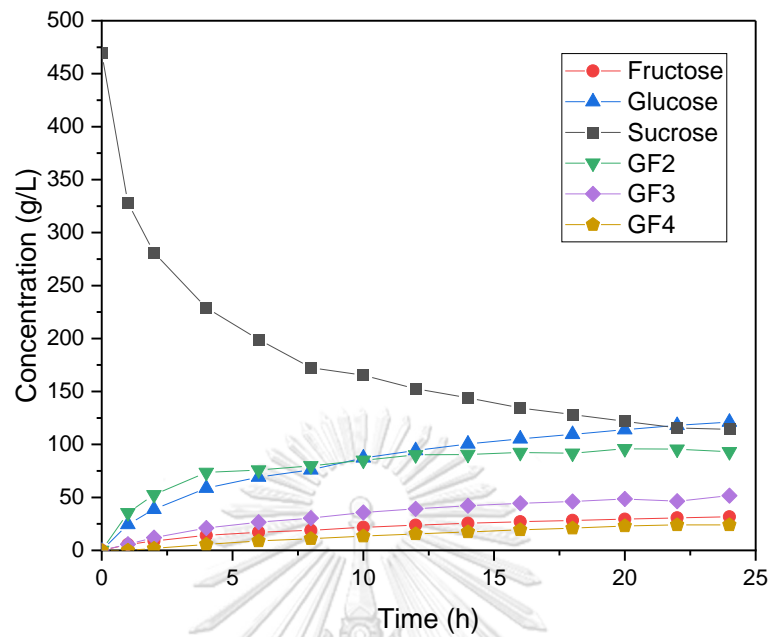
อิสระ การตรึงเอนไซม์ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรต่อและค่ากรด-เบสมากขึ้น เมื่อเวลาใช้งานไปที่ระยะเวลาหนึ่งเอนไซม์อิสระเสื่อมสภาพได้เร็วกว่าการใช้เอนไซม์ตรึง



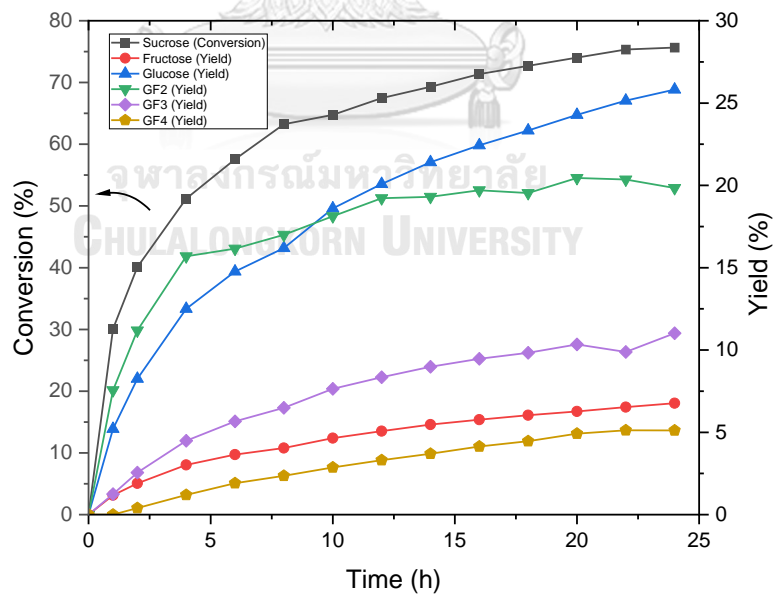
รูปที่ 36 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้สำหรับการใช้
ลิแวนซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซาน core-shell ซ้ำ 5 ครั้ง

4.4.3 อินูโลซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซานไฮโดรเจล

การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินูโลซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซานไฮโดรเจล 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในเครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่ง น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 11.08 กรัม จะให้ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 37 ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 4 ชั่วโมง มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างเร็วและการลดลงของซูโครสในระบบอย่างรวดเร็วจากปฏิกิริยาที่ 1 ที่ 4 ชั่วโมง มีปริมาณ GF_2 เท่ากับ 73.65 กรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณกลูโคสในระบบ เมื่อเวลาผ่านไป ชั่วโมงที่ 4 ถึง 12 ชั่วโมง ปริมาณ GF_2 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ ส่วนปริมาณ GF_3 และ GF_4 เพิ่มขึ้นค่อนข้างเร็ว จากปริมาณ GF_2 ที่สะสมและปริมาณซูโครสที่เหลือน้อยลงในระบบ ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 เร็วขึ้น จึงมีปริมาณ GF_3 และ GF_4 เพิ่มขึ้นค่อนข้างเร็ว ณ เวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลินได้ 168.79 กรัม/ลิตร ซึ่งประกอบด้วย GF_2 GF_3 และ GF_4 เท่ากับ 93.08 51.72 และ 24.00 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การใช้เอนไซม์อินูโลซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซานไฮโดรเจล 500 U เกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิส จากปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าฟรุกโตส การใช้เอนไซม์อินูโลซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคไตซานเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้อยกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูโครสอิสระ

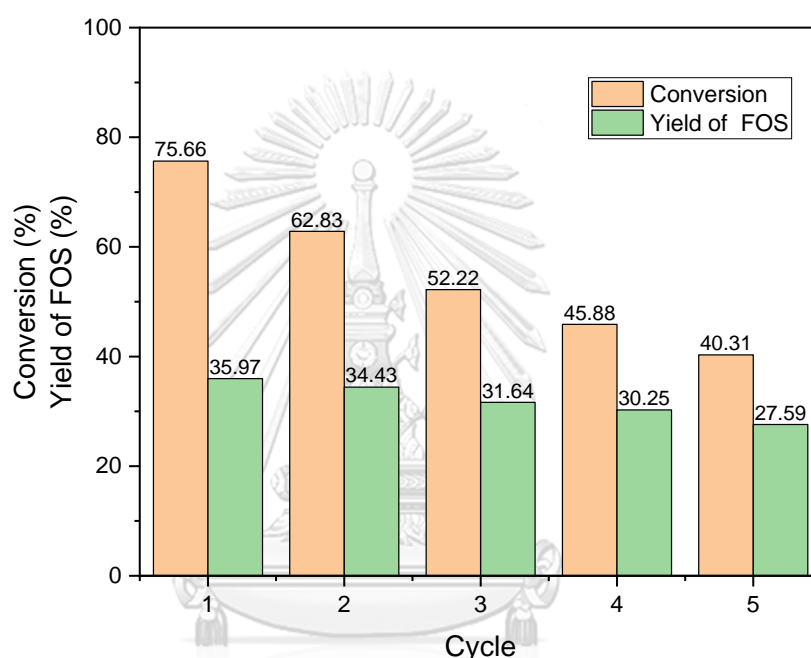


รูปที่ 37 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้น ณ เวลาต่างๆ ของแอนไฮมโกลูโคสรีดิวซ์อินนูลูโครสตรังบนโคโตซานไฮโดรเจล



รูปที่ 38 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของแอนไฮมโกลูโคสรีดิวซ์อินนูลูโครสตรังบนโคโตซานไฮโดรเจล

การใช้อินุโลชูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง เวลาทั้งหมด 120 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินุลิน ร้อยละผลได้เฉลี่ยเท่ากับ 31.98 ร้อยละการเปลี่ยนซูโครสเฉลี่ย 55.38 ซึ่งครั้งที่ 1 มีร้อยละผลได้มากที่สุด 35.97 และร้อยละการเปลี่ยนซูโครส เท่ากับ 75.66 แนวโน้มของค่าการเปลี่ยนซูโครสลดลงครั้งละ 16.96 30.98 39.36 และ 46.72 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ แนวโน้มของค่าผลได้ลดลงครั้งละ 4.28 12.04 15.90 และ 23.30 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 39

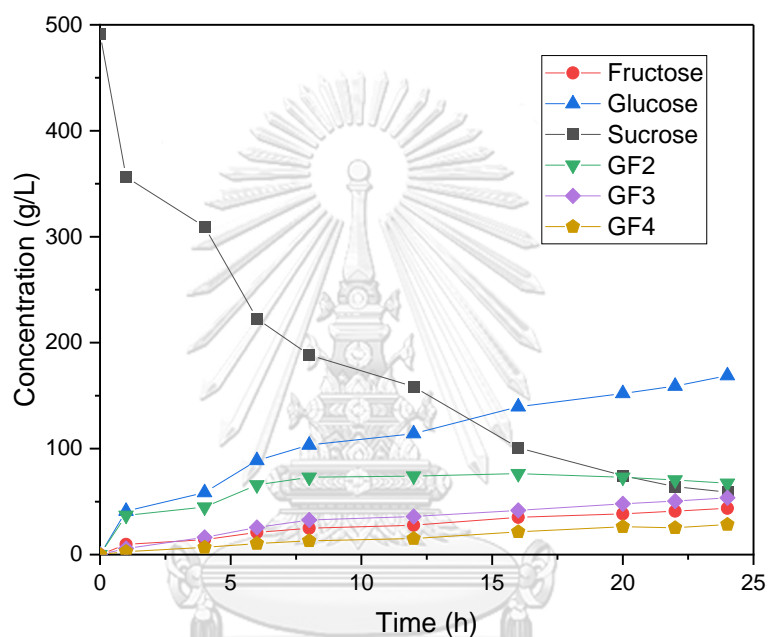


รูปที่ 39 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ รอบต่างๆ สำหรับการใช้ซ้ำอินุโลชูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

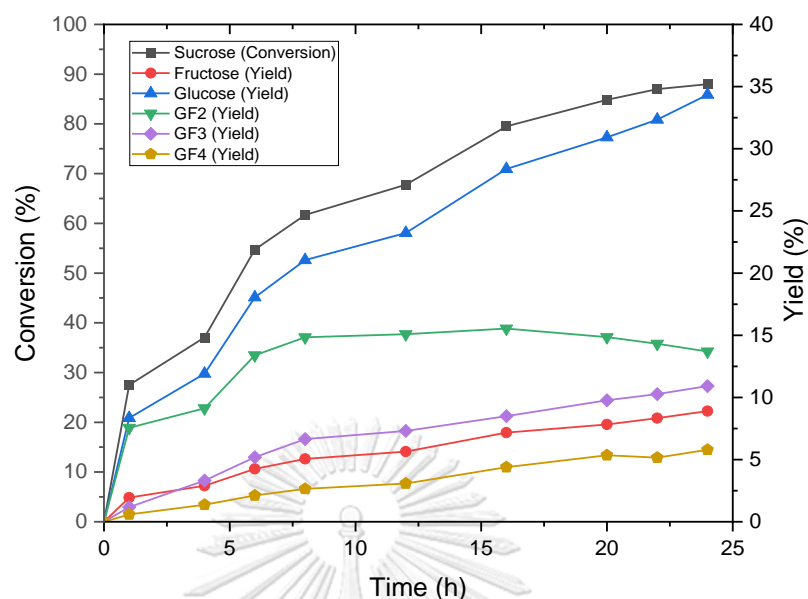
4.4.4 อินุโลชูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell

การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินุลินจากซูโครสโดยใช้อินุโลชูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 500 U เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 10.74 กรัม จะได้ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 40 เวลาที่ 0 ถึง 8 ชั่วโมง อัตราการเกิดปฏิกิริยาก่อนข้างเร็ว เกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 มากกว่า ปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 ณ เวลา 8 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 118.70 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 72.98 32.72 และ 13.00 กรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป ชั่วโมงที่ 8 ถึง 16 ปริมาณ GF₂ เพิ่มขึ้นน้อยลงเมื่อเทียบกับ GF₃ และ GF₄ เนื่องจากซูโครสในระบบเหลือน้อยลง ทำให้ปฏิกิริยาที่ 1 เกิดช้ากว่าปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 ช่วงเวลาที่ 8 ถึง 24 ชั่วโมง ปริมาณ GF₂ ค่อยๆลดลง

แต่ปริมาณฟรุกโตสโกลิโกแซคคาไรด์ยังเพิ่มขึ้น จากปริมาณของ GF₃ GF₄ ที่เพิ่มขึ้น ณ เวลาที่ 24 ชั่วโมงสามารถผลิตฟรุกโตสโกลิโกแซคคาไรด์ได้ 149.48 กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณค่าร้อยละผลได้รวมเท่ากับ 30.00 ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 67.35 53.65 และ 28.48 กรัม/ลิตร ตามลำดับ การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 500 U เกิดกระบวนการทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าไฮโดรไลซิส จากปริมาณฟรุกโตสโกลิโกแซคคาไรด์ที่มากกว่าฟรุกโตสในระบบ

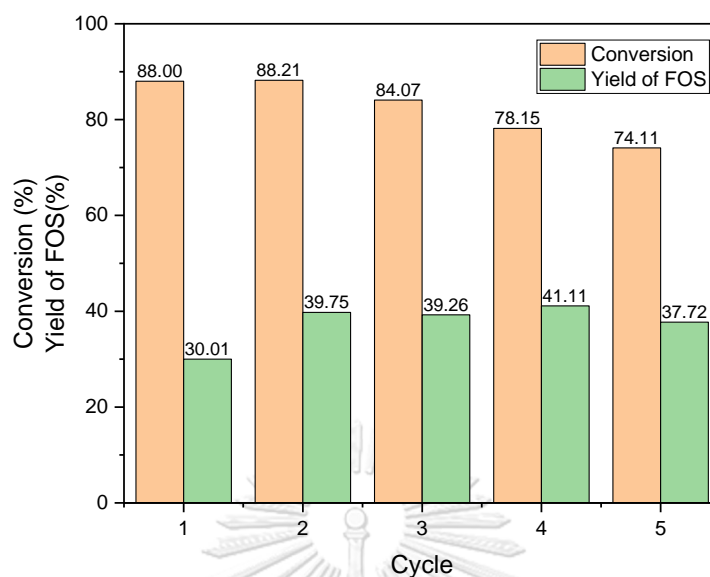


รูปที่ 40 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้น ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนโคโตซาน



รูปที่ 41 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์
อินูโลซูเครสตรึงบนโคโคโตซาน core – shell

การใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core – shell ผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ซ้ำ 5 ครั้ง สามารถผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอินูลิน ร้อยละผลได้เฉลี่ยเท่ากับ 37.57 และร้อยละการเปลี่ยนซูโครสเฉลี่ย 82.51 ซึ่งครั้งที่ 4 มีร้อยละผลได้มากที่สุด 41.11 และร้อยละการเปลี่ยนซูโครสเท่ากับ 84.07 แนวโน้มของค่าผลได้เพิ่มขึ้นครั้งละ 32.45 30.81 36.98 และ 25.69 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 42 เนื่องจากการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรึงเป็นการเกิด ปฏิกิริยาแบบเนื้อผสม มีการถ่ายโอนมวลสารตั้งต้นผิวของเม็ดโคโคโตซานจากการคำนวณมวลรวมของการผลิตครั้งที่ 1 จะมีปริมาณสารในระบบบางส่วนหายไป เมื่อเทียบกับการผลิตโดยใช้เอนไซม์อิสระจะพบว่าปริมาณสารในระบบเท่าเดิม เมื่อทดลองซ้ำครั้งที่ 2 3 4 และ 5 ป้อนสารตั้งต้นเข้าระบบโดยไม่มีการล้างเอนไซม์ตรึง ปริมาณของสารในระบบคงที่ สันนิษฐานว่ามีปริมาณสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ติดอยู่บนเม็ดของเอนไซม์ตรึง จึงทำให้ครั้งที่ 1 มีปริมาณของสารในระบบบางส่วนหายไป แต่ในครั้งที่ 2 3 4 และ 5 ปริมาณของสารในระบบเท่าเดิม เนื่องจากตัวเม็ดของเอนไซม์ตรึงมีปริมาณของสารจากครั้งที่ 1 ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาดีขึ้น ได้ผลิตภัณฑ์มากขึ้นแต่ใช้ปริมาณซูโครสลดลง



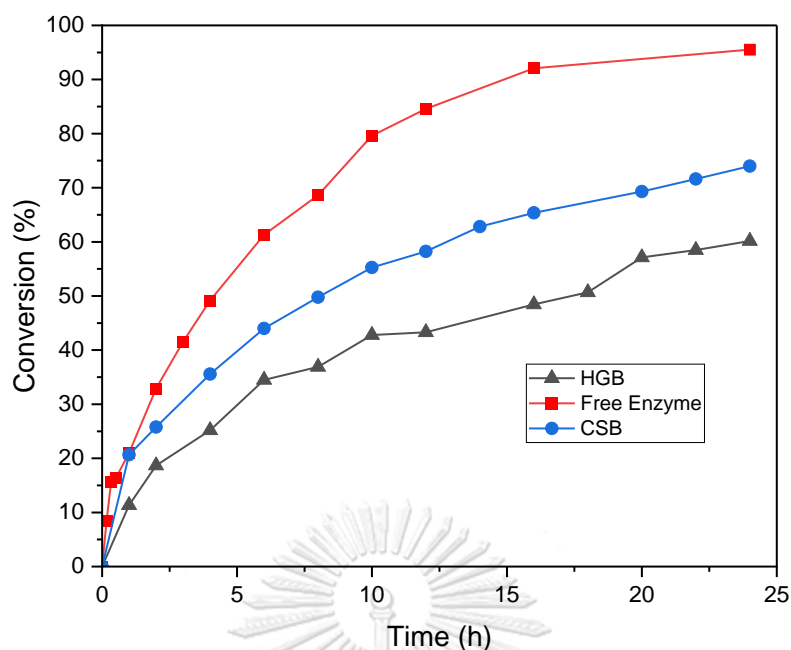
รูปที่ 42 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ รอบต่าง ๆ สำหรับการใช้ซ้ำ

อินุโลชูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

4.4.5 การเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิวานูเครส

4.4.5.1 ร้อยละการเปลี่ยน (% conversion)

จากรูปที่ 39 แสดงร้อยละการเปลี่ยนของซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ในการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิวานด้วยเอนไซม์ลิวานูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell การใช้เอนไซม์อินุโลชูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระจะมีอัตราการเปลี่ยนซูโครสที่เร็วกว่าการใช้เอนไซม์ตรึง เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ตรึงเป็นการเกิดปฏิกิริยาแบบเนื้อผสม (Heterogeneous Reaction) มีการถ่ายเทมวลจากของเหลวไปยังพื้นผิวของเม็ดโคโตซาน ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ช้าลงเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์อิสระที่เป็นการเกิดปฏิกิริยาแบบเนื้อเดียว (Homogenous Reaction) สำหรับความแตกต่างของค่าการเปลี่ยนซูโครสของปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ลิวานูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core-shell พบว่ามีการใช้ลิวานูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าการใช้ลิวานูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell เนื่องจากเม็ดโคโตซาน core-shell มีลักษณะแกนกลางที่แข็งและมีรูพรุนเฉพาะผิวด้านนอก สันนิษฐานว่าเอนไซม์ตรึงอยู่เฉพาะบนพื้นผิวของเม็ด ซึ่งต่างจากเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลที่นุ่ม มีลักษณะคล้ายเจลลี่ อาจทำให้เอนไซม์เข้าไปในเม็ดได้และเมื่อบรรจุลงเครื่องปฏิกรณ์แบบเบตนิ่งเกิดการเสีรูปร่าง ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีจึงเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าและมีค่าการเปลี่ยนซูโครสที่ต่ำกว่าการใช้ลิวานูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

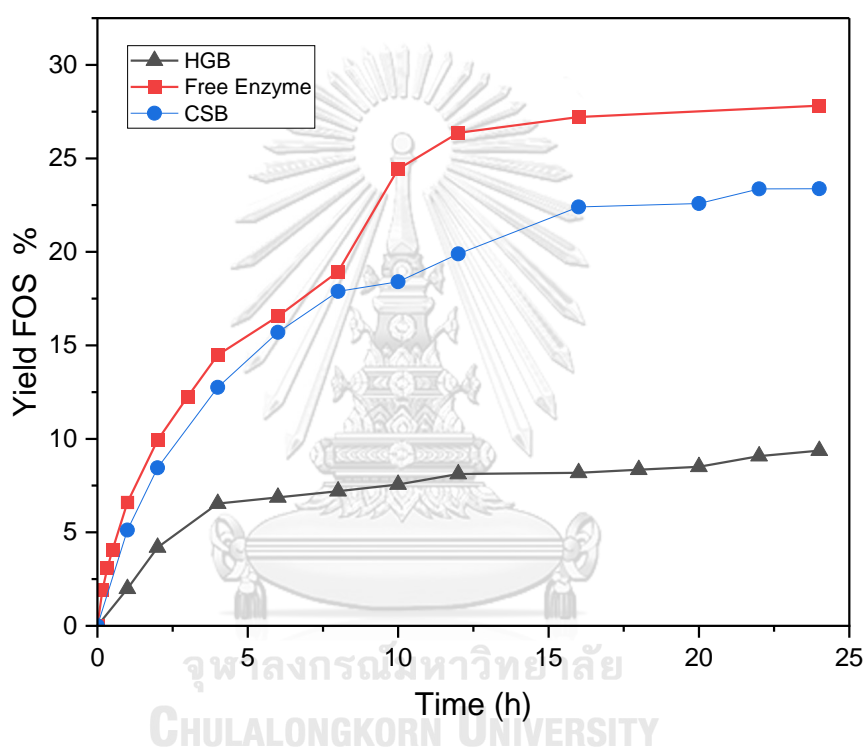


รูปที่ 43 แสดงค่าการเปลี่ยนซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูโครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล (HGB) และเม็ดโคโคซาน core – shell (CSB)
4.4.5.2 ร้อยละผลได้ (% yield)

การใช้เอนไซม์ลิแวนซูโครสอิสระจะผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนที่มี DP มากกว่า 5 เกิดขึ้นด้วย ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GF₂ GF₃ GF₄ และ GF₅₊ ต่างจากการใช้เอนไซม์ตรึงจะได้ GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่านั้น จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบผลิตภัณฑ์เบื้องต้นด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ในรูปที่ 21 คาดการณ์ว่าการใช้เอนไซม์อิสระเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า ทำให้เกิดทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันได้เร็วกว่าและจึงเกิดผลิตภัณฑ์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ขนาดใหญ่กว่า ดังนั้นค่าผลได้ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่แสดงในรูปที่ 44 ของเอนไซม์ลิแวนซูโครสอิสระ (Free Enzyme) จะเป็นผลรวมของ GF₂ GF₃ GF₄ และ GF₅₊ มีค่าเท่ากับ 27.82 % ซึ่งมากกว่าการใช้เอนไซม์ตรึง และเมื่อพิจารณาการใช้ลิแวนซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลและ core - shell ครั้งที่ 1 เปรียบเทียบกันพบว่า การตรึงลิแวนซูโครสบนเม็ดโคโคซาน core - shell จะผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ปริมาณมากกว่าการตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล เนื่องจากเม็ดโคโคซาน core - shell มีลักษณะเป็นแกนแข็งซึ่งต่างจากเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลที่นิ่ม คาดการณ์ว่าเม็ดโคโคซาน core - shell เอนไซม์ไม่สามารถดูดซึมเข้าไปภายในเม็ดได้ ทำให้เกิดปฏิกิริยาเฉพาะบริเวณที่ผิวของเม็ดโคโคซาน การตรึงบนเม็ดโคโคซาน core - shell จึงเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายกว่าและเร็วกว่าการตรึงเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลที่อาจจะมีเอนไซม์เข้าไปในเม็ด ที่เวลา 24 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์ลิแวนซูโครสตรึงบนเม็ดโคโคซาน core

- shell มีร้อยละผลได้ 23.37 ในขณะที่ใช้เอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลมีร้อยละผลได้เท่ากับ 9.37

การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถดูได้จากปริมาณฟรุกโตสที่เกิดขึ้นในระบบ การใช้เอนไซม์ลีแวนซูเครสอิสระจะเกิดไฮโดรไลซิส 20% ซึ่งมากกว่าการใช้เอนไซม์ตรึง คาดการณ์ว่าเอนไซม์อิสระเกิดปฏิกิริยาก่อนข้างเร็ว จึงทำให้เกิดไฮโดรไลซิสมากตามไปด้วยและเมื่อพิจารณาระหว่างการตรึงลีแวนซูเครสบนไฮโดรเจลจะเกิดไฮโดรไลซิสมากกว่าการตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

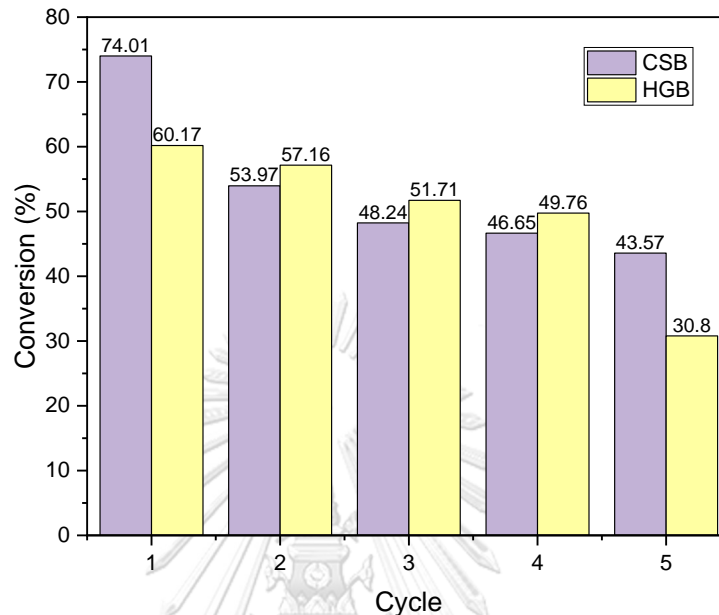


รูปที่ 44 แสดงค่าผลได้ฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ลีแวนซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และ core - shell (CSB)

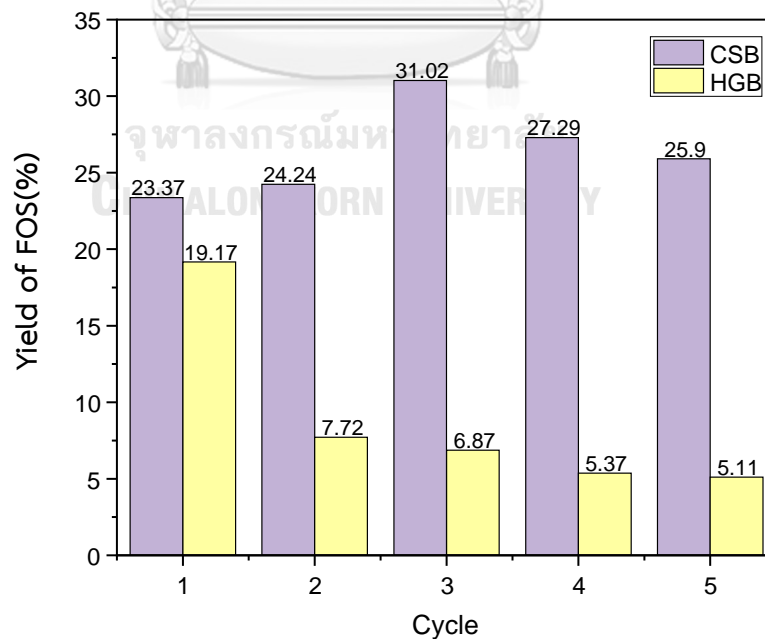
4.4.5.3 ความเสถียร

สำหรับความเสถียรของลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core - shell พบว่าเมื่อนำเอนไซม์ตรึงมาใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง เอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell และเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล จะมีค่าการเปลี่ยนซูโครสลดลงในแนวนอนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งต่างกับค่าผลได้ของเอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell ที่มีแนวนอนเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดกับการตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลที่มีแนวนอนลดลง แสดงดังรูปที่ 45 และ 46 ซึ่งคาดว่าเกิด

จากเม็ดโคโคซานไฮโดรเจลมีลักษณะเป็นเจลลีนิ่มและเกิดการเสียรูปง่าย เมื่อนำไปใช้ซ้ำทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงและเสื่อมสภาพเร็วกว่าเม็ดโคโคซาน core-shell



รูปที่ 45 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสของการลิแวนซูโครสตรังบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล (HGB) และตรังบนเม็ดโคโคซาน core - shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง



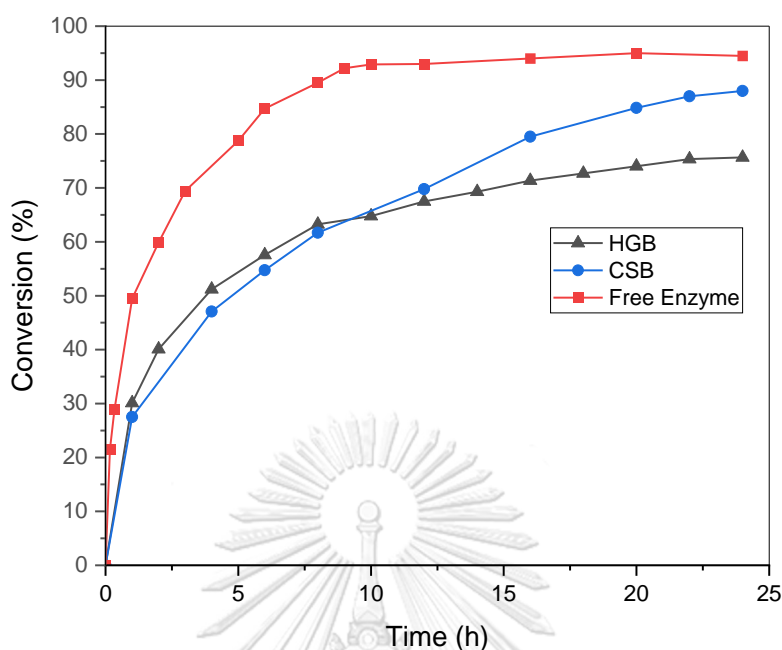
รูปที่ 46 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ลิแวนซูโครสตรังบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล (HGB) และตรังบนเม็ดโคโคซาน core - shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง

ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพโดยรวมของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรงบนเม็ดโคโตซานจะพบว่าตรงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซาน core - shell มีประสิทธิภาพสูงกว่าทั้งในด้านของค่าการเปลี่ยนซูโครส เสถียรภาพ และค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้อยกว่าการใช้ลีแวนซูเครสตรงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและเอนไซม์ลีแวนซูเครสอิสระ อีกทั้งการใช้ซ้ำของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรงบนเม็ดโคโตซาน core - shell มีค่าผลได้เฉลี่ย 5 ครั้งของผลิตภัณฑ์หลักใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์อิสระลีแวนซูเครสมาก สามารถนำมาใช้แทนเอนไซม์ลีแวนซูเครสอิสระได้

4.4.6 การเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครส

4.4.6.1 ร้อยละการเปลี่ยน (% conversion)

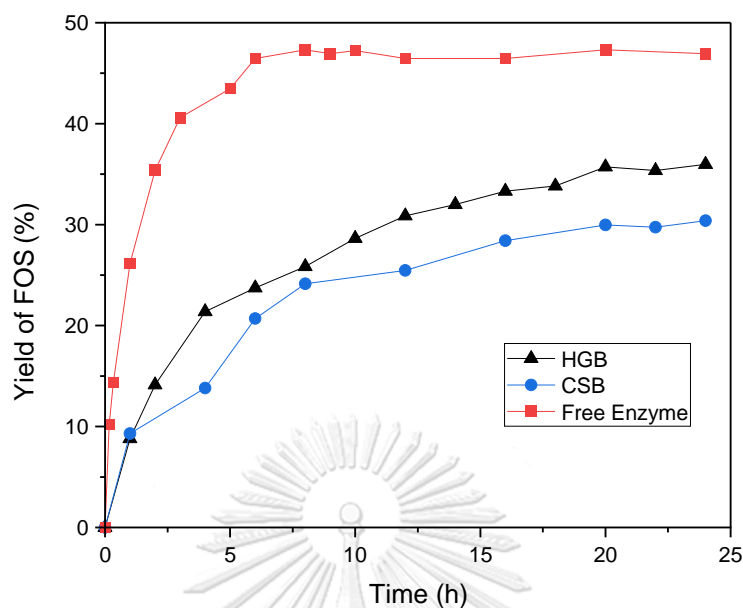
จากรูปที่ 47 แสดงค่าการเปลี่ยนของซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core - shell มีความแตกต่างกัน โดยการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระจะมีอัตราการเปลี่ยนซูโครสที่เร็วกว่าการใช้เอนไซม์แบบตรง เนื่องจากเกิดการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์แบบตรง เป็นการเกิดปฏิกิริยาแบบเนื้อผสม (Heterogeneous Reaction) มีการถ่ายเทมวลจากของเหลวไปยังพื้นผิวของเม็ดโคโตซาน ทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ช้าลงเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์อิสระที่เป็นการเกิดปฏิกิริยาแบบเนื้อเดียว (Homogenous Reaction) สำหรับความแตกต่างของค่าการเปลี่ยนซูโครสของปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสตรงบนไฮโดรเจลและ core - shell พบว่ามีความใกล้เคียงกัน โดยที่การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสที่ตรงบนไฮโดรเจลจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาในช่วงแรกสูงกว่าการใช้อินูโลซูเครสที่ตรงบน core - shell แต่การเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มช้าลงในตอนท้าย ทำให้ที่เวลา 24 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสที่ตรงบนไฮโดรเจล มีค่าการเปลี่ยนซูโครสที่ต่ำกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสที่ตรงบน core-shell เล็กน้อย



รูปที่ 47 แสดงค่าการเปลี่ยนซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล (HGB) และเม็ดโคโคซาน core – shell (CSB)

4.4.6.2 ร้อยละผลได้ (% yield)

จากรูปที่ 48 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตอลิโกแซคคาไรด์ที่เวลาต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล และ core-shell ครั้งที่ 1 การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสในรูปแบบเอนไซม์ตรึงทั้งสองชนิดจะมีค่าร้อยละผลได้ที่ต่ำกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ สำหรับร้อยละผลได้ของปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนไฮโดรเจลและcore-shell พบว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสที่ตรึงบน core-shell จะผลิตฟรุกโตอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่ำกว่าการใช้อินูโลซูเครสตรึงบนไฮโดรเจลเล็กน้อยในครั้งที่ 1 แต่จะมากกว่าในครั้งที่ 2 ถึง 5 โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสที่ตรึงบน core - shell มีค่าร้อยละผลได้ 29.1 ในขณะที่การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสที่ตรึงบนไฮโดรเจลมีค่าร้อยละผลได้ 33.8 ซึ่งต่างกันเพียงเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากปริมาณฟรุกโตสในระบบของเอนไซม์อินูโลซูเครส ในรูปแบบการใช้เอนไซม์ที่ต่างกัน พิจารณาที่เอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงจะมีการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ใกล้เคียงกันประมาณ 7.5 ถึง 10 % ซึ่งน้อยกว่าเอนไซม์ลิแวนซูเครส

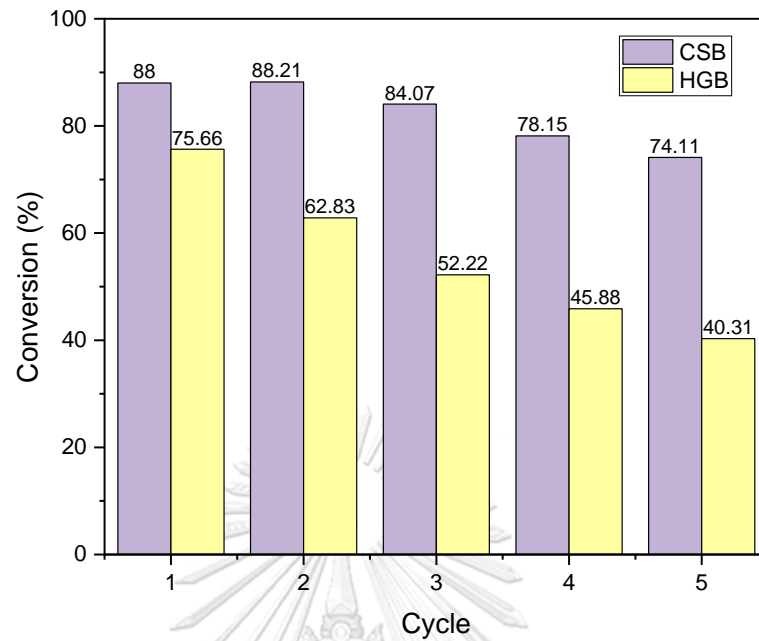


รูปที่ 48 แสดงค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์หลักที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้เอนไซม์อิสระ (Free Enzyme) ตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล (HGB) และเม็ดโคโตซาน core - shell (CSB)

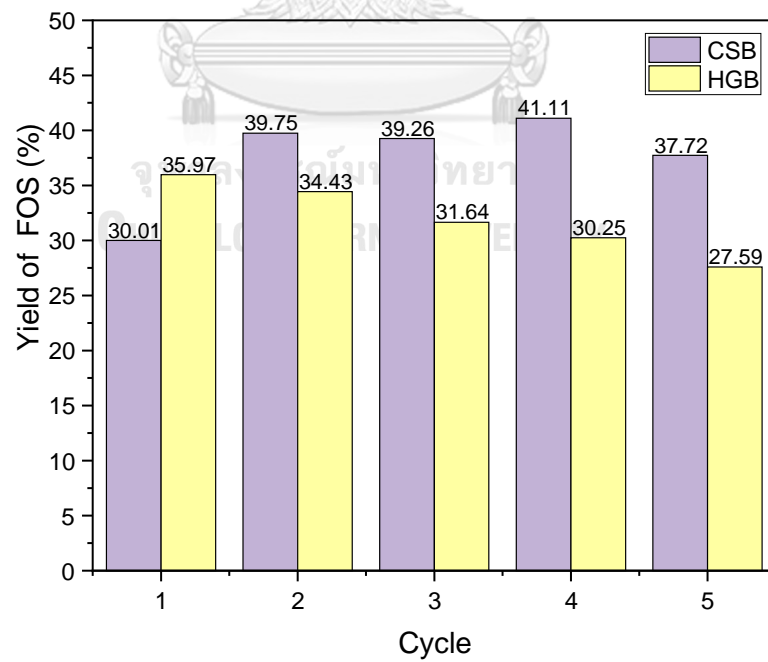
4.4.6.3 ความเสถียร

สำหรับความเสถียรของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตฟรุกตออลิโกแซคคาไรด์ พบว่าเมื่อนำเอนไซม์ตรึงมาใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการล้างเอนไซม์ตรึง การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล ค่าการเปลี่ยนแปลงและค่าผลได้จะมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell มีการลดลงของค่าการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และค่าผลได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงในรูปที่ 49 และ 50 ซึ่งคาดว่าเกิดจากเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลมีลักษณะเป็นเจลลีนุ่มและเกิดการเสียรูปง่าย เมื่อนำไปใช้ซ้ำทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงและเสื่อมสภาพเร็วกว่าเม็ดโคโตซาน core - shell

ดังนั้นเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพโดยรวมของเอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซานจะเห็นได้ว่าการตรึงเอนไซม์อินูโลซูเครสบนเม็ดโคโตซาน core - shell มีประสิทธิภาพสูงกว่าทั้งในด้านของค่าการเปลี่ยนแปลงซูโครส เสถียรภาพและค่าผลได้ สำหรับค่าผลได้นั้น ถึงแม้จะมีค่าผลได้ต่ำกว่าการตรึงเอนไซม์อินูโลซูเครสบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลในครั้งแรก แต่ในครั้งที่ 2 ถึง 5 มีค่าผลได้ที่สูงกว่าทั้ง 4 ครั้งและมีค่าผลได้เฉลี่ยที่มากกว่า การใช้ซ้ำของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานบนไฮโดรเจลและ core - shell มีค่าผลได้เฉลี่ย 5 ครั้งของผลิตภัณฑ์หลักใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์อิสระอินูโลซูเครส สามารถนำมาใช้แทนเอนไซม์อิสระได้



รูปที่ 49 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสของการใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล (HGB) และตรึงบนเม็ดโคโคซาน core – shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง



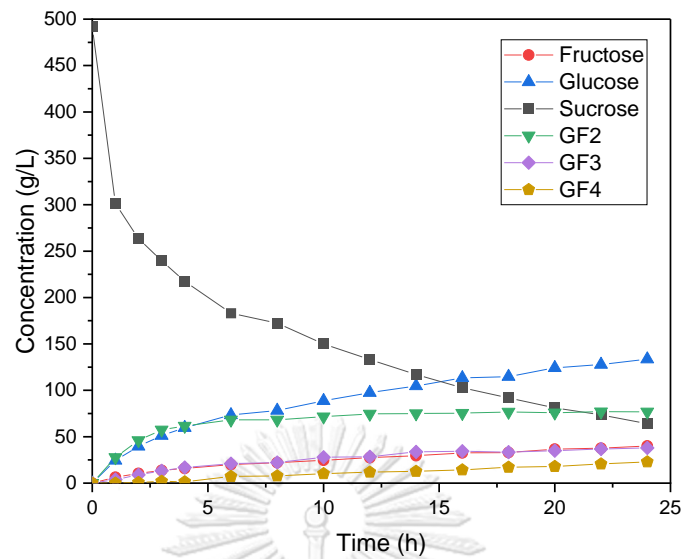
รูปที่ 50 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคซานไฮโดรเจล (HGB) และตรึงบนเม็ดโคโคซาน core – shell (CSB) ซ้ำ 5 ครั้ง

4.5 การผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน

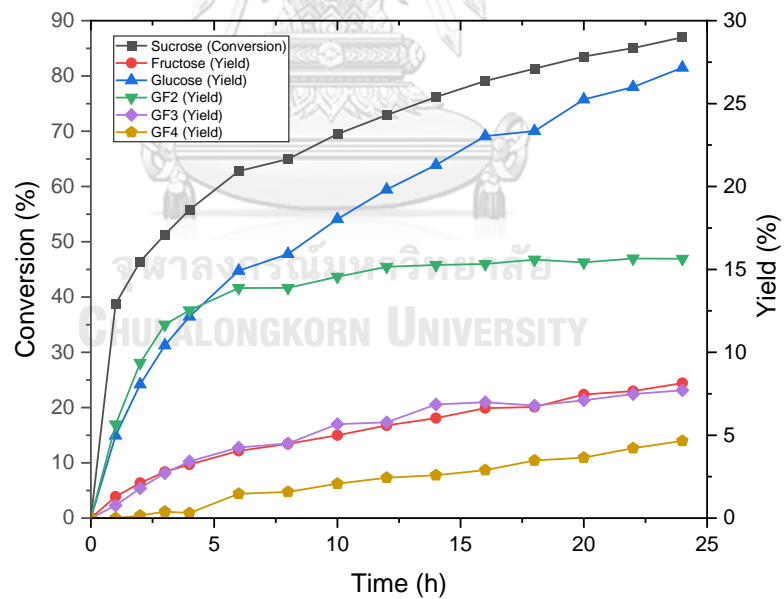
จากการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรีกลีแวนซูเครสและอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core - shell ให้ค่าผลได้ของฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์และค่าการเปลี่ยนซูโครสสูงกว่าการตรึงบนเม็ดโคโคโตซานไฮโดรเจล ดังนั้นจึงเลือกตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโคโตซาน core -shell สำหรับเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งที่อินูโลซูเครสต่ออนุกรมกับลีแวนซูเครส

การผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกัน โดยเครื่องปฏิกรณ์ที่ 1 บรรจุเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core - shell 250 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 5.85 กรัม ต่ออนุกรมกับเครื่องปฏิกรณ์ที่ 2 บรรจุเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโคโตซาน core - shell 250 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 7.42 กรัม ค่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด 500 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งหมด เท่ากับ 13.27 กรัม การผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบต่ออนุกรมกันโดยใช้อินูโลซูเครสและลีแวนซูเครส สามารถผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังแสดงในรูปที่ 51 ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง มีการเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างเร็ว โดยปฏิกิริยาที่ 1 มากกว่าปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 สามารถผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 96.37 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 68.23 20.94 และ 7.20 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งคำนวณร้อยละผลได้เท่ากับ 19.59 ช่วงเวลาที่ 6 ถึง 24 ชั่วโมง อัตราการเกิดปฏิกิริยาค่อย ๆ ช้าลง เนื่องจากสารตั้งต้นซูโครสเหลือน้อยลง ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 ช้ากว่าปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 ปริมาณ GF₂ ในระบบจึงเริ่มคงที่ ณ เวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 137.72 กรัม/ลิตร ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่ากับ 76.91 37.93 และ 22.89 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

การใช้เอนไซม์ลีแวนซูเครสจะเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสมากกว่าเอนไซม์อินูโลซูเครส และเมื่อใช้เอนไซม์ผสมจะเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสน้อยกว่าลีแวนซูเครส แต่คงยังมากกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครส สามารถดูได้จากปริมาณของฟรุทโตสที่เกิดขึ้นในระบบ จะสรุปได้ว่า การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ลีแวนซูเครส > เอนไซม์ผสม > เอนไซม์อินูโลซูเครส

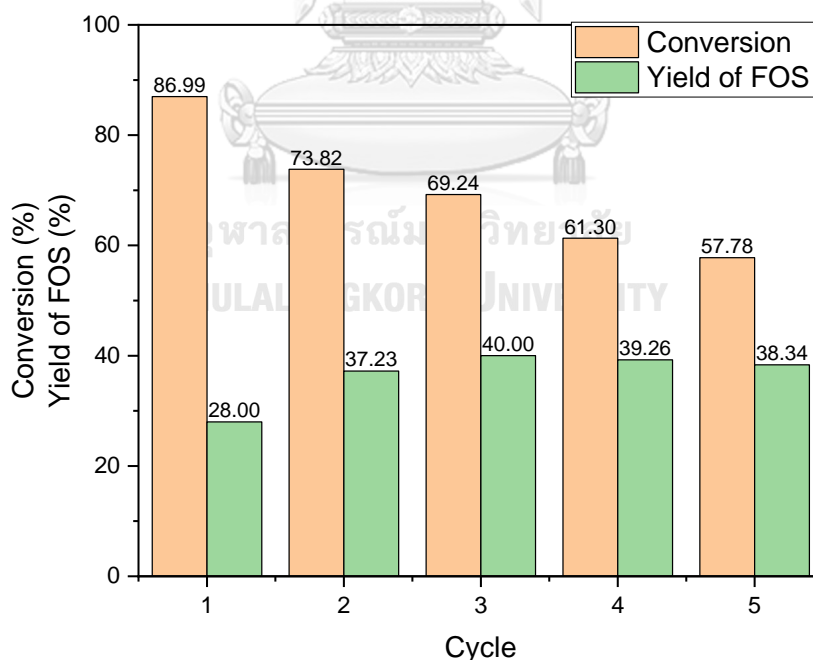


รูปที่ 51 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้น ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสตรังบนโคโตะซาน core-shell ต่ออนุกรมกัน



รูปที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ร้อยละการเปลี่ยนและร้อยละผลได้ ณ เวลาต่างๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสและลิแวนซูเครสตรังบนโคโตะซาน core-shell ต่ออนุกรมกัน

การใช้อินโนโลซูเครสและลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานในการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง รวมทั้งหมด 120 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ร้อยละผลได้เฉลี่ยเท่ากับ 36.6 และร้อยละการเปลี่ยนซูโครสเฉลี่ยเท่ากับ 69.8 โดยครั้งที่ 3 มีร้อยละผลได้มากที่สุด 40.0 และร้อยละการเปลี่ยนซูโครสเท่ากับ 69.24 แนวน้มน้ของค่าการเปลี่ยนซูโครสลดลงครั้งละ 15.13 20.40 29.53 และ 33.58 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ แนวน้มน้ของค่าผลได้เพิ่มขึ้นครั้งละ 32.96 9.91 2.64 และ 3.29 % จากครั้งที่ 1 ตามลำดับ แสดงในรูปที่ 53 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้า การผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ตรึงบน core – shell ค่าผลได้จะมีแนวน้มน้เพิ่มขึ้นแต่ค่าการเปลี่ยนซูโครสมิแนวน้มน้ลดลงเล็กน้อย การใช้เอนไซม์ผสมในการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นการพัฒนากระบวนการผลิต ซึ่งให้ร้อยละผลได้เฉลี่ยของผลิตภัณฑ์หลักเพิ่มขึ้นจากเดิม 38.84 % ที่ใช้เอนไซม์ลีแวนซูเครสอย่างเดียวและเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้อยกว่า การใช้เอนไซม์ลีแวนซูเครสอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กรัณท์และคณะ (2022) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนโดยการเติม GF_2 และ GF_3 ลงในปฏิกิริยา จากการศึกษาพบว่า การเติม GF_2 และ GF_3 ลงในปฏิกิริยาทำให้ผลิตภัณฑ์ฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลีแวนเพิ่มขึ้น

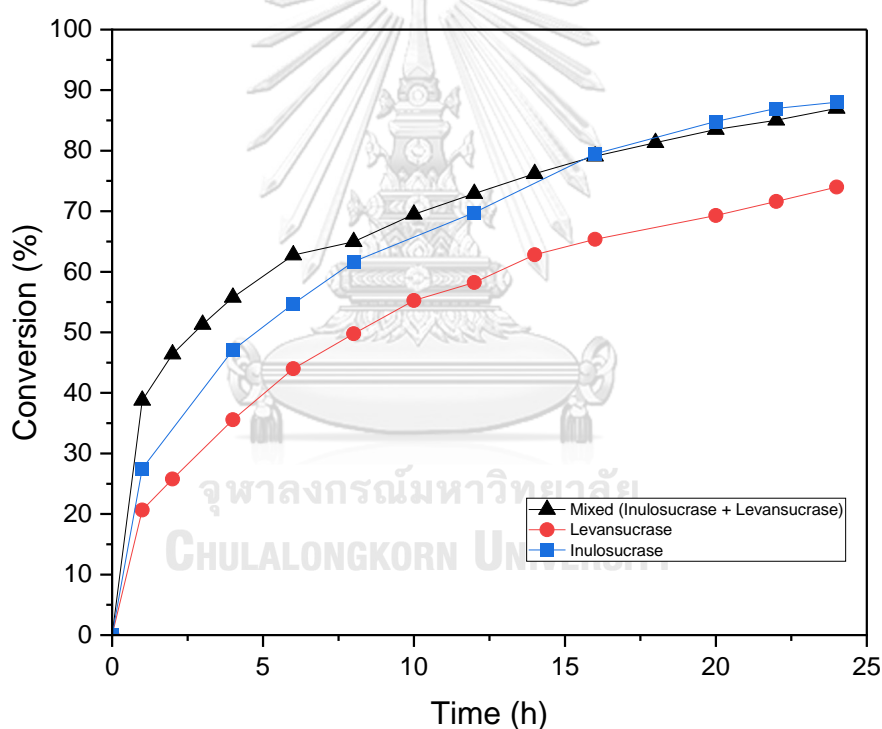


รูปที่ 53 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสและร้อยละผลได้ของฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่รอบต่าง ๆ ณ เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการใช้อินโนโลซูเครสและลีแวนซูเครสตรึงบน core-shell ซ้ำ 5 ครั้ง

4.5.1 การเปรียบเทียบระหว่างการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งแบบใช้เอนไซม์ชนิดเดียวและเอนไซม์ผสมต่ออนุกรมกัน

4.5.1.1 ร้อยละการเปลี่ยน (% conversion)

เมื่อเปรียบเทียบค่าการเปลี่ยนของซูโครสที่เวลาต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ ลีแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell ดังแสดงในรูปที่ 54 พบว่า ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 14 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์ผสมจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าการใช้เอนไซม์เดี่ยว แต่เมื่อเวลาผ่านไปอัตราเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ผสมใกล้เคียงกับเอนไซม์อินูโลซูเครส ที่เวลา 24 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell มีค่าการเปลี่ยนซูโครสใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสและมากกว่าการใช้ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell



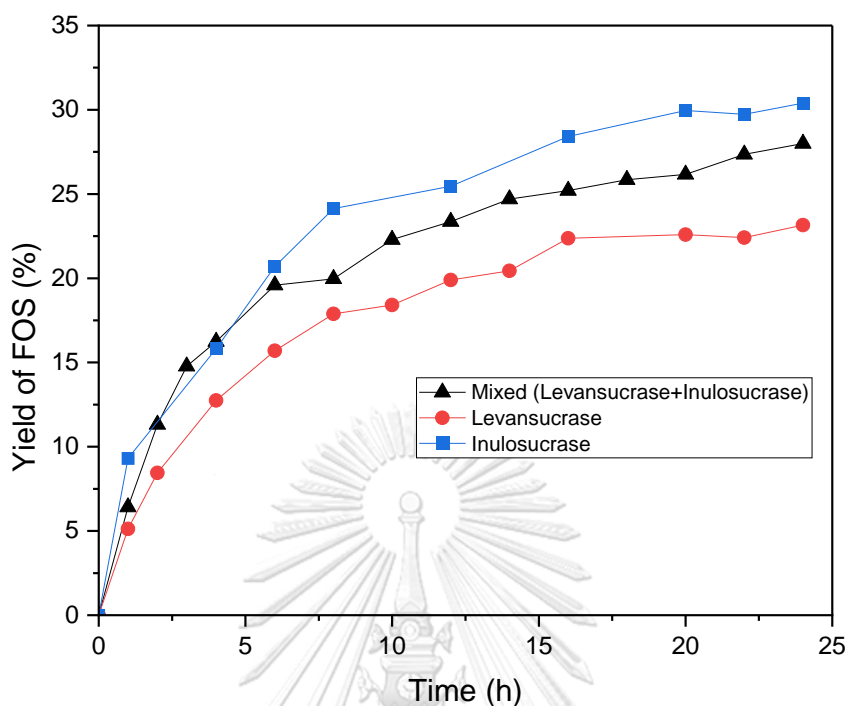
รูปที่ 54 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสที่เวลาต่าง ๆ จากเอนไซม์ลีแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell ครั้งที่ 1

4.5.1.2 ร้อยละผลได้ (% yield)

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลได้ของฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เวลาต่าง ๆ ในการผลิตโดยใช้ เอนไซม์ลิวานซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรีงบนเม็ดโคโตซาน core – shell ครั้งที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 55 พบว่าการใช้เอนไซม์ผสมตรีงบนเม็ดโคโตซาน core – shell มีร้อยละผลได้สูงกว่า การใช้ลิวานซูเครสตรีงบนเม็ดโคโตซาน core – shell ที่เวลา 24 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์ลิวานซูเครสมีร้อยละผลได้ เท่ากับ 23.37 ในขณะที่ใช้เอนไซม์ผสมมีร้อยละผลได้ 30.01 ซึ่งเพิ่มขึ้น 28.41 % ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของกรัณท์ และคณะ (2022) ที่ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิวานด้วยการใช้เอนไซม์ผสมระหว่างอินูโลซูเครสและลิวานซูเครส จากการศึกษาพบว่าการใช้เอนไซม์ผสมลงในปฏิกิริยาทำให้ผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิวานได้มากขึ้น

การใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี GF₂ GF₃ และ GF₄ เป็นหลัก ซึ่งต่างจากลิวานซูเครสที่ผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ DP GF₅₊ ด้วย และเมื่อใช้เอนไซม์อินูโลซูเครสผสมกับลิวานซูเครสจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ DP ที่สั้นกว่าใช้ลิวานซูเครสอย่างเดียว สามารถดูได้จากรูปที่ 21 แสดงผลโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์จากเอนไซม์ลิวานซูเครสและอินูโลซูเครสด้วยการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง

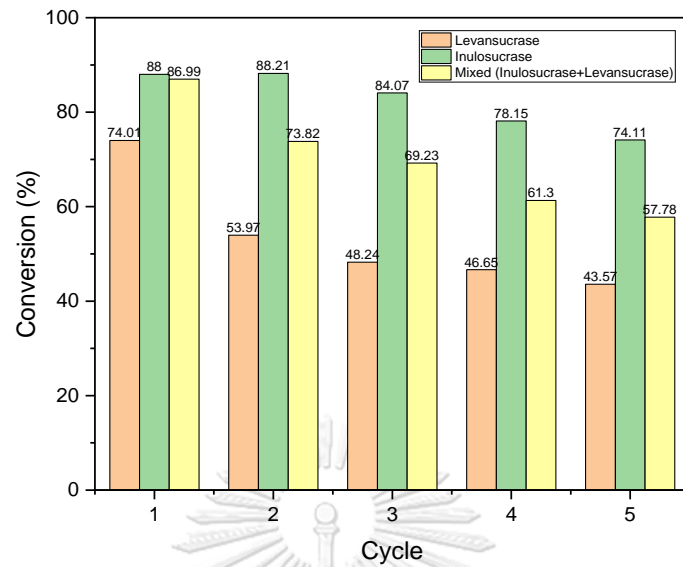
เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการเปลี่ยนซูโครสของเอนไซม์ผสมกับเอนไซม์อินูโลซูเครสพบว่า มีค่าใกล้เคียงกันมาก แต่ค่าร้อยละผลได้ฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์มีความแตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์ผสมเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสมากกว่าเอนไซม์อินูโลซูเครส จึงทำให้ร้อยละผลได้มีค่าน้อยกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครส



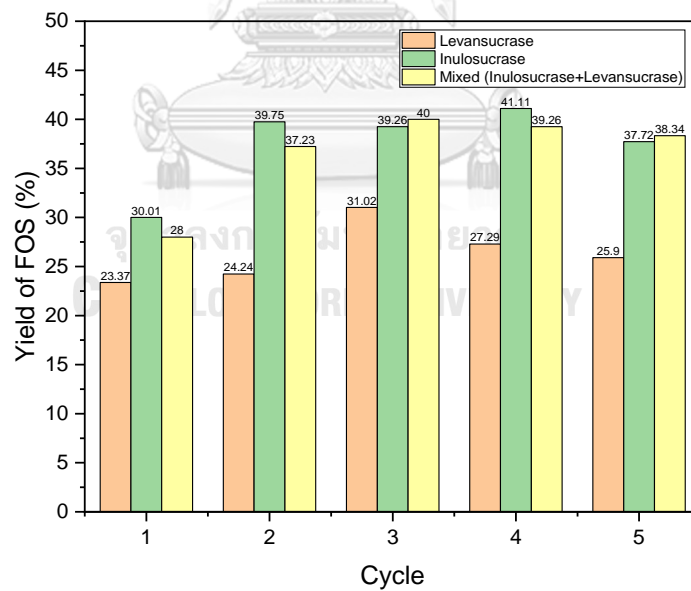
รูปที่ 55 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่เวลาต่าง ๆ จากเอนไซม์ลีแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell ครั้งที่ 1

4.5.1.3 ความเสถียร

สำหรับความเสถียรของเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงและค่าผลได้ทั้ง 5 ครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 56 และ 57 มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกับเอนไซม์เดี่ยวทั้งสองแบบ โดยค่าการเปลี่ยนแปลงจะลดลงในแต่ละครั้ง ในขณะที่ค่าผลได้จะสูงขึ้นเล็กน้อยในครั้งที่ 2 และ 3 เนื่องจากการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซานซ้ำนั้น ไม่มีการล้างเอนไซม์ตรึงก่อนนำมาใช้ซ้ำ สันนิษฐานว่ามีการดูดซึมของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์บริเวณที่ผิวของเม็ดโคโตซาน จากปริมาณสารรวมของระบบที่หายในการทดลองครั้งที่ 1 จึงทำให้การผลิตฟรุคโตโอลิโก-แซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ตรึงซ้ำในครั้งที่ 2 3 4 มีค่าผลได้ที่เพิ่มขึ้นจากครั้งที่ 1 ถึงแม้ว่าค่าการเปลี่ยนแปลงจะลดลงจากครั้งที่ 1 ก็ตาม แต่เมื่อใช้ซ้ำจนครั้งที่ 5 ค่าผลได้เริ่มลดลงเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ตรึงมีค่าลดลง จากการที่ใช้ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง การทำงานของเอนไซม์ก็มีค่าลดลงตามเวลา



รูปที่ 56 แสดงร้อยละการเปลี่ยนซูโครสโดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคซาน core - shell ซ้ำ 5 ครั้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง

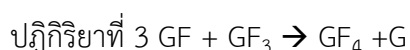
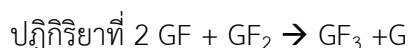
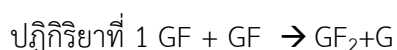


รูปที่ 57 แสดงร้อยละผลได้ของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ลิแวนซูเครส อินูโลซูเครสและเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคซาน core - shell ซ้ำ 5 ครั้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง

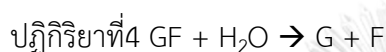
4.6 การหาค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง

จากการหาค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระ ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม จะได้กลไกการเกิดปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

ทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน



ไฮโดรไลซิส



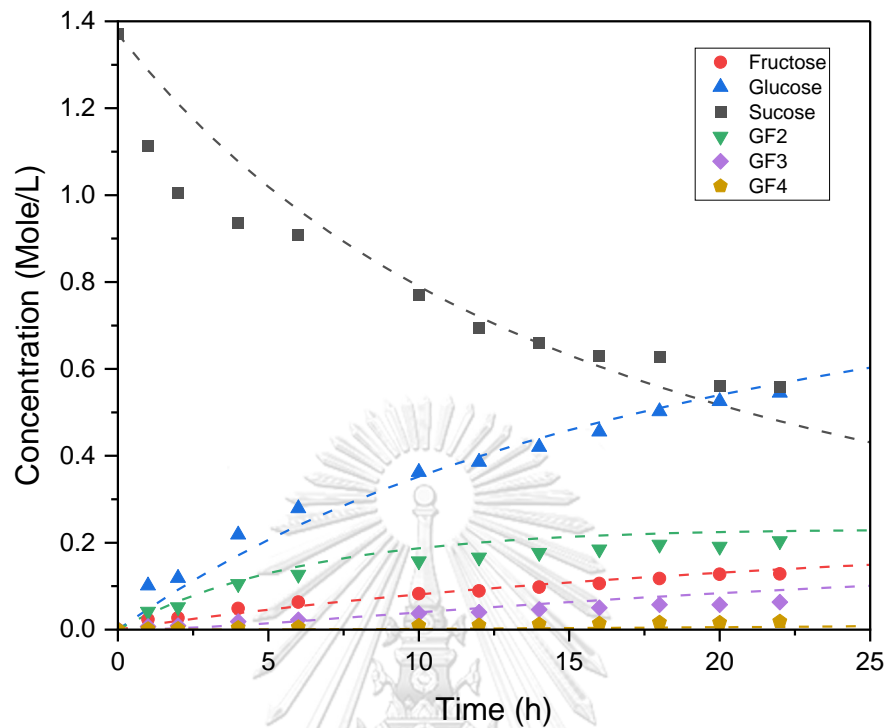
หาค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง จากกลไกการเกิดปฏิกิริยาข้างต้น และใช้สมการสมดุลโมลของเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง แบบกะ ดังต่อไปนี้

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_i}{dt} = r'_i$$

4.6.1 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนไฮโดรเจล 500 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 11.076 กรัม โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง ดำเนินการแบบกะ และอุณหภูมิคงที่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 14 จะได้ว่า ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 2 มากกว่าปฏิกิริยาที่ 3 และ $k_2 > k_3 > k_1$ และมีค่า MSD เท่ากับ 0.048 รูปที่ 58 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการทดลองในรูปของสัญลักษณ์และความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณในรูปของเส้นประที่เวลาต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกันมากและเมื่อนำความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณของซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF_2 GF_3 และ GF_4 มีค่าความสัมพันธ์ R^2 เท่ากับ 0.992 0.993 0.992 0.998 0.974 และ 0.936 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 59 ซึ่งมากกว่า 0.8 โมเดลนี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ได้แม่นยำ

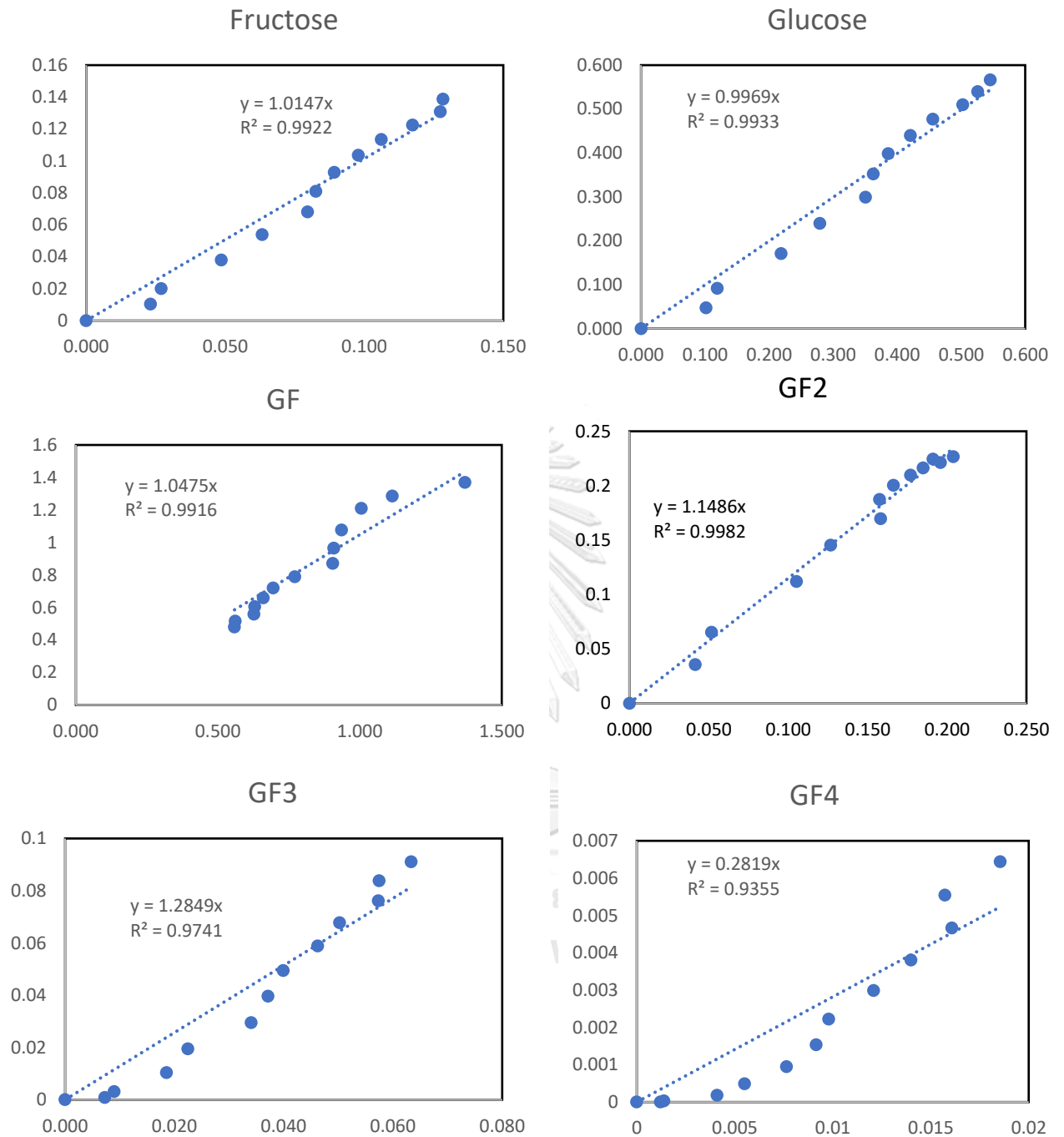
ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึง จากตารางที่ 14 จะได้ว่าค่าคงที่ทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 2 และ 3 (k_1 , k_2 , k_3) ของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบน core – shell มีค่ามากกว่าการตรึงเอนไซม์บนไฮโดรเจล ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันของเอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบน core – shell มีค่ามากกว่าการตรึงเอนไซม์บนไฮโดรเจลทั้ง 3 ปฏิกิริยา ซึ่งตรงกับผลการทดลอง



รูปที่ 58 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) การคำนวณ (เส้นประ) ของอินโนไลซุเครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลที่เวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 14 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินโนไลซุเครสตรึง

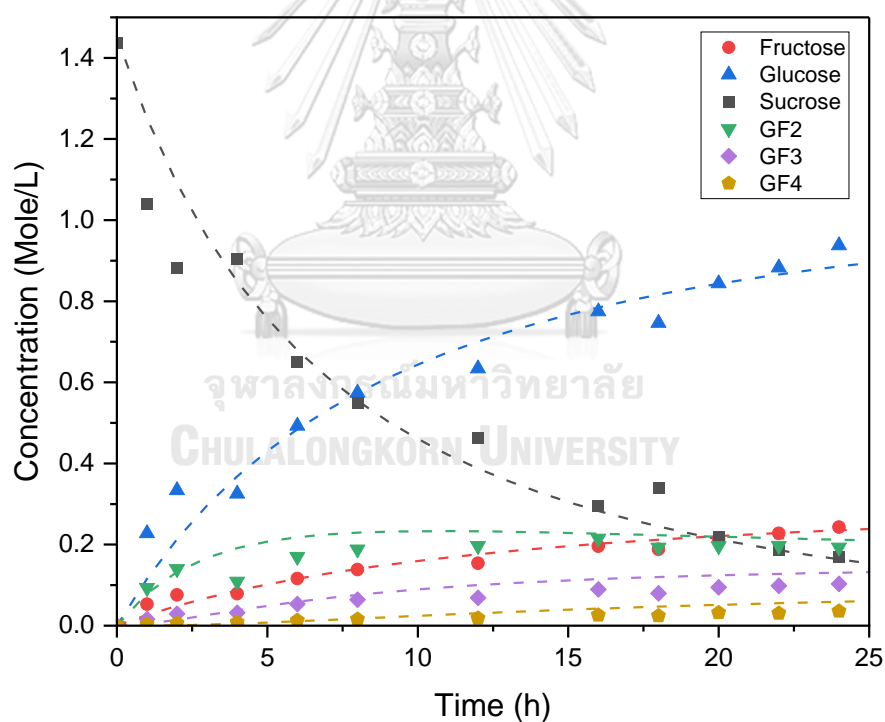
ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	อินโนไลซุเครสตรึงบน core-shell	อินโนไลซุเครสตรึงบนไฮโดรเจล
k_1 ($L^2/mol \cdot kg \cdot h$)	0.216	0.093
k_2 ($L^2/mol \cdot kg \cdot h$)	0.401	0.163
k_3 ($L^2/mol \cdot kg \cdot h$)	0.374	0.046
k_4 ($L/kg \cdot h$)	0.091	0.035



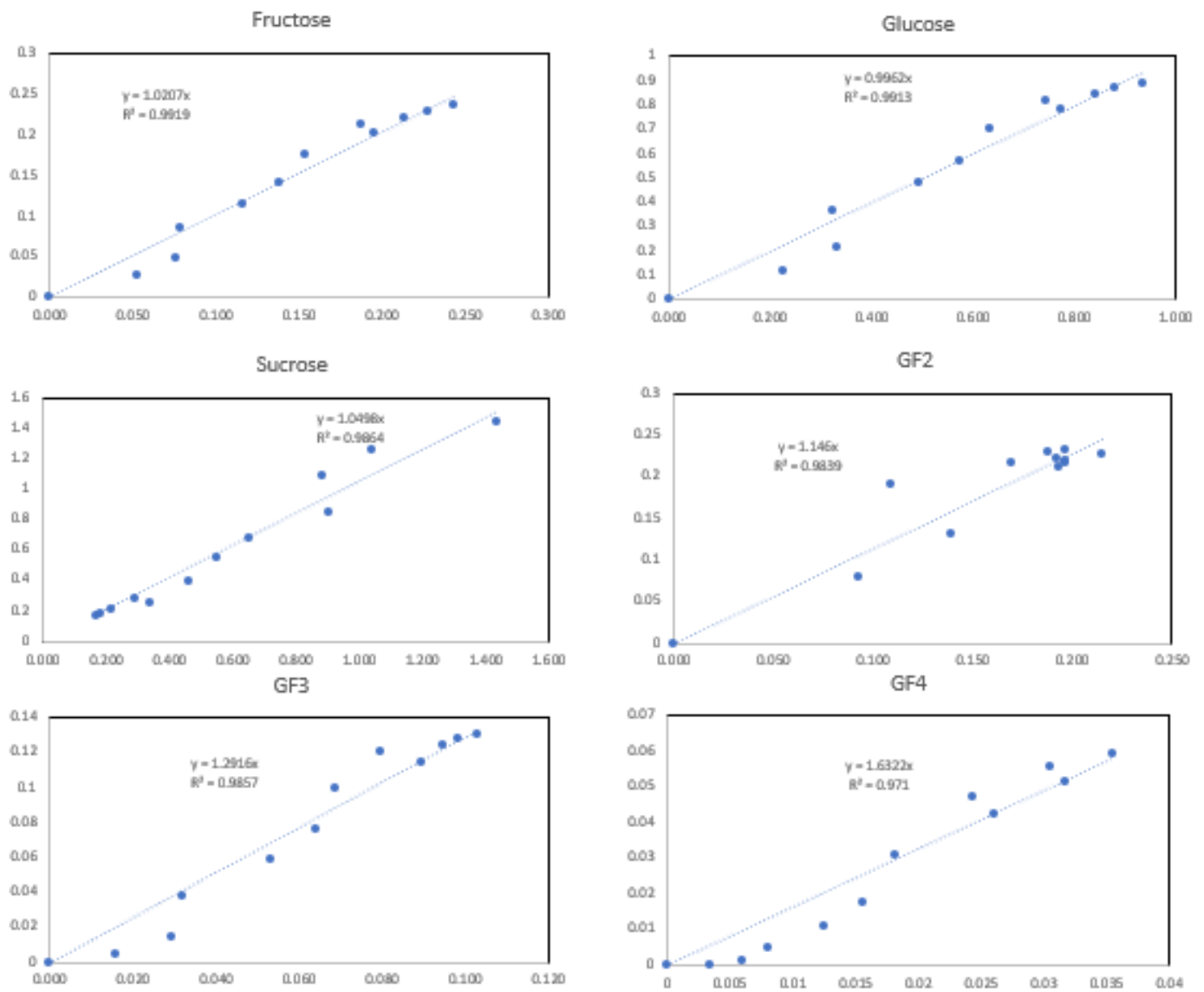
รูปที่ 59 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุกโตส
กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ โดยใช้อินูลูโครสตรังบนเม็ดไคโตซานไฮโดรเจล

4.6.2 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของอินูลูโครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core - shell

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินูลูโครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 500 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 8.997 กรัม โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่ง ดำเนินการแบบกะ และอุณหภูมิคงที่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 14 จะได้ว่า ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 2 มากกว่าปฏิกิริยาที่ 1 และ 3 $k_2 > k_1 > k_3$ และมีค่า MSD เท่ากับ 0.039 รูปที่ 60 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการทดลองในรูปของสัญลักษณ์และความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณในรูปของเส้นประที่เวลาต่าง ๆ ค่อนข้างใกล้เคียงกันและเมื่อนำความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณของ ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF₂ GF₃ และ GF₄ มีค่าความสัมพันธ์ R² เท่ากับ 0.986 0.996 0.992 0.994 0.986 และ 0.971 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 61 ซึ่งมากกว่า 0.8 โมเดลนี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ได้แม่นยำ



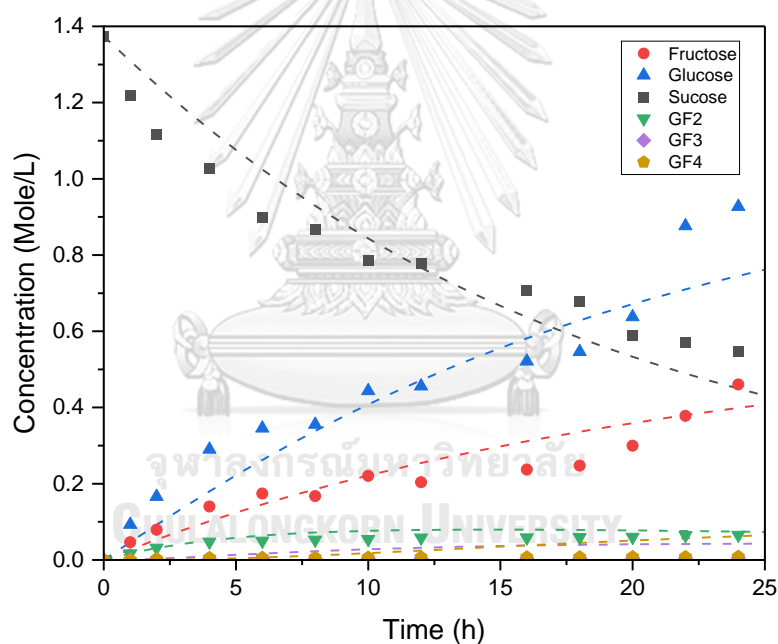
รูปที่ 60 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และคำนวณจากโมเดล (เส้นประ) ของอินูลูโครสตรึงบน core - shell



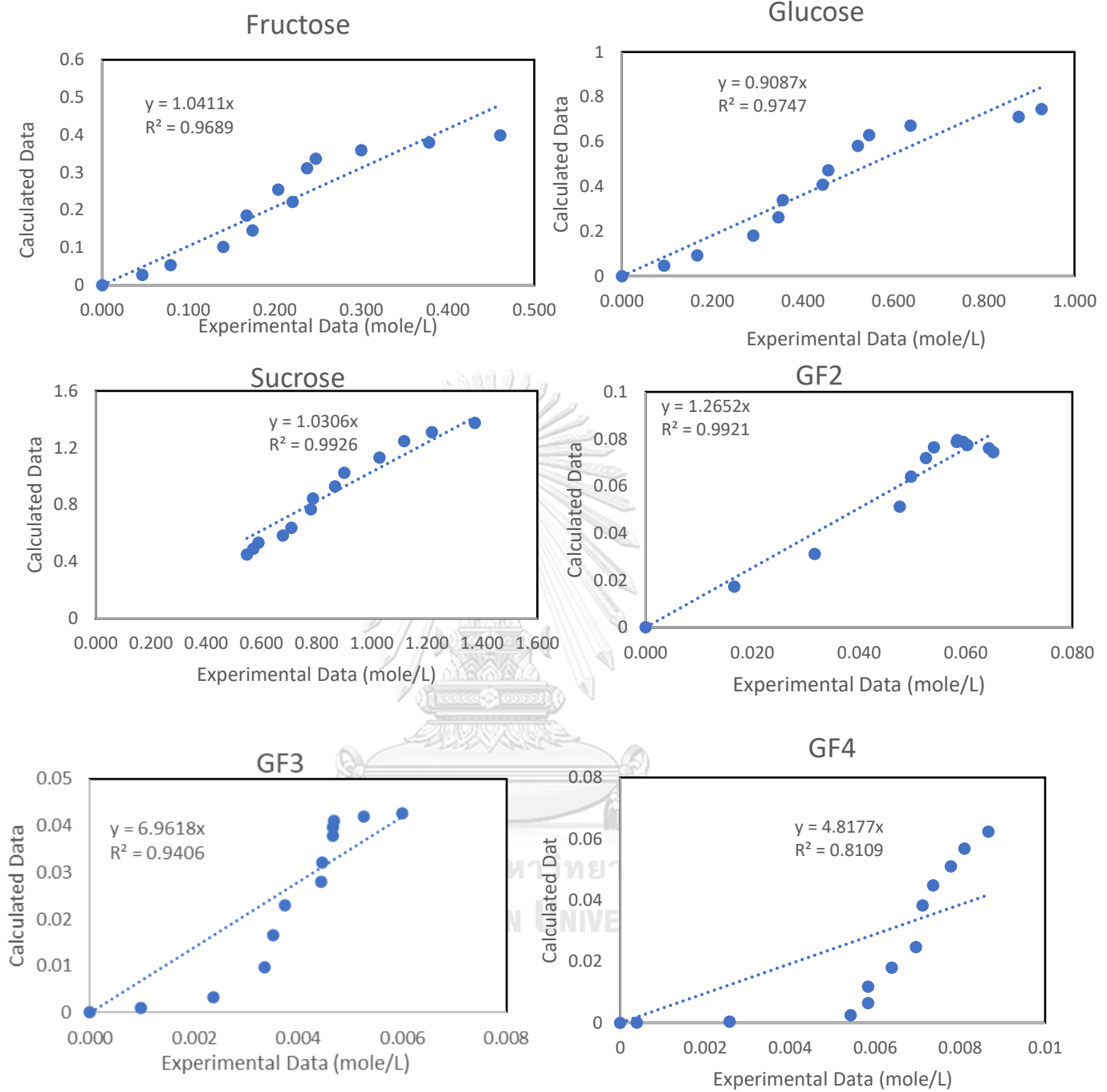
รูปที่ 61 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณ ของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ โดยใช้อินุโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

4.6.3 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรังบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของลีแวนซูเครสตรังบนไฮโดรเจล 500 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 13.36 กรัม โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง ดำเนินการแบบกะและอุณหภูมิคงที่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 15 จะได้ว่า ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชัน $k_3 > k_2 > k_1$ และมีค่า MSD เท่ากับ 0.122 รูปที่ 62 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณที่เวลาต่าง ๆ และเมื่อนำความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณของซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF₂ GF₃ และ GF₄ มีค่าความสัมพันธ์ R² เท่ากับ 0.993 0.975 0.969 0.992 0.941 และ 0.811 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 63 ซึ่งมากกว่า 0.8 แบบจำลองนี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ได้



รูปที่ 62 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และคำนวณจากโมเดล (เส้นประ) ของลีแวนซูเครสตรังบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล



รูปที่ 63 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณ ของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ โดยใช้ลิแกนด์ซูโครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

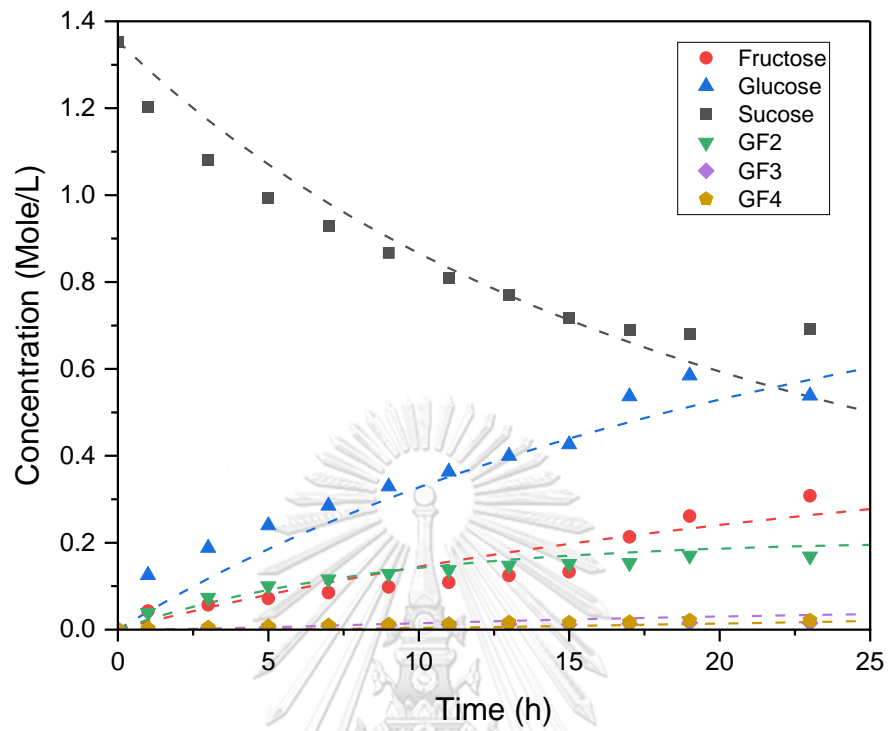
ตารางที่ 15 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรง

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	ลีแวนซูเครสตรง	
	บน core-shell	บนไฮโดรเจล
k_1 (L ² /mol • kg • h)	0.065	0.038
k_2 (L ² /mol • kg • h)	0.104	0.320
k_3 (L ² /mol • kg • h)	0.306	0.511
k_4 (L/kg•h)	0.065	0.076

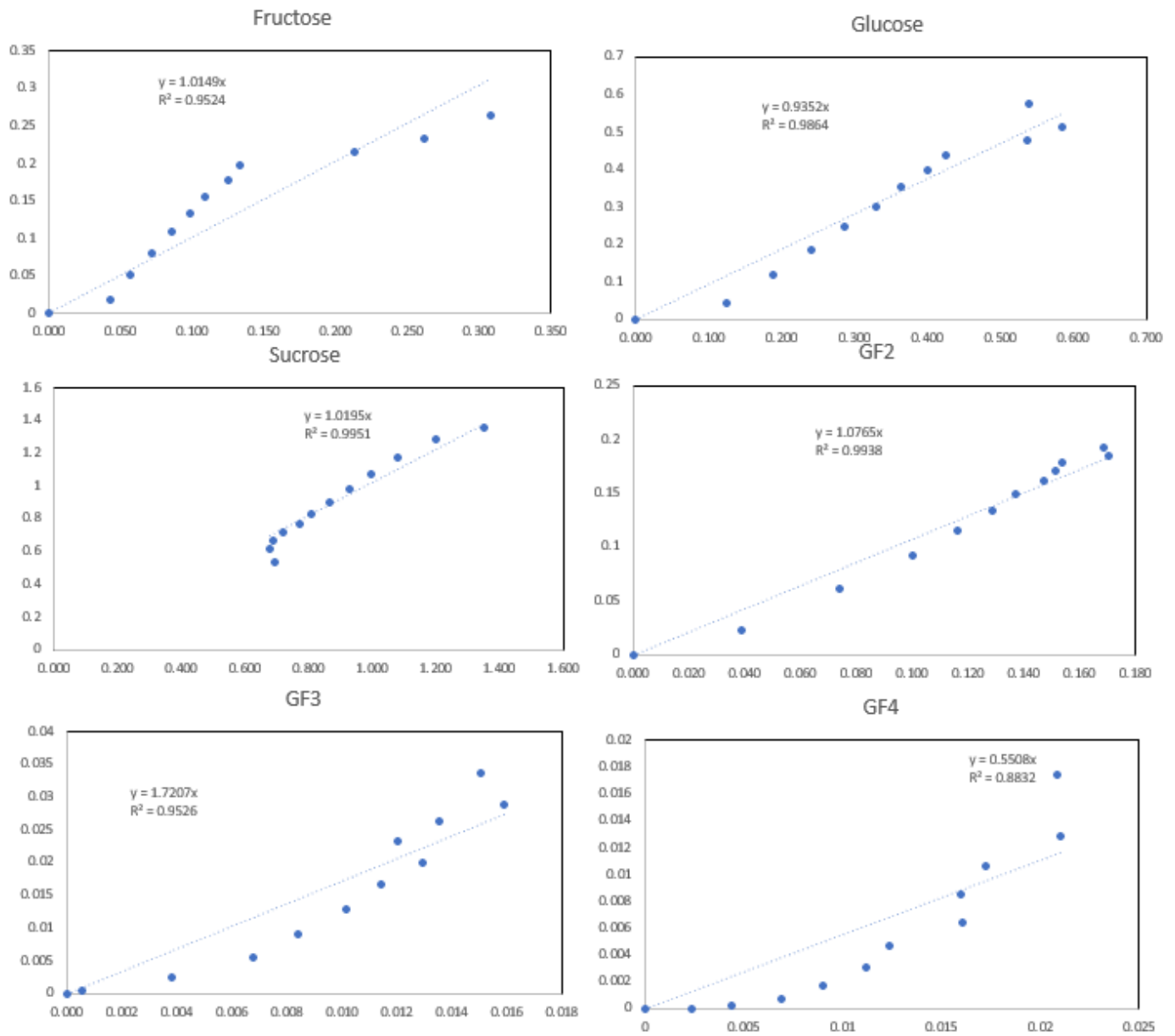
4.6.4 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรงบนเม็ดโคโตะซาน core-shell

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของลีแวนซูเครสตรงบน core-shell 500 U น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา 10.392 กรัม โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่ง ดำเนินการแบบกะและอุณหภูมิคงที่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 15 จะได้ว่าค่าคงที่การเกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 3 มากกว่าปฏิกิริยาที่ 2 และ 1 $k_3 > k_2 > k_1$ และมีค่าเฉลี่ย MSD เท่ากับ 0.082 รูปที่ 64 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณที่เวลาต่าง ๆ และเมื่อนำความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากคำนวณของซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF₂ GF₃ และ GF₄ มีค่าความสัมพันธ์ R² เท่ากับ 0.996 0.935 0.952 0.994 0.953 และ 0.883 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 65 ซึ่งมากกว่า 0.8 โมเดลนี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ได้

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครส เมื่อนำไปคำนวณความเข้มข้นของซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF₂ GF₃ และ GF₄ ที่เวลาต่าง ๆ เทียบกับผลการทดลอง กลไกการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ ใกล้เคียงกับผลการทดลองมากกว่าและมีค่า MSD น้อยกว่า เนื่องจากเอนไซม์ลีแวนซูเครสอิสระเกิดฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์ GF₅₊ เกิดขึ้นด้วย ซึ่งปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 คิดแค่ GF₂ GF₃ และ GF₄ เท่านั้น



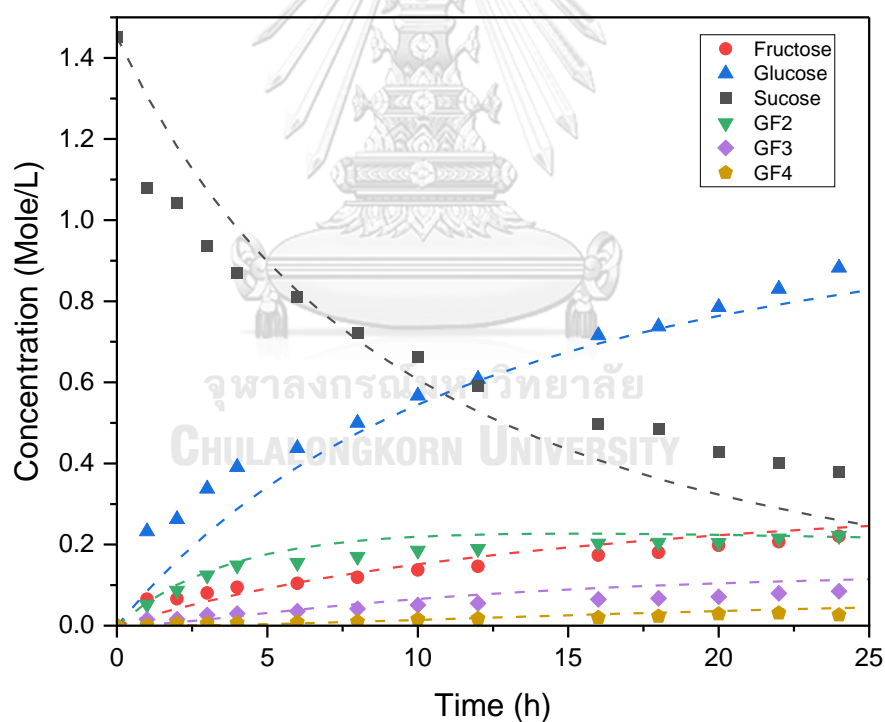
รูปที่ 64 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารจากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และการคำนวณ (เส้นประ) ของลิแกนด์ซูโครสตรึงบนบนเม็ดโคโตนาน core - shell ที่เวลาต่าง ๆ



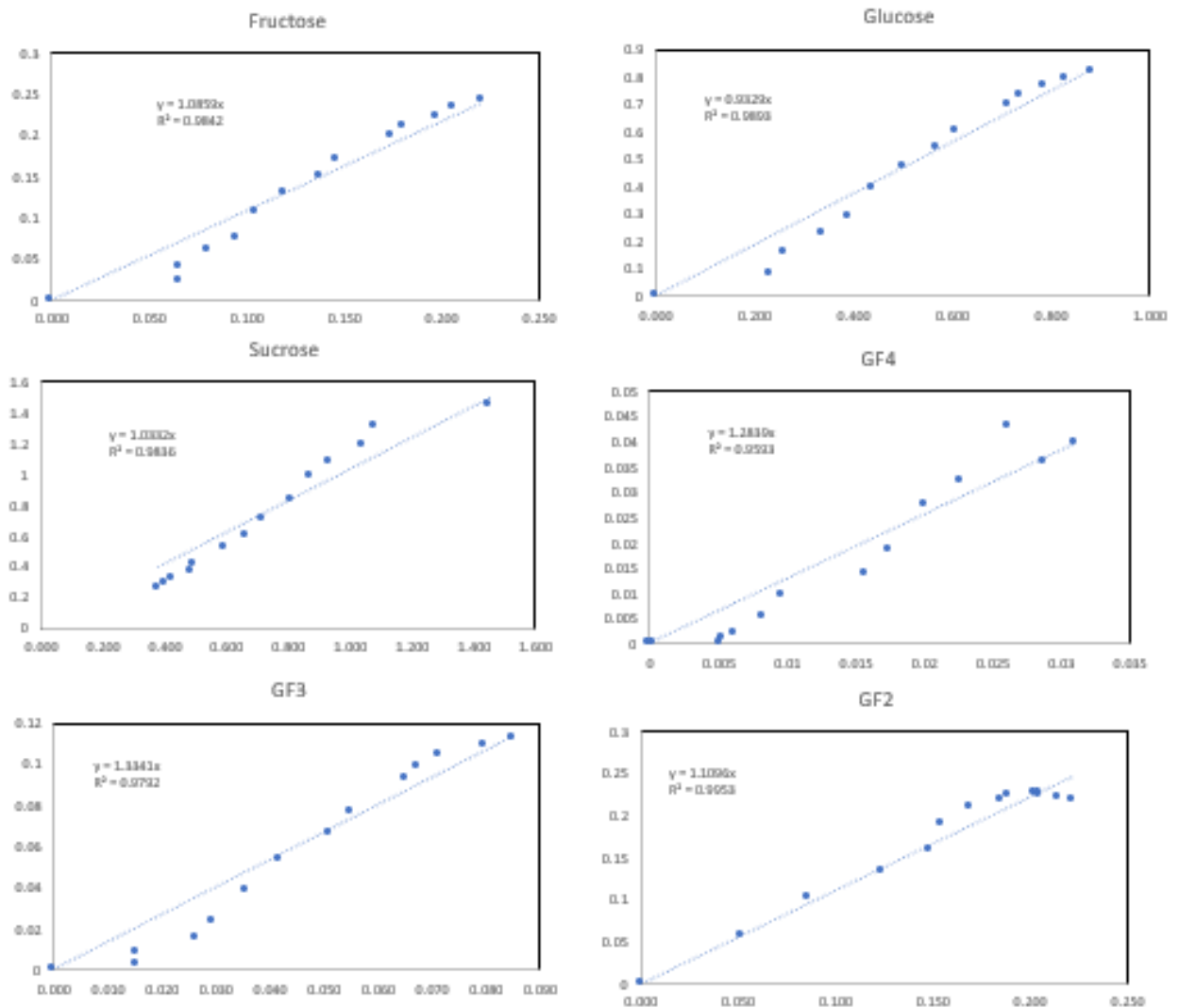
รูปที่ 65 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และ GF₄ ด้วยลิแวนตริงบนเม็ดโคโตซาน core - shell

4.6.5 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell 500 U โดยใช้ซูโครส 50 % (w/v) ในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งต่อเนื่องกัน ดำเนินการแบบกะและอุณหภูมิคงที่ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา แสดงดังตารางที่ 16 จะได้ว่าค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตสไคซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 2 และ 3 มีค่าใกล้เคียงกันและมากกว่าปฏิกิริยาที่ 1 และมีค่าเฉลี่ย MSD เท่ากับ 0.071 รูปที่ 66 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการทดลองในรูปแบบสัญลักษณ์และความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณในรูปแบบเส้นประที่เวลาต่าง ๆ ก่อนข้างใกล้เคียงกันและเมื่อนำความเข้มข้นจากการทดลองและความเข้มข้นที่หาได้จากการคำนวณของซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส GF₂ GF₃ และ GF₄ มีค่าความสัมพันธ์ R² เท่ากับ 0.984 0.933 0.984 0.995 0.979 และ 0.959 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 67 ซึ่งมากกว่า 0.8 โมเดลนี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตสโอลิโกแซคคาไรด์ได้



รูปที่ 66 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ จากผลการทดลอง (สัญลักษณ์) และคำนวณจากโมเดล (เส้นประ) ของเอนไซม์ผสมตรึงบน core - shell



รูปที่ 67 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นจากผลการทดลองและการคำนวณ ของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และGF₄ โดยใช้เอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคซาน core - shell

ตารางที่ 16 ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ผสม

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	เอนไซม์ผสมตรึงบน core-shell
k_1 (L ² /mol • kg • h)	0.120
k_2 (L ² /mol • kg • h)	0.228
k_3 (L ² /mol • kg • h)	0.217
k_4 (L/kg•h)	0.061

4.6.6 การเปรียบเทียบค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันของเอนไซม์ตรีง

ตารางที่ 17 แสดงค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันของเอนไซม์ตรีง

ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา	ลิแวนซูเครสตรีง บน core-shell	ลิแวนซูเครสตรีง บนไฮโดรเจล	อินูโลซูเครสตรีง บน core-shell	อินูโลซูเครสตรีง บนไฮโดรเจล	เอนไซม์ผสมตรีง บน core-shell
k_1 (L ² /mol •kg •h)	0.065	0.038	0.216	0.093	0.120
k_2 (L ² /mol •kg •h)	0.104	0.320	0.401	0.163	0.228
k_3 (L ² /mol • kg •h)	0.306	0.511	0.374	0.046	0.217

จากตารางที่ 17 แสดงค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันของเอนไซม์ตรีง ในปฏิกิริยาที่ 1 2 และ 3 ในการผลิต GF₂ GF₃ และ GF₄ ตามลำดับ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาอันดับ 2 ทั้งหมด เอนไซม์ลิแวนซูเครสจะมีค่าคงที่การเกิดทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 3 มากกว่า 2 และ 1 จะได้ $k_3 > k_2 > k_1$ ตามลำดับ

ตารางที่ 18 แสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรีง

อัตราการเกิดปฏิกิริยา (mol / L • h)	ลิแวนซูเครสตรีง บน core-shell	ลิแวนซูเครสตรีง บนไฮโดรเจล	อินูโลซูเครสตรีง บน core-shell	อินูโลซูเครสตรีง บนไฮโดรเจล	เอนไซม์ผสมตรีง บน core-shell
ทรานส์ฟรุคโตซิลเลชัน ปฏิกิริยาที่ 1	0.139	0.081	0.461	0.198	0.256
ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส	0.095	0.111	0.133	0.051	0.089

จากตารางที่ 18 แสดงอัตราการเกิดทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 และไฮโดรไลซิสปฏิกิริยาที่ 4 ซึ่งคำนวณจากความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 1.46 โมล/ลิตร และค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 และ 4 (k_1 , k_4) จะได้ว่าอัตราการเกิดทรานส์ฟรุคโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 ของเอนไซม์ตรีงมีค่ามากกว่าการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ยกเว้นของเอนไซม์ลิแวนซูเครสตรีงบนเม็ดโคโตซาน

ไฮโดรเจลที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 น้อยกว่าการเกิดไฮโดรไลซิส การตรึงเอนไซม์อินูโลซูเครสและ ลีแวนซูเครสบนเม็ดโคโตซาน core-shell จะมีอัตราการเกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าการตรึง บนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล เอนไซม์อินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core-shell จะมีอัตราการ เกิดทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันปฏิกิริยาที่ 1 และไฮโดรไลซิสมากที่สุด เมื่อใช้เอนไซม์ผสมในการผลิต ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ จะได้ว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุกโตซิลเลชันมากกว่าการใช้เอนไซม์ ลีแวนซูเครสอย่างเดียว แต่น้อยกว่าเอนไซม์อินูโลซูเครส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตฟรุกโตสจากซูโครสด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครส และอินูโลซูเครส ในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสมในรูปแบบเอนไซม์อิสระ เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งโดยใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลและ core – shell และเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตซาน โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นซูโครส 50 % (w/v) ภายใต้อุณหภูมิคงที่ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ค่าการทำงานของเอนไซม์ 500 U เท่ากันทุกการทดลอง เปรียบเทียบจากค่าการเปลี่ยนซูโครส ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์หลักและความเสถียรภาพในการใช้ซ้ำของเอนไซม์ตรึง

การตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซาน core – shell จะมีค่าการทำงานของเอนไซม์ตรึงมากกว่าการตรึงเอนไซม์บนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล เอนไซม์ลีแวนซูเครสอยู่ที่ 48.12 และ 37.44 U/กรัม ตามลำดับ ส่วนของอินูโลซูเครสเท่ากับ 55.57 และ 45.14 U/กรัม ตามลำดับ

การผลิตฟรุกโตสจากซูโครสด้วยเอนไซม์แบบอิสระจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เร็วกว่าการใช้เอนไซม์ตรึง การใช้เอนไซม์ลีแวนซูเครสจะให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรุกโตสจากซูโครสชนิดลิแวนและมีผลิตภัณฑ์ DP ที่มากกว่า 5 เกิดขึ้นด้วย จะได้เป็น GF₅₊ ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์อินูโลซูเครสที่ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นฟรุกโตสจากซูโครสชนิดอินูลิน ที่ประกอบด้วย GF₂ GF₃ และ GF₄ จากการทดลองจะพบว่าการผลิตฟรุกโตสจากซูโครสโดยใช้เอนไซม์อิสระอินูโลซูเครสและลีแวนซูเครส จะมีค่าการเปลี่ยนซูโครสที่ใกล้เคียง 95.89 และ 95.52 ตามลำดับ แต่อินูโลซูเครสมีร้อยละผลได้ของฟรุกโตสจากซูโครสมากกว่าลีแวนซูเครส ซึ่งเท่ากับ 47.22 และ 27.82 ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์ลีแวนซูเครสทำปฏิกิริยากับซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าการใช้เอนไซม์อินูโลซูเครส

การผลิตฟรุกโตสจากซูโครสด้วยเอนไซม์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง มีศักยภาพที่จะนำมาใช้แทนการผลิตด้วยเอนไซม์อิสระ จากการทดลองใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 120 ชั่วโมง การผลิตฟรุกโตสจากซูโครสด้วยเอนไซม์ลีแวนซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell มีค่าผลได้ฟรุกโตสจากซูโครสชนิดลิแวนเฉลี่ย 26.36 % ซึ่งมากกว่าการตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลที่ได้ 8.85 % และส่วนของอินูโลซูเครสตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell มีค่าผลได้ฟรุกโตสจากซูโครสชนิดอินูลินเฉลี่ย 37.57 % ซึ่งมากกว่าการตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลที่ได้ 31.98 % จากค่าผลได้และความเสถียรภาพทั้ง 5 ครั้งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ และเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งที่ใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซาน core – shell มีความเหมาะสมกว่าใช้เอนไซม์ตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากค่าประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์ที่สูงกว่า ความเสถียรภาพเมื่อนำมาใช้ซ้ำในการผลิต ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์หลักและค่าการเปลี่ยนซูโครสที่สูงกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโตะซาน core – shell ในการผลิตจะให้ค่าผลได้ฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์เฉลี่ย 36.6 % ซึ่งสูงกว่าการผลิตโดยใช้ลิแวนซูเครสเพียงชนิดเดียว ดังนั้นการใช้เอนไซม์ผสมเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดลิแวนให้สูงมากขึ้นเพิ่มขึ้น 38.84 %

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารตั้งต้นซูโครสในการผลิตฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์จากผลการทดลองด้วยวิธีการถดถอย (Regression) โดยใช้โปรแกรม EQUATRAN กำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่ 1 ถึง 3 เป็นการเกิดปฏิกิริยาทรานส์ฟรุทโตซิลเลชันและปฏิกิริยาที่ 4 เป็นการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากสมการ Power law หาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา (k_1, k_2, k_3, k_4) เอนไซม์ลิแวนซูเครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าเอนไซม์อินูโลซูเครส แบบจำลอง (Model) นี้สามารถทำนายการเกิดปฏิกิริยาได้ใกล้เคียง โดยมีค่า R^2 ของสารทุกตัวและทุกระบบมากกว่า 0.8 สามารถใช้จำลองปฏิกิริยาการเกิดฟรุทโตโอลิโกแซคคาไรด์ และออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ที่ขนาดใหญ่ขึ้นระดับอุตสาหกรรมในอนาคตได้

ตารางที่ 19 สรุปผลการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในเครื่องปฏิกรณ์ต่าง ๆ

เอนไซม์	ร้อยละการเปลี่ยนแปลง	ร้อยละผลได้					
	ซูโครส	ฟรุคโตส	กลูโคส	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₊
เครื่องปฏิกรณ์ถึงกวางผสม							
เอนไซม์อินูโลซูเครส อิสระ	92.89	8.03	40.25	15.53	16.70	14.99	-
เอนไซม์อติแวนซู เครสอิสระ	95.52	19.83	52.21	6.97	1.75	1.66	12.73
เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง							
ลิแวนซูเครสตรึงบน ไฮโดรเจล	60.16	17.64	35.52	6.99	0.85	1.53	-
ลิแวนซูเครสตรึงบน core - shell	73.99	7.65	22.70	14.66	3.41	5.31	-
อินูโลซูเครสตรึงบน ไฮโดรเจล	75.66	6.76	25.82	19.84	11.02	5.11	-
อินูโลซูเครสตรึงบน core - shell	88.00	7.33	24.86	14.71	10.04	4.86	-
เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งต่อเนื่อง							
เอนไซม์ผสมตรึงบน core-shell	86.99	8.15	27.16	15.64	7.71	4.65	-

ตารางที่ 20 สรุปผลค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยา

เอนไซม์	ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยา				R ²					
	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	F	G	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄
เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม										
เอนไซม์อินูโลซู เครสซิสระ* (×10 ⁻³)	9.83	25.46	2.64	3.24	0.962	0.997	0.992	0.988	0.999	0.987
เอนไซม์อัสกีแวนซู เครสซิสระ*(×10 ⁻³)	2.90	2.82	2.61	3.58	0.997	0.995	0.996	0.956	0.810	0.718
เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง										
ลิวานซูเครสตรัง บนไฮโดรเจล**	0.038	0.320	0.511	0.076	0.969	0.975	0.993	0.992	0.941	0.811
ลิวานซูเครสตรัง บนcore-shell**	0.065	0.104	0.306	0.065	0.952	0.935	0.996	0.994	0.953	0.883
อินูโลซูเครสตรัง บนไฮโดรเจล**	0.093	0.163	0.046	0.035	0.992	0.993	0.992	0.998	0.974	0.936
อินูโลซูเครสตรัง บนcor-shell**	0.216	0.401	0.374	0.091	0.992	0.996	0.986	0.994	0.986	0.971
เครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่งต่อเนื่อง										
เอนไซม์ผสมตรัง บนcore-shell**	0.120	0.228	0.217	0.061	0.984	0.933	0.984	0.995	0.979	0.959

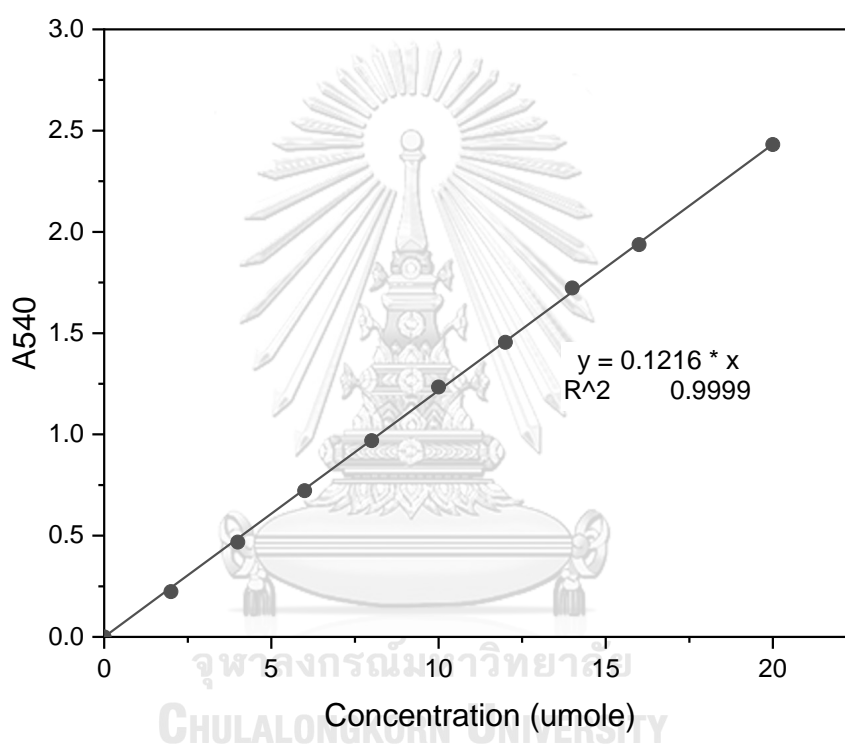
*ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์ถังกวนผสม k₁,k₂,k₃: L/ mol • h, k₄: 1/ h

**ค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาในเครื่องปฏิกรณ์เบตนิ่ง k₁,k₂,k₃: L²/ mol • kg • h , k₄: L/ •kg • h

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณการทำงานของเอนไซม์

ภาคผนวกนี้แสดงกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคสใช้สำหรับคำนวณค่าการทำงานของเอนไซม์ (Activity) โดยวิธี DNS วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร คำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส แกน y แสดงค่าการดูดกลืนแสง (A_{540}) แกน x แสดงปริมาณกลูโคสที่เอนไซม์ปล่อย 1 ไมโครโมล

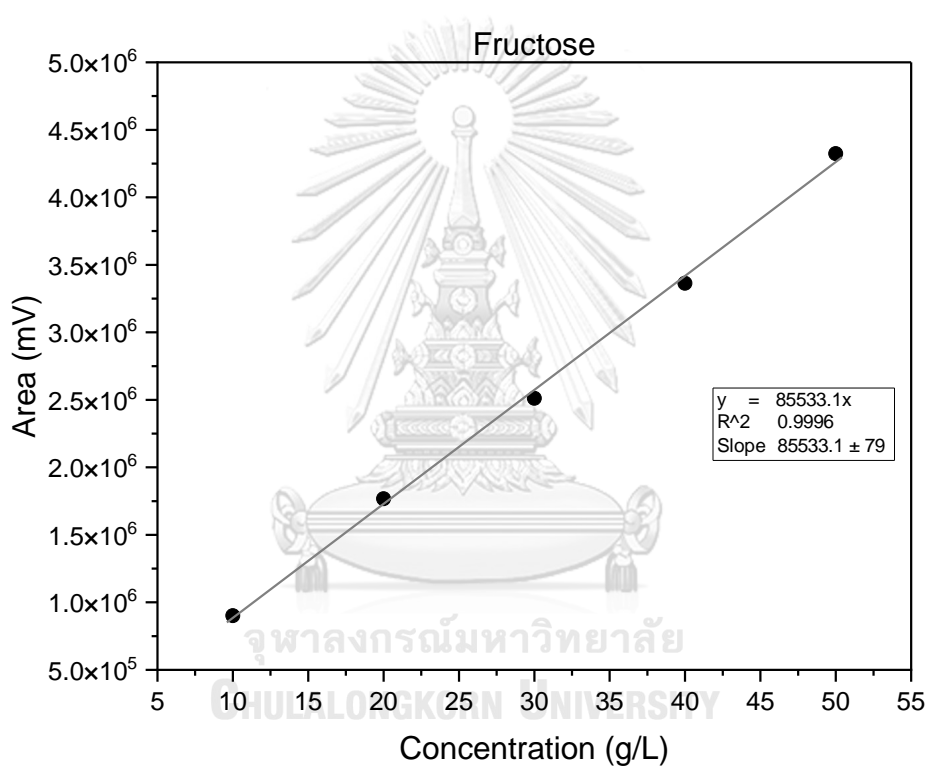


รูปที่ 68 กราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคส

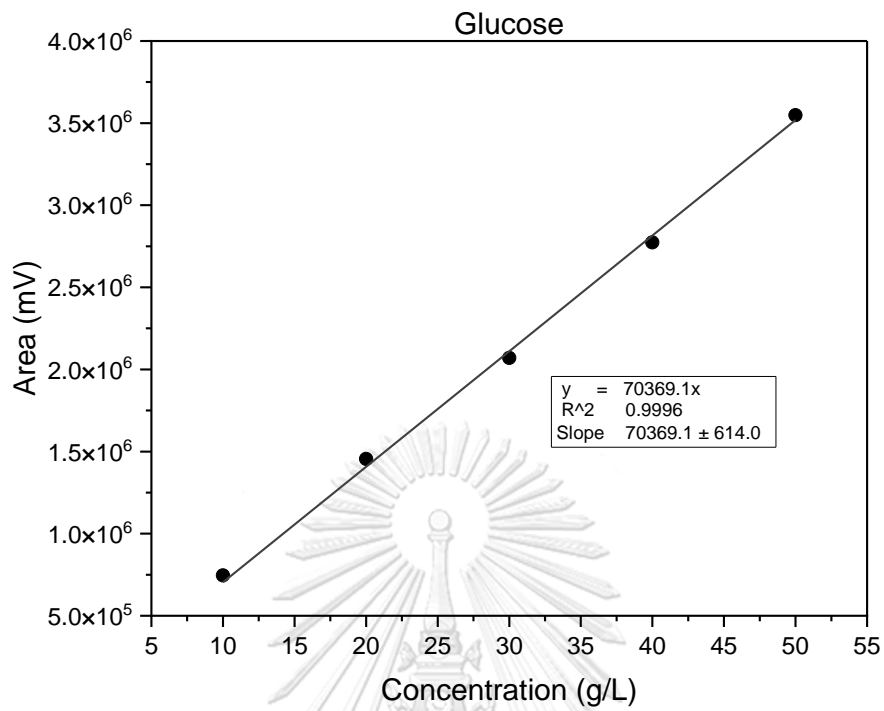
ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

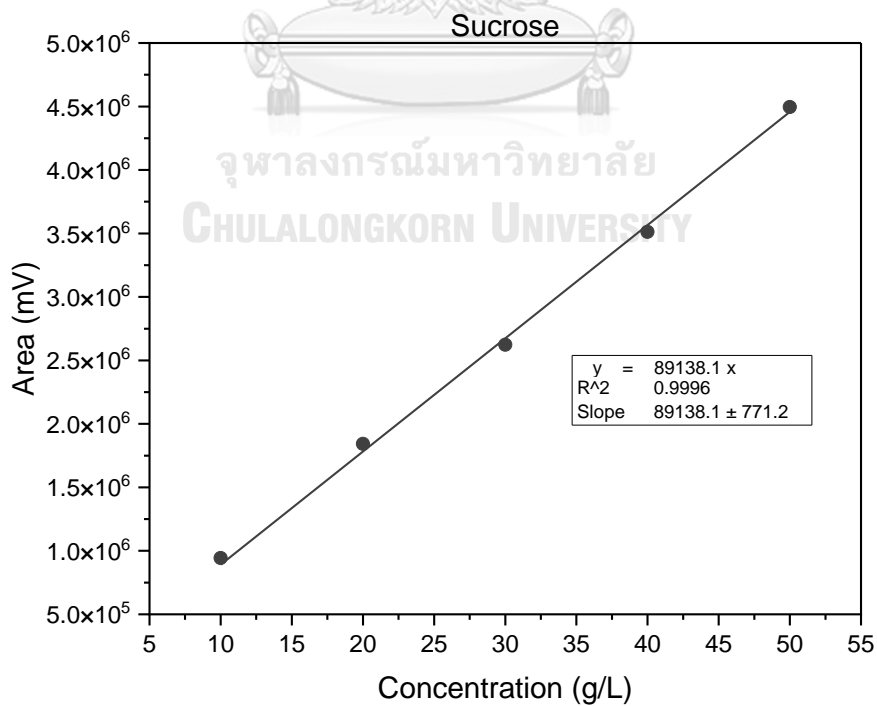
ภาคผนวกนี้ แสดงกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) สำหรับการคำนวณหาองค์ประกอบของสารในแต่ละตัวอย่าง ที่เก็บมาจากการทดลอง การผลิตฟรุกโตสโพลีเมอร์จากซูโครส กราฟจะแสดงความเข้มข้น (Concentration) ของสารบนแกน x และพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงบนแกน y



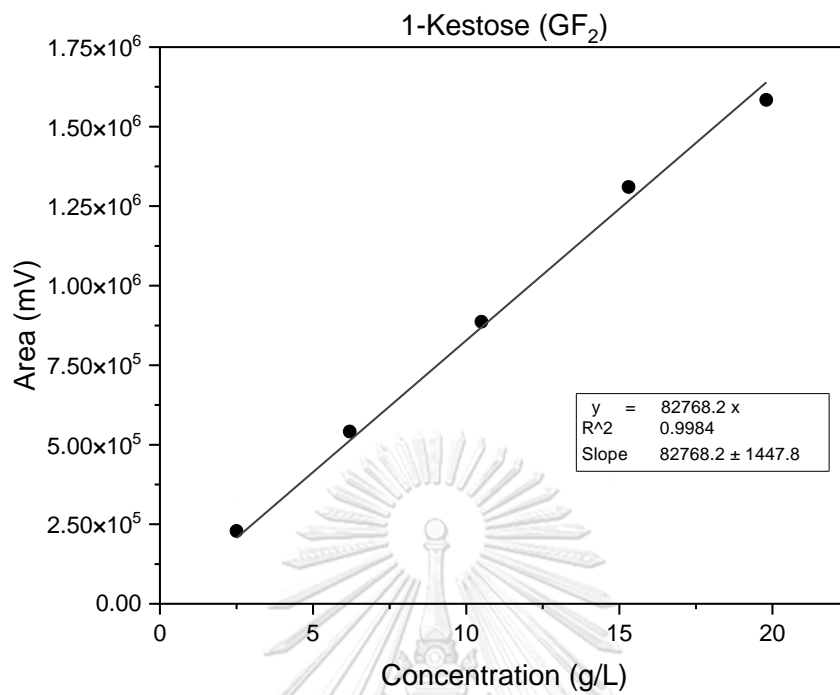
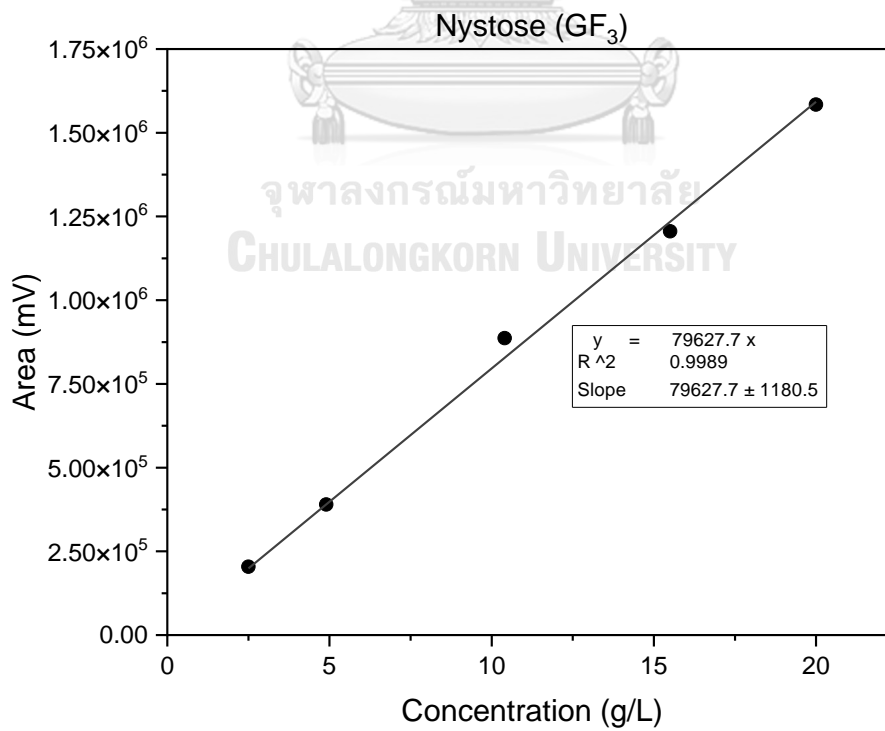
รูปที่ 69 กราฟมาตรฐานของฟรุกโตส

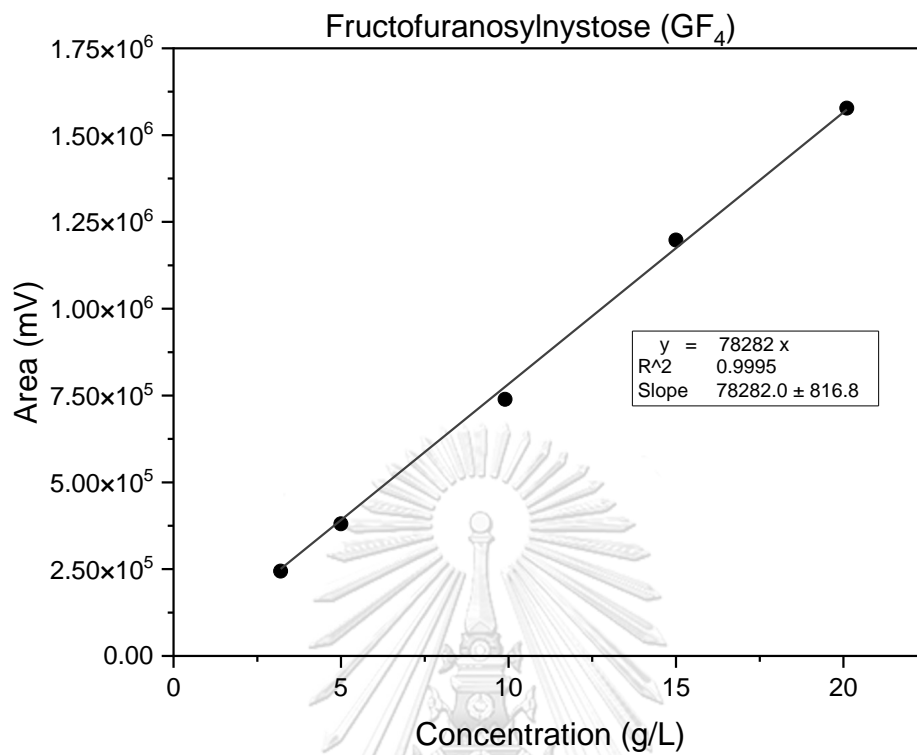


รูปที่ 70 กราฟมาตรฐานของกลูโคส



รูปที่ 71 กราฟมาตรฐานของซูโครส

รูปที่ 72 กราฟมาตรฐานของ 1-Kestose (GF₂)รูปที่ 73 กราฟมาตรฐานของ Nystose (GF₃)



รูปที่ 74 กราฟมาตรฐานของ¹F- Fructofuranosylmystose (GF₄)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลองการผลิตฟรุกโตสออลิโกแซคคาไรด์

ภาคผนวกนี้แสดงข้อมูลผลการทดลองการผลิตฟรุกโตสออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส ในรูปของความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ประกอบด้วย ฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF₂ GF₃ และ GF₄

ตารางที่ 21 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ลิแวนซูเครสอิสระ

เวลา (ชั่วโมง)	ฟรุกโตส (กรัม/ลิตร)	กลูโคส (กรัม/ลิตร)	ซูโครส (กรัม/ลิตร)	GF ₂ (กรัม/ลิตร)	GF ₃ (กรัม/ลิตร)	GF ₄ (กรัม/ลิตร)
0	0	0	496.02	0	0	0
10 นาที	5.11	10.05	454.07	8.47	0.61	0
20 นาที	12.85	23.19	418.81	13.4	1.35	0
30 นาที	12.26	25.14	415.19	17.46	1.92	0
1	16.61	36.71	391.82	24.39	4.95	2.14
2	26.89	62.22	332.74	33.45	8.4	5.5
3	36.05	86.71	289.93	42.42	9.21	6.77
4	44.57	110.25	252.04	40.54	10.11	8.39
6	55.45	142.31	191.89	40.64	9.99	10.21
8	72.85	181.99	155.61	42.28	10.21	11.26
10	72.17	193.02	101.05	31.3	8.88	10.57
12	77.5	209.42	76.44	36.12	6.98	10.01
16	89.59	241.4	39.31	34.88	6.25	9.89
24	98.34	258.98	22.21	34.55	8.69	8.25

ตารางที่ 22 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของลิแวนซูโครสตรึงบนเม็ดโคโโตซาน core-shell

เวลา (ชั่วโมง)	ฟรุกโตส (กรัม/ลิตร)	กลูโคส (กรัม/ลิตร)	ซูโครส (กรัม/ลิตร)	GF ₂ (กรัม/ลิตร)	GF ₃ (กรัม/ลิตร)	GF ₄ (กรัม/ลิตร)
0	0.00	0.00	463.28	0.00	0.00	0.00
1	4.61	14.37	367.58	21.36	1.31	1.07
2	7.58	24.24	343.91	34.72	2.26	2.16
4	12.11	38.86	298.48	48.75	5.23	5.09
6	15.81	49.87	259.48	56.76	7.24	8.73
8	19.98	62.50	232.68	63.06	8.98	10.83
10	21.07	65.70	207.21	62.83	9.44	13.01
12	23.87	73.77	193.52	66.76	9.82	15.58
14	24.99	77.21	172.30	64.99	10.93	14.13
16	29.69	90.20	172.30	80.45	10.35	17.48
20	31.89	96.39	142.27	73.20	12.57	18.86
22	34.03	101.97	131.45	69.77	12.61	21.44
24	35.45	105.16	120.48	67.90	15.81	24.60

ตารางที่ 23 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของลิแวนซูโครสตรึงบนเม็ดโคโตซานไฮโดรเจล

เวลา (ชั่วโมง)	พรุทอส (กรัม/ลิตร)	กลูโคส (กรัม/ลิตร)	ซูโครส (กรัม/ลิตร)	GF ₂ (กรัม/ลิตร)	GF ₃ (กรัม/ลิตร)	GF ₄ (กรัม/ลิตร)
0	0.00	0.00	470.10	0.00	0.00	0.00
1	8.35	16.75	416.72	8.38	0.65	0.32
2	14.27	29.94	382.32	15.99	1.58	2.13
4	25.22	52.25	351.73	24.02	2.23	4.49
6	31.34	62.27	307.96	25.09	2.35	4.83
8	30.13	64.05	296.67	26.50	2.50	4.83
10	39.68	79.93	269.00	27.26	2.96	5.30
12	36.70	82.15	266.59	29.42	2.97	5.77
16	42.71	93.94	242.37	29.47	3.11	5.90
18	44.54	98.42	231.93	30.04	3.11	6.10
20	54.00	114.84	201.55	30.41	3.12	6.45
22	68.11	157.91	195.14	32.46	3.51	6.71
24	82.94	166.99	187.29	32.88	4.00	7.18

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์อินูโลซูเครสอิสระ

เวลา (ชั่วโมง)	ฟรุกโตส (กรัม/ลิตร)	กลูโคส (กรัม/ลิตร)	ซูโครส (กรัม/ลิตร)	GF ₂ (กรัม/ลิตร)	GF ₃ (กรัม/ลิตร)	GF ₄ (กรัม/ลิตร)
0	0.00	0.00	485.97	0.00	0.00	0.00
10 นาที	14.26	35.54	381.67	42.40	7.22	0.00
20 นาที	19.12	49.45	345.57	55.87	12.23	1.60
1	27.50	86.36	245.51	84.32	33.20	9.60
1.5	18.25	84.38	242.68	91.16	41.99	12.89
2	22.47	105.22	194.95	97.07	53.19	21.67
3	27.48	127.66	148.47	100.37	64.92	31.94
5	27.32	149.72	103.32	85.07	75.69	50.37
6	30.55	160.64	74.28	90.77	80.29	54.66
8	33.42	171.36	50.92	88.63	78.79	62.52
9	34.91	180.77	37.88	86.08	79.59	62.41
10	39.04	195.58	34.55	75.48	81.14	72.86

ตารางที่ 25 ความเข้มข้นของสารที่เวลาต่าง ๆ ของเอนไซม์ผสมตรึงบนเม็ดโคโคไตซาน core-shell

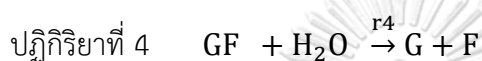
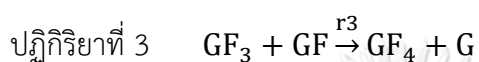
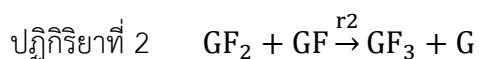
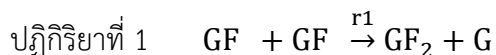
เวลา (ชั่วโมง)	ฟรุกโตส (กรัม/ลิตร)	กลูโคส (กรัม/ลิตร)	ซูโครส (กรัม/ลิตร)	GF ₂ (กรัม/ลิตร)	GF ₃ (กรัม/ลิตร)	GF ₄ (กรัม/ลิตร)
0	0.00	0.00	491.81	0.00	0.00	0.00
1	6.36	24.49	301.22	27.79	3.75	0.00
2	10.42	39.68	263.52	46.05	8.86	0.76
3	13.72	51.24	239.53	57.41	13.35	1.93
4	15.90	59.77	217.52	61.63	16.79	1.48
6	19.93	73.38	183.14	68.23	20.94	7.20
8	22.03	78.33	172.32	68.27	22.16	7.76
10	24.58	88.70	150.01	71.56	27.87	10.21
12	27.47	97.44	133.18	74.55	28.41	11.96
14	29.64	104.75	117.08	75.07	33.69	12.70
16	32.61	113.31	102.81	75.40	34.35	14.23
18	32.97	114.82	91.84	76.68	33.37	17.09
20	36.68	124.19	81.15	75.82	34.96	17.92
22	37.67	127.84	73.59	76.99	36.79	20.73
24	40.06	133.59	64.00	76.91	37.93	22.89

ภาคผนวก ง

การหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา

ภาคผนวกนี้แสดงการหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยาของฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์จากซูโครส นำผลการทดลองมาหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา โดยใช้วิธีการถดถอย (Regression)

1. กำหนดกลไกการเกิดปฏิกิริยา



โดย GF คือ ซูโครส

G คือ กลูโคส

F คือ ฟรุกโตส

GF_2, GF_3, GF_4 คือ ฟรุกโตออลิโกแซคคาไรด์

2. ตั้งสมการสมดุลโมลของระบบ และอัตราการเกิดปฏิกิริยาลงในโปรแกรม EQUATRAN

อัตราการเกิดปฏิกิริยาแบบ Power Law

$$r_1 = k_1 \cdot C_{GF}^2$$

$$r_2 = k_2 \cdot C_{GF} C_{GF_2}$$

$$r_3 = k_3 \cdot C_{GF} C_{GF_3}$$

$$r_4 = k_4 \cdot C_{GF}$$

สมการสมดุลโมลของเครื่องปฏิกรณ์ดังกล่าวผสม แบบกะ

$$\frac{dN_{GF}}{dt} = -2 \cdot r_1 - r_2 - r_3 - r_4$$

$$\frac{dN_G}{dt} = r_1 + r_2 + r_3 + r_4$$

$$\frac{dN_F}{dt} = r_4$$

$$\frac{dN_{GF_2}}{dt} = r_1 - r_2$$

$$\frac{dN_{GF_3}}{dt} = r_2 - r_3$$

$$\frac{dN_{GF_4}}{dt} = r_3$$

สมการสมดุลโมลของเครื่องปฏิกรณ์เบดนิ่ง แบบกะ

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_G}{dt} = r'_1 + r'_2 + r'_3 + r'_4$$

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_{GF}}{dt} = -2 \cdot r'_1 - r'_2 - r'_3 - r'_4$$

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_F}{dt} = r'_4$$

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_{GF_2}}{dt} = r'_1 - r'_2$$

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_{GF_3}}{dt} = r'_2 - r'_3$$

$$\frac{1}{M_{cat}} \times \frac{dN_{GF_4}}{dt} = r'_3$$

ตารางที่ 26 แสดงตัวแปรที่ใช้ในการหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา

ตัวแปร	นิยาม	หน่วย
r_i, r'_i	อัตราการเกิดปฏิกิริยา	โมล/ลิตร·ชั่วโมง , โมล/กิโลกรัม·ชั่วโมง
C_i	ความเข้มข้นของสาร	โมล/ลิตร
N_i	จำนวนโมล	โมล
M_{cat}	น้ำหนักตัวเร่งปฏิกิริยา	กิโลกรัม
V	ปริมาตร	ลิตร

- ใส่ข้อมูลของการทดลอง ความเข้มข้นของฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส GF_2 GF_3 และ GF_4 หน่วย โมล/ลิตร ที่เวลาต่างๆ

ตารางที่ 27 แสดงสูตรโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล

ชื่อสาร	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล (กรัม/โมล)
ฟรุคโตส	$C_6H_{12}O_6$	180.15
กลูโคส	$C_6H_{12}O_6$	180.15
ซูโครส	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.3
1-kestose (GF ₂)	$C_{18}H_{32}O_{16}$	504.44
Nystose (GF ₃)	$C_{24}H_{42}O_{21}$	666.58
1 ^F -fructofuranosylnystose (GF ₄)	$C_{30}H_{52}O_{26}$	828.72

4. กำหนดให้ข้อมูลจากจำนวนกับการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยใช้คำสั่ง Least ให้โปรแกรมคำนวณหาค่าคงที่การเกิดปฏิกิริยา k_1, k_2, k_3 และ k_4

บรรณานุกรม

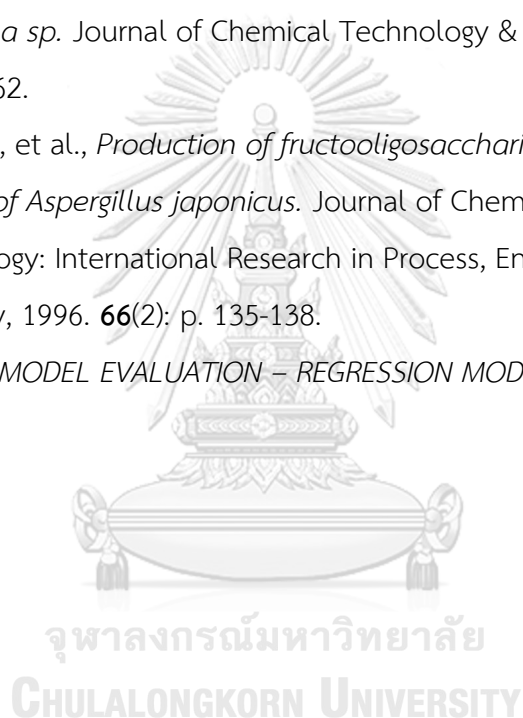
1. Smaali, I., et al., *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from date by-products using an immobilized crude enzyme preparation of β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus awamori* NBRC 4033*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012. **17**(2): p. 385-392.
2. เชื้อ มงคล, ว.ค., ประโยชน์ ของ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ใน อาหาร ทางการ แพทย์ *The Use of Fructooligosaccharide (FOS) in Medical Foods*. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal-วารสาร ไทย เกษษศาสตร์ และ วิทยาการ สุขภาพ*, 2013. **8**(3): p. 122-128.
3. Vijayendra, S. and T. Shamala, *Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review*. *Critical reviews in biotechnology*, 2014. **34**(4): p. 338-357.
4. Benkeblia, *Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food* 2013.
5. Li, W., et al., *Recent novel applications of levansucrases*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015. **99**(17): p. 6959-6969.
6. Sowcharoensuk, C., แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2564-2566: อุตสาหกรรมน้ำตาล. 2021.
7. Lorenzoni, A.S.G., et al., *Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015. **111**: p. 51-55.
8. Sangmanee, M.S., *PRODUCTION OF LEVAN-TYPE FRUCTOOLIGOSACCHARIDE BY IMMOBILIZED LEVANSUCRASE*. 2013, Chulalongkorn University.
9. Chih-Yu Cheng, K.-J.D., * Dey-Chyi Sheu, Chi-Tsai Lin & Shin-Yi Li, *Production of Fructooligosaccharides by Immobilized Mycelium of *Aspergillus japonicus**. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 1996.
10. Bedzo, O.K., M. Mandegari, and J.F. Görgens, *Comparison of immobilized and free enzyme systems in industrial production of short-chain fructooligosaccharides from sucrose using a techno-economic approach*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2019. **13**(5): p. 1274-1288.

11. Ghazi, I., et al., *Immobilisation of fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005. **35**(1-3): p. 19-27.
12. Sangmanee, S., et al., *Production and immobilization of Levansucrase*. Chiang Mai J Ence, 2015. **42**(1): p. 44-51.
13. Detofol, M.R., et al., *Modeling and simulation of fructooligosaccharides synthesis in a batch basket reactor*. J Biotechnol, 2015. **210**: p. 44-51.
14. Santos-Moriano, P., et al., *Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from Zymomonas mobilis: effect of reaction conditions*. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 2015. **119**: p. 18-25.
15. Dahech, I., et al., *Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats*. International journal of biological macromolecules, 2011. **49**(5): p. 942-947.
16. Saito, K. and F. Tomita, *Diffructose anhydrides: their mass-production and physiological functions*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2000. **64**(7): p. 1321-1327.
17. Esawy, M.A., et al., *Levansucrase optimization using solid state fermentation and levan biological activities studies*. Carbohydrate polymers, 2013. **96**(1): p. 332-341.
18. Öner, E.T., L. Hernández, and J. Combie, *Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects*. Biotechnology advances, 2016. **34**(5): p. 827-844.
19. Kulminskaya, A.A., et al., *Biochemical characterization of Aspergillus awamori exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2003. **1650**(1-2): p. 22-29.
20. Hidaka, H., M. Hirayama, and N. Sumi, *A fructooligosaccharide-producing enzyme from Aspergillus niger ATCC 20611*. Agricultural and Biological Chemistry, 1988. **52**(5): p. 1181-1187.

21. Ortiz-Soto, M.E., et al., *Selected mutations in Bacillus subtilis levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties*. Protein Engineering, Design and Selection, 2008. **21**(10): p. 589-595.
22. Lyness, E.W. and H.W. Doelle, *Levansucrase from Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters, 1983. **5**(5): p. 345-350.
23. L'Hocine, L., et al., *Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from Aspergillus niger AS0023*. Journal of biotechnology, 2000. **81**(1): p. 73-84.
24. Hayashi, S., et al., *Purification and properties of β -fructofuranosidase from Aspergillus japonicus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1992. **8**(3): p. 276-279.
25. Yoshikawa, J., et al., *Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from Aureobasidium pullulans*. Biotechnology Letters, 2008. **30**(3): p. 535-539.
26. Tieking, M., et al., *Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate Lactobacillus sanfranciscensis TMW 1.392*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **66**(6): p. 655-663.
27. Chávez, F.P., et al., *Purification and characterization of an invertase from Candida utilis: comparison with natural and recombinant yeast invertases*. Journal of biotechnology, 1997. **53**(1): p. 67-74.
28. Jangiam, W., *Produce prebiotic in form of Levan by added value of molasses*. 2018.
29. Charoenwongpaiboon, T., et al., *Highly porous core-shell chitosan beads with superb immobilization efficiency for Lactobacillus reuteri 121 inulosucrase and production of inulin-type fructooligosaccharides*. RSC advances, 2018. **8**(30): p. 17008-17016.
30. Esawy, M., D. Mahmoud, and A. Fattah, *Immobilisation of Bacillus subtilis NRC33a levansucrase and some studies on its properties*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2008. **25**(2): p. 237-246.

31. Bersaneti, G.T., C. Baldo, and M.A.P. Colabone Celligoi, *Immobilization of levansucrase: strategies and biotechnological applications*. Journal of the Chilean Chemical Society, 2019. **64**(1): p. 4377-4381.
32. Mouelhi, R., F. Abidi, and M.N. Marzouki, *An improved method for the production of fructooligosaccharides by immobilized β -fructofuranosidase from *Sclerotinia sclerotiorum**. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2016. **63**(2): p. 281-291.
33. Sheldon, R.A. and S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6223-6235.
34. Fogler, H.S. and S.H. Fogler, *Elements of chemical reaction engineering*. 1999: Pearson Educación.
35. Jung, K.H., et al., *Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose*. Enzyme and microbial technology, 1989. **11**(8): p. 491-494.
36. Duan, K.J., J.S. Chen, and D.C. Sheu, *Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose*. Enzyme and microbial technology, 1994. **16**(4): p. 334-339.
37. Nishizawa, K., M. Nakajima, and H. Nabetani, *Kinetic study on transfructosylation by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for fructooligosaccharide production*. Food Science and Technology Research, 2001. **7**(1): p. 39-44.
38. Rocha, O., et al., *A dynamical model for the fermentative production of fructooligosaccharides*, in *Computer Aided Chemical Engineering*. 2009, Elsevier. p. 1827-1832.
39. Schorsch, J., et al., *Identification and optimal control of fructo-oligosaccharide production*. IFAC-PapersOnLine, 2018. **51**(18): p. 678-683.
40. Wangpaiboon, K., et al., *Synergistic enzyme cocktail between levansucrase and inulosucrase for superb levan-type fructooligosaccharide synthesis*. Enzyme and Microbial Technology, 2022. **154**: p. 109960.

41. Lorenzoni, A.S., et al., *Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized beta-fructofuranosidase from Aspergillus aculeatus*. Carbohydr Polym, 2014. **103**: p. 193-7.
42. Hayashi, S., et al., *Immobilization of β -fructofuranosidase from Aureobasidium sp. ATCC 20524 on porous silica*. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 1992. **9**(3-4): p. 247-250.
43. Alvarado-Huallanco, M.B. and F. Maugeri-Filho, *Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from Rhodotorula sp.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2010. **85**(12): p. 1654-1662.
44. Cheng, C.Y., et al., *Production of fructooligosaccharides by immobilized mycelium of Aspergillus japonicus*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology, 1996. **66**(2): p. 135-138.
45. DataVedas, *MODEL EVALUATION – REGRESSION MODELS*. 2018.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว ศศินา พลับวังกล้า
วัน เดือน ปี เกิด	19 ธันวาคม 2540
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	253 หมู่ 6 ตำบลน้ำพุ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY