บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการทำเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำเอนไซม์ CGTase (crude enzyme) ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* A11 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi's Medium มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นที่ 4° ซ ตามวิธีในรูปที่ 2.1 (วิธีทดลองข้อ 2.10) โดยให้เอนไซม์ดูดซับกับแป้งข้าวโพด แล้วล้างตะกอนแป้งด้วย 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ จากผลการทดลองซึ่งแสดงดังตารางที่ 3.1 จะพบว่ามีการสูญเสียเอนไซม์ในขั้นตอนการดูดซับด้วยแป้ง (ใน supernatant A) ประมาณ 8 เปอร์เซนต์ สำหรับในส่วนของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้างตะกอนแป้งนั้นไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย หลังจากนั้นชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยสารละลาย 0.2 M มอลโตสใน 10 mM ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้วจะมีแอคติวิตีจำเพาะ2,720 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เดิม 15 เท่า และมี yield เท่ากับ 85 % จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำการทดลองตรึงต่อไป

3.2 ผลการตรึงเอนไซม์ CGTase

3.2.1 ผลการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ

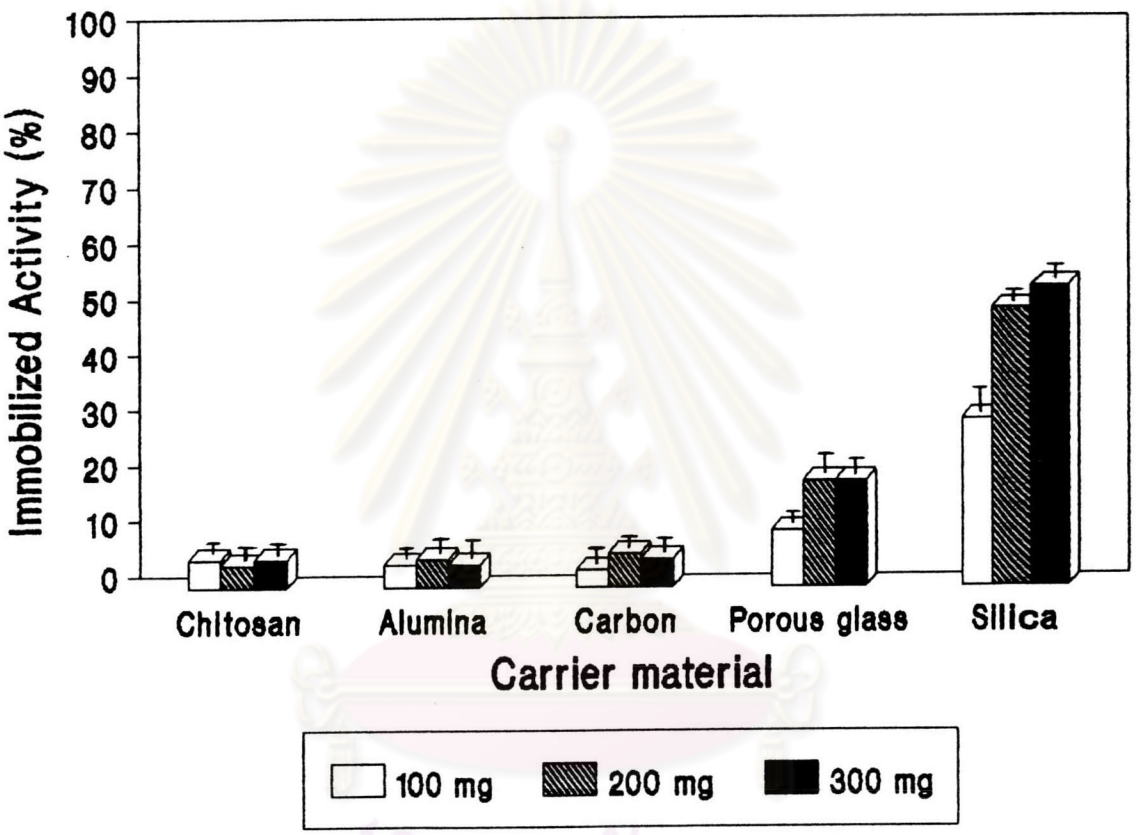
นำเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วมาทดลองตรึงบนตัวค้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ ไคโตแซน อะลูมินา คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน และซิลิกา ตามวิธีทดลองข้อ 2.11.1 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1 พบว่าปริมาณตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึงอยู่ในช่วง 200-300 มิลลิกรัม ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวค้ำ และจากรูปที่ 3.1 จะเห็น

I17192274

Step	Volume (ml)	Total Dext.act. (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	1,000	80,000	430	186	100	1
Supernatant A	2,000	7,000	380	18	-	-
Partial purified enzyme	290	68,000	25	2,720	85	15

ตารางที่ 3.1 ผลการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วนตามรูปที่ 2.1 (วิธีทดลองที่ 2.10)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 ผลการตรึงเอนไซม์ CGTase บนตัวค้ำด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ

(จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง n=2)

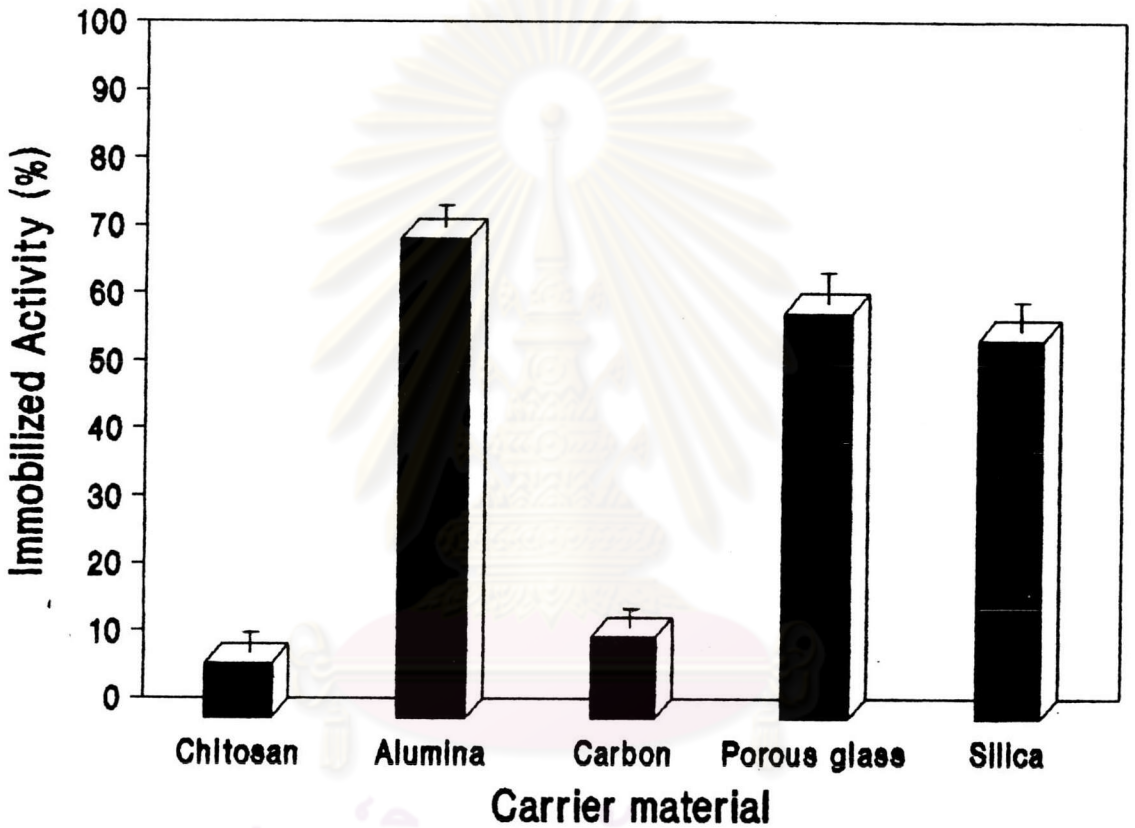
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้ว่า ซิลิกาเป็นตัวค้ำที่สามารถตรึงเอนไซม์ CGTaseได้ดีที่สุด โดยสามารถตรึงเอนไซม์ได้ติด 54 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น ส่วนตัวค้ำอื่นตรึงเอนไซม์ได้น้อยมาก ดังนั้นซิลิกาจึงเป็นตัวค้ำที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ

เมื่อเลือกได้ตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึง ซึ่งได้แก่ซิลิกาแล้ว จึงทำการทดลองต่อโดยเพิ่มปริมาณซิลิกาและเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึง (อัตราส่วนระหว่างซิลิกาต่อเอนไซม์คงเดิม) เพื่อนำไปทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินต่อไป โดยนำเอนไซม์ CGTase ที่ได้จากการตรึงบนซิลิกาไปผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40^{o} ซ โดยใช้ 1 % soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ เป็นสับสเตรท ป้อนเข้าด้านบน เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ แล้วนำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน พบว่าเอนไซม์ค่อยๆหลุดออกมาจากคอลัมน์ตลอดเวลา แสดงว่าเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงหลุดออกจากตัวค้ำซิลิกา ดังนั้นการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เพื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

3.2.2 ผลการตรึงเอนไซม์ CGTase กับตัวค้ำด้วยวิธีโคเวเลนต์

เมื่อการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทริน จึงปรับปรุงการทดลองการตรึงเอนไซม์โดยใช้วิธียึดติดเอนไซม์กับตัวค้ำด้วยพันธะโคเวเลนต์ โดยนำตัวค้ำที่จะใช้ตรึงเอนไซม์ซึ่งได้แก่ ไคโตแซน อะลูมินา คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน และซิลิกา มากระตุ้นด้วยอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (APTS) และกลูทารัลดีไฮด์ (GLT) ตามลำดับ ดำเนินวิธีการทดลองตามข้อ 2.11.2 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.2 พบว่า ตัวค้ำที่สามารถตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีโคเวเลนต์ได้ดีที่สุด ได้แก่ อะลูมินา โดยสามารถตรึงเอนไซม์ติด 71 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีตั้งต้น โดยมีเม็ดแก้วพรุนและซิลิกา เป็นตัวค้ำที่มีประสิทธิภาพรองลงมา คือ ตรึงเอนไซม์ได้ 57 และ 54 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในขณะที่คาร์บอนและไคโตแซนเป็นตัวค้ำที่ไม่ดี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

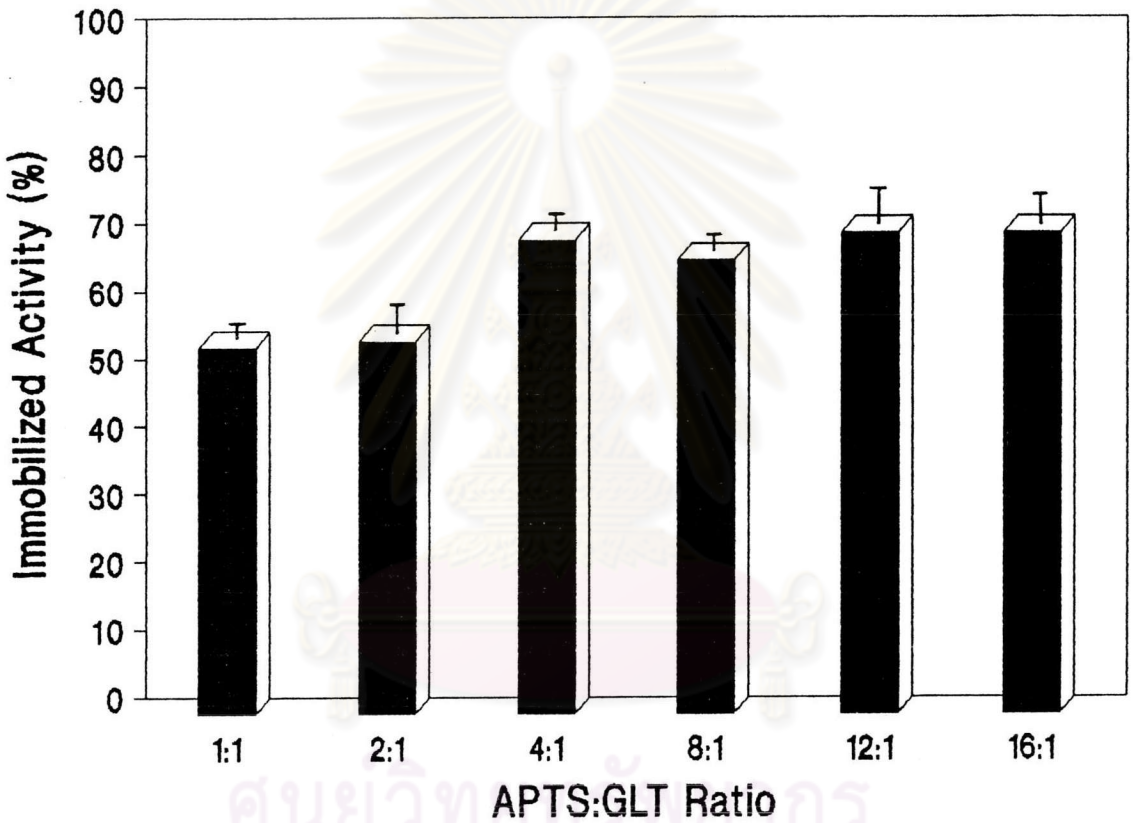
รูปที่ 3.2 ผลการตรึงเอนไซม์ CGTase บนตัวค้ำด้วยวิธีโคเวเลนต์

(จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง n=2)

หลังจากเลือกอะลูมินาเป็นตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีโคเวเลนต์แล้ว จึงทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์เพื่อให้สามารถตรึงเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง โดยปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งได้แก่อัตราส่วนของ APTS และ GLT ที่ใช้ในการกระตุ้นอะลูมินา ดังนั้นจึงทำการทดลองกระตุ้นอะลูมินาโดยใช้ปริมาณ APTS และ GLT ที่อัตราส่วนต่างๆกัน ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3 พบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนของ APTS และ GLT เท่ากับ 1:1 และ 2:1 อะลูมินาจะสามารถตรึงเอนไซม์ติดได้ 54 และ 55 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น ตามลำดับ แต่เมื่อใช้อัตราส่วนของ APTS และ GLT เท่ากับ 4:1, 8:1, 12:1 และ 16:1 จะสามารถตรึงเอนไซม์ติดได้ในช่วง 67-70 เปอร์เซนต์ ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมของ APTS และ GLT ในการกระตุ้นอะลูมินา ให้มีประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ CGTase ได้ดีที่สุด เท่ากับ 4:1

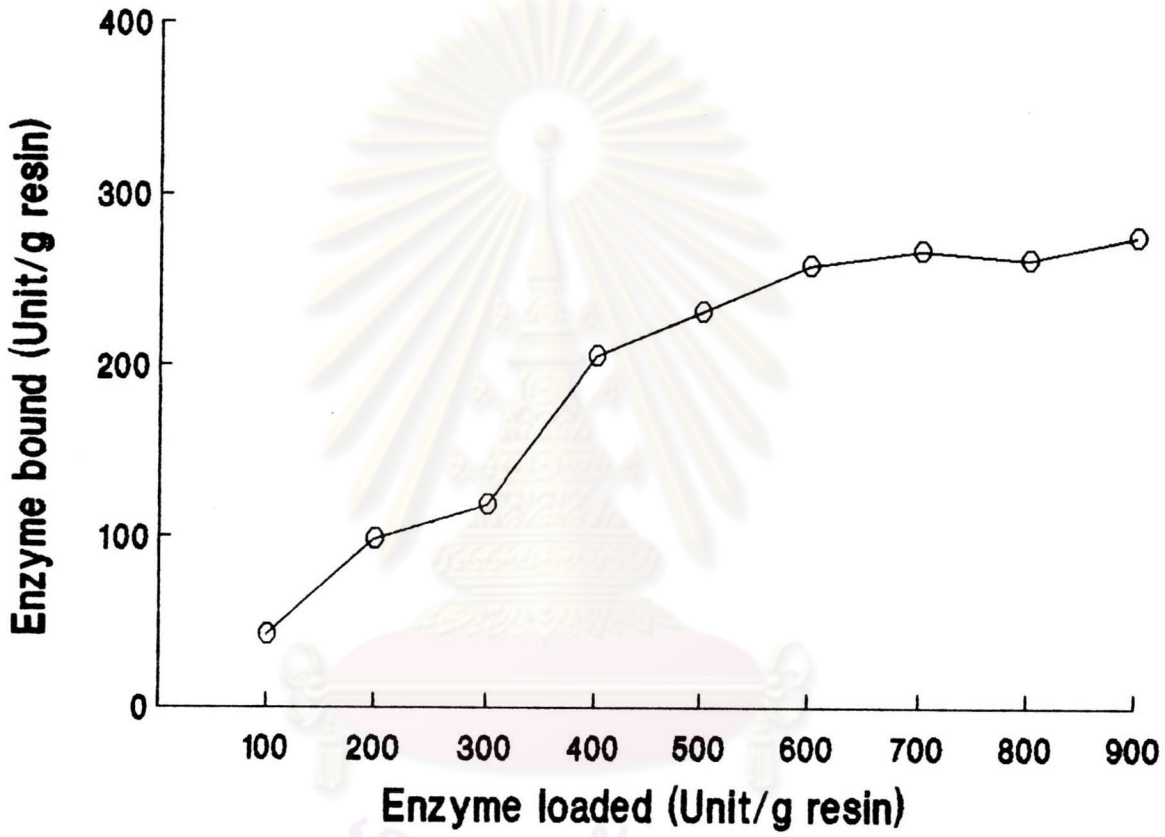
3.2.3 ผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์ CGTase และตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึง

หลังจากเลือกอะลูมินาให้เป็นตัวค้ำเพื่อใช้สำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีโคเวเลนต์ได้แล้ว จึงทำการทดลองต่อเพื่อศึกษาสัดส่วนของเอนไซม์ CGTase และอะลูมินาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรึงเอนไซม์เพื่อให้ได้ yield สูงสุด โดยเตรียมอะลูมินาตามวิธีข้อ 2.11.2.1 จากนั้นนำมาแบ่งใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร ขวดละ 1 กรัม ใส่เอนไซม์ CGTase ลงไปในแต่ละขวด โดยแปรแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งแต่ 0 ถึง 900 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ให้เป็น 10 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.4 โดยจะพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการตรึงคือ อะลูมินา 1 กรัม ต่อเอนไซม์ 600 ยูนิต โดยสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 258 ยูนิต



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.3 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ APTS และ GLT ในการกระตุ้นอะลูมินาเพื่อนำไปใช้ในการตรึงเอนไซม์ (จำนวนครั้งที่ทำการทดลอง n=2)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.4 ความสามารถในการตรึงเอนไซม์ CGTase ของอะลูมินา ที่ถูกกระตุ้นด้วย APTS และ GLT

3.3 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง

3.3.1 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง

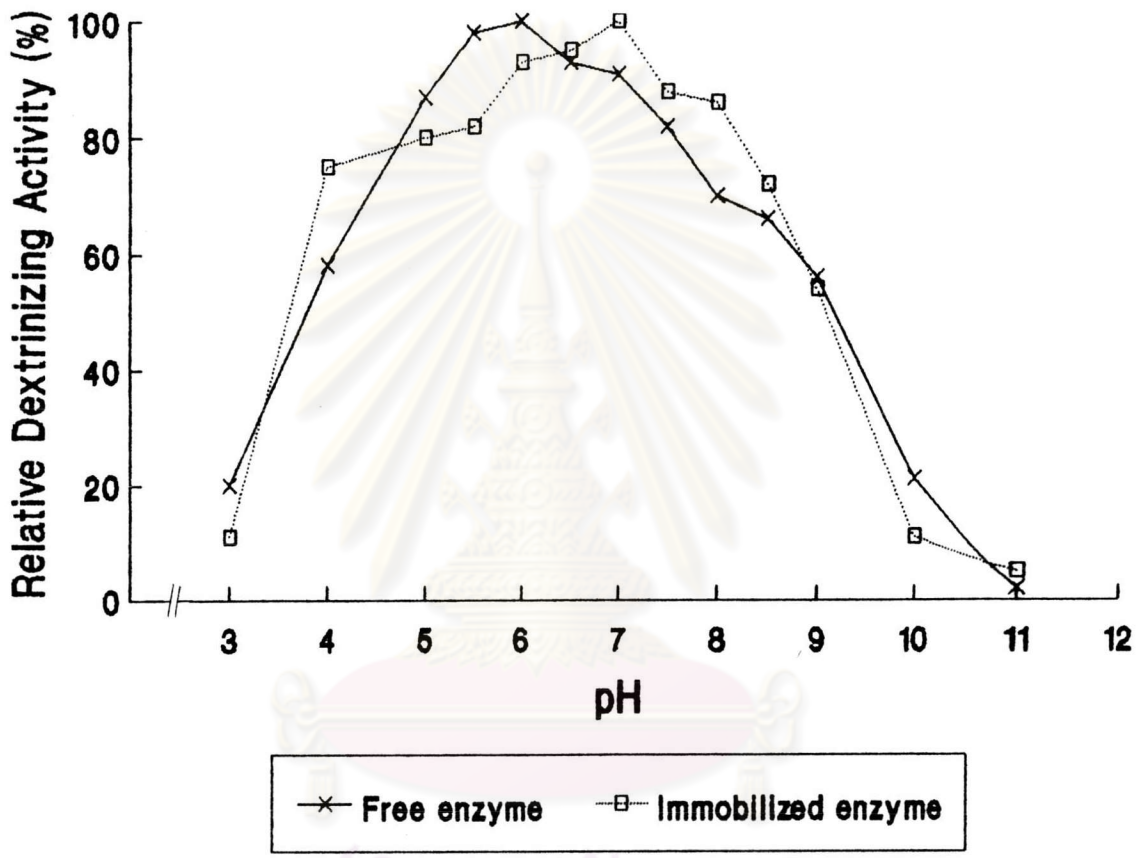
นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงไปวัดแอคติวิตีตามวิธีข้อ 2.8.1.1 และ 2.8.2.1 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3.0-11.0 (pH 3.0-6.0 ใช้สารละลายแอซีเตทบัฟเฟอร์, pH 6.5-7.5 ใช้สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์, pH 8.0-9.5 ใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ และ pH 10.0-11.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.5 ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์ CGTase อิสระ และเอนไซม์ตรึงจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH แตกต่างกัน โดยจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด pH 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ โดยเอนไซม์ทั้งสองสภาวะจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 5.0-8.0

3.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง

นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.8.1.1 และ 2.8.2.1 โดยใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 20-95° ซ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.6 พบว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิใกล้เคียงกัน คือในช่วง 50-60° ซ โดยเอนไซม์อิสระจะสามารถเร่งปฏิกิริยาในช่วงอุณหภูมิ 60-75° ซ ได้ดีกว่า เอนไซม์ตรึง

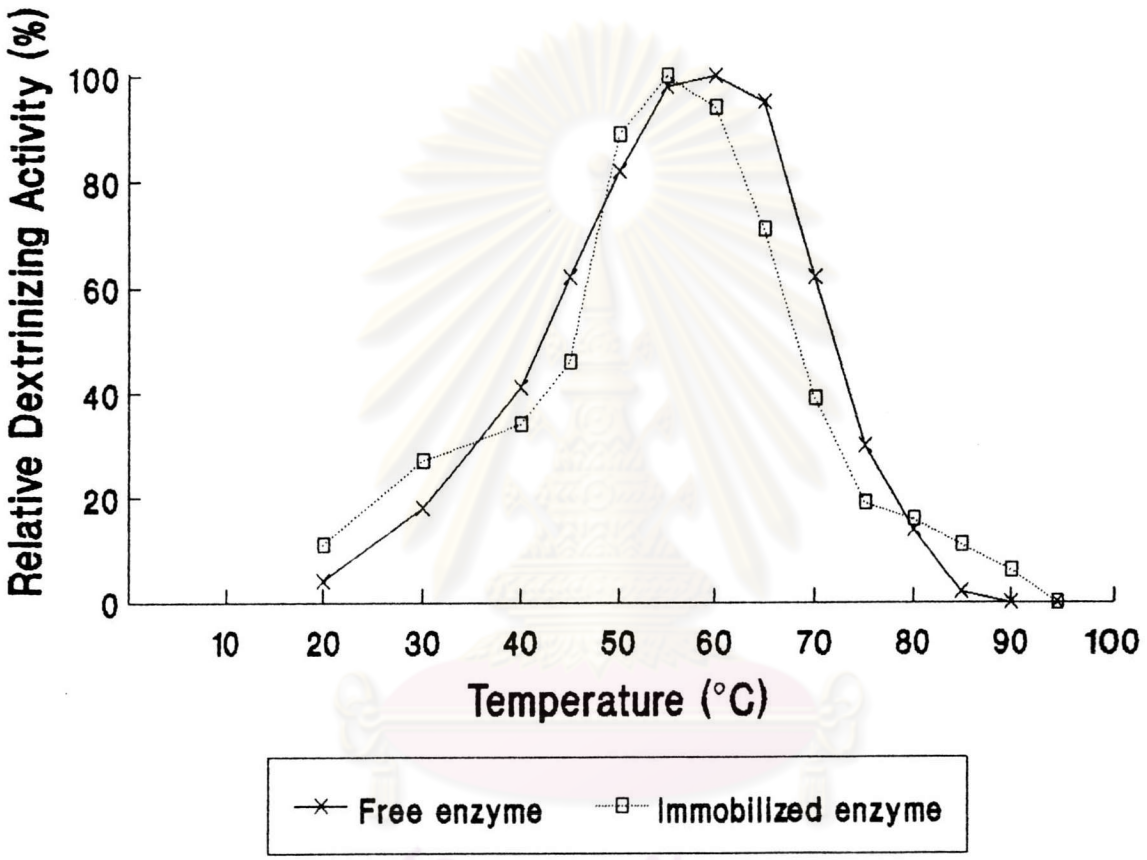
3.3.3 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง

นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าpH 3.0 -11.0 (pH 3.0-6.0 ใช้สารละลายแอซีเตทบัฟเฟอร์,pH 8.0-9.5 ใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ และ pH 10.0-11.0 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์) ที่อุณหภูมิ 40° ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงมาวัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.8.1.1 และ 2.8.2.1 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.7 โดยจะพบว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่อ pH ใกล้เคียงกัน แต่เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่อ pH เป็นเบสได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระเล็กน้อย



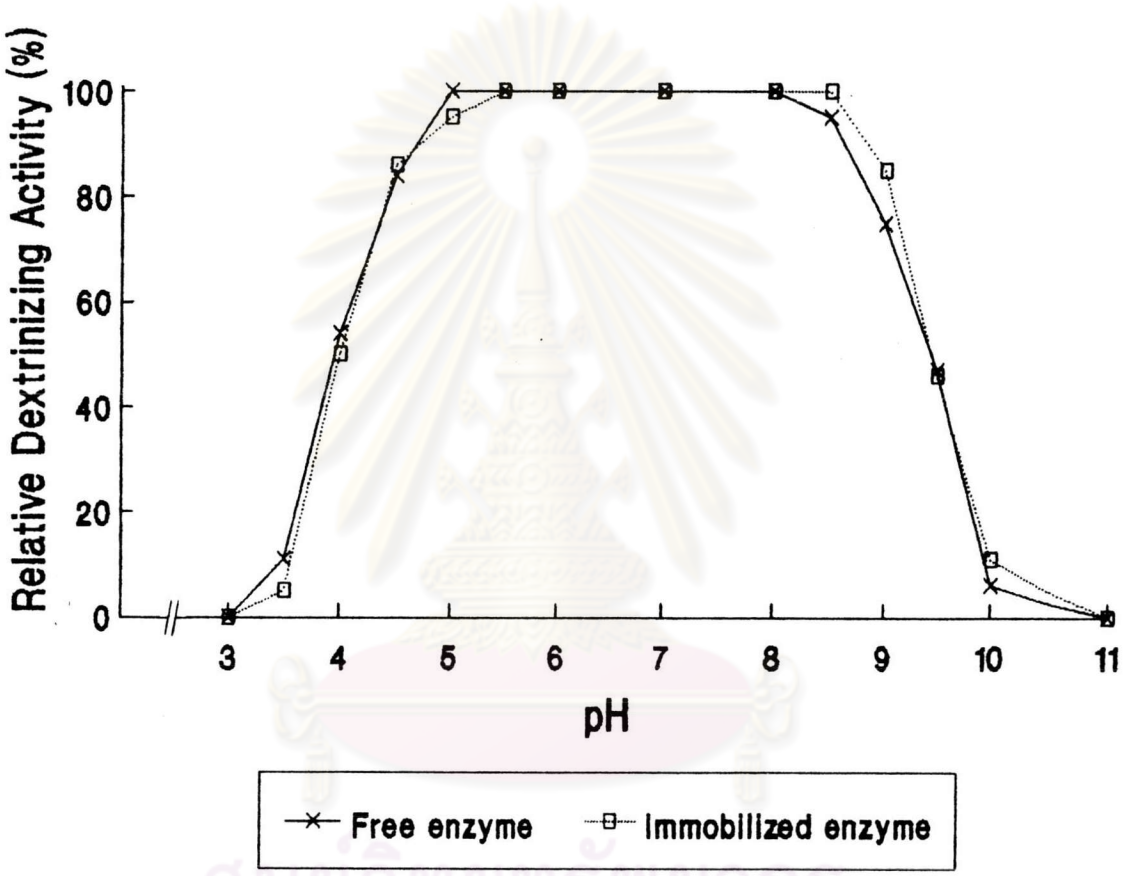
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.5 ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.6 ผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง



รูปที่ 3.7 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง

นำเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงมาบ่มในสารละลาย 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-85° ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีตามวิธีข้อ 2.8.1.1 และ 2.8.2.1 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.8 ซึ่งจะพบว่าเอนไซม์ตรึงจะมีความเสถียรได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ โดยเอนไซม์อิสระจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 45° ซ ในขณะที่เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 55° ซ และสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดที่อุณหภูมิ 80 และ 85° ซ ตามลำดับ

3.4 ผลการศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ระยะยาว

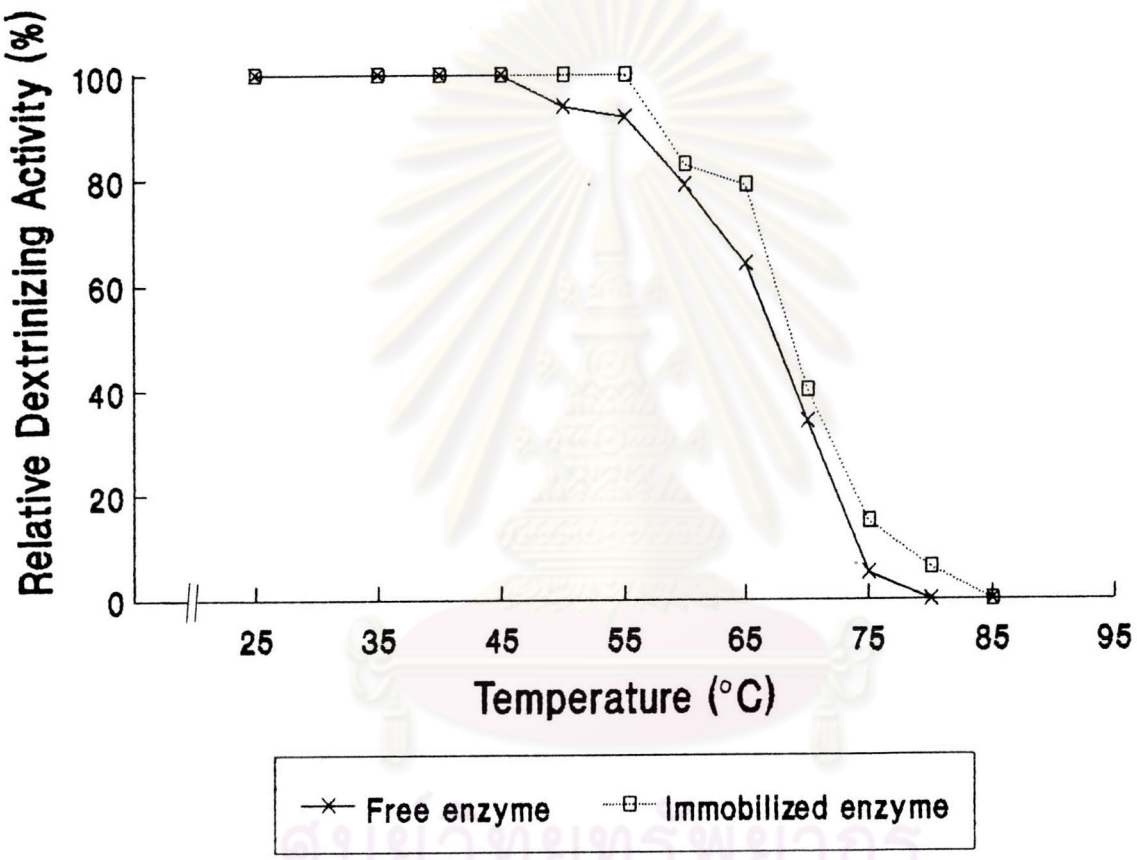
นำเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึงมาเก็บรักษาในสารละลาย 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 4° ซ เก็บตัวอย่างของเอนไซม์ ทั้งสองชนิดมามาวัดแอคติวิตีตามวิธีทดลองข้อ 2.8.1.1 และ 2.8.2.1 ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.9 พบว่าเอนไซม์ตรึงและเอนไซม์อิสระมีแอคติวิตีไม่แตกต่างกัน เมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลานาน 30 วัน

3.5 ผลการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากเอนไซม์CGTaseที่ถูกตรึงในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง

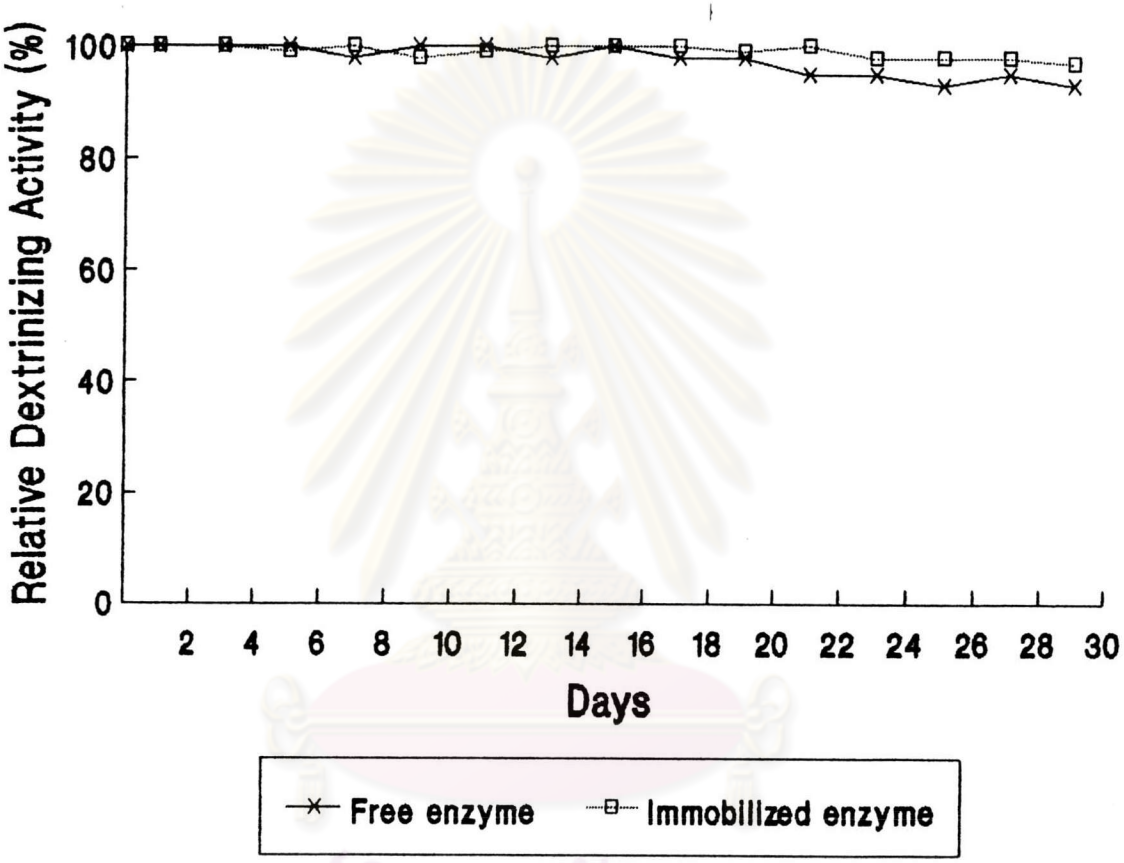
เนื่องจากข้อได้เปรียบสำคัญประการหนึ่งของการตรึงเอนไซม์ได้แก่การที่สามารถนำเอนไซม์ตรึงนั้นมาใช้งานได้ในระบบต่อเนื่อง ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปได้แก่การนำเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์มาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง

3.5.1 ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

ทำการทดลองเพื่อศึกษาช่วงเวลาที่เอนไซม์ตรึงสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดตามวิธีทดลองข้อ 2.12.1 โดยใช้เอนไซม์ตรึงในคอลัมน์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40° ซ และใช้ 1 % (w/v) soluble starchใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์เป็นสับสเตรทป้อนเข้าด้านบน จากการวิเคราะห์ปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน



รูปที่ 3.8 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.9 ผลการศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ CGTase อิสระและเอนไซม์ตรึงระยะยาวที่อุณหภูมิ 4 °ซ

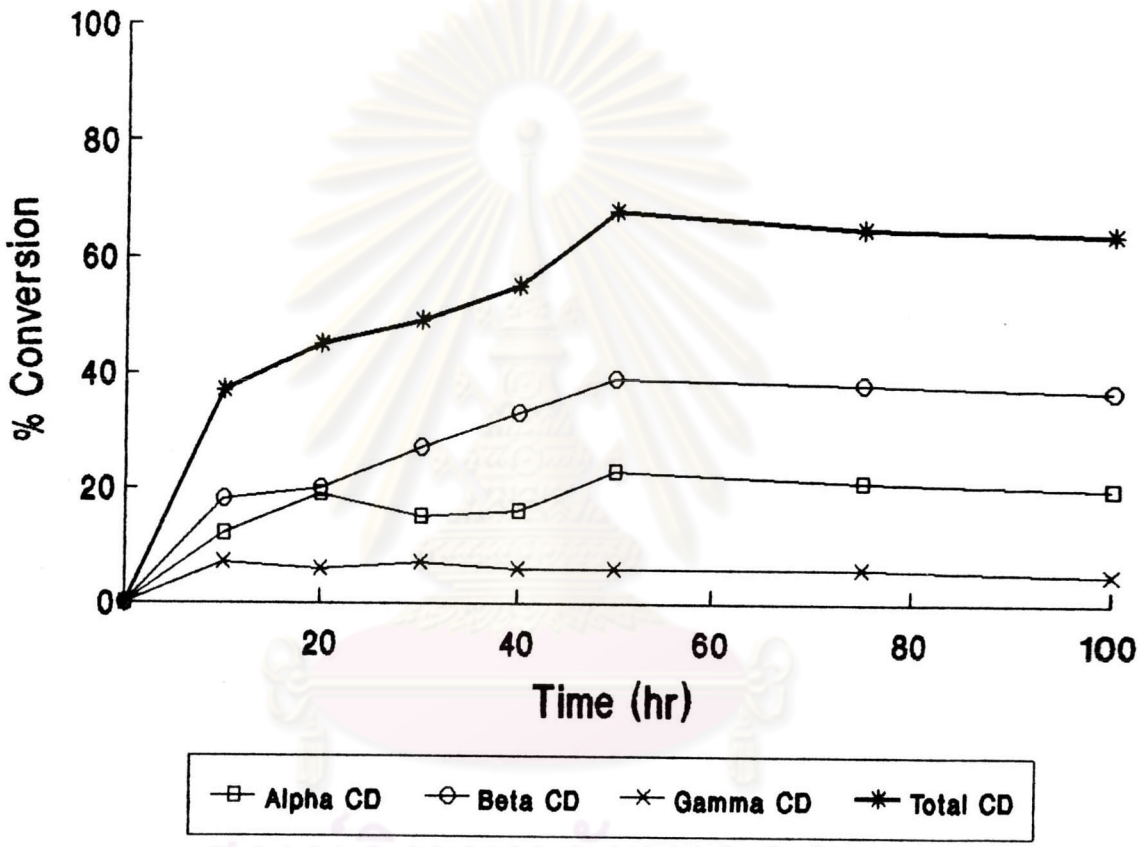
ในแฟรคชันที่เก็บได้ในช่วงเวลาต่างๆโดยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3 ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.10 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตรึงจะสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดที่เวลา 50 ชั่วโมง โดยเมื่อผ่านเวลา 50 ชั่วโมงไปแล้ว เอนไซม์ตรึงจะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในปริมาณค่อนข้างคงที่ ซึ่งปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้คิดเป็นค่า % conversion (วิธีการคำนวณดูภาคผนวกที่ 7) เท่ากับ 68 เปอร์เซนต์ โดยที่ไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ประกอบด้วย แอลฟา เบตา และแกมมาไซโคลเดกซ์ทริน โดยมีเบตาไซโคลเดกซ์ทริน เป็นผลิตภัณฑ์หลักและอัตราส่วนของ แอลฟา:เบตา:แกมมา ประมาณ 2:4:1

3.5.2 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

ศึกษาความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ตรึง โดยทำการทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์ตามวิธีข้อ 2.12.2 โดยใช้สับสเตรท soluble starch ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-3.0% (w/v) และมีอัตราการป้อนสับสเตรท 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ที่ช่วงเวลาต่างๆ ผลการทดลองแสดงในภาคผนวกที่ 8.1-8.4 และสรุปไว้ในรูปที่ 3.11 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตรึงสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเป็น 0.5 % โดยคิดเป็นค่า % conversion เท่ากับ 81 เปอร์เซนต์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ จะพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทต่ำเช่น 0.5 % ถึงแม้ % conversion จะมีค่าสูงแต่ได้ไซโคลเดกซ์ทรินต่ำ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสับเสตรทเท่ากับ 1.5 % เนื่องจากมี % conversion ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 0.5 % อยู่ไม่เกิน 10 % แต่ผลผลิตที่ได้มีค่าสูงกว่าผลผลิตจากการใช้สับสเตรทเข้มข้น 0.5 % ถึง 2 เท่า

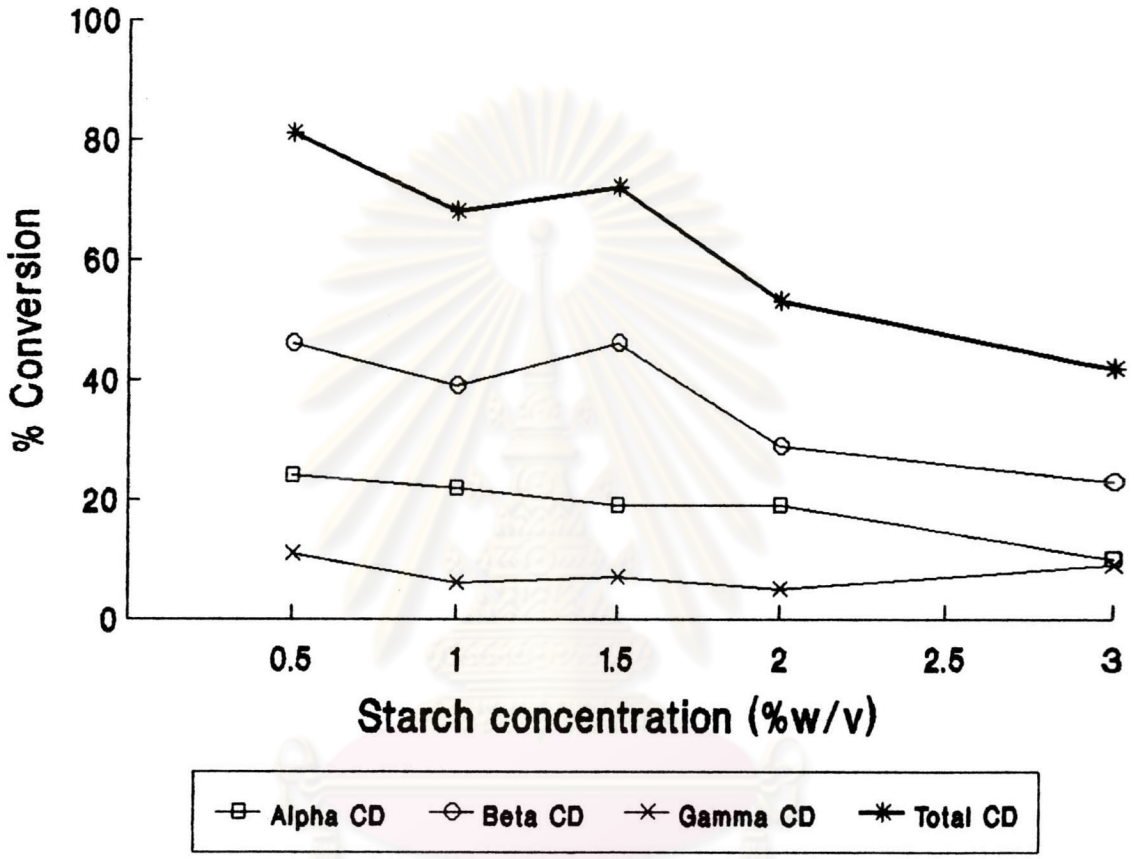
3.5.3 ผลของอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

เมื่อเลือกใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมได้เท่ากับ 1.5 %(w/v) แล้ว จึงทำการทดลองศึกษาปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินอีกประการหนึ่งซึ่งได้แก่ อัตราการป้อนสับสเตรท โดยทำการทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์ตามวิธีข้อ 2.12.3



รูปที่ 3.10 ผลของเวลาในการบ่มเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ กับ สับสเตรท 1.0 % soluble starch เมื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง โดยใช้อัตราการป้อนสับสเตรท 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.11 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง ของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ เมื่อใช้อัตราการป้อนสับสเตรท 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

และแปรผันอัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทเท่ากับ 3, 5 และ 7 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นที่เวลาต่างๆ ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาคผนวกที่ 8.2,8.5-8.6 และสรุปไว้ในรูปที่ 3.12 จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ตรึงจะสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดเมื่อใช้อัตราเร็วในการป้อนสับสเตรทเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยคิดเป็นค่า % conversion สูงสุดเท่ากับ 72 เปอร์เซนต์

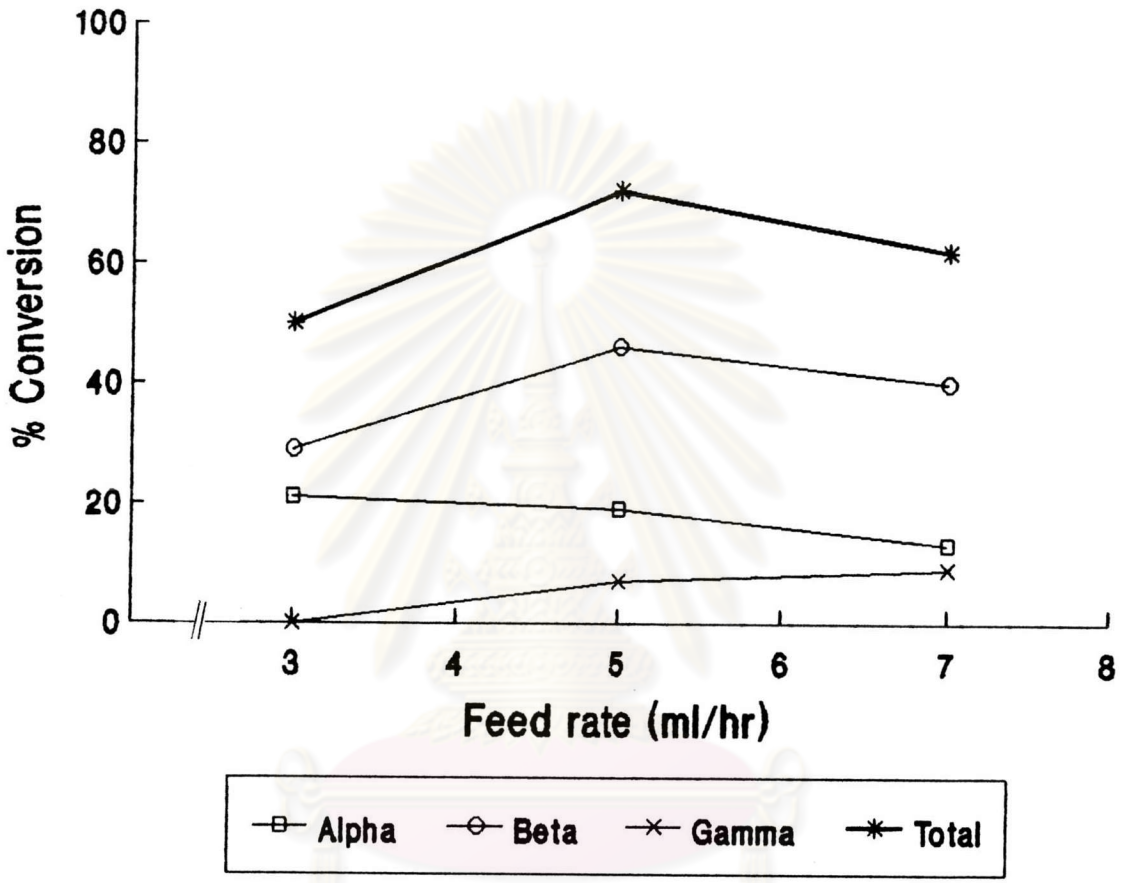
3.5.4 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง เมื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน

3.5.4.1 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยไม่เสริมโซเดียมเอไซด์

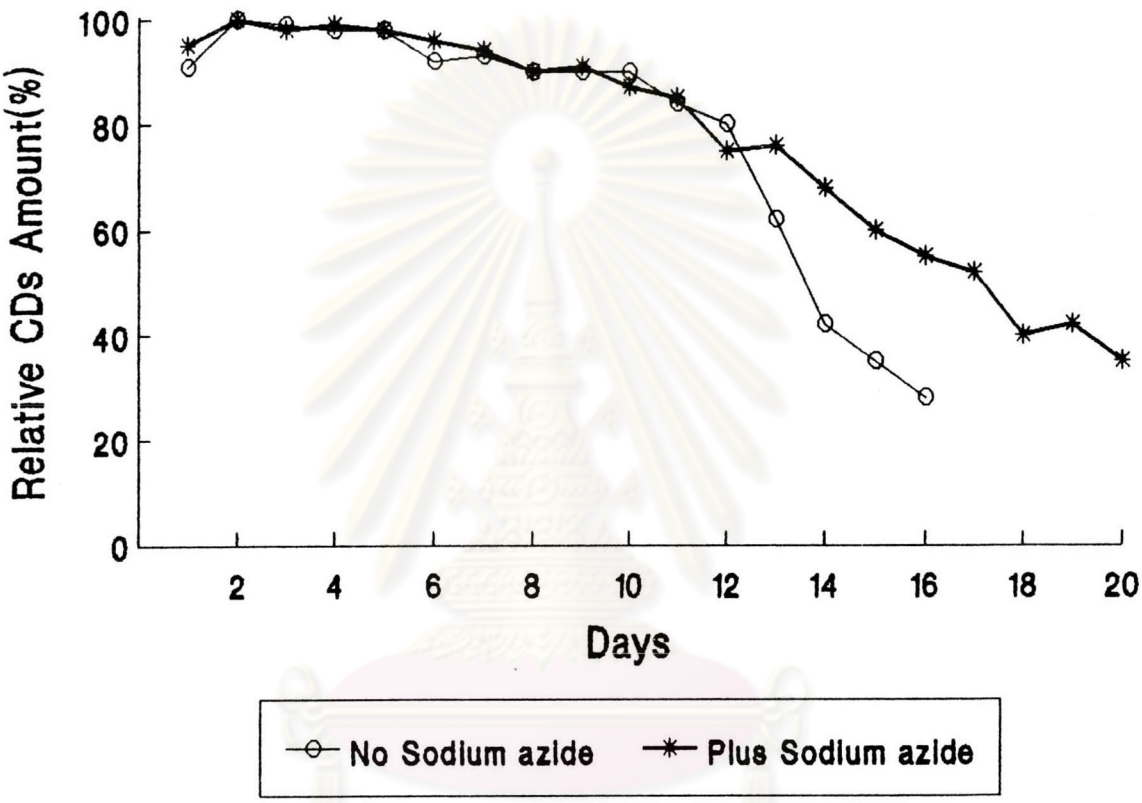
เพื่อศึกษาอายุการใช้งานของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ว่าสามารถนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องได้เป็นเวลานานกี่วัน จึงทำการทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ตรึงแบบต่อเนื่องเป็นเวลานาน เมื่อใช้สภาวะการทำงานที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.4.2 และ 3.4.3 โดยนำเอนไซม์ตรึงมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์แบบต่อเนื่องโดยใช้สับสเตรท คือ 1.5 % (w/v) soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ อัตราการป้อนสับสเตรทเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิที่ 40^{o} ซ ทำการทดลองเป็นเวลา 16 วัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.13 โดยจะเห็นว่าปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เอนไซม์ตรึงผลิตได้จะมีค่าคงที่ในช่วง 5 วันแรก และลดลงประมาณ 10 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้งานจนถึงวันที่ 10 และหลังวันที่ 12 ไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในการทดลองสังเกตเห็นว่าเริ่มมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว

3.5.4.2 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง โดยเสริมโซเดียมเอไซด์

จากผลการทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่อง พบว่าเมื่อดำเนินการผลิตไปเป็นเวลาประมาณ 13-14 วัน จะเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ขึ้นในคอลัมน์



รูปที่ 3.12 ผลของอัตราการป้อนสับสเตรทต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง ของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ เมื่อใช้ 1.5 % soluble starch เป็นสับสเตรท



รูปที่ 3.13 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ เมื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง โดยใช้ 1.5 % soluble starch ที่เติมและไม่เติมโซเดียมเอไซด์ เป็นสับสเตรท อัตราการป้อนสับสเตรทเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

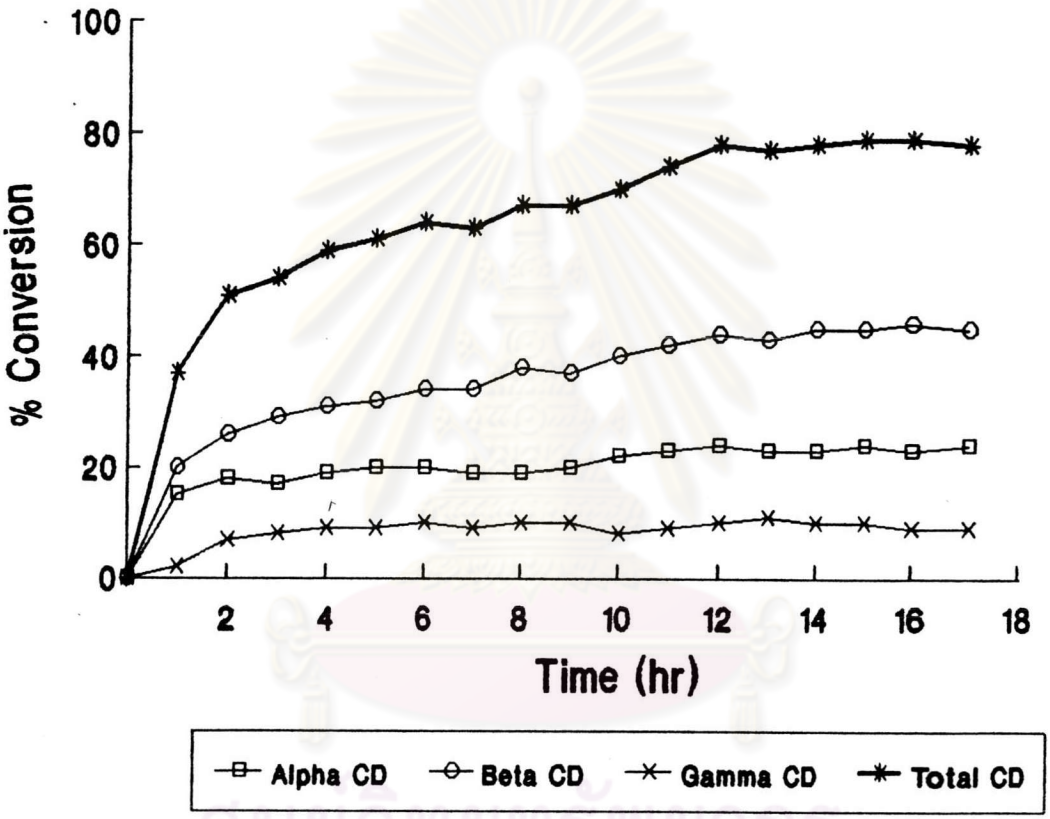
ดังผลที่ได้จากข้อ 3.5.4.1 ดังนั้นจึงปรับปรุงการทดลองโดยเติมสารเคมีเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าโซเดียมเอไซด์ 0.02 เปอร์เซนต์ ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase อิสระ (อุไรวรรณ รัชธร, 2536) และเอนไซม์ตรึงบนอะลูมินา (ดูภาคผนวกที่ 9) ดังนั้นจึงทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องด้วยสภาวะเติมและเติมโซเดียมเอไซด์ 0.02 เปอร์เซนต์ ลงในสับสเตรทด้วย ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.13 ซึ่งพบว่าในช่วง 12 วันแรก การผลิตไม่ต่างจากสภาวะที่ไม่ใส่โซเดียมเอไซด์นัก แต่ภายหลังจากวันที่ 12 ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะลดลงในอัตราที่ช้ากว่าสภาวะที่ไม่เสริมโซเดียมเอไซด์ และจากการสังเกตพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เกิดขึ้นระหว่างดำเนินการผลิต

3.6 <u>ผลการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงในถังปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่อง</u>

ข้อได้เปรียบที่สำคัญอีกประการหนึ่งของเอนไซม์ตรึง ได้แก่การที่สามารถนำเอนไซม์ตรึงนั้นกลับมาใช้งานได้อีก ดังนั้นจึงทำการศึกษาการใช้งานของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์เมื่อนำมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำหลายๆครั้ง

3.6.1 ผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่อง

ทำการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงในถังปฏิกิริยาแบบไม่ต่อเนื่องเมื่อทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.13.1 เพื่อหาช่วงเวลาที่เอนไซม์ สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุด เมื่อผสมเอนไซม์ตรึงกับ 1.5 % (w/v) soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 40°ซ วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาต่างๆโดยวิธี HPLC ตามวิธีทดลองข้อ 2.8.3 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.14 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตรึงสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะค่อนข้างคงที่ โดยมีค่า



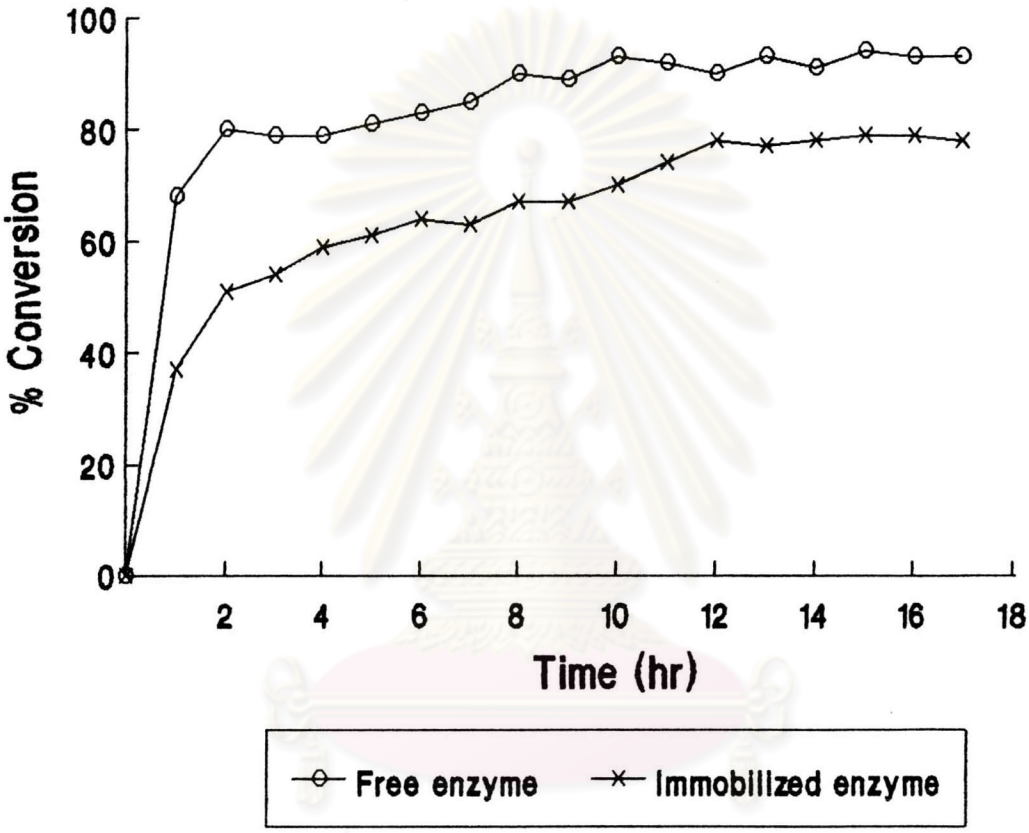
รูปที่ 3.14 ผลของเวลาในการบ่มเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์กับ สับสเตรท 1.5 % soluble starch เมื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวนแบบไม่ต่อเนื่อง

% conversion เท่ากับประมาณ 78 เปอร์เซนต์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิด โดยมีเบตาไซโคลเดกซ์ทรินเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และมีอัตราส่วนปริมาณแอลฟา:เบตา:แกมมา เท่ากับ 2:4:1

เมื่อพิจารณาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ CGTase อิสระ (partial purified enzyme) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ตรึง เมื่อใช้แอคติวิตีของเอนไซม์ในปริมาณเท่ากัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.15 ซึ่งพบว่าเอนไซม์อิสระสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ดีกว่าเอนไซม์ตรึงเล็กน้อย โดยมีค่า % conversion สูงสุดเท่ากับ 94 เปอร์เซนต์ ที่เวลา 10 ชั่วโมง

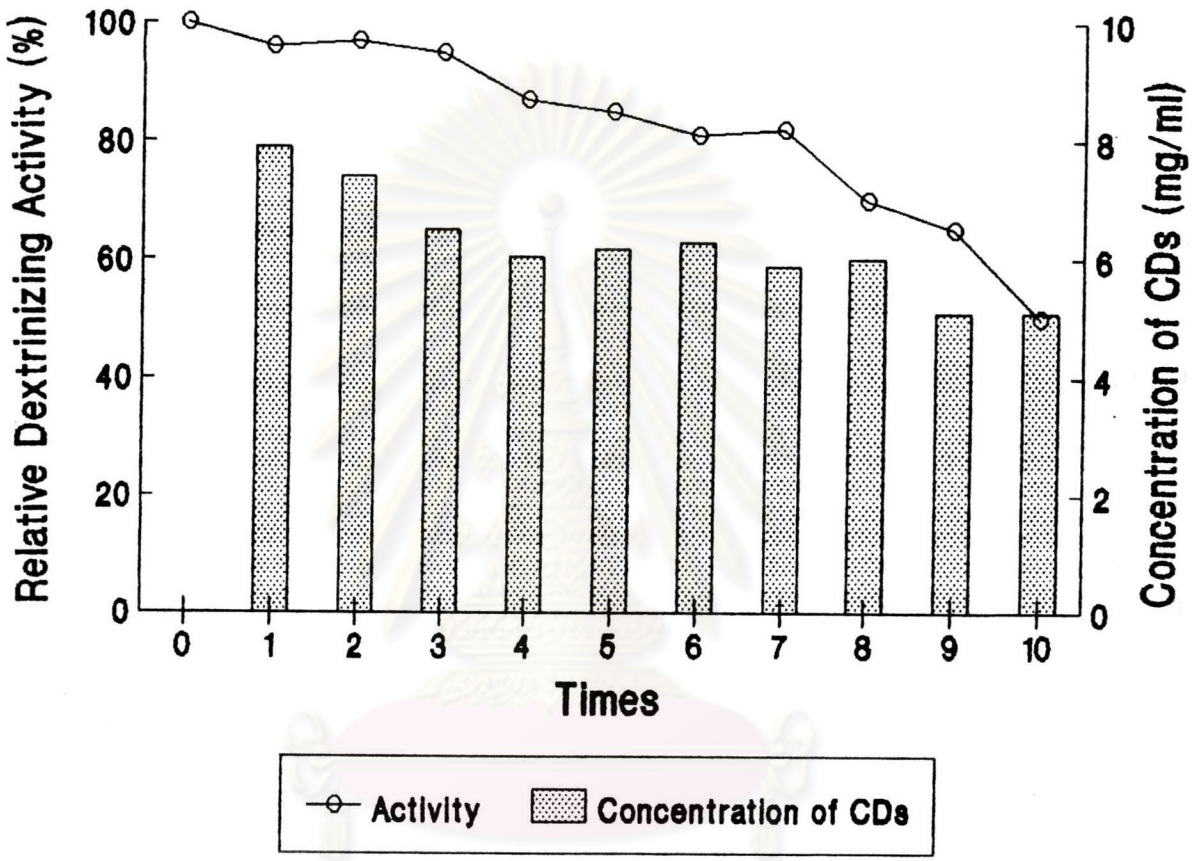
3.6.2 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงเมื่อนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำหลายครั้ง

นำเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงมาทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.13.2 เพื่อศึกษาอายุการใช้งานเมื่อนำมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำหลายครั้ง โดยบ่มเอนไซม์ตรึงกับ 1.5% (w/v) soluble starch ใน 50 mM แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ซึ่งมี 10 mM แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 40° ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นและแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึง แล้วนำเอนไซม์ตรึงมาล้างด้วย สารละลายแอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 3 ครั้งก่อนนำไปใช้ผลิตครั้งต่อไป ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.16 ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตรึงจะมีแอคติวิตีภายหลังการใช้งาน 3 ครั้งแรกค่อนข้างคงที่ จากนั้นแอคติวิตีจะเริ่มลดลงเรื่อยๆโดยภายหลังการใช้งานครั้งที่ 7 จะเหลือแอคติวิตี 80 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น และเหลือ 50 เปอร์เซนต์ เมื่อสิ้นสุดการใช้ครั้งที่ 10 ในขณะที่ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะลดลง 25 เปอร์เซนต์ ภายหลังการใช้งาน 4 ครั้ง และคงที่ในการใช้งานครั้งที่ 5-8 และลดลงอีกประมาณ 15 เปอร์เซนต์ ในการใช้งาน 2 ครั้งสุดท้าย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.15 ผลการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยาแบบกวนของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ



รูปที่ 3.16 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์เมื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ในถังปฏิกิริยาแบบกวนซ้ำหลายครั้ง โดยใช้ 1.5 % soluble starch เป็นสับสเตรทบ่มกับเอนไซม์นานครั้งละ 12 ชั่วโมง