หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 <u>การเก็บรักษาและการเลี้ยงสเตรพโตมัยซิส 190-1</u>

2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายเชื้อเสเตรพโตมัยซิส 190-1 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium) ในขวดแก้วทรงกรวยชนิดเพิ่มการถ่ายเทอากาศ (baffled flask) ขนาด 250 มล. ประมาณ 1 ลูป (1 loopful) ลากบนวุ้นเอียง (agar slant) ซึ่งปรับปรุงจากสูตรอาหารของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (60) (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน หรือจนเห็นสปอร์สีเทาบนวุ้นเอียง จากนั้นพันปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อป้องกันการเสียความชื้นภายในหลอด นำไปเก็บในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (Bio Freezer model 8358) เชื้อในอาหารเอียงนี้จะมีอายุใช้งานราว 1 ปี

2.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ในขวดแก้วทรงกรวย

นำสปอร์แขวนลอยจากแหล่งเชื้อวุ้นเอียง ถ่ายลงในอาหารหัวเชื้อ (inoculum medium) 60 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวย ขนาด 250 มล. (ภาคผนวกหมายเลข 1.2) ที่มีลักษณะพิเศษสำหรับเพิ่มอัตราการถ่ายเทอากาศ (baffled flask) บ่มบนเครื่องเขย่า (incubator shaker; Psychrotherm model G-27) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยเลือกการเขย่าแบบเป็นวง (rotary shaking) ใช้เวลาบ่ม 22-24 ชั่วโมง หัวเชื้อที่ได้นี้ใช้เตรียมหัวเชื้อรุ่นที่ 2 ต่อไป โดยถ่ายลงในอาหารหัวเชื้อดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น โดยใช้หัวเชื้อรุ่นที่หนึ่ง 6 มล. ต่ออาหารหัวเชื้อรุ่นที่สอง 1 ขวด (60 มล.)

2.1.3 การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 10 ลิตร

วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (60) โดยเตรียมหัวเชื้อรุ่นที่ 2 700 มล. ถ่ายลงในอาหารสำหรับผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส 6.3 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมักขนาด 10 ลิตร (10 L fermentor and controller; Marubishi Lab. model MD-500) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวกหมายเลข 1.3) ในอัตราการกวน (agitation rate) 400 รอบ/นาที อัตรา การให้อากาศ (aeration rate) 1 VVM ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และใช้อะเด คานอล (adecanol) ความเข้มข้นไม่เกิน 0.0028% โดยปริมาตร เพื่อเป็นสารยับยั้งฟอง (antifoaming agent) ใช้เวลาในการหมัก 22 ชั่วโมง

ที่ชั่วโมงที่ 10 ของการหมัก เติมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในสารละลายให้เป็น 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดเติมอย่างต่อเนื่องให้หมดใน 5 ชั่วโมง โดยใช้ปั๊มแบบเพอริสแตลติก (peristaltic pump; Microperpex model 2132) โดยปรับอัตราเร็วของการไหลให้เหมาะสม

ภายหลังการหมัก นำอาหารหมักที่มีสเตรพโตมัยซิส 190-1 ที่ผ่านการตรึงเอนไซม์ด้วยความร้อน (heat fixation) ดังจะกล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 2.4.1 ไปปั่น (centrifuge; Kubota model KR 20000T) ด้วยความเร็ว 5,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลด้วยน้ำปลอดอิออน (deionized water) 2 ครั้ง นำเซลที่ล้างแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เซลที่ได้นี้ต่อไปจะเรียกว่าเซลที่ตรึงด้วยความร้อน

2.2 <u>การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของเปลือกเมล็ดฝ้าย (H_2SO_4 hydrolysate of cotton seed hull)</u>

2.2.1 การย่อยเปลือกเมล็ดฝ้าย

วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ ศิริลักษณ์ ธีระดากร (60) โดยนำเปลือกเมล็ดฝ้ายบดละเอียดและอบแห้งขนาด 1 มม. ปริมาณ 1 กก. ผสมกับสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น

Ø.1% ปริมาตร 4 ลิตร นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 3Ø นาที เพื่อล้างสิ่งปนเปื้อนออกจากเปลือกเมล็ดฝ้าย กรองเอากากมาล้างด้วยน้ำอุ่น 2-3 ครั้ง

นำกากที่ล้างแล้วมาผสมกับ 3% กรดกำมะถัน 4 ลิตร นำไปนึ่งที่อุณหภูมิและความดันเท่าเดิม นาน 9Ø นาที กรองเอากากออกล้างกากด้วยน้ำ 1.5 ลิตร กรองเอาน้ำล้างกากไปผสมกับสารละลายกรดสกัด ต้มสารละลายที่ได้ในอ่างน้ำเดือด 1ØØ องศาเซลเซียส 3Ø นาที ปรับพีเอชของสารละลายที่ได้ให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และไซโลส เพื่อใช้คำนวณปริมาตรของเปลือกเมล็ดฝ้ายสกัด สำหรับนำไปผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

2.2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธีของ Bernfeld (61)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกหมายเลข 2) 1 มล. ลงในสารละลายตัวอย่าง 1 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ (blank) ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็นและเติมน้ำกลั่นอีก 1Ø มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 54Ø นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Shimadzu model UV-16Ø) และหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสดงกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ Ø.1-1.Ø มก./มล.

2.3 <u>การหาน้ำหนักแห้งของเซล</u>

ชั่งเซลที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งในอะลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) ที่พับเป็นรูปถ้วยเล็ก ๆ นำไปอบในตู้อบที่ 1Ø5 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในเดสสิเคเตอร์ (descicator) นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดถึงทศนิยมตำแหน่งที่ 4 นำไปอบที่อุณหภูมิ 1Ø5 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณหาน้ำหนักแห้ง

I17508116

2.4 การตริงเซลที่มีกลูโคสไอโซเมอเรส

ศึกษาการตริงกลูโคสไอโซเมอเรสเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมจากวิธีต่าง ๆ ต่อไปนี้

2.4.1 การตริงโดยใช้ความร้อน วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีการของ Lloyd และคณะ (37) โดยนำเซลที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในบีกเกอร์โลหะขนาด 2 ลิตร แช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เริ่มจับเวลาเมื่อของเหลวในบีกเกอร์มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนครบ 10 นาที นำไปทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น 28 องศาเซลเซียส หรือน้ำที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบแอคติวิตีโดยวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5.1.1

2.4.2 การตริงเซลโดยใช้โซเดียมอัลจิเนท (sodium alginate) ใช้วิธีของนฤมล ศุภจรรยา (26) โดยผสม 2% โซเดียมอัลจิเนท (500 cps., Nabarai Chemicals Ltd., Japan) 50 มล.กับ 10% สารแขวนลอยของเซลในน้ำ (cell suspension) 50 มล. คนให้เข้ากันแล้วนำไปทำให้เป็นหยด โดยใช้ปั๊มเพอริสแตลติก (peristaltic pump) ดึงสารละลายผสมที่ได้ผ่านสายซิลิโคน (silicone tube) ซึ่งมีหลอดแก้วกลวงเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอกประมาณ 0.7 มม. ต่ออยู่ตรงปลายสาย สารละลายจะหยดจากปลายหลอดแก้วลงในสารละลาย 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1 ลิตร ที่มีแท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ของเครื่องกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer, Corning model PC-101) กวนอยู่ จะได้เม็ดเจล (gel bead) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.0 มม. นำเม็ดเจลที่มีเซลตริงอยู่ภายในแช่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ 2 ชั่วโมง โดยมีการกวนตลอดเวลา แล้วกรองเม็ดเจลมาแช่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ตรวจสอบแอคติวิตีโดยวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5.1.2

2.4.3 การตริงเซลโดยใช้ไคโตแซน (chitosan) วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Hiroshi และคณะ (47) โดยชั่งไคโตแซนซึ่งเตรียมจากกระดองปู (chitosan from crab shell, practical grade, Sigma Chemical) 1 กรัม ละลายใน 20% กรดอะซีติก (acetic acid) โดยตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จะได้สารละลาย 1% ไคโตแซนใน 20% กรด

อะซีติก 100 มล. นำไปปรับพีเอชให้ได้ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติมน้ำจนเป็น 200 มล.

เตรียมสารแขวนลอยของเซลในน้ำ (cell suspension) โดยนำเซลที่ผ่านการตรึงด้วยความร้อนแล้วและมีความชื้นประมาณ 85±2% ปริมาณ 30 กรัม (น้ำหนักชื้น) มาแขวนลอยในน้ำ 500 มล. กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนระบบแม่เหล็กประมาณ 1 ชั่วโมง

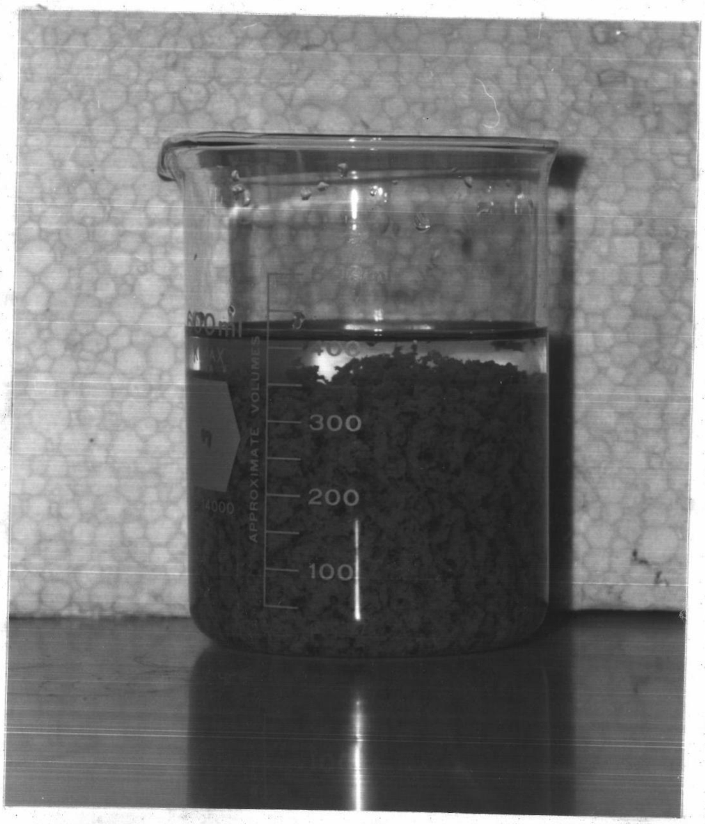
นำสารละลายไคโตแซนพีเอช 6.0 200 มล. ผสมในสารแขวนลอยของเซล 500 มล. กวนตลอดเวลา เซลจะตกตะกอนกับไคโตแซน (รูปที่ 10) ล้างตะกอนของเซลที่เกิดขึ้นด้วยน้ำ 4-6 ลิตร แยกเอาตะกอนออกนำไปซับด้วยกระดาษซับจนแห้งพอประมาณ จากนั้นนำไปขึ้นรูปโดยฉีดตะกอนเซลผ่านหลอดฉีดยาที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูประมาณ 1 มม. (รูปที่ 11) นำไปเป่าด้วยพัดลมให้แห้ง แล้วนำมาตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 2-4 มม. (รูปที่ 12) ตรวจสอบแอคติวิตีโดยวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5.1.3

2.4.4 การตรึงด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

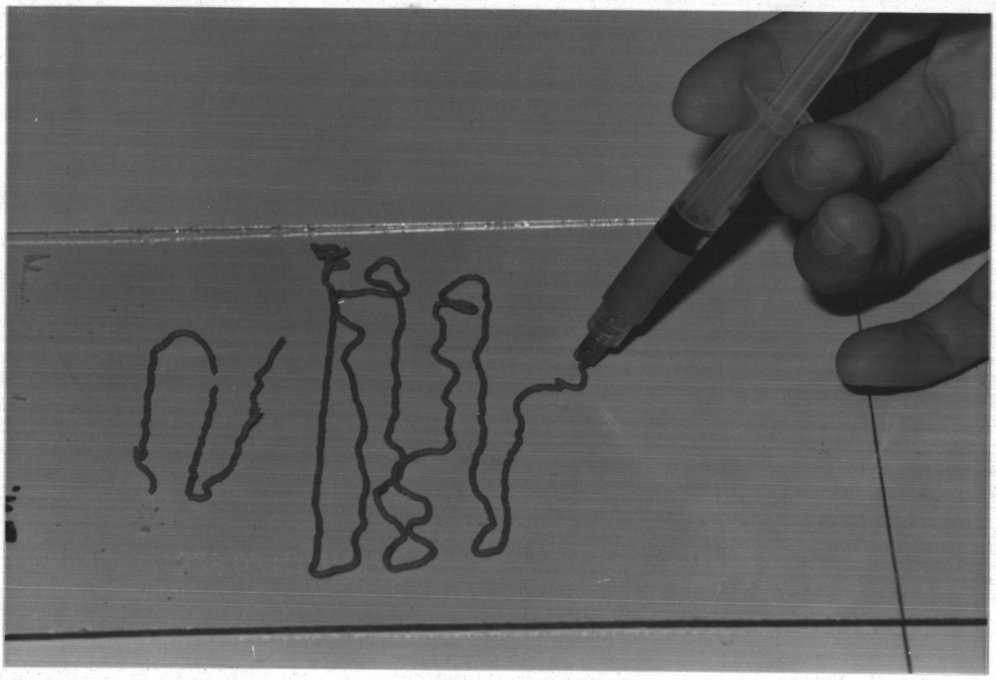
2.4.4.1 การตรึงเซลที่ยังไม่ผ่านการขึ้นรูปด้วยกลูตารัลดีไฮด์ วิธีนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Amotz และคณะ (62) โดยนำเซลที่ตรึงด้วยความร้อนแล้ว และมีความชื้นประมาณ 90% ประมาณ 10 กรัมมาเติมสารละลาย 50% กลูตารัลดีไฮด์ในน้ำ (50% glutaraldehyde in water, practical grade, Fluga Co.) ประมาณ 0.4 มล. ผสมเซลและกลูตารัลดีไฮด์ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลผสมกลูตารัลดีไฮด์ไปแช่เย็นที่ -70 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำจนหมดกลูตารัลดีไฮด์ส่วนเกิน ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับแล้วจึงนำไปขึ้นรูปตามวิธีขึ้นรูปในหัวข้อ 2.4.3

2.4.4.2 การตรึงเซลที่ผ่านการขึ้นรูปแล้วด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ใช้วิธีของ Ahn และคณะ (41) นำเซลที่ผ่านการตรึงด้วยความร้อนแล้วและมี ความชื้นประมาณ 85±2 % 3 กรัม มาขึ้นรูป โดยฉีดเซลผ่านหลอดฉีดยาที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูฉีดประมาณ 1.0 มม. เป่าเซลที่ฉีดแล้วให้แห้งด้วยพัดลม จากนั้นนำมาตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 2-4 มม.

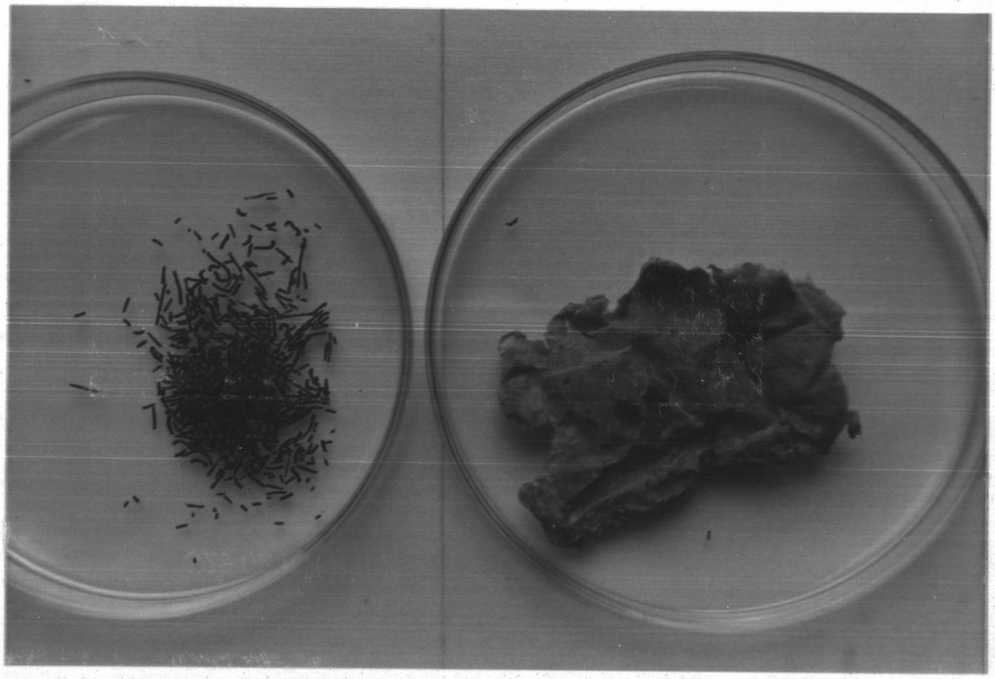
นำเซลที่ขึ้นรูปและทำให้แห้งแล้วมาตรึงโดยแช่ในสารละลาย 5% กลูตารัลดีไฮด์ใน 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate



รูปที่ 10 การตรึงสเตรพโตมัยซิส 190-1 ด้วยไคโตแซน



รูปที่ 11 การขึ้นรูปเซลที่ตรึงแล้ว



รูปที่ 12 การเปรียบเทียบระหว่างเซลตริงรูปในสภาพแห้งกับเซลตริงด้วยความร้อนในสภาพชื้น

buffer) พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลที่ตรึงแล้วด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้พัดลม

การตรวจสอบแอคติวิตีทั้งในข้อ 2.4.4.1 และ 2.4.4.2 ใช้วิธีตามข้อ 2.5.1.3

2.4.5 การตรึงเซลโดยใช้ไคโตแซนร่วมกับกลูตารัลดีไฮด์

ตรึงเซลด้วยไคโตแซนตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.4.3 เมื่อเซลตกตะกอนแล้วนำไปล้างด้วยน้ำ 4-6 ลิตร จากนั้นแบ่งตะกอนเซลเป็น 6 ส่วน แต่ละส่วนนำไปแช่ในสารละลาย 1% กลูตารัลดีไฮด์ใน 0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าเป็นวง (rotary shaking) ด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเซลที่ตรึงแล้วทั้งหมดด้วยน้ำ 10-12 ลิตร กรองเซลและซับเซลให้แห้งด้วยกระดาษซับ นำไปขึ้นรูปและทำให้แห้งตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.4.3

ตรวจสอบแอคติวิตีโดยวิธีในข้อ 2.5.1.3

2.5 <u>การตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ตรึงแล้ว</u>

2.5.1 การตรวจสอบแอคติวิตี

2.5.1.1 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงความร้อน ดัดแปลงจากวิธีของศิริลักษณ์ ธีระดากร (60) โดยการวัดปริมาณของฟรักโทส ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส โดยกลูโคสไอโซเมอเรส ขั้นตอนดำเนินการ คือ บ่มเซลประมาณ 25 มก. (น้ำหนักชื้น) ที่รู้น้ำหนักแน่นอนแล้ว และสามารถคำนวณน้ำหนักแห้งได้นำมาบ่มในสารละลายผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย

0.5 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0	0.6 มล.
0.1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.1 มล.
0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.2 มล.

1.0 โมลาร์ กลูโคส (glucose monohydrate) 1.0 มล.

น้ำกลั่น 0.1 มล.

ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่นาทีที่ 10, 18 และ 24 ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร (ul) นำมาทำให้เจือจาง 300 เท่าด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปหาปริมาณของฟรักโทสโดยวิธีของ Marshall และ Kooi (11) ดังกล่าวในหัวข้อ 2.5.1.4

2.5.1.2 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนท ชั่งเซลที่ถูกตรึงโดยคำนวณให้มีปริมาณเซลประมาณ 100 มก.(น้ำหนักชื้น) ซึ่งสามารถคำนวณหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอนของเซลใน 1 หน่วยน้ำหนักของเม็ดเจลได้บ่มในสารละลายที่มีส่วนผสมดังต่อไปนี้

1.0 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ (Tris hydroxymethyl aminomethane) พีเอช 9.0	0.8 มล.
1.0 โมลาร์ กลูโคส	2.0 มล.
0.1 โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2 มล.
0.001 โมลาร์ โคบอลท์คลอไรด์	0.4 มล.
น้ำกลั่น	0.6 มล.

บ่มเซลที่ตรึงแล้วในสารละลายดังกล่าว ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อหาฟรักโทสที่นาทีที่ 10, 18 และ 24 ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 300 เท่า แล้วนำไปหาปริมาณฟรักโทส ดังกล่าวในหัวข้อ 2.5.1.4

2.5.1.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลตรึงรูปด้วยกลูตารัลดีไฮด์หรือไคโตแซน เหมือนการตรวจสอบในข้อ 2.5.1.1 แต่ต้องบ่มเซลตรึงรูปก่อน (preincubation) ในสารผสมของปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเซลบวมตัวเต็มที่ก่อนการทำปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส

2.5.1.4 การหาปริมาณฟรักโทสใช้ตามวิธีของ Marshall และ Kooi (11) ดังนี้

2.5.1.4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) เตรียมสารละลายน้ำตาลฟรักโทส (D(-)-Fructose, AR grade,Merck Co., Ltd.) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเป็น 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40 และ50 ไมโครกรัมต่อ มล. เตรียมสารละลายซีสเตอีน-คาร์บาซอล ในหลอดทดสอบซึ่งแช่ในอ่างน้ำแข็งโดยเติมสารต่าง ๆ ตามลำดับดังต่อไปนี้

70% กรดซัลฟูริค (sulphuric acid)	3.0	มล.
1.5% ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์ (cysteine HCl)	0.1	มล.
0.12% แอลกอฮอล์คาร์บาซอล (carbazole in absolute ethanol)	0.1	มล.

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายฟรักโทสความเข้มข้นต่าง ๆ หลอดละ 0.5 มล. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วลดอุณหภูมิทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น 1-3 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD.) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลฟรักโทสและค่าการดูดกลืนแสง

2.5.1.4.2 การหาปริมาณฟรักโทสที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนกลูโคสโดยเอนไซม์นำสารละลายที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์และเจือจาง 300 เท่าแล้วจากข้อ 2.5.1.1,2.5.1.2 หรือ 2.5.1.3 ตัวอย่างละ 0.5 มล. เติมลงในสารละลายซีสเตอีน-คาร์บาซอล ทำตามวิธีการในหัวข้อ 2.5.1.4.1 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบหาปริมาณฟรักโทสจากกราฟมาตรฐาน

2.5.1.4.3 หน่วยของแอคติวิตีของเอนไซม์ ในที่นี้ 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นฟรักโทส 1 ไมโครโมล (µmole) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะของวิธีการตรวจสอบเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น

แอคติวิตีของเอนไซม์ตลอดการทดลองนี้จะรายงานในรูปของแอคติวิตีของเซล 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง)

แอคติวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) คือ แอคติวิตีของเซลที่ตรึงด้วยวิธีการใด ๆ เทียบกับเซลที่ถูกตรึงด้วยความร้อนซึ่งยังไม่ผ่านการทำให้แห้ง มีมีหน่วยเป็นเปอร์เซนต์ (%) ยกเว้นแต่จะระบุเป็นอย่างอื่นเป็นการเฉพาะ

2.5.2 การตรวจสอบความคงทนต่อการแตกสลายของเซลที่ตรึงแล้ว

การเปรียบเทียบความคงทนต่อการแตกสลายของเซลที่ผ่านการตรึงด้วยวิธีต่าง ๆ ทำได้โดยนำเซลที่ตรึงแล้ว 0.05 กรัม (น้ำหนักแห้ง) แช่ในน้ำกลั่น 5 มล. ในหลอดทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นหลอด (vortex mixer, Vortex Genie model K-550-GE) ด้วยความแรงระดับ 5 ตามมาตราส่วนที่หน้าปัดเครื่องนาน 1 นาที จากนั้นตั้งหลอดทิ้งไว้ 15 วินาที เพื่อให้ตะกอนขนาดใหญ่นอนก้นก่อน นำส่วนที่เป็นสารแขวนลอยในน้ำ (suspension) ไปวัดค่าความขุ่น (turbidity) ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร การรายงานความคงทนต่อการแตกสลายรายงานในรูปของความขุ่น

2.5.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล (effectiveness factor, ε)

ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลเป็นตัวบ่งชี้ความยากง่ายในการถ่ายเทมวลเข้าออกระหว่างภายนอกและภายในของเซลที่ตรึงแล้ว มีวิธีการดังนี้

นำเซลที่ตรึงแล้วประมาณ 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มาบดให้ละเอียดด้วยครกที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง นำเซลที่บดได้ไปตรวจสอบแอคติวิตี ตามวิธีในหัวข้อ 2.5.1.3 เทียบกับเซลที่ไม่ได้บด ค่า ε เขียนในรูปสมการได้ดังนี้

$$\text{ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล}(\varepsilon) = \frac{\text{แอคติวิตีของเซลตรึงรูปที่ไม่ได้บด}}{\text{แอคติวิตีของเซลตรึงรูปที่บดแล้ว}}$$

2.6 การศึกษาการใช้เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

ทำโดยการบ่มเซลที่ตรึงแล้วในสารละลายสำหรับตรวจสอบแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 2.5.1.3 ยกเว้นผันแปรการใช้สารละลายเฟอรัสซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น $5x10^{-5}$ ถึง $5x10^{-4}$ โมลาร์ วัดแอคติวิตีเทียบกับการใช้สารละลายโคบอลท์คลอไรด์เข้มข้น $5x10^{-5}$ โมลาร์

2.7 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ในเซลตรึงรูปในปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed bed reactor)

2.7.1 การบ่มล่วงหน้าเซลตรึงรูป แช่เซลตรึงรูป 1 กรัมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.15 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 50 มล.เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้เซลตรึงรูปบวมเต็มที่

2.7.2 การเตรียมสารละลายผสมสำหรับผลิตฟรักโทส

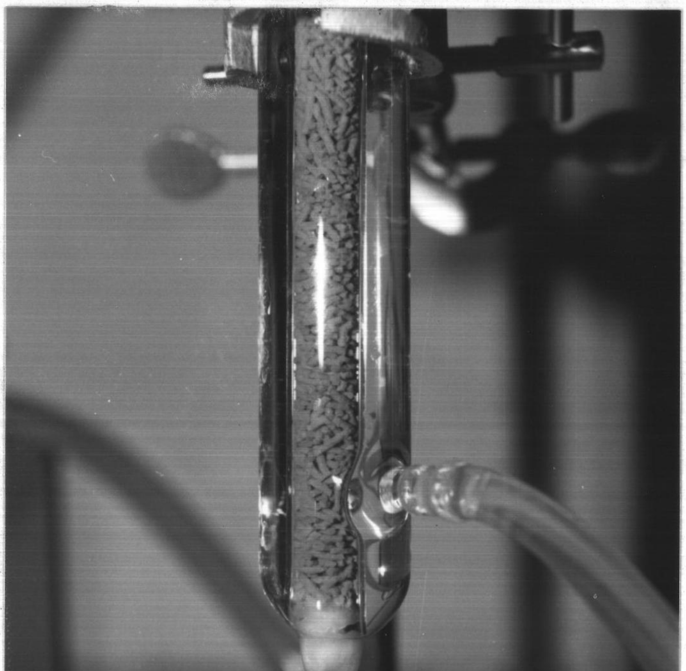
สารละลายผสมสำหรับผลิตฟรักโทสประกอบด้วยกลูโคส 2.0 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ เฟอรัสซัลเฟต $1x10^{-4}$ โมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.01 โมลาร์ และ อีดีทีเอ (EDTA) 0.01 โมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ก่อนใช้งานนำไปไล่ก๊าซ (degas) ด้วยระบบสุญญากาศเป็นเวลา 10-15 นาที สารละลายผสมนี้ต่อไปจะเรียกว่าสารละลายกลูโคส

2.7.3 การศึกษาผลของอัตราเร็วการไหลของสารตั้งต้นต่อการเปลี่ยนเป็นฟรักโทสในปฏิกรณ์

นำเอนไซม์ที่บ่มล่วงหน้าแล้วไปต้มเพื่อไล่อากาศที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นบรรจุลงในปฏิกรณ์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 7.8 มม. มีระบบหล่อน้ำรอบปฏิกรณ์ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสดังแสดงในรูปที่ 13,14 ปล่อยสารละลายกลูโคสให้ไหลเข้าทางด้านล่างของปฏิกรณ์ด้วยการดูดผ่านปั๊มเพอริสแตลติก ซึ่งแปรค่าอัตราการไหลของสารละลายกลูโคสตั้งแต่ 0.3-6.0 มล./นาที เก็บตัวอย่างหลังการปรับอัตราเร็วการไหล

รูปที่ 13 ปฏิกรณ์และอุปกรณ์ประกอบสำหรับผลิตน้ำเชื่อมฟรักโทส

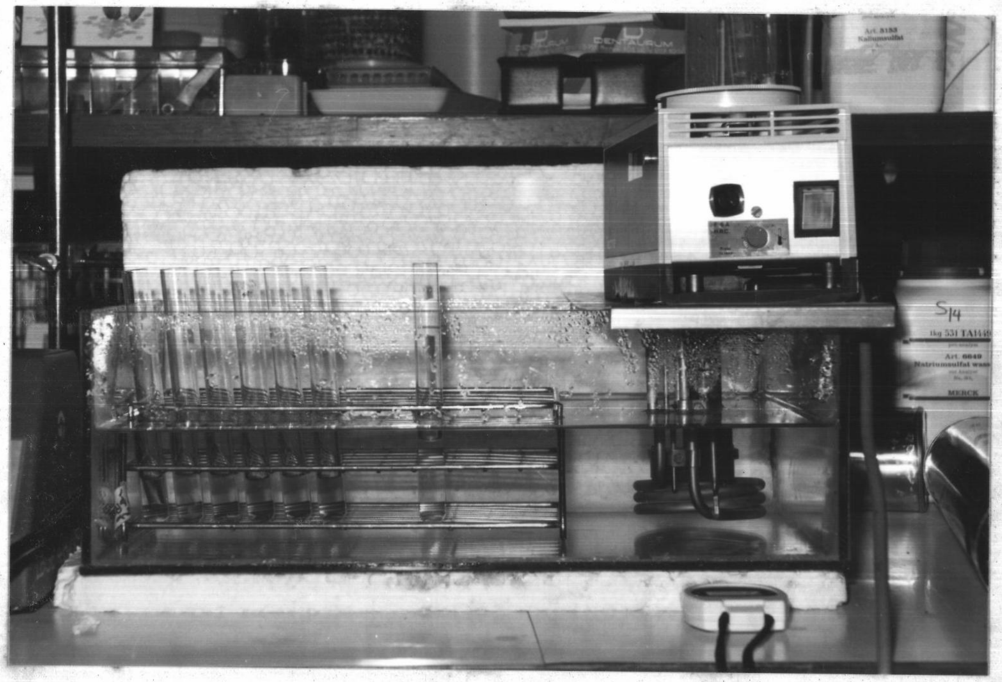


รูปที่ 14 เซลตรึงรูปที่บรรจุในปฏิกรณ์

90 นาทีทุกครั้งซึ่งเป็นเวลาที่ปฏิกิริยาเข้าสู่สมดุลแล้ว นำตัวอย่างมาหาปริมาณน้ำตาลฟรักโทส โดยวิธีซีสเตอีน-คาร์บาซอล ดังกล่าวในข้อ 2.5.1.4.2 (รูปที่ 15) เขียนกราฟระหว่างสเปซไทม์ (space time) กับสัดส่วนของฟรักโทส (conversion) และสเปซไทม์กับกำลังผลิต (productivity)

2.7.4 การหาอายุครึ่งชีวิต (half life) ของเอนไซม์ในการใช้งานในปฏิกรณ์แบบแพคเบด

ใช้วิธีการเดียวกับในข้อ 2.7.3 ยกเว้นในปริมาณเซลประมาณ 0.08 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ปรับอัตราการไหลของสารละลายกลูโคสให้คงที่ที่ 1 มล./นาที ผ่านสารละลายในปฏิกรณ์เวลาประมาณ 120 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุก 20-24 ชั่วโมง เพื่อนำไปประมาณค่า (extrapolate) ครึ่งชีวิตของเอนไซม์



รูปที่ 15 การหาปริมาณฟรักโทสด้วยวิธีซิสเตอีน-คาร์บาซอล