บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. <u>การสกัดน้ำแตงไทยโดยใช้เอนไซม์อิสระ 2 ชนิดร่วมกัน คือ เพคติเนสและเซลลูเลสภายใต้ภาวะปฏิกิริยาแบบต่อเนื่อง</u>

1.1 <u>ศึกษาหาความเข้มข้นของเพคติเนส เซลลูเลส และอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.1.1 ทดลองแปรระดับความเข้มข้นของเพคติเนสและเซลลูเลสอย่างละ 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0.02, 0.05 และ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น โดยที่ เพคติเนส 1 มิลลิลิตร มีแอคติวิตี 5,242 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 4.0 (1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ลดความหนืดของสารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร/น้ำหนัก ลงครึ่งหนึ่ง หรือลดลงร้อยละ 50 ภายในเวลา 1 นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส) และเซลลูเลส 1 มิลลิลิตรมีแอคติวิตี 16,860 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 4.8 (1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนสับสเตรทคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสไปเป็นกลูโคส 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ที่ 40 องศาเซลเซียส) ตามวิธีวัดแอคติวิตีในภาคผนวก ก-1.2 และ ก-2.2 ตามลำดับ และแปรอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง ติดตามผลจากค่าร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น (% Viscosity reduction) เปรียบเทียบกับค่าความหนืดของแตงไทยตีป่นที่ไม่ผ่านการใช้เอนไซม์ในแต่ละภาวะปฏิกิริยา ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีปน เมื่อใช้ความเข้มข้นของเพคติเนสและเซลลูเลสที่ระดับต่าง ๆ และบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของเพคติเนส (%V/W)	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเข้มข้นของเซลลูเลส (%V/W)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%Viscosity reduction)
0.02	40	0.02	63.07 ± 0.08 ^{o}
		0.05	63.87 ± 0.08 ^{o}
		0.10	67.08 ± 0.08 ^{n}
	50	0.02	70.35 ± 0.15 ^{m}
		0.05	72.62 ± 0.03 ^{l}
		0.10	76.36 ± 0.32 ^{ghij}
	60	0.02	69.82 ± 1.30 ^{m}
		0.05	72.22 ± 2.88 ^{l}
		0.10	75.96 ± 1.28 ^{ij}
0.05	40	0.02	67.07 ± 0.43 ^{n}
		0.05	75.15 ± 0.04 ^{jk}
		0.10	80.70 ± 0.08 ^{abc}
	50	0.02	76.10 ± 0.31 ^{hij}
		0.05	78.56 ± 2.58 ^{def}
		0.10	81.44 ± 0.14 ^{ab}
	60	0.02	73.48 ± 2.58 ^{kl}
		0.05	77.63 ± 0.08 ^{efghi}
		0.10	77.90 ± 0.73 ^{defgh}
0.10	40	0.02	79.10 ± 0.22 ^{cde}
		0.05	78.49 ± 0.14 ^{def}
		0.10	79.70 ± 0.04 ^{bc}

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของเพคติเนส (%V/W)	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความเข้มข้นของเซลลูเลส (%V/W)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (%Viscosity reduction)
0.10	50	0.02	73.36 ± 1.50 ^{l}
		0.05	77.20 ± 0.04 ^{fghij}
		0.10	82.17 ± 0.72 ^{a}
	60	0.02	76.96 ± 1.51 ^{fghij}
		0.05	78.16 ± 0.09 ^{defg}
		0.10	79.00 ± 0.02 ^{cde}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นที่ความเข้มข้นของเพคติเนส เซลลูเลส และอุณหภูมิต่าง ๆ

ปัจจัย	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของเพคติเนส (A)	2	647.44	323.72	487.27 *
อุณหภูมิ (B)	2	141.38	70.69	106.40 *
ความเข้มข้นของเซลลูเลส (C)	2	289.13	144.56	217.60 *
AB	4	194.72	48.68	73.27 *
AC	4	31.81	7.95	11.97 *
BC	4	12.63	3.16	4.75 *
ABC	8	84.56	10.57	15.91 *
Error	27	17.94	0.66	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ดังตารางที่ 4.2 พบว่า ตัวแปรทั้งหมดคือ ระดับความเข้มข้นของเพคติเนส เซลลูเลส อุณหภูมิ และปัจจัยร่วมของทั้งสามปัจจัย (AB, AC, BC และ ABC) ต่างก็มีผลต่อค่าร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ให้ผลดังตารางที่ 4.1 พบว่า ทั้งระดับความเข้มข้นของเพคติเนสร้อยละ 0.10 และเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการลดความหนืดสูงสุด แต่ไม่แตกต่างจากเพคติเนสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และเซลลูเลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นเพื่อเป็นการสะดวกและประหยัด ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำแตงไทย จึงเลือกใช้เพคติเนสและเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่นตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ทดลองหาเวลาที่เหมาะสมต่อไป

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่า เพคติเนสและเซลลูเลสมีผลต่อค่าร้อยละของการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น ($p \leq 0.05$) เนื่องมาจากโครงสร้างเนื่อเยื่อของผลไม้จะมีพอลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิด เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ เพคติน เป็นต้น (Wucherpfennig and Schopplein, 1991) ซึ่งสารประกอบเพคตินมักจะรวมกับเซลลูโลสที่บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอก (primary cell wall) และสารประกอบเพคตินจะพบมากบริเวณผนังเซลล์ที่อยู่ติดกัน (middle lamella) ซึ่งจะขัดขวางการสกัดน้ำผลไม้ทำให้การสกัดเป็นไปได้ยาก เมื่อเติมเอนไซม์เพคติเนสและเซลลูเลส จะทำให้สายโมเลกุลของเพคตินและเซลลูโลสที่ยาวถูกตัดให้สั้นลง และทำให้เพคตินและเฮมิเซลลูโลสแยกตัวออกจากกัน มีผลทำให้เนื้อเยื่อผลไม้อ่อนตัวลงได้ และเมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ พบว่า ระดับความเข้มข้นของเพคติเนสจะเป็นตัวแปรหลักที่มีผลต่อการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น มากกว่าเซลลูเลส ทั้งนี้เนื่องมาจาก สารประกอบเพคตินในผนังเซลล์พืชนั้นจะขัดขวางการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ดังเช่นผลการทดลองของ Noach (1986) ที่ศึกษาถึงผลของสารประกอบเพคตินต่อการทำงานของเพคติเนส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส ซึ่งเขาพบว่า ในผนังเซลล์พืชจะมีลักษณะการบดบังเซลลูโลสโดย

สารประกอบเพคติน การทำลายการบดบังของสารประกอบเพคตินโดยใช้เพคติเนส จะทำให้การย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสเพิ่มมากขึ้น และจากงานวิจัยของ Massiot และคณะ (1989) ที่ทำการศึกษาการย่อยสลายเส้นใยแครอท โดยใช้เพคติเนส และเซลลูเลส พบว่า การใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันจะส่งเสริมการย่อยสลายเส้นใยแบบเสริมกัน และจากการวิเคราะห์และการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการละลายของน้ำตาล พบว่า พอลีเมอร์ของเพคตินจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลลูโลสจะถูกย่อยสลายไปเป็นเซลโลบิโอสและกลูโคสในอัตราที่ช้ากว่า และนอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการที่เพคติเนสทางการค้ามักจะมีเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสผสมอยู่บ้างแล้ว (Rombouts and Pilnik, 1978) จึงมีผลทำให้เพคติเนสที่เติมลงไป แสดงบทบาทที่สำคัญในด้านการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันก็จะมีผลเสริมกันในการที่จะลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นลงด้วย ดังเช่นผลการทดลองของ Kilara (1982) ที่รายงานว่า การใช้เพคติเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ร่วมกับเซลลูเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในการลดความหนืดของเนื้อแอปเปิลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะสามารถลดความหนืดของเนื้อแอปเปิลได้มากกว่าร้อยละ 80 และจะดีกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว และจากงานวิจัยของ Sreenath และคณะ (1984) ที่ศึกษาการย่อยสลายแครอทโดยใช้เซลลูเลสร่วมกับเพคติเนส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า การใช้เอนไซม์แต่ละชนิดตามลำพัง สามารถย่อยสลายเนื้อแครอทได้ประมาณร้อยละ 60 ในขณะที่ เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันทำให้การย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 80

และเมื่อพิจารณาถึงระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการสกัดน้ำแตงไทย พบว่า เมื่อใช้เพคติเนสและเซลลูเลสร่วมกันแบบต่อเนื่อง อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ทั้งสอง จะเลื่อนมาที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมเดิม คือ 35-40 และ 60 องศาเซลเซียส (Novo, 1985 ; Novo, 1989) ตามลำดับ การที่เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่แตกต่างกัน จึงเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน เมื่อใช้ร่วมกัน โดยจะมีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้ เช่น ในงานวิจัยของ อรุณี เพียรทวีรัชต์ และปราณี อ่านเปรื่อง (2536) ที่ทำการประยุกต์ใช้เพคติเนส เซลลูเลส และอะมัยเลสทางการค้า ในการสกัดน้ำกล้วย โดยการให้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง (simultaneous) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดน้ำกล้วย เมื่อใช้เพคติเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ร่วมกับเซลลูเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดย

ปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อกล้วยหอมบด คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งต่างไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมเดิม คือที่ 35-40 องศาเซลเซียส สำหรับเพคติเนส และ 60 องศาเซลเซียส สำหรับเซลลูเลส

1.2 ศึกษาหาระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาย่อยสลายเนื้อแตงไทยตีป่นที่เหมาะสม

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.1.2 ในการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายแตงไทยตีป่นด้วยเพคติเนสและเซลลูเลส ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทดลองแปรระยะเวลาในการบ่มเนื้อแตงไทยตีป่นด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่เวลาต่างๆ กัน คือ 15, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ติดตามผล จากค่าร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นและร้อยละการเพิ่มผลผลิตน้ำแตงไทยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการใช้เอนไซม์ในแต่ละภาวะปฏิกิริยา ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น และร้อยละการเพิ่มผลผลิตที่เวลาในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน

เวลา (นาที)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืด ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ร้อยละ)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการเพิ่มผลผลิต ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ร้อยละ)
15	69.26 ± 0.80^{c}	24.84 ± 0.03^{c}
30	78.13 ± 0.68^{b}	28.82 ± 1.10^{b}
60	80.16 ± 0.55^{a}	32.15 ± 0.50^{a}
90	80.70 ± 0.02^{a}	32.42 ± 0.30^{a}
120	81.24 ± 0.54^{a}	32.85 ± 0.25^{a}
150	81.24 ± 0.27^{a}	33.35 ± 0.37^{a}
180	81.92 ± 0.23^{a}	33.29 ± 0.06^{a}

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าร้อยละการลดความหนืดและค่าร้อยละการเพิ่มผลผลิต ดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ พบว่า เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาย่อยสลายเนื้อแตงไทยตีป่น มีผลต่อทั้งค่าร้อยละการลดความหนืดและค่าร้อยละผลผลิตที่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's new multiple range test พบว่า ที่เวลา 60 นาที ขึ้นไป ทั้งค่าร้อยละการลดความหนืดและค่าร้อยละการเพิ่มผลผลิตค่อนข้างคงที่ ไม่แตกต่างจาก 180 นาที แต่แตกต่างกับที่ใช้เวลา 15 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมของการสกัดน้ำแตงไทย ที่ใช้เพคติเนสและเซลลูเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คือ เวลา 60 นาที

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นที่เวลาต่าง ๆ

ปัจจัย	df	SS	MS	F
เวลา	6	236.75	39.46	76.51 *
Error	7	3.61	0.52	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าร้อยละการเพิ่มผลผลิตที่เวลาต่าง ๆ

ปัจจัย	df	SS	MS	F
เวลา	6	120.43	20.07	40.06 *
Error	7	3.51	0.50	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาค่าร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยดิบ และร้อยละการเพิ่มผลผลิตจะเริ่มคงที่หลังจากระยะเวลาทำปฏิกิริยาไปแล้ว 60 นาที ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากที่เวลา 60 นาที ก็เพียงพอในการทำให้เนื้อแตงไทยดิบเหลวขึ้น (liquefaction) เกือบสมบูรณ์ โดยที่ผนังเซลล์พืชจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ เป็นผลให้ของเหลวภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาพร้อมกันกับที่พอลีแซคคาไรด์และสารประกอบเพคตินในผนังเซลล์พืช หลังจากถูกย่อยสลายเป็นสายสั้นๆ แล้วละลายลงสู่ส่วนที่เป็นของเหลวที่เซลล์ปล่อยออกมาได้เกือบสมบูรณ์ ดังนั้นแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อไปอีก ก็จะไม่มีผลต่อการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยดิบหรือร้อยละการเพิ่มผลผลิตของน้ำแตงไทยแต่อย่างไร ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Githaiti และ Karuri (1991) ซึ่งรายงานการใช้เพคติเนสทางการค้าในสกัดน้ำมะม่วง พบว่า น้ำมะม่วงที่สกัดได้จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และมีความหนืดลดลง เมื่อใช้เอนไซม์เข้มข้น 200 ppm. ช่วยในการสกัด และพบว่า เมื่อระยะเวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้นปริมาณผลผลิตน้ำมะม่วงจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น โดยที่ ในช่วงแรกของการสกัดความหนืดของเนื้อมะม่วงบดจะค่อยๆ ลดลง เนื่องจากในช่วงแรกเพคตินในเนื้อเยื่อผลไม้เริ่มละลายน้ำได้ และอัตราการย่อยสลายเพคตินโดยเอนไซม์ยังมีน้อย แต่เมื่อเอนไซม์ย่อยสลายเพคตินได้มากขึ้น ความหนืดจะลดลงมากขึ้น จนถึงระดับหนึ่งเมื่อเพิ่มเวลาต่อไปก็จะไม่มีผลต่อการลดความหนืดของเนื้อมะม่วงบด

2. <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเอนไซม์แต่ละชนิด คือ เพคติเนส หรือเซลลูเลส บนเม็ดแก้ว</u>

2.1 <u>ศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่ใช้กระตุ้นเม็ดแก้วที่เหมาะสม</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.2.1 โดยแปรความเข้มข้นของสารละลาย APTS ในโทลูอีน และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ในน้ำกลั่น เป็นร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 โดยปริมาตร ซึ่งจะให้ผลการทดลองสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดดังนี้ คือ

2.1.1 <u>ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเพคติเนสบนเม็ดแก้ว</u>

ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูป เมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้สารละลายเพคติเนสเข้มข้น

ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมล/ลิตร ที่ pH 4.0 (เพคติเนสมีแอคติวิตี 5,242 ยูนิต/มิลลิลิตร) ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (ร้อยละโดยปริมาตร)	ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10^2)
1	1	9.31 ± 0.20
	3	9.13 ± 0.10
	5	9.02 ± 0.06
	7	8.83 ± 0.22
3	1	7.87 ± 0.33
	3	7.61 ± 0.47
	5	6.27 ± 0.07
	7	7.16 ± 0.64
5	1	8.41 ± 0.27
	3	7.39 ± 0.63
	5	7.12 ± 0.16
	7	6.36 ± 0.36
7	1	7.98 ± 0.03
	3	7.29 ± 0.18
	5	7.05 ± 0.24
	7	7.21 ± 0.17

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่มีความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ต่าง ๆ

ปัจจัย	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของ APTS (A)	3	18.74	6.25	31.76*
ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (B)	3	5.58	1.86	9.46*
AB	9	2.92	0.32	1.65
Error	16	3.15	0.20	

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล พบว่า ทั้งความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ ต่างก็มีผลต่อค่าแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูป แต่ปัจจัยร่วม (AB) จะไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 4.7 ดังนั้น การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูป โดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงแยกพิจารณาทีละปัจจัย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.8 ซึ่งจะเห็นว่าการใช้สารละลาย APTS ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ในการกระตุ้นเม็ดแก้ว จะให้แอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปสูงที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย APTS เป็นร้อยละ 3, 5 และ 7 พบว่า ค่าแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปจะลดต่ำลงและไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 จะให้แอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปสูงสุด และแตกต่างจากที่ความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้น จึงเลือกใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นเม็ดแก้วด้วยสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร สำหรับการตรึงรูปเพคติเนส

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's new multiple range test ของแอคติวิตีเพคติเนสตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่มีความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ต่าง ๆ

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10^2)
ความเข้มข้นของ APTS (ร้อยละโดยปริมาตร)	
1	9.07 ± 0.09 [a]
3	7.23 ± 0.28 [b]
5	7.32 ± 0.31 [b]
7	7.38 ± 0.15 [b]
ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	
1	8.39 ± 0.23 [a]
3	7.86 ± 0.32 [b]
5	7.37 ± 0.39 [b]
7	7.39 ± 0.37 [b]

a, b ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

2.1.2 <u>ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเซลลูเลสบนเม็ดแก้ว</u>

ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูป เมื่อกระตุ้นด้วยสารละลาย APTS และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ระหว่างเซลลูเลสกับตัวพยุงเม็ดแก้ว-APTS ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้สารละลายเซลลูเลสเข้มข้นร้อยละ 4 โดยปริมาตร ในอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 4.8 (เซลลูเลสมีแอคติวิตี 16,860 ยูนิต/มิลลิลิตร) ให้ผลดังตารางที่ 4.9

<u>ตารางที่ 4.9</u> ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (ร้อยละโดยปริมาตร)	ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10)
1	1	15.72 ± 0.01 ^{fg}
	3	17.56 ± 0.61 ^{de}
	5	16.19 ± 0.01 ^{f}
	7	18.28 ± 0.09 ^{de}
3	1	18.37 ± 0.52 ^{d}
	3	19.76 ± 0.06 ^{c}
	5	20.43 ± 0.06 ^{b}
	7	22.52 ± 0.48 ^{a}
5	1	15.20 ± 0.11 ^{fg}
	3	14.93 ± 0.12 ^{gh}
	5	14.76 ± 0.02 ^{gh}
	7	15.14 ± 0.01 ^{fgh}

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลาย APTS (ร้อยละโดยปริมาตร)	ความเข้มข้นของสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (ร้อยละโดยปริมาตร)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10)
7	1	14.07 ± 0.62^{h}
	3	15.16 ± 0.09^{fgh}
	5	16.15 ± 0.15^{f}
	7	17.25 ± 1.55^{e}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรต่างกันกำกับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้วที่ความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ต่าง ๆ

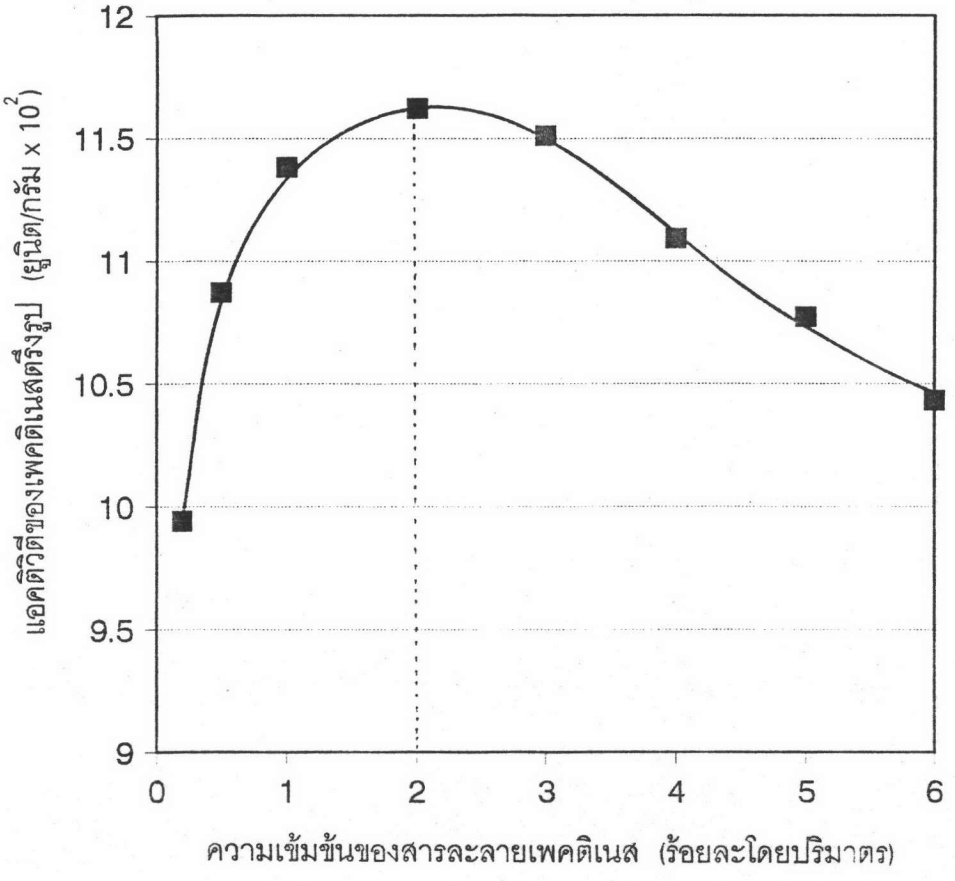
ปัจจัย	df	SS	MS	F
ความเข้มข้นของ APTS (A)	3	131.81	43.94	156.99 *
ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (B)	3	24.46	8.15	29.14 *
AB	9	13.29	1.48	5.28 *
Error	16	4.48	0.28	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

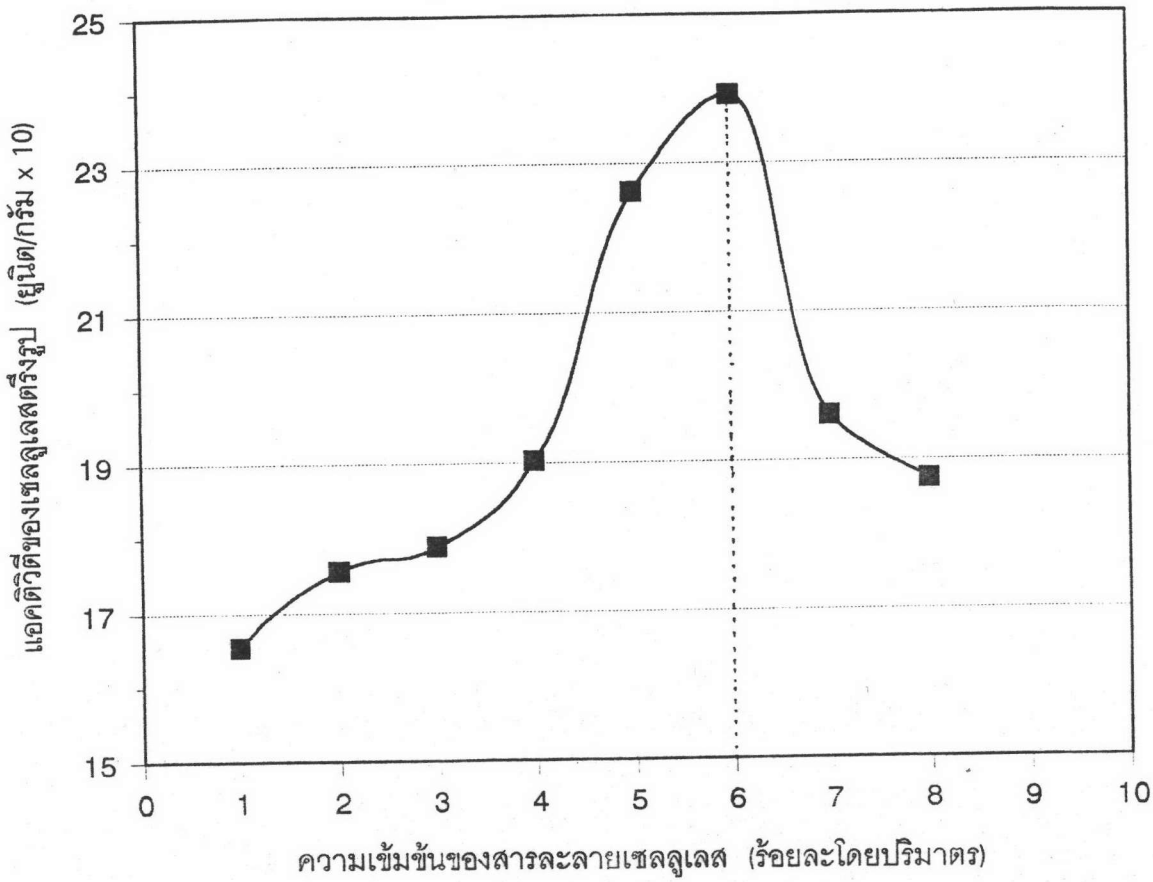
เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ดังตารางที่ 4.10 พบว่า ทั้งความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ รวมทั้งปัจจัยร่วมของทั้งสองปัจจัยต่างก็มีผลต่อค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูป ดังนั้นจึงพิจารณาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple range test ร่วมกัน จะให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.9 ซึ่งจากการวิเคราะห์จะพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 3 และ 7 ตามลำดับ จะให้ค่าแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปสูงที่สุด และแตกต่างจากที่จุดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย APTS และกลูตารัลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 7 โดยปริมาตร ตามลำดับ เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเซลลูเลสบนเม็ดแก้วต่อไป

2.3 <u>ศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.2.2 ที่ศึกษาความเข้มข้นของเพคติเนสและเซลลูเลสที่เหมาะสมในการตรึงรูปบนเม็ดแก้ว (โดยใช้สารละลาย APTS และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร สำหรับเพคติเนสตรึงรูป และใช้สารละลาย APTS เข้มข้นร้อยละ 3 และกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร สำหรับเซลลูเลสตรึงรูป) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ (เพคติเนสมีแอคติวิตี 5,242 ยูนิต/มิลลิลิตร และเซลลูเลสมีแอคติวิตี 16,860 ยูนิต/มิลลิลิตร) ให้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูป
กับความเข้มข้นของสารละลายเพคติเนส



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูป
กับความเข้มข้นของสารละลายเซลลูเลส

จากรูปที่ 4.1 และ 4.2 จะเห็นว่า ลักษณะกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปและความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง คือ ในช่วงแรกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึงรูป จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ทำให้มีจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาต่อหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาในเม็ดแก้วมากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์เกาะกับเม็ดแก้วได้มากขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจึงสูงขึ้น จนถึงระดับหนึ่งจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด ช่วงที่สองเป็นช่วงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์จะไม่มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปกลับทำให้

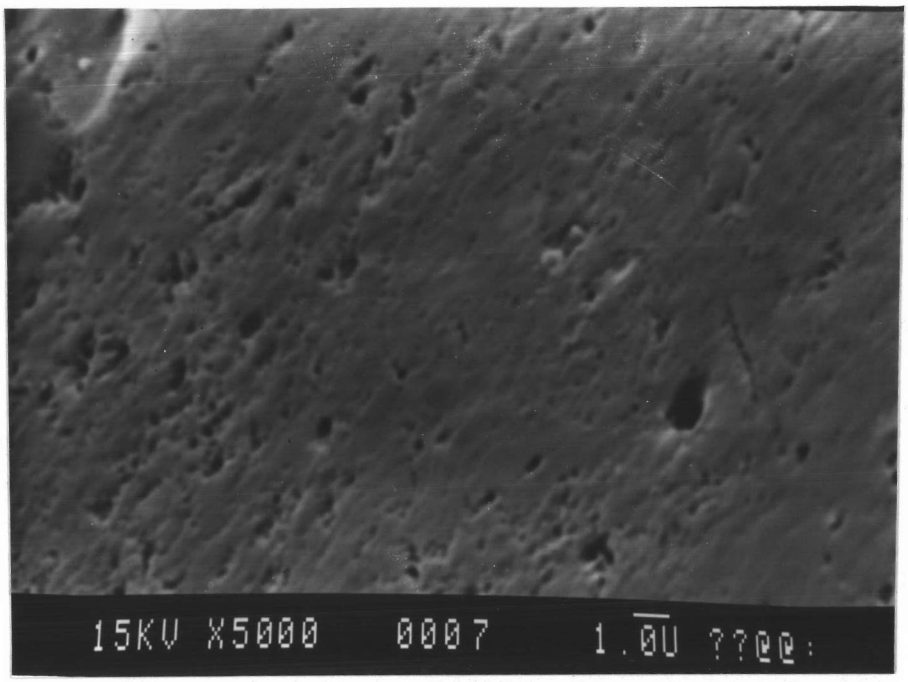
แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปลดต่ำลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก การที่มีเอนไซม์เกาะกับเม็ดแก้วมากขึ้น ทำให้เกิดลักษณะการบดบัง (steric effect) ของหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งจากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพคติเนสร้อยละ 2 จะทำให้แอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปสูงที่สุด และจากรูปที่ 4.2 จะเห็นว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเซลลูเลสร้อยละ 6 จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารละลายเพคติเนสและเซลลูเลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 6 โดยปริมาตร ตามลำดับ เป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเพคติเนสและเซลลูเลสต่อไป

ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Heinrichova และ Zliechovcova (1986) ทดลองแปรปริมาณของ exo-D-galacturonanase ที่ 3.5 - 15.0 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อกรัมตัวพยุงตรึงรูปแบบดูดซับบนตัวพยุง poly (ethylene terephthalate) พบว่า แนวโน้มความสัมพันธ์ของแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้กับปริมาณเอนไซม์ที่ถูกดูดซับบนตัวพยุงจะมีลักษณะเป็น 2 ช่วง เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยนี้ และพบว่าที่ปริมาณเอนไซม์ 9.12 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อกรัมตัวพยุง จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสูงสุด และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดต่ำลง ซึ่งเนื่องมาจากการถูกบดบังของหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์นั่นเอง

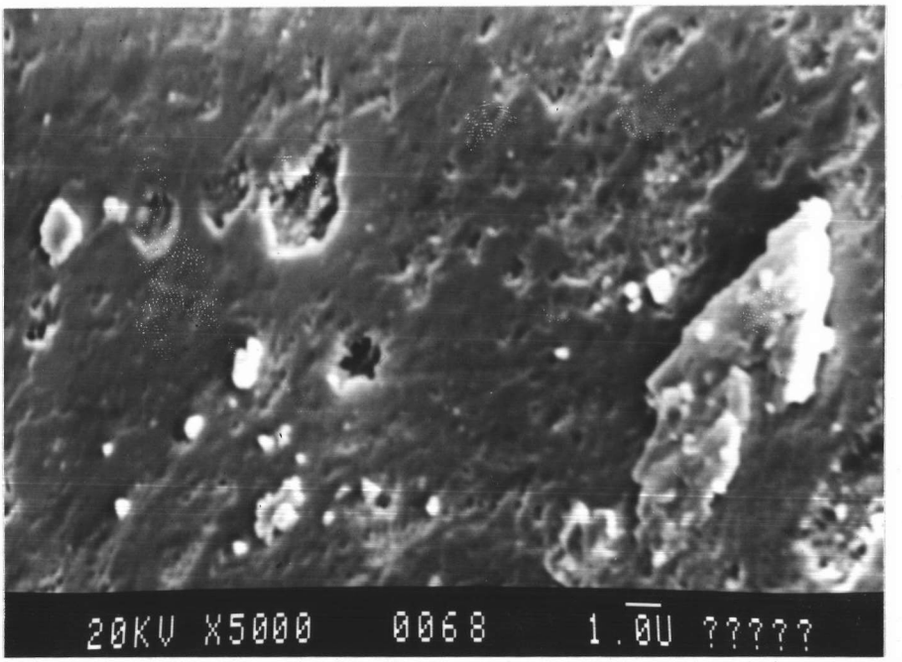
นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ บุศราภา ลีละวัฒน์ และ ปราณี อ่านเปรื่อง (2536) ที่ศึกษาเอนไซม์นิวเตรสและปาเปนตรึงรูปบนตัวพยุงทรายแม่น้ำขนาด 35-50 เมช ตรึงรูปโดยใช้สารละลาย APTS เป็นตัวกระตุ้นตัวพยุงให้มีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยา และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์นิวเตรสและปาเปนที่ใช้ในการตรึงรูปจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ และพบว่า เมื่อใช้สารละลายปาเปนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร จะให้แอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปไม่แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 6 และ 7 โดยน้ำหนัก/ปริมาตร และเมื่อใช้สารละลายเอนไซม์นิวเตรสความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์นิวเตรสตรึงรูปไม่แตกต่างจากที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อถึงความเข้มข้นระดับหนึ่ง การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จะไม่มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวจะมีการสร้างพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงค่อนข้างสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดผลในการบดบังแต่อย่างใด

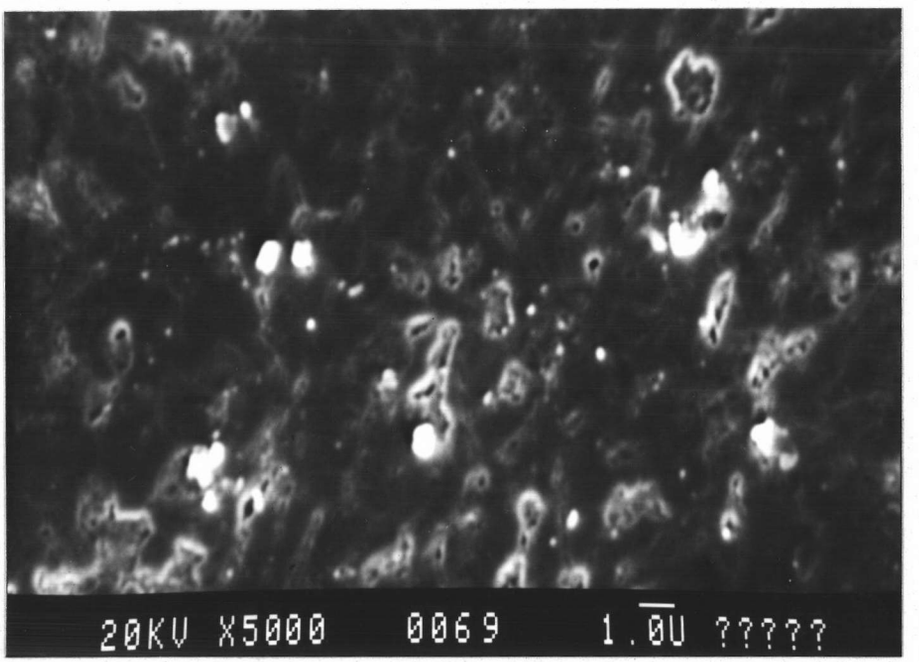
3. <u>ศึกษาโครงสร้างของเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้ว ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (SEM)</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.3 เมื่อตรวจดูโครงสร้างของเม็ดแก้วสะอาด รวมทั้งเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน ดังรูปที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ จะเห็นว่าผิวของเม็ดแก้วสะอาดมีลักษณะค่อนข้างเรียบและมีรูพรุนขนาดต่างๆ รอบๆ เม็ดแก้ว และเมื่อเม็ดแก้วนี้ผ่านกระบวนการตรึงรูปกับเอนไซม์แล้ว จะปรากฏกลุ่มของโปรตีนเอนไซม์มาเกาะอยู่บนผิวของเม็ดแก้วอย่างชัดเจน และเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน

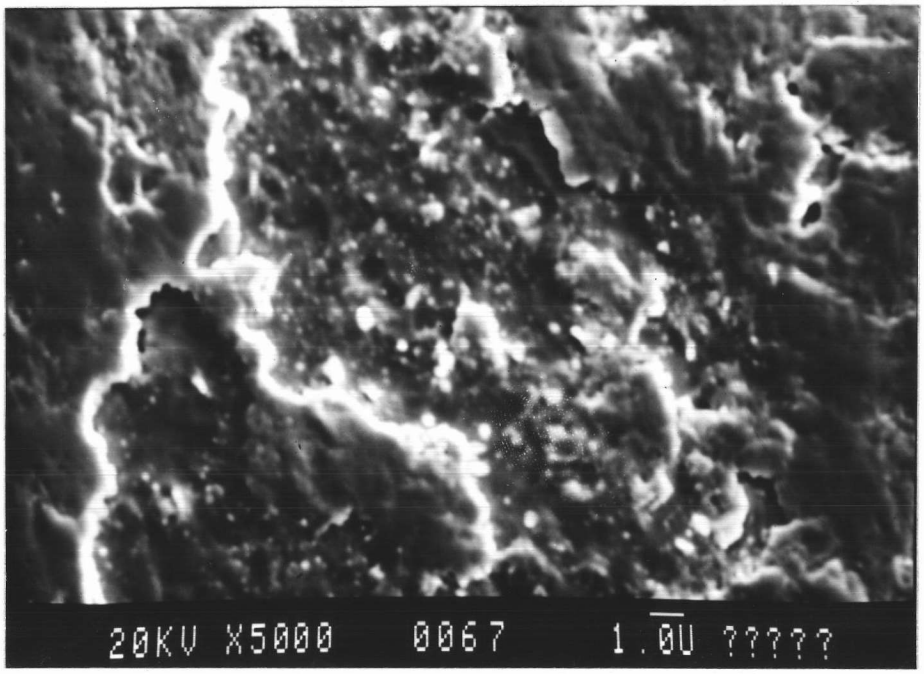


รูปที่ 4.3 โครงสร้างของเม็ดแก้วสะอาดจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า

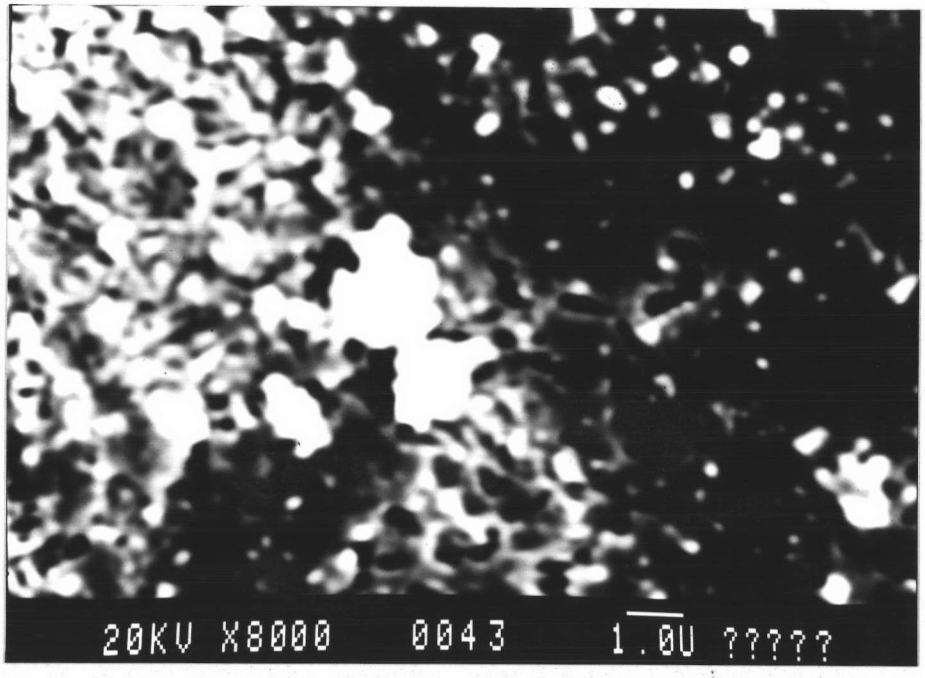




รูปที่ 4.4 โครงสร้างของเพคติเนสกระจายบนเม็ดแก้วจากจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนที่กำลังขยาย 5,000 เท่า



(1)



(2)

รูปที่ 4.5 โครงสร้างของเซลลูเลสกระจายบนเม็ดแก้วจากจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกนที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (1) และ 8,000 เท่า (2)

4. ศึกษาสมบัติบางประการทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

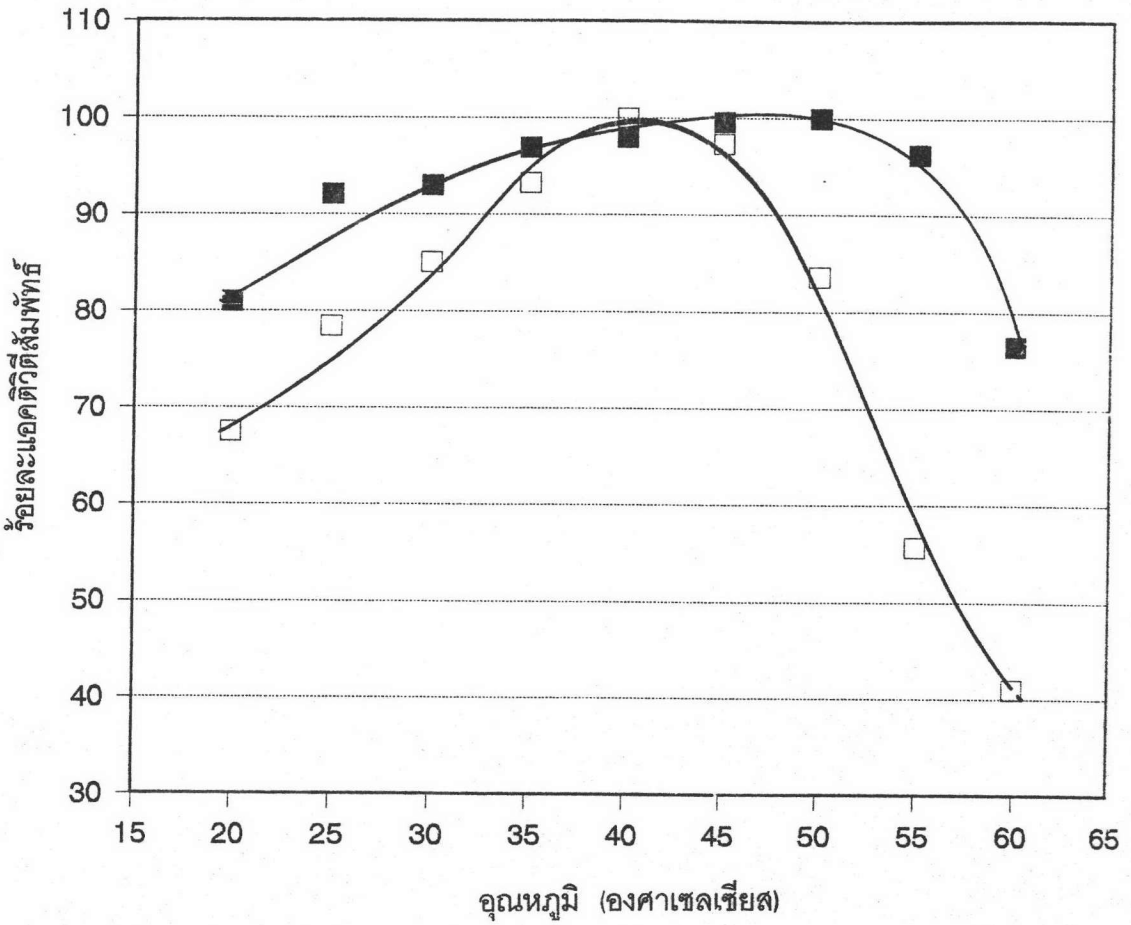
4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

4.1.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพคติเนสอิสระ และเพคติเนสตรึงรูป

จากวิธีการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.4.1 โดยทำการวัดแอคติวิตีของเพคติเนสอิสระที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (เพคติเนสมีแอคติวิตี 5,242 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 4.0) และเพคติเนสตรึงรูป ในช่วงอุณหภูมิ 20 - 60 องศาเซลเซียส ที่ pH 4.0 โดยใช้เพคตินที่มีเบ่อร์เซ็นต์การเอสเธอริไฟด์ร้อยละ 62-65 เป็นสับสเตรท ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.11 และเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับอุณหภูมิ จะให้ผลดังรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.11 แอคติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเพคติเนสอิสระและตรึงรูปที่ pH 4.0

อุณหภูมิ (^{o}C)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
	อิสระ (ยูนิต/มิลลิลิตร$x10^2$)	ตรึงรูป (ยูนิต/กรัมเอนไซม์$x10^2$)	อิสระ	ตรึงรูป
20	207.9 ± 0.05	10.12 ± 0.02	67.50	80.94
25	241.6 ± 0.14	11.51 ± 0.09	78.44	92.09
30	262.1 ± 0.12	11.63 ± 0.05	85.10	93.05
35	287.3 ± 0.08	12.11 ± 0.04	93.29	96.91
40	308.0 ± 0.09	12.25 ± 0.08	100.00	98.00
45	299.7 ± 0.10	12.45 ± 0.02	97.32	99.58
50	257.4 ± 0.02	12.50 ± 0.01	83.58	100.00
55	171.3 ± 0.03	12.03 ± 0.05	55.63	96.24
60	126.3 ± 0.24	9.56 ± 0.10	41.00	76.45



รูปที่ 4.6 ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของเพคติเนสอิสระ (—□—□—) และเพคติเนสตรึงรูป (—■—■—) ที่ pH 4.0

จากตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 2 ประการ คือ (Stauffer, 1989)

1. เพิ่มอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้สัดส่วนโมเลกุลของเอนไซม์ที่มีพลังงานเท่ากับพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาที่สารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้น

2. การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มอัตราการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจึงมีผลต่อเสถียรภาพของโปรตีนเอนไซม์

เมื่อพิจารณารูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของเพคติเนสอิสระและเพคติเนสตรึงรูป คือ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเพคติเนสตรึงรูปสามารถใช้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่า โดยที่ในช่วงอุณหภูมิต่ำ 20-50 องศาเซลเซียส เพคติเนสตรึงรูปจะแสดงแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่สูงกว่าเพคติเนสอิสระ ซึ่งอาจเกิดจากการตรึงรูปเพคติเนสโดยวิธีนี้จะสามารถลดพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยาลงได้ ทำให้เพคติเนสตรึงรูปสามารถทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น และเมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส พบว่า เพคติเนสตรึงรูปจะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเพคติเนสอิสระ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพันธะโควาเลนต์ของเพคติเนสตรึงรูปจะช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของเพคติเนส ซึ่งเป็นโปรตีน ทำให้เกิดการคลายเกลียว หรือการเสียสภาพของโปรตีนนั้นเป็นไปได้ยากกว่าเพคติเนสอิสระ จึงทำให้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการที่อุณหภูมิสูงขึ้นความหนืดของสับสเตรทจะลดลง ทำให้สับสเตรทสามารถเคลื่อนที่เข้าไปจับกับเอนไซม์ตรึงรูปได้ดีขึ้น ลดปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) ลงได้ หรืออาจเกิดจากการที่ตัวพยุงที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ทำให้อุณหภูมิบริเวณรอบๆ ตัวพยุง (microenvironment) ต่ำกว่าอุณหภูมิของสารละลาย จึงทำให้เพคติเนสตรึงรูป ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเพคติเนสอิสระ ซึ่งนับเป็นข้อได้เปรียบต่อการนำไปใช้ในระบบอุตสาหกรรม โดยที่ในบางครั้งอุณหภูมิของระบบอาจไม่สม่ำเสมอ เพคติเนสตรึงรูปจะทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกระทันหันได้ดีกว่าเพคติเนสอิสระ จึงทำให้การควบคุมการทำงานในระบบอุตสาหกรรมได้ง่ายขึ้น เนื่องจากมีข้อจำกัดของอุณหภูมิในการใช้งานน้อยลง

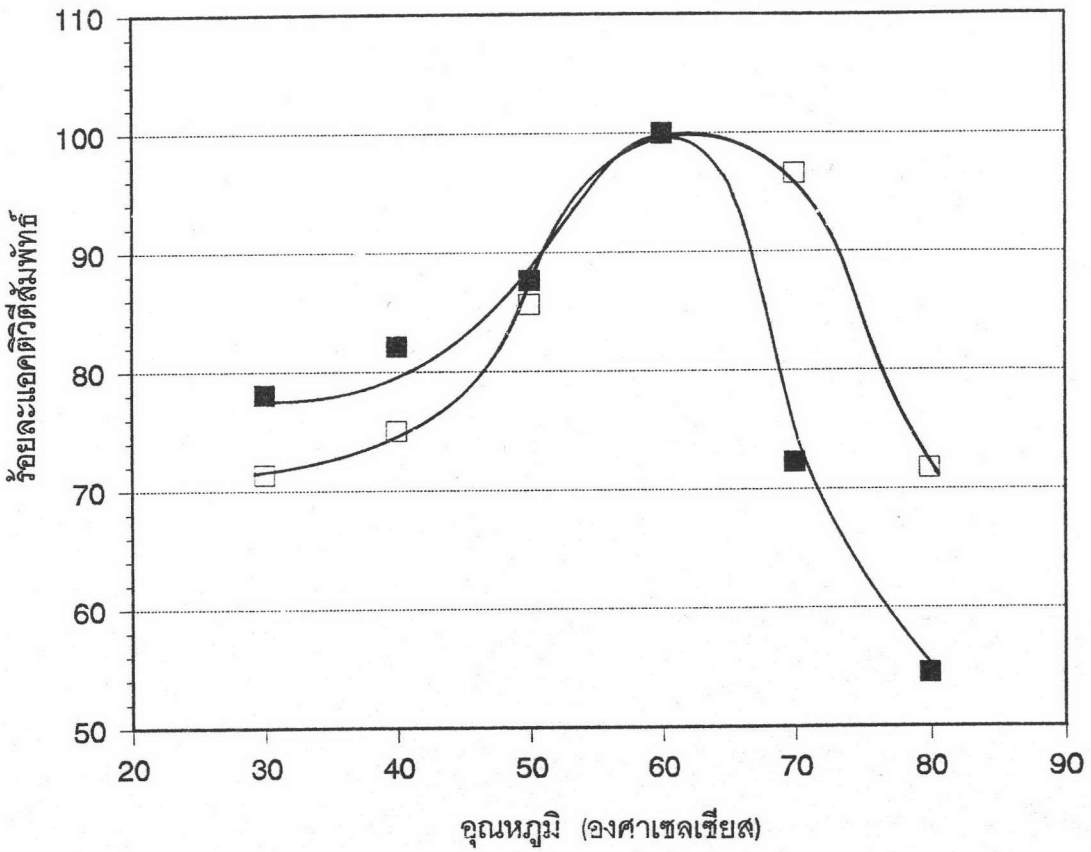
ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Markovic และ Machova (1985) ในการตรึงรูปเพคตินเอสเธอเรส (Pectinesterase) บน Sepharose 4B โดยใช้ไซยาโนเจนโบรไมด์ (CNBr) เป็นตัวกระตุ้นที่สนับสนุนว่าเอนไซม์ตรึงรูปจะทนต่อการเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระ และจากงานวิจัยของ Pifferi และคณะ (1988) ที่ตรึงรูปเอนไซม์เอนโด-พอลีกาแลคทูโรเนส (Endo-polymethylgalacturonase) บนตัวพยุงไตรเมทธิลไคโตแซน (Trimethylchitosan) โดยการดูดซับและใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ที่สนับสนุนถึงข้อได้เปรียบของเพคติเนสตรึงรูปที่สามารถใช้ได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าเพคติเนสอิสระ

4.1.2 <u>อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสอิสระ และเซลลูเลสตรึงรูป</u>

จากวิธีการดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4.1 โดยวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสอิสระที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (เซลลูเลสมีแอคติวิตี 16,860 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 4.8) และเซลลูเลสตรึงรูป ในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส และใช้คาร์บอกซี่เมทธิลเซลลูโลส (CMC) เป็นสับสเตรท ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.12 และเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์จะให้ผลดังรูปที่ 4.7

<u>ตารางที่ 4.12</u> แอคติวิตีที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเซลลูเลสอิสระและตรึงรูปที่ pH 4.8

อุณหภูมิ (^oC)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
	อิสระ (ยูนิต/มิลลิลิตร$x10^2$)	ตรึงรูป (ยูนิต/กรัมเอนไซม์$x10^2$)	อิสระ	ตรึงรูป
30	80.42 ± 0.05	19.61 ± 0.42	71.36	78.11
40	84.53 ± 0.23	20.63 ± 0.01	75.00	82.17
50	96.54 ± 0.12	22.02 ± 0.25	85.66	87.68
60	112.70 ± 0.15	25.11 ± 0.73	100.00	100.00
70	108.81 ± 0.04	19.16 ± 0.40	96.54	72.32
80	80.84 ± 0.54	13.69 ± 0.25	71.73	54.52



รูปที่ 4.7 ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของเซลลูเลสอิสระ (⊟—⊟) และเซลลูเลสตรึงรูป (■—■) ที่ pH 4.8

จากตารางที่ 4.12 และ รูปที่ 4.7 จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลลูเลสอิสระและตรึงรูปจะเท่ากัน คือ 60 องศาเซลเซียส โดยในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเซลลูเลสตรึงรูปจะสูงกว่าเซลลูเลสอิสระ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการตรึงรูปเซลลูเลสบนเม็ดแก้วโดยใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้น และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสาร

สร้างพันธะร่วมนี้สามารถลดพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยาลงได้ ทำให้เซลลูเลสตรึงรูปสามารถทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Bissett และ Sternberg (1978) ที่ทดลองตรึงรูปเบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) บนตัวพยุงไคโตแซน พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปจะลดพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยาลงได้จาก 11.95 กิโลแคลโลรี/โมล ในเอนไซม์อิสระ เป็น 7.93 กิโลแคลโลรี/โมล ในเอนไซม์ตรึงรูป ทำให้เอนไซม์ตรึงรูปสามารถเกิดปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ง่ายขึ้น และเมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส พบว่า แอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปบนเม็ดแก้วจะต่ำกว่าเซลลูเลสอิสระ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การตรึงรูปเซลลูเลสด้วยวิธีนี้อาจทำให้สภาพธรรมชาติของเซลลูเลสเกิดการคลายเกลียว หรือเสียสภาพได้ง่ายขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongkhalaung และคณะ (1985) ในการตรึงรูปเซลลูเลสบนเดกซ์แทรน (dextran) โดยใช้ไซยาโนเจนโบรไมด์เป็นตัวกระตุ้น และงานวิจัยของ Manjon และคณะ (1985) ที่ตรึงรูปเบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) บน arylamine-glass โดยวิธี diazo coupling ซึ่งทั้งสองงานวิจัย พบว่า แอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปจะต่ำกว่าเซลลูเลสอิสระที่อุณหภูมิ ที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

4.2 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

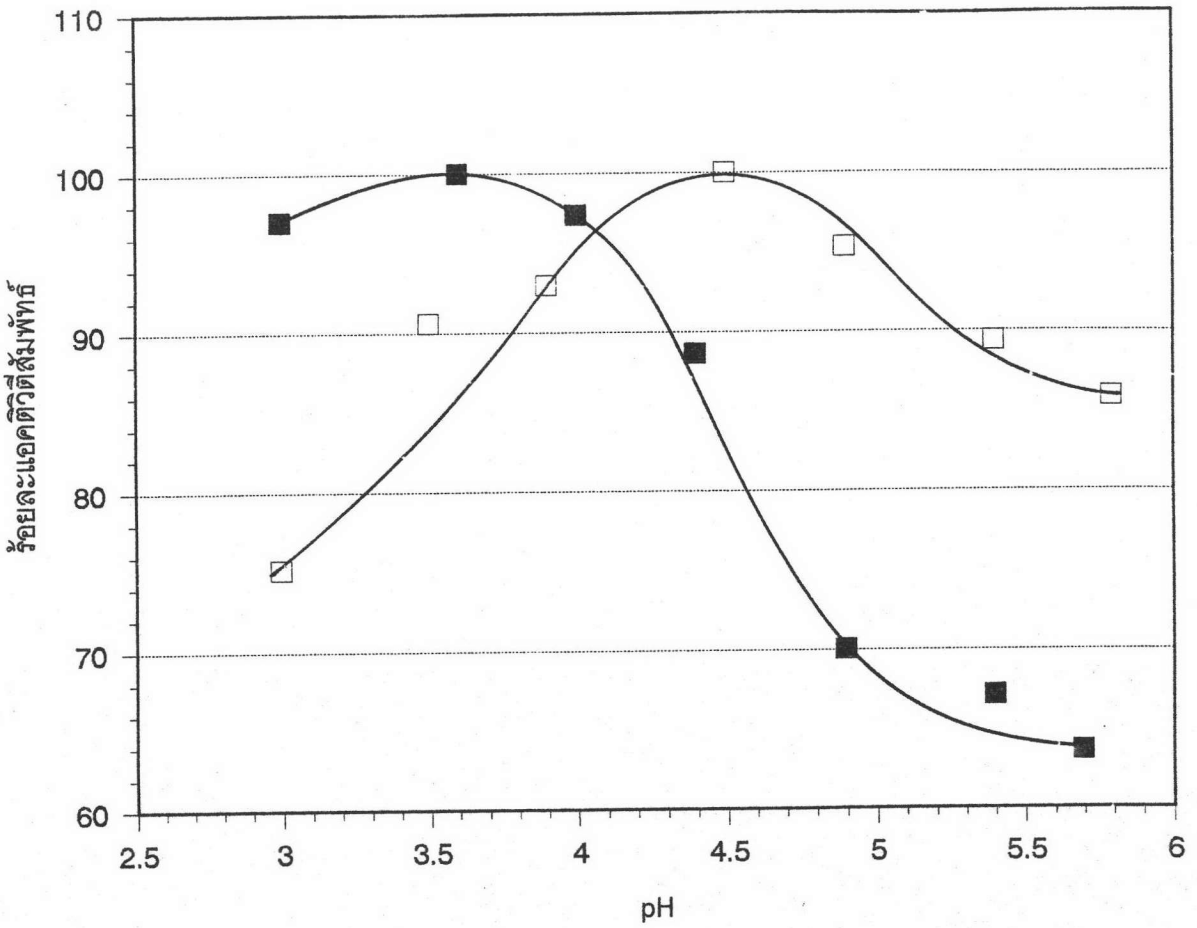
4.2.1 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพคติเนสอิสระและเพคติเนสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4.2 โดยวัดแอคติวิตีของเพคติเนสอิสระที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (เพคติเนสมีแอคติวิตี 5,242 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 4.0) และเพคติเนสตรึงรูปในช่วง pH 3 - 6 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.13 และเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ จะให้ผลดังรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.13 แอคติวิตีที่ pH ต่าง ๆ ของเพคติเนสอิสระ และตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

pH *		ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
อิสระ	ตรึงรูป	อิสระ (ยูนิต/มิลลิลิตร x10^2)	ตรึงรูป (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x 10^2)	อิสระ	ตรึงรูป
3.00	3.00	208.1 ± 0.21	10.98 ± 0.02	75.21	97.03
3.50	3.60	250.8 ± 0.02	11.32 ± 0.15	90.64	100.00
3.90	4.00	257.4 ± 0.15	11.02 ± 0.13	93.02	97.37
4.50	4.40	276.7 ± 0.08	10.04 ± 0.01	100.00	88.66
4.90	4.90	263.8 ± 0.13	7.96 ± 0.19	95.34	70.05
5.40	5.35	247.4 ± 0.02	7.60 ± 0.09	89.41	67.16
5.80	5.70	237.7 ± 0.14	7.20 ± 0.01	85.91	63.64

* วัด pH หลังหยุดปฏิกิริยา



รูปที่ 4.8 ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของเพคติเนสอิสระ (⊟—⊟) และเพคติเนสตรึงรูป (■—■)

การที่ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูป แตกต่างจากเอนไซม์อิสระนั้นเป็นผลมาจากประจุบนตัวพยุง และการเกิดการดัดแปรทางเคมี (chemical modification) ของเอนไซม์จากการตรึงรูป โดยอาจเกิดจากการที่กรดอะมิโนบางตัวที่มีส่วนร่วมในการเกิดพันธะระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงนั้น มีผลทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดประจุสุทธิของโปรตีนเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH มากน้อยแค่ไหน ขึ้นกับชนิดของตัวพยุง ธรรมชาติและจำนวนของกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปร (Goldstein et al., 1970)

จากตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.8 พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพคติเนสตรึงรูป คือ 3.6 ในขณะที่เพคติเนสอิสระมี pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้อาจอธิบายได้ โดยอาศัยหลักการกระจายโปรตอน (H^+) บริเวณใกล้โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูป (partition effect) กล่าวคือ ประจุบนตัวพยุงจะมีผลในการดึงดูดหรือต้านทานประจุของสับสเตรทและสารต่าง ๆ ในระบบ รวมทั้งไฮโดรเจนอิออน ส่งผลให้ pH ในระบบ (bulk phase) แตกต่างจาก pH ที่บริเวณรอบๆ โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูปที่เกาะกับตัวพยุง (microenvironment) (Trevan, 1980) การที่ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเพคติเนสตรึงรูปมีค่าเลื่อนไปทางกรด 0.9 หน่วย แสดงว่าการตรึงรูปเพคติเนสด้วยพันธะโควาเลนต์วิธีนี้ทำให้เกิดอิออนบวกเป็นส่วนใหญ่ที่บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการผลักโปรตอน ออกไปยังสารละลายภายนอก มีผลทำให้บริเวณรอบๆ เอนไซม์ตรึงรูปมี pH สูงกว่าสารละลายภายนอก จากการทดลอง เมื่อ pH ของสารละลายภายนอกเป็น 3.6 ทำให้ pH รอบๆ โมเลกุลเอนไซม์ตรึงรูปเทียบเท่ากับ pH 4.5 จึงทำให้ได้แอคติวิตีสูงสุด ซึ่งลักษณะการเบี่ยงเบนของ pH ที่เคลื่อนไปทางกรดดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hanisch, Rickard และ Nyo (1987) ที่ศึกษาการตรึงรูปเอนไซม์ Poly(methoxygalacturonide)lyase บน DEAE-cellulose โดยใช้เกลือไททาเนียมเป็นตัวกระตุ้น และงานวิจัยของ Stratilova, Capka และ Benkova (1987) ที่ศึกษาการตรึงรูป endopolygalacturonase บน epoxy-activated silica 3 ชนิด คือ Kieselgel, Fractosil และ Eupergit ซึ่งเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวพยุงทั้ง 3 ชนิด ล้วนแต่มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานเบี่ยงเบนไปทางกรดทั้งสิ้น

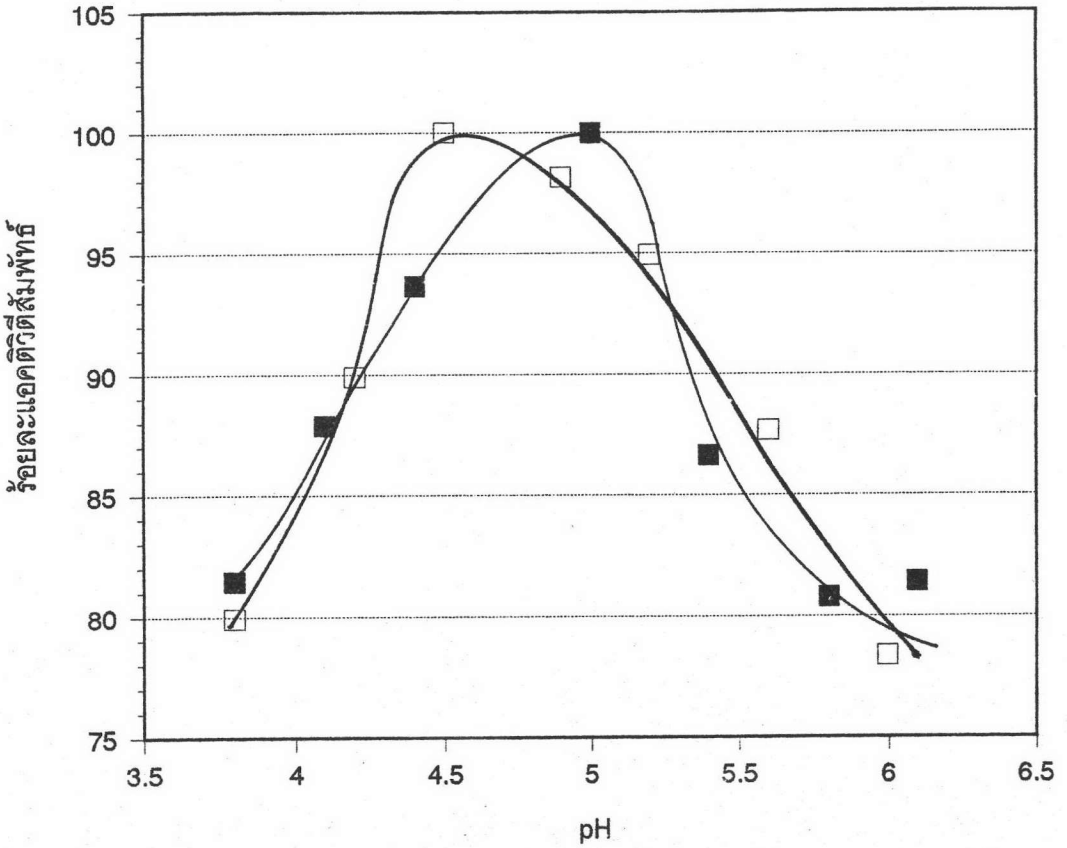
4.2.2 <u>pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเซลลูเลสอิสระ และเซลลูเลสตรึงรูป</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4.2 โดยวัดแอคติวิตีของเซลลูเลสอิสระที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร (เซลลูเลสมีแอคติวิตี 16,860 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 4.8) และเซลลูเลสตรึงรูป ในช่วง pH 3 - 6 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และใช้คาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเป็นสับสเตรท ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.14 แอคติวิตีที่ pH ต่าง ๆ ของเซลลูเลสอิสระและตรึงรูป ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

pH *		ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
อิสระ	ตรึงรูป	อิสระ (ยูนิต/มิลลิลิตร x 10)	ตรึงรูป (ยูนิต/กรัมเอนไซม์ x 10)	อิสระ	ตรึงรูป
3.82	3.75	94.54 ± 0.45	25.30 ± 0.11	79.92	81.44
4.19	4.10	106.33 ± 0.21	27.31 ± 0.66	89.89	87.89
4.55	4.40	118.29 ± 0.15	29.10 ± 0.31	100.00	93.66
4.94	5.00	116.08 ± 0.17	31.07 ± 0.56	98.13	100.00
5.16	5.40	112.28 ± 0.18	26.93 ± 0.19	94.92	86.66
5.59	5.80	103.70 ± 0.13	25.10 ± 0.01	87.67	80.79
5.98	6.10	92.69 ± 0.25	25.30 ± 0.01	78.36	81.43

* วัด pH หลังหยุดปฏิกิริยา



รูปที่ 4.9 ร้อยละแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH ต่าง ๆ ของเซลลูเลสอิสระ (—□—) และเซลลูเลสตรึงรูป (—■—)

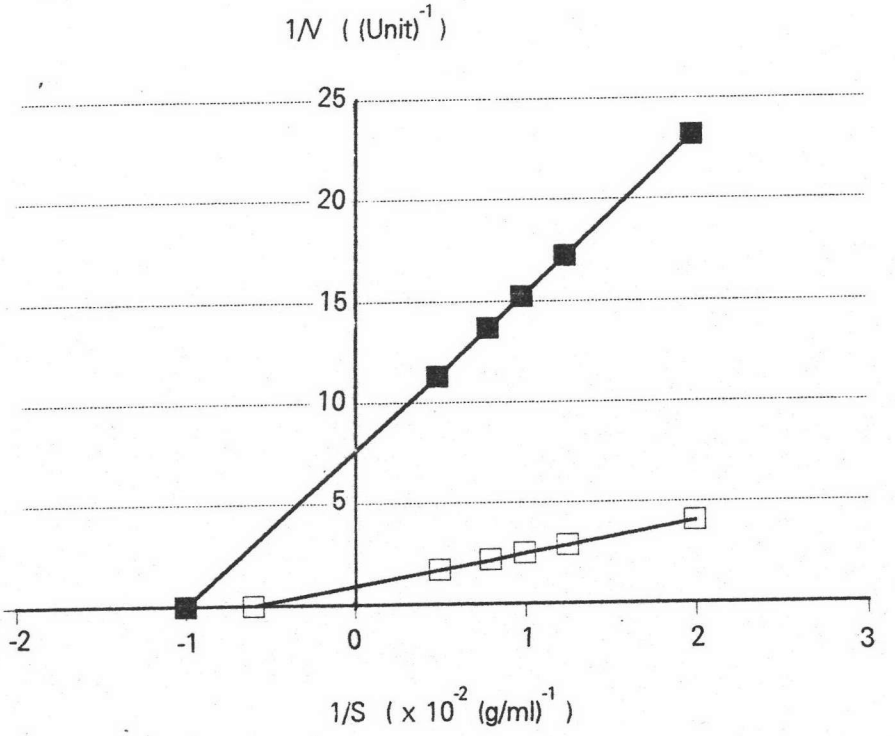
จากตารางที่ 4.14 และกราฟรูปที่ 4.9 พบว่า pH ที่เหมาะสมของเซลลูเลสตรึงรูป คือ 5.0 ในขณะที่ pH ที่เหมาะสมของเซลลูเลสอิสระอยู่ที่ 4.55 ซึ่งเซลลูเลสตรึงรูปจะให้แอคติวิตีสูงสุดที่ pH สูงกว่าเซลลูเลสอิสระ 0.45 หน่วย ซึ่งอธิบายได้ในทางกลับกันกับเพคติเนส นั่นคือการตรึงรูปเซลลูเลสด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ อาจก่อให้เกิดอิออนลบเป็นส่วนใหญ่ที่บริเวณรอบ ๆ โมเลกุลของเอนไซม์ตรึงรูป ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการดูดโปรตอนเข้ามารอบๆ โมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้บริเวณรอบๆ โมเลกุลของเอนไซม์มี pH ต่ำกว่าสารละลายภายนอก จากการทดลองเมื่อ pH ของสารละลายภายนอกเป็น 5.0 ทำให้ pH รอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์ตรึงรูปเทียบเท่ากับ 4.55 จึงทำให้ได้แอคติวิตีสูงที่สุด ซึ่งการที่เซลลูเลสตรึงรูปมี pH ที่

เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเบี่ยงเบนไปทางด่างนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Garcia, Oh และ Engler (1989) ที่ทดลองตรึงรูปเซลลูเลส บน Iron oxide (Fe_3O_4) โดยใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้น พบว่า pH ที่เหมาะสมของเซลลูเลสตรึงรูปและเซลลูเลสอิสระจะมีค่าเท่ากับ 5.5 และ 4.0 ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Sriputtirut และ Anprung (1989) ที่ศึกษาการตรึงรูปเซลลูเลสเชิงซ้อน บนทรายแม่น้ำ โดยใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้นตัวพยุง และใช้กลูตารัลดีไฮด์ เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้จะมี pH เคลื่อนไปทางด่าง 1 หน่วย เมื่อเทียบกับเซลลูเลสเชิงซ้อนอิสระ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Fadda และคณะ (1984) ที่ทดลองตรึงรูปเซลลูเลสบนตัวพยุง 3 ชนิด ได้แก่ CNBr-Sepharose, Con A-Sepharose และ CNBr-glass beads พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวพยุงทั้ง 3 ชนิดจะมี pH ที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาเบี่ยงเบนไปทางด่างทั้งสิ้น

4.3 ศึกษาค่าคงที่ Michaelis-Menten (Km) ของเอนไซม์

4.3.1 ค่าคงที่ Michaelis-Menten ของเพคติเนสอิสระ และเพคติเนสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4.3 หาแอคติวิตีของเพคติเนสอิสระและเพคติเนสตรึงรูปที่ pH 3.6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆ หาค่า Km โดยวิธี Lineweaver Burk Plot ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.15



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk Plot ของเพคติเนสอิสระ (⊟—⊟) และเพคติเนสตรึงรูป (■—■)

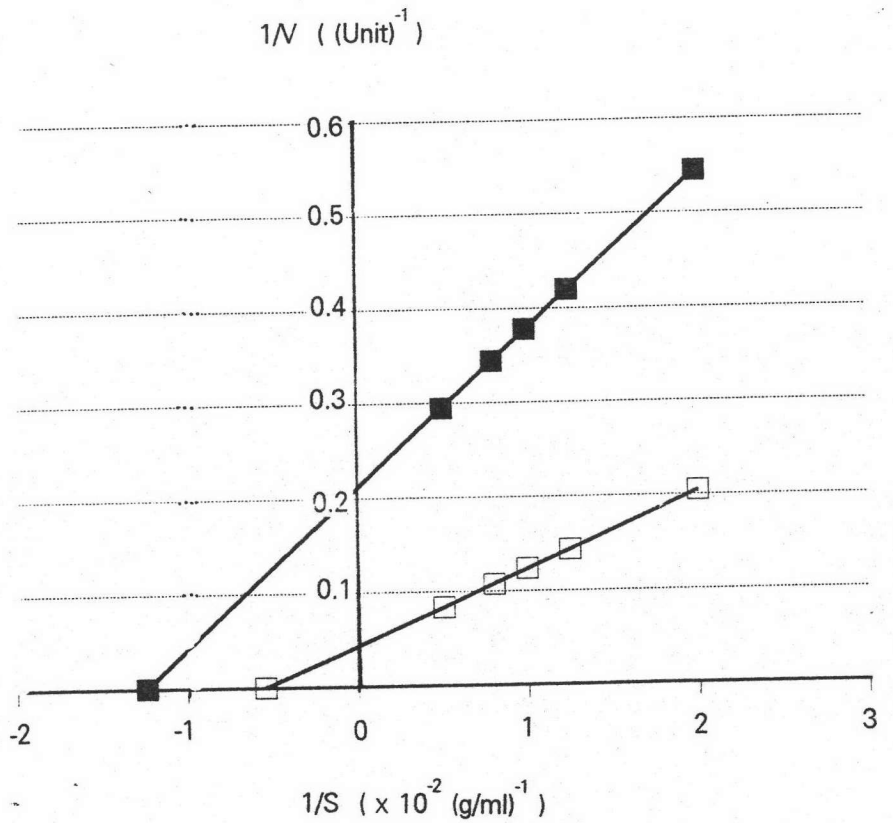
ตารางที่ 4.15 ค่า Km ของเพคติเนสอิสระและเพคติเนสตรึงรูป

ชนิดของเอนไซม์	ค่า Km ($g/ml \times 10^2$)
เพคติเนสอิสระ	1.733
เพคติเนสตรึงรูป	1.087

จากรูปที่ 4.10 และ ตารางที่ 4.15 พบว่า เพคติเนสตรึงรุปจะมีค่า Km เท่ากับ 1.087×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่เพคติเนสอิสระมีค่า Km เท่ากับ 1.733×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเพคติเนสตรึงรูปจะมีค่า Km น้อยกว่าเพคติเนสอิสระ 1.59 เท่า ที่ pH 3.6 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แสดงว่าเพคติเนสตรึงรูปจะมี affinity ในการจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น ส่งผลให้เพคติเนสตรึงรูปมีความจำเพาะต่อสับสเตรทเพคตินมากกว่าเพคติเนสอิสระ นั่นคือการตรึงรูปเพคติเนสบนเม็ดแก้วด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ จะช่วยปรับปรุงโครงรูปของเอนไซม์ให้เหมาะสมสำหรับการเข้าจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือเพคติเนสตรึงรูปบนเม็ดแก้วด้วยวิธีนี้ จะแสดงประจุบวกเป็นส่วนใหญ่บริเวณรอบๆ เอนไซม์ตรึงรูป ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วตามข้อ 4.2.1 ทำให้ความเข้มข้นของเพคติน ซึ่งมีประจุลบบริเวณรอบเอนไซม์ตรึงรูปจะมากกว่าสารละลายภายนอก ทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเข้าจับกับสับสเตรทได้ดีกว่าเพคติเนสอิสระ ซึ่งลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benkova และคณะ (1982) ที่ทดลองตรึงรูปเอนไซม์ Endo - D -galacturonase บนตัวพยุง polyethyleneterephthalate โดยวิธีดูดซับ พบว่า ค่า Km ของเอนไซม์ตรึงรูปและเอนไซม์อิสระจะมีค่าเท่ากับ 1.95×10^{-3} และ 1.57×10^{-3} โมลต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้ D-galactopyranuronic acid เป็นสับสเตรท และจากงานวิจัยของ Hanisch และคณะ (1978) ที่ทำการศึกษาการตรึงเอนไซม์ poly(methoxygalacturonide) lyase บน DEAE-cellulose โดยกระตุ้นตัวพยุงด้วยเกลือไททาเนียม ที่พบว่า Km ของเอนไซม์ตรึงรูปจะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับสับสเตรทสูงกว่าเอนไซม์อิสระนั่นเอง

4.3.1 ค่าคงที่ Michaelis-Menten ของเซลลูเลสอิสระ และเซลลูเลสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4.3 เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเซลลูเลสอิสระและเซลลูเลสตรึงรูปที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆ หาค่า Km โดยวิธี Lineweaver Burk Plot ให้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.16



รูปที่ 4.11 เปรียบเทียบกราฟแบบ Lineweaver Burk Plot ของเซลลเลสอิสระ (⊟—⊟) และเซลลูเลสตรึงรูป (■—■)

ตารางที่ 4.16 ค่า Km ของเซลลูเลสอิสระและเซลลูเลสตรึงรูป

ชนิดของเอนไซม์	ค่า Km ($g/ml \times 10^{2}$)
เซลลูเลสอิสระ	1.862
เซลลูเลสตรึงรูป	0.791

จากรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.16 พบว่า เซลลูเลสตรึงรูปมีค่า Km เท่ากับ 0.791×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่เซลลูเลสอิสระมีค่า Km เท่ากับ 1.862×10^{-2} กรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่า เซลลูเลสตรึงรูปมีค่า Km น้อยกว่าเซลลูเลสอิสระ 2.35 เท่า ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นั่นคือเซลลูเลสตรึงรูปมีความจำเพาะต่อคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสที่ใช้เป็นสับสเตรทมากกว่าเซลลูเลสอิสระ นั่นคือ การตรึงรูปเซลลูเลสบนเม็ดแก้วด้วยวิธีเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์วิธีนี้จะช่วยปรับปรุงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ให้เหมาะสมสำหรับการเข้าจับกับสับสเตรท ได้ดีขึ้นซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fadda และคณะ (1984) ที่ตรึงรูปเซลลูเลสบนตัวพยุง Con A-Sepharose พบว่าค่า Km ของเซลลูเลสตรึงรูปมีค่าลดลงเมื่อใช้ cellulose azure เป็นสับสเตรท นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ บุศราภา ลีละวัฒน์ และ ปราณี อ่านเปรื่อง (2536) ที่ทดลองตรึงรูปปาเปนและนิวเตรสบนทราย โดยใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้น และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า ค่า Km ของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปมีค่าลดลงถึง 7.29 และ 4.88 เท่า ตามลำดับ

4.4 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity)

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.4.4 วิเคราะห์แอคติวิตีของเพคติเนสหรือเซลลูเลสอิสระที่ pH 4.5 หรือ 4.55 ที่อุณหภูมิ 40 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และวิเคราะห์แอคติวิตีของเพคติเนสหรือเซลูเลสตรึงรูปที่ pH 3.6 และ 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ คำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะเป็น แอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต) ต่อปริมาณโปรตีนเอนไซม์ (มิลลิกรัม) ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.17 และ 4.18

ตารางที่ 4.17 ตารางเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะและแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเพคติเนสอิสระและเพคติเนสตรึงรูป

เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี (ยูนิต/กรัมเอนไซม์ $x10^2$)	ปริมาณโปรตีน (มก./กรัม เอนไซม์)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน $x10^2$)	แอคติวิตีสัมพัมธ์ (ร้อยละ)
เพคติเนสอิสระ	21,462	743.75	28.856	100.00
เพคติเนสตรึงรูป	12.5	0.634	19.716	68.33

ตารางที่ 4.18 ตารางเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะและแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเซลลูเลสอิสระและเซลลูเลสตรึงรูป

เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี (ยูนิต/กรัมเอนไซม์ x10)	ปริมาณโปรตีน (มก./กรัมเอนไซม์)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน x10)	แอคติวิตีสัมพัมธ์ (ร้อยละ)
เซลลูเลสอิสระ	61,450	918.75	66.884	100.00
เซลลูเลสตรึงรูป	32.2	0.587	54.855	82.02

จากตารางที่ 4.17 จะเห็นได้ว่า เพคติเนสอิสระมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 28.856×10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่เพคติเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 19.716×10^{-2} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเพคติเนสอิสระ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เพคติเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีเทียบเท่ากับร้อยละ 68.33 ของเพคติเนสอิสระ และจากตารางที่ 4.18 จะเห็นได้ว่าเซลลูเลสอิสระมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 66.884×10^{-1} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนเซลลูเลสตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 54.855×10^{-1} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่าเซลลูเลสอิสระ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เซลลูเลสตรึงรูปมีแอคติวิตีเทียบเท่ากับร้อยละ 82.02 ของเซลลูเลสอิสระ การที่เอนไซม์ตรึงรูปดังกล่าวมีแอคติวิตีจำเพาะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) หรือข้อจำกัดทางการแพร่ (diffusion limitation) ของสับสเตรทกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา หรืออาจเกิดจากการที่การตรึงรูปจะทำให้การเคลื่อนที่ของเอนไซม์ตรึงรูปไม่อิสระเพียงพอเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากภาวะการตรึงรูปด้วยพันธะโควาเลนต์ค่อนข้างรุนแรง ดังนั้นอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (conformation) ของเอนไซม์ เป็นผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการบดบัง (steric effect) ของหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยกัน ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้อย่างอิสระ จึงส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ

ซึ่งการลดลงของค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปนี้ จะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bissettและ Sternberg (1978) ที่ทดลองตรึงรูปเบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) บนไคโตแซนโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปเทียบเท่ากับร้อยละ 1-10 ของเอนไซม์อิสระขึ้นกับปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ และที่ปริมาณเอนไซม์ที่มากเกิน 10 มิลลิกรัม ต่อ 25 กรัมไคโตแซน จะทำให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปลดลง ซึ่งเขากล่าวว่าการที่เอนไซม์ตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะที่ลดลงเนื่องมาจากปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสารภายในระบบ และการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ในระหว่างการตรึงรูป นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Benkova, Mrackova และ Babor (1980) ที่ทดลองตรึงรูป endo-D-galacturonase บนตัวพยุง Spheron 300, Spheron 500 และ Spheron 1000 พบว่า แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะลดลงบนตัวพยุงทั้ง 3 ชนิด เนื่องมาจากการบดบัง (steric effect) ซึ่งจะมากน้อยขนาดไหนขึ้นกับขนาดของรูพรุน และแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะสูงขึ้น เมื่อใช้สับสเตรทที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

แต่จากการพิจารณาค่าสัดส่วน ระหว่างแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ต่อค่าคงที่ไมคีลีส (Vmax/Km) พบว่า เพคติเนสและเซลลูเลสอิสระมีค่า Vmax/Km เท่ากับ 16.66 และ 35.92 ยูนิต/ (กรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ส่วนเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปจะมีค่า Vmax/Km เท่ากับ 18.14 และ 69.35 ยูนิต/ (กรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งจะสูงกว่าเอนไซม์อิสระอยู่ 1.09 และ 1.93 เท่า ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายได้จากสมการ (Whitaker, 1972)

$$Vo = \frac{Vmax\,[Ao]}{Km + [Ao]}$$

โดยที่ Vo = อัตราเร็วของปฏิกิริยา

Vmax = อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา

[Ao] = ความเข้มข้นของสับสเตรท

Km = ค่าคงที่ไมคีลีส

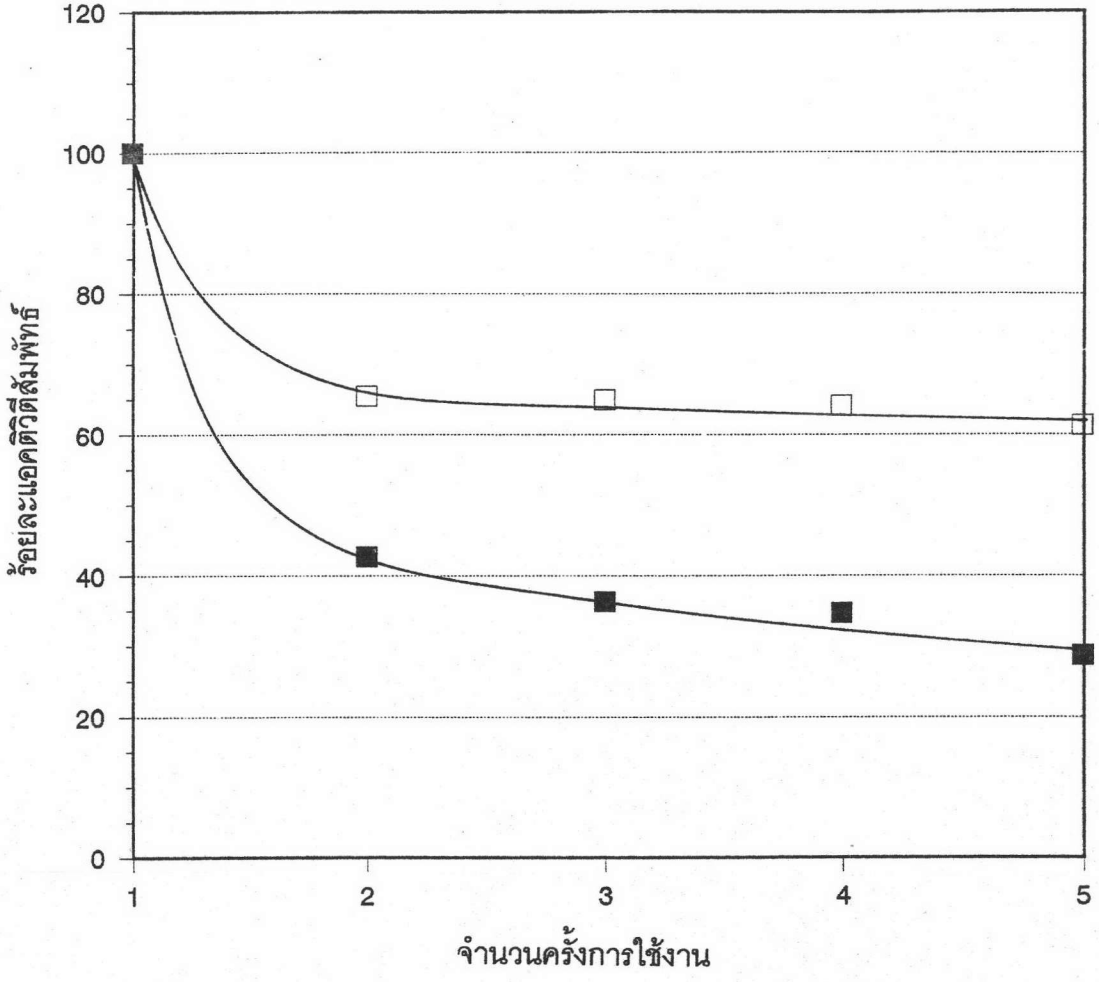
ซึ่งจากสมการจะพบว่าที่ 1st order state ความเข้มข้นของสับสเตรทจะเข้าใกล้ 0 ดังนั้น ที่ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เท่ากัน สัดส่วนของ Vmax/Km ที่มากกว่าจะให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มากกว่าเช่นกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตรึงรูปทั้ง 2 ชนิดโดยการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ จะช่วยปรับปรุงโครงรูปของเอนไซม์ให้เหมาะสมในการเข้าจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น

5. ศึกษาประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูป

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.5 วิเคราะห์แอคติวิตีคงเหลือของเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปที่ pH 3.6 และ 5.0 อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำกับสับสเตรทใหม่หลายๆ ครั้ง ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.19 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.19 แอคติวิตีของเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูป เมื่อใช้ทำปฏิกิริยาซ้ำหลายๆ ครั้ง

จำนวนครั้งที่ใช้ทำปฏิกิริยา	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
	เพคติเนส (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10^2)	เซลลูเลส (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10)	เพคติเนส	เซลลูเลส
1	12.43 ± 0.12	29.94 ± 0.08	100.00	100.00
2	5.30 ± 0.09	19.62 ± 0.14	42.67	65.53
3	4.52 ± 0.16	19.46 ± 0.21	36.35	64.99
4	4.31 ± 0.05	19.20 ± 0.18	34.69	64.13
5	3.56 ± 0.12	18.36 ± 0.13	28.66	61.32



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำของเพคติเนสตรึงรูป (—□—□—) และเซลลูเลสตรึงรูป (—■—■—)

จากตารางที่ 4.19 และรูปที่ 4.12 ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของจำนวนครั้งการใช้งานกับแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ตรึงรูป จะเห็นว่าทั้งเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปจะมีแนวโน้มการใช้งานที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ แอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปจะลดลงมากเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำ 1-3 ครั้งแรก จากนั้นจะค่อนข้างคงที่ ส่วนเซลลูเลสตรึงรูปแอคติวิตีจะลดลงมากเมื่อทำ

ปฏิกิริยาซ้ำ 1 - 2 ครั้งแรก และค่อนข้างคงที่เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำในครั้งต่อๆ ไป โดยที่เพคติเนสตรึงรูป จะมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 28.66 หลังจากใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ในขณะที่เซลลูเลสตรึงรูปจะมีแอคติวิตีคงเหลือถึงร้อยละ 61.32 หลังจากใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ทั้งนี้อธิบายได้ว่าการทำปฏิกิริยาซ้ำในช่วงครั้งแรกๆ แอคติวิตีของเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปจะลดลงอย่างมาก อาจเนื่องจาก ในระหว่างการตรึงรูปมีเอนไซม์บางส่วนที่เกาะกับตัวพยุงแบบพันธะโควาเลนต์และบางส่วนเป็นแบบการดูดซับ ซึ่งโมเลกุลเกาะกันด้วยแรงอ่อน ดังนั้นการทดสอบแอคติวิตีที่ได้ในครั้งแรกๆ ค่าที่ได้จึงเป็นค่ารวมที่ได้จากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ที่เกาะกับตัวพยุงแบบพันธะโควาเลนต์ กับเอนไซม์ที่เกาะกันแบบดูดซับ และหลังจากทำปฏิกิริยาซ้ำในครั้งที่ 2 และ 3 ด้วยเอนไซม์ชุดเดิมนี้ในการย่อยสับสเตรทที่เตรียมใหม่ เอนไซม์ที่เกาะกันด้วยการดูดซับจะหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่ายในขณะทำปฏิกิริยา และถูกชะออกไปด้วยบัฟเฟอร์ จนกระทั่งเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำในครั้งต่อๆ ไป แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะค่อนข้างคงที่ หรืออาจเกิดจากการที่ เอนไซม์บางส่วนมีการเสียสภาพทางธรรมชาติอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป

ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lozano และคณะ (1987) ที่ศึกษาการนำเพคติเนสตรึงรูปบน nylon polyethyleneimene copolymer มาใช้ในการทำน้ำแอปปริคอตให้ใส ก็พบว่า เพคติเนสตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตการใช้งาน 8 วัน และค่าแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเพคติเนสบนไนลอนมีแนวโน้มที่จะเสถียรเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้งานวิจัยของ Jain และ Winkins (1987) ที่ศึกษาการตรึง เซลลูเลส (Celluclast 200L) บนไนลอนโดยวิธีแตกพันธะเปปไทด์ด้วยกรดไฮโดรคลอริค และ N,N-dimethylaminopropylamine นำมาใช้ในการย่อยสลายขี้เลื่อย พบว่า แอคติวิตีลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยหลังจากการใช้ซ้ำเป็นครั้งที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีแนวโน้มที่จะเสถียรเช่นกัน ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้ นับเป็นข้อได้เปรียบสำหรับเอนไซม์ตรึงรูปที่จะนำไปใช้ในระบบอุตสาหกรรมแบบต่อเนื่อง และถ้าหากพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปต่ำลง ตามเวลาการใช้งาน ก็จะต้องปรับเพิ่มปริมาณเอนไซม์ตรึงรูปต่อสับสเตรทให้มากขึ้น เช่น ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด อาจทำได้โดย เพิ่มจำนวนคอลัมน์ หรือทำให้สับสเตรทไหลวนซ้ำในเครื่องปฏิกรณ์จนได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ

6. <u>ศึกษาเสถียรภาพของเพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปในระหว่างการเก็บ</u>

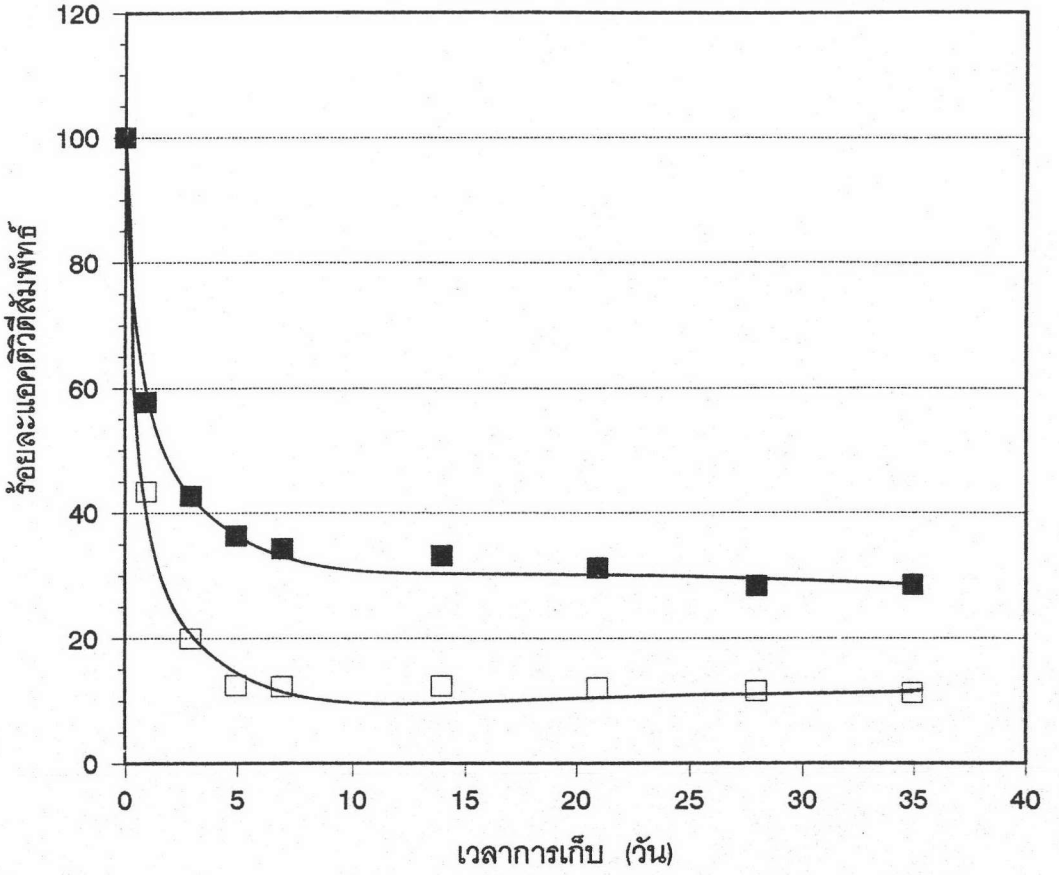
จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.6 วิเคราะห์แอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปซึ่งเก็บในอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0 และเซลลูเลสตรึงรูปซึ่งเก็บในอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.8 ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.20 และ 4.21 และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ให้ผลดังรูปที่ 4.13 และ 4.14

<u>ตารางที่ 4.20</u> ค่าเฉลี่ยของแอคติวิตีของเพคติเนสตรึงรูปที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส)

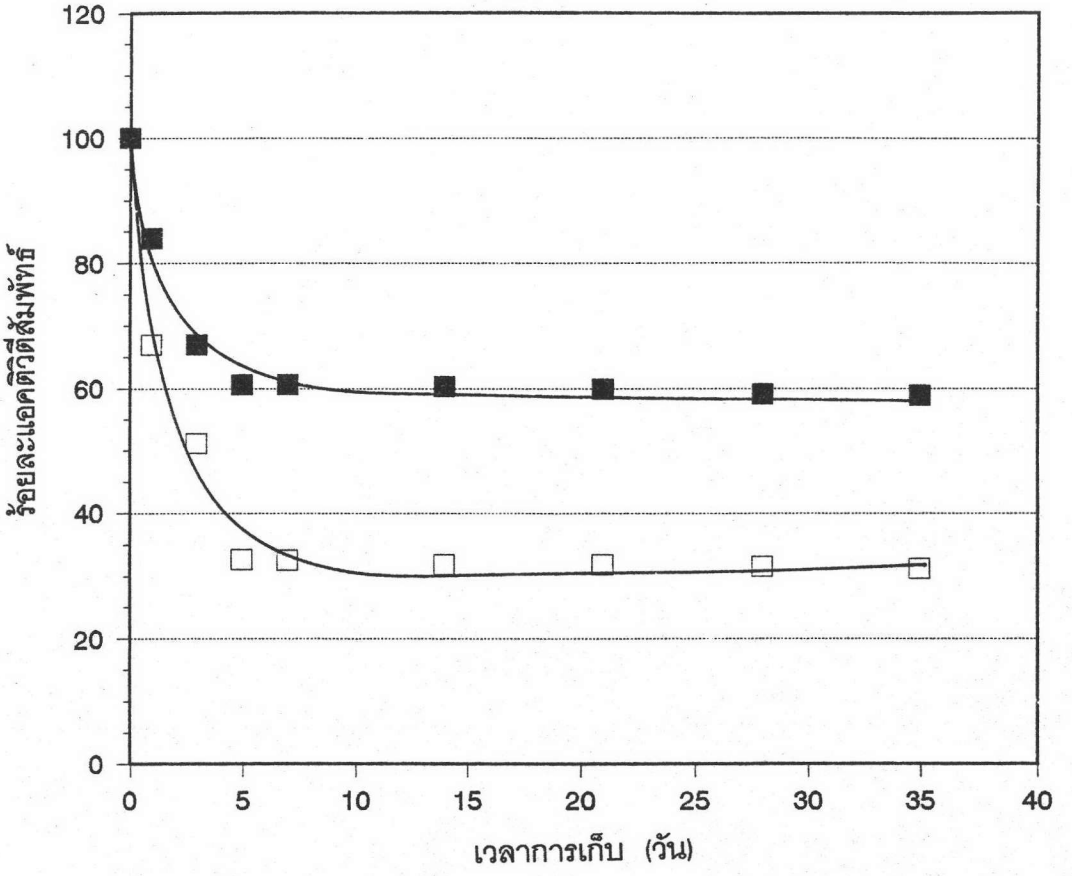
ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10^2)		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
	8-10°C	28-30°C	8-10°C	28-30°C
0	12.56 ± 0.02	12.56 ± 0.78	100.00	100.00
1	7.25 ± 0.12	5.45 ± 0.54	57.72	43.39
3	5.36 ± 0.15	2.51 ± 0.32	42.68	19.98
5	4.52 ± 0.21	1.56 ± 0.15	36.31	12.42
7	4.31 ± 0.22	1.54 ± 0.09	34.32	12.26
14	4.16 ± 0.16	1.55 ± 0.11	33.12	12.34
21	3.92 ± 0.05	1.51 ± 0.34	31.21	12.02
28	3.56 ± 0.01	1.45 ± 0.52	28.34	11.54
35	3.59 ± 0.56	1.42 ± 0.62	28.58	11.30

ตารางที่ 4.21 ค่าเฉลี่ยของแอคติวิตีของเซลลูเลสตรึงรูปที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส)

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่าเฉลี่ยแอคติวิตี ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10)		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (ร้อยละ)	
	8-10°C	28-30°C	8-10°C	28-30°C
0	30.02 ± 0.05	30.02 ± 0.25	100.00	100.00
1	25.21 ± 0.14	20.11 ± 0.17	83.98	66.99
3	20.12 ± 0.28	15.36 ± 0.09	67.02	51.17
5	18.20 ± 0.09	9.81 ± 0.07	60.63	32.68
7	18.22 ± 0.02	9.78 ± 0.16	60.69	32.58
14	18.11 ± 0.16	9.56 ± 0.02	60.33	31.84
21	17.98 ± 0.28	9.55 ± 0.01	59.89	31.81
28	17.75 ± 0.14	9.47 ± 0.56	59.13	31.55
35	17.66 ± 0.05	9.36 ± 0.65	58.83	31.18



รูปที่ 4.13 แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ ของเพคติเนสตริงรูปที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (⊟—⊟) และอุณหภูมิตู้เย็น (■—■)



รูปที่ 4.14 แอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ ของเซลลูเลสตรึงรูปที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (⊟—⊟) และอุณหภูมิตู้เย็น (■—■)

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.20 และ 4.21 และกราฟรูปที่ 4.13 และ 4.14 จะเห็นได้ว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาการเก็บ 1-5 วันแรก เนื่องจากมีการหลุดของเอนไซม์บางส่วนที่เกาะกับตัวพยุงในลักษณะดูดซับ และอาจมีการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์บางส่วนจากการใช้งาน และนอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

(28-30 องศาเซลเซียส) จะมีการลดลงของแอคติวิตีมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (8-10 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการเร่งรัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อาทิเช่น ปฏิกิริยาการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามตลอดระยะเวลาการเก็บในช่วง 5-35 วันหลัง แอคติวิตีคงเหลือของเอนไซม์ตรึงรูปจะไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงมากนัก จึงนับเป็นข้อได้เปรียบในการที่จะนำเอนไซม์ตรึงรูปไปใช้ในอุตสาหกรรมที่มีการผลิตแบบต่อเนื่องในระยะยาว

ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Benkova และคณะ (1983) ที่ทดลองตรึงรูป endo-polygalacturonase บนตัวพยุง poly(2,6-dimethyl-p-phenyleneoxide โดยวิธีดูดซับที่ใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม ซึ่งพบว่า เอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพหลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้น ความเสถียรจะลดลง โดยถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แอคติวิตีจะลดลงร้อยละ 40 และ 92 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Heinrichova และคณะ (1989) ที่ทดลองตรึงรูป D-galacturonandigalacturonohydrolase บนตัวพยุง BIO Gel CM100 พบว่าเอนไซม์ตรึงรูปจะไม่สูญเสียแอคติวิตีเลย หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเก็บไว้นาน 4 เดือน แอคติวิตีจะลดลงร้อยละ 47 และเมื่ออุณหภูมิในการเก็บเพิ่มมากขึ้นเอนไซม์ตรึงรูปจะสูญเสียแอคติวิตีเร็วขึ้น

จากการศึกษาสมบัติทางจนลพลศาสตร์ของเอนไซม์ตรึงรูปของเอนไซม์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ รวมทั้งการศึกษาถึงประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาซ้ำและเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้ พบว่า เอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้มีข้อได้เปรียบเอนไซม์อิสระอยู่หลายประการในการใช้งานในระบบอุตสาหกรรมแบบต่อเนื่อง อาทิเช่น เพคติเนสตรึงรูปจะสามารถใช้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าเพคติเนสอิสระ ทำให้การควบคุมการทำงานในระบบอุตสาหกรรมง่ายขึ้น เนื่องจากมีข้อจำกัดขออุณหภูมิในการใช้งานน้อยลง เพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปที่เตรียมได้มีค่าสัดส่วนระหว่าง Km/Vmax สูงกว่าเพคติเนสและเซลลูเลสอิสระ ซึ่งแสดงว่าการตรึงรูปเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้โดยการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์นี้ จะสามารถปรับปรุงโครงรูปของเอนไซม์ให้มีความสามารถในการเข้าจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น ตลอดจนเอนไซม์ตรึงรูปที่เตรียมได้นั้น จะมีเสถียรภาพต่อการเก็บที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิตู้เย็นตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บ 5-35 วัน

และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยที่แอคติวิตีไม่เปลี่ยนแปลงมากนักหลังจากใช้ซ้ำ 5 ครั้ง ซึ่งนับเป็นข้อได้เปรียบในการนำเอนไซม์ตรึงรูปไปใช้ในระบบอุตสาหกรรมการผลิตแบบต่อเนื่อง ในระยะเวลาที่ยาวนาน

7. ศึกษาการสกัดน้ำแตงไทยโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพของเอนไซม์ผสมระหว่าง เพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

7.1 ศึกษาหาอัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำแตงไทย

7.1.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.7.1.1 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.22 และรูปที่ 4.15 หาค่าความเร็วต่ำสุดที่ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชั่นของเม็ดแก้วจำนวน 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม โดยพิจาราณาอัตราเร็วการไหลต่ำสุดที่ความดันตกเริ่มมีค่าคงที่ จากรูปที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าค่าความเร็วต่ำสุดที่ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชั่นของเม็ดแก้วที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 110 มิลลิลิตร/นาที เมื่อเขียนสมการของเส้นกราฟในช่วงก่อนที่ความดันตกเริ่มมีค่าคงที่ โดยการทำสมการเส้นตรง (linear regression) ระหว่างอัตราการไหล (X) และความดันตก (Y) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แสดงดังสมการที่ 4.1

$$Y = 6.87 \times 10^{-2} X + 0.41 \qquad \text{ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (4.1)}$$

ถ้าต้องการให้ของไหลมีสมบัติต่างๆ ที่ดีที่สุด จะต้องให้อัตราเร็วการไหลไม่ต่ำกว่า 1.5 เท่าของอัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะกำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 165 มิลลิลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่โดยทั่วไปในงานวิจัยเกี่ยวกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปมักบอกอัตราการไหลเป็น space velocity (SV) ซึ่งหมายถึง ปริมาณของไหลที่ไหลผ่าน เอนไซม์ตรึงรูปในคอลัมน์ภายในเวลา 1 นาที ซึ่งคำนวณจาก

$$\text{Space Velocity (SV)} = \frac{\text{อัตราเร็วการไหลของน้ำแตงไทย}}{\text{ปริมาตรเอนไซม์ตรึงรูปในคอลัมน์}}$$

กำหนด อัตราการไหล = 165 มิลลิลิตร/นาที

ความสูงของเบด = 2.8 เซนติเมตร

เส้นผ่านศูนย์กลางของเบด = 2.0 เซนติเมตร

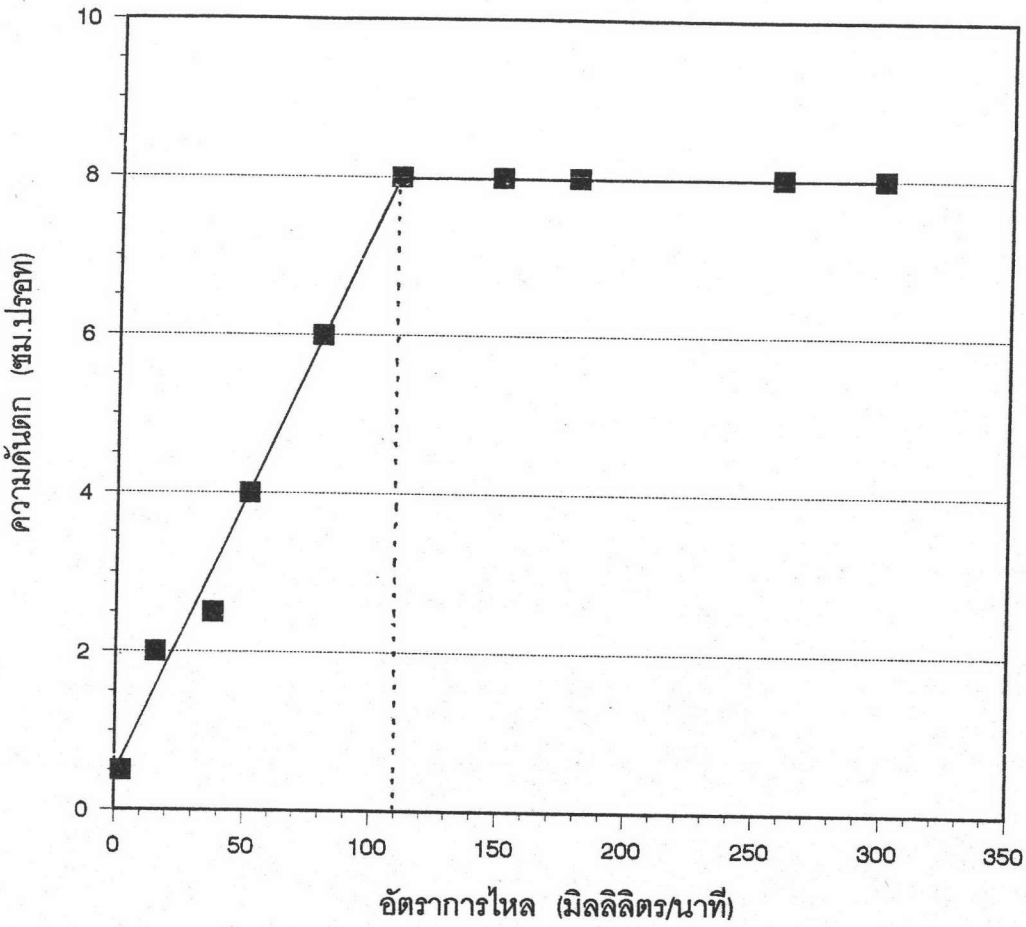
ดังนั้น

$$SV = \frac{165}{2.8 \times \pi \times (2.0/2)^2}$$

$$= 18.75 \text{ (นาที)}^{-1}$$

ตารางที่ 4.22 ค่าความดันตกของเบดเมื่อแปรอัตราการไหลขาออกของแตงไทยตีปน ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ เมื่อใช้เม็ดแก้ว 20 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	ความดันตก (ซม.ปรอท)
3.0	0.50
16.0	2.00
38.0	2.50
52.0	4.00
80.0	6.00
110.0	8.00
150.0	8.00
180.0	8.00
260.0	8.00
300.0	8.00



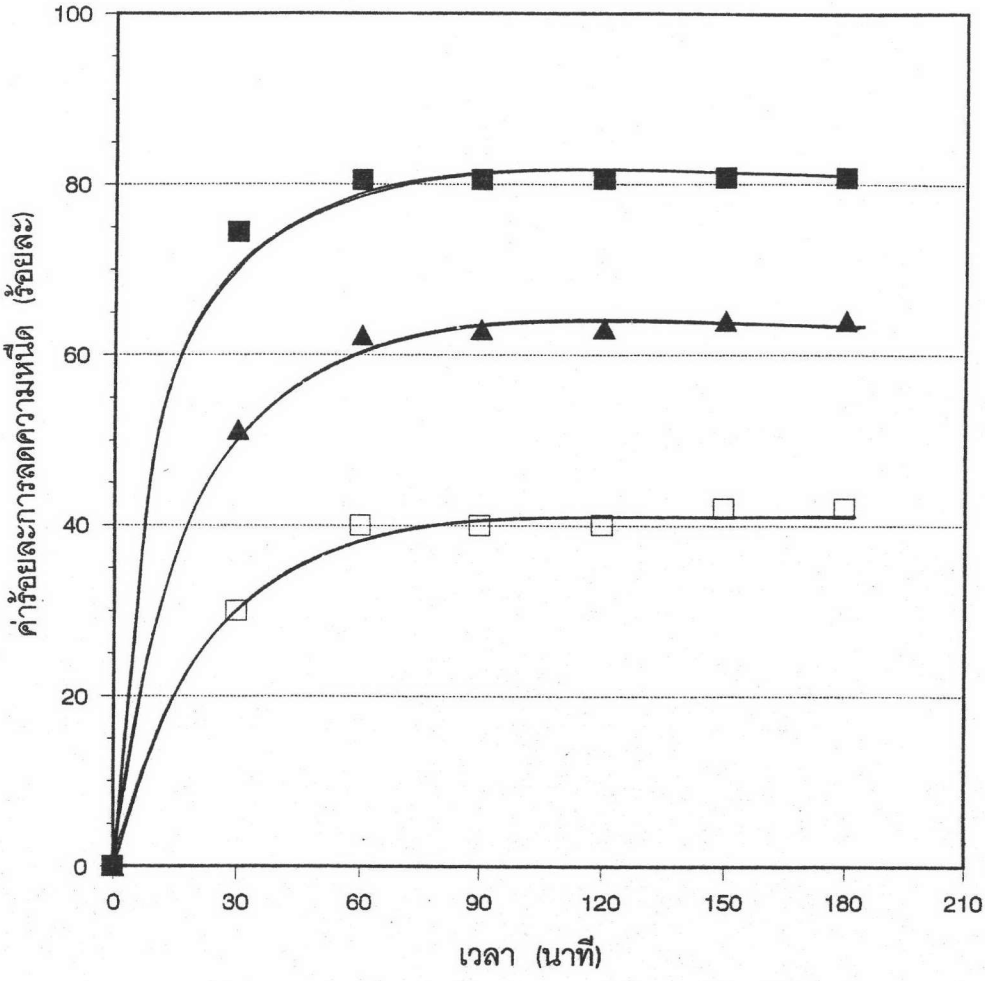
รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันตกและอัตราการไหลเมื่อใช้เม็ดแก้วจำนวน 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

7.1.2 <u>ศึกษาหาอัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูปที่เหมาะสมในการสกัดน้ำแตงไทย</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.7.1.2 กำหนดปริมาณเนื้อแตงไทยตีป่นเป็น 700 มิลลิลิตร ที่ SV เท่ากับ 18.75 (นาที)$^{-1}$ วัดความหนืดของแตงไทยตีป่นที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วนต่างๆ (เพคติเนสตรึงรูปมีแอคติวิตี 12.5 ยูนิต/กรัมx10^{2} ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 3.6 และเซลลูเลสตรึงรูปมีแอคติวิตี 32.2 ยูนิต/กรัมx10 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 5.0) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.23 และ รูปที่ 4.16

<u>ตารางที่ 4.23</u> ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่น ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่อัตราส่วนผสมของเพคติเนสตรึงรูป / เซลลูเลสตรึงรูป (กรัมเพคติเนสตรึงรูป/กรัมเซลลูเลสตรึงรูป)		
	2.5/7.5	5.0/5.0	7.5/2.5
30	30.28 ± 1.28	51.80 ± 0.57	74.47 ± 0.43
60	41.21 ± 0.65	62.95 ± 0.62	80.06 ± 0.50
90	41.39 ± 0.16	64.00 ± 0.89	80.12 ± 0.71
120	41.99 ± 0.03	64.34 ± 0.22	80.38 ± 0.42
150	42.25 ± 0.29	64.94 ± 0.94	80.68 ± 0.12
180	42.05 ± 0.50	65.26 ± 0.70	81.33 ± 0.67



รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของความหนืดของแตงไทยตีปั่น ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วน 2.5/7.5 (—□—□—), 5.0/5.0 (—▲—▲—) และ 7.5/2.5 (—■—■—) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.16 จะเห็นได้ว่า ความหนืดของเนื้อแตงไทยตีปั่นจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 60 นาทีแรก หลังจากนั้นความหนืดของแตงไทยตีปั่นจะค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อธิบายได้ว่า เอนไซม์ตรึงรูปมีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกในสับสเตรท

เมื่อพันธะเหล่านั้นถูกสลายไป ก็จะเกิดภาวะการจำกัดของสับสเตรท (substrate limitation) ขึ้น (Whitaker, 1972) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากเหตุผลหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการลดลงของแอคติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการใช้งานอย่างต่อเนื่อง อาทิเช่น การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเอนไซม์ การปนเปื้อนของแบคทีเรีย การหลุดของเอนไซม์จากตัวพยุง การถูกรบกวนจากอัตราการไหลในคอลัมน์ (Chibata, 1978) และการดูดซับสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Bissett และ Sternberg (1978) ที่ทดลองตรึงรูป β-glucosidase บนไคโตแซน พบว่า กลูโคสในผลผลิตของปฏิกิริยาจะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ตรึงรูปเช่นเดียวกับในกรณีของเอนไซม์อิสระ และเมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วนของเพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูปจะเห็นได้ว่า ที่อัตราส่วนของเพคติเนสตรึงรูป/เซลลูเลสตรึงรูป ที่ 7.5/2.5 กรัม จะให้ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นสูงที่สุด และลดลงเมื่อใช้เพคติเนสตรึงรูปในอัตราส่วนที่ลดลง ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจาก การที่เพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยมากกว่าเซลลูเลส จากผลที่ได้จากการใช้เอนไซม์อิสระในการสกัดน้ำแตงไทยดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ดังอธิบายเหตุผลไว้แล้วข้างต้น และนอกจากนี้ยังอาจเกิดจาก การใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสนี้ เพคติเนสตรึงรูปจะแสดงแอคติวิตีสูงที่สุด ในขณะที่เซลลูเลสตรึงรูปจะแสดงแอคติวิตีเพียงร้อยละ 87.68 ดังผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.4.1.2 จึงทำให้เซลลูเลสตรึงรูปสามารถลดความหนืดของแตงไทยตีป่นได้ต่ำกว่าเพคติเนสตรึงรูป แต่อย่างไรก็ตาม เนื้อแตงไทยตีป่นที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพของเอนไซม์ผสมระหว่างเพคติเนสตรึงรูป และเซลลูเลสตรึงรูป ที่อัตราส่วน 7.5/2.5 กรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นได้ถึงร้อยละ 80.06 ± 0.50 ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้เพคติเนสและเซลลูเลสอิสระเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเนื้อแตงไทยตีป่น ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ที่สามารถลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นลงได้ร้อยละ 80.70 ± 0.08

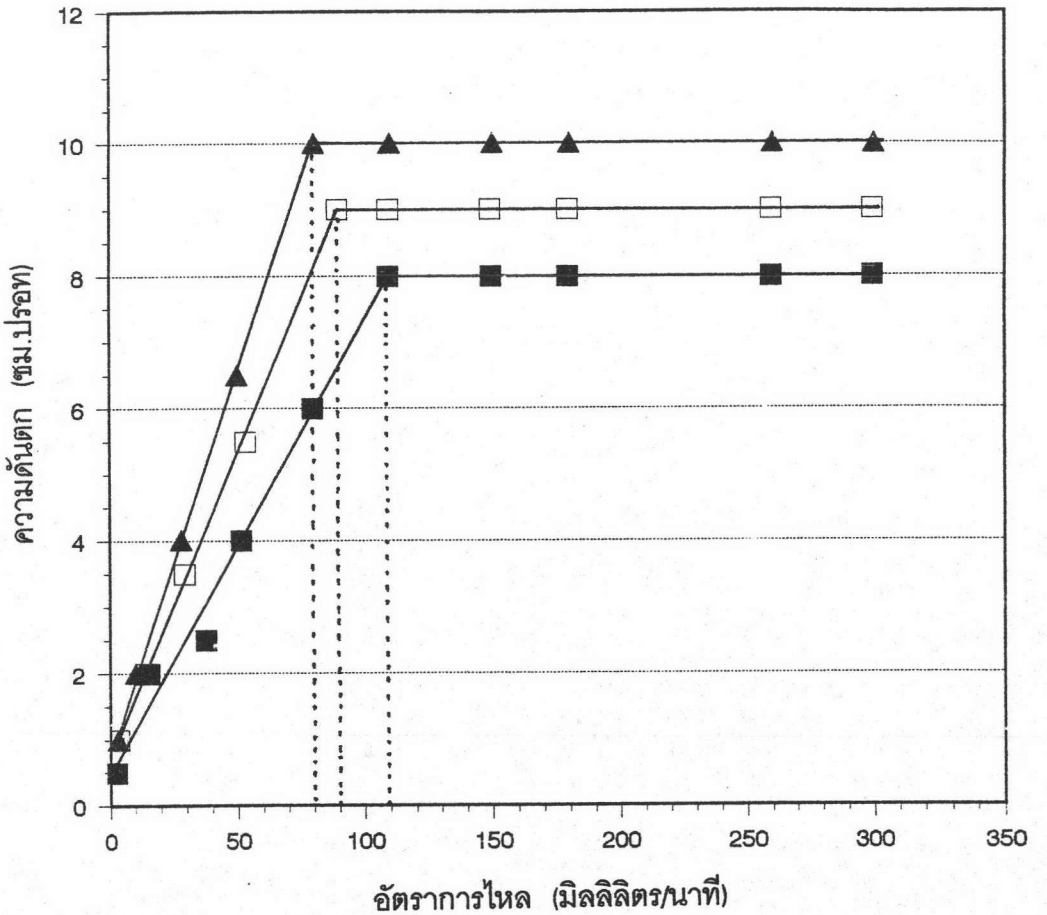
7.2 <u>ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำแตงไทยโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพของเอนไซม์ผสมระหว่างเพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูป</u>

7.2.1 <u>หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น</u>

จากการทดลองข้อ 3.7.2.1 แปรอัตราการไหลขาออกของแตงไทยตีป่น ที่ใช้เม็ดแก้วจำนวน 20 กรัม ผ่านเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม ที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.17

ตารางที่ 4.24 ค่าความดันตกของเบดเมื่อแปรอัตราการไหลขาออกของแตงไทยดีปนใน เครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ เมื่อใช้เม็ดแก้ว จำนวน 20 กรัม ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)					
30		40		50	
อัตราการไหล (มล./นาที)	ความดันตก (ซม.ปรอท)	อัตราการไหล (มล./นาที)	ความดันตก (ซม.ปรอท)	อัตราการไหล (มล./นาที)	ความดันตก (ซม.ปรอท)
3.00	1.00	4.00	1.00	3.00	0.50
10.00	2.00	15.00	2.00	16.00	2.00
28.00	4.00	30.00	3.50	38.00	2.50
50.00	6.50	54.00	5.50	52.00	4.00
80.00	10.00	90.00	9.00	80.00	6.00
110.00	10.00	110.00	9.00	110.00	8.00
150.00	10.00	150.00	9.00	150.00	8.00
180.00	10.00	180.00	9.00	180.00	8.00
260.00	10.00	260.00	9.00	260.00	8.00
300.00	10.00	300.00	9.00	300.00	8.00



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันตกและอัตราการไหลเมื่อใช้เม็ดแก้วจำนวน 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (—▲—▲—) 40 องศาเซลเซียส (—□—□—) และ 50 องศาเซลเซียส (—■—■—)

เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าค่าอัตราเร็วต่ำสุดที่ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชั่นของเม็ดแก้ว จำนวน 20 กรัม ในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ ละ 10 กรัม ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 80, 90 และ 110 มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ โดยสมการของเส้นกราฟในช่วงก่อนที่ความดันตกเริ่มมีค่าคงที่ ได้จากการทำสมการเส้นตรง ระหว่างอัตราการไหล (X) และความดันตก (Y) ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส แสดงดังสมการที่ 4.2, 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

$$Y = 11.57x10^{-2} X + 0.74 \quad \text{ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส} \quad (4.2)$$

$$Y = 9.25x10^{-2} X + 0.63 \quad \text{ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส} \quad (4.3)$$

$$Y = 6.87x10^{-2} X + 0.41 \quad \text{ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส} \quad (4.4)$$

ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับสมการที่ 4.5 (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) คือ

$$U_{mf} = \frac{D_p^2 (\rho_g - \rho_f) g_c}{1650\mu} \quad (4.5)$$

เมื่อ U_{mf} = อัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

D_p = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดของแข็ง

ρ_g = ความหนาแน่นของของแข็ง

ρ_f = ความหนาแน่นของของเหลว

g_c = อัตราเร่งจากแรงโน้มถ่วง

μ = ความหนืดของของเหลว

กล่าวคือการทดลองนี้ค่า D_p, ρ_g, g_c และ ρ_f เป็นค่าคงที่ ดังนั้นอัตราเร็วของการไหลจะแปรผกผันกับค่าความหนืดของของไหล เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง ค่าความหนืดของของไหลต่ำลง ดังนั้นอัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และสำหรับค่าความดันตกของระบบเมื่อเกิดฟลูอิไดเซชั่น พบว่า ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 10, 9 และ 8 เซนติเมตรปรอท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับสมการ 4.6 (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528) ดังนี้

$$\Delta P = \frac{200\, U\, \mu\, L_e\, (1 - \varepsilon_e)^2}{D_p^{\,2}\, \phi_s^{\,2}\, g_c\, \varepsilon e^{3}} \qquad (4.6)$$

เมื่อ ΔP = ความดันตกของเบด

U = อัตราเร็วของของเหลว

μ = ความหนืดของของเหลว

L_e = ความสูงของเบด

ε_e = สัดส่วนช่องว่างเบด

D_p = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดของแข็ง

ϕ_s = แฟคเตอร์รูปร่าง

g_c = อัตราเร่งจากแรงโน้มถ่วงของโลก

สำหรับการทดลองนี้ ค่า U, L_e, ε_e, D_p, ϕ_s และ g_c เป็นค่าคงที่ ดังนั้นความดันตกของเบดจึงแปรผันตรงกับความหนืดของของเหลว เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงค่าความหนืดของแตงไทยตีป่นลดต่ำลง ดังนั้นความดันตกในระบบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงต่ำกว่าความดันตกในระบบที่อุณหภูมิ 40 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

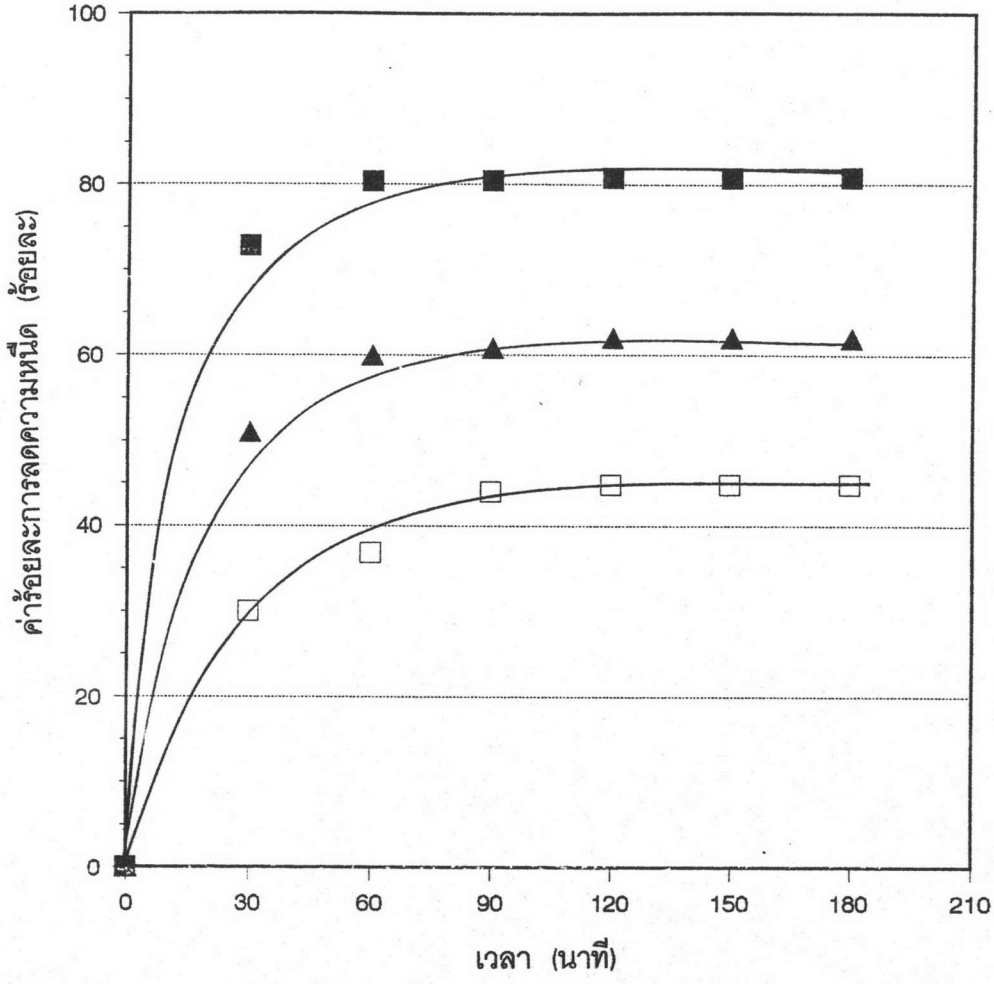
การเลือกอัตราไหลในการทดลองนี้จะกำหนดอัตราการไหลเป็น 1.5 เท่า ของอัตราเร็วต่ำสุดในการเกิดฟลูอิไดเซชั่น เป็น 165 มิลลิลิตร/นาที คิดเป็นค่า SV เท่ากับ 18.75 $(\text{นาที})^{-1}$

7.2.2 <u>หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำแตงไทย</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.7.2.2 กำหนดปริมาณแตงไทยตีป่นเป็น 700 มิลลิลิตร ที่ SV เท่ากับ 18.75 $(\text{นาที})^{-1}$ แปรอุณหภูมิในระบบเป็น 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส วัดความหนืดของแตงไทยตีป่นที่ได้จากการย่อยสลาย โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วน 7.5/2.5 กรัมเอนไซม์ (เพคติเนสตรึงรูปมีแอคติวิตี 12.5 ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10^2 และเซลลูเลสตรึงรูปมีแอคติวิตี 32.2 ยูนิต/กรัมเอนไซม์x10) ทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.25 และรูปที่ 4.18

ตารางที่ 4.25 ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีปนที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วน 7.5/2.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ

เวลา (นาที)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีปน ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่อุณหภูมิต่างๆ		
	30 (องศาเซลเซียส)	40 (องศาเซลเซียส)	50 (องศาเซลเซียส)
30	31.06 ± 1.06	51.98 ± 0.98	72.61 ± 0.51
60	36.32 ± 0.48	60.62 ± 0.62	80.82 ± 0.52
90	44.13 ± 0.13	61.34 ± 0.46	80.42 ± 1.02
120	44.43 ± 0.43	61.72 ± 0.72	80.56 ± 0.46
150	45.33 ± 0.53	61.89 ± 0.89	80.96 ± 0.16
180	45.38 ± 0.42	62.41 ± 0.85	81.04 ± 0.18



รูปที่ 4.18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละการลดลงของความหนืดของแตงไทยตีป่น ที่ผ่านเครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วน 7.5/2.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (—□—□—) 40 องศาเซลเซียส (—▲—▲—) และ 50 องศาเซลเซียส (—■—■—)

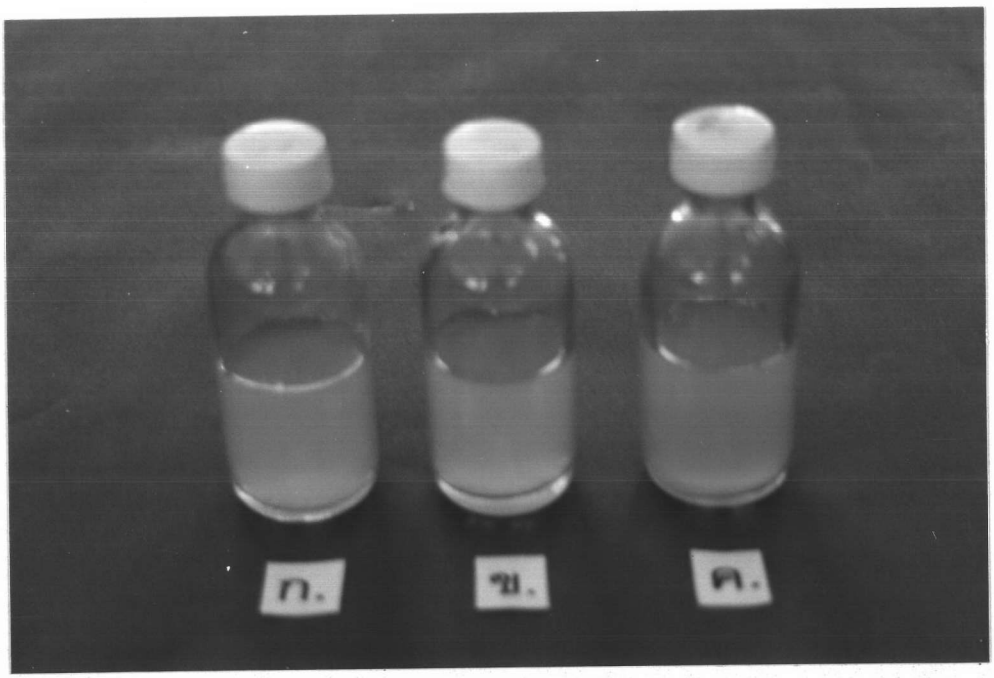
เมื่อพิจารณาตารางที่ 4.25 และกราฟรูปที่ 4.18 จะเห็นได้ว่า ร้อยละการลดลงของความหนืดของเนื้อแตงไทยตีป่นนั้นจะเพิ่มขึ้น โดยมีอัตราเร็วในการย่อยสลายสูงในชั่วโมงแรก และลดลงในชั่วโมงถัดไป ทั้งนี้เนื่องจากเกิดภาวะการจำกัดของสับสเตรท เช่นเดียวกับผลการทดลองข้อ 7.1.2 ดังได้อธิบายไปแล้วข้างต้น และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอัตราเร็วของการ

ย่อยสลายเนื้อแตงไทยตีปั่นที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งคิดเป็น SV เท่ากับ 18.75 (นาที)$^{-1}$ เห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะมีอัตราเร็วในการย่อยสลายสูงที่สุด และลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำลงเป็นลำดับ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้น ความหนืดของสับสเตรทลดต่ำลงทำให้สามารถเคลื่อนที่เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น และนอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพคติเนสตรึงรูปจะแสดงแอคติวิตีสูงสุดและลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง ส่วนเซลลูเลสตรึงรูปจะแสดงแอคติวิตีร้อยละ 87.68 และลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลงเช่นเดียวกัน ดังผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.4.1.2 สาเหตุที่ไม่ทำการทดลองที่อุณหภูมิที่สูงกว่านี้ เนื่องจากที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกลิ่นรสของแตงไทยได้

เมื่อผ่านแตงไทยตีปั่นในเครื่องปฏิกรณ์เพคติเนสตรึงรูปและเซลลูเลสตรึงรูปที่อัตราส่วน 7.5/2.5 กรัม ตามลำดับ ในคอลัมน์เดียวกัน ในเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปขนาด 2x45 เซนติเมตร จำนวน 2 คอลัมน์ๆ 10 กรัม เมื่อใช้แตงไทยตีปั่นปริมาณ 700 มิลลิลิตร ไหลวนซ้ำในเครื่องปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส คิดเป็น SV เท่ากับ 18.75 (นาที)$^{-1}$ เป็นเวลานาน 60 นาที สามารถลดความหนืดของเนื้อแตงไทยตีปั่นลงได้สูงสุดร้อยละ 80.82±0.52 ซึ่งเพียงพอในการทำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด เพราะการยืดเวลาในการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายแตงไทยตีปั่นนานๆ จะส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์น้ำแตงไทยที่ได้ ทั้งทางด้านการปนเปื้อนจุลินทรีย์ และการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ทางเคมีและทางกายภาพได้ ดังนั้นการเลือกภาวะที่ดีจำเป็นต้องพิจารณาด้วยเกณฑ์รวม ได้แก่ ปริมาณผลผลิตที่ได้ หรืออัตราการย่อยสลาย ระยะเวลาปฏิกิริยาที่จะกระทบต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์

8. <u>เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพและทางประสาทสัมผัสระหว่างน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยอาศัยเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงรูป</u>

ลักษณะของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยใช้แรงกดแบบธรรมดา (hydraulic press) การใช้เอนไซม์อิสระ และการใช้เอนไซม์ตรึงรูป แสดงดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 น้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยใช้แรงกดแบบธรรมดา (ก) การใช้เอนไซม์อิสระ (ข) และการใช้เอนไซม์ตรึงรูป (ค)

8.1 <u>เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของน้ำแตงไทยที่สกัดได้</u>

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.8.1 ทดสอบสมบัติทางกายภาพ ของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยวิธี 3 วิธี ได้แก่ การใช้แรงกดแบบธรรมดา การใช้เอนไซม์อิสระ และการใช้เอนไซม์ตรึงรูป ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.26

ตารางที่ 4.26 เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยวิธีต่างๆ

วิธีการสกัด	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (°Brix)	pH	ระดับความเข้มสี			
			น้ำเงิน	เหลือง	แดง	ร้อยละความสว่าง
การกดแบบธรรมดา	5.2±0.1	7.18±0.1	0.4±0.1	4.1±0.1	1.4±0.1	10±0.1
เอนไซม์อิสระ	6.0±0.1	6.65±0.1	0.3±0.1	4.3±0.2	1.4±0.1	11±0.1
เอนไซม์ตรึงรูป	5.8±0.2	6.92±0.1	0.4±0.1	4.2±0.1	1.4±0.2	11±0.1

จากตารางที่ 4.26 จะเห็นได้ว่า น้ำแตงไทยเมื่อผ่านการสกัดโดยใช้เอนไซม์ จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดเพิ่มสูงขึ้นและมี pH ลดต่ำลง ทั้งนี้น่าจะเนื่องมาจากการที่เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์พืช ทำให้มีสายโมเลกุลสั้นลง มีปริมาณกรดเพคติก และเพคตินิคเพิ่มมากขึ้น (Cliff, Dever and Gayton, 1991) และเมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายเซลล์พืชจะแตกออก สารละลายภายในเซลล์จะละลายออกสู่สารละลายภายนอก ทำให้มีปริมาณสารต่างๆ ในน้ำผลไม้เพิ่มสูงขึ้น รวมทั้งคุณค่าทางอาหารต่างๆ ด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jenniskens และคณะ (1991) พบว่า น้ำแอปเปิลที่สกัดโดยใช้เอนไซม์จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด และปริมาณกรดเพิ่มมากขึ้นกว่าน้ำแอปเปิลที่การสกัดโดยไม่ใช้เอนไซม์

8.2 เปรียบเทียบสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำแตงไทยที่สกัดได้

จากวิธีดำเนินงานวิจัยข้อ 3.8.2 ทดสอบสมบัติทางประสาทสัมผัส ของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยวิธี 3 วิธี ได้แก่ การใช้แรงกดแบบธรรมดา การใช้เอนไซม์อิสระ และการใช้เอนไซม์ตรึงรูป ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.27

ตารางที่ 4.27 เปรียบเทียบสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยวิธีต่างๆ

วิธีการสกัด	สี	กลิ่น	รส	การยอมรับรวม
การกดแบบธรรมดา	14.5 ± 0.5^{a}	14.0 ± 0.4^{a}	14.0 ± 0.7^{a}	14.1 ± 0.5^{a}
เอนไซม์อิสระ	10.5 ± 1.6^{c}	9.7 ± 1.6^{b}	9.9 ± 2.3^{c}	10.0 ± 0.7^{c}
เอนไซม์ตรึงรูป	12.9 ± 0.5^{b}	13.5 ± 0.5^{a}	13.1 ± 0.3^{b}	13.3 ± 0.5^{b}

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)
(โดยพิจารณาแต่ละปัจจัย คือ สี กลิ่น รส และการยอมรับรวมแยกกัน)

จากตารางที่ 4.27 จะเห็นได้ว่า คะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้าน สี รส และการยอมรับรวม ของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยวิธีที่ต่างกันทั้ง 3 ชนิด จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และการสกัดโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป จะให้คะแนนเฉลี่ยของสมบัติทางประสาทสัมผัสทั้ง 3 ด้านดีกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ และเมื่อพิจารณาคะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้านกลิ่นของน้ำแตงไทยที่สกัดได้โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป จะไม่แตกต่างจากน้ำแตงไทยที่สกัดโดยใช้แรงกดแบบธรรมดา แต่จะแตกต่างกับการสกัดโดยใช้เอนไซม์อิสระ ทั้งนี้อธิบายได้ว่า การใช้เอนไซม์อิสระจะมีปริมาณเอนไซม์ตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์น้ำแตงไทยมาก เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตทางการค้า จะผลิตจากเชื้อราทำให้มีลักษณะของกลิ่นเหม็นหืน หรือกลิ่นหมัก (Fermentation flavor) จึงมีผลการทบต่อสมบัติทางประสาทสัมผัสต่างๆ และจากงานวิจัยของ

Jenniskens และคณะ (1991) พบว่า กลิ่นแปลกปลอมของเอนไซม์ที่ใช้ในการเตรียมน้ำแอปเปิล จะมีผลต่อกลิ่นของน้ำแอปเปิลที่สกัดได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า การใช้เอนไซม์ตรึงรูปจะสามารถลดปริมาณของเอนไซม์ที่ตกค้างอยู่ในน้ำแตงไทยที่สกัดได้ ทำให้เกิดผลกระทบทางด้าน สี กลิ่น และรสชาติแปลกปลอมของเอนไซม์น้อยลง ซึ่งจะมีส่วนในการพัฒนาคุณลักษณะของน้ำแตงไทยที่สกัดได้ โดยที่คะแนนเฉลี่ยด้านการยอมรับรวมของน้ำแตงไทยที่สกัดได้จะอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับมาก