การตรึงรูปยีสต์ทำเบียร์ที่มีอินเวอร์เทสบนทราย

นางสาวกาญจนา ปุญโสภะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 974-578-095-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016947

IMMOBILIZATION OF BREWER'S YEAST CONTAINING INVERTASE ON SAND

Miss Karnchana Poonyakosa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Biotechnology Program
Graduate School
Chulalongkorn University
1990

ISBN 974-578-095-2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรึงเซลล์ยีสต์ทำเบียร์ที่มีอินเวอร์เทสบนทราย
โดย นางสาวกาญจนา ปุญญโฆษะ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคลัตถุศาสน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคลัตถุศาสน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กาญจนา ปุญญโมษะ : การตรึงรูปยีสต์ทำเบียร์ที่มีอินเวอร์เทสบนทราย (IMMOBILIZATION OF BREWER'S YEAST CONTAINING INVERTASE ON SAND) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์, 96 หน้า.
ISBN 974-578-095-2

การตรึงเซลล์หรือเอนไซม์บนพื้นผิวของตัวยึดเกาะเช่น ทราย ได้รับการพิจารณาเลือกเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดเรื่องการถ่ายเทมวล และยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการผลิตเซลล์หรือเอนไซม์ตรึงรูปในปริมาณที่มากได้ วิธีที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์จะพิจารณาถึงแอคติวิตีของอินเวอร์เทส ซึ่งสูงพอเหมาะสำหรับการสลายซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสในระบบต่อเนื่อง วิธีที่ใช้ คือ เซลล์ยีสต์ 5% (นน.แห้ง/ปริมาตร) ตรึงร่วมกับ 0.3% (ปริมาตร/ปริมาตร) โพลีเอทธิลีนไอมีน pH 7.0 และ 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) กลูตารัลดีไฮด์ โดยตรึงบนทรายที่มีขนาด 0.833-1.041 มม. อินเวอร์เทสตรึงรูปมี pH ที่เหมาะสมในการใช้งานที่ pH 3.0 และมีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 2.5-7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสลาย 15% (นน./นน.) สารละลายซูโครสของเซลล์ตรึงรูปคือ 40 องศาเซลเซียส เซลล์ตรึงรูปสามารถเก็บในลักษณะแห้งที่ 4 องศาเซลเซียส ได้โดยมีค่าครึ่งชีวิต 270 วัน มีค่าไมคาลิสที่ปรากฏ 12.76 มิลลิโมลาร์ และอัตราเร็วสูงสุดของการเกิดปฏิกิริยา 1,148.87 หน่วย สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ขนาดบรรจุ 25 มล. ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายซูโครส 15% (นน./นน.) pH 3.0 มีอัตราส่วนการไหลย้อนกลับเท่ากับ 0.95 และมีสเปซไทม์ 41 นาที จะได้อัตราการเปลี่ยนซูโครสเป็นน้ำตาลอินเวอร์ท 87% เซลล์ตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตในการใช้งาน 7.35 วัน ค่าไมคาลิสที่ปรากฏในการผลิตน้ำตาลอินเวอร์ทแบบต่อเนื่องในสภาวะสม่ำเสมอเท่ากับ 154.90 มิลลิโมลาร์ และอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด 11,900.10 หน่วย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KARNCHANA POONYAKOSA : IMMOBILIZATION OF BREWER'S YEAST CONTAINING INVERTASE ON SAND. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS , Ph.D. 96 PP.

Immobilization of cells or enzymes on surface of supporting material such as sand was selected to avoid mass transfer limitation and to provide simple method of producing the immobilized cells or enzymes in larger quantity. A suitable method of immobilizing yeast cells on sand was developed with high invertase activity suitable for continuous inversion of sucrose into glucose and fructose. Yeast cells at 5% (dry weight /volume) were immobilized with 0.3% (volume/volume) glutaraldehyde on sand particles with sizes ranging from 0.833 to 1.041 mm. Optimal pH for invertase activity of the immobilized yeast cells was 3.0 and the stability pH of the invertase was 2.5-7.0 . The optimal temperature for inversion of 15% sucrose solution by the immobilized yeast cells was 40° C. The dried immobilized yeast cells could be kept at 4° C. with a half life of 270 days. The Km(app) of the immobilized enzyme in yeast cells for sucrose was 72.76 mM. and Vmax(app) was 1,148.87 units. The optimal condition for continuous production of invert sugar in packed-bed reactor 25 ml. capacity at 40° C., was 15% (weight/weight) sucrose pH 3.0, had the recycling ratio of 0.95 and space time of 41 minutes, the maximum conversion of invert sugar was 87%. The kinetics of hydrolysis of sucrose by immobilized yeast cells in steady state had Km(app) of 154.90 mM and Vmax(app) of 11,900.10 units.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ โดยได้กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา รวมทั้งแนวความคิดต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดียิ่ง ซึ่งข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสำหรับการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณชจีนาฏ โพธิเวชกุล ที่กรุณาเขียนรูปกราฟในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนพี่ๆน้องๆร่วมหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยฉบับนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่โจ้ ที่ได้ช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์ และให้กำลังใจมาตลอดเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญรูป..... ฌ

คำย่อและสัญญลักษณ์..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 15

บทที่ 3 ผลการทดลอง..... 30

บทที่ 4 การอภิปรายผลการวิจัย..... 59

บทที่ 5 สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 66

เอกสารอ้างอิง..... 68

ภาคผนวก ก..... 75

ภาคผนวก ข..... 81

ประวัติผู้เขียน..... 96

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของน้ำเชื่อมอินเวอร์ท	2
2	คุณสมบัติของอินเวอร์เทสจากแหล่งต่างๆ	4
3	วิธีการตรึงเอนไซม์อินเวอร์เทส	9
4	วิธีการตรึงเซลล์ที่มีอินเวอร์เทส	13
5	แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	15
6	แสดงสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	17
7	ค่า % conversion/นาที. กรัมทรายตรึงเซลล์ที่มีระดับเซลล์ยีสต์และอัลบูมินต่างๆ	36
8	ค่า % conversion/นาที. กรัมทรายตรึงเซลล์ที่มีเซลล์ยีสต์ กลูตารัลดีไฮด์ และเวลาในการแช่กลูตารัลดีไฮด์ในระดับต่างๆ	38
9	ผลของปริมาณเซลล์ยีสต์ กลูตารัลดีไฮด์ และเวลาในการแช่กลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคทิวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูป	39
10	ผลในการเปรียบเทียบในการตรึงเซลล์ยีสต์ที่มีอินเวอร์เทสด้วยวิธีต่างๆ	40
11	ค่าครึ่งชีวิตของอินเวอร์เทสตรึงรูปในขณะเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (25-28 องศาเซลเซียส)	46
12	ค่าChemical Kinetics ของอินเวอร์เทสตรึงรูปที่ 40 องศาเซลเซียส	56
ก-1	ค่าความถ่วงจำเพาะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถเกิดขึ้นเมื่อเกิด conversion 100%	77
ก-5	การเตรียมสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์	79
ข-1	ค่า % conversion/นาที. กรัมทรายตรึงเซลล์บนทรายขนาดต่างๆ	81
ข-2	ค่า % conversion/นาที. กรัมทรายตรึงเซลล์ที่มีปริมาณเซลล์ยีสต์และอัลบูมินระดับต่างๆ	83

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 แบบจำลองกลไกการทำงานของอินเวอร์เทส..... 5
2 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลอินเวอร์ทในปฏิกรณ์
แบบ packed-bed..... 24
3 ปฏิกรณ์แบบ packed-bed และอุปกรณ์ประกอบสำหรับผลิต
น้ำตาลอินเวอร์ท..... 25
4 การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลอินเวอร์ทในปฏิกรณ์
แบบ packed-bed ในระบบไหลย้อนกลับ..... 26
5 ปฏิกรณ์แบบ packed-bed และอุปกรณ์ประกอบสำหรับผลิต
น้ำตาลอินเวอร์ท ในระบบไหลย้อนกลับ..... 27
6 เม็ดทรายขนาดต่างๆ ซึ่งนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์..... 30
7 ค่า % conversion/นาที.กรัมทรายตรึงเซลล์ที่ใช้เม็ดทรายขนาดต่างๆ..... 31
8 เม็ดทรายขนาด 16-20 เมช โดยการทำ Scanning Electron
Microscope กำลังขยาย 100 เท่า 32
9 พื้นผิวของเม็ดทรายขนาด 16-20 เมช โดยการทำ Scanning
Electron Microscope กำลังขยาย 1,500 เท่า 32
10 เม็ดทรายขนาด 20-50 เมช โดยการทำ Scanning Electron
Microscope กำลังขยาย 100 เท่า 33
11 พื้นผิวของเม็ดทรายขนาด 20-50 เมช โดยการทำ Scanning
Electron Microscope กำลังขยาย 500 เท่า 33
12 เม็ดทรายขนาด 50-80 เมช โดยการทำ Scanning Electron
Microscope กำลังขยาย 100 เท่า 34
13 พื้นผิวของเม็ดทรายขนาด 50-80 เมช โดยการทำ Scanning
Electron Microscope กำลังขยาย 1,500 เท่า 34
14 เม็ดทรายขนาด 80-100 เมช โดยการทำ Scanning Electron
Microscope กำลังขยาย 100 เท่า 35

รูปที่ หน้า

15 พื้นผิวของเม็ดทรายขนาด 80-100 เมช โดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 1,500 เท่า..... 35

16 ค่า % conversion/นาที.กรัมทรายตรึงเซลล์ที่ pH ต่างๆ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส..... 42

17 ค่า % conversion/นาที.กรัมทรายตรึงเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆ pH 3.0..... 43

18 พื้นผิวของเม็ดทราย โดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 1,500 เท่า..... 44

19 พื้นผิวของเม็ดทรายตรึงเซลล์ โดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 500 เท่า..... 44

20 พื้นผิวของเม็ดทรายตรึงเซลล์ โดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 1,500 เท่า..... 45

21 เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนเม็ดทราย โดยการทำ Scanning Electron Microscope กำลังขยาย 5,000 เท่า..... 45

22 ความสัมพันธ์ของความเสถียรของแอคทิวิตีของอินเวอร์เทสตรึงรูปในขณะเก็บที่อุณหภูมิห้อง และที่ 4 องศาเซลเซียส 47

23 ความสัมพันธ์ของ % conversion กับอัตราการป้อนสารละลายซูโครสในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ปริมาตรบรรจุ 25 มล. ที่สารละลายซูโครสความเข้มข้นต่างๆ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0..... 49

24 ความสัมพันธ์ของ % conversion กับสเปซไทม์ในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ปริมาตรบรรจุ 25 มล. ที่สารละลายซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0 50

25 ความสัมพันธ์ของ % conversion กับอัตราการไหลออกของผลิตภัณฑ์ที่อัตราการป้อนสารละลายต่างๆ กัน ในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ในระบบไหลย้อนกลับ ปริมาตรบรรจุ 25 มล. ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0 51

รูปที่ หน้า

26 ความสัมพันธ์ของ % conversion กับสเปซไทม์ที่อัตราการป้อนสารละลายน้ำตาลทรายต่างๆ กัน ในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ในระบบไหลย้อนกลับ ซึ่งมีปริมาตรบรรจุ 25 มล. ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0..... 52

27 ความสัมพันธ์ระหว่าง % แอคทิวิตีสัมพัทธ์ที่ pH 2.5-8.0 ของอินเวอร์เทสตรึงรูปที่บ่มในสารละลายซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส..... 53

28 การประมาณค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ตรึงรูปในการใช้งานที่ pH 3.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส..... 55

29 Lineweaver Burk Plot ของอินเวอร์เทสตรึงรูปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0..... 57

30 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $S_o X$ กับ ln(1-X) ของอินเวอร์เทสตรึงรูป ในปฏิกรณ์แบบ packed-bed ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 3.0 อัตราการป้อนสารละลายน้ำตาลทราย 1 มล./นาที..... 58

31 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และน้ำตาลอินเวอร์ท..... 65

คำย่อและสัญญลักษณ์

ซม.	=	เซนติเมตร
นน.	=	น้ำหนัก
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
%	=	เปอร์เซ็นต์หรือ ร้อยละ
k	=	ค่าคงที่จำเพาะของการเสียแอคติวิตีของอินเวอร์เทส ตริงรูป(นาที)$^{-1}$ หรือ (วัน)$^{-1}$
KE	=	แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ทั้งหมดในปฏิกรณ์แบบ packed-bed (โมลาร์.ลิตร/นาที)
Km(app)	=	ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten ที่ปรากฏ (มิลลิโมลาร์ หรือ โมลาร์)
q	=	อัตราการป้อนสารละลายน้ำตาลทราย (มล./นาที)
So	=	ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลทรายตั้งต้น (โมลาร์)
T	=	อุณหภูมิสมบูรณ์ (absolute temperature) (องศาเคลวิน)
v	=	อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (หน่วย/กรัม)
V	=	ปริมาตรบรรจุของปฏิกรณ์แบบ packed-bed (มล.)
Vmax(app)	=	ค่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดที่ปรากฏ (หน่วย/กรัม)
X	=	ค่า conversion
	=	สเปซไทม์ (space time) (นาที)