บทที่ 4

ผลการทดลอง

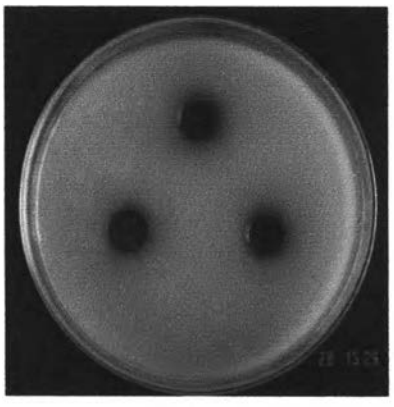
4.1 การผลิตเดกซ์แทรนเนสจากรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14

จากการเลี้ยง *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อผลิตเดกซ์แทรนเนส ซึ่งมีเดกซ์แทรนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติมกากน้ำตาลเพื่อเพิ่มการสร้างเอนไซม์ (ศิโรจน์ ศรีสรากรณ์, 2547) ตามวิธีในข้อ 3.2 รวมถึงการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 3.3 พบว่า *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU 3-14 สามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ประมาณ 640.89 หน่วยต่อมิลลิลิตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 5.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

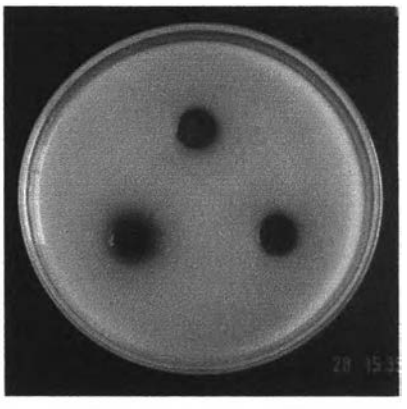
4.2 ผลการตรวจสอบโปรติเอสในสารละลายเอนไซม์

จากการที่เอนไซม์ถูกย่อยสลายได้ด้วยโปรติเอส และการปนเปื้อนด้วยโปรติเอสเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เอนไซม์ไม่เสถียร การทดลองนี้จึงได้รับการทำเพื่อตรวจสอบว่าในส่วนน้ำใสของเดกซ์แทรนเนสมีการปนเปื้อนด้วยโปรติเอสหรือไม่ โดยนำสารละลายเอนไซม์มาหยดลงในรูที่เจาะไว้บนจานวุ้นที่ผสมนมผงพร่องมันเนย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.6 แล้วตรวจสอบการทำงานของโปรติเอสโดยสังเกตจากวงกลมใสที่เกิดขึ้น

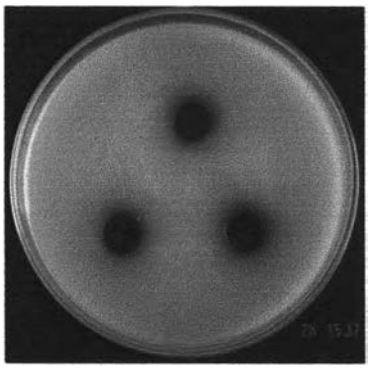
จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 พบว่าไม่มีวงกลมใสเกิดขึ้นในทุกๆจาน แต่เนื่องจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีสีเข้มทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นวิธีการนี้อาจไม่สามารถใช้ตรวจหาโปรติเอสได้



(ก)



(ข)



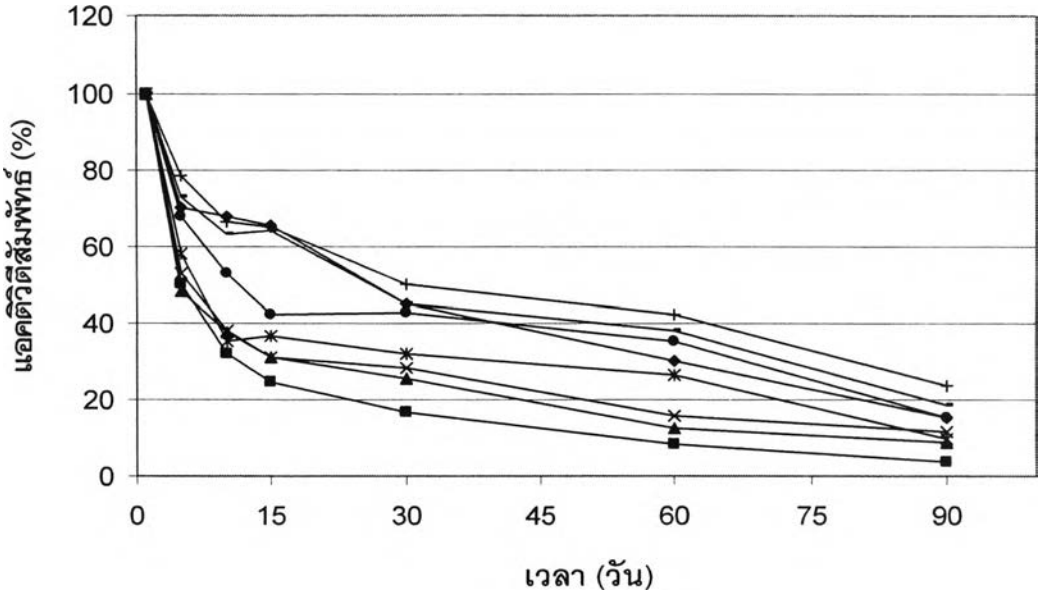
(ค)

รูปที่ 4.1 ผลของการตรวจสอบโปรติเอสในสารละลายเดกซ์แทรนเนสโดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (ก) อุณหภูมิห้อง (ข) 37 องศาเซลเซียส และ (ค) 45 องศาเซลเซียส

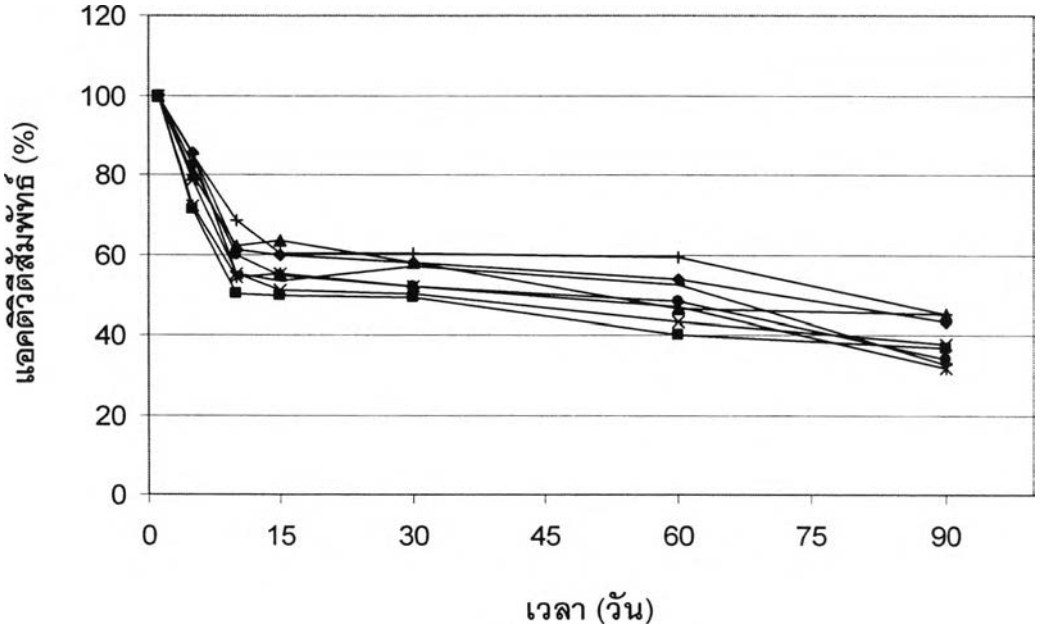
4.3 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

ทำการแปรผันความเป็นกรดเบสของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสตั้งแต่ 4.0 – 7.0 และเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ตามวิธีการดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.7 แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไปแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสมีแนวโน้มลดลงทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วงกรดคือ ตั้งแต่ 4.0 - 6.0 เมื่อเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสปกติที่ไม่มีการเติมบัฟเฟอร์ แต่เมื่อค่าความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นแนวโน้มของแอคติวิตีก็ไม่แตกต่างจากเอนไซม์ปกติมากนัก พบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดเบส 6.5 เดกซ์แทรนเนสมีแนวโน้มของแอคติวิตีคงเหลือมากที่สุด จึงเลือกสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดเบส 6.5 สำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.2 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดเบสต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.3 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในบัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดเบสต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส

เอนไซม์
อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.0
อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5
อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0
อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.4 สารที่เหมาะสมในการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนส

เปรียบเทียบการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต อะซีโตน และเอทานอล โดยทำการทดลองตามวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.8.1 จากนั้นตรวจสอบแอคติวิตีทั้งหมดของเดกซ์แทรนเนสหลังจากผ่านการตกตะกอนแล้ว ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีแอคติวิตีสัมพัทธ์คงเหลือ 79.43 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ แอคติวิตีสัมพัทธ์ไม่เพิ่มขึ้น สำหรับการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยเอทานอล พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นเอนไซม์มีแอคติวิตีสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเช่นกัน และมีแอคติวิตีสัมพัทธ์มากที่สุดเท่ากับ 88.51 เมื่อใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ และสุดท้ายเมื่อตกตะกอนด้วยอะซีโตนที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีแอคติวิตีสัมพัทธ์มากที่สุดเท่ากับ 92.84 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของอะซีโตนแอคติวิตีสัมพัทธ์ก็ไม่เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองนี้ จึงเลือกอะซีโตนที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ในการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่เตรียมได้จะทำการเติมโซเดียมเอไซด์ให้ได้ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาด้วยวิธีต่างๆต่อไป

จากการที่การทำงานของโปรติเอสถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งโปรติเอส เช่น ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsuphonyl Fluoride, PMSF) เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าไม่มีโปรติเอสในส่วนเตรียม จึงทำการเติมฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ลงไปในส่วนเตรียมในระหว่างการตกตะกอน จากผลการทดลองพบว่าในระบบที่มีการเติมฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเดกซ์แทรนเนสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยสารต่างๆ ไม่มีความแตกต่างจากระบบที่ไม่มีการเติม เป็นไปได้ว่าในน้ำเลี้ยงเชื้ออาจไม่มีการปนเปื้อนด้วยโปรติเอส แต่เนื่องจากฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ ยับยั้งเฉพาะเซอรีนโปรติเอสดังนั้นหากมีโปรติเอสชนิดอื่นวิธีนี้จะไม่สามารถตรวจพบโปรติเอสได้

ตารางที่ 4.1 ผลการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสด้วยชนิดต่างๆ

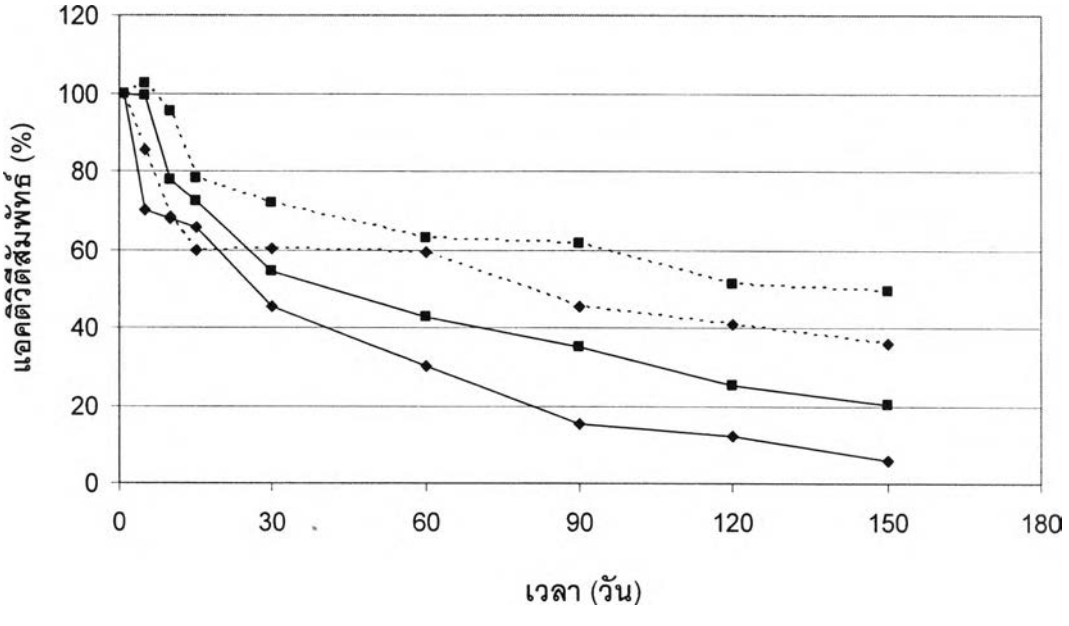
สารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอน	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%) (เติม PMSF)
เดกซ์แทรนเนสหยาบ	100	100
แอมโมเนียมซัลเฟต		
70%(w/v)	79.43	81.94
80%(w/v)	73.51	79.34
90%(w/v)	70.14	75.11
อะซีโตน		
70%(v/v)	92.84	90.24
80%(v/v)	84.46	91.20
90%(v/v)	88.67	87.55
เอทานอล		
70%(v/v)	46.42	48.59
80%(v/v)	62.16	60.55
90%(v/v)	88.51	87.00

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีทั้งหมดของเอนไซม์หยาบก่อนตกตะกอน

4.5 ผลการเปรียบเทียบการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสในรูปเอนไซม์หยาบกับเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน

ทำการทดลองตามวิธีการดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.9 โดยนำเอนไซม์หยาบและเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตนแล้วมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ตลอดช่วงของการเก็บรักษา ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.4

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไปเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตนจะมีแนวโน้มของแอคติวิตีคงเหลือมากกว่าเอนไซม์หยาบทั้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.4 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในรูปเอนไซม์หยาบและเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอน

—◆— เอนไซม์หยาบ (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

—■— เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยอะซีโตน (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

---◆--- เอนไซม์หยาบ (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

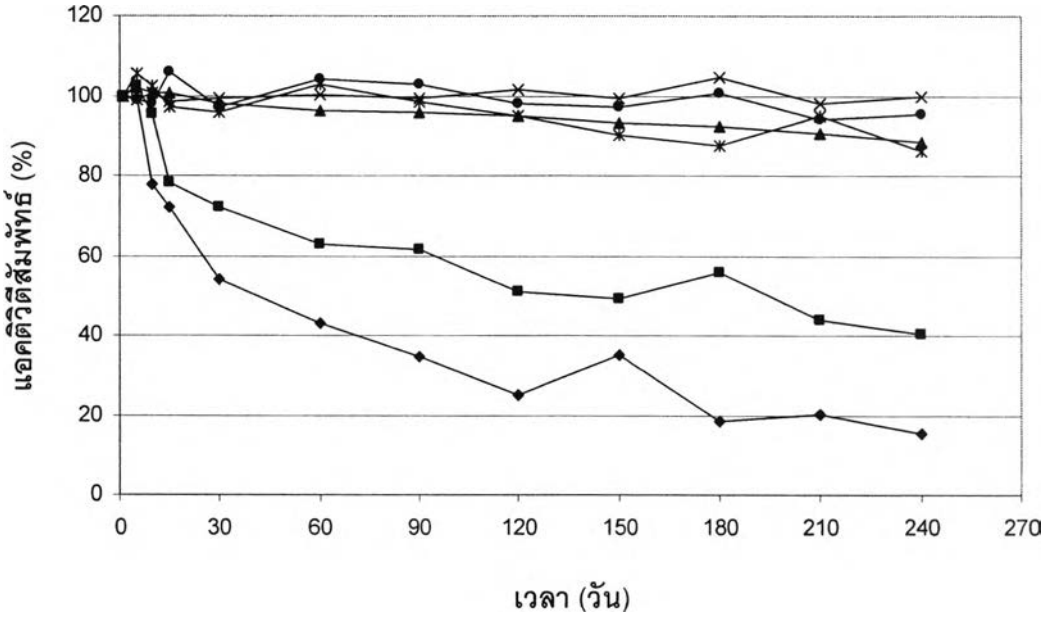
---■--- เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยอะซีโตน (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.6 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

หลังจากได้เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน นำเอนไซม์เข้มข้นที่ผ่านการตกตะกอนมาศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเก็บรักษา โดยทำการแปรผันอุณหภูมิ 4 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง, 4, -20 และ -70 องศาเซลเซียสตามลำดับ ตามวิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.10 จากนั้นทำการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.5

พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเดกซ์แทรเนสเข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็ว โดยในวันที่ 240 เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำมาก คือ -20 และ -70 องศาเซลเซียส เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ โดยในวันที่ 240 เดกซ์แทรนเนสที่เก็บ -20 และ -70 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ เช่นเดียวกันการเก็บเดกซ์แทรนเนสหยาบที่อุณหภูมิต่ำถึง -20 และ -70 องศาเซลเซียส สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้เมื่อเวลาผ่านไป 240 วัน



รูปที่ 4.5 ผลการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่อุณหภูมิต่างๆ

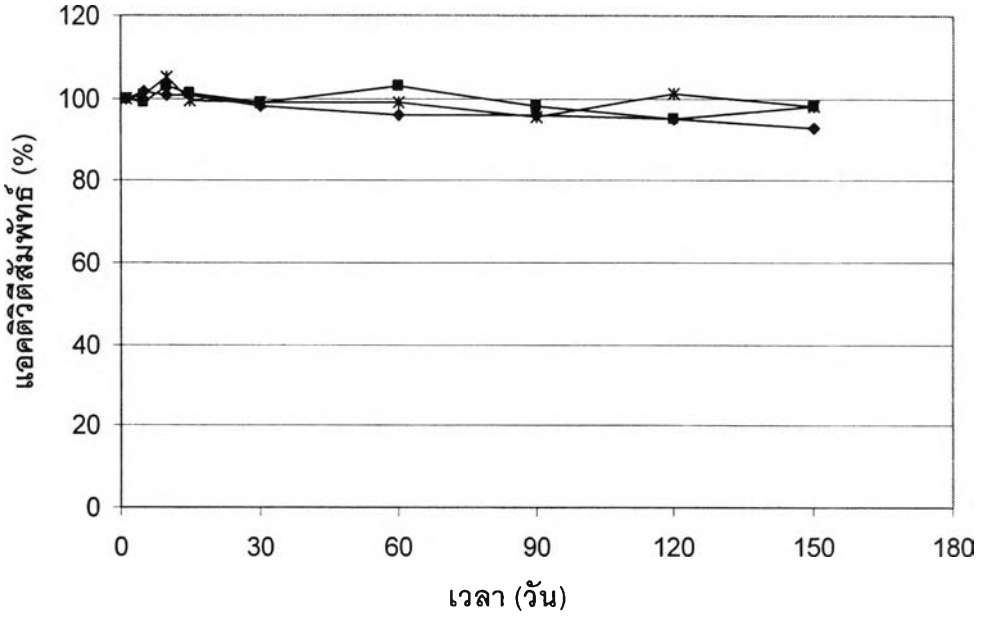
อุณหภูมิห้อง
4 องศาเซลเซียส
-20 องศาเซลเซียส
-20 องศาเซลเซียส (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)
-70 องศาเซลเซียส
-70 องศาเซลเซียส (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

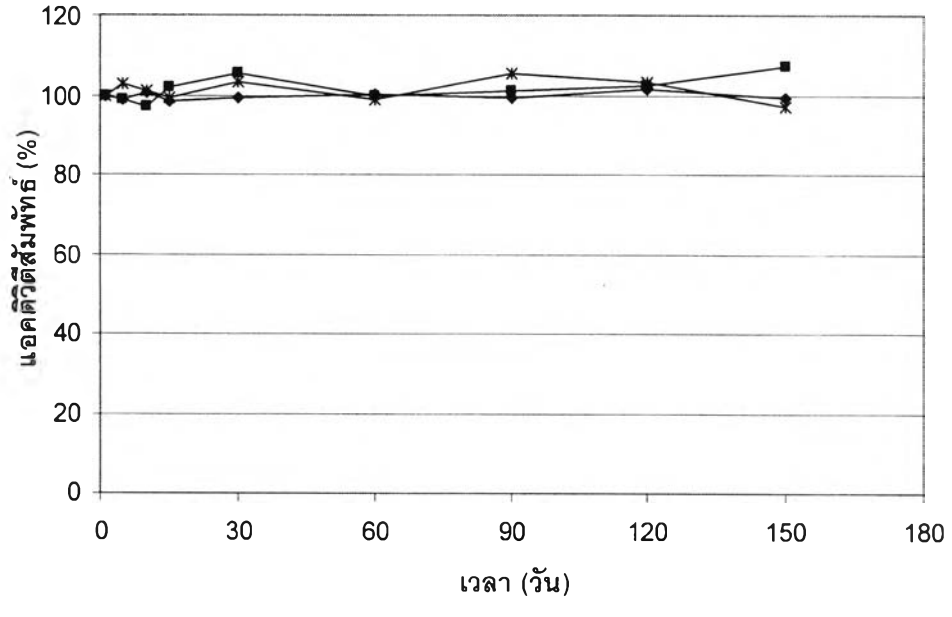
4.7 ผลของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลที่มีต่อการเก็บเดกซ์แทรนเนสที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส

จากการที่อุณหภูมิต่ำสามารถช่วยรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสได้ แต่ในบางกรณีโดยทั่วไปการถนอมเอนไซม์มีความจำเป็นต้องเติมสารถนอมภายใต้ความเย็น เช่น กลีเซอรอลและซอร์บิทอล เพื่อป้องกันบริเวณออกฤทธิ์ของเอนไซม์ โดยทำการทดลองตามวิธีดำเนินการวิจัยในข้อ 3.11 ผลการทดลองที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7

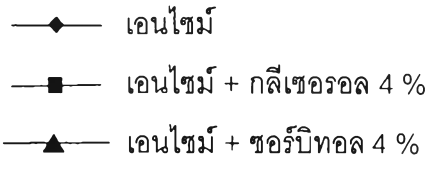
จากผลการทดลองพบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมกลีเซอรอลและซอร์บิทอลเมื่อนำมาเก็บที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ไม่แตกต่างจากเอนไซม์ปกติ โดยเดกซ์แทรนเนสสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 150 วัน



รูปที่ 4.6 ผลของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสที่ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.7 ผลของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสที่ -70 องศาเซลเซียส



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

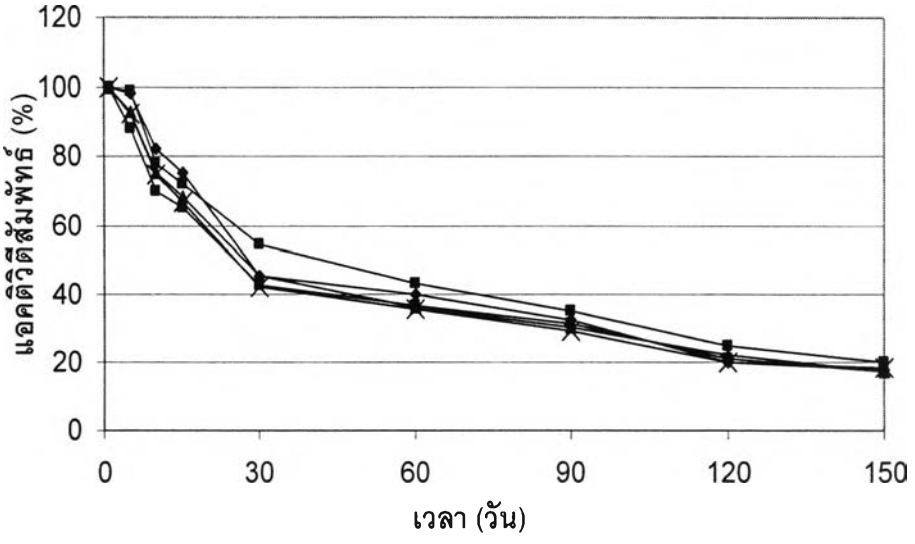
4.8 คัดเลือกสารที่ใช้ร่วมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

4.8.1 ผลของน้ำตาลที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

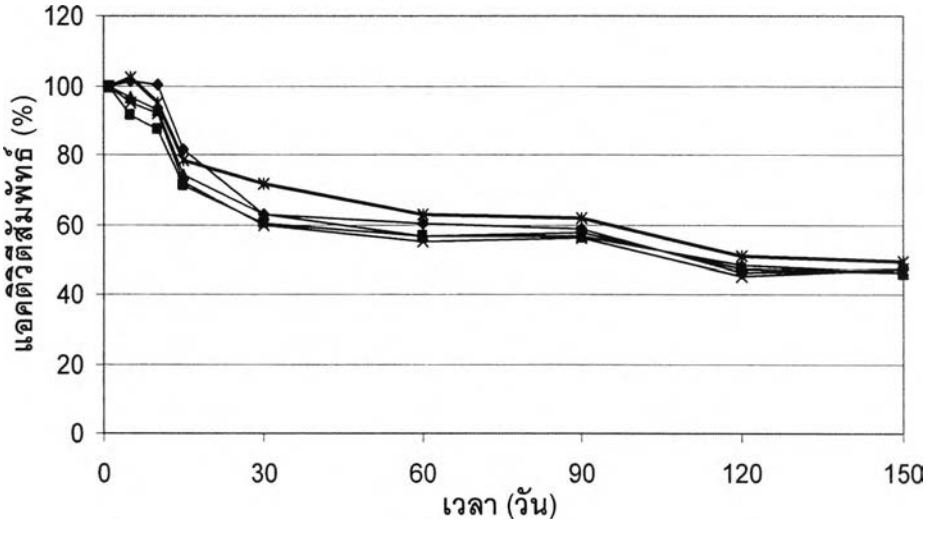
จากการที่มีรายงานว่าการเติมน้ำตาลลงในสารละลายเอนไซม์สามารถช่วยป้องกันบริเวณแสดงฤทธิ์ของเอนไซม์ (Ward และคณะ, 1999) จึงได้ทำการทดลองศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส, แลคโทส, ซูโครสและมอลโทส ต่อการถนอมแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส โดยในแต่ละระบบจะผสมน้ำตาลลงในสารละลายเดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้น 0.5 มก.ต่อมล. แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 และ 4.9

พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป เดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมน้ำตาลทั้ง 4 ชนิดมีแนวโน้มของแอคติวิตีที่ลดลงใกล้เคียงกัน ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลต่างๆ ไม่มีผลต่อการช่วยรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นที่ใช้อาจไม่ใช่ความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ 3 ระดับ คือ 0.25, 0.5 และ 1.0 มก.ต่อมล. ตามลำดับ จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส ตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในช่วงของการเก็บ

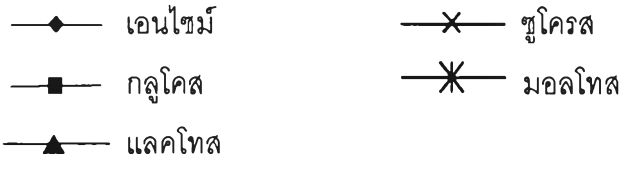
จากการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, แลคโทส, ซูโครสและมอลโทส เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.10 - 4.17 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปน้ำตาลทุกชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆมีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติ แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลชนิดต่างๆไม่มีผลต่อการรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส



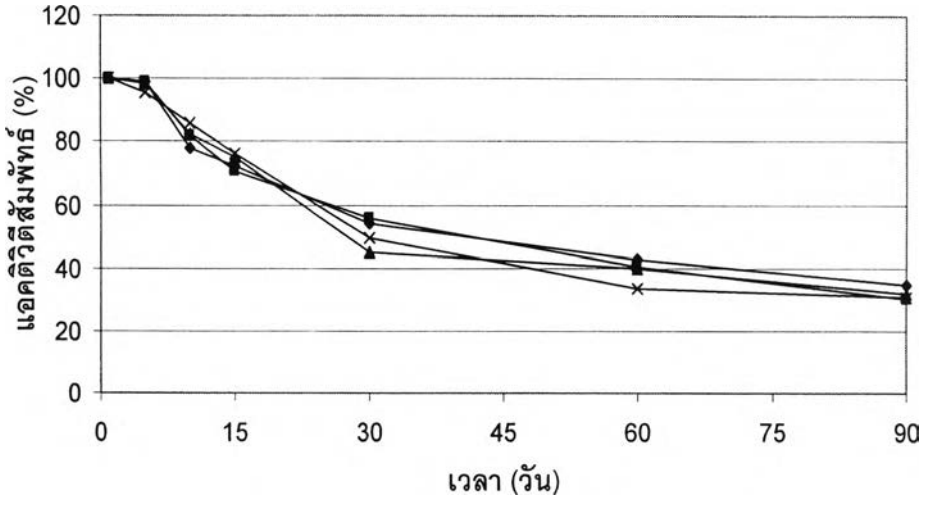
รูปที่ 4.8 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



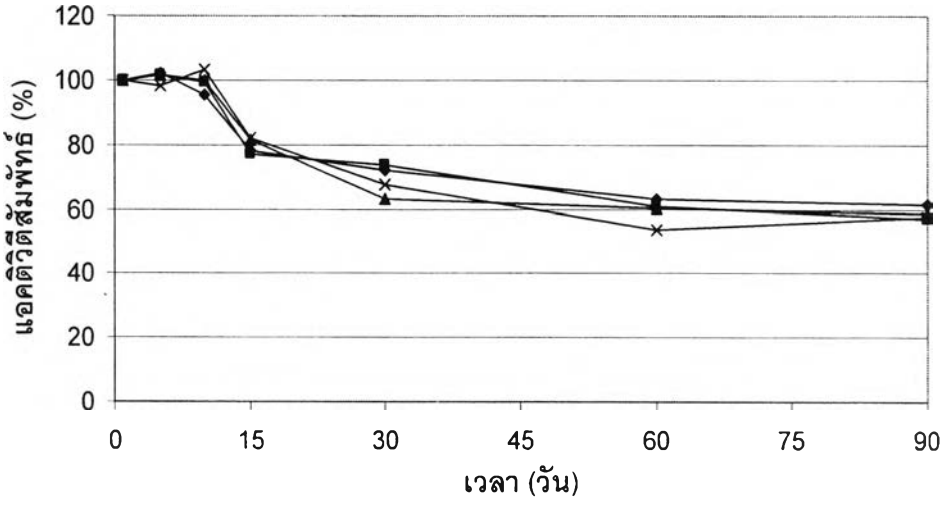
รูปที่ 4.9 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส



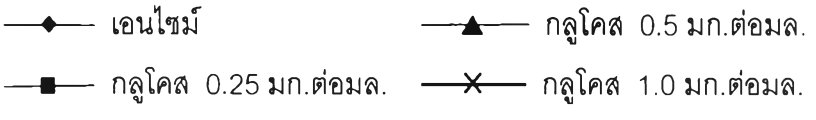
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



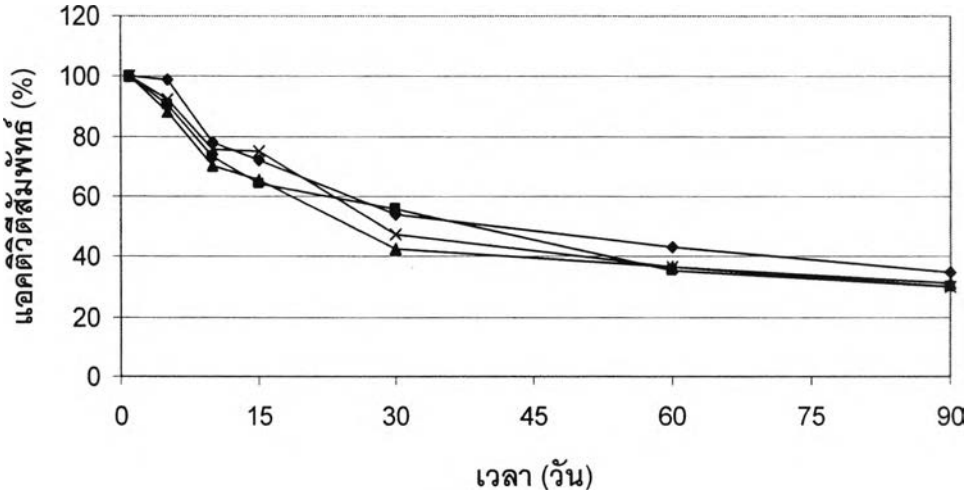
รูปที่ 4.10 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



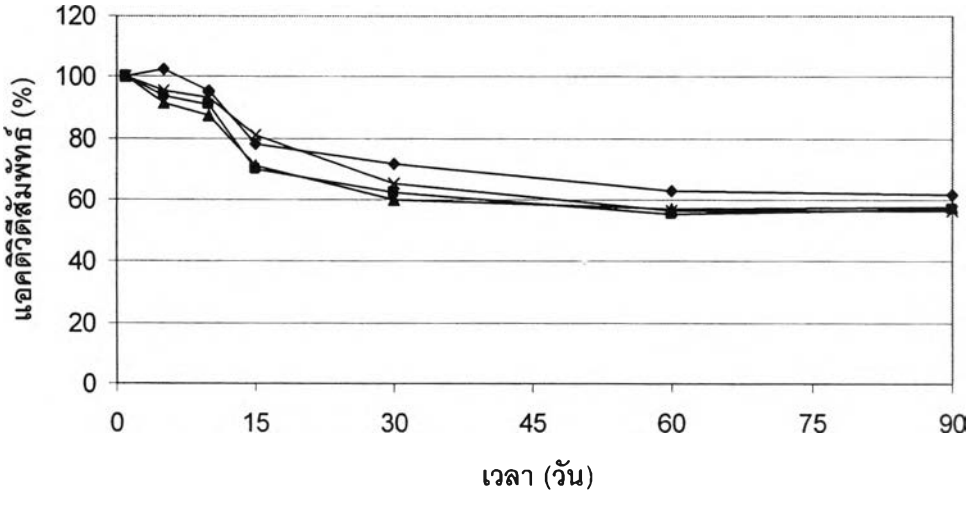
รูปที่ 4.11 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



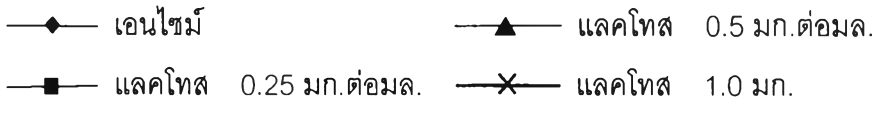
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



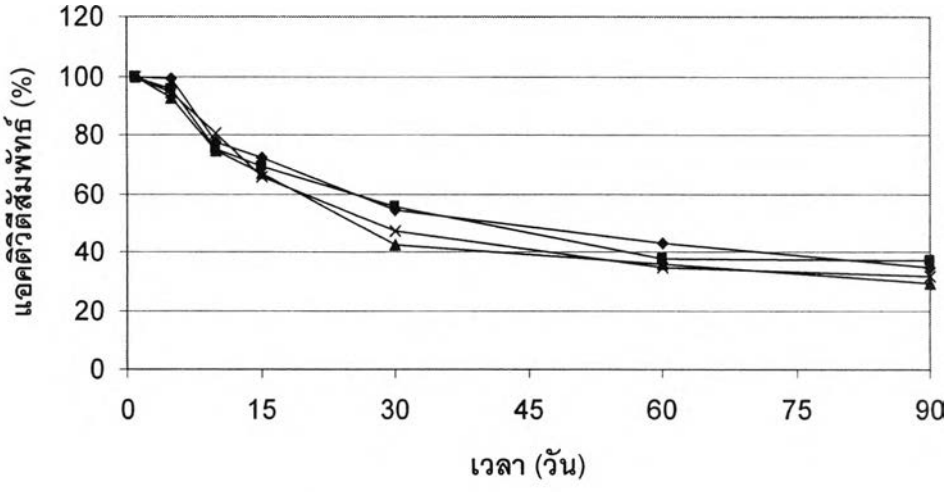
รูปที่ 4.12 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโทสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



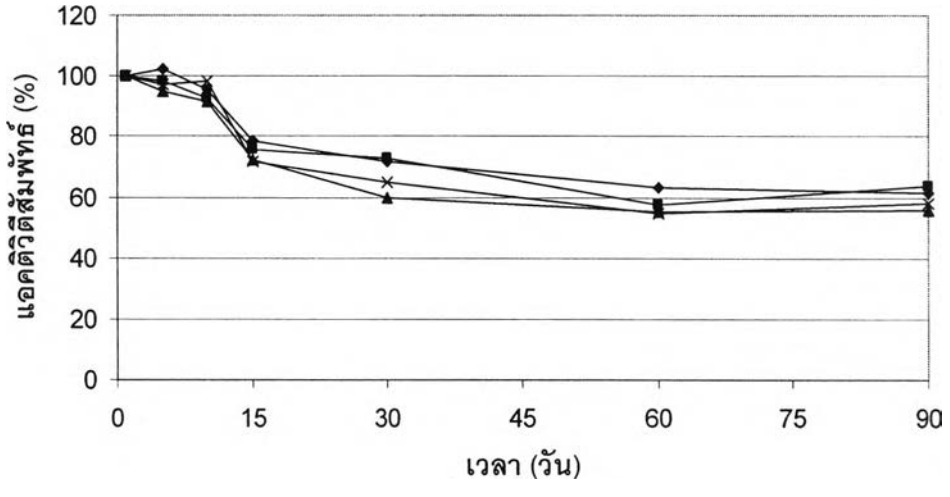
รูปที่ 4.13 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโทสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



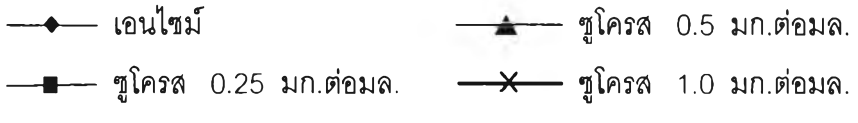
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



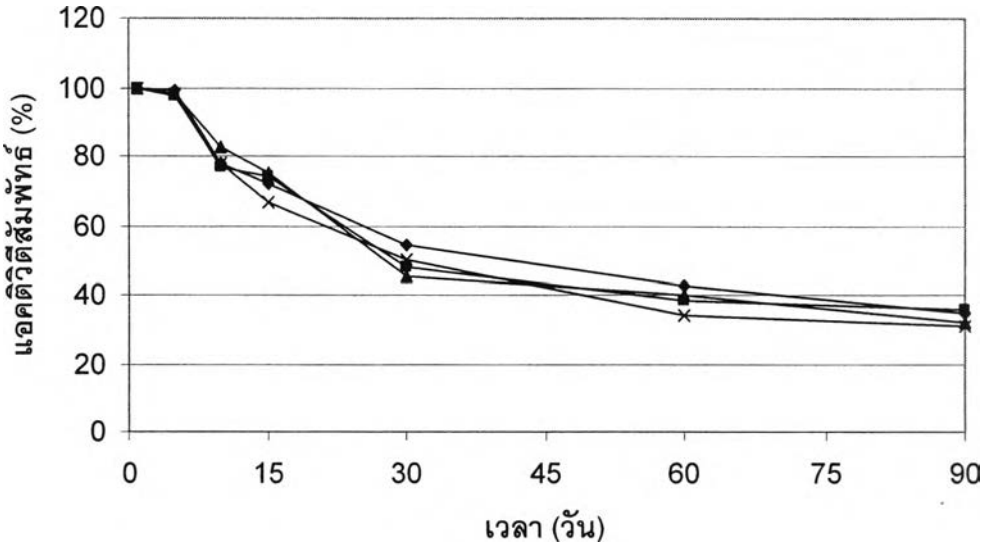
รูปที่ 4.14 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



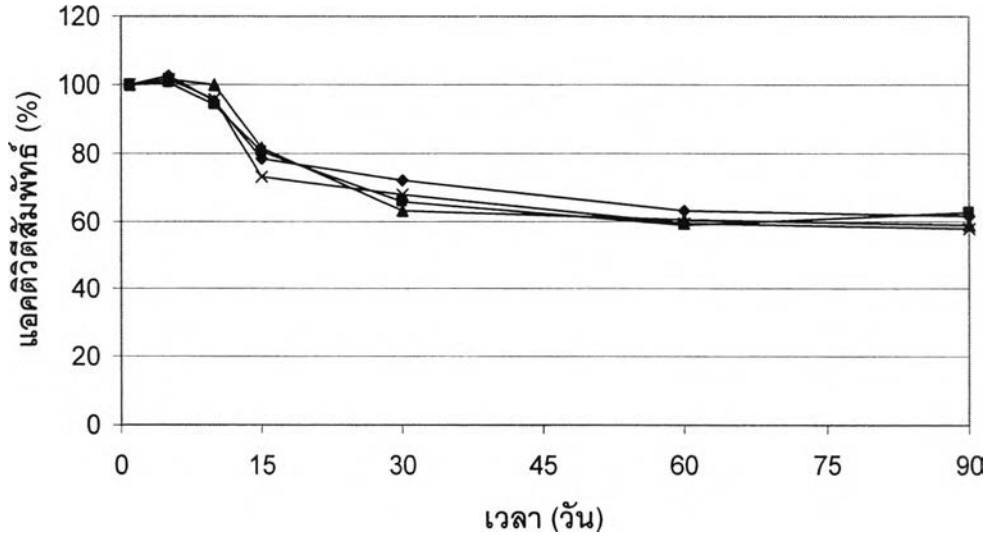
รูปที่ 4.15 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



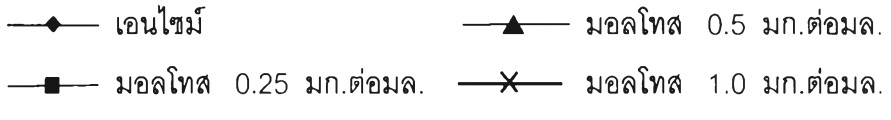
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.16 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.17 ผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโทสในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



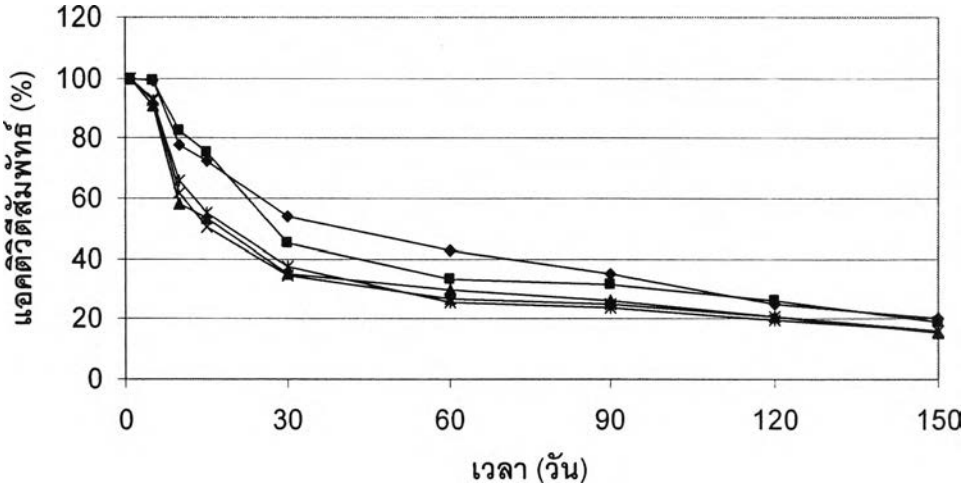
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.8.2 ผลของพอลิออลที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

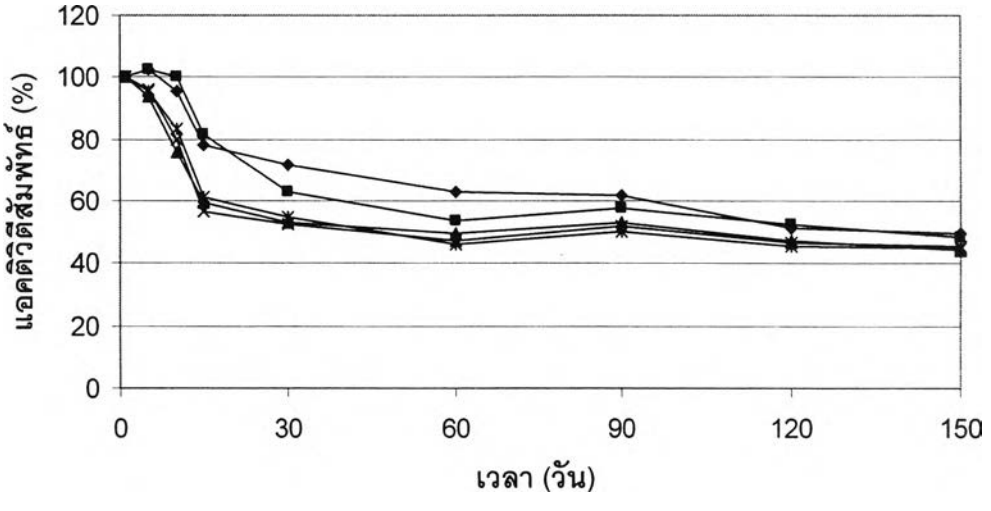
พอลิออลเป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาความเสถียรของเอนไซม์ เนื่องจากสามารถป้องกันเอนไซม์จากการถูกทำลายด้วยความร้อน หรือการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็งในระหว่างการเก็บ (Ward และคณะ, 1999 และ Hellman และคณะ,1983) ทำการทดลองศึกษาผลของพอลิออลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลีซอรอล ซอร์บิทอล แมนนิทอล และไอโนซิทอล โดยผสมกลีเซอรอลและซอร์บิทอลในเดกซ์แทรนเนสให้มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ ผสมแมนนิทอลและไอโนซิทอลในเดกซ์แทรนเนสที่ความเข้มข้น 0.5 มก.ต่อมล. จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส ตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.18 และ 4.19

พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเอนไซม์ปกติและเอนไซม์ที่เติมพอลิออลชนิดต่างๆ มีแอคติวิตีลดลงทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ที่เติมกลีเซอรอลมีแนวโน้มแอคติวิตีลดลงใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติ ในขณะที่เอนไซม์ที่เติมซอร์บิทอล แมนนิทอลและไอโนซิทอลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเร็วกว่าเอนไซม์ปกติเล็กน้อย อย่างไรก็ตามในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลองเอนไซม์ที่เติมกลีเซอรอลแสดงแอคติวิตีคงเหลือดีที่สุด จึงทำการแปรผันความเข้มข้นของกลีเซอรอล 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส ตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในช่วงของการเก็บ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.20 และ 4.21

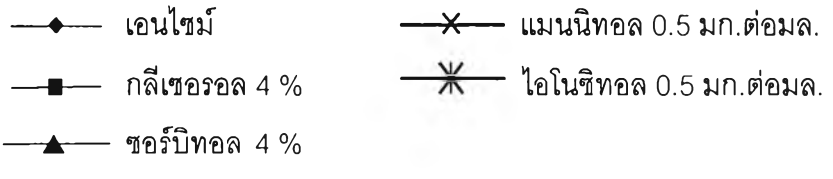
จากผลการทดลอง ถึงแม้จะทำการแปรผันความเข้มข้นของกลีเซอรอลทั้ง 3 ระดับ แต่แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสก็ยังคงมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับเดกซ์แทรนเนสปกติทั้งที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส โดยเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน เดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 35 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีผลต่อการรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส



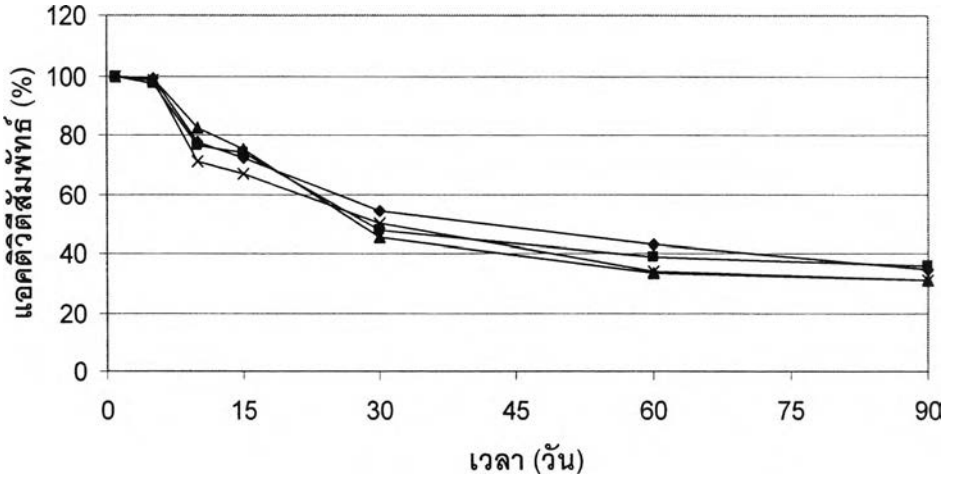
รูปที่ 4.18 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในพอลิออลชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



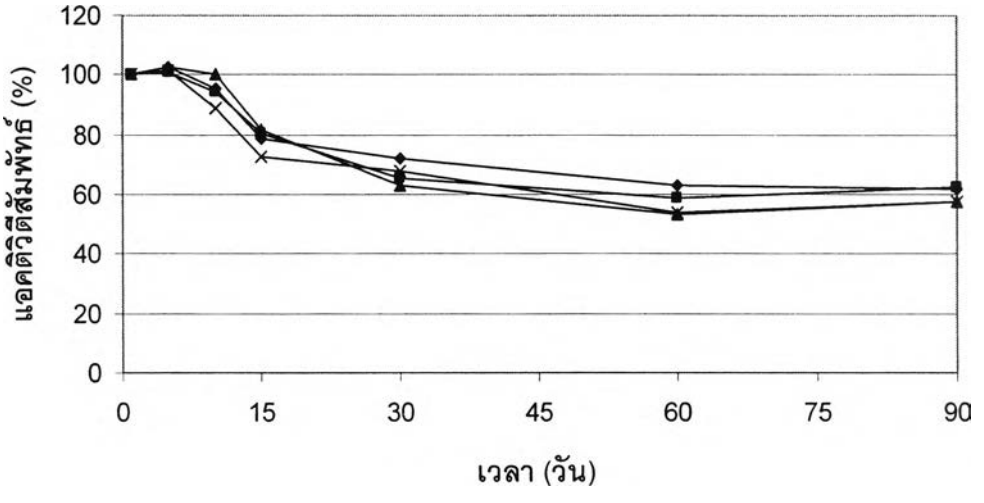
รูปที่ 4.19 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในพอลิออลชนิดต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส



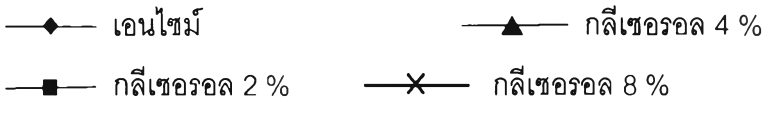
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.20 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกลีเซอรอลในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.21 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกลีเซอรอลในการเก็บเดกซ์แทรนเนส
ที่ 4 องศาเซลเซียส



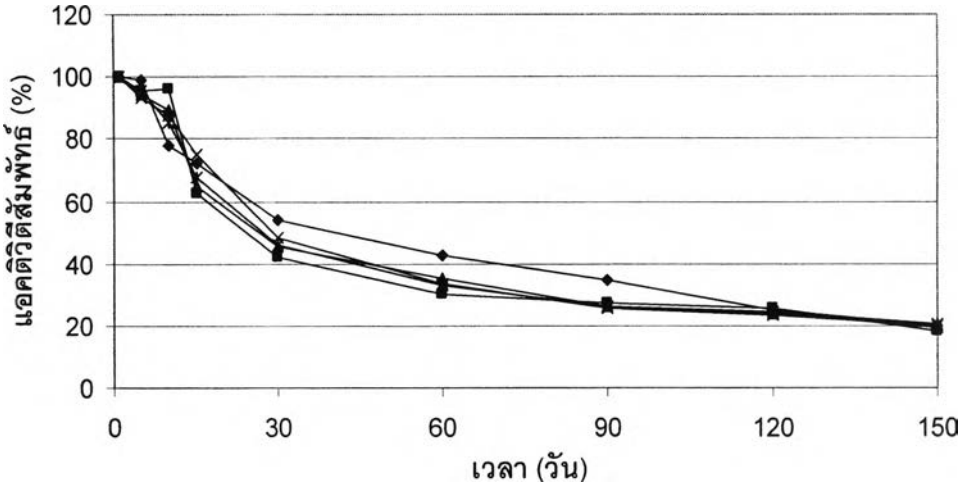
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษา ของแต่ละการทดลอง

4.8.3 ผลของกรดที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

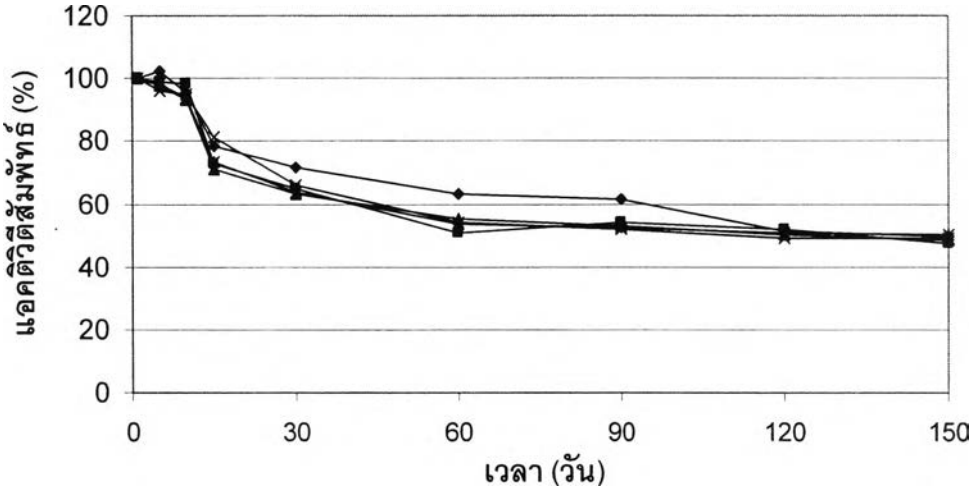
เป็นที่ทราบกันดีว่ากรดอินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นสารถนอมนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร จึงทำการทดลองศึกษาผลของกรดชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดเบนโซอิก กรดซิตริก กรดซอร์บิก และกรดซาลิไซลิก โดยผสมกรดชนิดต่างๆในเดกซ์แทรนเนสให้มีความเข้มข้น 2 มก.ต่อมล. จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.22 และ 4.23

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป เดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมกรดชนิดต่างๆมีแนวโน้มของแอคติวิตีลดลงใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนสปกติทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส โดยเมื่อเวลาผ่านไป 150 วัน เดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมกรดชนิดต่างๆมีแอคติวิตีคงเหลือที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงว่ากรดชนิดต่างๆที่เติมลงไปไม่มีผลในการช่วยรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกรดที่เลือกใช้อาจไม่เหมาะสมจึงทำการคัดเลือกกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกมาแปรผันความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1, 2 และ 4 มก.ต่อมล. ตามลำดับ จากนั้นนำเดกซ์แทรนเนสไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในช่วงของการเก็บ

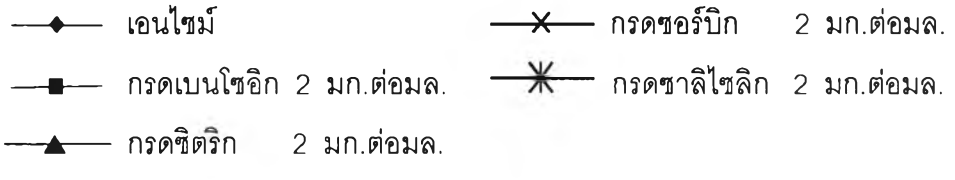
พบว่าในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลอง เดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกมีแนวโน้มการลดลงของแอคติวิตีใกล้เคียงกัน ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเริ่มเข้าสู่ช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มก.ต่อมล. เริ่มมีแนวโน้มลดลงเร็วกว่าเดกซ์แทรนเนสปกติเล็กน้อย ในขณะที่เดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกเพียง 1 มก.ต่อมล.มีแนวโน้มของแอคติวิตีใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติตลอดช่วงการทดลอง กรดทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ เบนโซอิกและซอร์บิกไม่มีผลช่วยในการรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส ขณะเดียวกันถ้ามีความเข้มข้นของกรดสูงยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของเดกซแทรนเนสด้วย



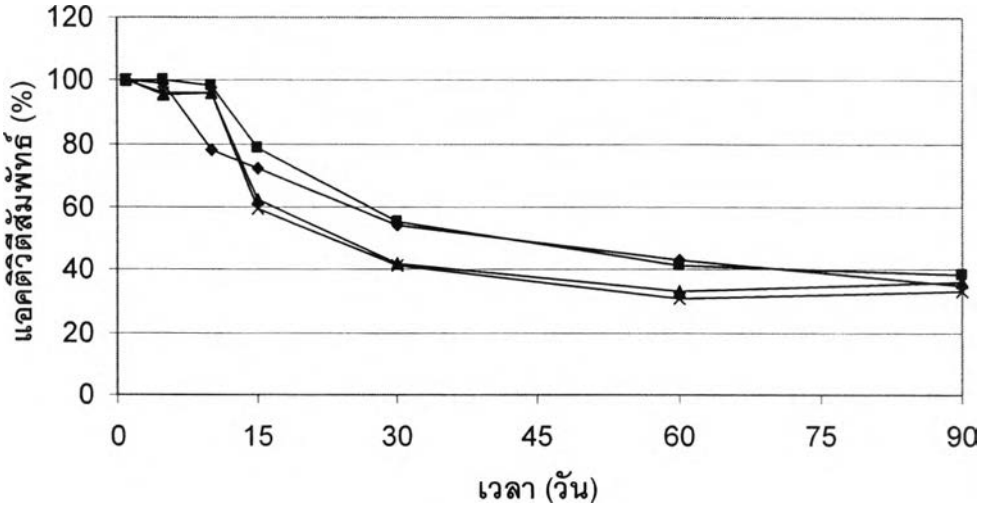
รูปที่ 4.22 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในกรดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



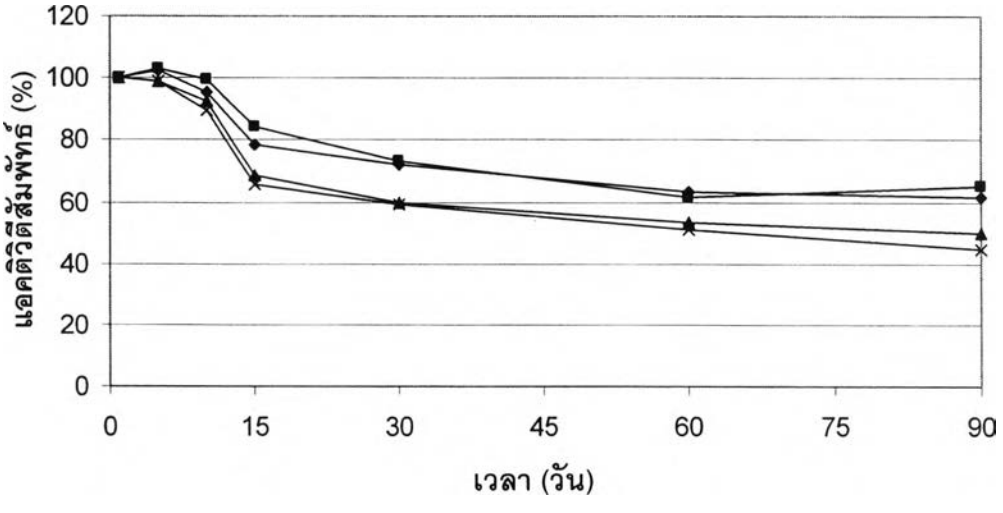
รูปที่ 4.23 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในกรดชนิดต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส



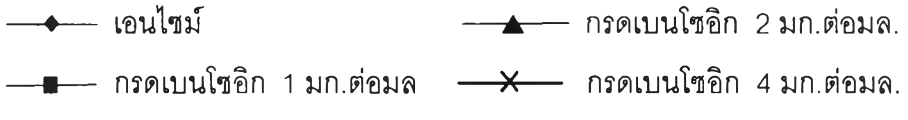
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



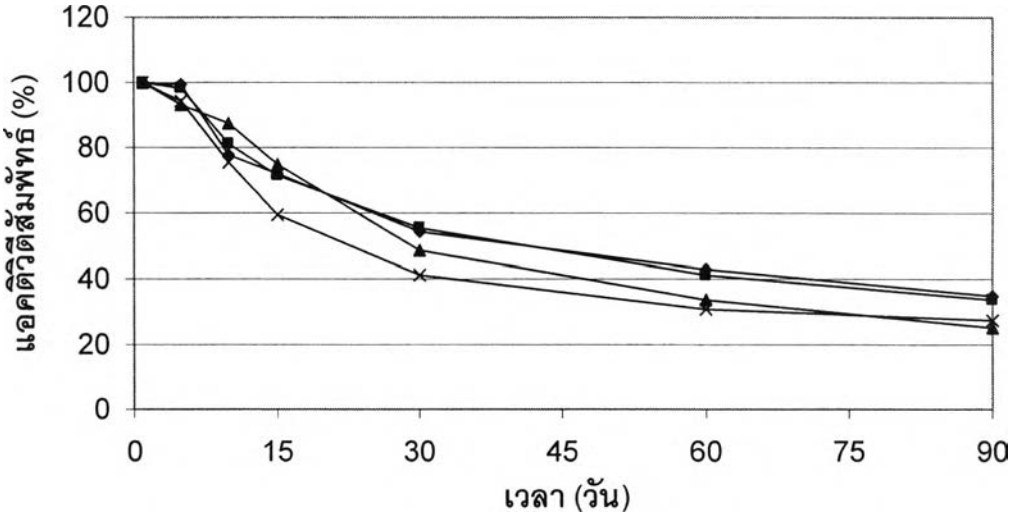
รูปที่ 4.24 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



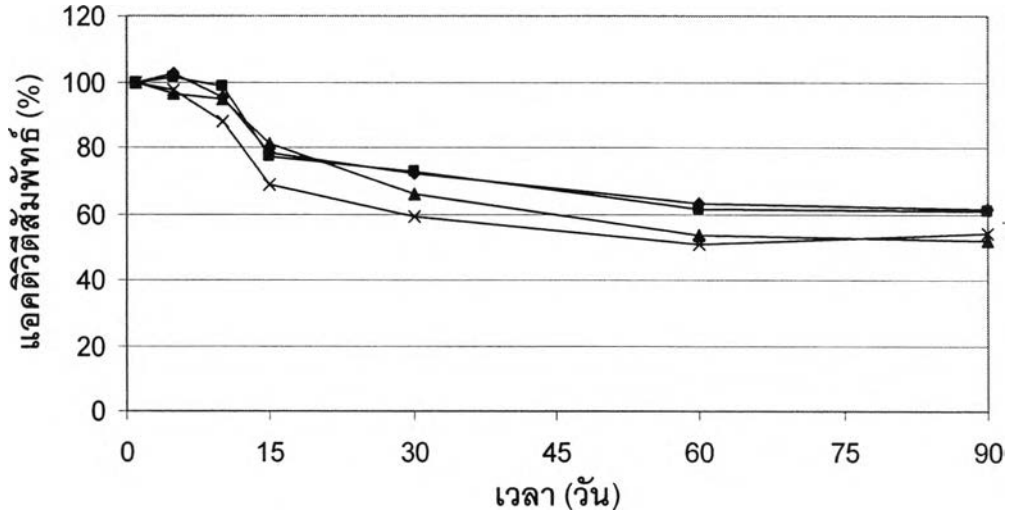
รูปที่ 4.25 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



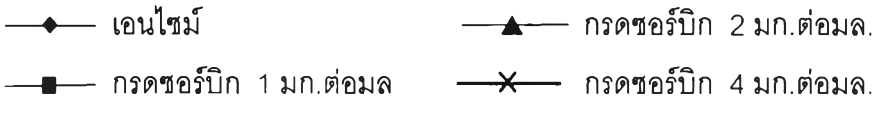
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.26 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกรดซอร์บิกในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.27 ผลการแปรผันความเข้มข้นของกรดซอร์บิกในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



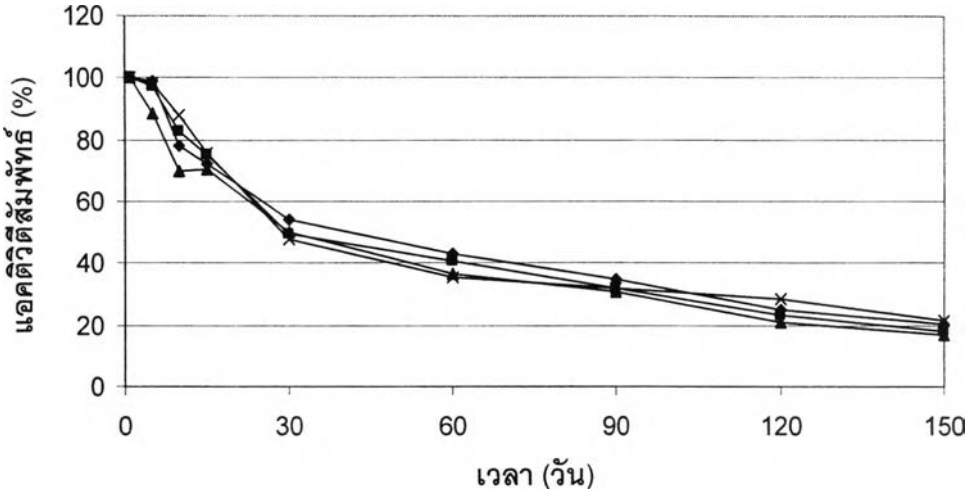
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.8.4 การใช้พอลิเมอร์เพื่อช่วยในการรักษาเดกซ์แทรนเนส

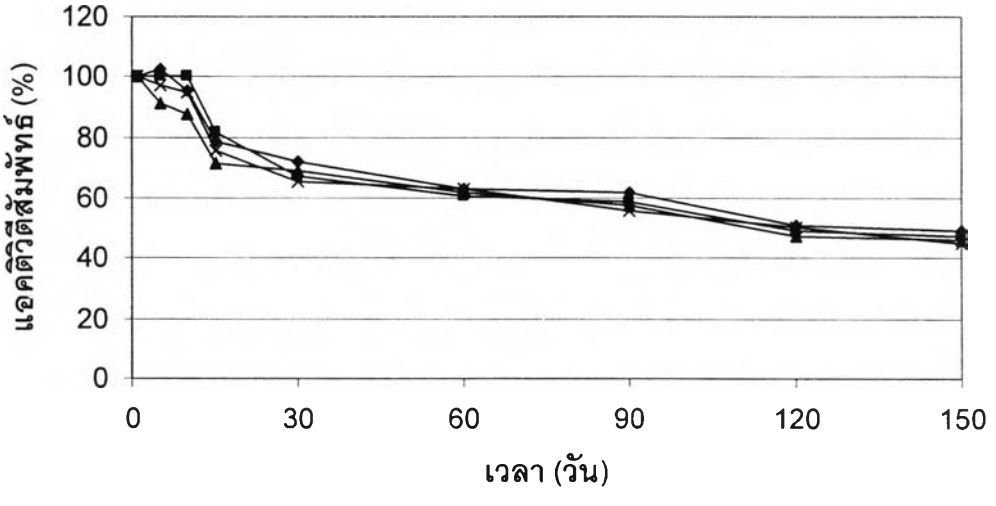
อีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ คือ การป้องกันบริเวณออกฤทธิ์ของเอนไซม์โดยเชื่อมกับสารประเภทพอลิเมอร์ ซึ่งอาจจะเข้าจับหรือล้อมจับโมเลกุลของเอนไซม์เพื่อป้องกันจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบเอนไซม์ (Gibson และคณะ, 1993 และ Abian และคณะ, 2002 และ Fagain, 2003) ในการทดลองนี้ทำการศึกษาผลของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เดกซ์แทรน ไคโตซานและเซลลูโลส ที่เป็นซับสเตรตและสารที่มีโครงสร้างคล้ายซับสเตรตซึ่งคาดว่าจะเข้าจับบริเวณออกฤทธิ์ แล้วทำให้ช่วยป้องการสูญเสียแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเมื่อเก็บเป็นเวลานานได้ โดยการผสมพอลิเมอร์ต่างๆในเดกซ์แทรนเนสให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในระหว่างช่วงการเก็บได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.28 และ 4.29

พบว่าเมื่อทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มการลดลงของแอคติวิตีใกล้เคียงกันอย่างเห็นได้ชัด โดยที่อุณหภูมิห้องเดกซ์แทรนเนสมีการสูญเสียแอคติวิตีที่รวดเร็วกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่อการรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เมื่อแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนและไคโตซาน ที่ 0.25, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผสมพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆกันในเดกซ์แทรนเนสแล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในระหว่างช่วงการเก็บ

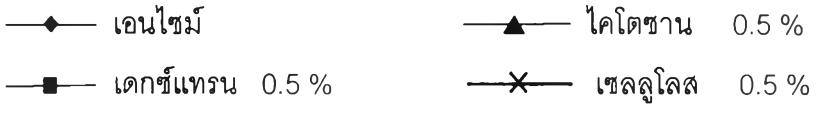
ผลการแปรผันความเข้มข้นของพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าไม่มีผลในการช่วยรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เนื่องจากมีแนวโน้มของแอคติวิตีลดลงเช่นเดียวกับเดกซ์แทรนเนสปกติ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน เดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมเดกซ์แทรนและไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ



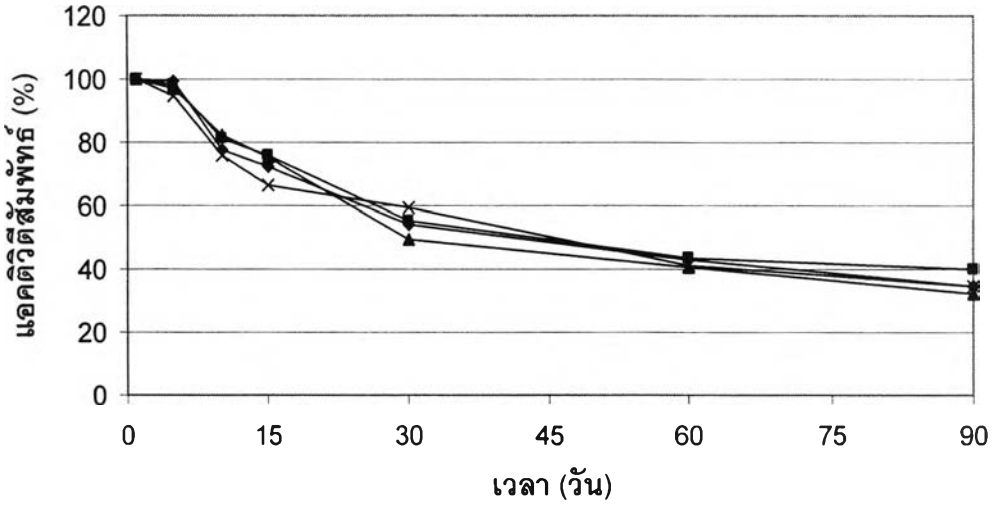
รูปที่ 4.28 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



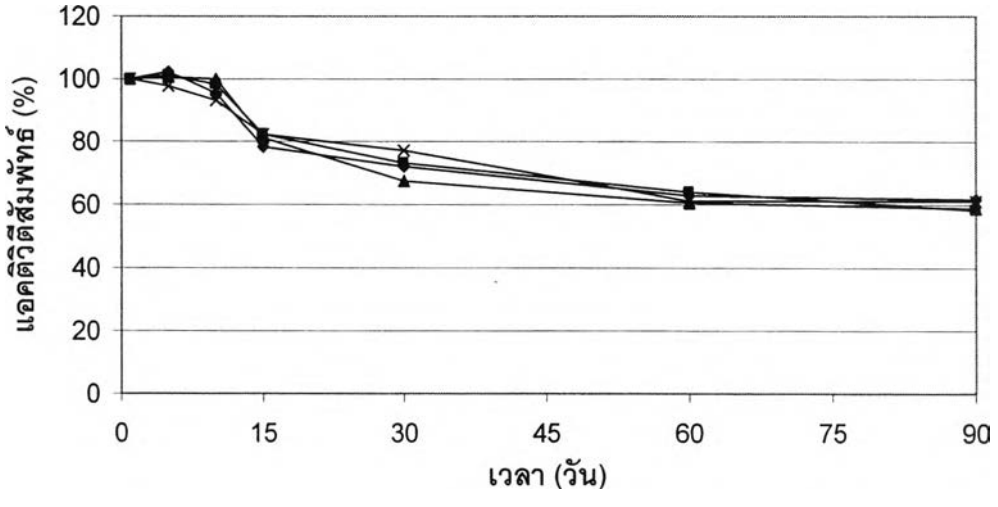
รูปที่ 4.29 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส



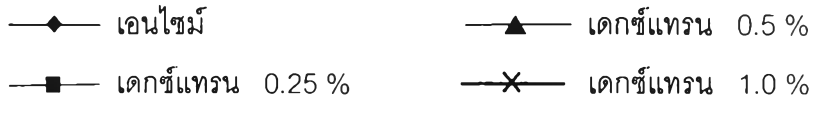
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



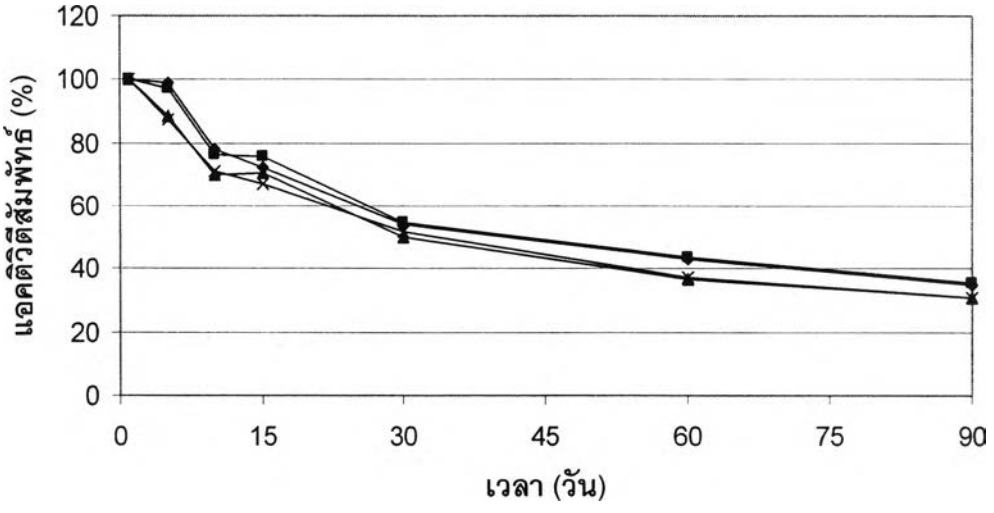
รูปที่ 4.30 ผลการแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



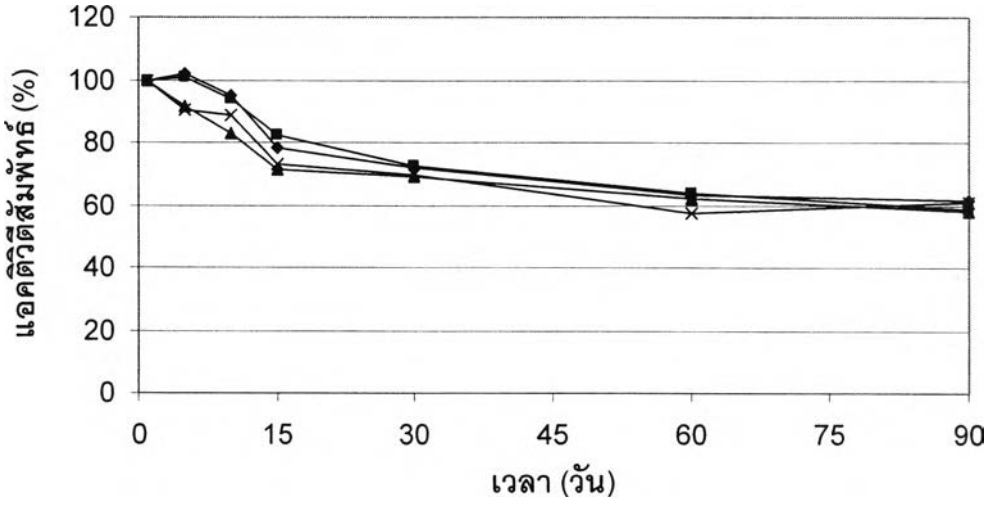
รูปที่ 4.31 ผลการแปรผันความเข้มข้นของเดกซ์แทรนในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



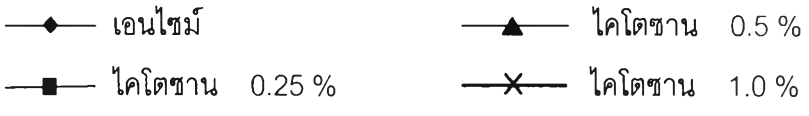
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.32 ผลการแปรผันความเข้มข้นของไคโตซานในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.33 ผลการแปรผันความเข้มข้นของไคโตซานในการเก็บเดกซ์แทรนเนส ที่ 4 องศาเซลเซียส



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.8.5 ผลของโปรตีนที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

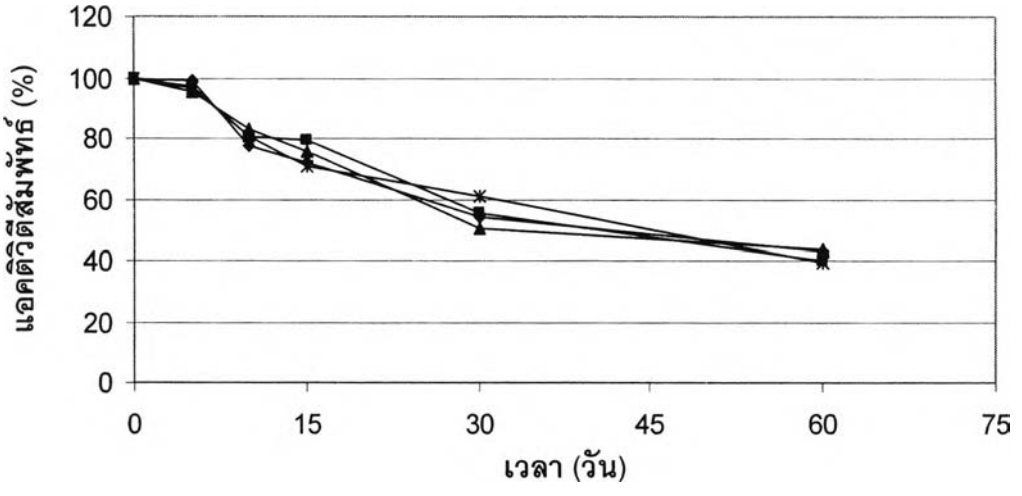
โปรตีนเป็นสารอีกกลุ่มที่สามารถป้องกันเอนไซม์จากความร้อน ซึ่งช่วยทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสถียร (Izutsu และคณะ, 1993) จึงได้มีการนำมาใช้รักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ (Kuhlmeyer และ Klein, 2003) ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของอัลบูมินซึ่งนอกจากจะป้องกันเอนไซม์จากความร้อน Dolapchiev และ Vassilev (1980) รายงานว่าสามารถดูดซับสิ่งปนเปื้อนในสารละลายและรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ โดยแปรผันความเข้มข้นออกเป็น 3 ระดับ คือ 0.25, 0.5 และ 1.0 มก.ต่อมล. หลังจากผสมอัลบูมินที่ความเข้มข้นต่างๆในเดกซ์แทรนเนสแล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในระหว่างช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.34 และ 4.35

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัลบูมินที่ความเข้มข้นต่างๆไม่มีผลในการช่วยรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส เห็นได้จากแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ลดลงที่เวลาต่างๆซึ่งมีแนวโน้มการลดลงใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนสปกติ โดยที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 วัน เดกซ์แทรนเนสปกติและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมอัลบูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ มีแอคติวิตีคงเหลือที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

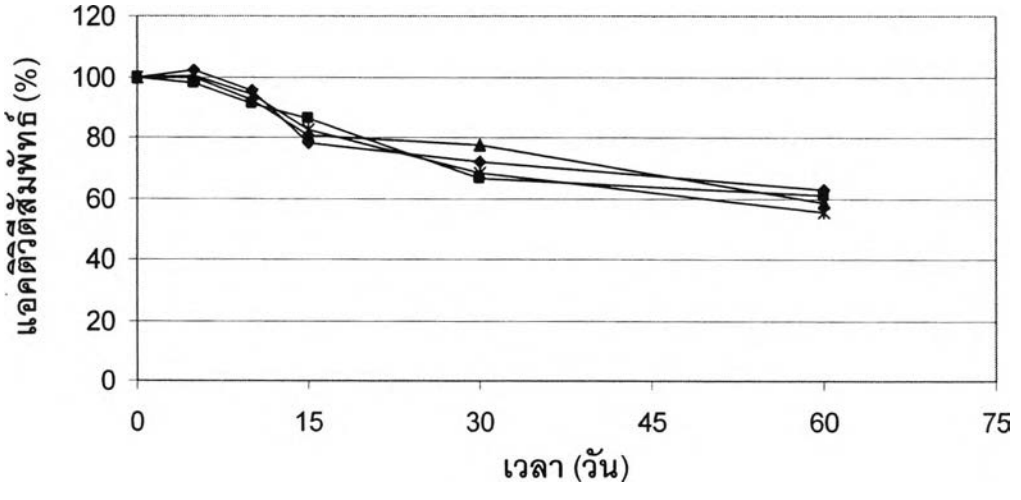
4.8.6 ผลของเกลือที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

ที่ผ่านมามีหลายงานวิจัยที่ได้นำสารในกลุ่มของเกลือมาใช้ในการรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยถ้าใช้ในปริมาณน้อยจะสามารถช่วยให้เอนไซม์ละลายอยู่ในสารละลายได้ดีขึ้นเป็นการป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ (Goller และ Galinski, 1999 และ Abian และคณะ, 2002) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงดำเนินการศึกษาผลของเกลือชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต โปแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส โดยทำการผสมแอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต ในเดกซ์แทรนเนสให้มีความเข้มข้น 0.5 มก.ต่อมล. และผสมโปแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเอนไซม์ไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส แล้ววัดแอคติวิตีที่เหลืออยู่ตลอดช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.36 และ 4.37

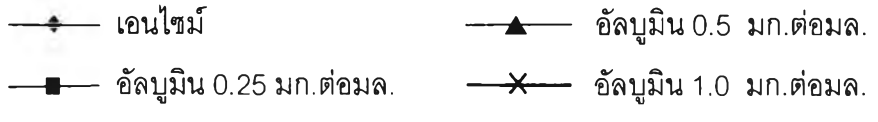
พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมซัลเฟตมีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนสปกติ ในขณะที่โปแทสเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าเกลือชนิดต่างๆที่คัดเลือกมาใช้ไม่มีผลในการรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนส



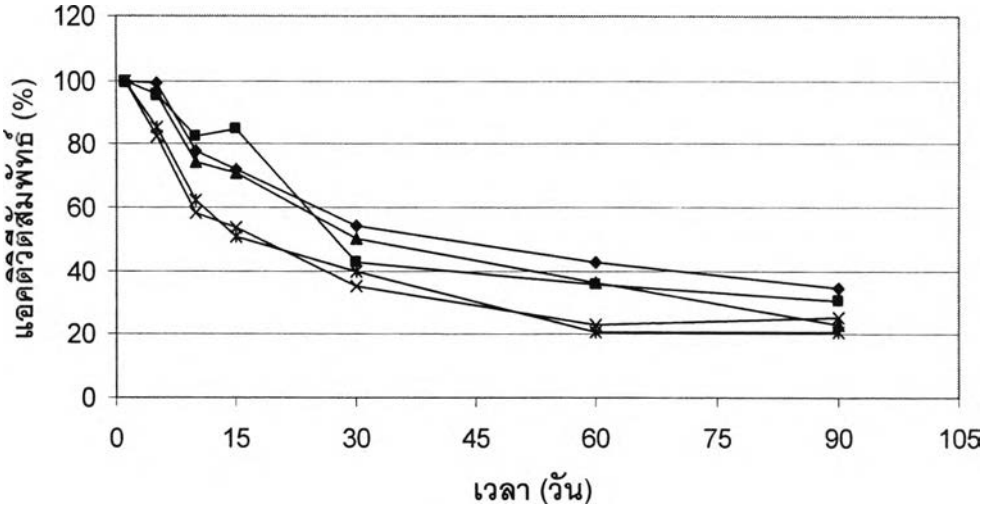
รูปที่ 4.34 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในอัลบูมิน ที่อุณหภูมิห้อง



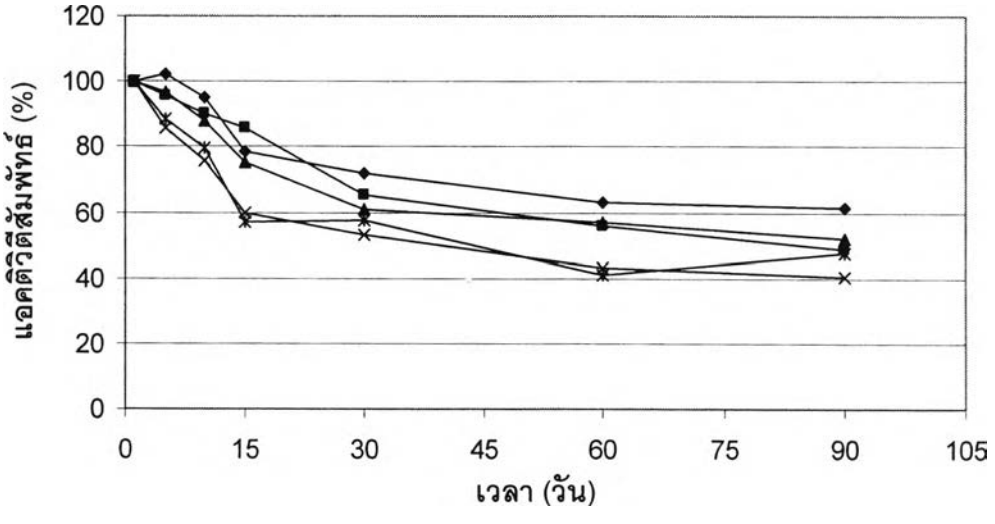
รูปที่ 4.35 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในอัลบูมิน ที่ 4 องศาเซลเซียส



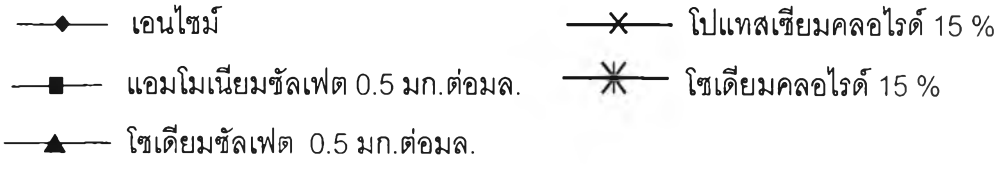
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.36 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในเกลือชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.37 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในเกลือชนิดต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.8.7 ผลของสารละลายอินทรีย์ที่มีต่อการถนอมแอคติวิตีและเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

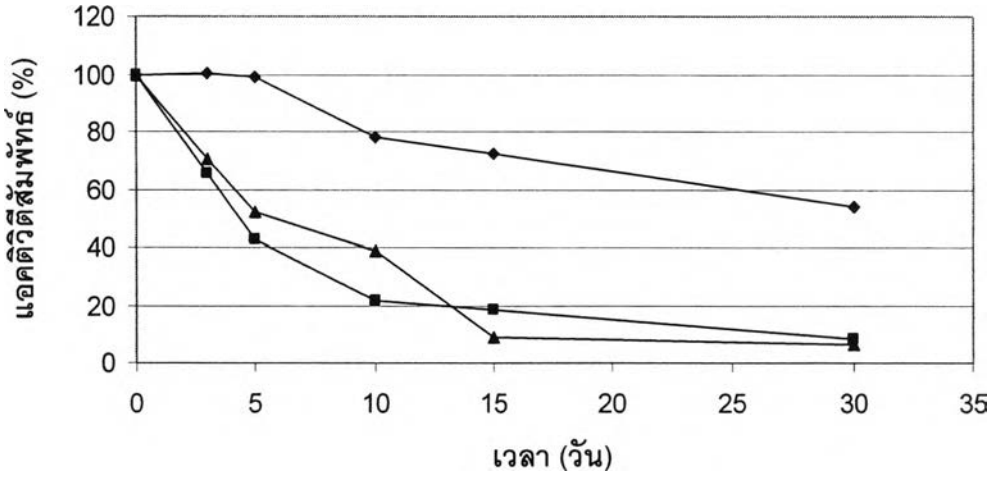
Brena และคณะ (2003) รายงานว่า อะซีโตนและเอทานอล ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ในสารละลายได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของสารละลายอินทรีย์ 2 ชนิดนี้ ที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส โดยทำการผสมเอทานอลและอะซีโตน ในเดกซ์แทรนเนสให้มีความเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีที่เหลืออยู่ในระหว่างช่วงการเก็บ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.38 และ 4.39

เมื่อทำการเติมอะซีโตนและเอทานอลในเดกซ์แทรนเนส พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป แอคติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วกว่าเดกซ์แทรนเนสปกติ โดยเพียงวันที่ 5 ของการทดลองเดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมอะซีโตนและเอทานอล เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส สูญเสียแอคติวิตีไปถึง 60 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ปกติยังคงรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าอะซีโตนและเอทานอลนอกจากจะไม่ช่วยรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสแล้ว ยังกลับมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีมากขึ้นด้วย

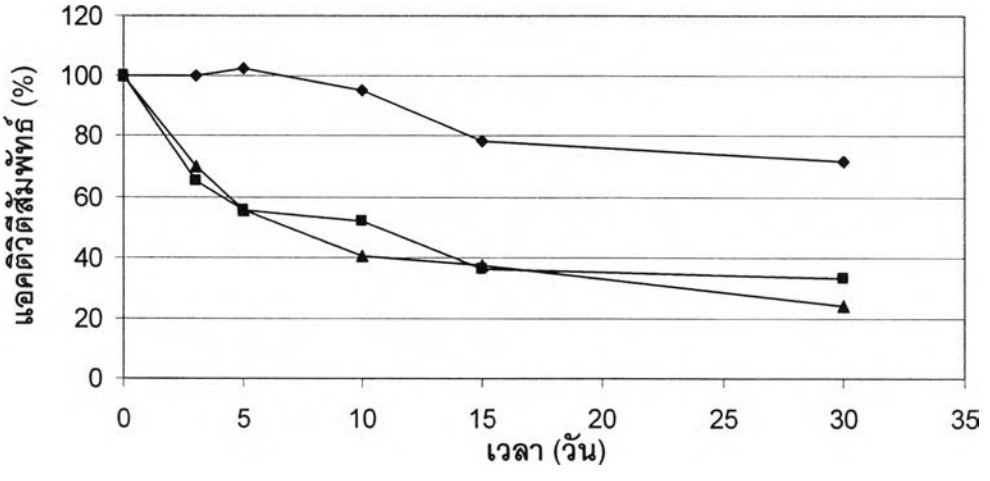
4.8.8 ผลของสารไบฟังก์ชันนอลที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

สารไบฟังก์ชันนอลสามารถช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ โดยการเชื่อมโยงโมเลกุลของเอนไซม์ไว้ เป็นการป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่ออยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในการตรึงรูปเอนไซม์ไว้กับตัวพยุง ซึ่งพบว่าสามารถรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้ ในการทดลองนี้ศึกษาผลของกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารไบฟังก์ชันนอลที่มีต่อการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส โดยแปรผันความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เป็น 2 ระดับ คือ 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ หลังจากผสมกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆในเดกซ์แทรนเนสแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจติดตามแอคติวิตีที่เหลืออยู่ทุกๆ 2 ชั่วโมง

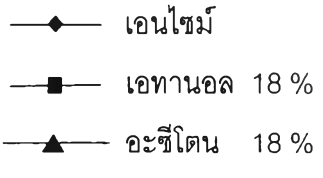
พบว่ากลูตารัลดีไฮด์มีผลทำให้เดกซ์แทรนเนสสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว จากรูปที่ 4.40 เห็นได้ชัดว่า กลูตารัลดีไฮด์เพียง 5 มิลลิโมลาร์ ทำให้เดกซ์แทรนเนสสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดไปในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่ากลูตารัลดีไฮด์ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นสารเติมแต่งในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส



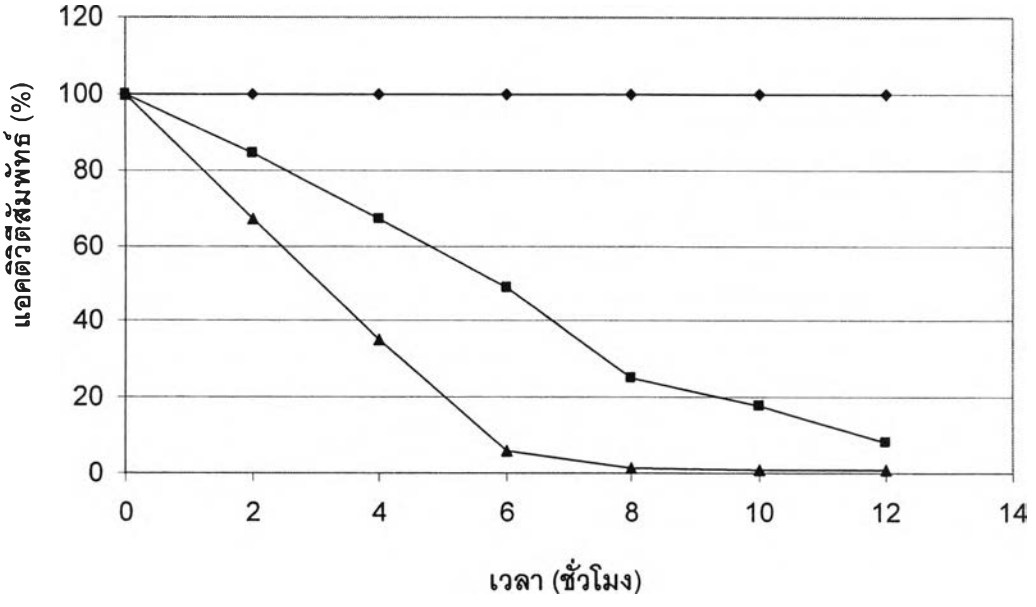
รูปที่ 4.38 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในสารละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง



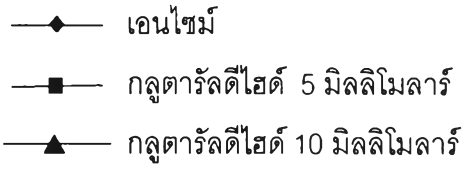
รูปที่ 4.39 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในสารละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.40 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสในกลูตารัลดีไฮด์ ที่อุณหภูมิห้อง



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.9 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสโดยการไลโอฟิไลซ์

4.9.1 ผลของสารเติมแต่งชนิดต่างๆที่มีต่อการไลโอฟิไลซ์เดกซ์แทรนเนส

โดยปกติการไลโอฟิไลซ์ มักจะมีผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติในการป้องกันเอนไซม์ลงไป ในการทดลองนี้จะนำเดกซ์แทรนเนสมาทำแห้งด้วยการไลโอฟิไลซ์ โดยการเติมสารต่างๆลงไป ได้แก่ นมผงพร่องมันเนย, มอลโทส, แลคโทส, แอมโมเนียมซัลเฟต, กลีเซอรอล, แมนนิทอล, ไอโนซิทอล และ ซอร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 2, 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เพื่อช่วยรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการทำแห้ง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

พบว่าเดกซ์แทรนเนสหยาบและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมสารชนิดต่างๆ ยกเว้นกลีเซอรอล เมื่อผ่านการทำแห้งแล้วเอนไซม์ยังสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมด ในขณะที่การเติมกลีเซอรอลมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีในระหว่างการไลโอฟิไลซ์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เดกซ์แทรนเนสหยาบสามารถรักษาแอคติวิตีในระหว่างการไลโอฟิไลซ์ได้โดยไม่ต้องมีการเติมสารใดๆ

อย่างไรก็ตามสารชนิดต่างๆ อาจไม่จำเป็นระหว่างการไลโอฟิไลซ์ แต่หลังจากได้เดกซ์แทรนเนสแห้งแล้วต้องนำไปศึกษาอายุการเก็บรักษาเอนไซม์ ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของสารชนิดต่างๆ ที่มีต่ออายุการเก็บรักษาเอนไซม์หลังจากการไลโอฟิไลซ์ต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลของสารชนิดต่างๆ ต่อการทำเดกซ์แทรนเนสให้แห้งโดยการไลโอฟิไลซ์

สารต่างๆ	แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (หน่วยต่อมก.)		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
	ก่อนการไลโอฟิไลซ์	หลังการไลโอฟิไลซ์	
เดกซ์แทรนเนสหยาบ	195.61	200.95	102.73
กลีเซอรอล			
2%	191.82	38.15	19.89
4%	190.60	19.94	10.46
8%	198.23	2.10	1.01
ซอร์บิทอล			
2%	191.50	195.34	102.01
4%	184.18	184.69	100.28
8%	197.87	195.48	98.79
แมนนิทอล			
2%	184.28	185.90	100.88
4%	188.32	190.47	99.62
8%	186.37	186.76	100.21
ไอโนซิทอล			
2%	198.91	197.34	99.212
4%	192.60	193.80	100.62
8%	197.20	198.39	100.60
นมผงพร่องมันเนย			
2%	187.78	203.29	108.26
4%	184.50	168.63	91.40
8%	192.14	183.67	95.59

สารเติมแต่ง	แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (หน่วยต่อมก.)		แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
	ก่อนการไลโอฟิไลซ์	หลังการไลโอฟิไลซ์	
แอมโมเนียมซัลเฟต			
2%	203.24	200.03	98.41
4%	197.76	193.47	97.83
8%	196.98	190.73	96.87
มอลโทส			
2%	188.32	200.58	106.51
4%	199.53	183.36	91.90
8%	198.46	194.43	103.85
แลคโทส			
2%	200.06	183.09	91.51
4%	194.69	186.38	95.73
8%	189.93	178.36	93.90

กำหนดให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ก่อนการไลโอฟิไลซ์ของแต่ละการทดลองเท่ากับ 100%

4.9.2 ผลของสารชนิดต่างๆที่มีต่ออายุการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังจากการไลโอฟิไลซ์

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 ได้ทำการแปรผันความเข้มข้นของสารต่างๆ 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเติมสารต่างๆทั้ง 3 ความเข้มข้น มีแอคติวิตีคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน ดังนั้นจึงเลือกสารต่างๆ ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการศึกษาผลของสารที่มีต่ออายุการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ โดยจะทำการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส

ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสแห้งที่อุณหภูมิห้อง ดังแสดงในรูปที่ 4.41 จะเห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสแห้งปกติและเดกซ์แทรนเนสแห้งที่มีการเติมสารต่างๆ มีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกัน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 120 วัน เอนไซม์มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บเอนไซม์หยาบในรูปสารละลายจะมีแอคติวิตีเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ในเวลาเท่ากัน และจากการสังเกตลักษณะของเอนไซม์แห้งพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป เอนไซม์เริ่มมีความชื้นเพิ่มขึ้น ความชื้นหรือน้ำนี้อาจเป็นสาเหตุทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี จึงทำการทดลองเก็บเอนไซม์ในภาวะแห้งโดยการเติมซิลิกาเจลลงในระบบ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.42 โดยพบว่าซิลิกาเจลสามารถลดความชื้นภายในระบบทำให้เดกซ์แทรนเนสแห้งและเดกซ์แทรนเนสแห้งที่มีการเติมสารต่างๆ สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมดในช่วงระยะเวลา 60 วัน แสดงให้เห็นว่าความชื้นมีผลต่อการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ และซิลิกาเจลช่วยป้องกันความชื้นทำให้เอนไซม์สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้

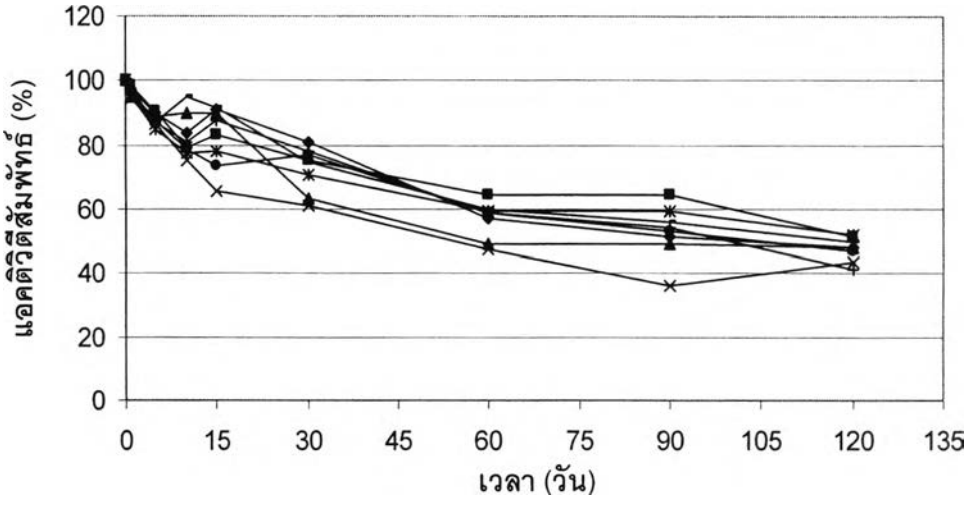
สำหรับผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสแห้งที่ 4 องศาเซลเซียส ได้แสดงไว้ในรูป 4.43 พบว่าเดกซ์แทรนเนสแห้งและเดกซ์แทรนเนสแห้งที่มีการเติมสารต่างๆ มีแนวโน้มการลดลงของแอคติวิตีใกล้เคียงกัน โดยในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการทดลอง เอนไซม์สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมด และเอนไซม์มีแอคติวิตีคงเหลือดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน เอนไซม์มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้ทำการทดลองเก็บเอนไซม์แห้งโดยการเติมซิลิกาเจลลงในระบบ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.44 เห็นได้ชัดเจนว่าซิลิกาเจลช่วยป้องกันความชื้นที่เกิดขึ้นระบบ ทำให้เอนไซม์สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ โดยเดกซ์แทรนเนสแห้งและเดกซ์แทรนเนสแห้งที่มีการเติมสารชนิดต่างๆสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน

สุดท้ายเป็นผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.45 พบว่าเดกซ์แทรนเนสแห้งและเดกซ์แทรนเนสแห้งที่มีการเติมสารต่างๆ สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมดแม้เวลาจะผ่านไปถึง 120 วัน และการเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นั้นทำให้ระบบมีความชื้นน้อยมาก ดังนั้นการเติมซิลิกาเจลลงในระบบจึงไม่มีความแตกต่างกันดังรูปที่ 4.46

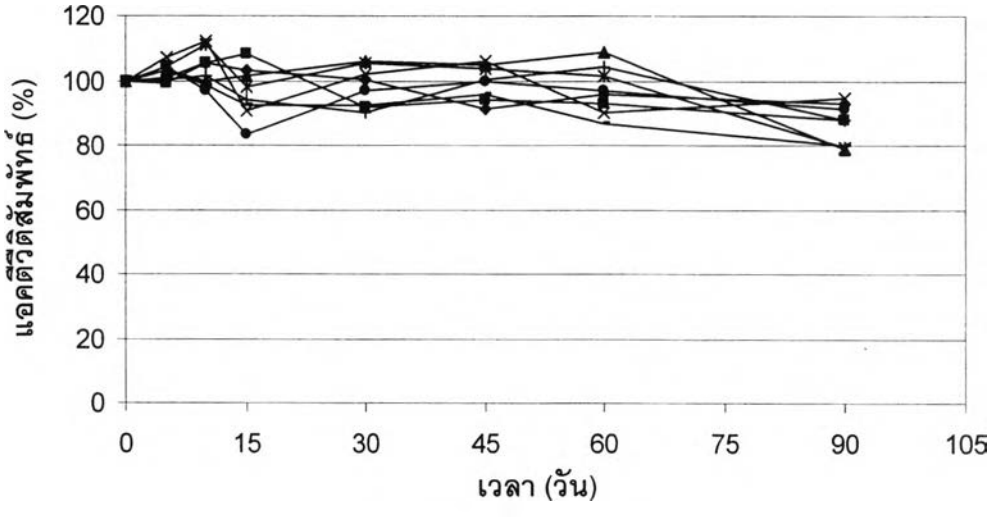
4.9.3 ผลอายุการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังจากการไลโอฟิไลซ์ภายใต้ภาวะสุญญากาศและป้องกันความชื้นด้วยซิลิกาเจล

จากผลการทดลองข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบการเก็บเดกซ์แทรนเนสแห้งกับเดกซ์แทรนเนสแห้งที่มีการเติมสารต่างๆ พบว่า สารต่างๆที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ นมผงขาดมันเนย, มอลโทส, แลคโทส, แอมโมเนียมซัลเฟต, แมนนิทอล, ไอโนซิทอลและซอร์บิทอล ไม่มีผลต่ออายุการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์

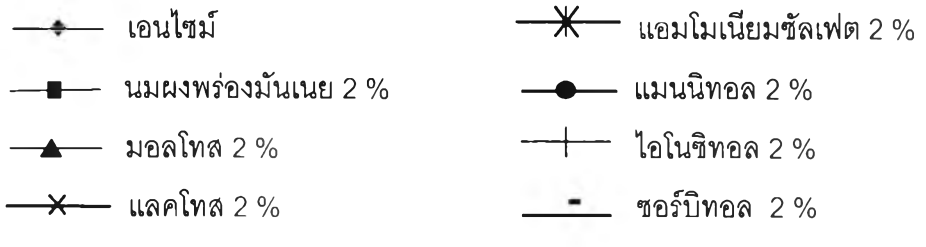
หลังจากนี้ขั้นตอนต่อไปทำการเก็บเดกซ์แทรนเนสแห้งที่ไม่เติมสารใดๆ โดยการบรรจุในถุงที่ทำให้เป็นสุญญากาศโดยใช้เครื่องดูดอากาศ เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเอนไซม์เมื่อมีความชื้นได้ พบว่าเดกซ์แทรนเนสแห้งทั้งที่เก็บที่ อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไปถึง 60 วัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.47



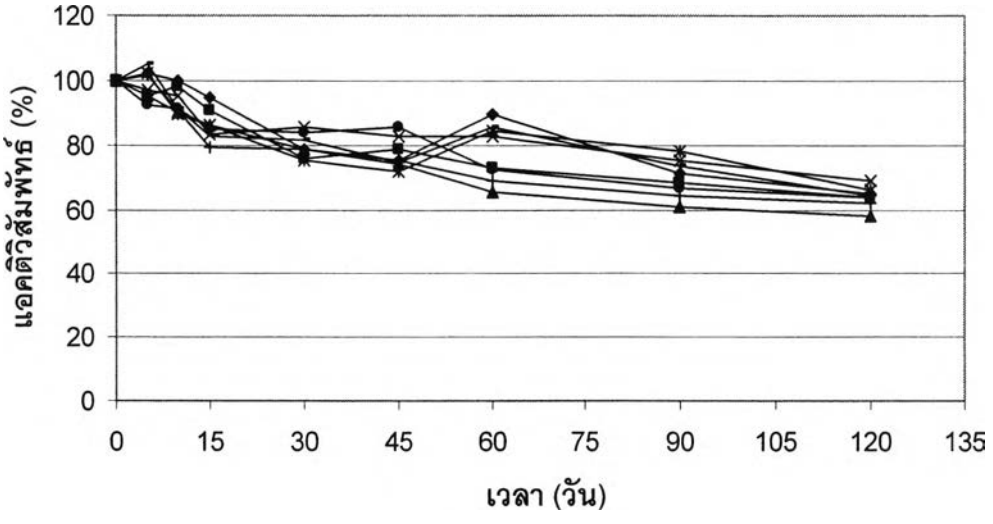
รูปที่ 4.41 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่อุณหภูมิห้อง



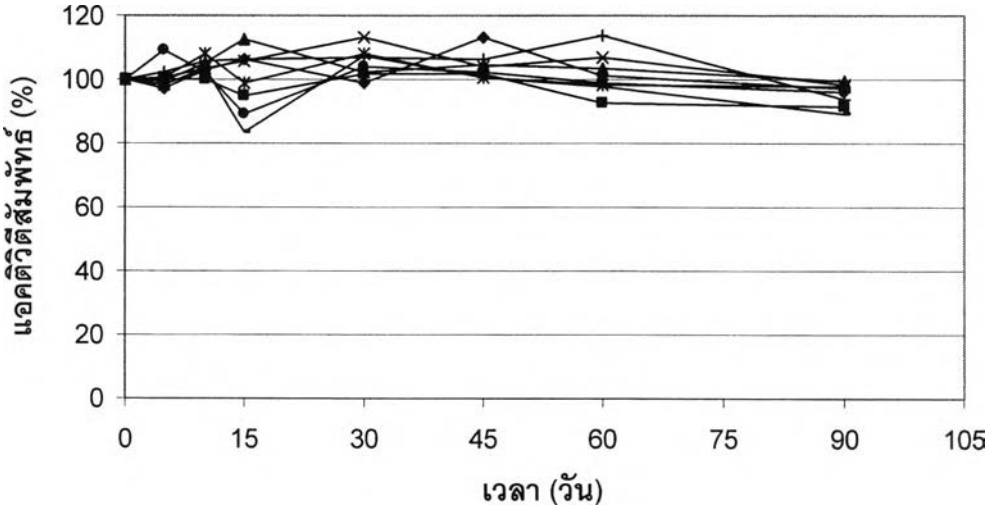
รูปที่ 4.42 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่อุณหภูมิห้องภายใต้ภาวะป้องกันความชื้นด้วยซิลิกาเจล



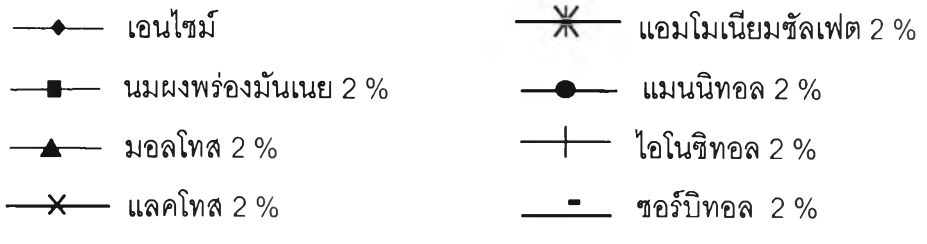
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



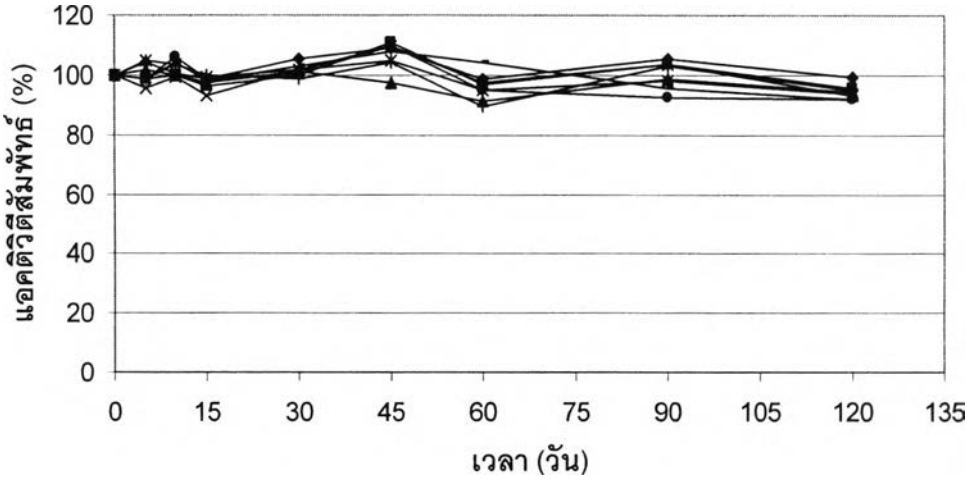
รูปที่ 4.43 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่ 4 องศาเซลเซียส



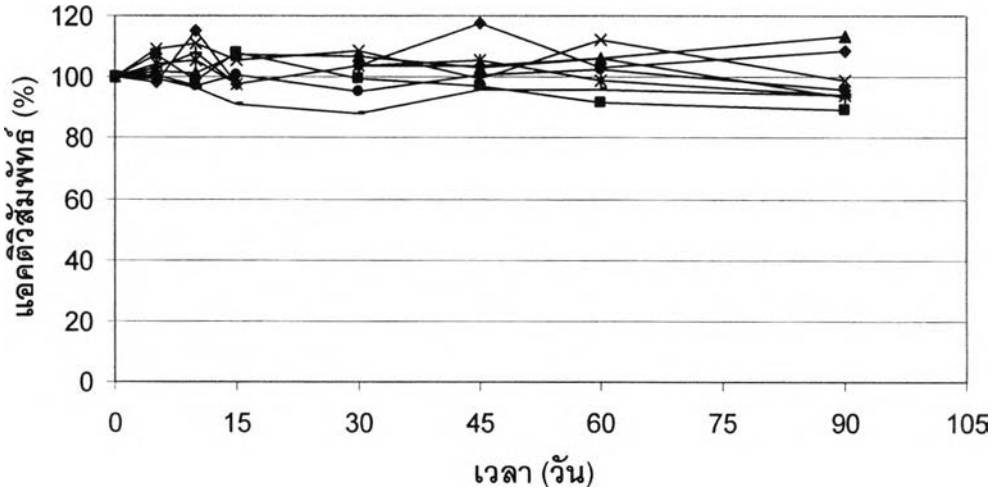
รูปที่ 4.44 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะป้องกันความชื้นด้วยซิลิกาเจล



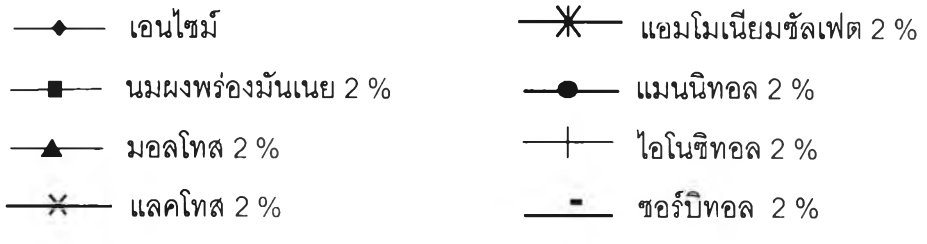
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



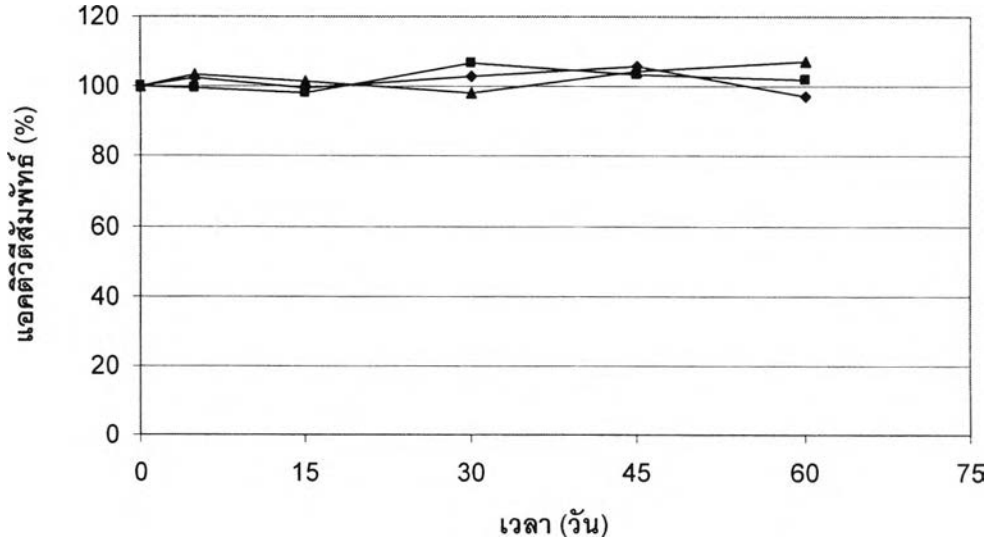
รูปที่ 4.45 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.46 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่ -20 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะป้องกันความชื้นด้วยซิลิกาเจล



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.47 ผลการเก็บเดกซ์แทรนเนสหลังการไลโอฟิไลซ์ ที่อุณหภูมิต่างๆ ภายใต้ภาวะสุญญากาศและป้องกันความชื้นด้วยซิลิกาเจล

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100 % คิดเทียบจากแอคติวิตีจำเพาะในวันแรกของการเก็บรักษาของแต่ละการทดลอง

4.10 การศึกษาสมบัติของเดกซ์แทรเนสที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ผ่านมาเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ผ่านมาพบว่าวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสได้แก่

1. การเก็บเดกซ์แทรนเนสหยาบที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส

2. การเก็บเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส

3. การเก็บเดกซ์แทรนเนสเข้มข้นที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเติมกลีเซอรอลหรือซอร์บิทอล

4. การทำเดกซ์แทรนเนสหยาบให้แห้งโดยการไลโอฟิไลซ์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะสุญญากาศและป้องกันความชื้นด้วยซิลิกาเจล

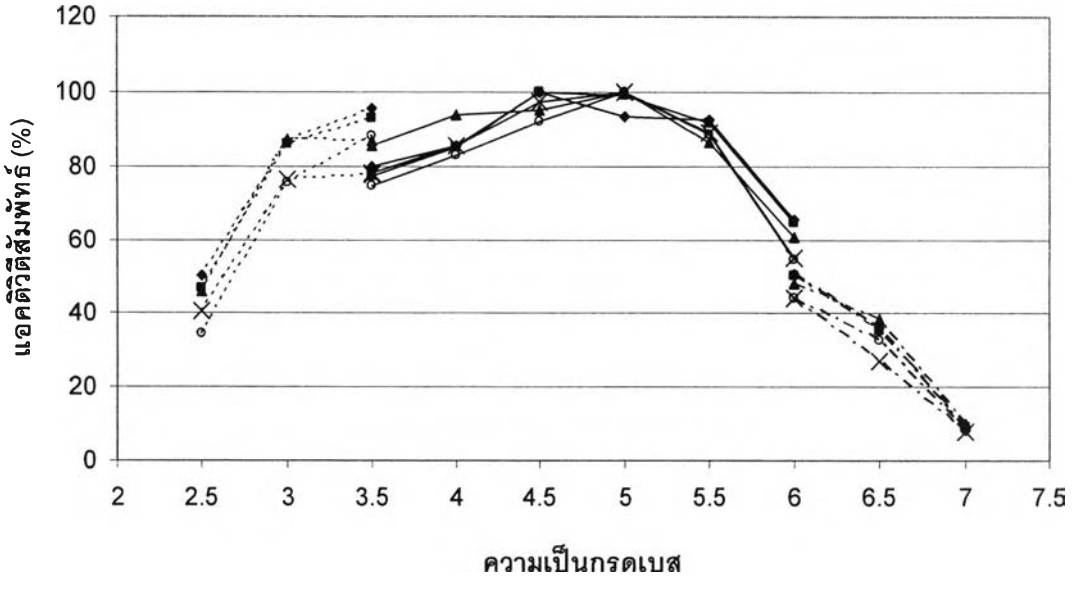
สำหรับขั้นตอนต่อไป ทำการศึกษาสมบัติบางประการของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ โดยคัดเลือกตัวอย่างของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บด้วยวิธีที่เหมาะสมมาทำการศึกษา 4 ตัวอย่าง ได้แก่ เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส, เดกซ์แทรนเนสแห้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส

4.10.1 ความเป็นกรดเบสและชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

หลังจากทำการแปรผันความเป็นกรดเบสในช่วง 2.5 – 7.0 และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์หยาบพบว่าไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่ความเป็นกรดเบส 2.5 – 3.5 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดเบส 6 – 7 ไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์ เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าน้อยกว่าการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ และพบว่าเมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจนถึงค่าความเป็นกรดเบส 4.5 จะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงที่สุด จากนั้นเมื่อเพิ่มความเป็นกรดเบสของอะซิเตตบัฟเฟอร์ขึ้นอีก พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บทั้ง 4 ตัวอย่างในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความสามารถในการทำงานใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนสหยาบและมีความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 4.5 – 5 ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.48

4.10.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

จากการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองตั้งแต่ 35 – 70 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.49 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น จะมีผลให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสเพิ่มขึ้น โดยที่เดกซ์แทรนเนสหยาบและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บทั้ง 4 ตัวอย่าง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากันคือที่ 55 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิอีกพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง แสดงให้เห็นว่า ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บไม่แตกต่างจากเดกซ์แทรนเนสหยาบ



รูปที่ 4.48 ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ

---■--- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

—■— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

-·-■-·- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

---◆--- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

—◆— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

-·-◆-·- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

---▲--- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

—▲— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

-·-▲-·- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

- -o- - ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

—o— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

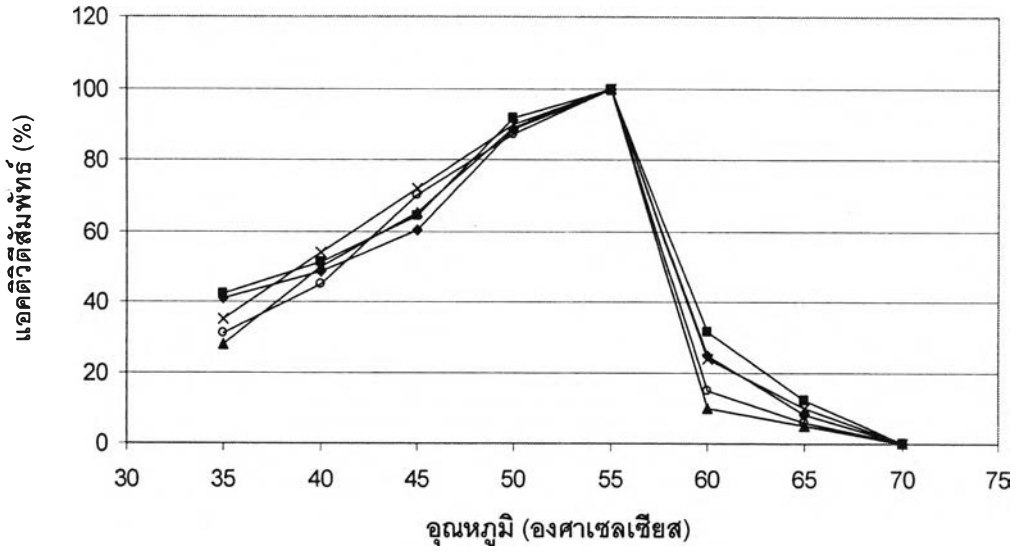
- -o- - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

- - X - - ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

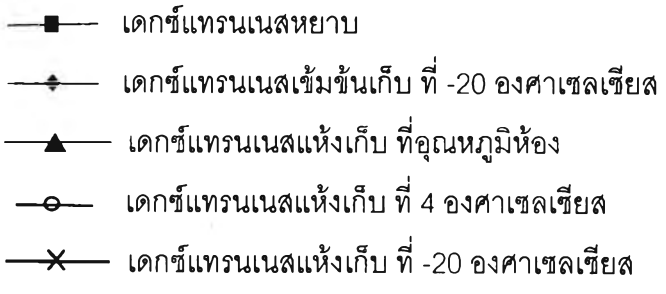
—X— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

- ·-X-·· ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง



รูปที่ 4.49 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ



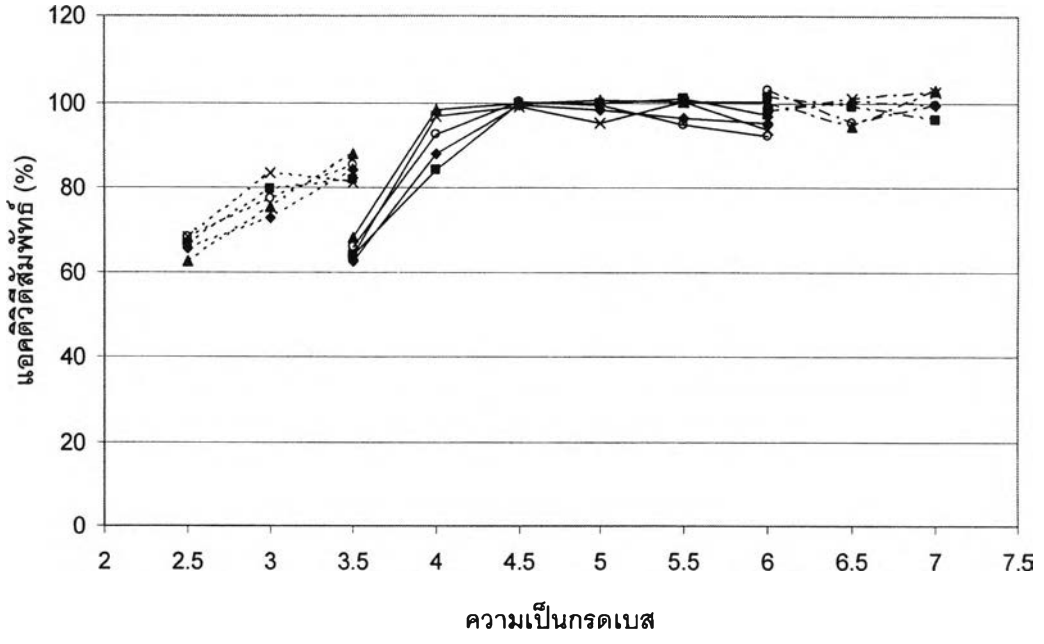
โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีสูงสุดของแต่ละการทดลอง

4.10.3 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

บ่มเดกซ์แทรนเนสหยาบและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่แปรผันความเป็นกรดเบสในช่วง 2.5 – 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.50 พบว่าเดกซ์แทรนเนสหยาบและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บมีความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสใกล้เคียงกันในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.5–7 โดยมีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 90–100 เปอร์เซ็นต์

4.10.4 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรเนสที่ผ่านการเก็บรักษาเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

นำเดกซ์แทรนเนสหยาบและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรผันอุณหภูมิในช่วง 35 - 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลืออยู่ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ผลการทดลองดังแสดงในรูป 4.51 พบว่าความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสหยาบและเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บมีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่เดกซ์แทรนเนสจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 35 – 45 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 และ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีแอคติวิตีคงเหลือประมาณ 90 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 65 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.50 ความเสถียรต่อความเป็นกรดเบสของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ

---■--- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

—■— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

---■--- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสหยาบ)

---◆--- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

—◆— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

---◆--- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

---▲--- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

—▲— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

---▲--- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

--o-- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

—o— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

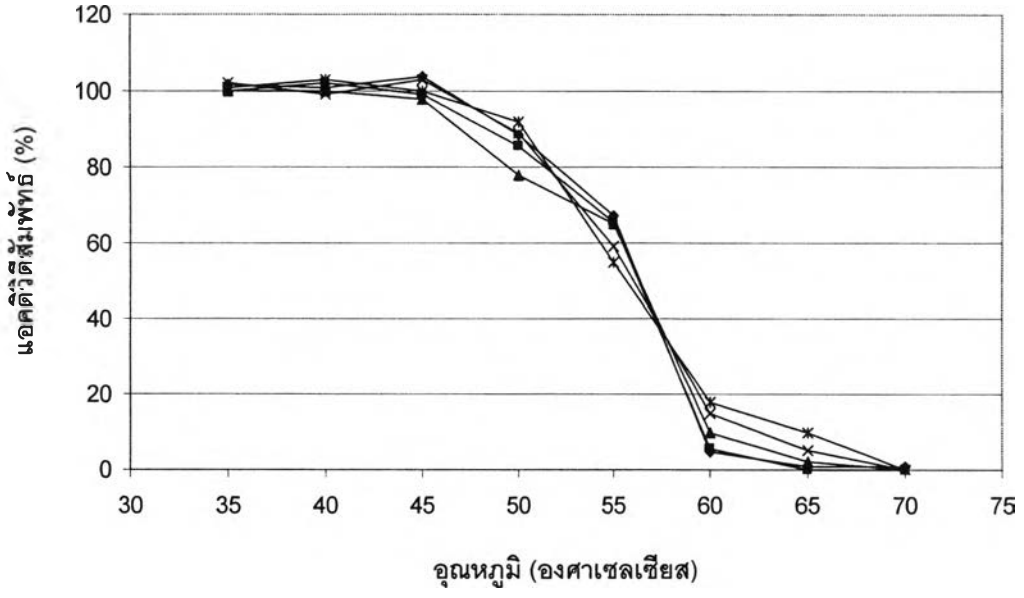
--o-- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

--×-- ไกลซีนไฮโรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

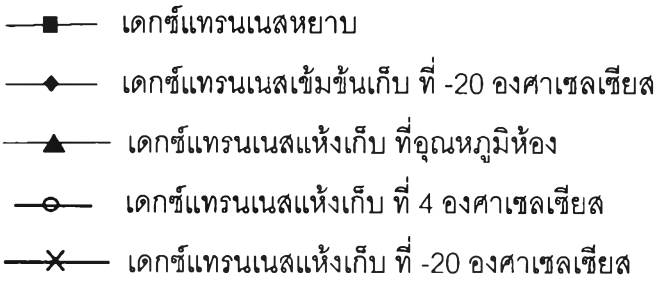
—×— อะซิเตตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

--×--- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส)

โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มของแต่ละการทดลอง



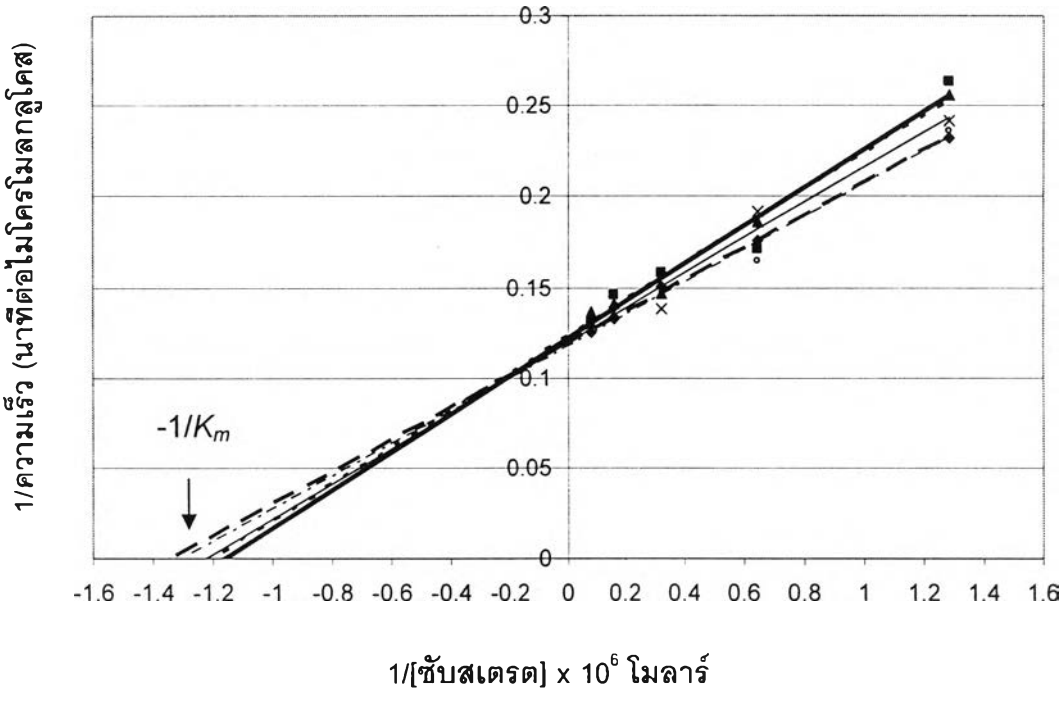
รูปที่ 4.51 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ



โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ 100% คิดเทียบจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ไม่ได้บ่มของแต่ละการทดลอง

4.10.5 การหาค่าความจำเพาะต่อซับสเตรต (K_m) เดกซ์แทน ที-2000 ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ

การทดลองนี้ได้ศึกษาความจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบ โดยแปรผันความเข้มข้นของซับสเตรต เดกซ์แทรน ที-2000 แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟตามวิธีของไลน์วีเวอร์-เบิร์ก (Linewever-Burk plot) ดังแสดงในรูปที่ 4.52 พบว่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสหยาบ มีค่าเท่ากับ 0.87 ไมโครโมลาร์ และเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บได้แก่ เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส, เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ –20 องศาเซลเซียส มีค่า K_m เท่ากับ 0.76, 0.83, 0.79 และ 0.83 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บด้วยวิธีต่างๆมีความจำเพาะต่อซับสเตรตใกล้เคียงกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ



รูปที่ 4.52 การประมาณค่า K_m โดยวิธีไลน์วีเวอร์ - เบิร์ก (Linewever – Burk plot) ของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ เมื่อใช้เดกซ์แทรน ที – 2000 เป็นซับเสตรต

——— เดกซ์แทรนเนสหยาบ

..... เดกซ์แทรนเนสเข้มข้นเก็บ ที่ -20 องศาเซลเซียส

– – – – เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บ ที่อุณหภูมิห้อง

——— เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บ ที่ 4 องศาเซลเซียส

▬ ▬ เดกซ์แทรนเนสแห้งเก็บ ที่ -20 องศาเซลเซียส