บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

จากข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวไปแล้ว การนำเดกซ์แทรนเนสไปใช้ในโรงงานน้ำตาลจะต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมากจึงต้องมีการผลิตสะสมไว้ล่วงหน้าก่อนถึงฤดูการผลิตในแต่ละปี ธรรมชาติของเอนไซม์คือโปรตีนที่จะเสื่อมสภาพไปในขั้นตอนการเก็บ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนสให้มีความเสถียรและมีแอคติวิตีเหลือเพียงพอต่อการนำไปใช้

5.1 การเตรียมเดกซ์แทรนเนสก่อนการเก็บรักษา

ขั้นตอนแรกเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของโปรติเอสในน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยนำส่วนน้ำใสที่ผลิตได้มาทดสอบการทำงานของโปรติเอสในจานวุ้นที่ผสมนมผงพร่องมันเนย ผลการทดลองพบว่าส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp สายพันธุ์ SMCU 3-14 ไม่มีการปนเปื้อนด้วยโปรติเอส แสดงว่าโปรติเอสจะไม่มีผลต่อการรักษาความเสถียรของเอนไซม์ในการทดลองต่อไป

ความเป็นกรดเบสของสารละลาย เป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เอนไซม์อยู่ในโครงสร้างที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถรักษาความเสถียรไว้ได้ ต่อมาจึงทำการศึกษาผลของความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ พบว่าเดกแทรนเนสเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วงกรด และเมื่อความเป็นกรดเบสเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 6 – 7 ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรใกล้เคียงกัน โดยที่ความเป็นกรดเบส 6.5 เดกซ์แทรนเนสมีแอคติวิตีคงเหลือมากที่สุด

สำหรับขั้นตอนต่อไปเป็นการเตรียมเอนไซม์ก่อนนำไปเก็บรักษา โดยเดกซ์แทรนเนสหยาบที่ผลิตได้ นำมาทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอน สารที่เลือกใช้ในการตกตะกอน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต เอทานอล และอะซีโตน ซึ่งเป็นที่ทราบกันแพร่หลายแล้วว่าแอมโมเนียมซัลเฟตตกตะกอนเอนไซม์โดยอาศัยหลักการ "Salting out" ในขณะที่สารละลายอินทรีย์คือ อะซีโตนและเอทานอลจะมีผลทำให้ค่า Dielectric constant ของสารละลายลดลงทำให้โปรตีนตกตะกอน (Scopes, 1994) และจากผลการทดลองพบว่าอะซีโตนเหมาะสมที่สุดในการตกตะกอนเดกซ์แทรนเนสเพราะใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุด และทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีคงเหลือมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ

การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและเอทานอล นอกจากนี้การตกตะกอนด้วยอะซีโตนยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นจึงเลือกใช้อะซีโตนในการทำเดกซ์แทรนเนสให้เข้มข้นเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5.2 เปรียบเทียบการเก็บเดกซ์แทรนเนสในรูปเอนไซม์หยาบกับเอนไซม์เข้มข้นที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน

พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน มีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์หยาบเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส โดยมีแอคติวิตีคงเหลือมากกว่าเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสอดคล้องกับ Eggleston และ Monge (2005) ที่รายงานว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการทำเข้มข้นจะมีแอคติวิตีคงเหลือมากกว่าเดกซ์แทรนเนสหยาบเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน การที่เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนมีความเสถียรมากกว่าอาจเนื่องมาจาก ในระหว่างการตกตะกอนโปรตีนอื่นๆและสิ่งที่เจือปนอยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ถูกทำให้ตกตะกอนลงมาและแยกออกไปทำให้เดกซ์แทรนเนสมีความบริสุทธิ์ขึ้นส่งผลให้เอนไซม์มีเสถียรภาพมากขึ้น

5.3 ผลของอุณหภูมิต่อการรักษาความเสถียรของเดกซ์แทรนเนส

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส คือ การเก็บแบบแช่แข็งที่ -20 และ -70 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์สามารถรักษาแอคติวิตีทั้งหมดไว้ได้เมื่อเวลาผ่านไปถึง 240 วัน เนื่องจากการเก็บแบบแช่แข็งจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์ไม่มีการเคลื่อนที่ (Pikal และคณะ, 1991 และ Hora และคณะ, 1992) จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ส่งผลให้เอนไซม์อยู่ในสภาพที่เสถียร เมื่อเปรียบเทียบการเก็บที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เอนไซม์อยู่ในรูปสารละลายทำให้สามารถเคลื่อนที่ไปมาได้ อาจส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียโครงสร้างและแอคติวิตีตามมา

5.4 ผลของสารเติมแต่งที่ใช้ร่วมในการเก็บรักษาเดกซ์แทรนเนส

แม้ว่าการเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำจะให้ผลที่ดีในการรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่หากต้องเก็บในปริมาณมากจะเป็นผลให้ต้นทุนในการเก็บสูงตามมาด้วย ดังนั้นหากสามารถเก็บเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิห้องหรือ 4 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเติมสารต่างๆเพื่อช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ จะสามารถช่วยลดต้นทุนในการเก็บได้

การเสื่อมสภาพของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสารละลาย เกิดเนื่องมาจากการรวมตัวและการตกตะกอนของโปรตีน (Pikal และคณะ, 1991) ซึ่งเป็นผลให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้มีความพยายามที่จะเติมสารชนิดต่างๆ ที่มีรายงานว่าช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้

สำหรับสารเติมแต่งในกลุ่มของน้ำตาลและพอลิออลนั้นมีรายงานการใช้อย่างแพร่หลาย โดยจากรายงานของ Singer และคณะ (1998) พบว่า ทรีฮาโลส ซูโครส และกลูโคส ช่วยยับยั้งการตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Guiavarc'h และคณะ (2003) ที่กล่าวว่า ซูโครส และทรีฮาโลส มีผลทำให้เพกตินเมทิลเอสเทอเรส (Pectinmethylesterase) มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงขึ้นแสดงให้เห็นจากค่า D-value ของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้น Kaushik และคณะ (1998) พิจารณาผลของพอลิออลชนิดต่างๆ ในการเป็นตัวช่วยรักษาความเสถียรของโปรตีน พบว่า ไอโนซิทอล มีความสามารถในการรักษาความเสถียรได้มากที่สุด รองลงมาคือ แมนนิทอล และ ซอร์บิทอล และ Costa และคณะ (2002) รายงานผลของพอลิออลต่อความเสถียรของ แคทาเลส (Catalase) พบว่า กลีเซอรอลและพอลิเอทิลีนไกลคอล ช่วยเพิ่มอายุการเก็บและความเสถียรของแคทาเลสที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส และช่วยให้เอนไซม์เสถียรต่อความเป็นกรดเบสที่เพิ่มขึ้น นอกจากน้ำตาลและพอลิออลจะช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้แล้ว Goller และคณะ (1999) รายงานว่าซัลเฟตไอออน ในแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมซัลเฟต ช่วยรักษาความเสถียรของแลคเททดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ได้ดีกว่าการใช้ทรีฮาโลสและซูโครส

อย่างไรก็ตามกลไกของสารเหล่านี้ที่มีผลต่อการรักษาความเสถียรของเอนไซม์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่อาจสามารถอธิบายได้โดยทฤษฎี Preferential exclusion ของ Arakawa และ Timasheff (1982, 1985) ที่กล่าวว่า เมื่อเติมสารต่างๆเหล่านี้ลงไปในสารละลาย จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ไม่เหมาะสม ชักนำให้โปรตีนเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารละลายมากขึ้น เป็นผลให้โครงสร้างของโปรตีนมีความแข็งแรงและเสถียรเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Levine และคณะ (1991) ยังเสนอว่าสารเติมแต่งเหล่านี้อาจช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ โดยป้องกันโมเลกุลของเอนไซม์จากแรงกระทำระหว่างผิวหน้าของสารละลายกับอากาศ

แต่ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่า สารในกลุ่มต่างๆ ดังกล่าวนี้ ได้แก่ น้ำตาล พอลิออล และเกลือไม่มีผลในการช่วยรักษาความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสเมื่อเก็บเป็นเวลานาน ไม่ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือ 4 องศาเซลเซียส การที่สารต่างๆ เหล่านี้ช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ แต่ไม่ช่วยรักษาความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสนั้น น่าจะเป็นผลมาจากความแตกต่างทาง

ชีวเคมีของเอนไซม์แต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น Manson และ Combes (1984) รายงานว่าซอร์บิทอลมีผลในการรักษาความเสถียรของอินเวอร์เทสดีกว่ากลีเซอรอล ในขณะที่ Guiavarc และคณะ (2003) พบว่ากลีเซอรอลสามารถรักษาความเสถียรของเพกตินเมทิลเอสเทอเรส ได้ดีกว่าซอร์บิทอล เห็นได้ชัดว่าผลของสารต่างๆ ในการรักษาความเสถียรของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย (Lippert และ Galinski, 1992)

กรดอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะมีผลในการช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์โดยทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) แต่เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสก่อนการเก็บรักษาได้มีการเติมโซเดียมเอไซด์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน ผลที่ได้จากการเติมกรดอินทรีย์จึงไม่มีความแตกต่าง ในขณะที่เมื่อศึกษาผลของกรดอินทรีย์ในเอนไซม์ที่ไม่ได้เติมโซเดียมเอไซด์ พบว่ากรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่เลือกใช้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มีผลทำให้ความเป็นกรดของสารละลายเพิ่มขึ้น และส่งผลให้ความเสถียรของเดกซ์แทรนเนสลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการคัดเลือกความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ที่แสดงให้เห็นว่าเดกซ์แทรนเนสสูญเสียแอคติวิตีเมื่อความเป็นกรดของสารละลายเพิ่มขึ้น

สำหรับการใช้พอลิเมอร์ในการรักษาความเสถียรของเอนไซม์นั้น Kuhlmeler และ Klein (2003) ได้รายงานการใช้พอลิไวนิลแซคคาร์ไรด์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นและเอาโมเลกุลของน้ำตาลเข้าไปจับ โดยนำไปใช้ในการศึกษาความเสถียรของฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดสพบว่าความสามารถในการรักษาความเสถียรขึ้นอยู่กับระดับของการก่อการเชื่อมไขว้ (degree of polymerization) และชนิดของน้ำตาลที่เข้าจับ นอกจากนี้ Gomez และ Villalonga (2000) รายงานการรักษาความเสถียรของอินเวอร์เทสโดยทำการออกซิไดส์ตรงบริเวณส่วนของคาร์โบไฮเดรตของเอนไซม์ก่อน แล้วจึงนำมาเชื่อมกับไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนท์ พบว่าเอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตที่ 65 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นจาก 5 นาที เป็น 5 ชั่วโมง

แต่จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าเดกซ์แทรน ไคโตนซาน และ เซลลูโลส ที่นำมาใช้ไม่มีผลในการช่วยรักษาความเสถียรของเดกซ์แทรนเนส อาจเนื่องมาจากพอลิเมอร์ที่นำมาใช้อยู่ในสภาพธรรมชาติ (native form) ไม่ได้มีการดัดแปลงโครงสร้างจึงเข้าจับกับเดกซ์แทรนเนสได้ยากกว่า อย่างไรก็ตาม Gibson แ ละคณะ (1993) รายงานว่าการใช้เดกซ์แทรนในสภาพธรรมชาติ มีผลในการช่วยรักษาแอคติวิตีของแอลกอฮอล์ออกซิเดสได้ดีกว่า DEAE-dextran ดั้งนั้นการคัดเลือกหาชนิดของพอลิเมอร์ที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงชนิดของเอนไซม์ด้วย

จากรายงานของ Dolapchiev และ Vassilev (1981) พบว่าอัลบูมินสามารถดูดซับสิ่งเจือปนที่อยู่ในสารละลายทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ แต่จากผลการทดลองพบว่า อัลบูมินไม่แสดงผลในการช่วยรักษาความเสถียรของเดกซ์แทรนเนส เพราะในขั้นตอนการตกตะกอนถือว่าเป็นการลดสิ่งสกปรกที่เจือปนอยู่ออกไปได้ส่วนหนึ่งแล้ว

ส่วนการรักษาความเสถียรของเอนไซม์โดยสารละลายอินทรีย์นั้น พบว่าทั้งอะซีโตนและเอทานอล นอกจากจะไม่มีผลในการช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์แล้ว ยังทำให้เดกซ์แทรนเนสสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว เป็นผลมาจากการที่ทั้งอะซีโตนและเอทานอลเป็นสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง ซึ่งจะสามารถแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ที่ผิวหน้าของโปรตีนเป็นผลทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพได้ ดังนั้นควรใช้สารละลายอินทรีย์ประเภทที่ไม่มีขั้วจะสามารถรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้ดีกว่า (Santucci และคณะ, 2002)

อีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการรักษาความเสถียรของเอนไซม์ในรูปสารละลาย คือ การก่อการเชื่อมไขว้ (cross-linking) ของโมเลกุลของโปรตีนโดยอาศัยสารไบฟังก์ชันนอล โดยวิธีการนี้จะสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน สำหรับสารไบฟังก์ชันนอล ที่นิยมใช้คือ กลูตารัลดีไฮด์ การที่กลูตารัลดีไฮด์จับกับเอนไซม์จะทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า Crosslinked enzyme crystals ('CLECs') (Goverdhan, 1999) ทำให้เอนไซม์มีอายุการเก็บนานขึ้น และเสถียรในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง หรือมีปัจจัยอื่นรบกวน นอกจากนี้ 'CLECs' ยังสามารถแยกจากสารละลายได้ง่ายและสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก ซึ่งอาจเปรียบได้ว่าเป็นการตรึงรูปเอนไซม์วิธีหนึ่ง สำหรับเอนไซม์ที่ได้มีการนำมารักษาความเสถียรโดยวิธีนี้ ได้แก่ ไลเปส, เพนนิซิลินอาซิเลส, ซับทิลิซิน และ เทอร์โมไลซิน (Fagain, 2003) แต่เมื่อนำเทคนิคนี้มาใช้กับเดกซ์แทรนเนส พบว่าวิธีการดังกล่าวไม่เหมาะที่จะใช้รักษาความเสถียร เพราะจากผลการทดลองพบว่า การใช้กลูตารัลดีไฮด์เพียง 5 มิลลิโมลาร์ มีผลให้เดกซ์แทรนเนสสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดภายในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับรายงานของ นฤมล วงศาสุข (2547) ที่กล่าวว่า เมื่อกลูตารัลดีไฮด์สัมผัสกับโมเลกุลของเดกซ์แทรนเนสโดยตรงจะมีผลทำลายสภาพของเอนไซม์แต่หากใช้เป็นสารช่วยตรึงกับทรายจะทำให้เดกซ์แทรนเนสมีความเสถียรเพิ่มขึ้น

5.5 การเก็บเดกซ์แทรนเนสโดยวิธีไลโอฟิไลซ์เซชัน

โดยทั่วไปพบว่าการเก็บเอนไซม์ในรูปสารละลายจะสูญเสียแอคติวิตีเร็วกว่าเก็บแบบแห้ง (Geigert, 1989) ดังนั้นไลโอฟิไลซ์เซชันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ในระยะยาว (Van และคณะ, 1997 และ Haentjens และคณะ, 1998 และ Guiavarc และคณะ, 2002) เหมาะสำหรับเอนไซม์ที่ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย (Carpenter และคณะ, 1987, 1988) เช่น เดกซ์แทรนเนส

การเก็บแบบไลโอฟิไลซ์นั้นเป็นการนำน้ำออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้ลดการเคลื่อนที่อย่างอิสระของโมเลกุลและเป็นการยับยั้งการเปลี่ยนโครงสร้างซึ่งจะทำให้เอนไซม์สามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ (Monsan และ Combes, 1987) แต่ในระหว่างขั้นตอนการไลโอฟิไลซ์อาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปได้ เนื่องจากมีการทำให้แข็งและแห้งอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในกรณีของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย (Crowe และคณะ, 1990 และ Yasui และ Hashimoto, 1966 และ Nai-teng และคณะ, 1972) ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารที่มีสมบัติในการป้องกันโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งได้แก่ สารในกลุ่มของ น้ำตาล พอลิออล และโปรตีน (Arakawa และคณะ, 1993 และ Skrabonja และคณะ, 1994 และ Hellman และคณะ, 1983 และ Prestelski และคณะ,1993)

กลไกในการรักษาความเสถียรของเอนไซม์ในการไลโอฟิไลซ์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากรายการที่ผ่านมามีผู้เสนอทฤษฎีในการรักษาความเสถียรไว้ 2 ทฤษฎี ทฤษฎีแรกคือ The water replacement (Carpenter และคณะ, 1988) อธิบายได้ว่าในระหว่างการดึงน้ำออก เอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้สูญเสียแอคติวิตี (Prestrelski และคณะ, 1993) ดังนั้นสารเติมแต่งที่เติมลงไปจะเข้าไปแทนที่น้ำเพื่อช่วยป้องกันไม่ให้เอนไซม์เปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้ช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ไว้ได้ ทฤษฎีที่สองคือ The glassy state (Frank และคณะ, 1991) ซึ่งอธิบายได้ว่า การที่โมเลกุลของเอนไซม์อยู่อย่างสงบนิ่งภายในผลึกของสารเติมแต่งที่เติมลงไปเป็นการจำกัดการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ซึ่งจะส่งผลให้การตกตะกอน การรวมกลุ่ม และการเสื่อมสภาพของโปรตีนลดลง (Craig และคณะ, 1999)

และจากผลการทดลองพบว่าเดกซ์แทรนเนสเมื่อผ่านการไลโอฟิไลซ์มีแอคติวิตีคงเหลือถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องมีการเติมสารเติมแต่งใดๆ ดังนั้นการรักษาแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสสามารถอธิบายได้ด้วย ทฤษฎี The glassy state คือ เมื่อโมเลกุลของเดกซ์แทรนเนสอยู่ในสภาพที่

สงบนิ่งไม่มีการเคลื่อนที่ทำให้สามารถรักษาความเสถียรไว้ได้ อย่างไรก็ตามเดกซ์แทรนเนสที่มีการเติมสารเติมแต่งชนิดต่าง ๆ ลงไปพบว่ามีแอคติวิตีคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารที่เลือกมาใช้ไม่มีผลในการทำลายโครงสร้างของโปรตีน

เดกซ์แทรนเนสแห้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เอนไซม์มีความชื้นเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลต่อการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ ตรงกับรายงานของ Vasiljevic และ Jelen (2003) ที่ศึกษาการเก็บบีตากาแลคโตซิเดส (ß-galactosidase) โดยการไลโอฟิไลซ์ร่วมกับการเติมแลคโทสและนมผงพร่องมันเนย พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 วัน ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์และ Water activity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เอนไซม์เสียแอคติวิตี โดยความชื้นที่สูงขึ้นมีผลทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพเร็วขึ้นด้วย ผลของความชื้นที่เกิดขึ้นในการเก็บเดกซ์แทรนเนสแห้งได้แก้ปัญหาโดยการเติมซิลิกาเจลลงในระบบทำให้ความชื้นลดลง และทำให้เดกซ์แทรเนสแห้งที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีแอคติวิตีคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเป็นเวลา 90 วัน

อย่างไรก็ตามซิลิกาเจลเพียงอย่างเดียวไม่อาจส่งผลต่อการรักษาความชื้นในระยะยาวได้ เพราะในระบบจะมีความชื้นสะสมเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บ โดยความชื้นที่อยู่ในระบบจะชักนำให้เกิดปฏิกิริยาการทำลายเอนไซม์ (deterioactive reaction) เช่น การเกิดออกซิเดชันของเอนไซม์ และการถูกย่อยสลายด้วยโปรติเอส เพราะกลไกการเก็บรักษาเอนไซม์ของเราจะสามารถรักษาแอคติวิตีของโปรติเอสไว้ด้วย (Schwimmer, 1980) แต่จากการตรวจสอบในขั้นตอนการเตรียมเดกซ์แทรนเนสพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของโปรติเอส ดังนั้นการสูญเสียแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในการทดลองนี้ จึงน่าจะเกิดจากการเกิดออกซิเดชันที่โมเลกุลของเดกซ์แทรนเนส นอกจากนี้ถ้ามีความชื้นเกิดขึ้นจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยชักนำให้เกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนของโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (Yoshioka และคณะ, 1993)

ดังนั้นขั้นตอนสุดท้าย จึงทำการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของเดกซ์แทรนเนสโดยนำเดกซ์แทรนเนสแห้งบรรจุในถุงที่ทำให้เป็นสภาพสุญญากาศโดยใช้เครื่องดูดอากาศ ร่วมกับการเติมซิลิกาเจล พบว่าเมื่อไม่มีความชื้นและออกซิเจนจะส่งผลให้เดกซ์แทรนเนสสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้

5.6 เปรียบเทียบสมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บด้วยวิธีต่างๆและเดกซ์แทรนเนสหยาบ

โดยจากผลการทดลองที่ 4.9 พบว่าเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ มีค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 4.5 – 5 และเดกซ์แทรนเนสหยาบเท่ากับ 4.5 ซึ่งมีความใกล้เคียงกัน และจากตรวจสอบผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานพบว่า ทั้งเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บและเดกซ์แทรนเนสหยาบอยู่ที่ 55 องศาเซลเซียส เท่ากัน รวมถึงความเสถียรต่อความเป็นกรดเบส และความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ก็อยู่ในช่วงเดียวกัน สุดท้ายเมื่อพิจารณาถึงความจำเพาะต่อซับสเตรต พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการเก็บทั้ง 4 แบบ มีค่าคงที่ไมคิลิส (K_m) ใกล้เคียงกับเอนไซม์หยาบ ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดทำให้สรุปได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไปสมบัติของเดกซ์แทรนเนสที่ผ่านการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับเดกซ์แทรนเนสหยาบ