บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาการตรึงเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* A11 ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาของอุไรวรรณ รัชธร (2536) ได้นำเอนไซม์ CGTase จากเชื้อเดียวกันนี้มาตรึงบนตัวค้ำด้วยพันธะไอออนิก โดยใช้ DEAE - cellulose เป็นตัวค้ำ พร้อมทั้งศึกษาสมบัติและการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงนั้น ถึงแม้เอนไซม์ตรึงบน DEAE-cellulose จะมีประสิทธิภาพใช้งานได้ดี แต่อาจไม่เหมาะสมในด้านการผลิตสเกลใหญ่ขึ้น เนื่องจากราคาของตัวค้ำสูง อีกทั้งต้องควบคุมการเปลี่ยน pH และ ionic strength อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงต้องการทดลองหาตัวค้ำชนิดอื่นและวิธีการที่เหมาะสมในการตรึง CGTase บนตัวค้ำนั้น โดยต้องคำนึงถึงปัจจัยในการลงทุนและการควบคุมในระดับสเกลใหญ่ด้วย

ในขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ก่อนนำมาใช้ตรึงด้วยวิธีต่าง ๆ ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ควรจะพิจารณาได้แก่ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ เนื่องจากถ้าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ จะทำให้สิ่งเจือปนรบกวนการตรึง โดยอาจจะแย่งจับกับตัวค้ำ ทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงต่ำลง (Messing, 1975) ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ CGTase ที่ได้มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนก่อนด้วยวิธี starch adsorption โดยให้เอนไซม์จับกับแป้งด้วยแรงดูดซับ โดยอาศัยหลักความจำเพาะของการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1988) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 15 เท่า (ตารางที่ 3.1) ซึ่ง Nakamura และ Horikoshi (1977) รวมทั้ง อุไรวรรณ รัชธร (2536) ได้รายงานการใช้วิธี starch adsorption ในการทำให้เอนไซม์ CGTase มีความบริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ตรึงบนตัวค้ำเช่นกันสำหรับในขั้นตอนนี้ ได้ทำ

ต่างจาก อุไรวรรณ รัชธร (2536) คือ เตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนในขั้นตอนสุดท้ายให้อยู่ในสารละลาย แอซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 เนื่องจากถ้าทำในสารละลาย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.5 เหมือนที่รายงาน เอนไซม์จะมีประจุลบมากเกินไป ไม่เหมาะสมกับตัวค้ำที่จะใช้ตรึงเอนไซม์ด้วยหลักการดูดซับแบบกายภาพ

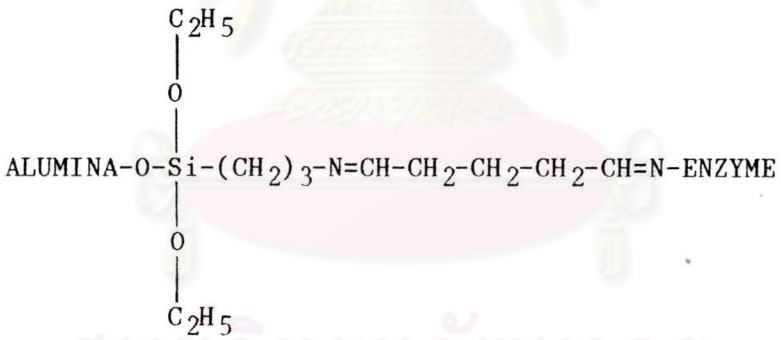
งานวิจัยนี้ได้ทดลองตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพบนตัวค้ำชนิดต่าง ๆ สำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้มีข้อดีหลายประการได้แก่ วิธีการตรึงสามารถทำได้สะดวก รวมทั้งใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในการตรึง ทำให้ไม่มีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติ และแอคติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังมีต้นทุนในการผลิตต่ำ และสามารถนำตัวค้ำกลับมาใช้ใหม่ได้ (Chibata, 1978) องค์ประกอบที่สำคัญประการหนึ่งสำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ ได้แก่ ประเภทของตัวค้ำ โดยงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ตัวค้ำที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ ไคโตแซน อะลูมินา คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน และซิลิกา จากการทดลองพบว่า ซิลิกาและเม็ดแก้วพรุนจะตรึงเอนไซม์ CGTase ได้ดีกว่าไคโตแซน คาร์บอน และอะลูมินา โดยสามารถตรึงเอนไซม์ได้ติด 19 และ 54 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) จากผลงานวิจัยของ Steighardt และ Kleine (1993) ที่ได้ทดลองตรึงเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus macerans* บนตัวค้ำชนิดต่างๆด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพแล้ว พบว่าเม็ดแก้วพรุนเป็นตัวค้ำที่เหมาะสมที่สุดโดยสามารถตรึงเอนไซม์ได้ประมาณ 7 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการตรึงเอนไซม์ CGTase บนซิลิกาในงานวิจัยนี้ประมาณ 9 เท่า สำหรับในงานวิจัยนี้ได้เลือกซิลิกาซึ่งชนิดที่ใช้เป็นแบบควบคุมขนาดรูพรุนเท่ากับ 60 A^{o} เป็นตัวค้ำที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ

ในการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนซิลิกามาทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในคอลัมน์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40^{0} ซ และป้อนสับสเตรทแป้งเข้าทางด้านบนคอลัมน์ พบว่าเอนไซม์ CGTase จะหลุดออกจากคอลัมน์ตลอดเวลาในระหว่างการใช้งาน ทั้งนี้การที่เอนไซม์หลุดจากตัวค้ำได้ง่ายอาจเป็นเพราะแรงที่ยึดเอนไซม์ไว้บนผิวซิลิกานั้น เป็นแรง electrostatic ระหว่างประจุบวกบนโปรตีนกับหมู่ SiO^{-} ของซิลิกา (Kaul และ Mattiasson, 1990) ซึ่งเป็นแรงที่ค่อน

ข้างอ่อน นอกจากนั้นการหลุดของเอนไซม์ อาจเป็นเพราะการมีสับสเตรทเติมลงไปในระบบ (Treven, 1980; Kaul และ Mattiasson, 1990) โดยในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง โดยจากรายงานของ Steighardt และ Kleine (1993) พบว่า เอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus macerans* ที่ตรึงบน Trisoperl ด้วยพันธะโคเวเลนต์ และเอนไซม์อิสระ มีค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) เท่ากับ 6.5 และ 3.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าความเข้มข้นของสับสเตรทแป้งที่ใช้ในการงานวิจัยนี้ ดังนั้นการตรึงเอนไซม์ CGTase บนซิลิกาด้วยการดูดซับแบบกายภาพไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้งานในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินต่อไป

การตรึงเอนไซม์ CGTase เพื่อให้เอนไซม์ยึดติดกับตัวค้ำด้วยพันธะที่แข็งแรงขึ้นกว่าการดูดซับแบบกายภาพ เช่นพันธะไอออนิกหรือโคเวเลนต์นั้น Kato และ Horikoshi(1983) ได้ตรึงเอนไซม์ CGTase บน DIAION-HP 20 (porous-styrene-divinylbenzene) โดยเอนไซม์ตรึงสามารถใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในระบบต่อเนื่องได้นานติดต่อกันถึง 2 สัปดาห์ โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี นอกจากนั้น Yang และ Su (1989) ได้ตรึงเอนไซม์บนไคโตแซนด้วยพันธะโคเวเลนต์ พบว่าประสิทธิภาพการตรึงรูปเท่ากับ 83 เปอร์เซนต์ และเอนไซม์ตรึงมีประสิทธิภาพในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินเช่นกัน โดยนำมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำกันได้ 4 ครั้ง และมีค่าครึ่งชีวิตในการผลิตแบบต่อเนื่องเท่ากับ 6 วัน สำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 ด้วยพันธะไอออนิกนั้น อุไรวรรณ รัชธร (2536) ได้รายงานการตรึงไว้โดยใช้ DEAE - cellulose เป็นตัวค้ำ พบว่าเอนไซม์ติดบนตัวค้ำอย่างแข็งแรง ที่ pH 8.5 เอนไซม์ CGTase ติดบนตัวค้ำได้มากที่สุด 350 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตัวค้ำ ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีที่ใช้ตั้งต้น เอนไซม์ตรึงด้วยวิธีนี้สามารถนำไปใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยนำไปใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำได้ถึง 6 ครั้ง และผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้นานติดต่อกัน 10 วัน เมื่อเสริมด้วย streptomycin sulphate แต่อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการใช้งานต้องมีการควบคุมให้ pH และ ionic strength ของระบบคงที่อย่างสม่ำเสมอซึ่งเป็นข้อด้อยของเทคนิคนี้

ในโครงงานวิจัยนี้ ได้ทำการทดลองตรึงเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 โดยการยึดติดกับตัวค้ำด้วยพันธะที่แข็งแรงอีกชนิดหนึ่งนอกเหนือจากพันธะไอออนิก คือพันธะโคเวเลนต์ แต่เนื่องจากบริเวณผิวของตัวค้ำที่ใช้มีเพียงหมู่ฟังก์ชันประเภทออกไซด์และไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีความว่องไวน้อยในการที่จะจับกับหมู่ฟังก์ชันของเอนไซม์ (Kennedy, 1987) จึงต้องมีการใช้สารกระตุ้น (activator) ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลุ่มฟังก์ชันเดิมของตัวค้ำให้เป็นกลุ่มฟังก์ชันใหม่ที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น โดยวิธีเตรียมอนุพันธ์สำหรับตรึงเอนไซม์วิธีที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ปฏิกิริยา silanization ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่ aminoalkyl ของอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน (APTS) ให้กับตัวค้ำ จากนั้นจึงใช้กลูทารัลดีไฮด์ (GLT) เป็นสารเชื่อมไขว้ ทำหน้าที่เชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของตัวค้ำและหมู่อะมิโนของเอนไซม์ ซึ่งแสดงโครงสร้างของการจับระหว่างเอนไซม์และตัวค้ำได้ดังนี้ (Hartmeier, 1986)



การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้จะทำให้เอนไซม์มีความคงทนในการจับอยู่บนตัวค้ำ ไม่หลุดออกไปอยู่ในสารละลาย แม้ว่าจะอยู่ในสารละลายที่มีสับสเตรท หรือ ค่า ionic strength สูง ๆ (ภาวิณี, 2531)

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพแล้ว พบว่าการกระตุ้นตัวค้ำด้วย APTS และ GLT จะทำให้เอนไซม์ตรึงติดบนตัวค้ำได้ดีขึ้น โดยอะลูมินาเป็นตัวค้ำที่สามารถตรึงเอนไซม์ CGTase ได้มากที่สุด คิดเป็น 71 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีตั้งต้น (รูปที่ 3.2) ซึ่งมากกว่าการตรึงบนอะลูมินาด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ ซึ่งตรึงเอนไซม์ได้ไม่ถึง 5 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 3.1) จากงานวิจัยของ Steighardt และ Kleine (1993)

ที่รายงานการตรึงเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus macerans* ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ และวิธีโคเวเลนต์บนตัวค้ำหลายชนิดเช่นกัน พบว่า Trisoperl (spherical porous glass) ที่กระตุ้นด้วย APTS และ GLT จะเป็นตัวค้ำที่ตรึงเอนไซม์ CGTase ได้มากที่สุด คิดเป็น 25เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น ซึ่งมีค่าต่ำกว่าผลการตรึงเอนไซม์ CGTase บนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ในงานวิจัยนี้ นอกจากนั้น Steighardt และ Kleine (1993) ยังได้รายงานว่าการตรึงเอนไซม์ CGTase บนตัวค้ำด้วยวิธีโคเวเลนต์จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการตรึงด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพอีกด้วย สำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase บนไคโตแซนด้วยวิธีโคเวเลนต์ในงานวิจัยนี้ พบว่าเอนไซม์สามารถตรึงได้ติดเพียง 8 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าผลงานวิจัยของ Yang และ Su (1989)ที่ตรึงเอนไซม์ CGTase บนไคโตแซนที่มีกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางได้ติด 83 เปอร์เซนต์ ผลความแตกต่างเหล่านี้ น่าจะเป็นเพราะความแตกต่างของเอนไซม์ รวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการเตรียมตัวค้ำและการตรึงเอนไซม์โดยในการทดลองของ Yang และ Su (1989) นั้น ตรึงเอนไซม์ CGTase บนไคโตแซนที่ผ่านการกระตุ้นด้วย กลูทารัลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซนต์ เท่านั้น และทำการตรึงเอนไซม์ที่ 4^{o} ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

อะลูมินานอกจากจะเป็นตัวค้ำที่มีประสิทธิภาพในการตรึงเอนไซม์ได้ดีที่สุดแล้วยังเป็นตัวค้ำที่มีความแข็งแรง ทนต่อความร้อน สารเคมี ไม่ถูกสลายด้วยจุลินทรีย์ รวมทั้งมีราคาถูก (Messing, 1975) ซึ่งมีสมบัติที่เหมาะสมหลายประการในการไปประยุกต์ใช้งานทางด้านอุตสาหกรรม จึงเลือกใช้อะลูมินาเป็นตัวค้ำสำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีโคเวเลนต์ ในการดำเนินงานวิจัยนี้ต่อไป

ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีโคเวเลนต์ ได้แก่ จำนวนของหมู่ฟังก์ชันที่ผิวของตัวค้ำที่จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ซึ่งได้แก่ปริมาณของ APTS และ GLT โดยถ้าปริมาณของ APTS และ GLT ที่ใช้ในการกระตุ้นตัวค้ำมีค่าน้อยเกินไปก็จะทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงต่ำ รวมทั้งทำให้แรงยึดระหว่างเอนไซม์กับตัวค้ำมีลักษณะอ่อนซึ่งอาจมีผลทำให้เอนไซม์หลุดออกจากตัวค้ำได้ง่าย (Kovalenko และ Sokolovsku, 1983)ในทางกลับกันถ้า APTS

และ GLT มีปริมาณมากเกินไปก็จะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้สูญเสียแอคติวิตีได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อเลือกอัตราที่เหมาะสมของ APTS และ GLT ในการกระตุ้นอะลูมินาเพื่อตรึงเอนไซม์ CGTaseจาก *Bacillus* A11 นี้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ APTS:GLT เท่ากับ 4:1 (รูปที่ 3.3) โดยสามารถตรึงเอนไซม์ได้มากที่สุดประมาณ 67 เปอร์เซนต์ ถ้าเพิ่มอัตราส่วนมากกว่านี้ก็พบว่าเอนไซม์ที่ตรึงได้ไม่เพิ่มขึ้น

เมื่อตรึงเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 บนอะลูมินาที่กระตุ้นด้วย APTS และ GLT หนัก 1 กรัม พบว่าปริมาณเอนไซม์ CGTase ซึ่งถูกตรึงจะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามปริมาณเอนไซม์ที่ใส่มากขึ้น จนกระทั่งเมื่อใส่เอนไซม์มากกว่า 600 ยูนิตขึ้นไป เอนไซม์ที่ถูกตรึงจะมีปริมาณคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนหมู่ฟังก์ชันบนอะลูมินาถูกจับอย่างอิ่มตัวด้วยเอนไซม์หมดแล้ว (Leonowicz, Sarker และ Bollag, 1988) สำหรับอะลูมินา 1 กรัม (เปียก) นั้น สามารถตรึงเอนไซม์ได้สูงสุด 258 ยูนิต (Dextrinizing Unit ตามข้อ 2.8.2.1) (รูปที่ 3.4) หรือเท่ากับ 13 ยูนิตต่อกรัม (แห้ง) จากการวัด แอคติวิตีด้วยวิธี phenolphthalein assay ผลที่ได้จากการวิจัยนี้มีค่ามากว่าผลการศึกษาของ Steigharat และ Kleine (1993) ซึ่งรายงานว่า Trisoperl ที่กระตุ้นด้วย APTS และ GLT 1 กรัม (แห้ง) จะตรึงเอนไซม์ได้ติด 0.7 ยูนิต แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานของอุไรวรรณ รัชธร (2536) ซึ่งตรึงเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 ตัวเดียวกับในงานวิจัยนี้ พบว่าตัวค้ำ DEAE-cellulose 1 กรัม (เปียก)ตรึงเอนไซม์ ได้ถึง 350 ยูนิต (Dextrinizing Unit ตามข้อ 2.8.2.1)

จากการเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ ในด้านผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยา พบว่าเอนไซม์จะมีค่า optimum pH เลื่อนไปทางด้านเบส 1 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ (รูปที่ 3.5) สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองสภาวะ พบว่าเอนไซม์อิสระและเอนไซม์ตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่ดีที่สุดอุณหภูมิ 60 และ 55^{o} ซ ตามลำดับ (รูปที่ 3.6) และเอนไซม์อิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาในช่วงอุณหภูมิ 60-75^{o} ซ ได้ดีกว่าเอนไซม์ตรึง ทั้งนี้อาจ

เนื่องมาจากการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีโคเวเลนต์ อาจมีผลทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย

สมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของเอนไซม์ตรึงที่ควรพิจารณาได้แก่ ความเสถียรของเอนไซม์ตรึง โดยจากการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ทั้งสองสภาวะ พบว่า มีความเสถียรต่อ pH ใกล้เคียงกัน คือในช่วง 4.5-9.0 (รูปที่ 3.7) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงกว่าเอนไซม์อิสระ โดยจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 55° ซ (รูปที่ 3.8) จะเห็นได้ว่าการตรึงรูปเอนไซม์ CGTase จะช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ต่อความร้อนได้ นับว่าเป็นการเพิ่มศักยภาพการนำเอนไซม์ตรึงไปใช้ในอุตสาหกรรมได้วิธีหนึ่ง สำหรับ Steigharadt และ Kleine (1993) ได้รายงานการตรึงเอนไซม์ CGTase บน Trisoperl ที่กระตุ้นด้วย APTS และ GLT แล้วพบว่าเอนไซม์ตรึงมีค่า optimum pH เลื่อนไปทางกรดประมาณ 1 หน่วย และค่า optimum temperature ลดลงไป 3° ซ โดยที่เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิเท่ากับเอนไซม์อิสระ นอกจากนั้น Yang และ Su (1989) ได้รายงานว่าเอนไซม์ CGTase ที่ตรึงบนโคโตแซนด้วยพันธะโคเวเลนต์ จะมีค่า optimum pH และ optimum temperature สูงขึ้น 1 หน่วย และ 5° ซ ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิขึ้น แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านความเสถียรต่อ pH

นอกจากจะศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ตรึงต่อ pH และ อุณหภูมิ ในการเร่งปฏิกิริยาแล้ว ความเสถียรในการใช้งานก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงด้วย เมื่อพิจารณาลักษณะการนำเอนไซม์ตรึงมาใช้งาน โดยทั่วไปจะนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ 2 ระบบ ได้แก่การผลิตแบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง ซึ่งการที่จะใช้ระบบใดนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการประกอบกัน และนอกเหนือจากการใช้งานแล้ว การเลือกใช้ประเภทของถังปฏิกิริยา (reactor) ก็เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องควรจะพิจารณาถึง สำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในระบบต่อเนื่องนั้น งานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านมา โดยส่วนใหญ่จะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากเอนไซม์ที่บรรจุในคอลัมน์แก้วที่ควบคุมอุณหภูมิ (Nakamura และ Horikoshi,

1979; Kato และ Horikoshi,1983; Yang และ Su, 1989) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากเอนไซม์ตรึงโดยใช้คอลัมน์แก้ว 2ชั้น ซึ่งข้อดีของการใช้คอลัมน์แก้ว ได้แก่สะดวกในการใช้งาน สามารถควบคุมอัตราการไหลของสารรวมทั้งอุณหภูมิได้ง่าย

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรทแป้งและอัตราการป้อนสับสเตรท โดยจากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 0.5 เปอร์เซนต์ ที่อัตราการป้อน 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จะทำให้เอนไซม์ตรึงเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดโดยคิดเป็นค่า % conversion เท่ากับ 81 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 3.10)เมื่อเวลาผ่านไป 50 ชั่วโมง เนื่องจากการใช้คอลัมน์แบบ packed bed จะทำให้เกิด concentration gradient ระหว่างสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ โดยด้านบนของคอลัมน์เอนไซม์ตรึงจะสัมผัสกับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง จากนั้นความเข้มข้นของสับสเตรทจะเริ่มลดลง ในขณะที่ความเข้นข้นของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้น (Hartmeier, 1986) ดังนั้นจึงต้องใช้ระยะเวลาในการที่จะทำให้อัตราการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินมีค่าสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบผลวิจัยนี้ คือการใช้ เอนไซม์ CGTase ที่ตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่องในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าได้ประสิทธิภาพการผลิต (% conversion) ใกล้เคียงกับงานของ อุไรวรรณ รัชธร (2536) ซึ่งใช้เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบน DEAE cellulose ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินในถังปฏิกิริยา โดยได้ค่า % conversion เท่ากับ 85 เปอร์เซนต์ (เมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 1.25 เปอร์เซนต์ และอัตราการป้อนสับสเตรท 3 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้ให้มากขึ้น เอนไซม์ตรึงจะเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินได้น้อยลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสับสเตรทสูง ปฏิกิริยา cyclization จะเกิดน้อยลง แต่จะเกิดปฏิกิริยา disproportionation ได้ดีแทน (Starnes, 1990) อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทต่ำ จะมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้มีปริมาณต่ำด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 1.5 เปอร์เซนต์ เนื่องจากจะให้ผลผลิตไซโคลเดกซ์ทรินสูงกว่าการใช้

ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 0.5 เปอร์เซนต์ ถึง 2 เท่า ในขณะที่ค่า % conversion ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 0.5 เปอร์เซนต์ เพียงไม่เกิน 10 เปอร์เซนต์

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในรูปที่ 3.10 จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ CGTase ที่ตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์นี้ จะผลิตเบตาไซโคลเดกซ์ทรินเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยมีอัตราส่วนของ แอลฟา เบตา และแกมมา ประมาณ 2:4:1 ซึ่งแตกต่างจากที่ อุไรวรรณ รัชธร (2536) รายงานไว้ว่า เอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A11 ที่ตรึงบน DEAE-cellulose จะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินที่มีอัตราส่วนของ แอลฟา เบตา และแกมมา เท่ากับ 1:8.5:2 จะเห็นได้ว่าปริมาณเบตาและแกมมาไซโคลเดกซ์ทรินมีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากงานวิจัยของอุไรวรรณถึง 4 เท่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการจับของเอนไซม์บนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ อาจมีผลกระทบทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงมากกว่าการจับของเอนไซม์บน DEAE-cellulose ด้วยพันธะไอออนิก นอกจากนั้นในการผลิตที่รายงานโดยอุไรวรรณ รัชธร (2536) นั้น ได้ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 2.5 เปอร์เซนต์ ในขณะที่งานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเพียง 1.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้

จากผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึง เมื่อนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินอย่างต่อเนื่อง จะเห็นได้ว่าปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่เอนไซม์ตรึงผลิตได้จะมีค่าคงที่ในช่วงการผลิต 5 วันแรก และลดลงประมาณ 10 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้งานจนถึงวันที่ 10 และหลังจากวันที่ 12 ไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะเริ่มมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ (รูปที่ 3.13) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิต จึงได้ปรับปรุงการทดลองโดยเติมโซเดียมเอไซด์ 0.02 เปอร์เซนต์ ลงในสับสเตรทด้วย ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตรึงจะผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ระยะเวลานานขึ้นเล็กน้อย โดยไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างดำเนินการผลิต แต่อย่างไรก็ตามปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ก็ยังมีค่าลดลงภายหลังจากการใช้งานประมาณ 12 วัน ซึ่งอาจเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์อันเนื่องจากความร้อนในระหว่างการใช้งานทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไป (Messing, 1975)

นอกจากนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เกิดการยับยั้งแบบ non-competitive ของเบตาไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินของเอนไซม์ CGTase นี้ (Lee และ Kim, 1992) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยใช้เอนไซม์ CGTase ที่ตรึงบน DEAE - cellulose ของอุไรวรรณ รัชธร (2536) แล้วจะเห็นได้ว่ามีอายุการใช้งานใกล้เคียงกัน โดยเมื่อใช้งานไปประมาณ 14 วัน ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะลดลงประมาณ 30 เปอร์เซนต์เช่นกัน

ในลักษณะการนำเอนไซม์ตรึงรูปไปใช้งานนั้น นอกจากการนำไปใช้ในระบบต่อเนื่องแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ผลิตซ้ำด้วยระบบไม่ต่อเนื่องได้อีก สำหรับการวิจัยนี้ ได้ใช้ถังปฏิกิริยาแบบกวนในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินด้วยวิธีนี้ เนื่องจากจะมีการกระจายของเอนไซม์ตรึงและสับสเตรทอย่างสม่ำเสมอมากกว่าในคอลัมน์ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเอนไซม์ตรึงกับเอนไซม์อิสระเมื่อใช้แอคติวิตีเท่ากัน พบว่าเอนไซม์อิสระสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ได้ดีกว่าเอนไซม์ตรึงเล็กน้อยคือดีกว่าประมาณ 10 % conversion (รูปที่ 3.15) แสดงว่าประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ตรึงไม่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระมากนัก ซึ่งอาจประเมินได้ว่าแนวโน้มของการจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท รวมทั้งอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยามีค่าไม่แตกต่างกันนัก และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนของ แอลฟา เบตา และแกมมา ไซโคลเดกซ์ทรินที่เอนไซม์ตรึงผลิตได้เปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ พบว่าเอนไซม์อิสระผลิตเบตาไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงกว่า เอนไซม์ตรึงเล็กน้อย คือ เท่ากับ 2:5:1 และ 2:4:1 สำหรับ เอนไซม์ตรึง

สำหรับ การผลิตไซโคลเดกซ์ทริน แบบไม่ต่อเนื่อง จากผลที่ได้ในรูป 3.14 พบว่ามี % conversion สูงสุด 78 เปอร์เซนต์ แสดงว่ามีประสิทธิภาพการผลิตไม่ต่างจากการผลิตแบบต่อเนื่อง ซึ่งได้ 81 % conversion และจากการนำเอนไซม์ตรึงมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำ พบว่าเมื่อนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำ 6 ครั้ง แอคติวิตี (Dextrinizing activity) ของเอนไซม์จะลดลง 20 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีตั้งต้น (รูปที่ 3.16) ขณะที่ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินลดลงประมาณ 25 เปอร์เซนต์ ของปริมาณที่ผลิต

ได้ในการใช้เอนไซม์ตรึงครั้งแรก (เหลือ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อใช้ซ้ำถึง 10 ครั้ง แอคติวิตีลดลง 50 เปอร์เซนต์ ส่วนปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ลดลงประมาณ 40 เปอร์เซนต์ ผลนี้อาจวิเคราะห์ได้ว่า CD-forming activity ลดลงไปพร้อม ๆกับ Dextrinizing activity วัลยา เตชชัยกุล (2534) เคยรายงานว่า เอนไซม์ CGTase อิสระมี Dextrinizing activity และ CD-formimg activity ซึ่งมีความสัมพันธ์กันโดยตรง และผลที่ได้ในงานวิจัยนี้อาจประเมินได้ว่า เอนไซม์ตรึงบนอะลูมินาด้วยพันธะโคเวเลนต์ยังคงโครงสร้างที่กำหนดความสัมพันธ์ระหว่าง Dextrinizing activity และ CD-formimg activity ไม่ต่างจากเอนไซม์อิสระ การที่แอคติวิตีของ เอนไซม์ลดลงเมื่อใช้ซ้ำหลายครั้ง คาดว่าส่วนสำคัญมาจากการสูญเสียเอนไซม์ เมื่อล้างถึง 3 ครั้งหลังการใช้งานแต่ละครั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของ อุไรวรรณ รัชธร (2536) ซึ่งพบว่า เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบน DEAE - cellulose สามารถนำมาผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำได้ 6 ครั้ง โดยปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีค่าคงที่ คือประมาณ 18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เอนไซม์มีแอคติวิตี (Dextrinizing activity) ลดลง 40 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีตั้งต้นจะเห็นว่า เอนไซม์ตรึงของ อุไรวรรณ รัชธร (2536) ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ปริมาณมากกว่างานวิจัยนี้ประมาณ 3 เท่า ทั้งนี้คาดว่าการใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทในการผลิตต่างกัน อาจทำให้ปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้มีค่าแตกต่างกัน และเมื่อนำค่าไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Steighardt และ Kleine (1993) ซึ่งผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากเอนไซม์ CGTase ที่ตรึงบน Trisoperl ด้วยวิธีโคเวเลนต์ และได้ผลผลิตเบตาไซโคลเดกซ์ทริน เท่ากับ 0.20 กรัมต่อเอนไซม์ตรึง 1 กรัม (แห้ง) จากสับสเตรทแป้ง 1 กรัม พบว่าเอนไซม์ตรึงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ให้ผลผลิตเบตาไซโคลเดกซ์ทรินที่สูงกว่าเล็กน้อย คือเท่ากับ 0.26 กรัมต่อเอนไซม์ตรึง 1 กรัม (แห้ง) จากสับสเตรทแป้ง 1 กรัม

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อนำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส จาก *Bacillus* A11 ไปทดลองตรึงด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพบน ไดโตแซน อะลูมินา คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน และซิลิกา พบว่าตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึงคือ ซิลิกา โดยตรึงเอนไซม์ได้ 54 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น

2. เมื่อนำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส จาก *Bacillus* A11 ไปทดลองตรึงด้วยวิธีโคเวเลนต์บน ไดโตแซน อะลูมินา คาร์บอน เม็ดแก้วพรุน และซิลิกา พบว่าตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึงคือ อะลูมินา โดยตรึงเอนไซม์ได้ 71 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีตั้งต้น (เมื่อใช้อะลูมินาต่อเอนไซม์ เท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อ 150 ยูนิต)

3. เอนไซม์ CGTase สามารถตรึงบนอะลูมินาที่ถูกกระตุ้นด้วย อะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลน 1.0 เปอร์เซนต์ และ กลูทารัลดีไฮด์ 0.25 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 4:1 ได้เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้อะลูมินาต่อเอนไซม์ เท่ากับ 1 กรัมต่อ 600 ยูนิต จะตรึงเอนไซม์ได้ 258 ยูนิต

4. เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 ซึ่งมากกว่าค่า pH ของเอนไซม์อิสระ 1 หน่วย และเอนไซม์ตรึงมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาน้อยกว่าเอนไซม์อิสระ 5^{o} ซ

5. เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงมีความเสถียรต่อ pH ใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ คือ ในช่วง 4.5-9.0 และเอนไซม์ตรึงจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 55^{o} ซ ในขณะที่เอนไซม์อิสระมีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 45^{o} ซ

6. ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบต่อเนื่องในคอลัมน์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ ความเข้มข้นของสับสเตรทเท่ากับ 1.5 เปอร์เซนต์ และอัตราการป้อนสับสเตรท 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ดำเนินการผลิตที่อุณหภูมิ 40^{o} ซ เป็นเวลา 50 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเปลี่ยนแป้งเป็นไซโคลเดกซ์ทรินเท่ากับ 72 เปอร์เซนต์ ไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้มีปริมาณคงที่ใน 5 วันแรก และลดลง 20 เปอร์เซนต์ ในวันที่ 5-12 และการเติมโซเดียมเอไซด์ ทำให้

ระบบผลิตดีขึ้น โดยผลิตได้ถึง 20 วัน โดยที่ไม่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน

7. ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแบบไม่ต่อเนื่องในถังปฏิกิริยา เอนไซม์ตรึงผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง โดยมี % conversion 78 เปอร์เซนต์ และสามารถนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ซ้ำถึง 10 ครั้ง โดยไซโคลเดกซ์ทรินที่ผลิตได้จะลดลง 40 เปอร์เซนต์ ภายหลังการใช้งานครั้งที่ 10

8. เอนไซม์ CGTase อิสระผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้สูงกว่าเอนไซม์ตรึง โดยพบว่าผลิตในถังปฏิกิริยาได้สูงสุดที่ 10 ชั่วโมง โดยมี % conversion 94 เปอร์เซนต์

9. อัตราส่วนของ แอลฟา เบตา และแกมมา ที่เอนไซม์ตรึงผลิตได้ทั้งในระบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง เท่ากับ 2:4:1 ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งมีอัตราส่วนผลิตภัณฑ์ 2:5:1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย