บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 กำหนดภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทราย

5.1.1 กำหนดอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล พบว่าทั้งของอุณหภูมิและเวลาของการเขย่า ทราย-เอพีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ กับสารละลายเดกซ์แทรนเนส มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) และมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test เมื่อพิจารณาปัจจัยของอุณหภูมิพบว่าการตรึงรูปอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการตรึงรูปที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Madhu และ Pradhu (27) ทดลองตรึงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันทั้งนี้อาจเนื่องจากการตรึงรูปที่อุณหภูมิห้อง มีผลให้เดกซ์แทรนเนสบางส่วนสูญเสียแอคติวิตีเนื่องจากการเสียสภาพของโปรตีนในเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส และเมื่อพิจารณาปัจจัยของเวลา พบว่าการตรึงรูปที่เวลา 90 นาที ให้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงกว่าการตรึงรูปที่เวลา 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การเขย่าทราย-เอพีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์กับสารละลายเอนไซม์นั้นพบว่าการทดลองของ Thomplison, Agello และ Mathur (33) ซึ่งตรึงรูปเรนินใช้เวลาเพียง 30 นาที เท่านั้นแต่การทดลองตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสเวลา 30 นาที น้อยเกินไปจนกระบวนการตรึงรูปยังไม่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากการทดลองของ Puranakrisnan และ Bose (32) ตรึงรูปทริปซินบนทรายโดยใช้เอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ใช้เวลาในการเขย่าทราย-เอพีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์กับทริปซิน 2 ชั่วโมง และจากการทดลองของ Gray และ Livingstone (23) ตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนตัวพยุง cellulose

โดยใช้ diaminobenzene พบว่าใช้เวลาตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน ซึ่งหากเวลานานกว่านี้แอคติวิตีกลับลดลง ทั้งนี้เนื่องจากผลจากการบดบัง (steric effect) ของเอนไซม์ตรึงรูปบนตัวพยุงที่มีความหนาแน่นของเอนไซม์มากจนเกินไป สำหรับการทดลองนี้ใช้เวลาตรึงรูป 90 นาที นับว่าเพียงพอต่อการตรึงรูปเอนไซม์บนตัวพยุงอย่างสมบูรณ์แล้ว

5.1.2 กำหนดความเร็วรอบและเวลาที่เหมาะสมต่อการเขย่าทราย-เอพีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ กับสารละลายเดกซ์แทรนเนสในการตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.1.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.4เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูล พบว่า ทั้งความเร็วของการเขย่าทราย-เอพีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ และเวลามีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test ในตารางที่ 4.6 เมื่อพิจารณาปัจจัยความเร็วของเครื่องเขย่า พบว่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงกว่าที่ความเร็วอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การที่ความเร็วของเครื่องเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสสูงกว่าที่ความเร็วอื่นๆ เนื่องจากการเกิดพันธะโควาเลนท์บนอนุภาคทรายจำเป็นต้องอาศัยการชนกันของโมเลกุลของสารตั้งต้นในปฏิกิริยา (reactant) ซึ่งต้องมีพลังงานจลน์ที่พอเหมาะ และพบว่าการเพิ่มความเร็วเป็น 200 รอบต่อนาที แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงสุด และจากการพิจารณาปัจจัยเวลาพบว่าที่เวลา 90 นาที และ 120 นาที ให้แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงกว่าที่เวลา 30 และ 60 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเวลา 90 นาที ยังคงเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการเขย่า ทราย-เอพีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ กับสารละลายเดกซ์แทรนเนสเช่นเดียวกับการทดลองที่กล่าวมาแล้ว ถึงแม้ว่าจะมีปัจจัยของอัตราเร็วการชนกันของอนุภาคเข้ามาเกี่ยวข้องก็ตาม

5.1.3 กำหนดความเข้มข้นของสารละลาย เอพีทีเอส และกลูตารัลดีไฮด์ ที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปที่เหมาะสมต่อการตรึงรูป

5.1.3.1 จากผลการทดลองข้อ 4.1.3.1 และตารางที่ 4.7 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าทั้งความเข้มข้นของสารละลาย เอพีทีเอส และกลูตารัลดีไฮด์มีผลต่อแอคติวิตีเฉลี่ยของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป โดยวิธี Duncan's new multiple range test พบว่าที่ความเข้มข้นของเอพีทีเอสเป็นร้อยละ 0 ให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีสูงสุดและแตกต่างจากที่ระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาปัจจัยความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์เป็นร้อยละ 0 ให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีสูงที่สุดและแตกต่างจากที่ระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เช่นเดียวกันเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะการตรึงรูปเอนไซม์แบบไม่ใช้เอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ นั้นผลผลิตของเอนไซม์ตรึงรูปเป็นแบบ adsorption ซึ่งการเกาะบนของอนุภาคอาศัยแรงดึงดูดอ่อนๆของเอนไซม์กับตัวพยุงซึ่งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ขณะการตรึงรูป อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บเอนไซม์ตรึงรูปไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเกิดการหลุดของเอนไซม์ตรึงรูปออกจากตัวพยุงเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ขณะที่นำเอนไซม์ตรึงรูปไปทดสอบแอคติวิตีก็มีการหลุดของเอนไซม์ตรึงรูปออกจากตัวพยุงด้วยเช่นกัน ดังนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจึงเทียบเท่าเอนไซม์อิสระ จึงพิจารณาผลการทดลองใหม่โดยนำข้อมูลเฉพาะการทดลองที่ใช้เอพีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ในการตรึงรูปเท่านั้นมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล ซึ่งผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.10 เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าเฉพาะความเข้มข้นของสารละลายเอพีทีเอส เท่านั้นที่มีผลต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test พบว่าที่ความเข้มข้นของเอพีทีเอส ทุกระดับให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยที่ระดับความเข้มข้นของเอพีทีเอสร้อยละ 5 ให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกที่ระดับความเข้มข้นของเอพีทีเอสร้อยละ

5 ในการทดลองขั้นต่อไป ส่วนความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อแอคติวิตีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงกำหนดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Thomplison, Agello และ Mathur (33) ซึ่งทดลองตรึงรูปเรนินบนอนุภาคทราย โดยกำหนดความเข้มข้นของเอมีทีเอส ร้อยละ 5 และความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 เช่นเดียวกันการเพิ่มความเข้มข้นของเอมีทีเอสเป็นผลให้ค่าเฉลี่ยแอคติวิตีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และแอคติวิตีสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอมีทีเอสเป็นร้อยละ 5 เมื่อความเข้มข้นเพิ่มเป็นร้อยละ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปกลับมีแนวโน้มลดลงทั้งนี้อาจเนื่องจากจำนวนเอนไซม์บนตัวพยุงมีปริมาณมากเกินไปจนรบกวนแอคติวิตีในลักษณะการบดบังเช่นเดียวกัน

การทดสอบประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวของเอนไซม์บนตัวพยุงทำได้หลายวิธีเช่น การหาปริมาณโปรตีนในเอนไซม์ตรึงรูปหลังผ่านการทำปฏิกิริยาหรือหาปริมาณโปรตีนจากส่วนผสมของปฏิกิริยาหลังจากแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกแล้ว แต่วิธีดังกล่าว มีข้อผิดพลาดจากการทดลองสูง ดังนั้นการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นโดยตรงหลังจากแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากส่วนผสมของปฏิกิริยาแล้วทำให้สามารถเห็นถึงการหลุดของเอนไซม์ออกจากตัวพยุงได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น จากกราฟรูปที่ 4.1 กราฟ B มีค่าเฉลี่ยแอคติวิตี (ไมโครกรัมกลูโคสต่อกรัมเอนไซม์ตรึงรูปที่เพิ่มขึ้น) หลังจากแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกจากส่วนผสมของปฏิกิริยาแล้ว เกิดจากเอนไซม์ที่หลุดจากตัวพยุงมากกว่า กราฟ D เนื่องจากความชันของกราฟมากกว่า และเมื่อพิจารณาความชันของกราฟ A และ B จะเห็นได้ว่าค่าความชันของกราฟทั้งสองใกล้เคียงกัน กราฟ A เป็นแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปขณะที่ยังมีเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ในส่วนผสมปฏิกิริยา ค่าความชันที่ใกล้เคียงกันหมายถึงแอคติวิตีที่เวลาต่างๆใกล้เคียงกันจากการพิจารณากราฟ C และ D จะเห็นได้ว่าความชันของกราฟ C หลังจากเวลา 10 นาที มีความชันมากกว่ากราฟ D อันเป็นผลมาจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ตรึงรูปนั่นเอง ส่วนกราฟ D หลังจากแยกเอนไซม์ตรึงรูปออกแล้วบ่มต่อพบว่ามีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเนื่องจากเอนไซม์ตรึงรูปไม่ได้เกิดพันธะโควาเลนท์ทั้งหมดแต่มีบางส่วนเกาะบนตัวพยุงแบบ adsorption จึงเกิดการที่หลุดจากตัวพยุงขณะทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงเลือกการตรึงรูปที่ความเข้มข้นของเอมีทีเอสร้อยละ 5 ส่วนความเข้มข้น

ของกลูตารัลดีไฮด์เพียงร้อยละ 1 เหมาะสมต่อการตรึงรูปเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นเป็นร้อยละ 3 และ 5 นั้น แอคติวิตีมีแนวโน้มคงที่

5.1.4 กำหนดความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสที่เหมาะสมต่อการตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.1.4 ดังแสดงในตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.2 จากรูปจะเห็นว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์แทรนเนสจากร้อยละ 1 เป็นร้อยละ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากแต่การเพิ่มความเข้มข้นไปเป็นร้อยละ 10 และ 15 แอคติวิตีกลับมีแนวโน้มคงที่ อธิบายได้ว่าเนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 5 เพียงพอต่อการเชื่อมพันธะ ทราย-เอมีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ ซึ่งมีปริมาณจำกัดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1 ปริมาณเอนไซม์น้อยเกินไปไม่เพียงพอต่อการเกิดพันธะกับ ทราย-เอมีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ ได้ทั้งหมดแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปเป็นร้อยละ 5 ปริมาณเอนไซม์เพียงพอต่อการเกิดพันธะกับ ทราย-เอมีทีเอส-กลูตารัลดีไฮด์ อย่างค่อนข้างสมบูรณ์ดังนั้นความเข้มข้นร้อยละ 5 จึงเพียงพอต่อการตรึงรูป

5.1.5 กำหนดพีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทราย

จากผลการทดลองข้อ 4.1.5 ดังแสดงในตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.3 พีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปอยู่ที่ภาวะกรด และแอคติวิตีของเอนไซม์ ตรึงรูปสูงสุดที่พีเอช 4.5 แอคติวิตีจะค่อยๆลดลงเมื่อพีเอชสูงขึ้นและลดต่ำสุดที่พีเอช 7.0 หลังจากนั้นแอคติวิตีจะสูงขึ้นอีกเล็กน้อยที่พีเอช 8 แล้วแอคติวิตีมีแนวโน้มลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Gray และ Livingstone (23) พบว่าพีเอชของการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนตัวพยุง cellulose โดยใช้ diaminobenzene ซึ่งให้รูปแบบพีเอชของการตรึงรูปเช่นเดียวกันนี้ ส่วนเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เบต้า-ดี-กาแลคโตสิเดสและปาเปนจากผลงานวิจัยของ Gray ให้รูปแบบนี้เช่นเดียวกัน ดังนั้นเขาจึงสรุปว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการตรึงรูปเอนไซม์ (insolubilized enzyme) โดยใช้ diaminobenzene คือที่พีเอช 5.0 และกล่าวว่ากระบวนการตรึงรูปยังสามารถเกิดขึ้นได้ที่พีเอชของการตรึงรูปสูงถึง 9-10 หน่วยพีเอช

5.2 ศึกษาโครงสร้างของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปบนทราย

5.2.1 ศึกษาโครงสร้างของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปบนทรายเปรียบเทียบกับโครงสร้างของผิวทรายสะอาด

5.2.1.1 โครงสร้างของผิวทรายสะอาด

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1.1 เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจดูโครงสร้างของผิวทรายสะอาดด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,500 และ 10,000 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ ผิวทรายสะอาดมีลักษณะขรุขระและมีรูพรุนเล็กน้อยและเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 10,000 เท่า จะเห็นลักษณะดังกล่าวนี้ชัดเจนยิ่งขึ้นโดยผิวทรายสะอาดนี้ไม่มีโครงสร้างของกลุ่มโปรตีนเกาะอยู่เลย

5.2.1.2 โครงสร้างของผิวทรายที่ผ่านการเติมเอนีทีเอส และกลูตารัลดีไฮด์

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1.2 เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจดูโครงสร้างของผิวทรายสะอาดด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 3,500 และ 10,000 เท่า พบว่าโครงสร้างของผิวทรายที่ผ่านการเติมเอนีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ ที่กำลังขยาย 3500 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ยังคงมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของผิวทรายสะอาดเช่นเดิม โดยไม่พบหมู่หรือกลุ่มของโปรตีนเกาะอยู่บนผิวทรายเลย ถึงแม้ว่าจะเพิ่มกำลังขยายเป็น 10000 เท่า ดังรูปที่ 4.7 แล้วก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของเอนีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ นั้นมีขนาดเล็กจนไม่สามารถมองเห็นได้จากการดูด้วย SEM ที่กำลังขยาย 10000 เท่า

5.2.1.3 โครงสร้างของผิวทรายที่ผ่านการตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1.3 เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจดูโครงสร้างของเดกซ์แทรนเนสตริงรูปบนทรายด้วยเครื่อง SEM โครงสร้างของทรายที่ผ่านการตรึงรูปเอนไซม์แล้วที่กำลังขยาย 5000 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.8 จะเห็นกลุ่มโปรตีนเกาะบนอนุภาคทราย ทำให้เห็นความแตกต่างจากโครงสร้างของผิวทรายสะอาดและผิวทรายสะอาดที่ผ่านการเติมเอนีทีเอสและกลูตารัลดีไฮด์ โดยกลุ่มของโปรตีนที่เกาะบนผิวทรายนี้สามารถเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อเราเพิ่มกำลังขยายไปเป็น 15000 เท่า ซึ่งกลุ่ม

ของโปรตีนดังกล่าวเกิดการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างหมู่ฟังก์ชั่นของเดกซ์แทรนเนส และหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยาของกลูตารัลดีไฮด์

5.2.1.4 โครงสร้างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย หลังจากผ่านการใช้งานโดยกำจัดเดกซ์แทรนจากน้ำอ้อยแล้ว

จากผลการทดลองข้อ 4.2.1.4 ใช้ตัวอย่างเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่ผ่านการใช้งานโดยนำไปกำจัดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยแล้วนำมาตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง SEM จะเห็นว่าโครงสร้างของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทรายที่ผ่านการใช้งาน ที่กำลังขยาย 5000 เท่า ดังแสดงในรูป 4.10 ยังคงมีกลุ่มของโปรตีนเอนไซม์เกาะอยู่บนผิวทราย เช่นเดียวกับโครงสร้างของโปรตีนเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการใช้งาน

5.3 <u>สมบัติทางด้านจนพลศาสตร์ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเปรียบเทียบกับเดกซ์แทรนเนสอิสระ</u>

5.3.1 เปรียบเทียบช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนส (Temperature activity profile)

จากผลการทดลองข้อ 4.3.1 แสดงในตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.11 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30 องศาเซลเซียส ไปเป็น 55 องศาเซลเซียส แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและตรึงรูปมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับโมเลกุลของเอนไซม์กับสับสเตรท ซึ่งการย่อยสลายจะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อพลังงานจลน์สูงขึ้น โดยแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเดกซ์แทรนเนสอิสระมีค่าสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป เพราะในปฏิกริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อิสระนั้นทั้งโมเลกุลของเอนไซม์ และสับสเตรทเคลื่อนที่ชนกัน ปฏิกิริยาการย่อยสลายจึงเกิดได้เร็วกว่ากรณีของเอนไซม์ตรึงรูปซึ่งมีเฉพาะโมเลกุลของสับสเตรทเท่านั้นที่เคลื่อนที่เข้าหาโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งถูกตรึงแน่นอยู่บนทราย แอคติวิตีสัมพัทธ์จึงต่ำกว่า อุณหภูมิที่เดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดคืออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสทั้งสองชนิดใกล้เคียงกันโดยแอคติวิตีสัมพัทธ์จะต่ำลงเพราะเกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีนเอนไซม์เนื่องจากความร้อน

5.3.2 เปรียบเทียบช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนส (pH activity profile)

จากผลการทดลองข้อ 4.3.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.12 พีเอชที่เดกซ์แทรนเนสอิสระแสดงแอคติวิตีสูงสุดคือ พีเอช 5.0 ขณะที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่ พีเอช 7.0 ซึ่งสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ 2 หน่วยพีเอช จะเห็นว่ากระบวนการตรึงรูปทำให้พีเอชเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยอาศัยหลักการกระจายของโปรตรอนรอบๆเอนไซม์ตรึงรูป (40) จากการพิจารณาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอาจกล่าวได้ว่าให้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีประจุลบเป็นส่วนใหญ่ ทำให้โปรตรอนในส่วนผสมของปฏิกิริยาเข้ามาล้อมรอบเอนไซม์ตรึงรูปเป็นจำนวนมากเมื่อความหนาแน่นของโปรตอนรอบเอนไซม์ตรึงรูปมากเป็นผลให้บริเวณเอนไซม์ตรึงรูปมีพีเอชลดต่ำกว่าพีเอชเหมาะสมของการทำงานคือ ที่พีเอช 5.0 ดังนั้นการเปลี่ยนพีเอชของส่วนผสมเช่นการเพิ่มเป็นพีเอช 7.0 จะทำให้บริเวณย่อยๆของเอนไซม์ตรึงรูปมีพีเอชสูงขึ้น จนเท่ากับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงขึ้นแต่เนื่องจากการวัดพีเอชเป็นการวัดพีเอชของสารละลายภายนอกไม่ได้วัดพีเอชที่บริเวณย่อยๆ ของเอนไซม์ตรึงรูปจึงเห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสเลื่อนไปอยู่ที่พีเอช 7.0 ในขณะที่พีเอช 5.5 ซึ่งเป็นภาวะมาตรฐานที่ใช้ทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปๆ แสดงแอคติวิตีเพียงร้อยละ 33 เท่านั้น ในขณะที่เอนไซม์อิสระแสดงแอคติวิตีถึงร้อยละ 87

5.3.3 เสถียรภาพต่อความร้อนของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และตรึงรูป (Temperature stability profile)

จากการทดลองข้อ 4.3.3.1 ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4.18 และรูปที่ 4.13 พบว่าสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 20 มีผลทำให้เสถียรภาพต่อความร้อนของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงกว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในบัฟเฟอร์กล่าวคือ แอคติวิตีในช่วงอุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส จะมีค่าประมาณร้อยละ 80-85 และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส ค่าแอคติวิตีเหลือเพียงร้อยละ 28 เท่านั้นเช่นเดียวกับกรณีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในสารละลายบัฟเฟอร์ คือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นช่วง 45-60

องศาเซลเซียส แอคติวิตีมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 70 เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส แอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็ว

สำหรับเสถียรภาพต่อความร้อนของเดกซ์แทรนเนสอิสระจากการทดลองข้อ 4.3.3.2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.19 และรูปที่ 4.14 พบว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระในสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 20 มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงกว่าในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 โดยช่วงอุณหภูมิ 30-65 องศาเซลเซียส เดกซ์แทรนเนสอิสระในสารละลายซูโครสมีแอคติวิตีร้อยละ 90-100 ขณะที่เมื่ออยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์มีแอคติวิตีร้อยละ 70-80 ที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส พบว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระในสารละลายซูโครสและสารละลายบัฟเฟอร์ 5.5 มีเสถียรภาพต่อความร้อนต่ำลงโดยในสารละลายซูโครสมีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงกว่าในบัฟเฟอร์

จากการทดลองทั้งสองกรณีอาจกล่าวได้ว่าสารละลายซูโครสเข้มข้นร้อยละ 20 มีผลต่อการเพิ่มเสถียรภาพต่อความร้อนในเดกซ์แทรนเนสอิสระและเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งนี้เนื่องจากซูโครสมีคุณสมบัติเป็น highly polar nature ช่วยป้องกันเอนไซม์จากความร้อนได้เมื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพต่อความร้อนของเดกซ์แทรนเนสอิสระ และเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในสารละลายเดียวกันเช่นในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 พบว่าเสถียรภาพต่อความร้อนของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์อิสระทุกช่วงอุณหภูมิที่ทำการทดลองและในสารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 20 ให้แนวโน้มเช่นเดียวกันกับในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 การทดลองของ Madhu และ Prabhu (27) พบว่าการตรึงรูปทำให้เสถียรภาพต่อความร้อนของเอนไซม์ตรึงรูปลดลงเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ในขณะตรึงรูปเสถียรภาพต่อความร้อนจึงลดลง

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการตรึงรูปเดกซ์แทรนเนสบนทรายจะมีผลทำให้เสถียรภาพต่อความร้อนของเอนไซม์ลดลง แต่ผลของการลดลงนี้อาจไม่มีความสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับข้อได้เปรียบอื่นๆ ที่ได้รับจากการตรึงรูปเอนไซม์

5.3.4 เปรียบเทียบเสถียรภาพต่อพีเอชของเดกซ์แทรนเนสอิสระและตรึงรูป (pH stability profile)

จากผลการทดลองข้อ 4.3.4 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.20 และรูปที่ 4.15 ซึ่งจะพบว่าเสถียรภาพต่อพีเอชของเดกซ์แทรนเนสอิสระจะอยู่ในช่วงพีเอช 5.5-7.0 ส่วนที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้แอคติวิตีจะต่ำลงตามลำดับและแอคติวิตีจะเท่ากับ 0 เมื่อพีเอชสูงถึงพีเอช 11.0 ส่วนเสถียรภาพต่อพีเอชของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-4.5 หากพีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้แอคติวิตีจะต่ำลงตามลำดับและแอคติวิตีจะเท่ากับ 0 เมื่อพีเอชสูงถึง 11.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการตรึงรูปมีส่วนช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อพีเอชช่วงกว้างขึ้นและการที่เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อพีเอชที่เป็นกรดนั้นนับได้ว่าเป็นข้อได้เปรียบต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ทั้งนี้เนื่องจากอ้อยที่ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์พีเอชของน้ำอ้อยจะลดต่ำลงอยู่ในช่วง 4.0-4.5 ซึ่งเอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อพีเอชช่วงนี้สูงการสูญเสียแอคติวิตีที่พีเอชต่ำจึงเกิดได้น้อยและพบว่าทั้งเดกซ์แทรนเนสอิสระและตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อพีเอชกรดมากกว่าพีเอชด่างการตรึงรูปมีผลทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์อยู่ในช่วงที่กว้างมากกว่าเอนไซม์อิสระ

5.3.5 เปรียบเทียบค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสอิสระและตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.3.5 นำมาคำนวณค่า 1/ s และ 1/V ได้ดังตารางที่ 4.21 และรูปที่ 4.16 และ 4.17 ซึ่งหาค่า K_m ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.22 พบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมี K_m สูงกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ 2.94 เท่าและที่พีเอช 7.0 ค่า K_m ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปต่ำกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ 1.93 เท่า

เนื่องจากค่า K_m เป็นค่าที่บ่งถึงความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท การเปลี่ยนแปลงค่า K_m เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงประจุไฟฟ้าที่บริเวณย่อยๆบนตัวพยุง (microenvironment effect) การบดบังเนื่องจากตัวพยุงทำให้สับสเตรทเข้าหาเอนไซม์ตรึงรูปได้ยากและการแพร่ของสับสเตรทเข้าสู่เอนไซม์ตรึงรูปได้ยาก เนื่องจากการแพร่ของสับสเตรทเข้าสู่เอนไซม์ตรึงรูปนั้นขึ้นกับสมบัติของตัวพยุง (41)

ทั้งนี้ค่า K_m ขึ้นกับปัจจัยการเปลี่ยนแปลงประจุไฟฟ้ามากที่สุด ซึ่งพบว่าถ้าสับสเตรทไม่มีขั้ว (uncharge) การตรึงรูปจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า K_m เพียงเล็กน้อย แต่ถ้าทั้งสับสเตรทและตัวพยุงมีขั้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่า K_m มากโดยค่า K_m จะลดลงหากประจุของสับสเตรทและตัวพยุงตรงกันข้ามทำให้เกิดการดึงดูดกันระหว่างสับสเตรทกับตัวพยุงเป็นผลทำให้ความเข้มข้นของสับสเตรทบนตัวพยุงสูงขึ้นกว่าบริเวณอื่น ปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงเกิดได้ดีค่า K_m จึงลดต่ำลงและถ้าหากตัวพยุงกับสับสเตรทมีประจุเหมือนกันค่า K_m จะสูงขึ้นทั้งนี้เพราะเกิดการผลักกันระหว่างตัวพยุงกับสับสเตรททำให้ความเข้มข้นของสับสเตรทบนตัวพยุงต่ำกว่าปกติปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ไม่ดี (32)

นอกจากนี้ค่า K_m ยังขึ้นกับขนาดโมเลกุลของสับสเตรทเพราะการแพร่ของสับสเตรทที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เข้าหาเอนไซม์ตรึงรูปจะถูกบดบังเนื่องจากตัวพยุงทำให้ค่า K_m สูงขึ้น (25)

5.3.6 ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนส (Specific activity)

จากผลการทดลองข้อ 4.3.6 ดังแสดงในตารางที่ 4.23 พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสอิสระเป็น 20354.82 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่แอคติวิตีจำเพาะของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปเป็น 6574.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระมากอาจอธิบายด้วยเหตุผล 4 ประการ คือประการแรกเนื่องจากอาจมีหมู่อะมิโนบริเวณเร่งของเดกซ์แทรนเนสเกิดพันธะโควาเลนท์กับตัวพยุงด้วยจึงทำให้แอคติวิตีลดลง ประการที่ 2 เกิดเนื่องจากสับสเตรทเข้าไปทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปได้ยากเพราะเกิดจากการบดบังโดยตัวพยุง (steric hindance) หรือการตรึงรูปอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์จนไม่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาแอคติวิตีจึงลดลง ประการที่ 3 เนื่องจากภาวะมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์แอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสที่พีเอช 5.5 นั้นเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีเพียงร้อยละ 33.60 เท่านั้นในขณะที่เดกซ์แทรนเนสอิสระมีแอคติวิตีสูงถึงร้อยละ 87.62 ทำให้ค่าแอคติวิตีที่วัดได้ต่ำเมื่อนำมาคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะจึงให้ค่าต่ำด้วย และประการสุดท้ายเนื่องจากพื้นผิวของทรายส่วนที่เป็นรูพรุนและอาจมีเดกซ์แทรนเนสถูกตรึงรูปอยู่ในรูพรุนนั้นทำให้สับสเตรทไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปได้

5.3.7 ค่าครึ่งชีวิต (Half life)

จากผลการทดลองข้อ 4.3.7.1 ผลแสดงในตารางที่ 4.24 และรูปที่ 4.18, 4.19, 4.20 และ 4.21 การเก็บเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่อุณหภูมิห้องเย็น (8-10 องศาเซลเซียส) มีความเสถียรกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) สังเกตได้จากอัตราการลดลงของแอคติวิตีน้อยกว่าที่อุณหภูมิห้องและการเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 3.5 ที่อุณหภูมิห้องเย็นให้เสถียรภาพต่อการเก็บสูงสุดโดยมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 82.6 เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 81 วัน ที่อุณหภูมิห้องเย็นสำหรับกรณีเดกซ์แทรนเนสอิสระมีเสถียรภาพต่อการเก็บสูงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 โดยมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 73.1 เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 81 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

จากการพิจารณาค่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสอิสระและตรึงรูปจากตารางที่ 4.25 จะเห็นว่าสำหรับค่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปที่อุณหภูมิห้องเย็นมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง การเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิห้องเย็น ในบัฟเฟอร์พีเอชต่ำให้ค่าครึ่งชีวิตสูงกว่าบัฟเฟอร์พีเอชสูง แต่การเก็บที่อุณหภูมิห้องเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีค่าครึ่งชีวิตสูงสุดที่พีเอช 6 ทั้งนี้อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงและพีเอชต่ำมีผลทำให้โปรตีนเอนไซม์เกิดการสูญเสียแอคติวิตีและหลุดออกจากตัวพยุง สำหรับค่าครึ่งชีวิตของเดกซ์แทรนเนสอิสระพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง พีเอช 4.5 ให้ค่าครึ่งชีวิตสูงที่สุดโดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 81 วันและการเก็บที่อุณหภูมิห้องเย็นให้ค่าครึ่งชีวิต 51 วัน เมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.5

5.3.8 ผลของสารปฏิกิริยาต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระและตรึงรูป

จากผลการทดลองข้อ 4.3.8 ดังแสดงในตารางที่ 4.26 พบว่าผลของ $AgNO_3$ $Ca(OH)_2$ และ $Zn(AcO)_2$ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระมากกว่าเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารต่างๆนี้เข้าไปทำปฏิกิริยากับเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปได้ยากกว่าเดกซ์แทรนเนสอิสระ อาจเนื่องมาจากกระบวนการตรึงรูปก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ไปอยู่ในลักษณะที่สารปฏิกิริยาไม่มีผลต่อการทำลายแอคติวิตีของเอนไซม์ หรืออาจถูกบดบังโดยตัวพยุงจึงทำให้แอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปสูงกว่าอิสระส่วนกรณีของ $K_3Fe(CN)_6$ พบว่า

สารนี้ยับยั้งแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสอิสระ แต่กลับกระตุ้นให้เดกซ์แทรนเนสตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงขึ้นกลไกการกระตุ้นไม่แน่ชัดอาจเนื่องจากไปทำให้โครงสร้างของเดกซ์แทรนเนสยืดหยุ่นเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา (41)

5.4 การย่อยสลายน้ำอ้อยรวมด้วยเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปบนทราย

5.4.1 การย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อย

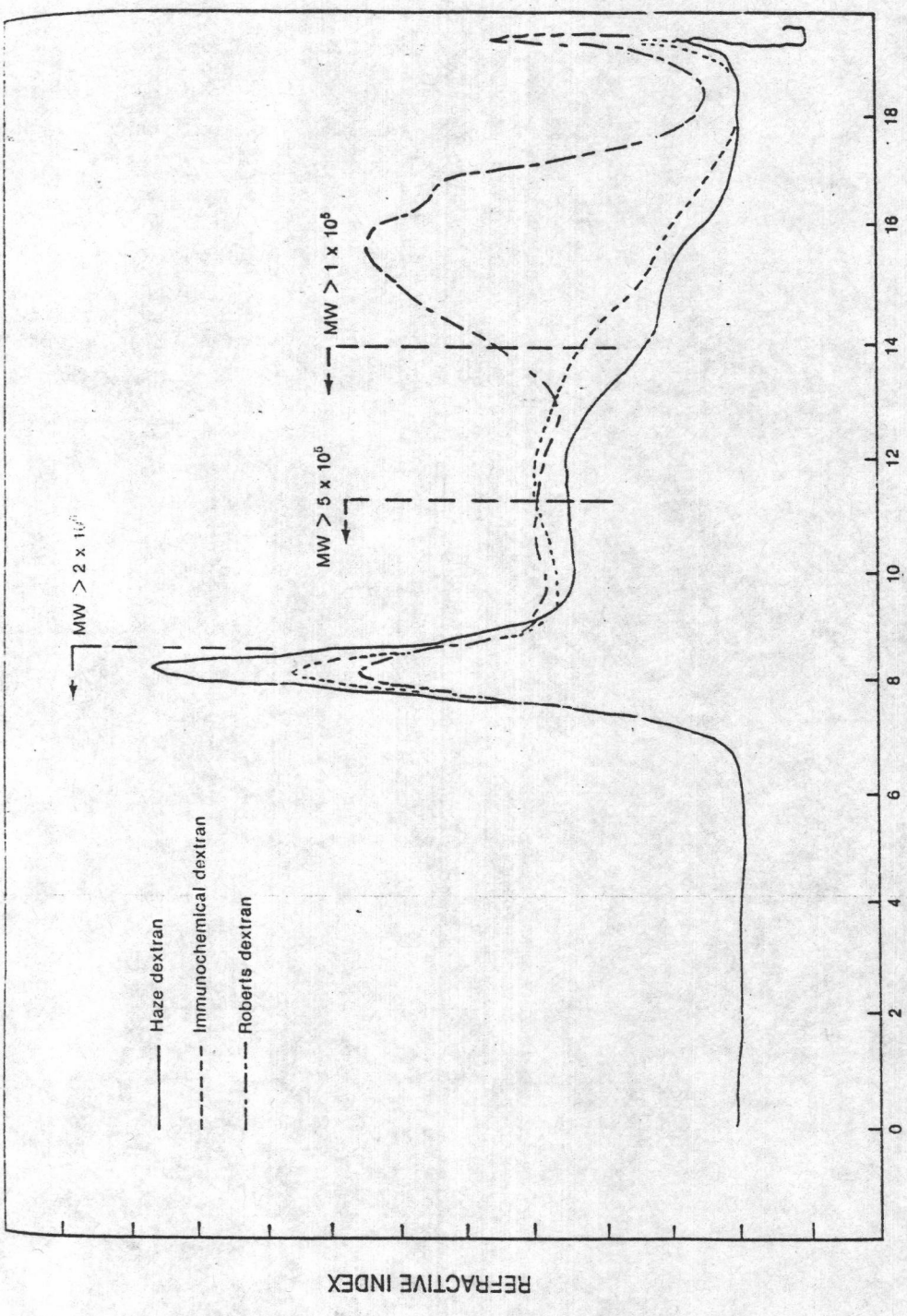
จากการทดลองข้อ 4.4.1 ดังแสดงในตาราง 4.27 ซึ่งพบว่าการย่อยสลายเดกซ์แทรนด้วยเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปอยู่ในระดับต่ำและการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้น

การวิเคราะห์ปริมาณเดกซ์แทรน สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน และมีความจำเพาะต่อน้ำหนักโมเลกุลของเดกซ์แทรนแตกต่างกันดังแสดงในรูป 5.1 (42)

เช่นการวิเคราะห์โดยวิธี Haze method โดยตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์มีความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า $2x10^5$ หากน้ำหนักโมเลกุลไม่อยู่ในช่วงนี้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้หรือมีความไวต่อการวิเคราะห์ต่ำและพบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ประมาณ 300 พีพีเอ็ม เป็นค่าที่ได้จากสารอื่นที่เป็นองค์ประกอบของน้ำอ้อย มิใช่เดกซ์แทรน แต่สามารถตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (non dextran Haze forming material) เช่น แป้งและโพลีแซคคาไรด์ (16)

ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการวิเคราะห์ โดยวิธีของ Robert (39) โดยตกตะกอนเดกซ์แทรนด้วยคอปเปอร์ คอมเพลกซ์ ซึ่งวิธีนี้กำจัดสิ่งรบกวนเช่นแป้ง โปรตีน และ น้ำตาลรีดิวส์ออกจากปฏิกิริยา มีความจำเพาะกับเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ช่วงคือ มากกว่า $2X10^5$ และน้อยกว่า $1X10^5$ ซึ่งมีความไวต่อการวิเคราะห์เดกซ์แทรนสูงกว่าวิธีแรกแต่วิธีนี้มีข้อด้อยคือ เมื่อย่อยสลายเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกจนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $1x10^5$ แล้วค่าการวิเคราะห์จะสูงขึ้นอีกปริมาณเดกซ์แทรนได้อีกจนไม่เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณเดกซ์แทรนเมื่อใช้เวลาการย่อยสลายนานขึ้น

เนื่องจากข้อด้อยของการวิเคราะห์เดกซ์แทรนดังกล่าวนี้การการทดลองขั้นต่อไปจึงเปลี่ยนจากการวัดปริมาณเดกซ์แทรนมาเป็นวัดความหนืดของน้ำอ้อยแทน ถึงแม้ว่า



รูปที่ 5.1 gel permeation chromatography ของเดกซ์แทรน (42)

การวัดความหนืดของน้ำอ้อยจะไม่ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำทั้งหมดก็ตามทั้งนี้เนื่องจากความหนืดของน้ำอ้อยแปรตามปริมาณของสารต่างๆเช่น แป้ง กัม และเดกซ์แทรน ซึ่งขึ้นกับสายพันธ์ของอ้อยภาวะการเก็บเกี่ยวและการส่งเข้าโรงงาน

5.4.2 การลดความหนืดของน้ำอ้อยรวมและน้ำเชื่อมโดยใช้เดกซ์แทรนเนสตริงรูปบนทราย

จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.28 ถึง 4.31 และรูปที่ 4.22 แสดงความสัมพันธ์ระดับของการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยที่เวลาแตกต่างกัน จะเห็นว่าในน้ำเชื่อม ความหนืดของน้ำเชื่อมคงเดิมเมื่อย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสที่เวลาต่างๆกันทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fulcher และ Inkerman(20) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของซูโครสจะยับยั้งปฏิกิริยาของการย่อยสลายของ เดกซ์แทรนเนสในน้ำเชื่อม (เข้มข้น 65 องศาบริกซ์) อัตราการย่อยสลายลดลงเป็น 100 เท่าของน้ำอ้อย

และเมื่อพิจารณาระดับของการย่อยสลายในน้ำอ้อยที่ผ่านการสะเทินด้วยปูนขาว จะเห็นว่ามีระดับการย่อยสลายต่ำกว่าน้ำอ้อยรวมและอ้อยที่เผาไฟทิ้งไว้ 3-5 ถึงแม้ว่าพีเอชหลังการสะเทินด้วยด่างจะเท่ากับ 7 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสตริงรูปก็ตาม แต่จากการทดลองผลของสารปฏิกิริยาต่อแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสพบว่า เดกซ์แทรนเนสอิสระถูกยับยั้งแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนเดกซ์แทรนเนสตริงรูปถูกยับยั้งแอคติวิตีบางส่วน เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Fulcher และ Inkerman (20) พบว่า หากเติมเดกซ์แทรนเนสอิสระลงในน้ำอ้อยรวม ที่ผ่านการปรับพีเอชเป็น 7.0 ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีต่ำมากระดับการย่อยสลายในน้ำอ้อยรวมจากสายงานการผลิตและน้ำอ้อยจากอ้อยเผาไฟทิ้งไว้ 3-5 วันพบว่ามีระดับการย่อยสลายที่สูงกว่า ถึงแม้ว่าที่ พีเอชของน้ำอ้อยทั้งสองชนิดเป็น 4.8 และ 4.5 จะมิใช่พีเอชเหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ตริงรูปก็ตามก็ตาม การย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยที่พีเอช 7 นอกจากจะไม่ช่วยให้ระดับการย่อยสลายสูงขึ้นแล้วยังพบว่าการผสมปูนขาวกับน้ำอ้อยรวมไว้นานกว่า 3 นาที อาจเกิดโอกาสที่ปูนขาวผสมน้ำอ้อย

เฉพาะที่บางส่วนทำให้เกิดภาวะด่างอย่างแรง ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์สลายตัวมากดังนั้นหลังจากผสมน้ำปูนขาวกับน้ำอ้อยแล้วจะต้องให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 102-105 องศาเซลเซียสทันที (5) การนำน้ำอ้อยหลังจากการผสมกับปูนขาวแล้วนำมาย่อยสลายด้วยเดกซ์แทรนเนสตริงรูป จึงไม่ควรกระทำเนื่องจากไม่สะดวกต่อกการปฏิบัติในโรงงานและไม่ช่วยเพิ่มระดับการย่อยสลายและในทางตรงกันข้ามระดับการย่อยสลายกลับลดลง

5.5 การย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมด้วยเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปแบบฟลูอิไดเบด

5.5.1 หาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

จากผลการทดลองข้อ 4.5.1 ดังแสดงในรูปที่ 4.23 จะเห็นว่าอัตราการไหลต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น คืออัตราการไหล 7.5 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และอัตราการไหล 5.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสอดคล้องกับสมการ (34)

$$U^2_{mf} = \frac{D^2_p(\rho_s - \rho_f)\, g_c}{1650\mu}$$

U_{mf} = อัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่น

D_p = ขนาดเส้นผ่านศูนย์ของเม็ดของแข็ง

ρ_s = ความหนาแน่นของของแข็ง

ρ_f = ความหนาแน่นของของเหลว

g_c = อัตราเร่งจากแรงโน้มถ่วง

μ = ความหนืดของของไหล

สำหรับการทดลองนี้ค่า D_p, ρ_s, g_c และ ρ_f เป็นค่าคงที่ ดังนั้นอัตราเร็วของการไหลจะแปรผกผันกับ μ ที่อุณหภูมิสูงค่าความหนืดต่ำลง ดังนั้นอัตราเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นจึงสูงกว่าที่อุณหภูมิห้อง

และสำหรับค่าความดันตกของระบบเมื่อเกิดฟลูอิไดเซชั่นพบว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความดันตกมีค่า 5.1 เซนติเมตรของปรอท และที่อุณหภูมิห้อง ความดันตกของระบบมีค่า 5.3 เซนติเมตรของปรอท ซึ่งสอดคล้องกับสมการ (34)

$$\Delta p = \frac{200\ U\mu L_e(1-\Sigma_e)^2}{D_p^2 \phi_s^2 g_c \Sigma_e^3}$$

โดยที่ p = ความดันตกของเบด

U = ความเร็วของของไหล

μ = ความหนืดของของเหลว

L_e = ความสูงของเบด

Σ_e = สัดส่วนช่องว่างเบด

D_p = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดของของแข็ง

ϕ_s = แฟคเตอร์รูปร่าง

g_c = อัตราเร่งจากแรงดึงดูดของโลก

สำหรับการทดลองนี้ค่า U, L_e, Σ_e, D_p, ϕ_s และ g_c เป็นค่าคงที่ ดังนั้นความดันตกของเบดแปรผันตรงกับความหนืดของของเหลว ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ของเหลวมีความหนืดต่ำกว่าที่อุณหภูมิห้องดังนั้น ความดันตกในเบดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จึงต่ำกว่าความดันตกในเบดที่อุณหภูมิห้อง

5.5.2 ศึกษาการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้อ 4.5.2 ดังแสดงในตารางที่ 4.32 และรูปที่ 4.24 ซึ่งจะพบว่าระดับการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิห้องในทุกค่าความหนืดที่ทำการศึกษา

การที่กำหนดอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ศึกษาระดับการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมนอกเหนือจากที่อุณหภูมิห้องด้วยเหตุผล 2 ประการ คือ

5.5.2.1 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูป จากการศึกษาสมบัติด้านจลนพลศาสตร์

5.5.2.2 ในกระบวนการผลิตก่อนนำน้ำอ้อยรวมผสมกับปูนขาวจะอุ่นน้ำอ้อยรวมจนมีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ไม่ใช้อุณหภูมิสูงกว่านี้เพราะไม่ต้องการให้เกิดสีเนื่องจากการสลายตัวของน้ำตาลรีดิวซ์ขณะผสมกับปูนขาวและไม่ใช้อุณหภูมิต่ำกว่านี้เพราะจะทำให้เกิดการสลายตัวของน้ำตาลรีดิวส์ได้กรดอินทรีย์เกลือแคลเซียมของกรดอินทรีย์เมื่อนำน้ำอ้อยผสมกับปูนขาวซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนสารอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาลมากขึ้น ดังนั้นจึงนิยมใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

จากการทดลองจะเห็นว่าการย่อยสลายน้ำอ้อยรวมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ให้ระดับการย่อยสลายสูงกว่าที่อุณหภูมิห้องทุกค่าความหนืดที่ทำการศึกษา

5.5.3 ศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้อ 4.5.3 ดังแสดงในตารางที่ 4.33 และรูปที่ 4.25 จากรูปจะเห็นว่าระดับการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิห้องในทุกรอบของการวนซ้ำ และความหนืดของน้ำอ้อยรวมคงที่เมื่อผ่านการทำปฏิกิริยาซ้ำ 2 รอบ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 3 รอบที่อุณหภูมิห้อง

5.5.4 ศึกษาการสูญเสียแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในคอลัมน์ เมื่อใช้งานคอลัมน์อย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้อ 4.5.4 แสดงดังตารางที่ 4.34 และรูป 4.26 จากรูปจะเห็นว่าของระดับการย่อยสลายลดลงที่ระยะเวลาต่างๆของการใช้คอลัมน์บรรจุเอนไซม์อย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นลักษณะของ two-phase pattern จากภาวะที่ไม่มีเสถียรภาพ (unstable) ซึ่งรูปแบบนี้แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปจะลดลงเร็วมากจากภาวะต้น แต่หลังจากนั้นการสูญสลายเกิดขึ้นช้าในกรณีเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการที่เอนไซม์โปรตีนแตกต่างกันถูกนำมาตรึงรูปและเร่งปฏิกิริยาแบบเดียวกัน (41) จากการศึกษาเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น เดกซ์แทรนเนสจาก *Pennicillium funiculosum* (43) เมื่อนำเอนไซม์

มาทำให้บริสุทธิ์พบว่ามี 2 fraction คือ dextranase I (pI = 3.98) และ dextranase II (pI = 4.19) และจากศึกษาเดกซ์แทรนเนสจาก *Aspergillus carneus* (38) พบว่าประกอบด้วยเดกซ์แทรนเนสสองชนิดคือ dextranase I (pI = 4.12) และ dextranase II (pI = 4.35) สำหรับเดกซ์แทรนเนสที่นำมาศึกษาเป็นเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Pennicillium lilacinum* ซึ่งยังไม่มีรายงานถึงการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อราชนิดนี้ผลิตเดกซ์แทรนเนสสองชนิดเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแบบเดียวกัน

การสูญเสียสภาพของเดกซ์แทรนเนสตรึงรูปในคอลัมน์จากการย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวมมีสาเหตุจาก

1. การเสียสภาพเนื่องจากความร้อนและการเปลี่ยน pH ขณะย่อยสลายเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยรวม

2. การดูดซับสารยับยั้งปฏิกิริยาบางชนิดในน้ำอ้อยรวมเช่น เหล็ก ตะกั่ว ทองแดง และปรอท ซึ่งติดมากับวัตถุดิบก่อนเข้ากระบวนการผลิตเป็นผลให้สูญเสียแอคติวิตีขณะใช้งาน

3. การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ติดมากับน้ำอ้อยรวมหลังจากการหีบและอาจมีจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนปนเปื้อนด้วยจึงเป็นเหตุให้แอคติวิตีถูกทำลาย

4. เกิดการหลุดของเอนไซม์ระหว่างใช้งาน

5. มีการรบกวนการไหลในคอลัมน์เช่น การเกิดแนวร่อง (chanelling)